

計畫編號：DOH95-DC-2007

行政院衛生署疾病管制局 95 年度科技研究發展計畫

台灣地區腸病毒群流行株間免疫螢光染色法系統之建立與應用

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：林翠莉

研究人員：

執行期間：95 年 01 月 01 日至 95 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*

中文摘要

關鍵字：流行株、間接免疫螢染色法、多株抗體、棋盤式滴定、靈敏性、
專一性

自 1998~2006 年由行政院衛生署疾病管局建立的腸病毒監測網系統中，顯示台灣地區腸病毒克沙奇 A 群病毒的流行相當的活躍，且都可以為不同年代主要的流行株(prevalence strain)之一；如 1998 年 CocksackieA2,4,6,16、1999 年的 CocksackieA10、2001 年 CocksackieA6,16、2002 年 CocksackieA4,5,6,16、2003 年 CocksackieA2,5,6,16 及 2004 年的 Cocksackie4,5,6,10 等血清型，2005 年的 Cocksackie4,5,6,16 及 2006 年的 Cocksackie2,4,5，根據整體腸病毒的流行趨勢而言，這些的血清型自 1998~2006 年在台灣地區佔了相當大的比例，因時序的變遷反應這些血清型之間有著消長的情況，也突顯了該等血清型在未來對於台灣地區腸病毒的再流行(re-circulation)的機率是相當高的。

在上述的腸病毒血清型別中，只有 CocksackieA16 可被市售的間接免疫螢光染色(Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)法所鑑定，其餘皆需經基因定序或中和試驗方可鑑定其血清型別，疾病管制局研究檢驗中心有鑑於此，計劃逐年針對 CocksackieA2,,4,5,6,8,10,12 等血清型建置間接免疫螢光染色法的檢測系統，目前已完成 Cocksackie A2,4,5,10A10 等血清型的評估測試系統。

在第二年的計劃中，仍是以兔子為免疫個體來量產多株抗體(polyclonal antibodies)，佐以中和試驗來測得同質抗體(homotiter)與異質抗體(heterotiter)之效價，分析其交叉反應的抗體效價，再挑選一隻進行棋盤式滴定(checkerboard titration)來評估選取抗血清與標幟螢光抗體最適當的測試條件；首先針對各腸病毒之標準株(54株)進行染色鑑定，繼而進行年腸病毒臨床分離株之測定，參與這二個血清型在 Cocksackie A2 計有 268 株及 Cocksackie A5 計有 213 株等臨床分離株，而對於 Cocksackie A2 及 Cocksackie A5 病毒株的選取，回溯自 1998~2006 年歷年的臨床分離株，並佐以基因定序及部份的中和試驗鑑定，這二個血清型經評估後靈敏性(sensitivity)和專一性(specificity)分別為 CVA2 sensitivity 100%, specificity 96.1%、CVA5 sensitivity 100%, specificity 95.9%。

連續二年的計劃結果顯示 CVA2, CVA4, CVA5 和 CVA10 這些血清型的檢測系統是可應用在鑑定臨床腸病毒分離株的例行性檢驗以為本局建立腸病毒之流行趨勢之用，目前由全省各合約實驗室均反應出不錯的效果，由於該方法本身不僅具備簡單、快速，且具有良好的靈敏性及專一性，縮短檢測時間並可減少人力與經費的支出等優點；另外它也可解決台灣地區每年因腸病毒流行時所造成無法分型之窘境，更重的是可快速的累積資料建立台灣地區腸病毒血清型流行趨勢及增加流行預測模式的資料等；每個國家因地域、緯度、氣候、社經狀況、人口等因素，造成腸病毒在該地區的流行趨勢及血清型別均有所不同、為有效的監測與防治腸病毒之疫情，更需發展對於台灣地區流行的腸病毒群的檢測方法來因應我們所面臨到的病原體與疾病的發生。

Abstract

Keyword: Prevalence strain、Indirect Immunofluorescence Assay、polyclonal antibodies、checkerboard titration、sensitivity、specificity

