

## 中文摘要

**關鍵字：**微小病毒科、間接免疫螢光染色法、未分型腸病毒、敏感性、特異性、Coxsackievirus

### A IFA Typing Kit set I、動態化試劑套組

開發腸病毒血清型實驗室鑑定系統與應用，主要架構是以製備多株抗體來建置間接免疫螢光染色法，並已成功應用於台灣地區腸病毒病原體血清型流行趨勢監測之用，已開發型別分別為 CVA2, 3, 4, 5, 6, 10, 21, CBV3 及 Echo 18 等血清型；其中 CVA2, 4, 5, 6, 10 等五種血清型組合“Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I”檢驗試劑套組已常態提供本局遍佈於全台病毒性合約實驗室進行鑑定與監測，並獲中華民國發明專利(發明第 I 414608 號)；本計畫再度開發 CVA8, CVB2, Echovirus type 7, 16, 25 等血清型，每單一血清型的獲得敏感性與專一性分別為 CVA8(Sensitivity: 100% ; Specificity :98.4%)、CVB2(Sensitivity: 100% ; Specificity: 98%)、Echo7(Sensitivity: 100% ; Specificity: 98.9%)、Echo16(Sensitivity: 100 % ; Specificity: 99.0%) Echo25(Sensitivity: 100% ; Specificity: 98.9 %)。

由於血清型別的增加，可組成不同型別的檢驗試劑套組模式(內含 3~5 型)，使具生技產能之功效；另亦可組成動態化檢驗試劑套組(內含 8~10 個血清型)，以因應台灣地區腸病毒病原體監測型別鑑定之用，可使整體未分型腸病毒的鑑定率由原有每年平均的 50%下降至 10%再下降至 5%或以下，不僅及時反應整體的流行趨勢、早期發現再浮現腸病毒血清型別或新興病原體及防治策略擬定與宣導。

# Abstract

**Keyword : Picornaviridae 、 Indirect immunofluorescence assay 、 untypeable enterovirus 、 Sensitivity 、 Specificity 、 Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I 、 Dynamic typing kit**

The establishment of indirect immunofluorescence assay (IFA) using polyclonal antibodies is important for developing the identification system in laboratories. The indirect IFA has been used for enterovirus surveillance in Taiwan, and the available serotypes are CVA2, 3, 4, 5, 6, 10, 21, CBV3 and Echo 18. Among them, the Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I, containing CVA2, 4, 5, 6, 10, has been used in Taiwan CDC Collaborating Laboratories of Virology, and we have obtained the patent (I414608). In this study, we further developed indirect IFA for CVA8, CVB2, Echovirus type 7, 16, 25 with the sensitivity and the specificity of 100% and 98.4 %, 100% and 98%, 100% and 98.9%, 100% and 99%, 100% and 98.9%, respectively.

Since the available serotypes for IFA increase, we could increase the production efficiency by setting different typing kit sets containing different serotypes (3-5 serotypes). In addition, the dynamic typing kit sets containing 8-10 serotypes could be used for enterovirus surveillance in Taiwan, which may decrease the percentage of untypeable enteroviruses from 50% to 5% or below. It may reflect the circulation trends and help to recognize re-emerging enteroviruses or emerging pathogens, and provide references for policy assessment and guidance.

## 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]。

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等來區分其種類，分別為 1.小兒麻痺病毒 (Polioviruses, PV) 2.克沙奇 A 族病毒 (Coxsackie A viruses, CV-A) 3.克沙奇 B 族病毒 (Coxsackie B viruses, CV-B) 4.伊科病毒 (Echoviruses, EV)；而目前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.Poliavirus (PV1-3)，2. Human enterovirus A (HEV-A) (包括 CV-A2~CVA-8，CV-A10，CV-A12，CV-A14，CV-A16 與 EV-71，EV-76)，3. Human enterovirus B (HEV-B) (包括 CVA9，CVB1~CVB6，E1~E7，E9，E11~E21，E24~E27，E29~E33，EV-69，EV-73，EV-74，EV-75，EV-77，EV-78)，4. Human enterovirus C (HEV-C) (包括 CV-A1，CV-A11，CV-A13，CV-A15，CV-A17，CV-A19~CV-A22 與 CV-A24 及 5. Human enterovirus D (HEV-D) (包括 EV-68，EV-70，EV-94)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[4-5]；臨床上的表現呈現多樣化，如 non-specific febrile illness,mild upper respiratory、self-limiting gastroenteritis、Hand-foot-and mouth disease(HFMD)、Herpangina 及 acute haemorrhagic conjunctivitis 等、有時也會併發嚴重的臨床表徵如 aseptic meningitis、acute myocarditis、encephalitisw 及 poliomyelitis 等甚至死亡的發生。

