

計畫編號：DOH99-DC-2015

行政院衛生署疾病管制局 99 年度科技研究發展計畫

建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：林智暉

協同主持人：鄭如茜、林貴香

研究人員：張慧文

執行期間：99 年 1 月 1 日至 99 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
目 錄	2
一、 中文摘要	4
二、 英文摘要	5
三、 前言	4
四、 材料與方法	10
五、 結果	14
六、 討論	21
七、 計畫重要研究成果及具體建議	24
八、 參考文獻	25
九、 圖、表	31
	共(37)頁

一、中文摘要

疾病管制局之法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統、及症狀監測系統等，對目前常見感染症之流行狀況提供豐富及全面的資訊，然而在已建立的呼吸道病原體偵測基礎下，仍有些許包括呼吸道群聚感染，不明原因肺炎患者甚至因呼吸道感染導致重症或死亡的個案，仍無法檢測出致病原。本局在過去已建置有呼吸道病毒快速檢驗系統，可快速偵測包括 A 型、B 型流感病毒、RSV、Adenovirus、HSV、以及其他如 SARS 等病毒。但至今尚有許多臨床上具有明顯呼吸道感染症狀，但經由對已知病原體檢驗結果卻為陰性的未知感染原檢體有待確認，為能及時偵測未知或新興感染症之病原體，需針對一般檢驗無法確定病原之感染症患者再建立更完備的即時性檢驗平台。

本計劃今年度已建置包括 A 型、B 型流感病毒、RSV、Adenovirus、HSV、human bocavirus (HBoV)、human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)、human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)、human polyomavirus KI (KIPyV) 以及 human polyomavirus WU (WUPyV) 等包含例行性呼吸道病毒以及新興病毒之快速同步偵測平台，以健全呼吸道病毒檢驗方法，同時可大幅縮短病毒多重檢驗的時間。而由於這些新興呼吸道病毒大部份均無法進行體外培養系統，利用所建立之多重病毒同步偵測平台，以及製備各新興病毒的檢驗陽性對照標準品，以解決檢驗結果判讀比對之問題，同時藉由同步偵測平台，快速釐清致病因，降低民眾恐慌。

關鍵字：新興呼吸道病毒、同步偵測、台灣

二、英文摘要

Acute respiratory tract infection (ARTI) is a leading cause for hospitalization of infants and young children and accounts for hundred thousand hospitalizations a year in Taiwan. The most important viral agents are influenza viruses, respiratory syncytial virus (RSV), parainfluenza viruses, adenoviruses, rhinoviruses, coronaviruses, and human metapneumovirus. In comprehensive studies of the etiology of ARTI, no etiologic agent has been found in 12-39% of cases, which suggests that additional unknown agents may be involved in the etiology of ARTI. And, more recently, a renewed interest in coronaviruses after the severe acute respiratory syndrome(SARS) epidemic has led to the characterization of two coronavirus species (HKU1 and NL63) associated with ARTI.

In this study, we try to build up a general strategy for molecular virus screening of clinical samples and the systematic screening of a set of respiratory tract samples resulting in the discovery and characterization of the new emerging respiratory viruses, including human bocavirus (HBoV), human Coronavirus-HKU1 (HcoV-HKU1), human Coronavirus-NL63 (HcoV-NL63), human polyomavirus KI (KIPyV), and human polyomavirus WU (WUPyV).

Key words : New identified respiratory virus, detection assay, Taiwan

三、前言

隨著全球化的迅速發展，國際間往來密集，各種新興急性傳染病可能由區域性疾病的發展，演變成全球性的傳播，威脅公共衛生和人類的健康，且造成社會大眾的恐慌；面對變化及傳播快速的傳染病，如何在有限的時間內，運用可行的檢驗技術或平台正確而快速的偵測出感染原，防止疫情擴散，實為當前重要的課題。1997 年的 H5N1、2003 年的 SARS-CoV 及 2009 年的 pandemic H1N1，均為首先出現於社區之新興傳染病，顯示即時且完整的監測及病原體診斷系統之重要性。疾管局已建置包括法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，並加強致病原的檢驗技術，然仍有許多感染症病患無法得到確切診斷。為能及時偵測未知或新興感染症，需針對一般檢驗無法確定病原之感染症患者建立檢驗平台。

病毒性的呼吸道感染症在兒童與嬰兒是很常見的，對於老人、成人、心肺疾病患者及免疫不全之患者，都有可能發展出嚴重的疾病(Wang et al., 2004)，病毒性呼吸道感染症中以 RSV、PIV 及 Influenza 最常見(Osiowy et al., 1998; Templeton et al., 2004; Morris et al., 1996)，另外約有 10% 的孩童感染肺炎是 Adenovirus 所造成(World Lung Foundation, 2010;)。急性呼吸道感染(acute respiratory tract infection ARTI)是世界性重要的罹病率與致死率極高的疾病，尤其是孩童，在十歲之前會重複性感染不同的感染源。根據 2010 年世界肺臟基金會 (World Lung Foundation) 發表的「急性呼吸道感染解說」(Acute Respiratory Infections Atlas) 報告指出，急性呼吸道感染至今平均每年於全球奪走超過 425 萬條人命，約佔全球每年死亡總人數的

6%，其中 160 萬位 5 歲以下兒童因肺炎而死亡，同時也造成 165 萬 60 歲以上的老人以及 15-59 歲的青壯年 50 萬人的死亡(Arnold et al., 2008)。然而呼吸道感染的案例中，仍有高達 40% 以上的比例無法確認感染源(Sloot et al., 2008; Arden et al., 2006; Kahn, 2007; Chieochansin et al., 2010)。

傳統呼吸道感染的診斷包括細胞培養、病毒抗原偵測、如直接螢光染色(direct immunofluorescent assay, DFA)、及分生檢測技術，如 PCR 或 RT-PCR。其中，流行性感冒病毒為台灣地區，尤其在冬季的重要呼吸道致病源(7-8)。為因應流感大流行，本單位已針對流感病毒建立完善的偵測方式並推廣至各合約實驗室。然而，除了流感病毒外，其他一般傳統呼吸道病毒還包括呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、鼻病毒(rhinoviruses, HRV)、副流感病毒(parainfluenza, PIV)、腺病毒(adenovirus, ADV)等；目前仍以傳統培養方法進行病原分離，同時僅能以傳統 PCR 及螢光染色方法進行病原體種類的鑑定。

本局原有的例行性呼吸道病毒檢驗，以傳統的病毒細胞培養分離方法，配合分生技術偵測，仍有 40-60% 的呼吸道病毒是偵測不出致病源(Sloot et al., 2008)。2001 年後，陸續有一些新興的呼吸道病毒被偵測出來，包括包括 human metapneumovirus,(HMPV), 3 種 new human coronaviruses,(HCoV, SARS, NL63, HKU1)及 human bocavirus(HBoV), 及 2007 年新發現的 human polyomavirus KI (KIV), WU(WUV)等(Louie et al., 2005; Sloot et al., 2008; Arden et al., 2006; Kahn, 2007; van den Hoogen et al., 2001)，暗示在偵測不出致病源的呼吸道檢體中，可能有一些尚未鑑定出的致病源，可能就包括這些新興的呼吸道病毒，且由於檢測技術方法不斷

的研發，新興病毒的種類與次型別仍不斷的被鑑定出(Ksiazek et al., 2003; Gaynor et al., 2007; ven den Hoogen et al., 2004; Lin et al., 2009; Chieochansin et al., 2010)。

