

## 中文摘要

**關鍵字：**腸病毒七十一型、基因亞型、免疫抗原性、中和試驗、疫苗候選株、

**標準化、中和抗體效價比**

腸病毒七十一型出現於 1941 年並於 1969 年首度被分離並開始有規模造成流行，1975 年在 Bulgaria 引起的 Poliomyelitis-like disease 及 1978 年在 Hungary 引起 Acute CNS diseases 為最早期因該病原體所引發流行表現於影響神經之狀況臨床，當二十年後再度的面臨時(1997 年)該病原體即不斷的流行於西太平洋地區的等國家尚未間斷。目前 WHO 強調腸病毒七十一型的浮現對於整體西太平地區在公共衛生上是為重要議並預期在於未來有更多的 HFMD 個案是因腸病毒七十一型所引起。

腸病毒七十一型以 VP1 區域為主，共分為 A,B 和 C 和三個基因型，13 個基因亞型；分別為 B0,B1~B5、C0,C1~C5 and C2-like 等基因亞型，每一波的流行都反應出不同的基因亞型，腸病毒七十一型 genetic diversity 進一步反應了 immunogenicity 的不同，所以對於現階段腸病毒七十一型疫苗發展的過程中，如何挑選最佳化的病毒株並兼具強烈 immunogenicity 及能引發廣泛的中和交叉保護效應實為一大課題；挑選六型不同腸病七十一型基因亞型進行抗血清之製備，分別為 A genogroup、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups，進行 cross-protective 抗體效應分析，不同基因亞型間的 NT ration 差異可以達 1~2048X；其中以 C2-like 基因亞型病毒株對應於其他不同的基因亞型抗血清 NT ratio 介於 8X~512X，A 基因型病毒株 NT ratio 介於 2X~2048X 腸病毒，A genogroup 的抗體相對於 C2-like subgenogroup strain 時，其 NT Ratio 遠大 C2-like subgenogroup 抗體相對於 A genogroup，結果顯示 C2-like subgenogroup 和其他的基因亞型間 cross-protective 的效應最好，即 NT Ratio 差距最小，亦可能是這個計劃中最佳化的腸病毒七十一型疫苗候選。

以多株抗體來建立了腸病毒七十一型的間接免疫螢光染色法(Indirect

Immunofluorescence Assay;IFA)檢測系統，總計 350 株病毒株參與評估系統之測試，包括 53 株腸病毒標準株、2 株 Parechovirus type1 and type2 標準株、2 株 Coronavirus OC-43 and 229E 標準株；1998~2010 年流行在台灣地區的腸病毒分離株 293 株病毒株，含 101 株腸病毒七十一型病毒株，基因亞型分別為 A genotype, B1, B4, B5, C2, C4, C5 and C2-like subgenogroups，評估之敏感性 (Sensitivity)與專一性(Specificity)分別為 100%及 98.4%，可適應於臨床病原體分離鑑定之用。

我們系統性的建立了腸病毒七十一型不同基因亞型之病毒株種庫，包括 A、B1、B4、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups、全長基因序列解碼及 A、B5、C2、C4、C5 and C2-like 等基因亞型抗血清庫，在初步的結果顯示無論是對 EV71vaccine candidate 的選擇或是疫苗發展已進入了臨床試驗階段的國家，皆可提供適當的 cross-protective 效應分析；由於腸病毒七十一型的快速演化及流行的幅度程度，標準化抗血清的建置則是因應未來 ew emerge subgenogroup of EV71 之需求及進行 cross-protective 效應分析以達是否造成流行之主動監測，這將是這個計劃結束後所面臨的另一個挑戰，無論是抗血清庫或是間接免疫螢光染色法的建置，這些也突顯出生技產能的提昇。

# Abstract

**Keyword : Enterovirus 71 、 subgenogroup 、 immunogenicity 、 Neutralization test 、 vaccine candidate 、 standardization 、 NT ratio**

Enterovirus 71 (EV-71) appeared in 1941 and was first isolated in 1969 in California, US. EV-71 caused Poliomyelitis-like disease in Bulgaria in 1975, and acute CNS diseases in Hungary in 1978, respectively. It is the first epidemic report about the EV-71 infection and EV-71 related neurologic symptoms. EV-71 caused different levels of epidemics in Western Pacific Region during recent years, and never stopped. WHO announced that EV-71 was another important issue in public health, and expected that more and more HFMD cases were caused by EV-71.

Based on the VP1 region, EV-71 was divided into three genotypes (A, B and C) and included thirteen subgenogroups (B0, B1~B5, C0, C1~C5 and C2-like). Because the genetic diversity of EV-71 reflects the differences of immunogenicity, it is an important issue to select the most suitable virus strain in the vaccine production to induce broad cross-protections. In this study, six different types of EV-71 (A genogroup 、 B5 、 C2 、 C4 、 C5 and C2-like subgenogroups) were used for antiserum preparation, and cross-protective antibodies analysis. The results showed that 1~2048X differences of NT ratio were observed among different subgenogroups. Using C2-like subgenogroup virus reacted with antisera against other subgenogroups, 8-512X of NT ratio was observed. Whilst, 2-2048X was observed when using A genogroup virus reacted with antisera against other subgenogroups. The NT ratio in the test using C2-like subgenogroup virus reacted with the antiserum against A genogroup was much higher than that in test using A genogroup virus reacted with the antiserum against C2-like subgenogroup. According to these results (smallest differences of NT ratio, and best cross-protective effects), C2-like subgenogroup was considered to be the

most suitable subgenogroup of EV-71 vaccine candidate.

A indirect IFA method was set up by using polyclonal antibodies, and 350 virus strains (including 53 standard enteroviruses, 2 parechovirus type 1 and type 2, 2 coronavirus OC-43 and 229E, and 293 EV isolates circulated in Taiwan during 1998-2010 comprising 101 EV-71) were used for testing this method. A genotype and B1, B4, B5, C2, C4, C5 and C2-like subgenogroups were included in these 101 EV-71 isolates. The sensitivity and specificity was 100% and 98.4%, respectively.

