登革熱的實驗室診斷

登革熱實驗室診斷用之臨床檢體的收集與處理

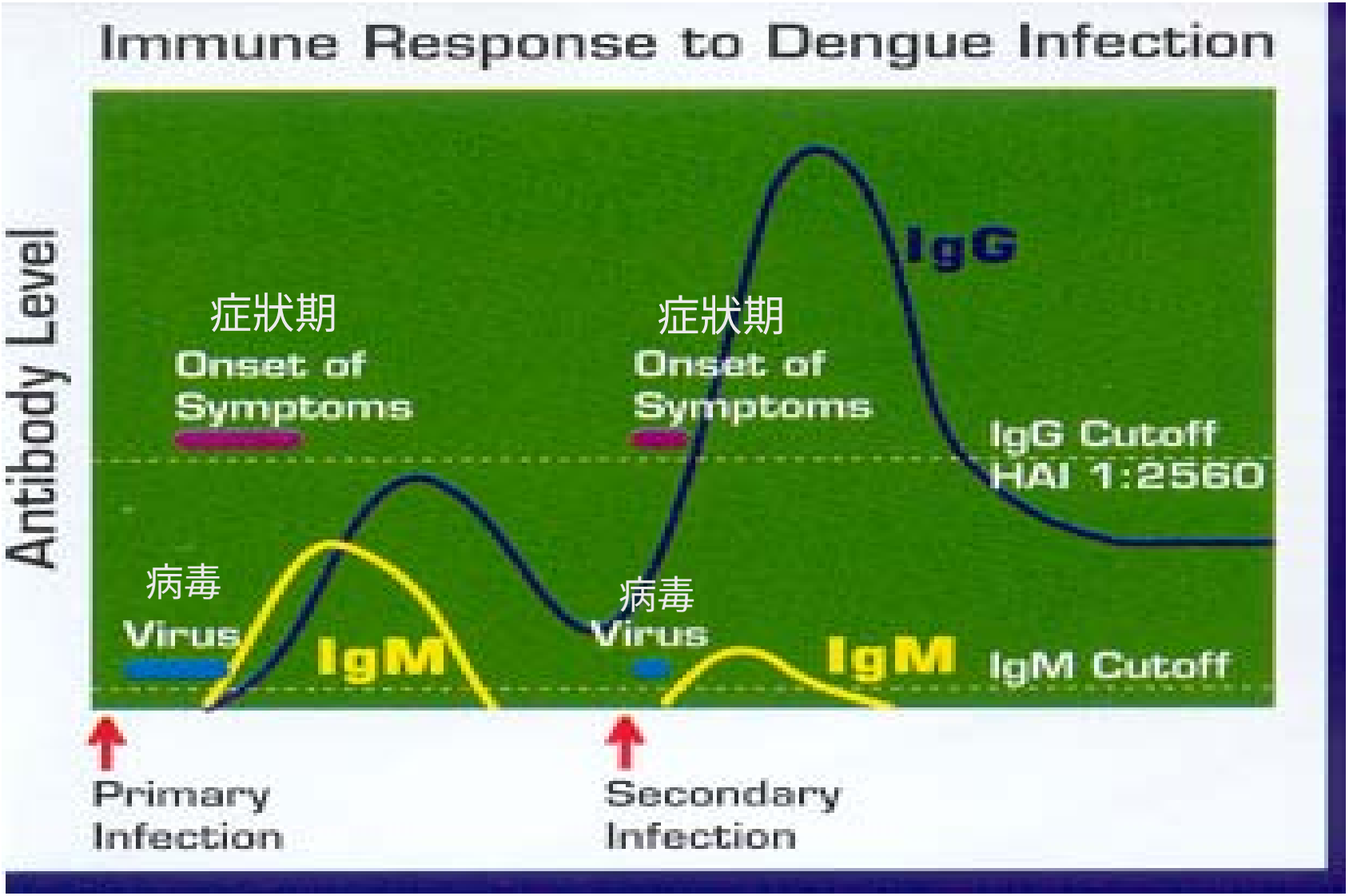
檢體種類	採檢時間	凝血反應條件	保存	運送
急性期血液	發病後 0-5天	2-6 小時 4°C	血清 -70°C	乾冰
恢復期血液	發病後 14-21天	2-24 小時,室溫	血清 -20 °C	冷凍或室溫
組織	死亡後儘快採集		-70 °C 或福馬林固定	乾冰或室溫

