

1998~2004 年台灣地區腸病毒七十一型分子流行病學分析

摘 要:

腸病毒七十一型是造成手口足症(hand, foot, and mouth disease; HFMD)的主要原因，有時亦會造成嚴重的神經症狀，包括：腦炎、類脊髓灰白質炎等。近幾年來在西太平洋地區(Western Pacific Region, WPR)持續都有腸病毒七十一型的分離與小規模的流行，而台灣地區在 1998 年的夏天，爆發了腸病毒的流行，當年有 405 例疑似感染腸病毒且併發重症個案發生，幼童與嬰兒為感染之高危險群。本研究之樣本為疾病管制局與各病毒合約實驗室所分離與鑑定為腸病毒七十一型之臨床檢體，利用反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)與基因定序(Sequencing)的方法增幅腸病毒七十一型 VP1 區域基因片段，並以基因演化樹分析(Phylogenetic analysis)。結果發現，腸病毒七十一型之 B、C 基因亞型在澳洲、馬來西亞、新加坡、日本與台灣地區共同循環傳播(co-circulating)，1998 年台灣地區腸病毒七十一型主要流行的基因型為 C2 基因亞型(subgenotype)，而 1999 年至 2003 年主要流行的基因型轉為 B4 基因亞型，在 2004 年所分離到的腸病毒七十一型分析鑑定為新的基因亞型 C4 與 2003 年中國大陸腸病毒分離株 SHZH03-China 相似。而台灣地區腸病毒七十

一型 C4 基因亞型彼此間序列同源相似性為 97~99%，與 SHZH03-China 平均同源相似性為 96.9%。

簡 介:

腸病毒七十一型(Enterovirus 71, EV71) 首度被發現是在 1969 年美國加州由一腦炎嬰兒之糞便檢體中分離出，隨即在美國本土、保加利亞、日本、香港、馬來西亞、台灣及澳洲等地區陸續被分離出[1-6]，且引起不同程度規模的流行。腸病毒七十一型與克沙奇病毒 A16 非常相近(Coxsackie virus, CA16)，同樣都會造成手口足症(HFMD)，但腸病毒七十一型確和造成急性神經症狀(acute neurologic disease)有關，包括：類脊髓灰白質炎(poliomyelitis-like paralysis)、腦炎(encephalitis)與無菌性腦膜炎(aseptic meningitis)等。雖然在美洲、亞洲與澳洲爆發腸病毒七十一型的流行，但僅有少數個案會產生嚴重神經症狀，致死率(mortality)也不高[7]。但在 1998 年台灣地區爆發大規模的腸病毒流行，有 405 位幼童被通報為手口足症，出現嚴重的神經症狀與併發症，造成 78 位幼童死亡[8-10]。

腸病毒為正性單股核糖核酸(plus sense, single stranded RNA) 病毒，屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，此病毒的構造很小，其直徑約只有 20-30nm 大小，為不帶有外套膜 (nonenveloped)、正二十面體之結構[11, 12]。腸病毒七十一型的基因體全長約 7.5 kb，從 5'端至 3'端的順序分別為：5'-NCR、P0(VP4、VP2)、VP3、VP1、2A(protease)、3D(RNA polymerase) 及 3 端 poly-A。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，並可與其他不同腸病毒之血清型進行區域區分[13]。目前常用來作腸病毒七十一型之偵測或基因型區分的區域為 5'端高保守未轉譯區(5'-untranslated region, UTR)[14, 15]、VP1 與 VP4 區域[7, 11, 14, 16]。本研究

利用 RT-PCR 與基因定序的技術分析台灣腸病毒七十一型 VP1 區域，以了解台灣自 1998~2004 年腸病毒七十一型的基因變異(genetic diversity)與流行的基因亞型之型別。

材料與方法:

*檢體來源

自 1998 年至 2004 年本局研究檢驗中心例行性檢驗疑似腸病毒七十一型感染之臨床檢體與各病毒性感染症合約實驗室分離出之腸病毒七十一型病毒株共約 2073 株。

*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 200 ul 接種 RD、HEp-2C、MRC5、Vero 細胞株，置於 36°C 含有 5% 的二氧化碳培養箱培養，觀察 14 日，當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，以為分生檢測及腸病毒定序，而其餘的細胞則固定於玻片上，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，與腸病毒七十一型老鼠單株抗體 (CHEMICON Inc, CA, USA; Catalog No. 3321,3323,3324) 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。

*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

用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 。

*反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction : RT-PCR) [11,15]

(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 MgCl₂、10 mM DTT、dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul 及 antisense primer162 (表二) [15] 50 pmoles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，cDNA加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1 mM及primer: 159 及 162 [11, 17, 18]各 50 pmoles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。

*定序分析:

ABI 3730 定序儀作定序分析: 使用商用螢光核酸定序試劑組 ABI PRISM^(TM) BigDye^(TM) Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) 來標記欲分析之核酸產物。由於核酸的純度會影響定序反應之好壞，取用高純度 (OD_{260/280} >1.8) 之核酸產物來做為定序之模板。所需之核酸量於雙股DNA (例如：質體) 使用 200~500 ng、單股DNA 50~100 ng，PCR反應產物 30~90 ng即可。將適量核酸模板、3 μl premix (包括Tris-HCl buffer, pH 9.0, MgCl₂, dNTP mix, labeled A-dye terminator, C-dye terminator, G-dye terminator, T-dye terminator, AmpliTaq DNA Polymerase FS with thermally stable pyrophosphatase)、3.2~5.0 pmoles的