We created a EV-71 virus seed bank (including A, B1, B4, B5, C2, C4, C5 and C2-like subgenogroups), whole genome sequencing, and an antiserum bank (including A, B5, C2, C4, C5 and C2-like). According to the results, we can provide the appropriate analysis for the selection of EV-71 vaccine candidate or the country in the clinical tests phase of vaccine development. However, it is a challenge to survey the epidemics caused by the new emerging subgenogroup of EV-71 by using the antiserum bank or the indirect IFA method. All the results highlight the development of biotechnology.

## 前言

腸病毒七十一型出現於 1941 年間 (1928.8-1952.2)；直至 1969 年首度在 California 腦炎的個案被分離出該病原體，腸病毒七十一型屬正股 RNA (positive stranded RNA)，大約具有 7,500 核苷酸，在結構性蛋白質部份分別為 VP4, VP2, VP3 and VP1 及非結構性蛋白分別為 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D；而其中 VP1 結構性蛋白質裸露於病毒顆粒的表面，不僅和病毒進入宿主細胞的吸附有關而且也是重要的中和抗體位點，且實驗數據亦顯示在 VP1 的 N 端為重要的中和抗體決定位並有著高效價的中和抗體，該病毒由於缺乏脂質的套膜，所以人類腸病毒可以穩定的存活於環境中，如曝露於胃酸中且可以在室溫中存活數天，在地下水(ground water)及熱溫泉(hot spas) 亦可測得它的存在；另外該病毒對於有機溶劑也有抵抗性，如乙醚 (ether) 及氯仿 (Chloroform) 及酒精等，使其喪失活性的方法如高溫 (56 °C 以上)、chlorination、formaldehyde and ultraviolet irradiation 等[1-5]。

腸病毒七十一型，主要造成孩童之手口足症與皰疹性咽峽炎，症狀包括發燒、口或肢端現水泡或潰瘍，並且可能出現神經性併發症，例如非化膿性腦膜炎、腦炎、肢體麻痺、甚至死亡 [6]；因該病原體所引起手口足病已在美國、歐洲、澳洲及亞洲等地區造成了流行，自 1997 年至 2010 不斷的流行於西太平洋地區，在時序的變遷中，亦呈現出基因變異的多樣性。

腸病毒七十一型目前以 VP1 區域為主，共分為 A,B 和 C 和三個基因型，計有 13 個基因亞型，分別為 B0,B1~B5、C0,C1~C5 and C2-like 等基因亞型；腸病毒七十一型在 1969 年首度被分離出來是為 A 基因型，並非現在流行的基因型，而是一個單一的標準病毒株，然而在 2008 年再度的發現於中國大陸並與原來的基因型其在 VP1 序列差異為 97.4~98.9%，有二個說法支持它的再度出現；一是該基因型的出現是由於對美國與中國大陸之間透由傳遞所致；另一個是這個基因型即源自於中國大陸然後經過了突變所致。所有基因亞型的出現由年時序上的關係顯示出在 1970s 間，基因亞型 B1 流行於美國及日本等地、1980s 年基因亞型 B1,B2 和 C1 流行於香港、澳洲及美國等，這幾年更流行於亞太地區

(Asian Pacific region)，基因亞型 B3 於 1997~1999 年出現於 Sarawak, Singapore 及 Australia 其中 B1-B5, C1, C2 和 C5 等基因亞型流行於相同時間不同地區，是一個全球性的狀態，除 C3 較侷限於韓國及 C5 流行於越南；而在 Malaysia、United States、Taiwan 及 Japan 等國家亦存在不同基因亞型的共同流行(Co-circulation)；不過目前仍有一些較不常出現的基因亞型被確認過，包括基因亞型 B0 首度被發現到是在 1963 年的 Netherlands；基因亞型 C0 於 1978 年出現於 Japan 及在 2001 年於印度發現一種基因序列上不同於其他腸病毒七十一型的分離株而被命名為 D 基因型，2008 年 C2-like 基因亞型首度出現於台灣 [6-17]。

目前 WHO 強調腸病毒七十一型的浮現對於整體西太平洋地區在公共衛生上是為重要議題並預期在於未來有更多的 HFMD 個案是因腸病毒七十一型所引起的，該病原體自 1997 年開始大規模的流行於西太平洋地區後，整體西太平洋地區的國家均已陸續建立完善的監測系統及臨床照護，臨床上的檢測亦趨於的完善；在病原體的檢測中，採用傳統的病毒學檢驗及分子生物學檢測、在抗體檢測部份，配合傳統中和試驗檢測及 IgM 抗體的檢測方式 (ICT 或是酵素免疫分析法) [18-20]，抗藥物也持續研究發展中，腸病毒七十一型疫苗的發展亦是當下刻不容緩。

自 1997 年，腸病毒七十一型 B3、B4、B5、C2、C4 and C5 這幾個基因亞型已在西太平洋地區隨著時序與地域的不同引起流行並年有嚴重的臨床症狀及死亡個案的發生，且大部份的基因亞型在引起大規模的流行前即無聲無息的流行於群體中了，且資料已顯示不同基因亞型存有不同的基因特徵 (genetic characteristics)，所以如何篩選病毒腸病毒七十一型疫苗候選株可以引發強又廣泛的中和效應，在疫苗研發過程中是為重要的一環 [21-24]。因此建立腸病毒七十一型不同基因亞型間 immunogenicity 之基本資料及標準化抗血清有其需求性。

本計劃將選取流行於台灣地區腸病毒七十一型不同基因亞型進行抗血清之製備，同時建立不同基因亞型的全長基因序列庫及病毒種庫，採用中和抗體試驗交叉進行不同基因亞型及抗血清相互之間的中和抗體效價分析，期望建立標準化腸病毒七十一型疫苗株篩選平台，不僅可以了解各國所挑選的疫苗株對於不同基因亞型 cross-protective 之效應況，並可

進一步建立提供西太平洋地區對於 EV71new emerging subgenotype immunogenicity 的監控。

對於建置不同腸病毒七十一型基因亞型抗血清庫的同時，亦是搭配多元化種庫的建立，如細胞株種庫、不同腸病毒七十一基因亞型病毒株種庫、不同腸病毒七十一基因亞全長基因序列庫等，這些種庫的建立可多元化的應用於

