

## 1998~2006 年台灣地區腸病毒重症個案血清型之分析探討與警惕

林翠莉<sup>1</sup>、陳國東<sup>2</sup>、王恩慈<sup>3</sup>、李宜學<sup>1</sup>、黃教威<sup>1</sup>、徐秋菊<sup>1</sup>、吳和生<sup>1</sup>

- 1.衛生署疾病管制局研究檢驗中心
- 2.國立成功大學公共衛生研究所
- 3.衛生署疾病管制局第二組

### 摘要

台灣地處亞熱帶地區，每年都有一群腸病毒在流行，隨著流行血清型的不同，部份個案會因感染腸病毒併發較為嚴重臨床症狀的發生，佐以經實驗室檢驗之數據及臨床之綜合研判，謂之腸病毒確定重症個案；自 1998~2006 年最主要的血清型為腸病毒七十一型(Enterovirus 71; EV71)及克沙奇病毒 B3 型(Coxsackievirus B3; CB3)，藉由合約實驗室回饋資料所建立的病原體監測系統顯示台灣地區這九年內 EV71 的流行為地域性的(endemic)，無論它是否為當年主要的流行株，在腸病毒確定重症個案中為主要的血清型；另一血清型為 CB3，流行於 1999 至 2000 年，並在 2005 年再度流行於台灣地區，且為當年最主要的流行株，這個血清型在時序上呈現的流行週期是再現性(recurrence)。這二個血清型不僅在流行趨勢上有所不同，而在年齡層、臨床症狀及分子流行病學上也有差異，疫情的規模也不盡相同，這些資料不僅可進一步提供防治的策略的訂定，藉由病原體及臨床症狀的發生可提早發佈警訊，或許可減少或減緩因腸病毒血清型別造成的疫情因而帶來的衝擊。

關鍵字：腸病毒七十一型、克沙奇病毒 B3 型、地域性、再現性

### 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

---

民國 96 年 3 月 15 日受理；民國 96 年 6 月 15 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

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[1~3]。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[4,5]，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。)；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, EV76)，3.*Human enterovirus B* (HEV-B) (包括 CVA9, CVB1~CVB6, E1~E7, E9, E11~E21, E24~E27, E29~E33, EV69, EV73, EV74, EV75, EV77, EV78)，4.*Human enterovirus C* (HEV-C) (包括 CVA1, CVA11, CVA13, CVA15, CVA17, CVA19~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 合併成為同一個種[6,7]。

大部份的腸病毒感染屬於無症狀感染，手足口症(Hand-Foot-Mouth disease；HFMD)及疱疹性咽峽炎(Herpengina)為臨床上較典型之症狀，其他的

症狀亦在臨床上可見，如感冒、呼吸道感染，紅疹、結膜炎、心肌炎、涉及中樞神經系統之無菌性腦膜炎、腦炎、麻痺及死亡等；所以單一腸病毒的血清型在臨床上可以表現出不同的臨床表徵，而一個臨床表徵的發生，亦可由不同的腸病毒血清型所引起的；沒有單一的腸病毒之流行病學，相對的應是多種的腸病毒流行病學，而獨特病原體的流行病學或疾病和這病原體的關係，不僅反應出病原體、宿主和環境的特性也反應出傳染的模式，腸病毒的傳染模式可藉由糞-口、水、食物、呼吸道及血液(垂直感染)等途徑傳染，其中以糞-口為最主要的傳染途徑。地域之不同會使得腸病毒在季節循環(circulation)上出現差異，在溫帶地區，它是屬於夏季病毒，而在熱帶及亞熱帶地區，它的流行是全年的[8~11]。台灣地處亞熱帶，所以腸病毒的流行也是全年的，冬季的流行不如夏、秋二季來得明顯，且每年從四月到十月中，可以觀察出有二波的流行，第一波在 4 月~7 月；第二波~在 9~11 月，第一波的流行幅度較第二波來得明顯，部份血清型呈現出互換(replacement)的情形

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臨床上較嚴重表徵的個案發生，幼童為死亡之高危險群體。衛生單位隨即在隔年建立了全島性的腸病毒監測系統，並將因腸病毒感染併發重症納入本國第二類的法定傳染病之一，個案謂之「腸病毒感染併發重症」可能病例。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

