

計畫編號：MOHW111-CDC-C-315-134116

衛生福利部疾病管制署 111 年署內科技研究計畫

計畫名稱：腸道及呼吸道病毒之實驗室診斷監測及基因資料庫
之建立與應用

年度/全程研究報告

執行單位：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：楊志元、劉銘燦、楊季融、李中皓、吳靜怡、

黃湘怡、鄭玉新、蔡昆霖、沈容均

執行期間：111 年 1 月 1 日至 111 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 260 萬元整

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、研究報告中文摘要	(03)
二、研究報告英文摘要	(04)
三、前言	(06)
四、材料與方法	(16)
五、結果	(21)
六、結論與建議	(28)
七、參考文獻	(30)
八、表	(32)
九、圖	(33)
十、附錄	(43)

研究報告中文摘要

關鍵詞：腸道病毒與呼吸道病毒監測、生物材料庫、基因序列、感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台

全球化的疾病傳播與基因體研究的快速發展，促使世界各國對於生物材料相關資源保存及應用逐漸提高重視；為了提高國內對於本土疫情研判速度與增加國際之間生物材料交流之籌碼，本署於民國 97 年 12 月起與國立陽明大學合作建立「台灣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)」，之後持續儲存來自全國腸道與呼吸道傳染疾病病原之相關基因序列資料，並凍存生物材料，以利後續產業界與學術界研究與應用發展。

由於基因資料庫建置已久，為豐富資料庫內容與操作的便利性，本計畫規劃 4 年期研究計畫，並延續 108 年「強化病原微生物基因體資料庫架構與建立系統化分析流程」前期規劃，將主要目標訂於更新與維護基因資料庫網站系統架構、編修系統程式碼，以及進行資料格式統一與資料重整，此外藉由持續透過合約實驗室社區網絡收集病毒材料與資料，加強深入病毒株分析，以增加生物材料資料庫資料深度及豐富基因資料庫材料收集。本年度計畫仍將持續與病毒合約實驗室進行社區監測，採集疑似呼吸道與腸病毒感染之病毒株，進行病毒培養與病毒分子生物學鑑定，挑選病毒株再深入基因分析了解病毒演化，回饋合約實驗室與疫情監測相關病毒變化訊息，達到即時監控病毒型別流行趨勢之功能；計畫中持續優化基因資料庫進行系統維護與架構整理，與本署內外網間系統介接，並且探討基因資料庫與國際上主要基因資料保存相關網站之差異性，藉此評估新增本署基因資料庫功能。

Abstract

keywords : enterovirus and respiratory virus monitoring, biological resources, gene sequences, Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database

The rapid development of global disease transmission and genomic research has prompted countries around the world to pay more and more attention to the conservation and application of biomaterial-related resources. In order to improve the diagnosis speed of domestic epidemics and increase the international exchange of biomaterials, Centers for Disease Control (CDC), R.O.C has already established a pathogenic gene bank (Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database, TPMGD). This database stores related gene sequences from enterovirus and respiratory infectious diseases in various counties and cities. Also, the freezing of biological materials in CDC can be used to facilitate the research and application development of the industry and academia.

Since TPMGD was established in 2008, our job is always to collect virus genome segment and improve the system operation. To achieve this goal, we plan a four-year project. This project is the extension of the "The Database Structure Refine and Establishing Systemic Analysis Workflow of Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database ". The previous project is main to update and maintain the gene database website system, refine the system code, and processing the data format unification and reorganization. On the other hands, the virus sample and epidemic data returned from the virus contract laboratory will be cultured and collected into this gene database and biomaterials storage. Therefore, this project will continue to cooperate

with virus contract laboratory and also monitoring the epidemic changes in community. The collecting of suspected respiratory virus and enterovirus infections will be identified the subtype. The contract laboratory will receive the gene sequence as a feedback to monitor the virus changing tendency, immediately. Beside, this year we will continue to maintain the system of TPMGD and to evaluate the possibility of system combination of CDC and evaluating the addition or removal of the genetic database functions.

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 及 2020 年 COVID-19，疫情爆發之初均以特殊新興傳染病或未知感染症在社區出現散發病例，經過多重病原檢測及比對後才確認病原體，顯示良好的疾病監測、病原體診斷系統及生物資料庫之重要性[1]。歷年我國已建立法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室社區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，但面對未知的新興傳染病及國際疫情時，除能快速偵測比對病原體、分析其可能的感染源、監控疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，還需有豐富資料庫以提供更多生物資訊，並增進對該病原的瞭解及認識，作為未來防疫政策擬定及相關疾病研究的重要參考。

本署傳染病生物材料之保存管理，源起於 1987 年預防醫學研究所時期設立血清銀行，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，檢體來源除早年自上述之研究計畫收集血清外，尚包括法定傳染病驗餘檢體與分離病原、病毒實驗室分離病原體、重要醫院感染菌株、以及本署相關研究計畫檢體等，迄 2022 年 6 月底，共保存重要傳染病病毒 85,226 株、細菌 45,193 株、血清檢體 269,505 件。歷經多年，本署傳染病生物材料庫之保存管理已略具規模，為執行與維持目前生物材料庫保存之長期運作，提升生物材料系統功能及保存管理，並符合日趨嚴謹之生物安全規範，以及擴充生物材料庫量能之需求，未來將對國內學術單位加強推廣應用與合作，以及與生技業者簽訂合作協議，並可藉由國際生物材料分讓，提升生物材料庫量能，以及增加本署實驗室參與國際合作交流。

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，且已建立許多基因資料庫，如 National Center for Biotechnology Information(NCBI，網址：

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、流感基因資料庫(網址：<https://gisaid.org/>)、愛滋病基因資料庫(網址：<https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/index.html>)[1-3]、新冠病毒 SARS-CoV-2 基因資料庫(網址：<https://gisaid.org/>)等。

本署於 2003 年爭取執行「建立我國病原體基因資料庫」國家型計畫，並於 2008 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之腸病毒、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)，供各界應用與分析。上述每筆資料均經本署確認、彙整、分析、建檔，每個月定期更新，同時主動更新網站上儲存之 NCBI 及世界衛生組織(WHO)相關基因資料，以提供可比對分析之國際參考資料[4]，前述之本土病原基因資料、流行病學資訊，可作為防疫、治療藥物、疫苗開發或使用診斷工具的參考依據，進而改善國民健康。

本署的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 VP1 基因。過去曾藉由此資料庫分析發表數篇論文，如簡等人分析 2003-2006 年間的流感病毒基因及流病資料[5]、分析 B 型流感的基因重組情況[5]、黃等人分析 2006-2007 年的腸病毒 71 型係屬於新引入的基因亞型 B5 及 C5 所引起[6]，更確認 2008 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[7]，近年因應本土 COVID 19 疫情檢驗需要，於昆陽實驗室建立國家級檢驗實驗室，針對 COVID 19 進行大規模基因序列檢驗[8]，更於 2021 年發現確認本土首例 H1N2 基因重組人畜共通感染案例[9]。

未來可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，亦可作為病原體快速檢驗技術與疫苗的開發依據，或適用於新興感染原監測系統開發之背景資料庫，對於早期找出感染原與控制疾病蔓延不可或缺。

本計畫主要重點監測分析兩種病毒，其中腸病毒屬於微小 RNA 病毒科 (Picornaviridae)、腸病毒屬(Enterovirus)之病毒，為一群病毒的總稱，其直徑大小約 20–30 nm，不具外套膜(nonenveloped)，呈現立體對稱的正二十面體結構。其基因體為單股正向 RNA，大小約 7.5Kb，其中 5' -UTR 及 VP2 基因為高度保留區，常作為 RT-PCR 臨床診斷腸病毒標的位置，但與血清型別均無關聯性，早期的腸病毒絕大數是在 1948 年至 1963 間利用細胞培養及注射 suckling mice 來培養並進行型別鑑定來區分及認識這些腸病毒。傳統上這些腸病毒是區分成 polio I ~III，克沙奇 A1~A24，克沙奇 B1~B6，伊科病毒 1~34 及其他腸病毒 68 型至 71 型。這些傳統上的分類是利用抗血清以及彼此交互的中和反應測試來鑑定、驗證其型別。近年來由於分子生物學上的長足進步，核酸定序也不再是那麼遙不可及，遂有人開始以分子生物學方法來鑑定腸病毒之型別。另有研究顯示 VP4 基因亦與血清型有密切關係。VP1 為表面結構蛋白，包含了中和抗體之抗原決定位，其基因序列與血清型有密切關聯，目前為止仍是以 VP1 區域（約 900bps）這一區域之序列做區分時，效果最好，且能與傳統上之 Serotyping 有較佳之相關性。同時，依據美國 CDC，Dr. Steve Oberste 對絕大多數之腸病毒 VP1 做序列分析後，以 Phylogenetic Study 區分其關聯性。發現可將這些腸病毒劃分為 4 個族群（A~D cluster）分別為 A（CA16-like）：有 CA2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 及 EV71；B：(CB-like) 有 CB1~6,E1~303,CA9,EV69；C：(Polio-like) 有 PV1~3, 及其他 CA（CA11 與 CA15, CA13 與 CA18 無法區分）E34；D 則只有 EV68 及 70。

近年來腸病毒基因型別的變化或重組可能會影響其疾病之流行，如腸病毒 71 型基因等亞型轉變可能引起新一波流行。因此實驗室需透過分析腸病毒基因序列變異，監控病原體流行狀況，以及變異株或重組病毒的發生，期望能提早做出預警。

第二種重點監測病毒為流感病毒，屬於正黏液病毒科 (Orthomyxoviridae)，病毒基因體為 8 個負單股 RNA，病毒產生 10-14 個蛋白質。流感病毒外套膜上的二種醣蛋白，血球凝集素 (hemagglutinin, HA) 和神經胺酸酶 (neuraminidase, NA) 為病毒主要的表面抗原，可引發中和抗體。HA 與細胞表面的受體唾液酸結合，使病毒進入細胞內，HA 與不同種類受體唾液酸結合，影響病毒感染細胞特異性。NA 則具有切斷醣蛋白及細胞受器上的唾液酸的酵素活性，與病毒自細胞釋出的作用有關。感染人類之流感病毒可分 A, B, C 三亞型，A 型流感病毒可再分次亞型，HA 的次亞型有 18 種 (H1 至 H18) 與 NA 有 11 種 (N1 至 N11)，H1-H16 以及 N1-N9 亞型病毒可感染禽類，H17N10 與 H18N11 為存在蝙蝠的亞型，人類則較易受到 H1, H2 及 H3 亞型的感染。H5, H6, H7, H9 及 H10 亞型也有零星人類案例，但仍無法有效人與人之間傳播。人類歷史上曾發生過四次有記載可驗證的流感大流行，分別是 1918 年的西班牙型流感 (H1N1)，1957 年的亞洲型流感 (H2N2) 及 1968 年的香港型流感 (H3N2)，以及 2009 年來自墨西哥與美國 H1N1，其所引起的全球大流行，都讓數以千萬計的人類遭受感染，甚至死亡。1997 年以來 H5N1 病毒感染人類案例持續出現，2013 年在中國大陸爆發 H7N9 感染案例，H5N1 與 H7N9 兩亞型病毒持續改變，具引起大流行之潛能，需密切注意。流感病毒基因具有高突變的特性，可經由突變及基因重配 (reassortment) 二種方式來產生新型病毒。病毒基因每年所累積的點突變造成抗原小部分的改變，稱為抗原漂移 (antigenic drift)，至於抗原轉移 (antigenic shift)，則涉及基因段的互換，例如當不同來源的病毒株同時感染同一宿主時，病毒於複製過程就可能產生基因段互換及重新排列組合 (reassort)，導致抗原分子的大幅改變，進而形成全新的流感病毒。此高突變率的特性造成其抗原變異較快，人類無法獲得持久的免疫力，且當新型病毒出現，大部分人類族群對新型病毒皆無免疫力時，易進而造成全球性的大流行。

