

臺灣腸病毒實驗室監測簡介

林翠莉、林廷翰、黃元品、吳和生*

摘要

臺灣地區「腸病毒病原體監測系統」自1999年疾病管制局(現為疾病管制署,以下簡稱疾管署)成立當年,即開始建置並持續運作,迄今已達16年。在這段期間,疾管署研究檢驗及疫苗研製中心(以下簡稱疾管署研檢中心)腸病毒實驗室持續進行檢測技術的開發與檢驗品質的維護與提昇,並在8-13家病毒合約實驗室共同參與下,除有效掌握國內每年各種不同型別腸病毒的流行趨勢外,也有一些新興病原體被偵測出。統計自該監測系統運作以來,計有40餘型腸病毒及新興病原體如human parechovirus (HPeV)1, 3, 4 and 6及Saffold virus type 3(SAFV-3)等病毒被檢出。因此,該系統所監測之病毒不再侷限於腸病毒群,而是擴及到整個微小病毒科的所有成員,故應稱為「微小病毒科監測系統」較為正確,但為讓多數人容易了解,本文仍稱為「腸病毒監測系統」。

關鍵字: 微小病毒科; 未分型腸病毒; 再浮現傳染病; 新興病原體

前言

微小病毒科(*Picornaviridae*), 為無套膜(non-enveloped)、帶有一條單股正性RNA(positive-sense RNA), 大小約近30nm的二十面體的病毒顆粒[1]。在微小病毒科中, 以小兒麻痺病毒(poliovirus)造成的全球性疾病最廣為熟悉, 且危害最大。該病毒科之基因組成大約為7000-8800 鹼基(7-8.8 Kb), 由5'端非轉譯區(5' UTR; 5' -untranslated region)開始, 依序為VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D以及3'端非轉譯區(3' -UTR)等。其中VP4-VP1(P1 region)為結構性蛋白質(structure protein), 其形成病毒capsid的蛋白質, 在不同屬(genus)之間, 有不同的特性

衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

通訊作者: 吳和生*

E-mail: wuhs@cdc.gov.tw

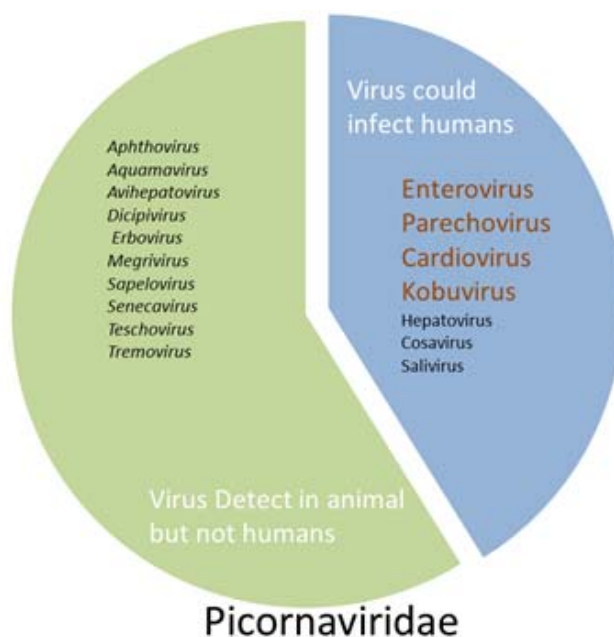
投稿日期: 2014年09月16日

接受日期: 2014年12月23日

DOI: 10.6524/EB.20150512.31(9).001

，VP4 及 VP2 未分離成兩個區域前，則稱作 VP0。另外 2A-2C(P2 region)及 3A-3D(P3 region)區域所轉譯者為非結構性蛋白質(non-structure protein)，這些蛋白質為病毒進入宿主細胞所必須，以及病毒進行複製所需要的酵素，例如 protease 及 RNA polymerase 等。

早期對於微小病毒科係以血清學方法來分類，目前則以分子生物學方法 sequence-based phylogeny 作為分類的最高遵循標準(gold standard)，可將微小病毒科細分為 17 個不同的屬 (圖一)。其中與人類疾病相關者，主要為 enterovirus、parechovirus、cardiovirus、kobuvirus 等，不同的屬(genus)及不同血清型感染，會有不同的疾病症狀與嚴重程度。



