



2011年12月20日 第27卷 第24期

原著文章

快速偵檢肉毒桿菌毒素 之方法建立

魏俊傑、崔佩怡、徐榮華
洪耀文、唐嘯石、趙德江

國防醫學院預防醫學研究所

摘要

本研究發展免疫層析紙牒技術來檢測肉毒桿菌毒素 A 型，首先由抗肉毒桿菌毒素 A 型單株抗體中，挑選捕捉毒素能力最佳之單株抗體 150-3，固定於含孔洞之硝化纖維膜偵檢區，以檢測能力最佳之單株抗體 44.1A 與膠體金顆粒結合，將含有肉毒桿菌毒素 A 型檢體滴入此系統中，藉由毛細現象之作用力，此混合物會沿著含孔洞之硝化纖維膜向偵檢區前進，當檢體到達偵檢區後，固定於偵檢區之抗體會捕捉和免疫膠體金結合之毒素，而顯現出紅色膠體金沉積線。利用此法可偵測到約 50 ng/ml 毒素，且反應完成所需時間少於 10 分鐘。此外，利用相同的單株抗體配對，我們另外發展出磁珠酵素免疫分析法，其可在 30 分鐘左右偵測到 500 pg/ml 毒素，經測試後，這兩種方法皆具有良好之專一性與靈敏度。

關鍵字：免疫層析紙牒、肉毒桿菌毒素 A 型 (BoNT/A)、膠體金顆粒、單株抗體、磁珠酵素免疫分析法

前言

肉毒桿菌毒素最主要由梭狀芽苞菌屬 (*Clostridium* genus) 之 *Clostridium botulinum* 所產生，其廣泛存在於自然界，外形為桿狀細菌，可形成芽孢 (spore)，革蘭氏染色為陽性，需要厭氧的環境生長，具有 4-8 根鞭毛，運動遲緩，沒有莢膜，細菌溶解後產生劇烈之外毒素，即肉毒桿菌毒素。

肉毒桿菌毒素是一種神經毒素，而按照肉毒桿菌神經毒素 (*Clostridium botulinum* neurotoxin) 之血清抗原性來區分，共可分為 A 到 G 共七型血清型。除了人為蓄意所造成之中毒事件以外，最常引起肉毒中毒的原因為食品保存不當，造成食物污染產生肉毒桿菌毒素，而後經由誤食者之腸胃道黏膜吸收，引起全身性病變；或經由食入孢子污染之食物，肉毒桿菌孢子在腸胃道產生肉毒桿菌毒素，而造成肉毒中毒 (botulism)，而經由誤食肉毒桿菌孢子所造成之肉毒中毒，常見於嬰兒及老人，因其腸胃道之正常菌種缺乏，而無法與肉毒桿菌孢子競爭所致。現今發現，肉毒桿菌毒素之感染途徑除了經由上述之腸胃道吸收，也可經由污染之傷口等途徑造成感染 [1]。肉毒桿菌毒素現今被認為是

本期內容

原著文章

- 326 快速偵檢肉毒桿菌毒素之方法建立
333 2011 年花蓮縣某醫院精神科病房住民 H1N1 新型流感群聚事件

生安專欄

- 337 布氏桿菌檢驗人員之健康管理建議
339 中國大陸之實驗室生物安全認可制度簡介

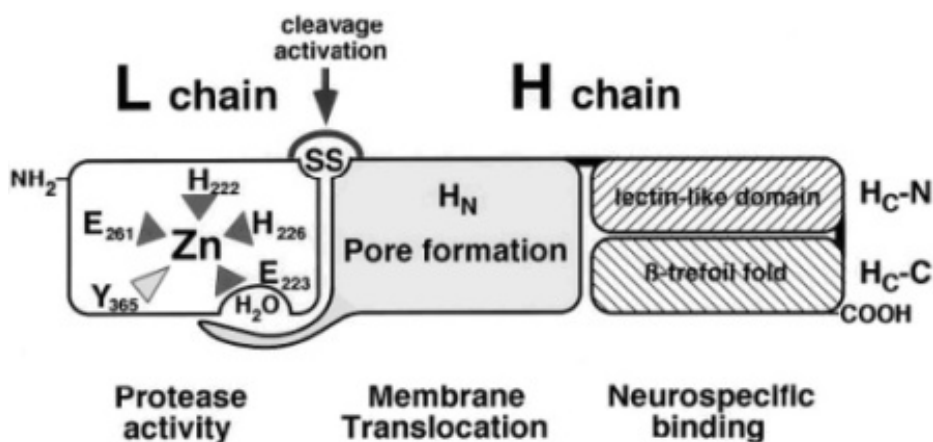
創刊日期：1984年12月15日
 出版機關：行政院衛生署疾病管制局
 發行人：張峰義
 總編輯：吳怡君
 執行編輯：吳麗琴、劉繡蘭
 電話：(02) 2395-9825
 地址：台北市中正區林森南路6號
 網址：<http://teb.cdc.gov.tw/>
 文獻引用：
 [Author].[Article title].Taiwan Epidemiol Bull
 2011;27:[inclusive page numbers].

自然界中生物毒性最高之物質，毒性是氰化物的百億倍，其對動物之半數致死劑量(LD50)少於0.3 ng/kg [2]，只需極少量之毒素就可導致人死亡。肉毒桿菌毒素最主要作用之部位為神經肌肉聯匯處，在臨床上產生之症狀為肌肉收縮無力，嚴重者常因無法自主呼吸而死亡；因具有極高之毒性，所以肉毒桿菌毒素最可能被應用為生物戰劑或恐怖行動的生化武器之一，近年來在動物模式及人類肺上皮細胞模式之研究，證實肉毒桿菌毒素可經由呼吸造成肉毒中毒 [3]，因此更增加肉毒桿菌毒素之危險性，所以建立一套快速、靈敏的肉毒桿菌毒素偵檢方法，來

維護民眾健康，一直是肉毒桿菌毒素研究的重點。

肉毒桿菌毒素之致病機轉

肉毒桿菌產生之肉毒桿菌毒素其實是由多種蛋白質所組成，稱之為肉毒桿菌毒素複合體 (botulinum neurotoxin complex)，此複合體包含一個肉毒桿菌神經毒素分子 (botulinum neurotoxin；BoNT)、一個非神經毒素非紅血球凝集素分子 (nontoxic non-hemagglutinin；NBP) 及多個分子量不同的紅血球凝集素 (hemagglutinin；HA) 分子。這些蛋白質分子靠著非共價鍵作組合成肉毒桿菌毒素複合體，因為 HA 與 NBP 以緊密的纏繞方式與 BoNT 結合，達到保護 BoNT 的目的，使 BoNT 在消化系統中避免遭受強酸、強鹼及蛋白酶之破壞 [4]。而 BoNT 則扮演著神經毒性作用最重要的角色。由基因序列發現，BoNT/A 原本為 150 kDa 之單一條肽鏈，經切割後，產生兩條肽鏈，其分別為分子量約 100 kDa 之重鏈 (heavy chain) 與分子量 50 kDa 之輕鏈 (light chain)，藉由雙硫鍵 (disulfide bond) 相連接 [5]；BoNT 具有三個功能基團 (domain) 分別負責毒素的不同之功能，如圖一所示。

