

計畫編號：DOH92-DC-1055

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

南台灣腸病毒 PANEV 檢驗分型及分子生物學及
抗原性之研究

研究報告

執行機構：高雄醫學大學

計畫主持人：林貴香

研究人員：董宜青、柯冠銘、王株鳳、許郁停

執行期間：92年01月01日至92年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄	頁碼
一. 中文摘要	(2)
二. 英文摘要	(3)
三. 計劃內容	
(一) 前言	(4)
(二) 材料與方法	(5)
(三) 結果	(7)
(四) 討論	(9)
(五) 參考文獻	(12)
(六) 圖表	(13)

摘要

腸病毒為一種 RNA 病毒，極容易產生變異，當變異發生在抗原決定位上則會造成鑑定之困難。1999 年以來無法以螢光抗體鑑定之腸病毒(pan EV)逐漸增加，而以中和試驗鑑定腸病毒耗時費事且抗體購得不易。本研究擬藉由腸病毒 VP4 基因定序分析，進行 1999 年以後 pan EV 之分型及 20 年來各血清型腸病毒之分子流行病學分析，以建立台灣地區腸病毒 VP4 基因資料庫，並與 Gene Bank 之 VP4 基因資料加以比對，以正確的鑑定血清型別。Pan EV 之分型方面，1999~2003 年間無法以螢光抗體及中和試驗分型的(pan EV)之 VP4 基因共 214 株，已完成鑑定者有 96 株，(1) 2003 年 pan EV 定序分析 6 株，結果 CA16 為 3 株及 CB3 有 3 株；(2) 2002 年 pan EV 定序分析 17 株，結果 E6 有 11 株、Polio3 有 2 株、Polio2、E3、EV71、CA 各 1 株；(3) 2001 年分析 40 株 pan EV，其中有 18 株 E30、CA16 有 5 株、E6 有 6 株 Polio1 有 4 株、Polio3、CA24 各 2 株及 CB4、Polio2、E3 各 1 株；(4) 2000 年分析 28 株，結果 CA16 有 16 株，EV71 有 8 株，CA4、CA5、CA9、E30 各 1 株；(5) 1999 年分析 3 株 pan EV，結果為 2 株 CA16, 1 株 EV71。以 VP4 基因比對可以快速而明確鑑定腸病毒血清型別。分子流行病學分析方面，(1) CA16 於 1999、2000、2001

及 2003 年皆有分離株。2000 年的分離株屬於 B 基因型 2001 及 2003 年的分離株屬於 C 基因型。(2)E30 在南台灣於 1993 及 2001 曾爆發大流行，其 VP4 核酸序列分析屬於基因型第五型，1993 與 2001 年所分離之 E30 其 VP4 基因核苷酸差異較大(7-13%)，而 2000 年及 2001 年分離之 E30 病毒株彼此間只有 0-7%的差異。(3) E6 於 2001 年底至 2002 年初發生大流行，分析其 VP4 基因序列與原型株有極大之差異 (22-27%)，而同一流行之 E6 彼此間核酸序列差異則在 3% 以內。(4) CA9 於 1997 年的分離株與 2002 年羅馬分離株 VP4 基因極為接近，差異僅 2-3%；但與美國、日本 1998~2002 年分離株差距則高達 19-27%。(5)1995-1996 及 1999-2000 兩波流行的 CB3 分離株，其 VP4 基因差異不大，在 0-6% 之間，但與原型株則有 24-26% 的差異。(6) 台灣之 CB5 可區分為 2 個基因型，與 Faulkner 原型株核酸序列差異在 18-25%，1995 年以來每年都有分離到 CB5 病毒，於 2002 年底到 2003 年則成為台灣地區腸病毒流行之主要族群。(5)全世界 EV71 分為三個 genotype，1998 年於台灣地區發生大流行之多數流行株屬於 genotype C，少數屬於 genotype B。但自 1999 至 2003 年所分離到之 EV71 則皆為 genotype B。本研究以 VP4 基因序列分析做為腸病毒分型之依據兼具簡單、快速及正確、經濟的特性，並且適合做分子流病分析。台灣地區對腸病毒之監測若能加入 VP4 基因序列分析資料，

將可有效監控本土及境外移入之腸病毒基因的演化，對腸病毒之流行提供正確的預測以便衛生單位儘早提出最有效預防措施。

Abstract

Enterovirus (EV) is a RNA virus. Mutation was often found in enterovirus isolates due to the lack of RNA proof reading. The EVs that can not be typed by FA test had increased since 1999. The NT test is laborious and time consuming. Besides, the NT antibodies are expensive and are running out worldwide. To address the typing of EVs in recent years and to study the molecular epidemiology of EVs in the last two decades, the sequences of the VP4 region were analyzed. The results of pan EV typing were as follows. (1) Six pan EV isolates obtained in 2003 were: 3 strains of CA16 and CB3, respectively. (2) Seventeen pan EV isolates from 2002 were: 11 strains of E6, 2 strains of polio 3 and one each of polio2, E3, EV71 and CA, (3) Forty pan EV isolates obtained in 2001 were 18 strains of E30, 5 strains of CA16, 6 strains of E6, 4 strains of polio 1 and two each of polio 3, CA24, CB4, and one each of polio 2, E3. (4) Twenty-eight pan EV isolates from 2000 were: 16 strains of CA16, 8 strains of EV71 and one each of CA4, CA5, CA9, E30. (5) Three pan EV isolates obtained in 1999 were: 2 strains of CA16 and one strains of EV71. The typing by VP4 nucleotide sequence analysis is precise and rapid. The results of molecular epidemiology were as follow. (1) The CA16 isolates obtained in 2000 clustered in genotype B while the isolates from 2001 and 2003 clustered in genotype C. (2) The E30 isolates from 1993 and 2001 clustered in genotype 5. The nucleotide differences among 1993 and 2001 isolates were 7-13% while 0-7% differences were found among 2000 and 2001 isolates. (3) The E6 isolates from 2001-2002 outbreak had a variation of 22-27% in nucleotide sequence comparing to

that of the prototype while only 3% variation was found among the isolates in the same outbreak . (4) The CA9 isolates in 1997 from Taiwan were similar to that of Rome isolates in 2002 (only 2-3% in nucleotide difference). However, 17-27% nucleotide differences were found among 1997 isolates from Taiwan and the isolates from US and Japan in 1998-2002. (5) The CB3 isolates obtained in 1995-1996 and 1999-2000 showed little nucleotide differences (0-6%) while 24-26% nucleotide differences were found comparing to that of the prototype. (6) There are two genotypes of CB5 in Taiwan. They showed 8-25% nucleotide difference with that of the Faulkner strain, the prototype. CB5 viruses were isolated since 1995 and turned out to be the major isolates in 2002-2003. (7) There are three EV71 genotypes worldwide. In Taiwan, most of the EV71 isolates in 1998 outbreak belonged to genotype C, only a few isolates belonged to genotype B. Intriguingly, all EV71 isolates during 1999-2003 belonged to genotype B. The results of this study revealed that typing and molecular epidemiological study of EV based on the VP4 gene analysis is simple, rapid, precise and cost effective. Information from this study will help the monitoring of the EV gene evolution of either endemic strains or imported strains. In addition, our information will help the Taiwan CDC to announce a precise disease alert and launch the effective prevention and control measures.

計畫內容

一、前言：

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，感染所造成的疾病包括有：呼吸道症狀、手口足病、無菌性腦膜炎、腦膜腦炎、急性肢體麻痺、出血性結膜炎等 (Melnick, 1996)。

腸病毒共有 67 個血清型，以抗原性區分 (Rotbart, 1995) 可將腸病毒區分為 Polioviruses (PV)、Coxsackieviruses A (CA)、Coxsackieviruses B (CB)、Echoviruses (E) 以及 Enterovirus (EV) 68-71。近年來的研究以分子生物學的方法 (Hyypia et al., 1997; Poyry et al., 1996) 可將 EV 分為五個基因型 (1) PV 包括 Poliovirus type 1、2 及 3；(2) EV-A 包含 11 型 Coxsackieviruses A 及 EV71；(3) EV-B 包含所有 Coxsackieviruses B、所有的 Echovirus、EV69 及 CA9；(4) EV-C 包含其他 12 型 Coxsackieviruses A；(5) EV-D 包含 EV68 及 EV70 (Pringle, 1999)。此外 E22 及 E23 歸類為一新的 genus *Parechovirus* 的兩個血清型 (Hyypia et al., 1992; Mayo and Pringle, 1998) (圖一)。

傳統腸病毒的鑑定以中和試驗 (Neutralization test; NT) 為主，但 NT 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，故在臨床上發現許多 EV 無法正確分型。近代分子生物學研究顯示腸病毒之基因結構約有 7500 個鹼基，包含 5' 及 3' non-coding region (NCR) 及單一個 open reading frame (ORF)，其中 5' NCR 及 VP2 基因為高度保留區，常用以作為 RT-PCR 臨床診斷腸病毒標的位置 (Romero, 1999)，但無論 5' NCR 或 VP2 之序列與血清型別均無關聯性 (Oberste et al., 1998)，VP1 為 EV 表面結構蛋白，包含了誘導中和抗體之抗原決定位，分析 VP1 基因發現其序列與血清型有非常密切的關聯 (Valerie Caro et al., 2001)。但是，VP1 基因在同一血清型之分離株因病毒基因差異過大，容易造成誤判。另有研究顯示 VP4 基因亦與血清型有密切關係。吾人認為由於 VP4 之變異性較 VP1 少，因此以 VP4 序列做定型之依據其確定性應優於 VP1 序列 (Ishiko et al., 2002)。並用以取代 NT 及 FA，作為 EV 分型及分子流行病學分析之用 (Heroaki et al., 2002)。

二、材料與方法

(一) 病毒分離株

病毒株為之來源取自高雄醫學大學附設醫院病毒室自 1999~2002 年間所分離出之病毒分離株隨機取 1/5(約 60 株)進行研究。

(二) 細胞與病毒培養及培養基

RD 及 HeLa 兩種細胞株以添加 10% fetal calf serum 之 Hanks' minimum essential medium (HMEM) 作為生長培養基培養，在接種病毒前則換成含 2 % fetal calf serum 的 EMEM 為維持培養基。所分離之腸病毒株，儲存於 -70°C 。細胞及病毒之培養環境為 36°C ，5 % CO_2 。

(三) 病毒活性定量試驗 (50% Tissue Culture Infective Dose ; TCID₅₀)

將 HeLa 細胞株經 0.05% trypsin-EDTA 作用 2 分鐘後，以生長培養基沖散細胞並調整細胞濃度到 $1 \times 10^5/\text{ml}$ ，將細胞培養於 96 孔盤中 (每孔加入 100 μl 細胞)，在細胞八分滿時將生長培養基換成維持培養基。病毒以維持培養基作連續十倍稀釋，然後將 25 μl 各稀釋倍數的病毒稀釋液加

入 96 孔盤中，每個稀釋倍數做 4 個穴孔。同時也做病毒對照組及細胞對照組。放入 36°C，CO₂ 培養箱。每天觀察並記錄 cytopathic effect (CPE) 程度至第五天。以 Reed-Muench 公式算出其 TCID₅₀。