圖一、微小病毒科及其分屬

與人類疾病相關之微小病毒科分屬(genus)

一、腸病毒 (Enterovirus)

微小病毒科中，腸病毒屬(enterovirus)最常感染兒童並常在夏季引發流行，最初是依據疾病的型態、病毒的毒力及顱內注射乳鼠(suckling mice)致病模式為基礎分成 4 種病毒型別(species)；分別為 1)小兒麻痺病毒 (polioviruses, PV)；2)克沙奇 A 群病毒 (coxsackieviruses A, CVA)；3)克沙奇 B 群病毒 (coxsackieviruses B, CVB) 及 4)伊科病毒 (echoviruses, E)[2]等。其中 CVA 可造成實驗小鼠無力性麻痺(flaccid paralysis)，並對骨骼肌及心肌造成傷害；而 CVB 則會引發痙攣性麻痺(spastic paralysis)，並廣泛侵犯各組織，如：中樞神經系統、肝臟、胰臟等[3]。現今，腸病毒屬依據核酸序列分析(sequencing analysis)，將可引發人類疾病的腸病毒重新分類為 human enterovirus A (HEVA)、human

enterovirus B (HEVB)、human enterovirus C (HEVC)及 human enterovirus D (HEVD)等四群。HEVA 包括 CVA2-A8、CVA10、CVA12、CVA14、CVA16、EV-A71、EV76、EV89-91；HEVB 包括 CVB1-6、CVA9、E1-7、E9、E11-21、E24-27、E29-33、EV69、EV73-75、EV77-88、EV93、EV97-98、EV100-101、EV106-107、EV-B111；HEVC 包括 PV1-3、CVA1、CVA11、CVA13、CVA17、CVA19-22、CVA24、EV95-96、EV99、EC102、EV104、EV105、EV109、EV113、EV116、EV117-118；而 HEVD 則包括 EV68、EV70、EV94、EV111 等 (<http://www.picornaviridae.com/>)。這些病毒引發的臨床症狀呈現多樣性，輕症如手足口病(hand-foot-and-mouth disease)、上呼吸道及下呼吸道感染(upper and lower respiratory diseases)、疱疹性咽峽炎(herpangina)、結膜炎(conjunctivitis)、腸胃炎(gastroenteritis)等；部分型別則會造成嚴重的全身性症狀或侵犯至中樞神經系統，如腦炎(encephalitis)、肢體麻痺(paralysis)、脊髓炎(myelitis)、腦膜炎(meningitis)甚至死亡等。

另一大分類群則為鼻病毒(rhinovirus)，早期鼻病毒被歸類為微小病毒科之一屬，但在 2008 年之後，經由基因序列分析，將 Rhinovirus 歸類至腸病毒屬之內，並藉由 capsid 之核酸序列分析，再細分為 human rhinovirus A (HRV-A)、human rhinovirus B (HRV-B) 及 human rhinovirus C (HRV-C)等三大群 [4]。HRV-A 包含 80 種基因型，HRV-B 有 32 種，而在 2006 年才首度歸類的 HRV-C 則有 54 種 [4]。雖然 HRV 歸類在腸病毒屬內且基因型別眾多，惟其臨床症狀主要侷限於呼吸道感染，可感染成人及幼童，常引發感冒(common cold)，症狀包括鼻塞、流鼻涕、打噴嚏、喉嚨痛及咳嗽等[1]，然而 HRV 也可能會感染下呼吸道，引發氣喘(asthma) [5]、造成慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)的加劇[6]、小兒肺炎(pneumonia)及細支氣管炎(bronchiolitis)等。流行病學研究發現，HRV 感染人類比例以 HRV-A 型較為常見，約占 45-65%，其次為 HRV-C 型約 30-50%，HRV-B 則約占 2-13%。

