

利用新型分子檢測法進行腸病毒偵測

鍾婉瑜 李敏西

國家衛生研究院 感染症與疫苗研究所

前 言

腸病毒有高達一百種以上的血清型，除了小兒麻痺病毒 (Polioviruses)，腸病毒 71 型 (EV71)，還有一些克沙奇 B 型 (Coxsackievirus B) 的一些型別會併發引起中樞神經受損等傷害外，其餘型別大致上都鮮少發生併發症[1,2]。國內於 1998 年爆發 EV71 嚴重疫情後，台灣疾病管制署 (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) 建立了三個腸病毒檢測平台：1. 定點醫師聯絡網，每週收集一次手足口症 (Hand, foot and mouth disease, HFMD) 和疱疹性咽峽炎 (herpangina) 的案例，但最近已改由全民健保研究資料庫[3,4]的即時疫情和疾病監測取代。2. 成立合約實驗室，透過從腸病毒症狀疱疹性咽峽炎 (herpangina) 和手足口症患者身上收集喉頭拭子來鑑定病毒型別；3. 針對通報疑似腸病毒的重症病例，透過流行病學的研究調

查，採集喉頭拭子，血清和接觸者資訊，進行分子檢測及血清 IgM 抗體檢驗。

目前坊間最常使用的傳統檢測腸病毒以及分型的方法為病毒分離及免疫螢光法 (Virus isolation/IFA, VI-IFA)，消耗大量人力，財力以及時間，需要耗時 7~14 天才能完成檢測，所以在急性爆發期無法提供快速的實驗室診斷報告。依據疾病管制署 2017 年 7 月公告最新標準[5]，在下列疫情狀況下，建議幼兒園、托嬰中心等學前教托育機構採取停課措施：1. 衛生福利部疾病管制署公布當年度發生腸病毒 71 型流行疫情：當機構內同一班級在一週內有兩名以上 (含兩名) 幼童經醫師診斷為腸病毒感染 (手足口病或疱疹性咽峽炎) 時，該班級應停課 7 天。2. 當年度無腸病毒 71 型流行疫情，但機構所在的鄉鎮市區，若當年度曾由衛生福利部疾病管制署公布有「腸病毒 71 型檢驗陽性個案」或「年齡在 3 個月以上的腸病毒感染

併發重症個案」時，當機構內同一班級在一週內有兩名以上(含兩名)幼童經醫師診斷為腸病毒感染(手足口病或疱疹性咽峽炎)時，該班級應停課7天。停班課政策的標準是依靠臨床診斷而不是實驗室診斷，可能導致不必要的停課，並造成整個社會的負擔。因此，當務之急是實驗室發展出快速檢測腸病毒型別的方法，以防止過度的停課，以及不必要的恐慌。

腸病毒感染的檢測方法

目前開發快速檢測腸病毒的方法，主要是利用聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)的分子檢測及血清IgM抗體檢測，主要應用在住院病人以及門診病人上[6-9]，和傳統VI-IFA方法相比，可節省更多時間且靈敏度更高，但只能針

對單一血清型別(表一)。

除此之外，目前正發展一個新型的分子檢測方法-保留簡併性雜交寡核苷酸引子(CONSensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer, CODEHOP)，可以同時檢測和鑑定所有的腸病毒型別以及親緣相近的一些病原體。此外，CODEHOP可以擴增腸病毒序列中具有高度變異性的基因(VP1)而不是保守區域(5'NTR)，因此相較於以往的分子檢測法，更有效率可以區別腸病毒的血清型[9]。腸病毒血清型傳統是以動物抗血清來分型，最近研究發現：依據腸病毒的VP1基因序列做親緣分析與血清抗體分型得到的結果非常一致[10]。因此VP1-CODEHOP分子檢測法，可以利用臨床檢體來診斷腸病毒血清型，取代早期利用5'-UTR PT-PCR的分子檢測方法[12]。