Taiwan CDC set up a national contract laboratory-based surveillance system specifically for Enterovirus infection in 1999. It was shown that Coxsackieviruses A group (CA) were actively circulating during 1998-2006 in Taiwan area; these were exemplified by CA2, A4, A6, A16 in 1998, CA10 in 1999, CA6, A16 in 2001, CA4, A5, A6, A16 in 2002, CA2, A5, A6, A16 in 2003, CA2, A5, A6, A16 in 2004, CA4,5,6,16 in 2005 and CA2,4,5 in 2006. The trend of enterovirus epidemics has favored the recirculation of these CA serotypes.

Among the circulated CA serotypes, only the CA16 can be specifically identified by a commercially available monoclonal antibody; other CA serotypes can only be identified by genetic sequencing or neutralization test. In view of the situation, we have started to develop indirect fluorescent immunoassays for CA2, A4, A5, A6 and A10, with the CA4 and CA10 being completed for use in the contracted laboratories.

In the second year, we have generated rabbit polyclonal antibodies, and assessed their homotiter and heterotiter by means of checkerboard titration for optimal conditions for an indirect fluorescent immunoassay. We started with enterovirus prototypes and followed by clinical isolates, with a total of 268 strains for CA2 and 213 strains for CA5; these clinical isolates were collected during 1998-2006 and substantiated by genetic sequencing and neutralization test. The sensitivity and specificity of the assay for CA2 were 100.0% and 100.0%, respectively, while those for CA5 were 96.1% and 95.9%, respectively.

The data indicated that these newly developed assay is suitable for routine virus isolation, with the advantages of being more simple, rapid, sensitive and specific, and being less workload and expenses. The other advantages are that they would be useful for the untypable enteroviruses, and lead to develop and predict the trend of enterovirus epidemics. The immunoassays developed herein would be beneficial to taking measures for the next possible enterovirus epidemics.

前言

腸病毒的實驗室診斷方法目前仍以傳統的病毒分離及血清學檢查，其血清型別都是仰賴 golden standard 中和試驗之鑑定或藉由分子生物技術及因應區域性所流行之腸病毒血清型自行研發酵素免疫分析法等^(1,2,3,4)。但腸病毒的種類繁多，中和試驗不僅耗時且需不同型別之抗血清，其人力及經費非一般實驗室所能負荷的。所以臨床檢體對腸病毒病毒病原體之分離則以細胞培養時出現細胞病變時，即以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)鑑定出其血清型別⁽⁵⁾，目前已有 19 種腸病毒之血清型可經由商品化之間接免疫螢光染色法之單株抗體鑑定出，分別為：小兒麻痺病毒 1-3 型(Polio type 1-3)、克沙奇 B1-B6(Coxsackie 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(Coxsackie A9, 16, 24) 及腸病毒七十及七十一型等，著實縮短了檢驗時程，而無法用單株抗體所鑑定出之型別則為泛腸病毒(Pan-Enterovirus)，即無法得知為何種血清型？也意味著約有四十餘型的腸病毒仍未被商品化而大量應用在臨床腸病毒檢體之檢測。

台灣地區自 1998 年爆發腸病毒之流行後，暴露了我國在整體病毒檢驗監測網的不足，遂於民國八十八年三月起在全國成立了四家「病毒性感染症合約實驗室」，至九十五年共有十三家合約實驗室分部於北、中、南、東共同

參與病毒監測網資料系統之回饋與資源共享，更使得防疫單位可掌握每年國內腸病毒之流行趨勢及其血清型別的週期的變動情形，並逐年累積腸病毒感染本土資料庫，藉由監測資料顯示不同腸病毒血清型別在不同年代，因環境、季節、流行的週期、群體免疫及盛行率等因素或為腸病毒群之間的競爭，而使得腸病毒群出現消長的現象。

