

出國報告（出國類別：研習）

人畜共通傳染病檢驗技術研習

服務機關：行政院衛生署 疾病管制局 研究檢驗中心

姓名職稱：楊志元 聘任研究員

派赴國家：日本

出國期間：2006.05.10 - 2006.06.09

報告日期：2006.08.10

目 錄

	頁 碼
目的	3
過程及內容	4 - 15
心得	16 - 17
建議	18

摘 要

1986年英國首先有牛海綿狀腦病之個案報告，並於1994年發現有人類新型庫賈氏症，1998年在馬來西亞爆發人與豬感染Nipah，1999年美國有鳥類、馬與人類藉蚊蟲傳播之西尼羅病毒，2003年全球由其在亞洲華人國度爆發有嚴重急性呼吸道症候群(SARS)，以及目前大家聞之色變之禽流感等新興傳染病的紛至沓來，一再的衝擊著公共衛生體系，提醒大家，這些傳染病不是僅止於教科書或書本的章節或發生在遙遠的國度，它是那麼活生生的呈現於我們的眼前，雖然我們用肉眼無法觀察到它的存在，用雙手無法撫摸它的形狀，可是我們知道它是存在的，因為它會奪去寶貴的生命，造成傷殘，甚至影響經濟活動，改變我們的生活形態，我們可以忽視它嗎？答案當然是否定的。

這幾十年來台灣在公共衛生的領域經過國人、政府相關單位、醫療院所、民間組織的努力，在傳染病的防治上獲得輝煌的成果，陸續根除天花、瘧疾、狂犬病、小兒麻痺。一些疫苗可預防的疾病如日本腦炎、B型肝炎、麻疹、德國麻疹、腮腺炎、百日咳、破傷風等感染數亦大幅減少，但隨著經濟活動的增加，交通的頻繁，生活形態的改變，密集的開發，環境及生態的改變，遂使得許多前所未見之新興傳染病浮現，因此我們應該正視傳染病可能帶來之威脅。

此行主要目的，在於研習多重目標檢測，可同時偵測不同的目標而非像傳統方式逐一檢測，如此一來不僅可縮短檢驗時間，試劑成本，人事成本，同時也可節省有限的檢體來源，以便解決萬一檢體量不足可是又有多項項目須要檢驗時可達成篩選之目的。此外由於美、加、日等近年陸續有狂牛症的動物個案傳出，但對於相關檢驗技術皆闕如，同時以往本局如有不明原因傳染病皆尋求美方協助，如SARS期間，但因美國疾病管制局本身也不具備確診之能力，而日本是世界上少數國家除英國外具有確診能力之國家，遂前往日本國立感染症研究所尋求溝通機制建立連絡管道，了解是否台灣如有類似個案時可以接受台灣的疑似檢體代為檢驗。

目 的

- 一、研習檢驗技能，提昇檢驗效能，此一 multiplex RT-PCR，原則上設計並不是高難度的，但是困難處在於 monoplex RT-PCR 可行，多個 primer sets 混合一起時是否可行，便須要嘗試錯誤找出最適當的反應條件，同時無可晦言，當以 multiplex 進行，一定須要犧牲其部份之靈敏度，但無論如何此一套方法如果靈敏度仍在可接受的範圍下，因為可同時偵測多重目標故能省時、省力、省錢。此外也順便瞭解 LAMP 核甘酸測試法。
- 二、Norovirus 目前仍無法培養，故發展一快速之檢測方法仍有其困難，目前已有實驗室依據 Norovirus 之序列以基因表現的方式其表現出蛋白質，然後再去免疫實驗動物以取得單源或多株抗體，而發展出檢測抗原之 ELISA Kit or Norovirus Ag Rapid test，但成本高，成本效益可能不是頗佳，但如果實驗室有能力自行生產製造應可大幅降低成本。
- 三、拜會日本國立感染症研究所病理解剖實驗室，參訪了解庫賈氏症、狂牛症，包括人與動物死亡後之組織檢體之檢驗，並已建立溝通管道，台灣如有疑似個案將可送交該實驗室協助進行確認之檢驗，並已達成協議。

