計畫編號：MOHW104-CDC-C-315-000114

MOHW105-CDC-C-315-123502

MOHW106-CDC-C-315-113501

衛生福利部疾病管制署 104 - 106 年署內科技研究計畫

病媒病毒核酸快速等溫檢測技術之開發

年 度 研 究 報 告

執行機構：疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人： 舒佩芸

研究人員：林世浤、楊正芬、張淑芬、蘇千玲

執行期間：104 年 1 月 1 日至 106 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	(11-16)
(4)	討論	(17)
(5)	結論與建議	(18)
(6)	計畫重要研究成果及具體建議	(19)
(7)	參考文獻	(20-21)
三、表次		(22-26)
四、圖次		(27-54)

共 (54)頁

中文摘要

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，使得新興/再浮現病媒病毒（vector-borne viruses）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。近年來如登革熱、屈公病、黃熱病、西尼羅熱在全球散播的範圍日益擴大，日本腦炎在亞洲造成嚴重流行，蜱媒腦炎在歐洲及亞洲流行，新種類的布尼亞病毒也在中國大陸、日本、韓國流行等，皆造成公共衛生上很大的危機。台灣位於亞熱帶地區，節肢動物種類繁多，許多種類皆具有傳播病毒的能力，一旦病毒由境外引入，極有可能造成台灣本土的流行，影響民眾的健康。所以有必要建立高靈敏、快速的核酸檢測系統，檢測出各種新興/再浮現病媒病毒傳染病，包括黃病毒屬（Flavivirus）之登革熱、日本腦炎、茲卡病毒、黃熱病等，阿爾發病毒屬（Alphavirus）之屈公病毒等。本研究我們利用快速等溫核酸增殖(RT-LAMP 與 RT-RPA)、定量反轉錄 RT-PCR (qRT-PCR)與 TaqMan RT-PCR 方法，開發病媒病毒等溫核酸檢測試劑，其優點為核酸增殖可在等溫條件下進行與即時定量，有利於開發出定點照護(point-of –care) 核酸檢測方法，及時幫助傳染病的防治及病人的醫療照顧。

關鍵詞：病媒病毒、快速等溫核酸增殖方法、TaqMan 核酸增殖方法

英文摘要

Because of the increasing international traffic, global warming and climate change, pathogens and their vectors have expanded their geographical distributions and threaten the health of human population. Vector-borne viral diseases transmitted by blood-feeding arthropods, such as mosquitoes, ticks and mites, are among the most important infectious diseases to emerge in the human population. In recent years, dengue virus, chikungunya virus, yellow fever virus and West Nile virus become the world's most widely spread mosquito-borne viral diseases and threatened more than two-thirds of the world's population. West Nile virus dramatically expanded its geographic range to the Americas, chikungunya outbreaks spread quickly on Indian Ocean, Western Pacific Ocean islands, and the Americas. Tick-borne encephalitis emerged in Europe and Asia. In addition, a new Phlebovirus (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) was detected and caused outbreaks in China, Japan and Korea. Taiwan is located in the subtropical region and has a large number of arthropod species. Among them, many species are potential vectors for vector-borne viral diseases. The introduction of vector-borne virus pathogens into an area where competent vectors had existed, may cause new and devastating outbreaks in the country. Therefore, there is a need for establishment of a laboratory based surveillance and diagnostic system for the effective detection of unknown / emerging vector-borne viral diseases. In this study, we develop the isothermal nucleic acid amplification assays (LAMP and RPA), and TaqMan qRT-PCR for detection of Dengue, Japanese encephalitis, chikungunya, Zika fever, yellow fever and Lassa viruses. Rapid and sensitive diagnostic tools for detection of arboviral infections can help disease control and case management.

keywords：Vector-borne viruses, LAMP, RPA, RT-qPCR, TaqMan probe RT-PCR

前言

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/新興病媒病毒（vector-borne viruses）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）所媒介的病毒傳染病最為重要。近年來如登革熱、西尼羅熱在全球散播的範圍日益擴大(1-3)，屈公病與茲卡病毒在亞洲、非洲地區及美洲迅速傳播(4-9)，蜱媒腦炎(Tick-borne encephalitis) 在歐洲及亞洲流行，新種的布尼亞病毒(Bunyavirus, Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; SFTSV) (10) 在中國大陸、日本、韓國流行，皆造成全球公共衛生上重大的危機。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。

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%。目前全球至少有一千種以上的病毒被歸類為病媒病毒，而以節肢動物為媒介的病毒至少有 700 多種，其中超過 100 多種的病媒病毒可感染人類。引起人類疾病的病媒病毒主要分為四類，包括阿爾發病毒屬（Alphavirus），黃病毒屬（Flavivirus）、布尼亞病毒科（Bunyaviridae）及呼腸孤病毒科(Reoviridae)的病毒。Alphaviruses 所引起的主要疾病為屈公病（Chikungunya）、羅斯河病毒病（Ross River virus disease）、東方馬腦炎（Eastern Equine encephalitis, EEE）、西方馬腦炎(Western Equine encephalitis，WEE)及委瑞內拉馬腦炎(Venezuelan equine encephalitis，VEE)等；Flaviviruses 引起的主要疾病為登革熱（Dengue）、茲卡病毒感染症(Zika virus disease)、黃熱病（Yellow fever）、日本腦炎（Japanese encephalitis）、西尼羅熱/腦炎（West Nile fever/encephalitis）、聖路易腦炎（St. Louis encephalitis）及蜱媒腦炎 (Tick-Borne Encephalitis Virus,

TBEV) 等；Bunyaviruses 引起的主要疾病為加利福尼亞腦炎(California encephalitis)，LaCrosse encephalitis、裂谷熱（Rift Valley fever）、克里米亞-剛果出血熱（Crimean-Congo hemorrhagic fever）、發燒伴血小板減少症候(Severe fever with thrombocytopenia syndrome SFTS) (10)及漢他病毒出血熱及漢他病毒肺症候群等；Reoviruses 引起的主要疾病為科羅拉多蜱咬熱(Colorado tick fever virus; CTFV)、Banna virus (BAV)所引起之腦炎等。

本研究將利用三種方法進行病媒病毒傳染病之偵測，對疑似發燒病患進行檢驗，以及時篩檢出病人，減少病毒之境外移入及本土流行。等溫核酸檢測方法與傳統的 PCR 反應不同，可在恆溫下進行核酸增殖反應，其優點為可利用簡單且價格低廉的儀器進行檢驗，並可縮短反應的時間，提升檢驗時效。等溫核酸檢測的方法有許多種，較常使用的如 RT-LAMP (Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)方法，可使用 Eiken Genome site 所開發的 RT-LAMP 試劑進行反應，RT-LAMP 在 60 ^{o}C 下，反應約需 60 min。與 RT-RPA(Reverse transcription Recombinase Polymerase Amplification)方法，在 40 ^{o}C 下，反應可在 40 分鐘內完成，若利用儀器(可攜式，重約 3 公斤)，則可在反應進行中即時觀察定性與定量結果，具有在野外及臨床 point-of-care 即時診斷的優點。由於例行防疫檢體檢驗之需要，本研究亦利用 TaqMan RT-PCR 方法開發 yellow fever virus 及 Lassa virus 檢測方法。TaqMan RT-PCR 因靈敏度高、準確、專一及快速而被廣泛採用。TaqMan probe 是一條人工合成 oligonucleotid，在 oligonucleotid 的兩端分別標記上不同的螢光物質，5’端螢光稱為 reporter 而 3’端螢光稱 quencher。如 probe 在游離狀態時，reporter 及 quencher 的交互作用會互相遮蔽對方的螢光以達到不會發光，當 DNA 複製時 probe 被 hydrolysis 後，

reporter 與 quencher 會分開來，而 quencher 就失去可以遮蔽 reporter 的效果，則使 reporter 發光被偵測到。probe 是特異性的與目標的片段結合，因此不會偵測到非特異的產為，其專一性佳。

材料與方法

本計畫之實施方法為利用 RT-LAMP、RT-RPA 及 TaqMan RT-PCR 方法開發病媒病毒傳染病之分子診斷方法。

1. **血清檢體及病毒株來源**：血清檢體來源為通報自疾管署之各種病媒病毒感染者之血清，及配合機場發燒篩檢系統，對疑似發燒病患進行例行性篩選採集之血清。檢體以冷藏方式送達實驗室，實驗室人員於收到檢體後立即置於 4℃冰箱內靜置保存，隨後進行後續之檢驗分析事項。各種病毒來源為自行分離建立的病毒株，或購自 ATCC，或由其他實驗室分讓之病毒株。
2. 抽取 RNA：利用 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，可以選擇性的與核酸結合，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 Ribonuclease 去活性，再將處理後的血清加到離心圓柱中，使核醣核酸與矽土膜結合，再經過離心及加入清洗液之重覆步驟清洗離心圓柱，最後以純水將核酸洗脫下來。血清(140 µl)中的 RNA 依據本法萃取，最後將 RNA 溶於 70 µl 純水(Water , containing 0.02% sodium azide)。
3. 引子(Primer)的設計與合成：依 RT-LAMP，RT-RPA 及 TaqMan 原理設計病毒專一性引子以檢測茲卡病毒（ZIKV），屈公病毒（CHIKV）及黃熱病毒(YFV)等病媒病毒。
4. TaqMan RT-PCR 方法需設計引子與探針組(primers and TaqMan probe)。不同的探針可加上不同螢光染劑，可將不同的引子探針組混合在同一試管中反應(multiplex RT-PCR)。 TaqMan RT-PCR 反應條件為: 12.5 ul 2X QuantiTect SYBR Green RT-PCR master mix、0.25 ul QuantiTect RT mix、0.6 ul primer mix (10 uM) 及 5ul template RNA 混合，50℃, 20 min 進行

reverse transcription、95℃，15 min Taq polymerase activation、95℃，15 sec 與 60℃，60 sec 收集螢光值，進行 45 Cycle。

5. RT-LAMP：LAMP 是一種能夠在恆溫條件下(60-65℃)快速擴增核酸的方法。需設計 4 至 6 個 Primers，包括兩個 outer、兩個 inner 和兩個 loop primers，6 primers 需認識 target sequence 上的 8 個位置，Primer 的設計可採用 LAMP 設計軟體 (Net laboratory, Japan, http://venus. netlaboratory. com)。Primer 名稱如下: Forward outer primer (F3), reverse outer primer (B3)，forward inner primer (FIP) and reverse inner primer(BIP)，forward loop primer (FLP) 及 reverse loop primer (BLP)。FIP 包含 F1c 和 F2，BIP 包含 B1c 和 B2，FIP 及 BIP primers 需經 HPLC 純化。 FLP 和 BLP primers 包含 complementary to the sequence between F1&F2 and B1&B2 regions。LAMP 擴增反應稱為 strand displacement DNA synthesis，是由於 Bst DNA polymerase 具有強的 strand displacement activity。在 LAMP 反應過程不需 DNA denaturation 步驟，故可在恆溫下進行反應。當檢測 RNA 病毒時，先進行 reverse transcription，再進行 LAMP，故稱為 RT-LAMP。RT-LAMP 反應條件: 12ul 2x reaction Mix、1ul Enzyme Mix (Bst and AMV)、5ul primer mix、5ul template RNA，在 60℃作用一小時、80℃作用 5 分鐘，將產物置於 4℃。RT-LAMP 產物之以 2%洋菜膠進行電泳偵測或以 real-time trubidimeter LA-500 偵測產物。
6. RT-RPA: RT-RPA 主要是利用三種酶 (recombinase、single strand binding protein, SSB 及 strand-displacing polymerase)的作用。Recombinase 能使 primers 與雙股 DNA 中之一股同源序列進行配對。SSB 可與未配對的單股 DNA 進行結合，維持 primers 與同源序列的配對。Strand displacing polymerase 利用引子進行 DNA 的擴增反應，反應過程可在 37-42℃下進行，約 10-20 分鐘即可完成反應。也可加入反轉錄酶（RT）以檢測 RNA，

稱為 RT-RPA。RT-RPA 反應條件: 29.5 ul, Behydration Buffer、4.2 ul primer mix、0.6 ul exo probe、5ul template RNA、2.4ul magnesium acetate。41℃作用 20 分鐘。

結果

1. **病媒病毒 RT-LAMP、RT-RPA 與 TaqMan probe RT-PCR 系統之引子設計、合成與測試：**

   表一所示為本研究設計出之病媒病毒引子組。

   a. 設計不同的 RT-LAMP 引子組，針對 DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, JEV, CHIKV, ZIKV, YFV 之偵測。

   b. 設計不同的 RT-RPA 引子組，針對 CHIKV, ZIKV 之偵測。

   c. 設計不同的 TaqMan probe RT-PCR 引子組，針對 YFV, LASV 之偵測。

2. **Dengue viruses NS1 (DENV-1~DENV-3)引子組與 3'UTR (DENV-4) 引子組，RT-LAMP 之測試。**

   a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 NS1 引子組 (Figure 1) 與 3'UTR 引子組 (Figure 3)，利用電泳分析結果，各表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子組具有專一性。

   b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 NS1 引子組 (Figure 2)與 3'UTR 引子組 (Figure 3)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10-100 pfu/mL。

3. **Dengue viruses (DENV-1~DENV-4) E gene 引子組，RT-LAMP 之測試。**

   a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 E gene 引子組(Figure 4)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登

革病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子有專一性。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 E gene 引子組(Figure 5)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度至少可達 10 pfu/mL 以下。

4. **Dengue viruses (DENV-1~DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之測試。**

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 3'UTR 引子組 (Figure 6)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎及屈公病毒皆無反應，故設計之引子具有專一性。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 3'UTR 引子組(Figure 7)，利用電泳分析結果，表現出第一、二、三、四型登革病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度可達 10-100 pfu/mL。

c. Table 2 綜合 DENV 測試結果: DENV-1，使用 E primer set，DENV-2，使用 NS1 primer set，DENV-3，使用 3'UTR primer set，DENV-4，使用 3'UTR primer set，可得最佳結果。

5. **Japanese Encephalitis virus (JEV) JEV-2 引子組，RT-LAMP 之測試。**

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，其設計之引子 JEV-1 與 JEV-2 (Figure 8)，利用電泳分析與 Fluorescent dye 偵測結果，表現出 G1 與 G3 型日本腦炎病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對登革及屈公病毒皆無反應，其設計之具引子有專一性。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子 JEV-2 (Figure 9)，利用電泳分析與 Fluorescent dye 偵測結果，表現出 G1 與 G3 型日

本腦炎病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度至少可達 10 pfu/mL 以下。

6. CHIKV 1-2 (3'UTR)引子組，RT-LAMP 之測試。

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之引子組 (Table 1)，利用電泳分析結果，各表現出屈公之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎、第一型登革病毒及茲卡病毒皆無反應，故設計之引子組具有專一性 (Figure 10)。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子組 (Table 1)，利用電泳分析結果，表現出屈公病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10 pfu/mL (Figure 10)。

7. ZIKV 1-2 (3'UTR)引子組，RT-LAMP 之測試。

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之引子組(Table 1)，利用電泳分析結果，表現出茲卡病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對日本腦炎、第一型登革病毒及屈公病毒皆無反應，故設計之引子有專一性 (Figure 11)。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之引子組，利用電泳分析結果，表現出茲卡病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度至少可達 100 pfu/mL 以下(Figure 11)。

c. 利用 LA-500-LAMP 即時濁度測定儀，ZIKV-1 primer 反應結果 AF(10, 非洲株)於 32 min, AS(10, 亞洲株)於 25 min 被偵測、AF(1000, 非洲株)於 52 min, AS(1000,亞洲株)於 47 min 被偵測、NTC 於 52 min 被偵測。ZIKV-1 primer 加上 Loop 反應結果 AF(10)於 13 min, AS(10)於 13 min 被偵測、AF(1000)於 22min, AS(1000)於 21 min 被偵測、NTC 於 36 min 被偵測

(Figure12, Figure13)。

d. 利用 LA-500 —LAMP 即時濁度測定儀，ZIKV-2 primer 反應結果 AF(10)於 49 min, AS(10)於 41 min 被偵測、NTC 陰性。

