

計畫編號：DOH94-DC-2003

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

計畫名稱：建立腸病毒71型SNP基因型分型法與快速診斷鑑定系統

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：楊志元、陳豪勇、林翠莉、王聖帆、徐秋菊

執行期間： 94年1月1日至94年12月31日

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
壹、綜合資料	
貳、計畫摘要	
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
參、計畫內容	
一、研究簡介	(6)
二、材料方法	(11)
三、結 果	(16)
四、討 論	(20)
五、表 圖	(23)
六、參考文獻	(30)

計畫摘要

中文摘要：

關鍵字：腸病毒 71 型、單一核酸多型性、即時定量系統

腸病毒七十一型是造成手口足症 (hand, foot, and mouth disease; FMD) 的主要原因，有時亦會造成嚴重的神經症狀，包括：腦炎、類脊髓灰白質炎。腸病毒 71 型是容易產生變化的 RNA 病毒，所以在不同時間、區域會導致產生不同輕重之腸病毒 71 型基因型分離株。目前在分子流行病學上已有利用腸病毒 71 型之 VP1 之基因片段將腸病毒 71 型分為 A、B、C 三種基因型。基因型的演化與流行對於腸病毒 71 的治療與疫苗的研發提供很重要的訊息，本計劃採用單一核酸變異 (SNP) 的方法來作腸病毒 71 型基因分型，提供一個快速簡單的分型方法。此外，藉此可發展腸病毒 71 型定性與定量之分析並且適合用於篩檢大量的檢體，能更快速得知結果。

將本局 1998-2005 腸病毒七十一型之臨床檢體，經反轉錄聚合酶連鎖反應後的 VP1 區域基因片段，經定序並以演化樹分析 (Phylogenetic analysis)。結果發現，台灣地區主要流行腸病毒七十一型之 B、C 基因，1998 年主要流行的基因型為 C2 基因亞型 (subgenotype)，而 1999 年至 2003 年轉為 B4 基因亞型，在 2004 年至 2005 年分析鑑定為基因亞型 C4。根據腸病毒 B 基因型與 C 基因型序列比對找到兩個核酸變異點可以來作為分型之用，分別是經截取比對後 112 位點與 157 位點，在 B 基因型 112 位點的核酸為 G、157 位點的核酸為 A；而在 C 基因型 112 位點的核酸為 A、157 位點的核酸為 G，可利用此二位點先將腸病毒七十一型作初步基因分型。另外，欲發展腸病毒七十一型快速診斷系統 Real-time RT-PCR，目前已設計了多組的引子對與探針結果顯示探針: EVP1_TM 與引子對: Ent V F+/ EV7_A 此組的測試效果較好，但也只可偵測到高濃度標準品和腸病毒 71 的原型株 (prototype)。故在此快速診斷系統的建立方面，未來應利用腸病毒 71 型基因上其它較不易產生變化的區域 (2A、VP4...) 來做引子對與探針的設計再來評估與改良。

英文摘要：

Key word: Enterovirus 71 、 SNP 、 Real-time RT-PCR

Enterovirus 71 (EV71), a common causative agent of hand, foot, and mouth disease (HFMD), may induce severe neurological diseases, such as encephalitis and poliomyelitis-like paralysis. EV71 is a genetically diverse, rapidly evolving virus. To examine the genetic diversity and rate of evolution of EV71, the sequences of complete EV71 VP1 gene comparisons demonstrated three distinct EV71 genotypes, designated A, B and C. The molecular genetic analyses of EV71 were very important information for diagnosis and vaccine development research. The aim of the present study was to locate single nucleotide polymorphism (SNP), which can distinguish from EV71 B and C genotypes. Moreover, we can use SNP data to develop real-time RT-PCR assay to detect clinical samples.

We used the EV71 positive clinical samples in Taiwan from 1998-2005 for subtyping by RT-PCR amplification and sequencing of a portion of the VP1 gene. After phylogenetic analysis, the dendrogram showed that isolates from Taiwan are either genotype B or C. EV71 isolated from the 1998 epidemic belonged to subgenotype C2. The samples isolated from 1999 to 2003 grouped into subgenotype B4. However, EV71 subgenotype switched to C4 during 2004 to 2005. According to genotype B and C nucleotide sequence alignment, we found two SNP sites, B genotype: site 112 GAA (Glu), site157 ACT (Thr) ; C genotype: site 112 AAA /AAG (Lys) , site 157 GCT(Ala). Then, several specific primers and probes were designed for EV71 to evaluate the Real-Time RT-PCR assay. The result showed that Ent V F+/EV7_A (primers) paired with

EVP1 (probe) was the most sensitive condition but it only could detect the high copies number standard and EV71 prototype. Others were not good enough to pick up any signal for subtyping of EV71.

Even SNPs were identified between EV71 subtype B and C, our primers design were still not suitable to apply in real-time RT-PCR detection system. If the sequences adjacent to the SNP spot also show highly divergent, it would jeopardize the development of our try. Therefore, other regions or primers design warrant further study to establish the detection system based on SNP.