二、Parechovirus

除腸病毒外，另外可能造成新生兒及幼兒重症者為 human parechovirus (HPeV)。早在 1956 年，HPeV 病毒即自一位腹瀉病童的檢體被分離出來，當時被歸類於腸病毒屬 (enterovirus)下的 Echovirus 22 及 23 型 [7]。隨著分子流行病學技術的快速發展，經由基因序列的分析比對，而將 echovirus 22 及 23 歸類為 parechovirus genus，並命名為 HPeV-1 及 HPeV-2 兩種病毒型別。此後陸續分離出新的病毒型別，如 1999 年的 HPeV-3 [8]，2002 年的 HPeV-4 [9]，其後 HPeV-5 及 HPeV-6 也相繼被發現。目前 HPeV 病毒總共可分為 16 種不同基因型。HPeV 的傳染途徑如同腸病毒一般，主要為糞-口傳染，但也可經由呼吸道感染，感染後可經由血液傳播到其他器官組織，進一步造成全身性疾病。研究顯示 HPeV-3 感染幼童可造成重症，包括敗血症、腦炎及肝炎等。而 HPeV-1 引發的重症案例也曾被報導，諸如無菌性腦膜炎(aseptic

meningitis)、腦炎(encephalitis)、腦脊髓炎(encephalomyelitis)、無力性肢體麻痺(flaccid paralysis)等 [10]。至於 HPeV-2 則最初即是由一位無菌性腦膜炎患者所分離出來的，因此臨床上對新生兒及幼兒群體不可忽略 HPeV 感染的重要性。

三、Cardiovirus

Cardiovirus 病毒感染動物，主要分為 encephalomyocarditis virus (EMCV)及 theilovirus 兩種 species。EMCV 僅有一種血清型，theilovirus 則可分成 Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)、Vilyuisk human encephalomyelitis virus (VHEV)及 Thera virus(TRV)等三種。第一個感染人類的 cardiovirus 於 2007 年被發現，是在 1982 年由罹患不明原因發燒的病童糞便檢體中被分離出來，並被命名為 Saffold virus(SAFV) [11]。隨後，Abed 等人一罹患肺炎、發燒及耳炎(otitis)的 23 個月大男童的鼻咽拭子檢體中，分離出 Saffold 類病毒(saffold-like virus) [12]。這兩株病毒株現稱為 SAFV-1 及 SAFV-2，並歸類於 theilovirus 之下。許多研究指出，SAFV 病毒感染曾於阿富汗、加拿大、中國、德國、巴基斯坦及美國被確認，顯示 SAFV 感染已經是全球性的散布，並多在嬰兒及小於六歲的兒童的呼吸道及糞便檢體被分離出來。感染型別主要為 SAFV-1、SAFV-2 及 SAFV-3 等三種；其中 SAFV-3 病毒血清抗體在亞洲、非洲、及歐洲兩歲內之嬰幼兒血清陽性率達 75%，而於較大孩童及成人血清之陽性率則高達 90% [13]。SAFV 病毒感染症狀包括腸胃炎(gastroenteritis)及呼吸道症狀，但其致病過程仍不清楚。一份早期針對 SAFV 的研究指出 [14]，雖然在一位急性肢體麻痺患者(acute flaccid paralysis; AFP)的糞便檢體分離到 SAFV 病毒，但在腦脊髓液(cerebrospinal fluid; CSF)中並未發現病毒，因而無法確認 SAFV 病毒是造成 AFP 的主因。而 Nielsen 等人 2012 年的研究發現，一位患有小腦炎(cerebellitis)並導致運動失調症(ataxia)的兒童，其 CSF 及糞便檢體均可偵測出 SAFV-2 病毒的存在；並且同一研究另外一位死亡個案也在其 CSF、血液等檢體發現相同病毒的存在 [15]。這些發現表示 SAFV 如同腸病毒，均可造成嬰幼兒腸胃炎、呼吸道感染及嚴重的神經性的併發症，因此 SAFV 病毒被認為是另一個應被關注的新興病原體。

四、Kobuvirus

Kobuvirus 可再細分 Aichi virus 及 bovine kobuvirus 等兩種 species。其中 Aichi virus 與人類疾病相關而 bovine kobuvirus 則否。自 1989 年 kobuvirus 被發現之後，Aichi virus 可被分成 A、B、C 三種基因型(genotype) [16]。A 及 B 基因型主要出現於亞洲及歐洲，但 B 基因型也見於美國境內，而 C 基因型則主要出現於非洲。依據血清學研究指出，30-40 歲的族群，高達 80-95% 皆帶有 anti-Aichi virus 的抗體，顯示 Aichi virus 在不同族群中曾造成全面性的散佈。由於 Aichi virus 感染的症狀較輕微甚或無症狀感染，因此病患採檢送驗率不高，僅被零星地發現，其傳染途徑也與其他腸病毒相同，均屬糞-口感染，經由被汙染的水或食物或者是經由人與人接觸所傳播。

