

# 呼吸道病毒感染之實驗診斷

蔡慧頻<sup>1,4</sup> 李南瑤<sup>2,3</sup>

成功大學醫學院附設醫院 <sup>1</sup>病理部病毒組 <sup>2</sup>感染管制中心 <sup>3</sup>內科部

<sup>4</sup>成功大學醫學院 醫學檢驗暨生物技術學系

呼吸道病毒感染可由無症狀、輕症至重症甚而死亡，臨床醫師困難從病人症狀去正確地區分病毒致病原，因此準確的識別這些感染原和適當地照護患者的健康是醫療體系首項任務。呼吸道病毒的檢測方法日新月異，由數十年前的傳統培養鑑定法到快速抗原檢測，演變至最近的核酸擴增檢測方法 (nucleic acid amplification tests, NAAT) 與即時定點照護核酸檢測法 (point of care nucleic acid testing, POCT)。雖然 NAAT 和 POCT 的高敏感度與特異性對臨床診斷有非常大之助益，但其試劑成本相較傳統方法昂貴且無法大量繁殖活的病毒做進一步的分析研究。因此病毒培養鑑定、偵測病毒顆粒和抗原的傳統方法在實驗室仍有其存在的必要性。因此本篇的重點則是介紹現今實驗室檢測呼吸道病毒的方法和討論該方法的優缺點。( **感控雜誌 2022:32:107-116** )

**關鍵詞：** 呼吸道病毒感染、檢測方法、病毒培養鑑定、核酸擴增檢測方法、即時定點照護檢測法

## 前 言

呼吸道疾病是影響人類的健康狀況最常見的疾病之一。這些疾病多數是由病毒所引起，其臨床表現和嚴重程度可從輕度到自行痊癒的上呼吸道疾病 (upper respiratory tract illnesses,

URTI) 到嚴重或致命的下呼吸道道疾病 (lower respiratory tract illnesses, LRTI)。呼吸道病毒所併發的疾病常使醫療單位過度使用抗生素，造成醫療體系的沉重負擔。因此準確的識別這些感染原和適當的照護受影響患者的健康是醫療體系首項任務。

民國 110 年 12 月 6 日受理  
民國 110 年 12 月 29 日修正  
民國 111 年 2 月 22 日接受刊載

通訊作者：蔡慧頻  
通訊地址：704台南市勝利路138號  
連絡電話：06-2353535#2653

DOI: 10.6526/ICJ.202204\_32(2).0005

中華民國 111 年 4 月第三十二卷二期

急性呼吸系統疾病 (acute respiratory disease, ARD) 在世界上佔所有急性疾病的發病率和死亡率中很大比例，其中 80% 是由急性病毒性呼吸道感染所引起[1]，致病的主要病毒包括 A 型與 B 型流感病毒 (influenza virus)、副流感病毒 1-4 型 (parainfluenza virus)、呼吸道融合病毒 (respiratory syncytial virus, RSV)、人類冠狀病毒 (human coronavirus)：OC43 型、229E 型、中東呼吸症候群冠狀病毒 (middle east respiratory syndrome. coronavirus, MERS-CoV)、嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和新型冠狀病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)、腺病毒 (adenovirus)、鼻病毒 (rhinovirus) 和人類間質肺炎病毒 (human metapneumovirus) 等。常見呼吸道病毒的潛伏期與傳染途徑請見表一[2]。

在 5 歲以下的兒童中，每年全球 influenza virus 和 RSV 每年均有 300,000 例的死亡病例。其他呼吸道病毒：如腺病毒和鼻病毒，雖其死亡率較低，但罹病率相當高，導致社會巨大的經濟負擔。高致病性的新興和重新出現的冠狀病毒可能導致流行病或大流行，例如 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2，已對全球公共衛生與人類的健康構成巨大威脅 [3]。

