

計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000108

衛生福利部疾病管制署 104 年署內科技研究計畫

計畫名稱：台灣腸病毒監測與分子流行病學研究

年度/全程研究報告

執行單位：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳芳姿、黃元品

研究人員：吳和生、林翠莉、林智暉、葉庭愷

執行期間： 104 年 01 月 01 日至 104 年 12 月 31 日

目 錄

計畫中文摘要.....	1
計畫英文摘要.....	4
前言.....	6
材料與方法.....	14
結果.....	23
討論.....	32
結論與建議.....	37
參考文獻.....	39
圖表.....	46

中文摘要

關鍵詞：人類腸病毒 A 群、克沙奇 B 群、再浮現、重組、基因性、免疫
抗原性、演化、親緣系統樹

人類腸病毒係屬於微小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*)、腸病毒屬(*Enterovirus*)之病毒。腸病毒的構造很小，其直徑大小約 20~30 nm，為不具外套膜(nonenveloped)呈現立體對稱的正二十面體結構；依據疾病管制署病毒病原體監測資料(<http://www.cdc.gov.tw>)顯示在時序的變遷中，有著不同的腸病毒群在流行，平均每年可監測出約有 15~20 型腸病毒共同循環流行於台灣地區；部份血清型可經年累月持續著，當中的 *Enterovirus A species* 在台灣地區呈現常態性(endemic)的流行，包括 *Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10, 16* and *EV71* 等型別；*Coxsackievirus B 群*屬於 *Enterovirus B species*，在台灣則呈現再發生(Recurrence)。

腸病毒七十一型自 1998 年在台灣地區爆發流行後，即持續性地存在，在這 15 年中已常態性流行於台灣地區。腸病毒七十一型目前共分 A, B, C 和 D 四個基因型及 13 個基因亞型(B0, B1~B5, C0, C1~C5 及 C2-like 等)，台灣地區計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋八個 lineages (C2, C4a, C4b, C5, C2-like, B4, B5a, B5b) 被偵測到，目前大部份造成流行的基因亞型皆在流行前先出現散發型(sporadic)病例，而後成為流

行時期之最主要基因型別；1998 年主要流行型別為 C2 基因亞型、1999~2003 年為 B4 基因亞型、2004~2005 年為 C4 基因亞型、2008 年為 B5b 基因亞型、2011~2012 年 B5c 基因亞型及 2013 年 B5x 基因亞型。

腸病毒在時序的變遷中受突變及重組等因素的影響，出現新的基因型或亞型，當累積至一定的程度，即可能會帶來另一波的流行，此時的疾病嚴重程度及該血清型在臨床上的表徵都可能改變。持續進行腸病毒七十一型的監測及其免疫抗原性的及時監測，將有助於整體流行趨勢及疫苗保護力之評估。分析腸病毒的臨床分離株的結構區及非結構區的基因，可推估在自然循環下人類腸病毒演化的速率及重組間的關係，並追溯這些常態流行的血清型在相同地域走過的軌跡外，更重要的是提供未來變化的預警進而有所防範。

本研究持續建立動態化 HEV-A species 及 Coxsackievirus B 群分子流行病學監測網有助於及時監測台灣地區腸病毒，其目標為：

1. 建構動態性 HEV-A species 及 Coxsackievirus B 群分子流病監測網
2. 建構台灣地區 1998~2014 年 HEV-A species(CVA2, 4, 5, 6, 10, 16 及 EV71 等血清型)及 CoxsackievirusB 群(CB1-5)親緣系統樹 (Phylogenetic Tree)；
3. 及時監測單一血清型基因型之多樣性(emerging genogroup or

subgenogroup) ;

4. 追溯 HEV-A species 共同循環下重組發生之演化；
5. 腸病毒七十一型基因性與免疫抗原性動態監測；
6. 累積本土化腸病毒群分子流病資料以接軌國際。

英文摘要

keywords : Human Enterovirus A species, Coxsackievirus B group,
Re-emerge, Recombination, Genetic, Antigenicity,
Evolution, Phylogenetic tree

Human enteroviruses (HEVs) belong to the family *Picornaviridae* and genus *Enterovirus*. HEVs are non-enveloped particles of about 20-30 nm diameter, and with an icosahedral capsid. Based on the surveillance results provided by Taiwan Centers for Disease Control (<http://www.cdc.gov.tw>), several serotypes of HEV have been circulating in Taiwan for many years. Endemic circulation of the species Enterovirus A (HEV-A) (e.g., Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10, 16 and EV71), and recurrence of the species Enterovirus B (HEV-B) (e.g., Coxsackievirus B) was observed.

EV-71 outbreaks have been observed in Taiwan since 1998, and it was a re-emerging pathogen. EV-71 circulated in Taiwan over the past 15 years, and was composed of 4 genogroups (A, B, C, D) and 13 subgenogroups (B0, B1~B5, C0, C1~C5 and C2-like). Eight lineages (C2, C4a, C4b, C5, C2-like, B4, B5a, B5b) in 6 subgenogroups (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5) have been identified in Taiwan. The dominant subgenogroups were usually sporadic prior to circulation, e.g., C2 subgenogroup in 1998, B4 in 1999-2003, C4 in 2004-2005, B5 in 2008. In contrast, genetic drifts were observed in 2009-2012, from C4a-1 (2004-2005) to C4a-2 (2010-2011), and from B5b (2007) to B5c (2011-2012).

Since the mutation and recombination frequently occur in HEV, it is not

surprised to discover new genogroups or subgenogroups. These genetic changes may cause another outbreak, and may affect the clinical symptoms. To continue the surveillance system of EV-71 and detection of its antigenicity will be helpful of understanding of EV71 endemic trend and evaluation of protection of candidate vaccines. The surveillance of antigenicity is needed to evaluate the vaccine efficacy. By analyzing the structural and non-structural protein gene, we could estimate the viral evolutionary rates, the relationships in recombinants, and the predictions of future changes. The surveillance system of HEV-A and Coxsackievirus B would be helpful to monitor the HEV circulation, antibody production, and the correlations among virus, host and environment.

In this project, we plan to

1. establish the surveillance system of HEV-A and Coxsackievirus B;
2. perform the phylogenetic analysis of Taiwanese HEV-A from 1998 to 2014;
3. monitor the genetic diversity in a specific serotype/genotype;
4. monitor the recombination and evolution of HEV-A;
5. dynamic surveillance of antigenicity and genicity of EV-71;
6. collect molecular epidemiological data.

前言

人類腸病毒係屬於微小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*)、腸病毒屬(*Enterovirus*)之病毒。腸病毒的構造很小，其直徑大小約 20~30 nm，為不具外套膜(nonenveloped)呈現立體對稱的正二十面體結構。其基因的組成是單股、正性的 RNA，基因組大小接近 7.5Kb，從 5'端至 3'端的順序分別為：5'-NCR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A(protease)、2B、2C、3A、3B、3C、3D(RNA polymerase)及 3'-NCR，VP1-4 屬於結構性蛋白的區域(P1)；2A(protease)、2B、2C、3A、3B、3C、3D(RNA polymerase) 為非結構性蛋白區域(P2-P3)[1]。5'-NCR 約有 750 個核苷酸，在基因之演化上為高度保守區域，VP4 和病毒 RNA 的穩定性有關，VP1-3 是和細胞接受器的結合及抗體結合有關，其中 VP1 不僅是中和抗體主要作用之區域，亦是基因序列中變化較大之區域 [2-3]，由於該病毒沒有外套膜(Envelope)，所以可以抵抗有機溶劑如酒精及氯仿等，並在酸性狀況下可維持其活性。人類腸病毒最初依據引起人類疾病的種類、病毒毒力及顱內注射吮鼠致病機轉為基礎分成 4 大類，分別為 1.小兒麻痺病毒(Polioviruses, PV；人類小兒麻痺症的致病因子；通常不會感染老鼠產生疾病。) 2.克沙奇 A 族病毒(Coxsackie A viruses, CVA；與人類的中樞神經系統疾病、皮疹與疱疹性咽峽炎有關;使老鼠出現無力肢體麻痺) 3.克沙奇 B 族病毒(Coxsackie B

viruses, CVB；與人類的中樞神經系統疾病與心臟疾病有關；使老鼠出現痙攣性癱瘓) 4.伊科病毒(Echoviruses, E；最初並不知道會引發人類產生疾病；不會感染老鼠)；現依分子生物學之特性腸病毒屬可分為 12 個種(species)，分別為 *Enterovirus A*，包括 CVA2~CVA8, CVA10, CVA12, CVA14, CVA16 與 EV71, EV76；*Enterovirus B*，包括 CVA9, CVB1~CVB6, E1~E7, E9, E11~E21, E24~E27, E29~E33, EV69, EV73, EV74, EV75, EV77, EV78；*Enterovirus C*，包括 CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17, CVA19~CVA22, CVA24 與 Poliovirus 1~3；*Enterovirus D*，包括 EV68 與 EV70；*Enterovirus E*；*Enterovirus F*；*Enterovirus G*；*Enterovirus H*；*Enterovirus J*；*Rhinovirus A*；*Rhinovirus B* and *Rhinovirus C* [4-6]。

台灣地區每年可以監測到腸病毒的血清型或基因型平均為 15~20 型共同流行於台灣地區，部份血清型可經年累月持續著，如克沙奇 A2, 4, 5, 6, 10, 16 及腸病毒七十一型，這些型別皆屬於 *Enterovirus A* species，並在台灣地區呈現常態性(endemic)的流行，不僅為歷年(1998~2014)最主要的流行血清型，並逐年皆可監測該型別的存在；另克沙奇 B 群病毒(*Coxsackievirus B*)群病毒歸屬 *Enterovirus B* species，除 CB6 自 1998 年起未曾在台灣地區被監測出，其餘的型別 CB1~CB5 呈現再發性(Recurrence)的流行，腸病毒的流行往往並非單一血清型別的病毒，而是由好幾種血清

型別的病毒在交互流行，它不但反應出病原體、宿主及環境的特性，也包括傳染模式，每一種傳染模式不僅反應病原體的特性，也決定了流行病學上及臨床上的表現。

克沙奇病毒 B 群主要造成新生兒及嬰幼兒感染，尤以 CB1 及 CB3 容易造成新生兒感染；而 CB2、CB4 及 CB5 也常見感染於歲數較小的嬰兒，CB1 及 CB3 較常見於呼吸道檢體，CB2、CB4 及 CB5 則較常見於腦脊髓液(CSF)檢體，與症狀的發生關聯。克沙奇 B 族的感染症狀大多會出現無菌性腦膜炎、心肌炎等症狀，並可能造成全身性的感染重症的發生。這些血清型在台灣地區流行的週期中，以 CB3 出現時的流行幅度及造成重症及死亡的個案最為顯著，如 2005 年；另自 2008 年起即已開始偵測出 CB2、CB3 及 CB4 等血清型，使用行之已久之單株抗體進行間接免疫螢光染色，無法順利偵測到病毒，顯示病毒的抗原性的改變，與台灣常態流行多種型別之腸病毒共同循環下血清型有不可分的關聯性。

CB1-CB5 出現的症狀如下表所示

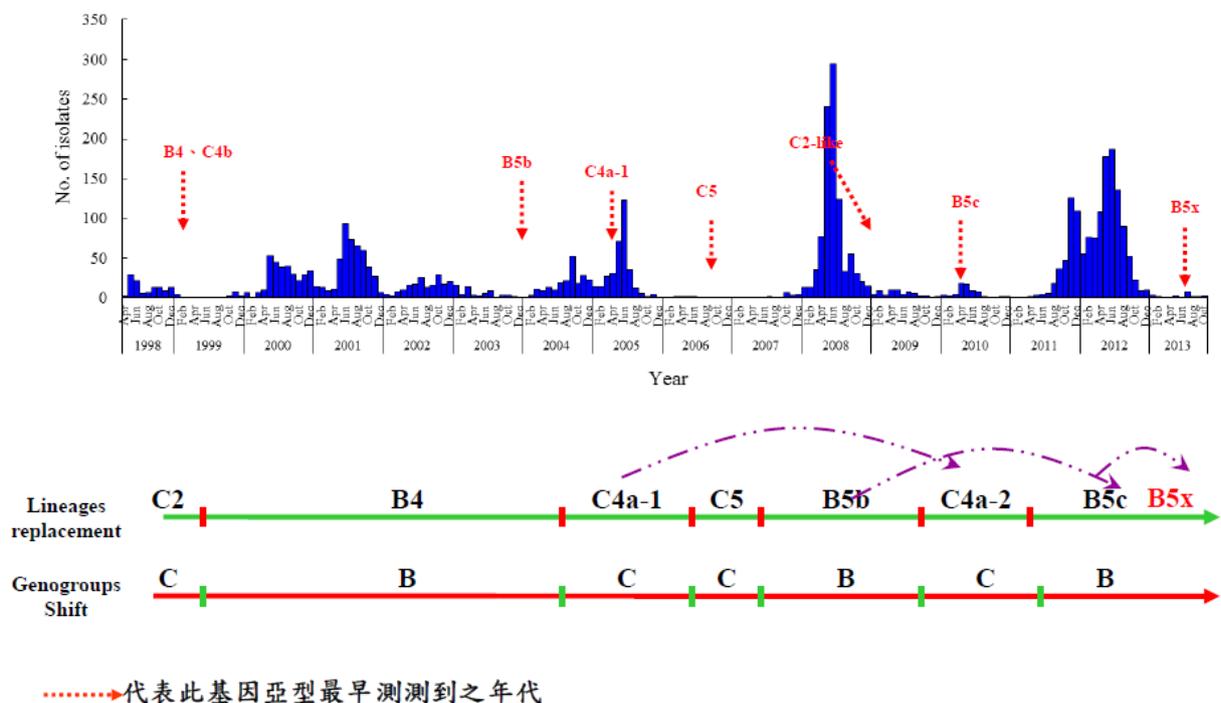
CB1	aseptic meningitis, meningoencephalitis, myocarditis, hand, foot, and mouth disease, pleurodynia, systemic neonatal illness sometimes presenting as fulminant hepatitis with coagulopathy
CB2	aseptic meningitis, myocarditis, neonatal systemic illness
CB3	myopericarditis, aseptic meningitis, neonatal systemic illness, meningoencephalitis in immunodeficient persons, herpangina, rash

	illnesses
CB4	aseptic meningitis, encephalitis, myopericarditis, neonatal infections, febrile rash illnesses, respiratory manifestations
CB5	myopericarditis and neonatal systemic illness (encephalomyocarditis syndrome), aseptic meningitis, meningoencephalitis, acute flaccid paralysis

