

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-122503

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：肺炎病原體分子檢驗套組開發

年度/全程研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：劉銘燦

研究人員：楊季融、郭權益、黃湘怡

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面

第 1 頁

目錄

第 2 頁

摘要

第 3 頁

本文

前言

第 5 頁

材料與方法

第 6 頁

結果

第 11 頁

討論

第 13 頁

計畫重要研究成果及具體建議

第 14 頁

參考文獻

第 15 頁

圖、表

第 17 頁

三、摘要

關鍵詞：肺炎；檢驗套組；呼吸道病原體

肺炎是威脅生命的疾病，也是造成死亡的主要感染原因之一。多種病原體的感染會引起肺炎，包含寄生蟲、真菌、細菌與病毒。在兒童，呼吸道融合病毒、鼻病毒、人偏肺病毒(metapneumovirus)、博卡病毒(bocavirus)、副流感病毒(parainfluenza)是在已開發和開發中國家最常見引起肺炎的病原體。在成年人，流感病毒與細菌仍持續在引起成人肺炎有主導的地位。分子檢驗方法的進步，增加了我們對病原體引起肺炎所扮演的角色，也說明感染性相關肺炎的發生率可能被低估了。本計畫之目的在開發一可多重性、敏感且快速地檢測肺炎病原體的檢驗套組。實施方法為將現有使用中之單一或多重 real-time PCR 病原體檢測方法 24 種呼吸道病原體，包含 A 型流感、B 型流感病毒、腺病毒、呼吸道融合病毒、冠狀病毒(229E, OC43, NL63, HKU1, MERS)、人類偏肺病毒(metapneumovirus)、博卡病毒(bocavirus)、副流感病毒 1-4 型(parainfluenza type 1-4)、腸病毒、鼻病毒、Parvovirus B19、人類單純皰疹病毒第 1, 2 型、巨細胞病毒(CMV)、水痘病毒(VZV)、退伍軍人菌、肺炎黴漿菌，整合成 Panel Chip 的檢測套組(CDC 24R-Panel Chip)，CDC 24R-Panel Chip 單次反應可檢測 24 種病原體，以實際檢體測試，比較 multiplex real-time PCR 與 CDC 24R-Panel Chip 檢測性能，二者相似，靈敏度分別為 86.7% 與 84.6%，專一性分別為 93.2% 與 95.2%。此病原體檢測套組的開發，可節省肺炎病原體的檢驗時間與提高檢驗的穩定性與品質。

Abstract

Keywords: Pneumonia; Diagnostic kit, Respiratory pathogens

Pneumonia is a life-threatening disease and one of leading infectious causes of mortality. Infection of many pathogens can cause pneumonia, including parasites, fungi, bacteria and viruses. In children, respiratory syncytial virus (RSV), rhinovirus, human metapneumovirus, human bocavirus, and parainfluenza viruses are most frequently in both developed and developing countries. In adults, influenza viruses and bacteria continue to have a predominant role with pneumonia. Advances in molecular testing methods, increase our understanding the roles of the pathogens that cause pneumonia and also show that the incidence of pneumonia caused by infection may be underestimated. In this study, we want to develop a multiplex, high sensitive and rapid detection kit for pneumonia pathogens. The currently used monoplex or multiplex real-time PCR reactions for 24 respiratory pathogens, including influenza A and B viruses, human adenovirus, RSV, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS), human metapneumovirus, bocavirus, parainfluenza type 1-4, enterovirus, rhinovirus, Parvovirus B19, HSV1, HSV2, CMV, VZV, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* will be integrated into a Panel Chip platform (CDC-24R-Panel Chip), which can detect 24 pathogens in one reaction. The test performance between CDC-24R-Panel Chip and multiplex real-time PCR assays are similar and comparable. The sensitivity is 86.7% and 84.6% and specificity is 93.2% and 95.2%, respectively, for CDC-24R-Panel Chip and multiplex real-time PCR assays. The development of this pathogen detection kit can shorten the time of pneumonia pathogen testing and improve the stability and quality of detection.

四、本文

(1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

急性呼吸道感染所引起的肺炎仍是全球公共衛生一大負擔，肺炎也是兒童發病和死亡的主要感染原因之一。在一回顧性文獻的研究報告在 2010 年，5 歲以下孩童約 1.2 億人次肺炎，其中 1 千 4 百萬人重症；在 2011 年約 130 萬人因肺炎導致死亡[15]。多種呼吸道病原體會導致肺炎，在兒童，呼吸道融合病毒(RSV)，鼻病毒(Rhinovirus)，人偏肺病毒(metapneumovirus)，博卡病毒(bocavirus)，副流感病毒(parainfluenza)是在已開發和開發中國家最常見引起肺炎的病原體。雙重病毒感染是常見的，有約 1/3 為病毒 - 細菌混合感染。在成年人中，病毒引起的社區肺炎約占 1/3，特別是流感病毒，鼻病毒，和冠狀病毒。而細菌仍持續在引起成人肺炎有主導的地位[12]。

肺炎在微生物檢驗上，有其重要性與必要性，微生物檢驗的結果將有助於藥物的使用，與疾病傳播的控制。傳統上，利用基本的培養技術藉由特殊的培養基以及特殊的培養環境來鑑定不同微生物的種類的鑑定。不過，這種方法遇到不易培養或被要求需要迅速的診斷決定的情況下並不適用。近年來，以 PCR 為基礎的方法來檢測呼吸道病原體已逐漸成為市售套組且對無法或難以培養的病原體有很高的檢出率並且可即時提供臨床端相關的資訊。一般 PCR 方法的靈敏度比傳統檢測方法高，對於新發現的病原體也能快速的因應發展出檢驗方法。近年來各種高通量檢測平台已改變現代檢驗實驗室的運作方式，從微生物培養與抗原檢測等方法逐漸轉移至以使用 PCR 為基礎的標準檢驗方法。有些 PCR 檢驗方法兼具定性與定量，且 PCR 放大的產物，可用來基因定序，分析病原體的遺傳資料。[2, 7, 8, 10]

