

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000103

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：腸病毒及無法分型腸病毒之實驗室診斷及
基因資料庫建立

106 年 度/全 程 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：許珍禎

研究人員：葉庭愷

執行期間： 106 年 01 月 01 日至 106 年 12 月 31 日

目 錄

計畫中文摘要.....	3
計畫英文摘要.....	5
前言.....	7
材料與方法.....	11
結果.....	12
討論.....	27
結論與建議.....	28
參考文獻.....	29
圖表.....	32

中文摘要

關鍵詞：人腸病毒、腸病毒七十一型、基因型、演化、親緣系統樹、人類 Parechovirus

本計劃對腸病毒陰性檢體、未知或無法分型之病毒株，檢測新興病原，釐清疾病感染源，且嘗試探討十年內台灣腸病毒的分子流病資料及演化關係，建置 VP1 全長序列親緣系統樹(Phylogenetic Tree)，監測腸病毒隨著時序的變遷發生變異情形，並結合流行病學資訊建立本土性腸病毒病原體基因庫資料，以提供疾病防治政策參考。

針對無法分型病毒株及疑似重症陰性檢體執行 HPeVs RT-PCR 檢驗結果，由 2016 年下半年至 2017 年 10 月 15 株 untypable 病毒株中，檢出 5 例 HPeV 3 及 3 例 HPeV 1，另由 2015 至 2017 年 179 個疑似重症陰性檢體中檢出 8 例 HPeV 3 及 3 例 HPeV 1，檢出陽性率約為 6%。大多數病例症狀輕微包括發燒、咳嗽、喉嚨痛，臨床診斷為泡疹性咽峽炎或類流感，少數個案可能引起重症，不排除為急性無力肢體麻痺的病原體之一。

本研究建構 2007~2017 年 Human Parechovirus 親緣系統樹顯示，臺灣主要流行型別為 HPeV1，其次為 HPeV3，以及少數 HPeV6。由建構 2007~2017 年台灣地區 CV-A16 親緣系統樹，2014 ~2016 年主要流行病毒株序列，自成新的獨立分群，但胺基酸序列並無明顯變化，臨床症狀亦無

特別嚴重，可能僅為序列上之演化。經分析 2006~2017 年台灣地區 EV-A 71 親緣系統樹發現，首次在臺灣偵測到 C1 基因亞型並提出預警。

英文摘要

keywords : Enterovirus, Enterovirus 71, genotype, evolution,
Phylogenetic tree, Human Parechovirus

The unknown or untyped virus strains would be tested further by molecular diagnostics for Human Parechovirus, in order to identify the suspected pathogens and assist in outbreak investigations. This project attempts to investigate the molecular epidemiological data and evolutionary relationships of enterovirus from 2007~2017. We will setup a database of complete VP1 sequences to perform the phylogenetic analysis and monitor any mutation among them. The enterovirus gene bank combined with epidemiological information may clarify where the disease come from and spread to where. The valuable information may provide reference for prevention measures, future vaccine research and development of diagnostic reagents.

According to the results of HPeVs RT-PCR test, 5 HPeV 3 and 3 HPeV 1 were detected from 15 strains of untypable strains from the second half of 2016 to October 2017. 8 HPeV3 and 3 HPeV1 were detected in 179 suspected severe negative specimens from 2015 to 2017. The positive rate was about 6%. In most cases, the symptoms include mild fever, cough, sore throat. In a minority of cases, serious symptoms or acute flaccid paralysis may occur.

This study constructed the phylogenetic tree of Human Parechovirus from 2007 to 2017. The major epidemic types in Taiwan are HPeV1, followed by HPeV3 and a few HPeV6. By constructing the phylogenetic tree of CV-A16 in Taiwan from 2007 to 2017, the major epidemic strains in 2014-2016 were

grouped into new independent groups, but the amino acid sequences did not change significantly and the clinical symptoms were not particularly serious either. Only for the evolution of the sequence. After analyzing the EV-A71 phylogenetic tree from 2006 to 2017, it was found for the first time that the C1 subtype was detected in Taiwan, and we provided an early warning.

前言

腸病毒主要是經糞便一口傳染，直接由污染的手指將病毒帶入口腔內；在疾病的高峰期，也可經由飛沫，而高峰期過後，糞便一口傳染便是唯一的傳染途徑。於疾病潛伏期的末期時，最可能散播病毒給他人，據流行病學研究調查指出，在某些封閉的社區當中，特別是有幼兒的環境下，其腸病毒感染率可能高達90%以上，人類可說是唯一的宿主或傳染源，並無其它的中間宿主。

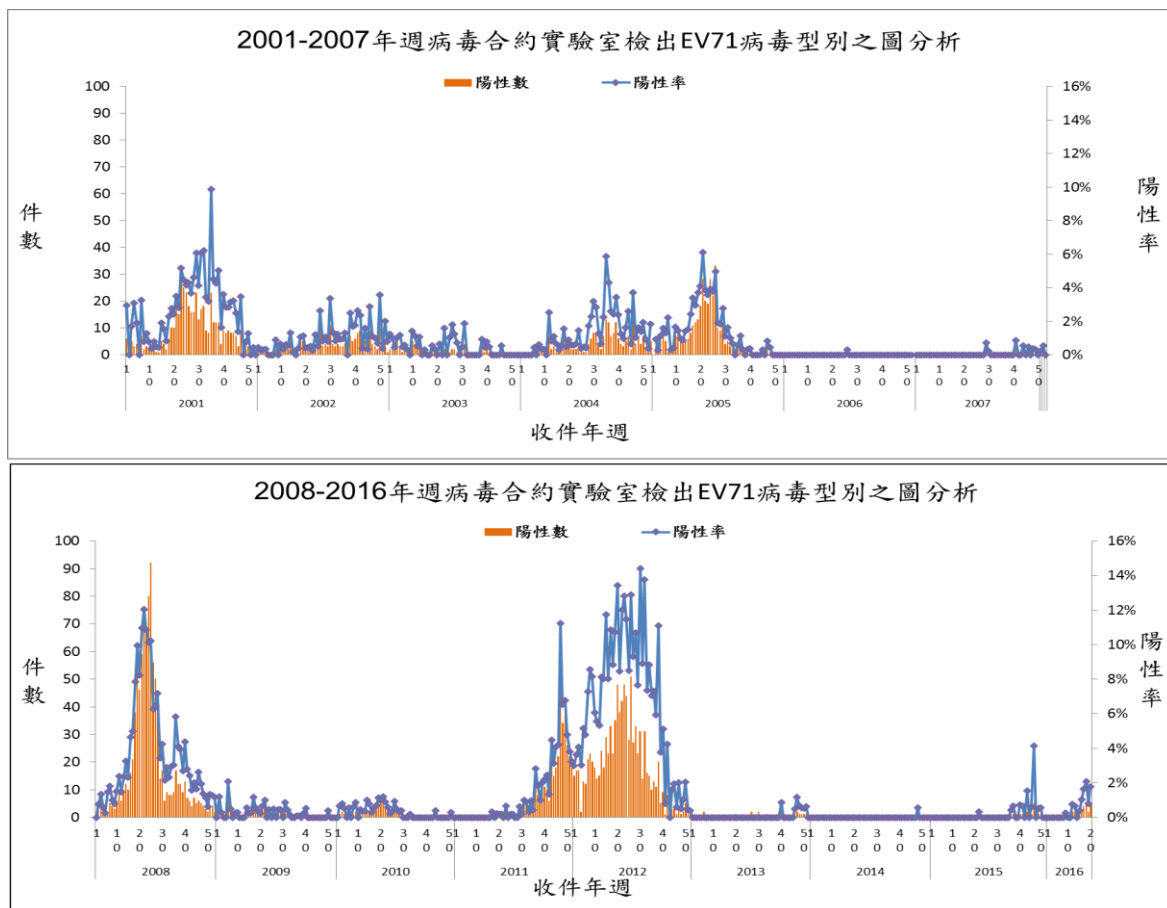
非小兒麻痺性之其它腸病毒之感染，多發生於夏季與秋季，病例集中在嬰幼兒及社會經濟情況較差、環境衛生條件不佳的族群當中。家庭、托兒所、幼稚園、育嬰中心、公共場所的接觸可能導致疾病快速的散播而造成大流行。

