

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-112101

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：呼吸道細菌病原體監測研究

年度/全程研究報告

執行機構：檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：江春雪

研究人員：王昱嵐、胡晉賓

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

\*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
目錄	(2)
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
本文	
一、前言	(5)
二、材料與方法	(9)
三、結果	(12)
四、討論	(14)
五、結論與建議	(17)
六、重要研究成果及具體建議	(18)
七、參考文獻	(19)
八、圖、表	(21)
附錄	(26)

## 中文摘要

關鍵詞：呼吸道細菌性病原體、肺炎重症、新興/再浮現傳染病

全球氣候變遷、環境過度開發及交通頻繁簡便，各種傳染病病原體變異及傳播速度比以往更快，各類傳染病的威脅也更大，如何正確而即時地偵測病原體、釐清其傳播路徑及感染源，並擬定適當防治策略，有效控制疾病進行，是目前各國公共衛生相關部門或研究領域熱切關注的議題。近年來出現的新興/再浮現病原體，許多都是以嚴重肺炎為臨床症狀的呼吸道病原體，更凸顯肺炎病原體的適時偵測在疾病防治及社會安定上有舉足輕重的角色。本計畫將針對 107-108 年醫院通報不明原因肺炎重症之檢體，每年預估收集 300-400 個個案，利用細菌培養、multiplex real-time PCR 及尿液抗原檢測，進行細菌性病原體的監測，並提供業務權責組及送驗醫療單位防治參考。107 年研究結果顯示，自 1 月至 10 月中旬醫院通報不明原因肺炎重症之個案檢體，248 件痰液檢體中有 34 件有呼吸道病原性細菌生長(13.7%)，104 件尿液檢體中有 5 件為退伍軍人菌血清型第一型抗原陽性(4.8%)，並建立針對常見 7 種呼吸道細菌性病原體的 multiplex real-time PCR 檢測方法，當混合兩種病原體一起進行檢測時，兩者的訊號都有被完整的放大出來。

## 英文摘要

keywords : Respiratory bacterial pathogens, severe pneumonia, (re)emerging diseases

Due to climate change, overdeveloped environment and easy travel globally, infectious agents mutate and spread faster than ever. How to correctly identify pathogens, clarify transmission routes and reveal agent sources, as well as to implement proper treatment and prevention strategy, has become an important issue for public health and research internationally. In recent years, most (re)emerging pathogens resulting in severe pneumonia, indicating that timely detection of pathogens causing pneumonia plays an essential role in disease prevention and society stability. The aim of this project is to detect respiratory bacterial pathogens from severe pneumonia cases. The methods of bacterial culture, multiplex real time PCR and urine antigen detection will be applied. The results will be provided to the responsible division at CDC and the reporting hospitals for references. The result of the current study is that from January to mid October in 2018, 34 out of 248 sputum specimens (13.7%) from severe pneumonia cases grew pathogenic bacteria, while 5 out of 104 urine specimens (4.8%) was positive for *Legionella* antigen. A multiplex real-time PCR method was set up for the most prevalent seven pathogenic bacteria in respiratory tract.

## 本文

### 一、前言

全球氣候變遷、環境過度開發及交通頻繁簡便，各種傳染病病原體變異及傳播速度比以往更快，各類傳染病的威脅也更大，如何正確而即時地偵測病原體、釐清其傳播路徑及感染源，並擬定適當防治策略，有效控制疾病進行，是目前各國公共衛生相關部門或研究領域熱切關注的議題。近年來出現的新興/再浮現病原體，許多都是以嚴重肺炎為臨床症狀的呼吸道病原體，如 SARS、avian influenza H5N1、MERS-CoV、2009 pandemic H1N1、H7N9 等，更凸顯肺炎病原體的適時偵測在疾病防治及社會安定上有舉足輕重的角色。

肺炎是常見的下呼吸道感染，也是國人重要的死亡原因，105 年排行國人十大死亡原因的第三位，每十萬人口死亡率為 51.9 人。英國肺臟基金會(British Lung Foundation)公布 2001-2010 年肺炎在各國每百萬人口年齡標準化死亡率(age-standardised mortality rate)的資料，英國為 214 人、美國為 101 人，鄰近我們的亞洲各國，菲律賓 1,069 人、香港 372 人、日本 271 人、馬來西亞 239 人及泰國 201 人 (<https://statistics.blf.org.uk/pneumonia>)，顯示肺炎在各國都是一個重要的死亡原因。尤其對於兒童，特別是小於 5 歲的幼童，肺炎更是最主要的死亡

