

計畫編號：DOH98-DC-2007

行政院衛生署疾病管制局 98 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：98 年 1 月 1 日至 98 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	1
一、 中文摘要	2
二、 英文摘要	3
三、 前言	4
四、 材料與方法	8
五、 結果	12
六、 討論	18
七、 參考文獻	21
八、 圖、表	27

共(31)頁

一、中文摘要

台灣地區呼吸道群聚事件發生頻繁，其中仍有相當大部分案例檢測不出致病源。目前本局已建置有呼吸道病毒快速偵測系統，可快速偵測包括 A 型、B 型流感病毒、RSV、Adenovirus、HSV、以及其他如 SARS 病毒等。但尚有許多臨床上有明顯呼吸道症狀，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，故本計劃建置包括 human bocavirus (HBoV)、human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)、human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)、human polyomavirus KI (KIPyV) 以及 human polyomavirus WU (WUPyV) 等呼吸道新興病毒之快速偵測系統，以健全呼吸道病毒檢驗方法。然而由於這些新興病毒大部份均無法進行體外培養系統，故考量檢體使用量及後續流行病學研究分析，本研究計畫總目標以建立新興病毒的快速偵測系統，以解決新興感染原檢體的檢驗問題，並建立台灣地區呼吸道病毒的流行病學資料庫，作為防疫政策的參考依據。

關鍵字：新興呼吸道病毒、real-time PCR、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 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

呼吸道感染是常見的嬰幼兒感染之一。上呼吸道感染有可能導致氣喘發作，中耳炎及下呼吸道感染(Jennings et al., 2004)。病毒性呼吸道感染常由鼻病毒、呼吸道融合細胞病毒、流感病毒、副流感病毒以及腺病毒等引起，這些病原體可以利用病毒培養或抗原監測幫助診斷；但是在臨床上仍然有病徵出現，但卻找不到致病源的案例。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 (Immunofluorescent assay, FA)、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(Lin et al., 2008; Lin et al., 2007)。為因應流感大流行，疾管局研檢中心已針對流感病毒建立完善的偵測方式並落實於各合約實驗室之檢驗操作。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)、副流感病毒(parainfluenza virus)、腺病毒(adenovirus, AdV)等；目前則以傳統培養方法進行病原分離，並傳統 PCR 及螢光染色方法進行病原體種類的鑑定。

然而以目前靈敏的分生技術偵測，仍有 40-60% 的呼吸道病毒是偵測不出致病源的(Albuquerque et al., 2009; Jennings et al., 2004)。2005 年後陸續有一些新興的呼吸道病毒被偵測出來，包括 human bocavirus (HBoV)、human metapneumovirus (HMPV)、new human coronaviruses (NL63, HKU1) 以及 2007 年新發現的 human KI polyomavirus (KIPyV), WU polyomavirus (WUPyV)等(Allander et al., 2005; Biacchesi et al., 2003; Dalianis et al., 2009; Dominguez et al., 2009)，可能在偵測不出致病源的呼吸道檢體中，就包括這些新興的呼吸道病毒。

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。為避免單一檢驗便需消耗一次檢體量，本計畫第一年除了擬建立這些新興病毒的檢測方法，並初步以局裏未知病原的呼吸道檢體進行測試，以了解這些新興病毒在台灣是否已潛伏存在；同時將於接續的計畫年度中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。同時依據執行其間所收集之資訊，依氣候如季節、溫度、雨水等條件，建立台灣地區呼吸道病毒的流行圖譜，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

所使用的檢體為疑似呼吸道感染檢體，採集病患咽喉部位檢體後，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°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

- 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），反應最終體極為 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、新興病毒資料搜尋以及基因序列排比

