

## 1998~2004 年台灣地區腸病毒流行血清型別之分析

### 摘要：

民國八十七年夏天台灣地區爆發腸病毒的流行，曝露出我國在整體病毒監測體系的不完善，衛生署疾病管制局於民國九十一年起建立病原體基因資料庫，逐年收集並且回溯調查腸病毒臨床檢體的基因體與疾病臨床症狀資料，期建立完備的腸病毒監測系統。腸病毒監測網的建立使得防疫單位可以藉由逐年累積的本土腸病毒感染症資料庫，去瞭解不同血清型別的腸病毒在台灣地區的週期變動情形，充分掌握其流行趨勢。本研究乃藉由種系演化樹分析台灣地區 2002 與 2004 年未知血清型別腸病毒排行榜首位的 CVA4 的 VP1 基因片段，結果只有一種基因型並無法依據病毒株分離時間與分離地區歸類出不同的基因型。

根據疾病管制局腸病毒基因體資料庫的統計，1998 年至 2004 年 9 月為止，未知血清型別腸病毒每年的平均比率為 52.9%，本局研究檢驗中心因應此問題，針對近年台灣地區腸病毒群流行株血清型別排行榜中常見的克沙奇病毒 CVA2、A3、A4、A5、A6 及 A10 等建置間接免疫螢光染色法的檢測系統，統一各病毒性合約實驗室對未知血清型別腸病毒之檢測模式，縮短檢測時間有助於迅速建立每年腸病毒流行株之趨勢，凝聚臨床檢驗的焦點。腸病毒監測網可以作為分析不同血清型別的腸病毒因應特殊的地理環境、季節條件產生流行的週期變化及盛行率變化的研究基礎。本研究發現以病毒基因分析而歸類為 HEV-A 腸病毒群，近年來在台灣地區流行的病毒株佔最多數。

### 簡介：

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。腸病毒基因組是單股、正性的 RNA，基因組大小接近 7.5Kb，基因組結構見圖 1。腸病毒

基因組是由單一的開放閱讀框構( open reading frame ; ORF )所組成，此一開放閱讀框構的兩側分別是 5' 及 3' 端不轉譯區( non-translated region, NTR )，開放閱讀框構經轉譯成長約 2,100 個胺基酸的單一聚蛋白 ( polyprotein )，此聚蛋白在複製過程中再被切割成組成病毒結構的蛋白質 VP4、VP2、VP3 及 VP1 等，以及其他與複製有關的蛋白質。

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產生，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。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、皮疹與疱疹性咽喉炎有關 ; 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 ; 當時並不知道會引發人類產生疾病 ; 不會感染老鼠。 )。隨著會感染老鼠且其抗原性和已知伊科病毒相同的腸病毒病原體被發現，以及伊科病毒被證明和許多人類疾病有關，科學家意識到原有的 4 個類別無法包含所有種類的腸病毒，因此新發現的人類腸病毒血清型被簡單命名為「腸病毒」 “ Enteroviruses ”( EV )，依照發現的順序從 EV 68 開始命名[1,2]。目前總共有 64 種血清型的腸病毒被普遍認定，尚有 6 種血清型仍在研究確認的過程，依據病毒基因組轉譯區與 3' 端非轉譯區的核苷酸序列相似性可以將人類腸病毒屬分為 5 個種( species )：分別是(1) *Poliovirus* ( PV1-3 )，(2) *Human enterovirus A* ( HEV-A ) (包括 CVA2~CVA8，CVA10，CVA12，CVA14，CVA16 與 EV71 )，(3) *Human enterovirus B* ( HEV-B ) (包括 PV1-3，CVA9，CVB1~CVB6，E1~E7，E9，E11~E21，E24~E27，E29~E33，

EV69 與評估中的 EV73 )，(4) *Human enterovirus C* ( HEV-C ) (包括 CVA1，CVA11，CVA13，CVA15，CVA17~CVA22 與 CVA24 )及(5) *Human enterovirus D* ( HEV-D ) (包括 EV68 與 EV70)等 5 個種，由於演化關聯性很接近 polioviruses 被建議與 HEV-C 合併成爲同一個種[3,4]。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，即是民國 87 年在台灣地區造成大流行，超過 300,000 人感染，導致 78 例個案死亡的病原體[5,6]。

腸病毒的鑑定方法有中和試驗、各血清型單株抗體螢光染色法、酵素免疫分析法、反轉錄聚合酵素鏈鎖反應( RT-PCR )及病毒核苷酸定序等，其實驗室黃金標準診斷法( golden standard method )是先利用細胞培養分離出病毒，再以標準化的 pool 抗血清進行中和試驗鑑定[7~9]。腸病毒中和試驗具有下列四種缺點: (1) 非常消耗時間、人力 (2) 目前 pool 抗血清僅有 64 種血清型中的 40 種 (3) 抗血清的供應是限量的 (4) 抗原變異株的產生與少數具有凝聚特性的病毒株會使得中和試驗的困難度增加。所以目前疾病管制局研究檢驗中心病毒實驗室(以下簡稱本實驗室)與各合約實驗室針對臨床檢體腸病毒病原之分離，首先將檢體接種於不同感受性細胞株，進行細胞培養，當出現細胞病變時，則佐以各血清型單株抗體間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay ; IFA)將腸病毒之血清型別鑑定出，有 19 種腸病毒之血清型別可經由商品化之間接免疫螢光染色法之單株抗體鑑定出，分別爲小兒麻痺病毒第 1-3 型( Poliovirus type 1~3 )，克沙奇 A 族病毒第 9、16 及 24 型( CVA9,16,24 )，克沙奇 B 族病毒第 1~6 型( CVB1~B6 )、伊科病毒第 4、6、9、11 及 30 型( Echovirus type 4,6,9,11,30 )，及腸病毒 70、71 型( Enterovirus 70, 71 )等，間接免疫螢光染色法縮短了檢驗時程，各實驗室依其能力自行斟酌以中和試驗或 RT-PCR 方法作進一步確認，但目前檢驗結果以間接免疫螢光染色法的結果居多。無法用單株抗體鑑定出血清型別之病毒株則歸類爲未知血清型別腸病毒( unknown serotypes )，尚約有 40 種血清型別的腸病毒單株抗體仍未被商品化應用在臨床腸病毒檢體之檢測。

藉由結合病毒性合約實驗室與病原體基因資料庫的腸病毒監測網的實施，陸續將 2000 年至 2004 年向各病毒性合約實驗室回收之腸病毒陽性分離株以及前行政院預防醫學研究所因應 1998 年台灣地區腸病毒大流行所檢測的全國疑似腸病毒感染所分離的腸病毒病原體，檢測為未知血清型別腸病毒之病原體已可藉由部份基因序列的定序與 GenBank 資料庫中的腸病毒參考病毒序列比對，分析其血清型別歸檔入腸病毒基因體資料庫，腸病毒監測網的建立可以幫助瞭解本土腸病毒流行血清型別的趨勢。

## 材料與方法：

### 檢體收集

檢體為收集疑似腸病毒感染之檢體(含腸病毒感染重症可能病例)，檢體的種類包括咽喉拭子( Throat swab )、肛門拭子( Rectal swab )、糞便( Stool )，腦脊髓液 ( CSF )及血液等。

### 病毒培養

將前處理完畢的檢體( 包括肛門拭子、咽喉拭子、糞便等 )取 200ul 接種於不同感受性細胞株如 RD、HEp-2C、Hela、Vero、MRC-5 等細胞，置於 36°C，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 ( IFA ) 染色鑑定

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。

### 病毒血清中和試驗

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<sub>50</sub> )，稀釋成 100 TCID<sub>50</sub> 之病毒量，與每 20 U / 50 $\mu$ l 的各種血清型別抗體中和，確定其血清型別。

#### 病毒RNA的萃取

使用病毒核酸純化試劑組( QIAGEN Inc, CA, USA )進行病毒 RNA 的純化，吸取檢體 140 ul 加入 560 ul AVL 緩衝液於室溫下作用 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，離心管以 AW 緩衝液清洗兩次以後，用 AVE 緩衝液將 RNA 離心溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應。

#### 反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 ( Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR )

#### 參考

Primer :

| 編號  | 序 列                       | 對應病毒序列位址    |
|-----|---------------------------|-------------|
| 011 | 5'-GCICIGAYTGITGCCRAA -3' | (3408-3389) |
| 292 | 5'-MIGCIGYIGARACNGG-3'    | (2613-2628) |

註：引子對出處參考文獻[10].

