

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-122110

衛生福利部疾病管制署 105 年署內科技研究計畫

計畫名稱：新興/再浮現傳染病監測技術開發與應用計畫

## 105 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：李淑英

協同主持人：楊志元、舒佩芸、劉銘燦、慕蓉蓉、江春雪、陳婉

青、洪敏南、李欣純

研究人員：許國昌、林建州、楊素鈴、高振峰、楊季融、廖郁昕、

謝若郁

研究人員：研發替代役 7 名、研究助理 6 名

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

## 目錄

	頁 碼
目錄	1
計畫中文摘要	2
計畫英文摘要	6
計畫內容	
一、前言	8
二、材料與方法	17
三、結果	36
四、討論	49
五、結論與建議	56
六、計畫重要研究成果及具體建議	58
七、參考文獻	63
八、圖、表	67
附錄：	
附件一、肺炎重症收案問卷	80
附件二、腦炎重症收案問卷	89

共 (94) 頁

## 計畫中文摘要：

近年來氣候環境變化劇烈及全球化趨勢，各種傳染病病原體變異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/再浮現病原體中，屬人畜共通疾病、跨物種傳播及抗藥性等議題最為迫切，綜觀 1967 年至今，有伊波拉、愛滋病、漢他病毒肺症候群、利百病毒、狂牛病、human metapneumovirus、SARS coronavirus、avian influenza H5N1、new coronaviruses NL63、HKU1、MERS-CoV、human bocavirus、2009 pandemic H1N1、NDM-1、H7N9、H6N1 及 ZIKA 等多種新興病原體及抗藥性細菌浮現，這些傳染病在發生之初，多半僅賴臨床醫師的高度警覺性，依病患臨床症狀去推測可能病原及感染途徑，卻缺乏實驗室明確的檢驗證據，不僅因疾病的未知而使社會大眾恐慌，更因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。近年來，由於分子生物檢驗技術快速發展，以往針對單項病原體的檢驗（如細胞培養、中和試驗等），已發展成高通量多重檢驗方式，如 multiplex real-time PCR、microarray 及高通量基因定序等，使新興病原體得以快速偵知並解碼其基因序列，如 2009 年 H1N1 新型流感、2010 年 NDM-1 及 2013 年 H7N9 與 H6N1 禽流感等，皆因病原體的即早偵測與基因序列之公開分享，使全世界均能及時注意防範。

綜上，適當串連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，可同時偵測多種已知或未知病原體，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，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。本計畫包括：

一、建立未知感染原監測網絡：除持續感染性生物材料庫之建置及維護外，並有效連結各醫院，建立重要疾病流行監測點與檢體採檢點，針對肺炎重症、不明原因腦炎、不明原因快速死亡、不明原因群聚、噬血症候群檢體及其他法定傳染病通報，但常規

檢測為陰性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。

二、未知/新興感染原檢驗技術檢測平台之開發：包括 multiplex PCR、高通量定序檢測系統與分生檢測等，藉由適當擷取各種技術優點，建立可同時偵測多種病原的檢測方法，包括未知病原的檢測，期能及早偵測未知/新興感染原，防止疾病之擴散，以即時、有效達到新興傳染病監測及檢驗研究之目的。

三、建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術：收集並分析病原體基因序列及相關個案流病資料，釐清疾病感染源及感染途徑，以利國內疫情之監控與防範。同時建置病原體基因資料庫暨分析平台，可用來分析各種抗原性相關基因與抗藥性相關基因，必要時針對重要的流行株進行全基因體定序，以釐清流行株之變異度與重組變化。

透過三大目標之整合與執行，本計畫期許能建置台灣未知/新興病原體探索中心，近程以即時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，未來期能發展成為國際未知/新興病原體交流平台，累積足夠的實驗室檢

驗能量與各國建立雙邊合作關係，於未來面對疫情時，將不再只  
依賴國際援助或資訊，更可望成為主動協助者，達到衛生外交。

關鍵詞：新興/再浮現傳染病、高通量定序、病原體基因資料庫

## 計畫英文摘要：

Dramatic climate change and globalization make infectious pathogens mutate and transmit more rapidly than ever. It has been a hot issue among international public health fields to detect unknown pathogens correctly in the very beginning, clarify the transmission routes and sources, integrate social, educational, medical, and health resources and to plan adequate prevention policies and effectively control infectious diseases. Among all emerging/re-emerging pathogens, the most urgent topics are the zoonotic, interspecies transmission and drug resistance. Since 1967, emerging pathogens have included Ebola virus, HIV, Hantavirus, Nipah virus, prion, human metapneumovirus, SARS coronavirus, avian influenza H5N1, new coronaviruses NL63, HKU1, MERS-CoV, human bocavirus, 2009 pandemic H1N1, NDM-1, H7N9, H6N1, etc. At first, the identification of these emerging pathogens only rely on clinicians' experience and alertness but lack clear and strong diagnostic evidence, which not only make people panic because of unknown disasters but also take much social costs because of not halting disease spread effectively.

The key point of successfully battling against fast changing and transmission pathogens is to utilize limited biological resources to find out known or unknown pathogens in the very short time. Recently, molecular biological diagnosis techniques have been developed vigorously, and the single diagnostic technique has been replaced by high throughput multiple ways to speed up the identification of emerging pathogens and decode their gene sequences. The early detection of pathogens and share of the gene sequences of pandemic (H1N1) 2009, NDM-1 in 2010 and H7N9 in 2013 help people around the world prepare for an epidemic in time.

In sum, a pathogen diagnostic platform made by adequately integrating many kinds of molecular diagnostic techniques enables the detection of thousands of known or unknown pathogens in the same time. The collection and preservation of pathogens and analysis of their gene sequences is also important. Through the analysis of their gene sequences and related epidemiological information, we can assist the clarification of infectious pathogens and infection routes, provide a reference for disease prevention policy assessment and formulating, evaluate the effectiveness of vaccines, monitor the drug resistance of pathogens and even provide a foundation for future developing vaccines and diagnostic techniques. Our goals include: 1. to build up an unknown pathogens surveillance network; 2.

to develop an emerging/re-emerging pathogens diagnostic platform including multiplex PCR, high throughput sequencing and molecular biological diagnosis; 3. to establish a high-quality pathogen sequence database and innovate application techniques.

Hopefully, we expect ourselves to be an emerging/re-emerging pathogen research center in Taiwan. In the short run, our aim is to instantly resolve domestic unexplained infectious disease and discover novel pathogens, and further strengthen the effectiveness of disease prevention as well as reduce the social impact. In the long run, we hope to accumulate enough knowledge and techniques to become an international platform for the information exchange and sharing of unknown/emerging infections and Taiwan could be playing a more constructive role in the global health.

keywords : emerging and re-emerging infectious diseases, high-throughput sequencing, Taiwan pathogenic microorganism genome database



## 本文

### 一、前言：

#### (一) 建立未知感染原監測網絡

##### 1、 不明原因快速死亡、肺炎及腦炎

近年來，各類未知/新興感染疾病的威脅由於全球氣候變遷與國際間交通日漸頻繁而逐漸增加。1997年的H5N1、2003年的SARS-CoV、2009年的pandemic H1N1、NDM-1、2012年的中東呼吸症候群冠狀病毒、2013年的H7N9、H6N1、2014年的伊波拉與2015年的H5NX等均為新興傳染病，這些傳染病原體的浮現，除提醒我們不可掉以輕心，更突顯嚴密的病原體監測與診斷系統的重要<sup>1</sup>。我國現有的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；而檢驗中心各實驗室與時俱進的檢驗技術，包括病毒學、血清學及分子診斷學，更增進對於疾病的了解；然而，仍有許多感染症病患無法得到確切診斷，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建立檢驗平台。感染症之臨床表現眾多，本計畫擬針對疑似感染症導致之不明原因重症或快速死亡(unexplained critical illnesses or deaths due to possibly infectious cause, UNEX)、噬血症候群、腦炎與肺炎重症之個案優先收案並分別分析。針對目前法定傳染病系統中常規檢驗為陰性之檢體，也將同步依疾病類別挑選收案。

疑似感染症之不明原因重症或快速死亡個案由於病情嚴重，且需在短時間內排除新興傳染病或生恐攻擊事件之威脅，在公共衛生及傳染病

防治上之重要性實不可忽視。美國CDC於1995-1998年間首次針對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因感染症死亡之病患，藉由各項血清學、病毒學、分子生物學及病理學檢驗結果判定病因及其公共衛生威脅。在四年間所收集之137名個案中，以神經系統重症(29%)及呼吸道系統重症(26%)最多，其中有28%可經由各樣檢驗找到確定或可能之致病原<sup>2</sup>。值得一提的是，美國東部於1999年發生之West Nile virus encephalitis群聚事件亦由此系統通報並確診，顯示UNEX監測之價值<sup>3</sup>。目前在Arizona、Washington、Minnesota、California等州均將以UNEX納入法定傳染病之方式持續此項監測。除了即時通報、取得適當檢體及與臨床醫師持續溝通外，建立症狀導向之監測系統，增加收案特定性(syndrome-specific surveillance)也可增強對特定病原體之診斷能力。因此除不明原因快速死亡個案外，本計畫擬針對腦炎及肺炎重症病患優先收案。

腦炎病患由於症狀具特異性，病程快速且極易產生嚴重後遺症，一直是臨床診斷上一大難題，各國也陸續對腦炎病原進行全國性、大規模之研究。以英國所進行為期兩年之全國性研究為例，203名腦炎個案在經過兩階段病毒學、分子生物學及免疫學相關檢查後，有42%可找到感染性病因，包括 herpes simplex virus、varicella zoster virus 及 *Mycobacterium tuberculosis* 等，另有21%為免疫相關腦炎<sup>4</sup>。法國在2007年間進行之全國性研究則發現，253名個案中有52%可找到感染性病因<sup>5</sup>。相較於先前所進行之大規模研究約只有16-30%可找到病原<sup>6</sup>，可見檢驗技術之進步可減少不明原因感染之個案數。本計畫即是藉由建立一先進之檢驗平台，以分子生物學檢驗技術增進國內腦炎診斷能力。肺炎由於個案數眾多且嚴重程度各異，本計畫僅收集臨床產生急性呼吸窘迫症之

重症個案，期望能增進對重症肺炎個案病因之了解，並及時診斷如 hantavirus、avian influenza 等具有公共衛生重要性之新興傳染病。

## 2、 新興真菌及特殊寄生蟲感染症監測

近年來因愛滋病毒的肆虐及先進醫療行為等因素，使得侵襲性真菌感染成為引發接受免疫抑制化療的癌症或器官移植患者，或是自身免疫缺損族群產生合併症 (morbidity) 及死亡 (mortality) 的主要原因，亦為公共衛生上的隱憂。除了上述院內感染案例外，病原真菌在社區對於健康個體之威脅性亦與日俱增。例如，肇因於都市發展、人口遷移及環境變遷、地震等天災及氣候異象等因素，助長了真菌如 coccidioidomycosis、histoplasmosis 及 blastomycosis 等雙型性高致病性真菌的感染趨勢。新興真菌的崛起、社區病感染的增加及抗真菌藥物菌株的浮現更增加問題的棘手性。而這些新興及社區感染病原真菌其流行傳播途徑不明、好發危險因子及抗藥性特性有待釐清。真菌的感染加長了住院期，且抗真菌用藥價昂，往往增加醫療花費成本。未來治療所需費用可能隨著藥價持續上升而更形增加。本研究計畫旨在建立真菌鑑定技術，期能達到及早確定菌種，釐清國內流行概況及原因，以提供防治策略研擬之參考。細菌與真菌差異大，用藥選擇不能夠混而一談，快速精確鑑定菌種，有助於臨床精確投藥，節約昂貴藥物的治療費用，並避免產生副作用及抗藥性。

## 3、 恙蟲病監測

恙蟲病 (Scrub typhus) 是由立克次體 (*Orientia tsutsugamushi*) 所引起。立克次體感染引起急性高燒、淋巴結腫大等臨床症狀，有時會併發肺炎或肝功能異常。恙蟲病在台灣一年約有 300-400 例恙蟲病發生。恙蟲病

的臨床診斷主要是病人的旅遊史及其臨床症狀來判定，然而許多病原體的感染都會引發類似的症狀，例如 *leptospirosis*, *murine typhus*, *malaria*, *dengue fever* 及 *viral hemorrhagic fevers* 也會引起相同的徵兆及症狀，難於區別。因此常見恙蟲病的誤診或延誤了正確治療時機。本計畫的主要目標在監測及建置近年台灣立克次體流行菌株，以分子生物學分析主要抗原蛋白質及基因特異性，比較主要抗原高保守性基因序列分析，做定序與演化親緣性分析，有助於立克次體傳染流行病學研究。

#### 4、 地方性傳染病原體主動監測

南台灣因處亞熱帶，受氣候及地型關係，每年入夏即飽受登革熱疫情侵犯。去(104)年台南、高雄地區爆發嚴重登革熱疫情，感染者陽性檢出43,784件，為歷年之最。因應前車之鑑，今(105)年擬即早防範，避免重蹈去年覆轍。目前國內法定傳染病通報系統已爭臻完備，有症狀感染者醫院診所即應通報，但登革熱感染者其症狀常不明顯，或為非典型表現導致不易察覺感染。本計畫擬針對無症狀之疑似登革熱感染人員，以及高風險地理區預作監測篩檢和警示，期將南台灣登革熱疫情發生地區及發生率降至最低，減少患者損傷，保障人民生命安全。

#### 5、 愛滋病毒抗藥性監測

台灣人類免疫不全病毒第一型 (HIV-1) 感染之本國病患，皆可接受健保給付之抗反轉錄病毒藥物治療。完整的醫療照顧與藥物治療已有效地延長這些病患的壽命，但長期服藥所產生的抗藥性病毒株將會影響藥物治療的效果，使得抗愛滋病毒藥物的治療效果大打折扣。本研究擬針對國內目前使用的第一線高效能抗反轉錄病毒藥物 (HAART) 治療失敗之愛滋病病患，探討病毒產生抗藥性突變的情形 (Acquired HIV

DR)，並建立抗藥性監測資料庫，提供臨床醫師參考，並作為本署第二線用藥審查通過與否之重要依據。本計畫將藉由獲得完整的台灣地區愛滋病毒抗藥性的流行病學藍圖，了解我國HIV-1抗藥性嚴重程度，以及產生抗藥性之因素及其所帶來的衝擊和影響，進而作為提供政府及醫療單位制定政策時的科學依據。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術檢測平台之開發

### 1. 未知/新興感染原檢驗

近年來新的人類病原體不斷被發現，如 human metapneumovirus, coronavirus SARS, NL63, HKU1, human bocavirus, polyomavirus KI/WU 等<sup>7-22</sup>。檢測這些病原體的方法除了傳統細胞培養、電子顯微鏡、consensus PCR外，可同時檢出多種病原體之病原體微陣列(microarray)與高通量定序 (high throughput sequencing)等方法也逐漸被應用<sup>14</sup>。本計畫將依腦炎、肺炎及不明原因快速死亡、疑似感染新興真菌及特殊寄生蟲、新興病毒及立克次體或無法分型腸病毒個案等設計不同檢驗項目，利用細菌學、病毒學、血清學及分子生物學各樣檢查，包括multiplex PCR、microarray及high throughput sequencing等，針對收集到之檢體進行檢驗。同時若不明原因死亡個案有進行解剖，亦可於必要時對組織檢體作檢驗。另一方面，對於高度懷疑感染症卻檢驗陰性者，仍可進一步調查、嘗試找出其病原體。目前臨床上檢測病原體，仍以病原體分離培養為主，但往往耗費時日，若為無法培養之病原體也無法適用，而分生檢測往往使用特定專一性的引子，因此陰性檢體也只能排除目前已建立方法之病原體，不代表沒有其他病原體存在。因此為找尋新興傳染病，也將採用退化性引子 (degenerate primer) 分生檢測方法，以期檢出更多新興病原體。

## 2、 新興病毒

小RNA病毒科共12個屬，分別會引起人類或動物各種的臨床症狀，引起人類疾病最常見為腸病毒屬(*Enterovirus*)，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<sup>23,24</sup>，其中有些較為嚴重之病患，可能造成重症或死亡。小RNA病毒科近年新興之病毒—Human Parechovirus (HPeV)常見感染5歲以下幼童，感染HPeV後所表現之臨床症狀包括有呼吸道、腸胃道感染症疾病，與嚴重之無菌性腦膜炎、心肌炎、腦炎、急性無力肢體麻痺症，以及新生兒敗血症等；本署近年來陸續進行無法分型之新興病毒檢驗方法的開發，目前已建立HPeV病毒診斷方法，利用分子生物檢測方法進行核酸定序及序列比對，將此病毒與腸病毒區分<sup>25,26</sup>。又由於各合約實驗室之病毒診斷，僅在細胞培養後觀察到細胞病變，再以間接螢光免疫染色法做為主要鑑別方法，而目前市售螢光抗體只針對幾種常見之腸病毒，因此不容易在第一時間發現HPeV病毒。先前透過本計畫之執行，利用分生檢測方法直接針對該病毒核酸進行檢測，檢測結果顯示已發現到HPeV1、HPeV3與HPeV6，因此仍需持續監控病毒的變化。

狂犬病是由桿狀病毒科 (*Rhabdoviridae*) Lyssavirus引起，對神經組織有很強的親和性。狂犬病之發生屬全球性，世界衛生組織估計每年約有三至五萬人死亡病例，亞洲地區的發生率最高。1947年狂犬病從上海傳入台灣，隔年發現光復後第1個狂犬病病例，其後陸續有病例發生，1951年共發生283例，及1952年發生102例為最多，透過家犬接種、捕殺野狗等控制動物傳染窩的措施，自48年起台灣地區即不再有人的病例。

而在2002年，花蓮曾出現一名境外移入疑似病例，為大陸籍來台探親人士，在大陸曾遭家犬咬傷，惟並未注射疫苗而於遭咬傷兩個月後在台灣發病，終因不治死亡，經屍體解剖證實其感染狂犬病。2012年一名台商個案，於大陸被飼養犬隻咬傷，未進行狂犬病暴露後疫苗注射，咬傷後一個月發病，並回台進行治療。2013年5月有一疑似狂犬病感染境外移入個案(菲律賓)，其唾液拭子中亦檢出狂犬病病毒核酸陽性。台灣於1961年後不再有動物病例，但行政院農業委員會於2013年公布國內野生鼬獾、錢鼠與狗檢出狂犬病毒，顯示國人萬不可掉以輕心。

伊波拉病毒屬於線狀病毒科 (Filoviridae)，感染初期症狀為突然出現高燒、嚴重倦怠、肌肉痛、頭痛與咽喉痛等，接著出現嘔吐、腹瀉、皮膚斑點狀丘疹與出血現象。重症者常伴有肝臟受損、腎衰竭、中樞神經損傷、休克併發多重器官衰竭。個案死亡率可高達9成，目前尚無有效疫苗可供預防接種。2014年2月開始於西非出現大規模疫情，最初始於幾內亞，隨後蔓延至獅子山、賴比瑞亞及奈及利亞等國，連美國、西班牙等亦有病例，累計至10月底已有一萬多名病例，疫情非常嚴重。

