

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000109

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：建置本土傳染病原體生物資源庫及其分享運用

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

研究人員：李中皓、賴若絮、陳姿吟

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

目錄

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫.....	1
研究報告中文摘要.....	3
Abstract.....	5
一、 前言：.....	7
二、 材料與方法.....	10
1. 檢體來源：.....	10
2. 採檢定義：.....	10
3. 檢體收件與運送：.....	11
4. 檢驗方法及步驟：.....	11
5. 檢體之保存與病毒株之寄送：.....	14
6. 實驗室培養品質管制.....	14
1. 腸病毒、流感病毒基因鑑定分析流程.....	14
2. 病原體基因資料庫網頁之建置.....	16
三、 結果.....	17
1. 生物材料庫建置與流行趨勢分析.....	17
2. 建置病原微生物體基因資料庫與其防疫上之應用.....	19
四、 結論與建議.....	21
1. 生物材料庫建置.....	21
2. 病原基因體資料庫.....	21
3. 防疫應用.....	22
五、 參考文獻.....	23
六、 表.....	24
七、 圖.....	26

研究報告中文摘要

關鍵詞：生物材料資源庫、基因序列、病原微生物基因資料庫、再浮現傳染病

生物資源是指對人類具有實際或潛在用途與價值的生物體或其衍生物(如核酸萃取物)、生物物種或任何生物組成。1992 年國際簽署生物多樣性公約(Convention on Biological Diversity, CBD)後，各國開始重視生物資源之保護與運用，並規範生物材料之移轉與可能衍生利益之分享，2001 年國際經濟合作暨發展組織(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)建議各國成立生物材料資源庫(Biorepository)，收集、處理、儲存、分讓生物材料與相關資訊，以因應未來科學研究(如基因體及個體化醫療)之挑戰。例如：人類基因組的定序，對於多因素的疾病，以及對整體自然界的認識有顯著的幫助；另過去許多研究僅針對少見的單一基因疾病，或可能後續的標靶性治療方法進行研發討論。目前生物資訊的發展，可以讓科學家建立更清楚「疾病與基因」之關聯性，同時也可連結更多大規模流行病學調查，以及來自個案檢體資訊的世代追蹤調查等資訊，有助於科學界與醫學技術的進展。因此，生物資源庫之建立更顯重要，尤其有組織性的檢體收集、以及相關資訊的連結與共享機制的建立等，對於生物研究更是刻不容緩。

面對再浮現傳染病，生物資源的保存有助於回溯追查疾病來源及歷程，以制定疫情防治策略及控制疾病蔓延，亦有利於未來發展疫苗及新型分子檢驗技術。對於致病原因未明者，若可先保存其相關材料，將來除了可隨時監測其抗體、抗原指標的流行情形外，亦可提供疾病來源及經過的線索，對於發現新病原或建立新檢驗方法等，均有積極正面的意義。近來，國際間相繼發生生物性恐怖攻擊案件，如 2001 年美國 911 恐怖攻擊及炭疽郵件攻擊引起大眾的恐慌；以及國內 2004 年發生 SARS 實驗室生物安全事件等，均凸顯生物材料保存中心對生物材料的系統化管理、國際流通與開發應用的重要性及必要性，因此系統

性地建立全國性的本土生物資源庫實屬目前首要面臨的挑戰。

為使生物資源材料資訊更趨完整，並及時提供防疫相關資訊，本計畫將收集的生物材料進行基因資料分析，所建置之本土傳染病生物資源庫名為病原微生物基因體資料庫(Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database, TPMGD)，包含保存病原體的生物材料庫以及整合該病原體之基因序列與流行病學之病原體基因資料庫，以連結蒐集彙整與病原有關之資訊，為保存及提供生物材料與病原體基因序列等相關資訊；研究中材料主要自本署病毒合約實驗室社區監測收集樣本經培養分離確認之流感病毒及腸病毒株，以擴充歷年重點病毒保存於生物材料庫，並對收案保存之病毒株進行特定基因之定序，將基因序列及相關流行病學資料保存於病原體基因資料庫，以提供相關政府機關、學術界、產業界研究之用。

Abstract

keywords : Biorepository, gene sequences, biological resources, re-emerging pathogens,

Bioresources are any organisms or their derivatives (such as nucleic acid), species or biological constituents having practical or potential use and value to human beings. Every country began to appreciate the conservation and application of bioresources, also managing the transfer of bioresources and sharing of the potential resulting benefits after Convention on Biological Diversity (CBD) in 1992. Organization of Economic Cooperation and Development (OECD) suggests every country establish her biorepository to collect, process, store, and transfer of bioresources and their related information to deal with the challenges of science research (such as genomics and tailored medicine) in the future. For example, sequencing of human genome is helping diseases of multiple factors and life sciences; and the discussion of research on potential target therapies. Now, the development of bioinformatics help scientist elucidate the “disease-gene” relationship more clearly, and can connect epidemiologic surveillance and cohort studies from each specimen to help science and medicine progress. So, it is important to establish biorepositories, especially the organized collection of specimen, the linkage of related information and the sharing mechanism for life science research.

Recently, bioterror attacks happened frequently. Such as the 911 terror attack and the bioterror attack of anthrax mails in the United States caused panic in the population in 2001 and the biosafety accident in 2004 in a Taiwanese SARS laboratory all demonstrate the importance and necessity of the systematic management, international trafficking and application of bioresources in biorepositories.

In order to abundant the bioinformatics of bioresources and prevent the infection immediately. This project aims to establish a local infectious biorepository including a bio-material bank storing pathogens and a pathogenic gene bank (Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database, TPMGD) storing gene sequences of pathogens and epidemiologic information to provide bio-materials and related information. TPMGD includes influenza virus and enterovirus isolates collected by our contract laboratories from community surveillance. We will culture virus isolates and store them in our bio-material bank. And we will sequence specific genes of these virus isolates, store these sequences and related epidemiologic information in TPMGD for governmental, academic, and industrial research.

一、 前言：

由於全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交流日漸頻繁，各種未知/新興感染疾病的威脅日增，例如 1997 年的 H5N1、2003 年的 SARS 及 2009 年的 pandemic H1N1，由於該類病毒散播快速增加群眾感染風險，由於皆可能為先出現於社區的新興傳染病，顯示建立良好監測系統之必要性¹。

另隨著分子生物技術的進步，國際間基因體研究已非常興盛，例如利用基因序列診斷出不知名的發燒，為蟬蟲所攜帶之螺旋菌感染²；亦或透過基因型與血清型之分析，辨別出肺炎球菌是否產生抗藥性³，諸多的基因體研究儼然已經成為防疫的重要武器之一。現今國際間已經建立許多蒐集基因體相關的資料庫，如包含各種微生物及其衍生物的資料庫，最常應用以由美國國家生物技術資訊中心所建立的 NCBI 資料庫 (National Center for Biotechnology Information)，其收錄之資料涵蓋來自世界各地之生物研究，並且能讓使用者免費自由下載進行生物研究；此外，亦有以監測各種重要病原在全球流行動向為主的資料庫，如流感病毒、麻疹病毒、人類免疫缺乏病毒基因等為主要收集目標的資料庫等 (<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>)^{1,4,5}，或以收集各種重要病原基因資料為主，並提供分型分析工具與比對資料庫，作為重要病原在國際間散播或病原變化的監測等，其重要性皆是在建立完善的生物資源並將其靈活運用；雖然在國際間已經建立如此大規模的資料庫，但是仍然不能滿足在本土防疫上的急迫性，因此為了構築針對本土病毒的基因體資料庫，本署於民國 97 年 12 月起與陽明大學「國科會進階生物資訊核心設施研究團隊」合作建置「病原微生物基因體資料庫對外開放網站暨分析平台(簡稱基因資料庫)」，以每筆對應的方式整合國內近年流行腸病毒、流感病毒基因序列與不含個人隱私之流行病學資料(包括性別、年齡、居住地、發病日期等)，供各界取得與分析應用⁶。

然而基因資料庫目前保存的基因序列主要是流感病毒的血球凝集素

(hemagglutinin, HA)和腸病毒的 *VPI* 基因片段。過去曾藉由此資料庫分析發表數篇論文，如簡等人分析 92-95 年間的流感病毒基因及流病資料⁷、分析 B 型流感的基因重組情況⁷、黃等人分析 95-96 年的腸病毒 71 型係屬於新引入的基因亞型 B5 及 C5 所引起⁸，更確認 97 年所大流行的也屬於 B5 基因亞型，與中國大陸所流行的 C4 基因亞型或新加坡所流行的 C2 基因亞型不同，並於同年發現 C2-like 基因亞型⁹，諸多成功的研究成果皆指出基因體資料蒐集的重要性；因此除了維持仍有的病毒基因序列蒐集之外，仍應該不斷的擴增病原基因體資料庫的豐富性，例如曾經在美國導致疫情爆發的腺病毒¹⁰；未來進一步更能依據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，針對傳染病進行全面的資料蒐集，面對未知的新興傳染病時，既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，還需獲取更多生物資訊，作為未來防疫政策擬定及相關疾病研究的重要參考。

建立完善的基因體資料庫，除了蒐集完整的重要基因片段之外，保存傳染病生物材料在未來不僅是純粹作為學術研究，甚至是國際間疫情探討的重要籌碼；因此於 1987 年前起預防醫學研究所設立血清銀行，執行加強 B 型肝炎防治計畫所保存之血清檢體，目前所保存檢體種類包括血清、病原體，以及病原體相關衍生物；檢體來源除上述之血清外，也包括法定傳染病驗餘檢體、病毒實驗室分離病原體、重要醫院感染菌株、以及其他相關研究計畫檢體等，迄 2017 年 7 月底，共保存重要傳染病病毒 87,776 株、細菌 49,784 株、第三級病原體 35,388 株與血清檢體 279,280 件；隨著生物材料庫保存之生物材料逐漸增加，基因體資料庫內容不斷擴增，以及日趨嚴謹之生物安全規範，如何能夠有效的進行管理與資料分析，將會是最迫切需要解決之問題。

目前，將持續透過不斷地蒐集並且豐富資料庫，以及即時的分析資料上傳，提供病毒流行趨勢、病毒株型別變化、病毒抗藥性資料等於每周、定期性疫情分析資料參考，並定期將資料回饋給提供收案的實驗室與定點醫院，作為醫療

與病患互動的訊息，以達到藉此資料庫的資訊來提供傳染病即時預警及防疫政策參考；未來資料庫亦可作為病原體快速檢驗技術與疫苗的開發依據，對於早期找出感染原與控制疾病蔓延不可或缺。