#### ( 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<sub>2</sub>、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul 及antisense primer :011 50 pmole的混合物中，70°C 10 分鐘，再加入 100 units MuLV-reverse transcriptase，於 37°C 作用 90 分鐘。

#### ( 2 ) 聚合酶鏈鎖反應 ( Polymerase Chain Reaction, PCR )

以Reverse Transcription反應中所得cDNA進行PCR，20  $\mu$ l cDNA加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% Triton-X 100、ATCG

dNTP mixture 1 mM及primer: 011 及 292 各 50 pmole的混合物中，加入 5 units Taq polymerase (Promega Inc, WI, USA )，於 94°C 變性 (denature) 3 分鐘後，以 94°C 1 分鐘、48°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72°C 作用 15 分鐘。

#### 演化樹分析 (Phylogenetic tree analysis)

分析民國八十四年至民國九十三年之間，由病患檢體定序所得到之 CVA4 病毒序列 ( 95330056、98797、981032、990081、99010341、2002170、2002620、2002625、2002645、20021790、20022379、20022381、20022383、20022387、20022394、20032656、20032729、20033283、20037186、2004167、2004311、2004370、2004379、2004388、2004389、2004400、2004431、2004432、20040570 及 04-0898-2 等) 34 筆資料，與原型病毒株 ( Prototype strain High Point, GenBank accession no. AY421762 ) CVA4，以及 GenBank 中可以搜尋到的 CVA4 參考序列 AB114087-Japan 2000、AB167794-Japan、AB167796-Japan 與 AB162723-Japan 2003 等 4 筆資料，以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis ( MEGA ) version 3.0 操作。採用 " Neighbor-joining " 方法，重覆計算 ( Bootstrap ) 1,000 次作演化樹分析。

#### 結果：

##### 1. 未知血清型別腸病毒之鑑定

根據本局腸病毒基因體資料庫統計 1998 至 2004 年病毒性合約實驗室及本實驗室檢出腸病毒數據顯示，共檢出腸病毒病原體 17,166 件，各年度的鑑定出已知血清型別的比率介於 27.2%~61.9%之間，無法使用單株抗體間接免疫螢光染色法鑑定出血清型別的未知血清型別腸病毒比率介於 38.1%~72.8%的高比率之間，整體而言，此段期間平均分離出的未知血清型別腸病毒比率為 52.9%，見表 1。本實驗室另針對 1998 年台灣地區腸病毒大流行所蒐集檢測出的未知血清型別腸病毒病原體全部進行中和試驗及基因

定序分析，希望釐清該年度每件檢體的血清型別，該年度未知血清型別的檢體分別為 CVA2-32 件、CVA4 - 16 件、CVA5 - 2 件、CVA6 - 13 件、CVA8 - 1 件、CVA10 - 5 件、Echo 7 - 3 件與 Echo 25 - 2 件等共 74 件。對於無法使用單株抗體間接免疫螢光染色法鑑定出的未知血清型別腸病毒進行基因定序分析，以求進一步降低無法釐清血清型別的病毒株的比例，2001~2004 年多分析出共 1,426 株的病毒株血清型別，其中 2002 年分析出的未知血清型別中，CVA4 51.3% ( 164 / 320 )及 CVA10 28.4% ( 91 / 320 )最多；2003 年分析出的未知血清型別中，CVA2 31.5% ( 173 / 549 )、CVA6 30.6% ( 168 / 549 )及 CVA5 26.0% ( 143 / 549 )佔前三位；2004 分析出的未知血清型別則是以 CVA4 80.1% ( 422 / 527 )最多，其他結果詳見表 2。

## 2. 每年流行腸病毒血清型前 10 名分析

結合病毒性合約實驗室、本局基因體計畫核心實驗室及本實驗室使用間接免疫螢光染色法、基因定序比對及中和試驗的資料，分析統計台灣地區 1998 至 2004 年期間常見被分離出的非小兒麻痺病毒的腸病毒( nonpolio enterovirus, NPEV )病原體 9,824 件，列出 NPEV 腸病毒病原體每年流行血清型別前 10 名，見表 3。結果顯示在不同的年代，分別有不同的血清型別的腸病毒群在流行，進一步歸納出兩類主要的血清型別流行型態，第一類的血清型別流行型態屬於每年持續出現的血清型別並且時常是當年主要的腸病毒流行株，例如 EV 71 與 CVA16 兩個血清型別，其中，EV 71 是 1998 及 2000 年主要的腸病毒流行株，而 CVA16 則是 2002 及 2003 年主要的腸病毒流行株；第二類的血清型別流行型態屬於經常出現的血清型別，但從未成爲主要的腸病毒流行株，例如 CVA2、CVA6、CVA9、CVA10、CVA24、CVB4 及 CVB5 等血清型別；少數的血清型別流行型態屬於不規則出現的血清型別，但出現即成爲該年度主要的腸病毒流行株，例如 1999 年主要的腸病毒流行株 CVB3、2001 年主要的腸病毒流行株 E 4 及 2004 年主要的腸病毒流行株 CVA4 等。綜合分析台灣地區 1998 至 2004 年 9 月底期間 NPEV 腸

病毒的流行狀況，基因型分析主要屬於 HEV-A 的克沙奇 A 族病毒在台灣地區相當的活躍，而屬於 HEV-C 的 CVA 1、CVA11、CVA13、CVA15、CVA17、CVA18、CVA19、CVA20 及 CVA22 等血清型別病毒在台灣地區尚未被分離出，HEV-A 中只有 CVA14 未被分離出，其餘皆已在台灣地區被分離出，部分的 HEV-A 克沙奇 A 族病毒如 CVA 2、CVA 4、CVA 5、CVA 6、CVA 8、CVA 10 及 CVA 12 等血清型別病毒，在 1998~2004 年間已成為在主要的流行株，每隔 2~3 年會再次出現。可以看出每年的腸病毒流行並非單一血清型別在流行，而是同時存在好幾種血清型別的流行，每年的前 10 名排行榜累積統計放包含了 93.74~99.48 % 的全部台灣地區流行血清型別種類。

### 3. 台灣地區腸病毒基因型類別的流行

病毒基因組轉譯區與 3' 端非轉譯區的核苷酸序列相似性可以將微小 RNA 病毒科中的腸病毒屬分為 *Poliovirus*、HEV-A、HEV-B、HEV-C、HEV-D 等 5 個種，將台灣地區流行的 NPEV 腸病毒血清型別依此分類方法區分，見圖 2，其中由於 1999~2001 年未知血清型別的比率仍佔 44.4 %~69.1 % 的高比率，會影響主要流行血清型別的分析，所以不列入參考，此部分待進一步基因定序分型後再納入。可以觀察出 HEV-A 在台灣地區自 2002 年的 58 % 以來，呈現逐漸增加的趨勢，至 2003 年的 83 % 及 2004 年的 68 %，顯見遺傳學關聯性相近的 HEV-A 血清型別群在台灣地區的腸病毒感染中佔有很高的比例。HEV-A 包括 CVA2~CVA8，CVA10，CVA12，CVA14，CVA16 與 EV71 等血清型別，其中 CVA4 在 2002 年 10.26 % 佔前 10 名排行榜的第 4 位，至 2004 年 39.51 % 升到排行榜的第 1 位，今年有明顯增加的趨勢，見表 3。