綜上，在收集符合條件之臨床檢體後，適當串連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。

### (三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

目前國際間已有數個大型資料庫，包括 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)、流感基

因資料庫 (<http://www.flu.lanl.gov/>) 以及人類免疫缺陷病毒資料庫 (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) 等<sup>1-3</sup>，使用人數亦持續增加，顯示建置我國本土的病原體基因資料庫網站不僅為時勢所趨，亦可強化各面向之防疫資訊整合。台灣的病原體基因資料在過去是分散於政府部門、學術單位、醫療院所或者是生技公司，並且沒有與流行病學資料作結合，因此本署的病原體基因資料庫(舊版)結合流行病學資訊應有重要參考價值，並依政府資訊公開及資源共享之原則，已提供外界申請序列資料及流病資訊的使用，至少超過20位學者教授使用過本資料庫，分享超過兩萬五千筆基因序列及流病資料。本署於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 (Advanced Bioinformatics Core)」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)」，主要功能為儲存本署相關病原體資訊，應用生物資訊軟體進行分析，經由網頁線上呈現的方式，提供序列比對與分型功能，並輔以每筆對應的方式整合國內近年流行之病原體基因序列(主要為腸病毒與流感病毒)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)，上述資料均來自本署彙整、分析歷年資料而成<sup>27</sup>。期望藉由本基因資料庫的資訊，可釐清疾病感染源或感染途徑，提供疾病防治政策參考，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。

流感病毒屬於正黏液病毒科，依病毒表面之血球凝集素 (hemagglutinin; HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase; NA) 兩種抗原蛋白可區分為不同的亞型，目前已有18種HA (H1至H18) 與11種NA (N1至N11)<sup>28,29</sup>。腸病毒屬於微小病毒科的腸病毒屬，其VP1蛋白是中和抗體主要作用區域，亦為序列高變異區域<sup>30,31</sup>，也較常被用作分析<sup>32</sup>。我們持續收集合約實驗室病毒株，將序列合併流病資訊上傳至資料庫後，進



行分析以追蹤病毒來源及序列變異。先前本署已藉此完成許多分析，例如分析2003-2006年間的流感病毒基因及流病資料<sup>33</sup>、研究B型流感的基因重組情況<sup>34</sup>；分析2006-2007年的腸病毒71型，掌握其屬於新引入的B5及C5基因亞型<sup>35</sup>，更確認2008年大流行的腸病毒71型也屬於B5，與中國大陸流行的C4或新加坡流行的C2不同；並於同年發現C2-like基因亞型<sup>36</sup>，以及2009年仍延續2008年的B5流行，2010-2011年轉為C4基因亞型，但2012年再度以B5亞型為主<sup>37</sup>；以及利用歷年的腺病毒資料來比對分析2011年的流行<sup>38</sup>等。

## 二、 材料與方法

### (一) 未知/新興傳染病監測

#### 1、 檢體來源：

- (1) 主動監測通報之肺炎重症、腦炎、不明原因快速死亡或其他未知感染原等突發急性傳染病之檢體。
- (2) 統計同時通報三種以上法定傳染病，檢驗均陰性之檢體且無臨床確定診斷之檢體，將視其臨床症狀設計檢驗 panel，分群檢驗。
- (3) 無法檢驗出感染原之群聚個案檢體。
- (4) 病毒合約實驗室之陰性檢體、未知或無法分型之病毒株。
- (5) 其他學術研究計畫，潛在感染性病原體檢體。

#### 2、 監測與檢體採集點：

全國各地教學醫院與區域醫院之臨床醫師(感染科、胸腔科、神經科、兒科等)合作，依據以下肺炎重症及腦炎收案條件，通知院內感染管制委員會，循法定傳染病模式通報，通報病名為「其他(未知感染原腦炎/肺炎重症)」。另不明原因快速死亡個案，由法醫解剖後，循法定傳染病系統通報送驗。其他疑似未明原因感染症亦藉由通報系統送驗。

#### 3、 主動監測通報之條件：

- (1) 肺炎重症收案條件--住院病患合併以下所有條件:

A、 體溫超過 38 度且通報時無確定診斷；

B、 非院內感染：在社區或住院 48 小時內發病；

C、 嚴重肺炎，符合下列 I 或 II

I. 急性呼吸窘迫症，定義如下：

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

ii.  $PaO_2/FiO_2 \leq 200$  mmHg

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

II. Respiratory failure that requires intubation

(2) 腦炎收案條件--病患合併以下所有條件：

A、 急性發作（一個月之內）；

B、 發燒超過 38°C；

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

D、 腦脊髓液有任何一項檢驗為異常（超過該院的正常值）

(3) 不明原因快速死亡收案條件：

住院 7 天內死亡，經檢驗或臨床醫師診斷，不能排除與感染症相關。或通報法定傳染病在案，檢驗陰性且無臨床確定診斷之特殊個案。

(4) 噬血症候群收案條件：8 項中至少符合 5 項診斷條件：

A、發燒；

B、脾腫大；

C、2種血球細胞系低下：ANC <1000/uL；PLT < 100,000 /uL；Hb < 9 mg/dL；

D、Fasting TG > 265 mg/dL 或 fibrinogen < 1.5 g/L；

E、嗜血現象：淋巴結、脾臟或骨髓且沒有任何惡性腫瘤之證據；

F、自然殺手細胞活性減少或缺乏；

G、Ferritin > 500 mg/dL；

H、溶解性 CD25(IL-2 接受器)大於 2400 U/ mL。

4、採檢項目如表一，送驗之檢體將進行病原體實驗室檢驗鑑定，包括細菌、病毒、真菌、寄生蟲及可能未知的病原體。

5、實驗室檢驗結果將提供臨床醫師治療參考，配合臨床症狀與治療情形，確認檢驗出的病原體與疾病的關係。

6、病歷資料回顧、個案研判與分析：

針對特殊病例，本署將定期以公文函知通報醫院，派遣防疫醫師至醫院進行通報個案病歷調閱，根據病歷資料填寫 case report form (附錄一、二)。病例資料及檢驗結果將建檔進行分析。個案研判標準會參考檢體來源部位、檢驗方法以及檢驗陽性病原體種類，依過往文獻和該疾病臨床與流行病學的特徵分成確定病因、極可能病因以及可能病因(表二、表三)。上述研判過程，由 2-3 位防疫醫師討論後研判。

## (二) 恙蟲病/立克次體監測

1. 檢體來源：

血清檢體來源為通報(各種被動與主動疫情監測系統)個案之血清。

首先利用 PCR 方法與 IFA 方法檢測出立克次體陽性之案例，再由腦脊髓液或血液分離病原，病進行立克次體分離與基因定序。

## 2. 新興立克次體分離法：

檢體為病患急性期（1~7 病日）含 heparin (10U/mL) 之全血，分離出周邊血液單核細胞（PBMC），再將其接種至 L929 或 HL60 細胞株 (shell-vial 細胞培養瓶)。每隔 3~4 天更換培養基，並觀察是否有細胞病變發生，並以間接免疫螢光法偵測是否有立克次體生長。2 週後若無新興立克次體生長，則將細胞凍解 3 次後再行細胞株接種 1-2 次。所有實驗過程應於 P3 實驗室生物安全操作台內操作，慎防感染自己及他人。培養基中不可添加四環黴素及氯黴素等抗生素。

## 3. 血液標本及細胞培養製備新興立克次體 DNA：

以 ROCHE High Pure PCR Template Preparation Kit ( Cat. No. 11 796 828 001 ) 萃取病人檢體全血或細胞培養之細菌 DNA 核酸。首先取加抗凝血劑之全血 200  $\mu$ L，與 200  $\mu$ L 之 Binding Buffer 均勻混合後，再加入 40  $\mu$ L Proteinase K，以震盪器混合均勻，置於 70°C 水浴槽加熱 10 分鐘。再加入 isopropanol 100  $\mu$ L 均勻混合後，加到 High Pure Filter Tube 以 8,000 x g 離心 1 分鐘。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500  $\mu$ L 之 Inhibitor Removal Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘。再置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，加入 500  $\mu$ L 之 Wash Buffer，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，重複此步驟再 wash 一次。置換 High Pure Filter Tube 至新的 Collection Tube 後，以 13,000 x g 離心 1 分鐘，將 High Pure Filter Tube 上殘留的廢液甩乾淨。最後將 High Pure Filter Tube 放至新的 eppendorf，

加入 50  $\mu$ L 預熱 70°C 的 Elution Buffer，靜置 10 分鐘，以 8,000 x g 離心 1 分鐘，eppendorf 中的液體即為欲萃取之 DNA。

#### 4. 新興病毒或立克次體核酸定序：

對於具有代表性的分離新興病毒或立克次體株，以新興病毒或立克次體培養液為材料，進行 5' 端非轉譯區及整個結構基因的定序工作，RT-PCR 或 PCR 產物經瓊膠電泳分離及純化後，以 ABI Prism 3700 DNA sequencer (Applied Biosystems) 核酸定序儀定序。核酸序列之比對及親緣性分析，可利用 MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/>) 分析方法及工具進行。

### (三) 南台灣登革熱主動監測

#### 1. 檢體收集：

(1) 採檢區域：台南市、高雄市、屏東縣。

(2) 採檢對象：

A. 病例附近或高風險區里篩檢。

B. 病媒蚊指數高之地區。

C. 民眾有意願接受血清篩檢者。

#### 2. NS1 抗原檢測：

使用 NS1 抗原測試組 (SD BIOLINE Dengue NS1 Ag)，檢測血液以 3000 rpm 離心 2 分鐘，再以塑膠吸管將血清吸入檢體瓶內旋緊瓶蓋。利用測試組內附之滴管吸取血清，滴入 3 滴約 100  $\mu$ L 至測試組檢體區靜置 15-20 min 後判讀。

### 3. 登革熱病毒 IgM 和 IgG 抗體 ELISA 檢測：

將四型登革熱病毒細胞培養液(DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4)分別以 Dilution buffer 稀釋後，各取等量混合加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體。對照之日本腦炎病毒細胞培養液以 Dilution buffer 稀釋後，加入 1：1,000 之抗黃病毒屬抗原單株抗體。山羊抗小鼠 IgG 抗體(goat anti-human)-鹼性磷酸酶結合體以 Dilution buffer 1：4000 稀釋。血清 6  $\mu$ L 加入 Dilution buffer 0.6 mL 稀釋 100 倍。加入含 Coating goat anti-human IgM 及 Coating goat anti-human IgG 之 96 孔真空乾燥盤，置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。取 0.1 mL 含抗黃病毒屬抗原單株抗體之四型登革熱病毒細胞培養稀釋液分別加入 96 孔真空乾燥盤，置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。取 0.1 mL 山羊抗小鼠 IgG 抗體-鹼性磷酸酶結合體稀釋液，置於 37°C 溫箱，搖盪 30 min，然後以 Washing buffer 清洗 4 次。取 0.1 mL/孔 呈色劑 (p-NPP) 加入 96 孔微量滴定盤中呈色。置於 37°C 溫箱，搖盪 40 min。以雙波長 405、630 nm 測定吸光度 (OD<sub>405-630</sub>)。

#### (四) 愛滋病毒抗藥性監測

##### 1. 檢體收集：

取得 105 年度愛滋病指定醫院收集第一線高效能抗反轉錄病毒藥物 (HAART) 治療失敗之愛滋病患檢體，並送至本署進行抗藥性分析。

##### 2. ViroSeq 抗藥性基因序列分析：

使用符合 FDA、CE 及本署 IVD (In vitro Diagnostics) 規範的 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, US) 所包含的完整流程，分析 HIV-1 基因體中 pol 基因序列突變。此 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System 可偵測 HIV-1 *pol* 基因中反轉錄酶(reverse transcriptase) 以及蛋白酶區域(protease) 的基因突變，提供一份具病毒抗藥性基因證據的檢驗報告。此檢驗系統可提供從血漿中分離病毒 RNA、進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應、以及基因定序的所有試劑，並可獲得 HIV-1 蛋白酶基因的第 1 至第 99 個密碼子，與反轉錄酶基因的第 1 至第 335 個密碼子的氨基酸序列，並將序列與 HXB-2 參考株進行比對，以鑑定存在於待測病毒中的突變基因。最後，ViroSeq™ 軟體再利用其專利整合系統，分析出基因突變以及病毒抗藥性產生的報告。操作流程完全依照試劑所附之操作手冊，依序為檢體 RNA 的萃取、反轉錄酶聚合酶鏈鎖反應、聚合酶鏈鎖反應、聚合酶連鎖反應產物純化、定序循環反應、定序自動偵測、軟體分析。

### 3. HIV-1 病毒基因亞型分析：

利用 HIV-1 抗藥性分析所獲得之整個蛋白酶基因(protease gene) 的第 1 至第 99 個密碼子，與三分之二個反轉錄酶基因(reverse transcriptase gene) 的第一至第 335 個密碼子，來進行 HIV-1 病毒基因分型。所有的基因序列將利用 Rega Subtyping Tool v.2.0 (<http://jose.med.kuLeuven.be/genotypetool/html/>) 分析，以基因系統樹分析(phylogenetic analysis) 為基礎架構來決定病毒株之亞型，此 HIV-1 分型工具之優勢為準確度為 100% 而可辨識率為 99.2%。至於無法直接由 Rega Subtyping Tool v.2.0 決定病毒株之亞型者，則以



Viral Genotyping Tool (National Center For Biotechnology Information, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 進行序列分析決定，此 HIV-1 分型工具優勢為快速並且可辨識率為 100%而準確度則為 99.5%。

#### (四) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

- 1、建置 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統：針對特定病原進行初步篩檢，針對肺炎及腦炎可能病原設計不同引子組合，能有效減省檢體用量，並縮短偵測時間。本計畫建立 multiplex real-time PCR panel，針對造成肺炎以及腦炎、腦膜炎之病原體進行偵測。本實驗收集已發表的報告之引子及探針序列，進行 real-time PCR 偵測，目前可偵測病原包括 influenza viruses, parainfluenza virus, rhinovirus, human metapneumovirus, herpes simplex virus (HSV) I and II, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, enterovirus, coronavirus, parvovirus B19, respiratory syncytial virus, parechovirus, chikungunya virus, Japanese encephalitis virus, dengue virus, *Toxoplasma gondii* 以及 *Borrelia* 等項目。

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：

- (1) 反轉錄反應 (Invitrogen)：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 10  $\mu$ L 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°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°C 作用 60 分鐘。

(2) Real-time PCR 反應：20  $\mu$ L DNA 與 cDNA 產物與 1x LightCycler 480 Probes Master、200 nM forward primer、200 nM reverse primer 以及 100 nM hydrolysis probe 混合。混合物以 LightCycler 480 系統(Roche Diagnostic)進行反應，反應條件如下：50°C 2 min，95°C 10 min，接續 45 cycles 之反應(95°C 15 sec、60°C 40 sec)，最後 1 min 降溫(cooling)至 40°C。

2、高通量定序：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。

實驗方法：本實驗方法分成兩部份，進行檢體處理萃取核酸，進行反轉錄反應，以及序列分析。

(1) 反轉錄反應 (Invitrogen)：取 10  $\mu$ L 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°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°C 作用 60 分鐘。合成之第一股 cDNA 續加入 DNA ligase、DNA polymerase 及 RNase H，16°C 作用 2 小時完成第二股的合成(second strand synthesis)。將 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。

(2) 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 Genebank 中 virus 資料庫。

3、其他新興病毒檢驗：

- (1) HPeV real-time RT-PCR<sup>39,40</sup>：以 ABI 7500 來作分析，取 5  $\mu$ l 的 RNA 加到 TaqMan one-step RT-PCR 混合反應液 (reaction mix) 中，其中引子的濃度為 400 nM，螢光標的的探針濃度為 200 nM。反轉錄作用為 50°C 30 分鐘，接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶 95°C 10 分鐘，再進行 PCR 反應 40 個循環：95°C 15 秒，58°C 45 秒，72°C 10 秒，螢光訊號的收集於 annealing 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。引子設計增幅的區域範圍是在 parechovirus 的高度保守的基因片段 5' UTR 區域。
- (2) HPeV CODEHOP RT semi-nested PCR：取 5  $\mu$ L 的 RNA，加入 5 $\times$  PCR buffer，7.5 pmol primer mix (primers AN273, AN274, AN275, AN276, AN277, and AN278)，加入 20 U Rnasin，510  $\mu$ M dNTP、0.01 M DTT、100 U of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen)，混合均勻後，反應在 22°C，10 分鐘；45°C，60 分鐘；95°C，5 分鐘。得到 10  $\mu$ L 的 cDNA，將 cDNA 直接進行 PCR1 反應，加入 2 $\times$  PCR buffer、200  $\mu$ M dNTP、50 pmol primers (AN353 and AN355)，2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)，補足水至 50 $\mu$ l，混合均勻，PCR 反應條件為 95°C 30 秒，42°C 40 秒，72°C 60 秒，共 35 個循環，最後 72°C 3 分鐘完成反應。接著要進行第二次 PCR 反應 (PCR 2A 及 PCR 2B)，取出 1  $\mu$ L PCR1 產物，加入 40 pmol primers (PCR 2A: AN353 and AN357; PCR 2B: AN369 and AN358)、200  $\mu$ M dNTP、2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)，總體積為 50  $\mu$ L，先以 95°C 6 分鐘做熱起始，PCR 2A 反應為 95°C 30 秒，58°C 40 秒，72°C 60 秒，PCR 2B 反應為 95°C 30 秒，44°C 40 秒，72°C 60 秒，40 個循環反應，最後 72°C 3 分鐘完成反

應。之後進行電泳分析，陽性結果進一步進行定序反應。

- (3) Rabies virus L gene RT-PCR<sup>41</sup>：取 5  $\mu$ L 的 RNA，加入 2 $\times$  RT-PCR buffer，10 pmol primers (PVO5m/PVO8)，加入 20 U Rnasin，200 U SuperScript III reverse transcriptase 及 5U Platinum Taq (Invitrogen)，混合均勻後，反應在 25 $^{\circ}$ C，10 分鐘；45 $^{\circ}$ C，30 分鐘；95 $^{\circ}$ C，5 分鐘，接著 PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 30 秒，56 $^{\circ}$ C 45 秒，72 $^{\circ}$ C 40 秒，共 40 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 3 分鐘完成反應。之後進行電泳分析，陽性結果進一步進行定序反應。
- (4) Ebola virus：參考 Science paper<sup>42</sup>、日本 NIID<sup>51</sup> 及歐洲 ECDC 檢驗方法，先以 QIAamp Viral RNA Kit 萃取核酸，接著進行 nested RT-PCR 或 real-time RT-PCR。nested RT-PCR 條件如下：取 5  $\mu$ L 的 RNA，加入 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  buffer，3  $\mu$ L primers (primers FiloNP-Fe and FiloNP-Re)，0.5  $\mu$ L RNaseOUT，1  $\mu$ L SSIII/Ptaq，3  $\mu$ L DEPC-ddH<sub>2</sub>O，混合均勻後，反應在 50 $^{\circ}$ C，30 分鐘；95 $^{\circ}$ C，10 分鐘，接著 PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 60 秒，52 $^{\circ}$ C 60 秒，72 $^{\circ}$ C 90 秒，共 50 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘完成反應。將 1  $\mu$ L 產物進行第二個 PCR 反應，加入 12.5  $\mu$ L Takara PCRMASTER MIX，3  $\mu$ L primers (Sudan Zaire 2nd F1 and Sudan Zaire 2nd R1)，8.5  $\mu$ L DEPC-ddH<sub>2</sub>O，混合均勻，反應在 95 $^{\circ}$ C，10 分鐘；PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 60 秒，54 $^{\circ}$ C 60 秒，72 $^{\circ}$ C 60 秒，共 30 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘完成反應。之後進行電泳分析。real-time RT-PCR 則使用 RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (altona)，依產品說明進行檢驗，反應條件為 55 $^{\circ}$ C，30 分鐘，95 $^{\circ}$ C，2 分鐘，接著 PCR 反應為 95 $^{\circ}$ C 15 秒，58 $^{\circ}$ C 45 秒，72 $^{\circ}$ C 15 秒，共 50 個循環。

