

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-112708

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建立 MERS-CoV 與新型流感病毒之多重微流體
檢驗平台

106 年 度/全 程 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：劉銘燦

協同主持人：楊季融

研究人員：吳俊賢

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

目錄

	頁 碼
目錄	1
計畫中文摘要	2
計畫英文摘要	3
計畫內容	
一、前言	4
二、材料與方法	8
三、結果	12
四、討論	14
五、結論與建議	16
六、計畫重要研究成果及具體建議	17
七、參考文獻	17
八、圖、表	21

共 (30) 頁

計畫中文摘要：

近年來，新興/未知病原體持續演進並感染人類，對於公共衛生所造成的威脅日益增加。新型流感病毒以及冠狀病毒包括嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒(SARS-CoV)、各類 HxNx 流感病毒(H5N1, H7N9, H6N1, H10N8 等亞型)以及中東呼吸道症候群冠狀病毒(MERS-CoV)等，因容易引發較為嚴重的疾病，對於國際社會的影響層面更是不容忽視。隨著科技進步，分子生物學檢測技術持續推陳出新，可應用的範圍更勝以往。微流體技術於微生物領域已成功結合核酸萃取或生物檢測晶片，突顯其縮短檢測時間、增加檢測高通量與節省樣本的特性。本計畫擬發展一個兼具快速、便利、靈敏與任務導向化的新型 A 型流感與冠狀病毒的微流體檢測平台，強化此等重要人畜共通傳染病原體的監測與檢驗。實施方法將建立兩個 real-time RT-PCR 檢測用引子與探針對的大型資料庫(library)，分別針對流感病毒，包括型別(A 或 B)與亞型(H1-H18 與 N1-N11)鑑定，以及新型冠狀病毒(包含 MERS-CoV)，構築大規模的檢測平台，突破以往相對著重於特定人類病毒檢測的限制。此外，也預計依照各種防疫需求，將資料庫中的各檢測模組以不同型式或組合，利用客製化的概念整合至微流體 real-time RT-PCR 平台中，研發多種檢驗套組，使單一樣品的檢驗可依目的獲取最大效益。預計可藉由開發全流感病毒檢測平台、新型冠狀病毒檢測平台或具特定地區旅遊接觸史患者檢測平台等，強化我國防疫效能。此外，此檢測平台的開發，亦可持續縮短檢測新型流感與冠狀病毒的檢驗時間，更可將研發成果與國內企業合作或技轉，期能陸續產出傳染病防疫所需客製化檢驗試劑產品，帶動醫藥相關生技產業之競爭力。

關鍵詞：新型 A 型流感病毒、新型冠狀病毒、分子檢測套組

計畫英文摘要：

In recent years, newly emerging or unknown pathogens continue to evolve and infect humans, increasing the potential to cause public health threats. Due to the more severe disease outcome, the epidemiological impact caused by novel influenza virus and coronaviruses, including severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), all kinds of HxNx virus (eg. H5N1, H7N9, H6N1 and H10N8 subtypes) and the Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), etc., cannot be ignored. Along with technological advances, molecular biology-based technology continues to introduce new range of applications than ever. Microfluidics platform has been successfully combined with the nucleic acid extraction or biological detection wafer in the field of clinical microbiology, highlighting their characteristics to shorten detection time, detect in a high-throughput manner and reduce the sample requirement. The current project intends to develop a rapid, convenient, sensitive and task-oriented microfluidic detection platform for detection of the novel influenza A and coronavirus, which can further strengthen the surveillance and diagnosis against these important zoonotic pathogens. Two databases will be constructed, each contains a complete panel of real-time RT-PCR primer and probe set for large-scale detection of influenza viruses, including types (A or B) and subtypes (H1-H18 and N1- N11) identification, as well as novel coronavirus (including MERS-CoV), respectively. They can be used to target not only the human but also zoonosis-originated influenza and coronavirus strains. In addition, each detection set in the databases is planned to be integrated into the microfluidic real-time RT-PCR platform in various combinations as a variety kinds of kits. This allows us to obtain the maximum benefit when detecting a single sample, in accordance with the epidemiological demand for disease intervention. The development of the microfluidic detection platform can also promote cooperation between government and domestic enterprises through technology transfer, which further strengthens the development of R & D industry in Taiwan.

keywords : Novel influenza virus, Novel coronavirus, Molecular diagnostic kit

本文

一、前言：

近年來，由於氣候及環境的變遷，人類的生活型態跟著改變，這也使得各類新興/未知病原體持續演進並感染人類，例如嚴重急性呼吸道症候群冠狀病毒(SARS-CoV) (1, 2)、各類 HxNx 新型流感病毒(H1N1pdm09, H5N1, H6N1, H7N9, H9N2 與 H10N8 等亞型) (3-8)、中東呼吸道症候群冠狀病毒(MERS-CoV) (9, 10)、伊波拉病毒(11)等，對於公共衛生所造成的威脅日益增加。此外，隨著全球交通往來日漸頻繁，各種傳染病的傳播已無國界。以流感以及冠狀病毒為例，這兩種病原體近年來感染人類的模式，包括上述 1997 年的 H5N1 流感病毒、2003 年 SARS-CoV 病毒、2009 年 pandemic H1N1 流感病毒、2012 年中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)、2013 年 H7N9 流感病毒等，均為病毒首先出現於單一地區感染人類宿主後，再迅速傳播至全球各國。值得注意的是，這兩種病原體均屬人畜共通，除了有人類宿主間的傳播可能外，動物間的互相傳染或是由動物傳染給人的模式，都增添對於此等人畜共通傳染病原感染症防治上的困難，也突顯這兩種病原體於人類公共衛生的重要性。在禽類，我國中部及南部養禽場持續傳出由高/低病原禽流感引發的疫情(例如 H5N2、H6N1) (12, 13)，其中新型高病原 H5N2、H5N3 與 H5N8 禽流感病毒更於 2015 年 1 月首次造成國內雞、鴨、鵝等大規模感染及死傷疫情，除重創農業經濟，亦對人類健康造成潛在威脅(14)。

流感病毒可分 A, B, C 三型，其中 A 型與 B 型流感病毒是引起人類季節性感染的主要元兇，A 型流感病毒引發的疾病嚴重度則較 B 型流感病毒高(15)。A 型流感病毒可依其表面 HA 以及 NA 糖蛋白次分為不同亞型，HA 的亞型有 18 種 (H1 至 H18)；NA 有 11 種 (N1 至 N11) (16, 17)。禽類為 A 型流感病毒的自然宿主，目前的研究發現，H1-H16 以及 N1-N9 亞型的 A 型流感病毒都可於禽類發現，H17-H18 以及 N10-N11 則僅存在於蝙蝠。各種亞型當中，H1、H2 與 H3 均可有效

於人類間傳播；H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型等禽源性病毒則曾引起零星人類感染案例(3-8, 15)，感染後的死亡率也較 H1-H3 病毒為高，但仍無法有效人傳人。雖然如此，因流感病毒本身變化速度快，容易藉由基因複製產生的突變，改變抗原特性，例如 H5N1 病毒的 HA 基因在近十幾年間，已由最初期的 clade 1、2，演化至 clade 1.x.x.x 與 2.x.x.x，包括 2014 年開始於全球禽類大規模流行的 2.3.4.4 H5 病毒(18)；或是各基因段於宿主間互換及重新排列組合，進而形成全新的流感病毒(15)。這些由病毒引起的變異常使人類無法獲得持久的免疫力，尤其當新型流感病毒出現時，因多數人群皆無保護力，容易引發全球性的大流行。除了禽源性的病毒亞型以及 H1-H3 季節性流感病毒外，豬源性的 H1 及 H3 亞型於 1990 年起即造成人類偶發的感染疫情(19)。在 2009 年 pandemic H1N1 病毒大規模感染人類之後，H3N2v (H3N2 variant) 病毒於 2011 年於美國再次感染人類，並於隔年 (2012) 在美國造成超過 300 人感染的疫情，被推測具有限制性的人傳人趨勢 (limited human to human transmission)(20)。病毒分析結果顯示，這個豬源性病毒包含來自人類流感病毒 H1N1pdm09 的 Matrix 基因，顯示 pandemic H1N1 病毒自 2009 年開始感染人類之後，亦在豬隻與其他流感病毒相互重組產生新興病毒，並影響人類。自此之後，2012 年亦首次發現帶有 H1N1pdm09 的 Matrix 基因的 H1N2v 以及 H1N1v 病毒的人類感染個案(21)。這些再次印證經多次重組的豬源性新型 A 型病毒持續存在感染人類的潛力，並已逐漸增加對於人類的適應性，表示流感病毒的防治需要透過極為全面且嚴密的監測，以及時揭露各種新病毒於全球出現的面貌。冠狀病毒為一種人畜共通病原體，可感染人類以及多種動物包括蝙蝠、鳥類、貓、狗等。在動物界中，目前認為蝙蝠為冠狀病毒的自然宿主。冠狀病毒可於被感染的宿主引起嚴重度不一的症狀，包括呼吸道、腸道以及神經系統皆可能受到影響。在 2012 年以前，曾經感染人類的冠狀病毒包括 HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63 以及 HCoV-HKU1(22)。MERS-CoV 病毒是於 2012 年 9 月首度於沙烏地阿拉伯被發現的新型冠狀病毒(9)，之後陸續在中東地區及亞洲 (阿烏地阿拉

