

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000105

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：腸病毒分子檢驗方法之測試與評估

107 年 度/全 程 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：許珍禎

研究人員：林建文

執行期間：107 年 01 月 01 日至 107 年 12 月 31 日

目 錄

計畫中文摘要.....	3
計畫英文摘要.....	5
前言	7
材料與方法	11
結果.....	20
討論.....	28
結論與建議	30
參考文獻	34

中文摘要

關鍵詞：腸病毒、腸病毒分型分生檢測、腸病毒 71 型反轉錄聚合酶鏈鎖反應、即時聚合酶鏈鎖反應、敏感性、專一性

目前台灣腸病毒監測是採用病原體培養分離鑑定、腸病毒分型分生檢測 (EV CODEHOP RT sn-PCR)^{1,2}、腸病毒 71 型聚合酶鏈鎖反應 (EV-A71 RT-PCR)³ 及 EV-A71 IgM 抗體 ELISA test 等檢測方法。然而病原體分離鑑定之缺點為平均陽性率不到 50% 及檢驗耗時；已使用 10 多年之 EV-A71 RT-PCR 可能因病毒演化而導致靈敏度不足；CODEHOP RT sn-PCR 專一性及敏感性最佳，但檢驗流程繁瑣耗時，試劑成本及定序費用昂貴，各醫療院所使用意願低落。近年來各醫療院所紛紛因腸病毒疫情開發不同檢驗技術或採用市售腸病毒檢驗試劑，本計畫已評估 Pan-EV RT-qPCR 及腸病毒認可機構之 EV-A71 RT-qPCR 檢驗方法⁴ 具有良好之專一性及敏感性，市售 Pan-EV RT-qPCR 檢驗試劑成本昂貴但效果並非較好。現行 EV-A71 RT-PCR 敏感性不足，建議可改以 CODEHOP 之 PCR1 產物做 EV-A71 PCR2，或使用認可檢驗機構之 EV-A71 RT-qPCR 來提升檢驗敏感性及專一性。本計畫評估結果提供各腸病毒認可檢驗機構作為檢驗參考。

英文摘要

keywords : Enterovirus 、 EV CODEHOP RT sn-PCR 、 EV-A71 RT-PCR 、
RT-qPCR 、 sensitivity 、 specificity

Pathogen isolation and identification, EV CODEHOP RT sn-PCR^{1,2}, EV-A71 polymerase chain reaction (EV-A71 RT-PCR)³ and EV-A71 IgM antibody ELISA test are applied in EV detection and identification on suspected EV infections and laboratory-based EV surveillance in Taiwan. However, the average positive rate of pathogen isolation and identification is less than 50% and time-consuming. The EV-A71 RT-PCR that has been used for more than 10 years however because of genetic evolution and diversify of EV-A71 may cause the mismatched for the primer sets to detect EV-A71, the primers may need to be modified. The EV CODEHOP RT sn-PCR has better performance on sensitivity and specificity than RT-PCR. However, due to the complicated test process, expensive costs of reagents and sequencing, the medical institutions have no intention to use the test.

Some medical developed different detection methods or using commercially available test reagents to detect EV infection. This project has evaluated that the Pan-EV RT-qPCR and the EV-A71RT-qPCR tests have good specificity and sensitivity. Commercially available Pan-EV RT-qPCR test reagents are expensive but not very effective. The current EV-A71 RT-PCR is not sensitive enough. It is recommended to use CODEHOP EV-A71 PCR2 or EV-A71 RT-qPCR to improve test sensitivity and specificity. The results of this project evaluation provide medical units as a test reference.

前言

腸病毒屬於微小 RNA 病毒科(Picornaviridae)、腸病毒屬(Enterovirus)之病毒，為一群病毒的總稱，其直徑大小約 20 - 30 nm，不具外套膜(nonenveloped)，呈現立體對稱的正二十面體結構。其基因體為單股正向 RNA，大小約 7.5Kb，包括 5' -UTR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D 及 3' -UTR，其中 5' -UTR 及 VP2 基因為高度保留區，常作為 RT-PCR 臨床診斷腸病毒標的位置，但與血清型別均無關聯性，VP1 為表面結構蛋白，包含了中和抗體之抗原決定位，其基因序列與血清型有密切關聯，另有研究顯示 VP4 基因亦與血清型有密切關係。早期的腸病毒分類依抗原性可分為小兒麻痺病毒(Polioviruses；PV)、克沙奇 A(Coxsackieviruses A；CV-A)、克沙奇 B(Coxsackieviruses B；CV-B)、伊科病毒(Echoviruses；E)以及 Enterovirus 68-71 等約 60 多種血清型。近年依分子生物學之特性，而將腸病毒屬(genus)重新歸類為 Enterovirus A~J 及 Rhinovirus A~C 共 13 個種(species)⁵。其中 EV-A 包含 11 型克沙奇 A 及 EV-A71 等 25 個基因型；EV-B 包含所有克沙奇 B、所有的 Echovirus、EV69 及 CA9 等 63 個基因型；EV-C 包含其他 9 型克沙奇 A、小兒麻痺病毒 1、2 及 3 型等 23 個基因型；EV-D 包含 EV68 及 EV70 等 5 種基因型；EV-E 及 F 在牛發現；EV-G 在豬；EV-H 及 J 在猿猴；EV-I

在駱駝發現。E22 及 E23 歸類為一新的 genus Parechovirus 的兩個血清型

6。腸病毒的感染遍及全世界，主要是經由飛沫、糞口及接觸等途徑感染，腸病毒可以引發多種疾病，雖然大部份的感染為無症狀，或只出現類似一般感冒的輕微症狀，其餘常見的症狀如呼吸道症狀、手足口病、無菌性腦膜炎、腦膜腦炎、急性無力肢體麻痺症、出血性結膜炎、心肌炎及新生兒敗血症等。

由於臺灣的濕熱環境適合腸病毒生存與傳播，腸病毒因此成為臺灣主要的夏季傳染病之一，依據疾病管制署監測資料顯示，腸病毒疫情每年約有兩個流行期，第一自 3 月份開始上升，於 5 月至 6 月間達到高峰後下降，第二個流行期則於 9 月份開學後出現⁷。其腸病毒感染患者以 5 歲以下幼童居多，約佔九成病例數。台灣每年約可監測到 15~20 型腸病毒共同循環流行；其中類歸為 EV-A species 呈現常態性(endemic)的流行，如克沙奇 A2, 4, 5, 6, 10, 16 及 EV-A71，而 EV-B species 則呈現再發性(recurrence)流行，如伊科病毒、克沙奇 B 等。1998 年台灣地區爆發腸病毒大流行，超過 300,000 人感染，導致 78 例個案死亡。死亡之個案皆集中在五歲以下，經研究發現主要病原體以 EV-A71 為主，病理特徵為腦脊髓炎、肺水腫及肺出血。EV-A71 已常態性流行於台灣地區，於 2001、2004-2005、及 2008 大約每 4 年會有一波較大流行，2016 年出現小幅流行。目前 EV-A71 主要

分為 A、B、C 三個基因型，以及 B1-B5、C1-C5、C2-like 等十幾個基因亞型，臺灣地區常態流行計有 6 個基因亞型(B4、B5、C2、C4、C5 及 C2-like)，2017 年首次在臺灣偵測到 C1 基因亞型。

傳統的病毒分離及血清型別鑑定，是仰賴 golden standard 中和試驗，但腸病毒的種類繁多，中和試驗費時費力且往往受限於 antiserum pools，無法偵測抗原性變異及新的病毒株，造成臨床上無法正確分型。目前台灣腸病毒的社區監測是採用以細胞進行病毒分離的方式，當細胞株出現細胞病變時，再以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)鑑定出其血清型別，鑑定時間依病毒量多寡，由 3 天至 14 天不等。目前市面上的商用單株抗體檢驗套組可鑑定出 19 種腸病毒血清型，而無法鑑定出之型別的腸病毒則稱為泛腸病毒(Pan-Enterovirus)。由於克沙奇 A 群病毒在台灣相當活躍，為加強商用檢驗套組之不足處，疾管署針對克沙奇 A2, 4, 5, 6, 10 五種在台灣常態流行之血清型別，進行間接免疫螢光染色試劑之開發，製成 Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I，於 2007 年全面應用於病毒性感染症合約實驗室之腸病毒監測用，進而降低每年未能分型腸病毒之比率至 10%以下⁸。

在台灣腸病毒感染併發重症監測方面，本署檢驗方法採用病原體分離及鑑定、腸病毒分型分生檢測(EV CODEHOP RT sn-PCR)、EV-A71 聚合酶

連鎖反應(EV-A71 RT-PCR)及 EV-A71 IgM 抗體 ELISA 檢測。近年為建構傳染病在地即時檢驗監測量能，推動認可實驗室制度，至今已有 13 家認可檢驗機構共同參與腸病毒重症監測，認可之檢驗項目包括病原體分離鑑定及 EV-A71 RT-PCR 二項。

病原體分離鑑定之方法優點為費用較低(400 元/件)，且分離之病毒後續可建立病毒種庫及基因資料庫，然而缺點為平均陽性率約為 50%，及檢驗耗時無法即時偵測流行之發生。依據本署疫情資料倉儲 BO 資料庫，統計自 2013 年 1 月至 2017 年 6 月共 712 件疑似腸病毒感染併發重症檢體檢驗結果，以病原體分離鑑定或 EV CODEHOP RT sn-PCR 任一陽性即為陽性病例(288 例)為標準時，病原體分離鑑定與 EV CODEHOP RT sn-PCR 之敏感性分別為 43.8%及 95.1%，在 EV CODEHOP RT sn-PCR 未檢出之 14 件檢體中僅 6 件檢體(4 個病例)為腸病毒，其他病毒培養結果為 Adenovirus、HSV、Influenza A、Para influenza 及待定型病毒。2012 年有醫學中心發表 EV CODEHOP RT sn-PCR 陽性檢出率高達 96%²。僅管 EV CODEHOP RT sn-PCR 敏感性高，最快可於 3 天內(含定序天數)得知結果，定序之腸病毒 VP1 部份核酸序列更可進一步使用於腸病毒分型演化分析用，但因檢驗流程繁瑣，試劑及定序費用昂貴，各醫療院所在人力及經費拮据之情況下使用意願不高，而傾向採用以 5' -UTR 為目標之 Pan-

enterovirus RT-qPCR 做為臨床快速診斷參考，其優點為反應時間只需 1 至 2 個小時，不需進行電泳分析及核酸定序，更可避免 nest PCR 容易汙染之風險。