原因(1)。

依感染相關的流行病學因子，肺炎分為社區肺炎(community-acquired pneumonia, CAP)、院內肺炎(hospital-acquired pneumonia, HAP)、健康照護相關肺炎(health-care associated pneumonia, HCAP)和呼吸器相關肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)等，其中社區肺炎是臨床上最常見的一種，發生在沒有住院或住院未滿48小時之病人的肺實質的急性感染，其餘的肺炎則是與住院、住安養院、住長期照護機構或者使用呼吸器相關的感染。依流行病學不同分類的肺炎，其致病病原體、必須的治療與感染後的結果可能都有所差異。

國外關於社區肺炎的研究很多，近幾年有Torres等人回顧歐洲在2005-2012年間25個關於15歲以上成人社區肺炎的觀察研究(observational studies)所發表的文獻(2)，最常見的病原體為*Streptococcus pneumoniae* (12.0-85.0%病人鑑定出此菌)，其他常見的病原體包括*Haemophilus influenzae*、*Chlamydia pneumoniae*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Legionella pneumophila*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Klebsiella pneumoniae*、*Moraxella catarrhalis*、*Escherichia coli*和respiratory viruses等。EPIC (Etiology of Pneumonia In the Community) Study，由美國CDC、三家美國兒童醫院和五家美國成人醫院組成的研究團隊，評估2010年1月

初到2012年6月底社區肺炎病人住院所造成的負擔，納入研究的38%病人有鑑定出病原體，其中23%病人只有病毒性病原體，11%病人只有細菌性病原體，3%病人同時有病毒性和細菌性病原體，主要的細菌性病原體包括*S. pneumoniae*、*M. pneumoniae*、*S. aureus*、*L. pneumophila*、*Enterobacteriaceae*、*H. influenzae*和*C. pneumoniae*，主要的病毒性病原體包括human rhinovirus、influenza A or B virus、human metapneumovirus、parainfluenza virus、respiratory syncytial virus、coronavirus和adenovirus(3)。

國內關於社區肺炎的研究報告不少，有些局限於特定病原體，有些則探討所有的病原體(4-9)，例如Lauderdale et al自2001年12月到2002年4月止，從13家醫院收集需要住院的168位成人社區肺炎病例，其中有99位可以確認致病的病原體，依序為*S. pneumoniae* (40)、*M. pneumoniae* (24)、*C. pneumoniae* (12)、Influenza A virus (11)、*K. pneumoniae* (8)、*H. influenzae* (8)。整體而言，國內常見社區肺炎的病原體與其他國家的文獻報告相近，主要為*S. pneumoniae*、*M. pneumoniae*、*C. pneumoniae*、*H. influenzae*、*K. pneumoniae*、*S. aureus*、*E. coli*、*P. aeruginosac*和viruses。另外，不論國內外，研究肺炎病原體的報告都顯示，約有30~40%的肺炎無法確認其致病的病原體。

自2010年開始，本中心呼吸道病毒實驗室與腸道及新感染症細菌實驗室以科技計畫的方式，建立未知感染原監測網絡，針對肺炎重症、不明原因腦炎、不明原因快速死亡、不明原因群聚及噬血症候群等個案，由合作醫院主動通報，並採集檢體檢驗，以監測新興-再浮現傳染病。本計畫將於107-108年參與該監測網絡，針對不明原因肺炎重症之檢體，進行細菌性病原體監測，以提供業務權責組及送驗醫療單位防治參考。



## 二、材料與方法

### 1. 檢體收集及病人基本資料

過去本署執行多年的新興-再浮現傳染病監測計畫已建立未知感染原監測網絡，符合條件的個案將由醫院主動通報並採集適當檢體，經由傳染病通報系統送到實驗室，病人的基本資料(年齡、性別、發病日及送檢醫院)則由送檢醫院提供。