透過本局基因體計劃的實施，陸續將 2000 年至 2006 年各「病毒性感染症合約實驗室」之腸病毒陽性分離株回收、前行政院預防醫學因應 1998 年腸病毒大流行所檢測的全省疑似腸病毒感染所分離的腸病毒病原體及自 1994 年急性無力肢體麻痺症監視系統(Acute Flaccial Paralysis Surveillance System；AFP)的建置所分出的腸病毒病原體等，檢測為 Pan-Enterovirus 之病原體已可藉由部份基因序列與 Gene bank 中腸病毒群參考病毒株序列比對，結果顯示腸病毒群在不同的年代，有著不同的血清型別在流行，有些血清型可經年累月持續著；如腸病毒七十一型及克沙奇 A16 這二個血清型，有些型別則當年出現並為一主要的腸病毒流行株但隔年即消失蹤跡，如 2000 年的伊科病毒第九型、2002 年的伊科病毒第六型；克沙奇 B5、2003 年的伊科病毒第 11 型等，2005 年的克沙奇 B3 等，部份腸病毒的血清型別則持續出現著，但從未為主要之流行株，所以每年的腸病毒流行應為一群腸病毒，而非單一型別。自 1998~2006 年(十月底)整體腸病毒的流行現況，

則以克沙奇 A 群病毒在台灣地區表現的相當活躍，除克沙奇 A1,11,13,14,15,17,18,19,20,22,等型尚未由基因序列分析出，其餘之型別均有被定序出，部份血清型在 1994~2006 間已成為主要的流行株，每隔 2~3 年單一血清型會再次出現，如：CoxsackieA2,4,5,6,8,12 等。

在整體腸病毒的監測網中，顯示在每年腸病毒分離出 Pan-Enterovirus 佔有百分之五十之分離率不等，即約有四十餘型之腸病毒血清型涵蓋在此，由於上述資料克沙奇 A 群病毒在台灣地區表現的相當活躍，且在 1998~2006 年間部份之血清型為主要之流行株；如 1998 年克沙奇 A2,4,6,16、1999 年的克沙奇 A10、2001 年克沙奇 A6,16、2002 年克沙奇 A4,5,6,16、2003 年克沙奇 A2,5,6,16 及 2004 年的 4,5,6 等血清型，2005 年的 Coxsackie4,5,6,16 及 2006 年的 Coxsackie2,4,5，除克沙奇 A16 可藉由市售的單株抗體間接免疫螢光染色法鑑定出，其餘之型別仍需仰賴中和試驗或分子生物之技術等方法，方可確認之。

研究檢驗中心有鑑於此，有計劃的逐年針對 CoxsackieA2,,4,5,6,8,10,12 等血清型建置間接免疫螢光染色法的檢測系統，間接螢光染色法之建立不僅可解決現階段本局所回收腸病毒株結果呈現 NPEV 之檢體，縮短縮短檢測時間、且可統一各病毒性合約實驗室對 NPEV 之檢測模式、迅速建立腸病毒監測網、建立台灣地區腸病毒流行株之趨勢與其週期性、節省基因庫進

行基因定序耗費時間及經費等優點。

材料與方法

材料

- 一、 1998~2006 年病毒性合約實驗室腸病毒臨床分離株
- 二、 製備多株抗血清(polyclonal antibody)
- 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、 1998~2006 年研究檢驗中心腸病毒分離株及標準株

方法

A、RD 細胞株繼代培養^(6, 7, 8, 9)

由液態氮桶中取欲 recoverRD 細胞株一管，迅速置於 37°C 水浴中回溫，將細胞放入 75cm² 培養瓶中，緩慢滴入 10cc%10%DMEM 未含抗生素培養基，置入 36°C 二氧化碳培養，隔夜觀察細胞生長狀況(3~4 天)以為繼代使用。

B、徵漿菌之測定(Mycoplasma Detectiom) (採用 ATCC 之試劑套組)