世界衛生組織(World Health Organization, WHO)估計全球每年流感侵襲率在兒童約 20-30%、成年人約 5-10%，流感主要導致嬰兒、老人或慢性病患等高危險群者住院和死亡，估計每年約造成 3~5 百萬例嚴重病例，約有 25-50 萬人死亡 (WHO, Fact sheet on influenza, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>)。流感疫苗與抗病毒藥物為流感防治最主要的方法，然而因流感病毒變異快，疫苗株與流行株不符合將降低疫苗的效率，並使流感相關死亡率增加，如美國 2003-2004 與 2007-2008 流感季。而抗藥性病毒產生，將衝擊抗病毒藥物在防治流感上的應用。流感病毒監測主要目的，在於即時瞭解流行病毒的特性、流行時間、感染者族群，病毒的特性包含病毒的亞型(A 型或 B 型)、A 型次亞型(H1、H3 或新型病毒)、基因突變等。流感病毒傳播快速，需全球性監測，才能及早發現新病毒出現，故 WHO 聯合世界各國流感監測實驗室，形成全球流感監測與應變系統(GISRS, Global Influenza Surveillance and Response System)，GISRS 已涵蓋 111 會員國(51%) 佔全球總人口數 91%，GISRS 每年檢測 1,530,000 檢體，分析~7,200 病毒株。

WHO 為了使疫苗株與流行株符合，每年分別於二月與九月更新並建議北半球與南半球下一流感季使用之疫苗組成，流感疫苗株的選擇，主要根據 GISRS 監測資料，而監測資料來源與疫苗施打期約相差 8-12 個月，若新的抗原變異病毒株於此期間出現，將導致疫苗株與流行株不符合降低疫苗的效率。再者，抗藥性病毒的產生，使得治療流感的藥物失效。從 2005-2006 流感季後，大部分流行之 A 型流感 H3N2 病毒 M2 蛋白具有 S31N 突變，此突變造成病毒對 adamantane 類藥物具抗藥性。2007-2008 流感季，丹麥與歐洲其他國家發現 A 型流感 H1N1 病毒 NA 蛋白具有 H275Y 突變，此突變造成病毒對 oseltamivir 藥物具抗藥性，此抗藥性病毒的流行並非在抗藥篩選壓力下產生。在 2008-2009 流感季大部分 A 型流感 H1N1 病毒皆具抗藥性。在台灣，抗藥性病毒株於 2008 年 9 月的 14.3%迅

速擴增至同年 12 月的 100%。對於流感的監視除了需掌握病例數及其分布外，還需高效率之實驗室檢驗來判定，以辨認病毒之抗原性、抗藥性以及基因序列的變化。目前對於流感病毒之抗原性分析，主要利用雪貂之抗病毒血清，雪貂對人類流感病毒的高感受度和臨床病徵與人類類似，故為流感病毒研究常用的動物模式，其抗病毒血清，也為國際上判定不同流感病毒抗原差異的依據。2015-2016 流感季 H1N1pdm09 流行病毒屬於 clade 6B.1 與 6B.2，以雪貂抗血清進行抗原性分析，結果與疫苗株 A/California/7/2009 相似，但人類免疫後血清與流行株 clade 6B.1 與 6B.2 反應差，後來 WHO 建議 2017 年南半球 H1N1 疫苗株由 A/California/7/2009 更新為 A/Michigan/45/2015。H1N1pdm09 clade 6B.1 與 6B.2 造成台灣 2015-2016 年一波嚴重疫情，推究其原因可能與病毒改變與可感受族群累積有關。為了強化流感病毒抗原變化監測，除了使用雪貂抗血清外，人類免疫後的抗體對流行病毒的反應也是病毒抗原是否改變的重要依據。為持續加強流感病毒的全面監測，本計畫擬(1)持續監測台灣流感病毒基因變化、抗原變化與抗藥性之產生。(2) 使用雪貂抗血清，監測台灣流感病毒抗原變化與抗原漂移病毒之產生，並比較流感病毒流行株與分離株之差異。本計畫的進行可即時供流感病毒監測資料，作為調整流感防疫策略依據與參考。

計畫目標

近來，因為全球交通頻繁、氣候變化及土地開發等因素，使未知與新興傳染病逐漸出現，且迅速傳播至世界各地，如 2003 年 SARS 病毒及 2009 年 H1N1 新型流感的流行等，因此，快速監測未知與新興傳染病的流行、準確且有效率地檢驗病原體，將成為防疫成敗的關鍵點。本署依據法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室社區監測等監測系統，可收集全國傳染病流行狀況及全面豐富樣貌的資訊。加強病原體的收集及其基因序列資料的匯整分析，對於新興傳染病以及病原改變可能影響的疫情轉變，有資源快速偵測比對病原體的種類，瞭解可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查，並可得到更多生物資訊以增進對該病原的瞭解及認識，以作為將來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。除此之外，本署於民國 97 年 12 月起與國立陽明大學合作建立「台灣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)」，由於基因資料庫建置已久，為豐富資料庫內容與操作的便利性，在 108 年先進行「強化病原微生物基因體資料庫架構與建立系統化分析流程」前期規劃，後續於本計畫規劃 4 年期研究計畫分年執行，以豐富資料庫內容與操作的便利性。

第一年至第四年各分項重點概述如下

(一)、生物材料收集與保存

透過主動社區合約實驗室監測與法定傳染病通報，持續加強多樣化生物材料的收集，以豐富生物材料的保存品項。

1. 提升病原體增殖保存技術與鑑定的能力，以確保其品質與數量。
2. 加強生物材料交流，加強與國內及國際間相關機構的生物材料交流與合作。

(二)、強化病原體基因資料庫功能與其防疫上的應用

1. 收集當年分區之流感病毒與腸病毒病毒株，進行病原體基因定序，以維持社區抽樣分散代表性；為瞭解我國引起呼吸道感染非流感病毒流行期間之其他重要感染病原流行現況，新增腺病毒其他重要相關病原持續性監測與基因定序，並以此豐富病原體基因資料庫。將陽性病毒株之基因序列應用於主動疫情監測，與過去流行的病毒株序列比較，以瞭解是否為新變異型或新種，以供臨床醫師治療與防疫人員作為之參考。
2. 建立基因定序及序列組合技術，得到病原基因序列後，可快速釐清感染源、抗藥性及流行型別等重要資訊，提供防疫需求。本署針對台灣地區流行的腸病毒、流感病毒及腺病毒等重要病原體進行基因片段的定序，並將定序分析結果及時提供給相關業務單位，作為疾病防治政策制定之參考。
3. 為了符合未來大數據分析的趨勢，進行病原體基因資料庫重整，如資料內容格式統一與資料庫系統升級；依計畫時程逐步加入基因序列模體分析(sequence motif)，針對不同病毒序列保留區域及胺基酸變異位置進行判讀，並且建構多種病原體基因 BLAST 資料庫。
4. 因應緊急疫情分析，進行重點病原全長基因定序，如腸病毒、流感病毒等全長基因序列，透過分析腸病毒、流感病毒等基因序列變異，監控病原體流行狀況，以及變異株或重組病毒的發生，提早做出預警。

(三) 我國重要重點病毒株社區監測

腸病毒(Enterovirus)

為我國最常見之引起人類孩童手足口症及重症疾病病原，屬於微小病毒科的腸病毒屬，大多數腸病毒之感染是沒有任何臨床症狀或僅造成輕微或不甚明顯的臨床表徵，如：發燒或上呼吸道症狀(一般感冒)，然而，腸病毒感染可能造成其他臨床症狀，包括急性出血性結膜炎、無菌性腦膜炎、急性無力肢體麻痺症、心肌炎及新生兒敗血症等^{1,2}，而有些較為嚴重之病患，可能造成重症或死亡，而其 VP1 基因是中和抗體主要作用區域，亦為序列高變異區域^{3,4}，也較常被用作分析。因此，在收集符合臨床條件之檢體後，適當串連各種分子檢驗技術之優點，並建立未知感染源研究檢驗分析方法偵測病原體，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，還可獲取更多生物資訊以增進對該病原的流行狀況及病原、病毒株的變化，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。

1. 腸病毒檢測

- (1) 釐清疾病感染源或感染途徑，提供疾病防治政策參考。
- (2) 監控病原體流行狀況，以及變異株或重組病毒的發生，提早做出預警。
- (3) 提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之參考依據。

2. 腸病毒基因與基因資料庫的防疫成效

- (1) 進行親源演化樹分析，判斷病毒型別與分析流行株抗原性的差異。
- (2) 重要病毒株社區預警監測(EV71、EVD68 等)

流感病毒

人類歷史上曾發生過四次有記載可驗證的流感大流行，分別是 1918 年的西班牙型流感 (H1N1)，1957 年的亞洲型流感 (H2N2) 及 1968 年的香港型流感 (H3N2)，以及 2009 年來自墨西哥與美國 H1N1，其所引起的全球大流行，都讓數以千萬計的人類遭受感染，甚至死亡。流感病毒基因具有高突變的特性，可經由突變及基因重配(reassortment)二種方式來產生新型病毒。病毒基因每年所累積的點突變造成抗原小部分的改變，稱為抗原漂移 (antigenic drift)，至於抗原轉移 (antigenic shift)，則涉及基因段的互換，例如當不同來源的病毒株同時感染同一宿主時，病毒於複製過程就可能產生基因段互換及重新排列組合(reassort)，導致抗原分子的大幅改變，進而形成全新的流感病毒，因此為了持續監測流感病毒抗原分子是否進行大幅度改變，本計畫分項重點如下；社區

流感病毒株基因檢測

1. 每週分析流感病毒，包含 HA 基因序列、抗原性與 NA 基因抗藥性變化。

2. 每週提供流感病毒抗原性與抗藥性資料，作為調整流感防疫策略依據。
3. 特殊病毒株全基因序列分析，以研判感染途徑，作為疫情擴大調查依據。

材料與方法

一、 生物材料庫之建置

(一) 檢體之採取：本署為建構重要病毒(包括腸道病毒及呼吸道病毒)感染症監測網，並擴增實驗室之檢驗量能，自民國 88 年迄今，全國分成北、中、南、東等四區，共委託 8-12 家不等的機構擔任本署病毒性感染症合約實驗室，進行疑似相關病毒感染之社區收案，以建立我國長期穩定之病毒抗原性、抗藥性及疫情流行趨勢監測，相關陽性檢體分離之病原體，依合約送回本署生物材料庫保存，以擴增本土生物材料庫之量能，本署亦另進行病原體之基因定序，以充實本土病原體基因資料庫與即時防疫監控。

1. 檢體來源：

- i. 合約實驗室所在醫學中心的門診、住院及急診病患，合乎採檢定義者。
- ii. 院外定醫採檢點：合約實驗室自行尋找合作之採檢點醫師，每一個採檢點每周以送驗二件為原則。

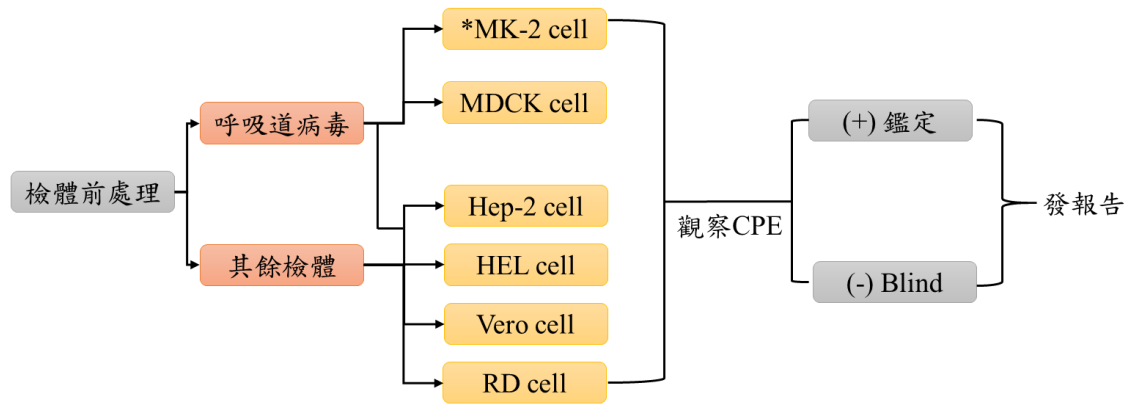
2. 採檢定義：

- (1) 疑似流感病毒感染病患：需符合類流感病例定義【1.突然發病、發燒(耳溫 $\geq 38^{\circ}\text{C}$)及呼吸道症狀。2.具肌肉痠痛、頭痛、極度倦怠感之其中一項症狀者。】；注意區別單純性流鼻水、扁桃腺炎與支氣管炎等。疑似腸病毒感染病患：需為手足口病或疱疹性咽峽炎或無菌性腦膜炎或結膜炎等患者。
- (2) 收案採檢以在發病日 3 日內進行採檢，檢體以咽喉拭子為佳，採檢簡易且分離率高。

