

計畫編號：DOH 102-DC-2210

行政院衛生福利部疾病管制署 102 年度

自行研究計畫

建立未知/新興病媒病毒分子診斷及監測系統

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：楊正芬、陳歷禹、蘇千玲、張淑芬

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 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 | (16-17) |
| 三、表次 | (18-24) |
| 四、圖次 | () |
| | 共 (24) 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/新興病媒病毒 (vector-borne virus) 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。最常見的病媒種類為節肢動物，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/新興病媒病毒傳染病。本研究中，我們開發出以病毒屬(或群)共通引子 (consensus primers) 與病毒專一性引子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 (Flavivirus)、阿爾發病毒屬 (Alphavirus)、布尼亞病毒科 (Bunyaviridae) 與呼腸孤病毒科 (Reoviridae) 之病媒病毒。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：病媒病毒、黃病毒、布尼亞病毒、呼腸孤病毒、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 vector-borne virus infectious diseases now spread rapidly in the world and increase the threats to global public health security. Among these, the mosquito-, tick-, and rodent-borne diseases are the most serious vector-borne 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 and virus-specific primer sets to detect flaviviruses, Alphaviruses, Bunyaviruses, and Reoviruses. Fever screening at airports in Taiwan has proved to be an effective surveillance system of arboviral infections, including dengue and chikungunya. In this study, we coordinate with the airport fever screening system to detect arboviral infections in febrile patients, to reduce local prevalence of arboviral diseases in Taiwan.

Key word: vector-borne virus, Flavivirus, Bunyavirus, Reovirus, 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、韓國及日本流行等（8），皆造成公共衛生上很大的危機。節肢動物所媒介的病媒病毒種類繁多，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）、阿爾發病毒屬（Alphavirus）、布尼亞病毒科（Bunyaviridae）與呼腸孤病毒科（Reoviridae）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 Crimean- Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV)(14)、非洲及中東流行的 Rift Valley 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。此外，漢他病毒亦屬於布尼亞病毒科，可感染小型哺乳動物，動物的體液及排泄物中含有病毒，可經由空氣傳播給人，引起漢他出血熱及漢他肺症候。呼腸孤病毒科(Reoviridae)中，較重要的有 Colorado tick fever virus 及 Eyach virus，以壁蝨為媒介，可引起腦炎。中國也有類似的病毒，如 Seadornavirus 屬的 Banna virus 及 Liao Ning virus，以蚊蟲為媒介。

病媒病毒分佈於全球，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在叮咬或吸血時將病毒傳播至脊椎動物宿主，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，地方性傳染病即開始流行，如日本腦炎等。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，影響民眾的健康，如登革熱的流行。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，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 35,000 至 45,000 名旅客，近 5 年

民眾入境人次數每年約有 1,200-1,700 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，疾病管制署針對入境旅客全面測量體溫，並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，經由疾病管制署主動採取病人檢體，檢驗相關傳染病，包括登革熱及屈公病。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 40-50%。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。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)、布尼亞病毒科 (Bunyaviridae)、呼腸孤病毒科 (Reoviridae) 之病媒病毒。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 檢驗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病媒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 螢光定量 RT-PCR 方法，開發病媒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病媒病毒傳染病，及配合機場發燒篩檢系統及醫師/醫院通報系統，對疑似發燒病患血清進行篩選。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病媒病毒，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**：病媒病毒包含許多 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/DQ0764176871-7880; (8) Hantaan virus /JQ083393/3401~4300 bp; (9) Sin Nombre virus/ NC005217/3401~4300 bp; (10) Seoul virus/ JX879770/ 3401~4300 bp; (11) Colorado tick fever virus (CTFV)/ AF343051 (1~500 bp); (12) Banna virus/ AF133430 (2401~3100 bp); (13) Yunnan orbivirus AY701509 (2100-2900 bp)等。
3. **引子(Primer)的設計與合成**：為檢測未知/新興的黃病毒屬 (Flavivirus)、布尼亞病毒科 (Bunyaviridae) 及呼腸孤病毒科 (Reoviridae)等病媒病毒，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。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，皆含有重要的病媒病毒。呼腸孤病毒科(Reoviridae)中 Orbivirus 屬、Seadornavirus 屬及 Coltivirus 屬，皆含有重要的病媒病毒。應視病毒序列的變化設計適當的引子，且應視需要取得、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. **病媒病毒的分離與鑑定**：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. **常見重要病媒病毒**：表一所示為常見重要病媒病毒之種類、動物媒介及其地理分佈。本研究針對表中所列病毒進行引子之設計及測試。
2. **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)等。表二為黃病毒共通引子，及針對個別病毒專一性引子之靈敏度(detection limit)測試結果。今年(2013 年)1-10 月機場發燒篩檢等主動監測檢體共 1653 件，檢出 73 件登革病毒陽性，未檢出其他黃病毒；醫院報告檢體 410 件，共檢出 40 件登革病毒陽性，未檢出其他黃病毒。
3. **建立布尼亞病毒科(Bunyaviridae)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 (SFTSV) 等病毒。表三為 Nairovirus 屬、Orthobunyavirus 屬、Phlebovirus 屬共通引子，及漢他病毒專一引子之篩選結果。表四為布尼亞病毒共通引子，及漢他病毒專一性引子之靈敏度(detection limit) 測試結果。今年(2013 年)8-10 月機場發燒篩檢等主動監測檢體及醫院報告檢體共 648 件，應用 Phlebovirus consensus primers 及 SFTSV-specific primers，未檢出 SFTSV 陽性檢體。此外，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-F4，RV-R3)進行 multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR，篩檢 5-7 月採集之 406 池(pools)，共 17,9615 蚊蟲，並未發現帶有 Bunyavirus。