(四) 病毒鑑定

1. 免疫螢光染色 (Immunofluorescence antibody test, IFA)

將病毒接種於 RD 或 HeLa 細胞中，待細胞株被腺病毒感染產生 95% 以上的 CPE 時，將該細胞培養管經磷酸緩衝液清洗三次。將細胞培養管中之細胞刮下，與培養管中之 PBS 混合作成細胞懸浮液，取出 10 μ l 的細胞懸浮液作成抹片，室溫中乾燥，然後再以冰的 Acetone 固定 10 分鐘，取出在室溫中乾燥，以單株抗體進行直接或間接染色。

2. 微量中和試驗 (micro neutralization test, micro NT)

病毒濃度調成 100 TCID₅₀，取 25 μ l 100 TCID₅₀ 的病毒液與腸病毒 antiserum pools (A-H 及 J-P 購自 ATCC，自行調配) 25 μ l (20 U) 在 96 孔盤中混合均勻後，於 37°C 一小時進行中和反應，反應後加入 RD 細胞 (4×10^4 /well)，於 36°C 培養 5 天後判讀，若抗血清能夠抑制腸病毒所造成的細胞病變現象，則此腸病毒即和抗血清屬於同一種血清型

的腸病毒。

(五) 病毒 RNA 之萃取

核酸萃取試劑組 (TRIzol LS Reagent; Invitrogen):

將 multiplicity of infection (m. o. i.) 為 1 到 10 的腸病毒加入培養於 3 ml tube 的 HeLa 或 RD 細胞中培養，待細胞產生 95% 以上 CPE 後用細胞刮勺將細胞刮下，取 250 μ l 細胞液，加入 750 μ l TRIzol 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘，加入 200 μ l chloroform 均勻混合後於室溫作用 10 分鐘； 13000 rpm 離心 10 分鐘，取上清液置於一新的 1.5cc 離心管，再加入 500 μ l 之 Isopropanol，13000 rpm 離心 10 分鐘，丟棄上清液，再加入 1000 μ l 75% 酒精，13000 rpm 離心 15 分鐘，丟棄上清液，待風乾後，加入 50 μ l 滅菌水存於-70°C 備用。

(六) RT-PCR 放大 VP4 基因

1. 引子

Primer	Sequence	Gene
OL68-1	5' GGTA (C/T) TTCCACCACCA (A/T/G/C) CC-3'	VP2
MD91	5' -CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT-3'	5'NCR

2. 反轉錄作用

primer random	1
OL68	1
RNA	20
RT(MMLV)	1
5X buffer	10
d NTP(2.5mM)	10
RNasin	2
H2O	5
<hr/>	
Total	50

37°C 作用 60 分鐘

3. PCR

c DNA	5
primer OL68	0.5
MD91	0.5
Taq Mix	5
DDW	14
<hr/>	
Total	25

94°C, 2 min.

Then 35cycles of : 95°C, 30 sec. ; 55°C 30 sec., ; 72°C,

1 min, followed by holding at 4°C

4. Nested PCR (條件同上)。

(七) VP4 基因之選殖

1. PCR 產物 3' 端補平

10X buffer	5
d NTP(0.5 mM)	5
Klenow enzyme	1
DNA	30
H ₂ O	

50

37°C 作用 2 小時，P/C/I 純化，酒精沉澱

2. Insert 5' 端加磷酸根

DNA	20
T4 kinase	1
10X Buffer	5
ATP(1mM)	4
H ₂ O	20

37°C 作用 2 小時

65°C 作用 5 分鐘，P/C/I 純化，酒精沉澱

3. Ligation

Vector	3 μ l
Insert	1.5 μ l
DDW	3.5 μ l
Buffer	1 μ l
Ligase	1 μ l

總量 10 μ l

14°C，感作 overnight

4. Transformation

- a. 將 Competent cell (*E. coli* Top 10F') 由 -70°C 取出，放在冰上回溫約 10 分。
- b. 解凍取 50 μ l 至新的滅菌過 1.5 ml 的 eppendorf 要溫和的動作。
- c. 加入純化的質體 5 μ l，溫和的邊加邊用 tip 攪拌
- d. 靜置冰上 30 分鐘使其充份感作。

e. 42°C 感作(heat shock) 2 分鐘

f. 冰上 5 分鐘

g. 加入 250 μ l LB，再溫和的移至 50 ml 離心管，37 度振盪培養一個小時

h. Plate out 在含 ampicillin 之 LB plate。

5. Plate out

取 150 μ l，用 L 型玻璃棒，均勻塗於 plate 上

upside down 置於 37°C 培養箱中培養 18 小時左右

(不可超過 20 個小時，不然會有衛星菌)

6. 重組基因之確認(小量質體 DNA 抽取)

取得含重組基因之單一菌落，於 5 ml 的 LB 培養液，隔夜培養，

翌日於無菌操作取菌液 1 ml。

a. 菌液 1 ml to 1.5ml 離心管以 10000 rpm 離心 10 分鐘抽去上

清培養液體加上 100 μ l solution I resuspend and vortex at room temperature for 5 min。

b. 加上 200 μ l solution II 溫和反轉數次(7~8 次)，室溫 5 分鐘。

c. 加上 150 μ l solution III，溫和反轉數次(7~8 次)，呈白色沉澱物 on ice for 5 min 以 13000 rpm 離心 15 分鐘。

d. 收集上清液 (即 plasmid DNA), 置新試管加入等量的 P/C/I 混合至乳糜狀以 13000 rmp 離心, 15 分鐘取上清液 400 μ l 至新管子(*小心勿抽到下層的有機層)。

e. 加入 3M sodium acetate 40 μ l

加入 propanol 400 μ l

放入冰箱 -70°C, 1hr, 以 13000 rmp 離心 30 分鐘

*(小心抽去上清液, 保留白色 pellet)

f. 加入 70% ethanol 1000 μ l (洗去鹽離子), 以 13000 rmp 離心 10 分鐘小心抽去上清液後風乾加入 15 μ l sterile DDW*(小心勿將 DNA 洗掉)

7. Check Insert

-抽取菌中的質體, 使用 *Eco* R I 及 *Hind* III 限制酶切割, 並加入 RNase 加以消化 RNA。

DNA	15 μ l
<i>Eco</i> R I	1 μ l
<i>Hind</i> III	1 μ l
RNase	1 μ l
10X Buffer	2 μ l

總量 20 μ l 37°C, 感作 3 小時

(八) 將選殖成功之菌株定序其 VP4 序列, 定序後之資料以 DNA star

軟體作基因序列及胺基酸序列比對，並作親緣關係及演化速率之分析。

(九) RT-PCR 放大 VP1 基因

1.	引子	Sequence	Gene
	008	GCRTGCAATGAYTTCTCWGT	VP3
	009	NGCNCCDGATTGNTGSCC	2A
	011	GCICCGAYTGITGICCRAA	2A
	050	GTRCTYACIAIIAGRTCYCT	2A
	051	TSAARYTGTGCAARGACAC	VP3
	052	STGYCCAGATTTTCAGTGT	VP3
	053	GGNACNCAYRTNATHHTGGGA	VP3
	054	GCCITRTTITGRTGICCRAA	2A
	055	GGIACICAYRTIRTITGGGA	VP3

2. One-step RT-PCR : 50ul Reactions

RNA	2ul
Primer 1 (20uM)	1ul
Primer 2 (20uM)	1ul
<u>H₂O</u>	<u>16ul</u>
	20ul

mix. heat to 75°C 2min, Cool to 4°C.

10x PCR Buffer	5ul
dNTP (25mM)	5ul
RT (20 μ /ul)	0.5ul
Taq polymerase (5 μ /ul)	0.25ul
RNase Inhibitor	0.25ul (40 μ /ul)
25mM .MgCl ₂	5ul
10mM. DTT	5ul
<u>H₂O</u>	<u>9ul</u>

30ul

Thermocycler conditions : 42°C, 30 min. ; 94°C, 2 min.

Then 35cycles of : 94°C, 1 min. ; 48°C, 1 min. ; 68

°C, 1.5 min, followed by holding at 4°C

3. Run gel and reading the result

以 1.5% agarose gel , 100V 進行洋菜膠體電泳 , 40 分鐘後

取出 , 以 Ethidium bromide 染色 5 分鐘 , 再以清水 destain 5

分鐘 , 進行判讀。

4. PCR 產物之純化

RT-PCR 產物經低熔點膠 elute 後以 PROTECH 公司 DNA

Extraction Kit 純化 DNA, 其餘步驟同(七)

(十) Realtime RT-PCR

1. 聚合酶連鎖反應器 (Roche Molecular Biochemicals
LightCycler)

2. 反轉錄作用

Primer KHEVR1	1
RNA	20
RT(MMLV)	1
5X buffer	10
d NTP(2.5mM)	10
RNasin	2
H2O	6
<hr/>	
Total	50

混合後 37°C 作用 50 分鐘

3. FastStart DNA Master SYBR Green I for LightCycler:

a. Hot Start reaction mix 配置:

於 1.5 反應管，加入

Component	Vol.	Final Conc.
MgCl ₂	2.4ul	4mM
Primer Mix(white cap)	2ul	0.5uM each
FastStart DNA Master SYBR Green I	2ul	1X
H ₂ O, sterile, PCR grade	11.6ul	
Total ^b .	18ul	

- b. 取 18ul master mix 加入 LightCycler 毛細管.
- c. 加入 2ul of the DNA template or sample 至反應管中，蓋上蓋子並以 3000rpm 離心 5sec.
- d. 將反應管放入 LightCycler 機器中。

4. Real time PCR 做腸病毒之分型：

Primer name	Sequence5' -3'
KHEVR1	5' -CCCTGAATGCGGCTAATCC-3'
KHEVF1	5' -ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3'

- a. Denaturation: 95°C for 30sec.
- b. Amplification: 95°C for 0sec, 58°C for 5sec, 72°C for 30sec.
- c. Melting Curve: 95°C for 0sec, 65°C for 15sec, 95°C for 0sec in 0.1°C/sec rate.
- d. Cooling: 40°C for 30 sec.

