

中文摘要

關鍵字：腸病毒七十一型、基因亞型、基因性、免疫抗原性、中和試驗、

交叉保護效力

腸病毒七十一型自 1998~2013 年已常態流行於台灣地區，計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋 9 個 lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c, B5x)，每一基因亞型伴隨著不同時序的流行，除 C5、C2-like 及 B5x 等基因亞型；這些基因亞型的出現反應出(1)源自於境外移入並在地化造成流行；(2)病毒基因重組；及(3)持續演化所造成；B5x 基因亞型首度於 2013 年 5 月份被監測到，然而亞型已開始循環於環境中，在人與人之間進行傳染並擴散在不同的地域。

C2-like 基因亞型具備了廣效的交叉保護效力，是為疫苗的候選株之一；建立

Cross protective effect 平台，可應用於 1. 即時評估 emerge new subgeogroups 中和能力的表現，可預測該亞型對於流行的影響 2. 評估每一疫苗候選株交叉保護力的效能可協助疫苗政策的執行時可推估保護效力，台灣地區是最典型的反應出不同的基因亞型帶動著不同年代腸病毒七十一型的流行，且亞型流行時間較短，長期監測腸病毒七十一型 genetic 及 immuno-antigenicity 的變化有其必需性。

Abstract

**Keyword : Enterovirus 71 、 subgenogroup 、 geneticity 、 immuno-antigenicity 、
Neutralization test 、 cross protective effect**

Enterovirus 71 (EV-71) has commonly circulated in Taiwan during 1998-2013, which included nine lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c, B5x) in six subgenogroups (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5). Each subgenogroup appeared chronologically, except C5, C2-like and B5x. The appearance of these subgenogroups indicates that 1) the virus was imported to Taiwan and localized, 2) the virus was recombined, and 3) the virus was in the process of evolution. The B5x subgenogroup was firstly found in May, 2013, and circulated in different areas in Taiwan.

The C2-like subgenogroup showed broad cross-protectivity, and was one of the vaccine candidates. The cross-protective effect platform may help to 1) immediately evaluate the cross-protective effect of emerging new subgenogroups, and 2) evaluate the cross-protective effect of vaccine candidates. It was typical in Taiwan that different subgenogroups caused different EV-71 outbreaks in different years. In addition, since the subgenogroups in circulation changed quickly, it was needed to monitor the variations of geneticity and immuno-antigenicity.

前言

腸病毒七十一型(Enterovirus 71; EV71)出現於 1941 年間 (1928.8-1952.2); 直至 1969 年首度在 California 腦炎的個案被分離出該病原體; 腸病毒七十一型屬正股 RNA (positive stranded RNA), 大約具有 7,500 核苷酸, 在結構性蛋白質部份分別為 VP4, VP2, VP3 and VP1 及非結構性蛋白分別為 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, and 3D; 而其中 VP1 結構性蛋白質裸露於病毒顆粒的表面, 不僅和病毒進入宿主細胞的吸附有關而且也是重要的中和抗體位點, 且實驗數據亦顯示在 VP1 的 N 端為重要的中和抗體決定位並有著高效價的中和抗體, EV71 是腸病毒屬中的一員, 該屬由於缺乏脂質的套膜, 所以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, 使其喪失活性的方法如高溫 (56°C 以上)、chlorination、formaldehyde and ultraviolet irradiation 等[1-5]; EV71 主要造成孩童之手口足症與皰疹性咽峽炎, 症狀包括發燒、口或肢端現水泡或潰瘍, 並且可能出現神經性併發症, 例如非化膿性腦膜炎、腦炎、肢體麻痺、甚至死亡 [6]; 因該病原體所引起手口足病已在美國、歐洲、澳洲及亞洲等地區造成了流行, 自 1997 年至 2010 不斷的流行於西太平洋地區。

EV71 目前共分 A,B ,C 和 D 四個基因型及 13 個基因亞型, 腸病毒七十一型在 1969 年首度被分離出來是為 A 基因型, 並非現在流行的基因型而是一個單一的標準病毒株; B 和 C 基因型可再分為 B1-B5 及 C1-C5, 所有基因亞型的出現由年時序上的關係顯示出在 1970s 間, 基因亞型 B1 流行於美國及日本等地、1980s 年基因亞型 B1,B2 和 C1 流行於香港、澳洲及美國等, 這幾年更流行於亞太地區 (Asian Pacific region), 基因亞型 B3 於 1997~1999 年出現於 Sarawak, Singapore 及 Australia 其中 B1-B5,C1,C2 和 C5 等基因亞型流行於相同時間不同地區, 是一個全球性的狀態, 除 C3 較侷限於韓國及 C5 流行於越南; 而在 Malaysia、United States、Taiwan 及 Japan 等國家亦存在不同基因亞型的共同流行 (Co-circulation); 不過目前仍有一些較不常出現的基因亞型被確認過, 包括基因亞型 B0 首度被發現到是在 1963 年的 Netherlands; 基因亞型 C0 於 1978 年出現於 Japan 及在 2001 年

於印度發現一種基因序列上不同於其他腸病毒七十一型的分離株而被命名為 D 基因型，2008 年 C2-like 基因亞型首度出現於台灣 [7-16]，在時序的變遷中亦呈現出基因變異的多樣性。

