

腸病毒即時定量系統(Real-time RT-PCR)對臨床檢體之檢驗與分析

摘要

即時定量系統的分析方法結合聚合酶鏈反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)與螢光探針(Fluorescent Probe)能量激發轉移的特性，具有高度的敏感性與專一性[1]。本局病毒實驗室發展出腸病毒即時定量系統 real-time RT-PCR，根據腸病毒 5'端高度保守區(highly conserved region)設計引子對與探針[2,3,4]，經過以腸病毒七十一型 (Enterovirus 71, EV 71) 具活性的標準病毒株作敏感性的分析，結果發現此系統可以偵測到約 10 copies RNA。將此腸病毒即時定量系統運用於臨床檢體分析並與傳統病毒分離方法做比較分析，結果顯示在 366 件的臨床檢體中，藉由 real-time RT-PCR 篩檢出的陽性檢體共 135 件，而傳統病毒分離陽性共 190 件，其敏感性 (Sensitivity)51.5% 及特異性 (Specificity)78.4%。而在 135 件 real-time RT-PCR 陽性的檢體中，計有 97 件被分出病原體；即 190 件病原體分離陽性之檢體，只有 97 件被篩檢出 real-time RT-PCR 陽性。就整體腸病毒病原體的分離而言，克沙奇 A 群腸病毒(CVA 2、CVA 4、CVA 5、CVA 6 及 CVA 12 等)與腸病毒七十一型 (EV 71)在此腸病毒即時定量系統 real-time RT-PCR 測試中，敏感性較優於克沙奇 B 群及伊科病毒第十一型(Echovirus 11, Echo11)，而本法應可適用於腸病毒群聚感染之偵測，以配合防治及醫療等工作之進行。

簡介

在 1998 年的夏天，台灣地區爆發了腸病毒的大流行，大部分感染症狀通常輕微，但仍造成少部份幼童有嚴重的感染症狀甚至有死亡之個案[5,6]。腸病毒的基本結構為正性單股核糖核酸(plus sense, single stranded RNA)具有微小RNA病毒科的基本特質，為RNA病毒中最小病毒，其大小只有 30nm，氯化鈉離心密度為 1.32-1.35 g/ml，外形是二十面體成立體對稱形式，

直徑約 $20\sim 30 \times 10^{-9}$ 公分，基因組長度約 7.4Kb，分子量約 2.3-2.8 百萬，佔本身重量的 30%，由於外殼堅固故有耐熱、酸與清潔劑之能力。

一般對於疑似腸病毒感染之個案，臨床檢體之檢測上通常使用兩種方式來作鑑定診斷：一種是採用細胞培養感染(cell culture infectivity) [7,8,9]，傳統的方法是將檢體處理後接種至具有感受性的細胞株，經由培養後觀察是否有細胞病變(Cytopathic effect, CPE)的現象，當出現CPE時再以間接免疫螢光染色法、酵素免疫分析法、中和反應或分子生物學技術來鑑定其病原體之種類；另一種則採用分子生物診斷方式，例如：RT-PCR或PCR [10]。目前實驗室已建立即時定量系統 (real-time PCR)的方法來直接偵測檢體中腸病毒，此方法為結合 *Taq-Man* 的技術與 *ABI Prism™ 7000* 或 *7900* 即時序列偵測系統，其特性為高敏感度、高專一性且節省人力與時間，其方法是根據腸病毒 5'端 non-coding region (此區為腸病毒高度保守(high-conserved)區域) 設計引子以單一步驟(one-step)的RT-PCR增幅出 145bps 片段，同時以雙螢光標記的DNA探針 (probe) 與 *AmpliTaq DNA* 聚合酶 5'→ 3'nucleolytic activity的特性，偵測具有特異性之PCR產物並可與已知量的標準線性比較而間接偵測出病毒量，此方法的線性範圍約 7-log dynamic range ($10^1\sim 10^7$)，並且適合用於篩檢大量的檢體，並且由於PCR反應後即可得知檢體中是否有特異性之產物，故可省略傳統方法在PCR反應後還須進行PCR產物的分析，所以更能縮短時間並快速獲得結果。

材料與方法

檢體收集

檢體為收集疑似腸病毒感染之檢體(含腸病毒感染重症可能病例)共計 366 件，檢體的種類包括咽喉拭子 (Throat swab)、肛門拭子 (Rectal swab)、糞便(Stool)及腦脊髓液(CSF)等。

病毒培養 [7,8,9]

