

# 以臨床檢驗觀點對登革熱實驗室 診斷流程之建議

黃聖文<sup>1,5</sup> 洪素珍<sup>2</sup> 蔡慧頻<sup>2,3</sup> 王貞仁<sup>1,2,3,4</sup> 齊嘉鈺<sup>4,5</sup>

國立成功大學 <sup>1</sup>傳染性疾病與訊息傳遞研究中心 <sup>2</sup>醫學檢驗生物技術學系

<sup>3</sup>國立成功大學附設醫院 病理部

國家衛生研究院 <sup>4</sup>感染症與疫苗研究所 <sup>5</sup>國家蚊媒傳染病防治研究中心

## 前 言

登革病毒每年感染全球超過 3.9 億人，其中 9 千多萬人會引起急性病症，50 萬人可能會造成致命性的病徵[1]。臨床的症狀包括登革熱以及登革出血熱，當出現血漿滲漏時，就有可能會造成登革休克症[2]，目前能夠治療嚴重登革出血熱病患方法，僅侷限於以靜脈輸液的方法控制病患的體液量。

登革熱是由登革病毒所引起的急性傳染病，病毒會經由蚊子傳播給人類。依據病毒不同的血清型可分為 I、II、III、IV 四種型別[3,4]，而每一型都具有能感染致病的能力。如果患者感染到某一型的登革病毒，就會對該型的病毒具有終身免疫，但是對於其他型別的登革病毒僅具有短暫的免疫力，未來還是有可能再感染其他

型別。台灣在過去 20 年來，已發生數次登革熱地區性流行，2015 年南台灣爆發嚴重登革熱疫情，累計有超過 4 萬例感染病例，同時病毒型別分析結果指出，造成台南與高雄感染的主要為登革第二型病毒。台灣雖然每年均有登革病毒的流行，但許多受到登革病毒感染並不會產生症狀。由此可知，真正登革病毒感染的人數遠超過疾管署確診的通報數目。

登革熱的致病機轉仍然未被完全的了解，起因於在病毒與宿主之間的因子相當複雜。在宿主方面，宿主的免疫狀態、年齡、性別、基因等都有可能影響到疾病的嚴重程度[5]，同時也有許多的研究指向疾病嚴重程度與病毒基因序列之間的關係，其中，登革病毒依照基因序列，目前已知有四種血清型，而不同血清型之間的抗原特性差異，已被認為在疾病的

嚴重程度、流行的趨勢、病毒的演化與疫苗的設計中，扮演重要的角色[2,3]。許多不同的病毒決定因子影響了病毒對於宿主的毒性。研究結果指出，某些突變可能藉由改變病毒外套膜蛋白的功能，影響病毒的抗原特性與細胞結合能力；或是改變非結構蛋白功能，造成病毒複製效率的改變。而這些發現，特別是抗原特性的部分，已經被認為對於了解登革病毒的致病機轉與發展減毒登革病毒疫苗都非常重要。

現行對於登革病毒血清型分型，主要是源自於人類受到登革病毒第一次感染時，體內所產生的免疫反應，能夠完全的保護宿主免於受到相同型別的病毒感染，然而對於不同型別的病毒，僅有部分或是暫時性的保護能力[5]。利用體外中和試驗也可以發現，登革病毒所產生的抗體較能夠中和相同型別的病毒，對於不同型別的病毒反應較低。由此可知，在人體觀察到對於不同型別病毒的免疫反應差異，主要與抗體有關。然而，在體內試驗中發現，這種來自不同病毒型別所產生的低親和力抗體，可以更進一步的造成病毒感染能力的增加，稱之為抗體依靠性增強作用，此作用在人類中也被證明與疾病嚴重程度有關。

