

病毒感染的實驗室診斷

黃雅玲 1,2 黃瓊瑰 1,2 曹國倩 1,2

1 長庚紀念醫院 林口總院 臨床病理科 2 長庚大學 醫學生物技術暨檢驗學系

隨著分子生物學在病毒感染方面的研究發展，病毒的診斷技術已由傳統病毒培養方法擴展至新的快速診斷技術。病毒感染的快速診斷有利於對病毒感染者的治療；例如對有些病毒(如流行性感冒病毒、疱疹病毒、HIV 等)感染已有較特異的抗病毒藥物治療。早期診斷及早期治療對控制病毒感染十分重要。此外，從群聚感染角度分析，確定病毒感染的病源在監控病毒的流行病學(如新型流感、冠狀病毒的發現等)方面也有重要的意義存在。由於新興病毒的崛起，例如 2003 年 SARS 病毒造成的非典型性肺炎；以及近年來，流感病毒仍不斷演化，使得禽流感是否會再度引起如 1918 年之大流行，成為全世界及世界衛生組織(World Health Organization;WHO)極度關切之議題等等，使我們更加重視病毒診斷的重要性。現今，對於病毒診斷的方法包括病毒分離與鑑定、病毒抗原快速鑑定、特異性抗體的檢測、以及病毒核酸偵測等四大方向。本文將針對病毒實驗室鑑定方法做重點介紹，期能提高大家對於病毒鑑定方法之認知，充分利用實驗室資源，有效且正確鑑定出病毒感染症。

前 言

病毒實驗室以往倚賴組織或細胞培養技術作為診斷主要依據，此技術花費不僅昂貴，並且需要大量時間及人力，加上商業化的相關試劑產品相當有限，抗病毒藥物亦是屈指可數，因此大部分的醫院並沒有臨床病毒實驗室。直到近幾年來，診斷性病毒學才真正被整合併入臨床醫學實驗室的主流。探究其原因如下：首先，因為人類免疫缺陷病毒(HIV)感染所造成的後天免疫不全症候群(AIDS)人數持續攀升，再加上器官移植成功個案逐年提高，因此造成許多嚴重伺機性病毒的感染；其次，抗病毒藥物的普及使用，使得用藥的選擇更需倚賴以實驗室為基礎的診斷；最後，由於單株抗體及聚合酶連鎖反應(PCR)的發明，更開啓了病毒抗原快速鑑定的時代[1]。近年來，新興病毒的崛起，例如 2003 年 SARS 病毒造成的非典型肺炎；2005 年，大眾聞之色變的禽流感病毒等等，使我們更加重視病毒診斷的重要性。現今，臨床上對於病毒診斷方法包括病毒分離與鑑定、病毒抗原快速鑑定、特異性抗體的檢測、以及病毒核酸偵測等四大方向。臨床醫師可根據流行病學資料和疾病的症狀，綜合判斷可能為何種病毒感染，再採集適當的檢體送檢。

檢體的採集與運送

病毒性疾病通常採集血液、咽喉拭子、鼻咽分泌液、痰液、肛門拭子、糞便、腦脊髓液、水泡液、活體組織或切片等。提供病毒培養、核酸及抗原偵測的檢體要求如下：

- 一、儘早採檢：在發病初期(急性期)採集檢體，較易檢測出病毒，越晚陽性率越低。
- 二、適宜部位：由感染部位採檢，如呼吸道感染採集鼻咽沖洗液、咽喉拭子或痰液；腸道感染採集肛門拭子或糞便；腦部感染採集腦脊髓液；皮膚感染採取病灶組織；有病毒血症時則採集血液。

三、冷藏速送：採檢後將檢體或採檢棒裝於 collectionmedium 內，儘量置 4℃ 送至實驗室。因為病毒離開人體後在室溫下很易死亡，故取得檢體後應儘快送檢。若距離較遠或無法馬上送達實驗室時，應將之保存在 4℃ (不超過 24 小時)，切勿放置於冰箱冷凍層(-20℃)，否則病毒不容易培養。檢測病毒特異性抗體時，需要採急性期與恢復期對的血清，第一次盡可能在發病後立即採檢，第二次在發病後 2-3 週採檢，血清檢體放 4-20℃ 保存。

