

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-112502

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：腸病毒分生檢驗方法標準化與套組化

年度/全程研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊志元

研究人員：林建文

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意\*

## 目錄

計畫中文摘要 .....	3
計畫英文摘要 .....	4
計畫內容	
一、前言： .....	5
二、材料與方法： .....	8
三、結果： .....	12
四、討論與建議： .....	15
五、參考文獻： .....	16
六、圖表： .....	17

## 計畫中文摘要

依據世界衛生組織 (WHO) 與美國疾病管制署 (CDC)「2015 年腸病毒監測指引(Enterovirus Surveillance Guidelines) <sup>1</sup>」，腸病毒分型分生檢測 (EV CODEHOP RT-snPCR，以下簡稱 EV RT-snPCR) 為目前國際建議檢驗方法之一。此法本署已實行多年，對於腸病毒檢驗具優良靈敏性，且可彌補病毒培養判定天數較長之缺點。本署於 2007 年及 2016 年教育及推廣 EV RT-snPCR 檢驗方法，但由於檢驗流程繁瑣耗時、試劑成本及定序費用昂貴等因素，各醫療院所考量人力與經費未使用於例行性檢驗中，並表示希望本署能提供經費、試劑補助或協助定序。為降低各認可及合約實驗室採行之困難，本計畫設計 EV RT-snPCR 標準化流程，請合格廠商分填及包裝檢驗試劑套組，提供給有意願的認可或合約實驗室，協助縮短腸病毒的檢測時間，提高陽性檢出率，以即時監測腸病毒的流行趨勢。

另為因應緊急疫情，本署 2018 年測試 Pan-enterovirus real-time RT-PCR 檢驗效能，結果專一性佳，臨床陽性檢體檢出率 >90%，稍略遜於 EV RT-snPCR，其優點為反應時間短，不需進行電泳分析及核酸定序，可做為臨床快速診斷腸病毒參考。因此將針對 Pan-enterovirus real-time RT-PCR 檢驗試劑標準化及套裝化，以協助臨床快速診斷腸病毒感染，把握醫療處置黃金時間。

關鍵詞：腸病毒、腸病毒分型分生檢測、腸病毒即時反轉錄聚合酶連鎖反應

## 計畫英文摘要

According to the "Enterovirus Surveillance Guidelines 1" from the World Health Organization (WHO) and the United States Department of Disease Control (CDC), the EV CODEHOP RT-snPCR (hereinafter referred to as EV RT-snPCR) is one of the international recommendations enterovirus molecular diagnosis methods. This method has been implemented for many years and has excellent sensitivity to detect enterovirus. The TCDC has educated and promoted the EV RT-snPCR test method in 2007 and 2016. However, due to the complicated test process, expensive costs of reagents and sequencing, the medical institutions have no intention to use the test. Many expressed the hope that the TCDC can provide funding, reagent subsidies or assist in sequencing. In order to reduce the difficulty of adopting various accredited and contract laboratories, the project will design the EV RT-snPCR standardization process and development reagent kits. We hope to shorten the detection time of enterovirus and increase the positive detection rate to monitor the epidemic of enterovirus.

In response to the emergency epidemic, we tested the efficacy of Pan-enterovirus real-time RT-PCR in 2018. The specificity is good and the positive detection rate of clinically positive samples was >90%, slightly lower than EV RT-snPCR. The advantage of the method is short reaction time, no need for electrophoresis analysis and nucleic acid sequencing. It can be used as a clinical rapid diagnosis of enterovirus. Therefore, we will development reagent kit of the Pan-enterovirus real-time RT-PCR test to assist in the rapid diagnosis of enterovirus infection.

keywords : enterovirus 、 EV RT-snPCR 、 Pan-enterovirus real-time RT-PCR

## 本文

### 一、前言：

腸病毒屬於微小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、腸病毒屬(Enterovirus)之病毒，為一群病毒的總稱，其直徑大小約 20–30 nm，不具外套膜(nonenveloped)，呈現立體對稱的正二十面體結構。早期的腸病毒分類依抗原性可分為小兒麻痺病毒(Polioviruses；PV)、克沙奇 A(Coxsackieviruses A；CV-A)、克沙奇 B(Coxsackieviruses B；CV-B)、伊科病毒(Echoviruses；E)以及 Enterovirus 68-71 等約 60 多種血清型。近年依分子生物學之特性，而將腸病毒屬(genus)重新歸類為 Enterovirus A~J 及 Rhinovirus A~C 共 13 個種(species)<sup>2</sup>。其中 EV-A 包含 11 型克沙奇 A 及 EV-A71 等 25 個基因型；EV-B 包含所有克沙奇 B、所有的 Echovirus、EV69 及 CA9 等 63 個基因型；EV-C 包含其他 9 型克沙奇 A、小兒麻痺病毒 1、2 及 3 型等 23 個基因型；EV-D 包含 EV68 及 EV70 等 5 種基因型；EV-E 及 F 在牛發現；EV-G 在豬；EV-H 及 J 在猿猴；EV-I 在駱駝發現。E22 及 E23 歸類為一新的 genus Parechovirus 的兩個血清型。腸病毒基因體為單股正向 RNA，大小約 7.5Kb，包括 5' -UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 及 3' -UTR，其中 5' -UTR 及 VP2 基因為高度保留區，常作為 RT-PCR 臨床診斷腸病毒標的位置，但與血清型別均無關聯性，VP1 為表面結構蛋白，包含了中和抗體之抗原決定位，其基因序列與血清型有密切關聯，另有研究顯示 VP4 基因亦與血清型有密切關係。腸病毒的感染遍及全世界，主要是經由飛沫、糞口及接觸等途徑感染，腸病毒可以引發多種疾病，雖然大部份的感染為無症狀，或只出現類似一般感冒的輕微症狀，其餘常見的症狀如呼吸道症狀、手足口病、無菌性腦膜炎、腦膜腦炎、急性無力肢體麻痺症、出血性結膜炎、心肌炎及新生兒敗血症等。