(5) 泛冠狀病毒: 病毒 RNA 萃取液 5  $\mu$ L 為模板, 加入 1  $\mu$ L 50  $\mu$ M 隨機引子及 1  $\mu$ L 10 mM dNTP 於 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後, 馬上將反應管置於冰上 5 分鐘後; 再加入單管 RT 混合液, 內含 200U 反轉錄酵素, 40U RNase 抑制劑, 反應緩衝溶液, 反應總體積為 20  $\mu$ L。 (RT-TaKaRa Cat:6110A PrimeScript 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis kit Cat:6110A) 於 30 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘, 42 $^{\circ}$ C 60 分鐘反轉錄作用, 之後 70 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。Nest-PCR: 以 cDNA 產物 5  $\mu$ L 為模板, 加入 20  $\mu$ L PCR premix, 含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix(QIAGEN HotStarTaq Master Mix Kit Catalog no.203445)及 0.4  $\mu$ M 每個分析引子(Cor-FW/ Corona-1R), 片段序列 PCR, 先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘, 熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、annealing 50 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 共 40 個 cycle, 最後 extension 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。以第一次 PCR 產物 2  $\mu$ L 為模板, 加入 23  $\mu$ L PCR premix, 含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix (QIAGEN HotStarTaq Master Mix Kit Catalog no.203445)及 0.4  $\mu$ M 每個分析引子(Pan-CoVF/ Pan-CoVR1), 片段序列 nest PCR, 先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘, 熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘、annealing 50 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 共 40 個 cycle, 最後 extension 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析, 得到陽性反應之 PCR 產物約 462 bp, 進一步做片段序列分析。

引子序列如下:

Cor-FW: ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC

Corona-1R: GTRTGYTGIGARCARAAYTCRTG

Pan-CoVF: ATGGGITGGGAYTATCCWAARTGTG

Pan-CoVR1: AATTATARCAIACAACISYRTCRTCA

#### 4、 腸病毒 CODEHOP RT-PCR :

首先進行反轉錄反應，取 5  $\mu$ L 的 RNA，加入 5 $\times$  PCR buffer，10  $\mu$ M primer mix ( primers AN32, AN33, AN34, and AN35 )，加入 20 U RNasin，100  $\mu$ M dNTP、0.01 M DTT、100 U SuperScript III reverse transcriptase，進行 22 $^{\circ}$ C 10 分鐘，45 $^{\circ}$ C 60 分鐘，95 $^{\circ}$ C 5 分鐘的反應。取 10  $\mu$ L 的 cDNA，進行 PCR1 反應，加入 2 $\times$  PCR buffer、200  $\mu$ M dNTP、50 pmol primers 224 and 222，2 U Taq DNA polymerase，補足水至 50  $\mu$ L，進行 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘，PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 30 秒，42 $^{\circ}$ C 30 秒，60 $^{\circ}$ C 45 秒，共 40 個循環。接著進行第二次 PCR 反應，取 1  $\mu$ L PCR1 產物，加入 40 pmol primers AN89 and AN88、200  $\mu$ M dNTP、2 U Taq DNA polymerase，配置總體積為 50  $\mu$ L，PCR 條件為 95 $^{\circ}$ C 30 秒，60 $^{\circ}$ C 20 秒，72 $^{\circ}$ C 15 秒，40 個循環反應，最後以 72 $^{\circ}$ C 5 分鐘結束反應，之後進行電泳分析，產物大小約為 320 bp。

#### 5、 特殊寄生蟲檢驗：

(1) 弓形蟲、隱孢子蟲、痢疾阿米巴、梨形鞭毛蟲與環孢子蟲等食媒性寄生蟲之盛行率調查係利用 Nested PCR 及 real-time PCR 方法進行檢驗。

A. Nested PCR 檢測系統：5  $\mu$ L template DNA，12.5  $\mu$ L TopTaq master mix，1  $\mu$ L outer forward primer，1  $\mu$ L outer reverse primer，2.5  $\mu$ L coraload concentrate，及 3  $\mu$ L RNase-free water，最終體積為 25  $\mu$ L，進行第 1 次 PCR 反應。94 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘後，進行

35 個循環，每個循環為 denature 94°C, 30 秒；annealing 50°C, 30 秒以及 extension 72°C, 1 分鐘。第 2 次 PCR 反應: 2  $\mu$ L template DNA, 12.5  $\mu$ L TopTaq master mix, 1  $\mu$ L inner forward primer, 1  $\mu$ L inner reverse primer, 2.5  $\mu$ L coraload concentrate, 及 6  $\mu$ L RNase-free water, 最終體積為 25  $\mu$ L。94°C 加熱 5 分鐘後，進行 35 個循環，每個循環為 denature 94°C, 30 秒；annealing 54°C, 30 秒以及 extension 72°C, 1 分鐘。

B. Real-time PCR 反應總體積為 25  $\mu$ L, 其組成內容物分別為: 5  $\mu$ L DNA template, 12.5  $\mu$ L KAPA SYBR FAST qPCR master mix, 6.5  $\mu$ L PCR-grade water, 10 mM 0.5  $\mu$ L forward primer 及 10 mM 0.5  $\mu$ L reverse primer。PCR 增幅條件，先以 95°C 反應 3 分鐘後，另以 95°C 反應 1 分鐘、55°C 反應 20 秒、72°C 反應 30 秒，進行 40 次循環，並在每次循環結束後偵測螢光訊號。

(2) 建置隱孢子蟲恆溫式圈環形核酸增幅法 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) 分生檢測: 分析整理已知病原體的基因序列, 尋找病原體之特有序列, 利用這些序列為目標基因, 設計兩對 primer, 以 outer primer 與 inner primer 快速增幅目標產物, 建立可快速篩檢與容易操作且有效率的檢測系統, 以達到快速尋找致病原的目的。實驗流程包括樣品核酸萃取及 LAMP PCR 反應與結果分析。

A. LAMP PCR 反應: 2  $\mu$ L DNA 與 1x Reaction Buffer 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% Tween 20, 0.8 M betaine, and 1.4 mM of each

deoxynucleoside triphosphate (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、fluorescent detection reagent (Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)、0.2mM outer primer 以及 1.6mM inner primer 與 Bst DNA polymerase 混合。混合物以恆溫核酸增幅系統(Biometra) 進行反應，反應條件如下：63°C 120 min，90°C 1 min。

- (3) 弓形蟲檢測-抗體檢測：利用生物梅里埃 (BioMerieux) 出品之 Vidas<sup>o</sup>RRToxo IgM、IgG 與 IgG avidity kit 進行測定。

## 6、新興真菌培養鑑定

- (1) 檢體先以 Mycosel agar 真菌選擇性培養基於 37°C、24 小時分離培養出真菌菌株後，再以 Chromagar Candida agar 產色培養基於 37°C、24 小時培養後，再挑取單一菌落做 *Candida* spp. specific PCR 鑑定。*Candida albicans* 專一性引子 CALB1 (5' TTT ATC AAC TTG TCA CAC CA GA 3' )和 CALB2 (5'ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG3');*Candida glabrata* 專一性引子 CGL1 (5'TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT3') 和 CGL2 (5'CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA 3');*Candida tropicalsi* 專一性引子 CTR1 (5'CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T3') 和 CTR2 (5'TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T3')。PCR 反應總體積 25  $\mu$ L，其中引子對各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ M)，10.5  $\mu$ L distilled water，及 12.5  $\mu$ L 2X Master Mix (Fermentas)。PCR 反應條件為 94°C，7 min denature，接著進行



30 cycle 94°C, 1 min → 58°C, 45 sec → 72°C, 1 min 的反應，最後為 72°C, 7 min。

(2) 流式微珠陣列檢測

- i. 引子及探針之設計集合所有病原真菌的 species-specific 或 groups-specific 探針設計是根據 GenBank 資料庫 ITS2 region 的序列利用 BioEdit 7.0 版進行多序列比對。這些 species-specific 或 groups-specific 探針有些是新設計的有些是參考以前報告或作修改。
- ii. 真菌 ITS3 & ITS4 之聚合酶鏈反應(PCR)以 ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC 3') 和 ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') 引子對增幅 ITS2 (internal transcribed spacer) 區域。PCR 反應總容積為 50 μL，內含 10 ng 待測 DNA，25 μL 2X Master Mix (Fermentas)，及 50 nM ITS3 (forward primer)，200 nM of ITS4 (reverse primer)，其餘加蒸餾水混勻。反應初始以 95°C 5 分鐘溫度，35 次循環的變性反應 95°C 30 秒 → 黏和 58°C 30 秒 → 72°C 1 分鐘聚合延長反應，最後為 72°C 10 分鐘聚合延長反應。PCR 機器使用 PTC-200 (MJ research)。

- iii. 鍵結固定化探針於微珠：取  $2.5 \times 10^6$  顆磁珠 (Luminex, TX)，加入 50  $\mu\text{L}$  0.1 M 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer pH 4.5 (Sigma)與 1 mM 探針 oligonucleotide。序列的設計為在 5' amino 端加上 12-carbon linker。加入 3  $\mu\text{L}$  現配製 1-ethyl-3-(3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) solution (10 mg/ml) (Pierce Biotechnology)，可將探針與磁珠結合，置於室溫反應 30 分鐘。之後再加入 3  $\mu\text{L}$  現配製的 EDC 反應 30 分鐘。其後加入 0.5 mL 0.02% Tween 20，混合均勻，8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液，加入 0.5 mL 0.1% SDS 清洗後，再以 8000 rpm 離心 2 分鐘，去除上清液。最後磁珠以 50  $\mu\text{L}$  Tris-EDTA 回溶，置於 4°C 暗房保存。
- iv. 增幅產物與探針專一性雜交：磁珠以 1.5 X tetramethylammonium chloride (TMAC) solution (Sigma, St. Louis, MO)稀釋。TMAC solution 包含 4.5 M TMAC、0.15% Sarkosyl、75 mM Tris-HCl pH 8.0 與 6 mM EDTA (pH 8.0)。取 33  $\mu\text{L}$  1.5X TMAC 包含 5,000 顆磁珠與 17  $\mu\text{L}$  增幅產物混合均勻，置於暗室於 95°C 反應 5 分鐘，接著於 55°C 反應 30 分鐘。以 6000 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液，加入 75  $\mu\text{L}$  1X TMAC solution 包含 10 ng/ $\mu\text{l}$  streptavidin-R-phycoerythrin (Molecular Probes, Eugene, OR)，

置於暗房 55°C 10 分鐘。最後將樣本分別加至 96 孔 ELIS A 盤，以 Bio-Plex 200 Suspension Array System (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) 檢測。螢光強度中位數值 (Median fluorescent intensity, MFI) 為測量 100 個訊號數值之中位數，再由 Bio-Plex Manager 4.1.1 軟體分析結果。

## (五) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

### 1、病原微生物基因體資料庫對外開放網站暨分析平台

- (1) 基因資料庫採用 Redhat Enterprise Linux 5 作業系統，以 Apache2 網頁伺服器配合資料庫系統 MySQL 5.0.77 及開發語言 PHP Version 5.1.6 進行基因資料庫之建立。
- (2) 資料庫內容為序列資料與對應流行病學資料，如：採檢日、性別與年齡等。除了本署提供的資訊外，也包含 WHO 公佈之流感疫苗資訊以及相關病原體序列資訊。另有統計報表介面，可計算使用者登入情況，以及統計序列或流行病學資料數量。
- (3) 分析功能：包括序列比對 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)、多序列排比、親緣樹狀圖繪製、引子設計 (Primer3) 及腸病毒 71 型基因亞型分型及流感疫苗建議疫苗株比對功能。
- (4) 使用者若需要完整資料則須向權責單位依病原體基因資料序列申請規範文件申請，其內容包含計畫摘要表和使用協議書，而申請者利用本資料發表之有關論文或著作，應詳細書明資料出處。

### 2、病原體防疫資料庫基因序列的分析流程

- (1) 將合約實驗室送檢病毒株進行病毒核酸的萃取、RT-PCR、PCR 產物純化以及 Cycle Sequencing 等，並經過核酸染劑純化後進行序列判讀，最後進行序列整理及比對分型。
- (2) 所定序的基因片段為流感病毒的 HA 基因 (約定序 1,000 bp)及 NA 基因 (約定序 600bp)、腸病毒的 VP1 基因 (約定序 500-700 bp)、腺病毒的 hexon 基因 (約定序 800 bp)，若是序列長度不足或品質不良者皆予剔除。
- (3) 使用 ClustalW2 套件或於本機端使用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 來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，或合併流行病學資料 (包含年齡、性別及發病日等資料)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。

### 三、 結果

#### (一) 建立未知感染原監測網路

##### 1、 肺炎重症監測結果

2016 年 1 月至 11 月，共計 561 個肺炎重症通報個案，其中呼吸道檢體，使用病毒 multiplex RT-realtime PCR 檢測套組(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 2014-2016 年每月通報與送驗數目，發現 2016 年因台灣爆發 H1N1pdm09 流感，造成不明原因肺炎通報數激增(圖一 A)，病原體的檢出率約為 47-67%。2016 年 561 例案中有 264 例(47.1%)檢驗出病原體(圖一 B)，其中 37 例檢驗出病毒與細菌或真菌同時感染(圖二)。在檢出病毒的個案中，以 influenza A(H1N1)pdm09 149 例最多，(圖三 A)。在檢出細菌病原體中，*Streptococcus pneumoniae* 有 24 例，*Legionella pneumophila* 3 例(圖三 B)。本年通報個案無 MERS-CoV 陽性。

##### 2、 腦炎及未知感染原監測結果

2016 年 1 月至 10 月，共計 232 個腦炎或未知感染原通報個案，使用病毒 multiplex RT-real time PCR 檢測套組(包含 Influenza A, B viruses, Human adenovirus, RSV, Coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1), HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, Human metapneumovirus, parainfluenza type 1-3, parainfluenza type

4a, 4b, Bocavirus, Polyomavirus (JC, BK, WU, KI), Parvovirus, Enterovirus, Human Parechovirus, Rhinovirus, Japanese Encephalitis virus, Dengue virus, West Nile virus, Chikungunya virus, Toxoplasma gondii, Mycoplasma, Chlamydia pneumoniae Borrelia, Hendra virus, Nipah virus, cyclovirus, Balamuthia, Acanthamoeba, Naegleria, Borrelia 等 45 種病毒檢測) 進行檢驗。比較 2014-2016 年每月通報與送驗數目，並無季節關聯性(圖四 A)，病原體的檢出率約 20-23% (圖四 B)。2016 年 232 例個案中 46 例 (20%) 檢驗出病原體 (圖五)。其中 5 個血清檢體中驗出 CMV(2 個案)、HHV6 (1 死亡個案)、VZV (1 個案)以及 BK, CMV, HHV6 共同出現之 1 個案。4 個案腦脊髓液中驗出 HHV6 (2 個案，其中一例為死亡個案)、JC polyomavirus (1 個案)以及 VZV(1 個案)。另一死亡個案左腦拭子驗出 Echovirus 18。其餘 37 個案病原驗出於咽喉或肛門拭子中。

### 3、 不明原因監測：

105 年通報 4 起不明原因個案，檢送血液、心、脾、氣管及腦膜等各組織或拭子檢體，以 multiplex RT- real time PCR 檢測套組檢驗 3 個案陽性檢述如下：

- (1) 105 年 6 月 21 日林口長庚醫院通報 1 例不明原因腦炎之死亡個案，該案為 1 歲男童，於同月 18 日發病並於 21 日死亡，經檢驗於個案之腦脊髓液、血清及鼻咽拭子均檢出 Human herpesvirus 6。
- (2) 105 年 9 月 22 日彰化縣衛生局通報 1 例不明原因腦炎之司法相驗個案，該案為 2 歲女童，於同月 11 日發病並於 22 日死亡，經檢驗於個案之左腦室拭子檢出 Echovirus 18。

(3) 105 年 10 月 21 日高雄醫學大學附設醫院通報 1 例不明原因腦炎個案，該案為 3 歲男童，於同月 20 日開始出現肌抽躍 (myoclonic jerks) 症狀，經檢驗於個案之鼻咽拭子同時檢出 Enterovirus 71、Human coronavirus NL63、Rhinovirus 及 Human herpesvirus 7 等多種病原，亦於肛門拭子檢出 Enterovirus 71，該案已另案通報腸病毒感染併發重症並於鼻咽及肛門拭子檢出 Enterovirus 71。

4、 狂犬病/麗沙病毒監測：

因應狂犬病於 102 年在台灣出現野生動物案例，以及今年農委會檢測到蝙蝠感染新型麗沙病毒，105 年持續以狂犬病 RT-PCR 檢驗 (此方法可同時檢驗麗沙病毒)通報不明原因腦炎個案共 69 例，臨床檢體共 130 件，結果皆為陰性。

5、 MERS-CoV 監測：

因應 101 年起中東地區與 104 年韓國曾爆發 MERS-CoV 疫情，加強通報與檢驗，105 年 1-11 月臨床檢體共 7 例，結果皆為陰性。

另為擴大監視，針對醫院送驗之 1330 名不明原因肺炎個案進行檢驗，結果皆為陰性。

6、 新型 A 型流感監測：

105 年 1-11 月共通報新型 A 型流感及疑似案例 17 例，檢測結果陰性。

7、 呼吸道群聚常規檢驗陰性檢體監測：

105 年 1-11 月於 32 起通報呼吸道群聚，且流感、腺病毒、呼吸道

融合病毒檢測陰性案件中，以肺炎套組檢出 6 起 human metapneumovirus、3 起 rhinovirus、1 起 parainfluenza type 1、4 起 parainfluenza type 3 以及 1 起 human metapneumovirus 與 adenovirus 共同感染等陽性案件，檢出率 50%。

#### 8、 南臺灣好發登革熱地區主動監測：

105 年登革熱主動監測計畫對象，為南高屏各縣市無症狀及高風險區居民，從入夏前 4 月至 7 月止，分別接受來自高雄市(包含小港區、三民區、仁武區、左營區、前金區、塩埕、鳳山及鼓山區)和屏東縣(屏東市)採檢送驗共 373 人，其中以三民區送驗 207 件最多登革熱，NS1 快篩檢驗結果皆為陰性。除 NS1 檢驗外，部分檢體有採用 ELISA 加驗 IgM/IgG 抗體，共 5 人(分別在苓雅區 4 人及鼓山區 1 人)驗出陽性，研判非本年疫情發生之殘留抗體(圖六)。

