

計畫編號：DOH92-DC-2026

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

建立以增幅 RNA 為基礎之登革熱病毒與呼吸道病毒快速檢測法

## 研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：詹麗蓉

研究人員：鞏喬琪、林建州、郭郁中、舒佩芸

執行期間：92 年 1 月 1 日至 12 月 30 日

\*本研究報告僅供參考不代表衛共共生署疾病管制局意見\*

## 一、前言

近年來台灣地區已成為登革熱病毒的駐足之處，光復後台灣地區已發生多次的流行，民國 70 年位於西南海域的小琉球曾遭第二型登革熱病毒侵襲，76 年 9 月靠近小琉球的屏東東港發現第一型病毒流行，隔年高屏地區則發生了一次大流行，確定病例達 4,389 個，主要為第一型。此後斷斷續續台灣每年均會發生一些小流行，多數發生在高雄縣與屏東縣，主要為第一型，少數為第二、三或四型；民國 81 年台北市首次發生流行，84、85 年亦出現兩次小流行，主要為第一或第三型病毒；民國 83 年台南市首次發現登革熱病毒流行，屬於第一型，89 年則有第四型病毒的流行；台中市在民國 84 年亦曾有一次第二型病毒的小流行；91 年高雄縣市則爆發民國 76~78 年以來最大的流行，為於第二型病毒，確定病例數達 5294 例。登革熱病毒感染的診斷目前多採用簡單、快速之血清 IgM 鑑定法，但血清 IgM 需採恢復期血清確診且感染初期有數天之空窗期，因此當監測檢體需快速鑑定或進一步調查時採用高特異性與高敏感度之分子檢測法可補傳統檢測方法之不足而改善登革熱病毒監測系統功能，以期爆發流行時能早期偵測，及早處置避免疫情擴大且可使病人及時得到適當之處置。

已有許多報告有效應用分子診斷系統來檢測登革熱病毒，反轉錄酶-核酸合成酶連鎖反應法(RT-PCR)應用最廣，但為達到高敏感度此法常需使用 2-step 的 nested 增幅步驟，不但耗時且增加偽陽性機會。近年來發展之 TagMan

RT-PCR 法對此有所改善，在核酸增幅過程中即可及時 (real-time)由電腦螢幕偵測到標的序列，不需使用 nested 增幅步驟，但此法乃需 thermal cycling 步驟 (PCR 反應)。本計畫擬應用一新近發展且較適用於臨床常規檢驗之分子診斷系統來快速檢測登革病毒—以核酸為基礎之 RNA 增幅法 (NASBA, Nucleic Acid Sequence Based Amplification)，NASBA 法中使用的二條 primer，一條 5' 端帶有 T7 RNA 合成酶 promoter 序列，另一條則尾端含有 generic 序列，共用三種酵素 AMV (Avian Myoblastosis Virus) 反轉錄酶、RNase H 與 T7 RNA 合成酶協同作用，只需進行恆溫反應(isothermal)單一步驟，不需進行 PCR 反應，90 分內即可將 RNA 增幅至  $10^9$  (Fig.1)，此法敏感度與 TagMan RT-PCR 法相當，因增幅之核酸為 RNA 故不受 genomic 雙股 DNA 影響，與 RT-PCR 相較特异性更高。其最終產物為單股 RNA，由於每條 RNA 增幅產物尾端均帶有一 generic 序列，因此所有之 RNA 增幅產物全可被一帶有 ruthenium 標記之 generic 探針偵測到，最後再用結合有磁珠之標的特異性抓取探針(capture probe)抓取 RNA 增幅產物，以 ECL (Electrochemiluminescence)冷光測試儀偵測後由電腦計算後輸出結果(Fig.2)，ECL 具高敏感度且適用範圍廣檢體不需稀釋即可定量，因此定性與定量可同步完成。核酸之萃取採用 Boom 氏 silica 萃取法，可同時萃取 RNA 與 DNA，檢體適用範圍廣，各類檢體包括血清、血漿、血球、全血、唾液、痰、鼻腔分泌物、喉拭子、鼻咽拭子等與身體各類組織均可直接使用，檢體體積則由 100ul~2ml 均可適用。核酸萃取可由人手操作也可自動化，自動化核酸萃取儀一次可操作 10 隻檢體，一次 45 分鐘，8 小時約可