國內腸病毒監測網絡及相關研究計畫

一、衛生福利部委託病毒性合約實驗室

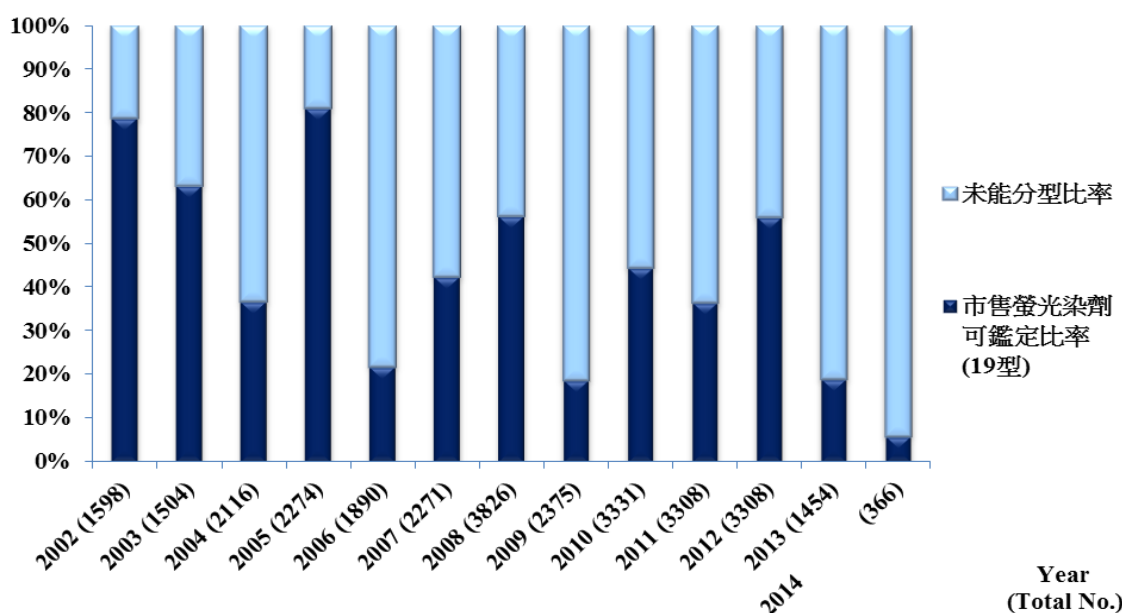
1998 年全臺爆發腸病毒疫情，故前衛生署於 1999 年三月起在全國陸續委託設立病毒性感染症合約實驗室，此一措施對我國病毒性感染症即時監測及防治工作上扮演相當重要的角色。這些合約實驗室所參與之內容包括：1)各縣市定點醫師負責採檢當地患者檢體，並送這些病毒性合約實驗室進行檢驗；2)每一例類似腸病毒及流感重症病患均能進行快速而精確之實驗室診斷，及早偵測流行趨勢並發布疫情警訊；3)除腸病毒和流感病毒監測外，這些合約實驗室也會在發生不明病因感染症病例或重大疫情時，配合增加檢驗項目並提昇整體檢驗量能。此外，在疫病監測方面，更能為我國建立寶貴的病毒性感染症資料庫，使我們對於重要病毒在國內不同地區及季節的活動狀況有所瞭解並為重要生物材料主要來源之一。

二、腸病毒監測相關研究計畫 (基因體醫學國家型科技計畫) [17-18]