雖然腸病毒之感染起始點為腸道(故名之)但卻甚少引起腸道疾病，感染後通常並無明顯的症狀，有病徵產生時範圍可從微燒、感冒似之症狀到腦膜炎，甚至死亡。感染痊癒後，不會演變成永久性之帶原者。除了小兒麻痺病毒會造成脊髓灰白質炎外，其它腸病毒感染所引起的疾病有下列幾種較為常見：疹性咽峽炎(Herpangina)、手足口病(Hand-Foot-Mouth Disease)、流行性肋肌痛(Pleurodynia)、心肌炎(Myocarditis)、無菌性腦膜炎(Aseptic meningitis)、腦炎(encephalitis)、急性無力肢體麻痺症(acute flaccid paralysis)及新生兒敗血症(neonatal sepsis disease)等^{1,2}，其中有些較為嚴重之病患，可能造成重症或死亡。在台灣造成流行的腸病毒屬於微小RNA病毒科(Picornaviridae)、腸病

毒屬(Enterovirus)，直徑約 20~30 nm，為不具外套膜(nonenveloped)呈現立體對稱的正二十面體結構，基因組大小接近 7.5Kb。總共有超過 60 種以上不同種類之腸病毒，絕大數是在 1948 年至 1963 間利用細胞培養及注射 suckling mice 來培養並進行型別鑑定來區分及認識這些腸病毒。傳統上這些腸病毒是區分成 polio I~III，克沙奇 A1~A24，克沙奇 B1~B6，伊科病毒 1~34 及其他腸病毒 68 型至 71 型。這些傳統上的分類是利用抗血清以及彼此交互的中和反應測試來鑑定、驗證其型別。近年來由於分子生物學長足進步，遂有人開始以分子生物學方法來鑑定腸病毒之型別。其中有以 5' -non-coding region (5' NCR)、VP2~VP4 結合區、以及 VP1 區域之序列來做型別之區分。目前為止仍是以 VP1 區域(約 900bps)這一區域之序列做區分時，且能與傳統上之 Serotyping 有較佳之相關性。同時，依據美國 CDC，Dr. Steve Oberste 對絕大多數之腸病毒 VP1 做序列分析後，以 Phylogenetic Study 區分其關聯性。發現可將人類腸病毒劃分為 4 個族群(A~D cluster)分別為 A(CA16-like)：有 CA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 及 EV71；B：(CB-like)有 CB1~6,E1~303,CA9,EV69；C：(Polio-like)有 PV1~3，及其他 CA(CA11 與 CA15, CA13 與 CA18 無法區分) E34；D 則包含 EV68 及 70。近年來腸病毒基因型別的變化或重組可能會影響其疾病之流行，如腸病毒七十一型基因亞型轉變可能引起新一波流行(圖一及表一)。因此實驗室需透過分析腸病毒基因序列變異，

監控病原體流行狀況，以及變異株或重組病毒的發生，期望能提早做出預警。

圖一、歷年腸病毒七十一型流行情形



表一、歷年腸病毒七十一型流行趨勢及基因亞型(粗體字為主要基因亞型)

年代	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
重症	-	C4	C4	C5	C5	B5	B5	C4	B5	B5	B5	-	-	C4
						C2			C4	C2	C4			
輕症	B4	C4	C4	C5	C5	B5	B5	C4	B5	B5	B5	B5	C4	C4
	C4	B4				C4	C4	B5	C4	C2	C4		B5	
						C5	C5			C4				

國際間已有數個大型資料庫，包括可免費使用的 National Center for

Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。建置我國本土的病原體基因資料庫網站不僅為時勢所趨，亦可強化各面向之防疫資訊整合。將腸病毒基因序列結合流行病學資訊建立基因資料庫，應有重要參考價值，期望藉由本基因資料庫的資訊，可釐清疾病感染源或感染途徑，提供疾病防治政策參考，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。

對於腸病毒感染通報個案，除進行法定傳染病相關檢驗外，對新興感染原之檢測，可進一步釐清檢驗陰性者的真正致病源。如 Human Parechovirus 可引起嬰幼兒發燒、紅疹、腹瀉、肝炎、腦炎及敗血病等^{4~6}，與腸病毒類似同屬小 RNA 病毒科，於國內持續低度流行與演化，國外甚至有此病毒造成重症之案例，對此應持續進行相關研究。

材料與方法

一、 檢體來源：

- (一) 無法檢驗出感染原之群聚個案檢體。
- (二) 通報腸病毒感染併發重症之檢體。
- (三) 病毒合約實驗室之病毒株、未知或無法分型之病毒株。

二、 實驗方法

- (一) 以 EV CODEHOP RT-snPCR 初步鑑定腸病毒檢體或病毒株之型別，培養擴增病毒量後進行病毒核酸的萃取，再以 RT-PCR 擴增放大核酸，進行定序分析，最後進行序列修補及整理。
- (二) 挑選病毒核酸序列，連同自國內外資料庫下載的參考病毒株序列，使用 MEGA 軟體進行多序列排列比對。
- (三) 將整理過後的序列進行各序列位點變化的分析，包括將變異程度較大或者是抗原決定位的位點進行分析。
- (四) 使用 MEGA 軟體進行親緣樹狀圖的繪製，藉以確認所流行的病毒株之基因型別與各國病毒株之親緣關係。
- (五) 合併流行病學資料分析流行之病毒株的來源、基因型別變化、傳播過程、或演化速率等。

三、實驗步驟

(一) RD 細胞株繼代培養

1. 由液態氮桶中取欲 recover 之 RD 細胞株一管。
2. 迅速置於 37°C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處。
3. 緩慢滴入 10cc10%DMEM 未含抗生素生長培養基後，將細胞放入 75 cm² 培養瓶中，置入 36°C 二氧化碳培養箱。
4. 隔夜後觀察細胞生長狀況並吸取上清液。
5. 再放入 10cc 10% DMEM 未含抗生素生長培養基。
6. 觀察細胞生長狀況做為繼代使用。
7. 吸取上清液。
8. 放入適量 0.25% trypsin-EDTA。
9. 吸取 trypsin-EDTA。
10. 取適量 10% DMEM 培養基衝散細胞。
11. 計算細胞數目。
12. 稀釋每 1CC 含有 1X10⁵ 細胞，做為繼代培養之用。
13. 細胞繼代代數約為 15 代，重新由細胞庫取出繼代使用。