過 程

- 一、前往位於日本東京都文京區東京大學醫學院之醫學系研究科午島廣治教授實驗室進行研習。
- 二、研習過程：先由其實驗室助手帶領操作實驗一次後，由實習者重覆相同檢體看是否得至相同結果，伺結果一致後，便獨立作業以本實習室所收集之腹瀉檢體進行操作。
- 三、另外前往位於東京都新宿區之國立感染症研究所感染病理部與部長佐多徹太郎如下圖討論台灣疑似人類感染狂牛症之確認檢驗事宜。



內 容

一般而言人畜共通疾病指的是由脊椎動物與人類間共通的疾病，但廣義而言，在海產類食物受到污染後被人類攝入造成疾病，也可納入人畜共通疾病。

因此長久以來它的定義依然是爭執不休，但無論如何它所帶來的威脅是一項不容忽視的議題，它不僅種類繁多，除可危害經濟動物生產與寵物健康外，更可能傳染給人類而成為公共衛生的重要威脅，目前已被世界動物衛生組織列為全球首要工作重點。而會被人畜共通傳染病傳染的高危險族群可分為 1.農業從事人員 2.動物產品處理人員 3.森林戶外活動人員 4.都會區飼養寵物或接觸野生動物者 5.獸醫臨床診療實驗室人員 6.流行病學田野調查人員 7.從事災難救助或難民本身。而受到污染的食物一般而言，會偏向細菌性病原體如 *Staphylococcus*，*Shigella*，*Salmonella*，*E coli*等。

而病毒性病原體則是以 *Rotavirus*，*Norovirus*，*Astrovirus*，*Adenovirus* (40&41) 為主要偵測目標，同時這些也是最常見之病原體，其中以 *Rotavirus* 更是對 3 歲以下之孩童造成嚴重之傷亡，尤其是處於未開發中之國家，據世界衛生組織統計每年嬰幼兒因腹瀉而死亡者高達 45~60 萬人，它所造成的殘害算是頗為嚴重，只是一般而言在較為進步、先進的國家，只要適時補充水份、電解質，大都可避免死亡，但因嬰幼兒遭受腹瀉症狀侵襲時，往往無法進食身體虛弱，故需住院靠點滴維生，所以這些醫療水準較完善國家極少有因腹瀉死亡個案，但住院則家長須請假陪同，因此會是經濟層面之考量，也因此有疫苗之研發，其他則因無法培養、不會造成重大疫情或死亡，故仍無疫苗之研發。

實驗步驟

Multiplex RT-PCR

Table-1. Protocol of reverse transcription(RT) for RT-multiplex PCR				
No	reagent	Volume (ul)	Thermal cycler program	
1	5xFirst	1	Temperature	Time
2	10mM dNTPS	0.4	50°C	60min
3	100mM DTT	0.4	99°C	5min
4	Superscript reverse transcriptase III	0.4	one ice	
5	Random primer	0.2		
6	RNAse inhibitor	0.3		
7	Mill Q	1.3		
tatal 1	Reagent mixture	4		
8	Viral RNA-template	4		
tatal 2	Reaction mixture	8		

Table-2: Protocol of polymerase chain reaction (PCR)for RT-multiplex PCR					
NO	Reagent	Volume	Therhmal cycler program		
1	MillQ	6.04	Temperature	Time	
2	10x TaqDNA polymerase buffer	1.3	94°C	3min	35 cycles
3	2.5mM dNTPS	1	94°C	30s	
4	Primer 1	0.2	55°C	30s	
5	primer2	0.2	72°C	60s	
6	Primer 3	0.2	72°C	7 min	
7	Primer 4	0.2	Cooling at 4°C		
8	Primer 5	0.2			
9	Primer 6	0.2			
10	Primer 7	0.2			
11	Primer 8	0.2			