HBoV 為主要是由瑞典科學家以分子生物技術所發現的一個新興病毒 (Allander et al., 2005)。由於 2005 年 Allander 等人的初步的演化樹分類，國際病毒分類委員會 (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) 暫時將 HBoV 分在 *Parvoviridae* 科、*Parvovirinae* 亞科、*Bocavirus* 屬。HBoV 的病毒體的構造含有四個功能蛋白以及一條線性單股 DNA，不具有外套膜，為大小約直徑 22-24nm 的對稱性二十面體。HBoV 基因體全長共 5299 個核苷酸，共有 3 個 ORF，分別轉譯為 single nonstructural protein (NS1)、NP-1 以及兩個 capsid protein (VP1 以及 VP2)。capsid protein 是外殼蛋白的重要結構，在病毒組裝過程中扮演重要的角色 (Allander et al., 2005; Chieochansin et al., 2007)。HBoV 在世界各地都有傳出感染的案例，於呼吸道感染的病人之呼吸道分泌物檢體當中，盛行率由 1.5~18.3% 不等 (Allander, 2008)。關於 HBoV 發生季節性的研究有許多不同的結果 (Allander et al., 2007b; Bastien et al., 2006; Bastien et al., 2007; Fry et al., 2007; Kesebir et al., 2006; Manning et al., 2006)，但綜合所有的研究，HBoV 並沒有明顯的發生季節。

自 2003 年 SARS 病毒爆發流行後，全球對於 human coronavirus 的研究便趨於積極，而除了自 1960 年代即由人類檢體分離得到的 HCoV-229E 以及 HCoV-OC43 以外，2005 年又有 HCoV-HKU1 以及 HCoV-NL63 等 (Pyrce et al., 2004; van der Hoek et al., 2004; Woo et al., 2005a)。HCoV 陸續在嬰幼兒及成年人的上呼吸道 (URTIs) 以及下呼吸道 (LRTIs) 檢體中被偵測

到(Dominguez et al., 2009; Woo et al., 2005a)，臨床症狀包括支氣管發炎、肺炎、腹瀉、發燒、咳嗽等。HCoV-HKU1 與 HCoV-NL63 均屬於冠狀病毒屬 (Genus Coronavirus)，其中 HCoV-HKU1 與 HCoV-OC43 病毒屬於 group2a，而 HCoV-NL63 則與 HCoV-229E 均屬於 group1，與 Bat-CoV, F-CoV (feline coronavirus)等 coronavirus 屬於同一個 group (Woo et al., 2009)，病毒基因全長依各 HCoV 病毒的不同而有所差異，總體而言基因體約有 28~30K，為 positive single-strand RNA 基因體。研究顯示 HCoV 病毒於呼吸道感染的盛行率約為 1%-10% (van der Hoek et al., 2005; Woo et al., 2005b)

2007 年新發現兩種 human polyomavirus，並依照發現他們的機構瑞士 Karolinska Institute 以及美國 Washington University 而命名為 KI polyomavirus (KIPyV)以及 WU polyomavirus (WUPyV)(Allander et al., 2007a; Gaynor et al., 2007)。Polyomavirus 病毒體很小，為不具有外套膜的對稱性二十面體，內部基因體組成為 supercoiled double-strand DNA (Imperiale, 2007)。病毒體有主要的外鞘蛋白 VP1，由 72 個 pentamer 組成，而每個 pentamer 又帶有小的鞘膜蛋白 VP2 或 VP3 (Liddington et al., 1991; Stehle and Harrison, 1996)。Polyomavirus 的寄主範圍很有限，已知的 Polyomavirus BKV 以及 JCV 便僅在人類身上被發現會導致疾病 (Dalianis et al., 2009)。

在 KIPyV 以及 WUPyV 病毒均由鼻腔清洗液 (nasopharyngeal aspirates, NPA) 檢體中被發現後，病毒的基因便陸續全球各地的呼吸道檢體中被偵測到(Abed et al., 2007; Bialasiewicz et al., 2009; Han et al., 2007; Norja et al., 2007; Payungporn et al., 2008)，目前雖無直接證據顯示 KIPyV

以及 WUPyV 與人類疾病間的直接關聯性，但根據研究顯示，KIPyV 的疾病盛行率約為 0.5%-3%，而 WUPyV 的盛行率約為 1%-9% (Le et al., 2007; Mourez et al., 2009; Ren et al., 2009)。而且依據 Nguyen 等人進行 KIPyV 以及 WUPyV 的血清流行病學 (seroepidemiology) 調查結果顯示在 419 位年齡 6 個月-79 歲的受測者中，約有 80% 的人被檢測出有 WUPyV 的抗體，而對 KIPyV 有抗體的受測者也有接近 70%，顯示 KIPyV 以及 WUPyV 已經普遍在於人類族群之中 (Nguyen et al., 2009)，而其在呼吸道病原中所扮演的角色，仍陸續在進行研究。

由於目前已發現的新興病毒包括 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63 以及 KIPyV、WUPyV 等病毒目前均仍無法進行體外培養，故檢體量是這些新興呼吸道病毒檢驗上最大的瓶頸。建置並發展這些新興病毒的同步偵測方法，不但可減低檢測這些病毒的檢體消耗量，大幅縮減目前未知病源的檢體偵測時間，減低群聚或大規模流行時可能引起的民眾的恐慌。此外，若能再結合傳統已建立的呼吸道致病原，建立同步偵測技術，將可完善呼吸道病毒的快速檢驗，以作為防疫政策的參考依據。

四、材料與方法

1. 新興病毒的基因資料收集及核酸引子設計

至 NCBI 基因資料庫中收集已發表的各新興病毒序列，經由 MEGA4 序列分析軟體進行排比分析（alignment）(Tamura et al., 2007)之後，針對病毒的具特異性的區域進行目標基因設定，並以 SCPrimer 軟體進行 multiple alignment 核酸引子對設計(Jabado et al., 2006)。

2. 檢體收集

所使用的檢體包括一、疑似呼吸道感染檢體，採集病患咽喉部位檢體進行檢測；二、通報呼吸道感染重症，但在例行性檢驗中檢測不出病原體的送驗個案，所使用的檢體依照送驗程序種所採檢的檢體項目；三、經病毒性合約實驗室檢測，無法檢測或無法分型的檢體。在低溫狀態下送至疾病管制局研究檢驗中心進行檢測。

3. 檢體前處理

將咽喉拭子檢體與內含 0.5 ml 運送培養基充分攪拌(vortex)，使病毒自棉棒脫離至培養基中，將培養液取出置於 1.5 ml Nalgene 檢體保存管中，取出欲進行核酸萃取的檢體量外，其餘檢體均冰存至-80°C 冷凍櫃保存。

4. 病毒核酸萃取

病毒核酸萃取方式以商業化試劑（包括 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini kit、QIAamp viral RNA Kit）萃取，步驟依照試劑所建議的操作程序進行，操作步驟簡述如下：

(1) QIAamp DNA Mini kit：

- A. 20 μ l proteinase K 與 200 μ l 檢體混合，檢體混合液加入 200 μ l AL，於 56 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。
- B. 10 分鐘後作用完成，加入 200 μ l 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000rpm 1 分鐘。
- C. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500 μ l，離心 8000rpm 1 分鐘。
- D. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500 μ l，離心 14000rpm 3 分鐘。
- E. 將 column 置於以標示完整之 1.5ml 離心管，加入 150 μ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20 $^{\circ}$ C 備用。