由疾病管制署(以下簡稱本署)之病毒性病原體監測系統及法定傳染病通報系統(腸病毒併發感染重症)來監測出腸病毒七十一型病原體流行的動態，依據本局針對 EV71 病毒性病原體監測並轉換成分子流病監測模式資料顯示，在這 15 年(1998~2012 年)間 EV71 腸病毒已常態性流行於台灣地區 (<http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=34330F1263D5F7E4&typeid=74F0ADB6FF198821>)，計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋八個 lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c) 被偵測到，且流行於不同的年代。除 C5 及 C2-like 外，流行最主要的基因亞型分別為：1998 年 C2 基因亞型、1999~2003 年 B4 基因亞型、2004~2005 年 C4b 基因亞型、2007~2009 為 B5b 基因亞型、2010~2011 年為 C4a-2 基因亞型及 2011~2012 為 B5c 基因亞型；另許多文獻顯示出大部份的基因亞型在引起規模性的流行前即無聲無息的流行於群體中了，這些基因上的變異導致新基因亞型的產生，並且反應出過去不同時期的手足口症流行。

目前 WHO 強調腸病毒七十一型的浮現對於整體西太平洋地區在公共衛生上是為重要議題並預期在於未來有更多的 HFMD 個案是因腸病毒七十一型所引起的，該病原體自 1997 年開始大規模的流行於西太平洋地區後，其他的歐、美國家亦都已偵測到該病原體的存在，腸病毒七十一型的威脅是與日俱增且其流行或許將是全球性的 [17-20]，雖說整體西太平洋地區的國家均已陸續建立完善的監測系統及臨床照護，臨床上的檢測亦趨於的完善；在病原體的檢測中，採用傳統的病毒學檢驗及分子生物學檢測、在抗體檢測部份，配合傳統中和試驗檢測及 IgM 抗體的檢測方式 (ICT 或是酵素免疫分析法) [21-22]，抗病毒藥物也持續研究發展中，然而疫苗的發展與施打將是阻斷該原體所帶來威脅的最佳策略；目前應用發展腸病毒七十一型疫苗的型態包括：1.Live attenuated vaccines 2.Inactivated vaccines 3.Virus-like particle (VLP) vaccines 4.Viral and bacterial vector-based vaccines 5.Recombinant protein

vaccines 6.DNA vaccines [23-26]，其中以 Inactivated vaccines 的模式不僅可以誘發較高的中和抗體力價，並具有較廣的 immunogenicity，部份亞型已進入了臨床試驗的階段[27-28]，但是我們仍需謹記在心的是腸病毒七十一型的抗原性是否如小兒麻痺病毒的穩定或是如同流感病毒一樣在時序的變遷中，演化造成了 low level cross-immunity，所以在疫苗發展的過程，對於 vaccine candidate 應具有一個評估的機制。

台灣地區是最典型的反應出不同的基因亞型帶動著不同年代腸病毒七十一型的流行，且亞型流行時間較短，不同於中國大陸或是馬來西亞，皆為單一的基因亞型(C4 基因亞型)或基因型(B 基因型)為流行主要的基因型別；在這流行的過程中，不同基因亞型的多樣性、免疫抗原性及 herd immunity 三者之間牽引如何造成的平衡進而影響整體流行規模的大小是需長期性監測與分析探討，期能建立三者之間的動態模式為下一波流行提出預警警訊。

本計劃架構於腸病毒病毒性病原體監測系統及法定傳染病通報系統(腸病毒併發感染重症)監測系統，並將選取流行於台灣地區腸病毒七十一型不同基因亞型代表株進行病毒株種庫及感染個案血清庫的建立，逐年建立不同基因亞型的全長基因序列庫，採用中和抗體試驗交叉進行不同基因亞型及抗血清相互之間的中和抗體效價分析，建立標準化腸病毒七十一型疫苗株篩選及交叉保護力評估平台，不僅可以了解各國所挑選的疫苗株對於不同基因亞型 cross-protective 之效應，並可進一步建立提供西太平洋地區對於 EV71new emerging subgenotype immunogenicity 的監控。

材料與方法

材料

- 一、選取歷年流行於台灣地區感染腸病毒七十一型不同基因亞型個案所分離出之病毒株
- 二、選取歷年感染腸病毒七十一型重症個案恢復期血清
- 三、病毒性病原體監測系統及法定傳染病通報系統腸病毒七十一型病毒株

方法

A、RD 細胞株繼代培養 [29-33]

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 10cc 10% 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 培養基充散細胞
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

B、微漿菌之測定(Mycoplasma Detection) (採用 ATCC 之試劑套組)

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 °C 下離心 20 分鐘 12000xg，並去除上清液
3. 加入 100ul 的 Lysis Buffer 混合均勻
4. 加熱 95 °C 10 分鐘
5. 取出 5ul 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)
6. 加入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1unit)Taq polymerase
7. 混合均勻離心
8. 94°C 2 分鐘
9. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)
10. 由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5ul
11. 放入 1ul 之引子、45ul Taq polymerase buffer 及 0.2ul(1unit)Taq polymerase
12. 混合均勻離心
13. 94°C 2 分鐘
14. 設定 30cycles(Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ; Extention : 72°C , 60 秒)
15. Hold 4°C
16. 取出第二階段 PCR 產物 10ul 以電泳分析觀察最後結果

C、病毒株增量[33]

- 1.將已發育完成在 25 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，將病毒株欲適量接種於 RD 細胞株上
- 3.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
- 4.加入 DMEM 培養基，置於 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
- 5.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
- 6.4°C，2100 g 離心 15 分鐘
- 7.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
- 8.4°C，2100g 離心 15 分鐘，分裝於病毒貯存管以為種庫使用。

D、Viral Titration and Determination of CCID₅₀[34]

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. 取已增量之標準株上清液 0.2ml 加入第 1 管混合後取 0.2ml 至第 2 管，依次稀釋至第 8 管。病毒稀釋液由 10^{-1} 至 10^{-8} 每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50ml 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100ml 細胞維持培養基。
3. 置入 36°C 二氧化碳培養箱繼續培養
4. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
5. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (CCID₅₀)。