ZIKV-2 primer 加上 Loop 反應結果 AF(10)於 26 min, AS(10)於 20 min 被偵測、NTC 陰性 (Figure 14,15)。

8. 黃熱病毒(YFV, NS5)引子組，RT-LAMP 之測試。

a. 檢測 RT-LAMP 專一性反應，所設計之 NS5 引子組 (Table 1)，利用電泳分析結果，各表現出黃熱病毒之 LAMP-DNA 片段，各引子組對第一型登革病毒、屈公病毒、茲卡病毒、 日本腦炎及西尼羅病毒皆無反應，故設計之引子組具有專一性 (Figure 16)。

b. 檢測 RT-LAMP 靈敏度，所設計之 NS5 引子組 (Table 1)，利用電泳分析結果，表現出黃熱病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10~1 pfu/mL (Figure 16) 。

c. 利用 LAMP 螢光偵測 (Fluorescent dye)與核酸分析裝置偵測黃熱病毒之 LAMP-DNA 片段(Figure 16)。

d. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，YFV- primer 反應結果，表現出黃熱病毒之 LAMP-DNA 片段，檢測靈敏度約為 10~1 pfu/mL，高濃度可在 30 分鐘開始被增幅 (Figure 17)。

9. 檢測 CHIKV 引子組，RT-RPA 之測試

a. 檢測 RT-RPA 專一性反應，所設計之 NS5 gene 引子組，利用 TwistTM 分析，表現出屈公病毒之 RT-RPA- DNA 片段，引子組對第一型登革病毒、日本腦炎、茲卡病毒、黃熱病毒及西尼羅病毒皆無反應，故設計之引子具有專一性 (Figure 18)。

b. 檢測 RT-RPA 靈敏度，所設計之 NS5 gene 引子組，利用

TwistTM 分析，表現出屈公病毒之 RT-RPA DNA 片段，檢測靈敏度可達 $1x10^2$ pfu/mL, 並可於 10 分鐘內偵測其反應 (Figure 18)。

10. 檢測 ZIKV 引子組，RT-RPA 之測試

a. 檢測 RT-RPA 專一性反應，所設計之 3'UTR gene 引子組，利用 TwistTM 分析，表現出茲卡病毒之 RT-RPA- DNA 片段，引子組對第一型登革病毒、日本腦炎、黃熱病毒、西尼羅病毒及屈公病皆無反應，故設計之引子具有專一性 (Figure 19)。

b. 檢測 RT-RPA 靈敏度，所設計之 3'UTR 引子組，利用 TwistTM 分析，表現出茲卡病毒之 RT-RPA DNA 片段，檢測靈敏度可達 $1x10^3$ pfu/mL, 並可於 10 分鐘內偵測其反應 (Figure 19)。

11. ZIKV (Envolope gene)引子組，RT-qPCR 之測試。

a. 檢測 RT-QPCR 專一性反應，所設計之 Envolope gene 引子組，利用 MX3000 分析，表現出茲卡病毒之 RT-qPCR- DNA 片段，各引子組對第一、二、三、四型登革病毒、日本腦炎、屈公病、黃病毒及西尼羅病毒皆無反應，故設計之引子具有專一性 (Figure 20)。

b. 檢測 RT-QPCR 靈敏度，所設計之 Envolope gene 引子組，利用 MX3000 分析與電泳分析結果，表現出亞洲株(PRVABC59)、非洲株(IBH30656)、PUC57/ZK *Eg* plasmid 之 RT-QPCR-DNA 片段，檢測靈敏度可達 8 pfu/mL (R^2=0.99, Efficiency=91%)、9 pfu/mL (R^2=0.99, Efficiency=101%)與 36 copies /RX (R^2=0.99, Efficiency=105%) (Figure 21, 22, 23)。

d. Tm 值為 82.5, 82.5, 83.5 (Figure 22,24,25)

12. YFV (NS5)引子組，TaqMan probe RT-PCR 之測試

a. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 專一性反應，所設計之 NS5 gene

引子組，利用 Roche LC480 分析，表現出黃熱病毒之 TaqMan probe RT-PCR- DNA 片段，引子組對第一、二、三、四型登革病毒、茲卡病毒、屈公病、西尼羅病毒及日本腦炎皆無反應，故設計之引子具有專一性 (Figure 26)。

b. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 靈敏度，所設計之 NS5 gene 引子組，利用 Roche LC480 分析，表現出 Yellow fever virus (17D vaccine strain)之 TaqMan probe RT-PCR- DNA 片段，檢測靈敏度可達 0.1 pfu/mL (R^2=0.99, -slope=-3.6, Efficiency=91%) (Figure 27,28,29)。

1. Lassa virus (LASV) (GP)引子組，TaqMan probe RT-PCR 之測試

a. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 專一性反應，所設計之 GP gene 引子組，利用 Roche LC480 分析，表現出拉薩病毒之 TaqMan RT-PCR- DNA 片段，引子組對第一、二、三、四型登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒、西尼羅病毒及日本腦炎皆無反應，故設計之引子具有專一性 (Figure 30, 31)。

b. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 靈敏度，所設計之 GP gene 引子組，利用 Roche LC480 分析，表現出拉薩病毒之 TaqMan RT-PCR- DNA 片段，檢測靈敏度可達 68.8 copy number/RX (R^2=0.99, -slope=-3.6, Efficiency=91%) (Figure 32,33,34)。

討論

本計畫的目標在建立等溫核酸檢測技術，應用於病媒病毒傳染病之偵測。RT-LAMP、RT-RPA 核酸檢測方法，約可在 1 小時內完成核酸增殖反應，若配合螢光檢測儀器，則可即時偵測出結果。未來配合核酸純化方法的開發，將可以發展出高靈敏度、高專一性之 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑。本研究利用 1. RT-LAMP 檢測方法，開發出登革病毒 1-4 型、日本腦炎病毒、屈公病毒、茲卡病毒、黃熱病毒，具高專一性，靈敏度約在<10~100 pfu/mL 之間並能快速在 60 分鐘內進行增幅反應。2. RT-RPA 檢測方法，開發屈公病毒其引子組的靈敏度已可達 100 pfu/mL 與茲卡病毒引子組的靈敏度已可達 1000 pfu/mL。3. qRT-PCR 檢測方法，開發茲卡病毒(亞洲株 PRVABC59、非洲株 IBH30656 與 PUC57/ZK *Eg* plasmid)引子組的靈敏度已可達 8, 9 pfu/mL 與 36 copies /RX。4. TaqMan probe RT-PCR 檢測方法，開發黃熱病毒引子組的靈敏度已可達 1~10 pfu/mL 與拉薩熱(PUC57/LAV *Gp* plasmid)引子組的靈敏度已可達 68.8 copy number/RX。未來將繼續改良引子、試劑、反應濃度、溫度等，發展核酸增殖反應之最適化條件。我們也將開發 Alphavirus 及 Bunyavirus 之分子診斷方法，希望及時篩檢出病原體，有效降低傳染病的流行。未來仍應持續對境外移入及本土病毒進行篩檢，使國人免於受傳染病之威脅。

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，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。本計畫開發出可偵測登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒、黃熱病毒與西尼羅病毒的等溫核酸檢測方法 (RT-LAMP 與 RT-RPA)。未來可發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑，應用於傳染病的醫療及監測，一旦發現傳染病，可及時實施防治工作，有效降低傳染病的流行，解決公共衛生上的危機。未來仍應持續監測境外移入及本土傳染病原體，並運用風險管理的概念，以發生機率高及影響較嚴重的病原體優先開發，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

我們開發出病媒病毒(登革病毒、茲卡病毒、屈公病毒、日本腦炎病毒、黃熱病毒與西尼羅病毒等)等溫核酸檢測(RT-LAMP、RT-RPA)與TaqMan RT-PCR 方法。未來可發展為 point-of-care 核酸分子快速檢測試劑，應用於醫療及監測，以有效降低傳染病的擴散及流行。

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，更需要後續的主動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，各種病媒病毒如登革病毒、屈公病毒、Zika 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. Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, Zanella PL, Soder RB, da Costa JC. J Pediatr (Rio J). 2016 Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. May-Jun;92(3):230-40. doi: 10.1016/j.jped.2016.02.009. Epub 2016 Apr 15.
10. Holbrook MR. Kyasanur forest disease. Antiviral Res. 2012. S0166-3542 (12) 00235-5.
11. 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.
12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

Table 1. RT-LAMP, RT-RPA and TaqMan promers and probes used for detection of vector-borne viruses.

	DENV-1 (NS1)
DV-1 F3	GCGGTGTTTCTTGGACCAT
DV-1 B3	CTGTCCAGGTGTGAACTTCA
DV-1 FIP	TGCCAACTGCGATACACGTCAT-GGATTCTGCTGACATGGCTG
DV-1 BIP	AGGCGGACTCGGGATGTGTA-AGTCACAAAAATGCCGCTTC
DV-1 FLP	ACGTGCTCCTTGAGTTTAATCC
DV-1 BLP	AACTGGAAAGGCAGAGAACTCAAA
	DENV-2 (NS1)
DV-2 F3	CAA ACA GCA GGA CCT TGG
DV-2 B3	ATC CAT CCT CAC CTC TGT
DV-2 FIP	ACA TTC TTC GGT TAC CAC CAC TTT TTG CAA GCT TGA GAT GGA CT
DV-2 BIP	AGA GGG CCT TCT TTA AGA ACA ACT TTT TGG TGG TAG TGT GCA AGA
	DENV-3 (NS1)
DV-3 F3	CCC TCA TAG AGG TGA AAA CC
DV-3 B3	TGA AGT GGT CGTT CCA ATT
DV-3 FIP	GGAATGATCATGTCACTCTCTAGCTTTGCACATGGCCAAAATCA C
DV-3 BIP	AGA GTC TAG CTG GTC CTA TTT CGT TTT TTC CTA AGT GCC AGG GTC
	DENV-4 (3’UTR)
DV-4 F3	GTG GAC CGA CAA AGA CAG
DV-4 B3	GAA AAA AGT CCG GTT GAG
DV-4 FIP	TTCATTTTTCCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT
DV-4 BIP	AACGAAAAAAGGTGGTTAGACCACTTTTCTTCACCAACCCTTGAGGGGT
DV-4 FLP	GCG AGA GAA ACC GCG TGT C
	DENV (E gene)
DENV 1/3 B3	GTG AGC AAT CCT TTT GAG
DENV 2 B3	TGC AGC ATT CCA AGT GAG
DENV 4 B3	GAA AAA AGT CCG GTT GAG

DENV 1/3 FIP	GGTTATTCATCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT
DENV 2 FIP	GGTTATTCATCAGAGATCTGCTCTCTTTTATTCTTTGAGGGAGCTAAGC
DENV 4 FIP	TTCATTTTTCCAGAGATCTGCTCTCTTTTTTTCGAATCGGAAGCTTCGT
DENV 1/3 BIP	AACGGAAAAAGACGGGTCAACCGTTTTTCTTTGTCAGCTGTTGCACAGT
DENV 2 BIP	AACGGAAAAAGGCGAGAAATACGCTTTTCTTTGTCAGCTGTTGCACAGT
DENV 4 BIP	AACGAAAAAAGGTGGTTAGACCACTTTTCTTCACCAACCCTTGAGGGGT
DENV 1234 F3	GTG GAC CGA CAA AGA CAG
DENV 1234 Loop	GCG AGA GAA ACC GCG TGT C
	DENV (3’UTR)
DEN 1/3/4 F3	CAAACCGTGCTGCCTGT
DEN 2/ F3	TGAGTAAACTATGCAGCCTGT
DEN 1/2/3 B3	ACCTGTTGATTCAACAGCACC
DEN 4/ B3	ACCTGTTGGATCAACAACACC
DEN 1/2/3 FIP	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTCAAACC-TGGAAGCTGTACGC
DEN 4/ FIP	AGGGGTCTCCTCTAACCRCTAGTCTTTTTTGCCACGGAAGCTGTACGC
DEN 1/2/3 BIP	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGTTCTGTGCCTGGAATGATGCTG
DEN 4/ BIP	ACAGCATATTGACGCTGGGARAGACGCTCTGTGCCTGGATTGATGTTG
DEN 1/2/3/4 BLP	CAGAGATCCTGCTGTCTC
	JEV-1
JEV-1 F3	CGG CAT GGA GAA ACA GAG AA
JEV-1 B3	CCT TCA GAG CCA GTT TGT CC
JEV-1 FIP	CCT GCC AAC GCT TGA TGG AGG GAA GAG GCA CAT GCC ACA A
JEV-1 BIP	AGC CAT CGT GGT GGA GTA CTC GAG CCT GCA TTT CAG GTG AC
	JEV-2
JEV-2 F3	TGGGAGTGAAGAGGGTAGT
JEV-2 B3	TTTTGCCCCGCTTGTTCA
JEV-2 FIP	TTGGTGGGGGCTAATGCTGAATTCGAGGGCCAGTACGATTTGTG
JEV-2 BIP	GGCCGATGGAGAGCAGTGGAAATTTTCGTCGATGAGTGTTCCAAGT
JEV-2 BIP	TTGAAGAACGTGATAAGAGCCAG

JEV-2 FLP	GTGGCAATGAAACATCT
	CHIKV
CHIKV-1 F3	TGC GAC GCT GAA AAC ACG
CHIKV-1 B3	TTG GCG TCC TTA ACT GTG AC
CHIKV-1 FIP	TGA GCC CTG TAT GCT GAT GCA AGA GCG AAG CAC ATG TGG A
CHIKV-1 BIP	CAG CTA AGC TCC GCG TCC TTG TCG CCG TTT GCA TAG GC
	CHIKV
CHIKV-2 F3	ACA TGC CCA TCT CCA TCG A
CHIKV-2 B3	AGT GAC GGC GTT GGT CAT
CHIKV-2 FIP	ACC TCG CAC GAC ATG TCC GTG GAT GCG GCC TTC ACT AG
CHIKV-2 BIP	GCA CCC ATT CCT CAG ACT TCG GCG AAT GCA CCG CAC ACT T
	ZIKV
ZIKV-1 F3	TGTTGTCAGGCCTGCTAGT
ZIKV-1 B3	TGAAGGGTGGGGAAGGTC
ZIKV-1 FIP	TCGGCCTGACTATAGGCTTGGT-GCTTGGGGAAAGCTGTGC
ZIKV-1 BIP	AAGCCATGCTGCCTGTGAGC-TCTTTTCCCATCCTGCGC
ZIKV-1 FLP	TTCTCCTGGGGGGGTCACAG
ZIKV-1 BLP	CCCTCAGAGGACACTGAGTC
	ZIKV
ZIKV-2 F3	GCAGCACCATTGGAAAAGC
ZIKV-2 B3	ACCACATCAGCAACGTTCC
ZIKV-2 FIP	CCAAAGTCCCAGGCTGTGTCTC-TTTGAAGCCACTGTGAGAGG
ZIKV-2 BIP	TCAACTCATTGGGCAAGGGCA-ACCAGGACATTCCTCCAAAC
ZIKV-2 FLP	TCCATCAAATTTTTGGAGCAGC
ZIKV-2 BLP	CAAGACTGCCATTCTCTTGG
	YFV
YFV7 - F3	TCCACACCYTGGAGRCAYTR
YFV7 - B3	GYCCATCACAGYYGCCRTCA
YFV7 - FIP	GRCCTCCGATTGAYCTCGGCARTGTGARTGGCC RCTGAC
YFV7 - BIP	GGTYCAGACRAACGGACCTTGGYCCTGGGCAAG CTTCTCT
YFV7 - FLP	TCTACGCGGATGACACCG