1. Realtime PCR 進行腸病毒血清分型：

根據本研究所得之病毒 5'NTR、VP4、VP2 基因資料庫選取各血清型腸病毒特異序列設計引子及探針，以進行腸病毒之分型。

(十一) 融合瘤細胞之製備

1、實驗動物：BALB/c 小鼠。

2、免疫計劃：取 6-8 週之 BALB/c 小鼠進行免疫。以 sucrose gradient 純化之 EV 用 1X PBS 稀釋後取 500 μ g 溶液與 Freund' s 完全佐劑 1:1 混合，經三向閥(three-way stopcock)均質化後進行腹腔注射。基礎免疫兩週後，取 500 μ g 溶液(EV 加 1X PBS)與 Freund' s 不完全佐劑 1:1 混合，進行腹腔內注射，此乃第二次補強免疫。在第二次補強免疫後兩週，以斷尾法採血進行抗體分析，並進行第三次補強免疫，以不含佐劑之病毒液行腹腔注射，待 5-7 天後進行骨髓瘤細胞與小鼠脾臟細胞融合。

3、骨髓瘤細胞培養：在小鼠預定進行融合前一週，取出先前保存在液態氮中的骨髓瘤細胞(Myeloma cell, P3-NS-A-Ag4/1, NS-1)，進行細胞解凍。細胞保存瓶由液態氮中取出，迅速置於 37°C 回溫，待細胞接近完全溶解，以 30ml 不含血清之 RPMI 1640 培養液懸浮，離心 600rpm，5 分鐘，然後去上清液，以

10ml 含 15%胎牛血清之 RPMI 1640 培養液懸浮骨瘤細胞，培養於 25cm²細胞培養瓶(25T, cell culture flask)中，置入含 5%CO₂之培養箱進行培養。經 16-24 小時後，待其長滿細胞培養瓶後繼續繼代至 75T 或 175T 細胞培養瓶，並持續以一比一的繼代以保持細胞的生長活性。多餘之 NS-1 細胞將其離心後，加入含 10% DMSO 之胎牛血清中以緩慢降溫方式冷凍至液態氮中。

4、細胞融合：經病毒免疫之小鼠以酒精棉消毒胸、腹部，以 24G 針頭行心臟採血，血液靜置後收集血清進行抗體分析。利用頸椎脫離法犧牲老鼠後，以酒精、碘酒擦拭胸、腹部後置於無菌操作台。使用無菌器械脫去皮毛，再以另一套器械剪開肌肉打開腹腔。小心鈍剝取出脾臟，置於不含血清之 RPMI 1640 培養液之無菌培養皿，並以 10ml 注射器抽吸 RPMI 1640 培養液，並重複將 RPMI 1640 培養液注入小鼠脾臟，將脾臟細胞沖出。處理好的脾臟細胞離心 800rpm，5 分鐘。棄除上清液，再重複上述動作一次，將雜質去除。將活性良好的骨髓瘤細胞自培養瓶拍下。離心 800rpm，5 分鐘，去上清液，加入不含血清之 RPMI 1640 培養液懸浮，此動作共重複上述步驟兩次。取二支 175T 大角瓶量之骨髓瘤細胞及兩隻處理好

的小鼠脾臟細胞混合，離心 800rpm，5 分鐘，棄除上清液，此動作重複一次。將離心下來的細胞敲鬆，在 60 秒內加入 37°C 預熱之 1ml PEG 1400，同時保持在 37°C 中並搖晃均勻。繼續在 37°C 水浴中搖晃 90 秒，接著在 30 秒內加入 1ml 不含血清之 RPMI 1640。30 秒內加入 3ml 不含血清之 RPMI 1640。60 秒內加入 16ml 不含血清之 RPMI 1640。最後緩慢地以不含血清之 RPMI 1640 培養液加至 5ml，靜置 5 分鐘。而後離心 600rpm，5 分鐘，棄除上清液，以 150ml HAT 培養液懸浮融合瘤細胞，並加至 96 孔微量培養盤上(Microwell-plate)進行融合瘤細胞培養。

5、融合瘤細胞的培養：經融合完成之細胞各滴兩滴(約 100 μ l)

懸浮液在 96 孔微量培養基內，共十盤。隔日觀察有無污染並固定取一盤作為觀察用，其他的培養基則儘量不去移動，5-7 天後視情況換液。另取未經融合之骨髓瘤細胞培養於本次使用之 HAT 培養液中，作為陰性對照組。融合瘤細胞培養 7-10 日後，視其培養液之酸鹼度換液。換液時抽出 80-100 μ l，以不超過原體積之二分之一為原則，再加入新的含有 HAT 及血清之 RPMI 1640 培養液。第一次換液後 2-3 天視培養液之酸鹼度進行第二次換液。換液進行三次後始進行抗

EV 單株抗體之篩選。

6、融合瘤之篩選：進一步進行分析融合瘤細胞是否具有對抗

EV 的抗體產生即為融合瘤篩選(screening)。所用方法如

下：酵素免疫連結吸附試驗

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ; ELISA)

免疫墨點反應(Immuno-dot assay)

西方墨漬反應(Western blot)

7、融合瘤細胞單株化：融合瘤單株化係利用極限稀釋法進行。

確定 96 孔微量培養基中具分泌抗 EV 單株抗體的融合瘤細胞

株，以 1000P tip 懸浮細胞，取 100 μ l 至另一 96 孔微量培

軌基的第一個孔，以兩倍稀釋的方式稀釋至最後一個孔，再

以 12 爪之 pipette 由第一行列連續兩倍稀釋至第八列。最後

各加入 100 μ l 之小鼠脾臟細胞或巨噬細胞做為伴飼細胞

(feeder cell)，10-14 天觀察有無單株化形成。

(十二) 單株抗體之生產及純化：

1、腹水之生產：取 12-15 週齡 BLAB/C 小鼠腹腔注射 pristane

0.5ml，7-10 日後，取 4×10^6 /ml 單株化完成之融合瘤細胞，

行腹腔注射 0.5ml 至小鼠，待 2-3 週後小鼠腹部膨大產生腹

水，隨即利用無面注射器將腹水抽出。經離心 4500rpm，10

分鐘，取上清液，分裝至 1.5ml eppendorf 置-20°C 備用。

2、飽和硫酸銨純化抗體

Protein G 親和性管柱(Protein G Affinity column)純化抗體

(十三) 單株抗體分析：

1. 單株抗體亞型分析(isotyping)

用 Mouse-hybridoma subtyping Kit (Boehringer Mannheim) 方式進行分析。取已 coating 好的全病毒蛋白及 block 完全之免疫測試盤，加入稀釋 500 倍之腹水，行 37°C 感作 30 分鐘，經 washing buffer (KPL) 洗五次後，分別加入有過氧化酶酵素抗鼠源各亞型 (peroxidase 標示兔抗鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgA、IgM 亞型 IgG) 及兩輕鏈 (κ 、 λ) 之二抗，經 37°C 感作 30 分鐘，洗五次後加入 ABTs，於 37°C 下呈色 30 分鐘，以肉眼判讀。

2. 競爭性酵素連結免疫吸附試驗 (Competitive ELISA)

採用 Kimura-kuroda & Yasui (1983) 之方法進行。Coating 全病毒蛋白之免疫測試盤與 HRP-Mabs 在 ELISA 反應中 OD₄₀₅ 值約為 2.0 之稀釋倍數，取其二分之一稀釋倍數，體積 50 μ l。未標定氧化酶之單株抗體 (unlabeled-Mab) 做為競爭者 (competitor) 先行稀釋成 200ng/ μ l 後，以連續 2 倍稀釋至 15.6ng/ μ l 後，各取 50 μ l 之 HRP-Mabs 及 50 μ l 競爭者單株抗體混合後，加入 100 μ l ABTs，37°C 感作 30 分鐘後，加入 100 μ l ABTs stop solution，以 ELISA reader 在波長 405 下測其吸光值，並依下列公式計算其競爭性：

$$\text{Competition (\%)} = \frac{(A-n)}{(A-B)} \times 100\%$$

A：HRP-Mab 單獨感作之 OD₄₀₅

B：HRP-Mab 與同源性競爭者一同感作之 OD₄₀₅

3. 單株抗體與腸病毒蛋白交互反應 (Cross reaction)

製備各血清型腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液。每 30cm² 細胞加入 1ml 之 coating buffer 經冰凍刮下懸浮後細胞萃出液離心 (Model Biofuge fresco ; Heraeus) 1200rpm, 4°C 20 分鐘; 取上清液製成病毒蛋白細胞萃出液。利用小鼠抗表現蛋抗體 (polyclonal antibody) 以 coating buffer 稀釋 1000 後塗鍍 100 μ l 在免疫測試盤上, 4°C 隔夜感作。隔日並以 5% 脫脂奶粉 4°C 隔夜 blocking 感作。加入腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液 100 μ l, 37°C 感作 30 分鐘, 以 washing buffer 洗 5 次, 加入 250 倍稀釋之鼠抗病毒蛋白抗體作為陽性對照組, 37°C 感作 30 分鐘後, 洗五次, 加入 100 倍稀釋隻 HRP-標示之山羊抗老鼠 IgG 100 μ l, 37°C 感作 30 分鐘, 洗五次, 加入 100 μ l ABTs, 37°C 感作 30 分鐘後, 加入 ABTs stop solution 100 μ l, 以 ELISA reader 在波長 405nm 下測其吸光值進行分析。實驗組同樣取利用小鼠抗重組 EV 之多價抗體塗鍍 blocking 完全之免疫測試盤, 加入腸病毒病毒株之病毒蛋白細胞萃出液 100 μ l, 37°C 感作 30 分鐘後。另取 2000 倍稀釋之 HRP-MAb, 行 37°C 感作 30 分鐘, 經 washing buffer 洗 5 次後, 加入 100 μ l ABTs, 37°C 感作 30 分鐘, 再經 washing buffer 洗 5 次後, 加入 ABTs stop solution 100 μ l, 以 ELISA

reader 在波長 405nm 下測其吸光值進行分析。兩者之值依下

列公式換算成親和性百分比；

各血清型 EVOD405—未感染病毒細

胞 OD405

Cross reactivity% =

用以製備 mAb 之 EVOD405—

結果

定序分析 1999~2003 年間無法以螢光抗體及中和試驗分型的 NPEV 之 VP4 基因，2003 年 NPEV 定序分析 6 株，結果 CA16 為 3 株、E9 有 1 株及 CB3 有 3 株；2002 年 NPEV 定序分析 26 株，結果 E6 有 11 株、Polio3 有 2 株、Polio2、E3、EV71 各 1 株，此外有三株；在 2001 年分析 45 株 NPEV，其中含有 18 株 E30、CA16 有 5 株、E6 有 6 株 Polio1 有 4 株、Polio3、CA24 各 2 株及 CB4, Polio2, E3 皆 1 株；2000 年 NPEV 中取 29 株做分析，結果為 16 株 CA16，EV71 有 8 株，CA4、CA5、CA9、E30 各 1 株；分析 1999 年 3 株 NPEV，結果分別為 2 株 CA16 和 1 株 EV71。(表一)

CA16 於 1999、2000、2001 及 2003 年皆為流行之主要型別，可區分為三個基因型。2000 年爆發以 B 型為主 2001 及 2003 年爆發之 CA16 則以 C 型為主 (圖二)。台灣地區野外分離之 CA16 與原形株差異在 19.9-23.3% 之間，兩群台灣地區分離株基因型之間差異約在 10% 左右 (圖三)，CA16 不同於其他腸病毒每隔幾年才會流行一次，可能與多種不同型之腸病毒存在台灣有關。

E30 在南台灣於 1993 及 2001 曾爆發大流行，其 VP4 核酸序列與原型株比對結果有 15.9-25% 的差異 (圖三)，屬於基因型第五型，2001 年本研究室所分離之皆無法以 E30 螢光抗體鑑定其血清型，反而會與 E4 之螢光抗體產生交叉反應。1993 年所分離到之 E30 與 2001

