

應用 WGS-PCR 方法輔助痢疾桿菌鑑定之探討

魏孝倫*、廖盈淑、鄧如琇、陳柏翰、邱乾順

摘要

志賀氏桿菌會引起桿菌性痢疾，目前列為我國之第二類法定傳染病，此病原近五年每年平均造成 104 例的本土個案。由於志賀氏桿菌鑑定標準方法係以傳統生化試驗配合血清學分型，但此法仍無法明確鑑定部份的志賀氏桿菌，造成臨床醫學實驗室通報的困擾。為提升志賀桿菌的鑑別度，本研究以臨床分離株測試以基因體為基礎的 PCR 分型法(WGS-PCR)，此法主要測定志賀氏桿菌基因體的各個演化枝，並搭配志賀氏菌及腸侵襲性大腸桿菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)專一性基因 *IpaH* 的測定，來鑑定出志賀氏菌的血清群。我們以 30 株痢疾桿菌確認菌株進行驗證，發現 WGS-PCR 在血清群 B、C、D 的結果與血清凝集法有 100% 的一致性，但在血清群 A 的結果與血清凝集法僅有 20% 一致。另外以 WGS-PCR 測試 29 株疑似痢疾桿菌菌株，各有 2 株菌株被鑑定為血清群 B 及 D，亦顯示 WGS-PCR 可用於鑑定血清群 B 及 D 菌株，可明確釐清疑似菌株。WGS-PCR 只需進行低成本的 PCR 檢驗，我們建議可作為血清凝集法的輔助試驗，以提升志賀氏菌的鑑別度。

關鍵字：志賀氏桿菌、WGS、PCR

前言

志賀氏桿菌(*Shigella* spp.)為桿菌性痢疾的致病原，會造成人類腹瀉、血便、粘液便、發燒、腹痛及裏急後重等症狀[1]，目前全球每年約有 1.6 億人感染且主要發生在開發中國家[2]，我國目前列為第二類法定傳染病。疾病管制署(以下簡稱疾管署)「傳染病統計資料查詢系統」[3] 顯示，我國 2015 至 2019 年本土桿菌性痢疾每年平均有 104 例個案。

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：魏孝倫*

E-mail : slwei@cdc.gov.tw

投稿日期：2020 年 09 月 16 日

接受日期：2021 年 01 月 13 日

DOI : 10.6524/EB.202301_39(2).0001

Shigella spp.已被多數人認為與大腸桿菌(*E. coli*)是同種菌[4]。傳統的 *Shigella* spp.鑑定標準方法係以生化試驗配合血清學分型綜合判定。*Shigella* spp.常以缺乏運動性及不發酵乳糖與 *E. coli* 區別，然而這些生化試驗經常無法將 *Shigella* spp.與侵襲性大腸桿菌(enteroinvasive *E. coli*, EIEC)區分[5]。而 *Shigella* spp.依其 O 抗原分為 A、B、C、D 血清群，分別代表 *Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei* 四種菌；然而，其 O 抗原與 *E. coli* 的 O 抗原常有交叉反應[6]，這增加 *Shigella* spp.血清群判讀的困難。細菌鑑定標準方法 16S 基因定序及常用的質譜儀也無法鑑定出 *Shigella* spp.[7]。由於驗出 *Shigella* spp.必須依第二類法定傳染病於 24 小時內通報，不能明確鑑定常造成臨床醫學實驗室的困擾，而正確的 *Shigella* spp.血清型不僅可以協助第一線疫調人員初步推測可能的聚集，也有助於提升脈衝式電泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE)資料庫正確性，以利後續進行流行病學監測及個案的追蹤溯源。近年來研究人員應用全基因體定序(Whole genome sequencing, WGS)技術於區分 *Shigella* spp.及 *E. coli*，發現可提高鑑別效果[8]，Sahl 等人則利用發展以 WGS 為基礎的 PCR 鑑定法(WGS-PCR)用於區分 *Shigella* spp.的四種血清群[9]，他分析 336 株 *Shigella* spp.及 *E. coli* 之全基因體資料，發現 *Shigella* spp.主要分佈在 S1、S2、S3、S4、S5 等 5 個演化枝，S1 含有 A、B、C 三種血清群，S2 含有 D 血清群，S3 含有 A、C 血清群，S4 含有 A 血清群，S5 含有 B 血清群，偵測 5 個演化枝的專一性序列進而確認出各個演化枝內的菌株。*IpaH* 則為 *Shigella* spp.及 EIEC 特有的侵襲性基因[10]。故合併以 PCR 鑑定演化枝及毒力基因於鑑定 *Shigella* spp.敏感度可達 98.6%，且可 100%排除 *E. coli* 測試株[9]。

本研究試著利用 WGS-PCR 測試 30 株 *Shigella* spp.確認菌株及 29 *Shigella* spp.疑似菌株，來評估 WGS-PCR 的鑑定效果。

材料與方法

一、菌株之收集：

- (一) 菌株：收集 *Shigella* spp.臨床分離株 54 株，來源為疾管署腹瀉及病毒實驗室及各認可實驗室依傳染病送驗規定[11]送至中區參考實驗室之確認或疑似菌株。另有 5 株購自生物資源保存及研究中心作為陽性對照之 *Shigella* spp.標準菌株，分別為 *Shigella dysenteriae* BCRC13983、*Shigella flexneria* BCRC13984、*Shigella boydii* BCRC13959、2 株 *Shigella sonnei* 分別為 BCRC10773 及 BCRC15965。此外，有 3 株購自生物資源保存及研究中心作為陰性對照之 *E. coli* 標準菌株分別為 BCRC15372、BCRC15373、BCRC15374。
- (二) *Shigella* spp.確認菌株定義：包括 5 株標準株及 25 株臨床株，經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. [12]，且以 *Shigella* spp.血清群或血清型凝集僅出現單一凝集反應。

(三) *Shigella* spp.疑似菌株定義：共有 29 株，經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. [12]，*Shigella* spp.抗血清凝集結果包含多重凝集、凝集不明確或無凝集菌株，以及血清群 A 及 B 無法鑑定至血清型別之菌株。

二、*Shigella* spp.純化及鑑定：

疑似菌株培養於Salmonella-Shigella選擇性培養基(Oxoid, Hampshire, UK)，在37°C培養18至24小時後，挑選無色菌落接種於TSA培養基(Oxoid, Hampshire, UK) (Oxoid, Hampshire, UK)，在37°C培養18至24小時，挑選單一菌落依標準操作流程進行質譜儀鑑定[12]鑑定為*E. coli* / *Shigella* spp.之後再依標準流程執行血清凝集測試[13]。