(二) 病毒 RNA 萃取(採用 QIAGEN QIAamp® Viral RNA Mini Kit

(Cat.No. 52906)

1. 取 560 µl AVL Buffer(含 carrier RNA) 至 eppendorf 微量管內
2. 加入 140 µl 檢體(病毒液)，震盪 15 秒，放置室溫 10 分鐘
3. 加入 560 µl 100% 絕酒精，震盪 15 秒
4. 將混合之溶液吸至 QIAamp Spin Column，離心 8000rpm 1 分鐘
5. 加入 500 µl Buffer AW1，離心 8000rpm 1 分鐘
6. 加入 500 µl Buffer AW2，離心 8000rpm 1 分鐘後，再離心 12000rpm 1 分鐘

7. 加入 60 μl Buffer AVE，放置室溫 5 分鐘以上，離心 8000rpm 2 分鐘收集所 elute 之液體

8.

(三) EV CODEHOP RT-snPCR

a. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)

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

反應試劑	加入體積	RT 反應最終濃度
5x First-Strand RT Buffer	2 μl	1x
20mM dNTP Mix	0.5 μl	1 mM of each dNTP
100 μM AN32 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100 μM AN33 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100 μM AN34 – primer	0.05 μl	0.5 μM
100 μM AN35 – primer	0.05 μl	0.5 μM
0.1M DTT	1 μl	0.01 M
RNaseOUT	0.5 μl	20 units
SuperScript™ III RT(200U/ μl)	0.5 μl	100 units
RNase-free water	0.3 μl	-

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

(1) annealing：22 $^{\circ}\text{C}$ ，10 分鐘。

(2) R.T.作用：45 $^{\circ}\text{C}$ ，60 分鐘。

(3) HotStop：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 分鐘。

(4) 最後維持在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，保存 cDNA。

b. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

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

反應試劑	加入體積	PCR 反應最終

		濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	1 μ l	1x
2.5 mM dNTP Mix	1 μ l	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	0.5 μ l	2.5 mM
0.1 M DTT	0.1 μ l	0.001 M
224 –Forward primer(10 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ M
222 –Reverse primer(10 μ M)	0.8 μ l	0.8 μ M
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 μ l	0.5 units
RNase-free water	3.7 μ l	-

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

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

c. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)

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

反應試劑	加入體積	nest-PCR 反應 最終濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	2.5 μ l	1x
2.5 mM dNTP Mix	2.5 μ l	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	1.25 μ l	2.5 mM
0.1 M DTT	0.25 μ l	0.001M
AN89 –Forward primer(10 μ M)	2.0 μ l	0.8 μ M
AN88 –Reverse primer(10 μ M)	2.0 μ l	0.8 μ M
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 μ l	0.5 units
RNase-free water	13.4 μ l	-

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

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

d. 核酸引子序列

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

(四) RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入同一微量管內

RNA 抽取物 5 μ l

R' Primer 3 μ l

F' Primer 3 μ l

ddH₂O 11 μ l

2. 使用 PCR thermal cycler 加熱 70°C , 10 分鐘

3. 加入下列試劑

2X RT-PCR Buffer 25 μ l

Taq DNA Polymerase 1 μ l

Reverse Transcriptase 1 μ l

RNASEOUT 12 μ l

4. 反轉錄聚合酶鎖反應：使用 PCR thermal cycler:

(1) Reverse Transcription：42°C，50 分鐘

(2) HotStart：95°C，3 分鐘

(3) denature：94°C，30 秒

(4) annealing：48°C，1 分 30 秒

(5) extension：72°C，1 分 30 秒

(6) 重複上述 3~5 步驟 40 cycles。

(7) final extension：72°C，7 分鐘

(8) 4°C，∞

5. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position	Specificity
011	GCICCGAYTGITGICCRAA	3408-3389	Most EV(r)
187	ACIGCIGYIGARACIGGNCA	2612-2631	EV-B(forward)
188	ACIGCIGTIGARACIGGNG	2612-2630	EV-C and EV-D(f)
189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	2612-2631	EV-A(f) - 797bp
224-F	GCI ATG YTI GGI ACI CAY RT	1977-1996	All EV(f)
294	TTAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC	1-24	All EV(r)
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
EV71-R2	AGTGAGTGTTACTGATCCATGGT	2241-2219	EV71
06125-A	GTGCTTGACGCTGGTATCC	1443-1461	
06125-B	CATTAAGCTAGTGGCATTCTGTG	1910-1889	
238	CCIGGIWSIAAAYCARTTIYTAC	1787-1809	
162	CCRGTAGGKGTRCACGRAC	2869-2850	
EV71-F3	TACACACCACCAGGAGGCCCT	2115-2136	EV71
EV71-R3	ACCAGCATAATTTGGGTTGGCT	3281-3260	EV71
06125-C	GATGGGCACGTTCTCAGT	3125-3142	
06125-D	AATACGGTGTTT	4436-4418	
EV71-F5	ATYAGYAAGTTYATTGAYTGGCT	4149-4171	EV71

EV71-R5	ACAACTGCWACCACAGTRGCRAT	5278-5256	EV71
329	CCiyTIRtITGYGGIAARGC	4923-4942	
398	TAIAARYTITTYGCIGGIYTICARGG	5298-5323	
334	ATRTCICKYTTYTTIWTNCC	6325-6306	
392	GGIREIAAIGARCCIGCNGT	6042-6061	
423	GCTATTCTGGTTATAACAAAYTYAC	7408-7384	
EV71-F8	GAGAAATT-TGTGAGTACAA	7227-7245	EV71
EV71-R8	AAGCAGTGGTAACAACGCAG-GTACT(30)VN	Poly-A	EV71
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG	2385-2403	EV71

Human Parechovirus RT-PCR

a. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)

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

反應試劑	加入體積	RT 反應最終濃度
5x First-Strand RT Buffer	2 μ l	1x
20mM dNTP Mix	0.5 μ l	1 mM of each dNTP
100 μ M AN273 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
100 μ M AN274 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
100 μ M AN275 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
100 μ M AN276 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
100 μ M AN277 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
100 μ M AN278 – primer	0.05 μ l	0.5 μ M
0.1M DTT	1 μ l	0.01 M
RNaseOUT	0.5 μ l	20 units
SuperScript™ III RT(200U/ μ l)	0.5 μ l	100 units
RNase-free water	3.2 μ l	

1. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)：使用 PCR thermal cycler。
 - (5) annealing：22 $^{\circ}$ C，10 分鐘。
 - (6) R.T.作用：45 $^{\circ}$ C，60 分鐘。
 - (7) HotStop：95 $^{\circ}$ C，5 分鐘。

