

『紅眼症』病原體之確認與分子流病之分析與探討

林翠莉、黃教威、徐秋菊、李宜學、林瑩貞、吳和生、李麗俐

疾病管制局研究檢驗中心

摘要

台灣地區於 2007 年十月爆發了『紅眼症』的疫情，這個疫情在基隆市與雲林縣首度傳開，隨即台灣地區其他縣市均有該症狀的個案通報，症狀通報個案數約 16,047 人(2007.10.19)。計有 91 例的個案進行臨床檢體的採檢並送往疾病管制局進行病原體的分離與鑑定，個案之居住地分佈於台北市、基隆市、台北縣、雲林縣及嘉義縣等五個縣市，男性與女性的比例為 1.1:1，並分佈在不同的年齡層，其中年齡最小為出生 2 個月的嬰兒，最大 86 歲。實驗室採用多種不同的檢驗方法同時進行病原體之鑑定與確認，造成此次『紅眼症』的病原體為腸病毒克沙奇病毒 A24 變異株(CoxsackievirusA24 variant; CA24v) 並應稱之為急性出血性結膜炎(Acute hemorrhagic conjunctivitis; AHC)；在分子流行病學分析顯示，病原體的基因型是屬於 Genotype III 的 cluster6，和 2005 年流行於新加坡引起的急性出血性結膜炎所分離出的病毒株最為相似接近。台灣地區自 1985 年起隨著時序的變遷，該病原體出現在不同的年代，然而這次的疫情是自 1994 年後首度發生在北台灣的基隆市並有往南散播的趨勢；從症狀的出現到結束不到一個月的時間，衛生單位運用了多重的防治策略，媒體的宣導、學校教育的導入、各醫療單位的配合及防疫人員努力，多洗手，勿共用毛巾及有症狀者少進入公共場所如學校及辦公室及加強個人的衛生習慣等，是阻斷或降低病原體傳染的有效法，加上疫情發生之際適時序入秋，這時流行於台灣地區的腸病毒不如夏季明顯，台灣地區對於 CA24v 在分子流行病學上自 1986 至 2003 年的病毒株在親緣系統

西元 2007 年 11 月 29 日受理；西元 2008 年 3 月 5 日接受刊載

通訊作者：林翠莉；聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

e-mail：tllin@cdc.gov.tw

樹上所呈現的 lineage 和發生的時序有關，常常二年的病毒株座落在同一個 lineage，所以應持續加強紅眼症的通報及病原體的監測能力，以防另一波的疫情再度發生。

關鍵字：紅眼症、克沙奇病毒 A24 變異株(Coxsackievirus A24 variant ; CA24v)、急性出血性結膜炎(Acute hemorrhagic conjunctivitis ; AHC)、基因型(Genotype)

前言

急性出血性結膜炎(Acute haemorrhagic conjunctivitis ; AHC)是一個高度傳染發生在眼部的疾病，該症狀在 1969 年由迦納這個國家首次報告的，臨床症狀為突然的疼痛、腫脹、紅眼、異物感、結膜出血並伴隨著過量的淚液等，其中一眼於 6~12 小時內便會出現這樣的症狀，然而在 80%的病患中，另一眼則於 24 小時內也會產生相同的症狀〔1〕。除了腺病毒(Adenovirus)之外，在腸病毒屬中有二個血清型可以造成這樣的症狀；一為腸病毒型別 70(Enterovirus 70 ; EV70)，另一個為克沙奇病毒 A24 變異株(Coxsackievirus A24 variant ; CA24v)皆可引發流行；CA24v 最早被分離到是在 1970 年新加坡爆發的急性出血性結膜炎，自此在 15 年內它引起的疫情一直在東南亞及印度，直到 1985 再度流行時即快速的散至日本、台灣、美國及部份的歐洲及南非國家均有疫情傳出，如 1987 年在巴西、1988 年波多黎各，在同一時間迦納及奈及利亞有相同的疫情，隨即在 2000 年後，由此病原體所造成的急性出血性結膜炎陸續傳出；2002 年的韓國，2003 年的突尼西亞、蓋亞納、西印度及巴西及 2005 年的新加坡等國家〔2-5〕，CA24v 除可成上述眼部的症狀外，事實上它可由健康的群族、患有感冒、腹瀉及急性肢體麻痺的個案中分離出該病原體〔5〕。

