

計畫編號：DOH93-DC-1029

行政院衛生署九十三年度
研究計畫

台灣先天性免疫不全病人之口服小兒麻痺疫苗病毒偵測

研究報告

執行機構：台灣大學醫院小兒部

計畫主持人：李秉穎

研究人員：江伯倫、高全良

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

目 錄

	頁 碼
封面	(1)
目錄	(2)
壹、中文摘要	(3)
貳、英文摘要	(4)
參、報告內容	
(一) 前言	(5-7)
(二) 研究對象與方法	(7-10)
(三) 結果	(10)
(四) 參考文獻	(11-13)
	共 13 頁

中文摘要

小兒麻痺病毒一共有三種亞型，在分類上都屬於腸病毒。世界衛生組織於 1988 年開始進行全世界根除小兒麻痺的計畫，2001 年仍然有本土型小兒麻痺病例的國家只剩下十個。在即將進入全世界根除小兒麻痺的此刻，我們必須注意活的小兒麻痺疫苗有可能反轉 (revert) 成為有毒性的病毒，也必須注意口服小兒麻痺疫苗病毒也不可在根除小兒麻痺以後還在環境中存在以免日後又造成問題。

2000 年開始有報告發現口服小兒麻痺疫苗病毒的確出現毒性反轉突變，包括海地、多明尼加、菲律賓、埃及等地。所以在宣布小兒麻痺絕跡的時候，在我們決定停用疫苗之前，必須確定在環境中也沒有沙賓疫苗病毒存在。最近的報告也發現免疫功能不全者不但容易因為口服疫苗病毒而致病，他們也容易由糞便中長期排出病毒，其排出時間可達 9 年或更久。這種免疫不全病人長期排出口服小兒麻痺疫苗病毒的現象，使人擔心在宣布全世界根除小兒麻痺以後，全面停用疫苗是否安全。

為了釐清本地免疫不全病人帶有口服小兒麻痺疫苗病毒的可能，本計畫收集 143 名免疫不全兒童的糞便進行病毒培養，發現有二株腸病毒，均非口服沙賓疫苗。但在這段期間，長庚兒童醫院曾經發現一位可能帶病毒數年的免疫不全病人，引發嚴重的腦炎並帶有後遺症。台大醫院則發現一位同樣病人，罹患症狀持續長達 20 天的病毒性腦膜腦炎，其糞便培養長出第六型伊科病毒，並沒有口服小兒麻痺病毒。

關鍵詞：小兒麻痺、免疫不全、沙賓疫苗、腸病毒、毒性反轉

英文摘要

The World Health Organization is putting efforts to eradicate poliomyelitis in the world. There are only 10 countries with wild-type polio virus in 2001. When we have achieved the goal of eradicating polio in the world, it should be noted that oral polio vaccine virus has the potential to be reverted to the wild-type virus, and such a revertant may pose much threat when we have decided to stop polio vaccination program. Several recent reports suggested that the oral polio vaccine virus may be excreted from immunodeficient patients for up to 9 years. To delineate the possibility of future threat from these potential carriers of polio virus, this study enroll 143 children with immunodeficiency for detection of oral polio vaccine virus in their stool. Two of the stool specimens enterovirus other than oral polio vaccine virus.

Key words: poliomyelitis, immunodeficiency, Sabin vaccine, enterovirus, revertant

前言

小兒麻痺病毒一共有三種亞型，在分類上都屬於腸病毒。傳染的主要途徑是糞口傳染，得到感染以後大約只有 1% 到 2% 的人會發生神經症狀，其中有一部份只出現無菌性腦膜炎，有些則因為病毒破壞了脊髓主管運動的神經細胞，於是引起肢體麻痺現象。在 1950 年代末，人們開始使用兩種疫苗來預防小兒麻痺，一種是注射用的沙克疫苗，這是將病毒殺死以後做成的非活性疫苗；另外一種是口服的沙賓疫苗，這是將病毒去除大部分毒性以後做成的活性減毒疫苗。

沙克疫苗的優點是將病毒完全去除活性，所以使用以後不會有引起神經併發症的可能性。口服沙賓疫苗的優點是比較便宜、口服的接種方法比較方便，而且可以引起沙克疫苗所不能達成的腸道免疫力。此外，沙賓疫苗病毒可經由糞便排出而感染其他的小孩。為了擴大疫苗的保護面，台灣目前是規定所有小孩應該在二個月、四個月、六個月、十八個月與入小學以後，一共口服五劑沙賓疫苗，國內的研究也顯示這種疫苗具有優異的致免效果 [1]。國內在民國六十二年開始全面口服沙賓疫苗，但是在民國七十一年卻發生了一次大流行。分析這些病例的疫苗接種情形，發現其中沒有服用或只服用一次疫苗者就佔了 88% [2]。

