

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114108

衛生福利部疾病管制署 109 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

109 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：張捷

研究人員：李孟珊

研究人員：胡晉賓

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 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 11 頁

結論與建議

第 13 頁

參考文獻

第 14 頁

圖、表

第 16 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 SARS coronavirus, avian influenza H5N1, MERS-CoV, 2009 pandemic H1N1, H7N9, 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 SARS coronavirus, avian influenza H5N1, MERS-CoV, 2009 pandemic H1N1, H7N9, 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 meningitides*、*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) $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$
- (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。

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*、*Chlamydia 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 $^{\circ}$ 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：

2020 年 1-10 月通報肺炎重症共 107 例，相較 2016-2020 年，2016 年與今年流行 A/H1N1pdm09，通報數增多，2020 年 1 月通報個案數歷年最多 (圖一)。2020 年 1 月通報肺炎重症共 107 例，其中 62 例(57.9%)，檢出病原體，其中病毒 53 例，細菌與真菌

19 例，co-infection 10 例。病毒感染中，A/H1N1pdm09 29 例，influenza B 7 例，CMV 4 例，Rhinovirus 3 例 A/H3N2 3 例，HSV1 2 例，adenovirus 2 例，RSV1 例，Metapneumovirus 1 例，coronavirus OC43 1 例。不明原因肺炎個案流感陽性者，若在 ICU 者會轉通報流感重症。

2020 年 1 月至 10 月，共計 107 個肺炎重症通報個案，其中呼吸道檢體，使用病毒 multiplex RT-realtime PCR 檢測(包含 influenza A virus, influenza B virus, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinovirus, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type 1, 2, 3, 4, coronavirus 229E/OC43/NL63/HK/MERS, human bocavirus, parvovirus, HPeV, VZV, enterovirus, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* 等 25 個病原體檢測)與細菌培養方式進行檢驗，比較 2016-2020 年每月通報與送驗數目，2016 年因台灣爆發 H1N1pdm09 流感，造成不明原因肺炎通報數激增，2020 年也是因 H1N1pdm09 流感流行，造成通報個案增加(圖一)，2020 年 1 月後因 COVID-19 疫情，暫時關閉法定傳染病通報系統「其它」項目，2 月起無通報個案。2020 年通報個案中，男女性比 2.5:1 以男性居多(圖二 A)。年齡層年紀大於 65 歲者佔 35.5% 為多數(圖二 B)。2016-2020 年病原體的檢出率約為 43.0-57.9%，2020 年在檢出病毒的個案中，檢出病原體，其中病毒 53 例，細菌與真菌 19 例，co-infection 10 例(圖三)。2020 年在檢出病毒的個案中，檢出病原體，其中病毒 53 例，細菌與真菌 19 例，co-infection 10 例。病毒感染中，A/H1N1pdm09 29 例，influenza B 7 例，CMV 4 例，Rhinovirus 3 例 A/H3N2 3 例，HSV1 2 例，adenovirus 2 例，RSV1 例，Metapneumovirus 1 例，coronavirus OC43 1 例。(表一)。

腦炎與快速不明原因死亡監測結果：

2020 年 1-11 月通報不明原因腦炎與快速不明原因死亡個案 29 例 96 件檢體，未檢出可能病原體。

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，2020 年 1-10 月臨床檢體共 3 例，結果皆為陰性。另為擴大監視，針對通報不明原因肺炎送驗之 107 名個案進行檢驗，結果皆為陰性。

呼吸道群聚常檢體監測：

2020年1-11月通報67個呼吸道感染群聚(232例個案)，其中24個群聚檢驗出病原體，7個為A(H1N1)pdm09，1個群聚為influenza B，6個群聚為adenovirus，4個群聚為RSV，7個群聚為Coronavirus NL63。

流感疫苗不良個案：

10月26日專家會議建議，疑似流感疫苗不良反應採CSF送本署檢驗，本計畫運用兩種檢驗方法檢驗(1)實驗室之multiplex real-time PCR;市售之The BIOFIRE® FILMARRAY® Respiratory 2.1 plus Panel 試劑。兩項方式檢驗結果均為陰性。

SARS-CoV-2 培養與全基因定序：

成功培養28株病毒，病毒培養成功與檢體內病毒量及採檢日與發病日有關，病毒量低Ct大於27時，培養成功率3%(圖四)，採檢日距發病日超過14天，無法培養成功率(圖五)。

SARS-CoV-2 與全基因定序：

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，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(圖五)。

(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

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(表一)。

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。

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 25 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方法也是敏感度高的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、COVID-19 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。