(2) QIAamp viral RNA Kit :

- A. 560 μ l 之 carrier RNA+ AVL 混合液與 140 μ l 檢體混合均勻，室溫靜置 10 分鐘
- B. 10 分鐘後，加入 560 μ l 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000rpm 1 分鐘。
- C. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500 μ l，離心 8000rpm 1 分鐘。
- D. 丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500 μ l，離心 14000rpm 3 分鐘。
- E. 將 column 置於以標示完整之 1.5ml 離心管，加入 50 μ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20 $^{\circ}$ C 備用。

5. 核酸引子對專一性分析

將針對各新興病毒所設計的核酸引子對，與目前現有的所有呼吸道病毒包括 influenza A virus、influenza B virus、RSV、Adenovirus、Parainfluenza virus 1~3 以及 HSV 以及其他新興病毒等進行 PCR 連鎖反應，確認核酸引子對不會夾出對目標病毒以外的基因片段。

6. 病毒核酸增幅放大反應

以 Qiagen one-step RT-PCR 試劑組進行核酸複製反應，操作程序依照試劑組建議進行。每一反應均加入 10 μ l 之 5X buffer 以及 Q-solution，dNTP 以及 Enzyme mix 均加入 2 μ l，針對各病毒設計之專一性核酸引子均加入 3 μ l，以純化之病毒 DNA 或 RNA 5 μ l 作為複製模板（template），反應最終體積為 50 μ l。反應條件依據各病毒核酸引子對設計不同而條件各異。反應完成後以 1.5% Agarose 進行核酸膠體電泳確認複製片段。進行下一步驟前，產物均存放於 4 $^{\circ}$ C。

7. PCR 產物純化

以 Qiagen 廠牌之 QIAquick Purification Kit 進行複製片段之純化，操作程序依照試劑組建議進行。將產物加入 5X 體積之 PB 溶液，之後加入試劑組所附之 column 中，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，再加入 750 μ l 之 PE 溶液，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，丟棄離出液，之後以 DEPC 水將產物溶出，進行序列分析用。

8. 核酸定序

利用 ABI 3130xl sequence analyzer 進行核酸序列的分析。以 BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（AB applied biosystem company）試劑組進行定序。操作程序依照試劑組建議進行，將 BigDye Terminator v3.1 與

5X buffer 依照分析片段比例混合後，加入 1 μ l 反應核酸引子，再加入 2 μ l 純化之 cDNA 模板之後，以 95 $^{\circ}$ C 5 秒、60 $^{\circ}$ C 4 分鐘進行 25 個循環的反應。之後以 100% 酒精沉澱後風乾，再將反應產物溶於 HiDi-Formamide 後，加入 96 孔反應盤上機。

9. 序列比對及分析

得到的序列至 NCBI 基因資料庫進行 BLAST 之後，確認病毒種類，並將序列與已發表的新興病毒進行序列排比與分析，以了解台灣病毒與其他已發表序列間的相似性及演化分析。

五、結果

一、目標基因片段選取及偵測之核酸引子對設計

將各 alignment 好的病毒選擇序列保守性較高的基因片段，為配合 real-time PCR 以及 real-time RT-PCR 的實驗條件需求，故選取小於 500 bp 以下的目標基因片段，進行核酸引子對設計。以 HBoV 病毒為例，將所有病毒的完整序列進行排比後，進行序列相似度的比對，之後篩選出序列差異較大的病毒序列，進行排比後選擇序列保守性較高的基因片段，進行引子設計。最後 HBoV 病毒所選擇目標基因位於 NS1 gene 基因片段；HCoV-HKU1 病毒選擇位於 polymerase gene 基因片段；HCoV-NL63 病毒同樣選取位於 polymerase gene 基因片段；KIPyV 病毒以及 WUPyV 病毒則均選取位於 VP1 gene 片段做為目標基因。

二、各新興病毒核酸引子對專一性測試

2.1. HBoV 病毒

將病毒核酸純化後以對 HBoV 具專一性的核酸引子進行 PCR 反應，反應條件為反應條件為 94°C 3 分鐘進行 denature，之後以 94°C 1 分鐘、54°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長（final elongation），結果如圖一(A) lane 3 所示，所設計的核酸片段均可將目標基因片段順利複製出（產物片段長度為 352bp），並且沒有非專一性的產物（nonspecific band）出現。

將針對 HBoV 所設計的的核酸引子，與 HCoV-HKU1、HCoV-NL63 以及 KIPyV、WUPyV 等新興呼吸道病毒及其他目前於例行性檢驗中可分離到的其他呼吸道病毒如 influenza A virus、influenza B virus、RSV、

Parainfluenza virus、Adenovirus 以及 HSV 等病毒核酸進行引子專一性的檢測，檢測結果如圖二所示，並無非特異性片段被複製出。

2.2. HCoV-HKU1 病毒

將病毒核酸純化後以對 HCoV-HKU1 具專一性的核酸引子進行 PCR 反應，反應條件為反應條件為 50°C 30 分鐘，95°C 15 分鐘，之後以 95°C 1 分鐘、48°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長（final elongation）結果如圖一(A) lane 2 所示，所設計的核酸片段均可將目標基因片段順利複製出（產物片段長度為 440bp），沒有 nonspecific band 產生。

將針對 HCoV-HKU1 所設計的的核酸引子，與 HBoV、HCoV-NL63 以及 KIPyV、WUPyV 等新興呼吸道病毒及其他目前於例行性檢驗中可分離到的其他呼吸道病毒如 influenza A virus、influenza B virus、RSV、Parainfluenza virus、Adenovirus 以及 HSV 等病毒核酸進行引子專一性的檢測，檢測結果無非特異性片段被複製出。

2.3. HCoV-NL63 病毒

將病毒核酸純化後以對 HCoV-NL63 具專一性的核酸引子進行 PCR 反應，反應條件為反應條件為 50°C 30 分鐘，95°C 15 分鐘，之後以 95°C 1 分鐘、48°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長（final elongation），結果如圖一(B) 所示，所設計的核酸片段均可將目標基因片段順利複製出（產物片段長度為 441bp），經由 1.5% Agarose 電泳進行 30 分鐘後偵測結果亦無 nonspecific band 產生。

將針對 HCoV-NL63 所設計的的核酸引子，與 HBoV、HCoV-HKU1 以及 KIPyV、WUPyV 等新興呼吸道病毒及其他目前於例行性檢驗中可分離到的其他呼吸道病毒如 influenza A virus、influenza B virus、RSV、Parainfluenza virus、Adenovirus 以及 HSV 等病毒核酸進行引子專一性的檢測，檢測結果無非特異性片段被複製出。

2.4. KIPyV 病毒

將病毒核酸純化後以對 KIPyV 具專一性的核酸引子進行 PCR 反應，反應條件為反應條件為 94°C 3 分鐘進行 hot start denature，之後以 94°C 1 分鐘、60°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長（final elongation），結果如圖一(C) lane 2 所示，所設計的核酸片段均可將目標基因片段順利複製出（產物片段長度為 145bp），沒有 nonspecific band 產生。

將針對 KIPyV 所設計的的核酸引子，與 HBoV、HCoV-NL63 以及 HCoV-HKU1、WUPyV 等新興呼吸道病毒及其他目前於例行性檢驗中可分離到的其他呼吸道病毒如 influenza A virus、influenza B virus、RSV、Parainfluenza virus、Adenovirus 以及 HSV 等病毒核酸進行引子專一性的檢測，檢測結果並無非特異性片段被複製出。