沙賓疫苗的病毒雖然已經經過減毒的處理，但是平均在二百四十萬次接種之中，就可能有一次會因疫苗中的病毒侵犯神經系統，而引起神經麻痺的現象。這種副作用與疫苗的劑次有關，使用第一劑疫苗的時候，發生麻痺的機會約為七十六萬分之一。美國即基於當地已經沒有小兒麻痺病例，所以建議全面採用沙克疫苗以消除疫苗導致神經麻痺的危險性 [3]。國內衛生單位以前曾經討論過是否需要將小兒麻痺疫苗改為注射的沙克疫苗，當時發現有幾個顧慮，所以並沒有作出

馬上改變疫苗的結論。第一點是如果改用沙克疫苗，小孩就必須多打一針。第二個考慮因素是鄰近國家有些地方可能還有小兒麻痺，所以最好是讓沙賓疫苗繼續發揮擴大保護面的優點。如果小兒麻痺疫苗的接種率可以達到 95% 以上，或是小兒麻痺已經在鄰近地區絕跡的話，就可以考慮改用沙克疫苗。最後一個因素是沙克疫苗比較昂貴。

世界衛生組織進行全世界根除小兒麻痺的計畫 (Global Polio Eradication Initiative) 始於 1988 年，當時希望在 2000 年之前達成讓小兒麻痺在全世界絕跡的目標，但後來未能達成此目標。此計畫施行以後，美洲地區率先在 1994 年宣布根除，包括台灣在內的西太平洋地區則在 2000 年宣布小兒麻痺絕跡，歐洲則在 2002 年宣布絕跡。2001 年仍然有本土型小兒麻痺病例的國家一共有十個，包括五個高度流行國家 (印度、巴基斯坦、阿富汗、奈及利亞、尼日) 與五個低度流行國家 (索馬利亞、蘇丹、衣索匹亞、安哥拉、埃及) [世界衛生組織網站資料]。在即將進入全世界根除小兒麻痺的此刻，我們必須注意活的小兒麻痺疫苗有可能反轉 (revert) 成為有毒性的病毒，也必須注意沙賓疫苗病毒也不可在根除小兒麻痺以後還在環境中存在 [4]。

小兒麻痺病毒這種 RNA 病毒很容易突變 [4a]，一開始就有學者擔心沙賓病毒可能會發生基因反轉突變而變成具有致病能力。在 2000 年開始有人分析麻痺患者分離出來的小兒麻痺病毒以後，真的發現有這種毒性反轉突變的現象，而且陸陸續續在海地、多明尼加、菲律賓、埃及等地都有類似發現，發生突變的沙賓病毒則涵蓋了所有三型病毒 [5-8]。所以在宣布小兒麻痺絕跡的時候，在我們決定停用疫苗之前，必須確定在環境中也沒有沙賓疫苗病毒存在。

當一位免疫功能正常者得到小兒麻痺感染以後，糞便中可以排出病毒 4-8 週 [9]。但在免疫功能不足的病人，小兒麻痺病毒排出的時

間則可長達 3.5 年，尤其是漿液性免疫功能 (humoral immunity) 異常者 [10,11]。曾經有人報告過在抗體缺乏病人，其他腸病毒排出時間可以長達 6.5 年 [12]。尤有甚者，有學者分析一位排出沙賓疫苗 189 天的常見可變性免疫缺乏 (common variable immunodeficiency) 病人的病毒，根據其病毒基因的變異，他們推估這位病人已經排出沙賓疫苗病毒長達 9.3 年 [13]。