年所分離之 E30 其 VP4 基因差異在 6.8-12.7%，而 2000 年及 2001 年分離之 E30 病毒株彼此間有 0-7.1% 之間的核苷酸差異，可見 E30 是一變異極大之病毒株（圖五）。

ECHO6 於 2001 年底至 2002 年初發生大流行（圖六），分析 E6 之 VP4 基因序列與原型株有極大之差異（22.1-27.2%），而本次流行之 E6 彼此間核酸序列差異則在 3% 以內十分接近（圖七）。在 2000-2001 年本研究室亦分離到 11 株無法以螢光抗體分型之 E6 病毒株，此一抗原性改變而無法以螢光抗體鑑定病毒株有待進一步分析其抗原性改變之原因。

南台灣地區於 1997 年爆發一波 CA9 的流行，分析其 VP4 基因結果顯示，在不同地區（台灣、日本、美國、羅馬）分離到之 CA9 差異極大（圖八），台灣地區 1997 年分離株與羅馬 2002 年分離株 VP4 基因極為接近，差異僅 2-3%；但與美國、日本地區分離之 CA9 差距則高達 19-27.2% 之間（圖九）。分析在南台灣 1995-1996 及 1999-2000 兩波 CB3 之流行顯示其 VP4 基因差異不大在 0-6.2% 之間，但與原形株則有 23.5-26.3% 的差距（圖十、十一）。

本研究室自 1993-2003 年所分離之 CB-5 及原型株 Faulkner，分析其 VP4 核酸序列結果顯示，台灣地區所分離之 CB5 可區分為 2 個基因型（圖十二），與 Faulkner 採核酸序列差異在 17.6-25.2%（圖十

三)，1995 年以來每年都有分離到 CB5 病毒，於 2002 年底到 2003 年則成初為台灣地區腸病毒流行之主要族群，CB5 之基因型別與臨床症狀並無相關性。

EV71 分為三個 genotype，分析本研究室所分離 EV71 結果顯示 1999 至 2002 年所分離病毒株基因型屬 Genotype B (圖十四)，其彼此間核酸序列的差異極小 (0-5.1%)，但與 Genotype A 有 17.2-19.4% 的差異，與 Genotype C 則有 20.4-23.9% 的差異，而與 1986 年 genotype B 分離株基因序列有 9.5-11.8% (圖十五)。EV71 於 1998 年於台灣地區發生大流行，本研究室曾撰文發表研究結果指出當時之主要流行族群為 Genotype C，但 Genotype B 亦可分離到。自 1999 至 2003 年所分離到之 EV71 則皆為 genotype B，EV71 病毒在 2003 年分離到 1 株，2001 至 2003 皆僅零星發生，可能與群體免疫有關，EV71 為腸病毒重症之主要原因，各合約實驗室分離到 EV71 應特別注意其基因型別，防止 genotype C 之 EV71 引發大規模流行。

討論

以 VP4 基因序列分析做為腸病毒分型之依據兼具簡單、經濟、快速及正確的特性，要放大 67 血清型腸病毒 VP1 基因需要 5 對以上的引子對，但只需單一引子 (OL68-1/MD91) 對就可放大所有腸病毒之 VP4 基因。雖然與血清型箱關之抗原決定位在 VP1 蛋白上而非 VP4 蛋白，但 VP1 基因變異過大反而於分析分型時造成干擾，但 VP4 基因與腸病毒血清型仍有絕對之關聯性，並可以運用臨床之分型。

比對 E30 及 EV71 兩種血清型之腸病毒之 VP4 及 VP1 基因結果顯示，以此二基因所做的分群結果並無太大差別，因此無論以 VP4 或 VP1 基因序列做為腸病毒分子流行病學的分析結果相當接近。雖然 VP1 基因變異較大，於分子流行病學的分析上有其較高的敏感性，但以 VP4 基因做為分子流行病學依據時，反而具有較明確之親緣關係分群，適合做為長時間分子流病分析。

腸病毒之流行通常於一次大規模流行後，造成群體免疫，必須間隔一段時期才會再度爆發相同的血清型，在南台灣 ECHO30 於 1993 年爆發後於 2001 年才又再度爆發流行。CB3 於 1995-1996 流行後於 2000 年才又再度發生，分析此二種病毒於不同流行年代分離株之 VP4 基因序列發現。另一種流行模式則為不同基因型同時存在於台灣，以

EV71 為例，1998 年爆發大規模感染後，1999-2000 年亦可分離到極多之 EV71，於基因序列分析可發現，1998 年與 1999-2000 年所分離到之 EV71 為不同基因型，可能其抗原性有差異，其交叉保護力不足以防止 1999 年這波 EV71 的流行。2001 年後 EV71 於南台灣僅有零星發生，分析其 VP4 基因序列顯示與 1999-2000 分離株屬同一基因型且相當接近，故無法造成大規模流行。CB5 於南台灣 1993、1995、1996、1997、1998 及 2002 年都爆發流行；CA16 於 1999、2000、2001 及 2003 年皆佔及高之分離比例，分析其 VP4 基因皆可顯示於南台灣皆同時存在不同基因型之病毒株，於不同年代交替流行，因而無法顯現群體免疫之效應。

在台灣腸病毒之流行相當複雜，雖然年底的小波流行出現的病毒株可能會是次一年流行之主流，但此一小波流行可能同時分離倒數種血清型腸病毒，台灣地區對腸病毒之監測若能加入基因序列分析之結果，監控腸病毒基因的演化，或是境外不同抗原性腸病毒之移入，以期能做最正確的預測及最有效之防治。

參考文獻

- Azar R, Varsano N, Mileguir F, Mendelson E: Molecular epidemiology of adenovirus type 7 in Israel: identification of two new genome types, Ad7k and Ad7d2. *J Med Virol* 54 (4): 291-9, 1998
- Beby-Defaux A, Maille L, Chabot S, Nassimi A, Oriot D, Agius G. Fatal adenovirus type 7b infection in a child with Smith-Lemliopitz syndrome. *J Medical Virology Methods* 65:66-69, 2001
- Gjoen, K., Bruu, A. L. &Orstavik, I.(1996). Intratypic genome variability of echovirus type 30 in part of the VP4/VP2 coding region. *Archives of Virology* 141, 901-908.
- 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.
- Hyypia, T., Hovi, T., Knowles, N. J. & Stanway, G. (1997). Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *Journal of General Virology* 78, 1-11.
- Jean-Luc Bailly, Aline Beguet, Martine Chambon, Cecile Henquell, Helene Peigye-Lafeuille (2000) Nosocomial transmission of echovirus 30: molecular evidence by phylogentic analysis of the VP1 encoding sequence. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 2889-2892.
- Melnicj, J. L., Rennick, V., Hampil, B., Schmidt, N. J. & Ho, H. H. (1973). Lyophilized combination pools of enterovirus equinr antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 48, 263-268.

P.-Y. Chu, K.-H. Lin, K.-P. Hwang, L.-C. Chou, C.-F. Wang, S.-R. Shih, J.-R. Wang, Y. Shimada, and H. Ishiko (2001) Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Taiwan. *Archives of Virology* 146, 589-600.

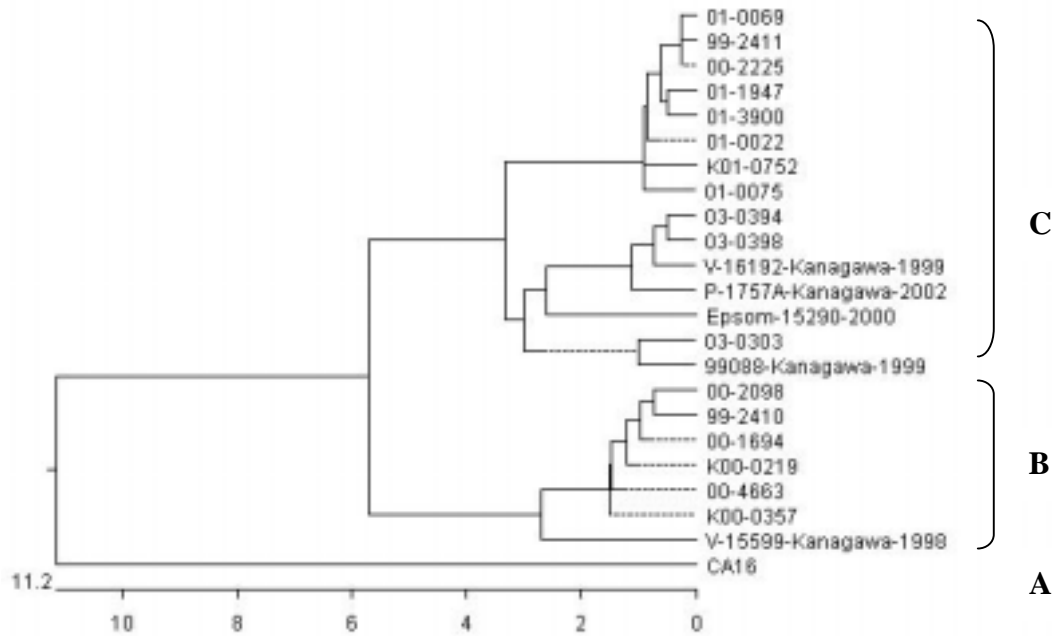
Saitoh-Inagawa W, Oshima A, Aoki K, Itoh N, Isobe K, Uchio E, Ohno S, Nakajima H, Hata K, Ishiko H: Rapid Diagnosis of Adenoviral Conjunctivitis by PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J Clin Microbiol* 34 (9): 2113-6, 1996

Tai FH, Grayston JY, Johnston PB and Woolridge RL: Adenovirus infections in Chinese army recruits on Taiwan. *J Infect Dis* 107: 160-4, 1960

Wadell G, Allard A, Hierholzer JC: Adenovirus .In: *Manual of Clinical Microbiology*. Chapter 76: 970-982, 2000



