腸病毒 71 型(Enterovirus71)群聚感染之實驗室鑑定與分析

林翠莉[1]、黃教威[1]、林敏琮[2]、賴明和[1]
徐秋菊[1]、李宜學[1]、楊志元[1]、吳和生[1]
1. 行政院衛生署疾病管制局研究檢驗中心
2. 行政院衛生署疾病管制局第三局

摘要：

台灣地區在 2005 年上半年腸病毒流行的血清型別主要是腸病毒 71 型(enterovirus71；EV71)與克沙奇 B 族病毒第 3 型(Coxsackie virusB3；CB3)，兩種病毒在臨床上造成重症的表徵及感染的年齡群皆不相同。隨著時序進入腸病毒流行期，已經陸續發生腸病毒 71 型的群聚感染及克沙奇 B 族病毒第 3 型的院內感染等事件。台中市某一產後護理中心於四月底發生了四名嬰兒疑似不明原因發燒聚集情形，經由相關的疫情調查顯示，自 4 月 26 日~5 月 7 日總共有八例個案陸續出現臨床症狀，疾病管制局病毒實驗室對於該事件之發生，藉由適當的檢體採檢及運用正確的臨床檢驗方法，可確認該群聚案件之感染源，並且針對其感染源之關聯性加以釐清。

在此次群聚感染的案件中，首先利用 EV Real-time RT-PCR 及 EV 71 RT-PCR 兩種分子生物學核酸快速檢測方法，以期達到快速鑑定病原體之目的；同步對相關個案的檢體進行傳統細胞培養，待分離出病原體後進一步確定其型別。經確定此次群聚感染案件的病原體之型別為腸病毒 71 型，依據分子流行病學腸病毒相關的研究文獻指出當病原體特定基因的核苷酸序列相異性小於 2 %時，兩株病毒株之間具有流行病學上的直接關聯性，分析病毒基因體 VP1 序列證明此次群聚感染案件分離出的病毒株確實有直接關聯性；佐以血清學之近期感染腸病毒 71 型證據，即案件中個案血清抗體效價急性期與恢復期呈現四倍之上升。本次以病毒實驗室之檢驗數據，結合群聚事件個案之臨床表徵、發病日距與相關流行病學調查等資料進行分析，可作

為腸病毒群聚感染案件調查之參考模式。

簡介：

人類腸病毒係屬於微小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*)、腸病毒屬(Enterovirus；EV)之病毒。腸病毒的構造很小，其直徑大小約 20~30 nm，爲不具外套膜(nonenveloped)呈現立體對稱的正二十面體結構。腸病毒基因組是單股、正性的 RNA，基因組大小接近 7.5Kb [1]。大部分的腸病毒感染屬於無症狀感染，不會引發重大的疾病，僅少數會導致嚴重的疾病，特別是當嬰幼兒或是免疫缺乏的病人被腸病毒感染時會導致嚴重的疾病產生。此外，這類病毒是常見引發無菌性腦膜炎的原因之一，特別是中樞神經系統被感染的情況。臨床上會造成小兒手足口症及嚴重神經病變的腸病毒 71 型，西元 1969 年在美國首次被發現，在加州由一腦炎嬰兒之糞便檢體中分離出，亦即是民國 87 年在台灣地區造成大流行的病原體，當年超過 300,000 人感染，腸病毒 71 型確實和造成急性神經症狀有關，如類脊髓灰白質炎(poliomyelitis-like paralysis)、腦炎(encephalitis)及無菌性腦膜炎(aseptic meningitis)等症狀 [2,3]，雖然腸病毒 71 型曾在美洲、澳洲及亞洲等地均爆發流行，但其中僅有少數個案會產生嚴重神經症狀，致死率(mortality)亦不高。在進入腸病毒流行之高峰期時，一般的社區當中，特別是有幼兒存在的情況下，腸病毒感染率可能高達 90%以上；另外腸病毒也會造成新生兒之感染，其中小兒麻痺病毒約有 40%嬰兒是在母親分娩時遭受感染，但造成小兒麻痺症的機會很小，而非小兒麻痺之腸病毒(Nonpolio enterovirus)常常造成嬰兒感染，常見的有：克沙奇病毒 B 族病毒 (Coxsackievirus B；CB)及伊科病毒(Echovirus; ECHO)，常見之血清型爲克沙奇 B 族病毒第 2,3,4,5 型及伊科病毒第 4,9,及 11 型等 [4,5,6]。