(8) 最後維持在 4 °C，保存 cDNA。

b. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

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

反應試劑	加入體積	PCR 反應最終 濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	1 µl	1x
2.5 mM dNTP Mix	1 µl	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	0.5 µl	2.5 mM
0.1 M DTT	0.1 µl	0.001 M
AN353-Forward primer(10 µM)	0.8 µl	0.8 µM
AN355-Reverse primer(10 µM)	0.8 µl	0.8 µM
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 µl	0.5 units
RNase-free water	3.3 µl	-

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

(6) denature：95 °C，30 秒。

(7) annealing：42 °C，40 秒。

(8) extension：72 °C，60 秒。

(9) 重複上述 1~3 步驟 35 cycles。

(10) Final extension：72 °C，3 分鐘

(11) 最後維持在 4 °C。

c. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)

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

反應試劑	加入體積	nest-PCR 反應 最終濃度
------	------	---------------------

10x PCR Buffer, Minus Mg	2.5 μ l	1x
2.5 mM dNTP Mix	2.5 μ l	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	1.25 μ l	2.5 mM
0.1 M DTT	0.25 μ l	0.001M
AN353(or 369)–Forward primer(10 μ M)	2.0 μ l	0.8 μ M
AN357(or 358) –Reverse primer(10 μ M)	2.0 μ l	0.8 μ M
Platinum <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1 μ l	0.5 units
RNase-free water	13.4 μ l	-

4. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)：使用 PCR thermal cycler。

(7) HotStart：95 $^{\circ}$ C，6 分鐘。

(8) denature：95 $^{\circ}$ C，30 秒。

(9) annealing：58 $^{\circ}$ C (for PCR 2A 2C) 或 44 $^{\circ}$ C (for PCR 2B)，40 秒。

(10) extension：72 $^{\circ}$ C，60 秒。

(11) 重複上述 2~4 步驟 40 cycles。

(12) Final extension：72 $^{\circ}$ C，3 分鐘

(13) 最後維持在 4 $^{\circ}$ C。

(14)

d. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position	Specificity
AN273	AARTAGTC	3243–3236	
AN274	AARTAATC	3243–3236	
AN275	TCRCAGTT	3309–3302	
AN276	TCRCAATT	3309–3302	
AN277	ATRAATTT	3564–3557	
AN278	ATRAACTT	3564–3557	
AN353	GACAATAGTTTTGAAATNACNATHCCNTA	2126–2154	PCR1,2A
AN355	CTCCAAC TATAATGCCATARTGYTTRTARAANCC	3119–3086	PCR1
AN357	GAATAAAATGGTACTGANARNGTCATYTG YTC	2829–2798	PCR2A,2C
AN358	AACTATAATGCCATARTGYTTRTARAANCC	3115–3086	PCR2B,2C
AN369	ACCAAGGTTGACAACATTTTTYGGNMGNCGC	2531–2559	PCR2B

(五) 電泳分析

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

(六) 演化樹(Phylogenetic tree)之分析

以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA)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. 2007~2017 年台灣地區 Human Parechovirus 親緣系統樹

本研究將腸病毒監測系統中未能分型病毒株，經腸病毒分生檢測陰性的病毒株再進行 HPeVs RT-PCR 分析，然後進行核酸定序。本計畫已對 2016 年下半年至 2017 年 10 月腸病毒 untypable 病毒株及陰性檢體執行 HPeV 檢驗，在 15 株 untypable 病毒株中有檢出 5 例 HPeV 3、3 例 HPeV 1，另外由 179 個疑似重症陰性檢體中檢出 8 例 HPeV 3 及 3 例 HPeV 1。由初步建構之 2007~2017 年 Human Parechovirus 親緣系統樹(圖一)顯示，臺灣常見的基因型為 HPeV1 與 HPeV3，另有少量 HPeV6 出現。臺灣 2007-2008 年出現一波流行，其後 2011-2012 年有較大的流行，2013 年及 2014 年僅零星病例，2015-2016 年再度出現一波流行。臺灣主要流行型別為 HPeV 1，幾乎每年皆檢出，其次為 HPeV 3(以 2007、2012、2016 居多)，以及少量 HPeV 6。

二. 台灣腸病毒監測系統中人類 Parechovirus 流行情形分析

(一)腸病毒社區監測中人類 Parechovirus 流行情形分析

2007-2017 臺灣腸病毒監測之 952 株 NPEV 中，共檢出 58 例 HPeV 陽性，檢出陽性率為 6.09%，大多是 6 歲以下的孩童，性別分布男性比女性多一點，歷年陽性數以 2007、2011-2012 及 2015 年檢

出較多(圖二)，臺灣主要流行型別為 HPeV 1(共 34 例)，其次為 HPeV3(共 20 例)，以及少量 HPeV 6(共 4 例)。臨床症狀主要為發燒(80.7%)、咳嗽(38.6%)、流鼻水(29.8%)、喉嚨痛(21.1%)、皰疹性咽峽炎(19.3%)等，但未有肢體無力症狀。其臨床診斷包括皰疹性咽峽炎 (Herpangina, 17.5%)、類流感(15.8%)等。流行季節主要在夏季及秋季，以 9 月為發病最高峰。主要分離細胞株包含 MK-2(33%)、RD(31%)、A549(22%)、MRC-5(9%)及 Vero(5%)。

(二)疑似腸病毒重症病例中人類 Parechovirus 流行情形分析

有關通報法傳腸病毒重症病例，針對 2015 年 5 月~2017 年 10 月病毒培養及分生檢測皆陰性共 179 件檢體也進行 HPeVs RT-PCR 及定序分析，共檢出 11 例 HPeV 陽性，歷年陽性數如圖三包含 8 例 HPeV3 及 3 例 HPeV 1，檢出陽性率為 6.15%。年齡分布有 8 例為 2 個月以下嬰兒、1 例為 5 個月大嬰兒、2 例為 2 歲幼兒。臨床症狀除了發燒(5 例)較為普遍外，病例症狀各不相同，症狀包括紅疹、手足口病、皰疹性咽峽炎、腦幹性腦炎、肝功能異常、心肌酵素上升、肢體無力、高血壓、癲癇、肌抽躍與血小板低下等，值得注意的是其中有 2 例為急性肢體無力的確定病例，而另外一例腸病毒重症病例的肢體無力症狀則不排除與 EV-D68 共同感染

