

計畫編號：MOHW110-CDC-C-315-124116

衛生福利部疾病管制署 110 年署內科技研究計畫

計畫名稱：
肺炎腦炎及不明原因傳染病之病原體分析研究

110 年 度 研 究 報 告

執行單位：疾病管制署

主持人：劉銘燦

協同主持人：慕蓉蓉

協同主持人：江春雪

協同主持人：楊季融

研究人員：林鈺棋

研究人員：林筠彤

研究人員：李孟珊

執行期間：110 年 1 月 1 日至 110 年 12 月 31 日

二、目錄：包括目次、圖次、表次、附錄。

頁數

封面

第 1 頁

目錄

第 2 頁

摘要

第 3 頁

本文

前言

第 5 頁

材料與方法

第 7 頁

結果

第 9 頁

討論

第 15 頁

結論與建議

第 17 頁

參考文獻

第 18 頁

圖、表

第 20 頁

三、摘要

關鍵詞：肺炎；腦炎；不明原因傳染病；病原體分析

近年來氣候變遷、環境過度開發及交通全球化，使得各種新興與再浮現傳染病病原體出現及傳播速度更勝以往，如何於疫情初期即時而正確地偵測未知病原體，釐清其傳播路徑及感染原，並整合各類社會、教育、醫療及衛生等資訊擬定適當防治策略，以針對疾病進行有效控制，已成為跨國公共衛生相關部門或研究領域熱切關注的議題。在各種新興/再浮現病原體常引起的症狀為肺炎與腦炎，如 Coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV2, avian influenza H5N1, H7N9, 2009 pandemic H1N1, 腸病毒 EV-D68。新興病原體出現之初，若只依賴臨床醫師的警覺性，依病患臨床症狀去推測可能病原及感染途徑，缺乏實驗室明確的檢驗證據，恐因病原體的未知而使引起社會大眾恐慌，無法即時且有效地遏阻疾病蔓延，而付出相當大的社會成本。因此，面對變化及傳播快速的傳染病病原體時，如何於短時間內運用有限的生物檢體，來尋找已知或未知的病原體，將是未來疫病防治成效的關鍵。為了監測新興/再浮現病原體，本計畫建立重症肺炎、腦炎與不明原因傳染病監測網絡、有系統化檢體收集與標準化實驗室病原體檢測流程，本監測網絡架構由法定傳染病通報系統，由全國各醫療院所與地方衛生人員通報，檢體送至台灣疾病管制署實驗室進行檢驗。病原體檢測流程為整合各種分子檢驗技術之優點以建立未知感染源研究檢驗平台，另加強病原體之收集及其基因序列資料之彙整分析，如此面對未知的新興傳染病時，除能快速偵測比對病原體、瞭解其可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考，經由本計畫可了解重症肺炎、腦炎與不明原因傳染病的病原體譜，提高公共衛生評估這些傳染病的能力，有效解決國內不明原因傳染病、發現新興病原體為目標，以強化防疫時效並且降低社會衝擊。

Abstract

Keywords: pneumonia; encephalitis; unknown infectious diseases; pathogen analysis

In recent years, climate change, over-exploitation of the environment and global transportation results in occurrence of emerging and re-emerging infectious diseases and the spread of these pathogens quicker than ever. It has become a great concern of international public health departments or research area to detect unknown pathogens instantly and accurately in the early epidemic, to clarify its original infection and propagation pathways and to integrate various social, educational, medical and health and other information to develop appropriate control strategies for effective control of the diseases. Some of emerging/re-emerging pathogens caused pneumonia or encephalitis, such as Coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV2, avian influenza H5N1, H7N9, 2009 pandemic H1N1, enterovirus EV-D68 et al. If the first appearance of these pathogens in human was found with only dependence on the alertness of clinicians, who deduce pathogens according to clinical symptoms of patients and presumably pathogen infection route, without clear laboratory test evidence, it will cause public panic because of unknown pathogens and be unable to effectively curb the spread of disease. It will take considerable social cost. Thus, in the face of rapid change and the spread of infectious disease pathogens, it plays a key role for disease prevention and control how to use effectively limited biological specimen to look for known or unknown pathogens in a short time. For the surveillance of emerging / re-emerging respiratory viruses, the present project intends to establish a systematic surveillance networks for pneumonia, encephalitis and unknown infectious diseases and to develop a standardized approach to specimen retrieval and laboratory testing. The surveillance system is based on the Notifiable Disease Surveillance System to monitor unexplained severe pneumonia, encephalitis and unknown infectious diseases. Staff of hospitals across the country and the local health personnel collect specimens and send them to the laboratory of Centers for Disease Control, Taiwan. The processes of pathogen detection integrate the advantages of the various techniques of molecular tests to establish a platform for unknown pathogens. In addition, the project strengthens the collection of pathogens and aggregates analysis of gene sequence data. When the unknown emerging infectious disease occurs in the future, it can be rapid detected and compared to understand the possible source of infection, disease trends and to benefit outbreak investigation, the data obtained serve as a future prevention policy development and related diseases research important reference. The project makes us understand the etiologic spectrum of severe pneumonia, encephalitis and unknown infectious diseases. The project will effectively address domestic unexplained infectious diseases, emerging pathogens and prevent infectious diseases in real-time to reduce the social impact.

四、本文

(1)前言：包括研究問題之背景與現況、研究目的等

由於全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交通日漸頻繁之際，各類未知/新興感染疾病的威脅日增。1997 年後 H5N1、2003 年 SARS、2012 年後中東地區與 2015 年韓國 MERS-CoV、2009 年 pandemic H1N1 及 2019 年 COVID-19，均為首先出現於社區之新興呼吸道病毒傳染病[1-4]，在經歷 2003 年 SARS 後，WHO 建議各國應建立不明原因肺炎與呼吸道群聚的監測，可提早偵測新興病原體出現，防止疾病蔓延，2009 年新型 H1N1 與 2015 年韓國 MERS-CoV 的爆發，顯示良好的監測及病原體診斷系統之重要性。我國法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，對傳染病流行狀況提供豐富及全面的資訊；疾病管制署檢驗中心針對各種法定傳染病之病原體，建立標準檢驗流程，並建立病原體基因資料庫，更增進對病原體的了解；然而，仍有許多感染症病患無法得到確切診斷與檢出病原體，為能及時偵測未知/新興感染症，需針對一般檢驗無法確定病原之感染症患者，應建立進一步檢驗流程，避免第一時間因無法確認病原體，造成新興病原體擴散。

急性呼吸道感染所引起的肺炎仍是全球公共衛生一大負擔，肺炎也是兒童發病和死亡的主要感染原因之一。在一回顧性文獻的研究報告在 2010 年，5 歲以下孩童約 1.2 億人次肺炎，其中 1 千 4 百萬人重症；在 2011 年約 130 萬人因肺炎導致死亡[5]。多種呼吸道病原體會導致肺炎，在兒童，呼吸道融合病毒(RSV)，鼻病毒(Rhinovirus)，人偏肺病毒(metapneumovirus)，博卡病毒(bocavirus)，副流感病毒(parainfluenza)是在已開發和開發中國家最常見引起肺炎的病原體 [6]。由於病原體檢測技術的快速發展，新的人類呼吸道病原體不斷被發現，如 human metapneumovirus, coronavirus SARS, NL63, HKU1 MERS, human bocavirus 等[1,2,7-11]。而發現這些病原體的方法除了傳統細胞培養、電子顯微鏡、consensus PCR 外，可同時偵測多種已知或未知病原體之病原體微陣列 (microarray)與高通量定序 (high throughput sequencing) 方法也逐漸被應用[11]。

