

計畫編號：DOH95-DC-1118

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究發展計畫

以 Real-time PCR 及 ELISA 應用於懷孕婦女弓形蟲症之診斷
暨個案治療癒後之評估

研究報告

執行機構：國立陽明大學

計畫主持人：蔡洪又欽

研究人員：蔡洪又欽、張甘楠

執行期間：95 年 03 月 15 日至 95 年 12 月 15 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見*

目錄

目次

摘要	7
前言	8
材料與方法	11
一、弓形蟲取得	11
二、即時聚合酶連鎖反應條件及定量標準曲線之建立	11
(一) 弓形蟲 Genomic DNA 萃取	11
(二) Real-time PCR 條件	11
(三) Real-time PCR 標準曲線建立	12
三、酵素結合免疫吸附法材料及條件之建立	14
(一) rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白製備	14
(二) rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白濃度測定	16
(三) Box titration (Checker board titration)	17
1. 抗原定量	17
2. 抗體定量	17
(1) 陽性抗體之定量	17
(2) 陰性抗體之定量	17

(四) 酵素聯結免疫吸附法.....	18
四、孕婦檢體篩檢.....	19
(一) 血液檢體收集.....	19
(二) 乳膠凝集試驗法.....	19
(三) Real-time PCR.....	20
(四) ELISA.....	20
結果.....	21
一、即時聚合酶連鎖反應條件及定量標準曲線建立之結果.....	21
二、酵素結合免疫吸附法材料及條件建立之結果.....	21
三、孕婦檢體篩檢結果.....	22
(一) 檢體資料特徵.....	22
(二) 乳膠凝集試驗法.....	22
(三) Real-time PCR.....	22
(四) 酵素結合免疫吸附法.....	23
討論.....	24
結論與建議.....	26
計畫重要研究成果及具體建議.....	錯誤! 尙未定義書籤。
參考文獻.....	26

圖	29
表	32
附錄	35

圖次

- 圖一 陽性檢體以弓形蟲 P30 基因為標地所做的 PCR 反應 (108 bp) 電泳圖
- 圖二 以 TaqMan 針對弓形蟲 P30 gene 之質體所建立的定量標準曲線(a)及線性回歸(b)。
- 圖三 傳統計數結果與標準對照濃度對照

表次

表一 蟲體計數與 Real-time PCR 濃度換算表

表二 乳膠凝集試驗與 Real-time PCR 檢查為陽性個案之檢驗數據

摘要

本計畫係發展 Real-time PCR 及 ELISA 方法偵測弓形蟲，並運用所發展之方法篩檢孕婦族群，以了解其目前流行情形。在 Real-time PCR 發展部份，本研究選擇 P30 基因做為標的基因，藉由其增幅放大該段基因以偵測弓形蟲存在，並予以做定量檢測。實驗結果發現，Real-time PCR 方法最低偵測極限可測得 8 隻蟲體，的確為一良好之檢測方法；ELISA 檢測部分，研究設計欲使用先前已完成選殖之 SAG-1 (P30 基因) 與 SAG-2 (P22 基因) 所表現重組蛋白(rSAG-1 與 rSAG-2)來偵測弓形蟲抗體，惟計畫所需大腸桿菌菌株無故死亡，導致菌株應表現之重組蛋白無法順利取得，造成本研究無法於計劃結束前完成 ELISA 檢測方法之建立，目前已加緊實驗工作，俟完成將另提報告補充。

至於孕婦篩檢工作，共收集桃園地區 463 位孕婦血清，運用商品化試劑（乳膠凝集試驗）進行弓形蟲抗體診斷結果有 43 位呈陽性反應，盛行率為 9.29%。針對上述試驗陽性者，有 20 位孕婦同意再次採取全血檢體進行 Real-time PCR 檢驗，結果有 8 位呈現陽性結果；ELISA 檢測部分，則待重組蛋白表現、純化完成後另提報告補充。

前言

弓形蟲症 (Toxoplasmosis) 是一種全球性的感染疾病，其致病原是由寄生性原蟲，弓形蟲 (*Toxoplasma gondii*) 所引起。最早在 1948 年由 Sabin 及 Feldman 發展出染劑試驗 (dye test) 後，逐步開啟後續一連串的研究發展。弓形蟲症無論在人或動物，通常以慢性或不顯性感染為主，然而一旦宿主免疫功能低下時，則極有可能產生嚴重的急性弓形蟲症。弓形蟲生活史可分為兩階段，貓科動物是其最終宿主，中間宿主則包含人在內的多種哺乳動物。人類感染弓形蟲的途徑包括經口感染、先天性感染、輸血感染及器官移植等，弓形蟲在感染一般免疫力正常人時，通常沒有太大(特異)的症狀產生，使得感染者不易發覺。根據流行病學調查顯示，美國及英國估計約有 16%至 40%的人口受到弓形蟲感染，尤其是美國中南部、歐洲大陸感染率約介於 50%至 80%之間；法國巴黎有 84%的孕婦抗體檢查為 IgG 陽性反應，紐約則為 32%，至於英國倫敦有 22%的懷孕婦女弓形蟲抗體 IgG 呈陽性反應。

在幾種傳染途徑當中，先天性感染特別受到注目。先天性感染肇因於母體在懷孕期間遭弓形蟲感染，其再經由胎盤垂直傳染胎兒，造成胎兒產生先天性弓形蟲症 (Congenital Toxoplasmosis)，受到弓形蟲感染的孕婦可能會導致流產、死產、胎兒畸形等臨床症狀。不同懷孕

期程的胎兒遭受感染後，所產生的症狀輕重亦有差異，孕婦若在懷孕第一期(first trimester)感染弓形蟲，則胎兒罹患先天性弓形蟲症嚴重度大於懷孕第二或三期感染¹。罹患先天性弓形蟲症的胎兒中，約有 87% 的新生兒無顯現任何症狀，一直到兒童甚至是青少年時期才出現神經或視力受損等症狀²。因此，發展早期偵測孕婦感染弓形蟲症診斷系統是防治先天性弓形蟲症的重要課題。