### 2. 肺炎重症收案條件

住院病患合併以下 3 個條件：

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 a 或 b

a. 急性呼吸窘迫症，定義如下：

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

(2)  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$

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

b. 呼吸衰竭需呼吸器治療

### 3. 痰液的細菌培養

將痰液檢體以三區劃線的方式分別塗抹於 4 種不同的培養基，分別為巧克力培養基(Chocolate Agar)、綿羊血液培養基(BAP)、哥倫比亞培養基(Columbia CNA Agar)及伊紅甲基藍培養基(EMB Agar)，於 37°C 培養箱培養，隔天以無菌接種環挑取培養基上的單一菌落並塗抹於胰化蛋白大豆瓊脂培養基(TSA)，再於 37°C 培養箱培養，隔天再利用細菌鑑定暨藥敏試驗分析儀(Phoenix)或 MALDI-TOF 做菌種的鑑定，同時將疑似病原菌保存。另外，當懷疑個案可能是退伍軍人菌感染或者個案的尿液檢體呈現退伍軍人菌抗原陽性反應時，加做退伍軍人菌的培養。

### 4. 痰液的 multiplex real-time PCR 檢測

痰液經過核酸萃取後，將以 multiplex real-time PCR 偵測下呼吸道常見的八種細菌，包括 *Streptococcus pneumoniae*、*Haemophilus influenzae*、*Staphylococcus aureus*、*Moraxella catarrhalis*、*Escherichia coli*、*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Acinetobacter baumannii* (10)，使用的引子及探針如下表，反應參數依文獻所述，必要時做適度調整。

微生物	基因標的	引子
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Autolysin (lytA)	Forward ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA Reverse: TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT Probe: YY-TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG-BHQ1
<i>Haemophilus influenzae</i>	L-Fuculokinase (fucK)	Forward: ATGGCGGGAACATCAATGA Reverse: ACGCATAGGAGGGAAATGGTT Probe: FAM-CGTAATTGGGATCCAT-MGB
<i>Staphylococcus aureus</i>	Thermostable nuclease (nuc)	Forward: AGCATCCTAAAAAAGGTGTAGAGA Reverse: CTTCAATTTTMTTTCATTTTCTACCA

		Probe: TEX-TTTTCGTAAATGCACTTGCTTCAGGACCA-BHQ2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Outer membrane protein (copB)	Forward: CGTGTTGACCGTTTTGACTTT Reverse: CATAGATTAGGTTACCGCTGACG Probe: Cy5-ACCGACATCAACCCAAGCTTTGG-BHQ3a
<i>Escherichia coli</i>	Conserved protein, function unknown (ycct)	Forward: ATCGTGACCACCTTGATT Reverse: TACCAGAAGATCGACATC Probe: TEX-CATTATGTTTGCCGGTATCCGTTT-BHQ2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Citrate synthase (gltA)	Forward: AGGCCGAATATGACGAAT Reverse: GGTGATCTGCTCATGAA Probe: YY-ACTACCGTCACCCGCCACA-BHQ1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DNA gyrase subunit B (gyrB)	Forward: CCTGACCATCCGTCGCCACAAC Reverse: CGCAGCAGGATGCCGACGCC Probe: FAM-CCGTGGTGGTAGACCTGTTCCAGACC-BHQ1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	OXA-51-like $\beta$ -lactamase (blaOXA-51-like)	Forward: TTTAGCTCGTCGTATTGGACT Reverse: CCTCTTGCTGAGGAGTAATTTT Probe: Cy5-TGGCAATGCAGATATCGGTACCCA-BHQ3a
Specimen quality Control (Human)	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward: TTGTCTCACTTGTTCTCT Reverse: ATGGGAGTTGTTTTCTTG Probe: FAM-CTCGTCTTCTGTCATCTCTGCTG-BHQ1
Internal control for inhibition (PhHV)	Glycoprotein B (gB)	Forward: GGGCGAATCACAGATTGAATC Reverse: GCGGTTCCAAACGTACCAA Probe: Cy5-TTTTTATGTGTCCGCCACCATCTGGATC-BHQ3a

## 5. 尿液中退伍軍人菌抗原的檢測

將採用退伍軍人菌尿液抗原酵素免疫檢驗試劑組(*Legionella* Urine Antigen Elisa kit, BINAX, Inc., USA)，檢驗方式如產品所描述，目前可以檢測出嗜肺性退伍軍人菌血清型第 1 到第 6 型(*Legionella pneumophila* serogroups 1~6)。