準確與快速地診斷出致病的病毒，可使臨床選擇合適的治療方法挽救人們的生命遏制流行病，減少不必要的抗生素使用。上述病毒可引起上呼吸道和下呼吸道道感染，以及多種呼吸道病毒引起相似的臨床表現，若無實驗室之檢驗結果，臨床醫師則很難區分真正致病的病原體。傳統的診斷方法，例如病毒培養和直接/間接免疫螢光檢測 (immunofluorescence assay, IFA) 較費時費力，靈敏度較差。快速的呼吸道病毒準確診斷，有

表一 呼吸道病毒的潛伏期與傳染途徑

病毒種類	潛伏期平均值(天)	潛伏期範圍(天)	主要傳染途徑	次要傳染途徑
腺病毒	5.6	4.8~6.3	接觸	糞口；飛沫
冠狀病毒(非 SARS 相關)	3	2.0~5.0	飛沫	接觸
冠狀病毒(SARS 相關*)	5	2.0~10.0	飛沫	接觸
A 型流感病毒	1.4	1.3~1.5	飛沫	接觸；空氣
B 型流感病毒	0.6	0.5~0.6	飛沫	接觸
副流感病毒	2.6	2.1~3.1	接觸	飛沫
呼吸道融合病毒	4.4	3.9~4.9	接觸	飛沫
鼻病毒	1.9	1.4~2.4	空氣	飛沫

\* SARS 相關指 SARS-CoV、SARS-CoV-2

助於同時進行流行病學監測、採取有效的預防措施和實施適當的抗病毒療法。在過去的二十年裡，病毒診斷檢測的演變則從傳統方法到快速抗原檢測，直至最近敏感度高的核酸擴增檢測方法 (nucleic acid amplification tests, NAAT) 和即時定點照護檢驗 (point-of-care tests, POCT) 方法已蓬勃發展。雖然使用快速核酸擴增法檢測呼吸道病毒核酸的實驗室越來越多，但其試劑成本相較傳統方法昂貴且無法大量繁殖活的病毒做進一步的分析研究，因此病毒培養鑑定、偵測病毒顆粒和抗原的傳統方法在實驗室仍有其存在的必要性。因此本篇的重點則是介紹現今實驗室檢測呼吸道病毒的方法和討論該方法的優缺點。

## 檢體的選擇、收集、傳送與過程

下列為常見用於檢測呼吸道病

毒的檢體類別：支氣管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage, BAL)，喉頭/鼻咽拭子 (throat/nasopharyngeal, NP swab)，鼻咽沖洗液 (NP washes)，鼻咽抽取液 (NP aspirates) 和肺部組織 (lung tissue) 等呼吸道與肺部實體採檢。適用之檢體類別常取決於特定病人的族群，例如兒科病人鼻咽部位檢體相較喉頭部位的取得是非常具挑戰性的。根據過去的研究發現，發病後 3~5 天內取得的檢體中所含的病毒濃度最高，檢體必須保存與傳送在 2~8°C 的適當保存液與傳送容器 (viral transport medium, VTM)，VTM 可用來穩定病毒顆粒與核酸、避免檢體乾掉、穩定酸鹼值和抑制細菌的生長進而影響檢驗結果。具有套膜的病毒如流感病毒、RSV、HMPV 和副流感病毒等，較不穩定容易失去活性。檢驗應該需在檢體送達實驗室 48 小時內完成。表二為直接檢測呼吸道病原

表二 直接檢測呼吸道病原體的適用於不同方法的常見檢體類別

病毒種類	培養法	血清法	核酸檢測方法	備註
Influenza virus, Parainfluenza virus, RSV, HMPV, Coronavirus, Rhinovirus, Enterovirus, Adenovirus	nasal swab, NP swab, NP wash, NP aspirate, throat swab, BAL, lung tissue, Sputum	不建議	nasal swab, NP swab, NP wash, NP aspirate, throat swab, BAL, lung tissue, Sputum	Coronavirus 在常規實驗室無法培養
冠狀病毒 (SARS 相關)	tracheal aspirate, NP aspirate, throat/nasal swab, throat wash, stool	不建議	tracheal aspirate, NP aspirate, throat/nasal swab, throat wash, stool	需在生物安全第三等級實驗室中進行培養

