計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000102

衛生福利部疾病管制署 103 年委託科技研究計畫

計畫名稱：開發 Picornaviridae 血清型實驗室鑑定系統與應用

年 度/全 程 研 究 報 告

執行機構：疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：林翠莉

協同主持人：林智暉、黃元品

研究人員：林廷翰、李嘉綺

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 年 12 月 31 日

＊本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意*

目　　錄

	頁　碼
封面	
目錄	
中文摘要	(1)
英文摘要	(2)
一、 前言	(3-8)
二、 材料與方法	(9-13)
三、 結果	(14-15)
四、 討論	(16-18)
五、 結論與建議	(19)
六、 計畫重要研究成果及具體建議	(　)
七、 參考文獻	(20-21)
八、 圖表	(22-24)
附錄	(　)

共 (24)頁

中文摘要

關鍵字：微小病毒科、腸病毒、副腸孤病毒、間接免疫螢光染色法、常態性、未分型腸病毒、Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I

開發 Picornaviridae family 中不同型別實驗室鑑定系統與應用，以製備多株抗體並建立間接免疫螢光染色法平台，來維持整體系統之運作，除原有發展出的血清型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，如 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，並已獲中華民國發明專利(發明第 I 414608 號)外；陸續開發的血清型則是藉由監測系統中所反應出的現象，如 1.再浮現血清型 2.新興病原體等，分析其對台灣地區日後所帶來的威脅，與擴充在監測上能自給自足的量能分別為 Coxsackiveirus A 3,21、Echovirus type7,16,18,25、Coxsackiveirus B2,3 及 Enterovirus EV71，包含本計畫所建置的血清型 Echovirus type3,33, Human Parechovirus1,3 (HPeV1 and 3)等；這四個型別在間接免疫螢光染色法所獲得的敏感性與專一性二者皆可達 95%或以上。

由於血清型別已有原有的 14 型增加至 18 型，可用於組成動態化檢驗試劑套組(內含 5~8 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，維持可以鑑定的血清型維持在 90%以上，不僅及時反應整體的流行趨勢及防治策略擬定與宣導，亦可發現再浮現腸病毒血清型別或新興病原體的現；另亦可發展組成不同型別具診斷性的檢驗試劑套組模式(內含 3~5 型)，使具生技產能之功效。

Abstract

Keyword：Picornaviridiae、Indirect immunofluorescence assay、untyeable enterovirus 、Sensitivity、Specificity、Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I、Dynamic typing kit

We prepared poly-clonal antibodies and established the platform of indirect immunofluorescence assay (IFA) for the identificatin of viruses of Piconavirdae family. Our previously developed kits had been applied for the enterovirus surveillance in Taiwan, for example, the “Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I“ containing serotypes CVA2, 4, 5, 6, 10. These kits were routinely provided for collaborating laboratories of virology in Taiwan. Based on the surveillance results, we continually developed assays for other re-emerging and emerging serotypes, including Coxsackiveirus A3, 21, Echovirus type7, 16, 18, 25, Coxsackiveirus B2, 3, Enterovirus EV71, Echovirus type3, 33, Human Parechovirus1, 3 (HPeV1 and 3). The last four types were developed in this study, and a sensitivity and specificity of 95% (or more) was shown.

These in-house developed IFA methods contained 18 serotypes now, and could be used as dynamic identification kits (5-8 serotypes in each kit) for the serotyping and enterovirus surveillance in Taiwan. Therefore, the percentage of typeable viruses could reach 90%. It could reflect the epidemic trend and help to make policies, find re-emerging enterovirus serotypes and emerging pathogens. In addition, 3-5 serotypes of these assays could be combined to different typing kit sets, which may provide benefit for biotech industry.

前言

微小 RNA 病毒科(Picornaviridae)本身不具外套膜(nonenveloped)，其基因的組成是為單股正性的 RNA 病毒並包覆著約 30nm 正二十面體結構;其中包含 12 個屬，分別為 Enterovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus, Teschovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Tremovirus, Avihepatoviru(http//www.picornaviridae.com/)；在不同屬(genus)之間，有不同的特性，VP4 及 VP2 未分離成兩個區域前，則稱作 VP0。另外 2A-2C(P2 region)及 3A-3D(P3 region)區域所轉譯者為非結構性蛋白質(non-structure protein)，這些蛋白質為病毒進入宿主細胞所必須，以及病毒進行複製所需要的酵素，例如 protease 及 RNA polymerase 等。[1]