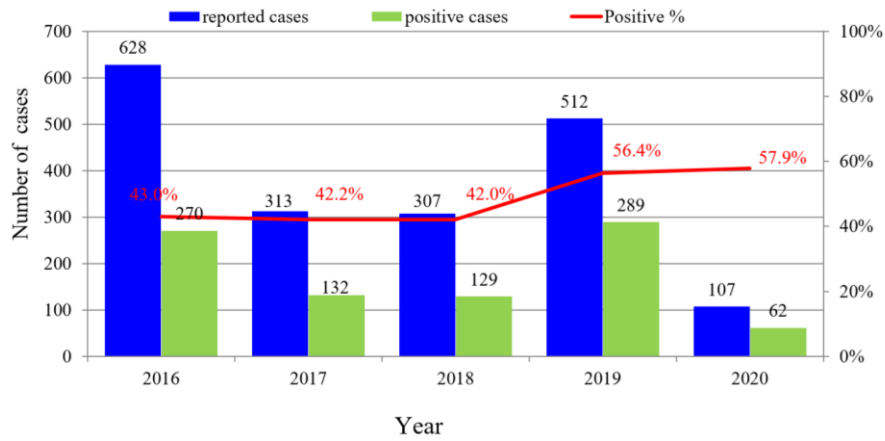
(7) 參考文獻：請依台灣醫誌編排方式

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.

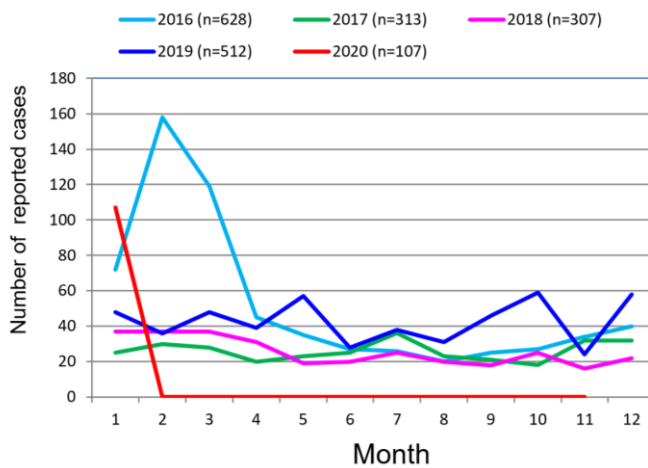
22. Wong S, Pabbaraju K, Pang XL, Lee BE, Fox JD. Detection of a broad range of human adenoviruses in respiratory tract samples using a sensitive multiplex real-time PCR assay. *J Med Virol*. 2008;80(5):856-865.
23. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent 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

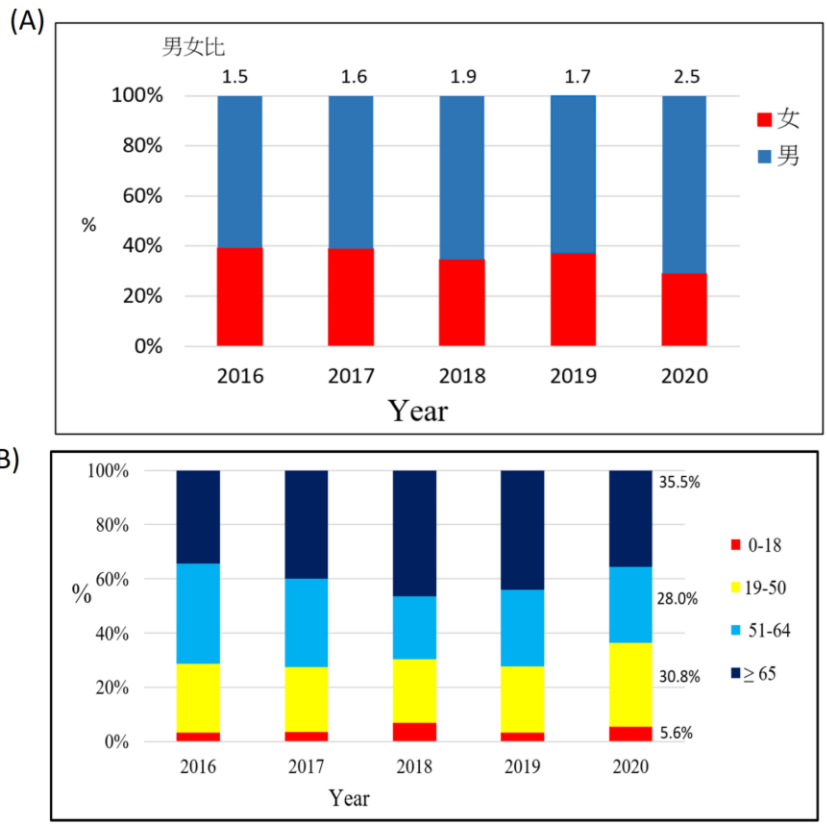
(A)