腸病毒七十一型自 1998 年在台灣地區爆發流行，亦是在腸病毒群中再度浮現的病原體 [15-16]；在這 15 年中已常態性流行於台灣地區。腸病毒七十一型目前共分 A, B, C 和 D 四個基因型及 13 個基因亞型(B0, B1~B5, C0, C1~C5 及 C2-like 等)，台灣地區計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)(附圖一)，涵蓋八個 lineages (C2, C4a, C4b, C5, C2-like, B4, B5a, B5b) 被偵測到，且流行於不同的年代；除 C5 and C2-like subgenogroups 外，目前大部份造成流行的基因亞型皆在流行前先出現散發型(sporadic)病例，而後成為流行時期之最主要基因型別，如 1998 年台灣流行腸病毒七十一型的基因亞型雖為 C2，但在當時即已偵測到 B4 and C4 二個基因亞型，隨即 B4 開始流行於 1999 年及 C4 流行於 2004 年，另 B5 基因亞型最早被偵測到是在 2003 年，至 2007 年即在台灣地區又造成另外一波的流行；相較於 2009~2012 年之間，腸病毒七十一型陸續的被偵測到不曾間斷過，所流行的基因亞型分別為 C4(2010~2011) and B5(2011~2012)，雖與 2004 及 2008 年流行的基因亞型相同，卻反應出時序變遷中基因亞型 genetic 的改變，即 2004~2005(C4a-1

subgenogroup) 轉變(drift)為 2010~2011(C4a-2 subgenogroup)及 2007(B5b) 轉變為 2011~2012(B5c subgenogroup)亞型[8-13]。腸病毒七十一型自 1998~2013 年已常態流行於台灣地區，計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋 9 個 lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c, B5x)，每一基因亞型伴隨著不同時序的流行，除 C5、C2-like 及 B5x 等基因亞型；這些基因亞型的出現反應出(1)源自於境外移入並在地化造成流行；(2)病毒基因重組；及(3)持續演化所造成；B5x 基因亞型於 2013 年 5 月份首度被監測，並於 6~8 等月份皆有其蹤跡，雖為散發性但顯示該亞型已循環於環境中，在人與人之間進行傳染並擴散在不同的地域。

1998~2013 年台灣地區腸病毒七十一型流行趨勢圖



目前 WHO 強調腸病毒七十一型的浮現對於整體西太平洋地區在公共衛生上是為重要議題，並預期在於未來可能有更多的 HFMD 個案是因腸病毒七十一型所引起的，該病原體自 1997 年開始大規模的流行於西太平洋地區後，其他的歐、美國家亦都已偵測到該病原體的存在，腸病毒七十一型的威脅是與日俱增且其流行或許將是全球性的[15-21]；台灣地區是最典型的反應出不同的基因亞型帶動著不同年代腸病毒七十一型的流行，且亞型流行時間較短，不同於中國大陸或是馬來西亞，皆為單一的基因亞型(C4 基因亞型)或基因型(B 基因型)為流行主要的基因型別；在這流行的過程中，不同基因亞型的多樣性、免疫抗原性及 herd immunity 三者之間牽引如何造成的平衡繼而影響整體流行規模的大小是需長期性監測與分析探討，所以本計畫亦持續針對該病原體持續進行基因性與免疫抗原性動態監測。

突變(Mutation)與重組(Recombination)是在腸病毒演化過程中的二個重要機制[22]，由於腸病毒本身是屬於單股的 RNA 病毒，本身又缺乏 RNA-dependent RNA polymerase proofreading 的功能，所以病毒在複製過程的 misinsertion rate 是相當的高。Recombination 是二個病毒株在同一單一細胞進行腸病毒複製時所發生的一種現象[23]，可分為 intra(同一血清型)及 inter(不同血清型) recombination，會發生在相同的 species 內[24]，腸病毒重組的現象是在 1962 年首度被記載的[10,17]，隨後陸續證明此現象在腸病毒群

是一個有意義且相當頻繁的事件[28,39,50]。文獻記載無論是小兒麻痺病毒疫苗或是野生株即已發生 Recombination 的現象，另更多的證據指向 Non-Polio Enterovirus(NPEV)亦會發生相同的狀況；如 CVB5, CVA9 及 Echo11 等血清型的 intra-recombination、Echo9 及 Echo18 標準株、CVB3 及 CVB4、Echo4, 7, 30 等分離株的 inter-recombination，這些發現顯示腸病毒的重組是普遍的且可獨立演化在不同的基因片段[25-31]。M. Staeveb Oberste 已對屬於 HEV-A species 的標準株(Prototype)進行全長的基因定序，利用親緣系統樹及 Simplot 的結果分析，部份 HEV-A species 的標準株(Prototype)即已有重組現象的發生，如 CVA6 (Gdula)和 CVA10 (Kowalik)及 CVA12 (Texas-12)發生在非結構區，這三個血清型在演化的過程中來自同一個祖先；而血清型 CVA4(High Point)、CVA14(G-14)及 CVA16(G-16) 位於 P2 和 P3 區域基因有著不同的相似性，這些顯示有二個或多個的重組事件是在發生在 P2 和 P3 區域(非結構區)，而在結構區部份保有原來的抗原特性。

由於在相同的時間與空間流行著多種腸病毒血清型，在共同循環下將可增加重組的機會，因此出現新的基因型或亞型事實上是預期的，可能與引發的疾病嚴重程度有關[32]或改變該血清型在臨床上的表徵[33-37]，當累積至一定的程度將會帶來另一波流行的警訊，前期計畫已進行 HEV-A species 中 CVA2, 4, 5, 6, 10, 16 及 EV71 不同血清型的建構，初步結果顯示這些流行

於台灣地區的血清型出現重組的頻率相當地高，如 CVA2 及臨床表徵由疱疹性咽峽炎轉變成不典型的手口足症，如 2013 年 CVA6 及 EV71 出現新的基因亞型等。

持續監測不同腸病毒流行的消長及建立動態化的 HEV-A species 及 Coxsackievirus B 群分子流行病學監測網則有助於及時的監測台灣地區腸病毒；進一步分析台灣地區腸病毒群臨床分離株的結構區及非結構區的基因，可推估在自然的循環下人類腸病毒的演化及重組的關係，並追溯這些流行的血清型在相同的地域走過的軌跡外，進一步了解病原體在相同的地域所表現的親緣關係[29-31]，更重要的是提供未來的改變繼而對預防而有所防範。

材料與方法

一. RD 細胞株繼代培養 [38-41]

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 10cc 10% DMEM 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm² 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 10cc 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 培養基衝散細胞。
11. 計算細胞數目。
12. 稀釋每 1CC 含有 1X10⁵ 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。

二. 微漿菌之測定(Mycoplasma Detection) (採用 ATCC 之試劑套組)

1. 取至少經繼代二次而未加抗生素之細胞且不經 trypsin-EDTA 處理。
2. 於 4 °C 下離心 20 分鐘 12000xg，並去除上清液。
3. 加入 100ul 的 Lysis Buffer 混合均勻。
4. 加熱 95 °C 10 分鐘。
5. 取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)。
6. 加入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1unit)Taq polymerase。
7. 混合均勻離心。
8. 94°C 2 分鐘。
9. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)。
10. 由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5ul。
11. 放入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1uit)Taq polymerase。
12. 混合均勻離心。
13. 94°C 2 分鐘。

14. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ;
Extention : 72°C , 60 秒) 。

15. Hold 4°C 。

16. 取出第二階段 PCR 產物 10ul 以電泳分析觀察最後結果。

三. 病毒株增量[42]

1. 將已發育完成在 150 flask 中的 RD 細胞之培養基液體丟棄
2. 以 PBS 緩衝液清洗細胞表面，將病毒株欲適量接種於 RD 細胞株
上
3. 置入 36°C 二氧化碳培養箱培育 1 小時，每間隔 15 分鐘搖晃培養
瓶
4. 加入僅含抗生素的 DMEM 維持培養基，置於 36°C 二氧化碳培養
箱繼續培養
5. 接種細胞呈現 4 價細胞病變 (CPE) 時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、
解凍二次
6. 4°C ，2100 g 離心 15 分鐘
7. 將上清液移至耐氯仿的離心瓶中，放入適量的玻璃珠及體積十分
之一氯仿強烈振盪十分鐘

8. 4°C，2100g 離心 15 分鐘，吸取上清液經紫外線燈之照射後，並分裝於密閉安瓶以作為動物基礎免疫使用。

四. Viral Titration and Determination of CCID50[43-44]

1. 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。
2. 取已增量之標準株上清液 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 10⁻¹ 至 10⁻⁸ 每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50ml 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100ml 細胞維持培養基。
3. 置入 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
4. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
5. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (CCID50)。

五. 中和抗體效價測定 [45-48]

1. 將抗血清稀釋為 1:8，於 56°C 加熱 30 分鐘
2. 經 56°C 加熱處理過之抗血清以含 2% 胎牛血清之細胞培養液做 1:8x 系列稀釋
3. 加入病毒液 100 TCID50 為中和劑量
4. 攻擊病毒之濃度測定以 100 TCID50 再作 10⁻¹~10⁻³ 系列稀釋
5. 放置 36°C，CO₂ 培養箱中和作用 1 小時

6. 再加入 100 μ l (5×10^4 細胞) 細胞懸浮液，置 36°C，CO₂ 培養箱培養
7. 翌日以倒立顯微鏡觀察 CPE，連續觀察 4 天。第 4 天判定血清中和抗體效價，即對照細胞形態正常，攻擊病毒量在 32~1000 TCID₅₀ 之間
8. 計算中和抗體效價

六. RNA Extraction 病毒 RNA 萃取(採用 **QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit** (Cat.No. 52906))

1. 取 560 μ l AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內
2. 加入 140 μ l 檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘
3. 加入 560 μ l 100% 絕酒精，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 μ l Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘
6. 加入 500 μ l Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘
7. 加入 60 μ l Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體

七. RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) [49]

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入同一微量管內

RNA 抽取物	5 μ l
R' Primer	3 μ l
F' Primer	3 μ l
ddH ₂ O	11 μ l

2. 利用 PCR 機器加熱 70°C，10 分鐘

3. 加入下列試劑

2X RT-PCR Buffer	25 μ l
Taq DNA Polymerase	1 μ l
Reverse Transcriptase	1 μ l
RNASEOUT	12 μ l

4. 放入 PCR 機器

設定條件如下:

42°C，50 分鐘

95°C，3 分鐘

94°C，30 秒

48°C，1 分 30 秒

40 個循環

72°C，1 分 30 秒

72°C，7 分鐘

4°C， ∞

5. 全長基因序列採用引子

name	Sequence	start	End
294	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC	1	24
295	CACCGGATGGCCAATCC	645	629
EVP2	CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA	449	472
OL68-1	GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC	1198	1179
141	CTCGGATCCATGGGRGCWCARGTDTCAAC	743	762
284	AGIGTITKISWIATCCANGG	2289	2270
141	CTCGGATCCATGGGRGCWCARGTDTCAAC	743	762
286	NGCITTICAYTGIACRTG	1291	1274
EV71-F2	TATGGTGAGTGGCCTTCATACTG	1053	1075
EV71-R2	AGTGAGTGTTACTGATCCATGGT	2241	2219
238	CCIGGIWSIAAYCARTTIYTNAC	1787	1809
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	2969	2951
06125-A	GTG CTT GAC GCT GGT ATC C	1443	1461
06125-B	CAT TAA GCT AGT GGC ATT CGT G	1910	1889
238	CCIGGIWSIAAYCARTTIYTNAC	1787	1809
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850
EV71-F3	TACACACCACCAGGAGGCCCT	2115	2136
EV71-R3	ACCAGCATAATTTGGGTTGGCT	3281	3260
486	TGGTAICARACIAAITWYGTIGTNCC	2297	2322
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	3408	3389
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG	2385	2403
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	2612	2631
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	3408	3389

EV4F	CARGTYTCHGTBCCRTTYATGTCACC	3005	3030
EV4R	GCTGTYTTBGMYTIRAYCCAUGC	4044	4022
06125-C	GAT GGG CAC GTT CTC AGT	3125	3142
06125-D	AAT ACG GTG TTT GCT CTT G	4436	4418
EV5F	YAACTCWMSAGAAARCACTAYCC	3526	3559
EV5R	GWSGAKGCAATSACAAACTTDGAKG	4743	4719
290	CCIGGIGAYTGIGGNGG	3701	3717
405	TIGAIACCATYTGRCARAA	4707	4691
EV71-F5	ATYAGYAAGTTYATTGAYTGGCT	4149	4171
EV71-R5	ACAACCTGCWACCACAGTRGCRAT	5278	5256
EV6F	CCWGAYCAYTTTGAYGGRTAYMARC	4559	4583
EV6R	AHCCRTACTGVVVCVACRTCHYC	5759	5738
329	CCiyTIRtITGYGGIAARGC	4923	4942
334	ATrTCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
EV7F	GTTGAGCGHCACYTSAAYAGAGY	5216	5238
EV7R	GYARRTCYAACCCATACTTRTCC	6395	6373
398	TAIAARYTITTYGCIGGIYTICARGG	5298	5323
334	ATrTCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
392	GGIRWIAAIGARCCIGCNGT	6042	6061
423	GCTATTCTGGTTATAACAAAYTYAC	7408	7384
392	GGIRWIAAIGARCCIGCNGT	6042	6061
424	CCGCACCGAAYGCGGAKAATTTAC	7400	7380
EV71-F8	GAGAAATT-TGTGAGTACAA	7227	7245
EV71-R8	AAGCAGTGGTAACAACGCAG-GTACT(30)VN-3') poly A 區		

八. 電泳分析

1. 利用 1X TBE buffer 泡成 1.5% Agarose gel
2. 加熱 3 分鐘完全溶解，待降溫至 50°C 左右，加至電泳 cassette 內，
放入齒狀物，待凝固後再取出齒狀物
3. 將凝固後的 gel 放入電泳槽內
4. 取 1~2 μ l 6X loading dye 與 8 μ l RNA 產物混合，加至 gel 孔洞內
5. 跑 100V，30 分鐘
6. 利用 EtBr 染色
7. 在 UV 下，觀察最後結果。

九. 演化樹(Phylogenetic tree)之分析 [50]

以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)操作。採用“Neighbor-joining”方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析。

結果

一. 疾病管制署自 1999 年開始常病毒監測，平均每年約有 15~20 型腸病毒共同循環流行於台灣地區；部份血清型可經年累月持續著，當中的 Enterovirus A species 在台灣地區呈現常態性(endemic)的流行，包括 Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10, 16 and EV71 等型別；Coxsackievirus B 群屬於 Enterovirus B species，則呈現再發生(Recurrence)及散發性在台灣地區的流行，除 CB6 自 1998 年起從未被檢測出外，其餘的型別 CV1~5 均曾被檢出，歷年各主要流行病毒型別如圖一。

