

計畫編號：DOH 101-DC-2304

行政院衛生署疾病管制局 101 年度

自行研究計畫

建立未知/新興節肢動物媒介病毒分子診斷及監測系統

研究報告

執行機構：疾病管制局研究檢驗中心

計畫主持人：舒佩芸

研究人員：陳歷禹、廖采苓、楊正芬、蘇千玲、張淑芬、張梅君

執行期間：101 年 1 月 1 日至 101 年 12 月 31 日

* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 *

目 錄

	頁 碼
封面	
一、中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
二、本文	
(1) 前言	(5-7)
(2) 材料與方法	(8-10)
(3) 結果	(11-12)
(4) 討論	(13)
(5) 結論與建議	(14)
(6) 計畫重要研究成果及具體建議	(15)
(7) 參考文獻	(16-18)
三、表次	(19-22)
四、圖次	(23-27)
	共 (27) 頁

中文摘要

由於國際間交通往來日益頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得未知/新興節肢動物媒介病毒（arthropod-borne virus, Arbovirus）傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。其中尤以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（tick）所媒介的傳染病最為重要。台灣位於亞熱帶地區，節肢動物種類繁多，許多種類具有傳播病毒的能力，一旦病毒從境外引入，極有可能造成本土的流行，影響民眾的健康。所以有必要建立實驗室的監測與診斷系統，有效的檢測各種未知/新興節肢動物媒介病毒傳染病。本研究中，我們開發出以病毒屬(或群)共通引子（consensus primers）為基礎的多重即時螢光定量核酸增殖方法，檢測未知/新興黃病毒屬（Flaviviruses）及布尼亞病毒科（Bunyaviridae）節肢動物媒介病毒。台灣地區自 SARS 後期所建立的機場發燒篩檢系統，已證明是一項有效監測境外移入傳染病的措施。我們配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行檢驗，及時篩檢出病人，減少病毒之境外移入，有效降低傳染病的流行，解決公共衛生上的危機。

關鍵詞：節肢動物媒介病毒、黃病毒、布尼亞病毒、機場發燒篩檢

英文摘要

Because the international traveling occur much more frequently, and the effects of climate change due to global warming, the unknown / emerging arthropod-borne virus (Arbovirus) infectious diseases now spread rapidly in the world and increase the threats to global public health security. Among these, the mosquito and tick-borne diseases are the most serious arboviral diseases. Taiwan is located in a subtropical region and has a wide range of arthropod species. Many of these arthropods have the ability to spread arboviruses to human. Therefore, it may cause local epidemics, if the arbovirus was imported into Taiwan. It is necessary to establish a laboratory-based diagnosis and surveillance system of arboviral infections. In this study, we developed multiple real-time fluorescence quantitative RT-PCR using virus Genus (or group) consensus primer sets to detect flaviviruses and Bunyaviruses. Fever screening at airports in Taiwan has proved to be an effective surveillance system of dengue and chikungunya. In our study, we coordinate with the airport fever screening system to detect arboviral infections in febrile patients, and to help to reduce local prevalence of arboviral diseases in Taiwan.

Key word: Arbovirus, Flavivirus, Bunyavirus, Fever screening at airports.

前言

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，使得未知/新興節肢動物媒介病毒（arthropod-borne viruses, Arbovirus）傳染病在全世界散佈範圍擴大，對人類健康所造成的威脅日益嚴重。其中尤以蚊蟲（mosquito）及壁蝨（Tick）所媒介的傳染病最為重要。(1-4) 近年來如登革熱、西尼羅熱在全球散播的範圍日益擴大，屈公病在亞洲及非洲地區迅速傳播(5-7)，蜱媒腦炎(Tick-borne encephalitis; TBEV) 在歐洲及亞洲流行，新種類的布尼亞病毒(Bunyavirus, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) 在中國大陸中部及東部流行等(8)，皆造成公共衛生上很大的危機。節肢動物媒介病毒種類繁多，分佈於8科14屬，已知約有140種病毒會引起人類的疾病(1,2)，其中又以黃病毒屬(Flavivirus)、Alphavirus屬及布尼亞病毒科(Bunyaviridae)的病毒為最重要。黃病毒屬的病毒包括有登革病毒(dengue viruses 1-4)、日本腦炎病毒(Japanese encephalitis virus; JEV)、西尼羅病毒(West Nile virus; WNV)、黃熱病毒(yellow fever virus; YFV)等，在世界許多地區造成大流行，引起人類疾病及死亡。此外如澳洲的Murray Valley encephalitis virus (MVEV)、印度及中東的Kyasanar Forest disease virus (KFDV)、歐亞及北美洲的蜱媒腦炎(TBEV)、東南亞及西太平洋地區的Zika virus (ZIKV)等，是各地區流行的新興或再浮現的病毒(9-12)。Togaviridae科包括近年來在亞洲及非洲造成大流行的屈公病毒(Chikungunya virus; CHIKV)、南太平洋及澳洲流行的Ross River virus (RRV)、南美洲流行的Mayaro virus (MAYV)、非洲的O'nyong-nyong virus (ONNV)、歐亞及非洲的Sindbis virus (SINV)等，是各地區流行的新興或再浮現的病毒(13)。布尼亞病毒科包括近年來在中國大陸中部及東部流行的Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) (8)、歐

亞及非洲流行的 Congo-Crimean hemorrhagic fever virus (CCHFV)(14)、非洲及中東流行的 Rift Valle fever virus (RVFV)(15)、北美洲的 La Crosse encephalitis virus (LACV) (16)、歐亞及非洲的 Sandfly fever virus (SFV) (17)、北美及歐亞洲的 California encephalitis virus group (18)等，是各地區流行的新興或再浮現的病毒。

節肢動物媒介病毒分佈於全球，但主要分佈於熱帶及亞熱帶地區，病毒的傳播循環是藉由節肢動物攜帶病毒，在叮咬或吸血時將病毒傳播至脊椎動物宿主；脊椎動物宿主被感染後，血液中含大量病毒再傳給叮咬或吸血的節肢動物，使節肢動物受感染。節肢動物是動物界中種類及數量最多的一群，種類約占所有動物物種的 85% 以上。而台灣位於亞熱帶地區，節肢動物種類繁多，許多種類具有傳播病毒的能力，一旦因環境、氣候等因素，節肢動物數量開始增加，地方性疾病即開始流行，如日本腦炎。此外非本土流行的病毒一旦從境外引入，若有適當的節肢動物宿主，則極有可能造成本土的流行，如登革熱，影響民眾的健康。

Wilson 等人報告於 1997-2006 年間從 GeoSentinel Surveillance Network 監測網分析旅遊回國發燒病患結果，顯示 6957 發燒旅遊病患中，35% 有全身性發燒，22% 為非特異性性發燒，15% 有腹瀉，14% 有呼吸道症狀。病人以感染蚊子為媒介的傳染病最為常見，到非洲旅遊以感染瘧疾的人數最多，到亞洲旅遊則以感染登革熱最為常見(3)。近年來，屈公病也成為到非洲及亞洲旅遊之重要傳染病(5,19)。目前台灣地區入境民眾每日約 25,000 至 35,000 名旅客，平均一年國人入境人次數約 800-1,200 萬人。為防範境外移入傳染病之發生及散佈，自民國 92 年 3 月 SARS 疫情開始，行政院衛生署疾病管制局針對入境旅客全面測量體溫，並於同年 7 月 14 日起，將機場的發燒篩檢列為傳染病監測系統，利用紅外線體溫偵測儀測量入境旅客的體溫。有發燒症狀者，經醫師診斷後，經

