

傳染病陽性對照片細胞蠟塊製作技術

胡瑄耘¹、蕭開平^{1,3,4}、陳英彥²、蘇千玲²、潘至信^{1*}

摘要

目前分子生物學及生物技術能夠於血液或組織檢體偵測致病原生物指標，但在組織、細胞或法醫病理微生物鑑識工作中，必須比對組織或細胞之病理層級變化，方可直接證實死者是否確實因遭受此微生物感染致病或致死。為了能夠直接觀察病原體所造成之組織病理變化，我們利用免疫組織化學染色、原位雜交及免疫螢光染色等技術與方法，執行組織病理診斷。我們使用細胞蠟塊的技術，將生物材料製作成陽性對照片，分別以蘇木紫與伊紅染色以及免疫組織化學染色結果呈現。傳染病陽性對照片細胞蠟塊製作技術，可供日後新興傳染病(如 MERS 及 Zika 等病毒感染)或致死性傳染病(如 SARS、Ebola 及 Influenza 等病毒感染)之組織或細胞病理層級鑑定，有助於國內重大疫情控制，為國內傳染病病理發展，踏出極重要的第一步。

關鍵字： 法醫微生物鑑識、傳染病病理、陽性對照片、細胞蠟塊、免疫組織化學染色

前言

近年因疑似疫苗傷害致死案件而使得國內疫苗防疫政策面臨嚴峻挑戰。為使國家疫苗政策順利推展，其中微生物鑑識在法醫鑑定是否因疫苗之微生物成分致死之死因判定上扮演非常重要的角色。目前雖然可以分子生物學及生物化學等技術(如聚合酶連鎖反應、微生物分離培養及質譜儀等)判斷血液或組織中是否存在致病原，但仍無法得知死者是否確實因遭受到此微生物感染致病或致死，而法醫鑑識工作僅能藉由解剖後比對組織或細胞之病理層級變化，即醫學最終診斷[1]，配合微生物鑑定，來釐清確切死因與死亡機轉。

法醫病理解剖鑑識乃運用組織病理學之常規蘇木紫與伊紅染色 (hematoxylin & eosin stain, H&E stain)、特殊染色與組織分子病理學之免疫組織化學染色 (immunohistochemistry, IHC)、原位雜交 (*in situ* hybridization, ISH) 及免疫螢光染色 (immunofluorescence, IF) 等技術與方法進行病理診斷。免疫組織化學染色、原位雜交染色與免疫螢光染色其原理，係利用辨認病原體之特定抗體或針對病原體之

¹ 法務部法醫研究所

² 衛生福利部疾病管制署檢驗與疫苗研製中心

³ 中央警察大學鑑識科學學系

⁴ 國防醫學院附設三軍總醫院病理部

DOI : 10.6524/EB.20170214.33(3).002

通訊作者：潘至信^{1*}

E-mail : acpanp501361@gmail.com

投稿日期：2016 年 04 月 26 日

接受日期：2016 年 07 月 25 日

DNA或RNA序列設計的探針，於病理組織或細胞上直接進行病原體的偵測與觀察，其結果皆可直接呈現病原體攻擊之器官組織及細胞層級病理變化，並作為確立診斷微生物致病或致命之直接證據。

縱然市面上有販售許多病原體相關抗體，然而國內傳染病病理仍未發展完整，其主要原因之一是陽性對照片不易取得，導致無法有信心地確認染色結果。為解決此問題，本所與衛生福利部疾病管制署(以下簡稱疾管署)檢驗及疫苗研製中心(以下簡稱檢驗中心)合作，將疫苗及傳染病相關病原體之生物材料，利用細胞蠟塊的技術，製作成陽性對照片。我們希望傳染病病理陽性對照片的製作與建立，能夠為國內傳染病病理發展踏出極為重要的第一步。

材料與方法

一、生物材料

本研究之部分生物材料是向疾管署申請生物材料分讓，申請時須備妥生物材料使用申請書、協議書一式兩份、單位生物安全委員會同意書、第三級以上感染性生物材料異動(核備)單以及計畫書或計畫摘要函送疾管署。本生物材料前處理與培養由疾管署檢驗中心協助進行(表一)。

