

計畫編號：DOH97-DC-2010

行政院衛生署疾病管制局九十七年度科技研究發展計畫

台灣地區腸病毒群流行株間接免疫螢光染色法
系統之建立與應用

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：林翠莉

研究人員：曾燦璋、黃教威、謝若郁

執行期間：97年1月1日至97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：間接免疫螢光染色法、多株抗體、棋盤式滴定、靈敏性、專一性、克沙奇病毒 A21、伊科病毒 18

台灣地區自 1999 年起建立多元化的腸病毒監測網，逐年因應本土性資料的累積，顯示因感染腸病毒在臨床上的表徵配合病原體監測，十年內已反應出腸病毒不同的血清型別，平均每年約有 15 個型別或以上流行於台灣地區，在週期性的流行可呈現出三種型態，分別為常態性(endemic)、再發性(occurrence)及穿插性的(episodical)。在 2006 年腸病毒的型別以基因分型前十名的排行榜中，有二個腸病毒型別幾近十年內未曾出現並流行於台灣地區，分別為 Coxsackievirus A21 (CVA21)and Echovirus type 18(Echo18)，本計劃嘗試延續間接免疫螢光染色建置這二個血清型的檢測系統，目的為因應來年流行時以降低腸病毒的型別無法在第一線時間於臨床上被鑑定之現象並增加型別的鑑定量能。

疾病管制局自 1999 年起建立的腸病毒病原體勢監測系統中，藉由血清型與基因型分析的資料，顯示隨著時序的變遷有著不同的腸病毒群在流行呈現出消長的現象；其中克沙奇 A 群的病毒部份血清型在台灣地區呈現常態性的流行，如 1998 年血清型克沙奇病毒 A2,4,6,16、1999 年克沙奇病毒 A10、2001 年血清型克沙奇病毒 A6,16、2002 年克沙奇病毒 A4,5,6,16、2003 年血清型克沙奇病毒 A2,5,6,16、2004 年克沙奇病毒 A4,5,6,10、2005 年克沙

奇病毒 A5,6,16、2006 年血清型克沙奇病毒 A2,4,5,6 及 2007 年血清型克沙奇病毒 A4,6,10 等血清型；顯示這些血清型在台灣地區週期性的流行趨勢。

目前病毒性合約實驗室對於腸病毒病原體的鑑定仍是以細胞培養為主，當出現細胞病變時佐以間接免疫螢光染色法(Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)為最廣泛的方法，雖然利用中和試驗或基因定序的方法亦可知其型別，惟對各合約實驗室在人力與在經費上仍是一大考量；由於台灣地區所流行的腸病毒血清型在上述的型別中，只有 CVA16 可被市售的間接免疫螢光染色法所鑑定，其餘皆需經基因定序或中和試驗方可鑑定其血清型別，相對的會增加型別鑑定的時間與經費，有鑑於防疫的時效，在連續執行三年的計劃中，已陸續完成了克沙奇病毒 A2,4,5,6,10 等五個血清型的間接免疫螢光染色法的檢測系統，並將五種血清型混合在一起，組合檢驗試劑套組，謂之『Coxsackievirus A IFA Typing Kit Set I』，現階段已導入各病毒性合約實驗室臨床分離株使用以為即時建立腸病毒流行趨勢。

本計劃仍延續前三年的計劃模式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)之效價，以棋盤式滴定(checkerboard titration)來選取間接免疫螢光染色法最適當的測試條件，進一步測試各型腸病毒之標準株，繼而進行腸病毒臨床分離株之測定，所以在前三年所完成的五型腸病毒血清型的敏感性(Sensitivity)與專一性(specificity)分別為：

CVA2 sensitivity 100%, specificity96.1%

CVA4 sensitivity 95.59%, specificity96.9%

CVA5 sensitivity100%, specificity95.8%。

CVA6 sensitivity 100%, specificity96.6%

CVA10 sensitivity96.59%, specificity96.1%

另將五型之抗血清混合成 Blend 的抗血清亦再進行腸病毒之標準株及臨床分離株之測定，其敏感性及專一性亦可達 100%及 95.6%；另在今年執行計劃中所完成的 CVA21 及 Echo18 二個血清型的敏感性(Sensitivity)與專一性(specificity)分別為：

