



應用分子生物技術診斷 H1N1 新型豬流行性感胃病毒

本所豬瘟研究組 鄧明中

背景

當年疫情狀況

新型流感病毒 (Novel Influenza virus, New Flu) 最早於 2009 年 3 月首度於墨西哥爆發疫情，當時導致超過百人死亡。其後疫情由美洲傳播到全世界，包括澳洲、中國大陸、香港、冰島、印度、印尼、馬來西亞、菲律賓、新加坡、南韓及泰國等一百多個國家皆傳出有確診之病例。台灣則於同年 5 月 20 日報告首名病例，其後疫情如野火般地在國內蔓延。新型流感後來證明為一種以豬流感病毒基因為主，結合包含人流感及禽流感病毒基因之全新 A 型變種流感病毒。因此世界衛生組織便使用「豬

流感」 (Swine Flu) 來稱呼這次新的變種病毒，此名稱並獲得大部分國家跟進使用。但由於資訊、地區、文化、宗教以及政治等因素，除豬流感這樣的名稱外，另外還有豬源流感、人類豬 (型) 流感、墨西哥流感、北美流感、H1N1 新型流感、以及 2009 年 H1N1 流感等各種不同的名稱。但由於美國豬農抗議「豬流感」易使人誤會病毒來自豬隻並經由豬肉傳播，進而影響豬肉的銷售。美國疾病管制中心 (Centers for Disease Control, CDC) 隨後將新流感改稱為「北美流感」，歐盟則隨即改稱為「新流感」。我國當初媒體報載時也依俗稱為「豬流感」，但隨後官方則將名稱定為

「新型 A 型 H1N1 流感【Novel Influenza A(H1N1)】」。

豬源 H 1 N 1 流感怎麼來的？

本次爆發疫情之流感病毒後經證實為豬源 H1N1 血清型。此流感病毒可同時感染人、鳥及豬。由於豬本身同時具有禽類及人類流感病毒的接受器，因此豬可同時感染傳統典型豬流感、人類流感以及禽類流感 3 種不同的病毒，如此特性加深病毒基因重組進一步產生新型變種病毒的可能性。然而此次爆發的新流感即是透過此一方式，病毒在豬體內基因重組，產生帶有人類流感病毒基因及一段禽類流感基因的全新豬流感病毒株，並傳播給人類造成本次的大流行。雖然過去經常出現豬流感傳染給人類的情形，但仍只是主要從事與豬隻密集接觸行業的少數病例。然而此次新流感無法證實是由豬隻傳染給人類並造成如此重大疫情，但本次大規模流行主要還是藉由人傳人的感染方式以及交通便利性，才是這波疫情快速傳播的重要因素。

病原簡介

新型 H1N1 流行性感冒病毒被歸類在正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae) 內的 A 型流感病毒屬 (Influenza virus A)，其為負向具有封套 (Envelope) 之單股 RNA 病毒，病毒顆粒呈圓形。而依照病毒顆粒中之基質蛋白 (Matrix, M)、核蛋白 (Nucleocapsid, NP) 之抗原性的不同又可區別成 A、B 及 C 型流行性感冒病毒。A 型流感病毒的分類主要依其表面之血球凝集素 (Hemagglutinin, HA) 以及神經胺酸酶 (Neuraminidase, NA) 兩種醣蛋白的抗原性作依據，其中 HA 血清已被鑑定出具有 16 種亞型，而 NA 則具有 9 種亞型。流感病毒具有 8 個分段的基因，可轉譯出 11 種病毒蛋白，分別為 3 種表面蛋白：HA、NA 以及 M2 蛋白，6 種內源性蛋白，3 種聚合酶蛋白 (PB2、PB1、PA)、NP、M1、NEP(NS2) 及 2 種未包覆在病毒顆粒內的非結構蛋白 (NS1 以及 PB1-F2)。流感病毒是經由空氣傳染，並且是經由呼吸道入侵宿主而致病，其點突變和高頻率片段交換的基因重組 (Antigenic drift) 特性造成病毒表面醣蛋白抗原改變，這



