

出國報告 〈出國類別：研究〉

腸道病毒實驗檢驗技術之研習

服務機關：行政院衛生署疾病管制局

姓名職稱：謝若郁技士

派赴國家：美國

出國期間：民國 98 年 4 月 20 日至 6 月 17 日

報告日期：民國 98 年 9 月 1 日

摘 要

人們受腸病毒感染後，大多為無症狀，或輕微類似感冒的症狀，偶爾腸病毒會引起手足口症、急性出血性結膜炎，無菌性腦膜炎、似敗血性症狀、心肌炎、急性肢體無力或嚴重至引起死亡。腸病毒屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，為一群病毒的總稱，在 1997 年以前，已知而被分類的腸病毒共有小兒麻痺病毒 (Poliovirus)，克沙奇病毒 (Coxsackievirus) 有 A 型及 B 型，伊科病毒 (Echovirus) 及腸病毒 (Enterovirus) 等型別，近年來又陸續發現多種型別，依據基因序列分析結果將之重新歸類，分為人類腸病毒 A、B、C、D (Human enterovirus A、B、C、D) 型。

腸病毒的標準檢驗流程 (Gold standard) 為細胞培養病毒，當細胞因病毒感染產生病變後，再以各型別之血清進行中和反應，始能得知為何種型別之腸病毒的感染。後來有間接免疫螢光染色法 (Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)，以各血清型單株抗體，與產生病變的細胞反應，透過觀察螢光，分析出腸病毒型別，但依然受限在一般市售之抗體血清型別上，能分析的腸病毒血清型別僅 19 型。近年來隨著病毒基因檢測技術的快速發展，分析病毒基因片段，與網路上的基因序列做比對，便能得知型別，也因此發現了許多新的腸病毒型別，目前腸病毒已達 100 多型；而起初被歸為伊科病毒 22 與 23 型，後來因基因序列與腸病毒差異太大，成為小 RNA 病毒科中新的一屬 Human Parechovirus (HPeV)。

依據研檢中心生物材料科收集各合約實驗室所分離之腸病毒，所作的台灣腸病毒血清型別分析，近年來每年約有百餘件為未知血清型別，隨著分子生物診斷方法的發展，希望透過與美國疾病管制局小兒麻痺病毒與小 RNA 病毒實驗室學習，基因檢測新的設計方法，能找尋到更廣大範圍的病原體，包括腸病毒 71 型之後的型別，與 Human Parechovirus 等，使得腸病毒型別之資料更完備。

目 次

	頁 碼
目的	1
過程	2
心得	9
建議	10

目 的

1. 學習美國疾病管制局腸道病毒之檢驗流程與技術
2. 回溯台灣 2007 年腸病毒無法分型之病毒株，透過 Pan-EV 新式分型技術之研習，鑑定其型別，並篩檢與分析新型 Human Parechovirus 病毒屬

過 程

一、檢體歸檔與核酸萃取

1. 檢體歸檔

此行前往美國，觀摩疾病管制局小兒麻痺病毒與小 RNA 病毒實驗室〈Polio and Picornavirus Laboratory Branch〉，從第一步檢體歸檔開始，由於此實驗室接受世界各國小兒麻痺病毒檢體，並依據 WHO 標準流程，對臨床檢體先經過 2 種的細胞培養，才進行分生檢測，再以基因序列比對為野生株或疫苗株，並分析核酸的變化，觀察病毒在地域上的差異。在全球終止小兒麻痺病毒計畫，美國疾管局不遺餘力。小 RNA 病毒實驗室則負責檢驗腸病毒或 Human Parechovirus 的感染，分析美國各地疑似腸病毒感染，卻找不出病原體的臨床檢體。

為了使大量來自世界各地的檢體能系統化地歸檔，實驗室電腦工程師設計了檢體資訊管理系統，從檢體進到實驗室開始至每項實驗結果記錄，都詳細的登錄在系統中。檢體寄達後，由專人負責收件與登打，除了將檢體基本資料直接轉入資訊系統裡，並且能直接印出實驗室工作表單，立即交給各實驗負責人員，進行實驗分析。而實驗結果將儲存成電子檔案，方便將來實驗人員對龐大檢體資料庫的搜尋。