目前我國已建立法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，對傳染病流行情形已提供豐富的資訊，但仍有許多病患無法找出病因，其中包含為數不少的腦炎病患。腦炎由於不具特異性，加上部分腦炎症狀之病程發展快速且可能產生神經後遺症，已成為臨床診斷及治療上一大難題，因此例行性監測腦炎，

除檢驗結果可提供醫師作為診斷及治療之參考，同時瞭解國內特有腦炎流行型態，更重要的是主動監測與日俱增的新興/再浮現傳染病可能藉由腦炎症狀現蹤 [12]，例如 1999 年馬來西亞出現的 Nipah virus 群聚疫情[13]以及 2010 年於非洲馬拉威發生的 Cyclovirus 疫情[14]，其致病原均從病患的血清或腦脊髓液檢出，顯示監測腦炎對於因應突發新興傳染病之重要性；此外，鑑於近年新興傳染病的威脅日益增加，各國已陸續針對腦炎病患進行大規模研究。以在英國進行 2 年研究為例，來自 24 間醫院的 203 例腦炎個案經過兩階段病毒學、分子生物學及免疫學相關檢驗後，其中有 42% 個案可找到感染性病因，包括 herpes simplex virus、varicella zoster virus 及 *Mycobacterium tuberculosis* 等，另有 21% 個案屬於免疫相關腦炎 [15]。此外法國在 2007 年間進行之全國性研究則發現，在 253 例個案中共有 52% 可找到感染性病因[16]，相較先前進行之大規模研究僅 16-30% 可找到感染性病因 [17]，顯示檢驗技術之進步，將有效減少不明原因感染之個案數，以達到有效監測之目的。

不明原因重症或快速死亡(unexplained critical illnesses and deaths of possible infectious etiology, UNEX)個案由於病情嚴重，且需在短時間內排除新興傳染病或生恐攻擊事件之威脅，因此 UNEX 對於公共衛生及傳染病防治上實為不可忽視的重點監測項目。美國疾病控制與預防中心於 1995-1998 年期間首次針對 UNEX 進行監測，在四個州內收集年齡介於 1 至 49 歲無潛在重大疾病且疑似感染症死亡之病患，藉由各種血清學、病毒學、分子生物學及病理學檢驗結果判定病因及評估其對於公共衛生之威脅。該研究在四年期間收集 137 名個案，其中以神經系統重症(29%)及呼吸道系統重症(26%)最多，其中有 28% 個案可經由各種檢驗方法找到確定或可能之致病原，包括 *Neisseria meningitidis*、*Bartonella henselae*、*Chlamydia pneumoniae* 等細菌，以及 influenza、enterovirus、Epstein-Barr virus 等病毒[18]。值得注意的是，美國於 1999 年發生 West Nile virus 腦炎群聚疫情亦由此系統通報並確診，顯示 UNEX 監測對於新興傳染病防治之重要性 [19]。目前美國 Arizona、Washington、Minnesota、California 等州均已將 UNEX 監測納入法定傳染病之方式持續進行。

近年來，新興呼吸道病原體的出現，如 SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 禽流感 H5N1, H7N9, 2009 新型流感 H1N1 等，世界衛生組織或新興病原體的發現者皆會公布基因序列，以便進行 real-time PCR 檢測方法的引子與探針序列的設計，說明 real-time PCR 檢測方法在新興病原體檢測的重要性。因 real-time PCR 在建立檢測上的便利性與

靈活性，當病原體突變時，也可即時更新引子與探針序列，維持高靈敏性。故本計畫採集檢體後的檢驗流程，將初步以 multiplex real-time PCR 方法進行已知一般例行檢驗、後續檢體進行病原體培養，multiplex real-time PCR 與培養陰性之個案檢體，將進行第二階段高通量基因定序(NGS)。期望在收集符合條件之臨床檢體後，適當串連各種檢驗技術之優點以建立未知感染源研究檢驗平台，未來面對新興傳染病時，能快速偵測比對病原體、瞭解其可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，還可獲取更多生物資訊以增進對該病原的瞭解及認識，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。

(2)材料與方法

1. 建立未知感染原監測網絡：本監測網絡架構在疾病管制署法定傳染病通報系統中，符合肺炎重症收案條件之個案，以其他(肺炎)經法定傳染病通報系統進行通報，並採集咽喉拭子、痰液、血清等檢體，進行檢驗，檢驗結果登錄法定傳染病通報系統，可即時回饋臨床端，提供醫治參考。如有不明原因群聚事件或死亡特殊個案，亦經本署防疫醫師評估個案，納入通報。

檢體來源與數目：醫院通報之不明原因重症肺炎與呼吸道群聚突發急性傳染病之檢體。預估每年不明原因重症肺炎 300-400 個案，腦炎 200-250 個案。

2. 肺炎重症收案條件--住院病患合併以下 3 個條件：

- (1) 體溫超過 38 度且通報時無確定診斷
- (2) 非院內感染：在社區或住院 48 小時內發病
- (3) 嚴重肺炎，符合下列 1 或 2

1. 急性呼吸窘迫症，定義如下：

(1) Acute onset with bilateral infiltrates consistent with pulmonary edema (within 48 hours)

(2) $PaO_2/FiO_2 \leq 200$ mmHg

(3) No clinical evidence for an elevated left atrial pressure (i.e. exclude heart failure related)

2 呼吸衰竭需呼吸器治療。

3. 不明原因腦炎收案條件--同時符合下列 4 項條件：

- (1) 急性發作（一個月之內）。

(2) 發燒超過 38°C。

(3) 出現精神功能惡化（如記憶衰退、行為反常及意識減退）、抽搐、局部神經症狀等任一項。

(4) 腦脊髓液之任一項檢驗異常者（超過正常參考值）。

4. 快速不明原因死亡--符合下列任一項條件：

住院 7 天內死亡，經檢驗或臨床醫師診斷，無法排除與感染症相關。

通報法定傳染病在案，檢驗結果陰性且無法臨床確診之特殊個案。

5. 病原體檢驗流程

multiplex real-time PCR/RT-PCR：針對引起肺炎可能病原體設計不同引子組合，能有效減省檢體用量，並縮短偵測時間。這些 real-time PCR/各 RT-PCR 方法的引子和探針序列有些來自文獻、經修飾優化或自行設計，可偵測病原體包括 A 型流感、B 型流感病毒 [20,21]、腺病毒 [22]、呼吸道融合病毒 [23]、冠狀病毒 (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS) [24-26]、人類偏肺病毒 (metapneumovirus) [27]、博卡病毒 (bocavirus) [24]、副流感病毒 1-4 型 (parainfluenza type 1-4) [23,24]、腸病毒 [23]、鼻病毒 [28]、人類單純皰疹病毒第 1, 2 型 [29]、巨細胞病毒 (CMV) [29]、退伍軍人菌 [30]、肺炎黴漿菌 [30] 等。

肺炎檢驗項目：包括 influenza A virus, influenza B virus, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinovirus, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type 1, 2, 3, 4, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS), human bocavirus, parvovirus, VZV, enterovirus, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* 24 種病原體。