表一、生物材料前處理條件

生物材料	菌株/病毒株	培養條件	檢驗中心實驗室
百日咳桿菌	<i>Bordetella pertussis</i> 2003 年至 2012 年臨床 分離株	BG 含馬血培養基 (Bordet Gengou Agar with 15% Horse Blood)， 35°C-36°C，3-4 天。	呼吸道細菌 實驗室
b 型嗜血桿菌	<i>Hemophilus influenzae</i> type b 2004 年至 2012 年臨床 分離株	巧克力培養基， 35°C-37°C，5% CO ₂ 環境， 18-24 小時。	呼吸道細菌 實驗室
白喉桿菌	<i>Corynebacterium</i> <i>diphtheria</i> ATCC 13812 及 ATCC 27012	血液瓊脂平板 (blood agar plate, BAP)， Cystine Tellurite plate， 35°C，48 小時。	腸道及新感染症 細菌實驗室
小兒麻痺病毒疫苗株	Oral polio vaccine virus 第一型 (strain LS-c, 2ab) 第二型 (strain P712, ch, 2ab) 第三型 (strain Leon 12a (1) b)	感染人類橫紋肌瘤細胞株 (rhabdomyosarcoma cell line, RD cell line)， 36°C，5% CO ₂ 環境， 72 小時。	HIV 及新感染 症病毒實驗室
腸病毒 71 型	Enterovirus 71	感染人類橫紋肌瘤細胞株 (rhabdomyosarcoma cell line, RD cell line)， 36°C，5% CO ₂ 環境，O/N。	

(續上頁表一、生物材料前處理條件)

生物材料	菌株/病毒株	培養條件	檢驗中心 實驗室
水痘帶狀疱疹病毒	Varicella zoster virus(VZV) Oka strain	感染人類肺纖維母細胞(MRC-5 cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境。	
麻疹病毒	Measles Enders' Attenuated Edmonston Strain	感染非洲綠猴腎細胞(Vero cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 4-5 天。	
腮腺炎病毒	Mumps Jeryl Lynn B Strain	感染非洲綠猴腎細胞(Vero cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 7 天。	
德國麻疹病毒	Rubella Wistar RA 27/3 Strain	感染非洲綠猴腎細胞(Vero cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 7 天。	
H1N1 流感病毒	Influenza A virus H1N1 (A/California/07/2009)	感染犬類腎臟上皮細胞(Madin-Darby canine kidney epithelial cell, MDCK cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 72 小時。	呼吸道病毒 實驗室
A 型流感病毒 (H3N2)	Influenza A virus H3N2	感染犬類腎臟上皮細胞(Madin-Darby canine kidney epithelial cell, MDCK cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 24 小時。	
B 型流感病毒	Influenza B virus	感染犬類腎臟上皮細胞(Madin-Darby canine kidney epithelial cell, MDCK cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 24 小時。	
日本腦炎病毒	Japanese encephalitis virus Nakayama strain	感染非洲綠猴腎細胞(Vero cell), 37°C, 5% CO ₂ 環境, 49 小時。	病媒病毒及 立克次體實 驗室

二、細胞蠟塊

細胞蠟塊之製作方式是根據下列步驟進行。首先，將病毒感染細胞後，待細胞產生細胞病變(cytopathic effect, CPE)，收集受病毒感染之細胞，並以 1,500 rpm 離心 5 分鐘。小心的去除上清液後，再加入 3 ml 10% 福馬林溶液並與細胞均勻混合。

細菌類之細胞蠟塊製備製作方式為：細菌菌株塗盤培養生長後，挑起菌株菌落直接混合至 3 ml 10% 福馬林中。

待上述之細胞或細菌固定後，再以離心方式 (1500 rpm, 5 分鐘) 移除福馬林溶液。於冰寶上的濾紙，取與剩餘固定後細胞或細菌等體積微波加熱的 3% 瓊脂(agarose, Lonza)，將細胞或細菌檢體包覆。待瓊脂膠體凝固後，再將膠體置於組織包埋紙中並放入組織包埋盒進行脫水處理，最後以石蠟包埋製作成細胞蠟塊。