台灣腸病毒監測系統為定點醫師與病毒合約實驗室合作，收集疑似腸病毒感染病患之臨床檢體，交給病毒合約實驗室，以細胞培養病毒的方式，監控腸病毒各血清型流行情形；在細胞培養發現病毒感染後，利用特定抗體螢光染色結果，得到腸病毒之血清型別，但特定抗體只針對二十餘種型別，少數無法鑑定出型別，則仰賴疾病管制局生物材料科進行分析。依據統計，每年約有百餘支病毒，為未知型別。此行前往美國疾病管制局之實驗室，先行寄送了 2007 年無法分型之腸病毒病毒株，希望藉由新的分型技術能得知其型別。病毒株檢體被編進實驗室流水批號（區分不同國家與不同時間寄達檢體序號）22386，編號則改為實驗室流水號 2009704126 至 2009704214。

2. 核酸萃取

實驗室裡對於腸病毒臨床檢體分析，以敏感性較高的分生檢測方法為主。進行分生檢測的第一步為核酸的萃取，對於病毒類感染性物質，實驗室非常要求操作空間的獨立，並在每次操作完畢，需要以 10% 的漂白水及 70% 酒精分別擦拭操作台與實驗儀器，避免病毒的殘留與汙染。核酸萃取的方法與台灣疾管局現行方法大致雷同，使用 Qiagen QIAamp Viral RNA Kit 進行萃取。萃取之 RNA 暫存於-20 冰櫃，以利短期使用，如需長期保存 RNA，則冷凍於-80 冰櫃中。

二、病毒株之分型

1. 腸病毒 RT-PCR

針對分離之病毒株，按照實驗室流程，先以腸病毒分型 RT-PCR 進行分析。首先是以 EV 68 原型病毒株之 RNA 做為實驗陽性對照組，卻無法得到陽性結果，經過與研究人員討論，更換新的緩衝溶液與利用其他的病毒株取代 EV 68，最後以 Echo 11 病毒之 RNA 當作新的陽性對照組。一開始選用 EV 68，是因此病毒株在美國較罕見，如果在檢體分析結果得到與陽性對照組 EV 68 相同的序列，則可能有汙染之虞。而後來選用的 Echo 11 病毒也是相對少見的病毒株。

RT-PCR 使用的引子序列如下：

Forward 5' MI GCI GYI GAR ACN GG 3'

Reverse 5' CIC CIG GIG GIA YRW ACA T 3'

每一個 RT-PCR 反應 50 μ l 含 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1 μ M primers, 17 mM ammonium sulfate, 6 μ M EDTA, 2 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 1 mM DTT, 10 U placental RNase inhibitor, 3 U AMV reverse transcriptase, 2.5 U Taq DNA polymerase, 及 1 μ l template RNA.

以 ABI 9700 機器進行 RT-PCR，反應溫度如下：

50 °C, 30 min, 94 °C, 3 min，進行反轉錄反應。

94 °C, 30 s; 42 °C, 30 s and 60 °C, 30 s; 進行 40 個 cycles 之聚合酶鏈反應
72 °C, 5 min，進行完整反應。

2. RT-PCR 產物之定序

將 RT-PCR 產物以 2% agarose gel 利用電泳分離大小不同片段，並加入 0.5 μ g/ml ethidium bromide 結合 RT-PCR 產物，經紫外光照射下，RT-PCR 產物即能發出螢光，立即以刀片割下具有 RT-PCR 產物的 agarose gel，利用 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) 將 PCR 產物純化。測定純化後 DNA 濃度，取 1 μ g DNA 進行 dideoxy-chain terminators 之定序反應，反應完成後，去除多餘螢光染劑與酵素，並加入 Hi-Di Formamide 使 DNA 變性成單股，以 Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer 進行分析。