(二) 檢體之運送：檢體採集後應於 24 小時內，送至病毒合約實驗室處理；檢體送檢維持 4°C 冷藏，運送過程中，應防滲漏包裝放置於本署專用之檢體 P650 送驗箱中。

(三) 檢驗方法及步驟：

1. 病毒培養：



- (1) MK-2 cell 可以 H292 cell 代替；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。
- (2) 流感病毒培養：將含有病毒粒子之病毒液 200 μl 與 1 mL 病毒培養用細胞培養基(不含胎牛血清)充分混合，經 0.45 μm 過濾膜過濾後，接種至 MDCK 細胞株，培養 7-10 天後，或培養出現 CPE 時，以 3,000 rpm 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 1 mL PBS 混合均勻後，滴入 21 孔玻片。玻片經丙酮固定後，以 Influenza A 及 Influenza B 之單株抗體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，當細胞出現蘋果綠螢光，則判定為流感病毒陽性。

2. 病毒鑑定：

- i. Respiratory viruses (follow DAKO system-direct FA)：抹片固定→風乾→加螢光抗體 10 μl →置於 wet chamber 中 37°C，15 分鐘→以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾，封片觀察。
- ii. Enteroviruses & Respiratory viruses (follow Chemicon system-indirect FA)：抹片固定→風乾→加螢光抗體 10 μl →置於 wet chamber 中 37°C，30 分鐘→PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾→加二次抗體 10 μl →置於 wet chamber 中 37°C，30 分鐘→以 PBS 稍微沖一下，並浸入 PBS 染缸中 5 分鐘→風乾，封片觀察。

**檢驗之病毒包括：Poliovirus、Coxsachievirus A、Coxsachievirus B、Echovirus、Enterovirus68-71、Influenza virus、Respiratory syncytial virus、Parainfluenza virus、Adenovirus、Herpes virus 等。

(四) 檢體之保存與病毒株之寄送：

1. 每周應將全部陽性病毒株，並同檢體清冊寄回本署。
2. 檢體保存：臨床檢體應保存於-70°C冷凍櫃內，陰性檢體需保留三個月，陽性檢體需保留六個月，必要時，本署可要求寄回相關臨床檢體 (含能力試驗檢體)。
3. 基於防疫所需，本署得隨時取回備份檢體或病毒株複檢，以及查閱相關之檢驗紀錄，各合約實驗室並配合所有相關之行政措施，以利疫情之掌握。

(五) 品質管制

1. 定期進行細胞 mycoplasma 檢測及敏感性試驗。
2. 病毒檢驗用細胞株來源、繼代史、繼代紀錄、種原細胞黴漿菌測試等之紀錄需保存。
3. 病毒分離及鑑定之觀察紀錄至少保存 2 年。
4. 所有設備設施、檢體簽收簿、實驗工作簿、檢驗報告及所有內(外)部品管相關紀錄等，至少保存 3 年。

二、 建置病原體基因資料庫並強化其防疫上的應用

(一) 腸病毒、流感病毒及腺病毒基因的分析流程

1. 將合約實驗室送檢病毒株進行病毒核酸的萃取、RT-PCR、產物純化以及定序等，最後進行序列合併與比對分型。
2. 挑選病毒核酸序列，連同自國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。
3. 將整理過的序列進型各點位變化的分析，包括將變異程度較大或是抗原決定位的點位進行分析，以及針對抗藥性決定之特定位點進行分析，以及針對抗藥性的重要特定位點進行分析。
4. 使用 MEGA 程式，進行親源樹狀圖的繪製，藉以確認所流行的病毒株之基因型別與各國病毒株之親源關係。
5. 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。

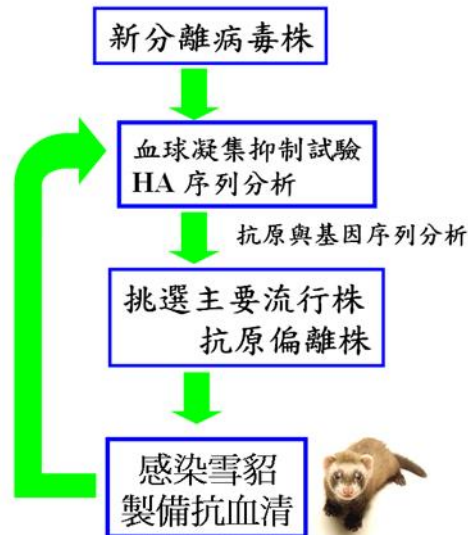
(二) 病原體基因資料庫網站之功能與資料優化

1. 定序分析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、結果分析和結果自動郵件寄發，以強化系統功能、增進效率。
2. 新版基因資料庫系統維護與功能新增：定期更新系統功能，以軟體分析流行病學資料，並呈現於基因資料庫網頁，便於網站使用者觀察流行趨勢。目前病原體基因資料庫以累積人次達 7,640 人次，序列資料超過 30,000 筆。

3. 整合性流感病毒序列自動擷取與分析流程網站建置(IAP)：為即時監測流感病毒迅速突變演化特性，設計一套能即時將國內定序資料與國際公開資料庫比對的網站，並以初步應用於序列即時分析，增加防疫之功效。
4. 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申請，至今已至少有十位學者教授使用個本資料庫，共計分享約兩萬筆基因序列及流行性病學資料。

三、新分離病毒株抗原檢測與雪貂抗血清製備之循環

- (一) 新分離病毒株經抗原與 HA 序列分析，挑選主要流行株與抗原偏離株，大量製備抗原並感染雪貂，製備抗血清。再以抗血清分析後續分離之病毒株，比較其抗原差異。因流感病毒變化快速，需持續監測病毒之演化。實驗流程如下圖。



- (二) 臨床檢體接種於 MDCK (Madin-Darby canine kidney cell) 細胞，分離流感病毒。MDCK 細胞以 EMEM 培養基(內含 10%胎牛血清)於 34°C，5%CO₂ 下繼代培養。

血球凝集試驗:

1. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 50 mL 的 PBS 溶液，於第一列加入 100 ml 的病毒抗原原液，negative control 行則以 100 mL PBS 取代抗原。
2. 取第一列的抗原 50 mL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 50 mL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列，抗原呈現 2 倍～

128 倍稀釋。

3. 每孔分別加入 50 ml 的天竺鼠紅血球 (0.75%)，以手輕微搖晃孔盤後，之後以膠膜封住孔盤，置於室溫或 4 °C 下靜置 30—60 分鐘，之後觀察血球凝集，記錄病毒價位。

血球凝集抑制試驗

1. 進行血球凝集抑制試驗前，須先以 PBS 溶液稀釋抗原原液至每 50 mL 稀釋液中含有 8 HA unit 的抗原。
2. 取 U 形底的 96 孔盤，於第二列至第八列加入 25 mL 的 PBS 溶液。於第一列加入 50 mL 的各標準病毒株的標準抗血清，negative control 行則以 25mL PBS 取代抗血清。取第一列的抗體 25 mL 加入第二列，以微量吸管充份混合後，再取 25 mL 加入第三列，如此序列稀釋至第八列。抗血清呈現 2 倍~128 倍稀釋。抗血清須經 RDE 處理以去除非專一性凝集。
3. 分別加入 25 mL (8 HA unit/50 mL) 的待測抗原及標準抗原，以手輕微搖晃孔盤後，置於室溫下反應 10—15 分鐘。
4. 加入以 PBS 稀釋的 0.75% 的天竺鼠紅血球 50 mL/well，之後以膠膜封住孔盤，至於室溫或 4°C 下靜置 30—60 分鐘，之後記錄抗血清價位結果。

結果

一、檢體收集與生物材料庫量能擴充

(一) 今(2022)年自合約實驗室監測 1 月至 10 月 28 日(收件日統計)，社區病毒監測統計共收案 8,944 件，病毒培養成功分離 793 株陽性病毒株(圖一)，其中流感病毒 58 件、腸病毒 144 件、腺病毒 123 件以及其他病毒(包括 Respiratory syncytial virus、Parainfluenza virus、Adenovirus、Herpes virus、Parechovirus) 468 件；病毒株送回生材科鑑定保存，其中流感病毒株 45 件、腸病毒 143 件、腺病毒 110 件、其他病毒 342 件，合計 640 件；其中流感病毒株、腸病毒株及無法分型腸病毒，經生材科病毒入庫前培養及定序確認共有 189 件，包括流感病毒 44 件，1 件經定序為(H1N2v)禽流感，腸病毒株及無法分型腸病毒 143 件，Parechovirus 1 件。另為因應後新冠疫情在社區流行病毒轉變與崛起之可能，依據重點流行病毒進行回溯檢驗，總計回溯歷年檢體 223 件病毒株，包含腺病毒 15 件、流感病毒 76 件、102 件腸病毒 CA6 型與其他類呼吸道病毒 30 件(12 件 RSV、5 件 PRI 與 13 件 HMPV)。

(二) 擴大新型冠狀病毒社區監測：因應新型冠狀病毒 COVID-19 社區流行，為了解新型冠狀病毒於我國社區即時流行疫情及感染狀況，配合政策規劃，以本計畫病毒合約實驗室收案之疑似呼吸道感染及腸病毒感染病例為基礎，在每件收案檢體病毒培養前，先進行新型冠狀病毒(COVID-19) 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)分生檢測。自今年 1 月 1 日起至 10 月 28 日止共檢驗 9,300 件檢體，8 家病毒合約實驗室分別依負責轄區收案，已完成檢測合計 8,751 件檢體；此外為了解社區新型冠狀病毒流行株亞型，經新型冠狀病毒(SARS-CoV-2) 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time PCR)分生檢測陽性檢體，當周送回昆

陽實驗室再進行病毒全基因定序，以即時掌握社區新型冠狀病毒株(SARS-CoV-2)流行亞型；於統計期間合計後送 34 件新冠病毒陽性回生材料，新型冠狀病毒株(SARS-CoV-2)收案檢驗陽性比例最高者為成大，大約占整體檢驗數量 2%，其次為慈濟，其餘實驗室檢驗陽性皆低於 1%(圖二)。

二、生物材料分讓現況

今年截至 10 月為止，總計辦理生物材料(病毒株)申請分讓案件共 14 案 48 種病毒株，申請單位包括：食藥署、中研院、國防醫學院預醫所、國衛院、台大醫學院、林口長庚醫院等。分讓生物材料包含腮腺病毒、呼吸道融合病毒、新型冠狀病毒、麻疹病毒、日本腦炎、登革熱、茲卡病毒與發熱伴血小板綜合症病毒，如表一。生物材料申請用途主要應用在開發病毒檢測試劑、疫苗評估、建立檢測方法與相關核酸標準品、或應用於相關臨床試驗等。

三、病毒株基因定序檢測

2022 年度截至 10 月止生物材料及病原基因資料庫中，基因序列整合流行病學資料總計逾 50,000 件；本年度新增入庫保存病毒株與進行基因定序分析共計 297 件，其中流感病毒 45 件(包含 44 件 H3N2、1 件 H1N2)、腸病毒 140 件、腺病毒 110 件與猴痘病毒 2 件。另持續更新病毒序列資料庫相關背景資料，資料整理上傳共 208 件，為歷年腸病毒、流感病毒、腺病毒等資料；相關序列資料已上傳至本署感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台(TPMGD)合計為 505 件(圖三)，並公開序列在 TPMGD 網頁供產學研界分析比較應用。