近年來，由於免疫學及分子生物學的進步，許多病原體的診斷紛紛開始使用 PCR 及 ELISA 等方式進行偵測。Burg 等人以及 Novati 等人曾利用弓形蟲的 35 重複的 B1 基因作為偵測弓形蟲之 PCR 增幅的標的，獲致不錯的效果^{3,4}。類似 PCR 原理又較新穎的診斷方法則是以即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 進行診斷，這是一種可以針對受試檢體內所含偵測標地物質定量的偵測工具。本實驗以弓形蟲所具有的 P30 基因建立 Real-time PCR 技術偵測弓形蟲；另外，目前已有許多學者進行弓形蟲 tachyzoite 的表面抗原 (surface antigens, SAG) 方面的研究，其中以 Couvreur 等人提出的五大表面蛋白質最被注意，此五種蛋白質的分子量分別為 30 kDa (SAG1)、22 kDa (SAG2)、43 kDa (SAG3)、35 kDa 以及 23 kDa⁵。上述蛋白質中，SAG1 與 SAG2 兩種蛋白質在 tachyzoite 表面的數量為最多，因此這兩種蛋白質被認為是蟲體表面與宿主免疫系統最先接觸的兩種抗原。後續 Lunden 等

人的動物實驗也證明感染弓形蟲後，其急性期的血清能與這兩種抗原作用⁶，所以 SAG1 與 SAG2 兩種蛋白質是初步引起免疫反應的抗原，援此，本研究使用先前研究已完成的 SAG1 與 SAG2 基因選殖菌株，將其所表現之重組蛋白(rSAG1 與 rSAG2)應用於酵素結合免疫吸附法(ELISA)弓形蟲診斷，評估其是否適用於孕婦產前檢查時使用。

材料與方法

一、弓形蟲取得

取弓形蟲與 0.85%生理食鹽水配置成 1.0×10^7 蟲體/0.2 ml 懸浮液，腹腔注射小鼠，接種 72 小時後以 2 ml 生理食鹽水洗出腹水，經 1,500rpm、15 分鐘離心取得沉澱之弓形蟲。所得之弓形蟲經計數後，以十倍稀釋方式取得 1×10^7 / ml 至 1×10^0 / ml 的蟲體。

二、即時聚合酶連鎖反應條件及定量標準曲線之建立

(一) 弓形蟲 Genomic DNA 萃取

弓形蟲 Genomic DNA 萃取採用 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer Company, Chonbuk, Chonju, South Korea)，操作步驟完全依據手冊說明進行。

(二) Real-time PCR 條件

本實驗 Real-time PCR 方法採用 TaqMan 系統，以弓形蟲所具有的 P30 基因為標的，並搜尋到適合於此基因序列之探針 Human#08 (cat.no.04685067001, Roche Applied Science)，探針序列為 5'-gaagcgag-3'。Real-time PCR 之條件如下：反應總體積 20 μ l。UPL probe (Human#08, Roche Applied Science) 0.4 μ l、Master Mix 4 μ l、正股引子(TOXO-p30-forward primer)及反股引子(TOXO-p30-reverse

primer) 各 1 μ l、DNA template 2 μ l。Real-time PCR 使用的儀器為 Lightcycler II (Roche Diagnostic GmbH, Germany), 溫度設定為 95 $^{\circ}$ C (10 分鐘) 一循環; 95 $^{\circ}$ C (10 秒), 60 $^{\circ}$ C (30 秒), 72 $^{\circ}$ C (1 秒) 五十循環; 40 $^{\circ}$ C (30 秒) 一循環。

(三) Real-time PCR 標準曲線建立

首先使用 PCR 增幅弓形蟲所擁有的 P30 基因特定片段, 引子 (primer) 及條件如下: 正股引子 (forward primer): 5' -CCACTTCATTATTTCTTCTGGTTTT-3' ; 反股引子 (reverse primer): 5' -ACACTGATGTCGTTCTTGCG-3'。PCR 反應總體積為 50 μ l, 其組成內容物分別為: 弓形蟲 DNA template (2 μ l); 1 \times 聚合酶連鎖反應緩衝液; 鎂離子 (1.5 mM); 正股與反股引子 (各 0.3 μ M); dNTP (200 μ M); Super-Therm polymerase (1 unit)。PCR 增幅條件先予以 94 $^{\circ}$ C 10 分鐘後, 另以 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、55 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒, 進行 32 次反應, 最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘。前述引子增幅弓形蟲 P30 基因可獲得預期大小為 108 bp 之 DNA 片段 (圖一)。

接著利用上述引子所增幅之弓形蟲 P30 基因片段, 以 T4 黏接酶 (ligase) 接到 pGEM-T Easy Vector (Promega) 內, 其反應條件如下: 反應總體積 10 μ l, pGEM-T Easy Vector 1 μ l、Insert DNA 3 μ l、T4 DNA

ligase 1 μ l、1x Rapid Ligation Buffer，混合均勻後置於 4 $^{\circ}$ C 18 小時。完成黏接所形成的質體以轉型（transform）的方式送入 JM109 細胞中，其反應條件如下：取質體 10 μ l 與 JM109 細胞 100 μ l 稍事混合，置於冰上 20 分鐘，再於 42 $^{\circ}$ C 作用 45 秒，最後加入 SOC medium『SOB（Bacto-tryptone 20g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 0.5g，蒸餾水加至 1,000ml，再加入 2M MgCl₂ 5 μ l），1M Glucose 20ml』950 μ l，混勻後置於 37 $^{\circ}$ C 恆溫培養箱中以 150rpm 震盪培養 1.5 小時。