也是為何流感疫苗必須每年施打的主要原因之一。

臨床症狀

人類感染新流感之症狀（與季節性流感症狀之差異）

A 型 H1N1 新型流感的患者症狀除了有發燒（體溫大於或等於 38°C）、頭痛、肌肉痠痛、關節疼痛、明顯疲勞、咳嗽、喉嚨痛、鼻塞等典型流感徵狀之外，大約四分之一的患者會出現有腹瀉、嘔吐等類似腸胃炎的症狀。這些類似腸胃炎症狀是以前季節性流感所不常見的。過去，大部分感染流感的人，病徵都很輕微，但偶而可見死亡之病例發生。但本次新型流感之疫情，已造成全世界 214 個國家有病例報告，共造成 18,600 人死亡，雖然全世界統計之死亡率僅約 2%，較過去傳統季節性流感沒有高出許多，但也引起國際上極大之恐慌。

豬隻一旦感染新型 H1N1 流感病毒後之臨床症狀

豬隻一旦感染新型流感病毒，其潛伏期約 1 至 3 天，幾乎所有感染豬隻都

同時出現呼吸系統之臨床症狀，主要症狀包括：食慾不振、活力不佳、俯臥、嗜睡、打噴嚏及咳嗽，口鼻可見分泌物，嚴重感染的豬隻可見眼睛變紅、結膜炎、鼻炎、開口呼吸及腹式呼吸等症狀。一般而言，若無放線桿菌、巴斯德桿菌、嗜血桿菌及豬鏈球菌等二次性細菌性感染，發生率雖高但死亡率是很低的。感染的豬隻通常於 5 至 7 天內自行恢復（若有潛在健康問題，恢復期會較長）。但若豬場中仍具感受性的豬隻（亦即未曾接觸過同類病毒的豬隻）存在，病毒在豬群中流傳的時間會增長。病毒流傳時間長短，端視豬場型態而定。受感染之豬群很難徹底消滅病毒，因此預防疾病的入侵就顯得非常重要。

診斷方法

新型 H1N1 流感之快速檢驗方法

目前各醫院對於疑似感染新流感病人所進行之快速篩檢試劑乃利用乾式色層免疫分析法，檢測患者鼻清或咽喉分泌液中是否帶有 A 型流感病毒（非針對新流感）之抗原蛋白。其原理類似我們一般市面上常見到之驗孕棒（條），

只要 15 分鐘即可知道病患是否感染。這種檢查雖然快速方便，但是敏感性 (Sensitivity) 不高，而且該試劑無法偵測到所有的 A 型流感病毒株。一般認為，這類檢驗試劑的敏感性大約只有 50%。也就是說，真正感染流感病毒的患者進行這種快篩檢驗，大約只有 50% 的人會呈現陽性。其他 50% 的人則呈現偽陰性。而這也僅僅表示，患者的口鼻分泌液含有 A 型流感病毒，無法準確判斷患者是否真的為新型 H1N1 流感病毒感染。

如何快速區別新流感與季節流感

為了改善診斷準確度，美國疾病管制局應用分子生物學的技術來精確偵測患者檢體中是否含有新型 H1N1 流感病毒之核酸，其原理乃應用核酸增幅方法，並配合不同螢光標示之專一性核酸探針，在精密之螢光偵測儀器中偵測是否檢體中含有微量之病毒核酸，這樣的方式不但快速方便，且敏感度與精確性非常高。較之傳統微生物診斷技術如病毒分離、血清型別鑑定等方式，往往一個診斷流程必須花費 3-5 天。而新的診斷技術只需要 4-6 小時便可得到完整且

準確之結果，對於增進醫療品質於病患權益有相當大之助益。

應用分子生物快速區別診斷方法於豬隻檢體的確診

本所目前診斷新型流感之方法主要依據美國疾病管制局所公佈之核酸引子 / 探針組 (序列詳如表 1)，反應條件也依據針對 A 型新型流感病毒之即時反轉錄聚合酵素鏈鎖反應步驟 [CDC Protocol of Real Time RTPCR for Swine Influenza A(H1N1)]。其中 InfA 引子 / 探針組乃針對所有 A 型流感病毒，一旦出現陽性反應即表示該檢體為 A 型流感；而 swInfA 則更進一步針對 A 型豬型流感；最重要的則是 sw H1 引子 / 探針組，是針對本次新型流感病毒所設計之高專一性引子 / 探針組，一旦呈現陽性反應，則檢體內一定含有新流感病毒核酸。依上述原理檢測，便可快速準確地偵測送檢樣品中是否帶有新型 H1N1 流感病毒而達成快速診斷的目的。我們舉例來說明：當疑似病例在 InfA 引子 / 探針組反應結果於 37 次的反應循環內 (Reaction Cycles \leq 37) 出現背景閾值 (Threshold)