腸病毒屬(enterovirus)最常感染兒童並常在夏季引發流行，最初是依據疾病的型態、病毒的毒力及顱內注射乳鼠(suckling mice)致病模式為基礎分成 4 種(species)病毒型別；分別為 1.小兒麻痺病毒 (Polioviruses, PV)； 2.克沙奇 A 群病毒 (Coxsackie A viruses, CVA)；3.克沙奇 B 群病毒 (Coxsackie B viruses, CVB) 及 4.伊科病毒 (Echoviruses, E)等)[2]。其中 CVA 可造成實驗小鼠無力性麻痺(flaccid paralysis)，並對骨骼肌及心肌造成傷害；而 CVB 則會引發痙攣性麻痺(spastic paralysis)，並廣泛侵犯各組織，如：中樞神經系統(CNS)、肝臟、胰臟等[3]。現今，腸病毒屬依據核酸序列分析(sequencing analysis)，將可引發人類疾病的腸病毒重新分類為 human enterovirus A (HEVA)、human enterovirus B (HEVB)、human enterovirus C (HEVC)及 human enterovirus D (HEVD)等四群。HEVA 包括 CVA2-A8、CVA10、CVA12、CVA14、CVA16、EV-A71、EV76、EV89-91；HEVB 包括 CVB1-6、CVA9、E1-7、E9、E11-21、E24-27、E29-33,EV69、EV73-75、EV77-88、EV93、EV97-98、EV100-101、EV106-107、EV-B111；HEVC 包括 PV1-3、CVA1、CVA11、CVA13、CVA17、CVA19-22、CVA24、EV95-96、EV99、EC102、EV104、EV105、EV109、EV113、EV116、EV117-118；而 HEVD 則包括 EV68、EV70、EV94、EV111 等 (http://www.picornaviridae.com/)。腸病毒基因組成大小接近 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

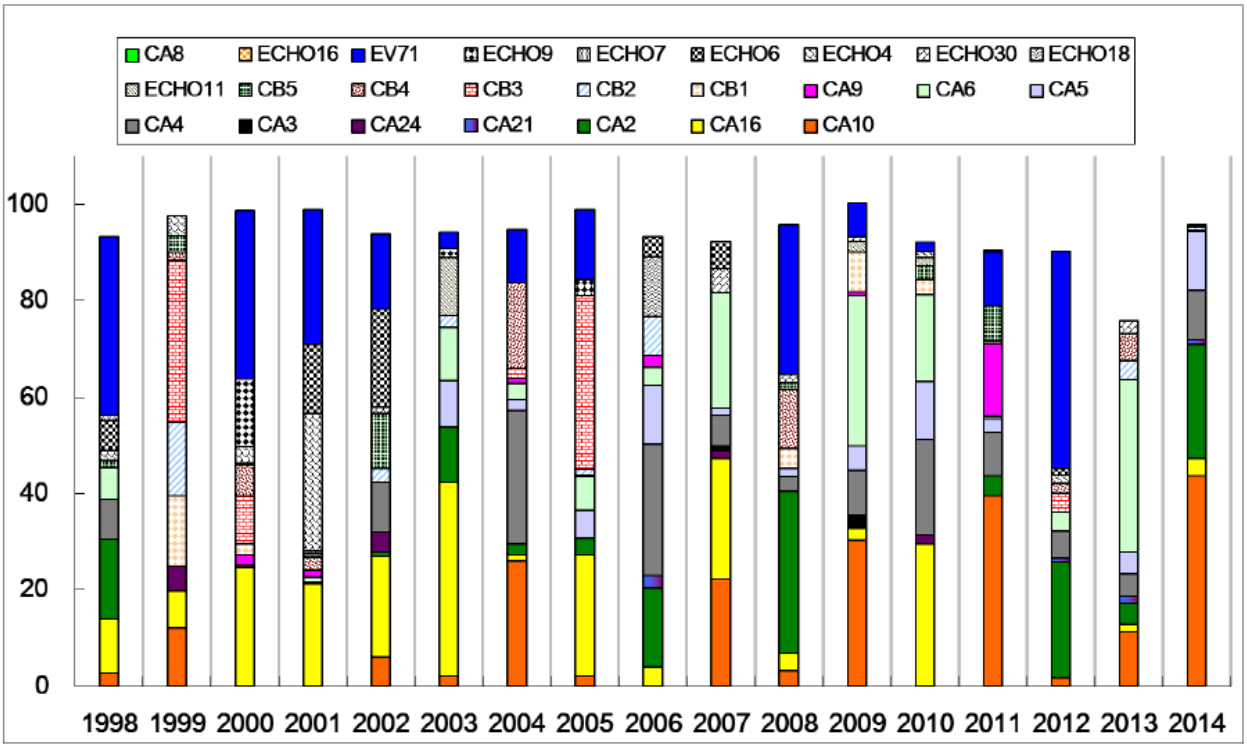
polymerase)及 3’-NCR。5’-NCR 約有 750 個核苷酸，在基因之演化上為高度保守區域，VP4 和病毒 RNA 的穩定性有關，VP1-3 是和細胞接受器的結合及抗體結合有關，其中 VP1 不僅是中和抗體主要作用之區域，亦是基因序列中變化較大之區域〔2-7〕；人類腸病毒可以穩定的存活於環境中，如暴露於胃酸中且可以在室溫中存活數天，在地下水(ground water)及熱溫泉(hot spas) 亦可測得它的存在；另外該病毒對於有機溶劑也有抵抗性，如乙醚 (ether) 及氯仿 (Chloroform) 及酒精等，在使其喪失活性的方法如高溫 (56℃以上)、chlorination、formaldehyde and ultraviolet irradiation 等。腸病毒感染大部份為無症狀的感染，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)、Herpengina 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[8-9]。