轉型所獲得之菌液均勻塗抹於含有 ampicillin 100 μ g/ml、0.5 M IPTG 8 μ l 和 200 μ g/ml x-gal 40 μ l 的 LB 培養基上，靜置 37 $^{\circ}$ C 隔夜後，再以藍白篩選方式挑選含弓形蟲 P30 基因片段於其內的菌落。將挑選出的菌落在 37 $^{\circ}$ C 大量增殖後，萃取出質體 DNA 測其 O.D. 值，並連續稀釋成 1×10^0 至 1×10^{13} copies/ μ l。

將含有弓形蟲 P30 基因之質體依序稀釋成 1×10^0 至 1×10^{13} copies/ml 後，併抽取 genomic DNA 執行 Real-time PCR；同時，另利用傳統計數法分出之蟲體依序稀釋成 1×10^6 至 1×10^0 蟲體/ml 後，各吸取 200 μ l 抽取 genomic DNA，最終將所抽取的 genomic DNA 溶於 50 μ l TE buffer，並吸取 2 μ l 執行 Real-time PCR。將傳統計數法所獲得之 Real-time PCR 數據對照於質體所建立之標準曲線，可以建立一方程式用於將 Real-time PCR 結果換算成傳統的蟲體計數結果。後續即可

使用此一標準曲線推估送檢樣本內所含的蟲體濃度（圖二）。

三、酵素結合免疫吸附法材料及條件之建立

（一）rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白製備

將含有 rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白基因的大腸桿菌以 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 及 5 ml LB 培養基培養 18 小時後，再將菌液移至另新鮮製備之含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin 的 100 ml LB 培養基，並再繼續培養 3 小時後，加入 1 mM IPTG（isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside）誘導表現 SAG-1 及 SAG-2 蛋白，再培養 5 小時，最後以高速離心（5,000 轉離心 10 分鐘）處理，去掉上層液之後的菌塊先以內含 1% Triton X-100、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lysozyme、1mM PMSF（phenylmethylsulfonyl fluoride）以及 1mM dithiothreitol（DTT）的 4 ml PBS（140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.3）溶解菌塊，然後利用超音波震盪器震盪菌液，最後利用高速離心機 1400 $\times g$ 轉離心 10 分鐘後去上層液，菌塊置於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰櫃內，備用。

1. 陽離子交換樹脂色層層析

先使用的色層層析管柱為陽離子交換樹脂（5 ml HiTrap SP, Amersham Pharmacia）。第一次使用色層層析管柱時先用含 1 M NaCl 的醋酸鈉緩衝溶液（10 mM sodium acetate、pH 4.0）25 ml 清洗管柱，

再以 25 ml 醋酸鈉緩衝溶液(10 mM sodium acetate、pH 4.0)平衡管柱。再將前面所製備的細胞間質萃取液注入管柱中，先以醋酸鈉緩衝溶液沖洗出未結合或結合不強之蛋白質，再分別以含有 50 mM、100 mM 及 150 mM NaCl 之醋酸鈉緩衝溶液沖提管柱，將蛋白質沖提出，並且分析每一管的酵素活性，具有酵素活性的片段，再以 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳確認蛋白質的純度。

2. 陰離子交換樹脂色層層析

過完陽離子交換樹脂具酵素活性的蛋白液，再經由透析將其緩衝液由原來的醋酸鈉緩衝溶液(10 mM sodium acetate、pH 4.0)置換成磷酸鉀緩衝溶液(10 mM potassium phosphate、pH 8.0)。第二次所使用的色層層析管柱為陰離子交換樹脂(5 ml HiTrap Q, Amersham Pharmacia)。先以 25 ml 磷酸鉀緩衝溶液(10 mM potassium phosphate、pH 8.0)平衡管柱，然後將已透析具酵素活性的蛋白液注入管柱中，以磷酸鉀緩衝溶液沖洗出未結合或結合不強之蛋白質，再分別以含有 50 mM、100 mM、150 mM、200 mM、300 mM、500 mM NaCl 之磷酸鉀緩衝溶液沖提管柱，純化過程中每 5 ml 收集一管，分析每一管的酵素活性，而具有酵素活性的片段，則再以 SDS-聚丙烯醯胺膠體電泳確認蛋白質的純度。

3. 斥水性交互作用色層層析

過完陰離子交換樹脂，而蛋白質還尚未純化的部分，則再進一步利用斥水性交互作用色層層析管柱來純化(1 ml HiTrap Octyl Sepharose)。將需要進一步純化的蛋白液加入等體積的含 2 M 硫酸銨 $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ 的磷酸鉀緩衝溶液(10 mM potassium phosphate、pH 8.0)。先以 5 ml 磷酸鉀緩衝溶液(10 mM potassium phosphate、pH 8.0)含 1 M 硫酸銨平衡管柱，然後將具酵素活性且已添加等體積 1 M 硫酸銨的蛋白液注入管柱中，以磷酸鉀緩衝溶液(含 1 M 硫酸銨)沖洗出未結合或結合不強之蛋白質，再分別以含有 500 mM、300 mM、200 mM、100 mM、50 mM 硫酸銨之磷酸鉀緩衝溶液沖提管柱，接著再以含 10、20、40 及 60% 乙二醇(ethylene glycol)之磷酸鉀緩衝溶液沖提管柱，純化過程中每 3 ml 收集一管，分析具有酵素活性的片段，接著再以 SDS-聚丙稀醯胺膠體電泳確認蛋白質的純度。

(二) rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白濃度測定

純化蛋白產物濃度以 Coomassie. Plus Protein Assay Reagent (PIERCE) 試劑進行濃度測定。取 96 孔的 ELISA 盤，在適當位置注入 150 μl 之上述試劑，接著將純化蛋白稀釋 2 倍、4 倍及 8 倍後取 5 μl 加入已含有 150 μl 試劑的孔內，此外 bovine serum albumin (BSA) 以 saline 稀釋成標準濃度為 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以及 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之後取 5 μl 加入已含有 150 μl 試劑的孔內作為測定標準曲線的濃度，再利用 ELISA 判讀機測定波長 595nm 之