二. 1998~2014 年台灣地區 EV-A species 親緣系統樹

本研究中挑選 477 株台灣地區腸病毒分離株，共同建構 VP1 區域 EV-A species 親緣系統樹，血清型包括 CV-A2、A4、A5、A6、A10、A16 及 EV-A71 等七型，每一血清型都是獨立形成一個 clade，Bootstrap value 皆為 99% (圖二)。

三. 1998~2014 年台灣地區 EV-A species 不同血清型親緣系統樹

以每單一腸病毒血清型別及其標準株建在 VP1 區域建立親緣系統樹，分別為：

1. CV-A2：可分為三個 lineage，分別為 lineage A、lineage B、lineage C。lineage A 僅有 prototype(CV-A2-Fleetwood, 1947)；lineage B 則

可再分為 lineage B-1(1998-1999, 2003-2008)以及 lineage B-2(1998, 2000, 2005,, 2009-2012)；lineage C(2008, 2010, 2013-2014) (圖三 A)。

2. CV-A4：可分為三個 lineage，分別為 lineage A、lineage B、lineage C。lineage A 僅有 prototype(CV-A4-High point, 1948)；lineage B 則可再分為 lineage B-1(2003-2004, 2006)以及 lineage B-2(1995, 1998-1999, 2003, 2005, 2009, 2011-2012)；lineage C 亦可再分為 lineage C-1(2002-2004, 2006)以及 lineage C-2(2007-2010, 2012-2014) (圖三 A)。
3. CV-A5：可分為三個 lineage，分別為 lineage A、lineage B、lineage C。lineage A 僅有 prototype(CA5-Swartz, 1950)；lineage B (2003-2004)；lineage C 可再分為 lineage C-1(2005-2007, 2009, 2011, 2013)以及 lineage C-2(2005, 2007-2013) (圖三 A)。
4. CV-A6：可分為兩個 lineage，分別為 lineage A、lineage B。lineage A 僅有 prototype(CA6-Gdula, 1949)；lineage B 則可再分為 lineage B-1(1998, 2001-2010)以及 lineage B-2(2010-2013) (圖三 B)。
5. CV-A10：可分為兩個 lineage，分別為 lineage A、lineage B。lineage A 僅有 prototype(CA-A10-Kowalik, 1950)；lineage B 則可再分為

lineage B-1(1998, 2002-2004, 2007-2009) 、 lineage B-2(1998-1999)

以及 lineage B-3(1999, 2005-2008, 2010, 2012-2014) (圖三 B) 。

6. CV-A16: 可分為兩個 lineage, 分別為 lineage A、lineage B。lineage A 僅有 prototype(CA16-G10, 1951); lineage B 則可再細分為 lineage B-1(1998, 2002-2004, 2007-2009) 、 lineage B-2(2008, 2012)以及 lineage B-3(1999, 2002-2003, 2005-2006, 2008-2014) (圖三 B) 。

四. EV-A species 3CD 親緣系統樹及 BCMC of phylogeny

EV-A species 3CD 親緣系統樹可分為 A 及 B 兩個 lineage。Lineage A 可再分為兩個 sub-lineage — A1 以及 A2; A1 lineage 包括 EV-A71(BrCr, 1969) 、 CV-A2(Fleetwood, 1947) 、 CA5(Swartz, 1950) 、 CA6(Gdula, 1949) 、 CV-A10(Kowalik, 1950)等 prototype 外, 另包含了臺灣本土的 EV-A species 中的 CA16(1998, 2004-2014) 、 EV-A71 B subgenogroup(1998, 2000-2003, 2007-2009, 2011, 2013) 、 CA5(2005-2012) 、 CV-A10(2006-2008, 2010-2014); A2 lineage 包括 CA8(Donocan, 1949)prototype 外, 另包含臺灣本土 EV-A71 C2(1998-1999)及 C5 subgenogroup(2006, 2010)以及 CA3(2009) 。

Lineage 亦可粗分為兩個 sub-lineage — B1 以及 B2; B1 lineage 包含 CA16(G-10, 1951)及 CV-A4(High point, 1948)兩株 prototype, 另包

含臺灣本土的 EV-A species 中的 EV-A71 C4a subgenogroup(1998, 2004, 2011)、CV-A2(1998-1999, 2003, 2005)、CA12(2003, 2008)；B2 lineage 可再分為三個細分支(B2a-B2c)，B2a 包含三個小分支，B2a-1 包含 CV-A2(2008, 2011-2012)、CV-A4(2002-2003)、CA5(2004)、CA6(2007-2009)、CA8(2006)、CV-A10(1998, 2002, 2004-2005, 2007, 2009)；B2a-3 包含 CV-A2(2009)、CA6(2004-2005, 2010-2012)。B2b 分支包含 CV-A2(2010, 2013)、CV-A4(2012)、CA5(2012)、CA8(2013)；而 B2c 分支則包含 CV-A2(2007-2008, 2011-2012)、CA3(2007)、CV-A4(2004, 2006, 2011-2012)、CV-A10(2011)以及 EV-A71 C2-like(2008)。相較於 A lineage，B lineage 呈現較高頻率的重組事件發生。(圖四、五)

五. 1998~2014 年台灣地區 CV-B 不同血清型親緣分析

選擇以再發性(Recurrence)血清型 CV-B1~5 型，進行 VP1 基因親緣性分析，初步結果顯示，隨著時序的變遷，這五個血清型發展成 3 lineages(含 prototype 在內)。這五種不同血清型的腸病毒標準株首度被分離時間為：(1)1948 年 CV-B1: Tueson, (2)1947 年 CV-B2: Ohio-1, (3)1949 年 CV-B35: Nancy, (4)1951 年 CV-B4, J. V. B. Benschoten, (5)1952 年 CV-B5: Faulkner。這些血清型自 2003~2015 年間在臺灣地

區的演化皆形成二個 lineages，並可次分為不同的 sub-lineages。此外，即使這些腸病毒流行於相同的時間與地域，但在分子流行病學上卻顯示著不同的流行方式，其中 CV-B1 血清型二個 lineages 在不同年代呈現出相互替換，至 2014 年則為是共同循環模式進行；其餘四個血清型皆是呈現一個主要的 lineage 為主，雖然不同的血清型在不同的年代有監測到另一個 lineage 的存在，但這四型是呈現一個主要的 lineage，其中 sub-lineages 互換的模式 (圖六 A~E)。

分析 2004 年到 2014 年 CVB1-5 病毒的 3CD 序列，其整段基因序列相似性(similarity) 為 77.3~95.7% 之間，比對結果顯示腸病毒 3CD 基因的序列並不像 VP1 基因段那樣的具高度保守性。病毒雖依其血清型分為 CVB1-5，但 3CD 序列並未依各血清型而有明顯的分群。本次研究調查 2004 年到 2014 年間 CV-B 病毒的 3CD 序列可區分為兩群 clades A 群 及 B 群，其中 A 群包括 2004 年至 2013 年間所分離出之 CVB1-5 各個型別，而屬於 B 群的病毒出現的時間則為 2004 年至 2014 年，值得注意的是 B 群病毒並無 CVB5 的病毒包含於其中，CVB3 病毒也僅有一支；B 群組成幾乎以其他三型 CVB1、CVB2 以及 CVB4 為主，顯示 B 群病毒 3CD 的序列與血清型別間可能有較強的關連性。此外分析結果亦發現 CVB2 病毒在 2010 年以前均屬於 A 群，2010 年

後則均出現在 B 群，這種情況在其他 CVB 病毒並沒有被觀察到，顯示病毒的某些血清型別其 3CD 基因會隨分離時間的不同，因為基因重組或交換等因素產生病毒基因組成的變異，值得進一步分析探討。(圖七)

六. 2015 年臺灣地區進入腸病毒流行期在主要的血清型是以 CV-A16 及 CV-B5 為主，CV-A16 在臨床上的表徵以手口足症(Hand foot and mouth disease; HFMD)最為常見，分析 CV-A16 分子流病親緣性顯示該血清型 18 年來臺灣地區只有一個 lineage (lineage B，並可分為 B1 和 B2)，其中 lineage B2 再分成 4 個 sub-lineages：B2-a~d，隨著時序的變遷，B1 lineage 及 B2-b lineage 已不再被監測到；B2d sub-lineage 自 2002 年起被偵測到後至 2014 年，呈現一個穩定持續演化的過程，值得注意的是 CV-A16 自 2014 年即陸續被監測到，在腸病毒第二波流行時(九月)為流行的血清型之一，並延續至 2015 年為最主要流行的血清型(分離數量第一名)，惟 2014 年在分子流行病學上的變化則落於 B2-a, B2-c 及 B2-d 等三個 lineages 中，其中 B2-c lineage 為今年主要流行的 lineage (圖八)；CV-B5 雖與 CV-A16 於 2015 年共同流行於臺灣地區，卻截然不同於 CV-A16，該型別的行行為再發性(Recurrence)，臨床上的表徵以疱疹性咽峽炎為主，但對感染的新生兒會造成較嚴重

的表徵，出現心肌炎、肝炎、腦炎、血小板下降、多發性器官衰竭等敗血症徵候，今年首例腸病毒重症死亡個案即為該血清型所引起，分析 2003~2015 年 CV-B5 分子流病親緣性顯示有二個 lineages 流行於臺灣地區，惟 B lineage 自 2008 年後已完全被 C lineage 完全取代，其中的 sub-lineage 在不同年代呈現共同循環流行狀態(圖九)。

七. EV-71 自 1998 年在臺灣地區爆發流行後，是造成法定傳染病腸病毒重症個案最主要的血清型，並和每年國內腸病毒疫情嚴重程度相關，因 EV-71 基因型與基因亞型已有國際上常用的分型定義，依國際定義建構 1998~2013 年臺灣地區腸病毒七十一型親緣系統樹(圖十)；藉由分子流行病學分析顯示臺灣地區在 1998~2013 年間 EV71 計有六種基因亞型(C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋八個 lineages(C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B5b, B5c)被偵測到，且流行於不同的年代：分別為 1998 年的 C2 亞型(subgenogroup)、1999~2003 年間的 B4 亞型、2004~2005 年間的 C4a-1 亞型、2007~2008 年間的 B5b 亞型、2010~2011 年間的 C4a-2 亞型及 2011~2012 年間的 B5c 亞型。當 EV71 腸病毒基因亞型轉換時，有可能引發一波新的流行，但 C5 亞型於 2006 年首次出現於臺灣及 C2-like 亞型於 2008 年被偵測出時，尚無發生較大規模的流行；此外 2013 年也由重症通報及定點監測出一例 B5x 亞型是為

境外移入，自 2012 年後臺灣地區面靈到基因亞型轉換及易感宿主的增加，應持續加強對該病原體的監測其能對下一波的流行提出預警。

八. Recombination analysis

由 VP1 及 3CD 的親緣系統樹二者之間 branching orders 不一致的現象，顯示出有重組的發生，為評估這些潛在重組的事件，分別以 EV-A71 及 CV-A2 進行了 Simplot 及 Boostscanning Plot 分析，結果如下：

1. CV-A2: 取臺灣本土 2014 年發生的 CV-A2(E2014041)與 CV-A10、CV-A4 以及 EV-A71 B3 subgenogroup 做 similarity 分析。以 CV-A2(E2014041)為 Query 比對序列相似度的結果，在 4800 bps 以後(約為 P3)的序列相似度，與 CVA10 約為 90%的相似度最為接近(圖十一 A)。另將 2012 年香港發生的 CV-A2 與臺灣本土 2014 年發生的 CV-A2(E2014041)做 similarity 分析，可以發現 2012 年香港發生與 2014 年本土發生的 CV-A2 序列非常相似，而在 P3 以後的序列，與 CV-A2 prototype 相比，更為接近 CV-A10 的序列；顯示在 CV-A2 的演化過程中，重組事件發生的相關性。(圖十一 B)
2. EV-A71：以 EV-A71 C2-like subgenogroup、EV-A71 C2 subgenogroup、EV-A71 B3 subgenogroup、CV-A2、CV-A4 之全長

序列以 BootScan 做序列重組分析。以 EV-A71 C2-like subgenogroup 全長序列作為 Query。如圖示，在 P1 序列的位置(約 700-4000 bps)與 EV-A71 C2 subgenogroup 是相似的，但隨後 P2 以及 P3(4000 bps~)則顯示與 CV-A4 重組機率提高，一直延續至序列末端。結果顯示，EV-A71 C2-like subgenogroup 雖以 VP1 序列分型與 C2 相似，而重組事件則發生在 P2 以及 P3 區域。(圖十二)

討論

臺灣地區自 1998 年起建立了腸病毒病原體監測網迄今已有 17 年的歷史，由監測資料顯示在 1998~2014 年期間，每年約有 20 種腸病毒血清型或基因型共同流行於臺灣地區，其中 EV-A71 型腸病毒不僅是在台灣造成腸病毒重症最重要的血清型，亦是自 1997 年起對西太平洋地區的國家帶來相當大的威脅。世界衛生組織(WHO)強調 EV-A71 腸病毒的浮現對於整體西太平洋地區在公共衛生上是一項重要議題，並預期未來會有更多的 HFMD 個案是因腸病毒 71 型所引起。

分析 1998~2014 年常態流行於臺灣地區以 EV-A species 中的 CV-A2, 4, 5, 6, 10, 16 及 EV-A71 等血清型共同建構 VP1 capsid region 親緣系統樹(圖二)，每一個血清型都是獨立的形成一個 clade，Bootstrap value 皆為 99% 且無重組事件的發生。病毒基因在此區段上的功能及選擇性壓力等因素會想重組的相容性，另一方面亦是維持 capsid 的 barrel structural elements 或保留 receptor-binding domains 的功能，所以 VP1 capsid region 是適合腸病毒分子分型的區域。分析每單一血清型在 VP1 之親緣系統樹(圖三 A、B)，顯示隨著時序的變遷，每種血清型在演化上有不同的發展，大約可形成 2~3 lineages(包含 prototype 在內)，血清型 CV-A2, 4, 5 及 EV-A71 等腸病毒形成兩個 lineages，CV-A6, 10 及 16 等腸病毒則只