伯、阿拉伯聯合大公國、約旦、卡達、阿曼、科威特、葉門、黎巴嫩、伊朗、馬來西亞、菲律賓)、非洲(突尼西亞、阿爾及利亞)、歐洲(英國、法國、義大利、德國、荷蘭、希臘、埃及)、及美洲(美國)等地區(國家)造成人類散發性感染，感染病例於2012-2014年間僅限集中於中東地區或具有該地區接觸史再移入他國者(23)。根據各國的流行病學資料顯示，MERS-CoV 病毒感染確定病例多數具有慢性潛在疾病，臨床症狀主要是發生急性的嚴重呼吸系統與循環系統疾病，包括肺炎、腎衰竭、心包膜炎、血管內瀰漫性凝血 (DIC)、發燒、咳嗽、呼吸急促與呼吸困難等，嚴重者可能造成死亡。截至2014年7月22日止，WHO共發布837例實驗室確認之MERS-CoV感染個案，其中291例死亡，平均死亡率約34.8% (24)。可怕的是，MERS-CoV 病毒在2015年5月於南韓引發大規模的人傳人院內感染，感染人數在短短的2個月內暴增至約200人，引發國際社會的高度重視(25)。

鑑於新型流感及冠狀病毒等人畜共通傳染病原體對於人類健康的嚴重威脅，如何於疫情初期即時而正確地偵測未知病原體，釐清其傳播路徑與感染原，進而防堵或控制疫情的擴散，已成為跨國公共衛生相關部門或研究領域密切關注的議題。每當國際間出現新興病原體感染人類的疫情初期，疑似個案多半仰賴臨床醫師的警覺性，依病患臨床表徵以及旅遊史等資訊，推測致病原的可能屬性，然而這種診斷模式因缺乏實驗室的檢驗證據，不僅無法確診，也因為對疾病的未知，往往無法即時採取有效的介入措施，以致付出相當大的社會成本。近年來，由於病原體分子生物學檢測技術的快速發展，以傳統聚合酶鏈鎖反應 (conventional PCR) 或搭配螢光偵測平台的即時聚合酶鏈鎖反應 (real-time PCR) 已成為廣用的病原體檢測平台，這類方法的優點在於檢測速度快，於數小時內可得到結果，並具備優異的檢測靈敏度與專一性，與以往須利用病原體培養為基礎的方法相比更具實用性。觀察近期世界衛生組織針對 pandemic H1N1、H5N1、H7N9 及 MERS-CoV 等新型 A 型流感與冠狀病毒所公布的檢測方法，均以 real-time PCR 為建議平台 (26-28)，顯示此方法已在新興病原體的檢測扮演重要角色。雖然如此，上述各項

病毒的檢測能於個別反應進行，尚無法有效整合，以致檢驗未知流感病毒時，需以多組引子及探針進行各種疑似 HA 以及 NA 基因的分型，除耗費大量的檢驗試劑，操作過程亦容易因繁複的準備與試驗配置步驟導致錯誤。相較於單一標的檢測模式，以生物晶片的概念整合各檢測標的有逐漸成為新一代微生物檢驗的趨勢。傳統的微陣列生物晶片檢測係將各病原體的特定核酸片段，以密集而有規律的方式，排列於一微小的晶片上，再利用序列互補的原理，於待測檢體中抓取標的基因，作為結果研判的依據。此類檢測法的優點在於，一個晶片可植入大量的病原微生物核酸序列，可達高通量(high throughput)檢測之效，但相對的，注射樣品於晶片上的每一檢測槽時，需要非常精準，若無儀器協助而以人工操作，往往較為耗時，且此種雜交檢測的靈敏度不如 PCR。微流體技術是近年來在微機電領域廣為應用的平台，其於微生物領域已成功結合核酸萃取或生物檢測晶片，突顯其縮短檢測時間、增加檢測高通量與節省樣本的特性(29)。微流體生物晶片在設計上，係以特殊設計的微流道，在其上設計幫浦、閥門、感測器等，能夠把樣品前處理、混合、輸送及偵測等繁瑣步驟整合於單一晶片上，類似 lab-on-a-chip 的設計概念。此方式的優點在於待測樣品可透過微流道的分流，於特定反應槽與核酸純化或專一性引子與探針等試劑混合，進行核酸萃取與 PCR 反應。其後再以感測器偵測各反應槽產物的增殖情形，除可節省樣品需求，亦可同時達到快速且操作簡便的進步性。

近年來我國陸續藉由傳染病監測網成功鑑定新型A型流感病毒感染個案，包括1例本土H6N1與4例H7N9境外移入(5, 30)。在其他曾感染人類的新型A型流感病毒中，我國至今雖無確認個案，但因病毒持續於各國造成散發感染，加強監仍勢在必行；MERS-CoV的情形亦是如此。本計畫擬發展一個兼具快速、便利、靈敏與任務導向化的新型A型流感與冠狀病毒的微流體檢測平台，強化此等重要人畜共通傳染病原體的監測與檢驗。考量前述real-time PCR所具備的優點，規劃將建立兩個檢測用引子與探針對的大型資料庫 (library)，分別針對流感病毒，包括型別

(A或B)與亞型(H1-H18與N1-N11)鑑定，以及新型冠狀病毒(包含MERS-CoV)，構築大規模的檢測平台，突破以往相對著重於特定人類病毒的限制。此外，也預計依照各種防疫需求，將資料庫中的各檢測模組以不同型式或組合，利用客製化的概念整合至微流體real-time RT-PCR平台中，研發多種檢驗套組，使單一樣品的檢驗可依目的獲取最大效益。上述PCR的引子和探針預計先參考文獻，評估適合作為目標區域的病原體基因段，再以序列比對方式，修飾優化或重新設計適合的序列，並使各標的檢測使用同一PCR反應條件，達高通量檢測輸出之效。此檢測平台的開發，除了可節省檢測新型流感與冠狀病毒的檢驗時間，強化防疫效能，更將研發成果與國內企業合作或技轉，期能陸續產出傳染病防疫所需客製化檢驗試劑產品，帶動醫藥相關生技產業之競爭力。

二、 材料與方法

(一) 新型 A 型流感 real-time RT-PCR 檢測平台建立與優化

1. 建立引子與探針對資料庫：參考科學文獻，搜尋針對各流感病毒 HA 與 NA 亞型檢測引子探針對的目標區域，並透過 NCBI 基因資料庫，下載各 H1-H18 以及 N1-N11 的流感病毒基因序列，經比對後，根據病毒序列的保守情形 (conservation)，評估各檢測目標區域的適用性。為使同一引子探針對可於單一亞型檢測最多病毒，將選擇相對保守的區域作為基因檢測標的，設計研發或改良可精準檢測各種 A 型流感病毒亞型(包括 H1-H18 與 N1-N11) 之 real-time RT-PCR 專一性檢測用引子與探針。

(1) 曾感染人類的流感病毒亞型：針對曾感染人類的流感病毒亞型，將參考各病毒 HA clade 或 lineage 的序列特徵設計引子與探針，例如 H1 與 H3 亞型又可在分為 seasonal 及 swine-origin lineage 等；H5 包括各 1.x.x.x 及 2.x.x.x clades 等；H7 包括 H7N9 及非 H7N9 之其他 H7 亞型。NA 的

設計方式相同。

(2) 尚未感染人類的病毒亞型：針對這些病毒，大致將病毒區分為 American 及 Eurasian lineages，各 lineage 均設計至少一組 HA 與 NA 引子與探針對。

2. 建立新型 A 型流感病毒各(亞)型鑑定 real-time RT-PCR 檢測平台。搭配 Roche LightCycler 480 系統，以原廠 Multiplex RNA Virus Master 試劑，先測試資料庫內各 PCR 反應的個別檢測條件，並加以優化，試劑配置與 PCR 反應環境條件分別如下所述：

試劑配置

Component	Volume/reaction
RT-Enzyme Solution, 200 X	0.1 µl
RT-qPCR Reaction Mix, 5 X	4 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
Probe (5 µM)	0.5 µl
RNase-Free Water	8.4 µl
Template RNA	5 µl
Total volume	20 µl

反應環境設定

Reverse Transcription:	50 °C	30 min
Initial denaturation	95 °C	30 sec
3-step cycling Amplification:	95 °C	5 sec
Annealing:	53 °C	30 sec

Extension:	72°C	30 sec
Number of cycles:	45	
Cooling:	40 °C	30 sec

3. 陽性對照檢體來源：除已在我國感染人類的新型 A 型流感病毒(例如 H6N1 與 H7N9)外，本計畫擬與農委會家畜衛生試驗所或農科院等單位合作，洽請提供禽及豬源性各亞型流感病毒核酸。取得核酸後，首先以 real-time RT-PCR 之引子放大產物片段，並植入載體 DNA，構築各檢測反應的陽性對照質體 DNA。

(二) 新型冠狀病毒 real-time RT-PCR 檢測平台建立與優化：

1. 建立引子與探針對資料庫：參考文獻並透過基因資料庫比對，設計研發針對冠狀病毒(包含 MERS-CoV)之專一性檢測用引子與探針。MERS-CoV 於 2012 年開始感染人類至今已超過 4 年，惟世界衛生組織所建議之 real-time RT-PCR 診斷用引子與探針對於初次公布後並未更新。利用與新型 A 型流感病毒相同策略，透過 NCBI 基因資料庫，下載近年各宿主(包含人類及駱駝等)之 MERS-CoV 病毒基因序列，並進行比對，以評估世衛所建議之檢測用核苷酸序列是否需更新。除 MERS-CoV 外，將同步設計或優化其他冠狀病毒 real-time RT-PCR 檢測用引子與探針序列。
2. 建立新型冠狀病毒 real-time RT-PCR 檢測平台。搭配 Roche LightCycler 480 系統，以原廠 Multiplex RNA Virus Master 試劑，先測試資料庫內各 PCR 反應的個別檢測條件，並加以優化，試劑配置與 PCR 反應環境條件與新型 A 型流感部分相同。

