

計畫編號：DOH99-DC-2026

行政院衛生署疾病管制局九十九年度科技研究發展計畫

計畫名稱：

腸病毒 71 型快速檢驗試劑與即時定量系統(Real-time RT-PCR)之研發

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：洪志昌、謝若郁

執行期間：99 年 01 月 01 日至 99 年 12 月 31 日

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、計畫摘要

中文摘要-----02

英文摘要-----03

貳、計畫內容

一、研究簡介-----04

二、材料方法-----07

三、結果-----11

四、討論-----13

五、表圖-----15

六、參考文獻-----19

共 21 頁

壹、計畫摘要

中文摘要：

關鍵詞：腸病毒 71 型，免疫層析檢測技術

腸病毒近兩年來之疫情仍以中國、台灣、新加坡、韓國、馬來西亞等亞洲地區為發生率較高的地區，尤其以中國大陸的手口足病(即腸病毒)疫情特別顯著，迄於 2009 年初，仍延續前一年的高峰期，通報病例不降反升，確診病例約 75% 屬於腸病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)之病患。而台灣的腸病毒疫情自 1998 年爆發至今，已造成多起嚴重併發症與死亡病例，而受該病毒感染多屬身體抵抗力較弱之嬰幼兒族群，對於一般家中有幼兒的家長或社會大眾，皆已產生有形或無形的負擔、恐慌與壓力，其相關檢驗結果顯示 EV71 可能是造成嚴重併發症的主要因子，而截至目前為止，亦沒有疫苗或藥物可供預防或治療。而於 EV71 之確認檢驗方法中，皆需要設備完善的實驗室與專業人員操作並判讀檢驗結果，且檢驗時間冗長，有鑑於此，故研發「腸病毒 71 型抗體 IgM 快速檢驗試劑」。

「腸病毒 71 型抗體 IgM 快速檢驗試劑」之研發係以免疫層析檢測技術 (immunochromatographic test, ICT) 製成，係參考 Capture ELISA 之設計原理，以 anti-human IgM 單株抗體捕捉病患血清中抗體 IgM，並與實驗室自行建構表現之 EV71-VP1 重組蛋白相互反應，以及利用 Protein G/A 加強該檢驗試劑之呈色反應，如此雙抗體之反應作用，可同時提高該試劑之特異性與靈敏度。本試劑亦採用特殊阻斷技術，去除非特異性蛋白干擾，並選用特殊墊片試劑材質，降低背景值，不需特殊儀器、操作簡單、使用方便，亦不需專業人員，於極短時間(20 分鐘)內即可完成判讀結果，可提供第一線醫療人員與臨床醫師可於極短時間內得知診斷罹患手足口病或泡疹性咽峽炎之病患是否受到腸病毒 71 型所感染，即時提供適當治療及後續防疫決策之參考，並有效防禦及控制疫情，且降低醫療和社會經濟成本。

英文摘要：

keywords : Enterovirus 71, ICT

Enterovirus infections occurs frequently in China, Taiwan, Singapore, Korea, and Malaysia for the last two years, especially in Mainland China with significant high number of fatal cases. In Taiwan, EV71 infection has resulted in thousand of sever cases and many mortality ever since the major outbreak of hand foot mouth disease in 1998.

The high risk group for the severe and fatal cases of EV infection is children under age 5. Therefore it causes panic among parents with young children and brings instability among our society. After suffering and ordeal for these years, more experience in medical care and preventive measures are gained. However, there are still no vaccines or antiviral drugs available specific against EV 71 infection. In addition, detection of EV71 infection still needs to be processed in advanced laboratory and operated by experience & well-trained working staffs. It usually will take days to get the final result for the whole process. Therefore, we propose to develop a rapid test to quick screen for EV71 infection.

Immunochromatographic test (ICT) is the most used platform to do the rapid test. Anti-human IgM and protein A/G conjugation with colloidal gold was spotted onto two conjugate pads separatly. EV71-VP1 expressed protein and anti-immunoglobulin IgM monoclonal antibody was put onto the test and control line of the membrane pad. Strip of Sample pad, two conjugated pads, membrane and absorbent pad were all organized together on a backing card and put inside a cassette to become a rapid test. The ICT need no reading machine and well trained personnel to perform the test in the first line when facing suspected cases. Therefore, it can proved preliminary data for health care worker and public health worker to adapt appropriate medical support and preventive measure to stop the infection immediately.

貳、計畫內容

一、研究簡介

腸病毒71型(*Enterovirus 71*, EV71) 於近幾年來在夏天會引起一定規模的流行，依據公共衛生學上三段五級的預防方法中，第二段預防：早期診斷、早期治療，為使腸病毒71型達到早期診斷的目標，需要發展腸病毒71型快速檢驗試劑。

腸病毒71 型首度被發現是在1969年美國加州由一腦炎嬰兒之糞便檢體中分離出來，之後便在美國本土、保加利亞、日本、香港、馬來西亞、台灣及澳洲等地區陸續被分離出[1]，且引起不同程度規模的流行。台灣在1998年時，爆發了腸病毒71 型流行，導致78 例兒童死亡，其後在2000年與2001年的流行亦造成二十至三十名的死亡病例，而在2002至2005年間也有流行，但有病毒學確認的死亡病例則較1998年減少許多[2]，於2008年全年通報重症病例共計有522例，確定病例有370例，其中有14例兒童死亡[3]。腸病毒重症確定及死亡個案主要發生於五歲以下兒童，早期病患常表現有嗜睡、肌躍型抽搐合併心脈加速，會造成手足口症(*Hand-foot-mouth disease*, HFMD)或皰疹性咽峽炎(*herpangina*)，臨床症狀與部分克沙奇病毒(*Coxsackie virus*)相同；而腸病毒71型則會感染併發重症造成急性神經性疾病(*acute neurologic disease*)，包括：類脊髓灰白質炎(*poliomyelitis-like paralysis*)、腦炎(*encephalitis*)與無菌性腦膜炎(*aseptic meningitis*)等嚴重併發症[4]。因此能在第一線針對手足口症或皰疹性咽峽炎的症狀確認是否受到腸病毒71型的感染，對治療與後續防疫方向會有極大的幫助。