處理 80~100 隻檢體，為一密封濾膜式 cartridge 操作系統。可避免檢體間及與環境的污染。

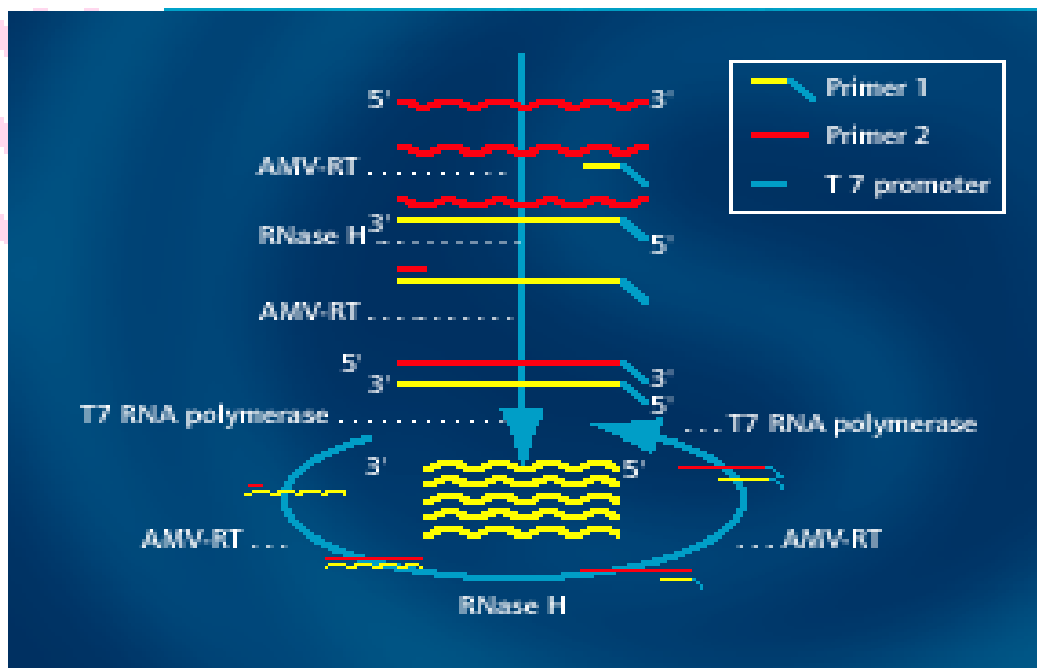


FIG. 1

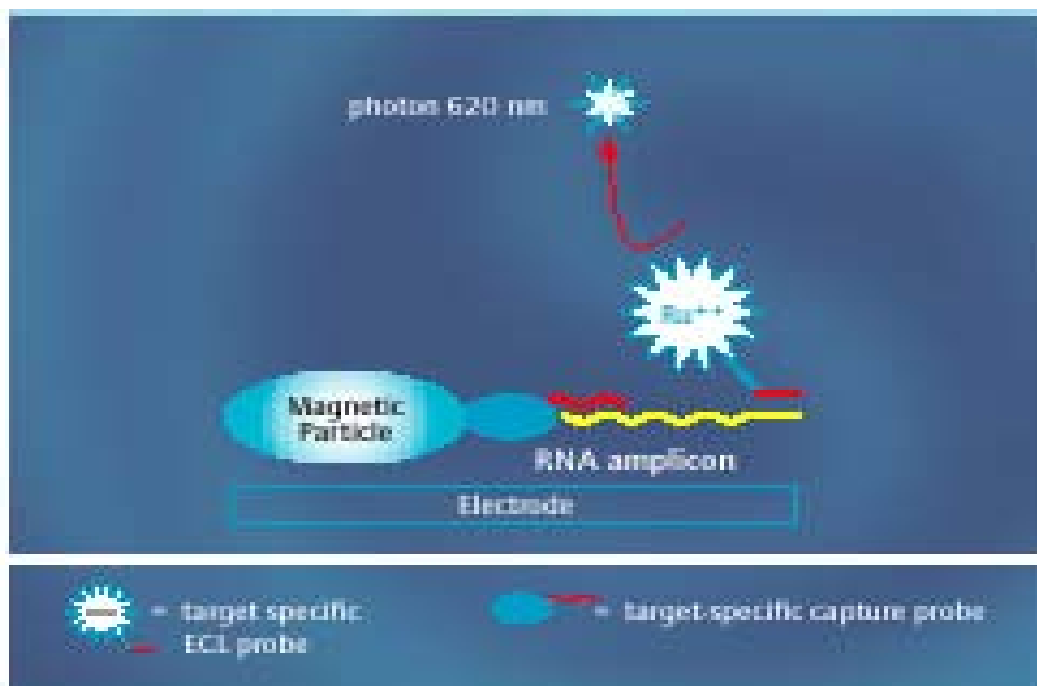


FIG. 2

## 二、材料與方法

**血清檢體.** 選取 2002 年發生於高雄縣市之登革病毒 RT-PCR 強陽性患者血清檢體 46 個 (儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 與疑似或血清確診之登革患者血清檢體 108 個 (儲存於  $-80^{\circ}\text{C}$ )，包括 RT-PCR 陽性，血清確診陽性；RT-PCR 陽性，血清確診陰性；IgM 陽性，RT-PCR 陰性等檢體，這些檢體均是發病 1~10 天內收集的血清，登革病毒陽性血清對照為陰性血清加入登革病毒。

**病毒株.** 已知型別之四型登革病毒各 5~7 株，一型 6 株、二型 7 株、三型 5 株、四型 6 株，均為 1988 年以來之臺灣分離株。這些病毒株主要用來建立登革病毒 NASBA 檢測法，測試 NASBA 偵測登革病毒基因與分型之能力。

**NASBA 檢測法.** 使用 Nuclisens 基礎試劑套組 (Basic Kit, bioMerieux bv, NL)，包括核酸分離試劑組、核酸增幅試劑組與核酸偵測試劑組。套組中以 Boom 氏法淬取病毒 RNA，使用 100  $\mu\text{l}$  血清，最終淬取出之病毒 RNA 體積為 50  $\mu\text{l}$ ；淬取出之登革病毒 RNA 再進行 NASBA 反應：取 5  $\mu\text{l}$  之病毒 RNA 加入 10  $\mu\text{l}$  核酸增幅試劑與 5  $\mu\text{l}$  酶混合液，使其最終含 40 mM Tris (pH 8.5)，12 mM  $\text{MgCl}_2$ ，70 mM KCl，5 mM dithiothreitol，dATP，dCTP，dGTP 與 dTTP 各 1 mM，ATP，CTP，與 UTP 各 2 mM，1.5 mM

GTP, 0.5 mM ITP, 