RRPG89090023(41 .P)

計畫編號：DOH89-TD-1020

行政院衛生署八十九年度委託研究計畫

登革病毒快速診斷定型方法之發展與建立(II)
ESTABLISHMENT OF Rapid Diagnosis and Serotyping System for Dengue Viral Infection (II)

研究成果報告

執行機構：私立臺北醫學院

計畫主持人：施純明

研究人員：施純明、王嘉媜、李淑芬

執行期限：88年7月1日至89年6月30日

＊＊本研究報告僅供參考用，不代表本署意見＊＊

目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
前言	3
結果	11
討論	14
結論與建議	15
參考文獻	16
圖、表	21

中文摘要

關鍵詞：登革病毒(dengue virus), 反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR), 化學呈色法(colorimetric method), 微量滴定盤(microtiter plate), 雜交技術(hybridization), 診斷(diagnosis)

登革病毒屬黃質病毒科，依其抗原性之不同，可分為四種血清型，主要流行於熱帶及亞熱帶地區；台灣亦屬登革熱之流行地區，四種血清型的登革病毒均曾出現本土株，並有本土化跡象，甚或有出血性登革熱病例，故登革病毒的檢測與防範，帖為流行病學與預防醫學之重要課題。

本計劃之目的為簡化檢體 RT-PCR 之前處理，並建立登革病毒快速診斷定型之流程。利用 96 孔微量滴定盤，配合化學呈色法及登革病毒特異型探針(type-specific probe)雜交技術(hybridization)偵檢 PCR 產物，以提高靈敏度與特異性(specificity)；而利用酵素免疫分光光度計(ELISA reader)讀取 96 孔微量滴定盤檢體之化學呈色吸光值，有利於操作的自動化、標準化，且方便、省時，並具低成本特性；PCR-ELISA 系統之建立，除適用於處理大量檢體外，尚具定量(quantitation)功能，或能提供患者體內病毒量與疾病嚴重度之關聯性。

本研究室利用 TouchDown PCR 方法以提高 RT-PCR 產物之特異性與產量，亦即先以高溫(66℃) 進行 polymerization 反應，以提高反應引子之結合專一性，藉以提升產物特異性，但為兼顧產量，故將 annealling 溫度以每 cycle TouchDovon –0.5℃ 至 58℃ 為止。此外，反轉錄之反應溫度亦從 42℃ 提升至 53℃，並縮短反應時間至 30min。此外，以 streptavidin 或 DNA 塗佈之 96 孔微量滴定盤，配合化學呈色法及登革病毒特異型探針(type-specific probe)雜交技術，本研究室目前可偵檢靈敏度為 1 fg，並可降低交叉反應，以提高特異性。另外，並具有下列優點：

(1)利於自動化、標準化，故方便、省時，並降低成本；

(2)適於處理大量檢體，並具定量化的功能。

台灣地區為登革病毒之流行區域，登革熱已名列台灣十大重要傳染病之一，故發展一簡單、快速又可靠之診斷方法，以利登革熱疫情之預防與掌握，實為流行病學與預防醫學的重要課題。本計劃之成果，近程可提供防疫單位實際診斷操作應用的參考，兼具學術性與實用性。此外，因流程簡化省時、成本降低，故可節省公帑；更因其易於自動化與標準化，故本研究成果在遠程上，有助於登革病毒 RT-PCR 檢驗試劑組之開發。

英文摘要

Keyword : dengue virus, RT-PCR, colorimetric method, microtiter phate, hybirdization, diagnosis

Dengue virus, a flaviviridae, can be distinguished to four serotypes due to their epitopes. Taiwan is an endemic area. Local strains and local cases were discovered in recent years. Therefore, the prevention and diagnosis of dengue virus are an important course in the policy-making for public health.

Our laboratory was supported by the Department of Health (DOH89-TD-1020) to establish a system of rapid diagnosis and serotyping for dengue viral infection. Results showed that the standardized RT-PCR/ELISA method was performed very well and had the advantages of low cost, short diagnosis course (< 8hr) and low labor intensive with automatic potential. The best RT-PCR condition was established by a TouchDown PCR method with high starting annealing temperature (66 °C) and touchdown by –0.5 °C/cycle for 15 cycles. After this procedure, another 15 cycles were proceeded with 58 °C annealing temperature. Such PCR protocol can obtain products with high specific quality and a lot of quantity. Moreover, by streptavidin or DNA coated plate coupled hybridization and colorimetric detection method, as low as 1 fg dengue viral RNA with high sensitivity and specificity. Based on this protocol, the diagnosis can be completed within 8 hr. However, it needs further investigation to evaluate the potential of RT-PCR/ELISA to replace the conventional nested RT-PCR method.

Furthermore, our ambition is to combine the nucleic acid hybridization and ELISA-like colorimetric detection technique to develop a high sensitivity and specificity dengue viral diagnosis and serotyping kit which with automatic, standardized, convenient and low cost characteristics. On the other hand, such kind of method can also be applied to diagnosis the infection of entrovirus or hantavirus.

前言

登革熱主要流行於熱帶及亞熱帶地區，據統計，全世界超過二十億人受登革熱威脅，每年有一千萬以上的感染病例發生。台灣地區在近百年來均出現周期性流行，並有數次大規模感染的記錄，如 1922 年於澎湖，1944 年於台灣本島，1981 年於小琉球及 1988 年於高屏地區。而近兩三年來均於固定時節引發流行，且除境外移入病例外，四型登革病毒都曾出現本土性病例，並漸有本土化的跡象，這在在都透露著，爆發出血性登革熱流行的危險性正持續增加。因此，快速確診登革熱疑似病患與建立登革病毒快速定型法，以便迅速掌握疫情，防範疫情擴展，實為流行病學和預防醫學之重要課題。

病毒學簡介

登革熱病毒屬於黃質病毒科 (flaviviridae)之黃質病毒屬 (flavivirus) (Westaway *et al.*, 1985)。成熟的登革熱病毒為一直徑約 50 nm 之球形顆粒，以約 10 nm 厚之脂質外套膜 (envelope)圍繞正二十面體的蛋白質外殼 (capsid)，內含一單股正向 RNA (positive single-strand RNA) (Kautner *et al.*, 1997; Henchal and Putnak, 1990)。登革病毒 RNA 的開放轉譯區 (open reading frame)可直接轉譯(translate)出約 3000 個胺基酸之單一多蛋白先驅物 (precursor polyprotein)，經胞內訊息胜　酶或病毒蛋白酶(protease)切割成各單一蛋白，結構蛋白位於 N 端，其中包括 nucleocapsid protein (C)，membrane-associated protein，prM (M)及 envelope protein (E)三種 (Rice *et al.*, 1986)；非結構性蛋白位於 C 端，包括 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B、NS5 七種，其中 NS3 為病毒蛋白酶 (viral protease)、NS4A、4B 功能尚未確定，現今證據顯示可能為輔因子(cofactor)，用以幫助 RNA 複製複合體 (RNA replication complex)之形成，NS5 為黃質病毒中保留性最高的蛋白質，為 RNA 依賴性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase) (Kautner *et al.*, 1997； Henchal and Putnak, 1990)。病毒依抗原性的不同，可分為四種血清型 (DEN-1、DEN-2、DEN-3、DEN-4)；四型病毒各別引發的抗體在血清學檢驗中，雖會有發生交叉反應 (cross-reaction)，但卻無交叉保護 (cross-protection)之現象發生(Kautner *et al.*, 1997; Innis *et al.*, 1989)。

傳染途徑

人類為登革病毒之天然宿主，經埃及斑蚊及白線斑蚊為傳染媒介而受到感染。埃及斑蚊為效率最強之媒介，原產於非洲叢林中，現今以廣泛分佈於北緯三十度至南緯二十度之間流行區域包括亞洲、美洲、非洲、大洋洲等熱帶、亞熱帶

地區(Kautner *et al.*, 1997; Guble, 1988)，現今分佈於台灣中南部各縣市。白線斑蚊遍佈於全省海拔一千公尺以下的山區及平地。兩種斑蚊之生活環境相似，喜好濕熱環境，因飛行範圍限制，台灣登革熱病例的發生與埃及斑蚊之分佈地較為相關。兩種斑蚊均僅雌蚊會吸血，喜白天吸血，最常在下午四至五點及早上九至十點，多叮咬人的下肢。登革熱病毒由蚊子叮咬而傳播，潛伏期約二至七天，接著是高濃度的病毒血期，此期間蚊子叮咬病人血液，可經八至十二天的增殖後，終其一生均可藉叮咬人而傳播病毒(闕等., 1999; 李, 1995)。

臨床症狀

(1) 典型登革熱：突發性頭痛，持續性高燒，眼窩疼痛，背痛，骨頭關節酸痛，虛弱及全身倦怠，部份病人會在胸前及四肢屈側出現短暫性的疹子。

(2) 出血性登革熱及登革熱休克症候群：此類病人較嗜睡，由於血管通透性改變及血液凝集異常，出現低血壓及嚴重的內出血，世界衛生組織依是否出現血小板減少(<100,000/mm^3)及血液濃縮(>20%)來辦定有無出血性登革熱，依血壓高低判定有無出現登革熱休克症。(何等., 1999; Kautner *et al.*, 1997)

治療與預防

一般採用支持療法，退燒宜用 acetaminophen，避免使用水楊酸類 salicylate 及具肝毒性之藥物，以免損害血小板功能。治療期間需監測生命徵象及血比容，對於無休克現象之病人，給予電解質口服液補充(闕等., 1999; Fields and Knipe, 1990)。

預防工作方面：(1)教育民眾清除孳生源。(2)進行病媒蚊密度調查，以擬定清除孳生源計畫，避免流行爆發。(3)對於疑似病例，確實報告當地衛生主管機關，以對疫情確實掌握。(4)病人於燒退前預防被病媒蚊叮咬，病房應加裝紗窗且蚊帳，將病人與蚊蟲確實隔離(行政院, 1999)。

登革熱流行史

世界性

登革病毒的流行近年來不論疾病嚴重度、病例數和流行地區的分佈等，均有大幅增加的現象，例如 1981-1990 十年間的病例數是 1956-1980 二十五年間的兩倍(Halstead 1988)。而出血性登革熱在 1950 年代間原本只發生於東南亞地區，但 1980-1990 的十年間，卻在加勒比海周圍國家蔓延流行開來，1980 年代末期整個亞洲－太平洋地區也都受到波及。出血性登革熱流行特徵的變化除了在地理範圍

擴大和病例數增加外，病毒血清型也由以往的第二型為主，第一、三、四型散發的情況，變成有以第三型為主的流行發生。根據世界衛生組織統計，全世界有超過二十億的人暴露在登革熱的威脅之下，每年有一千萬以上的新病例發生，登革熱已成為全世界最重要的蚊媒傳染病。如何有效偵測以防治登革病毒的威脅已成為重要的公共衛生課題(Kautner *et al.*, 1997)。

台灣地區

臺灣地區在日治時代與南洋有貿易往來，登革病毒由往來的商船引入，疫情就由通商港口高雄地區開始，接沿著鐵路北上而傳播至全島，期間曾有多次登革熱流行的記錄且於民國 4 年、20 年及 31 年均有全島性之大流行（許, 1995）。但自民國 34 年二次大戰結束之後，台灣約有 40 年沒有病例報告，這可能與戰後噴 DDT 撲滅瘧蚊也因而將斑蚊撲滅有關，直到民國 70 年才在屏東縣的小琉球爆發第二型登革病毒的流行，經追查原因可能因我國漁民被菲律賓政府扣留期間於獄中得到而帶回台灣，估計該島近 80%的居民受到感染，約有一萬人(李, 1995; 許, 1995; 吳, 1986; 謝等, 1982)。台灣本島於民國 76 年在高雄屏東地區發生第一型登革病毒為主的流行(報告病例 1,123 名)，根據衛生署調查，侵襲率為 13.5%。次年，疫情繼續擴大，報告病例數高達 10,420 名，確定病例 4,389 例，病毒分離結果仍以第一型登革病毒為主(Ko, 1989; Ko *et al.*, 1989; 行政院, 1987)。民國 78 年至 82 年間則病例數少且以境外移入為主，只有在民國 80 年曾出現小規模的流行；一般而言，自民國 76 年起的這段期間中，雖然四種血清型的登革病毒都曾分離到，也有少數登革熱併發出血症狀的病例出現(Liu *et al.*, 1989)，整體來說，流行範圍仍侷限以高屏地區為主，屬於單一病毒型，臨床症狀典型的流行。但自民國 83 年起，流行情況開始有所轉變。高雄市左營區首先本土型登革熱第三型登革病毒的流行，臺南市則有第一型登革病毒，高雄縣鳳山市並出現臺灣地區第一位因出血性登革熱死亡的病例，此年共計有 11 名符合世界衛生組織出血性登革熱標準的病例(行政院, 1995a; 許, 1995)。民國 84 年登革熱的威脅甚至越過北迴歸線，進入無埃及斑蚊但只有白線斑蚊分佈的區域，侵襲北部及中部臺灣；全年共計有 369 名確定病例，其中 329 例為本土病例，流行幅度為民國 77 年以後最大的一年，而且四型登革病毒皆已出現本土性病例(行政院, 1996)。民國 85 年收到之 6935 個案中，發現 56 例確定病例，36 例為境外移入，20 例為本土病例。民國 86 年之 5800 個案中，共發現 76 例確定病例，其中 57 例為境外移入，19 例為本土病例。至民國 87 年登革熱疫情更加嚴重，於 1430 個報告病例及 11654 個主動監測個案中，共計有 110 例境外移入病例及 238 例本土病例，不只是病例數之大幅增加，且本土性病例為境外移入病例之二倍之多，此現象顯示出對於登