1. 系統化建立不同腸病毒七十一型基因型與表現型比較資料
2. 不同腸病毒七十一型基因亞型抗血清庫之建立可發展檢驗技術基礎
3. 不同種庫可建立西太平洋地區腸病毒七十一型疫苗株交流平台網絡
4. 評估最佳化疫苗候選株
5. 疾病管制局將首度建立西太平洋地區腸病毒七十一型不同基因亞型抗血清庫貯存量，並可供應西太平洋地區等國家對於 new emerging subgenogroup 篩株平台
6. 標準化抗血清可因應疫苗試劑評估之需

# 材料與方法

## 材料

- 一、1986、1998~2010 年病毒性合約實驗室腸病毒臨床分離株
- 二、腸病毒標準株
- 三、家兔(紐西蘭品系)

## 方法

### A、RD 細胞株繼代培養 [25-29]

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 10cc 10% DMEM 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm<sup>2</sup> 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 培養基充散細胞
11. 計算細胞數目
12. 稀釋每 1CC 含有 1X10<sup>5</sup> 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

#### **B、Vero 細胞株繼代培養 [29]**

1. 由液態氮桶中取欲 recover 之 Vero 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 10cc 5%199 Medium 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 25cm<sup>2</sup> 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 10cc 5% 199 Medium 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 10cc 5%199 Medium 培養基沖散細胞
11. 計算細胞數目
12. 稀釋每 1CC 含有 1X10<sup>5</sup> 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

#### **C、微漿菌之測定(Mycoplasma Detection) (採用 ATCC 之試劑套組)**

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 20 分鐘 12000xg，並去除上清液
3. 加入 100ul 的 Lysis Buffer 混合均勻

4. 加熱 95 °C 10 分鐘
5. 取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)
6. 加入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1unit)Taq polymerase
7. 混合均勻離心
8. 94°C 2 分鐘
9. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)
10. 由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5ul
11. 放入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1unit)Taq polymerase
12. 混合均勻離心
13. 94°C 2 分鐘
14. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)
15. Hold 4°C
16. 取出第二階段 PCR 產物 10ul 以電泳分析觀察最後結果

#### **D、病毒株增量[29]**

- 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，將病毒株欲適量接種於 RD 細胞株上
- 3.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
- 4.加入 DMEM 培養基，置於 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養

- 5.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
6. 4°C，2100 g 離心 15 分鐘
7. 將上清液移至耐氣仿的離心瓶中，放入適量的玻璃珠及體積十分之一氣仿強烈振盪十分鐘
8. 4°C，2100g 離心 15 分鐘，吸取上清液經紫外線燈之照射後，並分裝於密閉安瓶以為動物基礎免疫使用。

備註：若以 Vero 細胞株為病毒增量之細胞，則將 DMEM 更換成 199 培養基，其餘之步驟相同

#### **E、Viral Titration and Determination of CCID<sub>50</sub>[30-32]**

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. 取已增量之標準株上清液 0.2ml 加入第 1 管混合後取 0.2ml 至第 2 管，依次稀釋至第 8 管。病毒稀釋液由  $10^{-1}$  至  $10^{-8}$  每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50ml 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100ml 細胞維持培養基。
3. 置入 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
4. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
5. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (CCID<sub>50</sub>)。

#### **F、不同基因亞型抗血清之製備**

1. 每一腸病毒七十一型基因亞型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(五劑)，每次劑量為 5 ml 去活化之病毒液
3. 第一劑免疫後至 36 天進行免疫動物部份採血
4. 直至 42 天，再追加 10 ml 該病毒株之未去活化病毒液
5. 第一劑免疫後至 49 天，進行免疫動物全採血流程

#### **G、中和抗體效價測定 [33-36]**

1. 將抗血清稀釋為 1：8，於 56°C 加熱 30 分鐘
2. 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 1：8x 系列稀釋，加入 50ul 病毒液 100 TCID<sub>50</sub> 為中和劑量
4. 攻擊病毒之濃度測定以 100 TCID<sub>50</sub> 再作 10<sup>-1</sup>~10<sup>-3</sup> 系列稀釋
5. 放置 36°C，CO<sub>2</sub> 培養箱中和作用 1~2 小時
6. 再加入 100 μl (5×10<sup>4</sup> 細胞) 細胞懸浮液，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。第 4 天判定血清中和抗體效價，即對照細胞形態正常，攻擊病毒量在 32~1000 TCID<sub>50</sub> 之間
8. 計算中和抗體效價

#### H、免疫抗血清冷凍結乾燥

1. 冷凍乾燥機(Virtis Asdcantage) Freeze on
2. 等 Shelf(冷凍板)溫度下降至-40°C，分裝抗血清 0.3ml 於安瓶內並直立於冷凍板上
3. 設定凍結乾燥時間(-60°C 36 小時、-20°C 4 小時、-10°C 2 小時及 35°C 10 小時)
4. 當欲冷凍之抗血清下降至-45°C 時並將 sensor 放至血清安瓶之底部
5. 開 Condenser 待溫度下降至-75~80°C
6. 啟動 Vaccum pump 降至 100mbar
7. 啟動原設計程式開始運轉至抗血清呈現乾燥狀態
8. 關閉 Vaccum pump
9. 先鬆開冷凍腔室壓克力門，釋放冷凍腔室內真空，空氣通過 silica Gel
10. 關 Condensor
11. Sample 先放到 Silica Gel 瓶內，再移至二次乾燥機(speedivac model 5PS)抽取真空並融封安瓶

## I、RNA Extraction

一、病毒 RNA 萃取(採用 **QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat.No. 52906)**)

1. 取 560  $\mu\text{l}$  AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內
2. 加入 140  $\mu\text{l}$  檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘
3. 加入 560  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘
6. 加入 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘
7. 加入 60  $\mu\text{l}$  Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體

## J、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) [37]

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入,同一微量管內

RNA 抽取物	5 $\mu\text{l}$
R' Primer	3 $\mu\text{l}$
F' Primer	3 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	11 $\mu\text{l}$

2. 利用 PCR 機器加熱 70°C，10 分鐘

3. 加入下列試劑

2X RT-PCR Buffer	25 $\mu\text{l}$
Taq DNA Polymerase	1 $\mu\text{l}$
Reverse Transcriptase	1 $\mu\text{l}$
RNASEOUT	12 $\mu\text{l}$

4. 放入 PCR 機器

設定條件如下:

42°C , 50 分鐘  
 95°C , 3 分鐘  
 94°C , 30 秒  
 48°C , 1 分 30 秒  
 72°C , 1 分 30 秒  
 72°C , 7 分鐘  
 4°C , ∞