近年來，多種會引起肺炎的新興呼吸道病原體的出現，如 2003 年 SARS, 1997 年 H5N1, 2009 H1N1pdm09, 2013 H7N9 新型流感, 2012 MERS-CoV，

嚴重威脅公共衛生和人類的健康且造成社會大眾的恐慌，為了及時檢驗與監測這些病原體，快速地建立病原體檢測方法有其必要。世界衛生組織或新興病原體的發現者皆會即時公布 real-time RT-PCR 檢測方法的引子與探針序列[6, 11, 17-19]，說明 real-time RT-PCR 檢測方法在新興病原體檢測的重要性。因 real-time PCR/RT-PCR 在建立檢測上的便利性與靈活性，當病原體突變時，也可即時更新引子與探針序列，維持高靈敏性[21]。

本計畫開發一兼具快速、方便與敏感度高的呼吸道病原體檢測平台，可強化肺炎病原體之監測與檢驗。將已建立 24 種病原體 multiple real-time PCR/RT-PCR 檢測方法，包含 A 型流感(含 H1N1 與 H3N2 分型)、B 型流感病毒、腺病毒、呼吸道融合病毒、冠狀病毒(229E, OC43, NL63, HKU1, MERS)、人類偏肺病毒(metapneumovirus)、博卡病毒(bocavirus)、副流感病毒 1-4 型(parainfluenza type 1-4)、腸病毒、鼻病毒、Parvovirus B19、人類單純皰疹病毒第 1, 2 型、巨細胞病毒(CMV)、水痘病毒(VZV)、退伍軍人菌、肺炎黴漿菌，這些 real-time PCR/各 RT-PCR 方法的引子和探針序列有些來有自文獻、經修飾優化或自行設計，目前 24 種病原體 real-time PCR/RT-PCR 使用同一反應條件，可靈活增減檢驗項目組合，檢測極限約 100 copies/reaction。Panel-on-a-Chip 檢測平台具數位 PCR 與 real-time PCR 之優點，適用臨床檢體量少且需多重檢驗的特性。此病原體檢測套組的開發，可節省肺炎病原體的檢驗時間與提高檢驗的穩定性與品質，並降低取得檢驗試劑之傳染病防治成本。

(2)材料與方法

1. multiplex real-time PCR/RT-PCR：針對引起肺炎可能病原體設計不同引子組合，能有效減省檢體用量，並縮短偵測時間。這些 real-time PCR/各 RT-PCR 方法的引子和探針序列有些來有自文獻、經修飾優化或自行設計，可偵測

病原體包括 A 型流感、B 型流感病毒[16, 21]、腺病毒[20]、呼吸道融合病毒[3]、冠狀病毒(229E, OC43, NL63, HKU1, MERS)[4-6]、人類偏肺病毒(metapneumovirus)[9]、博卡病毒(bocavirus)[4]、副流感病毒 1-4 型(parainfluenza type 1-4)[3, 4]、腸病毒[3]、鼻病毒[14]、人類單純皰疹病毒第 1, 2 型[13]、巨細胞病毒(CMV)[13]、退伍軍人菌[1]、肺炎黴漿菌[1]，自行設計之反應，使用 AlleleID 軟體(PREMIER Biosoft)。

實驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄與 real-time PCR 反應與結果分析。實驗步驟如下：驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄與 real-time PCR 反應與結果分析。實驗步驟如下：(1)反轉錄反應 (Takara Cat. #6110A)：利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行樣品核酸萃取，取 5 μ L 萃取之核酸，利用隨機核苷酸(random octamer) 進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 65°C 作用 5 分鐘後，置於冰上，再利用 PrimeScript RTase reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為先 30°C 作用 10 分鐘後，再次 50°C 作用 60 分鐘，最後 95°C 作用 5 分鐘。(2) Real-time PCR 反應(LightCycler® 480 Probes Master)：20 μ L DNA 與 cDNA 產物與 1x LightCycler 480 Probes Master、200nM forward primer、200nM reverse primer 以及 100n M hydrolysis probe 混合。混合物以 LightCycler 480 系統(Roche Diagnostic)進行反應，反應條件如下：95°C 10sec，接續 45 cycles 之反應(95°C 10 sec、50°C 30 sec、72°C 1 sec)，最後 30 sec 降溫(cooling)至 40°C。

2. Panel Chip Platform

Panel Chip 為台灣奎克生技公司(QUARKBIO)研發成功的平台，此平台是一開放系統，可提供一整合解決方案，適合將現有的 real time PCR 檢測方法變成商品化套組。Panel Chip 預注 real time PCR 的引子

(primers)與探針(probe)到奈米孔中,在一 36 mm x 36 mm 晶片(圖一)中包含 2,500 奈米孔。理論上可同時進行 2,500 不同 real-time PCR 反應。將待檢測的樣品與 PCR 反應試劑混和後,刮入晶片奈米孔內,將晶片置入 QUARKBIO 的即時定量 PCR 分析儀(圖二)。即時定量 PCR 分析儀已將 real time PCR 定量分析所需之溫度設定,螢光收集, CT 計算等軟體嵌入即時定量 PCR 分析儀中。此平台結合數位 PCR(digit PCR)與 real-time PCR 之優點。The Panel Chip 晶片操作流程,如下(1)利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science)進行樣品核酸萃取,取 5 μ L 萃取之核酸,利用隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應,合成第一股 cDNA (first strand cDNA):核酸與引子於 65°C 作用 5 分鐘後,置於冰上,再利用 PrimeScript RTase reverse transcriptase 進行反轉錄反應,反應條件為先 30°C 作用 10 分鐘後,再次 50°C 作用 60 分鐘,最後 95°C 作用 5 分鐘。(2) Real-time PCR 反應:50 μ L 混和液包含 5 μ L cDNA 產物與 1X CrackerBio TaqMan Master mix 與混合。將混合液刮入 nano-wells,將晶片置入承載架 nano-wells,並置入即時定量 PCR 分析儀,開始進行分析(圖三),反應條件如下:95°C 10sec,接續 40 cycles 之反應(95°C 10 sec、60°C 30 sec、72°C 1 sec),最後 30 sec 降溫(cooling)至 40°C。