12	Taq DNA polymerase	0.06			
Total 1	Reagent mixture	10			
14	Viral cDNA-template	1			
Total 2	Reaction mixture	11			

Table 3: Specific primers used in multiplex PCR

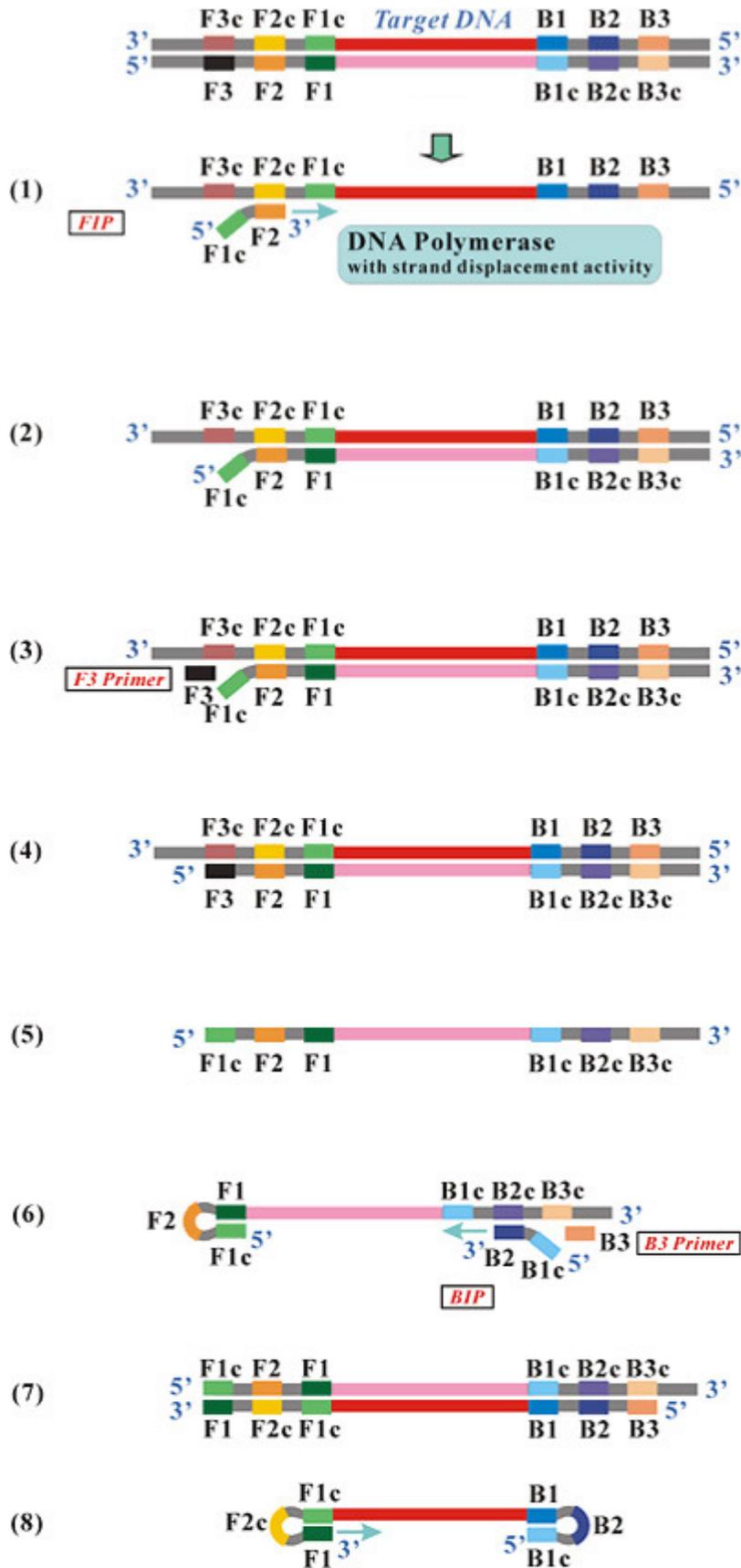
Group	Virus	Primer Order	Primer name	Polarity	Sequence(5'to3')
I	Group A rotavirus	1	Beg9	+	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG
		2	VP7-1'	-	ACTGATCCTGTTGGCCATCCTTT
	Group B rotavirus	3	B5-2	+	GGCAATAAAATGGCTTCATTGC
		4	B3-3	-	GGGTTTTTACAGCTTCGGCT
	Group C rotavirus	5	NG8S1	+	ATTATGCTCAGACTATCGCCAC
		6	NG8S2	-	GTTTCTGTACTAGCTGGTGAAC
	Adenovirus	7	Ad1	+	TTCCCCATGGCICAYAACAC
		8	Ad2	-	CCCTGGTAKCCRATRITGTA
II	Astrovirus	1	PreCAP1	+	GGACTGCAAAGCAGCTTCGTG
		2	82b	-	GTGAGCCACCAGCCATCCCT
	Norvirus GI	3	G1-SKF	+	CTGCCCGAATTYGTAAATGA
		4	G1-SKR	-	CCAACCCARCCATTRTACA
	Norvirus GII	5	COG2F	+	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG
		6	G2-SKR	-	CCRCCNGCATRHCCRTRTACAT
	Sapovirus	7	SLV5317	+	CTCGCCACCTACRAWGCBTGGTT
		8	SLV5749	-	CGGRCYTCAA AVSTACCBCCCCA
III	Eterovirus	1	F1	+	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG
		2	R1	-	ATTGTCACCATAAGCAGCCA
	Hepatitis A virus	3	P3	+	TATTTATCTGTACAGAACAATCAG
		4	P4	-	AGGAGGCGGAAGCACTTCATTTGA
	Hepatitis E virus	5	2S	+	CCGTCGTCTCAGCCAATGGCGAGC
		6	2as	-	CTCATGTTGGTTGTCATAATCCTG
	Influenza A virus	7	MMU43	+	CATCCCAGTGCTGGGAARGAYCCTAAGAA
		8	MMU42	-	AGAGCTCTTGTCTCTGATAGGTG