(三) 微流體晶片檢測系統整合與套組化應用

將資料庫中新型 A 型與冠狀病毒之 real-time RT-PCR 引子探針組，依不同防疫需要，搭配目前市場上已販售或尚未販售但開發完成的微流體系統，包括 Luminex

公司的 ARIES 以及台灣奎克生技公司(Cracker Bio) 研發的 Panel-on-a-Chip 平台等，整合成各類新式檢測套組。

1. 整合核酸萃取與 real-time RT-PCR 即時檢測步驟流程於單一微流體卡匣：
Luminex 的 ARIES 系統為一結合核酸萃取與分子生物核酸檢測的平台，其以流體力學的設計，使臨床檢體可直接滴入檢測口，之後檢體將會以層流的方式，自動經消化(lysis)、結合(binding)、洗滌(washing)與洗提(elution)等步驟，完成核酸萃取；萃取後的核酸將會自動加入具有特定引子與探針對的反應槽，再繼續進行類 real-time RT-PCR 的分析。此種整合後的產品設計將類似目前市售分子生物學快篩試劑的概念，可加快檢驗速度、簡化檢驗流程，避免人為之檢測誤差與降低檢體之暴露機會。檢測標的將選擇特定病原體例如 H5N1、H7N9 或 MERS-CoV 等，以配合具特殊接觸或旅遊史之疑似個案快速檢測(例如可發展具中國大陸或中東旅遊使專用檢測套組)。
2. 整合各流感病毒型別與分型鑑定之 real-time RT-PCR 即時檢測引子探針對於同一微流體卡匣：奎克生技公司(Cracker Bio) 研發的 Panel-on-a-Chip 平台，是先預注 real-time RT-PCR 的引子與探針組到晶片的奈米孔中，再將待檢測的樣品刮入奈米孔，與 PCR 反應試劑混和，最後將晶片置入晶片分析儀進行 real-time RT-PCR。此種產品設計可省去傳統上以人工或機器手臂逐孔加取的時間，使於短時間內，同時鑑定單一待測樣品是否存在各 HA 與 NA 亞型的新型 A 型流感病毒，以利於常規防疫檢驗出現無法分型之流感病毒時，快速釐清可能的感染原。檢測標的將為完整的流感病毒亞型 HA 與 NA 基因(H1-H18、N1-11)，例如可開發無法次分型之流感病毒檢測套組。
3. 整合目前已知冠狀病毒(包括 MERS-CoV)之 real-time RT-PCR 即時檢測引子探針對於同一微流體卡匣：同樣以 Panel-on-a-Chip 平台，使單一待測樣品可同時鑑定是否存在 MERS-CoV 或其他冠狀病毒，例如可開發新型冠狀病毒檢測套組。

- (四) 測試微流體檢測套組的偵測靈敏度與特異性：利用陽性 DNA 質體，進行 10 倍續列稀釋，測試該檢測平台的偵測極限。
- (五) 使用通報流感併發重症、新型 A 型流感、明原因肺炎及 MERS-CoV 等防疫檢體剩餘核酸，測試並比較微流體系統與 real-time RT-PCR 或市售 IVD 檢測試劑於靈敏度與特異性的差異。

三、 結果

本年為計畫執行年度的第一年。依原規劃，截至 106 年 11 月止，針對新型 A 型流感及 MERS-CoV real-time RT-PCR 檢測平台的建立與優化，已完成可檢測 16 種 HA 以及 9 種 NA 病毒亞型鑑定引子與探針對的設計，並以這些引子與探針對個別建立流感病毒分子生物學快速檢驗方法以及其檢靈敏度與特異性的評估。此外，亦已陸續設計冠狀病毒檢測用核苷酸序列資料庫，並以新型 A 型流感病毒檢驗技術開發模式，持續建立新型冠狀病毒(含 MERS-CoV)之快速檢驗平台。

(一) 新型 A 型流感 real-time RT-PCR 檢測平台引子與探針對序列設計

為設計新型 A 型流感病毒 real-time RT-PCR 快速檢測法所需引子與探針對，本年透過搜尋 NCBI 以及 GISAID 基因資料庫，先下載各 H1-H16 以及 N1-N9 亞型自 2000 年之後分離的流感病毒 HA 及 NA 基因序列，分別進行各亞型病毒基因的大規模比對，其後再根據病毒序列的變異情形，找尋適合設計引子與探針對的區域。為使用於各亞型病毒檢測的引子探針對可於單一檢測反應檢出最多病毒，找尋引子與探針對時，係選擇同一亞型病毒中，基因序列保守度較高的區域作為基因檢測標的，各 real-time RT-PCR 反應放大後的基因片段產物設計介於 100-250 bp 之間，並搭配 degererate base 的使用，擴大可檢測對象的範圍。本年設計完成之各亞型專用檢測引子與探針對清單如表一及表二，可用於 16 種 HA 以及 9 種 NA 之人類或禽源性新型 A 型流感病毒快速鑑定。

(二) 新型 A 型流感 real-time RT-PCR 檢測反應的建立、測試與優化

為實地測試已設計完成之 HA 及 NA 亞型引子與探針對應用於 real-time RT-PCR 時，針對各類人類或禽源性新型 A 型流感病毒的檢測能力，本年已與農委會家畜衛生試驗所合作，洽請分讓動物世界衛生組織(OIE)禽流感標準病毒株的核酸，作為各檢測反應之陽性對照組，病毒清單詳如表三，其亞型包括 H1-H13 以及 N1-N8；H14 及 N9 核酸則由農方提供萃取於我國本土於 2016 年自鴨子分離之病毒。H15 及 H16 因農方無病毒提供，故以自行合成核苷酸序列的方式製備質體作為陽性對照樣本。此外，因近年 2.3.4.4 演化群 H5 病毒於國際禽類間持續流行，且部分亞型(例如 H5N6 病毒)亦已造成人類偶發感染，故本年同時向家衛所分讓我國於 2015 年分離自雞的 H5N2、H5N3 及 H5N8，與 2017 年分離自水鳥之 H5N6 等病毒核酸(表三)，大規模評估各亞型檢測方法的可應用性。

Real-time RT-PCR 檢測方法的建立，係同時利用 SYBR Green I 與 Taqman probe 兩系統，先建立 SYBR Green I 的檢測平台，以其檢測結果評估引子的檢測適用性，並排除引子二聚體(primer dimer)的形成，經評估適用的引子對後續再搭配 Taqman probe，建立更具專一性的檢測平台。本年已完成建立、測試與優化的病毒亞型檢測方法清單詳如表四及表五，包括 16 種 HA 以及 9 種 NA 亞型的鑑定，各檢測反應的評估結果詳如圖一(HA 分型)及圖二(NA 分型)。此外，為進一步評估各亞型分行試驗的檢測能力，各 HA 或 NA 反應檢測陽性對照組所得的 Cp (cycles of crossing point)值，亦與世界衛生組織建議的 A 型流感病毒檢測法(檢測 M 基因)所得 Cp 值進行比較，作為後續進一步優化的依據，結果詳如圖一及圖二。除了利用由家衛所分讓之禽源性流感病毒核酸外，亦以源自人類之新型流感病毒包括 2 株 H5N1 疫苗株(RG2、RG14)與 1 株人類 H6N1 流感病毒(A/Taiwan/2/2013)之核酸進行測試。綜觀各檢測反應測試結果，本年所建立的 16 種 HA 以及 9 種 NA 流感病毒 real-time RT-PCR 快速檢測法可有效檢出源自人類以及禽類之新型流感病毒。

(三) 新型 A 型流感 real-time RT-PCR 偵測反應的敏感度測試

為精確掌握各 HA 與 NA 亞型偵測反應的檢測效能，本年利用各亞型基因的質體 DNA 評估其檢測靈敏度。首先以各檢測反應針對陽性對照組所放大的 DNA 產物，將其轉殖入 pGEMT 載體，建構陽性對照質體。各質體建構完成並測定其濃度後，先調整至每檢測反應含有 10^6 個分子數(copies)的含量，再透過序列稀釋，以各稀釋後的質體 DNA 做為樣本，測定各反應對於 $10^6 \sim 10^0$ 個質體的檢測靈敏度，並繪製標準曲線(standard curve)，作為後續半定量的依據，結果詳如圖三(HA 分型)及圖四(NA 分型)。根據評估結果顯示，本研究完成設計開發的 HA 與 NA 檢測法，其各別偵測極限的分布介於 1~100 個質體分子數之間；各檢測反應標準曲線的 R^2 值均大於 0.99 (圖三、四)。

(四) 新型 A 型流感 real-time RT-PCR 偵測反應的特異性測試

除了各 HA 與 NA 分型 real-time RT-PCR 反應之檢測靈敏度外，本年亦同時分析其檢測特異性。評估方法係利用前述來自動物世界衛生組織，以及我國自行由禽類以及人類分離之各亞型流感病毒核酸共 20 種，針對各 HA 及 NA 亞型檢測反應進行交叉測試，結果詳列如表六(HA 分型)及表七(NA 分型)。特異性趨勢顯示，16 種 HA 分型試驗中，H2 與 H5 兩亞型出現微弱交叉反應，H2 檢測反應針對部分 H5 病毒(H5N1 與 H5N6)以及 H5 反應檢測 H2N2 病毒皆有弱陽性訊號，其餘 14 個分型試驗皆僅檢測個別基因亞型，具良好專一性，未來將釐清交叉反應產生的原因，再次進行優化；另 9 種 NA 反應亦皆僅檢測個別基因亞型，同具良好專一性。