} 40 個循環

腸病毒七十一型全長序列採用引子

name	sequence	start	End
294	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC	1	24
295	CACCGGATGGCCAATCC	645	629
EVP2	CCT CCG GCC CCT GAA TGC GGC TAA	449	472
OL68-1	GGT AAY TTC CAC CAC CAN CC	1198	1179
EV71-F2	TATGGTGAGTGGCCTTCATACTG	1053	1075
EV71-R2	AGTGAGTGTTACTGATCCATGGT	2241	2219
06125-A	GTG CTT GAC GCT GGT ATC C	1443	1461
06125-B	CAT TAA GCT AGT GGC ATT CGT G	1910	1889
238	CCIGGIWSIAAYCARTTIYTAC	1787	1809
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850
EV71-F3	TACACACCACCAGGAGGCCCT	2115	2136
EV71-R3	ACCAGCATAATTTGGGTTGGCT	3281	3260
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG	2385	2403
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	2612	2631
011	GCICIGAYTGITGICCAA	3408	3389
06125-C	GAT GGG CAC GTT CTC AGT	3125	3142
06125-D	AAT ACG GTG TTT GCT CTT G	4436	4418

EV71-F5	ATYAGYAAGTTYATTGAYTGGCT	4149	4171
EV71-R5	ACAACACTGCWACCACAGTRGCRAT	5278	5256
329	CCiyTIRtITGYGGIAARGC	4923	4942
334	ATRtCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
398	TAIAARYtITTYGCIGGIYtICARGG	5298	5323
334	ATRtCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
392	GGIRWIAAIGARCCIGcNGT	6042	6061
423	GCTATTCTGGTTATAACAAAYTYAC	7408	7384
EV71-F8	GAGAAATT-TGTGAGTACAA	7227	7245
EV71-R8	AAGCAGTGGTAACAACGCAG-GTACT(30)VN-3')	poly A 區	

### K、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 1~2  $\mu$ l 6X loading dye 與 8  $\mu$ l RNA 產物混合，加至 gel 孔洞內
5. 跑 100V，30 分鐘
6. 利用 EtBr 染色
7. 在 UV 下，觀察最後結果

### L、演化樹(Phylogenetic tree)之分析 [38]

以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 操作。採用“Neighbor-joining”方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析。

## 結果

### 一、腸病毒七十一型不同基因亞型病毒種庫

選取 A、B1、B4、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups 等 8 個不同腸病毒七十一型基因型或亞型病毒株經 4~5 代繼代培養增量於 RD 細胞株；並將此 8 個基因型之病毒再適應培養於 Vero 細胞株增量，即相同的亞型增量於不同的細胞株，進行 CCID<sub>50</sub> 的測定，分別建立 RD 及 Vero 病毒種庫及每 50ul 病毒的含量，詳見表一。

### 二、腸病毒七十一型基因全長序列庫

總計 8 株不同腸病毒七十一型基因型或亞型病毒株(A、B1、B4、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups)已完成全長序列之解序，並將 A 亞型病毒與其他七株的各基因片段相似度列於表二。而 A 亞型病毒全長序列與其他七株的 nucleotide 相似度約介於 79-80.1%之間，其中相似度最低與最高的基因亞型分為 C5 及 B5，詳見表二。

### 三、腸病毒七十一型不同基因亞型抗血清之製備

總計挑選六型不同腸病毒七十一型基因亞型進行抗血清之製備，分別為 A genogroup、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups，每一基因亞型以四隻兔子為免疫接種之個體，每隻接種之病毒量、進行全採血取得之抗血清量及最終中和抗體效價詳見表三。

### 四、腸病毒七十一型不同基因亞型同質與異質中和抗體效價分析表

計有 6 型腸病毒七十一型基因亞型同步進行同質與異質中和抗體測試，每一單基因亞型之同質中和抗體效價 A Genotype #151(1:65, 536), #152(1:262, 144), #153(1:65, 536), #154(1:524, 288)、 B5 genogroup #119(1:131, 072), #120(1:8, 192), #121(1:131, 072)、 C2 genogroup #1(1:8, 192), #3(1:32, 768) #4(1:32, 768)、 C4 genogroup #147(1:65, 536), #148(1:262, 144), #149(1:524, 288)、 #150(1:89, 125)、 C5 genogroup #103(1:131, 072),



#104(1:131, 072), #105(1:262, 144)、 #106(1:32, 768)及 C2-like genogroup #143(1:12, 618), #144(1:1024), #145(1:65536); 在異質抗體部份，相同基因亞型的抗血清對應於其他不同的基因亞型病毒株時所測得的中和抗體效價比價(即相同基因亞型抗血清中和抗體效價/不同基因亞型中和抗體效價; NT Ratio)，整體的差異可以達 1~2048X，其中以 C2-like 基因亞型病毒株對應於其他不同的基因亞型抗血清，整體的 NT ratio 介於 8X~512X，Ag 基因型病毒株 NT ratio 介於 2X~2048X 詳見表四及圖一。

#### 五、EV71 間接免疫螢光法檢測系統

選擇 C5 genogroup #104 抗血清連續稀釋並與螢光標幟物的 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluorescein conjugated secondary antibody 挑選最佳化抗血清的釋條件以得到適當的螢光反應，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。總計 350 株病毒株參與評估系統之測試，包括 53 株腸病毒標準株、2 株 Parechovirus type1 and type2 標準株、2 株 Coronavirus OC-43 and 229E 標準株；1986, 1998~2010 年流行在台灣地區的腸病毒分離株 293 株病毒株，含 101 株腸病毒七十一型病毒株，基因亞型分別為 A genotype, B1, B4, B5, C2, C4, C5 and C2-like subgenogroups，評估之敏感性(Sensitivity)與專一性(Specificity)分別為 98.4% 及 100% 及不同腸病毒七十一型基因亞型螢光圖示，詳見表五圖二。

#### 六、腸病毒七十一型抗冷凍乾燥抗血清庫

目前製備完成 6 型不同腸病毒七十一型抗血清(A genogroup、B5、C2、C4、C5 and C2-like subgenogroups)，其中 3 型(B5、C2 and C5 subgenogroups)已完作冷凍乾燥的過程，計有 1073 瓶庫存量，其餘 3 型(A genogroup、C4 and C2-like subgenogroups)經冷凍乾燥後預計為 1300 瓶，詳見表六。