本次主動監測送驗單具完整年齡及性別資料可供查詢者共 131 人，男性和女性分別為 67 人和 64 人；年齡群大都屬成年人，年齡間距小於 10 歲 1 人、10-19 歲 5 人、20-29 歲 13 人、30-39 歲 17 人、40-49 歲 30 人、50-59 歲 23 人、60-69 歲 24 人而大於 70 歲 18 人(圖七)。

#### 9、 抗藥性愛滋病毒監測：

在 HARRT 藥物治療失敗之 HIV-1 病患病毒抗藥性分析方面，105 年共收集檢體 99 件，其中有 31 件(31.3%)檢體因病毒量太低無法進行後續抗藥性分析；順利進行抗藥性分析者共有 68 件檢體。完成分析之結果顯示，有 50 件(73.5%)具有一個以上之抗藥性相關



之突變位點，多重抗藥性有 38 件(55.9%，表一)。其中以 NNRTIs 與 NRTIs 類別之抗藥性突變位點最普遍(分別為 58.8%，70.6%)，而 PIs 類別偵測案例最少(1.5%，圖八)，相關抗藥性位點分布次數如表二。然而其中有 18 位(18.2%)病患病毒沒有發現任何 HIV-1 抗藥性突變位點，惟個案是否具抗藥性仍需審慎評估。

#### 10、 腸病毒 71 型監測

本年定點醫院社區腸病毒監測以及腸病毒重症個案檢體，以腸病毒 CODEHOP RT-PCR 方法共驗出 109 件腸病毒 71 型(EV71)，25 件為通報腸病毒重症，84 件為社區腸病毒監測之病毒株，而以東部花蓮縣佔最多數(46.4%)。

#### 11、 腸病毒 D68 型監測：

本年持續監測腸病毒 D68 型，以往感染主要的症狀為發燒及呼吸道症狀，除在病毒合約實驗室分離到 8 株腸病毒 D68 型，8 月時亦發現一起急性無力肢體麻痺之病例，以分生方法檢出腸病毒 D68 型。

#### 12、 Human Parechovirus 病毒監測：

105 年 1 至 10 月病毒合約實驗室分離無法分型與定序之腸病毒，進行 HPeV (Human Parechovirus)病毒檢測，收到 19 件檢體中，共檢出 5 株陽性。105 年 38 例腸病毒陰性結果之重症案例，亦檢測出 3 件陽性，此三個個案皆為小於 3 歲嬰幼兒，顯示 HPeV 感染可能造成嬰幼兒重症發生。

#### 13、 新興真菌與特殊寄生蟲監測：

- (1) 於 66 件不明原因肺炎個案檢體中，以培養方式檢出 21 件 *Candida spp.*。另以微珠陣列系統鑑定檢測酵母菌(*Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans*)及麴菌(*Aspergillus spp.*)，54 檢體中有 19 件檢體為 *Candida spp.*，其中有 11 件與培養鑑定結果一致。
- (2) 本年度截至 11 月 5 日止，弓形蟲抗原與抗體檢驗合計 509 件(受檢病患為 101 人)。弓形蟲抗原檢測部分，包含血液 100 件、非血液類檢體 9 件(包含腦脊髓液 3 件、羊水、眼液各 2 件、淚液、腦組織各 1 件)，以即時定量 PCR 方法檢測結果皆為陰性(陽性率 0%)。弓形蟲抗體檢測部分，抗體檢測合計 400 件(101 人)，8 名綜合研判結果為陽性：7 人為 IgG 親和力測試呈現低度表現，1 名抗體表現呈現重複感染趨勢，陽性率 7.9%。
- (3) 截至本年 11 月 10 日止，隱孢子蟲感染通報 10 件，檢出陽性 8 件，陽性率為 80 %。其中 *C. hominis* 5 件，占陽性檢體 62.5 %；*C. parvum* 有 3 件，占陽性檢體 37.5 %。其他通報包括梨形鞭毛蟲感染 1 件、環孢子蟲感染 1 件、棘阿米巴感染 1 件等，檢驗結果皆為陰性。上述送驗之檢體種類包含新鮮糞便 (92.4%)、眼角組織 (7.6%)。

#### 14、 HpgV 病毒監測：

HPgV 為 Flaviviridae(黃病毒屬)，以前命名為 GBV-C 或 hepatitis G virus，研究發現 HPgV 好發於 HIV 患者，並可能降低 HIV 病毒於血球中之複製。由於今年 A 型肝炎爆發同性間性行為傳染，因

此挑選 A 型肝炎與愛滋病病毒陽性檢體，進行檢測 HPgV。本年 1-9 月間共檢測 120 例，其中 40 例結果為陽性，陽性率為 33.3%，進一步分析結果顯示病毒基因型別分別屬第二型與第三型。

#### 15、恙蟲病立克次體監測：

恙蟲病是經由帶有病原體(*Orientia tsutsugamushi*)之恙蟎幼蟲叮咬而感染的急性熱病。本研究主要針對我國 105 年恙蟲病通報與確定病例資料進行分析，以瞭解臺灣恙蟲病的發生情形。分析 105 年 1 月 1 日至 11 月 11 日共檢驗 2,723 個案數，以免疫螢光染色 (golden standard) 及 PCR 檢驗，結果顯示恙蟲病確定病例共 383 例，其中男性計 232 例(61%)，女性計 151 例 (39%)，性別比為 1.536：1，男性感染恙蟲病的比例較女性為高 (圖九)。恙蟲病的年齡層分佈以 50-59 歲最多，病例數為 85 例 (22%)，其次為 60-69 歲、40-49 歲年齡層的病例數為 82 例 (21.5%) 與 55 例 (14%，圖十)。進一步分析感染恙蟲病縣市分布情形，從 2016 年 1 月 1 日至 11 月 11 日每月皆有恙蟲病病例發生，並以 5、6 份發生率最高為 20%，圖十一)。發生率最多縣市為澎湖縣共 58 例 (15.1%)，其次為花蓮縣共 52 例 (13.6%)，而金門縣確定病例數為 51 例 (13.3%，圖十二)。確定病例之臨床症狀，以發燒為最多，其次為頭痛，再者為皮膚焦痂。境外移入病例共 5 例主要感染國家以中國大陸(2 例) 為最多，其次為菲律賓 1 例、瑞士 1 例與泰國 1 例。

#### 16、病毒合約實驗室之陰性檢體、未知或無法分型之病毒株監測：

105 年 1 至 10 月病毒合約實驗室分離無法分型與定序之腸病毒共 81 件；其中檢出 echovirus 33 件，Human Rhinovirus 15 件，

Enterovirus D68 8 件，Coxsackievirus A 22 件，Coxsackievirus B 3 件。腸病毒 D68 之 8 株經序列分析與演化樹排列，與 103 年美國流行株相比屬於不同 cluster，與 103 年台灣流行株屬於同一 cluster。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術檢測平台之開發

### 1、已建置 multiplex RT- real time PCR 檢測系統：

(1) 2016 年肺炎重症檢驗流程新增 multiplex RT- real time PCR 檢驗項目至 28 種病原體，病毒包含 influenza A, B viruses, human adenovirus, RSV, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS), human metapneumovirus, parainfluenza type 1-4, HSV1, HSV2, VZV, CMV, EBV, HHV6, HHV7, bocavirus, parvovirus B19, enterovirus, rhinovirus, HPeV，另 2 種細菌(Mycoplasma pneumonia, Legionella pneumophila)檢驗項目。腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至 45 種病原體，包含 Influenza A, B viruses, Human adenovirus, RSV, Coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1), HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, Human metapneumovirus, parainfluenza type 1-3, parainfluenza type 4a, 4b, Bocavirus, Polyomavirus (JC, BK, WU, KI), Parvovirus, Enterovirus, Human Parechovirus, Rhinovirus, Japanese Encephalitis virus, Dengue virus, West Nile virus, Chikungunya virus, Toxoplasma gondii, Mycoplasma, Chlamydia pneumoniae, Borrelia, Hendra virus, Nipah virus, cyclovirus, Balamuthia, Acanthamoeba, Naegleria, Borrelia 等 45 種病毒檢測)。

(2) 開發泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法: 101 年 9 月，一種新型冠狀病

毒「中東呼吸症候群冠狀病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus ; MERS-CoV)」源自中東地區被確認，為人類冠狀病毒 HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63 以及 HCoV-HKU1 病毒被發現以來，第六種可感染人類的冠狀病毒。有鑑於新型冠狀病毒持續於各國造成人類的感染，加強國內新型冠狀病毒檢測有其必要。故開發可檢測泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法(pan-CoV RT-PCR)，分析各種冠狀病毒之 RNA polymerase 基因序列，並於保守區域設計 primers，測試可檢測各種冠狀病毒的情形，目前已測試可檢驗人類 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1 與鳥類 Infectious bronchitis virus、豬 Porcine epidemic diarrhea virus 與貓 Feline coronavirus。

(3) 建立新興真菌分子生物檢測法：已完成建立 *Coccidioides species* 及 *Histoplasma capsulatum* 免疫及分子檢驗方法，以及建立及改善酵母菌及麴菌微珠陣列鑑定檢測系統。*Coccidioides species* 免疫檢測採用免疫擴散的方法偵測專一性抗體，分子檢測的方法針對特異之 CSP gene。*Histoplasma capsulatum* 免疫檢測採用免疫擴散的方法偵測專一性抗體，分子檢測的方法針對特異之 M antigen gene。

(4) 建立特殊寄生蟲分子生物檢測法：

A. 建立人芽囊原蟲之 real-time PCR 與傳統 PCR 檢測系統：以人芽囊原蟲之次分類 1 至 10 型 (subtype 1-10)之 Small SubUnit ribosomal RNA (SSU rRNA)特異性序列為標的，進行即時定量聚合酶連鎖反應檢測。本檢測系統分析之檢體為新鮮糞便與疾

病相關部位之感染組織，並經過核酸純化。之後以 SYBR 系統之即時定量聚合酶連鎖反應增幅目標基因片段，繼而判定人芽囊原蟲之存在與否。設計完成的引子序列為(表三)：  
BL18SPPF1: 5'-AGT AGT CAT ACG CTC GTC TCA AA-3'、  
BL18SR2PP: 5'-TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC-3'。

B. 隱孢子蟲恆溫式圈環形核酸增幅法(LAMP)分生檢測:本計畫參考 Panagiotis Karanis 等人於 2007 年發表於 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY 之文獻，建立隱孢子蟲之 LAMP 檢測系統。此分子檢測技術以隱孢子蟲之 60-kDa glycoprotein (gp60) 基因 (Gene Bank accession no. AB237136) 為 PCR 增幅標的，與現行傳統巢式 PCR 檢測方式之偵測目標相同。檢驗方法係以新鮮糞便檢體經過核酸純化後，以 LAMP 核酸增幅反應放大目標基因片段，分析特異性序列產物之有無，繼而判定隱孢子蟲之存在與否。設計完成的引子序列為(表四)：  
CrypF3: 5'-TCG CAC CAG CAA ATA AGG C-3'、CrypB3: 5'-GCC GCA TTC TTC TTT TGG AG-3'、CrypFIP: 5'-ACC CTG GCT ACC AGA AGC TTC AGA ACT GGA GAC GCA GAA-3'、CrypBIP: 5'-GGC CAA ACT AGT GCT GCT TCC CGT TTC GGT AGT TGC GCC TT-3'。

(5) 建立新興病毒分子生物檢測法：參考近年來新興病毒 HPgV (Human Pegivirus)相關文獻，建立 RT-nest-PCR 檢驗方法。105 年 1-9 月於 120 例 A 型肝炎與愛滋病病毒陽性檢體中，檢出 40 例陽性個案，陽性率為 33.3%。

2、 新世代高通量定序：

與國衛院群健所生統生資組合作進行新世代高通量定序資料分析，採用 SURPI 作為分析的 pipeline，其 fast mode 可直接將基因序列比對病原資料庫，找出可能病原。而 comprehensive mode 可將序列 assemble，以期發現新病原。

本年度將 multiplex real-time PCR 檢驗後陰性之不明原因腦炎之檢體之血清及 CSF 檢體 (60 件)，以新世代高通量定序技術進行定序共 2 次，後續以 SURPI 分析。以 fast mode 分析後之結果，大都為 spike in 的病原，並無發現其他病原。由於臨床檢體量少，核酸萃取有限，因此 NGS 序列深度不夠，coverage rate 不足，無法進行 comprehensive mode 將序列 assemble。

### (三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

- 1、 105 年分析 EV71 結構蛋白區 VP1 部分基因序列 (267 bp)，其中 109 件陽性檢體在序列比對基因相似度高達 98% 以上。利用親緣系統樹分析劃分其基因亞型主要為 C4a，並在相同 cluster 中 (圖十三)。
- 2、 往年腸病毒 D68 型基因型別 A 與 B 交替出現，並可再細分為 A1 與 A2 亞型，以及 B1 與 B3 亞型，顯示腸病毒 D68 型在台灣已有區域演化的傾向。本年在病毒合約實驗室分離到的 8 株腸病毒 D68 型，與 8 月時由急性無力肢體麻痺病例所檢測到的病毒，其基因型別皆為 B3 (圖十四)，顯示輕重症與型別無關聯。

- 3、 105 年 1 至 10 月病毒合約實驗室分離無法分型與定序之腸病毒，共檢出 5 株陽性，演化分析皆屬第一型。腸病毒陰性結果之重症案例，檢測出 3 件陽性結果，分別為第一型 1 件，第三型 2 件（圖十五）。
- 4、 105 年截至 10 月 31 日經收集並完成定序呼吸道病毒 260 株及腸道病毒 401 株，共 661 株，正進行彙整序列及流行病學資料作業。
- 5、 完成整理並匯入 105 年序列資料及流病資訊 405 筆於病原微生物基因體資料庫，其中呼吸道病毒 245 筆、腸道病毒 160 筆。從 94 年累計至 105 年 10 月底，基因資料庫儲存之病原體資訊共包含流感病毒 16,420 筆（含近千筆 NA 基因序列）、腸病毒 11,910 筆、腺病毒 1,206 筆及登革熱 20 筆序列資料，累計共超過 29,650 筆序列，可作為基因演化或流行病學分析之重要參考依據，累計共超過 29,188 筆序列。
- 6、 臺灣近年恙蟲病流型菌株分析：  
分析恙蟲病基因體資料庫，結果顯示近年流行菌株為 TW1、TW10、TW19 及 TW22 等菌株。進一步與國際間 phototype Karp、Kato 及 Gillium 等病原株分析比對研究，顯示國內菌株大多屬於 Karp strain，且 TW22 strain 有增加的趨勢；TW10 則與泰國 TA763 相近



(圖十六)。

- 7、 隱孢子蟲種類繁多，能夠造成人類腸道疾病的類型至少可分為 *C. hominis*、*C. parvum*、*C. meleagridis*、*C. felis*、*C. canis*、*C. suis* 與 *C. muris* 共 7 種，其中 *C. parvum* 及 *C. hominis* 最常在人體中發現。本計畫以隱孢子蟲的 gp60 基因進行次分型，截至本年度 11 月 10 日止，已收集 8 件陽性檢體，以 Maximum Likelihood method 配合 Hasegawa-Kishino-Yano model 進行分析，並同時利用 *Plasmodium falciparum* 之 MSP1 基因為外部族群(圖紅色點)。結果顯示，本年度醫院通報的陽性病例 (圖綠色點)大致上可分為三大類；其中 4 個蟲株之基因分型比較接近 *C. hominis* Ib 型別，另 1 個的分類上則屬於 *C. hominis* Id 型別。值得注意的是，有 3 個陽性案例則是屬於 *C. parvum* II a 的型別 (圖十七)。

## 四、 討論

### (一) 傳染病及病原體抗藥性監測

- 1、 近年國內外發生重大新興傳染病有 H5N1、H7N9、中東與韓國 MERS-CoV、伊波拉病毒、台灣狂犬病毒與 H5N8, H5N2 禽流感。大陸爆發 H7N9 流感病毒感染，至今已經歷 4 波疫情，確認 798 例，並持續有散發病例出現。101 年發現中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)感染案例後，病例亦持續發生，尤其 104 年南韓因境外移入個案引發一大波院內感染，除了突顯其在防疫上的重大疏失，亦表示這些新興傳染病仍然威脅大眾的健康，本計畫監測肺炎與腦炎，涵蓋新型流感病毒 H7N9、H5N1 等、新型冠狀病毒 MERS-CoV 與狂犬病毒等所引起的症狀，當有個案出現時，期望能在最短時間內監測，爭取時效並俾利防疫的進行。
- 2、 本年不明原因死亡或重症通報中偵測出腸病毒 2 例(其中 1 例為 EV71)，HHV6 一例，顯示未知/新興傳染病監測能提供快速準確之檢驗平台，檢測的病原數從 102 年的 10 個增至 105 年的 45 個，擴增檢驗涵蓋面，增加檢出率，則可減緩疾病對社會的衝擊，也是未來疫情防治的趨勢。
- 3、 本計畫監測點分布全國各區，目前每年通報個案逐年增加，臨床醫師遇到無法解釋病因之個案，已會提高警覺，加強通報。這對可能未知可能爆發的傳染疾病的監測非常重要。這亦是本計畫重要的項目，提供不明與未知感染源檢驗平台。本計畫從臨床檢體收集、檢驗方法整合、病原體確認與分析、病原體資料庫建立維護 (圖十八)，此平台除了常見之病原體外，亦發現新興或罕見病

原體如 H6N1, H7N9, EV-D68 等，顯示其對未來可能爆發的傳染疾病的監測與檢驗非常重要。

- 4、 因應 102 年農委會於野生動物鼬獾檢出狂犬病病毒與民眾被狂犬病病毒陽性反應之鼬獾咬傷事件，實驗室已擴充分生檢測、血清學檢驗與病毒培養細胞等檢驗量能，而今年農委會更檢測到蝙蝠感染新型麗沙病毒，實驗室已確認分生檢測方法能涵括檢驗麗沙病毒，所幸由未明原因腦炎且住加護病房的個案結果皆為陰性，將持續對未明原因腦炎進行狂犬病檢驗。
- 5、 103 年發生伊波拉病毒感染的疫情，在西非造成嚴重的疫情外，尚有西班牙及美國的本土性個案皆因照顧病患時被感染。目前並無由台灣與西非國家直航的班機，所以伊波拉入侵台灣的風險極低。雖然如此，實驗室仍積極準備了針對伊波拉病毒的 RT-PCR 及 qRT-PCR 檢驗方法。這些檢驗方法有參考 Science paper (DOI:10.1126/science1259657)、日本 NIID 及歐洲 ECDC。目前送驗疑似病例中，經過實驗室診斷後均為陰性。
- 6、 愛滋病毒抗藥性分析方面，目前感染 HIV-1 陽性患者的治療方式多採用高效能抗反轉錄酶(Highly Active Antiretroviral Therapy, HAART)，為結合蛋白質酶抑制劑、反轉錄酶抑制劑(Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NRTI)，與非核苷酸反轉錄酶抑制劑(Non-nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NNRTI)，同時抑制愛滋病毒複製時所需要的兩個重要的酵素，然而一旦病患的服藥順從性不佳或同一種藥物服用時間太長，或是因為病毒複製過程中反轉錄(Reverse transcription)或轉錄作用所發生的自然突變

