

封面樣式

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000112

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：利用 KlenTaq DNA polymerase 改進 Q 熱 PCR 之檢測

年度/全程研究報告

執行單位：研究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：104 年 1 月 1 日至 104 年 6 月 30 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、預定完成工作項目及實際執行情形	9
陸、結果與討論	10
柒、重要參考文獻	12

壹、計畫中文摘要

關鍵詞：Q 熱、Klentaq DNA polymerase

目前 Q 熱檢測分為 PCR 與 IFA 兩種方法，PCR 檢驗其意義在於能以最短時間及早檢測出病原體，以達到早期發現早期治療之目的。但 PCR 方法侷限在 50%靈敏度不足之缺點，且受限於檢體之前處理，全血液檢體必須經由核酸萃取機分離核酸後再以 PCR 分析，其成本佔目前單一病例 Q 熱檢測費用之半數。由此可見，PCR 方法不論是用核酸萃取前處理或 PCR 靈敏度之提高都有改善空間。

原 PCR 系統利用純化 DNA 進行 real-time PCR 檢驗之陽性率 6.5%，靈敏度 38.9%，專一性 94.5%；本研究計畫直接採全血之周邊單核細胞(PBMC)進行 Klentaq PCR 檢驗，陽性率 1.8%、靈敏度 5.6%、專一性 98.4%。原 PCR 系統檢驗的陽性率較 Klentaq PCR 檢驗高，且檢驗靈敏度也高約 7 倍，專一性差別不大。

由實驗結果得知，Klentaq polymerase 系統與原 PCR 系統檢驗靈敏度低，專一性差別不大。顯示 Klentaq polymerase 系統仍有許多部份需要改善。

貳、 計畫英文摘要

關鍵詞：Q fever、Klentaq DNA polymerase

In current examination assay, we use real-time PCR and IFA. PCR method is used to detect pathogen immediately and cure can be treated to patient at the shortest period. But PCR is limited by its 50% sensitivity. Furthermore, it is restricted that blood sample should be first extracted to nucleic acid and follow by real-time PCR analysis. The price of DNA extraction make up most of the examination cost. In that way, sample pre-treating method as DNA extraction and sensitivity of real-time PCR have room for improvement.

The original PCR system using purified DNA to perform real-time PCR examination has 6.5% positive rate, 38.9% sensitivity and 94.5% specificity. However, this study using peripheral blood mononuclear cell separated from whole blood to perform Klentaq PCR has 1.8% positive rate, 5.6% sensitivity and 98.4% specificity. Comparing with Klentaq PCR system, the positive rate of the original PCR system has higher positive rate and 7 times higher sensitivity, but the specificity is similar.

As data shown, Klentaq polymerase system has lower sensitivity than the original PCR system. Showing that Klentaq polymerase 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菌(*Coxilla burntii*)。目前全國負責檢測 Q 熱傳染病由本署研究檢驗及疫苗研製中心之南區實驗室職掌。其中檢測分為 PCR 與 IFA 兩項目，透過 PCR₍₁₎ 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；IFA₍₂₎ 為檢測宿主免疫系統所產生之抗體是否存在。就防疫目的與意義而言，PCR 較能符合在感染早期檢測出病原體並給予病患治療。然而目前 Q 熱檢測之流程，所有送驗病例須待發病後第二次採檢(約兩周後之恢復期)才能透過 IFA 判定病例是否為陽性，其原因在於目前 PCR 技術仍有 50% 機率無法判定陽性，其中包含偽陽性及無法檢出之因素。

探討 PCR 靈敏度過低因素可能為全血萃取核酸；Q 熱檢體以全血進行核酸萃取，但病原體寄生於單核球細胞中₍₃₎，所以全血核酸萃取會造成病原體核酸濃度過低以致檢測不出的結果。改善方法可以透過血液分離周邊單核球細胞方式再行核酸萃取，此法雖然可以大幅提升 PCR 之靈敏度，但經自動核酸萃取之過程仍會耗費高比重的經費，長久下來並無法提升整體檢驗能量。如果能以周邊單核球細胞直接進行 PCR 就可以解決上述靈敏度與經費之問題，然而卻面臨到新問題的產生。PCR 主要由 DNA polymerase 將 DNA 增幅，但會受到血液中的干擾因子影響讓 DNA

polymerase 的效率大幅降低造成 PCR 品質不佳，如採前述周邊單核球細胞進行 PCR 之檢測必然會受到血液中的干擾因子抑制。

Klentaq DNA polymerase 是近幾年所改良的 DNA polymerase，主要是將過往的 Taq DNA polymerase 的 N 端去除一部份而讓其活性可以在血液干擾因子存在下仍然保持⁽⁴⁾。現在已有許多血液 PCR 檢測採用 Klentaq DNA polymerase 方式，利用血液直接進行 PCR 亦可達到與經核酸萃取相同的結果。利用 Klentaq DNA polymerase 搭配周邊單核球細胞進行 Q 熱 PCR 檢測預期會大幅提升靈敏度，同時可以節省經費，因此提升 Q 熱 PCR 檢測之效能可大幅縮短檢測與病患治療的時效。