至 NCBI 基因資料庫中搜尋已發表之 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、KIPyV、WUPyV 等新興病毒序列資料，截至 98 年 10 月 31 日止，共計得到 23 條 HCoV-HKU1 complete genome (NC_006577、DQ415896-DQ415914、DQ339101、AY884001、AY597011)；5 條 HCoV-NL63 complete genome (NC_005831、DQ445912、DQ445911、AY567487、AY815594)；9 條 KIPyV complete genome (NC_009238、EU358767、EU358766、EF520287-EF520289、EF127906-EF127908)；23 條 WUPyV complete genome (GQ926975-GQ926980、EU711054-EU711058、EJ890981、EJ890982、NC_009539、EU358769、EU358768、EU296475、EF444549-EF444554) 以及 101 條 HBoV complete genome (GQ925675、GQ926981-GQ926983、EF450717-EF450740、NC_012729、GQ455987、GQ455988、FJ858259-FJ858261、GQ200737、FJ973558-FJ973568、EU984231-EU984245、NC_012564、NC_012042、EU918736、EU082213、EU082214、AB480170-AB480176、FJ697452、AB481071-AB481085、FJ170278-FJ170280、FJ496754、NC_007455、EU262978、EU262979、EF203920、EF584447、EF441262、DQ988934、EF203921、EF203922、DQ988933、EQ778300、DQ340570、DQ000495、DQ000496)。將各新興病毒進行序列排比後，進行偵測片段的篩選。

二、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，所使用的方式如圖一所示，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，進行排比後選擇序料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 NP1 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。設計出來的各病毒核酸引子及探針序列如表一。

三、核酸引子對專一性測試

3.1. 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），結果如圖二(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，檢測結果如圖三所示，並無非特異性片段被複製出。

3.2. 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）結果如圖二(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。

3.3. 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），結果如圖二(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。

3.4. 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），結果如圖二(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。

3.5. 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），結果如圖二(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。各新興病毒的詳細專一性偵測結果，整理如表二所示。

四、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 DH5 α 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四所示，靈敏度可達 1 個 copy/25 μ l (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三所示，核酸偵測的靈敏度約在 1-10 copies/25 μ l，顯示所建置的快速偵測系統具有相當好的靈敏度。

五、檢體篩檢初步結果

將 2009 年截至 9 月 30 日止之疑似呼吸道感染檢體包括咽喉拭子、鼻咽拭子、痰液、肺部組織等以建置之偵測系統進行新興病毒檢測。共計 563 支進行檢驗的檢體中，檢測出包括 HCoV-HKU1 病毒 1 支，HCoV-NL63 病毒 1 支以及 4 支 HBoV 病毒，新興病毒整體陽性率約為 1.1%。而這些檢體一經由例行性呼吸道病毒之 real-time PCR assay 以及培養鑑定的

結果均為檢驗結果陰性，顯示這些被鑑定出的新興病毒並沒有跟其他流感、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。而將得到之 HCoV-HKU1 病毒基因片段送至 NCBI 基因序列資料庫進行比對，同時以 Neighbor-joining Method 進行初步演化分析，結果如圖五所示，顯示病毒序列與香港所得到的序列 genotype A 相近，但仍須進行全長定序，才可得到完整的演化資訊。

六、討論

本計畫已建置各新興病毒包括 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、KIPyV 以及 WUPyV 等病毒之 real-time PCR 檢測系統，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 以及其他新興病毒進行專一性檢測，均無非特異性的 PCR 產物產生，顯示建置系統的專一性效果良好。而經由建置的標準品 DNA 進行各系統的靈敏度評估，結果顯示病毒的靈敏度約在 1-10 copies 之間，與過去已發表研究的靈敏度效果相當(Bialasiewicz et al., 2007; Dare et al., 2007; Lu et al., 2006)。

利用已建置的新興病毒偵測系統，針對 2009 年疑似呼吸道病毒檢體共 563 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 6 支新興病毒，陽性率約 1.1%，其中 HCoV-HKU1 病毒以及 HCoV-NL63 病毒陽性率約為 0.2%，與過去研究顯示 HCoV 於呼吸道感染的盛行率約為 1%-10%相較之下略低 (van der Hoek et al., 2005; Woo et al., 2005b)。可能原因由於過去研究均統計包含已發現之 HCoV-OC43 以及 HCoV-229E 病毒(Kuypers et al., 2007)，HCoV-OC43 以及 HCoV-229E 根據研究顯示盛行率為 5%-30% (McIntosh et al., 1970)，故計算盛行率時會有誤差，且目前所檢測之檢體多為春夏季檢體，根據研究顯示，Human Coronavirus 病毒好發季節雖不明顯，但仍以秋冬為可能的主要發生時間 (Dominguez et al., 2009; Kuypers et al., 2007; Woo et al., 2005b)，故持續進行檢體之收集與偵測實屬必要。而已偵測出之 HCoV-HKU1、HCoV-NL63 以及 HBoV 病毒檢體，將後續進行病毒全序列以及各開放閱讀區 (open reading frame, ORF) 之基因定序，以分析台灣地區各新興病毒之

