

計畫編號：DOH92-DC-2033

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

計畫名稱：發展腸病毒快速診斷鑑定系統-單管即時RT-PCR定量系統
-----------------------------------

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：92年1月1日至92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 (1)

    英文摘要 (2)

參、計畫內容

    一、研究簡介 (3)

    二、材料方法 (4)

    三、結 果 (7)

    四、討 論 (10)

    五、表 圖 (13~16)

    六、參考文獻 (17~18)

## 中文摘要：

自 1998 年開始，台灣地區陸續爆發腸病毒的流行，雖然大部分的感染不會造成重大影響，但仍造成許多孩童感染症狀嚴重者甚至死亡，引起許多家長的恐慌並造成社會極大地不安。因此若能及早偵測出病原體便可提供臨床上診斷治療的依據與爭取治療的黃金時機。本計劃欲發展腸病毒快速診斷鑑定系統- 單管即時 RT-PCR 定量系統，是根據腸病毒高保守區域 5 端的非轉譯基因(none-coding region)設計螢光探針與引子，在探針的 5 端標記 FAM 的偵測螢光(reporter dye), 3 端標記 TAMRA 的抑制螢光(quencher dye), 在反轉錄聚合酶鏈反應時(RT-PCR)藉由螢光的激發與偵測大大地提高敏感度與專一性，以便於在最短的時間內偵測到腸病毒病原體。此方法的線性範圍約 7-log dynamic range (  $10^1 \sim 10^7$  copies RNA )，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在臨床檢體的偵測部分此即時定量系統可以及早偵測到腸病毒病原體核酸，與傳統細胞培養分離病毒之方法比較下，不僅縮短減出的時間亦可減低因檢體採集與運送不良而造成檢出率降低。在腸病毒偵測種類方面本計劃以台灣地區腸病毒分離株 EV71、CA16 等作分析，結果發現台灣地區的流行株都能以單管即時 RT-PCR 定量系統偵測得到。

## 英文摘要：

There was a major outbreak of Enterovirus infection in Taiwan in 1998. After the outbreak, Taiwan CDC has established surveillance system to monitor the trend of EV infections. Most EV infections only cause mild clinical symptoms in susceptible hosts; however there are still some children may result in severe or even fatal cases. As a result of it, it creates great panic and anxiety in our society, especially for the parents with young children. Therefore the early detection of EV infection not only can provide the background information to the medical doctors taking care of the sickness but also the epidemiological data to the health authority controlling the further spreading of the disease. In this study, we developed a rapid detection system, one single tube real-time RT-PCR quantitative assay, to identify EV infections. The primers and probes were designed according to the most constant nucleotide sequences located on the 5' end noncoding region of EV genome. The specific probes were labeled with reporter dye, FAM and quencher dye, TAMRA on their 5' end and 3' end respectively. By detecting the excitation fluorescent reporter dye of probe in RT-PCR reaction, the sensitivity and specificity would be increased greatly for detection the pathogens in the short time. The dynamic range of this assay encompassed at least 7 orders of magnitude ( $10^1 \sim 10^7$ ). It is useful in the mass screening of specimens. Any enteroviral titer within  $10^1 \sim 10^7$  copies RNA can be detected immediately after real-time RT-PCR reaction; the conventional way of detecting the presence of PCR products after PCR reaction is not necessary. In aspect of enterovirus species analysis, the epidemic enterovirus strains including EV71, CA16 etc. could be detected and analyzed with single tube real-time RT-PCR quantitative system.