體的適用於不同方法的常見檢體類別 [4]。

## 鑑定呼吸道病原體感染之非分子 檢測法

### 一、電子顯微鏡 (electron microscopy, EM)

電子顯微鏡為最古老的直接檢查方法之一。在已開發國家，實驗室利用此技術用來檢測病毒超微結構及致病機轉的研究。從過去的歷史經驗，EM 在幾次大疫情爆發時鑑定新的病毒株方面發揮了很重要的作用，例如 SARS 的疫情爆發時即是利用 EM 確認是由冠狀病毒所造成的。然而，儘管有上述幾個優點，EM 的使用在呼吸道病毒的診斷上仍受到限制，因為它昂貴、費力、費時、需較長的檢驗時間 (約 16 小時)，敏感度相較其他診斷方法差。此外，EM 需要嚴格控制在一定的實驗條件下，如高濃度的病毒顆粒 (> 100,000/L)，以及高規格的技术技能和專業知識的準確分析 [5]。

### 二、病毒培養鑑定 (viral culture and identification)

將病人檢體與細胞一起培養後，利用觀察細胞病變效應 (cytopathic effect, CPE) 和血球吸附試驗來檢測病毒的方式，在過去數十年被認為是診斷呼吸道病毒病原體的「黃金標準方法」。例如腺病毒、A/B 型流感、

RSV 和人類副流感病毒是最常利用細胞培養分離鑑定的呼吸道病毒。以傳統細胞管可培養多種病毒，包括新的或未知的病毒，但通常需要幾天時間甚至幾週才能提供結果。多年來，改良的細胞培養法以將檢體與細胞一起進行離心，增強病毒進入細胞的效率，以縮短培養的時間至 1~3 天，此稱為 shell-vial 離心培養法。Shell-vial 離心培養法中所使用的細胞小瓶可由多種細胞組合而成，此有利於增加檢測之敏感度；其中在培養時 RSV 時 (73%)，相較傳統細胞管培養法 (42%)，可見到顯著的效果 [6]。儘管有這些優勢，許多臨床相關的病毒難以在細胞培養中生長 (如鼻病毒和冠狀病毒)。此外，多次冷凍解凍的檢體其病毒的活性會降低，進而影響病毒培養的成功率。分子檢測方法相比，傳統的試管培養法和 shell-vial 離心培養方法較為費力，偽陰性的比率較高，所需檢驗的時間較長，因此對臨床的即時診斷成效不大。

### 三、病毒抗原檢測方法 (viral antigen detection assays)

#### (一) 快速免疫法 (rapid immunoassays, RIA)

快速免疫檢測方法 (RIA) 可在 30 分鐘內提供檢驗結果，通常在即時檢測的設置情形下執行，此結果允許納入臨床決策。四種主要的 RIA 方法為：乳膠凝集 (latex agglutination)、水平流動裝置

(horizontal flow devices)、側向流動裝置 (lateral flow devices) 和光學免疫分析 (optical immunoassays)，其中側流免疫分析 (lateral-flow immunoassay, LFIA) 是目前最常用和最流行的抗原快篩法。RIA 相對便宜、易於執行，並且大多數他們符合美國臨床實驗室改進法案 (Clinical Laboratory Improvement Act, CLIA) 指南的簡易執行試驗 (waived test)，因此它們易於門診、初級照護、緊急情況和資源匱乏的環境下執行檢驗。目前市售的 RIA 大多限於 A 型流感病毒、B 型流感病毒和 RSV 的檢測。許多研究顯示，RIA 對流感病毒和 RSV 的敏感性差 (44~95%) 但其特異性高。由於病毒濃度在小孩相較大人高，因此其敏感度的表現也較好。儘管靈敏度較低，RIA 在急診被認為是一種有價值的診斷工具，因為他們可以顯著減少置留的時間、額外的檢查，以及不必要抗生素的使用。

