

淺談 COVID19(SARS-CoV 2)的檢驗方法

中國醫藥大學附設醫院檢驗醫學部/蘇美綺醫檢師

中國醫藥大學附設醫院檢驗醫學部/張雅棻醫檢師

中國醫藥大學附設醫院檢驗醫學部/田霓醫檢師

2019 年 12 月在中國武漢爆發了新型冠狀病毒感染，引起了 COVID-19(Coronavirus Disease 2019)肺炎恐慌的疫病，截止 2020 年 2 月 29 日止，統計全球感染人數為 85,678 人，死亡人數為 2,933 人，粗估死亡率為 3.42%。在許多官方及媒體的報導之下顯示，有愈來愈多無症狀帶病毒者出現，可能導致醫護人員或社區民眾受到感染，甚而使病毒迅速傳播開來。對於受病毒感染的患者或帶病毒者進行快速及準確的診斷是預防與控制 COVID19 大流行的關鍵。

SARS-CoV 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)實驗室診斷可分為三部份，分別為病毒核酸檢測、病毒分離培養及病毒抗體檢測。因目前病毒培養實屬不易，需在 BSL-3 生物安全等級實驗室操作，故目前實驗室診斷以 real-time RT-PCR 核酸檢測為主，自中國官方公布病原體為新型冠狀病毒，並於 2020 年 1 月 11 日完成其基因定序後，德國柏林 Charité 大學醫院病毒研究所 Christian Drosten 實驗室及其合作夥伴根據其序列數據設計出可鑑別檢測 SARS-CoV 2 病毒核酸的 primer 與 probe(表一)，其基因組擴增位點見(圖一)¹ (簡稱為 Berlin test)，該團隊將此方法提供給 WHO 及各國實驗室，包括我國疾病管制署一開始構建檢測方法是依此為參考依據，疫情初始得以用此方法診斷 COVID-19。陸續各國皆有分離新的 SARS-CoV 2 病毒株，並將其 genome sequence 上傳至 Global Initiative on Sharing All Influenza Data(GISAID)，因此國際間各個單位皆有發表檢測 SARS-CoV 2 所使用的 primer 與 probe，以下表二整理中國大陸²、香港³、美國疾病管制與預防中心⁴及 WHO¹所使用的引子及探針。檢測方法的敏感度分別受到「病毒基因變異」、「病毒 Shedding 的動力學」及「採集檢體方法與部位」的影響。冠狀病毒 Coronaviruses 具有高度變異性，其 RNA dependent RNAPolymerase 在進行複製時每 $10^3 \sim 10^4$ 個 nucleotides 就會突變⁵，也會產生基因重組，因此若發生較大的變異，則原先設計的引子就無法偵測出病毒的核酸，另一方面 SARS-CoV-2 viral shedding 動力學仍然存在不確定性，因此採檢的時間點可能會影響檢測結果，所以需進行多次採樣檢測，才能進行正確的診斷，而採檢的部位亦會影響檢測的敏感性，由中國疾病預防控制中心提出一份報告說明鼻咽拭子比痰液檢體具有更高的一致性⁶。由於全球感染人數不斷攀升，國外更多無症狀的超級傳播者被報導出來，使得防疫越顯困難，為防堵國內社區傳播，對疑似接觸者擴大檢驗範圍，也因此由一開始 8 家指定檢驗機構擴增至 30 家，不斷的擴增檢驗量能，由每日 500 件上升至 1500 件，面對更嚴峻的疫情，未來面對的檢驗量能只會愈來愈高，使得醫檢師的工作負荷及責任相對變大，醫檢師人力吃緊在此次疫情被凸顯出來。核酸檢測是需要專業及經驗的醫檢師執行，依照疾病管制署及 WHO 的規範需在 Biosafety Level 2(BSL-2)實驗室執行，面對傳染力非常高的 SARS-CoV 2 病毒，不少實驗皆提高安全防護層級，甚至到 Biosafety Level 3 實驗室執行檢體的去活化後，再至 BSL-2 實驗室穿戴比照 BSL-3 實驗室