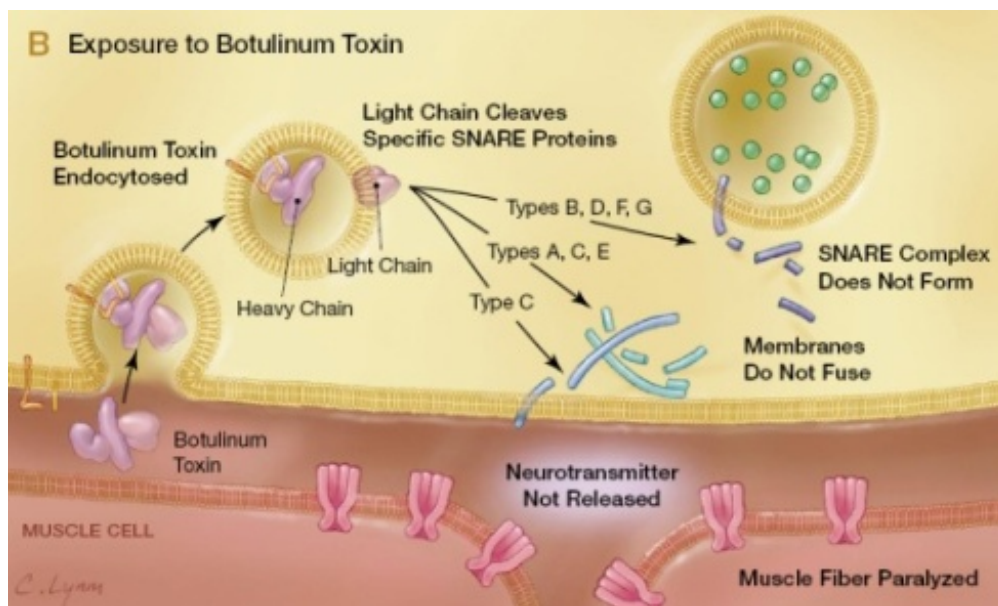


圖一、肉毒桿菌神經毒素分子 (Fig from Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological Reviews* 2000, 80: 717-767)

現今研究發現 100 kDa 之重鏈是負責與細胞結合的重要部份，經蛋白質刪除的實驗證明，只要有重鏈全長 50% 之重鏈 C 端就可與細胞結合，其與細胞結合的能力與全長之重鏈相同，將此片段對動物免疫，所產生之抗體具有中和 BoNT 及保護動物免於肉毒桿菌毒殺之功能 [6]。而重鏈 N 端是形成陽離子孔道的主要部位 [7]，並藉由此通道將 BoNT 輕鏈送入細胞質，現今發現此孔道還提供部份 chaperon 的功能 [8]，可恢復因酸性環境遭破壞之輕鏈功能，將其送入細胞質中產生作用。分析 BoNT 輕鏈胺基酸序列發現，輕鏈具有 HEXXH motif，具有金屬蛋白酶 (metalloprotease) 活性，例如 BoNT/A 輕鏈可切割 SNAP-25 [9]，而 SNAP-25 是形成 SNARE proteins 的重要分子，因為 BoNT/A 輕鏈的切割，使受破壞之 SNARE proteins 無法完成 vesicle membrane 與 presynaptic membrane 之融合，最後造成乙醯膽鹼分泌受阻，而產生肌肉收縮無力症狀，如圖二所示。

現有偵測肉毒桿菌神經毒素之方法簡介

雖然現今每一年發生 BoNT 中毒的案例並不多，但是它的毒性卻是非常強烈，症狀嚴重者將因呼吸麻痺而造成死亡，死亡率非常地高，因此 BoNT 已被列為生物戰劑與食品衛生等檢驗項目。同時近年來因台灣黑面琵鷺肉毒中毒事件，所以對於自然環境是否遭受 BoNT 污染之問題也備受重視。目前被廣泛接受的檢測肉毒桿菌毒素方法就是 mouse bioassay，因為此方法可針對具有生物活性之 BoNT 做檢測，靈敏度極高，可達到 5-10 pg/ml [10]，但 mouse bioassay 也有下列缺點，首先，此方法為 in vivo assay，需要犧牲大量小鼠，所以將引起動物倫理道德的問題爭議，並且此方法需要 3-5 天的時間來觀察動物存活狀況，無法即時反應出檢驗結果，除此之外，mouse bioassay 若要區分檢體中所含 BoNT 為何種血清型，則需以不同血清型毒素之抗體來進行毒素中和實驗，因此將犧牲更多的小鼠。由於 mouse bioassay 有上述缺點，因此另外發展可信、靈敏、快速的 BoNT 檢測方法就有其必要性。



圖二、肉毒桿菌神經毒素抑制乙醯膽鹼分泌之機轉 (Fig from Arnon SS, Schecchter R, Inglesby TV, et al. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management. JAMA 2001, 285: 1059-1070)

在此將現行檢測 BoNT/A 與 BoNT/B 方法之優劣大致列於下：Immuno-PCR assay [11] 偵測 BoNT 之靈敏度極限約為 1-20 pg/ml，比現行之 mouse bioassay 靈敏度更佳，完成檢測需花費 10 小時以上，但此方法如同 PCR 反應容易因操作過程污染而產生偽陽性結果，因此增加此方法之複雜性與困難性。Enzyme-linked coagulation assay [12] 之靈敏度極限小於 10 pg/ml，亦優於 mouse bioassay，但需花費 18 小時完成檢測，然而因使用 Russell's viper 蛇毒作為凝集因子，增加此方法之複雜性，並限制其普遍應用性。Time-resolved fluorescence assay [13] 是以 Lanthanide (Europium, Eu³⁺) 與抗體結合作為 tracer，靈敏度極限可達到 200 pg/ml。相同地以 electrochemiluminescence [14] 與抗體結合，進行肉毒檢測，其檢測之靈敏度可達 0.78-1.56 ng/ml，兩者花費的時間大約 2-2.5 小時。而傳統 ELISA 檢測 BoNT 之靈敏度極限約在 5 ng/ml 左右 [14]，所需時間約 4 小時。Enzyme assay 靈敏度約 3.5-5 pg/ml [15]，所需時間約 2-5 小時，此方法是針對 BoNT 輕鏈之金屬蛋白酶活性所設計，藉此來偵測 BoNT，因此能檢驗出檢體中是否有 BoNT 之活性，但也有受其它蛋白酶干擾之困擾。Ganglioside liposome immunoassay 主要是利用 BoNT 重鏈可與受體 ganglioside 結合之原理所發展的方法，可用肉眼判讀結果，靈敏度可達到 0.1 ng/ml [16]，若進一步利用儀器 (densitometry) 分析，其靈敏度可達到 15 pg/ml，整個流程所需時間少於 20 分鐘，因此具有快速、簡易、靈敏之優點，但此方法只適用於致病機轉具有 ganglioside 作為受體之毒素，例如霍亂毒素 (cholera toxin)、破傷風毒素 (tetanus toxin) 及 BoNT 等，因此限制了此方法之應用範圍。