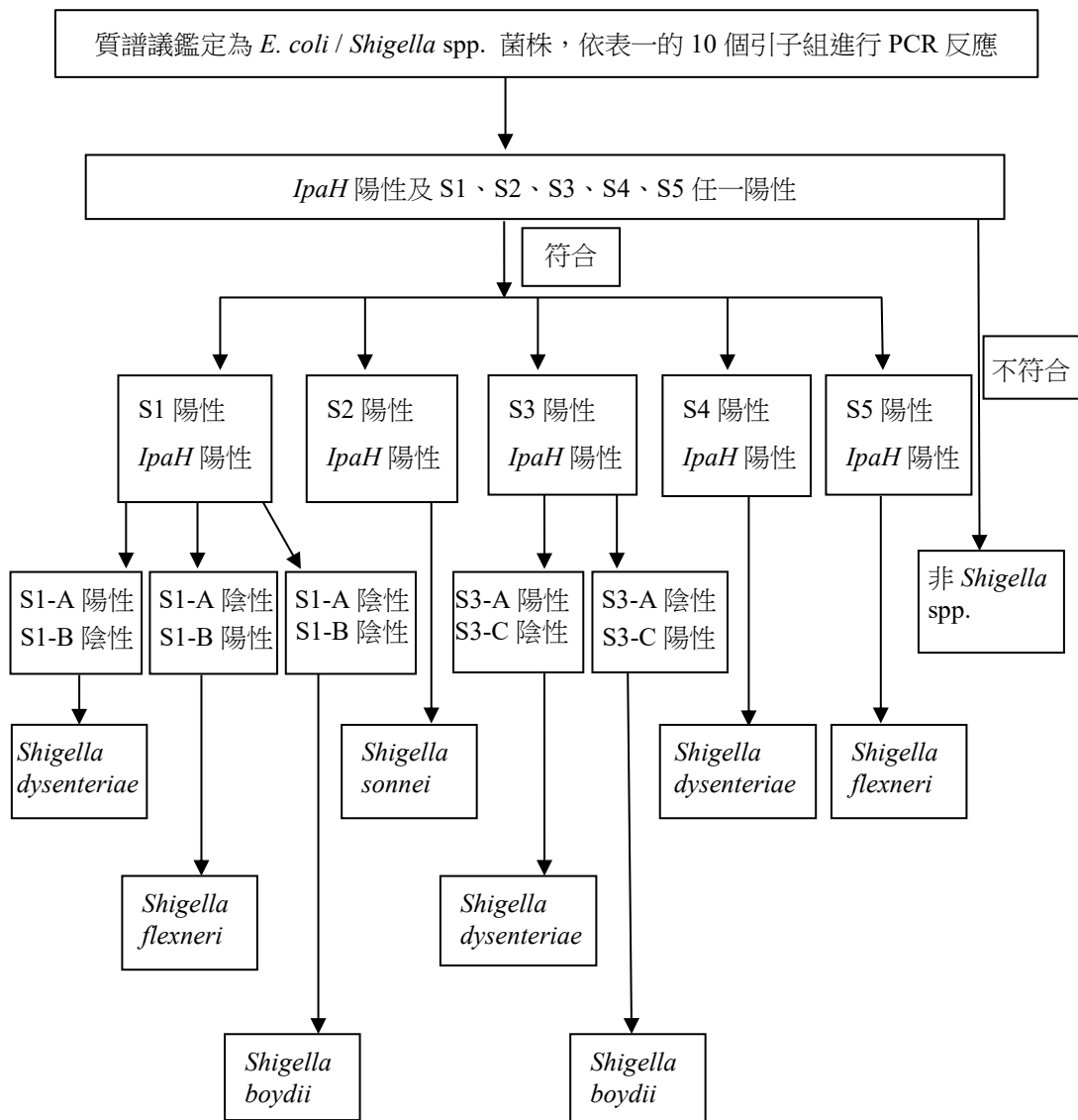
三、基因體為基礎之 PCR 分型(WGS-PCR)：

自 TSA 培養基挑取菌落置於 1 ml 無菌水中，以 100°C 加熱 15 分作為 DNA 模版。依 Sahl 的方法修改反應濃度如後述，配製 10 對引子組（表一）[9]，每個引子的操作濃度均為 10uM。每個引子組進行獨立反應，總體積均為 10 uL，內含 1uL 的 DNA 模版，5 uL 的 GoTaq® Green Master Mix(Promega, USA) 及 1 uL 的 10 uM 引子組。依表一之反應產物片段大小判讀對應的血清群，流程圖如圖一。

表一、WGS-PCR 使用之引子序列、標的基因、增幅片段、對應之演化枝及所包含之血清群。[8]

引子組	引子名稱	引子序列 5'→3'	標的基因	增幅片段大小	演化枝	演化枝包含血清群
1	S1-F	CTTCAACGCACGAATATCAAC	type 3 restriction enzyme	1008	S1	A, B, C
	S1-R	CGGAAATTGTGAATCTGGTCTT				
2	S2-F	GCCCTTTAGCGGATCGTAGT	rhs core protein	561	S2	D
	S2-R	CAGCTGCATATAACAGAGCAA				
3	S3-F	GATAATGGCGACGAAAGGAA	conserved hypothetical protein	334	S3	A, C
	S3-R	GTAGCGAAACTGGTAGCGATG				
4	S4-F	CAGCGTGTTCAGGGATCAGTCG	shiga-toxin 1 subunit A	451	S4	A
	S4-R	CGGACTCTCCATCTGCCGGACAC				
5	S5-F	CAATAACGAGCTACCGATTACCTT	putative periplasmic protein	808	S5	B
	S5-R	CTTCAGCGGTGTTAAAGGTACAG				
6	<i>IpaH</i> -F	TGAGTTACCTGAATCACTGGAAG	<i>IpaH</i> invasion antigen	180	S1, S2, S3, S4, S5	A, B, C, D
	<i>IpaH</i> -R	TCGAGGATGATAGTGCAGGTC				
7	S1B-F	AGGTTCTGGTTTGGGTAATGTC	flexneria 6 O-antigen	511	S1-B*	B
	S1B-R	TCCTAIACTTTGGGCTTCTGCT				
8	S1A-F	ATATGTCGCCATTCGATTTACC	putative prophage protein	617	S1-A*	A
	S1A-R	CTCAATGTCTAAGCCAACAGGA				
9	S3C-F	CAGCAATTCGGAAAGGATTAC	adhesin	87	S3-C*	C
	S3C-R	GTTCAACCCACCAACTCTTCAC				
10	S3A-F	CATTCAGGTAGCACCATATCCA	cox	479	S3-A*	A
	S3A-R	GTTTCTCACCCGATAAACCAGA				

*「-」後字體表示該演化枝內的血清型。



圖一、WGS-PCR 鑑定分型判定流程。[8]
S1、S2、S3、S4、S5 為演化枝，S1-A、S1-B、S3-A、S3-C 表「演化枝-演化枝內的血清型」，IpaH 表 IpaH 基因。