傳統的病毒分離及血清型別鑑定，是仰賴 golden standard 中和試驗，但腸病毒的種類繁多，中和試驗費時費力且往往受限於 antiserum pools，無法偵測抗原性變異及新的病毒株，造成臨床上無法正確分型。目前台灣腸病毒的社區

監測是採用以細胞進行病毒分離的方式，當細胞株出現細胞病變時，再以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)鑑定出其血清型別，鑑定時間依病毒量多寡，由 3 天至 14 天不等。目前市面上的商用單株抗體檢驗套組可鑑定出 19 種腸病毒血清型，而無法鑑定出之型別的腸病毒則稱為泛腸病毒(Pan-Enterovirus)。病原體分離鑑定之方法優點為費用較低，且分離之病毒後續可建立病毒種庫及基因資料庫，然而缺點為平均陽性率約為 50%及檢驗耗時可能無法即時偵測流行之發生。

依據世界衛生組織(WHO)與美國疾病管制署(CDC)「2015 年腸病毒監測指引(Enterovirus Surveillance Guidelines)<sup>1</sup>」，腸病毒分型分生檢測(EV CODEHOP RT-snPCR，以下簡稱 EV RT-snPCR)為目前國際建議檢驗方法之一。此法本署已實行多年，對於腸病毒檢驗具優良靈敏性<sup>3</sup>，且可彌補病毒培養判定天數較長之缺點。依據本署疫情資料倉儲 BO 資料庫，統計自 2013 年 1 月至 2017 年 6 月共 712 件疑似腸病毒感染併發重症檢體檢驗結果，以病原體分離鑑定或 EV RT-snPCR 任一陽性即為陽性病例(288 例)為標準時，病原體分離鑑定與 EV RT-snPCR 之敏感性分別為 43.8%及 95.1%，在 EV RT-snPCR 未檢出之 14 件檢體中僅 6 件檢體為腸病毒，其他病毒培養結果為 Adenovirus、HSV、Influenza A、Para influenza 及待定型病毒。EV RT-snPCR 敏感性高，最快可於 3 天內得知結果，定序之腸病毒 VP1 部份核酸序列可進一步作為腸病毒分型演化分析用，2012 年亦有北部醫學中心發表 EV RT-snPCR 對原始檢體陽性檢出率高達 96%<sup>4</sup>，更適合作為臨床標準檢驗方法。

為推行 EV RT-snPCR，本署於 2007 年 9 月進行「CODEHOP RT-snPCR 與 Cell Culture 同步測試計畫」<sup>5</sup>，參與對象包括全省 13 家病毒性合約實驗室，研究全面以 EV RT-snPCR 方法監測腸病毒流行型別趨勢之適用性，期縮短腸病毒的檢測時間、即時監測建立腸病毒的流行趨勢，俾針對腸病毒流行之型別提早預警。另 2016 年為因應腸病毒疫情爆發之準備，提升第一線人員之檢驗量能，舉辦三

梯次教育訓練，共 20 家腸病毒責任醫院參訓，課程包括檢驗原理、操作說明及實習操作，並給予核酸引子及測試檢體，以協助各醫院建立 EV RT-snPCR 檢驗系統。許多參訓醫院表示雖有意願採用 EV RT-snPCR，宥於實驗流程繁複且檢驗試劑昂貴及定序成本太高、人力不足等困難，未使用於例行性檢驗中。本署於 2018 年 3 月修改認可機構作業要點新增 EV RT-snPCR 認可檢驗項目，但至今尚無醫院申請認可。為降低各認可及合約實驗室採行 EV RT-snPCR 檢驗之困難，本署計畫將 EV RT-snPCR 檢驗試劑套裝化，提供給有意願的認可或合約實驗室，協助縮短腸病毒的檢測時間，提高陽性檢出率，以即時監測腸病毒的流行趨勢。

另本署 2018 年依據 Nijhuis M 等人文獻<sup>6</sup>設計之引子及探針，並參考 Washington University School of Medicin 文獻<sup>7</sup>使用之檢驗試劑，測試 Pan-enterovirus real-time RT-PCR 檢驗效能。測試結果專一性佳，只對 rhinoviruses 有交叉反應，臨床陽性檢體檢出率>90%，稍略遜於 EV RT-snPCR，但其優點為反應時間短，不需進行電泳分析及核酸定序，更可避免 nest PCR 容易汙染之風險，可做為臨床快速診斷參考。因此將於計畫第 2 年進行 Pan-enterovirus real-time RT-PCR 檢驗試劑標準化及套裝化，以協助臨床快速診斷腸病毒感染，把握醫療處置黃金時間。