病毒診斷方法

一、病毒的分離與鑑定

病毒是細胞內寄生的生物，故需活體系統方可培養。Weller 和 Enders 於 1948 年成功地使用組織培養法(tissue culture)來檢測致病性的人類病毒[2]；由於組織或細胞培養的技術所需的設備較一般的實驗室不同，因此病毒實驗室被獨自地設立出來。早期病毒通常是藉由動物試驗或接種在雞胚胎蛋來進行病毒的複製與繁殖，但是此兩種技術隨著細胞培養技術的成熟而幾乎被取代，如今細胞培養技術已成為現今診斷病毒學的黃金標準。此方法不僅可以複製大量病毒來提供實驗室進一步的鑑定外，甚至可以廣泛培養出不同種類的病毒；然而，病毒培養最大的缺點在於需要第二等級以上的生物安全櫃以及操作人員經驗的累積。

(一)病毒的分離

病毒分離一般程序如下：無菌檢體(腦脊髓液)可直接接種至細胞；組織檢體或切片經 phosphate-buffered sa-line(PBS)洗滌後，製成細胞懸浮液，再加入抗生素後直接接種；咽喉拭子、肛門拭子、尿液或感染性組織等非無菌性檢體，在接種前先用抗生素處理，殺死常在性細菌或黴菌後，再接種至細胞中。

分離病毒的鑑定培養所需的基礎培養基通常市面上多已商品化，此外再加入胎牛血清、氨基酸、抗生素的緩衝溶液，pH7.2-7.4。臨床上絕大多數利用塑膠或玻璃材質培養單層吸附細胞後，才進行檢體的接種。很不幸地，目前並沒有單一種細胞就能養出所有醫學上重要的病毒，因此選用適合的細胞種類作為臨床常規細胞使用是非常重要的。細胞培養種類共分為三大類，詳見表一。

(二)病毒的鑑定

1.細胞病變效應(cytopathic effect; CPE)

病毒在細胞內增殖，引起細胞產生型態上病變，表現為細胞皺縮、變圓、出現空泡、融合、死亡和脫落。某些病毒產生特殊性 CPE，普通光學倒立顯微鏡下可觀察上述細胞病變，再結合臨床表現，可做出預測性初步判斷。免疫螢光法(immunofluorescence assay; IFA)用於鑑定病毒，具有快速及特異的優點，細胞內的病毒或抗原可被螢光標記的特異性抗體呈色，在螢光顯微鏡下可見黃綠色螢光，根據所用抗體的特異性，即可正確判斷為何種病毒感染。

2.血球吸附試驗(hemadsorption test)

流感病毒和某些副粘液病毒在感染細胞後 24-48 小時，新合成的血球凝集素表現在細胞膜上，能吸附天竺鼠、雞等動物及人類的紅血球，而產生紅血球吸附現象。對於無細胞病變或只有輕微細胞病變之病毒，利用血球吸附現象，可以檢測病毒的存在；對於有細胞病變的病毒，亦可藉之早期偵測。

3.電子顯微鏡(electron micro-copy)

病毒形態與結構的觀察，可將病毒懸浮液經高度濃縮和純化後，借助磷鎢酸負染及電子顯微鏡直接觀察病毒顆粒，根據大小、形態可初步判斷病毒屬那一科。此方法對於第一時間無法利用免疫或分子生物方法進行病毒鑑定時特別重要，但是此法操作特別繁瑣，因此臨床病毒診斷已鮮少使用。

(三)Shell vial culture

為傳統病毒培養方法經過改良的方法，將病毒接種在內含有蓋玻片的細胞培養瓶中，經低溫離心後，可以增加病毒與細胞接觸的機率，再將蓋玻片進行培養，隔天使用單株抗體染色，藉由檢測病毒的早期抗原進行診斷。此方法主要優點是可以縮短偵測時間，一些生長速度較慢的病毒，如巨細胞病毒，若用傳統病毒培養，出現 CPE 時間最快需要一星期，最慢需等一個月，利用 shell vial culture 可以將鑑定時間縮短成兩天。此方法敏感度依實驗室不同而不同，影響因素包括培養 fibroblast 細胞的狀況及代數、染色的時間點、單株抗體的品質等等。在某些實驗室，shell vial culture 敏感度可以超越傳統病毒培養方法，有些則不然[1]。