Parechovirus genera 全長基因約為 7400 核苷酸，包含 5’and 3’untranslatedregions(UTRs) 約 710 bp、three structural viral proteins(VP1-VP3) 約 2320 bp and severn nonstructural portens(2A-2C and 3A-3D)約 4363 bp[10]。

其中名為 Human parechovirus 1 and 2(HPeV1 and 2)原本是屬於腸病毒屬中的 Echovirus type 22,23 血清型，目前經由分子分型的方式，HPeVs genus 具有 8 個型別及尚未確定 type9,11-16(http://www.Picornaviridae.com/parechovirus/hpev/hpev.htm)；在臨床上的表徵以呼吸道、腸胃道為主，較嚴重時亦會出現無菌性腦膜炎、心肌炎、腦炎、急性無力肢體麻痺症，以及新生兒敗血症等，與 Enterovirus genera 引起的感染在臨床上難以區分[11-15]。

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

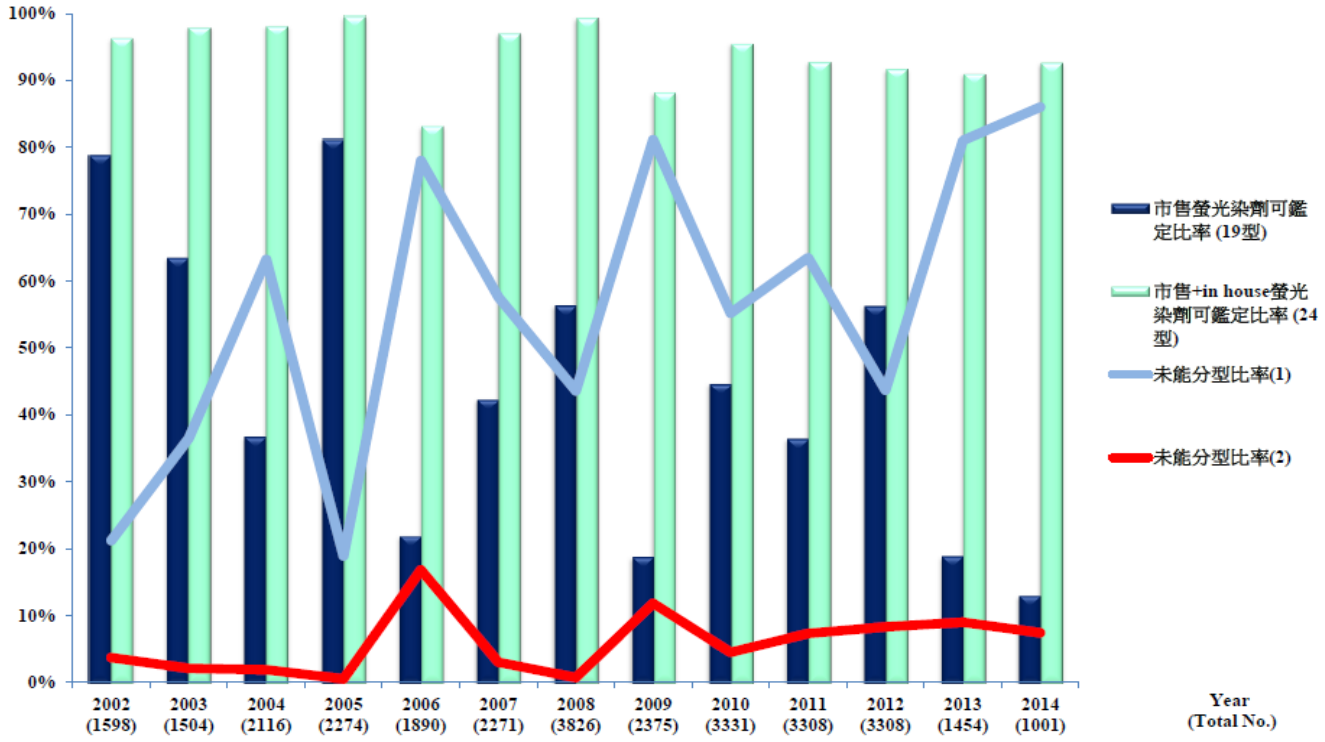
類歸為 Human Enterovirus B species，呈現再發性(recurrence)流行，如伊科病毒 6,8,11,30、克沙奇 B2,3,4,5 等(圖一)。



