計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-123504

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：強化感染症合約實驗室社區主動檢驗監測防治網

年度/全程研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計劃主持人：吳芳姿

協同主持人：楊志元

研究人員：李宛育(林建文代理)、郭禮文、李中皓、徐鳳光、陳嘉諠

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

目錄

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫 1
研究報告中文摘要 3
Abstract 4
一、 前言： 5
二、 材料與方法 6
1. 檢體採集： 6
2. 檢體之保存與病毒株之寄送： 8
3. 實驗室品質管制 8
4. 合約實驗室培養陰性之剩餘檢體回收 9
三、 結果 12
1. 擴展全國各區社區監測點，強化社區病毒監測 12
2. 我國流行病毒株收集與材料保存 13
3. 實驗室品質管制 13
4. 回收合約實驗室培養陰性之剩餘檢體，進行腸病毒分型分生檢測 15
四、 結論與建議 16
五、 參考文獻 18
六、 圖表 19

研究報告中文摘要

關鍵詞：病毒合約實驗室、腸病毒、呼吸道病毒、病毒株流行型別、病毒監測資料

參與本署腸病毒及呼吸道病毒社區監測之全國合約實驗室共有 8 家，分布於北、中、南、東四區，本研究之目的在於建立穩定之重點病毒社區主動監測，以委託全國實驗室主動偵測系統，結合社區腸病毒及流感病毒之流行型別、抗原性及抗藥性等疫情監測，提供即時與透明化之疫情資訊，並以每週及長期監測訊息提供檢驗結果以合併病原重症監測作為防疫政策參考。

經由病毒性感染症合約實驗室，快速而精確的診斷病毒感染，是提供控制疾病疫情發展不可或缺的重要資源。在疫情監測方面，由合約及院外定點醫師組成之病毒性感染症監視系統，能有效建立即時性各地區病毒流行趨勢資料庫，並對於各種病毒型別在不同地區及季節之活動狀況加以監控，當新興病毒感染症發生時方可防止病原體擴散，並於疫情發生初期時便予以控制。

本計畫除維持現有委託各合約實驗室協助本署監測社區病毒流行情況外，期能逐年強化、鞏固、分析及擴展全國各地區定醫採檢點，收集更具代表性之病毒株、菌株以及樣本，並提升合約實驗室檢驗監測品質、辦理教育訓練、合約實驗室技術交流相關病原檢測技術等，以培養精實之全國各區檢驗監測量能。

Abstract

keywords：Virus contract laboratory, enterovirus, respiratory viruses,

Virus strain type , surveillance database

At present, there are 8 contract laboratories participating in the community monitoring of enterovirus and respiratory virus, which are distributed in the north, middle, south and east four districts of Taiwan. The purpose of this study is to establish a stable virus community active monitoring by entrusting contract laboratories proactive detection system. Combining with epidemic surveillance of community enterovirus and influenza virus epidemics, antigenicity and drug resistance, provide immediately and transparently epidemic information. These supply weekly and long-term monitoring information and with the severe surveillance is used as a reference for epidemic prevention policies.

Rapid and accurate diagnosis of viral infections through a contract laboratory is an indispensable resource for controlling the development of disease epidemics. In the aspect of epidemic surveillance, a viral infection surveillance system consisting of contracted and out-of-hospital physicians can effectively establish a database of real-time virus epidemic trends. By monitoring this database can be aware of the activity of the virus in different regions and seasons. When a viral infection occurs, it prevents the spread of the pathogen and controls it at the beginning of the epidemic.

This project is main to preserve the original contracted laboratories to assist the detection of community viruses. By years, the education training will be hold to refine contracted laboratories sampling and data analysis skills. Moreover the collection of representative virus strains makes virus database more comprehensive. This is aim to enhance the virus infection monitoring of Taiwan.

一、前言：

腸病毒與呼吸道病毒感染為我國重要容易引起群聚或重症之感染病原，每年分別在春-夏季與冬季會引起較大的感染流行；由於每年流行疫情部分受病毒株型別改變影響，或病毒之病原體基因變異等因素，因此感染規模與引起的疾病嚴重度亦會有差異，因此需要透過社區長期性監測，可早期發現病毒株的變化，提早進行防疫準備工作。此外，建立社區長期性監測的另外目的在於發現新興感染源，許多引發新與及再浮現傳染病事件的病源可以在社區監測時提早發現，特別像 A(H1N1)pdm09、H7N9 等新型流感病毒對人類健康之威脅尤甚，建構病毒性感染症合約實驗室監視網，可提供重要病毒在國內不同地區及季節的活動狀況，以協助掌控國內病毒疫情。

本計畫主要目的在建立社區長期性病毒監測、推廣傳染病在地檢驗及增進分層檢驗量能。為強化現有合約實驗室監測分布均勻度，今年納入本署區管中心加入本研究，以分區負責方式協助各監測合約實驗室，尋找與聯繫該區域定點醫師採檢點，以提升傳染病監測之靈敏度，以及強化代表性病毒株收集；在監測與檢驗品質部分，透過要求各實驗室之品質計畫、檢驗品質管控、人員教育訓練、內部與外部能力試驗，提升檢驗品質與病原監測之穩定性；在整體能力提升與訊息交流部分，本署透過定期性討論會議、技術回饋與病原資訊交流，辦理實驗室查核、盲樣能力試驗與教育訓練等，以強化全國各區實驗室之能量，為整體防疫量能做準備，並為未來因應重大規模疫情發生時之需要進行彈性支援檢驗工作準備。

二、材料與方法

1. 檢體採集：

收集全國腸病毒及呼吸道病毒社區感染病例，輔導合約實驗室在其轄區中找到院外採檢點，並均勻分配收集採樣點定期採集符合收案定義病例檢體，及每個監測點其收件檢體能維持在陽性率至少在 35%~40%以上。

i. 檢體來源：

A. 合約實驗室所在醫學中心的門診、住院及急診病患，合乎採檢定義者。

B. 院外定醫採檢點：合約實驗室自行尋找合作之採檢點醫師，每一個採檢點每週以送驗二件為原則。目前院外定醫診所配合委託合約醫院之採檢點，病例收案數分配不均勻，或其他因素影響收案，可能影響各區域監測品質，合約實驗室應定期檢視通報資料，了解採檢點醫師收案問題與配合意願等，進行聯繫與溝通，或向轄區衛生局或本署區管中心尋求協助，以另找尋配合意願高之採檢點，以維持該區域監測品質之代表性。