本署 EV-A71 RT-PCR 方法自 2001 年起已使用十多年，對台灣曾出現過所有基因亞型之 EV-A71 病毒核酸皆可偵測到，但仍可能存在因病毒演化而導致靈敏度不足之風險。依據本署疫情資料倉儲 BO 資料庫，統計 2013 年 1 月至 2017 年 6 月共 93 件 EV-A71 病例檢體檢驗結果分析，以任一檢驗結果陽性即陽性病例為標準時，病原體分離鑑定與 EV-A71 RT-PCR 之敏感性分別為 65.1%及 74.6%。依往年腸病毒能力試驗結果顯示，該方法之偵測極限約為敏感性試驗病毒株稀釋倍數 10^{-5} (約 400 TCID₅₀)(表一)，故可能會出現偽陰性結果，且該法為傳統 one-step RT-PCR，需以電泳分析 PCR 產物耗時較長，因此多家認可機構紛紛各自發展其敏感性較佳的方法，例如認可機構 B 使用 real-time RT-PCR，認可機構 H 使用 161 primers 等，以降低偽陰性結果。

近年來市售腸病毒檢驗試劑及台灣地區各醫療院所相關檢驗技術多種且多樣性，有時會發生機構間檢驗結果不一致情形，為了解各檢驗方法專一性與靈敏度，本計畫將對市售 Pan-enterovirus RT-qPCR 檢驗試劑，以及對腸病毒認可機構使用靈敏度較佳的 EV-A71 RT-qPCR 檢驗方法進行評

估，並嘗試改進本署 EV-A71 RT-PCR 方法，以期提升本署臨床腸病毒檢測效能，並可提供各腸病毒認可檢驗機構作為選擇檢驗方法之參考。

材料與方法

一、 檢體來源：

- (一) 收集來自美國亞特蘭大疾病管制中心、日本 Nation Institute Health 及 National Institute of Infectious Disease，及購自 American Type Culture Collection (ATCC) 之腸病毒標準株，包含 CV-A2~6、CV-A8~18, 20, 21, 24，CV-B1~ 6、E1~9, 11~14, E16~21, E24~27, E29~33、EV-A71、EV-A73、EV-B69、EV-D68 等 59 株，並萃取病毒 RNA。
- (二) 收集 2014~2018 年通報腸病毒重症感染之剩餘檢體共 226 件，另收集 2015 年腸病毒 Echovirus 30 群聚檢體共 13 件。檢體的種類包括 92 件鼻咽/咽喉拭子 (Throat swab)、86 件肛門拭子 (Rectal swab)、21 件糞便(Stool)及 27 件腦脊髓液(CSF)等(表二)。
- (三) 挑選 2003~2018 年腸病毒社區監測臨床分離 EV-A71 病毒株，包含台灣地區各基因亞型(C1, C2, C4, C5, B4 及 B5)共 64 株，抽樣方式為每年每個基因亞型於不同地區至少各挑 1 例。
- (四) 收集 29 株其他類似病毒株收集包含 Rhinoviruses (RVs)、Influenza virus A (Flu A)、Influenza virus B (Flu B)、Respiratory Syncytial Virus (RSV)、Herpes simplex virus 2 (HSV-2)、Paranfluenza virus

(PIV)、Human metapneumovirus (hMPV)、Cytomegalovirus (CMV) 各 2 株，Human parechoviruses (HPeVs)、Herpes simplex virus 1 (HSV-1)、Adenovirus (Ad) 各 3 株及 4 株 Saffold virus (SAFV)，並萃取病毒 DNA 及 RNA。

二、實驗方法

- (一) 進行腸病毒標準株及 EV-A71 病毒株繼代培養並萃取病毒株及臨床剩餘檢體 RNA。
- (二) 建立絕對及相對定量標準品
 1. 使用 2015 年臨床分離 EV-A71 C4a 亞型 E2015216 R7 病毒株，其 CCID₅₀ 為 $10^{-7.6}$ ，以 10 倍連續稀釋病毒液後再萃取 RNA，作為相對定量標準品。
 2. 以含有 Human poliovirus 3 strain Sabin 3 之 5' UTR 片段 plasmid(圖一)，或 EV-A71 C4a 亞型 E2015216 R7 病毒株之部分 VP1 片段 plasmid，10 倍連續稀釋成 $10^5 \sim 10^0$ copies/ul，作為絕對定量標準品。
- (三) 以本署 EV-A71 RT-PCR 及 EV CODEHOP RT sn-PCR 檢測上述病毒及檢體 RNA。
- (四) 以 Pan-enterovirus One-Step RT-qPCR 檢測上述病毒及檢體 RNA。

(五) 以認可檢驗機構 B 之 EV-A71 real-time RT-PCR 檢測上述病毒及檢體 RNA。

(六) 以市售 Mikrogen_alphaCube_Enterovrus 2.0 RT-PCR kit

(七) 評估各檢驗方法之專一性、敏感性、優缺點及試劑成本分析。

三、實驗步驟

(一) RD 細胞株繼代培養

1. 由液態氮桶中取欲 recover 之 RD 細胞株一管。
2. 迅速置於 37°C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處。
3. 緩慢滴入 10cc10%DMEM 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm² 培養瓶中，置入 36°C 二氧化碳培養箱。
4. 隔夜後觀察細胞生長狀況並吸取上清液。
5. 再放入 10cc 10% DMEM 未含抗生素生長培養基。
6. 觀察細胞生長狀況做為繼代使用。
7. 吸取上清液。
8. 放入適量 0.25% trypsin-EDTA。
9. 吸取 trypsin-EDTA。
10. 取適量 10% DMEM 培養基衝散細胞。
11. 計算細胞數目。
12. 稀釋每 1CC 含有 1x10⁵ 細胞，做為繼代培養之用。
13. 細胞繼代代數約為 15 代，重新由細胞庫取出繼代使用。

(二) 病毒 RNA 萃取

1. QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat.No. 52906)
 - (1) 取 560 µl AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內
 - (2) 加入 140 µl 檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘
 - (3) 加入 560 µl 100%絕酒精，震盪 15 秒

(4) 將混合之溶液吸至 QIAamp Spin Column，離心 8000rpm 1 分鐘

(5) 加入 500 μ l Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘

(6) 加入 500 μ l Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘

(7) 加入 60 μ l Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體

2. TANBead Nucleic Acid Extraction kit (REF: 665A46)

(三) EV CODEHOP RT-snPCR

a. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)

1. 取 5 μ l RNA 做模板，分別加入反轉錄試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 10 μ l。

反應試劑	加入體積	RT 反應最終濃度
5x First-Strand RT Buffer	2 μ l	1x
40mM (10mM each) dNTP Mix	0.5 μ l	2mM (0.5mM each)
AN32, 33, 34, 35primer (10 μ M each)	0.5 μ l	0.5 μ M of each
0.1M DTT	1 μ l	0.01 M
RNase OUT (40U/ μ l)	0.5 μ l	2 units/ μ l
SuperScript TM IV RT(200U/ μ l)	0.5 μ l	10 units/ μ l
RNase-free water	0.3 μ l	-

2. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)：使用 PCR thermal cycler。

(1) annealing：22 $^{\circ}$ C，10 分鐘。

(2) R.T.作用：45 $^{\circ}$ C，60 分鐘。

(3) HotStop：95 $^{\circ}$ C，5 分鐘。

(4) 最後維持在 4 $^{\circ}$ C，保存 cDNA。

b. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

1. 取 2 μ l cDNA 做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 10 μ l。

TaKaRa 反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
-------------	------	------------

2X TaKaRa PCR Master Mix	5 μ l	1x
224 –Forward primer(10 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ M
222 –Reverse primer(10 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ M
RNase-free water	2 μ l	-

2. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)：使用 PCR thermal cycler。

- (1) denature：95 $^{\circ}$ C，30 秒。
- (2) annealing：42 $^{\circ}$ C，30 秒。
- (3) Ramp：60 $^{\circ}$ C 0.8 $^{\circ}$ C /second。
- (4) extension：60 $^{\circ}$ C，45 秒。
- (5) 重複上述 1~3 步驟 40 cycles。
- (6) 最後維持在 4 $^{\circ}$ C。

c. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)

1. 取 1 μ l 聚合酶鏈鎖反應(PCR)產物做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 25 μ l。

TaKaRa 反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
2X TaKaRa PCR Master Mix	12.5 μ l	1x
224 –Forward primer(10 μ M)	2 μ l	0.8 μ M
222 –Reverse primer(10 μ M)	2 μ l	0.8 μ M
RNase-free water	7.5 μ l	-

2. 巢式聚合酶鏈鎖

反應(nest-PCR)：使用 PCR thermal cycler。

- (1) HotStart：95 $^{\circ}$ C，6 分鐘。
- (2) denature：95 $^{\circ}$ C，30 秒。
- (3) annealing：60 $^{\circ}$ C，20 秒。
- (4) extension：72 $^{\circ}$ C，45 秒。
- (5) 重複上述(2)~(4)步驟 40 cycles。
- (6) 最後維持在 4 $^{\circ}$ C。

d. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position
--------	----------	----------

AN32	GTYTGCCA	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	3009-3002
AN34	CCRTCRTA	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	3009-3002
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	1977-1996
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	2969-2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	2977-2951

e. EV-A71 巢式聚合酶鏈鎖反應(EV-A71 PCR2)

1. 取 1 μl 聚合酶鏈鎖反應(PCR)產物做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑（成分如下表），調整反應總體積至 25 μl 。

TaKaRa 反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
2X TaKaRa PCR Master Mix	12.5 μl	1x
159 –Forward primer(10 μM)	2 μl	0.8 μM
162 –Reverse primer(10 μM)	2 μl	0.8 μM
RNase-free water	7.5 μl	-