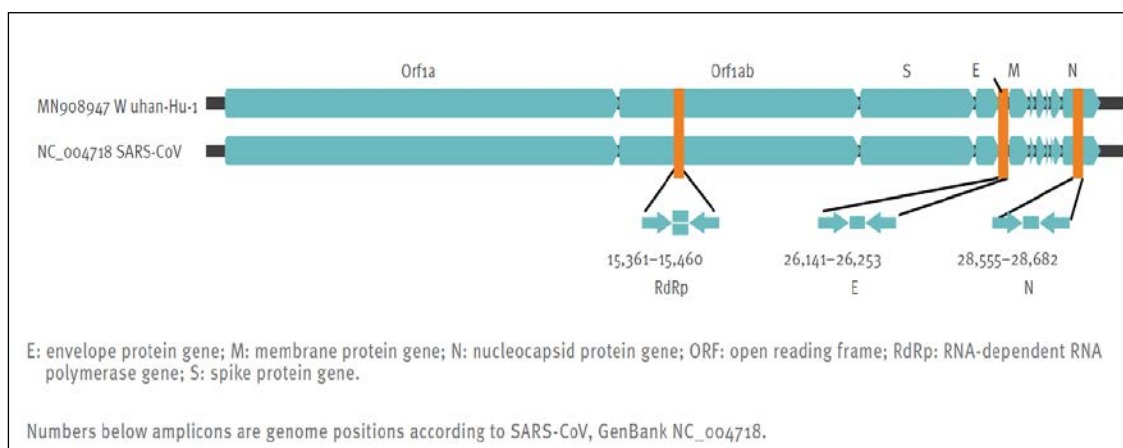
的防護裝備執行核酸的萃取，上機...

表一、偵測 SARS-CoV 2 的引子及探針序列¹

Assay/use	Oligonucleotide	Sequence ^a	Concentration ^b
RdRP gene	RdRp_SARSr-F	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	Use 600 nM per reaction
	RdRp_SARSr-P2	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ	Specific for 2019-nCoV, will not detect SARS-CoV. Use 100 nM per reaction and mix with P1
	RdRp_SARSr-P1	FAM-CCAGGTGGWACRTCATCMGGTGATGC-BBQ	Pan Sarbeco-Probe will detect 2019-nCoV, SARS-CoV and bat-SARS-related CoVs. Use 100 nM per reaction and mix with P2
	RdRp_SARSr-R	CARATGTTAAASACACTATTAGCATA	Use 800 nM per reaction
E gene	E_Sarbeco_F	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	Use 400 nm per reaction
	E_Sarbeco_P1	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	Use 200 nm per reaction
	E_Sarbeco_R	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	Use 400 nm per reaction
N gene	N_Sarbeco_F	CACATTGGCACCCGCAATC	Use 600 nm per reaction
	N_Sarbeco_P	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA-BBQ	Use 200 nm per reaction
	N_Sarbeco_R	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	Use 800 nm per reaction

^a W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C. FAM: 6-carboxyfluorescein; BBQ: blackberry quencher.

^b Optimised concentrations are given in nanomol per litre (nM) based on the final reaction mix, e.g. 1.5 µL of a 10 µM primer stock solution per 25 µL total reaction volume yields a final concentration of 600 nM as indicated in the table.



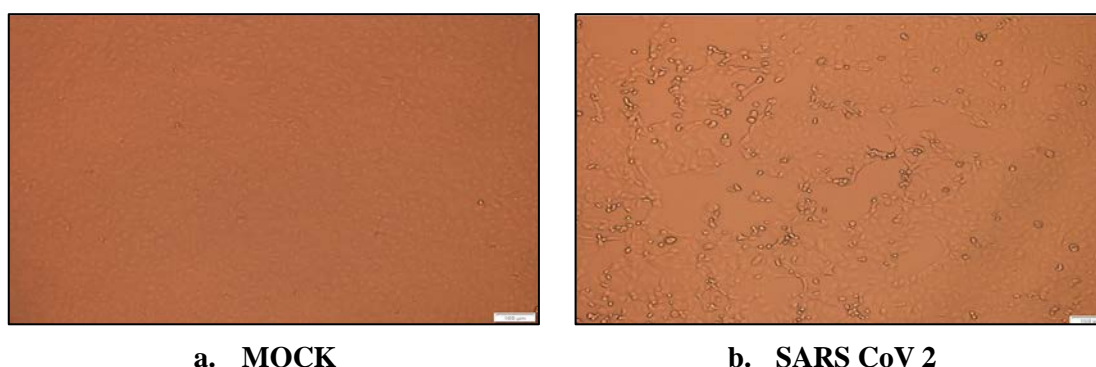
圖一、Relative positions of amplicon targets on the SARS coronavirus and the 2019 novel coronavirus genome¹.