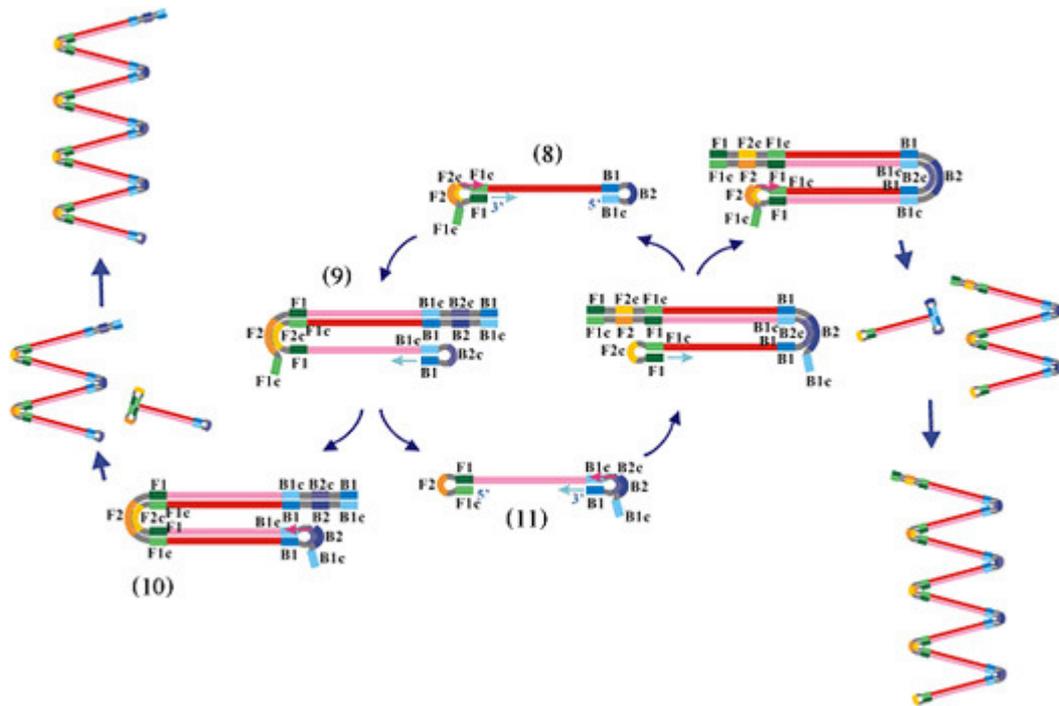
Table4: Result of detection of target virus in clinical fecal specimens by RT-multiplex PCR with different protocols