2. EV-A71 巢式聚合酶鏈鎖反應(EV-A71 PCR2)：使用 PCR thermal cyclor。
 - (1) HotStart：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘。
 - (2) denature：95 $^{\circ}\text{C}$ ，30 秒。
 - (3) annealing：48 $^{\circ}\text{C}$ ，40 秒。
 - (4) extension：72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 分
 - (5) 重複 (3) ~ (5) 步驟 35 cycle。
 - (6) final extension：72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 分鐘。
 - (7) 最後維持在 4 $^{\circ}\text{C}$

(四) EV-A71 RT-PCR (QIAGEN OneStep RT-PCR kit ; 210212)

1. 取 5 μl RNA 做模板，分別加入引子組（159、162）及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 25 μl 。

反應試劑	加入體積	最終濃度
------	------	------

5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5 μ l	1x
dNTP Mix	1 μ l	400 μ M of each dNTP
5xQ-solution	5 μ l	1 x
RNaseOUT	0.25 μ l	10 units
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 μ l	-
159 –Forward primer	1.5 μ l	0.6 μ M
162 –Reverse primer	1.5 μ l	0.6 μ M
RNase-free water	4.75 μ l	-

2. 反轉錄酶－聚合酶鏈鎖反應 (RT-PCR)：使用 PCR thermal cycler。

(1) R.T.作用：50 °C，30 分鐘。

(2) HotStart：95 °C，15 分鐘。

(3) denature：95 °C，30 秒。

(4) annealing：48 °C，40 秒。

(5) extension：72 °C，1 分

(6) 重複 (3) ~ (5) 步驟 40 cycle。

(7) final extension：72 °C，10 分鐘。

(8) 最後維持在 4 °C

3. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position	Specificity
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG	2385-2403	EV71
162	CCRGTAGGKGTRCACGCAC	2869-2850	EV71

(五) 電泳分析

1. 利用 1X TBE buffer 泡成 1.5% Agarose gel
2. 加熱 3 分鐘完全溶解，待降溫至 50°C 左右，加至電泳 cassette 內，放入齒狀物，待凝固後再取出齒狀物
3. 將凝固後的 gel 放入電泳槽內
4. 取 1 μ l 6X loading dye 與 5 μ l RNA 產物混合，加至 gel 孔洞內
5. 跑 100V，30 分鐘
6. 利用 EtBr 或內染劑染色

7. 在 UV 下，觀察最後結果。

(六) Pan-enterovirus RT-qPCR (Pan-EV RT-qPCR)
(ThermoFisher AgPath-ID one-step RT-PCR kit)

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入同一微量管內

2X RT-PCR buffer	12.5 μ l
(25X) enzyme mix	1 μ l
EF1 primer 10uM	1 μ l
ER1 primer 10uM	1 μ l
ER1 primer 10uM	1 μ l
EP1 probe (5uM)	0.6 μ l
EP2 probe (5uM)	0.6 μ l
H ₂ O	2.3 μ l
sample RNA	5 μ l
total	25 μ l

2. 反轉錄聚合酶鎖反應：使用 ABI QuantStudio 12K

(1) Reverse Transcription：42°C，10 分鐘

(2) 95°C，10 分鐘

(3) denature：95°C，15 秒

(4) annealing and extension：58°C，45 秒

(5) 重複上述 3~4 步驟 45 cycles。

(6) final：40°C，5 秒

Primer	Sequence	Reporter	Quencher
Forward primer	TCCTCCGGCCCCTGA		
Reverse primer 1	AATTGTCACCATAAGCAGCCA		
Reverse primer 2	GATTGTCACCATAAGCAGCCA		
Probe 1	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	FAM	BHQ1
Probe 2	CGGAACCGACTACTTTGGGTGACCGT	FAM	BHQ1

(七) 認可醫院 B 之 EV-A71 real-time RT-PCR

(ThermoFisher AgPath-ID one-step RT-PCR kit)

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入同一微量管內

2X RT-PCR buffer	10 µl
(25X) enzyme mix	0.8 µl
EV71 F primer (10µM)	0.8 µl
EV71 R primer (10µM)	0.8 µl
EV71 Pa probe (5µM)	0.5 µl
EV71 Pb probe (5µM)	0.5 µl
H ₂ O	1.6 µl
sample RNA	5 µl
total	20 µl

2. 反轉錄聚合酶鎖反應：使用 ABI QuantStudio 12K

- (1) Reverse Transcription：45°C，10 分鐘
- (2) 95°C，10 分鐘
- (3) denature：94°C，10 秒
- (4) annealing：55°C，15 秒
- (5) extension：72°C，14 秒
- (6) 重複上述(3)~(5)步驟 40 cycles。
- (7) final：40°C，5 秒

Primer	Sequence	Reporter	Quencher
EV71-F	AGTGATGAGAGTATGATTGAGACACG		
EV71-R	CCCGCTCTGCTGAAGAAACT		
EV71 Pa	CTTAACCTCGCACAGTACAGC	FAM	BHQ1
EV71 Pb	TCGCACAGCACAGCTGAGACCACT	FAM	BHQ1

(八) 市售 Mikrogen_alphaCube_Enterovirus 2.0 RT-PCR kit

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入同一微量管內

Reaction Mix	15.8 μ l
enzyme	0.2 μ l
sample RNA	4 μ l
total	20 μ l

2. 反轉錄聚合酶鎖反應：使用 ABI QuantStudio 12K

(1) Reverse Transcription： 45°C， 20 分鐘

(2) 95°C， 2 分鐘

(3) denature： 94°C， 5 秒

(4) annealing： 55°C， 20 秒

(5) extension： 72°C， 10 秒

(6) 重複上述(3)~(5)步驟 45cycles。

結果

一. 各病毒株及臨床檢體之 EV CODEHOP RT sn-PCR 檢驗結果

- (一) 偵測極限：對 EV-A71 C4a 亞型病毒株偵測極限為 10^{-8} 稀釋濃度，約 0.4 CCID₅₀ (圖二)。
- (二) 59 株腸病毒標準株 100 倍稀釋 RNA 皆為 EV CODEHOP RT sn-PCR 陽性，並定序確認型別正確；65 株歷年 EV-A71 病毒株 RNA 皆為陽性，並定序確認型別正確；其他類似病毒株原倍 RNA，除 2 株 Rhinoviruses 為陽性且定序確認為 Rhinoviruses，其他皆為 EV CODEHOP RT sn-PCR 陰性。
- (三) 226 件臨床檢體中，155 件檢出為腸病毒陽性，71 件為陰性或檢出其他病原體，另陽性中 38 件為 EV-A71 陽性。72 件病原體分離為腸病毒陽性之檢體，除 6 件 Echovirus 11 及 1 件 NPEV 為 CODEHOP 未檢出，其餘 EV CODEHOP RT sn-PCR 結果皆為陽性，且定序型別相符；另 13 件 Echo30 腦炎群聚檢體中 8 件為陽性，5 件為陰性。

二. 檢測 EV-A71 RT-PCR 之結果

- (一) Qiagen One-step RT-PCR kit 測試結果：偵測極限為 10^{-5} 稀釋濃度 EV-A71 C4a 亞型病毒株，約 400 CCID₅₀。59 株腸病毒標準株 100

倍稀釋 RNA 僅有 1 株 EV-A71 BrCr 為陽性； 65 株歷年 EV-A71 病毒株 100 倍稀釋 RNA 中有 59 株為陽性，6 株陰性，10 倍稀釋 RNA 中測得 3 株為陰性，原倍 RNA 中測得 1 株為陰性(C5 亞型)；其他 29 株類似病毒株原倍 RNA 中有 1 株 HSV-1 及 1 株 HSV-2 為弱陽性，其餘皆為陰性；226 件臨床檢體中以 CODEHOP 檢出 38 件 EV-A71 陽性之檢體，以 EV-A71 RT-PCR 檢測 24 件為陽性，14 件為陰性；EV CODEHOP RT sn-PCR 檢驗為非 EV-A71 之 188 件臨床檢體，EV-A71 RT-PCR 測試皆為陰性；另 13 件 Echo30 腦炎群聚檢體皆為陰性。

(二)Invitrogen One-step RT-PCR kit：偵測極限為 10^{-6} 稀釋濃度 EV-A71 C4a 病毒株，約 40 CCID₅₀。陽性檢體檢出率約 97.3%(37/38)，原使用 Qiagen one-step RT-PCR kit 檢驗陰性之 14 件 EV-A71 病毒株，其中有 13 件為陽性(圖三)，其敏感性較佳但易有雜 band，不利於定序分型。

(三)EV CODEHOP 之 PCR1 產物以 159/ 162 primer 做 EV-A71 PCR2：偵測極限為 10^{-8} 稀釋濃度 EV-A71 C4a 亞型病毒株，約 0.4 CCID₅₀， 6 株原使用 Qiagen one-step RT-PCR kit 檢驗陰性 EV-A71 病毒株 100 倍稀釋 RNA 皆可檢出陽性，14 件原 Qiagen 檢驗陰性

之 EV-A71 臨床檢體，其中有 12 件為陽性，其敏感性佳且 band 十分專一，雖病毒濃度高時於 750bp 會出現 PCR1 product band，但不影響定序，可進一步分析基因亞型(圖四)。

三. 檢測 Pan-enterovirus One-Step RT-PCR (Pan-EV RT-qPCR)之結果

(一)舊有 Pan-EV RT-qPCR，敏感性約 50%，僅用於檢測群聚檢體。

(二)經測試文獻(Nijhuis M et al. *J Clin Microbiol.* 2002 Oct; 40(10): 3666-70)設計之 primers/ probes，使用 KAPA KK4752 One-step RT-PCR kit，較舊有方法佳。偵測極限：EV-A71 C4a 病毒株 10^{-5} 稀釋濃度，約 400 CCID₅₀ (圖五)。

(三)因 EV-D68 疫情，本署參照 Washington University 文獻(*J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2641-7)使用 ThermoFisher Ag Path-ID one-step RT-PCR kit，經測試發現該試劑對於 Applied Biosystem™ QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System 機型，更提升偵測靈敏度 100~1000 倍，故以此試劑做後續測試。

(1)偵測極限：對 EV-A71 C4a 亞型病毒株偵測極限為 10^{-8} 稀釋濃度，約 0.4 CCID₅₀。對 Sabin 3 之 5' UTR plasmid 偵測極限為 100 copies/ ul，每個反應使用 5ul RNA，故約為 500 copies (圖六)。