表一 目前腸病毒感染的檢驗方法比較

方法	優點	缺點
Virus isolation/IFA	可以提供病毒做進一步分析	低靈敏度；耗時；需要專業的人力操作；需要儲備多型單株抗體
Nested RT-PCR	靈敏度高；節省時間	需要專業的人力操作；不同血清型或基因型需設計多組不同引子
CODEHOP RT-PCR	靈敏度高；節省時間	需要專業的人力操作；需要定序
Serology: neutralizing antibody	靈敏度高；特異性高	需要專業的人力操作；需要配對血清
Serology IgM	快速診斷	偽陽性高；發病前三天高偽陰性；不易同時檢測不同血清型

酵素免疫分析法 ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay;

免疫螢光染色法 IFA = immunofluorescence assay ;

反轉錄聚合酶連鎖反應 RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction ;

保留簡併性雜交寡核苷酸引子 CODEHOP = COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer

利用 CODEHOP 進行腸病毒偵測

國衛院與長庚兒童醫院從 2006 年開始進行嬰幼兒世代追蹤研究，收集了北台灣孩童的臨床檢體[12-14]。在世代追蹤研究中，如果參與計畫的兒童發生疑似腸病毒的臨床症狀 (HFMD 和 herpangina)，則將這些參與計畫的孩童採樣取得咽喉拭子樣本，進行病毒分離。在腸病毒流行季節有時候，小兒科醫生也採集一些非特異性免疫反應，例如：發燒的兒童的咽喉拭子，用來進行病毒分離。參與世代追蹤計畫的孩童同時也定期採集血清檢體，採集的時間分別為：新生兒出生時 (臍帶血)，以及 6, 12, 24, 36, 48, 60 和 72 個月。從 2008 年到 2012 年，總共提供 431 例咽喉拭子，其中 346 例也提供了在發病前後採集的配對血清樣品。

此研究進行傳統 VI-IFA 方法以及 VP1-CODEHOP 方法的比較。2008~2012 年此 5 年間，共蒐集了 431 名診斷為 HFMD (105 例)，Herpangina (255 例) 和其他 (包括非

特異性發燒或有呼吸道疾病) 兒童 (71 例) 的咽喉拭子。在 431 例中，經過 VI-IFA 和 VP1-CODEHOP 檢測陽性的檢體數量為 208 例 (48%) 和 250 例 (58%) (表二)。總體而言，比較兩法之間的一致性和不一致的比例分別為 87.5% (377/431) 和 12.5% (54/431) ($p < 0.0001$, McNemar 測試)。

在使用 VI-IFA 方法檢測到腸病毒的 208 例中，有 6 例是 VP1-CODEHOP 陰性，其中 4 例提供配對進行血清血清中和試驗驗證，3 例與 VI-IFA 一致，1 例無法確認。在 VP1-CODEHOP 陽性的 250 例中，有 48 例是 VI-IFA 陰性，其中 35 例提供配對進行血清血清中和試驗驗證，均與 VP1-CODEHOP 一致。在兩項檢測法測出陽性的 202 例中，192 例血清型結果一致，而 10 例則血清型結果不一致，其中有 8 例進一步完成血清中和試驗驗證，2 例與病毒分離一致，5 例與 VP1-CODEHOP 一致，1 例無法確認。總體而言，在 VI-IFA 和 VP1-CODEHOP 檢測結果不一致

表二 2008~2012 年比較兩種腸病毒檢測方法的陽性率[15]

	VI-IFA		VP1-CODEHOP	
	n/N	%	n/N	%
2008	18/61	29.5%	22/61	36.1%
2009	21/49	42.9%	26/49	53.1%
2010	89/160	55.6%	112/160	70.0%
2011	40/86	46.5%	47/86	54.7%
2012	40/75	53.3%	43/75	57.3%
Total	208/431	48.3%	250/431	58.0%

的病例中，47 例提供配對血清進行驗證，與 VI-IFA 和 VP1-CODEHOP 一致的病例分別為 5 例 (11%，95% 信賴區間 1~19%) 和 40 例 (85%，95% 信賴區間 75~95%)。綜合比較結果顯示，VP1-CODEHOP 比 VI-IFA 對於偵測腸病毒有更高的靈敏度和可信度。