CA24v 首次出現在台灣地區為 1985 年〔6〕，隨著時序的變遷，該病原體分別於 1985-1986 年、1988-1989 年、1990-1991 年及 1994 年造成急性出

血性結膜炎的流行，雖在後續的年代該病毒引起急性出血性結膜炎較屬於散發性的〔7〕，遠不如 2007 年的這一波疫情。

在分子流行病學上，引起 AHC 病原體的 CA24v 大都以 3C 這一段基因為演化上及追溯病原體在不同時間、不同地域的相關性分析，以 3C 所建構 CA24 v 的親緣系統樹中，可以類分為三個基因型，分別為 Genotype I、II、III，其中屬於 Genotype I、II 於 1970 年代是來自於新加坡、香港及泰國等地分離株，而屬於 Genotype III 則包含有 1985~2005 年代自日本、台灣、迦納、香港、泰國，新加坡、巴基斯坦及迦納等地分離株；Genotype III 可再進一步區分為六個基因亞型，每一個基因亞型則與每一個流行地區所分離出的病毒，伴隨著時序上的關連性〔4,5,6,8,9〕。

材料與方法

一、檢體來源

檢體之採檢來自於出現紅眼症疫情之縣市，計有 91 例個案，臨症狀之通報為結膜炎、眼部出現分泌物及疼痛等，檢體以採檢眼部之拭子並送至疾病管制局研究檢驗中心進行病原體之分離與各項鑑定工作。

二、病毒分離[10-11]

將採檢眼部拭子取其保存液經 3000rpm，15 分鐘，離心後將上清液接種於 RD、HEp-2C 及 Hela 等三種細胞株，置於 36°C 含有 5% 的二氧化碳培養箱培養，10 天為觀察終止日，當接種細胞之檢體出現顯著細胞病變(Cytopathic effect, CPE)，則離心收取上清液，進行血清型別之鑑定及分子生物檢測；另殘留之細胞可為間接免疫螢光染色之用。

三、間接免疫螢光 (IFA) 染色鑑定〔12〕

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，則判定為陽性，呈現紅色螢光則判定為陰性。

四、病毒血清中和試驗[13]

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(Cell Culture Infective Doses; CCID₅₀)，稀釋成 100 CCID₅₀ 之病毒量，採用 96 孔平面的細胞培養盤與每 20u / 50ul 的 Anti-CA24 variant 抗血清(in house)進行中和反應，每日觀察細胞病變連續 4 日，確定血清型別。

五、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 ul 加入 560 ul Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 ul 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°C 純水(RNase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於各反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)。

六、腸病毒即時定量系統(Enterovirus Real-time RT-PCR) [14]

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:580-5)，探針 EV-Probe 5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-TAMRA-3'。以 ABI7900 的儀器分析，反應條件為 48 °C 30 分鐘、95°C 10 分鐘，設定循環 95°C 30 秒，60°C 1 分鐘，反應 40 個循環。

七、CODEHOP反轉錄-半套巢式聚合鏈鎖反應(CODEHOP reverse transcription- seminested PCR RT-snPCR) [15]

取 5ul 的 RNA，加入 5xPCR buffer，10 μM primer mix(primers AN32, AN33, AN34, and AN35，加入 20 U RNase out，100 μM dNTP、0.01 M DTT、100 U

of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)，混合均勻後，反應在 22 °C,10min; 42°C, 60min; 95°C ,5min。得到 10ul 的 cDNA，進行 PCR1 反應，2xPCR buffer、200 μM dNTP、50 pmol primers 224 and 222，.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)，補足水至 50ul，混合均勻，PCR 反應條件為 95°C for 30 s, 42°C for 30 s, 60°C for 45 s，共 40 個循環，產物大小約為 700bp。接著要進行第二次 PCR 反應，取出 1ul PCR1 產物，加入 40 pmol primers AN89 and AN88、200 μM dNTP、2.5 U Taq DNA polymerase(Invitrogen)，總體積為 50μl，PCR 條件為 95°C for 30 s, 60°C for 20 s, 72°C for 15 s，40 個循環反應，之後進行電泳分析，產物大小約為 350bp ~400bp。