- (一) 該計畫以監測國內重要傳染病為主要目的，自2002年起逐年建立多項重點病原體基因資料庫，選擇重要傳染病病原體進行大規模基因定序工作，以作為後續比對及演化分析基礎；此外，除適時提供分子流行病學及病原體基因資訊供學術機構運用外，並可提供疾管署進行病原體快速檢驗技術的開發，提升傳染病及時預警時效。
- (二) 開發腸病毒型別鑑定檢驗試劑(計畫編號：DOH95-DC-2007,DOH96-DC-2009) 該計畫之目的是提供病毒合約實驗室不同腸病毒型別的螢光染色試劑，以快速且正確鑑定出腸病毒感染。首先建立RD (rhabdomyosarcoma)細胞株的恆定系統，並經病毒的感受性(susceptibility)測試後，選取欲建立血清型 IFA (immunofluorescence assay)檢測系統之標準株 (prototype Strain)，大量增殖於RD細胞株上，經過濃縮及活性等測試，選擇兔子為施以基礎及追加免疫，製備抗血清以為螢光免疫染色法多株抗體之來源，並測其最終之抗體效價(homotiter)，以標定出抗血清與螢光標識物的最適當反應濃度 (checkerboard)，進而應用在腸病毒標準株及回溯歷年的不同型別腸病毒陽性分離株，評估該每一血清型之敏感性(sensitivity)及特異性(specificity)以為臨床腸病毒血清型別鑑定之用。
- (三) 新興/再浮現傳染病監測技術開發與應用計畫[19-24] (計畫編號：DOH100-DC-2019, DOH101-DC-2401, DOH102-DC-2601, MOHW103-CDC-C-315-000601) 。該計畫主要目標為：(1)建立未知感染原監測網絡；(2)未知/新興感染原檢驗技術檢測平臺之開發；(3)建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術。透過前述三大目標之整合與執行，期能建置臺灣未知/新興病原體國際級實驗室，以儘早確認不明原因傳染病，發現新興病原體為目標，並期待未來發展成為國際未知/新興病原體交流平臺，善盡國際社會一分子之責任。

實施成果

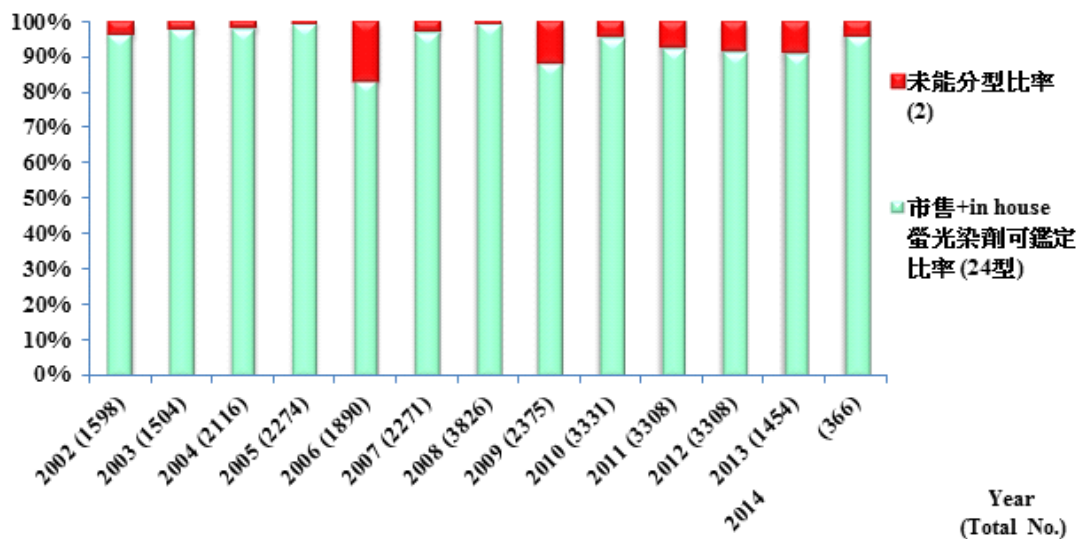
臺灣地區腸病毒病原體監測主要是以細胞培養的方式並佐以間接免疫螢光染色法鑑定其血清型，目前市售可以鑑定出的血清型計有 19 型，分別為小兒麻痺病毒 1-3 型 (poliovirus type 1-3)、克沙奇 B1-B6 (coxsackievirus B1-B6)、伊科病毒第 4 型、第 6 型、第 9 型、第 11 型及第 30 型 (echovirus type 4,6,9,11,30)，克沙奇 A 群病毒第 9 型、第 16 型及第 A24 型 (coxsackievirus A9,16,24) 及腸病毒 70 及 71 型，但如僅使用這些抗血清應用於臺灣地區的腸病毒鑑定時，平均鑑定率僅約 50%，換言之，尚有一半的腸病毒無法及時被鑑定出來 (圖二)。