3. multiple real-time PCR 平台轉換至 Panel- Chip 檢測平台: Panel Chip 檢測平台,將 24 種呼吸道病原體與 1 個 internal control (housekeeping gene, RNase P) real-time PCR 方法測試並調整在 Panel Chip 平台反應之最佳引子與探針的濃度。整合 24 種呼吸道病原體 real-time PCR 病原體檢測方法至單一晶片,將最佳引子與探針預注在晶片奈米孔中,製備可一次檢測 24 種呼吸道病原體的 real time PCR 晶片(命名為 CDC 24R-Panel Chip)。

4.測試 CDC 24R-Panel Chip 晶片的檢測極限值:將 DNA 陽性樣品,進行 10

倍稀釋，測試晶片的檢測極限值。

4. 市售 RespiFinder 2SMART kit (CE-IVD marked) ，實驗分為兩步驟

Step1: Pre-amplification

1-1. 設定 Thermal cycler program

- I. Reverse transcription: 95°C, 10 min
- II. Activation of hot start Taq:
 - 94°C, 20 sec
 - 55°C, 20 sec → 40 cycles
 - 72°C, 35 sec
- III. Hold: 20°C

1-2. 準備 pre-amplification 試劑

- I. 由 Box 1 中取出 pre-amplification master mix 以及 pre-amplification primer mix, 由 Box2 中取出 Positive control, 解凍後置於冰上
- II. 每個反應加入之試劑如下表

Component (screw cap)	Volume / reaction
Pre-amplification master mix (purple)	6.25 µl
Pre-amplification primer mix (white)	8.75 µl
Total volume	15 µl

- III. 準備檢體相應數量之 0.2 ml PCR tubes 並標記檢體編號 (檢體 + 1 positive control)
- IV. 將第二步驟準備之 15 ul mix 以及 10 ul 之檢體核酸模板加入相應之 0.2 ml PCR tube 中，混和均勻後 spin down
- V. 放入設定好 program 之 Thermal cycler 中執行

Step2: Amplification Detection

2-1 並依下列條件設定 program

- I. Denaturation: 95°C, 2 min
- II. PCR1:
 - 94°C, 20 sec
 - 55°C, 20 sec → 10 cycles
 - 72°C, 35 sec
- III. PCR2:
 - 94°C, 20 sec
 - 50°C, 20 sec → 23 cycles
 - 72°C, 35 sec
- IV. Denaturation: 95°C, 2 min
- V. pre-melt: 40°C, 90 sec

- VI. Melt: 40-90°C, continuous acquisition, 1 acquisition/OC
- VII. Cooling: 37°C, 1 sec

2-2 2. 準備 Amplification Detection 試劑

- I. 由 Box 1 中取出 2SMART Buffer1, 2SMART Buffer2, 以及 2SMART enzyme, 解凍後置於冰上
- II. 每個反應加入之試劑如下表

2SMART mix	Component (screw cap)	Volume / reaction
1	2SMART buffer 1 (red)	19.0 µl
	Taq polymerase (orange)	1.0 µl
	Total volume	20.0 µl
2	2SMART buffer 2 (blue)	19.0 µl
	Taq polymerase (orange)	1.0 µl
	Total volume	20.0 µl

- III. 取出於 Step 1 pre-amplification 之產物置於冰上
- IV. 將第二步驟準備之 20 ul mix 1 以及 5 ul 經過 pre-amplification 之檢體核酸模板加入相應之 PCR 八連排中(包括 positive control, negative control), 混和均勻後蓋上蓋子, spin down
- V. 將第二步驟準備之 20 ul mix 2 以及 5 ul 經過 pre-amplification 之檢體核酸模板加入相應之 PCR 八連排中(包括 positive control, negative control), 混和均勻後蓋上蓋子, spin down
- VI. 放入設定好 program 的 LightCycler 480 II 之中執行

3. 分析 Tm 值

- Analysis

-選擇 Tm calling

-在開始計算螢光值前, 必須先套用 color compensation 步驟儲存之校正檔案

-分別選擇 ROX / Cy5 channel 以電腦自動計算各 control 之 Tm 值

-選擇 FAM channel, 以手動計算 control 檢體之 Tm 值

-每個檢體需計算之 Tm 值有六組

Mix 1 : ROX, Cy5, FAM

MIX 2 : ROX, Cy5, FAM

-計算完畢後, 與廠商提供之病原-Tm 值對照表, 初步篩選檢體中可能之病原

4. 分析結果判讀

- ROX / Cy5 中有一陽性結果, 且 FAM 中之 AC1/2 為 +/- 則為陽性
- 若有一個以上的螢光顯示陽性, 則需考慮多重病原

(3)結果

- 1.整合 multiplex real time RT-PCR/PCR 成相同反應條件:引起肺炎的病原體總類繁多，文獻上已有很多 mono- or multiplex real time RT-PCR/PCR 可檢驗可能病原體，但各種檢驗病原體之 real time RT-PCR/PCR 條件不同，使用固定單一反應條件時，須調整 primers 與 probes 的濃度，使其最佳化，本研究整合 16 個反應 mono- or multiplex real time RT-PCR/PCR，涵蓋 24 種病原體與一 internal control (RNase P) (圖四)。
2. 測試並調整各 real-time PCR 反應之最佳 pre-load 引子與探針的濃度:在 Panel Chip 進行 adenovirus 與 VZV 陽性組檢測極限約 50-100 copies/reaction (圖五)，比原 real-time PCR 平台為佳(圖六)。製備肺炎檢驗晶片 Panel Chip (CDC 24R-Panel Chip)，28 個反應排列如圖七，每一反應含 55 重複 (11x5 wells)。
3. 測試 CDC 24R-Panel Chip 專一性與檢測極限值:以 28 個陽性對照 DNA 進行實驗，結果 28 個區域的 wells 皆陽性，使用單一陽性對照 DNA 或兩種陽性對照 DNA，如 influenza A 與 coronavirus-MERS, rhinovirus 與 Rnase P, coronavirus HKU1 與 metapneumovirus, 單獨 bocavirus, CMV 測試，結果只有對應區域有陽性反應(圖八，藍點表示陽性)，顯示 CDC 24R-Panel Chip 具專一性。將陽性對照 DNA 稀釋，估計檢測極限值，influenza A 與 bocavirus 約 125 copies/reaction (圖九、十)，28 個反應中，除了 RSV 與 HSV2 外，其他反應檢測極限值可達 125 copies/reaction、RSV 的檢測極限值 2000 copies/reaction (圖十一)與 HSV2 檢測極限值 > 2000 (圖十二)，還有 parainfluenza 2 (PIV2)反應會有非專一性的陽性訊號(圖九~十二)。針對 RSV、HSV2 反應檢測極限值大及 parainfluenza 2 反應有非專一性問題，重新設計三個反應的 primers,