有一個 lineage，而每一種血清型的 lineage 又可次分為不同的 sub-lineage。此外，即使這 7 種腸病毒流行於相同的時間與地域，但在分子流行病學上卻有不同的流行方式，諸如：(1) CV-A2 的 lineage B 於 1998~2012 年期間，每年都可偵測到，且由不同的 sub-lineage 共同循環流行，惟自 2014 年起則由另一個 lineage C 全面予以取代；(2) CV-A4 則是由兩個 lineages(lineage B 及 lineage C)在不同年代，呈現 shift 的現象；(3) CV-A5 lineage B 曾出現於 2003~2004 年間，但自 2005 年起即被 lineage C 完全取代並成為主要流行的 lineage(2005~2013 年)，不過在 2012 年仍監測到 lineage B 的蹤跡；另外，CV-A6, CV-A10 及 CV-A16 等三型目前在臺灣均僅有一個 lineage，其中(4) CV-A6 是 sub-lineage 於 2010 年間發生取代；(5) CV-A10 在 sub-lineages 間呈現持續演化；(6) CV-A16 的 sub-lineages 在不同年代內呈現共同循環；以及(7) EV-A71 在 VP1 區域可分成 Shift、Droft、Co-circulation 及 Replacement 等四種模式，這些分子流行模式反映出病原體本身的特性、流行的幅度及不同血清型病原體的互相影響等。

對腸病毒而言，基因重組是一個普遍的現象，源自於病毒複製時，在負股 RNA 形成過程中造成模板 RNA 的變更(template switching)或併入了其他來源的 RNA 片段，大部分同質性的重組事件都屬於 template

switching。由於大多數 EV-A species 的標準株分離於 1947~1951 年(如 CVA2~8、A10、A12、A14、A16，但 EV-A71 於 1969 年始被確認)，經由基因全長定序分析顯示這些病毒在非結構區有不同的演化關係，如 CV-A4、A14、A16 在 P2 及 P3 區域、CV-A5、A10 在 2A 區域、CV-A4、A5 在 2B 區域、CV-A4、A14、A16 在 2C、3AB、3D 區域及 CV-A7、A8 在 3D 區域。本計畫是以臺灣地區在 1998 年以後所分離的本土豬為主，與原有標準株差距幾近五十年，僱有相當差異的演化情形是可以預期的。如以 1998 年做一分界點來看這七個血清型，在 3CD poly,erase region 可分為兩個 lineages(A and B)，在 lineage A 中很明顯的可以看出 CV-A5、CV-A10、CV-A16、及 EV-A71 的 B 基因型呈現出較為穩定的演化狀態，但也有部分 CV-A5 及 CV-A10 落在 lineage B 中；而在 lineage B 中的血清型主要為 CV-A2、CV-A4、CV-A6 及 EV-A71 的 C 基因型，其中 CV-A2 及 CV-A4 發生重組之頻率遠大於其他血清型，而 EV-A71 的 C 基因亞型中只有 C2-like subgenogroup 是落於 lineage B2-C 中。

由於 2014 年流行於臺灣地區 CV-A2 開始出現具有急性肢體無力麻痺的臨床表徵，分析該病原體在 VP1 區域，顯示自 1998~2014 年我們所分離的本土株形成兩個 lineages(B 及 C)，而 lineage B 持續流行於 1998~2012 年，其間又可再細分為 lineage B1 及 B2，這兩個 sub-lineage

在 2008 年前呈現不同年代的 co-circulation，並於 2009 年轉變成 lineage B2 二型，同時亦有 lineage C 的出現，亦即 lineage B2 及 lineage C 於 2008 年開始 co-circulation，直至 2014 年方以 lineage C 為主要的流行株。而分析 VP1 序列顯示 2008 年該病原體已發生變異，出現新的 lineage 並持續演化直至 2014 年為最主要的流行株之一。這些不同年代的分離株在 3CD 區域與不同的血清型落在不同的 sub-lineage 中，顯示參與重組腸病毒包括 CV-A4、CV-A6、CV-A10 及 EV-A71 等。最近香港地區曾由死亡個體的檢體分離出 CV-A2，經由全長基因定序，顯示該分離株為一重組株，於 2A 區域起始端 EV-A71 B3 subgenogroup 及 CV-A4 產生重組現象；以本署於 2014 年所分離到的 CV-A2 和香港的分離株進行 Simplot 分析，顯示兩者具有高相似度；但與臺灣 2004 年所分離到的 CV-A10 相比，發現在第 4800 核苷酸序列有極高的相似度，因此推論 2004 年臺灣 CV-A10 之 3CD 區域序列可能在 2004~2008 年皆與 CV-A4 發生重組，並成為 2014 年 CV-A2 重組株的一部份。(圖五)

EV-A71 血清型屬於 EV-A species 成員之一，亦是在臺灣地區造成疫情嚴峻及臨床症狀最為嚴重的血清型，臺灣自 1998 年所偵測出的 EV-A71 基因亞型在不同年代的轉換皆引起一波的流行(C2-like 及 C5 基因亞型除外)，其中 B5 基因雅行在 2008 年造成相當大的疫情後，並於

2012 年又再度浮現，惟已有部分改變，在親緣性分析上被歸類為 B5b 及 B5c 基因次亞型，主要是在非構造型蛋白質區域中長時間突變的累積所造成的。2013 年再次變異為 B5x 基因次亞型(暫定名稱)，藉由 3CD 的親緣樹及 Bayesian MCMC 分析顯示(圖四、五)，B5 基因亞型一直穩定的演化且未和臺灣地區其他常態流行的血清型有重組現象的發生。

2003 年首次偵測到 B5 基因亞型後，以引臺灣地區(2008、2011~2012) 二波的流行，2013 年演化為 B5x 後，是否會帶來另一波的流行，我們皆持續觀察。至於 EV-A71 的 C2-like subgenogroup 是 2008 年首度在臺灣地區被監測到的基因亞型，其他國家皆無此亞型的報告，並由 3CD 及 Simplot 的分析，顯示出 C2-like subgenogroup 屬於 intra (與 EV-A71 B3 subgenogroup)及 inter (CV-A4 臺灣地區本土株)的重組株，由於該型病毒在動物實驗中所產稱的抗體也可以中和(neutralization)其他亞型的 EV-A71 腸病毒，因此有潛力成為腸病毒七十一型疫苗發展的 candidate 之一。

結論與建議

- 一. 本計畫選取1998~2014年流行於台灣地區的EV-A 群腸病毒，包括CV-A2、A4、A5、A6、A10、A16及EV-A71等七型，依據VP1 capsid region的分子流行病學分析，可分成shift、co-circulation、replacement和major等四個分子流行模式。此外，分析位於3CD區域顯示CV-A16在這17年中其演化相當穩定，CV-A2及CVA4發生重組則較為明顯，而EV-A71的C基因型重組的事件較B基因型明顯。
- 二. 經由持續的監測，我們發現病毒基因不斷發生重組而產生新的型別或次分型(lineage)時，可能會導致臨床症狀的改變；例如2013年CV-A6病毒，其臨床症狀由疱疹性咽峽炎轉變成不典型的手口足症，而CV-A2原以疱疹性咽峽炎為主，也出現急性肢體無力麻痺症(Acute Flaccid Paralysis；AFP)，嚴重時甚或造成死亡。此外，由於新型別或次分型的出現，也有可能帶來新一波的疫情流行，因此EV-A71於2013年再度被發現基因已產生變異(暫時命名為B5x基因次亞型)，未來是否會帶來新一波的流行，值得密切觀察。
- 三. 不同國家即使流行相同的型別，也會因流行週期、傳染模式、宿主及環境等因素，使得在3CD區域重組的現象不盡相同。因此應挑選具有代表性的腸病毒血清型進行全長基因(whole genome)的分析，以

建立比對基準。

- 四. 持續監測流行於台灣地區腸病毒並分析 VP1 及3CD 二個區域的基因序列，將可及
- 五. 早掌握基因的變異，並對腸病毒可能的流行幅度、毒力及臨床症狀的變化等提出預警，因此維持一個長期穩定的腸病毒監測系統是非常重要的，俾能及早提出警訊，及早採取防疫作為而防止疫情擴大。

參考文獻

1. Melnick JL: Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In Fields Virology. 3rd edition. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. M. Chanock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 655-712.
2. Tan CS, Cardoso MJ: High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. Arch Virol 2007, 152:1069-1073.
3. Sivasamugham LA, Cardoso MJ, Tan WS, Yusoff K: Recombinant Newcastle Disease virus capsids displaying enterovirus 71 VP1 fragment induce a strong immune response in rabbits. J Med Virol 2006, 78:1096-1104.
4. Enterovirus update page. [<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>].
5. Stanway G, Brown F, Christian P: Picornaviridae. In Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press; 2005: 757-778
6. New enterovirus species. [http://www.picornastudygroup.com/types/enterovirus/ev_species.htm].
7. GR Villarruel, GE Langley, MS Oberste, M Pallansch.. Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance --- United States,

- 2006--2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010 Dec 10; 59:1577-1580.
8. Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, McMinn PC: Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1733-1741.
 9. Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* 2003, 148:253-263.
 10. Chan YF, Sam IC, AbuBakar S: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenogroups using complete genome sequences. *Infect Genet Evol* 2010, 10:404-412.
 11. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, Fan WB, Yang JY, Chang FY, Wu HS. Genetic Diversity and C2-like Subgenogroup Strains of Enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology Journal* 7(1):277, 2010.
 12. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, Hsu LC, Yang CF, Yang JY, Chen PJ, Wu HS: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res* 2008, 137:206-212.
 13. Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 2004, 46:231-235.
 14. Bible JM, Iturriza-Gomara M, Megson B, Brown D, Pantelidis P, Earl P, Bendig J, Tong CY: Molecular epidemiology of human enterovirus 71 in the United Kingdom from 1998 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008, 46:3192-3200.
 15. Diedrich S, Weinbrecht A, Schreier E: Seroprevalence and molecular

- epidemiology of enterovirus 71 in Germany. *Arch Virol* 2009, 154:1139-1142.
16. Maël Bessaud , Sylvie Pillet , Wafa Ibrahim , Marie-Line Joffret , Bruno Pozzetto , Francis Delpeyroux , Ionela Gouandjika-Vasilache: Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol.* 2012 May;50(5):1650-8
17. Bessaud M, Pillet S, Ibrahim W, Joffret ML, Pozzetto B, Delpeyroux F, Gouandjika-Vasilache I. Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol.* 2012 May;50(5):1650-8
18. Schuffenecker I, Henquell C, Mirand A, Coste-Burel M, Marque-Juillet S, Desbois D, Lagathu G, Bornebusch L, Bailly JL, Lina B. New introductions of enterovirus 71 subgenogroup c4 strains, France, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014 Aug;20(8):1343-6
19. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, López-Miragaya I, Pérez C, Reina J, Otero A, González I, Echevarría JE, Trallero G. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Mar;20(3):O150-6.
20. Fonseca MC, Sarmiento L, Resik S, Martínez Y, Hung LH, Morier L, Piñón A, Valdéz O, Kourí V, González G. *Arch Virol.* 2014 Apr 10. [Epub ahead of print] Coxsackievirus A6 and enterovirus 71 causing hand, foot and mouth disease in Cuba, 2011-2013.
21. Chia MY, Chung WY, Chiang PS, Chien YS, Ho MS, Lee MS. Monitoring

- antigenic variations of enterovirus 71: implications for virus surveillance and vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 24;8(7):e3044
22. Juhana Santti, Timo Hyypiä, Leena Kinnunen, and Mika Salminen. Evidence of recombination among enteroviruses. *Journal of virology*, Oct. 1999, vol. 73, No. 10. p.8741-8749.
23. Lamjed Bouslama, Dorsaf Nasri, Lionel Chollet, Khaoula Belguith, Thomas Bourlet, Mahjoub Aouni, Bruno Pozzetto, and Sylvie Pillet. Natural recombination event within the capsid genomic region leading to a chimeric strain of human enterovirus B. *Journal of virology*, Sept. 2007, vol. 81, No.17. p.8944-8952.
24. M. Steven Oberste, Silvia Peñaranda, and Mark A. Pallansch. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of Coxsackie B viruses. *Journal of virology*, Mar. 2004, vol.78, No.6. p.2948-2955.
25. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res*. 1998;58:35-43.
26. Alexander N. Lukashev. Role of recombination in evolution. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15:157-176.
- 27.12. M. Steven Oberste, Kaija Maher, and Mark A. Pallansch. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *Journal of virology*, Jan. 2004, vol. 78, No.2. p.855-867.
28. Gabriela Oprisan, Mariana Combiescu, Sophie Guillot, Valerie Caro, Andrei Combiescu, Francis Delpeyroux and Radu Crainic. Natural genetic recombination between co-circulation heterotypic enteroviruses. *Journal of*

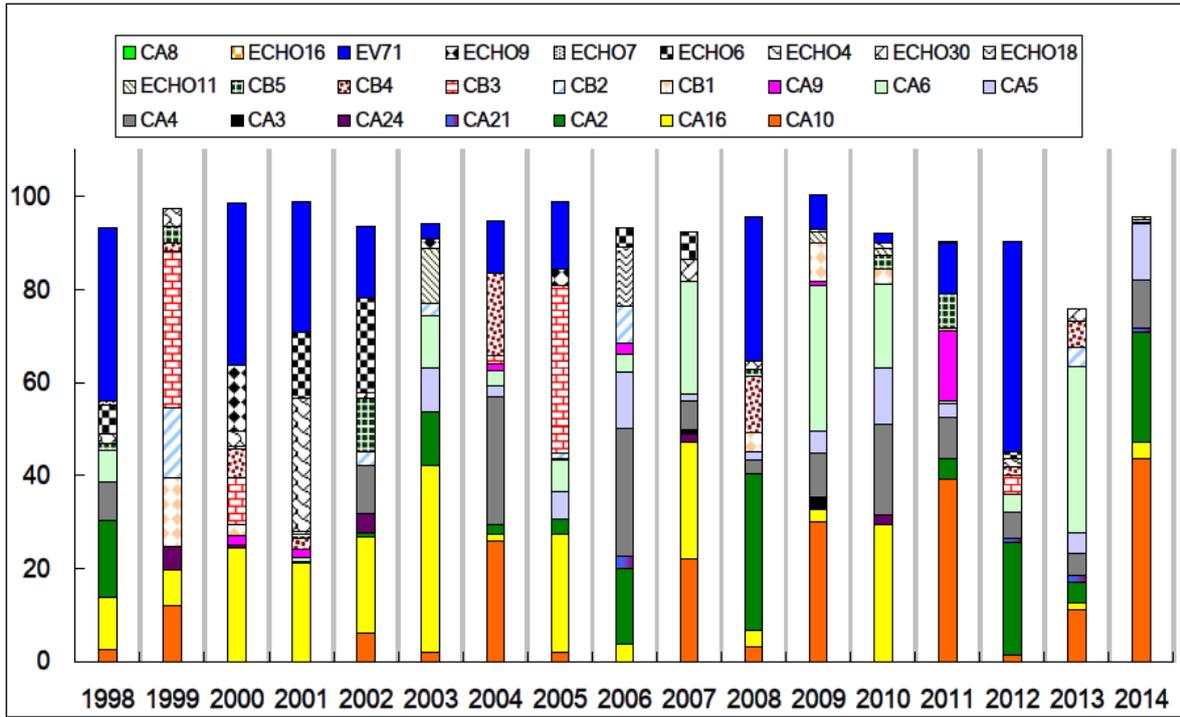
- general virology 2002, 83, 2193-2200.
29. Oberste MS. Comparative genomics of the coxsackie B viruses and related enteroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;323:33-47.
 30. Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J Virol.* 2004 Mar;78(6):2948-55.
 31. Zhou F, Wang Q, Sintchenko V, Gilbert GL, O'Sullivan MV, Iredell JR, Dwyer DE. Use of the 5' Untranslated Region and VP1 Region to Examine the Molecular Diversity in Enterovirus B Species. *J Med Microbiol.* 2014 Jul 18. pii: jmm.0.074682-0
 32. Peter Simmonds and Jon Welch. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *Journal of virology*, Jan. 2006, vol. 80, No.1. p.483-493.
 33. Hu YF1, Yang F, Du J, Dong J, Zhang T, Wu ZQ, Xue Y, Jin Q. Complete genome analysis of coxsackievirus A2, A4, A5, and A10 strains isolated from hand, foot, and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2426-34
 34. Chen YJ, Chang SC, Tsao KC, Shih SR, Yang SL, Lin TY, Huang YC. Comparative genomic analysis of coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities. *PLoS One*, Dec. 2012 ; 7 (12); e52432
 35. Zhang Ting, Du Jiang, Xue Ying, Su Haoxiang, Yang Fan, Jin Qi. Epidemics and frequent recombination within species in outbreak of human enterovirus B-Associated hand, foot and mouth disease in Sandong China in 2010 and 2011. *PLoS One* ; June 2013;8(6); e67157