結果

一、Shigella spp. 確認臨床株及標準株之評估

共有確認臨床株 25 株及志賀氏菌標準株 5 株用於評估（表二），B、C 及 D 血清群菌株均分別被 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella flexneri*、*Shigella boydii*、*Shigella sonnei*，兩項試驗 100% 一致。A 血清群有 10 株菌，僅有 1 標準株及 1 臨床株經 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella dysenteriae*，兩項試驗僅有 20% (2/10) 一致，其它 8 株均鑑定不出為 *Shigella* spp.，8 株中有 4 株為 IpaH(-)，推測可能不是 *Shigella* spp.。另外陰性對照的 *E. coli* 標準菌株與 *Shigella* spp. 血清抗體雖都有程度不一的凝集反應，但 WGS-PCR 結果均為陰性（未顯示資料）。

二、*Shigella* spp. 疑似臨床株之評估

在 29 株疑似菌株中（表三），各有 2 株以 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella flexneri* 及 *Shigella sonnei*。其它的 25 株菌，包含 A 血清群、A 血清群弱凝集、D 血清群弱凝集、多重凝集或無凝集等，其 WGS-PCR 均為陰性，而其 *IpaH* 基因有 22 株為陰性，推測這群菌不是 *Shigella* spp.。

三、血清凝集試驗在不同檢驗機構的差異

比較認可機構送驗時提供其鑑定的血清群與本實驗室確認之血清群資料，發現在 25 株 *Shigella* spp. 確認菌中有 1 株(4%)與確認結果不一致（表二）；在 29 株疑似菌株有 25 株(86.2%)與確認的結果不一致（表三），顯示多重凝集或凝集不明確菌株，在機構間的檢驗結果差異大。

表二、已知 *Shigella* spp. 菌株 WGS-PCR、*IpaH* 鑑定結果。

送驗血清群別	鑑定血清群別	數量	血清型別	WGS-PCR**	<i>IpaH</i> 陽性數
A*	A	1	type 1	<i>S. dysenteriae</i>	1
A	A	1	type 2	<i>S. dysenteriae</i>	1
A	A	4	type 3	-	3
A	A	3	type 7	-	1
A	A	1	type 8	-	0
B*	B	1	2a	<i>S. flexneri</i>	1
B	B	1	1a	<i>S. flexneri</i>	1
B	B	2	2a	<i>S. flexneri</i>	2
B	B	2	3a	<i>S. flexneri</i>	2
B	B	4	4a	<i>S. flexneri</i>	4
B	B	3	6	<i>S. flexneri</i>	3
B	B	1	yV	<i>S. flexneri</i>	1
C*	C	1	ND	<i>S. boydii</i>	1
A-、B-、C-、D-	C	1	ND	<i>S. boydii</i>	1
D*	D	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2
D	D	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2

*標準菌株。

**-,陰性非 *Shigella* spp.。

表三、疑似 *Shigella* spp. 菌株之 WGS-PCR、*IpaH* 鑑定結果。

送驗血清群別*	鑑定血清群別*	數量	血清型別*	WGS-PCR**	<i>IpaH</i> 陽性數
A-、B-、C-、D-	A+	1	-	-	0
A	A±	1	-	-	0
B	B	2	-	<i>S. flexneri</i>	2
B	B+、C+	3	-	-	0
B	A+、B+、C+	1	-	-	0
B	A+、B+、C+、D+	1	-	-	0
B	B+、D+	1	-	-	0
C	A±、B±、C±、D±	1	-	-	0
D	D±	2	NA	-	1
D	D+、A±、C±	2	NA	<i>S. sonnei</i>	2
A-、B-、C-、D-	A-、B-、C-、D-	9	-	-	1
A(1)、B(1)、D(3)***	A-、B-、C-、D-	5	-	-	1

*±, 20-40 秒內出現凝集；-, 1 分鐘內未出現凝集。

** -, 陰性非 *Shigella* spp.。

*** ()內表示數量。

討論

Shigella spp. 與 *E. coli* 因基因有 80% 以上相同，已被多數微生物學家認為是同種[4]，因此在鑑定上常有混淆，但因 *Shigella* spp. 會引起嚴重疾病及低劑量即可造成感染的特性，在我國被列為法定傳染病，且因血清型別有助於初步疫情調查之判斷，我們希望找出較為明確的方法提高 *Shigella* spp. 的鑑別度，進一步增加 *Shigella* spp. 的 PFGE 資料庫的正確性。例如 2007 年臺中市某國小發生 *Shigella sonnei* 大型群聚事件，我們利用 *Shigella sonnei* 的 PFGE 資料庫比對病人及環境分離株之型別，成功協助釐清並阻斷污染源[14]。

本研究發現 WGS-PCR 與血清型鑑定在 *Shigella* spp. 確認菌株的 B、C、D 血清群有 100% 的一致性，但 A 血清群只有 20% 一致，這有兩種可能，一為 WGS-PCR 的資料庫代表性不足，未納入足夠的 A 血清群，以致引子的設計無法測出 *Shigella* spp.；另一個可能是，這些 A 群的不一致菌並非 *Shigella* spp.，只是 *E. coli* 的 O 抗原與 *Shigella* spp. 的血清會有交叉反應，因本實驗的 *Shigella* spp. 確認菌株是經質譜儀鑑定為 *E. coli* / *Shigella* spp. 後，再以 *Shigella* spp. 血清鑑定為標準，並未同時測試 *E. coli* 血清抗原，因此無法排除為 *E. coli* 的可能性。與其它機構結果不一致的菌株中有 2 株 7 型及 1 株 3 型均缺少 *IpaH* 基因，推測可能不是 *Shigella* spp.，因為 *IpaH* 基因是 *Shigella* spp. 及 EIEC 均會攜帶的專一性基因[10]。綜合來說，這些 A 群的不一致菌仍需要有更充份的資料庫及證據才能確認其分類，我們建議現階段 WGS-PCR 仍主要用於 B、C、D 血清群的鑑別。

本實驗發現 WGS-PCR 可於血清凝集不明確時，輔助判定是否為 *Shigella* spp.，有 2 株 B 群未能分型菌及 2 株 D 群多重凝集菌，均被 WGS-PCR 鑑定為 *Shigella* spp.，顯示 WGS-PCR 在鑑定 B 群及 D 群菌時較血清凝集法容易鑑定出 *Shigella* spp.。

各指定實驗室送驗血清群與本室確認血清群在疑似菌株中有高達 86.2% 的不一致（表三），這些不一致菌以 WGS-PCR 鑑定不出為 *Shigella* spp.。因為多數後測結果顯示為多重凝集，推估應是檢驗人員未實際測試完所有血清群而誤判，因此我們建議在執行血清凝集測試時應依標準操作程序完成所有血清群的測定，始能綜合判讀。

WGS-PCR 雖僅在 B、C、D 血清群與血清凝集鑑定一致，但具有簡單、低成本、又明確的特性，我們建議仍可作為輔助試驗。本研究使用評估的菌株有限且來源多樣性不足，因此本評估有其限制。