簡 介 (Introduction) :

自 1998 年夏天，台灣地區爆發了腸病毒的流行，雖然大部分的感染不會造成重大影響，但仍造成部份孩童有嚴重的感染症狀甚至有死亡之個案。臨床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 )[1]，傳統的方法是將檢體處理後接種到適合的細胞上，經過一段時間培養後觀察有無細胞病變(CPE)的現象，有 CPE 者再以免疫螢光法、中和反應或分子生物學技術來鑑定其感染源種類；另一種則採用分子生物診斷方式，例如: PCR[2]。目前實驗室發展出利用即時 PCR (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<sup>TM</sup> 7900* 即時序列偵測系統，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 (此區為腸病毒高保守(high-conserved)區域)設計引子以單一步驟(one-step)的 RT-PCR[3]增幅出約 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，為了要更準確的定出檢體中的病毒數量，本實驗使用 Mahoney type 1 poliovirus RNA 作為 standard 並採用分子選殖(molecular cloning)的方法將此片段黏接到 pGEM-T Easy Vector 上。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，所以能更快速精準的得知結果。

材料與方法 (Material and Method) :

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[4]。正股引子 (forward primer) EV-F : 5'-CCCCTGA ATGCG G C T AATC-3' (position:450-468) , 反股引子 (reverse primer) EV-R : 5'-GATTGTCACCATAAGCAGC-3' (position:580-596) , 探針 EV-Probe: 5'-FAM-CGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGT-TAMRA-3[4]'[5]。

pGEM-T Easy vector

為兩端帶有 T 核鹼基及 Amp<sup>r</sup> 基因之線形 ( linear ) 載體 , 可與兩端為 A 核鹼基之線形 DNA 進行快速接合作用 ( rapid ligation ) 。

腸病毒 Standard 的建立:

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 Ampicillin resistance 基因以抗生素 Ampicillin 來篩選。將篩選出的菌落在 37 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。

RNA 的萃取:

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(vortexing)，上述混合液再通過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，用 80  $\mu$ l 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 )。

定量 RT-PCR：以 ABI 7900 來作分析，首先，取 5ul 的 RNA 加到 Qiagen one-step RT-PCR 混合反應液(reaction mix)中，其中引子的濃度為 400nM，螢光標的的探針濃度為 200nM。反轉錄作用為 48  $^{\circ}$ C 30 分鐘，接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶 95  $^{\circ}$ C 10 分鐘，再進行 PCR 反應 40 個循環：denature 為 95  $^{\circ}$ C 15 秒，annealing-extension 為 60  $^{\circ}$ C 1 分鐘，螢光訊號的收集於 annealing-extension 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。

反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 ( Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction ; RT-PCR )

( 1 ) Primer : 012- ATGTAYGTICCCICGIGG ( 2875-2894)

040- ATGTAYRTICCMCIGGIGC (2905-2924)

011-GCICCGAYTGITGICCRAA (3311-3292)

( 2 ) Reverse Transcription 反應

取病毒 RNA 5ul 加入 75mM KCl、50 mM Tris-HCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM DTT、ATCG dNTP mixture 0.5 mM、RNasin 38U/ul 及 antisense primer :R- RT-probe 50 pmole 的混合物中，70  $^{\circ}$ C 10 分鐘，再加入 100

units MuLV-reverse transcriptase , 於 37 作用 90 分鐘。

### (3). 聚合酶鏈反應 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 MgCl<sub>2</sub>、 0.1 % Triton-X 100、 ATCG dNTP mixture 1 mM 及 primer: 012/011 或 040/011 各 50 pmole[6, 7]的混合物中 , 加入 5 units Taq polymerase ( Promega ) , 於 94 變性 ( denature ) 3 分鐘後 , 以 94 1 分鐘、 primer 配對溫度 ( T<sub>m</sub> , 依每對 primer 不同而異 ) 1 分鐘、 72 2 分鐘 , 進行 35 次反應 , 最後在 72 作用 15 分鐘

病毒細胞培養及定量 :

將已定病毒量或尚未定量的檢體 , 以 RD 細胞培養於 96 孔盤 , 培養液為 DMEM 加上 10%的胎牛血清 , 每孔加入 50 $\mu$ l 細胞生長培養基 ( 細胞對照孔除外 ) 及 100 $\mu$ l 細胞懸浮液 ( 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞 ) , 置 36 , CO<sub>2</sub> 培養箱培養 , 於第 4 5 及 7 天觀察細胞病變 CPE(cytopathic effect) , 並計算其 TCID<sub>50</sub> 與病毒量。