ii. 採檢定義：

A. 疑似流感病毒感染病患：需符合類流感病例定義 1.突然發病、有發燒（耳溫≧38℃以上）及呼吸道症狀。且 2.具有肌肉酸痛、頭痛、極度倦怠感其中一項症狀者。區別排除疑似單純性流鼻水、扁桃腺炎與支氣管炎等個案。

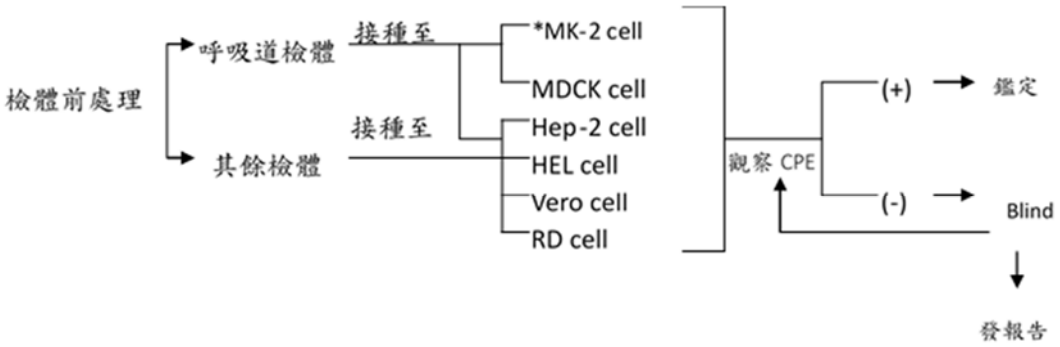
B. 疑似腸病毒感染病患：需為手足口病或疱疹性咽峽炎或無菌性腦膜炎或結膜炎等患者。

C. 需在發病第三日內進行採檢，檢體以咽喉拭子為佳，採檢簡易且分離率高。

iii. 合約實驗室檢體收件：

A. 檢體運送：檢體採取後應於 24 小時內送至病毒合約實驗室處理；檢體送驗應維持 4℃冷藏，輸送過程中，請放置於本署專用之檢體送驗箱中。

B. 檢驗方法及步驟：



iv. 病毒培養：

A. 以 MK-2 cell 或 H292 cell；使用細胞株之組合可由各實驗室視狀況自行調整或以 R-mix cells 取代傳統病原分離方法。

B. 流感病毒培養：將由疑似感染病患檢體或病毒液 200μL 與 1mL 病毒培養用細胞培養基（不含胎牛血清）充分混合，經 0.45μm 過濾膜過濾後，接種至 MDCK 細胞株，培養 7-10 天後或培養出現 CPE 時，以 3000rpm 離心 15 分鐘以收取病毒液，並將離心沉澱之疑似感染細胞加入 1mL PBS 混合均勻後，滴入 21 孔玻片。玻片經 Acetone 固定後，以 Influenza A 及 Influenza B 之單株抗體（monoclonal antibody）進行間接免疫螢光染色法（indirect immunofluorescence assay，IFA）染色，並以螢光顯微鏡進行鏡檢，當細胞出現蘋果綠（apple green）螢光則判定為流感病毒陽性。

v. 病毒鑑定：

A. 呼吸道病毒（DAKO system direct FA）鑑定： 抹片固定風乾加 10 μL 螢光抗體後置於 wet chamber 中 37℃，15 分鐘再以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘，待風乾，封片觀察。

B. 腸病毒及呼吸道病毒（Chemicon system–indirect FA）鑑定：抹片固定風乾後加 10 μL 螢光抗體，置於 wet chamber 中 37℃，30 分鐘 後以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘，待風乾後加入二次抗體 10 μL，置於 wet chamber 中，37℃，30 分鐘後，再以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘，待風乾，封片觀察。

C. 檢驗病毒項目包括：Poliovirus、Coxsackievirus A、Coxsackievirus B、Echovirus、Enterovirus 68–71、Influenza virus、Respiratory syncytial virus、Parainfluenza virus、Adenovirus、Herpes virus、CMV 等。

2. 檢體之保存與病毒株之寄送：

i. 每週應將全部陽性病毒株，併同檢體清冊寄回本署。

ii. 檢體保存：臨床檢體應保存於–70℃ 冷凍櫃內；陰性檢體需保留三個月，陽性檢體保留六個月，必要時本署可要求實驗室寄回相關臨床檢體，作為確認或保存等（含能力測試檢體）。

iii. 基於防疫所需，本署將隨時抽樣備份檢體或病毒株複檢，並於定期性實驗室查核查閱相關之實驗操作與檢驗記錄，以維持監測品質與以利疫情之掌控。

3. 實驗室品質管制

（1） 外部品管

i. 每年至少一至二次採不定時或不特定方式寄送盲樣試驗品至各合約實驗室進行測試作業，以確保計畫執行檢驗品質與流程之精確性與時效性；各合約實驗室亦應參加國際性或國內有關腸病毒及流感病毒相關品管測試（如 CAP）。

ii. 定期性舉辦討論會議，並請各實驗室提出報告。

iii. 實驗室檢驗狀況不良者，將依進行實驗室輔導及抽查。

iv. 辦理書面或實地審查作業，於審查時進行實驗室收案、品質與檢驗等問題檢討。

（2）內部品管

i. 規定需定期進行細胞 mycoplasma 檢測及敏感性試驗。

ii. 病毒檢驗用細胞株來源、繼代史、繼代記錄、種原細胞黴漿菌測試等之記錄需保存。

iii. 病毒分離及鑑定之觀察記錄至少保存 2 年。

iv. 所有設備設施、檢體簽收簿、實驗工作簿、檢驗報告及所有內(外)部品管相關紀錄等，至少保存 3 年。

4. 合約實驗室培養陰性之剩餘檢體回收：進行腸病毒分型分生檢測(EV RT-snPCR)

i. 反轉錄酶反轉錄反應(RT)

A. 取 5 µL RNA 做模板，分別加入反轉錄試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 10 µL。

反應試劑	加入體積	RT 反應最終濃度
5x First-Strand RT Buffer	2 µL	1x
20mM dNTP Mix	0.5 µL	1 mM of each dNTP
100µM AN32 – primer	0.05 µL	0.5 µM
100µM AN33 – primer	0.05 µL	0.5 µM
100µM AN34 – primer	0.05 µL	0.5 µM
100µM AN35 – primer	0.05 µL	0.5 µM
0.1M DTT	1 µL	0.01 M
RNaseOUT	0.5 µL	20 units
SuperScript™ III RT(200U/µL)	0.5 µL	100 units
RNase-free water	0.3 µL	-

ii. 反轉錄酶反轉錄反應(RT) ：使用 PCR thermal cycler。

A. annealing：22 ℃，10 分鐘。

B. R.T.作用：45 ℃，60 分鐘。

C. HotStop：95 ℃，5 分鐘。

D. 最後維持在 4 ℃, 保存 cDNA。

iii. 聚合酶鏈鎖反應(PCR)