CVA21 sensitivity 100%, specificity97.8%

Echo18 sensitivity 100%, specificity98.0%

以目前整體的檢測系統顯示與市售的螢光染劑不同並具有以下之特點：1. 抗血清來源不同，市售間接免疫螢光試劑是以老鼠免疫的單株抗體為主，本檢測系統則為兔子免疫的多株抗體。2. 單株抗體是檢測病原體表面之單一抗原位點(Epitope)，如病毒之抗原位點有改變就無法偵測，本試劑是為多株抗體(polyclonal antibodies)，故無此現象發生。3. 具良好之敏感性及特一性，型別鑑定效能等同於 gold standard 之中和試驗。4. 尚無其他國家有此檢驗試劑套組的設計與應用。

本計劃自九十四年起申請並執行，已順利完成了五型常態性出現於台灣地區之血清型，已可大幅下降台灣地區腸病毒未能分型的比率至 10%或

以下並縮短腸病毒檢測時間增加實驗室的鑑定量能，更重要的是能符合並達到原計劃中訂定之目標，及時建立腸病毒監測網、節省基因庫進行基因定序耗費時間及經費等。

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:Indirect Immunofluorescence Assay 、 polyclonal antibodies 、 checkerboard titration 、 sensitivity 、 specificity 、 CVA21 、 Echo18

A laboratory surveillance system for enterovirus in Taiwan was set up in 1999, and the accumulated data since then showed that various enteroviruses of an average around 15 serotypes were taking turns to break out each year. According to their reemerging patterns, these enteroviruses can be classified into three categories: endemic, recurrent, and episodic. Many Human Enterovirus A (HEVA) species belong to the “endemic” category. For example, we had outbreaks caused by Coxsackievirus A 10 (CVA 10) in 1999; by EV71, CVA6, and CVA16 in year 2001; by EV71, CVA4, CVA5, CVA6, and CVA16 in 2002; by EV71, CVA2, CVA5, CVA6, and CVA16 in 2003, etc. In our last three years’ projects, a “Coxsackievirus A IFA Typing Kit Set I” good for the detection of CVA2, CVA4, CVA5, CVA6, and CVA10 has been developed and distributed for use at our contract laboratories. The sensitivity and specificity of the assay were 100% and 96.1% for CVA2, 95.59% and 96.9% for CVA4, 100% and 95.8% for CVA5, 100% and 96.6% for CVA6, and 96.59% and 96.1% for CVA10, respectively. And those of the blended antisera of the above five species were 100% and 95.6%, respectively, as assessed by using both standard strains and clinical isolates.

In 2006, we detected two “episodic” enterovirus species among the top ten isolates, as these were their first appearances in recent 10 years. They were Coxsackievirus A21 (CVA 21) and Echovirus type 18 (Echo 18). In this year project, we followed our previous methodology to build up a serologic diagnostic system particularly for these two enteroviruses. In case they reemerge in the future, we can use it to facilitate the case diagnoses and enhance

their prevention. The assessed sensitivity and specificity of these two antisera were 100% and 97.8% for the former, and 100% and 98.0% for the latter, respectively.

These data indicate that our home-made polyclonal antibody kit is rather suitable for routine use with the advantage of being rapid, simple, highly sensitive, and specific. The results of the tests are just as good and accurate as those from the conventional test of neutralization, but without the time-consuming details. Additional value it brings about is that other different virus strains can also be recognized by these polyclonal antibodies, as the enterovirus changes consistently and unpredictably through the years, while commercial monoclonal antibodies may lose their ability to identify different strains if the key epitope happens to disappear. We have found that the annual rate of enteroviruses becoming untypable has been drastically reduced to less than 10% in recent years, which are in favor of the development of our projects. Therefore, the novel immunoassay developed here would very likely be beneficial in the long run to the prevention and control in the future.

We believe the epidemic trend and circulating serotypes are somehow related to various factors, such as locality, latitude, climate, social and economic circumstances, and demographic elements of the people involved, which each has certain impacts on the practical outcomes of the enterovirus epidemics. In order to effectively monitor, prevent in advance, and control its spread when it occurs, we need to further develop more different ways of diagnostic assays to detect enterovirus cases quickly and accurately, so that we can successfully face the challenge without too much costs.