吸光值，以內插法求得純化蛋白產物之濃度。

(三) Box titration (Checker board titration)

1. 抗原定量

以純化後的重組融合蛋白為抗原，利用 96 孔平盤進行試驗，第一孔 (A1) 抗原量為 2 μg ，以 coating buffer 【A 液：1 M Na_2CO_3 ，B 液：1 M NaHCO_3 (A : B = 1 : 9)】 : Normal Saline (0.14 M NaCl) = 1 : 19，依序以 2 倍連續稀釋法 2x 至 2048x。抗原依序稀釋完成後之 96 孔平盤置於 4 $^{\circ}\text{C}$ ，36 小時。

2. 抗體定量

(1) 陽性抗體之定量

本研究所取得之感染者血清(以商品化試劑進行弓形蟲症 IgG 篩檢陽性者)各取等量混合後，以 96 孔平盤執行陽性抗體定量作業。上述血清以 PBS 稀釋，依序連續稀釋 2 x 至 256 x。

(2) 陰性抗體之定量

將本研究所取得之未感染者血清(以商品化試劑進行弓形蟲症 IgG 篩檢陰性者)各取等量混合後，以 96 孔平盤執行陽性抗體定量作業。上述血清以 PBS 稀釋，依序連續稀釋 2 x 至 256 x。

將前述所測 OD 值之平均 (mean) \pm 3 倍標準差即為刪除值，以其做為後續孕婦檢體篩檢時判定陽性或陰性反應之標準，OD 值大於或等於刪除值時，判為陽性反應，若小於刪除值，判為陰性反應。

(四) 酵素聯結免疫吸附法

96 孔平盤每孔先以 200 μ L PBST (PBS 99.5 mL 加 Tween-20 0.5 mL, pH 7.28) 洗三次，每次 5 分鐘，每孔再加 200 μ L blocking buffer: NET (gelatin 5 g, NaCl 17.5 g, EDTA·2 Na 3.6 g, Tween-20 1 mL, Tris-base 12.1 g 加 1800 mL DDW 加熱溶解，調 pH 8.0 再加 DDW 至 2000 mL)，37 $^{\circ}$ C，30 分鐘，每孔再以 200 μ L PBST 洗三次，每次 5 分鐘，每孔加第一抗體 100 μ L (已依序連續稀釋 2x, 4x...至 256x 完成之陽性或陰性血清)，37 $^{\circ}$ C，30 分鐘，每孔再以 200 μ L PBST 洗三次，每次 5 分鐘，加第二抗體(1:2500) (Anti-human-IgG-HRP) 每孔 100 μ L，37 $^{\circ}$ C，30 分鐘，每孔再以 200 μ L PBST 洗三次，每次 5 分鐘，加呈色劑【ABTS (2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) 27.4 mg 於 50 mL citric buffer(citric acid 2.1 g 加 H₂O 至 90 mL 調整 pH 至 4.2 再加 H₂O 至 100 mL) 中並加 50 μ L 30% H₂O₂) 每孔 150 μ L，置暗室 15 分鐘，加阻止劑 (2 N HCl 或 1 M NaF) 每孔 100 μ L，OD_{405 nm} 判讀。

四、孕婦檢體篩檢

(一) 血液檢體收集

血液檢體(血清及全血檢體)收集對象為前往本研究合作醫院診所產檢之孕婦,經該孕婦同意後委由護理人員予以抽取 5 ml 的全血。本研究收集孕婦血液檢體分為兩部分。第一部分為血清檢體,孕婦血液先置於不含凝血劑之採血管,待靜置 30 分鐘後離心 10 分鐘(2,500 rpm),分離取得上清液部分即為血清檢體。此一血清檢體則分別予以商品化弓形蟲抗體診斷試劑組(Toxo Test-MT, Eiken Co. LTD, Tokyo, Japan)及 rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白所組成的免疫檢驗(ELISA),檢測孕婦血清中弓形蟲抗體。第二部分則針對免疫學檢測結果呈現陽性之孕婦,另行安排孕婦再至其原先產檢醫院接受血液採集,採集全血檢體(採血管內含抗凝血劑)血量為 10ml,此部份血液檢體則進行 Real-time PCR 診斷。

(二) 乳膠凝集試驗法

乳膠凝集試驗所選用的弓形蟲抗體診斷試劑組為 Toxo Test-MT, Eiken Co. LTD, Tokyo, Japan。檢驗步驟及判定皆按照說明書指示,現簡述如下:將 25 μ l 待測血清檢體置於 96 孔 U 型微量滴定盤內,以 Eiken 緩沖液 2 倍系列稀釋後,每孔中再加入弓形蟲乳膠凝集試液,

震盪一分鐘，而以 Eiken 所附弓形蟲陽性血清，作為陽性對照組，再將微量滴定盤置於室溫下 18 小時之後判讀，顯示凝集的最高血清稀釋倍數即為 LA 力價。LA 力價小或等於 16 倍，則判定為陰性，大或等於 32 倍即判定為陽性反應。

(三) Real-time PCR

進行 Real-time PCR 診斷前，先將孕婦全血檢體離心（300 x g，10 分鐘），離心完畢後謹慎地吸取檢體內 Buffy coat 層，另置於新的血清小瓶中保存在 -70 °C 之冰箱。Buffy coat 層內的細胞 Genomic DNA 萃取同樣亦採用 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit，同時操作步驟亦完全依據手冊說明進行。

(四) ELISA

以孕婦血清做為受測檢體，將前項所製備之 rSAG-1、rSAG-2 抗原重組蛋白應用於血清抗體篩檢。ELISA 反應條件及定量之方法與前述同。以 OD_{405 nm} 進行結果判讀。OD_{405 nm} 值大於或等於刪除值時，判為陽性反應，若小於刪除值，判為陰性反應。