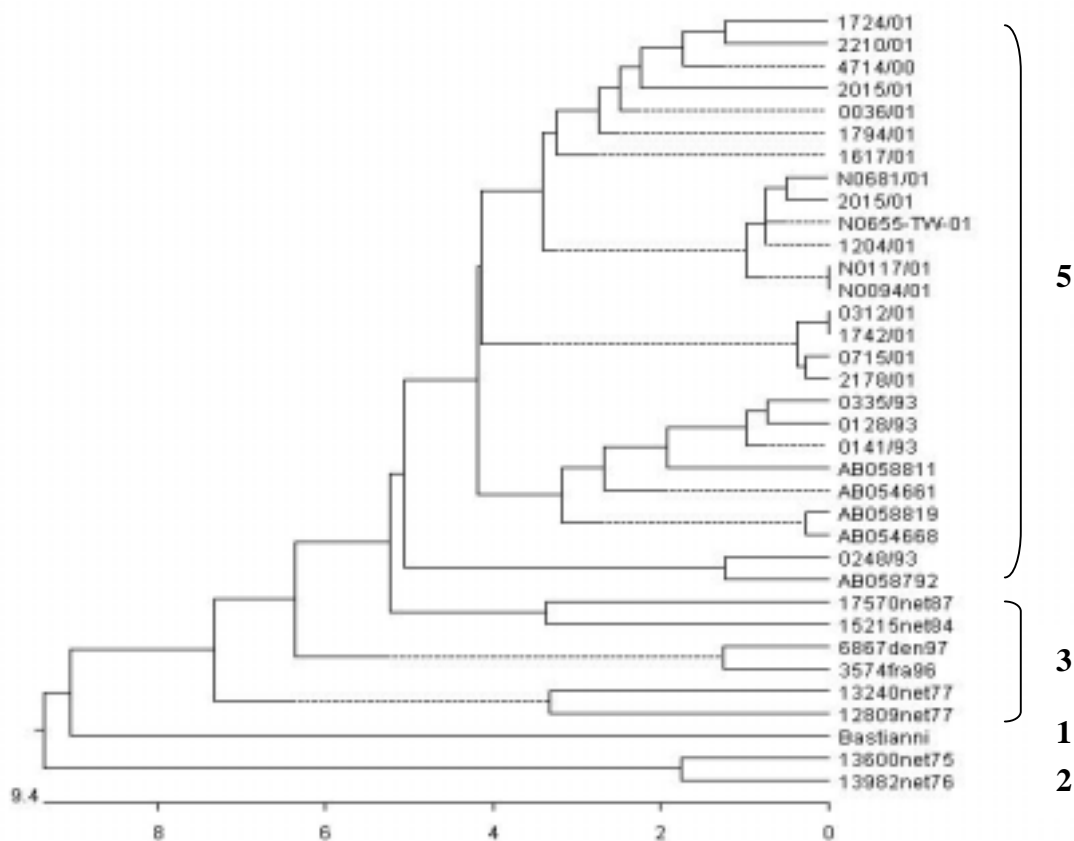
圖一、腸病毒 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。



圖二、CA16 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

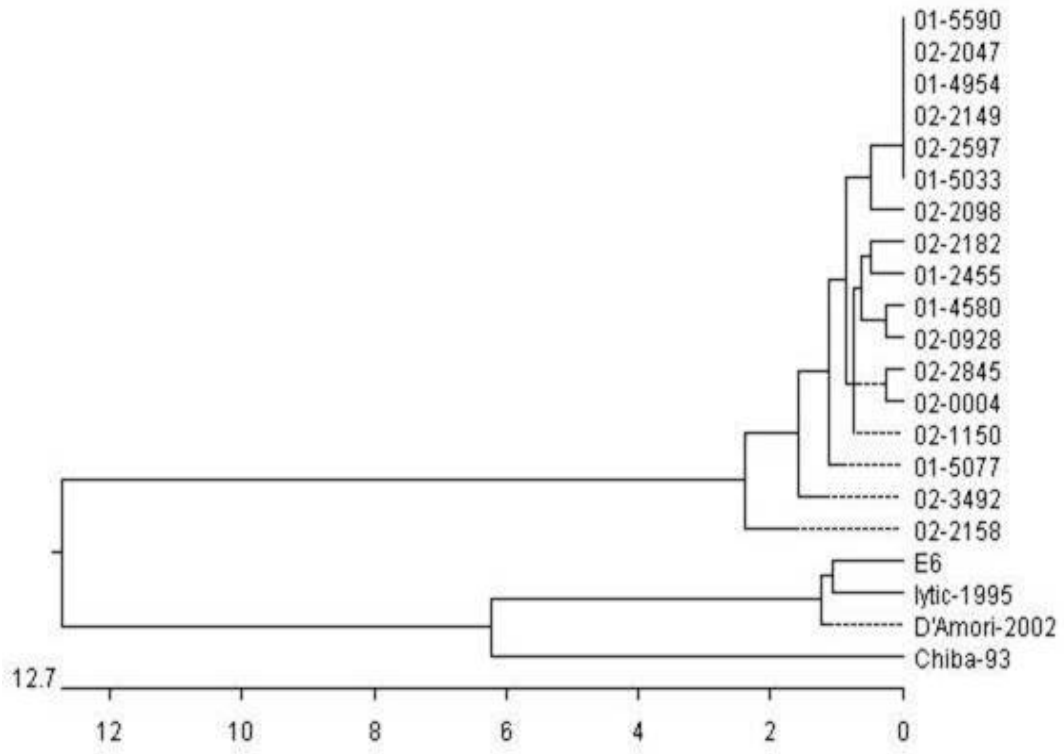
Percent Identity																						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
CA16	81.2	79.7	80.2	80.7	80.7	80.7	80.2	80.7	81.2	81.2	81.2	82.1	80.7	80.7	80.7	79.7	80.7	80.7	81.2	80.2	81.2	1
V-15599-1998	21.3	95.7	96.6	98.1	95.7	94.7	95.7	91.8	92.3	92.8	92.3	91.3	91.8	92.8	92.3	89.9	90.8	91.3	90.3	91.3	90.3	2
99-2410	22.6	4.5	99.0	99.5	99.0	98.6	99.0	98.9	89.4	89.9	89.4	89.4	88.9	88.9	89.4	87.9	89.4	89.9	88.9	89.4	88.9	3
K00-0219	22.6	3.5	1.0	99.5	99.0	98.6	99.0	89.4	89.9	90.3	89.9	89.9	89.4	89.4	89.9	88.4	89.4	89.9	88.9	89.9	89.9	4
K00-0357	21.9	4.0	0.5	0.5	99.5	99.0	98.5	99.9	90.3	90.8	90.3	90.3	88.9	88.9	90.3	88.9	89.9	90.3	89.4	90.3	89.4	5
00-1694	21.9	4.5	1.0	1.0	0.5	98.6	99.0	89.4	89.9	90.3	89.9	89.9	89.4	89.4	89.9	88.4	89.4	89.9	88.9	89.9	89.9	6
00-2090	21.9	5.1	1.5	1.5	1.0	1.5	98.6	88.4	88.9	89.4	88.9	89.4	88.4	88.4	88.9	87.4	88.4	88.9	87.9	88.9	87.9	7
00-4683	22.6	4.5	1.0	1.0	0.5	1.0	1.5	99.4	89.9	90.3	89.9	89.9	89.4	89.4	90.8	88.4	89.4	89.9	88.9	89.9	88.9	8
99-2411	21.9	9.0	11.9	11.9	11.3	11.9	12.5	11.9	99.5	99.0	99.5	98.6	99.0	98.1	98.6	94.2	93.7	94.7	93.7	94.7	93.7	9
00-2225	21.3	8.4	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	11.3	0.5	99.5	100.0	99.0	99.5	98.6	99.0	94.7	94.2	95.2	94.2	95.2	94.2	10
01-0022	21.3	7.8	10.7	10.7	10.1	10.7	11.3	10.7	1.0	0.5	99.5	98.6	99.0	98.1	98.6	94.2	93.7	94.7	93.7	95.7	93.7	11
01-0089	21.3	8.4	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	11.3	0.5	0.0	0.5	99.0	99.5	98.6	99.0	94.7	94.2	95.2	94.2	95.2	94.2	12
01-0075	19.9	9.6	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	11.3	1.5	1.0	1.5	1.0	98.6	97.6	98.1	93.7	93.2	94.2	93.2	94.2	93.2	13
01-1947	21.9	9.0	11.9	11.9	11.3	11.9	12.5	11.9	1.0	0.5	1.0	0.5	1.5	99.0	98.6	95.2	93.7	94.7	93.7	94.7	93.7	14
01-3900	21.9	7.8	11.9	11.9	11.3	11.9	12.5	11.9	2.0	1.5	2.0	1.5	2.5	1.0	97.6	94.2	92.8	93.7	92.8	93.7	92.8	15
K01-0752	21.9	8.4	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	10.1	1.5	1.0	1.5	1.0	2.0	1.5	2.5	93.7	93.2	94.2	93.2	95.2	93.2	16
Epsom15290-2000	23.3	11.3	13.2	13.2	12.6	13.2	13.7	13.2	6.2	5.6	6.2	5.6	6.7	5.1	6.2	6.7	95.2	95.7	94.7	95.7	93.7	17
P-1757A-2002	21.9	10.1	11.9	11.9	11.3	11.9	12.4	11.9	6.7	6.1	6.7	6.1	7.2	6.7	7.8	7.2	5.1	98.6	97.6	94.7	96.6	18
V-16192-1999	21.9	9.6	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	11.3	5.6	5.1	5.6	5.1	6.2	5.6	6.7	6.2	4.5	1.5	99.0	96.1	96.1	19
03-0394	21.3	10.7	12.6	12.6	11.9	12.6	13.1	12.6	6.7	6.2	6.7	6.2	7.3	6.7	7.8	7.3	5.6	2.5	1.0	95.2	99.0	20
03-0303	22.6	9.6	11.3	11.3	10.7	11.3	11.9	11.3	5.6	5.1	4.5	5.1	6.2	5.6	6.7	5.1	4.5	5.6	4.0	5.1	94.2	21
03-0398	21.3	10.7	12.6	12.6	11.9	12.6	13.1	12.6	6.7	6.2	6.7	6.2	7.3	6.7	7.8	7.3	6.7	3.5	2.0	1.0	6.2	22

圖三、CA16 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



圖四、ECHO30 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

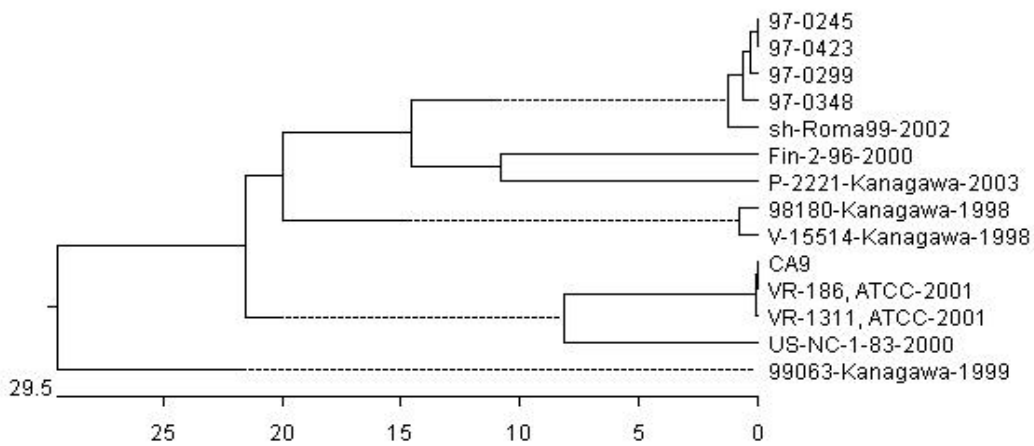
圖五、ECHO30 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