取至少經繼代二次而未加抗生素之細胞且不經 trypsin-EDTA 處理，於 4°C 下離心 20 分鐘 12000xg，並去除上清液，加入 100ul 的 Lysis Buffere 混合均勻，加熱 95 °C 10 分鐘，從中取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)，加入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1umit)Taq polymerase，混合均勻離心，94 °C 2 分鐘，設定 30cycles(Denature : 94°C，30 秒；Annealing : 55°C，30 秒；Extention : 72°C，60 秒)，由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5ul，放入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1umit)Taq polymerase，混合均勻離心，94°C 2 分鐘，設定 30cycles(Denature : 94°C，30 秒；Annealing : 55°C，30 秒；Extention : 72°C，60 秒)，最後以電泳分析觀察最後結果。

C、病毒株增量^(6,7,8,9,10,11)

將已發育完成在 150 flask 中的 RD 細胞之培養基液體丟棄，以 PBS 緩衝液清洗細胞表面，將欲製備的多株抗之血清型病毒株液適量接種於 RD 細胞株上，置入 36°C 二氧化碳培養箱培育 1 小時，每間隔 15 分鐘搖晃培養瓶，使接種之檢體均勻散佈在細胞之表層，以利吸附，加入僅含抗生素的 DMEM 維持培養基，置於 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養，翌日以倒立顯微鏡觀察細胞病變的發生，當接種細胞呈現 4 價細胞病變(CPE)時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次，4°C，2100g 離心 15 分鐘，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，4°C，2100g 離心 15 分鐘，吸取上清液並分裝以為動物基礎免疫使用。

D、Polyclonal Antibody 製備

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

E、中和試驗(抗體效價測定)⁽¹²⁾

將經免疫後經全採之抗血清稀釋為 1:8，於 56°C 加熱 30 分鐘，經 56°C 加熱處理過之抗血清以含 2% 胎牛血清之細胞培養液做 2 倍系列稀釋，範圍由 1:8~1:131072，加入 100 TCID₅₀ 欲測定該抗血清型之原免疫之腸病毒血清型之抗原，放置 36°C，CO₂ 培養箱中和作用 1 小時，加入 100 μl (5×10⁴ 細胞) RD 細胞懸浮液，置 36°C，CO₂ 培養箱培養，翌日以倒立顯微鏡觀察 CPE，連續觀察 4 天。第 4 天計算同質抗體效價。

F、Checkerboard titration for determining dilutions of Polyclonal antibody and FITC⁽¹²⁾

挑選適當每一血清型經中和試驗測定其同質及異質抗體(homotiter and heterotiter)後之個體可作為間接免疫螢光染色法之 Polyclonal antibodies 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，利用棋盤式的方法求得最適當的測試條作。

G、間接免疫螢光 (IFA) 染色鑑定⁽⁵⁾

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

H、病毒 RNA 的萃取

使用病毒核酸純化試劑組(QIAGEN Inc, CA, USA)進行病毒 RNA 的純化，吸取檢體 140 ul 加入 560 ul AVL 緩衝液於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 ul 絕對酒精混合完全，混合液再通過 QIAmp spin column，離心管以 AW 緩衝液清洗兩次以後，用 AVE 緩衝液將 RNA 離心溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應。

I、反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR) ^(13, 14)

(1) 反轉錄反應(Reverse Transcription) ^{11, 16, 17}

取 5 ul 病毒 RNA 加入 RT 反應的混合液含有 75 mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl₂、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul 及 antisense primer :162 50 pmole 的混合物中，70°C 10 分鐘，再加入 100 units MuLV-reverse transcriptase，於 37°C 作用 90 分鐘。

(2) 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

以 Reverse Transcription 反應中所得 cDNA 進行 PCR，20 μ l cDNA 加入 50 mM KCl、10 mM Tris-HCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、ATCG dNTP mixture 1 mM 及 primer: 159 及 162 各 50 pmole 的混合物中，加入 5 units Taq polymerase (Promega Inc, WI, USA)，於 94°C 變性 (denature) 3 分鐘後，以 94°C 1 分鐘、48°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，進行 35 次反應，最後在 72°C 作用 15 分鐘。