將前處理完畢的檢體(包括肛門拭子、咽喉拭子與糞便等)取 200ul 接種 RD、HEp-2C 二種細胞株，置於 36°C，二氧化碳培養箱培養，觀察 14 日，若檢體接種細胞出現顯著細胞病變(cytopathic effect, CPE)，則離心收取上清液，接著將細胞固定於玻片上，進行間接免疫螢光法(IFA)的染色，鑑定其型別。

間接免疫螢光 (IFA) 染色鑑定

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，判定為陽性，呈現紅色螢光，則判定為陰性。

RNA的萃取

使用病毒核酸純化試劑組(QIAGEN Inc, CA, USA)進行 RNA 的純化。吸取檢體 140 ul 加入 560 ul Buffer AVL 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，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，用 80°C 純水(RNase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)。

腸病毒Real-time RT-PCR 的建立

引子與探針(primers/probe): 本實驗用的引子與探針是用 primer Express 軟體所設計出來其區域位於腸病毒 5' UTR 高度保守的基因片段。正股引子(forward primer) EV-F : 5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3' (position:450-468)，反股引子(reverse primer) EV-R : 5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3'(position:580-596)，探針 EV-Probe:5'-FAM-CGGAACCGACTAC TTTGGGTGTCCGT-TAMRA-3。

pGEM-T Easy vector

為兩端帶有T 核酸基及Amp^r基因之線形 (linear) 載體，可與兩端為A

核酸基之線形DNA進行快速接合作用 (rapid ligation)。

腸病毒Standard 的建立與檢體分析

以Mahoney type1 poliovirus full genome為模板(template)，EV-F/EV-R為引子利用RT-PCR的方法增幅出 145bps的基因片段，再將此基因片段以分子生物學遺傳工程之方法使用T4 黏接酶(ligase)，將此 145bps之基因片段接到 pGEM-T 載體上(pGEM-T Easy Vector ,Promega)，接著以轉殖(transformation)的方法，將已經黏接好的載體送入JM109 的大腸桿菌(E.coli)中，並利用載體中所帶有的Ampicillin resistance 基因以抗生素Ampicillin 來篩選。將篩選出的菌落在 37°C大量增殖後，萃取出載體DNA，測其O.D值，再將其稀釋成 $2\sim 2\times 10^6$ copies/ul。將經Qiagen Viral RNA kit粹取過的RNA取 5ul，加入含有 1X Taq Man one-step RT-PCR master mix reagent(ABiosystem)、EV-F 300nM、EV-R 450nM、dual- labeled probe150 nM，總體積 25 ul，以ABI 7000 或 7900 的儀器分析，反應的條件為 48°C 30 分鐘、95°C 30 秒、60°C 1 分鐘反應 40 cycles。

反轉錄及聚合酶鏈鎖反應

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction , RT-PCR)

Primer : 編號	序 列	對應病毒序列位址[11]
011	5'-GCICCGAYTGITGICCRAA -3'	(3408-3389)
292	5'-CICCGIGGGIAYRWACAT -3'	(2969-2951)

(1) 反轉錄反應(Reverse Transcription, RT)

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 :011 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，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: 011 及 292 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。

結果

首先，在 Real-time RT-PCR 分析時要建立標準曲線 (Standard Curve)，一方面可以藉由標準曲線的病毒複製數推算檢體內腸病毒的複製數，二方面亦可利用標準曲線來了解整個分析過程與系統的準確度與可信度。一般建議標準曲線斜率 (slope) 趨近於 -3.3，R² 值趨近於 1。本實驗標準曲線的斜率為 -3.6，R² 值為 0.9988，在可接受範圍之內 (圖一)。以腸病毒 71 型為標準株來作敏感度 (sensitivity) 測試的實驗，可以發現以 Real-time RT-PCR 分析系統可以測到約 10 copies Viral RNA，比一般我們實驗室常用的 RT-PCR 敏感度高上 1000 倍，但相對於傳統的病毒培養其敏感度又比 Real-time RT-PCR 高 10 倍，可以測到 1 copy Viral RNA (見表一)。