## (二) 直接螢光抗體檢測 (direct fluorescent antibody tests, DFA)

鼻咽的直接螢光抗體檢測 (DFA) 是一種快速、可靠檢測呼吸道病毒感染的方法。雖然此方法需要較高標準的技術才能準確判讀，市售 DFA 試劑組已證明對多種呼吸道病毒具有高靈敏度和特異性，如 hMPV (95% 和 100%)、腺病毒 (62% 和 100%)、RSV (94% 和 96%) 和副流感病毒 (88% 和 99.7%) [5]。

## (三) 血清學檢驗方法 (serological tests)

利用血清學方法病原體特異性抗體通常在初次感染後 2 週左右出現可被檢測到。血清學檢測可成功地識別大多數呼吸道病原體的抗體，如 RSV、腺病毒、流感病毒 A 型和 B 型、副流感病毒第 1-3 型病毒等，並可檢測住院兒童 (嬰兒除外) 罹患呼吸道急性多重感染之抗體反應。然而，副流感病毒和腺病毒的血清學檢測法比核酸偵測法敏感度明顯較低[7]。不同的研究顯示，血清學的偵測呼吸道病原體的敏感度 (14%~77%) 和特異性 (49%~97%) 懸殊極大，因此在臨床上的用處被限制。此外，臨床需利用急性期和恢復期的 2 次血清學結果，確認在恢復期比急性期的效價是否有 4 倍上升才能用於診斷。為了偵測適當時機的 IgM 抗體，急性期血清的檢體應在病程早期採集[8]。

## 分子檢測方法鑑定呼吸道病原體

現今許多市售新的核酸擴增檢測試劑可用於檢驗呼吸道病原體，具台灣衛署許可證市售檢測試劑簡介於表三。以分子方法檢測呼吸道病原體的準確度不僅決定於特定試劑的化學性質，其檢體的型式、檢體量與檢體的品質也是非常關鍵的[5]。

表三 具台灣衛署許可證市售檢測呼吸道病毒之檢測試劑介紹

檢測試劑 (test)	製造商 (manufacturer)	檢驗技術 (technology)	目標的病原體 (targets)	檢體種類 (sample type)	機器測測時間 (turnaround time)	CLIA 技術複雜度 (complexity classification)
NxTAG respiratory pathogen panel	Luminex Corporation	real-time RT-PCR*	multiplex panel (20 targets)	NPS	4小時	high
FilmArray respiratory panel (RP)	BioFire Diagnostics, Inc.	nested** multiplex RT-PCR	multiplex panel (20 targets)	NPS	1小時	moderate
FilmArray Respiratory panel 2 (RP2)	BioFire Diagnostics, Inc.	nested multiplex RT-PCR	multiplex panel (21 targets)	NPS	45分鐘	moderate
Xpert xpress Flu/RSV/SARS-CoV-2	Cepheid	real-time RT-PCR	Flu A, Flu B, and RSV	NPS, NA, and NW	30分鐘	waived
cobas Liat influenza A/B & RSV assay	Roche Molecular Diagnostics	real-time RT-PCR	Flu A, Flu B, and RSV	NPS	20分鐘	waived
cobas Liat influenza A/B & SARS-CoV-2 assay	Roche Molecular Diagnostics	real-time RT-PCR	Flu A, Flu B, and SARS-CoV-2	NPS	20分鐘	waived
ID NOW influenza A & B 2 test	Abbott	isothermal nucleic acid Amplification***	Flu A, Flu B	NPS, NS	<15分鐘	waived
ID NOW RSV	Abbott	isothermal nucleic acid amplification	RSV	NP swab or NP swab eluted in VTM	<15分鐘	waived
ID NOW COVID-19	Abbott	isothermal nucleic acid amplification	SARS-CoV-2	nasal, throat, and NP swabs	<15分鐘	waived