## 二、材料與方法

### 108 年度實施方法

#### (一) 建立品管病毒株及 plasmid DNA：

- (1) 使用臨床分離 EV-A71、EV-D68 及 Echo 11 等病毒株，測定其 CCID<sub>50</sub>，作為品管病毒株，並以 10 倍連續稀釋病毒液後再萃取 RNA。
- (2) 以含有 Human poliovirus 3 strain Sabin 3 之 VP1 及 5' UTR 片段 plasmid，10 倍連續稀釋成 10<sup>10</sup>~10<sup>0</sup> copies/ ul，作為品管 plasmid DNA。

#### (二) 設計並測試 EV RT-snPCR 檢驗試劑套裝化條件。

#### (三) 請合格廠商進行試劑分填、品管測試及包裝設計。

#### (四) 套裝化試劑效果評估，包括品管檢體測試、臨床檢體測試、定序效果測試及試劑穩定性測試。

#### (五) 實驗步驟：

##### **A、RD細胞株繼代培養**

1. 由液態氮桶中取欲 recover 之 RD 細胞株一管。
2. 迅速置於 37°C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處。
3. 緩慢滴入 10ml 10% DMEM 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm<sup>2</sup> 培養瓶中，置入 36°C 二氧化碳培養箱。
4. 隔夜後觀察細胞生長狀況並吸取上清液。
5. 再放入 10ml 10% DMEM 未含抗生素生長培養基。
6. 觀察細胞生長狀況做為繼代使用。
7. 吸取上清液。
8. 放入適量 0.25% trypsin-EDTA。
9. 吸取 trypsin-EDTA。
10. 取適量 10% DMEM 培養基沖散細胞。
11. 計算細胞數目。
12. 稀釋每 1CC 含有 1X10<sup>5</sup> 細胞，做為繼代培養之用。
13. 細胞繼代代數約為 15 代，重新由細胞庫取出繼代使用。



## B、Viral Titration and Determination of TCID50

1. 把欲被測定的腸病毒病毒株增殖於 25cm<sup>2</sup> 的培養瓶。
2. 當呈現+++~++++細胞病變時(CPE)，則置於-70°C及 37°C冷凍、解凍二次。
3. 4°C，2100g 離心 15 分鐘。
4. 將上清液分裝於 Cryotube 中(0.5ml/管)，放置於 -70°C冰箱中並記錄之。
5. 取 8 支 4ml 容量塑膠管依序標示 1,2~8 各加 1.8ml 之細胞維持培養基。
6. 取已增量之病毒株上清液 0.2ml 加入第 1 管混合後取 0.2ml 至第 2 管，依次稀釋至第 8 管。病毒稀釋液由 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-8</sup> 每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50μl 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100μl 細胞維持培養基。
7. 置入 36°C二氧化碳培養箱繼續培養。
8. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變。
9. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (TCID50)。

## C、病毒RNA萃取(採用QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat.No. 52906))

1. 取 560 μl AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內。
2. 加入 140 μl 檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘。
3. 加入 560 μl 100%絕對酒精，震盪 15 秒。
4. 將混合之溶液吸至 QIAamp Spin Column，離心 8000rpm 1 分鐘。
5. 加入 500 μl Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘。
6. 加入 500 μl Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘。
7. 加入 60 μl Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體。

## D、EV RT-snPCR

### a. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)

1. 取 5 μl RNA 做模板，分別加入反轉錄試劑及其他反應溶液 (成分如下表)，調整反應總體積至 10 μl。

反應試劑	加入體積	RT 反應最終濃度
5x First-Strand RT Buffer	2 μl	1x
20mM dNTP Mix	0.5 μl	1 mM of each dNTP

100μM AN32 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100μM AN33 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100μM AN34 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100μM AN35 – primer	0.05 μl	0.5 μM
0.1M DTT	1 μl	0.01 M
RNaseOUT	0.5 μl	20 units
SuperScript™ III RT(200U/μl)	0.5 μl	100 units
RNase-free water	0.3 μl	-

2. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)：使用 PCR thermal cycler。

- (1) annealing：22 °C，10 分鐘。
- (2) R.T.作用：45 °C，60 分鐘。
- (3) HotStop：95 °C，5 分鐘。
- (4) 最後維持在 4 °C，保存 cDNA。

#### b. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

1. 取 2 μl cDNA 做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 10 μl。

反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	1 μl	1x
2.5 mM dNTP Mix	1 μl	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	0.5 μl	2.5 mM
0.1 M DTT	0.1 μl	0.001 M
224 –Forward primer(10 μM)	0.8 μl	0.8 μM
222 –Reverse primer(10 μM)	0.8 μl	0.8 μM
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 μl	0.5 units
RNase-free water	3.7 μl	-

2. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)：使用 PCR thermal cycler。

- (1) denature：95 °C，30 秒。
- (2) annealing：42 °C，30 秒。
- (3) extension：60 °C，45 秒。
- (4) 重複上述 1~3 步驟 40 cycles。
- (5) 最後維持在 4 °C。

#### c. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)

1. 取 1  $\mu\text{l}$  聚合酶鏈鎖反應(PCR)產物做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 25  $\mu\text{l}$ 。