Respiratory 2.1 plus Panel tests 檢驗試劑，此試劑可同時檢測 17 種病毒 (Adenovirus, Coronavirus 229E, HKU1, OC43, NL63, Mers-CoV, SARS-CoV-2, Human Metapneumovirus, Human Rhinovirus/Enterovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza type 1-4, RSV 及 4 種細菌 (*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*) 。

腦炎檢驗項目：包含 influenza A virus, influenza B virus、Human adenovirus、RSV、Coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1)、HSV1、HSV2、VZV、CMV、HHV6、Human metapneumovirus、parainfluenza type 1、2、3、4、Bocavirus、Polyomavirus (JC、BK、WU、KI)、Parvovirus、Enterovirus、Enterovirus D68、Human Parechovirus、Rhinovirus、Japanese Encephalitis virus、Dengue virus、West Nile virus、Chikungunya virus、*Toxoplasma*

gondii、*Mycoplasma pneumoniae*、Hendra virus、Nipavirus、*Acanthamoeba*、*Naegleria fowleri*、*Chlamydophila pneumoniae* 40 種病原體。

本計畫之檢驗結果，將以法傳通報系統回饋通報醫院，除提供醫師作為診斷及治療之參考，並配合臨床症狀及治療情形，以確認檢出病原與疾病之相關性。

實驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄與 real-time PCR 反應與結果分析。實驗步驟如下：驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄與 real-time PCR 反應與結果分析。實驗步驟如下：(1)反轉錄反應 (Takara Cat. #6110A)：利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science)進行樣品核酸萃取，取 5 μ L 萃取之核酸，利用隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後，置於冰上，再利用 PrimeScript RTase reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為先 30 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，再次 50 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘，最後 95 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘。(2) Real-time PCR 反應(LightCycler[®] 480 Probes Master)：20 μ L DNA 與 cDNA 產物與 1x LightCycler 480 Probes Master、200nM forward primer、200nM reverse primer 以及 100n M hydrolysis probe 混合。混合物以 LightCycler 480 系統(Roche Diagnostic)進行反應，反應條件如下：95 $^{\circ}$ C 10sec，接續 45 cycles 之反應(95 $^{\circ}$ C 10 sec、50 $^{\circ}$ C 30 sec、72 $^{\circ}$ C 1 sec)，最後 30 sec 降溫(cooling)至 40 $^{\circ}$ C。

2 高通量定序(high throughput sequencing)檢測系統：具有大規模 de novo 定序分析的強大能力，無需事先設計引子或探針，直接可對未知基因進行序列分析。對於未知感染源疫情之爆發，可即時偵測及鑑定。實驗步驟：本實驗方法分成兩部份，進行反轉錄反應，以及序列分析。(1)反轉錄反應 (Invitrogen)：取 10 ul 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸 (random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，置於冰上，再利用 transcriptor reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為 45 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘。合成之第一股 cDNA 續加入 DNA ligase、DNA polymerase 及 RNase H，16 $^{\circ}$ C 作用 2 小時完成第二股的合成(second strand synthesis)。(2)6~8 個完成第二股 cDNA 之檢體合併一起，純化後送高通量定序。(3)序列分析：分析完成之序列，先過濾與人類基因相符之序列，再比對 Genbank 資料庫。

檢驗流程

(3)結果

肺炎重症監測結果：

2021 年 1-11 月通報流感併發重症，檢驗流感病毒陰性 224 例，使用 Respiratory 2.1 *plus* Panel tests 進行檢驗，此試劑可同時檢測 17 種病毒 (Adenovirus, Coronavirus 229E, HKU1, OC43, NL63, Mers-CoV, SARS-CoV-2, Human Metapneumovirus, Human Rhinovirus/Enterovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza type 1-4, RSV 及 4 種細菌 (Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumonia)。224 例群通報流感併發重症，其中 18 例檢出呼吸道病原體，包括 8 例 Rhinovirus，4 例 parainfluenza type 3，5 例 Metapneumovirus，1 例 Adenovirus + Rhinovirus。

腦炎與快速不明原因死亡監測結果：

因應 COVID-19 疫情，暫緩通報。。

MERS-CoV 監測檢驗：

因應 2012 年起中東地區與 2015 年韓國曾爆發 MERS-CoV 疫情，加強通報與檢驗，2021 年 1-11 月臨床檢體共 1 例，結果皆為陰性。另為擴大監視，針對通報流感併發重症送驗之 224 名個案進行檢驗，結果皆為陰性。

呼吸道群聚常檢體監測：

2021 年 1-11 月 通報 38 件呼吸道群聚感染，總計採集 141 個檢體。檢測流程先使用 real-time RT-PCR 檢測 Influenza A, Influenza B, Adenovirus, RSV 4 種，若未檢出病原體，接續使用 Respiratory 2.1 *plus* Panel tests 進行檢驗，此試劑可同時檢測 17 種病毒 (Adenovirus, Coronavirus 229E, HKU1, OC43, NL63, Mers-CoV, SARS-CoV-2, Human Metapneumovirus, Human Rhinovirus/Enterovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza type 1-4, RSV 及 4 種細菌 (Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae)。38 件群聚感染中，其中 31 件(81.6%)檢出呼吸道病原體，如下表，結果顯示台灣 2021 年 1-11 月常見引起呼吸道群聚感染病原體有 Rhinovirus, Adenovirus, RSV, parainfluenza type 3。往年常見的流感病毒，無發現。

Microbes	群聚數
Adenovirus	3
Adenovirus + Rhinovirus	2
Adenovirus + RSV	1
Metapneumovirus	2
Mycoplasma pneumoniae + Rhinovirus + Coronavirus OC43	1
parainfluenza type 3	3
Rhinovirus	14
Rhinovirus + parainfluenza type 3	1
Rhinovirus + parainfluenza type 3 + parainfluenza type 4 + RSV	1
RSV	3
Negative	7
Total	38

流感疫苗不良個案:

法醫研究所通報疑似疫苗不良反應 6 例共 35 個檢體，其中兩例為流產胚胎。

以 multiplex real-time PCR 檢驗出病原有兩例：

1. 1 例於氣管病毒拭子驗出 Human parvovirus B19。
2. 1 例於數個組織檢體(肝、脾及肺)驗出 Human herpesvirus 6。
3. 流產胚胎均無驗出病原。

本署防疫醫師檢視法傳通報個案快速死亡或年輕重症，取其檢體以 NGS 進行病原體探討。本年度共計 5 例，1 例於血清中驗出 EBV，該個案為疑似疫苗不良反應十多歲女性，施打新冠疫苗後發生嚴重不良反應，住院接受 ECMO 等治療中。

個案編號	區管	通報疾病	檢體種類	NGS檢驗結果 (佔檢體比率)
1	高屏區	恙蟲病 地斑	全血	未檢出
2	高屏區	鈎端 日腦 恙蟲 地斑	全血	未檢出
3	高屏區	登革熱,恙蟲病,地方性斑疹傷寒,Q熱,鈎端螺旋體病,漢他病毒肺症候群	血液	未檢出
			血液	未檢出
4	高屏區	鈎端螺旋體	全血	未檢出
5	南區	無	血清	Human gammaherpesvirus 4 (<0.01%)

SARS-CoV-2 基因序列分析:

2019 年新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 引起之 COVID-19 疾病在全球迅速蔓延，造成社會、經濟和醫療保健系統之全球性災難，世界各國皆採取各種防治措施以控制疫情擴散。病毒快速突變影響其傳播速度、疾病嚴重程度、疫苗、治療藥物、診斷工具或其他公共衛生和社會防治措施的有效性，爰此，即時掌握病毒基因與特性變化等監測資料，據此作為調整防治策略依據實有必要；此外，即時監測病毒基因序列可瞭解全球病毒變化趨勢，病毒基因序列可做為流行調查佐證，解析時空傳播和傳播途徑；再者，病毒基因序列有助於設計診斷分析藥物和疫苗，並有助於監測其功效隨時間發生的假設變化是否可歸因於病毒基因序列的變化。

2020 年全球爆發 COVID-19 疫情，台灣在 1 月 21 日發現第一例自中國大陸境外移入個案，後續本土疫情可分為 3 波 (圖一)，第一波中 2 月到 3 月中旬，境外移入個案仍以中國為主要，也發生幾起本土家庭群聚，分析病毒基因後，病毒屬於 Clade S, V, L, O，3 月中旬後歐洲與美洲陸續爆發疫情，境外移入個案來源轉以歐美國家，病毒轉換

成 Clade G, GR, GH 為主, 4 月發生的軍艦感染群聚, 病毒屬於 clade O (圖二)。自 2020 年 12 月後, 全球出現多種變異株, 其基因突變影響病毒傳播速度和/或增加再感染風險, 並降低疫苗的保護作用, 其中四種快速擴張的病毒變異株被 WHO 定義為受關注變異株變種 (variants of concern, VOC): alpha、beta、gamma、delta。2021 年 4 月 alpha 為主流變異株(約佔 37%), 2021 年 6 月 delta 取代 alpha 成為主流變異株(約佔 39%), 2021 年 11 月 delta 變異株約佔 95% (圖三.A)。2020 年 10 月 1 日至 2021 年 11 月 13 日台灣定序分析 939 株 SARS-CoV2, 全球變異株如下: Alpha 英國變異株:655 株 (本土 612 株, 境外 43 株)、Beta 南非變異株:6 株 (境外)、Delta 印度變異株:207 株 (本土 43 株, 境外 164 株)、Gamma 巴西變異株: 6 株 (境外)、Theta 巴西(菲律賓)變異株: 2 株 (境外)、Epsilon 加州變異株: 19 株 (本土 14 株, 境外 5 株)、Mu 哥倫比亞變異株 1 株 (境外)、非變異株 43 株 (境外)(圖三.B、C)。台灣境外移入個案病毒序列監測:台灣 2020 年 12 月發現首例從英國回台之 Alpha 變異株病毒確診個案。接下來, 2021 年 1 月在美國移入的病例中發現了變種 Epsilon。主要變異株病 2021 年 3 月至 2021 年 6 月的 Alpha, 變異株病 Delta 在 7 月取代並成為主導。總體而言, 台灣變異株病毒替換的時間分佈與全球相似 (圖三.B)。台灣本土確診個案的病毒基因分析, 台灣出現了三波疫情。第一波病毒屬於野生型。第二波中的病毒屬於 Epsilon 變異株。第三波病毒以 Alpha 為主, 少數 Delta 變異株。分析第三波 Alpha 病毒, 發現病毒皆具 spike M1237I 突變(圖四), 台灣 5-8 月此波疫情可能是由單一來源病毒引起。本土 Delta 變異株基因分析, 發現 Delta 變異株有 4 來源(圖五), 流病相關個案之病毒具相同病毒序列。10 月後, 台灣在國內確診病例中沒有發現新感染的病毒。台灣採取了嚴格的防控措施, 阻止了 Epsilon、Alpha 和 Delta 在台灣的傳播。然而, 新的變異株不斷出現且可能入侵台灣, 嚴格的防控措施仍須持續進行, 避免病毒擴散。

死亡個案之病毒序列分析: 5-6 月 5 例 COVID-19 死亡個案之病毒, 病毒序列與其他個案病毒序列相同 (圖六)。

感染人類 H1N2v 全基因序列分析:

2021 年 3 月中部有 1 個案感染 A 型無法分型流感病毒, 經病毒合約實驗室送分離病毒至國家流感中心, 進行後續次亞型鑑定, 依據 HA 與 NA 基因序列比對, 分別與台灣 A 型豬流感 H1N2 病毒 HA, NA 最相近。此為台灣首次自人類分離的 H1N2 流感病毒,

該個案具發燒、流鼻涕和咳嗽症狀，分離出的病毒被命名為 A/Taiwan/1/2021(H1N2)v。全基因定序分析顯示，A/Taiwan/1/2021(H1N2)v 是一種新型重配(reassortment)病毒，病毒中 HA 和 NA 基因片段含有源自豬流感 A(H1N2) 病毒基因，依據病毒序列演化分析顯示屬於台灣豬群中特有的進化群，該基因推測在台灣已流行了幾十年，其他 6 個內部基因 (PB2、PB2、PA、NP、M 和 NS) 與人類 A (H1N1) pdm09 病毒最相近 (圖七)。

(4) 討論

環境開發、全球氣候變遷與交通便利等因素，導致各種新興傳染病的浮現與傳播更勝以往，民眾在受到病原微生物感染的初期，所呈現的臨床症狀通常與一般傳染性疾病無法區辨。為解決這種初期時臨床判別的困難，而能增加公共衛生體系對於異常事件的警覺，發展出對於不特異的臨床症狀進行症候群分組，統整出幾個重要的症候群通報，提早偵知社區中的新興傳染病發生事件。疾病管制局2000年7月開始試辦「新感染症候群監視通報系統」，2006年1月起，系統更名為「症候群重症監視通報系統」，分別有急性出血熱、急性呼吸、急性神經、急性黃疸等四項症候群重症通報。後因經費與監測效益等因素停辦了此候群重症通報監測。2009年pandemic H1N1, 2012年MERS-CoV, 2013年H7N9, 2019年SARS-CoV2等多種新興呼吸道病原體出現，臨床症狀常有肺炎發生，WHO亦建議常規例行性的檢測與檢驗不明原因肺炎。所以本計畫接續「症候群重症監視通報系統」急性呼吸重症通報的任務，希望提早偵知社區中的新興病原體的出現。

本計畫建立未知感染原監測網絡，有效連結各醫院，建立重要疾病流行監測點與檢體採檢點，針對肺炎重症、呼吸道群聚檢體之個案檢體等訂定病例定義、收件標準與檢驗流程，作為個案選定及檢驗程序之依據。本署之法定傳染病通報系統，已針對流感重症、新型A型流感與中東呼吸症候群冠狀病毒感染症(MERS-CoV)進行監測通報，但從2016-2020年檢測肺炎重症通報個案結果發現，仍以流感病毒為主要病原體，且病毒亞型與同時間流感重症個案或社區流行亞型相同，如2016年H1N1pdm09大幅流行，肺炎重症通報個案陽性個案也H1N1pdm09占多數，2017年H3N2為台灣流感主要流行亞型，肺炎重症通報個案陽性個案H3N2占多數。但值得注意的是2017年台灣在流感社區監測與流感重症H1N1pdm09比例低(小於10%)，但在肺炎重症通報中發現H1N1pdm09 9例，相對於H3N2 15例，兩者比例明顯高於社區監測與流感重症系統，可能原因H3N2感染臨床端較易診斷，直接通報流感併發重症，而H1N1pdm09感染症狀不易判斷，而通報肺炎重症。2018年1-4月B型流感病毒為台灣社區流感病毒主要流行株，肺炎重症個案中檢出B型流感病毒並未明顯增加，可能與B型流感病毒造成住院與重症比例較低有關。2019, 2020年年A型H1N1pdm09流感病毒為台灣社區流感病毒主要流行株，肺炎重症個案中檢出H1N1pdm09流感病毒明顯增加。