二、 材料與方法

(一)、生物材料庫之建置

檢體收集：本研究計畫以建構感染症監測網，優先收集重要病毒（包括腸道病毒及呼吸道病毒）為主軸，並擴增病毒性感染症合約實驗室之檢驗量能。全國分成北、中、南、東等四區，共委託 8 家的機構擔任本署病毒性感染症合約實驗室，進行相關病毒之抗原性、抗藥性及疫情流行趨勢監測，相關陽性檢體分離之病原體，依規範送回本署生物材料庫。本署經培養鑑定與基因定序再確認回送之病原樣本後入庫保存，以擴增本土生物材料庫之量能，以及充實病原體基因資料庫之內容。

1. 檢體來源：

- i. 合約實驗室依所在醫學中心的門診，住院及急診病患，合乎採檢定義者。
- ii. 院外定醫採檢點：合約實驗室於分配負責轄區內，尋找合作之地區採檢點醫師，每一個採檢點每週以送驗二件為原則。
- iii. 品質規劃：目前院外定醫診所配合委託合約醫院之採檢點，如配合意願落差大，將影響各區域監測品質。若合約醫院發現採檢點醫師之送檢頻率下降，或無配合意願，可透過本署轄區衛生局或本署區管中心尋求協助，協助另外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。

2. 採檢定義：

- i. 疑似流感病毒或腸病毒感染病患：前者需符合類流感病例定義【1.突然發病、有發燒（耳溫 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 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。】註：請注意區別單純性流鼻水、扁桃腺炎與支氣管炎等。後者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。

- ii. 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)。

3. 檢體收件與運送：

定點醫院採檢點於檢體樣本採取後，應先於 4°C 冷藏保存，並於 24 小時內送至病毒合約實驗室處理；檢體送驗過程應符合感染性生物材料運送規定以三層包裝置於本署專用之檢體送驗箱中，維持 4°C 冷藏運送。

4. 檢驗方法及步驟：

i. 病毒培養：

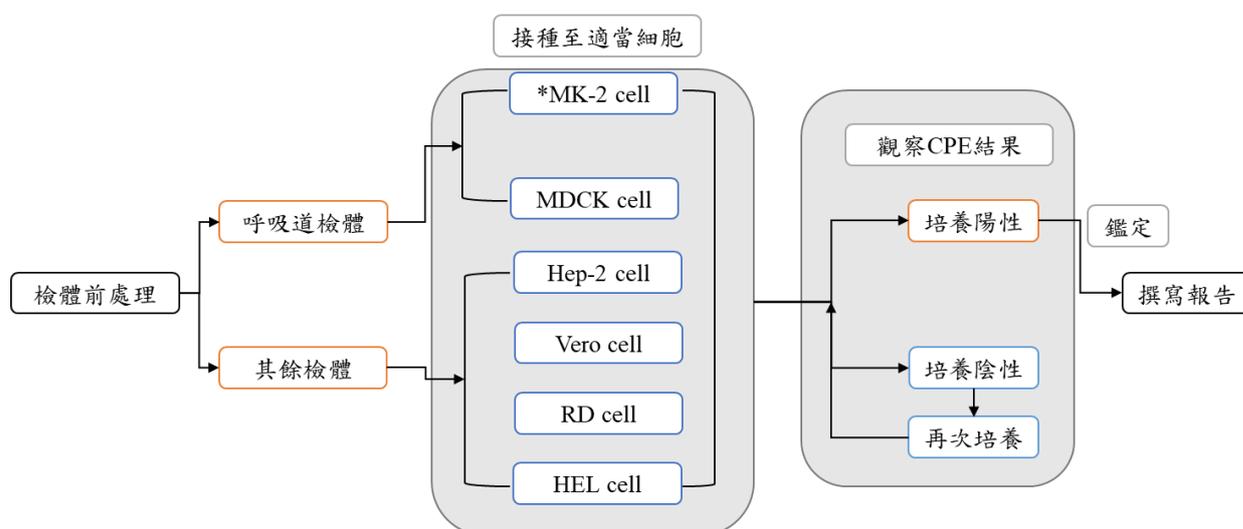


圖 1：病毒培養與鑑定示意圖

- A. 病毒培養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. 流感病毒培養流程：將由含有病毒粒子之病毒液 200 μ L 與 1mL 病毒培養用細胞培養基（不含胎牛血清）充分混合，經 0.45 μ m 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(Cytopathic effect)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。

- C. 腸病毒培養與鑑定：將由含有病毒粒子之病毒液 200 μ L 與繼代數三代以內之培養細胞(RD Cell)充分混和，靜置於 34°C、CO₂ 濃度 5%之培養箱培養，觀察 CPE 情況並且每天記錄病毒培養情形，以 CPE 面積大於 75%為+++等級，收取以 3000rpm 離心 15 分鐘之上清病毒液，保存並且完成腸病毒之培養流程；腸病毒型別之鑑定為使用間接免疫螢光染色法 (Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)，將 1-3.cc PBS 加入培養完成之細胞管柱中，利用 vortex 管柱以達到碎裂細胞之目的，將管柱離心後取出多餘的 PBS 溶劑(管內約留下 0.5cc PBS)，均勻混和並且將內容物滴至觀察玻片上，待溶液風乾後將玻片置於丙酮液中 15 分鐘，風乾以達到固定細胞之功效。以市售之 Chemicon 為螢光染色試劑組，將第一劑抗體約 5~10 μ L 加入並且置於潮濕盒中以 37 °C 之烘箱烘烤，烘烤完成之玻片以 Tween 20 及 PBS 等溶劑清洗、風乾，加入第二劑抗體標幟物(goat anti-mouse IgG FITC)，再次放置潮濕盒與烘箱進行烘烤，烘烤完成後以 Tween 20 及 PBS 等溶劑清洗、風乾，將玻片滴上甘油進行螢光染色結果觀察，當細胞出現蘋果綠 (apple green) 螢光則判定為病毒陽性。
- D. 流感病毒分子檢測：以 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 進行萃取病毒 RNA，先吸取 560 μ L Lysis buffer 放入 1.5ml 離心管，再加入 140 μ L 的病毒細胞培養液，震盪混和，靜置於室溫反應 10 分鐘，加入 100%酒精 560 μ L 後，將上述混合液利用管住分兩次以 8000rpm 分別離心 1 分鐘，隨後加入清洗液(AW1)500 μ L 以 8000rpm 離心 1

分鐘，再次加入清洗液(AW2)500 μ L，進行第二次清洗，最後以 13000rpm 離心 5 分鐘，已徹底去除管柱中吸附在膜上之酒精殘留液，清洗皆完成之後，加入萃取液(AVE)60 μ L，室溫靜置 5 分鐘並且以 13000rpm 的 4°C 離心 1 分鐘，取得 RNA。RNA 取得之後，流感病毒以一般 PCR 實驗流程進行 *HA* 基因檢驗，其依據不同病毒型別所使用的引子序列如。

- E. 腸病毒分子檢測：以 QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit 進行萃取病毒 RNA，先吸取 560 μ L Lysis buffer 放入 1.5ml 離心管，再加入 140 μ L 的病毒細胞培養液，震盪混和，靜置於室溫反應 10 分鐘，加入 100%酒精 560 μ L 後，將上述混合液利用管住分兩次以 8000rpm 分別離心 1 分鐘，隨後加入清洗液(AW1)500 μ L 以 8000rpm 離心 1 分鐘，再次加入清洗液(AW2)500 μ L，進行第二次清洗，最後以 13000rpm 離心 5 分鐘，已徹底去除管柱中吸附在膜上之酒精殘留液，清洗皆完成之後，加入萃取液(AVE)60 μ L，室溫靜置 5 分鐘並且以 13000rpm 的 4°C 離心 1 分鐘，取得 RNA。RNA 取得之後，腸病毒之型別檢測皆以 CODEHOP(Consensus Degenerate Hybrid Oligonucleotide Primer)進行檢測，所使用的引子如；其實驗順序為，首先進行反轉錄酶反應(RT, Reverse transcription)，再將產物進行聚合酶反應(PCR, Polymerase chain reaction)，以得到腸病毒之片段 *VPI* 基因 PCR 產物，隨後送至定序公司進行定序以及後續定序結果基因分行分析。
- F. 定序結果基因分型分析：將 DNA 定序結果利用 Sequencher 序列組合分析軟體進行定序檔案(*.ab1)資料組合，其軟體設定 Minimum Match Percentage 需大於序列總數量 80%，Minimum Overlap 需大於 20 個鹼基，並且軟體程式自動偵測之序列 Quality 數值不得低於 70%；

序列組合完成，將連同流行病學資料，且進行去識別化處理後，上傳至病原微生物基因體資料庫中備存；流感病毒於後續分析中，將利用 BioEdit 軟體進行序列排序動作，其使用的演算法為 ClustalW 進行 1000 次 Bootstrap NJ Tree 之排序結果，並且與 WHO 每年公布之病毒疫苗株進行序列相似程度分析；腸病毒於後續分析中，如若出現 EV71 與 EVD68 型別，將利用 BioEdit 軟體進行序列排序，其參數與流感實驗相同，而後將使用 MEGA 生物資訊軟體，進行 Bootstrap NJ Tree 模擬 1000 次之演化樹分析，藉此提供更詳細的型別檢驗結果。

5. 檢體之保存與病毒株之寄送：

- i. 合約實驗室每週將全部陽性病毒株，同檢體清冊寄回至本署。
- ii. 檢體保存：臨床檢體應保存於零下 70°C 冷凍櫃內，陰性檢體需保留三個月，陽性檢體保留六個月，必要時以提供本署相關臨床檢體確認（含能力測試檢體）。
- iii. 品質監測：基於防疫調查需求、確認病毒株、或維持合約實驗室之品質，備份檢體或病毒株重複檢驗，以及查閱相關之檢驗記錄。

6. 實驗室培養品質管制

- i. 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、種原細胞與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)部品之品管相關紀錄等，至少保存 3 年