依據疾病管制署病毒病原體監測資料顯示在不同的年代 (<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=34330F1263D5F7E4&typeid=74F0ADB6FF198821>)，不同腸病毒血清型共同循環流行於台灣地區，平均每年可監測出約有 15~20 個腸病毒型別共同流行；其中類歸為 Human Enterovirus A species

在台灣地區呈現常態性(endemic)的流行，如克沙奇 A2, 4, 5, 6, 10, 16 及腸病毒七十一型，而類歸為 Human Enterovirus B species，呈現再發性(recurrence)流行，如伊科病毒 6, 8, 11, 30、克沙奇 B2, 3, 4, 5 等。腸病毒病原體的監測系統主要建構在以細胞培養為主，並佐以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，目前已有 19 種腸病毒之血清型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[7]，惟針對台灣地區所流行的腸病毒血清型，每年平均只有 50%採用此商品化的檢驗染劑可被鑑定出型別，其餘皆為未分型腸病毒(untypable enterovirus)；基於防疫的需求疾病管制署遂於 95 年開始逐步建置五種常態流行在台灣地區血清型別；分別為克沙奇 A2, 4, 5, 6, 10 等血清型，並將這五種血清型組 Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I 檢驗試劑套組[8]，且於 97 年全面應用於本局遍佈於全省的病毒性合約實驗室以為監測腸病流行趨勢之用，並自該年開始整體的腸病毒未能分型監測比率由 50%下降至 10%或以下，對於每年建立腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當的大。

### The ratio of untypeable EV by IFA from 2002 to 2012 Improvement after CVA Typing Kit Set I

Year	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
<b>Tota No. IFA kits</b>	<b>1598</b>	<b>1504</b>	<b>2116</b>	<b>2274</b>	<b>1890</b>	<b>2271</b>	<b>3826</b>	<b>2375</b>	<b>3331</b>	<b>3308</b>	<b>3308</b>
<b>A</b>	<b>78.8%</b>	<b>63.5%</b>	<b>36.8%</b>	<b>81.1%</b>	<b>22.0%</b>	<b>42.4%</b>	<b>56.4%</b>	<b>18.9%</b>	<b>44.7%</b>	<b>36.5%</b>	<b>56.3%</b>
<b>Untypeable EV(1)</b>	<b>21.2%</b>	<b>36.5%</b>	<b>63.2%</b>	<b>18.9%</b>	<b>78.0%</b>	<b>57.6%</b>	<b>43.6%</b>	<b>81.1%</b>	<b>55.2%</b>	<b>63.5%</b>	<b>43.7%</b>
<b>A+B</b>	<b>96.3%</b>	<b>97.9%</b>	<b>98.1%</b>	<b>99.5%</b>	<b>83.2%</b>	<b>97.0%</b>	<b>99.3%</b>	<b>88.2%</b>	<b>95.5%</b>	<b>92.7%</b>	<b>91.7%</b>
<b>Untypeable EV(2)</b>	<b>3.7%</b>	<b>2.1%</b>	<b>1.9%</b>	<b>0.5%</b>	<b>16.8%</b>	<b>3.0%</b>	<b>0.7%</b>	<b>11.8%</b>	<b>4.5%</b>	<b>7.3%</b>	<b>8.3%</b>

**A:Commercial Kit(19 serotypes)**

**B:CVA IFA Typing Kit SetI(Serotypes:CVA2,4,5,6,10)**

然而目前仍大約有 10%的病原體卻隨著時序的變遷流行於台灣地區被偵測到但未能及時鑑定出型別，總計 21 個基因型；這些型別呈現出二個特性：1. 較不常態流行 2. 部份型別具有 endemic 之狀態，但為 low level circulation；然而這些基因型也會隨著時序的發展，而成為主要的流行型別之一的潛在優勢，如 2006 年 Echo virus type 18, Cosackievirus A3.8 及 21 等型別，屆時腸病毒群未能分型的比率則會提昇，繼而影響整體腸病毒的監測及防治策略，防範於未來，本計劃選擇伊科病毒 7,16,25 等三型，又因行趨勢之需，再增加 Coxsackievirus B2 及 Coxsackievirus A8 二型逐步的建立間接免疫螢光染色法檢測系統，以適時再導入各病毒性合約實驗室進行型別之鑑定，不僅增加腸病毒型別的鑑定量能並提昇整體腸病毒分型的比率，健全腸病毒病原體監測體系並監測及發現新興或再浮現病原體及發展檢驗技術平台繼而提昇生技產能。