檢體來自 1998~2006 年腸病毒併發重症可能病例個案及一般例行性之臨床檢體；採檢相關之檢體如咽喉拭子、糞便、肛門拭子、腦脊髓液及血清等送至疾病管制局或病毒性合約實驗室進行病原體之分離與鑑定之工作。

### 二、法定傳染病通報系統(1999 年納入第二類法定傳染病)

通報「腸病毒感染併發重症可能病例」之定義為：【病例出現典型的手

足口病或疱疹性咽峽炎、或與病例有流行病學上相關的腸病毒感染個案，同時併發腦炎、急肢麻痺症候群、肌抽躍(myoclonic jerk)、急性肝炎、心肌炎、心肺衰竭等重症病例】；及九十四年再增列出生三個月內嬰兒，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，並排除細菌等其他常見病原感染者。

### 三、病毒性合約實驗室監測系統

疾病管制局在全省共有十三家病毒性合約實驗室，協助建立台灣地區病毒性病原體的監測工作為合約實驗室的所付予的責任之一，每星期由定點醫師依腸病毒之採檢定義採以咽喉拭子送檢，進行病原體的分離與鑑定，藉由十三家合約實驗室所回饋病原體的資料建立腸病毒不同血清型的流行趨勢。

### 四、病毒分離

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 RD、HEp-2C 二種細胞株，置於 36°C 含有 5% 的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，進行血清型別之鑑定。[12~14]

### 五、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。

### 六、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)。

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

Primer[8,15,16] 編號	序 列	位 置
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG-	2385-2403
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869-2850
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	3408-3389
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	2612-2631
012	ATGTAYGTICCICGIGG	2951-2970
040	ATGTAYRTICCIMCIGGIGC	2951-2970

(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、dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul 及antisense primer :162 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, cDNA加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、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°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。

**八、演化樹(Phylogenetic tree)之分析**

選取 EV71(27 株)及 CB3(39 株)這二個血清歷年的分離株與不同地域的參考病毒株(reference strains)及標準株(Prototype),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[17]。

## 結果

### EV71 及 CB3 流行趨勢

台灣地區在 1999 年即建立了全島性的腸病毒監測系統，每週由定點醫師採檢之檢體所分離出病原體建立的腸病毒流行趨勢，顯示 EV71 自 1999 年起在台灣地區呈現出活躍的狀態(active circulation)，每年台灣地區進入腸病毒流行期時在北部、中部、南部及東部均可分離出 EV71 病原體，惟在 1999 及 2006 年的監測的幅度較不及其他年代明顯，見圖一 a；另一血清型 CB3 其流行於 1999 年、2000 年及 2005 年，顯示該血清型的流行趨勢為再現性，其中又以 2005 年這年的流行幅度遠大於 1999 及 2000 年，見圖一 b。

### 腸病毒確定重症個案血清型別

分析自 1999~2006 年腸病毒重症確定個案的血清型別結果顯示(1998 年尙未有腸病毒重症之法定傳染病通報系統)，其中 EV71 型所佔重症型別比率分別為 1999 年 17.0%、2000 年 52.2%、2001 年 46.2%、2002 年 52.2%、2003 年 30.8%、2004 年 46.0%、2005 年 57.7% 及 2006 年 18.2%，自 2000~2006 年都是最主要的血清型；另一血清型 CB3 在確定重症型別比率為 1999 年 43.0%、2000 年 2.3%、2004 年 2.0% 及 2005 年 18.3%，並在 1999 年為最主要確定重症個案的血清型，其餘能造成重症確定個案的血清型則在各年度稍有不同，分別出現過 CA4,5,16、CB1,2,5、Echo4,6,9,11 及 Pan-Enterovirus (未知腸病毒血清型別)等血清型，每年均佔有不同的比率，見表一。

### 年齡層

在腸病毒確定重症個案年齡層上顯示 EV71 及 CB3 這二個血清型有著不同的分佈情況，以 EV71 這個血清型而言，隨著年齡層增長，確定重症個案有逐漸增加的趨勢，直至 3 足歲(36 個月)以下的年齡層，自 1999~2006 年間為 59.6~100%，平均約 81.2%，並以 2 足歲(12~24 個月)的年齡層的重病確定個案最多，在不同的年代均是這樣的結果，見表二；另一血清型 CB3 在年齡層上的分佈完全不同於 EV71，其主要年齡層都是在三個月(90 日)以下，

