

封面樣式

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-113108

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建置新興病毒及立克次體檢測技術平台

106 年 度 研 究 報 告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊素鈴

研究人員：楊素鈴、陳湘妃、陳光彥、舒佩芸

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 年 12 月 31 日

# 目 錄

	頁碼
封面	
目錄	
壹、摘要	
一、中文摘要	3
二、英文摘要	4
貳、本文	
一、前言	5
二、材料與方法	8
三、結果	11
四、討論	15
五、結論與建議	16
六、重要研究成果及具體建議	17
七、參考文獻	18
八、圖、表	20

## 一、 中文摘要:

新興病毒如茲卡病毒感染症 (Zika virus infection) 是由茲卡病毒 (Zika virus) 所引起的急性傳染病，屬黃病毒的一種，主要經由蚊子叮咬傳播，最早在1947年於烏干達茲卡森林中的獼猴體內分離出來。依據基因型別分為亞洲型和非洲型兩種。近年在美洲巴西及鄰近國家與亞洲有不少案例發生，累積到2017年11月，台灣已有17例境外移入個案。西尼羅熱是一種由西尼羅病毒所引起的急性傳染病。西尼羅病毒最早是從1937年烏干達一名發燒婦女身上發現，由受西尼羅熱病毒感染的病媒蚊叮咬人類傳播，可由器官移植或輸血而感染，甚至受到感染媽媽經由胎盤或哺乳感染給幼童，也曾因實驗室人員操作不慎而被感染的案例。立克次體如恙蟲病、地方性斑疹傷寒、人類顆粒細胞無形體症、人類顆粒球艾利希氏體為絕對細胞內寄生、感染人畜的新興立克次體細菌，會引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發器官衰竭異常，臨床診斷極不易判定。然而許多病原體的感染都會引發類似的徵兆及症狀，難於區別，因此本計畫將分析近年台灣新興病毒及立克次體傳染病，設計篩選特異性基因區域與探針使檢測平台具有特異性，能在最短時間內同步檢測新興病毒如茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒、西尼羅病毒及立克次體傳染病等，可應用於疾病的早期診斷及流行病學的研究，將有助於快速檢測出傳染病種類，提早進行防疫措施，對病人實施正確的醫療照顧，對新興病毒及立克次體的監測與防治具有極大的幫助，作為未來研究及防疫政策的重要參考。

## 二、 英文摘要:

Emerging viruses such as Zika virus infection is an acute infection caused by Zika virus, mainly spread through mosquito bites, the first isolated in 1947. Based on genotype divided into Asian and Africa genotypes. In recent years, there were many cases occurred in Americas and Asia. Taiwan currently has four confirmed cases were all came from foreign. West Nile fever is an acute infectious disease caused by the West Nile virus. The virus was first identified in Uganda in 1937. The virus can be spread bite humans or from infected blood transfusions or organ transplants, and even spread to infected mothers via the placenta or breast-feeding children, have reported spread through a careless handling of laboratory personnel infected cases. These emerging viruses of clinical symptoms is very similar to general viral or bacterial infections and is not easy to diagnose determination. Therefore, this purpose of this study is to analyze the recently Taiwan's emerging virus molecular biology and genetic analysis. To establish the emerging viruses and multiplex qRT-PCR for detection system could detect emerging viruses such as Zika virus, Chikungunya virus, Dengue virus and West Nile virus infectious diseases in the shortest time, and to improve the sensitivity and specificity of the detection system, there will be helps to quickly detect the pathogen of infectious disease, and implement the corrected medical care, surveillance, prevention and control policies.

## 貳、計劃內容

### 一、前言

茲卡病毒為 *Flaviviridae* 科，*Flavivirus* 屬，依基因型別區分為亞洲型和非洲型，主要藉由埃及斑蚊 (*Aedes aegypti*) 及白線斑蚊 (*Aedes albopictus*) 叮咬傳播。最早於 1947 年烏干達茲卡森林內的恒河猴體內分離而得。2007 年，克羅尼西亞聯邦的雅蒲島爆發群聚疫情，隨後在 2013、2014 及 2015 年陸續造成美洲與非洲各地大流行。台灣於 2016 年 1 月篩檢出首例境外移入個案，截至 2017 年 11 月已有 17 例境外移入病例，主要移入國家多在東南亞地區，如泰國、越南等。

屈公病毒為 *Togaviridae* 科，*Alphavirus* 屬，依基因型別分為亞洲型和非洲型兩種，可引起屈公病，臨床症狀包括發燒、關節疼痛或關節炎、頭痛、噁心、疲倦、肌肉疼痛等。主要藉由埃及斑蚊及白線斑蚊叮咬傳播。主要流行區域為非洲、美洲，隨著全球化商業模式及人口遷移因素，目前屈公病疫情已擴展至亞洲、非洲、歐洲及美洲超過 60 個國家。台灣截至 2017 年 11 月中累計 105 例境外移入病例。多以印尼、菲律賓、馬來西亞為最多。

登革病毒為 *Flaviviridae* 科，*Flavivirus* 屬，依病毒的非結構蛋白 (NS1) 抗原性不同，而區分成 1、2、3、4 型血清型。病毒所引起的疾病包括登革熱

(Dengue fever)或登革出血熱 (dengue hemorrhagic fever) ，臨床症狀如急性高燒，頭痛、肌肉酸痛、骨頭與關節酸痛、後眼窩痛以及皮疹，疾病初期症狀不易與茲卡病毒感染或屈公病區別。病毒傳播方式由埃及斑蚊及白線斑蚊等病媒蚊叮咬傳播。主要流行於熱帶及亞熱帶國家，台灣由 1998 年截至 2017 年 11 月中已累計 78,612 例確定病例。

西尼羅病毒為單股RNA病毒，屬 *Flaviviridae* 科，*Flavivirus* 屬，依基因型可分為 Lineage 1 及 Lineage 2 兩大類。禽鳥類(烏鴉和鴿形目)是西尼羅病毒的增幅宿主，病毒傳播方式由家蚊類 (*Culex genus*)、白線斑蚊及白肋斑蚊 (*Aedes vexans*) 等病媒蚊叮咬傳播，人類為意外宿主 (incidental host) 。依據文獻報導西尼羅病毒可藉由器官移植或輸血而感染，一般感染者為無症狀，約 20% 感染者會產生發熱疾病症狀 (West Nile fever, WNF)，類似登革熱症狀，例如:頭痛、發燒、全身痠痛、關節痛、淋巴結腫大、噁心及嘔吐等症狀，小於 1% 感染者產生腦神經侵襲性症狀 (West Nile neuroinvasive disease, WNND)。主要的流行病學分布在非洲、北美洲、西亞洲和中東地區，美國自 1999 年到 2016 年間，共計 46,086 人感染，其中造成 2,017 人死亡，死亡率約為 4%，台灣截至 2017 年 11 月無本土或境外移入案例。

由於人類感染茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒及西尼羅病毒之早期臨床症狀不易區分，故需發展鑑別診斷試劑，以利及早對症下藥及防治疫情擴散。因病毒核酸可在病人發病早期被診斷出，本計畫研發以具快速、高

靈敏性，高專一性的即時反轉錄聚合酶鏈式反應 (real-time reverse transcription PCR ; qRT-PCR) TaqMan probe，開發出一套完整即時同步監測新興病毒及立克次體檢驗的篩檢平台。

## 二、材料與方法

### 1. 檢體來源

檢體來自疾管署疫情監測系統，檢體多為疑似個案的血清或尿液，依送檢來源可區分為國內各醫院端或機場發燒篩檢系統端兩大類。檢體運送過程須以低溫(4°C)條件送至實驗室，即刻進行後續臨床檢驗。