表二、Frequency of untypeable enterovirus from 2002 to 2012 (sequencing)

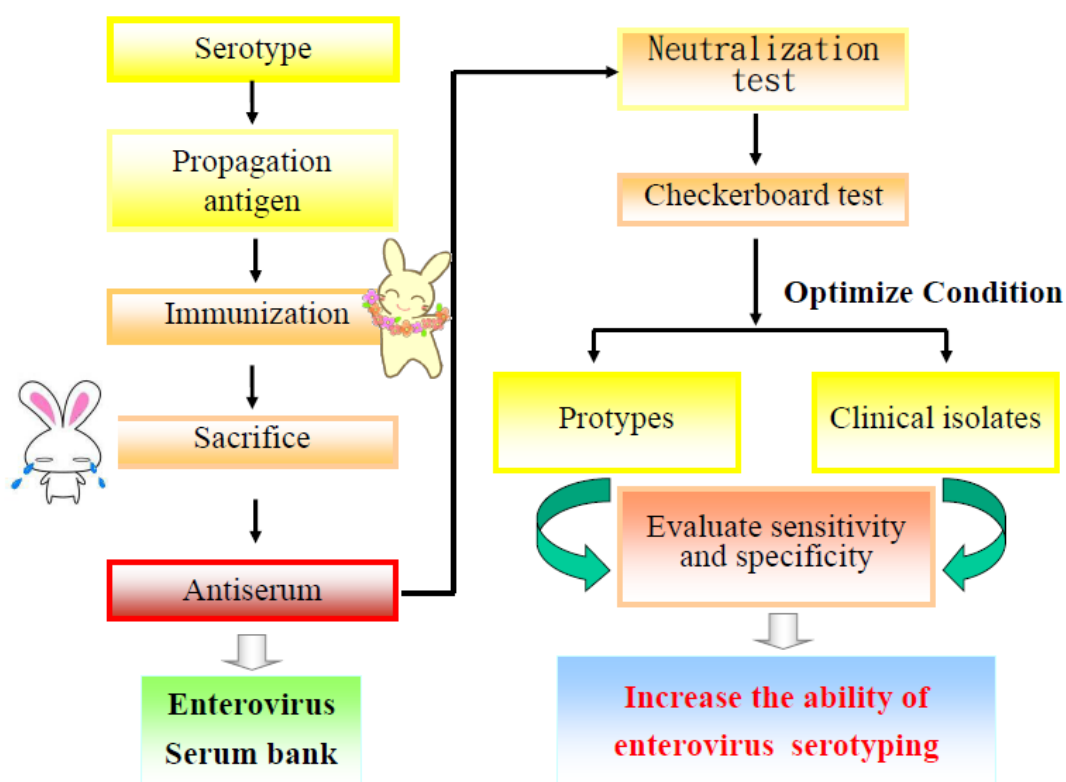
serotype	Enterovirus genera																				Parechovirus genera					
	CA3	CA7	CA8	CA12	E3	E5	E7	E8	E13	E14	E15	E16	E18	E19	E20	E24	E25	E27	E33	CA21	EV68	HPeV1	HPeV3	HPeV4	HPeV6	
2002	●	●	●	●	●		●		●	●		●		●	●		●	●		●	●					
2003	●			●					●		●	●														
2004			●	●							●	●		●		●	●			●						
2005			●	●		●	●	●					●	●			●									
2006	●		●				●						●				●			●		●				
2007			●		●	●						●	●				●			●			●			
2008					●							●					●		●		●	●				●
2009	●				●		●										●									
2010			●				●										●			●		●				
2011			●									●		●						●	●	●	●	●	●	
2012			●				●					●					●			●	●	●	●	●	●	

備註：灰色圓圈代表該血清型被測出的年代

計畫之實施首先需建立 RD(Rhabdomyosarcoma)細胞株的恆定系統，並經病毒的感受性

(Susceptibility)測試之後，選取欲建立血清型 IFA 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)，進一步標定出抗血清與螢光標幟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，方可評估每單一血清型的敏感性及專一性及該檢測系統對於對臨床之適用性，以因應組成動態化或商品化腸病毒群間接免疫螢光染色檢驗試劑套組。

### 不同腸病毒血清型間接免疫螢染色法流程圖



# 材料與方法

## 材料

- 一、1998~2013 年病毒性合約實驗室腸病毒臨床分離株
- 二、多株抗血清 (polyclonal antiserum)
- 三、1994~2006 年急性無力肢體麻痺症監視系統(Acute Flaccial Paralysis Surveillance System ; AFP)分離株
- 四、腸病毒標準株