E、中和抗體效價測定 [35-38]

1. 將抗血清稀釋為 1：8，於 56°C 加熱 30 分鐘
2. 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 1：8x 系列稀釋，加入 50ul 病毒液 100 TCID₅₀ 為中和劑量
4. 攻擊病毒之濃度測定以 100 TCID₅₀ 再作 10^{-1} ~ 10^{-3} 系列稀釋
5. 放置 36°C，CO₂ 培養箱中和作用 1~2 小時

6. 再加入 100 μl (5×10^4 細胞) 細胞懸浮液，置 36°C ， 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。第 4 天判定血清中和抗體效價，
即對照細胞形態正常，攻擊病毒量在 $32 \sim 1000 \text{TCID}_{50}$ 之間
8. 計算中和抗體效價

F、RNA Extraction

一、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

G、RT-PCR(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) [39-40]

1. 將下列試劑及 RNA 抽取物放入,同一微量管內

RNA 抽取物	5 μl
R' Primer	3 μl
F' Primer	3 μl
ddH ₂ O	11 μl

2. 利用 PCR 機器加熱 70°C ，10 分鐘
3. 加入下列試劑

2X RT-PCR Buffer	25 μl
------------------	------------------

Taq DNA Polymerase	1 μ l
Reverse Transcriptase	1 μ l
RNASEOUT	12 μ l

4. 放入 PCR 機器

設定條件如下:

42°C , 50 分鐘

95°C , 3 分鐘

94°C , 30 秒

48°C , 1 分 30 秒

72°C , 1 分 30 秒

72°C , 7 分鐘

4°C , ∞

} 40 個循環

腸病毒七十一型全長序列採用引子

name	sequence	start	End
294	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGTTCCC	1	24
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-R2	AGTGAGTGTTACTGATCCATGGT	2241	2219
06125-A	GTG CTT GAC GCT GGT ATC C	1443	1461
06125-B	CAT TAA GCT AGT GGC ATT CGT G	1910	1889
238	CCIGGIWSIAAYCARTTIYTNA C	1787	1809
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850
EV71-F3	TACACACCACCAGGAGGCCCT	2115	2136
EV71-R3	ACCAGCATAATTTGGGTTGGCT	3281	3260
159	ACYATGAAAYTGTGCAAGG	2385	2403
162	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC	2869	2850

189	CARGCIGCIGARACIGGNGC	2612	2631
011	GCICCGAYTGITGICCRAA	3408	3389
06125-C	GAT GGG CAC GTT CTC AGT	3125	3142
06125-D	AAT ACG GTG TTT GCT CTT G	4436	4418
EV71-F5	ATYAGYAAGTTYATTGAYTGGCT	4149	4171
EV71-R5	ACAACCTGCWACCACAGTRGCRAT	5278	5256
329	CCiyTIRtITGYGGIAARGC	4923	4942
334	ATRtCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
398	TAIAARYtITTYGCIgGIYtICARGG	5298	5323
334	ATRtCICKYtTYtTIWtNCC	6325	6306
392	GGIRWIAAIGARCCIGCNGT	6042	6061
423	GCTATTCTGGTTATAACAAAYTYAC	7408	7384
EV71-F8	GAGAAATT-TGTGAGTACAA	7227	7245
EV71-R8	AAGCAGTGGTAACAACGCAG-GTACT(30)VN-3')	poly A 區	

H、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 1~2 μ l 6X loading dye 與 8 μ l RNA 產物混合，加至 gel 孔洞內
5. 跑 100V，30 分鐘
6. 利用 EtBr 染色
7. 在 UV 下，觀察最後結果

I、演化樹(Phylogenetic tree)之分析 [41]

以電腦軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4.0 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、1998~2013 年腸病毒七十一型流行趨勢及親緣系統樹

選取自 1998~2013 年流行於台灣地區腸病毒七十一型分離株進行基因定序，並建構親緣系統樹，顯示計有六個基因亞型(C2, C4, C5, C2-like, B4, B5 等基因亞型，涵蓋九個 lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c, B5x 等)，詳如圖一、二

二、建立腸病毒七十一型不同基因亞型病毒株種庫

選取歷年流行於台灣地區感染腸病毒七十一型不同基因亞型個案所分離出之病毒株，計有 C4a-1 基因亞型 11 株、C4a-2 基因亞型 4 株、C2-like 基因亞型 1 株、C5 基因亞型 1 株、B4 基因亞型 8 株、B5b 基因亞型 7 株、B5c 基因亞型 3 株及 2013 年 B5x 基因亞型 1 株，總計 36 株，以 RD 細胞株進行病毒增量及 CCID₅₀ 的測定，每株病毒株皆具有種毒庫(stock bank)及進行中和試驗使用之病毒株(working bank)。詳如表一