二、病毒抗原的快速鑑定

Liu 以螢光抗體染色法(fluorescent antibody staining)有效地檢測出鼻黏液抹片中的感冒病毒；而隨著單株抗體的發展，免疫試劑已能更具專一性且直接地從臨床採樣的檢體中鑑定出個別病毒的抗原。

(一)免疫螢光染色(IFA)

如前所述，IFA 可用於細胞培養病毒的鑑定，同時也適用檢測臨床檢體中的病毒抗原，具有快速、特異的優點。直接免疫螢光技術是用螢光直接標記特異性抗體，檢測病毒抗原；間接免疫螢光技術是先用特異性抗體與檢體中抗原結合，再用螢光標記的抗體與特異性抗體結合，從而間接識別抗原。可取咽喉脫落細胞，檢測呼吸道融合病毒、流感及副流感病毒抗原；取病灶刮片，檢測單純疱疹病毒抗原；取尿沉渣檢測巨細胞病毒抗原等。

(二)免疫色層分析

為針對病毒之迅速免疫色層分析法，可於十五分鐘內，直接偵測並定性檢體中病毒抗原的存在。操作者不需限定檢體採集方法，鼻咽洗液、鼻咽抽出物、鼻咽拭子等檢體皆可使用。對於實驗室設備不足之檢驗室，此方法不需繁瑣步驟及儀器，並且可以在短時間內測得結果。

(三)西每聯免疫吸附試驗(ELISA)

先將特異性抗體吸附到塑膠 96 微孔盤中，以捕捉檢體中相對應抗原，然後加入西每標記的特異性抗體，特異性抗原被夾在兩種抗體之間，當加入西每的受質後呈色，顏色深淺程度直接反映檢體病毒抗原量。因其敏感性接近放射線免疫分析法，又不接觸放射性物質，已被多數實驗室採用。

此外，對難以分離培養，形態特殊且病毒數量較多的檢體，可用電顯或免疫電顯法直接觀察，是一種快速診斷與鑑定病毒的方法。

三、特異性抗體的檢測

病毒感染後通常誘發針對病毒一種或多種抗原的免疫反應，特異性抗體效價升高或 IgM 抗體出現有輔助臨床診斷的價值。

(一)補體結合試驗(complement fixation test; CF)

CF 分二個階段：1. 抗原與抗體(一個為已知抗原，一個為待測抗體)混合，加入定量補體，若抗原與抗體結合，形成免疫複合物，則補體會被消耗掉；2. 在上述混合物中加入溶血素致敏化綿羊紅血球，若補體已與抗原抗體複合物完全結合，沒有剩餘補體存在，那麼綿羊紅血球不會溶血，結果為陽性，說明待測檢體中有特異性抗體存在，出現陽性結果時血清檢體最高稀釋倍數為抗體的效價。反之為陰性結果。由於補體結合抗體產生早，消失快，適於診斷病毒近期感染。

(二)酵素免疫分析法

早在 1970 年代，固相酵素結合試劑(solid phase enzyme-coupled reagent)分析法已被發展，用來對抗原與抗體進行簡單又靈敏地偵測和定量。主要原理是將酵素以化學鍵連結至抗原或抗體後，再被用來測定免疫複合物(immune complexes)，而此複合物是在一固相(solid phase)中形成。實驗中，將過多且未被結合到免疫複合物上的酵素連結物洗去，接著加入受質與酵素反應，會產生有顏色的產物，經由光學密度(optical density)的測量，即可定量之。由於酵素免疫分析法既簡單又靈敏，在一個簡單的實驗環境中，可被用來測定大量的微量樣本；因此，其已廣泛地被使用在流行病學與病毒感染性疾病的偵測。

(三)中和試驗(neutralization test; NT)