由疾病管制局主動採取病人檢體，檢驗相關傳染病[包括登革熱、腸道疾病（主要為桿菌性痢疾及霍亂）、屈公病、瘧疾、新型流感等]。目前經機場發燒篩檢檢疫偵測，每年約有超過 20,000 入境旅客有發燒症狀（比例約為千分之 3 至千分之 10），約有 5,000-6000 人經採取臨床檢體送實驗室檢驗。此傳染病監測措施，成效良好，檢驗出登革熱確定病例數約佔全部境外移入病例之 45-50%。因為這些確定病例多處於急性期，由機場發燒篩檢及高效率的實驗室檢驗，可及時發現境外移入的確定病例，進行防治工作，有效的防止病原體的散播。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原菌的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區、及檢驗實驗室的效能有關。目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的監測系統之一，能有效降低傳染病的引進(6,7,20-22)。

本研究中，我們開發出多重即時螢光定量核酸增殖方法（Multiplex real-time RT-PCR），檢測未知/新興的黃病毒屬（Flavivirus）及布尼亞病毒科（Bunyaviridae）之節肢動物媒介病毒。由於黃病毒屬及布尼亞病毒科之病毒種類繁多，故先以屬(或群)共通引子（consensus primers）篩選病人檢體，陽性檢體再利用病毒專一性引子確認或直接將 PCR 產物進行核酸定序比對。我們利用此 Multiplex real-time RT-PCR 篩選報告病例疑似腦炎病人的檢體，及機場發燒篩檢監測系統之檢體，進行未知/新興黃病毒屬及布尼亞病毒科節肢動物媒介病毒分子診斷及監測，有助於發燒病人的及時診斷與治療及後續的防治措施。

材料與方法

本計畫之實施方法為利用 SYBR Green I-based 及 TaqMan probe-based 螢光定量 RT-PCR 方法，開發節肢動物媒介病毒之分子診斷方法：

1. **血清檢體及病毒株來源**：血清檢體來源為通報自疾管局之各種節肢動物媒介病毒傳染病，及配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性的篩選採集之血清。全部檢體以保持低溫之國內快捷郵件寄送或由專人親送方式送達實驗室。而實驗室於收到檢體後立即置於 4°C 冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種病毒之來源為疾管局歷年自行分離出之各種節肢動物媒介病毒，或購自 ATCC，或由其他實驗室取得的病毒株。
2. **病毒核酸之合成**：節肢動物媒介病毒包含許多 RG(risk group)3 及 RG4 的病毒，無法購買或取得，以委託廠商(Genomics)合成病毒核酸 cDNA 作為 RT-PCR 之模版(Template)。已合成的病毒核酸 cDNA 序列如下：(1) Phlebovirus AH12/China/2010 strain segment S (GenBank Acc. No. HQ141591), nucleotide sequence 1-1000/pGEM-T Easy Vector; (2) Tick-borne encephalitis virus TBE/JE316708/8954-9353/pUC57 vector; (3) Murray Valley encephalitis virus MVE/AF161266/8977-9376/pUC57 vector; (4) Kyasanur Forest disease virus KFDV/HM055369/8962-9361; (5) Rift Valley fever L segment virus RVFV/HE687305/2292-3290; (6) La Crosse virus L segment LCV/GU206122/2895-3894; (7) Crimean-Congo hemorrhagic fever virus L segment CCHFV/DQ076417/6871-7880。
3. **引子(Primer)的設計與合成**：為檢測未知/新興的黃病毒屬 (Flavivirus)、阿爾發病毒屬 (Alphavirus)、布尼亞病毒科 (Bunyaviridae) 等節肢動物媒介病毒，引子可依不同的需要而設計。如黃病毒屬之病毒約有 100 種，相似的病毒又可以分群 (group)，包括 dengue virus group、Japanese encephalitis virus group、Kokobera virus group、Ntaya virus group、Spondweni virus group、Tick-borne encephalitis virus group 及 Yellow fever virus group

等，如可選擇如 [polymerase gene](#) 保守性高的核酸序列片段作為共通引子之標的來設計，以提高檢測的靈敏度與專一性。阿爾發病毒屬 (Alphavirus) 之病毒約有 30 種，相似的病毒又可以分組 (complex)，包括 EEEV complex、SFV complex、VEEV complex、WEEV complex 等；布尼亞病毒科 (Bunyaviridae) 之病毒種類繁多，包括 Nairovirus 屬 (約 20 種病毒)、Orthobunyavirus 屬 (約 90 種病毒)、Phlebovirus 屬 (約 100 種病毒) 病毒，皆含有重要的節肢動物媒介病毒，應視病毒序列的變化設計適當的引子。且應視需要取得或購買病毒或合成病毒核酸片段，以供引子的測試。理論上螢光定量 PCR 的靈敏度可以到達 1~10 copies/Rxn，可藉由核酸引子之設計、檢體核酸的萃取及純化、反應試劑之選擇、反應條件之修正等，改善系統之靈敏度及專一性。

4. **抽取 RNA**：以 QIAamp Viral RNA Kit (QIAGEN) 抽取及純化病毒核酸。主要原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可以選擇性的與 RNA 結合，再經過數次清洗步驟，進而達到純化的目的。詳細的步驟如下：首先將病人血清檢體加入溶解液，分解蛋白質等雜質，同時將檢體中之 RNase 去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使 RNA 與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將 RNA 溶出。血清(140 μ l) 中的 RNA 依據本法萃取，最後將 RNA 溶於 70 μ l 純水(Water, containing 0.02% sodium azide)。
5. **SYBR Green 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鍊鎖反應 (SYBR Green Real-time RT-PCR Reaction)**：使用 QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit, QIAGEN 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μ l 的 2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μ l QuantiTect RT Mix，最後加入 10 μ l 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μ l。再進行 SYBR Green one-step RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，PCR 作用 95°C 15 分鐘，45 次循環之 94°C 15 秒、55°C 30 秒、72°C 20 秒、77°C 30 秒 (讀取螢光值) (23)。

6. **熔點曲線分析(Melting curve analysis)**：RT-PCR 反應完成後，再進行熔點曲線分析：95°C, 1 分鐘、68°C, 30 秒，再進行 45 次循環，每次循環比前次溫度+0.5°C/30 秒/循環。
7. **TaqMan 即時螢光定量反轉錄酶／聚合酶鍊鎖反應 (TaqMan Real-time RT-PCR)**：使用 QuantiTech probe RT-PCR ready mix (QIAGEN) Kit 為反應試劑。依序加入以下試劑：25 μl 的 2x QuantiTect probe RT-PCR mix，RNase-free Water，核酸引子，0.5 μl QuantiTect RT Mix，最後加入 5 μl 檢體 RNA，反應最終體積為 50 μl。再進行 TaqMan one-step RT-PCR 反應：50°C RT 作用 30 分鐘，1 initial cycle at 95°C for 15 min，50°C for 30 s，72°C for 1 min and 45 cycles at 95°C for 15 s and 48°C for 3 min with continuous fluorescence data collection (讀取螢光值) (24)。
8. **節肢動物媒介病毒的分離與鑑定**：病毒的分離與鑑定，係將病人血清、腦組織液(CSF)經 C6/36、Vero 等常用之細胞株培養約 7 天後分離出病毒，再以病毒專一性單株抗體如 Flavivirus-specific mAb (D56.3)、JEV group-specific (E3.3)、dengue group-specific (ATCC HB114) 等做免疫螢光染色，以鑑定分離之病毒及其血清型。或用 RT-PCR 方法偵測病毒核酸分子，當 RT-PCR 為陽性時，可直接將產物進行核酸定序及分析。