所造成自然變異等，都有可能造成對 HAART 輕度到重度的抗藥性。本計畫以亞培廠商所提供 ViroSeq™ HIV-1 Genotyping system kit (FDA、CE、衛福部 IVD) 進行 HIV-1 抗藥性監測，主要是看 *pol* 基因上是否有針對 PIs、NRTIs 或 NNRTIs 此三類的藥物具有抗藥性之突變位點產生，數據結果可提供權責組擬定防疫政策之參考，並持續進行 HIV-1 抗藥性監測。

- 7、 於入夏 4 月初即加強登革熱 NS1 抗原與血清學檢測，可快速及提早了解潛在登革熱病毒之散撥。現行防疫監測對有病癥者須即時就醫和法傳通報，早期監測對好發登革熱或潛在有擴散疑慮地區有補強防疫作為。本年度在高雄市、台南市、屏東縣政府已大量於各臨床診所醫院鋪設 NS1 快篩試劑，惟無症狀主動監測仍須持續加派人力協助訪視及抽血送驗等額外負擔，早期防治其成本及人力均較事後處理低，提高地方醫療院所配合主動監視採檢的意願。本計畫因執行於疫情前期，可有效作為監測警示作用，並達提早準備及預防疫情之效。
- 8、 在新興真菌方面，為快速多重偵測病原真菌，本研究發展由 ITS 序列與流式微珠陣列結合而成的偵測平台，可有效率的區分病原真菌菌種，有助於臨床更精準地投藥，避免藥物濫用減緩抗藥性菌株之崛起。
- 9、 弓形蟲感染症主要是透過食入未經煮熟的牛、羊、豬肉與食或入食入含有具感染力速殖體的動物組織及體液傳染，也可能會透過被貓排出的卵囊，污染食物或器械而間接傳染。健康人感染該疾病鮮有不適症狀，根據美國 CDC 網站顯示，在美國 12 歲以上約

有 22.5%曾經遭受弓形蟲感染，在世界部分地區甚至高達 95%曾經感染弓形蟲症，於台灣今年度 101 位受檢者中 53 名感染，比率約為 52.4%，扣除 1 位 12 歲以下近期感染，顯示 12 歲以上之感染比率 51.5%，惟此比率尚待大規模調查實證數據，再與美國感染情形相比。另本年度目前為止受檢者無弓形蟲抗原檢出，推測可能因素為感染初期多數人為無明顯或不易察覺症狀，且保護抗體產生後弓蟲可能已埋入組織內部，使血液抗原無法偵測。

- 10、 監測及建置新興病毒及立克次體傳染病原體基因資料庫，比較抗原高保守性基因序列分析，並做定序與演化親緣性分析，有助於新興人畜共通傳染流行病學研究、防疫整備與疫苗開發等重要的防疫資訊。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術檢測平台之開發

- 1、 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數十個病原體的 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。

- 2、本年度 multiplex real-time PCR 檢驗後陰性之檢體，以新世代高通量定序分析並無檢測出病原，顯示 multiplex real-time PCR 套組中之病原項目，已涵蓋目前已知的大多病原。
- 3、新型冠狀病毒感染人類不斷被發現，從 92 年 SARS-CoV 後，陸續出現 HCoV-NL63、HCoV-HKU1 與 101 年中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)，故可能仍有其他新型冠狀病毒尚未被確認。為了加強國內新型冠狀病毒檢測，開發可檢測泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法(pan-CoV RT-PCR)，並對通報肺炎重症個案進行檢測，應可提早發現新型冠狀病毒。

### (三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

- 1、病原體基因資料庫對外開放網站暨分析平台之維護與新增：
  - (1) 資料庫定期更新 WHO 建議流感病毒疫苗株序列資料 (2 月份公佈北半球建議疫苗株，9 月份公佈南半球建議疫苗株)，例如 2016-2017 年 H1N1 北半球疫苗株為 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus，2017 年南半球疫苗株已改為 A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like virus；H3 的建議疫苗株則皆為 A/Hong Kong/4801/201 (H3N2)-like virus；B 型流感建議疫苗株亦皆為 B/Brisbane/60/2008-like virus。歷年建議疫苗株亦已整理列表供大眾下載利用。此外，腸病毒 71 型則維持 A、B1-B5、C1-C5 及 C2-like 亞型可供比對。
  - (2) 105 年至 10 月底共完成整理並匯入 105 年序列資料及流病資訊 405 筆於病原微生物基因體資料庫，其中呼吸道病毒 245 筆、腸道病毒 160 筆。從 94 年累計至 105 年 10 月底，基因資料庫儲存

之病原體資訊共包含流感病毒 16,420 筆 (含近千筆 NA 基因序列)、腸病毒 11,910 筆、腺病毒 1,206 筆及登革熱 20 筆序列資料，累計共超過 29,650 筆序列，可作為基因演化或流行病學分析之重要參考依據 (圖十九)。資料庫並同步更新流感病毒建議疫苗株之序列資訊。在資料庫的使用狀況部份，截至 105 年 10 月為止，已有 548 位的註冊者，以及超過四千五百人次之登入次數與超過四萬三千人次的瀏覽次數。註冊者的身份約有 50% 屬於各學校人員、約 14% 屬於醫院相關人員，顯示本資料庫可以提供學術及臨床研究上的參考 (圖二十)。

- (3) 現有功能包含「序列資料比對」、「多重序列排比及親緣樹狀圖之繪製」、「序列引子設計」、「腸病毒 71 型病毒亞型比對」、「流感病毒疫苗株比對」以及「Proteotype 分析功能」。此外，使用者可在「流病資料或序列資料查詢」內查詢目前收錄的流行病學資料 (包括年齡、性別、城市及發病日等資訊)、以及序列的資訊報表 (包括序列編號、類型、Virus、Locus、發病日等欄位)。

## 2、 基因資料庫的防疫成效：

- (1) 與 WHO 建議之流感疫苗株資料庫進行 BLAST 比對或親緣樹狀圖分析，可用來判斷病毒株型別或病毒來源，還可初步比較流行株與疫苗株的抗原性差異，亦可輔以抗體檢測資料來評估疫苗保護力是否足夠，對於流行趨勢的預測、疫苗株的選擇或防疫政策的制定都有相當大的參考價值。而資料庫所含的 NA 基因序列亦可作為 Neuraminidase 抑制劑抗藥性相關研究的參考依據。
- (2) 基因資料庫已被應用在許多研究中，例如：經由序列資料比對證

實台灣 2006-2007 年間出現新引入的腸病毒 71 型 C5 以及 B5 基因亞型<sup>35</sup>；2008 年年初則是確認當年腸病毒重症主要由腸病毒 71 型之 B5 基因亞型引起，與中國大流行之 C4 基因亞型不同。更進一步分析 2009-2012 年間的資料，顯示 2009 年主要為延續 2008 年的 B5 亞型(B5b)，但是 2010-2011 年主要流行亞型則轉為與中國大陸病毒株相當類似的 C4 基因亞型，2012 年再度以 B5 亞型為主，但其序列已稍有變異(B5c)，C5 亞型則是於 2010 年之後就沒有再被監測到<sup>37</sup>。此外，在已發表的克沙奇病毒 B3 以及 HPeV 相關研究中亦有利用「Proteotype 分析功能」來分析歷年病毒株的位點與基因群變化<sup>43,44</sup>。而我們分析台灣於 2007-2014 年間的腸病毒 D68 型 VP1 序列，並和其他各國的基因型進行比對後，也發現台灣腸病毒 D68 型分屬於兩個 cluster，在流行病學表現上亦較輕症<sup>45</sup>。



## 五、結論與建議

- (一) 近年國內外所發生的H7N9、H5NX、MERS-CoV、台灣H6N1、狂犬病毒、伊波拉病毒、例行檢驗陰性群聚感染、不明原因之死亡個案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，去年韓國MERS-CoV與西非伊波拉疫情便是很好的例子，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。
- (二) 過去實驗資料顯示檢體中含少量的病原(約10-100 copy病原)即可以multiplex real-time PCR檢驗套組檢測。但若要能以高通量定序完成assemble則需大量的病原。顯示未來面對完全未知的病原，在沒有任何reference sequences參考下，需要足夠的量才能進行de novo assemble，因此，加強病毒的培養能力，也將是未來解開新興病原基因體重要的一環。
- (三) 運用SURPI的過程，大都採用NCBI的data base，由於含許多unclassified sequences，在選擇sequence hit時需通過較嚴格的篩選，往往損失很多有效的sequence而造成coverage rate不足。由於國衛院團隊自行建構完整病毒序列的data base，因此可調降sequence hit時篩選的參數，保留較多的sequences與assemble步驟，在assemble時仍可去除不合格的sequences，增加assemble的完成率。這些步驟都需有經驗

的生物資訊專家建置data base，調整參數。因此，建議未來本署徵募相關人才，在未來面對新興病原疫情時，即時因應，找出病原。

- (四) 目前建立的未知與新興傳染病團隊，持續穩定地執行計畫，通報個案亦逐年增加，檢驗平台亦持續精進。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。
- (五) 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，如H7N9境外移入個案、台灣H6N1個案或腸病毒71與68型等，皆是加強通報後發現的個案，故提高警覺，鼓勵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。
- (六) 基因資料庫目前所含資料以流感病毒、腸病毒及腺病毒為主，這些都是本國常見的病原體，而本資料庫是基因序列資料與流行病學資訊的整合分享，已被應用在病毒流行趨勢監測、病原體演化特徵和抗藥性相關研究中，對於需大量資料分析的公共衛生研究及防疫應用層面皆有著重要參考價值，更期望能夠藉此資料庫促進資訊交流以及生技產業發展。未來針對包括新興病毒、立克次體、新興真菌與特殊寄生蟲等序列，亦將考量納入基因資料庫的可行性，持續擴大資料庫的應用性。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 形成未知與新興傳染病團隊，完成建立監測不明原因疾病，包含肺炎、腦炎、噬血症候群、不明原因快速死亡之收案條件、監測據點、通報流程、檢體收集流程與檢體檢驗流程。亦針對立克次體、新興真菌與特殊寄生蟲、登革熱、新興病毒與愛滋病毒抗藥性等加強監測。
- (二) 肺炎重症檢驗流程的multiplex real-time PCR檢測套組已新增檢驗項目至25種病毒、2種細菌，腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至45種病原體，由歷年NGS結果顯示這些檢驗項目已包含大多數感染之病原體，相信檢測套組的檢驗流程對於防疫能有效作為，而NGS量能之儲備，則對未來檢測套組無法涵蓋之新興重組或變異病原之偵測，提供進一步分析之利器。
- (三) 新型流感病毒如H5NX、H7N9等病毒持續演化改變中，對人類的威脅增加，因此新型流感病毒監測仍需持續加強。
- (四) 感染人類的新型冠狀病毒不斷被發現，甚至造成恐慌，應加強國內新型冠狀病毒檢測。
- (五) 相關學術論文發表
  1. Cheng WY, Wang HC, Wu HS, and Liu MT: Measles surveillance in Taiwan, 2012-2014: Changing epidemiology, immune response and circulating genotypes. *J Med Virol* 2015.
  2. Huang YP, Lin TL, Lin TH, and Wu HS: Molecular and epidemiological study of enterovirus D68 in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2015.
  3. Lin TL, Lin TH, Chiu SC, Huang YP, Ho CM, Lee CC, Wu HS, and Lin

- JH: Molecular epidemiological analysis of Saffold cardiovirus genotype 3 from upper respiratory infection patients in Taiwan. *J Clin Virol* 2015; 70:7-13.
4. Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, Jones J, De La Cruz JA, Sleeman K, Tamura D, Nguyen HT, Wu HS, Chang FY, Liu MT, Fry AM, Cox NJ, Villanueva JM, Davis CT, and Gubareva LV: Characterization of drug-resistant influenza A(H7N9) variants isolated from an oseltamivir-treated patient in Taiwan. *J Infect Dis* 2015; 211:249-257.
  5. Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinje J, Huang JC, and Wu HS: Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012-December 2013. *J Med Virol* 2015; 87:1462-1470.
  6. Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Wu HS, and Liu MT: Characterization of Influenza A (H7N9) Viruses Isolated from Human Cases Imported into Taiwan. *PLoS One* 2015; 10:e0119792.
  7. 黃元品、林翠莉、吳和生 臺灣克沙奇A6型腸病毒之流行疫情分析  
疫情報導 2015 第 31 卷 第 21 期 第527-531頁
  8. Huang AS, Chen WC, Huang WT, Huang ST, Lo YC, Wei SH, Kuo HW, Chan PC, Hung MN, Liu YL, Mu JJ, Yang JY, Liu DP, Chou JH, Chuang JH, Chang FY.: Public Health Responses to Reemergence of Animal Rabies, Taiwan, July 16-December 28, 2013. Clinical and epidemiological characteristics in children with community-acquired

- mycoplasma pneumonia in Taiwan: A nationwide surveillance. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0132160,
9. Hsieh YC, Chi H, Chang KY, Lai SH, Mu JJ, Wong KS, Liu CC, Huang YC, Lin HC, Chang LY, Huang YC, Huang LM :Increase in fitness of *Streptococcus pneumoniae* is associated with the severity of necrotizing pneumonia.; Taiwan Pediatric Infectious Diseases Alliance. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 May;34(5):499-505.
  10. Ma YJ, Wang SM, Cho YH, Shen CF, Liu CC, Chi H, Huang YC, Huang LM, Huang YC, Lin HC, Ho YH, Mu JJ; Taiwan Pediatric Infectious Disease Alliance. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014 Oct 10. pii: S1684-1182(14)00171-6.

## 衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫

### 105 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：新興/再浮現傳染病監測技術開發與應用

主持人：李淑英

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-122110

#### 1.計畫之新發現或新發明

- (1) 本計畫從臨床檢體收集、檢驗方法整合、病原體確認與分析、病原體資料庫建立維護，已形成一個完整的研究團隊。此外，病原體監測點分布全國各區，且每年通報個案逐年增加，顯示臨床醫師遇到無法解釋病因之個案，已會提高警覺，加強通報，有利本署早期偵測未來可能爆發的未知傳染疾病。
- (2) 肺炎重症、腦炎或未知感染原的 multiplex real-time PCR 檢測套組已分別新增至 28 及 45 種病原體，由歷年 NGS 結果顯示這些檢驗項目已包含大多數感染之病原體，顯示檢測套組對防疫能有效作為；NGS 量能的儲備，亦對未來少數無法涵蓋至套組之新興病原體，擴增檢測能力。
- (3) 病原微生物基因體資料庫從 94 年累計至 105 年 11 月底，共包含流感病毒、腸病毒、腺病毒及登革病毒等序列資料，累計超過 29,650 筆，可作為各病原基因演化或流行病學分析之重要參考。此外，目前已有 548 位註冊者，以及超過 4,500 次之登入次數與超過 43,000 人次的瀏覽。註冊者的身份為各級學校或醫院相關人員，顯示本資料庫可作為學術及臨床研究上的重要資源。

#### 2.計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫開發之多重 PCR 檢驗平台及監測，能協助釐清不明原因感染、死亡個案等可能原因，而且所能監測的病原體涵蓋 H7N9、H6N1 流感病毒、MERS-CoV、伊波拉病毒與狂犬病病毒等，能於短時間內針對傳染病疑似

個案檢體進行檢驗，釐清民眾的疑慮，避免恐慌；若需啟動進一步防疫作為，亦可爭取時效，提高工作效能與民眾滿意度。

### 3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

- (1) 新型冠狀病毒感染人類不斷被發現，從 2003 年 SARS-CoV 後，陸續出現 HCoV-NL63、HCoV-HKU1 與 2012 年中東呼吸症候群冠狀病毒，故可能仍有其他新型冠狀病毒尚未被確認。為了加強國內新型冠狀病毒檢測，開發可檢測泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法(pan-CoV RT-PCR)，並對通報肺炎重症個案進行檢測，應可提早發現新型冠狀病毒。
- (2) 需持續強化傳染病監測網，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，再次精進監測效能；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、防疫策略推行等專業人員，以利早期偵測、早期因應新興傳染病。
- (3) 基因資料庫目前所含資料以流感病毒、腸病毒及腺病毒為主，未來可將其他新興病原納入，使基因序列資料與流行病學資訊更有效整合，除可直接應用於防業務外，亦可作為傳染病公衛研究的重要參採，並期藉以促進病原體資訊交流以及生技產業發展。

## 七、 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;451:990-3.
2. 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;8:145-53.
3. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;48:845-9.
4. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis* 2010;10:835-44.
5. Mailles A, Vaillant V, Stahl JP. [Infectious encephalitis in France from 2000 to 2002: the hospital database is a valuable but limited source of information for epidemiological studies]. *Med Mal Infect* 2007;37:95-102.
6. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2006;43:1565-77.
7. Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;36:3149-54.
8. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564-9.
9. Morris DJ, Cooper RJ, Barr T, Bailey AS. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *J Infect* 1996;32:113-7.
10. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 2008;121:e631-7.
11. Lin JH, Chiu SC, Lee CH, Su YJ, Tsai HC, Peng YT, et al. Genetic and antigenic analysis of epidemic influenza viruses isolated during 2006-2007 season in Taiwan. *J Med Virol* 2008;80:316-22.
12. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007;13:73-81.
13. Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, Mark J, Maselli JH, Yagi S, et al.



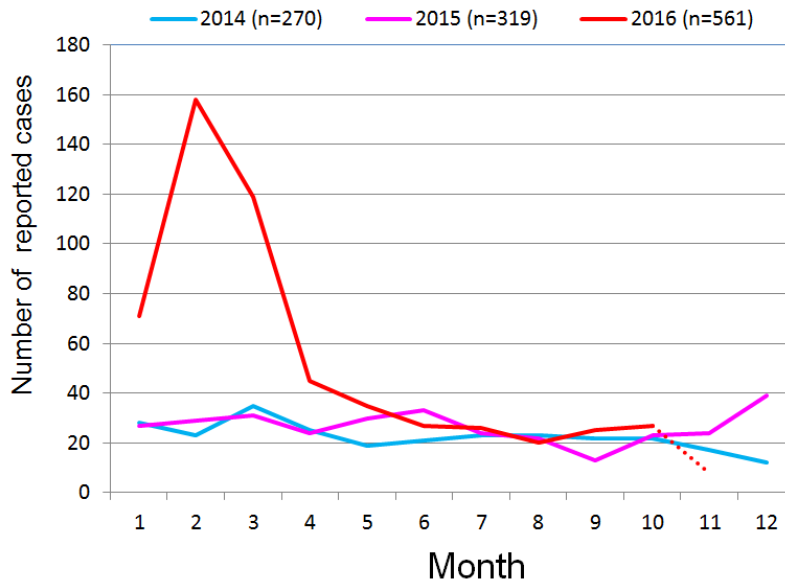
- Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clin Infect Dis* 2005;41:822-8.
14. Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008;42:233-43.
  15. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol* 2006;78:1232-40.
  16. Kahn JS. Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:478-83.
  17. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-24.
  18. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
  19. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;3:e64.
  20. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S25-32.
  21. Lin JH, Chiu SC, Lin YC, Chen HL, Lin KH, Shan KH, et al. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan. *J Clin Virol* 2009;44:219-24.
  22. Chieochansin T, Simmonds P, Poovorawan Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Arch Virol* 2010;155:2023-8.
  23. Legay V, Chomel JJ, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 2002;25:193-5.
  24. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses--biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000;10:57-69.
  25. Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 2007;81:1013-21.
  26. Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 2007;13:889-95.