有關(表一)。流行季節也主要在夏季及秋季，以 8 月為發病最高峰。

三. 2006~2017 年台灣地區 EV-A71 親緣系統樹

依據疾管署腸病毒監測資料，EV-A71 自 1998 年爆發流行後，於 2001、2004-2005、及 2008 大約每 4 年會有一波較大流行，2016 年也有小幅流行出現。本研究中挑選 2003 及 2006-2017 年共 61 株 EV-A71 病毒株，共同建構 VP1 區域親緣系統樹(圖四)，抽樣方式為每年每個基因亞型於北中南東不同地區各挑 1 例，以 Neighbor-Joining phylogenetic trees 分析長度約 893bp VP1 序列。目前 EV-A71 主要分為 A、B、C 三個基因型，以及 B1-B5、C1-C5、C2-like 等十幾個基因亞型，臺灣地區常態流行計有 6 個基因亞型(B4、B5、C2、C4、C5 及 C2-like)。EV-A71 genogroup B 部分，臺灣出現過 B4 及 B5 基因亞型，B4 基因亞型出現在 2004 年以前，近十年皆為 B5 基因亞型。雖然 B5 基因亞型在 2008-2017 年陸續地被偵測到，但隨著時序變遷，產生基因序列改變，分為 2008-2010、2011-2013 及 2013、2015、2017 年三個不同 lineages。EV-A71 genogroup C 部分，臺灣曾經出現 C2、C2-like、C4 及 C5 基因亞型，1998 年臺灣流行的 EV-A71 基因亞型為 C2，C2 又於 2009、2012 及 2016 出現散發病例，C2-like 於 2008 年出現，C5

於 2006-2009 年出現，C4b 曾於 1998 年短暫出現，而 C4a 於 2004 年出現後，2008-2016 幾乎每年都陸續被偵測到。值得注意的是，2017 年首次在臺灣偵測到 C1 基因亞型。

四. 2007~2017 年台灣地區 CV-A 16 親緣系統樹

依據疾管署近十年腸病毒監測資料，CA16 於 2007、2010 及 2015 年有較大波流行，本計畫目前共挑選 2007-2016 年共 53 株 CV-A16 病毒株分析 VP1 序列變化情形，抽樣方式為每年每個 clade 於北中南東不同地區各挑 1 例，地區分布如表二所示。以 Neighbor-Joining phylogenetic trees 分析長度約 891bp VP1 序列，初步建構之克沙奇 A16 病毒株親緣系統樹(圖五)顯示，2007~2016 年每年持續流行病毒主要為 clade B1-a，少部分為 clade B1-b，但 2012 年、部分 2014 年與 2015~2016 年主要流行病毒株序列，似乎自成新的獨立分群(clade B1-d?)，Blast 結果最接近新 clade 的病毒序列分別位於 B1-a 與 B1-b，但後續分析其 VP1 胺基酸序列(圖六)，與 B1-a 及 B1-b 並無明顯差異，個案的臨床症狀亦無特別嚴重，可能僅是因時序變遷產生之基因序列演化。

五. 基因序列上傳資料庫

本研究已上傳 81 個腸病毒監測部分 VP1 序列及 53 個 CV-A16 VP1
全長序列至本署病原體基因資料庫。

討論

- 一. 人類 parechoviruses (HPeV) 首先在 1956 年被發現，HPeV1, HPeV2 以前被稱為 echoviruses 22 和 23。人類 Parechoviruses (HPeV) 與腸病毒是親戚，皆屬於 Picornaviridae 成員，目前有 19 型，HPeVs 和廣泛的疾病有關，包括胃腸炎，呼吸系統疾病，腦膜炎/腦炎，急性無力肢體麻痺及嬰幼兒的新生兒敗血症，與腸病毒引起的感染在臨床上難以區分。腸病毒輕症之社區監測由定點醫師診所採檢送驗，檢體來源大多為鼻咽拭子，病原體的監測主要建構在以細胞培養為主，並佐以間接免疫螢光染色法(IFA)鑑定腸病毒型別，目前已有 19 種血清型可經由商品化單株抗體鑑定出，再加上本署自行開發的 5 型克沙奇 A IFA 試劑，已經涵蓋台灣每年 90% 常態出現腸病毒病毒株，剩餘 10% IFA 無法染色的非 polio 之未分型腸病毒(簡稱 NPEV)，本研究將腸病毒 CODEHOP 分生檢測分型陰性的病毒株再進行 HPeVs RT-PCR 分析，發現台灣地區 Human Parechovirus 之檢出陽性率約為 6.1%，未來應持續針對未知或無法分型之病毒株進行 Human Parechovirus 檢驗，以釐清真正的病原體。
- 二. EV-A71 C1 基因亞型自 1980 年代在美國及澳洲出現，之後陸續在英國、馬來西亞等許多國家流行，序列比對結果顯示該基因最接近德

國 2015 年流行的病毒株序列，雖僅有單一病例且症狀並不嚴重很快好轉出院，但據疫調顯示無出國史，且無法找出明確感染源。對新亞型於提出預警後，11 月初於台北市北投區監測到新一波 C1 基因亞型幼童群聚感染，故本署應持續加強對 EV-A71 的監測，以提早對下一波流行提出預警。

結論與建議

- 一. 臺灣常見的HPeVs基因型為HPeV1與HPeV3，另有少量HPeV6出現。儘管HPeVs每年檢出的陽性病例數不多，但HPeV持續流行對幼兒健康造成威脅，這些病例主要為6歲以下嬰幼兒，大多數症狀輕微包括發燒、咳嗽、喉嚨痛，臨床診斷為泡疹性咽峽炎或類流感，少數個案可能引起重症，且不排除為急性無力肢體麻痺的病原體之一，故建議當發現的腸病毒陰性檢體之病例小於6歲且具有相關症狀，以及分離出untypable病毒株大部分由A549、MK2細胞或RD培養出來時，可進一步檢測HPeV以釐清病原體來源。
- 二. 經由持續的監測，我們發現腸病毒71型基因出現新的基因亞型(lineage)時，未來可能會帶來新一波的流行。持續監測流行於台灣地區腸病毒並分析 VP1 區域的基因序列，將可及早掌握抗原基因的變異，因此維持一個長期穩定的腸病毒監測系統是非常重要且必須的，俾能及早提出警訊，及早採取防疫作為而防止疫情擴大。透過選定腸病毒之基因序列及個案流行病學資料的分析有助於監控病原體流行狀況，累積本土化腸病毒群分子流病資料，可作為日後與國際間交流、合作之重要資訊。

參考文獻

1. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:1170-4.
2. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003;148:1369-85.
3. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*. 1999;73:1941-8.
4. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses--biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000;10:57-69.
5. Renaud C1, Kuypers J, Ficken E, Cent A, Corey L, Englund JA. Introduction of a novel parechovirus RT-PCR clinical test in a regional medical center. *J Clin Virol*. 2011 May;51(1):50-3.
6. Legay V, Chomel JJ, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 2002;25:193-5.
7. Nix WA, Maher K, Pallansch MA, Oberste MS. Parechovirus typing in clinical specimens by nested or semi-nested PCR coupled with sequencing. *J Clin Virol*. 2010; 48(3):202-7.
8. Sivasamugham LA, Cardoso MJ, Tan WS, Yusoff K: Recombinant Newcastle Disease virus capsids displaying enterovirus 71 VP1 fragment induce a