probes 和製備陽性對照組。

4. 進行檢體測試:測試 143 件臨床檢體，CDC-24R panel Chip 檢驗結果與 multiplex real-time PCR 不符者，以 monoplex real-time PCR 進行檢驗，以 monoplex real-time PCR 的結果為標準，CDC-24R panel Chip 與 multiplex real-time PCR 的準確率皆為 87.4% (125/143) (表一)。53 件檢測陰性檢體 multiplex real-time PCR 與 CDC-24R panel Chip 各有 6 件與 4 件偽陽性的結果 (表一)。90 件檢測陽性檢體 multiplex real-time PCR 與 CDC-24R panel Chip 各檢出 78 件與 76 件敏感性各為 86.7% 與 84.6% (表一)，multiplex real-time PCR 檢測 89 件檢體陽性中有 83 正確，專一性為 93.2%，CDC-24R panel Chip 檢測 83 件檢體陽性中有 79 正確，專一性為 95.2%，這些數據顯示 CDC-24R panel Chip 檢測性能與 multiplex real-time PCR 相當，皆具有高敏感性與高專一性。
5. 比較市售 RespiFinder 2S MART kit 檢測結果: RespiFinder 2S MART kit 經 CE-IVD 標記，將 32 件 multiplex real-time PCR 與 CDC-24R panel Chip 檢測結果與 monoplex real-time PCR 結果不同檢體，以 RespiFinder 2S MART kit 進行檢測，結果如表二，32 件中有 15 件結果與 multiplex real-time PCR 結果相同，17 件檢測結果不同者中，其中有 7 件結果與 CDC-24R panel Chip 結果相同，包含 3 件 RSV 與 1 件 OC43(表二)，顯示檢體中可能有 RSV 與 OC43，因為 CDC-24R panel Chip RSV 檢測 primers 與 probe 更新，原先 multiplex real-time PCR 與 monoplex real-time PCR RSV 檢測的靈敏度不足，造成檢測陰性的結果。

(4) 討論

引起肺炎的病原體種類繁多，傳統的病原體檢測技術，單次的試驗裡只能檢測一個或數種已知的病原體。當面對未知病原體所引的感染，若單一病原體的檢測方法，已日漸不符合需求。所以目前呼吸道病原體檢驗套組大多涵蓋多種病原體(圖十三)，本計畫初步涵蓋 24 種病原體，後續可依需要靈活增減，類似模組化的檢驗方法，固定相同的檢測反應條件，調整優化 primers, probes 序列，使不同檢測標的可靈活地組合，再者使用預注 (preload) primers, probes 在奈米孔(well)中，可簡化檢驗流程，因區分為 2500 奈米孔，理論上為 monoplex real-time PCR/RT-PCR，可減少 multiplex PCR 反應時，不同 primers, probes 間的干擾，降低檢測的靈敏度。目前 real-time PCR/RT-PCR 因其高敏感性與特異性，設計方便，檢驗時間短，分子檢驗的主流與第一線方法，但其缺點是同一試管反應最多 4-5 個反應，若要檢驗 20 種病原體需要分作 4-5 個以上反應，檢驗操作繁瑣。所以，Panel Chip 檢驗平台，適用臨床檢體量少且需多重檢驗的特性。

分子檢測雖具設計容易、靈敏、快速等好處，但病原體基因經常改變，分子檢測的 primers 與 probes 需定期審視與更新，否則易造成偽陰性[21]，為了避免此情形，同一病原體可選擇不同區域當檢測區域，例如本研究有兩個反應檢測 A 型流感病毒 M 基因，當病原體突變時，其中一檢測方法檢測陰性，可進行更新引子與探針序列，維持高靈敏性。

本計畫將使用中之 29 個 real-time RT-PCR/PCR 病原體檢測方法(涵蓋 24 種病原體)，轉換至 Panel Chip 檢測平台，其中 RSV, HSV2 轉換後，敏感度下降，parainfluenza 2 產生非專一性訊號，須重新設計置換，其餘反應可成功轉換，更新此三個反應的 primers, probes 和製備陽性對照組後，新版 CDC 24R-Panel Chip 晶片已製備且經臨床檢體測試，其檢測性能與原

先 multiplex real-time PCR 相當。CDC 24R-Panel Chip 對 Rhinovirus 檢測效果較差，後續須再優化，市售產品 RespiFinder 對 Metapneumovirus 檢測效果有本計畫已初步成功開發一肺炎病原體檢測套組，可節省肺炎病原體的檢驗時間與提高檢驗的穩定性與品質，並降低取得檢驗試劑之傳染病防治成本，研發成果亦可與企業合作或技轉，帶動國內相關生技產業之競爭力。