材料與方法：

檢體採集與來源

共有八例個案臨床表徵上出現發燒伴隨腦膜炎或敗血症等症狀之新生兒，採檢咽喉拭子、肛門拭子及血清等 26 件檢體，分別進行分子生物核酸快速檢測、病毒分離鑑定培養及血清中和抗體之檢測。

病毒培養[7,8]

將前處理完畢的檢體(肛門拭子、咽喉拭子)取 200*u*l 接種 RD、HEp－2C 等細胞株，置於 36℃，二氧化碳培養箱培養，觀察 14 日，若檢體接種細胞出現顯著細胞病變(cytopathic effect, CPE)，則離心收取上清液，接著將細胞固定於玻片上，進行間接免疫螢光法(IFA)的染色，鑑定其型別。

間接免疫螢光染色鑑定（IFA）[9]

將出現細胞病變的細胞固定於玻片，與不同型別腸病毒老鼠單株抗體(Chemicon Inc, CA,USA)孵育，清洗後，再與 FITC 標幟之抗老鼠血清作用，經過孵育與清洗後，於螢光顯微鏡下觀察，若受感染細胞之細胞質呈現蘋果綠螢光，則判定爲陽性，呈現紅色螢光則判定爲陰性。

病毒血清中和試驗[10]

經IFA鑑定後之病毒株，接種於原先所使用分離病毒之細胞株使病毒增量，待達到 3~4 價的細胞病變，經冷凍及解凍，測定病毒的含量($TCID_{50}$)，稀釋成 100 $TCID_{50}$之病毒量，與每 20u / 50ul的EV71 抗體中和，確定血清型別。

中和抗體測定[11]

將血清檢體稀釋爲 1：8，於 56℃加熱 30 分鐘，經 56℃加熱處理過之血清檢體以含 2 %胎牛血清之細胞培養液做系列稀釋，即 1：8~1：1024，加入 100 $TCID_{50}$ EV71 病毒抗原，攻擊病毒之濃度測定以 100 $TCID_{50}$再作 10^{-1}~10^{-3}系列稀釋爲病毒控制對照組，並加入等量細胞培養液與血清抗體測試，放置 36℃，CO_2培養箱中和作用 1 小時，再加入 100 μl（5×10^4細胞）細胞懸浮液，置 36℃，CO_2培養箱培養，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 $TCID_{50}$之間。而對照血清檢體對細胞發育無不良影響或者是有毒性，但其倍數不影響中和抗體效價之判定者，則最高血清稀釋倍數之 50%能完全阻止CPE，即為該血清之中和抗體價。

RNA的萃取

使用病毒核酸純化試劑組(Qiagen Inc, CA, USA)進行 RNA 的純化。吸取檢體 140 μl 加入 560 μl Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 μl 絕對酒精混合完全，混合液再通過QIAmp spin column，column以Buffer AW 清洗兩次以後，用 80℃純水(RNase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR）。

腸病毒 Real-time RT-PCR [12]

引子與探針是設計在腸病毒 5' UTR 高度保守的基因片段。正股引子(forward primer) EV-F : 5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3' (position:450-468)，反股引子(reverse primer) EV-R : 5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3'(position: 580-596)，探針 EV-Probe:5'-FAM-CGGAACCGACTAC TTTGGGTGTCCGT-TAMRA-3'。以 ABI 7000 或 7900 的儀器分析，反應的條件為 48℃ 30 分鐘、95℃ 10 分鐘，設定循環 95℃ 15 秒、60℃ 1 分鐘，反應 40 cycles。

反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction；RT-PCR）[13,14,15]

Primer:	編號	序　　列	位　　置
	159	5'-ACY ATG AAA YTG TGC AAG G-3'	2385-2403
	162	5'-CCR GTA GGK GTR CAC GCR AC-3'	2869-2850

(1) 反轉錄反應(Reverse Transcription)