## 方法

### A、RD 細胞株繼代培養[9-12]

1. 由液態氮桶中取欲 recoverRD 細胞株一管
2. 迅速置於 37°C 水浴中回溫
3. 將細胞放入 75cm<sup>2</sup> 培養瓶中，緩慢滴入 10cc%10%DMEM 未含抗生素培養基置入 36°C 二氧化碳培養
4. 隔夜觀察細胞生長狀況(3~4 天)以為繼代使用

### B、黴漿菌之測定 (EZ-PCR Mycoplasma Test Kit, Biological Industries)

1. 取至少經繼代二次而未加抗生素之細胞且不經 trypsin-EDTA 處理
2. 於 4 °C 下離心 10 分鐘 16000xg，並去除上清液
3. 加入 50ul 的 Lysis Buffer 混合均勻
4. 加熱 95 °C 3 分鐘
5. 從中取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)
6. 加入 35ul 純水及 10ul reaction Mix，使用 thermal cyler 進行 PCR  
其條件如下: 94°C，30 秒，(94°C，30 秒； 60°C，120 秒； 72°C，60 秒) 36cycles，  
72°C，4 分鐘
7. 最後以電泳分析結果。

### C、病毒株增量[9-12]

1. 將已發育完成在 150 flask 中的 RD 細胞之培養基液體丟棄
2. 以 PBS 緩衝液清洗細胞表面
3. 將 lineage1 及 lineage3 之病毒株欲適量接種於 RD 細胞株上，置入 36°C 二氧化碳培養箱培育 1 小時，每間隔 15 分鐘搖晃培養瓶，使接種之檢體均勻散佈在細胞之表層，以利吸附
4. 加入僅含抗生素的 DMEM 維持培養基，置於 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
5. 翌日以倒立顯微鏡觀察細胞病變的發生，當接種細胞呈現 4 價細胞病變 (CPE) 時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次，4°C，2100 g 離心 15 分鐘
6. 將上清液移至耐氯仿的離心瓶中，放入適量的玻璃珠及體積十分之一的氯仿強烈振盪十分鐘，4°C，2100g 離心 15 分鐘
7. 吸取上清液並分裝以為動物基礎免疫使用。

#### **D、Viral Titration and Determination of CCID<sub>50</sub>[13]**

1. 取 8 支 4ml 容量塑膠管依序標示 1,2...8 各加 1.8ml 之細胞維持培養基
2. 進行病毒液 10 倍稀釋依次至 8 管
3. 病毒稀釋液由  $10^{-1}$  至  $10^{-8}$  每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50uL 稀釋病毒、細胞對照 10 孔
4. 每孔加 100ml 細胞維持培養基並置入 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
5. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
6. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (CCID<sub>50</sub>)。

#### **E、Polyclonal Antibody 製備[8]**

1. 以四隻兔子為製備抗血清之個體
2. 二天為一間隔，連續五次的基礎免疫
3. 每次劑量為 5 ml 去活化之病毒液
4. 直至 42 天，再追加 10 ml 該病毒株之未去活化病毒液
5. 間隔一週後，進行全採血取得免疫後之抗血清並以中和試驗測其最終抗體效價。

#### **F、中和試驗(抗體效價測定) [15-17]**



1. 將經免疫後經全採之抗血清稀釋為 1 : 8
2. 於 56°C 加熱 30 分鐘，經 56°C 加熱處理過之抗血清以含 2% 胎牛血清之細胞培養液做 2 倍系列稀釋至：131,072
3. 加入 100 CCID<sub>50</sub> 欲測定該抗血清型之原免疫之腸病毒血清型之抗原
4. 放置 36°C，CO<sub>2</sub> 培養箱中和作用 1 小時
5. 加入 100 μl (5×10<sup>4</sup> 細胞) RD 細胞懸浮液
6. 置 36°C，CO<sub>2</sub> 培養箱培養
7. 翌日以倒立顯微鏡觀察 CPE，連續觀察 4 天。
8. 第 4 天計算同質抗體效價。

### G、Checkerboard titration for determining dilutions of Polyclonal antibody and FITC

1. 挑選中和試驗測定其同質後之免疫個體可作為間接免疫螢光染色法之 Polyclonal antibodies
2. 和 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluorescein conjugated secondary antibody 分別稀釋為 1:200、1:400、1:800、1:1000、1:1200、1:1400、1:1600 及 1:2000 等
3. 利用棋盤式的方法求得最適當的測試條件。