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法色之單株抗體鑑定出，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[16],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)；因此本署研檢中心特別針對現在無市售之抗血清，開發出螢光檢驗試劑(Coxsackievirus A IFA Typing Kit I) [17]，內含五種腸病毒血清型，分別為 Coxsackievirus A2,4,5,6,10 等血清型，並於 96 年起全面性提供本署病毒性合約實驗室使用；目前以市售染劑的 19 種型別(單株抗體)合併本署研檢中心所開發的腸病毒檢驗試劑試

劑套組 5 型(多株抗體)，總計 24 型全面用於腸病毒病原體的鑑定後，平均可將腸病毒可分型的比率提昇至 90%（圖一），有助於掌握每年每單一腸病毒血清型的流行趨勢。

圖一、The ratio of untypeable EV by IFA from 2002 to 2012 Improvement after CVA Typing Kit Set I



Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I 自導入腸病毒流行趨勢監測之後，可以將分型的比率提昇平均 90%或以上，即可及時反應出當下腸病毒不同血清型別的流行趨勢，並顯示出這些常態流行的血清型別在台灣地區流行的優勢；然而仍約有 10 左右的病原體卻隨著時序的變遷在台灣地區被偵測到但未能及時鑑定出型別，經基因定序其型別顯示為 1.鼻病毒(Rinovirus)2.再浮現腸病毒，約有 21 個基因型及原市售螢光劑無法將血清型別鑑定出來並以未能分型的形態出現，如 2008 年首度監測出 CVB3 及 2010 年的 CVB2 血清型等 3 新興病原體，如 Human Parechovirus (HPeV1,3,4,6)及 Cardiovirus (SAFV-3)，雖然非腸病毒屬，但在臨床螢光的鑑定上則呈現出未能分型的形態。(表一)

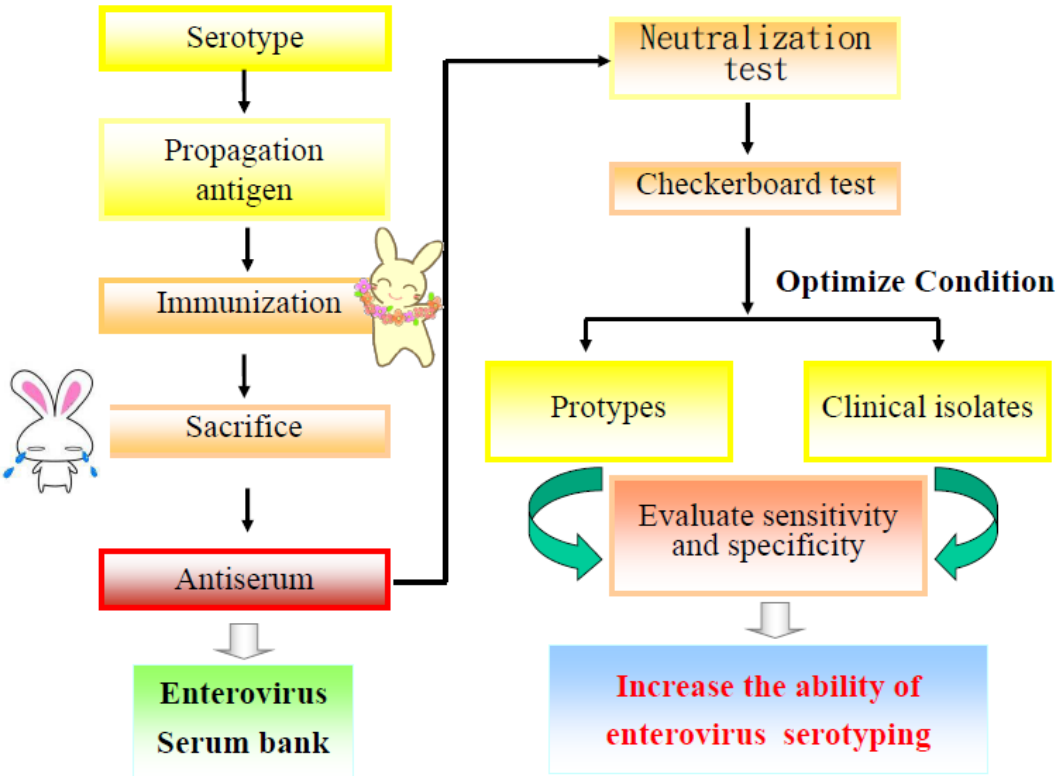
表一、**Frequency of untypeable enterovirus from 2002 to 2014 (sequencing)**

genera	Enterovirus																						Parechovirus				Cardiovirus
Serotype	CA3	CA7	CA8	CA12	E3	E5	E7	E8	E13	E14	E15	E16	E18	E19	E20	E24	E25	E27	E33	CA21	EV68	Rhinovirus	HPeV1	HPeV3	HPeV4	HPeV6	SAFV-3
2002	●	●	●	●	●		●		●	●		●		●	●		●	●		●	●	●					
2003	●			●					●		●	●										●					
2004			●	●							●	●		●		●	●	●		●		●					
2005			●	●		●	●	●					●	●			●					●					
2006	●		●				●						●				●			●		●	●				
2007			●		●	●						●	●				●			●		●		●			
2008					●							●					●		●		●	●	●			●	
2009	●				●		●										●					●					
2010			●				●										●			●		●	●				
2011			●									●		●						●	●	●	●	●	●		
2012			●				●					●					●			●	●	●	●	●	●		
2013			●	●	●		●										●		●	●	●	●					●
2014							●						●				●				●	●					