- (2) 最佳反應溫度測試：使用 EV-A71 C4a 亞型 10^{-3} ~ 10^{-8} 稀釋病毒液 RNA，分別測試 57-62°C 不同之 annealing 及 extension 溫度，結果最佳效率為 58°C(圖七)。
- (3) 59 株腸病毒標準株 100 倍稀釋 RNA 皆為陽性。
- (4) 65 株歷年 EV-A71 病毒株 100 倍稀釋 RNA 皆為陽性。
- (5) 29 株其他類似病毒株測試結果：除 2 株 Rhinoviruses 陽性外(圖八)，其餘皆為陰性。
- (6) 226 件臨床檢體測試結果：162 件培養或 CODEHOP 陽性檢體中，150 件為陽性，12 件為陰性；CODEHOP 陰性的 67 件檢體中，有 60 件為陰性(其中 2 件為 Echovirus 11 培養陽性，2 件檢出 rhinovirus)，11 件為陽性(其中 4 件為 Echovirus 11 培養陽性，5 件檢出 rhinovirus，2 件為培養或 CODEHOP 皆陰性)。
- (7) 13 件 Echo30 腦炎群聚檢體測試結果：8 件 CODEHOP 陽性檢體中有 7 件為陽性；5 件 CODEHOP 陰性檢體中有 1 件為陽性，4 件為陰性。

四. 檢測認可檢驗機構 B 之 EV-A71 RT-qPCR 之結果

- (一)偵測極限：EV-A71 C4a 病毒株 10^{-8} 稀釋濃度，約 0.4 CCID₅₀。對 EV-A71 C4a 病毒株 E2015216 部分 VP1 plasmid 偵測極限為 100 copies/ ul，每個反應使用 5ul RNA，故約為 500 copies (圖九)。
- (二)59 株腸病毒標準株 100 倍稀釋 RNA 僅 EV-A71(BrCr)及 CV-A2 為陽性外，其他皆為陰性。
- (三)65 株歷年 EV-A71 病毒株 100 倍稀釋 RNA 除了 1 株 2003 年 B4 亞型為陰性外，其他皆為陽性。
- (四)29 株其他類似病毒株測試結果皆為陰性。
- (五)226 件臨床檢體測試結果：38 件培養或 CODEHOP 檢出 EV-A71 陽性檢體中，36 件為陽性，2 件為陰性；CODEHOP 為 EV-A71 陰性的 188 件檢體中，有 186 件為陰性，2 件為弱陽性(CODEHOP 檢出 1 件 CV-A9 及 1 件 CV-A10)。
- (六)13 件 Echo30 腦炎群聚檢體測試結果皆為陰性。
- (七)EV-A71 不同基因亞型(C1, C2, C4, C5, B4 及 B5)之 RT-qPCR 效率不同，以 C4 最佳，C2、C5、B5 次之，C1 及 BrCr 效率較差，曲線幾乎為直線，B4 則完全偵測不到(圖十)。

五. 市售 Mikrogen_alphaCube_Enterovrus 2.0 RT-PCR kit 檢測結果

- (一)偵測極限：EV-A71 C4a 病毒株 10^{-7} 稀釋濃度，約 4 CCID₅₀(圖十)

一)。

(二)試劑說明書(表三)未評估的 CV-A2~6、CV-A8、CV-A10~15、CV-A18, 20, 21，CV-B1~2、E1~8, 12~14, E16~19, E21~22, E24~27, E29, E31~33、EV-A71(BrCr)、EV-A73、EV-B69 等 45 株腸病毒標準株 100 倍稀釋 RNA，測試結果其中 5 株為陰性(E6, E25, E27, E33, EV-A71 BrCr)。

(三)EV-A71 不同基因亞型(C1, C2, C4, C5 及 B5) 皆為陽性。

(四)12 株其他病毒株包含 Saffold virus、Flu A、Flu B、Paranfluenza virus、RSV、HSV-1、HSV-2、HPeVs 1、HPeVs 3、hMPV、CMV、Rhinoviruses (RVs) 皆為陰性。

(五)5 件臨床檢體，結果 3 件為陽性(含 EV-D68、EV-A71 及 Echo11 各 1 件)，2 件為陰性(包含 1 件 EV-68 及 1 件 Rhinoviruses)。

六. 敏感性、專一性及一致性分析

(一)判定標準：重症檢驗項目包括病原體分離鑑定、EV CODEHOP RT-snPCR、本署 EV-A71 RT-PCR(Qiagen kit)等任一檢驗結果陽性即判定為陽性。則 226 件臨床檢體中，162 件為腸病毒陽性，其中 38 件為 EV-A71，134 件為其他腸病毒型別，64 件為腸病毒陰性或檢出其他病毒。

(二)在 162 件腸病毒陽性臨床檢體中，病原體分離鑑定、EV

CODEHOP RT-snPCR 及 Pan-EV RT-qPCR 分別檢出 72 件、155 件

及 150 件陽性，敏感性分別為 44.4%、95.7%及 92.6%。64 件為腸

病毒陰性臨床檢體中，病原體分離鑑定、EV CODEHOP RT-snPCR

及 Pan-EV RT-qPCR 分別檢出 64 件、64 件及 57 件陰性，特異性

為 100%、100%及 89.1%，一致性分別為 60.2%、96.9%及

91.6%。(表四)

(三)在 38 件 EV-A71 臨床檢體中，病原體分離鑑定、EV CODEHOP

RT-snPCR、EV-A71 RT-PCR(Qiagen kit)及 EV-A71 RT-qPCR 分別檢

出 21 件、38 件、24 件及 36 件陽性，敏感性分別為 55.3%、

100%、63.2%及 94.7%。在 188 件非 EV-A71 臨床檢體中，病原體

分離鑑定、EV CODEHOP RT-snPCR、EV-A71 RT-PCR(Qiagen kit)

及 EV-A71 RT-qPCR 分別檢出 188 件、188 件、188 件及 186 件陰

性，專一性分別為 100%、100%、100%及 98.9%，一致性分別為

92.5%、100%、93.8%及 98.2%。(表五)

七. 成本分析

(一)病原體分離鑑定平均 400 元/件。

(二)EV CODEHOP RT-snPCR 含抽 RNA、陰陽性對照及定序平均 700

元/件。

(三)EV-A71 RT-PCR：

(1) Qiagen QIAamp Viral RNA kit(250 tests)約 29,000 元，含抽 RNA 及陰陽性對照，平均 600 元/件。

(2) Invitrogen One-Step RT-PCR System(100 tests)約 23,000 元，含抽 RNA 及陰陽性對照，平均 650 元/件。

(3) EV CODEHOP EV-A71 PCR2 含抽 RNA 及陰陽性對照，平均 500 元/件。

(4) EV-A71 RT-qPCR：ThermoFisher AgPath-ID one-step RT-PCR kit(1000 tests)約 61,000 元，含 probes、抽 RNA 及陰陽性對照，平均約 460 元/件。

(四) Pan-EV RT-qPCR：ThermoFisher AgPath-ID one-step RT-PCR kit(1000 tests)約 61,000 元，含 probes、抽 RNA 及陰陽性對照，平均約 460 元/件。

(五) 市售 Mikrogen_alphaCube_Enterovrus 2.0 RT-PCR kit (96 tests) 約 66,900 元，含抽 RNA 及陰陽性對照，平均約 1,700 元/件。

討論

- 一. 病原體分離鑑定之方法優點為費用較低(400 元/件)，且分離之病毒後續可建立病毒種庫及基因資料庫，然而缺點為平均陽性率不到 50%，及檢驗耗時無法即時偵測流行之發生。EV CODEHOP RT sn-PCR 敏感性及專一性高，最快可於 3 天內(含定序天數)得知結果，腸病毒 VP1 部份核酸序列更可進一步使用於腸病毒分型演化分析用。但缺點是檢驗流程繁瑣，試劑及定序費用昂貴，各醫療院所在人力及經費拮据之情況下使用意願不高。
- 二. 2018 年 Echo 11 疫情發現， 38 例通報重症或群聚之 Echo 11 病例，同時進行病毒分離及 EV CODEHOP RT sn-PCR 檢測之 54 件檢體中，病原體分離陽性率為 83.3% (45/54)，而 EV CODEHOP 陽性率為 79.6% (43/54)，故 Echo 11 臨床檢體病原體分離陽性率較高。有 6 件檢體是 EV CODEHO 陰性但病原體分離陽性的。
- 三. 本中心現行 EV-A71 RT-PCR 使用 Qiagen One-step RT-PCR kit 優點為專一性佳，但缺點是敏感性不足。改用 Invitrogen One-step RT-PCR kit 可提升敏感性，但缺點為雜 band 較多。以 EV CODEHOP 之 PCR1 產物做 EV-A71 PCR2 其敏感性佳且 band 十分專一，不須定序即可判定陽性，亦可定序進一步分析基因亞型，但缺點如同

CODEHOP 較費時，且工序繁複需要跑電泳。雖經比對 159/162 primer 與臺灣歷年 EV-A71 病毒序列有少數變異(圖十二)，但 CODEHOP EV-A71 PCR2 皆可以放大 PCR 產物並經定序確認型別正確。另評估認可檢驗機構 B 之 EV-A71 RT-qPCR 之優點為敏感性及專一性皆佳，速度快，不須定序；缺點為部分 EV-A71 基因亞型偵測效率較差(如 C1，BrCr)，B4 亞型測不到，經比對 primers/ probes 與不同亞型之核酸序列(圖十三)，B4 亞型與 primers/ probes 有 4 個以上 mismatch，其他亞型也有 2、3 個 mismatch，可能導致 EV-A71 RT-qPCR 效率降低。儘管台灣 B4 亞型已有 10 年以上未出現，但要注意 2017 年後新出現 C1 亞型之偵測。

- 四. 本計畫測試新 Pan-EV RT-qPCR 優點為敏感性及專一性皆佳，缺點為對 rhinoviruses 有陽性交叉反應，其中一個 Pan-EV RT-qPCR 陽性的腸病毒陰性檢體，為其他檢體有檢出 Echo 11 的病例，故可能是病毒培養及 CODEHOP 沒有偵測到，而非 Pan-EV RT-qPCR 偽陽性。另 CODEHOP 定序結果為 rhinoviruses 的臨床檢體，亦不能排除共統感染腸病毒之可能性。市售 Mikrogen alphaCube Enterovirus 2.0 RT-PCR kit 優點為取得歐盟及美國 IVD 檢驗試劑，缺點為偵測極限及對腸病