革病毒之檢測與防治之迫切，以確實監控並避免本土性大流行之發生。登革熱流行已擴及全島且嚴重臨床病例的出現增加，民國 88 年至六月止，於 602 個報告病例及 4947 個主動監測個案中，已有 18 例境外移入病例及 20 例本土性病例之多，可見登革熱疫情已成為臺灣每年之重要防疫問題(行政院, 1999)。

實驗室診斷方法

血清學檢查（MAC-ELISA & HI test）

(一) MAC-ELISA (IgM capture enzyme-liked immunosorbent assay)

經過高病毒濃度的病毒血期(viremia)後，血清中 IgM 抗體產生後可維持 60~90 天，因此可利用 IgM 之出現，當作急性感染的指標，利用 MAC-ELISA 檢測血清中 IgM 的方法，簡單快速的判讀是否感染(Innis *et al.*, 1989; Bundo and Igarashi, 1985)。據統計，民國 83 和 84 年分別有 78% 及 60%的確定病例為 IgM 陽性(行政院, 1996; 1995a)；部份因採血時間過早，抗體尚未生成而無法檢測。依民國 80、83 及 84 年三年的資料顯示，確定病例中，發病六天內進行第一次採檢，有 31.1~57.1% (平均 44.6%)為病毒分離陽性，但這些是在採檢至少一週後才能得到檢驗報告；並有 21.8~56.9% (平均 32.4%)為 IgM 陽性，這表示有半數以上的個案須第二次採檢確認。對於 MAC-ELISA 之檢測上的缺點，有改良的 IgM-biotin-streptavidin ELISA 檢測方式，利用 biotin 及 streptavidin 反應增強抗原-抗體反應之訊息，將此方法利用於急性感染之檢測時，靈敏度可高達 83.3%，特異性可達 95.3%(Kittigul *et al.*, 1998)，雖然如此，使用 MAC-ELISA 檢測急性血清時，仍必須與其他方式比較結果為佳(Rossi *et al.*, 1998)。

(二) HI (hemagglutination inhibition) test

HI test 是傳統上檢驗登革病毒感染的方法(Clerke and Casals, 1958)，敏感性高，但血清要先經過丙酮處理，再經鵝血吸收，步驟繁雜，且因抗體在人體內可達五十年之久，因此必須取急性期及恢復期的成對血清檢測，再經由抗體效價的變化判讀為初次或二次感染；依民國 80~84 年的經驗結果顯示，二次採檢的成功率為 72~81%，許多個案因採檢問題而無法判別，除此之外，此方法對於其他 flaviviruses（如：Japanese encephalitis and West Nile virus）有交叉反應(cross reactivity)現象（WHO,

1997)，會對檢測結果造成影響。此外，恢復期檢體須於發病後第十四天才採檢，在流行發生初期缺少早期偵檢的功能。

病毒分離及培養

病毒檢測的方法是以急性期病人的血清或白血球接種於細胞培養，可使用哺乳類細胞株(BHK-21 及 LLC-MK_2)或蚊子細胞株(C6/36, AP-61 及 TRA-284)培養，藉觀察細胞病變情形，再以螢光抗體染色來做病毒判定(Gubler and Kuno, 1997)。病毒分離的方法敏感性高，且可判定病人感染的病毒型別，並可取得病毒株樣本，但病人檢體是否於正確的時間採檢，影響檢測結果甚巨，再加上接種至細胞株培養至少需 7 天才能進行免疫螢光染色判讀(行政院, 1995b)，整個過程所需時間過長，缺少早期診斷之功能(Gubler, 1998)。

聚合酶鏈鎖反應(PCR)

以反轉錄酶 /聚合酶 鏈鎖(RT-PCR)反應法偵測病毒血期病人血清中之病毒，其偵測結果之陽性率與病毒分離相近，且可縮短確診時間至兩天(Lanciotti *et al.*, 1992)，截至目前，有多組引子可供 RT-PCR 選用，有依 NS1 及 NS3 等不同部位所設計之引子組，再利用巢式 RT-PCR(nested RT-PCR)方式，經兩次 PCR 大量複製加強訊息(Meiyu *et al.*, 1997; Brown 1996; Morita *et al.*, 1994)。也有報告指出，僅經過 RT-PCR 以一保留性引子及一特異性引子進行RT-PCR後，也可有效率的判讀不同血清型(Harris *et al.*, 1998; Seah *et al.*, 1995)，以 PCR 方式檢測為目前最快速之檢測方法，且具同時可分辨血清型之優點。但是以此方法僅適用於仍在病毒血症之急性期檢測，且檢測過程需特殊訓練之操作人員，以避免因人工技術問題而污染，造成檢測結果之誤差。

本研究室所發展之方法

(一) RT-PCR/ELISA

PCR 及 RT/PCR 技術，於偵檢微量遺傳物質(Chelly *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985)已十分普遍。大多以電泳法(包括 agarose gel / ethidium bromide 及 polyacrylamide gel / silver nitrate staining)判定結果，也有使用墨漬法(Southern-blot / Dot blot hybridization)判定之報告(Meiyu *et al.*, 1997; Brown 1996; Morita *et al.*, 1994; Erlich *et al.*, 1991; Henchal *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1989; Chelly *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985)，南方墨漬法之靈敏度(sensitivity)極高，且具有定量效果，但實驗過程相當耗時繁雜，再加上放射線物質使用不利操作，所能處理之檢體量較少。現今有利用酵素免疫分析法(Immunoassay, EIA)，配合核酸雜交技術，已成功的發展出非放射性偵檢法，不但可提高 PCR 靈敏度、特異性(specificity)及方便性外，且可行定量分析(quantitative analysis)。依微量滴定盤(microtiter plate)塗佈(coating)物質之差異，將之分為兩大類：

第一大類：Streptavidin 塗佈之微量滴定盤（參照圖 1 及圖 2）

1. 將 streptavidin 塗抹於微量滴定盤(microtiter plate)上後儲存，其中一引子(primer)以 biotin 標識於 5′端，進行 PCR 後(圖 1-1)，利用 streptavidin 與 biotin 結合之特性，將 PCR 產物置入預先塗佈 streptavidin 之 96 孔微量滴定盤，使 PCR 產物接著於滴定盤中（圖 1-2），將固定於微量滴定盤之 PCR 產物以鹼性變性(alkaline denature)（圖 1-3），續以 Dig(digoxigenin)標識之探針(probe)進行雜交反應(圖 1-4)，另以接合 alkaline phosphatase (AP)之抗 Dig 抗體，進行呈色反應，並讀取 OD 值(圖 1-5) (Fujise *et al.*, 1995)。如此可提高靈敏度與特異性，僅需進行一次 PCR 即可偵測原需以巢式 PCR 偵測之超微量檢體(Hockett *et al.*, 1995; Lear *et al.*, 1995; Ossewaarde *et al.*, 1994; He *et al.*, 1993)。

2. 將 Streptavidin 塗抹於微量滴定盤(microtiter plate)後儲存，在 PCR 過程中，其中一引子(primer)以 biotin 標識於 5′端，另一無標識之引子為登革病毒特異型引子(type-specific primer)，且於進行 PCR 時，加入 Dig-11-dUTP，使 PCR 產物直接標識 Dig(圖 2-1)，利用 streptavidin 與 biotin 結合之特性，將 PCR 產物置入預先塗佈 streptavidin 之 96 孔微量滴定盤，使 PCR 產物接著於滴定盤中（圖 2-2），續以接合 alkaline phosphatase (AP)之抗 Dig 抗體，進行呈色反應，並讀取 OD 值（圖 2-3）。如此可提高靈敏度且直接可判別病毒之血清型(Chow *et al.*, 1997; Lear *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1994)。

第二大類：DNA 塗佈之微量滴定盤（參照圖 3）

將登革病毒特異型探針(type-specific probe)塗佈於微量滴定盤(圖 3-1)，以 biotin 標識之引子進行 PCR，產物經煮沸變性(boiling denature)後（圖 3-2），加入事先塗佈探針之微量滴定盤與變性後之 PCR 產物進行雜交反應（圖 3-3），續以接合 alkaline phosphatase (AP)之 streptavidin 抗體，進行呈色反應，並讀取 OD 值(圖 3-4) (Bazzichi *et al.*, 1998; Sudiro *et al.*, 1998; Kawai *et al.*, 1994; Vliet *et al.*, 1993)。此處之引子選用 biotin 標識是因 biotin 呈色反應之靈敏度較 Dig 高(Yang *et al.*, 1993)。

(二) 單管固相反轉錄酶/聚合酶鏈鎖反應法（參照圖 4）

不同於其他 RT-PCR/ELISA 將 PCR 過程與呈色反應分開處理的方式，本實驗室簡化 RT-PCR/ELISA 之流程，以 Nunc 廠牌之 NucleoLink strips 為材料，發展單管固相反轉錄酶 /聚合酶 鏈鎖反應法(one tube solid-phase RT-PCR/ELISA)方法。將引子 5'端磷酸化，使其與孔壁產生鍵結，固定於孔洞(well)內（圖 4-1），接著於此孔洞內進行 RT-PCR（圖 4-2），續以鹼性變性(alkaline denature)步驟將 PCR 產物分離並清洗除去未固定之單股 DNA（圖 4-3），利用 biotin 標識之探針與固定之單股 PCR 產物行雜交反應(hybridization)（圖 4-4），加入接合 alkaline phosphatase (AP)之 streptavidin，利用 streptavidin 與 biotin 結合之特性接合後，進行呈色反應，並讀取 OD 值（圖 4-5），全部的步驟均於同一孔洞中完成，且同時具有 RT-PCR/ELISA 之各項優點。

RT-PCR/ELISA 之優點

1. 使用 RT-PCR/ELISA 之方式與傳統巢式 PCR 相比較，雖然全部的實驗過程所需花費的時間相當，但以 ELISA 方法取代電泳方式後，每次實驗所可檢測的檢體數將大幅的增加（每一微量滴定盤有 96 孔洞），且可因減少第二次 PCR 過程而降低所需成本，除此之外，部份的 ELISA 步驟可經過機械化的幫助，有助於將來檢測者操作之方便性。

2. 使用 one tube solid-phase RT-PCR/ELISA 方法與其他 RT-PCR/ELISA 相較下，因為其所有的過程均在同一孔洞中完成，經此程序的簡化，可增加操作者處理之方便性且對於實驗過程之機械化將會有所幫助，不只如此，使用 one tube solid-phase RT-PCR/ELISA 方法所需耗費的成本（標識物質之使用方面）也較另兩組 RT-PCR/ELISA 方式節省，對於期望將檢測技術廣泛使用於快速檢測登革熱方面，將是有利的一套方法。

結果

(一)RT-PCR 條件之最佳化

為提高 RT-PCR 產物之特異性與產量，以降低將來發展 RT-PCR/ELESA 方法，讀取吸光之背景值，本研究室首先以 agarose gel electrophoresis /EtBr Staining 方法尋求最佳反應條件，主要的幾種條件列於“材料與方法”中，經實證以 TouchDown PCR 方法最佳，亦即先以高溫(66℃) 進行 polymerization 反應，以提高反應引子之結合專一性，藉以提升產物特異性，但為兼顧產量，故將 annealling 溫度以每 cycle TouchDovon –0.5℃ 至 58℃ 為止。此外，反轉錄之反應溫度亦從 42℃ 提升至 53℃，並縮短反應時間至 30min，詳細反應條件如下：

(1) 53℃ 30min (for reverse transcription)
(2) 94℃ 4min
58℃ 1min
72℃ 1min
(3) 94℃ 30sec
66℃ 30sec
72℃ 30sec
} 15 cycles
TouchDown=-0.5℃/cycle
(4) 94℃ 30sec
58℃ 30sec
72℃ 30sec
} 15 cycles
(5) 72℃ 10min