核酸引子 159/162，與適量的水混合均勻，使反應總體積為 10 μ l。然後再覆上一層石臘油，並將裝有反應物之微量離心管移置預熱在 94°C 之聚合酶連鎖反應器中，以 94°C 30 秒、55°C 15 秒、60°C 4 分鐘之條件，進行 25 次之循環反應，最後將反應停止在 4°C，之後進行電泳定序。

*演化樹(Phylogenetic tree)之分析：

將 2004 年的病毒株 2004496~20041055 與過去實驗室的 2003 年的病毒株 2003-0695~2003-6720；2002 年的病毒株 2002-042~2002-4348；2001 年病毒株 2001-336~2001-522；1999 年病毒株 99195~99214；1998 年病毒株 1341 及 980200~981321；與參考病毒株(reference strains): N5101-TW-98、TW-1743-982003-SHZH03-china、HK1159、2381MA、EV71BrCr、Malaysia、EV71MS、0627-MAA00~0815MAA00、S1971SAR03~S19741SAR03、0128-MAA97~0889-MAA97、7629PA87~7631PA87、1413CA87、4826CT83、3984OH82、4644AR83、2259CA82、1011ND79、2234NY77、2229NY76~2238NY77、2604AUS74~2610AUS74、KOR-EV71-02~07、013-KOR-00、2132VA95、2037MD95、2007CT94、2006CT94、0756MAA97、S19691SAR03MA、CN30014SAR03MA、2261CA91、2583CAN91、9323TX89、0915~0916MA87、2262CA92、9718TX89、1919NM94、0390TX90、2641~2644AUS95、2355OK97、2286TX97 以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 2.1 操作。採用“Neighbor-joining”與“Kimura 2 parameter”演算方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析。

註:本次腸病毒七十一型病毒株參考序列摘自[14-16, 19, 20]

結果:

將檢體純化處理後萃取病毒 RNA，再以腸病毒七十一型專一性引子對 159/162 利用 RT-PCR 的方法增幅 VP1 區域基因片段，經洋菜膠電泳與 EtBr

染色分析可見 485bp 基因片段(圖一)。在將此片段純化後以 ABI 3730 定序儀作基因定序，將得到的序列利用 NCBI 網站作 BLAST 比對分析，確定為腸病毒七十一型以及其相似的腸病毒株。將實驗室分析所得的腸病毒七十一型基因序列，與 GeneBank 中腸病毒七十一型不同基因亞型之參考病毒株序列 (reference strains)，比對截取適當長度 414 bp 以 MEGA2.1 版的軟體作演化樹分析。結果發現演化樹呈現兩個主要的基因型(genotypes) B 與 C，而與原型病毒株(prototype) BrCr 所屬的 A 基因型有明顯的區別。依據 Betty Brown 等人在核酸序列演化樹分析中以 VP1 可將腸病毒七十一型分成三種基因型，分別為 A、B 及 C 等三型，其中 BrCr Prototype 為 A 型，而 B 型在 70 年代至 80 年代皆有發生，C 型則是從 80 年代中期至 90 年代一直有出現過，目前全球所分之腸病毒七十一型都是 B 型或 C 型。然而，若從基因序列的差異與演化樹的同源性將基因型進一步分析，依據 Betty A. Brown 等人[11]、Peter McMinn 等人[20]、Mary Jane Cardosa 等人[7]的研究發現，B 與 C 基因型又可區分出基因亞型(subgenotypes)。B 基因型可以區分為 B1、B2、B3 與 B4 基因亞型；C 基因型可以區分為 C1、C2、C3 與 C4 基因亞型(圖二)。而根據 Betty A. Brown 等人[11]從基因序列與演化樹的分析發現，在同一個基因型(genotype)中的核酸變異度在 12%之內；不同的基因型別彼此變異度在 16.5~19.7%；B 基因亞型彼此核酸差異度約 6~11%，C 基因亞型彼此核酸差異度約 6~10%。

本次研究結果發現若單獨分析 B 與 C 基因型，利用演化樹與核酸差異的比對，在 B 基因型中進一步區分出 B1~B4 基因亞型(圖三)，1999-2003 年流行的腸病毒七十一型多為 B4 基因亞型，1999 年分離的腸病毒七十一型獨自行成小聚落(cluster)且與馬來西亞在 1999 與 2000 年分離的腸病毒七十一型(0627MAA99~0778MAA00)較相近，同源性(homology)約為 96~97%，而 2002~2003 年所分離到的腸病毒其彼此相似度高自成一個聚落，但其中有一株腸病毒七十一型分離株 2002-119 與 0627-MAA99 在同一聚集，同源性為

99%。另外，有兩株腸病毒七十一型分離株 8623VNR3 與 TW/1743/98 為 B1 基因亞型，其中 8623 NR3 為 1986 年的分離腸病毒七十一型病毒株與長庚大學所註冊的 TW/253/86(AF116805)相同，而 TW/1743/98 為長庚大學在 1998 年的腸病毒七十一型分離株，其相似度為 94%。