參考文獻

1. Lampel KA, Formal SB, Maurelli AT. A Brief History of Shigella. *EcoSal Plus* 2018; 8(1): ESP-0006–2017.
2. Williams P, Berkley JA. Dysentery (shigelosis) current WHO guidelines and the WHO essential medicine list for children. *WHO Guideline* 2016.
3. <https://nidss.cdc.gov.tw/Home/Index?op=1>
4. Devanga Ragupathi NK, Muthurandhi Sethuvel DP, Inbanathan FY, et al. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies. *New Microbes New Infect* 2018; 21: 58–62.
5. Johnson JR. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery? *J Med Microbiol* 2000; 49(7): 583–5.
6. Lefebvre J, Gosselin F, Ismail J, et al. Evaluation of commercial antisera for *Shigella* serogrouping. *J Clin Microbiol* 1995; 33(8): 1997–2001.
7. Khot PD and Fisher MA. Novel Approach for Differentiating *Shigella* Species and *Escherichia coli* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51(11): 3711–6.
8. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2014; 52(8): 139–46.
9. Sahl JW, Morris CR, Emberger J, et al. Defining the Phylogenomics of *Shigella* Species: a Pathway to Diagnostics. *J Clin Microbiol* 2015; 53(3): 951–60.
10. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Use of *Shigella flexneri* ipaC and ipaH gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2687–91.
11. 衛生福利部疾病管制署：衛生福利部疾病管制署傳染病檢體採檢手冊。2018。取自：<https://www.cdc.gov.tw/Category/List/fl4pGet3T9fQxrpbiCzuDw>。

12. 廖盈淑：微生物鑑定質譜儀標準操作程序。第二版。2017。取自：
<https://lims.cdc.gov.tw/DocumentsManage/ElectronicPaperDocument>。
13. 衛生福利部疾病管制署：傳染病標準方法檢驗手冊：桿菌性痢疾。2020。取自：
https://www.cdc.gov.tw/Category/Page/4pQgzB07prAqzxE_zUDOGw。
14. 趙雁南、黃頌恩、邱乾順等：2007 年 11 月台中市某國小水源性桿菌性痢疾流行事件調查。疫情報導 2008；24(10)：769-79。

高防護實驗室負壓自動控制系統更新及異常事件檢討 —以疾病管制署臺南生物安全第三等級實驗室為例

黃仲德、劉健良、林建州*

摘要

高防護 (BSL-3/ABSL-3 以上) 實驗室在 2020 年嚴重特殊性傳染性肺炎 (COVID-19) 疫情爆發後，益顯得防疫的需要和生物安全的重要性。以疾病管制署臺南 BSL-3 實驗室之負壓自動控制系統更新案為例，說明高防護實驗室之功能運作和意外事件處置，分享實驗室生物安全實務經驗，提供國內建置高防護實驗室之單位參考。(一) 自動系統依客製程式監控各機組，進氣及排氣機組以主/備用輪替使用，生物安全櫃 (Bio-Safety Cabinet, BSC) 排氣和室內環境排氣連動，設定「無人進入」(降載)、「人員進入」、「人員進入及使用 BSC」等三種模式，依現況調節負壓值以節省能源。以動態圖式監控各機組運作情況，異常狀況發生時可透過網路通知管理人員；(二) 實驗室發生負壓異常或喪失，且無法立即恢復時，依法須於 24 小時通報各級主管機關。實驗室人員可藉由登入疾病管制署「實驗室生物安全管理資訊系統」進行異常事件通報，再依循該署「高防護實驗室啟用、暫停及關閉規定」，辦理暫停使用以及後續恢復使用程序。在面對國際間高傳染性疾病不斷發生，各單位意識到疫病檢驗和疫苗研發所需高防護實驗室之必要性，故紛紛投入資源建置。對維持高防護實驗室之正常運作以及發生異常事件之處置，皆需熟悉相關法規及安全防護，以避免發生生物危害意外。

關鍵字：高防護實驗室、負壓自動控制系統、負壓異常、異常事件通報

前言

高防護實驗室係指 BSL-3 (Biosafety level 3) 或 ABSL-3 (Animal biosafety level 3) 以上實驗室，操作第三級危險群 (Risk Group 3, RG3) 病原體之實驗室，其通風空調 (Heating, ventilation, and air conditioning, HVAC) 系統是生物安全防護的核心。實驗室之負壓向內定向氣流，且排氣經高效率空氣微粒 (HEPA) 過濾器過濾後排出，防止室內可能之致病源擴散污染到週遭環境，以達到保護工作人員和環境安全 [1, 2]。2020 年初，嚴重特殊傳染性肺炎 (COVID-19) 疫情開始蔓延。截至 2020 年 11 月 17 日止，全球已有 54,564,759 例感染，1,321,671 例死亡，其致死率為 2.42% [3]，部分國家已有第 2 波疫情發生 [4]，專家預估疫情可能持續到 2022 年，在 2024 年前疫情仍有機會捲土重來 [5]。各國初始面對新型冠狀病毒 (SARS-CoV-2) 時顯得無所適從，因為不瞭解病毒的特性，例如致死率多高？或是否會藉由空氣傳播？

衛生福利部疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

通訊作者：林建州*

E-mail : jjlin@cdc.gov.tw

投稿日期：2020 年 12 月 16 日

接受日期：2021 年 08 月 12 日

DOI : 10.6524/EB.202301_39(2).0002

後經專家估計其傳播能力 R_0 值是 5.7，比嚴重急性呼吸道症候群(SARS)高，且患者常為無症狀帶原者[6, 7]。新型冠狀病毒之病毒培養、疫苗研發或動物試驗等，都須在 BSL-3 實驗室操作，以保障工作人員安全。

疾病管制署（以下簡稱疾管署）臺南 BSL-3 實驗室建置迄今已逾 10 年，由於自動控制系統為老舊設計，加上原有系統元件不斷更新，新版程式軟體未必適用，系統如發生故障恐無料件可搭配。該實驗室於 2019 年 8 月，因臺南發生連日豪大雨，以至於建築物頂樓之變頻器因雨水滲入受損，導致負壓系統故障而停機。該異常事件經提報疾管署生物安全會議，決議應提升該實驗室設備異常警報系統，並提升監控功能。2020 年適逢全球 COVID-19 疫情爆發，在擴大國內檢驗量能及防疫備戰下，疾管署全面更新該實驗室之負壓自動控制和監控系統，連結進氣空調箱、排風機組、冰水主機組、風管內電動風門、溫溼度及壓力感測器等設施[8, 9]。監控 1 台排風機運轉狀態需 5 個點位，整體達 250 個點位，另依區域間之進氣和排氣壓力梯度差異，設置室內之空調切換功能。當各機組訊號異常時，連動警示系統，可緊急通報管理人員。

BSL-3 實驗室操作高危險傳染性病原，依傳染病防治法第 34 條「中央主管機關對持有、使用感染性生物材料者，應依危險程度之高低，建立分級管理制度」[10]。「感染性生物材料管理辦法」規範實驗室生物安全管理方式及陳報主管機關等規定[11]，在 2019 年 1 月 31 日修正第 20 條第 2 項之條文，規定實驗室、保存場所發生下列異常事件時，應立即通報生物安全會或生物安全專責人員。其中高防護實驗室之設施或生物安全櫃(Bio-Safety Cabinet, BSC)負壓異常，無法立即恢復者，設置單位應於 24 小時內通報各級主管機關。實務面，國內部分高防護實驗室確實面臨老舊、損壞、故障或遭遇到天然災害，而發生實驗室設施或負壓異常，須遵循疾管署「高防護實驗室啟用、暫停及關閉規定」之「已啟用高防護實驗室暫停使用流程」，申請實驗室之暫停使用，俾利進行實驗室維修工作。