0.1 mg/ml BSA, 1.5M sorbitol, 0.08U RNase H, 32 U T7 RNA 合成酶 與 6.4 U avian myeloblastosis virus 反轉錄酶 (AMV-RT), P1 與 P2 引子各 2 mM 與 15% dimethyl sulfoxide (DMSO). P1 引子序列為 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGACAGCAGGATCTCTGG TCT-3'; P2 引子序列則為 5'-GATGCAAGGTCGCATATGAGGGTTAGAGGAGACCCC TCCC-3'. 反應於 41°C 進行 90 分, 產物為單股 RNA。核酸增幅產物之偵測採用 ECL (Electrochemiluminescence) 冷光系統, 其過程為單一雜交反應 (hybridization Reaction) 同時含有二種探針, 偵測探針 (detector probe) 與抓取探針 (capture probe), 二者分別與 RNA 產物在不同位置雜交。雜交反應中含有 5 ml 1:20 稀釋之 RNA 增幅產物,  $2 \times 10^{12}$  copies 結合有磁珠之抓取探針與  $2 \times 10^{12}$  copies 標記有 ruthenium 之偵測探針; 最終體積為 25 ml 使含有 0.75 M NaCl, 75 mM sodium citrate 與 BSA 0.8 mg/ml, 反應於 60°C 進行 5 分後再 41°C 進行 30 分即可以 ECL 冷光偵測儀 (ECL reader) 偵測 (bioMerieux bv, NL)。由於 P2 引子 5' 端帶有一偵測探針序列, 因此 ruthenium 標記之偵測探針即可吸附至所有的 RNA 增幅產物, ruthenium 為 ECL 訊號之來源; 抓取探針具標的特異性 5' 端結合有磁珠, RNA 增幅產物若為其標的物抓取探針亦可吸附上, 此雜交反應形成之複合物以 ECL 冷光偵測時因磁珠之故被吸引至電極, ruthenium 受冷光照射後引發連串光反應傳輸至電腦計算後輸出結果。本研究使用之登革病毒抓取探針位於病毒基因 5' 端非蛋白轉錄區