取 5 ul 病毒RNA 加入RT反應的混合液含有 75 mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM $MgCl_2$、10 mM DTT、dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul 及antisense primer: 162 50 pmole的混合物中，70℃ 10 分

鐘，再加入 100 units MuLV-reverse transcriptase，於 37℃作用 90 分鐘。

(2) 聚合脢鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

以Reverse Transcription反應中所得cDNA進行PCR，cDNA加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM $MgCl_2$、0.1%Triton-X 100、dNTP mixture 1 mM及primer: 159 及 162 各 50 pmole的混合物中，加入 5 units Taq polymerase（Promega Inc, WI, USA），於 94℃ 變性（denature）3 分鐘後，以 94℃ 1 分鐘、48℃ 1 分鐘、72℃ 2 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72℃作用 15 分鐘。

演化樹分析(Phylogenetic tree analysis)

由原檢體編號 765, 804, 778, 787, 803, 746, 789, 790 及細胞培養所分出之病毒株 804-R_3, 803-R_2, 746-R_2, 765R_2之序列與 1998~2005 年台灣地區所分離到腸病毒 71 型病毒株相互比較，以電腦軟體Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.1 操作。採用 “Neighbor-joining” 方法 ，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析。

結果

腸病毒 Real-time RT-PCR

利用疾病管制局研究檢驗中心已建置完成的 EV Real-time RT-PCR 檢測系統，將 14 件原檢體經過離心之前處理，以病毒核酸純化試劑套組來萃取病毒核酸，進行該系統之檢測結果顯示有 9 件原檢體可得陽性反應，陽性率爲 64.2%。

反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應

這一次群聚感染事件中，我們將原檢體與接種於細胞株所分離出之病毒株，以病毒核酸純化試劑套組來萃取病毒核酸，利用 RT-PCR 的方法以適用於鑑定腸病毒 71 型的引子對 159 與 162 增幅腸病毒 VP1 基因片段，並將 RT-PCR 的產物以洋菜膠電泳分析，其中 12 件原檢體及 5 件分離株的腸病

毒 VP1 基因片段在 485bp 的位置被增幅出來(圖一)；將產物作定序分析、將基因序列登錄 National Center for Biotechnology Information (NCBI)網站(網址:http://www.ncbi.nlm.nih.com)進行序列同質性與相似度比對 (Nucleotide-nucleotide BLAST)，比對後發現所有從案件檢體增幅出來的 VP1 基因片段都屬於腸病毒 71 型。

演化樹分析

將引子對 159/162 增幅出來的基因序列與其它已知的腸病毒 71 型病毒株作基因演化樹的分析，截取相同的長度 414 bp並以電腦軟體Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA) version 2.1 操作，採用 “Neighbor-joining”方法 ，並重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。結果發現由原檢體編號 765, 804, 778, 787, 803, 746, 789, 790 及細胞培養所分出之病毒株 804-R_3, 803-R_2, 746-R_2及 765R_2之序列與 1998~2005 年台灣地區所分離到腸病毒 71 型病毒株相互比較從這次疑似群聚感染腸病毒 71 型的原檢體及病毒株增幅出的基因片段都在一個聚集裡(圖二)；核苷酸序列相似度介於 98.6~100%，其與 2005 年不同縣市及不同時間所分離到的腸病毒 71 型病毒株的核苷酸相似度 97.0%~100%有不同程度之差異 (表一)。

病毒分離、鑑定及抗體檢測

14 件臨床檢體採用細胞培養，分離結果如表一所示。有 5 件檢體出現細胞病變(CPE)，2 件爲咽喉拭子；3 件爲肛門拭子，並以間接免疫螢光染色的方法與中和試驗分析，鑑定爲腸病毒 71 型。另個案的配對血清進行腸病毒 71 型血清中和抗體效價測試結果發現個案二、三、六及七的配對血清抗體呈現四倍上升，顯示爲近期遭受腸病毒 71 型之感染 (表二) 。

結論與討論：

在這一次的群聚事件中，本實驗室首先採取分子生物學檢驗方法，分別爲 EV Real-time RT-PCR 及反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)，當我們將原檢體進行 EV Real-time RT-PCR 後，在 14 件原檢體中有 9 件檢體呈現陽