Primer : 編號	序 列	對應病毒序列位址
011	5' -GCICCGAYTGITGCCRAA - 3'	(3408-3389)
187	5' -ACIGCIGYIGARACIGGNCA - 3'	(2612-2631)
189	5' -CARGCIGCIGARACIGGNGC - 3'	(2612-2631)

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

J、定序分析

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 Chcle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)來標記欲分析之核酸產物。由於酸的純度會影響定序反應之好壞，取用高純度($OD_{260/280} > 1.8$)之核酸產物來做為定序之模板。所需之核酸量於雙股 DNA(例如：質體)使用 200~500ng、單股 DNA50~100ng，PCR 反應產物 30~90ng 即可。將適量酸模板、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)、3.2~5.0pmole 的核酸引子，與適量的水混合均勻，使反應總體積為 10ul。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°C 之聚合酶連鎖反應器中，以 94°C 30 秒、55°C 15 秒、60°C 4 分鐘之條件，進行 25 次之循環反應，最後將反應停止在 4°C，之後進行電泳定序。

結果

一、 polyclonal antibodies 之製備

本計劃在第二年年共選擇二株不同腸病毒標準株做為基礎免疫之血清型，分別為 Cocksackie A2,5，每個血清型別均以四隻兔子為免疫接種之個體，每隻接種之病毒量為分別為 CA2：CCID₅₀10^{-7.95}/ml、CA5：CCID₅₀10^{-8.78}/ml，二天為一間隔，連續五次的基礎免疫，每次劑量為 5ml，直至 42 天，再追加 10ml 該型之未去活化病毒，間隔一週後，進行全採血取得免疫後之抗血清並以中和試驗測其最終抗體效價。

二、 Homotiter 之測定

所採得的血清則與原來所接種免疫的標準株進行中和試驗，測其最終抗體效價，結果如表一、表二

三、 CocksackieA2、5 Checkerboard 測試條件之選取

對於 checkerboard 的測定，我們選定多株抗體的個體分別為 CA2(編號#80)、CA5(編號#86)進行測試條件的選取，我們所挑選的 CocksackieA2,5 的 popolyclonal antibodies 稀釋倍數達 1:1000(CA2)及 1:2000(CA5)與 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluoresccin conjugated secondary antibody 稀釋倍數為 1:1000 及 1:1200 作用於原來所免疫的腸病毒標準株(即 CocksackieA2,5)進行交叉配對使用時，可觀察到在這樣的條件內所得的螢光效果最為適當，依判定的標準約為 2+(平均每個視野可觀察到百分之五十或以上的綠色螢光細

胞)。隨著多株抗體及螢光標幟物稀釋倍數的增加，則蘋果綠之螢光則隨之下降，經測定後所選擇之測試稀釋濃度如表三

四、 敏感性(Sensitivity)與專一性(Specificity)

在對於這二個血清型(CoxsackieA2, 5)進行臨床株的測試前，我們已藉由 checkboard 所挑選出的測試濃度進行 54 株腸病毒標準株的間接免疫螢光染色法的檢測，觀察是否在不同的血清型會有 cross reaction 反應的發生，繼而進行臨床株的測定，Coxsackie A2 部份，計有 268 株；另 Coxsackie A5 計有 213 株，檢體來源則涵蓋自 1998~2006 年流行在台灣地區的腸病毒分離株如表四，這二個血清型的敏感性 (Sensitivity)與專一性(Specificity)詳如表五。