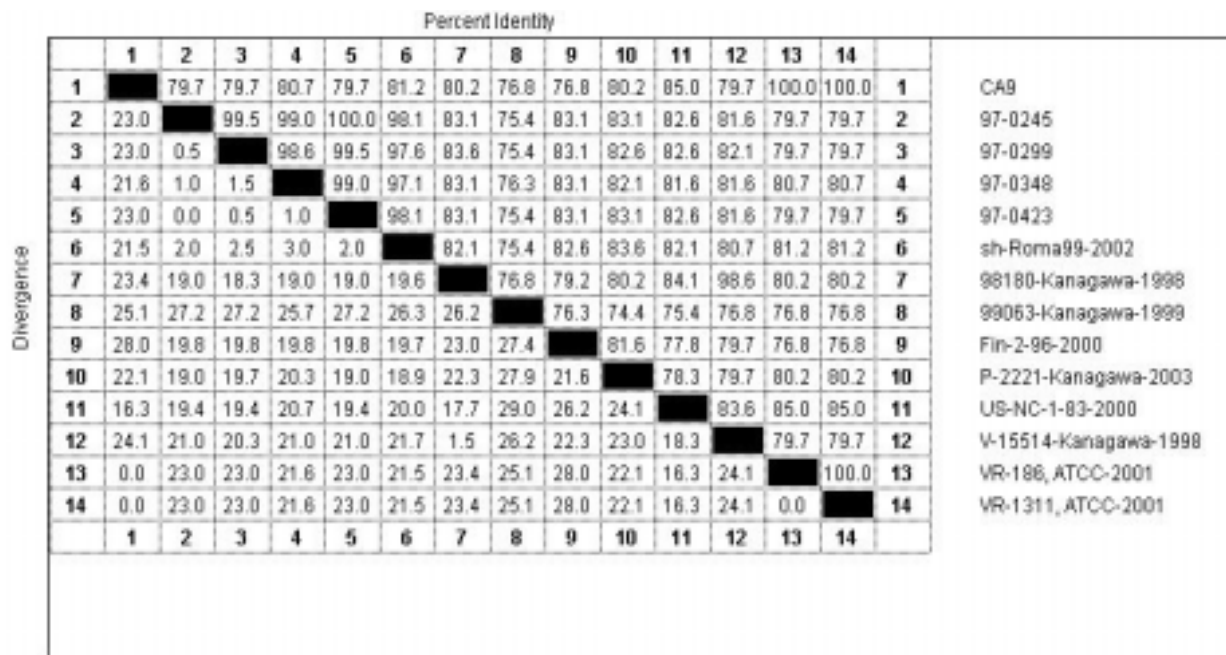
圖六、ECHO6 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

		Percentage																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Divergence	1	■	88.8	100.0	98.6	78.3	88.2	76.8	78.3	77.8	77.8	78.3	77.8	77.8	78.3	77.8	78.3	77.8	78.3	78.3	78.3	77.3	1	E6
	2	11.1	■	89.8	87.9	78.7	78.7	78.3	78.7	78.3	78.3	78.7	79.2	78.3	78.7	79.2	78.7	77.8	78.7	78.7	78.7	78.7	2	Chiba-93
	3	8.8	11.1	■	90.6	78.3	88.2	76.8	78.3	77.8	77.8	78.3	77.8	77.8	78.3	77.8	78.3	77.8	78.3	78.3	78.3	77.3	3	D'Amon-2002
	4	1.5	12.8	1.5	■	76.8	78.7	76.3	76.8	76.3	76.8	76.3	76.8	76.3	76.8	76.3	76.8	76.3	76.8	76.8	76.8	75.8	4	Mo-1995
	5	24.9	24.4	24.9	27.2	■	87.6	98.1	100.0	98.6	98.0	100.0	99.0	99.0	100.0	99.0	100.0	99.0	98.5	100.0	99.5	98.6	5	01-5033
	6	22.1	22.8	22.1	24.2	2.5	■	95.6	97.6	98.1	98.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	98.1	97.6	98.1	97.1	6	02-2108
	7	27.2	25.1	27.2	27.9	2.0	3.5	■	98.1	97.6	97.1	98.1	99.0	99.0	98.1	98.1	98.1	98.1	98.6	98.1	98.6	98.6	7	03-2182
	8	24.9	24.4	24.9	27.2	8.0	2.5	2.0	■	98.6	98.0	100.0	99.0	99.0	100.0	99.0	100.0	99.0	98.5	100.0	99.5	98.6	8	02-2997
	9	24.9	24.4	24.9	27.2	1.5	2.0	2.5	1.5	■	97.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.1	9	03-3492
	10	25.6	25.0	25.6	27.8	1.0	3.5	3.0	1.0	2.5	■	99.0	98.1	98.1	98.0	98.1	99.0	98.1	98.6	99.0	98.6	97.6	10	02-2098
	11	24.9	24.4	24.9	27.2	8.0	2.5	2.0	0.0	1.5	1.0	■	99.0	99.0	100.0	99.0	100.0	99.0	98.5	100.0	99.5	98.6	11	02-2149
	12	25.7	23.8	25.7	27.9	1.0	2.5	1.0	1.0	1.5	2.0	1.0	■	99.0	98.0	99.0	99.0	99.0	98.5	99.0	99.5	99.5	12	01-4580
	13	25.7	25.1	25.7	27.9	1.0	2.5	1.0	1.0	1.5	2.0	1.0	1.0	■	99.0	99.0	99.0	99.0	98.5	99.0	99.5	98.6	13	01-2405
	14	24.9	24.4	24.9	27.2	8.0	2.5	2.0	0.0	1.5	1.0	0.0	1.0	1.0	■	99.0	100.0	99.0	98.5	100.0	99.5	98.6	14	01-4954
	15	25.7	23.8	25.7	27.9	1.0	2.5	2.0	1.0	1.5	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	■	99.0	98.6	98.5	99.0	99.5	98.6	15	01-5077
	16	24.9	24.4	24.9	27.2	8.0	2.5	2.0	0.0	1.5	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	■	99.0	98.5	100.0	99.5	98.6	16	01-5590
	17	25.7	25.1	25.7	27.9	1.0	2.5	2.0	1.0	1.5	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	■	98.5	99.0	99.5	98.6	17	02-2845
	18	24.9	24.4	24.9	27.2	8.5	2.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	■	99.5	100.0	99.0	18	02-0004
	19	24.9	24.4	24.9	27.2	8.0	2.5	2.0	0.0	1.5	1.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	0.0	1.0	0.5	■	99.5	98.6	19	02-2047
	20	24.9	24.4	24.9	27.2	8.5	2.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	■	99.0	20	02-1150
	21	26.4	23.8	26.4	28.7	1.5	3.0	1.5	1.5	2.0	2.5	1.5	0.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0	1.5	1.0	■	21

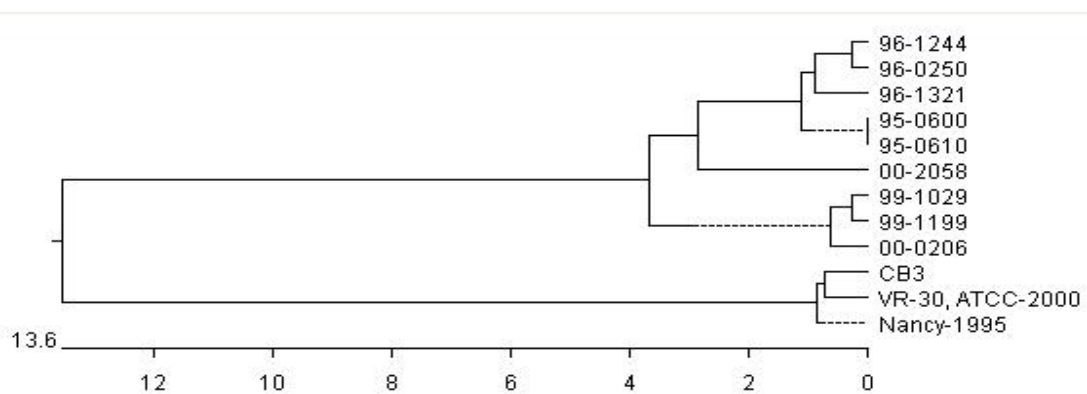
圖七、ECHO6 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



圖八、CA9 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。



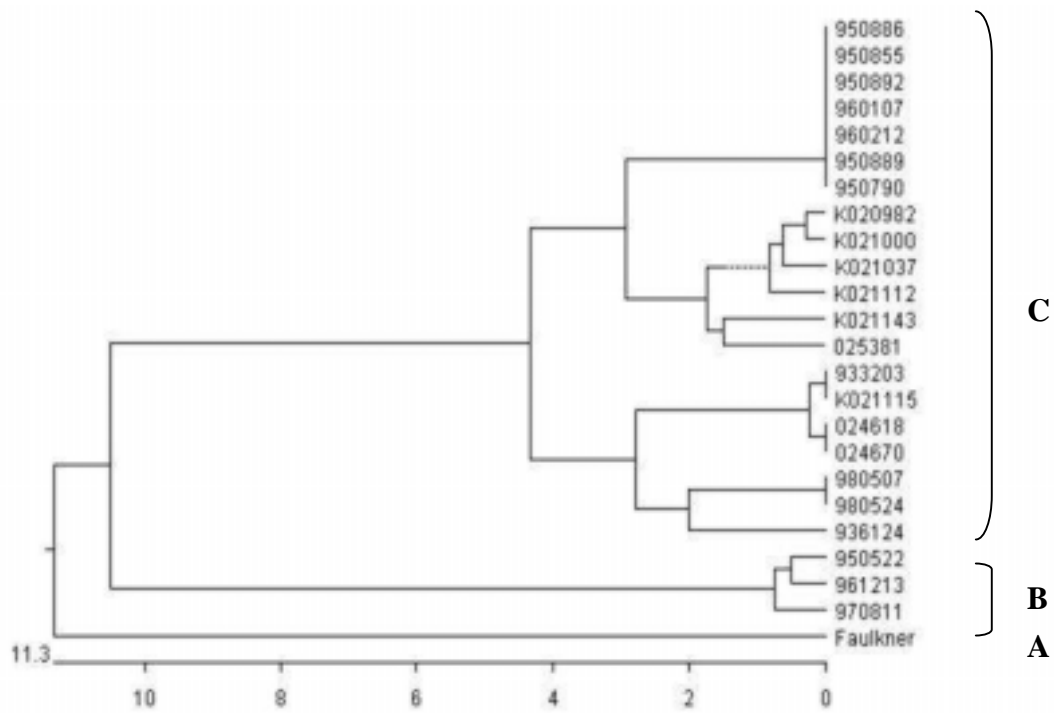
圖九、CA9 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