對於臨床最佳照護，正確、快速、早期的診斷登革病毒感染對於公共衛生相當重要，然而，診斷登革病毒的標準偵測方法為在感染急性期時，以細胞培養病毒，然而，這種偵

測方法相當曠日費時，因此，偵測登革病毒 NS1 抗原與核酸序列被廣泛地使用在偵測登革病毒急性期感染上[6]。另外，分析登革病毒 IgM 與 IgG 抗體反應可以顯示感染的時期，也可以用在區分初次感染與二次感染，如 IgM/IgG 比例  $> 1.7$  時被認為是初次感染，而  $< 1.7$  時則被認為是二次感染。因此，偵測 NS1 抗原、病毒核酸與抗體對於登革病毒診斷相當重要[7]。在之前的研究中[8]，我們針對登革病毒抗原、抗體、病毒核酸等檢驗結果，利用不同的檢測方法進行比較。結果發現有 7% NS1 抗原陰性的檢體，其病毒 RNA 基因為陽性；另外，重症老年病患檢體中發現，病毒量明顯高於其他年齡層的病患。同時，另外兩個蚊媒病毒，茲卡病毒與屈公病病毒，也同時在不同區域造成流行爆發，並且其症狀與傳染媒介與登革病毒相似，無法只利用臨床病徵區分疾病，極需仰賴更準確的實驗室診斷流程進行判斷。綜合登革熱臨床診斷與流行病學調查的最新研究，本文將針對登革病毒的實驗室診斷流程提出建議，包括檢體種類、保存與運送，病毒的實驗室診斷方法，與建議的檢驗流行提出建言，以提供日後登革病毒流行治療與流行趨勢的參考依據。

## 建 議

針對登革熱的實驗室診斷部分，

我們綜合目前的流程與最新的研究，分別針對檢體種類、保存與運送、實驗診斷流程等方面，提出以下建議：

## 一、檢體

### (一) 檢體的種類

品質良好的檢體，可以幫助提供正確的檢測結果。登革熱檢驗的最佳檢體是患者的成對血清，包括：1. 發病第 1 至 7 日內急性期的血清 (acute phase serum) 以及 2. 發病第 14 至 21 天恢復期的血清 (convalescent phase serum)，以利個案進行綜合研判檢驗結果。

### (二) 檢體的保存條件與運送

血清檢體若無法立即進行抗原及抗體檢驗時，請暫時保存於 2~8℃，保存時間若超過兩周，建議冷凍於 -15℃ 以下之冷凍櫃。若要進行病毒分離，在採檢之後的檢體須立即於 2~8℃ 冷藏，且儘速感染具感受性的宿主細胞；若檢體無法在 48~72 小時內進行上述感染檢測，檢體需存放至低於 -70℃ 冷凍保存；並請以 2~8℃ 低溫傳送檢體，以確保病毒之活性。

### (三) 檢體的前處理與干擾檢驗結果

含有沉澱物的血漿或血清可能導致結果不一致。使用這類檢體進行檢驗前，應再次離心使檢體澄清。抗凝血劑，如肝素、EDTA 或檸檬酸，不影響抗原及抗體檢驗結果。目前已知溶血、類風濕性因子、脂糜血與黃疸檢體會干擾抗原及抗體之檢驗結果。

## 二、實驗室診斷方法

### (一) 病毒 NS1 抗原檢測 (NS1 antigen rapid test and NS1 antigen ELISA)

登革病毒感染急性期時，在病患血清中會存在病毒感染細胞後釋放出的 NS1 蛋白，因此利用快速篩檢試劑，以檢測病人血清中的登革病毒 NS1 蛋白抗原，可以作為登革熱快速診斷的工具。目前已有市售操作簡易的快篩試劑，其原理是利用免疫色層分析法 (Immunochromatography) 偵測 NS1 抗原，可方便提供急診或診所第一線使用。免疫色層分析法約在 15~30 分鐘內即可得檢驗結果。另外檢驗實驗室亦可利用酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，檢測血清中的 NS1 抗原。此法雖較耗時需特殊檢驗技術，但一次可同時進行多達 90 餘個檢體，並提供較快篩試劑準確之結果。

### (二) 血清抗體檢測 (Serum IgM/IgG antibody detection)

檢測病人血清中的抗登革病毒抗體，亦可用來診斷患者是否被此病毒感染。登革熱病人發病約 3~5 天後，可在血液中偵測到 IgM 或 IgG 抗體。登革病毒感染後，免疫反應產生的 IgM 或 IgG 抗體的效價或濃度，會因該病人處於感染期不同階段，或者為初次或是二次感染登革病毒而有不同。目前利用酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 的檢測平台，可以分析