結果 (Result) :

腸病毒標準曲線(standard curve)與 Ct (Cycle threshold)值

本實驗將含有腸病毒 5' UTR 高度保守基因片段的載體以 Qiagen DNA extraction kit 萃取後，測量其 O.D260 的吸光值，先換算出重量體積濃度 (ug/ml)後，換算出其體積莫耳數(mole/ul)，再將其 10 倍稀釋  $2 \times 10^6 \sim 2$  copies/ul，以 real-time 7900 儀器分析結果發現：在不同的濃度之情況下所測得之螢光值大於閾值(Threshold)的 PCR 循環數亦不同，濃度高的在較少的循環數時其測量值可高於閾值；濃度低時則相反，結果如圖一。從圖一中可以發現把螢光的閾值定在 0.03 時，濃度較高的例如在圖中最左邊的曲線濃度為  $10^6$  copies/ml 可以在約 19 個循環數達到相當的閾值，；相反的，濃度較低的例如圖中最右邊的曲線濃度為 10 copies/ml 可以在約 38 個循環數達到相當的閾值。再根據不同濃度之標準物產生的螢光值( Rn)與 PCR 循環數去定出循環數閾值(Cycle threshold ; Ct) ，  $10^7$  copies 其 Ct 值約為 15 並且依 copies 數目下降其 Ct 值會上升每減少 1 個 log 的 copies 其 Ct 值約增加 2~3，其中最少的 copies 為 10 其 Ct 值為 38， $r^2$  值>0.990。

本實驗以 ABI 7900 的機型來分析 RT-PCR 的結果,兼具定性與定量的功能,其螢光的偵測是在 PCR 反應中的延伸步驟(extension)結束後並以垂直雷射光束激發，在定量的實驗中其標準曲線扮演了非常重要之角色，因為所有的待測檢體都是要根據此標準曲線間接推出檢體內含的病毒數量，因此標準曲線的建構要非常謹慎小心，通常建議 slope 值接近 3.3，Y-Intercept 值接近 40，Correlation 值接近 1.0[3]。在以 SDS 軟體分析標準曲線的結果會以 Ct 值與質量(Quantity)的圖形呈現如圖二，本次實驗的 R2 值為 0.9988。

## 臨床檢體與台灣流行腸病毒株測試

本實驗引子設計增幅的區域範圍是在腸病毒的高度保守的基因片段 5'UTR 區域，因此可適用於檢測所有的腸病毒包括：小兒麻痺病毒 (poliovirus)、腸病毒 68-71 型，伊柯病毒 (Echovirus)，克沙奇病毒 (Coxsackievirus)，等[8]，目前在實驗室此方法檢測的腸病毒是以腸病毒 71 型，伊柯病毒，克沙奇病毒為多。本組原先所使用之傳統 RT-PCR 引子，係針對 Enterovirus VP1 區域，原因是此段基因變異較大 (故此 PCR 產物之序列分析在判定不同型別)，或者型別相同但不同亞型時可用來區分期間的差異，但也因此有其限制性；腸病毒種類多達 60 幾種在變異較大的 VP1 區域要設計出 universal primers 較為困難，往往只能偵測其中的幾種腸病毒，若要檢測出所有不同之腸病毒可能需要好幾種不同的引子，所以本實驗使用之引子 011/012/040 主要是區分一些常見的型別例如：CA16，CA2，CA4，Echo4，EV71 等。

因此本研究亦取台灣流行的腸病毒株包括：CA2~18、EV70、EV71、CB5、Echo11 等分離病毒株來作分析測試並與傳統分型的 RT-PCR 以 011/040/012 的引子分析結果作比較。結果發現：這些台灣流行的病毒株以及時定量系統都可以偵測到，但有些腸病毒株例如 CB5、CA4、Echo11 以傳統分型的 RT-PCR 偵測不到(表二)，因為此引子對 011/040/012 是用於腸病毒分型專用所設計，一旦腸病毒 VP1 序列有改變或突變就容易導致分析檢出率降低！如果要以單一對引子來作偵測所有腸病毒之感染則應考慮在 constant region，但如此一來則無法區分是何種類型之腸病毒，所以這兩套不同系統的 PCR 所偵測之腸病毒區域是有所區隔，同時目的也不完全一致。