(5)結論與建議

本計畫成功開發一肺炎病原體檢測套組，單一反應可檢測 24 種呼吸道病原體，包含 A 型流感、B 型流感病毒、腺病毒、呼吸道融合病毒、冠狀病毒(229E, OC43, NL63, HKU1, MERS)、人類偏肺病毒(metapneumovirus)、博卡病毒(bocavirus)、副流感病毒 1-4 型(parainfluenza type 1-4)、腸病毒、鼻病毒、Parvovirus B19、人類單純皰疹病毒第 1, 2 型、巨細胞病毒(CMV)、水痘病毒(VZV)、退伍軍人菌、肺炎黴漿菌。此病原體檢測套組的開發，可節省呼吸道病原體的檢驗時間與提高檢驗的穩定性與品質。未來可應用在呼吸道群聚與境外移入個案，可擴大檢驗病原體的種類與縮短檢驗與確認病原體的時間。

(6)計畫重要研究成果及具體建議

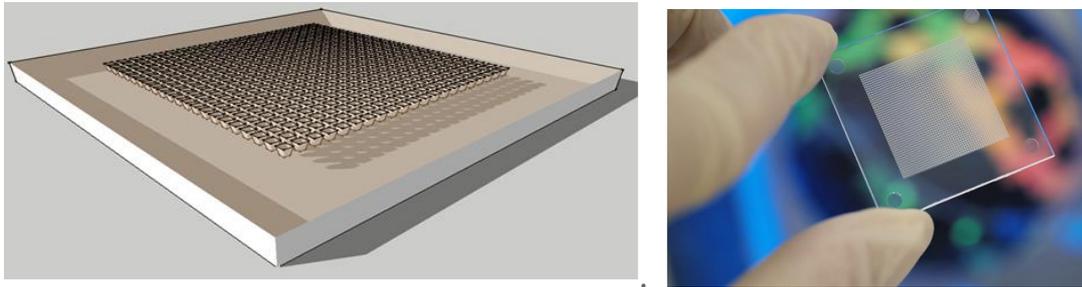
本計畫已初步成功開發一肺炎病原體檢測套組，單一反應可檢測 24 種呼吸道病原體，相同的模式可延伸至其他疾病套組的開發。此病原體檢測套組的開發，可縮短病原體的檢驗時間與提高檢驗的穩定性與品質。

(7)參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

1. Al-Marzooq F, Imad MA, How SH, and Kuan YC: Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia. *Trop Biomed* 2011; 28:545-556.
2. Anderson TP, Werno AM, Barratt K, Mahagamasekera P, Murdoch DR, and Jennings LC: Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens. *J Virol Methods* 2013; 191:118-121.
3. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, and Adams O: Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J* 2008; 27:589-594.
4. Chidlow GR, Harnett GB, Shellam GR, and Smith DW: An economical tandem multiplex real-time PCR technique for the detection of a comprehensive range of respiratory pathogens. *Viruses* 2009; 1:42-56.
5. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, van Boheemen S, Gopal R, Ballhause M, Bestebroer TM, Muth D, Muller MA, Drexler JF, Zambon M, Osterhaus AD, Fouchier RM, and Drosten C: Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 2012; 17.
6. Corman VM, Muller MA, Costabel U, Timm J, Binger T, Meyer B, Kreher P, Lattwein E, Eschbach-Bludau M, Nitsche A, Bleicker T, Landt O, Schweiger B, Drexler JF, Osterhaus AD, Haagmans BL, Dittmer U, Bonin F, Wolff T, and Drosten C: Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 2012; 17.
7. Drancourt M, Gaydos CA, Summersgill JT, and Raoult D: Point-of-care testing for community-acquired pneumonia. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:647-649.
8. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, and Raoult D: Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol* 2013; 11:574-585.
9. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, de Graaf M, van den Hoogen BG, Spaete R, Osterhaus AD, and Fouchier RA: Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 2004; 42:981-986.
10. Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, Vabret A, and Pozzetto B: Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One* 2013; 8:e72174.
11. Poon LL, Chan KH, Wong OK, Yam WC, Yuen KY, Guan Y, Lo YM, and Peiris JS: Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003; 28:233-238.
12. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, and Murdoch DR: Viral pneumonia. *Lancet* 2011; 377:1264-1275.
13. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Mizukami M, Morio T, Sugamoto Y, and Mochizuki M: Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2008; 92:928-932.
14. Tapparel C, Junier T, Gerlach D, Van-Belle S, Turin L, Cordey S, Muhlemann K, Regamey N, Aubert JD, Soccacal PM, Eigenmann P, Zdobnov E, and Kaiser L: New

- respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:719-726.
15. Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, and Black RE: Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet* 2013; 381:1405-1416.
 16. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, Kempson RE, Zhang L, Gor D, Snowden BW, and Tisdale M: Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004; 29:179-188.
 17. WHO: Real-time RT-PCR protocol for the detection of avian influenza A(H7N9) virus. Available from http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf. 2013.
 18. WHO: Recommendations and laboratory procedures for detection of avian influenza A(H5N1) virus in specimens from suspected human cases. Available from <http://www.who.int/influenza/resources/documents/RecAllabtestsAug07.pdf>. 2007.
 19. WHO: WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans. Available from http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf 2009.
 20. Wong S, Pabbaraju K, Pang XL, Lee BE, and Fox JD: Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol* 2008; 80:856-865.
 21. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, and Liu MT: Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2014; 52:76-82.

