

出國報告（出國類別：研究）

## 腸病毒培養檢驗技術研習

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：謝若郁技士

派赴國家：日本

出國期間：民國 107 年 7 月 09 日至 7 月 21 日

報告日期：107 年 9 月 20 日

## 摘要

自 1998 年台灣爆發腸病毒 71 型大流行，其後每隔 3~4 年會發生規模大小不等之腸病毒 71 型之疫情。但近年來腸病毒疫情除了腸病毒 71 型之外，腸病毒其他型別不若以往只是引起輕症，臨床症狀的變化造成不少重症感染個案，例如克沙奇 A6、腸病毒 D68 型等。目前國內監測腸病毒感染主要依賴腸病毒重症通報與採檢，及社區監測由定點醫師採檢送交病毒合約實驗室進行檢驗，兩者皆需要進行病毒培養，以取得病毒株做進一步抗原性分析，然而腸病毒型別眾多，增加腸病毒培養之挑戰。

本次赴日本國立感染症研究所研習，即為學習日方對於腸病毒培養實驗流程，以精進國內相關檢驗技術，提升腸病毒監測量能，並增進彼此資訊分享與交流。

## 目次

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	6
心得與建議.....	14
附錄.....	15

## 目的

腸病毒屬於小 RNA 病毒科(Picornaviridae)，為一群病毒之總稱，病毒不具備套膜，因此無法以酒精殺死腸病毒，其核酸屬於正股 RNA，病毒外觀為正 20 面體蛋白殼體，病毒顆粒大小約 20~30 奈米。早期依中和抗體與動物感染模式為分類方法，最早於 1908 年發現的腸病毒為小兒麻痺病毒(poliovirus)有 3 型 (PV1~3)，因其感染會造成嚴重的小兒麻痺症(poliomyelitis, 脊髓灰質炎)，為目前最詳細研究之腸病毒，也是唯一有疫苗能預防的腸病毒，世界衛生組織已於 2015 年宣布根除小兒麻痺病毒第二型之野生株。後來陸續發現克沙奇 A 型與 B 型病毒(Coxsackie A and B virus)各有 23 型(CVA1~23)與 6 型(CVB1~6)、伊科病毒(Echovirus)30 型(E1~30)及之後新發現以數字命名之腸病毒(Enterovirus 68~121)，初期以小鼠感染實驗結果進行分類，並以中和抗體進行分型，隨著發現型別增加，漸漸發現中和抗體出現交叉反應或相同病毒被分成不同型別。近年來則改以分子生物學分析其抗原(VP1)序列，重新定義腸病毒之分類法，將感染人類之腸病毒依抗原序列相似度，分為腸病毒 A~D 型、感染其他動物之腸病毒 E~L 型，與鼻病毒 A~C 型。而常引起重症之腸病毒 71 型屬 EV-A，小兒麻痺病毒屬於 EV-C，腸病毒 68 型則屬於 EV-D。

腸病毒傳染途徑可經由糞-口傳染或者透過呼吸道傳染，從初次感染位置(腸道或呼吸道)病毒進行複製後，有機會再感染至其他組織或器官，甚至感染中樞神經系統。大多數感染腸病毒能自行痊癒或未被發覺，腸病毒感染後之臨床症狀是多元的，重症情形容易發生在嬰幼兒、兒童或免疫缺陷之個案。腸病毒為引起病毒性無菌腦膜炎之主因，這些病毒同時也可能引起新生兒敗血症、腦炎、急性無力肢體麻痺、手足口病、咽峽炎、胸膜痛、心包炎及心肌炎等症狀。克沙奇 B 病毒與伊科病毒則可能因慢性感染造成胰臟細胞之發炎症狀，造成第一型糖尿病。

近年來 EV-A71 與 EV-D68 引起了嚴重的公共衛生威脅，EV-A71 為手足口病之主要病原體，通常症狀為輕微並能自行痊癒，但也有可能發生致命之神經併發症，如感染腦幹引起之腦炎、腦膜炎或類似小兒麻痺症之無力症狀，嚴重者發生心肺功能衰竭。在過去 20 年來，東南亞爆發多次 EV-A71 大流行，1998 年 EV-A71 於我國首次爆發大流行，造成約有 13 萬名兒童感染，超過 400 名兒童引起嚴重神經症狀，並有 20% 之死亡率，其後亞洲各國包含馬來西亞、新加坡、中國、香港、日本、韓國、越南及柬埔寨等國，陸續出現 EV-A71 之疫情，在我國每隔 3 至 4 年持續出現 EV-A71 之疫情，因提前預警與提高臨床注意重症前兆，大大降低了死亡率，近幾年之疫情則有降低之趨勢。除了 EV-A71 之外，CV-A6 造成臨床症狀變化，增加了重症之比例，其病毒培養亦有困難度。