### 2. 病毒株

各病毒之來源為實驗室購自 ATCC (PRVABC59、IBH30656、YFV-17D vaccine strain、WNV VR1510 strain ATCC Lineage II)，或由實驗室自個案血清檢體中分離、培養及建立出病毒株 (CK-9700032、CK-9500002 與 DENV1-8700828、DENV2-454009、DNEV3-8700829、DENV4-9000475) (表 1)。

### 3. 新興病毒或病原的分離與鑑定

病毒的分離與鑑定，係將病人血清、腦組織液(CSF)、或新興病毒或立克次體病原蚊均質液經 C6/36, Vero, HL60, L929 等細胞株培養至少 7-12 天後分離出新興病毒，另以專一性單株抗體，如 Flavivirus-specific mAb (D56.3)、JEV group-specific (E3.3)、dengue group-specific (ATCC HB114) 等做免疫螢光染色確認病原體。或以 Real-time RT-PCR 鑑定所分離之病原體。為避免新興病毒或立克次體株產生變異，分離出病原體後，立即於 T-25 培養瓶擴大培養分裝、冷凍於液態氮中保存。

### 4. 抽取血清檢體 RNA



以 QIAamp viral RNA mini kit (cat. No. 52906, Qiagen, Hilden, Germany) 抽取病毒 RNA。原理為利用裝有矽土-膠膜的離心圓柱，可選擇性的與核酸結合，再經由數次清洗步驟去除非核酸物質，達到純化病毒 RNA 效果。取 140  $\mu$ L 病人血清混入 560  $\mu$ L 含 carrier RNA 的 Buffer AVL，混勻後靜置室溫 10 分鐘。加入 560  $\mu$ L 95~100 % 乙醇混合搖晃 15 秒後，再移至 QIAamp Mini 管柱內，離心 (6,000xg) 去除廢液。加入 500  $\mu$ L Buffer AW1 後離心 (6,000xg) 去除廢液。再加 500  $\mu$ L Buffer AW2 後離心 (6,000xg) 去除廢液。最後高速離心(20,000 x g) 3 分鐘去除殘留廢液，回溶於 70  $\mu$ L 純水。

## 5. 引子(Primer)及探針(Probe)設計與合成

自 NCBI 找尋並設計具有代表性的新興病毒核酸序列，比對各病毒間高度保留序列，設計適合的引子及探針序列，並在探針 5'端合成接上螢光探針。

(Table 2.)

## 6. 專一性 TaqMan 定量即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative real time Polymerase Chain Reaction, qPCR)

使用 Qiagen QuantiTect Probe RT-PCR kit 反應試劑。依序加入以下試劑：15  $\mu$ L 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix、核酸引子與螢光探針、0.2  $\mu$ L RT-Enzyme Mix，再以 RNase-free Water 補至體積 25  $\mu$ L，最後加入 5  $\mu$ L 檢體 RNA，反應最終體積為 30  $\mu$ L。以 Roche LightCycler480 II 進行 PCR 增幅

反應:(1) 50°C RT 反應 30 分鐘 (2) 95°C 15 分鐘 (3) 45 次循環之 95°C 15 秒、60°C 60 秒。五種新興病毒所選用的螢光為茲卡病毒探針 FAM；屈公病毒探針 Cy5；登革熱病毒探針 Hex；西尼羅病毒探針 FAM；黃熱病毒探針 HEX。

### 三、結果

1. 計畫所使用病毒株、濃度、基因型或血清型別 (表 1)。另對茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒、西尼羅病毒及黃熱病毒基因序列設計專一性引子及螢光探針(表 2)。茲卡病毒螢光探針為 FAM；屈公病毒螢光探針為 Cy5；登革病毒螢光探針為 Hex；西尼羅病毒螢光探針為 FAM；黃熱病毒探針 HEX。
2. **ZIKV TaqMan RT-PCR**：以 ZIKV Primer Forward, ZIKV Primer Reverse 與 ZIKV Probe (FAM)進行專一性測試 (表 3)、偵測極限 (圖 1A)、偵測線性範圍 (圖 1B) 及增幅曲線 (圖 1C)，結果發現茲卡病毒亞洲型與非洲型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL。為了確認人類血清中是否存在 qRT-PCR 抑制物，以人類血清混合茲卡病毒，或以無菌水混合茲卡病毒進行 qRT-PCR，結果證明人類血清中無 qRT-PCR 抑制物(圖 1D 1E)。
3. **CHIKV TaqMan RT-PCR**：以 CHIKV Primer Forward, CHIKV Primer Reverse 與 CHIKV Probe (Cy5)進行專一性測試 (表 3)、偵測極限進行(圖 2A)、偵測線性範圍 (圖 2B) 及增幅曲線 (圖 2C)，結果發現屈公病毒亞洲型 RNA 偵測極限落在  $10^0 \sim 10^1$  PFU/mL 之間；非洲型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間。為了確認人類血清中是否存在 qRT-PCR 抑制物，以人類血清混合屈公病毒，或以無菌水混合屈公病毒進行 qRT-PCR，結果證明

人類血清中無 qRT-PCR 抑制物(圖 2D 2E)。

4. **DENV TaqMan RT-PCR**：以 DENV Primer Forward, DENV Primer Reverse 1-3、DENV Primer Reverse 4 與 DENV Probe (HEX) 進行專一性測試(表 3)、偵測極限 (圖 3A)、偵測線性範圍 (圖 3B) 及增幅曲線 (圖 3C)，結果發現登革病毒血清型第 1 型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間；第 2 型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間；第 3 型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間；第 4 型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間；為了確認人類血清中是否存在 qRT-PCR 抑制物，以人類血清混合登革病毒，或以無菌水混合登革病毒進行 qRT-PCR，結果證明人類血清中無 qRT-PCR 抑制物(圖 3D 3E)。
  
5. **WNV TaqMan RT-PCR**：以 WNV Primer Forward, WNV Primer Reverse 與 WNV Probe (FAM) 專一性測試 (表 3)、偵測極限 (圖 4A)、偵測線性範圍 (圖 4B) 及增幅曲線 (圖 4C)，結果發現西尼羅病毒第 I 型質體 DNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  Copies/well 之間；第 II 型 RNA 偵測極限落在  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL 之間。為了確認人類血清中是否存在 qRT-PCR 抑制物，以人類血清混合西尼羅病毒，或以無菌水混合西尼羅病毒進行 qRT-PCR，結果證明人類血清中無 qRT-PCR 抑制物(圖 4D 4E)。
  
6. **YFV TaqMan RT-PCR**：以 YFV Primer Forward, YFV Primer Reverse 與 YFV

Probe (HEX) 專一性測試 (表 3)、偵測極限 (圖 5A)、偵測線性範圍 (圖 5B) 及增幅曲線 (圖 5C)，結果得知黃熱病毒 RNA 偵測極限約落在  $10^{-1}$ ~ $10^0$  PFU/mL 之間。為了確認人類血清中是否存在 qRT-PCR 抑制物，以人類血清混合黃熱病毒，或以無菌水混合黃熱病毒進行 qRT-PCR，結果證明人類血清中無 qRT-PCR 抑制物(圖 5D 5E)。

## 7. Multiplex TaqMan RT-PCR :

(1) 進行 ZIKV, CHIKV 及 DENV multiplex TaqMan RT-PCR，實驗結果偵測極限 (表 4)，偵測線性範圍 (圖 6A 6B 6C)。其中茲卡病毒亞洲型 RNA 偵測極限落在  $10^3$ ~ $10^4$  PFU/mL；非洲型 RNA 偵測極限落在  $10^3$ ~ $10^4$  PFU/mL。屈公病毒亞洲型 RNA 偵測極限落在  $10^1$ ~ $10^2$  PFU/mL 之間；非洲型 RNA 偵測極限落在  $10^1$ ~ $10^2$  PFU/mL 之間。登革病毒第 1 型血清型 RNA 偵測極限落在  $10^3$ ~ $10^4$  PFU/mL 之間；登革病毒第 2 型血清型 RNA 偵測極限落在  $10^2$ ~ $10^3$  PFU/mL 之間；登革病毒第 3 型血清型 RNA 偵測極限落在  $10^2$ ~ $10^3$  PFU/mL 之間；登革病毒第 4 型血清型 RNA 偵測極限落在  $10^2$ ~ $10^3$  PFU/mL 之間。