結果

一、即時聚合酶連鎖反應條件及定量標準曲線建立之結果

將含有弓形蟲 P30 基因之質體依序稀釋成 1×10^0 至 1×10^{13} copies/ml 後執行 Real-time PCR，其偵測極限可測得 2×10^2 copies，相關資料如圖二所示；此外，另利用傳統計數法分出 1×10^7 蟲體/ml (tachyzoites)，依序稀釋成 1×10^6 至 1×10^0 蟲體/ml 後，各吸取 $200 \mu\text{l}$ 抽取 genomic DNA，最終將所抽取的 genomic DNA 溶於 $50 \mu\text{l}$ TE buffer，並吸取 $2 \mu\text{l}$ 執行 Real-time PCR，此方法最低偵測極限可測得 8 隻蟲體(理論值： $1000 \text{ tachyzoites} * 200 \mu\text{l} / 1000 \mu\text{l} * 2 \mu\text{l} / 50 \mu\text{l}$)，相關資料如圖三所示。將傳統計數法所獲得之 Real-time PCR 數據對照於質體所建立之標準曲線，可以建立一方程式用於將 Real-time PCR 結果換算成傳統的蟲體計數結果(表一)。故得一方程式 $y = 0.03057 x \pm 0.004 \times 10^n$ ($n = \text{Real-time PCR 測得之 } 10 \text{ 的次方數}$ ， y 為實際的蟲體計數， x 為 Real-time PCR 測得結果)。後續即可以此方程式推估送檢樣本內所含的蟲體濃度。

二、酵素結合免疫吸附法材料及條件建立之結果

此部份數據無法於計畫截止日期前完成，目前已加緊實驗工作，俟完成後另提報告補充。

三、孕婦檢體篩檢結果

(一) 檢體資料特徵

本次篩檢工作收集孕婦血清期間自 7 月 1 日至 11 月 25 日止，共取得桃園地區孕婦血清檢體 521 個。其中，單一孕婦取得兩次血清檢體者計 59 人，全體受檢孕婦計 462 人。樣本族群年齡介於 15 至 43 歲，年齡中位數為 27 歲。所有血清檢體皆分別予以乳膠凝集試驗法及酵素結合免疫吸附法檢驗；至於全血檢體部分，僅針對血清檢體乳膠凝集試驗法陽性者再行採集，共採得 20 個檢體，全血檢體即送往進行 Real-time PCR 檢驗。

(二) 乳膠凝集試驗法

全體受檢 463 位孕婦中，乳膠凝集試驗法呈弓形蟲陽性（疑陽性者）者計 43 人，受檢孕婦弓形蟲抗體陽性盛行率為 9.29%。

(三) Real-time PCR

在 Real-time PCR 部分，乳膠凝集試驗法陽性者經其同意後另予採集血液樣本，本研究共取得 20 個全血檢體，經 Real-time PCR 檢驗後，計有 8 個案呈現陽性結果，陽性率為 40%；使用本研究建立標準曲線推估送檢樣本內含有蟲體濃度分別介於 $9.79 \times 10^3 \sim 2.64 \times 10^5$ 蟲體/ml 之間。

有關乳膠凝集試驗及 Real-time PCR 陽性檢體檢驗結果之詳細資料如表二。

(四) 酵素結合免疫吸附法

此部份數據無法於計畫截止日期前完成，目前已加緊實驗工作，俟完成後另提報告補充。

討論

本實驗所建立 Real-time PCR 方法係採用 TaqMan 系統，原本計畫內欲採用弓形蟲的 B1 基因序列為標的，故本實驗先以軟體 (ProbeFinder Version 2.20) 搜尋合用於 B1 基因的探針，其結果並無適合的現貨可提供，而重新訂購合成曠日費時恐延誤計畫進度，因此本實驗採用弓形蟲所具有的 P30 基因為標的，並搜尋到適合於此基因序列之探針 Human#08 (cat.no.04685067001, Roche Applied Science)。本研究中所利用的 P30 基因僅有 1 copy 數，理論上若選用具有 35 copies 數的 B1 基因，將可再降低 Real-time PCR 的偵測極限。然而，Buchbinder 等人曾比較 P30 基因與 B1 基因分別運用於 Real-time PCR 的偵測能力，發現兩段基因的偵測能力皆能達到 10^1 隻蟲體。惟其所採用的 Real-time PCR 系統與本研究 TaqMan 系統不同，TaqMan 系統的優點為具高度的檢測專一性，大幅降低偽陽性的產生，而本研究使用 P30 基因所建立 Real-time PCR 方法的最低偵測極限為 8 隻蟲體，與前人測得 10^1 隻蟲體數據類似，同時又具備有較好的檢測專一性，的確為一良好之檢測方法。

台灣地區過去數年間，相關研究孕婦族群感染弓形蟲的文獻不多：1985 年曾有學者以 ELISA 方法檢測弓形蟲 Ig G 抗體，該文獻調查孕婦族群的盛行率為 10.2%；另一份 2006 年的文獻則指出北台灣

懷孕婦女弓形蟲 Ig G 抗體的盛行率為 9.1%。而本研究利用弓形蟲抗體診斷試劑組（乳膠凝集試驗）篩檢桃園地區的懷孕婦女血液檢體，結果發現弓形蟲抗體的盛行率為 9.29%，與前人研究數據相近。但曾有文獻指出乳膠凝集試驗其敏感度（sensitivity=86%）不甚理想，因此本研究所得之盛行率應較實際值高出；但反觀其所擁有的高特異度（specificity=97%）在本研究內確適合用於是否進行第二次採血的依據。

至於本研究中「三、酵素結合免疫吸附法材料及條件之建立」部份，因計畫所需大腸桿菌菌株無故死亡，導致菌株應表現之重組蛋白無法順利取得，進而影響到「四、孕婦檢體篩檢（四）ELISA」部分數據產生。為解決此一情況，目前已加緊實驗工作，俟實驗完成將另提報告補充。