(二)、建置病原體基因資料庫並強化其防疫上的應用

1. 腸病毒、流感病毒基因鑑定分析流程

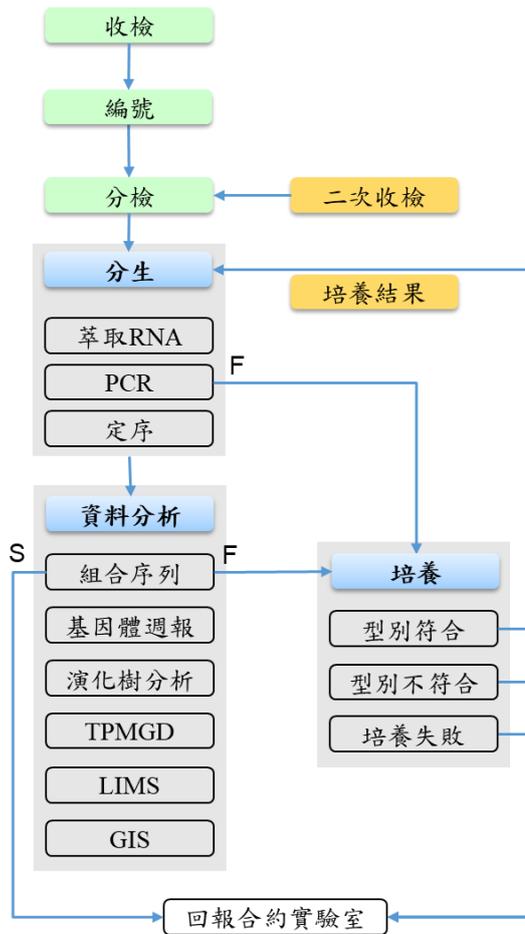


圖 2：腸病毒、流感病毒基因鑑定分析流程示意圖

- i. 將合約實驗室送檢病毒株進行病毒核酸的萃取、RT-PCR、產物純化以及 Cycle Sequencing 等，進行核酸染劑純化後上機進行序列判讀，最後進行序列組合與病毒型別判別。
- ii. 挑選病毒核酸序列，連同自國內外資料庫下載的參考病毒株序列，使用 BioEdit 軟體進行多序列排列比對。
- iii. 將整理過後的序列進行各序列位點變化的分析，包括將變異程度較大或者是抗原決定位的位點進行分析，以及針對抗藥性決定之特定位點進行分析。
- iv. 使用 MEGA 軟體進行親緣樹狀圖的繪製，藉以確認所流行的病毒株之基因型別與各國病毒株之親緣關係。
- v. 合併流行病學資料分析流行之病毒株的來源、基因型別變化、傳播過程、

或演化速率等。

- vi. 將分析完成之病毒株基因序列，上傳至病原體基因資料庫中(TPMGD)，以提供後續研究所需之素材。

2. 病原體基因資料庫網頁之建置

- i. 目前定序分析自動化程式與實驗室資訊管理系統功能編修與維護：包括檢體的追蹤、PCR 與定序流程、序列比對、結果分析和結果回饋自動郵件寄發，以強化系統功能，增進效率。
 - A. 新版基因資料庫系統維護與功能新增：定期更新系統功能，並整合病毒、細菌、真菌等基因分型資訊與整合性流行病學資料。目前病原體基因資料庫蒐集序列資料超過 33,000 筆。
 - B. CODEHOP 定序服務網站建置：因應腸病毒 CODEHOP 快速檢驗計畫，透過網頁介面化設計，建構一個資料庫系統，將疾病管制局各實驗室定序服務之流程進行線上化、資訊化與自動化。
 - C. 基於政府資訊公開及資源共享的原則，2008 年起以合作計畫方式開放腸病毒、流感病毒序列及相關流病資料的申請，至今至少已有十位學者教授使用過本資料庫，共計分享約三萬筆基因序列及流行病學資料。

三、 結果

1. 生物材料庫建置與流行趨勢分析

本研究中檢體收集以合約實驗室所在醫學中心門診、住院及急診病患，或院外定醫採檢點收案之病患，須符合採檢定義者：

採檢定義為疑似流感病毒或腸病毒感染病患：前者需符合類流感病例定義【1.突然發病、有發燒（耳溫 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 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。】註：請注意區別單純性流鼻水、扁桃腺炎與支氣管炎等。後者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；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。

- i. 依據該檢體收集規則，由 2018 年 1 月 1 日至 2018 年 10 月 18 止，來自北中南東各區合約實驗室總計收案送驗 8719 疑似病毒感染檢體，其中疑似呼吸道病毒感染 5985 件，成功分離出呼吸道病毒，包括流感病毒 1479 株(24.7%)、腺病毒 553 株(9.2%)與其他病毒 392 株(6.5%)，統計至 10/18 前自合約實驗室送回流感病毒 1459 株、腺病毒 545 株與其他病毒 372 株(HSV1、PARAINF、RSV、CMV、Metapneumovirus)；於此同時為了擴增生物材料庫之庫存與基因體資料庫檢驗流感之業務，入庫前再確認總計培養 1168 株流感病毒；而疑似腸病毒感染共計收案 2734 位，其中成功分離出腸病毒者 990 株(36.2%)，於 10/18 前總計送回本署 967 株，入庫前品質檢驗確認，共計培養 966 株病毒。
- ii. 相較於去年同時期，呼吸道病毒不論是送驗數量或分離成功數皆些許低於去年，然而以病毒分離成功率而言，今年則略勝於去年，與今年腸病毒疫情流行不明顯相關；以疑似症狀與地區將其細分之後，呼吸道病毒

今年度的病毒分離率以中區(增加 5.29%)與南區(減少 3.09%)的變化幅度最大，平均而言呼吸道病毒仍然與去年有相同的病毒分離率，然而以周統計數據顯示，在流行時期，在今年初呼吸道病毒的檢驗陽性率有明顯的提升；與去年相比呼吸道病毒的流行週期有些許不同，2017 年主要集中在 21~33 週，2018 則主要流行自 2017 年年底至 17 週(圖 3)，以病毒種類區分，去年與今年流行的呼吸道病毒依然是流感病毒為主(圖 4)，2017 年度主要流行的流感病毒以 INFAH3 為主，至 2017 年 48 周至 2018 年初，流行株則轉為 INFB 為主要流行的病毒株，流行約至 17 周左右流感病毒陽性率均為低度流行，感染人數僅每周以微幅逐漸增加，流行病毒株逐漸轉以 swH1 以及 INFAH3 為主(圖 5)。

- iii. 腸病毒檢驗方面，2018 年病毒送驗數量明顯高於去年同期送驗數量，並且病毒分離率也有顯著的提升，分別為北區增加 2.17%、中區增加 22.18%、南區減少 5.33%與東區增加 15.24%，如此顯著的提升病毒分離率，主要原因為今年流行的病毒株種類和去年有很明顯的不同，去年主要流行的腸病毒族群為 CA (Coxsackie virus A)，其他腸病毒族群僅有零星個案，但是在 2018 年起，主要流行的腸病毒族群則由 CA 轉為 CB (Coxsackie virus B)與 ECHO (Echovirus)為主要流行病毒株，除此之外容易誘發重症感染的腸病毒 71 型 (EV71)也在 2018 年後半年有顯著的增加(圖 6)；將病毒流行的型別細分之後，2017 年腸病毒主要為 CA4 與 CA6 為主要的流行型別至年底開始出現零星 CA16，至 2018 年上半年，CA4 仍維持低度流行病例，至 17 周起主要流行的型別 CA10、CA16 與 ECHO11 感染病例則開始明顯偏高(圖 7)；腸病毒在 2018 年時，以 ECHO11、CA10 與 CA16 為主要的流行型別，然而並非全台灣地區的流行趨勢一致，將台灣以四區分析如(圖 9)中所示，ECHO11、CA10 與 CA16 三種型別的腸病毒主要流行於台灣北區及東區，而西區及南區則

是持續流行與去年相同的型別。(歷年流行概況圖 8)

- iv. 進行生物材料分讓交流：為促進國內學術及醫藥生技產業之研究與發展，本署蒐集之生物材料，無償提供申請病原體之分讓服務 107 年至 10 月 18 日止共辦理 26 件生物材料分讓作業，其中 20 件為學術單位生物材料分讓，6 件為醫藥生技產業生物材料分讓。建置病原微生物體基因資料庫與其防疫上之應用

2. 建置病原微生物體基因資料庫與其防疫上之應用

病原微生物基因資料庫(TPMGD)，為全國唯一具多樣性的病原體基因資料庫，其整合病毒基因序列及相對應流行病學資料，作為防疫政策與疫情爆發時有力的生物資訊分析後盾。

- i. 2018 年 1 月截至 10 月 18 日止，資料庫共匯入 1322 筆資料，其中呼吸道病毒 555 筆、社區監測腸道病毒 710 筆與重症個案腸病毒 57 筆資料，目前累計資料庫已累計超過 30000 筆基因序列資料可供各單位申請使用(表 3)。
- ii. 2018 年中，腸病毒 ECHO11 病例明顯偏高，並出現重症與嬰兒死亡病例，為了能夠快速比對出此次 ECHO11 的流行病毒株，及區分社區流行與群聚或重症感染病例之病毒株之相似性，以制訂合宜的防疫方向，經基因序列分析後，判斷此次疫情社區監測、腸病毒群聚與重症病患 ECHO11 型別均屬於 Lineage IV，與 2013 日本株(LC014882)及 2010 年日本株(AB601188)演化分類接近(圖 10)，並且從演化樹中推論，此次流行的 ECHO11 有可能是從 2015 年起開始的病毒變異，詳細研究可以再透過病毒全基因序列進行更深度的探討。
- iii. 在流感病毒監測應用，透過社區流感病毒監測發現，2017 年流行之病毒株為 INFAH3，至 2017 年底約 47 周起持續至 2018 年初流行病毒株改以 INFB 為主直到進入秋季，流感病毒又再次從 INFB 轉至 INFAH3，

INFAH3 流行期間社區監測並沒有偵測到 INFB 病例(圖 5)，直至 2018 年 10 開始檢出 1 例 INFB，然而卻在此 INFB 案例，基因序列的分析中卻發現，其基因型別與 B/Victoria, B/Colorado/06/2017-like 株相似，該病毒株為首次在台灣發現，與今年疫苗株相同，將持續密切觀察今年病毒株的變化以提供疫苗政策參考。