1999 及 2000 年以 31~60 日的重症個案居多，然而 2005 年有 18 例(69%)的重症個案則以出生一個月(30 日)內的新生兒為主，見表三。

### 演化樹分析

我們分別收集了歷年(1996~2006)EV71 及 CB3 之病毒株，建構出這二個血清型的親緣系統樹，分析其基因型上的變化，依據 Betty Brown 等人在核酸序列種系分析中以 VP1 全長可將腸病毒七十一型分成三種基因型，分別為 A、B 及 C 等三個基因型，BrCr Prototype 為 A 基因型，並進而將 B 和 C 基因型再分為 B1,B2,C1 and C2 等 subgenotypes[15]；繼而再分類出 B3、B4、C3 and C4 等 subgenotypes[18~20]。台灣地區自 1998~2006 年間，EV71 型呈現的在 1998 年的 C 基因型、1999~2003 年為 B 基因型、2004~2006 為 C 基因型，見圖二；而另一個血清型 CB3，雖然目前尚無對該型基因型有所定義，但由所建構出的親緣系統樹上，藉由 bootstrap values 所支持的可以類歸為三個 Clades，CB3 病毒株的基因型分別落在 Clade2 和 Clade3，而 2000 年呈現的是一個獨立的 Clade(Clade2)，其餘年代的分離株均落在 Clade3，見圖三。

### **討論**

台灣地區將因腸病毒感染併發重症納入我國的第二類法定傳染病，事實上異於其他國家對於腸病毒的監測體系系統，然而這樣的傳染病法的訂定完全是起源於 1998 年腸病毒疫情的經驗，而由於這個傳染病通報系統的建立，確也讓衛生單位逐漸了解台灣地區每年在進入腸病毒的流行期時，則會因為流行腸病毒的血清型不同，在臨床上會出現了不同的表徵。以 EV71 血清型而言，自 1999 年~2006 年間，合約實驗室的病原體監測顯示其分離率最低為 3.47%，最高為 35.01%，並在 2000 年為台灣地區腸病毒流行血清型的第一名(35.01%)；血清型 CB3 則於 1999 及 2005 為當年流行血清型的第一名，分離率分別為 33.85% 及 36.06%，然而相對於個別血清型 Coxsackievirus A4(CA4)，亦於 2004 及 2006 為流行血清型的第一名，分離率分別為 27.65%

及 26.51%，但造成重症的個案卻不及 EV71 和 CB3 這二個血清型，顯示著不管 EV71 型是否為當年主要的流行株，在併發腸病毒重症的個案都是最顯著的血清型，所以感染不同腸病毒血清型的個案數並不是造成重症個案最主要的因素，而是和血清型別有關，以 1998~2006 年間，因感染腸病毒併發嚴重症狀主要以 EV71 及 CB3 二個血清型為主，並伴有少數不同的血清型別；而這二個血清在這九年內隨著流行趨勢的不同，也導致了感染腸病毒併發重症個案在臨床症狀的多樣化。

在遭受感染腸病毒過程中，年齡是影響的因素之一，亦是決定腸病毒感染結果的，不同的年齡層有著不同感染的感受性，不同的臨床症狀及嚴重程度的差異，甚至是癒後的狀況，在感染的個體上，疾病的嚴重性也突顯在年齡層上；由 EV71 及 CB3 這二個血清型在年齡上的分析顯示這樣的結果。由於 EV71 感染可併發中樞神經的症狀較為明顯，個案反應在癒後的所留下的後遺症亦較不同，如智力的受損、肌肉的癱瘓則須仰賴呼吸器等；而另一個值得注意的是 EV71 在年齡層上雖說三足歲以下已佔了所有感染重症平均約 80%，對於 1-2 足歲的年齡層在歷年所佔的比率卻是最高的，由於六個月以下的嬰兒具有母體所給予的被動抗體，可以抵抗部份病原體的感染及其臨床症狀較不明顯或嚴重，然而在年齡的增長中，被動抗體的消失及個體免疫系統成熟度不同及活動力的增加，以致突顯在這個年齡層上；而 CB3 在 2005 年所造成的重症個案有約七成左右落在一個月內的新生兒(1~19 天)，造成此現象除了和病毒本身的特性有關，或許流行趨勢也是影響的因素之一，圖一中顯示出 CB3 流行在 1999 年橫跨 2000 年，隨即在監測點上較少有這個病原體被監測出，直至 2004 年開始監測點又開始陸續出現，到了 2005 年在台灣地區造成的流行最為明顯，由於 1999 及 2000 年的流行，已有了群體免疫的個體存在，阻斷了該血清型病毒的傳遞，然而隨著時序的變遷，易感宿主的增加，使得該血清型在 2005 年又再度流行，由於該血清型在新生兒上所引起臨床症狀較為嚴重，加上它的年齡、宿主及流行的趨勢，導致了而 CB3



