

流感病毒快速檢驗試劑 Inlu A · B-Quick “SEIKEN”之檢驗效能評估

摘 要

流行性感冒病毒(流感病毒)具有高度傳染力，為台灣地區每年最活躍的致病微生物之一，每年均會造成許多老年人及幼童上呼吸道感染，有些甚至會併發肺炎、腦炎、腎炎及新陳代謝問題等重大病症，嚴重者甚致會導致死亡，對於患者之生命安全極具威脅⁽¹⁻²⁾。傳統的流感病毒檢驗方式（細胞培養、免疫螢光染色法、血清試驗等）由於需要很長的時間才可以獲得檢驗結果且須專業人員的操作，對於一般醫院診所在臨床診斷上並無太大的助益，所以對於流感病毒的快速及專一性檢驗診斷技術的研發，一直是臨床醫學與公共衛生界共同的心願，不僅可以有效控制疾病的爆發流行，對於病人的照護、感染控制、藥物使用、及其他臨床上的相關處理亦有著相當重要的影響，是當前傳染病防治工作上急需發展的一項新技術。

前 言

病毒分離確認一直是檢測流感病毒的黃金準則，但是病毒分離需要複雜的實驗室步驟及大量的時間，因此研發快速的流感病毒診斷方法，避免全球性的大流行，一直是傳染病防治工作的重點。近年來，利用分子生物學所發展的反轉錄聚合酶連鎖反應（RT-PCR）檢驗技術，在流感病毒檢測時效上確實能對檢驗人員提供良好的協助。不過，雖然以 RT-PCR 檢測流感病毒的特異性 RNA 靈敏度高且快速，但是這項技術需要特殊設備及專業人員的操作，使得這項技術難以做為臨床實驗室的例行診斷工作。為克服這項困難，新近有生技公司研發出一種新型流感病毒快速檢驗試劑 Inlu A · B-Quick “SEIKEN”，可以簡單快速的檢測 A 型和 B 型流感病毒病原體，利用酵素免疫法(EIA) 檢測流感病毒共同核蛋白的特異性單株抗體，可以快速檢測喉嚨（throat swab）、鼻咽棉棒（nasopharyngeal swab）、及鼻腔抽

取液 (nasopharyngeal aspirate) 等臨床檢體中的 A 型與 B 型流感病毒，可以做為臨床檢驗上的另一個新的選擇，提供快速又正確的專一性檢測及判定結果。在本篇文章中，我們將對此一新售流感檢驗試劑進行測試，評估其對於目前 A 型及 B 型流感病毒的檢驗能力。

材料與方法

檢體

以與本局長期合作的台北市區的 4 個醫療院所之門診病患為研究對象，當患者產生下列部份或全部症狀，包括高燒超過 38.5°C、咳嗽、喉嚨痛、頭痛、肌肉酸痛及流鼻水等時，在發病日起三到五日內以咽喉拭子採取上呼吸道檢體，並以病毒運送培養基將檢體以低溫 (4°C—8°C) 送至本局呼吸道病毒檢驗室，進行病毒培養、分離與鑑定。

病毒培養

將咽喉拭子與 1ml 運送培養液充分攪拌，使病毒自棉棒脫離至培養液中，將培養液取出，經 0.45 μ m 過濾膜過濾後，取 100 μ l 檢體接種至培養管 (culture tubes) 內的 Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞，放進 35°C 培養箱一個小時，然後加入不含胎牛血清的 DMEM 培養液 1ml、TPCK (tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone) treated trypsin (2 μ g/ml) (Sigma, St. Louis, Mo.)、及抗生素。每天觀察細胞是否有細胞病變 (cytopathic effect, CPE)，觀察期為 14 天，若細胞出現 CPE，則立即離心收取上清液，沉澱下來的細胞碎片以 1 ml PBS 洗下存於 4°C 冰箱；其他至第 7 天細胞沒有出現 CPE 的培養管，則更換培養管內的培養液，繼續觀察至觀察期結束。之後將細胞由培養管上刮除，固定於玻片上進行免疫螢光染色。

MDCK 細胞本身之繼代培養不超過 25 代，且使用各種不同濃度之標準病毒液及陰性對照組進行感染細胞培養，以檢查比對 MDCK 細胞的敏感度是否有異。

免疫螢光染色法

將接種檢體之細胞培養管以 3000 rpm 離心 15 分鐘收取上清液，並將離心沉澱之疑似感染細胞以間接免疫螢光染色法（indirect immunofluorescence assay, IFA）染色後，以螢光顯微鏡進行鏡檢，細胞質出現蘋果綠(apple green) 螢光則判定為流感病毒陽性。