(2) 進行 YFV, WNV 及 CHIKV multiplex TaqMan RT-PCR，實驗結果偵測極限 (表 5)，偵測線性範圍 (圖 7A 7B 7C)。其中黃熱病毒 RNA 偵測極限落在  $10^0$ ~ $10^1$  PFU/mL。西尼羅病毒 RNA 偵測極限落在  $10^1$ ~ $10^2$  PFU/mL。

屈公病毒亞洲型 RNA 偵測極限落在  $10^2 \sim 10^3$  PFU/mL 之間；非洲型 RNA 偵測極限落在  $10^2 \sim 10^3$  PFU/mL 之間。

#### 四、討論

由於氣候環境變遷、交通發達與經濟全球化因素，造成新興病毒及立克次體散播，造成亞太地區與全球的流行，如 2013 到 2014 年的美國屈公病毒境外移入流行及 2016 年全球茲卡病毒流行等。爰此，新興病媒病毒及立克次體的境外監測與邊境檢驗為防疫重要的一環，有效提早篩選出病原體境外移入避免造成疾病傳播而本土化。即時反轉錄聚合酶鏈式反應 TaqMan probe 因具有快速、高敏感度及高專一度優點，可在疾狀初期早期診斷，利於早期治療，能有效阻止疫情擴散。本計畫已完成建立各項單一病毒的即時反轉錄聚合酶鏈式反應，皆具有高度專一性及低偵測極限，另所建置的多重即時反轉錄聚亦保有高度專一性，除了可有效偵測出病原體外，亦可降低檢驗成本及增進檢驗效率等優勢。

#### 未來將進一步

多重即時反轉錄聚合酶鏈式反應平台偵測極限，持續改良引子及探針、試劑、反應濃度與溫度等，使其達最佳化。同時將於明年進行立克次體 Multiplex TaqMan 檢驗平台開發，強化立克次體病原體偵測，及早檢驗出病原體，俾利即早監控與疫情防治。

## 五、結論與建議

本年度計劃目前已完成建立茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒、西尼羅病毒與黃熱病毒之即時反轉錄聚合酶鏈式反應 TaqMan probe 平台，也嘗試合併為多重 TaqMan probe 平台，在茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒三合一平台，各病毒的偵測極限分別為茲卡病毒  $10^3 \sim 10^4$  PFU/mL, 屈公病毒  $10^2 \sim 10^3$  PFU/mL, 登革病毒為  $10^2 \sim 10^3$  PFU/mL (表 6)；另在黃熱病毒、西尼羅病毒、屈公病毒三合一平台，黃熱病毒偵測極限  $10^0 \sim 10^1$  PFU/mL, 西尼羅病毒  $10^1 \sim 10^2$  PFU/mL, 屈公病毒為  $10^2 \sim 10^3$  PFU/mL。未來將最佳化多重反轉錄聚合酶鏈式反應平台，使偵測極限更靈敏，使能早期診斷、及時治療與進行防疫措施。



## 六、重要研究成果與具體建議

### 1. 計畫之新發現或新發明

開發出新興病媒病毒(茲卡病毒、屈公病毒、登革病毒與西尼羅病毒) qRT-PCR TaqMan probe 方法。未來可發展為更具專一性及敏感性核酸分子檢測試劑。未來我們也將開發新興立克次體 qRT-PCR TaqMan probe，可及時篩檢出病原體，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，可及早發現早期症狀的發燒患者，減少境外移入的引進及本土擴散。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，各種新興病毒如茲卡病毒、黃熱病毒、拉薩熱病毒、登革病毒、屈公病毒、人畜共通立克次體傳染疾病等在亞、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。

## 七、參考文獻:

1. Barros, S. C. *et al.* Simultaneous detection of West Nile and Japanese encephalitis virus RNA by duplex TaqMan RT-PCR. *Journal of virological methods* **193**, 554-557 (2013).
2. Barzon, L., Pacenti, M., Ulbert, S. & Palù, G. Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert review of anti-infective therapy* **13**, 327-342 (2015).
3. Campbell, G. L., Marfin, A. A., Lanciotti, R. S. & Gubler, D. J. West nile virus. *The Lancet infectious diseases* **2**, 519-529 (2002).
4. Dick, G., Kitchen, S. & Haddow, A. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **46**, 509-520 (1952).
5. Driggers, R. W. *et al.* Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. *New England Journal of Medicine* **374**, 2142-2151 (2016).
6. Dudley, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nature communications* **7** (2016).
7. Eiden, M., Vina-Rodriguez, A., Hoffmann, B., Ziegler, U. & Groschup, M. H. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *Journal of veterinary diagnostic investigation* **22**, 748-753 (2010).
8. Faye, O., Faye, O., Diallo, D., Diallo, M. & Weidmann, M. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. *Virology journal* **10**, 311 (2013).
9. Huang, A. S.-E., Shu, P.-Y. & Yang, C.-H. A new reportable disease is born: Taiwan Centers for Disease Control's response to emerging Zika virus infection. *Journal of the Formosan Medical Association* **115**, 223-225 (2016).
10. Mlakar, J. *et al.* Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* **2016**, 951-958 (2016).
11. Mlakar, J. *et al.* (February, 2016).
12. Naze, F. *et al.* Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and dengue virus typing using high resolution melting. *Journal of virological methods* **162**, 1-7 (2009).
13. Pabbaraju, K. *et al.* Simultaneous detection of Zika, Chikungunya and Dengue viruses by a multiplex real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Virology* **83**, 66-71 (2016).
14. Parida, M. *et al.* Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Journal of clinical microbiology* **45**, 351-357 (2007).

- 15 Santhosh, S. *et al.* Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. *Journal of Clinical Virology* **39**, 188-193 (2007).
- 16 Tang, Y., Hapip, C. A., Liu, B. & Fang, C. T. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *Journal of Clinical Virology* **36**, 177-182 (2006).
- 17 Vasilakis, N. & Weaver, S. C. Flavivirus transmission focusing on Zika. *Current opinion in virology* **22**, 30-35 (2017).
- 18 Waggoner, J. J. *et al.* Single-reaction, multiplex, real-time rt-PCR for the detection, quantitation, and serotyping of dengue viruses. *PLoS neglected tropical diseases* **7**, e21116 (2013).
- 19 Wong, S. J. *et al.* A multiplex microsphere immunoassay for zika virus diagnosis. *EBioMedicine* **16**, 136-140 (2017).
- 20 Zhou, K. *et al.* Molecular and cellular insights into Zika virus-related neuropathies. *Journal of NeuroVirology*, 1-6 (2017).