資料來源 : Gubler DJ, and Sather GE. 1988

登革熱的實驗室診斷

- 病毒分離陽性
- 測得對抗登革病毒特異性抗體的效價上升
- 在組織或血清中測得登革病毒的抗原或核酸

登革病毒感染後的免疫反應



初次感染　　二次感染

病毒分離

- 檢體: 急性期血清、血漿、或白血球
  死亡病例解剖組織
  蚊子
- 檢體貯存條件:
  48 小時內分離病毒 — +4 ~ +8°C
  較長時間保存 — -70°C
- 優點: a. 登革病毒感染的最直接證據
  b. 可取得病毒株進行後續研究
- 限制: a. 需要較熟練的實驗技巧與較昂貴的設備
  b. 檢體接種後7-14天才能得到結果

傳統血清學診斷

- 血球凝集抑制試驗 (HI)
  - ✓ 原理: 在控制的 pH 值和溫度條件下，黃病毒可以凝集鵝的紅血球。如果病毒先與帶有抗體的血清反應，則可抑制紅血球凝集的現象。
  - ✓ HI 抗體再發病後5~6天就可以測得到 (效價≥1:10) 。對於初次感染者，恢復期血清抗體效價最高可達1:640；對於二次感染者，恢復期血清抗體效價可能達1:5120或更高。
  - ✓ HI 抗體可維持50年。
  - ✓ 限制: 特異性低

    抗原準備與檢體前處理耗時又耗工

    需要有經驗的人員操作
  - ✓ 目前少用於登革熱常規檢驗

傳統血清學診斷

- 補體固定試驗 (CF)
  - ✓ 原理: 在抗體-抗原反應的過程中會消耗補體，之後加入的致敏化紅血球不會被抗體破壞溶解。反之，若出現溶血反應就表示血清中沒有抗體存在。
  - ✓ CF 抗體比 HI 抗體晚出現，持續的時間也較短
  - ✓ 限制: 抗原準備與檢體前處理耗時又耗工
    需要訓練純熟的人員操作
  - ✓ 已罕用於登革熱常規檢驗

傳統血清學診斷

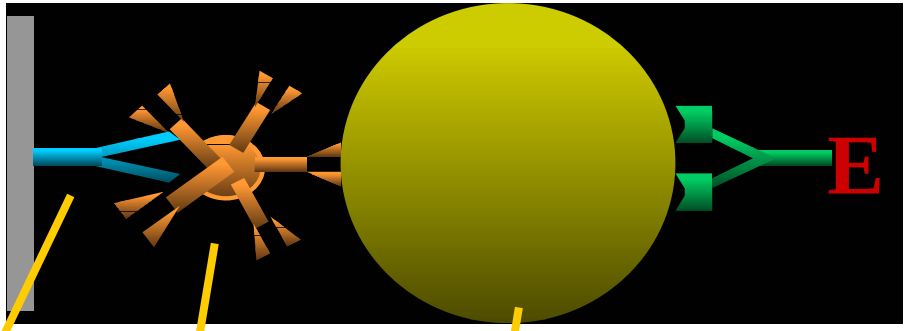
- 中和抗體試驗 (NT)
  - ✓ 原理: 登革病毒感染某些細胞會造成細胞病變 (CPE)，如果血清中含有中和抗體，可以抑制病毒感染細胞，進而避免細胞病變發生。
  - ✓ NT 抗體比CF抗體早，但比 HI 抗體晚或同時出現。
  - ✓ NT 抗體可維持50年。
  - ✓ 敏感性及特異性比 HI 和 CF 抗體試驗佳
  - ✓ 限制: 設備及材料所需費用較高
    需要約 7 天才能得到檢驗結果
    技術較困難
  - ✓ 不適用於常規檢驗

血清學診斷

抗體酵素連結免疫分析法 (IgM, IgG, IgA 和 IgE)

