

出國報告（出國類別： 研習）

建構生物防護及新興傳染病防治網 計劃---E 型肝炎檢驗新技術研習

服務機關：衛生署疾病管制局
姓名職稱：林思鳳 助理研究員
派赴國家：日本
出國日期：94 年 10 月 1 日
 至 94 年 10 月 15 日

報告日期：95 年 1 月 10 日

目 錄

	頁碼
一、 摘要	3
二、 研習疾病概述	4
三、 目的	5-6
四、 研習行程	7
五、 研習內容	8-21
六、 研習心得之檢討與建議	22-24

摘要

病毒性肝炎在我國傳染病防治史上一直佔有重要地位，其中又以經由血液體液傳染方式所傳播之 B 型及 C 型肝炎病毒在公共衛生及輸血感染上猶被重視，而山地偏遠地區幼童免費施打 A 型肝炎疫苗也明顯降低感染發生率，台灣地區 E 型肝炎也有少數病例報告，但因台灣的豬感染豬型的 E 型肝炎病毒，與人感染的病毒很類似，也有可能是人畜共通感染的疾病。

目前 E 型肝炎血清學診斷檢驗試劑發展並不普遍，且也都尚未通過美國 FDA 認證核可使用，只能以研究性質進口於研究實驗室，此行主要目的除研習 E 型肝炎相關檢驗技術，檢討實驗室尚待改進之處，同時也藉由向相關領域專家請益，希望建立雙方互動的管道，增進未來合作機會，以強化實驗室檢驗技術發展。

研習疾病概述

E 型肝炎病毒(Hepatitis E Virus)是一種 RNA 病毒，病毒顆粒大小約為 27~30 nm，其傳染途徑與 A 型肝炎相似皆經由腸道(糞便_口腔)感染，潛伏期約 2-9 週，在發病前之潛伏期的後段主要出現於急性肝炎病患的糞便中。臨床症狀為發燒、嘔吐、黃疸、右上腹痛，血中 AST 及 ALT 值升高。而在某些地區的爆發性大流行也主要由於飲水被污染（因大雨洪水污染水源）以及污染食物而造成地區性大傳染。HEV 的主要流行地區包括有印度、尼泊爾、巴基斯坦、蘇聯、阿爾及利亞、利比亞、索馬尼亞以及中國大陸，這些國家都曾經發生過區域性的大流行。根據文獻資料之流行病學分析健康成人約有 10% 呈現 IgG-Anti-HEV 陽性，表示目前臨床上可能有不少沒有症狀出現的感染病例，急性期感染者病例中約 1-2% 可能發生猛爆型肝炎，但在孕婦感染的致死率高達 15-20%。

E 型肝炎抗體可分為 IgM anti-HEV 和 IgG anti-HEV 兩種，可由人體血清中檢測，IgM anti-HEV 僅出現於急性 E 型肝炎病患，IgG anti-HEV 則可能與 A 型肝炎抗體相似，血中會長期出現此抗體，表示過去曾感染 E 型肝炎。

E 型肝炎病毒(HEV)可分類為四個主要基因型(Genotype 1、2、3、4)，基因型 1 主要在熱帶國家，基因型 2 主要在墨西哥、奈及利亞，基因型 3 則包括亞洲、歐洲、大洋洲和南美洲，相反地，基因型 4 主要被發現亞洲國家例如日本、韓國和台灣，基因型 3 和基因型 4 被發現存在豬隻或鹿等野生動物。

目的

接受行政院衛生屬疾病管制局的 94 年度建構生物防護及新興傳染病防治網計劃之第六編號亞太地區標準實驗室傳染病研習- 赴日本國立感染症研究所，學習 E 型肝炎檢驗新技術的研習-增進 E 型肝炎血清學診斷相關檢驗技術。根據文獻資料之流行病學分析健康成人約有 10 %呈現 IgG-Anti-HEV 陽性，表示目前臨床上可能有不少沒有症狀出現的感染病例，急性期感染者病例中約 1-2%可能發生猛爆型肝炎，但在孕婦感染的致死率高達 15-20%。