計劃內容:

一、 研究簡介:

腸病毒為正性單股核糖核酸(plus sense, single stranded RNA) 病毒，屬於小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)，此病毒的構造很小，其直徑約只有 20-30nm 大小，為不帶有外套膜 (nonenveloped)、正二十面體之結構[1]。其 RNA 基因約有 7,5kb 長。腸病毒分為五屬。小兒麻痺病毒(Poliovirus)具 3 種血清型(3:1-3)，會引起麻痺症、無膿性腦膜炎、發熱等症狀；克沙奇病毒 A 群(coxsackievirus, group A)(23 serotype: A1-A24 無 A23)則會引起無膿性腦膜炎、咽喉炎、呼吸道感染、發疹等症狀；克沙奇病毒 B 群(coxsackievirus, group B)(6 serotype: B1-B6)引起症狀和 A 群相似，但是其尚會引起新生兒心肌炎、胸膜炎、肌痛等疾病；伊柯病毒(Echovirus)引起症狀亦雷同，具 31 種血清型；腸病毒型 68-71 為較新發現的病毒，其中 71 行會引起中樞神經系統(CNS)疾病[2]。

腸病毒 71 型首先於 1974 年在美国加州被報導出來[3, 4]，與嚴重之神經病變有關。接著陸續在世界各地皆有不等程度規模之流行，在台灣地區 1998 年約有 30 萬人次感染腸病毒。腸病毒 71 型感染後引起之病症可從無臨床症狀,手足口症到嚴重之中樞神經病變。中樞神經性病變包括無菌性腦膜炎、類小兒麻痺症 (poliomyelitis

paralysis) 、及致死性腦炎,或伴有肺水腫、肺出血等。雖然在腦神經病變上與小兒麻痺病毒引起之相類似,但腸病毒 71 型基因之核酸序列與小兒麻痺病毒基因序列有不同的差異[5]。1998 年台灣全年合乎腸病毒感染之監測系統病例(手足口症或咽峽炎併有無菌性腦膜炎、腦炎、急性肢體無力或心肌炎)共有 405 位,其中 78 例死亡,327 例存活,致死率 19%。115 例重症中,20 例檢出為腸病毒 71 型。病理特徵為腦炎、肺水腫、肺出血。在引起腦炎的病例中研究指出腸病毒 71 型只要是侵犯腦幹(brain stem) 之中腦中央(midbrain) 、橋腦(pons) 及延腦(medulla oblongata) 後方,以及小腦齒狀核(dentate nuclei of the cerebellum), 嚴重者可往下侵犯頸椎脊椎(spinal cord) [6, 7]。雖然早期已有利用猴子為動物模式探討腸病毒 71 型病理研究[8], 也推測可能有對神經細胞較毒之病獨株存在,或是因為高濃度病毒血症引起臨床上微血管漏失症候群(capillary leak syndrome)而導致急性休克之解釋,但是對該病毒侵犯人體之路徑、病理機轉、或為何可以引起嚴重中樞神經病變還是未知。

腸病毒 71 型是容易產生變化的 RNA 病毒,所以在不同時間、區域、及導致不同輕重之腸病毒 71 型分離株基因之差異性是很值得探討與了解。目前在分子流行病學上已有利用腸病毒 71 型之 5'NCR (non-coding region)[9]、VP4~VP2 及 VP1[1]之區域作基因演化分析。

其中 Hiroyuki 等人[2]用 VP4-VP2 之基因片段將腸病毒 71 型分為基因型 A(Genotype A)與基因型 B(Genotype B);Betty A. Brown 等人[1]利用 VP1 之基因片段將腸病毒 71 型分為 A、B、C 三種基因型(圖二)。台灣地區目前流行的腸病毒 71 型多為 B 或 C 型，而基因型的演化與流行對於腸病毒 71 的治療與疫苗的研發提供很重要的訊息，本計劃欲採用單一核酸變異(SNP)的方法來作腸病毒 71 型基因分型，提供一個快速簡單的分型方法。

關於 Real-time PCR[10]:

Real-time PCR 是由 Christian 等人於 1996 年所發展出的一項定量 DNA 的技術[11]。相較於之前的定量系統，real-time PCR 於反應進行中偵測反應產物，因而在反應結束後即可分析定量之。它不需額外的後處理，除了速度加快外也可避免後處理時所可能造成的污染。

目前有兩種方式用以偵測經 real-time PCR 所增幅出之 DNA 片段，分別為利用螢光標記的 DNA 探針及一種會與 DNA 結合的螢光化學試劑。TaqMan 探針[12]、hybridization probe 及 molecular beacon 等系統利用螢光標記之 DNA 序列進行定量；而 SYBR-green I 則為不具特異性的雙股 DNA 嵌合劑[13]。molecular beacon 為一 hairpin 結構之 DNA 序列，當它與目標基因結合時可測得螢光，故可利用螢光遮

蔽效應的改變而加以定量目標基因[14]。SYBR-green I 則為一化學染劑，它會嵌入雙股 DNA 的小螺旋 (minor groove) 序列中，隨著產物的增加而可測得較高量之激發光。

TaqMan Probe 之原理：

此系統的定量原理是利用一標記兩種螢光的 DNA 探針來偵測聚合連鎖反應的產物。此 DNA 探針的 5'端標記一報告染劑 (reporter dye)，3'端則標記一遮蔽染劑 (quencher dye)，完整的 DNA 探針其報告染劑所散發出的螢光會被遮蔽染劑所掩蓋。當聚合進行延伸反應 (extension phase) 時，具有從 5'端 DNA 切割活性的 DNA 聚合酶將探針切割，使得 5'端報告染劑與 3'端遮蔽染劑分開，遮蔽效應被破壞，此時即可偵測到螢光反應。

反應進行中 CCD (charged-coupled device) 相機持續偵測螢光值的改變，其中遮蔽染劑的螢光改變是極微小的，利用它來校正 (normalized) 報告染劑的改變量，再利用軟體計算出 ΔR_n ,

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$$

$$R_n^+ = \frac{\text{emission intensity of reporter}}{\text{emission intensity of quencher}} \quad \text{PCR 反應進行前之時間點}$$

$$R_n^- = \frac{\text{emission intensity of reporter}}{\text{emission intensity of quencher}} \quad \text{PCR 反應進行中的任一時間點}$$