A. 取 2 μL cDNA 做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 10 μL。

反應試劑	加入體積	PCR 反應最終濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	1 μL	1x
2.5 mM dNTP Mix	1 μL	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	0.5 μL	2.5 mM
0.1 M DTT	0.1 μL	0.001 M
224 –Forward primer(10 μM)	0.8 μL	0.8 μM
222 –Reverse primer(10 μM)	0.8 μL	0.8 μM
Platinum *Taq* DNA Polymerase	0.1 μL	0.5 units
RNase-free water	3.7 μL	-

iv. 聚合酶鏈鎖反應(PCR) ：使用 PCR thermal cycler。

A. denature：95 ℃，30 秒。

B. annealing：42 ℃，30 秒。

C. extension：60 ℃，45 秒。

D. 重複上述 1～3 步驟 40 cycles。

E. 最後維持在 4 ℃。

v. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR)

A. 取 1 μL 聚合酶鏈鎖反應(PCR)產物做模板，分別加入聚合酶鏈鎖反應試劑及其他反應溶液（成分如下表），調整反應總體積至 25 μL。

反應試劑	加入體積	nest-PCR 反應最終濃度
10x PCR Buffer, Minus Mg	2.5 μL	1x
2.5 mM dNTP Mix	2.5 μL	0.25 mM
50 mM Magnesium Chloride	1.25 μL	2.5 mM
0.1 M DTT	0.25 μL	0.001M

AN89 –Forward primer(10 μM)	2.0 μL	0.8 μM
AN88 –Reverse primer(10 μM)	2.0 μL	0.8 μM
Platinum *Taq* DNA Polymerase	0.1 μL	0.5 units
RNase-free water	13.4 μL	-

vi. 巢式聚合酶鏈鎖反應(nest-PCR) ：使用 PCR thermal cycler。

A. HotStart：95 ℃，6 分鐘。

B. denature：95 ℃，30 秒。

C. annealing：60 ℃，20 秒。

D. extension：72 ℃，45 秒。

E. 重複上述 2～4 步驟 40 cycles。

F. 最後維持在 4 ℃。

5. 核酸引子序列

Primer	Sequence	Position
AN32	GTYTGCCA	3009-3002
AN33	GAYTGCCA	3009-3002
AN34	CCRTCRTA	3111-3104
AN35	RCTYTGCCA	3009-3002
224	GCIATGYTIGGIACICAYRT	1977-1996
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	2969-2951
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	2602-2627
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	2977-2951

三、結果

1. 擴展全國各區社區監測點，強化社區病毒監測

合約實驗室每週以電子系統即時上傳社區收案資料，包含所有疑似收案個案之臨床症狀，與病毒檢測陽性個案之病毒檢出結果，本署可以透過資料分析，即時了解各區域呼吸道病毒以及腸病毒流行趨勢，以及病毒株流行情形；同時透過長期性監測資料之比較，了解當年疫情的變化。

2019 年 1-43 週統計各合約實驗室收案總數 8,482 件，包括疑似呼吸道病毒感染 5,260 件及腸病毒感染 3,222 件，收案檢體中有 3,594 件病毒培養陽性，陽性率佔 42.37%；其中流感病毒培養陽性 1,697 件(32.26%)、腺病毒 368 件(7%)、呼吸道其他病毒(包含 HSV1、PARAINF、RSV、CMV、Metapneumovirus 等)共 439 件(8.35%)；另，腸病毒培養出陽性共 1,090 件(33.83%)；收案與培養結果如表一。

與去年同期間各區收案數與病毒培養檢驗結果分析比較(表二)，疑似呼吸道病毒感染收案送驗數除了東區略有增加之外，其餘均明顯下降，收件件數雖較去年略為減少，但是呼吸道培養檢出陽性率較去年提高了約 7%左右，平均有 47.6%；疑似腸病毒感染病例收案總送驗數與去年同期比較則收案數略為上升(表三)，腸病毒陽性率由去年的 37.24% 略降至 33.83%左右，分區檢視分析比較，今年腸病毒檢出率較去年略為減少。。

與去年腸病毒監測資料比對顯示(圖一)，今年有二波流行疫情，一波在年初延續去年底冬天疫情，另一為夏季流行疫情，今年夏季與去年同期比較，流行疫情與去年略有增加，平均每週陽性件數約為 30-40 件；病毒株與病毒型別分析，在今年年初疑似呼吸道感染病例主要以流感病毒為主，，病毒以 pandemic H1N1 為主，其次為 INFAH3 (圖二)。

與去年腸病毒監測資料比對顯示(圖三)，去年腸病毒在社區感染病例屬低度流行，今年腸病毒陽性件數從第 15 週開始逐漸增加到第 28 週時達最高峰，最高每週陽性件數約為 60 件，之後逐週遞減至第 38 週時才又出現些微的腸病毒陽性個案增加，後續陽性病例數遞減，約為最高峰期的一半約為 30 件(圖四)；病毒型別分析，今年腸病毒延續去年仍以克沙奇 A 為主，另 EV71 今年檢出病毒數較去年明顯增多，自第 3 週開始出現散發之 EV71 病例，21 週後每周病例數亦明顯增多，且分布全國各區(圖四)。

2. 我國流行病毒株收集與材料保存

今年截至 43 週為止，各合約實驗室共收集檢體數為 8,482 件，呼吸道病毒 5,260 中檢出流感病毒 1,697 件(32.26%)，回收件數為 1,651 件；生物材料科針對回收之陽性病毒株，培養確認入庫保存件數為 630 件，其中檢出腺病毒 368 件(7%)，其他類病毒共檢出 439 件(8.4%)，包含單純皰疹病毒、副流感病毒、呼吸道融合病毒、巨細胞病毒、人類間質肺炎病毒等；腸病毒收案數為 3,222 件，檢出腸病毒 1,090 件(33.8%)，回收件數為 1,042 件，生材科經培養確認後入庫保存件數為 654 件(表一)。

3. 實驗室品質管制

合約實驗室檢驗品質要求，透過要求各實驗室之品質計畫、檢驗品質管控、人員教育訓練、內部與外部能力試驗，提升實驗室檢驗品質與病原監測之穩定性。另外，為使監測病毒株流行疫情訊息上傳即時性，透過規定收案資料與檢驗結果上傳系統，及於時效內將陽性病毒株送回本署培養確認，與進行病毒基因分析，以維持監測資料完整與保存病毒株穩定。

（1）各合約實驗室檢驗時效統計由檢體收件日期起算至檢驗結果登打止，統計至今年 10 月底於 14 個工作天內完成檢驗的比例為 99.2%，超過 30 天才登打

檢驗結果的有 13 件(台大、中榮、彰基各 1 件及林口長庚 2 件與高醫 8 件)，於 22-30 天登打檢驗結果有 5 件(中榮 1 件及高醫 5 件)，於 15-21 天登打檢驗結果有 10 件(中榮 1 件及成大、高醫各 2 件與彰基 5 件) (表四)。與各合約實驗室檢討病毒檢測結果致登打時間延遲主要原因為，部分檢體病毒株培養速度較慢無法在 14 天內以 IFA 染色判讀，或病毒 CPE 不明顯需要再繼代培養，或病毒株型別無法確認等因素。