本計畫開發 Picornaviridae famiy 中不同成員來建立單一劑型的建立間接免疫螢光染色法檢測系統，分別為腸病毒屬(Enterovirus genus)中的伊科病毒 3 and 33(Echovirus type 3;Echo3, 33)及呼腸病毒屬(Parechovirus genus) 1 中的 Human parechovirus 1 and 3(HPeV1 and 3)，隨時序變遷及防治需求可適時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奠展檢驗技術平台繼而提昇生生技產能。

計畫之實施首先需建立 RD(Rhabdomyosarcoma)及 Vero 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 檢測系統之代表株，大量增殖於 RD 細胞株或其適應的細胞株上，經過純化及活性等測試，以家兔為製備血清之個體，所獲得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。

單一型型別間接免疫螢染色法流程圖



材料與方法

材料

一、1998~2014 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[18-21]

1. 由液態氮桶中取欲 recoverRD 細胞株一管
2. 迅速置於 37℃水浴中回溫
3. 將細胞放入 75cm^2 培養瓶中，緩慢滴入 10cc%10%DMEM 未含抗生素培養基置入 36℃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 ℃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 ℃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 cycler 進行 PCR
   其條件如下: 94℃，30 秒，(94℃，30 秒； 60℃，120 秒； 72℃，60 秒) 36cycles，72℃，4 分鐘
7. 最後以電泳分析結果。

C、病毒株增量[22]

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. 將選取之病毒株適量接種於 RD 細胞株上，置入 36℃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℃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℃及 37℃冷凍、解凍二次，4℃，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℃，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。

   備註：當以 Vero 細胞株進行病毒增量時，培養基更換成 199 Medium，其餘流程不變

D、Viral Titration and Determination of $CCID_{50}$[23-24]

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℃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＆Müench 法計算病毒感染價 ($CCID_{50}$)。

E、Polyclonal Antibody 製備[17]

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，陸續進行採血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) [25-28]

1. 將經免疫後經全採之抗血清稀釋為 1：8
2. 於 56℃加熱 30 分鐘，經 56℃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 $CCID_{50}$ 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℃，CO_2 培養箱中和作用 1 小時
5. 加入 100 μl（5×10^4 細胞）RD 細胞懸浮液
6. 置 36℃，CO_2 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[16-17]

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）

[29]

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℃，50 分鐘，95℃，3 分鐘，(94℃，30 秒； 48℃，90 秒； 72℃，90 秒) 40cycles，72℃，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’-GCICCIGAYTGITGICCRAA–3’	(3408-3389)
187	5’-ACIGCIGYIGARACIGGNCA–3’	(2612-2631)
189	5’-CARGCIGCIGARACIGGNGC–3’	(2612-2631)
222	5’-5CICCIGGIGGIAYRWACAT -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 DNA50~100 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,MgCl2,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. 然後再覆上一層石臘油，並將裝有反應物之微量心管移置預熱在 94℃之聚合酶連鎖反應器中，以 94℃30 秒、55℃15 秒、60℃4 分鐘之條件，進行 25 次之循環反應，最後將反應停止在 4℃，之後進行電泳定序。

結果

一、polyclonal antibodies 之製備

本計畫以開發四型 Picornaviridae famiy 中不同成員來建立單一劑型的螢光染劑，分別為伊科病毒 3 and 33(Echovirus type 3；Echo3,33)及 Human parechovirus 1 and 3(HPeV1 and 3)，其中除 Echovirus type 3 及 HpeV1 為標準株(Prototype)，另二型為本土分離株，將 Echo3,33 及 HpeV-1 增量於 RD 細胞株及 HpeV3 增量於 Vero 細胞株，每一型別需約 200mL 病毒液並進行純化，以避免免疫個體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 $CCID_{50}$，分別 Echo3:$10^{-8.5}$/mL、Echo33:$10^{-9.38}$/mL、HPeV1:$10^{-6.6}$/mL、HpeV3:$10^{-6.6}$/mL；在去感染性部份則以紫外線照射，以細胞培養之方式以 14 天無分離出病原體視為已喪失感染力。

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

由於在前期計畫中已開發完成多種不同型別腸病毒血清型 (如 CV-A2,4,5,10,21、 Echo18 及 EV71 等間接免疫螢光染色法的檢測系統，對於螢光標幟物的 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluoresccin 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釋條件分別為 Echo3 編號#2(1:750)、Echo33 編號#1(1:1000)、HpeV 編號#1 (1:600)、HpeV3 編號#1 (1:600)，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，評估平測試平台包含:

1.腸病毒標準株(Prototype):

Coxsackie A group type 2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,21

Coxsackie B group type1,2,3,4,5,6

Echo virus group type 1,2,3,4,5,6,7,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,24,25, 26,27,29,30,31,32,33

EV68,69,70,71,73

2.1998~2014 年出現於台灣地區的腸病毒不同血清型的臨床分離株：

CA2,3,4,5,6,8,9,10,12,16,21,24 ,EV71,CB1,2,3,4,5

Echo virus type 3,4,6,7,9,11,13,16,18,25,30,33 Polio1,2,3(疫苗株)

3.非腸病毒臨床分離株

Human Parechovirus type1,3、Aichi virus、Saffold virus type 3、Influenza virus、Adenovirus 及 HSV 等。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、Picornaviridae 抗血清庫

逐步開發微小病毒科中不同型別 IFA 的檢測方法，主要是因應台灣地區目前腸病毒監測所需，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 Coxsackiveirus 2,3,4,5,6,10,21、Echovirus type7,16,18,25、Coxsackiveirus B2,3 及 Enterovirus EV71，包含年所建置的血清型 Echovirus type3,33, Human Parechovirus1,3 (HPeV1,3,)等五型，所以腸病毒抗血清庫目前總計 18 型 1900mL 的血清可供使用。詳如表三

討論

目前臨床上皆以細胞培養的方式來分離出腸病毒病原體並佐以接免疫螢光染色法(Indirect Immunoflorescence Assat；IFA)來鑑定腸病毒的血清型別是為最廣泛的檢驗方法，目前市售可以鑑定出腸病毒的血清型計有 19 型，如僅採用這些抗血清，則每年平均只有 50%腸病毒可被鑑定出，其餘皆為未分型腸病毒(untypable enterovirus)，雖說本署可將所有由合約實驗室所分離出腸病毒的病原體均以基因定序分析其基因型(尤其著重無法分型的病原體)；這些病原體基因分型鑑定是先由合約實驗室先行培養，再送回本署研檢中心檢驗，在時效上已有 1~2 週的落差，較無法達到即時監測的目標，所以著手開發了非市售染劑可以鑑定腸病毒血清型的檢驗試劑，先期以台灣地區常態流行的血清型為主，分別為 coxsackievirus A2,4,5,6,10 (EV71 及 CA16 已有市售螢光染劑)並組合成檢驗試劑套組為〝Coxsackievirus A IFA Typing Kit I″，該檢驗試套組於 96 年起常態提供全國病毒性合約實驗室進行鑑定，故自 2008 年後已將每年可分型腸病毒的比率提昇至 90%，對及早了解國內每年腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當大。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 A IFA Typing Kit I″試劑套組內含 CA2,4,5,6,10 等腸病毒血清型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；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，也可架構不同腸病毒血清型的免疫抗原性平台，如 EV71。

計劃中免疫的個體主要是以家兔為主，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，由於我們是以測定中和試驗的方式來測定所免疫出來抗體的效價，相同的物種不同的個體注射相同的劑量及時間，所反應出中和抗體的效價亦不相同；即使在進行間接免疫螢光染色法最佳鑑定效能條件化的篩選時，中和抗體的力價與螢光，個 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。

目前每年仍約有 10%腸病毒未能分型，其中包含了 1）鼻病毒(Rhinovirus)，此群病原體依據 2002 年後的資料顯示在台灣地區已呈現常態性流行，臨床上以上呼吸道感染為主，目前該病毒已併入了腸病毒屬，主要基因型為 HRV-A 型；2）再浮現腸病毒，總計有 21 個基因型，這些基因型大部分尚未呈現常態流行，然而未來如群體免疫、病原體變異及氣候變遷等因素是否會改變其流行型態，值得進一步觀察；3）新興病原體，如 parechovirus (HPeV1,3,4,6) 及 cardiovirus，目前這些新興病原體引起人類疾病的致病機轉尚待進一步研究，但值得注意的是這些新興病原體在臨床上所造成的症狀與腸病毒群無法區分，且亦會造成在臨床上的鑑定呈現出腸病毒未能分型的反應，腸病毒病原體監測自 1999 年建立持續迄今，已成為一個穩定且常態化運作的監測系統，我們已能確實掌握腸病毒在台灣地區的流行及其造成疾病的嚴重程度，時序變遷的 15 年中，監測目標不再是侷限於腸病毒群，而是擴及到整個微小病毒科，並從中檢測出過去未曾在台灣地區出現過的新興或再浮現病原體。我們只是從監測系統看到了到 Picornaviridae 的不同樣貌 未來我們將持續不斷的引進新技術新科技，以期早期偵測並評估這些新興或再浮現病原體對於疾病所帶來疾病威脅的程度，惟有盡可能掌握已知病原體的流行趨勢及其特性才有能力面對未知新興病原體的挑戰。