三、蘇木紫與伊紅染色

細胞蠟塊以 4 μm 厚度切片並進行蘇木紫與伊紅染色，其步驟簡述如下：首先玻片置於 65°C 烘箱 20 分鐘，再以自動染色機(LEICA AUTO STAINER XL) 進行染色，其各步驟分別設定如下：二甲苯(xylene, J.T. Baker) 8 分鐘，二甲苯 7 分鐘，100% 乙醇(ethanol, Cancer Diagnostics) 50 秒兩次，95% 乙醇 20 秒兩

次，水洗 2 分鐘，蘇木紫(hematoxylin, Surgipath) 2 分 30 秒，分別水洗兩次(每次 3 分鐘)，碳酸鋰溶液(lithium carbonate, Muto Pure Chemicals) 15 秒，水洗 4 分鐘，95%乙醇 10 秒，伊紅(eosin, Muto Pure Chemicals) 2 分鐘，95%乙醇 20 秒兩次，100%乙醇 20 秒三次，二甲苯 3 分鐘兩次，最後以封片膠(Hisfluid mounting medium, Amber)與自動封片機 (LEICA CV5030)進行封片。

四、免疫組織化學染色

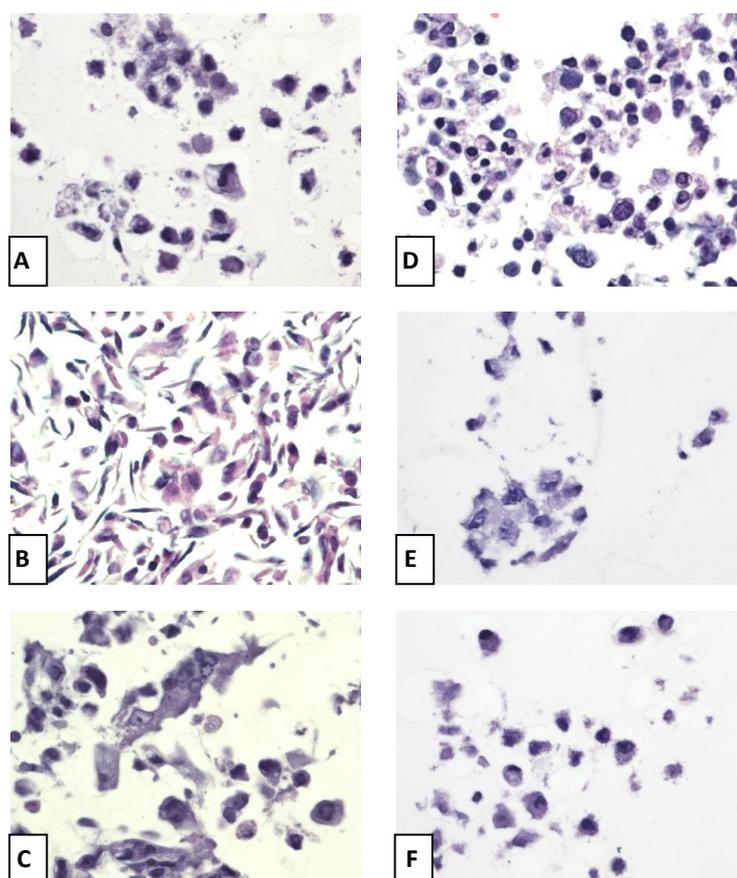
細胞蠟塊以 4 μm 厚度切片並進行免疫組織化學染色，首先玻片置於 65 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱 20 分鐘後，再進行脫蠟及回水，其步驟如下：二甲苯 8 分鐘，二甲苯 7 分鐘，100%乙醇 50 秒兩次，95%乙醇 20 秒兩次，水洗 2 分鐘。再將玻片置 95 $^{\circ}\text{C}$ 抗原修復液(Trilogy, Cell Marque) 20 分鐘進行抗原修復(antigen retrieval)，取出玻片置於室溫冷卻 30 分鐘後以 TBST(Tris Buffered Saline-Tween 20, Thermo)清洗。為去除內生性過氧化氫酶(hydrogen peroxidase)活性之干擾，利用 Hydrogen Peroxide Block (TA-060-HP, Thermo)作用 10 分鐘後再以 TBST 清洗。之後利用 Ultra V Protein Block (TA-060-UB, Thermo)作用 5 分鐘後再以 TBST 清洗。加入一級抗體，抗體特性及作用條件詳見表二。反應結束後以 TBST 清洗三次。加入 UltraVision Quanto Detection System(HRP, TL-060-QHL 或 AP, TL-060-QAL, Thermo)進行二級抗體作用，再以 AEC(TA-060-SA, Thermo)、DAB (TA-060-QHDX, Thermo)或 Liquid fast red (TA-060-AL, Thermo) 進行呈色，TBST 清洗，以蘇木紫進行對照染色 3 分鐘，水洗 10 分鐘，最後以封片膠進行封片。染色抗體經由濃度測試實驗，參照免疫組織化學染色實驗步驟，以使用建議濃度上下抓取稀釋倍率進行測試，抓取最佳抗體作用染色條件。進行染色時，陰性對照組為染色步驟未加入一級抗體，而以抗體稀釋液取代，其餘步驟皆相同。