（2）由各合約實驗室送回病毒株至本署生物材料科確認之回收時效部分，14 天內送回的比例為 99.8%，15-24 天內送回的比例為 0.28%，超過 21 日送回的比例為 0.14%(表五)。分析延遲寄送原因，部分因連續假日或人員疏忽遺漏，因此，本署已透過定期於時效接近時，通知各實驗檢體收案天數、資料上傳或回送病毒株天數提醒。

（3）為維持病毒合約實驗室之腸病毒檢測能力，本署每年定期寄送能力試驗測試樣本予之實驗室進行能力品質評估。今(2019)年於 5 月 27 日寄出腸病毒分離鑑定及 EV-A71 RT-PCR 能力試驗樣本檢體，各院於收件後 15 日內回覆測試結果。至 2019 年 6 月 13 日止，共 14 家，合約實驗室及腸病毒認可均參加本次測驗，測試包括病毒分離培養定、敏感性測試，及 EV71 RT-PCR 測試，結果皆合格(表六)；呼吸道盲樣病毒測試將於 11 月份進行。

（4）除病毒株之盲樣能力測試外，本計畫更注重要求各實驗室檢驗品質，以維持病毒監測之穩定性；品質要求包括品質計畫、檢驗品質管控、人員教育訓練、內部與外部能力試驗。今年度病毒合約實驗室實地查核作業安排於 10-11 月間進行 (圖五)，透過查核過程了解今年收案狀態、合約實驗室與定點收案點醫師之互動聯繫，各轄區收案點分布狀況，討論及提供意見以提升收案意願與採樣之均勻度。今年度亦安排各區管中心協助加強布點與收案，期間拜會東區區管制中心，協請該中心增加花東地區採檢點，查核時並邀請南區、高屏區及東區區

管中心業務相關同仁陪同，一併前往了解實際狀況並積極參與討論，提供經驗分享及協助等。於腸病毒疫情流行期間，區管中心亦加入協助新增收案布點聯繫與溝通。今年查核 8 家病毒合約實驗室皆符合規定(表七)。

（5）結果錯誤情形：本年度台大、林長、中榮及成大各 1 件，彰基、高醫 2 件；原因經分析以人員謄寫及鍵入資料錯誤比率佔多數，已要求各實驗室檢討並加強人員訓練；其他分述如下：(1)高醫有 1 件狀況係為病毒培養 IFA 染色型別鑑定結果研判錯誤，將 EV71 判讀為 CA16(共有 7 例)，除要求該實驗室將本年所有檢出 CA16(24 件)之檢體重新進行培養重新鑑定外，並對操作實驗室技術人員加強能力試驗訓練，以及填復異常處理報告(原因應為病毒螢光染色時 CPE(細胞病變)價數有關，或螢光判讀標準不一致所致)，本署亦於 11 月 1 日派人至該實驗室了解並予以技術指導。(2) 林口長庚病毒株汙染狀況，內部檢討應為將繼代細胞分管時所造成的汙染，已檢討改善。(3)中榮 1 件培養結果與本署定序資料不一致，經討論係人員操作錯誤所致；以上錯誤問題均要求進行人員強化訓練，發報告流程檢討及改善。(表八)

4. 回收合約實驗室培養陰性之剩餘檢體，進行腸病毒分型分生檢測

為了解合約實驗室培養陰性的原因，同時了解病毒株是否有變化，因此從培養陰性檢體抽樣送回本署分析。

（1）1-8 月由社區監測陰性檢體共回收 434 件，其中為疑似腸病毒感染培養陰性檢體 235 件，疑似呼吸道病毒感染培養陰性檢體 199 件(表九)。

（2）於八家合約實驗室 434 件檢體中，抽樣進行 EV RT-snPCR 檢驗共 336 件，平均每家合約實驗室抽驗 42 件，檢驗結果合計有 93 件為陽性，有 243 件為陰性，平均陽性率為 27.7%，回收陰性檢體中檢出陽性率最高的為高醫大 40%，最低的為台大醫院 2.3% (表十)。

（3）進一步分析 2019 年 1-8 月回收疑似腸病毒感染培養陰性檢體 EV RT-snPCR 的結果：自合約實驗室回收今年 1-8 月培養陰性檢體共 434 件(235 件腸道陰性檢體及 199 件呼吸道陰性檢體)；在 1-8 月 235 件腸道陰性檢體中，總共檢驗 192 件與未檢驗 43 筆資料，其中 90 件腸病毒檢驗結果為陽性，其型別包括 CA6(57 件) 、EV71(10 件)、CA10(6 件) 、CA2(4 件)、CA16(4 件) 、CA5(3 件) 、CA9(3 件)、CA4(1 件)、CB4(1 件)、與 ECHO9(1 件)，102 件檢驗檢體為陰性 (表十一、圖六)；回收疑似呼吸道陰性檢體 EV RT-snPCR 結果：在 199 件呼吸道陰性檢體中，總計檢驗 144 件檢體，尚未檢驗 55 件，其陰性結果為 141 件，陽性檢驗結果共 3 件腸病毒陽性，其型別分別為 EV71(1 件)、EV-D68 (1 件)及 CA9(1 件)(圖七)。

四、結論與建議

1. 在社區採檢點分布方面，新增採檢點的考量依據係依地理分布及涵蓋人口數為重要指標，目前院外定醫診所配合委託合約醫院之採檢點有分布不均，採檢送驗數差距等狀況，導致各區域監測品質受到影響。對於送驗數較少的點，除要求合約實驗室不定期聯繫關切外更可主動回饋疫情流行資訊或前往拜會提供協助資源；針對配合意願較差的採檢點，應於該區再尋找其他意願較高的採檢院，以期增加監測數；至採檢點分布合理性方面，仍將依本署整體防疫需求考量進行規劃；並依據 2016 年「因應腸病毒疫情擴充病毒合約實驗室採檢點分佈」會議及 2019 年 11 月 13 日「病毒感染症合約實驗室採檢點分布與收案規則」研商會議決議，請本署區管制中心加強督導轄區衛生局協助開發不穩定或尚未有採檢點之區域，穩定採檢點送件頻率。

   本署亦視行政需要亦可協助發函予醫院端要求內部配合作業，除縮短回饋檢驗結果於採檢院所外，平常亦會適時詢問及問候並解決疑問，目前全國已約有 156 家醫療院所加入採檢行列。此外，若有部分合約實驗室會於收案檢驗進行

培養鑑定時，同步執行病毒分生檢測，因此可以提早回饋給定點收案醫師，以提高醫師收案意願。

2. 對於檢體回收時效及檢驗時效部分：要求醫療院所檢體採檢後將即刻通知病毒合約實驗室收件或請快遞傳送，若無法及時送往病毒合約實驗室時，應將檢體保存在 2~8℃冰箱，寄送時則須冷藏置放於檢體傳送桶中遞送。爾後，請合約實驗室同仁定期追蹤各定醫是否有應送未送之檢體以確保檢體品質。