### H、間接免疫螢光 (IFA) 染色鑑定[7-8]

1. 將出現細胞病變的細胞固定於玻片
2. 與不同型別腸病毒老鼠單株抗體(CHEMICON Inc, CA,USA) 孵育
3. 清洗後，再與 FITC 標幟之抗老鼠血清作用
4. 經過孵育與清洗後，於螢光顯微鏡下觀察
5. 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。

### J、病毒 RNA 的萃取

1. 使用病毒核酸純化試劑組(QIAGEN Inc, CA, USA)進行病毒 RNA 的純化
2. 吸取檢體 140 μl 加入 560 μl AVL 緩衝液於室溫下作用 10 分鐘
3. 再加入 560 μl 絕對酒精混合完全
4. 混合液離心通過 QIAmp spin column

5. 再以 AW 緩衝液清洗兩次
6. 最後以 AVE 緩衝液將 RNA 離心溶出
7. 製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應。

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

[18-19]

1. 取 5 µl 病毒 RNA
2. RT-PCR 總反應體積為 50 µl  
包含：SuperScript III RT 反轉錄酵素 (Invitrogen ,USA) 200U、Taq DNA Polymerase (Invitrogen ,USA) 5 U、2X PCR buffer、200 µ M dNTP、50 pmole primers
3. 使用 thermal cycler 進行 PCR  
其條件如下: 42°C，50 分鐘，95°C，3 分鐘，(94°C，30 秒； 48°C，90 秒； 72°C，90 秒) 40cycles，72°C，7 分鐘，最後以電泳分析結果。

Primer :

編號	序 列	對應病毒序列位址
011	5'-GCICCGAYTGITGICCRAA-3'	(3408-3389)
187	5'-ACIGCIGYIGARACIGGNCA-3'	(2612-2631)
189	5'-CARGCIGCIGARACIGGNGC-3'	(2612-2631)
222	5'-5CICCGIGGIGIAYRWACAT -3'	(2951-2969)
292	5'-MIGCIGYIGARACNGG-3'	(2612-2627)

備註：引子 187 及 189 之序列位址相同，主要是因為該引子乃是針對腸病毒的 species group 而設計的

## L、定序分析

1. ABI 3730 定序儀作用分析：使用商用螢光核酸定序試劑組 ABI PRISM(™)Big Dye(™) Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)來標記欲分析之核酸產物。
2. 由於核酸的純度會影響定序反應之好壞，取用高純度(OD260/280>1.8) 之核酸產物來做為定序之模板。
3. 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。

4. 將適量核酸模板、3ul premix(包括 Tris-HCL buffer,pH9.0,MgCl<sub>2</sub>,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 pmole 的核酸引子，與適量的水混合均勻，使反應總體積為 10 μl。
5. 然後再覆上一層石蠟油，並將裝有反應物之微量心管移置預熱在 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。

# 結果

## 一、polyclonal antibodies 之製備

本項計畫總計選取五型腸病毒血清型製備多株抗體的來源，分別為 Coxsackievirus A8(CVA8),Coxsackievirus B2(CVB2),Echovirus type 7,16,25(Echo7,16,25)，其中除 Echovirus type 7 為 2001 年台灣地區分離外，其餘型別皆為標準株(Prototype)，並大量增殖於 RD 細胞株上，進行純化及濃縮後，以避免免疫個體於體內產生過敏反應及降低非特異性抗體的產生，同時測定每一型 CCID<sub>50</sub>，分別 CVA8:10<sup>-7.5</sup>/50uL、CVB2:10<sup>-8.09</sup>/50uL、Echo7:10<sup>-8.5</sup>/50uL、Echo16:10<sup>-6.16</sup>/50uL 及 Echo25:10<sup>-7.8</sup>/50uL；另以紫外線照射為去除病毒感染力，以細胞培養之方式以 14 天無法分離出病原體視為已喪失活性。

## 二、中和抗體效價測定

每一血清型別的每一個體所獲得的抗血清均進行中和抗體效價的測定，結果詳如表一

## 三、間接免疫螢光染色法抗血清最佳化稀釋條件之選取

由於我們已完成了多種不同型別腸病毒血清型（如 CV-A2,4,5,10,21 and Echo18 等間接免疫螢光染色法的檢測系統，所以對於螢光標幟物的 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluorescein conjugated secondary antibody 稀釋倍數已訂定為 1:1000 (此目的為因應簡化臨床上腸病毒血清型別鑑定流程)，進行每一血清型別的每一個體抗血清的連續稀釋；所獲得最佳化抗血清的稀釋條件分別為 CVA8 編號#4(1:2000)、CVB2 編號#3(1:1600)、Echo7 編號#1(1:1000)、Echo16 編號#1(1:2000)及 Echo25(1:750)，在此條件下可觀察到適當的螢光反應，判定的標準約為 2+ (平均每個視野可觀察到百分之五十左右的綠色螢光細胞)。隨著多株抗體及螢光標幟物稀釋倍數的增加，則蘋果綠之螢光會有逐漸下降之現象，每一血清型別所標示抗血清稀釋濃度與相對應之病毒株螢光反應判定詳如圖一