表 1 各病毒株基因型與血清型

Virus	Reference	Conc. (PFU/ mL)
ZIKV Asian	PRVABC59	$9 \times 10^7$
ZIKV African	IBH 30656	$3 \times 10^7$
CHIKV Asian	9700032	$1 \times 10^8$
CHIKV African	9500004	$1 \times 10^8$
DENV1	8700828	$2.1 \times 10^7$
DENV2	454009	$4.8 \times 10^6$
DENV3	8700829	$1.6 \times 10^6$
DENV4	9000475	$2 \times 10^7$
YFV	17D vaccine strain	$1 \times 10^5$
WNV	VR1510 strain ATCC Lineage II	$2 \times 10^7$

表 2 茲卡、屈公、登革引子及螢光探針

Primer/ probe name	Target site	Sequence(5'-3')	Position
ZIKV Primer Forward	3'-UTR	AAGGGARGACTTTRTGGTGTGGA	10,077-10,097
ZIKV Primer Reverse	3'-UTR	TRCGCACCATGTTGACTGTG	10,149-10,168
ZIKV Probe (FAM)	3'-UTR	ACCKCGCACCACYTGGGCTGA	10,116-10,136
CHIKV Primer Forward	3'-UTR	TACCCGGCGTCACAYACCAC	11,161-11,180
CHIKV Primer Reverse	3'-UTR	CGACAACCAGTCCCACACCT	11,238-11,257
CHIKV Probe (Cy5)	3'-UTR	TCCGCTACGGCGATGTCATGGGTGCA	11,200-11,225
DENV Primer Forward	3'-UTR	GACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC	10,581-10,604
DENV Primer Reverse 1-3	3'-UTR	CATTCCATTTTCTGGCGTTCT	10,680-10,700
DENV Primer Reverse 4	3'-UTR	CAATCCATCTTGC GGCGCTCT	10,610-10,630
DENV Probe (HEX)	3'-UTR	CTGTCTCYDCARCATCAWTCAGGCA	10,653-10,678
YFV Primer Forward	NS5	GAAAGGAAGCTGCACCAACA	8,951-8,970
YFV Primer Reverse	NS5	GCTTCCCTTTGCTTTCCCAA	9,033-9,052
YFV Probe (Cyan500)	NS5	AGGCAGGTGTCGGACTTGTGTGT	8,971-8,993
WNV Primer Forward	3'-UTR	TAAGCCCTCAGAACCGTCTC	10,542-10,561
WNV Primer Reverse	3'-UTR	GCCTTTGTAAACCCAGTCC	10,662-10,680
WNV Probe (Texas Red)	3'-UTR	TGCGGAGAGTGCAGTCTGCG	10,628-10,647

表 3 各種引子與探針專一性測試

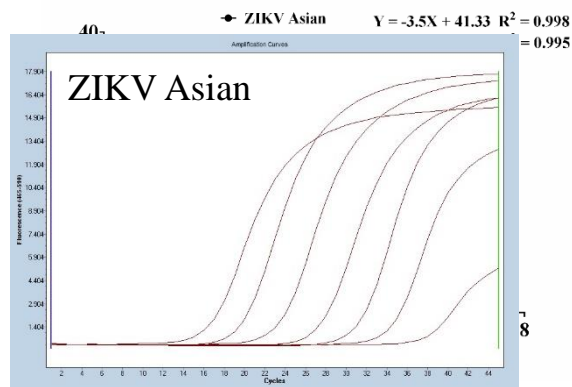
Virus	ZIKV Primer / Probe		CHIKV Primer / Probe		DENV Primer / Probe		WNV Primer / Probe		YFV Primer / Probe	
	Cq	EPF	Cq	EPF	Cq	EPF	Cq	EPF	Cq	EPF
ZIKV Asian	19.42	1.63	-	0.09	-	0.04	-	0.03	-	0.18
ZIKV African	21.85	0.8	-	0	-	0.1	-	0.08	-	0.05
CHIKV Asian	-	0.04	16.26	2.11	-	0.12	-	0.01	-	0.08
CHIKV African	-	0.11	17.98	2.03	-	0.08	-	0.03	-	0.12
DENV1	-	0.06	-	0.08	25.38	0.25	-	0.05	-	0.03
DENV2	-	0.05	-	0.05	16.02	0.55	-	0.02	-	0.01
DENV3	-	0.13	-	0.07	21.35	0.52	-	0.05	-	0.11
DENV4	-	0	-	0.04	20.56	0.21	-	0.05	-	0.02
JEV	-	0.06	-	0.07	-	0.05	-	0.04	-	0.17
YFV	-	0.03	-	0.05	-	0.06	-	0.04	16.12	2.11
WNV	-	0.05	-	0.09	-	0	14.37	2.78	-	0.15
No Template control	-	0.05	-	0.06	-	0.05	-	0.07	-	0.14

\* JE, 日本腦炎病毒; EPF (Endpoint fluorescence); 各病毒株濃度約為  $1 \times 10^6$  PFU/mL。

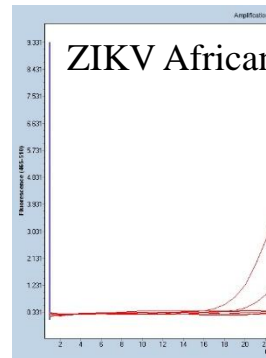
(A)

Viral load (PFU/mL)	Cq value	
	ZIKV Asian	ZIKV African
1.0E+07	16.50	17.66
1.0E+06	19.61	20.59
1.0E+05	23.35	24.26
1.0E+04	27.17	28.03
1.0E+03	31.03	31.35
1.0E+02	34.46	34.02
1.0E+01	37.33	36.60

(B)



(C)



(D)

RNA	Viral load (PFU/mL)	Cq
ZIKV RNA	1.0E+06	22.04
ZIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+06	23.45
ZIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+06	23.45
ZIKV RNA	1.0E+05	25.8
ZIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+05	27.45
ZIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+05	27.32
ZIKV RNA	1.0E+04	29.47
ZIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+04	30.74
ZIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+04	30.32

(E)

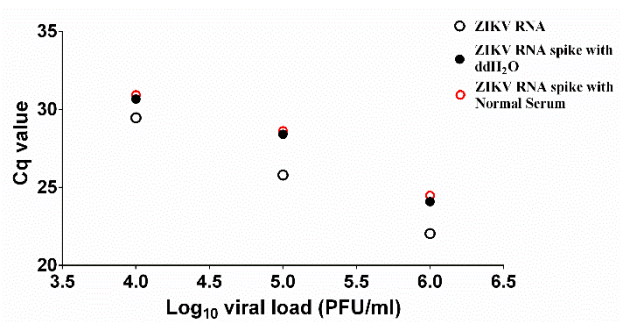
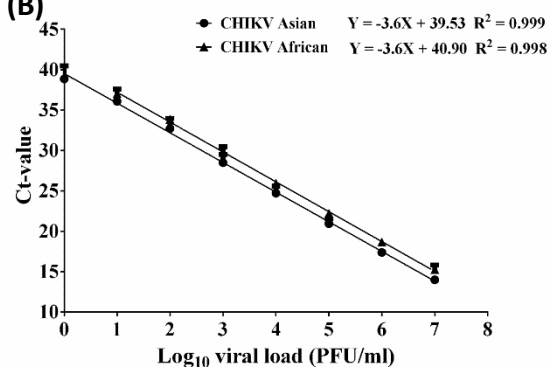


圖 1 ZIKV Primer Forward、ZIKV Primer Reverse 與 ZIKV Probe (FAM) 進行 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 茲卡病毒亞洲型與非洲型 qRT-PCR Cq 值。(B) 茲卡病毒亞洲型與非洲型 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(C) 茲卡病毒亞洲型與非洲型 qRT-PCR 增幅曲線。(D) (E) 茲卡病毒、茲卡病毒混合水及茲卡病毒混合人類血清進行 qRT-PCR Cq 值差異。