在 C 基因型可區分出 C1~C4 亞型(圖四)，在 1998 年台灣地區腸病毒大流行的時候所流行的型別多為腸病毒七十一型 C2 基因亞型，而 1998 年台灣地區所分離到腸病毒七十一型 C2 基因亞型與澳洲與美洲所分離到的 C2 基因亞型仍有不同，演化樹呈現在不同的小群落中，兩者的同源性為 96~98%。但是仍有少部分檢體分離出腸病毒七十一型 B 基因型，其中 981263 與成大病毒實驗室所分離的 N5101-TW-98 為 B4 基因亞型，根據施信如教授與王貞仁教授的研究發現 1998 年台灣地區主要流行的為腸病毒七十一型 C 基因型，少部分為 B 基因型[14, 15, 21]。然而，比較值得注意的是台灣地區在 2004 年所分離的腸病毒七十一型多為 C4 基因亞型，此基因亞型與中國大陸在 2003 年所流行的腸病毒七十一型相似，而台灣地區則從 2003 年底到 2004 年開始流行 C4 基因亞型，其彼此 VP1 的核酸相似度為 97~99%。

在序列同源相似性分析方面，以目前有分析到的台灣地區腸病毒七十一型為 B1、B4、C2 與 C4 基因亞型為主，在 B1 基因亞型裡同源相似性(% homology range)範圍 92-98%、B4 基因亞型為 95~99%、C2 基因亞型為 98~99%、C4 基因亞型為 94~99%，而此四種基因亞型與 A 基因型同源相似性範圍為 81~86%，其中 C2 與 C4 和 A 基因型相似度稍微偏高，平均同源相似度為 84%。在 B 基因型與 C 基因型其 VP1 序列差異度為 15~19%。B 基因型中的基因亞型彼此同源相似度為 88~96%，而 C 基因型中的基因亞型彼此同源相似度為 89~94%，2004 年台灣地區流行的腸病毒七十一型 C4 基因亞型與 C3 基因亞型同源相似性較高平均為 90.9%，與 B 基因亞型差異度為 15~17%(表一)

討 論:

台灣地區自 1989 年開始由衛生署主導成立定點疾病監測系統(sentinel surveillance system)[9, 10]，許多腸病毒感染個案的確認即藉由此監測系統內的專科醫生、醫護人員與臨床實驗室的判斷與檢驗，1998 年台灣地區確定為 HFMD 與疱疹性咽峽炎(herpangina)個案數為 129,106 件，有 405 件判定腸病毒重症個案，其中 78 件為腸病毒重症死亡個案[9, 15]。有專家學者推論在當年造成如此大規模的流行原因可能有兩點 1.病毒本身突變所致:由於病毒本身突變或突變點的累積可能導致病毒毒性(virulence)增加或外來株引入。2.宿主本身的因素(host factor):易感受族群(susceptible population)與個體基因感受性(individual genetic susceptibility)的增加[9]。從病毒基因方面來分析，本次的研究分析了台灣地區自 1998 年到 2004 年本局病毒實驗室與合約實驗室所鑑定分離的腸病毒七十一型，在演化樹的分析可以發現台灣地區所流行的腸病毒七十一型為 B1、B4、C2、C4 四種基因亞型，在 1998 年台灣地區腸病毒大流行造成幼童出現 HFMD 以及嚴重的神經症狀，甚至死亡的多為腸病毒七十一型 C2 基因亞型，少部分有分離到 B1、B4 基因亞型。相對於西太平洋地區的鄰國馬來西亞，在 1997 年爆發腸病毒大流行，當時所流行的主要型別為腸病毒七十一型 B3 與 B4 基因亞型、少數為 C1、C2 基因亞型，可能和幼童導致嚴重神經症狀與死亡有很大的關聯，隨後在 2000 年馬來西亞流行的腸病毒七十一型型別逐漸轉變為 B4 與 C1 亞型。因此，腸病毒七十一型 B4 基因亞型自 1997 年之後從馬來西亞開始慢慢的往外傳播至新加坡、沙勞越、台灣等地區[13]。雖然當年有些專家學者觀察在馬來西亞 1997 年腸病毒大流行後，台灣地區隨之在 1998 年 3 月份開始產生大流行推論兩者之間具高度的關聯性，藉由本次基因亞型的演化樹分析可以澄清了解流行病毒株的不同，雖然在馬來西亞於 1997 年僅有分離到兩株腸病毒七十一型 C2 基因亞型 03907-MAA-97 與 03750-MAA-97[13]，但從演化樹的分析可見與台灣地區 1998 年所流行的腸病

毒仍有所差異，其VP1 基因相似度範圍為 96~97%，演化樹呈現在不同的小群落當中。同樣地，長庚大學施信如教授藉由 5'-NCR 區域演化樹分析也發現 1998 年台灣腸病毒七十一型的流行株與 1997 年馬來西亞的流行株屬不同型別 [14]。但本局病毒實驗室這幾年來的研究發現，腸病毒重症患者與造成一般症狀患者體內所分離出來的腸病毒七十一型，其VP1 區域基因序列並無明顯的差異。而長庚大學施信如教授等人也定了兩株腸病毒七十一型病毒全長 TW/2272/98、TW/2086/98 [14]，其中TW/2272 /98 從腸病毒重症死亡個案分離出，將兩株全長序列比對發現，5'-NCR、VP1~VP4、2A、2B、2C、3A、3B與 3D區域核酸序列的相似性為 97-100%，但是在 3C與 3-UTR區域核酸相似度為 90-91%。而台灣成大醫學院的研究團隊建立了適應腸病毒感染的動物模式[23]，藉由ICR幼鼠口服腸病毒七十一型的感染方式，分離出具有較高病毒毒性(virulence)的腸病毒七十一型病毒，並比較其核酸的差異，結果發現在 5'-UTR區域有 4 個突變點、VP2 區域有 3 個突變點、2C區域有 8 個突變點，由於 5'-UTR包含了IRES (internal ribosome entry site)區域，而IRES二級結構可以調控腸病毒在細胞內的複製速度，進而增加病毒毒性[23-24]。然而，在宿主因素方面，從群體免疫(Herd immunity)與個體感受性(susceptibility)來討論，群體保護性抗體的產生與否和腸病毒七十一型的大流行有極大的關係，從張鑾英醫師等人的研究發現[27]，在腸病毒七十一型流行前(pre-epidemic)的抗體陽性盛行率(seroprevalence rates)與腸病毒流行期的死亡率和疾病的嚴重程度有關。台大小兒科黃立民醫師等人[28]分析歷年嬰幼兒腸病毒七十一型血清抗體陽性率發現，1994 年為 7%~11%，而 1994~1997 年逐漸降為 3%~4%[9]，且從抗體的資料可以了解 1995~1997 年腸病毒七十一型出現的規模都很小，使得新生兒與幼童的群體免疫缺少病毒抗原刺激，推測如此情況可能造成宿主對腸病毒七十一型的感受性增加而在 1998 年爆發大流行。若從免疫系統細胞激素(cytokine)的觀點來分析，根據成功大學與成大醫院Lin TY等人[25]的研究發現，腸病毒七十一型感染的患者若有腦炎(encephalitis)與肺水腫