反應試劑	加入體積	nest-PCR 反應最終濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	2.5 $\mu\text{l}$	1x
2.5 mM dNTP Mix	2.5 $\mu\text{l}$	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	1.25 $\mu\text{l}$	2.5 mM
0.1 M DTT	0.25 $\mu\text{l}$	0.001M
AN89 –Forward primer(10 $\mu\text{M}$ )	2.0 $\mu\text{l}$	0.8 $\mu\text{M}$
AN88 –Reverse primer(10 $\mu\text{M}$ )	2.0 $\mu\text{l}$	0.8 $\mu\text{M}$
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 $\mu\text{l}$	0.5 units
RNase-free water	13.4 $\mu\text{l}$	-

2. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)：使用 PCR thermal cycler。
- (1) HotStart：95  $^{\circ}\text{C}$ ，6 分鐘。
  - (2) denature：95  $^{\circ}\text{C}$ ，30 秒。
  - (3) annealing：60  $^{\circ}\text{C}$ ，20 秒。
  - (4) extension：72  $^{\circ}\text{C}$ ，45 秒。
  - (5) 重複上述 2~4 步驟 40 cycles。
  - (6) 最後維持在 4  $^{\circ}\text{C}$ 。

#### d. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position
AN32	GTYTGCCA	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	3009-3002
AN34	CCRTCRTA	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	3009-3002
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	1977-1996
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	2969-2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	2977-2951

### 三、結果

在腸病毒分生技術診斷中，通常是選定其序列最保守的區域 5' 端(5' UTR)，進行 PCR 的設計，可以偵測到各血清型腸病毒，相較於傳統病原體的分離鑑定方法不僅效率高且敏感度佳，已經有許多的論文都利用分子生物學的方法於腸病毒的臨床檢體診斷，但是，這種方法往往只能提供我們知道病原體是否為腸病毒，無法判定是腸病毒的何種血清型別。腸病毒基因序列的 VP1 區域不同血清型別間有所差異，故可以作血清型的判別，利用 RT-PCR 所得到的產物，經過定序便可加以分型，目前針對 VP1 所設計的 primer 也有不錯的敏感度。然而，這些檢驗方法似乎並沒有辦法涵蓋所有的腸病毒型別，皆是針對某一血清型別，如 EV-A71，所以有實驗室嘗試用 degenerate primers 來設計，但敏感度和專一性都不夠理想，且容易出現非特異性的產物而影響定序。

而 COnsensus DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers (CODEHOP) PCR primer 設計，可以補足這些缺失。其 primer 主要針對目標物的家族蛋白質胺基酸序列高度相似性的位置而設計出 primer pool，每一條 primer 包含了兩個部分，3' 端序列較短，稱 3' degenerate core，由 3 至 4 個保守胺基酸序列組成，含有各種不同核苷酸序列組合。5'端稱作 5'consensus clamp，由該區最高度保守胺基酸序列所組成，核苷酸序列較長且固定。CODEHOP 因為其 3' core 的長度較一般 degenerate primer 短，相對的 primer pool 裡面單一種 primer 的濃度較高，如此便可以避免 PCR 反應初期單一 primer 很快被耗盡，提高了 PCR 產量和敏感性。在 PCR 反應初期，3' degenerate core 藉著保守的 5' clamp 和目標序列穩定配對，因此可以用較高的 annealing 溫度，增加專一性。而 PCR 產物初步產生後，所有 primers 都可以利用相同的 5'consensus clamp 與目標序列進行配對，PCR 的產能便提升，經定序後即可得知為何種腸病毒。此 primer 是利用保守胺基酸序列設計，所以也能偵測到差異性較大的相關序列，亦有可能找到同一家族未知新成員。

目前 EV RT-snPCR (即為 CODEHOP)此一腸病毒分型分生檢驗方法，已經被 WHO 採納列為腸病毒監測指引的分生檢驗方法，本署實驗室從 2007 年起即派員前往美國 CDC 研習並導入於例行性的腸病毒檢驗中，並對本署病毒合約實驗室與有意願之醫學中心病毒檢驗室辦理教育訓練，然因經費成本加上操作人員異動問題，僅有部分醫學中心，不計成本採行 EV RT-snPCR。為加速腸病毒檢驗時效，即時反應出流行趨勢與疫情，以利防疫作為之佈署整備與調整，本計畫將此一 EV RT-snPCR 所需使用之各個成分組成，原來 RT 反應需要 12 管 (含 Enzyme, primers, buffer, H<sub>2</sub>O...)、PCR1 反應需要 9 管、nested PCR (PCR2) 反應也要 9 管，盡量精簡讓使用者方便操作，同時還確保其穩定度與效能。

#### 1. 品管病毒株及 plasmid DNA 製備

- (1) 使用以含有 Human poliovirus 3 strain Sabin 3 之 VP1 片段 plasmid，10 倍連續稀釋成  $10^6 \sim 10^{-1}$  copies/ ul，作為絕對定量標準品(圖一)。
- (2) 使用 2015 年臨床分離 EV-A71 C4a 亞型之病毒株，其 CCID<sub>50</sub> 為  $10^{-7.5}$ ；2017 年臨床分離 EV-D68 B3 亞型之病毒株，其 CCID<sub>50</sub> 為  $10^{-6.8}$ ；2018 年臨床分離 Echo 11 之病毒株，其 CCID<sub>50</sub> 為  $10^{-7.4}$ 。該三株病毒株分別以 10 倍連續稀釋病毒液  $10^{-1} \sim 10^{-9}$  後，再萃取 RNA，作為相對定量標準品。