3. 今年辦理之實地查核作業，八家病毒合約實驗室均符合規範，主要效益如下：

（1）針對加強定醫採檢點分布區域與收案狀況討論可改善方案，將可提升未來監測分布。

（2）針對今年 CA6 部分病毒株不易培養狀況討論，主持人研究發現為今年不易培養之 CA6 病毒株與往年病毒株比較有出現序列有些微變異所致，將請計畫主持人於病毒合約實驗室會議時分享。

（3）已提供合約實驗室配合評估 EV RT-snPCR 試劑套組，未來將繼續收案與目前培養方法一起分析後回饋相關資料，以評估後續納入合約事宜。

（4）11/28-29 拜會東區管制中心，針對花東地區增加定醫採檢點分布區域與收案狀況進行改善方案討論，區管中心將與花蓮與台東衛生局聯繫研商布點，未來將可協助提升監測分布及量能；中區、南區及高屏區管制中心亦派人陪同出席轄區病毒合約實驗室訪查會議，會中就增加採檢點方面提供實質協助。

（5）針對高醫 EV71 病毒錯誤判斷為 CA16 病毒狀況進行討論，原因應為 EV71 與 CA16 螢光染色抗體所使用 2 種螢光抗體重疊，容易造成研判錯誤所致，以及螢光染色時 CPE(細胞病變)價數有關及螢光判讀標準不一致所致，以建議加強人員訓練並給予技術方面指導及平時教育訓練與測試。

（6）對於合約實驗室目前使用之病毒培養之細胞株，細胞繼代數建議勿超過 20 代。

4. 192 件腸道陰性檢體中共 90 件檢出腸病毒陽性，陽性率為 46.9%，其中以 CA6

(57 件)佔 29.7%為最多，EV-A71 (10 件)佔 5.2%次之，再其次為 CA10(6 件)佔 3.1%，另外亦偵測到少量 EV-A71 (3 件)及其他腸病毒型別。另 144 件呼吸道陰性檢體中，只有 3 件檢出腸病毒陽性，包括 EV-A71 (1 件)、EV-D68 (1 件)及 CA9(1 件)，陽性率僅 0.7%，而今年僅於年初(1-2 月)社區監測偵測到 EV-D68 病例，其為 EV-D68 (A2)型別，但在之後並未偵測到，推測可能為今年未流行 EV-D68 型別。

5. 腸道陰性檢體中腸病毒檢出陽性率達 46.9%，而所有陰性檢體平均腸病毒陽性率為 27.7%，顯示部分腸病毒型別無 IFA 抗體或無法以培養方法分離，此外分生檢測方法的靈敏度亦較培養靈敏度高。目前病毒培養陰性樣本測試顯示 EV RT-snPCR 為相當靈敏的檢測方法，可以增進社區監測之敏感性並提高陽性率。本年份培養陰性結果之檢體回收以分生檢測，亦可提供有部分特定型別病毒株再社區流行的狀況，顯示目前細胞培養鑑定方式仍會有限制性。將納入整體評估合約實驗室監測的目的與疫情評估的應用。

五、參考文獻

1. Jian, J. W. et al. Genetic analysis and evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004-2005 and 2006-2007 epidemics. Virus Res 131, 243-249, doi:10.1016/j.virusres.2007.09.014 (2008).
2. Huang, Y. P. et al. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. Virus Res 137, 206-212, doi:10.1016/j.virusres.2008.07.015 (2008).
3. Huang, Y.-P. et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. Virology journal 7, 277-277, doi:10.1186/1743-422X-7-277 (2010).

六、圖表

表一、2019 年合約實驗室收案病例與病毒培養分析表

送驗疾病	送驗件數	病毒類別	總分離數	疾管署收件數	生材科培養件數
呼吸道病感染	5260	流感	1697(32.26%)	1651	630
		腺病毒	368(7.00%)	357	N
		其他	439(8.35%)	431	N
腸病毒感染	3222	腸病毒	1090(33.83%)	1042	654
總計	8482		3594	3481	1284

其它病毒：HSV1、PARAINF、RSV、CMV、Metapneumovirus。
(資料統計區間 1-43 週，N 表示未培養僅保存)

表二、2018 年與 2019 年同期(1-43 週)各區呼吸道病毒收案與培養檢出比較表

收件年	2018			2019		
區域	送驗數	陽性數	陽性率(%)	送驗數	陽性數	陽性率(%)
北區	2343	824	35.17	1880	771	41.01
中區	1548	708	45.74	1476	790	53.52
南區	1894	823	43.45	1450	714	49.24
東區	413	166	40.19	454	229	50.44
總計	6198	2521	40.67	5260	2504	47.60

表三、2018 年與 2019 年同期各區腸道病毒數量對照表(1-43 週)

收件年	2018			2019		
區域	送驗數	陽性數	陽性率(%)	送驗數	陽性數	陽性率(%)
北區	1553	478	30.78	1375	420	30.55
中區	334	181	54.19	634	270	42.59
南區	414	171	41.30	752	257	34.18
東區	529	224	42.34	461	143	31.02
總計	2830	1054	37.24	3222	1090	33.83

表四、合約實驗室收件與檢驗結果時效分析統計

合約實驗室	1-14天		15-21天		22-30天		>30天		總計
	N	%	N	%	N	%	N	%	
台大	276	99.64	-	-	-	-	1	0.36	277
三總	449	100	-	-	-	-	-	-	449
林口長庚	430	99.54	-	-	-	-	2	0.46	432
中榮	534	99.44	1	0.19	1	0.19	1	0.19	537
彰基	623	99.05	5	0.79	-	-	1	0.16	629
成大	440	99.55	2	0.45	-	-	-	-	442
高醫	432	96.86	2	0.45	4	0.9	8	1.79	446
慈濟	382	100	-	-	-	-	-	-	382
總計	3566	99.22	10	0.28	5	0.14	13	0.36	3594

備註： 登錄時效14日件數依契約規範須完成95%以上

本統計表依工作日數製作(扣除周休二日、年假及國定假日)

表五、合約實驗室檢體寄回本署確認保存時效分析統計

合約實驗室	1-14天		15-21天		>21天		總計
	N	%	N	%	N	%	
台大	260	99.62	-	-	1	0.38	261
三總	413	99.04	4	0.96	-	-	417
林口長庚	432	100	-	-	-	-	432
中榮	515	100	-	-	-	-	515
彰基	627	100	-	-	-	-	627
成大	436	100	-	-	-	-	436
高醫	441	99.55	2	0.45	-	-	443
慈濟	378	100	-	-	-	-	378
總計	3502	99.80	6	0.28	1	0.14	3509

備註： 每二週應將全部陽性病毒株，併同檢體清單計回本署　　資料擷取日2019/1/1日 至2019/10/22日

本統計表依工作日數製作(扣除周休二日、年假及國定假日)