- iv. 持續性的進行基因體分析，亦能作為監控病毒是否產生蛋白質結構改變的最佳手段，如作為研判防治工作之抗病毒藥劑使用的效果，以流感病毒為例，其基因體中的 *NA* 基因(Neuraminidase)能轉譯出 NA 蛋白質，該蛋白於呼吸道中與唾液酸(sialic acid)進行結合，藉此被呼吸道細胞的唾液酸受體辨認，因而感染呼吸道細胞¹¹，目前台灣治療流感藥物為 Relenza 及 Tamiflu，其作用機制便是利用 NA 蛋白質會與唾液酸結合的特性，製造出一個類似唾液酸的相似物和 NA 蛋白質結合，促使 NA 蛋白質無法正常發揮作用，導致流感病毒感染細胞之能力下降；因此觀察該基因體是否產生變異，同時檢視蛋白質結構是否產生改變，便能夠即時判斷病毒是否產生抗藥性，例如 INFB 可以觀察 E117G、Q138R、P139S、G140R、R150K、D197E，INFAH3 可以觀察 E119D、I222L、R224K、E276D，INFASWH1 可以觀察 H275Y 等胺基酸重要位置，若發生胺基酸取代將有可能導致流感藥物失效。以 INFB 的 NA 蛋白質為例(圖 11)，圖中紫色的部分為第 119 號胺基酸位置，該位置處於蛋白質的酵素活性位點，圖中 DANA 為唾液酸之類似物，如果該位點的氨基酸進行突變，進而改變蛋白質結構，將有可能造成藥物失效，因此透過基因體資料庫中所蒐集的基因序列進行觀察，將能夠提供更多的資訊以建立更優質的防疫政策。

四、 結論與建議

1. 生物材料庫建置

- i. 生物材料庫將隨著每年持續收集我國重要病毒株儲存件數，準備為其未來面對各種疾病監測回溯比對及準備因應未知與新興病原時的警急應變能力，為我國儲備重要的傳染病資源；然而目前生物材料庫，僅能夠以各種計劃擴增病毒株儲存數與維持保存寶貴生物材料資源，並因為人力逐年缺乏，以及設備老舊與不足，因此重點監測僅能以常見的流感病毒以及腸病毒進行較深入研究，其他種類生物材料與病毒株僅能先提供病毒株的凍存；未來希望能爭取更多資源以逐漸擴充各種重要病原之研究與資料庫之建置。此外，未來世界將邁入精準醫學以及個人醫學的時代，生物材料庫的建置必須能夠有有效的運用，除了期許各種病毒皆能進行基礎研究之外，甚至收集完整的臨床訊息，併以個人化基因組建立資料，以提供更有效的防疫醫療研究，同時可以藉由此基因研究資料，降低個人罹患傳染性疾病的可能性與提升國民生活品質。

2. 病原基因體資料庫

- i. 因為經費連年的縮減，導致基因體資料庫每年能夠擴增的基因序列不斷縮減(圖 12)，如若沒有其他計畫提供基因序列或流行病學資料，此資料庫的生物資訊資源將會隨時間不斷減少，因此可能使得該資料庫的功能隨時間下降；此外資料庫當中所儲存的傳染病資料與基因序列皆主要為腸病毒及流感病毒，其占比率高達 90%(圖 13)，因此資料庫能夠實質應對的傳染性疾病有限，因此如何能夠提高資料庫的豐富程度，是現在以及未來都必須面對的問題；基因體資料庫因為連年的預算縮編，也導致了原來設計的網頁分享功能無法持續精進應用；由於預算的不充足，合約實驗室進行的社區監測檢體，僅能以抽樣方式進行分生檢驗與病毒株

基因分析建置資料庫。為了解抽樣是否造成病毒株監測代表性偏差，因此將病毒基定序抽樣之時序行趨勢，與門診就診感染流行趨勢數據比較，趨勢圖顯示，目前抽樣方式檢驗依舊能夠與實際病毒流行趨勢相符合(圖 14)，惟抽樣檢驗雖然能維持相同的流行趨勢，但是若在疫情爆發時需要足夠量的序列資訊進行分析，可能會造成資訊量的不足以及抽樣並未抽到檢驗的情況，因此做為一個巨量資料的傳染病資料庫，除了傳染病種類的豐富程度之外，數據量的充足也是其重點之一。

- ii. 目前病原微生物基因體資料庫(TPMGD)，已收錄高達 30000 筆資料，未來仍將持續擴充序列與流行病學資料，同時持續為社區疫情監測以及序列演化分析提供助力；然而因為系統規格與設備的老舊，諸多軟件也已逐漸不支援更新，因此當務之急必須先將 TPMGD 資料進行全面性的整合，同時進行資料庫網站前台與後台之架構強化，提升設備效能與全面更新網頁架構；而該計畫實行起來將面臨諸多困難，原因為病原微生物基因體資料庫需要由相關專業領域人才管理，目前，本署缺少相關生資人才，因此引進研發替代役研究助理協助管理，未來相關人才晉用方式取消後將產生人才斷層，將更難以進行資料庫及網站的擴充與升級。

3. 防疫應用

生物材料庫與基因體資料庫透過經連累月不斷的擴增生物資源，除了在疫情發生時，可以快速提供生物材料進行病毒檢驗與判斷型別之外，還可以透過長時間的資料對整體疫情流行趨勢進行分析(圖 9、圖 10)；此外利用基因序列進行基礎研究，可以更深入了解病毒與藥物之間的關係(圖 15)，藉此提供更好的生物數據分析，以達到提升防疫品質與規劃正確防疫政策之功效。

五、 參考文獻

- 1 Jones, K. E. *et al.* Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990-993, doi:10.1038/nature06536 (2008).
- 2 Bissett, J. D. *et al.* Detection of Tickborne Relapsing Fever Spirochete, Austin, Texas, USA. *Emerging infectious diseases* **24**, 2003-2009, doi:10.3201/eid2411.172033 (2018).
- 3 Ubukata, K. *et al.* Effects of Pneumococcal Conjugate Vaccine on Genotypic Penicillin Resistance and Serotype Changes, Japan, 2010-2017. *Emerging infectious diseases* **24**, 2010-2020, doi:10.3201/eid2411.180326 (2018).
- 4 Centers for Disease, C. & Prevention. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **48**, 845-849 (1999).
- 5 Hajjeh, R. A. *et al.* Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerging infectious diseases* **8**, 145-153, doi:10.3201/eid0802.010165 (2002).
- 6 Huang YP, Y. C., Chen YJ, Chuang PC, Hsu LC, and Wu HS. Taiwan pathogenic microorganism genome database and its applications. *Taiwan Epistemology Bulletin* **26**, 364-374 (2010).
- 7 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).
- 8 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).
- 9 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).
- 10 Biggs, H. M. *et al.* Adenovirus-Associated Influenza-Like Illness among College Students, Pennsylvania, USA. *Emerging infectious diseases* **24**, 2117-2119, doi:10.3201/eid2411.180488 (2018).
- 11 Air, G. M. Influenza neuraminidase. *Influenza Other Respir Viruses* **6**, 245-256, doi:10.1111/j.1750-2659.2011.00304.x (2012).

六、 表

表 1：流感病毒核酸檢測用引子組序列表

Gene	Genotype	引子 編號	對應病毒 序列位址	序列 (5' - 3')	
HA	AH1N1	H1F-6	6-23	AAGCAGGGGAAAATAAAA	
		H1R-1193	1176-1193	GTAATCCCGTTAATGGCA	
	Pandemic H1N1	n-HA-316F	316-336	ACRTGTTACCCAGGRGATTTC	
		n-HA-1238R	1220-1238	TCTTTACCYACTRCTGTGAA	
	AH3N2	H3F-7	7-24	ACTATCATTGCTTTGAGC	
		H3R-1184	1167-1184	ATGGCTGCTTGAGTGCTT	
	B	BHF-52	52-72	CTACTCATGGTAGTAACATCC	
		BHA-2R	996-1018	TGCATGTTCTCCTGTGTAGTAAG	
		BHF-493	493-514	ACCTCAGGATCTTGCCCTAACG	
		BHA-3R	1505-1528	GAAGCATCCATTCCCTATGTCTAC	
NA	AH1N1	NA1-25F	25-48	ACCATTGGATCAATCAGTATAGCA	
		NA1-838R	817-838	TGCCAGTGTCTGGGTAACAGGA	
		NA1-710F	710-732	CATGTTTCACCATAATGACCGAT	
		NA1-1411R	1391-1411	ACTTGTC AATGGTGAAYGGCA	
	Pandemic H1N1	n-NA-536F	536-557	GGTCAGCAAGCGCWTGYCATGA	
		n-NA-1326R	1306-1326	GCTGCTYCCRCTAGTCCAGAT	
	AH3N2	NA2-1F	1-22	AGCAAAAGCAGGAGTAAAGATG	
		NA2-847R	827-847	CTCGACATGCTGAGCACTTCC	
		NA2-579F	579-598	AAGCATGGCTGCATGTTTGT	
		NA2-1431R	1410-1431	GCTTATATAGGCATGAGATTGA	
	B	n-BNA- F317	317-336	CCAAAGGAAACTCAGCTCCC	
		n-BNA- R1274	1255-1274	ATACAGGGGACATCRCATTT	
	M	INF A	MP-1F	1-23	AGCAAAAGCAGGTAGATATTGAA
			MP-1027R	1002-1027	AGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTAC TC
NP	INF A	n-NP-5F	5-24	CAGGGTAGATAATCACTCAC	
		n-NP-536R	516-536	AGAGCACATYCTGGGATCCAT	

表 2：腸病毒診斷用引子組序列表

Primer 編號	Gene	對應病毒序列位址	序列 (5' - 3')
011 ^a	2A	3408-3389 ^e	GCICCGAYTGITGICCRAA
187 ^a	VP1	2612-2631 ^e	ACIGCIGYIGARACIGGNCA
189 ^a	VP1	2612-2631 ^e	CARGCIGCIGARACIGGNGC
159 ^b	VP3	2385-2403 ^f	ACYATGAAAYTGTGCAAGG
162 ^b	VP1	2869-2850 ^f	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC
222 ^a	VP1	2969-2951 ^e	CICCIGGIGGIAYRWACAT
EV-2400F ^d	VP3	2400-2422 ^e	GCTTTGTGTCTGCMTGYAATGA
CA24-D1 ^c	3C	5371-5390 ^g	TACAA ACTGT TTGCT GGGCA
CA24-U2 ^c	3C	6025-6044 ^g	ACTTC TTTTG ATGGT CTCAT
CA24-F ^d	VP3	2353-2375 ^g	ACAAGAATAGTGGTGCCATCTGG
CA24-R2 ^d	VP1	2813-2835 ^g	TGTGTAHGTGATAGCCCATGTRG
AN88 ^h	VP1	2977-2951 ^e	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT
AN89 ^h	VP1	2602-2627 ^e	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
224 ^h	VP3	1977-1996 ^h	GCIATGYTIGGIACICAYRT
188	VP1	2612-2630	ACIGCIGTIGARACIGGNG