總體而言，在 2008~2012 年台灣北部利用 VI-IFA 和 VP1-

CODEHOP 兩種檢測法分別偵測到 13 種和 15 種腸病毒血清型。值得注意的是，只有 VP1-CODEHOP 法檢測出克沙奇 B2 (CVB2) 和伊科 30 (Echo30) 兩種血清型。表三呈現 2008~2012 年北台灣用兩種方法檢驗出排名前 5 名的腸病毒血清型，顯示兩種測驗的總體血清型大致相似。此外，CVA2，CVA4，CVA6，CVA10，CVA16 和 EV71 是最流行的

表三 2008~2012 年北台灣用兩種方法檢驗出排名前 5 名的腸病毒血清型[15]

檢測方法	第一名	第二名	第三名	第四名	第五名
2008 年病毒分離法 (N=18)	CVA2 (39%, 7)	EV71 (22%, 4)	CVA10 (17%, 3)	CVA5; CVA16; CVB4; CVB5 (6%, 1)	
2008 CODEHOP (N=22)	CVA2 (41%, 9)	EV71 (32%, 7)	CVA10 ; Rhino (9%, 2)	CVA5; CVA16; CVB4; CVB5 (5%, 1)	
2009 年病毒分離法 (N=21)	CVA6 (43%, 9)	CVA10 (29%, 6)	CVA4 (19%, 4)	CVA5; CVB1 (5%, 1)	
2009 CODEHOP (N=26)	CVA6 (38%, 10)	CVA10 (23%, 6)	CVA4 (15%, 4)	CVA5 (12%, 3)	EV71 (8%, 2)
2010 年病毒分離法 (N=88)	CVA16 (45%, 40)	CVA6 (25%, 22)	CVA4 (12%, 11)	CVA5 (9%, 8)	EV71 (3%, 3)
2010 CODEHOP (N=110)	CVA16 (41%, 46)	CVA6 (30%, 34)	CVA4; CVA5 (10%, 11)		EV71 (4%, 4)
2011 年病毒分離法 (N=40)	CVA10 (43%, 17)	CVA9 (13%, 5)	CVA16 (10%, 4)	CVA4; CVA5 (8%, 3)	
2011 CODEHOP (N=47)	CVA10 (45%, 21)	CVA4 (12.5%, 6)	CVA5; CVA9 (11%, 5)		CVA6; CVA16 (6%, 3)
2012 年病毒分離法 (N=40)	EV71 (65%, 26)	CVA2 (25.0%, 10)	CVB3 (8%, 3)	CVA10 (3%, 1)	
2012 CODEHOP (N=43)	EV71 (63%, 27)	CVA2 (26%, 11)	CVB3; CVA10 (5%, 2)		
2008~2012 年病毒 分離法 (N=207)	CVA16 (22%, 45)	EV71 (16%, 34)	CVA6 (16%, 33)	CVA10 (13%, 27)	CVA2; CVA4 (9%, 18)
2008~2012 CODEHOP (N=248)	CVA16 (20%, 50)	CVA6 (19%, 47)	EV71 (16%, 40)	CVA10 (12%, 31)	CVA2; CVA4 (9%, 21)