前言

腸病毒之型別眾多，並廣泛存在世界各地造成流行，臨床上的表徵是為多樣性的，實驗室對於型別的鑑定主要是以中和試驗為主，謂之為“血清型”，然而該方法不僅耗時且需不同型別之抗血清，且在人力、經費、技術的熟練度及再浮現或新興的腸病毒型別非一般實驗室所能負荷的，對於臨床上時效的助益不大；所以間接免疫螢光染色法 (Indirect Immunofluorescence Assay；IFA)、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^(1,2,3,4,5)皆可用來進行腸病毒型別定之用。其中以 IFA 這個檢驗方法是目前在臨床上最廣泛用來鑑定腸病毒的型別，惟只有 19 種腸病毒之血清型可經由該商品化之間接免疫螢光染色法之單株抗體鑑定出⁽⁵⁾，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(Coxsackievirus A9, 16, 24)、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？也意味著約有臨床上若以間接免疫螢光染色法做為腸病毒的型別鑑定時，仍有四十餘型的腸病毒無法鑑定其型別。

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 1999 年三月起在全國成立了四家「病毒性感染症合約實驗室」，至 2006 年增加成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，其目的可使防疫單位每年掌握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症本土資料庫，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。

台灣地區腸病毒的監測網中主要是以 IFA 來進行臨床上第一線監測腸病毒型別的鑑定；並在 2002 年起配合基因定序之方法雖可提昇泛腸病毒 (Pan-Enterovirus) 未知腸病毒型別的鑑定，但在時效上較仍未能及時反應當時的流行趨勢(會有 1~2 個月的落差)，結合二個型別鑑定的方法結果顯示台灣地區腸病毒群在不同年代，有著不同的血清型別在流行，流行的趨勢可分為常態性 (endemic)、再發性 (occurrence) 及穿插性的 (episodic)。所以每年的腸病毒流行應為一群腸病毒，而非單一型別而導致在臨床表徵的多樣化⁽⁶⁾。分析自 1998~2007 年整體腸病毒的流行趨勢，顯示克沙奇 A 群病毒在台灣地區表現的相當活躍，主要為克沙奇病毒 A2,4,5,6,8,9,10,12 and 16 等血清型，部份血清型在 1998~2007 間已成為主要的流行株，常態性的流行於台灣地區，主要為克沙奇病毒 A2,4,5,6,10 and 16 等；但只有 Coxsackie

virus 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，這五個常態出現的血清型顯示自 1998~2007 在年台灣地區腸病毒每年平均約為百分之 40~50%的分離率，因在 1998~2007 年間這五個血都是主要的流行株之一；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 年的克沙奇 A4, 10 及 2005 年克沙奇 A2, 5、2006 年克沙奇 A2, 4 等血清型及 2007 年克沙奇 A6,10,16 等血清型。

所以本計劃在前三年(94~96 年)執行中，已建置完成了自 1998~2006 年五種常態(endemic)流行在台灣地區血清型別；分別為 Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10 等血清型，並將這五種血清型組成『Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I』應用於本局遍佈於全省的的十三家病毒性合約實驗室以為監測腸病流行趨勢之用⁽⁷⁾，對於本局每年建立腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當的大，該試劑套組在 2008 年的腸病毒監測網中，是已可真正反應出對於防疫上的效力，雖說今年亦是腸病毒七十一型的流行，但克沙奇 A2(十月底)應是今年的第一名流行株，也是十年來流行幅度最大的一年；所以提供了防疫單位進入腸病毒流行期時，更能及時掌握了不同型別的流行趨勢，對於同一時間不同地域不同的血清型別配合臨床上的表徵可進一的宣導與

防範。

不同國家因地域及緯度的不同，流行血清型別亦不相同，『Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I』納入腸病毒流行趨勢監測之用，最重要的是縮短型別的鑑定時間，及時建立單一型別的流行趨勢；依據表一腸病毒病原體利用基因定序的資料顯示，2006 年台灣地區在當年流行的前十名血清型排行榜中，出現了二個自 1998 年起不曾在監測點上所分離到的腸病毒型別，分別為 Coxsackievirus A21(CVA21) and Echovirus type 18(Echo18)，其中 Echo18 為當年排行榜上的第三名，腸病毒的流行勢顯示出台灣地區對於腸病毒的流行不僅是現有常態的血清型或是再發性的，而再浮現的血清型亦是另一個警惕，所以本計劃嘗試在 97 年以現有的模式建立這二個血清型之間接免疫螢光染色法檢測系統，其目的為因應來年之流行及增加腸病毒型別的鑑定量能。