本文藉由疾管署臺南 BSL-3 實驗室發生硬體機電和行政管理[12]之案例，提供高防護實驗室管理人員對於該實驗室運作異常時，應有一定之警覺及意識，以符合法規要求。

材料與方法

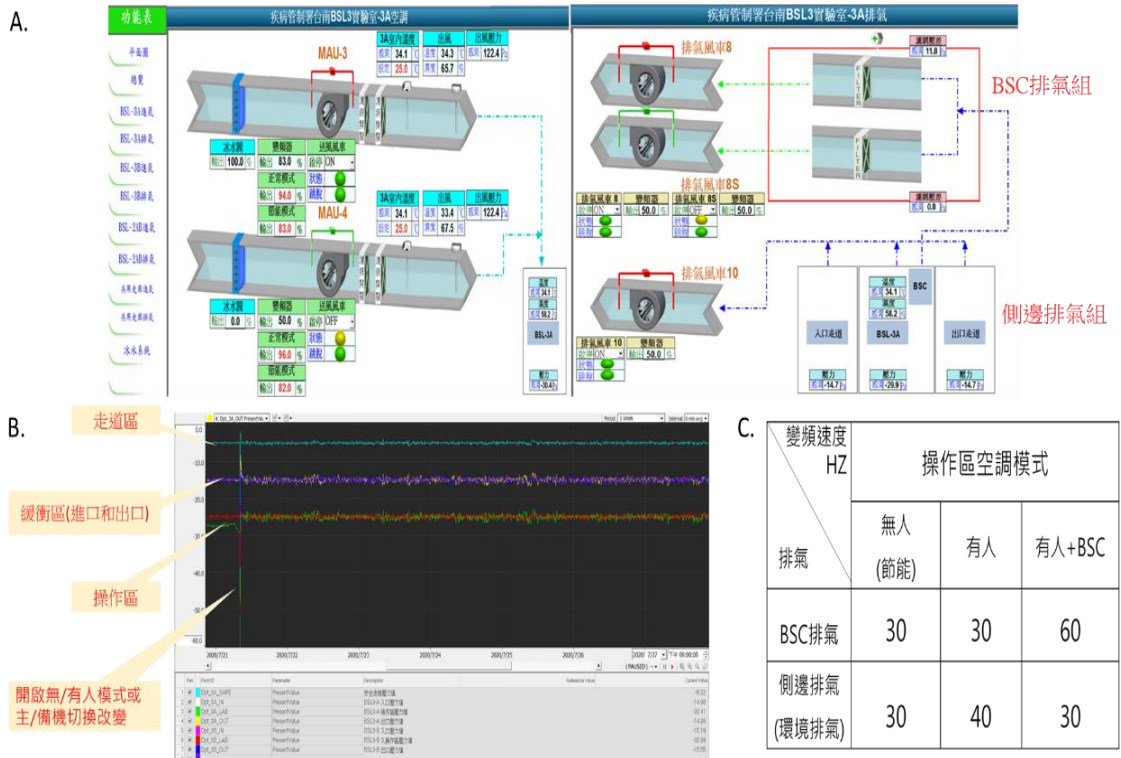
- 一、依疾管署 2020 年採購「臺南三級實驗室負壓自動控制系統更新」招標案規格，編列進氣及排氣系統、冰水及冷卻系統程式控制軟體，包含系統啟動及停止、負壓控制、BSC 排氣、冷卻系統、袋進袋出濾網過髒、警報操作、事件記錄、趨勢記錄及壓力顯示程式，入口之人機介面控制面板設置及功能性測試。
- 二、臺南 BSL-3 實驗室因大雨造成負壓系統異常而停機異常事件，通報疾管署「實驗室生物安全管理資訊系統」。內部矯正措施，包括填報「不符合事項」及「矯正預防措施紀錄單」表單，暫停使用部分填報「新建（整修）BSL-2（含）以上實驗室、保存場所」申請單。

結果

實驗室負壓自動和監控系統，進氣機組設置於機房吸入戶外乾淨空氣，經過第一道初級濾網，再經第二道 HEPA 過濾後至操作區，其運轉及監控如圖一（A 左）。操作室內由生物安全櫃(BSC)和側邊排氣為主，置於室內氣流下游處，不適合擺置在氣流激烈變化和人員走動入口處，排風口其下邊沿距地面 10 公分高，並安裝 HEPA，連接出口於建築物頂樓。除側邊排氣機組，進氣和 BSC 排氣馬達都設有備援，並設定週二早上 8 時交互替換。當馬達故障時，可經由連動系統啟動備援馬達，其排氣及監控狀況如圖一（A 右）。濾網潔淨度過髒之程式邏輯需求，送風量為固定，不因 HEPA 過濾器積塵阻力變化而改變，但當袋進、袋出濾網感測壓差大於設定值，警示燈將提醒工作人員須進行濾網更換。在進氣及排氣管道上皆設有全開／閉式電動風門(MD)，在進行燻蒸消毒時，可關閉保持實驗室密閉性，確保周遭環境安全。高空排風管之出風口須高於樓地板 3 公尺，管口上方安裝防風罩及防雨帽，排出風速大於 15m/sec。實驗室走道區、緩衝區（入口／出口）及操作區之壓力線性圖，當進氣及排氣之運轉及備用馬達在切換時或啟動空調模組時，氣壓線會上下波動如圖一(B)。監控室和入口處可調控空調模組，以人員是否進出實驗室操作為想定，設有「無人進入」（降載）、「人員進入」、「人員進入及使用 BSC」等三種模式切換。在不同模式下，BSC 和側邊連動有不同排氣量，分別為 30/30 Hz、30/40 Hz 及 60/30 Hz，排氣運轉監測值如圖一(C)。

進氣及排氣系統透過通訊數位或類比式訊號進行控制，即時以燈號及動態畫面顯示各感測器之動態數據及運轉現況。氣流通過安裝在主管道內的風速傳感器，計算出室內部的空氣流量，室內排氣風量壓差利用變頻器微調排氣馬達或風管內可變風門調節風量。冰水主機由 HVAC 控制室內溫度，通過回饋邏輯控制器回傳終端主機調節溫度，整體之進、排氣和冰水主機運行參數表如圖二(A)。操作區由單側上部進氣，其對側下部排放之單向氣流方式，壓差梯度由安全走道之微負壓，至緩衝室（入口／出口）負壓，再至操作區高負壓，負壓逐漸加強，減少室內氣體回流或渦流，並朝向內之定向流動。各區之負壓控制，由各室靜壓讀值輸入運算，經由演算控制對應之風門，調整氣流開度，操作區與相鄰緩衝區壓力差需大於-12.5Pa，操作區和公共走道須相差-25Pa 以上，如圖二(B)。目前，實驗室操作區與相鄰緩衝區壓力設定-20Pa。在人機面板是以絕對壓力呈現數值，以利操作者直接瞭解操作區間之負壓狀況如圖二(C)。