表 1、即時反轉錄聚合酵素鏈鎖反應所需引子 / 探針組及其序列。

Primers and Probes	Sequence (5' → 3')	Working Concentration
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 μM
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 μM
InfA Probe	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 μM
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 μM
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 μM
SW InfA Probe	CYA CTG CAA GCC CA"™ ACA CAC AAG CAG GCA	10 μM
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 μM
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 μM
SW H1 Probe ²	CA GAA TAT ACA "™CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 μM

以上之螢光增殖曲線 (Ct value) 則判定為陽性 (檢體內含 A 型流感) (圖 1)，而 swInfA 引子 / 探針組反應結果於 37 次的反應循環內呈現背景閾值以上之螢光增殖曲線，該檢體則判定為 A 型豬流感病毒陽性 (圖 2)。若 sw H1 引子 / 探針組於 37 次的反應循環內出現背景閾值以上之螢光增殖曲線，檢體則百分之百確定為 A 型 H1N1 新型流感病毒感染之病例 (圖 3)。

結論

由上述實際使用於豬隻臨床檢體之結果顯示，應用分子生物技術診斷豬是否感染新型 H1N1 流行性感冒病毒可得

到快速、準確之結果，與人類目前檢測方式相同。應用專一性引子與標示探針可成功區分出新型流感與季節流感。雖然診斷速度無法如採乾式色層免疫分析法之快篩試劑於 5 至 10 分鐘呈現結果，但其準確度卻高出許多，若檢體量大時，更能顯現應用專一性引子與標示探針之優勢。所以，不論是人類或動物，一旦需要確診是否感染新型 H1N1 流行性感冒病毒時，本方法是最好、最準確的選擇。