圖十、CB3 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

		Percent Identity													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Divergence	1	■	78.3	75.4	78.7	78.3	77.3	77.3	76.3	76.3	76.8	100.0	99.0	1	CB3
	2	24.1	■	95.2	99.0	98.6	95.7	95.7	94.7	95.7	96.1	78.3	77.3	2	00-0206
	3	27.1	4.5	■	96.1	95.7	94.7	94.7	93.7	94.7	95.2	75.4	74.4	3	00-2058
	4	23.4	1.0	3.5	■	99.5	95.7	95.7	94.7	95.7	96.1	78.7	77.8	4	99-1029
	5	24.0	1.5	4.0	0.5	■	95.2	95.2	93.7	95.2	95.7	78.3	77.3	5	99-1199
	6	24.8	4.5	5.1	4.5	5.1	■	100.0	98.1	99.0	99.5	77.3	75.8	6	95-0600
	7	24.8	4.5	5.1	4.5	5.1	0.0	■	98.1	99.0	99.5	77.3	75.8	7	95-0610
	8	26.3	5.6	6.2	5.6	6.1	2.0	2.0	■	98.1	98.6	76.3	74.9	8	96-1321
	9	26.3	4.5	5.1	4.5	5.1	1.0	1.0	2.0	■	99.5	76.3	74.9	9	96-1244
	10	25.6	4.0	4.5	4.0	4.5	0.5	0.5	1.5	0.5	■	78.8	75.4	10	96-0250
	11	0.0	24.1	27.1	23.4	24.0	24.8	24.8	26.3	26.3	25.6	■	99.0	11	Nancy-1995
	12	1.0	25.6	28.6	24.8	25.5	26.3	26.3	27.8	27.8	27.1	1.0	■	12	VR-30, ATCC-2000
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

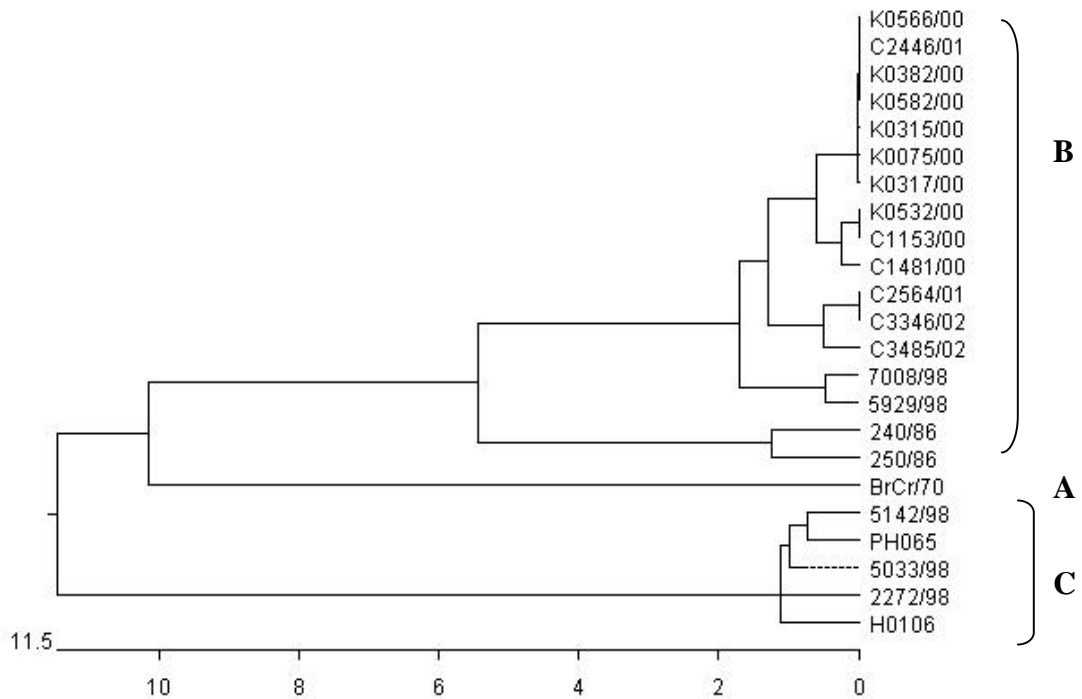
圖十一、CB3 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



圖十二、CB5 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

Percent Identity																									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24		
78.7	78.7	79.2	83.6	83.6	79.7	79.7	84.1	84.1	83.6	81.2	81.2	81.2	81.2	80.2	79.2	79.7	80.2	80.2	81.2	81.2	81.2	81.2	78.3	1	Faulkner
25.2	99.0	99.0	81.2	80.7	76.3	76.3	81.2	81.2	81.2	83.1	83.1	83.1	83.1	81.2	80.7	81.2	81.6	81.6	83.1	83.1	83.1	83.1	83.1	2	950522
23.7	1.0	98.1	81.2	80.7	76.3	76.3	81.2	81.2	81.2	83.1	83.1	83.1	83.1	80.2	79.7	80.2	80.7	80.7	83.1	83.1	83.1	83.1	82.1	3	981213
24.5	1.0	2.0	81.2	80.7	76.8	76.8	81.2	81.2	81.2	83.1	83.1	83.1	83.1	81.2	80.2	81.6	81.6	81.6	83.1	83.1	83.1	83.1	82.1	4	970811
18.2	21.7	21.7	21.7	98.1	88.9	88.9	99.5	99.5	100.0	94.2	94.2	94.2	94.2	90.8	80.3	89.9	91.8	91.8	94.2	94.2	94.2	90.8	5	933203	
18.2	22.3	22.3	22.3	4.8	93.7	93.7	86.8	86.8	96.1	93.7	93.7	93.7	93.7	82.3	81.8	91.3	93.2	93.2	93.7	93.7	93.7	93.7	93.7	6	936124
20.8	25.8	25.8	24.2	7.7	4.8	100.0	89.4	89.4	89.9	87.4	87.4	87.4	87.4	86.0	86.0	95.5	87.0	86.0	87.4	87.4	87.4	87.4	85.0	7	980507
20.8	25.8	25.8	24.2	7.7	4.8	0.0	89.4	89.4	89.9	87.4	87.4	87.4	87.4	86.0	86.0	95.5	87.0	86.0	87.4	87.4	87.4	87.4	85.0	8	980524
17.8	21.7	21.7	21.7	0.5	3.5	7.1	7.1	100.0	99.5	94.7	94.7	94.7	94.7	91.3	80.8	90.3	92.3	92.3	94.7	94.7	94.7	90.3	9	024618	
17.8	21.7	21.7	21.7	0.5	3.5	7.1	7.1	0.0	99.5	94.7	94.7	94.7	94.7	91.3	80.8	90.3	92.3	92.3	94.7	94.7	94.7	90.3	10	024670	
18.2	21.7	21.7	21.7	0.8	4.8	7.7	7.7	0.5	94.2	94.2	94.2	94.2	94.2	80.8	80.3	89.9	91.8	91.8	94.2	94.2	94.2	90.8	11	K021115	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	100.0	100.0	100.0	94.7	94.2	93.7	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	93.7	12	950790	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	100.0	100.0	94.7	94.2	93.7	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	93.7	13	950889	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	0.0	100.0	94.7	94.2	93.7	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	93.7	14	980212	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	0.0	0.0	94.7	94.2	93.7	95.7	95.7	100.0	100.0	100.0	93.7	15	980107	
22.1	21.5	22.9	21.5	10.0	8.3	12.2	12.2	9.4	9.4	10.0	5.8	5.8	5.8	5.8	99.5	99.0	99.0	99.1	94.7	94.7	94.7	94.7	16	K020882	
22.8	22.2	23.6	22.2	10.6	8.8	12.7	12.7	10.0	10.0	10.6	6.1	6.1	6.1	6.1	0.5	98.1	98.6	97.6	94.2	94.2	94.2	95.7	17	K021800	
22.8	21.4	22.8	20.8	11.1	9.3	12.7	12.7	10.5	10.5	11.1	6.8	6.8	6.8	6.8	1.0	1.5	98.1	97.1	93.7	93.7	93.7	95.2	18	K021837	
22.1	20.9	22.3	20.9	8.9	7.2	11.0	11.0	8.3	8.3	8.9	4.5	4.5	4.5	4.5	1.0	1.5	2.0	99.0	95.7	95.7	95.7	19	K021112		
22.1	20.8	22.2	20.8	8.8	8.3	12.2	12.2	8.3	8.3	8.8	4.5	4.5	4.5	4.5	2.0	2.5	3.0	1.8	95.7	95.7	95.7	97.1	20	K021143	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	6.1	6.8	4.5	4.5	100.0	100.0	93.7	21	950892	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	6.1	6.8	4.5	4.5	0.0	100.0	93.7	22	950888	
20.8	18.9	18.9	18.9	6.1	6.8	10.5	10.5	5.6	5.6	6.1	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	6.1	6.8	4.5	4.5	0.0	0.0	93.7	23	950895	
25.8	18.9	20.2	20.2	10.0	10.6	14.8	14.8	10.8	10.8	10.0	6.7	6.7	6.7	6.7	4.0	4.5	5.0	3.0	3.0	6.7	6.7	6.7	24	025001	

圖十三、CB5 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。



圖十四、EV71 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之親緣關係圖。

Percent identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
1	█	83.1	84.1	82.8	82.6	82.6	82.6	81.6	82.6	82.6	81.6	82.1	82.6	83.1	83.1	82.6	80.3	88.7	81.2	82.1	82.1	81.2	81.2	1	BvCv70
2	18.7	█	99.0	97.1	87.1	97.1	97.1	87.1	97.1	97.1	97.1	96.6	97.1	86.1	96.1	95.2	80.3	88.4	81.6	82.1	82.1	82.1	81.2	2	T08898
3	17.4	1.0	█	97.1	87.1	97.1	97.1	87.1	97.1	97.1	87.1	96.6	97.1	87.1	97.1	96.1	80.3	88.4	80.7	81.2	81.2	81.2	80.2	3	592898
4	18.4	3.0	3.0	█	100.0	100.0	100.0	88.0	100.0	100.0	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	4	KD31700
5	19.4	3.0	3.0	6.0	█	100.0	100.0	88.0	100.0	100.0	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	5	K050200
6	19.4	3.0	3.0	6.0	0.0	█	100.0	88.0	100.0	100.0	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	6	K007500
7	19.4	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	█	88.0	100.0	100.0	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	7	K038200
8	20.7	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	1.0	█	99.0	99.0	100.0	99.5	99.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	8	K053200
9	19.4	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	█	100.0	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	9	KD31500
10	19.4	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	█	88.0	98.6	100.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	10	K056600
11	20.7	3.0	3.0	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	1.0	1.0	█	99.5	99.0	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	11	C115300
12	20.8	3.5	3.5	1.5	1.5	1.5	0.5	1.5	1.5	3.5	3.5	█	98.6	87.6	97.6	96.6	88.9	88.9	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	12	C148100
13	18.4	3.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.5	█	88.1	98.1	97.1	80.3	88.4	79.7	79.2	79.2	80.2	78.3	13	C244601
14	18.7	4.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	2.0	█	100.0	99.0	80.3	88.9	79.2	78.7	78.7	79.7	77.8	14	C258401
15	18.7	4.0	3.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.5	2.0	3.0	3.0	█	99.0	80.3	88.9	79.2	78.7	78.7	79.7	77.8	15	C334802
16	19.4	5.1	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.0	1.0	1.0	1.0	█	81.3	88.9	78.3	77.8	77.8	78.7	76.8	16	C348502
17	22.9	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	11.2	10.6	10.6	10.6	8.6	█	97.6	78.7	79.2	79.2	80.2	78.3	17	24886
18	22.2	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	11.8	12.4	11.8	11.8	11.8	10.8	2.5	█	78.3	79.2	78.7	79.7	77.8	18	25806
19	22.3	21.1	22.5	24.8	24.0	24.0	24.8	24.0	24.0	24.8	24.0	24.0	24.0	24.8	24.8	26.3	25.8	26.6	█	88.1	88.0	98.6	98.6	19	503398
20	20.8	20.3	21.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	25.4	25.4	27.8	24.1	24.9	2.0	█	88.0	97.6	97.6	20	227398
21	20.8	20.4	21.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	25.5	25.5	27.1	25.0	25.8	1.0	1.0	█	98.6	98.6	21	514298
22	20.8	20.4	21.8	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	24.0	24.0	25.5	23.5	24.2	1.5	2.5	1.5	█	88.1	22	H0186
23	22.3	21.8	23.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	26.3	27.1	27.1	28.7	26.8	27.4	1.5	3.5	1.5	2.0	█	23	PH065
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		