4. **建立呼腸孤病毒科(Bunyaviridae)之分子診斷系統:** 呼腸孤病毒科至少包含 80 種以上的病毒，可分 15 個屬(genus)，其中 Coltivirus、Seadornavirus 及 Orbivirus 包含重要的病媒病毒。表五為 Coltivirus 屬、Seadornavirus 屬及 Orbivirus 屬共通引子篩選之結果。表六為呼腸孤病毒共通引子之靈敏度(detection limit) 測試結果。我們混合 Coltivirus 屬共通引子(CT109F，CT479R)、Seadornavirus 屬共通引子(BA2407F，BA2673R)及 Orbivirus 屬共通引子(OR2185，OR2532R)進行 multiplex SYBR Green I-based real-time RT-PCR，篩檢 5-7 月採集之 406 池(pools)，共 17,9615 蚊蟲，並未發現帶有 Reovirus。

5. 討論

本計畫的目標在建立一套完整的病媒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，Bunyaviridae 科之 Hantavirus、Nairovirus、Orthobunyavirus、Phlebovirus 屬，及 Reoviridae 科之 Coltivirus、Seadornavirus 及 Orbivirus 屬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 40~50%全國的登革熱境外移入病例及 90%以上的屈公病境外移入病例(6,7)。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)。為了強化機場發燒篩檢系統，我們將建立更完整的病媒病毒分子診斷，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 及 SFTSV-specific 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被動報告 648 件檢體進行 Bunyaviridae 科病毒的篩檢，並未發現陽性病例。也對 5-7 月採集之 406 池(pools)，共 17,9615 蚊蟲進行篩檢，並未發現 Bunyaviridae 及 Reoviridae 病毒。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），Reoviridae 科之 Coltivirus、Seadornavirus 及 Orbivirus 屬（共約 30 種病毒）病毒之分子診斷方法。應用於機場發燒篩檢及醫師/醫院通報檢體的篩檢，雖尚未檢驗出新的 Bunyavirus 及 Reovirus，未來仍應持續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。病媒病毒是藉由病媒所傳播之病毒，由於有些病媒的分布具有侷限性，故病媒病毒傳染病具有特殊地理分布的特性。當世界各地有特殊傳染病疫情爆發時，機場發燒篩檢可依入境來源國家採檢發燒病人檢體送驗，以減少由境外引進病毒之可能性。實驗室也應建立靈敏的檢驗方法以檢出病原體。此外在醫院通報的檢體中，有許多未檢出已知的病原體，故可利用共通引子篩選，以符合成本效益，監測未知病原體在本土傳播的可能性。

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及呼腸孤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，各種病媒病毒如登革病毒、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 arbovirolosis. *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.