Influ A · B-Quick

Influ A · B-Quick 試劑是由日本 SEIKEN 廠商所研發的一種流感快速檢驗試劑套組，其檢測原理是利用酵素免疫法(EIA)，使用流感病毒共同核蛋白的特異性單株抗體，以快速檢測咽喉、鼻咽拭子、及鼻腔抽取液中的 A 型或 B 型流感病毒。操作過程是依循製造廠商的檢驗操作步驟來進行，將檢體採樣棉棒浸入套組所提供之檢體緩衝溶液中，以 vortex 混合均勻後將棉棒取出，檢體以內附的濾膜蓋過濾，未經過濾的檢體可能會導致偽陽性的結果。整個試驗均在室溫的環境中操作，將已經過濾的檢體，分別滴入已標記 A 與 B 檢測孔之檢測盤中，等檢體完全滲入檢測孔後，再滴入 5 滴試劑組提供之 A 型及 B 型抗體進行酵素連結反應。待試劑完全滲入檢測孔後，再滴入 5 滴試劑組所附之清洗液進行 wash 步驟，之後加入 5 滴呈色液進行呈色步驟，整個過程於 15 分鐘內即可完成，檢驗結果的目測判讀在終止劑加入後約 5 分鐘時進行，檢測盤的 A 與 B 檢測孔中，都應出現紫紅色呈色圓點，才算是有效的檢驗，如未出現呈色點，則將結果列為無法判讀(indeterminate)。檢驗的過程是由另一位不知細胞培養及螢光染色結果的檢驗人員負責進行，以避免產生實驗偏差(bias)。

RT-PCR

以 QIAGEN 的 QIAamp Viral RNA Kit 進行 RNA 的萃取，於 560 μ l Buffer AVL 中加入 140 μ l 的檢體於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 μ l 高純度酒精混合完全(vortexing)，將混合液通過 QIAamp spin column，column 以緩衝液 AW1 及 AW2 清洗，再以純水 (RNase free water) 將 RNA 溶出，將

備製好的RNA應用於反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)。本研究參考國內外之期刊及本實驗室之經驗，選用的核酸引子 (primer) 分別是根據A型流感病毒表面核蛋白 (nucleoprotein)及B型流感病毒的 3' HA1 高保守的片段所設計⁽³⁻⁴⁾，可用來對流感病毒之AB型別進行分辨，但是無法做更進一步的次分型工作。

Reverse Transcription 反應 (follow Promega RT procedure)

1.取 15 μ l 抽出之 RNA 溶液，以 70 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，打開 RNA 二級結構

2.加入混合液如下列：

RNA template	15 μ l
5X buffer	8 μ l
100mM dNTP mix	0.5 μ l
RTase (200u/ μ l)	1 μ l
Random primer (0.1 μ g/ μ l)	1 μ l
H ₂ O	14.5 μ l
Final volume	40 μ l

置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫槽 60 分鐘後，立即進行 PCR 反應或存於-20 $^{\circ}$ C

PCR反應 (follow Qiagen PCR core kit procedure)

1.使用之 primer sequence:

A Anp-1 5'- ATC ACT CAC TGA GTG ACA TC -3'

Anp-2 5'- CCT CCA GTT TTC TTA GGA TC -3' (306 bp)

B BHA+ 5'- CGA ATC TGC ACT GGG ATA ACA TC -3'

BHA- 5'- TGC ACC ATG TAA TCA ACA ACA A -3' (751 bp)

2. PCR 反應混合液如下所示：

cDNA template	5 μ l
5X Q solution	10 μ l
10X buffer	5 μ l

25mM MgCl ₂	4μl
10mM dNTP	4μl
Primer1 (10 pmole/μl)	1μl
Primer2 (10 pmole/μl)	1μl
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.5μl
H ₂ O	19.5μl
Final volume	50μl

3. PCR program 如下所列：

94°C	2 分鐘	
94°C	1 分鐘	← 40 cycles
52°C	2 分鐘	
72°C	3 分鐘	
72°C	7 分鐘	
4°C	∞	

4.1.5% agarose gel, 100V 進行電泳層析, 30 分鐘後取出, 以 ethidium bromide 染色 3 分鐘, 再以清水清洗去染 (destain) 3 分鐘, 以顯像系統進行判讀。

分 析

所有經細胞培養後, 以免疫螢光染色法鑑定為陽性之檢體均視為陽性; 而細胞培養為陰性, 但是經抗原檢測試劑 (Influ A · B-Quick 試劑) 或是 IFA 檢驗為陽性之檢體, 則以 RT-PCR 來檢測這些檢體是偽陽性 (false positive) 或是真陽性 (true positive)。Influ A · B-Quick 快速檢驗試劑的敏感度 (sensitivity)、精確度 (specificity)、陽性及陰性預測值 (positive and negative predictive values) 將以 2 X 2 表來計算。