四、 討論

近年國內外持續發生人類或動物感染新興或再浮現傳染病原體，包括新型 A 型流感病毒(H7N9、H5Nx、H6N1)、MERS-CoV、狂犬病毒、伊波拉病毒等社會大眾關切的事

件。隨著時代進步、交通便利與全球化國際間往來密集，上述新興傳染病將可能由區域性的疾病，演變成全球性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康，2015 年韓國 MERS-CoV 與西非伊波拉疫情便是很好的例子。防範傳染病的最佳策略為即時檢驗，早期得知檢驗結果除了可使臨床端針對感染患者盡早治療，公共衛生防疫單位亦可即時啟動防疫措施，阻絕可能的感染源，避免疾病進一步擴散。然而，即時檢驗需仰賴強而有力的檢驗平台，在靈敏度與專一性兼顧的情形下，快速且正確地進行病原體鑑定，故國內各級防疫檢驗單位持續強化檢驗平台已是勢在必行的作為。以新型 A 型流感病毒來說，我國迄今所檢出的 5 例 H7N9 確診個案，皆由中國境外移入。參考先前文獻，中國目前被認為是新興流感病毒衍生的熱點(epicenter)之一，我國於地理位置上因與中國接近，且經貿或旅遊往來已相當頻繁，在此趨勢下，未來續由中國移入新型 A 型流感確診個案將無可避免。

在流感病毒的檢驗層次，目前常用於檢驗的方法包括快篩試劑、病毒培養及分子生物學檢驗等。在這些方法中，real-time RT-PCR 是被廣為應用的分子生物學檢驗方法，除了在研發端持續吸引眾多團隊投入資源，開發各式病毒檢驗套組，現行國內外市售流感病毒快速檢驗試劑中，也以利用該平台為檢驗原理的佔最大比例。然而，流感病毒的基因體突變快速，常因幾個核苷酸的突變，影響 real-time RT-PCR 引子與探針對的結合，降低病毒檢測效能，故現行市售檢驗套組的偵測標的多以較為保守的 M 基因為主，而非突變率較快的表面蛋白 HA 及 NA 基因，如此易使這些檢驗試劑僅能鑑定尤感病毒的型別，例如 A 型或 B 型流感病毒，並無法進行後續針對 A 型流感病毒的亞型進行分析，對於公衛防治幫助有限。藉由本年針對 16 種 HA 以及 9 種 NA 亞型流感病毒 real-time RT-PCR 快速檢驗平台的成功開發，本系統已可立即上線，應用於我國流感病毒快速檢驗，再次提升政府對新型 A 型流感病毒的防治量能。除此之外，有鑑於目前市售的微流體(Microfluid)晶片，對 Flu A 及 MERS 的分型技術尚未成熟，例如 Gene Xpert 僅能檢測 FluA，無法分型；FilmArray 僅能針對人類季節性流感(H1N1 及 H3N2)分型，且這些晶片目前並無客製化的服務，無法依使用者需求擴充檢測標的，因此本計畫將於明年依規

劃與國內外廠商合作，將建立完成之新型 A 型流感 real-time PCR 病原體檢測方法，逐一轉換至微流體檢測平台，依不同防疫需求，開發各類客製化的檢驗試劑組，並於各檢測套組轉移至微流體平台後，平行比對檢測效能，期能打造傳染病原體試劑開發的新市場趨勢。

依現行我國中央政府對於流感病毒實驗室檢驗的職掌分工，係由衛生福利部疾病管制署及農委會家畜衛生試驗所兩機關負責；前者以檢驗人源性的流感病毒為主，後者則針對禽源性流感病毒進行監測檢驗。鑑於各類禽源性流感病毒感染人類的風險持續增加，農衛防疫單位雙方必需有更為緊密的合作，共同建構我國新型 A 型流感防疫藍圖。本研究藉由與農委會家畜衛生試驗所合作，以具代表性的國內外各亞型禽流感病毒核酸建立檢驗方法，明年除將規劃續由該所分讓我國近年由各類禽類所分離之各亞型流感病毒核酸，持續測試並掌握本 HA 與 NA 亞型鑑定 real-time RT-PCR 之檢測穩定性外，並視需要與該所進行禽流感病毒檢驗技術交流，使雙方的檢驗能力同步成長。

五、結論與建議

- (一) 本計畫為兩年期計畫，已於第一年度建立 A 型流感及 MERS-CoV 檢測用核苷酸序列資料庫，並完成 16 種 HA 及 9 種 NA 亞型的流感病毒 real-time RT-PCR 鑑定方法開發與檢測效能評估，每一反應可在相同檢測條件進行，後續進一步推展模組化時將可更為靈活。各 HA、NA 的亞型鑑定反應靈敏度測試結果顯示，檢測極限範圍介於 1~100 個陽性質體分子之間，顯示本年所設計的檢測引子探針對具良好的檢測效能，符合未來規劃整合至微流體檢測平台的實驗設計。
- (二) 目前國內外市場並無可全面進行 16 種 HA 及 9 種 NA 亞型流感病毒之分子生物學快速檢測套組，此外，國內市售的微流體平台，僅能針對人類季節性流感 (H1N1 及 H3N2) 分型，並無跨足新型 A 型流感病毒亞型檢驗。本計畫本年所開發的流感病毒 real-time RT-PCR HA 及 NA 分型試驗成果已達全程所設定的階段性目標，除可

立即應用於國內流感病毒監測檢驗業務外，下年度將積極找尋合作對象，完成微流體平台之技術轉移，以客製化的概念，逐步打造傳染病原體試劑開發的新市場趨勢。

六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一)在以往本署依業務職掌，對於人畜共通傳染病的檢驗對象相對著重於人類傳染病原體，動物相關病原體檢測則須倚賴其他權責機關例如農委會的協助，此種模式並不有利於傳染病公共衛生的防疫時效。藉由本計畫本年對於新型A型流感病毒亞型檢驗技術的全面開發，除可持續強化本署針對流感病毒之防疫檢驗量能外，亦已同時將檢測標的大規模拓展至動物病毒亞型。未來在人類新型A型流感或動物禽流感的實驗室監測檢驗，將視需要與農方展開更為緊密的合作。
- (二)新型流感病毒如H5Nx、H7N9等病毒持續藉由多種宿主的適應感染演化改變中，對人類的威脅已大幅增加；感染人類的新型冠狀病毒亦不斷被發現。由於這些新興傳染病原體都是以飛沫方式藉由呼吸道傳播，容易引發大規模感染疫情，針對這些容易造成社會恐慌的傳染病原體，應加強國內檢驗及監測量能。此外，流感病毒因基因體突變速率快，容易產生突變而影響分子生物學檢測法的檢驗效能，國家實驗室權責單位須定期藉由病原基因體序列資料，審視檢驗用引子與探針對與病原體目標基因的吻合度，確保檢驗效力與品質。

七、參考文獻：

1. Drosten, C., S. Gunther, W. Preiser, S. van der Werf, H. R. Brodt, S. Becker, H. Rabenau, M. Panning, L. Kolesnikova, R. A. Fouchier, A. Berger, A. M. Burguiere, J. Cinatl, M. Eickmann, N. Escriou, K. Grywna, S. Kramme, J. C. Manuguerra, S. Muller, V. Rickerts, M. Sturmer, S. Vieth, H. D. Klenk, A. D. Osterhaus, H. Schmitz, and H. W. Doerr. 2003. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348:1967-76.

2. Rota, P. A., M. S. Oberste, S. S. Monroe, W. A. Nix, R. Campagnoli, J. P. Icenogle, S. Penaranda, B. Bankamp, K. Maher, M. H. Chen, S. Tong, A. Tamin, L. Lowe, M. Frace, J. L. DeRisi, Q. Chen, D. Wang, D. D. Erdman, T. C. Peret, C. Burns, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, A. Sanchez, S. Liffick, B. Holloway, J. Limor, K. McCaustland, M. Olsen-Rasmussen, R. Fouchier, S. Gunther, A. D. Osterhaus, C. Drosten, M. A. Pallansch, L. J. Anderson, and W. J. Bellini. 2003. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300:1394-9.
3. Claas, E. C., A. D. Osterhaus, R. van Beek, J. C. De Jong, G. F. Rimmelzwaan, D. A. Senne, S. Krauss, K. F. Shortridge, and R. G. Webster. 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351:472-7.
4. Gao, R., B. Cao, Y. Hu, Z. Feng, D. Wang, W. Hu, J. Chen, Z. Jie, H. Qiu, K. Xu, X. Xu, H. Lu, W. Zhu, Z. Gao, N. Xiang, Y. Shen, Z. He, Y. Gu, Z. Zhang, Y. Yang, X. Zhao, L. Zhou, X. Li, S. Zou, Y. Zhang, X. Li, L. Yang, J. Guo, J. Dong, Q. Li, L. Dong, Y. Zhu, T. Bai, S. Wang, P. Hao, W. Yang, Y. Zhang, J. Han, H. Yu, D. Li, G. F. Gao, G. Wu, Y. Wang, Z. Yuan, and Y. Shu. 2013. Human Infection with a Novel Avian-Origin Influenza A (H7N9) Virus. *N Engl J Med*.
5. Wei, S. H., J. R. Yang, H. S. Wu, M. C. Chang, J. S. Lin, C. Y. Lin, Y. L. Liu, Y. C. Lo, C. H. Yang, J. H. Chuang, M. C. Lin, W. C. Chung, C. H. Liao, M. S. Lee, W. T. Huang, P. J. Chen, M. T. Liu, and F. Y. Chang. 2013. Human infection with avian influenza A H6N1 virus: an epidemiological analysis. *Lancet Respir Med* 1:771-8.
6. Peiris, M., K. Y. Yuen, C. W. Leung, K. H. Chan, P. L. Ip, R. W. Lai, W. K. Orr, and K. F. Shortridge. 1999. Human infection with influenza H9N2. *Lancet* 354:916-7.
7. Chen, H., H. Yuan, R. Gao, J. Zhang, D. Wang, Y. Xiong, G. Fan, F. Yang, X. Li, J. Zhou, S. Zou, L. Yang, T. Chen, L. Dong, H. Bo, X. Zhao, Y. Zhang, Y. Lan, T. Bai, J. Dong, Q. Li, S. Wang, Y. Zhang, H. Li, T. Gong, Y. Shi, X. Ni, J. Li, J. Zhou, J. Fan, J. Wu, X. Zhou, M. Hu, J. Wan, W. Yang, D. Li, G. Wu, Z. Feng, G. F. Gao, Y. Wang, Q. Jin, M. Liu, and Y. Shu. 2014. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*.
8. Neumann, G., T. Noda, and Y. Kawaoka. 2009. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* 459:931-9.
9. ProMED-mail. 2012. Novel coronavirus - Saudi Arabia: human isolate. <http://www.promedmail.org/?p=2400:1000> (accessed 5 Aug, 2014).
10. Chan, J. F., K. S. Li, K. K. To, V. C. Cheng, H. Chen, and K. Y. Yuen. 2012. Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic? *J Infect* 65:477-89.
11. Tong, Y. G., W. F. Shi, D. Liu, J. Qian, L. Liang, X. C. Bo, J. Liu, H. G. Ren, H. Fan, M. Ni, Y. Sun, Y. Jin, Y. Teng, Z. Li, D. Kargbo, F. Dafa, A. Kanu, C. C. Chen, Z. H.