Table 1. Vectors, geographic distributions and diseases of important vector-borne viruses.

| RNA arboviruses | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Family Togaviridae (+ssRNA) | | | | | |
| Genus | Species | Abbreviation | Vector | Geographic distribution | Disease |
| Alphavirus | Chikungunya virus | CHIKV | Ae. Mosquito | Africa, Asia | fever |
| Alphavirus | Ross River virus | RRV | mosquito | Australia, S Pacific | fever |
| Alphavirus | Sindbis virus | SV | Cx mosquito | S.E Africa, Asia (PH), E | arthralgia |
| Alphavirus | Barmah Forest virus | BFV | Cx mosquito | Australia | fever, arthralgia |
| Alphavirus | Ockelbo virus | | Cx mosquito | N Europe (Sweden,2013) | fever, arthralgia, rash |
| Alphavirus | Eastern equine encephalitis virus | EEEV | Culiseta, Ae, etc mosquito | N, C, S America, Caribea | fever, meningitis |
| Alphavirus | Venezuelan equine encephalitis virus | VEEV | Ochlerotatus mosquito | C, S America | fever |
| Alphavirus | Western equine encephalitis virus | WEEV | Cx, Culiseta mosquitoes | N, S America | fever |
| Alphavirus | Mayaro virus | MAYV | mosquito | S America | fever, arthralgia |
| Alphavirus | O'nyong-nyong virus | ONNV | Anopheles mosquito | Africa | fever, rash, polyarthriti |
| Alphavirus | Sandfly fever virus | SFV | sandfly | S. Europe | fever, rash |
| Family Flaviviridae (+ssRNA) | | | | | |
| Genus | Species | Abbreviation | Vector | Geographic distribution | Disease |
| Flavivirus | Dengue virus | DENV | Ae mosquito | Africa, Asia, America | fever, hemorrhage |
| Flavivirus | Japanese encephalitis virus | JEV | Cx mosquito | Asia, S Pacific | encephalitis |
| Flavivirus | Murray Valley encephalitis virus | MVEV | Cx mosquito | Australia, PN Guinea | encephalitis |
| Flavivirus | Kunjin virus | KUNV | Cx mosquito | Australia, Oceania | encephalitis |
| Flavivirus | West Nile virus | WNV | Cx mosquito | Africa, America, Asia | fever, encephalitis |
| Flavivirus | St. Louis encephalitis virus | SLEV | Cx mosquito | N, C America | encephalitis |
| Flavivirus | Yellow fever virus | YFV | Ae mosquito | Africa, C, S America | hemorrhage |
| Flavivirus | Tick-borne encephalitis virus | TBEV | Ixodid tick | Europe, Asia | encephalitis |
| Flavivirus | Kyasanur forest disease virus | KFDV | Ixodid tick | S Asia | hemorrhage |
| Flavivirus | Alkhurma virus | ALKV | Ixodid tick | Middle East (Saudi Arab | encephalitis |
| Flavivirus | Zika virus | ZIKV | Ae mosquito | Asia | fever |
| Family Bunyviridae (-ssRNA) | | | | | |
| Genus | Species | Abbreviation | Vector | Geographic distribution | Disease |
| Hantavirus | Hantaan virus | HTNV | rodent | Asia | HFRS |
| Hantavirus | Seoul virus | SEOV | rodent | World | HFRS |
| Hantavirus | Puumala virus | PUUV | rodent | Europe | HFRS |
| Hantavirus | Sin Nombre virus | SNV | rodent | America | HPS |
| Hantavirus | Andes virus | ANDV | rodent | America | HPS |
| Orthobunyavirus | California encephalitis virus | | mosquito | N America | encephalitis |
| Orthobunyavirus | La Crosse encephalitis virus | LACV | Ochlerotatus mosquito | N America | encephalitis |
| Orthobunyavirus | Jamestown Canyon virus | JCV | mosquito | N America | encephalitis |
| Orthobunyavirus | Bunyamwera virus | | Ae aegypti | Africa (W Uganda) | fever |
| Orthobunyavirus | Schmallenberg virus | | Culicoides midge | Europe | (animal) |
| Nairovirus | Crimean-Congo hemorrhagic fever virus | CCHFV | Ixodid tick | Africa, E. Europe, Asia | hemorrhage |
| Phlebovirus | Severe fever with thrombocytopenia syndrom | SFTSV | Haemophysalis longicornis | China, Japan, Korea | hemorrhage |
| Phlebovirus | Rift Valley fever virus | RVFV | Ae mosquito | Africa, Arabian Peninsul | hemorrhage |
| Phlebovirus | Toscana virus | TOSV | Phlebotomus sandfly | Italy, Mediterranean Sea | fever, meningoencephalitis |
| Family Reoviridae (dsRNA) | | | | | |
| Genus | Species | Abbreviation | Vector | Geographic distribution | Disease |
| Orbivirus | Orungo virus | | mosquito | Africa | fever |
| Orbivirus | Changuinola virus | | Phlebotomine sandfly | N, S America | fever |
| Orbivirus | Yunnan virus | YUNV | Cx mosquito | China | |
| Orbivirus | Great Island virus (Kemerovo virus) | | tick | W Siberia | /fever, meningitis |
| Orbivirus | African horse sickness virus | AHSV | Culicoides midge | | (animal) |
| Orbivirus | Bluetongue disease virus | BTV | Culicoides midge | | (animal) |
| Seadornavirus | Banna virus | BAV | Cx mosquito | India, China | encephalitis |
| Seadornavirus | Liao Ning virus | | mosquito | China | |
| Coltivirus | Colorado tick fever virus | CTFV | tick Dermacentor anderson | N America | fever, hemorrhage or encephalitis? |
| Coltivirus | Eyach virus | | tick | Europe? | encephalitis? |
| Family Rhabdoviridae (-ssRNA) | | | | | |
| Vesiculovirus | Vesicular stomatitis Indiana virus | VSIV | | | |
| Family Orthomyxoviridae (-ssRNA) | | | | | |