性反應(64.2%)，這個快速檢測系統經過臨床檢體的評估與測試，結果顯示其敏感度(Sensitivity)及專一性(Specificity) 分別爲 51.5%與 78.4%，所以現階段適用於早期腸病毒群聚感染之偵測，以配合防治及醫療等工作之進行。另外我們亦將該 14 件原檢體以 RT-PCR 的方法進行另一快速檢驗方法的篩檢，結果從 12 件檢體中增幅出腸病毒特異性之 VP1 基因片段，並將定出之基因序列與 NCBI 基因庫作核酸 BLAST 比對，發現此產物爲腸病毒中的腸病毒 71 型；若以演化樹分析則可發現本次群聚感染個案序列及 2005 年台灣地區不同縣市及不同時間所分到的腸病毒 71 型均落在同一聚集中(cluster)，基因亞型均爲 C4 [16]。

在傳統病毒檢驗方面，本實驗室採用病毒培養、螢光染色、中和試驗鑑定與抗體測定試驗來作鑑定與分析。這次的病原體分離一般都是在繼代之後，才出現細胞病變，由於檢體乃是由本局合約實驗室轉寄，並非新鮮檢體，並且已經過冷凍-解凍之狀態，且部份檢體有污染之情形，以致降低其病毒活性，進而影響分離時間及分離率，所以在傳統的細胞培養將病毒分離出只有 5 件檢體，將這些分離株利用RT-PCR的方法增幅出腸病毒特異性之VP1基因片段，並將定出之基因序列與NCBI基因庫作核酸BLAST比對，皆爲腸病毒中的腸病毒 71 型；若以演化樹分析則可發現本次群聚感染個案無論其原檢體或經細胞培養所分離出之病毒株，如：746(原檢體)與 746R_2(分離株)、803(原檢體)與 803R_2(分離株)、804(原檢體)與 804R_2(分離株) 、789(原檢體)與 789R_2(分離株) 其核苷酸比對的相似度介於 99.7%~100%，可佐證原檢體以RT-PCR所增幅出之產物確爲腸毒 71 型，亦無發生分子生物檢測時造成的污染的狀況，當然這些分離株的基因亞型亦爲C4。

由於本次的群聚所定序之原檢體及分離株進行核苷酸比對的相似度介於 98.6%~100%，相較於 2005 年台灣地區不同縣市及不同時間所分到的腸病毒 71 型病毒株進行其核苷酸序列比對的相似度介於 97.0%~100%，相異度(diversity)較小，若以文獻上曾對 poliovirus type 1 探討其分子流行病學時指

出當核苷酸序列相異比例小於 2 %時，兩株病毒株具有流行病學上的直接關聯性，以本次群聚感染事件中的核苷酸相似度則有此現象 [17,18,25] 。

根據 Bodian 的 poliovirus 猩猩感染實驗[19,20]：當病毒在腸道及淋巴節增殖後，進入血液中藉由血液循環到達脊髓運動神經破壞神經原細胞致發生麻痺。病毒依循何種途徑進入血液循環通過血腦屏障(Blood Brain Barrier)到達中樞神經的機制尚待究明，惟感染後患者病毒應會短暫在血液裏出現，因此若能在血液裏分離到病毒將是最直接的證據，由於本次個案急性期之血清量不多且部份個案發病日期已經超過 3 日(若發病日期小於 3 日內，則分離到致病原的機率高；data not show)，所以不適合進行細胞培養之工作。由於台灣低年齡之健康兒童有 12%可以從糞便中分離出腸病毒[19]，不同國家亦有 5~30%不等之報告，所以在流行期中因此從咽喉拭子或糞便中分離到病原體是必須要配合臨床表徵作綜合研判。

以中和試驗的方法來進行腸病毒 71 型血清抗體效價的測定，可間接佐證該腸病毒 71 型病原體應爲本次之致病原，亦對配對血清檢體亦進行了克沙奇 B 族病毒第 3 型的血清抗體效價測定，結果爲個案二、三、六及七腸病毒 71 型抗體效價呈現四倍之上升；克沙奇 B 族病毒第 3 型抗體效價並無此現象，顯示爲腸病毒 71 型近期感染之最佳佐證亦可排除克沙奇 B 族病毒第 3 型爲致病原之可能性。