## 討論

這是一個有規模性的建置腸病毒七十一型不同基因亞型抗血清庫，腸病毒七十一型出現於 1941 年並於 1969 年首度的被分離且開始有規模造成流行，1975 年在 Bulgaria 引起的 Poliomyelitis-like disease 及 1978 年在 Hungary 引起 Acute CNS diseases 為最早期因該病原體所引起流行表現出影響神經的臨床狀況臨床，當二十年後再度的面臨時(1997 年)該病原體即不斷的流行於西太平洋地區的國家並引發不同程度的的流行，Malaysia(1997)、Taiwan (1998)、Singapore(2000)、Japan、South Korea(2003)、mainland China、Perth, Australia(1999)、Vietnam(2005)、Brunei(2006)、India and Netherlands(2007)及 China(2008)直至目前尚未間斷，也突顯了該病原體在檢驗技術的研發與應用，手足口症監測系統的建立，臨床醫療照護的改善並降低致死率及發展疫苗的挑戰。

有關針對腸病毒七十一型的檢驗來協助臨床的診斷及照護，檢驗的技術已趨於完善，針對抗原或抗體的檢驗，不同的檢驗方式具有不同的敏感性及專一性，尤其在血清學 IgM 抗體的檢測，已具備良好的敏感性及專一性，在檢驗技術的歷程突顯出時效上的改善更能因應臨床治療及防治的需求。本計劃中再度嚐試以所製備的腸病毒七十一型抗血清(多株抗體)來建立了腸病毒七十一型的間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay; IFA) 檢測系統，其目的是可應用於臨床病原體分離鑑定腸病毒七十一型之用，雖說目前已有市售的腸病毒七十一型螢光染劑(Chemicon Inc)，其來源為單株抗體；以製備多株抗體來建立 IFA 檢測系統抗血清的不同單株抗體，主要是不會因 epitope 位點改變後即無法被鑑定出來是其優點；然而抗血清的製備不易及免疫物種個體的差異及螢光之亮度等確是不及單株抗體。由台灣地區腸病毒的監測系統已顯示出部份流行的腸病毒血清型別已無法由單株抗體的螢光染劑鑑定出型別，如 Echo30、CVB2 and CVB3 血清型，由於腸毒七十一型本身具備者快速演化的特性，隨著時序的發展，或許也會和 CVB2 and CVB3 一樣，造成臨床上無法即時鑑定的情形。選擇 C5 genogroup #104 抗血清做為此檢測系統的來源，經

評估測示顯示出良好的敏感性與專一性，分別為 100 % 及 98.4%，所以該螢光檢測系統的建立是為因為防範於未來，這也突顯了抗血清庫建立的多元應用之一。

腸病毒七十一型本身具備了 RNA 病毒的特性，隨著環境及宿主的因素，本身快速的演化，導致不同基因亞型的出現，相同的基因亞型流行於不同的國家，同一個國家流行著不同的基因亞型，genetic diversity 進一步反應了 immunogenicity 的不同，所以也對於在腸病毒七十一型疫苗發展的過程中，如何挑選最佳化的病毒株並兼具強烈 immunogenicity 及能引發廣泛的中和交叉保護效應，為另外一個需要考慮的層面。有關腸病毒七十一型不同基因亞型之間的交叉中和能力一直有文獻報導，大部份都是免疫於動物個體模式來進行分析(家兔、小鼠, 猩猩及天竺鼠等)資料顯示不同腸病毒七十一型基因亞型間的交叉中和效應在抗體的差異有 4X~192X 的差異。以本次計劃所製備完成的抗血清中進行了交叉中和抗體的結果顯示，不同的基因亞型之間 NT Ratio 各有不同，若以 cross-protective 效應而言，C2-like subgenogroup 應是這個計劃中最佳化的腸病毒七十一型疫苗選取株；因為它和其他的基因亞型間 cross-protective 的效應最好，即 NT Ratio 差距最小，但是在動物模式中所有基因亞型依相同的免疫劑程相較於其它基因亞型所引發的中和抗體效價較低，除 C2 subgenogroup 較為接近，當然在圖一當中亦顯示 A genotype 也不失為是一個適當的疫苗候選株，它不僅具備了和 C2-like subgenogroup 一樣有著良好的 cross-protective 的效應最好，且在動物模式中所引發中和抗體效相當高(當然這會汲到病毒株本身的特性及免接接種的劑量及個體的反應)，惟一值得注意的是 A genotype 的抗體相對於 C2-like subgenogroup strain 時，其 NT Ratio 遠大 C2-like subgenogroup 抗體相對於 A genotype，Kok Keng Tee 曾推估一個新的基因亞型從被偵測到流行約有 5 年的時間，所以 C2-like subgenogroup 可能是這個計劃中突顯為最佳的腸病毒七十一型疫苗候選。

由於目前已有三個國家均已進行腸病毒七十一型的疫苗研發，並已走向臨床試驗的階段，其中中國大陸選擇的是 C4a subgenogroup、新加坡為 A genotype 及台灣 B4 subgenogroup，所以本計劃的結果可以較系統性的來分析這三個國家所挑選的疫苗候選株在動物模式上 cross protective 的效應(圖一)及進一步分析將這幾個國家所挑選疫苗株的

優劣勢，並協助當疫苗政策的執行時可推估整體的保護效力。

Cross-protective 效應的評估會因為不同實驗室的評估方法不同、所選擇的病毒株、及在因實驗室的不同所出現的異常不一而導致 Cross-protective 抗體的效價有所差異，而為因應腸病毒七十一型因時序的變遷導 geneti diversity 及已進入疫苗的發展時代，抗血清的標準化及各實驗室之間對於 cross-protective 標準化的數值來比較，如“NT Ratio”，是可以協助我們對於不同基因亞型或相同基因亞型不同的病毒株的之間 cross-protective 的能建立一個標法化進行評估，才是這個計劃結束後的另一個挑戰。