#### 2. Sabin 3 VP1 plasmid 及各病毒株之 EV RT-snPCR 檢驗結果

- (1) 偵測極限：Sabin 3 VP1 plasmid 偵測極限為  $10^1$  稀釋濃度；EV-A71 病毒株偵測極限為  $10^{-8}$  稀釋濃度，約 CCID<sub>50</sub> 為 0.1；EV-D68 病毒株偵測極限為  $10^{-7} \sim 10^{-8}$  稀釋濃度，約 CCID<sub>50</sub> 為 0.1；Echo 11 病毒株偵測極限為  $10^{-8}$  稀釋濃度，約 CCID<sub>50</sub> 為 0.1(圖二)。

#### 3. 設計並測試 EV RT-snPCR 檢驗試劑套裝化條件

- (1) 本署所使用之 EV RT-snPCR 所需使用之各個成分組成，原來 RT 反應需要 12 管 (含 Enzyme, primers, buffer, ..H<sub>2</sub>O) 、PCR1 反應需要 9

管、 nested PCR (PCR2) 反應也要 9 管。因此預計將其套裝化，並減少管量(圖三)。

(2) 測試條件：

- A. RT 反應原來 12 管：分成 cDNA kit、SuperScript IV RT(SSIV RT)及 RNaseOUT，共三管；分別放置一、三、六個月做測試(圖四-1)。
- B. PCR1 反應原來 9 管：分成 PCR MASTER MIX、PCR1 primer mix 及 DEPC water，共三管；分別放置一、三、六個月做測試(圖四-2)。
- C. PCR2 反應原來 9 管，分成 PCR MASTER MIX、PCR1 primer mix 及 DEPC water，共三管；分別放置一、三、六個月做測試(圖四-3)。

4. 試行調查及公開招標，委由得標廠商分填及包裝

- (1) 得標廠商包裝樣板(圖五)。
- (2) 詢問腸病毒認可機構及合約實驗室試行之意願，共 9 間有意願使用(表一)。
- (3) 於 9/5-6、9/19 辦理 EV RT-snPCR 之 Proficiency Test。
- (4) 寄出 EV RT-snPCR 套組，用於腸病毒重症及社區監測(送驗腸道疾病)之檢測。

5. 套裝化試劑效果評估

- (1) 資料擷取統計自 10/2-11/15，有意願之合約及認可實驗室及 CDC 研檢中心共計使用 EV RT-snPCR 試劑套組檢測 244 件腸病毒檢體(5 件疑似腸病毒重症；181 件社區監測及 58 件 CDC 研檢中心-疑似腸病毒感染併發重症)。
- (2) 統計由各合約及認可實驗室進行之 EV RT-snPCR 檢測結果(圖六)，在 186 件檢體中，檢測出 123 件經定序後為腸病毒陽性(最多為 CA6(67 件)；次之 CA2(20 件)；EV-A71(15 件)；63 件陰性(其中有 5 件為 Rhinovirus)。
- (3) EV RT-snPCR 之陽性率 63.5% (155/244)，相較於病原體分離與鑑定

陽性率 27% (66/244)，更能協助縮短腸病毒的檢測時間，提高陽性檢率，以即時監測腸病毒的流行趨勢。

#### 四、討論與建議

1. 病原體分離鑑定方法，其優點為費用較低，且分離之病毒後續可建立病毒種庫及基因資料庫，然而缺點為平均陽性率不到 50%，及檢驗耗時無法即時偵測流行之發生；EV RT-snPCR 方法，其敏感性及專一性高，最快可於 3 天內得知結果，腸病毒 VP1 部份核酸序列更可進一步使用於腸病毒分型演化分析用，然而缺點是檢驗流程繁瑣，試劑及定序費用昂貴，各醫療院所在人力及經費拮据之情況下使用意願不高。
2. 在本計畫中所推行之 EV RT-snPCR 精簡套組化後，經有意願之合約及認可實驗室及 CDC 研檢中心使用於共 244 件檢體(5 件認可醫院通報疑似腸病毒重症、181 件合約實驗室社區監測送驗腸道疾病及 58 件 CDC 研檢中心通報疑似腸病毒感染併發重症)中，同時進行病原體分離鑑定及 EV RT-snPCR 檢測。以目前結果發現，病原體分離陽性分離率為 27% (66/244)(表二)，而 EV RT-snPCR 陽性分生檢出率為 63.5% (155/244)(表二)，其中有 6 件檢體是 EV RT-snPCR 陰性但病原體分離陽性(2 件 EV-A71；1 件 CV-A2；2 件 CV-A4 以及 1 件 CV-A6)；而 EV RT-snPCR 陽性但病原體分離陰性則有 95 件(58 件 CV-A6；20 件 EV-A71；8 件 CV-A2；3 件 CV-A5；1 件 CV-A4；1 件 CV-A10；1 件 Echo5；1 件 Echo25 以及 2 件 HSV-1)，故臨床檢體病原體分離分離率較低。
3. EV RT-snPCR 為目前腸病毒分生檢測中敏感性及專一性均佳的方法，建議除了腸病毒感染併發重症及群聚檢測外，如經費人力許可，亦可用於腸病毒社區監測，將提升陽性率及時效。在明年度，本計畫也將推行 Pan-EV real-time RT-PCR，雖然其對於臨床檢體敏感性及專一性略遜於 EV RT-snPCR，但速度更快，不須定序，可以作為臨床初步篩檢病例是否有腸病毒感染之快速檢驗方法。