圖二、2002.01~2014.06 年市售腸病毒螢光染劑可分型比率

為提升腸病毒分型比率，疾管署自 2002 年起，開始執行基因體計畫，藉由基因定序分析無法分型腸病毒之基因型。結果顯示 2002-2014 年期間，總計有 40 餘型的腸病毒基因型被監測出來，每年平均可監測出約有 15~20 個腸病毒型別共同流行於臺灣地區。這些型別包括為 coxsackievirus A2,3,4,5,6,8,9,10,12,16, 21,24、coxsackievirus B 1,2,3,4,5、echovirus 3,4,5,6,7,9,11,13,14,15,16,18,19,20,24,25,27,30,33、EV68, EV71 及 rhinovirus 等。其中 human enterovirus A species 在臺灣地區呈現常態性(endemic)的流行，分別為 coxsackievirus A2,4,5,6,10,16 and EV71 等基因型，不僅為歷年(1998~2014)最主要的流行血清型之一，且幾乎每年皆可監測該型別的存在。此外，human enterovirus B species 為每隔 2~4 年內出現，呈現出再發性(recurrence) 或散發性(sporadic)流行趨勢，如 echovirus type 6,9,11,18 及 coxsackievirus B2,3,4,5 等。

由於使用基因定序來鑑定腸病毒型別，費用較昂貴且費時，因此疾管署研檢中心特別針對現在無市售之抗血清，開發出螢光檢驗試劑(Coxsackievirus A IFA Typing Kit I)，內含五種腸病毒血清型，分別為 coxsackievirus A2,4,5,6,10 試劑套組，並於 96 年起全面性提供疾管署病毒性合約實驗室使用。目前以市售染劑的 19 種型別合併疾管署研檢中心所開發的腸病毒檢驗試劑試劑套組 5 型，總計 24 型全面用於病原體的鑑定後，平均可將腸病毒可分型的比率提昇至 90% (圖三)。



圖三、2002.01~2014.06年臺灣地區腸病毒可分型之比率

其他將近 10%的未能分型之腸病毒，經分析可能的原因包括非屬 *Picornaviridae* 病毒，病毒量太少或不屬於前述 24 種腸病毒，或病毒發生變異(mutation)等。經由分子生物學檢測，陸續發現 *Picornaviridae* family 之其他 genus 成員，包括 parechovirus and cardiovirus，檢測出之基因型別為 HPeV1,3,4 and 6 及 Saffold virus type 3(SAFV-3) 及原市售螢光染劑已無法鑑定出腸病毒血清型，如 CB2,3,4,E30 等 (表一)。

表一、2002~2014 臺灣地區微小病毒科不同型別病原體

Genera	genotype
Enterovirus	CA2-6, CA8-10, CA12, CA16, CA21, CA24 CB1-5 E3-9, E11, E13-16, E18-20, E24-25, E27, E30, E33 EV68, EV71, Rhinovirus
	Re-emerge: CB2,3,4,E30
Parechovirus	HPeV 1,3, 4,6
Cardiovirus	SAFV-3

