

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-000105

衛生福利部疾病管制署 105 年署內科技研究計畫

計畫名稱：研發 Q 熱環型恆溫核酸增幅法與 real-time PCR  
檢驗之比較評估

105 年 度/全 程 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林建州

研究人員：馬瑋健

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

## 目 錄

	頁 碼
封面	1
目錄	2
壹、計畫中文摘要	3
貳、計畫英文摘要	4
參、前言	5
肆、材料與方法	7
伍、結果	9
陸、討論	12
柒、重要研究成果及具體建議	14
捌、重要參考文獻	15

## 壹、計畫中文摘要

關鍵詞：Q 熱、環型恆溫核酸增幅法

Q 熱菌檢驗利用 Real-time PCR 偵測病原體，檢測時需要儀器調控其溫度，反應時間至少 2 至 3 個小時。而環型恆溫核酸增幅法(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)利用 Bst 2.0 WarmStart® DNA Polymerase 於 65°C 恆溫進行反應，因不需要進行升溫及降溫的步驟，反應時產生焦磷酸鎂(magnesium pyrophosphate) 產物，消耗樣本中鎂離子含量，經由加入指示劑(hydroxy naphthol blue, HNB)反應，於可見光下觀察顏色變化進行判讀，反應時間可調降至 30 至 60 分鐘。

本研究 PCR 和 LAMP 陽性率分別為 1.16%(15/1291)及 0.62%(8/1291)，經 Cohen's kappa 計算，兩種檢驗方法間比較一致性好(good)。以恢復期抗體 IFA 檢驗為標準，追蹤 PCR 和 LAMP 陽性個案之結果比較，真陽率分別為 100%(5/5)和 60%(3/5)，本研究 real-time PCR 檢驗及 Q 菌 DNA 連續稀釋測試其真陽率較 LAMP 高，LAMP 系統靈敏度低仍需調整改善。

## 貳、 計畫英文摘要

關鍵詞：Q fever、LAMP、Loop-mediated isothermal amplification

Real-time PCR is mainly used in Q fever pathogen detection. It needs particular instrument to adjust temperature and time and takes 2 to 3 hours to finish a reaction. Bst 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA Polymerase is utilized in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) at constant 65°C during the reaction. Without the step to modulate the temperature, the reaction time can be lowered to 30 to 60 minutes. In case of the byproduct magnesium pyrophosphate production, the Mg<sup>2+</sup> concentration of sample decreases and hydroxy naphthol blue (HNB) as indicator is added to detect by the color change under visible light.

In this program, LAMP is used with HNB to mimic real-time PCR. The examination of Q fever could be faster with shorter reaction time and instant detection. The original PCR system using purified DNA to perform real-time PCR examination has 1.16% positive rate, 100% true positive rate. However, this study using DNA to perform LAMP has 0.62% positive rate, 60% true positive rate. Comparing with LAMP system, the positive rate of the original PCR system has higher positive rate and the true positive rate is 1.7 times higher.

As data shown, LAMP system has lower positive rate and true positive rate than the original PCR system. Showing that LAMP system still has many problems to solve.

## 參、 前言：

Q 熱是人畜共通傳染病，主要致病原是貝氏考克斯菌(*Coxiella burnetii*)，易造成慢性心內膜炎或孕婦流產。目前，全國負責檢測 Q 熱傳染病是由本署檢驗中心南區實驗室職掌。包括 real time PCR 及 IFA 兩種檢驗項目，PCR 主要為檢測病原體是否存在宿主體內，視為感染初期的一項指標<sup>(1)</sup>；IFA 為檢測宿主免疫系統所產生之抗體是否存在<sup>(2)</sup>，作為綜合研判。今(105)年國內 Q 熱通報檢驗最後綜合研判陽性率為 3.25%(42/1291)，PCR 部分檢測出陽性為 1.16%(15/1291)。

就防疫和治療而言，PCR 較能符合在感染早期檢測出病原體並給予病患適當藥物治療。然而，抗原檢測部分易受採檢時間點是否在急性期內或檢驗方法敏感度等因素影響。PCR 在檢驗過程，除了試藥準備和前處理外，進行所需的時間為 2 至 3 個小時，其中大多數時間花在各階段的升溫和降溫反應，本實驗室有意改善檢驗方法提升其敏感度和效率，透過研究計畫進行檢驗方法的比較和評估。

傳統環型恆溫核酸增幅法(LAMP)，設計一對帶有互補序列的引子(FIP/BIP)及其 5'端上游的引子(F3/B3)，在 60-65°C 恆溫下利用 Bst 2.0 WarmStart<sup>®</sup> DNA Polymerase 進行合成。其中步驟有：(1) 初始產物 starting material producing step: 此階段先是 FIP/BIP 此對引子與目標基因黏合後合