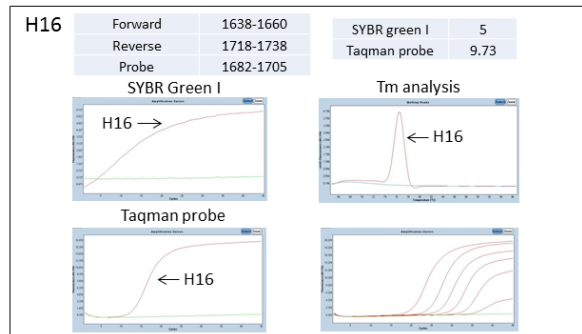
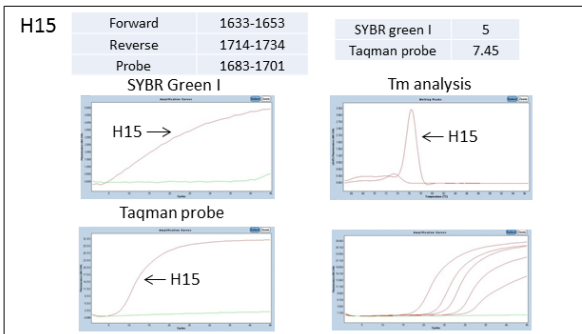
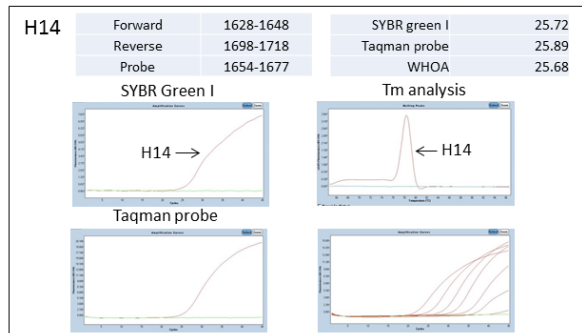
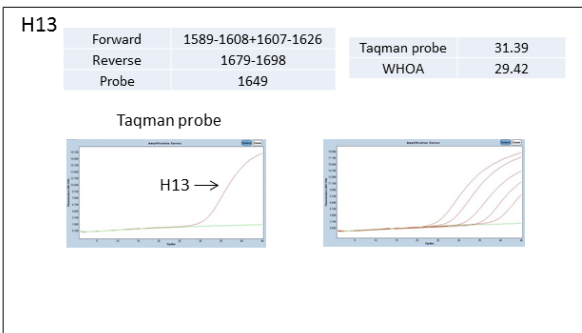
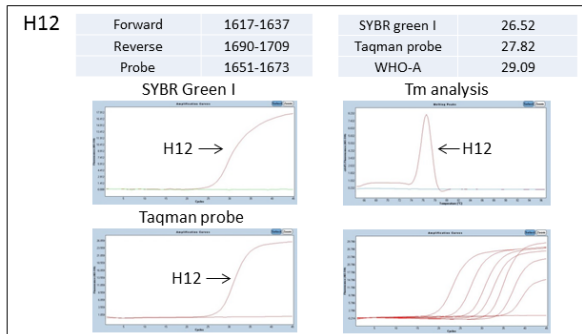
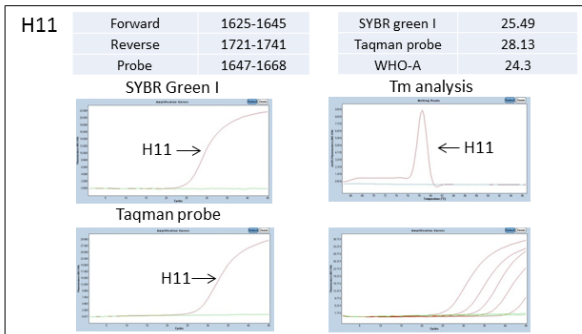
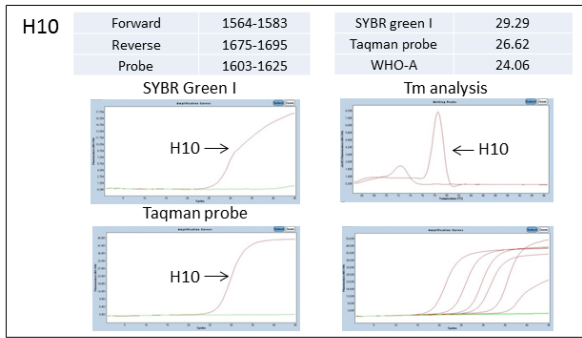
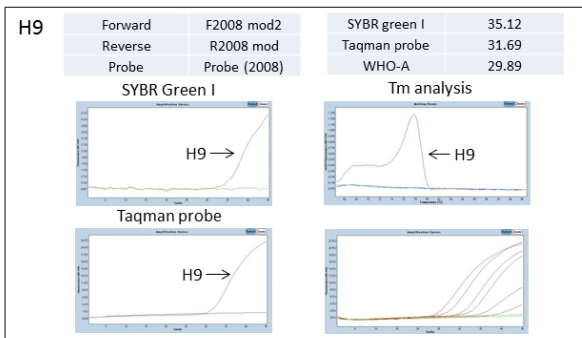
- Lan, H. Jiang, Y. Luo, H. J. Lu, X. G. Zhang, F. Yang, Y. Hu, Y. X. Cao, Y. Q. Deng, H. X. Su, Y. Sun, W. S. Liu, Z. Wang, C. Y. Wang, Z. Y. Bu, Z. D. Guo, L. B. Zhang, W. M. Nie, C. Q. Bai, C. H. Sun, X. P. An, P. S. Xu, X. L. Zhang, Y. Huang, Z. Q. Mi, D. Yu, H. W. Yao, Y. Feng, Z. P. Xia, X. X. Zheng, S. T. Yang, B. Lu, J. F. Jiang, B. Kargbo, F. C. He, G. F. Gao, W. C. Cao, and L. China Mobile Laboratory Testing Team in Sierra. 2015. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone. *Nature* 524:93-6.
12. Lee, M. S., P. C. Chang, J. H. Shien, M. C. Cheng, C. L. Chen, and H. K. Shieh. 2006. Genetic and pathogenic characterization of H6N1 avian influenza viruses isolated in Taiwan between 1972 and 2005. *Avian Dis* 50:561-71.
 13. Cheng, M. C., K. Soda, M. S. Lee, S. H. Lee, Y. Sakoda, H. Kida, and C. H. Wang. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic H5N2 influenza virus from a chicken in Taiwan in 2008. *Avian Dis* 54:885-93.
 14. ProMED-mail. 2015. Avian influenza (13): Taiwan, poultry, HPAI H5N2, H5N3, H5N8, spread, OIE. <http://promedmail.chip.org/pipermail/promed/2015-January/006399.html> (accessed 11 Aug, 2016).
 15. Nelson, M. I., and E. C. Holmes. 2007. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8:196-205.
 16. Fouchier, R. A., V. Munster, A. Wallensten, T. M. Bestebroer, S. Herfst, D. Smith, G. F. Rimmelzwaan, B. Olsen, and A. D. Osterhaus. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79:2814-22.
 17. Wu, Y., Y. Wu, B. Tefsen, Y. Shi, and G. F. Gao. 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*.
 18. Smith, G. J., R. O. Donis, H. F. World Health Organization/World Organisation for Animal, and H. E. W. G. Agriculture Organization. 2015. Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014. *Influenza Other Respir Viruses* 9:271-6.
 19. Shu, B., R. Garten, S. Emery, A. Balish, L. Cooper, W. Sessions, V. Deyde, C. Smith, L. Berman, A. Klimov, S. Lindstrom, and X. Xu. 2012. Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. *Virology* 422:151-60.
 20. Lindstrom, S., R. Garten, A. Balish, B. Shu, S. Emery, L. Berman, N. Barnes, K. Sleeman, L. Gubareva, J. Villanueva, and A. Klimov. 2012. Human infections with novel reassortant influenza A(H3N2)v viruses, United States, 2011. *Emerg Infect Dis* 18:834-7.
 21. ProMED-mail. 2012. Influenza (91): Canada (ON) H1N1v, human case.