## 四、敏感性 (Sensitivity) 與專一性 (Specificity) 評估

建置間接免疫螢光染色法之平台基礎以為評估不同血清型敏感性與專一性，計畫中的評估平台基礎包含了 63 株腸病毒標準株及選取自 1999~2013 年流行在台灣地區腸病毒及其他臨分離株計有 357 株，計有 34 種基因型或血清型，每一血清型所獲得的敏感性與專一性詳如表二，造成偽陽性反應的臨床分離株皆為 HSV。

## 五、腸病毒抗血清庫

逐步開發腸病毒不同血清型 IFA 的檢測，主要是因應台灣地區腸病毒流行趨勢，目前已建立間接免疫螢光染色法腸病毒血清型的型別分別為 Coxsackievirus 2,3,4,5,6,10,21, Coxsackievirus B3,Echovirus type18 及 Enterovirus EV71，涵蓋今年所建置的血清型 Coxsackievirus 8, Coxsackievirus B2,Echo virus Type 7,16,25 等五型，所以腸病毒抗血清庫目前總計 15 型 1200mL 的血清可供使用。詳如表三

## 討論

一般實驗室對於腸病毒的檢測仍以傳統的病毒分離及血清學檢查，傳統上腸病毒血清型的鑑定都是以 gold standard 中和試驗鑑定確認之；然而以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)來鑑定腸病毒的血清型別是為臨床上最常用檢驗方法之一，原因在於同一時間內可以區分多型的腸病毒血清型別，不過亦受限於可供鑑定的血清型別有限，目前已有 19 種腸病毒之血清型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；以製備多株抗體來建置間接免疫螢光染色法平台已成功應用於台灣地區腸病毒病原體血清型流行趨勢監測之用，分別為 Coxsackievirus A2, 3, 4, 5, 6, 10, 21, Coxsackievirus B3 及 Echovirus type 18 等型別；其中 Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10 已常態提供本局遍佈於全台病毒性合約實驗室進行鑑定，對於建立每年腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當的大，兼具之效能為 1. 提供臨床早期鑑定病原體 2. 即時區分在相同時間內流行不同腸病毒血清型的鑑別診斷 3. 減緩民眾對於傳染病之恐慌 4. 防治策略擬定與宣導；並突顯出自備不同腸病毒血清型多株抗體是為疾病管制署研究檢驗中及疫苗研製中心現階段對於腸病毒病毒性病原體監測及實驗室鑑定不可或缺開發工作之一。

計劃中免疫的個體主要是以家兔為主(4 隻/型)，納入考量的因素為 1. 動物體型較為適中，易於飼養及管理 2. 可獲得較多之血清量(30~50CC) 3. 價錢較為便宜 4. 個體免疫的差異會造成抗體效價不同，增加選擇之機會 5. 避免基礎免疫過程中，因個體之不同而導致死亡發生因而影響抗血清量產之問題等。當然多株或單株抗體皆可應用於腸病毒間接免疫螢光染色法檢測系統，惟多株抗體不同於單株抗體，主要是不會因 epitope 位點改變後即無法被鑑定出來是其優點；而腸病毒在時序的變遷在台灣地區亦已出現了現的市售的螢光染劑無法鑑定出來，如 2008 年 Coxsackievirus B3 及 2010 年 Coxsackievirus B2 等型別，反應出製備不同腸病毒血清型多株抗體有其需求的存在。

由歷年科技計畫的申請與成果的應用，彰顯了 serotyping 實驗室鑑定系統廣效性，建置系統性間接免疫螢光染色法評估平台，對於開發血清型的鑑定量能是逐漸提昇的，臨床或對於腸病毒監測系統的檢驗模式不變的話(即以細胞培養為主，並佐以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA)，基本上 serotyping 仍優於 genotyping，原