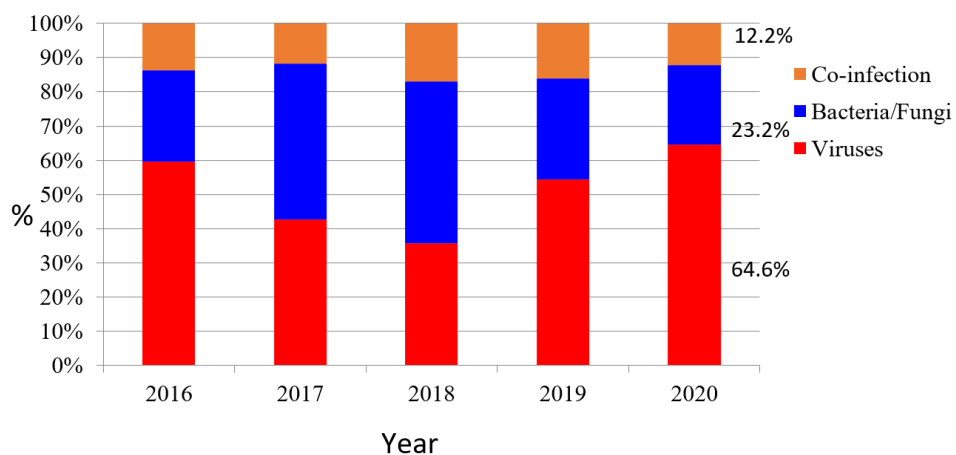
(B)