表二、引子及探針序列

國家	偵測基因	序列
中國大陸 ²	ORF 1b	F : 5'-CCCTGTGGGTTTTACACTTAA-3' R : 5'-ACGATTGTGCATCAGCTGA-3' P : 5'- the FAM- CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG - BHQ1-3'
	Nucleocapsid gene	F : 5'-GGGGAACCTTCTCTGCTAGAAT-3' R : 5'-CAGACATTTTGTCTCAAGCTG-3' P : 5'- FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'
香港 ³	ORF1b	F : 5'-TGGGGYTTTTACRGGTAACCT-3' R : 5'-AACRCGCTTAACAAAGCACTC-3' P : 5'- TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-3'
	Nucleocapsid gene	F : 5'-TAATCAGACAAGGAACTGATTA-3' R : 5'-CGAAGGTGTGACTTCCATG-3'

			P : 5 '-GCAAATTGTGCAATTTGCGG-3 '
美國疾病管制與預防中心 ⁴	Nucleocapsid gene	N1	F : 5 '--GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3 ' R : 5 '-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG--3 ' P : 5'- P : 5 '-CC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3 '
		N2	F : 5 '--TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3 ' R : 5 '-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3 ' P : 5 '-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3 '
		N3	F : 5 '--GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3 ' R : 5 '-TGT AGC ACG ATT GCA GCA TTG-3 ' P : 5 '-FAM-AYC ACA TTG GCA CCC GCA ATC CTG-BHQ1-3 '
WHO ¹	RdRp		F : 5 '-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3 ' R : 5 '-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3 ' P : 5 '-FAM-CAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGC-BBQ-3 ' W is A/T; R is G/A; M is A/C; S is G/C.

SARS-CoV 2 病毒培養依據疾病管制署公告「醫學實驗室處理嚴重特殊傳染性肺炎檢體之實驗室生物安全指引」指出，有關進行涉及病原體在體外或體內增殖之診斷試驗，須於 BSL-3 實驗室下進行，以提高生物安全防護。因此國內實驗室需具備生物安全第三等級實驗室才有資格進行 SARS-CoV 2 的病毒培養，有鑑於病毒的分離對於研發有效疫苗、抗病毒藥物篩選及發展快速而精準的檢測試劑非常重要且必需。因此許多國家在疫情發生時，均成功分離出病毒株，包含臺灣。用於分離 SARS CoV-2 病毒的細胞為 Vero E6 及 Human lung cell Huh7 細胞株⁷，將帶病毒之檢體接種於含 16µg/ml trypsin DMEM 的 Vero E6 細胞，於 37°C 溫箱進行培養，每日觀察其細胞病變(Cytopathic effect)情形，於 3 天後可明顯觀察到細胞變圓及聚集的細胞病變(圖二)，其培養上清液與細胞分別以 RT-PCR 及使用 SARSr-CoV Rp3 NP antibody 進行免疫螢光染色確認病毒，對於後續的研究，分離 SARS-CoV 2 是站穩成功的第一步。



圖二、SARS CoV 2 Cytopathic effect(CPE)⁷

SARS-CoV 2 病毒抗體或抗原檢測各國仍在開發中，目前還未有標準檢驗方法。先前報導用於檢測疑似感染源之血清抗體，使用的方法為「西方墨點法」，由於人體感染冠狀病毒後，通常會產生大量針對冠狀病毒核蛋白的抗體，因此先將 SARS-CoV 2 的核蛋白(Nucleocapsid protein)用大腸桿菌大量表達並純化，將製備好的 Nucleocapsid protein 進行電泳轉漬至薄膜，再加入疑似病人血清進行反應呈色，即可得到檢測結果，不過由於此方法非常費力耗時，無法用於大量篩檢，因此開發 IgG/IgM 抗體快速篩檢有助於感染源的追

溯與流行病學的調查，另開發 SARS-CoV 2 抗原快速篩檢，提高其敏感度及特異性有助於整體的防疫，進行患者分流，舒緩目前不斷擴大檢驗範圍所以造成檢驗量能之負荷。面對更加嚴峻緊張的疫情，全國醫檢師皆群起與病毒宣戰，待這一波疫情退燒，期盼醫檢師的人力與專業能夠再次喚醒衛生官員及醫院的關切。

參考資料

1. CormanVM, LandtO, KaiserM, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill. 2020.
2. ZhuN, ZhangD, WangW, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N Engl J Med. 2020.
3. ChuDKW, PanY, ChengSMS, et al. Molecular Diagnosis of a Novel Coronavirus (2019-nCoV) Causing an Outbreak of Pneumonia. Clin Chem. 2020.
4. BranchRV. Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus Centers for Disease Control and Prevention , Respiratory Viruses Branch , Division of Viral Diseases. 2020:1-12.
5. WooPCY, LauSKP, HuangY, YuenKY. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Exp Biol Med. 2009. doi:10.3181/0903-MR-94
6. WangM, WuQ, XuW, et al. Clinical diagnosis of 8274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan. medRxiv. 2020.
7. ZhouP, YangX-L, WangX-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature. 2020.