腸病毒在進入流行期時，院內或群聚感染是有可能發生的[21,22,23,24]，當然也會和病毒本身的毒力、血清型別、感染途徑及年齡等各項因素有關，一個院內或群聚感染的事件証實，是有賴於流行病學相關之背景資料及實驗室之數據相互印證，腸病毒 71 型之群聚感染事件，所進行的鑑定分析結果爲：

一、分離出病原體皆爲腸病毒 71 型。

二、當核苷酸序列相似度爲 98.6%~100%，具有流行病學上的直接關聯性。

三、血清檢體抗體之檢測，配對檢體呈現有意義的 4 倍上升，可顯示爲近期

感染之佐證。

四、腸病毒 VP1 基因序列分析則顯示結果爲腸病毒 71 型，與今年流行株之演化樹分析均落在同一聚集，爲 subgenotype C4。

致謝

本次疫情有賴於本局與衛生局防疫工作人員及台中榮民總醫院病毒室(病毒性合約實驗室)充分掌握時效，在腸病毒之防治、相關個案之追蹤與檢體之採檢等工作不遺餘力，在此致上最深之謝意。

參考文獻：

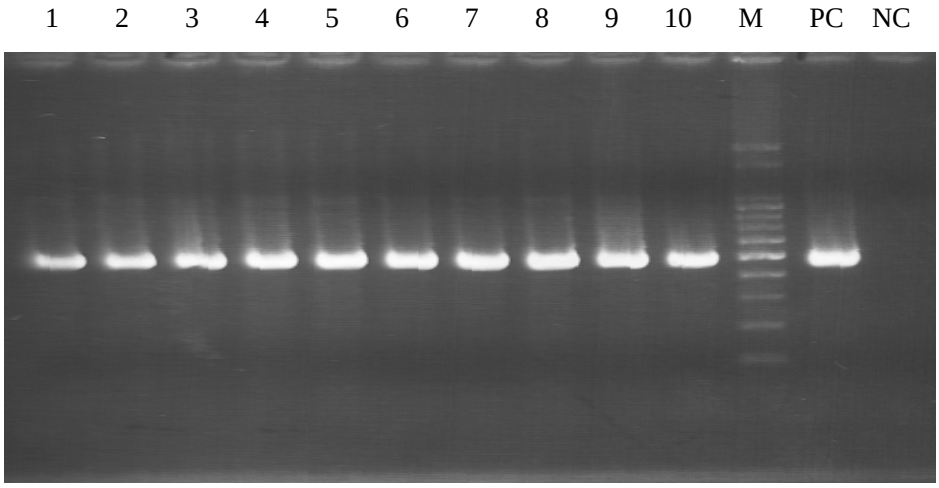
1. Pallansch MA, Roos, RP. Enteroviruses : *Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses.* In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), Fields Virology, third ed. Lippicott-Raven, Philadelphia, 1996 pp. 723-775.
2. Liu CC, Tseng HW, Wang SM, Wang JR, Su IJ. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998 : epidemiologic and clinical manifestiations. *J Clin Viro*l 2000, 17 : 23-30.
3. McMinn P, Stratov I, Dowse G. Enterovirus 71 outbreak in Western Australia associated with acute flaccid paralysis.Preliminary report. *Commun Dis Intell* 1999, 23 : 199.
4. Modlin JF. Perinatal echovirus infection : insights from a literature review of 61 cases of serious infection and 16 outbreaks in nurseries. *Rev Infect Dis* 1986, 8 : 918-926.
5. Dagan R, Hall CB, Powell KR, Menegus MA. Epidemiology and laboratory diagnosis of infection with viral and bacterial pathogens in infants hospitalized for suspected sepsis. *J Pediatr* 1989, 115 : 351-356.
6. Hsiao CC, Tsao LY, Chen HN. Echovirus 11 sepsis in a neonate : report of

one case. *Acta Paediatr Taiwan* 2003, 44 :104-105.