在建置不同腸病毒七十一型基因亞型抗血清庫的過程中，由於需要細胞株、病毒株、基因序列及傳統的檢測技術等，亦也同時建立了多元化種庫，如細胞株種庫、不同腸病毒七十一基因亞型病毒株種應庫、不同腸病毒七十一基因亞全長基因序列庫等，這些種庫讓我進一步獲得較具系統性的有關腸病毒七十一型不同基因亞型與表現型比較資料、利用抗血清庫可研發檢驗試劑研發如間接免疫螢光染色法檢測系統、建立西太平洋地區腸病毒七十一型疫苗株交流平台網絡之雛型並可供應西太平洋地區等國家之需求及隨時可評估最佳化疫苗候選株及監測腸病毒七十一型 immunogenicity 之變化以達多原種庫多元應用。

## 結論與建議

- 一、不同腸病毒七十一型基因亞型抗血清庫的建置，我們不僅可以發展屬於台灣地區臨床病原體的檢測系統，亦可配合疫苗政策的需求自給自足並有能力擴展至立西太平洋地區建立腸病毒七十一型疫苗株交流平台網絡及即時評估 emerging new subgeogroups 對於中和抗體效力。
- 二、本計劃結果顯示腸病毒七十一型 C2-like subgenogroup 為最佳化的 EV71 vaccine candidate。
- 三、抗血清的標準化是為這個計劃執行完作後另一個需要持續進行的工作，其可用二種方式進行，一為換算成每 mL 抗血清的單位(U/mL)或以 NT ratio(即相同基因亞型抗血清中和抗體效價/不同基因亞型中和抗體效價來比較，可縮短實驗室之差異。
- 四、採用多株抗體的模式來建置腸病毒間接免疫螢光染色法檢測系統，已順利完成 CV-A2、CV-A3、CV-A4、CV-A5、CV-A6、CV-A10、CV-A21 and Echo18 等血清型並已全面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，EV71 間接免疫螢光染色法的建置，再度顯示該檢測系統的穩定性及抗血清庫建立的多元應用之一。
- 五、EV71 new emerging subgenotype 是可以預期的且並不會隨著計劃結束後不再出現，如何維持整體系統之穩性及後續的運作更顯重要，往往都以計劃模式來爭取臨時人力，長期規劃下建議納入常規業務中增加人力，事實上對於整體後續的作業有所影響，且傳統檢驗技術傳承及紮根未能落實。

## 參考文獻

1. Tom Solomon, Penny Lewthwaite, David Perera, Mary Jane Cardosa, Peter McMinn, Mong How Ooi. 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 10:778-90.
2. Tan CS, Cardosa MJ: High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. *Arch Virol* 2007, 152:1069-1073.
3. Tan CS, Cardosa MJ: High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. *Arch Virol* 2007, 152:1069-1073
4. Sivasamugham LA, Cardosa MJ, Tan WS, Yusoff K: Recombinant Newcastle Disease virus capsids displaying enterovirus 71 VP1 fragment induce a strong immune response in rabbits. *J Med Virol* 2006, 78:1096-1104.
5. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine*. 2009 21;27(24):3153-8.
6. Melnick JL: Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In *Fields Virology*. 3rd edition. Edited by B. N. Field DMK, P. M. Howley, R. M. Channock, J. L. Melnick, T. P. Monath, B. Roizman, and S. E. Straus. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 655-712.
7. Yu H, Chen W, Chang H, Tang R, Zhao J, Gan L, Liu B, Chen J, Wang M. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008. *Virus Genes*. 2010 41(1):1-4.
8. Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P: 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.
9. Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardosa MJ, McMinn PC: Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1733-1741.
10. van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, van der Avoort H: Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol* 2009, 47:2826-2833.
11. Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T: 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.
12. Chan YF, Sam IC, AbuBakar S: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol* 2010, 10:404-412.

13. Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP: Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Curr Sci* 2003, 84:1350-1353.
14. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, Fan WB, Yang JY, Chang FY, Wu HS. Genetic Diversity and C2-like Subgenogroup Strains of Enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology Journal* 7(1):277, 2010.
15. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, Hsu LC, Yang CF, Yang JY, Chen PJ, Wu HS: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res* 2008, 137:206-212.
16. Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi Z, Yu-Jie M, Pongsuwanna Y, Miyamura T: Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 2004, 46:231-235.
17. 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.
18. Tan EL, Yong LL, Quak SH, Yeo WC, Chow VT, Poh CL. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. *J Clin Virol.* 2008 Jun;42(2):203-6
19. Wang SY, Lin TL, Chen HY, Lin TS. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA. *J Virol Methods.* 2004 Jul;119(1):37-43
20. Tan EL, Yong LL, Quak SH, Yeo WC, Chow VT, Poh CL. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. *J Clin Virol.* 2008 Jun;42(2):203-6
21. Min-Shi Lee, Luan-Ying Chang. 2010. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 9(2), 149-156.
22. Juan Xu, Yuan Qian, Shixia Wang, Jill M. Grimes Serrano, Wei Li, Zuhu Huang, Shan Lu. 2010. EV71: An emerging infectious disease vaccine target in the Far East? *Vaccine* (28)3516-3521.
23. Min-Shi Lee and Luan-Ying Chang 2010 *Expert.Rev. Vaccine*9(2), 149-156
24. .Qunying Mao, Nan Li, Xiang Yu, Xin Yao, Fengxiang Li,Fengmin Lu, Hui Zhuang, Zhenglun Liang, Junzhi Wang 2011 Antigenicity, animal protective effect and genetic characteristics of candidate vaccine strains of enterovirus 71 *Arch Virol*
25. Lee,L.H.,C .A.Phillips,M.A.South,J.L.Melnick,and M. D.yow1965 : Enteric virus isolation in dfferent cell culture.*Bull.WHO* 32:657-663
26. Bell EJ, Cosgrove BP(1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line.*Bullectin of the World Health organization* 58:423-428
27. McAllister RM,Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC Jr.,Gardner MB(1969) : Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24:520-526
28. Schmidt NJ,Ho HH,Lennette EH(1975) : Propagation and isolation of group Acoxsackieviruses in RD cells.*Journal of clinical Microbiology* 2:183-185