三、建立自然感染腸病毒七十一型不同基因亞型個案血清庫

建立腸病毒七十一型不同基因亞型病毒株種庫中每一株感染個案急性期或恢復期血清，包含 C4a-1 基因亞型 11 例、C4a-2 基因亞型 4 例、C2-like 基因亞型 1 例、C5 基因亞型 1 例、B4 基因亞型 8 例、B5b 基因亞型 7 例、B5c 基因亞型 3 例及 2013 年 B5x 基因亞型 1 例，總計 36 例並稀釋 1:8X，分裝保存於-80°C，並進行由感染個案所分離出的病原體相對應感染血清染個案中和抗體效價測定；測定的血清檢體大都以恢復期的血清為主(即發病後第 8 日後謂之)，其中有 3 例個案之血清檢體為急性期(1~7 天)；血清中和抗體效價 1:32(1 例)、1:256(2 例)、1:512(2 例)、1:1024(5 例)、1:2048(12 例)、1:4096(6 例)、1:8192(7 例)，其中 C4a-1 subgenogroup 中和抗體效價介於 1:4096~1:8192、C4a-2 subgenogroup 中和抗體效價介於 1:32~1:8192、B5b subgenogroup 中和抗體效價介於 1:512~1:8192、B5c subgenogroup 中和抗體效價介於 1:2048~1:8192、B5x subgenogroup 中和抗體效價 1:2048、C5 subgenogroup 中和抗體效價 1:1024、C2-like subgenogroup 中和抗體效價 1:512；在採血天數部份則為 1~7 天(3 例)、12 天(1 例)、14 天(8 例)、15 天(1 例)、16 天(4 例)、17 天(2 例)、

18 天(3 例) 、19 天(3 例) 、20 天(3 例) 、22 天(1 例) 、24 天(3 例) 、28 天(1 例) 、
29 天(1 例) 、31 天(1 例) 、34 天(1 例) 。結果詳如表一

四、腸病毒七十一型不同基因亞型同質與異質中和抗體效價分析表

進行 36 例感染不同腸病毒七十一型基因亞型個案與相對應感染血清中和抗體檢測 (Homo titer) ; 另一部份則進行每單一感染個案所分離之病毒株與其他 35 例血清檢體及感染個案之血清與 35 株病毒株(含相同或不同基因亞型)進行中和抗體檢測(Hetero titer) , 即交叉中和試驗, 可反應出每一株病毒株被中和能力及每一感染個案血清檢體 cross protective effect , 所獲得的中和抗體效價以 2 為底, 用 log 表示, 力價則由高至低依紅色漸至綠色區塊表示的高低當中和抗體的效價果, 結果顯示中抗體的效價在交叉區塊介於 1:<8-1:32, 768 , 對於每一株不基因亞型病毒株其基因性與免疫抗原性並沒有明顯不同, 除 C2-like 基因亞型, 此基因亞型顯示出較低的中和能力, 但卻具有廣泛的中和交叉能力 cross protective effect 。結果詳如表二

討論

1998 年腸病毒七十一型(Enterovirus 71; EV71) 在台灣地區爆發，這是繼小兒麻痺病毒根除後，另一個重要且引起關注的腸病毒病原體，隨著時序的發展、環境的變遷、病原體本身的演化及交通旅遊的便利，該病原體散播對公共衛生造成衝擊。

本計畫可藉由疾病管制署(以下簡稱本署)之病毒性病原體監測系統及法定傳染病通報系統(腸病毒併發感染重症)來監測出腸病毒七十一型病原體流行的動態，依據本署針對 EV71 病毒性病原體監測並轉換成分子流病監測模式資料顯示，在這 15 年(1998~2012 年)間 EV71 腸病毒已常態性流行於台灣地區，計有六個基因亞型 (C2, C4, C5, C2-like, B4, B5)，涵蓋八個 lineages (C2, C4a-1, C4a-2, C5, C2-like, B4, B5b, B5c) 被偵測到，且流行於不同的年代，分別為 1998 年(C2 subgenogroup)、1999~2003 年(B4 subgenogroup)、2004~2005 年(C4a -1subgenogroup)、2007~2008 年(B5b subgenogroup)、2010~2011 年(C4a -2 subgenogroup)、2011~2012 年(B5c subgenogroup)；另 C5 subgenogroup 首次於台灣地區 2006 年及 C2-like subgenogroup 於 2008 年被偵測出。

在台灣地區，除 C5 and C2-like subgenogroups 外，曾經被監測到的基因亞型經過一段時間後都會造成一波的流行；如 1998 年台灣流行腸病毒七十一型的基因亞型雖為 C2，但在當時即已偵測到 B4 and C4 二個基因亞型，隨即 B4 開始流行於 1999 年及 C4 流行於 2004 年，另 B5 基因亞型最早被偵測到是在 2003 年，至 2007 年即在台灣地區又造成另外一波的流行，反應出 1998~2008 年前台灣地區 EV71 分子流病的現象；相較於 2009~2012 間，腸病毒七十一型陸續的被偵測到不曾間斷過，所流行的基因亞型分別為 C4(2010~2011) and B5(2011~2012)，雖與 2004 及 2008 年流行的基因亞型相同，卻反應出時序變遷中基因亞型 genetic 的改變，即 2004~2005(C4a-1 subgenogroup) drift 2010~2011(C4a-2 subgenogroup)及 2007(B5b) drift 2011~2012(B5c subgenogroup)亞型，由 1998~2012 年台灣地區腸病毒七十一型分子流行病學顯示，目前大部份造成流行的基因亞型皆在流行前先出現散發型(sporadic)病例，而後成為流行

時期之最主要基因型別，如 B4, B5 及 C4 等基因亞型均可見此一現象，而 EV71 基因亞型之出現，有可能是(1)源自於境外移入並在地化造成流行；(2)病毒基因重組；及(3)持續演化所造成，這種現象反應出單一血清型的病原體隨時序的變遷中並伴隨著 mutation 及 recombination 的發生，而存在於自然界。