結果

1. **建立黃病毒屬(Flavivirus)分子診斷系統**：Flavivirus 包含約一百種病毒，其中約有半數病毒對人類有致病性。以 SYBR Green-I 為基礎之多重即時螢光定量核酸增殖方法，利用黃病毒屬共通引子 (FL-F1m、FL-R3 及 FL-R4)，可偵測出全球主要流行的黃病毒，包括登革病毒 1~4 型(DENV-1~4)、日本腦炎病毒、西尼羅病毒、Saint Louis encephalitis virus (SLEV)、黃熱病毒(YFV)、蜱媒腦炎病毒(TBEV)、 Murray Valley Encephalitis virus (MVEV)、Kyasanur forest disease virus (KFDV)、Zika virus (ZIKV) (Table 1, Figure 1)。對 TBEV 的靈敏度可達約 19 copies/reaction (Figure 3)，MVEV 的靈敏度可達約 12 copies/reaction (Figure 4)，KFDV 的靈敏度可達約 24 copies/reaction (Figure 5)，ZIKV 的靈敏度則可達約 50 copies/reaction (Figure 6)，此方法目前以應用於疾管局黃病毒之例行性分子診斷。以 TaqMan 為基礎之多重即時螢光定量核酸增殖方法，亦可偵測出上述的黃病毒 (Table 2, Figure 2)。
2. **建立 Bunyaviridae viruses 之分子診斷系統**：Bunyaviridae 科包含 300 種以上的病毒，可分為 5 個屬：Hantavirus 屬 (漢他病毒屬)、Nairovirus 屬、Orthobunyavirus 屬、Phlebovirus 屬及 Tospovirus 屬。除了漢他病毒的病媒為小型哺乳動物 (包括嚙齒類、食蟲目、蝙蝠等) 外，其他 4 屬皆為節肢動物媒介病毒。Tospovirus 屬病毒主要感染植物；Nairovirus 屬約有 20 種病毒，包含 Crimean-Congo hemorrhagic fever virus、Nairobi sheep disease virus、Dugbe virus 等重要的致病性病毒。Orthobunyavirus 屬約有 90 種病毒，包含 La Crosse encephalitis virus、California encephalitis virus、Oropouche virus 等病毒。Phlebovirus 屬約有 100 種病毒，包含 Rift Valley

fever virus、Sandfly fever virus、Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus 等病毒，皆造成公共衛生的危機。Nairovirus 屬共通引子(NR-F1，NR-R2)對 Crimean-Congo hemorrhagic fever virus 的靈敏度可達約 <5 copies/reaction (Figure 7)，Orthobunyavirus 屬共通引子(OB-F4，OB-R2)對 La Crosse encephalitis virus 的靈敏度可達約 <10 copies/reaction (Figure 8)，Phlebovirus 屬共通引子(RV-F4，RV-F3)對 Rift Valley fever virus 的靈敏度可達約 <5 copies/reaction (Figure 9)。此外 Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus 之專一性引子組 (SFTS-1F，SFTS-1R)對 SFTSV 的靈敏度可達約 5 copies/reaction(Figure 10)。

表三為共通引子之靈敏度及專一性之結果。

3. 應用 **Flavivirus** 分子診斷系統進行疾管局例行性黃病毒之檢驗：目前不論報告病例或主動監測之檢體只驗出 dengue viruses 及 Japanese encephalitis virus，顯示國內並無其他黃病毒之流行。
4. 應用 **Bunyaviridae viruses** 分子診斷系統篩檢腦炎病人腦脊髓液檢體及機場發燒病人血清檢體：我們混合 Nairovirus 屬共通引子 (NR-F1，NR-R2)、 Orthobunyavirus 屬共通引子(OB-F4，OB-R2) 及 Plebovirus 屬共通引子(RV-F6，RV-R5)進行 multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR，篩檢今年 50 支機場發燒病人血清檢體，如**表四**，結果均為陰性。因 Bunyaviridae viruses 中許多病毒會引起腦炎症狀，包括 La Crosse encephalitis virus、California encephalitisvirus 等，因此我們也篩檢今年 8-11 月疾管局通報有腦炎症狀病人之 30 支 (Flavivirus 陰性) 腦脊髓液檢體。結果如**表五**，均為陰性。由陽性及陰性控制組之正確結果可知此分子診斷系統之可靠性。

討論

本計畫的目標在建立一套完整的節肢動物媒介病毒分子診斷及監測系統，以防止各種新興及再浮現傳染病的入侵。已開發出可偵測 Flavivirus 屬（約 100 種病毒）、Bunyaviridae 科之 Nairovirus 屬（約 20 種病毒）、Orthobunyavirus 屬（約 90 種病毒）、Phlebovirus 屬（約 100 種病毒）病毒之多重即時螢光定量核酸增殖方法。

目前機場的發燒篩檢已成為台灣地區最重要的病媒性傳染病之監測系統之一，能有效降低傳染病的引進。於 2003 年開始在機場實施後，每年可檢驗出 45~50%全國的登革熱境外移入病例。登革熱機場發燒篩檢的經驗顯示出病原體的成功檢出與此傳染病的輸出國家之流行幅度、入境旅客之人數與地區及檢驗實驗室的效能有關(20)。自 2006 年初也開始擴大進行屈公病監測，首先於 2006 年 11 月發現新加坡境外移入屈公病病例，也是最先偵測出屈公病在新加坡之流行。台灣自 2006 年起至今共發現 42 例境外移入屈公病病例，成功的阻斷這些病毒在台灣流行(6,7)。為了強化機場發燒篩檢系統，我們將建立更完整的節肢動物媒介病毒分子診斷，藉由對疑似發燒病患進行篩選，阻斷這些病毒入侵至台灣及造成本土流行。本研究中，除了 Flavivirus consensus primers 已應用於疾管局例行性檢驗外，我們也對機場發燒篩檢體及國內腦炎報告病例檢體進行 Bunyaviridae 科病毒的篩檢。已完成 10-11 月機場發燒篩檢 50 支血清檢體及 8-11 月國內腦炎報告病例 30 支腦脊髓液檢體之檢測，並未發現陽性病例。未來仍應加強境外移入及本土病毒之篩檢，使國人免於受病媒性傳染病之威脅。