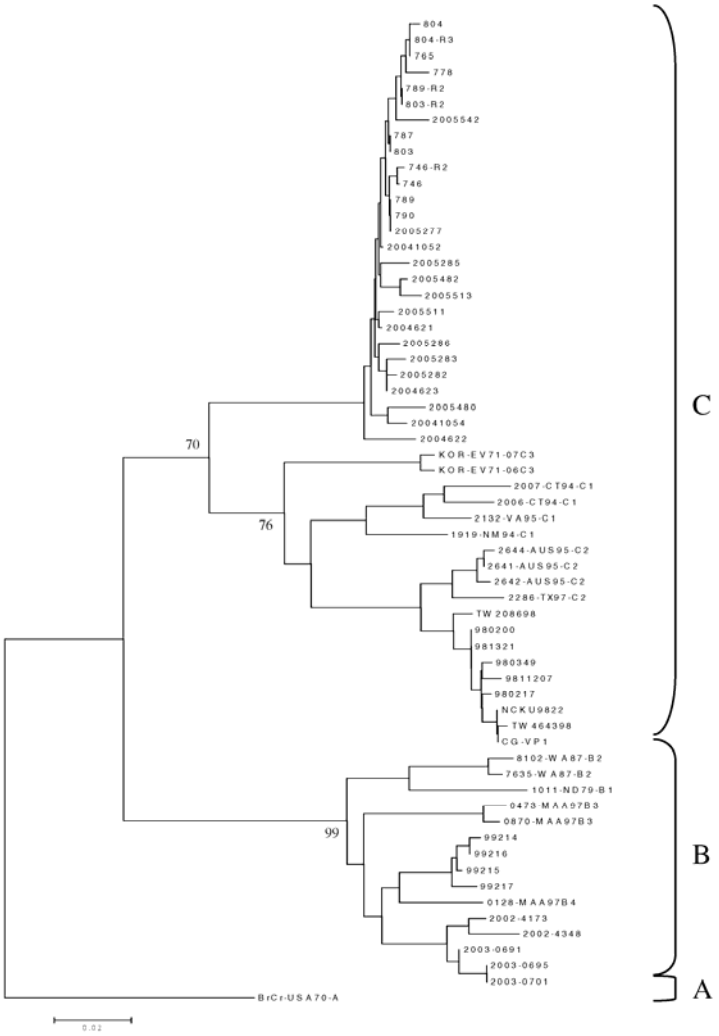
7. Bell EJ, Cosgrove BP. Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bull World Health Organ* 1980, 58 : 423-428.
8. Hennry D. Isenberg. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington D.C. pp 451-523.
9. Bastis, D., Simonet, S., Patterson, MA., 1995. Identification of enteroviruses
   by indirect immunofluorescence using monoclonal antiobodies. *Semin Diagn Virol.* 3, 83-93.
10. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980, 12 : 329-334.
11. Schmidt N J, Lennette E H, 1973. Advance in the serodiagnostic of viral infections. *Pro. Med. Virol.* 15. 244-308.
12. 林翠莉等人,腸病毒即時定量系統(Real-time RT-PCR)對臨床檢體之檢驗與分析。疫情報導 2005，21：p 436~450。
13. Betty A Brown, M. Steven Oberste, James P. Aleander Jr., Margery L. Kennett, and Mark A . Pallansch. Molecular Epidemiology and Evolution of Enterovirus 71 Stranins Isolated form 1970-1998. *J Virol* 1999, 73 : 9969-9975.
14. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human picornavirus Classification. *J virol* 1999, 73 :1941-194.
15. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sepuencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999, 37:1288-1293.
16. 王聖帆等,1998~2004 年台灣地區腸病毒七十一型分子流行病學分。疫情報導 2004，21：p 305~326。

17. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK. Kew, O.M. Geographic distribution of wild Poliovirus type 1 genotypes. *Virol* 1987, 160, 311-322.
18. Bodian D. Poliovirus in chimpanzee tissures after virus feeding.Am.J.Hyg1956 Sep;64(2):181-97
19. Bodian D,Nathanson N. Inhibitory effects of passive antibody on virulent poliovirus excretion and on immune response in chimpanzees. Bull Johns Hopkins Hosp 1960 Sep;107:143-62
20. Wu TH, Chen CY, Yang CS, Chen CL, Chen KP. Prevalence of enterovirus infection among healthy young children in Taipei area. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* 1966, 65 : 99-108.
21. Jerri Ann Jenista, Powell KR, Marilyn A. Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr*, 685~690.
22. Bendig JWA. Bendig, Orla M. Franklin, Anna K. Hebden, Patricia J. Backhous, Jonathan P. Clewley, Alan P. Goldman, and Nick Piggott. Coxsackievirus B3 Sequences in the Blood of a Neonate With Congenital Myocarditis, Plus Serological Evidence of Maternal Infecion. *J Med Virol* 2003, 70 : 606-609.
23. John F. Modlin, MD.Perinatal Echovirus and Group B Coxsackie virus Infections. *Clinic in Perinatology* 1998, 15 : 233-246.
24. Nottay B K,Kew OM, Hatch M H, Heyward JT,Obijeski JF.Molecular variation of type 1 vaccine-related and wild polioviruses during replication in humans. *Virology* 1981, 108, 405-423.

圖一：電泳分析群聚之臨床檢體及分離出之病毒株的結果，其中 M 爲 100bp ladder Marker ,編號 1~7 爲本次群聚之臨床檢體，8~10 爲經分離後之病毒株，另以 DMEM 培養基爲陰性對照組(Negative control)及 2005 年腸病毒 71 型分離株爲陽性對照組(Postive control)



圖二、演化樹分析



以 MEGA version 2.1 操作，採用“Neighbor-joining” 方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。其中 A、B、C 爲腸病毒 71 型的三個亞型。

表一：群聚個案與 2005 年台灣地區腸病毒七十一型分離株之核苷酸序列相似性百分比比較圖

Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
1		99.8	99.8	99.3	99.5	99.3	98.8	99.0	99.0	98.6	99.5	99.8	99.8	98.8	98.6	98.8	98.8	97.6	98.6	98.8	98.3	98.3	**1**	746_.SEQ
2	0.2		99.5	99.5	99.3	99.5	99.0	99.3	99.3	98.8	99.3	99.5	99.5	98.6	98.3	98.6	98.6	97.3	98.3	98.6	98.1	98.6	**2**	746-R2_.se
3	0.2	0.5		99.5	99.8	99.5	99.0	99.3	99.3	98.8	99.8	100.0	100.0	99.0	98.8	98.8	99.0	97.8	98.8	99.0	98.6	98.6	**3**	789_.SEQ
4	0.7	0.5	0.5		99.8	100.0	99.5	99.8	99.8	99.3	99.8	99.5	99.5	98.6	98.3	98.8	98.6	97.8	98.8	99.0	98.6	99.0	**4**	789-R2_.se
5	0.5	0.7	0.2	0.2		99.8	99.3	99.5	99.5	99.0	100.0	99.8	99.8	98.8	98.6	99.0	98.8	98.1	99.0	99.3	98.8	98.8	**5**	803_.seq
6	0.7	0.5	0.5	0.0	0.2		99.5	99.8	99.8	99.3	99.8	99.5	99.5	98.6	98.3	98.8	98.6	97.8	98.8	99.0	98.6	99.0	**6**	803-R2_.se
7	1.2	1.0	1.0	0.5	0.7	0.5		99.8	99.8	99.0	99.3	99.0	99.0	98.1	97.8	98.3	98.1	97.8	98.3	98.6	98.1	98.6	**7**	804_.SEQ
8	1.0	0.7	0.7	0.2	0.5	0.2	0.2		100.0	99.3	99.5	99.3	99.3	98.3	98.1	98.6	98.3	98.1	98.6	98.8	98.3	98.8	**8**	804-R3_.se
9	1.0	0.7	0.7	0.2	0.5	0.2	0.2	0.0		99.3	99.5	99.3	99.3	98.3	98.1	98.6	98.3	98.1	98.6	98.8	98.3	98.8	**9**	765_.SEQ
10	1.5	1.2	1.2	0.7	1.0	0.7	1.0	0.7	0.7		99.0	98.8	98.8	97.8	97.6	98.1	97.8	97.8	98.1	98.3	97.8	98.3	**10**	778_.SEQ
11	0.5	0.7	0.2	0.2	0.0	0.2	0.7	0.5	0.5	1.0		99.8	99.8	98.8	98.6	99.0	98.8	98.1	99.0	99.3	98.8	98.8	**11**	787_.seq
12	0.2	0.5	0.0	0.5	0.2	0.5	1.0	0.7	0.7	1.2	0.2		100.0	99.0	98.8	98.8	99.0	97.8	98.8	99.0	98.6	98.6	**12**	790_.SEQ
13	0.2	0.5	0.0	0.5	0.2	0.5	1.0	0.7	0.7	1.2	0.2	0.0		99.0	98.8	98.8	99.0	97.8	98.8	99.0	98.6	98.6	**13**	2005277.se
14	1.2	1.5	1.0	1.5	1.2	1.5	2.0	1.7	1.7	2.2	1.2	1.0	1.0		99.3	98.3	99.0	98.3	98.8	99.0	98.1	98.1	**14**	2005282.se
15	1.5	1.7	1.2	1.7	1.5	1.7	2.2	2.0	2.0	2.5	1.5	1.2	1.2	0.7		98.1	98.8	98.1	98.6	98.8	97.8	97.8	**15**	2005283.se
16	1.2	1.5	1.2	1.2	1.0	1.2	1.7	1.5	1.5	2.0	1.0	1.2	1.2	1.7	2.0		98.8	97.6	98.6	98.8	98.3	98.3	**16**	2005285.se
17	1.2	1.5	1.0	1.5	1.2	1.5	2.0	1.7	1.7	2.2	1.2	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2		97.8	98.8	98.6	98.1	98.1	**17**	2005286.se
18	2.5	2.7	2.2	2.2	2.0	2.2	2.2	2.0	2.0	2.2	2.0	2.2	2.2	1.7	2.0	2.5	2.2		98.6	98.3	97.8	97.3	**18**	2005480.se
19	1.5	1.7	1.2	1.2	1.0	1.2	1.7	1.5	1.5	2.0	1.0	1.2	1.2	1.2	1.5	1.5	1.2	1.5		98.8	99.3	98.3	**19**	2005482.se
20	1.2	1.5	1.0	1.0	0.7	1.0	1.5	1.2	1.2	1.7	0.7	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.5	1.7	1.2		98.6	98.6	**20**	2005511.se
21	1.7	2.0	1.5	1.5	1.2	1.5	2.0	1.7	1.7	2.2	1.2	1.5	1.5	2.0	2.2	1.7	2.0	2.2	0.7	1.5		98.1	**21**	2005513.se
22	1.7	1.5	1.5	1.0	1.2	1.0	1.5	1.2	1.2	1.7	1.2	1.5	1.5	2.0	2.2	1.7	2.0	2.7	1.7	1.5	2.0		**22**	2005542.se
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**		