Table 2. Detection limits of real-time RT-PCR for the detection of Flaviviruses.

| Species | Abbreviation | Detection Limit | Species-spe primer | Detection Limit |
|----------------------------------|--------------|------------------------------|--------------------|-----------------|
| Dengue virus | DENV | 10-50 copies/Rx | R36,R169,R170 | 10-50 copies/Rx |
| Japanese encephalitis virus | JEV | 50-100 copies/R | JE3F1,JE3R1 | <20 copies/Rx |
| Murray Valley encephalitis virus | MVEV | <15 copies/Rx | | |
| Kunjin virus | KUNV | | | |
| West Nile virus | WNV | 50-100 copies/R | WN1160,1229 | <25 copies/Rx |
| St. Louis encephalitis virus | SLEV | | | |
| Yellow fever virus | YFV | <25 copies/Rx | | |
| Tick-borne encephalitis virus | TBEV | <20 copies/Rx | | |
| Kyasanur forest disease virus | KFDV | <25 copies/Rx | | |
| Alkhurma virus | ALKV | | | |
| Zika virus | ZIKV | 0.024 ng/Rx (NIID viral RNA) | | |

Table 3. Primer sets used for the detection of Bunyaviruses.

| Hantavirus primers | | | | | | | | | |
|--|----------|-----------------------------------|--------|----------------|-----------|------------|----------|-------------|---------|
| Primer# | Name | Seq | Region | Primer set | Size (bp) | Ct | Ct (NTC) | For routine | |
| Seoul virus primers | | | | | | | | | |
| | SEO3465F | GGA AAA GTA TGT TTA ACC TGC ATG | L | SEO3465F-3709R | 244 | 10.01 | No Ct | | |
| | SEO3709R | TGC TCC CAA ATC CAT TGC TTT GAC | L | SEO3465F-3730R | 265 | 9.88 | 36.03 | | |
| | SEO3567F | CTA CAT TTT TYG AGG GTT GTG CTG | L | SEO3465F-3770R | 305 | 10.3 | No Ct | V | |
| | SEO3619F | TGG CTC ACT ATC TGA CCT ACC AGG | L | SEO3465F-3905R | 440 | 10.22 | No Ct | | |
| | SEO3730R | AAG TTG TGA GAT YTG AGG CGA TGC | L | SEO3567F-3770R | 203 | 10.47 | No Ct | | |
| | SEO3770R | CAT ATA ATC TCT CAA CCT TAC TCG | L | SEO3567F-3905R | 338 | 9.9 | 42.1 | | |
| | SEO3778F | AAT AGG CAT GGT WAA TTA TCC TGG | L | SEO3567F-4056R | 489 | 12.97 | 38.54 | | |
| | SEO4056R | ACT TTT CCT ATA AAT GAA AAC TGG | L | SEO3619F3905R | 286 | 9.86 | 33.79 | | |
| | SEO3905R | TTG TCA GAC ATG CCT ATA CCG GC | L | SEO3619F-4056R | 437 | 11.78 | No Ct | | |
| | SEO4162R | AAT GTA ATC ATA TGT AGG ATG CTG | L | SEO3778F-4056R | 278 | 10.21 | 10.21 | | |
| | | | | SEO3778F-4162R | 384 | 11.94 | 35.7 | | |
| Hantaan virus primers | | | | | | | | | |
| | HTN3442F | GTT TAG TGT DAA TAC TGA RAT GTG G | L | HTN3442F-3672R | 230 | No Ct | No Ct | | |
| | HTN3567F | CAA CTT TCT TTG ARG GWT GTG CTG | L | HTN3442F-3801R | 359 | 14.87 | 24.36 | | |
| | HTN3672R | GCT GCT GCT AAA TCA TCA AAA TAG | L | HTN3442F-3894R | 452 | 16.48 | No Ct | | |