Target virus							
Number of clinical specimens tested	Lanoratory method	Group A rotavirus	Norovirus G II	Sapovirus	Group C rotavirus	Hepatitis A virus	Other Virus
100	RT-Multiplex PCR with an old protocol	67(67)	4(4)	1(1)	1(1)	1(1)	0(0)
100	RT-Multiplex PCR with an novel protocol	67(67)	4(4)	1(1)	1(1)	1(1)	0(0)
100	RT-Multiplex PCR with an old protocol	67(67)	4(4)	1(1)	1(1)	1(1)	0(0)
100	RT-Multiplex PCR with an novel protocol	67(77)	4(4)	1(1)	1(1)	1(1)	0(0)

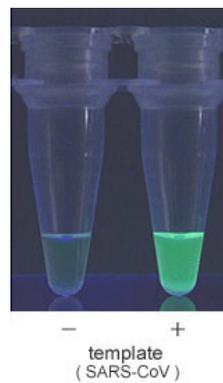
LAMP 核苷酸測試法

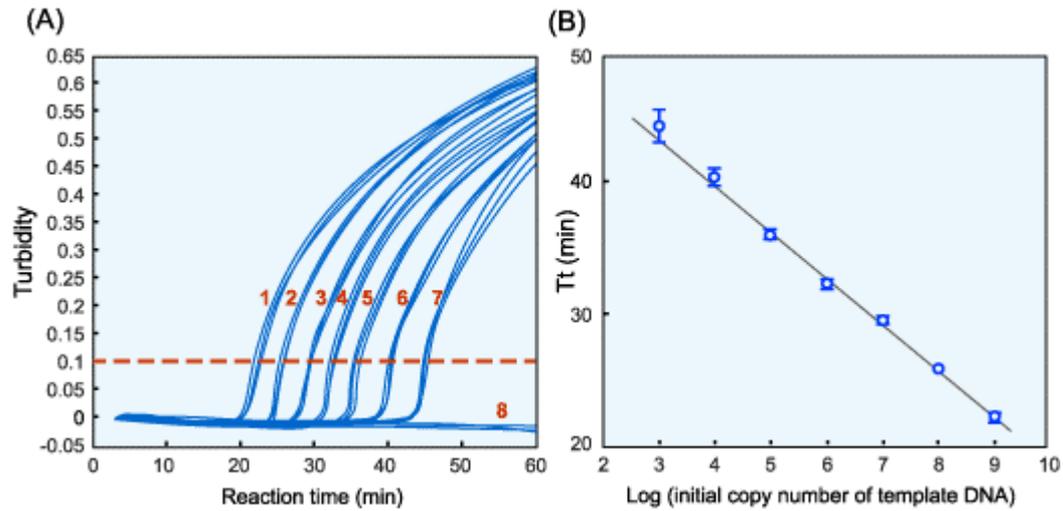
詳細操作流程如附圖所示：





1. Prepare mater mix
2. Add DNA/RNA samples
3. LAMP amplification
4. Detections: visual detection by either turbidity or fluorescence;



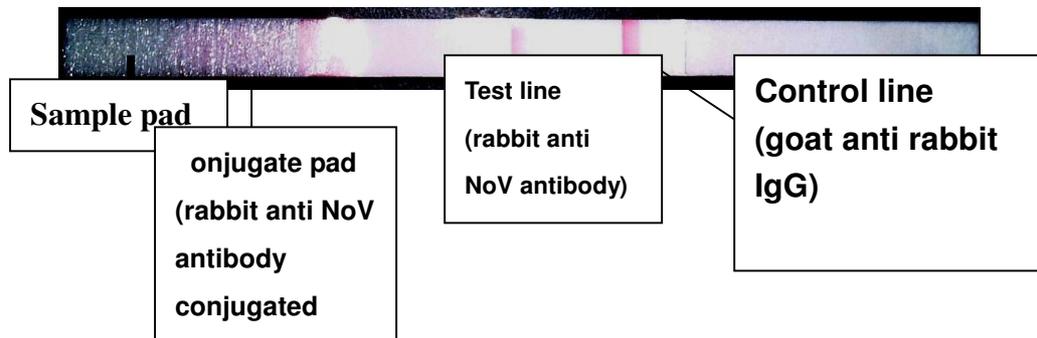


Total procedure take about 60 to 80 minutes.