表二、免疫組織化學染色一級抗體作用條件

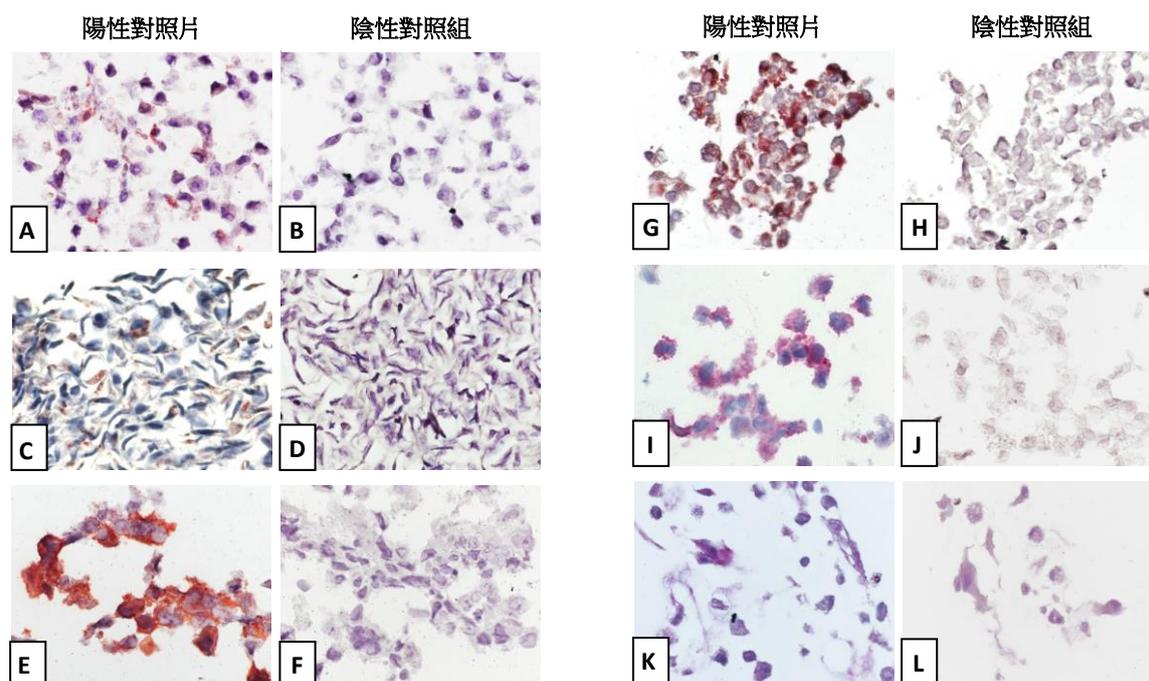
抗體名稱	特性/廠牌(貨號)	作用條件
日本腦炎病毒 Anti-Japanese encephalitis virus NS1 glycoprotein antibody [JN1]	Mouse monoclonal/ Abcam (ab41651)	1:10 室溫 1 小時
德國麻疹病毒 Rubella virus virions goat anti-Rubella virus polyclonal (HRP) antibody	Goat polyclonal/ LSBio (LS-C75569)	1:50 室溫 2 小時
麻疹病毒 Measles virus phosphoprotein mouse monoclonal (9H4) antibody	Mouse monoclonal/ LSBio (LS-C144534)	1:1,000 室溫 1 小時
小兒麻痺病毒 Polio virus 1,2,3 mouse anti-poliovirus monoclonal antibody	Mouse monoclonal/ LSBio (LS-C56240)	1:400 室溫 1 小時
水痘帶狀疱疹病毒 Anti-varicella zoster virus antibody [C90.2.8]	Mouse monoclonal/ Abcam (ab49708)	1:50 室溫 1 小時
腮腺炎病毒 Mumps virus mouse anti-mumps virus monoclonal antibody	Mouse monoclonal/ Abcam (ab9876)	1:20 室溫 1 小時