美國在 2014 年首次爆發 EV-D68 之嚴重大流行，除了引起嚴重呼吸道症狀，甚至造成急性無力脊髓炎(acute flaccid myelitis, AFM)，其後在不同國家陸續通報類似疫情。在 2016 年以前，國內腸病毒監測可測得 EV-D68 感染個案，但都為社區監測輕症個案，雖然由序列分析上，與美國流行的病毒株序列同屬 B1 亞型，但詳細分析次分型仍有差異。於 2016 年台灣首次發現造成 AFM 之 EV-D68 感染個案，在 2017 年秋冬季節，則有超過 10 名兒童感染 EV-D68 而造成 AFM 症狀或腸病毒重症，而病毒抗原分析其已演化為 B3 亞型。由於 EV-D68 病毒特性較類似鼻病毒(不耐酸且偏好低溫)，增加腸病毒培養之困難度，個案確認僅能仰賴分生檢驗技術，無法取得病毒株，難以進行後續分析。

因此本次出國研習目的即為強化我國腸病毒培養技術，以提升病毒抗原性分析能力，學習符合國際規範之腸病毒培養流程，建立與日本聯繫管道，拓展國際人脈，增進彼此技術交流。

## 過程

### 壹、行程

此次奉派赴日本研習地點為國立感染症研究所之傳染疾病監測中心 (Infectious Disease Surveillance Center) 第四室病原診斷實驗室 (LABORATORY DIAGNOSIS DIVISION)，該中心位於東京都戶山市，屬國立感染症研究所之戶山廳舍。研習期間為自民國 107 年 7 月 9 日起至 7 月 21 日止，含路程共計 13 天，相關時間地點及行程內容詳述如下：

日期	工作 日誌	地 點	行 程 內 容
107/07/09	啟程/抵達	台北→東京	路程/抵達
107/07/10~ 107/07/20	研習	東京	腸病毒培養檢驗技術研習
107/07/21	返程/抵達	東京→台北	路程/抵達

### 貳、研習內容

#### 一、腸病毒培養技術簡介

本次赴日本國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases)研習的主要內容，為學習腸病毒培養技術，藉由培養出腸病毒，將得以進一步分析病毒全基因體序列與病毒抗原性等詳細之研究。研習地點為該所傳染病監測中心之第四室，由該室室長 Dr. Fujimoto (藤本嗣人)以及研究員 Dr. Hanaoka (花岡希)指導。傳染疾病監測中心之病原診斷實驗室主要蒐集來自各縣衛生研究所分離出病毒，做進一步研究與分析，並診斷不明原因傳染病，以及病原體鑑定之新技術開發之研究，近期研究包含腸病毒 D68 型、腺病毒及 Human

Parechovirus (HPeV)。

在日本國立感染症研究所制定之診斷方法，依臨床症狀為分類，例如本次以無菌性腦膜炎診斷方法(Diagnosis manual for Aseptic meningitis)作為腸病毒培養檢驗技術研習之參考方法，無菌性腦膜炎在日本主要發生季節為夏季，類似腸病毒發生的季節，而無菌性腦膜炎為非細菌感染造成之腦膜炎總稱，因此還包括由其他病毒感染引起的腦膜炎，例如腮腺炎病毒和單純疱疹病毒。大部分的無菌性腦膜炎則由腸病毒感染所引起，包含伊科病毒與克沙奇 B 病毒。依日本無菌性腦膜炎個案所分離出之腸病毒最多為伊科病毒 30 型、克沙奇 B 病毒 5 型、伊科病毒 9 型、7 型與 6 型，每年流行的型別與疾病嚴重程度皆不相同，腸病毒所引起之無菌性腦膜炎臨床症狀主要為發燒，其他為頭痛，噁心和嘔吐，但預後通常良好，主要感染族群為嬰幼兒與學齡幼童。如同其他腸病毒，糞-口傳染為主要傳播途徑，潛伏期約 4 至 6 天，目前沒有針對無菌性腦膜炎的預防方法或有效治療，包括疫苗和抗病毒藥物。