27. Huang YP, Yao CY, Chen YJ, Chuang PC, Hsu LC, Wu HS. Taiwan pathogenic microorganism genome database and its applications. *Taiwan Epidemiol Bull* 2010;26:364-74.
28. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;79:2814-22.
29. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003657.
30. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:1170-4.
31. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003;148:1369-85.
32. Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* 2003;9:461-8.
33. Jian JW, Chen GW, Lai CT, Hsu LC, Chen PJ, Kuo SH, et al. Genetic and epidemiological analysis of influenza virus epidemics in Taiwan during 2003 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46:1426-34.
34. 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 Res* 2008;131:243-9.
35. 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 Res* 2008;137:206-12.
36. 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. *Virol J* 2010;7:277.
37. Huang YP, Lin TL, Lin TH, Wu HS. Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLoS One* 2013;8:e80942.
38. Tsou TP, Tan BF, Chang HY, Chen WC, Huang YP, Lai CY, et al. Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1825-32.
39. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, et al. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46:2519-24.

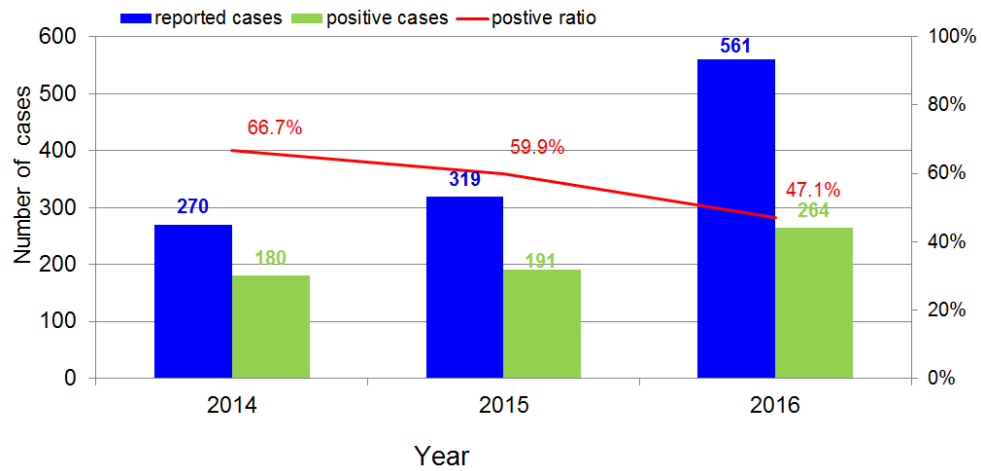
40. Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 2008;41:69-74.
41. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, Rousset D, et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2008;47:1410-7.
42. Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014;345:1369-72.
43. Huang YP, Lin TL, Chen YJ, Hsu CC, Lin TH, Wu HS. Phylogenetic analysis and development of an immunofluorescence assay for untypeable strains of coxsackievirus B3. *J Microbiol Immunol Infect* 2013.
44. Huang YP, Hsieh JY, Wu HS, Yang JY. Molecular and epidemiological study of human parechovirus infections in Taiwan, 2007-2012. *J Microbiol Immunol Infect* 2014.
45. Huang YP, Lin TL, Lin TH, Wu HS. Molecular and epidemiological study of enterovirus D68 in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2015.

## 八、圖、表

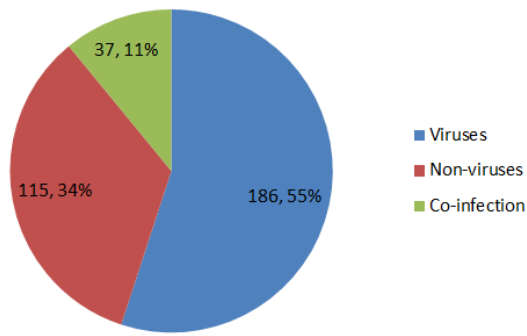
(A)



(B)

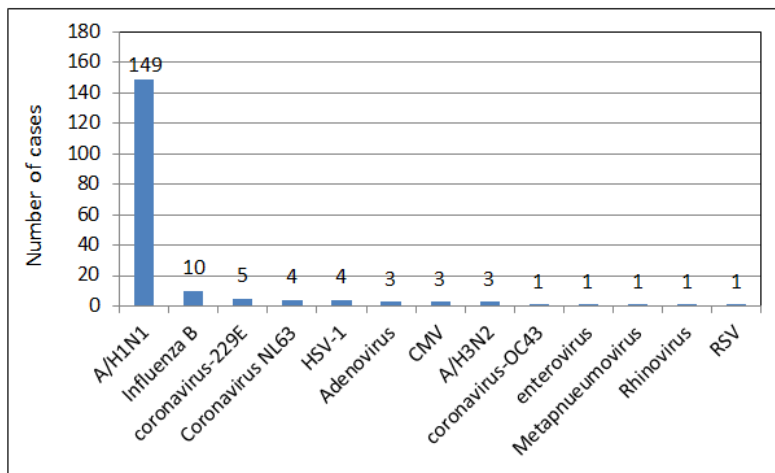


圖一、2014-2016年肺炎重症 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。

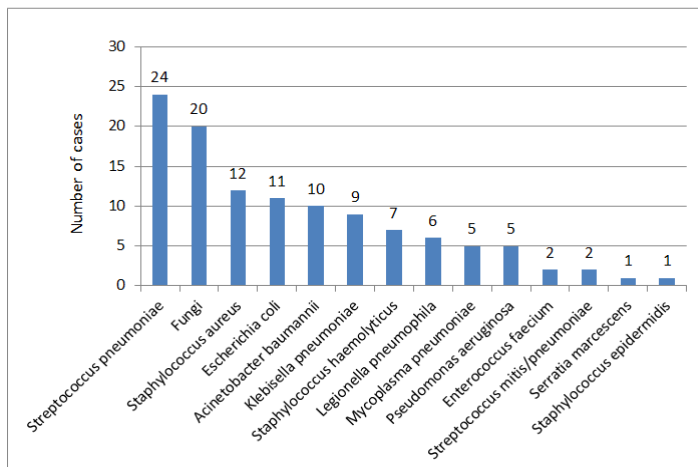


圖二、2016年肺炎重症檢出各類病原體之比例

(A)

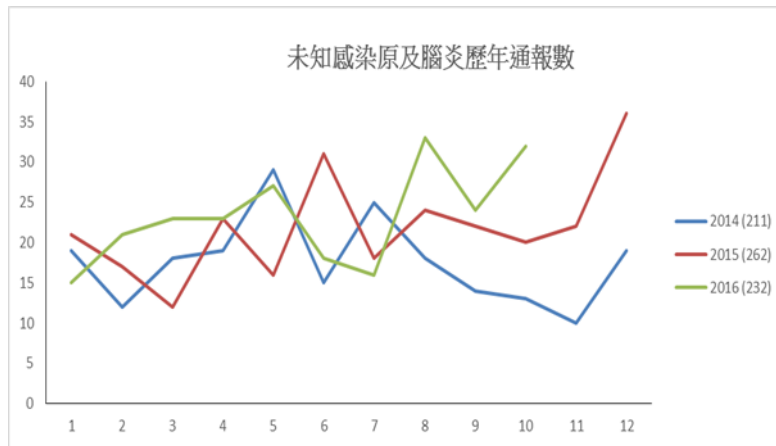


(B)

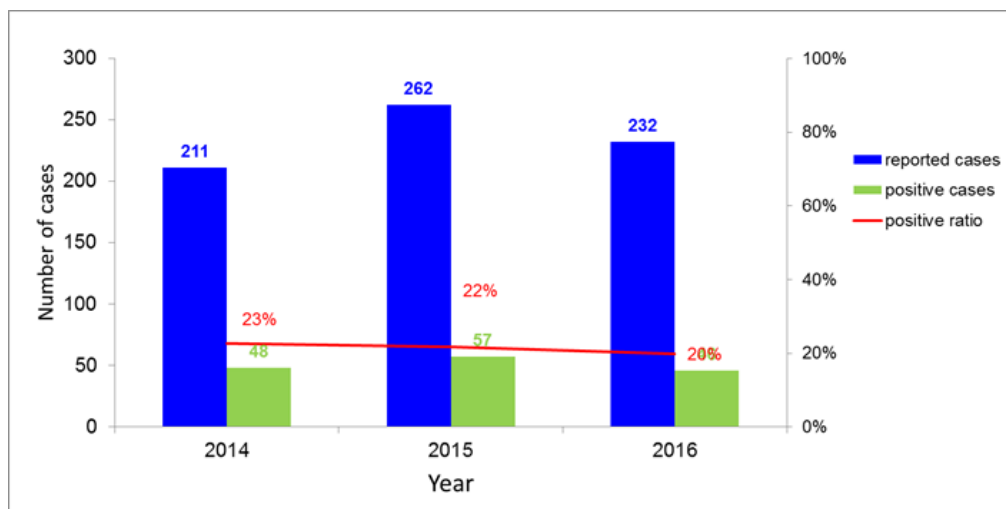


圖三、2016年肺炎重症各類病原體之個案數:(A)病毒、(B)細菌。

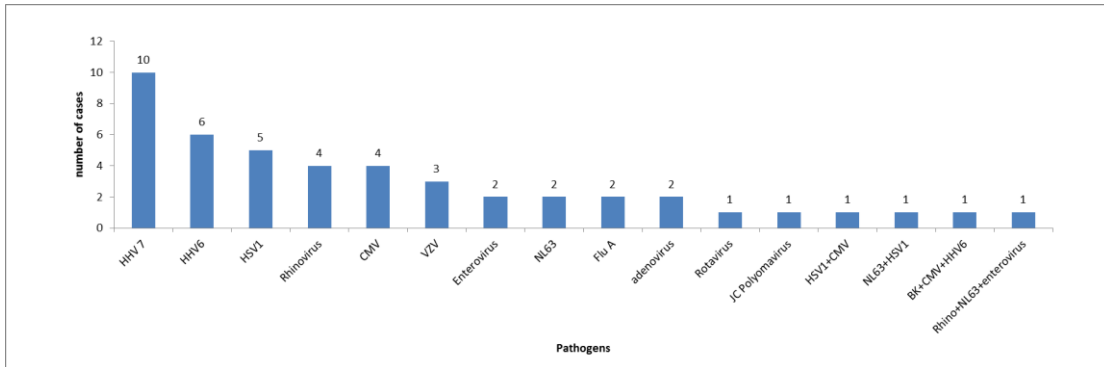
(A)



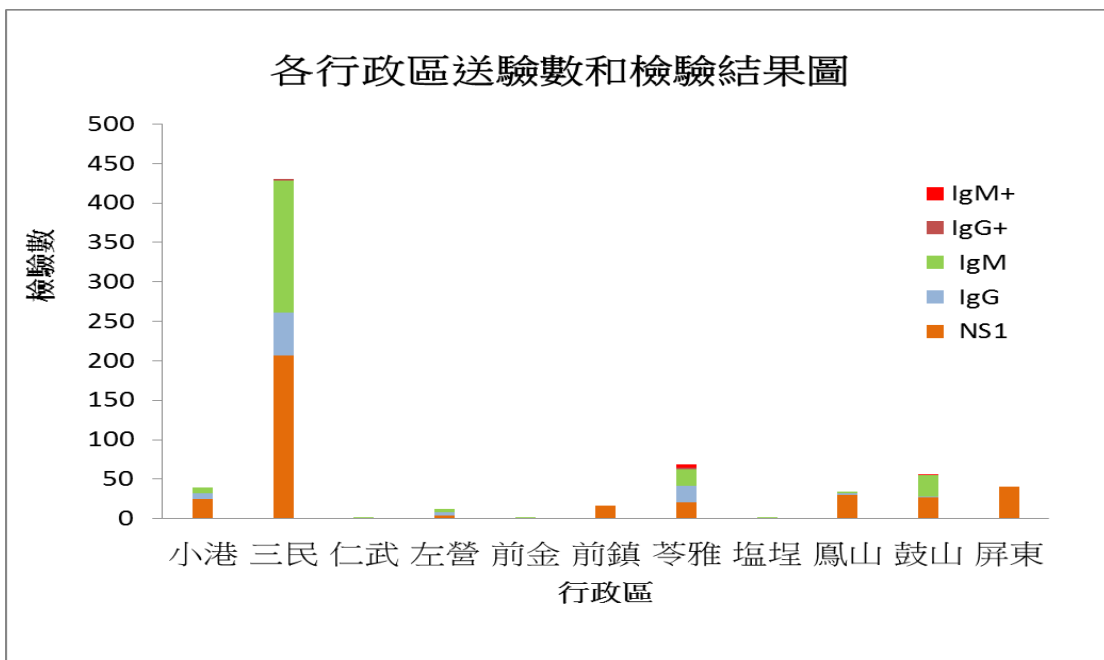
(B)



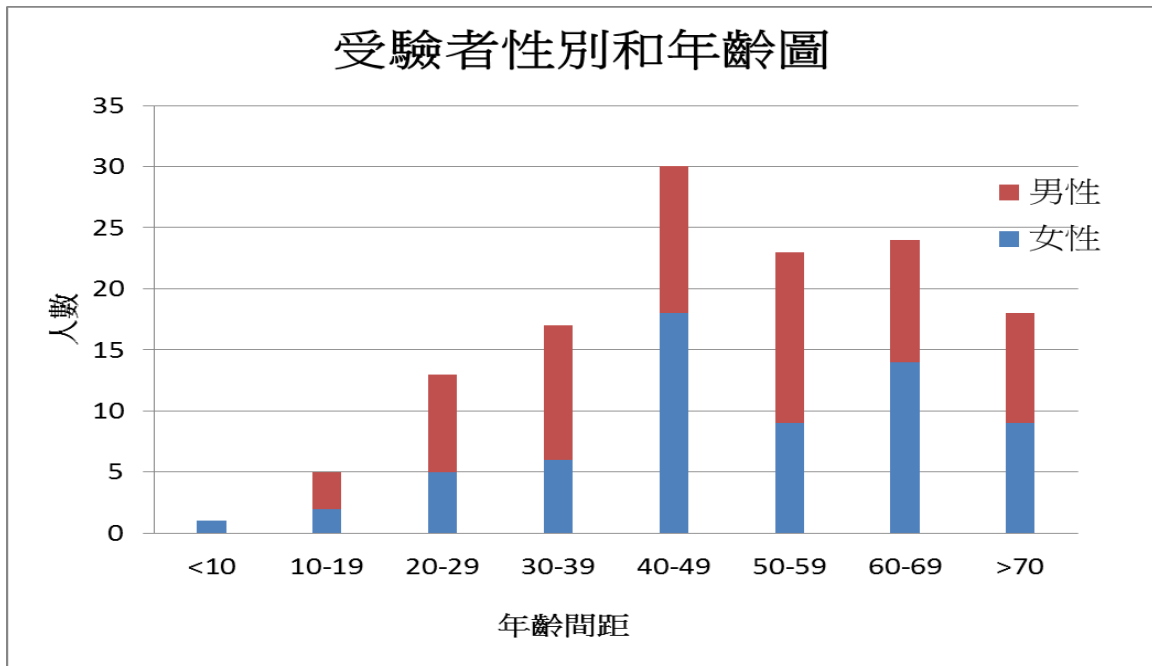
圖四、2013-2016 年通報腦炎及不明感染 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。