(Non-Coding Region, NCR)，登革病毒特異抓取探針序列為 5'-AAACAGC  
ATATTGACGCTGGG-3'，型特異抓取探針序列分別為 5'-GGGAAGCTGTATCCT  
GGTGGTAAGG -3' (第一型)，5'-ATGAAGCTGTAGTCTCACTGGAAG-3'(第二  
型)，5'-AGGGAAGCTGTACCTCCTTGCAAAG-3'(第三型)，與 5'-GAGGAAGCTGT  
ACTCCTGGTGGAAG-3'(第四型)。

**Tagman 檢測法。** 本法為登革熱病毒實驗室之常規檢驗，使用之登革病毒  
特異引子位於核蛋白基因上，一條正股引子，逆股引子則有二條混合（詳  
問舒佩芸）。儀器使用Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System  
(Stratagene)。



## 結果

為建立與評估登革病毒 NASBA 檢測法偵測登革病毒基因與分型之能力，本研究選取 1988 年以來於臺灣所分離已知型別之登革病毒株共 25 株(第一型 6 株、第二型 8 株、第三型 5 株與第四型 6 株)進行 NASBA 反應，結果顯示登革病毒核酸與型別均可正確測出，一般而言，登革病毒特異性抓取探針之敏感度均高於型特異性抓取探針，尤其是在第一型，但在某些病毒株其型特異性抓取探針之敏感度卻反高於登革病毒特異性抓取探針，第二型中即可見到 2 株(表一)。四種型特異性抓取探針分別對四型病毒之雜交反應顯示第一型與第四型間及第二型與第三型間有交叉反應，但不同型間之交叉反應遠低於同型間之反應，第四型病毒與第一型特異性抓取探針之交叉反應最高，其 ECL 訊號可達第四型特異性抓取探針之 40%；第一型病毒與第四型特異性抓取探針之交叉反應次之，其 ECL 訊號最高可達第一型特異性抓取探針之 10%，第二型與第三型間之交叉反應只發生於某些病毒株，第二型或第三型病毒株中各有一株與第三型或第二型特異性抓取探針交叉反應之 ECL 訊號可達同型抓取探針之 15%，因此型特異性抓取探針與不同型登革病毒間雖有交叉反應但型別均可正確區分。

為評估 NASBA 檢測法偵測臨床血清檢體中登革病毒基因之能力，本研究選取了 46 個已知為登革病毒 RT-PCR 強陽性之血清檢體進行

NASBA 法，結果亦明確顯示均為登革病毒陽性。為了進一步評估 NASBA 檢測法之敏感度本研究另外再選取了 108 個 2002 年發生於高雄縣市之登革熱患者血清同時進行 NASBA 與 Tagman 檢驗，結果顯示 108 個檢體中有 101 個結果相符(93.52%)，其中有 10 個檢體二測試法均呈現陽性，此 10 個檢體中有 7 個 PCR 檢測法亦為陽性，2 個為陰性，1 個則未測試；其餘 91 個檢體則二測試法均呈現陰性，其中 46 個 PCR 檢測亦為陰性，31 個為陽性，14 個未測試。7 個二測試法結果不相符之檢體(6.48%)中有 5 個檢體 NASBA 檢測陽性但 Tagman 檢測陰性，5 個中有 2 個經血清學證實為陽性，3 個無法判讀(PCR 均為陽性)；其餘 2 個則 NASBA 檢測陰性但 Tagman 檢測陽性，1 個經血清學證實為陽性(PCR 亦陽性)，另 1 個無法判讀(PCR 陰性，IgM 陽性，但第 15 天之血清 IgG 陰性)，但診斷為陰性之機率高，即 Tagman 檢測結果很可能為假陽性。選取 35 個檢體(Tagman 與 NASBA 測試法結果不相符之檢體 7 個與結果相符之檢體 28 個)，互換其 RNA 分別以二法再測試，結果顯示有 2 個檢體 Tagman 法測試為陽性但其 RNA 若以 NASBA 法測試卻呈陰性，1 個檢體 NASBA 法測試為陽性但其 RNA 以 Tagman 法測試則呈陰性；其餘 32 個若 NASBA 法檢測陽性則其 RNA 以 Tagman 法檢測亦為陽性，反之亦然，此結果顯示 1. Tagman 與 NASBA 法敏感度相近，有些檢體 NASBA 法較佳，有些檢體則 Tagman 法較佳。2. Boom 氏 RNA 萃取法優於一般 RNA 萃取法。此 108 個檢體中經血清學證實者只有 58 個(其中 46 個為陽性，13 個為陰性)，