由於間接免疫螢光染法本身不僅具備簡單、快速，且具有良好的敏感性及專一性，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流行預測模式等；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。

材料與方法

材料

- 一、 1998~2007 年病毒性合約實驗室腸病毒臨床分離株
- 二、 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、 腸病毒標準株

方法

A、RD 細胞株繼代培養^(8, 9, 10, 11)

由液態氮桶中取欲 recover RD 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、黴漿菌之測定(EZ-PCR Mycoplasma Test Kit, Biological Industries)

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 10 分鐘 16000xg，並去除上清液，加入 50ul 的 Lysis Buffer 混合均勻，加熱 95 °C 3 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 35ul 純水及 10ul reaction Mix，使用 thermal cycler 進行 PCR，其條件如下：94°C，30 秒，(94°C，30 秒； 60°C，120 秒； 72°C，60 秒) 36cycles，72°C，4 分鐘，最後以電泳分析結果。

C、病毒株增量^(8,9,10,11,12,13)

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，將欲製備的多株抗體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

愧培養瓶，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，2100 g 離心 15 分鐘，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氯仿強烈振盪十分鐘，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)⁽¹⁴⁾

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 倍系列稀釋至：131072，加入 100 CCID₅₀ 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⁽¹⁴⁾

挑選適當每一血清型經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 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件。

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，混合液離心通過 QIAmp spin column，再以 AW 緩衝

液清洗兩次，最後以 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) ^(15,16,17)

取 5 ul 病毒 RNA ， RT-PCR 總反應體積為 50ul ， 包含: SuperScript III RT 反轉錄酵素 (Invitrogen ,USA) 200U 、 Taq DNA Polymerase(Invitrogen ,USA) 5 U 、 2X PCR buffer 、 200uM dNTP 、 50 pmole primers ， 使用 thermal cycler 進行 PCR ， 其條件如下: 42 °C ， 50 分鐘 ， 95°C ， 3 分鐘 ， (94°C ， 30 秒 ; 48°C ， 90 秒 ; 72°C ， 90 秒) 40cycles ， 72°C ， 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' -GCICCGAYTGITGCCRAA - 3'	(3408-3389)
187	5' -ACIGCIGYIGARACIGGNCA - 3'	(2612-2631)
189	5' -CARGCIGCIGARACIGGNGC - 3'	(2612-2631)
222	5' -5CICCGIGGIGGIAYRWACAT - 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

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^(TM) Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystems)來標記欲分析之核酸產物。由於核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 DNA 50~100ng，PCR 反應產物 30~90ng 即可。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)、3.2~5.0pmole 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

選擇 Coxsackievirus A21(CVA21)及 Echovirus type18(Echo18)之標準株做為基礎免疫之病原體之來源，每個型別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 CVA21： $CCID_{50}10^{-7.17}/ml$ 、Echo18： $CCID_{50}10^{-7.35}/ml$ ，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，結果如表二及表三

三、 CVA21 與 Echo18 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 CVA21(編號#107)、Echo18(編號#45)進行測試條件的選取，我們所挑選的 CVA21 和 Echo18 的 popolyclonal antibodies 稀釋倍數 分別為 1:600 及 1:2000 與 goat anti-rabbit immunoglobulin G fluoresccin conjugated secondary antibody 稀釋倍數為 1:1000 作用於原來所免疫的腸病毒標準株進行螢光染色(表四)，可觀察到在這樣的條件內可以得到適當的螢光反應，判定的標準約為 2+(平均每個視野可觀察到百分之五十左右的綠色螢光細胞)。隨著多株抗體及螢光標幟物稀釋倍數的增

加，則蘋果綠之螢光會有逐漸下降之現象。(圖一)

四、 敏感性(Sensitivity)與專一性(Specificity)

五、 在進行臨床分離株測試前，分別將 CVA21 and Echo18 藉由 checkboard 所挑選出的測試條件進行 55 株腸病毒標準株(表五)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，選取自 1998~2007 年流行在台灣地區的腸病毒分離株計有 310 株，包括 56 株 CVA21 及 82 株 Echo18，參與臨床的血清型計有 25 型如(表五)，該二個血清型所獲得的敏感性(Sensitivity)與專一性(Specificity)如表六所示。