四、呼吸道病毒監測

(一) 社區流感病毒株監測與病毒型別分析

2022 年台灣社區流感監測資料顯示，2022 年 8 月台灣開始分離到流感病毒 A/H3N2，自從 2020 年 COVID-19 全球大流行，台灣自 2020 年 4 月到 2022 年 7 月無分離到流感病毒(圖四)，台灣 2009-2022 年 13 個流感季，其中 5 次主要流行病毒為 H1N1pdm09，4 次主要流行病 H3N2，2 次為 B 型 Yamagata lineage (圖四)，分析主要流行病毒替換取代模式，發現 3 次 H1N1pdm09 (2010-2011, 2015-2016, 2018-2019) 主要流行病毒變化皆發生在 12 月(圖五)，接續流行的病毒為 B 型 Victoria lineage；H3N2 與 B 型流行替換則較不固定。2022 年 A/H1N1pdm09 其 HA 基因坐落在 6B.1A.5a，主要突變位點在 N129D、T185I 和 N260D，6B.1A.5a 可分成 6B.1A.5a.1 (2020-2021 疫苗株 A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2009)，主要突變位點在 D187A，Q189E 與 6B.1A.5a.2(2022-2023 疫苗株 A/Victoria/2570/2019)，主要突變位點在 K54Q, A186T, Q189E, E224A, R259K, K308R，2022 年 11 月全球約 93% 屬 6B.1A.5a.2，流行株與疫苗株吻合(圖六)2022 年 A/H3N2 其 HA 基因坐落在 3C.2a1b.2a.2 (2022-2023 疫苗株 A/Darwin/9/2021)，主要突變位點在 Y159N, T160I, L164Q, G186D, D190N, F193S, Y195F 與 3C.2a1b.2a1 (2021-2022 疫苗株 A/Cambodia/e0826368/2020)，主要突變位點在 G186S, F193S, Y195F, S198P，2022 年 11 月全球約 86% 屬 3C.2a1b.2a.2，流行株與疫苗株吻合(圖七)，台灣 2022 年 8-11 月分離之 A/H3N2 屬於 3C.2a1b.2a.2，流行株與疫苗株吻合(圖八)2022 年 B/Victoria 依據 HA 基因，可分 cladeV1A.3，(2021-2022 疫苗株 B/Washington/2/201) 主要突變位點在 K136E, triple deletions (162-164)，後 V1A.3 衍生出 V1A.3a 主要突變位點在 N150K, G184E, N197D, R279K，V1A.3a 有分成 V1A.3a1，主要突變位點在 V220M, P241Q 與 V1A.3a2 (2022-2023 疫苗株

B/Austria/1359417/2021)，主要突變位點在 A127T, P144L, K203R，2022 年 11 月全球約 89% 屬 V1A.3a2，流行株與疫苗株吻合(圖九)。2022 年 B/Yamagata 流行少，與疫苗株 B/Phuket/3073/2013，仍屬相同 clade。

(二) 合約實驗室非流感呼吸道病毒監測分析

2022 年度 1-10 月合約實驗室於社區監測收案 疑似呼吸道病毒感染收案共 8,032 件，疑似腸病毒感染收案共 898 件，兩者症狀皆疑似者有 14 件，全部檢體經培養檢出呼吸道相關病毒株共 648 件，包含腺病毒(HAdV) 123 件(1.38%)、單純疱疹病毒(HSV) 230 件(2.57%)、流感病毒 58 件(0.65%)、副流感病毒(PRI) 162 件(1.81%)、巨細胞病毒(CMV) 20 件(0.22%)以及呼吸道融合病毒(RSV) 55 件(0.61%)。腺病毒株培養分離陽性病毒株再經分生定序確認分型，2021 至 2022 年主要流行株以 HAdV-C 為主佔腺病毒分生確認總數 9 成以上，其中又以 HAdV-C1、HAdV-C2 為多，2021 年佔總分生確認 83.43% (HAdV-C1 與 HAdV-C2 分別各佔 36.46%及 46.96%)，2022 年佔總分生確認 75.45% (HAdV-C1 與 HAdV-C2 分別各佔 20.00%及 55.45%)； 2021 年 HAdV-C1 與 HAdV-C2 驗出比例較為接近，至 2022 年則 C1 比例明顯下降 C2 比例上升 (圖十)。從 2021 年至 2022 年 1-10 月間病毒分離資料顯示，非流感呼吸道病毒株在 2021 年 1-5 月間及 2022 年 8 月起有比較多病毒種類高度流行，以 PRI(Parainfluenzavirus)及 RSV 明顯偏多，於 2022 年 8 月起社區監測非流感呼吸道病毒出現少數 RSV 與 PRI 病毒，9 月起 RSV 與 PRI 病毒便倍數成長，9 月 RSV 為 20 件 PRI 為 73 件，10 月 RSV 為 35 件 PRI 為 108 件；自 2021 年 5 月至 2022 年 7 月間便有顯著下降，社區流行病毒僅維持以 HMPV 與 CMV 流行為主，然而(圖十一)。

五、 腸病毒監測

(一) 社區腸病毒株監測與病毒型別分析

因受嚴重特殊傳染病肺炎疫情影響，近年符合社區監測疑似腸病毒症狀收案數呈現顯著下降，直至今今年腸病毒仍然處於低度流行狀態，流行趨勢與全國健保門急診腸病毒就診趨勢相同，和往年比較明顯下降；2022 年度 1-10 月合約實驗室於社區監測收案 疑似呼吸道病毒感染共 8,032 件，疑似腸病毒感染收案共 898 件，兩者症狀皆疑似者有 14 件，全部檢體經培養檢出腸病毒株共 143 件，其中腸病毒完成定序共 163 件（新增 140 件，回溯 23 件），新增部分依序列分型其中 Rhinovirus A49 為最主要型別占約 83.57%，其次為 Rhinovirus A31 占約 7.86%，其餘病毒型別皆為零星個案(圖十二)。相較於新冠疫情之前腸病毒送驗與收案數量，2022 年因符合疑似腸病毒感染病例減少，型別分析後，除 Rhinovirus 外並無其他明顯的腸病毒流行的高峰，惟值得注意的是在 2022 年的腸病毒 NPEV 相較往年(以 2019-2021 年比較)有明顯的上升(圖十三)。以分年 NPEV 分型結果來看，2019 年主要流行為克沙奇 A 型病毒(CA10)，其次則為腸病毒 68 型(EVD 68)與伊科病毒 18(Echo 18)；2020 年主要流行型別為鼻病毒 A30(Rhino A30)，其次則為鼻病毒 A44 (Rhino A44)；2021 年主要流行型別同為鼻病毒 A30(Rhino A30)，其次為鼻病毒 A1B(Rhino A1B)；2022 年流行病毒株轉為 Rhinovirus A49 與 Rhinovirus A31 (圖十四)。

(二) 腸病毒株流行株演化分析

疾病管制署自 1999 年台灣爆發手足口病疫情後開始建立腸病毒病監測系統，每年監測到不同血清型或基因型的腸病毒流行於臺灣，其中部份血清型可能於某一年造成大流行，如腸病毒 71 型、D68 型等。由於腸病毒的演化速率快，雖是同一血清型但卻有不同的基因亞型；在不同國家

出現相同的基因亞型所造成的流行幅度不完全相同，而在臺灣腸病毒基因亞型轉變可能引起新一波流行。

以 VP1 區域核酸序列做親緣演化分析(2017 至 2022 年 12 月)，由腸病毒重症檢驗及社區腸病毒監測所偵測之 EV-A71(圖十五)，結果顯示 2017 年主要流行的 EV-A71 基因亞型為 B5 和 C1，首次於臺灣發現 C1 基因亞型，序列比對結果顯示該亞型最接近德國 2015 年流行的病毒株序列。而基因亞型 B5 自 2008 年於臺灣出現後，便以 2~3 年為一個週期持續性地流行(如表二)。另外，2019 年腸病毒 71 型的 B5 基因亞型之 VP1 序列演化分析與 2018 年 B5 屬於同分群，推論可能由 2018 年彰化株演化而來。2022 年至 10 月底前無任何確認重症個案(圖十六)，推估與新冠疫情期間加強防疫措施有關。

六、病原微生物基因體資料庫資料擴充

病原微生物基因體資料庫統計至 2022 年 10 月，已儲存超過 50,000 筆基因序列及合併流行病學之資料檔；其中 2022 年資料重新整理與新增合計共維護上傳 505 筆基因序列，包含 180 筆腺病毒(ADENO)、163 筆腸病毒輕症(EV)、17 筆人類偏肺病毒(HMPV)、2 筆猴痘病毒、1 筆 HSV、107 筆副流感病毒(PRI)與 35 筆人類呼吸道合胞病毒(RSV)，未來會持續進行資料新增。自 2006 年開始上傳腸病毒基因資料到病原微生物基因體資料庫，自 2006 年開始到 2022 年 10 月，總共上傳 25,534 筆腸病毒資料、流感病毒 19,339 筆、腺病毒 4,581 筆、HIV 病毒 288 筆、新冠病毒 126 筆、登革熱病毒 116 筆、人類呼吸道合胞病毒 95 筆、立克次體 43 筆、副流感病毒 23 筆、豬 E 型肝炎 17 筆、人類偏肺病毒 19 筆、猴痘病毒 2 筆與 HSV 1 筆基因資料(表三、圖十七)。

七、 感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台(TPMGD)系統改善 規畫

TPMGD 經過系統與功能評估過後，今年優化架構並納入生物材料庫與基因資料平台整合成為新版 TPMGD，朝向生物材料庫存資料庫與基因資料庫資料整合儲存至 TPMGD；今年資料庫系統改善進度，現階段系統資料已包含生物材料與基因資料、生物材料背景資料系統介接、繪製即時病毒培養與收案狀況、合約實驗室採檢點分布與收案分析，以及 2022 年度新增病毒基因胺基酸變化分析(圖十八)。胺基酸變化分析功能可以上傳病毒基因序列，配合系統平台內建 BLAST 資料與固定點位進行分析，藉此探討病毒演化時重要基因位點序列變化情況。

結論與建議

本研究計畫利用社區監測所蒐集之病原體經基因序列分析及資料庫比對，配合合約實驗室上傳的收案個案流病資料，建立我國重要感染症長期觀察社區流行病毒株型別之間互相轉換的資料庫與機制。在新版生物材料與病原微生物基因體資料庫(新版 TPMGD)中，新增寫入對接模組，藉由與倉儲系統進行系統介接，使得資料自動從倉儲系統帶入 TPMGD 進行分析與資料整合，即時呈現病毒合約實驗室社區監測在全國採檢點收案現況，以及病毒株即時流行現況；另外在病毒株型別分析功能上，並更新 BLAST 序列資料庫，提供國內外一個快速且方便查詢分析本土病原體基因檢驗平台，提升我國防疫儲備病原資料與分析功能，展現病原微生物基因體資料庫在防疫上存在的重要性。

歐盟委員會聯合研究中心 (European Commission Joint Research Centre, EC-JRC) 報告提到了生物材料庫的一般功能應包含[9, 10]：

1. 收集和存儲生物材料，結合醫學，流行病學數據
2. 藉由長期收集生物材料進行生物材料庫的動態發展
3. 收集的生物材料與正在進行的研究項目相關聯
4. 為保護捐贈者的隱私而對生物材料進行匿名處理
5. 實施標準程序

因此，在生物材料庫建立時須先確認成立料庫確切目的（例如組織類型或是研究目標）的狀況下，其生物材料庫的特徵會有所不同，應用規劃方向也會有差異。在有專業的生物存儲解決方案、新穎的生物信息學數據處理系統和標準程序的作為相結合下，可構成了具有多種用途的生物材料庫，例如：基礎研究、藥物開發和其他尚未計劃的研究。

病原微生物基因體資料庫於 2008 年起開始設立，歷年已提供台灣產學界應用申請，但仍需強化系統的資料多樣性、完整性與功能定期更新與維護，

並加強宣傳與推廣應用，倘若缺少適當宣傳以及妥善的推廣，資料庫經年累月所儲存之大量資料無法有效利用著實令人惋惜。也因此，今年進行 TPMGD 系統優化、增加功能與細節修改，與廠商持續進行訪談與系統服務設計、介接系統修改項目，固定每月開一次工作小組會議，使新系統更趨完善。

在流感病毒國內與國際疫情監控部分，即時監測瞭解台灣流感病毒基因改變、抗藥性、抗原變化與抗原漂移病毒之產生，每週提供流感病毒抗原性與抗藥性資料，作為調整流感防疫策略依據。2021-2022 年使用的流感疫苗中，H3N2 使用 A/Darwin/9/2021 與 A/Darwin/6/2021，H1N1 使用 A/Sydney/5/2021 (H1N1)pdm09-like virus，B 型流感則使用 B/Austria/1359417/2021 (B/Victoria lineage)-like virus 與 B/Phuket/3073/2013 (B/Yamagata lineage)-like virus 疫苗株，然而今年因為新冠疫情影響下，上半年度檢測檢體中並未發現流感病毒株，至 8 月起逐漸放寬搭機來台入境旅客管制措施，社區監測流感確定病例也開始逐漸增加，初期病毒株以 H3N2 為主，與國際流行株相同並與 2022 年疫苗株吻合，目前將持續監測台灣社區流感病毒流行狀況，儲備病毒資料，建立台灣流感病毒流行與演化模式。