在 2005 年所造成的重症個案有約七成左右落在一個月內的新生兒[21,22]。

在流行趨勢及年齡層上關係，EV71 型自 1998~2006 年在台灣地區的流行是相當活躍的，它呈現的流行趨勢是地域性的(endemic)，所以在環境中一直循環，尋找尚未感染的宿主；而 CB3 則是再現性行( recurrence)的流行趨勢，當群體免疫與易感宿主之間達到不同的高低點時，則將導致 CB3 傳遞的被阻斷或再度流行。無論是那一個腸病毒的血清型流行與否，每年則將會有易感宿主的增加，即是新出生的人口。

由於 EV71 及 CB3 這二個血清型重症個案的臨床表徵截然不同，所引發的疫情亦不相同，相對的對於在醫療及社會層面的衝擊也有所不同，因 EV71 血清型所感染的併發的重症個案，較突顯的是在個案本身，走向痊癒或遺留後遺症者甚至死亡；而 CB3 血清型則它所引發的不僅是在個案的本身，也由於病毒本身的特性及傳染的模式不同，其所引發的疫情確也是值得注意，如 2005 的流行時，所發生疑似母子垂直感染及群聚事件等疫情遠比 EV71 有過之而不及，雖有相同的恐慌，但是確由不同的血清型所造成的。

分子生物學的進步，提供了對於病原體原始生命的探討，不僅可以讓我們應用在臨床上的快速檢驗，也可以讓我們追溯相同病原體演化上的來源或不同血清型之間的關係，圖二及圖三為 EV71 及 CB3 的親緣系統樹，所顯示二個血清型在台灣地區基因型流行的趨勢變化，EV71 自 1998~2006 年台灣地區呈現出 B 和 C 基因型的 co-circulation，很明顯的這些基因型在時序的變遷中，流行在不同的年代，它們之間有著互換的情形(replacement)，如 1998 年較顯著的基因型為 C，而 1999~2003 年被置換成 B 基因型，隨後於 2004~2006 置換成爲 C 基因型；由於 CB3 目前國際上並無統一基因型命名方式，但由親緣系統樹顯示出台灣地區(1996~2005)都是在同一個 Clade3，換言之有可能是同一個基因型，較特殊的是 2000 年則是一個獨立的 Clade，亦是另一個基因型，這可反應出 CB3 橫跨了二年的流行(1999 年和 2000 年)，不僅是在基因型上有所不同，且中和能力(表現型)也有所差異(data not

show), 對於 CB3 的基因型的流行趨勢而言, 它自 1996 年開始, 循環在台灣地區幾乎同屬同一個基因型(Clade2), 除 2000 年外。

由於腸病毒屬於單股的 RNA 病毒, 本身呈現是不穩定的狀態, 自然會發生突變的情形, 由於病毒與宿主的關係及環境的不同等因素, 加上病毒本身會面臨到 selective pressure、quasispecies 及 intra-recombination 等因素而發生基因型的變化, 它的改變反應出的是病毒本身演化的情形, 雖說表現型才是真正能反應出病原體的改變化的特性, 由於基因型上的變化也是影響抗原性改變的因子之一, 所以導致發生腸病毒重症個案的血清型它在不同年代所出現的基因型與病原體的流行趨勢則是有助做為另一波的流行所帶來警訊, 有持續監測的必須性。

無論是台灣地區其他地域不同的國家, 每年都有不同的腸病毒血清型在做共同的循環(co-circulation), 所以它的流行有可能是散發性的(sporadic)或是流行的(epidemic), 由於腸病毒能在無症狀的個案中被分離出來, 顯示著腸病毒有相當量能的 silent circulation 在建康的群族中; 腸病毒感染而併發臨床的重症個案的血清型是反應出由於當年流行的腸病毒群其中的血清型所導致, 隨著時序的變遷, 將會再有不同的血清型再出現或浮出, 所以更突顯出腸病毒病原體監測系統早期趨勢的變化監測的重要, 而臨床上的表徵也是另一個警告, 或許可協助預測當年流行的血清型, 而提供防治策略上因應措施, 我們雖然無法改變任何一個血清型的流行趨勢, 但是我們可因策略的應用可減少或減緩因腸病毒血清型別造成的疫情而所帶來的衝擊。