結論與建議

本計劃所收集之受檢孕婦弓形蟲抗體陽性盛行率為 9.29%。若以 94 年婦女人口 1,120 萬人計算，全國婦女人口感染弓形蟲人數約在 100 萬之譜，如何降低此寄生蟲感染盛行率，應為未來衛生政策訂定的一項重要課題；若以每年全國孕婦 20 萬人算，約有 18 萬名孕婦未曾感染，如這些婦女於懷孕期間遭感染，則胎兒經由母體感染導致先天性弓形蟲症機率大增，恐引發胎兒的健康問題，因此建議國內衛生政策應於新生兒篩檢加做此一項目，並以文宣提醒懷孕婦女注意，同時政府疾病監測部門應採自行或委外方式長期監測國內流行情況；另鑒於辨識是否為首次感染之篩檢技術仍未成熟，應在此相關研究的推動給予長期性支持，降低弓形蟲症對新生兒健康所帶來的可能傷害。

参考文献

1. Desmonts G, Couvreur J. Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med.* 1974;290:1110-6.
2. Foulon W, Villena I, Stray-Pedersen B, et al. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: a multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:410-5.
3. Burg JL, Grover CM, Pouletty P, et al. Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1787-92.
4. Novati R, Castagna A, Morsica G, et al. Polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii* DNA in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with focal brain lesions. *Aids.* 1994;8:1691-4.
5. Couvreur G, Sadak A, Fortier B, et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology.* 1988;97 (Pt 1):1-10.
6. Lunden A. Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. *Vet Parasitol.* 1995;56:23-35.

95 年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：以 Real-time PCR 及 ELISA 應用於懷孕婦女弓形蟲症之診斷暨個案治療癒後之評估

主持人：蔡洪又欽 計畫編號：DOH95-DC-1118

1. 計畫之新發現或新發明

本研究使用 P30 基因建立 Real-time PCR (TaqMan 系統) 方法的最低偵測極限為 8 隻蟲體，與前人測得 10^1 隻蟲體數據類似，但具備有較好的檢測專一性。同時本研究亦建立一標準曲線用於推估送檢樣本內所含蟲體濃度，使 Real-time PCR 具備有定量的能力。

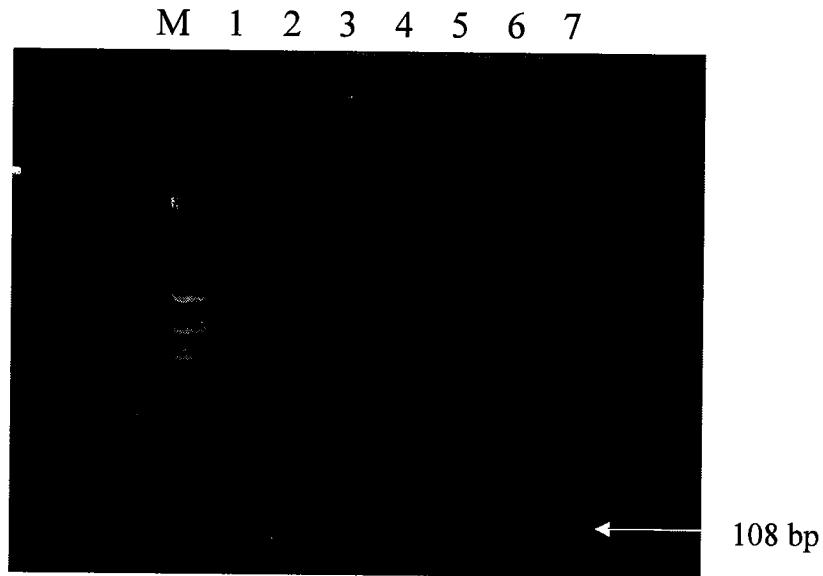
2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

在收集血液檢體過程中，發放衛教單張使孕婦對弓形蟲感染途徑有所瞭解；同時以面對面衛教宣導方式提醒孕婦在懷孕過程中應避免接觸貓、土壤及生肉，避免清理貓的便盒，降低感染弓形蟲的可能。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- (1) 本計劃所收集之受檢孕婦弓形蟲抗體陽性盛行率為 9.29%，如何降低此寄生蟲感染盛行率，可為未來衛生政策訂定的一項課題
- (2) 由於國內對此疾病資料仍少，且其對於胎兒的健康會造成一定程度之危害，因此建議國內應於新生兒篩檢加做此一項目。
- (3) 由於懷孕期長，同時弓形蟲感染對胎兒之影響非立即可見，故一年期計畫難以達到實際研究成效，建議後續研究應至少補助為期三年，俾利實驗進行及執行後續追蹤。
- (4) 辨識該孕婦是否為於懷孕期感染之篩檢技術仍未成熟，可在此相關研究的推動給予長期性支持。

圖



圖一 陽性檢體以弓形蟲 P30 基因為標地所做的 PCR 反應 (108 bp) 電泳圖

Lane M, 100bp ladder;

Lane 1, 陰性對照檢體 (no DNA) ;

Lane 2, 陽性檢體;

Lane 3, 陽性檢體;

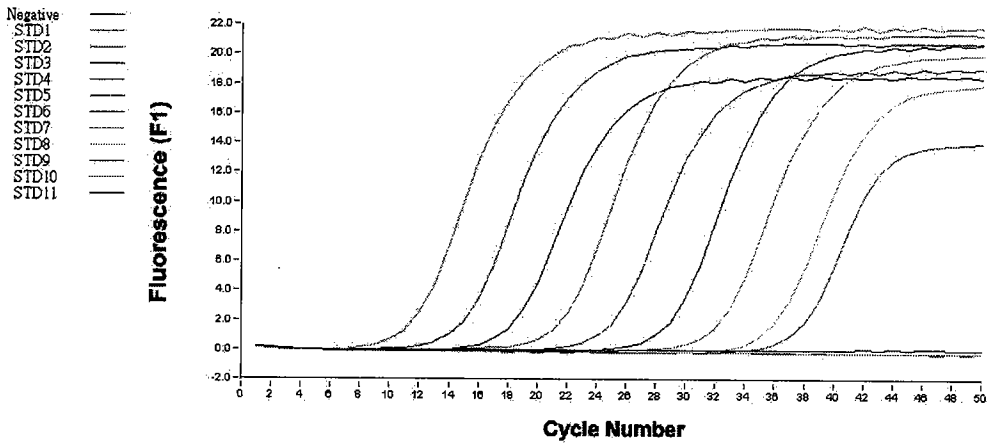
Lane 4, 陽性檢體;