隨著台灣經濟繁榮及國際化景象，國人旅遊的人潮愈來愈多，以前都認為 E 型肝炎大都是發生在流行地區因衛生習慣不佳，例如生食或吃下未煮熟食物發生感染病例。但近幾年來的研究報告顯示，在先進國家也有本國感染的病例，並不一定都發生在旅遊到疫區後回國的人，因此台灣地區雖有 E 型肝炎少數病例報告，但曾有研究豬是否是 E 型肝炎感染源檢測豬血清及排除國外旅遊史的急性 E 型肝炎病人，偵測到人和豬的 E 型肝炎病毒株，經由基因圖比對屬於同一群，與美國、墨西哥株及大部分的亞洲、非洲病毒株不同，核甘酸定序鑑定台灣的人與豬間分離病毒株相似性 84-95%，與其他地區相似性 72-79%，推測豬是 E 型肝炎的宿主，HEV 感染是人畜共通的疾病。

因 E 型肝炎血清學診斷檢驗試劑發展並不普遍，日本曾於近五年內發三篇有關 E 型肝炎血清學診斷及分子生物技術論文。本次研習單位是日本國立感染症研究所村山廳舍病毒第二部第一室，市長武田直和醫學博士(Dr. Takeda)指派該室主任研究官李天成博士(Dr. Li)為指導老師。

行前事先於實驗室選取近二年來以商業化檢驗試劑檢測之 E 型肝炎陽性或疑似陽性檢體共計 30 支，透過 WORLD COURIER 公司協助空運冷凍寄送，並於本人出國前檢體已順利抵達日本國立感染症研究所村山廳舍病毒第二部第一室。預計進行 E 型肝炎血清抗體及分子生物相關技術研習，比較商業化檢驗試劑與日本自行研發試劑表現之差異，及日本分子診斷技術應用於 E 型肝炎檢測，評估現行方法差異，以提升其檢驗靈敏度及特異性，進而早期偵測出急性期病例，降低傳染源之擴散，達到公共衛生防疫之目標。

研習行程

1. 研習地點：日本東京
2. 研習機構：國立感染症研究所(NIID) 村山廳舎
3. 研習日期：94/10/1-94/10/15
4. 研習技術：
 - 4.1 ELISA Coated the plate for HEV ELISA test
 - 4.2 Molecular Biotechnology
 - 4.3 DNA sequencing and data analysis

研習內容

一、檢體的採檢與運送

1) 檢體的採集

待測的檢體，必須採取急性期發作的黃疸肝炎病患血清，糞便檢體比血清檢體可更及早偵測出正確的結果。偵測血中IgM抗體早期診斷出急性期發生病例，是最快速而確實的診斷方法。檢體採集後分離出之血清分裝於耐低溫檢體試管快速冷凍保存。

2) 檢體的運送

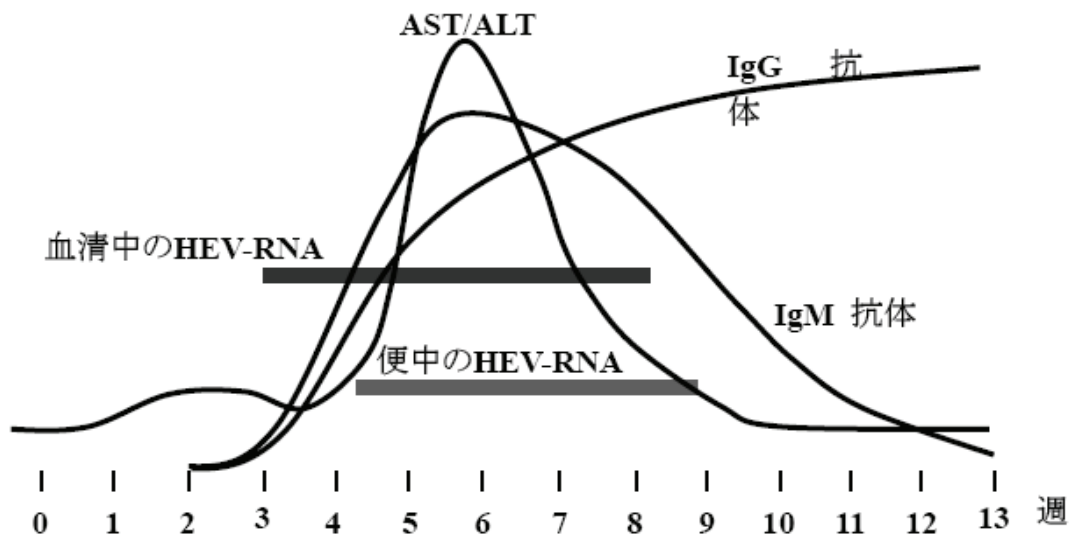
採集之檢體冷凍保存，並避免於運送途中溶解，確保運送中保存於0~8°C檢體運送箱，檢體送驗單詳細紀錄檢體編號、發病日、檢體採檢日等及注意事項，送驗單位是否遵守檢體運送安全管理規定，送驗單位預先聯繫告知檢送待測檢體數量，以確定送交檢測單位。