雖然本所目前診斷新型 A 型 H1N1 流感乃參考美國疾病管制局針對新型流感 H1N1 病毒之方式進行。但該方法仍

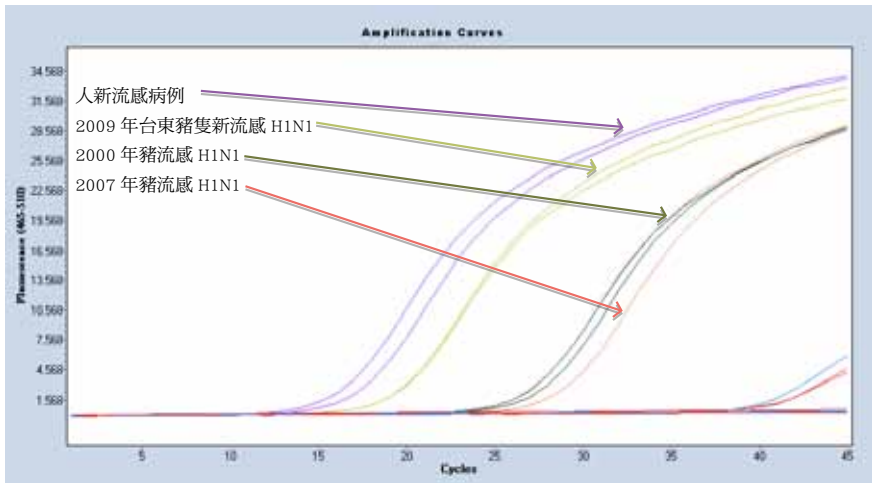


圖 1、InfA 引子 / 探針組反應結果。如圖顯示，所有的流感樣品皆有反應，只要是 A 型流感病毒皆可以被偵測出來。無法區別季節流感與新流感。

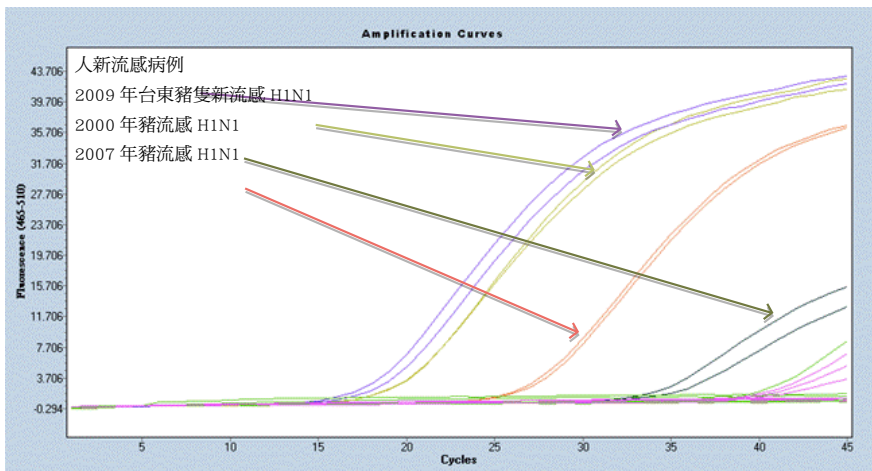


圖 2、swInfA 引子 / 探針組反應結果。如圖顯示，只有豬流感樣品才有反應。

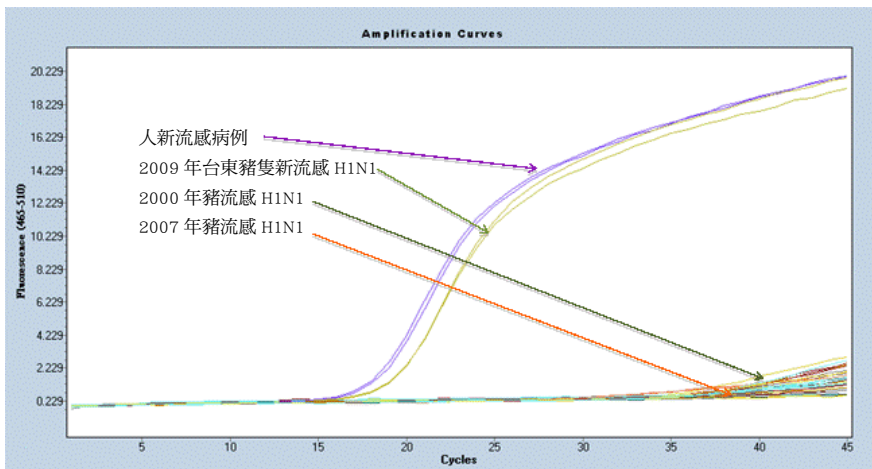


圖 3、sw H1 引子 / 探針組反應結果。如圖顯示，只有 A 型新流感病毒可以被偵測出來，豬流感無法被檢出，可有效區別季節流感與新流感。



有下述缺點：

- (1) 對單一樣品需進行 3 組不同之引子 / 探針組之反應，非常浪費試劑與耗材。
- (2) 同時一次診斷時，檢測最大量僅能檢測 32 個樣品。
- (3) 偵測基因僅針對豬源之 H1 基因，應用在人類檢體檢測沒問題，但應用於豬隻檢體很可能與其他豬源之 H1 產生難以區別之情況。

基於上述之幾項因素，未來本所將持續應用分子生物快速區別診斷之原理與方式，投入開發同步式分子生物檢驗技術，並可能針對容易混淆之基因進行區別化，期能達到快速、準確、省時、省錢之目的。

此外，欲應用分子生物技術檢測病原核酸來達到快速區別診斷之目的，就必須萃取樣品檢體中之病原核酸，而欲檢測檢體內是否含有病毒核酸，完整且快速便利之核酸萃取方式是必要的。傳統方式乃以酚 / 氯仿萃取與酒精沉澱法來萃取檢體之病毒核酸。由於酚 / 氯仿屬於有害之有機溶劑，使用上必須特殊之化學物品操作櫃 (Chemical Hood)，

且使用完畢之有機溶劑亦需特別處理，否則將造成人體以及環境的危害。考慮整體利弊得失，目前本所採用自動核酸萃取系統來取代傳統的核酸萃取法。自動核酸萃取系統可以避免人為操作之交叉汙染、誤差以及避免檢驗環境之汙染，亦能大幅降低人力資源以及減少萃取所需時間，增加診斷工作之準確性，在動物疾病的診斷上實屬可行。

目前新型流感的疫情已經平歇，但未來不論是人類或動物之傳染病，甚至類似這波疫情之人畜共通傳染病，將不斷地考驗著診斷人員，為能與時間賽跑，新的診斷方式與技術是從事動物疾病診斷人員責無旁貸的挑戰。唯有更專心、更用心地努力學習新的觀念、技術以及新的知識，就像此次新型流感疫情的挑戰一樣，應用分子生物的技術來精確偵測 H1N1 新型豬流行性感冒病毒，方能有效達成疫情控制，降低經濟與社會的衝擊。本所未來將秉持同樣的精神，發揮獸醫從業人員愛護生命的特質，為動物安全與公共衛生盡最大心力。