病毒與抗體(一個為已知感染效價之病毒，一個為待測抗體)混合培養後，加入細胞中，若病毒已被抗體中和，則不會對細胞產生 CPE，結果為陽性，說明待測檢體中有中和性抗體存在，出現陽性結果時血清檢體最高稀釋倍數為抗體的中和效價。反之，若細胞產生病變效應，則結果為陰性。由於中和試驗可直接檢測抗體對於病毒是否具有免疫特異性，且持續時間久，以往受病毒感染後，血中可長期存在中和抗體，所以適用於流行病學調查，雖然一般不作常規使用，但是對於尚未有商品化試劑檢測抗體時，此法對於臨床病毒診斷也是一項很好的參考指標。

(四)血凝抑制試驗(hemagglutination inhibition test; HI)

某些病毒(流感病毒、副流感病毒、腮腺炎病毒等)能凝集紅血球，而抗體與這些病毒結合後卻能阻止它們的凝集，若成對血清有 4 倍以上效價增高，也可用於診斷這類病毒感染。本法簡便、快速、經濟、特異性高，常用於流行病學調查等。

(五)IgM 捕捉 ELISA

特異性 IgM 出現於病毒感染的早期或病毒感染的活動期，因此可從急性期病人單份血清中檢出特異性 IgM，這是病毒感染實驗室早期診斷的可靠方法。實驗中先用抗~90 子鏈抗體吸附到塑膠 96 微孔盤中，用以捕捉血清檢體中的 IgM 抗體，當加入特異性病毒抗原及酵素標記抗體後，可證實特異性 IgM 的存在。現已廣泛用於病毒感染的早期診斷。在先天性感染中，IgM 不能通過胎盤，新生兒血清中若發現抗病毒 IgM，表示為子宮內感染。

四、病毒分生診斷

(一)核酸雜交(nucleic acid hybrid-ization)

臨床病毒學中快速診斷方法通常是檢測檢體中的病毒抗原，然而核酸分子雜交技術則具有高度敏感性和特異性的優點，例如點雜交法(dot hybridization) 廣泛用於檢測呼吸道檢體及尿檢體中的病毒核酸。檢體滴加到硝酸纖維素膜上，病毒 DNA 結合到膜上，在原位上進行鹼變性處理後，再利用螢光標記的已知病毒 DNA 片段與之雜交，兩條單股核酸依照鹼基互補原則結合成雙股，經螢光訊號偵測，陽性結果出現圓點狀雜交訊號。含輪狀病毒的糞便檢體經熱變性處理，點到膜上，使用輪狀病毒體外轉錄的螢光標記探針做點雜交，其結果敏感性高於 ELISA。腸道病毒也可用互補的 DNA 探針做點雜交。目前核酸分子雜交不但用來檢測急性病人檢體中的病毒 DNA，也用於檢測不易分離培養的慢性感染、潛伏感染及多重感染病人檢體中的病毒 DNA。

(二)聚合酉每連鎖反應(polymerase chainreaction; PCR)

一種體外核酸片段擴增法。先將待測檢體中的病毒 DNA 加熱變性為單股 DNA 用以做為模板；若為 RNA 病毒，則序列需先經反轉錄酉每的作用轉錄成 cDNA 模板。加入一對人工合成的引子，此對引子分別與模板 DNA 兩端各 20 個鹼基互補，在耐熱 DNA 聚合酉每作用下，使四種去氧核甘三磷酸(dNTP)按照 5'端向模板 3'端延伸 DNA 鏈，經 25-40 個循環後，可使 1 個拷貝(copy)的核酸擴增至 106 拷貝以上。經跑膠電泳及 ethidium bromide 的化學物質作用，利用其會與 DNA 嵌合，經紫外燈照射時會發出肉眼可見的螢光，即在電泳膠片上會呈現具有特定分子量的 PCR 基因片段的產物。此法較核酸雜交更敏感且快速，目前已應用於肝炎、AIDS、疱疹病毒感染的診斷上，尤其適用於不易分離培養及含量極少的病毒檢體。此外還可進一步利用核酸定序(sequencing)分析病毒核酸組成、基因組構造及序列同源性比較等等。

(三)即時定量 PCR (real-time quantitative PCR)