(pulmonary edema)的重症症狀其血液中的細胞激素IL-1 β 、IL-6、TNF- α 會出現明顯的升高，且在感染的前兩天CSF中的IL-6也出現明顯的上升。因此，若患者產生結合CNS與系統性發炎(systemic inflammatory)反應會誘發腸病毒七十一型相關之心肺功能衰竭。國衛院Wang SM等人[26]的研究也指出感染腸病毒七十一型而產生的腦炎與肺水腫之併發症會使得致死率提高，重症患者會出現白血球增多(leukocytosis)與血小板增多(thrombocytosis)的現象，血漿中IL-10、IL13與INF- γ 具顯著上升，但是週邊血液循環的淋巴球CD4⁺、CD8⁺與自然殺手細胞(NK cell)的數目減少。因此，造成1998年台灣地區的腸病毒大流行與腸病毒重症的原因，除了以上的探討之外仍須作更多方面的研究與回溯性的調查便以釐清了解。

由於1998年之前，並無腸病毒監測之實驗室診斷，1994年台灣地區開始執行AFP(急性無力肢體麻痺症)之監測系統，主要目的在於尋找是否為腸病毒中的小兒麻痺病毒(poliovirus)所造成，因此只要是對於non-polio之腸病毒那時並無進一步分型通稱為NPEV。由於1998年台灣爆發大規模腸病毒流行之前欠缺相關之資料，本局之前身“預防醫學研究所”當時曾試圖由1998年之前經AFP監測系統所分離到之NPEV找尋是否有腸病毒七十一型病毒，但無所獲。實驗室也曾將台灣腸病毒七十一型之基因序列送到美國病管局腸病毒實驗室比對，結果認為台灣1998年之腸病毒七十一型是獨特的序列並無法確認其來源。因此，到底是本土的腸病毒七十一型演化至某一程度加上多數嬰幼兒族群欠缺保護性抗體而爆發大流行；還是外來的病毒株由其它鄰近國家如：中國(china)，並無相關資料可以提供比對分析。從1998年後本局陸續與12家合約實驗室監控腸病毒之血清型變化，有著相當完整的資料庫，有因此對於1998年往後的腸病毒七十一型的變化情形可以掌握並了解，但這些基因上對於表現型上所造成之影響如中和性抗體，影響似乎有限，往後會如往何處演化？到哪種程度或臨界值有可能造成流行，則仍無法有預測模式，變數、參數過於複雜更增加其困難度。

在腸病毒七十一型演化分析方面，目前有專家學者採用 VP1、VP4、VP4-VP2 junction 與 5'-UTR 區域來作演化分析[6, 7, 11, 14, 15]，本研究採用腸病毒 VP1 區域來作基因亞型分析，由於 VP1 區域為腸病毒的外殼蛋白(capsid protein)最外層，是免疫系統作用標的與抗體中和位點所在。根據 Betty A. Brown[11]等人在 1999 年的研究利用 VP1 區域作演化分析結果將腸病毒區分為三大基因型(genotypes) A、B、C，又進一步區分出 B1~B2 與 C1~C2 的基因亞型，其中 B 基因型與 C 基因型差異度範圍為 15.5~18.7%，而 B 基因型中的 B1 基因亞型內彼此基因差異最高為 9.5%，B1、B2 基因亞型彼此差異為 6.9~11.1%；在 C 基因型中的 C1、C2 基因亞型內基因差異為 1~6.3%、0.7~1.1%，而 C1、C2 基因亞型彼此差異為 6.1~10.1%。接著 Peter McMinn 等人[20]在 2001 年分析馬來西亞、新加坡、澳洲西部的腸病毒七十一型流行株，發現了 B3 與 B4 基因亞型，其中 B3 基因亞型分離株彼此相似度為 98-99%，B4 基因亞型分離株彼此相似度為 96-99%；Mary Jane Cardosa 等人[7]在 2003 年研究亞太地區(Asia-Pacific Region)腸病毒七十一型分子流行病學，結果藉由韓國地區 2000 年的腸病毒七十一型分離株(KOR-EV71-05、KOR-EV71-06 等)序列演化分析發現了 C3 基因亞型；而在 2004 年 Hiroyuki Shimizu 等人[16]研究西太平洋地區(Western Pacific Region)腸病毒七十一型分子流行病學，了解此區域主要流行的腸病毒七十一型為 B 與 C 基因型，在分析中國大陸西元 2000 年上海地區的腸病毒七十一型分離株 F1-CHN-00、H25-CHN-00 等，序列比對與演化樹分析的結果發現基因亞型為 C4。本實驗室分析台灣地區 2004 年的腸病毒七十一型分離株，在 NCBI 網站比對序列發現與 2003 年中國大陸分離株 SHZH03-China 較相近，同源相似度為 96~97% 然而此病毒株在演化樹的分析亦屬於 C4 基因亞型，與在上海 2000 年的分離株差異度約為 4~6%。