- <http://promedmail.chip.org/pipermail/promed/2012-September/000310.html> (accessed 11 Aug, 2016).
22. Wevers, B. A., and L. van der Hoek. 2009. Recently discovered human coronaviruses. *Clin Lab Med* 29:715-24.
 23. CDC. Middle East Respiratory Syndrome (MERS).
<http://www.cdc.gov/CORONAVIRUS/MERS/> (accessed 5 Aug, 2014).
 24. WHO. 2014. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) - update, 23 July, 2014. http://www.who.int/csr/don/2014_07_23_mers/en/ (accessed 4 Aug, 2014).
 25. Ki, M. 2015. 2015 MERS outbreak in Korea: hospital-to-hospital transmission. *Epidemiol Health* 37:e2015033.
 26. Corman, V. M., M. A. Muller, U. Costabel, J. Timm, T. Binger, B. Meyer, P. Kreher, E. Lattwein, M. Eschbach-Bludau, A. Nitsche, T. Bleicker, O. Landt, B. Schweiger, J. F. Drexler, A. D. Osterhaus, B. L. Haagmans, U. Dittmer, F. Bonin, T. Wolff, and C. Drosten. 2012. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 17.
 27. WHO. 2013. Real-time RT-PCR protocol for the detection of avian influenza A(H7N9) virus.
http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realttime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf (accessed 11 Aug, 2016).
 28. WHO. 2014. WHO information for molecular diagnosis of influenza virus - update.
http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/molecular_diagnosis_influenza_virus_humans_update_201403rev201505.pdf (accessed 11 Aug, 2016).
 29. Luo, J., X. Fang, D. Ye, H. Li, H. Chen, S. Zhang, and J. Kong. 2014. A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria. *Biosens Bioelectron* 60:84-91.
 30. Yang, J. R., C. Y. Kuo, H. Y. Huang, F. T. Wu, Y. L. Huang, C. Y. Cheng, Y. T. Su, H. S. Wu, and M. T. Liu. 2015. Characterization of Influenza A (H7N9) Viruses Isolated from Human Cases Imported into Taiwan. *PLoS One* 10:e0119792.