Rapid Test:

Immunochromatography (IC)
supernatant and buffer

Detection time: 15 minutes 10% Stool



狂牛症之檢驗 Rapid Immunohistochemistry for BSE-PrP^{Sc}

Tissue Processing & Embedding

- 15-20% Formalin fixation, overnight
- 3 mm-thick specimen
- Re-fixation in formalin for 1 hr at 60°C_
- 98% formic acid for 1 hr at RT
- Paraffin embedding for 4.5 hr or overnight
- Sectioning of paraffin embedded tissue

Immunostaining•Autoclaving in 1 mM HCl for 20 min at 121°C•3% H₂O₂-methanol for 5 min

- 10% normal goat serum/PBS for 5 min at RT
- Anti-PrP^{Sc} rabbit or mouse antibody for 45 min at 37°C•Envision+ (Dako) for 30 min at RT
- DAB 40 mg/Tris 200ml, 100 µl H₂O₂ for 5 min
- Hematoxylin staining for 1 min at RT

Western Blot Method **Preparation of homogenate**:200 mg brain tissue

was homogenized with 800 ml of 0.05M Tris-HCl buffer containing 0.1M NaCl (to make 20% homogenate)

or remainder of ELISA (Plateria) homogenate **Successive digestion with enzymes**:250 ml 20% homogenate in TN-Buffer

250 ml Detergent buffer (TN-buffer containing

4% zwittergent 3-14 and 1% sarkosyl)

25 ml 2-BuOH (final 5%)

sonication for 1-2 min

collagenase (12.5 ml, 20 mg/ml, final 50 mg/ml)

37 C for 30 min

add PK (2 ml, 10 mg /ml, final 40 mg/ml)

add 0.1M Pefablock 10 ml

add DNase I (2 ml, 20 mg/ml, final 40 mg/ml)

□ RT for 5 min

Precipitation of PrPSc :□ add 250 ml 2-butanol-metanol mixture (5:1)

□ 15,000 rpm for 20 min, RT □ SDS-Sample buffer, 50 ml

SDS-PAGE: sample: 10 ml (containing 10mg, 0.25 mg tissue equivalent)

Gel: 12.5% Bis-Tris Gel, 1 mm thickness, 12well

Buffer :NuPAGE MOPS SDS Running buffer

Equipment: Xcell *sureLock mini*-cell 200v 45-60min

(invitrogen)

Internal standard: (evaluation for Blot)

mouse PrPSc (1.6, 0.4, 0.1 mg brain eq.),

bovine PrPSc (32, 8, 2 mg brain eq.)

Blotting:Buffer: NuPAGE transfer buffer (invitrogen)

PVDF: (invitrogen)

Blotting: 20V, 40 – 60 min

Blocking:□ 5% defatted milk/ 50 mM Tris-HCl, pH7.5

containing 0.1% Tween 20 (15 min)

□ 1% defatted milk/ 50 mM Tris-HCl, pH7.5 **Primary Ab**:□ 1st. Ab 44B1

(Horiuchi et.al., Virology 320:40, 2004)

x1/5,000-x1/20,000 (1-0.2 mg/ml)

□ RT for 30min

□ Wash with PBS-Tween 6-7 times each for 5 min

2ndary Ab: □ 1% defatted milk/ 50 mM Tris-HCl, pH7.5 □ HRP-labeled anti-mouse antibody (x2,500)