\* 即時聚合酶連鎖反應

\*\* 巢式多重即時聚合酶連鎖反應

\*\*\* 等溫核酸放大

## 多重病原體核酸檢測 (Multiplex pathogen Panel Nucleic Acid Assays)

檢測呼吸道病原體核酸的檢測方法有許多種，包含核酸序列的擴增法、轉錄介導的擴增法 (transcription mediated amplification, TMA)，鏈置換擴增法 (strand displacement amplification, SDA)，恆溫環狀擴增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等，上述方法在過去十年中獲得了極大的歡迎。呼吸道症狀型核酸檢測套組可同時檢測多種病原體，有利於感染管制及時地決策治療的方式，並且比檢測單一病原體價格之總價還便宜。核酸檢測套組依美國臨床實驗室促進法案 (CLIA) 的指引，將實驗的難易程度分為高複雜度 (high complexity)、中等 (moderate complexity) 與簡易分子定點照護檢驗 (waived molecular point-of care tests)。

### 一、高複雜度多重呼吸道病原體核酸檢驗 (high complexity)

跟其他核酸檢測方法相比，高複雜度多重呼吸道病原體核酸檢驗試劑套組的敏感性及特異性之表現較佳，然而針對不同的病原體可能會有些差異。然而，對於新的變異株偵測的準確度仍須再加以驗證。高複雜性的檢驗機台一次檢測檢體數量可由一次 1 個至多達 96 個，操作此類檢驗機台的檢驗人員必須具

備相當程度的學識、訓練和經驗。批次上機對此類高通量的檢驗機台最為理想，特別是當有呼吸道病原體爆發大規模疫情導致檢體量大增時。雖然具有這些優點，高複雜度的檢驗儀器需要檢體準備、檢驗過程與結果判讀等分次步驟，檢驗時間大約需 5~8 小時。例如：Luminex xTAG Respiratory Viral Panel Fast V2 (RVP FAST V2) 為高通量 (96 tests/kit) 之試劑組，可檢測 20 種呼吸道病原體包含 2 種細菌 (*Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) 和 18 種病毒 (influenza A, influenza A-subtype H1, influenza A-subtype H3, influenza B, respiratory syncytial virus A, respiratory syncytial virus B, rhinovirus/enterovirus, human parainfluenza viruses 1-4 (PIV1-4), human metapneumovirus, adenovirus, coronavirus 229E, coronavirus HKU1, coronavirus NL63, coronavirus OC43, 和 human bocavirus，其敏感度和特異性為 98.9% 和 99%；2021 年的升級試劑版可偵測新冠病毒 (SARS-CoV-2)。

### 二、中等多重呼吸道病原體核酸檢驗 (moderate complexity)

中等複雜性之快速多重病原體分子測試系統在過去幾年廣受歡迎，它們容易操作、檢驗時間較短與具有高效率的工作流程。這些檢測試驗一次可做 1~12 個檢體，隨到隨作，大多

數的檢驗平台所提供之結果為定性報告。由於檢驗機台與試劑反應是在封閉的盒子 (cassette) 或卡匣 (cartridge) 中進行，因此可降低污染的風險。過去文獻指出，Filmarray RP (第一代) 試劑偵測腺病毒的敏感度 (57%) 較差 [9]，此現象在第二代試劑 filmArray respiratory panel 2 (RP2) 已獲得改善。雖然檢驗時間可縮短至 1~2 小時，但臨床的實用性仍受到質疑，因為在非流感病毒檢測呈陽性與陰性的患者中，觀察到其抗生素使用率或死亡率並沒有顯著的下降 (陽性 48%；陰性 49%) [10]。然而，在某些情況下，可縮短住院時間 (7 天；9 天) 和隔離時間 (75 小時；82 小時) [5]。這些檢驗試劑的成本較高複雜度檢測試劑昂貴，並且無法客製化進行檢測某些特定的病原體。

### 三、簡易分子定點照護檢驗 (waived molecular point-of care tests, POCT)

簡易分子定點照護 (POCT) 檢驗的儀器檢驗時間大多小於 30 分鐘，檢體加入檢測試劑的時間約需 5 分鐘，可由非實驗室工作人員輕鬆操作，適合在患者附近執行檢測。目前市售具衛署許可證的檢驗試劑大多只能檢測 A 型及 B 型流感病毒、RSV 和新冠病毒。過去研究顯示，某檢驗試劑對 B 型流感病毒的敏感度較差 (45.2~54.5%)，因此需要其他輔助方