PCR 每一循環反應中最後偵測到的三個 ΔRn 值，利用其平均數即可畫出 amplification plot，隨著 PCR 產物增幅累積，amplification plot 由基準線 (base line) 轉而呈現指數期 (log phase)，直到反應到達高循環次數時，amplification plot 即呈現平原期 (plateau phase)。利用 amplification plot 定出閾限值 (threshold，即開始測得螢光的點，定義為 PCR 反應之 1 至 15 個循環所測得的螢光散發值的平均加上 10 倍標準差)，當閾限值選定，每一 PCR 反應進行時，超過閾限值的循環數即被定義為 C_T 值， C_T 值即提供一定量目標基因的參考值。經由已知量的 DNA 連續稀釋後定出一標準曲線，X 軸為已知量的 DNA 數目，Y 軸為 C_T 值，經由軟體分析未知量樣品之 C_T 值，由內插法求得其所對應的 DNA 數目，進而計算出未知量樣品中 DNA 之數量。

因此本計畫的兩個主要目標為：一、利用單一核酸多型性的差異建立腸病毒 71 型 SNP 基因型分析方法，同時以 SNP 與演化樹的方法來作腸病毒 71 型基因型分型，來確定此 SNP 位點的正確性與應用性。二、建立腸病毒 71 型即時定量快速診斷鑑定系統。

二、 材料與方法(Materials and Methods) :

一、 建立腸病毒 71 型 SNP 基因型(genotype)分型法:

1.檢體來源：

自 1998 年至 2004 年本局研究檢驗中心例行性檢驗疑似腸病毒 71 型感染之臨床檢體與各病毒病毒性感染症合約實驗室分離出之長病毒 71 型病毒株。

2.病毒培養：

將前處理完畢的檢體（包括肛門拭子、咽喉拭子、糞便等）取200 ul 接種RD、HEp - 2C、MRC5、Vero 細胞株，置於36°C含有5%的二氧化碳培養箱培養，觀察14 日，當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，以為分生檢測及腸病毒定序，而其餘的細胞則固定於玻片上，進行間接免疫螢光法(IFA)的染色，鑑定其型別。

3.核酸萃取：

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。吸取檢體 140 ul 加 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(vortexing)，上述混合液再通過 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)。

4.反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR) [1,17]

(1) 反轉錄反應 (Reverse Transcription)

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、dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38 U/ul及antisense primer162 (表一) [17] 50 pmoles 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、dNTP mixture 1 mM及primer: 159 及162 [11, 17, 18]各50 pmoles 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。

4. 分型之 SNP 位點與演化樹比對:

將1998年~2004年所分離到的腸病毒71型不同基因型之序列，找出具有代表性的B基因型與C基因型的腸病毒71型，以DNA Star軟體將序

列作alignment並找出可分型之SNP位點，再利用此位點分析所有的腸病毒71型序列，同時將這些序列與參考病毒株（reference strains）：N5101-TW-98、TW-1743-982003-SHZH03-china、HK1159、2381MA、EV71BrCr、Malaysia EV71MS、0627-MAA00~0815MAA00、S1971SAR03~S19741SAR03、0128-MAA97~0889-MAA97、7629PA87~7631PA87、1413CA87、4826CT83、3984OH82、4644AR83、2259CA82、1011ND79、2234NY77、2229NY76~2238NY77、2604AUS74~2610AUS74、KOR-EV71-02~07、013-KOR-00、2132VA95、2037MD95、2007CT94、2006CT94、0756MAA97、S19691SAR03MA、CN30014SAR03MA、2261CA91、2583CAN91、9323TX89、0915~0916MA87、2262CA92、9718TX89、1919NM94、0390TX90、2641~2644AUS95、2355OK97、2286TX97 以電腦軟體Molecular Evolutionary Genetics Analysis（MEGA）version 2.1 操作。採用“Neighbor-joining”演算方法，重複計算（Bootstrap）1,000 次作演化樹分析。

註：本次腸病毒七十一型病毒株參考序列摘自[17-21]

二、建立腸病毒 71 型快速診斷鑑定量系統:

1.引子(primers)與探針(probe)的設計：

根據腸病毒可分型之 VP1 區域來設計腸病毒 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 與探針 EV71-Probe 標記雙螢光。

2. 腸病毒 71 型標準曲線(Standard curve) 的建立:

首先，以腸病毒 71 型原型(prototype BrCr strain)為模板(template)，EV71-F(159)/EV71-R(162)為引子利用 RT-PCR 的方法增幅出基因片段，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)接到 pGEM-T Easy Vector (Promega)上，接著以轉殖(Transformation)的方法，將以黏接好的載體送入 JM109 的大腸桿菌(E.Coli)中，並利用載體中所帶有的 Ampiciline resistance 基因以抗生素 ampiciline 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，再將其換算成複製數(copies number)。

3、與分子生物技術 RT-PCR 和傳統的病毒細胞培養作敏感度與專一性之比較:

*專一性分析(specific analysis):

將台灣的腸病毒流行株 CA2~18、EV70、EV71、CB5、Echo11、30 等分離病毒株，以腸病毒 71 型即時定量系統分析，同時以傳統細胞培養與 RT-PCR 分生技術作專一性分析，已確定此即時定量系統對腸病毒 71 型的專一性。

*敏感性分析(sensitivity analysis):

將腸病毒 71 型的分離株作不同濃度的稀釋($10^7 \sim 1$ copies RNA) 以
腸病毒 71 型即時定量系統、傳統細胞培養與 RT-PCR 比較其敏感度。

三、結果：

一、建立腸病毒 71 型 SNP 基因型(genotype)分型法:

將檢體純化處理後萃取病毒RNA，再以腸病毒七十一型專一性引子對159/162 利用RT-PCR 的方法增幅VP1 區域基因片段，經洋菜膠電泳與EtBr染色分析可見485bp 基因片段。在將此片段純化後作基因定序，將得到的序列利用NCBI 網站作BLAST比對分析，確定為腸病毒七十一型以及其相似的腸病毒株。將實驗室分析所得的腸病毒七十一型基因序列，與GeneBank 中腸病毒七十一型不同基因亞型之參考病毒株序列(reference strains)，比對截取適當長度414 bp 以MEGA2.1 版的軟體作演化樹分析。結果發現演化樹呈現兩個主要的基因型 (genotypes) B 與C，而與原型病毒株 (prototype) BrCr 所屬的A 基因型有明顯的區別，依據Betty Brown 等人在核酸序列演化樹分析中以VP1 可將腸病毒七十一型分成三種基因型，分別為A、B 及C 等三型，其中BrCr Prototype 為A 型，而B 型在70年代至80 年代皆有發生，C 型則是從80 年代中期至90 年代一直有出現過，目前全球所分之腸病毒七十一型都是B 型或C 型。然而，若從基因序列的差異與演化樹的同源性將基因型進一步分析，依據Betty A. Brown 等人[1]、Peter McMinn 等人[21]、Mary Jane Cardosa 等人[22]的研究發現，B 與C 基因型又可區分出基因亞型 (subgenotypes)。B 基因型

可以區分為B1、B2、B3 與B4 基因亞型；C 基因型可以區分為C1、C2、C3 與C4 基因亞型 (圖三)。

根據腸病毒B基因型與C基因型序列比對找到兩個核酸變異點可以來作為分型之用，分別是經截取比對後112位點與157位點(相對於腸病毒七十一型原型株BrCr基因全長位點為2565與2610；對應在VP1全長區域位點為127與172)。在B基因型112位點的核酸為G、157位點的核酸為A；而在C基因型112位點的核酸為A、157位點的核酸為G(表二)。目前經過比對許多不同國家包括台灣在不同年代的腸病毒七十一型分離株序列，發現B基因型112位點為G、157位點為A；而C基因型112位點為A、157位點為G，可利用此二位點先將腸病毒七十一型作初步基因分型： B genotype:112 GAA, 157 ACT ; C genotype: 112 AAA or AAG , 157 GCT。

然而，為了解腸病毒七十一型基因亞型(subgenotype)的演化情形，亦利用演化樹分析的方法採用MEGA2.1分析軟體，將腸病毒七十一型分離株VP1區域之基因片段比對分析，結果發現， B基因型可以進一步細分為B1、B2、B3與B4基因亞型(圖四)而C基因型亦可細分為C1、C2、C3與C4基因亞型(圖五)。台灣地區所流行的腸病毒七十一型多為B1、B4、C2、C4四種基因亞型。在1998年台灣地區腸病毒大流行造成幼童出現HFMD以及嚴重的神經症狀，甚至死亡的多為腸

病毒七十一型C2基因亞型，少部分有分離到B1、B4與C4基因亞型。而1999-2003年流行的腸病毒七十一型多為B4基因亞型，其有兩株腸病毒七十一型分離株8623VNR3與TW/1743/98為B1基因亞型。從2003年底到2005年底開始轉為C4基因亞型，其彼此VP1的核酸相似度為97~99%。

二、 建立腸病毒71型快速診斷鑑定量系統：

本計劃欲發展腸病毒七十一型快速診斷系統 Real-time RT-PCR，設計了多組的引子對與探針，欲找到一組準確度高與專一性高的引子對與探針，發展腸病毒七十一型即時定量診斷系統。根據腸病毒可分型之 VP1 區域來設計腸病毒 71 型專一性之引子對與探針設計了 10 條引子(4 條 forward ; 6 條 reverse)，首先利用 RT-PCR 篩選出最適之 primers 組合，選出了 6 組較好的 primers 組以及同時我們也設計了兩條 probes(表三)，接著便可進行 Real-Time 測試。

利用分生遺傳工程法，備製了已知濃度的標準品，將其稀釋成 10^6 和 10^5 copies number，待測之六組 primers、兩條 probes 進行評估。Real-Time RT-PCR 結果顯示(表四)，probe:EVPI_TM 與 primers : EV71_u / EV7_A 和 Ent V F+ / EV7_A 配對後效果較好。從中篩選出 EV7_F/EV7_A 和選取 9811207 (EV 71 prototype) 以及三支臨床檢體 (已用 RT-PCR，經定序確定為 EV71)做評估，結果顯示(表五) probe:

EVP1_TM 與 primers: Ent V F+/ EV7_A 此組的測試效果較好，
prototype 和一支臨床檢體有反應線。

四、討論：

利用SNP來做腸病毒七十一型的基因型鑑別是本研究首先發現的，再將歷年來NCBI Gene Bank所收尋到國內外的所註冊的腸病毒七十一型vp1序列，經過比對分析才發現，在B基因型與C基因型上112與157位點有不同且具保守性(conserved)，並可以利用此單點核酸變異(Single nucleotide polymorphism)來做腸病毒七十一型病毒基因型的區分，亦可利用此點位置的辨識性與專一性來設計Genotyping SNP real-time PCR

目前在腸病毒七十一型演化分析，有專家學者採用VP1、VP4、VP4-VP2 junction 與5'-UTR 區域來作演化分析[1,17, 18, 21, 22]，本研究採用腸病毒VP1 區域來作基因亞型分析，由於VP1 區域為腸病毒的外殼蛋白(capsid protein)最外層，是免疫系統作用標的與抗體中和位點所在。根據Betty A. Brown [1]，等人在1999 年的研究利用VP1 區域作演化分析結果將腸病毒區分為三大基因型(genotypes) A、B、C，又進一步區分出B1~B2 與C1~C2 的基因亞型，其中B 基因型與C 基因型差異度範圍為15.5~18.7%，而B 基因型中的B1 基因亞型內彼此基因差異最高為9.5%，B1、B2 基因亞型彼此差異為6.9~11.1%；在C 基因型中的C1、C2 基因亞型內基因差異為1~6.3%、0.7~1.1%，而C1、C2 基因亞型彼此差異為6.1~10.1%。從病毒基因方