膠體金免疫層析紙牒之簡介

常用於免疫層析紙牒的 report particle 包含帶有顏色之乳膠微粒、膠體炭及膠體金等。而膠體金是由金離子還原所產生的；另外一個有趣的現象是金在一般的情形下為黃色，但分散成奈米尺寸時，顏色會漸漸轉成紅色，主要是由於表面電漿共振 (surface plasma resonance) 效應所引起 [17]。實驗常用氯金酸 (HAuCl₄) 在還原劑作用下製作奈米尺寸膠體金，因還原作用，將原本帶正電之金離子還原成為不帶電之金原子，不帶電之金原子成為核種 (nuclei)，在核種上經過金原子凝集作用而形成奈米級之金顆粒 (gold particle)，此時溶液中殘餘之陰離子會將金顆粒表面包圍，而形成帶有負電荷之表層，由於靜電作用，使金顆粒彼此互相排斥而成為穩定的膠體狀態，故稱膠體金 [17]。粒徑大小不同之膠體金顆粒顏色亦不相同，最小的膠體金 (2~5 nm) 顆粒是橙黃色，中等大小的膠體金 (20~40 nm) 顆粒是酒紅色，較大顆粒的膠體金 (60~80 nm) 則是藍紫色。蛋白質與膠體金之結合，主要是藉由靜電吸附、厭水力、金硫鍵 (Au-S) 等作用，將蛋白質吸附到膠體金顆粒表面 [18]。與蛋白質結合之膠體金，必須有少量電解質存在來穩定此膠體金，但濃度不宜過高，因為高濃度鹽類與介面活性劑會剝去與膠體金結合之蛋白質，加入一定量的高分子物質可增加此膠體金之穩定性，例如膠體金溶液中加入 BSA、gelatin、PEG 或 casein 以增加其穩定性 [17]，除了增加穩定性之外，加入這類穩定劑可將膠體金未吸附蛋白質之部位阻斷，以避免被其他蛋白質佔據，來減少後續實驗之非特异性作用產生。

膠體金免疫層析法 (immunochromatography) 是結合抗原、抗體之專一性反應及層析原理所發展的分析方法，是近幾年來興起的一種診斷技術，此方法具有快速、簡易、方便等優點，其架構如圖三所示。

首先將特異性抗體先固定於 NC membrane 的某一端，此膜另一端吸附有與膠體金結合的特異性抗體（吸附在 conjugation pad），當樣本加入後，樣本中之抗原會與膠體金上特異性抗體結合，形成膠體金-抗體-抗原複合物，而後藉由毛细作用，樣品將沿著 NC membrane 向前移動，當移動至固定有抗體的區域時，樣品中的膠體金-抗體-抗原複合物將被固定之抗體捕捉，而使該區域顯示出膠體金的顏色，從而實現特異性的免疫診斷。

磁珠酵素免疫分析法之簡介

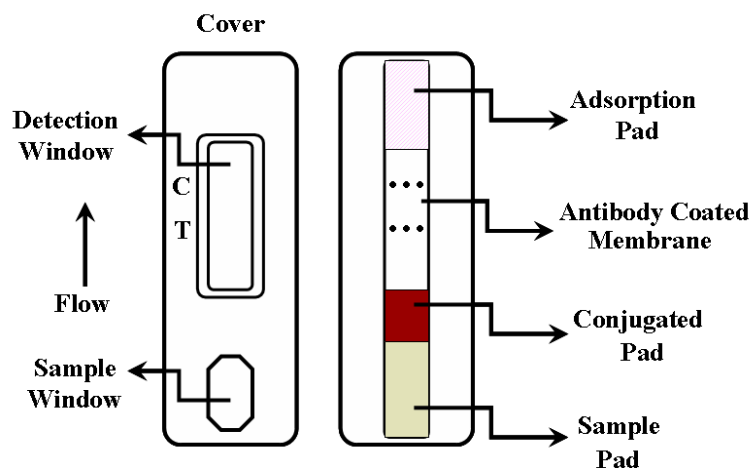
磁珠是小而圓的含氧化鐵成分之顆粒，其粒徑可為數個奈米到數百個微米，因磁珠之核心具有氧化鐵，因此當磁珠置於磁場中時會產生順磁效應之吸力(paramagnetic attraction)，而將珠體吸附到磁鐵上；正常珠體核心之氧化鐵部分約占珠體 50-60%，一般使用的磁珠，會利用有機聚合物將珠體核心包覆，例如：polyvinyl alcohol (PVA)，接著利用不同的修飾方法，修飾磁珠外殼之有機物聚合體，使其產生具不同功能鍵之磁珠，最常利用之商業產品就是卵蛋白(avidin) 包覆的磁珠，卵蛋白(avidin)與生物素(biotin) 機溶劑甚至變性質、核酸與細胞作用影響。

現今磁珠已被廣泛利用於蛋白、核酸與細胞等物質之分離 [19]，此外磁珠亦可用於免疫檢測，例如將磁珠應用於 *Clostridium perfringens* A 型腸毒素之檢測 [20]。

材料與方法

BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒的製作

將 goat anti-mouse 抗體與單株抗體 150-3 (for BoNT/A)以線形塗抹方式分別塗抹於具孔洞之硝化纖維膜 (porous NC membrane)上端上方與下方之 control 與 test 位置，置於室溫中乾燥一小時，使抗體充分固定於 porous NC membrane 上。將 porous NC membrane 置於含 1% (v/w) polyvinyl alcohol 之 20 mM Tris pH 7.4 之試劑中，於室溫浸泡 30 分鐘，之後將免疫層析紙牒置於清水中清洗一次，用微風使其乾燥，再將免疫層析紙牒置於 5% sucrose 充分浸溼，並用微風將其乾燥。接著取膠體金抗體探針 (44.1A anti-BoNT/A IgG coating colloidal gold probe) 讓 conjugation pad 吸附，用微風將其乾燥。將此 conjugation pad 接合到 porous NC membrane 上，並且在 porous NC membrane 上端加 absorption pad，而於 conjugation pad 端接合 sample pad，將完成後之紙牒儲藏於 4°C 中備用。



圖三、免疫層析紙牒之架構

結論

BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒

經由單株抗體之篩選，按照單株抗體特性，將捕捉 BoNT/A 能力最佳之抗體 150-3 固定於 porous NC membrane，而將偵測 BoNT/A 能力最佳之 44.1A 抗體與膠體金結合，建立膠體金免疫層析紙牒來檢測 BoNT/A。所研發之 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒靈敏度極限約為 50 ng/ml，經由交叉反應測試，我們所建立之 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒不會與 BoNT/B 及 BoNT/E 毒素產生交叉反應，因此我們所研發之 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒具有良好的特異性。再經由初步模擬檢體實際測試以體積比 1:1 稀釋之血清檢體，發現其對 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒靈敏度並無影響，因此我們所建立之 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒，已可應用於血清檢體之檢測。