表六、腸病毒培養鑑定與核酸檢測能力試驗測試結果

醫療院所	分離與鑑定(60分)					(20分) 敏感性試驗 (CCID50/50uL)	EV-A71 RT-PCR(20分)	總分
	CV-B5	CV-A16	EV-A71	Echo11	Neg		(10^{-1}~10^{-8})	
(A)	1	3	3	1	*	$10^{-7.5}$	10^{-5}	100
(B)	2	2	2	6	*	$10^{-7.92}$	10^{-8}	100
(C)	4	4	4	4(A549)	*	$10^{-8.0}$	10^{-6}	100
(D)	2	5	2	2	*	$10^{-7.714}$	10^{-5}	100
(E)	2	3	2	7	*	$10^{-8.68}$	10^{-4}	100
(F)	3(Vero)	3(Vero/MRC5)	2(MRC5)	2	*	$10^{-7.88}$	10^{-4}	100
(G)	4(A549)	4	4	4	*	$10^{-9.09}$	10^{-4}	100
(H)	1	1	1	2	*	$10^{-7.76}$	10^{-5}(159/162) 10^{-6}(161/162)	100
(I)	2	6(MRC5)	3	3	*	$10^{-7.71}$	10^{-4}	100
(J)	4(GMK)	6(GMK)	3	3	*	$10^{-6.5}$	10^{-5}	98
(K)	2(A549)	6	2	3	*	$10^{-8.8}$	10^{-7}	100
(L)	8	7	2	7	*	10^{-8}	10^{-5}	100
(M)	4(A549)	4	4	4	*	$10^{-8.4}$	10^{-4}	100
(N)	3	2	3	2	*	$10^{-8.38}$	10^{-8}	100
(O)	2	3	2	2	*	$10^{-7.78}$	10^{-6}(159/162) 10^{-9}(CODEHOP)	100
(P)	3	3	3	3	*	$10^{-7.43}$	10^{-6}(159/162	100

[註] 1.在分離與鑑定部份，數字代表出現細胞病變收細胞做 IFA 之天數，主要以 RD 細胞株為主，若分離天數少於 RD 細胞株，則標示出分細胞株名稱。 2.*代表時間觀察終止未分離出病原體。 3.評分方式：病原分離與鑑定(陽/陰性及型別正確每題 12 分，共 60 分)、敏感性試驗(去極端值後平均值 10-7.56±1 log 滿分 20 分，誤差 1 log 扣 2 分)、EV-A71 RT-PCR(靈敏度達 10-4 以上滿分 20 分，每低 1 log 扣 4 分)

表七、2019 年病毒合約實驗室實地查核委員評分表

查核項目及配分	查核項目	台大	三總	林長	中榮	彰基	成大	高醫	慈濟
定醫檢體之收集與分佈	定醫檢體收件數佔總收件數之比率	V	V	V	V	V	V	V	V
	定醫分佈與責任區縣市比率	V	V	V	V	V	V	V	V
	單一定醫採檢件數比率	V	V	V	V	V	V	V	V
	單一定點分離率	V	V	V	V	V	V	V	V
設備與空間規劃	檢體檢驗動向及硬體設備	V	V	V	V	V	V	V	V
人員及訓練	檢驗人員之再教育/訓練及實務能力評估	V	V	V	V	V	V	V	V
病毒分離及鑑定	全年流感及腸病毒陽性分離率	V	V	V	V	V	V	V	V
	全年分離之病毒完成型別鑑定率	V	V	V	V	V	V	V	V
能力試驗	參加本署之能力試驗測試結果	V	V	V	V	V	V	V	V
	參加國際性之能力試驗（如CAP）測試結果	V	V	V	V	V	V	V	V
檢驗報告完整性	抽查三份檢驗報告並查核其內容完整性	V	V	V	V	V	V	V	V
內部品管	細胞株黴漿菌檢測	V	V	V	V	V	V	V	V
	細胞株定期進行感受性試驗	V	V	V	V	V	V	V	V
	細胞株定期繼代及使用紀錄	V	V	V	V	V	V	V	V
	病毒分離觀察及繼代紀錄	V	V	V	V	V	V	V	V
	螢光檢驗觀察記錄	V	V	V	V	V	V	V	V
	不符合事項及矯正預防措施	V	V	V	V	V	V	V	V
	上年訪查缺失及改善情形	V	V	V	V	V	V	V	V

表八、2019 年結果上傳登入錯誤情形分析

單位	情況	備註
台大	1 件(CA2-CA4)	key in 錯誤
林長	1 件(CA6-CA10)	謄寫錯誤
中榮	1 件(ECHO4-CB4)	人員操作錯誤所致
彰基	(1)19 件 untype (2)1(CB4-EV71)	(1)未分型前先 鍵入 untype (2)謄寫錯誤
成大	1 件(CA21-CA6)	謄寫錯誤
高醫	(1)24 件有 7 件(CA16-EV71) (2)1 件(ECHO4-CA21)	螢光染色時 CPE(細胞病變)價數有關及螢光判讀標準不一致所致

表九、2019 年 1-8 月回收陰性檢體進行 EV RT-snPCR 之件數統計表

月份	呼吸道病毒感染	腸道病毒感染	總計
1	56	23	79
2	47	28	75
3	26	21	47
4	26	24	50
5	13	30	43
6	9	39	48
7	10	30	40
8	12	40	52
總計	199	235	434

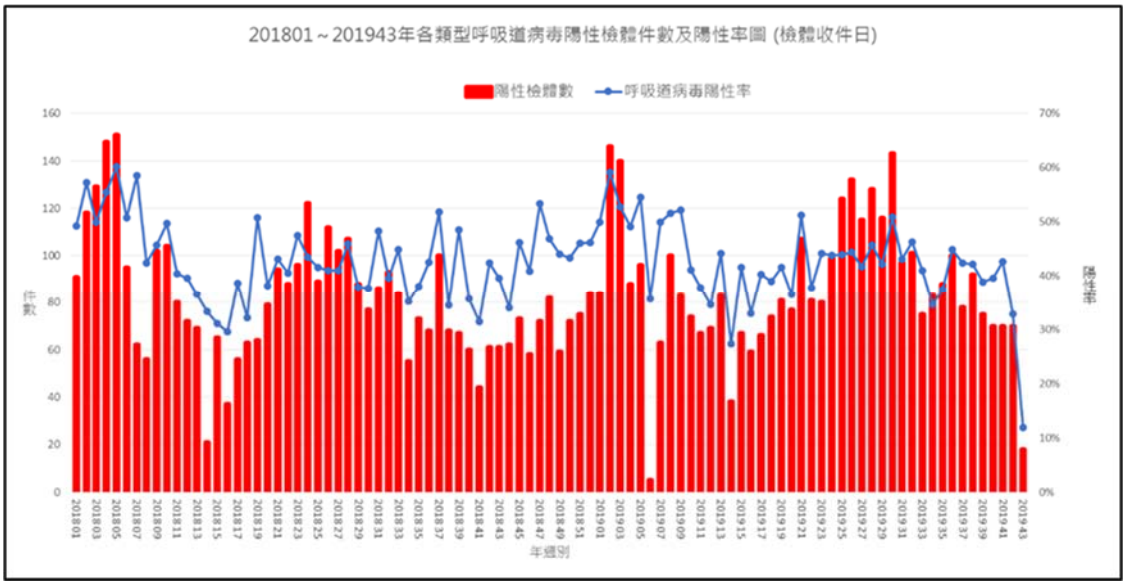
表十、2019 年 1-8 月由各合約實驗室回收之陰性檢體檢出腸病毒陽性件數表

合約實驗室	檢驗數	陽性數	陽性率
慈濟	42	16	38.1%
林口長庚	42	13	31.0%
彰基	42	14	33.3%
成大	42	10	23.8%
高醫	40	16	40.0%
三總	42	12	28.6%
中榮	42	11	26.2%
台大	44	1	2.3%
合計	336	93	27.7%