結果如圖六~圖八所示，圖六為 first run RT-PCR，圖六、七為 secondary PCR 的結果，可見 Dengue 1 (圖七，lane 1)、Dengue 2 (圖七，lane 6)、Dengue 3 (圖八，lane 3) 及 Dengue 4 (圖八，lane 8) 之特異性 PCR 產物。利用此 RT-PCR 條件除可提升產量外，並可降低非特異性 PCR 片段的形成，將有效降低往後發展 RT-PCR/ELISA 之非特異性背景值。

(二)Streptavidin coated plate based assay 之評估

(A) Streptavidin 之塗佈

如材料與方法所述，將 streptavidin 塗怖於 96 well plate 後，為確實品管與品保，本研究室之抽驗率約 20%，方法如下：

因 streptavidin 可與 biotin 結合，故以商業合成 5'端為 biotin 之引子，再自行於 3'端標示 digoxigenin(Dig)，將該引子加入孔洞(well)反應後，續以 AP-conjugated anti-Dig antibody 進行接合，再以 p-nitrophenyl phoshate (pNPP) 呈色，取 OD_{405} 吸光值。本研究室目前已掌握良好的塗佈技術，與 Boehringer Mannhein 公司商賣已塗佈的滴定盤相較，毫不遜色，但價格約只有商賣滴定盤的二十分之一，且於 4℃之儲存期經測試可達 3 日之久。

(B) PCR 產物之 denature 與 hybridization

本研究室分別測試 denature 過程中 NaOH 與 Tween-20 之濃度與反應時間。此外，並檢測 hybridization 過程，probe 的濃度與作用時程及清洗步驟，結果如材料與方法所述，此過程可產生最高的 OD_{405} 讀值，藉以提升檢驗靈敏度。

(三)DNA coated plate based assay 之評估

本研究室測試過多種 chemical based coating method 及 UV-cross linked method，經評估其效能與方便性後，決採用 UV-cross linked method，並以該塗佈引子之反義引子(antisense strand primer)，經 3'端人工標示 Dig 後，進行雜交呈色，以達品管與品保之目的，完成測試後，可於 4℃儲存 6 個月之久。值得注意的是，不論 streptavidin 或 DNA 的塗佈，均須於無菌操作台確保無菌操作，否則將無法達到上述的保存期限。

(四)Dengue Virus 之檢測

(A) 病毒 RNA 之純化

以登革病毒感染 BHK-21 細胞，收取細胞培養液，以 acid-quanidiun thiocyanate phenol-chroroform extraction (Lanciotti et al.,1992)大量製備登革病毒 RNA，並以 0.1ml 石英 cuvette 測定 OD_{260} 吸光值，每 15ml 培養液可得 OD_{260}=0.06 左右，換算約為 1.8ug RNA (0.06 x 30)，亦即約有 1.6×10^{11} 約個病毒 RNA 分子($1.8 \times 10^{-6} \div 660 \div 10000 \times 6.02 \times 10^{23}$)。

(B) 敏感度(sensitivity)評估

(I)streptavidin coating plate based assay

取 10pg RNA 進行 10^{-1} 的系列稀釋 (serious dilution)，圖九~十二分別表示登革病毒 1~4 型之結果，若以 dengue negative serum (NS) 之 OD 值乘以 3 倍為 cutoff value，則約可偵測 1 fg 之 RNA 物質，亦即約為 100 個病毒 RNA 分子。

(II)DNA coated plate based assay

如圖十三~十六所示，可偵測之敏感度限制值 (limitation value)與 streptavidin 塗佈法相當。但若考慮塗佈之方便性與成本，本研究室認為 DNA 塗佈法應是較佳的選擇。

(III)交叉干擾的評估

雖然偵檢單一病毒時，均可達到 fg 的良好敏感度，但四型病毒間之交叉反應(cross-reactivity)仍需進一步評估，圖十七~十八分別顯示兩種方法的交叉反應性，顯示各探針(probe)之特異性甚高，但值得注意的是本研究室礙於材料之取得，未能一一檢測對不同黃熱病毒科病毒之特異性

討論

台灣從民國 83 年起，登革熱幾乎成為常態性的流行，且經本土化後，有日趨嚴重的態勢。因此發展低成本、快速、高靈敏度、高特異性及自動化的方法診斷登革熱，以掌握疫情，實為刻不容緩課題。本計劃提供一些初步的成果，藉以評估 RT-PCR/ELISA 方法之可行性。

本研究室之成果與其他實驗室所得之結果相較毫不遜色(Chow et al.,1997；Ruiz et al.,1995；Chang et al.,1994；Puri et al.,1994)，偵檢之靈敏度可達 1fg，且無因交叉反應而影響特異性的問題，更可大輻降低檢驗時程至 8 小時左右。雖然如此，但仍有改善空間，說明如下:

1、取得各種黃熱病毒科病毒，檢測對各種病毒之特異性。

2、取得實際之血清檢体，進行檢驗。

3、重新設計引子或改進雜交(hybridization)技術，以提升敏感度。

4、改改採熒光呈色法，據廠商數據說明，約可提升敏感度 100 倍左右，但成本較高。

結論與建議

登革熱已成為臺灣的地方性流行病(endemic disease)，每年周而復始的威脅著民眾的健康。由於四種血清型的登革病毒都曾出現過本土株，而且有本土化的跡象；一方面表示病毒流通性增加，高毒力病毒株引入的機會較多，另一方面則是異型二次感染(heterologous secondary infection)的機率增加，造成病毒的抗體增幅作用(antibody dependent enhancement)發生機會增多，這些都可能造成登革出血熱發生的機率上升。因此台灣面臨的不僅是如何避免登革熱流行的擴大，更必須注意防範登革出血熱流行的發生，以免造成社會及經濟的嚴重衝擊與損失。

建立以 RT-PCR 快速檢測登革熱的病例雖有助於疫情的掌空，但仍需依賴有效的病媒蚊管制與撲滅，清除孳生源，以及建立周密且迅速確實的疾病監視和反應系統，才能全民一起防治登革熱的危害。

參考文獻

Bazzichi A, Guidi FV, Rindi L, Incaprera M, and Garzelli C: PCR ELISA for the quantitative detection of Epstein-Barr virus genome. *J. Virol. Methods* 74:15-20, 1998.

Brown JL, Wilkinson R, Davidson RN, Wall R, Lloyd G, Howells J, and Pasvol G: Rapid diagnosis and determination of duration of viraemia in dengue fever using a reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Trans Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 90: 140-143, 1996.

Bundo K and Igarashi A: Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. *J. Virol. Methods* 11: 15-22, 1985.

Chang GJ, Trent DW, Vorndam AV, Vergne E, Kinney RM, and Mirchell CJ: An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* 32: 477-483, 1994.

Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Goutron S, and Kahn A: Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333: 858-860, 1988.

Chow VTK, Yong RYY, Ngoh BL, and Chan YC: Automated type specific ELISA probe detection of amplified NS3 gene products of dengue viruses. *J. Clin. Pathol.* 50: 346-349, 1997.

Clerke DM, and Casals J: Hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573, 1958.

Erlich HA, Gelfand D, and Sninsky JJ: Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651, 1991.

Fields BN and Knipe DM: Flaviviruses, Virology Vol.I Raven press. 2/ed, p763-814, 1990.

Fujise O, Hamachi T, Hirofuji T, and Maeda K: Colorimetric microtiter plate based assay for detection and quantification of amplified Actinobacilus actinomyce-temcomitans DNA. *Oral. Microbiol. Immunol.* 10: 372-377, 1995.

Gubler DJ and Kuno G: Laboratory diagnosis of dengue virus infections, Dengue and dengue hemorrhagic fever. CABI press, pp313-333, 1997.

Gubler DJ: Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Revw.* 11:

480-496, 1998.

Gubler DJ: Dengue, The arboviruses: epidemiology and ecology vol. II CRC press, pp223-260, 1988.

Halstead SB: Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239: 476-481, 1988.

Harris E, Roberts TG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, and Balmaseda A: Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single-tube multiplex reverse transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2634-2639, 1998.

He Y, Coutlee F, Saint-antoine P, Olivier C, Voyer H, and Kessous-elbaz A: Detection of polymerase chain reaction-amplified human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA with a digoxigenin-labeled RNA probe and an enzyme-linked immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 31: 1040-1047, 1993.

Henchal EA and Putnak JR: The dengue viruses. *Clin. Microbiol. Revw.* 3: 376-396, 1990.

Henchal EA, Polo SL, Vorndam V, Yaemsiri C, Innis B, and Hoke CH: Sensitivity and specificity of a universial primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45: 416-428, 1991.

Hockett Jr RD, Janowski KM, and Bucy RP: Simultaneous quantitation of multiple cytokine mRNAs by RT-PCR utilizing plate based EIA methodology. *J. Immunol.* 187: 273-285, 1995.

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P and Hoke CH: A enzyme-linked immunosorbent assay to charadcterize dengue infection where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 418-427, 1989.

Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, Puttisri P, and Hoke CH: An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 418-427, 1989.

Kautner I, Robinson MJ, and Kubnle U: Dengue virus infection: epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *J. Pediatr.* 131: 516-524, 1997.

Kawai S, Maekawajiri S, Tokunaga K, Juji T, and Yamane A: A simple method of

HLA-DRB typing using enzymatically amplified DNA and immobilized probes on microtiter plate. *Hum. Immunol.* 41: 121-126, 1994.

Kittigul L, Suthachana S, Kittigul C, and Pengruangrojanachai V: Immunoglobulin M-capture biotin-strepavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 352-356, 1998.

Ko YC, Chen JW, and Chang IC: Attack rate of dengue-like illness among teachers in Kaohsiung city. Kaohsiung. *J. Med. Sci.* 5: 129-131, 1989.

Ko YC: Epidemiology of dengue fever in Taiwan. Kaohsiung. *J. Med. Sci.* 5: 1-11, 1989.

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

Lear W, McDonnell M, Kashyap S, and Boer PH: Random primer p(dN)6-digoxigenin labeling for quantitation of mRNA by Q-RT-PCR and ELISA. *BioTechniques* 18: 78-83, 1995.

Liu HW, Ho TL, Hwang CS, and Liao YH: Clinicla observations of virologically confirmed dengue fever in the 1987 outbreak in southern Taiwan. Kaohsiung. *J. Med. Sci.* 5: 42-49, 1989.

Meiyu F, Huosheng C, Cuihua C, Xiaodong T, Lianhua J, Yifei P, Weijun C, and Huiyu G: Detection of fliviviruses by reverse transcriptase-polimerase chain reaction with the universal primer set. *Microbiol. Immuno.* 41: 209-213, 1997.

Morita K, Maemoto T, Honda S, Onishi K, Murata M, Tanaka M, and Igarashi A: Rapid detection of virus genome from imported dengue fever and dengue hemorrhagic fever patients by direct polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* 44: 54-58, 1994.

Nikiforov TT, Rendle RB, Goelet P, Rogers YH, Kotewicz ML, Anderson S, Trainor GL, and Knapp MR: Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 22: 4167-75, 1994.

Oroskar AA, Rasmussen SE, Rasmussen HN, Rasmussen SR, Sullivan BM, and Johansson A: Detection of immobilized amplicons by ELISA-like techniques. *Clin. Chem.* 42: 1547-1555, 1996.

Ossewaarde JM, Rieffe M, van Doornum GJJ, Henquet CJM, and van Loon AM: Detection of amplified Chlamydia trachomatis DNA using a microtiter plate-based enzyme immunoassay. *Eur. J. Clin. Microbiol. Dis.* 13: 732-740,

1994.

Puri B, Henchal EA, Burans J, Porter KR, Nelson W, Watts DM, and Hayes CG:A rapid method for detection and identification of flaviviruses by polymerase chain reaction and uncleic acid hybridization. *Arch. Virol.* 134:29-37, 1994.

Rice CM, Strauss EG and Strauss JH: Structure of the flavivirus genome, Togaviruses and flaviviruses. Plenum Publishing Corp., New York, pp279-327, 1986.

Rossi CA, Drabick JJ, Gambel JM, Sun W, Lewis TE, and Henchal EA: Laboratory diagnosis of acute dengue during the united nations mission in haiti, 1995-1996. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59: 275-278, 1998.

Ruiz BH, Zamora MP, and Liu S: Detection of dengue viral RNA by microplate hybridization. *J.Virol.Meth.* 54:97-108, 1995.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, and Arnhaim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.

Seah CLK, Chow VTK, Tan HC, and Chan YC: Rapid, single step RT-PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J. Virol. Methods* 51:193-200, 1995.

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

Vliet GME, Hermans CJ, and Klatser PR: Simple colorimetric microtiter plate hybridization assay for detection of amplified mycobacterium leprae DNA. *J. Clin. Microbiol.* 31: 665-670, 1993.