腸病毒71型為小RNA 病毒科(*Picornaviridae*)、腸病毒屬(*Enterovirus*)，近年來依據基因序列分析結果重新歸類，分為人類腸病毒A、B、C、D(*Human enterovirus A、B、C、D*)型，其中腸病毒71型被歸類於人類腸病毒A型[5] (*Pallansch MA and Roos*)。腸病毒直徑大小約20~30nm，不具外套膜(*non-envelope*)呈現立體對稱正二十面體之結構，基因組為大小約7.5Kb之單股正向

RNA[6] (Pallansch MA and Roos)。腸病毒顆粒是由外殼蛋白(capsid)包覆其單股RNA，外殼蛋白是由VP1、VP2、VP3與VP4四種蛋白質共同組成，VP4與病毒RNA的穩定性有關，而VP1、VP2以及VP3則是與細胞接受器及抗體結合有關，其中VP1不僅是中和抗體主要作用區域，亦是基因序列中變化較大之區域，並可與其他不同腸病毒之血清型進行區分[7]。

目前國內對於腸病毒的實驗室診斷，仍依賴傳統標準方法進行病毒培養分離，鑑定時間依採檢的病毒量多寡，由3天至14天不等；針對腸病毒71型，有EV71 RT-PCR分子生物學核酸快速檢測方法可在收件24小時內確認是否感染腸病毒71型[8, 9]；另外本局亦發展了腸病毒71型IgM 酵素免疫分析(EV71 IgM capture ELISA)快速檢驗法[10]，經偵測病人血清是否有腸病毒71型IgM，來確認感染腸病毒71型之急性期(發病二日後)，可於數小時內得知結果。惟上述檢驗方法皆需於專業的實驗室及相當熟練的技術人員方可進行。為因應未來腸病毒71型防疫及醫療照護之需要與臨床疑似腸病毒71型感染病患之確認，快速檢驗之結果為最重要的部分，故研發腸病毒71型快速檢驗試劑，於極短時間內(20分鐘內)即可得知結果，不需特殊儀器、操作簡單、使用方便，不需專業人員判讀結果，可提供一般醫院及第一線現場直接檢測，對作為即時提供患者治療及後續防疫決策之參考會有極大的幫助。

目前實驗室已建立即時定量系統(real-time RT-PCR)的方法來直接偵測檢體中之腸病毒(Pan EV)，此方法為結合*Taq-Man*的技術與ABI PrismTM 7500或7900即時序列偵測系統，其特性為高敏感度、高專一性，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[11]，但是此實驗方法無法立即區分出腸病毒的型別，需要再經過約兩天的定序時間，才能確

認為何型腸病毒，對腸病毒71 型病程與流行的急迫性，略顯緩不濟急。因此需要重新設計腸病毒71型之即時定量系統(real-time RT-PCR)，將複製的片段由腸病毒5'端non-coding region改變成不同腸病毒具有變異區的片段，例如常被用作區分腸病毒基因型的VP1基因或C3基因等部份，希望腸病毒71型即時定量系統(real-time RT-PCR)的建立，能在取得原檢體後數小時內即能得知檢驗結果。

二、材料與方法

病毒株及血清檢體來源

本研究使用之病毒株來自2008年流行於台灣地區，並經由本局研究檢驗中心傳統細胞培養分離及鑑定確認之腸病毒71型B5基因亞型病毒株。

快速檢驗試劑測試用之100支血清檢體係隨機挑選2009年經醫院或衛生所通報為腸病毒重症並送驗之血清防疫檢體，年齡層及人數分別為0-5歲有77人，6-10歲15人、11-20歲7人、20歲以上11人；採樣時間於1-15天有72人，15天以上有28人，經中心實驗室以血清例行性檢驗EV71 IgM capture ELISA鑑定是否為腸病毒71型所引發之重症病人。

病毒RNA的萃取

以商業化套組 QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Cat. No. 52906, QIAGEN) 進行病毒 RNA 萃取[12]。吸取 EV71 病毒液檢體 140ul 與 560ul 含 RNA carrier 之緩衝液 AVL 均勻混合，於室溫靜置作用 10 分鐘，再加入 560ul 純度 100%的絕對酒精，劇烈震盪混合 15 秒。將上述混合液體加至 QIAmp spin column 高速離心後，丟棄濾出液，並以 Buffer AW 清洗 column，再以 50ul 緩衝液 AVE 溶出 column 中之病毒 RNA，保存於-20°C 或-80°C，可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

反轉錄及聚合酶鏈鎖反應

(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR)

1. 反轉錄反應(Reverse Transcription)

萃取自 EV71 之 RNA 須經由反轉錄酶作用製成 cDNA，才可進一步以引子操作聚合酶鏈鎖反應放大後續實驗需要之 DNA 片段。取 5ul 病毒 RNA 加入 RT 反應混合液中，分別含有 5X buffer mix(75mM KCl、50mM Tris-HCl、3mM MgCl₂、10mM DTT、0.5mM dNTP mixture)、RNasin 40U/ul 與 antisense primer 50 pmole 以及 100 units reverse transcriptase，反應時間溫度分別為 42°C：50 分鐘，95°C：10 分鐘，之後置於 4°C 或-20°C 保存使用。