表 3：病原微生物基因體資料庫年度儲存資料量(依發病日時間進行分類)，至 20181018 止，總計上傳 33,911 筆資料於資料庫中

Virus Type	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	Total
Influenza	5	1234	1777	1124	4983	2526	2268	768	736	374	455	372	480	550	17652
Human Enterovirus	0	31	1822	2793	1864	2843	774	723	400	324	187	250	203	706	12920
Human Adenovirus	0	30	346	103	335	392	0	0	0	0	0	0	0	0	1206
Flaviviridae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	4	0	0	24
Retroviridae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	50
Enterovirus severe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	42	81	57	183
Human Immunodeficiency Virus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1876	0	1876
Total	5	1295	3945	4020	7182	5761	3042	1491	1136	698	715	668	2640	1313	33911

七、圖

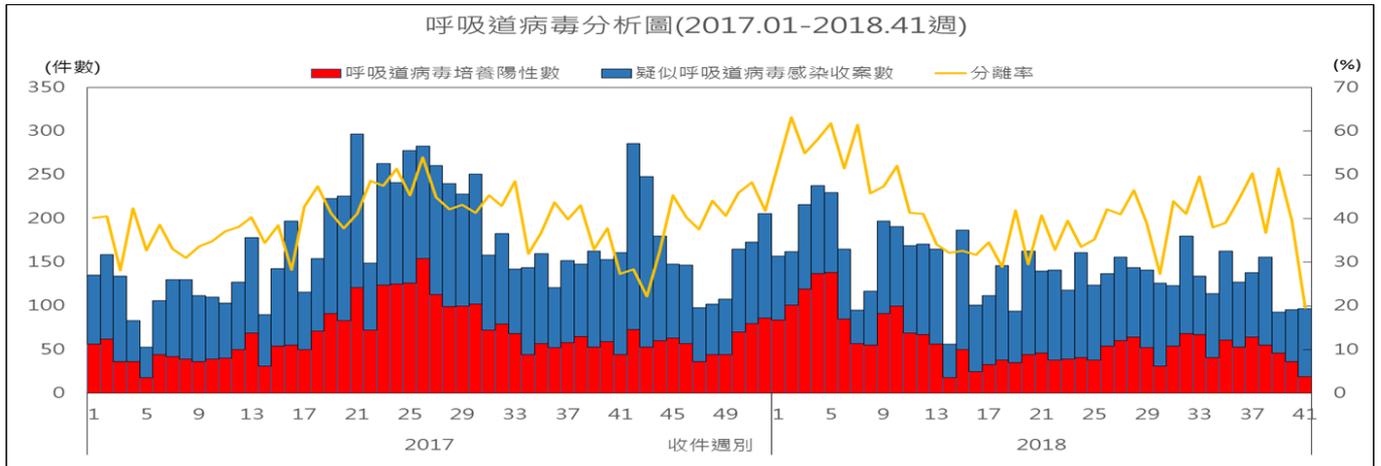


圖 3：2017 年與 2018 年同期各區呼吸道病毒數量趨勢圖(2017 全年，2018：1-41 週)，當疫情產生時，呼吸道病毒的檢驗陽性率有明顯的提升，與去年相比呼吸道病毒的流行時間週期有些許不同，2017 年主要集中在 21~33 週，2018 則主要流行自 2017 年年底至 17 週。

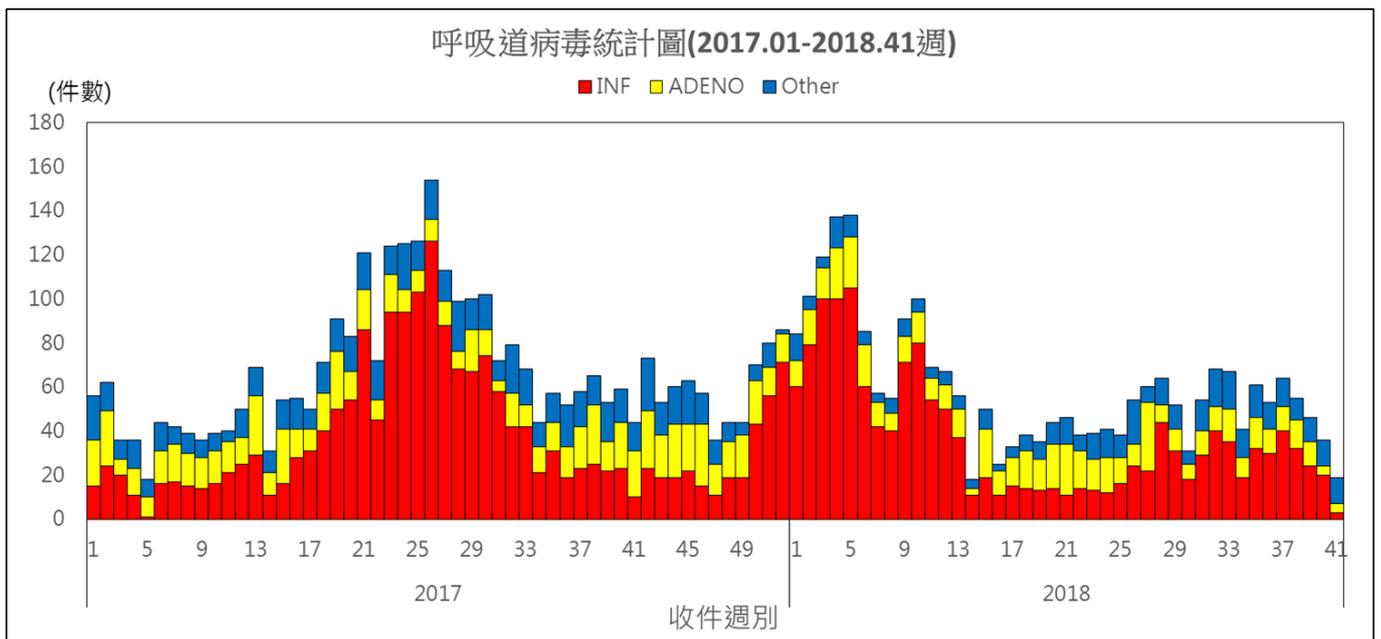


圖 4：2017 年與 2018 年同期呼吸道病毒數量趨勢圖 (2017 全年，2018：1-41 週)，與 2017 年相比呼吸道病毒主要流行的時間週期並不相同，2017 年主要於年中流行，2018 年於 2017 年年底便開始流行，但是主要流行的呼吸道病毒依舊是以流感病毒為主。

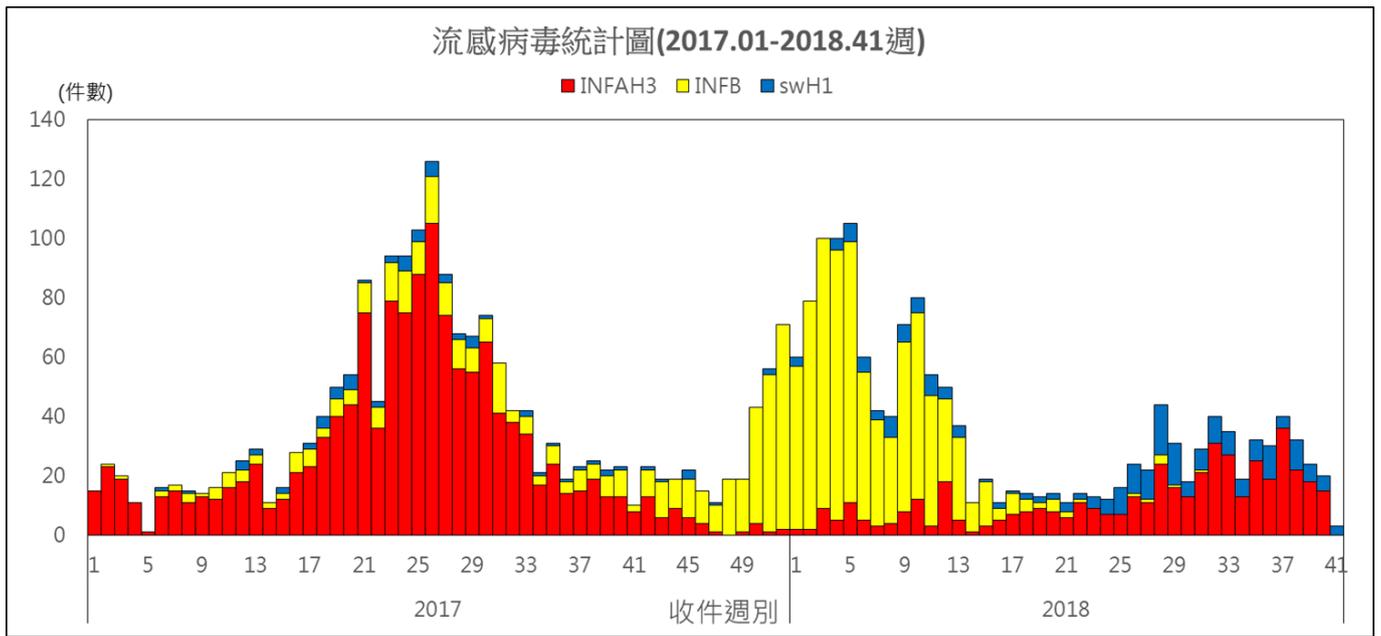


圖 5：2017 年與 2018 年同期流感病毒病毒數量趨勢圖(2017 全年，2018：1-41 週)，圖中可以明顯的發現，2017 年度主要流行的流感病毒以 INFAH3 為主，然而時至 2018 年起，流感病毒則轉為 INFB 為主要流行的病毒株，並且當 INFB 病毒株開始衰退時，swH1 以及 INFAH3 有同時興起的趨勢。