3) 作業上的注意

採集的臨床檢體要小心處理，必須在生物安全操作櫃內(CLASS 2)進行相關檢測且遵照實驗室標準操作手冊規範。

HEV感染的時程

E型肝炎病例感染病程發展時間、可由E型肝炎病毒的特異性為發現病患血液中IgM抗體大量異常升高。藉由偵測血中IgM抗體早期診斷出急性期發生病例，是最快速而確實的診斷方法。用HEV ORF2病毒基因段轉殖載入類病毒之中空質粒表現出無病毒核酸具有病毒抗原但可為抗體中和。下圖一：典型急性E型肝炎病程的臨床表現及檢驗表示



圖一 典型急性E型肝炎病程的臨床表現及檢驗表示

二、實驗過程與結果

(一) E型肝炎病毒抗體酵素連結免疫吸附分析檢測

IgM-anti-HEV抗體檢測

(1). 器具及試藥之製備

1. 96試孔平底微量盤：IMMULON 2 (Dynatech Laboratories, Inc. USA. Catalog # 011-010-3455)、或 (Nalgen NUNC International, Denmark. Catalog#439454)。
2. 被覆用緩衝液：[Sigma C-3041] carbonate-bicarbonate 緩衝液 (pH9.6) 調製。
3. PBS-T：0.05% Tween 20包含PBS 調製。
4. 1%SM/PBS-T：1% skim milk (DIFCO catalog# 0032-17-3) 溶解於PBS-T調製。
5. 5%SM/PBS：5% skim milk溶解於PBS-T調製。
6. OPD用緩衝液：[Sigma P-4809]以0.05M phosphate-citrate 緩衝液 (pH5.0) 調製。
7. OPD溶液 [Sigma P-3804]加入OPD用緩衝液以0.4 mg/mL濃度溶解。

(2). 操作步驟：

1. 抗原被覆(Coating of antigen)：將經由clone表現出的ORF2 Protein 當成抗原以被覆用緩衝稀釋為濃度 1ug/ml ，96試孔平底微量盤中每一試孔加入100 ul，加蓋放置於4°C冰箱過夜。
2. 取出抗原已被覆之96試孔平底微量盤，去除試孔中液體，每一試孔加入150 ul 的5%SM/PBS，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
3. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
4. 患者血清以1%SM/PBS-T(稀釋1：200倍)後，將稀釋過的待測檢體及對照血清，依分配的位置順序加入100 ul 的體積於微量盤之每一

- 試孔中，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
5. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
 6. 製備以含有1%SM/PBS-T將HRP-conjugated goat anti-human IgM (〔Cappel catalog# 55255〕稀釋1：1000倍)，依分配的位置順序加入100 ul 的體積於微量盤之每一試孔中，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
 7. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
 8. 製備受質：製備OPD溶液取12.5 ml加入(Sigma P-3804)錠劑一顆溶解後，再加入30%過氧化氫(H₂O₂) 5ul均勻混合，依序加入100 ul於每一試孔中，放置室溫避光30分鐘。
 9. 中止反應：以 4N 硫酸依序加入50 ul 於每一試孔中。
 10. 波長492 nm測定吸光值。

(3) 判定

OD值大於0.2以上的檢體即為陽性。

IgG-anti-HEV抗體檢測：

1. 抗原被覆(Coating of antigen)：將經由clone表現出的ORF2 Protein當成抗原以被覆用緩衝稀釋為濃度 1ug/ml ，96試孔平底微量盤中每一試孔加入100 ul，加蓋放置於4°C冰箱過夜。
 2. 取出抗原已被覆之96試孔平底微量盤，去除試孔中液體，每一試孔加入150 ul 的5%SM/PBS，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
 3. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
 4. 患者血清以1%SM/PBS-T(稀釋1：200倍)後，將稀釋過的待測檢體及對照血清，依分配的位置順序加入100 ul 的體積於微量盤之每一試孔中，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
 5. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
 6. 製備以含有1%SM/PBS-T將HRP-conjugated goat anti-human IgG (稀釋1：10000倍)，依分配的位置順序加入100 ul 的體積於微量盤之每一試孔中，放置37°C培養箱內，作用60分鐘。
 7. 以PBS-T清洗抗原已被覆之96試孔平底微量盤 4次，清洗後將平底微量盤倒置拍乾以去除殘留液。
 8. 製備受質：製備OPD溶液取12.5 ml加入(Sigma P-3804)錠劑一顆溶解後，再加入30%過氧化氫(H₂O₂) 5ul均勻混合，依序加入100 ul於每一試孔中，放置室溫避光30分鐘。
 9. 中止反應：以 4N 硫酸依序加入50 ul 於每一試孔中。
 10. 波長492 nm測定吸光值。
- (3) 判定： OD值大於0.2以上的檢體即為陽性。