討論及結論

臺灣流行的腸病毒血清型在臨床上主要是以手足口症(hand-foot-and-mouth disease; HFMD)及疱疹性咽峽炎(herpangina)為表徵，主要的血清型以腸病毒七十一型(enterovirus 71, EV71)及克沙奇 B3 病毒(Coxsackievirus B3, CVB3)為主。這二個血清型亦是自 1998~2013 年來造成臺灣地區引發病毒造成重症最重要的腸病毒血清型，也對當時社會大眾帶來相當大的衝擊。2005 年也因 CVB3 腸病毒流行而修訂了腸病毒併發感染可能重症的定義，即出生三個月內嬰兒，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。腸病毒七十一型是繼小兒麻痺病毒根除後，另一個重要且引起關注的腸病毒病原體，臺灣在 1998 年期間曾爆發腸病毒七十一型大流行並造成 78 例感染個案死亡[24]，並於 2002 年、2004 年、2008 及 2012 年皆有不同程度的流行，以 2000 年(41 例)及 2001 年(58 例)為大宗[25]。在西太平洋地區除臺灣外，在馬來西亞、新加坡、日本、越南等國家也曾爆發過腸病毒七十一型之大流行，在過往的 15 年臺灣地區腸病毒七十一型的流行會隨著基因亞型的改變及群體免疫等因素，約 2-3 年會發生較大規模的流行。經由長期病原體監測下，顯示 EV71 血清型在臺灣地區呈現出常態化(endemic)及 CVB3 為再發性(recurrence)的流行趨勢。

疾病管制署為我國傳染病防治的專責機構，而腸病毒在國內儼然已成為夏季為主要的傳染病病原體之一；在多元化腸病毒的監測系統中，病毒合約實驗室的監測主要是以病原體分離為主，而臨床實驗室對於病原體的分離大部份選擇 3~4 種細胞株進行病原體的分離，待出現細胞病變時再進行病原體的鑑定，此時大都仰賴螢光染色鑑定方法。由於腸病毒型別眾多，目前市售可以鑑定出腸病毒的血清型計有 19 型，如僅採用這些抗血清，則每年平均只有 50% 腸病毒可被鑑定出，其餘皆為未分型腸病毒(untypable enterovirus)。雖然中和試驗為 gold standard 可供鑑定，但由於該方法耗時及需具備不同型別腸病毒抗血清方能進行鑑定。因此，疾管署自 2002 年基因體計畫施行後，即將所有由合約實驗室所分離出腸病毒的病原體均以基因定序分析其基因型(尤其著重無法分型的病原體)，故自 2002~2009 年計有 40 餘型的腸病毒基因型被檢出，使我們更能掌握每一個腸病毒基因型的流行現況。惟這些病原體基因型鑑定是先由合約實驗室先行培養，再送回疾管署研檢中心檢驗，在時效上已有 1~2 週的落差，無法達到即時監測的目標；所以陸續開發了非市售染劑可以鑑定腸病毒血清型的檢驗試劑，先期以臺灣地區常態流行的血清型為主，分別為 coxsackievirus A2,4,5,6,10 (EV71 及 CA16 已有市售螢光染劑)並組合成檢驗試劑套組為“Coxsackievirus A IFA Typing Kit I”，該檢驗試套組於 96 年起常態提供全國病毒性合約實驗室進行鑑定，故自 2008 年後已將每年可分型腸病毒的比率提昇至 90%，對及早了解國內每年腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當大。

目前每年仍約有 10% 腸病毒未能分型，其中包含了 1) 鼻病毒(rinovirus)，此群病原體依據 2002 年後的資料顯示在臺灣地區已呈現常態性流行，臨床上以上呼吸道感染為主，目前該病毒已併入了腸病毒屬，主要基因型為 HRV-A 型；2) 再浮現腸病毒，總計有 21 個基因型，這些基因型大部分尚未呈現常態流行，然而未來如群體免疫、病原體變異及氣候變遷等因素是否會改變其流行型態，值得進一步觀察；3) 新興病原體，如 parechovirus (HPEV1,3,4,6) 及 cardiovirus，目前這些新興病原體引起人類疾病的致病機轉尚待進一步研究，但值得注意的是這些新興病原體在臨床上所造成的症狀與腸病毒群無法區分[26]，對於新生兒而言，一樣會引起 sepsis-like syndrome、腦炎、肝炎及多重器官衰竭等症狀；另一屬的病原體 SAFV-3，是否為呼吸道或是胃腸道的病原體的角色尚待釐清，因二者的感染部份皆可檢測出該病原體的存在。臺灣地區於 2013 年首度監測出並確認 SAFV-3 病原體的流行，流行時期在 2~7 月，流行區域以花蓮、宜蘭、新北市及臺中等縣市，具有上呼吸道感染之共同症狀(如發燒、頭痛、肌肉痛、流鼻水、咳嗽、咽痛、類流感症狀及類似於典型腸病毒群臨床表徵如疱疹性咽峽炎)。