### 4. 台灣地區腸病毒流行型別 CVA4 的演化樹分析

此現象引發本實驗室利用基因型遺傳演化樹探討其分子流行病學關聯性的興趣，我們在未知血清型別的腸病毒基因定序分析的部分 CVA4 在 2002 年分析出 164 株，2004 年分析出 422 株，追溯從 1995~2004 年所有的 CVA4 感染案件挑選出不同時間點與不同地區的病毒株 34 株進行基因定序分析，

與 GenBank 中的原型病毒株(CVA4 Prototype strain High Point, accession no. AY421762 )，以及 GenBank 中可以搜尋到臨近台灣地區的日本登載 CVA4 參考序列 AB114087-Japan 2000、AB167794-Japan、AB167796-Japan 與 AB162723-Japan 2003 等 4 筆資料共同進行比對，整體核苷酸序列相似性介於 84.0 % ~ 99.8 %之間，台灣地區的 CVA4 腸病毒分離株與原型病毒株 High Point 的序列相似性較低介於 84.0 % ~ 87.6 %之間；台灣地區 2004 年的 CVA4 腸病毒分離株 E2004379 與日本地區 2003 年的 CVA4 腸病毒分離株 AB162723-Japan 核苷酸序列相似性高達 99.6 %，而台灣地區 2002 年的 CVA4 腸病毒分離株 20022394 與日本地區的 CVA4 腸病毒分離株 AB167796-Japan 核苷酸序列相似性最低只有 84.8 %；而台灣地區的 CVA4 腸病毒分離株之間的核苷酸序列相似性介於 84.4 % ~ 99.8 %之間，見表 4。進行台灣地區 1995~2004 年的 CVA4 腸病毒分離株演化樹叢分析，見圖 3，可以觀察出台灣地區的 CVA4 腸病毒分離株只有一個基因型。

#### 討論：

目前總共有 64 種血清型別的腸病毒被普遍認定，包括 3 種不同的小兒麻痺病毒血清型別在內。多數感染腸病毒者沒有症狀，有些只有發燒或類似一般感冒的症狀，少數感染腸病毒者會出現特殊的疾病，包括疱疹性咽峽炎、無菌性腦膜炎、腦炎、新生兒腸道病毒性疾病、嬰兒急性心肌炎、成人心包膜炎、急性出血性結膜炎、類小兒麻痺病毒疾病、手足口病與非特異性上呼吸道疾病等症狀等與 NPEV 病原體有關[1]。腸病毒屬於季節性的流行疾病，在人口稠密、環境濕熱的亞洲國家，如 1985 年(香港)、1997 年(馬來西亞、日本)、1998 年(台灣)及 1999 年(澳大利亞、香港)等均有不同規模的流行，且經常會爆發嚴重的大流行，例如 1998 年台灣地區爆發嚴重的腸病毒流行感染，約有 30 萬人次受到腸病毒感染，其中，全年合乎腸病毒感染之監測系統重症通報病例(手足口症、咽峽炎併有無菌性腦膜炎、腦炎、急性肢體

無力或心肌炎等)共 405 名的重症兒童以及 78 名的死亡案例，其重症感染死亡率為 19.3 %，造成國內民眾的恐慌[5,6]。衛生署遂於民國八十八年三月在台灣北、中、南、東四區成立「病毒性感染症合約實驗室」，主要目的是作為腸病毒之監視系統，提供台灣地區每年腸病毒血清型別的主要流行趨勢，民國八十九年起共有臺大醫院、三軍總醫院、林口長庚醫院、台中榮總、中國醫藥大學附設醫院、彰化基督教醫院、成大醫院、高醫附設醫院、高雄榮總、高雄長庚醫院及慈濟醫院等十一家醫院的病毒實驗室共同參與腸病毒監測網。衛生署疾病管制局於民國九十一年起建立病原體基因資料庫，逐年收集腸病毒臨床檢體的基因體資料，嘗試解決未知血清型別腸病毒的部分，使得腸病毒監測網的資料更加完備。

疾病管制局研究檢驗中心病毒實驗室(以下簡稱本實驗室)與各合約實驗室的臨床檢體腸病毒病原之檢驗程序是先將檢體接種於不同感受性之細胞株，進行細胞培養，當出現細胞病變時，則佐以各血清型單株抗體間接免疫螢光染色法將腸病毒之血清型別鑑定出，無法用單株抗體鑑定出血清型別之病毒株則歸類為未知血清型別腸病毒。未知血清型別腸病毒可以利用基因定序的方法，經由序列比對鑑定出其血清型別，雖然目前血清型別的鑑定無法對病人的治療有所幫助，但是可以提供流行病學上的重要資訊，特別是幫助腸病毒流行案件的調查與病毒血清型別對應特殊疾病關聯性的研究。台灣地區腸病毒監測網的未知血清型別腸病毒比率平均是 52.9 %，見表 1，相較於美國 CDC 的國家腸病毒監測系統( **National Enterovirus Surveillance System, NESS** )所公佈的數據，在實施基因定序的方法之後未知血清型別腸病毒比率平均是 19.7 %，台灣地區腸病毒監測網的未知血清型別腸病毒比率明顯偏高許多。欲建立完整的每年腸病毒主要血清型別流行趨勢，必須先解決未知血清型別腸病毒比率偏高的問題，才得以反應接近真實的流行現況，基因定序的發展與應用能幫助解決未知血清型別腸病毒比率偏高的問題，惟受限於耗費人力、經費成本考量與確定血清型別現行對醫院在臨床治療上並

無助益，所以目前仍未被各合約實驗室廣泛應用於大量分析未知血清型別腸病毒部分，而是各實驗室依其能力自行斟酌是否以中和試驗或基因定序方法作進一步確認，合約實驗室回報的檢驗結果仍是以快速、簡便的間接免疫螢光染色法的結果居多。為因應此問題，本實驗室已於 94 年科技計劃提出了「台灣地區腸病毒群流行株間接免疫螢光染色法系統之建立與應用」，逐年針對近年來由流行腸病毒血清型別前 10 名排行榜所分析出的台灣地區常見的 CVA2、CVA3、CVA4、CVA5、CVA6 及 CVA10 等腸病毒血清型別建立間接免疫螢光染色法的檢測系統，間接螢光染色法可解決現階段本局所回收為 NPEV 腸病毒株之檢體，其優點為可以大幅縮短檢測時間、可統一各合約實驗室對 NPEV 之檢測模式與節省基因庫進行基因定序所需耗費時間及經費等，達到迅速建立腸病毒監測網觀察台灣地區腸病毒流行株之趨勢的目的。

本實驗室與本局病原體基因資料庫核心實驗室利用基因定序鑑定血清型別加上進一步用中和試驗進行確認，回溯分析未知血清型別腸病毒部分，2001~2004 年共定序 1,396 株未知血清型別腸病毒，加上少數亦同樣使用基因定序鑑定血清型別的合約實驗室所回報的血清型別及序列資料，彙集已知血清型別腸病毒整理出台灣地區每年 NPEV 腸病毒主要的血清型別流行趨勢排行榜。根據文獻定義 NPEV 流行病毒株( epidemic type )是指該年度被分離出的某血清型別佔所有被分離出的血清型別總和數的 20 % 以上的病毒株，可以看出台灣地區 2000 年的 NPEV 流行病毒株是 EV 71 與 CVA16，2001 年是 E4、EV 71 與 CVA16 ( 部分的間接免疫螢光法鑑定出的 E4，利用基因定序及中和試驗鑑定出為 E30，經研究該年度的 anti-E30 單株抗體不適用於鑑定台灣地區的 E30 病毒分離株，E4 的確實比率還有待確認釐清 ) [14]，2002 年是 CVA16 與 E6，2003 年是 CVA16，2004 年則是 CVA 4 與 CVB 4，2004 年 9~12 月 CVA10 有大幅增加的趨勢，惟 1999 及 2000 年由於當時腸病毒監測體系尚未健全，檢體數目過少是否能真正反應當時情況有待進一步蒐集當時的流行病學資料才能確定。此外，據台灣地區每年腸病毒主要的血