B5c 基因亞型直至 2013 年二月份再也監測不到其蹤跡；雖說在病毒性病原體監測系統顯示 2013 年所流行的腸病毒血清型別並非以 EV71，但該病原體仍透由二大監測系統持續監測中，直至在 5 月份間由法定傳染病重症通報系統中檢驗出一例 EV71 個案，並在親緣系統樹中顯示出該病原體台灣地區已開始在有轉換成新亞型或次亞型的現象，暫定為 B5x 基因亞型，且陸續在 7~10 月份間無論從法定傳染病重症通報或定點病毒性病原體監測系統均有該亞型的出現，地域擴及台中市、彰化縣及嘉義市等區域，顯示該亞型已開始循環於環境中，在人與人之間進行傳染並擴散在不同的地域，由於腸病毒七十一型基因型(或亞型)的轉換或改變會潛在隱藏流行的警訊，所以對於此病原體 genetic 的改變其監測有其必需性

腸病毒七十一型本身具備了 RNA 病毒的特性，隨著環境及宿主的因素，本身快速的演化，導致不同基因亞型的出現，相同的基因亞型流行於不同的國家，同一個國家流行著不同的基因亞型，台灣地區是最典型的反應出不同的基因亞型帶動著不同年代腸病毒七十一型的流行，且亞型流行時間較短，不同於中國大陸長時期皆為單一的基因亞型(C4 基因亞型)，或是馬來西亞以 B 群基因亞型為主要的流行基因型別。genetic diversity 進一步反應了 immuno-genecity 的不同，所以也對於在腸病毒七十一型疫苗發展的過程中，如何挑選最佳化的病毒株並兼具強烈 immunogenecity 及能引發廣泛的中和交叉保護效應，為另外一個需要考慮的層面。對於腸病毒七十一型不同基因亞型之間的交叉中和能力一直有文獻報導，大部份都是免疫於動物個體模式來進行分析(家兔、小鼠、猩猩及天竺鼠等)，文獻顯示不同腸病毒七十一型基因亞型間或相同基因亞型的不同病毒株的交叉中和效應在抗體的差異有 4X~192X 的差異；為解決因物種的不同所帶來的差異，所以本計劃首度嘗試以自然感染不同基因亞型的個案所分離到的病毒及個案本身所誘發的抗體進行 homo and hetero 中和抗體效價的測試，結果顯示每一株不基因亞型病

毒株或相同基因亞型不同病毒株其基因性與免疫抗原性並沒有明顯不同，除 C2-like 基因亞型，此基因亞型顯示出較低的中和能力，但卻具有廣泛的中和交叉能力，所以以自然感染個案所建立的 cross protective effect 平台彰顯出此效能；對於疫苗株的篩選包含了需具有較高的病毒產量、可以誘發較強的中和抗體及廣泛的交叉保護效力等因素，由於目前已有三個國家均已進行腸病毒七十一型的疫苗研發，並已走向臨床試驗的階段，其中中國大陸選擇的是 C4a-1 subgenogroup、新加坡為 A genotype 及台灣 B4 subgenogroup，所以此平台亦可較系統性的應用於這三個國家所挑選的疫苗候選株的分析，並協助疫苗政策的執行時可推估整體的保護效力。

腸病毒七十一型在台灣地區所造成的衝擊及因應疫苗的發展，本計劃旨在建立動態化腸病毒七十一型基因性與免疫抗原性監測系統，繼而陸續建立了多元化種庫，如細胞株種庫、不同腸病毒七十一基因亞型病毒株種應庫、不同腸病毒七十一基因亞型血清庫、不同腸病毒七十一基因亞全長基因序列庫等，這些種庫的應用讓我進一步獲得較具系統性的有關腸病毒七十一型不同基因亞型與表現型比較資料、利用抗血清庫可研發檢驗試劑研發如間接免疫螢光染色法檢測系統、建立西太平洋地區腸病毒七十一型疫苗株交流平台網絡之雛型並可供應西太平洋地區等國家之需求及隨時可評估最佳化疫苗候選株及監測腸病毒七十一型 immunogenicity 之變化等效能。

結論與建議

- 一、台灣地區腸病毒七十一型在過往的 15 年中，每一個基因亞型帶動不同規模的流行，且亞型的轉換及數目在西太平洋地區最為明顯，即時監測腸病毒七十一型基因性與免疫抗原性有其必要性。
- 二、2008 年在台灣地區所監測出的腸病毒七十一型 C2-like subgenogroup 中和能力不及其他腸病毒七十一型病毒株，但確具有良 cross protective effect 遠優於其他基因亞型。
- 三、cross protective effect 平台的建立，可應用於
 1. 即時評估 emerge new subgeogroups 中和能力的表現，可預測該亞型對於流行的影響
 2. 評估每一疫苗候選株交叉保護力的效能。
- 四、因應腸病毒七十一型疫苗的發展與應用，標準化抗血清的建置是需要進行的工作，換算成每 mL 抗血清的單位(U/mL)進行檢測，可縮短實驗室之差異及品管之用。