## 參考文獻

1. Martin J, Dunn G, Hull R, et al. Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *J Virol* 2000; 74: 3001-10.
2. Vuorinen T, Vainionpää R, Heino J, et al. Enterovirus receptors and virus

- replication in human leukocytes. *J Gen Virol* 1999; 80: 921-7.
3. Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, et al. Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *J Virol* 1999; 73: 427-35.
  4. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003; 148: 1369-85.
  5. 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.
  6. Oberste MS, Penaranda S, Maher K, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A. *J Gen Virol*. 2004; 85: 1597-607.
  7. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, Amsterdam. 2005: 757-78.
  8. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; 73: 1941-8.
  9. Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, et al. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997; 78: 1-11.
  10. Hovi T, Stenvik M, Rosenlew M. Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Infect* 1996; 116: 91-7.
  11. Nairn C, Clements GB. A study of enterovirus isolations in Glasgow from 1977 to 1997. *J Med Virol* 1999; 58: 304-12.
  12. Bird BR, Forrester FT. *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*. US Department of Health and Human Services, Washington, DC. 1981.
  13. Isenberg HD. *Essential procedures for clinical microbiology*, American

- Society for Microbiology, Washington, DC. 1998: 451-523.
14. Bell EJ, Cosgrove BP. Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bull World Health Organ* 1980; 58: 423-8.
  15. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999; 73: 9969-75.
  16. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1288-93.
  17. 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.
  18. 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: 461-8.
  19. McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public health significance. *FEMS Microbiol Rev* 2002; 26: 91-107.
  20. Sanders SA, Herrero LJ, McPhie K, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community. *Arch Virol* 2006; 151: 1003-13.
  21. Bahri O, Rezig D, Nejma-Oueslati BB, et al. Enteroviruses in Tunisia: virological surveillance over 12 years (1992-2003). *J Med Microbiol* 2005; 54: 63-9.
  22. Trallero G, Casas I, Tenorio A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol Infect* 2000; 124: 497-506.



表一 1998~2006 年腸病毒感染併發重症確定病例血清型比率分佈之排行

年代(確定病例數)	血 清 型(rank)				陰性 (%)
	1	2	3	other	
1998(405)	EV71 (19.0)	Pan-Enterovirus (2.7)	Echo6、CB5 (1.0)	2.74	74.56
1999(35)	CB3 (43.0)	EV71 (17.0)	CB1、CB2 (11.0)	20.5	8.5
2000(291)	EV71 (52.2%)	Pan-Enterovirus (6.5)	CB3、Echo9 (5.6)	3.7	32.0
2001(389)	EV71 (46.2)	Pan-Enterovirus (7.67)	Echo4 (2.3)	12.13	31.7
2002(157)	EV71 (30.8)	Pan-Enterovirus (9.25)	CA16、Echo6 (2.3)	12.05	45.6
2003(70)	EV71 (62.8)	CA16 (4.2)	Echo11 (2.8)	8.8	21.4
2004(50)	EV71 (40.0)	Pan-Enterovirus (10.0)	CB3 (2.0)	6.0	42
2005(142)	EV71 (57.7)	CB3 (18.3)	CA16 (3.5)	5.0	15.5
2006(11)	EV71 (18.2)	CA5 (9.1)	CA4 (9.1)	0	63.6

備註：

1. 陰性代表經細胞培養未能分離出病原體
2. 未知腸病毒血清型(Pan-Enterovirus)