36. Leveque N, Jacques J, Renois F, Antona D, Abely M, Chomel JJ, Androletti L. Phylogenetic analysis of Echovirus 30 isolated during the 2005 outbreak in France reveals existence of multiple lineages and suggests frequent recombination events. *J Clin Virol.* June 2010; 48(2) : 137-141
37. Yip CC, Lau SK, Woo PC, Chan KH, Yuen KY. Complete genome sequence of a Coxsackievirus A22 strain in Hong Kong reveals a natural intratypic recombination event. Nov. 2011 ;Vol. 85; No.22; 12098-12099
38. Lee LH, Phillips CA, South MA, Melnick JL, Yow MD. Enteric virus isolation in different cell cultures. *Bull World Health Organ.* 1965;32(5):657-63.
39. Bell EJ, Cosgrove BP(1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bulletin of the World Health organization* 58:423-428
40. McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr., Gardner MB(1969) : Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24:520-526
41. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH(1975) : Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *Journal of clinical Microbiology* 2:183-185
42. World Health Organization. 2004. Polio laboratory manual, 4ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
43. H Muench, LJ Reed. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints *Am. J. Hyg.* 27:493-497.
44. Nagata, N., H. Shimizu, Y. Ami, Y. Tano, A. Harashima, Y. Suzaki, Y. Sato, T. Miyamura, T. Sata, and T. Iwasaki. 2002. Pyramidal and extrapyramidal

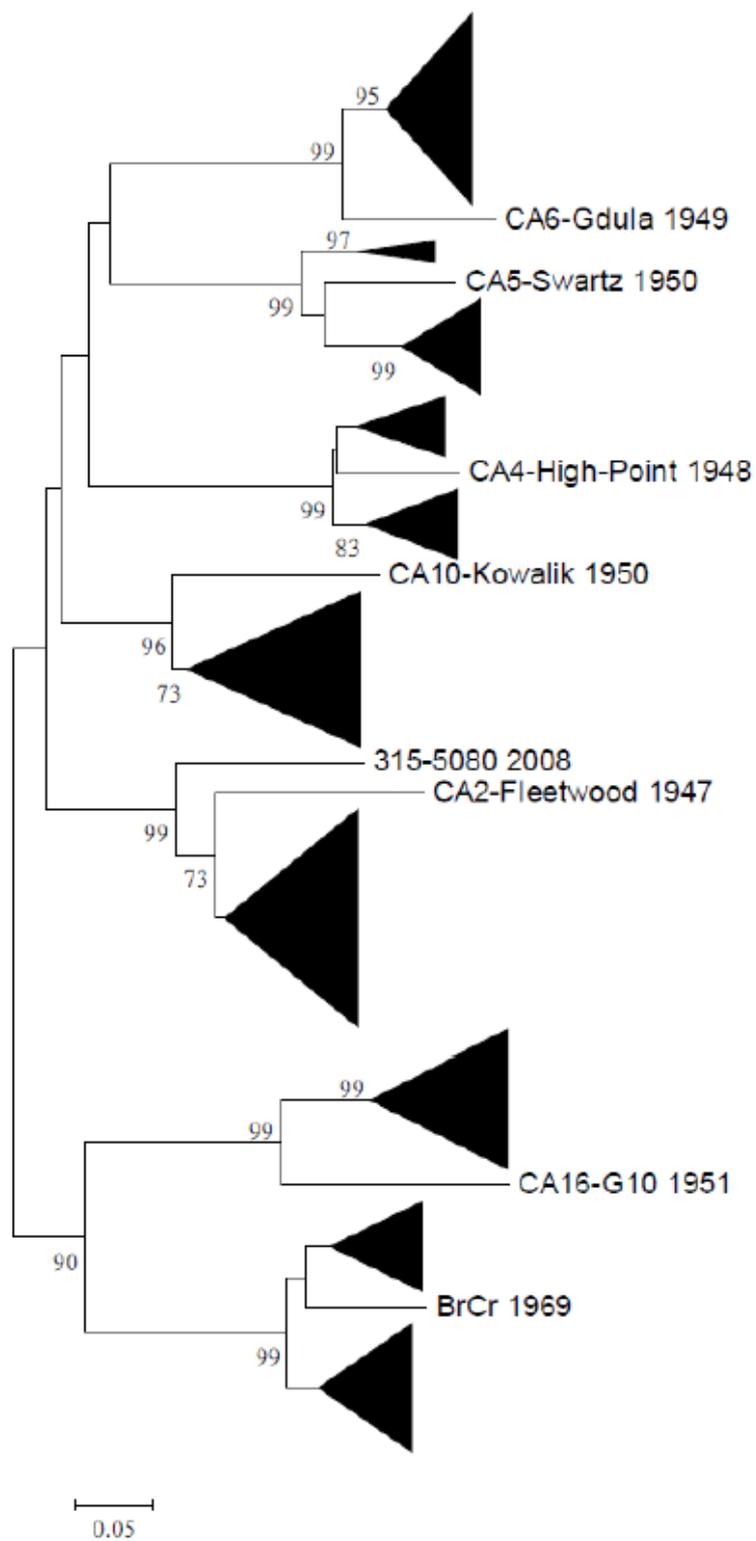
- involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J. Med. Virol.* 67:207-216.
45. Yin-Murphy M, Tan KL, Lim GN, Quek JH, Ishak B, Phoon MC. Poliovirus neutralizing antibody in infants and cord blood. *Ann Acad Med Singapore* 1993; 22:281-5.
46. Doerr HW (1973) Coxsackie B virus neutralising antibodies in myocarditis and pleurodynia. *Dtsch Med Wochenschr* 98(29):1396-1400.
47. Rabenau HF, Weber B (1994) Evaluation of a new automated microneutralization assay for the quantitative detection of neutralizing antibodies against enteroviruses. *Zentralbl Bakteriologie* 280:534-539.
48. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980,12:329-334.
49. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37:1288-1293
50. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-80.

圖表

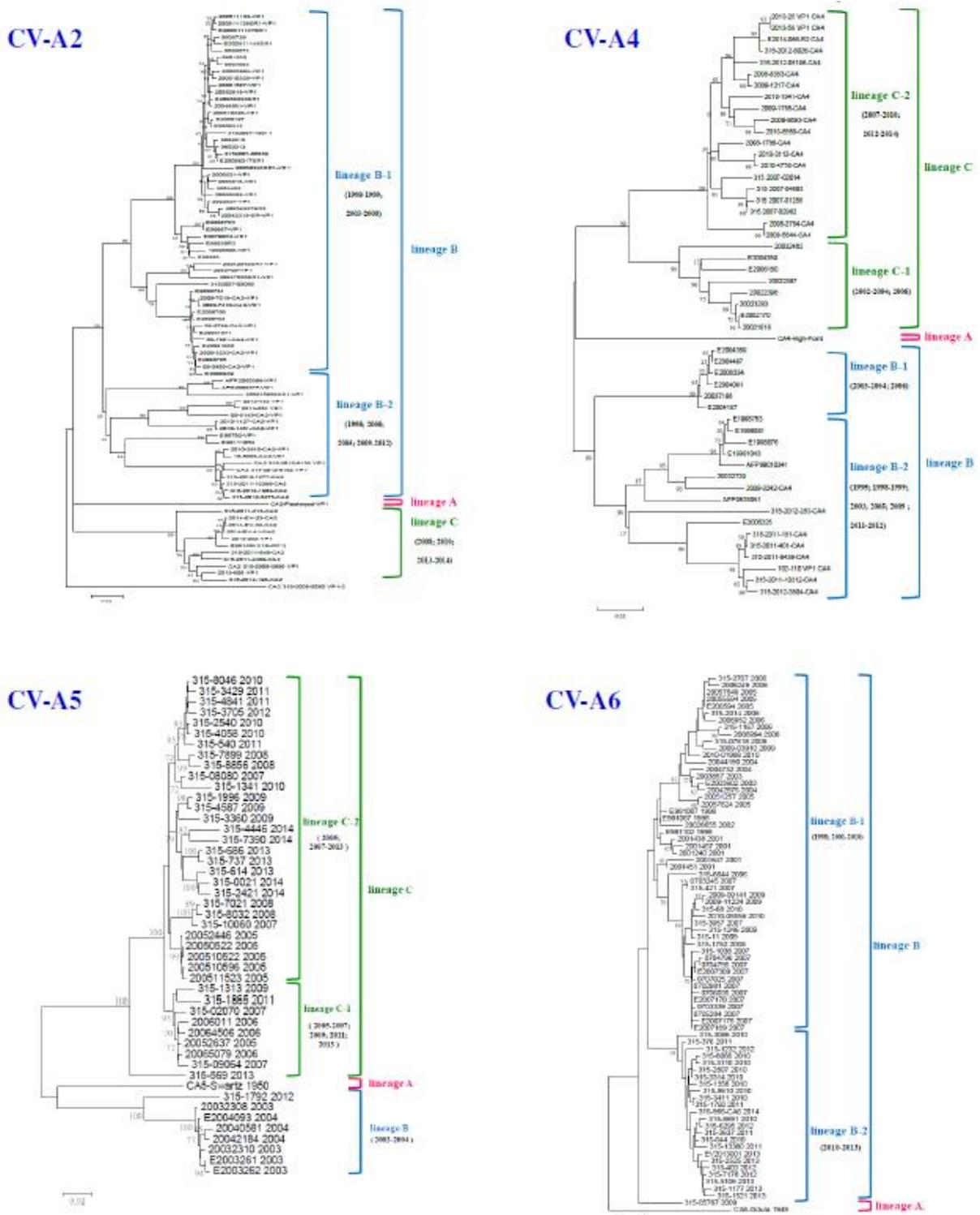
圖一、1998~2014 年臺灣地區腸病毒病原體監測前十名排行表



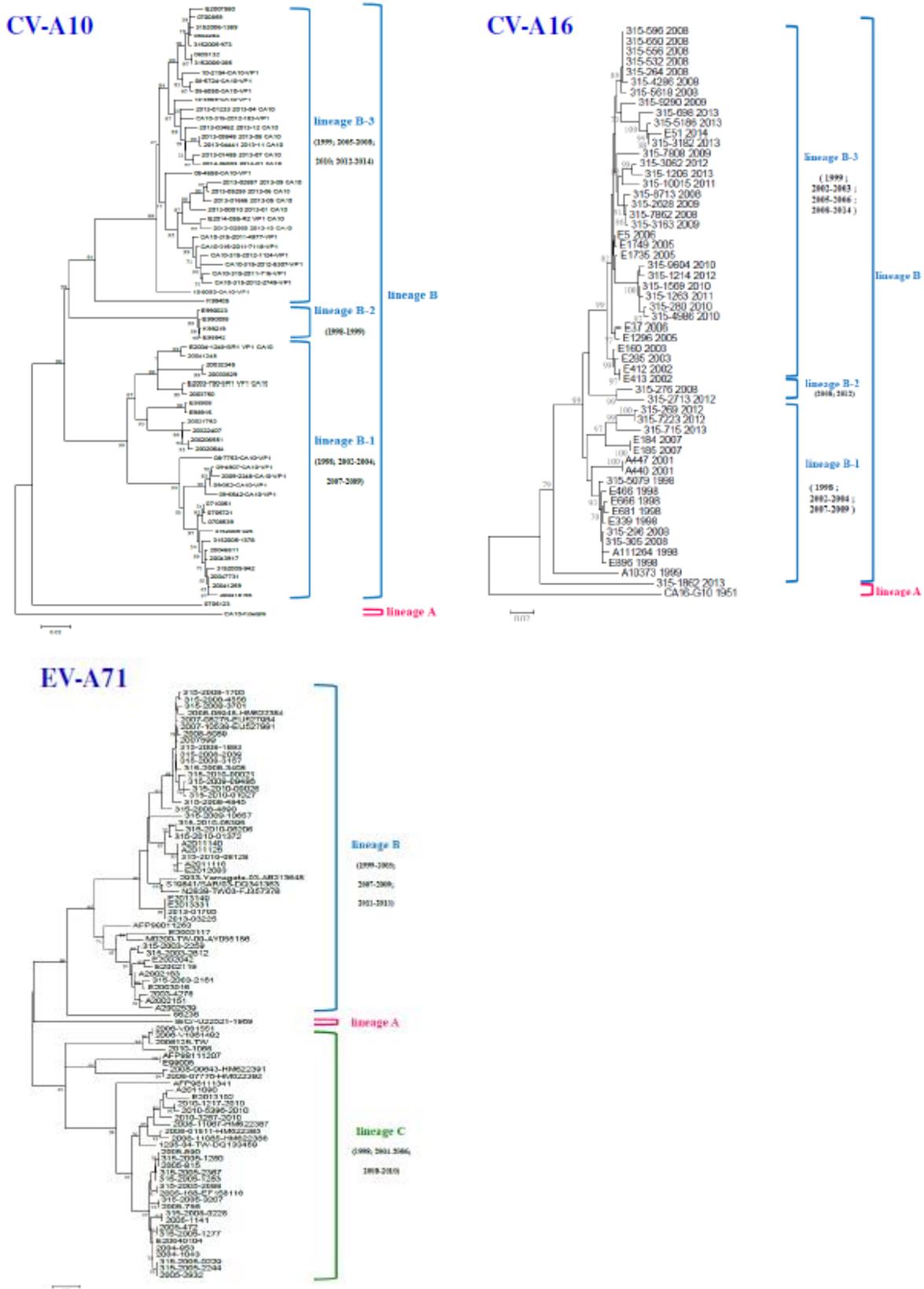
圖二、1998~2014 年台灣地區 EV-A species 親緣系統樹(VP1 region)