病人血清中的登革病毒 IgM 或 IgG 抗體效價或濃度，以確認登革病毒之感染狀態。檢驗時需使用成對血清檢體 (paired sera)，包括急性期及恢復期之血清，若兩者之 IgM 或 IgG 抗體效價有 4 倍或 4 倍以上之差異，或是有抗體陽轉 (即由急性期血清的「陰性」轉至恢復期血清的「陽性」) 時，可以確認患者「近期」曾受到登革病毒的感染。另外，亦有快速篩檢試劑利用免疫色層分析法原理，偵測血清中登革病毒的 IgM/IgG 是否存在，約在 15~30 分鐘內可得初步檢驗結果。NS1 抗原結合 IgM/IgG 抗體的快篩試劑檢測結果，可以協助臨床的診斷。但因快篩試劑只有定性的結果，無法提供效價或濃度定量之結果，因此對某些疑似病例，例如：NS1/IgM/IgG 皆為陰性時仍無法確認診斷。

### (三) 病毒核酸檢測 (Real-time RT-PCR)

傳統病毒培養需要約 4 天~2 週的檢驗時間，因此利用分子生物學的快速診斷方法，可大幅縮短檢驗時間至數小時。目前分子生物學的檢驗是以反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 或即時反轉錄聚合酶鏈反應 (Real-time RT-PCR, qPCR) 為主流。即時反轉錄聚合酶鏈反應與傳統的聚合酶鏈反應原理相同，均需要有高度專一性的核酸引子對 (primer) 來增幅目標基因。從血清

檢體萃取出病毒 RNA，於 real-time RT-PCR 反應中，同時加入針對四種血清型別的登革病毒 3' 端之非轉譯區 [3' untranslated region (UTR)：此區具四種血清型高度相似之序列] 設計的引子對，利用螢光探針偵測，即可偵測登革病毒的核酸是否存在，並且檢驗病毒的數量 (viral load, VL)，以確定病人是否受到登革病毒感染，尤其提供病毒量之結果可做為初次感染老人是否將演變為重症的預警指標 (Tsai et al., 2015)。

### (四) 病毒血清型別鑑定 (Serotyping)

登革病毒有四種血清型，已有研究顯示不同血清型影響疾病嚴重程度的差異。於爆發流行初期及流行期，會隨著不同時間與不同地點而監測與追蹤流行登革病毒的血清型與基因型別，可以協助臨床診斷與提供流行病學之資訊，並有助於防疫的進行。從血清檢體萃取出病毒 RNA，反轉錄成 cDNA 後，設計對四種血清型登革病毒具專一性的引子，於一管進行多重聚合酶鏈反應 (multiplex PCR)，或單管聚合酶鏈 (single PCR) 反應後，即可得知是哪一種血清型的登革病毒，並利用各種血清型的陽性對照組做最後正確判斷的確認。

### (五) 病毒培養 (Virus isolation by cell culture)

病毒分離可以確診病人是否確實受到該病毒感染，然病毒分離、培養與檢驗登革病毒需耗時約需 4 天至 2 週。一般採用蚊子的細胞株 (如

C6/36 cells) 來分離血清檢體中的登革病毒，有時病毒不一定會造成細胞病變 (cytopathic effect, CPE)，可以另用單株抗體對感染細胞進行免疫螢光染色 (immuno- fluorescence stain)，確認檢體中是否含登革病毒；甚至採用具登革病毒血清型別特異性高的單株抗體 (monoclonal antibody)，可有助於偵測感染了哪一血清型的登革病毒。