毒標準株偵測結果沒有前者好，且成本單價高昂，超過健保給付
1200 點數，實際使用上可能對醫院負擔較大。

結論與建議

- 一. 除了Echo 11臨床檢體外，EV CODEHOP RT sn-PCR為目前腸病毒分生檢測中敏感性及專一性最佳的方法，建議除了腸病毒感染併發重症及群聚檢測外，如經費人力許可，亦可用於腸病毒社區監測，將提升陽性率及時效。Pan-EV RT-qPCR臨床檢體敏感性及專一性雖略遜於EV CODEHOP RT sn-PCR，但速度更快，不須定序，可以作為臨床初步篩檢病例是否有腸病毒感染之快速檢驗方法。腸病毒目前無特效藥，但Pan-EV RT-qPCR結果可提供是否需要施打IVIG等藥物之健保給付參考。
- 二. 現行EV-A71 RT-PCR 敏感性不足，建議可改以EV CODEHOP 之PCR1 產物做EV-A71 PCR2，或使用認可檢驗機構B之EV-A71 RT-qPCR 來提升檢驗敏感性及專一性。
- 三. 本計畫僅以防疫剩餘檢體及病毒株進行各腸病毒分子檢驗方法初步評估，除市售 Mikrogen alphaCube Enterovirus 2.0 RT-PCR kit 外，皆為參考其他文獻之實驗室自行研發檢驗技術(Laboratory Developed Tests, LDTs)。衛福部食藥署近年擬針對 LDTs 進行適度管控，建議研發單位依照國際規範 CLIA/ ISO15189 建立品質管理系統，而各醫院執行檢測者皆具有相當的知識及經驗並受到監控，具備排除錯誤、維持儀器能

力、檢測材料穩定及品質管制之要求。本計畫評估之腸病毒分生檢測方法目前做為公眾健康監視用，僅提供其他實驗室及認可檢驗機構作參考，其後各醫院可自行評估是否適合作為臨床檢驗方法。

參考文獻

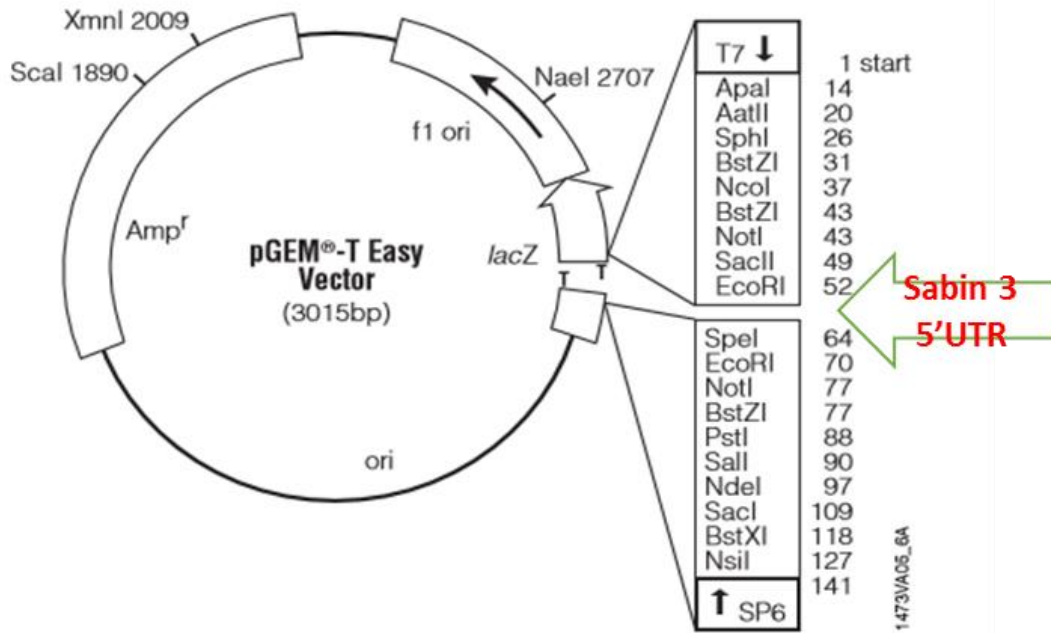
1. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2698-704.
2. Chiang PS1, Huang ML, Luo ST, Lin TY, Tsao KC, Lee MS. Comparing molecular methods for early detection and serotyping of enteroviruses in throat swabs of pediatric patients. *PLoS One.* 2012;7(10):e48269. doi: 10.1371/journal.pone.0048269. Epub 2012 Oct 25.
3. Brown BA, Kilpatrick DR, Oberste MS, Pallansch MA. Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR. *J Clin Virol.* 2000 Apr;16(2):107-12.
4. Xiao XL, He YQ, Yu YG, Yang H, Chen G, Li HF, Zhang JW, Liu DM, Li XF, Yang XQ, Wu H. Simultaneous detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control. *Arch Virol* 2009; 154:121–125
5. picornaviridae.com Available at <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>
6. Hyypia, T., Horsnell, C., Maaronen, M., Khan, M., Kalkkinen, N., Auvinen, P., Kinnunen, L. & Stanway, G.(1992). A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89, 8847-8851.
7. 黃元品、林翠莉、吳和生，臺灣克沙奇 A6 型腸病毒之流行疫情分析。疫
情報導，2015 年 11 月 10 日，第 31 卷第 21 期
8. Lin TL, Li YS, Huang CW, Hsu CC, Wu HS, Tseng TC, Yang CF. Rapid and highly sensitive coxsackievirus a indirect immunofluorescence assay typing kit for enterovirus serotyping. *J Clin Microbiol.* 2008 Feb;46(2):785-8. Epub 2007 Nov 21
9. Yan JJ, Su IJ, Chen PF, Liu CC, Yu CK, Wang JR. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR. *J Med Virol.* 2001 Oct; 65(2):331-9.
10. Perera D, Podin Y, Akin W, Tan CS, Cardosa MJ. Incorrect identification of recent Asian strains of Coxsackievirus A16 as human enterovirus 71: Improved

primers for the specific detection of human enterovirus 71 by RT PCR. *BMC Infect Dis.* 2004 May 4;4:11.

11. Singh S, Chow VT, Phoon MC, Chan KP, Poh CL. Direct Detection of Enterovirus 71 (EV71) in Clinical Specimens from a Hand, Foot, and Mouth Disease Outbreak in Singapore by Reverse Transcription-PCR with Universal Enterovirus and EV71-Specific Primers. *J. Clin. Microbiol.* August 2002 vol. 40 no. 8 2823-2827 (2)
12. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug; 44(8):2698-70.