18 個 IgM 為陽性，但無恢復期血清可供判定，其餘 32 個無法判定(表二)。

## 討論

NASBA 與 Tagman 檢測法結果不相符之 7 個檢體，互換其 RNA 分別以二法再測試之結果顯示有 1 個血清証實為陽性之檢體 NASBA 法檢測雖為陽性但其 RNA 以 Tagman 法檢測卻呈陰性，而 Tagman 檢測法呈現陰性之 RNA 若以 NASBA 法檢測則乃為陰性，此現象表示二檢測法結果之差異在使用之引子基因位置不同或 NASBA 法敏感度較高而非 RNA 之粹取。但二測試法結果相符之 28 個檢體互換其 RNA 之結果卻顯示有 2 個檢體 Tagman 法測試為陽性但其 RNA 以 NASBA 法測試卻為陰性，而 NASBA 法檢測為陰性之 RNA 若以 Tagman 法檢測則乃為陰性，表示二檢測法結果之差異在使用之引子基因位置不同或 Tagman 法敏感度較高，其中 1 個血清學証實為陽性(PCR 陰性)，但另 1 個則結果無法診斷(發病第 3 天血清-PCR 陰性，IgM 陰性、IgG 陽性)，但診斷為陰性機率高，即 Tagman 檢測結果很可能為假陽性。

NASBA 與 Tagman 檢測結果相符之檢體中有 12 個血清學診斷為陰性之檢體以二法測試均呈現陰性但 PCR 檢測卻為陽性，也有 4 個血清學診斷為陽性之檢體，PCR 檢測為陽性但 NASBA 與 Tagman 均為陰性，另有 2 個血清學診斷為陽性之檢體，PCR 檢測為陰性但 NASBA 與 Tagman 法均為陽性。由於檢體量不足再測 PCR，此結果顯示 PCR 法之假陽性數高於 NASBA 與 Tagman 法，PCR 法敏感度有時似乎高於 Tagman 與 NASBA

法，但同一檢體之 PCR 與 Tagman 或 NASBA 法並非同時測試，這些檢體經過 4°C 或 -20°C 保存數月最後儲存於 -80°C，經過凍結、解凍，若檢體中登革病毒含量低即可能很難再偵測到。

## 結論與建議

1. 建立登革病毒基因與型別NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) RNA 增幅檢測法。
2. 選取 108 個 2002 年發生於高雄縣市之血清檢體同時進行 NASBA 與 Tagman 檢驗，結果顯示 101 個結果相符(93.52 %)之檢體有 10 個二測試法均呈現陽性，91 個檢體二測試法均呈現陰性，而 7 個結果不相符(6.48 %)之檢體有 5 個 NASBA 法呈現陽性，但 Tagman 法卻呈現陰性，2 個 NASBA 法呈現陰性，但 Tagman 法卻呈現陽性
3. 交換 NASBA 與 Tagman 測試法之 RNA，分別以二法再測試之結果顯示 Boom 氏 RNA 萃取法優於一般 RNA 萃取法，Tagman 測試法與 NASBA 測試法敏感度相近，有些檢體 NASBA 法較佳，有些檢體則 Tagman 法較佳，敏感度與二測試法使用之引子基因位置不同有關。
4. 弱陽性檢體若能同時進行 NASBA 與 Tagman 檢測法對發病初期之快速診斷很有幫助。RNA 增幅產物可同時進行登革病毒基因檢測與定型且靈敏度不受影響。
5. Boom 氏 RNA 萃取法雖較優但步驟較多宜自動化。

## 參考文獻

Lanciotti RS, Kerst AJ: Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assays for Rapid Detection of West Nile and St. Louis Encephalitis Viruses. *J.Clin. Microbiol* 2001; 4506-4513.