分析台灣地區自 1998~2004 年分離的腸病毒七十一型，可得知 1998 年腸病毒七十一型流行株主要為 C2 基因亞型，少部分為 B1、B4 基因亞型。

1999~2003 年分離到的腸病毒七十一型流行株多為 B4 基因亞型，到了 2004 年腸病毒七十一型流行株轉為 C4 基因亞型。在同源性的分析可發現 B1、B4、C2、C4 基因亞型平均同源相似度為 94.9%、96.7%、99.1%、96.5%，與 A 基因型 BrCr 病毒株序列差異度為 14~19%，而 B4 基因亞型與 C4 基因亞型差異度為 15~16%，平均同源相似性 84.2%。然而，由於中國大陸在 2000 年的時候上海地區腸病毒七十一型分離株為 C4 亞型[16]，從實驗室的數據也發現 2001 年台灣地區有分離出兩株 C4 亞型 2001-336、2001-522 與 F1-CHN-00、H25-CHN-00 在同一個聚集中，之後在 2004 年台灣地區腸病毒分離株又與 2003 年大陸腸病毒七十一型分離株 SHZH03-China 在同一個小聚集中。但值得注意的是，演化樹中編號 1341 之 C4 基因亞型分離株是 1998 年實驗室所分離，由於與當年主要流型株基因序列不同在當時被定義為 C minor 基因型，由此可知在 1998 年台灣地區就已經有 C4 基因亞型的存在。但是是否台灣的 C4 基因亞型比中國大陸更早出現則不得而知，由於無法獲得 2000 年之前中國大陸腸病毒七十一型基因體資料作為參考序列，目前僅能透過 BLAST 比對結果與演化樹的呈現得知與中國大陸的 C4 基因亞型最為接近。此外，為了預防腸病毒七十一型 C4 基因型在台灣造成大規模流行與了解族群免疫力對此 C4 基因亞型的抗體保護能力，本實驗室取 2002 與 2003 年疑似腸病毒重症患者之配對血清及 1998 年的腸病毒七十一型 C2 基因亞型、2002 年的 B4 亞型與 2004 年的 C4 基因亞型進行中和抗體效價之測定，結果顯示過去感染過腸病毒七十一型的患者其體內產生的抗體對於腸病毒七十一型 C4 基因亞型仍具中和保護能力[22]，從群體免疫的角度來看或許這也是基因亞型會隨時間轉變但無造成大流行的原因之一，加上腸病毒防疫策略與衛教廣告文宣的推行，都能有效地預防腸病毒的大流行。

歷年來腸病毒七十一型基因亞型演化流行病學分析可作為腸病毒七十一型疫苗與抗病毒藥物研發之參考，也提供防疫政策決定與臨床治療上重要資訊。

此外，本局與全國 12 家合約實驗室建立腸病毒監測網，對於腸病毒血清型別與各血清型內的基因型別的演化都能確實的掌握。

致 謝:

本文對所有 Diagnostic Contact Virology Laboratory 及資源管理組基因體工作同仁致上最深之謝意。

撰稿者: 王聖帆、林翠莉、徐秋菊、李祥吉、羅淑真、黃教威、楊志元、陳豪勇

疾病管制局研究檢驗中心-病毒實驗室

參考文獻:

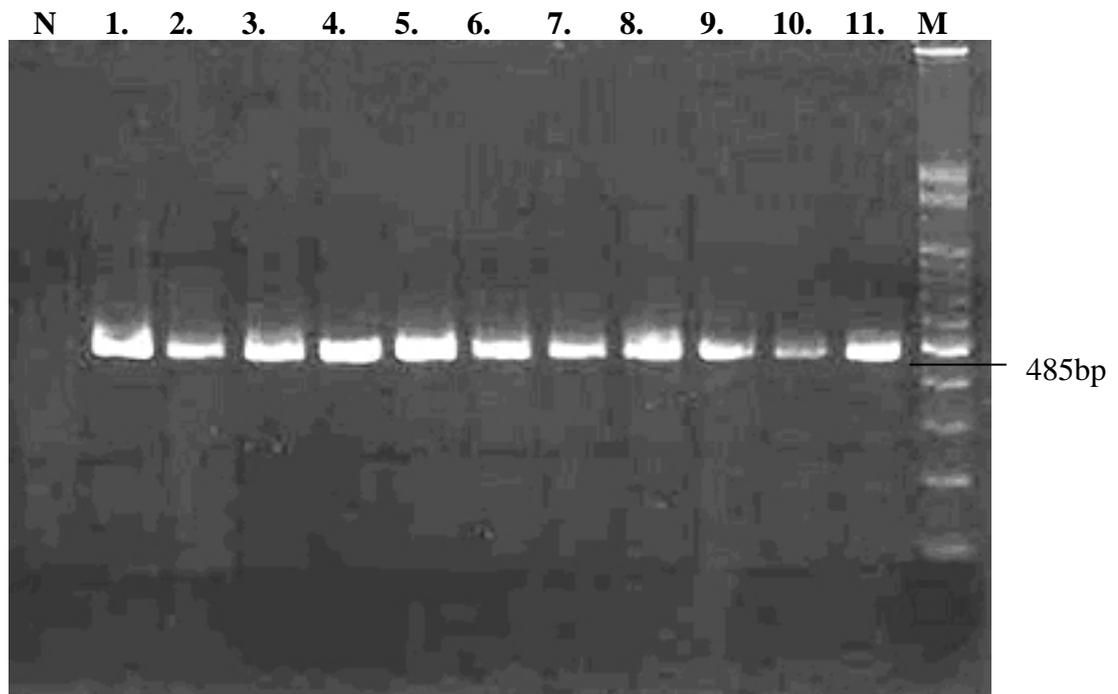
1. Chumakov M, Voroshilova M, Shindarov L, *et al.* Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol* 1979,60:329-340.
2. Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, *et al.* Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* 2003,148:253-263.
3. Hashimoto I, Hagiwara A. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982,8:149-156.
4. Lum LC, Wong KT, Lam SK, *et al.* Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr* 1998,133:795-798.
5. Liu CC, Tseng HW, Wang SM, Wang JR, Su IJ. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. *J Clin Virol* 2000,17:23-30.