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

以反轉錄反應中所獲得之 cDNA 當作模版進行 PCR 反應。取 1ul cDNA 加入含有 2X buffer Mix(50mM KCl、10mM Tris-HCl、1.5mM MgCl₂、0.1% Triton-X 100、dNTP mixture 1mM)、5 units *Taq* polymerase 及 sense 與 antisense primer(表一)各 50pmole 的反應混合液中，於 94°C 變性(denature)10 分鐘後，以 94°C : 30 秒、60°C : 30 秒、72°C : 1 分鐘，進行 30 次反應，最後在 72°C 作用 10 分鐘。經 PCR 分別增幅放大之 VP1、VP2、VP3 及 VP4 產物片段，須以 DNA 電泳確認產物大小分別為 891bp、762bp、726bp、207bp。

病毒結構蛋白重組表現及純化

將 RT-PCR 增幅放大的 VP1、VP2、VP3、VP4 之 DNA 序列片段，經由引子特定限制酵素切割位設計，選殖於 pET47b(+)質體上，並以熱休克(heat-shock)方式 Transformation 進入 *E coli* TOP10 (Invitrogen)中，培養於 LB/Amp(最終濃度為 100μg/ml)之固態培養基上，以 Colony PCR 之方式確認篩選出含有 VP1、VP2、VP3、VP4 之載體。將確認轉殖成功之載體分別再 Transformation 至 *E. coli* BL21B 菌株中，以 IPTG(最終濃度為 1mM)誘導蛋白質表現，於低溫離心收集菌體，再加入 Lysis buffer(100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、8M Urea，pH 8.0)再懸浮並破壞菌體，離心取其上清液，並將之注入含四價螯合 NI-NTA 的純化樹脂(Qiagen, hikden, Germany)中，先以 Lysis buffer 沖洗管柱，再利用 Elution buffer(100mM NaH₂PO₄、10mM Tris、300mM Imidazole、8M Urea，pH 8.0)沖洗出含 His-tag 之蛋白質，以聚丙烯醯胺凝膠電泳(Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE))及西方墨點法(Western blot)進行蛋白質產物確認，並使用 EV71 相關之單株抗體與多株抗體及病人血清反應測試之[13, 14]。

免疫層析檢測技術(immunochromatographic test, ICT)

此實驗是仿效三明治免疫分析法 (sandwich immunosorbent assay)，其原理是藉由抗體抗原間之專一性與免疫親和力，以毛細引力(capillary attraction)，使

待測物質於Nitrocellulose薄膜(NC膜)中移動，經標定物-膠體金的顯色作用做檢測[15-19]。

1. 膠體金(Colloids Gold, CGC)之製備

膠體金主要為標誌抗體所用，其粒子大小與立體結構均影響顯色結果，製作步驟參考 2009 年 Zhou 等人發表之文獻[19]。於 1000ml 煮沸騰之二次水中持續攪拌加熱混合均勻 0.01% Gold chloride solution 與 1% Sodium citrate solution (量愈多，粒子愈小)，之後置於常溫水中降溫，鋁箔避光，置於 4°C 保存待使用。

2. 抗體與膠體金之結合

主要目的是使抗體結合上膠體金(Ab-CGC)，並放置於結合墊片(Conjugate pad)上，做為檢測時能於檢測線(Test line)與控制線(Control line)上顯色。於每 100mL 膠體金中加入適量濃度之抗體(Mouse anti-human IgM Monoclonal antibody 與 Protein G)，於室溫中攪拌混合均勻，之後以低溫高速離心去除上清液，並加入 sucrose 及 trehalose 穩定膠體金溶液，延長使用效期。

3. 噴膜

利用噴膜機器(XYZ 3000 dispenser with BioJets and AirJets)將病毒重組蛋白及抗體固定噴於檢測線、控制線位置與結合墊片上。將製備好之病毒重組蛋白、單株抗體以及 Ab-CGC 依照實驗設計之快檢試劑，分別將之檢測線、控制線噴於黏貼於支撐底卡上之 NC 膜以及結合墊片(須先經過親水性處理)上，置於室溫乾燥。乾燥後浸泡 NC blocking buffer 中 30 分鐘，填補 NC membrane 表面之孔隙、降低偽陽性發生及減緩 protein 活性降低。

快速檢驗試劑元件之組裝

將已貼上 NC 膜並經 buffer 處理乾燥後之支撐底卡分別再依序黏貼上，吸水墊片(Absorption pad)(位置 3)、膠體金墊片(Conjugate pad)(位置 2)以及檢體墊片(Sample pad)(位置 1)，黏貼順序如 **圖一**，每張墊片之間都須有重疊 $2\pm 1\text{mm}$ ，確實壓合及黏貼牢固。將上述組裝好的試紙卡(**圖二**)，以試紙裁切機(CM 4000

Guillotine Cutter)進行裁切，並組裝試紙條至試劑卡組待使用。

腸病毒 71 型之即時定量系統(Real-time RT-PCR)

1. 設計引子(primers)與探針(probe)

自不同型別之腸病毒基因序列變異區域，設計腸病毒 71 型專一性之引子對與探針，以 PRIMER EXPRESS 軟體設計引子 EV71-F/ EV71-R 與探 EV71-Probe 標記雙螢光。

2. 建立標準曲線(Standard curve)

以EV71-F/EV71-R為引子，經由RT-PCR的方法增幅放大出腸病毒71型基因片段，再將此基因片段純化後，使用T4黏接酶接到pGEM-T Easy Vector (Promega)上，轉殖送入JM109的大腸桿菌(E.coli)中，大量表現載體後，萃取載體DNA，測量O.D值，換算成病毒copies number，將濃度調整為 $10^0\sim 10^6$ copies number/ μl ，並以real-time RT-PCR建立標準曲線。