	CHIKV
CHIKV- RPA-F	TGCARCGTGCGTACCCCATGTTTGAGGTGGAA
CHIKV- RPA-R	TCCAGGATGGTTGAGTCGGGRTCAATTTCCT
CHIKV- RPA-P	TGAGTCGGGRTCAATTTCCTGCTCTATTAG(BHQ1-dT) (Tetrahydrofuran) (FAM119dT)TATRGCTAGATGCG AGA-phosphate
	ZIKV
ZIKV- RPA-F	TCTCTTGGAGTGCTTGTGATTCTACTCATGGT
ZIKV- RPA-R	GCTTGGCCAGGTCACTCATTGAAAATCCTC
ZIKV- RPA-P	CCAGCACTGCCATTGA(BHQ1-dT)(Tetrahydrofuran) (FAM119dT)GCTYA TDATGATCTTTGTGGTCATTCTCTTC-phosphate
	ZIKV
ZIKV-F-qPCR	GCAACATGGCGGAGGTAAGAT
ZIKV-R-qPCR	GCTCTYGGTGAATTRGGCGT
	YFV
YFV TaqMan-F	GAAAGGAAGCTGCACCAACA
YFV TaqMan-R	GCTTCCCTTTGCTTTCCCAA
YFV TaqMan-P	Cyan500 -AGGCAGGTGTCGGACTTGTGTGT
	LASV
LASV TaqMan-F	CCCTCTCCTGCACAAAGAAC
LASV TaqMan-R	TCGTGTTGGTCAAGGTCAGT
LASV TaqMan-P	FAM-CCAGCCCTGTGTCATTGCCAACCC

Table 2:

Sensitivity (PFU/mL)

Virus	RT-LAMP	RT-RPA	TaqMan
DENV-1	$<10^1$ (E)	$<10^2$	-
DENV-2	$<10^2$ (NS1)	$<10^2$	-
DENV-3	$<10^1$ (3'UTR)	$<10^2$	-
DENV-4	$<10^1$ (3'UTR)	$<10^2$	-
JEV	$<10^1$	-	-
CHIKV	$<10^1$	$<10^2$	-
ZIKV	$<10^2$	$<10^3$	-
YFV	$<10^0$	$<10^0$	$<10^{-1}$
LASV	-	-	<70 copies/rx

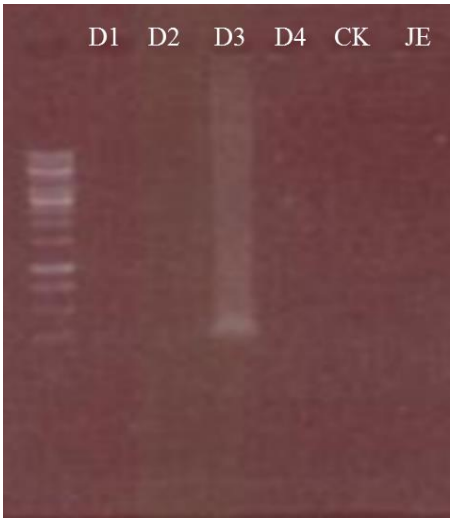
Figure 1. Dengue viruses (DENV-1~DENV-3) NS1 gene 引子組，

RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

(A)

(B)

(C)



以第一、二、三型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

總體積為 25 ul。

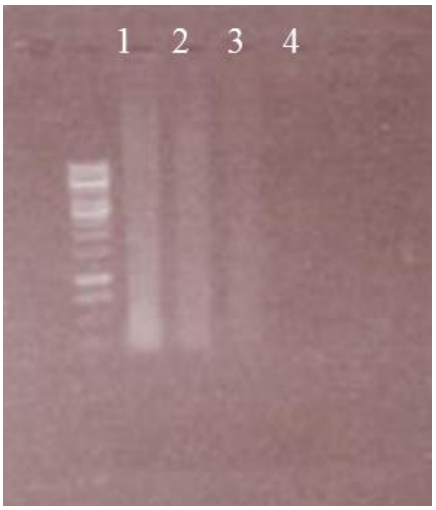
(a) 第一型登革病毒分型引子對 (b) 第二型登革病毒分型引子對
(c) 第三型登革病毒分型引子對

Lane1: D1-第一型登革病毒 RNA ; Lane2: D2-第二型登革病毒 RNA
Lane3: D3-第三型登革病毒 RNA ; Lane4: D4-第四型登革病毒 RNA
Lane5: CK-屈公病毒 Plasmid DNA ; Lane6: JE-日本腦炎病毒 RNA

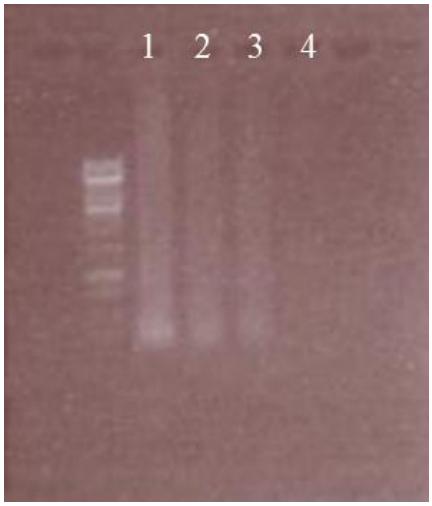
Figure 2. Dengue viruses (DENV-1~DENV-3) NS1 gene 引子組，

RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

(A)



(B)



(C)

以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

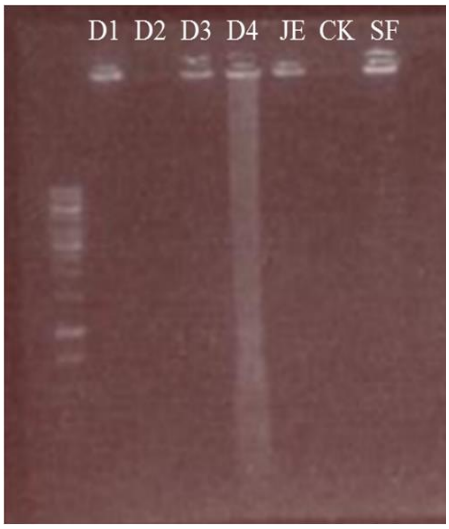
總體積為 25 ul。

(b) 第一型登革病毒分型引子對 (b) 第二型登革病毒分型引子對
(c) 第三型登革病毒分型引子對

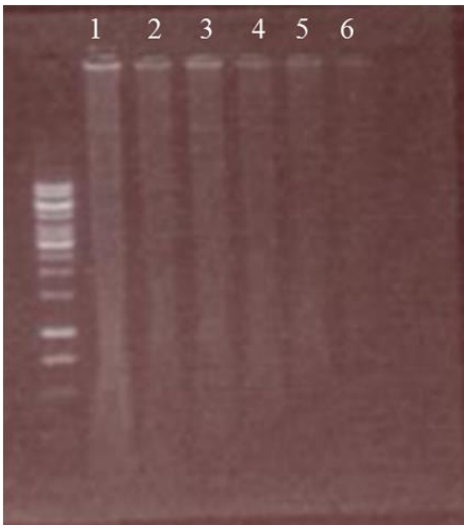
Lane1:登革病毒 RNA 10^4 ; Lane2:登革病毒 RNA 10^3
Lane3:登革病毒 RNA 10^2 ; Lane4:登革病毒 RNA 10^1

Figure 3. Dengue viruses (DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之專一性 (Specificity) 及靈敏度(Sensitivity)測試

(A)



(B)



以第一、二、三、四型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

總體積為 25 ul。

(A) 第四型登革病毒分型引子對

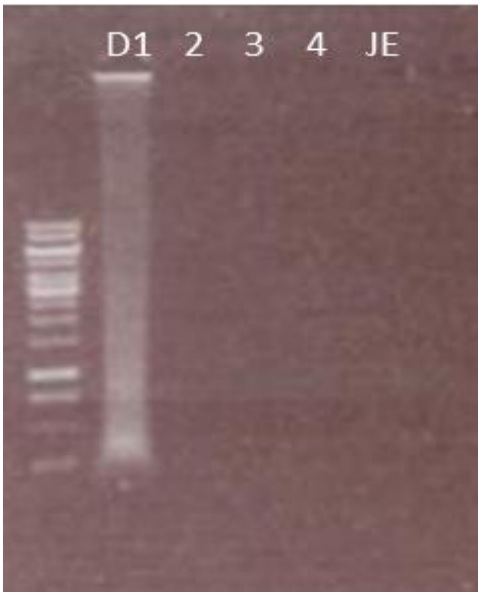
Lane1: D1-第一型登革病毒 RNA ; Lane2: D2-第二型登革病毒 RNA
Lane3: D3-第三型登革病毒 RNA ; Lane4: D4-第四型登革病毒 RNA
Lane5: JE-日本腦炎病毒 RNA ; Lane6: CK-屈公病毒 Plasmid DNA
Lane7: SFTSV- 新布尼亞病毒 Plasmid DNA

(B) 第四型登革病毒分型引子對

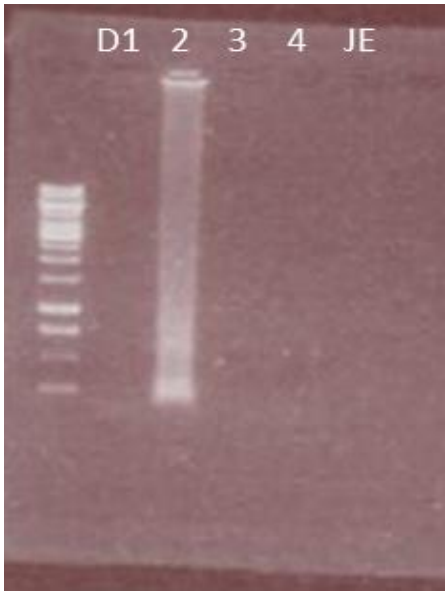
Lane1: 登革病毒 RNA 10^6; Lane2: 登革病毒 RNA 10^5
Lane3: 登革病毒 RNA 10^4; Lane4: 登革病毒 RNA 10^3
Lane5: 登革病毒 RNA 10^2; Lane6: 登革病毒 RNA 10^1

Figure 4. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-3) E gene 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

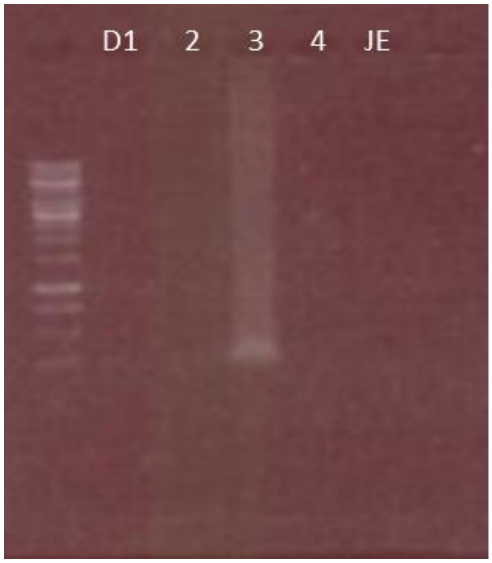
(A)



(B)



(C)



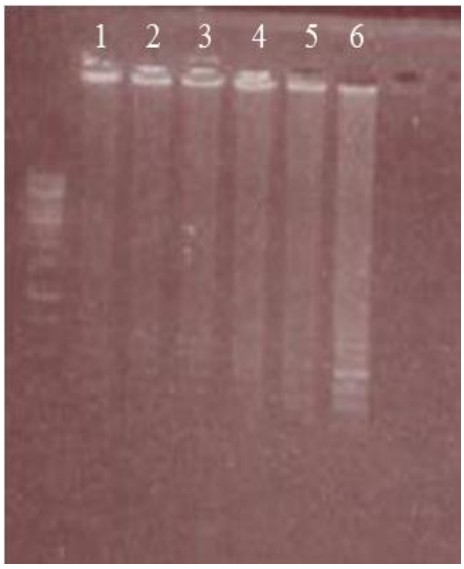
以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。 總體積為 25 ul。

(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(B) 第三型登革病毒分型引子對

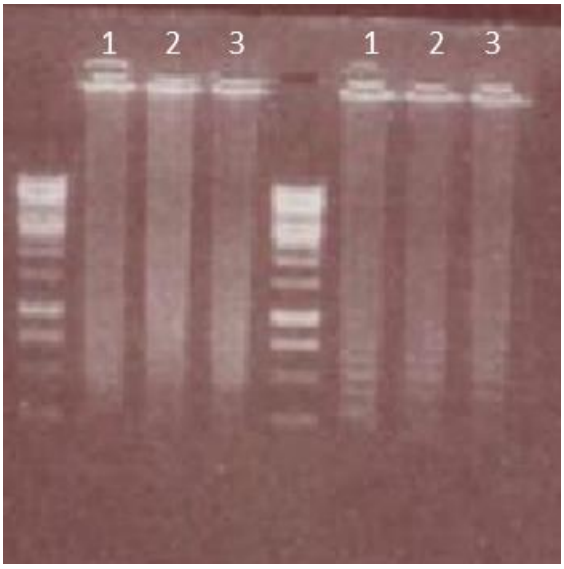
Lane1:登革病毒 RNA ; Lane2:登革病毒 RNA
Lane3:登革病毒 RNA ; Lane4:登革病毒 RNA

Figure 5. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) E gene 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

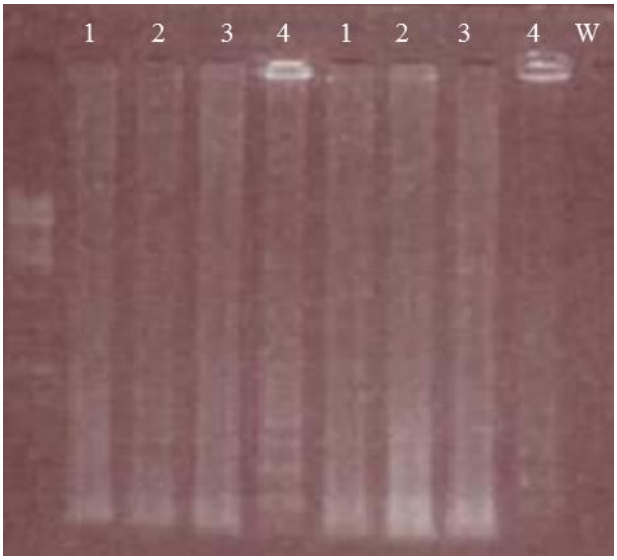
(A)



(B)



(C)



以第一、二、三、四型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。總體積為 25 ul。

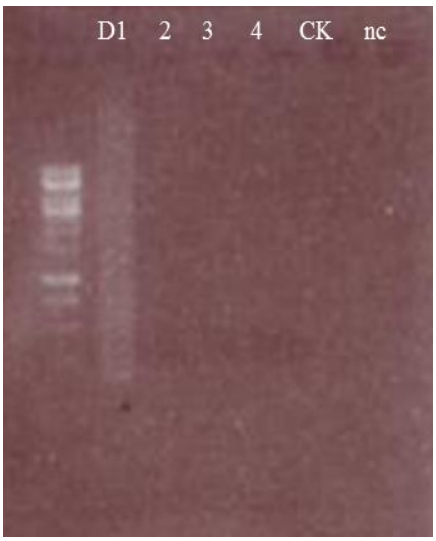
(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二、三型登革病毒分型引子對
(C) 第四型登革病毒分型引子對

Lane1:登革病毒 RNA 10^6 ; Lane2:登革病毒 RNA 10^5
Lane3:登革病毒 RNA 10^4 ; Lane4:登革病毒 RNA 10^3
Lane5:登革病毒 RNA 10^2 ; Lane6:登革病毒 RNA 10^1

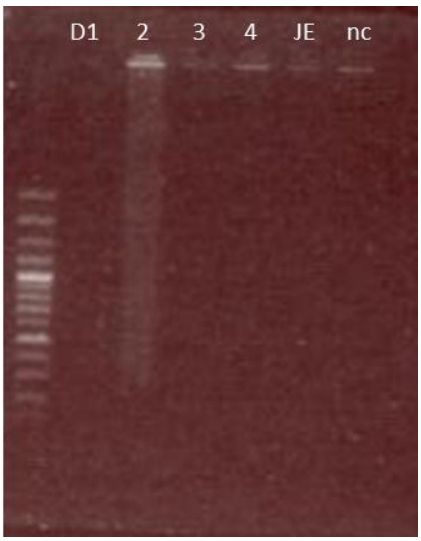
W: water

Figure 6. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)測試

(A)