Lane 5, 陽性檢體;

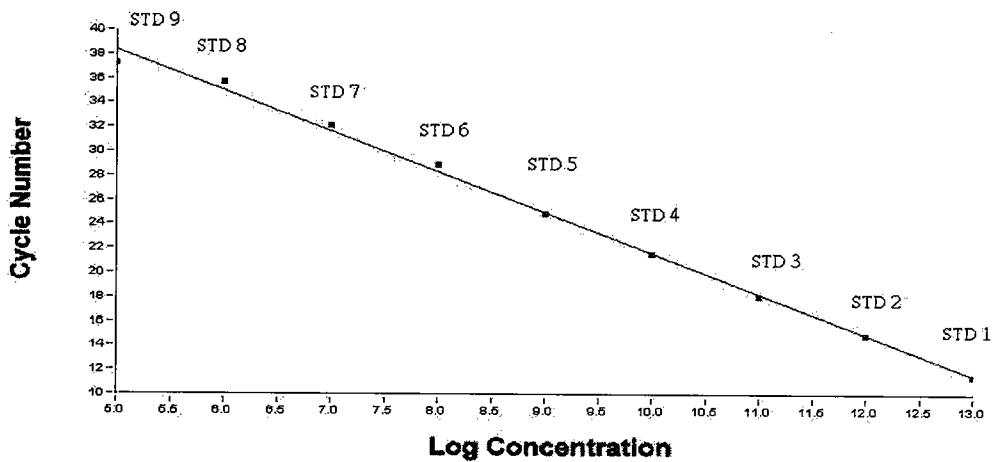
Lane 6, 陽性檢體;

Lane 7, 陽性檢體

(a)



(b)



圖二 以 TaqMan 針對弓形蟲 P30 gene 之質體所建立的定量標準曲線(a)及線性回歸(b)。

以 real-time PCR 軟體推算已完成序列稀釋 (1×10^0 至 1×10^{13} copies/ml) 之各管濃度如下：

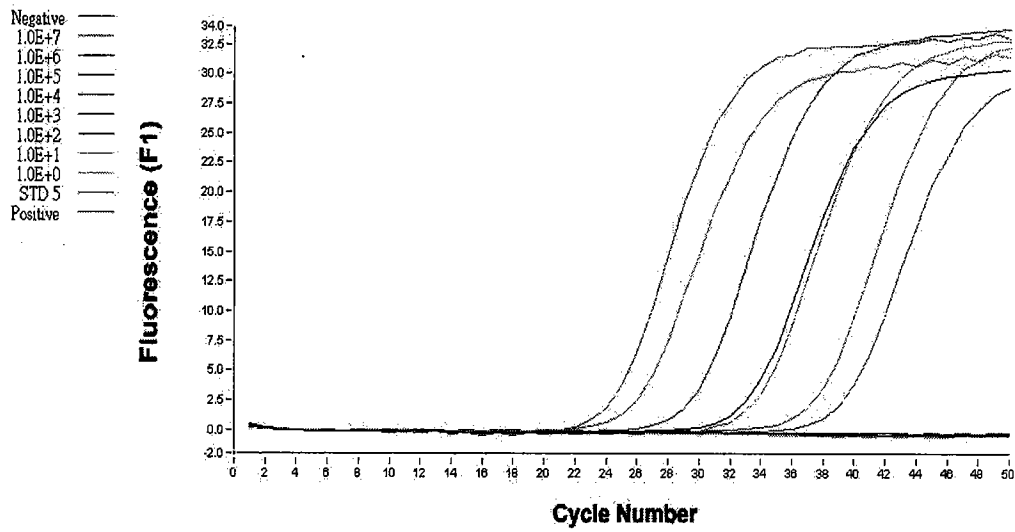
STD 1 為 1.06×10^{13} copies/ml; STD 2 為 1.06×10^{12} copies/ml

STD 3 為 1.14×10^{11} copies/ml; STD 4 為 1.03×10^{10} copies/ml

STD 5 為 1.09×10^9 copies/ml; STD 6 為 6.93×10^8 copies/ml

STD 7 為 7.25×10^7 copies/ml; STD 8 為 6.32×10^6 copies/ml

STD 9 為 2.18×10^5 copies/ml; STD 10 無法測得; STD 11 無法測得



圖三 傳統計數結果與標準對照濃度對照

利用傳統計數 (1×10^7 至 1×10^0 蟲體/ml) 後所抽取之 genomic DNA，再分別以 Real-time PCR 回推其濃度 (copies/ μ l) 及其檢測極限，標準對照組 (STD 5) 濃度為 1.09×10^9 copies/ ml，蟲體計數與 Real-time PCR 測得數據詳見表一。

表

表一 蟲體計數與 Real-time PCR 濃度換算表

實際的蟲體計數 (y)	Real-time PCR 測得濃度(x)	(y/x)
1×10^7	37.03×10^7	0.027005
1×10^6	30.65×10^6	0.032626
1×10^5	27.87×10^5	0.035881
1×10^3	37.38×10^3	0.026752
1×10^2	0	-
1×10^1	0	-
1×10^0	0	-