### 三、結果

#### 不明原因肺炎重症痰液檢體收集及細菌病原體培養鑑定

自 2018 年 1 月至 10 月中共收集通報不明原因肺炎重症的痰液檢體 248 件，經細菌培養後有細菌生長為 109 件，包括有病原性細菌生長的 34 件、只有正常菌叢生長的 54 件及有疑似真菌生長的 21 件檢體(轉送真菌實驗室)，剩餘 139 件檢體無生長，為陰性檢體(表一)。病原性細菌比率為 13.7%，與 2015 年 Jain 等人之研究的 11% 相近。分離出病原性細菌的 34 件檢體，都以一種病原性細菌為主，伴隨有正常菌叢生長(表二)。分離的病原性細菌以 *Staphylococcus aureus* 13 件最多，其次為各有 5 件的 *Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Acinetobacter baumannii*。分離出病原性細菌的 34 位個案的年齡分佈，60 歲以上有 17 位，30 到 59 歲有 15 位，其餘 2 位分別為 1 歲和 2 歲的新生兒。

#### 不明原因肺炎重症尿液檢體收集及退伍軍人菌抗原檢測

自 2018 年 1 月至 10 月中共收集通報不明原因肺炎重症的尿液檢體 104 件，經檢測，其中 5 件為退伍軍人菌血清型第一型(*Legionella pneumophila* serogroup 1)的抗原陽性，其餘 99 件為陰性檢體(表三)，陽性比率為 4.8% (5/105)。5 位退伍軍人菌抗原陽性個案中，80 歲以上的有 2 位，50 到 65 歲的有 3 位。

## 細菌病原體 real-time PCR 檢測方法

針對目前常見的呼吸道細菌病原體 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* 及 *Acinetobacter baumannii*，規劃發展一套 multiplex real-time PCR 的檢測方法，以期快速檢測出病原體。先進行單一菌株的檢測，以了解各組引子及探針的效果及敏感度，圖一至圖七為各個單一菌株的檢測結果。結果顯示除了 *Staphylococcus aureus* 外，單一菌株的檢測效果及敏感度都很高，最低 CFU 檢測可以達到 10 CFU 以下。之後考慮到將多種檢測各病原體的引子及探針混合一起進行反應以提高檢測效率，因此接下來將進行 multiplex real-time PCR，檢測各組引子及探針彼此之間的相容性，圖八至圖十為本計畫所研究的 6 種呼吸道細菌病原體 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* 及 *Acinetobacter baumannii* 兩兩混合一起進行檢測的結果，結果顯示並沒有產生互相干擾的現象，兩者的訊號都有被完整的放大出來，而敏感度的部份也沒有因此受到影響或是有降低的趨勢，這表示之後的實驗可以往多種病原菌同時檢測的方向進行，最後才進入痰檢體的細菌檢測。

#### 四、討論

自 2018 年 1 月至 10 月中旬總共收集了不明原因肺炎重症之痰液檢體 248 件，其中只有 109 件於培養上有菌落形成，需進行下一步鑑定，然而進行細菌培養需要耗費的時間長，在檢驗的效率上是較為不利的，因此本計劃除了細菌培養外，希望嘗試 multiplex real-time PCR 的方式來達到即時檢測。目前已有對從不明原因肺炎檢體培養出的幾種常見呼吸道病原體進行 multiplex real-time PCR 檢測的敏感度測試，在檢測效果上是確實可行。

2015 年 Zhang 等人的研究(11)中，利用 multiplex real-time PCR 去檢測北京地區的兒童社區型肺炎感染，總共檢測了 371 名肺炎重症患者，其中 24 名是單一菌種的細菌性感染，8 名是多重菌種的細菌性感染，131 名為單一病毒株造成的病毒性感染，43 名為多種病毒的感染，而同時感染細菌及病毒的有 66 名患者。根據數據顯示病毒性感染造成的肺炎重症最多，占了總體的 47%，細菌性的感染只有 8.7%，然而這篇研究針對細菌性感染的檢測只有 *Streptococcus pneumoniae* 及 *Haemophilus influenzae* 兩種呼吸道病原菌，而其中 99 名(26.7%)患者的感染屬於未知，在這個族群裡有可能是其它種類的呼吸道病原菌造成的感染，因此細菌性感染造成的肺炎重症案例有被低估的可能性。2017 年 Jung 等人的研究(12)中，同樣利用 multiplex real-time PCR 同時檢測包括 adenovirus 在內的 9 種呼吸道病毒並