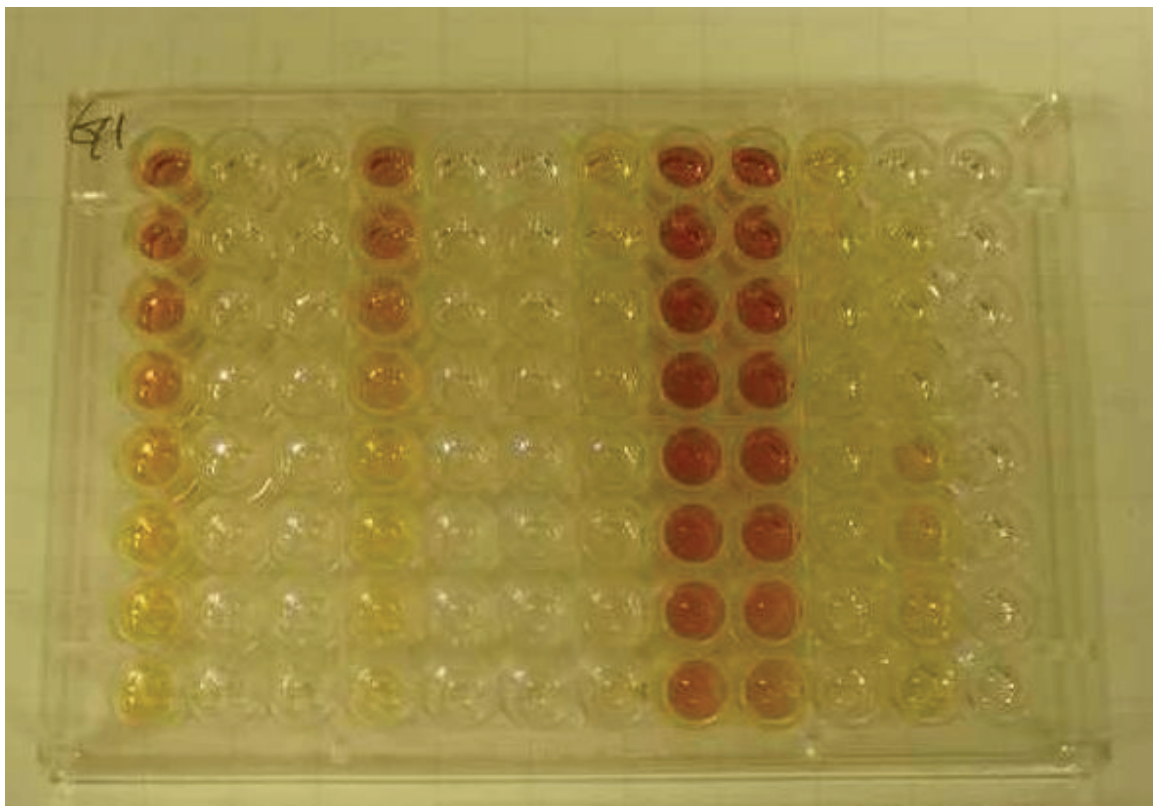
結果：

取自台灣E型肝炎檢體已商業化試劑檢測包括〔IgG(+)IgM(+)
檢體15支〕、〔IgG(-)IgM(+)
檢體6支〕、〔IgG(+)IgM(-)
檢體9支〕等陽性或疑似陽性檢體共計30支。此次再以NIID自行研發之ELISA試劑進行比對檢測，發現如以IgM(+)表示急性期個案，則商業化試劑檢出21名陽性病
例中，以NIID自行研發之ELISA試劑可測出IgG(+)IgM(+)有13名，
IgG(+)IgM(-)有2名，轉為IgG(-)IgM(-)則佔6名，由此顯示該6名可能是偽
陽性。至於原先商業化試劑IgG(+)IgM(-)9名，再以NIID自行研發之
ELISA試劑可測出IgG(+)IgM(+)有3名，IgG(+)IgM(-)有6名，顯示該試劑
靈敏度較佳。