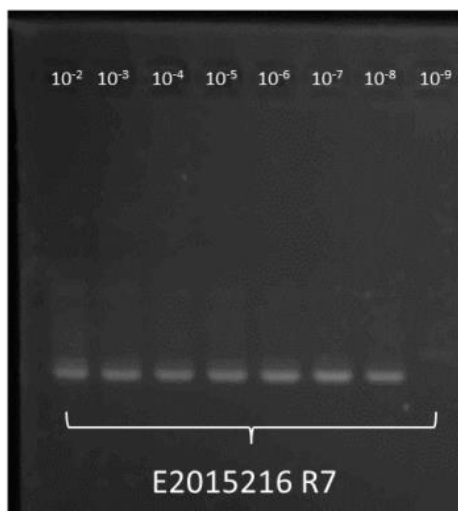
圖表

圖一、Sabin 3 5' UTR plasmid

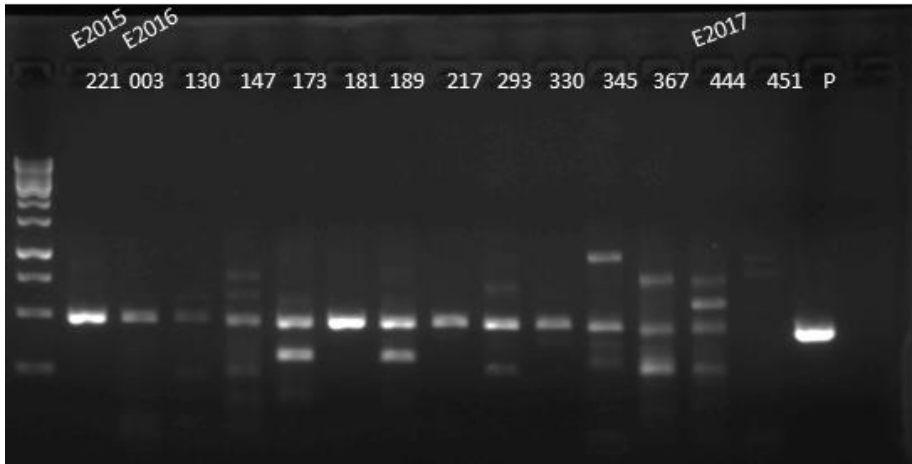


圖二、EV CODEHOP RT sn-PCR 偵測極限

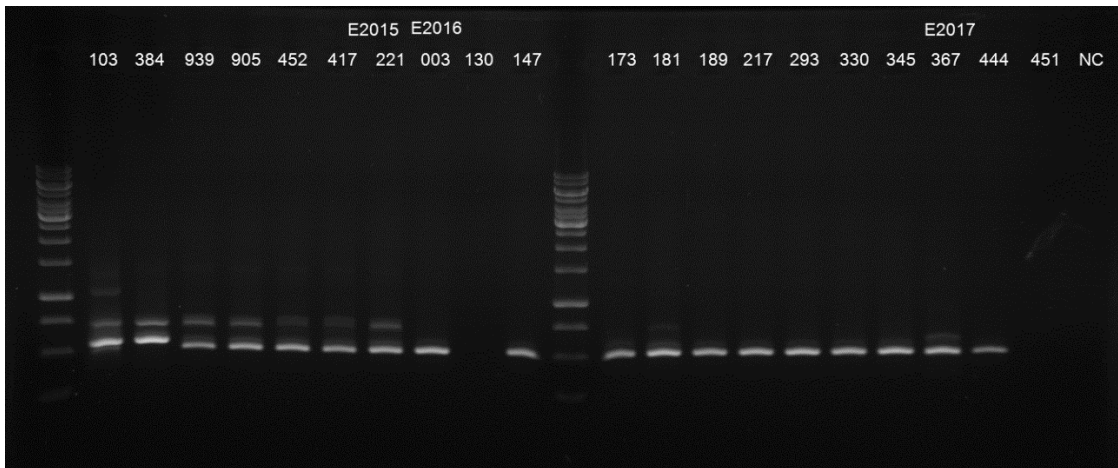
CODEHOP RT-snPCR偵測極限 10^{-8}



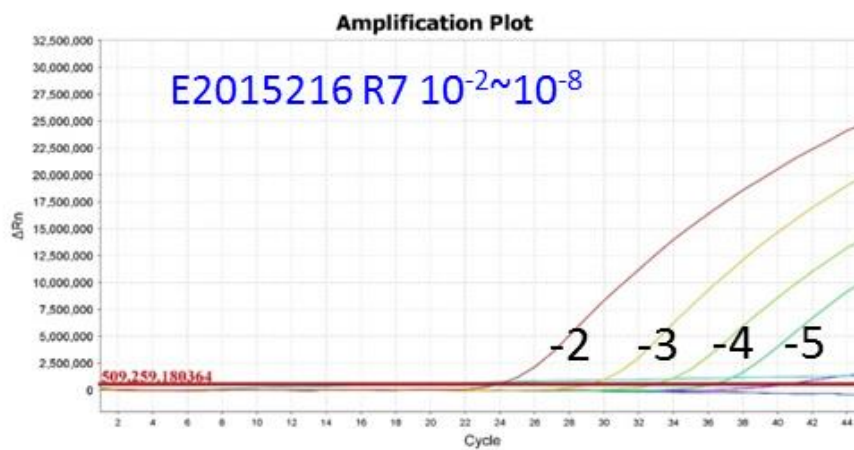
圖三、Invitrogen 試劑測試 Qiagen kit 檢驗陰性 14 支 EV-A71 檢體結果



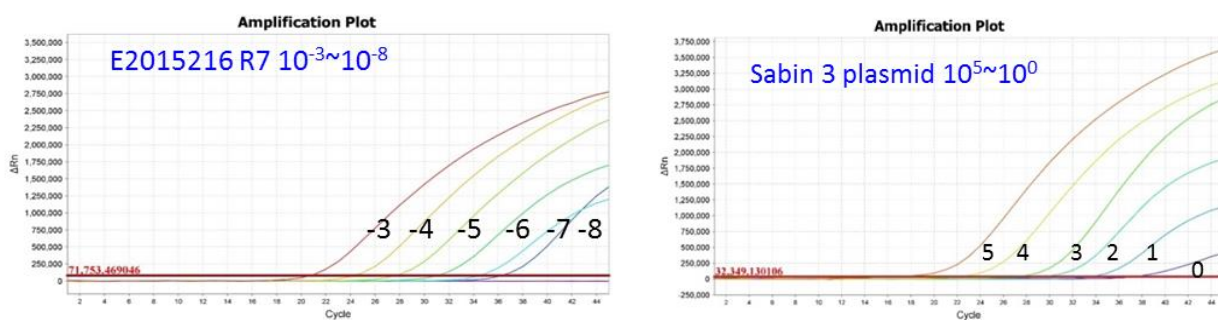
圖四、EV CODEHOP EV-A71 PCR2



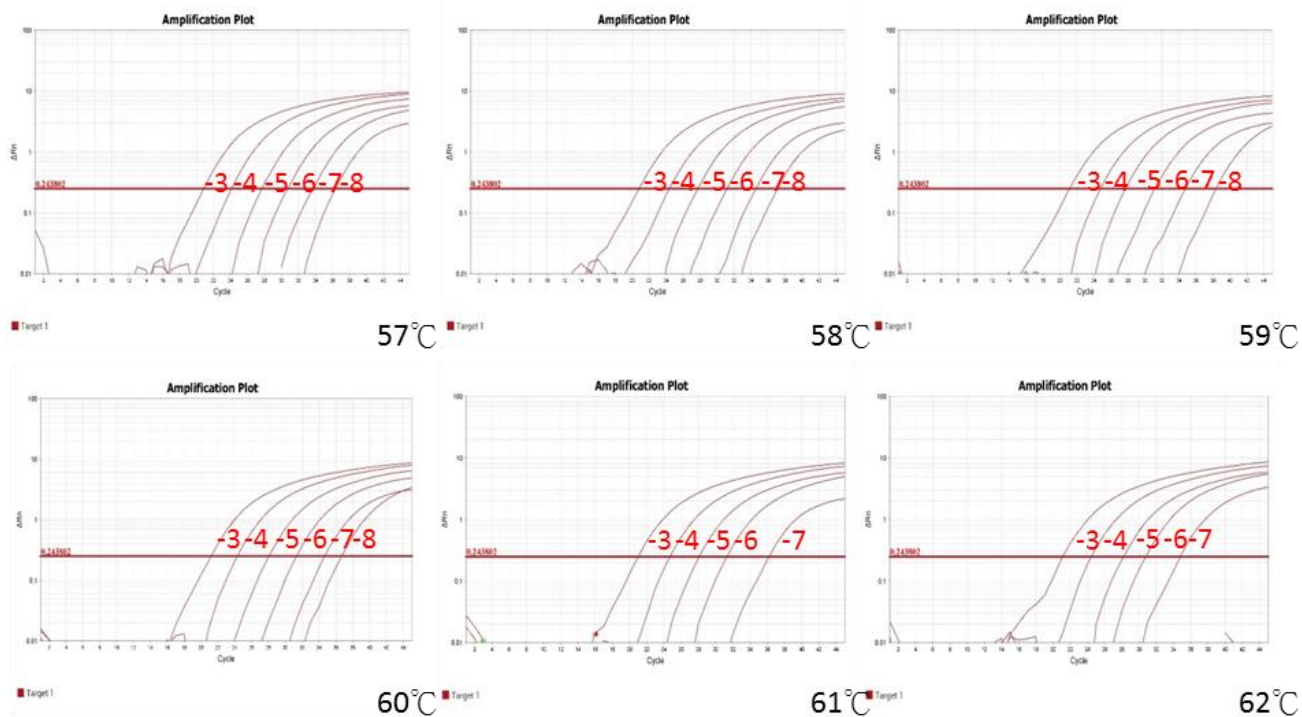
圖五、KAPA KK4752 One-step RT-PCR kit Pan-EV RT-qPCR 偵測極限



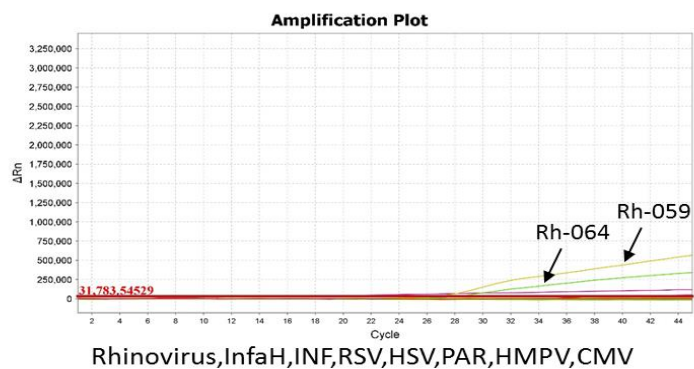
圖六、Thermo Ag Path-ID One-step RT-PCR kit Pan EV RT-qPCR 偵測極限



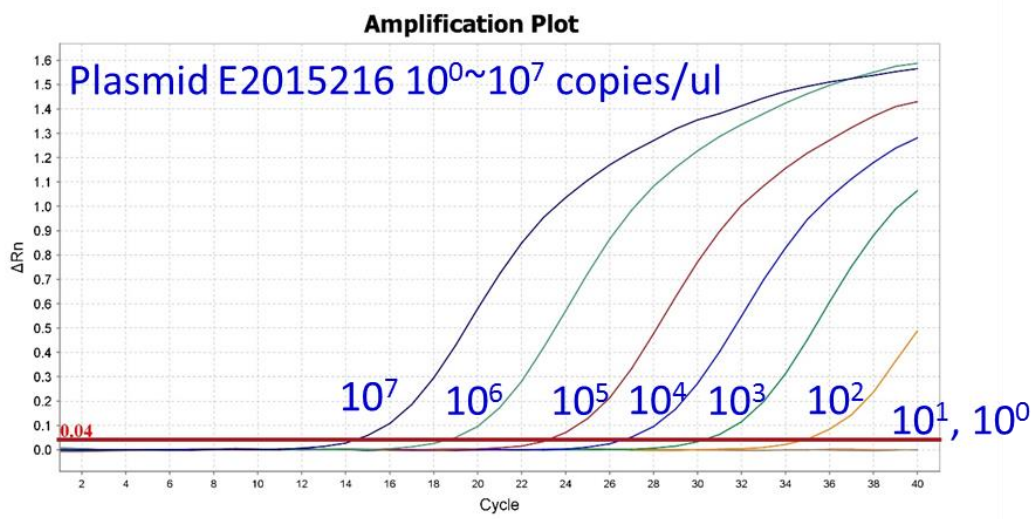
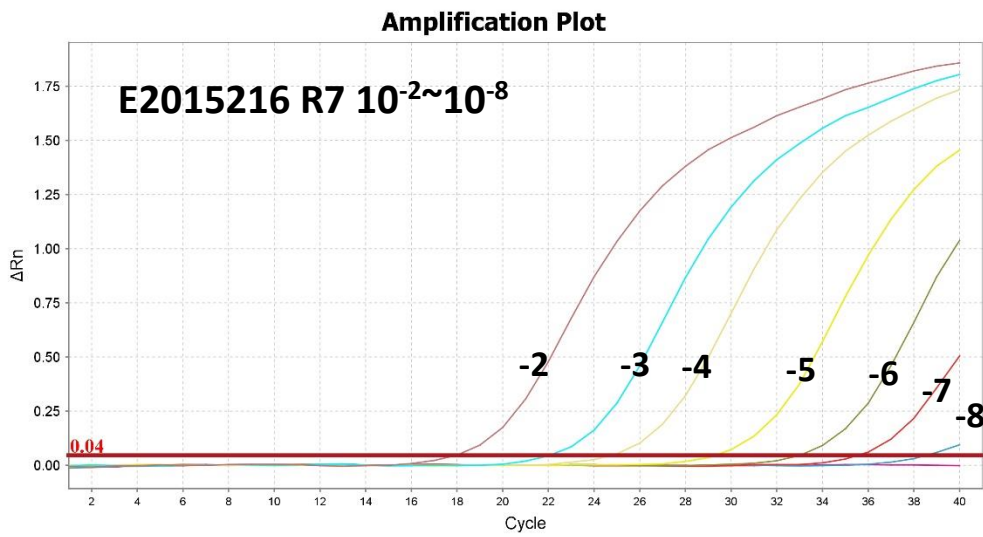
圖七、測試 Pan-EV RT-qPCR annealing 及 extension 最佳溫度