參考文獻

1. Tom Solomon, Penny Lewthwaite, David Perera, Mary Jane Cardoso, Peter McMinn, Mong How Ooi. 2010. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *Lancet Infect Dis* 10:778-90.
2. Tan CS, Cardoso MJ: High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. *Arch Virol* 2007, 152:1069-1073.
3. Tan CS, Cardoso MJ: High-titred neutralizing antibodies to human enterovirus 71 preferentially bind to the N-terminal portion of the capsid protein VP1. *Arch Virol* 2007, 152:1069-1073
4. 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.
5. Mizuta K, Aoki Y, Suto A, Ootani K, Katsushima N, Itagaki T, Ohmi A, Okamoto M, Nishimura H, Matsuzaki Y, Hongo S, Sugawara K, Shimizu H, Ahiko T. Cross-antigenicity among EV71 strains from different genogroups isolated in Yamagata, Japan, between 1990 and 2007. *Vaccine*. 2009 21;27(24):3153-8.
6. Melnick JL: Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, 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.
7. YCardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P: Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* 2003, 9:461-468.
8. Tu PV, Thao NT, Perera D, Huu TK, Tien NT, Thuong TC, How OM, Cardoso MJ, McMinn PC: Epidemiologic and virologic investigation of hand, foot, and mouth disease, southern Vietnam, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007, 13:1733-1741.
9. van der Sanden S, Koopmans M, Uslu G, van der Avoort H: Epidemiology of enterovirus 71 in the Netherlands, 1963 to 2008. *J Clin Microbiol* 2009, 47:2826-2833.
10. Munemura T, Saikusa M, Kawakami C, Shimizu H, Oseto M, Hagiwara A, Kimura H, Miyamura T: Genetic diversity of enterovirus 71 isolated from cases of hand, foot and mouth disease in Yokohama City between 1982 and 2000. *Arch Virol* 2003, 148:253-263.
11. Chan YF, Sam IC, AbuBakar S: Phylogenetic designation of enterovirus 71 genotypes and subgenotypes using complete genome sequences. *Infect Genet Evol* 2010, 10:404-412.
12. Deshpande JM, Nadkarni SS, Francis PP: Enterovirus 71 isolated from a case of acute flaccid paralysis in India represents a new genotype. *Curr Sci* 2003, 84:1350-1353.
13. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, Fan WB, Yang JY, Chang FY, Wu HS. Genetic Diversity and C2-like Subgenogroup Strains of Enterovirus 71, Taiwan, 2008.

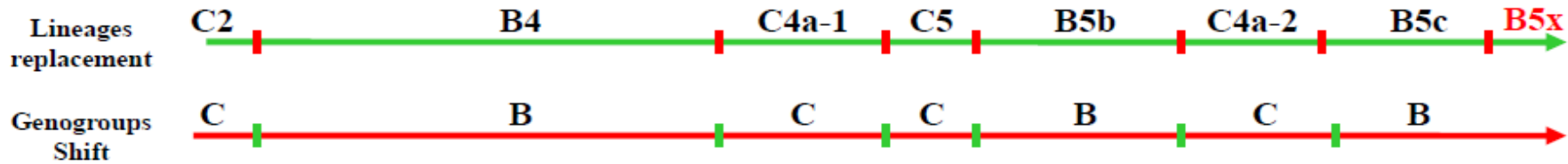
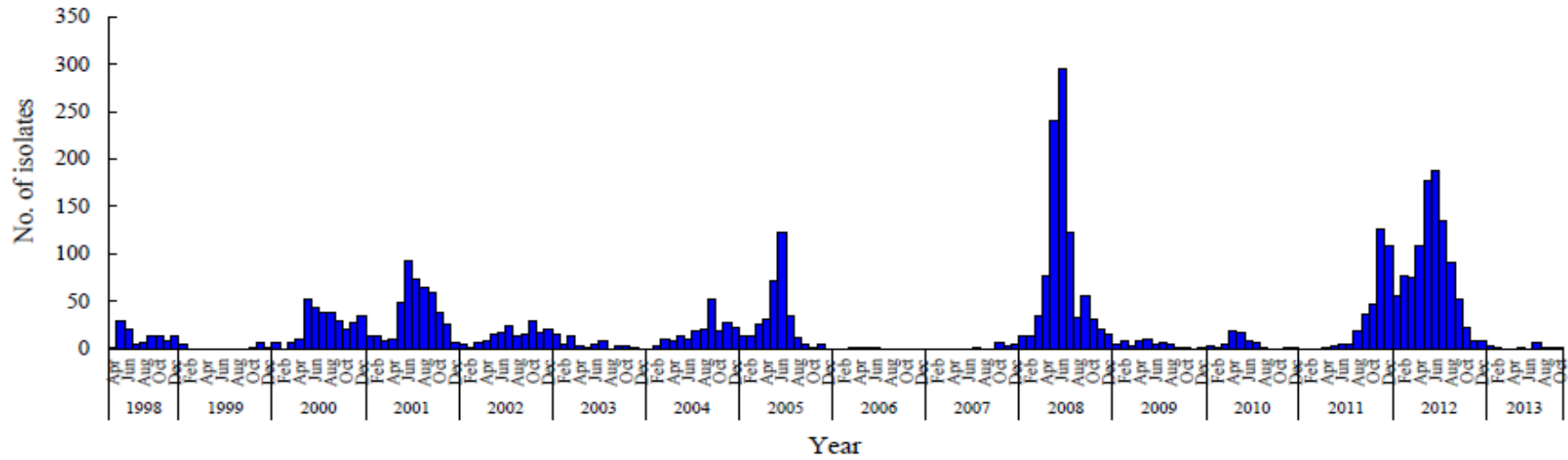
- Virology Journal 7(1):277, 2010.
14. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, Hsu LC, Yang CF, Yang JY, Chen PJ, Wu HS: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res* 2008, 137:206-212.
 15. Shimizu H, Utama A, Onnimala N, Li C, Li-Bi 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.
 16. McMinn P, Lindsay K, Perera D, Chan HM, Chan KP, Cardoso MJ: Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *J Virol* 2001, 75:7732-7738.
 17. Isabelle Schuffenecker, Audrey Mirand, Denise Antona, Cécile Henquell, Jean-Jacques Chomel, Christine Archimbaud, Geneviève Billaud, Hélène Peigue-Lafeuille, Bruno Lina, Jean-Luc Bailly: Epidemiology of human enterovirus 71 infections in France, 2000–2009. *J Clin Virol*. 2011 Jan;50(1):50-56.
 18. Maël Bessaud , Sylvie Pillet , Wafa Ibrahim , Marie-Line Joffret , Bruno Pozzetto , Francis Delpeyroux , Ionela Gouandjika-Vasilache: Molecular characterization of human enteroviruses in the Central African Republic: uncovering wide diversity and identification of a new human enterovirus A71 genogroup. *J Clin Microbiol*. 2012 May;50(5):1650-8
 19. Holger F, Rabenau, Matthias Richter, Hans Wilhelm Doerr: Hand, foot and mouth disease: seroprevalence of coxsackie A16 and Enterovirus 71 in Germany. *Med Microbiol Immunol* 2010 Feb; 199:45-51
 20. 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.
 21. Tan EL, Yong LL, Quak SH, Yeo WC, Chow VT, Poh CL. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. *J Clin Virol*. 2008 Jun;42(2):203-6
 22. Wang SY, Lin TL, Chen HY, Lin TS. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA. *J Virol Methods*. 2004 Jul;119(1):37-43
 23. Min-Shi Lee, Luan-Ying Chang. 2010. Development of enterovirus 71 vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 9(2), 149-156.
 24. Juan Xu, Yuan Qian, Shixia Wang, Jill M. Grimes Serrano, Wei Li, Zuhu Huang, Shan Lu. 2010. EV71: An emerging infectious disease vaccine target in the Far East? *Vaccine* (28)3516-3521.
 25. Min-Shi Lee and Luan-Ying Chang 2010 *Expert.Rev. Vaccine*9(2), 149-156
 26. .Qunying Mao, Nan Li, Xiang Yu, Xin Yao, Fengxiang Li, Fengmin Lu, Hui Zhuang, Zhenglun Liang, Junzhi Wang 2011 Antigenicity, animal protective effect and genetic characteristics of candidate vaccine strains of enterovirus 71 *Arch Virol*
 27. Li YP, Liang ZL, Gao Q ea al. Safety and immunogenicity of a novel human enterovirus