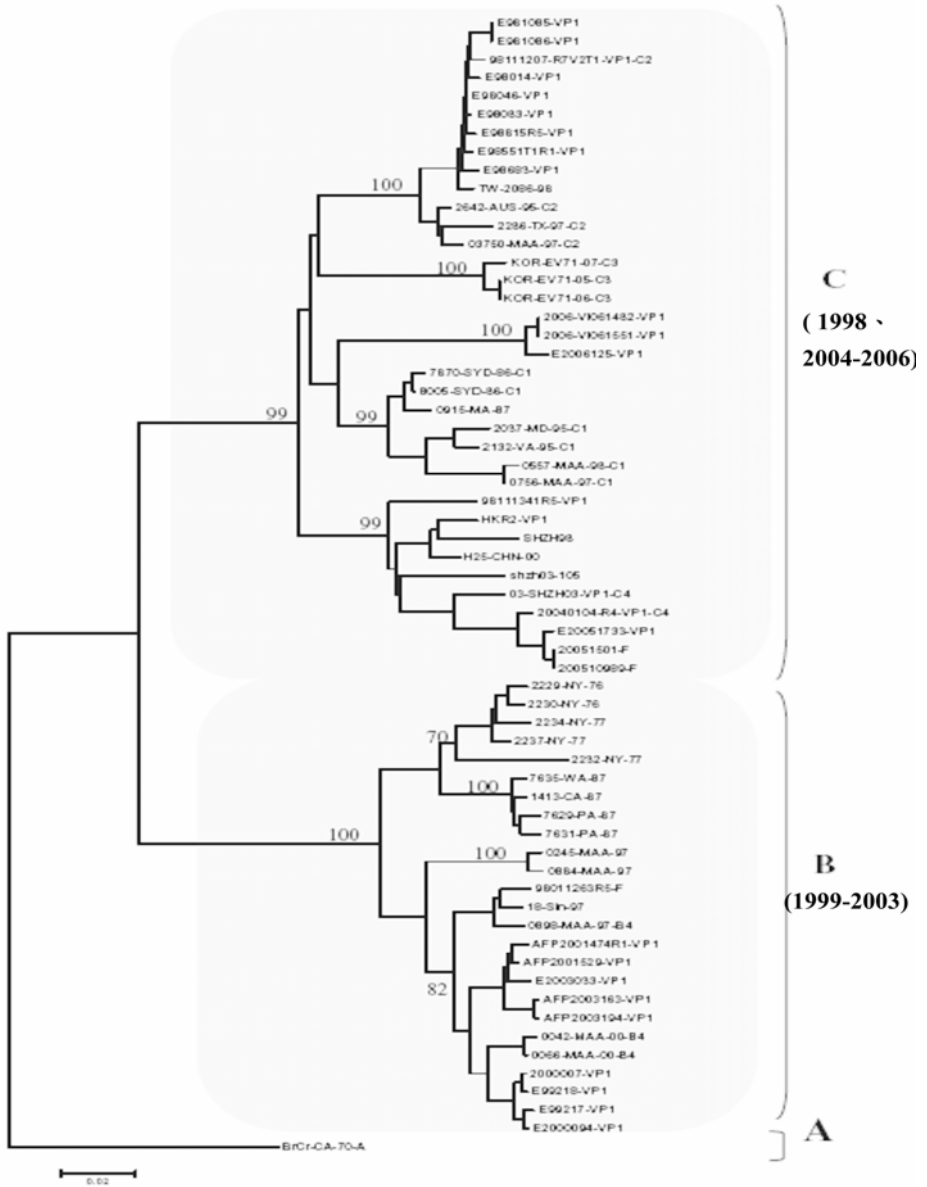
**表二 腸病毒七十一型確定重症個案年齡層之分析(1999~2006)**

年代	確定重症個案 (死亡)	月齡分佈							男:女
		1~6	7~12	13~24	25~36	37~48	48~60	>60	
1999	6 (1)	1	0	0	5	0	0	0	5:1
2000	152 (25)	16	17	42	37	19	17	4	1.6:1
2001	182 (26)	18	33	66	31	17	10	7	1.8:1
2002	57 (8)	3	11	20	12	4	3	4	1.1:1
2003	52 (7)	2	10	19	10	4	2	5	1.3:1
2004	20 (5)	1	3	8	5	1	1	1	1.2:1
2005	82 (7)	5	13	27	17	12	5	3	2.9:1
2006	2 (0)	0	2	0	0	0	0	0	0:1

**表三 克沙奇 B3 確定重症個案年齡層之分析(1999~2005)**

年	確定重症個案 (死亡)	日齡分佈					男:女
		<30	31~60	61~90	91~120	>120	
1999	15 (4)	0	10	2	2	1	0.8:1
2000	10 (1)	0	7	1	1	1	1.5:1
2005	26 (2)	18	3	2	3	0	1.2:1

圖二 1998~2006 年台灣地區腸病毒七十一型親緣系統樹(full VP1)





圖三 1996~2005 年台灣地區克沙奇 B3 親緣系統樹(Partial VP1)

