

出國報告（出國類別：研究）

小兒麻痺病毒根除後之監測研習

服務機關：衛生福利部疾病管制署

姓名職稱：李宛育助理研究員

派赴國家/地區：日本/東京

出國期間：民國 107 年 12 月 02 日至 12 月 14 日

報告日期：108 年 1 月 10 日

摘要

小兒麻痺症由小兒麻痺病毒感染所引起，其為一種腸病毒(Enterovirus)，包含三種血清型別，目前全球尚有部份地區仍有小兒麻痺病毒野生株引起之病例，在根除地區亦有疫苗衍生株爆發流行之案例，自 2000 年 10 月 29 日世界衛生組織宣布西太平洋區根除小兒麻痺症後，我國正式進入根除國家的行列，為保全得來不易之根除成果，需要持續精進急性無力肢體麻痺症(AFP)監測。本次赴日本國立感染症研究所學習小兒麻痺病毒相關實驗技術與規範，包含病毒細胞培養與分子生物診斷，期望能將所學應用於傳染病防治業務，強化本署實驗室對於小兒麻痺病毒監測之檢驗技術。

目次

目的	4
研習過程	5
心得與建議	12

目的

世界衛生組織(World Health Organization, WHO)於 1988 年開始積極投入推動全球小兒麻痺根除計畫 (Global Polio Eradication Initiative, GPEI)，根據 WHO 所訂的標準，小兒麻痺症根除地區是指在該區內最後 1 名小兒麻痺症確定病例發現後，3 年內無野生株小兒麻痺病毒(Wild Poliovirus, WPV)引起的小兒麻痺病例發生，且環境中亦證實沒有野生株病毒的存在。小兒麻痺症病例數從 1988 年的 35 萬例，下降到 2017 年的 22 例，美洲區域、西太平洋區域、歐洲區域分別於 1994 年、2000 年、2002 年宣佈根除，並於 2015 年 9 月宣布全球根除第二型小兒麻痺病毒。在 2018 年初，全球僅剩 3 個流行國家，分別為奈及利亞、巴基斯坦及阿富汗。

為了有效評估各地區是否仍有小兒麻痺症病例，特別擴大疫病監視範圍，WHO 建議以「急性無力肢體麻痺」(Acute Flaccid Paralysis, AFP)監視系統來監測小兒麻痺症。臺灣自 1966 年實施小兒麻痺疫苗預防接種計畫後病例顯著下降，惟 1982 年曾爆發全島大流行，依病毒檢驗報告資料，1984 年以後即未再分離出野生株之小兒麻痺病毒，並於 1994 年將「急性無力肢體麻痺」納入傳染病通報項目，做為小兒麻痺症監視指標，並持續至今。自 2000 年 10 月 29 日世界衛生組織宣布西太平洋區根除小兒麻痺症後，我國正式進入根除行列，於根除小兒麻痺症的艱辛過程中，AFP 疫情監視系統發揮了極大效能。雖然我國目前已經達成根除目標，但由於全球尚有部份地區仍有野生株引起之病例，應嚴防境外移入；另外在根除地區亦有疫苗衍生株(Vaccine-derived Poliovirus, VDPV)爆發流行之案例。為保全得來不易之根除成果，AFP 疫情監視系統仍有繼續執行之必要性(引用疾病管制署傳染病防治工作手冊資料)。

本次赴日研習的主要目的即為學習 WHO 規範之小兒麻痺病毒標準化實驗室診斷技術，應用於本署傳染病防治檢驗業務；同時亦期望增進與日本 NIID 的聯繫、互動，俾利台日雙方對於小兒麻痺病毒、腸病毒等相關資訊之分享與交流。

研習過程

一、 行程

此次奉派赴日本研習地點為國立感染症研究所(National Institute of Infectious Diseases, Japan)病毒第二部(Department of Virology II)第二室(Laboratory of enteroviruses)，位於東京都武藏村山市 NIID 之村山廳舍，相關行程如下：