討論

自 1998~2007 年在腸病毒的監測網中的型別顯示，每年腸病毒分離出腸病毒以市售螢光染劑判定為 Pan-Enterovirus 平均佔有百分之五十之分離率不等，在 2006 更高達 78%，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，也意味著代表這些血清型必須藉其他型別鑑定方法如基因定序或中和試驗來鑑定方可確認其型別之；監測網中的病原體型別以克沙奇 A 群病毒在臺灣地區表現的相當活躍，且在 1998~2007 年間部份之血清型為主要之流行的型別之一；如 1998 年克沙奇病毒 A2,4,6,16、1999 年的克沙奇病毒 A10、2001 年克沙奇病毒 A6,16、2002 年克沙奇病毒 A4,5,6,16、2003 年克沙奇病毒 A2,5,6,16 及 2004 年克沙奇病毒 A4,10, 5,6、2005 年克沙奇病毒 A4,5,6,16、2006 年的克沙奇病毒 A2,4,5 及 2007 年克沙奇病毒 A4,6,10 等血清型；所以依據整體腸病毒的流行趨勢而言，這些血清型來年在臺灣地區應會再 re-circulation 的機率是相當高的；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，本計劃在前三年(94~96 年)執行中，已建置完成了自 1998~2006 年五種常態(endemic)流行在臺灣地區血清型別；分別為 Coxsackievirus A2, 4, 5, 6, 10 等五個血清型，並將這五種血清型組成『Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I』應用於本局遍佈於全省的

十三家病毒性合約實驗室以為監測腸病流行趨勢之用，實際上對於本局每年建立腸病毒主要血清型別流行趨勢助益相當的大，往年需基因定序方可知道其型別，往往在流行趨勢的監測時效會有 1~2 個月的延滯時間，這個試劑套組的導入在型別鑑定之用，在 2008 年足已反應於防疫上的效力，雖說今年亦是腸病毒七十一型的流行，但克沙奇 A2(十月底)確是今年的第一名流行株，也是十年來最大流行的一次，提供了防疫單位進入腸病毒流行期時，更能及時掌握了不同型別的流行趨勢，對於同一時間不同地域不同的血清型別配合臨床上的表徵進一步的宣導與防治。

計劃中免疫的個體主要是以兔子為主，仍以四隻個體為免疫的對象，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.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，所以由表二及表三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，有時雖不影響檢測系統的建置，但可增加對於於血清稀釋的適當條件及整體抗血清的應用有所不同。

由於腸病毒的型別眾多，所以對於每一個血清的濃度都是做了適當的稀釋，其目的為預防產生 cross reaction，所以當挑選適當的濃度後，可

先與不同腸病毒標準株進行測試，結果顯示大部份是在多株抗體其血清稀釋倍數不高的情況下會發生 cross reaction (data not show)；可進而再修正其血清濃度的條件，以利進入臨床分離株的測試與評估系統；另一個在選取血清濃度的條件需考量在螢光顯微鏡下所反應的螢光效果，目前判定標準約為 2+(平均每個視野可觀察到百分之五十左右的綠色螢光)，這樣的條件是為避免當此抗血清導入在不同的臨床單位檢驗時，因實驗室的差異而造成判定上的不一致。當然每一個血清型的抗血清其稀釋濃度皆有所不同。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有時並非呈現正向的關係，如克沙奇病毒 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 或 Echo18 亦為 1:2000。綜合已完成的七個血清型中，我們亦可發現到 CVA21 個血清型在免疫的過程中其流程和其他六個血清型相同，但其所免疫出的抗血清的中和抗體效價最高沒有超過 1:4000，亦可用來建置間接免疫螢光染色法的檢測系統，也反應出抗原與抗體之間的 avidity 也是影響建立間接免疫螢光染色法檢測系統的因素之一。

對於臨床分離株的測定，檢體主要的來源是選取自 1998~2007 年疑似腸病毒感染個案，其臨床表徵伴有發燒、紅疹、手足口症(hand-foot-mouth disease)或疱疹性咽峽炎(Herpengina)等臨床表徵所分離到的病毒株，血清型分別為 Coxsackievirus A 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 16, 21, 24、Coxsackievirus B2, 3, 4, 5、Echovirus type 3, 4, 6, 7, 9, 11, 18, 25, 30、