71(EV71)vaccine: a randomized, placebo-controlled, double-blind, phase I clinical trial. *Vaccine* 2012;30:3295-303.

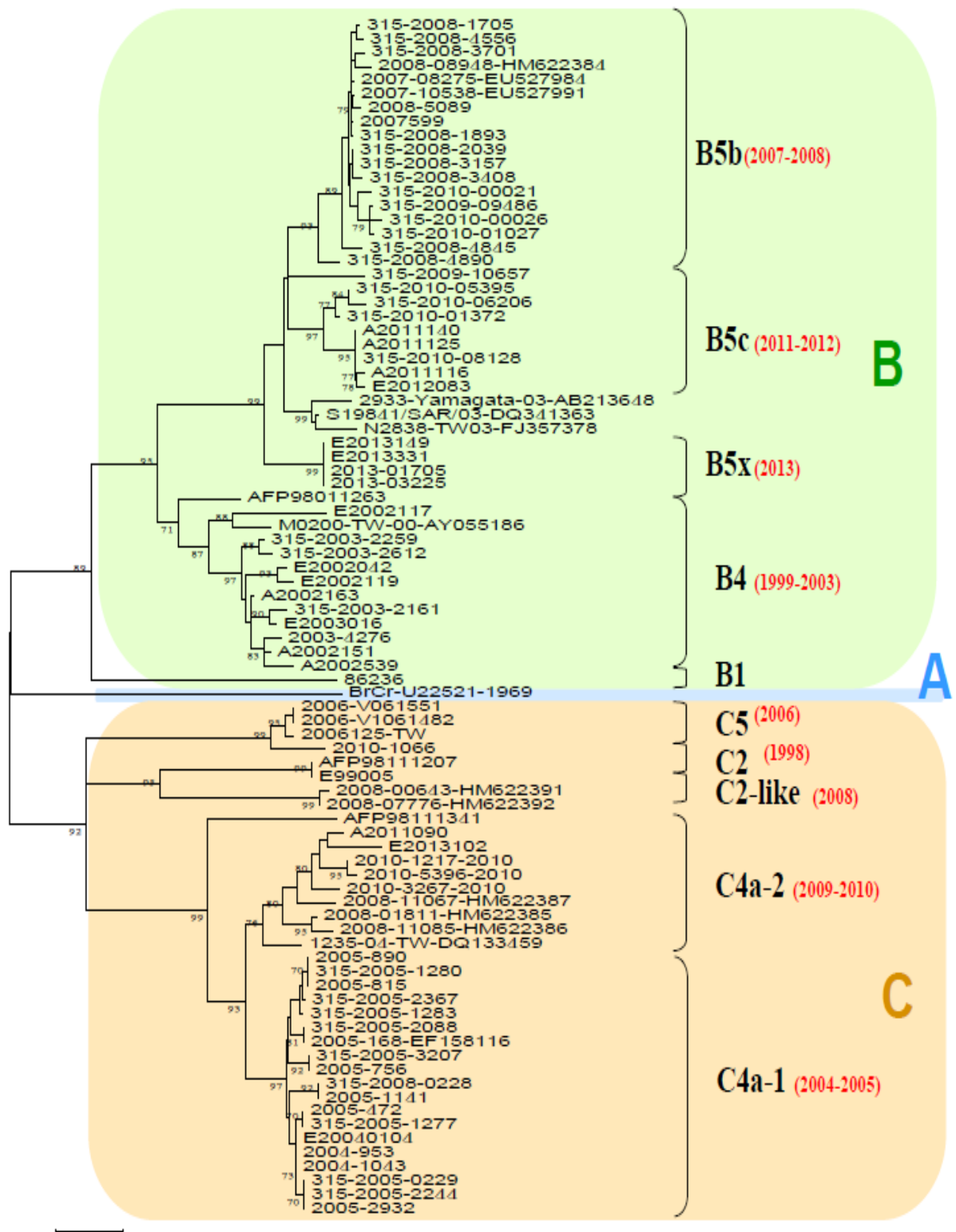
28. Zhu F.C., Meng F.Y., Li J.X., Li X.L., Mao Q.Y., Tao H., Zhang Y.T., Yao X., Chu K., Chen Q.H., Hu Y.M., Wu X., Liu P., Zhu L.Y., Gao F., Jin H., Chen Y.J., Dong Y.Y., Liang Y.C., Shi N.M., Ge H.M., Liu L., Chen S.G., Ai X., Zhang Z.Y., Ji Y.G., Luo F.J., Chen X.Q., Zhang Y., Zhu L.W., Liang Z.L. and Shen X.L. 2013 Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3. trial *The Lancet*, 381: 2024–32
29. Lee, L.H., Phillips, M.A., South, J.L., Melnick, J.L., and Doyow, M. 1965 : Enteric virus isolation in different cell culture. *Bull. WHO* 32:657-663
30. Bell EJ, Cosgrove BP (1980) : Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bulletin of the World Health Organization* 58:423-428
31. 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
32. Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH (1975) : Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *Journal of Clinical Microbiology* 2:183-185
33. World Health Organization. 2004. Polio laboratory manual, 4ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
34. Reed, L.J., and H. Miemc. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints *Am. J. Hyg.* 27:493-497
35. 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.
36. Doerr HW (1973) Coxsackie B virus neutralising antibodies in myocarditis and pleurodynia. *Dtsch Med Wochenschr* 98(29):1396_1400.
37. 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.
38. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology* 1980, 12:329-334.
39. Brown BA, Kilpatrick DR, Oberste MS, Pallansch MA : Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR. *J Clin Virol* 2000, 16:107-112.
40. 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
41. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:4673-80.