圖十五、EV71 之 VP4 基因以 DNASTAR 軟體分析之相似相異比較圖。

表一、高醫病毒室 1999 年以前 PANEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ	Note
1	7008(成大)				EV71	
2	86-250				EV71	
3	86-259				EV71	
4	86-240				EV71	
5	90N-2444				E30	*
6	91-128			CB5	E12/CB2/CB5	E6(NT)
7	91-151			CB5	E12/CB2/CB5	E6(NT)
8	91-261			E9	E1	E6(NT)
9	91-288				E1	E6(NT)
10	93-0335				E30	*
11	95-0855				CB5	
12	95-0886				CB5	
13	95-0892				CB5	
14	97-725			E6/CB5	E11	E6(NT)
15	97-729			CB(+)	E11	E6(NT)
16	97-731				E11	E6(NT)
17						
18	307				EV71	
19	0315				EV71	
20	5929				EV71	

表二、 高醫病毒室 1999 年 PANEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
1	99-595	X		panEV(+)	
2	99-1443	X		panEV(+)	
3	99-1444	X		panEV(+)	
4	99-1445	X		panEV(+)	
5	99-1469	X		panEV(+)	
6	99-2323	4+	-	panEV(+)	EV71
7	99-2410	4+	-	panEV(+)	CA16
8	99-2411	4+	-	panEV(+)	CA16
9	99-2447	X	-	panEV(+)	
10	99-2448	X		panEV(+)	
11	99-2614	X	+	panEV(+)	

表三、高醫病毒室 2000 年 PANEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
1	00-0100	?	+	panEV(+)	CA4
2	00-0154	X	-	panEV(+)	
3	00-0337	+		panEV(+)	
4	00-607	X		panEV(+)	
5	00-0696	X	-	panEV(+)	
6	00-0802	+	-	panEV(+)	
7	00-0862	X	-		
8	00-1005	+			CA16
9	00-1051	X	-	panEV(+)	
10	00-1366	X		panEV(+)	
11	00-1694	4+	-	panEV(+)	CA16
12	00-1719	X		panEV(+)	
13	00-1734	X	+	CA16	
14	00-1783	3+	-	Polio1	CA16
15	00-1859	+		panEV(+)	
16	00-1860	4+	-	panEV(+)	CA16
17	00-1861	+		panEV(+)	
18	00-1863	+		panEV(+)	CA16
19	00-1871	+		panEV(+)	
20	00-2021	X	-		
21	00-2044	+			CA9
22	00-2079	X	+	CA16	
23	00-2082	3+	+	CA16	CA16
24	00-2098	4+	-	panEV(+)	CA16
25	00-2111	4+	-	panEV(+)	CA16
26	00-2225	2+	-	panEV(+)	CA16
27	00-2940	1+			CA16
28	00-3526	3+	-	panEV(+)	CA16
29	00-4059	2+	-	panEV(+)	EV71
30	00-4061	4+	-	panEV(+)	CA16
31	00-4395	X	+	panEV(+)	
32	00-4489	3+	-	panEV(+)	CA5
33	00-4509	+		panEV(+)	E30

2000 年 panEV(續)

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
34	00-4665	X	+	CB4	CA16
35	00-4667	X		panEV(+)	
36	00-4714	2+	-	panEV(+)	E30
37	00-0075				EV71
38	00-0382				EV71
39	00-0532				EV71
40	00-0566				EV71
41	00-0582				EV71
42	00-0638				EV71
43	00-0728				EV71
44	00-2182	4+	-	-	CA16
45	00-2334	+			
46	00-2447a	X	-		
47	00-2447b	+			
48	00-2614	+			
49	00-4663	3+	-	-	CA16

表四、高醫病毒室 2001 年 panEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
1	01-0022	+	-	panEV(+)	CA16
2	01-0036	+	-	panEV(+)	E30
3	01-0069	+	-	panEV(+)	CA16
4	01-0075	+	-	panEV(+)	CA16
5	01-0312	+	-	panEV(+)	E30
6	01-0781	+	-	panEV(+)	E30
7	01-0821	X		panEV(+)	
8	01-0830	X		panEV(+)	
9	01-0947	-	-	panEV(+)	
10	01-1070	-	-	panEV(+)	-
11	01-1111	-	-	panEV(+)	-
12	01-1204	+		panEV(+)	E30
13	01-1319	-	-	panEV(+)	-
14	01-1335	X		panEV(+)	
15	01-1370	+	-	panEV(+)	E30
16	01-1374	-	-	panEV(+)	-
17	01-1449	-	-	panEV(+)	-
18	01-1474	X		panEV(+)	
19	01-1479	-	-	panEV(+)	-
20	01-1501	-	-	panEV(+)	-
21	01-1636	-	-	panEV(+)	
22	01-1692	X		panEV(+)	
23	01-1697	X		panEV(+)	
24	01-1715	+	-	panEV(+)	E30
25	01-1724	+	-	panEV(+)	E30
26	01-1735	-	-	panEV(+)	
27	01-1742	+	-	panEV(+)	E30
28	01-1753	-	-	panEV(+)	
29	01-1776	X		panEV(+)	
30	01-1777	4+		panEV(+)	V
31	01-1794	+	-	-	E30
32	01-1830	+	-	-	X
33	01-1834	+	-	-	CB4
34	01-1947	+	-	-	CA16

2001 年 panEV(續)

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
35	01-1976	+	-	-	X
36	01-1977	+	-	-	E30
37	01-2003	+	-	-	E30
38	01-2015	+	X	-(E4(±))	E30
39	01-2078	+	-	-	
40	01-2091	+	-	-	X
41	01-2093	X			
42	01-2114	-	-		
43	01-2116	-	-		
44	01-2178	-	±	CB4	Polio3
45	01-2186	+	X	E4(±)	E30
46	01-2191	-	-	分型皆(-)	
47	01-2210	3+	X		E30
48	01-2292	3+	X		E30
49	01-2310	-	-	-	-
50	01-2455				E6
51	01-2484	-	-	-	-
52	01-2503	-	-	-	-
53	01-2507	-	-	-	-
54	01-2551	-	-		
55	01-2584	+	X	Polio1,CA16	Polio2
56	01-2588	+	X	Polio2,CA16	
57	01-2644	3+	X		Polio1
58	01-2908	4+	X		E30
59	01-2940	-	-	-	-
60	01-3088	-	-	-	-
61	01-3104	-	-	-	-
62	01-3123	-	-	-	-
63	01-3124	-	-	-	-
64	01-3194	-	-	-	-

2001 年 panEV(續)

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
65	01-3241	-	-	-	-
66	01-3255	-	-	-	-
67	01-3279	-	-	-	-
68	01-3432	+			CA24
69	01-3724	3+	X		CA24
70	01-3900	+	-	-	CA16
71	01-4142	+	-	-	Polio1
72	01-4242	2+		panEV(+)	V
73	01-4327	3+		panEV(+)	V
74	01-4496	-	-		
75	01-4580				E6
76	01-4954				E6
77	01-5077				E6
78	01-5099	2+		panEV(+)	V
79	01-5590				E6
80	01-5162	-	-	-	-
81	01-5164	-	-	-	-
82	01-5218	X			
83	01-5362	4+			V
84	01-5620	+	-	-	E3
85	01-5666	+			CA
86	01-5696	+	-	-	Polio3
87	01-5700	-	-	-	-
88	H01-06				EV71
89	01-0094				E30
90	01-0117				E30
91	01-0655				E30
92	01-0681				E30
93	01-0715				E30
94	01-1358				Untyping

表五、高醫病毒室 2002 年 panEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
1	02-124	-	-	HSV-1	
2	02-129	-	-	HSV-1	
3	02-445	X		panEV(+)	
4	02-505	-	-	panEV(+)	
5	02-671	X		panEV(+)	
6	02-817	+		panEV(+)	
7	02-831	3+		panEV(+)	
8	02-892	X		panEV(+)	
9	02-928			panEV(+)	E6
10	02-1150			panEV(+)	E6
11	02-1171	X		panEV(+)	
12	02-1175	X		panEV(+)	
13	02-1194	+		panEV(+)	
14	02-1338	-	-	panEV(+)	
15	02-1358	2+		panEV(+)	
16	02-1438	2+		panEV(+)	Polio2
17	02-1582	-	-	panEV(+)	
18	02-1667	-	-	panEV(+)	
19	02-1768			panEV(+)	E3
20	02-1740	X		panEV(+)	
21	02-1777			panEV(+)	Polio3
22	02-1891	-	-	panEV(+)	
23	02-1921			panEV(+)	CA
24	02-2047			panEV(+)	E6
25	02-2068	X		panEV(+)	
26	02-2098			panEV(+)	E6
27	02-2136	X		panEV(+)	
28	02-2138	X		panEV(+)	
29	02-2149			panEV(+)	E6
30	02-2158			panEV(+)	E6
31	02-2182			panEV(+)	E6
32	02-2229	X		panEV(+)	
33	02-2269			panEV(+)	E6

2002 年 panEV(續)

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
34	02-2308			panEV(+)	X
35	02-2455	+	X	panEV(+)	
36	02-2471	X		panEV(+)	
37	02-2569			panEV(+)	Polio3
38	02-2597			panEV(+)	E6
39	02-2698	X		panEV(+)	
40	02-2824			panEV(+)	X
41	02-2839			panEV(+)	E6
42	02-3316	X		panEV(+)	
43	02-3492			panEV(+)	E6
44	02-3510	X		panEV(+)	
45	02-3566	2+		panEV(+)	
46	02-3701	X		panEV(+)	
47	02-3705	X		panEV(+)	
48	02-3777	X		panEV(+)	
49	02-4105	X		panEV(+)	
50	02-4166	2+		panEV(+)	
51	02-4173				EV71

表六、高醫病毒室 2003 年 panEV

NO	Lab NO.	VP4 RT-PCR	panEV RT-PCR	FA	SEQ
1	03-303				CA16
2	03-394				CA16
3	03-398				CA16
4	03-462				E9
5	03-557				SVD-CB3
6	03-613				SVD-CB3
7	03-2489	X		panEV(+)	
8	03-2649	X		panEV(+)	
9	03-2990	X		panEV(+)	