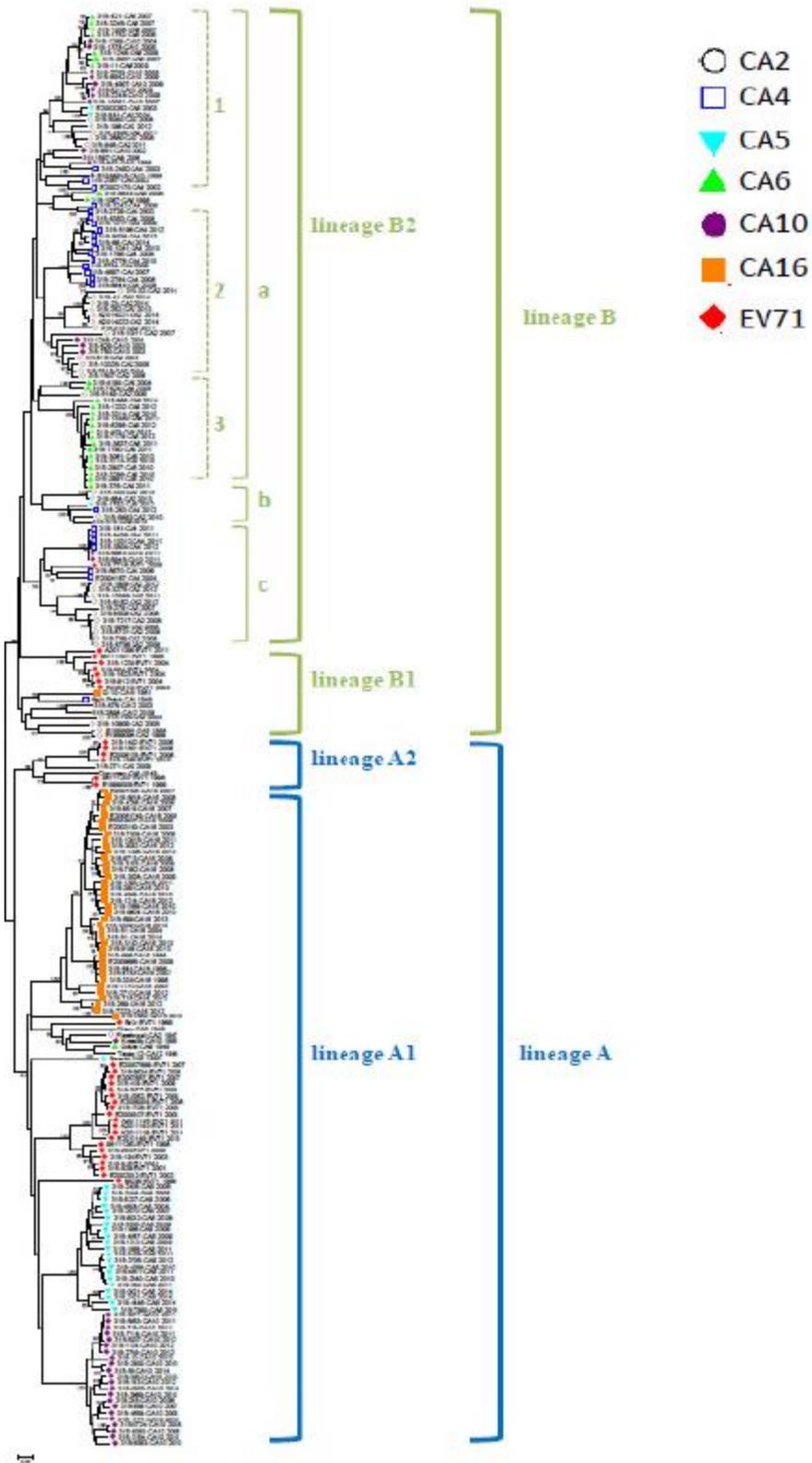
圖三 A、1998~2014 年台灣地區 EV-A species 不同血清型親緣系統樹 (VP1region)



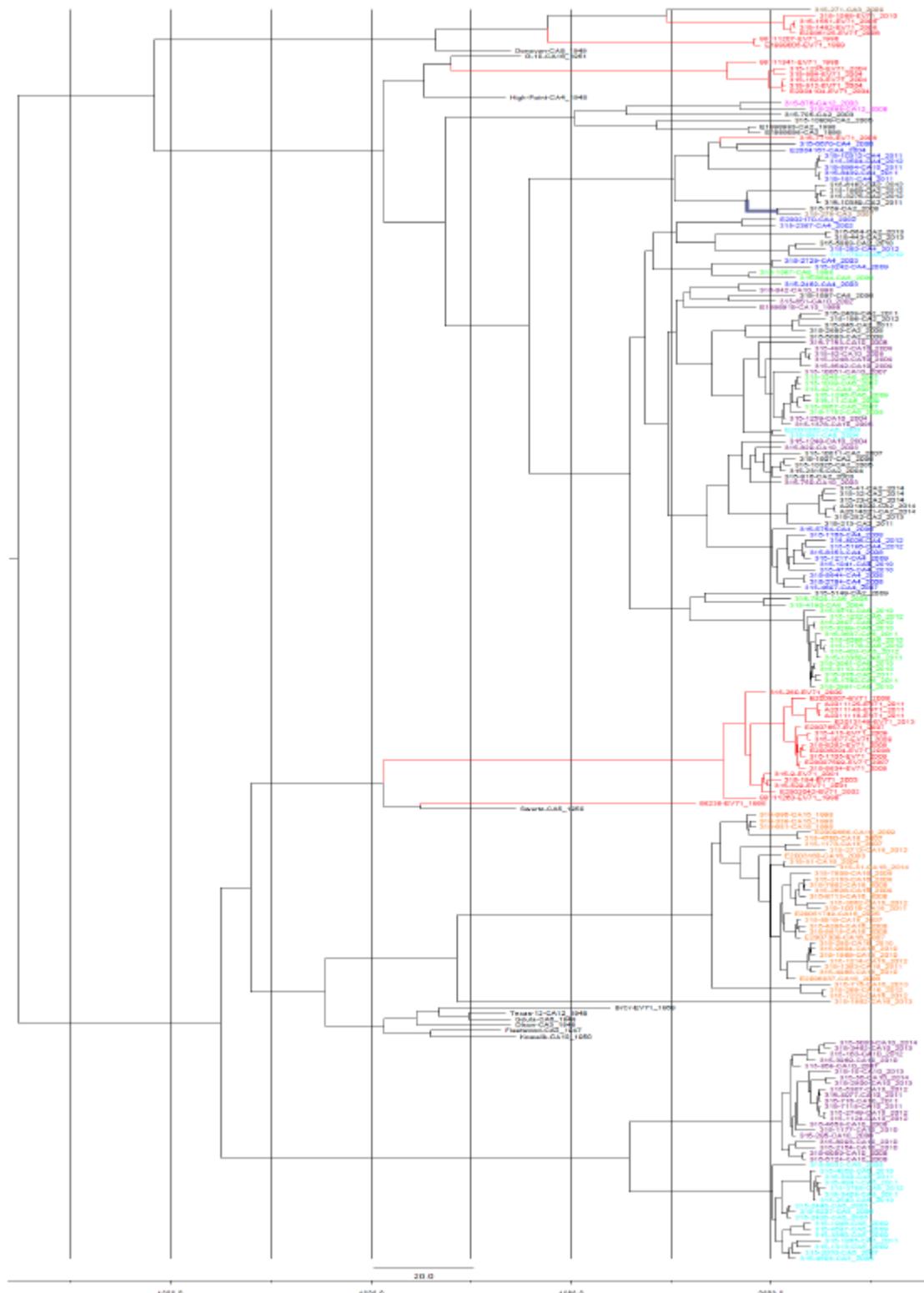
圖三 B、1998~2014 年台灣地區 EV-A species 不同血清型親緣系統樹 (VP1region)



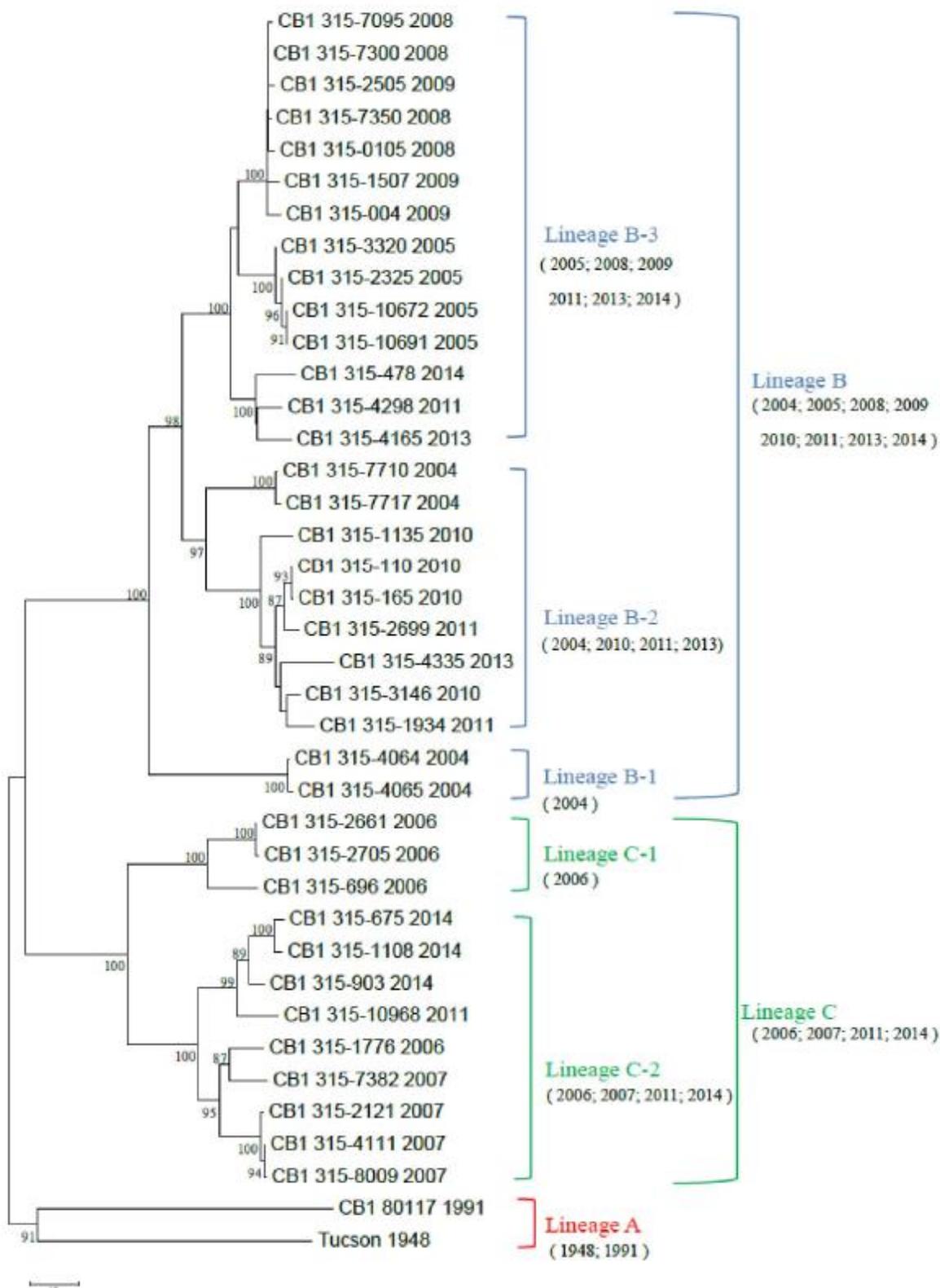
圖四、1998~2014 年台灣地區 EV-A species 親緣系統樹(3CD region)



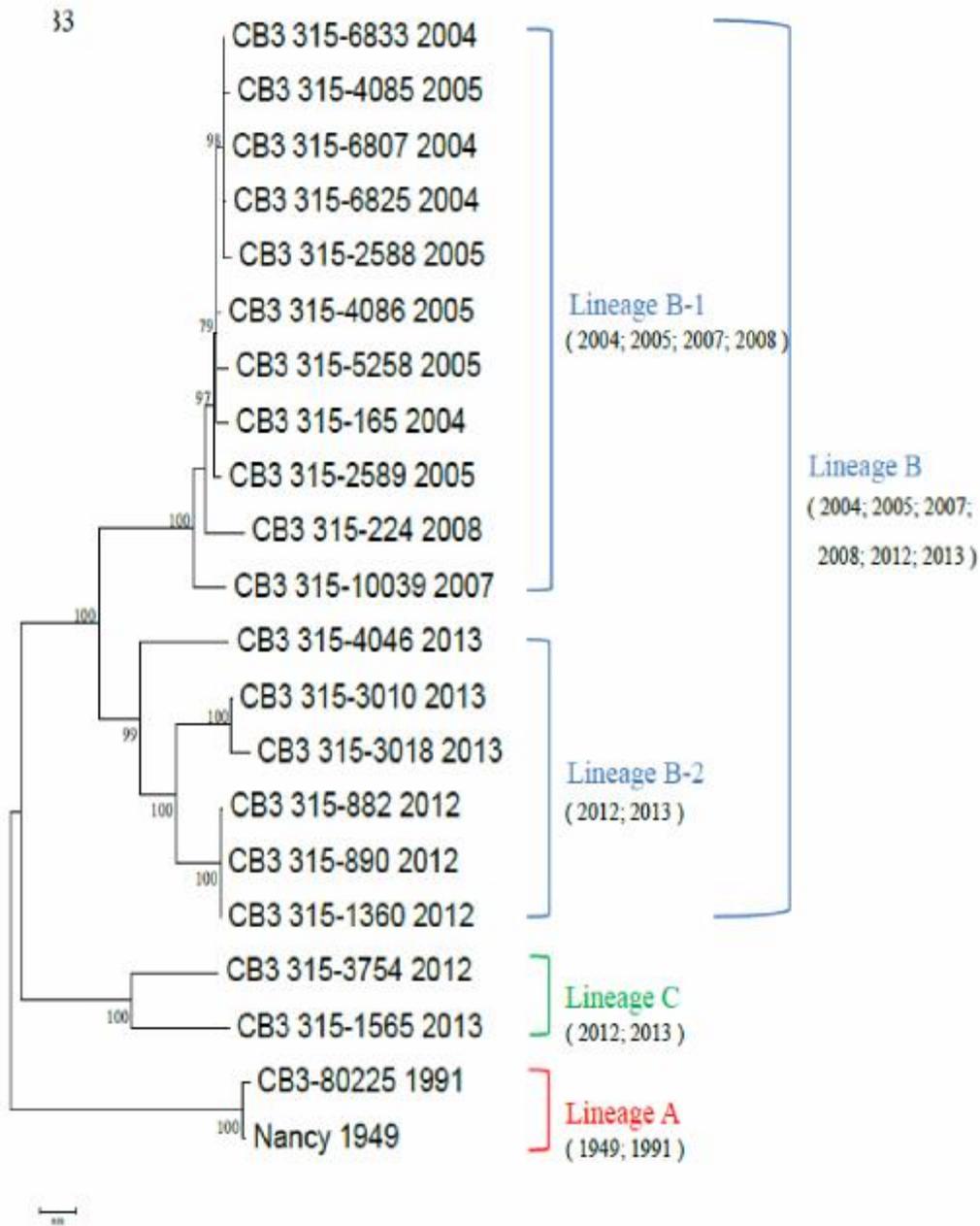
圖五、Bayesian MCMC analysis phylogeny of EV-A species