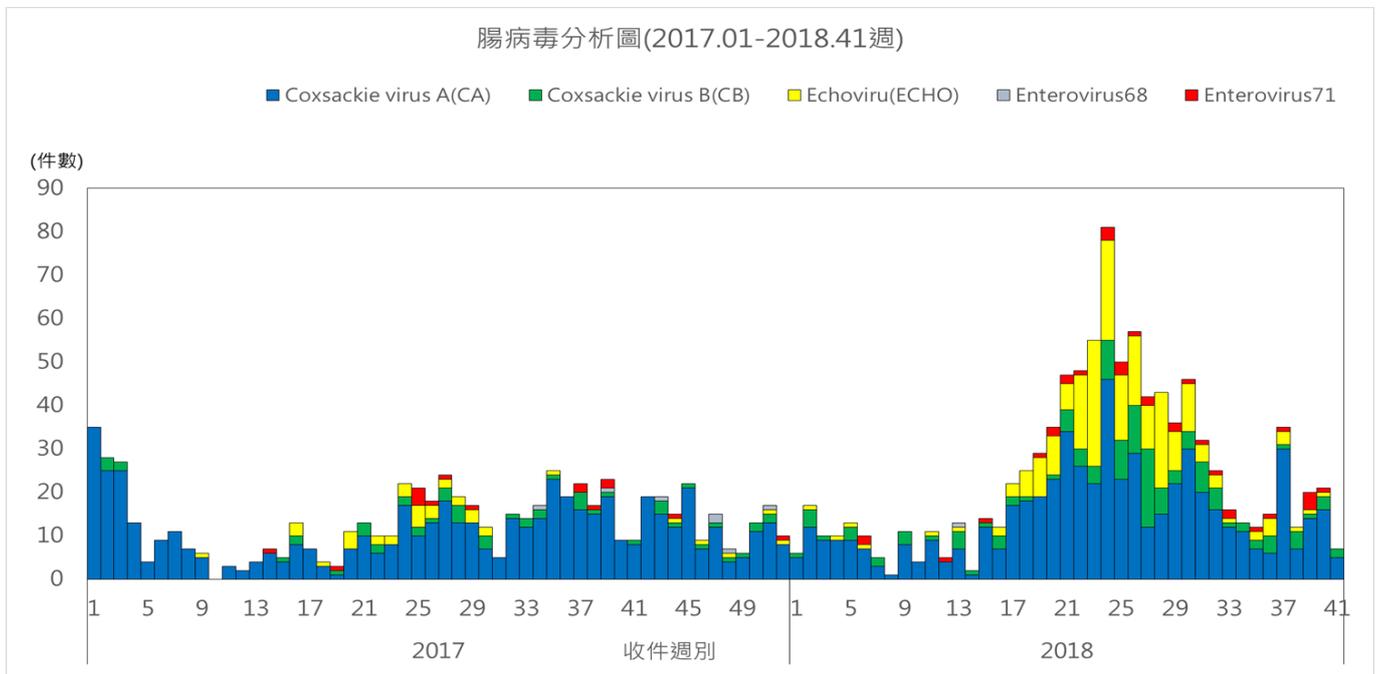


圖 6：2017 年與 2018 年同期腸病毒數量趨勢圖(2017 全年，2018：1-41 週)，2017 年主要流行的腸病毒族群為 CA，與其他族群的零星個案，但是在 2018 年起，主要流行的腸病毒族群則由 CA 轉為 CB 與 ECHO 為主要流行病毒株，除此之外容易誘發重症感染的腸病毒 71 型後半年有顯著的增加

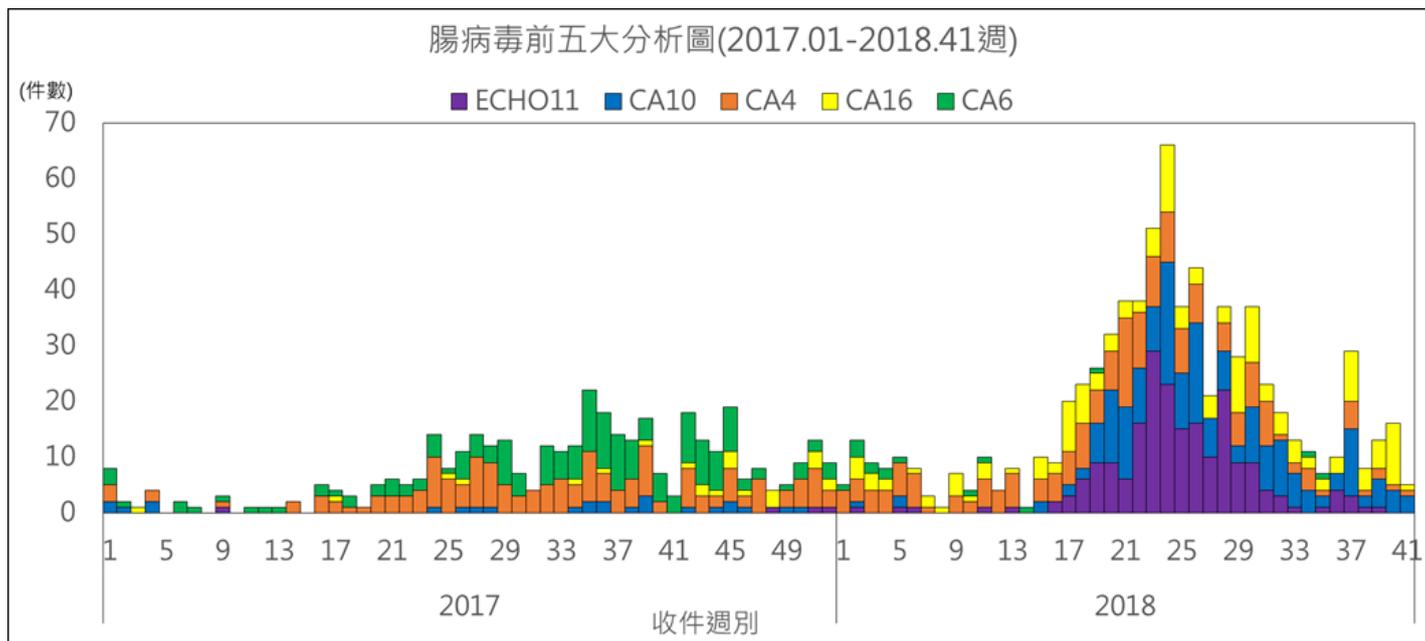


圖 7：2017 至 2018 年腸病毒流行型別數量累積圖(2017 全年，2018：1-41 週)，2017 年主要流行型別為 CA4、CA16，然而時至 2018 年起，腸病毒主要流行型別則轉為 CA10、CA16 與 ECHO11 為主