近年為因應中央經費逐年縮減，但防疫檢測仍須不怠，在有限資源下發揮最大的防疫能量。本計畫藉由新一種改良式 Klentaq DNA polymerase 能夠在檢體尚有血液形態存在下進行 PCR 檢測，因血液中的成分會干擾 PCR 的準確度，期望藉由本計畫發展 Klentaq polymerase 系統能節省核酸萃取之費用。

肆、 材料與方法：

1. 週邊血液單核性細胞分離

15 ml 離心管中先以 pipet 裝入 2 ml 之 Ficoll 試劑。取 Q 熱待測全血檢體 2 ml 以 pipet 沿上述之離心管壁緩慢加入最終形成兩液相之分層。以 1,000 rpm 離心 10 分鐘取出離心管。此時離心管會呈現三液相分層，中間層即為週邊血液單核性細胞，以 pipet 小心將該層取出並移入分裝小管中冷凍備用。

2. Real-time PCR

試劑配方(單管):

(sample)	1
5x buffer	5
dNTP	0.5
0.1uM primer (9+10)	1.25
10uM primer (11+12)	1.25
cell/DNA	5
1X SYBR	2.5
Hemo KlenTaq	2
ddH ₂ O	7.5
(μl/tube)	25

將上述配方混合均勻後，以 PCR 儀設定:

Activation: 95°C, 5 min

Denature: 95°C, 30 sec

Annealing: 60°C, 30 sec

Extension: 68°C, 30 sec (detection)

} 35 個循環

Melting profile

記錄各次實驗之 C_t 值、 T_m 值。

3. 平行試驗結果分析

將 104 年度全血檢體以現有方式(核酸萃取，PCR)及 Klintaq 方式進行檢測，就結果分析 1.陽性率、2.靈敏度、3. C_t 值、4.準確率。並進一步分析本研究計畫之實驗方法是否較現有方法佳，並評估未來用 Klintaq 取代現有 PCR 檢測之可行性。

伍、 預定完成工作項目及實際執行情形

預定完成工作項目	實際執行情形
檢體收集及前處理	自 103/11/4 至 104/5/27，收集 570 件第一採全血之周邊血液單核球細胞 (PBMC)。
Hemo Klentaq PCR 實驗條件設立	於第一季條件測試完成，包括引子濃度、黏合溫度、延長時間及結果分析。
平行測試： 原 PCR 系統與 Klentaq 系統比較	通報檢驗 570 件，PCR 系統檢出 40 件陽性，其中 5 件 IFA 陽性；Hemo Klentaq 系統檢出 10 件陽性，其中 1 件 IFA 陽性。 其中原 PCR 系統與 Klentaq 系統同時檢出陽性有 3 件，但 IFA 檢測皆為陰性。

陸、 結果與討論

原 PCR 系統利用純化 DNA 進行 real-time PCR 檢驗之陽性率 6.5%，靈敏度 38.9%，專一性 94.5%；本研究計畫直接採全血之周邊單核細胞(PBMC) 進行 Klentaq PCR 檢驗，陽性率 1.8%、靈敏度 5.6%、專一性 98.4%。原 PCR 系統檢驗的陽性率較 Klentaq PCR 檢驗高，且檢驗靈敏度也高約 7 倍，專一性差別不大。

routine PCR	IFA ⁺	IFA ⁻	
PCR ⁺	7	30*	18.9%
PCR ⁻	11	519	97.9%
	38.9%	94.5%	

*3 cases had no 2nd blood drawing to confirm

Klentaq PCR	IFA ⁺	IFA ⁻	
PCR ⁺	1	9	10.0%
PCR ⁻	17	540	96.9%
	5.6%	98.4%	

本研究 Klintaq PCR 檢測之陽性率偏低，推測可能原因，(1)在送驗之全血約 2-5ml，可收集之血液棕黃層(buffy coat)不好操作容易流失。(2)*Coxiella burnetii* 菌存在 PBMC 含菌量不高，不易檢出。(3)血液檢體品質差異，如溶血等影響 PBMC 分離及檢出。

柒、 重要參考文獻：

1. [Hou MY](#), [Hung MN](#), [Lin PS](#), [Wang YC](#), [Lin CC](#), [Shu PY](#), [Shih WY](#), [Wu HS](#), and [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](#), and [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. [Koster FT](#), [Williams JC](#), and [Goodwin JS](#): Cellular immunity in Q fever: modulation of responsiveness by a suppressor T cell-monocyte circuit. [J Immunol.](#) 1985;135(2):1067-72.
4. [Kermekchiev MB](#)¹, [Kirilova LI](#), [Vail EE](#), and [Barnes WM](#): Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. [Nucleic Acids Res.](#) 2009;37(5):e40. doi: 10.1093/nar/gkn1055. Epub 2009 Feb 10.