3. 與 RT-PCR、傳統病毒細胞培養作專一性與敏感度之比較：

(1)專一性分析(specific analysis)

將台灣的腸病毒流行株，以腸病毒 71 型即時定量系統分析，同時與傳統細胞培養、RT-PCR 作專一性分析，確定此系統對腸病毒 71 型的專一性。

(2)敏感性分析(sensitivity analysis)

將腸病毒 71 型之分離株，做不同濃度的連續稀釋，以腸病毒 71 型即時定量系統、傳統細胞培養與 RT-PCR 來比較其分析的敏感度。

4. 病毒細胞培養及定量：

取已知濃度之病毒量或未知濃度之檢體做連續稀釋，以 RD 細胞培養於 96well 中，每個 well 中加入 50 μl 細胞生長培養基及 100 μl 細胞懸浮液 (5×10^4 細胞)，置 36 $^{\circ}\text{C}$ ，5%CO₂ 培養箱培養，於第 4~5 天觀察細胞病變 CPE(cytopathic effect)，並計算其 TCID₅₀ 與病毒量。

三、結果

EV71抗體IgM快速檢驗試劑之微調修正及測試

腸病毒71型抗體IgM快速檢驗試劑係參考capture ELISA之設計原理，以anti-Human IgM之單株抗體間接捕捉病患血清中IgM抗體與EV71-VP1重組蛋白反應，並以Protein G加強試劑呈色反應(圖三.a)，初步測試其靈敏度為81%，特異性為66%，準確度為74%。為提高試劑之專一性與靈敏度，實驗室重新挑選特殊墊片材質降低背景值，且因衡量試劑之成本及組裝材料取得便利性，改選用Protein A取代Protein G(圖三.b)。而為確認修改後之試劑效能不變，實驗室亦隨機挑選50支防疫檢體進行測試。實驗結果顯示，微調修正後之試劑效能差異不大、呈色效果相似，亦可區分陽性與陰性檢體(結果未呈現)，且成本低、材料取得方便，故實驗室以此設計原型，委由民間GMP工廠小量生產約1500劑(組)，並擬委託指定之醫院及醫師收集臨床腸病毒就診病患血清檢體，更進一步評估試劑之專一性與靈敏度。

臨床腸病毒病患血清之收集

由於今年腸病毒重症疫情不嚴峻，各家醫院從九月後幾乎無感染腸病毒71型引發重症之個案，而造成以今年檢體測試之困難，但測試今年有送驗本實驗室之血清檢體共23件，結果顯示修改後之試劑其靈敏度為63%，特異性為71%。而因測試檢體數量過低，與先前2009年之檢體測試結果分別為靈敏度為81%，特異性為66%，難有統計上的差異，故擬更進一步委託指定之醫院及醫師共同協助收集不同年齡層，經由相關實驗證明確認因感染腸病毒71型之重症病患血清檢體，以及感染其他型別之腸病毒病患血清檢體，並擬於不同時間點進行採樣收集之，以便更進一步評估測試腸病毒71型抗體IgM快速檢驗試劑之特異性與靈敏度。

腸病毒71型即時定量系統(Real-time RT-PCR)之研發

實驗室挑選歷年台灣曾流行之EV71基因型別-C2, C4, C5, B4, B5，並分析VP1區域之序列，參考2000年Pallansch等人之發表文獻[20]及現行EV71 RT-PCR使用之引子，設計出EV71 real-time RT-PCR之引子EV71 F/ FV71 R與探針 EV71 probe(表一)，經測試亦可偵測歷年台灣曾流行之EV71基因型別-C2, C4, C5, B4, B5，而不與控制組有所反應(圖四)。而為建立標準曲線，實驗室基因選殖EV71 B5之P1區域〈含VP1, VP2, VP3, VP4〉至質體中，利用*E. coli*大量表現質體，進行核酸萃取，測定核酸濃度，將其濃度序列稀釋為 $10^0\sim 10^6$ copies number/ μl ，將進一步測試建立成為EV71 real-time RT-PCR標準曲線。

四、討論

研究發展腸病毒71型快速檢驗試劑對於提供患者即早治療及防疫決策之參考是目前所必須的。EV71 VP1區域不僅是中和抗體作用區域，其VP1重組蛋白及胺基酸序列也已被證實可有效發展成疫苗預防EV71[21-26]。因此實驗室自行建構重組表現EV71 VP1重組蛋白，經Western blot實驗證明亦為主要的抗體結合位，故作為後續研究發展。

本計畫設計之腸病毒71型抗體IgM快速檢驗試劑(EV71 Ab-IgM Rapid test)係參考capture ELISA之原理，以anti-Human IgM之單株抗體間接捕捉人體血清中IgM抗體與EV71-VP1重組蛋白反應，並以Protein G加強試劑呈色反應，實驗結果比直接利用VP1與血清中抗體IgM反應，或是只利用單株抗體捕捉血清中IgM之ICT原型成效更佳。而為提高試劑之專一性與靈敏度，以及降低試劑成本與組裝材料取得便利性，實驗室挑選特殊墊片材質降低背景值，並改選用同性質、具相同功能、價錢低及容易購買取得之Protein A取代Protein G。其試劑微調修正後之測試結果顯示，試劑之效能以及呈色效果皆相似，亦可區分陽性與陰性檢體，且成本低、材料更易取得，故實驗室以此原型設計，已委由民間GMP工廠小量生產約1500劑(組)，但由於今年疫情較為緩和，總計腸病毒重症確定病例為16例，故仍以2010年前之檢體為主，同時將於今(99)年11月25日召開技術轉移招標公司審查會，預計可選出一家民間生物科技公司來承接後續工作。