經過序列比對定序結果：14 個為 EV 68，8 個為 CVA 24，8 個 Human Rhinovirus (HRV)。EV 68 依據基因分型為人類腸病毒 D 型，D 型中僅有 EV 68 與 EV 70 兩種病毒，先前國內較少分析出此型別；而 HRV 與腸病毒屬相同為小 RNA 病毒科其中的一屬，部分型別的序列與腸病毒相似，因此作基因檢測分析時，除了可以得到腸病毒序列，也有可能得到幾個型別的 HRV。

但是尚有一半以上的檢體仍為未知型別，因此需要採用敏感度較高的 Real-time RT-PCR 做進一步的分析。

3. 腸病毒 Real-time RT-PCR

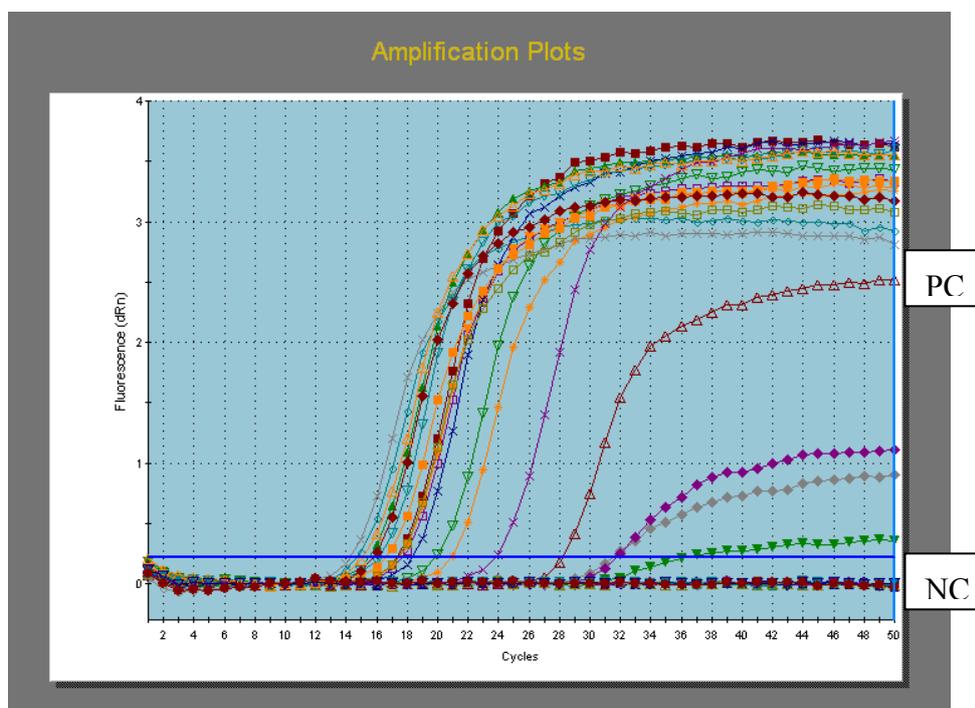
腸病毒之 Real-time RT-PCR 針對的基因片段為 5'UTR 高度保留區，不同型別的腸病毒皆擁有相似的序列，反應中使用水解探針，利用特殊酵素在合成 PCR 片段時，能水解探針放出螢光訊號。使用的引子與探針序列如下：

Forward 5' GGCCCTGAATGCGGCTAATCC 3'

Reverse 5' GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA 3'

Probe 5' FAM CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT BHQ1 3'

使用 **Stratagene MX3000** 進行反應，設定程式 50°C, 30 min, 95°C, 5 min; PCR 反應設定 95°C, 15 s; 55°C, 45 s; 72°C, 10 s 進行 45 次反應。並在每個反應結束時收集螢光訊號，螢光訊號超過閾值之反應數 (Ct 值) 小於 45，即為陽性結果。