基因組成，並與其他世界各地包括鄰近亞洲地區，以及其他國家病毒進行親源演化分析。

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 6 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。

本計畫目前雖已建置包括 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63、KIPyV 以及 WUPyV 之 real-time PCR 檢測系統，但由於這些新興病毒目前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，經由常見呼吸道病毒如 influenza virus、parainfluenza virus、Adenovirus、HSV、RSV 等例行檢測之後，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。為避免此現象，本計畫下一年度將整合現有的呼吸道病毒即時偵測系統，以及今年所建置的新興病毒即時偵測系統，發展多重病毒同步偵測方法，以節省檢體消耗。

由於進行多重病毒偵測系統需考量核酸引子對以及探針相互混合後，可能會因相互干擾或可能產生的互黏情形等，而導致 PCR 的偵測效果產

生的影響，故須經由反覆測試評估，以避免降低檢測靈敏度影響偵測效果，並提升新興病毒基礎流行病學檢驗量能。

七、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.
- 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., Ubbilos, I., Templeton, K. and Simmonds, P. (2007) No evidence for

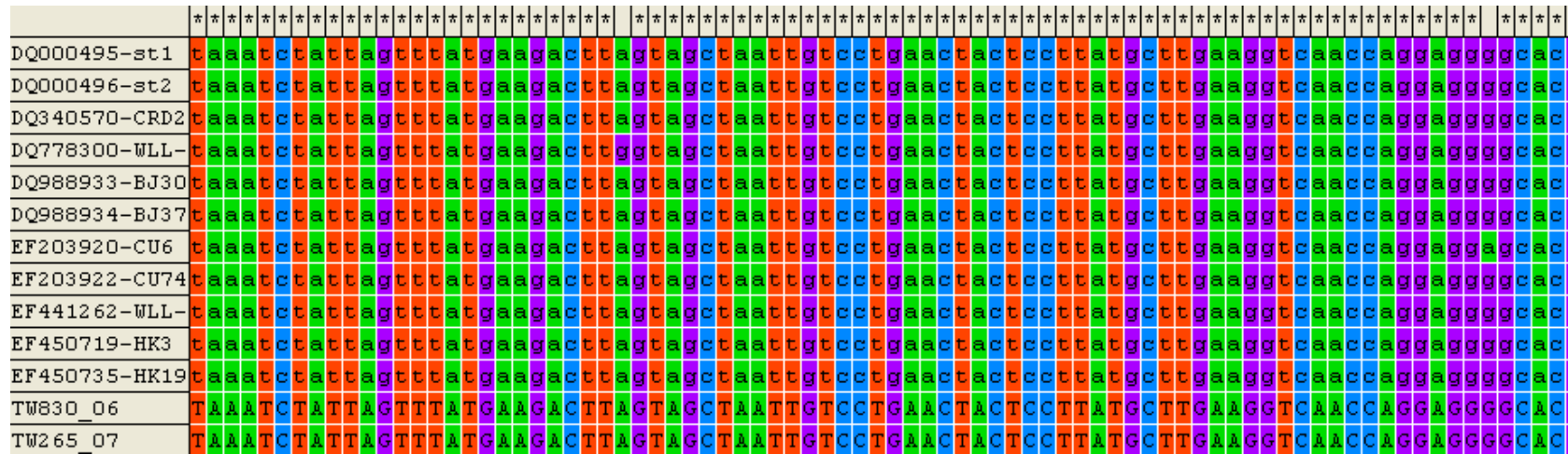
- an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol* 40(4), 307-11.
- Payungporn, S., Chieochansin, T., Thongmee, C., Panjaworayan, N., Samransamruajkit, R., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. (2008) Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses 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. *Virol J* 1, 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.