本計畫仍會延續推動 TPMGD 系統架構重整優化，依疫情與病毒(原)的特性評估與規劃整合生物材料與基因體資料，未來本病原微生物基因體資料庫可提供產學研界資料申請與應用。預計完成系統重建及資料重整後，並藉此系統整合並公開社區病毒流行趨勢監測、病毒基因、生物材料、流行病學資料，以提升公開申請使用率。

參考文獻

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008;451(7181):990-3. Epub 2008/02/22. doi: 10.1038/nature06536. PubMed PMID: 18288193; PubMed Central PMCID: PMC5960580.
2. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1999;48(38):845-9. Epub 1999/11/24. PubMed PMID: 10563521.
3. Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR, Sofair AN, Passaro D, Flood J, et al. Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(2):145-53. Epub 2002/03/19. doi: 10.3201/eid0802.010165. PubMed PMID: 11897065; PubMed Central PMCID: PMC2732455.
4. Yuan-Pin Huang C-YY, Yu-Ju Chen, Po-Cheng Chuang,, Li-Ching Hsu H-SW. Taiwan pathogenic microorganism genome database and its applications. *Taiwan Epidemiological Bull* 2010. 2010;26(21):364-74. Epub 374.
5. Jian JW, Lai CT, Kuo CY, Kuo SH, Hsu LC, Chen PJ, 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 research*. 2008;131(2):243-9. Epub 2007/11/13. doi: 10.1016/j.virusres.2007.09.014. PubMed PMID: 17996973.
6. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, et al. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus research*. 2008;137(2):206-12. Epub 2008/08/19. doi: 10.1016/j.virusres.2008.07.015. PubMed PMID: 18706461.

7. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology journal*. 2010;7:277. Epub 2010/10/21. doi: 10.1186/1743-422x-7-277. PubMed PMID: 20959020; PubMed Central PMCID: PMCPMC2975644.
8. Yang JR, Teng HJ, Chen JH, Huang HI, Liu MT, Li SY. The National Laboratory Response to the COVID-19 Pandemic in Taiwan. *Health Secur*. 2022 Sep-Oct;20(5):368-375. doi: 10.1089/hs.2022.0024. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36108302.
9. Yang JR, Kuo CY, Yu IL, Kung FY, Wu FT, Lin JS, Liu MT. Human infection with a reassortant swine-origin influenza A(H1N2)v virus in Taiwan, 2021. *Viol J*. 2022 Apr 7;19(1):63. doi: 10.1186/s12985-022-01794-2. PMID: 35392932; PMCID: PMC8988477.
10. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(10):2731-9. Epub 2011/05/07. doi: 10.1093/molbev/msr121. PubMed PMID: 21546353; PubMed Central PMCID: PMCPMC3203626.
11. Asslauer M, Zatloukal K. Biobanks: transnational, European and global networks. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2007;6(3):193-201. Epub 2007/10/06. doi: 10.1093/bfpg/elm023. PubMed PMID: 17916592.
12. Andersson K, Bray F, Arbyn M, Storm H, Zanetti R, Hallmans G, et al. The interface of population-based cancer registries and biobanks in etiological and clinical research--current and future perspectives. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2010;49(8):1227-34. Epub 2010/06/30. doi: 10.3109/0284186x.2010.496792. PubMed PMID: 20583946.

表

表一、2022 年生物材料分讓病原項目及數量統計表

分讓生物材料	呼吸道融合病毒	新冠病毒	發熱伴血小板減少綜合症病毒	腮腺炎病毒	麻疹病毒	日本腦炎病毒	登革熱病毒	茲卡病毒
分讓株數	12	13	1	5	5	2	9	1

表二、歷年腸病毒 EV71 基因亞型分析。

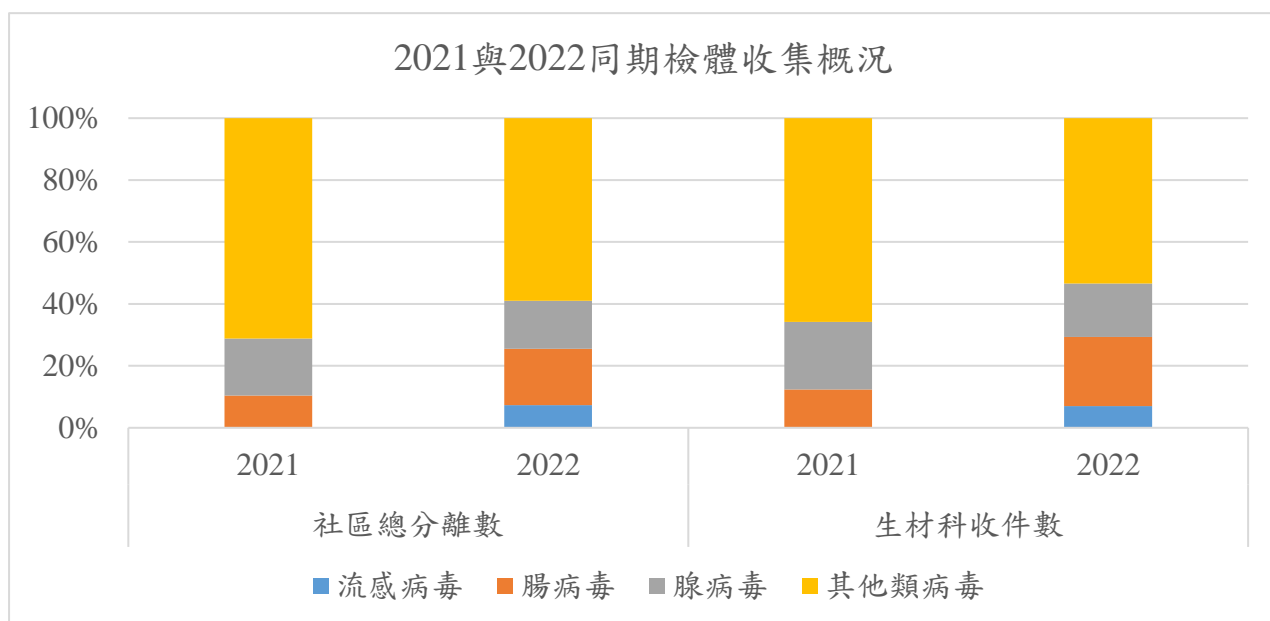
	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022
輕症	B5	C4	C4	B5	B5	B5	B5		
		B5	C2	C4	C4	C4a		-	-
重症			C4	C1	B5	B5	B5		
	-	-		C4	C1	C1		-	-
				B5		C4a			

表三、病原微生物基因體資料庫(TPMGD)序列資料儲存數量。

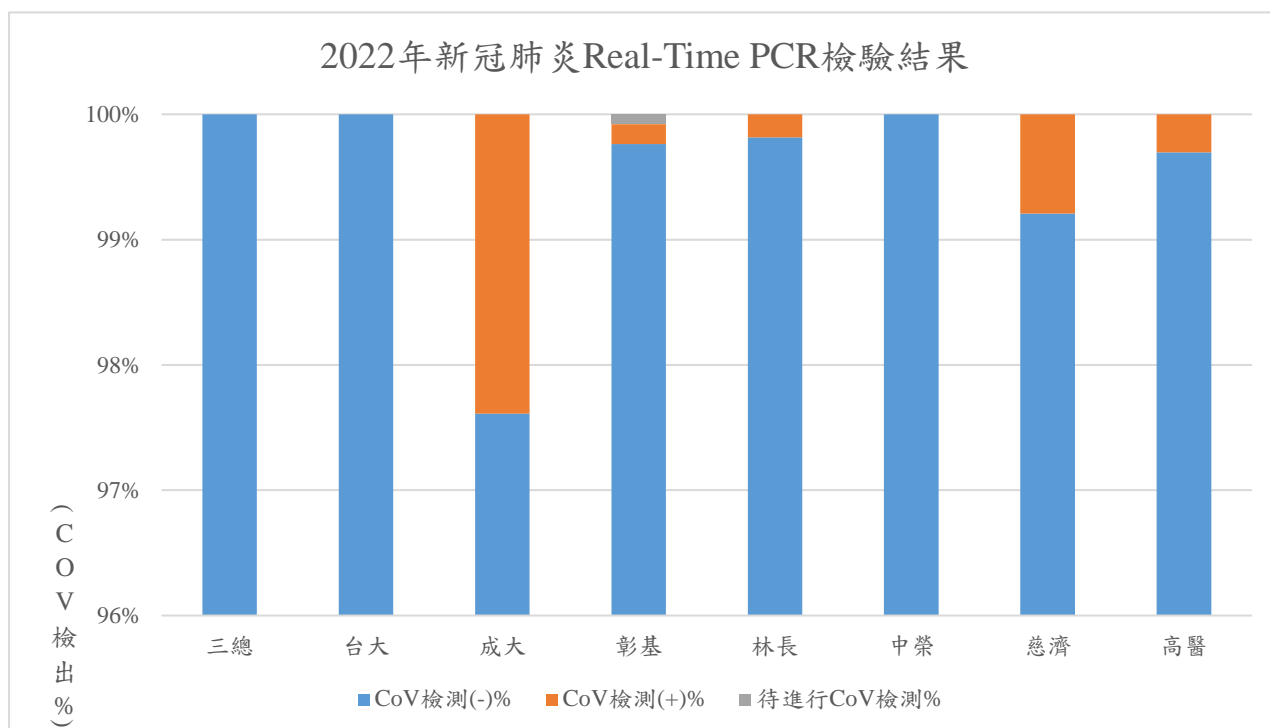
病毒類型	數量
Human Enterovirus	25534
Influenza	19339
Human Adenovirus	4581
Human Immunodeficiency Virus	288
Betacoronavirus	126
Dengue virus	116
Respiratory Syncytial Virus	95
Rickettsia	43
Human Parainfluenza	23
Human Metapneumovirus	19
Porcine Hepatitis E virus	17
Monkeypox	2
Herpes Simplex Virus	1

圖

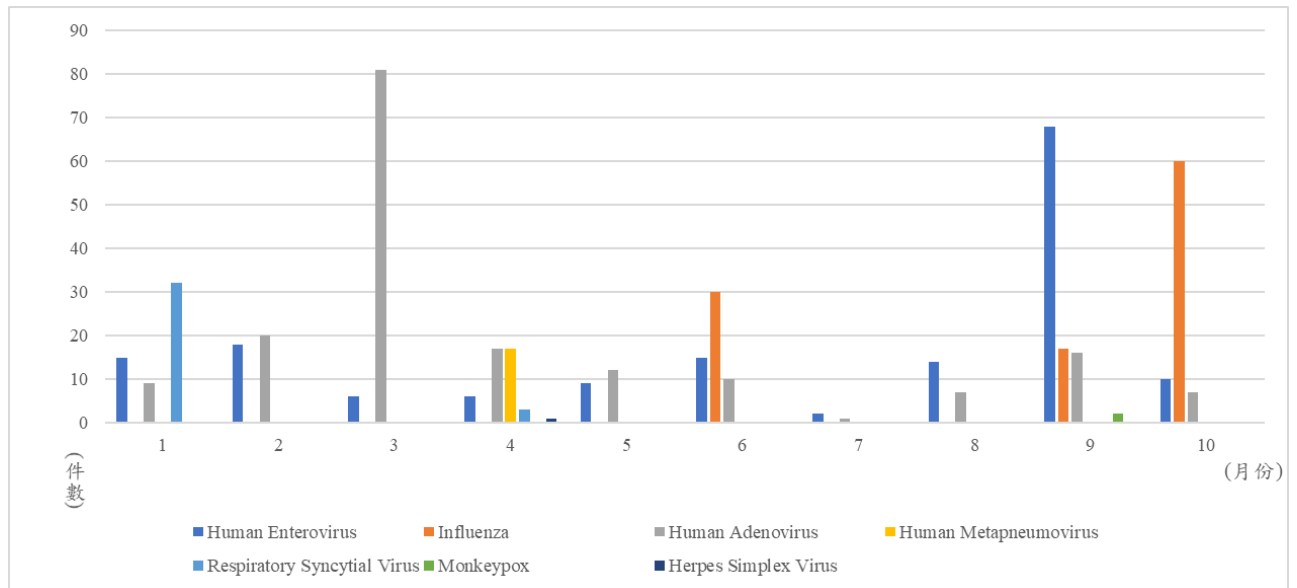
圖一、2021年及2022年同期(1-10月)社區監測病毒分離與培養入庫保存情形