L.Wu S-J, Lee EM, Putvatana R, Shurtliff RN, Porter KR, Suharyono W, Watts DM, King C-C, Murphy GS, Hayes CG, Romano JW: Detection of Dengue Viral RNA Using a Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Assay. *J.Clin. Microbiol* 2001;39:2794-2798.

Blackburn, GF, Shah HP, Kenten JH, Leland J, Kamin RA, Link J, Peterman J, Powell MJ, Shah A, Talley D B, Tyagi SK, Wilkens E, Wu TG, Massey RJ: Electrochemiluminescence detection for development of immunoassays and DNA probe assays for clinical diagnostics. *Clin. Chem* 1991;37:1534–1539.

Boom R., Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noorda J: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol* 1990; 28:495–503.

Chan A, Fox JD: NASBA and other transcription based amplification methods for research and diagnostic microbiology. *Rev. Med. Microbiol* 1999;10: 185-196.

Compton, J: Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 1991;350:91- 92.

Houng HS., Hritz H.D, Kanesa-thasan N: Quantitative detection of dengue 2 virus using fluorogenic RT-PCR based on 3'-noncoding sequence. *J. Virol. Methods* 2000;86:1–11.

Sudiro TM., Ishiko H Green S., Vaughn DW, Nisalak A., Kalayanarooj S, Rothman A L, Raengsakulrach B, Janus J, Kurane I, Ennis F.: Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *Am. J. Trop Med. Hyg* 1997; 56:424–429.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV: Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol* 1992; 30:545–551.

Harris E., Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A:

Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol* 1998; 36:2634–2639.

Huchon GJ, Gialdroni-Grassi G, Leophonte P, Manresa F, Schaberg T, Woodhead M: Initial antibiotic therapy for lower respiratory tract infection in the community: A European survey. *Eur. Resp. J* 1996;9:1590-1595.

Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P: NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J. Virol* 1991;Methods 35:273–286.



表一

Dengue virus strains	Sample volume	Group specific probe D ECL signal	Type 1 specific probe T1 ECL signal
D1-1	100ul	10000001	501658
D1-2	100ul	211320	660298
D1-3	100ul	933854	212666
D1-4	100ul	10000001	463545
D1-5	100ul	199334	49320
D1-6	100ul	10000001	2198303
RS		29859	
ANWT		180	
Type 2 specific probe T2			
D2-1	200ul	10000001	10000001
D2-2	100ul	1552341	1681879
D2-3	100ul	700197	220456
D2-4	200ul	1359458	10000001
D2-5	100ul	1614147	10000001
D2-6	100ul	10000001	10000001
D2-7	50ul	261099	402894
D2-8	100ul	10000001	2111979
RS		27386	
ANWT		171	
Type3 specific probe T3			
D3-1	100ul	2041245	1912927
D3-2	100ul	10000001	2187931
D3-3	100ul	2050821	1569262
D3-4	50ul	488620	519999
D3-5	100ul	1831747	1554886
RS		24023	
ANWT		143	
Type4 specific probe T4			
D4-1	100ul	10000001	2234152
D4-2	200ul	10000001	10000001
D4-3	50ul	2260034	1632942
D4-4	50ul	2130820	1683325
D4-5	50ul	743980	708654
D4-6	50ul	10000001	10000001
RS		33242	
ANWT		202	

\* RS : Reference Standard

\* ANWT : Assay Negative Wild Type

表二

Sample No				NASBA	Tagman	PCR	Serology Confirmed				
							Positive	Negative	IgM	?	
108	7	5	4	+	-	+	1/4	none	none	1/3	
			1	+	-	-	1/1	none	none	none	
		2	1	-	+	+	1/1	none	none	none	
			1	-	+	-	0/1	none	none	1/1	
	101	10	7	+	+	+	7/7	none	none	none	
			2	+	+	-	1/2	none	1/2	none	
		1	+	+	ND	0/1	none	1/1	none		
	91	31	31	-	-	+	5/31	11/31	4/31	11/31	
			46	46	-	-	-	22/46	2/46	8/46	14/46
				14	-	-	ND	7/14	none	4/17	3/17