- 快速
- 可發展為全自動檢驗
- 抗原可利用基因重組蛋白或細胞培養方式大量取得
- 可發展初次感染與二次感染利用血清學檢驗分型

對抗黃病毒 (日本腦炎和登革熱) E/M抗原的-Capture IgM抗體酵素連結免疫分析法

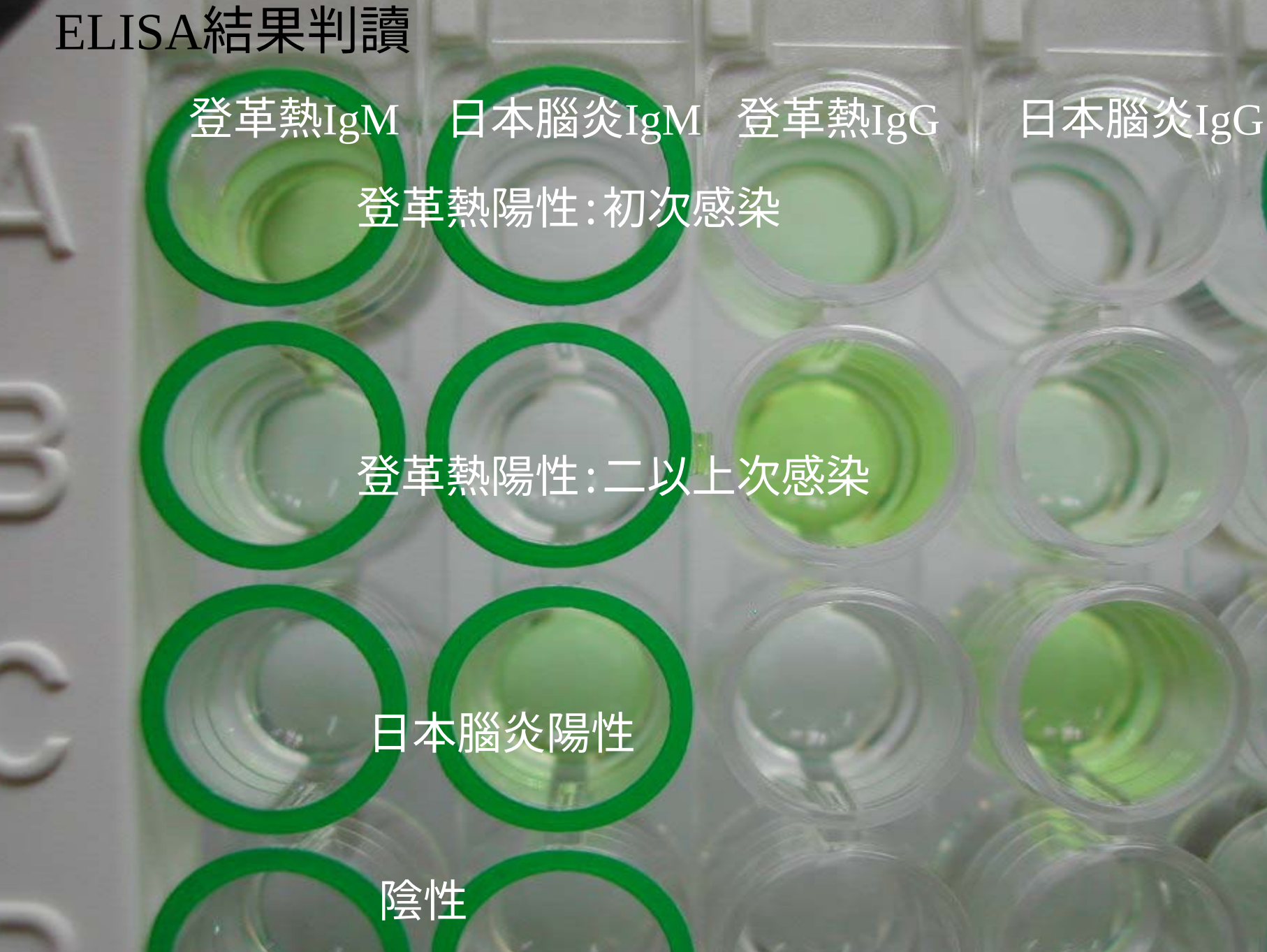