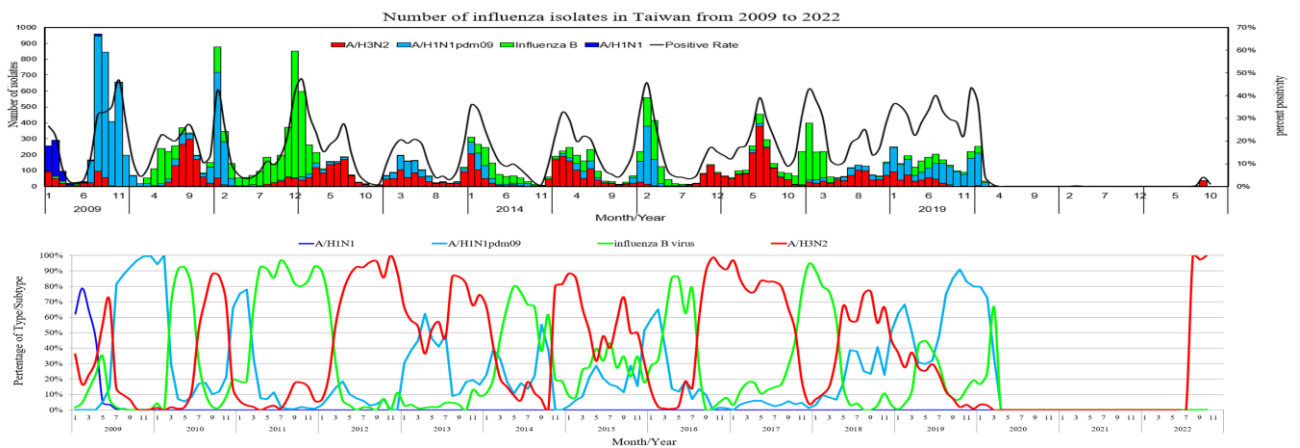
圖二、2022年1-10月社區監測新冠肺炎 Real-time PCR 檢驗件數



圖三、2022 年度(1-10 月)感染性生物材料及序列資料庫管理應用與分享平台新增各類病毒株基因定序資料庫(月)數量圖



圖四、2009-2022 年台灣流感病毒各亞型與次亞型流行情形，(A)每月病毒分離數與(B)各亞型與次亞型百分比。



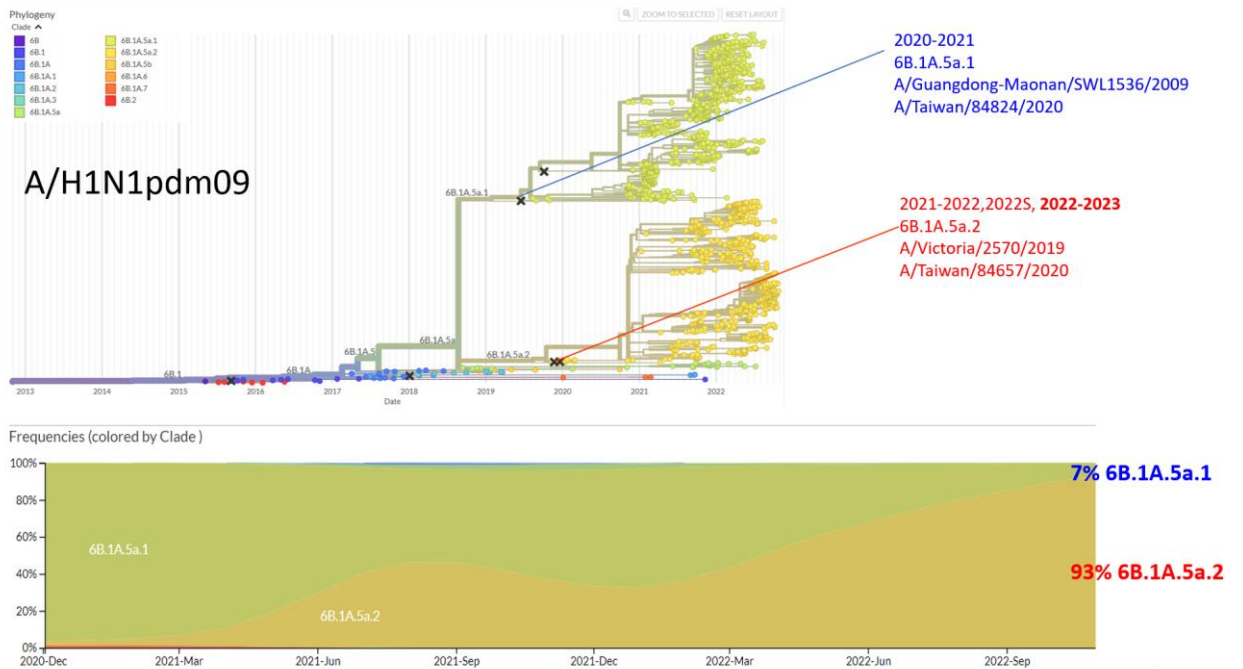
圖五、台灣 2009-2022 年 13 個流感季，主要流行病毒替換取代模式

發現 3 次 H1N1pdm09 (2010-2011, 2015-2016, 2018-2019) 主要流行病毒變化皆發

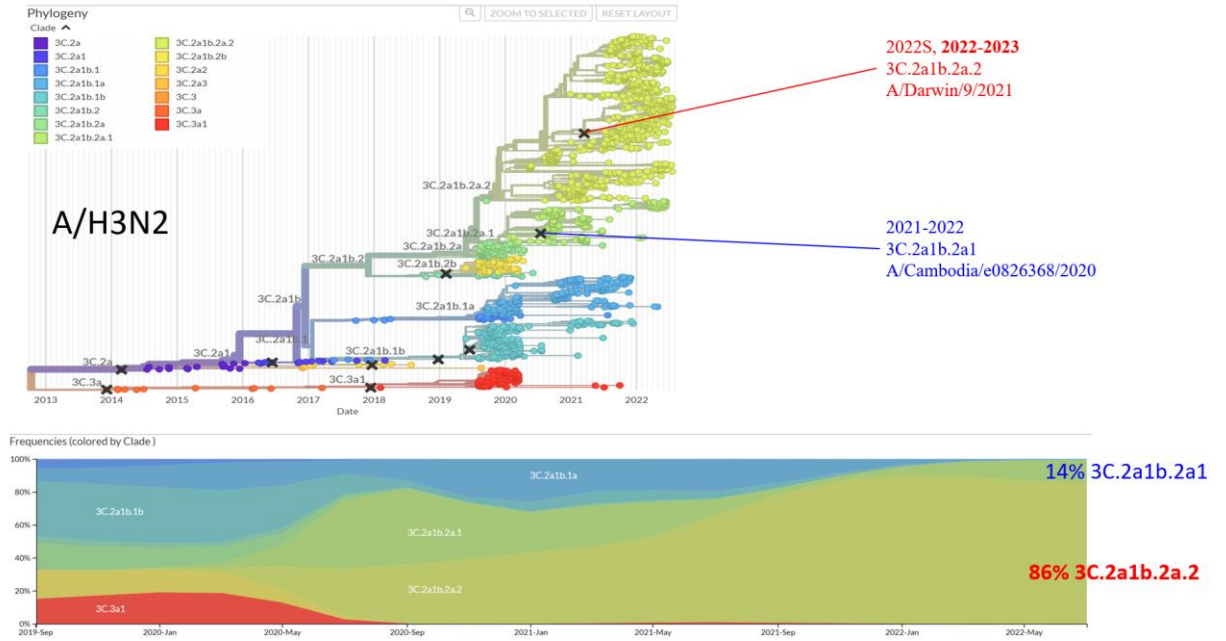
生在 12 月，且後續皆為 B 型 Victoria 流行；H3N2 與 B 型則較不固定。