Poliovirus type1, 2, 3、Enterovirus type71、HSV 及 Adenovirus 等；這些參與測試的臨床分離株血清型的鑑定皆經利用市售的單株抗體、基因定序及中和試等方法。在整體檢測系統的評估中，雖可獲得良好的敏感性與專一性、惟無論那一個血清型造成偽陽性的分離株皆為 HSV。

本計劃一直嚐試解決為何 HSV 的病原體會導致利用此系統的螢光反應所造成的偽陽性反應，初步以為是免疫後或是接受免疫個體的物種來自同一環境所造成的，但我們陸續利用美國及日本等國家亦利用兔子為免疫所量產的抗血清及免疫前的個體血清設計螢光染色法檢測流程，亦獲得相同的結果，都是呈現偽陽性的反應；初步的結果是顯示這個物種血清中的未知的生物性成份可與 HSV 的病原體以間接免疫螢光染色法產生螢光的效果。由於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，HSV 亦可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 就可以區分或是在進行螢光染色時，HSV 針對所有單一型的抗血清均會發生陽性反應而可判定之。

結論與建議

- 一、在建置台灣地區腸病毒流行株間接免疫螢光染色法的三年計劃中(94~96年)，已順利完成 CVA2、CVA4、CVA5 and CVA10 等血清型的評估與建置系統，並組合成『Coxsackievirus A IFA Typing Kit set I』全面應用在全省的病毒性合約實驗室，提供第一線臨床上腸病毒分離的例行性檢驗的鑑定工作。
- 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 2008 年的腸病毒血清型流行趨勢監測資料顯示，該試劑套組的導入，已將台灣地區每年因腸病毒流行時所造成無法即時分型之現況，由原有平均 50%下降了 10%或以下。
- 五、即時建立台灣地區腸病毒流行血清型之趨勢並縮短 2-3 星期型別鑑定時間，因應流行期間臨床表徵之不同可配防治策略之宣導。
- 六、流行趨勢的累積，可提供防疫、血清型流行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與分生物檢測應用、標準株種原的保存及歷年分離株的庫存(生物材料)方可完成。
- 九、由於腸病毒能在無症狀的個案中被分離出來，顯示著腸病毒有相當量

能的 silent circulation 在建康的群族中，臨床上的表徵更為多樣化，每年腸病毒疫情的嚴峻則與腸病毒的血清型別有關，本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，這樣的監測模式是為被動性的，病原體來自於有症狀的個案，對腸病毒的病原體而言，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病原體的監測為一過渡度時期，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。

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. 李祥吉、林翠莉、楊文志、柯玉芬、楊志元、陳豪勇等人：1998~2004年台灣地區腸病毒流行血清型別之分析。 *疫情報導* 第2005, 96~117。
7. Tsuey-Li Lin, Yi-Syue Li, Chiao-Wei Huang, Chiu-Chu Hsu, Ho-Sheng Wu, Tsan-Chang Tseng, and Chen-Fu Yang. 2008. Rapid and High sensitive Coxsackievirus A Indirect Immunofluorescence Assay Typing Kit for Enterovirus Serotyping. *J. Clin. Microbiol.* 46:p785-788
8. 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
9. Bell EJ, Cosgrove BP(1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bulletin of the World Health Organization* 58:423-428
10. 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
11. Henny D. Isenberg, Editor In Chief Long Island Jewish Medical Center. *Essential Procedure for Clinical Microbiology* p451-560
12. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH(1975) : Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *Journal of Clinical Microbiology* 2:183-185

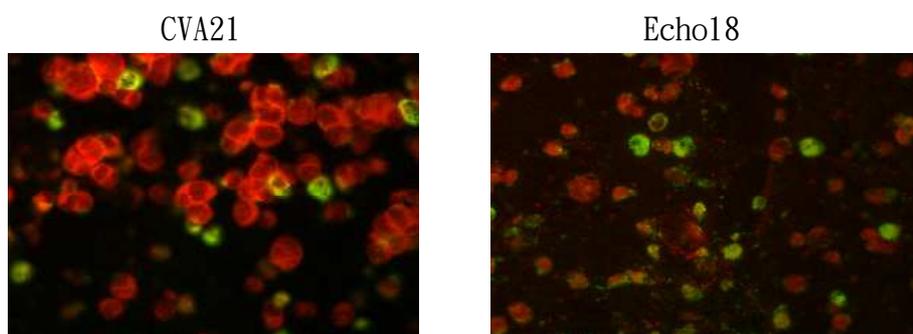
13. Reed, L.J.,and H. Miemcj. 1938.A simple method of estimating fifty percent endpoints
Am. J.Hyg. 27:493-497
14. Schidt N-J and Lennette E-H. 1973. Advances in the serodiagnosis of viral infections.
Prog Med Virol 15:244-308
15. K,Kilpatrick DR,Pallansch MA.1999.Molecular evolution of the human picornavirus
Clasification.*J virol* 73:1941-1948
16. 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
17. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Molecular phylogeny of all human enterovirus
serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2.
Virus Res. 1998;58:35-43.