6. 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.
7. Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, *et al.* Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* 2003,9:461-468.
8. Chu PY, Lin KH, Hwang KP, *et al.* Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan. *Arch Virol* 2001,146:589-600.
9. Lin TY, Twu SJ, Ho MS, Chang LY, Lee CY. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition. *Emerg Infect Dis* 2003,9:291-293.
10. Wu TN, Tsai SF, Li SF, *et al.* Sentinel surveillance for enterovirus 71, Taiwan, 1998. *Emerg Infect Dis* 1999,5:458-460.
11. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, Jr., Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999,73:9969-9975.
12. Alexander JP, Jr., Baden L, Pallansch MA, Anderson LJ. Enterovirus 71 infections and neurologic disease--United States, 1977-1991. *J Infect Dis* 1994,169:905-908.
13. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003,148:1369-1385.
14. Shih SR, Ho MS, Lin KH, *et al.* Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res* 2000,68:127-136.

15. Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, Yan JJ, Liu CC, Su IJ. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol* 2002,40:10-15.
16. Shimizu H, Utama A, Onnimala N, *et al.* Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 2004,46:231-235.
17. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999,73:1941-1948.
18. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999,37:1288-1293.
19. Lin SE, Zhang Q, Xie HP, *et al.* [Phylogenetic analysis of enterovirus 71 isolated from patients with hand, foot and mouth disease in Guangdong and Fujian provinces, 2000-2001]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2004,18:227-229.
20. McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardoso MJ. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol* 2001,75:7732-7738.
21. Wang JR, Tsai HP, Chen PF, *et al.* An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998. II. Laboratory diagnosis and genetic analysis. *J Clin Virol* 2000,17:91-99.
22. 林翠莉等人, 腸病毒七十一型之不同基因型病毒與血清學之分析探討 疫情報導 第 20 卷 第 11 期 P631~648.