BoNT/A 磁珠酵素免疫分析法

經由相同的抗體配對，將 150-3 單株抗體與 M270 磁珠以共價鍵結合，而後將檢測能力強之 44.1A 單株抗體與山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase; HRP) 結合，並藉由單株抗體上之山葵過氧化酶催化受質 (substrate) 產生呈色之作用，可在 450 nm 光源下測其吸光度，達到檢測 A 型肉毒桿菌

神經毒素抗原之目的，其架構如圖四所示。

此檢測方法之靈敏度極限約為 500 pg/ml，較膠體金免疫層析紙牒之靈敏度提高約 100 倍；相同地，經由交叉反應測試，我們所建立之 BoNT/A 磁珠酵素免疫分析法不會與 BoNT/B 及 BoNT/E 毒素產生交叉反應，並將其應用食物與臨床模擬檢體，其靈敏度極限並不會受檢體影響。

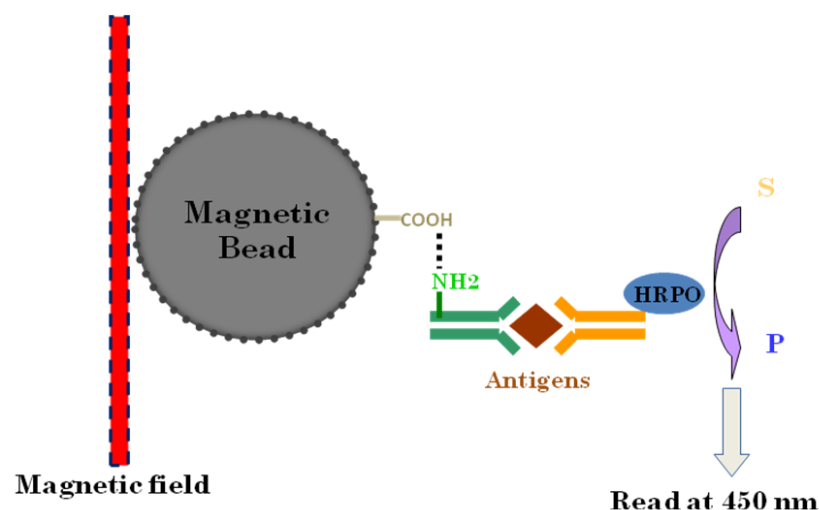
總體而言，我們所建立之 BoNT/A 膠體金免疫層析紙牒具有快速（只需 10 分鐘）、攜帶方便、經濟、實驗只需一步操作即可完成、操作者無需經驗、檢體需求量少（只需 50 ul 之檢體）、及肉眼觀察判讀不需使用昂貴儀器之優點；而 BoNT/A 磁珠酵素免疫分析法則具有快速（只需 30 分鐘）、靈敏、數據化、與自動化之潛力。因此這兩種方法皆可提供給第一線反應者或實驗室工作者，進行大量檢體之檢測與篩選，以滿足生物作戰、反恐、食物工業與環境監測等領域之需求。

誌謝

本研究承國防部經費補助，謹此致謝。

參考文獻

1. Dezfulian M, Bartlett JG. Kinetics of growth and toxigenicity of *Clostridium botulinum* in experimental wound botulism. *Infection and*



圖四、磁珠酵素免疫分析法之架構

- Immunity 1985;49:452-4.
2. Simpson LL. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. *Pharmacological Reviews* 1981;33: 155-88.
 3. Park JB, Simpson LL. Inhalation poisoning by botulinum toxin and inhalation vaccination with its heavy chain component. *Infection and Immunity* 2003;71:1147-53.
 4. Chen F, Kuziemko GM, Stevens RC. Biophysical characterization of the stability of the 150-kilodalton botulinum toxin, the nontoxin component and the 900- kilodalton botulinum toxin complex species. *Infection and Immunity* 1998;66:2420-5.
 5. Simpson LL. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2004;44:167-9.
 6. Clayton MA, Clayton JM, Brown DR, et al. Protective vaccination with a recombinant fragment of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 1995;63:2739-42.
 7. Shone CC, Hambleton P, Melling JA. 50-kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of *Clostridium botulinum* type A neurotoxin forms channels in lipid vesicle. *European Journal of Biochemistry* 1987;167:175-80.
 8. Koriazova LK, Montal M. Translocation of botulinum neuro- toxin light chain protease through the heavy chain channel. *Nature Structural Biology* 2003;10:13-8.
 9. Schiavo G, Ressetto O, Catsicas S, et al. Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *Journal of Biology and Chemistry* 1993;268:23784-7.
 10. Shone C, Wilton-Smith P, Appleton N, et al. Monoclonal antibody-based immunoassay for type A *Clostridium botulinum* toxin is comparable to the mouse assay. *Applied and Environmental Microbiology* 1985;50:63-7.
 11. Chao HY, Wang YC, Tang SS, et al. A high sensitive immuno-polymerase chain reaction assay for *Clostridium botulinum* neurotoxin type A. *Toxicon* 2004;43:27-34.
 12. Doellgast GJ, Triscott MX, Beard GA, et al. Sensitive enzyme-link immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1993;31:2402-9.
 13. Peruski AH, Johnson LH, Peruski LF. Jr. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *Journal of Immunological Methods* 2002;263:35-41.
 14. Guglielmo V, Attree O, Blamco V, et al. Comparison of electrochemiluminescence assay and ELISA for the detection of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. *Journal of Immunological Methods* 2005;301:164-72.
 15. Wictome W, Newton K, Jameson K, et al. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin

in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Applied and Environmental Microbiology* 1999;65:3787-92.

16. Ahn-Yoon S, Decory TR, Durst RA. Ganglioside-liposome immune- assay for the detection of botulinum toxin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004;378:68 -75.
17. Chandler J, Gurmin T, Robinson N. The place of gold on rapid tests. *In-Vitro Diagnostic Technology* 2000;6:37-49.
18. Chandler J, Robinson N, Whiting K. Handling false in gold rapid tests. *In-Vitro Diagnostic Technology* 2001;7:34-45.
19. Olsvik O, Popovic T, Skjerve E, et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 1994;1:43-54.
20. Cudjoe KS, Thorsen LI, Sorensen T, et al. Detection of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA. *International Journal of Food Microbiology* 1991;12:313-22.