經疾管署同意暫停超過 1 個月之實驗室，於啓用前必須完成各項功能性檢測報告，包括鄰室間之負壓差、溫度、溼度、照明度及空氣潔淨度等，除溫溼度部分視個別實驗室標準設定，檢測數據必須符合生物安全標準規定如圖三(A)。圖控顯示所有控制元件相關訊號和運轉狀態，如各區間負壓系統鄰間壓差小於 15Pa、室內冷卻系統異常，主機及備機切換時間延遲，可依現場測試結果調整交替延遲所需時間，目前設定在 2 分內未完成切換即作警報發送。當負壓異常時，現場發出蜂鳴警報聲，並透過 Line 簡訊通知實驗室管理人員，如圖三(B)。



圖一、實驗室負壓進氣和排氣自動和監控系統



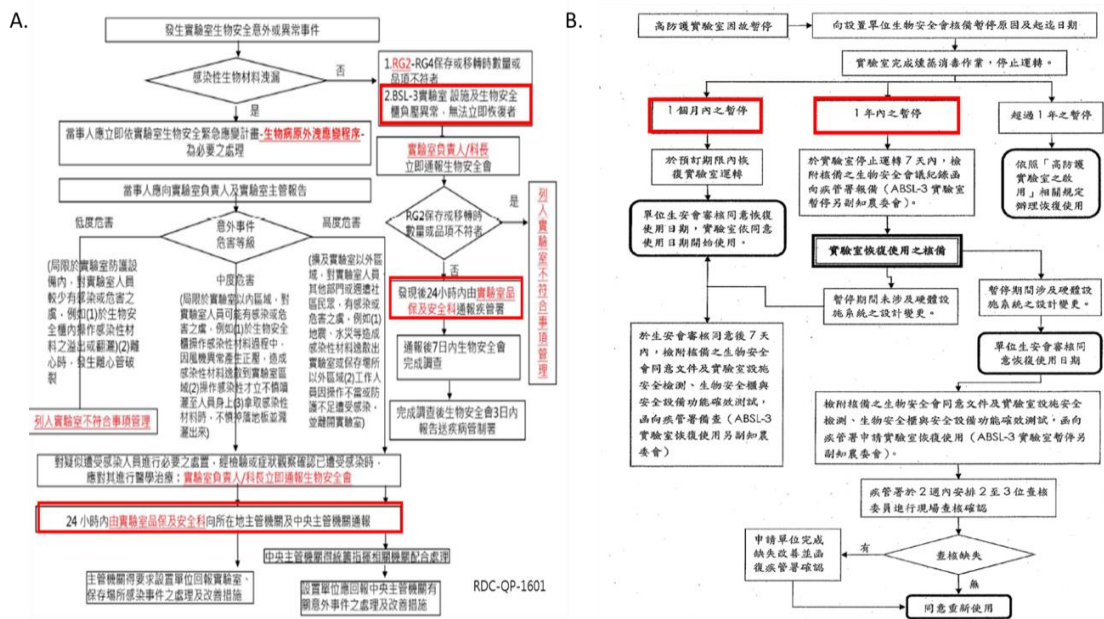
圖二、進氣、排氣和冰水主機運行參數和各區間之負壓梯度比較

項目	生物安全標準	檢測結果
實驗室壓力	公用走道至實驗室操作區至少壓差大於25Pa；相鄰區域至少壓差大於12.5Pa	合格
換氣次數	≥12次	合格
HEPA濾網洩漏率(排氣量測)	< 0.005%	合格
氣流煙霧量測	由室外向室內流動，不可溢出	合格
照度量測	> 500Lux	合格
噪音量測	< 80DbA	合格
氣密測試	確認內隔間板的接縫處無任何洩漏	合格
袋進/袋出濾網洩漏量測	< 0.005%	合格
屋頂排風口風速測試	排氣口離地高度至樓板起至少3m，出口平均風速≥15m/s	合格
實驗室溫溼度(參考)	溫度 21±2°C 濕度 60±20%	合格



圖三、臺南 BSL-3 實驗室之生物安全標準及負壓異常警報

高防護實驗室發生負壓異常事件無法立即恢復者，依「感染性生物材料管理辦法」規定，須 24 小時內通報相關主管單位，可登入「實驗室生物安全管理資訊系統」作通報。該實驗室之管理部門因應實驗室之異常事件，於 2020 年 1 月更新「生物安全意外和異常事件通報單」表單，新增異常事件通報流程如圖四(A)。承辦人須填報「不符合事項」及「矯正預防措施紀錄單」。如發生火災、水災、地震造成設施損害或是實驗室設備老舊、進行維修保養等，申請暫停使用及後續重新啟用，須填寫「新建(整修)BSL-2(含)以上實驗室、保存場所」申請單，並依循疾管署「高防護實驗室啟用、暫停及關閉規定」之「已啟用高防護實驗室暫停使用流程」辦理，如圖四(B)。



圖四、高防護實驗室異常事件通報及申請暫停、啟用流程圖

討論

實驗室生物安全保護層次分有個人、檢體及環境保護等分為：(一)個人防護裝備(PPE)—工作人員依操作病原體危害程度穿著 A、B、C 級或 PAPR 等防護衣；(二)生物安全櫃(BSC)—在操作不同危險群等級之病原體；(三)高防護實驗室除應有適合工作人員之溫度及溼度控制系統外，主要功能包括負壓設施，設有前室、入口/出口緩衝室及操作區等，各區定有不同負壓梯度，氣流由前室之潔淨更換區往較髒污更換區流動，最後透過 HEPA 過濾器過濾後排出室外[13]，檢驗過程產生之感染性廢棄物，以室內之高溫高壓滅菌鍋滅菌後，再由合格廢棄物處理廠商清運。

臺南 BSL-3 實驗室原監控系統軟體係由非通用專業語言程式編寫，易受制於原廠商之獨有設計。當自動控制系統元件規格汰舊更新後，原有程式不易套用，無法維持運作；若要更換新程式所需經費不易編列，常在維護和更新間進退維谷。軟體易受專業制約外，實驗室建造是分兩期工程案，前後期控制接點銜接不清楚，因未了解專業之接點，很多操作上的滯礙也無從找出問題的癥節。適逢 COVID-19 疫情經費挹注及備援需求，實驗室順勢更新採用大眾市場廠牌軟體編寫，並全面汰舊線路，有利後續接手工程人員維修保養。軟體控制邏輯導入使用者想法和需要，可直接操控約 250 個監控點位，當系統發生異常時不須逐層或逐點檢視，自動化監控節省人力及時間。