(B)



(C)

(D)

以第一、二、三型登革病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。 總體積為 25 ul。

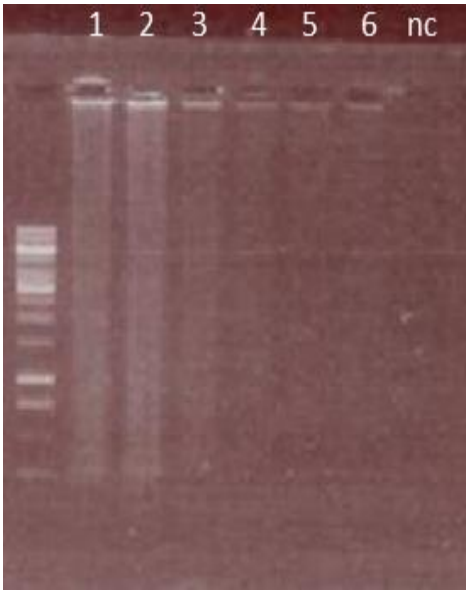
(A) 第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(C)第三型登革病毒分型引子對 (D) 第四型登革病毒分型引子對

Lane1:登革病毒 RNA ; Lane2:登革病毒 RNA
Lane3:登革病毒 RNA ; Lane4:登革病毒 RNA

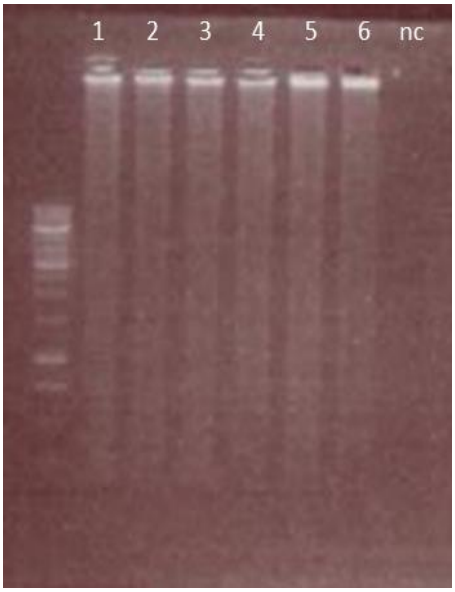
Figure 7. Dengeu viruses (DENV-1~DENV-4) 3'UTR 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(Sensitivity)測試

(A)

(B)



(C)



(D)

以第一、二、三、四型登革病毒、屈公病毒(Plasmid)與日本腦炎標準株的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。

總體積為 25 ul。

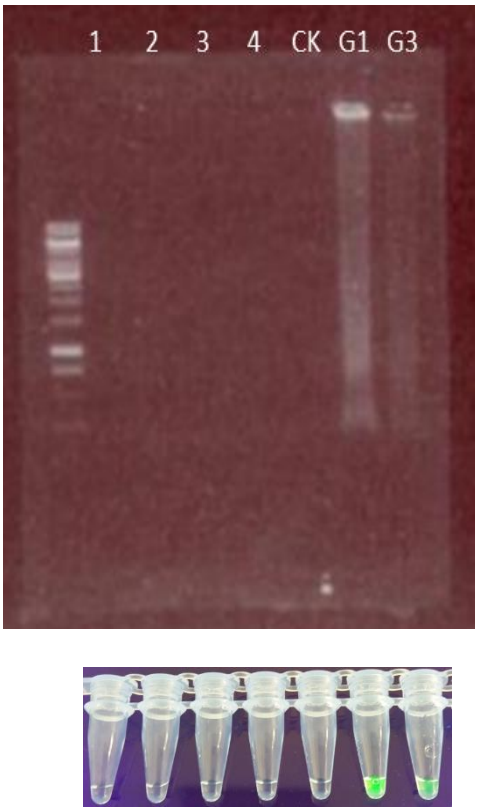
(A)第一型登革病毒分型引子對 (B) 第二型登革病毒分型引子對
(C)第三型登革病毒分型引子對

Lane1: 登革病毒 RNA 10^6; Lane2: 登革病毒 RNA 10^5
Lane3: 登革病毒 RNA 10^4; Lane4: 登革病毒 RNA 10^3
Lane5: 登革病毒 RNA 10^2; Lane6: 登革病毒 RNA 10^1

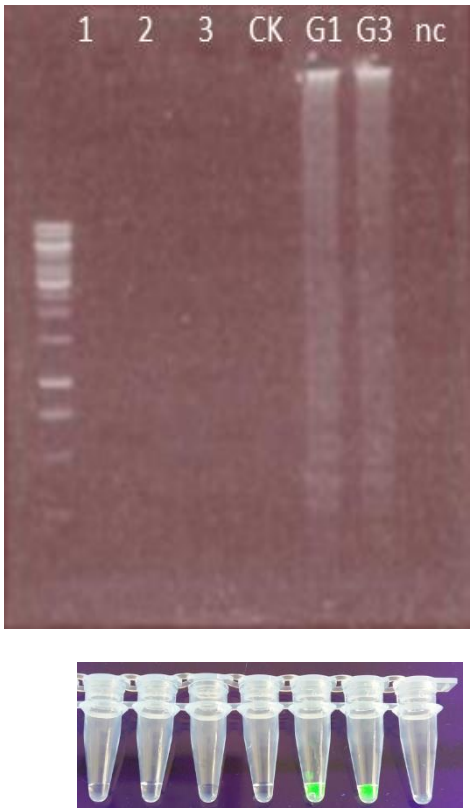
Figure 8. Japanese encephalitis virus (GI, GIII) JEV-1, JEV-2 引子組，

RT-LAMP 之專一性(specificity)測試

(A)



(B)



以第 G1、G3 日本腦炎的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應。總體積為 25 ul。

(A) JEV-1 Primer set, (B) JEV-2 primer set

Lane1:登革病毒(D1) RNA ; Lane2:登革病毒(D2) RNA

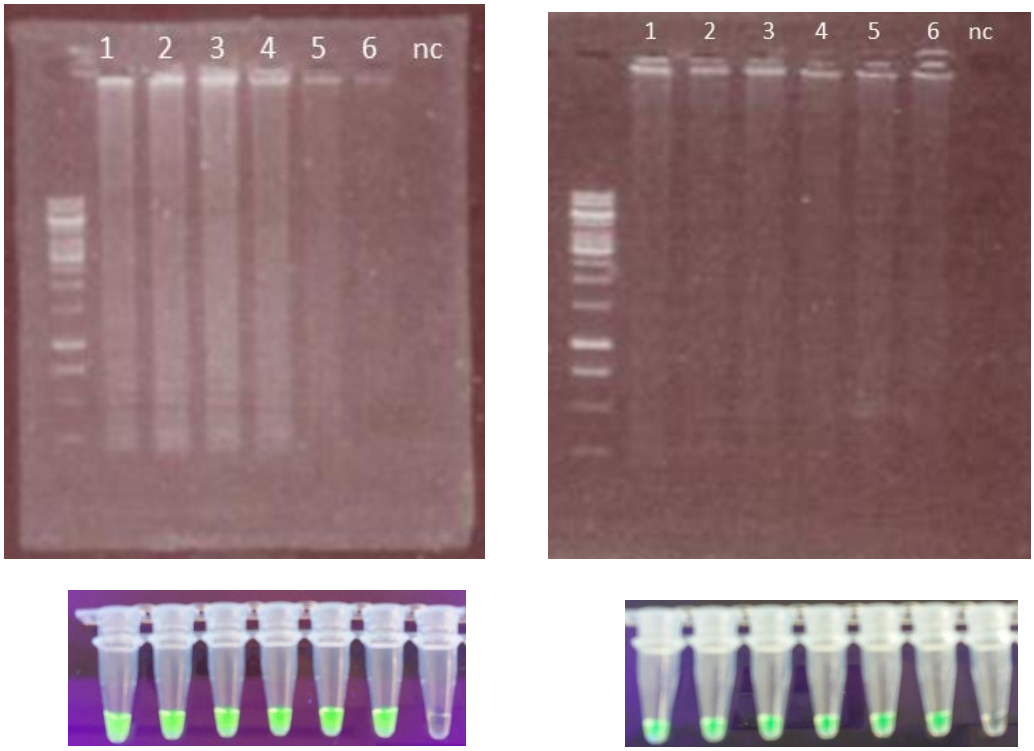
Lane3:登革病毒(D3) RNA ; Lane4: CK-屈公病毒 Plasmid DNA

Lane5:日本腦炎(G1) RNA ; Lane6:日本腦炎(G3) RNA

Lane6: nc (water)

Figure 9. Japanese encephalitis virus (GI, GIII) JEV-2 引子組，RT-LAMP 之靈敏度(sensitivity)測試

(A) (B)



(A) 日本腦炎 JEV-2 引子對 GI JEV 測試

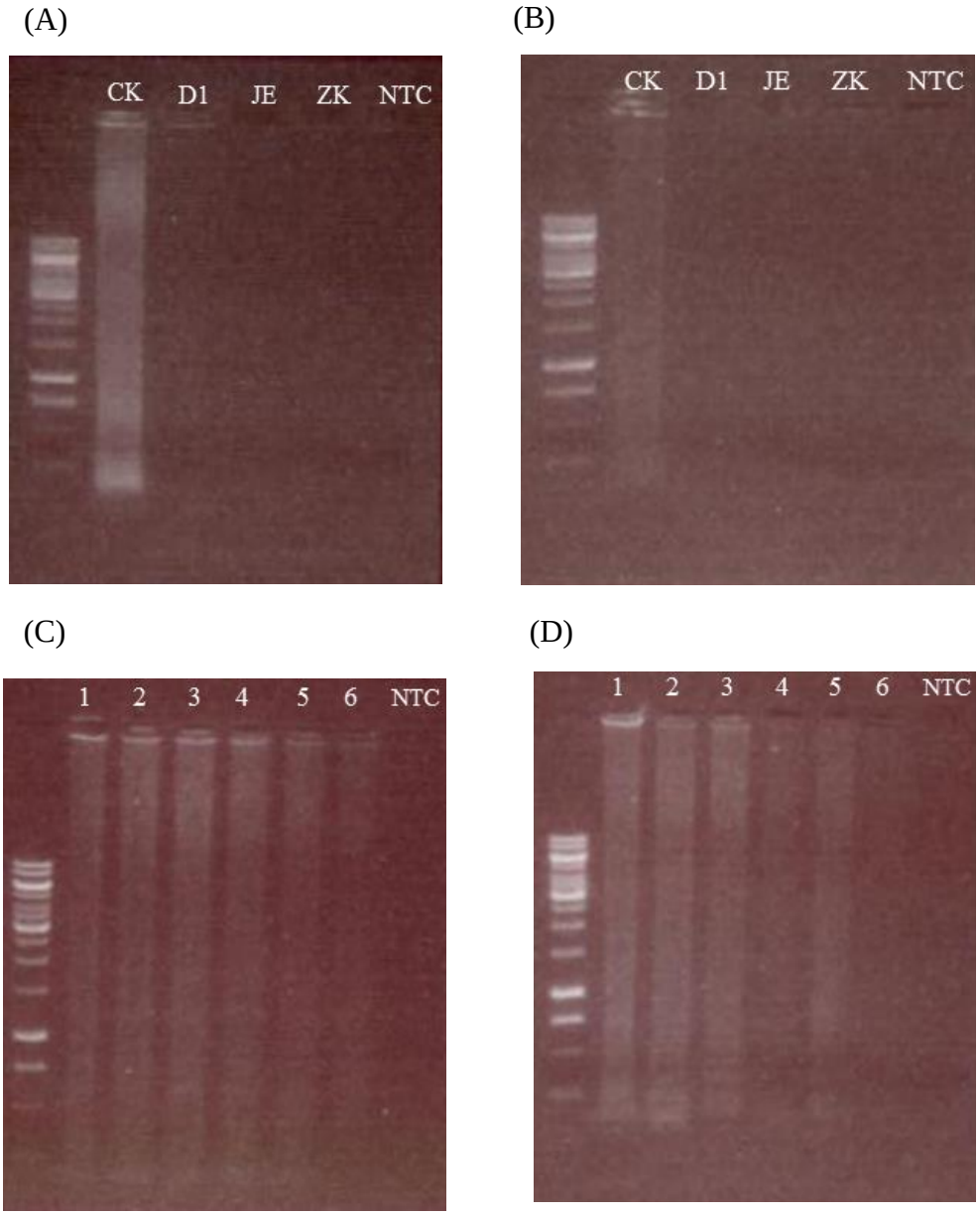
Lane1: 日本腦炎(G1) RNA 10^6; Lane2: 日本腦炎(G1) RNA 10^5
Lane3: 日本腦炎(G1) RNA 10^4; Lane4: 日本腦炎(G1) RNA 10^3
Lane5: 日本腦炎(G1) RNA 10^2; Lane6: 日本腦炎(G1) RNA 10^1

(B) 日本腦炎 JEV-2 引子對 G3 JEV 測試

Lane1: 日本腦炎(G3) RNA 10^6; Lane2: 日本腦炎(G3) RNA 10^5
Lane3: 日本腦炎(G3) RNA 10^4; Lane4: 日本腦炎(G3) RNA 10^3
Lane5: 日本腦炎(G3) RNA 10^2; Lane6: 日本腦炎(G3) RNA 10^1

W: water

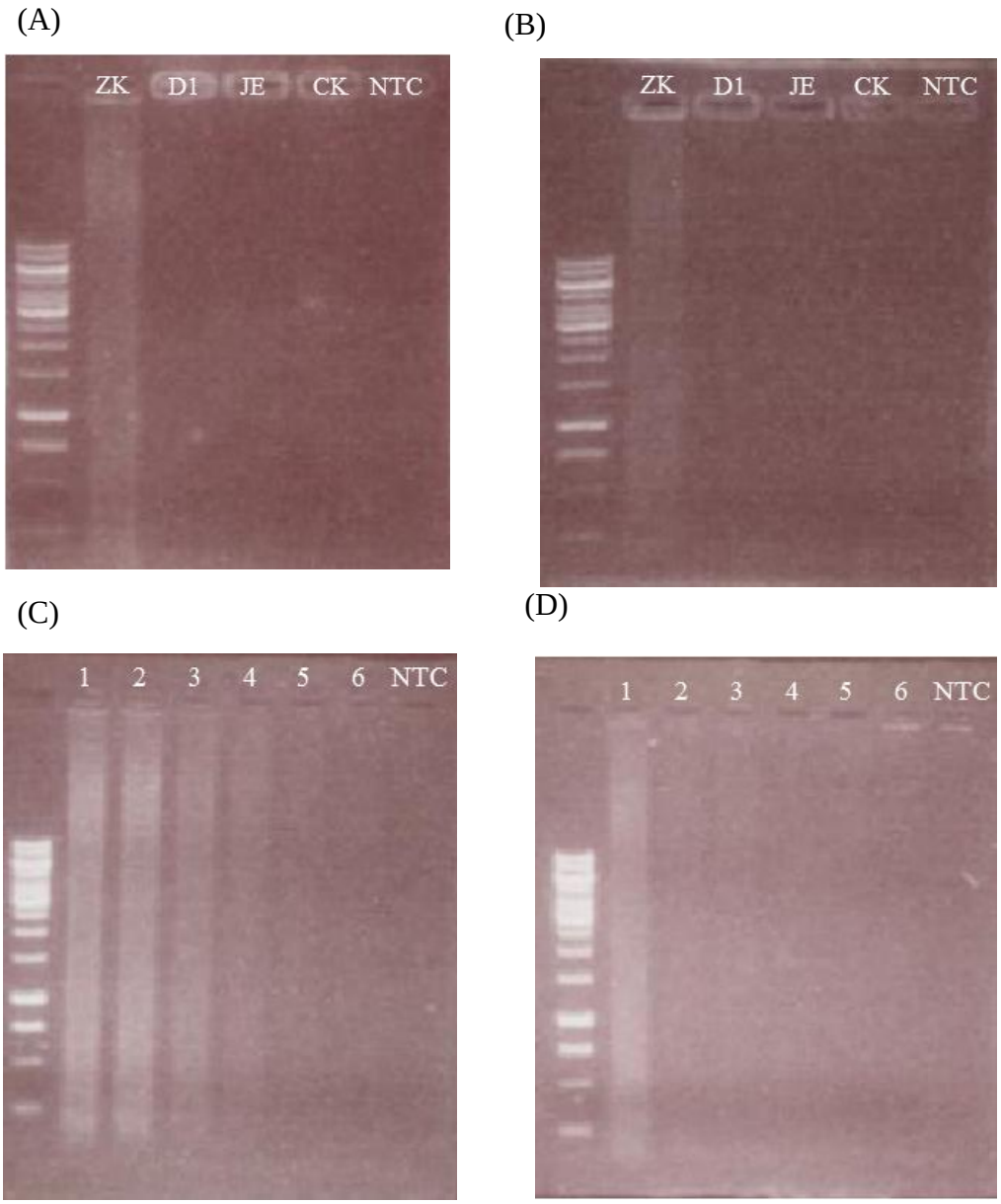
Figure 10.Chikungunya viruses (CHIKV-AS) 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)與靈敏度(Sensitivity)測試