2011年花蓮縣某醫院精神科病房住民H1N1新型流感群聚事件

王任鑫¹、吳俊賢¹、柯靜芬¹
李永盛²、孫效儒³、徐祥明⁴

- 1.衛生署疾病管制局第六分局
- 2.衛生署疾病管制局第四分局
- 3.衛生署玉里醫院
- 4.花蓮縣衛生局

摘要

2011年2月下旬花蓮縣某醫院通報其精神科病房，發生37名住民集體上呼吸道感染之事件，經採檢10名病例檢體，其中8例檢驗確定感染H1N1新型流感，由於疫情發生地點為人口密集機構，屬於H1N1新型流感所引發之院內感染群聚事件。本病房住民中有32% (37/117)出現上呼吸道感染症狀，另調查發現該病房之住民117人中，99.1%均已接種2010-2011年季節流感疫苗，卻仍出現集體感染H1N1新型流感，實屬於相當特殊之群聚事件。本案顯示人口密集機構之住民與工作人員雖為國內季節流感疫苗之優先接種對象，且有相當高之季節流感疫苗接種率，但在住民集中照顧之環境下，仍可能爆發H1N1新型流感群聚疫情。本案亦突顯出人口密集機構除需加強提升住民之疫苗接種率之外，另仍需加強疫情監視與通報、落實感染控制措施，並提升工作人員疫苗接種率，才能避免再次爆發類似之群聚疫情。

關鍵字：H1N1 新型流感、季節流感疫苗、群聚感染

前言

2009年4月墨西哥與美國西南部爆發H1N1新型流感疫情，疫情隨後迅速蔓延，世界衛生組織（WHO）於同年6月11日宣布H1N1新型流感疫情屬溫和大流行，所造成重症及死亡比率與一般季節性流感相當。因此，台灣於同年6月19日，將H1N1新型流感之傳染病分類自第一類修正為第四類，個案符合流感併發重症通報定義者才需通報，其防疫措施亦比照流感併發重症之處置。直至2010年8月10日，WHO宣布進入後流感大流行時期（post-pandemic period），並強調此新型流感病毒並未消失，而將以

季節流感之方式繼續傳播，仍會發生規模不同之局部疫情[1]。

為避免民眾因罹患流感導致嚴重併發症或死亡，衛生署疾病管制局針對老人、幼兒、衛生防疫人員，及人口密集機構之住民與工作人員等高風險族群，提供接種公費季節流感疫苗[2]。

2011 年 2 月下旬花蓮縣某醫院通報其精神科病房，發生 37 名住民集體上呼吸道感染之事件，經採檢 10 名病例檢體，其中 8 例檢驗確定感染 H1N1 新型流感，由於疫情發生地點係屬人口密集機構，故屬於 H1N1 新型流感所引發之院內感染群聚事件。因該病房 99.1% 住民都曾接種 2010-2011 年度季節流感疫苗，屬於較為特殊之案例。本報告描述此一特殊 H1N1 新型流感群聚疫情之發生經過及規模，並探討可能之發生原因。

病例定義

調查時間（2011 年 2 月 17 日至 25 日）內，於花蓮縣某醫院通報其精神科病房出現發燒（體溫 $>37.5^{\circ}\text{C}$ ）、全身痠痛及上呼吸道（包括咳嗽、有痰、鼻塞、流鼻水、喉嚨痛、聲音沙啞）症狀之一者，為本群聚事件之疑似病例；疑似病例經 real-time PCR 檢驗為 swine H1（swH1）陽性者則為確定病例。

疫情發生經過

2011 年 2 月 17-18 日，花蓮縣某醫院精神科病房 B 棟有 3 位住民陸續出現發燒、咳嗽、喉嚨痛情形，2 月 19 日 A 棟亦有住民出現咳嗽、流鼻水等症狀，另 B 棟亦持續有住民出現上呼吸道感染症狀。大多數病例僅有發燒、咳嗽或流鼻水等輕微症狀，並無出現危險症候，但為避免疫情擴大，院方於 2 月 20 日即採取相關疫情監測及感控措施，並將出現發燒等上呼吸道感染症狀之住民，提供外科口罩使用並集中隔離於 3 間病房。由於該院醫師診斷為上呼吸道感染，故對該些住民使用抗病毒藥物進行治療或預防性投藥。至 2 月 25 日為止，該病房共有 37 位住民出現發燒、咳嗽、喉嚨痛等症狀，故院方於 2 月 25 日通報為上呼吸道感染群聚事件（圖）。

調查結果及病例分析

本次發生群聚疫情之病房主要為收容精神疾病患者，該病房共有 117 床，收容男性住民 117 人。該病房分為 A、B 兩棟，兩棟住民之日常活動及用餐空間未有所區隔，並共用位於 B 棟之餐廳，使用 A、B 棟各有之浴室及廁所。

調查發現，在 2011 年 2 月 11 日至 15

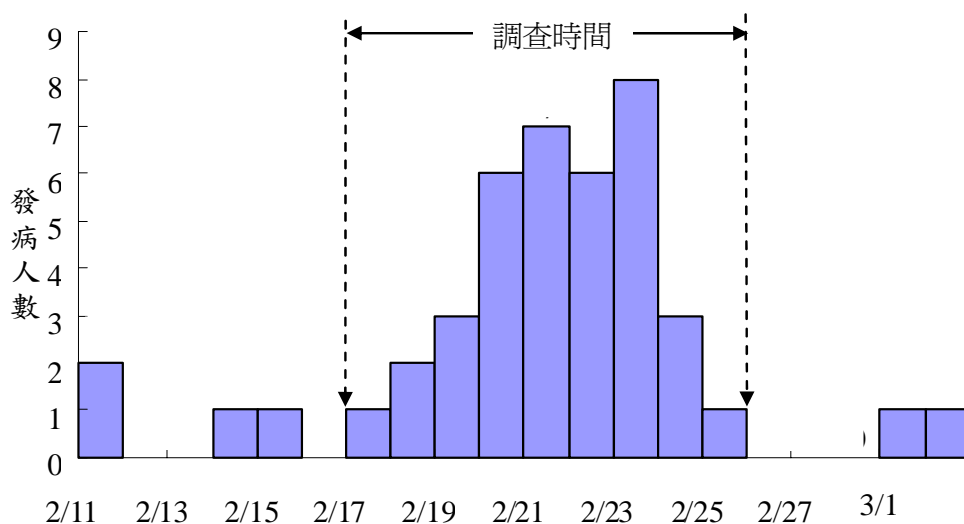


圖 花蓮縣某醫院精神科病房 H1N1 新型流感群聚事件流行曲線圖

日間即有 4 名工作人員（其中 3 名曾接種流感疫苗）出現上呼吸道感染之症狀，但皆未出現發燒之症狀。但在 2 月 17 日開始，住民陸續發病，累計至 2 月 25 日計 37 名病例，故院方於 2 月 25 日通報為上呼吸道感染群聚事件，當日亦採檢 10 例個案之咽喉拭子檢體，送至衛生署疾病管制局實驗室進行 real-time PCR swine H1 之檢驗，結果其中 8 件為 swH1 陽性，故確認 H1N1 新型流感病毒為該病房上呼吸道群聚感染之致病原。

另於 3 月 3 日該院再通報 3 月 1 日及 2 日分別有 1 名醫師及 1 名護士出現上呼吸道另共同症狀，依規定開給有症狀之人員治療性抗病毒藥劑（oseltamivir 75mg/1 cap Bid for 5 days）治療。