八、圖表

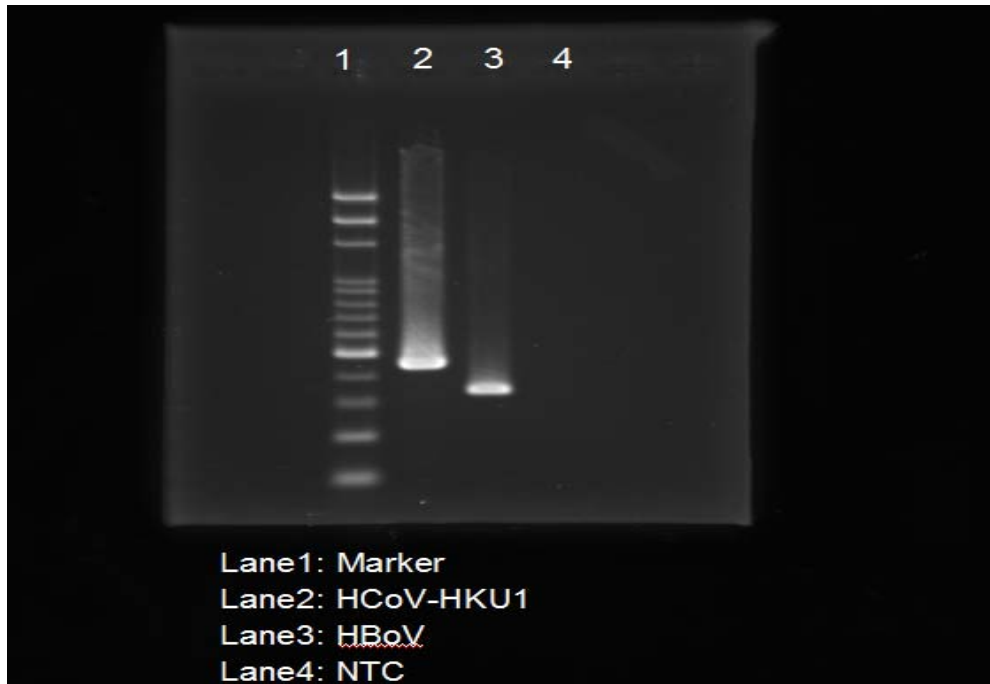


Percent Identity

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			
Divergence	1	█	99.5	99.5	99.3	99.5	99.4	99.4	99.1	99.4	99.5	99.6	99.5	99.4	1	DQ000495-st1-sweden
	2	0.5	█	99.9	99.7	99.8	99.8	99.8	99.3	99.8	99.9	99.9	99.9	99.6	2	DQ000496-st2-sweden
	3	0.5	0.1	█	99.7	99.8	99.8	99.8	99.2	99.8	99.9	100.0	99.9	99.7	3	DQ340570-CRD2-USA
	4	0.7	0.3	0.3	█	99.6	99.6	99.6	99.0	99.7	99.7	99.8	99.7	99.4	4	DQ778300-WLL-1
	5	0.5	0.2	0.2	0.4	█	99.9	99.7	99.1	99.7	99.8	99.9	99.8	99.5	5	DQ988933-BJ3064-Beijing
	6	0.6	0.2	0.2	0.4	0.1	█	99.7	99.1	99.6	99.8	99.8	99.8	99.5	6	DQ988934-BJ3722-Beijing
	7	0.6	0.2	0.2	0.4	0.3	0.3	█	99.1	99.7	99.8	99.9	99.9	99.6	7	EF203920-CU6-Thailand
	8	0.9	0.8	0.8	1.0	0.9	0.9	0.9	█	99.1	99.2	99.3	99.2	99.0	8	EF203922-CU74-Thailand
	9	0.6	0.3	0.2	0.3	0.3	0.4	0.3	0.9	█	99.8	99.8	99.8	99.5	9	EF441262-WLL-2
	10	0.5	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.8	0.3	█	99.9	99.9	99.6	10	EF450719-HK3
	11	0.4	0.1	0.0	0.2	0.1	0.2	0.1	0.7	0.2	0.1	█	99.9	99.7	11	EF450735-HK19
	12	0.5	0.1	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1	0.8	0.2	0.1	0.1	█	99.7	12	TW265_07
	13	0.6	0.4	0.3	0.6	0.5	0.5	0.4	1.0	0.5	0.4	0.3	0.3	█	13	TW830_06
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