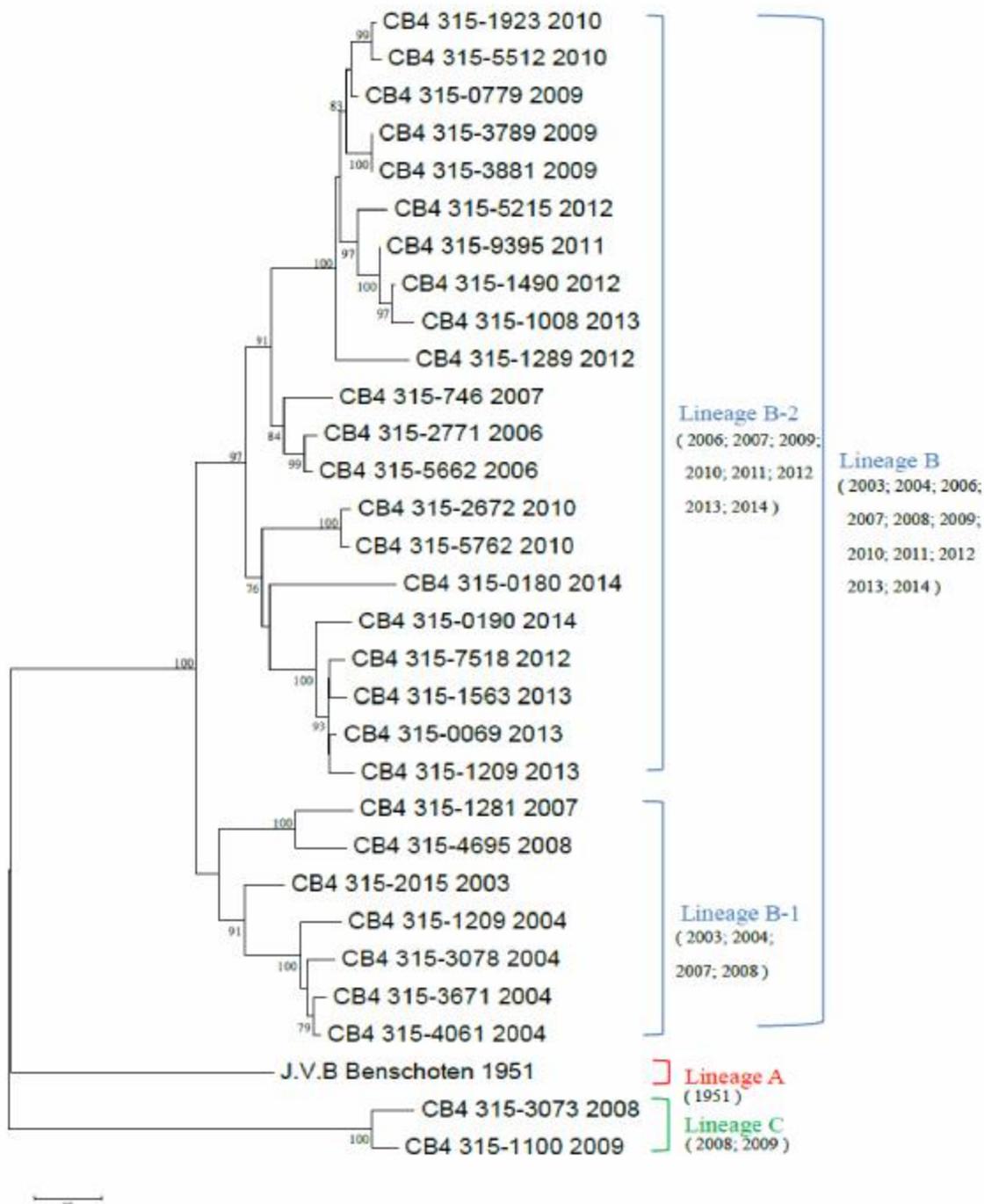
圖六 A、2004~2014 年臺灣地區 CV-B1 VP1 基因親緣系統樹



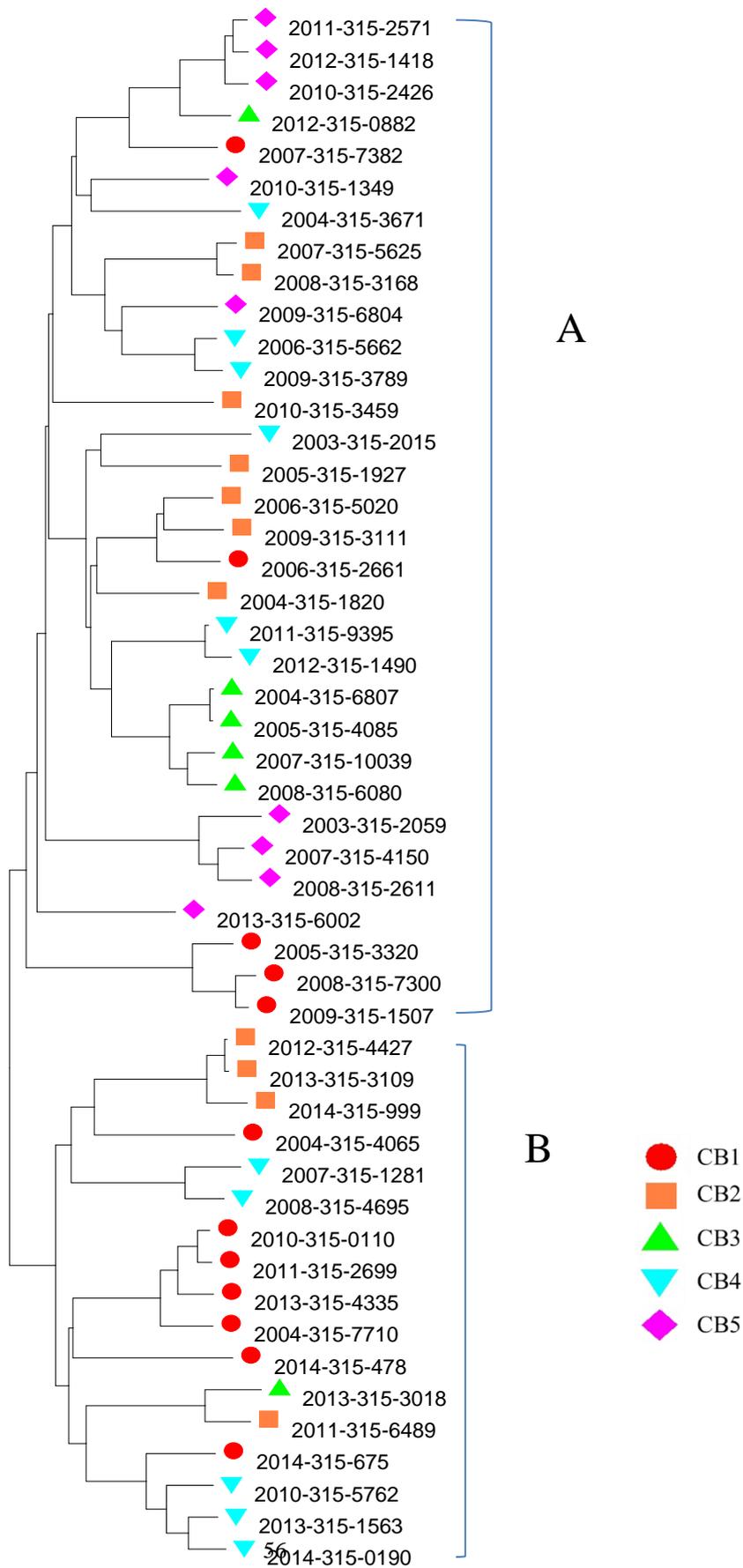
圖六 C、2004~2013 年臺灣地區 CV-B3 VP1 基因親緣系統樹



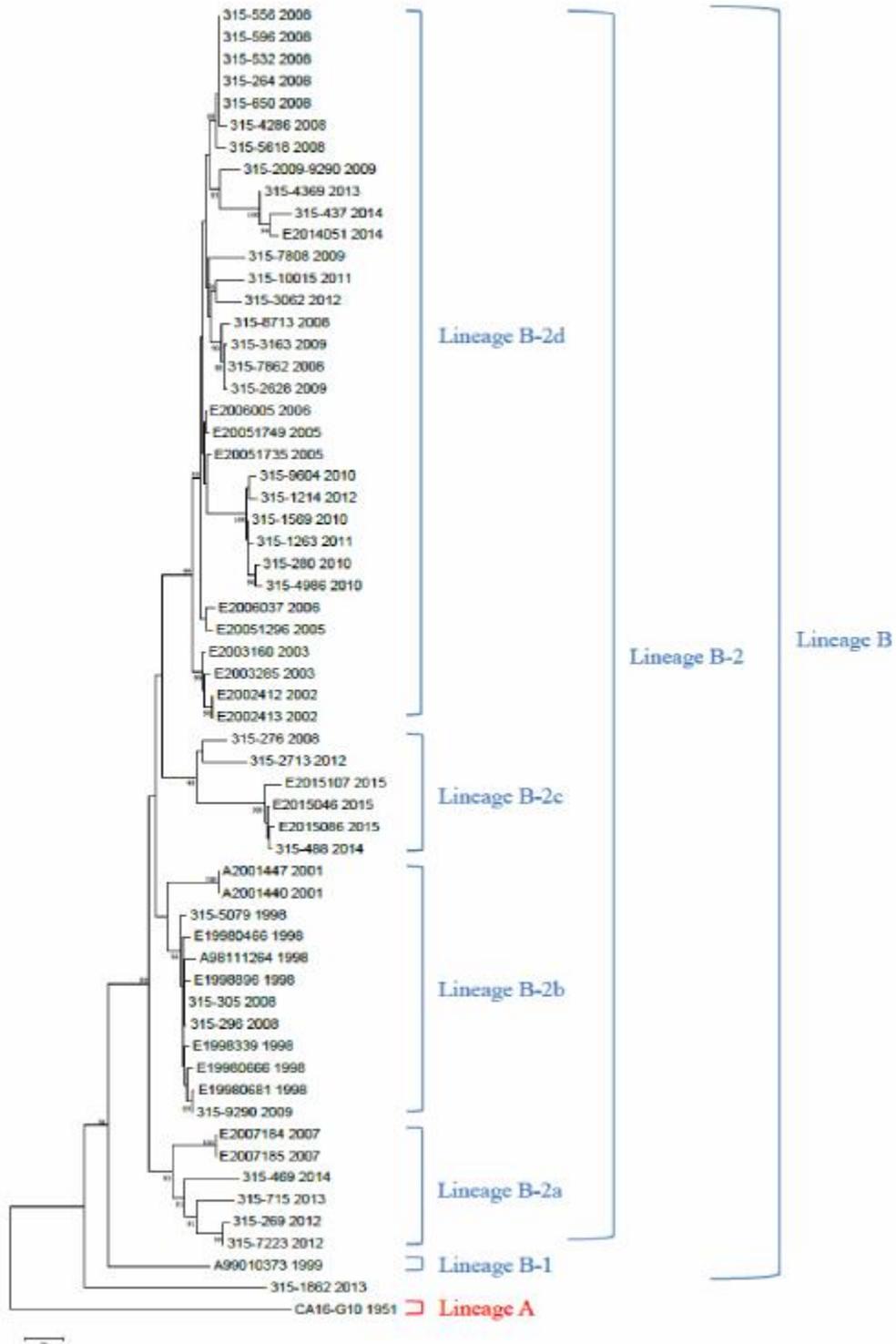
圖六 D、2003~2014 年臺灣地區 CV-B4 VP1 基因親緣系統樹



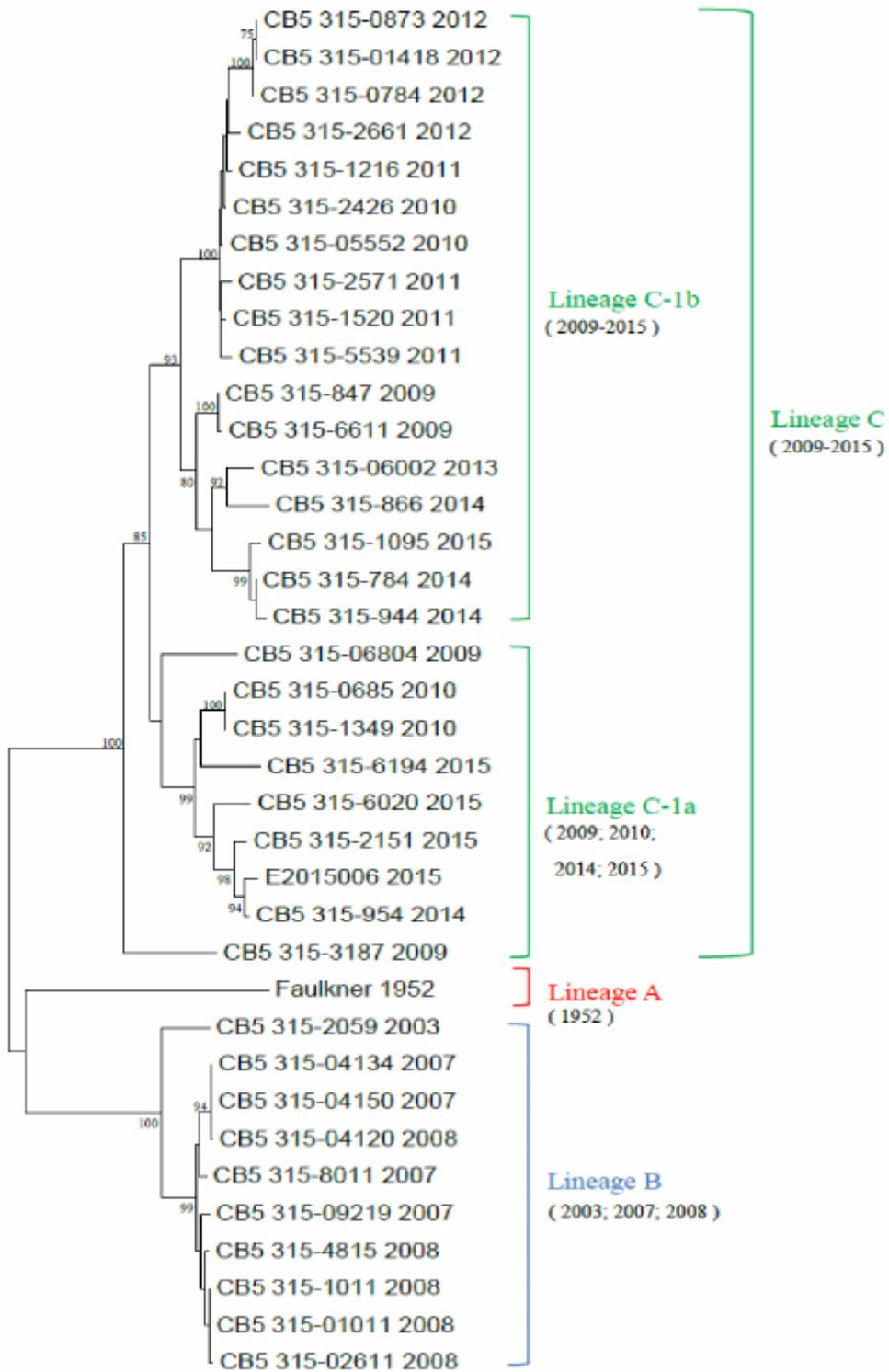
圖七、2004~2014 年臺灣地區 CV-B1~5 之 3CD 基因片段親緣系統樹



圖八、1998~2015 年臺灣地區 CV-A16 親緣系統樹

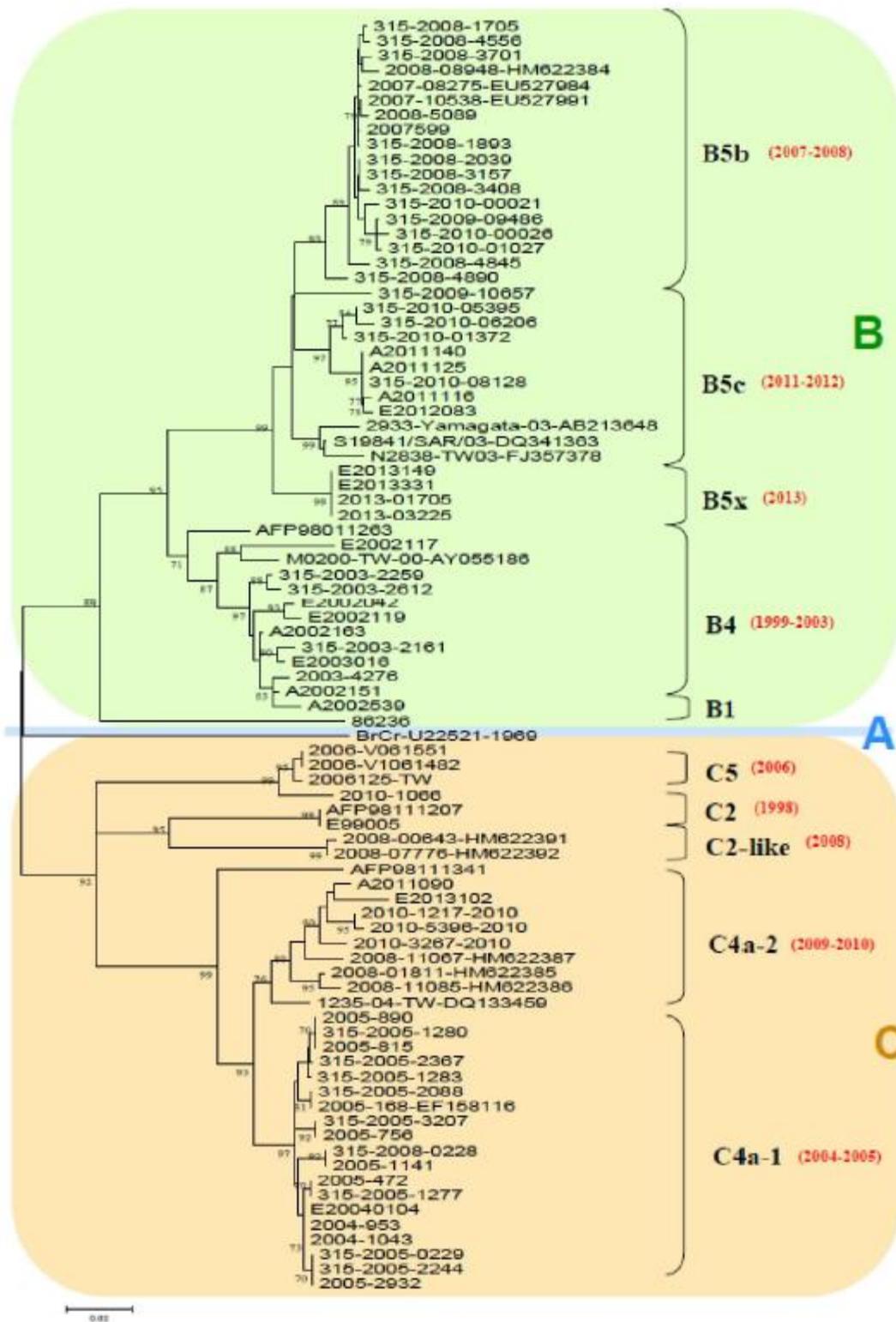