本計畫所發展之EV71 Ab-IgM Rapid test，採用之檢測物為血清(Serum)檢體，實驗室或是醫療院所仍需經由離心機步驟方可進行測試，基於多數民間醫療院所未備有離心機設備，故可能會影響此試劑之推廣效益，故實驗室已擬進一步改良現行發展之快速檢驗試劑，朝發展成直接檢測全血之EV71 Ab-IgM Rapid test，以縮短試劑檢測時間與提高推廣效益作為目標，進行發展之。

利用即時定量系統(Real-time RT-PCR)的方法來直接偵測檢體中之腸病毒(Pan EV)，早已於實驗室中建立及使用，其特性為高靈敏度及高專一性[11]，但

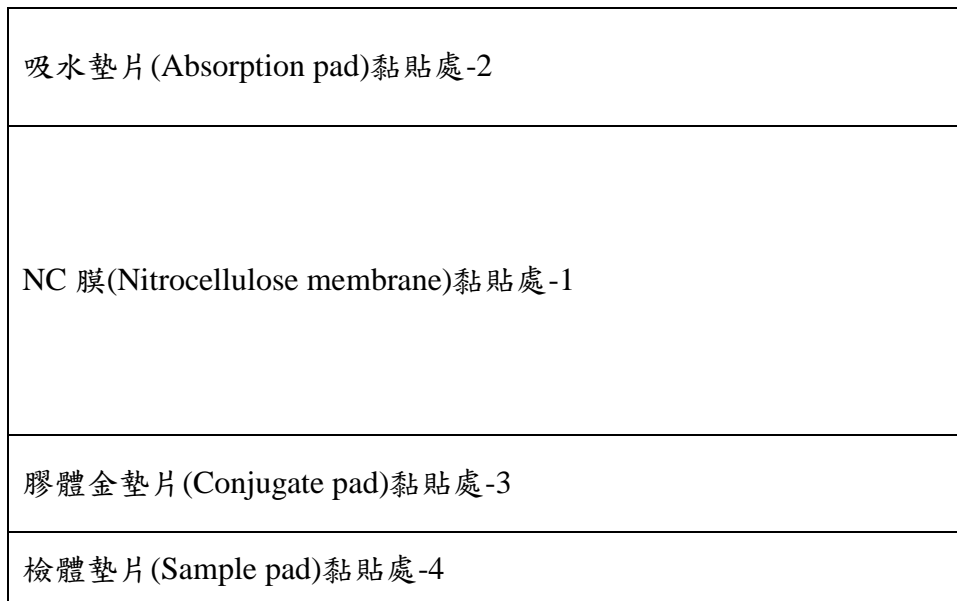
此方法仍無法立即區分出腸病毒的型別，需再經過約兩天的定序時間才能確認之。而基於腸病毒71型病程與流行的急迫性，實驗室於EV71 Real-time RT-PCR之研發上雖已設計其引子EV71 F/ FV71 R與探針EV71 probe，但仍無法突破建立 $10^0\sim 10^6$ copies number/ μl 之標準檢測曲線(Standard curve)，且基於目前論文學術研究及網路發達，並經由網路查詢即可得知已發表針對EV71設計之引子與探針[27-30]，故實驗室擬終止EV71 Real-time RT-PCR之研究發展，改採由實驗室人員自行測試評估目前已發表之引子與探針，更快速的建立高靈敏度及專一性之「腸病毒71型即時定量系統(real-time RT-PCR)」。