本篇文章所提及之 real-time PCR 主要是快速篩選是否為腸病毒，如果必要

時還可定量。

定性測試：根據文獻的資料，本實驗利用腸病毒分型的引子其所增幅的區域為腸病毒外殼蛋白 vp1 基因來作定性測試，取 7 支已知型別的腸病毒：包括腸病毒 71 型、克沙奇病毒 A2、A4、A6、A16、伊柯病毒第 4 型與第 6 型，以定量 PCR 的方式分析，並以 012/040/011 為引子作 RT-PCR 利用洋菜膠電泳確認，實驗結果發現伊柯病毒第 4 型以傳統的 RT-PCR 利用洋菜膠電泳分析，並沒有看見 436bp 的 DNA 增幅片段，而其它的腸病毒在洋菜膠電泳分析可見 436bp 的片段；若以 ABI 7900 作定性分析，則可發現每一支檢體都可測到不同強弱的螢光值(Ct 值)，表示這七支檢體內都含有腸病毒。由此可知 real-time PCR 可用於定性分析。結果見圖三。

定量分析:

以臨床所分離與培養出的腸病毒 71 型，經過 TCID<sub>50</sub> 的測試並且換算出每毫升中所含的病毒複製數(copies number)，在將定量後的病毒作 10 倍序列稀釋，在將稀釋的病毒同時作病毒培養觀察其 CPE 與作定量 PCR 的分析，結果發現：以 real-time 7900 作 one-step RT-PCR 分析，結果只能測到 1000 copies/ml 濃度範圍，所測出來的值與實際稀釋的病毒量差異不大[4]，其差異的值都小於 1 個 log，結果見表，在觀察 CPE 的結果可發現從  $3 \times 10^8$  至  $3 \times 10^2$  copies/ml 都可觀察到 CPE 的現象。結果見表一。

## 討論 (Discussion) :

發展以 real-time PCR 的技術運用於臨床檢體的病原體偵測與分析，已經成為一種趨勢，憑藉其快速與高敏感性及高專一性的特性，能夠在第一時間內鑑定出檢體中病原體的種類[9]，便可縮短致病原鑑定的時間，以利於臨床醫師的用藥與病患的存活率，同時也能對疫情提供快速而精準的資訊而能讓相關防疫人員快速展開行動有利於掌控遏止其擴散。為了使 real-time PCR 的敏感性與專一性達到最高，其引子的設計就顯得非常重要，為以區別不同病原菌之種類，引子的設計就需根據其高特異的基因區域，在引子與探針的設計可使用 *ABiosystem* 公司的 *PRIMER EXPRESS* 軟體來輔助實驗者的需要，本單位參考國內外之期刊與本實驗室的經驗，所選用的引子與探針是根據腸病毒 5' UTR 高保守的片段所設計[4]，此片段是所有腸病毒的高保守區域但又是與其它病原菌不同的高特異區，可用其來篩選所有的腸病毒但是不能用來區分不同類型之腸病毒，換言之它只能告訴我們是否為腸病毒，但不能得知是何種腸病毒。

本實驗室曾用此系統分析已知型別的腸病毒，包括腸病毒 71 型、克沙奇病毒 A2、A4、A6、A16、，伊柯病毒第 4 型、第 6 型與第 8 型[7]，結果發現都有偵測到螢光訊號，表示此系統可以偵測到不同種類的腸病毒，也證明引子所設計的區域為腸病毒基因的高保守區。如果需要針對特殊型別的病毒如 EV71，則需要找尋一段與其它型別之腸病毒有所差異之區域，例如 VP1，才能夠區分其間之不同。