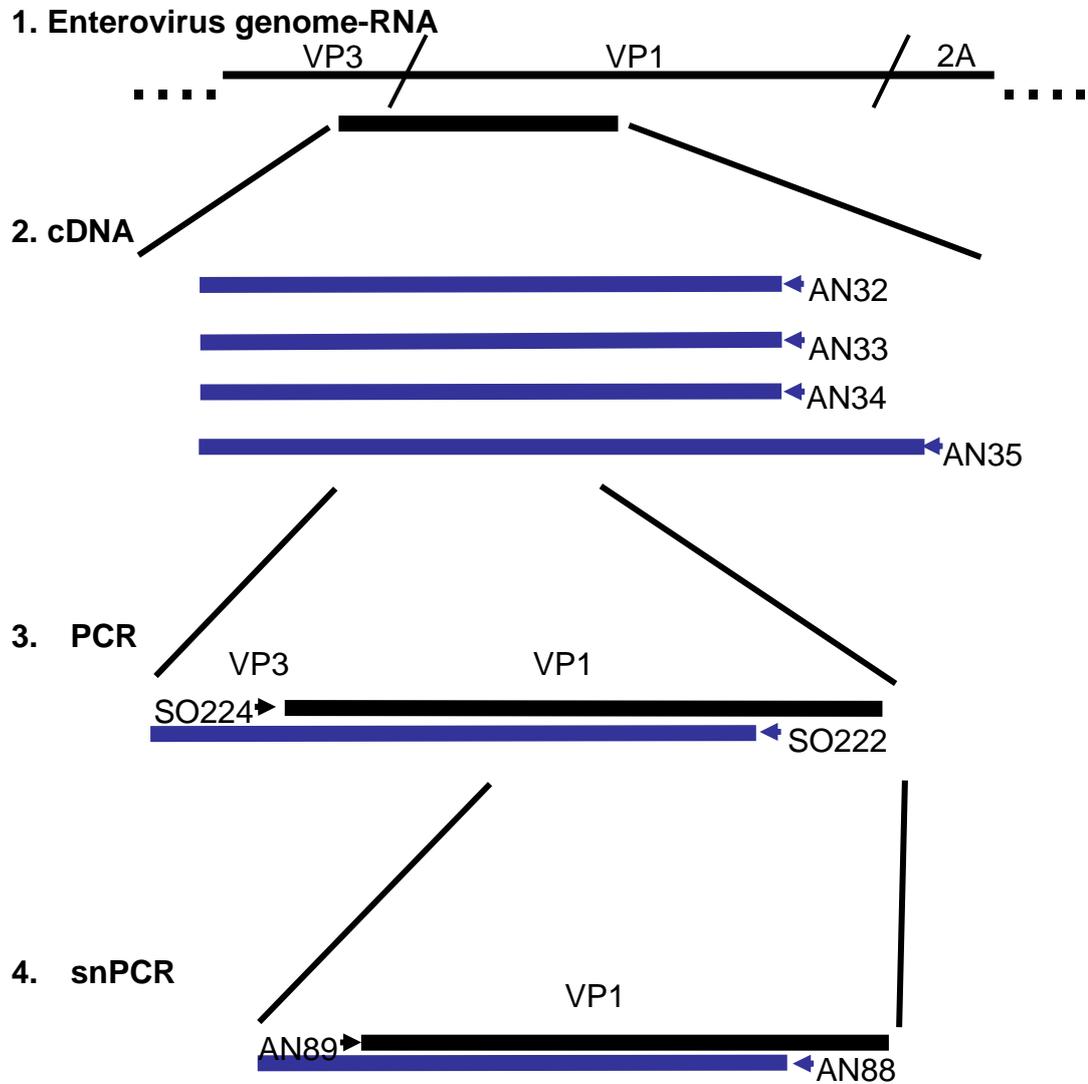
圖一、部分腸病毒之 Real-time RT-PCR 結果，圖中 PC (positive control) 與 NC (Negative control) 為陽性與陰性對照組。X 軸為 PCR 之反應數，Y 軸為 PCR 產物之螢光強度。

此批檢體經過腸病毒之 Real-time RT-PCR 實驗，得到 53 個陽性結果，與 RT-PCR 的方法相較，增加了 16 個檢體為腸病毒(其中有 4 件為 RT-PCR 陽性但 Real-time RT-PCR 陰性，皆為 HRV)，由於 Real-time RT-PCR 產物為 5'UTR 高度保留區，不同型別間序列大致相同，因此無法用於腸病毒型別分析；要得知分型的結果，則需要靠腸病毒 semi-nested (sn)