2013年大陸出現人類感染H7N9案例，迄今台灣已有5例境外移入個案，5例個案中有

3例通報不明原因肺炎，其中第1例與第5例為第一次通報新型A型流感檢驗陰性後，第二次通報不明原因肺炎檢出H7N9，所以，本計畫可對疑似感染症又無法解釋臨床症狀之個案，再次進行檢驗，避免因感染初期病毒量少，導致檢驗陰性。

2020-2021年全球新型冠狀病毒SARS-CoV-2 大流行，至迄今2021年11月已造成2.53億人感染，509萬人死亡，造成社會衝擊。此期間根據WHO流感監測資料，2020年3月後流感病毒流行幅度低，台灣2020年4月後也沒有偵測到流感病毒，以往流感重症與呼吸道群聚之病原體皆以流感病毒為主，2021年以Rhinovirus, Adenovirus, RSV, parainfluenza type 3 呼吸道病毒為主，可能原因為邊境管制與口罩等衛生防治有關，可見每年流感病毒的流行，源頭可能為境外輸入，導致流行，而其它呼吸道病毒可能為在地化流行。

multiplex real time PCR 因其敏感度高與專一性佳，已成為臨床分子檢驗主流的方法，目前只要有目標基因的序列，就可依序列設計出引子對與探針，加上基因DNA合成的便利，容易依基因序列製作陽性對照組(positive control)，且易組合不同檢測標的，形成針對不同症候群的檢測套組，有很好的便利性，目前本計畫已累積建立 40 種病原體的real time PCR方法。multiplex real time PCR方法除了可即時提供臨床檢驗資料，協助臨床醫師診治參考外，在本計畫整合檢驗技術平台中，real time PCR方法也是敏感度高篩選進入下一個與檢驗平台NGS的依據，因目前NGS檢驗方法在費用與時間上，無法涵蓋所有通報檢體，故目前搭配real time PCR方法，採兩階段整合的方式進行檢驗，以節省檢驗資源。

(5)結論與建議

1.近年國內外所發生的H7N9、H5NX、MERS-CoV、H6N1、SARS-CoV2 等社會大眾關切的事件，都有賴於即時建立檢驗方法以釐清感染源。尤其隨著交通便利與全球化國際間往來密集，新興傳染病可能由區域性的疾病，演變成全球性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康，因此我們需要持續強化監測網與檢驗平台，同時建立未知與新興傳染病團隊，包含檢體收集與檢驗、疫調、臨床資料收集、防疫策略的推行等人員，當發現新的傳染病時，能即時獲得完整資料，了解此新興傳染病的生物與流行特性，以制定最佳防疫策略。

2. 精進未知與新興病原體的檢驗平台，並鼓勵相關醫院檢驗室提供未知或無法分型的病原體或檢體，發現H7N9、H6N1、H1N2v感染個案皆為加強通報後發現的個案，故加強通報與精進病原體檢驗平台，為未知與新興病原體監測的雙翼。

3. 應持續未知與新興傳染病團隊，當發現新的傳染病時，檢體收集與檢驗、疫調、臨床資料收集、防疫策略的推行等可即時進行，並獲得完整資料，了解此新興傳染病的生物與流行特性，以制定最佳防疫策略。

4. 2020年新型冠狀病毒 SARS-CoV2 引起全球大流行，本計畫建立之檢驗平台，在疫情初期，及時發揮功能，將檢驗資源優先使用在SARS-CoV2 檢驗上。

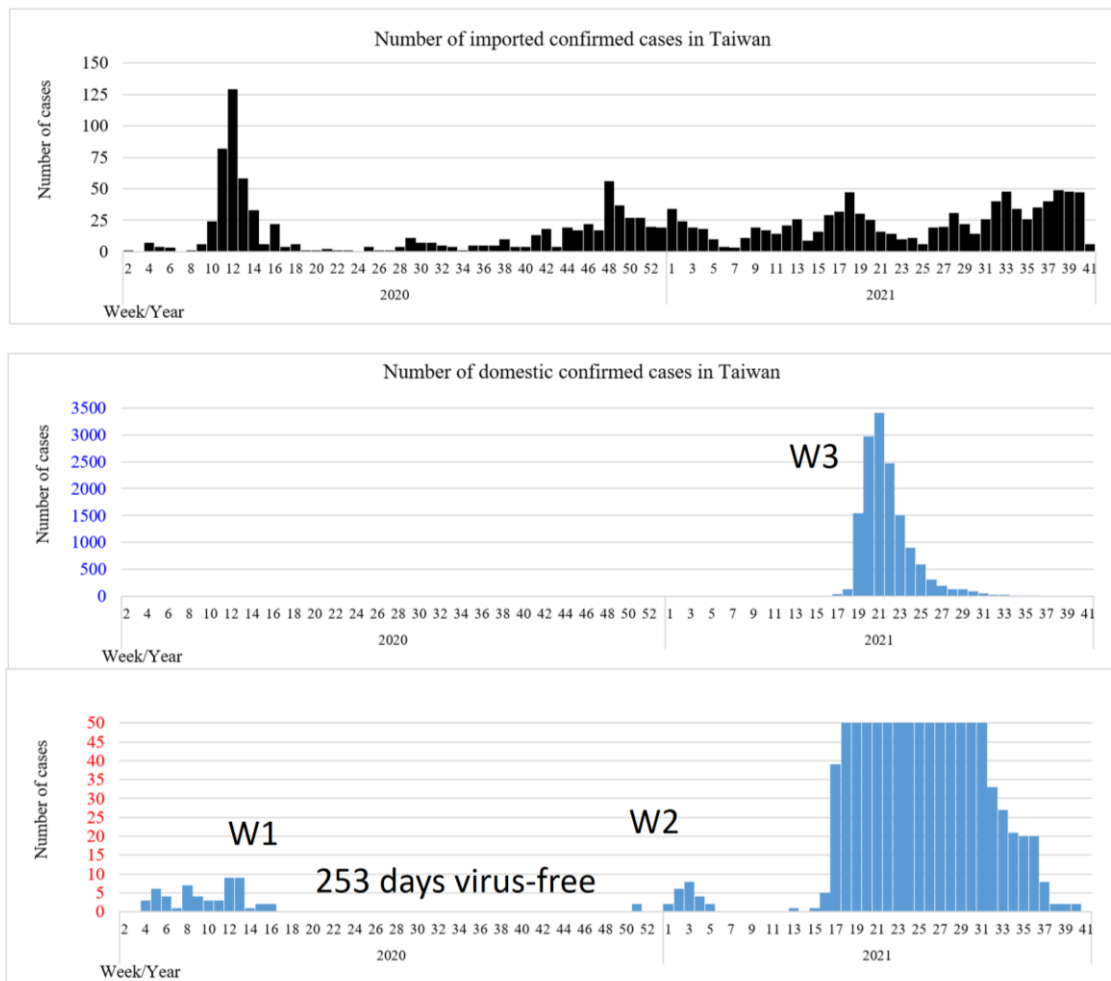
5. 病原體基因序列即時分析可瞭解全球該病原體病毒變化，病毒基因序列可做為流行調查佐證，解析時空傳播和傳播途徑；再者，病原體基因序列有助於設計診斷分析藥物和疫苗，並有助於監測其功效隨時間發生的假設變化是否可歸因於病原體基因序列的變化。