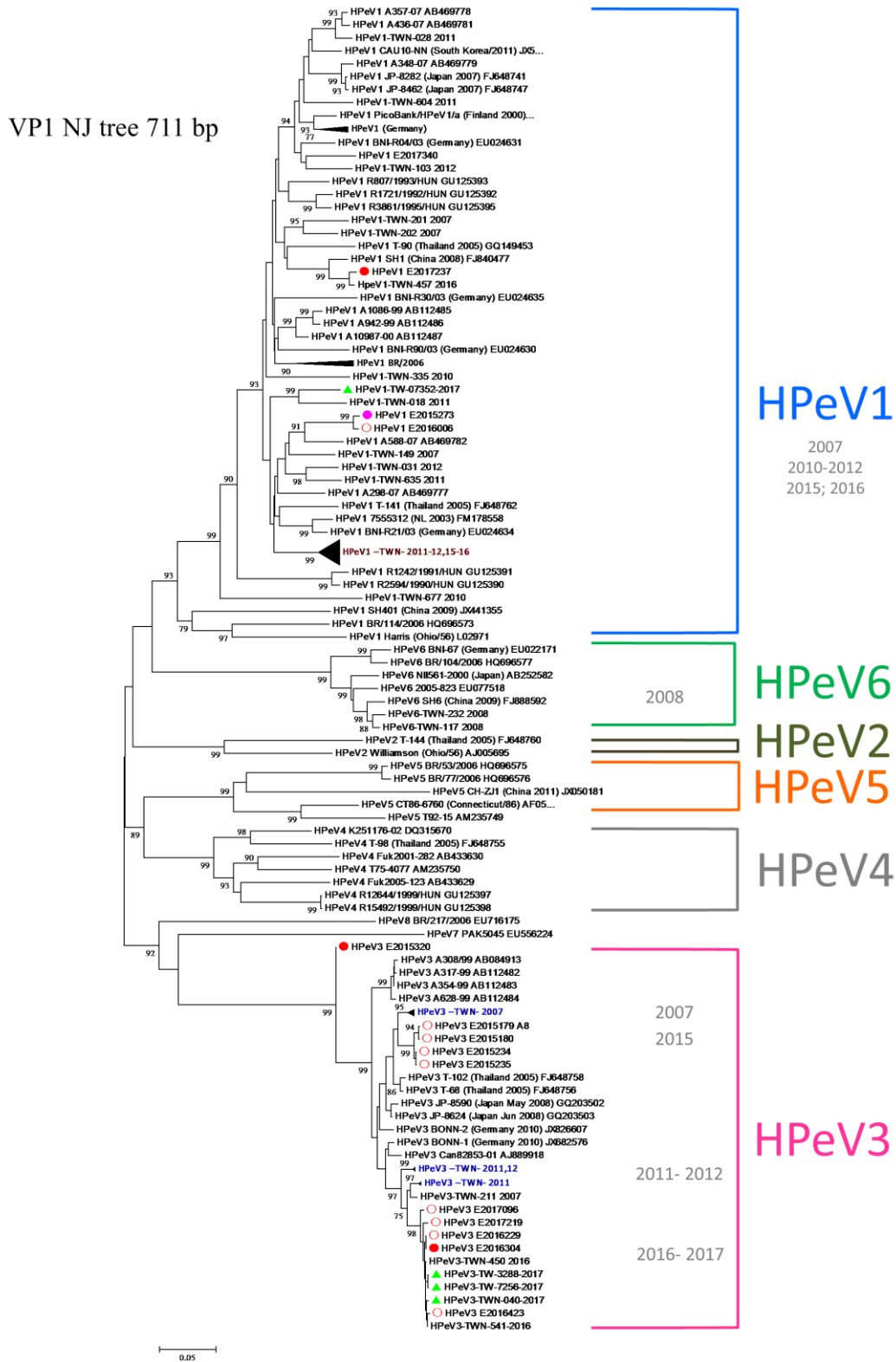
- strong immune response in rabbits. *J Med Virol* 2006, 78:1096-1104.
9. Enterovirus update page.
[<http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>].
 10. New enterovirus species.
[http://www.picornastudygroup.com/types/enterovirus/ev_species.htm].
 11. GR Villarruel, GE Langley, MS Oberste, M Pallansch. Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance --- United States, 2006--2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010 Dec 10; 59:1577-1580.
 12. Chan YF, Sam IC, AbuBakar S: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenogroups using complete genome sequences. *Infect Genet Evol* 2010, 10:404-412.
 13. 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.
 14. 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.
 15. Schuffenecker I, Henquell C, Mirand A, Coste-Burel M, Marque-Juillet S, Desbois D, Lagathu G, Bornebusch L, Bailly JL, Lina B. New introductions of enterovirus 71 subgenogroup c4 strains, france, 2012. *Emerg Infect Dis.* 2014 Aug;20(8):1343-6
 16. Cabrerizo M, Tarragó D, Muñoz-Almagro C, Del Amo E, Domínguez-Gil M, Eiros JM, López-Miragaya I, Pérez C, Reina J, Otero A, González I, Echevarría JE, Trallero G. Molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16 and A6 associated with hand, foot and mouth disease in

Spain. Clin Microbiol Infect. 2014 Mar;20(3):O150-6.

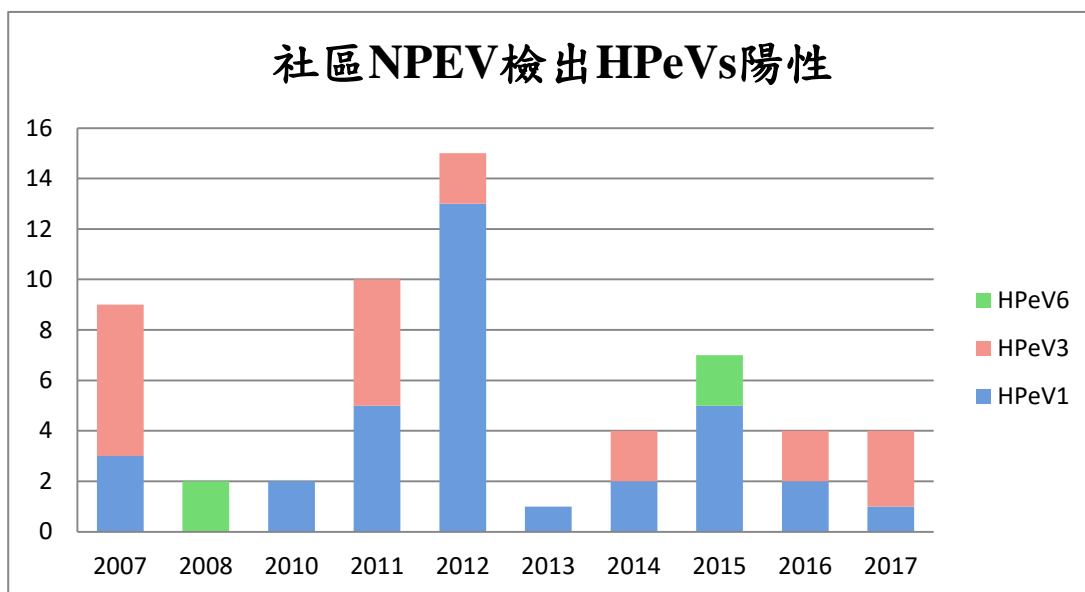
17. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. Intervirology 1980,12:329-334.
18. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. 1999. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. J Clin Microbiol. 37:1288-1293