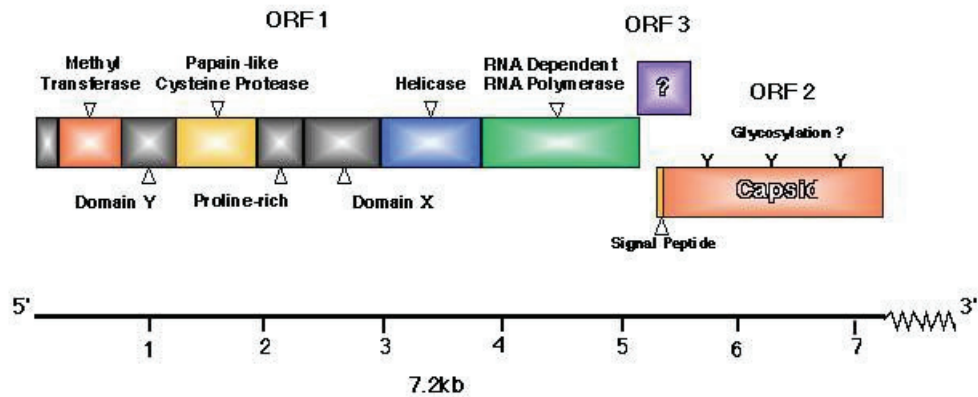
圖二、ELISA檢測結果之比較表

		NIID				total
		IgG(+) IgM(+)	IgG(-) IgM(+)	IgG(+) IgM(-)	IgG(-) IgM(-)	
HEV	IgG(+) IgM(+)	13	0	2	0	15
	IgG(-) IgM(+)	0	0	0	6	6
	IgG(+) IgM(-)	3	0	6	0	9
total		16	0	8	6	30

圖三、以NIID自行研發ELISA(酵素連結免疫吸附分析)檢測結果



圖五. E型肝炎病毒全長序列 (HEV Whole Genome)



HEV的基因為單股正性RNA分子，總基因長度約7.2kb及有3個ORF(open reading frame)；ORF1位於5端的一半上，主要是轉錄出HEV的非結構性蛋白質(nonstructural proteins)，ORF2位於全長的3端上，一般推斷是轉錄出71-kDa的外膜蛋白，ORF3位於ORF1及ORF2之間，目前的功能未知。E型肝炎病毒無法藉由細胞培養增殖，以RT-PCR方法藉由HEV遺傳基因增幅(ORF1、ORF2)決定序列位置。(圖五)

(二) E型肝炎病毒分子生物學檢測

實驗過程與結果

(1) 病毒 RNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。

取血清 140ul 加入 560 ul Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘

再加入 560 ul 絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再

過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，

用 80°C 純水(Rnase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (RT-PCR)。

(2) 反轉錄反應(Reverse Transcription)，合成 cDNA 取病毒 RNA 10ul

加入 75mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl₂、10 mM DTT、ATCG

dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38U/ul、ORF1及ORF2 之anti-sense primer :HEV 1-4(ORF1)、HEV R2(ORF2) (表一) 在50 pmole的混合物中，

42°C 2分鐘，再加入200 units SuperScript II reverse transcriptas，

於42°C作用50 分鐘，再進行不活化此反應在70°C 15分鐘。

(3). 聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction)

取 5ul的cDNA 當模板(template) 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5

mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、ATCG dNTP mixture、1 mM

ORF1(HEV 1-1 及HEV 1-4)與ORF2 引子對(HEV F1 及HEV R2)

(表一) 在各 50 pmole 的混合物中，加入 5 units Taq polymerase

(Invitrogen) 分別作此兩片段基因增幅，ORF1 及 ORF2 PCR 反

應條件如下：95°C 變性 (denature) 5 分鐘後，以 95°C 30 秒、55

°C 45 秒、72°C 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72°C作用 15 分鐘。

(4) 巢式聚合酶連鎖反應(Nest-PCR)

將第一次PCR的產物稀釋 10 倍後再取 5ul當模板(template)加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、ATCG dNTP mixture 與HEV ORF1(HEV 1-2 及HEV 1-3)與HEV ORF2(HEV F2 及HEV R1) Nest-PCR引子(表二)在各 50 pmole的混合物中，加入 5 units Taq polymerase (Invitrogen)，ORF1 PCR反應條件如下：於 94°C 變性 (denature) 5 分鐘後，以 95°C 30 秒、55.6°C 45 秒、72°C 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72°C作用 15 分鐘；ORF2 PCR反應條件如下：於 94°C 變性 (denature) 5 分鐘後，以 95°C 30 秒、59°C 45 秒、72°C 1 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72°C作用 15 分鐘。