2.5. WUPyV 病毒

將病毒核酸純化後以對 WUPyV 具專一性的核酸引子進行 PCR 反應，反應條件為反應條件為 94°C 3 分鐘進行 denature，之後以 94°C 1 分鐘、58°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘條件進行 35 個循環，最後以 72°C 10 分鐘進行最終延長（final elongation），結果如圖一(C) lane 3 所示，所設計的核酸片

段均可將目標基因片段順利複製出（產物片段長度為 150bp），沒有 nonspecific band 產生。

將針對 WUPyV 所設計的核酸引子，與 HBoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1 以及 KIPyV 等新興呼吸道病毒及其他目前於例行性檢驗中可分離到的其他呼吸道病毒如 influenza A virus、influenza B virus、RSV、Parainfluenza virus、Adenovirus 以及 HSV 等病毒核酸進行引子專一性的檢測，無非特異性片段被複製出。

三、核酸引子對靈敏度測試

將病毒複製基因片段以 TOPO TA cloning (invitrogen corporation) 的方法將病毒基因片段接至 plasmid DNA (pCR®2.1-TOPO® vector) 中，以 DH5α competent cell 進行轉殖及挑選 clone，挑選正確菌株大量培養並純化以得到病毒 plasmid DNA 標準品。經檢測核酸吸光值並透過計算得到質體 DNA 的 copy 數之後，將 plasmid DNA 標準品以序列稀釋 (serial dilution) 的方式由 10^5 至 10^0 進行 10 倍稀釋，並以稀釋好的 plasmid DNA 做為 template，進行 PCR detection assay，檢測所設計的快速偵測系統之靈敏度檢測。其中 HBoV 病毒偵測系統之靈敏度偵測結果如圖三所示，靈敏度可達 1 個 copy/25μl (real-time PCR 反應體積)。而所有新興病毒建置之 real-time PCR 靈敏度偵測結果詳如表一所示，核酸偵測的靈敏度約在 1-10 copies/25μl，顯示所建置的快速偵測系統具有相當好的靈敏度。

依照同樣的方式將各新興病毒的 PCR 基因複製片段轉殖入 pCR®2.1-TOPO® vector 中，建置包括 HCoV-HKU1、HCoV-OC43、HCoV-NL63 以及 HCoV-229E、KIPyV 以及 WUPyV 等新興病毒的 DNA 標準品，亦經由

real-time PCR 檢測各系統的靈敏度，以確認各新興病毒檢測反應條件均達到 1-10 copies/25 μ L。

四、新興病毒的同步偵測

為建立例行性呼吸道檢測病毒，包括 influenza A virus、influenza B virus、parainfluenza I、II、III 以及 Adenovirus、RSV、HSV 以及包括 HBoV、HCoV、HMPV、以及 KIPyV、WUPyV 等新興病毒的同步偵測平台，我們將各已建置 PCR 偵測系統的以上各呼吸道病毒，混合各核酸引子，以 multiplex PCR 的方式進行評估及反應條件的最佳化設定，將針對各新興病毒所設計的核酸引子，先各以 10 μ M 的濃度進行 multiplex 反應的測試，先利用 gradient PCR，測試出對 multiplex primer 均最適當的反應溫度，再加以微調核酸引子的序列及濃度，最後以 5 μ M 的核酸引子，反應條件為 RT 50 $^{\circ}$ C 30 分鐘，denature 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘，再以 94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 1 分鐘、72 $^{\circ}$ C 2 分鐘的條件進行 35 個循環的複製，最後以 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘進行最終延長（final elongation）。分別以各呼吸道單一病毒的標準品，以 10⁴ copies/ μ L 的濃度進行 multiplex PCR 檢測，結果如圖四所示，所設計的核酸片段均可將目標基因片段順利複製出。而各新興病毒的詳細專一性及靈敏度的偵測結果，靈敏度可達 10-100 copies/ μ L。

然而為加強提高臨床檢體的靈敏度，以及面臨臨床檢體可能具有一種以上的病毒同時感染(dual infection)的情形，我們捨棄傳統利用探針引子的技術，以節省各病毒探針條件最佳化所需的耗材與時間，將各病毒已完成最佳化的核酸引子，以 bead array 的方式建置多重病毒同步偵測平台，以 suspension array 的方式，將各專一性的核酸引子分別標記螢光後，經由設定 PCR 條件，在完成增幅反應後以電腦系統判讀螢光數值，透過計算而

判定檢測結果。PCR 複製反應條件經測試後設定為 RT 50°C 40 分鐘，之後以 94°C 30 秒進行 template denature，再以 94°C 30 秒、52°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘的條件進行 15 個循環的第一階段複製反應，之後以 94°C 15 秒、70°C 90 秒進行 6 個循環的第二階段增幅反應；再以 94°C 15 秒、52°C 15 秒以及 72°C 15 秒進行第三階段的 PCR 產物複製，最後以 72°C 3 分鐘進行最終延長（final elongation），結果顯示各病毒標準品的監測可提高至 1-10 copies/25 μ l 的靈敏度，更提高臨床檢體的檢出率，而各新興病毒的詳細專一性及靈敏度的偵測結果，整理如表二所示，除 WUPyV、KIPyV 以及 RSV 病毒以外，靈敏度均可達 1-10 copies/ μ L，大幅提升檢測靈敏度。

五、2010 年呼吸道感染檢體檢測結果

將 2010 年截至 11 月 16 日止之疑似呼吸道感染檢體以建置之呼吸道多重病毒偵測平台進行呼吸道病毒檢測。共計 2012 支待測檢體中，檢測出包括流感病毒、腺病毒、副流感病毒、單純疱疹病毒，以及呼吸道融合病毒，等例行性呼吸道檢測病毒，同時也檢測到包括 HCoV-HKU1 病毒，HCoV-NL63 病毒、HCoV-OC43 病毒、HCoV-229E 病毒以及 HBoV 病毒，肺間質病毒(human metapneumovirus)等新型病毒，詳如表二所示。整體而言呼吸道病毒的檢出陽性率為 6.67%，其中去除送驗為血清檢體，在咽喉拭子、痰液以及鼻腔沖洗液等較可能採檢至病原體的檢體共計 290 支檢體中，共有 134 支陽性的檢體被檢出，檢出率達到 46%，而其中新興病毒陽性率約為 8.17%。而這些新興病毒經檢測並沒有跟其他流感、新流感、腺病毒等其他呼吸道病毒有共同感染（coinfection）的情形發生。顯示新興呼吸道病毒的檢測方法，可協助解決具有呼吸道病徵的患者檢體中，原本分離不出病原體的窘境，同時也顯示新興病毒在台灣地區確實有存在，但各病毒的流行資訊以及盛行率，仍待全國性的調查，以建立台灣呼吸道病