29. World Health Organization. 2004. Polio laboratory manual, 4ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
30. Reed, L.J.,and H. Miemcj. 1938.A simple method of estimating fifty percent endpoints Am. J.Hyg. 27:493-497  
Reed, L.J.,and H. Miemcj. 1938.A simple method of estimating fifty percent endpoints Am. *J.Hyg.* 27:493-497
31. Nagata, N., H. Shimizu, Y. Ami, Y. Tano, A. Harashima, Y. Suzaki, Y. Sato, T. Miyamura, T. Sata, and T. Iwasaki. 2002. Pyramidal and extrapyramidal involvement in experimental infection of cynomolgus monkeys with enterovirus 71. *J. Med. Virol.* 67:207-216.
32. Kaber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Path. Pharm.* 162:480.
33. 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.
34. Doerr HW(1973) Cocksackie B virus neutralising antibodies in myocarditis and pleurodynia. *Dtsch Med Wochenschr* 98(29):1396\_1400.
35. Rabenau HF, Weber B(1994) Evaluation of a new automated microneutralization assay for the quantitative detection of neutralizing antibodies against enteroviruses. *Zentralbl Bakteriol* 280:534-539.
36. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980,12:329-334.
37. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin microbial* .37:1288-1293
38. 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.



表、圖

表一、腸病毒七十一型不同基因亞病毒株種庫貯存表

Genogroup (subgenogroup)		Seed virus stock		CCID <sub>50</sub> /mL	
		Master seed virus (mL)	Working seed virus/0.3mL	RD cell	Vero cell
A		10	30-60	10 <sup>-7.1</sup>	10 <sup>-5.6</sup>
B	B1	10	30-60	10 <sup>-7.0</sup>	10 <sup>-5.8</sup>
	B4	10	30-60	10 <sup>-7.8</sup>	10 <sup>-7.6</sup>
	B5	10	30-60	10 <sup>-7.8</sup>	10 <sup>-7.3</sup>
C	C2	10	30-60	10 <sup>-8.65</sup>	10 <sup>-7.5</sup>
	C4	10	30-60	10 <sup>-8.55</sup>	10 <sup>-6.8</sup>
	C5	10	30-60	10 <sup>-7.8</sup>	10 <sup>-7.5</sup>
	C2-like	10	30-60	10 <sup>-5.9</sup>	10 <sup>-6.0</sup>

表二、腸病毒七十一型 A 基因型與其他基因亞型之各段基因相似度比較表

Sub- genogroup		Gene												
		5'-UTR	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D	Comple
B1	nt	83.1	81.1	82.1	81.8	81.8	76.6	78.1	78.1	84.8	66.6	76.3	80.3	79.8
B4	nt	84.2	84	81.2	81.9	81	74.8	75.4	77.8	82.5	72.7	76.8	79.3	79.7
B5	nt	83.6	84	81.4	81.2	82.2	76	77.7	77.8	84.1	71.2	76.1	79.9	80.1
C2	nt	77.1	81.6	81.8	81.4	83.5	80.6	76.7	79.8	77.1	68.1	75.2	77.9	79.2
C2-like	nt	83.6	84	80.8	83	83.8	79.1	76	78.3	77.9	72.7	76.5	76.8	79.2
C4	nt	82.4	83	80.4	81.9	81.9	79.3	75	77.7	83.3	68.1	76.8	77.9	79.4
C5	nt	80.2	81.6	81.3	80.4	81.3	78.4	78.7	80.5	77.5	69.6	72.6	77.9	79

\*Subgenogroup A: BrCr-CA-70 (GenBank accession no. U22521), B1: B1-86236, B4: E2002042, B5: E2007599, C2: 98111207, C2-like: 2008-00643 (HM622391), C4: E2004104 (EF373576), C5: E2006125-TW (EF063152).

表三、製備腸病毒七十一型不同基因亞抗血清流程表

Subgenotype	Immunization (5mL)	Boost (10mL)	NO.	Total volume(mL)	NT titers
A	$10^{-5.0}$	$10^{-5.7}$	#151	29	65,536
			#152	37	262,144
			#153	29	65,536
			#154	44	524,288
B5	$10^{-7.8}$	$10^{-7.8}$	#119	28	131,072
			#120	40	8,192
			#121	45	131,072
C2	$10^{-8.6}$	$10^{-8.6}$	#1	28	8,192
			#3	31	32,768
			#4	26	32,768
C4	$10^{-8.5}$	$10^{-8.5}$	#147	27	65,536
			#148	30	262,144
			#149	37	524,288
			#150	45	65,536
C5	$10^{-7.8}$	$10^{-7.8}$	#103	41	131,072
			#104	46	131,072
			#105	31	262,144
			#106	25	32,768
C2-like	$10^{-5.9}$	$10^{-6.8}$	#143	40	8,192
			#144	39	2,048
			#145	40	65,536

表四、腸病毒七十一型不同基因亞型同質與異質抗體 NT Ratio 分析表

	A				B5				C2				C4				C5				C2-like			
	#151	#152	#153	#154	#119	#120	#121	#1	#3	#4	#147	#148	#149	#150	#103	#104	#105	#106	#143	#144	#145			
A	65,536	362,144	65,536	534,288	256X	256X	512X	256X	512X	16X	256X	1024X	2048X	512X	256X	512X	128X	64X	2X	2X	4X			
B1	0	2X	0	0	32X	8X	32X	16X	32X	2X	8X	16X	64X	16X	32X	8X	4X	4X	2X	0	4X			
B4	2X	2X	2X	0	2X	4X	2X	2X	4X	2X	8X	8X	8X	4X	2X	2X	0	0	0	0	2X			
B5	0	0	2X	2X	331,072	8,192	131,072	2X	4X	2X	2X	4X	4X	4X	2X	2X	0	0	2X	2X	2X			
C2	2X	0	0	8X	8X	2X	4X	8,192	32,768	32,768	4X	8X	8X	8X	4X	4X	4X	4X	2X	0	4X			
C4	2X	0	2X	8X	16X	0	0	4X	4X	0	65,536	262,144	534,288	65,536	2X	4X	2X	8X	4X	0	4X			
C5	0	0	2X	4X	4X	2X	0	4X	8X	2X	8X	8X	16X	4X	131,072	162,144	32,768	2X	2X	2X				
C2-like	64X	64X	128X	256X	64X	64X	128X	32X	16X	8X	32X	128X	512X	128X	32X	32X	16X	8,192	1,048	65,536				