八、反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR) [8]

取 5μl 的 RNA，RT-PCR 總反應體積為 50μl，包含; SuperScript III RT 反轉錄酵素(Invitrogen, USA)200U、Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) 5 U、2xPCR buffer、200 μM dNTP、50 pmolprimers，增幅 3C 基因片段。使用 ABI 9700 PCR thermal cyclers 進行 RT-PCR 反應，條件如下: 42°C, 50min; 94°C, 5min, 以下列條件進行 34 個循環反應 94°C ,60sec，55°C, 45sec，72°C, 60sec，最後在 72°C 作用 10 分鐘。

Primer :

D1(forward primer)	CAAACGTGTTTGCTGGGCA	nt 5371to 5390
U2 (reverse primer)	CTTCTTTTGATGGTTCAT	nt 6025to 6044

八、演化樹(Phylogenetic tree)之分析

以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 3.0 操作。採用“Neighbor-joining”方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析[16]。

結果

一、個案基本資料之分析

在本次送驗的 91 例個案中，地域的分佈來自五個縣市，分別為台北市的文山區；計有 5 例，基隆市的七堵區、中正區、安樂區、中山區、仁愛區、信義區及暖暖區；計有 49 例，台北縣的汐止市、板橋市及新莊市；計有 15 例，雲林縣的斗六市、荊桐鄉、西螺鎮及虎尾鎮；計有 14 例及嘉義縣的新港鄉，阿里山及民雄鄉等；計有 8 例，基隆市通報的個案最多且其區域涵蓋全市，所有通報個案男性與女性的比例為 1.1:1，並分佈在不同的年齡層，小於 10 歲計有 16 例、11-20 歲 24 例、21-30 歲 9 例、31-40 歲 15 例、41-50 歲 15 例及大於 50 歲以上 12 例，其中年齡最小為出生 2 個月的嬰兒，最大 86 歲。見表一

二、病毒分離與鑑定

91 件體的檢體當中，計有 61 件檢體出現檢體在 HEp-2c 的細胞株出現細胞病變(CPE)，在單一細胞株的分離率為 67.0%，分離陽性的檢體有 93.4%的檢體在四天內出現細胞病變，平均病原體分離時間為 3 天，對於出現細胞變變之檢體則進行臨床上常用於腸病毒鑑定的間接免疫螢光染色，60 件與 Coxsackievirus A24 單株抗體呈現陽性的反應，另一件為腺病毒(Adenovirus)。

三、中和試驗(型別鑑定)

選取五縣市之分離陽性病毒株各一株進行中和試驗的型別鑑定與確認，換算每一株分離株之 CCID₅₀ 病毒量，結果顯示所有的分離株皆可與 20u / 50ul 的 Anti-CA24 variant 抗血清產生所中和，中和能力的 CCID₅₀ 介於 640~42000；血清型別可確認為 CA24v。

四、腸病毒即時定量系統

將 91 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 57 件尚未培養的臨床原檢體呈現腸病毒的陽性反應，陽性率為 62.6%。

五、CODEHOP 反轉錄-半套巢式聚合鏈鎖反應

91 件尚未進行培養的臨床原檢體經過離心之前處理，進行該方法之檢測，由二次聚合酶的連鎖反應，經電泳的分析，位於 VP1 的部份基因片段 350~400bp 的位置被增幅出來，產物進行基因定序分析、將基因序列登錄 National Center of 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 CVA24，總計有 72 件檢體，陽性率為 79.1%；各項臨床檢體檢驗之結果詳見表二。

六、反轉錄及聚合酵素連鎖反應

選取間接螢光染色法及部份中和試驗型別確認的病毒株計有 16 株，進行 3C 基因片段的增幅，將產物以進行洋菜膠電泳及定序分析，將基因序列登錄 National Center of 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)，顯示該基因片段皆與 CVA24 variant 的相似度最高。