結 果

Influ A · B-Quick 試劑組目前可檢測的人類 A 型與 B 型流感病毒型別詳如表 1，因台灣目前尚未由廠商正式引進本項產品，所以本次測試評估只以一盒試劑組所能進行之檢驗量為限，總共收集了 20 支經醫師診斷符合病例定義之病人的咽喉拭子。

病人的年齡層分佈主要以學齡兒童為主，年齡分佈分別為 2-5 歲的有 5 人，6-12 歲的有 9 人，13-18 歲的有 4 人，19-50 歲有 1 人，>50 歲有 1 人，性別比例方面為男：女=1：1 (10:10)。

20 支臨床檢體經由細胞培養為陽性反應之檢體一共有 8 支，其中 6 支為 A 型流感病毒，2 支為 B 型流感病毒。6 支陽性 A 型及 2 支 B 型流感病毒分別為 A/panama/- (H3N2)及 B/Hong Kong/-。Influ A · B-Quick 試劑之檢驗結果列於表二中，6 支由細胞培養為 A 型流感病毒陽性之檢體，Influ A · B-Quick 檢測出 5 支；而 2 支由細胞培養為 B 型流感病毒之檢體，Influ A · B-Quick 亦都檢測出為 B 型流感病毒。有 1 支 A 型流感病毒經細胞培養為陽性之檢體，Influ A · B-Quick 之檢測結果為陰性。

與細胞培養結果比較，Influ A · B-Quick 檢驗試劑對 A 型流感病毒的敏感度、精確度、陽性預測值、及陰性預測值分別為 83.3%、100%、100%、及 92.3%，對 B 型流感病毒的敏感度、精確度、陽性預測值、及陰性預測值均為 100%。12 支經細胞培養結果為陰性的檢體，經由免疫螢光染色法及 RT-PCR 的檢驗結果亦均為陰性(表三)。Influ A · B-Quick 檢驗試劑之判讀方式與結果見附圖。

結論與討論

Influ A · B-Quick 檢驗試劑是免疫反應檢驗法中的一種新的選擇，可以即時即地的從數種呼吸道病毒中檢驗出 A 型及 B 型流感病毒，由臨床病人身上所採檢的咽喉拭子檢體，Influ A · B-Quick 試劑可以提供相當良好

之檢驗結果，尤其是對 B 型流感病毒的敏感度達到 100%，而對 A 型流感病毒也有 83.3%的敏感度。

Infl A · B-Quick試劑的檢驗步驟相當的簡單及方便，可於 15 分鐘獲得檢驗結果，而且不一定需要由專業技術人員才能操作。目前市售的各項流感病毒快速檢驗試劑中，有利用免疫螢光染色法來直接偵測抗原、或是神經胺酸酶（neuraminidase）偵測法來進行病毒的檢測工作，不過這兩種方式均不能有效的將A型及B型流感病毒分辨清楚，這對於臨床治療上有些程度上的關聯，因為臨床醫師可依據病毒型別的不同來選擇使用較為便宜但是只對A型流感有效的Amantadine (Amantadine 或 Rimantadine) 或是對於A型及B型流感均有效的的神經胺酸酶抑制劑 (例如 Zanamivir)⁽⁵⁾。

一般的免疫螢光染色法雖然可以同時偵測許多的呼吸道病毒（如 RSV、Adenovirus、parainfluenza virus、HSV、influenza virus），不過這種檢驗方法需要於實驗室進行且需有專業技術者來進行判讀與解釋。免疫螢光染色法對於 A 型流感病毒 (B 型流感病毒的報告較少) 的敏感性與特異性的報告有很大的分歧，會因檢體的種類、採檢的品質、及檢驗人員判讀的不同而有不同的敏感性與特異性。雖然在本次的評估中，免疫螢光染色法的檢驗結果優於 Infl A · B-Quick 試劑，但相對於時效上而言，一般的免疫螢光染色法很難滿足快速檢驗 A 型及 B 型流感病毒的要求。

RT-PCR檢驗技術提供了另一種檢驗A型與B型流感病毒的替代方法，具有高敏感度及特異性的優點⁽⁶⁾，不過其操作上需更高專業的技術及複雜的機器設備，在時間上也需要數小時才能得檢驗結果，不大符合目前臨床診斷上所追求快速、簡單、方便、不需專業技術人員操作的檢驗方法。

由於台灣目前尚未正式引進本組試劑組，本次的評估工作僅能以一組試劑來進行，檢體數目無法增加是本次評估工作的一個問題，容易造成評估上的誤差，但是以實驗設計上直接採用臨床檢體來進行檢測，目前又值流感流行季，該試劑精確度不論在 A 型或 B 型流感病毒均可達 100%，顯