結論與建議

在全球經濟一體化趨勢下，各種新興及再浮現傳染病對人類健康所造成的威脅日益嚴重，病媒性傳染病在世界各地散佈情形正急速增加，建立一套完整的病媒性傳染病監測、快速檢驗與流行病學分析系統，能監測台灣地區已知存在及未來可能會侵入的病媒性傳染病是十分重要的。我們的研究顯示機場發燒篩檢是一種有效的監測系統，應加強境外移入病毒之檢測，以有效防止病原體的本土擴散及流行。由於發燒病人多處於傳染病之急性期（1-7 天），以 RT-PCR 方法檢驗是非常有效的。本計畫的目標在建立一套完整的病媒性病毒分子診斷及監測系統，以防止各種新興及再浮現病媒性傳染病的入侵。本計畫開發出可偵測 Flavivirus 屬（約 100 種病毒）、Bunyaviridae 科之 Nairovirus 屬（約 20 種病毒）、Orthobunyavirus 屬（約 90 種病毒）、Phlebovirus 屬（約 100 種病毒）病毒之分子診斷方法。應用於本土病例及機場發燒篩檢檢體的篩檢，雖尚未檢驗出 Bunyavirus，未來仍應加強對境外移入及本土病毒之篩檢，使國人免於受傳染病之威脅。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

我們的研究顯示機場發燒篩檢是一種有效的監測系統，能在登革熱和屈公病病人還在病毒血症時被篩檢出，進行必要的緊急防治工作，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。本計畫除黃病毒外，同時也建立布尼亞病毒之分子檢驗方法，將更強化病媒性傳染病之監測。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

加強衛教宣導、實施病人自主管理、鼓勵醫師通報等防疫措施可及早發現病毒血症期的發燒患者，減少境外移入病毒的引進及本土擴散。對於境外移入的無症狀、無發燒之空窗期患者，因無法得知其感染，無法進行及時篩檢，更需要後續的監測與通報系統配合。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於國際間交通往來頻繁、全球溫室效應及氣候變遷等因素，各種節肢動物媒介病毒如登革病毒、屈公病病毒、蜱媒腦炎病毒、新布尼亞病毒(SFTSV)等在亞、歐及非洲流行，已成為全球公共衛生防疫上的重大問題，應積極加強境外及本土病媒性傳染病之監測。

參考文獻

1. Gubler DJ. Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;951:13-24.
2. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* 2002;33(4):330-42. Review
3. Wilson ME, Weld LH, Boggild A, Keystone JS, Kain KC, von Sonnenburg F, Schwartz E; GeoSentinel Surveillance Network. Fever in returned travelers: results from the GeoSentinel Surveillance Network. *Clin Infect Dis.* 2007 Jun 15;44(12):1560-8.
4. Wilson ME, Freedman DO. Etiology of travel-related fever. *Curr Opin Infect Dis.* 2007. 20:449-53. Review.
5. Powers AM, Logue CH. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.*2007; 88:2363-77.
6. Shu PY, Yang CF, Su CL, Chen CY, Chang SF, Tsai KH, Cheng CH, Huang JH. Two imported chikungunya cases, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14:1326-7.
7. Huang JH, Yang CF, Su CL, Chang SF, Cheng CH, Yu SK, Lin CC, Shu PY. Imported chikungunya virus strains, Taiwan, 2006-2009. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15:1854-6.
8. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, Zhang L, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N Engl J Med.* 2011. 364:1523-32.
9. Knox J, Cowan RU, Doyle JS, Ligtermoet MK, Archer JS, Burrow JN, et al. Murray Valley encephalitis: a review of clinical features, diagnosis and treatment. *Med J Aust.* 2012.19;196:322-6. Review.
10. Holbrook MR. Kyasanur forest disease. *Antiviral Res.* 2012. S0166-3542 (12) 00235-5.
11. Zhang Y, Si BY, Liu BH, Chang GH, Yang YH, Huo QB, Zheng YC, Zhu QY. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res.* 2012. 167:310-3.
12. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6:e1477.

13. Suhrbier A, Jaffar-Bandjee MC, Gasque P. Arthritogenic alphaviruses--an overview. *Nat Rev Rheumatol.* 2012.8:420-9.
14. Ergonul O. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: new outbreaks, new discoveries. *Curr Opin Virol.* 2012. 2:215-20. Review.
15. Ikegami T. Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral Res.* 2012. 95:293-310.
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus disease and other arboviral diseases - United States, 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012 Jul 13;61(27):510-4.
17. Depaquit J, Grandadam M, Fouque F, Andry P, Peyrefitte C. Arthropod-borne viruses transmitted by Phlebotomine sandflies in Europe: a review. *Euro Surveill.* 2010;15(10):pii=19507. Available from:
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19507>
18. Lu Z, Fu SH, Wang FT, Nasci RS, Tang Q, Liang GD. Circulation of diverse genotypes of Tahyna virus in Xinjiang, People's Republic of China. *Am J Trop Med Hyg.* 2011;85:442-5.
19. Pialoux G, Gaüzère BA, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infect Dis.* 2007; 7:319-27.
20. Shu PY, Chien LJ, Chang SF, Su CL, Kuo YC, Liao TL, et al. Fever screening at airports and imported dengue. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:460-2.
21. Shu PY, Su CL, Liao TL, Yang CF, Chang SF, Lin CC, Chang MC, Hu HC, Huang JH. Molecular Characterization of Dengue Viruses Imported into Taiwan during 2003-2007: Geographic Distribution and Genotype Shift. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80:1039-1046.
22. Huang JH, Su CL, Yang CF, Liao TL, Hsu TC, Chang SF, Lin CC, Shu PY. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Aug;87(2):349-58.
23. Shu PY, Chang SF, Kuo YC, Yueh YY, Chien LJ, Sue CL, et al. Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2003;41:2408-16.

24. Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1295-304

Table 1. Primer sets used for real-time RT-PCR screening of Arboviruses

No	Name	Seq	Region	position	Note
1	FL-F1m	GCC ATA TGG TWC ATG TGG CTN GGA GC	NS5	9056	flavivirus consensus primer
2	FL-R3	GTK ATT CTT GTG TCC CAW CCG GCT GTG TCA TC	NS5	9257	flavivirus consensus primer
3	FL-R4	GTG ATG CGR GTG TCC CAG CCR GCK GTG TCA TC	NS5	9257	flavivirus consensus primer
4	NR-F1	CAT GCA YGC AAC MAC WGA AAT GTT	L	6876	Nairovirus consensus primer
5	NR-R1	GAA CAG CAG TGT ATY GGR CCC CA	L	7104	Nairovirus consensus primer
6	NR-R2	RGA RCA GCA GTG TAT YGG RCC CCA	L	7107	Nairovirus consensus primer
7	OB-F4	YAA GTT GAA YCC TGA YGA RAT GAT	L	3007	Orthobunyavirus consensus primer
8	OB-R1	ACT CCA TTT WGA CAT RTC TGC ATT	L	3256	Orthobunyavirus consensus primer
9	OB-R2	GWA AAA WAC ATC YTG RGC ACT CCA	L	3274	Orthobunyavirus consensus primer
10	RV-F4	GTT TAA GAA RCA RCA GCA TGG DGG	L	2822	Plebovirus consensus primer
11	RV-R3	AGG TTC CAC TTC CTT GCA TCA TC	L	3063	Plebovirus consensus primer
12	RV-F6	ACW AAG TTT GCH CTV ATG CTA TG	L	3077	Plebovirus consensus primer
13	RV-R5	TGV ART ATT CCC TGC ATC ATB CC	L	3348	Plebovirus consensus primer
14	SFTS-1F	GGA AAC TGG RAG AGA GAA CT	S	425	SFTSV-specific
15	SFTS-1R	GAA GTG AAC AAG TGG TGG TT	S	626	SFTSV-specific

Table 2. Primer sets used for TaqMan real-time RT-PCR for the detection of Flaviviruses.