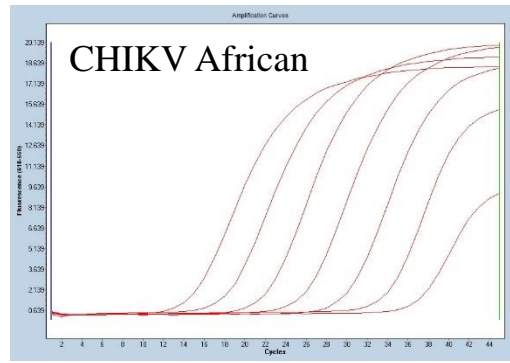
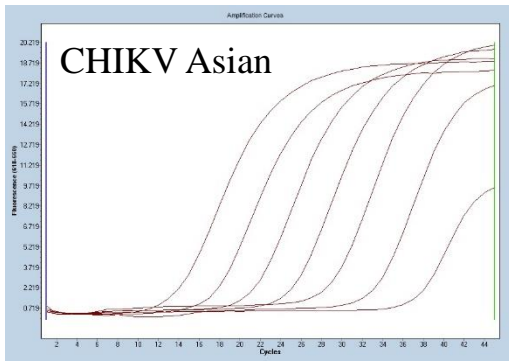
(A)

Viral load (PFU/mL)	Cq value	
	CHIKV Asian	CHIKV African
1.00E+07	13.99	15.26
1.00E+06	17.39	18.66
1.00E+05	20.94	22.22
1.00E+04	24.72	25.93
1.00E+03	28.51	29.83
1.00E+02	32.73	33.84
1.00E+01	36.09	37.04
1.00E+00	38.86	-

(B)



(C)



(D)

RNA	Viral load (PFU/mL)	Cq
CHIKV RNA	1.0E+05	20.23
CHIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+05	20.89
CHIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+05	20.54
CHIKV RNA	1.0E+04	23.73
CHIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+04	25.4
CHIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+04	24.39
CHIKV RNA	1.0E+03	27.34
CHIKV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+03	28.76
CHIKV RNA spike with Normal serum	1.0E+03	28.43

(E)

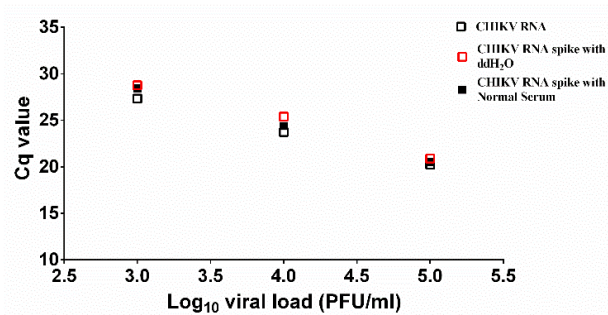
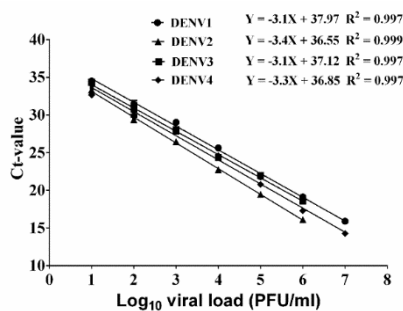


圖 2 CHIKV Primer Forward、CHIKV Primer Reverse 與 CHIKV Probe (Cy5) 進行 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 屈公病毒亞洲型與非洲型 qRT-PCR Cq 值。(B) 屈公病毒亞洲型與非洲型 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(C) 屈公病毒亞洲型與非洲型 qRT-PCR 增幅曲線。(D) (E) 屈公病毒、屈公病毒混合水及屈公病毒混合人類血清進行 qRT-PCR Cq 值差異。

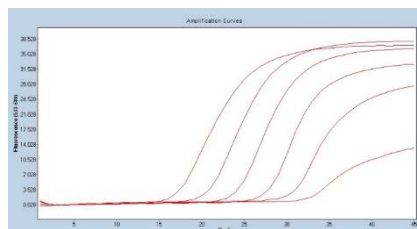
(A)

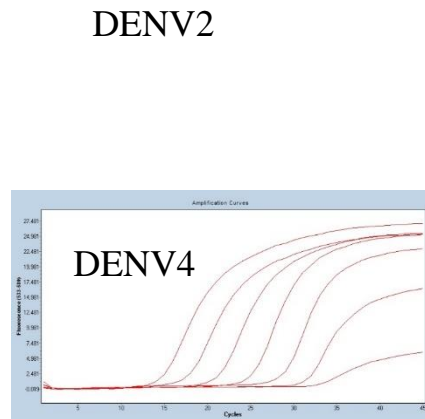
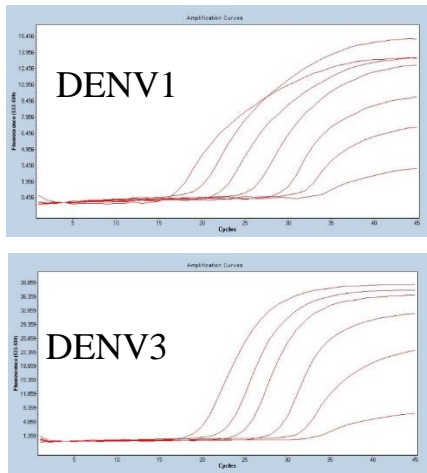
Viral load (PFU/mL)	Cq value			
	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
1.0E+07	15.90	ND	ND	14.28
1.0E+06	19.13	16.12	18.57	17.30
1.0E+05	21.84	19.47	21.97	20.79
1.0E+04	25.63	22.74	24.35	24.61
1.0E+03	29.02	26.46	27.91	27.88
1.0E+02	31.40	29.39	30.77	30.49
1.0E+01	34.50	33.34	34.32	32.74

(B)



(C)





(D)

RNA	Viral load (PFU/mL)	Cq
DENV RNA	1.0E+06	19.28
DENV RNA spike with ddH2O	1.0E+06	20.58
DENV RNA spike with Normal serum	1.0E+06	20.16
DENV RNA	1.0E+05	22.81
DENV RNA spike with ddH2O	1.0E+05	23.98
DENV RNA spike with Normal serum	1.0E+05	23.7
DENV RNA	1.0E+04	26.3
DENV RNA spike with ddH2O	1.0E+04	27.57
DENV RNA spike with Normal serum	1.0E+04	27.3
DENV RNA	1.0E+03	30.46
DENV RNA spike with ddH2O	1.0E+03	30.79
DENV RNA spike with Normal serum	1.0E+03	31.33

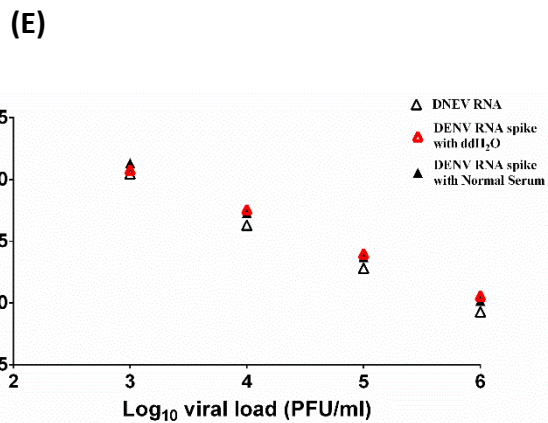
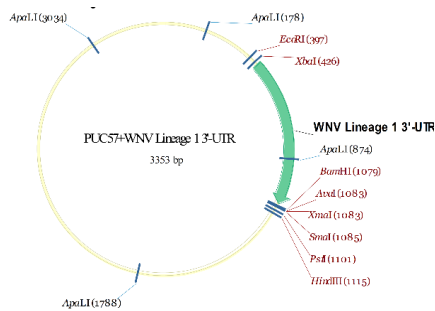