毒的流行資料庫。

六、討論

本計畫今年度建置各新興病毒包括 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、KIPyV 以及 WUPyV 等及其他例行性呼吸道病毒之多重病毒同步偵測平台，經由與目前例行性檢驗常見之呼吸道病毒包括 influenza virus、parainfluenza virus、Adenovirus、HSV、RSV 以及已檢測到新興病毒進行專一性檢測，均無非特異性的 PCR 產物產生，顯示所使用的各病毒核酸引子的專一性效果良好。而經由已建置的新興病毒標準品 DNA 及檢測到的臨床檢體進行檢測的靈敏度與專一性評估，結果顯示大部分的呼吸道病毒偵測方法的靈敏度約在 1-10 copies 之間，與各自獨立的 real-time 快速偵測方法靈敏度及專一性的結果相當，同時也與過去國際間已發表研究的靈敏度效果相近(Bialasiewicz et al., 2007; Dare et al., 2007; Lu et al., 2006)。然而由於同步偵測平台可同時偵測多重呼吸道病毒病原體，在檢測未知檢體的時效性，以及節省檢體用量上，具有更大的實質助益。

利用已建置的多重病毒檢測平台，針對 2010 年疑似呼吸道病毒檢體共 2012 支進行初步篩檢，透過 PCR 檢測以及複製片段之核酸定序比對，結果共檢測出 134 支陽性病毒株，陽性率約 6.67%，其中 1722 支檢體種類為血清檢體，根據已發表文獻顯示，這些呼吸道病毒包含新興病毒會造成病毒血症(Viremia)的機率很低(Osiowy et al., 1998; Templeton et al., 2004; Morris et al., 1996)，而本實驗以血清檢體進行呼吸道病毒及新興病毒的篩檢，確實也未發現有新興病毒或例行性呼吸道病毒的存在。其中 HCoV 病毒群，包括 HCoV-HKU1 病毒、HCoV-NL63 病毒、HCoV-OC43 病毒，以及 HCoV-229E 病毒，其陽性率為 3.74%，與過去研究顯示 HCoV 於呼吸道感染的盛行率約為 1%-10%的結果相符 (van der Hoek et al.,

2005; Woo et al., 2005b; McIntosh et al., 1970)，較前一年計畫執行的 0.2% 高出將近 10 倍，推測可能原因由於去年度初建置新病毒的快速偵測系統，實驗條件的專一性良好，但靈敏度略低，藉由今年計畫的持續執行，除配合最佳化同步實驗條件的設定外，也利用核酸引子的序列微調，建置多病毒同步偵測平台，經以軟體經過精密與判讀，使得以提高檢測結果的陽性率，同時 HCoV 目前已發表的 5 種次型別（包含 SARS、OC43、229E、HKU1 以及 NL63）(Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007; Woo et al., 2005b)，在今年的檢測中均有偵測到，顯示冠狀病毒在台灣的呼吸道病毒群中，應有一定的比例持續感染人類，鑒於 2003 年 SARS 冠狀病毒的爆發流行，造成數百人感染致死的慘痛經驗，冠種病毒的持續進行檢體之收集與偵測實屬必要。

另目前初步結果顯示，檢出的新興病毒與其他呼吸道病毒並沒有共同感染（coinfection）的現象發生，這與部分過去針對這些新興病毒的盛行率研究分析的結果有所差異(Abed et al., 2007; Chieochansin et al., 2008; Dominguez et al., 2009; Kesebir et al., 2006; Le et al., 2007)，推測原因可能為因樣本數太少，僅 11 支新興病毒被偵測到，故所計算的陽性率無法真實反應真正相關資訊，需等累積更多新興病毒的流行病學資料，方能進行後續分析，了解台灣這些新興病毒的盛行率。

目前全球所發現的新興病毒，有許多均無法進行體外培養，受限於檢體量的限制，在疑似呼吸道病毒感染檢體例如咽喉拭子等進入實驗室進行檢測時，經由常見例行性呼吸道病毒檢測之後，檢體已所剩無幾，若再單獨進行各種新興病毒檢測，不但將嚴重降低剩餘檢體量，且若篩出新興病毒，也將無足夠檢體進行病毒基因全長定序分析，了解病毒間的

序列相似性等生物資訊。本計畫目前已建置多重病毒針測平台，可避免一般傳統 multiplex PCR 所會產生相互干擾或可能產生的互黏情形等影響偵測效果，進一步將可用的檢體資源做更多流病資訊的分析，提升新興病毒基礎流行病學檢驗量能。同時將持續更新新發現的新興呼吸道病毒，以納入同步偵測平台，健全呼吸道病毒即時同步檢測。

七、計畫重要研究成果及具體建議

1.計畫之新發現或新發明

建置台灣呼吸道病毒包括 influenza virus、Adenovirus、RSV、HSV、parainfluenza virus 以及 human bocavirus (HBoV)、human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)、human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)、human polyomavirus KI (KIPyV)以及 human polyomavirus WU (WUPyV)等多重呼吸道病毒快速同步偵測平台

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

了解新興呼吸道病毒的感染率，以降低民眾對未知病毒性呼吸道感染症的恐懼及未明原因呼吸道感染的疑惑。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

1. 藉由新興病毒檢測系統之建置，可瞭解該等病毒之盛行率，建立更為完整之臺灣各類呼吸道病毒流行病學資料。
2. 透過快速檢驗，可及時得知該等病毒之流行趨勢，做為流行預警之參考，於防治實務具有助益。

八、参考文献

- Abed, Y., Wang, D. and Boivin, G. (2007) WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg Infect Dis* 13(12), 1939-41.
- Albuquerque, M.C., Pena, G.P., Varella, R.B., Gallucci, G., Erdman, D. and Santos, N. (2009) Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15(5), 806-8.
- Allander, T. (2008) Human bocavirus. *J Clin Virol* 41(1), 29-33.
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M.A., Dalianis, T., Ramqvist, T. and Andersson, B. (2007a) Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81(8), 4130-6.
- Allander, T., Jartti, T., Gupta, S., Niesters, H.G., Lehtinen, P., Osterback, R., Vuorinen, T., Waris, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., van den Hoogen, B.G., Hyypia, T. and Ruuskanen, O. (2007b) Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 44(7), 904-10.
- Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A. and Andersson, B. (2005) Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(36), 12891-6.
- Bastien, N., Brandt, K., Dust, K., Ward, D. and Li, Y. (2006) Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 12(5), 848-50.
- Bastien, N., Chui, N., Robinson, J.L., Lee, B.E., Dust, K., Hart, L. and Li, Y. (2007) Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 45(2), 610-3.
- Biacchesi, S., Skiadopoulos, M.H., Boivin, G., Hanson, C.T., Murphy, B.R., Collins, P.L. and Buchholz, U.J. (2003) Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 315(1), 1-9.
- Bialasiewicz, S., Whiley, D.M., Lambert, S.B., Gould, A., Nissen, M.D. and Sloots, T.P. (2007) Development and evaluation of real-time PCR assays

- for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol* 40(1), 9-14.
- Bialasiewicz, S., Whiley, D.M., Lambert, S.B., Nissen, M.D. and Sloots, T.P. (2009) Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol* 45(3), 249-54.
- Chieochansin, T., Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Hiranras, T., Samransamruajkit, R., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. (2007) Complete coding sequences and phylogenetic analysis of Human Bocavirus (HBoV). *Virus Res* 129(1), 54-7.
- Chieochansin, T., Samransamruajkit, R., Chutinimitkul, S., Payungporn, S., Hiranras, T., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. (2008) Human bocavirus (HBoV) in Thailand: clinical manifestations in a hospitalized pediatric patient and molecular virus characterization. *J Infect* 56(2), 137-42.
- Dalianis, T., Ramqvist, T., Andreasson, K., Kean, J.M. and Garcea, R.L. (2009) KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin Cancer Biol* 19(4), 270-5.
- Dare, R.K., Fry, A.M., Chittaganpitch, M., Sawanpanyalert, P., Olsen, S.J. and Erdman, D.D. (2007) Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Infect Dis* 196(9), 1321-8.
- Dominguez, S.R., Robinson, C.C. and Holmes, K.V. (2009) Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J Med Virol* 81(9), 1597-604.
- Fry, A.M., Lu, X., Chittaganpitch, M., Peret, T., Fischer, J., Dowell, S.F., Anderson, L.J., Erdman, D. and Olsen, S.J. (2007) Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring

- hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 195(7), 1038-45.
- Gaynor, A.M., Nissen, M.D., Whiley, D.M., Mackay, I.M., Lambert, S.B., Wu, G., Brennan, D.C., Storch, G.A., Sloots, T.P. and Wang, D. (2007) Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3(5), e64.
- Han, T.H., Chung, J.Y., Koo, J.W., Kim, S.W. and Hwang, E.S. (2007) WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg Infect Dis* 13(11), 1766-8.
- Imperiale, M.J. (2007) Gene therapy and biosecurity. *Mol Ther* 15(4), 648-9.
- Jabado, O.J., Palacios, G., Kapoor, V., Hui, J., Renwick, N., Zhai, J., Briese, T. and Lipkin, W.I. (2006) Greene SCPrimer: a rapid comprehensive tool for designing degenerate primers from multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 34(22), 6605-11.
- Jennings, L.C., Anderson, T.P., Werno, A.M., Beynon, K.A. and Murdoch, D.R. (2004) Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J* 23(11), 1003-7.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. and Daszak, P. (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451(7181), 990-3.
- Kesebir, D., Vazquez, M., Weibel, C., Shapiro, E.D., Ferguson, D., Landry, M.L. and Kahn, J.S. (2006) Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 194(9), 1276-82.
- Kuypers, J., Martin, E.T., Heugel, J., Wright, N., Morrow, R. and Englund, J.A. (2007) Clinical disease in children associated with newly described coronavirus subtypes. *Pediatrics* 119(1), e70-6.

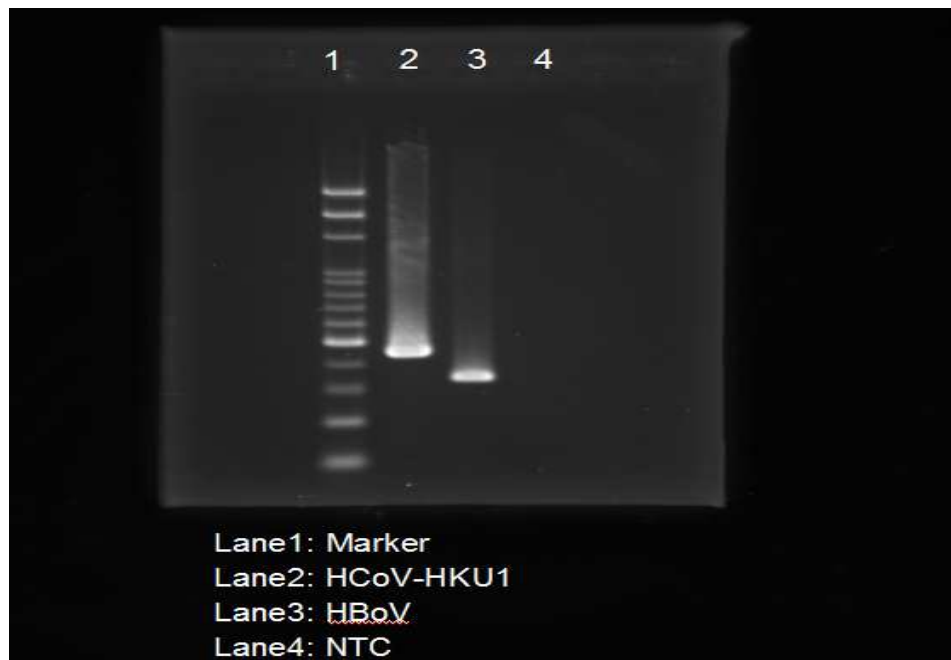
- Le, B.M., Demertzis, L.M., Wu, G., Tibbets, R.J., Buller, R., Arens, M.Q., Gaynor, A.M., Storch, G.A. and Wang, D. (2007) Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri. *Emerg Infect Dis* 13(12), 1936-8.
- Liddington, R.C., Yan, Y., Moulai, J., Sahli, R., Benjamin, T.L. and Harrison, S.C. (1991) Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354(6351), 278-84.
- Lin, J.H., Chiu, S.C., Lee, C.H., Su, Y.J., Tsai, H.C., Peng, Y.T. and Wu, H.S. (2008) Genetic and antigenic analysis of epidemic influenza viruses isolated during 2006-2007 season in Taiwan. *J Med Virol* 80(2), 316-22.
- Lin, J.H., Chiu, S.C., Shaw, M.W., Lin, Y.C., Lee, C.H., Chen, H.Y. and Klimov, A. (2007) Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan. *Virus Res* 124(1-2), 204-11.
- Lu, X., Chittaganpitch, M., Olsen, S.J., Mackay, I.M., Sloots, T.P., Fry, A.M. and Erdman, D.D. (2006) Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens. *J Clin Microbiol* 44(9), 3231-5.
- Manning, A., Russell, V., Eastick, K., Leadbetter, G.H., Hallam, N., Templeton, K. and Simmonds, P. (2006) Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 194(9), 1283-90.
- McIntosh, K., Kapikian, A.Z., Turner, H.C., Hartley, J.W., Parrott, R.H. and Chanock, R.M. (1970) Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol* 91(6), 585-92.
- Mourez, T., Bergeron, A., Ribaud, P., Scieux, C., de Latour, R.P., Tazi, A., Socie, G., Simon, F. and LeGoff, J. (2009) Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 15(1), 107-9.
- Nguyen, N.L., Le, B.M. and Wang, D. (2009) Serologic evidence of frequent

- human infection with WU and KI polyomaviruses. *Emerg Infect Dis* 15(8), 1199-205.
- Norja, P., Ubillos, I., Templeton, K. and Simmonds, P. (2007) No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol* 40(4), 307-11.
- Payungporn, S., Chieochansin, T., Thongmee, C., Panjaworayan, N., Samransamruajkit, R., Theamboolers, A. and Poovorawan, Y. (2008) Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis. *J Virol Methods* 153(1), 70-3.
- Pyrce, K., Jebbink, M.F., Berkhout, B. and van der Hoek, L. (2004) Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virology* 321, 7.
- Ren, L., Gonzalez, R., Xu, X., Li, J., Zhang, J., Vernet, G., Paranhos-Baccala, G., Jin, Q. and Wang, J. (2009) WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis* 15(1), 134-5.
- Stehle, T. and Harrison, S.C. (1996) Crystal structures of murine polyomavirus in complex with straight-chain and branched-chain sialyloligosaccharide receptor fragments. *Structure* 4(2), 183-94.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24(8), 1596-9.
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M., Kaandorp, J., Spaargaren, J. and Berkhout, B. (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 10(4), 368-73.
- van der Hoek, L., Sure, K., Ihorst, G., Stang, A., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Petersen, G., Forster, J., Berkhout, B. and Uberla, K. (2005) Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2(8), e240.