在評估定量的實驗方面，本實驗以腸病毒 71 型為材料，將已經知道濃度的病毒作序列稀釋，在以本系統來作定量分析試以評估定量上的準確度，從

結果中可發現儀器分析出來的結果與實際的病毒量雖然有差異但都小於 1 個 log，如此的結果是可接受的，但是本系統只測得 1000 copies/ml 以上的濃度，探討其原因:由於本系統是利用引子增幅出腸病毒的 DNA 片段，所以在實驗一開始就需核酸的萃取，在本實驗是以使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的萃取與純化，只取檢體 140ul 作核酸萃取，在最後 elution 時採用 60ul AVE buffer，在使用定量 PCR 7900 作分析時只取 5ul 萃取出 RNA 作為模板進行反應，因此在最後病毒量的計算，要將測試的結果乘以稀釋的倍數  $85.7(1000/140 \times 60/5)$  才可反推回原 1ml 檢體中實際的病毒量；反之若將 1000 copies/ml 除以 85.7 得到結果為 11 copies/ml，可推得若定量 PCR 7900 分析的反應中濃度小於 10 copies/ml 就有可能分析不到，其中還需考慮核酸萃取時所流失的量，所以這樣的結果在實驗上是可接受的。

若想要提高 Real-time PCR 之靈敏性，則可考慮將檢體濃縮，比如將 1 ml 濃縮成 100ul，則方法本身靈敏度不變下，即可提昇檢驗方法之靈敏性 10 倍之多。

使用定量 PCR 時會發現，在 None-temple-control ( NTC ) 的孔盤會偵測到微量的螢光，推測其原因，可能是探針不穩定而水解釋放出 5' 端所標記的螢光 FAM，所以在將探針稀釋時最好將其保存於 TE buffer 中並且分管儲存以減少冷凍解凍的次數，進而降低探針的不穩定性。要如何判斷所測得的螢光值為 DNA 片段增幅時所釋出而不是探針不穩定水解的結果，根據文獻的查詢得知只要其偵測的螢光值有三個連續的螢光值便可排除非特異性的螢光訊號[8, 10]。

除了目前針對腸病毒所設計出來之引子與探針外，對於其他病毒性病原體如 HIV-1，Influenza A & B，HAV 與 EBV 也在積極努力中，希望在不久

的將來能實際運用在本局一般的檢驗項目，已提供更完善、快速與精準的診析報告。

此外，以病毒培養的方式觀察在細胞是否造成細胞病變雖然費時費力，但最終可取得病原體，所以仍是檢驗方法的 Gold standard，同時只要檢體採集得宜從本實驗結果看來似乎比 Real-time PCR 更加靈敏，問題是，在病毒培養時的測試系統是加入 100ul 的測試病毒，但在 Real-time PCR 測試系統加入 5ul 萃取的 RNA 實際上只加入約 11.67 ul 的測試病毒。此外如果在考慮實際上採集檢體、運送檢體、處理檢體等以便於進行病毒培養的所有步驟，一旦病毒喪失活性都將使病毒培養的成效降低，所以加上這些考量後 Real-time PCR 應能提昇本實驗是目前在檢驗上的效能。

表一:

已知濃度之 EV71 檢體以 real-time PCR 定量分析之比較，並以 RT-PCR、Virus culture CPE 作敏感度之定性比較。

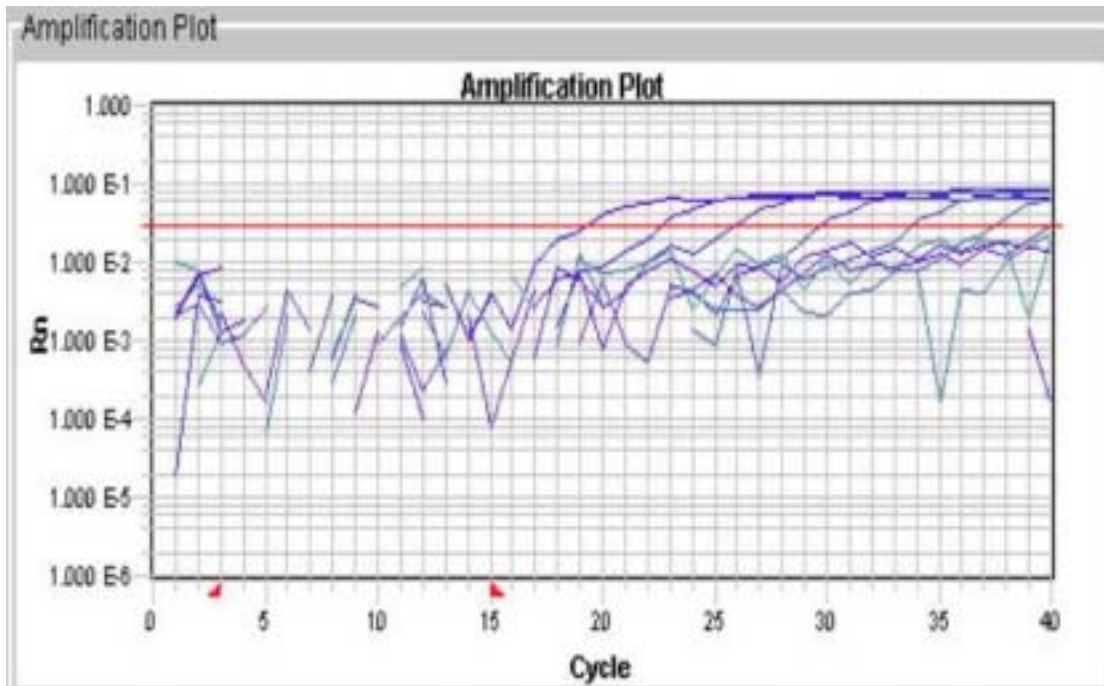
Sample (Copies/ ml)	Result of Real-time PCR (No. of Copies/ ml)	RT-PCR	Culture CPE
<b>Ev71</b>			
$3 \times 10^8$	$3.3 \times 10^8$	(+)	(+)
$3 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	(+)	(+)
$3 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$	(+)	(+)
$3 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	(-)	(+)
$3 \times 10^4$	$2.1 \times 10^4$	(-)	(+)
$3 \times 10^3$	$2.2 \times 10^3$	(-)	(+)
$3 \times 10^2$	Undetectable	(-)	(+)
$3 \times 10^1$	Undetectable	(-)	(-)

表二、

以及時定量系統分析台灣地區流行的腸病毒株並和傳統的 RT-PCR 作比較

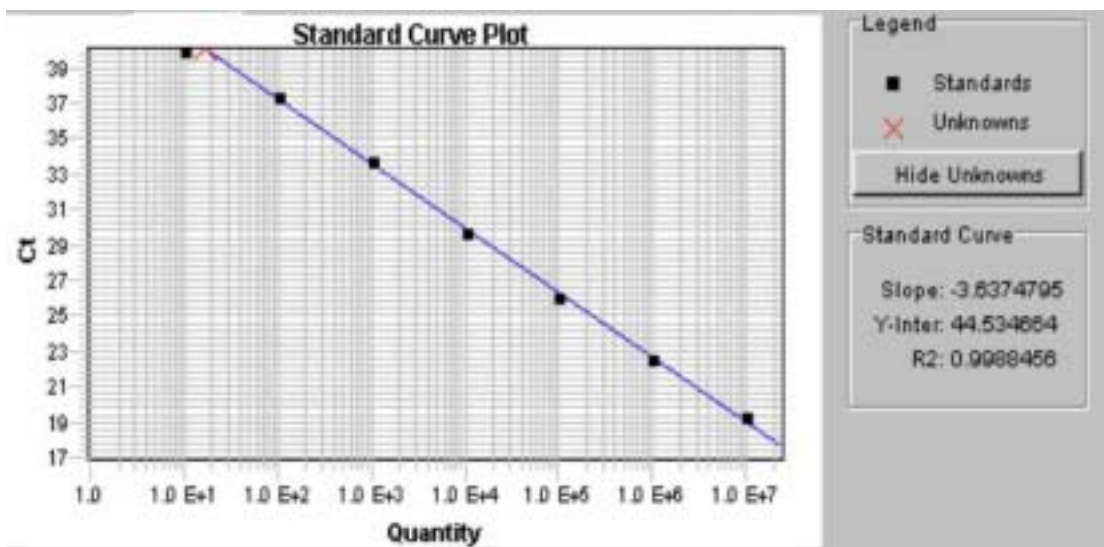
	CA2	CA4	CA5	CA6	CA9	CA10	CA15	CA16	CA18
real-timeRT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RT-PCR (011/012/040)	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	CA24	CB5	EV70	EV71	Echo3	Echo11	Echo16	Echo18	Polio
real-timeRT-PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RT-PCR (011/012/040)	+	-	+	+	+	-	+	+	+