| | HTN3655F | TGA TGA TTT AGC WGC AGC ACA GAG | L | HTN3567F-3801R | 234 | 13.33 | 39.7 | | |
| | HTN3801R | GCA GGG TGR TTC ACC ATA CCT GG | L | HTN3567F-3894R | 327 | 11.65 | No Ct | V | |
| | HTN3862F | GTC TAT WAT GGA GYT AGC AAC AGC | L | HTN3567F-4034R | 467 | 14.35 | No Ct | | |
| | HTN3894R | CCT ATC CCR GCT GTT GCT AAC TCC | L | HTN3655F-3894R | 239 | 11.89 | No Ct | | |
| | HTN4034R | GCC CTA ACC TTT CAT GYT GAA ATG | L | HTN3655F-4034R | 379 | 13.61 | No Ct | | |
| | | | | HTN3862F-4034R | 172 | No Ct | No Ct | | |
| Sin Nombre virus/Andes virus primers | | | | | | | | | |
| | SIN3442F | GCA TGC TRT TAA YCA AGA GAT GTG G | L | SIN3442F-3871R | 429 | 10.93 | No Ct | V | |
| | SIN3636F | TAC CAG GRT TAG GWT TCT TTG ATG | L | SIN3636F-3871R | 235 | 14.52 | 31.37 | | |
| | SIN3849F | GTG ATG GCT CAA TGT CTA TTA TGG | L | SIN3636F-4055R | 419 | 16.3 | No Ct | | |
| | SIN3871R | CAT AAT AGA CAT TGA GCC ATC TCC | L | SIN3849F-4055R | 206 | 16.8 | No Ct | | |
| | SIN4055R | CTT TAC CWA CAA AAC TAA ACT CAC | L | SIN3849F-4253R | 404 | 25.16 | No Ct | | |
| | SIN4253R | ATG GAG AYT GCA TWG TCA TAG CTG | L | | | | | | |
| PC plasmids | | | | | | | | | |
| JQ083393 (3401-4300 bp)-Hantaan virus | | | | | | | | | |
| NC005217 (3401-4300 bp)-Sin Nombre virus | | | | | | | | | |
| JX879770 (3401-4300 bp)-Seoul virus | | | | | | | | | |
| Nairovirus (Genus) | | | | | | | | | |
| Prim | Name | Seq | Region | position | size | Primer set | Ct | Tm | Routine |
| 1 | NR-F1 | CAT GCA YGC AAC MAC WGA AAT GTT | L | 6876 | | F1R1 | 9.01 | 78.25 | |
| 2 | NR-R1 | GAA CAG CAG TGT ATY GGR CCC CA | L | 7104 | | F1R2 | 8.94 | 78.75 | V |
| 3 | NR-F2 | CTG YTC YTT CTT YTC CGG YAT GAT | L | 7101 | | F2R3 | 21.68 | 76.75 | |
| 4 | NR-R2 | RG A RCA GCA GTG TAT YGG RCC CCA | L | 7107 | | F3R3 | 16.88 | 77.25 | |
| 5 | NR-F3 | RAA TGT NCC AGA YTG GWG TTC ATT | L | 7140 | | F4R4 | 15.59 | 79.15 | |
| 6 | NR-F4 | YTA YAT AAG CAA AGG RMT CAT GGC | L | 7368 | | F5R4 | 16.11 | 79.15 | |
| 7 | NR-R3 | AAT RCC YTG ACC CAT RTG RTT GTA | L | 7425 | | F6R5 | 12.22 | 77.7 | |
| 8 | NR-F5 | ATT RAA CAG YTA CAA YCA YAT GGG | L | 7392 | | F6R6 | 14.4 | 79.15 | |
| 9 | NR-F6 | TRA ACA TGC NGG YAG YTC AGA TGA | L | 7530 | | F7R6 | 11.9 | 77.75 | |
| 10 | NR-R4 | GTA ATC ATC YGA VCT DCC NGC ATG | L | 7557 | | F8R6 | 14.49 | 77.75 | |
| 11 | NR-F7 | RTG YTG TCA RAT GAA RGA TAG TGC | L | 7671 | | | | | |
| 12 | NR-R5 | YAA KGT YTT GGC ACT ATC YTT CAT | L | 7704 | | | | | |
| 13 | NR-F8 | RTT TTA CAG YGA RTT YAT GAT GGG | L | 7725 | | | | | |
| 14 | NR-R6 | DAC ACT ATT ATA CAT NGC TAG TTG | L | 7875 | | | | | |
| DQ076417 (6871-7880)-CCHFV(Crimean-Congo hemorrhagic fever virus) | | | | | | | | | |