Fig 1. HBoV 序列排比及相似度分析

(A)



(B)

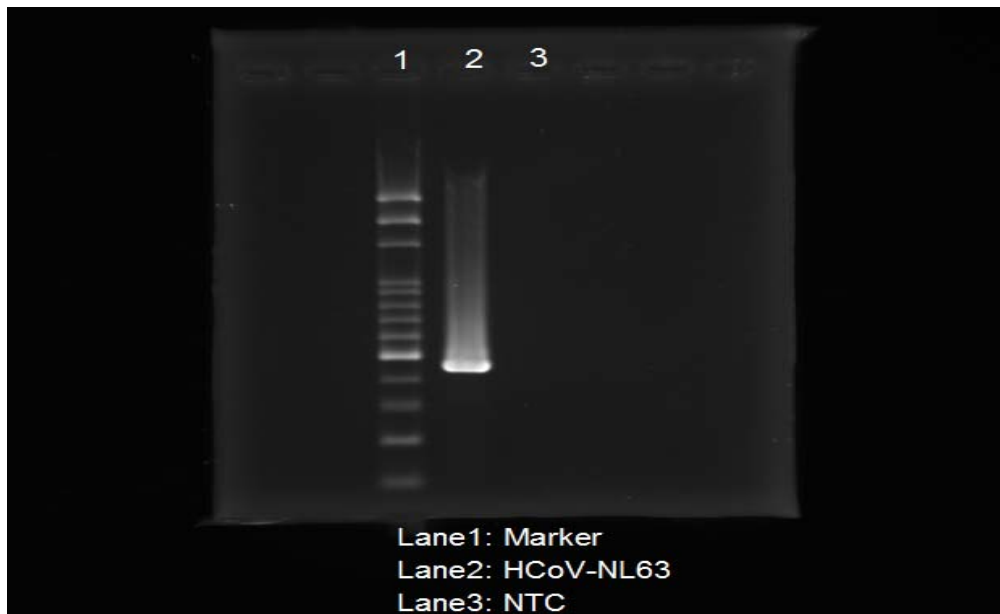


Fig2. 針對 HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HBoV、KIPyV 以及 WUPyV 病毒所設計的核酸引子對 PCR 複製結果，顯示 primer 均對病毒有良好的偵測效果，且無 nonspecific band 產生。其中圖 (A) 為 HCoV-HKU1 及 HBoV PCR 複製片段，圖 (B) 為 HCoV-NL63 PCR 複製片段。

(C)