(A) 、(B)CHIKV-1,2 引子對, 以屈公病毒、第一型登革病毒、日本腦炎標準株與茲卡病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應，總體積為 25 ul。

(C)、(D) CHIKV-1,2 引子對　以屈公病毒進行靈敏度 10^6~10^1 PFU/ml

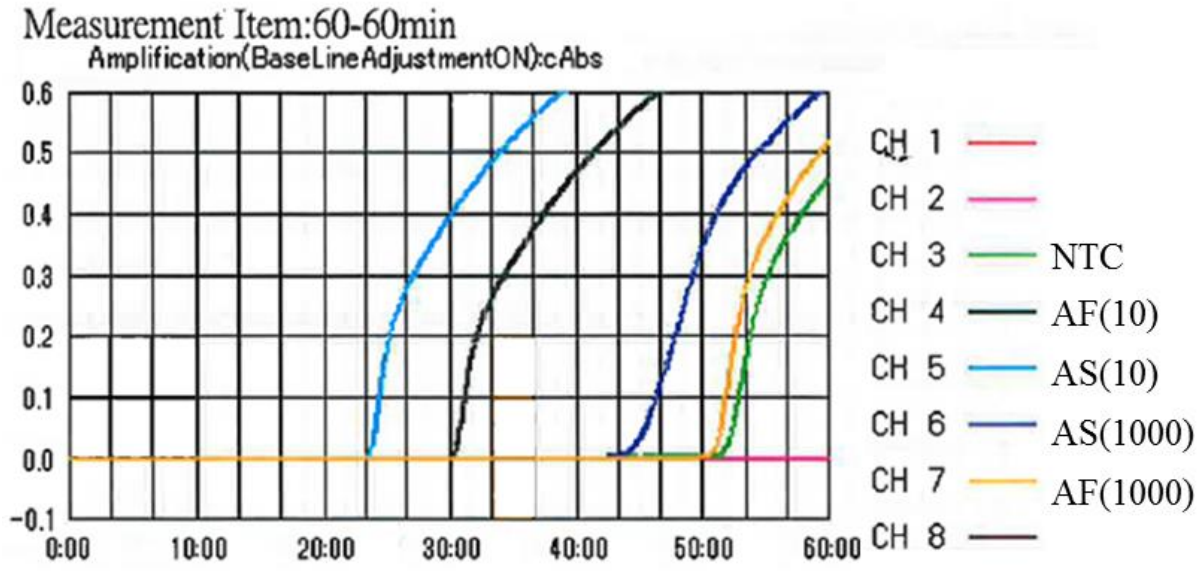
Figure 11. Zika viruses (ZIKV-AS) NS1 gene 引子組，RT-LAMP 之專一性(Specificity)與靈敏度(Sensitivity)測試



(A)、(B)ZIKV-1,2 引子對, 以茲卡病毒、第一型登革病毒、日本腦炎與屈公病毒的 RNA 為模板進行 RT-LAMP 反應，總體積為 25 ul , 50 min。

(C)、(D))ZIKV -1,2 引子對以茲卡病毒進行靈敏度 10^6~10^1 PFU/ml

Figure 12. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-1 primer 反應時間。



*AF(茲卡非洲株)，AS(茲卡亞洲株)，AF(10,1000)-病毒稀釋 10,1000 倍

Figure 13. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-1 primer 與 **loop primer** 反應時間。

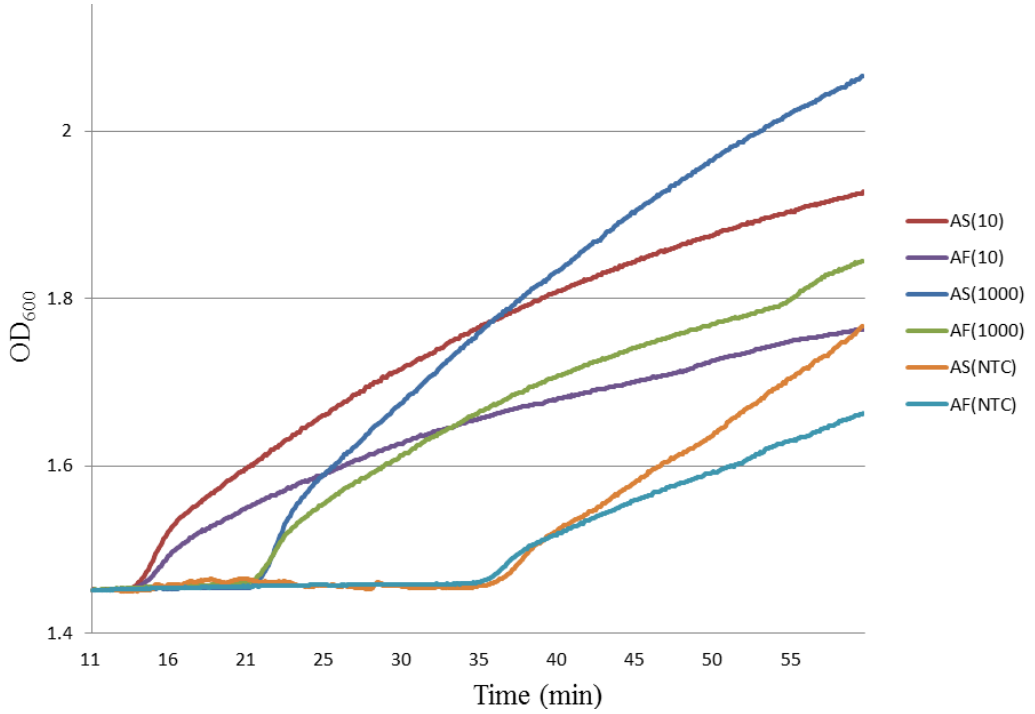
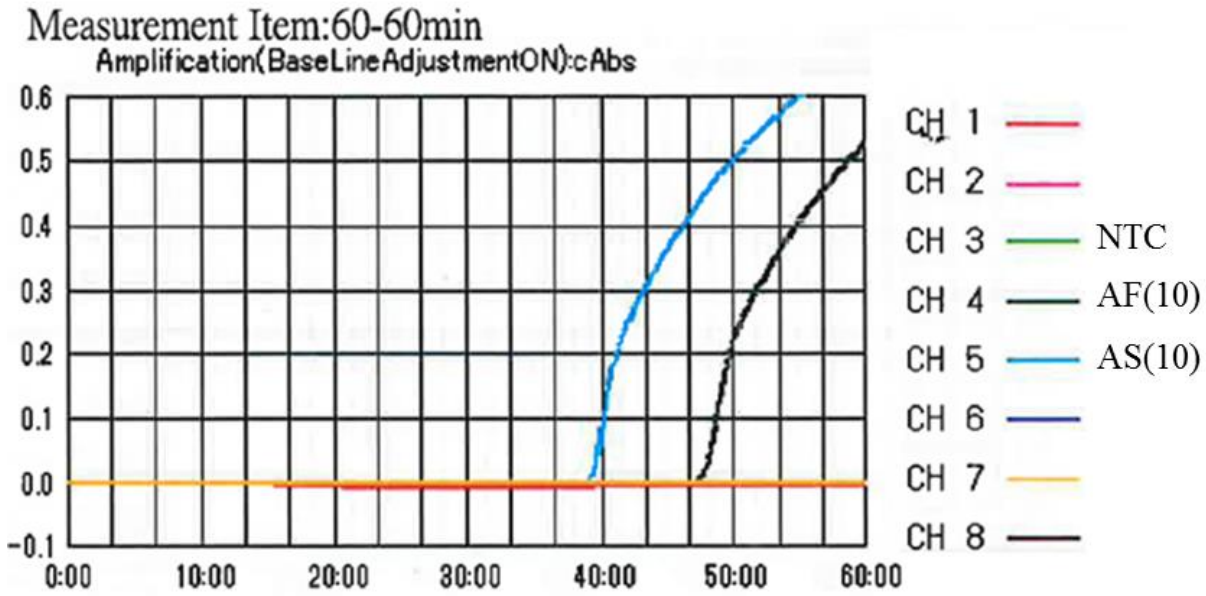


Figure 14. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-2 primer 反應時間。



*AF(茲卡非洲株)，AS(茲卡亞洲株)，AF(10)-病毒稀釋 10 倍

Figure 15. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 ZIKV-2 primer 與 **loop primer** 反應時間。

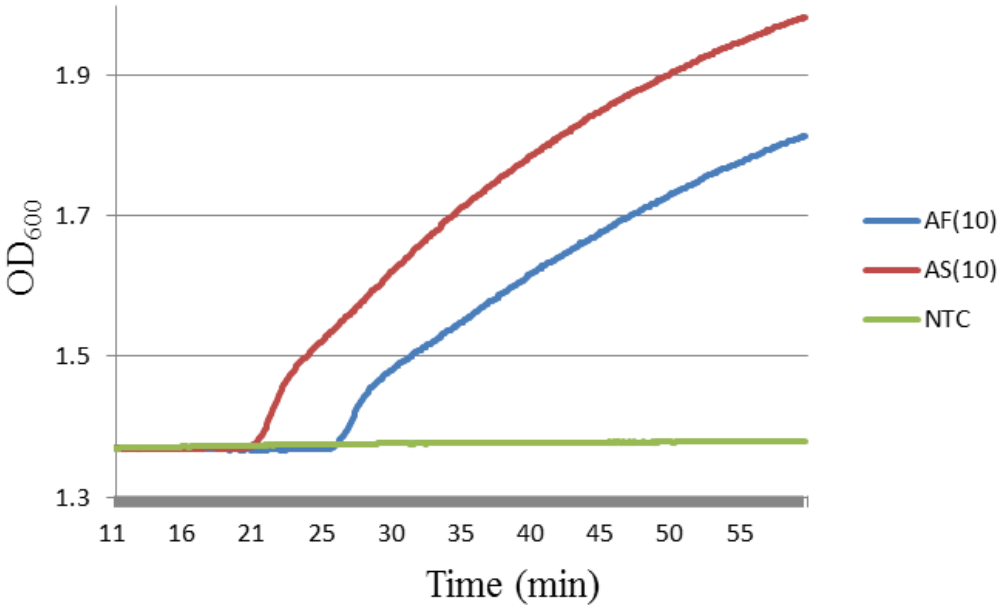
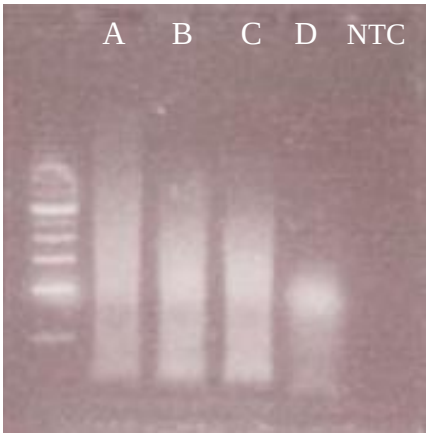
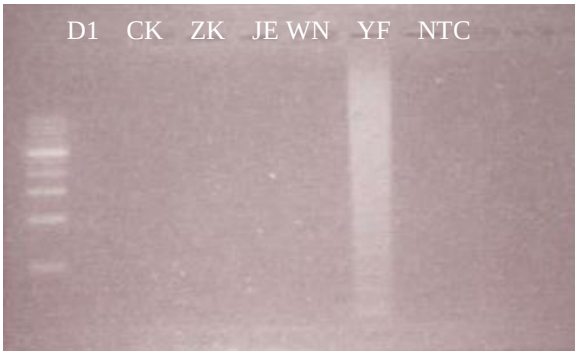


Figure 16. Yellow fever viruses (YFV) NS5 gene 引子組，RT-LAMP 之專一性

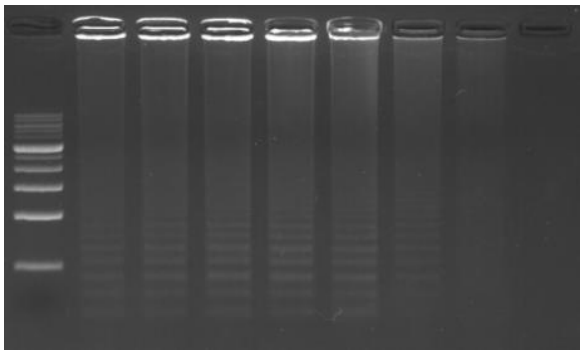
(A) (B)

(Specificity)與靈敏度(Sensitivity)測試

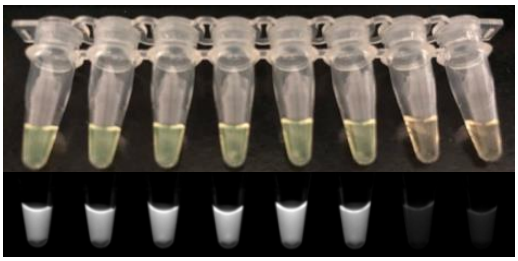




(B)



(D)



(A) 使用 YFV primer set

以 YFV RNA (pfu/mL)為模板進行 RT-LAMP 濃度測試

A : F3-B3(40 nM), FIP-BIP(20 nM), FLP-BLP(1 nM) ;

B : F3-B3(4 nM), FIP-BIP(5 nM), FLP-BLP(0.25nM) ;

C : F3-B3(1 nM), FIP-BIP(0.5 nM), FLP-BLP(0.025nM) ;

D : F3-B3(0.1 nM), FIP-BIP(0.05 nM), FLP-BLP(0.0025nM) ;

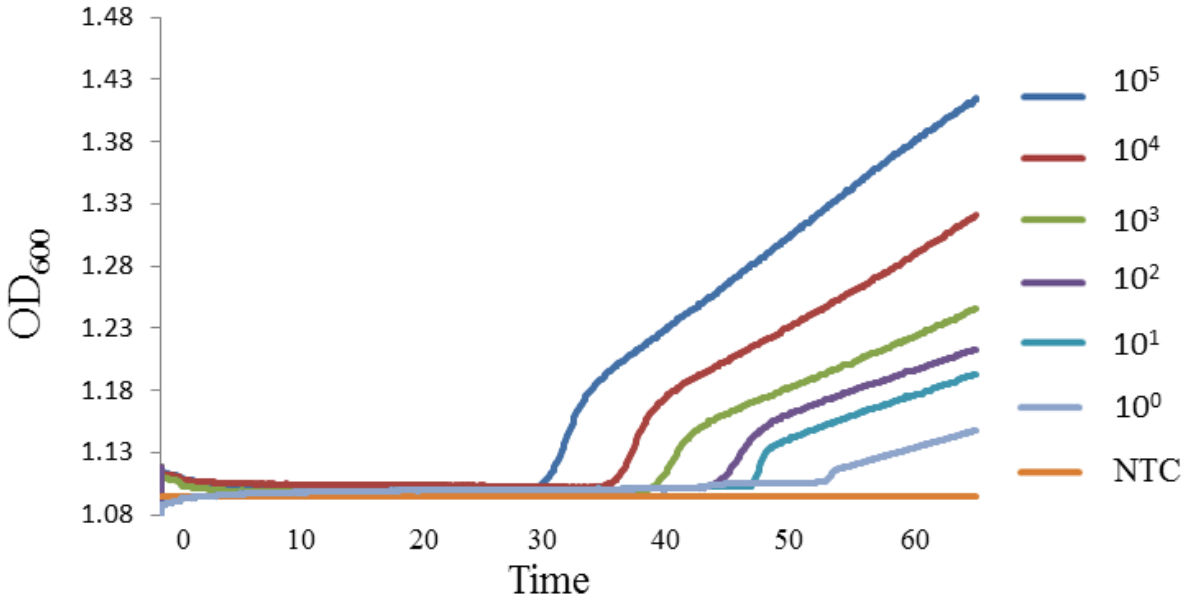
(B) 使用 YFV primer set 進行 RT-LAMP (specificity)反應