且分析各個種類的呼吸道病毒和呼吸道細菌之間的關聯性，其中呼吸道細菌是以細菌培養的方式進行分析。在 704 名肺炎重症患者中，發現其中 233 名患者有感染細菌性病原體，在呼吸道病毒和呼吸道細菌之間的關聯性方面，type A/B influenza virus、rhinovirus 與 human metapneumovirus (hMPV) 的感染容易導致由 *Staphylococcus aureus* 所引起的肺炎，而 coronavirus、parainfluenza virus 及 respiratory syncytial virus (RSV) 的感染則與其它格蘭氏陰性桿菌引起的肺炎有所關連。在 16 歲以上感染 type A/B influenza virus 的患者，被發現主要也發生 *Staphylococcus aureus*、*Klebsiella pneumoniae*、*Acinetobacter baumannii* 與 *Streptococcus pneumoniae* 的細菌性感染，而幼童族群方面無論是何種呼吸道病毒的感染，都是以 *Mycoplasma pneumoniae* 為肺炎重症的主要致病菌。2016 年 Cross 等人的研究(13)中，也將 multiplex real-time PCR 的技術運用在退伍軍人菌的檢測中，其偵測敏感度也都可以達到 50 fg 以下。

目前市售的 multiplex real-time PCR 試劑套組，主要以 Thermo Fisher 和 QIAGEN 兩家公司的產品為主，Thermo Fisher 的產品 TaqPath 1-Step Multiplex Master Mix 的優勢在於其 PCR 反應的進行不容易受到臨床檢體環境中的抑制物如 hematin 或是 heparin 的干擾而影響效率，至於 QIAGEN 的產品則是主打其反應進行時所添加的試劑 Q-Solution 能讓即使是不理想

的核酸模板(如 GC-rich template)也能很有效率的被放大。未來也會針對欲檢測病原菌的實驗條件與引子、模板特性去選擇適合的試劑套組。

綜上所述的研究雖然都是利用 multiplex real-time PCR 的技術來進行相關病原體的檢測，但對於病患檢體都還是需要先進行 DNA 或是 RNA 的萃取處理，目前直接對痰液檢體進行 PCR 即時定量檢測的相關文獻較少，因此以 multiplex real-time PCR 直接對痰液檢體進行檢測的效果有可能會不如預期的理想，也有可能需要搭配一定程度的檢體前處理，例如將檢體做溶菌處理，讓菌體內的 DNA 釋放出來但又不需要做到像 DNA 萃取那樣繁複的步驟，以達到兼顧檢驗效果與檢驗效率，會是未來實驗的重要目標。

之後考慮到將多種檢測各病原體的引子及探針混合一起進行反應以提高檢測效率時，必須先測試各組引子及探針在同一環境下是否會互相干擾的可能性，目前初步的結果是將收集到的病原體兩兩配對進行 multiplex real-time PCR，其中並沒有發現彼此互相干擾的現象，因此之後會嘗試進行多組引子及探針混合反應的相容性測試。由於考量到進入的最後階段直接對痰液檢體進行檢測時，痰液檢體裡可能帶有其它致病性或非致病性上呼吸道細菌，因此測試 multiplex real-time PCR 的引子及探針在如痰液檢體複雜的環境是否仍保有其專一性，而不會產生錯誤訊號，也有其必要性。



## 五、結論與建議

自 2018 年 1 月至 10 月中旬所收集的不明原因肺炎重症尿液檢體 104 件當中，有 5 件為退伍軍人菌血清型第一型抗原陽性，比率為 4.8%。而痰液檢體 248 件中有 34 件檢測出上呼吸道病原菌，比率為 13.7%，與 2015 年 Jain 等人之研究的 11%相近。然而退伍軍人菌的檢測可利用退伍軍人菌尿液抗原酵素免疫檢驗試劑組(*Legionella* Urine Antigen Elisa kit, BINAX, Inc., USA)，當天便能得出結果，但痰液檢體目前仍需經過細菌培養，相比前者需消耗更多的時間與實驗耗材，因此發展更快速、簡便的檢測方式是一個值得努力的方向。