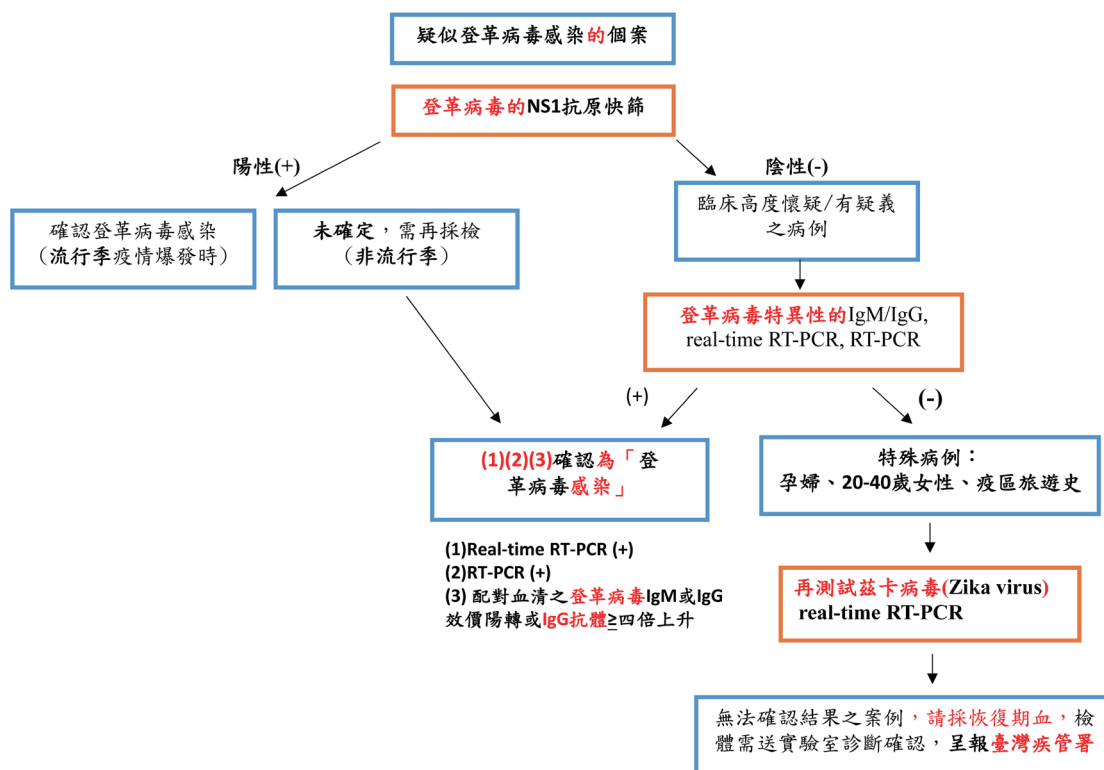
### 三、實驗診斷流程

針對臨床診斷，可用以下檢驗流程 (圖一)。然而，當臨床診斷疑似病例時，除了排除登革病毒感染外，若登革病毒的 NS1 抗原檢驗為陰

性，檢體仍需送實驗室檢測登革/屈公 (CHIKV)/茲卡三病毒的感染；必要時，另須採集恢復期血清以確定診斷。由於早期的登革病毒的感染會有症狀不典型的病例，此外，因登革、屈公與茲卡三病毒的流行區域與臨床症狀極為相似，若懷疑為茲卡病毒感染時，除血清外，可同時檢測尿液檢體。

### 討 論

目前，在急性期感染時偵測登革病毒的核酸已經被廣泛地應用在登革病毒的檢測中，許多研究已評估



圖一 疑似登革病毒感染個案的臨床檢驗之建議流程  
所有血清檢體離心後，宜分裝為每 150 ul 小管，供後續不同實驗法或不同單位再檢測  
驗，之後依據此流程進行臨床檢驗確診。

定量反轉錄聚合酶鏈反應對於登革病毒檢測的應用，這些比較的研究，主要針對自行研發方法與 TaqMan 即時聚合酶鏈反應法，較少針對市售 SYBR 與 FRET 即時聚合酶鏈反應法型比較。同時，這些方法最主要的目標區域為 3'-NCR，而 3'-NCR 及 NS5 regions 則被廣泛應用在血清型鑑定[9-11]。雖然 Levi 等學者認為市售 RealArt 即時聚合酶鏈反應法與自行研發之 multiplex RT-PCR 的結果有相當高的相似性，但其他許多已發表的文獻也顯示，二者靈敏度的差異相當大 (3.8~100%) [12]。另外，有 37 個國際實驗室進行跨國登革病毒特異性即時聚合酶鏈反應 (dengue-specific RT-PCR assays) 的研究，結果發現有些靈敏度僅有 80.4%。在我們先前的研究中利用市售 FRET 即時聚合酶鏈反應法 (qualitative serotyping RT-PCR assay) 可以 100% (102/102) 偵測到病毒，但是自行研發之即時聚合酶鏈反應法僅有 66.7% (68/102) 的靈敏度，這是第一篇評估以 FRET 原理進行即時聚合酶鏈反應 (real-time PCR) 方法的分析報告[8]。我們也曾針對市售 FRET 原理即時聚合酶鏈反應進行分析，結果顯示此反應在病毒量介於  $10^2$  至  $10^6$  copies/reaction 之間的線性回歸曲線  $R^2$  為 0.99。這個方法的結果用在偵測所有的登革病毒時都相當的靈敏，但是對偵測不同登革病毒的靈敏度仍有所差異[13]，這些差異可能與不具感染力的病毒顆粒或是與引子及探子的設計有關。