Table 3. Primer sets used for the detection of Bunyaviruses.

(continued)

| Orthobunyavirus (Genus) | | | | | | real-time RT-PCR | | | |
|---|-------|---------------------------------|--------|----------|------|------------------|-------|-------|---------|
| Prim | Name | Seq | Region | position | size | Primer set | Ct | Tm | Routine |
| 1 | OB-F1 | ATT YTT TAA TAA RGG CCA RAA RAC | L | 2899 | | F1R1 | 35.45 | 79.25 | |
| 2 | OB-F2 | GGA TAG RGA GAT ATT YGT DGG VGA | L | 2929 | | F2R1 | 24.69 | 78.75 | |
| 3 | OB-F3 | WGG AGA ATW TGA GGC WAA RAT GTG | L | 2947 | | F2R2 | 28.47 | 78.7 | |
| 4 | OB-F4 | YAA GTT GAA YCC TGA YGA RAT GAT | L | 3007 | | F3R1 | 19.18 | 78.7 | |
| 5 | OB-R1 | ACT CCA TTT WGA CAT RTC TGC ATT | L | 3256 | | F3R2 | 23.06 | 78.65 | |
| 6 | OB-R2 | GWA AAA WAC ATC YTG RGC ACT CCA | L | 3274 | | F4R1 | 18.08 | 78.65 | |
| 7 | OB-F5 | MAA TGC AGA YAT GTC WAA ATG GAG | L | 3232 | | F4R2 | 15.71 | 79.15 | V |
| 8 | OB-F6 | GTC WAA ATG GAG TGC YCA RGA TGT | L | 3245 | | | | | |
| 9 | OB-R3 | GTA RTT GAA ATT NCC YTG NAG CCA | L | 3511 | | | | | |
| 10 | OB-F7 | WTT TGG ATR YCA RGC AAA TAT GAA | L | 3718 | | | | | |
| 11 | OB-R4 | CAT NCG RCT KGC TAN ATC YTC ATA | L | 3889 | | | | | |
| GU206122: nt2895-3894 (La Crosse virus) | | | | | | | | | |

| Phlebovirus (Genus) | | | | | | | | | |
|--|-------|---------------------------------|--------|----------|------|------------------|-------|-------|---------|
| RVFV-SFV group | | | | | | real-time RT-PCR | | | |
| Prim | Name | Seq | Region | position | size | Primer set | Ct | Tm | Routine |
| | RV-F1 | GGD TAC TTB AAR AAC AAA GAR GA | L | 2342 | | F5R5 | 11.15 | 78.25 | |
| | RV-F2 | GGV ATG TAT TTR AAR ATH TAG A | L | 2390 | | F6R5 | 11.03 | 77.75 | |
| | RV-R1 | TTC TTR AAC AAR CAR ATA TGC AT | L | 2829 | | F6R6 | 16.99 | 77.25 | |
| | RV-F3 | ATG CAT ATY TGT YTG TTY AAG AA | L | 2807 | | F3R3 | 17 | 80.45 | |
| | RV-R2 | TAG ATY TCT CTC ARH CCH CCA TG | L | 2859 | | F7R5 | 18.33 | 77.25 | |
| v | RV-F4 | GTT TAA GAA RCA RCA GCA TGG DGG | L | 2822 | | F3R4 | 34.21 | 80.45 | |
| | RV-F5 | GAC WTG TGC WAC WTC WGA TGA TGC | L | 3025 | | F7R6 | 13.22 | 77.7 | |
| v | RV-R3 | AGG TTC CAC TTC CTT GCA TCA TC | L | 3063 | | F4R3 | 10.31 | 80.45 | V |
| v | RV-F6 | ACW AAG TTT GCH CTV ATG CTA TG | L | 3077 | | F4R4 | 17.4 | 80.95 | |
| | RV-R4 | AGC ATB AGD GCA AAC TTW GTN AC | L | 3096 | | | | | |
| | RV-F7 | TVA TCA TTA GRG GHT GYT CAA TG | L | 3129 | | | | | |
| v | RV-R5 | TGV ART ATT CCC TGC ATC ATB CC | L | 3348 | | | | | |
| | RV-R6 | GWA RTG VAR TAT TCC CTG CAT CAT | L | 3352 | | | | | |
| HE687305: syn. nt2291-3290 (Rift Valley fever virus) | | | | | | | | | |