面來分析，本次的研究分析了台灣地區自1998 年到2005年本局病毒實驗室與合約實驗室所鑑定分離的腸病毒七十一型，在演化樹的分析可以發現台灣地區所流行的腸病毒七十一型為B1、B4、C2、C4 四種基因亞型，在1998年台灣地區腸病毒大流行造成幼童出現HFMD以及嚴重的神經症狀，甚至死亡的多為腸病毒七十一型C2 基因亞型，少部分有分離到B1、B4 基因亞型。1999~2003 年分離到的腸病毒七十一型流行株多為B4 基因亞型，到了2004年腸病毒七十一型流行株轉為C4 基因亞型。在同源性的分析可發現B1、B4、C2、C4 基因亞型平均同源相似度為94.9%、96.7%、99.1%、96.5%，與A 基因型BrCr 病毒株序列差異度為14~19% ，而B4 基因亞型與C4 基因亞型差異度為15~16%，平均同源相似性84.2%。

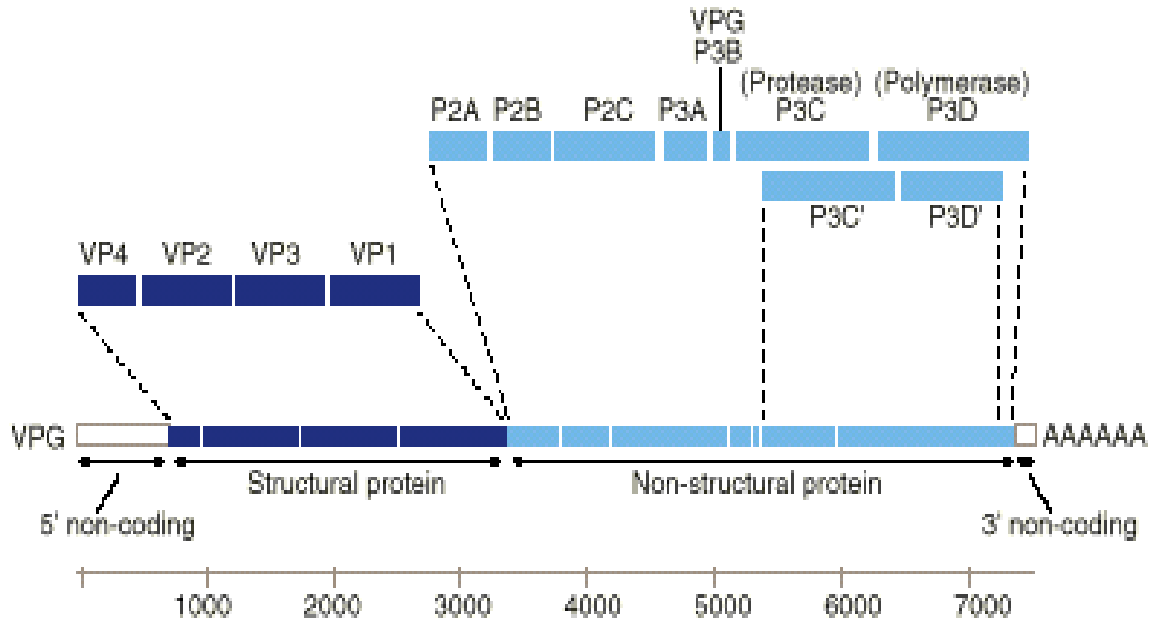
藉由演化分析，我們可以將腸病毒七十一型區分三大基因型 (genotype)，接著根據腸病毒71 B基因型與C基因型序列比對找到兩個核酸變異點可以來作為分型之用，分別是經截取比對後112位點與157位點，B genotype:112 GAA, 157 ACT ; C genotype : 112 AAA or AAG , 157 GCT.。

在設計即時定量系統方面，由於腸病毒七十一型可以分成A、B、C三種基因型，其中B基因型又可區分為B1~B4基因亞型，C基因型又可區分為C1~C4基因亞型，但彼此在VP1區域的差異頗大，若要利用

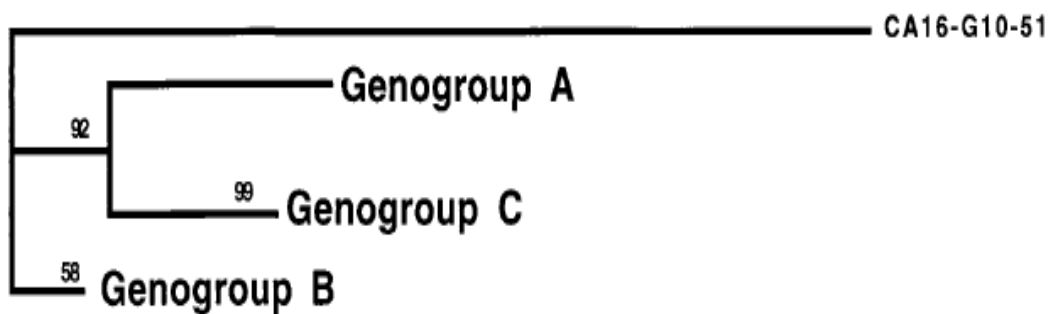
此段來設計較保守(conserved)的片段作為引子對與探針的序列酌實不易，在本研究初期設計多對的引子對與探針，經過測試發現僅有探針EVP1_TM與引子對 Ent V F+/ EV7_A此組的測試效果較好，但其偵測敏感度仍偏低，若日後需用於臨床檢驗並不適合，容易產生偽陰性。故在此快速診斷系統的建立方面，本實驗室會再嘗試利用腸病毒七十一型基因上其它片段例如: 2A、3C、VP4、non-coding region等較不易產生變化的區域來做引子對與探針的設計再來評估與改良。