圖一、2016-2020 肺炎重症通報個案數與檢出率(A)，每月通報個案數(B)。



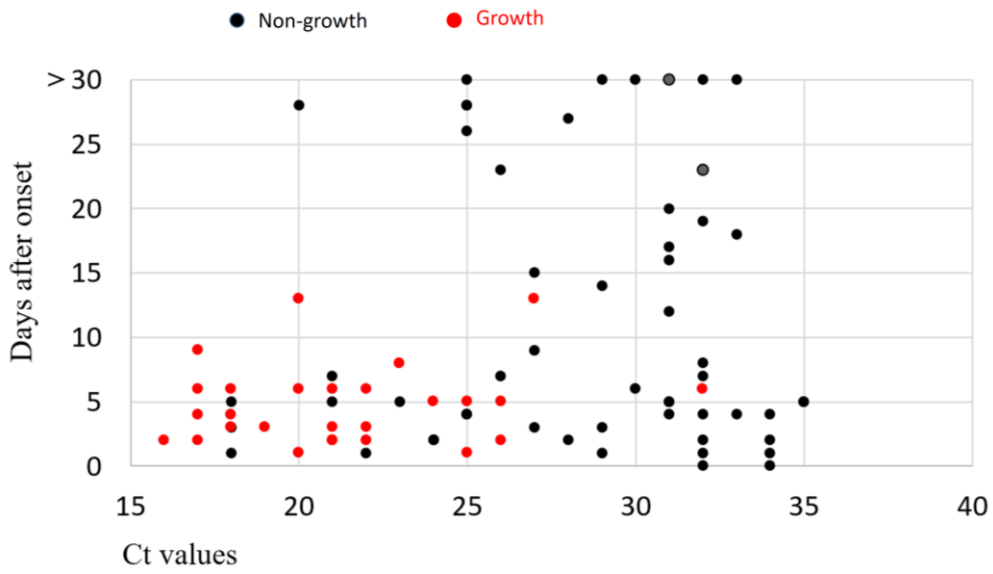
圖二、2016-2020 肺炎重症通報個案性別(A)、年紀分佈(B)。



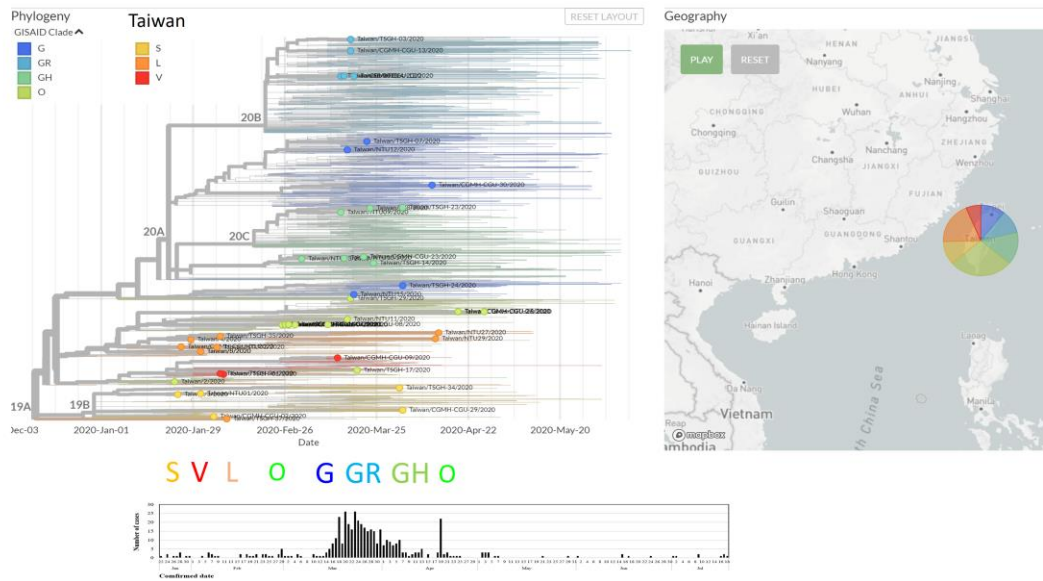
圖三、2016-2020年肺炎重症檢出病原體之種類



圖四、SARS-CoV-2 培養成功與原檢體病毒量關係



圖五、SARS-CoV-2 培養成功與檢體採檢日關係



圖六、台灣 SARS-CoV-2 病毒序列分析

表一、2016-2020 年肺炎重症檢出各類病原體個案數

Microbes detected	2016	2017	2018	2019	2020
H1N1pdm09	151	10	11	82	29
H3N2	6	15	4	11	3
Influenza B virus	10	3	10	3	7
H7N9	0	1	0	0	0
Adenovirus	6	12	3	1	2
RSV	1	5	8	3	1
HSV1	4	7	9	26	2
CMV	3	0	5	39	4
Coronavirus HK	0	1	2	0	0
Coronavirus 229E	4	0	0	1	0
Coronavirus NL63	5	1	2	0	0
Coronavirus OC43	2	0	1	0	1
Enterovirus	1	2	1	9	0
Rhinovirus	2	5	6	10	3
Metapneumovirus	1	10	4	2	1
Parainfluenza 1	0	0	1	0	0
Parainfluenza 2	0	2	0	2	0
Parainfluenza 3	0	0	1	2	0
Legionella pneumophila	7	8	8	26	0
Mycoplasma pneumoniae	4	0	2	5	0

衛生福利部疾病管制署委託/署內科技研究計畫
109 年度計畫重要研究成果及具體建議
(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：肺炎腦炎及不明原因傳染病之病原體分析研究

主持人：劉銘燦

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-114108

1.計畫之新發現或新發明

成功培養 28 株病毒，病毒培養成功與檢體內病毒量及採檢日與發病日有關，病毒量低 Ct 大於 27 時，培養成功率 3% ，採檢日距發病日超過 14 天，無法培養成功率。

2020 年通報 67 個呼吸道感染群聚(232 例個案)，其中 24 個群聚檢驗出病原體，7 個為 A(H1N1)pdm09，1 個群聚為 influenza B，6 個群聚為 adenovirus，4 個群聚為 RSV ，7 個群聚為 Coronavirus NL63。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

建立與維護肺炎重症、腦炎與不明原因死亡之感染原監測網絡與病原體檢驗平台，監測分析不明原因傳染並的病原體種類變化。

了解肺炎重症、腦炎與不明原因死亡的病原體譜，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。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

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。

109 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：109.12.22

*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	今年的檢體量較少(約 200 例)，但已完成非 LDTS 的檢測。	謝謝委員意見。	
2	通報→檢測→告知的流程希望能即時，有多少人的報告在住院期間完成？	從通報、檢測與檢驗結果告知約 5 天，在住院期間可知道件檢驗結果。	
3	檢驗成本與認證間須取得平衡。	若要使用 FDA 核准的平台，以每年 400 件檢體計算，每件 6500 元，需試劑費 260 萬元，目前經費無法負荷。	
4	腦炎的病例通報系統不宜關閉。	僅目前暫時關閉	
5	不明原因肺炎且檢測為 H1N1 者，是否補通報流感重症或僅上呼吸道群聚偵測？建議補充說明之。	不明原因肺炎個案流感陽性者，若在 ICU 者會轉通報流感重症。	第 10 頁

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日前至 GRB 系統完成資料抽換。