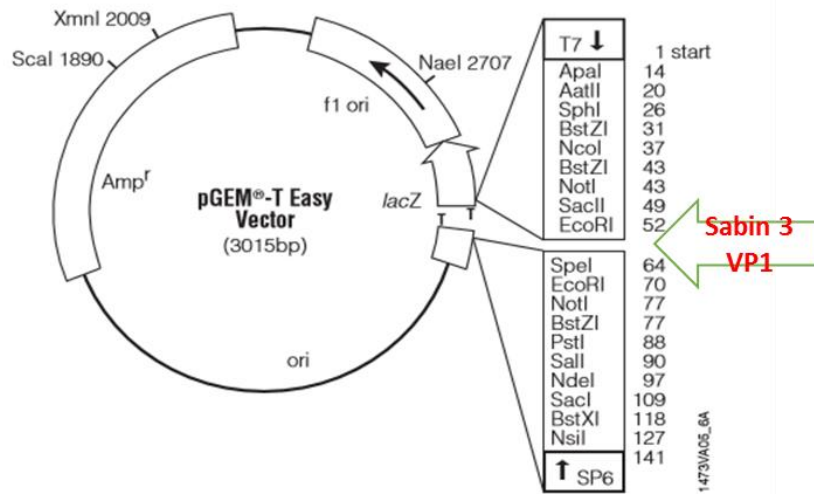
## 五、參考文獻

1. Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative (2015) , devised by the WHO Regional Office for Europe and the United States Centers for Disease Control and Prevention (CDC),  
(<http://www.euro.who.int/en/publications/abstracts/enterovirus-surveillance-guidelines.-guidelines-for-enterovirus-surveillance-in-support-of-the-polio-eradication-initiative>)
2. picornaviridae.com Available at  
<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>
3. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. J Clin Microbiol. 2006 Aug;44(8):2698-704.
4. Chiang PS1, Huang ML, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. PLoS One. 2012;7(10):e48269. doi:  
10.1371/journal.pone.0048269. Epub 2012 Oct 25.
5. 林翠莉、黃教威、郭權益、賴政宗、郭禮文，CODEHOP RT-snPCR 與 Cell Culture 同步測試計畫，中華民國 96 年 9 月 15 日行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心
6. Nijhuis M, van Maarseveen N, Schuurman R, Verkuijlen S, de Vos M, Hendriksen K, van Loon AM. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3666-70
7. Wylie TN, Wylie KM, Buller RS, Cannella M, Storch GA. Development and Evaluation of an Enterovirus D68 Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. J Clin Microbiol. 2015 Aug;53(8):2641-7)