Wang AM, Doyle MV, and Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9717-9721, 1989.

Westaway EG, Brinton MA, and Trent DW: Flaviviridae. *Intervirol.* 24: 183-192, 1985.

WHO: Laboratory diagnosis, Dengue haemorrhagic fever diagnosis, treatment, prevention and control. The world health organization, Geneva, switzerland 2/ed, pp34-47, 1997.

Yang B, Viscidi R, and Yolken R: Quantitative measurement of nonisotopically labeled polymerase chain reaction product. *Anal. Biochem.* 213: 422-425, 1993.

行政院衛生署疾病管制局(Center for Disease Control)網址：(1999) http://www.dsqs.gov.tw.

行政院衛生署預防醫學研究所。民國八十三年臺閩地區登革熱偵測年報。1995a.

行政院衛生署預防醫學研究所。民國八十四年臺閩地區登革熱偵測年報。1996.

行政院衛生署預防醫學研究所。防疫檢驗標準作業程序手冊。1995b.

行政院衛生署預防醫學研究所。臺灣南部高屏地區登革熱爆發性流行初步調查報告。疫情報導 1987; 3: 93.

何茂旺、劉正義。登革熱。臨床醫學 43: 291-293, 1999.

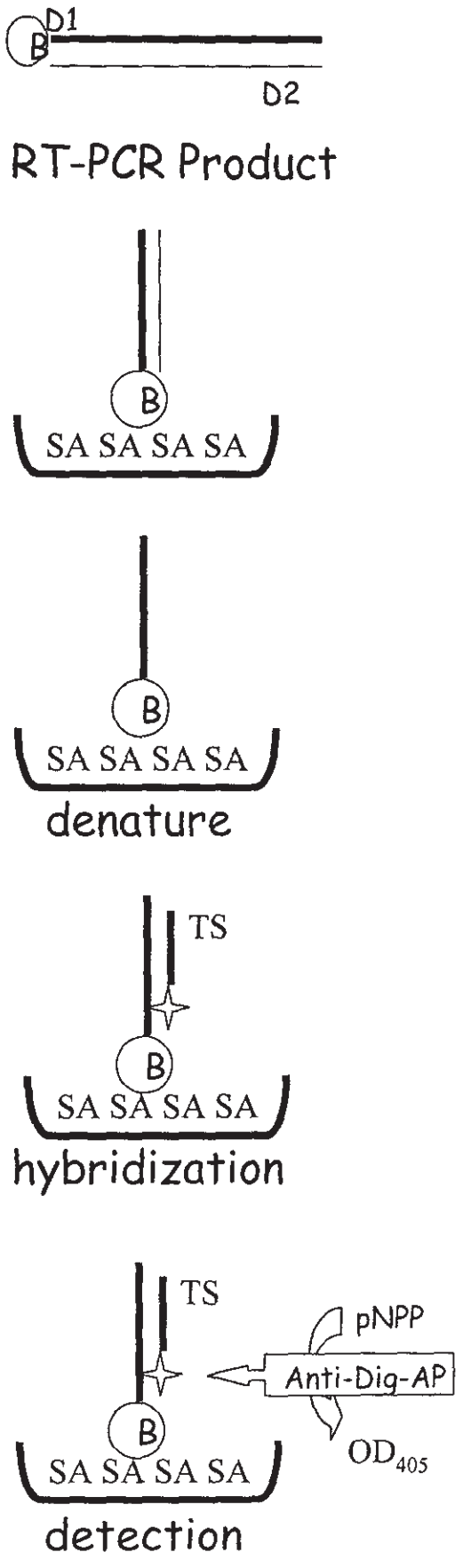
吳盈昌。1981 年屏東縣琉球鄉之第二型登革熱流行。中華微免雜誌 19: 203, 1986.

李維玲。登革熱。院內感染控制通訊 5: 29-32, 1995.

許英昌。登革熱的文獻記錄。醫望 9: 34-36, 1995.

謝維銓、陳明豐、林桂堂、許書刀、馬肇義、吳世勳。1981 年在屏東縣琉球鄉流行的登革熱之研究。臺灣醫誌 81: 1388, 1982.

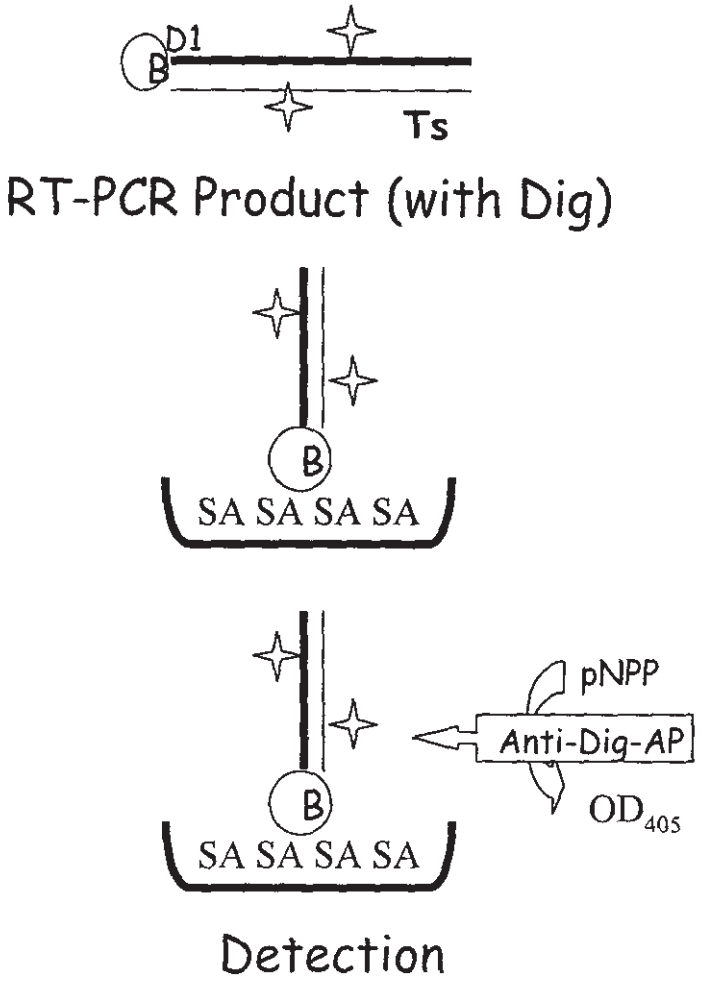
闕宗熙、盧章智、戚偉明、李偉華。登革熱病毒感染之症狀、診斷與治療。國防醫學 28: 40-45, 1999.



圖一

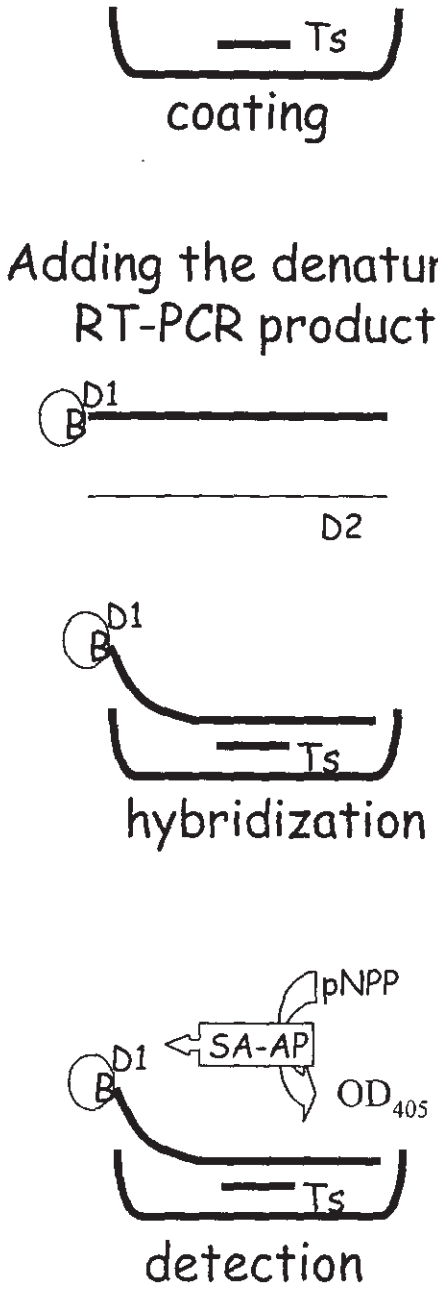
以streptavidin塗佈之微量滴定盤進行RT-PCR/ELISA的流程。呈色物質(digoxigenin)標示於探針引子之3'端。

B, biotin
SA, streptavidin
TS, type-specific primer/probe
Dig or ✧, digoxigenin
AP, alkaline phosphatase



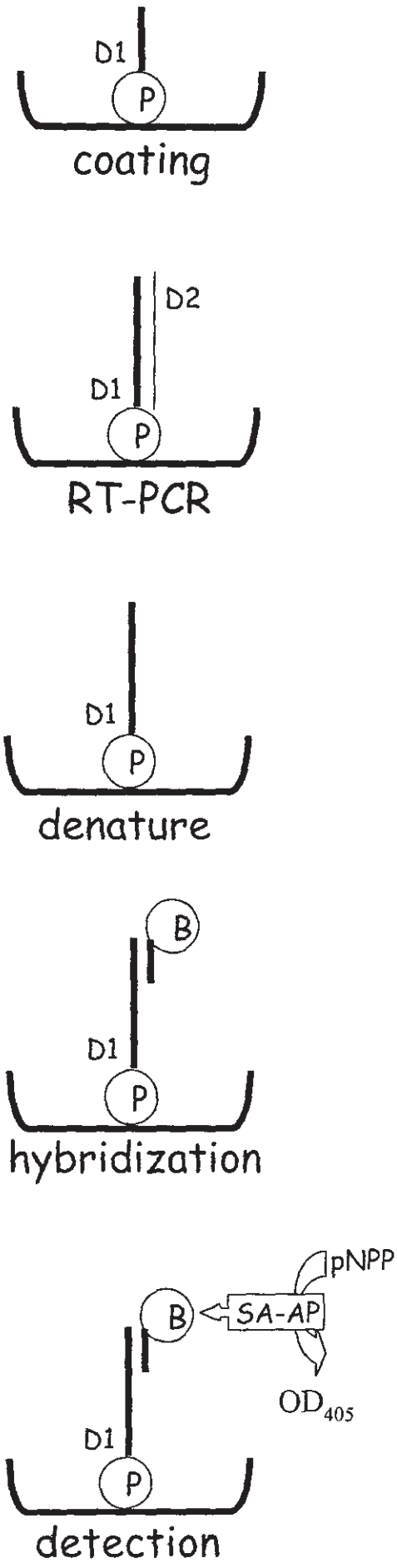
圖二
以streptavidin塗佈之微量滴定盤進行RT-PCR/ELISA流程。呈色物質(Dig)於PCR過程中標示於PCR產物上。

B, biotin
SA, streptavidin
TS, type-specific primer/probe
Dig or ✧ , digoxigenin
AP, alkaline phosphatase



圖三
以登革病毒特異性引子塗佈之微量滴定盤進行RT-PCR/ELISA的流程。呈色物質(biotin)標示於PCR引子D1之5'端。

B, biotin
SA, streptavidin
TS, type-specific primer/probe
AP, alkaline phosphatase