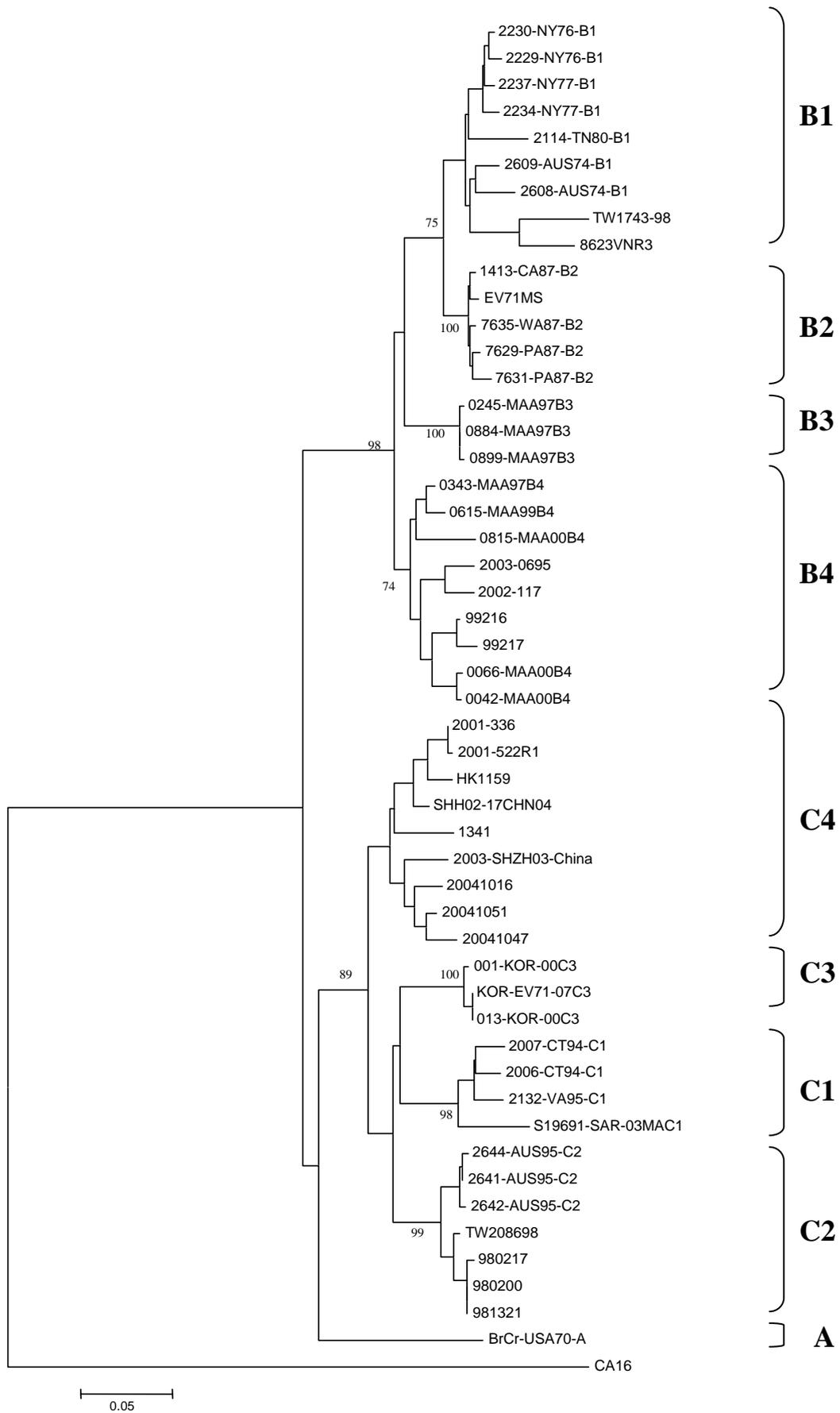
23. Chen YC, Yu CK, Wang YF, *et al* A murine oral enterovirus 71 infection model with central nervous system involvement. *J Gen Virol* 2004, 85: 66-77.
24. Wang YF, Chou CT, Lei HY, *et al* A Mouse-Adapted Enterovirus 71 Strain Cause Neurological Disease in Mice after Oral Infection. *J Virol* 2004, 78: 7916-7924
25. LIN TY, Hsia SH, Huang YC, Wu CT, *et al*. Proinflammatory Cytokine Reactions in Enterovirus 71 Infections of the Central Nervous System. *Clin Infect Dis* 2003;36:269-274.
26. Wang SM, Lei HY, Huang KJ, *et al*. Pathogenesis of Enterovirus 71 Brainstem Encephalitis in Pediatric Patients: Roles of Cytokines and Cellular Immune Activation in Patients with Pulmonary Edema. *J Infect Dis*. 2003,188:564-570.
27. Chang LY, King CC, Hsu KH, *et al*. Risk Factors of Enterovirus 71 Infection and Associated Hand, Foot, and Mouth Disease/ Herpangina in Children During an Epidemic in Taiwan. *Pediatrics*. 2002, 109:88-94
28. Lu CY, Lee CY, Kao CL, *et al*. Incidence and Case-Fatality Rates Resulting From the 1998 Enterovirus 71 Outbreak in Taiwan. *J Med Virol*. 2002, 67:217-223.