經調查，該病房 A、B 棟住民共 117 人，其中 116 人曾於 2010 年 10 月 19 日同日接種同一國外製造廠牌之季節流感疫苗。病房工作人員共有 19 人，包括照服員 8 人、護理人員 10 人及醫師 1 人，其中 12 人曾接種流感疫苗（該病房住民及工作人員預防接種情形如表）。

調查時間內共出現 37 例病例，其中病房 A 棟 17 例，B 棟 20 例。病例年齡介於為 24-70 歲（中位數年齡 49 歲），40 歲以下佔 5.4%、40-49 歲佔 45.9%、50-59 歲佔 35.1%、60 歲以上則為 13.5%，均為男性。本群聚事件侵襲率為 32%（37/117）。病例主要出現之症狀包括：發燒 100%（37/37，其中 17 人體溫超過 38°C）、咳嗽 43%（16/37）、流鼻水

24%（9/37），喉嚨痛、頭痛及腹瀉均為 3%（1/37）。

討論與建議

H1N1 新型流感主要傳染途徑為飛沫傳染與接觸傳染，病例在症狀出現之前 1 天到發病後 7 天均具有傳染性，但幼童、老人及免疫功能不佳之病人之可傳染期可能更久。由於本案精神科病房自 2 月 11 日至 15 日間，即發現有 4 名工作人員出現上呼吸道感染之症狀，惟因當時判斷其未符合類流感症狀，故未立刻採檢及通報，因此無法確認這 4 名工作人員是否感染 H1N1 新型流感，但以其發病時間，及與住民彼此密切接觸之工作環境來推論，仍然無法排除前述個案引起後續病房住民之上呼吸道群聚感染疫情之可能性。復以本群聚案雖遲於該病房主要疫情波段之末才進行群聚事件通報，惟院方於 2 月 20 日監測發現異常時，已開始著手隔離與配戴口罩等感控措施，仍有助阻斷第二波疫情之發生。

本案精神科病房，在 2 月 17-18 日間即有 3 名住民出現上呼吸道感染症狀，院方雖於 2 月 20 日即採取相關感染控制措施，惟未立即通報群聚疫情，直至感染人數持續增加至 30 餘人後才通報及採檢，顯示院方就本次疫情之因應及處理，後續仍有改進之空間，並採取更為積極之防治措施。另外本病房之住民 117 人中，雖有 99.1% 接種

表 花蓮縣某醫院精神科病房住民及工作人員預防接種與上呼吸道感染情形

	病房住民*	工作人員			合計
		醫師	護理人員	照服員	
接種季節流感疫苗	116 (36)	1 (0)	6 (0)	5 (0)	128 (36)
未接種季節流感疫苗	1 (1)	0 (0)	4 (0)	3 (0)	8 (1)
合計	117 (37)	1 (0)	10 (0)	8 (0)	136 (37)

註：1. * 住民於 2010 年 10 月 19 日接種同一廠牌之季節流感疫苗。

2. () 內表調查時間（2011/2/17-25）內出現上呼吸道症狀之住民。

2010-2011 年季節流感疫苗，但工作人員疫苗接種率僅 63.2%，有可能因其未具備充足保護力，而較易感染到 H1N1 新型流感病毒，並在照護住民時傳染出去，建議院方應提升季節流感疫苗之接種率。

由於每年流行之流感病毒株略有變異，因此，每年 2-3 月 WHO 會依據全球監測資料，預測該年度可能流行之病毒株，以建議當年北半球冬天的流感疫苗病毒株組成。2009 年全球 H1N1 新型流感疫情已經結束，WHO 建議將 H1N1 新型流感納入北半球 2010-2011 年流感季之疫苗病毒株。我國 2010-2011 年流感季使用之疫苗，即是依 WHO 每年對北半球建議更新之病毒株組成，該流感疫苗包含 3 種不活化流感病毒株，即 2 種 A 型 (H1N1 及 H3N2)、1 種 B 型 (A/California/7/2009 (H1N1)-like virus ; A/Perth/16/2009 (H3N2)-like virus ; B/Brisbane/60/2008-like virus) [2]。

本次疫情發生地點為人口密集機構，該機構之住民、工作人員及醫護人員，均為衛生署疾病管制局 2010 年公費季節流感疫苗之優先接種對象，該類機構之疫苗接種完成率普遍在 90% 以上。依據調查，該精神科病房 19 名工作人員中，12 名曾經接種 2010-2011 年季節流感疫苗；另病房 117 名住民中，其中 116 人曾在 2010 年 10 月 19 日接種同一廠牌、批號之季節流感疫苗，該病房相關人員之疫苗接種率高達 94%，應有足夠之群體免疫力。由於本次群聚疫情所分離之流感病毒抗原性，經檢測與疫苗株相似，亦顯示所感染之流感並未變異，病房住民所接種之季節流感疫苗仍具有保護效果。由於流感病毒是 RNA 病毒，而 RNA 病毒在複製遺傳物質之過程中缺乏良好偵錯的能力，使得流感病毒在複製過程中可能會產生突變，若因此在紅血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 及神經

胺酸酶 (neuraminidase, NA) 兩種抗原造成胺基酸之變化，稱為「抗原微變」 (antigen drift)。但「抗原微變」並不會改變病毒的亞型，是否可能因抗原之些微改變造成本次疫情發生，亦有探討之空間。依據文獻資料顯示，一般老年人接種流感疫苗之效果較差，但病房發病之住民中，僅有 3 人 (13.5%) 年齡超過 60 歲，又與前述資料不盡相符。另外本次疫情發生之時間，距離該病房住民接種季節流感疫苗時間已接近 4 個月，依時程推論，已接種之人員應已產生保護力，惟仍出現集體感染 H1N1 新型流感之狀況，是否與流感疫苗廠牌、保冷鏈或疫苗保護力下降等因素有關，值得進一步探討。

接種季節流感疫苗後，通常需 2 星期以上才會產生抗體，故在未產生抗體之期間仍有可能感染流感，一般認為，接種流感疫苗產生抗體之後，其保護時間應可持續 6 個月。根據國外研究，流感疫苗之保護力因年齡或身體狀況不同而異，平均約可達 30-80%，其對健康之成年人有 70-90% 的保護效果，對老年人則可減少 50-60% 罹患流感之嚴重性及其併發症等之住院，並可減少 80% 之死亡率 [3]。

依據 2009 年美國、加拿大、日本對於 H1N1 新型流感病例臨床症狀之研究資料顯示，87-94% 之病患會出現發燒，出現咳嗽之比例則為 59-92% 等症狀，另外有 39-60% 之病患則出現喉嚨痛之症狀 [4-5]。國內已發表對於新型流感病例之臨床症狀之分析則顯示，78.7-89.6% 的病例會出現發燒症狀，75.7-82% 有咳嗽症狀，其他約有 20-50% 之病例亦會出現喉嚨痛、流鼻水、頭痛及肌肉痠痛等症狀，低於 10% 之病例則會出現嘔吐、腹瀉等症狀 [6-8]。