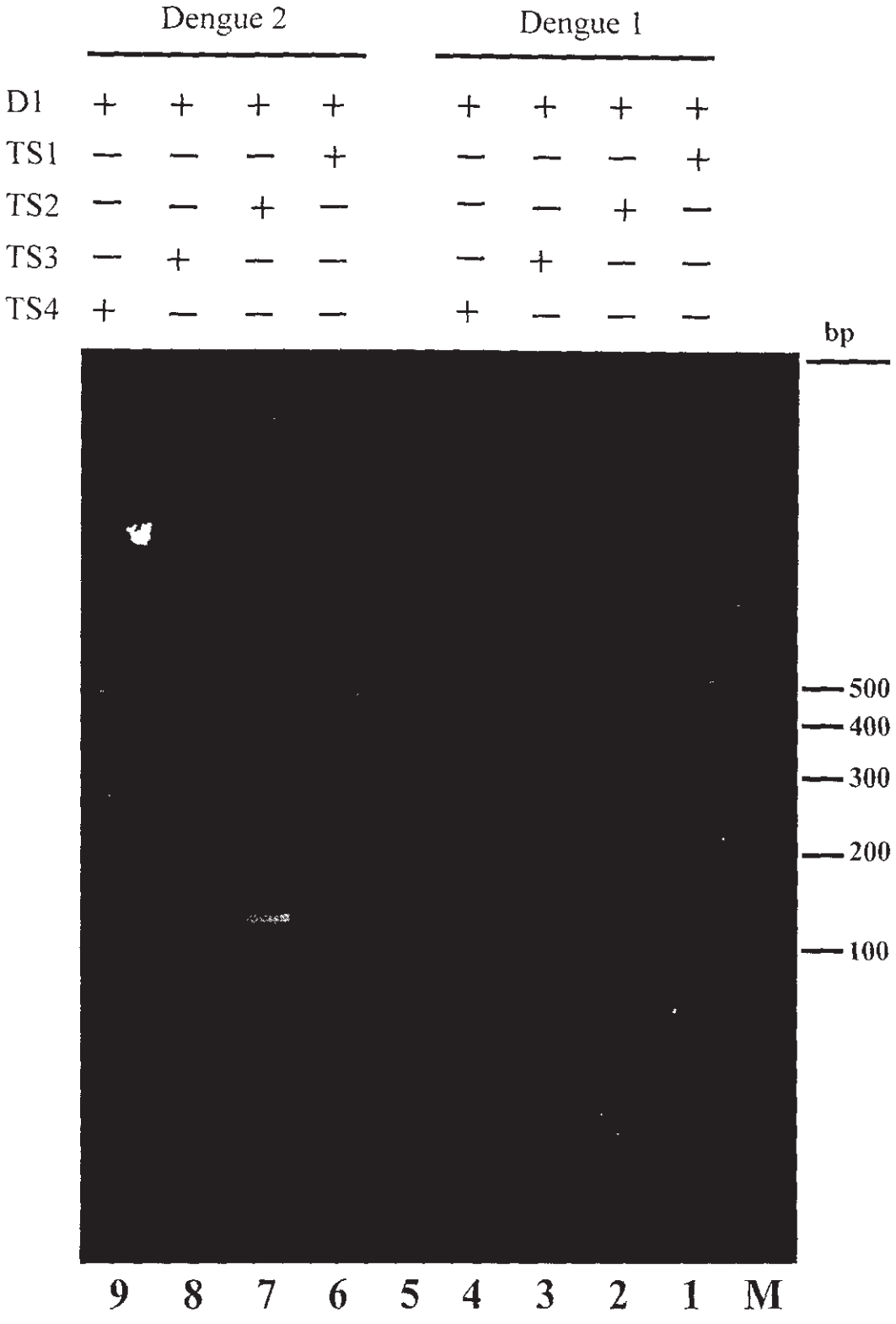


圖四
以5'端標示磷酸根之PCR引子D1塗佈之微量滴定盤，進行RT-PCR/ELISA的流程。呈色物質(biotin)標示於登革特異性探針引子之5'端。

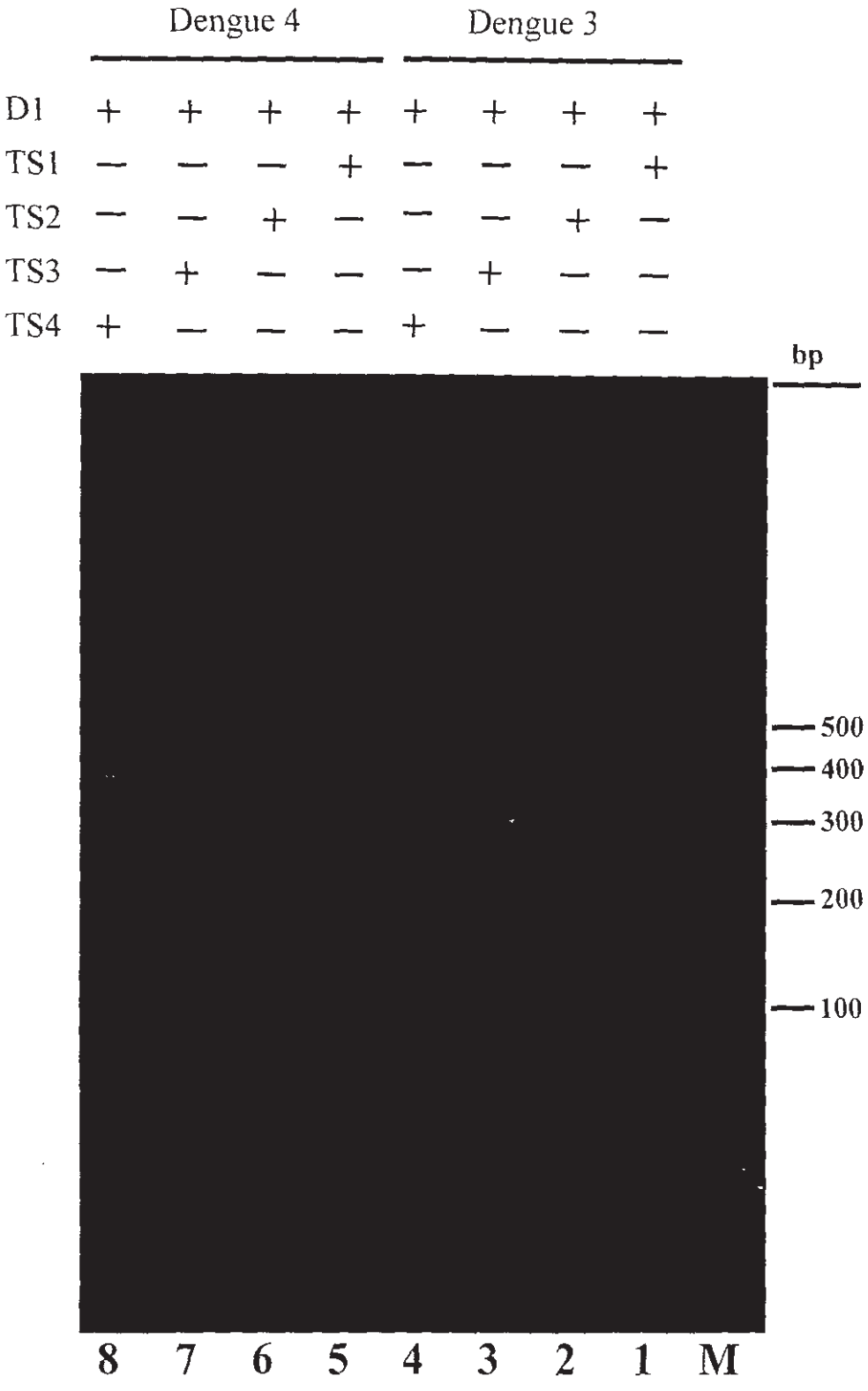
B, biotin
SA, streptavidin
TS, type-specific primer/probe
AP, alkaline phosphatase
P, phosphate

Primer set	
D1	5‘ TAT GCT GAA ACG CGA GAG AAA 3’
D2	5‘ TTG CAC CAA CAG TCA ATG TC 3’
TS1	5’ CAC CTC AGT AAT TCG AGG ACA T 3’
TS2	5’ CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3’
TS3	5’ TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3’
TS4	5’ CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3’