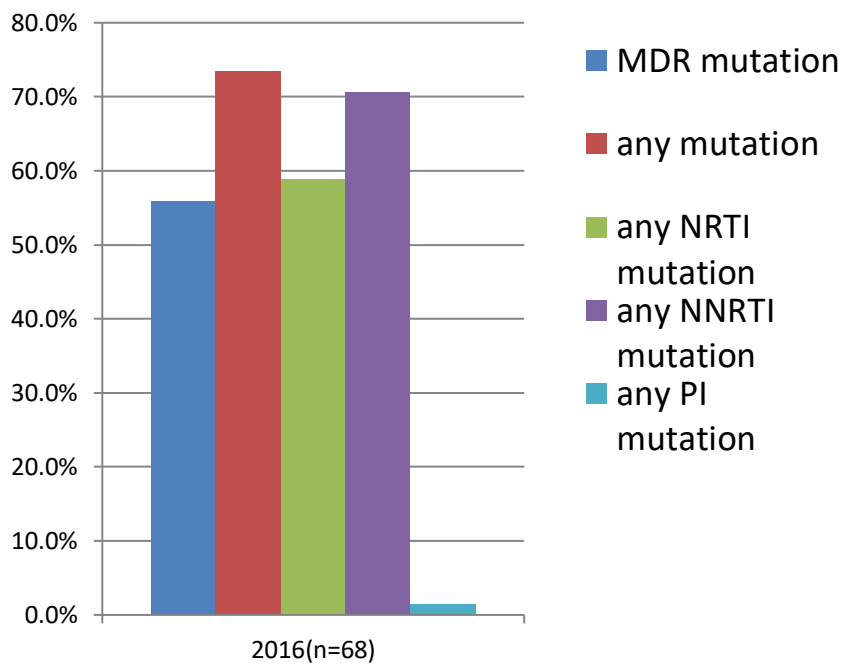
圖五、2016 年通報腦炎及不明原因各類病原體之個案數。



圖六、105 年南台灣登革熱主動監測檢驗結果

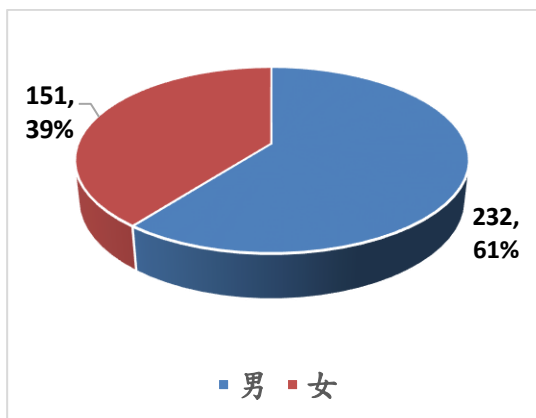


圖七、登革熱主動監測者性別與年齡分布圖

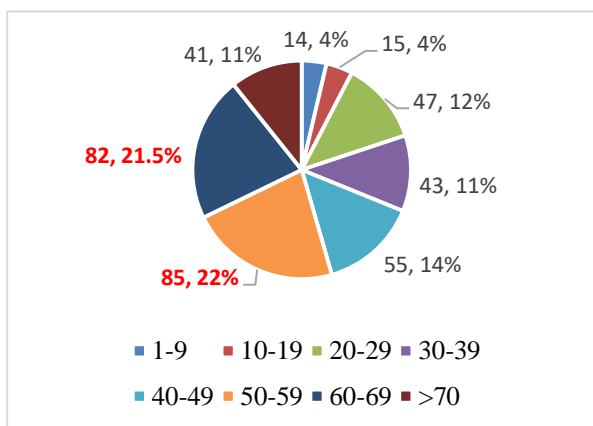


圖八、105 年 HIV-1 感染者治療失敗(Treatment failure)抗藥性分布

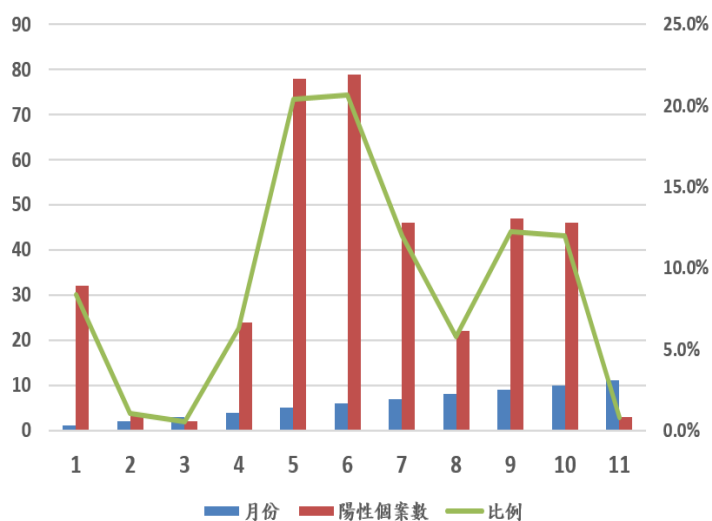




圖九、105年恙蟲病陽性個案性別比

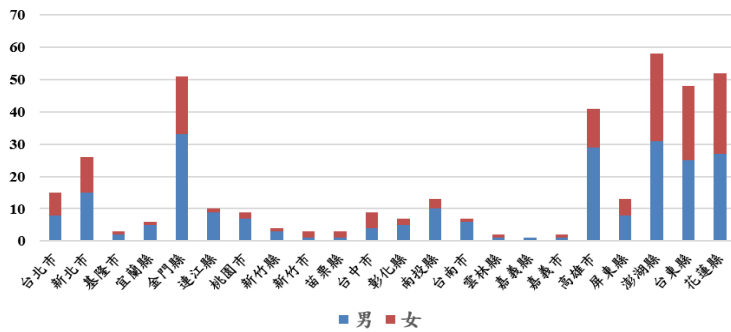


圖十、105年恙蟲病陽性個案數年齡分布



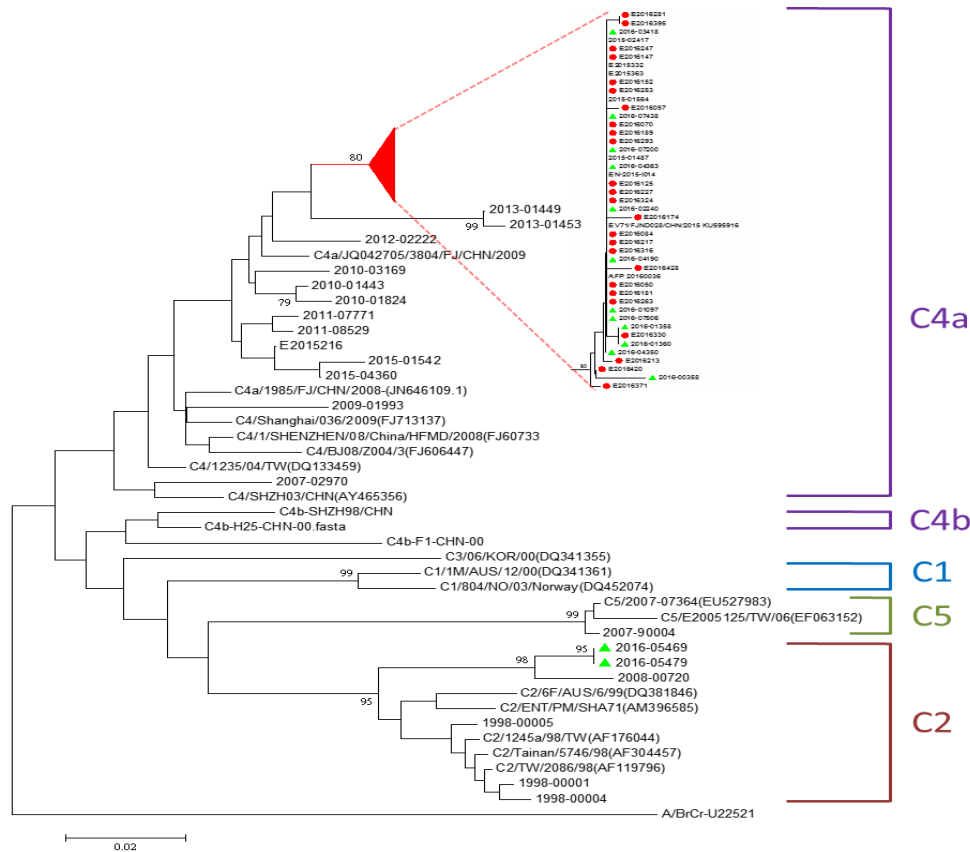
月份	陽性個案數	比例
1	32	8.4%
2	4	1.0%
3	2	0.5%
4	24	6.3%
5	78	20.4%
6	79	20.6%
7	46	12.0%
8	22	5.7%
9	47	12.3%
10	46	12.0%
11	3	0.8%
合計	383	100.0%

圖十一、105年恙蟲病陽性個案數月份發生率

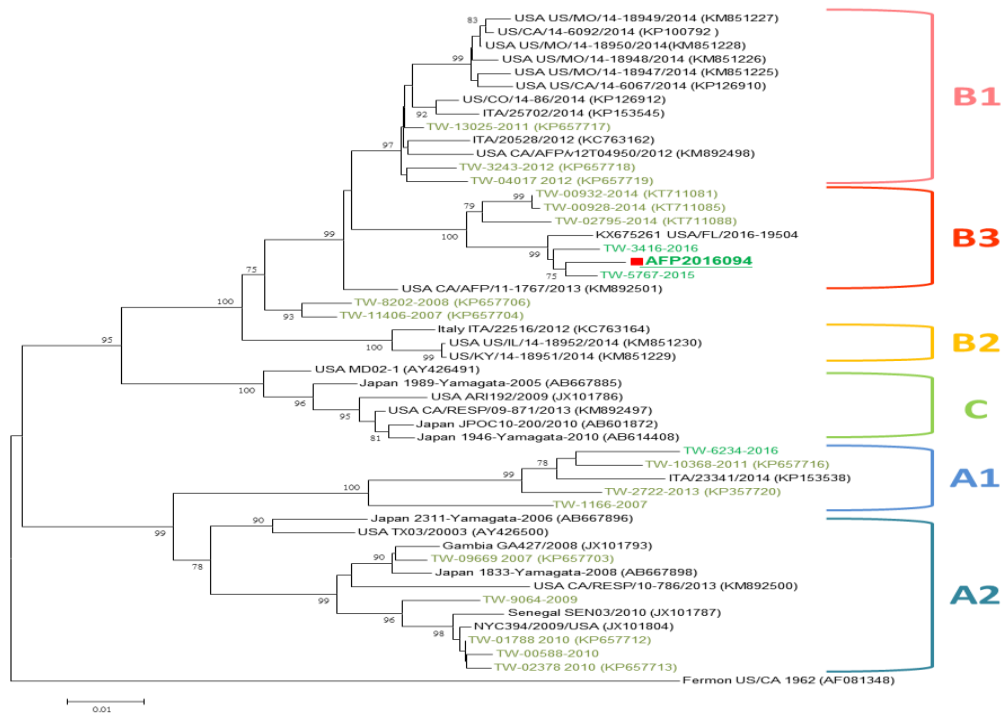


縣市	男	女	總計	比例
台北市	8	7	15	3.9%
新北市	15	11	26	6.8%
基隆市	2	1	3	0.8%
宜蘭縣	5	1	6	1.6%
<b>金門縣</b>	<b>33</b>	<b>18</b>	<b>51</b>	<b>13.3%</b>
連江縣	9	1	10	2.6%
桃園市	7	2	9	2.3%
新竹縣	3	1	4	1.0%
新竹市	1	2	3	0.8%
苗栗縣	1	2	3	0.8%
台中市	4	5	9	2.3%
彰化縣	5	2	7	1.8%
南投縣	10	3	13	3.4%
台南市	6	1	7	1.8%
雲林縣	1	1	2	0.5%
嘉義縣	1	0	1	0.3%
嘉義市	1	1	2	0.5%
高雄市	29	12	41	10.7%
屏東縣	8	5	13	3.4%
<b>澎湖縣</b>	<b>31</b>	<b>27</b>	<b>58</b>	<b>15.1%</b>
台東縣	25	23	48	12.5%
<b>花蓮縣</b>	<b>27</b>	<b>25</b>	<b>52</b>	<b>13.6%</b>
合計	232	151	383	100.0%

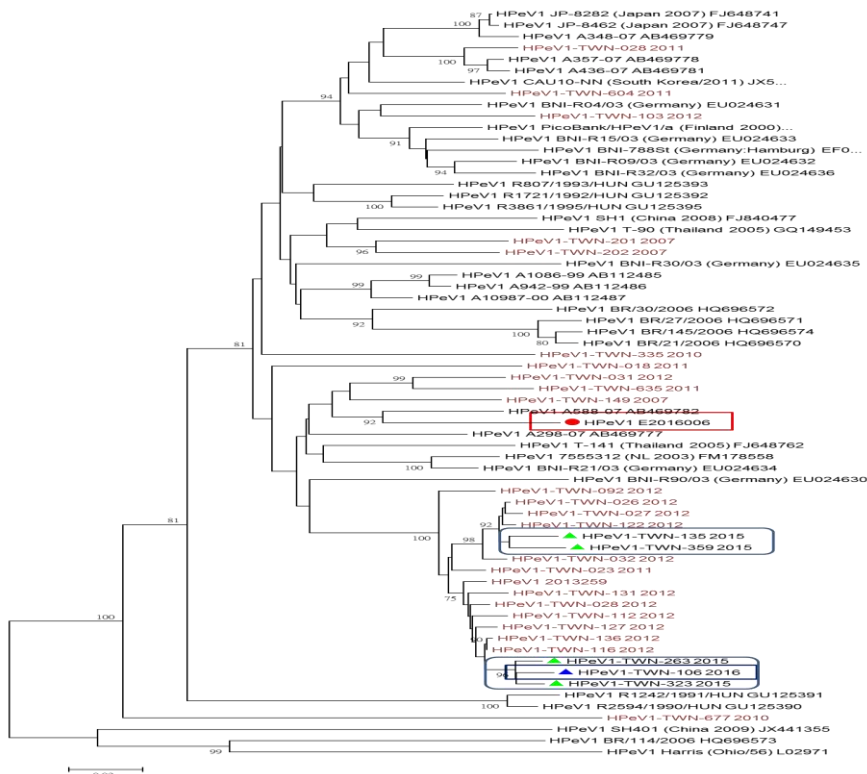
圖十二、105年恙蟲病陽性個案縣市居住分布圖



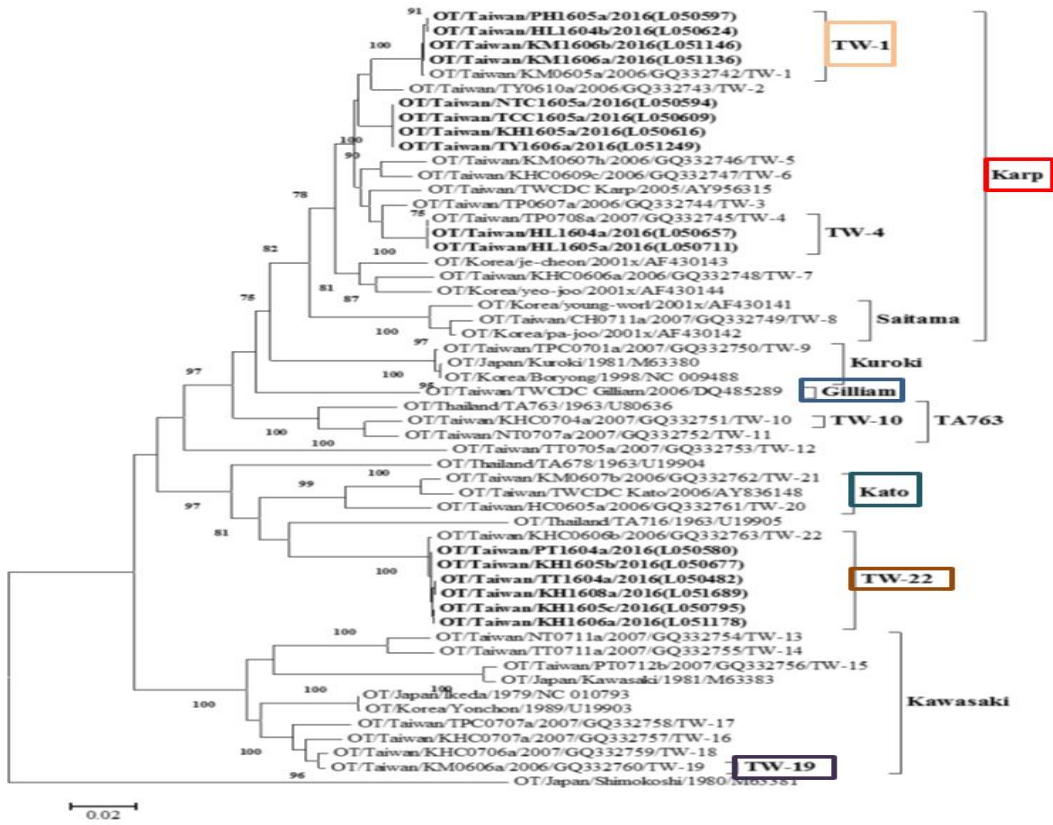
圖十三、腸病毒 71 型部分 VP1 基因演化分析



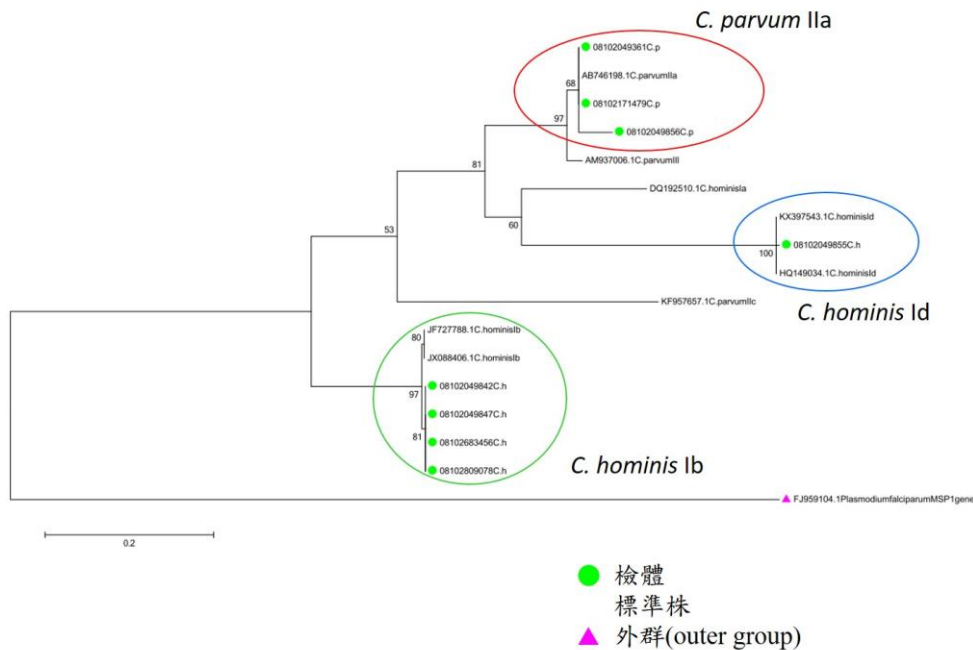
圖十四、腸病毒 D68 型 VP1 基因演化分析



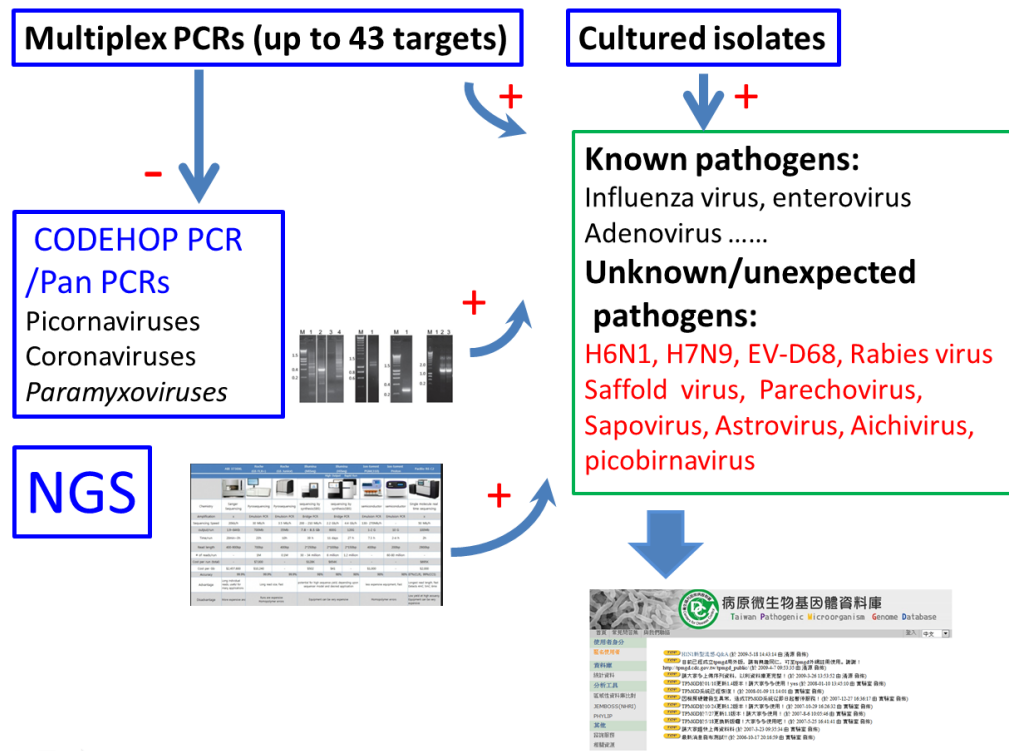
圖十五、Human Parechovirus 第一型基因演化分析，今年分析之無法分型腸病毒檢體 (藍框)與腸病毒重症檢測到之序列 (紅框)。



圖十六、恙蟲病立克次體基因演化分析結果



圖十七、隱孢子蟲演化分析



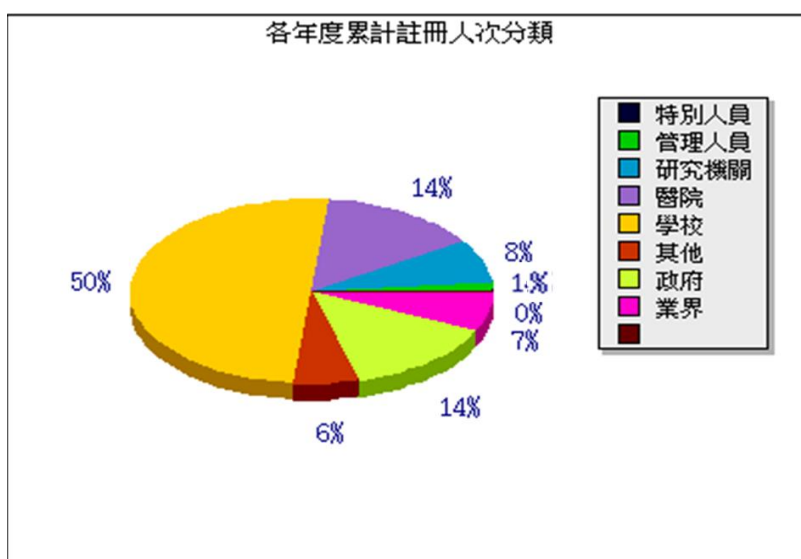
圖十八、檢驗方法整合、病原體確認與分析、病原體資料庫建立維護

資料類型	資料細目	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	總筆數
序列資料	INF	5	1234	1777	1124	4983	2526	2268	768	732	336	422	245	16420
	EV	0	31	1822	2793	1864	2843	774	723	400	324	176	160	11910
	ADENO	0	30	346	103	335	392	0	0	0	0	0	0	1206
	DEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20
	HIV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	50
	SINF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	44	0	44
全部	所有	5	1295	3945	4020	7182	5761	3042	1491	1132	660	712	405	29650