Table 4. Detection limits of real-time RT-PCR for the detection of Bunyaviruses.

| Species | Abbreviation | Group-spe primer | Detection Limit | Species-spe primer | Detection Limit |
|------------------------------------|--------------|------------------|-----------------|--------------------|-------------------------------|
| Hantaan virus | HTNV | | | HTN3567F-3770R | <50 copies/Rx |
| Seoul virus | SEOV | | | SEO3465F-3770R | <25 copies/Rx |
| Puumala virus | PUUV | | | | |
| Sin Nombre virus | SNV | | | SIN3442F-3871R | <200 copies/Rx |
| Andes virus | ANDV | | | | |
| California encephalitis virus | | OBF4,R2 | | | |
| La Crosse encephalitis virus | LACV | OBF4,R2 | <10 copies/Rx | | |
| Jamestown Canyon virus | | | | | |
| Bunyamwera virus | | OBF4,R2 | | | |
| Schmallenberg virus | | OBF4,R2 | | | |
| Crimean-Congo hemorrhagic fever | CCHFV | NRF1,R2 | <15 copies/Rx | | |
| Severe fever with thrombocytopenia | SFTSV | RVF6,R5 | | SFTS-1F,1R | 0.0023 TCID ₅₀ /Rx |
| Rift Valley fever virus | RVFV | RVF6,R5 | <10 copies/Rx | | |
| Toscana virus | TOSV | RVF6,R5 | | | |

Table 5. Primer sets used for the detection of Reoviruses.

Coltivirus

| Primer | Name | Seq | Region |
|--------|---------|---------------------------------|--------|
| | CT-109F | TCT CTG GAT GTR AAA GGT ATG GA | Seg 1 |
| | CT-163F | TCA YTK AGT TGT GTS TTY CAT CGT | |
| | CT-234F | GTC KTC BTC YAA AGA WAA TTA TGT | |
| | CT-326R | TAM GTY ARC TTR TAC TCT TCT TCA | |
| | CT-380R | AAY CTG GTK GGA CTC GTC CA | |
| | CT-386R | TCA GTA AAY CTG GTK GGA CTC G | |
| | CT-413R | GTC ATR ACR AAC TCY TGA AAG TA | |
| | CT-479R | ATH ACR CCR AGA AAM GTA TGC TG | |

PC **AF343051 (1-500 bp) Colorado tick fever virus (CTFV)**

| Primer set | Ct | Ct (NTC) | Routine |
|-------------|-------|----------|---------|
| CT109F-326R | 14.95 | No Ct | |
| CT109F-380R | No Ct | No Ct | |
| CT109F-386R | 13.06 | No Ct | |
| CT109F-413R | 15.47 | No Ct | |
| CT109F-479R | 13.46 | No Ct | V |
| CT163F-326R | 15.53 | No Ct | |
| CT163F-380R | 14.3 | No Ct | |
| CT163F-386R | 13 | No Ct | |
| CT163F-413R | 14.51 | No Ct | |
| CT163F-479R | 13.27 | No Ct | |
| CT234F-326R | 25.37 | No Ct | |
| CT234F-380R | 21.45 | No Ct | |
| CT234F-386R | 20.92 | No Ct | |
| CT234F-413R | 22.97 | No Ct | |
| CT234F-479R | 20.43 | No Ct | |

Seadornavirus-Banna virus

| Primer | Name | Seq | Region |
|--------|----------|------------------------------------|--------|
| | BA-2407F | YTG GAR ATW TCW GCB AAA CGT AC | Seg 1 |
| | BA-2557F | CAA GTA AAY ATM YTD TAT GAT ATG GC | |
| | BA-2637F | YAR TGA YAT GAA RTT GTT GAA TGG | |
| | BA-2709F | YGC WTA TGG TAC WCC TGA RAT ATG | |
| | BA-2758F | TTT GGT MGA TAY YTA CCR ATT GAC | |
| | BA-2673R | RCC RGC CCT WAT KCC ATT CAA CA | |
| | BA-2736R | RAA RCA TAT YTC AGG WGT CCA TA | |
| | BA-2773R | GTA RRT ATC KAC CAA AYG AWC GTA | |
| | BA-3000R | ATG TTT YTC ACA RTR YTC AGG CAT | |
| | BA-3051R | ATA GTC RCG AAT RRC YTT ATC ATC | |