IgM

抗原

對抗人類IgM抗體

ELISA結果判讀

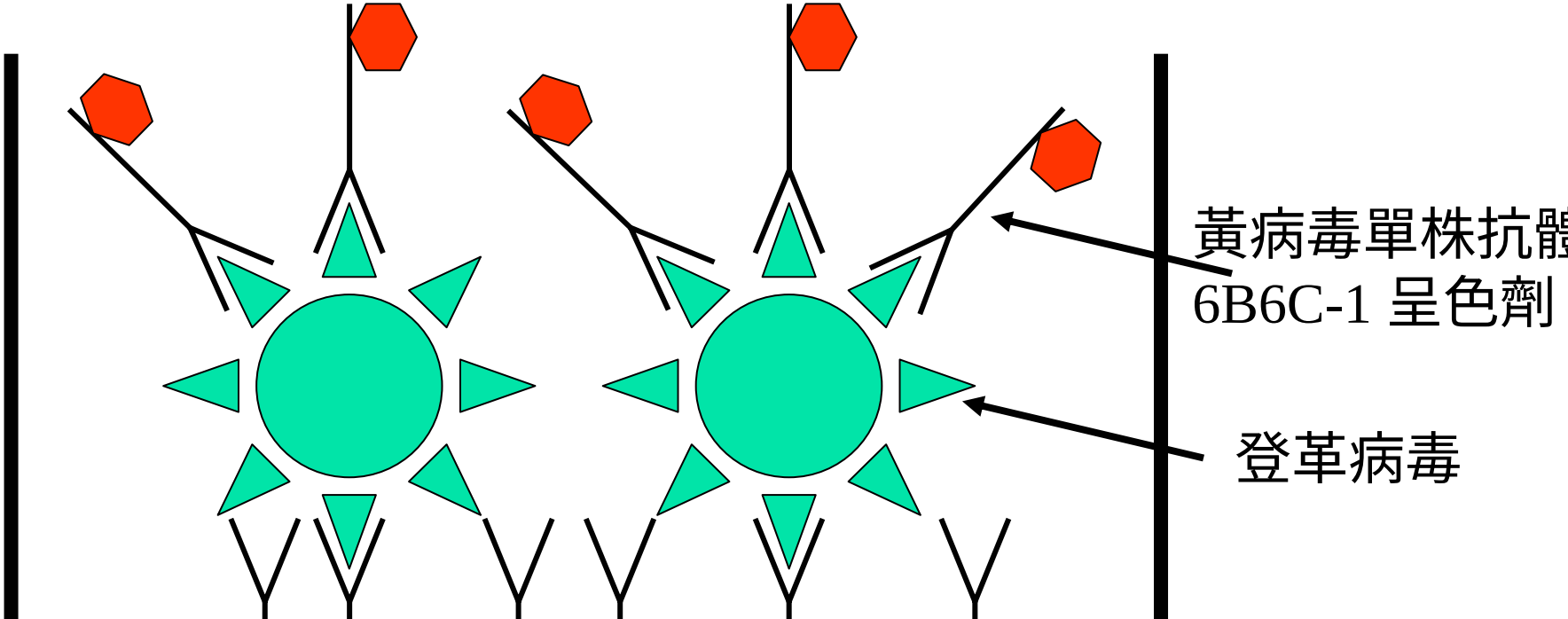

登革熱IgM
日本腦炎IgM
登革熱IgG
日本腦炎IgG
登革熱陽性:初次感染
登革熱陽性:二以上次感染
日本腦炎陽性
陰性

DEVICE