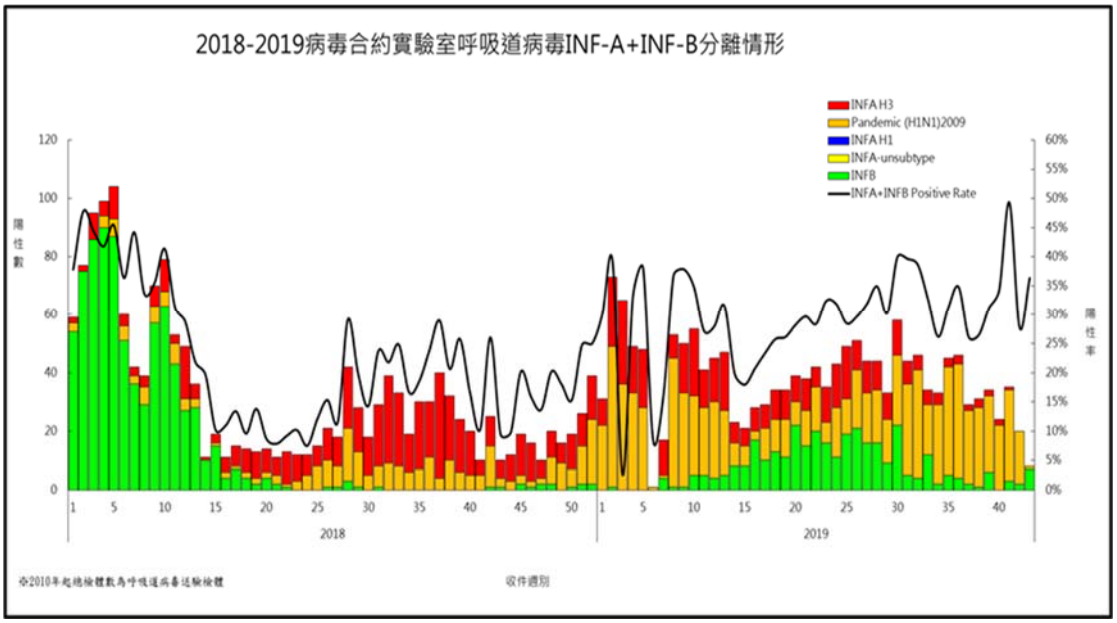
表十一、2019 年 1-8 月回收之陰性檢體檢出腸病毒型別統計分析表

合約實驗室	CV-A2	CV-A4	CV-A5	CV-A6	CV-A9	CV-A10	CV-A16	CV-B4	Echo E9	EV-D68	EV-71	陰性	總計
慈濟	0	0	1	8	0	0	3	0	0	0	4	26	42
林口長庚	2	0	0	6	3	0	0	1	0	1	0	29	42
彰基	0	0	1	11	0	1	0	0	0	0	1	28	42
成大	2	0	0	5	1	1	0	0	0	0	1	32	42
高醫	0	0	0	12	0	0	1	0	0	0	3	24	40
三總	0	1	0	7	0	1	0	0	1	0	2	30	42
中榮	0	0	1	7	0	3	0	0	0	0	0	31	42
台大	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	43	44
合計	4	1	3	57	4	6	4	1	1	1	11	243	336