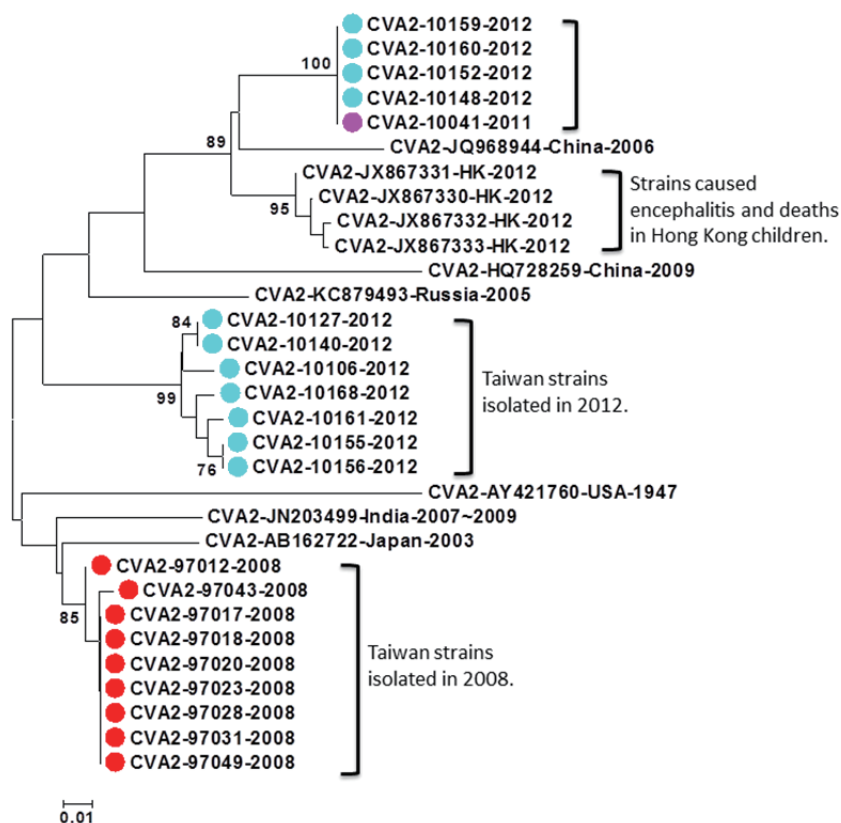
血清型，它們各自在不同的年份造成流行。

演化樹親緣分析

利用 VP1-CODEHOP 法可以獲得擴增的 VP1 基因的部分序列，將檢體得到的部分 VP1 序列去做演化樹分析，亦可得到基因分型結果。台灣常見的血清型 CVA2，利用 VP1-CODEHOP 法總共偵測到 21 個案例，其中包括 2008 年的 9 個，2011 年的 1 個，還有 2012 年的 11 個。根據演化樹分析區分了三群不同的基因

群。第一群包括 2008 年檢測到的 9 株病毒在演化樹分析上與 2003 年在日本流行的 CVA2 病毒株親緣相近。第二群包括 2012 年檢測到的 7 株病毒在演化樹分析上與 2005 年在俄羅斯流行的 CVA2 病毒株親緣相近。第三群包括 5 株在 2011~2012 年檢測到的病毒株與 2012 年在香港造成重症且伴隨神經併發症的 CVA2 病毒株親緣上非常相近(圖一) [14]。但是，所有 CVA2 案例在本研究中皆為輕症，沒有伴隨嚴重的神經併發症。