清型別流行趨勢排行榜的統計，見表 3。檢體資料齊全的 1999~2004 年前 10 名累計平均佔全部已知血清型別的 93.74 % ~ 99.48 %，相較於 NESS 所公佈的前 15 名累計平均佔 88.6 % ~ 98.2 % 有偏高的趨勢，台灣地區被分離出的 NPEV 血清型別種類較美國少是導致此現象的主要原因，依照基因定序基因型方法區分台灣地區 2001~2004 年流行的血清型別主要是屬於 HEV-A，而美國地區此段時期流行的血清型別主要是屬於血清型別種類較 HEV-A 多的 HEV-B，美國地區的流行血清型別數確實比台灣地區多。腸病毒之監視系統所提供台灣地區每年腸病毒血清型別的主要流行趨勢，就流行病學探討上發現腸病毒好發於夏季及初秋季節，台灣地區主要流行的月份為 3~5 月及 9~11 月兩段時期，依據美國 CDC 分析 14 年的 NPEV 監視系統資料，發現利用每年度 3~5 月發生的血清型別流行趨勢的排行榜前 6 名血清型別，去預測該年度下半年主要的 NPEV 流行病毒株血清型別具有統計學上的意義，當出現兩種血清型別發生率相同時，選擇和前一年的主要 NPEV 流行病毒株相同的血清型別作為預測血清型別，其結果會符合下半年主要的 NPEV 流行病毒株血清型別[15]，然而以台灣地區的資料進行相同的流行血清型別預測，並不會產生符合預期的預測血清型別結果，其原因需更進一步去探討，本實驗室希望藉由腸病毒監測網資料庫的統計分析，找出可以預測台灣地區流行血清型別的方法。目前國內有許多研究團隊投入腸病毒疫苗與抗腸病毒藥物的研發工作，國家衛生研究院正在研究抗病毒藥物或化合物對不同的腸病毒血清型別的抗病毒能力，初步成果顯示在對抗 EV71、CVA9 及 CVA24 等 3 種血清型別 NPEV 有具體的成效，針對不同血清型別的抗病毒藥物若研發成功，腸病毒監測網提供的該年度主要流行血清型別趨勢與預測流行血清型別兩項功能，將來除了可以提供防疫政策決定與臨床治療上重要的資訊，亦可以幫助臨床病毒實驗室凝聚腸病毒血清型別檢驗的焦點。

由於腸病毒基因體具有的高突變率，我們可以利用基因片段遺傳演化樹對相同血清型別的病毒株進行分子流行病學上的分析，腸病毒血清型別是以

病毒中和試驗為基礎，其中基因體 VP1 被分析出具有多個重要的中和決定位 [10,11]，Rico-Hesse 等分析小兒麻痺病毒( HEV-C )中演化選擇壓力最大的 VP1/2A 區域 150 bps 的片段，定義超過 15 % 核苷酸序列相異比例為不同的基因型( genotype )，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，並且觀察出通常任一血清型別的不同基因型會具有獨特的地理分布特性或季節時間特性[12]。Santti 等同樣分析 CVA9( HEV-B ) 的 VP1/2A 區域，將片段大小延伸至 390 bps，用相同的判斷標準檢視結果，同樣可觀察出任一血清型別的不同基因型會具有獨特的地理分布特性或季節時間特性的現象[13]。有鑑於未知血清型別的腸病毒基因定序分析的部分 CVA4 在 2002 年佔 51.3% ( 164 / 320 )，2004 年截至九月為止佔 80.1% ( 422 / 527 )，本實驗室從 1995~2004 年所有的 CVA4 感染案件挑選出不同時間點與不同地區的病毒株 34 株進行遺傳演化樹分析，嘗試釐清 CVA4 病毒株的分子流行病學關聯性，用相同標準檢視 VP1/2A 區域，將片段大小延伸至 500 bps，得到 CVA4 核苷酸序列相異比例不超過 15 %，只有一種基因型，並無法依據病毒株所分離時間或分離地區歸納出特定的流行基因型，相較於 PV 與 CVA9 兩種病毒而言，CVA4 在此基因片段的演化速率相對較慢，推論其原因可能與所選擇的 VP1/2A 區域並非 CVA4 遭受到演化選擇壓力最大的區域，其重要的中和決定位可能位於其他的基因片段，需進一步分析其他基因片段才能證明，不過仍可利用核苷酸序列相異比例小於 2 %時兩株病毒株具有直接關聯性來進行不同腸病毒流行案件在流行病學方面的討論。此外，台灣地區 2004 年的 CVA4 腸病毒分離株 E2004379 與 GenBank 搜尋獲得的日本地區 2003 年的 CVA4 腸病毒分離株 AB162723-Japan 核苷酸序列相似性高達 99.6 %，CVA4 亦是近年來日本地區的腸病毒流行血清型別，台灣與日本地區的 CVA4 病毒分離株是否具有直接關聯性必須藉由相關的流病資料綜合分析才能下定論。

建立完善的腸病毒感染監測系統是本局持續努力的目標，期能達到提供

防疫政策決定與臨床治療上重要的資訊，亦可以幫助臨床病毒實驗室凝聚腸病毒血清型別檢驗的焦點，本實驗室嘗試在整個系統中扮演好回溯追蹤腸病毒基因體資料庫檢體及提昇實驗室腸病毒檢驗品質的重要角色。

#### 致謝：

本文謹對所有 Diagnostic Contract Virology Laboratory 及本局資源管理組參與基因體計畫工作同仁致上最深之謝意。

**撰稿者：**李祥吉<sup>1</sup>、林翠莉<sup>1\*</sup>、柯玉芬<sup>2</sup>、楊文志<sup>2</sup>、吳秀玲<sup>2</sup>、王聖帆<sup>1</sup>、楊世仰<sup>2</sup>、楊志元<sup>1</sup>、陳培哲<sup>3</sup>、陳豪勇<sup>1</sup>

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資源管理組

3. 台大醫學院臨床醫學研究所

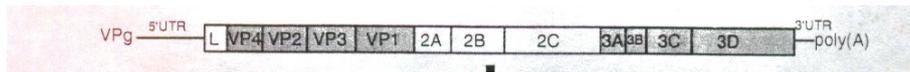
#### 參考文獻

1. Pallansch, M.A. and Roos, R.P. (1996) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, third ed. Lippicott-Raven, Philadelphia, pp. 723-775.
2. Racaniello, V.R. (1996) Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, third ed. Lippicott-Raven, Philadelphia, pp. 685-722.
3. Oberste, M.S., Penaranda, S., Maher, K. and Pallansch. (2004) Complete genome sequences of all members of the species *Human enterovirus A*. J. Gen. Virol. 85, 1597-1607.
4. King, A.M.Q., Brown, F., Christian, P. and 8 other authors. (2000). *Picornaviridae*. In Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 657-678.

5. Centers for Disease Control and Prevention. (1998) Deaths among children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease – Taiwan, Republic of China, April-July 1998. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 47, 629-632.
6. Wu, T.-N., Tsai, S.-F., Li, S.-F., Lee, T.-F., Huang, T.-M., Wang, M.-L., Hsu, K.-H., and Shen, C.-Y. (1999) Sentinel surveillance for Enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 458-460.
7. Hyppia, T., Hovi, T., Knowles N.J. and Stanway, G. (1997) Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78, 1-11.
8. Pulli, T., Koskimies, P. and Hyppia, T. (1995) Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. *Virology.* 212, 30-38.
9. Oberste, M.S., Maher, K., Flemister, M.R., Marchetti, G., Kilpatrick, D.R. and Pallansch, M.A. (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1170-1174.
10. Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R., Flemister, M.R., Brown, B.A. and Pallansch, M.A. (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1288-1293.
11. Oberste, M.S., Maher, K., Kilpatrick, D.R. and Pallansch, M.A. (1999) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to Picornavirus classification. *J. Virol.* 73, 1941-1948.
12. Rico-Hesse, R., Pallansch, M.A., Nottay, B.K. and Kew, O.M. (1987) Geographic distribution of wild Poliovirus type 1 genotypes. *Virol.* 160, 311-322.