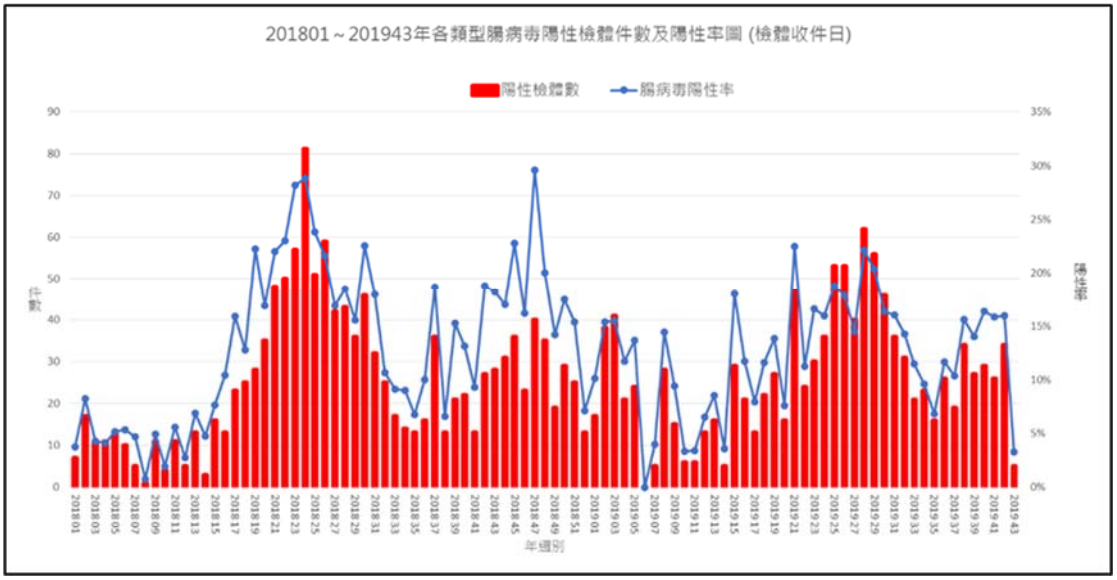
圖一、2018 至 2019 年 43 週呼吸道病毒社區監測趨勢圖



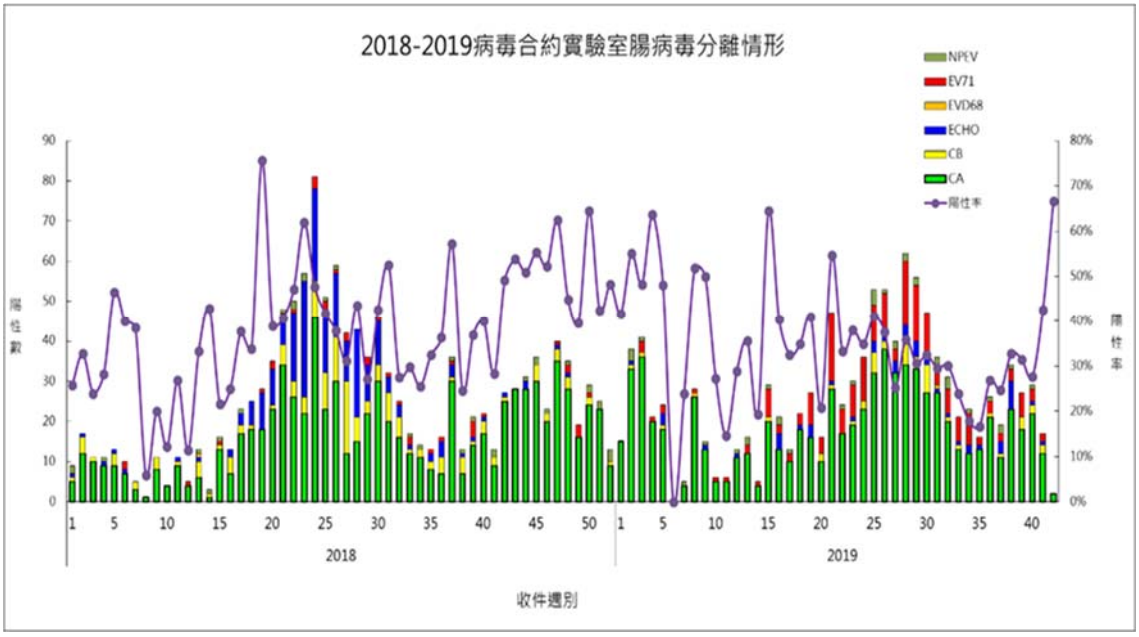
圖二、2018 至 2019 年 43 週社區監測流感病毒型別分布趨勢圖



圖三、2018 至 2019 年 43 週腸道病毒社區監測趨勢圖

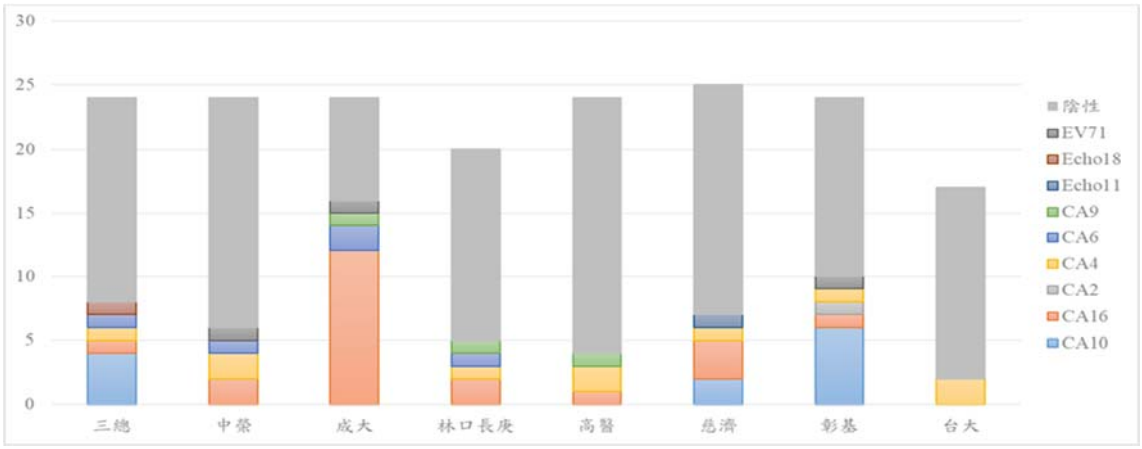


圖四、2018 至 2019 年 43 週社區監測腸病毒型別分布趨勢圖

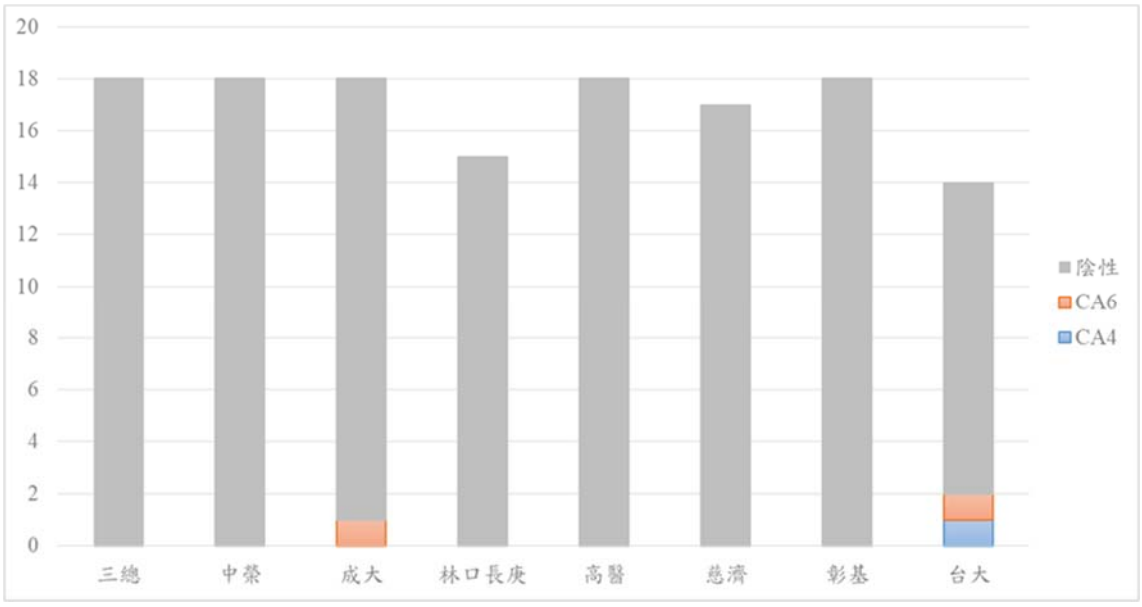


圖五

圖六、回收陰性檢體之疑似腸病毒感染檢出腸病毒型別比例圖



圖七、回收陰性檢體之疑似呼吸道病毒感染檢出腸病毒型別比例圖



衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-123504

計畫名稱：強化感染症合約實驗室社區主動檢驗監測防治網

計畫主持人: 吳芳姿科長

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正處頁碼
1	逐年變化的流行病學資料有參考價值。	謝謝委員支持	無
2	培養陰性檢體送回本署除做分生鑑定外，本署是否亦做培養?其結果如何?	本計畫設計定期抽樣合約實驗室培養檢測陰性檢體，主要目的在於輔助病毒培養受限於免疫螢光抗體型別僅可檢測主流病毒株之限制，並以分生定序檢驗提高檢測靈敏度；監測無法以病毒培養，但分生檢測可以驗出之腸病毒型別以免誤判疫情。	無
3			
4			
5			

備註:請將此表單附在期末報告後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，並務必至 GRB 系統完成資料抽換。