通風空調系統切換模式一：當無人在實驗室時，可降載生物安全櫃及側邊排風抽氣動力為 30/30Hz 之降載模式；模式二：有人進出實驗室，只啟動滿載空調排氣，但 BSC 排氣仍維持 30Hz；模式三：進入操作區作實驗，啟動有人及使用 BSC 排氣模式，側邊和 BSC 連動排氣可以改變抽氣量為 30/60Hz，透過運算兩者間達負壓恆定。模式立基於無人使用實驗室時可降載空調之運轉，除保護馬達機組不須持續高速運轉外，可降低電力使用節省電費支出。進入操作區時應注意室內各區間負壓值是否建立及符合標準，尤其啟用有人模式或排氣馬達主/備用機組切換時會有短暫起伏，若區間壓力閾值差 <15Pa 超出 2 分鐘時間，即作動警示燈和鳴叫。在無人情況或半夜負壓異常或停機時，訊息透過 LINE 傳遞實驗室管理人員或指定通知人員。所有警報內容及回復正常時間點，皆記錄在系統事件紀錄中，包含日期/時間、人員登錄、管理權限、操作人員手動變更參數、設備狀態變更、警報及警報確認和系統異常事件紀錄等。

在 2016 年修正之「感染性生物材料管理辦法」僅列有實驗室、保存場所發生感染性生物材料洩漏程度分為高度、中度、低度危害等級之意外事件，並無針對異常事件通報之規定。在 2019 年 1 月 31 日新修正第 21 條，其中增列異常事件原因和通報，若未於時限內進行通報，將依傳染病防治法第 69 條，處新臺幣 1 萬元以上 15 萬元以下罰鍰。當高防護實驗室負壓異常且有高污染物洩漏之虞即須通報這是無庸置疑，但如無人在實驗室操作而系統停機故障，或是生物安全櫃異常即時關閉操作等，實驗室人員常容易誤認只有負壓異常並無病原體洩漏和即刻危害，而忽略或忘了“無法立即恢復者”須 24 小時通報之規定。實務面，設備是否

可以即時修復，操作人員往往無法於短時間內判別狀況，須倚賴工程人員檢修作決定。因此，如發生類似情事時，現場人員先立即呈報生物安全會或諮詢中央或地方主管機關，應為較妥適之作法。而中央對生物安全通報時效應和發生危害程度要有比例或緩衝指引，降低實驗室人員壓力或緊張。

本室處理異常事件，除須填報不符合事項及矯正預防措施紀錄單等檢討改進外，後續系統更新案再填報新建或整修 BSL-2 以上實驗室之申請單，向單位生物安全會提出申請。從 2019 異常事件發生所作之維護至 2020 軟體系統更新案，時隔半年左右，主辦人員除應詳思工程維修和更新案之請購規格，對申請作業時程都要細算。事件發生只申請 1 個月暫停檢修，會因豪雨數十日不能送電檢測，最後再申請 1 年內之停用。而更新案考量疫情、經費來源及執行時程，則申請 1 個月之停用，從使用者需求洽談至開工日，燻蒸消毒耗時 3 日、軟體設備更新後測試調整花 20 日、公正單位驗證要 6 日，最後合格報告書要在 30 日前提送單位生物安全委員會核准及啓用。申請 1 個月和 1 年內停用之差異，在於 1 個月內暫停僅需報請單位生安會審核同意，中央主管機關備查，1 年內停用則須報備中央主管機關。1 個月內的工程作業是緊湊的，預期工期超出 20 日以上，最好申請 1 年內之暫停，以避免行政程序未完備，或未有合格條件下導致恢復流程逾期，實驗室負責人要謹慎為之。在更新案期間一段工安小插曲，因不幸有工人手指遭機櫃壓傷，須手術縫針住院 1 日觀察，依職業安全衛生法第 37 條事業單位工作場所發生職業災害，雇主應即採取必要之急救、搶救等措施，「雇主應於 8 小時內通報勞動檢查機構」，且須通報地方主管機關。因有前車之鑑，雖看似小受傷但緊急且謹慎依規定通報，避免後面不必要追責。

綜上，實驗室負責人對於設施自動化更新，其機電和系統功能的瞭解是必要的，當系統故障發生時，才有信心和方法去處理。面對意外發生，除法規及通報作業要嫻熟，因不了解或不知道都有可能觸犯法規。要積極任事快速處理，連絡並詳問相關單位和問題核心避免犯錯。

參考文獻

1. CDC. Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities (2003). Available at: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/environmental/background/air.html>.
2. Organization, W.W.H. When the laboratory works with pathogens requiring a biosafety level (BSL) III facility: create a negative pressure laboratory. Available at: <https://extranet.who.int/lqsi/content/when-laboratory-works-pathogens-requiring-biosafety-level-bsl-iii-facility-create-negative>.
3. 衛生福利部疾病管制署。取自：<https://www.cdc.gov.tw/>。
4. BBC News. Coronavirus: What is a second wave and is one coming? Available at:

<https://www.bbc.com/news/health-53113785>.

5. Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, et al. Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. *Science* 2020; 368(6493): 860–8.
6. Sanche S, Lin YT, Xu C, et al. High Contagiousness and Rapid Spread of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis* 2020; 26(7): 1470–7.
7. Chu H, Chan JF, Wang Y, et al. Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19. *Clin Infect Dis* 2020; 71(6): 1400–9.
8. 每日頭條：實驗室建設 SICOLAB 生物安全實驗室建設規範(重點)SICOLAB 2018。取自：<https://kknews.cc/design/2ebjg3y.html>。
9. 陝西宏碩實驗室：生物實驗室具備哪些系統？取自：<https://kknews.cc/news/ovqvyr6.html>。
10. 全國法規資料庫：傳染病防治法。取自：<https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawSingle.aspx?pcode=L0050001&flno=34>。
11. 感染性生物材料管理辦法。取自：<https://law.moj.gov.tw/LawClass/LawAll.aspx?pcode=l0050029>。
12. CDC. HIERARCHY OF CONTROLS. Available at: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/hierarchy/default.html>.
13. WHO. Laboratory biosafety guidelines and support. Available at: <https://www.who.int/in-vitro-diagnostic/biosafety-guidelines/en/>.