日期	地點	內容
107/12/2	台北→東京	路程
107/12/3-12/11	東京	小兒麻痺病毒檢驗研習
107/12/12	東京	NIID 戶山廳舍拜會與參訪
107/12/13-14	東京	小兒麻痺病毒檢驗研習、綜合討論

二、 研習內容

本次研習由第二室室長 Dr. Hiroyuki Shimizu(清水博之)主導規劃並親自授課與指導，另由主任研究官 Yorihiro Nishimura(西村順裕)、Hiromu Yoshida(吉田弘)、Minetaro Arita(有田峯太郎)協助指導部份課程。主要內容為學習 WHO 規範之小兒麻痺病毒標準實驗室檢驗流程，分為病毒細胞培養與分子生物診斷兩部份，包含介紹、示範或實作；另輔以相關授課課程，如小兒麻痺簡介、環境監測、疫苗接種、日本腸病毒流行情形等議題。

(一) 病毒分離與細胞培養

細胞培養

世界衛生組織建議同時使用 L20B 與 RD 細胞來分離小兒麻痺病毒，本次學習實際操作兩種細胞株的細胞繼代、細胞計數與生長培養基的配置。

細胞敏感性試驗

細胞敏感性試驗為病原體分離過程中重要品質監控指標之一，WHO 建議於每 15 次繼代中途使用標準品管病毒株(NIBSC Reference Sabin1&3

strains)測試，用以確保細胞株保持檢測低效價小兒麻痺病毒之效能。操作步驟(如下圖所示)為進行品管病毒之序列稀釋，於 96well 加入適當的病毒及待測細胞株之細胞懸浮液($1-2 \times 10^5$ cells/ml)後，放入 36°C 二氧化碳培養箱連續觀察 5-7 天 CPE 並計算效價，所得效價應落於實驗室建立之趨勢圖表參考範圍內，若細胞敏感度降低或遭黴漿菌污染，可請 WHO 協助提供新細胞等事宜，以解決小兒麻痺病毒株未能正確偵測之問題。