## 六、重要研究成果及具體建議

自 2018 年 1 月至 10 月中旬所收集的不明原因肺炎重症痰液檢體 248 件中，有 34 件檢測出上呼吸道病原菌，比率為 13.7%，尿液檢體 104 件當中，有 5 件為退伍軍人菌血清型第一型抗原陽性，比率為 4.8%。以 multiplex real-time PCR 檢測不明原因肺炎檢體常見的呼吸道病原體，單一菌株的檢測效果及敏感度都很高，最低 CFU 檢測可以達到 10 CFU 以下，兩種檢測各病原體的引子及探針混合一起進行反應以提高檢測效率時，並沒有發現彼此互相干擾的現象，結果顯示兩種病原體一起檢測彼此並不會互相影響檢測結果與敏感度。由於考量到進入的最後階段直接對痰液檢體進行檢測時，痰液檢體裡可能帶有其它致病性或非致病性上呼吸道細菌，因此之後會進行多組引子及探針混合反應的相容性測試，確認其是否仍保有專一性。

## 七、參考文獻

1. Wardlaw T, Salama P, Johansson EW, Mason E. Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet*. 2006 Sep 23;368(9541):1048-50.
2. Torres A, Blasi F, Peetermans WE, Viegi G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2014 Jul;33(7):1065-79.
3. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *The New England journal of medicine*. 2015 Jul 30;373(5):415-27.
4. Huang CY, Chang L, Liu CC, Huang YC, Chang LY, Huang YC, et al. Risk factors of progressive community-acquired pneumonia in hospitalized children: a prospective study. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2015 Feb;48(1):36-42.
5. Lai CH, Chang LL, Lin JN, Chen WF, Wei YF, Chiu CT, et al. Clinical characteristics of Q fever and etiology of community-acquired pneumonia in a tropical region of southern Taiwan: a prospective observational study. *PloS one*. 2014;9(7):e102808.
6. Lee YT, Chen SC, Chan KC, Wu TC, Tsao SM, Chan CH. Impact of infectious etiology on the outcome of Taiwanese patients hospitalized with community acquired pneumonia. *Journal of infection in developing countries*. 2013 Feb;7(2):116-24.
7. Chen CJ, Lin PY, Tsai MH, Huang CG, Tsao KC, Wong KS, et al. Etiology of

- community-acquired pneumonia in hospitalized children in northern Taiwan. *The Pediatric infectious disease journal*. 2012 Nov;31(11):e196-201.
8. Wu CL, Ku SC, Yang KY, Fang WF, Tu CY, Chen CW, et al. Antimicrobial drug-resistant microbes associated with hospitalized community-acquired and healthcare-associated pneumonia: a multi-center study in Taiwan. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*. 2013 Jan;112(1):31-40.
  9. Lauderdale TL, Chang FY, Ben RJ, Yin HC, Ni YH, Tsai JW, et al. Etiology of community acquired pneumonia among adult patients requiring hospitalization in Taiwan. *Respiratory medicine*. 2005 Sep;99(9):1079-86.
  10. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015 Aug;21(8):788 e1- e13.
  11. Zhang TG, Li AH, Lyu M, Chen M, Huang F, Wu J. Detection of respiratory viral and bacterial pathogens causing pediatric community-acquired pneumonia in Beijing using real-time PCR. 2015 July;110-116.
  12. Jung HS, Kang BJ, Ra SW, Seo KW, Jegal Y, Jun JB, et al. Elucidation of Bacterial Pneumonia-Causing Pathogens in Patients with Respiratory Viral Infection. 2017 Sep;80:358-367.
  13. Cross KE, Mercante JW, Benitez AJ, Brown EW, Diaz MH and Winchell JM. Simultaneous detection of Legionella species and *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* and *L. micdadei* using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay. 2016 July;85(3):295-301.