RT-PCR，以抗原決定位 VP1 的區域，分析其序列方能得到分型資訊。

4. 腸病毒 snRT-PCR

針對抗原決定位 VP1 進行腸病毒 snRT-PCR。



圖二、sn RT-PCR 圖示。

第一步先以專一引子將 RNA 反轉錄成 cDNA，透過進行兩次 PCR 反應，可以將微量的病毒 RNA 放大其訊號，提高偵測的敏感度與專一性。PCR 步驟中使用的 degenerate primers 雖能擴大結合不同序列，但與模板結合並不穩定，因此在 PCR 反應中需要減緩升溫速度。再加上 snPCR 的引子經過特殊設計：consensus degenerate hybrid oligonucleotide primer (CODEHOP)，引子的 5 端含有 15 至 25 個核酸為固定序列，能穩定 PCR 反應產物，3 端則為變異區，含有 9 至 12 個核酸，其中包含多重變化核

酸序列，得以與各型別之不同序列結合，增加 PCR 反應對不同腸病毒之敏感性。

由於此法敏感度高，實驗操作過程中，需要在無菌操作櫃裡進行，並對於可能造成污染的第一次 PCR 產物，與新配置第二次的 PCR 反應試劑之間，要盡量避免微粒分子飄散，而造成偽陽性的污染。

除了將腸病毒 real-time RT-PCR 陽性檢體進行 snRT-PCR 反應，亦將腸病毒 RT-PCR 與 real-time RT-PCR 兩種方法結果皆為陰性之檢體，做進一步進行分析，與 RT-PCR 反應相似，經過電泳與定序實驗，得到分析結果：15 個檢體為 HRV，3 個為 EV68，3 個為 CVA16。

5. HPeV (Human Parechovirus) Real-time RT-PCR

HPeV 先前被歸類為腸病毒屬裡的伊科病毒第 22 與 23 型(Echovirus 22, 23)，最近幾年利用生物資訊的方法計算基因分型，才發現這兩型病毒的基因序列與腸病毒有很大的差異，因此分別被重新命名為 Human Parechovirus 1, 2。經過多年的研究，如今研究人員已經找出 HPeV3 至 HPeV14，受此病毒感染之患者其臨床表現可能為無症狀、輕症、重症甚至造成死亡，其中以 HPeV1 與 HPeV3 最為常見。

由於基因序列與腸病毒的差異，造成針對腸病毒的一般 RT-PCR 反應無法偵測到 HPeV，而 HPeV 所引起的臨床症狀與一般腸病毒感染症狀相似，所以在臨床症狀懷疑為腸病毒感染時，其病原體可能會是 HPeV。而分析此批疑似腸病毒感染檢體時，有 2 成左右仍為未知病原體，因此再做進一步分析是否有 HPeV 在其中。