日期：2022 年第 52 週–2023 年第 1 週 (2022/12/25–2023/1/7)

DOI : 10.6524/EB.202301_39(2).0003

疫情概要

全球 COVID-19 疫情持續處此波疫情高峰，惟病例數可能低估；中國疫情仍嚴峻，流行株仍以 BA.5.2 與 BF.7 為主，另已發現特定位點突變之 BA.5.2.48 與 BF.7.14 變異株，各地已開始湧現春運人潮，需持續關注對我國疫情影響；BA.5 及其衍生變異株仍為全球主流株，BQ.1、BA.2.75 及 XBB 等變異株佔比續升，將持續監測國際間病毒株之演變與流行。

國內 COVID-19 新增本土病例數、中重症數及死亡數上升，另 COVID-19 境外移入病例數快速上升且進入春節前返國高峰期，變異株進入社區風險可能增加，呼籲持續加強長者等重症高風險族群疫苗接種與及早用藥，並落實個人防護措施，持續密切監測國內變異株及疫情變化。

重要疾病摘要說明

一、COVID-19

1. **國內疫情：**自 2020 年迄 2023/1/10，新型冠狀病毒累計 9,097,554 例確定病例，其中 9,053,937 例本土病例、43,563 例境外移入；累計 15,608 例死亡。
 - (1) 本土病例：近 1 週病例數上升，個案居住縣市前 3 名為新北市、臺中市及高雄市，2022 年起本土中重症病例比例為 0.45%。目前 Omicron BA.5 為主流株，自 2022 年累計檢出本土確定病例變異株 XBB 為 3 例、BF.7 為 9 例、BQ.1 為 15 例、BA.5 為 1,553 例、BA.4 為 5 例、BA.2.75 為 36 例、BA.2 為 2,537 例。
 - (2) 境外移入病例：近 1 週病例數上升。2022 年起累計檢出 Omicron 亞型變異株境外移入確定病例 XBB 為 28 例、BF.7 為 43 例、BQ.1 為 35 例、BA.5 為 1,376 例、BA.4 為 104 例、BA.2.75 為 135 例、BA.2 為 1,030 例。
2. **國際疫情：**
 - (1) 自 2020 年截至 2023/1/10 9:00 全球累計 201 國／地區計 659,891,620 例確診，其中 6,706,969 例死亡；近 1 週日增確診前五名為日本 170,451 例、美國 72,369 例、韓國 57,167 例、臺灣 26,166 例及巴西 21,274 例。
 - (2) 區域疫情趨勢：**西太平洋區及美洲處高峰**，中國疫情持續嚴峻，老年族群感染數及重症數均增加，各地已開始湧現春運人潮；預期春節前、後人流將使疫情再上升，多國宣布強化自中國入境旅客管制措施；美國假期過後，新增病例數、住院數及死亡數均上升，BQ.1 及 BQ.1.1 變異株為主流株。**歐洲、東南亞、非洲及東地中海持平。**

- (3) 世界衛生組織(WHO)於 2023/1/4 資料指出，全球已發現超過 540 種 Omicron 次分支變異株及 60 種重組變異株；目前 BA.5 變異株佔比約為 63.7%，仍為全球主流株惟佔比略降；BQ.1、BA.2.75 及 XBB 及其子代變異株佔比持續增加，已於至少 70–90 個國家檢出，佔比分別約 44.9%、11.8%及 6.8% (含 XBB.1.5)；其中近期 XBB.1.5 變異株已至少於 29 國檢出，於美國及歐洲佔比上升。BQ.1、BA.2.75 及 XBB 等變異株多已發展出免疫逃脫特性，具較佳增長優勢，惟是否引發新一波疫情仍取決於該地區人群免疫力、既往 Omicron 疫情發生時間與規模及疫苗涵蓋率等要素，現有證據顯示疾病嚴重度影響未明顯增加；另 WHO 專家表示 XBB.1.5 變異株傳播能力顯著增加，刻正密切評估其風險程度。

二、類流感

1. 國內疫情

- (1) 實驗室監測：依據社區合約實驗室及實驗室傳染病自動通報系統 (LARS) 監測顯示流感、副流感、呼吸道融合病毒等呼吸道病毒於社區持續活動，其中流感病毒陽性數趨勢略升，檢出以 A 型 H3N2 為主。
- (2) 類流感門急診就診人次：近期呈上升趨勢；惟近一週受元旦連假部分門診休診影響，與前一週持平。
- (3) 流感併發重症：新增 2 例重症病例 (B 型)；本流感季 (2022/10/1 至 2023/9/30) 累計 21 例 (含 3 例死亡)，分別 16 例感染 A 型 H3N2、2 例感染 A 型 H1N1、3 例感染 B 型，其中 20 例未接種流感疫苗。

2. 國際疫情

國家	趨勢	2023 流感季			
		活動度	週別	監測值	近期流行型別
日本	上升·高於去年同期	第52週	定點門診平均病例數：2.05(+0.81)	A型(H3)	
韓國	上升·高於流行閾值	第53週*	類流感門診就診率：60.7% (+5.3)	A型(H3N2)	
歐洲	上升·25國高於閾值	第52週	定點樣本陽性率：34.4% (+3.5)	A型(H3)	
加拿大	上升·同往年水平	第52週	類流感門診就診率：3.2% (-0.8)	A型(H3N2)	
美國	下降·仍高於閾值	第52週	類流感門診就診率：5.4% (-0.7)	A型(H3N2)	
中國大陸	南、北方ILI均驟降·南方仍高於往年同期·北方已降至往年水平。	第52週	南方	ILI：8.5% (-4.5) 陽性率：0.1% (-0.8)	A型(H3N2)
			北方	ILI：4.9% (-3.4) 陽性率：0.4% (-0.2)	
新加坡	略升·未達閾值	第51週	類流感門診就診率：0.4%(+0.1) 呼吸道感染就診(日平均)數：2,168 (+3.6%)	A型(H3N2)	
香港	持平·同往年水平	第53週*	類流感定點門診就診率：0.3% (-0.3)	A型(H3)	

*香港及韓國第53週別涵蓋日期與其他國家之第52週相當

三、新型 A 型流感

WHO 2023/1/6 發佈針對 2.3.4.4b H5N1 流感之風險評估：

1. 2020 年迄今全球累計檢出 6 例人類病例，分別為自西班牙 2 例、英國／美國／中國／越南各 1 例，其中歐／美病例輕症或無症狀，惟越／中病例重症或死亡，相關治療歷程及用藥未明，所有病例均有明確家禽接觸史，針對基因分析資料結果，尚未發現哺乳動物適應性標記或抗病毒藥物之抗

藥性標記。該病毒現於全球範圍之野鳥中流行並已入侵家禽，哺乳動物感染數亦增加，受感染動物種類多樣，多引發神經系統症狀，目前未具持續傳播能力。

2. WHO 評估，目前人類感染風險仍低，惟須各國持續密切監測並共享資訊，WHO 已優先進行 H5N1 抗原試劑開發；建議各國加強避免人禽接觸，並確保動物檢疫人員之防護及健康。

其他參考資料連結：

1. 國內 COVID-19 疫情趨勢(傳染病統資料查詢系統)
2. 國內類流感疫情資訊(傳染病統資料查詢系統)
3. 最新旅遊疫情建議等級資訊請參考國際旅遊疫情建議等級表

創刊日期：1984 年 12 月 15 日

出版機關：衛生福利部疾病管制署

地 址：臺北市中正區林森南路 6 號

電 話：(02) 2395-9825

文獻引用：[Author].[Article title].Taiwan Epidemiol Bull 2023;39:[inclusive page numbers].[DOI]

發行人：周志浩

總編輯：林詠青

執行編輯：陳學儒、李欣倫

網 址：<https://www.cdc.gov.tw>