結果

藉由細胞蠟塊及石蠟包埋之技術，我們完成製作疫苗及傳染病相關病原體細胞蠟塊，包括百日咳桿菌、b 型嗜血桿菌、白喉桿菌、小兒麻痺病毒、水痘帶狀疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、德國麻疹病毒、A 型(H1N1)流感病毒、A 型(H3N2)流感病毒、日本腦炎病毒、腸病毒 71 型、B 型流感病毒等 13 種病原體。將細胞蠟塊進行切片後，以蘇木紫與伊紅染色觀察，我們確實觀察到菌體或細胞的存在，並且明顯觀察到病毒感染細胞後所產生的細胞病變的情形（圖一）。陽性對照片進行免疫組織化學染色後，可於細胞質中偵測到病毒蛋白陽性訊號，與病毒複製過程之機轉相符合，而未加入一級抗體之陰性對照組則未偵測到任何訊號。例如德國麻疹病毒（圖二 A, B）、日本腦炎病毒（圖二 C, D）、麻疹病毒（圖二 E, F）、小兒麻痺病毒（圖二 G, H）、腮腺炎病毒（圖二 I, J）、水痘帶狀疱疹病毒（圖二 K, L）。除了以未加入一級抗體之條件做為陰性對照組，我們也進行測試陽性對照片進行交互染色（未顯示結果）。日本腦炎病毒陽性對照片染麻疹病毒抗體、麻疹病毒陽性對照片染腮腺炎病毒抗體、小兒麻痺病毒陽性對照片染水痘帶狀疱疹病毒抗體、腮腺炎病毒陽性對照片染日本腦炎病毒抗體皆不會有交互反應之訊號，可更加確認抗體之專一性。



圖一、陽性對照片蘇木紫與伊紅染色結果(400X)：(A)德國麻疹病毒感染非洲綠猴腎細胞；(B)日本腦炎病毒感染非洲綠猴腎細胞；(C)麻疹病毒感染非洲綠猴腎細胞；(D)小兒麻痺病毒感染人類橫紋肌瘤細胞；(E)腮腺炎病毒感染非洲綠猴腎細胞；(F)水痘帶狀疱疹病毒感染人類肺纖維母細胞



圖二、陽性對照片及陰性對照組免疫組織化學染色結果(400X)：
 德國麻疹病毒感染非洲綠猴腎細胞(A, B；AEC)；
 日本腦炎病毒感染非洲綠猴腎細胞(C, D；DAB)；
 麻疹病毒感染非洲綠猴腎細胞(E, F；AEC)；
 小兒麻痺病毒感染人類橫紋肌瘤細胞(G, H；AEC)；
 腮腺炎病毒感染非洲綠猴腎細胞(I, J；Liquid fast red)；
 水痘帶狀疱疹病毒感染人類肺纖維母細胞(K, L；Liquid fast red)

討論

細胞蠟塊的技術在臨床上，已普遍應用於細胞學檢查[2,3]，本篇研究藉由細胞蠟塊技術，製作 13 種疫苗及傳染病相關病原體之陽性對照片。利用此種技術須考量生物安全的問題，我們所使用的生物材料須向疾管署申請，並由檢驗中心協助進行前處理，經由福馬林固定後才交至本所，因此生物材料無傳染之疑慮。細胞蠟塊具有可進行多次切片使用的優點，即製作一次可產生足夠使用量的陽性對照片，並且可長久保存[4]。細胞蠟塊的形式及後續實驗的進行，與本所原先法醫病理所使用的技術相同，包括切片、染色等，因此可以很順利與原先的技術做結合。利用細胞蠟塊技術所製成的陽性對照片，經由染色後，可觀察到細胞型態、細菌型態以及感染所造成細胞病變等，亦可用免疫組織化學染色方式偵測到病原體抗原，因此是一個很好的陽性對照片製作技術。