圖、表

圖一、1998~2013 年台灣地區腸病毒七十一型流行趨勢圖



圖二、1998~2013 年腸病毒七十一型親緣系統樹(VP1 region)



表一、腸病毒七十一型感染個案基本資料分析表

編號	年齡(月)	檢體種類	居住地	基因亞型	CCID ₅₀ /50uL	中和抗體效價
E2002117	10	RS	雲林縣	B4	10 ^{-7.57}	1: 1024
E2002119	30	TS	台中縣		10 ^{-7.28}	1: 1024
A2002151	6	Stool	台北縣		10 ^{-7.4}	1: 4096
A2002063	13	Stool	彰化縣		10 ^{-5.67}	1: 2048
A2002539	15	Stool	苗栗縣		10 ^{-7.29}	1: 2048
E2003016	28	TS	台北縣		10 ^{-6.57}	1: 256
315-2003-2161	0	TS	彰化縣		10 ^{-6.2}	1:2048
315-2003-2239	27	TS	彰化縣		10 ^{-7.43}	1: 8192
315-2004-1043	41	TS	台中縣	C4a-1	10 ^{-7.2}	1: 2048
315-2005-0228	27	TS	雲林縣		10 ^{-6.5}	1: 4096
315-2005-0229	94	RS	雲林縣		10 ^{-7.5}	1: 256
G-2005-1277	13	TS	台中縣		10 ^{-7.5}	1: 1024
315-2005-1280	23	TS	台中縣		10 ^{-7.5}	1: 32
315-2005-1283	28	TS	南投縣		10 ^{-6.0}	1: 2048
315-2005-2088	18	RS	彰化縣		10 ^{-7.5}	1: 8192
315-2005-2244	7	TS	雲林縣		10 ^{-7.5}	1: 8192
315-2005-3207	11	RS	高雄市		10 ^{-6.58}	1: 2048
315-2005-3267	56	TS	高雄縣		10 ^{-5.46}	1: 2048
315-2005-2392	48	TS	雲林縣		10 ^{-6.71}	1: 2048
315-2008-1893	21	RS	新竹縣		10 ^{-5.43}	1: 2048
315-2008-2039	77	TS	南投縣		10 ^{-6.2}	1: 4096
315-2008-3406	47	RS	彰化縣		10 ^{-7.5}	1: 2048
2008-3701	46	TS	台南縣	10 ^{-6.42}	1: 2048	
2008-4556	26	RS	屏東縣	10 ^{-6.5}	1: 8192	
2008-4845	80	TS	高雄縣	10 ^{-6.2}	1: 512	
2008-4890	474	TS	高雄縣	10 ^{-6.5}	1: 8192	
A2011090	81	Stool	桃園縣	C4a-2	10 ^{-6.49}	1: 4096
315-2010-1217	60	TS	桃園縣		10 ^{-7.71}	1: 4096
315-2010-3267	71	TS	台南市		10 ^{-6.71}	1: 1024
315-2010-5396	57	TS	新竹縣		10 ^{-7.49}	1: 8192
A2011125	41	Stool	台南市	B5c	10 ^{-7.72}	1: 4096
A2011116	24	Stool	台中市		10 ^{-7.3}	1: 2048
A2011140	30	Stool	雲林縣		10 ^{-7.39}	1: 8192
315-2008-1101	8	TS	台北縣	C2-like	10 ^{-4.6}	1: 512
E2006125	8	Stool	台中市	C5	10 ^{-6.75}	1: 1024
E2013331	9	Stool	台中市	B5x	10 ^{-7.0}	1:2048

表二、腸病毒七十一型不同基因亞型同質與異質中和抗體效價分析表