進行病毒培養所採集之檢體包含糞便、腦脊髓液、鼻咽拭子或鼻腔沖洗液，而對於無菌性腦膜炎的明確診斷，能由腦脊髓液中分離出病毒具有高度診斷價值，但不同型別之腸病毒於腦脊髓液分離的比例差別很大。蒐集鼻咽拭子檢體時，建議使用能室溫保存運送培養基之套組(Universal Transport Medium System)，避免檢體於運送過程乾燥失去病毒活性。為了使檢測更正確並有效率，檢體採集應盡量接近症狀剛出現之急性期，採集可觀察到病灶的區域，並縮短運送時間，如無法即時檢測，則可冷凍保存檢體。進行血清學檢測時，急性期血清需在症狀出現早期採血，恢復期則在發病後兩週採集，以配對血清之中和檢驗，作為感染之輔佐證據。

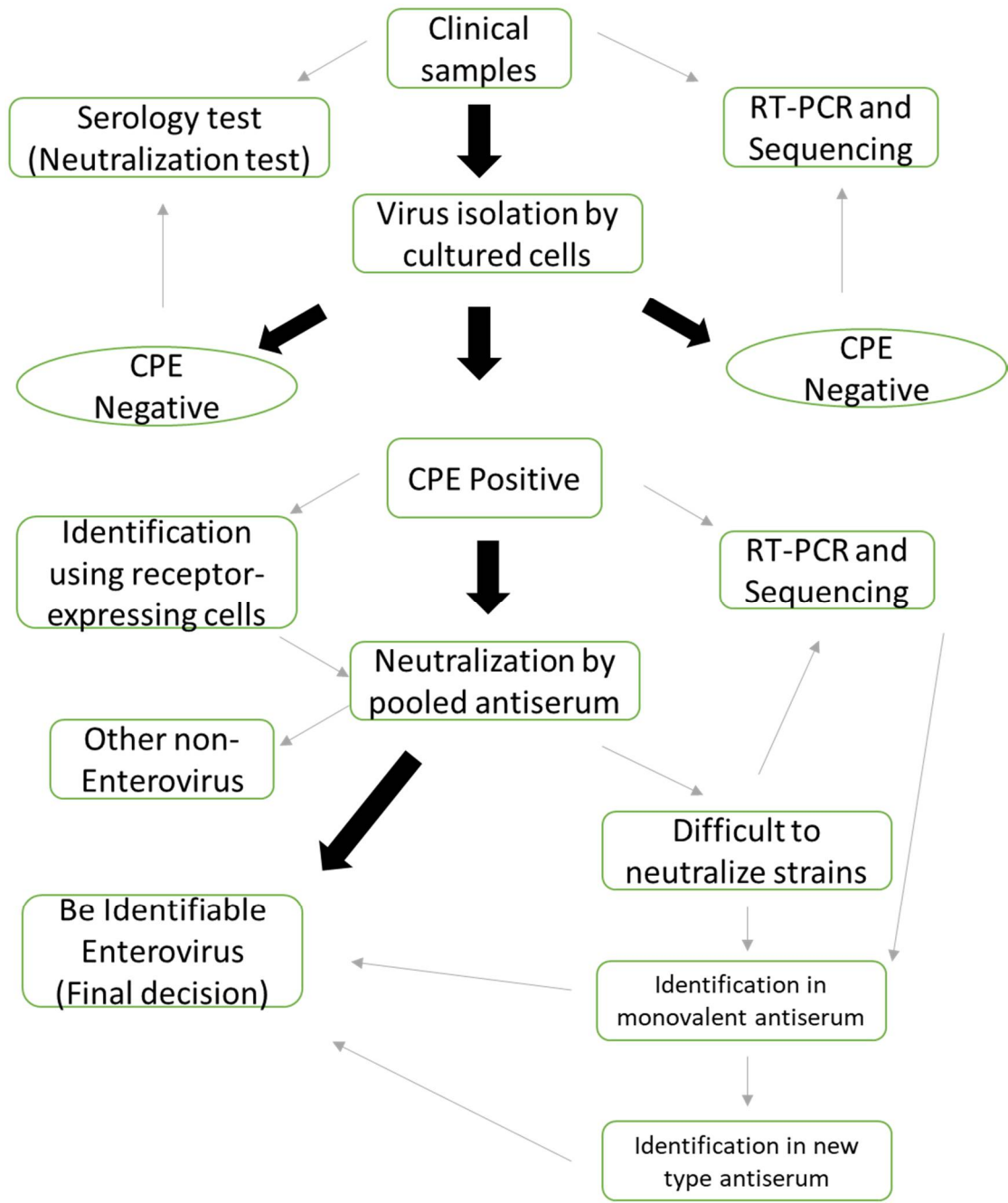
有許多不同的腸病毒型別會引起無菌性腦膜炎，而培養病毒的敏感性取決於使用的細胞，因此進行病毒培養時，需考慮當時流行的病毒來選擇用於病毒培養的細胞類型。常用於腸病毒培養之細胞種類有 RD-18S, RD-A, Vero,