討論

自 1998~2006 年在整體腸病毒的監測網中，顯示每年腸病毒分離出 Pan-Enterovirus 佔有百分之五十之分離率不等，在 2006 年(十月)高達 70%，即以市售的單株抗體是無法鑑定出型別約有四十餘型之腸病毒，也代表這些血清型必須藉由基因定序或中和試驗來鑑定方可確認其型別之；資料中亦顯示克沙奇 A 群病毒在台灣地區表現的相當活躍，且在 1998~2006 年間部份之血清型為主要之流行株；如 1998 年克沙奇 A2,4,6,16、1999 年的克沙奇 A10、2001 年克沙奇 A6,16、2002 年克沙奇 A4,5,6,16、2003 年克沙奇 A2,5,6,16 及 2004 年的 4,10, 5,6 等血清型，2005 年的 Coxsackie4,5,6,16 及 2006 年的 Coxsackie2,4,5。

所以疾病管制局研究檢驗中心有鑑於此，有計劃的逐年針對克沙奇 A2,4,5,6,8,12,10 等血清型建置間接免疫螢光染色法的檢測系統，在第一年的執行計劃中，挑選腸病毒血清型分別為 Coxsackie A4，A10，原因在於 Coxsackie A4 及 Coxsackie A10 分別為 2004 年台灣地區上半年及下半年主要的流行株。而在第二年的執行計劃中，則以 Coxsackie A2 及 Coxsackie 5 為主，這二個血清型 2006 年在台灣地區的流行幅度自 2000 年最為顯著，當然這並非是預測該血清型會發生流行，而是依歷年的流行趨勢而決定的；且根據整體腸病毒的流行趨勢而言，這些的血清型來年在台灣地區應會再 re-circulation 的機率是相當高的，因為這些血清型自 1998~2006 年間，幾乎每年都可監測出它們的存，並且可以為不同年代主要的流行株；這些血清型利用分子生物學的方法皆分類歸為 Human Enterovirus A Species

(HEVA)。

計劃中免疫的個體主要是以兔子為主，每個血清型四隻，其目的為 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. 以四隻為免疫之個體，可避免因個體之差異所造成抗體效價之不同，增加選擇之機會 5. 避免基礎免疫過程中，因個體之不同而導致死亡發生因而影響抗血清量產之問題等，所以由表一、表二即可觀察到同一血清型接種相同的病毒量及基礎免疫，而最後抗血清效價則因個體之不同而呈現倍數的差異，當然中和抗體效價的高低，雖不影響檢測系統的建置，只是對於於血清稀釋的倍數及整體抗血清的應用有所不同。

在進行臨床檢體分株離測試前，我們採用 checkerboarder 來挑選抗血清及螢光標幟物最適當的稀釋濃度及反應條件，藉由 checkerboard 可以觀察到 CocksackieA2 稀釋倍數達 1:1000 及 CocksackieA5 稀釋倍數達 1:2000 與 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluoresccin conjugated secondary antibody 稀釋倍數為 1:1000 及 1:1200 作用於原來所免疫的腸病毒標準株 (即 CocksackieA2,5) 進行交叉配對使用時，可觀察到在這樣的條件內所得的螢光效果最為適當，依判定的標準約為 2+(平均每個視野可觀察到百分之五十或以上的綠色螢光)，當然每一個血清型的抗血清其稀釋濃度皆有所不同。對於在第一年已建置完成的 CA and CA10，當時 goat anti-rabbit

immunoglobulin G fluorescein conjugated secondary antibody 即以 1:1000 的稀釋條件為主，所以在逐年不同血清型的建置，皆會以該稀釋條件為主，主要是讓整個操作流程更為簡化及一致；雖說間接免疫螢光染色法是個相當簡易又普遍的方法，但由於腸病毒的血清型別相當的多，在中和抗體的檢測中，即可得知不同的血清型之間會有 hetero-antibody 的產生，一般抗體效價介於 <1:8~1:128，相對於應用在間接免疫螢光染色法，則不同血清型會發生 cross reaction 是可以預知的，所以我們進一步採用上開的稀釋條件針對株腸病毒標準株(總計 54 株，血清型分別為:Coxsackie A group (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 20CA21)、Coxsackie B group (1, 2, 3, 4, 5, 6)、Echo virus group (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)、EV69, 69, 70、EV71 來進行這部份的測試，以確定這樣的條件下，是不會有 cross reaction 的反應發生，所以當抗血清稀釋倍數不高的情況(data not show)，這樣的現象是有可能發生的；另外我們也可觀察到這中和抗體的效價和抗血清的稀釋倍數並非呈現正向的關係，如 Coxsackie A2 挑選之抗血清稀釋濃度為 1:1000；Coxsackie A5 挑選之抗血清稀釋濃度為 1:2000，表三則為最後被選定為試之條件。