雖然本次群聚疫情依檢驗結果推論致病原應為 H1N1 新型流感病毒，但病例中 13 例僅出現發燒而無其他症狀，另外病例出現臨床症狀如發燒（ $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ，46%）、咳嗽（43%）及流鼻水（24%）之比例，明顯較未接種疫苗之 H1N1 新型流感病例為低，症狀亦較為輕微，且無重症病例出現，是否與絕大多數病例曾接種流感疫苗有所關聯，尚待有更完整之資料，才能進一步探討。而依據衛生署疾病管制局之監視資料，截至 2011 年 4 月 8 日止，2010-2011 年流感季累計出現 1,751 例流感住院病例，其中 47 例曾接種本季流感疫苗；130 例死亡病例中，其中僅有 3 例曾接種本季流感疫苗，而死亡病例中有 94 例 H1N1，其中 2 例僅曾接種本季流感疫苗，顯示未接種疫苗者，罹患流感得到重症之風險明顯較高，亦可證明接種流感疫苗確實能避免發生重症及減少住院病例人數。目前大部分文獻研究資料仍顯示接種流感疫苗仍是最有效且安全之預防方法，因此，為了確保自身之健康及保護家人，高風險族群仍應依時程完成季節流感疫苗接種。

誌謝

感謝疾病管制局研究檢驗中心、花蓮縣衛生局及本案醫院感控單位協助，謹此誌謝。

參考文獻

1. WHO. H1N1 in post-pandemic period. Available at : http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/index.html.
2. 行政院衛生署疾病管制局. 99 年度流感疫苗接種計畫. 2010. Available at: <http://flu.cdc.gov.tw/public/Attachment/0>

81311193116.pdf.

3. 行政院衛生署疾病管制局. 流感防治網. 2010. Available at: <http://flu.cdc.gov.tw/mp.asp?mp=150>.
4. Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team. Emergence of a novel swineorigin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 2009;360:2605-15.
5. Shimada T, Gu Y, Kamiya H, et al: Epidemiology of influenza A (H1N1) virus infection in Japan, May - June 2009. *Eurosurveillance* 2009;14:1-3.
6. 謝明君，鄒宗珮，陳婉青等：台灣 H1N1 新型流感之因應暨最初 61 例確定病例之分析。《疫情報導》2009;25:501-9。
7. 謝怡然，李姿瑩，黃盈甄等：北部某醫學中心 144 例 H1N1 新型流感病例分析。《感染控制雜誌》2011;21:25-36。
8. 張上淳，胡婉妍，鄭舒倖等：台灣 H1N1 新型流感初期診斷 47 案例臨床資料分析。《感染控制雜誌》2009;19:247-50。

生安專欄

布氏桿菌檢驗人員之 健康管理建議

陳奕禎、吳文超、顏哲傑

衛生署疾病管制局第五組

布氏桿菌屬 (*Brucella* spp.) 為革蘭氏陰性桿菌，可引起人畜共通之布氏桿菌病 (Brucellosis)，主要感染牛、羊、豬、駱駝、狗等動物。人類為偶發宿主 (accidental

host)，一般民眾遭致感染之主要原因為接觸感染動物組織或食入受感染乳製品等。布氏桿菌屬於第三級危險群 (Risk group, RG) 微生物，對人類的侵襲率約 31%[1]，實驗室工作人員可經由吸入或沾染該病原體或含該病原體之氣膠 (aerosols) 而感染，是造成實驗室感染事件 (Laboratory-acquired infections) 最常見的致病菌[2]。

台灣首次出現人類感染布氏桿菌之報告病例始於 1978 年[3]，其原因為某大學獸醫研究所學生於實驗室操作時不慎感染。1979 年至 1981 年間，台灣有 14 處牧場之乳牛感染布氏桿菌，同時有 16 人因直接接觸牛隻或操作檢體而感染布氏桿菌，其中 9 人為實驗室工作人員。

2011 年 5 月至 7 月間，疾病管制局(以下簡稱本局)接連接獲 3 家醫院通報 3 例境外移入人類感染布氏桿菌陽性病例。鑑於國內已有 30 年未曾出現人類感染布氏桿菌之報告病例，大多數實驗室並未具備布氏桿菌之檢驗經驗。因此，為了解通報單位檢驗人員進行相關檢驗操作時之防護措施，經本局以問卷及電訪方式進行調查。結果發現僅有 1 家醫院直接將病患血液檢體轉送本局進行檢驗；而另外 2 家醫院之檢驗部門皆曾將陽性病例之檢體進行接種及培養，並分別於生物安全第二等級實驗室及第二等級負壓實驗室，進行培養物之菌種鑑定及核酸定序。

依據美國疾病控制及預防中心對於布氏桿菌屬培養物之操作，建議應於生物安全第三等級實驗室進行[4]。並且從事布氏桿菌檢驗及研究之工作人員(例如直接接觸、吸入或接種布氏桿菌者；於開放式工作台上操作布氏桿菌時，距離 5 呎以內者；可能產生具感染性氣膠過程中，身處實驗室者等)，列為感染布氏桿菌病之高危險群，尤其如發現可能暴露於感染源的環境時，應通報至相關主管機關，並建議對

其採取暴露後之預防措施 (post-exposure prophylaxis, PEP)，例如連續 21 天服用一定劑量之 Doxycycline 及 Rifampin，並於暴露日起 6 個月內定期進行血清學檢查、體溫及症狀等健康監測[5]。

本局為因應爾後可能有類似案件再度發生，茲參考國外相關建議及指引，訂定「實驗室人員操作布氏桿菌之風險評估及暴露後處置指引」[6]，並置於本局全球資訊網供各界卓參遵循，以加強國內實驗室人員於操作布氏桿菌時之安全防護認知，並確保其於暴露後可採取適當之預防措施及健康監測。此外，為維護實驗室操作人員之自身安全，臨床實驗室對於未知病原體 RG 等級之培養物，如需進行後續菌種鑑定或核酸定序等操作，建議能於生物安全第三等級實驗室中進行。如果沒有這樣防護等級的實驗室時，建議送到本局或具有該等級實驗室之設置單位進行確認，但應將培養物完整原封(不可挑菌分裝)外送，以維護實驗操作人員之安全。

參考文獻

1. Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, et al. *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. J Clin Microbiol 2000;38:2005-6.
2. Singh K. Laboratory-acquired infections. Clin Infect Dis 2009;49:142-7.
3. Lu YS, Lee YL, Lin DF, et al. Case study on human brucellosis of bovine-origin in Taiwan. Exp. Rep. TPRIAH 1994;30:127-34.
4. CDC. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5th ed., 2009;126-7.
5. CDC. Brucellosis. Available at: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/brucellosis_g.htm

6. 行政院衛生署疾病管制局：實驗室人員操作布氏桿菌之風險評估及暴露後處置指引。Available at: <http://www.cdc.gov.tw/ct.asp?xItem=29649&ctNode=1602&mp=1>