SAMPLE

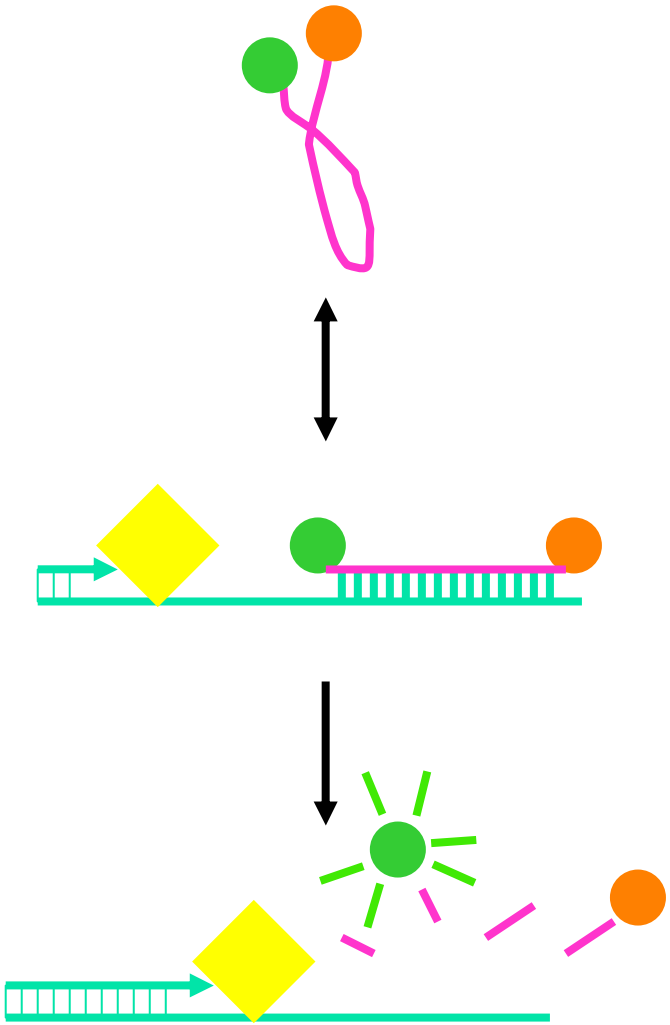
登革熱快速檢驗試紙的使用上限制

- 只能做為定性偵測
- 只可區辨部分初次感染與二次感染
- 只適用於出現臨床症狀的登革熱疑似患者
- 陽性結果仍需進一步用病毒分離, 抗原偵測或PCR進行再確認工作