No	Name	Seq	Note
1	MFU1-v2	TAC AAC ATG ATG GGA AAG CGA GAG AAR AA	flavivirus consensus primer
2	CFU2-v2	GTG TCC CAG CCG GCK GTG TCA TCA GC	flavivirus consensus primer
3	FLR-P	[HEX]-CTC CCA GCC ACA TGT ACC ATA TGG C-[BHQ]	flavivirus consensus probe
4	DENV1-P3	[6-FAM]TCA GAG ACA TAT CAA AGA TTC CAG GGG G[BHQ-6-FAM]	DENV-1-specific TaqMan probe
5	DENV2-P3	[AmC6+TxRed]AAG AGA CGT GAG CAG GAA GGA AGG GGG AGC[BHQ-TxRed]	DENV-2-specific TaqMan probe
6	DENV3-P3	[Cy5]TGA GAG ATA TTT CCA AGA TAC CCG GAG GAG[BHQ-Cy5]	DENV-3-specific TaqMan probe
7	DENV4-P3	[5HEX]TGG AGG AGA TAG ACA AGA AGG ATG GAG ACC[BHQ-5HEX]	DENV-4-specific TaqMan probe
8	JEV-P3	[6-FAM]TCC GTG ACA TAG CAG GAA AGC AAG[BHQ-6-FAM]	JEV-specific TaqMan probe
9	WNV-P3	[AmC6+TxRed]TGC GTG AAG TTG GCA CCC GGC CT[BHQ-TxRed]	WNV-specific TaqMan probe
10	SLEV-P3	[Cy5]TAC AAG AAA TCT CCC AAA TCC CAG GAG GA[BHQ-Cy5]	SLEV-specific TaqMan probe
11	YFV-P3	[5HEX]TCA GAG ACC TGG CTG CAA TGG ATG GT[BHQ-5HEX]	YFV-specific TaqMan probe
12	KFDV-P1	GGA GCG GGG GTT GAG GGG ACC AGT C	KFDV-specific TaqMan probe
13	TBEV-P1	GGA TCT GGA GTG GAG GGA ATA AGC T	TBEV-specific TaqMan probe
14	MVEV-P1	AGG AGG AGG AGT TGA AGG AGC TGG TAT T	MVEV-specific TaqMan probe

Table 3. 共通引子之靈敏度及專一性之結果

Sensitivity and specificity using Genus consensus primer sets

Primer set	Genus	Virus	Sensitivity	Specificity
FL-F1m/FL-R3/FL-R4	Flavivirus	TBEV	<20 copies/Rx	Alphavirus (-), bunyaviridae (-)
FL-F1m/FL-R3/FL-R4	Flavivirus	MVEV	<15 copies/Rx	Alphavirus (-), bunyaviridae (-)
FL-F1m/FL-R3/FL-R4	Flavivirus	KFDV	<25 copies/Rx	Alphavirus (-), bunyaviridae (-)
FL-F1m/FL-R3/FL-R4	Flavivirus	ZIKV	<50 copies/Rx	Alphavirus (-), bunyaviridae (-)
RV-F6/RV-R5	Phlebovirus	RVFV	<10 copies/Rx	Alphavirus (-), Flavivirus (-), other genera of bunyaviridae (-).
OB-F4/OB-R2	Orthobunyavirus	LACV	<10 copies/Rx	Alphavirus (-), Flavivirus (-), other genera of bunyaviridae (-).
NR-F1/NR-R2	Nairovirus	CCHFV	<10 copies/Rx	Alphavirus (-), Flavivirus (-), other genera of bunyaviridae (-).

Table 4. The results of multiplex real-time RT-PCR using Bunyavirus consensus primers in 50 serum samples from airports fever screening system.

Well	Well Name	R Last	Ct	Final Call	Tm	Country
G4	S10102860	2861	No Ct	-	71.95	India
H4	S10102861	2925	No Ct	-	71.45	Thailand
A5	S10102862	2660	No Ct	-	72.15	Malaysia
B5	S10102863	2799	No Ct	-	71.65	Singapore
C5	S10102864	2673	No Ct	-	71.15	Malaysia
D5	S10102854	2858	No Ct	-	72.05	Indonesia
E5	S10102855	2817	No Ct	-	72.05	Singapore
F5	S10102856	2858	No Ct	-	71.95	Malaysia
G5	S10102857	2738	No Ct	-	71.95	Philippines
H5	S10102858	2981	No Ct	-	71.95	Singapore
A6	S10102859	2669	No Ct	-	71.65	Singapore
B6	S10102850	2719	No Ct	-	72.05	Singapore
C6	S10102851	2798	No Ct	-	71.15	Thailand
D6	S10102852	2866	No Ct	-	72.05	Philippines
E6	S10102853	2705	No Ct	-	72.05	Singapore
F6	S10102835	2832	No Ct	-	71.15	Cambodia
G6	S10102836	2725	No Ct	-	71.95	Philippines
H6	S10102837	2997	No Ct	-	71.45	Philippines
A7	S10102838	2717	No Ct	-	72.55	Philippines
B7	S10102839	2912	No Ct	-	72.05	Philippines
C7	S10102840	3133	No Ct	-	71.15	Philippines
D7	S10102841	2848	No Ct	-	72.05	Philippines
E7	S10102842	2760	No Ct	-	72.05	Thailand
F7	S10102843	2876	No Ct	-	72.45	Thailand
G7	S10102844	2935	No Ct	-	71.95	Philippines
H7	S10102845	3049	No Ct	-	72.45	Thailand
A8	S10102846	2861	No Ct	-	72.55	Thailand
B8	S10102847	2910	No Ct	-	71.15	Singapore
C8	S10102848	2866	No Ct	-	72.05	Singapore
D8	S10102849	2990	No Ct	-	72.05	Philippines
E8	S10102830	3007	No Ct	-	72.05	Philippines
F8	S10102831	2974	No Ct	-	71.95	Singapore
G8	S10102832	2909	No Ct	-	71.95	Vietnam
H8	S10102833	2741	No Ct	-	71.45	Philippines
A9	S10102827	2832	No Ct	-	71.65	Egypt
B9	S10102828	2820	No Ct	-	71.65	Indonesia
C9	S10102829	2920	No Ct	-	71.65	Malaysia
D9	S10102821	2900	No Ct	-	72.05	Malaysia
E9	S10102822	2974	No Ct	-	72.05	Thailand
F9	S10102823	2853	No Ct	-	71.95	Indonesia
G9	S10102824	2821	No Ct	-	71.95	Vietnam
H9	S10102825	3257	No Ct	-	71.95	Malaysia
A10	S10102826	2647	No Ct	-	71.15	Malaysia
B10	S10102812	2864	No Ct	-	72.05	Indonesia
C10	S10102813	2858	No Ct	-	71.15	Vietnam
D10	S10102814	2752	No Ct	-	71.65	Thailand
E10	S10102815	2787	No Ct	-	71.65	Cambodia
F10	S10102816	2777	No Ct	-	71.15	Malaysia
G10	S10102817	2940	No Ct	-	71.95	Philippines
H10	S10102818	2892	No Ct	-	71.45	Philippines
A11	RVFV(0.1ng)	11001	17.12	+	78.25	
B11	CCHFV(10pg)	8142	23.46	+	78.7	
C11	LACV(10pg)	11099	22.14	+	79.15	
D11	NTC	2806	No Ct	-	71.15	

Table 5. The results of multiplex real-time RT-PCR using Bunyavirus consensus primers in 30 CSF samples from patients with encephalitis.