中國大陸之實驗室生物安全認可制度簡介

廖志恆

全國認證基金會實驗室認證處

隨著生物科技發展，以生物或動物性檢體為研究計畫的案件顯著增加，同時業間促使人員也越來越重視實驗室的相關安全。從 SARS 事件發生後，WHO[1]就曾警告各國，實驗室可能是 SARS 傳染的危險區域，同時建議各國注意實驗室生物安全措施之管理。

中國大陸就從 2003 年發生 SARS 事件後即由政府就生物安全實驗室建設與管理頒布一系列法律與規範。舉例說明，如 2004 年大陸國務院頒布 424 號令之病原微生物實驗室生物安全管理條例[2]，明訂國務院衛生主管部門主管與人體健康有關的實驗室及其實驗活動的生物安全監督工作。國務院獸醫主管部門則主管與動物有關的實驗室及其實驗活動的生物安全監督工作。並對使用的病原微生物建立分類管理、實驗室分級管理與生物安全標準做統一要求。而設置單位的實驗室與其主管部門應負責實驗室日常活動的管理，建立健全安全管理制度，檢查、維護實驗設施、設備，控制實驗室感染的職責。同時於該條例下第二十條也明訂生物安全第三等級與第四等級實驗室應施行國家認可制度，認可有效期為 5 年。

同年由中國合格評定國家認可委員會 (China National Accreditation Service for

Conformity Assessment, CNAS) 之前身中國國家實驗室認可委員會 (China National Accreditation Board for Laboratory, CNAL) 即著手組織與聯繫相關權責機構、學會、業界等，建立大陸實驗室生物安全國家標準-實驗室安全通用要求 (GB19489-2004) [3] 並公佈，同時配合病原微生物實驗室生物安全管理條例第二十條規定，草擬與建立實驗室生物安全國家認可體系。初期規劃之實驗室認可準則 (CNAL/AC 30;2005) [4] 包括兩部分：第一部分直接採用實驗室安全通用要求 (GB19489-2004) 內容，第二部分則引用大陸國務院頒布之病原微生物實驗室生物安全管理條例的部分規定。實驗室安全通用要求 (GB19489-2004) 主要是參考 WHO 實驗室生物安全手冊第三版[5]、ISO 15190:2003 醫學實驗室-安全要求[6]、美國 CDC 微生物及生物醫學實驗室生物安全手冊[7] 與加拿大衛生署實驗室生物安全指引[8] 等共同架構完成。

ISO 15190 是國際標準化組織 (International Organization for Standardization; ISO) 於 2003 年 11 月發佈 ISO 15190:2003 醫學實驗室-安全要求，對於實驗室建設、設施環境、人員運作、環境及管理與使用，明訂對應生物、化學、輻射等安全要求，內容多屬於醫學實驗室一般性安全要求，可適用於實驗室生物安全第一及二等級實驗室使用。

隨著生物安全管理的概念需與國際接軌，以符合生物安全與保全管理思維，CNAS 於 2007 年又著手從「風險評估」、「第一等級、第二等級生物安全實驗室」、「第三等級生物安全實驗室的類型」、「第四等級生物安全實驗室」、「生物安全實驗室的自動化控制要求」、「實驗室的生物安全管理體系」及「標準修訂」等方面進行實驗室安全通用要求 (GB19489-2004) 修訂檢討。並於 2008 年 12 月 26 日正式發佈新修訂之實驗室安全通

用要求 (GB19489-2008) [9], 同時也一併修訂實驗室生物安全認可準則 (CNAS-CL05:2009) [10]。2008 年版內容主要為配合實驗室活動差異, 增加個人一級防護與基礎防護設施不同實驗室之分類方式、增加實驗室對自動化系統控制要求、增加實驗室生物安全管理體系要求, 同時刪除內容重覆章節與危害程度分級。

有關實驗室生物安全管理概念導入, 是利用歐洲標準化協會 (European Committee for Standardization; CEN) 於 2008 年公告實驗室生物風險管理標準 (CWA 15793:2008) [11], 將組織運作過程之持續改善的管理思維, 結合實驗室生物安全制度之落實, 希望藉由機構或單位內的管理體系自我稽核與維持, 並藉由持續改善觀念, 落實生物安全的運作。由 CNAS 自我分析發現, 對現有實驗室生物安全事故分析, 有超過 90% 的事故是來自於管理問題所導致, 所以建立一套系統化的實驗室生物安全管理制度, 是確保實驗室生物安全運作不可缺少的手段。這也是過往所公告之實驗室安全通用要求 (GB19489-2004) 較沒有從體系的角度來說明與要求, 對於實際應用過程中, 這也是給實驗室帶來較大的挑戰。

CNAS 為中國大陸之執行實驗室生物安全認可體系執行單位, 2005 年 6 月第一家生物安全第三等級實驗室獲得認可, 截至 2010 年 10 月已有 26 家生物安全第三等級實驗室與 2 家生物安全第二等級實驗室獲得認可。

參考文獻

1. WHO, Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) in Singapore - update 2, SARS Case in Singapore linked to Accidental Laboratory Contamination, 24 September 2003. Available at: <http://www.who.int>

[/csr/don/2003_09_24/en/](http://csr/don/2003_09_24/en/)

2. 中華人民共和國國務院令: 第 424 號, 病原微生物實驗室生物安全管理條例。Available at: http://big5.gov.cn/gate/big5/www.gov.cn/xxgk/pub/govpublic/mrlm/200803/t20080328_31639.html.
3. 中華人民共和國國家標準: 實驗室安全通用要求 (GB19489-2004)。Available at: <http://www.cdc.gov.cn/Upload/Files/NewsAttaches/33410/%E5%AE%9E%E9%AA%8C%E5%AE%A4%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AE%89%E5%85%A8%E9%80%9A%E7%94%A8%E8%A6%81%E6%B1%82.-.200767145047.-.200768104348.-.20091218102757.pdf>.
4. 中國實驗室國家認可委員會 (China National Accreditation Board for Laboratories, CNAL): 實驗室生物安全認可準則 (CNAL/AC 30;2005)。Available at: <http://www.shanghaipasteur.cas.cn/jscz/swaq/gnwswwfg/200906/P020090630716899869519.pdf>.
5. WHO. Laboratory Biosafety Manual, 3rd ed. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety7.pdf>.
6. International Organization for Standard. ISO 15190 Medical Laboratory-Requirements for Safety, 2003.
7. U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in the Microbiological and Biomedical Laboratories 4th ed., 1999.
8. Canada Minister of Health. The Laboratory Biosafety Guideline, 3rd ed., 2001.
9. 中華人民共和國國家標準: 實驗室安全通用要求 (GB19489-2008)。Available at: <http://kjc.ahau.edu.cn/UploadFile/2010914171011189.pdf>.
10. 中國合格評定國家認可委員會 (China

National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS: 實驗室生物安全認可準則 (CNAS-CL-5: 2009)。
Available at: <http://www.cnas.org.cn/extra/col23/1246351600.pdf>.

11. European Committee for Standardization (CEN). Laboratory Biorisk Management Standard, CWA 15793; 2008 (E).
-