HeLa, HEp-2, FL, CaCo-2 等，建議使用其中 3~4 種細胞能培養出大部分之腸病毒。另外以表現特定病毒接受器的細胞，如 L20B 或 L-hCAR 細胞，則能快速鑑別出病毒型別。

以特定血清型之中和抗體血清進行中和試驗方法是鑑定腸病毒型別之基本方法，腸病毒的血清型別太多，因此一開始使用合併多種血清套組來初步鑑定型別，但是腸病毒在傳播期間可能會逐漸改變病毒之抗原性，使得難以用現有的抗血清中和病毒，在這種情況下，則需另外製備這種難以中和病毒株之抗血清，以確認與鑑定特殊血清型別與交叉中和反應(流程如圖一)。

從臨床檢體分離出腸病毒，特別是由腦脊髓液所分離或偵測之病毒，應該就是主要致病的病毒。如果無法進行培養或培養不出病毒，血清學診斷方法於急性期與恢復期血清中和倍數達四倍上升，可用於間接證明病毒感染。而病毒分生檢測方法(例如 RT-PCR)也可用於鑑定腸病毒的方法，尤其是難以分離或鑑定之腸病毒。然而腸病毒常會引起不明原因的感染，因此應綜合考慮臨床過程和流行病學訊息，並應謹慎解釋病毒診斷結果。





圖一、無菌性腦膜炎檢測方法

## 二、腸病毒培養操作方法

### 細胞培養與病毒分離

分離腸病毒所使用之細胞株各實驗室皆不相同，常用於病毒培養之細胞有 RD-18S, RD-A, Vero, Hela, Hep-2, FL, Caco-2 等等，同時使用 3~4 種細胞，可分離出大部分之腸病毒。各實驗室細胞培養使用之儀器與試劑也會依使用之細胞不盡相同，大致方法簡介如下：

### 使用試劑與配置

1. Chloroform(三氯甲烷), Eagle's MEM, 7.5% NaHCO<sub>3</sub>, penicillin-streptomycin (PS) solution (penicillin final concentration 100 unit/ml, streptomycin with 100 µg/ml), fetal bovine serum (FBS, 0.22µm filtered after 56°C, 30 min inactivation), PBS(+), L-glutamine solution (200mM, or L-Alanyl-Glutamine)
2. 生長培養基：500 ml of Eagle's MEM medium and PS-solution, FBS (10% final concentration), 7.5% NaHCO<sub>3</sub> add 7.5 ml, L-glutamine add 5 ml.
3. 病毒培養基：500 ml of Eagle's MEM medium and PS-solution, FBS (2% final concentration), 7.5% NaHCO<sub>3</sub> add 12.5 ml, L-glutamine add 5 ml.

### 臨床檢體病毒培養

1. 檢體前處理-1: 取 1 克左右糞便檢體置於 50 ml 離心管中，加入含有抗生素之 PBS 緩衝液與 1.5 ml 三氯甲烷，垂直震盪 20 分鐘後，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液至保存管，作為接種之檢體。
2. 檢體前處理-2: 鼻咽拭子於震盪採檢棉棒後，設定 4°C 以 10,000 rpm 離心 20 分鐘，取上清液進行接種，而腦脊髓液可直接接種。當觀察到細菌或黴菌污染時，以過濾方法去除污染。
3. 以 24 孔盤或病毒管進行細胞培養，使用 24 孔盤時，須特別注意檢體間交叉感染。