我們成功以免疫組織化學染色於德國麻疹病毒、日本腦炎病毒、麻疹病毒、小兒麻痺病毒、腮腺炎病毒及水痘帶狀疱疹病毒陽性對照片偵測病毒蛋白，然而 A 型(H1N1)流感病毒、A 型(H3N2)流感病毒、腸病毒 71 型及 B 型流感病毒雖然成功製備細胞蠟塊，但經由多次實驗測試，無法以免疫組織化學染色偵測到病毒陽性訊號，可能原因包括尚未抓取到最佳實驗條件，且縱然市面上有販售多種抗體，一些

研究顯示某些抗體可能無法順利偵測訊號[5]，因此選擇適合的抗體也是關鍵步驟。此外，亦無法確定製備細胞蠟塊之病毒感染量是否足以使免疫組織化學染色方式偵測到，這也是需要考量因素之一。細菌類之細胞蠟塊製備，主要是將培養基上的菌落直接固定於福馬林溶液中，因此細菌類之細胞蠟塊不含細胞成分，經由蘇木紫與伊紅染色，確實可觀察到菌體存在（未顯示結果），但發現菌量太多以致於太密集而不易觀察菌體型態，只有在較稀疏處可觀察到如同抹片方式之菌體，此部分可再做改進，以稀釋適當之菌量製備細胞蠟塊。

隨著交通便利的發展，國際間交流頻繁，傳染病的爆發隨時可能發展成全球疫情。2009年 H1N1 爆發流行期間，國家為因應 H1N1 防疫政策，以大量經費採購國內外相關疫苗免費施打，施打期間有 14 例疑似疫苗注射致死案件，包括社會關注臺中劉小弟案件，造成社會輿論與民眾恐慌，導致防疫措施窒礙難行。傳染病疫情隨時可能爆發流行並造成死亡，對於法醫解剖微生物鑑識工作為巨大的挑戰。除了委託疾管署進行微生物檢驗，藉由本研究疫苗及傳染病相關病原體陽性對照片製作，進行免疫組織化學染色法分析，可協助診斷病理變化與病原體之關係，大幅提昇疑似疫苗傷害致死等具爭議性的司法案件以及法醫疑似傳染病案件之鑑驗能力，並且日後可應用於新興傳染病（如 MERS 及 Zika 等病毒感染）或致死性傳染病（如 SARS、Ebola 及 Influenza 等病毒感染）之組織或細胞病理層級鑑定，有助於國內重大疫情控制，希望藉此能帶動傳染病病理發展。

誌謝

本研究生物材料來源由疾管署提供。感謝疾管署檢驗中心呼吸道細菌實驗室、腸道及新感染症細菌實驗室、HIV 及新感染症病毒實驗室、呼吸道病毒實驗室及病媒病毒及立克次體實驗室及實驗室品保及安全科協助進行生物材料前處理。感謝鄧華真科長協助協調聯絡事宜，使本研究得以順利進行。本研究部分資源及經費以疾管署委託科技研究計畫（研究計畫編號 DOH102-DC-1107）及法務部科技計畫（研究計畫編號 104-1301-IFM(8)-02）完成。

參考文獻

1. Pathmanathan R. The autopsy--the ultimate medical consultation. *Malays J Pathol* 1988; 10: 7–13.
2. Zanoni DS, Grandi F, Rocha NS. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an "old and forgotten" method. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 307–8.
3. Khan S, Omar T, Michelow P. Effectiveness of the cell block technique in diagnostic cytopathology. *J Cytol* 2012; 29: 177–82.

4. Shivakumarswamy U, Arakeri SU, Karigowdar MH, et al. Diagnostic utility of the cell block method versus the conventional smear study in pleural fluid cytology. *J Cytol* 2012; 29: 11–5.
5. Nicholls JM, Wong LP, Chan RW, et al. Detection of highly pathogenic influenza and pandemic influenza virus in formalin fixed tissues by immunohistochemical methods. *J Virol Methods*. 2012; 179: 409–13.