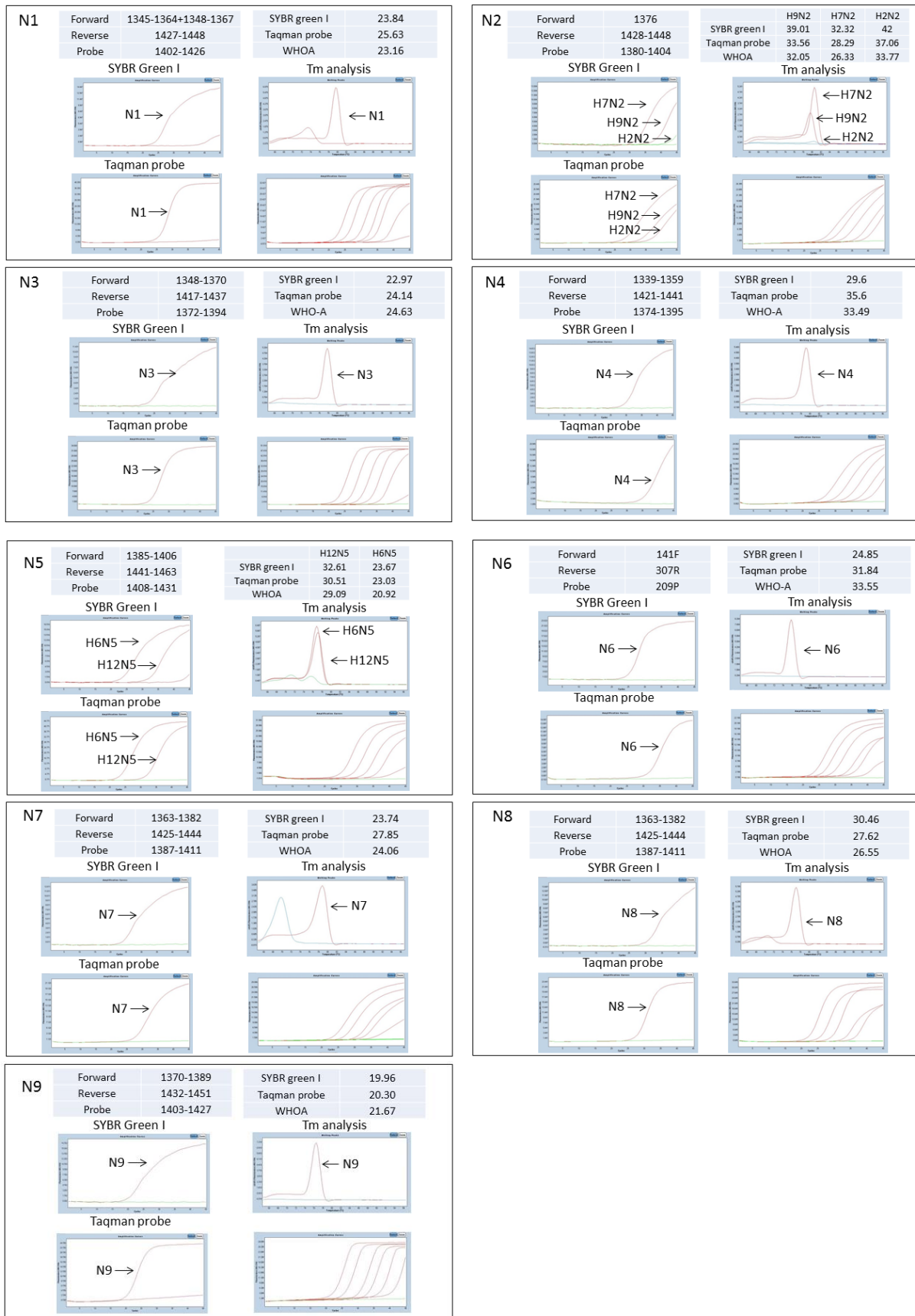
八、圖、表

圖一、16 種 real-time RT-PCR HA 分型試驗檢測結果

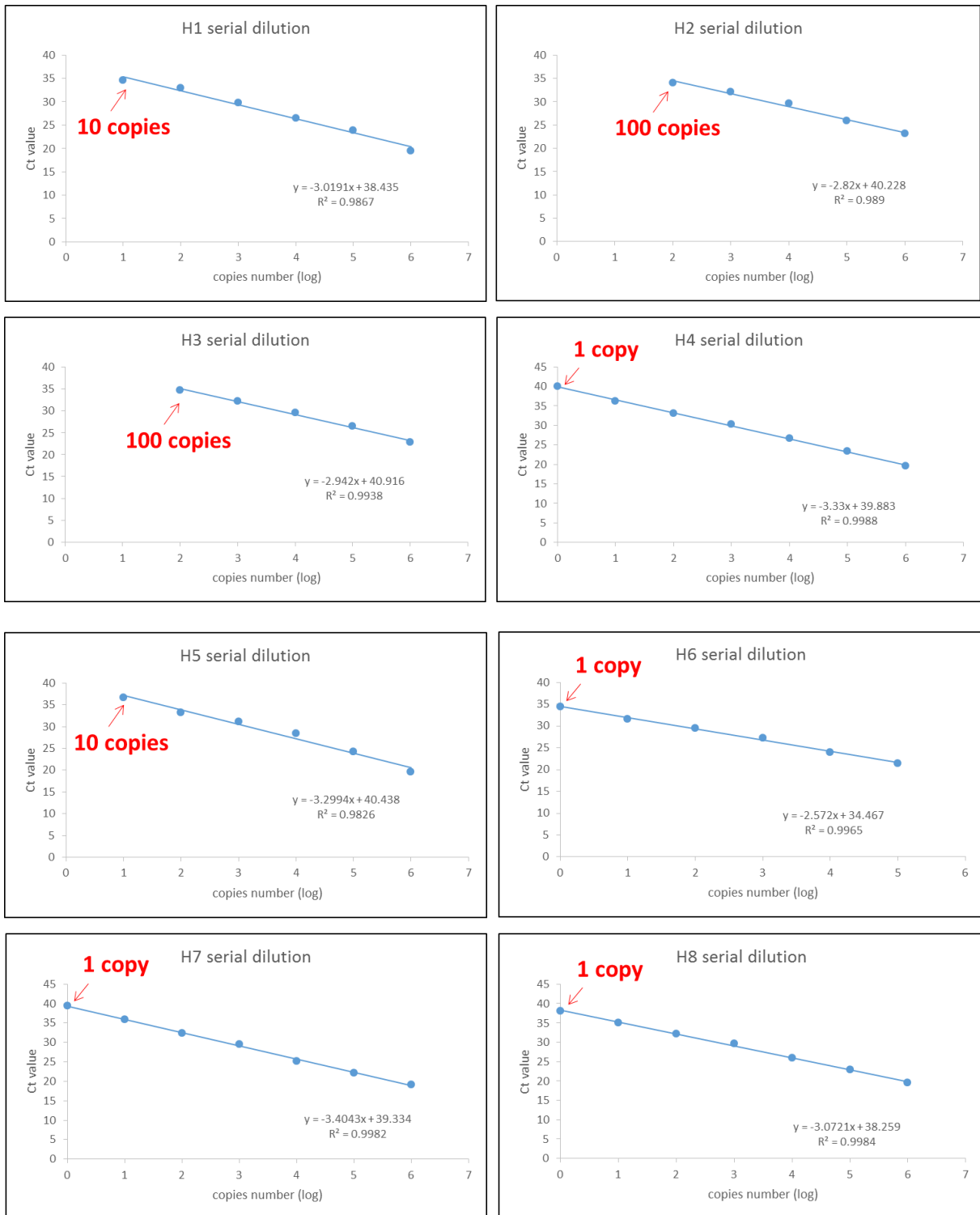


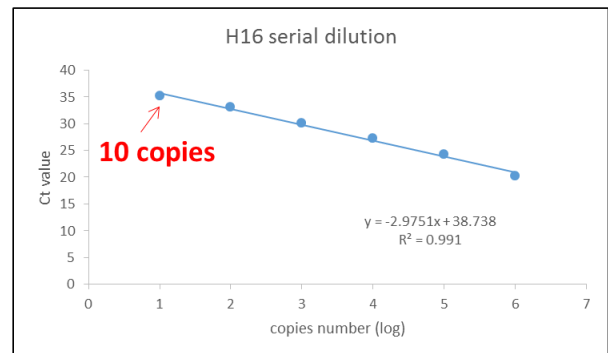
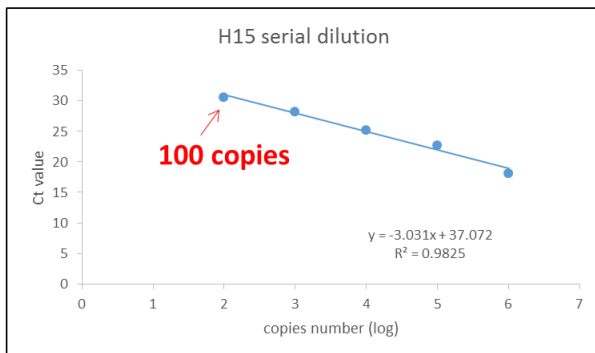
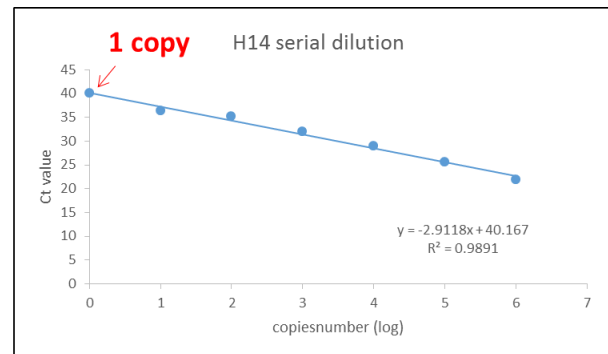
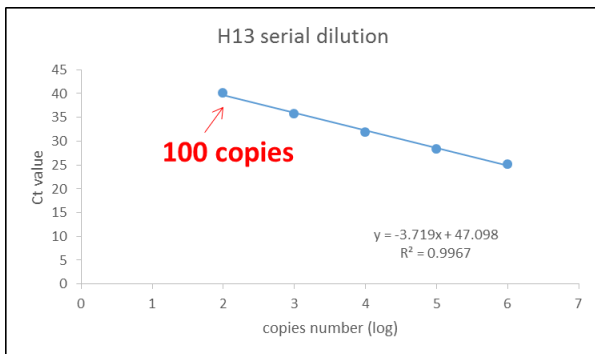
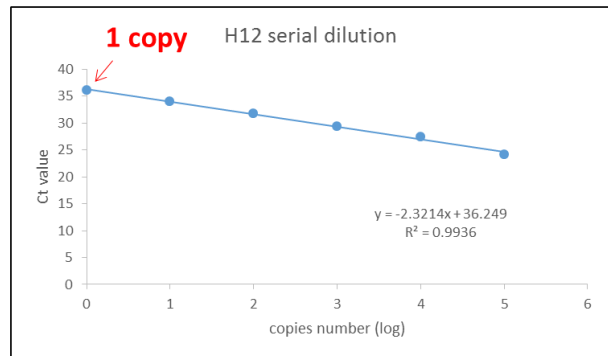
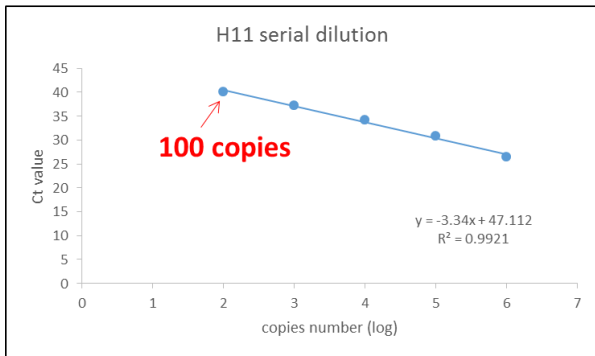
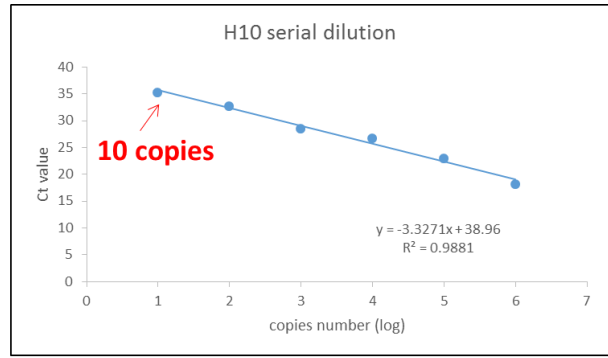
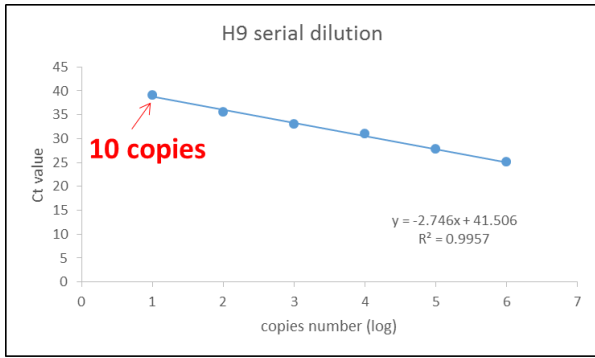