在臨床檢體分析方面，以本局腸病毒實驗室所取得疑似腸病毒感染的檢體共 366 件；【民國 92 年 102 件，民國 93 年 264 件 (截至六月底)】，同時以傳統病毒培養與 real-time RT-PCR 分析系統作病原體的檢驗與鑑定。在民國 92 年疑似腸病毒感染的檢體共 102 件來分析，以 real-time RT-PCR 系統分析的結果有 26 件檢體是陽性，76 件檢體是陰性；若是以傳統的病毒培養接種於 RD、Hep-2C 二種細胞株，觀察至細胞產生細胞病變 (CPE) 時再以螢光染色或 RT-PCR 來鑑定型別，結果發現有 53 件檢體病原體分離陽性，有 49 件檢體為陰性 (見表二)。將兩個結果綜合分析可發現，real-time RT-PCR 系統分析陽性檢體 1 件是傳統病毒培養病原體分離陰性，但陰性檢體中有 28 件是傳統病毒培養病原體分離陽性，若進一步將這 28 件檢體作以基因序列為血清型別鑑定時，則有 Echovirus 11、EV 71、CVA 16、CVA 2 等血清

型；而在 **real-time RT-PCR** 系統分析陽性的檢體，也進一步鑑定之陽性檢體腸病毒血清型亦為 **Echovirus 11**、**CVA 2**、**CVA 5**、**CVA 12**、**EV 71** 等血清型。(見表三)。

另民國 93 年疑似腸病毒感染的檢體共 264 件來分析，在以 **real-time RT-PCR** 系統分析的結果為 109 件檢驗陽性，155 件檢驗陰性。若是以傳統的病毒培養作病原體分離檢驗，結果發現 137 件病原體分離陽性，127 件病原體分離陰性(表二)。綜合兩分析結果可以發現，有 37 件檢體為 **real-time RT-PCR** 檢驗陽性但是病原體分離陰性，但有 65 件是 **real-time RT-PCR** 檢驗陰性但是病原體分離為陽性，進一步分析此 65 件的腸病毒血清型則有 **CVA 4**、**CVB 4** 及 **EV 71** 等血清型；同時也將 **real-time RT-PCR** 系統分析陽性的檢體，進一步作基因定序與血清型別鑑定，結果發現篩檢出陽性檢體的腸病毒血清型別為 **CVA 4**、**EV 71**、**CVB 4**、**CVA 5**、**CVA 6**、**CVB 2** 及 **CVB 4** 等血清型(見表三)。

討論

即時定量系統**real-time RT-PCR**由於結合**PCR**的技術與螢光探針的原理，具有高度的敏感度與專一性，目前已經被用來廣泛的運用在病原體的偵測、單點核酸變異(**Single Nucleotide Polymorphism ; SNP**)分析、**RNA**或**DNA**基因表現量的分析等，本局病毒實驗室亦利用此技術來發展腸病毒的快速檢驗。而在敏感度分析方面，首先將病原體分離陽性之腸病毒 71 型檢體經過**TCID₅₀**方法定量再將其系列稀釋 $1\sim 10^7$ **copies Viral RNA**，以即時定量系統與病原體分離的方法分析結果發現**real-time RT-PCR**可測到病毒 20 **copies RNA**，但是傳統的病毒培養方法敏感度可達 1 **copy RNA**。推測此原因可能由於本次實驗模式所採用的病毒都經數代繼代所增殖後具有活性較高的病原體，且**RD**細胞株對腸病毒的敏感度高，及實驗室的人員對於操作成熟度等都會使得此病毒所測得的黃金標準(**Golden Standard**)-病毒培養分離的

檢驗品質與敏感度達到最高。而即時定量系統real-time RT-PCR在本實驗中敏感度可高達 10 copies RNA 也有達到一般檢驗對此系統所要求的敏感度，由於 1 copy RNA 常會由於RNA粹取的過程或pipette error 所造成的誤差，而使得此濃度病毒檢出率降低。