(C) 使用 YFV primer set，以 YFV RNA 為模板進行 RT-LAMP (sensitivity)反應

Lane 1: YFV RNA 1×10^5 Lane 2: YFV RNA 1×10^4; Lane 3: YFV RNA 1×10^3
Lane 4: YFV RNA 1×10^2; Lane 5: YFV RNA 1×10^1 Lane 6: YFV RNA 1×10^0;
Lane 7: NSNC Lane 8: NTC

(D) Fluorescent dye detection

Figure 17. 利用 LA-500 — LAMP 即時濁度測定儀，測試 YFV-7 primer 反應時間。

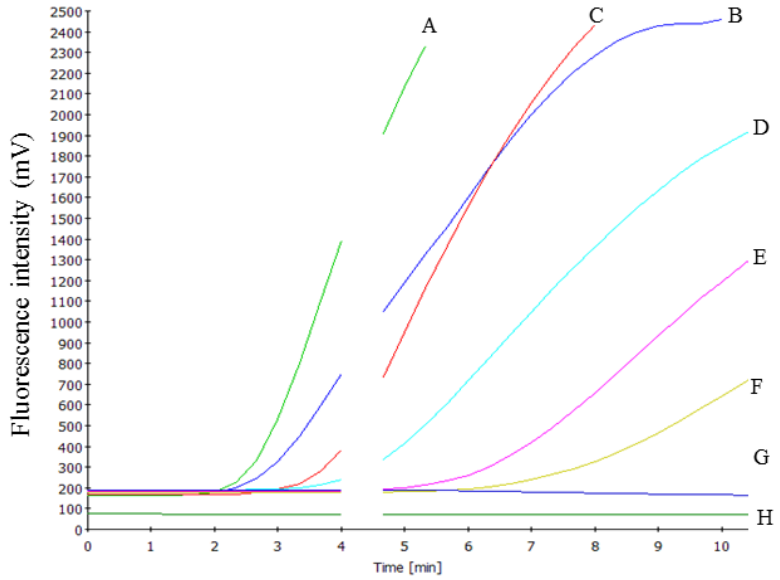


將 YFV 進行 10^5~10^0 倍序列稀釋

Figure 18. RT-RPA 進行 CHIKV 之敏感性(Sensitivity)與專一性

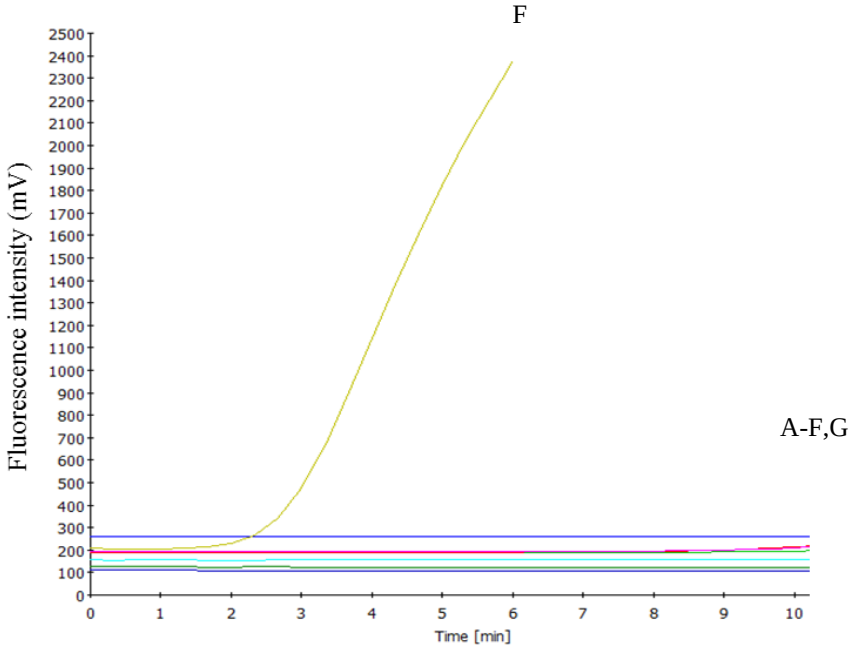
(Specificity)。

(A) .CHIKV virus dilution ($1x10^7$~$1x10^1$)



CHIKV: A: $1x10^7$(2 min), B: $1x10^6$ (2.3 min), C: $1x10^5$ (3 min), D: $1x10^4$ (3.8 min), E: $1x10^3$ (5 min), F: $1x10^2$ (6.5 min), G: $1x10^1$, H: NTC。

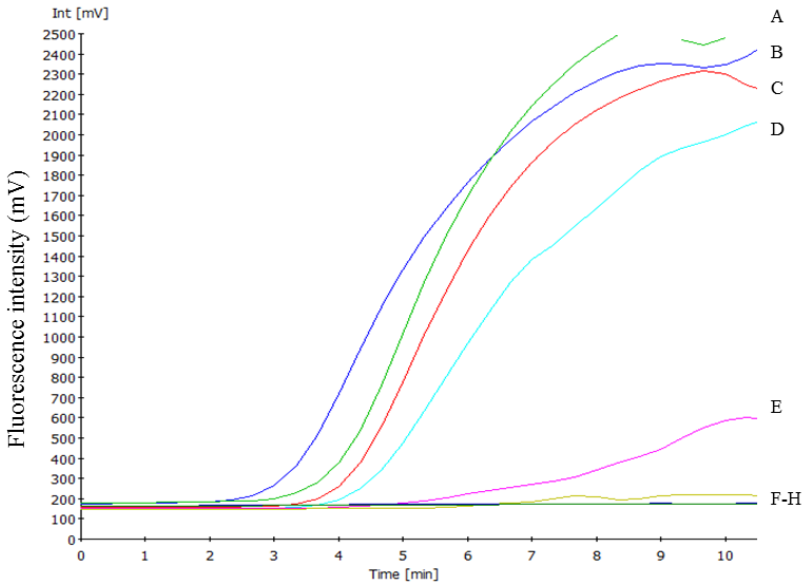
(B) .CHIKV virus specificity



CHIKV: A: DENV1, B: JaGa, C: ZIKV, D: YFV, E: WNV, F: CHIKV, G: NTC,

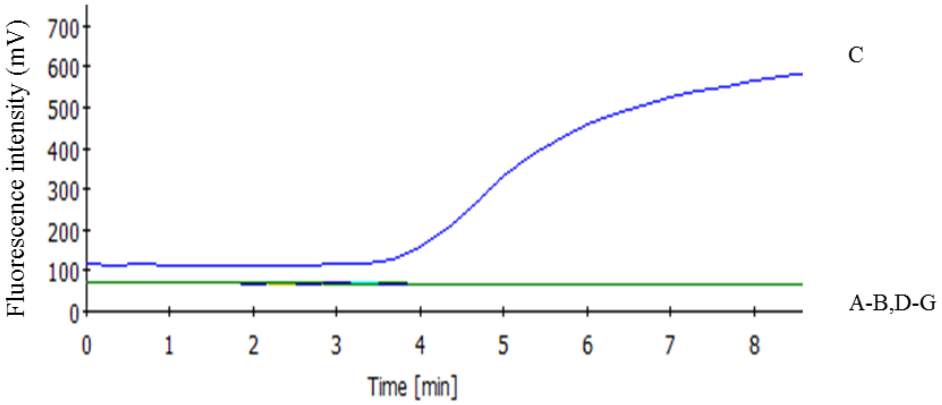
Figure 19. RT-RPA 進行 ZIKV 之敏感性(Sensitivity)與專一性(Specificity)。

(C). ZIKV virus dilution ($1x10^7$~$1x10^1$)



ZIKV: A: $1x10^7$(2 min), B: $1x10^6$ (2.3 min), C: $1x10^5$ (3 min), D: $1x10^4$ (3.8 min), E: $1x10^3$ (5 min), F: $1x10^2$ (-), G: $1x10^1$(-), H: NTC

(D) ZIKV virus specificity



ZIKV: A: DENV1, B: JaGa, C: ZIKV, D: YFV, E: WNV, F: CHIKV, G: NTC,

(A). CHIKV 引子對靈敏度為 $1x10^2$ PFU/ml

(C). ZIKV 引子對靈敏度為 $1x10^3$ PFU/ml

(B、D). CHIKV 與 ZIKV 各引子組對 DENV 1 型、JEV、ZIKV、CHIKV 、YFV 與 WNV RNA 皆無反應，故設計之引子具有專一性

Figure 20.使用 ZIKV primer set。以 ZIKV plasmid、ZIKV、DENV 1-4 型、CHIKV、JEV、Yellow fever virus 與 West Nile virus RNA 為模板進行 qPCR 反應。

Strain	Detection (ct) with primer pair
ZIKV plasmid	+ (24)
ZIKV	+ (26)
DEN-1 (8700828A)	– (no Ct)
DEN-2 (9200491A)	– (no Ct)
DEN-3 (9200439A)	– (no Ct)
DEN-4 (8700544A)	– (no Ct)
CHIK	– (no Ct)
JEV (JaGAr)	– (no Ct)
Yellow fever virus	– (no Ct)
West Nile virus	– (no Ct)
NTC	– (no Ct)

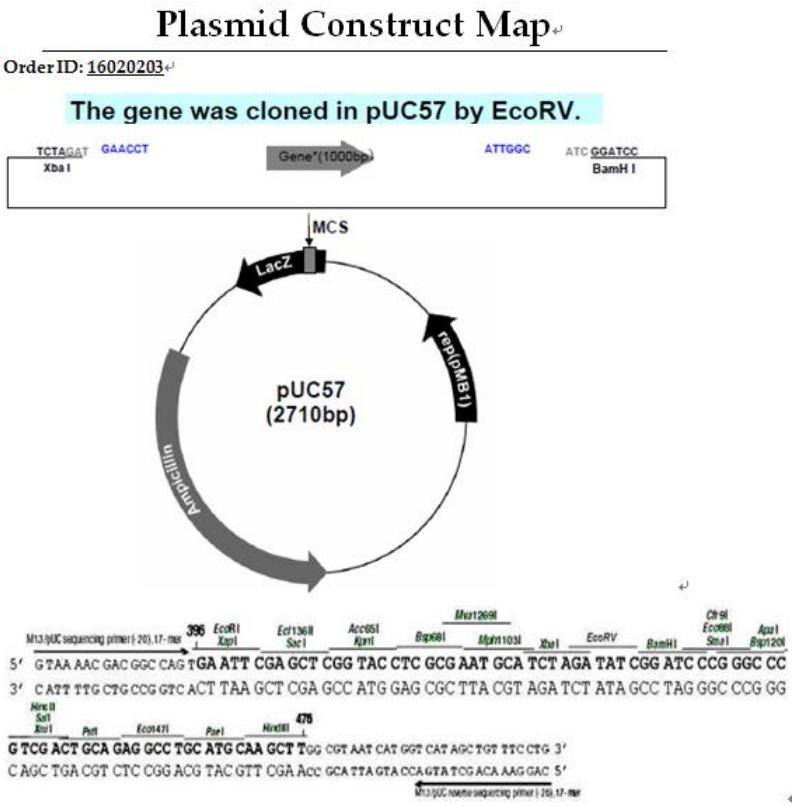
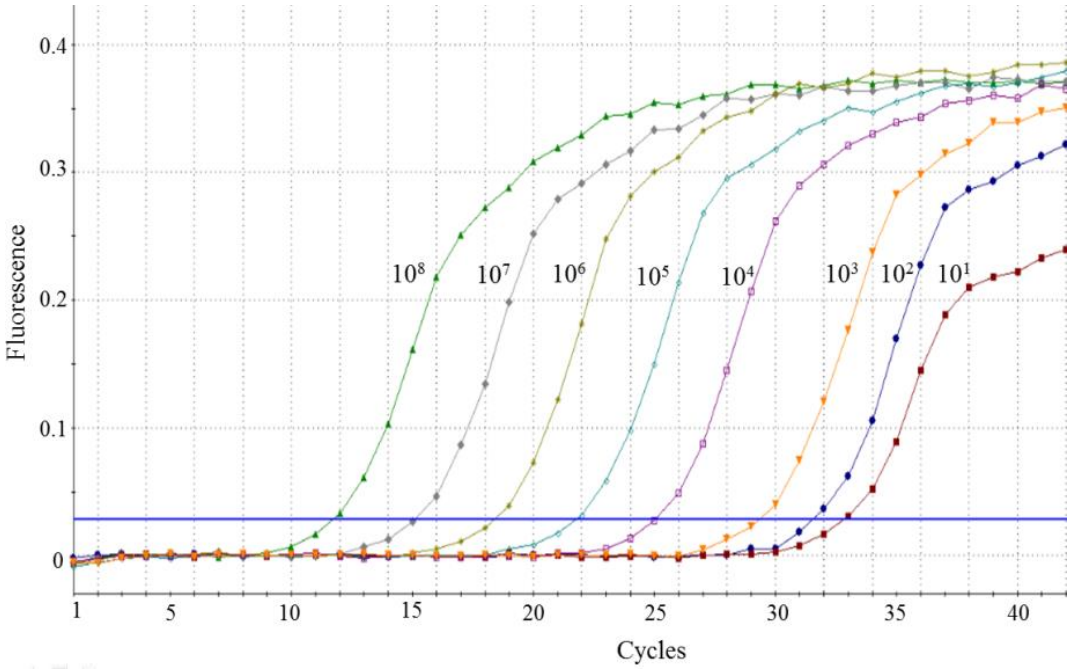
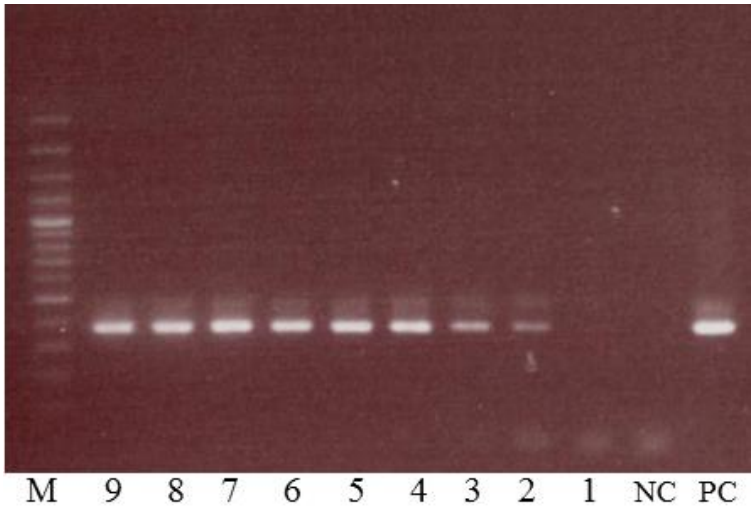