法來做確認 [5]。簡易分子定點照護檢驗費用昂貴，非實驗室人員容易因訓練不足而操作不當，以及因未依循廠商操作步驟說明執行品管，進而影響檢驗結果的正確性或發生污染的情形。

## 結 語

分子檢測大大的提高呼吸道病原體診斷率，被認為是新的「黃金標準」。儘管這些分子檢測方法現今已廣受歡迎，但在實施前仍應考慮被檢測的患者族群 (例如：成人、兒童和免疫功能低下)、實驗室規模、檢測目的 (用於常規或緊急醫療處置) 和成本/收益比等。分子檢測的高敏感度和特異性可提高病原體的檢出率，臨床醫師應評估檢驗結果後再開始進行特定的療程。快速的分子檢測最適合用於常規診斷和疫情暴發時期；而傳統方法，如細胞培養或電子顯微鏡，則可考慮用於鑑定新的病原體。檢驗技術日新月異、與時俱進，目前次世代基因體定序 (next-generation sequencing-based metagenomics, mNGS) 在檢測呼吸道病原體上亦有優異的表現，它可提供更多更準確的訊息，不過現今對 NGS 的發展潛力尚在驗證階段，未來對於新的檢驗技術的在不同族群的臨床應用仍需更進一步的探討。



## 參考文獻

1. Mahony JB, Petrich A, Smieja M: Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48:217-49.
2. Park CE: Diagnostic Methods of Respiratory Virus Infections and Infection Control. *Korean J Clin Lab Sci* 2021;53:11-8.
3. Zhang N, Wang L, Deng X, et al: Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J Med Virol* 2020;92:408-17.
4. Khare R, Gryns TE: Specimen requirements: selection, collection, transport, and processing, in *Clinical Virology Manual*, 5th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology 2016:59-35.
5. Das S, Dunbar S, Tang YW: Laboratory Diagnosis of Respiratory Tract Infections in Children-the State of the Art. *Front Microbiol* 2018;9:2478.
6. LaSala PR, Bufton KK, Ismail N, et al: Prospective comparison of R-mix shell vial system with direct antigen tests and conventional cell culture for respiratory virus detection. *J Clin Virol* 2007;38:210-6.
7. Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, et al: Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 2006;44:2382-8.
8. Dunn JJ: Specimen collection, transport, and processing: virology, in *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. Washington, DC: American Society of Microbiology 2015:1405-21.
9. Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB: Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2013;51:1528-33.
10. Green DA, Hitoaliaj L, Kotansky B, et al: Clinical Utility of On-Demand Multiplex Respiratory Pathogen Testing among Adult Outpatients. *J Clin Microbiol* 2016;54:2950-5.

# Laboratory Diagnosis of Viral Respiratory Infections

Huey-Pin Tsai<sup>1,4</sup>, Nan-Yao Lee<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology,

<sup>2</sup>Center for Infection Control,

<sup>3</sup>Division of infectious disease National Cheng Kung University Hospital,

College of Medicine, National Cheng Kung University

<sup>4</sup>Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, College of Medicine,

National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

Viral respiratory infections can be asymptomatic or result in mild-to-severe clinical symptoms or even death. Clinicians find it difficult to correctly identify viral pathogens based on patients' respiratory symptoms. Accurate identification of these infectious agents is vital in providing effective care for these patients. The methods for respiratory virus detection are changing rapidly, from the traditional culture and identification method to the rapid antigen tests developed decades ago, to the recent nucleic acid amplification tests (NAAT) and point-of-care nucleic acid tests (POCT). Although the high sensitivity and specificity of NAAT and POCT are very helpful for clinical diagnosis, their reagent costs are high compared with traditional methods and they cannot proliferate live viruses for further analysis. Consequently, the traditional methods of viral culture and detection of virus particles and antigens are still necessary in the laboratory. Therefore, the focus of this article is to introduce current laboratory tests for detecting respiratory viruses and discuss the advantages and disadvantages of these tests.

**Key words:** Respiratory virus infection, detection method, viral culture and identification, nucleic acid amplification detection test, point-of-care test