在臨床檢體實際的分析方面，將本局病毒實驗室於民國 92 年所收集疑似腸病毒感染的 102 件檢體與本年度截至六月底所收集的檢體共 264 件，同時以即時定量系統real-time RT-PCR與傳統的病毒培養方法作臨床的評估與比較，從結果可以發現 92 年檢體以real-time RT-PCR直接分析有 26 件是陽性，其中有 8 件其病毒量約 10^3 copies RNA/ml 但在病原體分離是陰性。同樣的情況也出現在 93 年度的分析，在以real-time RT-PCR 系統分析的結果為 109 件檢驗陽性，其中有 37 件檢體在病原體分離結果為陰性。會造成這樣的結果或許是因檢體內的病毒因採檢不良、保存不當或運送過程的影響導致病毒已經失去活性或實驗室的操作流程及技術等，故在傳統的病原體分離篩檢為陰性，但由於病毒RNA仍存在，所以在real-time RT-PCR分析為陽性。相對之下，在real-time RT-PCR檢驗陰性的檢體的在 92 年共有 76 件，93 年有 155 件。但此檢驗陰性之檢體若以傳統病原體培養分離的方法篩檢，在 92 年共有 28 件、93 年共有 65 件病原體分離為陽性，這樣分析的結果可能因為檢體內的病毒量太低，加上核酸粹取、操作過程等因素所導致；雖然檢體內的病毒量低但是病原體本身仍具活性時，則選擇較好的感受性之細胞株，經由其低量繁殖最經過較長的是還有活性就能感染RD或HEp-2C 細胞株，使得病原體分離為陽性。此現象跟本實驗在敏感度測試的結果相同，故傳統的病原體分離若病毒仍具有活性即使病毒量少，只要選擇的細胞得宜加上檢體處理過程適宜及操作人員的熟練度，都是可提高病原體分離率的因素之一。

為了瞭解在 real-time RT-PCR 檢驗陰性但是病原體分離陽性的的原因，本實驗取民國 92 年分離差異最大的 Echovirus 11 的臨床檢體，設計引

子對增幅非轉譯區(non-coding region)，並作分子選殖(molecular cloning)，將基因片段與 real-time RT-PCR 使用的引子對與探針序列作比對，結果發現 EV-F 與 EV-Probe 的序列和臨床分離的 Echovirus 11 非轉譯區序列 100% 相同，而 EV-R 序列與 Echovirus 11 非轉譯區僅差了一個核酸在 5'端的位置 G 變成 A (見表四)。

因環境、季節、發生的趨勢、流行的週期及盛行率等因素或為腸病毒群之間的競爭，使得我們都可以了解到台灣地區每年都有一群腸病毒群在流行，並非單一型別，籍由合約實驗室資料回饋系統及本局基因體所建立的腸病毒監視流行趨勢中，初步顯示民國 92 年所出現的腸病毒血清型為克沙奇 CVA 2、CVA 5、CVA 6、CVA 12、CVA 16、克沙奇 CVB 5、腸病毒七十一型及伊科病毒第十一型(Echovirus 11)等；另民國 93 年上半年的腸病毒血清型別則以克沙奇 CVA4、CVA5、CVA6、CVA16、克沙奇 CVB2、CVB4 及腸病毒七十一型等，在本次以 real-time RT-PCR 系統被做為測試檢體收集於民國 92 年及 93 年(截至六月底)，可以觀察到最後病原體的確認其血清型亦被該年的流行株所涵蓋，進而分析 real-time RT-PCR 的結果，不同的血清型都可被測得，並以克沙奇 A 群病毒及腸病毒七十型其敏感性以乎優於伊科病毒群及克沙奇 B 群病毒。

對於病原體的分離，臨床檢體大都以咽喉拭子(Throat swab)為主或根據其傳染途徑及臨床表徵再採檢不同部位之檢體，所以血清亦可被視為臨床的檢體之一，我們亦曾對於疑似腸病毒感染之個案收集其急性期血清(小於 3 日內)進行 real-time RT-PCR 系統之檢測，在 34 件急性期的血清中有 6 件被測定為陽性，經細胞培養及螢光染色後確定為腸病毒，且該件檢體之個案後經追蹤採其恢復期血清，其中和抗體效價亦呈 4 倍上升，則為近期感染的佐證之一。根據 Bodian 的 poliovirus 猩猩感染實驗：當病毒在腸道及淋巴節增殖後，進入血液中藉血液循環到達脊髓運動神經破壞神經原細胞致發生麻痺。

病毒依循何種途徑進入血液循環通過血腦屏障(Blood Brain Barrier, BBB) 到達中樞神經的機制尚待究明，惟感染後患者病毒應會短暫在血液裏出現。腸病毒血症(Enteroviremia) 通常發生在急性期的感染，時間短暫並中止於抗體形成，也由於時間的短暫，造成病原體的分離不易，且 real-time RT-PCR 系統在血清檢體之測定其敏感度不如咽喉或肛門部位所採檢的檢體，所以對於血清這樣的檢體所獲得的結果及其應用，應再進一步的評估。