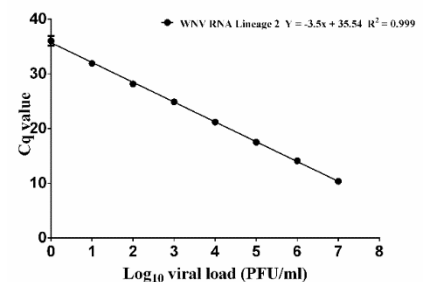
圖 3 DENV Primer Forward、DENV Primer Reverse 1-3、DENV Primer Reverse 4 與 DENV Probe (HEX)進行 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 登革病毒 1、2、3 及 4 型血清型 RNA qRT-PCR Cq 值。(B) 茲 1、2、3 及 4 型血清型 RNA。(C) 登革病毒 qRT-PCR 增幅曲線。(D) (E) 登革病毒、登革病毒混合水及登革病毒混合人類血清進行 qRT-PCR Cq 值差異。

(A)



(B)

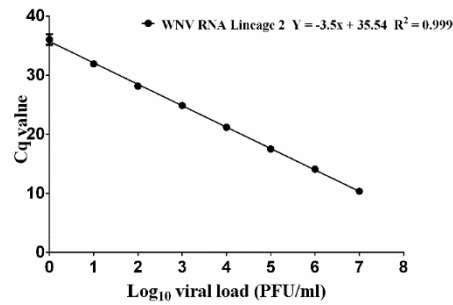
DNA Copies (Coipes/Well)	Cq value
5.53E+09	9.54
5.53E+08	12.35
5.53E+07	15.80
5.53E+06	18.98
5.53E+05	22.22
5.53E+04	25.86
5.53E+03	29.51
5.53E+02	33.10
5.53E+01	37.17



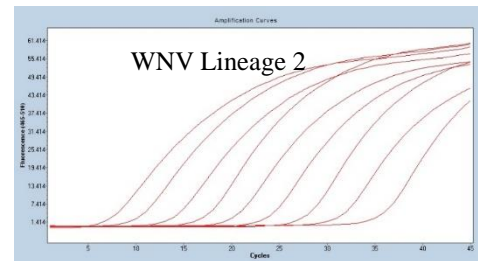
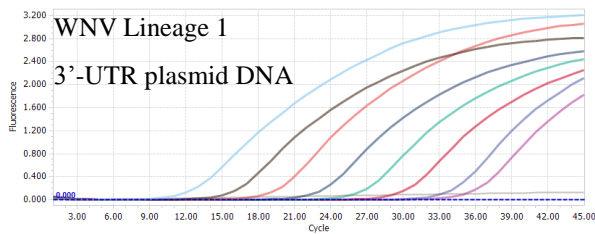


(C)

Viral load (PFU/mL)	Cq value
	WNV Lineage 2
1.00E+07	10.36
1.00E+06	14.10
1.00E+05	17.51
1.00E+04	21.18
1.00E+03	24.87
1.00E+02	28.14
1.00E+01	31.89
1.00E+00	36.02



(D)



(E)

RNA	Viral load (PFU/mL)	Cq
WNV RNA	1.0E+06	14.36
WNV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+06	15.52
WNV RNA spike with Normal serum	1.0E+06	15.81
WNV RNA	1.0E+06	17.68
WNV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+06	19.15
WNV RNA spike with Normal serum	1.0E+06	19
WNV RNA	1.0E+06	21.48
WNV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+06	23.87
WNV RNA spike with Normal serum	1.0E+06	23.35

(F)

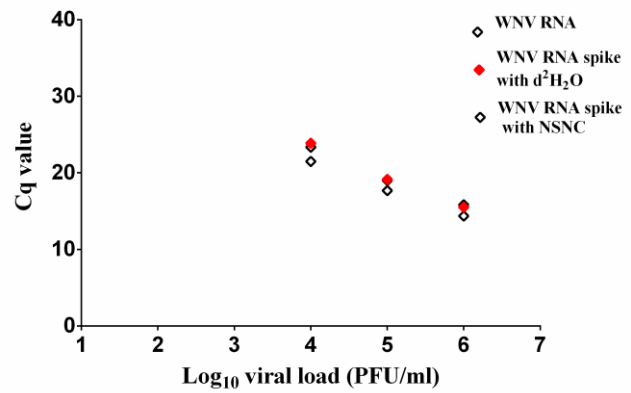
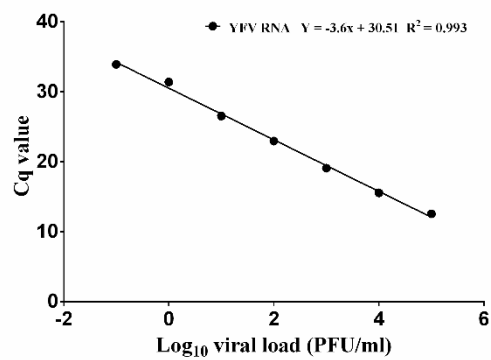


圖 4. WNV Primer Forward、WNV Primer Reverse 與 WNVV Probe (FAM) 進行 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 西尼羅病毒 Lineage 1 3'-UTR 質體 DNA Cloning map。(B) 西尼羅病毒 Lineage 1 3'-UTR 質體 DNA qRT-PCR Cq 值、偵測極限及偵測線性範圍。(C) 西尼羅病毒 Lineage 2 病毒 RNA qRT-PCR Cq 值、偵測極限及偵測線性範圍。(D) 西尼羅病毒 Lineage 1 3'-UTR 質體 DNA 與 Lineage 2 病毒 RNA qRT-PCR 增幅曲線。(E) (F) 西尼羅病毒、西尼羅病毒混合水及西尼羅病毒混合人類血清進行 qRT-PCR Cq 值差異。

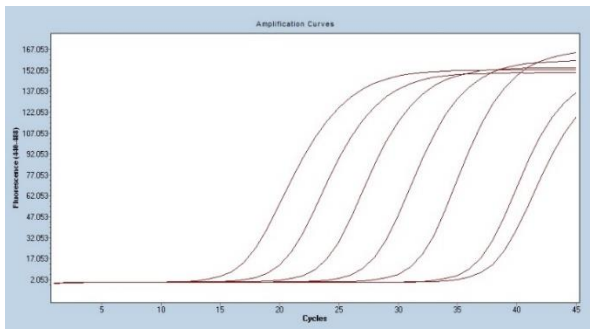
(A)

Viral load (PFU/mL )	Cq value YFV
1.00E+05	12.55
1.00E+04	15.56
1.00E+03	19.07
1.00E+02	22.95
1.00E+01	26.53
1.00E+00	31.39
1.00E-01	33.92

(B)



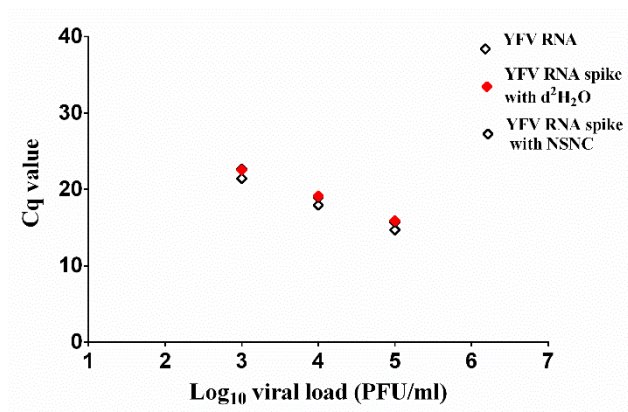
(C)



(D)

RNA	Viral load (PFU/mL)	Cq
YFV RNA	1.0E+05	14.71
YFV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+05	15.70
YFV RNA spike with Normal serum	1.0E+05	15.88
YFV RNA	1.0E+04	17.95
YFV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+04	18.98
YFV RNA spike with Normal serum	1.0E+04	19.13
YFV RNA	1.0E+03	21.41
YFV RNA spike with ddH <sub>2</sub> O	1.0E+03	22.67
YFV RNA spike with Normal serum	1.0E+03	22.54