七、演化樹分析

將 14 株 2007 年 CA24v 分離株與不同地域的參考病毒株(reference strains) 及標準株(Prototype)計有 45 株，於建構 3C 基因片段的親緣系統樹，顯示這次 CA24v 的分離株是屬於 genotypeIII 的 cluster6，病毒株之間核苷酸序列的相似性為 99.0~100%，和 2005 年的新加坡 Dso-26/2005 及 Dso-52/2005 落在同一個 cluster，核苷酸序列的相似性 97.8~98.6%；台灣地區於 1986 年所爆發的流行為 genotypeIII(AHC10-1)，但為該亞型的 cluster1，並與這次的疫情其核苷酸序列的相似性為 92.2~93.0%。見圖一

討論

在這次『紅眼症』的疫情中，實驗室在第一線的時間選擇了多種不同的檢驗方法，以分子生物學方法之檢測並配合傳統的病毒學檢驗，目的在於早期釐清病原體之屬性及提供防治更為有效之作爲；方法的配套爲傳統的細胞培養做用於病原體之分離、腸病毒即時定量系統反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應(Enterovirus Real-time RT-PCR)及CODEHOP反轉錄-半套巢式聚合鏈鎖反應及首度利用臨床檢體將離心後的沉澱物直接進行間接免疫螢光染色等，由於細胞培養需要觀察細胞病變的出現方可進一步確認病原體的型別，然而病原體的出現細胞病變時受到相當多因素的影，如檢體的採檢、運送、接種前的處理及所選取細胞株的感受性，皆可影響其分離時間，在時效較難即時符合防治需求，但病原體的出現相較於分子生物之檢測所得到的證據更為明確，所以時效上仍以分子生物學的檢測較為符合疫情的需求；因此在檢體檢測的第一個時間點，我們選擇了腸病毒即時定量系統反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應(Enterovirus Real-time RT-PCR)時，即已測得有出現腸病毒的反應，但確無法確認腸病毒的型別，所以在進行細胞培養的同時我們亦將臨床檢體離心所留下的沉澱物(即殘留的細胞)以市售螢光染劑進行染色時，部份檢體的細胞出現了Pan-Enterovirus及Anti-CA24單株抗體的陽性反應，而Anti-EV70的單株抗體則爲陰性反應(事實上在這個階段似乎造成此波急性出血性結膜炎的雛形已出現形了)，當然在採用分子生物學檢測的同時亦首度採用了CODEHOP反轉錄-半套巢式聚合鏈鎖反應的檢測，本法最大的目的是可利用臨床的檢體直接進行聚合鏈鎖反應，並可直接將腸病毒的型別定出，所以當有產物出現時，可進行基因定序的流程，經部份序列比對亦顯示型別與CA24病原體基因的相似度最高，雖說在此階段有關病原體的型別無庸置疑的應爲腸病毒的血清型CA24；由於對腸病毒病原體的檢測方法受限於方法本身的設計與應用，所以對於一個造成疫情的病原體の確認以上述的方法雖可確認但仍需中和試驗鑑定；中和試驗是雖是浪費時間、人力及需不同的血清型別，

所以無法廣泛應用於臨床，但對於腸病毒血清型別鑑定及確認是被公認的黃金標準(gold standard)方法，所以我們進而選了五株不同縣市的分離株進行此項試驗，最終鑑定並確認為CoxsackievirusA24 variant。

台灣是一個島國位於西太平洋地區，由於亞熱帶氣候及高密度的人口比例，有利於傳染性的疾病的散播，所以2007年台灣地區再度因CA24v所引發的急性出血性結膜炎，反應出了病原體本身的特性、流行的模式、年齡分佈、地域性的差異、群體免疫的狀態、防治措施的進行及分子流行病的關係；由所採檢的檢體進行細胞培養時，其分離的時間平均只有3天，反應出病毒的量較多且繁殖的能力較快，相對增加了傳染的速率。這是自1994在台灣區所引發急性出血性結膜炎較具規模的疫情，且是第一次流行在北台灣地區的基隆市而傳播開來，而不再是侷限於南台灣的高雄市，顯示著地域上的差異。由於群體免疫亦是決定流行幅度的因素之一，藉由高雄大學對於CA24v和EV70這二個可以引起急性出血性結膜炎的腸病毒進行的血清流行病學調查結果顯示，在1981年前有關CA24v 的抗體只有5.3%；EV70平均為34.0%〔17〕意味著EV70雖在1971年在台灣地區造成疫情，但在這之前即已流行過了；而CA24v在1985年前時並非是地域性持續的流行在台灣地區，在一個長時間都無此疫情發生或是只有偶發的個案，是造成群體免疫逐漸下降的因素，助長了下一波的流行具有相當大的空間。CA24v亦類歸於微小病毒科的腸病毒屬，但年齡層的分佈和歷年流行在台灣地區的腸病毒血清型別有所不同，根據疾病管制局病毒性病原體的監測系統顯示年齡因腸病毒感染個案比較集中在低年齡層，而CA24v突顯在具有較高活動力的年齡層，小於10歲的個案是最少的，這也是生活的型態反應出傳染的模式。