## 八、圖、表

表一、不明原因肺炎重症痰液檢體細菌病原體培養

細菌培養結果	件數(n=248)
病原性細菌	34
正常菌叢	54
疑似真菌	21
無生長	139

表二、不明原因肺炎重症痰液檢體分離出細菌病原體

細菌病原體	件數(n=34)
<i>Staphylococcus aureus</i>	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5
<i>Enterococcus faecium</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1

表三、不明原因肺炎重症尿液檢體的退伍軍人菌抗原檢測

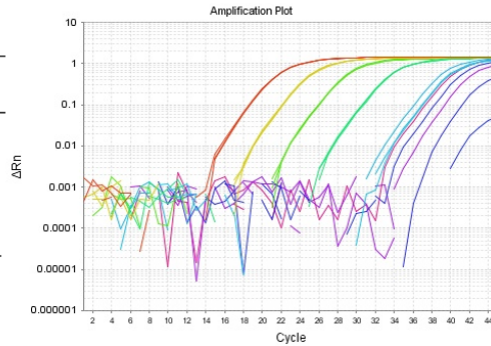
<i>L. pneumophila</i> sg1 檢測	件數(n=104)
陽性	5
陰性	99

# Streptococcus pneumoniae

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	18.52	21.99	25.84	30.43	36.86	38.12	39.16
	18.45	21.90	25.81	30.42	36.76	40.91	Nd
	18.54	22	25.78	30.58	35.94	Nd	Nd
mean	18.5	22.0	25.8	30.5	36.5	Nd	Nd

Bacterial suspension (CFU/mL)	Undiluted DNA (CFU/uL)*	Sensitivity (CFU)
5.2*10 <sup>7</sup>	1*10 <sup>6</sup>	100

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 溶於50uL TE.



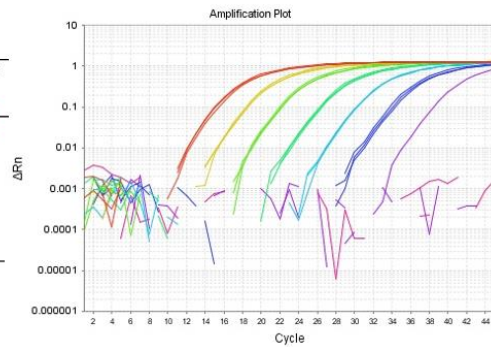
圖一、*Streptococcus pneumoniae*的real-time PCR檢測結果

# Haemophilus influenzae

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	15.49	18.82	22.38	26.66	30.73	34.2	38.92
	15.93	18.95	22.61	26.82	30.68	34.8	Nd
	15.56	19	22.63	26.95	30.67	34.53	Nd
mean	15.7	18.9	22.5	26.8	30.7	34.5	Nd

Bacterial suspension (CFU/mL)	Undiluted DNA (CFU/uL)*	Sensitivity (CFU)
3*10 <sup>7</sup>	6*10 <sup>5</sup>	6

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 溶於50uL TE.



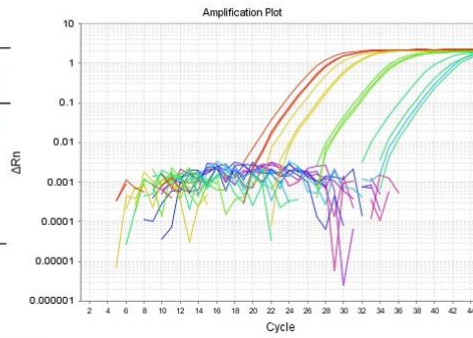
圖二、*Haemophilus influenzae*的real-time PCR檢測結果

# Staphylococcus aureus

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	26.18	28.94	33.67	39.66	40.22	Nd	Nd
	26.35	27.37	33.4	37.92	nd	Nd	Nd
	25.26	29.14	33.03	40.68	nd	Nd	Nd
mean	25.9	28.5	33.4	39.4	Nd	Nd	Nd

Bacterial suspension (CFU/mL)	Undiluted DNA (CFU/uL)*	Sensitivity (CFU)
2.6*10 <sup>8</sup>	5.2*10 <sup>6</sup>	5.2*10 <sup>3</sup>

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 混於50uL TE.