示 Influenza A · B-Quick 試劑對於流感的快速診斷及疾病防治工作上，已能提供一定程度的資訊與協助。另外，亦可將其他呼吸道病毒，如腺病毒、呼吸道融合病毒、單純性疱疹病毒等，也納入測試範圍，以更能瞭解這項檢驗試劑對於 A 型及 B 型流感病毒的專一性程度。

總之，Influenza A · B-Quick 試劑在許多檢驗 A 型及 B 型流感病毒的方法中，確實提供了方便及相對簡單的操作模式，利用一般的咽喉拭子所採到的檢體就可以獲得相當不錯的檢驗結果。

撰稿者：邱淑君、林智暉、林永政、陳豪勇

衛生署疾病管制局研究檢驗組

參考文獻

1. Barker, WH., and Mullooly, JP. Pneumonia and influenza death during epidemics, implication for prevention. *Arch. Intern. Med.* 1982, 142:85-89.
2. Sakuma T. Infant Influenza. *Acta Paediatrica Japonica.* 1997, 39:L669-675.
3. Wright KE, Wilson GAR, Novosad D, Dimock C, Tan D, and Weber JM. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 1180-1184
4. Zou S. A practical approach to genetic screening for influenza virus variants. *J Clin Microbiol* 1997, 35: 2623-2627
5. Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, and Trout T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin. Microbiol.* 2000, 38: 2824-2828
6. Herrmann B, Larsson C, and Zwegyberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 134-138

表一 **Influenza A·B Quick**可檢測之流感病毒*

A 型流行性感冒病毒

A/PR/8/34(H1N1)	A/Fukuoka/1/70(H3N2)
A/FM/1/47 (H1N1)	A/Chiba/5/71(H3N2)
A/Omachi/1/53(H1N1)	A/Tokay/6/73(H3N2)
A/USSR/92/77(H1N1)	A/Kumamoto/22/76(H3N2)
A/Fukushima/103/78(H1N1)	A/Bangkok/1/79(H3N2)
A/Beijing/262/95(H1N1)	A/Niigata/102/81(H3N2)
A/New Caledonia/20/99(H1N1)	A/Wuhan/359/95(H3N2)
A/Murakami/4/64(H2N2)	A/Sydney/5/97(H3N2)
A/Kumamoto/1/65(H2N2)	A/Panama/2007/99(H3N2)
A/Aichi/2/68(H3N2)	

B 型流行性感冒病毒

B/Setagaya/3/56	B/Yamagata/16/88
B/Taiwan/4/62	B/Aichi/5/8
B/Amakusa/1/64	B/Mie/1/93
B/Akishima/1/64	B/Bangkok/163/90
B/Sapporo/1/65	B/Gunma/1/73
B/Tokyo/7/66	B/Gifu/2/73
B/Osaka/2/7	B/Kanagawa/3/76
B/USSR/100/83	B/Guangdong/5/94
B/Ibaraki/2/85	B/Shandong/7/97
B/Nagasaki/1/87	B/Yamanashi/166/98

* 資料來源：Influ A · B- Quick “SEIKEN” 使用手冊

表二 Performance Characteristics of Influenza A·B Quick Compared to Culture.

Influenza A·B Quick	Culture result			
	Influenza A	Influenza B	negative	total
	+	+		
Influenza A +	5	0	0	5
Influenza B +	0	2	0	2
Influenza negative	1	0	12	13
total	6	2	12	20

表三 Comparison of Culture, Influenza A·B Quick, Immunofluorescence, and RT-PCR for Influenza A.

Culture result (CPE)	Immunofluorescence result	Influenza A·B Quick result	RT-PCR	No. of specimen
positive	positive	positive	positive	5
positive	positive	negative	positive	1
negative	negative	negative	negative	12

附圖





圖說：A 與 B 檢測孔中都有對照呈色點，是判定整個檢測步驟是否完成的指標，檢測盤的 A 與 B 檢測孔中，都應出現紫紅色圓點。對照點的型狀可能不是圓形，顏色也不一致，但不代表檢測的失敗或操作步驟的不完整。

1. 僅於A 檢測孔中出現紫紅色的菱形標記，而A與B檢測孔中都出現對照呈色點時，判定檢體為A型流行性感冒病毒陽性，B型流行性感冒病毒陰性。
2. 僅於B 檢測孔中出現紫紅色的菱形標記，而A與B檢測孔中都出現對照呈色點時，判定檢體為A型流行性感冒病毒陰性，B型流行性感冒病毒陽性。
3. A與B檢測孔中都出現紫紅色的菱形標記及對照呈色點時，判定檢體為A型與B型流行性感冒病毒陽性。
4. A與B檢測孔中都未出現紫紅色的菱形標記，但都出現對照呈色點時，判定檢體為A型與B型流行性感冒病毒陰性。