五、表圖

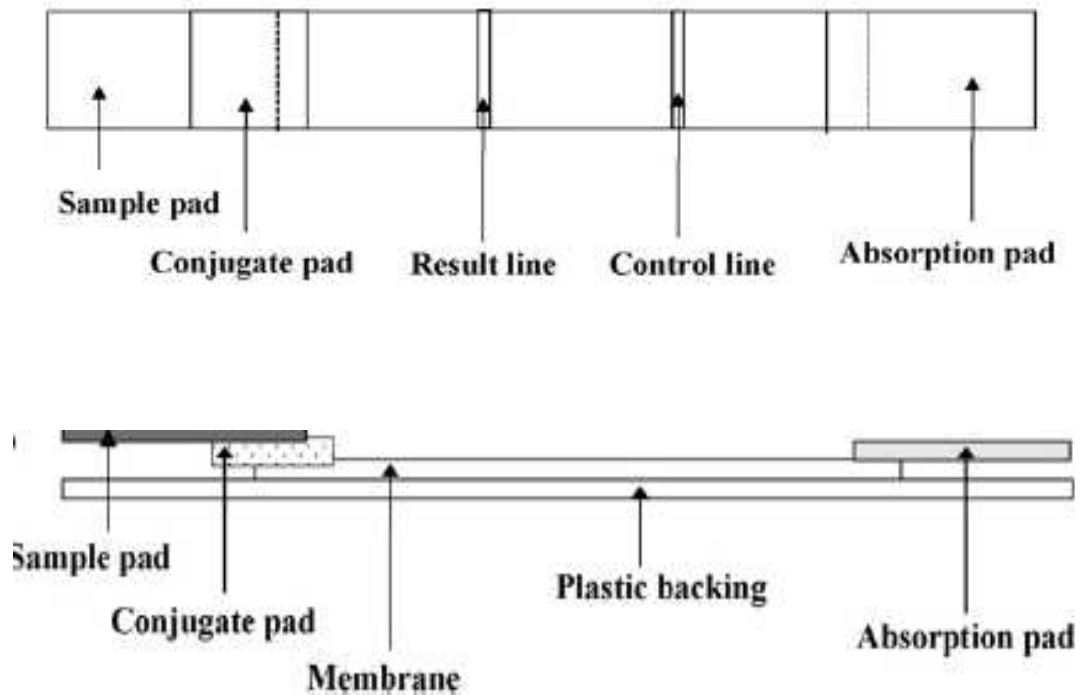
表一、引子名稱及序列

Primer Name	Sequence (5' to 3')
VP1-F-B	AGTCGGATCCGGGAGATAGGGTGGCAGATGT
VP1-R-S	AGTCGTCGACAAGGGTAGTAATGGCGGTAC
VP2-F-N	ATGCGTCGACATGTCTCCATCCGCTGAAGCT
VP2-R-N	AGTCCTCGAGAAGGGTAGTAATGGCGGTACG
VP3-F-B	AGTCGGATGCGGGCTTTCCCACTGAGCCAAA
VP3-R-S	AGTCGTCGACCTGAATAGAGGCTGTCTGTAA
VP4-F-N	TGCGTCGACATGGGCTCACAGGTG
VP4-R-N	AGTCCTCGAGCTTTAGAGGGGCAGCCATTTC
EV71 F	ATGGTTATGCIAAYTGGGAYATAG
EV71 R	ACAAACATRTAYTGRAGIARYTG
EV71 probe	6FAM-TTYGAYGCIGARTTYACITTYGT-BHQ1