備註：B5 subgenogroup #120 未進行免疫追加劑程

表五、腸病毒七十一型多株抗體間接免疫螢光染色法系統評估

	標準株 (Prototypes)	臨床分離株 (Clinical isolates)		Sensitivity	Specificity
		Non-EV71 isolates	EV71 isolates		
Polyclonal antibodies	HEV-A species	HEV-A species		100%	98.4%
	CAV2-8,10,12,14,16;EV71	CAV2,3,4,5,6,8,10,12,16			
	HEV-B species	HEV-B species			
	CAV9;CBV1-6;E1-7,9,11-21, 24-27,29-33;EV69,73	E3,4,6,7,11,14,16,18,25,30,33 CBV1,2,3,4,5			
	HEV-C species	HEV-C species			
	CVA11,13,17,18,21;Polio(Sabin strain)1-3	CVA21	101株 1998-2010 subgenogroups		
	HEV-D species	HEV-D species			
	EV68,70	EV68			
	Parechovirus	HSV			
	Parechovirus 1(E22), 2(E23)	Rhinovirus 49			
	Coronavirus	Inf A, B			
	OC-43,229E	JE Aichi virus			

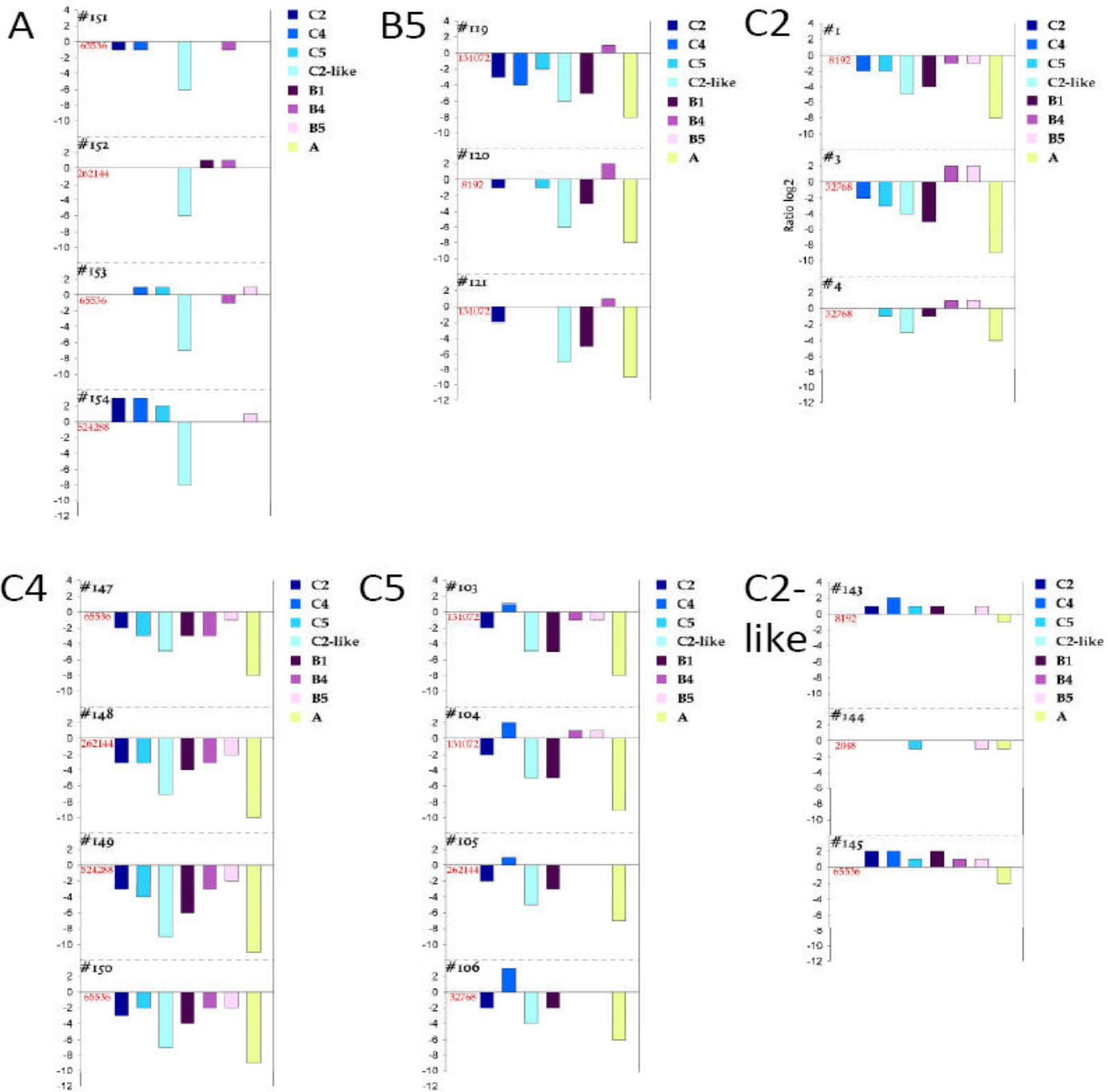
表六、不同腸病毒七十一型基因亞型冷凍乾燥抗血清庫存量

Subgenotype	NO.	Total volume(mL)	冷凍乾燥(瓶)
A	#151	29	95
	#152	37	120
	#153	29	95
	#154	44	145
B5	#119	28	80
	#120	40	120
	#121	45	140
C2	#1	28	93
	#3	31	100
	#4	26	80
C4	#147	27	90
	#148	30	100
	#149	37	120
	#150	45	150
C5	#103	41	130
	#104	46	150
	#105	31	100
	#106	25	80
C2-like	#143	40	130
	#144	39	130
	#145	40	130

備註：

1. 紅色數字代表抗血清已完成冷凍乾燥
2. 綠色數字表示預計冷凍乾燥之瓶數但尚未執行

圖一、腸病毒七十一型不同基因亞型 NT Ratio 分析圖



NT Ratio=即相同基因亞型抗血清中和抗體效價/不同基因亞型中和抗體效價

$2^n$  ,  $n=\log_2$

+ : NT titer ratio greater than compared subgenogroup

- : NT titer ratio minor than compared subgenogroup

Both +, - have no mathematic significance.

圖二、腸病毒七十一型不同基因亞型螢光圖譜

陽性反應：細胞呈現蘋果綠

陰性反應：細胞呈現紅色