13. Santti, J., Harvala, H., Kinnunen, M. and Hyppia, T. (2000) Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J. Gen. Virol.* 81, 1361-1372.
14. Wang, J.-R., Tsai, H.-P., Huang, S.-W., Kuo, P.-., Kiang, D., and Liu, C.-C. (2002) Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4439-4444.
15. Strikas, R. A., Anderson, L. J. and Parker, R. L. (1986 ) Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. *J. Infect. Dis.* 146, 103-108.

圖 1 腸病毒基因組結構示意簡圖



(摘錄自 B.N. Fields, Virology, 3<sup>rd</sup>, 1996.)

表 1 台灣地區西元 1998~2004 年腸病毒合約實驗室及研究檢驗中心檢出腸病毒報告-血清型確認情況數目與百分比

|       | Years          |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|-------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|       | 1998           | 1999             | 2000             | 2001             | 2002             | 2003             | 2004             | 總計               |
| 血清型狀態 | No. (%)        | No. (%)          | No. (%)          | No. (%)          | No. (%)          | No. (%)          | No. (%)          | No. (%)          |
| 已知血清型 | 120<br>(61.9%) | 507<br>(27.2%)   | 1,849<br>(50.3%) | 2,729<br>(54.1%) | 1,313<br>(48.2%) | 976<br>(47.9%)   | 590<br>(36.5%)   | 8,084<br>(47.1%) |
| 未知血清型 | 74<br>(38.1%)  | 1,360<br>(72.8%) | 1,830<br>(49.7%) | 2,319<br>(45.9%) | 1,412<br>(51.8%) | 1,062<br>(52.1%) | 1,025<br>(63.5%) | 9,082<br>(52.9%) |
| 總計    | 194            | 1,867            | 3,679            | 5,048            | 2,725            | 2,038            | 1,615            | 17,166           |

表 2 台灣地區 2001~2004 年未知型別腸病毒基因定序血清型別之分析

| 血清型別           | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 |
|----------------|------|------|------|------|
| coxsackie A2   | 1    | 15   | 173  | 16   |
| coxsackie A3   |      | 1    | 15   |      |
| coxsackie A4   |      | 164  | 4    | 422  |
| coxsackie A5   |      |      | 143  | 31   |
| coxsackie A6   | 25   | 5    | 168  | 44   |
| coxsackie A7   |      | 1    |      |      |
| coxsackie A8   | 1    | 2    |      | 1    |
| coxsackie A10  |      | 91   | 30   | 6    |
| coxsackie A12  | 1    | 13   | 19   | 1    |
| coxsackie A21  |      | 5    |      |      |
| echo 3         |      | 1    |      |      |
| echo 7         | 1    | 2    |      |      |
| echo 13        |      | 6    | 1    |      |
| echo 14        |      | 1    |      |      |
| echo 15        |      |      | 5    |      |
| echo 16        |      | 1    | 1    | 1    |
| echo 19        |      | 1    |      |      |
| echo 20        |      | 3    |      |      |
| echo 25        | 1    | 5    |      | 5    |
| echo 27        |      | 2    |      |      |
| enterovirus 68 |      | 1    |      |      |
| Total          | 30   | 320  | 549  | 527  |

表 3 台灣地區常見被分離出非小兒麻痺病毒的腸病毒( nonpolio enterovirus, NPEV )血清  
型別前 10 名分布排名 1998-2004

| Rank         | Years                  |                        |                         |                         |                         |                        |                         |
|--------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|              | 1998                   | 1999                   | 2000                    | 2001                    | 2002                    | 2003                   | 2004                    |
|              | ( n = 194 )            | ( n = 576 )            | ( n = 1,888 )           | ( n = 2,806 )           | ( n = 1,598 )           | ( n = 1,504 )          | ( n = 1,263 )           |
| Serotype %   | Serotype %             | Serotype %             | Serotype %              | Serotype %              | Serotype %              | Serotype %             |                         |
| 1            | enterovirus71<br>37.11 | coxsackie B3<br>33.85  | enterovirus 71<br>35.01 | echo 4<br>28.65         | coxsackie A16<br>20.84  | coxsackie A16<br>40.23 | coxsackie A4<br>39.51   |
| 2            | coxsackie A2<br>16.49  | coxsackie B2<br>15.28  | coxsackie A16<br>24.58  | enterovirus 71<br>28.05 | echo 6<br>20.21         | echo 11<br>11.97       | coxsackie B4<br>25.89   |
| 3            | coxsackie A16<br>11.34 | coxsackie B1<br>14.58  | echo 9<br>14.25         | coxsackie A16<br>21.24  | enterovirus 71<br>15.64 | coxsackie A2<br>11.50  | enterovirus 71<br>10.93 |
| 4            | coxsackie A4<br>8.25   | coxsackie A10<br>11.98 | coxsackie B3<br>10.12   | echo 6<br>14.22         | coxsackie B5<br>11.58   | coxsackie A6<br>11.17  | coxsackie A6<br>4.04    |
| 5            | coxsackie A6<br>6.70   | coxsackie A16<br>7.64  | coxsackie B4<br>6.36    | coxsackie B4<br>2.57    | coxsackie A4<br>10.26   | coxsackie A5<br>9.51   | coxsackie A5<br>3.17    |
| 6            | echo 6<br>6.19         | coxsackie A24<br>5.21  | echo 4<br>3.23          | coxsackie A9<br>1.53    | coxsackie A10<br>6.01   | enterovirus 71<br>3.32 | coxsackie A16<br>2.30   |
| 7            | coxsackie A10<br>2.58  | echo 4<br>3.99         | coxsackie B1<br>2.22    | coxsackie A6<br>0.89    | coxsackie A24<br>4.13   | coxsackie B2<br>2.53   | coxsackie A10<br>2.22   |
| 8            | coxsackie B5<br>2.06   | enterovirus 71<br>3.47 | coxsackie A9<br>2.07    | coxsackie B5<br>0.86    | coxsackie B2<br>2.82    | coxsackie B5<br>1.99   | coxsackie A2<br>2.22    |
| 9            | echo 4<br>2.06         | coxsackie B4<br>1.74   | coxsackie A24<br>0.53   | echo 30<br>0.50         | echo 4<br>1.31          | coxsackie A10<br>1.99  | coxsackie A9<br>2.06    |
| 10           | echo 7<br>1.55         | coxsackie B5<br>1.74   | echo 30<br>0.42         | coxsackie A24<br>0.36   | coxsackie A2<br>0.94    | coxsackie A12<br>1.26  | coxsackie B5<br>1.98    |
| <b>Total</b> | <b>94.33</b>           | <b>99.48</b>           | <b>98.79</b>            | <b>98.87</b>            | <b>93.74</b>            | <b>95.47</b>           | <b>94.32</b>            |

圖 2. 台灣地區常見被分離出非小兒麻痺病毒的腸病毒( nonpolio enterovirus, NPEV )血清型別前 10 名分布排名依分子分型型別分類比例示意圖。