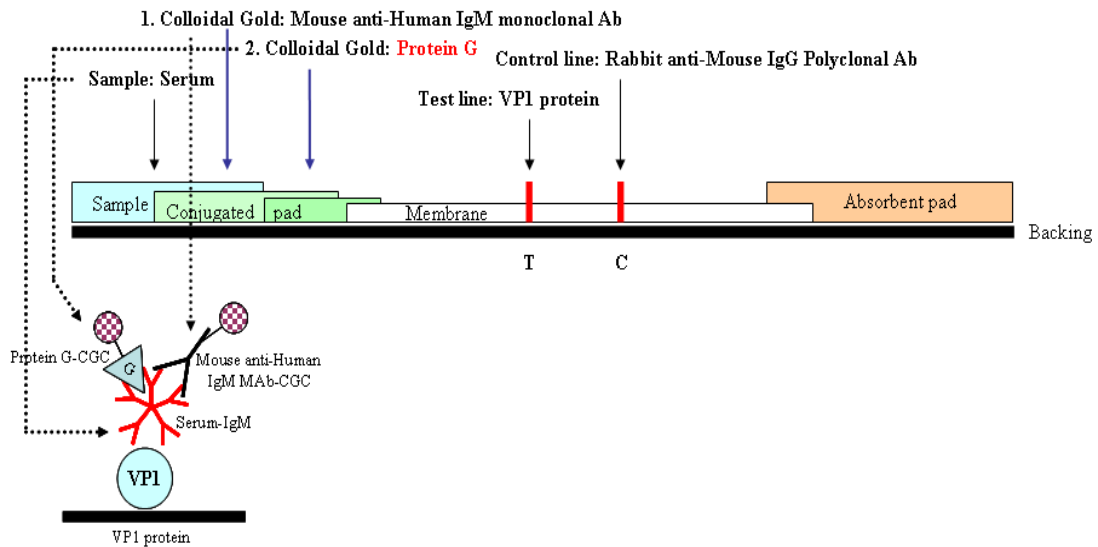
圖一、快速檢驗試劑元件組裝順序示意圖



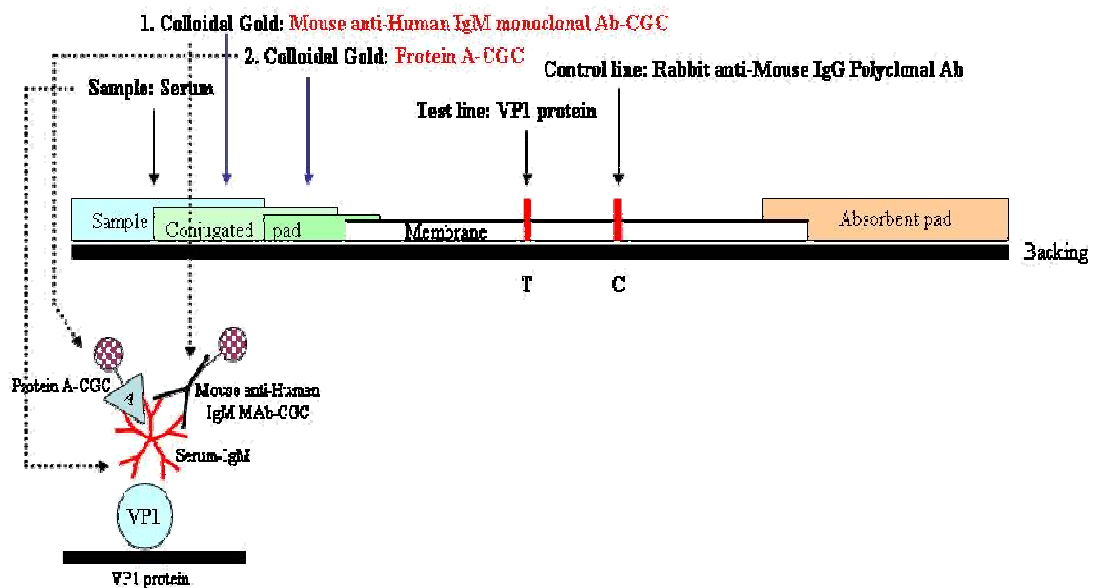
圖二、快速檢驗試劑元件組裝完成圖



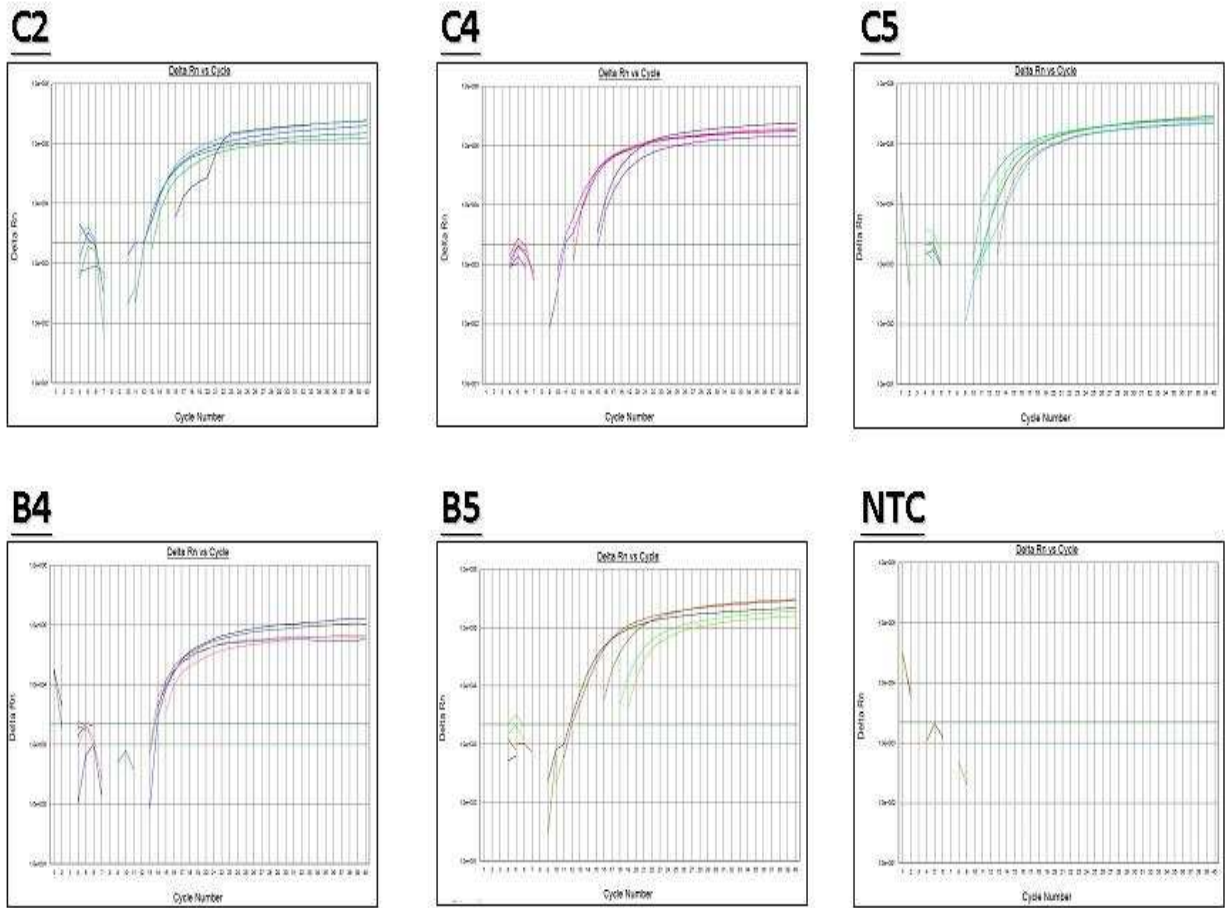
圖三、(a) 腸病毒71型抗體IgM快速檢驗試劑模型圖，係參考capture ELISA之設計原理，以anti-Human IgM之單株抗體間接捕捉病患血清中IgM抗體與EV71-VP1重組蛋白反應，並以Protein G加強試劑呈色反應。



(b) 以用同性質、具相同功能、價錢低及容易購買取得之Protein A取代 Protein G組裝之腸病毒71型抗體IgM快速檢驗試劑模型圖



圖四、使用實驗室設計之EV71 real-time RT-PCR之引子EV71 F/ FV71 R與探針EV71 probe，測試偵測歷年台灣曾流行之EV71基因型別-C2, C4, C5, B4及B5之結果。