在分子流行病學的分析，顯示著CA24 variant自1970年被分離出來後，這個祖先隨著時序的變遷，在不同年代，不同的地域，不僅有著演化上的關係，且在每一個疫情的發生，有著時空上的背景，可追溯其來源；其演化有著固定的速率，為 $3.7 \times 10^{-3}/\text{year}$ ；位於3C親緣系統樹上，自1970~2005年CA24v主

要可以分爲三個基因型，基因型和病原體被分離年代有時序上的關係，1970~1971 年的 GenotypeI、1975 年的 GenotypeII 及自 1985~2005 年的 GenotypeIII，這個基因型自 1985 年流行於世界各地，並可因時序及地域的不同再分爲六個基因亞型，再類分爲 GenotypeIII cluster1~6，每一個基因亞型的形來自於每一個流行所分出的病毒。CA24v 自 1985 年出現在台灣地區後，雖在不同的年代亦發生了不同規模的流行，但所有的基因型都類歸在 GenotypeIII，惟時序顯示出基因亞型的不同，分別爲 1985-1986 年 GenotypeIII cluster1、1988-1989 年 GenotypeIII cluster5、2001~2002 年 GenotypeIII cluster6；2007 年的病毒株其基因型亦爲 GenotypeIII cluster6，由整個 GenotypeIII cluster6 (圖一) 則顯示可再分爲二個 lineages，台灣地區的分離株在 2000~2001 年則自形一個 lineage1，2002 和 2007 年的分離株同屬另一個 lineage2，但從系統樹上可以看出 2002-2004 年有很多地區都發生了因 CA24v 所引起的急性出血性結膜炎並同屬 GenotypeIII cluster6 lineage2，雖說 2005 年新加坡的分離株及 2007 台灣的分離株目前屬於 GenotypeIII cluster6 lineage2，但時序及地域的變遷，將使 GenotypeIII cluster6 可再細分爲三個 lineages，而 GenotypeIII cluster6 lineage3 則爲 2005 年後的分離株。

這次急性出血性結膜炎的疫情從症狀的出現到結束不到一個月的時間，防治策略的運用是不可或缺的，如多洗手，勿共用毛巾及有症狀者少進入公共場所如學校及辦公室及加強個人的衛生習慣等，是阻斷或降低病原體傳染的有效法，惟本次的疫情發生之時適逢時序入秋，這時流行於台灣地區的腸病毒其活動力不如夏季明顯，根據南台灣對於 CA24v 在分子流行病學上自 1986 至 2003 年的病毒株在親緣系統樹上所呈現的 lineage 和發生的時序有關，常常二年的病毒株座落在同一個 lineage，所以持續應加強紅眼症的通報及病原體的監測能力，以防另一波的疫情再度發生。

2007 年在台灣地區因 CA24v 所造成急性出血性的疫情，有幾個經驗是值得我們借鏡的：

- 一、實驗室首度使用 CODEHOP RT sn-PCR 的檢驗方法及利用臨床檢體所殘留的細胞直接進行間接免疫螢光法染色，以利爭取時效。
- 二、本次急性出血性結膜炎是自 1994 年後首度發生在北台灣基隆市的疫情並向外散播，所以病原體一直循環在環境當中，尋找尚未感染的宿主；另群體免疫與易感宿主之間的關係，也可導致病原體的傳遞被阻斷或再度流行。
- 三、年齡的分佈及病毒的分離時間反應出傳染的模式及傳染速率。
- 四、從疫情的發生到結束不到一個月的時間，顯示腸病毒的型別因傳染模式的不同及防治策略的重要性。