(E)



5 YFV Primer Forward、YFV Primer Reverse 與 YFV Probe (HEX) 進行 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A)黃熱病毒 RNA qRT-PCR Cq 值。(B) 黃熱病毒 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(C) 黃熱病毒 RNA qRT-PCR 增幅曲線。(D) (E) 黃熱病毒、黃熱病毒混合水及黃熱病毒混合人類血清進行 qRT-PCR Cq 值差異。

表 4 各病毒於三合一(茲卡屈公登革病毒)引子螢光探針 qRT-PCR 結果

Viral load (PFU/mL)	ZIKV Asian		ZIKV African		CHIKV Asian		CHIKV African		DENV1		DENV2		DENV3		DENV4	
	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD
1.00E+07	14.59	0.078	16.19	0.594	10.73	0.290	10.49	0.148	17.07	0.007	-	-	-	-	13.93	0.467
1.00E+06	17.87	0.148	19.47	0.283	14.22	0.035	13.91	0.092	19.93	0.035	15.37	0.396	19.18	0.049	16.97	0.467
1.00E+05	21.38	0.269	22.69	0.177	17.58	0.014	17.35	0.679	23.36	0.629	18.64	0.580	22.29	0.092	20.28	0.028
1.00E+04	24.99	0.262	26.05	0.544	20.77	0.092	19.89	0.106	26.37	0.247	21.56	0.382	25.71	0.856	23.60	0.163
1.00E+03	28.65	0.269	29.68	0.884	24.73	0.375	23.61	0.000	31.06	0.361	25.39	0.021	29.46	0.269	26.33	0.042
1.00E+02	-	-	-	-	29.14	0.566	27.39	0.078	-	-	29.87	0.870	33.14	0.693	31.05	0.226
1.00E+01	-	-	-	-	32.45	0.099	32.62	0.014	-	-	-	-	-	-	-	-

\* DENV2、DENV3 病毒株濃度最高為 1x10<sup>6</sup> PFU/mL。

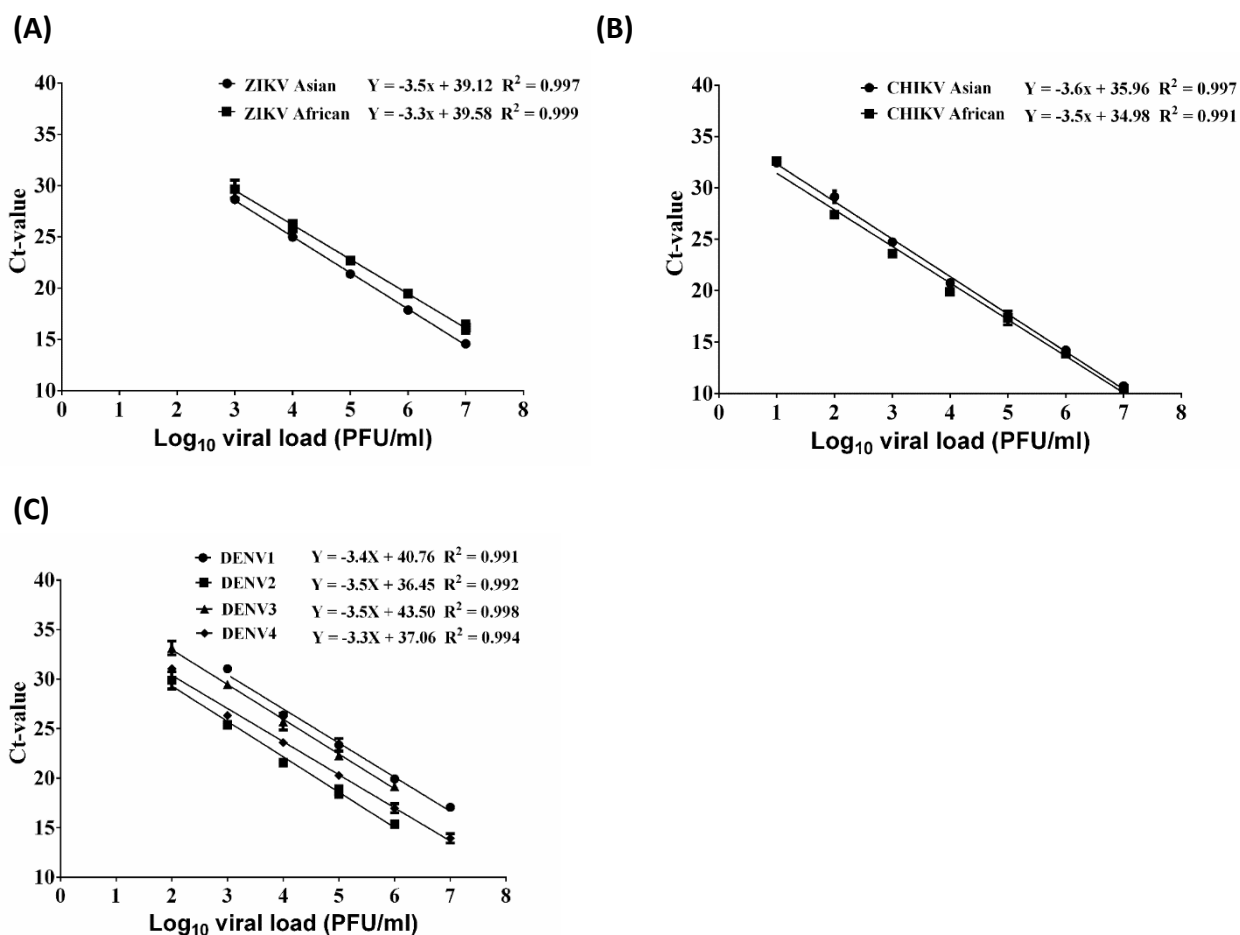


圖 6 三合一(ZIKV, CHIKV, DNEV) 引子與螢光探針做 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 茲卡病毒亞洲型與非洲型 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(B) 屈公病毒亞洲型與非洲型 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(C) 登革病毒 1、2、3 及 4 型血清型 RNA 偵測極限及偵測線性範圍。

表 5 病毒於三合一(黃熱西尼羅屈公病毒)引子螢光探針 qRT-PCR 結果

Viral load (PFU/mL)	YFV		WNV Lineage2		CHIKV Asian		CHIKV African	
	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD	Cq	SD
1.00E+07			12.10	0.057	13.73	0.000	14.58	0.085
1.00E+06			15.65	0.035	17.45	0.028	17.96	0.042
1.00E+05	16.03	0.021	19.13	0.071	21.42	0.057	21.76	0.106
1.00E+04	19.40	0.071	22.83	0.092	24.89	0.028	25.75	0.290
1.00E+03	22.95	0.071	26.30	0.085	28.46	0.212	29.03	0.035
1.00E+02	26.82	0.007	29.03	0.028	30.86	0.007	31.33	0.049
1.00E+01	30.00	0.028	31.98	0.233	-	-	-	-
1.00E+00	32.88	0.269	-	-	-	-	-	-