六、參考文獻

1. Chumakov M., Voroshilova M., Shindarov L., Lavrova I., Gracheva L., Koroleva G., Vasilenko S., Brodvarova I., Nikolova M., Gyurova S., Gacheva M., Mitov G., Ninov N., Tsyka E., Robinson I., Frolova M., Bashkirtsev V., Martiyanova L., Rodin V. Enterovirus 71 isolated from cases of epidemic poliomyelitis-like disease in Bulgaria. *Arch Virol.* 1979; 60(3-4):329-340.
2. Chen K. T., Chang H. L., Wang S. T., Cheng Y. T., Yang J. Y. Epidemiologic features of hand-foot-mouth disease and herpangina caused by enterovirus 71 in Taiwan, 1998-2005. *Pediatrics.* 2007; 120(2):244-252.
3. Taiwan Centers for Disease Control. Guidelines for the control and prevention of enterovirus infections.
4. Cardosa M. J., Perera D., Brown B. A., Cheon D., Chan H. M., Chan K. P., 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(4):461-468.
5. King AM, Brown F, Christian P, et al. Picornaviridae 2000, In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 657-78. San Diego: Academic Press.
6. Pallansch MA, Roos, RP. Enteroviruses : *Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Eds), *Fields Virology*, third ed. Lippicott-Raven, Philadelphia, 1996 pp. 723-775.
7. Herrero L. J., Lee C. S., Hurrelbrink R. J., Chua B. H., Chua K. B., McMinn P. C. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol.* 2003; 148(7):1369-1385.
8. 林翠莉, 王聖凡, 林奇勇, 李祥吉, 徐秋菊, 羅淑真, 陳豪勇, 楊志元。腸病毒即時定量系統(Real-time RT-PCR)對臨床檢體之檢驗與分析。疫情報導94年; 第21卷(第6期):436~450。
9. 林翠莉, 黃教威, 林敏琮, 賴明和, 徐秋菊, 李宜學, 楊志元, 吳和生。腸病毒71型(Enterovirus 71)群聚感染之實驗室鑑定與分析。疫情報導95年;252~266。
10. Wang S. Y., Lin T. L., Chen H. Y., Lin T. S.. Early and rapid detection of enterovirus 71 infection by an IgM-capture ELISA. *J Virol Methods.* 2004;119(1):37-43.
11. Chen T. C., Chen G. W., Hsiung C. A., Yang J. Y., Shih S. R., Lai Y. K., Juang J. L.. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray

- to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(6):2212-2219.
12. Huang Y. P., Lin T. L., Kuo C. Y., Lin M. W., Yao C. Y., Liao H. W., Hsu L. C., Yang C. F., Yang J. Y., Chen P. J., Wu H. S. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res.* 2008; 137(2):206-212.
 13. Huemer H. P., Wechselberger C., Bennett A. M., Falke D., Harrington L. Cloning and expression of the complement receptor glycoprotein C from Herpesvirus simiae (herpes B virus): protection from complement-mediated cell lysis. *J Gen Virol.* 2003; 84(5):1091-1100.
 14. Huemer H. P., Strobl B., Shida H., Czerny C. P. Induction of recombinant gene expression in stably transfected cell lines using attenuated vaccinia virus MVA expressing T7 RNA polymerase with a nuclear localisation signal. *J Virol Methods.* 2000 ; 85(1-2):1-10.
 15. Oh J. S., Ha G. W., Cho Y. S., Kim M. J., An D. J., Hwang K. K., Lim Y. K., Park B. K., Kang B., Song D. S. One-step immunochromatography assay kit for detecting antibodies to canine parvovirus. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13(4):520-524.
 16. Shiota S., Mannen K., Matsumoto T., Yamada K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Khawplod P., Gotoh K., Ahmed K., Iha H., Nishizono A. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods.* 2009;161(1):58-62.
 17. Rajerison M., Dartevelle S., Ralafiarisoa L. A., Bitam I., Tuyet D. T., Andrianaivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and Evaluation of Two Simple, Rapid Immunochromatographic Tests for the Detection of *Yersinia pestis* Antibodies in Humans and Reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4):421.
 18. Mikawa A. Y., Santos S. A., Kenfe F. R., da Silva F. H., da Costa P. I. Development of a rapid one-step immunochromatographic assay for HCV core antigen detection. *J Virol Methods.* 2009; 158(1-2):160-164.
 19. Zhou Y., Pan F. G., Li Y. S., Zhang Y. Y., Zhang J. H., Lu S. Y., Ren H. L., Liu Z. S. Colloidal gold probe-based immunochromatographic assay for the rapid detection of brevetoxins in fishery product samples. *Biosens Bioelectron.* 2009; 24(8):2744-2747.
 20. Brown B. A., Kilpatrick D. R., Oberste M. S., Pallansch M. A.. Serotype-specific identification of enterovirus 71 by PCR. *J Clin Virol.* 2000; 16(2):107-112.

21. 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;27(24):3153-3158.
22. Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Pallansch M. A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*. 1999; 73(3):1941-1948.
23. Chen H. F., Chang M. H., Chiang B. L., Jeng S. T. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*. 2006; 24(15):2944-2951.
24. Foo D. G., Alonso S., Phoon M. C., Ramachandran N. P., Chow V. T., Poh C. L. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides. *Virus Res*. 2007; 125(1):61-68.
25. Foo D. G., Alonso S., Chow V. T., Poh C. L. Passive protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by neutralizing antibodies elicited by a synthetic peptide. *Microbes Infect*. 2007; 9(11):1299-1306.
26. Wu C. N., Lin Y. C., Fann C., Liao N. S., Shih S. R., Ho M. S. Protection against lethal enterovirus 71 infection in newborn mice by passive immunization with subunit VP1 vaccines and inactivated virus. *Vaccine*. 2001; 20(5-6):895-904.
27. Tan E. L., Yong L. L., Quak S. H., Yeo W. C., Chow V. T., Poh C. L. Rapid detection of enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR. *J Clin Virol*. 2008; 42(2):203-206.
28. Tan E. L., Chow V. T., Quak S. H., Yeo W. C., Poh C. L. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 61(3):294-301.
29. Fujimoto T., Yoshida S., Munemura T., Taniguchi K., Shinohara M., Nishio O., Chikahira M., Okabe N. Detection and quantification of enterovirus 71 genome from cerebrospinal fluid of an encephalitis patient by PCR applications. *Jpn J Infect Dis*. 2008; 61(6):497-499.
30. Xiao X. L., He Y. Q., Yu Y. G., Yang H., Chen G., Li H. F., Zhang J. W., Liu D. M., Li X. F., Yang X. Q., Wu H. Simultaneous detection of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in clinical specimens by multiplex real-time PCR with an internal amplification control. *Arch Virol*. 2009; 154(1):121-125.