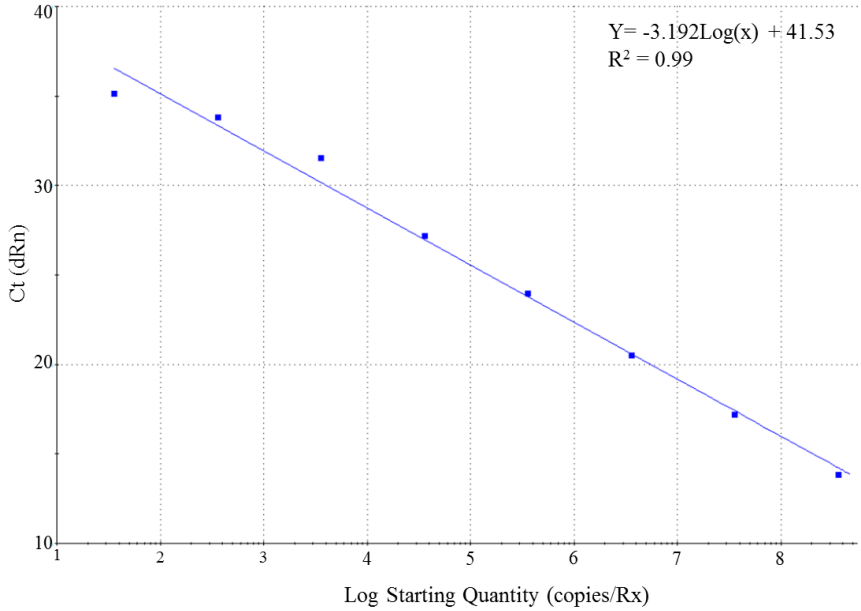
Figure 21. 利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Plasmid 以 10^8~10^1 copies/RX 進行稀釋。



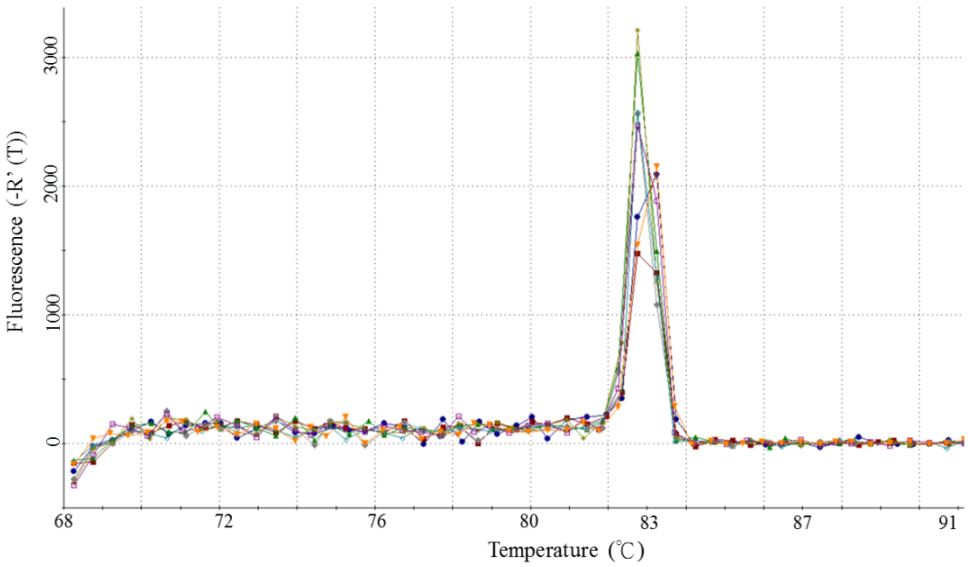


以瓊膠電泳所得的結果，顯示 PCR 產物的大小，且並無明顯的 Primer dimer 產物出現。

Figure 22. 檢測 RT-PCR 靈敏度，所設計 ZIKV 之 E gene 引子組，以 ZIKV Plasmid 進行標準曲線稀釋(10^8~10^1)。



利用 MX3000 分析結果，其檢測靈敏度至少可達 3.6 x 10^1 copies/RX。R^2=0.99, Efficiency=105%。



螢光定量 RT-PCR 反應產物之 Tm 值為 83.5。

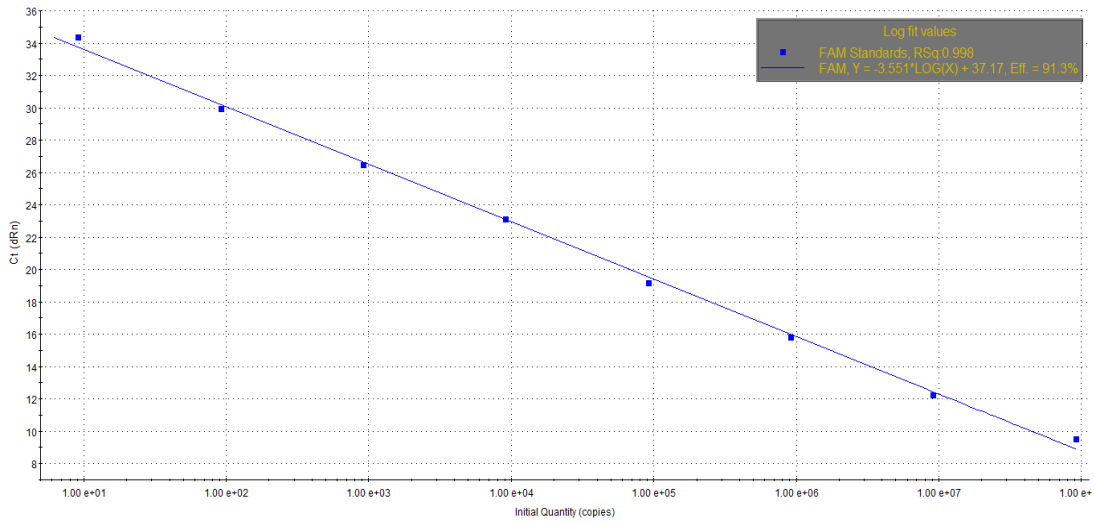
Figure 23. 檢測 RT-PCR 靈敏度，所設計 ZIKV 之 E gene 引子組，以 ZIKV Asia (PRVABC59)進行標準曲線稀釋(10^7~10^0)與 ZIKV Africa (IBH30656)進行標準曲線稀釋(10^5~10^0)

Asia PRVABC59

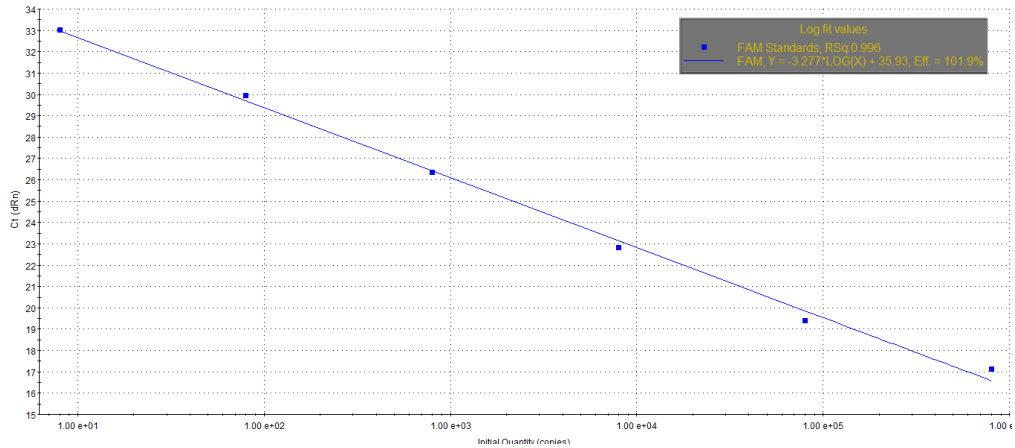
ZIKA128F+378R(400-400nM) Asia TE buffer					
Well	Well Name	R Last	Ct	Final	Tm
A11	$9.2x10^7$	8181	9.29	+	82.75
B11	$9.2x10^6$	8028	12.02	+	82.35
C11	$9.2x10^5$	7676	15.61	+	82.35
D11	$9.2x10^4$	7976	18.9	+	82.35
E11	$9.2x10^3$	8148	22.85	+	82.25
F11	$9.2x10^2$	8043	26.23	+	82.25
G11	$9.2x10^1$	8341	29.73	+	82.25
H11	$9.2x10^0$	7762	34.14	+	82.75
G11	NTC	2305	No Ct	-	76.75

Africa IBH30656

ZIKA128F+378R(400-400nM) Afica TE buffer					
Well	Well Name	R Last	Ct	Final	Tm
A10	$8x10^5$	8446	16.44	+	82.75
B10	$8x10^4$	7506	18.77	+	82.35
C10	$8x10^3$	8109	22.04	+	82.35
D10	$8x10^2$	7161	25.76	+	82.35
E10	$8x10^1$	7482	29.31	+	82.25
F10	$8x10^0$	7388	32.38	+	82.25
G10	NTC	2105	No Ct	-	74.75

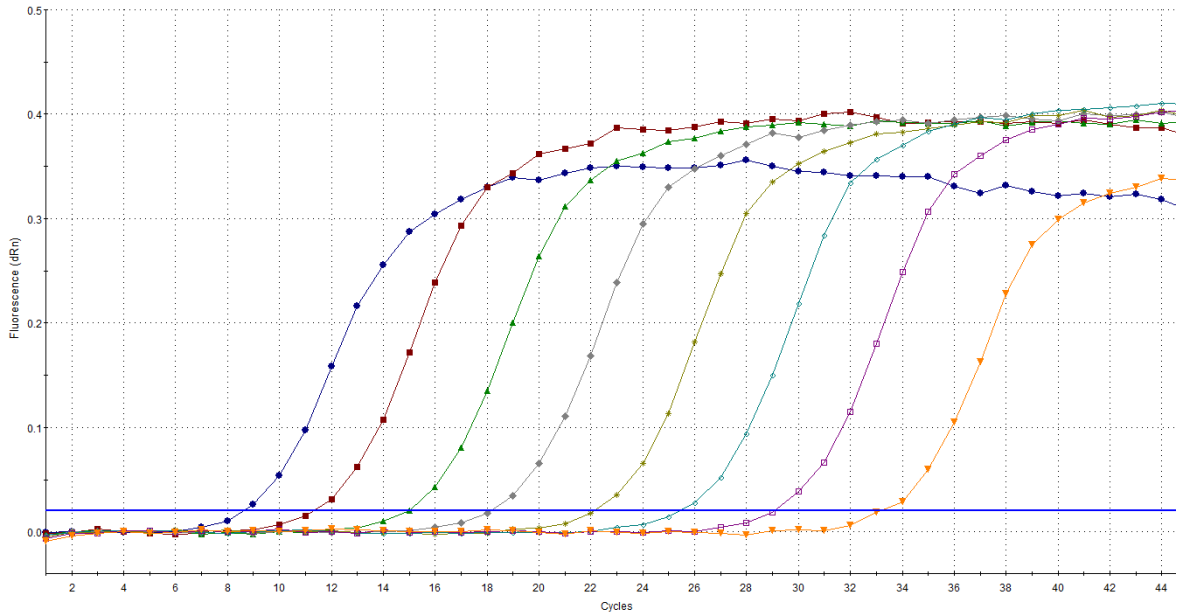


MX3000 分析結果，其 ZIKVAsia 檢測靈敏度至少可達 9.2 PFU/ml。R^2=0.99, Efficiency=91%



MX3000 分析結果，其 ZIKV Africa 檢測靈敏度至少可達 8 PFU/ml。R^2=0.99, Efficiency=101%

Figure 24. 利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Asia (PRVABC59)以 10^7~10^0 PFU/ml 進行稀釋。Tm 值為 82.5



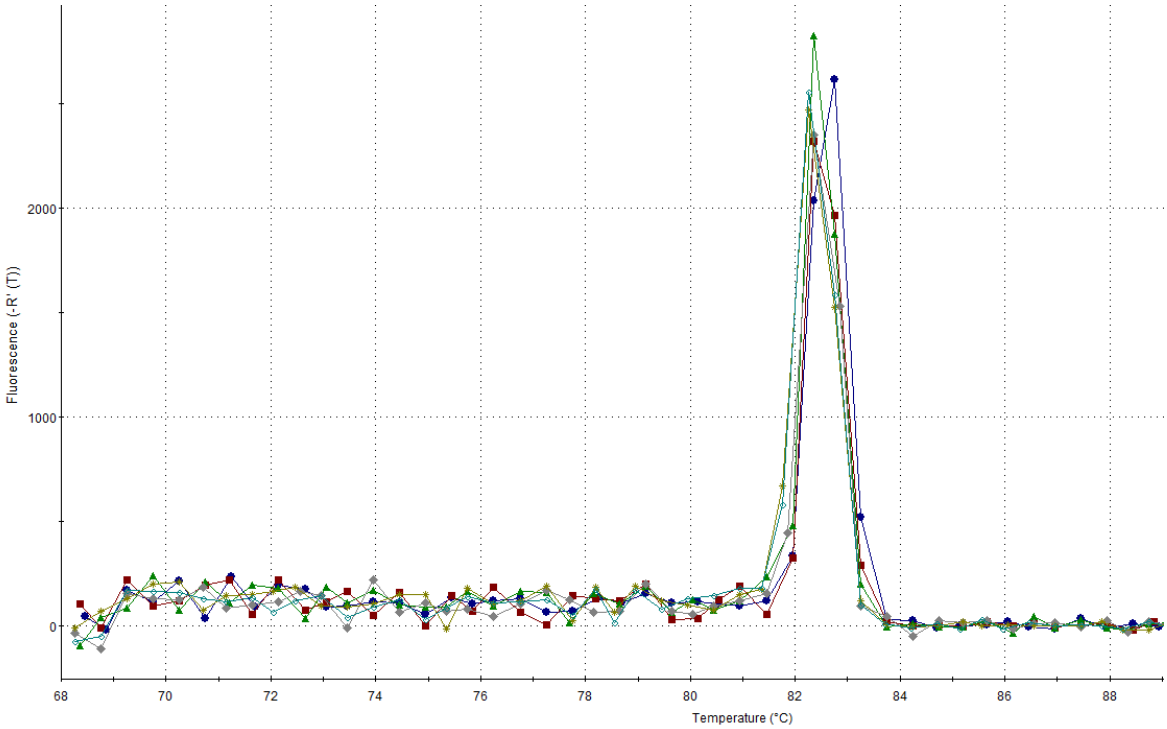
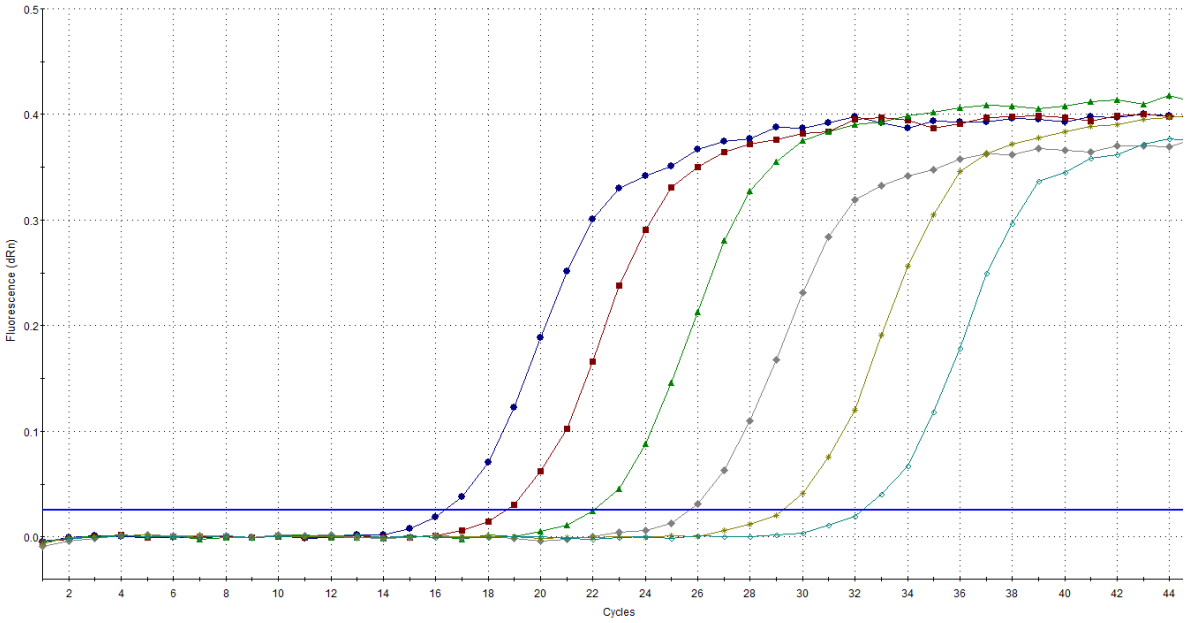