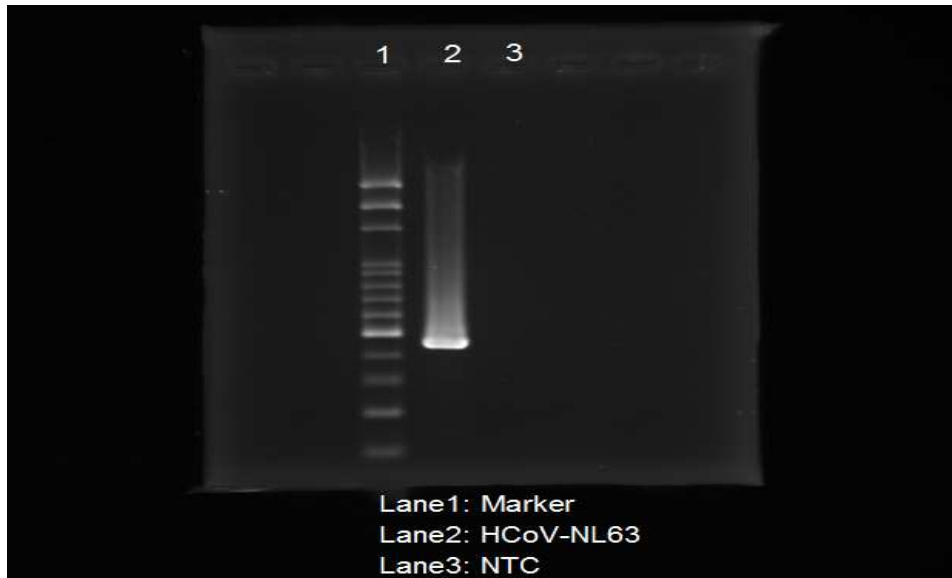
- Woo, P.C., Lau, S.K., Chu, C.M., Chan, K.H., Tsoi, H.W., Huang, Y., Wong, B.H., Poon, R.W., Cai, J.J., Luk, W.K., Poon, L.L., Wong, S.S., Guan, Y., Peiris, J.S. and Yuen, K.Y. (2005a) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 79(2), 884-95.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Huang, Y. and Yuen, K.Y. (2009) Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp Biol Med (Maywood)* 234(10), 1117-27.
- Woo, P.C., Lau, S.K., Tsoi, H.W., Huang, Y., Poon, R.W., Chu, C.M., Lee, R.A., Luk, W.K., Wong, G.K., Wong, B.H., Cheng, V.C., Tang, B.S., Wu, A.K., Yung, R.W., Chen, H., Guan, Y., Chan, K.H. and Yuen, K.Y. (2005b) Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 192(11), 1898-907.

九、圖表

(A)

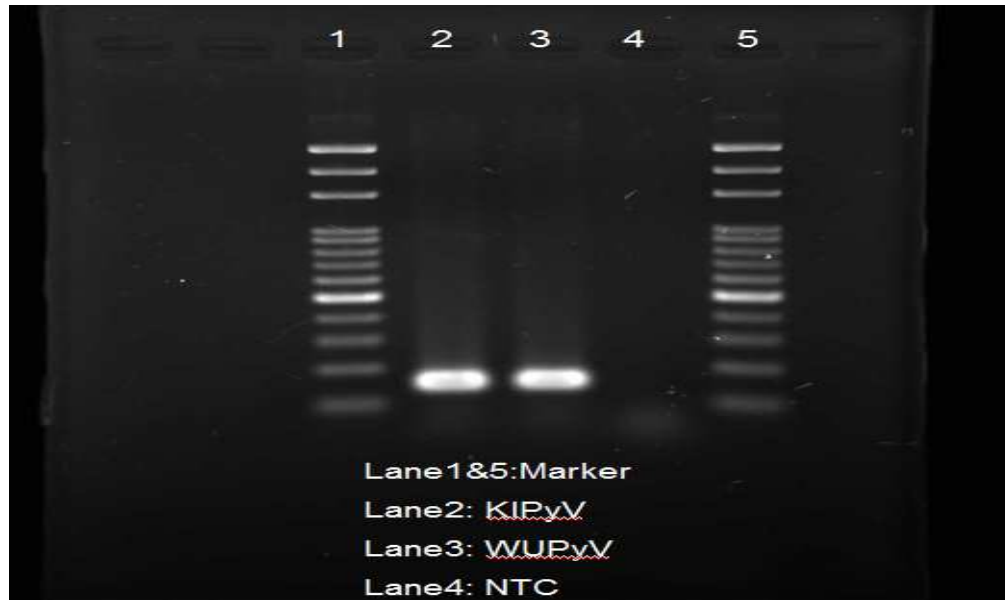


(B)

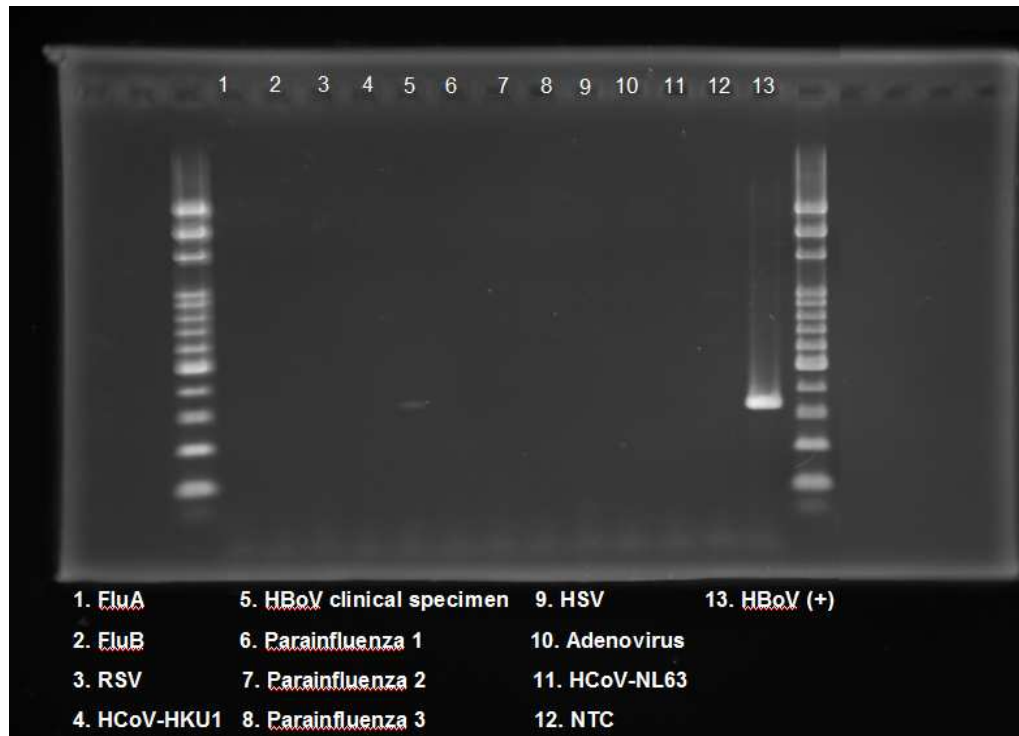


圖一. 針對 HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HBoV、KIPyV 以及 WUPyV 病毒所設計的核酸引子對 PCR 複製結果，顯示 primer 均對病毒有良好的偵測效果，且無 nonspecific band 產生。其中圖 (A) 為 HCoV-HKU1 及 HBoV PCR 複製片段，圖 (B) 為 HCoV-NL63 PCR 複製片段。