台灣地區對於腸病毒臨床表徵的監測是以手足口症或疱疹性咽峽炎為主，主要是和流行的腸病毒血清型別有關，不同的家國及地域所表現出的血清型亦有所差異，例如在美國地區其大部份腸病毒的感染臨床上是以腦膜炎為主，若以 Real-time RT-PCR 來檢測時，檢體則以腦脊髓液為最佳之選擇或為血清檢體，Real-time RT-PCR 不僅可利用其快速及敏感性高之優點，早期的診斷可避免抗生素的使用、降低住院率及爆發群聚感染的發生等優點 [12,13]；雖說本次的測試結果顯示敏感性約為 71.8%，且大部份都是以咽喉候拭子為主或許這是實際反應出對當個體遭受病原體入侵時，因其感染部位、病毒的繁殖及個體的反應等因素所表現出臨床檢體的檢驗與分析的現況，也因如此本法現階段應可適用於腸病毒群聚感染之偵測，其目的可用於早期控制聚感感染的擴大。

撰稿者：林翠莉¹ 王聖帆¹ 林奇勇² 李祥吉¹ 徐秋菊¹ 羅淑真¹ 陳豪勇¹ 楊志元¹

1.行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

2.彰化基督教醫院病毒室

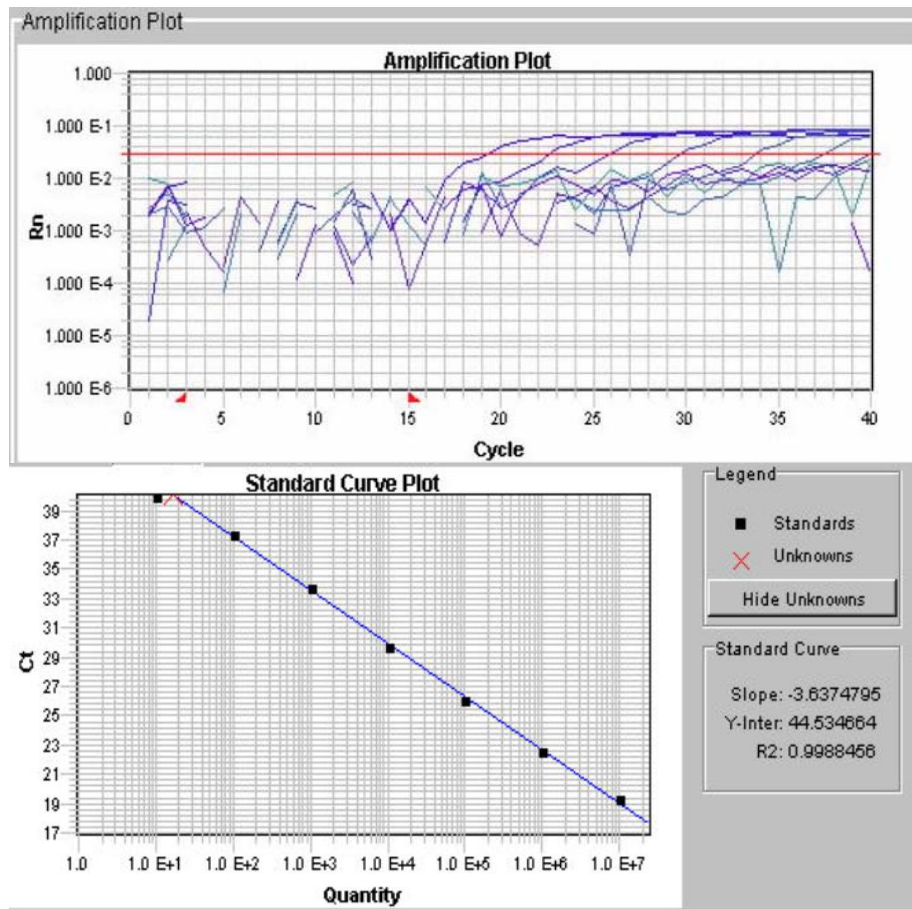
參考文獻：

- 1.王聖帆、林翠莉、楊志元 建立腸病毒即時定量 PCR 之分析系統 疫情報導 第 18 卷 第 11 期 559-569

2. Monpoeho S, Dehee A, Mignotte B, *et al.* Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques* 2000,29:88-93.
3. Corless CE, Guiver M, Borrow R, *et al.* Development and evaluation of a 'real-time' RT-PCR for the detection of enterovirus and parechovirus RNA in CSF and throat swab samples. *J Med Virol* 2002,67:555-562.
4. Verstrepen WA, Kuhn S, Kockx MM, Van De Vyvere ME, Mertens AH. Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2001,39:4093-4096
5. Liu CC, Tseng HW, Wang SM, Wang JR, Su IJ. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. *J Clin Virol* 2000,17:23-30.
6. Ho M, Chen ER, Hsu KH, *et al.* An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group. *N Engl J Med* 1999,341:929-935.
7. Bell EJ, Cosgrove BP. Routine enterovirus diagnosis in a human rhabdomyosarcoma cell line. *Bull World Health Organ* 1980,58:423-428.
8. 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.
9. Henry D. Isenberg 1998. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Washington DC. p451-523
10. Buck GE, Wiesemann M, Stewart L. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus

- meningitis. *J Clin Virol* 2002;25:13-18.
11. M. Steven Oberste , Kaija Maher , David R. Kilpatrick, Mark A. Pallansch. Molecular Evolution of Human Enteroviruses : Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification . *J. Virol* 1999 , 73: 1941-1948.
 12. Verboon-Macilek MA, Nijhuis M, Van Loon AM, et al. Diagnosis of Enterovirus Infection in the first 2 month of life by Real-time polymerase chain reaction. *Clin Inf Dis* 2003;37:1-6.
 13. Mogame N, Elfaitouri A, Fohlman J, et al. A sensitive and quantitative single-tube real-time reverse transcriptase-PCR for detection of enteroviral RNA. *J Clin Virol* 2004;(30) 150-156.

圖一、 腸病毒 Real-time RT-PCR 標準曲線之建立



上圖為螢光強度(Rn)與循環數(cycles)的分析圖，本分析設定的閾值為 0.05。下圖為Ct值與病毒量的關係圖，標準曲線的濃度範圍為 $10 \sim 10^7$ copies

表一、以腸病毒 71 型為標準株之偵測敏感性(Sensitivity)分析

Sample	Result of Real-time PCR (Copies Viral RNA)	Culture CPE (Copies Viral RNA)
Ev71		
10 ⁷	1.3 x 10 ⁷	(+)
10 ⁶	1.02 x 10 ⁷	(+)
10 ⁵	2 x 10 ⁵	(+)
10 ⁴	2.7 x 10 ⁴	(+)
10 ³	2.1 x 10 ³	(+)
10 ²	85	(+)
10 ¹	8.6	(+)
10 ⁰	Undetectable	(+)
10 ⁻¹	Undetectable	(-)

表二、腸病毒 real-time RT-PCR 與病原體分離結果比較表

病原體 分離	Real time		92 年		93 年	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
陽性	25	28	72	65		
陰性	1	48	37	90		

表三、 腸病毒 real-time RT-PCR 與血清型之鑑定分析

血清型 \ Real time	92 年		93 年	
	陽性	陰性	陽性	陰性
Adenovirus	0	0	0	1
CA2	6	1	0	0
CA4	0	0	28	20
CA5	3	1	6	0
CA6	2	1	2	0
CA12	3	0	0	0
CA16	1	3	0	0
CB2	0	0	1	0
CB4	0	0	4	8
CB5	0	1	0	1
Echo11	5	13	0	0
EV71	1	1	7	4
Pan-Enterovirus	4	2	23	27
HSV	0	5	1	4
病原體分離陰性	1	48	37	90
總計	26	76	109	155

表四、伊科病毒第 11 型(Echo11)之非轉譯區(none-coding region)之序列與腸病毒即時定量系統之引子對與探針序列比對分析其中 E2003-736R3、E2003-735R3、E2003-774R2、E2003-730R3、E2003-627R4 為臨床分離之 Echo11

Real-time PCR Primer	EV-F(5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC-3')	FAM-(CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT)-TARAMA	EV-R (5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3')
	5'-CCCCTGAATGCGGCTAATC	5'-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-3'	GCTGCTTATGGTGACAATC-3'
腸病毒 E2003 736R3	CCCCTGAATGCGGCTAATC	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	GCTGCTTATGGTGACAATT
腸病毒 E2003 735R3	CCCCTGAATGCGGCTAATC	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	GCTGCTTATGGTGACAATT
腸病毒 E2003 774R2	CCCCTGAATGCGGCTAATC	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	GCTGCTTATGGTGACAATT
腸病毒 E2003 730R3	CCCCTGAATGCGGCTAATC	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	GCTGCTTATGGTGACAATT
腸病毒 E2003 627R4	CCCCTGAATGCGGCTAATC	CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT	GCTGCTTATGGTGACAATT