為了避免沙賓疫苗病毒污染環境，在理論上應該禁止免疫功能不全者使用沙賓疫苗，但是第一劑是在二個月大的時候接種，而在那時候可能還未能診斷出免疫功能不全的疾病 [14,15]，尤其是 common variable immunodeficiency 的病人，他們大多在年紀比較大的時候才得到診斷。有很多免疫功能不全的病人，都是在這種未知的情形下長期感染沙賓疫苗病毒或發生沙賓疫苗導致神經麻痺的疾病 [16-19]。雖然有人發現排出持續達 637 天的沙賓疫苗病毒在一位免疫功能不全病人身上並沒有毒性反轉現象 [20]，但是曾經有一位被診斷為 common variable immunodeficiency 的病人，他在 16 歲時被發現罹患沙賓疫苗所致之神經麻痺，而根據病毒的基因分析，發現所分離出的第一型沙賓疫苗病毒在 VP1 有很多突變，而這病人慢性感染到這病毒的時間則為發病的 7 年前 [21]，目前已經知道與小兒麻痺病毒神經毒性最有關的區域是在含有 740 個核酸的 5 端非轉譯區 (5' noncoding region) [22,23]，以第三型沙賓疫苗病毒而言，會導致毒性反轉最重要的突變是在 5 端非轉譯區第 472 核酸 U 至 C 的突變 [24]，其他在 VP3-91 上的一些突變也很重要 [25]。如果我們能夠分離出免疫功能病人身上的疫苗病毒，就可以根據前人的經驗分析這些病毒是否具有致病能力。

在全世界即將進入根除小兒麻痺的現在，如何制訂根除小兒麻痺

以後的疫苗政策實為當務之急。雖然我們已經知道免疫不全病人可能會長期帶有沙賓疫苗病毒，也知道這些病毒長期以後可能因為宿主的免疫壓力而發生突變，但我們並不清楚這種情形會不會影響到我們決定全面停止疫苗接種的時機。所以本計畫將結合各醫學中心的力量，研究所有免疫不全兒童是否有長期帶有小兒麻痺疫苗病毒的現象，並進一步進行病毒的基因分析。一旦發現有慢性帶有病毒病人的時候，可以進行治療的研究，而根據以前的經驗，靜脈注射免疫球蛋白或口服免疫球蛋白或許有效 [26]。本計畫的研究結果不但可以提供本地將來是否能夠停用小兒麻痺疫苗的依據，並可提供全世界根除小兒麻痺計畫將來制訂政策的重要參考。台灣目前仍非世界衛生組織之一員，但這種沒有人做過的免疫不全病人大規模篩檢研究，其成果必定會為世界衛生組織所重視，也將是我們參與此類國際合作衛生計畫的重要助力。

研究對象與方法

1. 研究對象

- A. 年齡滿兩歲以上到三十歲以下，所有先天性免疫功能不全的病人，包括 X-linked agammaglobulinemia、common variable immunodeficiency。
- B. 由各醫學中心蒐集病例 143 病人。
- C. 在病人本身或監護人的同意下，書寫書面同意書以後加入本研究。

2. 研究方法

- A. 問卷調查：詢問病人的基本資料（姓名、生日、居住地、性別、職業）、過去小兒麻痺疫苗接種情形、家中是否有小孩及

小孩在何時曾經接種小兒麻痺疫苗、免疫不全疾病種類與診斷日期、有否接受免疫球蛋白補充性治療、最近有否生病、是否曾經有過神經系統疾病、有否其他疾病、家族有否免疫不全病人等。

- B. 檢體：新鮮糞便，比照腸病毒監測檢體已快遞冷藏方式送至檢驗室作病毒培養。如果病毒培養陽性，則每三個月追蹤一次糞便檢體。如果糞便培養出非小兒麻痺病毒的其他腸病毒，也比照繼續追蹤。
- i. 如果培養陽性，收集所有同住之家人糞便進行病毒培養。如果家人的培養也陽性，則檢驗其免疫功能，包括各種免疫球蛋白、mitogen response、淋巴球分類與比率。
 - ii. 如果培養陽性，抽血檢驗小兒麻痺抗體、病毒培養與 RT-PCR 檢查。
 - iii. 如果持續兩次以上的糞便檢體均有陽性培養結果，則嘗試以靜脈注射免疫球蛋白治療 (1 gm/kg)。治療後一個月再度追蹤糞便培養，如果仍維持陽性，則考慮用口服免疫球蛋白治療。
- C. 病毒培養：以標準方式作病毒培養，原則上以 HEP-2 細胞於含有 10% 胎牛血清的 MEM 培養液中培養，培養條件為攝氏 35 度、5% CO₂。培養出的病毒用 pooled hyperimmune sera 在中和試驗中分型。
- D. 核酸分析：以 RT-PCR 放大並純化病毒之 cDNA，然後用 autosequencer 定序，包括 5' NCR 與 VP1 兩區域。
- E. 統計分析：
- i. 分析基因變異是否會改變神經毒性(與現在已知的核酸序

列比較)。

- ii. 由基因變異性推估病人得到疫苗病毒感染的時間。
- iii. 分析帶病毒的危險因子，以 logistic regression 分析，包括單變項與多變項。
- iv. 其他統計分析，以 Student's t-test (常態分配) 或 Mann-Whitney test (非常態分配) 比較連續性變數之差異，以 chi-square test 比較頻率性變數之差異。