五、圖表：

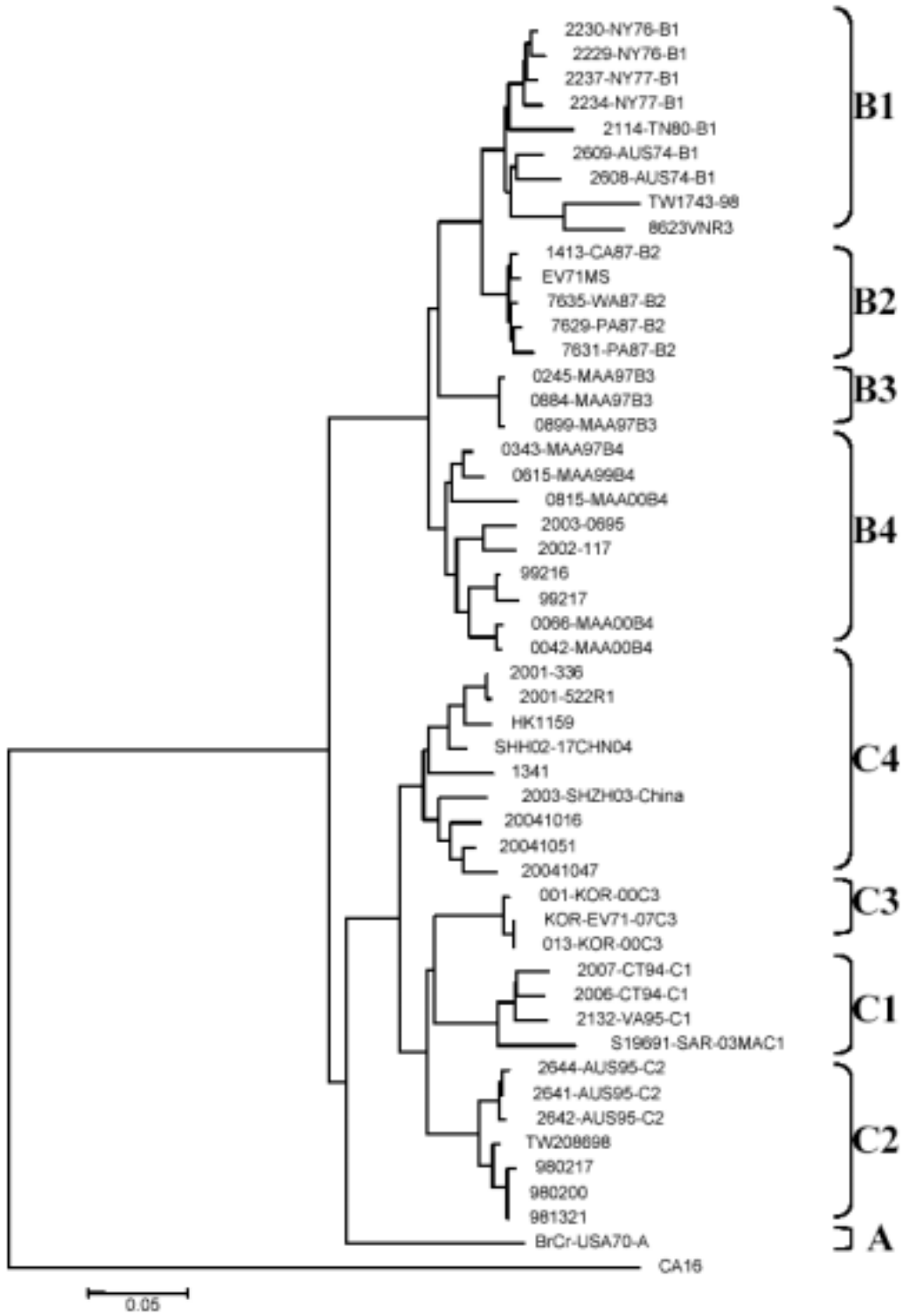
圖一、腸病毒的基因結構



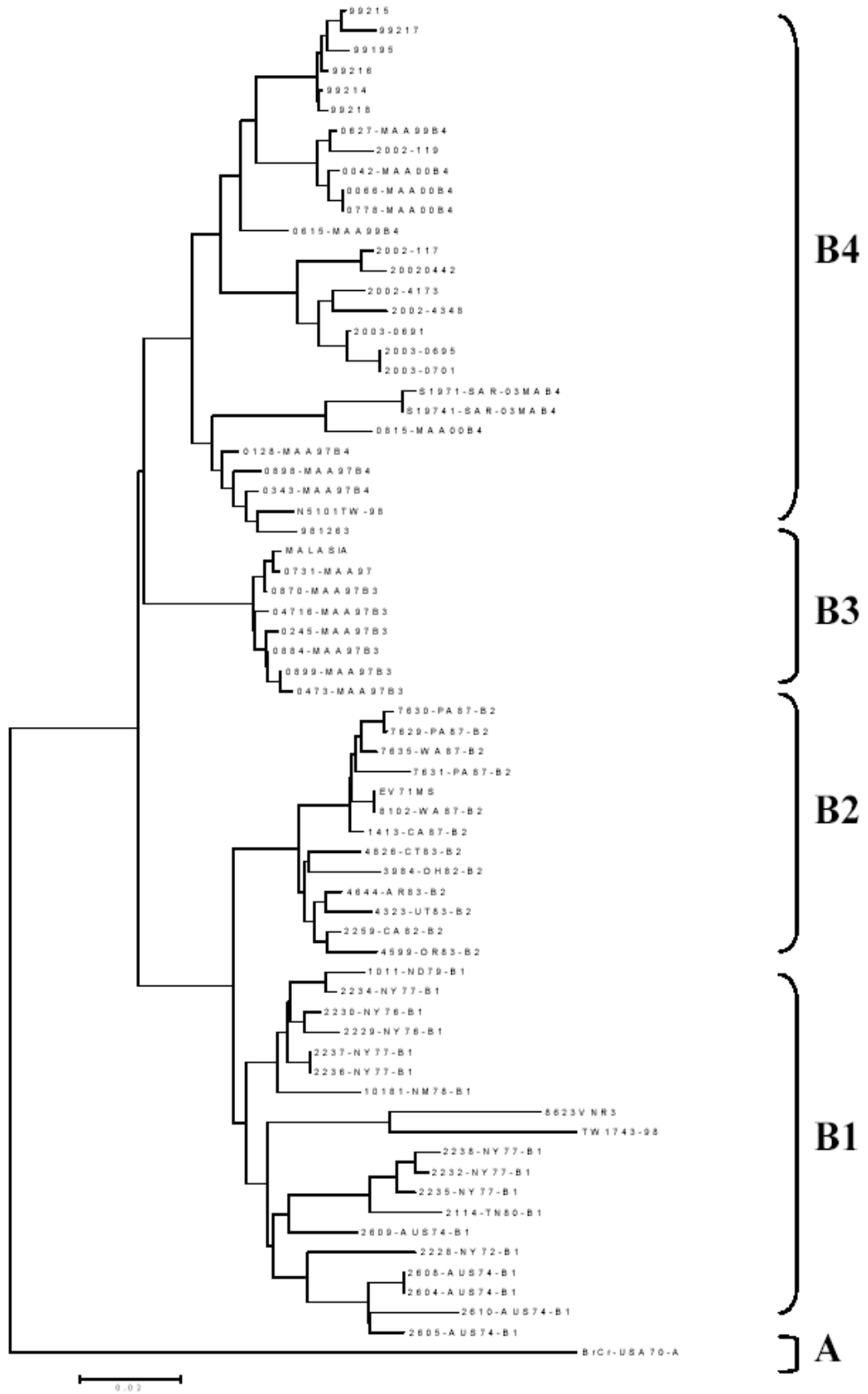
圖二、腸病毒 71 型基因型分型



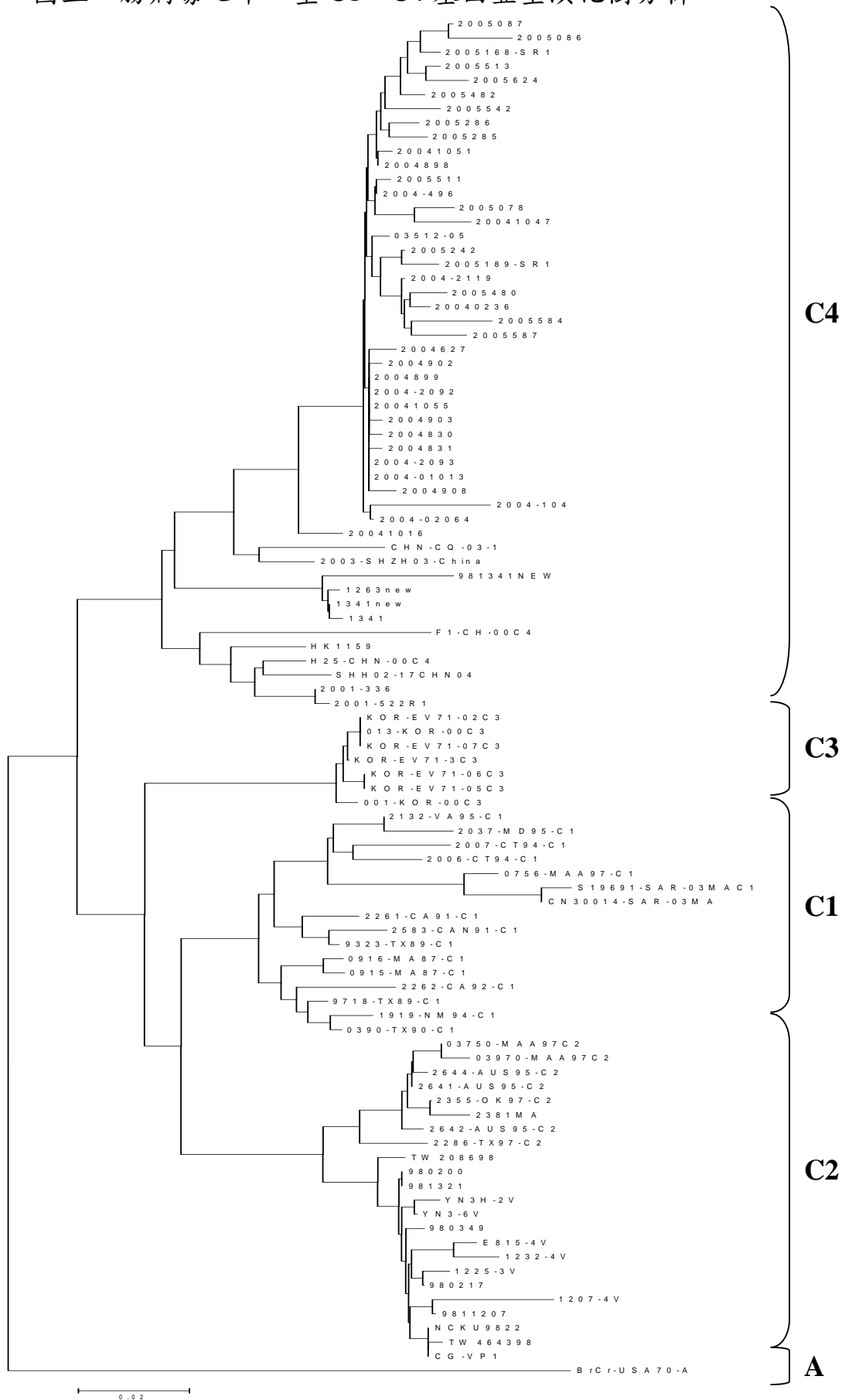
圖三、腸病毒七十一型 B&C 基因亞型演化數分析：



圖四、腸病毒七十一型 B1~B4 基因亞型演化樹分析：



圖五、腸病毒七十一型 C1~C4 基因亞型演化樹分析：



表一、

引子(primer)序列

引子 (primers)	序 列	相對位置
159	5'-ACYATGAAAYTGTGCAAG G-3'	2385-2403
162	5'-CCRGTAGGKGTRCACGCAC-3'	2869-2850