□ RT for 30 min

□ Wash with PBS-Tween 6-7times each for 5 min



心得

此次研習的機構是屬於東京大學醫學系研究所，國際保健學專攻發達醫學牛島廣治教授之實驗室，進行為期一個月的研習，東京大學醫學院全球享有盛名，學術地位崇高，本局昆陽實驗室如與其建立合作溝通的管道，對提昇自身之研究水準可以有所獲益。未進東大實驗室之前，原以為以其盛名實驗室必然有許多先進之儀器、設備，但是進入之後才發現，實際上儀器、設備根本無法和我們相比，型號沒有那麼新穎、機器也沒有太多！只是該有的當然他們都有具備，這情況與我以前在美國疾管局研習之情況完全是不一樣的，美國 CDC 的實驗室儀器種類多，都是頗為新型之機種，某種程度而言，台灣實驗室之情況比較像美國，同時與日本人做實驗發現，他們是相當節省的，不該浪費的絕對不浪費，對於水電方面，也嚴格要求，安全節約用電與能源之消耗。於該單位實習期間，也見識到東京大學教授之權威性，實驗室除了日本本地的研究生實習生外，還包括來自台灣、大陸、孟加拉、越南、泰國等地的研究生，教授本人對學生的教導以嚴格著稱，每個人都戰戰兢兢的從事其研究課題，但另一方面對這些學生也頗為照顧，往往也會讓這些研究生利用各機會管道參加許多國際性研討會，訓練其表達、組織、演講能力，每週的實驗室報告加上書報討論都是重大的挑戰與壓力，雖然我僅是短期實習生，但也被要求參與這些討論會，並進行專案報告，自己離開學生生活也已超過十年，因此剛開始對於一些步調顯得有些無法適應，不過經過一陣子的調教之後，很快的也融入其步調，同時因為自己帶了將近二百支檢體，需利用扣除初期的熟悉環境、觀摩、操作訓練後只剩下約不到三週的時間，也為了不讓其有半途而廢的感覺，所以絕大多數星期六也盡量趕工，以完成所帶去的檢體之檢測。

此外，由於儀器、設備大多數僅一套，但有多人使用，所以需要養成登記排隊的習慣，也因此整個實驗流程需要事先完善規劃，免得操作一半時，因儀器別

人在使用而中斷，影響實驗結果，此一情況與在局裡實驗室有明顯不同，也感謝局裡長官實際上對於我們的儀器與試劑方面頗為慷慨，往往有多套設備，所以很少有需要排隊之情形，當然另一方面我們實驗室的目的與東京大學醫學院實驗室目的不同也應該有所分別主要是我們實驗室是以防疫檢驗為主、研究為輔，因此發檢驗報告是有時效性的，故不可能等太久延誤疫情，也幸賴各級長官大力支持，讓我們在儀器、設備上不虞匱乏，而研究則是經年累月慢慢累積沉澱下來之成果。東京大學本身在全球大學排名位於十四，因而也跟許多國家有合作計劃，此次有幸前往東京大學醫學院研習，雖然自認實驗技術不輸對方，但日本人勤奮不懈、節約自持之精神，實值得我們效法，同時為了減輕全球溫室效應，京都協定的降低節省能源消耗之運動，也的確普遍在日本學術界推動，而我們政府最近兩年也是有長官出來喊口號，呼籲與推行一些節約措施，但一般而言，大家普遍沒有那麼熱絡，今年本局昆陽實驗室飽受用電激增，跳電、停電之苦，也落實了一些方案，效果也不錯，也因為在日本實驗室人家也在做，所以回國後配合養成節約習慣，便沒有像從前一樣虛應了事。

此外至日本國立感染症研究所參訪，這雖不是我第一次到該單位，但確可感受到是最友善的一次，相信這幾年對日工作應已經有所展獲，所以讓我們去與之對談未來合作事宜頗為順利，同時也深深覺得對這些單位的溝通交往，應該是細水長流長年經營，彼此也應展現誠意進行溝通，不要只是去其實驗室要資料、學東西，往後就不理對方，因此有機會應可邀請對方各科領域之負責人至台互相觀摩學習建立情誼，此行也喜獲 NIID 之新任所長（原為病毒第二部之部長所升任），Dr. Tatsuo Miyamura 長期與台灣互動良好，保持相當友好關係，也許高層有機會可以嘗試邀請其新任所長至台灣相關單位訪問。

建 議

- 一、所研習之 multiplex RT-PCR 偵測系統可運用於本局所之腹瀉性檢體之檢驗，以釐清何種病毒性病原體所造成，如此應可節省本實驗室之檢驗時間與試劑。
- 二、往後台灣如有疑似人類狂牛症之個案相關檢體可以送至該實驗室進行確認。
- 三、應加強兩方之科技交流 而非僅止於人員之拜會參訪、近年本實驗室承長官之關照，以有多名成員前往國立感染症研究所研習各項檢驗技術，未來應就特定實驗議題進行合作，如此才能有更緊密的關係。