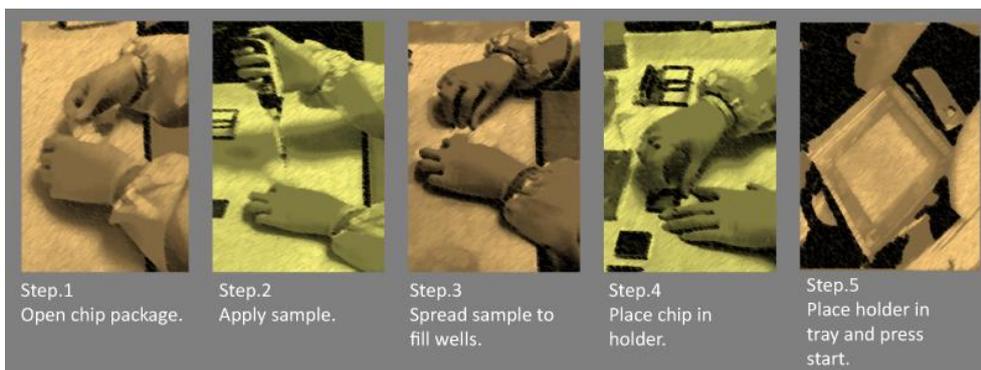
(8)圖、表



圖一、The Panel Chip 晶片，每一晶片大小 6 mm x 36 mm 有 2,500 nano-wells。



圖二、QBio 即時定量 PCR 分析儀(qRT Analyzer M6)，每次可分析 6 個晶片，40 Cycles 耗時 60-90 分鐘。



圖三、The Panel Chip 晶片操作流程，1:打開晶片包裝；2:加入樣本與試劑混合液；3:將混合液刮入 nano-wells；4:將晶片置入承載架 nano-wells；5:將晶片與承載架置入即時定量 PCR 分析儀，開始進行分析。

Reactions	Targeting pathogens	No of targets
panel flu	Influenza A/B	2
panel R1	MERS-CoV(upE, EMC) (FAM)	1
panel R2	RSV-A/B (FAM)	1
panel R3	metapneumovirus(Tex-Red); parainfluenza 4A(HEX)	2 (1)
panel R4	Coronavirus 229E(HEX) ; HK(FAM)	2
panel R5	CoronavirusNL63(HEX) ; OC43(FAM)	2
panel R6	Parainfluenza 1/2/3(FAM/HEX/Cy5)	3
panel R7	Rhinovirus (HEX)	2
panel R8	parainfluenza 4A(HEX) ; Enterovirus (Cy5)	1 (1)
panel R9	Adenovirus (FAM)	1
panel R10	Parvovirus (FAM) ; Bocavirus (HEX)	2
panel R11	HSV1(FAM) ; VZV(HEX)	2
panel R12	HSV2(FAM) ; CMV(TEX-Red)	2
panel R13	Mycoplasma pneumoniae(FAM)	1
panel R14	Legionella pneumophila(FAM)	1
panel RC	Rnase P	1
		24 +1 ITC

圖四、整合 16 個 mono- or multiplex real time RT-PCR/PCR 涵蓋 24 種病原體與一 internal control (RNase P)。

Target	Detection limit (copies)	
	real-time RT-PCR/PCR	CDC 24R-Panel Chip
Influenza A (M)-1	47	125
Influenza A (M)-2	444	125
H1N1pdm	469	200
H3N2	478	250
Influenza B (M)	47	125
Coronavirs HKU1	483	250
Coronavirs 229E	47	125
Coronavirs OC43	5	250
Coronavirs NL63	483	250
Coronavirs MERS	47	125
RSV-A	475	125
RSV-B	475	125
Metapneumovirus (hMPV)	436	250
Parainfluenza 1	463	200
Parainfluenza 2	48	125
Parainfluenza 3	471	250
Parainfluenza 4	424	125
Enterovirus	48	250
Rhinovirus	44	250
Adenovirus	453	125
Parvovirus B19	458	125
Bocavirus	4571	125
HSV1	4594	250
VZV	419	125
HSV2	4594	250
CMV	45	250
Legionella pneumophila	390	250
Mycoplasma pneumoniae	456	250
RnaseP	482	250

圖五、29 個 real-time Rt-PCR/PCR 反應，單一 real-time PCR 與 CDC 24R-Panel Chip 反應檢測極限值之比較。

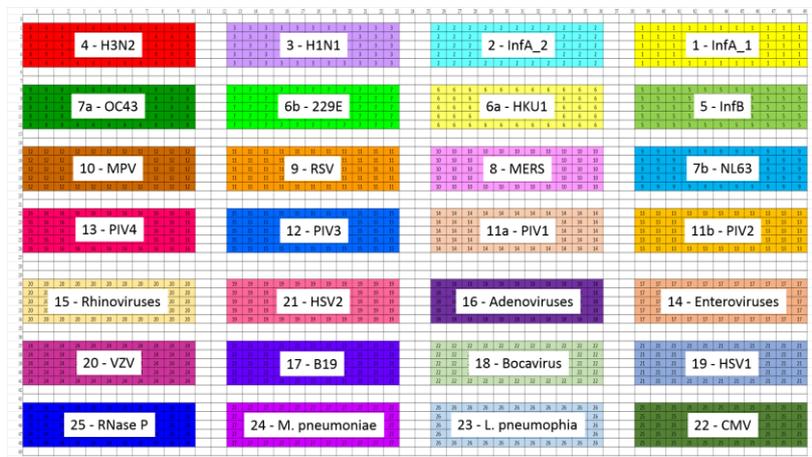
(A) LOD Test of No. 16 Adenovirus (4X serial dilution)

Tray No.	Sample ID	Copies / Well	Ct Mean	Positive Wells	Negative Wells	Fail Wells	Est. input copies	Est. input Conc.
1-1	16_2*10 ³	0.2081	31.65	468	2023	9	520.25	5202.5
1-2	16_5*10 ²	0.0856	31.52	205	2295	0	214.0	2140
1-3	16_1*10 ²	0.0161	33.11	40	2459	1	40.25	402.5
1-4	16_3*10 ¹	0.0044	31	11	2489	0	11.0	110
1-5	16_8*10 ⁰	N/A	N/A	0	2488	12	0	0
1-6	16_NTC	N/A	N/A	0	2500	0	0	0
2-1	16_2*10 ³	0.4891	31.19	967	1533	0	1222.75	12227.5
2-2	16_5*10 ²	0.1161	31.48	273	2217	10	290.25	2902.5
2-3	16_1*10 ²	0.0215	31.9	53	2434	13	53.75	537.5
2-4	16_3*10 ¹	0.002	31.69	5	2491	4	5.0	50
2-5	16_8*10 ⁰	N/A	N/A	0	2500	0	0	0
2-6	16_NTC	N/A	N/A	0	2500	0	0	0