Figure 1

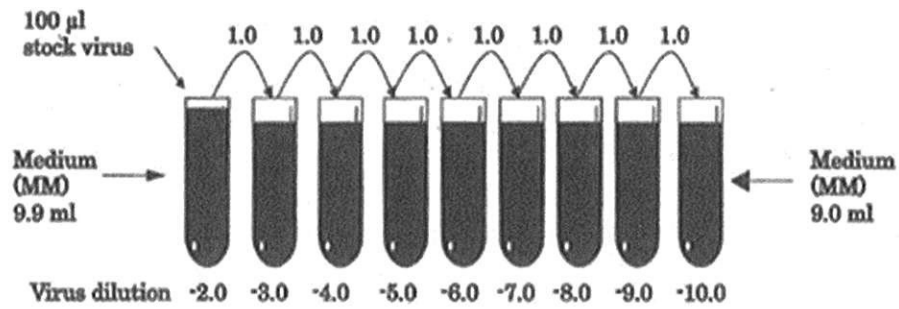
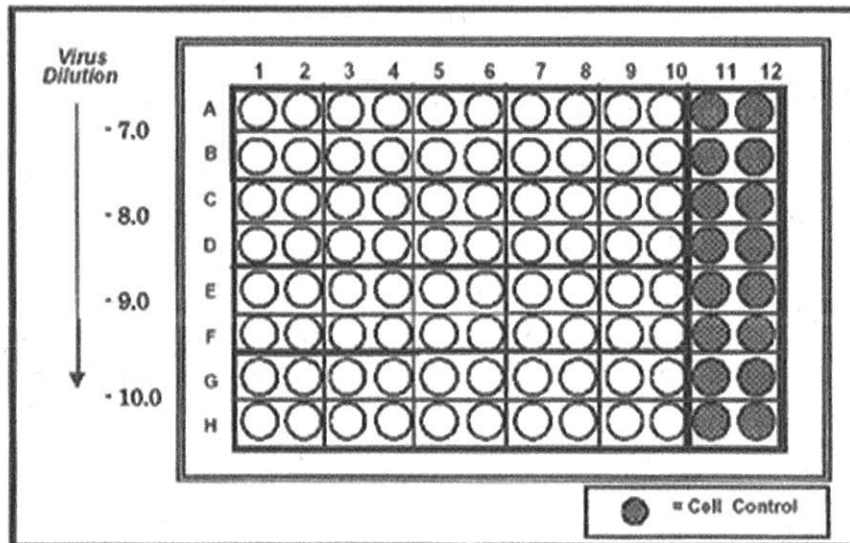
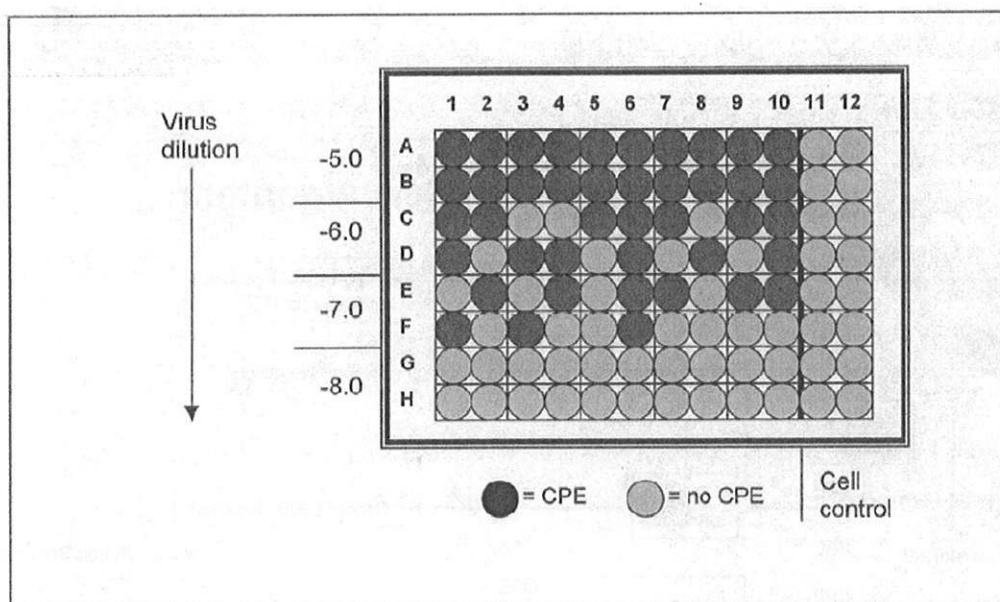


Figure 2



100µl virus diluent/well + 100µl cell suspension



5.4 Calculation of the virus titre by the Kärber formula

$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0.5)$, where:

L = log of lowest dilution used in the test

d = difference between log dilution steps

S = sum of proportion of "positive" tests (i.e. cultures showing CPE)

In this example:

$$L = -5.0; d = 1.0; S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.10$$

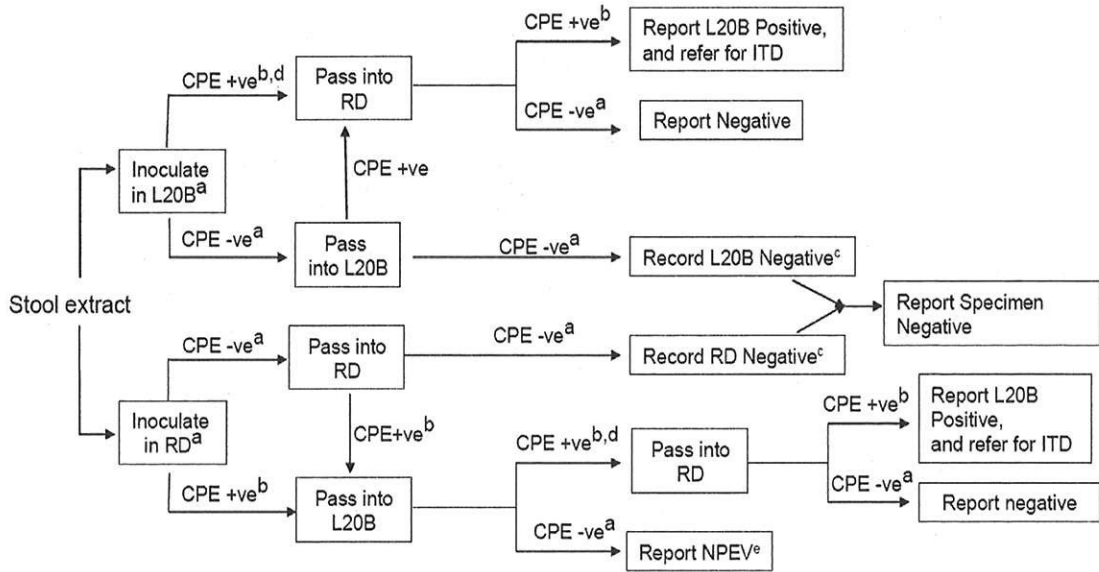
$$\log \text{CCID}_{50} = -6.60; \text{Virus titre} = 10^{6.60} \text{CCID}_{50} / 0.1 \text{ ml}$$