(7) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

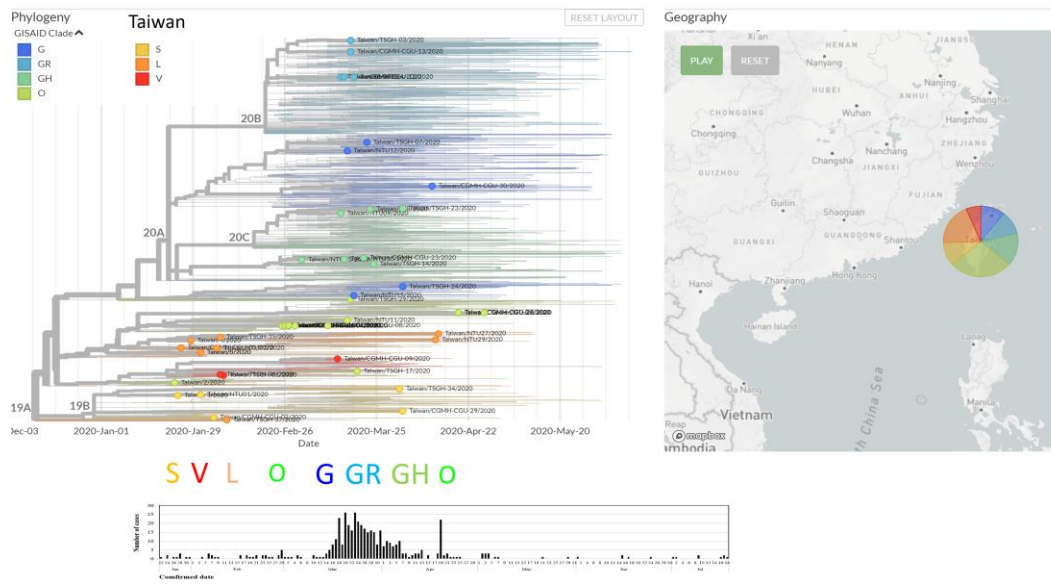
1. Centers for Disease C, Prevention. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection - Mexico, March-April 2009. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2009;58(17):467-470.
2. Zumla A, Hui DS, Perlman S. Middle East respiratory syndrome. *Lancet*. 2015;386(9997):995-1007.
3. Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-993.
4. Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-269.
5. Walker CL, Rudan I, Liu L, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*. 2013;381(9875):1405-1416.
6. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet*. 2011;377(9773):1264-1275.
7. Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses. *Trends in microbiology*. 2016;24(6):490-502.
8. Kahn JS. Human metapneumovirus: a newly emerging respiratory pathogen. *Current opinion in infectious diseases*. 2003;16(3):255-258.
9. Lindner J, Modrow S. Human bocavirus--a novel parvovirus to infect humans. *Intervirology*. 2008;51(2):116-122.
10. Drexler JF, Corman VM, Muller MA, et al. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nature communications*. 2012;3:796.
11. Tay A, Pavesi A, Yazdi SR, Lim CT, Warkiani ME. Advances in microfluidics in combating infectious diseases. *Biotechnology advances*. 2016;34(4):404-421.
12. Davison KL, Crowcroft NS, Ramsay ME, Brown DW, Andrews NJ. Viral encephalitis in England, 1989-1998: what did we miss? *Emerg Infect Dis*. 2003;9(2):234-240.
13. Chua KB, Goh KJ, Wong KT, et al. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet*. 1999;354(9186):1257-1259.
14. Smits SL, Zijlstra EE, van Hellemond JJ, et al. Novel cyclovirus in human cerebrospinal fluid, Malawi, 2010-2011. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9).
15. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(12):835-844.
16. Mailles A, Stahl JP, Steering C, Investigators G. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis*. 2009;49(12):1838-1847.
17. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2006;43(12):1565-1577.
18. Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR, et al. Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):145-153.
19. Centers for Disease C, Prevention. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;48(38):845-849.
20. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol*. 2004;29(3):179-188.
21. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, et al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of the real-time RT-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2014; 52:76-82.

22. Wong S, Pabbaraju K, Pang XL, Lee BE, Fox JD. Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol*. 2008;80(5):856-865.
23. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27(7):589-594.
24. Chidlow GR, Harnett GB, Shellam GR, Smith DW. An economical tandem multiplex real-time PCR technique for the detection of a comprehensive range of respiratory pathogens. *Viruses*. 2009;1(1):42-56.
25. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(39).
26. Corman VM, Muller MA, Costabel U, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2012;17(49).
27. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):981-986.
28. Tapparel C, Junier T, Gerlach D, et al. New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):719-726.
29. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2008;92(7):928-932.
30. Al-Marzooq F, Imad MA, How SH, Kuan YC. Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia. *Tropical biomedicine*. 2011;28(3):545-556.

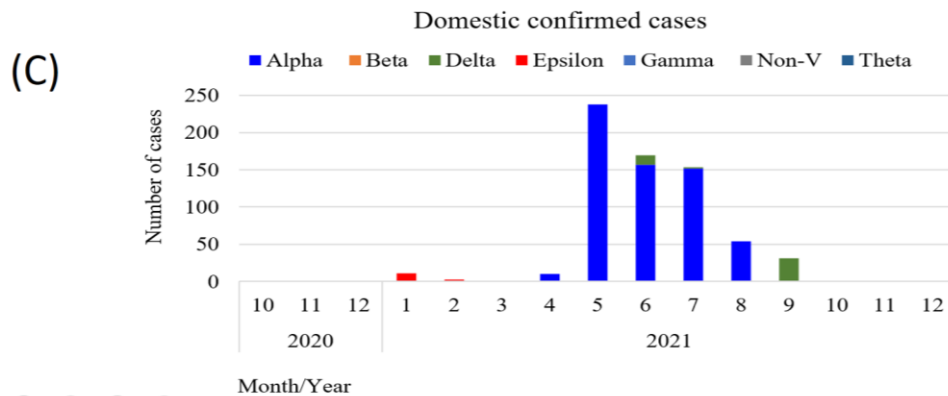
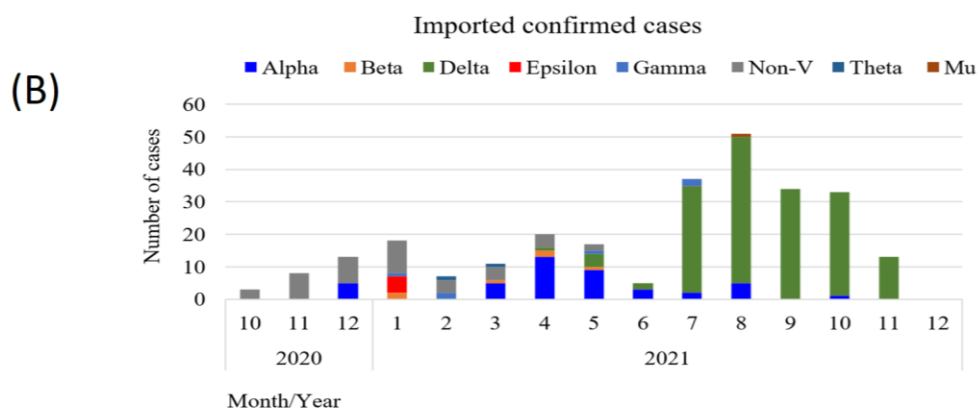
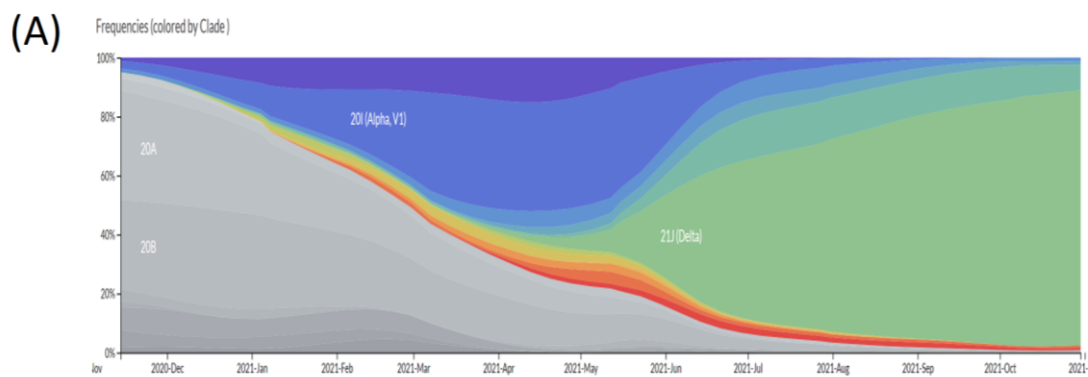
(8)圖、表