圖五
進行RT-PCR及nested PCR所使用之引子組

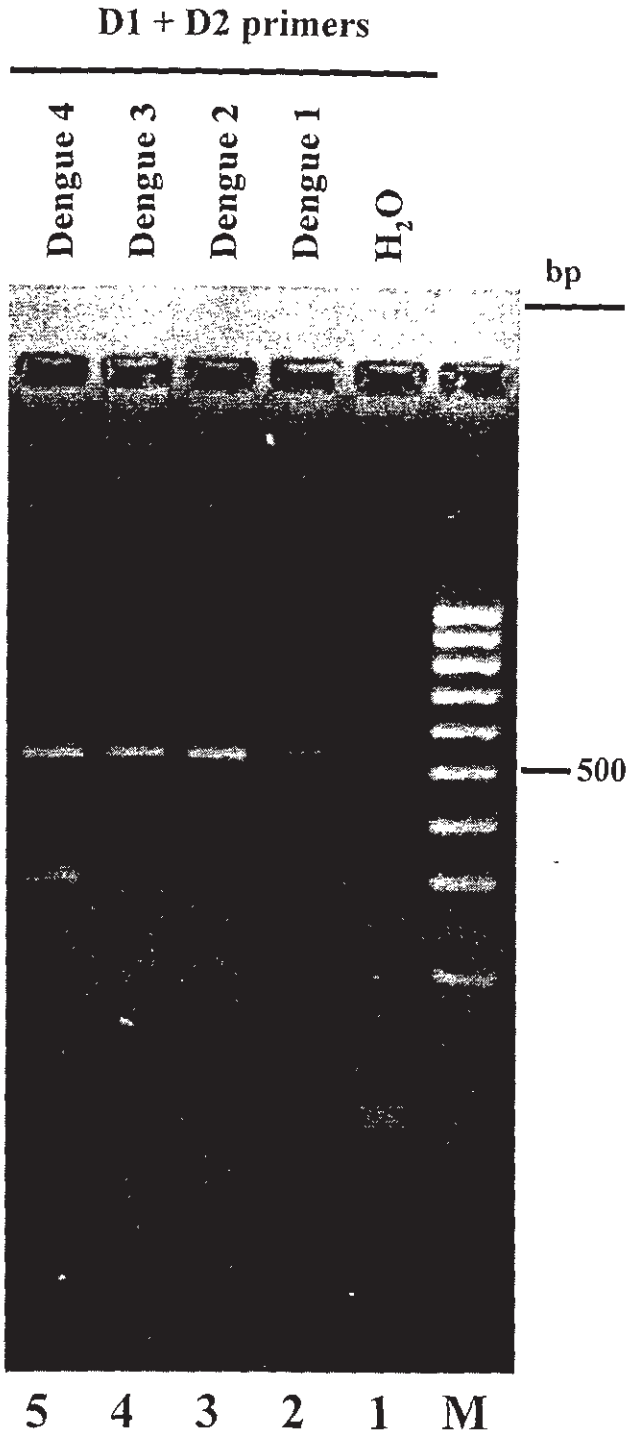


圖六
使用不同引子組進行Dengue 1和Dengue 2之nested PCR反應，PCR產物以2.5% agaros gel電泳後，續以EtBr染色之結果。



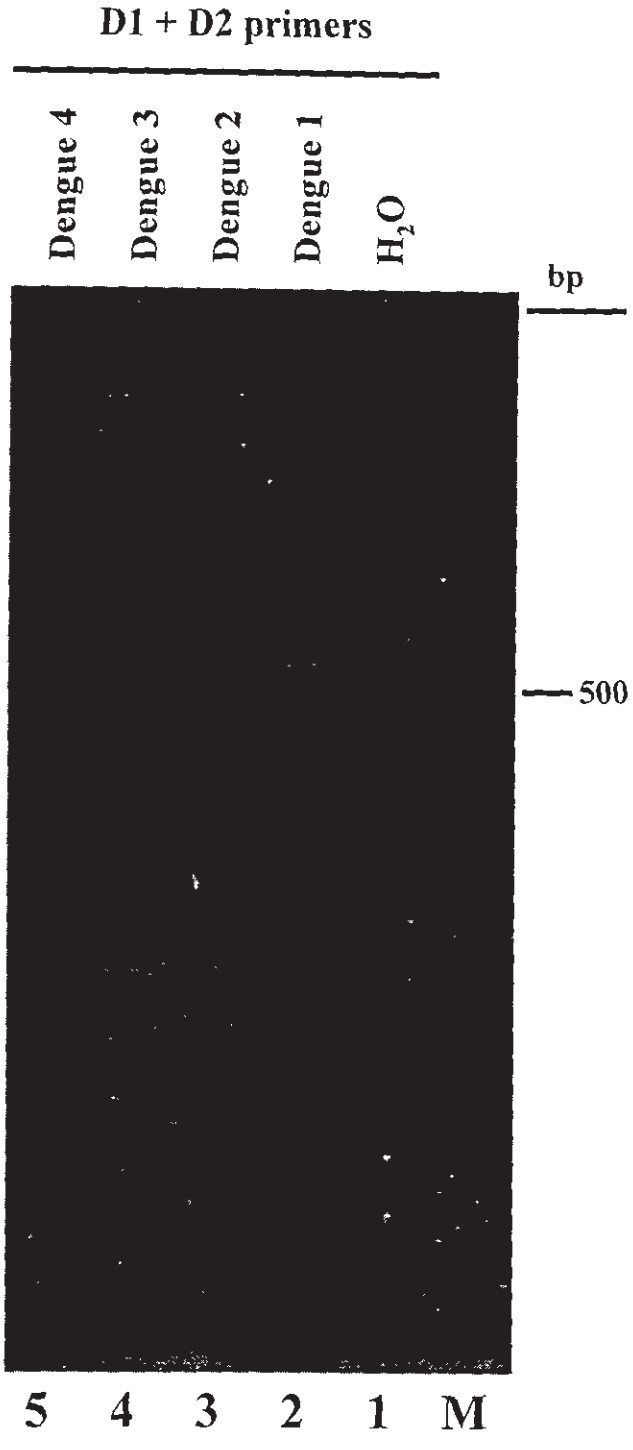
圖七

使用不同引子組進行Dengue 3和Dengue 4 之nested PCR反應，PCR產物以2.5% agaros gel電泳後，續以EtBr染色之結果。

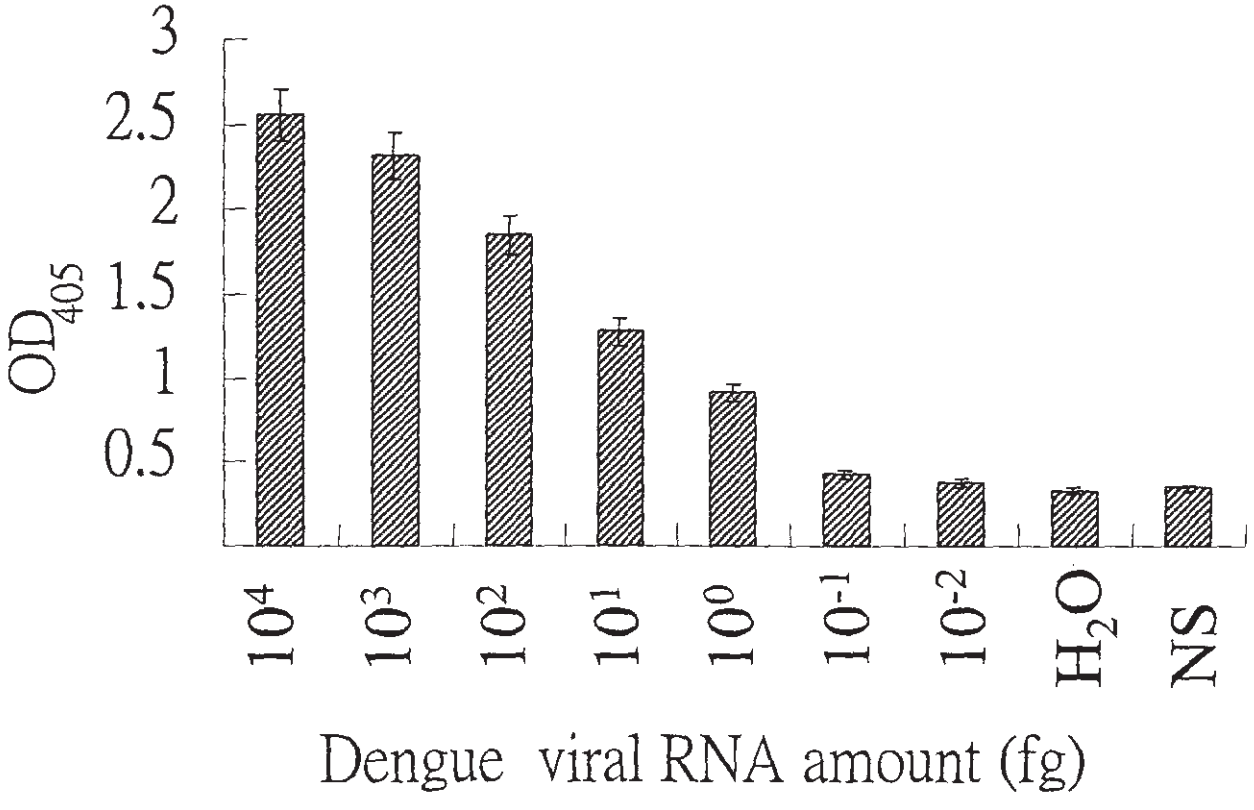


圖八

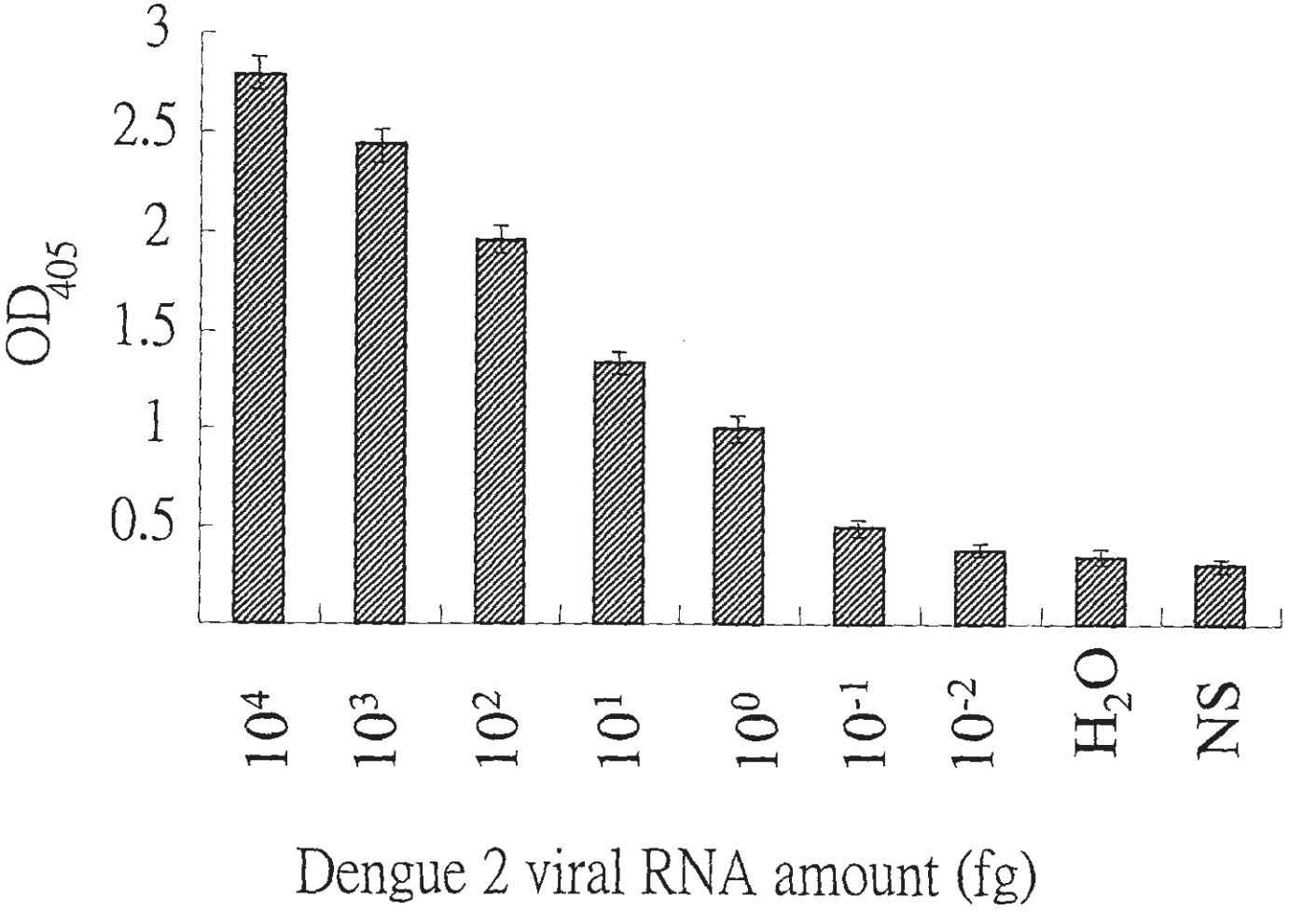
使用D1、D2引子組，進行Dengue 1~4 之RT-PCR反應，PCR產物以2.5% agaros gel電泳後，續以EtBr染色之結果。



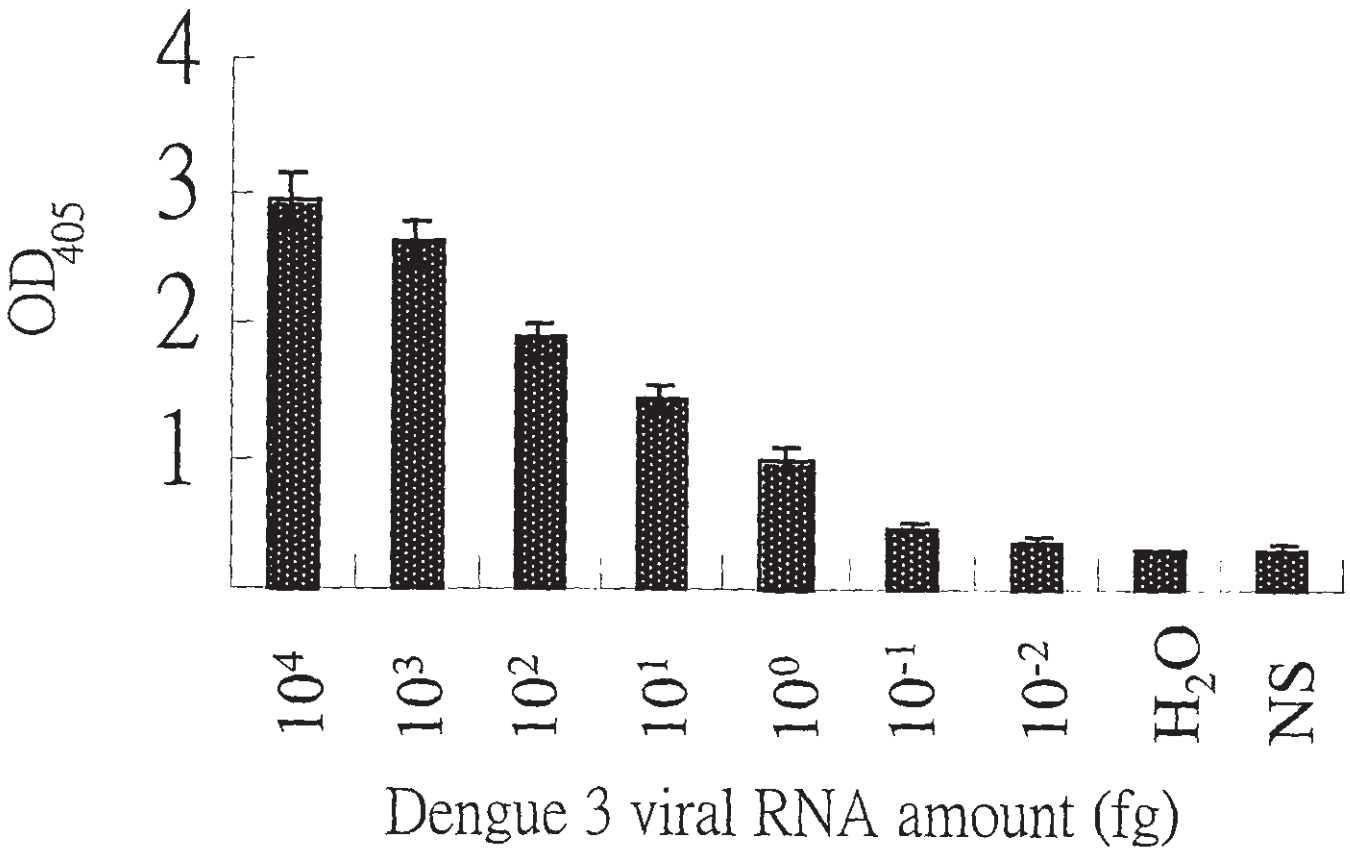
圖九
使用D1、D2引子組，進行Dengue 1~4 之RT-PCR反應，PCR產物以2.5% agaros gel電泳後，續以EtBr染色之結果。