註:更新到2016-10月底序列資料

圖十九、基因資料庫序列收錄種類及數量

累計註冊人次分類/年份	各年度累計								
	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	2015年	2016年	總數
特別人員	1	0	0	0	0	0	0	0	1
管理人員	4	1	0	1	0	1	0	0	7
研究機關	21	7	6	2	5	2	0	0	43
醫院	33	16	11	7	5	3	2	2	79
學校	105	57	36	21	25	18	2	13	277
其他	13	2	7	3	2	1	1	2	31
政府	31	10	5	6	6	3	2	14	77
業界	9	5	4	0	3	8	1	7	37
合計	217	98	69	40	46	36	8	38	552



圖二十、基因資料庫之註冊人數與分類

表一、2016 年愛滋治療失敗抗藥性統計

	Resistance		Possible Resistance		Total Resistance	
Acquired data Total: 99						
Virus not detected: 31 (31.3%)						
<b>result cases: 68</b>	n	%	n	%	n	%
MDR mutation	38	55.9%	0	0.0%	38	55.9%
any mutation	49	72.1%	1	1.5%	50	73.5%
any <b>NRTI</b> mutation	39	57.4%	1	1.5%	40	58.8%
any <b>NNRTI</b> mutation	47	69.1%	1	1.5%	48	70.6%
any <b>PI</b> mutation	1	1.5%	0	0.0%	1	1.5%

表二、2016 年愛滋治療失敗抗藥性位點統計

藥物類別					
NRTI (位點/出現次數)		NNRTI (位點/出現次數)		PI (位點/出現次數)	
<b>M184V</b>	29	<b>K103N</b>	21	<b>L10I</b>	11
<b>K65R</b>	9	<b>Y181C</b>	21	<b>A71V</b>	7
<b>K219E</b>	8	<b>G190A</b>	11	<b>A71T</b>	6
<b>M184I</b>	6	<b>V179D</b>	9	<b>L10V</b>	3
<b>D67N</b>	4	<b>K103R</b>	8	<b>Q58E</b>	2

表三、人芽囊原蟲之 Real-time PCR 檢測引子

Category	Primer pairs (forward+reverse)
BL18SPPF1	5'-AGT AGT CAT ACG CTC GTC TCA AA-3'
BL18SR2PP	5'-TCT TCG TTA CCC GTT ACT GC-3'

表四、隱孢子蟲之 LAMP PCR 檢測引子

<b>Category</b>	<b>Primer pairs (forward+reverse)</b>
CrypF3	5'-TCGCACCAGCAAATAAGGC-3'
CrypB3	5'-GCCGCATTCTTCTTTTGGAG-3'
CrypFIP	5'-ACCCTGGCTACCAGAAGCTTCAGAACTGGAGACGCAGAA-3'
CrypBIP	5'-GGCCAAACTAGTGCTGCTTCCCGTTTCGGTAGTTGCGCCTT-3'



附錄：

附件一

## 不明原因肺炎

通報醫院：

### 1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人：

Patient's Name: _____	Patient's ID No.: _____
Date of birth: ____ / ____ / ____	<b>Gender:</b> <input type="checkbox"/> Male <input type="checkbox"/> Female
Height: _____ cm	<b>Weight:</b> _____ Kg
<b>Occupation:</b>	

日期記錄統一以 (yyyy/ mm/ dd)

### 2 HOSPITALIZATION

* Date of illness onset: ____ / ____ / ____
* Enrolled criteria: <input type="checkbox"/> Fever (BT $\geq$ 38°C), <input type="checkbox"/> Community onset pneumonia ( $\leq$ 48 hrs after admission) <input type="checkbox"/> Severe illness: ARDS or Respiratory failure with MV support <input type="checkbox"/> No definite diagnosis when case reported
* Date of admission : ____ / ____ / ____
* Travel history within 3 months: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____
* Animal contact history(including pets): <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____
* Inset bite history : <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____
* Cluster: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes: <input type="checkbox"/> family, <input type="checkbox"/> school, <input type="checkbox"/> workplace <input type="checkbox"/> others

\* Admitted to ICU:  No  Yes, (date) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_至\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

\* Date of discharge: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

\* Final diagnosis: (可簡要 summary)

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.

**Past History**

<input type="checkbox"/>	Chronic lung diseases: <input type="checkbox"/> COPD <input type="checkbox"/> Asthma <input type="checkbox"/> Ventilation dependent <input type="checkbox"/> Others: _____
<input type="checkbox"/>	Acquired immune deficiency: <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Solid tumor <input type="checkbox"/> Hematologic Malignancy <input type="checkbox"/> HIV/AIDS <input type="checkbox"/> Chronic kidney disease <input type="checkbox"/> Liver cirrhosis <input type="checkbox"/> Use Of Any Immunosuppressive Agent Within 30 Days Before Infection
<input type="checkbox"/>	Congenital immune deficiency
<input type="checkbox"/>	Poor daily function: <input type="checkbox"/> Dementia <input type="checkbox"/> Bed-ridden <input type="checkbox"/> tube feeding
<input type="checkbox"/>	Neurological disorders: <input type="checkbox"/> Epilepsy <input type="checkbox"/> Cerebral palsy <input type="checkbox"/> Developmental delay <input type="checkbox"/> Others: _____
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> HTN, <input type="checkbox"/> CAD, <input type="checkbox"/> CVA, <input type="checkbox"/> HBV carrier, <input type="checkbox"/> HCV carrier
<input type="checkbox"/>	Other specific history: _____

**4 LABORATORY DATA (請注意單位)**

Admission	± 24hrs	48-72 hrs
Date		

<b>Hematology</b>		
Hemoglobin g/dL		
WBC count / $\mu$ L		
Band %		
Neutrophil %		
Lymphocyte%		
Eosinophil%		
Monocyte%		
Platelet *10 <sup>3</sup> / $\mu$ L		
<b>Blood Chemistry</b>		
BUN mg/dL		
Creatinine mg/dL		
Total protein g/dL		
Albumin g/dL		
Total bilirubin mg/dL		
AST (SGOT) IU/L		
ALT(SGPT) IU/L		
CK IU/L		
LDH U /L		
CRP mg/dL		
Procalcitonin ng/mL		
<b>ABG</b>		
FiO <sub>2</sub>		
Arterial pH		
O <sub>2</sub>		
CO <sub>2</sub>		
serum bicarbonate		
<b>Pleural fluid</b>		
WBC(L/N)		
RBC		
Total protein g/dL		
Glucose mg/dL		
LDH U /L		

**Culture Results:**  $\leq$  admission 72 hrs (except BAL, tissue, TB study or

significant findings)

檢體種類	Date	Result
Sputum		Gram stain: PMN: _____/LPF ; Epi: _____/LPF <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> GPB <input type="checkbox"/> GNC <input type="checkbox"/> GNB <input type="checkbox"/> yeast-like <input type="checkbox"/> No bacteria seen
		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Normal flora <input type="checkbox"/> Positive: _____
		AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Pleural fluid		Gram stain: PMN: _____/LPF <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> GPB <input type="checkbox"/> GNC <input type="checkbox"/> GNB <input type="checkbox"/> yeast-like <input type="checkbox"/> No bacteria seen
		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____
		AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
BAL		Gram stain: PMN: _____/LPF ; Epi: _____/LPF <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> GPB <input type="checkbox"/> GNC <input type="checkbox"/> GNB <input type="checkbox"/> yeast-like <input type="checkbox"/> No bacteria seen
		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Normal flora <input type="checkbox"/> Positive: _____
		AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Urine		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Blood		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Tissue (Site)		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Throat swab		Virus isolation: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____
Others (Site)		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM

Rapid antigen test (請圈選 nasal/throat swab?)

	Specimen	Date	Result
Influenza	Nasal/Throat swab		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B
Legionella	Urine		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Pneumococcus	Urine		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
RSV	Sputum		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Chlamydia	Sputum		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Cryptococcus antigen			<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Aspergillus antigen			<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
			<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive

### Serology result

	Date	Result
Mycoplasma		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Chlamydia		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-1		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-2		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
CMV		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
EBV		VCA IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive VCA IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive NA IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive

### PCR result

	Date	Site	Result
--	------	------	--------

Influenza			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> A, type: _____	<input type="checkbox"/> B
CMV			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> Positive	
HSV			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> Positive	
Enterovirus			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> Positive	
TB			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> Positive	
			<input type="checkbox"/> Negative	<input type="checkbox"/> Positive	

Other pathogen detection results:

---



---



---

**5. IMAGE STUDY RESULTS:** (within 7days after illness onset)(依放射科報告為準)

	Date	Result		
CXR		<input type="checkbox"/> Unilateral	<input type="checkbox"/> Consolidation	<input type="checkbox"/> Non-consolidation
		<input type="checkbox"/> Bilateral	<input type="checkbox"/> Patches <input type="checkbox"/> <i>Air-bronchogram</i> <input type="checkbox"/> Lobar	<input type="checkbox"/> Infiltration <input type="checkbox"/> Interstitial pneumonia <input type="checkbox"/> Ground glass <input type="checkbox"/> Reticular-nodular
		<input type="checkbox"/> Effusion/empyema <input type="checkbox"/> Abscess		
		<input type="checkbox"/> No active lung lesion <input type="checkbox"/> Others: _____		
Lung CT		<input type="checkbox"/> Unilateral	<input type="checkbox"/> Consolidation	<input type="checkbox"/> Non-consolidation
		<input type="checkbox"/> Bilateral	<input type="checkbox"/> Patches <input type="checkbox"/> <i>Air-bronchogram</i> <input type="checkbox"/> Lobar	<input type="checkbox"/> Infiltration <input type="checkbox"/> Interstitial pneumonia <input type="checkbox"/> Ground glass <input type="checkbox"/> Reticular-nodular
		<input type="checkbox"/> Effusion/empyema <input type="checkbox"/> Abscess		
		<input type="checkbox"/> No active lung lesion <input type="checkbox"/> Others: _____		
Others (specify)				

--	--	--

**6. SEVERITY OF ILLNESS:**

**Intensive medical support for this episode**

	Date of start	Date of end
<input type="checkbox"/> Hemodialysis(including CVVH)		
<input type="checkbox"/> Mechanical Ventilator		拔管日
<input type="checkbox"/> ECMO		
<input type="checkbox"/> Others		

**7. CLINICAL OUTCOME: (at discharge)**

Clinical Response	Criteria
<input type="checkbox"/> Cure	All or most of pretreatment signs and symptoms of the index infection had resolved, and no further therapy was required.
<input type="checkbox"/> Improved	The major signs and symptoms of infection had improved but medical treatment was still required. Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____
<input type="checkbox"/> Transfer out	The patient was transferred out to _____ hospital on (____ / ____ / ____)(date), and the outcome was unknown.
<input type="checkbox"/> Mortality Date:_____	For patients who expired due to any causes The primary cause of death is related to this infectious episode reported: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes

## 8. COMMENTS:

---



---



---



---

## 9. Case Classification(初判)

不符收案定義

符合收案定義

有其他明確診斷非感染症

感染症

非肺炎

肺炎重症： 確定病因， 極可能病因， 可能病因， 檢驗均陰性

	確定病因	極可能病因	可能病因
檢體來源部位	1. 感染部位，包括痰、氣管洗出液、肺部組織檢體、肋膜液、呼吸道拭子 2. 血液	不拘	不拘
檢驗方法	1. 病原分離陽性 2. PCR 陽性 3. 恢復期血清較急性期血清抗體效價 $\geq 4$ 倍上升	除病原分離或 PCR 外之其他方法檢驗陽性(如抗原快速檢測)，或血清一採檢驗陽性	不拘
檢驗陽性病原體之特性	已知可造成嚴重人類肺炎，且臨床表現與該個案表現相符	已知可造成嚴重人類肺炎，且臨床表現與該個案表現相符	非已知可造成嚴重人類肺炎，或臨床表現與該個案不相符
例子	1. 個案痰檢體流感 PCR/培養陽性 2. 個案血液檢體肺	1. 個案咽喉拭子流感快速檢測陽性 2. 個案單一血清黴漿	1. 個案咽喉拭子 HSV 培養陽性 2. 個案痰檢體



	炎鏈球菌培養陽性 3. 個案恢復期 MAT 有 >4 倍上升	菌抗體陽性	rhinovirus PCR 陽性
--	--------------------------------------	-------	-------------------

不明原因腦炎

1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人：

Patient's Name: _____	Patient's ID No.: _____
Date of birth: ____ / ____ / ____	Gender: <input type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female
Height: ____ cm	Weight: ____ Kg
Occupation:	

日期記錄統一以 (yyyy/ mm/ dd)

2 HOSPITALIZATION

\* Date of illness onset: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\* Enrolled criteria:

(a) 住院 。

(b) 且有腦病變\*  或步態不穩  的症狀。

(c) 並且符合以下任一項表現：

發燒超過 38°C ，抽搐(seizures) ，局部神經症狀(focal neurologic findings) ，  
腦脊髓液任何一項檢驗為異常 ，腦波(EEG)檢查異常 ，腦部影像異常(CT or MRI) 。

\*所謂腦病變症狀係指意識狀態改變(altered level of consciousness)超過 24 小時，  
如焦躁不安(irritability)，人格或行為改變。\*

\* Date of admission : \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\* Travel history within 3 months:  No  Unknown  Yes, specify \_\_\_\_\_

\* Animal contact history(including pets):  No  Unknown  Yes, specify \_\_\_\_\_

\* Inset bite history :  No  Unknown  Yes, specify \_\_\_\_\_

\* Cluster:  No  Unknown  Yes:  family,  school,  workplace  others

\_\_\_\_\_

\* Admitted to ICU:  No  Yes, (date) \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_至\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

\* Date of discharge: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

\* Final diagnosis: (可簡要 summary)

1.

2.

3.

4.

5.

### 3 CLINICAL PRESENTATION

\* 發燒 ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ )  無, 有

\* 躁動不安  無, 有

\* 上呼吸道症狀  無, 有

\* 幻覺  無, 有

\* 腸胃道症狀  無, 有

\* 步態失調  無, 有

\* 皮疹  無, 有

\* 局部神經功能障礙  無, 有

\* 頭痛  無, 有

\* 肌肉無力  無, 有

\* 倦怠  無, 有

\* 抽搐  無, 有

\* 意識混亂  無, 有

© intractable?  無, 有

\* 失語症或緘默  無, 有

© induced coma?  無, 有

- \* 其他特殊表現 無，有，請敘述：\_\_\_\_\_
- \* 氣管插管 無，有 首次插管日為\_\_月/\_\_日
- \* 使用 steroid 無，有
- \* 使用 IVIG 無，有
- \* 使用抗病毒藥 無，有 種類為\_\_\_\_\_。
- \* 昏迷指數：GCS= E\_\_V\_\_M\_\_ (選擇 induced coma (如果有執行) 之前的最糟狀況)

#### 4. Past History

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> DM, <input type="checkbox"/> Solid tumor, <input type="checkbox"/> Hematologic Malignancy; <input type="checkbox"/> HIV/AIDS, <input type="checkbox"/> Chronic kidney disease, <input type="checkbox"/> Liver cirrhosis, <input type="checkbox"/> Use Of Any Immunosuppressive Agent Within 30 Days Before Infection
<input type="checkbox"/>	Congenital immune deficiency
<input type="checkbox"/>	Neurological disorders: <input type="checkbox"/> Epilepsy <input type="checkbox"/> Cerebral palsy <input type="checkbox"/> Developmental delay <input type="checkbox"/> Others: _____
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> HTN, <input type="checkbox"/> CAD, <input type="checkbox"/> CVA, <input type="checkbox"/> HBV carrier, <input type="checkbox"/> HCV carrier
<input type="checkbox"/>	Others, specify: _____

#### 5. 影像學檢查結果

\* Brain CT 日期\_\_月/\_\_日。 結果：正常 ，異常 ，未作 。

若是異常，部位在：

temporal lobe ，white matter demyelination ，hydrcephalus ，brain edema ，

any others: \_\_\_\_\_。

\* Brain MRI 日期\_\_月/\_\_日。 結果：正常 ，異常 ，未作 。

若是異常，部位在：

temporal lobe ，white matter demyelination ，hydrcephalus ，brain edema ，

any others: \_\_\_\_\_。

\* EEG 日期\_\_月/\_\_日。 結果：正常 ，異常 ，未作 。

若是異常，結果為：

Diffuse slowing ，temporal epileptiform activity ，PLEDS ，

any others : \_\_\_\_\_。

## 6. 一般檢驗結果

\* CBC (最早採檢日\_\_月/\_\_日)

WBC=\_\_\_\_\_，DC= \_\_/\_\_/\_\_/\_\_(Neu/lymph/mono/eos)，Hb=\_\_\_\_\_，PLT=\_\_\_\_\_。

\* CSF (最早採檢日\_\_月/\_\_日)

RBC=\_\_\_\_\_，WBC=\_\_\_\_\_，DC= \_\_/\_\_/\_\_/\_\_(Neu/lymph/mono/eos)，

Protein=\_\_\_\_\_，Glucose=\_\_\_\_\_ (Blood glucose=\_\_\_\_\_)

VDRL=\_\_\_\_\_，Cryptococcal Ag=\_\_\_\_\_，AFS=\_\_\_\_\_，India ink=\_\_\_\_\_，Gram stain=\_\_\_\_\_。

## 7. Serology

	Date	Result
Mycoplasma		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-1		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-2		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
CMV		IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
EBV		VCA IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive VCA IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive EBNA IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive

Others		Type : <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
--------	--	--

### 8. CSF testing

	Date	Result
CMV		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-1 PCR		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
HSV-2 PCR		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Enterovirus isolation		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Mycobacterium / C		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Bacterial / C		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
Fungal / C		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive
JE IgM		<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive

### 9. Other testing

Test	Date	Site	Result
Influenza PCR			<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive : type:
Cryptococcal Ag			<input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive :

### 10. CLINICAL OUTCOME: (at discharge)

Outcome	Criteria
<input type="checkbox"/> Cure	All or most of pretreatment signs and symptoms of the index infection had resolved, and no further therapy was required.

<input type="checkbox"/> Improved	The major signs and symptoms of infection had improved but medical treatment was still required. Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify:
<input type="checkbox"/> Transfer out	The patient was transferred out to _____ hospital on (     /     /     ) (date), and the outcome was unknown.
<input type="checkbox"/> Mortality  Date: _____	For patients who expired due to any causes  The primary cause of death is related to this infectious episode reported: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes

**11. COMMENTS:**

---



---



---