腸病毒病原體監測自 1999 年建立持續迄今，已成為一個穩定且常態化運作的監測系統，不僅使得我們確實掌握腸病毒在臺灣地區的流行及其造成疾病的嚴重程度，也由於持續進行檢驗技術的開發、品質的維護與提昇，使得監測目標不再是侷限於腸病毒群，而是擴及到整個微小病毒科，並從中檢測出過去未曾在臺灣地區出現過的新興或再浮現病原體。未來我們將持續不斷的引進新技術新科技，以期早期偵測並評估這些新興或再浮現病原體對於疾病所帶來疾病威脅的程度，惟有盡可能掌握已知病原體的流行趨勢及其特性才有能力面對未知新興病原體的挑戰。

參考文獻

1. Tapparel C, Siegrist F, Petty TJ, et al. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, Genetics and Evolution* 2013;14:282-93.
2. Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, et al. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Virol* 1997;78:1-11.
3. Crowell RL, Landau BJ. A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Curr Top Microbiol Immunol* 1997;223:1-11.
4. Simmonds P, McIntyre C, Savolainen-Kopra C, et al. Proposals for the classification of human rhinovirus species C into genotypically assigned types. *J Gen Virol* 2010;91:2409-19.
5. Edwards MR, Bartlett NW, Hussell T, et al. The microbiology of asthma. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:459-71.
6. Kherad O, Kaiser L, Bridevaux PO, et al. Upper-respiratory viral infection, biomarkers, and COPD exacerbations. *Chest* 2010;138:896-904.

7. Wigand R, Sabin A. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch* 1961;11:224-47.
8. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Isolation and identification of a novel human parechovirus. *J Gen Virol* 2004;85:391-8.
9. Benschop K, Schinkel J, Luken M. Fourth human parechovirus serotype. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1572-5.
10. Harvalaa H, Wolthersb K, Simmonds P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2010;23:224-30.
11. Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, et al. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. *J Clin Microbiol* 2007;45:2144-50.
12. Abed Y, Boivin G. New Saffold cardioviruses in 3 children, Canada. *Emerg Infect Dis* 2008;14:834-6.
13. Chiu CY, Greninger AL, Chen EC, et al. Cultivation and serological characterization of a human Theiler's like cardiavirus associated with diarrheal disease. *J Virol* 2010;84:4407-14.
14. Chiu CY, Greninger AL, Kanada K, et al. Identification of cardioviruses related to Theiler's murine encephalomyelitis virus in human infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14124-9.
15. Nielsen AC, Bottiger B, Banner J, et al. Serious invasive Saffold virus infections in children, 2009. *Emerg Infect Dis* 2012;18:7-12.
16. Ambert-Balay K, Lorrot M, Bon F, et al. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2008;46:1252-8.
17. Brown B, Oberste M, Alexander JJ, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999;73:9969-75.
18. Nix W, Oberste M, Pallansch M. 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.
19. Nix W, Maher K, Pallansch M, et al. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol* 2010;48:202-7.
20. Savolainen C, Mulders M, Hovi T. Phylogenetic analysis of rhinovirus isolates collected during successive epidemic seasons. *Virus Res* 2002;85:41-6.
21. Ren L, Xiao Y, Li J, et al. Multiple genomic recombination events in the evolution of saffold cardiavirus. *PLoS One* 2013;8.
22. Drexler J, Luna L, Stöcker A, et al. Circulation of 3 lineages of a novel Saffold cardiavirus in humans. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1398-405.

23. Itagaki T, Abiko C, Ikeda T, et al. Sequence and phylogenetic analyses of Saffold cardiovirus from children with exudative tonsillitis in Yamagata, Japan. *Scand J Infect Dis* 2010;42:950-2.
24. Ho M, Chen E, Hsu K, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *New England Journal of Medicine* 1999;341:929-35.
25. Chang L. Enterovirus 71 in Taiwan. *Pediatr Neonatol* 2008;49:103-12.
26. Verboon-Maciolek M, Krediet T, Gerards L, et al. Severe neonatal parechovirus infection and similarity with enterovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:241-5.