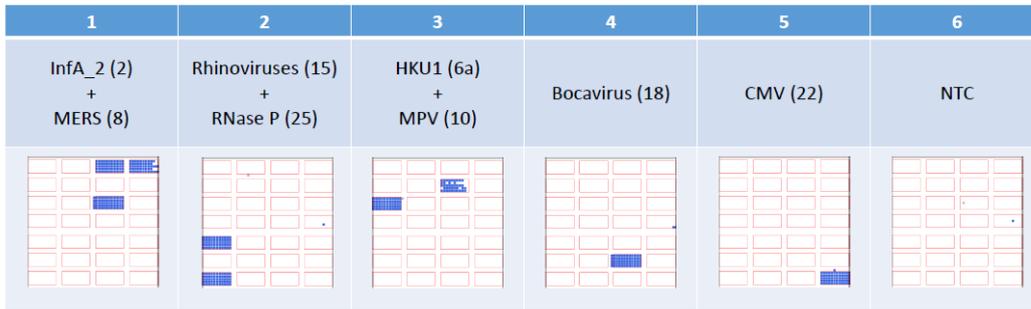
(B) LOD Test of No. 20 VZV (4X serial dilution)

Tray No.	Sample ID	Copies / Well	Ct Mean	Positive Wells	Negative Wells	Fail Wells	Est. input copies	Est. input Conc.
1-1	20_2*10 ³	0.086	31.79	206	2294	0	215.0	2150
1-2	20_5*10 ²	0.0153	31.27	38	2462	0	38.25	382.5
1-3	20_1*10 ²	0.0044	33.57	11	2489	0	11.0	110
1-4	20_3*10 ¹	0.0008	32.99	2	2498	0	2.0	20
1-5	20_8*10 ⁰	0.0004	30.96	1	2499	0	1.0	10
1-6	20_NTC	N/A	N/A	0	2500	0	0	0
2-1	20_2*10 ³	0.0554	32.9	134	2352	14	138.5	1385
2-2	20_5*10 ²	0.0154	32.86	38	2455	7	38.5	385
2-3	20_1*10 ²	0.002	31.33	5	2494	1	5.0	50
2-4	20_3*10 ¹	0.0008	30.97	2	2498	0	2.0	20
2-5	20_8*10 ⁰	N/A	N/A	0	2499	1	0	0
2-6	20_NTC	N/A	N/A	0	2500	0	0	0

圖六、在 Panel Chip 進行 real-time Rt-PCR/PCR 反應，(A) Adenovirus (B) VZV PCR 反應，檢測靈敏度約 50-100 copies/reaction



圖七、Panel-on-a-Chip 各反應的分布圖，單一反應有 55 wells (5x11)重複。



• Input Concentration = 1.67×10^4 copies/each target

圖八、CDC 24R-Panel Chip 陽性對照組 influenza A+coronavirus-MERS, rhinovirus+Rnase P, coronavirus HKU1+ metapneumovirus, bocavirus, CMV 測試

LOD of No. 2. InfA 2

Tray No.	Panel Layout	Sample ID	Input Copies	Ct Mean	Ct SD	Positive Wells	Negative Wells
1	RS28-InfA_2	2.5×10^3	2000	26.33	0.54	55	0
2	RS28-InfA_2	2.5×10^3	2000	26.12	0.72	54	1
3	RS28-InfA_2	$2.1.25 \times 10^3$	500	29.19	1.27	47	8
4	RS28-InfA_2	$2.1.25 \times 10^3$	500	29.59	1.08	40	15
5	RS28-InfA_2	$2.3.13 \times 10^2$	125	30.23	0.9	12	43
6	RS28-InfA_2	$2.3.13 \times 10^2$	125	28.84	0.97	8	47



11b-PIV2

圖九、CDC 24R-Panel Chip influenza A 檢測靈敏度測試

LOD of No. 18. Bocavirus

Tray No.	Panel Layout	Sample ID	Input Copies	Ct Mean	Ct SD	Positive Wells	Negative Wells
1	Bocavirus	18.5×10^3	2000	26.43	1.06	55	0
2	Bocavirus	18.5×10^3	2000	26.46	0.72	55	0
3	Bocavirus	$18.1.25 \times 10^3$	500	28.36	0.82	48	7
4	Bocavirus	$18.1.25 \times 10^3$	500	28.28	1	50	5
5	Bocavirus	$18.3.13 \times 10^2$	125	29.43	0.63	21	34
6	Bocavirus	$18.3.13 \times 10^2$	125	29.52	0.48	22	33



11b-PIV2

圖十、CDC 24R-Panel Chip bocavirus 檢測靈敏度測試

LOD of No. 9. RSV

Tray No.	Panel Layout	Sample ID	Input Copies	Ct Mean	Ct SD	Positive Wells	Negative Wells
1	RS28-RSV	9-5*10 ³	2000	30.71	1.32	2	53
2	RS28-RSV	9-5*10 ³	2000	30.44	0.21	3	52
3	RS28-RSV	9-1.25*10 ³	500	N/A	N/A	0	55
4	RS28-RSV	9-1.25*10 ³	500	N/A	N/A	0	55
5	RS28-RSV	9-3.13*10 ²	125	N/A	N/A	0	55
6	RS28-RSV	9-3.13*10 ²	125	N/A	N/A	0	55



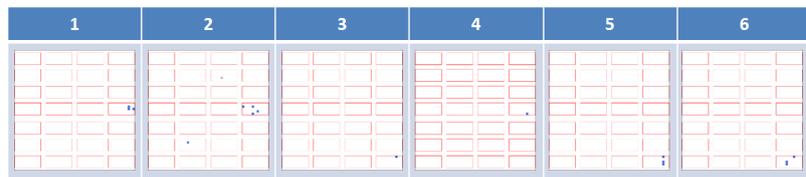
11b-PIV2

11 9 6 6 1 1 2

圖十一、CDC 24R-Panel Chip RSV 檢測靈敏度測試

LOD of No. 21. HSV2

Tray No.	Panel Layout	Sample ID	Input Copies	Ct Mean	Ct SD	Positive Wells	Negative Wells
1	HSV2	21-20000	2000	N/A	N/A	0	55
2	HSV2	21-5000	200	N/A	N/A	0	55
3	HSV2	21-1250	20	N/A	N/A	0	55
4	HSV2	21-312.5	2.0	N/A	N/A	0	55
5	HSV2	21-78.1	0.2	N/A	N/A	0	55
6	HSV2	21-19.5	0.0	N/A	N/A	0	55