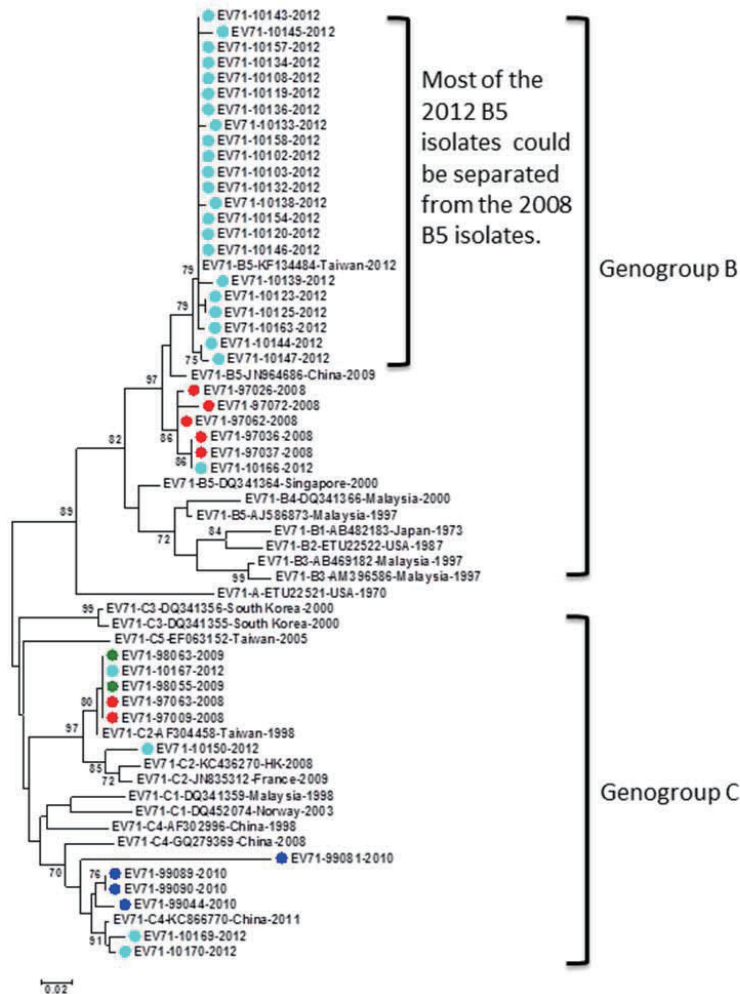
本研究中，EV71 血清型利用 VP1-CODEHOP 法總共偵測到 40 個



圖一 利用 VP1-CODEHOP 得到的部分 VP1 序列和 CVA2 參考株做演化樹分析得到的 CVA2 演化樹圖[15]

案例，其中包括 2008 年的 7 個，2009 年的 2 個，2010 年的 4 個，還有 2012 年的 27 個，全部案例均無引發神經併發症。根據演化樹分析結果，EV71 可區分出兩大基因型 (B 和 C) (圖二)。分析結果 28 株為 B5 基因型，其中 2008 年為 5 株，2012 年檢測到的大多數基因型 B5 病毒可進一步分類為亞型 B5c 型，與 2008 年檢測到的基因型 B5 型病毒在演化樹上

已有差異。令人驚訝的是，在 2008 年，2009 年和 2012 年零星發現的 6 株病毒株為基因型 C2 型，而 C2 型在 1998 年曾造成台灣大規模的流行，但從 1999 年至 2007 年在台灣並無發現[14]。另外 6 株被分析為基因型 C4 型和 2008 年後在中國大陸流行的 C4 病毒株具有高度親緣相關 (圖二)。本研究中利用部分 VP1 序列作的 EV71 演化樹分析的結果與其他相



圖二 利用 VP1-CODEHOP 得到的部分 VP1 序列和 EV71 參考株做演化樹分析得到的 EV71 演化樹圖[15]

關研究利用全長序列做演化樹分析的結果完全一致[16,17]。

結 語

腸病毒有超過 100 種血清型，使得實驗室診斷非常具有挑戰性。傳統 VI-IFA 是耗時且耗力的，而且無法檢測出新的血清型。VP1-CODEHOP 檢測比 VI-IFA 更靈敏和省時，且可直接應用於臨床樣本的檢測和血清分型。在這項研究中，我們對於 431 例案例進行兩種方法的比較，如預期 VI-IFA 的檢出率低於 VP1-CODEHOP (48% vs. 58%)。在用配對血清進行中和試驗驗證後，我們進一步證實了 VP1-CODEHOP 的高準確度。

總體而言，VP1-CODEHOP 比 VI-IFA 具有多重優點。但是，病毒分離法不能完全被取代，因為病毒分離仍然是進行病毒學研究以及完整基因序列及基因研究所必需的。因此，最好方式為 VP1-CODEHOP 作為腸病毒偵測的第一道檢測。然後，利用 CODEHOP 檢測到臨床樣本陽

性的病例或獨特的血清型再進一步選擇進行病毒分離。最近世界衛生組織 (WHO) 已正式推薦 VP1-CODEHOP 為腸病毒偵測的工具[18]。

在台灣，EV71 是目前最具破壞性的腸病毒型別。由於 EV71 疫苗和抗病毒藥物尚在研究階段，減少病童和健康兒童之間的接觸成為目前預防 EV71 感染和神經併發症的最重要的防預措施。目前台灣防止腸病毒嚴重感染的相關策略，為根據臨床診斷對幼兒園和小學學齡兒童實施進行停課 5~7 天的措施。2010~2013 年期間，台灣地區約有 4,000~6,000 個班級停課，以防止腸病毒流行 (表四)。令人驚訝的是，2010 年和 2013 年僅僅發現了零星偶發的腸病毒相關的重症病例，但在這兩年之內，停課了 5,000 多個班級。5~7 天的停課可能會對一個家庭造成嚴重的困擾，並會對社會造成負擔，社會成本的增加。如本報告所呈現，VP1-CODEHOP 法可第一時間用於判斷停課時間長短的依據。目前，VP1-CODEHOP 法可於一般具常規設備的分生實驗室完成檢