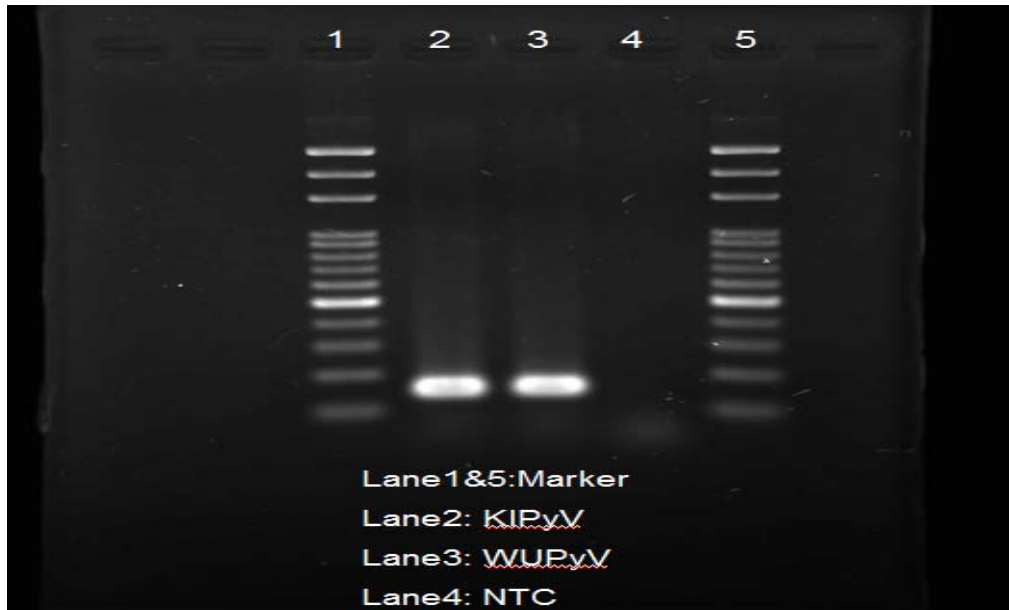


Fig2(續). 針對 HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HBoV、KIPyV 以及 WUPyV 病毒所設計的核酸引子對 PCR 複製結果。其中圖 (C) 為 KIPyV 及 WUPyV PCR 複製片段。