4. 當細胞單層生長時，將生長培養基替換成病毒培養基。檢體接種 100~300  $\mu\text{l}$  至細胞中。
5. 將接種檢體後之細胞放置於 35~37°C 二氧化碳培養箱中，觀察 7~10 天，無 CPE 產生時，將細胞冷凍-解凍後，繼代至新的細胞，再觀察 7~10 天，假如仍無 CPE 則判定結果為陰性。
6. 當觀察到 CPE 產生時，將病毒液保存於-20°C。
7. 將初次培養之病毒接種於新的細胞中，再次產生 CPE 後，收集二次病毒液並-20°C 保存。進行二次病毒液之濃度定量測試，並將使用於鑑別病毒種類。
8. 假如於接種 24 小時內即產生 CPE，則非常有可能為檢體中之非特異性細胞毒性。可以取產生非特異性反應之培養基 100  $\mu\text{l}$  接種至新細胞，或者以吸附法取代具細胞毒性之培養基(接種後一小時替換新的病毒培養基)皆可降低相關影響。

### 中和試驗鑑定病毒

當病毒培養出來後，可以市售之腸病毒抗體血清套組進行中和試驗與鑑定，中和試驗以微量盤進行，操作方法有兩種，一種是將病毒與抗血清反應後，再將病毒與抗血清移至培養好之細胞盤上之移轉盤法(transfer plate method)，另一種則是在病毒與抗血清反應完成後，直接加入懸浮之細胞液之接種法(sowing method)，之後再進行培養與觀察。以血清中和之前，需先定量病毒之 TCID<sub>50</sub>，以 100 TCID<sub>50</sub> 濃度之病毒與 20 單位之血清進行中和。

移轉盤法是以病毒培養基進行血清之稀釋，在 96 孔稀釋盤中，取 25  $\mu\text{l}$  稀釋為 100 TCID<sub>50</sub> 濃度之病毒，加入 25 $\mu\text{l}$  稀釋為 20 單位之血清，以微量盤震盪器混合均勻，在 35~37°C 二氧化碳培養箱中反應 2 小時。將已培養好在 96 孔培養盤之細胞，吸去原有之生長培養基，加入 100  $\mu\text{l}$  之病毒培養基，將前一步驟反應 2 小時之病毒與血清混合液，加入細胞中，於 35~37 °C 二氧化碳培養箱進

行培養，並每日觀察 CPE，約觀察七天。

接種法則為將 20 單位抗血清 50  $\mu$ l 加入盤中，再加入 50  $\mu$ l 濃度 100 TCID<sub>50</sub> 之病毒，以微量盤震盪器混合均勻，在 35~37°C 二氧化碳培養箱中反應 2 小時。在中和反應進行中，以胰蛋白酶將細胞打下來，準備 1~2 x 10<sup>5</sup> cells/ml 細胞 10 ml(一個反應盤所需之量)，中和反應完成後，每格加入 100  $\mu$  之細胞，於 35~37 °C 二氧化碳培養箱進行培養，並每日觀察 CPE 約七天。

觀察細胞 CPE 變化之型態來定義其血清型，但是如果加入的病毒超出 32~320 TCID<sub>50</sub>，則須重新進行定量與稀釋，中和試驗亦須重新操作。

### 測定中和抗體效價

血清檢體測定腸病毒之抗體效價可作為鑑定腸病毒感染之間接方法，通常需以急性期與恢復期採集之配對血清，效價達 4 至 8 倍上升時，可視為病毒感染之證據。但腸病毒也有慢性感染之個案，在解讀結果時須謹慎。中和試驗法也常用於血清學之診斷，血清中和抗體之效價常以微量盤進行定量。中和試驗中會使用病毒標準株，但更準確之效價應以適當之臨床分離株進行。

血清檢體以病毒培養基進行 1:4 之稀釋，並以 56°C 去活化 30 分鐘，在微量盤中加入 50  $\mu$ l 病毒培養基於第 1 與 3~10 直行中，取稀釋 1:4 之 50  $\mu$ l 血清加入第 1, 2 與 3 直行中，各濃度以 2 格進行反應，接續以連續稀釋血清。加入 100  $\mu$ l 之病毒培養基於細胞對照組(如下圖)。

		血清 對照	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	細胞 對照	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
試料 1	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 2	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
試料 3	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
力價 測定	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
			10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>						