關於登革病毒量與抗體間的研究，過去 Tittarelli 等學者[14]發現，病毒量與初次感染或二次感染沒有關聯。然而，在我們先前的研究中，NS1/IgM/IgG/VL (+/-/+/+) 的組別有 26/34 (76.4%) 的檢體病毒量為  $10^3$ ~ $10^6$  copies/mL。Laue 等學者指出，可以在病症出現後第一天與第二天偵測到高量的登革病毒 RNA ( $> 5 \times 10^6$  copies) [15]。相較之下，我們先前的研究中所偵測到的病毒量 ( $10^3$ ~ $10^6$  copies/mL) 僅為中量病毒量。由這些結果推論，因為 IgG 抗體的出現，可能造成這些病患的血清病毒量從高量病毒量降至中量病毒量。此外，根據台灣疾病管制署的統計結果，在 2015 年登革病毒流行的致死病例中，有多數患者均有一些慢性疾病，如高血壓 (72.9%)，糖尿病 (47.7%)，慢性腎臟疾病 (31.8%)，心臟病 (17.8%)，與癌症 (11.2%)，而在我們先前的研究中也發現，2015 年登革病毒重症病例中，79.5% (27/34) 年齡為  $\geq 71$  歲，這些病患中，82.3% (14/17) 病毒量高達  $10^6$ ~ $10^9$  copies/mL，明顯高於其他年齡層的病患 [8]。因此，這些慢性疾病可能是直接或間接造成老人感染時體內有較高的病毒量甚至死亡的原因。由於即時聚合酶鏈反應法結果對臨床判斷有其特有的優點，而 Ahmed 等學者亦指出在病症出現後第二與第三天 NS1 抗原與即時聚合酶鏈反應法的靈敏度最高[6]，因此建議應該同時應用這兩種方法作為急性期診斷的工具。當

登革病毒大流行時，NS1 抗原可作為快速檢驗篩檢之用，而即時聚合酶鏈反應法可以做為輔助分析 NS1 抗原陰性檢體之用。

對於登革病毒的實驗室診斷流程，我們建議如下：當臨床診斷判定為疑似病例時，即使登革病毒 NS1 抗原檢驗為陰性，檢體仍需進一步進行登革/屈公 (CHIKV)/茲卡三病毒的感染檢測，並建議採集恢復期血清，進行確定診斷。由於早期的登革病毒的感染會有不典型症狀，同時登革、屈公與茲卡病毒的流行區域、傳染媒介、與臨床症狀極為相似，因此，在登革熱非流行期時，需要進一步確診排除是否為其他蚊媒病毒的感染。我們相信，這些流程的建構，可提供臨床診斷寶貴的資訊，同時對於政府衛生單位與臨床醫療在日後登革病毒流行期時，作為病患治療與疾病流行偵測的重要依據。

## 參考文獻

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al: The global distribution and burden of dengue. *Nature* 2013;496:504-07.
- Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, et al: Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:518-28.
- Gubler DJ: Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:480-96.
- Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD: Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:564-81.
- Flipse J, Wilschut J, Smit JM: Molecular mechanisms involved in antibody-dependent enhancement of dengue virus infection in humans. *Traffic* 2013;14:25-35.
- Ahmed NH, Broor S: Comparison of NS1 antigen detection ELISA, real time RT-PCR and virus isolation for rapid diagnosis of dengue infection in acute phase. *J Vector Borne Dis* 2014;51:194-99.
- Hu D, Di B, Ding X, et al: Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virol J* 2011;8:47.
- Tsai HP, Tsai YY, Lin IT, et al: Validation and Application of a Commercial Quantitative Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Assay in Investigation of a Large Dengue Virus Outbreak in Southern Taiwan. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0005036.
- Chien LJ, Liao TL, Shu PY, et al: Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol* 2006;44:1295-304.
- Ito M, Takasaki T, Yamada K, et al: Development and evaluation of fluorogenic TaqMan reverse transcriptase PCR assays for detection of dengue virus types 1 to 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:5935-937.
- Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, et al: Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol* 2001;39:4119-124.
- Levi JE, Tateno AF, Machado AF, et al: Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiania, Central Brazil, in 2005. *J Clin Microbiol* 2007;45:1893-97.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS: Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol* 2005;43:4977-83.
- Tittarelli E, Barrero PR, Mistchenko AS, et al: Secondary dengue virus infections during the 2009 outbreak in Buenos Aires. *Trop Med Int Health* 2016;21:28-32.
- Laue T, Emmerich P, Schmitz H: Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol* 1999;37:2543-7.