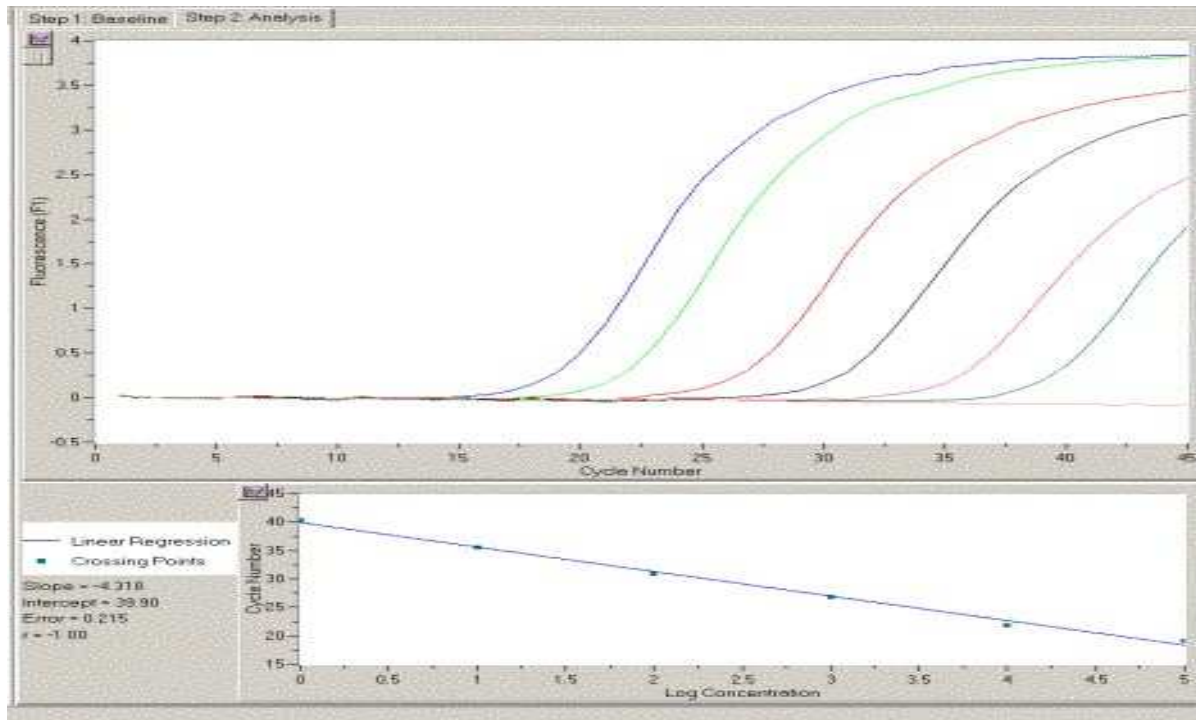
(C)



圖一(續). 針對 HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HBoV、KIPyV 以及 WUPyV 病毒所設計的核酸引子對 PCR 複製結果。其中圖 (C) 為 KIPyV 及 WUPyV PCR 複製片段。

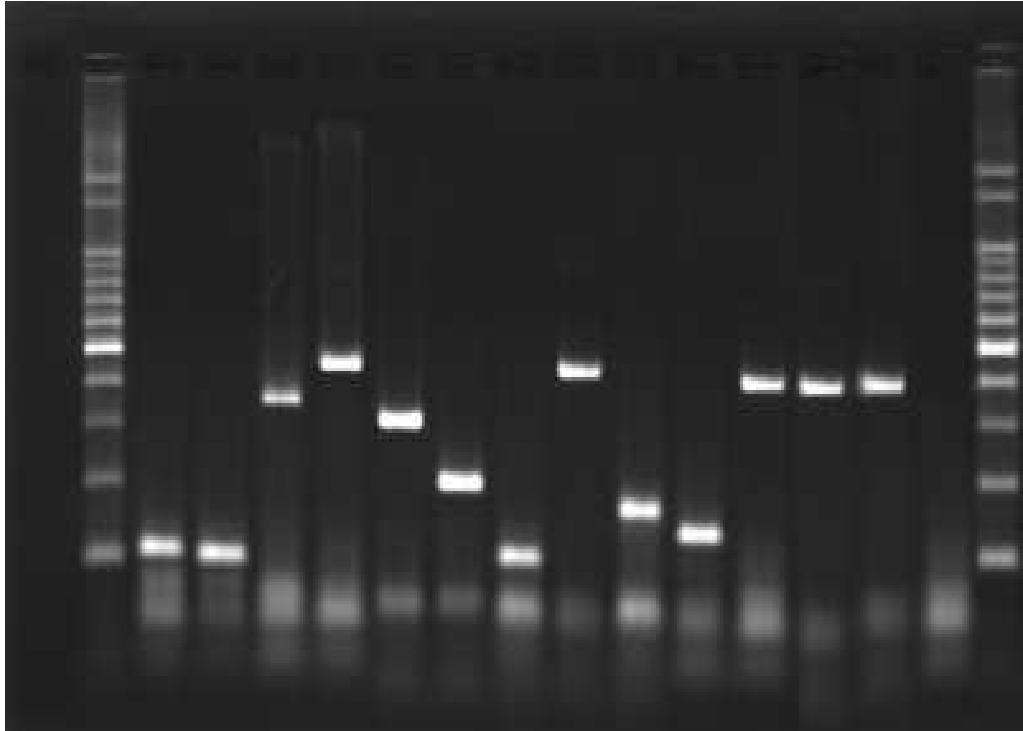


圖二、HBoV 病毒核酸引子對的專一性測定。顯示針對 HBoV 病毒設計的 primer 並不會對其他呼吸道病毒有非特異性片段被複製出。



圖三. HBov 標準曲線(由左至右依序為 $1.0E^5$ 至 $1.0E^0$ 10 倍序列稀釋結果)

M FluA FluB RSV HKU1 Para1 Para2 Para3 Meta Adeno HSV OC43 NL63 229E Blank M



圖四、將各病原體的核酸引子對混合後，分別以各建置之病毒標準品進行 multiplex PCR 反應所得到的 PCR 增幅結果，顯示各引子間的條件設定已達最佳化，呈現良好的專一性。

表一、以呼吸道多重病毒同步偵測平台評估各病毒偵測的靈敏度及專一性

PCR set	Specimen Pos (+)(copies) or Neg (-)												
	FluA	FluB	PIF*1	PIF2	PIF3	HSV	RSV	AdV	HBoV	HKU1	NL63	WUPyV	KIPyV
FluA	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FluB	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIF1	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIF2	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PIF3	-	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-	-
HSV	-	-	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-	-	-
RSV	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ²)	-	-	-	-	-	-
AdV	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-	-
HBoV	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-	-
HKU1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ¹)	-	-	-
NL63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ²)	-	-
WUPyV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ²)	-
KIPyV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+(1.0E ²)

*PIF: parainfluenza virus

表二、2010年ILI陽性檢體各呼吸道病毒陽性數及比例

Diagnosis	Number	%
FluA	75	55.97
FluB	31	23.13
Parainfluenza I	2	1.49
Parainfluenza II	0	0
Parainfluenza III	3	2.24
RSV	2	1.49
HSV	6	4.47
Adenovirus	4	2.99
HBoV	3	2.24
HCoV-HKU1	1	0.75
HCoV-229E	1	0.75
HCoV-NL63	1	0.75
HCoV-OC43	2	1.49
HMPV	3	2.24
KIPyV	0	0
WUPyV	0	0
總數	134	100