圖二、9種 real-time RT-PCR NA 分型試驗檢測結果

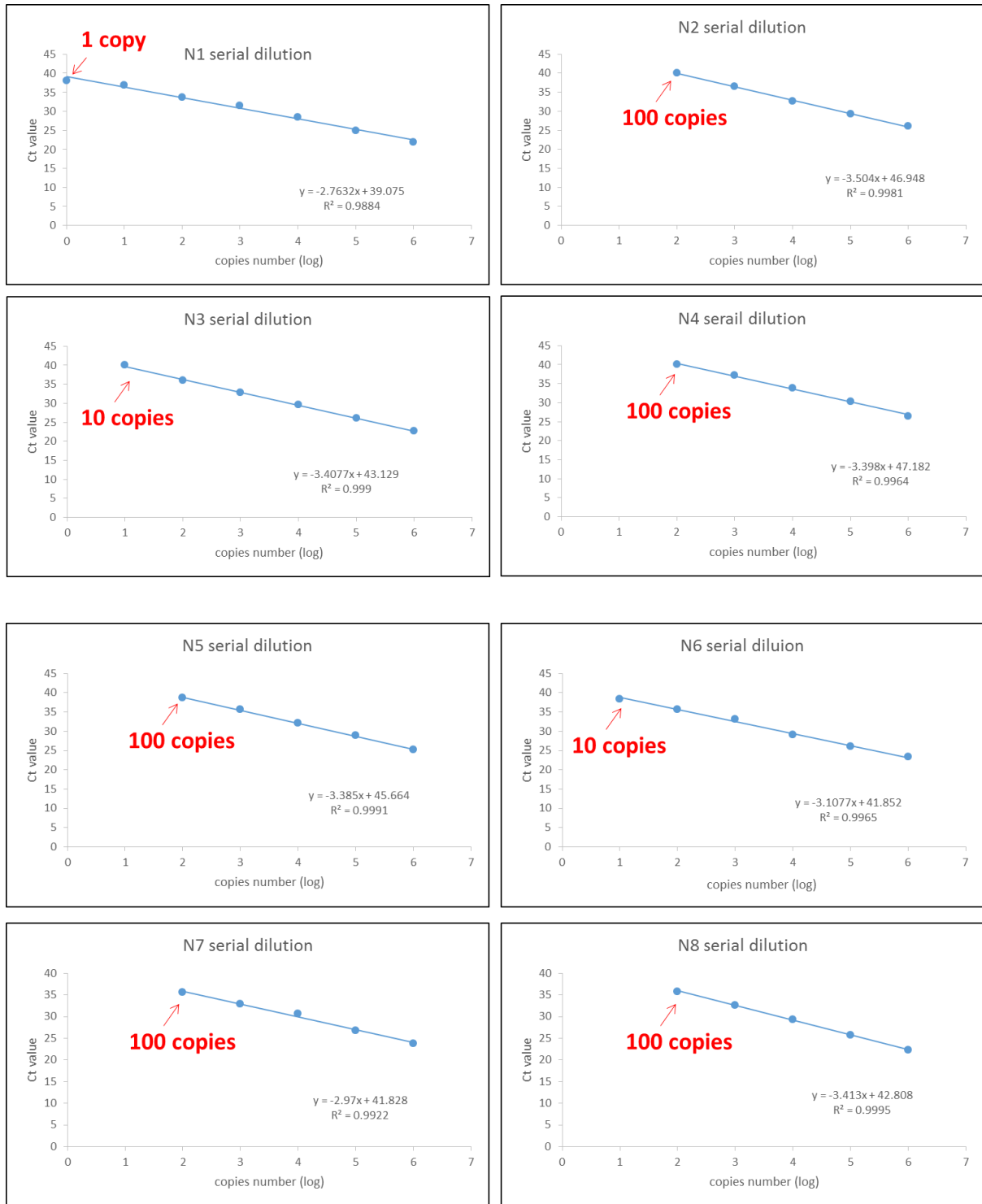


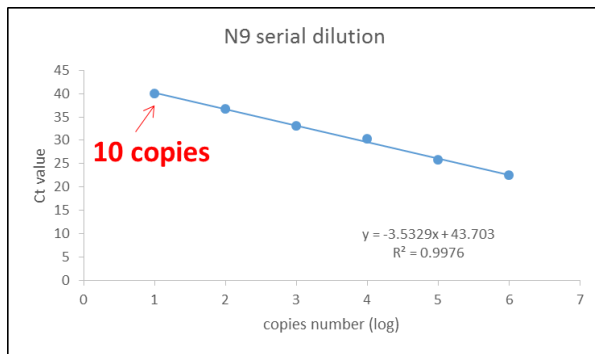
圖三、16種 real-time RT-PCR HA 分型試驗之檢測敏感度





圖四、9種 real-time RT-PCR NA 分型試驗之檢測敏感度





表一、各 HA 亞型新型 A 型流感病毒專用檢測引子與探針對清單

HA	Forward primer	Reverse primer	Taqman probe
H1	H1F-1622-1643-yang	H1R-1698-1718-yang	H1P-1673-1696-yang
H2	H2F-1085-1105-yang	H2R-1188-1209-yang	IAV-H2-1142P-rc-mod
H3	H3F-1642-1661-yang	H3R-1723-1743-yang	H3P-1694-1715-yang
H4	H4F-1625-1646-yang	H4R-1738-1757-yang	H4P-1711-1733
H5	H5-1063Fw-mod	H5-1162Rv-mod	H5d-1088Probe-FAM
H6	H6-1578F-mod	H6R-1688-1706-yang	H6-1620P
H7	H7F1-1639-1658-yang H7F2-1639-1658-yang	H7R-1732-1751-yang	H7P-1660-1684-yang
H8	H8F-1631-1648-yang	H8R-1682-1700-yang	H8P-1651-1672
H9	H9-For (2008)-mod2	H9-Rev (2008)-mod	H9-Probe (2008)
H10	H10F-1564-1583-yang	H10R-1675-1695-yang	H10P-1603-1625-yang
H11	H11F-1625-1645-yang	H11R-1721-1741-yang	H11P-1647-1668-yang
H12	H12F-1617-1637-yang	H12R-1690-1709-yang	H12P-1651-1673
H13	H13F-1589-1608-yang H13F-1607-1626-yang	H13R-1679-1698-yang	H13P-1649-yangLNA
H14	H14F-1628-1648-yang	H14R-1698-1718-yang	H14P-1654-1677-yang
H15	H15F-1633-1653-yang	H15R-1714-1734-yang	H15P-1683-1701-yang
H16	H16F-1638-1660-yang	H16R-1718-1738-yang	H16P-1682-1705-yang

表二、各 NA 亞型新型 A 型流感病毒專用檢測引子與探針對清單

NA	Forward primer	Reverse primer	Taqman probe
N1	N1F3-1345-1364-yang N1F4-1348-1367-yang	N1R-1427-1448-yang	N1P-1402-1426-yang
N2	IAV-N2-1376F-mod	N2R-1428-1448-yang	N2P-1380-1404-yang
N3	N3F-1348-1370-yang	N3R-1417-1437-yang	N3P-1372-1394-yang
N4	N4F-1339-1359-yang	N4R-1421-1441-yang	N4P-1374-1395-yang
N5	N5F-1385-1406-yang	N5R-1441-1463-yang	N5P-1408-1431-yang
N6	N6-141F-yang	N6-307R-mod2	N6-209P-yang
N7	N7F-1363-1382-yang	N7R-1425-1444-yang	N7P-1387-1411-yang
N8	N8F-1352-1372-yang	N8R-1422-1442-yang	N8P-1398-1420-yang
N9	N9F-1370-1389-yang	N9R-1432-1451-yang	N9P-1403-1427-yang

表三、建立 real-time RT-PCR 所使用之新型 A 型流感病毒陽性對照組清單

Subtype	Virus strain name
H1N1	A/PR/8/34 (H1N1)
H2N2	A/Singapore/1/57 (H2N2)
H3N8	A/duck/Ukraine/1/63 (H3N8)
H4N6	A/duck/Czech/56 (H4N6)
H5N3	A/duck/Hong Kong/820/80 (H5N3)
H6N5	A/shearwater/Australia/1/72 (H6N5)
H7N2	A/duck/ Hong Kong /301/78 (H7N2)
H8N4	A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)
H9N2	A/turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)
H10N7	A/chicken/Germany/N/49 (H10N7)
H11N8	A/duck/England/56 (H11N6)
H12N5	A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)
H13N6	A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)
HPAI H5	A/chicken/Taiwan/CH/f29/2015 (H5N8)
HPAI H5	A/waterfowl/Taiwan/1702004/2017(H5N6)
H14N5	A/duck/Taiwan/WB3427/2016(H14N5)
H1N9	A/duck/Taiwan/WB3330/2016(H1N9)
H1N1	A/duck/Taiwan/WB3130/2015 (H1N1)

表四、新型流感病毒 real-time RT-PCR HA 亞型檢測平台完成清單

HA subtype	Detection format	
	SYBR Green I	Taqman Probe
H1	✓	✓
H2	✓	✓
H3	✓	✓
H4	✓	✓
H5		✓
H6		✓
H7	✓	✓
H8	✓	✓
H9	✓	✓
H10	✓	✓
H11	✓	✓
H12	✓	✓
H13		✓
H14	✓	✓
H15	✓	✓
H16	✓	✓

表五、新型流感病毒 real-time RT-PCR NA 亞型檢測平台完成清單

NA subtype	Detection format	
	SYBR Green I	Taqman Probe
N1	✓	✓
N2	✓	✓
N3	✓	✓
N4	✓	✓
N5	✓	✓
N6	✓	✓
N7	✓	✓
N8	✓	✓
N9	✓	✓

表六、16 種 real-time RT-PCR HA 分型試驗之檢測特異性

Virus	WHO-A	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14
A/PR/8/34(H1N1)	24.73	31.11													
A/duck/Taiwan/WB3130/2015(H1N1)	28.3	28.88										38.78			
A/duck/Taiwan/WB3330/2016(H1N9)	21.46	23.79													
A/Singapore/1/57(H2N2)	34.48		32.04			36.23									
A/duck/Ukraine/1/63(H3N8)	28.66			27.07											
A/duck/Czech/56(H4N6)	29.04				31.67										
A/Vietnam/1194/2004(H5N1, RG14)	24.7		31.61			29.54									
A/Indonesia/2/2005(H5N1, RG2)	24.67		32.65			27.74									
A/waterfowl/Taiwan/1702004/2017(H5N6)	25.26		32.45			34.67									
A/duck/Hong Kong/820/80(H5N3)	25.18					28.47									
A/shearwater/Australia/1/72(H6N5)	23.04						26.69								
A/Taiwan/2/2013(H6N1)	35.85						31.07								
A/duck/ Hong Kong /301/78(H7N2)	25.8							28.68							
A/turkey/Ontario/6118/68(H8N4)	31.82								29.7						
A/turkey/Wisconsin/1/66(H9N2)	30.89									29.89					
A/chicken/Germany/N/49(H10N7)	24.61										30.57				
A/duck/England/56(H11N6)	29.44											27.73			
A/duck/Alberta/60/76(H12N5)	30.62												28.3		
A/gull/Maryland/704/77(H13N6)	30.73													32.89	
A/duck/Taiwan/WB3427/2016(H14N5)	25.66														28.9

表七、9 種 real-time RT-PCR NA 分型試驗之檢測特異性

Virus	WHO-A	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9
A/PR/8/34(H1N1)	24.73	28.18								
A/duck/Taiwan/WB3130/2015(H1N1)	28.3	31.5								
A/duck/Taiwan/WB3330/2016(H1N9)	21.46									23.13
A/Singapore/1/57(H2N2)	34.48				38.51					
A/duck/Ukraine/1/63(H3N8)	28.66								28.61	
A/duck/Czech/56(H4N6)	29.04									
A/Vietnam/1194/2004(H5N1, RG14)	24.7	29.87								
A/Indonesia/2/2005(H5N1, RG2)	24.67	28.28								
A/waterfowl/Taiwan/1702004/2017(H5N6)	25.26							37.76		
A/duck/Hong Kong/820/80(H5N3)	25.18				28					
A/shearwater/Australia/1/72(H6N5)	23.04						29.83			
A/Taiwan/2/2013(H6N1)	35.85	33.52								
A/duck/ Hong Kong /301/78(H7N2)	25.8				31.02					
A/turkey/Ontario/6118/68(H8N4)	31.82					36.15				
A/turkey/Wisconsin/1/66(H9N2)	30.89				32.55					
A/chicken/Germany/N/49(H10N7)	24.61							31.57		
A/duck/England/56(H11N6)	29.44									
A/duck/Alberta/60/76(H12N5)	30.62							32.13		
A/gull/Maryland/704/77(H13N6)	30.73									
A/duck/Taiwan/WB3427/2016(H14N5)	25.66							35.32		