登革病毒抗原的Capture ELISA 原理



定量RT-PCR-TaqMan®

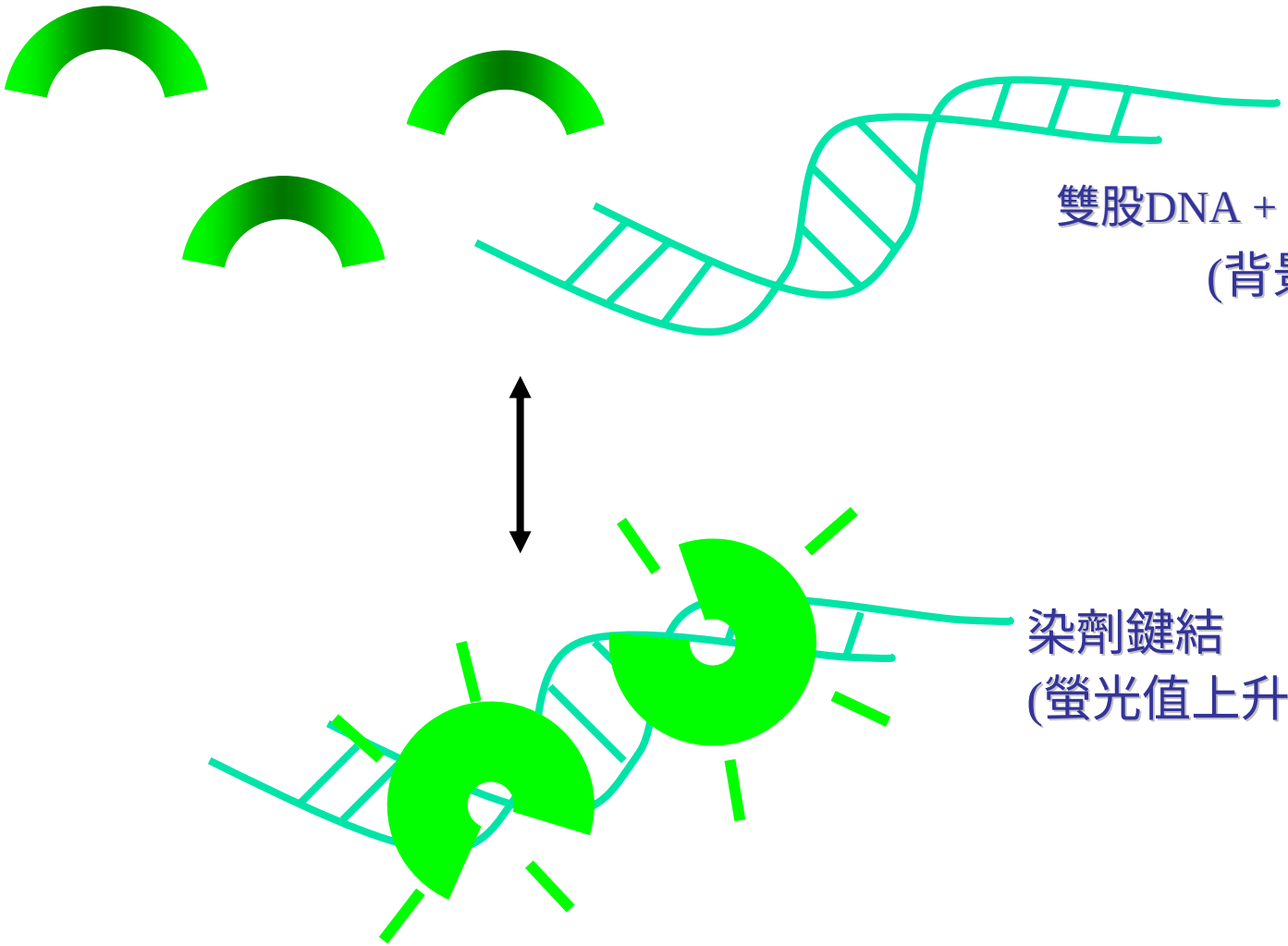


探針

標的核酸序列和聚合酵素

水解

雙股DNA-鍵結染劑



台灣疾病管制局目前所使用的實驗室檢驗方法與判定標準

凡符合下列任何一項者即判為陽性確定病例：

一、由血清檢體分離出登革病毒；

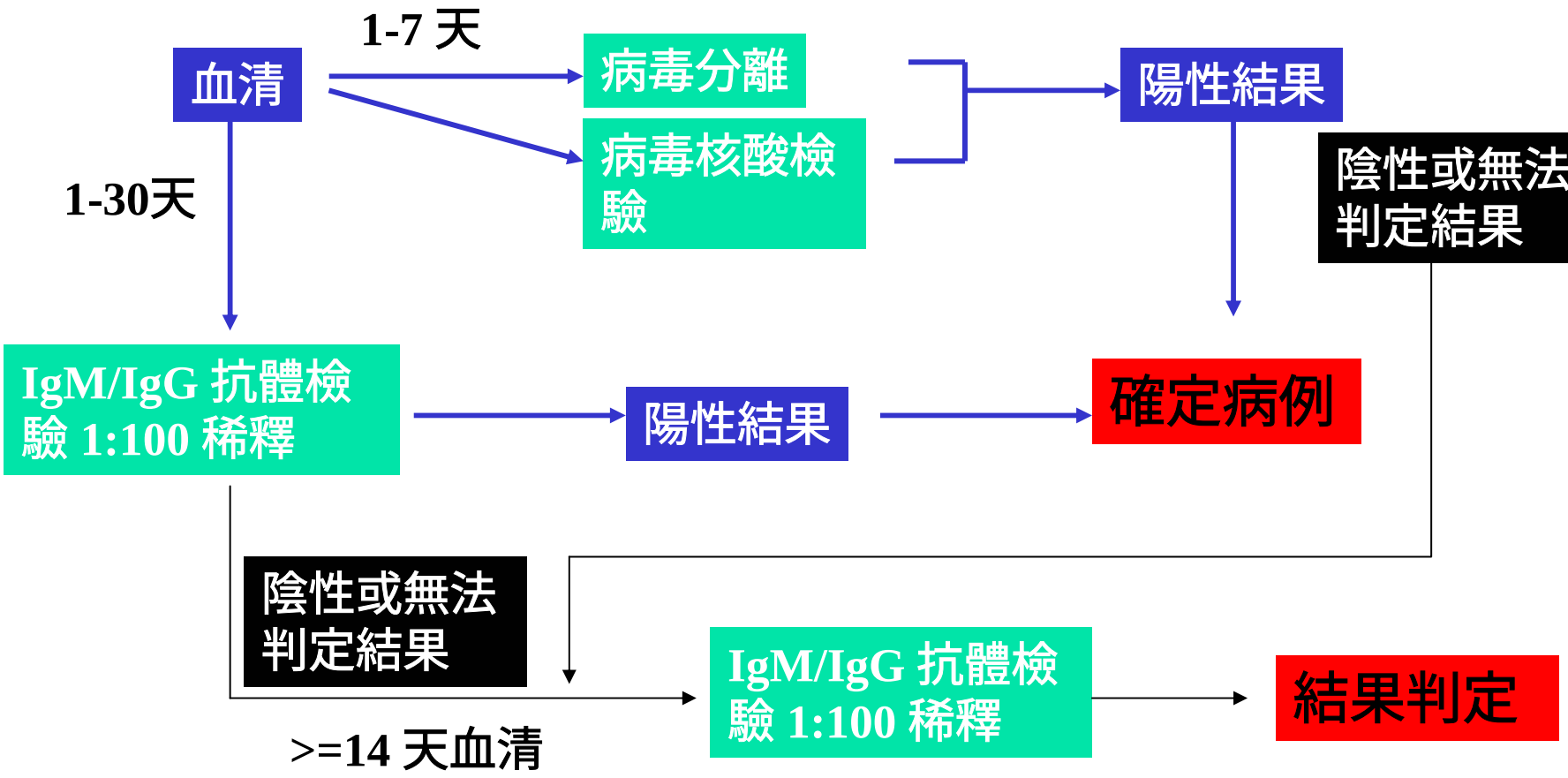
二、由血清檢體檢測出登革病毒核酸；

三、IgM與IgG抗體均為陽性者，或是成對血清中抗登革病毒IgM或IgG 抗體有四倍或更高倍上升。

登革病毒感染實驗室診斷

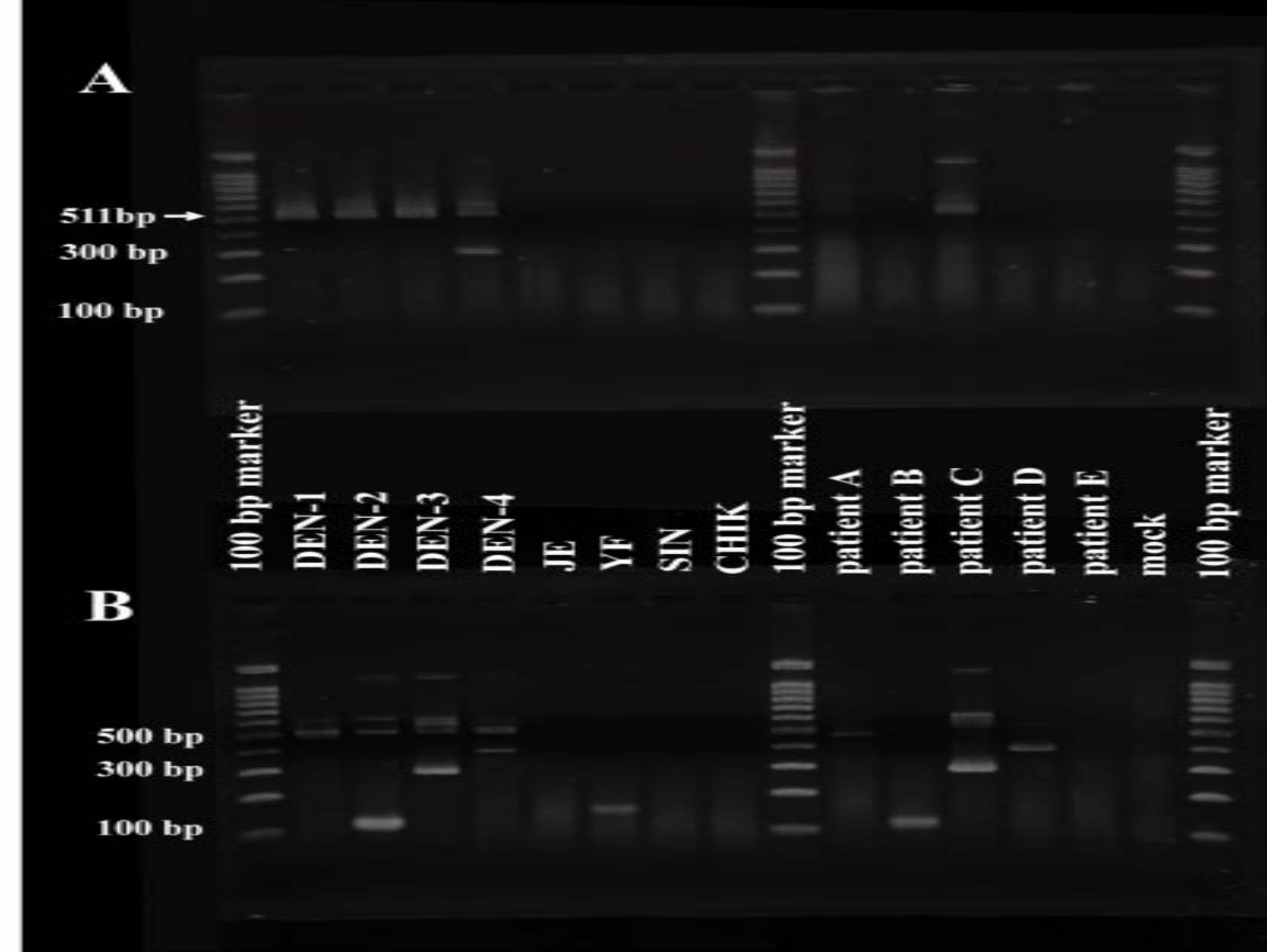
方法	血清檢體(1)	血清檢體(2)	檢驗時間
	急性期	恢復期	
病毒分離	1-7天		7天
病毒核酸檢驗	1-7天		1.5天
IgM與IgG血清抗體檢驗	1-13天	14-30天	1天

登革病毒感染實驗室診斷流程圖



登革熱傳統RT-PCR檢驗用引子組