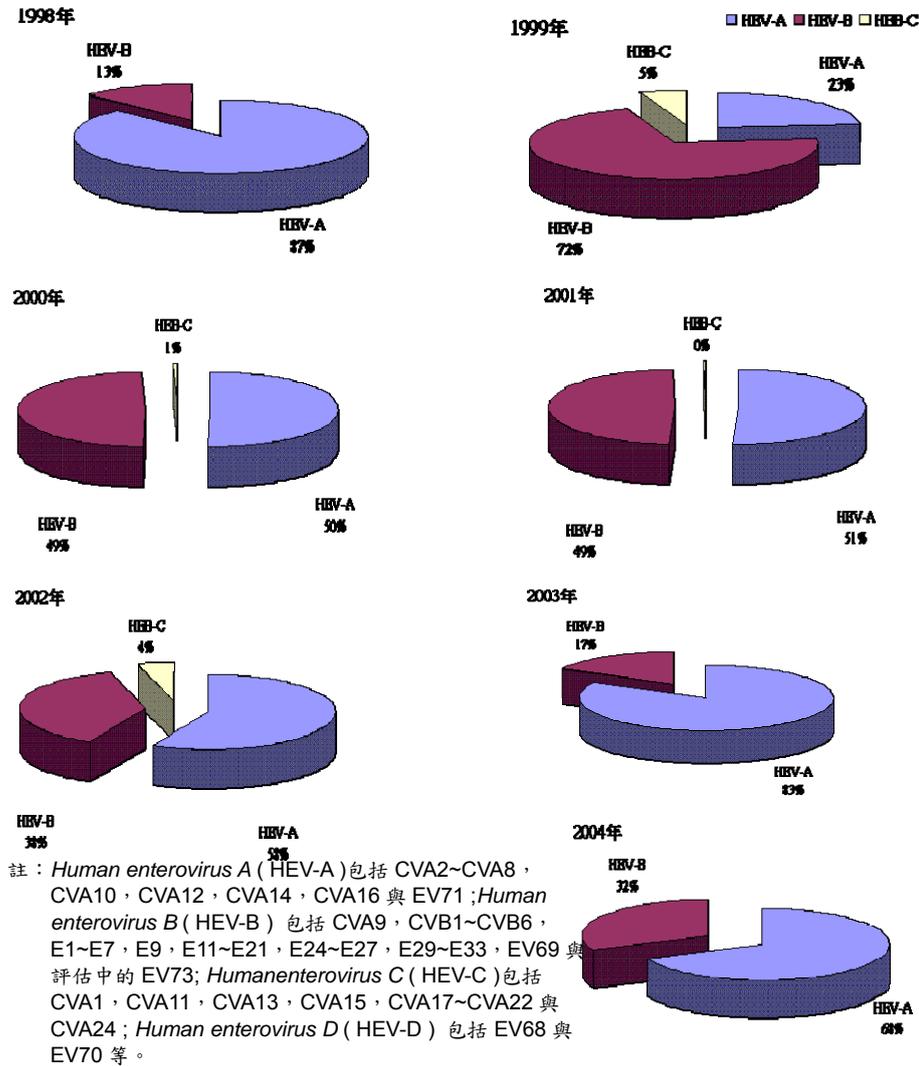


表 4 演化樹分析所選擇台灣地區 CVA4 與參考病毒株之核苷酸序列相似性百分比比較圖

|            |    | Percent Identity |      |      |      |      |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |                        |      |                           |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|------------|----|------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------------------|------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|------|---------------------------|---------------------------|
|            |    | 1                | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9     | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15   | 16   | 17   | 18   | 19    | 20   | 21   | 22   | 23   | 24   | 25   | 26   | 27   | 28   | 29   | 30   | 31   | 32   | 33   |                        |      |                           |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
| Divergence | 1  | █                | 97.4 | 97.6 | 97.2 | 97.0 | 97.6 | 97.4 | 97.6 | 98.0  | 97.4 | 97.4 | 97.2 | 97.0 | 97.2 | 97.0 | 95.8 | 95.6 | 96.6 | 95.0  | 94.6 | 95.8 | 96.2 | 96.4 | 96.4 | 96.2 | 95.2 | 94.8 | 94.0 | 94.6 | 94.0 | 95.0 | 94.8 | 1    | high point CVA-seq     |      |                           |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 2  | █                | 99.4 | 99.0 | 99.6 | 99.6 | 98.4 | 99.4 | 99.0 | 98.8  | 99.0 | 98.2 | 97.8 | 95.0 | 95.8 | 95.8 | 96.6 | 96.6 | 96.4 | 96.2  | 99.2 | 99.0 | 99.2 | 99.0 | 99.0 | 97.8 | 95.6 | 97.2 | 97.6 | 97.0 | 97.0 | 97.2 | 97.0 | 2    | E2004167R5_202-new-SEQ |      |                           |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 3  | █                | 14.0 | 0.6  | █    | 99.6 | 97.2 | 99.2 | 99.0 | 100.0 | 99.6 | 99.4 | 99.4 | 99.6 | 99.8 | 98.4 | 95.6 | 95.6 | 95.6 | 91.2  | 99.2 | 99.2 | 99.8 | 91.2 | 99.8 | 99.8 | 99.6 | 97.6 | 95.4 | 97.0 | 97.4 | 98.8 | 96.4 | 97.0 | 96.8                   | 3    | 20037186-0SR1_202-new-SEQ |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 4  | █                | 14.4 | 1.0  | 0.4  | █    | 99.8 | 98.8 | 99.6 | 99.6  | 99.2 | 99.0 | 99.0 | 99.2 | 99.4 | 99.0 | 99.2 | 95.2 | 95.2 | 96.8  | 96.8 | 96.8 | 96.8 | 90.4 | 90.8 | 99.4 | 99.4 | 99.2 | 97.2 | 95.0 | 96.6 | 97.0 | 96.4 | 96.0 | 96.6                   | 96.4 | 4                         | AB162723-SEQ                |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 5  | █                | 14.8 | 3.5  | 2.9  | 3.3  | █    | 97.6 | 97.4 | 97.2  | 96.8 | 96.6 | 97.4 | 97.2 | 96.6 | 96.8 | 97.2 | 95.2 | 95.2 | 96.8  | 96.8 | 96.2 | 96.8 | 91.2 | 99.8 | 99.8 | 99.0 | 96.4 | 95.0 | 96.6 | 97.0 | 96.4 | 96.4 | 96.6 | 96.6                   | 96.6 | 5                         | AB114087-SEQ                |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 6  | █                | 14.0 | 1.4  | 0.8  | 1.2  | 2.4  | █    | 99.8 | 99.2  | 99.8 | 99.0 | 99.2 | 98.4 | 98.4 | 98.0 | 95.2 | 95.2 | 96.4 | 96.4  | 96.2 | 96.2 | 96.2 | 90.0 | 90.4 | 99.0 | 99.0 | 98.8 | 97.2 | 95.0 | 97.0 | 97.4 | 98.8 | 96.8 | 97.0                   | 96.8 | 6                         | AB167794-SEQ                |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 7  | █                | 14.2 | 1.6  | 1.0  | 1.4  | 2.7  | 0.2  | █    | 99.0  | 98.8 | 98.4 | 98.8 | 99.0 | 98.2 | 98.2 | 95.8 | 95.0 | 95.0 | 90.6  | 96.8 | 96.0 | 96.2 | 90.6 | 99.2 | 99.2 | 99.0 | 97.4 | 94.8 | 96.8 | 97.2 | 96.6 | 96.6 | 96.8 | 96.8                   | 96.8 | 7                         | AB167786-SEQ                |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 8  | █                | 14.0 | 0.6  | 0.0  | 0.4  | 2.9  | 0.8  | 1.0  | █     | 99.6 | 99.4 | 99.4 | 99.6 | 99.8 | 98.4 | 95.6 | 95.6 | 95.6 | 91.2  | 99.2 | 99.2 | 99.8 | 91.2 | 99.8 | 99.8 | 99.6 | 97.6 | 95.4 | 97.0 | 97.4 | 98.8 | 96.4 | 97.0 | 96.8                   | 96.8 | 8                         | E2004370R2_202-new-SEQ      |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 9  | █                | 13.4 | 1.0  | 0.4  | 0.8  | 3.3  | 1.2  | 1.4  | 0.4   | █    | 99.0 | 99.0 | 99.2 | 98.4 | 98.0 | 95.2 | 95.2 | 95.2 | 91.2  | 99.2 | 99.2 | 99.8 | 91.2 | 99.8 | 99.8 | 99.6 | 97.6 | 95.0 | 96.6 | 97.4 | 98.8 | 96.4 | 97.0 | 96.8                   | 96.8 | 9                         | E2004211R4_202-new-SEQ      |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 10 | █                | 14.2 | 1.2  | 0.8  | 1.0  | 3.5  | 1.4  | 1.6  | 0.6   | 1.0  | █    | 98.8 | 99.0 | 98.2 | 97.8 | 95.4 | 95.4 | 95.4 | 91.4  | 99.4 | 99.4 | 91.0 | 91.4 | 90.0 | 99.8 | 97.0 | 95.2 | 96.8 | 97.6 | 97.0 | 97.0 | 97.2 | 97.0 | 97.0                   | 97.0 | 10                        | E2004431R2_202-new-SEQ      |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 11 | █                | 14.2 | 1.2  | 0.8  | 1.0  | 2.7  | 1.0  | 1.2  | 0.6   | 1.0  | 1.2  | █    | 99.8 | 99.0 | 97.8 | 95.4 | 95.4 | 95.4 | 91.0  | 99.0 | 95.6 | 91.0 | 91.4 | 99.8 | 99.6 | 99.4 | 97.0 | 95.2 | 96.8 | 96.8 | 96.2 | 96.4 | 96.4 | 96.4                   | 96.4 | 11                        | E2004432R2_202-new-SEQ      |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 12 | █                | 14.5 | 1.0  | 0.4  | 0.8  | 2.9  | 0.8  | 1.0  | 0.4   | 0.8  | 1.0  | 0.2  | █    | 99.2 | 99.0 | 95.6 | 95.2 | 96.8 | 96.8  | 96.8 | 96.8 | 90.8 | 91.2 | 99.4 | 99.4 | 99.2 | 97.2 | 95.0 | 97.0 | 97.0 | 96.4 | 96.4 | 96.6 | 96.4                   | 96.4 | 12                        | E2004389R2_202-new-SEQ      |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 13 | █                | 14.7 | 1.8  | 1.2  | 1.6  | 3.5  | 1.6  | 1.8  | 1.2   | 1.6  | 1.8  | 1.0  | 0.8  | █    | 97.2 | 95.0 | 94.6 | 94.6 | 90.2  | 96.2 | 95.2 | 90.2 | 90.6 | 99.8 | 99.8 | 99.6 | 96.6 | 94.4 | 96.4 | 96.4 | 95.8 | 95.8 | 96.0 | 95.8                   | 95.8 | 13                        | 04-0898-2_202-new-SEQ       |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 14 | █                | 14.4 | 2.2  | 1.8  | 2.0  | 3.3  | 1.8  | 1.8  | 1.6   | 2.0  | 2.2  | 2.0  | 2.0  | █    | 95.2 | 95.2 | 95.2 | 90.0 | 96.2  | 96.8 | 96.0 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 97.2 | 95.0 | 97.0 | 97.4 | 96.8 | 96.4 | 96.4 | 96.6 | 96.6 | 96.6                   | 14   | E2004370R2_202-new-SEQ    |                             |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 15 | █                | 14.8 | 5.2  | 4.8  | 5.0  | 2.9  | 4.2  | 4.4  | 4.6   | 5.0  | 4.8  | 4.8  | 4.6  | 5.2  | 5.0  | █    | 95.2 | 95.2 | 90.4  | 98.8 | 97.0 | 99.6 | 90.0 | 98.4 | 99.0 | 99.8 | 97.2 | 95.0 | 97.4 | 97.8 | 97.2 | 97.2 | 97.0 | 97.2                   | 97.2 | 15                        | 20022283-0SR1-1_202-new-SEQ |                                 |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 16 | █                | 16.4 | 16.4 | 16.6 | 17.2 | 17.2 | 17.2 | 17.2 | 17.5  | 16.6 | 17.2 | 16.9 | 16.9 | 17.2 | 18.0 | 17.2 | 17.2 | █    | 100.0 | 88.4 | 85.4 | 95.0 | 85.8 | 95.8 | 96.2 | 96.2 | 96.0 | 94.0 | 99.4 | 95.2 | 94.4 | 95.2 | 94.8 | 95.4                   | 95.6 | 95.6                      | 16                          | 20022287-0SR1_202-new-SEQ       |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 17 | █                | 16.4 | 16.4 | 16.6 | 17.2 | 17.2 | 17.2 | 17.5 | 16.6  | 17.2 | 16.9 | 16.9 | 17.2 | 18.0 | 17.2 | 17.2 | 0.0  | █    | 86.4  | 85.4 | 95.0 | 85.8 | 95.8 | 96.2 | 96.2 | 96.0 | 94.0 | 99.4 | 95.2 | 94.4 | 95.2 | 94.8 | 95.4 | 95.4                   | 95.4 | 95.4                      | 17                          | 20022283-0SR1_202-new-SEQ       |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 18 | █                | 15.4 | 10.3 | 9.8  | 10.0 | 10.1 | 10.5 | 10.3 | 9.6   | 9.6  | 9.3  | 9.8  | 10.1 | 10.8 | 11.0 | 10.6 | 15.7 | 15.7 | █     | 94.0 | 87.6 | 94.4 | 94.4 | 94.6 | 94.4 | 97.4 | 96.6 | 97.0 | 98.2 | 97.8 | 97.4 | 97.6 | 97.6 | 97.6                   | 97.6 | 97.6                      | 18                          | 058_D108_95330056R3_202-new-SEQ |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 19 | █                | 17.6 | 12.8 | 12.0 | 12.5 | 11.6 | 13.1 | 12.8 | 12.0  | 12.0 | 11.8 | 12.3 | 12.6 | 13.3 | 13.5 | 12.6 | 17.1 | 17.1 | 6.4   | █    | 96.2 | 87.6 | 97.6 | 95.8 | 96.2 | 96.4 | 96.4 | 95.6 | 95.6 | 97.2 | 96.4 | 96.4 | 96.2 | 96.4                   | 96.4 | 96.4                      | 19                          | 20022279-0SR1_202-new-SEQ       |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 20 | █                | 18.1 | 15.6 | 15.9 | 16.4 | 15.9 | 16.1 | 15.9 | 15.9  | 15.6 | 16.7 | 16.4 | 17.2 | 15.8 | 14.8 | 5.2  | 5.2  | 14.1 | 16.0  | █    | 87.0 | 87.0 | 97.4 | 97.4 | 97.4 | 97.2 | 95.4 | 95.2 | 97.4 | 97.8 | 96.8 | 96.6 | 99.2 | 99.2                   | 99.4 | 99.4                      | 20                          | 20021780-0SR1-2_202-new-SEQ     |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 21 | █                | 16.5 | 10.8 | 10.1 | 10.5 | 10.1 | 11.0 | 10.8 | 10.1  | 10.1 | 9.8  | 9.8  | 10.1 | 10.8 | 11.5 | 11.6 | 16.5 | 16.5 | 5.8   | 2.5  | 14.9 | █    | 99.6 | 96.6 | 97.0 | 97.2 | 96.0 | 96.8 | 98.0 | 97.2 | 97.2 | 97.2 | 97.0 | 97.0                   | 97.2 | 97.2                      | 21                          | 20032729-0SR1_202-new-SEQ       |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 22 | █                | 15.9 | 10.3 | 9.8  | 10.0 | 9.6  | 10.5 | 10.3 | 9.6   | 9.6  | 9.3  | 9.3  | 9.6  | 10.3 | 11.0 | 11.1 | 16.5 | 16.5 | 5.8   | 2.5  | 14.9 | 0.4  | █    | 96.6 | 97.0 | 97.2 | 96.0 | 96.8 | 98.0 | 97.2 | 97.2 | 97.2 | 97.0 | 97.0                   | 97.2 | 97.2                      | 22                          | 20040570-2_202-new-SEQ          |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 23 | █                | 15.7 | 12.0 | 11.3 | 11.8 | 11.3 | 12.3 | 12.0 | 11.3  | 11.3 | 11.0 | 11.5 | 11.8 | 12.5 | 12.3 | 11.8 | 16.0 | 16.0 | 5.7   | 4.4  | 14.4 | 3.5  | 3.5  | █    | 99.6 | 99.4 | 98.4 | 96.4 | 96.4 | 97.6 | 97.2 | 97.6 | 97.4 | 97.6                   | 97.4 | 97.6                      | 97.6                        | 23                              | E981032R4_202-new-SEQ     |                           |      |                           |                           |