\* YFV 病毒株濃度最高為  $1 \times 10^5$  PFU/mL。

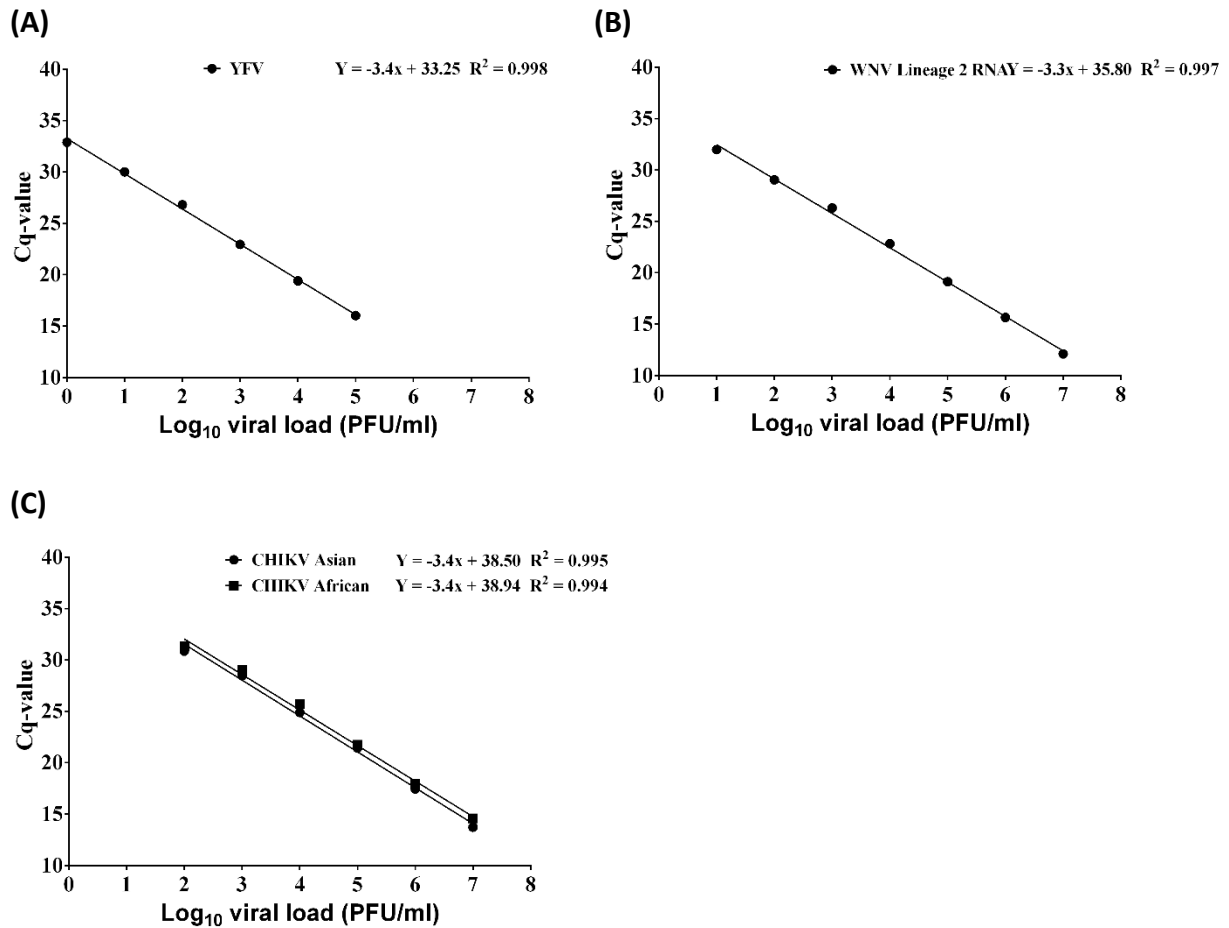


圖 7 三合一(YFV, WNV, CHIKV) 引子與螢光探針做 qRT-PCR 迴歸分析結果。(A) 黃熱病毒 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(B) 西尼羅病毒 Lineage 2 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。(C) 屈公病毒亞洲型與非洲型 RNA 的偵測極限及偵測線性範圍。

表 6 qRT-PCR 偵測線性範圍、偵測極限、標準曲線斜率、PCR 效率及引子螢光探針濃度結果。(A) 單一引子與螢光探針。(B) 三合一茲卡屈公登革熱引子與螢光探針。(C) 三合一黃熱西尼羅屈公引子與螢光探針。

	ZIKV primer/probe			CHIKV primer/probe			DENV primer/probe			WN
	ZIKV Asian RNA	ZIKV African RNA	ZIKV Asian RNA	CHIKV Asian RNA	CHIKV African RNA	DENV1 RNA	DENV2 RNA	DENV3 RNA	DENV4 RNA	Lineage 1 3' plasmid
Linear range (PFU/mL or Copies/well)	$10^7-10^1$	$10^7-10^1$	$10^7-10^0$	$10^7-10^1$	$10^7-10^1$	$10^7-10^1$	$10^6-10^1$	$10^6-10^1$	$10^7-10^1$	$5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^3$
Limit of detection ; LOD (PFU/mL)	$10^1$ (Cq=37.33)	$10^1$ (Cq=36.60)	$10^0$ (Cq=38.86)	$10^1$ (Cq=37.04)	$10^1$ (Cq=34.50)	$10^1$ (Cq=33.34)	$10^1$ (Cq=34.32)	$10^1$ (Cq=32.74)		$5 \times 10^1$ (Cq=3)
Linearity ( $R^2$ )	0.998	0.995	0.999	0.998	0.997	0.999	0.997	0.997	0.997	0.9983
Slope	-3.5	-3.2	-3.6	-3.6	-3.1	-3.4	-3.1	-3.1	-3.3	-3.4
PCR efficiency (%)	93.07	105.35	89.57	89.57	110.17	96.84	110.17	100.92	100.92	96.84
Primer / Probe final conc. ( $\mu$ M / reaction)	0.2/0.1	0.2/0.1	0.25/0.2	0.25/0.2	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	0.5/0.5	0.25/0.2

	Triplex (ZIKV, CHIKV, DENV)							
	ZIKV Asian RNA	ZIKV African RNA	CHIKV Asian RNA	CHIKV African RNA	DENV1 RNA	DENV2 RNA	DENV3 RNA	DENV4 RNA
Linear range (PFU/mL)	$10^7-10^3$	$10^7-10^3$	$10^7-10^1$	$10^7-10^1$	$10^7-10^3$	$10^6-10^2$	$10^6-10^2$	$10^7-10^2$
Limit of detection ; LOD (PFU/mL)	$10^3$ (Cq=28.65)	$10^3$ (Cq=29.68)	$10^1$ (Cq=32.45)	$10^1$ (Cq=32.62)	$10^3$ (Cq=31.06)	$10^2$ (Cq=29.87)	$10^2$ (Cq=33.14)	$10^3$ (Cq=31.05)
Linearity ( $R^2$ )	0.997	0.999	0.997	0.991	0.991	0.992	0.998	0.994
Slope	-3.3	-3.5	-3.6	-3.5	-3.4	-3.5	-3.5	-3.3
PCR efficiency (%)	100.92	93.07	89.57	93.07	96.84	93.07	93.07	100.92
Primer / Probe final conc. ( $\mu$ M / reaction)	ZIKV primer / probe : 0.5/0.2 ; CHIKV primer / probe : 0.25/0.2 ; DENV primer / probe : 0.75/0.5							

(C)

	Triplex (YFV, WNV, CHIKV)		
	YFV RNA	WNV Lineage2 RNA	CHIKV Asian RNA
Linear range ( PFU/mL )	$10^5 \sim 10^0$	$10^7 \sim 10^1$	$10^7 \sim 10^2$
Limit of detection ; LOD ( PFU/mL )	$10^0$ (Cq=32.88)	$10^1$ (Cq=31.05)	$10^2$ (Cq=30.86)
Linearity (R <sup>2</sup> )	0.998	0.997	0.995
Slope	-3.4	-3.3	-3.4
PCR efficiency ( % )	96.84	100.92	96.84
Primer / Probe	YFV primer / probe : 0.2/0.1 ; WNV primer / probe : 0.2/0.1 ; CHIKV primer / probe :		
final conc. (μM / reaction)	YFV primer / probe : 0.2/0.1 ; WNV primer / probe : 0.2/0.1 ; CHIKV primer / probe :		