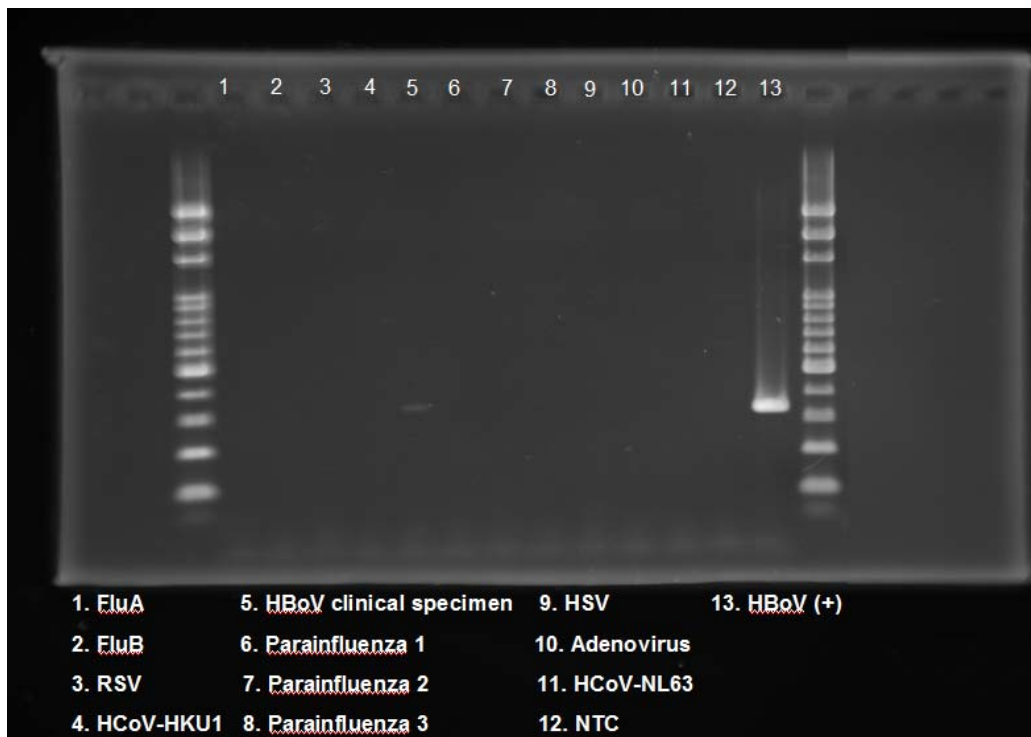


Fig3. HBoV 病毒核酸引子對的專一性測定。顯示針對 HBoV 病毒設計的 primer 並不會對其他呼吸道病毒有非特異性片段被複製出。

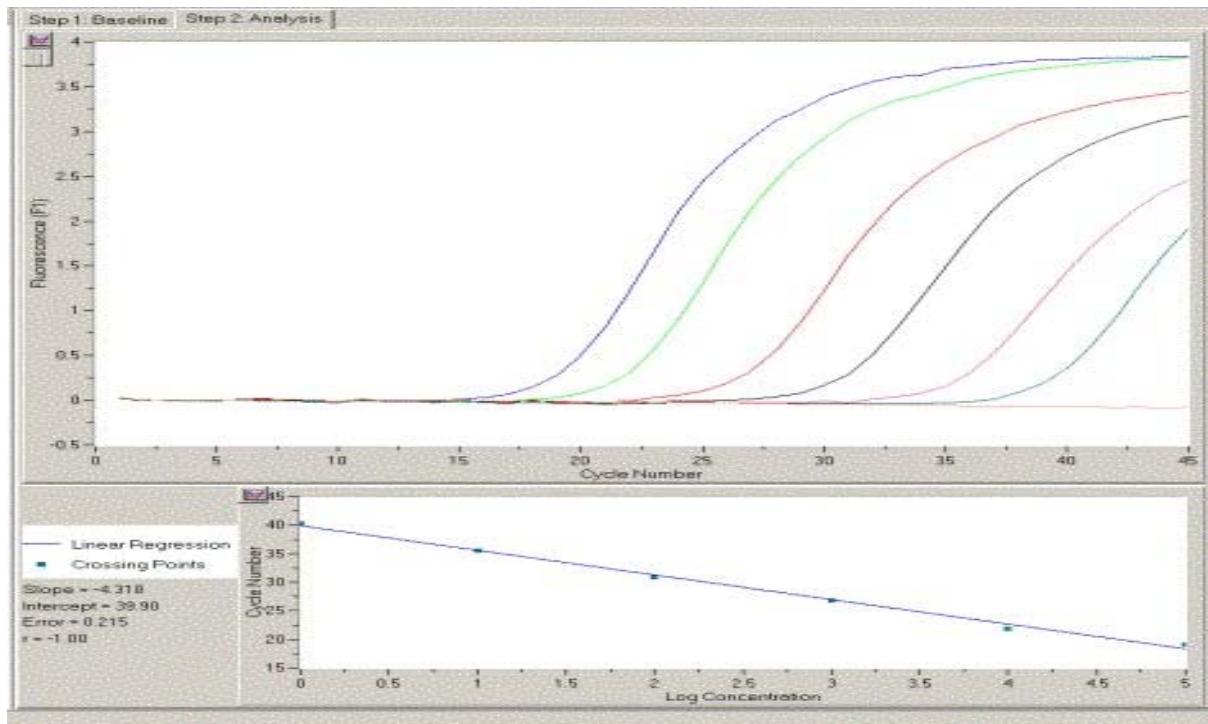


Fig 4. HCoV 標準曲線(由左至右依序為 $1.0E^5$ 至 $1.0E^{10}$ 倍序列稀釋結果)