因為 1. 可節省經費 2. 降低人力需求 3. 實驗設備與空間 4. 監測上時效的差異；當然 serotyping 卻沒有 genotyping 對於分子流行病學上之優勢。也因應如此為了時效與檢驗的便利性，對於所有已被建置完成的腸病毒血清型，在操作流程上雖可單一劑型進行鑑定，但當將不同血清型別混合在一起時，著實可短縮及簡化檢驗流程，所以本計畫不僅延續了先前計畫所完成的“Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I”檢驗試劑套組(內含 Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10 等血清型)，並藉由血清型別的增加朝二個方向進行，一為可再設計組合成不同型別的檢驗試劑套組，使其具生技產能之功效；另一可組成動態化的檢驗試劑套組(內含 8~10 個血清型)，此種組合方式完全是為因應台灣地區腸病毒病原體監測型別鑑定之用，可使整體未分型腸病毒的鑑定率由原有每年平均 50%下降至 10%再下降至 5%或以下，不僅及時反應整體的流行趨勢更可發現再浮現腸病毒血清型別或新興病原體。

## 結論與建議

- 一、採用多株抗體的模式來建置台灣地區腸病毒流行株之間接免疫螢光染色法，已順利完成 CVA2,3,4,5,6,8,10,2；1Echo7.16.25；CVB2,3 及 EV71 清型別，部份型別已常態全面供應用在全省的病毒性合約實驗室，提供第一線臨床上腸病毒分離的例行性檢驗的鑑定工作，彰顯了 serotyping 實驗室鑑定系統廣效性。
- 二、間接免疫螢光染法應用於腸病毒的血清型別的鑑定，方法本身不僅具備的簡單、快速，且具有良好的敏感性及專一性，確實可縮短檢測時間並減少人力與經費的耗損並統一實驗室之檢測模式。
- 三、Serotyping 檢驗系統的應用主要是由於臨床上仍以病原體分離為主，再佐以間接免疫螢光染色法進行型別的鑑定，對於腸病毒的監測模式是為被動性的，它是一個已告知流行的訊息，所以這樣的檢驗方法則為在腸病毒的監測為一過渡時期，為有效早期預測與監控，對於整體腸病毒流行趨勢的監測檢驗上需改變檢測方法或監測的模式，方可達到預警與提早防範之目的。



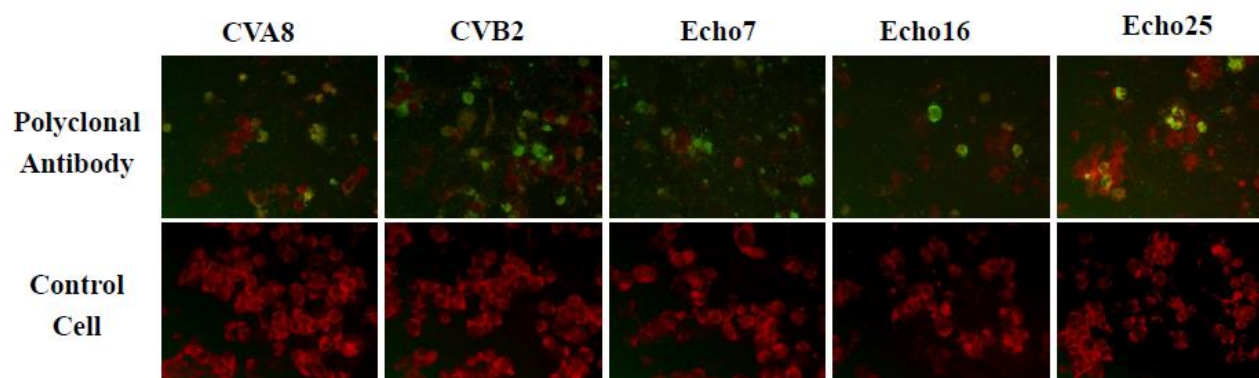
## 參考文獻

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, Vainionpaa 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. 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.
5. Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. *Academic Press, Amsaterdam.* 2005;757-77
6. Ling Ling Cheng, Pak Cheung Ng, Paul Kay-Sheung Chan, et al. Probable Intrafamilial Transmission of Coxsackievirus B3 With Vertical Transmission, Severe Early-Onset Neonatal Hepatitis, and Prolonged Viral RNA Shedding. *Pediatrics.* 2006 Sep;118(3):e929-33
7. Alma S. Rigonan, Linda Mann, and Tasnee Chonmaitree. Use of Monoclonal antibodies to Identify Serotype of Enterovirus Isolate. *Journal of Microbiology* 1998 July; p.1877-1881
8. Lin TL, et al. Rapid and High sensitive Coxsackievirus A Indirect Immunofluorescence Assay Typing Kit for enterovirus Serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:p785-788
9. Lee, L.H., C. A. Phillips, M.A. South, J.L. Melnick, and M. D. yow : Enteric virus isolation in different cell culture. *Bull. WHO* 1965; 32:657-663
10. Bell EJ, Cosgrove BP : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bulletin of the World Health organization* 1980; 58:423-428
11. McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr., Gardner MB : Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1969; 24:520-526
12. Henny D. Isenberg, Editor In Chief Long Island Jewish Medical Center. Essential Procedure for Clinical Microbiology p451-560 Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH (1975) : Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *Journal of clinical Microbiology* 2:183-185
13. Reed, L.J., and H. Miemc. A simple method of estimating fifty percent endpoints *Am. J. Hyg.* 1938; 27:493-497
14. Yin-Murphy M, Tan KL, Lim GN, Quek JH, Ishak B, Phoon MC. Poliovirus neutralizing antibody in infants and cord blood. *Ann Acad Med Singapore* 1993; 22:281-5.