PC **AF133430 (2401-3100 bp) Banna virus**

| Primer set | Ct | Ct (NTC) | Routine |
|---------------|--------|----------|---------|
| BA2407F-2673R | 15.96 | No Ct | V |
| BA2407F-2736R | 24.81 | No Ct | |
| BA2407F-2773R | 25.52 | No Ct | |
| BA2557F-2673R | 21.097 | No Ct | |
| BA2557F-2736R | No Ct | No Ct | |
| BA2557F-2773R | 32.05 | No Ct | |
| BA2637F-2773R | No Ct | No Ct | |
| BA2637F-3000R | 15.38 | No Ct | |
| BA2709F-3000R | 13.73 | No Ct | |
| BA2709F-3051R | 14.76 | No Ct | |
| BA2758F-3000R | 19.4 | No Ct | |
| BA2758F-3051R | 18.16 | No Ct | |

Orbivirus

| Primer | Name | Seq | Region |
|--------|-----------------|--|--------|
| | OR2185F | CYT RGT TTC ACC WTG GGA TGG MAG | Seg 1 |
| | OR2223F | TAT CRA CCC ATT TAT CVG GWG AAA | |
| | OR2345F | TCT GAR AYG TAY GTB GGB GAT GAC | |
| | OR2532R | TTG CTT SGC RTG HGT YTG YGT TTT | |
| | OR2581R | TTC TTT CCG AYG ADA YBA DCA TCA T | |
| | OR2502F | CGC TGA RAA AAC RCA RAC DCA YGC | |
| | OR2570F | CGT CGG AAM GAA DDA ARR ATA TTG A | |
| | OR2859R | TGG ATG HGC MCC AWA WCC RTT CCA | |
| | OR2900R | TCT AGA AAT ATT TCA GGC GTC AT | |
| | OrbiVP1-F2494-1 | TCT GAG ATG TAY GTY GGA GAT GAT A | |
| | OrbiVP1-F2494-2 | TCT GAG ATG TAY GTY GGT GAT GAC A | |
| | OrbiVP1-F2494-3 | TCG GAA CAR TAY GTV GGN GAY GAT A | |
| | OrbiVP1-F2494-4 | TCN GAR CAR TAY GTK GGN GAY GAC A | |
| | OrbiVP1-R2682 | CCY TGY TTN GCR TGN GTY TGY GTY TTY TC | |

PC **AY701509 (2100-2900 bp) Yunnan orbivirus**

| Primer set | Ct | Ct (NTC) | Routine |
|-------------------|-------|----------|---------|
| OR2185F-2532R | 13.65 | No Ct | V |
| OR2185F-2581R | 17.24 | No Ct | |
| OR2223F-2532R | 15.36 | 26.26 | |
| OR2223F-2581R | 18.81 | No Ct | |
| OR2345F-2532R | 14.86 | No Ct | |
| OR2345F-2581R | 19.41 | No Ct | |
| OR2502F-2859R | 13.35 | 30.18 | |
| OR2502F-2900R | 13.02 | 26.88 | |
| OR2570F-2859R | 17.97 | No Ct | |
| OR2570F-2900R | 16.65 | No Ct | |
| VP1-F2494-1-R2682 | No Ct | 44.59 | |
| VP1-F2494-2-R2682 | 24.72 | 38.41 | |
| VP1-F2494-3-R2682 | 27.31 | No Ct | |
| VP1-F2494-4-R2682 | 19.93 | 35.4 | |

Table 6. Detection limits of real-time RT-PCR for the detection of Reoviruses.

| Species | Abbreviation | Detection Limit |
|-------------------------------------|--------------|-----------------|
| Orungo virus | | |
| Changuinola virus | | |
| Yunnan virus | YUNV | <60 copies/Rx |
| Great Island virus (Kemerovo virus) | | |
| African horse sickness virus | AHSV | |
| Bluetongue disease virus | BTV | |
| Banna virus | BAV | < 90 copies/Rx |
| Liao Ning virus | | |
| Colorado tick fever virus | CTFV | < 30 copies/Rx |
| Eyach virus | | |