對於要進行臨床分離株的的測定時，檢體主要的來源是涵蓋自 1998~2006

年疑似腸病毒感染及重症等個案，臨床表徵伴有發燒、紅疹、手足口症 (hand-foot-mouth disease) 或疱疹性咽峽炎 (Herpangina) 等所分離到的病毒株，最後病體的確認主要是以間接免疫螢光染色法、基因定序及中和試驗來確定其血清型，而這些血清型或基因型亦是自 1998~2006 年流行於台灣地區的腸病毒群，分別為 CoxsackieA2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 21, 24 and EV71、CoxsackieAB1, 2, 3, 4, 5、Echo 3, 4, 6, 9, 11, 18, 25、Polio virus type1, 2, 3(均為疫苗株)及 HSV。在今年完成評估測試的這二個血清型 (CoxsackieA2, A5)，造成偽陽性的分離株皆為 HSV，由於臨床症狀上通報疱疹性咽峽炎時，其實分離出的病原體則為 HSV，另外一般實驗室用大概會選擇 2~3 株的細胞株來分離臨床上因疑似腸病毒感染的檢體，其是 HSV 亦可能在這些細胞株被分離出，但 HSV 之 CPE 與腸病毒不一樣，有經驗者從 CPE 就可以區分或在進行鑑定時加以排除，即可避免偽陽性的反應發生；而對於 CoxsackieA2 及 A5 同血清型病毒株的選取，我們皆回溯自 1998~2006 年歷年的臨床分離株，並佐以基因定序及部份的中和試驗鑑定，結果顯示目前所挑選的分離株皆可與其標準株所免疫的 polyclonal antibodies 進行反應，在不同年代的分離株經該方法的測定反應出螢光的強弱的不同。

在第二年計劃整體的結果顯示，CoxsackieA2 及 A5 整體評估測試系統亦如第一年計劃中 CoxsackieA4 及 A10 可以得到相當好的 sensitivity 及 specificity；分別為 CoxsackieA2 sensitivity 100%, specificity 96.1%、

CoxsackieA10sensitivity100%, specificity95.9% ◦

結論與建議

- 一、建置台灣地區腸病毒流行株腸間接免疫螢光染色法連續二年的計劃中，已順利完成 CVA2、CVA4、CVA5 and CVA10 等血清型的評估與建置系統，並已全面應用在全省的病毒性合約實驗室，提供臨床腸病毒分離的例行性檢驗的鑑定工作，以快速建立腸病毒血清型的流行趨勢。
- 二、該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。
- 三、該等血清型的建置完成，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。
- 四、對於台灣地區每年因腸病毒流行時所造成無法分型之現況，已可由原有之 50%下降了 20%。
- 五、該檢驗試劑的提供，對於累積資料建立台灣地區腸病毒流行血清型之趨勢可縮短 2-3 星期，可提供腸病毒流行的早期偵測。
- 六、流行趨勢的累積，可提供防疫、血清型預測模式及治療等多方面之發展。
- 七、每個國家因地域、緯度、氣候、社經狀況、人口等因素，造成腸病毒在該地區的流行趨勢及血清型別均有所不同、為有效的監測與防治腸病毒之疫情，是更需發展對於台灣地區流行的腸病毒群的檢測方法來因應我們所面臨到的病原體。
- 八、本項檢驗方法的建置，並非在於這項方法的困難性，重點在於基礎傳統檢驗技術的應用、標準株種原的備置、保存及歷年分株的庫存（生物材料）方可完成。
- 九、雖然目前已提供各病毒性合約實驗的試劑套組，人力乃由計劃中之人員勉強維持該系統之正常運作，但隨著血清型的增加及計劃的結束，則在後續的整個運作流程上恐出現無法成承擔這樣的負荷量，宜應再