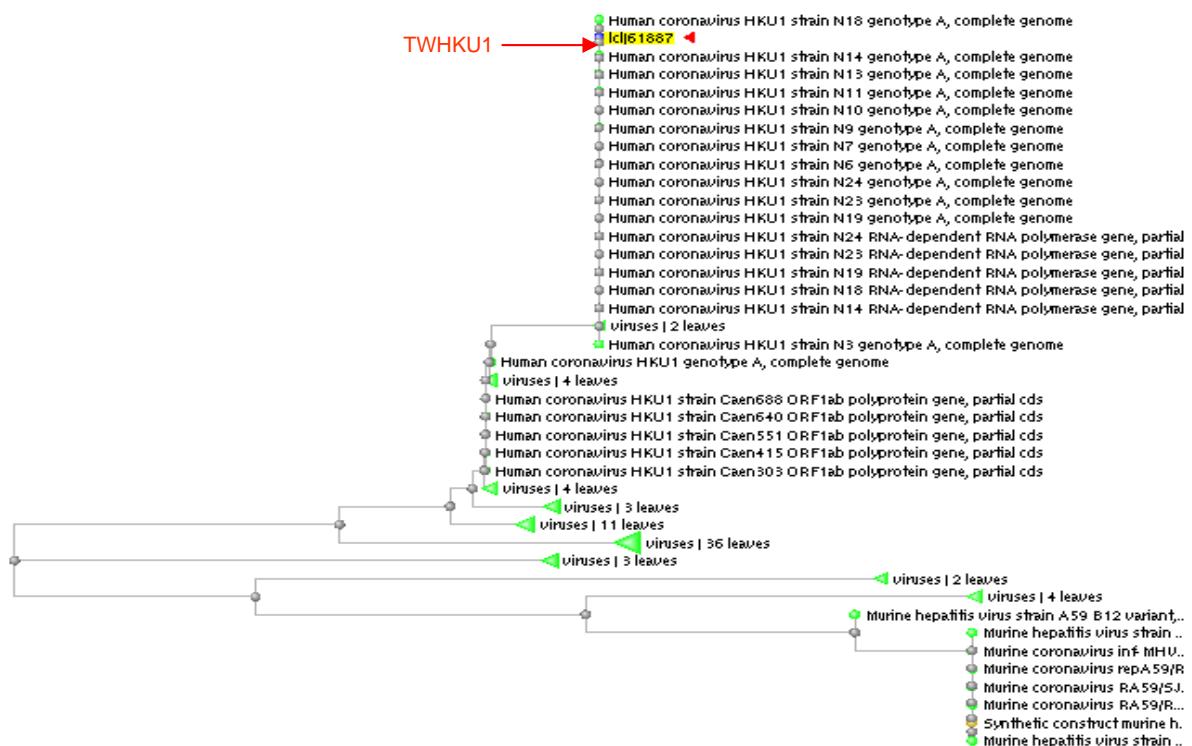


Fig5. 將得到的 2009 年之 TWHKU1 病毒複製基因片段與 NCBI 資料庫上已發表序列比對後，以 Neighbor-joining method 進行初步演化分析。

Table1. 各新興病毒複製之核酸引子及探針序列

Virus	Primer/Probe	Sequence (5' to 3')	Target gene
HBoV	HBoVF	AGCTCTGTAAGTACTATTAC	NP1
	HBoVR	CTCGTGTTGACTGAATACA	
	HBoVProbe	GGAACACCCAATCAGCCACCTATCGT	
HCoV-HKU1	HKU1F	AAAGGATGTTGACAACCCTGTT	Pol
	HKU1R	ATCATCATACTAAAATGCTTACA	
HCoV-NL63	NL63F	AATAATATGTTGCGTACTTTA	Pol
	NL63R	TCATTGAAAAATGTTTCCTA	
KIPyV	KIF	GGATGAAAATGGCATTGGTAT	VP1
	KIR	ACCCTTCTTTGTCTAAAATGTAGCCTAA	
	KIProbe	TAGGCTACATTTTAGACAAAGAA	
WUPyV	WUF	TGTTGGATGAAAATGGCAT	VP1
	WUR	CTACACTTTAGACAAAGAAGGGTTA	
	WUprobe	ACTTGTGCTGACCTTTTGGGAGTT	

Table2. 新興病毒 real-time PCR 靈敏度及專一性測試結果

PCR set	Specimen Pos (+)(copies) or Neg (-)												
	FluA	FluB	PF*1	PF2	PF3	HSV	RSV	AdV	HBoV	HKU1	NL63	WUPyV	KIPyV
HBoV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
HKU1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
NL63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
WUPyV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
KIPyV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

*PF: parainfluenza virus

98年度計畫重要研究成果及具體建議

(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法

主持人：林智暉 計畫編號：DOH98-DC-2007

1.計畫之新發現或新發明

建置台灣新興呼吸道病毒包括 human bocavirus (HBoV)、human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)、human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)、human polyomavirus KI (KIPyV)以及 human polyomavirus WU (WUPyV)等呼吸道新興病毒之快速偵測系統

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之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 activity 上升，做為流行預警之參考，於防治實務具有助益。