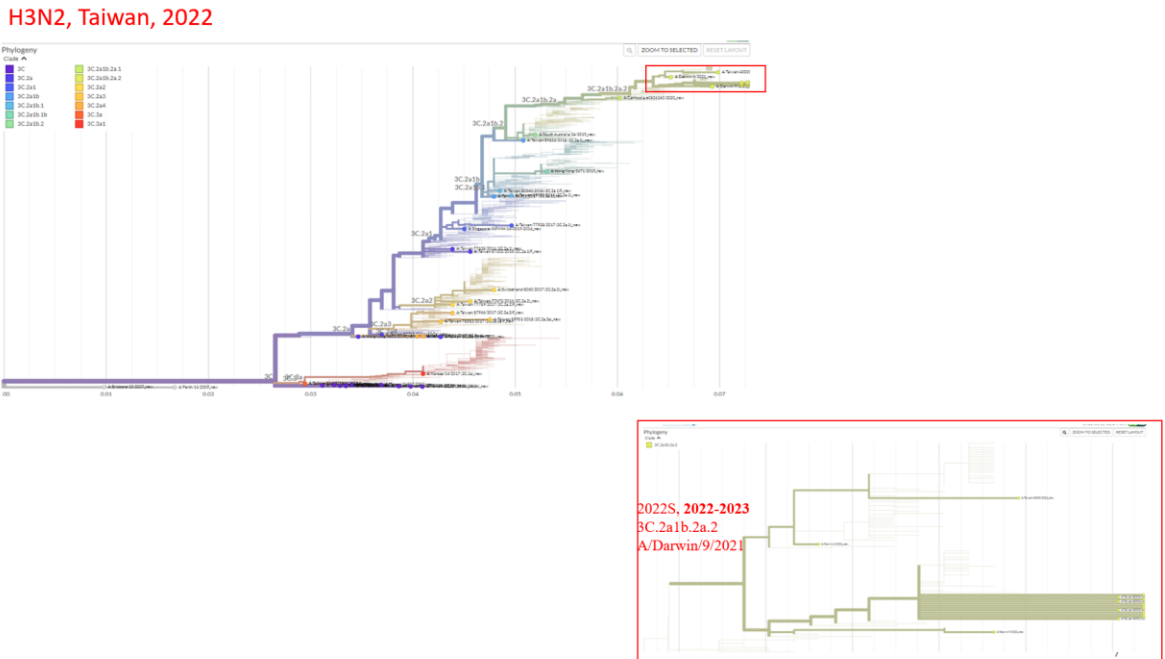
圖六、A/H1N1pdm HA 基因序列之樹狀圖，與不同 clades 之消長



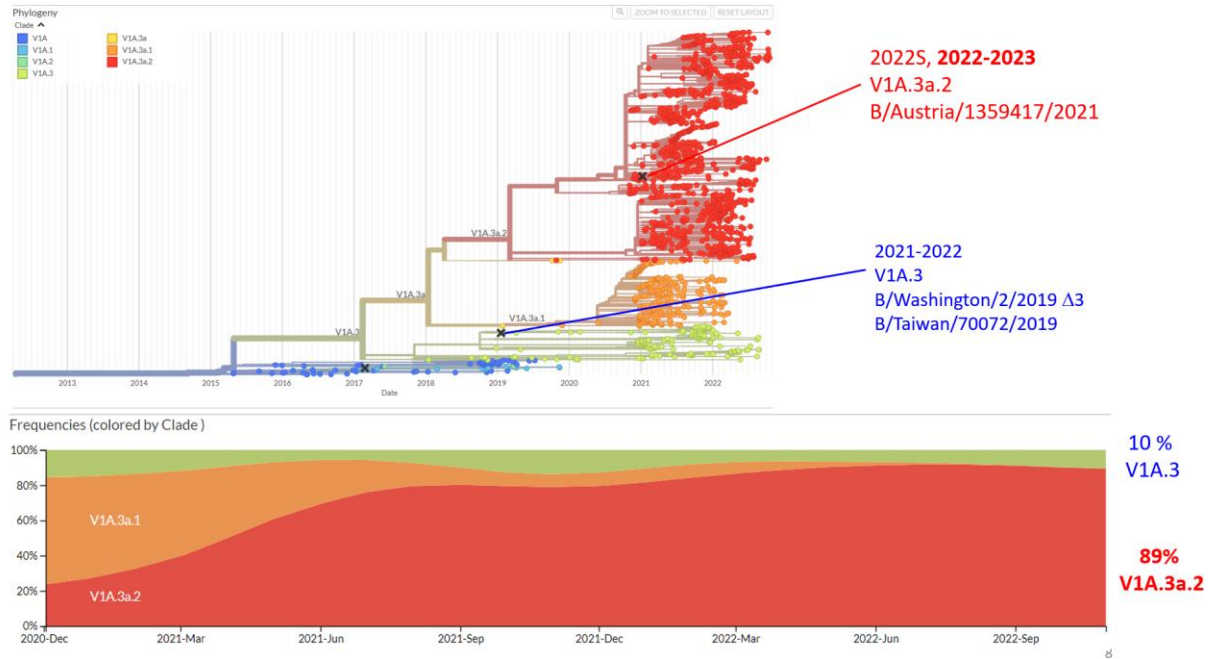
圖七、A/H3N2 HA 基因序列之樹狀圖，與不同 clades 之消長。



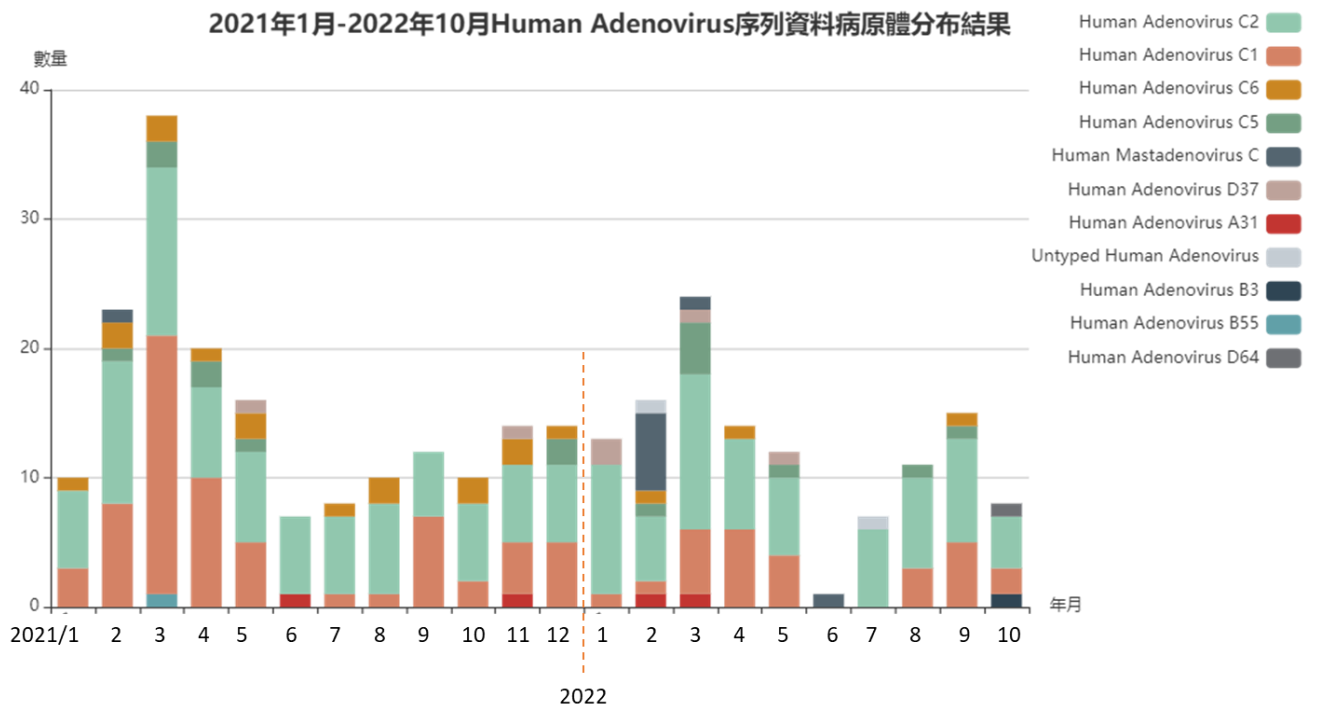
圖八、台灣 2022 年 8-11 月 A/H3N2 HA 基因序列之樹狀圖。



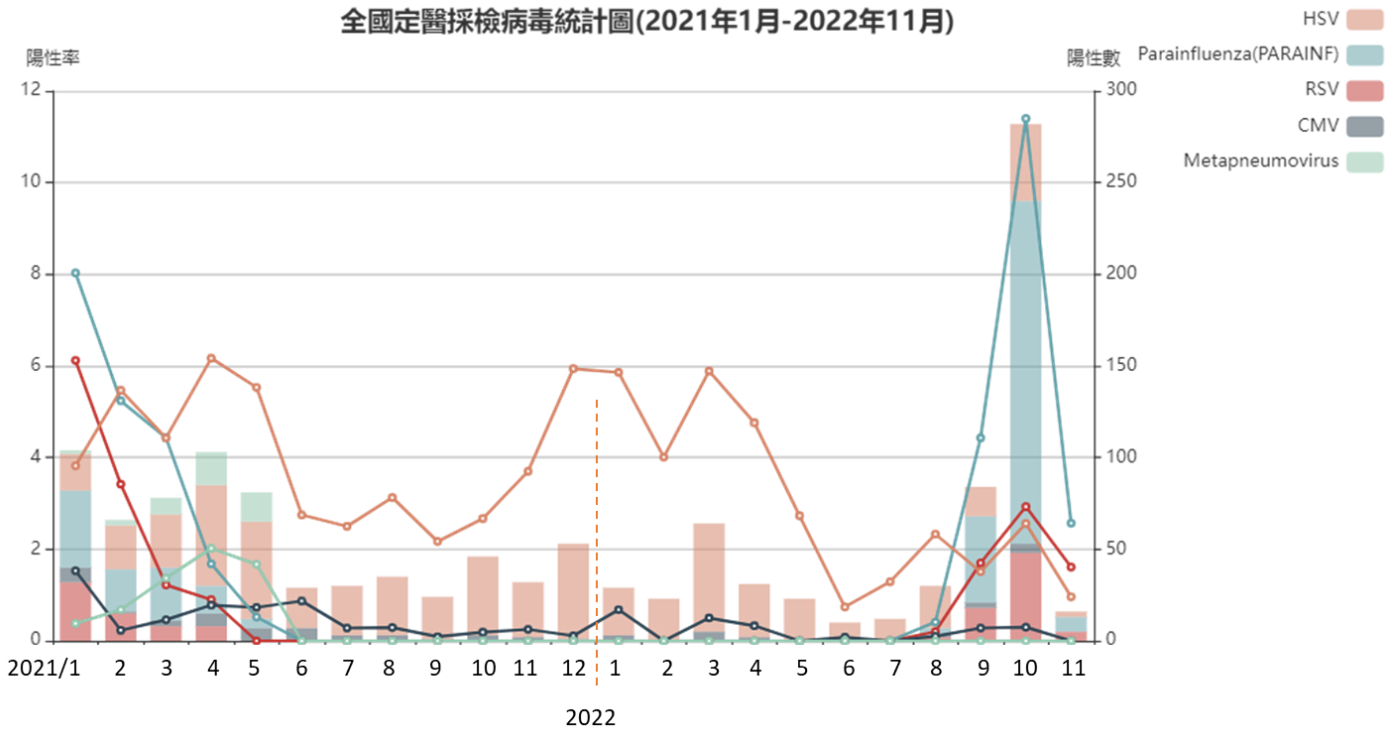
圖九、B/Victoria HA 基因序列之樹狀圖，與不同 clades 之消長。