圖一：



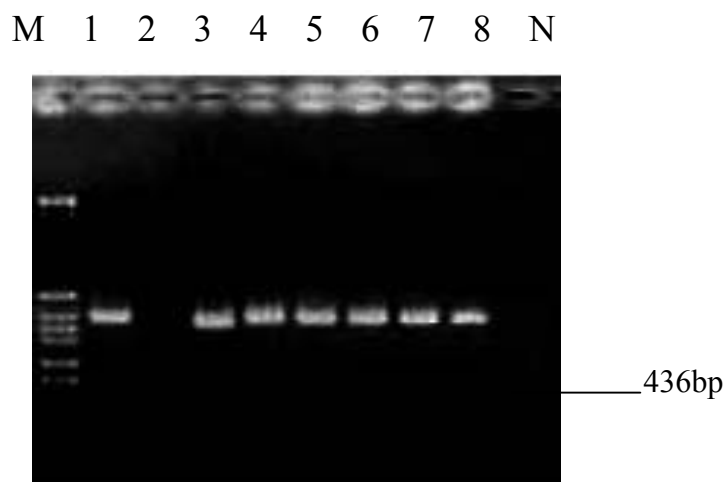
以 ABI7900 作腸病毒 real-PCR 標準曲線之分析。此圖為 Amplification plot 其縱為所偵測的到的螢光值，橫軸為 PCR 增幅之循環數(cycles)。

圖二：



為以 ABI7900 作腸病毒 real-time PCR 之標準曲線分析。縱軸為 Ct 值，橫軸為濃度(此實驗濃度單位為 Copies number)。

圖三：



**RT-PCR:** + - + + + + + + -

**Real-time RT-PCR:** + + + + + + + + -

以 RT-PCR 的方法分析腸病毒檢體以洋菜膠電泳分析並與 real-time RT-PCR 定性分析比較；lane1 為腸病毒 71 型(EV71)、lane2、3、4 為伊柯病毒(Echo)第 8 型、第 4 型與第 6 型；lane5~lane8 為克沙奇病毒(Cox) A2、A4、A6、A16。M 為 marker 100 bp ladder , N 為陰性對照組。

## 參考文獻：

1. 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.
2. Chandler DP, Wagnon CA, Bolton H, Jr. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol* 1998,64:669-677.
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. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Santti J, Vainionpaa R, Hyypia T. Molecular detection and typing of human picornaviruses. *Virus Res* 1999,62:177-183.
8. Verstrepen WA, Bruynseels P, Mertens AH. Evaluation of a rapid real-time RT-PCR assay for detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens. *J Clin Virol* 2002,25 Suppl:39-43.
9. Watkins-Riedel T, Woegerbauer M, Hollemann D, Hufnagl P. Rapid

diagnosis of enterovirus infections by real-time PCR on the LightCycler using the TaqMan format. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002,42:99-105.

10. Martell M, Gomez J, Esteban JI, *et al.* High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 1999,37:327-332.