Well	Well Name	R Last	Ct	Final Call	Tm
A1	C-3988	2744	No Ct	-	72.15
B1	C-3989	2800	No Ct	-	72.05
C1	C-3987	2900	No Ct	-	72.45
D1	C-3985	2860	No Ct	-	72.05
E1	C-3982	2816	No Ct	-	71.65
F1	C-3981	2795	No Ct	-	71.55
G1	C-3978	2962	No Ct	-	72.95
H1	C-3976	2816	No Ct	-	71.95
A2	C-3972	2894	No Ct	-	72.15
B2	C-3971	2719	No Ct	-	72.05
C2	C-3965	2826	No Ct	-	71.65
D2	C-3963	2879	No Ct	-	71.65
E2	C-3961	2777	No Ct	-	72.05
F2	C-3957	2796	No Ct	-	71.95
G2	C-3956	2861	No Ct	-	71.95
H2	C-3955	2889	No Ct	-	72.45
A3	C-3953	2831	No Ct	-	72.55
B3	C-3954	2836	No Ct	-	72.45
C3	C-3948	2853	No Ct	-	72.45
D3	C-3945	4814	No Ct	-	72.45
E3	C-3946	2985	No Ct	-	72.05
F3	C-3943	2829	No Ct	-	71.95
G3	C-3942	2888	No Ct	-	71.55
H3	C-3940	2829	No Ct	-	71.45
A4	C-3937	2803	No Ct	-	71.65
B4	C-3936	2811	No Ct	-	72.05
C4	C-3933	2863	No Ct	-	71.65
D4	C-3932	3029	No Ct	-	72.05
E4	C-3931	2945	No Ct	-	71.65
F4	C-3928	4233	No Ct	-	71.55
A11	RVFV(0.1ng)	11001	17.12	+	78.25
B11	CCHFV(10pg)	8142	23.46	+	78.7
C11	LACV(10pg)	11099	22.14	+	79.15
D11	NTC	2806	No Ct	-	71.15

Figure 1.

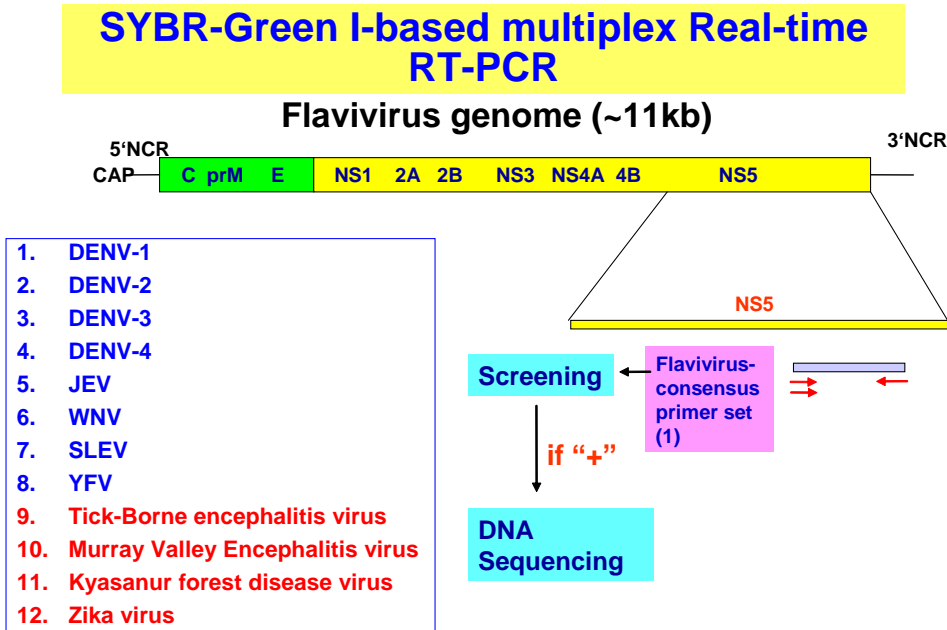


Figure 2.

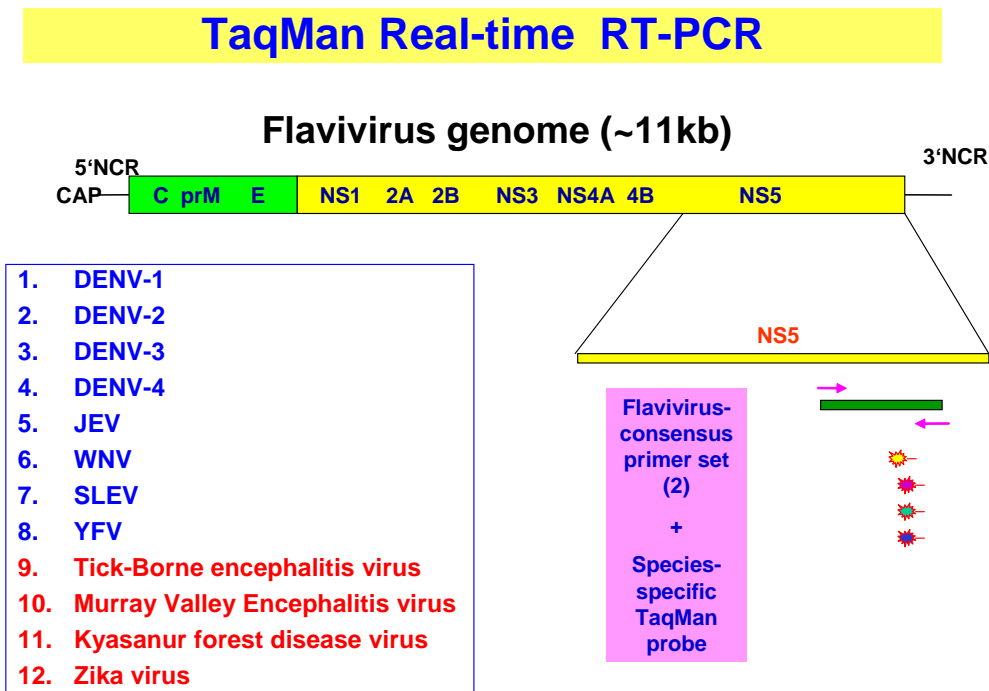


Figure 3.