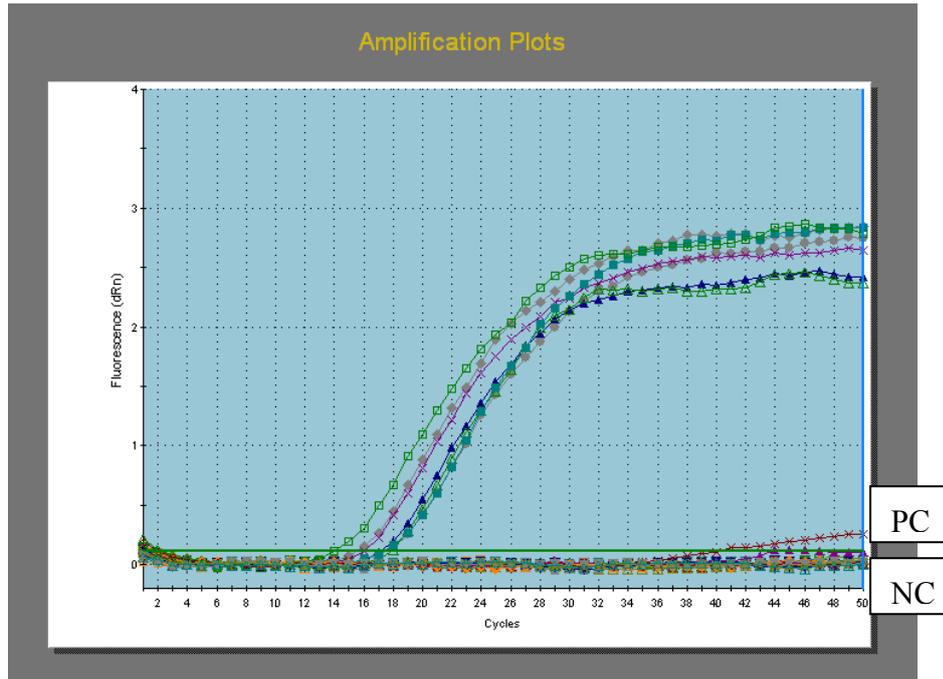
實驗原理同腸病毒 Real-time RT-PCR，使用之引子與探針序列如下：

Forward : 5' GTAACASWWGCCTCTGGGSCCAAAG 3'

Reverse : 5' GGCCCCWGRTCAGATCCAYAGT 3'

Probe : 5' HEX CCTRYGGGTACCTYCWGGGCATCCTTC BHQ1 3'

RT-PCR 反應條件為：50°C, 30 min 接著 95°C, 5 min 的 RT 反應； PCR 則為 95°C, 15 s; 58°C, 45 s, 72°C, 10s 進行 45 次反應，並在每次反應結束收集螢光訊號強度，部分結果如下圖：

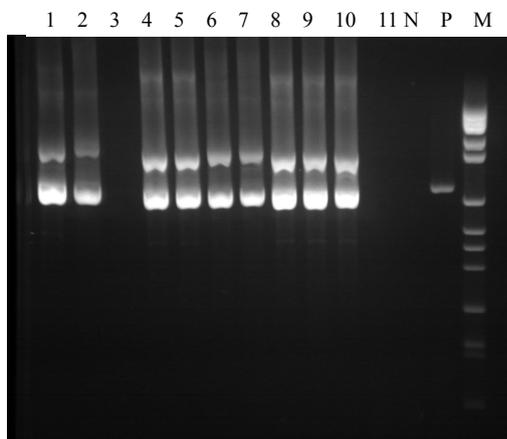


圖三、部分 HPeV 之 Real-time RT-PCR 結果，圖中 PC 與 NC 為陽性與陰性對照組。X 軸為 PCR 之反應數，Y 軸為 PCR 產物之螢光強度。

實驗結果得到 11 個陽性 (Ct 值小於 50)，但與腸病毒 Real-time RT-PCR 相同，無法直接獲知型別，仍需以 HPeV 之 snRT-PCR 做進一步的序列分析，才能確知型別。

6. HPeV snRT-PCR

實驗設計與腸病毒之 snRT-PCR 相似，設計多段 3'端反股引子，以進行反轉錄的反應，將反轉錄出來的 cDNA 當做模板，進行 PCR-1 反應，得到較長的片段，再經過 PCR-2 的反應，得到較短片段的 PCR 產物，進行分析序列，由 11 件篩檢 HPeV Real-time RT-PCR 陽性檢體，分析結果如下圖：