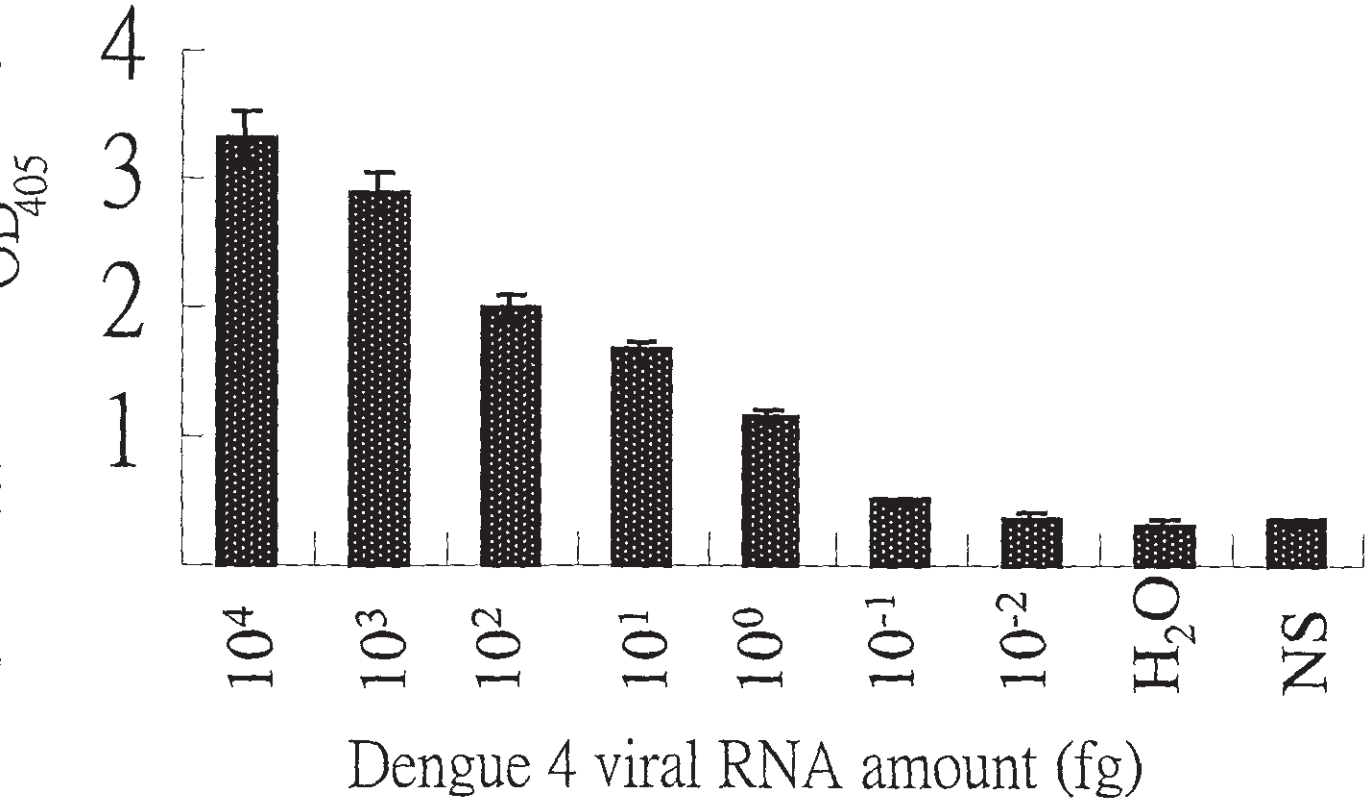
圖九：以 streptavidin coated plate based assay 檢測第一型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



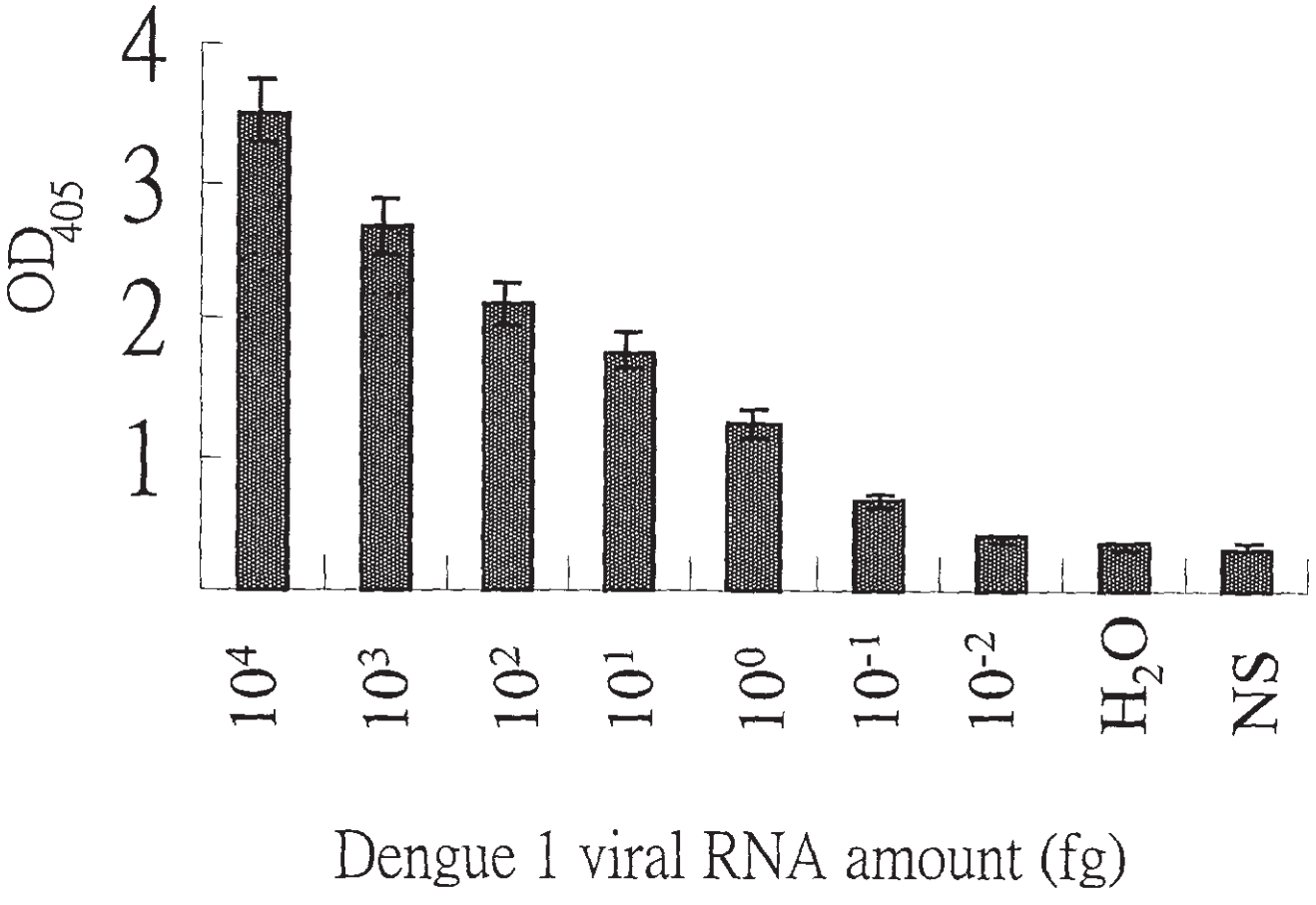
圖十：以 streptavidin coated plate based assay 檢測第二型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



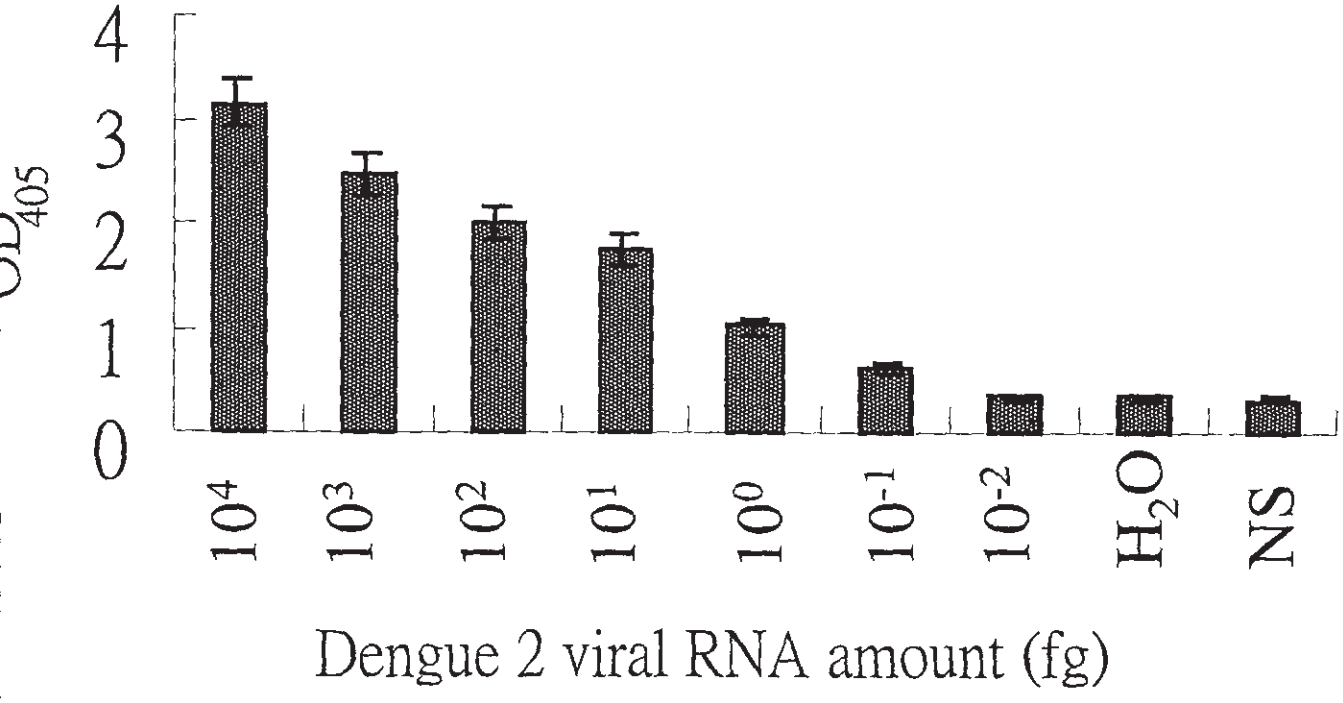
圖十一：以 streptavidin coated plate based assay 檢測第三型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



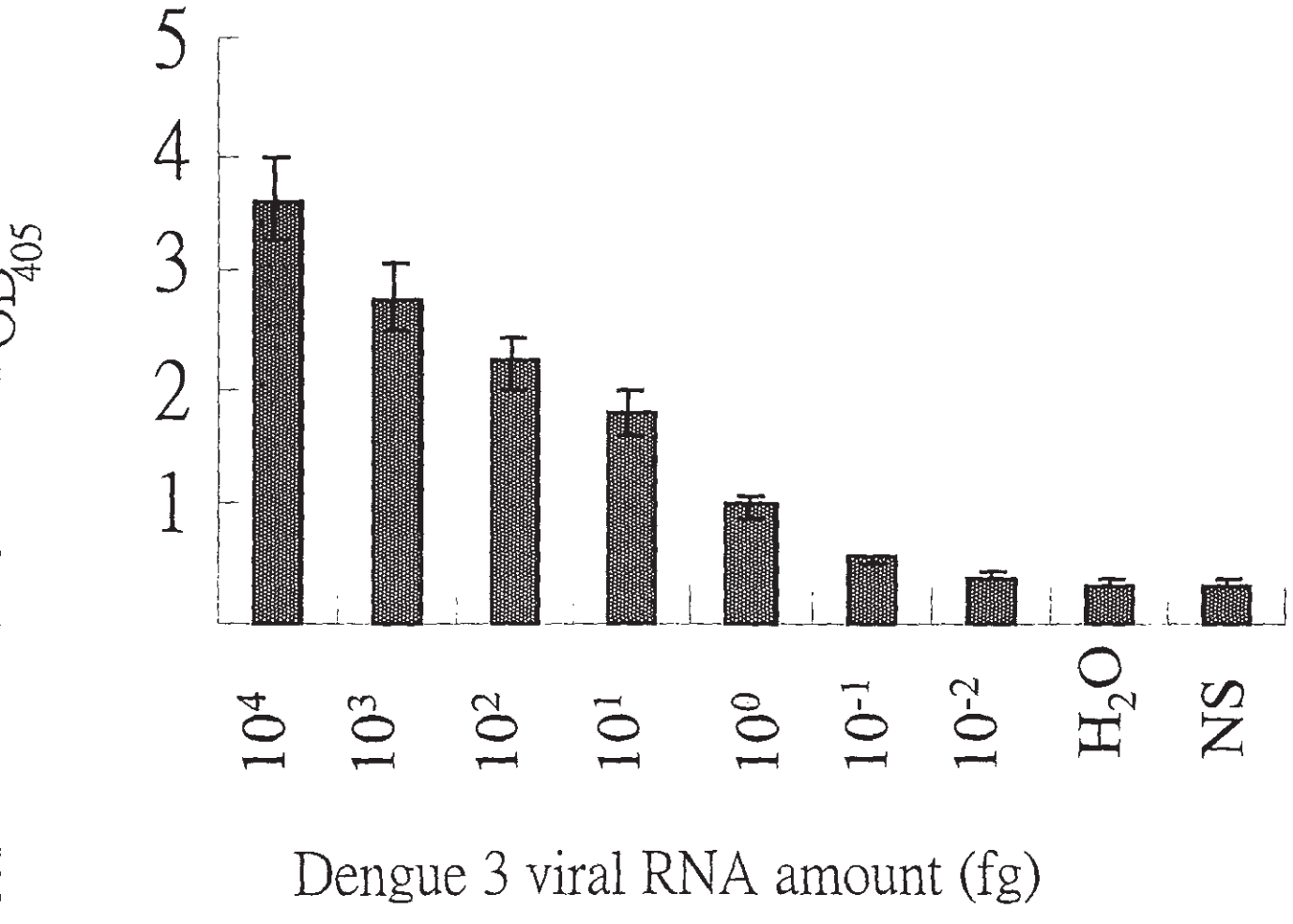
圖十二：以 streptavidin coated plate based assay 檢測第四型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