圖九、2003~2015 年臺灣地區 CV-B5 VP1 基因親緣系統樹

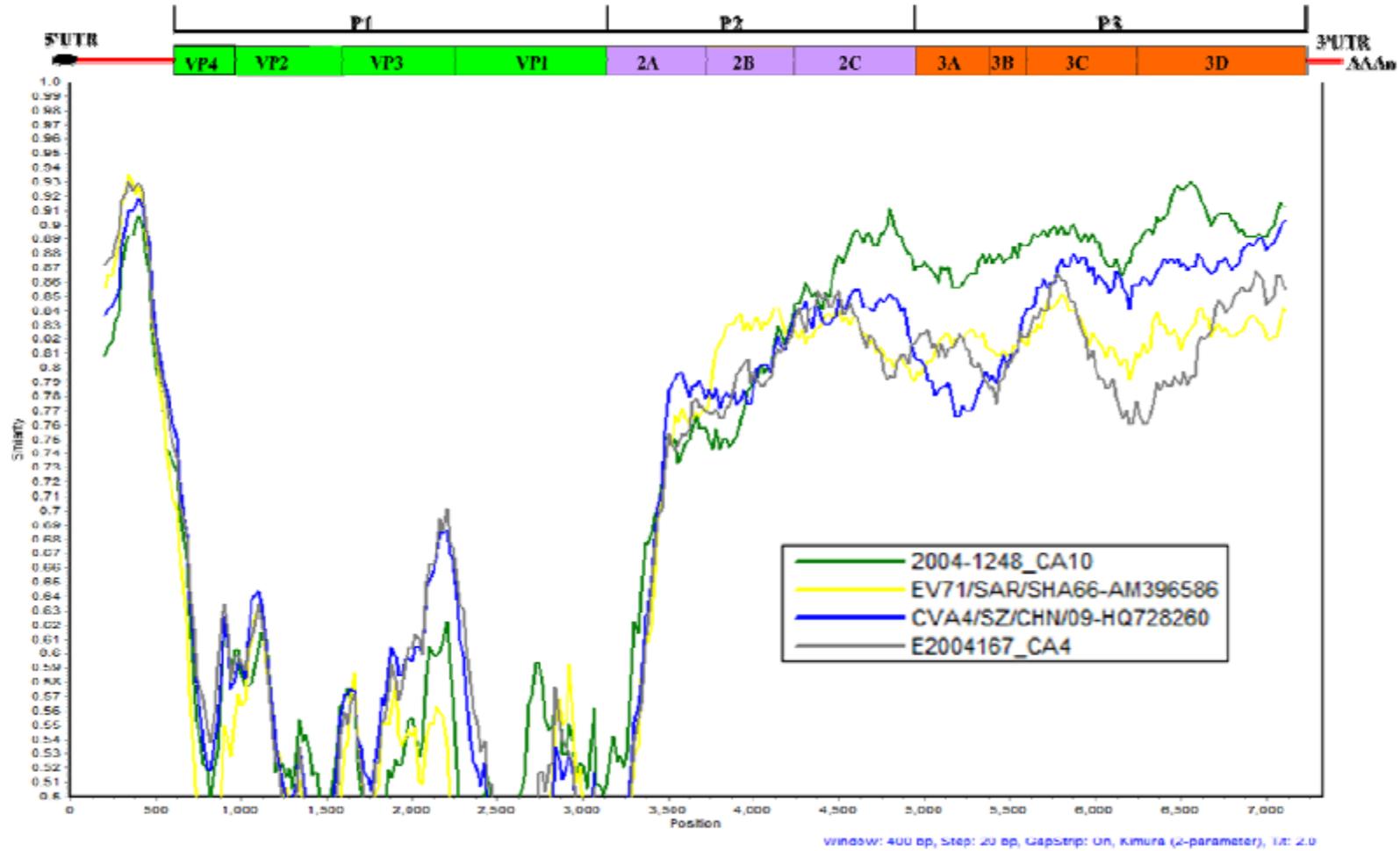


100

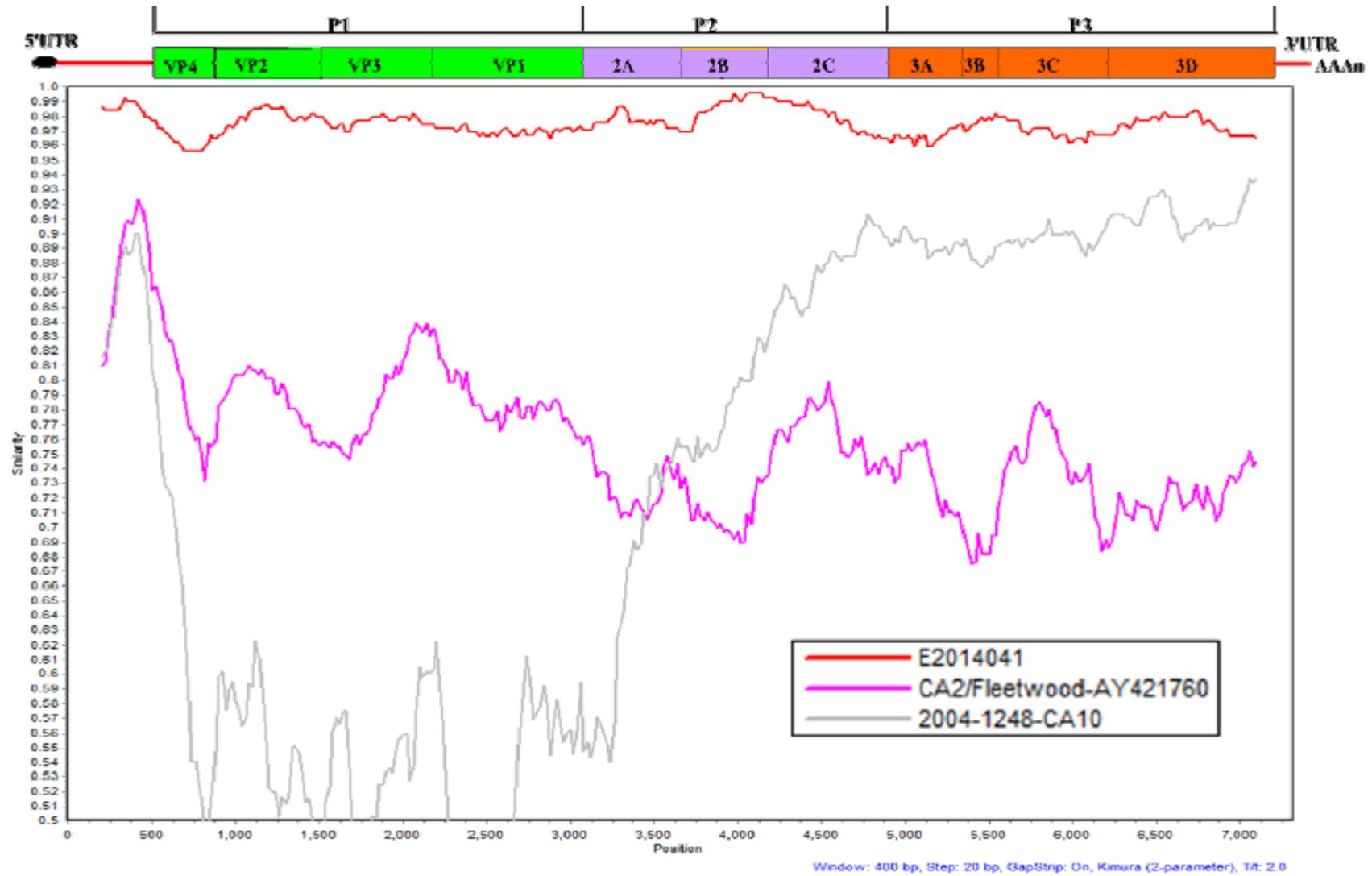
圖十、1998~2014 年臺灣地區 EV71 親緣系統樹(國際基因分型)



圖十一 A、Nucleotide similarity plot of full-length CV-A2 using CV-A2-E2014041 as the query sequence



圖十一 B、Nucleotide similarity plot of full-length CV-A2 using CV-A2/430895/HK/2012 as the query sequence



圖十二