檢體前處理、接種與 CPE 觀察

1. 小兒麻痺病毒分離主要檢體來源為糞便，目前 NIID 小兒麻痺病毒參考實驗室負責檢測來自柬埔寨與寮國之糞便檢體，前處理步驟為取 2 克左右糞便檢體置於 50ml 離心管中，加入 9ml 含鈣離子與抗生素之 PBS 緩衝液與 1ml 三氯甲烷，垂直振盪 10 分鐘後，以 3000rpm 離心 20 分鐘後，取上清液至保存管，用於後續接種。
2. 以 24 孔盤或病毒管進行細胞培養，每一個檢體進行兩重覆，使用 24 孔盤時需特別避免檢體間交叉汙染。
3. 接種 200 μ l 處理過之上清液至細胞後放置於 36°C 二氧化碳培養箱中，觀

察 5 天，若無 CPE 產生時，將細胞冷凍-解凍後，繼代至新的細胞，再觀察 5 天，相關流程如下圖。

Poliovirus Isolation New Algorithm



- a Observed for a minimum of 5 days
- b Observe until $\geq 3+$ CPE obtained (usually 1-2 days, 5 days maximum; re-inoculate when toxicity or contamination observed)
- c Total minimum observation time of 10 days (2 x 5 days)
- d Pool positive tubes (if both tubes show $> 3+$ CPE on the same day) before final RD passage
- e Isolates can be serotyped by laboratories with an interest in NPEV diagnosis or to confirm proficiency

(二) 分生檢測

型內鑑定(Intratypic differentiation, ITD)

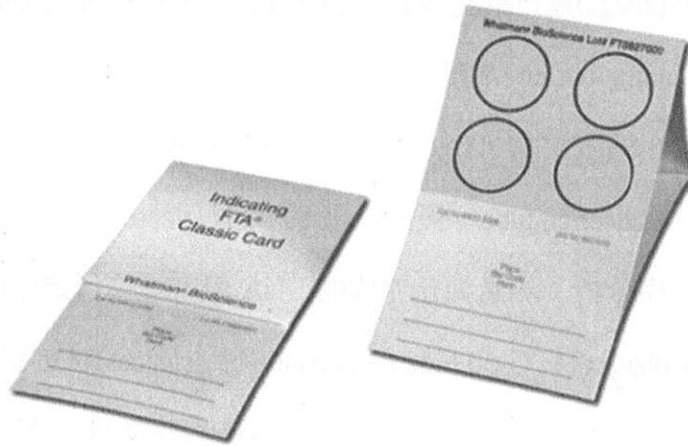
NIID 目前採用 USA CDC 發展、提供之即時聚合酶鏈鎖反應 (rRT-PCR ITD & rRT-PCR VDPV) 分型方法，檢體接種培養後 L20B 細胞呈 CPE 陽性者，需進行進一步 ITD 分型。檢驗試劑包含了各種組合的引子、探針，用來偵測 PanEV、PanPV、WPV1、WPV3 I&II、PV2、Sabin1/2/3，判讀結果若為野生株需接續定序，若為 Sabin-like strain 則接續 VDPV assay。