Consensus primers	Region		Product
D1 (G)	C		
D2 (C)	prM	5’-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC-3’	511
Type specific primers			
TS1 (C)	prM		482
TS2 (C)	C	5’-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3’	119
TS3 (C)	C	5’-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3’	290
TS4 (C)	prM	5’-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3	392


A
511bp
300 bp
100 bp
100 bp marker
DEN-1
DEN-2
DEN-3
DEN-4
JE
YF
SIN
CHIK
100 bp marker
patient A
patient B
patient C
patient D
patient E
mock
100 bp marker
B
500 bp
300 bp
100 bp

不同的登革熱病毒血症診斷方法之比較

	傳統 RT-PCR	定量RT-PCR	抗原檢測ELISA
採檢時間(發病後)	1-10 天	1-10 天	1-5 天
敏感性	60-70%	80-90%	50-70%
專一性	>95%	>95%	>95%
偵測極限	$<10^3$-10^4 copy RNA/ml	$<10^2$-10^3 copy RNA/ml	$<10^5$-10^6 copy RNA/ml
病毒型別鑑定	可	可	可
檢驗所需時間	24-36 小時	8 小時	5 小時

91年登革熱實驗室檢驗結果分析

		占確定病例血清檢體之百分比 (%)						
檢驗方法	檢驗結果	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天	第六天	第七天
病毒核酸檢驗	陽性	93	96	83	96	67	47	40
病毒分離	陽性	93	75	74	81	52	12	0