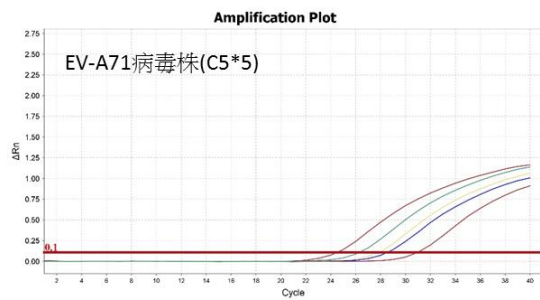
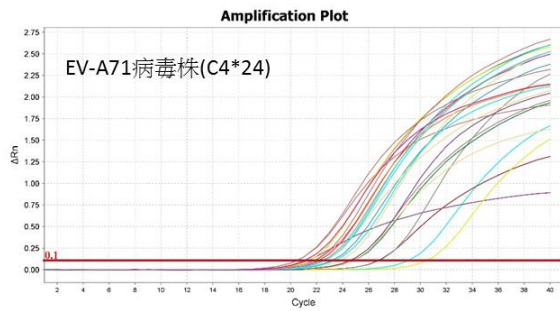
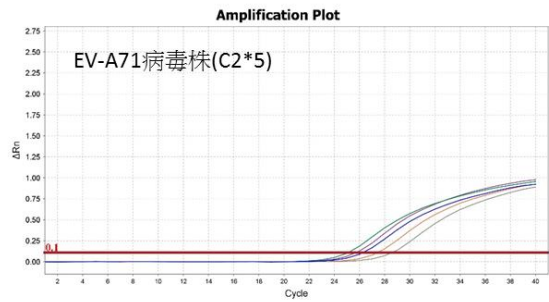
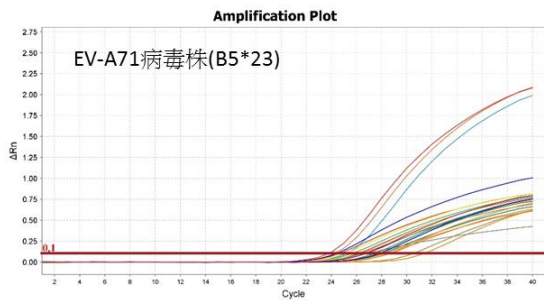
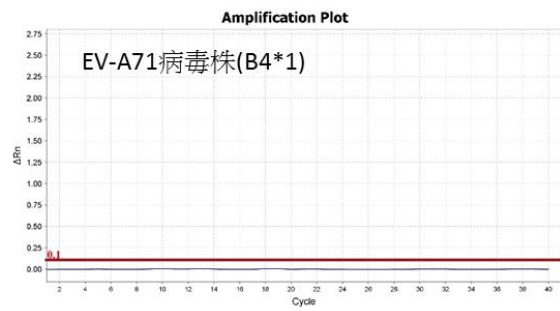
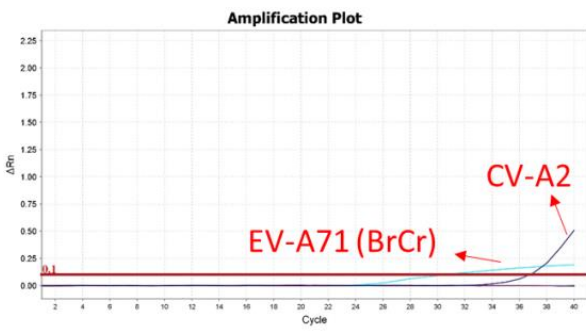
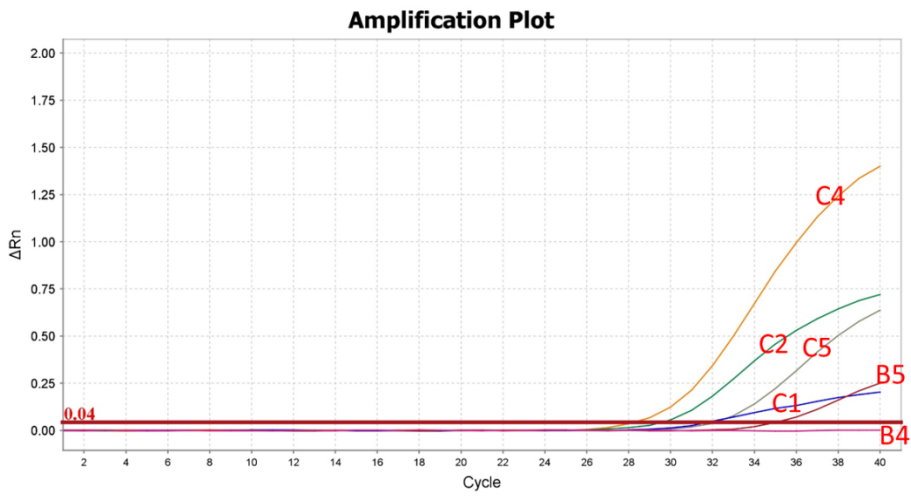
圖八、Pan-EV qRT-PCR 其他類似病毒株測試結果



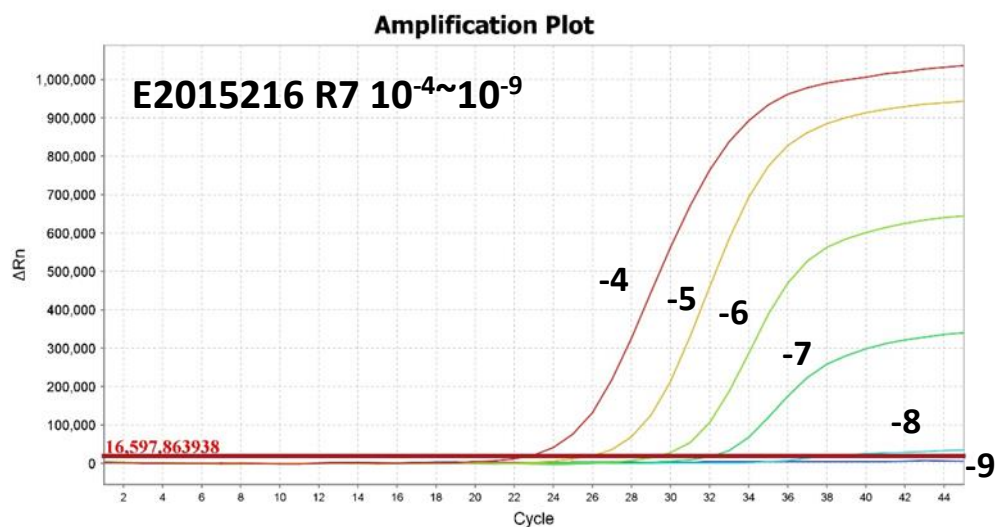
圖九、Thermo Ag Path-ID One-step RT-PCR kit EV-A71 rRT-PCR 偵測極限