建置間接免疫螢光染色法檢測系統，已由歷年科技計畫的申請與成果的應用，彰顯了 serotyping 對於臨床上實驗室鑑定系統廣效性，，無庸置疑的是開發血清型別的鑑定量能是逐漸提昇的，但不可諱言的是這些後續開發的型別對於未能分型的比率下降幅度遠不及 Coxsackievirus A IFA Typing Kit I 之效能，當然這就是腸病毒流行呈現 endemice、Recurrence 及 Sporatic 等趨勢，所以當台灣地區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)，所以該計畫的申請目的有二，維持常規性檢驗試劑的用，即可鑑定分型比率維持在 90%或以上 2.持續開發 Picornaviridae 其他成員的抗血清，以因應時序變遷可造成流行的潛在優勢，也因為如此現階 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 5.發現再浮現及新與病原體；反之 genotyping 對於分子流行病學上的絕對優勢。

所以本計畫由原有的腸病毒屬擴展至Picornaviridae family中的不同成員(當然以監測到的病原體為主)，建置了一個Picornaviridae抗血清庫及檢驗技術平台，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)，並藉由平台內的不同血清型朝二個方向進行，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4~8個血清型)，此這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、以多株抗體來建置台灣地區腸病毒流行株之間接免疫螢光染色法，業已完成 CVA2,3,4,56,8,10,2、Echo3,7,16,25,33、CVB2,3、EV71 及 HPeV1 and 3 等血清型，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。

四、腸病毒病原體監測自 1999 年建立持續迄今，已成為一個穩定且常態化運作的監測系統，不僅使得我們確實掌握腸病毒在台灣地區的流行及其造成疾病的嚴重程度，但對於腸病毒的監不再是侷限於腸病毒群，而是擴及到整個微小病毒科，後續應著重於早期偵測並評估這些新興或再浮現病原體對於疾病所帶來疾病威脅的程度，惟有盡可能掌握已知病原體的流行趨勢及其特性才有能力面對未知新興病原體的挑戰。