誌謝

謹對於文中發生疫情縣市衛生局的防疫人員致最深的謝意，感謝他們在疫情發生之際對於個案的追蹤、檢體的採檢運送及執行各項防治措施的進行等。

參考文獻

1. Kurokawa M, Rai SK, Ono K, et al. Viral investigation of acute hemorrhagic conjunctivitis outbreak (2003) in Nepal using molecular methods. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006;37:904-10.
2. Dussart P, Cartet C, Huguet P, et al. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in French Guiana and West Indies caused by coxsackievirus A24 variant: Phylogenetic Analysis Reveals Asian Import. *J Med Virol* 2005;75:559-65.
3. Gopalkrishna V, Patil PR, Kolhapure RM, et al. Outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Maharashtra and Gujarat States of India, caused by coxsackie virus A-24 variant. *J Med Virol* 2007;79:748-53.
4. Yeo DS, Seah SG, Chew JS, et al. Molecular identification of coxsackievirus

- A24 variant, isolated from an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis in Singapore in 2005. *Arch Virol* 2007;152: 2005-16.
5. Triki H, Rezig D, Bahri O, et al. Molecular characterisation of a coxsackievirus A24 that caused an outbreak of acute haemorrhagic conjunctivitis, Tunisia 2003. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:176-82.
 6. Lin KH, Wang HL, Sheu MM, et al. Molecular epidemiology of a variant of coxsackievirus A24 in Taiwan: two epidemics caused by phylogenetically distinct viruses from 1985 to 1989. *J Clin Microbiol* 1993;31:1160-6.
 7. Chang CH, Lin KH, Sheu MM, et al. The change of etiological agents and clinical signs of epidemic viral conjunctivitis over an 18-year period in southern Taiwan. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2003;241:554-60.
 8. Lin KH, Chern CL, Chu PY, et al. Genetic analysis of recent Taiwanese isolates of a variant of coxsackievirus A24. *J Med Virol* 2001;64:269-74.
 9. Ishiko H, Takeda N, Miyamura K, et al. Phylogenetic analysis of a coxsackievirus CA24 variant: The most recent worldwide pandemic was caused by progenies of a virus prevalent around 1981. *Virology* 1992;187: 748-59.
 10. Isenberg HD. Essential procedures for clinical microbiology, American Society for Microbiology, Washington, DC. 1998:451-523.
 11. Park SW, Lee CS, Jang HC, et al. Rapid identification of the coxsackievirus A24 variant by molecular serotyping in an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis. *J Clin Microbiol* 2005;43:1069-71.
 12. Rigonan AS, Mann L, Chonmaitree T. Use of monoclonal antibodies to identify serotype of enterovirus isolate. *J Microbiol* 1998; 1877-81.
 13. Schidt NJ and Lennette EH. Advances in the serodiagnosis of viral infections. *Prog Med Virol* 1973;15:244-308.

14. Lin TL, Wang SF, Yang JY, et al. Application of real-time RT-PCR in enterovirus detection from clinical specimens. *Epidemiol Infect* 2005;21:436-50.
15. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA, et al. 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.
16. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, et al. 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.
17. Lin KH, Sheu MM, Huang WL, et al. Seroepidemiological study of coxsackievirus type A24 variant (CA24v) pre and post-epidemic in Taiwan. *Kaohsiung J Sci* 10:606-12