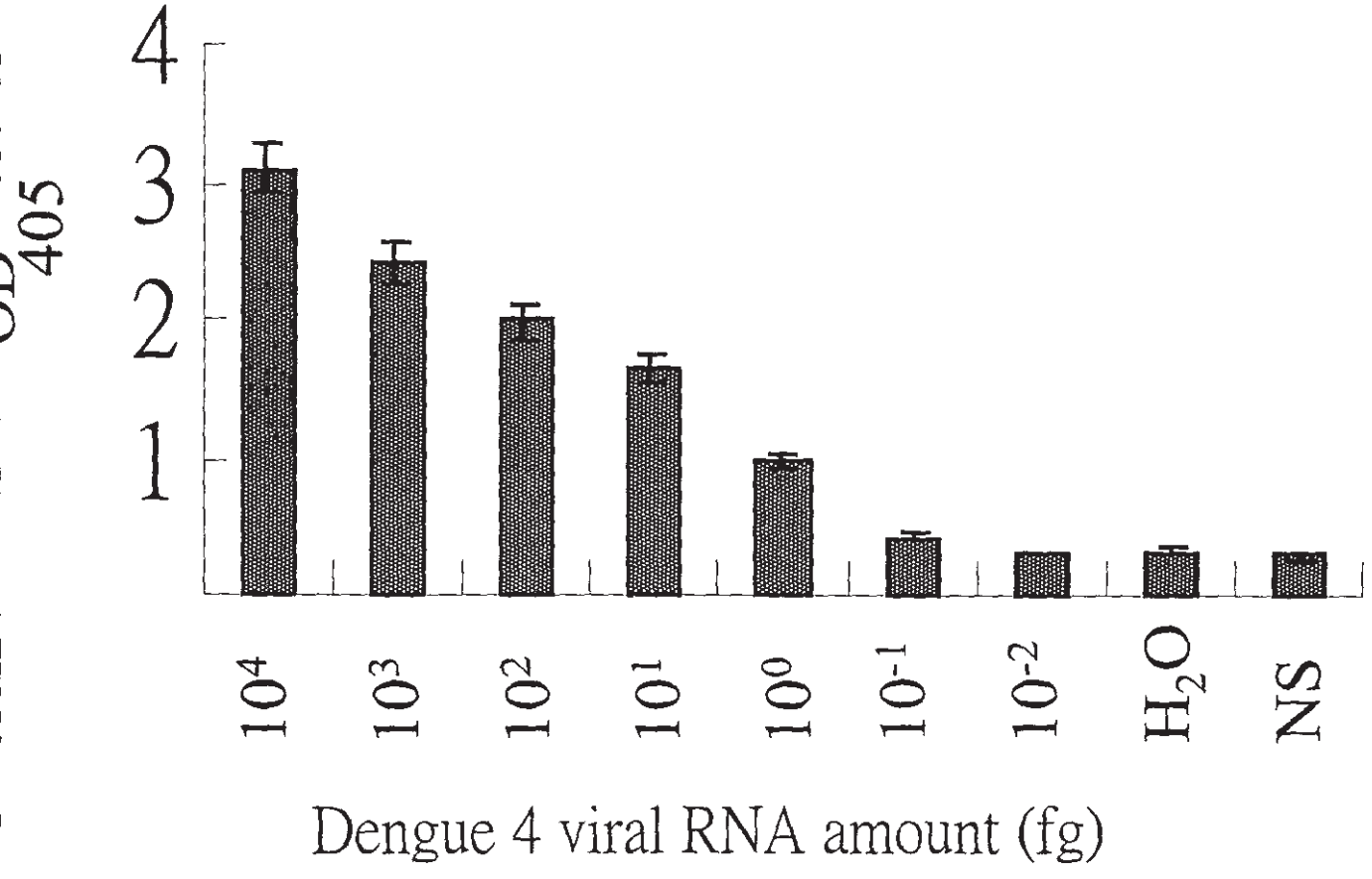
圖十三：以 DNA coated plate based assay 檢測第一型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



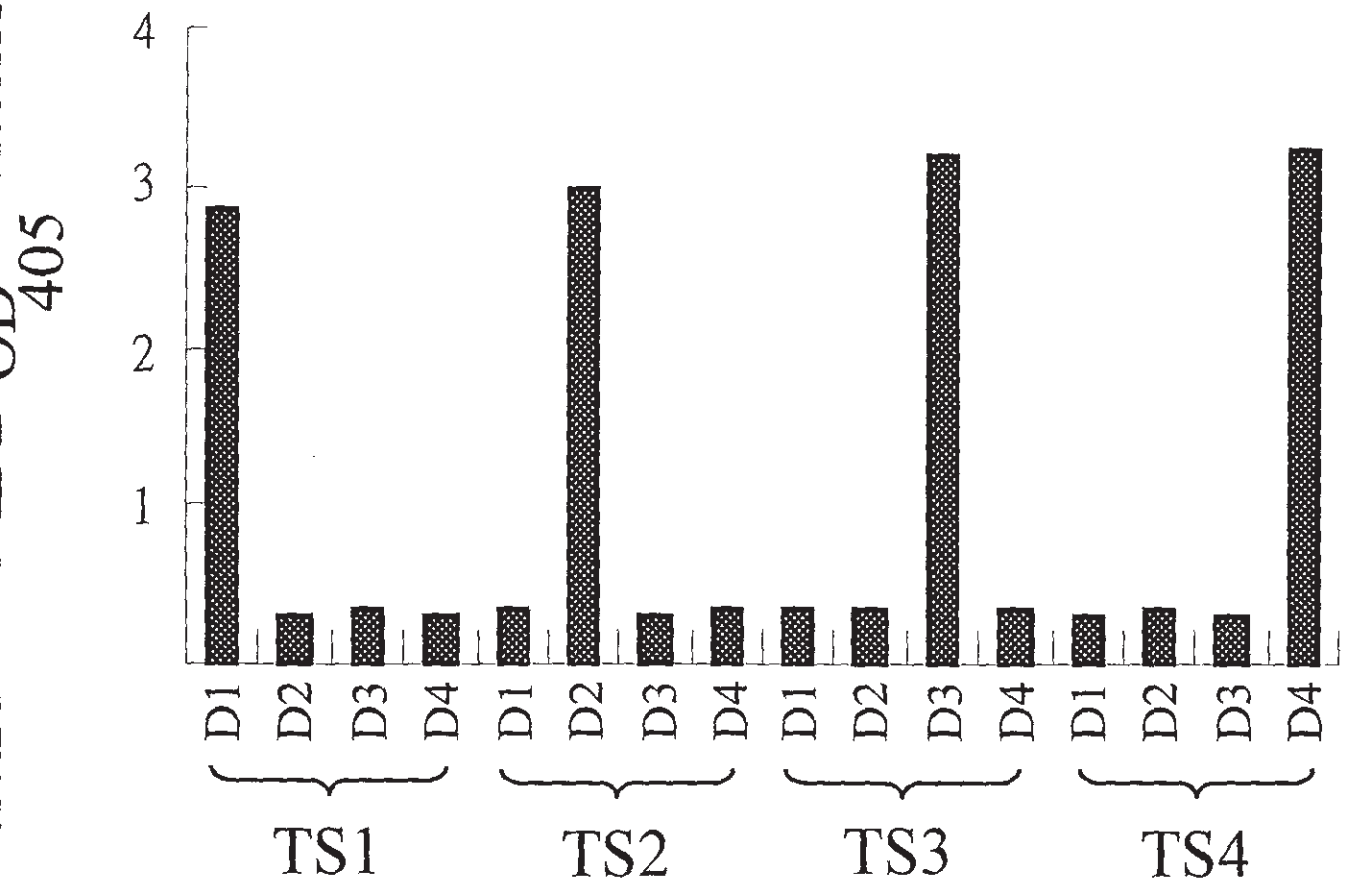
圖十四：以 DNA coated plate based assay 檢測第二型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



圖十五：以 DNA coated plate based assay 檢測第三型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。

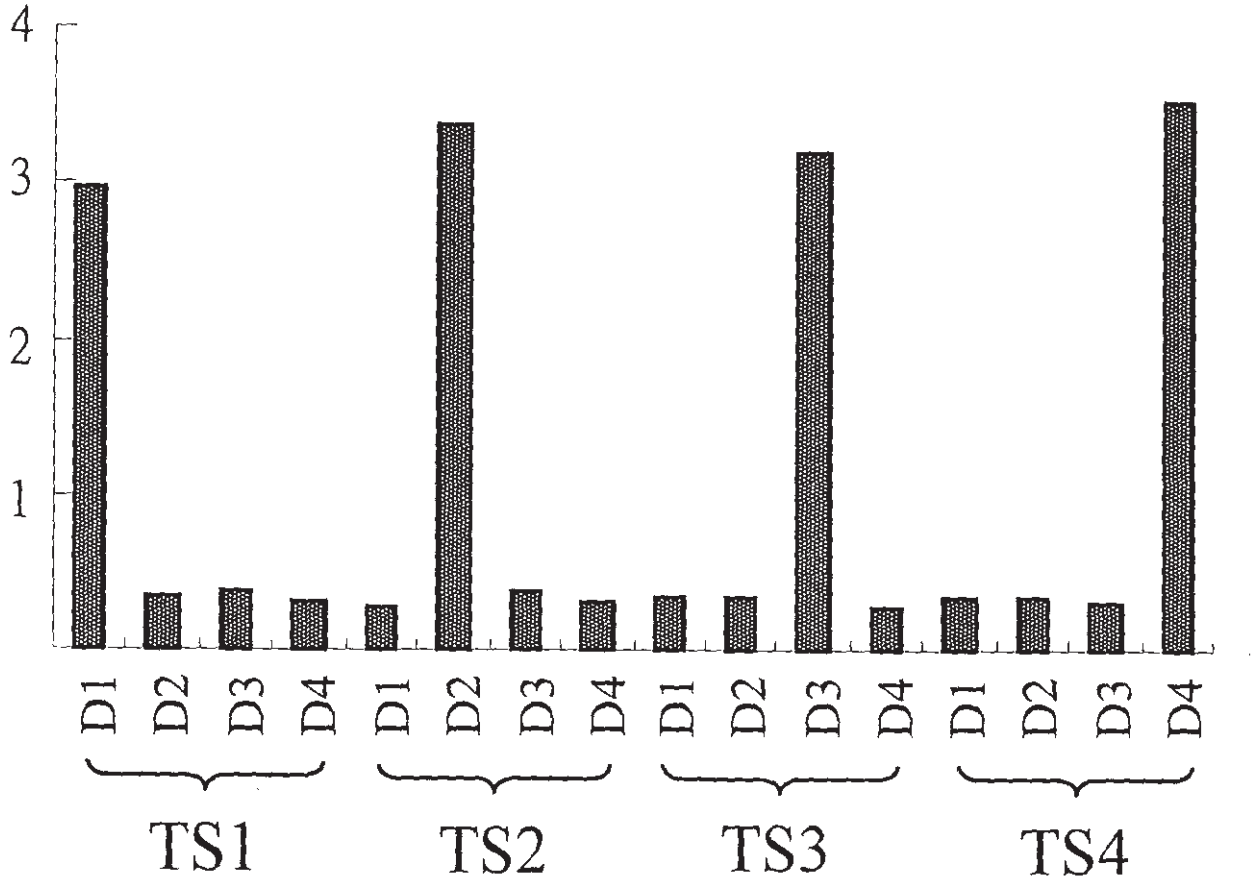


圖十六：以 DNA coated plate based assay 檢測第四型登革病毒之靈敏度。病毒 RNA 以 fg 為單位，H_2O 為 negative control，NS 為登革病毒陰性血清檢體。



圖十七：利用 streptavidin 塗佈的 96 孔滴定盤，以登革特異型探針(Dengue viral type specific probe)檢測四型登革病毒之交叉反應特異性。

TS1~4, type specific 1~4, respectively；D1~4, Dengue 1~4, respectively



圖十八：利用 DNA 塗佈的 96 孔滴定盤，以登革特異型探針 (Dengue viral type specific probe)檢測四型登革病毒之交叉反應特異性。

TS1~4, type specific 1~4, respectively；D1~4, Dengue 1~4 respectively