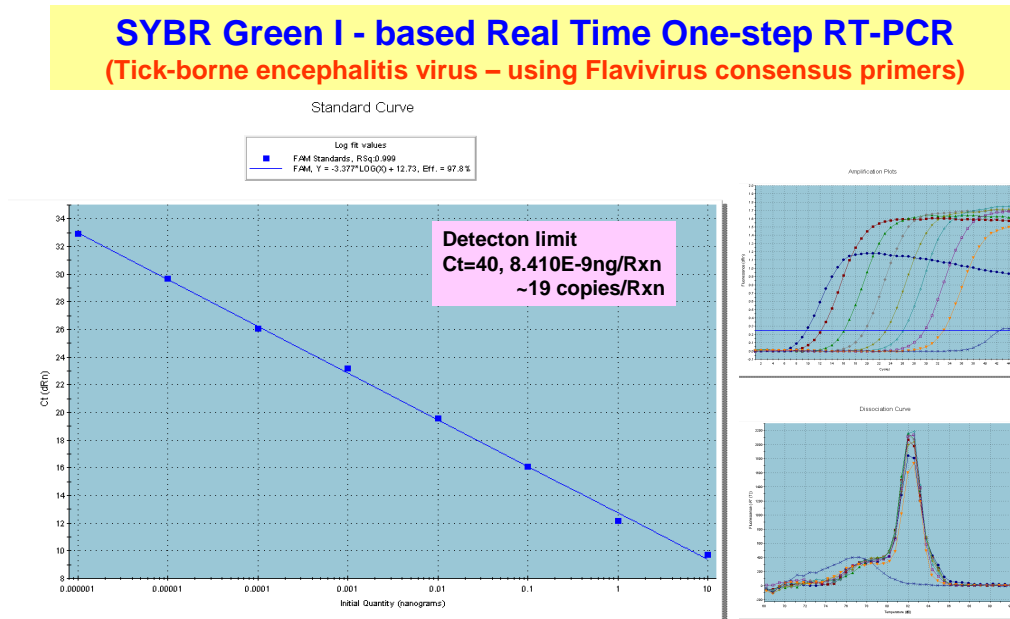


Figure 4.

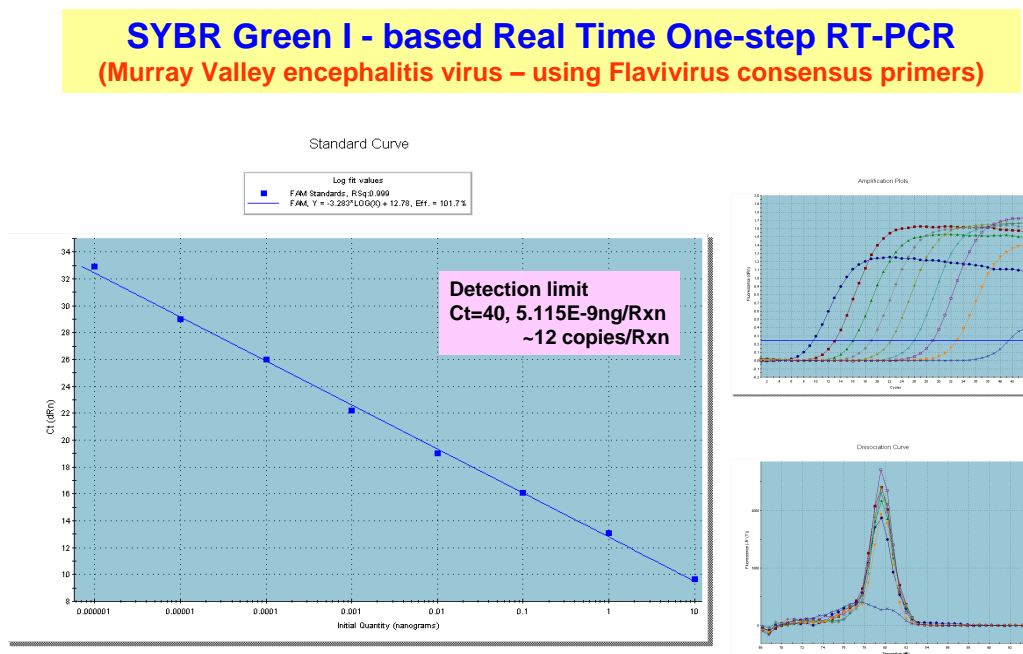


Figure 4.

Figure 5.

SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(Kyasnur Forest disease virus – using Flavivirus consensus primers)

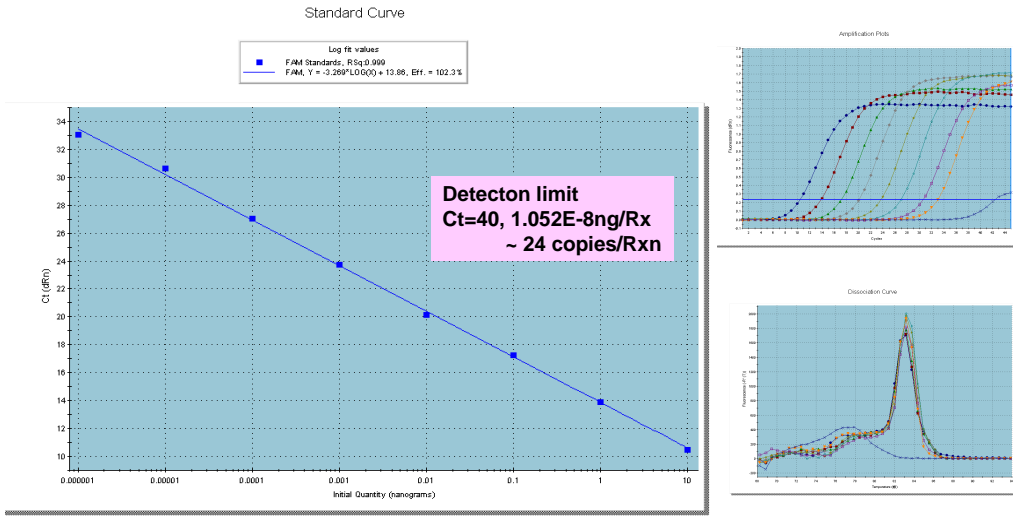
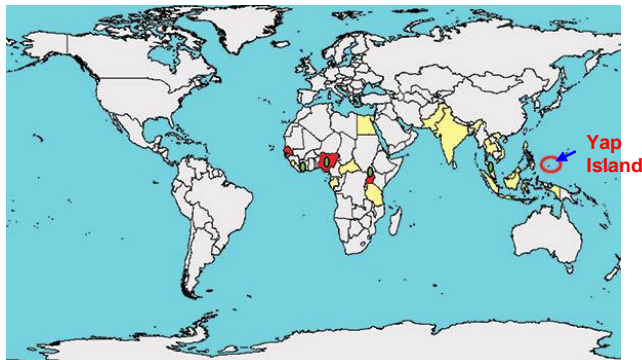


Figure 6.