增加正式的人力來延續這項業務的進行，方能與防疫的腳步同時進行，否則隨著年代的變遷，則又將回到面臨到無法快速確認腸病毒血清型的窘境。

參考文獻

1. Herrmann EC, Person DA, Smith TF (1972) : Experience in laboratory diagnosis of enterovirus infections in routine medical practice. *Mayo Clinic Proceedings* 47:577-586
2. Bird, B., and F.T. Forrester. 1981. *Basic Laboratory Techniques in Cell Culture*. U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
3. M. Steven Oberste, David Schnurr, Kaija Maher, Suleiman al-Busaisy and Mark A. Pallansch (2001) : Molecular identification of picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *Journal of General Virology*, 82:409-416
4. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980, 12:329-334.
5. Alma S. Rigonan, Linda Mann, and Tasnee Chonmaitree. Use of Monoclonal antibodies to identify serotype of enterovirus isolate. *Journal of Microbiology* July 1998, p.1877-1881
6. Lee, L.H., C.A. Phillips, M.A. South, J.L. Melnick, and M. D. Yow 1965 : Enteric virus isolation in different cell culture. *Bull. WHO* 32:657-663
7. Bell EJ, Cosgrove BP (1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bulletin of the World Health Organization* 58:423-428
8. 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
9. Henny D. Isenberg, Editor in Chief Long Island Jewish Medical Center. *Essential Procedure for Clinical Microbiology* p451-560
10. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH (1975) : Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *Journal of Clinical Microbiology* 2:183-185
11. Reed, L.J., and H. Mienck. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497
12. Schidt N-J and Lennette E-H. 1973. Advances in the serodiagnosis of viral infections. *Prog Med Virol* 15:244-308
13. K. Kilpatrick DR, Pallansch MA. 1999. Molecular evolution of the human picornavirus

Classification. J virol 73:1941-1948

14. 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

表一 CocksackieA2 標準株多株抗體中和效價

兔子 免疫個體編號	#79	#80	#81	#82
中和抗體效價	19,906	19,906	7,942	33,563

表二 CocksackieA5 標準株多株抗體中和效價

兔子 免疫個體編號	#83	#84	#85	#86
中和抗體效價	2,818	5,000	6,324	25,176

表三 CocksackieA2、5 Checkerboard 之濃度

血清型	多株抗體 稀釋濃度	二抗 FITC 標幟物稀釋濃度
Cocksackie A2	1:1000	1:1000
Cocksackie A5	1:2000	1:1000

表四

CoxsackieA2、5 評估測試檢體一覽表

血清型	腸病毒標準株 (Prototype)	臨床測試檢體	
CVA2	54 株 Coxsackie A group (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 20 CA21) Coxsackie B group (1, 2, 3, 4, 5, 6) Echo virus group (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) EV69, 69, 70、EV71	基因型或血清型為 CA2 (85 株) 1998, 1999, 2000, 2003~2006 年	N0n-CA2 (183 株) 1998-2006 年 CA4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 21, 24 and EV71 CB1, 2, 3, 4, 5 Echo 3, 4, 6, 9, 11, 18, 25 Polio1, 2, 3 HSV
		基因型或血清型為 CA5 (46 株) 2003~2006 年	N0n-CA5 (167 株) CA2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 21, 24 and EV71 CB1, 2, 3, 4, 5 Echo 3, 4, 6, 9, 11, 18, 25 Polio1, 2, 3、HSV
CVA5			

表五

CoxsackieA2、5 之靈敏性及專一性

Serotype	Sensitivity	Specificity
Coxsackie A2	100%	96.1%
Coxsackie A5	100%	95.9%

CoxsackieA2, 4, 5, 10IFA 檢驗試劑套組