|            | 24 | █                | 15.7 | 12.0 | 11.3 | 11.8 | 11.3 | 12.3 | 12.0 | 11.3  | 11.3 | 11.0 | 11.5 | 11.8 | 12.5 | 12.3 | 12.0 | 16.0 | 16.0 | 5.7   | 3.9  | 14.4 | 3.1  | 3.1  | 0.4  | █    | 99.8 | 98.0 | 96.4 | 96.4 | 97.6 | 97.2 | 97.6 | 97.4 | 97.6                   | 97.4 | 97.6                      | 97.6                        | 24                              | E980081R2_202-new-SEQ     |                           |      |                           |                           |
|            | 25 | █                | 15.9 | 12.3 | 11.5 | 12.0 | 11.1 | 12.5 | 12.3 | 11.5  | 11.5 | 11.3 | 11.8 | 12.0 | 12.8 | 12.5 | 12.6 | 16.2 | 16.2 | 5.8   | 3.7  | 14.7 | 2.9  | 2.9  | 0.6  | 0.2  | █    | 97.8 | 98.2 | 98.2 | 97.4 | 97.4 | 97.4 | 97.2 | 97.4                   | 97.4 | 97.4                      | 25                          | E98791R4_202-new-SEQ            |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 26 | █                | 17.3 | 13.7 | 14.0 | 14.5 | 15.6 | 14.5 | 14.3 | 14.0  | 14.0 | 14.8 | 14.8 | 14.5 | 15.3 | 14.5 | 14.6 | 6.4  | 6.4  | 14.4  | 15.7 | 4.8  | 13.6 | 13.1 | 13.6 | 13.8 | █    | 94.2 | 95.6 | 95.2 | 96.0 | 95.2 | 95.8 | 95.8 | 96.0                   | 96.0 | 96.0                      | 26                          | E2004400R2_202-new-SEQ          |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 27 | █                | 17.2 | 16.6 | 16.9 | 17.4 | 17.5 | 17.5 | 17.8 | 16.9  | 17.5 | 17.2 | 17.2 | 17.5 | 18.3 | 17.4 | 17.5 | 0.6  | 0.6  | 15.4  | 16.8 | 5.0  | 16.2 | 16.2 | 15.7 | 15.7 | 16.0 | 6.1  | █    | 95.4 | 94.6 | 95.4 | 95.0 | 95.6 | 95.6                   | 95.6 | 95.6                      | 27                          | 20022284-0SR1_202-new-SEQ       |                           |                           |      |                           |                           |
|            | 28 | █                | 17.8 | 14.5 | 14.8 | 15.3 | 15.4 | 14.8 | 15.1 | 14.8  | 16.3 | 15.1 | 15.1 | 14.8 | 15.6 | 14.8 | 14.3 | 5.0  | 5.0  | 14.8  | 16.8 | 2.7  | 15.2 | 15.2 | 15.7 | 15.7 | 16.0 | 4.8  | 4.8  | █    | 98.4 | 97.2 | 96.8 | 97.4 | 97.6                   | 97.6 | 97.6                      | 97.6                        | 28                              | 20032656-0SR1_202-new-SEQ |                           |      |                           |                           |
|            | 29 | █                | 18.9 | 14.0 | 14.2 | 14.7 | 14.8 | 14.2 | 14.5 | 14.2  | 14.2 | 14.0 | 15.0 | 14.8 | 15.6 | 14.2 | 13.7 | 5.9  | 5.9  | 13.3  | 14.6 | 2.2  | 13.6 | 13.6 | 14.1 | 14.1 | 14.4 | 5.0  | 5.7  | 3.7  | █    | 98.4 | 97.6 | 98.2 | 98.4                   | 98.4 | 98.4                      | 98.4                        | 98.4                            | 29                        | 20020620-202-new-SEQ      |      |                           |                           |
|            | 30 | █                | 18.1 | 14.8 | 15.0 | 15.5 | 15.6 | 15.0 | 15.3 | 15.0  | 15.0 | 14.8 | 15.8 | 15.6 | 16.4 | 15.0 | 14.5 | 5.0  | 5.0  | 13.8  | 15.7 | 1.4  | 14.6 | 14.6 | 14.6 | 14.9 | 4.2  | 4.0  | 2.9  | 1.6  | █    | 99.4 | 99.0 | 99.0 | 99.0                   | 99.0 | 99.0                      | 99.0                        | 99.0                            | 30                        | 20022281-0SR1_202-new-SEQ |      |                           |                           |
|            | 31 | █                | 19.0 | 14.8 | 15.6 | 16.1 | 15.6 | 15.1 | 15.3 | 15.6  | 15.6 | 14.8 | 15.9 | 15.6 | 16.4 | 15.6 | 14.6 | 5.5  | 5.5  | 14.4  | 15.7 | 1.4  | 14.7 | 14.7 | 14.1 | 14.1 | 14.4 | 5.0  | 5.2  | 3.3  | 2.4  | 1.6  | █    | 99.0 | 99.2                   | 99.2 | 99.2                      | 99.2                        | 99.2                            | 99.2                      | 99.2                      | 31   | 20020626-0SR1_202-new-SEQ |                           |
|            | 32 | █                | 17.5 | 14.5 | 14.8 | 15.3 | 15.4 | 14.8 | 15.1 | 14.8  | 14.8 | 14.5 | 15.6 | 15.3 | 16.1 | 14.8 | 14.8 | 4.8  | 4.8  | 14.1  | 16.0 | 0.8  | 14.9 | 14.9 | 14.4 | 14.4 | 14.7 | 4.4  | 4.6  | 2.7  | 1.8  | 1.0  | 1.0  | █    | 99.8                   | 99.8 | 99.8                      | 99.8                        | 99.8                            | 99.8                      | 99.8                      | 99.8 | 32                        | 20033283-0SR2_202-new-SEQ |
|            | 33 | █                | 17.8 | 14.8 | 15.1 | 15.6 | 15.6 | 15.1 | 15.3 | 15.1  | 15.1 | 14.8 | 15.9 | 15.6 | 16.4 | 15.0 | 14.6 | 4.6  | 4.6  | 13.9  | 15.7 | 0.6  | 14.7 | 14.7 | 14.1 | 14.1 | 14.4 | 4.2  | 4.4  | 2.5  | 1.6  | 0.8  | 0.8  | 0.2  | █                      | 99.8 | 99.8                      | 99.8                        | 99.8                            | 99.8                      | 99.8                      | 99.8 | 99.8                      | 33                        |

圖 3. 演化樹分析

此圖為台灣地區腸病毒 CVA4 血清型別的演化樹分析，採用 MEGA 3.0 分析軟體，以"Neighbor-joining"方法，將 CVA4 原型株與日本地區參考病毒株序列與本次定序的結果作分析比較。