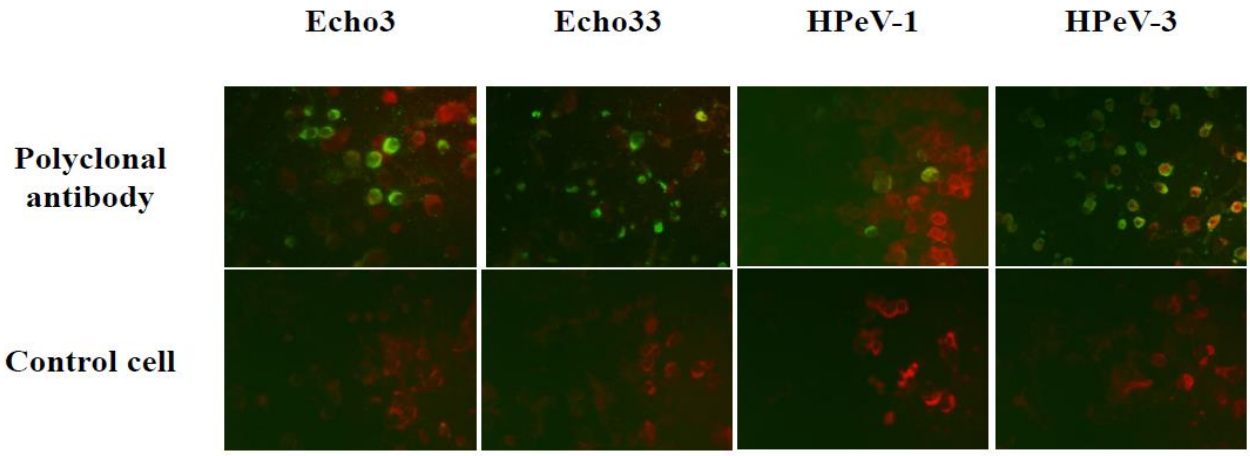
參考文獻

1. Stanway G, Brown F, Christian P: Picornaviridae. In Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Eighth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Academic Press; 2005: 757-778
2. Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, et al. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. J Gen Virol 1997;78:1-11.
3. Enterovirus update page. [http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm].
4. New enterovirus pecies.[http://www.picornastudygroup.com/types/enterovirus/ev_species.htm].
5. Melnick JL: Enteroviruses: polioviruses, coxackieviruses, 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.
6. Vuorinen T, Vainionpaa R, Heino J, et al. Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. J Gen Virol. 1999;80:921-7.
7. Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, et al. Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. J Virol. 1999;73:427-35.
8. David Kiang, Elly Chou Newbower, Elain Yeh, et. . An algorithm for the typing of enteroviruses and correlation to serotyping by viral neutralization. J Clin Virol. 2009 Aug;45(4):334-40
9. Marc Tebruegge, Nigel Curtis. Enterovirus infection in neonates. Semin Fetal neonatal med. 2009 Aug;14(4):222-712.
10. Harvala H, Simmonds P. (2009) Human parechoviruses: biology, epidemiology and clinical significance. J Clin Virol. 2009 May;45(1):1-9.
11. Wigand R, Sabin A. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. Arch Gesamte Virusforsch 1961;11:224-47.
12. 8. Ito M, Yamashita T, Tsuzuki H, et al. Isolation and identification of a novel human parechovirus. J Gen Virol 2004;85:391-8.
13. 9. Benschop K, Schinkel J, Luken M. Fourth human parechovirus serotype. Emerg Infect Dis 2006;12:1572-5.
14. 10.Harvalaa H, Wolthersb K, Simmondsc P. Parechoviruses in children: understanding a new infection. Current Opinion in Infectious Diseases 2010;23:224-30.
15. 11. Jones MS, Lukashov VV, Ganac RD, et al. Discovery of a novel human picornavirus in a stool sample from a pediatric patient presenting with fever of unknown origin. J Clin Microbiol 2007;45:2144-50.
16. Alma S.Rigonan,Linda Mann,and Tasnee Chonmaitree.Use of Monoclonal antibodies to Identify Serotype of Enteroviurs Isolate. Jounal of Microbiology 1998 July; p.1877-1881

17. Lin Tl.,et al.Rapid and High sensitive Coxsackievirus A Indirect Immunofluorescence Assay Typing Kit for enterovirus Serotyping. J. Clin. Microbiol. 2008; 46:p785-788Oberste 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.
18. 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
19. Bell EJ, Cosgrove BP(1980)：Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line.Bullectin of the World Health organization 58:423-428
20. 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
21. 18. Schmidt NJ,Ho HH,Lennette EH(1975)：Propagation and isolation of group Acoxsackieviruses in RD cells.Journal of clinical Microbiology 2:183-185
22. World Health Organization. 2004. Polio laboratory manual, 4ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
23. Reed, L.J.,and H. Miemcj. 1938.A simple method of estimating fifty percent endpoints Am. J.Hyg. 27:493-497Reed, L.J.,and H. Miemcj. 1938.A simple method of estimating fifty percent endpoints Am. J.Hyg. 27:493-497
24. 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.
25. 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.
26. Doerr HW(1973) Coxsackie B virus neutralising antibodies in myocarditis and pleurodynia. Dtsch Med Wochenschr 98(29):1396-1400.
27. 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.
28. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. Intervirology 1980,12:329-334.
29. Oberste MS,Maher K, Kilpatrick DR,Flemister MR,Brown BA,Pallansch MA.1999.Typing of human enteroviruses by partial sepuencing of VP1. J Clin microbial .37:1288-1293

圖、表

圖一：不同血清型免疫抗血清間接免疫螢光染色圖譜



陽性反應：細胞呈現蘋果綠

陰性反應：細胞呈現紅色

表一、Picornaviridae 不同型別中和抗體效價表

血清型	$CCID_{50}$/mL	中和抗體測定	
Echo3	$10^{-8.5}$	#1	9, 977
		#2	5, 623
		#2	3, 981
Echo33	$10^{-9.5}$	#1	79, 250
		#2	19, 906
		#3	1, 000
		#4	5, 623
HPeV-1	$10^{-6.6}$	#1	158, 124
		#2	300, 024
HPeV-3	$10^{-6.6}$	#1	177, 827
		#2	81, 925

表二、Picornaviridae 不同型別敏感性與專一性評估分析表

Serotype	Sensitivity	Specificity	Prototypes (58株)	Clinical isolates (300株)
Echo3	100%	98.8%	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 CVA11,13,15,17,21 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 HEV-B species E3,6,7,9,11,16,18,25,30, 33 CBV1,2,3,4,5 HEV-C species CVA21,24; Polio(Sabin strain)1-3 HEV-D species EV68 HSV Adenovirus,Rhinovirus Aichi virus HPV 1,3,4 SAFV-3
Echo33	100%	99.9%		
HPeV-1	100%	98.8%		
HPeV-3	100%	98.9%		

表三、Picornaviridae 抗血清庫

	Enterovirus																Par-Echovirus	
Serotype	CA2	CA4	CA5	CA6	CA10	EV71	CA3	CA21	E3	E7	E16	E18	E25	E33	CB2	CB3	HPeV-1	HPeV-3
Sensitivity (%)	100	95.6	100	100	96.6	100	100	100	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	98.1	98.8	98.9	99	97.8	98.9	99.9	98	98.4	98.8	98.9
Total Volume(mL)	110	50	80	115	125	120	120	150	100	120	120	115	120	100	75	200	50	50
動態化試劑套組	 *Coxsackievirus 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

注意：專利權人未依法繳納年費者，其專利

中 華 民 國 102 年 11 月 11 日