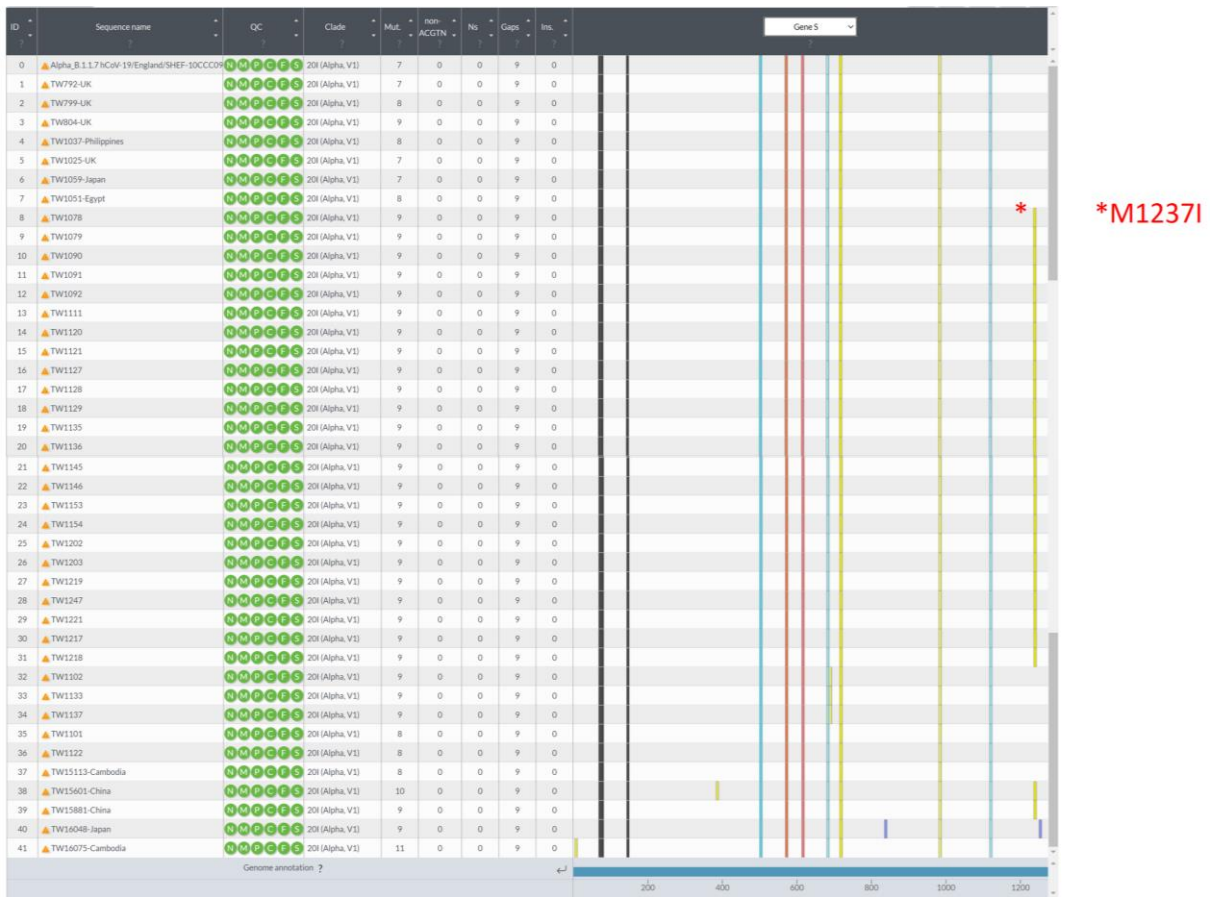
圖一、台灣 COVID-19 2020-2021 每週確診個案數目，本土疫情可分成 3 波，第 1 波(W1)與第二波間有 253 天無本土確診個案。



圖二、台灣 2020 年第一波 SARS-CoV-2 病毒序列分析



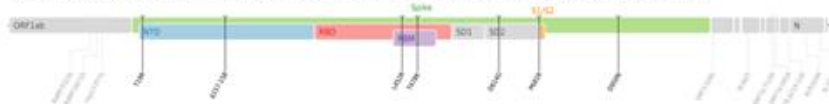
圖三、2020年10月後 SARS-CoV-2 全球(A)、台灣境外移入個案(B)、台灣本土個案(C) 變異株變化情形。



圖四、台灣第三波本土 Alpha 病毒皆具 spike M1237I 突變。

ID	Sequence name	QC	Clade	Mut.	non-ACGTN	No.	Gap	Ins.
0	TW13332_Peru	✓	21A-Delta	7	0	0	0	0
1	TW13333_Peru	✓	21A-Delta	7	0	0	0	0
2	TW14290_TW	✓	21A-Delta	7	0	0	0	0
3	TW16119-Australia	✓	21A-Delta	8	0	0	0	0
4	TW16122_TW	✓	21A-Delta	8	0	0	0	0
5	TW16128_TW	✓	21A-Delta	8	0	0	0	0
6	TW16129_TW	✓	21A-Delta	8	0	0	0	0
7	TW16007_Iran	✓	21A-Delta	10	0	0	0	0
8	TW16176-Turkey	✓	21A-Delta	30	0	0	0	0
9	TW16123_TW	✓	21A-Delta	8	0	0	0	0

Mutations Delta B.1.617.2: ST19R, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, DEL156/157