(5) 電泳判定及定序

將 Nest-PCR 的產物先以洋菜膠電泳分析以 ETBR 染色後預期可見 ORF1 基因片段約 388bp 與 ORF2 的基因片段 338bp，此兩段基因 PCR 產物使用 QIAamp PCR purification kit 純化後再以 ABI 377 定序儀作定序分析。

藉由此網址<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>，可進行序列比對及演化樹之分析。

表一 PCR 之引子

ORF1	序列
HEV 1-1	5-TCG ATG CCA TGG AGG CCC A-3
HEV 1-4	5-CAT HGC CTC SGC RAC ATC RG-3
ORF2	
HEV F1	5-TAY CGH AAY CAA GGH TGG CG-3
HEV R2	5-TGY TGG TTR TCR TAR TCC TG-3

表二 Nest-PCR 之引子

ORF1	序列
HEV 1-2	5-GCC YTK GCG AAT GCT GTG G-3
HEV 1-3	5-TYR AAR CAG TAR GTK CGR TC-3
ORF2	
HEV F2	5-GGB GTB GCN GAG GAG GAG GC-3
HEV R1	5-CGA CGA AAT YAA TTC TGT CG-3

R=A or G ; H=A or T ; Y=T or C ; K=G or T ; M=A or C

W=A or T ; N=A or C or G or T

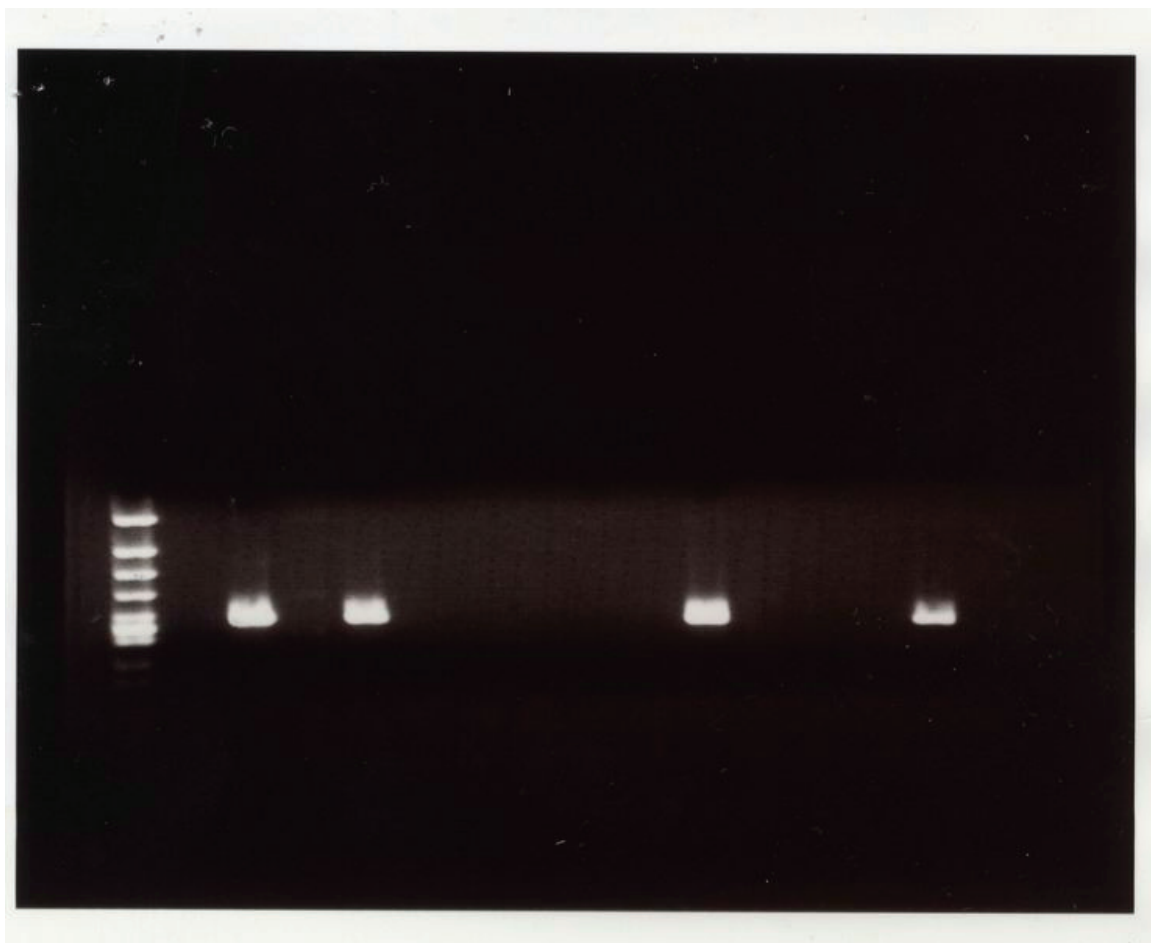
結果

取自台灣 E 型肝炎檢體以 in house 方法試劑檢測包括〔RT-PCR(+) 檢體 9 支〕、〔RT-PCR (-)檢體 6 支〕。此次再以 NIID 自行提供之 RT-PCR 引子(ORF1、ORF2)及相關 PCR 反應條件進行比對檢測，發現如以 RT-PCR(+)陽性來表示，則台灣以 in house 檢出 9 名陽性病例中，以 NIID 自行提供之 RT-PCR 方法可測出(ORF1(+)、ORF2(+))有 3 名，(ORF1(-)、ORF2(+))有 5 名，(ORF1(-)、ORF2(-))有 1 名；另台灣以 in house 檢出 6 名陰性病例中，以 NIID 自行提供之 RT-PCR 方法可測出 (ORF1(-)、ORF2(+))有 2 名，(ORF1(-)、ORF2(-))有 4 名，由此顯示 NIID 自行提供之 RT-PCR 方法敏感度較高，因 PCR 設計引子的區域不相同，其靈敏度與專一性容易造成不同的結果。