【註】參數 (1) 部分取平均值 $(0.027005+0.032626+0.035881+0.026752) \div 4 = 0.03057$ 。

參數 (2) $\pm 0.004 \times 10^n$

方程式 $y = 0.03057 x \pm 0.004 \times 10^n$ (n= real-time PCR 測得之 10 的次方數, y 為實際的蟲體計數, x 為 real-time PCR 測得結果)

表二 乳膠凝集試驗與 Real-time PCR 檢查為陽性個案之檢驗數據

個案資料		乳膠凝集試驗	Real-time PCR
個案編號	檢體編號	抗體力價	蟲體濃度 (蟲體/ml)
1	桃 0950726 004-01-081	64 x	-
2	桃 0950726 004-05-084	256 x	-
3	桃 0950726 004-07-085	32 x	-
4	桃 0950726 006-02-080	32 x	-
5	桃 0950726 008-04-063	16 x	3.481*10 ⁴
6	桃 0950726 010-17-061	16 x	3.099 *10 ⁴
7	桃 0950726 043-01-133	64 x	-
	桃 0950923 043-04-049	64 x	-
8	桃 0950726 020-02-110	128 x	-
9	桃 0950726 046-01-008	64 x	-
	桃 0950818 046-02-088	32 x	2.438*10 ⁴
10	桃 0950726 052-01-009	4096 x	-
11	桃 0950726 141-01-074	32 x	-
	桃 0951117 141-10-041	32 x	-
12	桃 0950726 147-05-096	256 x	-
13	桃 0950726 147-07-037	16 x	0
14	桃 0950726 276-01-015	256 x	-
	桃 0951125 276-09-015	128 x	-
15	桃 0950818 006-07-014	2048 x	0
	桃 0951103 006-17-013	2048 x	0
16	桃 0950818 010-23-020	512 x	0
	桃 0951103 010-57-034	512 x	0
17	桃 0950818 042-02-038	128 x	-
18	桃 0950818 147-15-056	128 x	-

19	桃 0950818 153-03-060	256 x	-
20	桃 0950818 359-02-081	256 x	0
21	桃 0950923 007-04-013	64 x	0
22	桃 0950923 151-04-078	256 x	-
23	桃 0950923 340-01-102	32 x	0
24	桃 0951103 004-19-002	32 x	-
25	桃 0951103 004-24-007	128 x	-
26	桃 0951103 008-12-019	128 x	$4.474*10^4$
27	桃 0951103 010-46-023	32 x	$2.64*10^5$
28	桃 0951103 010-50-027	64 x	$9.79*10^3$
29	桃 0951103 010-56-033	128 x	$2.32*10^4$
30	桃 0951103 024-20-057	128 x	0
31	桃 0951103 035-01-064	128 x	0
32	桃 0951103 096-12-071	1024 x	-
33	桃 0951103 096-16-073	256 x	-
34	桃 0951103 147-27-090	128 x	0
	桃 0951117 147-38-042	256 x	0
35	桃 0951103 141-10-097	64 x	0
36	桃 0951103 151-07-105	128 x	0
37	桃 0951103 153-06-106	64 x	-
38	桃 0951103 276-08-114	256 x	$2.19*10^4$
39	桃 0951103 322-08-116	128 x	-
40	桃 0951103 410-01-123	128 x	-
41	桃 0951103 412-01-125	256 x	0
42	桃 0951117 022-09-023	128 x	-
43	桃 0951125 147-43-019	32 x	-

附錄

國立陽明大學人體試驗暨倫理委員會
Institutional Review Board (IRB) of National Yang-Ming University

IRB 編號：950023R

同意臨床試驗證明書

由國立陽明大學熱帶醫學研究所蔡洪又欽副教授提研究計畫案
名稱「以 Real-time PCR 及 ELISA 應用於懷孕婦女弓型蟲症之診斷暨治療癒後
之評估」

執行期限 95 年 04 月 01 日至 95 年 12 月 31 日

已於 95 年 5 月 24 日經本委員會審查通過，特此證明。

有效期限至 95 年 12 月 31 日

國立陽明大學人體試驗暨倫理委員會
主任委員

姜信亭

To whom It May Concern:

Date: 0524 2006

RE:

Title of the proposed study:

Diagnosis of Toxoplasma infection in pregnant women and case tracing by using Real-time PCR and ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)

Principle Investigator:

Name: John C. Tsai Hong

Title: Associate Professor

Dept. (Institute): Institute of Tropical Medicine

Institution: National Yang-Ming University

The above study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of National Yang-Ming University on 04/01/2006, and effective till 12/31/2006.

Shim-Jang Huang

Chair, Institutional Review Board
National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan 112 ROC



國立陽明大學動物實驗管理小組審查同意書

Affidavit of Approval of Animal Use Protocol
Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of National Yang-Ming University

動物實驗申請表暨同意書編號： 950304

計畫申請人： 蔡洪又欽 職稱： 副教授
單位： 熱帶醫學研究所 飼養/應用地點： 本所動物房 / 本所實驗室
計畫名稱： 以 Real-time PCR 及 ELISA 應用於懷孕婦女弓形蟲症之診斷暨個案治療癒後之評估

本計畫之「動物實驗申請表」業經動物實驗管理小組 實質形式審查通過。
本計畫預定飼養應用之動物如下：

動物種類	動物數量	計畫執行期間
紐西蘭兔(母)(2.6kg)	35 隻	2006年3月15日至2008年12月31日
ICR 小鼠(母)(10至12週)	360 隻	2006年3月15日至2008年12月31日

The animal use protocol listed below has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Protocol Title : Diagnosis of Toxoplasma infection in pregnant women and case tracing by using Real-time PCR and ELISA (enzyme-Linked immunosorbant assay)

IACUC Approval No : 950304

Period of Protocol : Valid From: 03/15/2006 To: 12/31/2008 (mm/dd/yyyy)

Principle Investigator (PI) : John Chin Tsaihong

動物實驗管理小組召集人

IACUC Chairman

蔡又欽

日期 5-11-2006

Date