成 DNA，再透過上游引子 F3/B3 的 DNA 合成，將 FIP/BIP 引子合成之 DNA 分開，因 FIP/BIP 引子帶有互補序列，合成出的 DNA 會形成 stem-loop 結構的 starting material；(2) 循環複製 cycling amplification step: 此階段 starting material 利用 FIP/BIP 引子合成出結構更大帶有 inverted-repeat 的產物及另一個 starting material；(3) 延長及再複製 elongation and recycling step: 隨著合成時間的增加，starting material 透過 FIP/BIP 引子被聚合成帶有多個 inverted-repeat 的 cauliflower-like 結構<sup>(3)</sup>。LAMP 結果判讀主要利用指示劑(propidium iodine)與 DNA 結合反應終點產物，以 UV 光偵測螢光強度變化，得知樣本中目標基因的含量。近年有研究測試出 LAMP 檢測 Q 熱 DNA 檢體的條件，其偵測極限是一般 PCR 的 100 倍<sup>(4)</sup>。

另有方法利用指示劑(calcein、HNB)偵測反應時樣本中  $Mg^{2+}$  離子，隨著目標基因 DNA 合成量的增加，樣本內  $Mg^{2+}$  離子逐漸減少，HNB 於可見光下由紫色轉變成天藍色，且  $OD_{650}$  吸光值會上升<sup>(5)</sup>。

本研究實驗創新利用 LAMP 搭配 HNB 偵測  $OD_{650}$  吸光值變化，模擬 real-time PCR 即時偵測，藉由 LAMP 不需改變溫度，反應時間短的優勢，發展出更快速且具有高靈敏度及專一性的檢驗方式。

#### 肆、 材料與方法：

##### 1. 血液檢體核酸萃取

取 400 $\mu$ l 血液檢體利用 Roche MagNA Pure 核酸自動萃取機萃取貝氏  
考克細菌 DNA。

##### 2. LAMP 試劑配方(單管)

(sample)	1
1X Isothermal Amplification Buffer	10
10mM dNTP	3.5
16 $\mu$ M FIP+BIP	2.5
5 $\mu$ M F3+B3	1.5
DNA	2.5
750 $\mu$ M HNB	4
<i>Bst</i> 2.0 Warm Start DNA Polymerase	1
( $\mu$ l/tube)	25

將上述配方混合均勻後，以 PCR 儀設定：

Extension: 63 $^{\circ}$ C, 1hr (detection/30sec)

Termination: 80 $^{\circ}$ C, 2min

記錄各次實驗之 Ct 值。

### 3. 平行試驗結果分析

將本(105)年度全血檢體以現有 real-time PCR 方式和 LAMP 方式進行檢測，就結果分析 1.靈敏度、2.專一性、3.反應時間，評估未來採用 LAMP 檢測之可行性。



## 伍、結果

本(105)年度通報送驗 Q 熱菌檢驗 1,291 件，以 PCR 系統利用純化 DNA 進行 real-time PCR 檢驗之陽性率 1.16% (15/1291)，和本計畫採用純化 DNA 利用 LAMP 檢驗，陽性率 0.62% (8/1291)。計算 Cohen's kappa 係數得知兩檢驗之間一致性良好(good)。然而，PCR 系統檢出陽性率還是較 LAMP 高(表一)。