表四 台灣 2010~2013 年腸病毒停課統計[20]

年代	重症病例*	EV71 重症病例*	疾管署合約實驗室		停課班級數
			腸病毒病例	EV71 確診病例	
2010	16	12 (75%)	2,636	51 (1.9%)	5,857
2011	59	59 (100%)	2,172	349 (16.1%)	3,114
2012	153	144 (94%)	1,744	923 (52.9%)	6,033
2013	12	6 (50%)	1,454	22 (1.5%)	5,736

資料來源：台灣衛生福利部疾病管制署。

*不同年分所使用的檢驗方法不盡相同，實驗數據僅供參考

測，其單次材料成本低於 20 美元，與每年因不必要的停課而引起的直接和間接社會成本相比，建立 VP1-CODEHOP 決策平台會具有成本效益 [19]。

參考文獻

1. Lee MS, Tseng FC, Wang JR, et al: Challenges to licensure of enterovirus 71 vaccines. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:e1737.
2. Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al: Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 2010;10:778-90.
3. Wu TS, Shih FY, Yen MY, et al: Establishing a nationwide emergency department-based syndromic surveillance system for better public health responses in Taiwan. *BMC Public Health* 2008;8:18.
4. Chuang JH, Huang AS, Huang WT, et al: Nationwide Surveillance of Influenza during the Pandemic (2009-10) and Post-Pandemic (2010-11) Periods in Taiwan. *PLoS One* 2012;7:4:e36120.
5. 台灣衛生福利部疾病管制署網頁 (2017, 7 月 3 日)。摘自 <http://www.cdc.gov.tw/professional/info.aspx?treeid=5784355bfd011a1c&nowtreeid=620C434DA44379D8&tid=53CB10044A847D21>
6. Tsao LY, Lin CY, Yu YY, et al: Microchip, reverse transcription-polymerase chain reaction and culture methods to detect enterovirus infection in pediatric patients. *Pediatr Int* 2006;48:5-10.
7. Vuorinen T, Vainionpää R, Hyypia T: Five years' experience of reverse-transcriptase polymerase chain reaction in daily diagnosis of enterovirus and rhinovirus infections. *Clin Infect Dis* 2003;37:452-5.
8. Wu Y, Yeo A, Phoon MC, et al: The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains. *Int J Infect Dis* 2010;14:e1076-81.
9. Chiang PS, Huang ML, Luo ST, et al: Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS One* 2012;7:e48269.
10. Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S: CODEHOP (Consensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 2003;31:3763-6.
11. Pallansch M, Roos RP: Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. 5th ed. New York: Raven Press 2007:839-93.
12. 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;44:2698-704.
13. Luo ST, Chiang PS, Chao AS, et al: Enterovirus 71 maternal antibodies in infants, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2009;15:581-4.
14. Yip CC, Lau SK, Woo PC, et al: Recombinant coxsackievirus A2 and deaths of children, Hong Kong, 2012. *Emerg Infect Dis* 2013;19:1285-8.
15. Chung WY, Chiang PS, Luo ST, et al: A Molecular Approach Applied to Enteroviruses Surveillance in Northern Taiwan, 2008-2012. *PLoS One* 2016;11:e0167532.
16. Chia MY, Chiang PS, Chung WY, et al: Epidemiology of enterovirus 71 infections in Taiwan. *Pediatr Neonatol* 2014;55:243-9.
17. Huang YP, Lin TL, Lin TH, et al: Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLoS One* 2013;8:e80942.
18. World Health Organization. Enterovirus surveillance guidelines. Guidelines for enterovirus surveillance in support of the Polio Eradication Initiative. 2015:40.
19. World Health Organization. A Guide to Clinical Management and Public Health Response for Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD) Geneva: WHO; 2011.
20. 台灣衛生福利部疾病管制署傳染病統計資料查詢系統：https://nidss.cdc.gov.tw/ch/EVNOSCHOOL_query_page.aspx?dc=EVNOSCHOOL&dt=4&disease=1&position=5