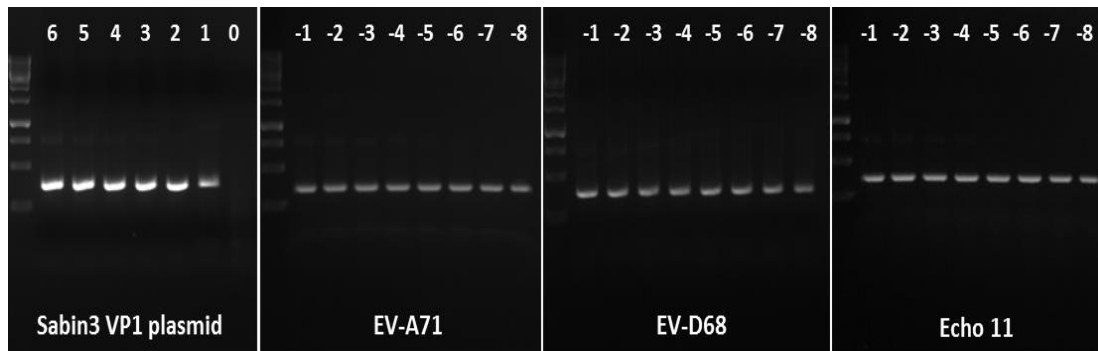


## 六、圖表

圖一、Sabin 3 VP1 plasmid



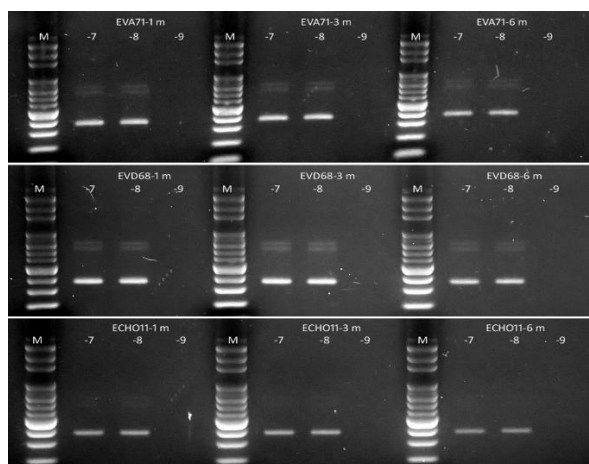
圖二、Sabin 3 VP1 plasmid 及各病毒株之偵測極限



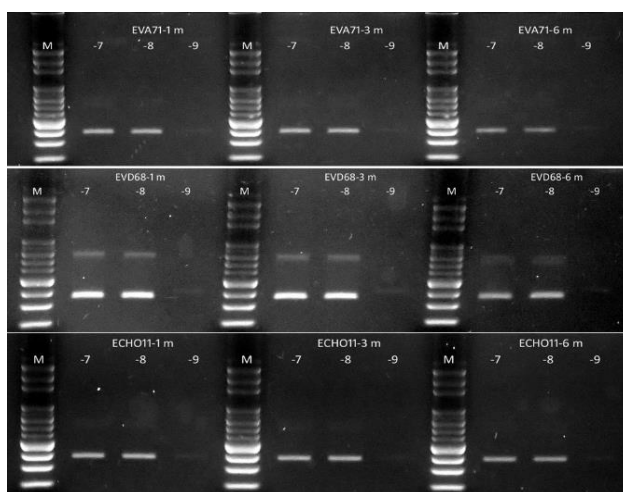
圖三、EV RT-snPCR 所需使用之各個成分組成

cDNA		PCR1		PCR2	
5X RT buffer	cDNA kit	10X PCR buffer	PCR MASTER MIX	10X PCR buffer	PCR MASTER MIX
DTT(0.1M)		Taq polymerase		Taq polymerase	
AN32(primer)		dATP		dATP	
AN33(primer)		dTTP		dTTP	
AN34(primer)		dGTP		dGTP	
AN35(primer)		dCTP		dCTP	
dATP		224F(primer)		AN88(primer)	
dTTP		222R(primer)		AN89(primer)	
dGTP		dd water		dd water	
dCTP					
SuperScript III (RT)	SuperScript III (RT)				
RNaseOUT	RNaseOUT				

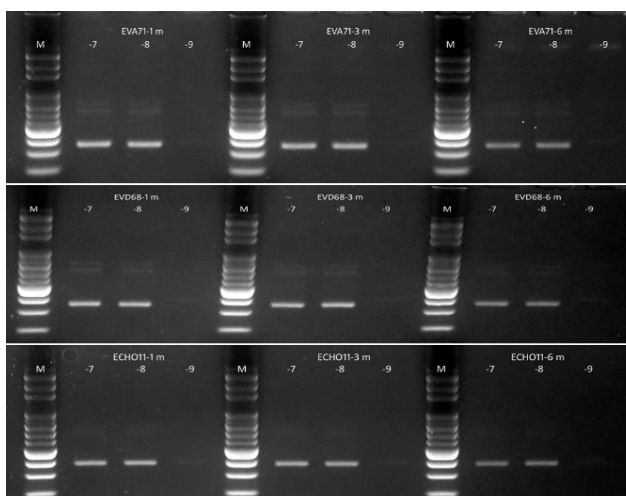
圖四-1、RT 反應之時間點及條件測試



圖四-2、PCR1 反應之時間點及條件測試



圖四-3、PCR2 反應之時間點及條件測試



圖五、包裝樣板

RT		1 rxn (μl)	
RT M	4	RT M	1 <sup>st</sup> strand buffer, DTT, RT Primer mix(AN32*35), dNTP
RT O	0.5	RT O	RnaseOUT
RT E	0.5	RT E	RT enzyme
Specimen RNA	5		

↓

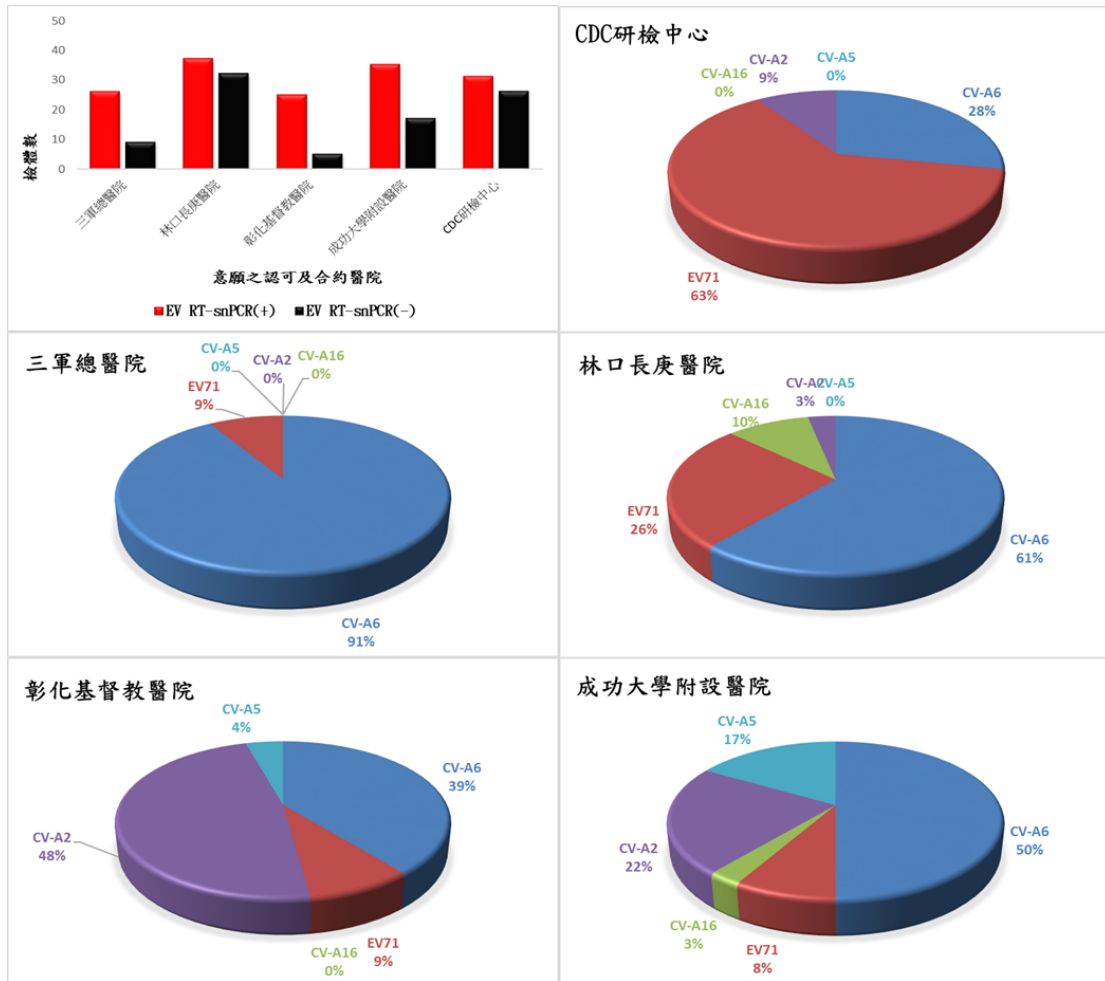
PCR 1		1 rxn (μl)	
PCR 1M	5	PCR 1M	2x PCR master mix
PCR 1P	1.6	PCR 1P	Primer mix (222R/224F)
H2O 1	1.4	PCR 1W	DEPC treated water
cDNA	2		