表一、PCR 和 LAMP 檢驗結果比較

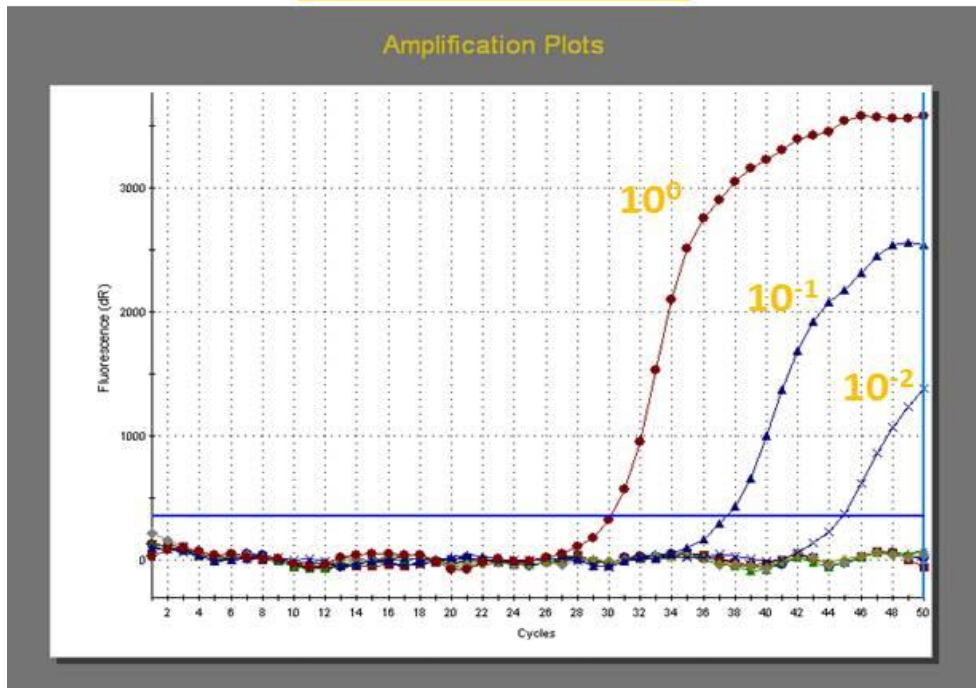
	LAMP <sup>+</sup>	LAMP <sup>-</sup>	Total
PCR <sup>+</sup>	8	7	15
PCR <sup>-</sup>	0	1276	1276
Total	8	1283	1291

Cohen's kappa Coefficient =0.693(good)

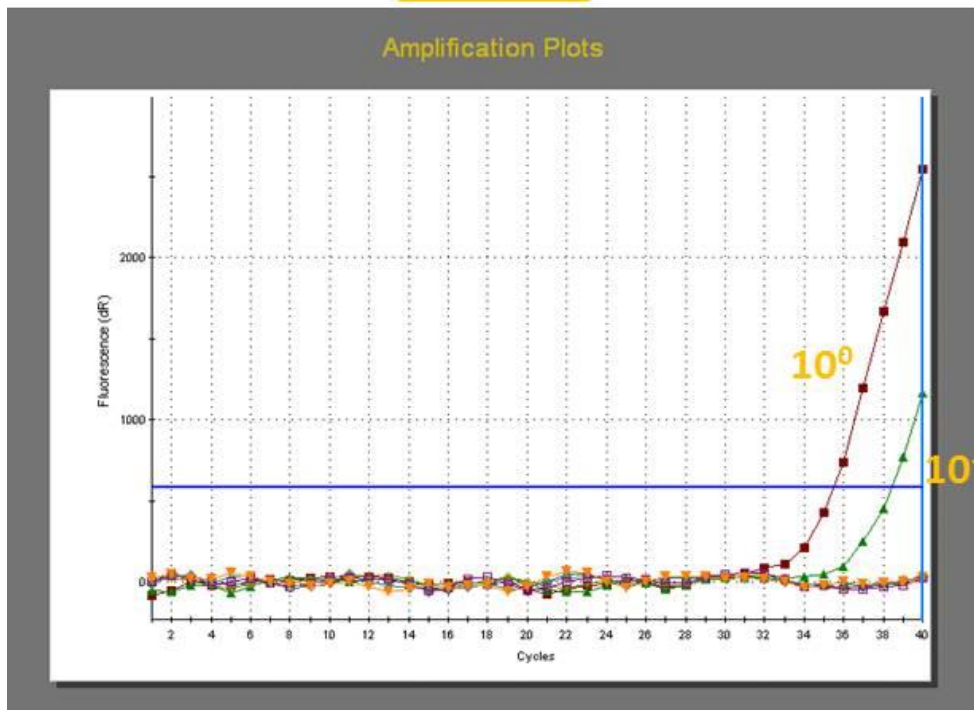
Q 熱 PCR 檢出 15 件陽性檢體，再委由醫院對回診患者進行第 2 次採檢，共取得 5 件恢復期血清，與急性期血清作 IFA 檢測比對，觀察病患 IgG 抗體是否有 4 倍上升；但其它 10 件陽性檢體並無第 2 次採檢，故無從比對。5 件恢復期血清其 IFA 檢驗抗體均為陽性(IgG 4X↑)，其中 PCR 檢出率 100%(5/5)，LAMP 檢出率為 60%(3/5)。