圖、表

圖一：標準株所免疫之抗血清與 CVA21 及 Echo18 病原體於螢光顯微鏡下之反應

陽性反應：細胞呈現蘋果綠

陰性反應：細胞呈現紅色



表一、2002~2006 台灣地區 nonpolio enterovirus 血清型前 10 名排行榜

(基因定序)

Rank	2002 (n=1598)		2003 (n=1504)		2004 (n=2116)		2005 (n=2274)		2006 (n=1924)	
	Serotype	%								
1	CA16	20.84	CA16	40.23	CA4	27.65	CB3	36.06	CA4	26.51
2	Echo6	20.21	Echo11	11.97	CA10	25.90	CA16	25.29	CA2	15.80
3	EV71	15.64	CA2	11.50	CB4	17.72	EV71	14.51	Echo18	12.16
4	CB5	11.58	CA6	11.17	EV71	11.01	CA6	6.86	CA5	11.95
5	CA4	10.26	CA5	9.51	CA6	3.31	CA5	5.89	CB2	7.80
6	CA10	6.01	EV71	3.32	CA5	2.32	Echo9	3.43	Echo6	3.85
7	CA24	4.13	CB2	2.53	CA2	2.17	CA2	3.34	CA16	3.74
8	CB2	2.82	CB5	1.99	CB3	1.98	CA10	1.98	CA6	3.74
9	Echo4	1.31	CA10	1.99	CA16	1.37	CB2	1.14	CA21	2.60
10	CA2	0.94	Echo9	1.93	CA9	1.23	CA9	0.44	CA9	2.34
Total		93.74		96.14		94.66		98.94		90.49

表二、CVA21 標準株多株抗體中和效價

兔子 免疫個體編號	#107	#108	#109	#110
中和抗體效價	177	3,981	1,000	707

表三、Echo18 標準株多株抗體中和效價

兔子 免疫個體編號	#43	#44	#45	#46
中和抗體效價	9,977	39,719	31,622	19,906

表四、 標定 CVA21 與 Echo18 抗血清與 FITC 最佳化測試條件

血清型	多株抗體 稀釋濃度	二抗 FITC 標幟物稀釋濃度
CVA21	1:600	1:1000
Echo18	1:2000	1:1000

表五、參與評估測試之標準株與臨床分離株之腸病毒型別

Serotype	腸病毒標準株 (Prototype)	臨床分離株 (1998-2008 年)	
CA21	<p>55 株</p> <p>Coxsackie A group (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 20 CA21)</p> <p>Coxsackie B group (1, 2, 3, 4, 5, 6)</p> <p>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)</p> <p>EV69, 69, 70</p> <p>EV71, 73</p>	<p>CA21 (56 株)</p>	<p>NO_n-CA21 (254 株)</p> <p>CA2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 24 and EV71</p> <p>CB2, 3, 4, 5</p> <p>Echo 3, 6, 7, 9, 11, 18, 25, 30</p> <p>Poliov, 2, 3</p> <p>HSV, ADE</p>
Echo18	<p>82 株</p> <p>CA2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 21, 24 and EV71</p> <p>CB2, 3, 4, 5</p> <p>Echo 3, 6, 7, 9, 11, 25, 30</p> <p>Poliov, 2, 3</p> <p>HSV, ADE</p>	<p>Echo18 (82 株)</p>	<p>NO_n-Echo18 (228 株)</p> <p>CA2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 21, 24 and EV71</p> <p>CB2, 3, 4, 5</p> <p>Echo 3, 6, 7, 9, 11, 25, 30</p> <p>Poliov, 2, 3</p> <p>HSV, ADE</p>

表六、CVA21 與 Echo18 之靈敏性及專一性

血清型	Sensitivity	Specificity
CVA21	100%	98.1%
Echo18	100%	97.8%