使用即時聚合酶鏈鎖反應法取代傳統聚合酶鏈鎖反應法可加快檢測速率、改善野生型病毒株及 VDPV 之篩檢。

VP1 RT-PCR 與定序

利用專一性引子增幅小兒麻痺病毒 VP1 區域，並進行定序與序列分析，依據 VP1 變異度確認為野生株、疫苗株或疫苗衍生株，此次觀摩步驟包括 FTA card 病毒核酸萃取、聚合酶連鎖反應(RT-PCR)、PCR 產物純化與定量及定序分析。

1. FTA 濾片(如下圖)為 Whatman 公司專利產品，可應用於保存核酸利於運送，並具有防止核酸酶、UV、氧化及抑制細菌等微生物生長作用，具有符合生安規範、降低運費等優點。



2. RT-PCR：使用 QIAGEN One Step RT-PCR Kit，試劑配製及反應條件如下圖。

Master mix

RNase-free water	13.9 μ l
X5 QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5 μ l
dNTP mix (10 mM)	1 μ l
F primer (10 μ M)	1.5 μ l
R primer (10 μ M)	1.5 μ l
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 μ l
<u>RNase Inhibitor</u>	<u>0.125 μl</u>
Total	24 μl
RNA	1 μ l
<u>Master mix</u>	<u>24 μl</u>
Total	25 μl

RT-PCR condition (Do not use Ramp. The following in a normal cycler is best.

2017.11.2)

RT reaction	x35				
50°C	30 min	94°C	30 sec	72°C	5 min
95°C	15 min	45°C	30 sec		
		72°C	1 min		

3. PCR 產物純化：先使用 2% agarose gel 進行膠體電泳，確認產物後進行 PCR 產物純化。使用 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 進行純化步驟，首先混合 50 μ l PCR 產物及 50 μ l Membrane Binding buffer，將混和液放入 minicolumn 內，接著離心 15000rpm 1 分鐘，接續兩次 700 μ l 及 500 μ l Wash buffer 清洗與離心步驟，更換新的 collection tube，最後使用 50 μ l Nuclease-free water 完成產物純化。
4. 定序分析：測量純化完成的 DNA 濃度並進行定序前置 PCR，再使用 Sephadex™ G-50 Fine (Amersham biosciences) 試劑組純化樣本，最後上機進行序列訊號之讀取，以下為定序前置 PCR 配製方式及反應條件：

Big Dye	2 μ l
X5 buffer	1 μ l
DW	1 μ l
Total	4 μ l

DNA dilution (Prepare 700 ng/ 50 μ l. Use 5 μ l (70 ng DNA))

DW (up to 50 μ l)	μ l
DNA (700 ng)	μ l

Mix

Primer (3.2 μ M)	1 μ l
Diluted DNA	5 μ l
Big Dye mix	4 μ l

Use right ABI9700 (User: polio, Program: polio pt seq)

x25

94°C 20 sec

42°C 15 sec

RAMP 0.4°C/sec

60°C 4 min

5. 序列分析：所得序列以 Sequencher 軟體進行編輯與組合(檢查定序訊號品質、去掉 3' 及 5' 端訊號雜亂的序列、針對兩端序列不一致的訊號判讀後選擇可信訊號、組合成一致性序列等)，與各型別參考序列進行排列比對(alignment)，進而計算彼此之間序列核苷酸差異，參考下表進行研判。

Sequence Reporting

- The trimmed VP1 sequence is then reported using the following criteria:
 - Sequences classified as serotype 1 but having less than 85% identity (~136nt diff) with Sabin1 are designated as **PV1 wild***.
 - Sequences classified as serotype 1 and ≤ 9 nucleotide differences from Sabin1 are designated as **PV1 Sabin**.
 - Sequences classified as serotype 1 and ≥ 10 nucleotide differences from Sabin1 are designated as **PV1 VDPV**.
 - Sequences classified as serotype 2 and ≤ 5 nucleotide differences from Sabin2 are designated as **PV2 Sabin**.
 - Sequences classified as serotype 2 and ≥ 6 nucleotide differences** from Sabin1 are designated as **PV2 VDPV*****.
 - Sequences classified as serotype 3 but having less than 85% identity (~136nt diff) with Sabin3 are designated as **PV3 wild***.
 - Sequences classified as serotype 3 and ≤ 9 nucleotide differences from Sabin3 are designated as **PV3 Sabin**.
 - Sequences classified as serotype 3 and ≥ 10 nucleotide differences from Sabin3 are designated as **PV3 VDPV**.
- All chromatograms and consensus sequences should be archived and catalogued in a manner to facilitate easy retrieval of raw sequence data and analysis of completed consensus data.