近年來，利用 real-time PCR 技術進行病毒檢驗的實驗室越來越多。PCR 與 real-time PCR 應用的原理大致是相同的，但其中最大的差異則是 PCR 是在反應全部完成後，另外在電泳膠片呈現結果，而 real-time PCR 則是 PCR 反應進行當中，多準備一段探針，探針上面接上螢光訊號物質與抑制物，螢光訊號與抑制物因在探針上距離過近，因此無法偵測或是偵測範圍不同(受到抑制物影響螢光、吸光不同)，當聚合酉每作用到探針位置時，聚合酉每上的 exonuclease 可將探針逐一移除，使螢光與抑制物分開，而可被偵測。由於機器利用螢光偵測技術與電腦分析記錄 PCR 的反應結果，所以當反應完成時，檢驗結果也就立即呈現。

傳統 PCR 在結束後，必須配製置電泳膠片，將已完成的 PCR 產物經由約半小時的電泳、ethidium bromide 染色及照相步驟，最後依照分子量大小，進行定性分析。整個過程比較繁瑣耗時，容易造成 PCR 產物的污染，進一步影響實驗結果的判讀。而 real-time PCR 除了可避免以上缺點外，還可以進一步透過電腦分析得到更敏感且更準確的定量病毒核酸(copies/mL)。

結 語

綜合上述病毒診斷四大方向的介紹，各有其優缺點，比較如表二[4]。正確的診斷是有效治療的基礎，病毒實驗室成立的目的即在於提供更快速且正確的臨床診斷報告。拜分子生物學技術不斷地研發創新之賜，多種新的鑑定技術陸續發展出來，例如超高密度基因晶片技術或多重即時定量 PCR 的研發，將可能實現在短

時間內一次偵測多種病毒的理想。使用更正確、低價且高效率的診斷技術，應用於臨床病毒常規檢測上，將可對病毒感染的正確診斷與治療，甚至公共衛生上的感染防治等重要問題，提供很大的幫助。

表一 分離病毒所需細胞種類

種類	細胞名稱	可培養之病毒
初代細胞培養 (Primary cell culture)	Monkey Kidney	Influenza virus, parainfluenza virus, enterovirus
	Rabbit Kidney	Herpes simplex virus (HSV)
雙套體細胞培養 (Diploid cell culture)	Fibroblast	Cytomegalovirus, VZV, HSV, enterovirus, adenovirus, RSV
連續性細胞培養 (Continuous cell culture)	HEp-2	RSV, adenovirus, HSV, parainfluenza virus, enterovirus
	A549	Adenovirus, HSV, enterovirus
	MDCK	Influenza virus
	LLC-MK2	Parainfluenza virus
	Rhabdomyosarcoma(RD)	Coxsacki virus

註：摘自參考文獻 [1]

表二 比較病毒診斷方法之優缺點

方法	檢測時間 ^a	檢測效能 ^b	優點	缺點
病毒培養	3-7 天	低	廣泛測定所有病毒 病毒可以重新解凍培養	1. 具有感染力的病毒才可以培養 2. 需經驗與技巧 3. 需花費較長時間 4. 需生物安全櫃設備
抗原鑑定	2 小時-1 天	中	快速	1. 需要完整細胞 2. 需經驗與技巧 3. 病毒不可以重新培養 4. 單株抗體需花費較高成本
抗體鑑定	15 分鐘-1 天	高	快速 不須特殊技巧 安全	1. 需成對血清 2. 結果需追溯 3. 無法直接反映爆發疫情
分生診斷	4-5 小時	高	敏感且具特異性 可進一步進行分子生物分析	1. 試劑成本昂貴 2. 特殊儀器與設備 3. 需經驗與技巧 4. 病毒不可以重新培養

^a 從接到檢體時間到發出結果報告時間 ^b 在一個單位時間內所處理的檢體數

註：摘自參考文獻 [4]

參考文獻

1. Kenneth M: Diagnostic virology. In: David MK, Peter MH, eds. Fields Virology. 2nd ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins. 1990:411-21.
2. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA: Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. J Clin Microbiol 1985;21:217-21.
3. Joanna SE, Maria CZ: Molecular diagnosis of influenza. Rev Med Virol 2002;12:375-89.
4. Steven S, Richard LH, Stephen AY: Clinical Virology Manual. 3rd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2000:69-152.