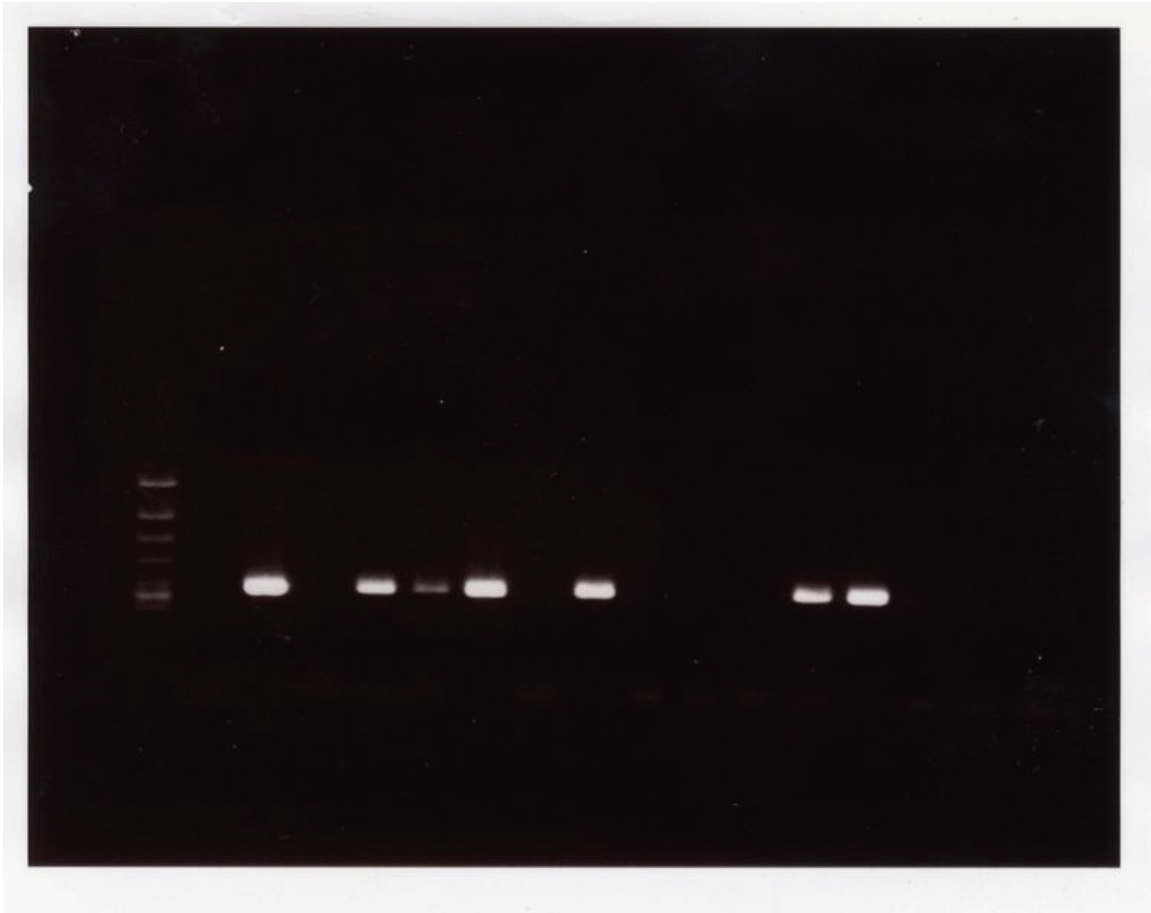
圖六 RT-PCR檢測方法比較表

		NIID 研發的 RT-PCR				total
		ORF-1(+) ORF-2(+)	ORF-1(+) ORF-2(-)	ORF-1(-) ORF-2(+)	ORF-1(-) ORF-2(-)	
PCR	RT-PCR(+)	3	0	5	1	9
	RT-PCR(-)	0	0	2	4	6
	total	3	0	7	5	15

圖七 HEV ORF1經 PCR 放大的DNA片段 (388bp)



圖八 HEV ORF2 經 PCR 放大的DNA片段 (338bp)



研習心得之檢討與建議

1. 此次赴日本國立感染症研究所研習收穫良多，除了學習實驗室技術之外，也了解到日本因國立感染症研究所工作內容與台灣疾病管制局對傳染病診斷的責任屬性略有不同，國立感染症研究所不需做臨床診斷病例，有關臨床診斷病例直接由醫院自行負責。因此國立感染症研究所主要是著力於檢驗新技術研究開發，疫苗的研發或著苛難問題的解決。因此既不需負責繁瑣的臨床病例檢體檢驗工作，也不需面臨相關行政會議或行政工作，故皆能很專心地致力於自己領域研究工作。也因缺乏直接面對醫院臨床病例檢體，所以相對地無法收集到有意義的研究材料，因此如我的指導老師會與醫院或學校進行研究計畫合作，所以不僅對人類E型肝炎病毒深入探討致力基因型別表現；也對動物的E型肝炎病毒的研究有鑽研，因此平時也接受動物如野豬、野鹿、貓、狗等進行研究，探討是否會造成人畜共通疾病。