表一、送驗個案基本資料分析表

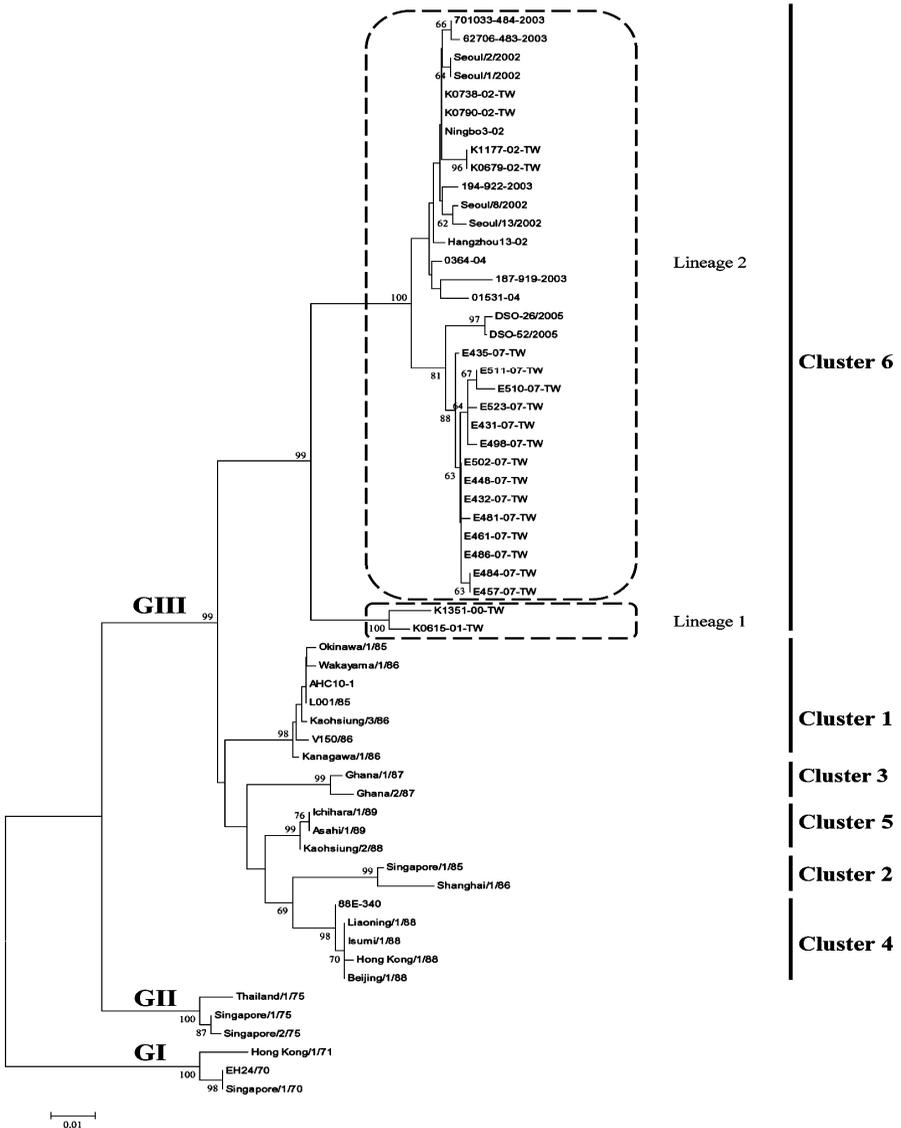
縣市別	個案數	男：女	年 齡 分 佈(歲)					
			<10	11-20	21-30	31-40	41-50	>50
台北市	5	1.5:1	0	3	1	1	0	0
基隆市	49	1.45:1	10	14	3	8	10	4
台北縣	15	1:1.5	1	3	4	3	3	1
雲林縣	14	1:1	4	1	0	1	1	7
嘉義縣	8	1:1	1	3	1	2	1	0
總 計	91	1.1:1	16	24	9	15	15	12

表二、結膜拭子不同檢驗方法結果之分析

細 胞 培 養	不同檢驗方法結果之件數								
	CODEHOP RTsn-PCR			Real time PCR			Pellet IFA ^{**}		
	總計	陽 性	陰 性	總計	陽 性	陰 性	總計	陽 性	陰 性
陽 性	61	57	4	61	51	10	35	12	23
陰 性	30	15	15	30	6	24	5	0	5
總 計	91	72	19	91	57	34	40	12	28

※為採檢結膜拭子經處理離心後之沉澱物直接進行間接免疫螢光法之染色

圖三、1970~2007 年 CA24v 親緣系統樹(3C region 511nt)



採用 “Neighbor-joining” 方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次。