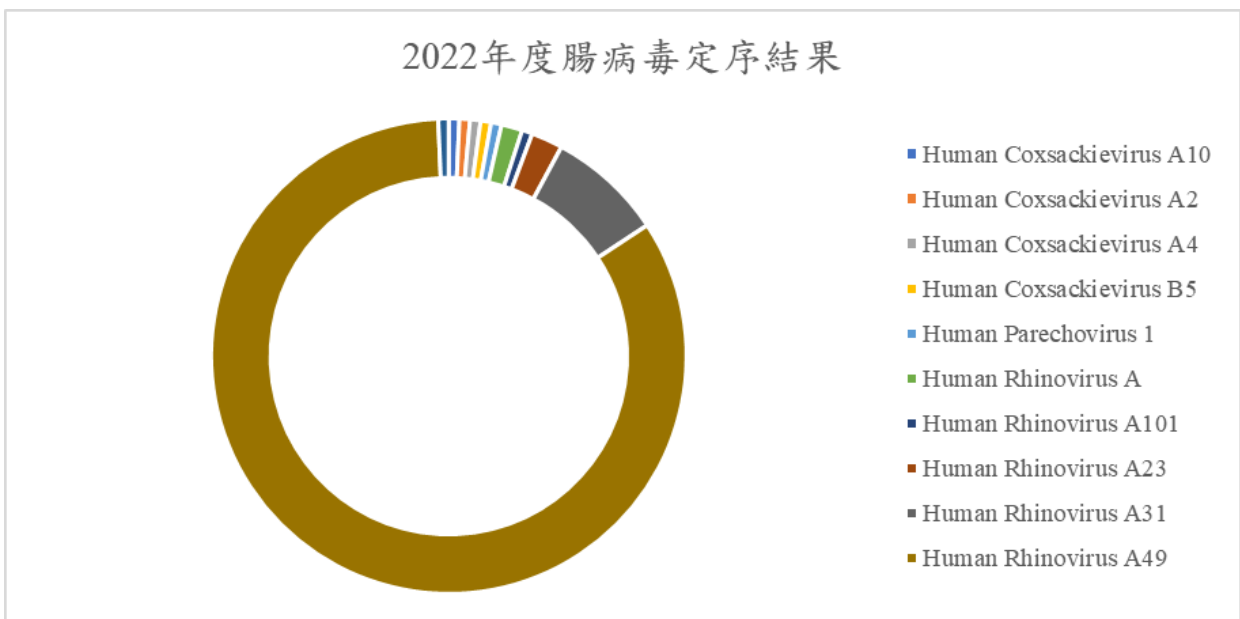
圖十、2021 年至 2022 年 10 月腺病毒基因型別分析



圖十一、2021-2022 年社區監測疑似呼吸道感染檢出非流感呼吸道病毒株分離情形

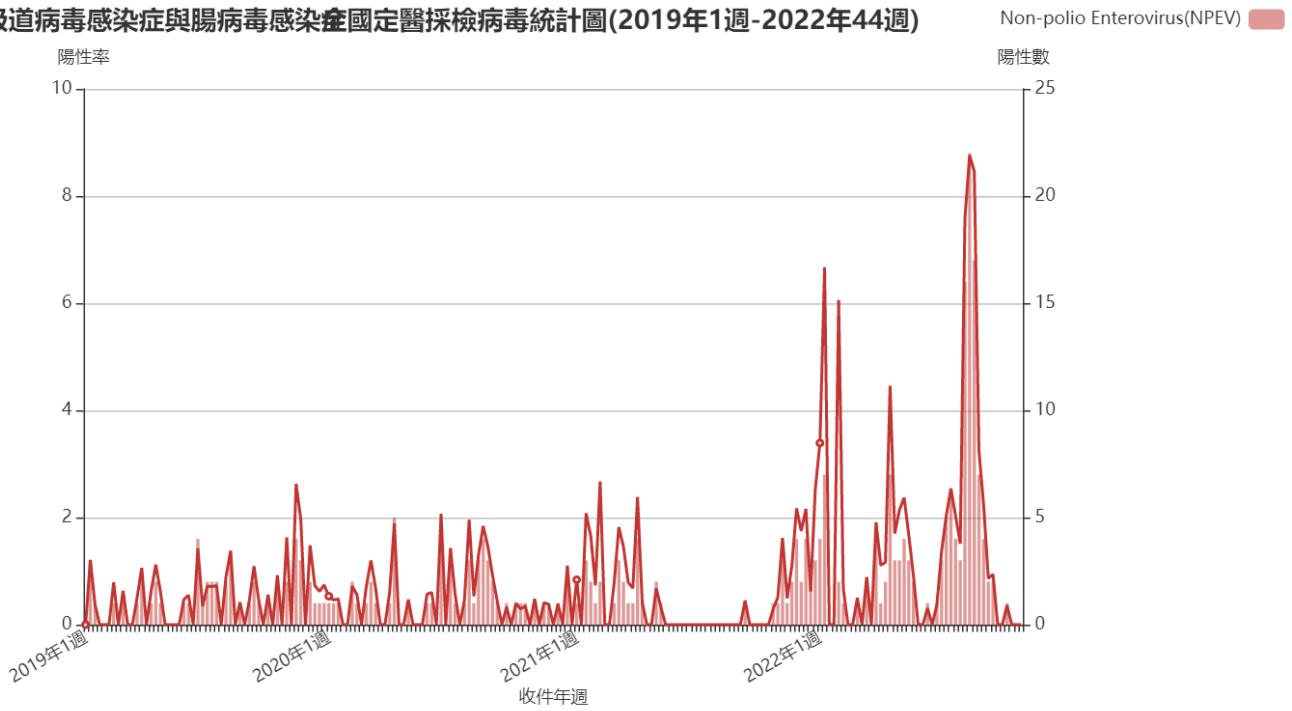


圖十二、2022 年社區監測腸病毒定序分型



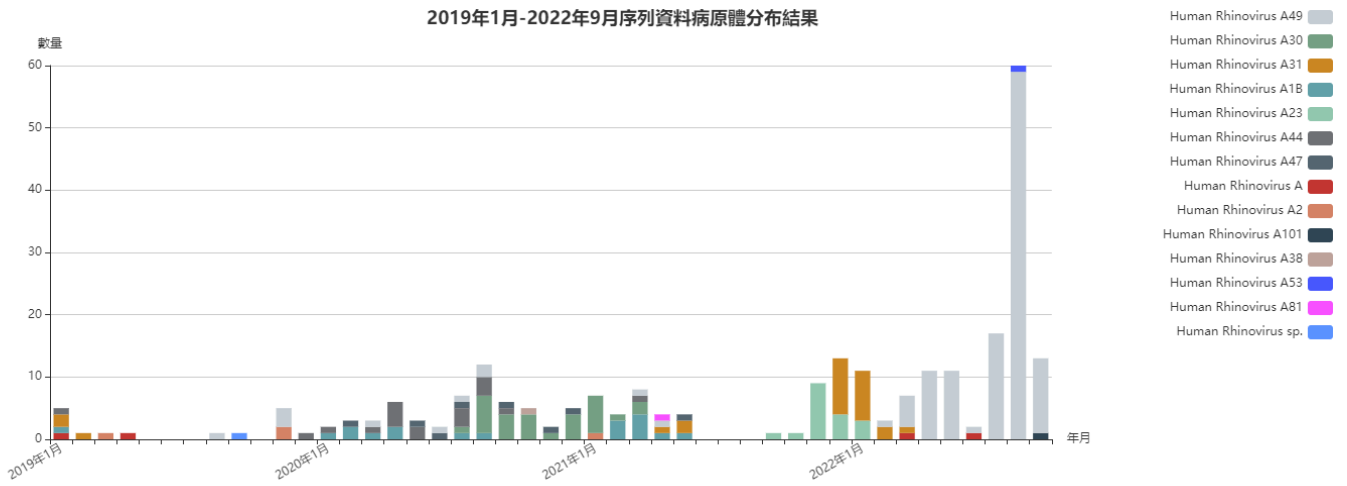
圖十三、2019 年至 2022 年社區監測 NPEV 流行趨勢圖。

呼吸道病毒感染症與腸病毒感染全國定醫採檢病毒統計圖(2019年1週-2022年44週)



圖十四、2019 年至 2022 年 10 月社區監測 NPEV 型別分析圖

2019年1月-2022年9月序列資料病原體分布結果



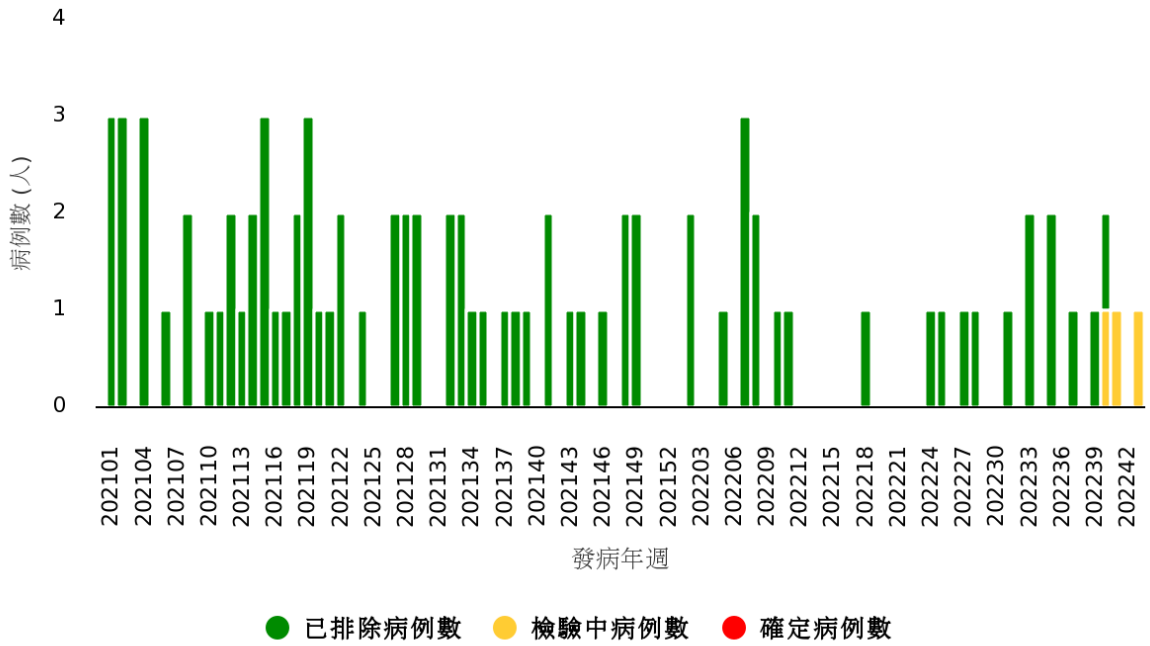
圖十五、2017-2020 年腸病毒 EV71 部分 VP1 序列親緣演化樹分析

EV-A71 VP1部分序列演化樹分析(300 bp)

- 2020年腸病毒感染併發重症及社區腸病毒
- 2019年腸病毒感染併發重症及社區腸病毒
- 2018年腸病毒感染併發重症及社區腸病毒
- 2017年腸病毒感染併發重症及社區腸病毒



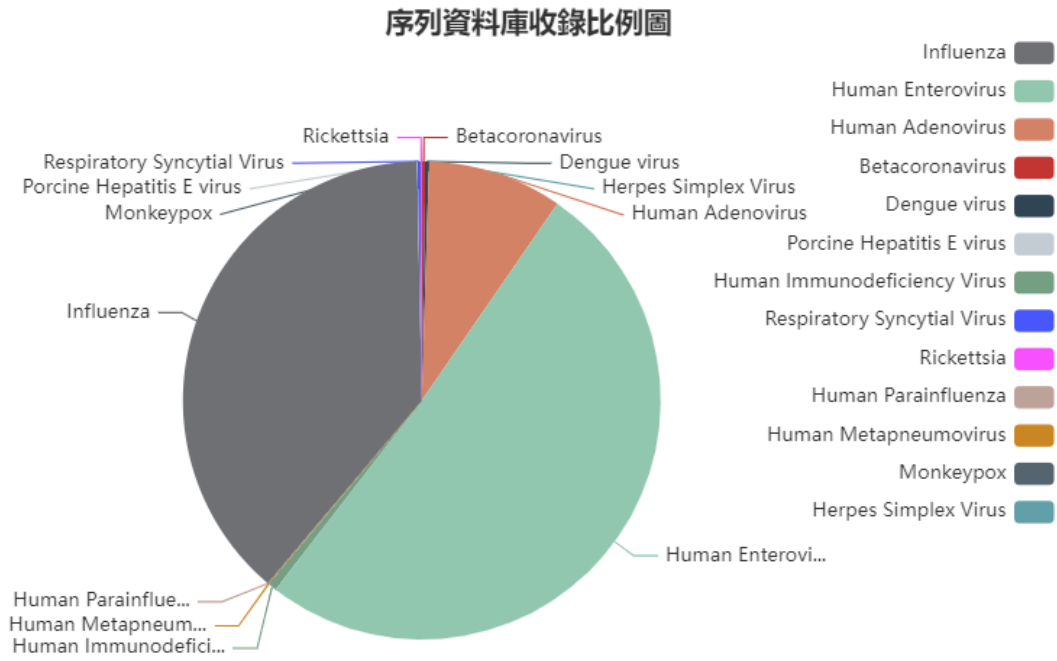
圖十六 2021-2022 年全國腸病毒併發重症本土及境外移入病例趨勢圖



Taiwan CDC 2022

圖十七、感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台病原序列資料蒐藏比

例圖



圖十八、感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台

基因體資料庫功能簡介圖



附錄

附錄 1.1 流感病毒核酸檢測用引子組序列表

Gene	Genotype	Primer 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

附錄 1.2 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	CARGCIGCIGARACIGGNCG
159 ^b	VP3	2385-2403 ^f	ACYATGAAAYTGTGCAAGG
162 ^b	VP1	2869-2850 ^f	CCRGTAGGKGTRCACGCRAC
222 ^a	VP1	2969-2951 ^e	CICCGIGGGIAYRWACAT
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	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNNGG
224 ^h	VP3	1977-1996 ^h	GCIATGYTIGGIACICAYRT
188	VP1	2612-2630	ACIGCIGTIGARACIGGNCG

附錄 1.3 腺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')
AdnU-A	Hexon	20743-20763	GCCTCGATGACGCCGCGGTG
AdnU-S	Hexon	21678-21698	TTCCCCATGGCNCACAACAC

111 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：**腸道及呼吸道病毒之實驗室診斷監測及基因資料庫之建立與應用**

計畫主持人：吳芳姿

填報日期：111/12/06

*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	研究主題及目標能配合業務需要。	謝謝委員支持。	
2	為台灣流感與世界各地區型別比較，及疫苗株選定的重要資料。	謝謝委員支持，未來會持續更新各項重要資訊。	
3	國內 111 年流感以 H3N2 為主，與疫苗株吻合。可監測國內流行疫情如 RSV、Parainfluenza 3 等，今年 RSV 以 TypeB 為主，對疫情研判了解有幫助。	謝謝委員支持，未來除監測當年度主要流行流感病毒外，仍會持續對其他類呼吸道病毒進行相關監測。	
4	資料庫功能有持續優化，提供分讓材料。	謝謝委員支持，該平台仍會逐年因應業務相關需求檢討進行功能優化或修正。	

序 號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
5	應發表最新分析結果，供國內外參考。	謝謝委員支持，對於社區疫情監測與特殊病原疫情現況，已著手進行資料整理，將投稿發表或平台公開訊息。	
6	感染性生物材料及基因資料庫管理應用與分享平台(TPMGD)系統改善規劃，建議將防疫人員納入系統訪談對象，以增進系統可使用面向。	謝謝委員建議，該平台系統後續規劃變更分析功能時，將會尋求相關防疫人員意見，增加系統可使用面向。	
7	P.33 圖一部分，建議可改以堆疊柱狀圖，呈現比較不同病毒之分離數與收件數情形。另圖二部分，因各醫院非連續可比較，建議以柱狀圖表示即可，刪除曲線較為適當。	謝謝委員建議，圖表已修改。未來會注意非連續型資料繪圖格式。	33
8	本計畫對監測國內社區腸道及呼吸道疫情流行變化具重要性。	謝謝委員支持。	
9	可提出使用分享平台之次數或實際成果，或提高使用次數之具體作為，以彰顯本創新平台	謝謝委員建議，該平台分析功能仍再持續優化中，現階段以提供外部使用者進行資	

序 號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
	之重要性。	料申請為主要用途，平台同時能呈現設定好篩選條件的疫情流行趨勢圖供使用者參考，平台使用次數統計未來會納入觀測此系統運作依據之一。	

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 111 年 12 月 21 日前至 GRB 系統完成資料抽換。