表二：群聚感染個案之各項檢驗結果

個案編號	性別	出生日	發病日	檢體種類	檢驗方法				
					EV Real time PCR	RT-PCR	Virus Isolation	EV71 抗體效價	
								急性期	恢復期
指標個案	男	94/03/02	94/04/28	TS(746)	+	+	EV71	1:256 (5 日)	未採檢
				RS(765)	+	+	EV71.		
個案 1	男	94/04/07	94/04/29	TS(788)	-	+	Neg.	1:128 (7 日)	未採檢
				RS(789)	+	+	EV71		
個案 2	男	94/3/14	94/04/29	TS(786)	-	-	Neg.	1:256 (5 日)	1: ≧1024 (21 日)
				RS(787)	+	+	Neg.		
個案 3	男	94/03/28	94/05/02	TS(790)	+	+	Neg.	1:128 (5 日)	1: ≧1024 (24 日)
				RS(778)	+	+	Neg.		
個案 4	女	94/04/23	94/05/03		無檢體			1:64 (2 日)	未採檢
個案 5	男	94/04/12	94/05/05	TS(807)	-	-	Neg.	1:32 (2 日)	未採檢
				RS(808)	-	+	Neg.		
個案 6	男	94/02/06	94/05/06	TS(803)	+	+	EV71	1:256 (2 日)	1: ≧1024 (14 日)
				RS(804)	+	+	EV71		
個案 7	男	94/04/11	94/05/07	TS(809)	-	+	Neg.	1:128 (4 日)	1: ≧1024 (12 日)
				RS(810)	+	+	Neg.		