結果與結論

本計畫收集 143 名免疫不全兒童的糞便進行病毒培養，發現有二株腸病毒，均非口服沙賓疫苗。但在這段期間，長庚兒童醫院曾經發現一位可能帶病毒數年的免疫不全病人，引發嚴重的腦炎並帶有後遺症。台大醫院則發現一位同樣病人，罹患症狀持續長達 20 天的病毒性腦膜腦炎，其糞便培養長出第六型伊科病毒，並沒有口服小兒麻痺病毒。這些免疫不全兒童之中，大部分均接受每週一次的免疫球蛋白注射，這種治療可能使他們不易長期帶有腸病毒。

參考文獻

1. Lu CY, Lee CY, Lee PI, et al. Immunogenicity of oral poliovirus vaccine in Taiwan. *J Formos Med Assoc* 1999; 98:859-62.
2. Kim-Farley RJ, Rutherford G, Lichfield P, et al. Outbreak of paralytic poliomyelitis, Taiwan. *Lancet* 1984; 2(8415):1322-4.
3. Anonymous. Prevention of poliomyelitis: recommendations for use of only inactivated poliovirus vaccine for routine immunization. Committee on Infectious Diseases. American Academy of Pediatrics. *Pediatrics* 1999; 104:1404-6.
4. Dove AW, Racaniello VR. The Polio Eradication Effort: Should Vaccine Eradication Be Next? *Science* 1997; 277:779-780.
5. Khalfan SA, Chomel JJ, Mallet L et al. Paralytic poliomyelitis associated with the Sabin 3 revertant strain of poliovirus in Bahrain. *Ann Trop Pediatr* 2001; 21:223-9.
6. Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002; 296:356-9.
7. Anonymous. From the Centers for Disease Control and Prevention. Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus--Egypt, 1982-1993. *JAMA* 2001; 285:1148-9.
8. Anonymous. From the Centers for Disease Control and Prevention. Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus--Philippines, 2001. *JAMA* 2002; 287:311.
9. Alexander JP Jr, Gary HE Jr, Pallansch MA. Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *J Infect Dis* 1997; 175(Suppl. 1):S176-82.
10. Dowdle WR, Birmingham ME. The biological principles of poliovirus eradication. *J Infect Dis* 175(Suppl. 1): S286-92.
11. Yoneyama T, Hagiwara A, Hara M, Shimojo H. Alteration in

- oligonucleotide fingerprint patterns of the viral genome in poliovirus type 2 isolated from paralytic patients. *Infect Immun* 1982; 37:46-53.
12. McKinney RE Jr, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 1987; 9:334-56.
 13. Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2893-9.
 14. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine* 1985; 64:145-56.
 15. Sutter RW, Prevots R. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis among immunodeficient persons. *Infect Med* 1994; 11:426-38.
 16. Misbah SA, Lawrence PA, Kurtz JB, Chapel HM. Prolonged faecal excretion of poliovirus in a nurse with common variable hypogammaglobulinaemia. *Postgrad Med J* 1991; 67:301-3.
 17. Yeung WL, Ip M, Ng HK, Fok TF. An infant with encephalitis. *Lancet* 1997; 350:1594.
 18. Nedelcu-Ion N, Dobrescu A, Strebal PM, Sutter RW. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis and HIV infection. *Lancet* 1994; 343:51-2.
 19. Inaba H, Hori H, Ito M, et al. Polio vaccine virus-associated meningoencephalitis in an infant with transient hypogammaglobulinemia. *Scand J Infect Dis* 2001; 33:630-1.
 20. Martin J, Dunn G, Hull R, Patel V, Minor PD. Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *J Virol* 2000; 74:3001-10.
 21. Anonymous. Prolonged poliovirus excretion in an immunodeficient person with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *MMWR*

- 1997; 46:641-3.
22. Minor PD. The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol* 1992; 73:3065-77.
 23. Wimmer E, Hellen CUT, Cao X. Genetics of poliovirus. *Ann Rev Genet* 1993; 27:353-435.
 24. Evans DM, Dunn G, Minor PD, et al. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature* 1985; 314:548-50.
 25. Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, et al. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* 1989; 172:408-14.
 26. Losonsky GA, Johnson JP, Winkelstein JA, Yolken RH. Oral administration of human serum immunoglobulin in immunodeficient patients with viral gastroenteritis. A pharmacokinetic and functional analysis. *J. Clin Inv* 1985;76(6):2362-7.