圖二、微量盤中和抗體測定試驗

取 50  $\mu\text{l}$  濃度 100 TCID<sub>50</sub> 之病毒加入各孔洞中，除細胞對照組與力價測定區。力價測定區在於同時測定病毒之濃度是否達 100 TCID<sub>50</sub> (可接受範圍為 32~320 100 TCID<sub>50</sub>/50  $\mu\text{l}$ )。以微量盤震盪器混合均勻，在 35~37°C 二氧化碳培養箱中反應 2~3 小時。反應期間製備 1~2 x 10<sup>5</sup> cells/ml 細胞，各孔洞中加入 100  $\mu\text{l}$  之細胞，進行培養與觀察 CPE 變化情形，判定抗體之中和效價。判定可參考下表：

	血清希積倍率								中和 抗体価
	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128	1 : 256	1 : 512	
試料 1	+	+	+	+	+	+	+	+	< 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	
試料 2	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	+	+	+	+	+	
試料 3	-	-	-	-	+	+	+	+	32
	-	-	-	-	+	+	+	+	

表一、血清檢體中和效價判定

## 心得與建議

本次奉派赴日本國立感染症研究所研習腸病毒培養檢驗技術進行為期兩週研習獲益良多，感謝長官給予寶貴機會前往研習。職於出差期間學習日方對於腸病毒培養檢驗相關技術，並互相討論鑑定方法及後續應用。此外，因職曾於106年參加日本國立感染症研究所獸醫學部門之狂犬病實驗室室長 Dr. Satoshi 主辦之研習會，本次赴日亦與該室成員進行聯繫，期待台日雙方對於狂犬病相關之交流管道能繼續維持。

日本國立感染症研究所之傳染疾病監測中心除了本次前往研習之病原診斷實驗室外，其他部門類似國內疫情中心，負責統計與監測日本傳染疾病之最新資訊，並每週出版 Infectious Diseases Weekly Report (IDWR)，每月則有 Infectious Agents Surveillance Report (IASR)，適逢六月出版腸病毒引起無菌性腦膜炎之歷年統計資料，因此與 Dr. Fujimoto 共同討論與分享日方與我國近年來腸病毒流行情形。顯示日本對於傳染病監測除了統計資料外，對於實驗室相關研究之重視。希望藉由本次研習所學之技術，得以增進本署腸病毒培養檢驗量能，並符合國際操作規範。

研習期間日方針對新型腺病毒檢驗方法與流行監測情形，協同各縣臨床醫院舉辦研討會，顯示中央單位與臨床研究單位共同分享檢驗與研究之成果，建議本署能增加與各學術單位與學會之交流，並在特殊病原體方面能持續與日方進行密切聯繫。

非常感謝本署長官支持實驗室人員出國研習各種傳染病之檢驗技術，厚植本署檢驗技術之實力，了解各國檢驗技術上之優點，並能補強不足之處，與國際研究技術同步更新。建議將來仍能持續支持實驗室人員至不同國家進行研習與交流，拓展國際人脈。

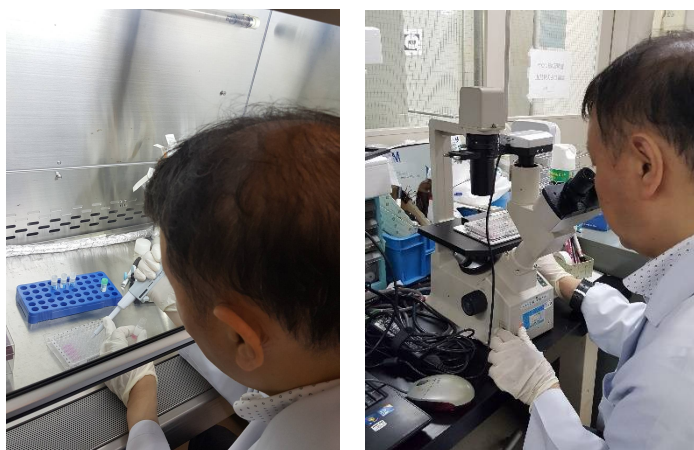
## 附錄



圖一、職與 NIID 傳染病監測中心之第四室成員合照



圖二、研究員 Dr. Hanaoka 操作血清配置過程



圖三、室長 Dr. Fujumoto 操作中和試驗過程