**Exceptions to this rule may occur, including the possibility of a VDPV that has replicated for more than 10-15 years. Additional analyses can be performed to determine if a sequence has a distant Sabin link.*

*** Determined at the Annual GPLN September 2010 Meeting for PV2 VDPV definition*

**** Please note that PV2 wild virus is not listed because no indigenous PV2 wild virus has circulated since 1999. It is important to remember that a wild PV2 virus might be detected if cross-contamination by type 2 reference strains has occurred.*

心得與建議

本次奉派赴日本國立感染症研究所研習小兒麻痺病毒監測檢驗技術，著實獲益良多，感謝機關給予機會前往學習，亦非常感謝 NIID 病毒第二部第二室室長及研究人員，即使自身公務繁重仍熱情協助提供相當豐富、多元的見習課程。此次研習單位本身屬於 WHO 全球小兒麻痺症實驗室網絡中的特別實驗室 (Global specialized Lab)，頻繁參與各種相關國際性會議且能夠即時接受最新的檢驗指引與規範，藉由向日本此領域專家請益，將有助於本署瞭解國際操作規範、增進 AFP 監測效能。

NIID 對於前來研習的外來訪客，如要操作相關病原體實驗，均會先行安排生物安全課程，由生安部門人員詳細介紹 NIID 生物安全規範，包含操作病原體的注意事項、病原體等級、發生生安事件的通報/管理流程等，並會進一步瞭解研修者相關實驗室經驗及個人防護知識，另外此次研習的實驗室本身即經常性的負責 WHO 小兒麻痺檢驗相關教育訓練，因此人員均具有相當的指導經驗並備有相關的教學文件，值得學習。

整個研習行程除了學習相關檢驗技術外，雙方也有許多就檢驗方法的異同、腸病毒流行情形與環境監測及小兒麻痺疫苗接種演變等議題進行交流與討論的機會，除了一對一的對談，清水室長表示 NIID 與本署近來有許多互動、往來，他本身來台數次亦參訪過本署對於本署有一定的認識，其他研究人員可能較不熟悉，因此也請職於其實驗室的內部會議進行簡報，介紹本署組織與業務內容及小兒麻痺/AFP 監測相關工作，報告中職播放了本署官網的英文版簡介影片，獲得許多認同。

相關建議如下：

1. WHO 為縮短病毒細胞培養天數為 14 天內，變更為每觀察 5 天繼代一次，本署目前為利於作業時程安排維持每 7 天繼代一次，但整體檢驗報告時限亦為 14 個工作天，且部份腸病毒培養需較長時間的觀察，WHO 規範主要

係針對 poliovirus，現階段本國小兒麻痺症已根除，此部份應可維持現行作法；另有關 rRT-PCR ITD 分型方法相關試劑我們不像 NIID 能獲得 WHO 持續性的提供，目前主要仍採用 IFA 與 VP1 定序來分型，不過 rRT-PCR ITD 相關檢驗技術已初步建置，建議持續關注 WHO 小兒麻痺病毒檢驗技術新的發展與規範。

2. 雖然我國小兒麻痺症已根除，惟為防止境外移入，仍建議持續 AFP 與環境監測，後續參考 WHO 對於若全球根除目標達成後是否有新的策略規劃。
3. 持續的技術交流有助於提升同仁的國際觀，厚植本署實驗室檢驗能力，建議將來仍能持續支持實驗室人員至各國進行研習，除獲取新知外亦能建立彼此互動管道。