Figure 25.利用 ZIKV SYBR green real time RT-PCR 進行增幅，將 ZIKV Africa (IBH30656)以 10^5~10^0 PFU/ml 進行稀釋。Tm 值為 82.5。



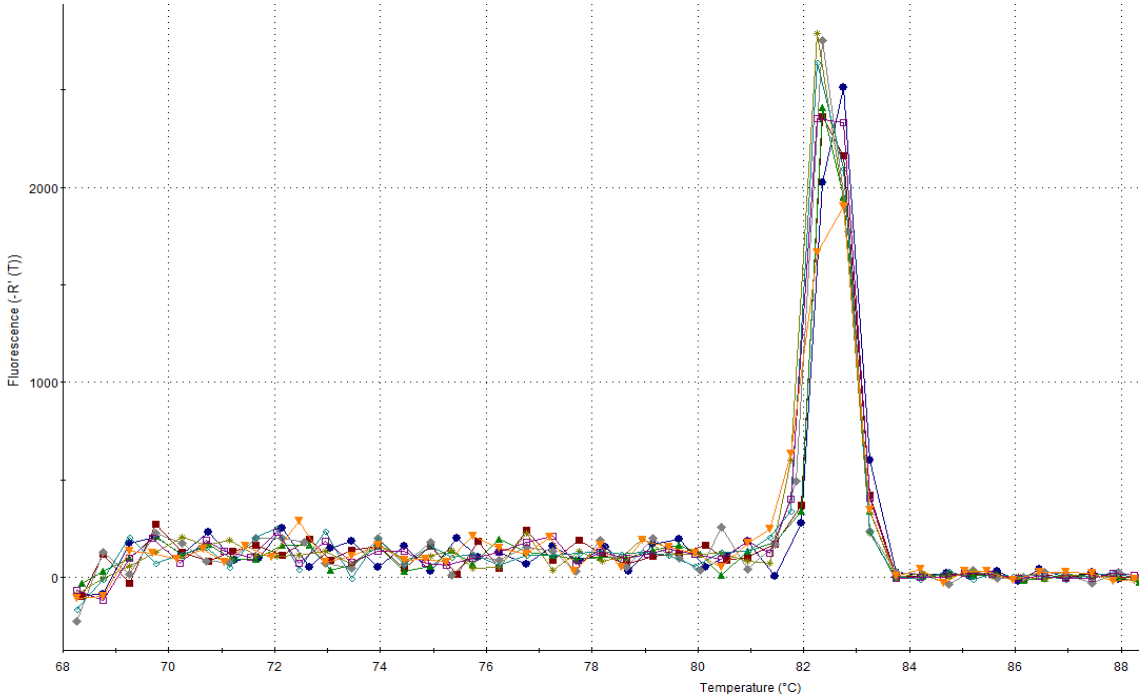


Figure 26. 使用 YFV primer set。檢測 TaqMan probe RT-PCR 專一性反應

Well	Viral load	Cq	EPF
DENV1	1.00E+07	-	0.03
DENV2	4.80E+06	-	0.01
DENV3	1.00E+06	-	0.11
DENV4	1.00E+07	-	0.02
ZIKV Asian	1.00E+06	-	0.18
ZIKV African	1.00E+06	-	0.05
CHIKV Asian	1.00E+06	-	0.08
CHIKV African	1.00E+06	-	0.12
WNV	1.00E+06	-	0.15
JE	1.00E+06	-	0.17
JE	1.00E+05	-	0.02
YFV	1.00E+05	1.61E+01	2.11E+00
NTC	-	-	0.14

Figure 27. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 靈敏度，所設計 YFV 之 NS5 gene 引子組，以 YFV (17D vaccine strain)進行標準曲線稀釋(10^5~10^{-1}) PFU/mL

Well	Viral load (PFU/mL)	EPF	Cq
YFV TaqMan FAM (200-200-250 nM)			
A1	1.0E+05	2.11	15.36
B1	1.0E+04	2.06	18.88
C1	1.0E+03	2.12	22.22
D1	1.0E+02	1.99	25.99
E1	1.0E+01	1.84	29.39
F1	1.0E+00	1.7	32.86
G1	1.0E-01	1.2	37.91
H1	NTC	0.03	-

Figure 28. Roche LC480 分析結果，其 YFV (17D vaccine strain)標準曲線

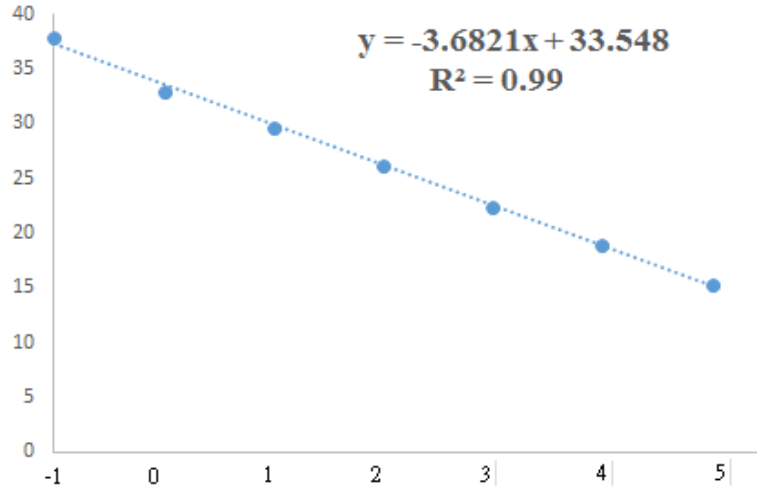


Figure 29. Roche LC480 分析結果，其 YFV (17D vaccine strain) 10^{5}~10^{-1} PFU/ml 進行稀釋之標準曲線

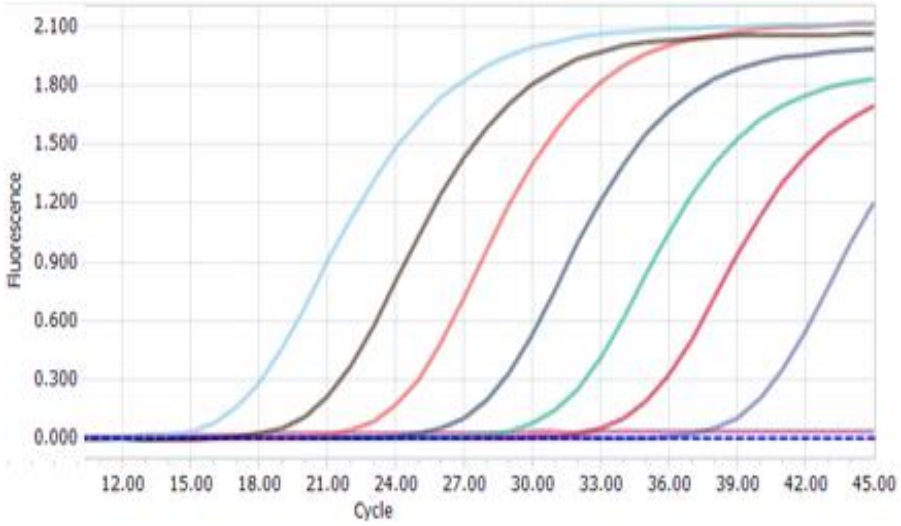


Figure 30 . LASSA Plasmid construct map

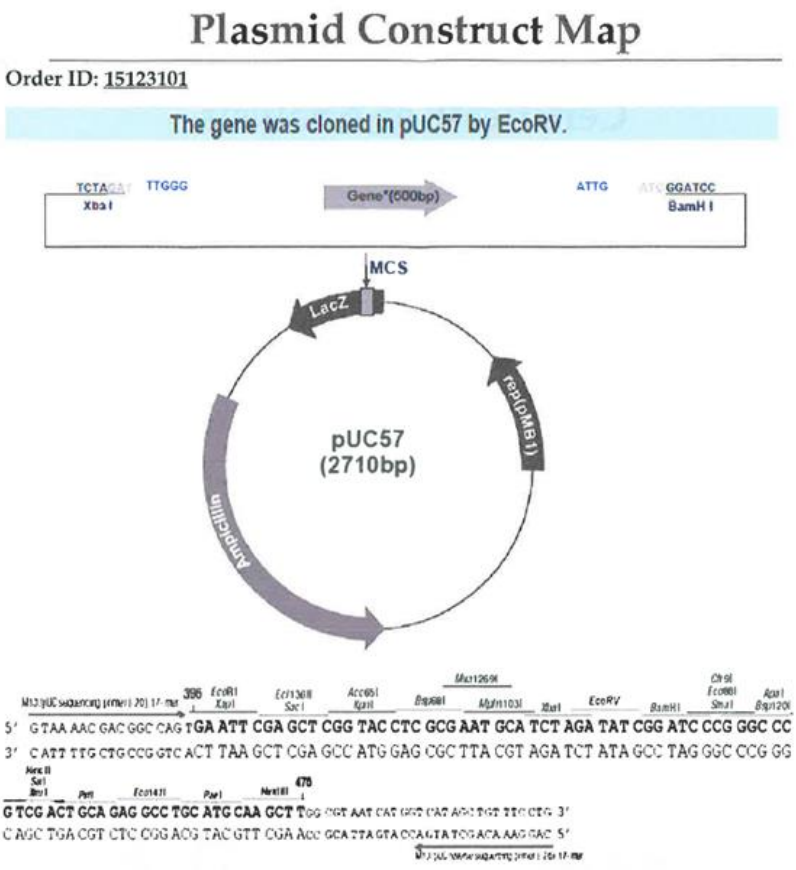


Figure 31. 使用 LASSA primer set。檢測 TaqMan probe RT-PCR 專一性反應

Plasmid Name	Well	Viral load (PFU/mL)	Cq	EPF
DENV1	A1	1.00E+06	-	0.726
DENV2	B1	1.00E+06	-	0.442
DENV3	C1	1.00E+06	-	0.652
DENV4	D1	1.00E+06	-	0.686
ZIKV Asian	E1	1.00E+06	-	0.795
CHIKV Asian	G1	1.00E+06	-	0.458
YFV	H1	1.00E+05	-	0.374
WNV	A12	1.00E+06	-	0.219
JEV	B12	1.00E+06	-	0.381
LASSA Plasmid	C12	6.88E+06	19.4	59.46
NTC	D12	-	-	0.727

Figure 32. 檢測 TaqMan probe RT-PCR 靈敏度，所設計 LASSA 之 GP gene 引子組，以 LASSA Plasmid 進行標準曲線稀釋(10^{10}~10^{0}) Copy number/RX

Plasmid Name	Copies	Log (Copies/well)	Cq	EPF
Lassa virus plasmid	6.88E+10	10.84	7.17	48.57
	6.88E+09	9.84	9.53	56.09
	6.88E+08	8.84	12.22	56.68
	6.88E+07	7.84	15.95	56.88
	6.88E+06	6.84	19.40	59.46
	6.88E+05	5.84	22.99	61.18
	6.88E+04	4.84	27.08	55.69
	6.88E+03	3.84	30.83	55.24
	6.88E+02	2.84	34.53	50.19
	6.88E+01	1.84	37.63	48.53
	6.88E+00	0.84	-	4.11

Figure 33. Roche LC480 分析結果，其 LASSA Plasmid 標準曲線

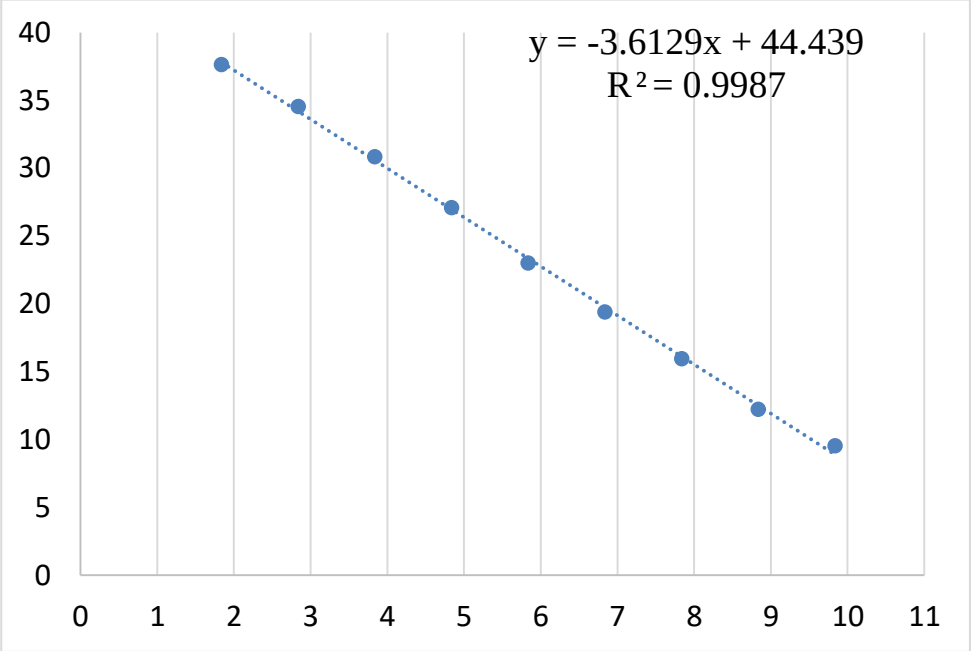
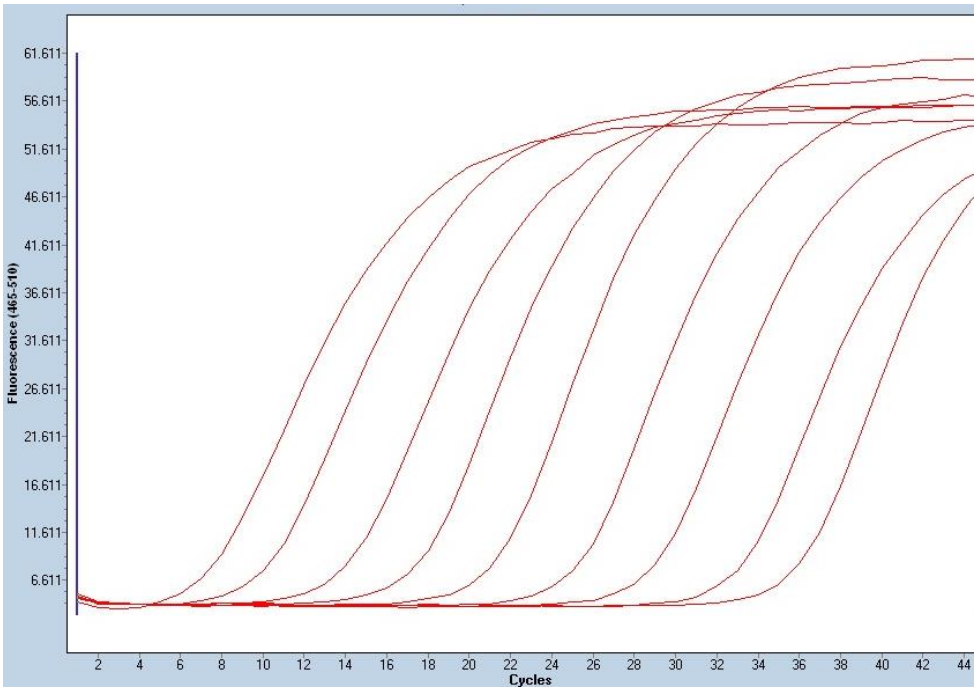



Figure 34. 利用 LASSA TaqMan probe RT-PCR 進行增幅，將 LASSA Plasmid 以 10^{10}~10^{0} Copies number/RX 進行稀釋。