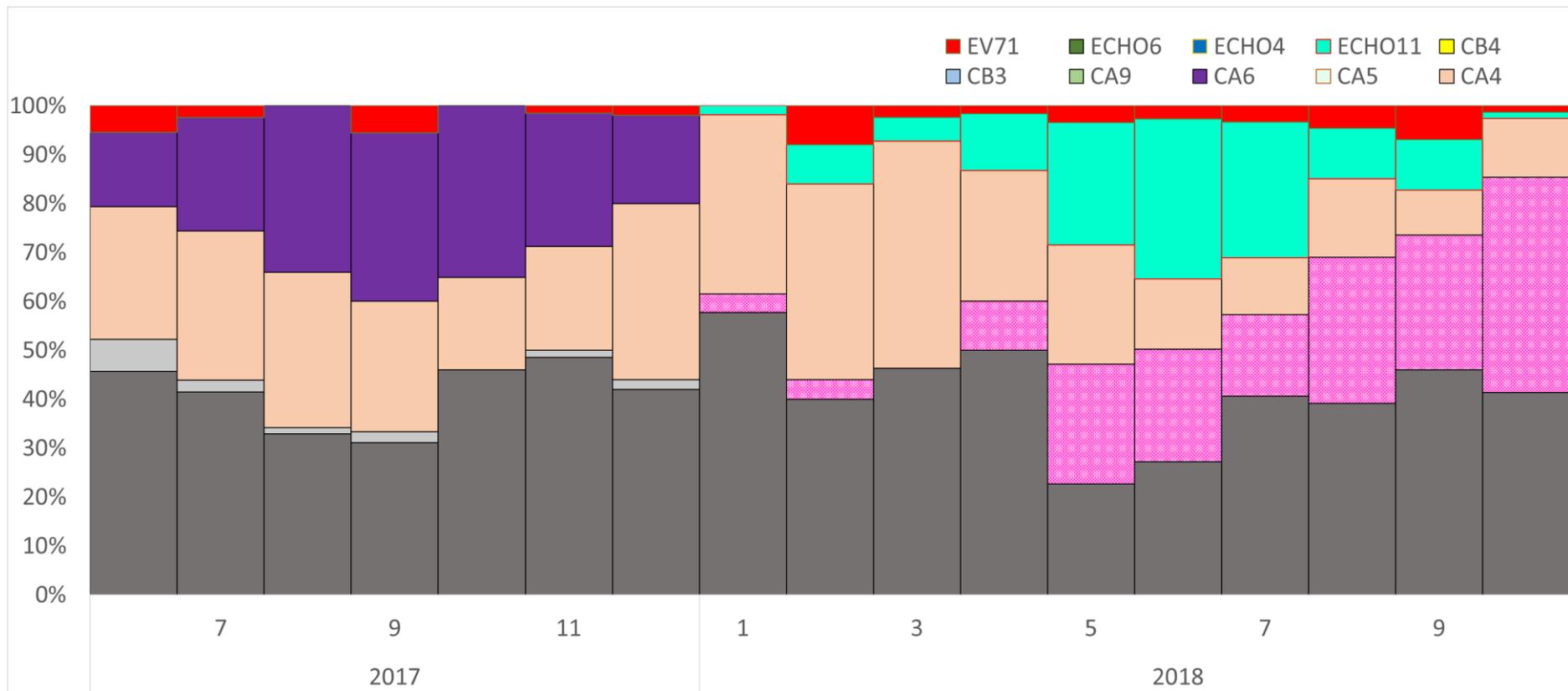


圖 8：2017 年至 2018 年腸病毒型別流行概況

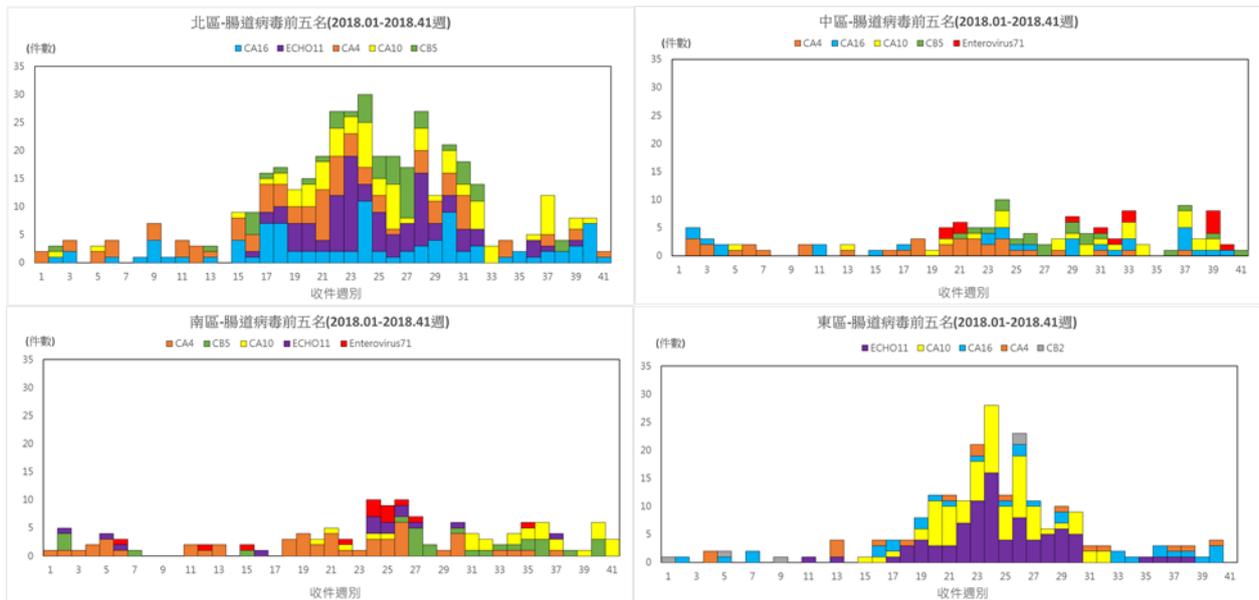
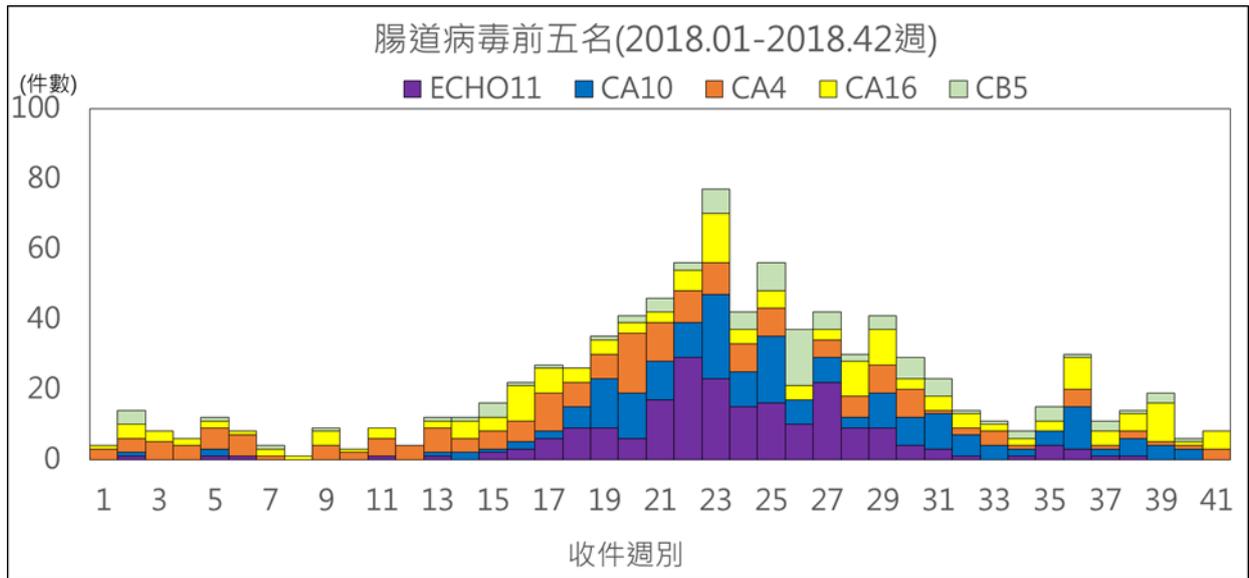