2. 這次研習主要針對E型肝炎病毒檢驗新技術的學習，因目前E型肝炎應用於臨床上之診斷檢驗試劑，並不普遍且也都尚未通過本國衛生署或美國FDA核可使用，因此與只能以研究性質進口診斷試劑，但因世界各地感染E型肝炎型別不一，因此如使用國外檢驗試劑檢測時，檢驗結果偶會有誤差。須再進一步進行分子生物技術檢驗，以排除偽陽或偽陰之可能性。另因PCR設計引子的區域不相同，其靈

敏度與專一性容易造成不同的結果。藉此次學習新的方法，相信未來在 E 型肝炎的診斷上可進行不同方法的檢測，達到更精準的診斷。

也希望藉此技術之建立，釐清台灣地區 E 型肝炎感染發生病例的研究調查，提供政府為防疫上之參考。

3. 此行也發現國立感染症研究所的部分研究助理雖然非正式公務人員，而是因為業務需求而增加的約僱人員，像這種人力基本上都非常穩定，所以那邊的助理工作年資也都是一、二十年，研究能量能夠繼續累積，因而在研究上累積很好的成果。
4. 建議加強中日雙方合作，此次研習過程十分充實，除學習檢驗新技術之外，也對實驗室管理及工作態度有深刻感受，真的是很難得的經驗。也期望藉由此次研習能與日本國立感染症研究所建立持續的聯繫管道，增加人員互訪及合作的機會。

誌 謝

本次研習承蒙病毒實驗室負責人楊志元博士協助，及吳芳姿副研究員的溝通聯繫下，得以順利成行到日本研習，敬表謝意。

也感謝日本國立感染症研究所病毒第二部第一室室長武田直和醫學博士（Dr. Takeda）親切接待，及此次研習的指導老師主任研究官李天成博士（Dr. Li）對於 E 型肝炎病毒診斷檢驗技術耐心指導，並協助解決實驗技術問題，在此一併致謝。