表二、以 SNP 來區分腸病毒七十一 B&C 基因型：

VP1 region (414bp):

Site \ Type	112	157
B type	<u>G</u> AA (Glu)	<u>A</u> CT (Thr)
C type	<u>A</u> AA(G) (Lys)	<u>G</u> CT (Ala)

表三、EV71 primers:

Forward

Primer	Sequence
EV 7_F	CAGAYGTGATYGAGAGYTCTATAGG
EV71_u	GTGGCAGAYGTGATYGAGAG
EntV F+	GTGATYGAGAGYTCTATAGGAGATAGT

Reverse

Primer	Sequence
EV 7_A	GCTGTRCTRTGYGARTTAAGAAC
EV71_bk	TAARCCYGCTCTYSYGAAGAA

Probe

Probe	Sequence
EV71_TM	6FAM-AGTYTCAATCATRCTCTCRTRCRCTRGYATTC--DB
EVP1_TM	6FAM-ACCGTGTCTCAATCATACTCTCRCTCACTAGC--DB

表四、不同 EV71 primers 以及 probes 比較結果：

sample	primer	primer	probe	CT
std 1x10 ⁶	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 7_F	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 7_F	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 71_u	EV7_A	EVP1_TM	37.87
std 1x10 ⁵	EV 71_u	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 71_u	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 71_u	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	36.89
std 1x10 ⁵	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	Ent V F+	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	Ent V F+	EV7_bk	EVP1_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 7_F	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 7_F	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	EV 71_u	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 71_u	EV7_A	EV71_TM	10.99
std 1x10 ⁶	EV 71_u	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	EV 71_u	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁶	Ent V F+	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined
std 1x10 ⁵	Ent V F+	EV7_bk	EV71_TM	Undetermined

* Std: 已知濃度標準品

表五、不同 EV71 primers 以及 probes 對臨床檢體測試比較:

98111207	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051563	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051564	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051565	EV 7_F	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
98111207	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	24.59
E20051563	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
E20051564	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
E20051565	EV 7_F	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
98111207	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051563	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051564	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
E20051565	Ent V F+	EV7_A	EV71_TM	Undetermined
98111207	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	35.33
E20051563	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined
E20051564	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	36.79
E20051565	Ent V F+	EV7_A	EVP1_TM	Undetermined

六、參考文獻：

1. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, Jr., Kennett ML, Pallansch MA. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999,73:9969-9975.
2. Shimizu H, Utama A, Yoshii K, et al. Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997-1998. *Jpn J Infect Dis* 1999,52:12-15.
3. Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis* 1974,129:304-309.
4. Blomberg J, Lycke E, Ahlfors K, Johnsson T, Wolontis S, von Zeipel G. Letter: New enterovirus type associated with epidemic of aseptic meningitis and-or hand, foot, and mouth disease. *Lancet* 1974,2:112.
5. Brown BA, Pallansch MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res* 1995,39:195-205.
6. Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, Ishiko H, Takada H. Outbreak of severe neurologic involvement associated with Enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol* 1999,20:17-23.
7. 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.
8. Hashimoto I, Hagiwara A. Pathogenicity of a poliomyelitis-like disease in monkeys infected orally with enterovirus 71: a model for human infection. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1982,8:149-156.
9. Zheng ZM, He PJ, Caueffield D, et al. Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype E71 BrCr strain but differs in the 5'-noncoding region. *J Med Virol* 1995,47:161-167.

10. Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002,25 Suppl 3:S3-12.
11. Chastant S, Christians E, Campion E, Renard JP. Quantitative control of gene expression by nucleocytoplasmic interactions in early mouse embryos: consequence for reprogramming by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 1996,44:423-432.
12. Kuimelis RG, Livak KJ, Mullah B, Andrus A. Structural analogues of TaqMan probes for real-time quantitative PCR. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997:255-256.
13. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 2003,3:18.
14. Kitagawa F, Ohori Y, Ikeda H, Fujimori H, Murakami Y, Nakamura Y. Design of a molecular beacon PNA. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002:143-144.
15. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999,73:1941-1948.
16. Santti J, Vainionpaa R, Hyypia T. Molecular detection and typing of human picornaviruses. *Virus Res* 1999 ,62 :177-183.
17. Wang JR, Tuan YC, Tsai HP, Yan JJ, Liu CC, Su IJ. Change of major genotype of enterovirus 71 in outbreaks of hand-foot-and-mouth disease in Taiwan between 1998 and 2000. *J Clin Microbiol* 2002,40:10-15.
18. Shih SR, Ho MS, Lin KH, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res* 2000,68:127-136.
19. Shimizu H, Utama A, Onnimala N, et al. Molecular epidemiology

- of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. *Pediatr Int* 2004 ,46:231-235.
20. Lin SE, Zhang Q, Xie HP, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 isolated from patients with hand, foot and mouth disease in Guangdong and Fujian provinces, 2000-2001. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2004,18:227-229.
 21. 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.
 22. Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. 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.