圖表

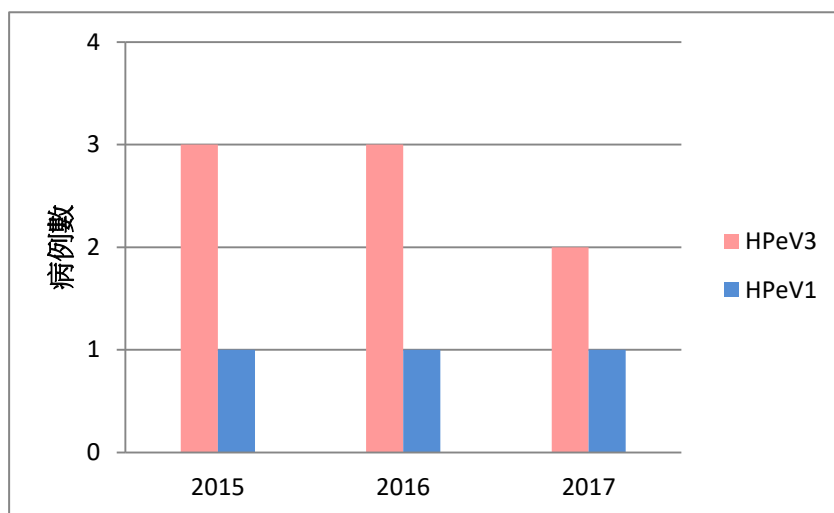
圖一、2007~2017 年台灣地區 Human Parechovirus 親緣系統樹