圖 9：腸病毒型別統計數量與流行分布圖，以流行分布而言，2018 主要流行 ECHO11 以及 CA10，其主要流行的區域為北區以及東區。

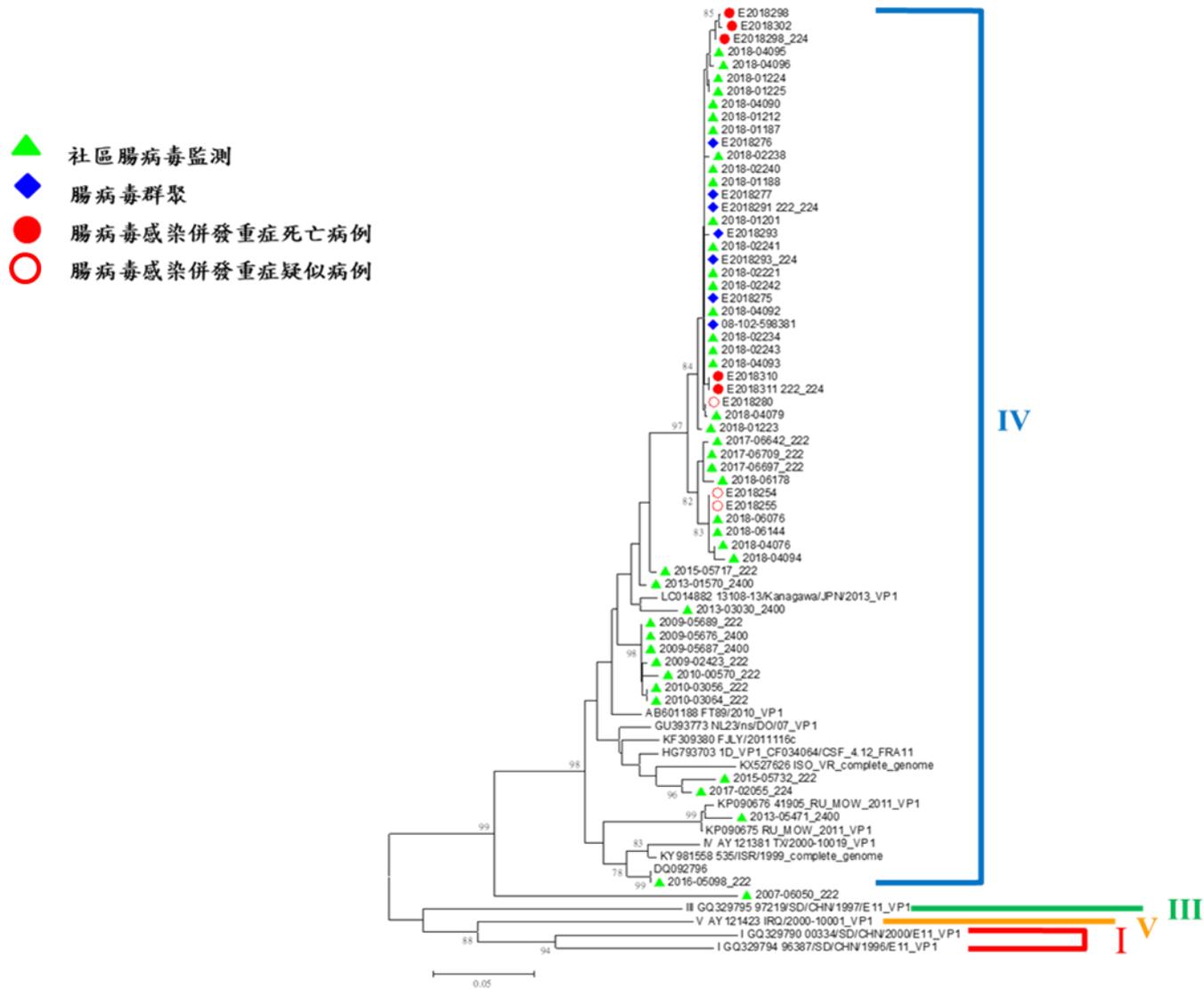


圖 10：ECHO11 演化樹分析，大部分社區監測、群聚與重症皆相似，與 2013 日本株(LC014882)及 2010 年日本株(AB601188)接近

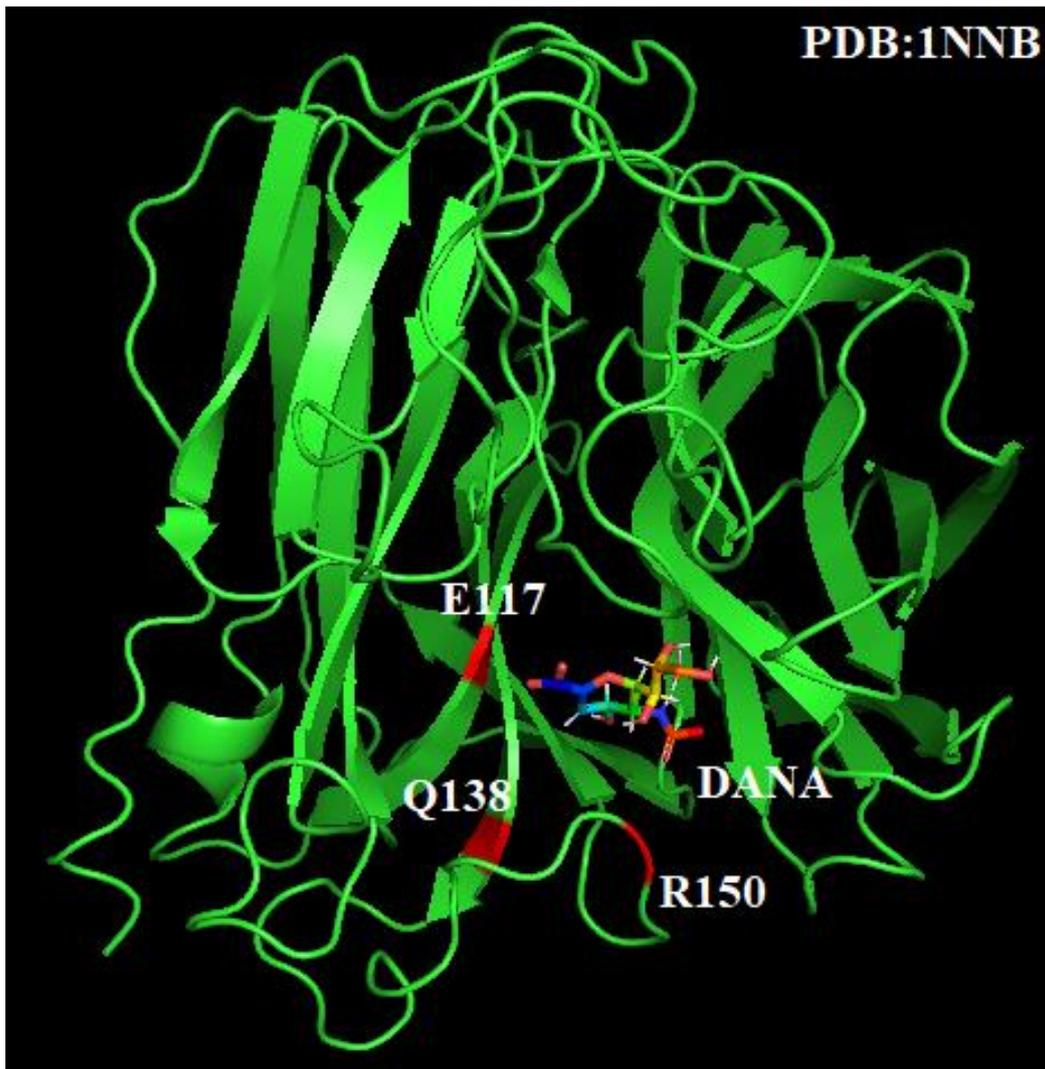


圖 11：流感病毒 NA 蛋白質，圖中所示 DANA 為唾液酸之類似物，其結合位為 NA 蛋白的酵素活性位，若是酵素活性位如 E117、Q138、R150 等胺基酸產生變異，便會影響其蛋白質功能。(PDB:1NNB)

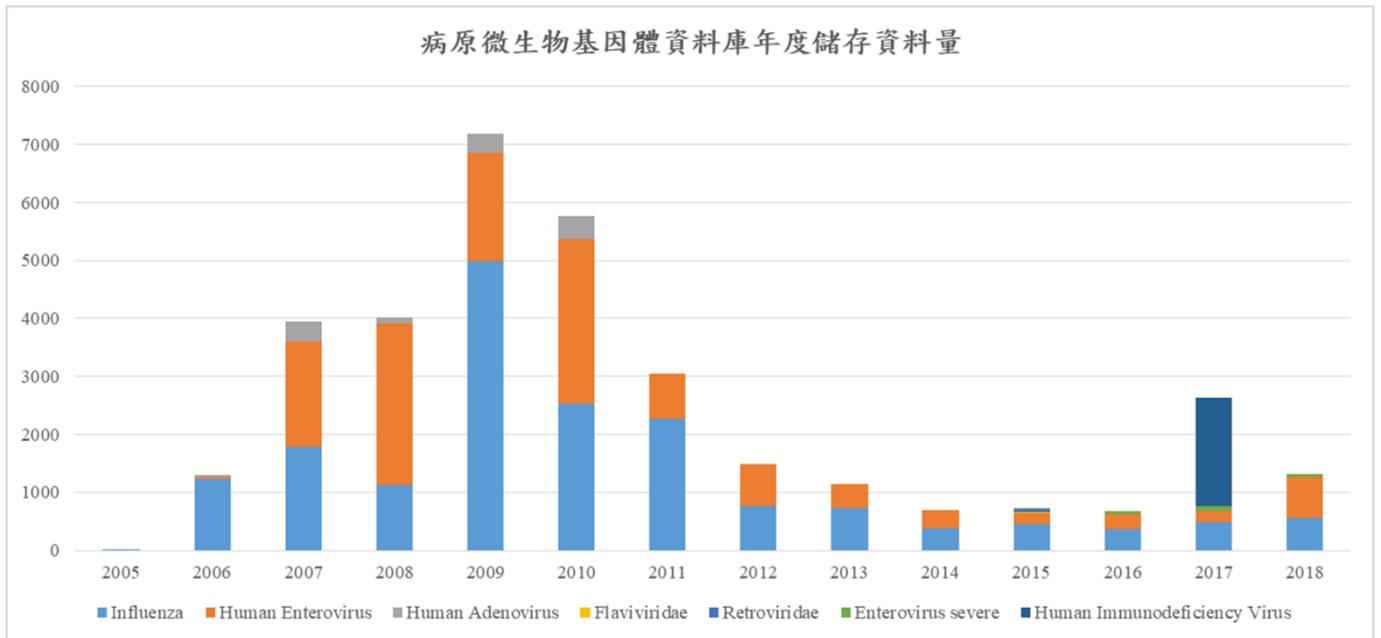


圖 12：病原微生物基因體資料庫年度儲存量，隨著經費縮減，基因體資料庫每年所能儲存的生物資源也逐年下降，圖中 2017 年時，因為有 HIV 合作相關計畫，因此儲存了近千筆的 HIV 流行病學資料於資料庫當中

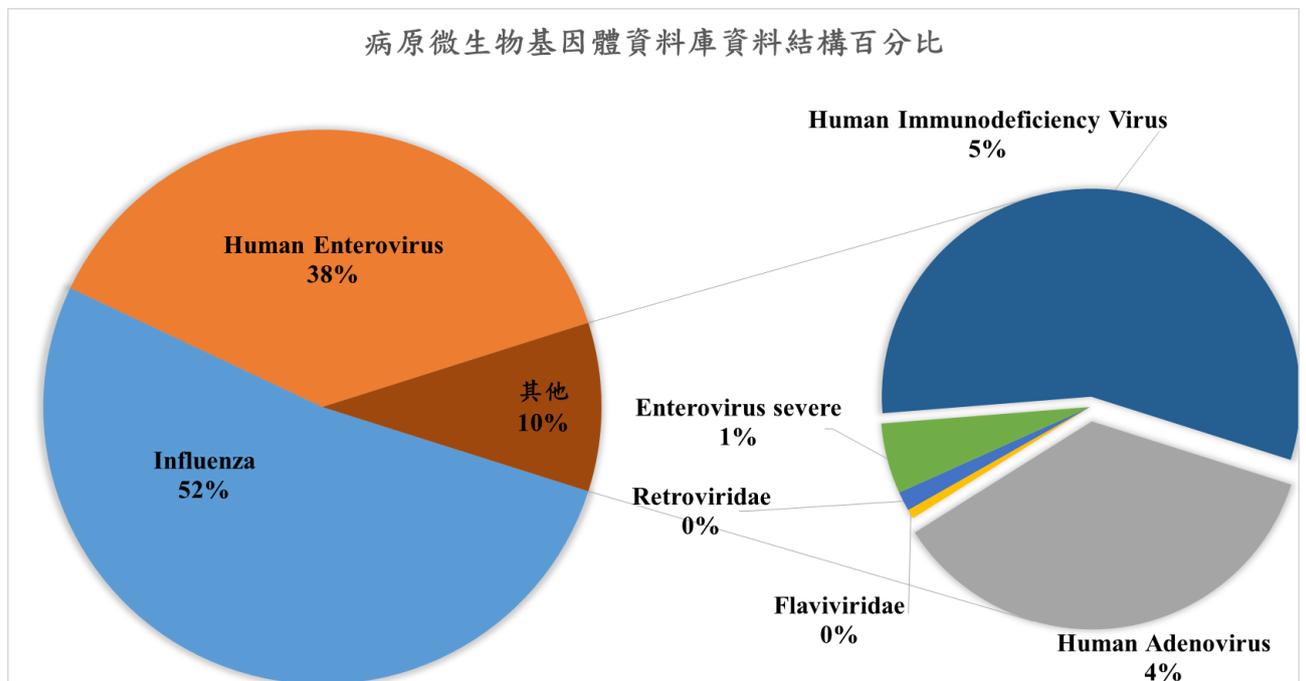


圖 13：病原微生物基因體資料庫資料結構百分比，90%以上資料為腸病毒與流感病毒

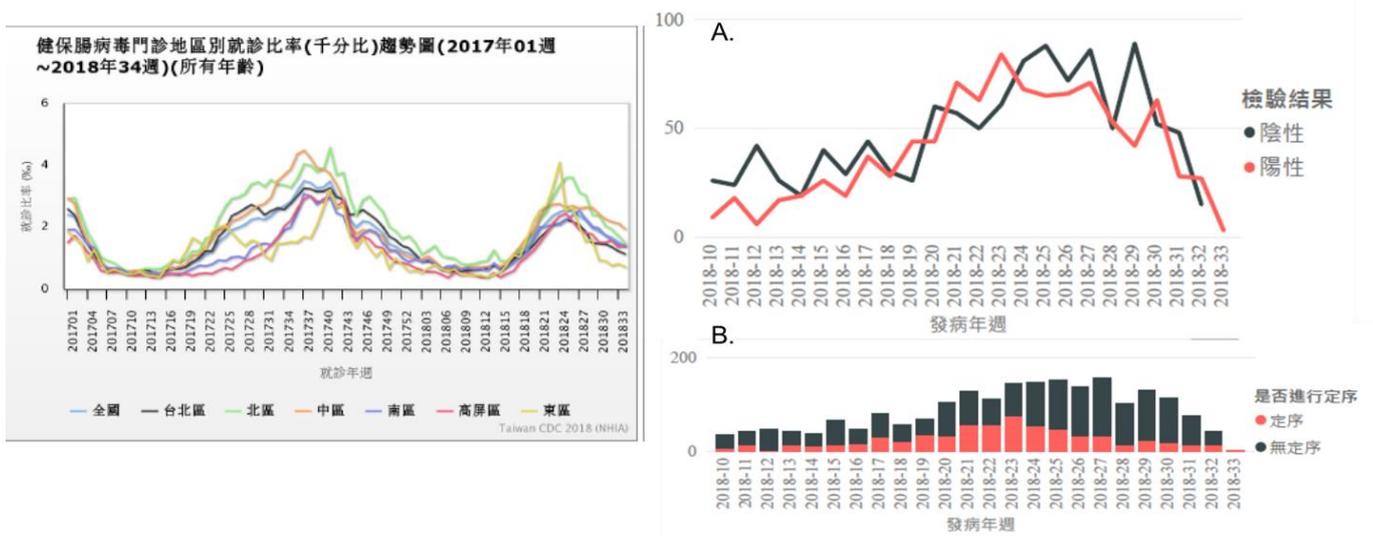


圖 14：抽樣定序結果與實際腸病毒門診流行趨勢比較圖，圖中可以發現在相同年週的情況下，抽樣採檢與實際門診有相同之趨勢