將 Q 熱陽性菌體 DNA 連續稀釋，比較兩檢驗的偵測極限。其中 PCR 可檢驗出較微量的陽性檢體，PCR 和 LAMP 兩者濃度相差約 10 倍(圖一)。

# Real-time PCR



# LAMP



圖一、PCR 和 LAMP 偵測極限比較

## 陸、討論

目前 Q 熱檢驗依病原體感染後的病理反應，採用分子生物學方法 PCR 直接偵測抗原，和血清學 IFA 方法偵測產生的抗體反應。其實兩方法檢驗注重的時間點不同，分別在急性期和恢復期的血清學變化，互相補足最大化檢測範圍，最後以抗體及免疫學反應較客觀且可信。目前以一次採檢(抗原+抗體)作為判定，難免因採檢時間點是空窗期而有所遺漏者。

Q 熱發病後患者逐漸產生抗體，則不易檢測出病菌抗原，其中部分送驗距發病日因已超出急性期，故未在第一時間檢測出 Q 熱抗原。以抗體 IFA 檢測為最後標準，相對於 PCR 檢出率(%)分別為 3.3：1.2。

本計畫嘗試使用檢驗成本低、時效快且較微小偵測極限的 LAMP 取代 real-time PCR，參考 Pan L. 等研究<sup>(4)</sup>中的研究方法及評估指標進行實驗。上半年度的測試結果兩檢驗結果並無差異(4/581 件)，但下半年度 LAMP 驗出的陽性數較少。在連續 Q 菌 DNA 稀釋比較兩檢驗偵測極限後發現，LAMP 的偵測極限較 PCR 高，檢體中細菌 DNA 含量造成檢驗結果差異(圖一)，也是否和上半年為 Q 熱菌流行期有較多之菌量有關。由於 LAMP 增幅反應總時間短，或許可延長反應時間，嘗試增加增幅反應次數來提升陽性檢出率。

目前美國 CDC 採急性和恢復期之 IFA 血清學抗體力價作比較及判定，但需較久時間等待結果。本署因統計 Q 熱確診個案數和防疫即時性考量，

本(105)年度檢驗政策改變，以一次採檢驗(抗原+抗體)結果即作判定，無法主動要求個案進行恢復期第二次採驗，均回診時醫師主動送驗二採檢體，有 2/3 PCR 陽性個案無再作 IFA 血清學確診，部分 PCR 陽性個案因此判定不明。在精準檢驗立場，對少部分 PCR 陽性個案進行第二次採檢確認，對患者正確檢驗及後續治療是有助益。

另外，本實驗室試圖回溯去年所保存 Q 熱陽性 DNA 萃取產物，但 real-time PCR 檢驗中只有少數幾件仍有 Ct 值反應，其餘均無反應。原檢體全血不易保存，陽性 DNA 萃取產物皆保存於-20°C，和 Q 熱菌 DNA 含量不高 Ct 值大都界於 35 左右，較不易進行回溯性測試。

檢驗科技日新月異，實驗室要突破或創新適合自己操作條件，在選擇評估比較下仍很多限制，需要努力去突破以助檢驗技術提升。

## 柒、重要研究成果及具體建議

### 1、計畫之新發現或新發明

評估比較原有 PCR 檢驗和新方式 LAMP 方法，檢驗成本低且時效快的 LAMP 偵測極限較 PCR 低。由於 LAMP 增幅反應總時間短，因此可延長反應時間，嘗試增加增幅反應次數來提升陽性檢出率。

### 2、計畫對民眾具教育宣導之成果

Q 熱易造成慢性心內膜炎或孕婦流產，其檢驗結果易受恢復期或送驗時機慢，是不易檢測出帶原者。即早診斷即早治療，有效治療是保障人民衛生安全最好途徑之一。

### 3、計畫對醫藥衛生政策之具體建議

目前，Q 熱檢驗均以一次採檢即作結果判定，因採檢時機超出急性期或處於抗體空窗期不易偵測，建議對部分 PCR 陽性患者可主動予以第二次採檢作確認。

捌、重要參考文獻：

1. Hou MY, Hung MN, Lin PS, Wang YC, Lin CC, Shu PY, Shih WY, Wu HS, Lin LJ., Use of a single-tube nested real-time PCR assay to facilitate the early diagnosis of acute Q fever. *Jpn J Infect Dis.* 2011;64(2):161-2.
2. Péter O, Dupuis G, Peacock MG, Burgdorfer W., Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of *Coxiella burnetii* antibody. *J Clin Microbiol.* 1987;25(6):1063-7.
3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T., Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
4. Pan L, Zhang L, Fan D, Zhang X, Liu H, Lu Q, Xu Q., Rapid, simple and sensitive detection of Q fever by loop-mediated isothermal amplification of the *htpAB* gene. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 May 16;7(5):e2231.
5. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K., Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques.* 2009;46(3):167-72.