Distribution of Zika virus, 1947–2007

- ✓ Yellow indicates human serologic evidence
- ✓ Red indicates virus isolated from humans
- ✓ Green represents mosquito isolates

SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(using Flavivirus consensus primers)

Well	Ct	Result
D2PC	20.34	+
D1PC	22.59	+
NTC	No Ct	-
ZIKV	20.79	+

D2PC: 5x10⁵ pfu/ml

< 50 copies/Rxn

Figure 7

**SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(SFTSV-specific primers)**

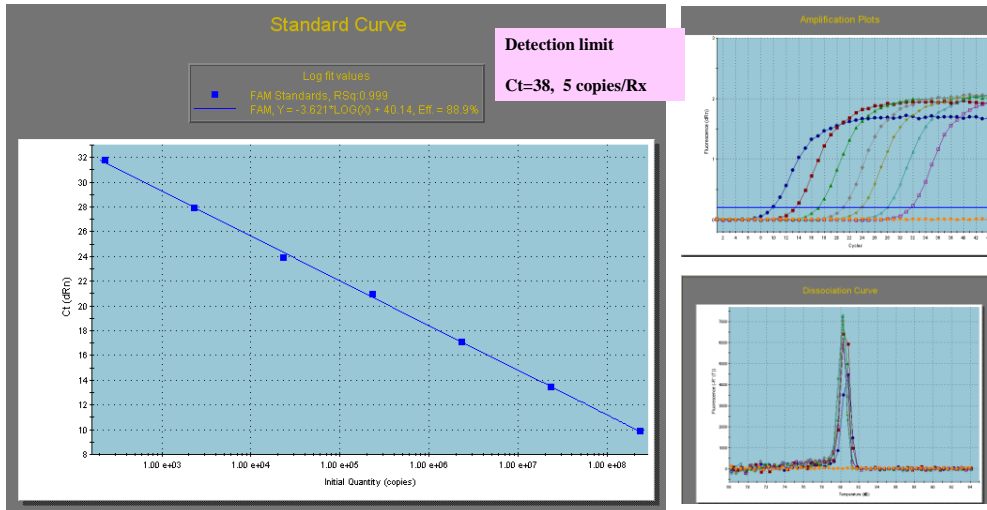
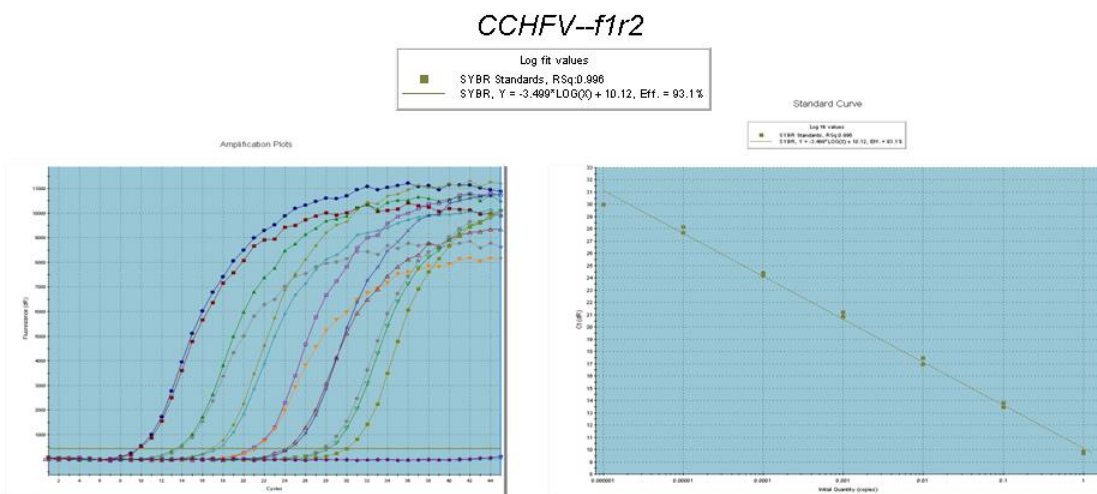


Figure 8.

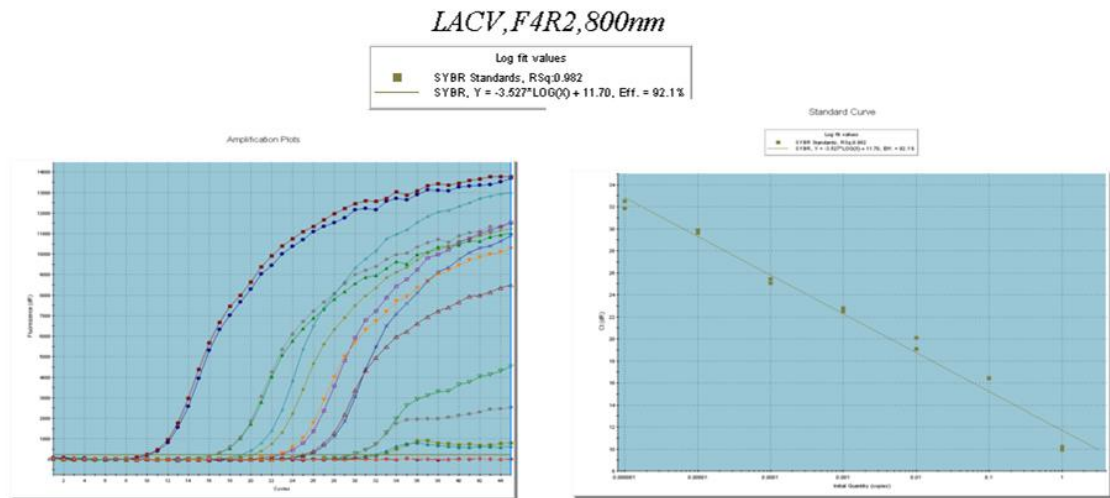
**SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(Nairovirus-consensus primers)**



Ct=40, 2.89E-9ng; 2.65 copy

Figure 9.

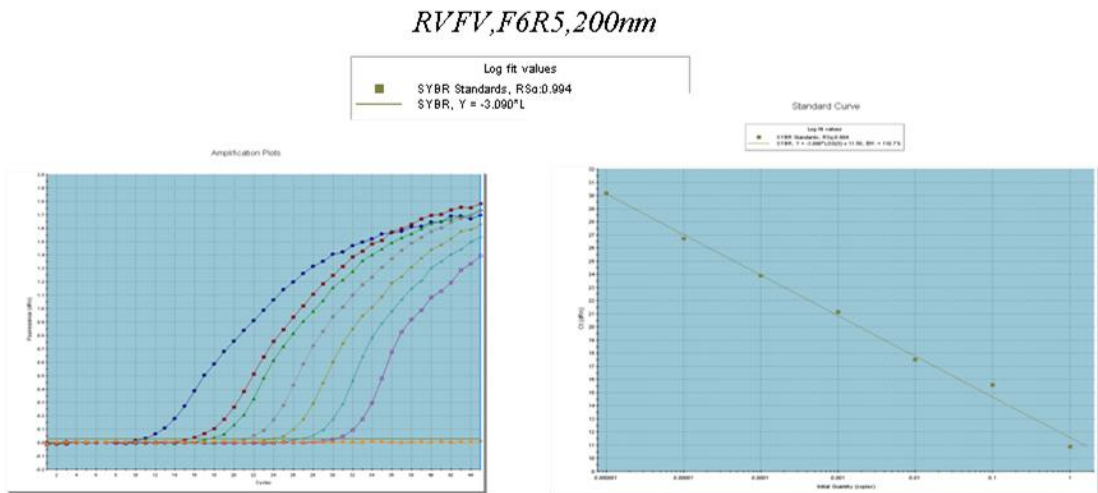
**SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(Orthobunyavirus-consensus primers)**



Ct=40,9.47E-9ng;8.77 copy

Figure 10.

**SYBR Green I - based Real Time One-step RT-PCR
(Phlebovirus-consensus primers)**



Ct=40,6.35E-10ng;0.588 copy