11b-PIV2

3 4 0 1 0 0

圖十二、CDC 24R-Panel Chip HSV2 檢測靈敏度測試

表一、143 件檢體使用 multiplex real-time PCR 與 CDC 24R-Panel Chip 檢驗之結果，F: false, T:true.

targets	multiplex real-time PCR		CDC 24R-Panel Chip		Total
	F	T	F	T	
Adenovirus		1	1		1
Adenovirus, CMV	1	1		2	2
Adenovirus, M. pneumoniae		1		1	1
Adenovirus, PIV3	1			1	1
CMV		3	1	2	3
CMV, HSV2		1		1	1
CoV-229E		2	1	1	2
CoV-229E, M. pneumoniae		1	1		1
CoV-HKU1		1		1	1
CoV-NL63		4	2	2	4
CoV-OC43		4		4	4
Enterovirus, M. pneumoniae	1	1	1	1	2
H1N1pdm09		6		6	6
H3N2		3		3	3
HSV1	2	5		7	7
HSV1, CMV		2		2	2
influenza B		6		6	6
influenza B, HSV1	1			1	1
Legionella pneumophila		2		2	2
M. pneumoniae		2	1	1	2
Metapneumovirus	4	9		13	13
negative	6	47	4	49	53
parainfluenza-1		3	1	2	3
parainfluenza-2		2		2	2
parainfluenza-3		6	1	5	6
Parvovirus		1		1	1
Rhinovirus	1	6	3	4	7
RSV	1	4	1	4	5
VZV		1		1	1
Total	18	125	18	125	143
Correction rate	87.4 % (125/143)		87.4 % (125/143)		
sensitivity	86.7% (78/90)		84.6% (76/90)		
specificty	93.2% (83/89)		95.2% (79/83)		

表二、32 個 CDC 24R-與 multiplex real-time PCR 結果不一致之檢體，以單一 real-time PCR 與 RespiFinder 檢測套組進行檢驗。

No.	multiplex real-time PCR	CDC 24R-Panel Chip	mono real-time PCR	RespiFinder
16	Enterovirus	M. pneumoniae	Enterovirus/M. pneumoniae	Enterovirus
21	Adenovirus	Adenovirus, PIV3	Adenovirus, PIV3	Adenovirus, PIV3
29	HSV1	negative	negative	negative
51	CoV-229E	negative	negative	M. pneumoniae
60	Adenoviruses	Adenoviruses, CMV	Adenovirus, CMV	Adenovirus
71	negative	Rhinoviruses	Rhinoviruses	Rhinovirus
82	negative	HSV1	HSV1	negative
89	Metapneumovirus	negative	negative	CoV-OC43
99	negative	Metapneumovirus	Metapneumovirus	Metapneumovirus, PIV4
103	negative	Metapneumovirus	Metapneumovirus	Metapneumovirus
117	negative	RSV	RSV	RSVB
126	PIV1	Metapneumovirus	Metapneumovirus	Metapneumovirus, PIV2
133	FluB	Flu B, HSV1	Flu B, HSV1	FluB
134	Adenovirus	negative	negative	negative
1	Rhinovirus	negative	Rhinovirus	Rhinovirus
23	CoV-229E, M. pneumoniae	M. pneumoniae	CoV-229E, M. pneumoniae	FluA, M. pneumoniae
37	CoV-NL63	negative	CoV-NL63	negative
46	RSV	negative	RSV	RSVA
69	Adenovirus	negative	Adenovirus	Adenovirus
70	CoV-NL63	negative	CoV-NL63	negative
108	PIV3	negative	PIV3	PIV3
113	Rhinovirus	negative	Rhinovirus	Rhinovirus
114	Rhinovirus	negative	Rhinovirus	Rhinovirus
125	PIV1	negative	PIV1	Metapneumovirus, PIV2
28	CoV-229E	negative	CoV-229E	Legionella pneumophila
25	M. pneumoniae	negative	M. pneumoniae	negative
53	CMV	negative	CMV	negative
76	negative	RSV	negative	RSV-B
116	Enterovirus	negative	negative	Enterovirus
119	negative	RSV	negative	RSVA
121	negative	RSV	negative	RSVB
138	negative	OC43	negative	OC43

表三、市售呼吸道病原體分子檢驗套組與 CDC 24R-Panel Chip 檢測病原體種類之比較。

No	Targets	CDC 24R-Panel Chip	RespiFinder	NxTAG	Filmarray
1	Influenza A	•	•	•	•
2	H1N1pdm09	•	•	•	•
3	H3N2	•		•	•
4	Influenza B	•	•	•	•
5	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	•	•	•	•
6	Parainfluenza 1	•	•	•	•
7	Parainfluenza 2	•	•	•	•
8	Parainfluenza 3	•	•	•	•
9	Parainfluenza 4	•	•	•	•
10	Metapneumovirus (hMPV)	•	•	•	•
11	Rhinovirus	•	•	•	•
12	Enterovirus	•			
13	Coronavirus NL63	•	•	•	•
14	Coronavirus HKU1	•	•	•	•
15	Coronavirus 229E	•	•	•	•
16	Coronavirus OC43	•	•	•	•
17	Coronavirus MERS	•			
18	Adenovirus	•	•	•	•
19	Bocavirus	•	•	•	
20	HSV1	•			
21	HSV2	•			
22	CMV	•			
23	VZV	•			
24	Human parvovirus	•			
25	Legionella pneumophila	•	•	•	
26	Mycoplasma pneumoniae	•	•	•	•
27	Bordetella pertussis		•		•
28	Chlamydia pneumoniae		•	•	•
	Total	24	20	19	20