D1: Pingtung cases

Nucleotide mutations (7)
 C21618G G21987A
 T22917G C22995A
 A23403G C23604G
 G24410A

Aminoacid mutations (8)
 S:119
 S:158
 S:178
 S:181
 S:142
 S:452
 S:614
 S:950

Aminoacid deletions (2)
 S:156
 S:157

D2: Aircrew

Nucleotide mutations (8)
 C21618G C21846T
 G21987A T22917G
 C22995A A23403G
 C23604G G24410A

Aminoacid mutations (9)
 S:119
 S:142
 S:452
 S:454
 S:950
 S:195
 S:158
 S:178
 S:181

Aminoacid deletions (2)
 S:156
 S:157

S:T95I

D3: Kindergarten

Nucleotide mutations (8)
 G21578T C21618G
 G21987A T22917G
 C22995A A23403G
 C23604G G24410A

Aminoacid mutations (9)
 S:V6F
 S:119
 S:142
 S:452
 S:614
 S:950
 S:158
 S:178
 S:181

Aminoacid deletions (3)
 S:149
 S:156
 S:157

S:V6F
 Y144-

D4: Airport cleaner

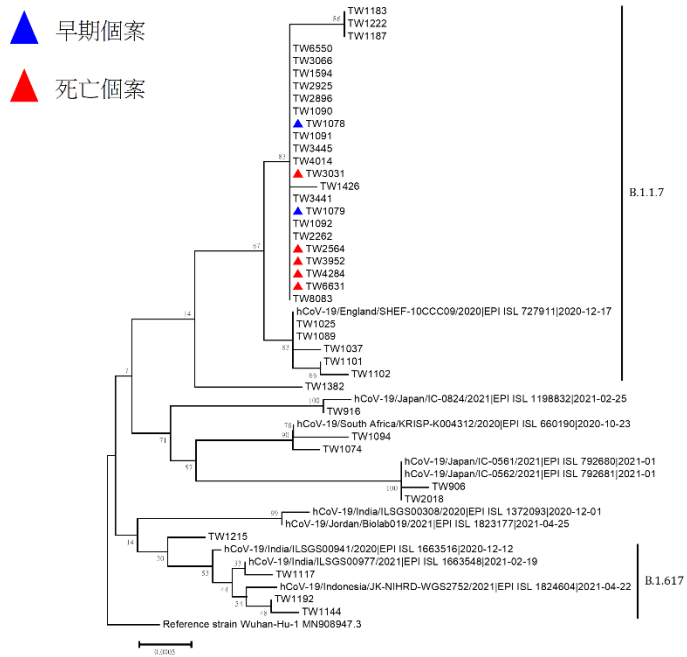
Nucleotide mutations (9)
 C21618G C21846T
 G21987A T22917G
 C22995A A23403G
 C23604G G24410A

Aminoacid mutations (10)
 S:119
 S:142
 S:452
 S:614
 S:950
 S:195
 S:158
 S:178
 S:181

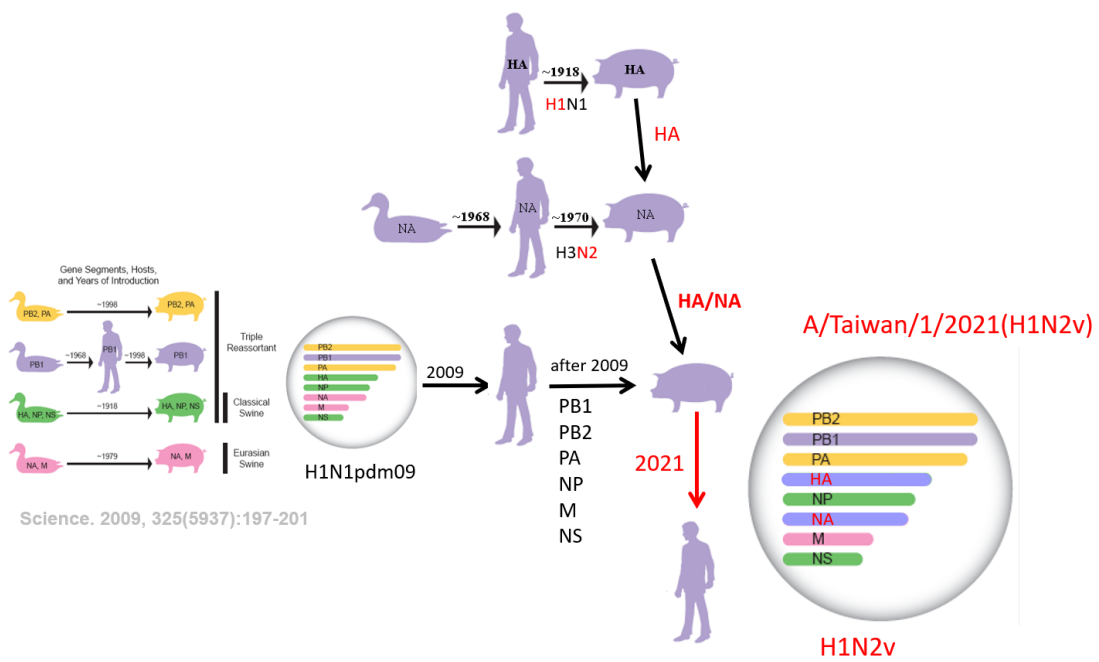
Aminoacid deletions (2)
 S:156
 S:157

S:T95I
 S:I850L

圖五、台灣第三波本土 Delta 病毒可區分 4 個不同來源。



圖六、台灣第三波死亡個案之 Alpha 變異株與疫情初期病毒基因之比較。



圖七、台灣人類 H1N2v 流感病毒 8 個基因片段之來源。

110 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：肺炎腦炎及不明原因傳染病之病原體分析研究

計畫主持人：劉銘燦

填報日期：110/12/21

*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	Respiratory and encephalitis surveillance for ID agents。	謝謝委員意見。	無
2	Simple RT-PCR, no external validations. The in-house respiratory panel is better to be replaced by FDA's approval ones to be consistent with worldwide.	謝謝委員意見。已導入使用 Respiratory 2.1 <i>plus</i> Panel tests 進行檢驗。	無
3	Good works to meet the COVID challenge.	謝謝委員意見。	無
4	However, other than no FDA approved diagnosis kits, please avoid using in-house kits for detection or diagnosis. This will compromise the quality.	謝謝委員意見。	無
5	Encephalitis cases needs to catch up.	不明原因腦炎病原之監測擬加強日本腦炎檢驗陰性之檢體檢驗。	無
6	無症狀患者鼻病毒帶病毒率 (carriage rate) 有多少？請說明。	本計畫通報個案皆有症狀，無法估算無症狀患者鼻病毒帶病毒率，根據文獻小孩(小於6歲)無症狀陽性率可達 14% (J Clin Microbiol,2011,49(7):2631-6)。	無
7	轉為研究 SARS-COV-2 有其價值。	謝謝委員意見。	無
8	不明原因腦炎的病原體偵測很重要，應持續收案。	謝謝委員意見。	無

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
9	SARS-COV-2 死亡個案序列 並無特殊。	謝謝委員意見。	無
10	針對不明原因腦炎病原監測 網絡之建立應再做加強。	不明原因腦炎病原之監測擬加強 日本腦炎檢驗陰性之檢體檢驗。	無

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 110 年 12 月 23 日
前至 GRB 系統完成資料抽換。