↓

PCR 2		1 rxn (μl)	
PCR 2M	12.5	PCR 2M	2x PCR master mix
PCR 2P	4	PCR 2P	Primer mix (88R/89F)
H2O 2	7.5	PCR 2W	DEPC treated water
PCR1 product	1		



圖六、各意願合約及認可實驗室進行 EV RT-snPCR 與病原體分離陽性率



表一、EV RT-snPCR 試劑套組使用意願單位

表 1、合約及認可實驗室列表及試劑需求、擬提供數量

醫療院所	腸病毒 合約實驗室	腸病毒重症 認可實驗室	試劑需求	擬提供之 試劑組數 <sup>(備註)</sup>
臺大醫院	✓	✓	✓ (合約實驗室)	2
三軍總醫院	✓	✓	✓	3
臺北榮民總醫院		✓		
林口長庚醫院	✓	✓	✓	3
臺中榮民總醫院	✓	✓		
彰化基督教醫院	✓	✓	✓	3
成功大學附設醫院	✓	✓	✓	3
奇美醫院		✓	✓	1
高雄長庚醫院		✓	✓	1
高雄醫學大學附設醫院	✓	✓		
高雄義大醫院		✓	✓	1
高雄榮民總醫院		✓		
花蓮慈濟醫院	✓	✓	✓	3
合計	8	13	9	20

備註：合約及認可實驗室負責之項目：

1. 腸病毒合約實驗室：負責腸病毒輕症社區監測業務，目前共有 8 間
2. 腸病毒重症認可實驗室：負責腸病毒重症檢驗業務，目前共有 13 間

表二、病原體分離與鑑定及 EV RT-snPCR 結果

	EV RT-snPCR(+)	EV RT-snPCR(-)
病原體分離(+)	60	6
病原體分離(-)	95	83

# 衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

## 期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-112502

計畫名稱：腸病毒分生檢驗方法標準化與套組化

計畫主持人：楊志元

\*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	本計畫為縮短腸病毒的檢測時間，提高陽性檢出率，設計 CODEHOP 標準化流程，測試檢驗試劑套裝化條件，並請合格廠商分填及包裝檢驗試劑套組，提供認可/合約實驗室，協助即時監測腸病毒的流行趨勢；方向正確、技術可行。但是，腸病毒為臨床常見傳染病之一，其檢測市場應該不小；CDC 的角色扮演可以是技術研發、但這些產品優化試驗、提升產品效能的事情似乎應該由相關廠商負責才是。	感謝委員指導。	無
2	報告指出「2018 年測試 Pan-enterovirus real-time RT-PCR 之檢驗效能，結果專一性佳，臨床陽性檢體檢出率>90%，稍略遜於 CODEHOP，其優點為反應時間短，不需進行電泳分析及核酸定序，可做為臨床快速診斷腸病毒參考。」的確「泛」病原檢測是一個研發方向。而臨床診斷貴在專一性、準確度、與快速診斷；這是醫事檢驗追求的目標，但是往往很難有三者兼具的技術或方法。因此實務上策略就很重要。	感謝委員指導。	無
3	建議研發策略可朝快速、精確的「雙系統」方向思考。也就是說建構一套可快速檢測之系統，它不一定需要 100%精確，只要它沒	感謝委員指導。	無

	有偽陰性，能在極短時間快速檢測即可。比如報告指出的「Pan-enterovirus real-time RT-PCR」就是很好的例子，它有 90%的檢出率已經很好了。然後對於未能檢出的其他 10% 檢體，再有一套後送相關實驗室進行精確檢測的機制。		
4	後續如何推廣此試劑套組？	爾後若有經費支持可提供試劑套組予合約或認可實驗室應用於腸病毒重症或社區監測。	無
5	請補充合約實驗室(林長) EV RT-snPCR 檢出率較低之可能原因。	各實驗室測試均使用院內檢體，比較基準不同，可能係林長抽樣之樣本實際陽性率本就偏低所致。	無

備註:請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。