圖一、以引子對 159/162 增幅 VP1 區域之洋菜膠電泳分析圖

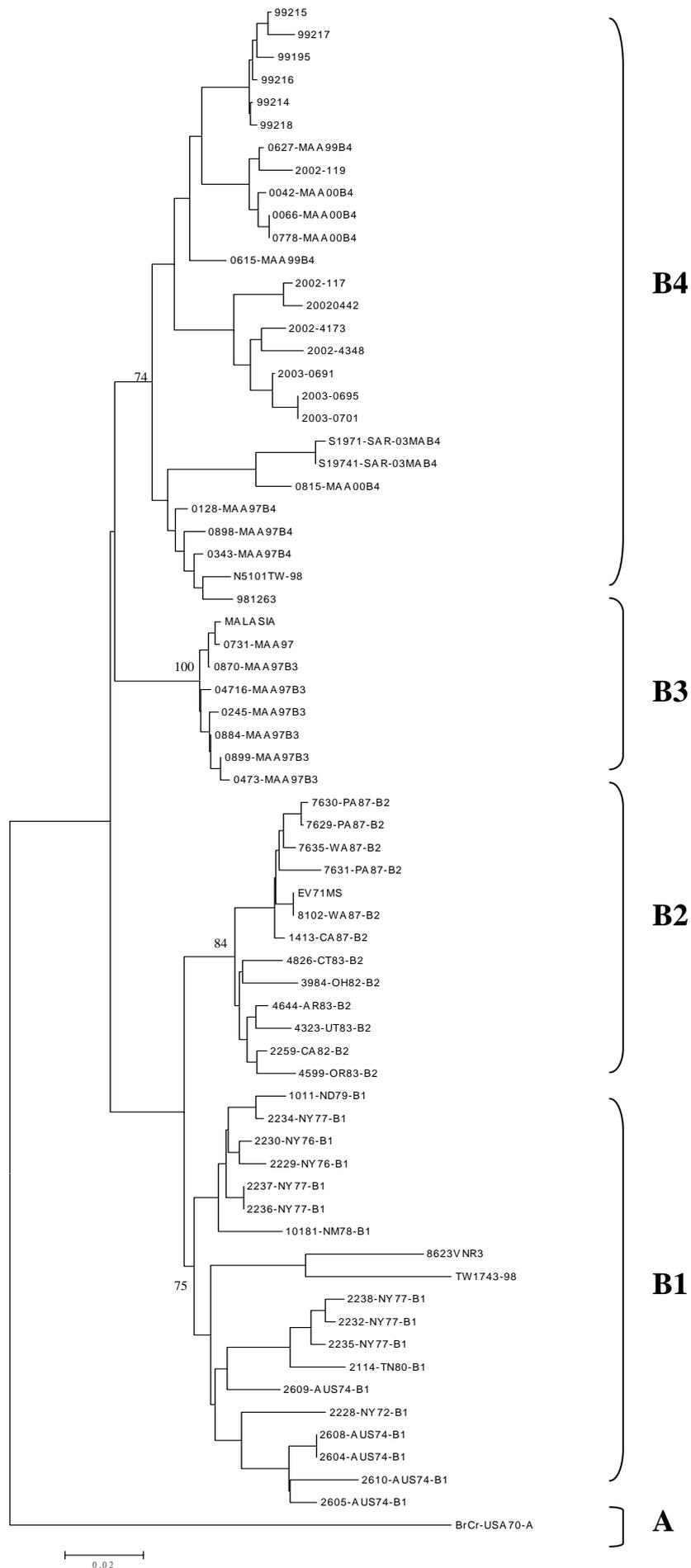


上圖中 N 為陰性對照組，M 為 100bp ladder 的 marker，1~11 為腸病毒 71 型臨床分離病毒株，以引子對 159/162 增幅腸病毒七十一型 VP1 片段約 485bp

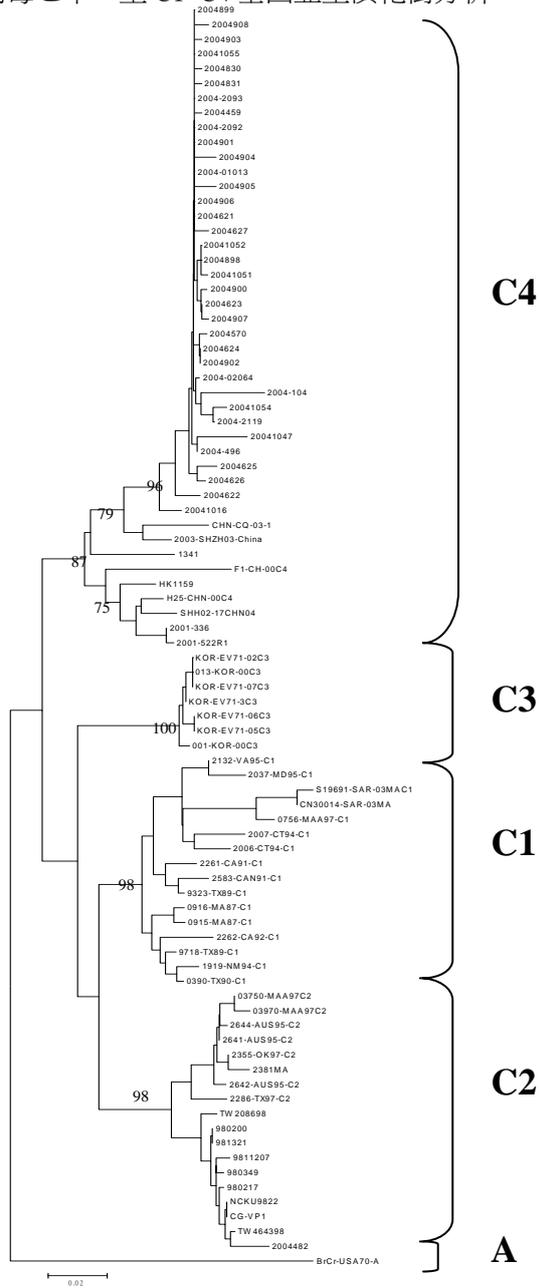
圖二、腸病毒七十一型 B 與 C 基因亞型演化樹分析



圖三、腸病毒七十一型 B1~B4 基因亞型演化樹分析



圖四、腸病毒七十一型 C1~C4 基因亞型演化樹分析



表一、腸病毒七十一型基因亞型(subgenotypes) 同源相似性(homology)百分比分析

EV71 subgenotypes	Comparison	%Homology range	Mean % homology
Within B1	-	92-98	94.9
Within B4	-	95-99	96.7
Within C2	-	98-99	99.1
Within C4	-	94-99	96.5
B2	B4	91-94	92.2
B2	C2	82-84	82.9
B2	C4	83-85	83.1
B4	C2	83-84	83.3
B4	C4	84-85	84.2
C2	C4	89-91	90.1
B1	A	82-84	83.5
B4	A	81-83	82.1
C2	A	82-86	84.3
C4	A	82-86	84.1
B1	B2	90-96	93.3
B1	B4	88-93	90.4
B1	C2	83-85	83.9
B1	C4	84-85	84.4
B2	B3	93-94	93.6
B4	B3	93-95	93.5
C2	B3	83-84	83.8
C4	B3	84-85	84.2
B2	C3	82-83	82.6
B4	C3	84-85	84.2
C2	C3	91-92	91.8
C4	C3	90-93	90.9
B2	C1	81-83	81.9
B4	C1	83-84	83.6
C2	C1	91-94	92.7
C4	C1	89-93	90.3

表二、引子序列

引子(primers)	序 列	相對位置
159	5'-ACYATGAAAYTGTGCAAG G-3'	2385-2403
162	5'-CCRGTAGGKGTRCACGCRAC-3'	2869-2850