圖十、EV-A71 RT-qPCR 對不同基因亞型檢測結果



圖十一、Mikrogen_alphaCube_Enterovirus 2.0 RT-PCR kit 偵測極限



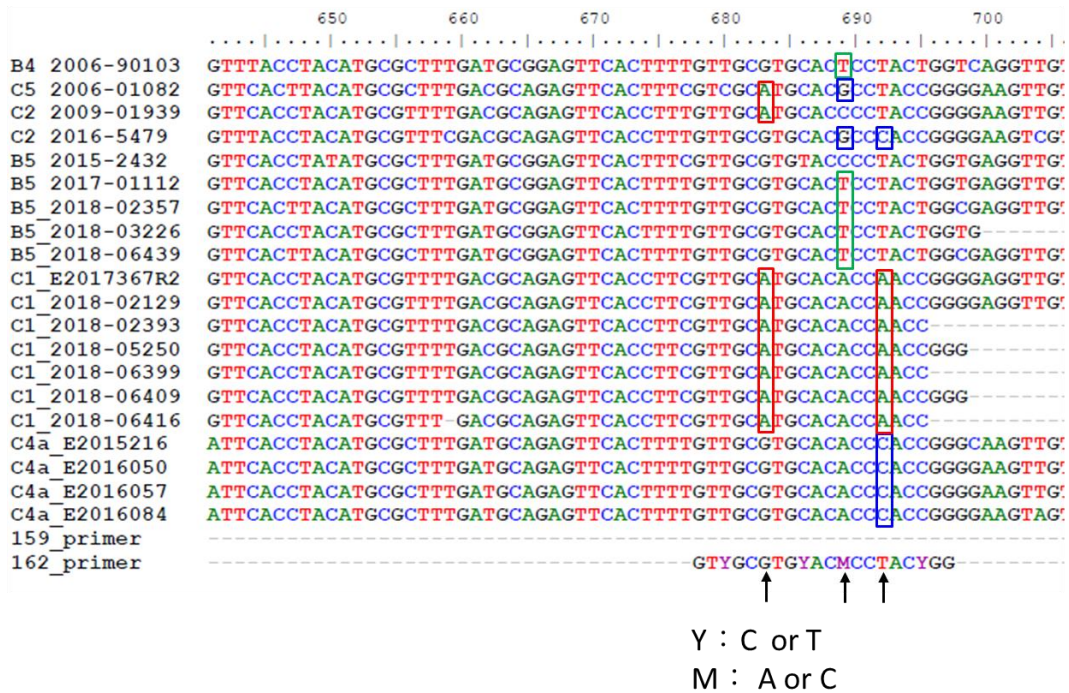
圖十二、比對 159/162 primer 與臺灣歷年 EV-A71 病毒序列

Primer 159與歷年病毒序列比對

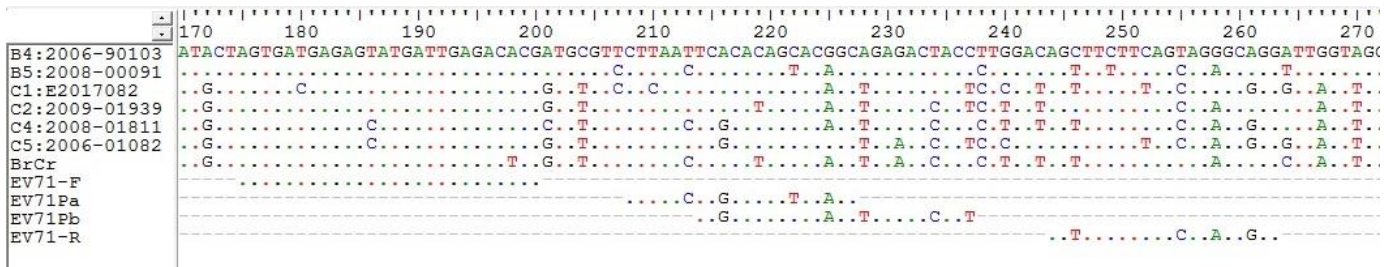
	170	180	190	200	210	220	230
B4_2006-90103	GGCACCCAACACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACACCA(
C5_2006-01082	GGCACCCAACACAGCCTATATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGATGCCA(
C2_2009-01939	AGCACCCAATACAGCCTATATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
C2_2016-5479	AGCACCCAATACAGCCTATATAAATAGCACTAGCGGCAGCTCAGAAGAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
B5_2015-2432	AGCACCCAACACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAACTGTGCAAGGATACTA(
B5_2017-01112	AGCACCCAATACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAACTGTGCAAGGATACTA(
B5_2018-02357	AGCACCCAATACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAACTGTGCAAGGATACTA(
B5_2018-03226	AGCACCCAATACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAACTGTGCAAGGATACTA(
B5_2018-06439	AGCACCCAATACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAGAAAGAAATTTTACCATGAAACTGTGCAAGGATACTA(
C1_E2017367R2	GGCACCCAATACAGCCTACATAAATAGCACTAGCAGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-02129	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCAGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-02393	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-05250	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-06399	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-06409	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C1_2018-06416	GGCACCCAACACAGCCTACATAAATAGCACTAGCGCAGCCAGAAAAATTTTACCATGAAATTTGTGCAAGGACTCTA(
C4a_E2015216	TGCGCCCAATACAGCCTATATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAAAAGAACTTTCACATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
C4a_E2016050	TGCGCCCAACACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAAAAGAACTTTCACATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
C4a_E2016057	TGCGCCCAACACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAAAAGAACTTTCACATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
C4a_E2016084	TGCGCCCAACACAGCTTACATAAATAGCACTAGCGGCAGCCAAAAGAACTTTCACATGAAATTTGTGCAAGGATGCTA(
159_primer						AC	
162_primer							ATGCAAGG

Y : C or T

Primer 162與歷年病毒序列比對



圖十三、比對 EV-A71 RT-qPCR primers/ probes 與不同亞型之核酸序列



表一、2016 年本署及 13 家認可檢驗機構能力試驗結果

認可檢驗機構	敏感性試驗 (TCID50/50uL)	EV-A71 RT-PCR	
		(10 ⁻¹ ~10 ⁻⁸)	參考文獻代碼
(A)	10 ^{-7.58}	10 ⁻⁶	3
(B)	10 ^{-8.17}	10 ⁻⁸	9
(C)	10 ^{-7.5}	10 ⁻⁶	11
(D)	10 ^{-7.714}	10 ⁻⁵	3
(E)	10 ^{-7.71}	10 ⁻⁴	3
(F)	10 ^{-7.5}	10 ⁻⁶	9
(G)	10 ^{-7.67}	10 ⁻⁶	11
(H)	10 ^{-7.43}	10 ⁻⁵ (159/162) 10 ⁻⁷ (161/162)	3 _(161/162)
(I)	10 ⁻⁸	10 ⁻²	3
(J)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10
(K)	10 ^{-6.83}	10 ⁻⁵	3
(L)	10 ^{-8.3}	10 ⁻⁶	3
(M)	10 ^{-7.2}	10 ⁻⁴	3
(N)	10 ^{-7.83}	10 ⁻⁸	
CDC 昆陽檢驗中心(O)	10 ^{-7.59}	10 ⁻⁵ (159/162) 10 ⁻⁸ (CODEHOP)	3 1

表二、226 件臨床檢體分型

		virus isolation			
CODEHOP		Pos	Neg	other virus+	total
Pos (155)	CA10	5	6		11
	CA16	5	3		8
	CA2	5	7		12
	CA4	4	5		9
	CA4+Ad	1			1
	CA5	1	2		3
	CA6	3	30		33
	CA6+Ad			1(Ad)	1
	CA9	1	3		4
	CB1	1			1
	CB3	2			2
	CB4	1			1
	CB5	2	1		3
	Echo 3	1			1
	Echo 5	1	2		3
	Echo11	9	2		11
	Echo18		2		2
	Echo6	1			1
	EV71+Echo6		1		1
	EV71	21	16		37
EVD68	1	9		10	
Neg (71)	Neg		50		50
	Echo11	6			6
	Adenovirus			4	4
	HSV			2	2
	rhinovirus		7		7
	HPeV		1		1
	NPEV	1			1
total	72	147	7	226	

表三、市售 Mikrogen_alphaCube_Enterovrus 2.0 RT-PCR kit 說明書

Table 9: Bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of *alphaCube Entero 2.0*.

Pathogen	<i>alphaCube Entero 2.0</i>
<i>Coxsackievirus A7</i>	positive
<i>Coxsackievirus A9</i>	positive
<i>Coxsackievirus A16</i>	positive
<i>Coxsackievirus A24</i>	positive
<i>Coxsackievirus B3</i>	positive
<i>Coxsackievirus B4</i>	positive
<i>Coxsackievirus B5</i>	positive
<i>Coxsackievirus B6</i>	positive
<i>Echovirus 9</i>	positive
<i>Echovirus 11</i>	positive
<i>Echovirus 20</i>	positive
<i>Echovirus 30</i>	positive
<i>Enterovirus 71</i>	positive
<i>Enterovirus 68</i>	positive
<i>Poliovirus 1</i>	positive
<i>Poliovirus 2</i>	positive
<i>Poliovirus 3</i>	positive
<i>Influenza A Virus</i>	negative
<i>Parechovirus 3</i>	negative
<i>Norovirus</i>	negative
<i>Rotavirus</i>	negative
<i>Adenovirus</i>	negative
<i>Salmonella thyphimurium</i>	negative
<i>Citrobacter freundii</i>	negative
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negative
<i>Listeria monocytogenes</i>	negative
<i>Shigella boydii</i>	negative
<i>Shigella sonnei</i>	negative
<i>Shigella flexneri</i>	negative
<i>E. coli</i>	negative

表四、腸病毒臨床檢體專一性及敏感性分析

Consensus result	virus isolation		EV CODEHOP RT-snPCR		Pan-EV RT-qPCR	
	+	-	+	-	+	-
+	72	90	155	7	150	12
-	0	64	0	64	7	57
sensitivity	44.4%		95.7%		92.6%	
specificity	100.0%		100.0%		89.1%	
Agreement	60.2%		96.9%		91.6%	

表五、EV-A71 臨床檢體專一性及敏感性分析

Consensus result	virus isolation		EV CODEHOP RT-snPCR		EV-A71 RT-PCR		EV-A71 RT-qPCR	
	+	-	+	-	+	-	+	-
+	21	17	38	0	24	14	36	2
-	0	188	0	188	0	188	2	186
sensitivity	55.3%		100.0%		63.2%		94.7%	
specificity	100.0%		100.0%		100.0%		98.9%	
Agreement	92.5%		100.0%		93.8%		98.2%	

衛生福利部疾病管制署 107 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000105

計畫名稱：腸病毒分子檢驗方法之測試與評估

計畫主持人：許珍禎

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處 頁碼
1	實驗做幾次，陰性檢體要重覆做。	感謝委員指導，因通報法定傳染病之原始檢體十分珍貴且檢體量不多，剩餘量往往僅能萃取一次 RNA，雖有分裝冷凍以維持品質，但由於多種分生檢驗方法要同時比較，故僅做一次實驗，是為初步成果供其他實驗室參考。	無
2	疾病管制署實驗室打算選那一種方法？	本署實驗室腸病毒感染併發重症檢驗目前採行病原體分離鑑定與 CODEHOP 並行，如果有需要做 EV71 RT-PCR，會使用 CODEHOP EV71 PCR2。	無
3	與核准的偵測系統的 benchmark？	本署重症檢驗系統係以病原體分離鑑定、CODEHOP 及 EV-A71 RT-PCR 任一檢驗結果陽性，即研判陽性。品管病毒株為 2015 年之特定 C4a EV-A71 病毒株($10^{-7.56}$ CCID ₅₀)，並以其連續稀釋病毒液 RNA 為分生檢測方法之偵測極限比較基準。	無
4	應通過 LDT 的要求。	本署腸病毒檢驗由於需要定序部分屬委外檢驗，無法參與 TAF 認證，但是有依品保科規定建立本	無

		署品保制度及文件，並維持人員訓練及儀器設備維護保養作業，且本署現行分生檢測方法僅作為公共衛生監視之用。將依循委員建議加強遵循 LDT 規範。	
5	不應再執行。	感謝委員指導，本計畫為一年期計畫。	無
6	針對 Echo11 在病毒培養可檢出而 codehop 無法偵測之原因與解釋需再探究。	經初步比對 CODEHOP 所用引子與部份檢出之 Echo11 基因序列，相較於其他型別腸病毒(EV71)並未發現引子結合力可能較差之現象，另外培養出的病毒株重作 CODEHOP 可檢出。可能因檢體中有影響 RT-PCR 之物質，加上 Echo11 病原體培養分離速度快，陽性率高於其他型腸病毒，故有此現象。	無

備註:請將此表單附在計畫書後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。