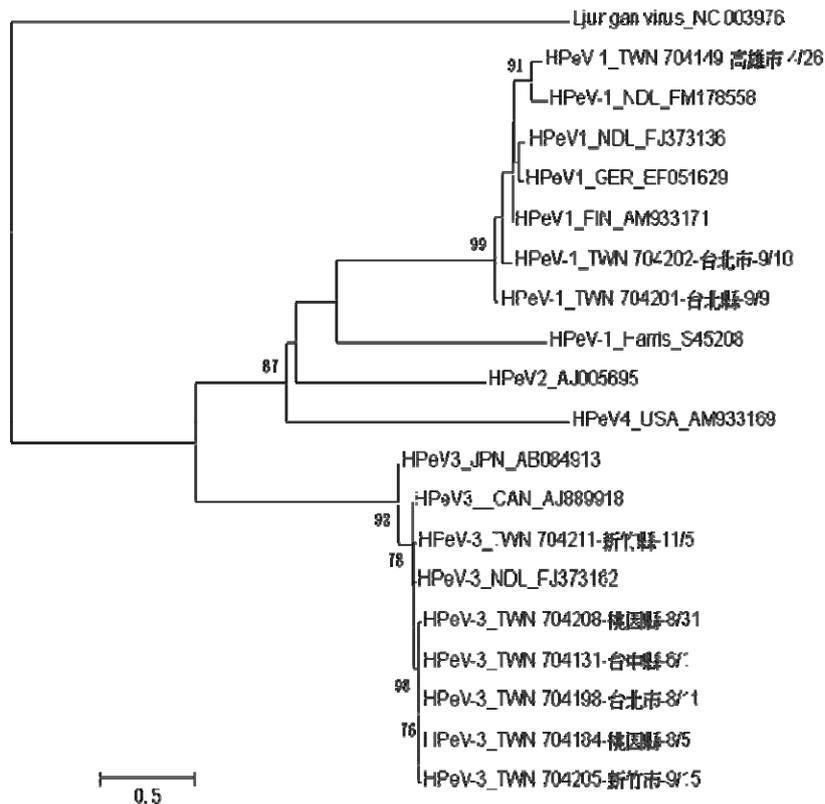
圖四、N 與 P 為陰性與陽性對照組，M 為分子量標記，PCR 產物片段大小約為 703bp。

編號 3 與編號 11 在 real-time RT-PCR 反應時，兩者之 Ct 值皆大於 35，而 snRT-PCR 無反應，推測其 real-time RT-PCR 應為非特異性反應，才會在 snRT-PCR 得到陰性結果。

經過分析序列與比對，3 件為 HPeV 第一型，6 件為 HPeV 第三型。

7. HPeV 演化樹分析

將得到的 HPeV 序列與 NCBI 資料庫中其他各國 HPeV 的序列利用 Clustal X 將序列排序(alignment)，再以 MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 4)進行基因演化樹分析。以 Neighbor-joining 方法計算，建立演化樹。



圖五、台灣 HPeV 與其他各國 HPeV 演化樹分析，附註個案居住地與發病日。

心 得

此次獲得前往美國疾病管制局小兒麻痺病毒與小 RNA 病毒實驗室學習之機會，著實獲益良多，並感受到極大衝擊，其中美國疾病管制局實驗室人員之編制與工作精神，國內現況確實難以望其項背。除了因為他們投入了相當大的心力在全球根除小兒麻痺病毒計劃，包括輔導各國防疫人員執行疾病預防、指導成立病毒實驗室與追蹤小兒麻痺病毒流行現況；實驗室成員有改良既有技術之研究人員與編寫資料庫程式之工程師，使得實驗室整體運作更臻完善。實驗室常與流行病學家與生物統計學家合作，一起討論分析所得之數據，使所得結果與公共衛生結合。

在研習期間，恰逢新流感疫情在墨西哥首度爆發，美國疾病管制局首要恪守國內疫情，並進一步支援墨西哥實驗室的建立，由生技廠商提供核酸檢測儀器，美國疾管局派員訓練實驗室人員，而小兒麻痺病毒與小 RNA 病毒實驗室中，熟稔西班牙語之工作人員，在第一時間便被調派至墨西哥，由於語言與當地人無隔閡，又熟悉實驗技術，能直接教導當地實驗室人員處理檢體與操作儀器。得知人手不足時，實驗室主管更是加派人手前去協助。實驗室人員不辭辛勞遠赴墨西哥支援，並深入疫情第一線，其精神真是令人敬佩。

建 議

1. 將腸病毒 snRT-PCR 基因檢測方法應用於臨床檢體檢測，希望藉由其高靈敏度與專一性之特性，加強檢驗效能。
2. 此行首次得到台灣 HPeV 之資料，期能繼續分析近幾年無法分型檢體是否有 HPeV，以建立台灣流行 HPeV 之情形。
3. 希望能多與國外實驗室合作及技術交流，受訓期間能再加長，得以吸收學習更完整的研習經驗。