15. Doerr HW Coxsackie B virus neutralising antibodies in myocarditis and pleurodynia. *Dtsch Med Wochenschr* 1973; 98(29):1396\_1400.
16. Rabenau HF, Weber B Evaluation of a new automated microneutralization assay for the quantitative detection of neutralizing antibodies against enteroviruses. *Zentralbl Bakteriolog* 1994; 280:534-539.
17. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980;12:329-334.
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. 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.

## 圖、表

圖一：不同腸病毒血清型免疫之抗血清螢光圖譜



陽性反應：細胞呈現蘋果綠

陰性反應：細胞呈現紅色

表一、不同血清型中和抗體效價表

血清型	CCID <sub>50</sub> /50uL	中和抗體測定	
<b>CVA8</b>	<b>10<sup>-7.5</sup></b>	#1	39,718
		#2	3,539
		#3	6,776
		#4	15,848
<b>CB2</b>	<b>10<sup>-8.09</sup></b>	#1	22,387
		#2	140,604
		#3	39,719
		#4	11,220
<b>Echo7</b>	<b>10<sup>-8.5</sup></b>	#1	79,469
		#2	125,892
		#3	7,943
		#4	1,259
<b>Echo16</b>	<b>10<sup>-6.16</sup></b>	#1	6,310
		#2	9,977
		#3	44,668
		#4	19,906
<b>Echo25</b>	<b>10<sup>-7.8</sup></b>	#1	44,668
		#2	107,398
		#3	125,892
		#4	39,719

表二、不同腸病毒血清型敏感性與專一性評估分析表

Serotype	Sensitivity	Specificity	標準株Prototype (63株)	Clinical isolation (357株)
<b>CA8</b>	100%	98.4%	HEV-A species CAV2-8,10,12,14,16;EV71 HEV-B species CAV9;CBV1-6;E1-7,9,11-21, 24-27,29-33;EV69,73 HEV-C species CVA11,13,15,17,18,20,21;Po lio(Sabin strain)1-3 HEV-D species EV68,70 Parechovirus Parechovirus 1(E22), 2(E23) Coronavirus OC-43,229E	HEV-A species CAV2,3,4,5,6,8,10,12,16 ; EV71
<b>CB2</b>	100%	98%		HEV-B species E3,6,7,9,11,16,18,25,30, 33
<b>Echo7</b>	100%	98.9%		HEV-C species CBV1,2,3,4,5
<b>E16</b>	100%	99%		HEV-D species CVA21,24
<b>E25</b>	100%	99%		EV68 HSV Adenovirus Rhinovirus 31 Aichi virus Parechovirus 1,3,4

表三、腸病毒抗血清庫

Serotype	Endemic											Occurrence						Re-emerge			
	CA2	CA4	CA5	CA6	CA10	EV71							CA3	CA8	CA21	E7	E16	E18	E25	CB2	CB3
						C2	C4	C5	C2-like	B4	B5	A									
Sensitivity (%)	100	95.6	100	100	96.6	100							100	100	100	100	100	100	100	100	100
Specificity (%)	96.1	96.9	95.8	96.6	96.1	98.3							97.7	98.4	98.1	98.9	99	97.8	98.9	98	98.4

動態化  
試劑套組



Cocksackievirus A IFA  
Typing Kit Set I



Dynamic IFA kit provided by Taiwan CDC



# 中華民國專利證書

發明第 I 414608 號

發明名稱：鑑定克沙奇A群病毒之間接螢光染色套組與鑑定克沙奇A群病毒的方法

專利權人：衛生福利部疾病管制署

發明人：林翠莉、曾燦璋

專利權期間：自 2013 年 11 月 11 日至 2028 年 5 月 22 日止

上開發明業經專利權人依專利法之規定取得專利權

經濟部智慧財產局  
局長 王美花

中華民國

102 年 11 月

11 日