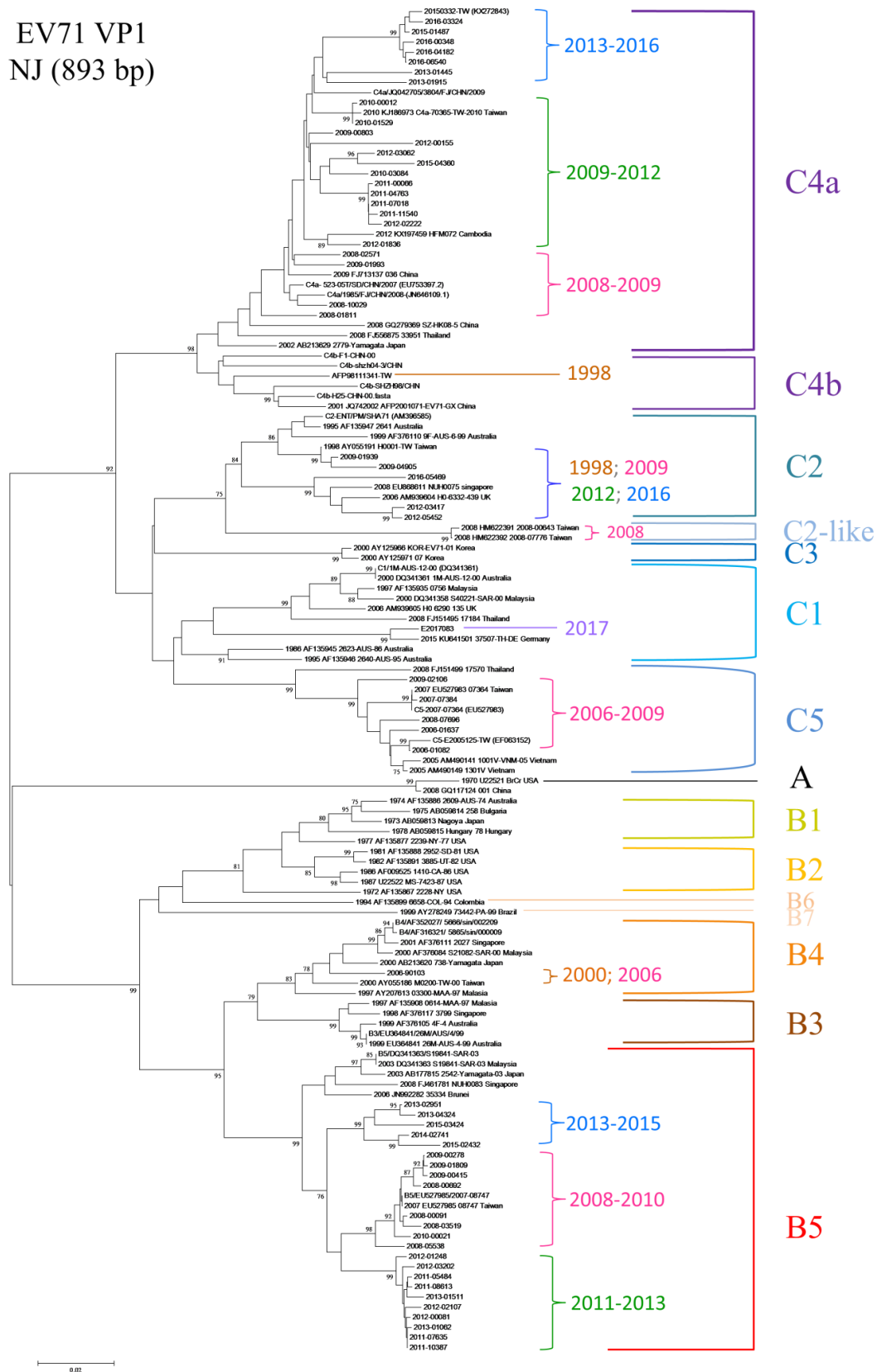
圖二、2007~2017 年台灣社區 NPEV 檢出 HPeVs 陽性分布圖



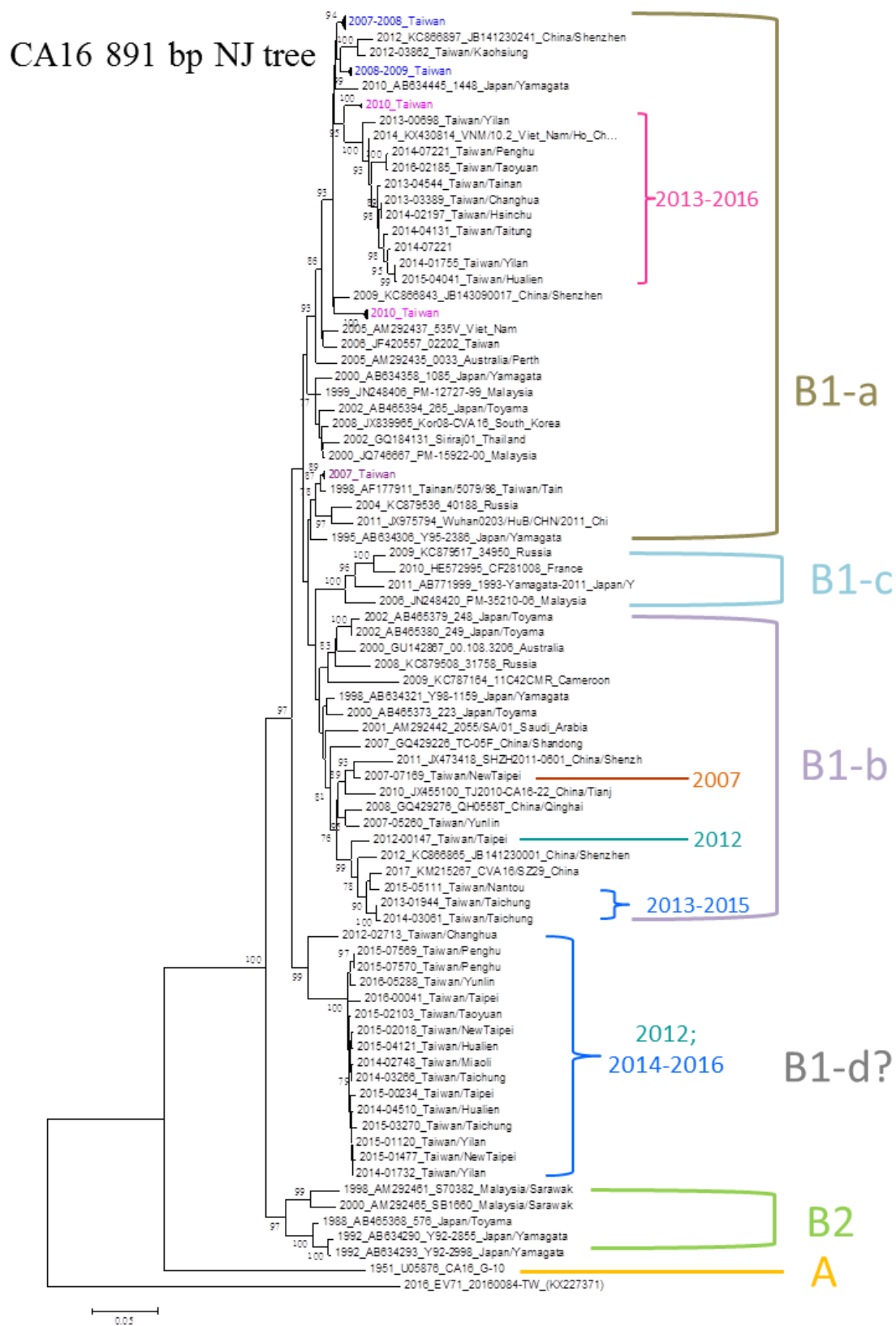
圖三、2015~2017 年腸病毒重症監測檢出 HPeVs 陽性分布圖



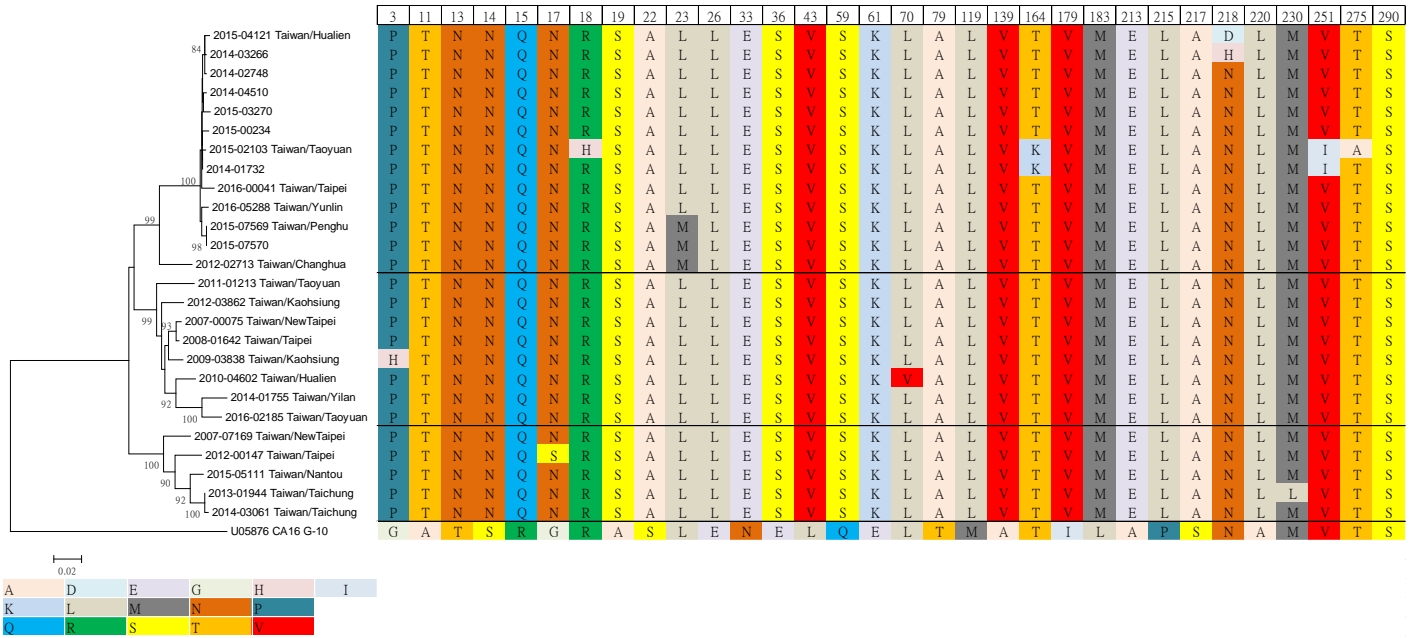
圖四、2006~2017 年台灣地區 EV-A 71 親緣系統樹



圖五、2007~2017 年台灣地區 CV-A 16 親緣系統樹



圖六、2007~2017 年台灣 CV-A 16 VP1 胺基酸序列分析



表一、疑似腸病毒重症病例 HPeVs 症狀分析

病例	HPeVs	臨床症狀	感染其他病原體或外傷
1	HPeV3	嗜睡、發紺，發燒(>38度)，脊髓液有蛋白質上升(86mg/dl)，血小板低下，血糖和電解質不平衡	
2	HPeV3	發燒；肝功能檢查異常 (GOT/GPT: 234/94 U/L)、心肌酵素CKMB上升	
3	HPeV1	腦幹性腦炎，有心搏快、高血壓、與神經學相關症狀，死亡	鼻咽檢出副流感病毒
4	HPeV3	發燒和手口足病表現，下肢肌力減退併步態不穩，急性無力肢體麻痺(AFP)審查為陽性	
5	HPeV1	一次癲癇發作與皮膚出疹。	
6	HPeV3	高燒、肌抽躍	
7	HPeV3	全身紅疹，嘴巴嚴重潰瘍，左側肢體無力，步態不穩。Brain MRI懷疑post. pons有輕微發炎。AFP審查為確認病例。	
8	HPeV3	高燒	尿液培養克雷白氏菌與腸球菌
9	HPeV3	到院前心肺功能停止，新生兒嚴重缺氧缺血性腦病變(HIE)	被床板夾住頭部
10	HPeV3	發燒、心搏加速	
11	HPeV1	嘔吐及輕微發燒，臉部肌肉不對稱(嘴角右偏)、嗜睡、頻繁肌抽躍及步態不穩症狀，腦幹炎，現仍有意識障礙及偶有癲癇	鼻咽檢出EVD68