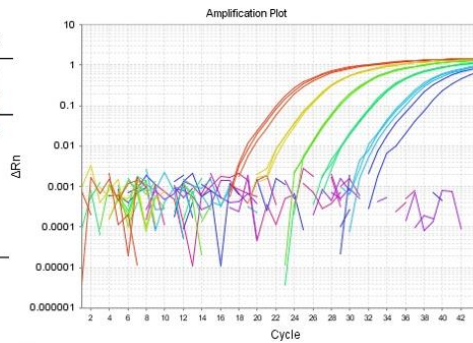
圖三、*Staphylococcus aureus*的real-time PCR檢測結果

# Escherichia coli

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	22.62	26.16	29.33	32.84	35.86	38.99	ND
	22.91	26.04	29.5	33.05	36.49	37.13	Nd
	23.36	26.29	29.35	32.94	36.04	Nd	Nd
mean	23	26.2	29.4	32.9	36.1	Nd	Nd

Bacterial suspension (CFU/mL)	Undiluted DNA (CFU/uL)*	Sensitivity (CFU)
6.3*10 <sup>7</sup>	1.3*10 <sup>6</sup>	130

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 混於50uL TE.

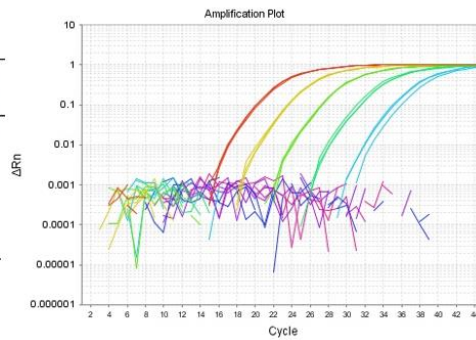


圖四、*Escherichia coli*的real-time PCR檢測結果

# Klebsiella pneumoniae

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	20.82 20.54 20.61	23.94 24.06 24.12	27.68 27.69 27.79	31.52 31.94 31.97	35.53 36.44 35.69	Nd	Nd
mean	20.7	24	27.7	31.8	35.9	Nd	Nd
Bacterial suspension (CFU/mL)	6.3*10 <sup>7</sup>		Undiluted DNA (CFU/μL)*		Sensitivity (CFU)		
	6.3*10 <sup>7</sup>		1.3*10 <sup>6</sup>		130		

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 溶於 50μL TE.

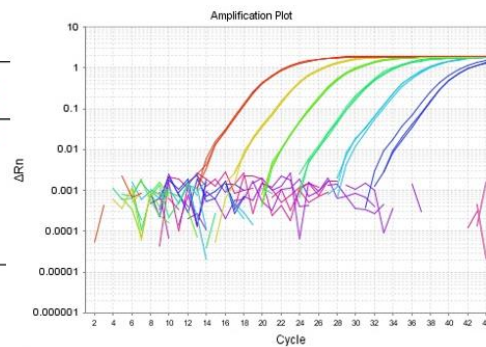


圖五、*Klebsiella pneumoniae*的real-time PCR檢測結果

# Pseudomonas aeruginosa

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	18.97 19.07 19.16	22.85 22.94 22.96	26.47 26.6 26.68	30.38 30.58 30.7	34.11 34.42 34.11	37.98 38.81 38.77	Nd
mean	19.1	22.9	26.6	30.6	34.2	38.5	Nd
Bacterial suspension (CFU/mL)	5.4*10 <sup>7</sup>		Undiluted DNA (CFU/μL)*		Sensitivity (CFU)		
	5.4*10 <sup>7</sup>		1.1*10 <sup>6</sup>		11		

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 溶於 50μL TE.

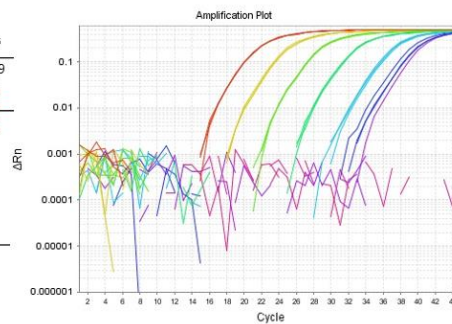


圖六、*Pseudomonas aeruginosa*的real-time PCR檢測結果

# Acinetobacter baumannii

Dilution	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
CT	19.39 19.45 19.44	22.81 22.93 22.97	26.6 26.66 26.61	30.71 30.72 30.86	34.94 35.24 35.03	37.72 37.04 37.79	38.29
mean	19.4	22.9	26.6	30.8	35.1	37.5	Nd
Bacterial suspension (CFU/mL)	1.55*10 <sup>7</sup>		Undiluted DNA (CFU/μL)*		Sensitivity (CFU)		
	1.55*10 <sup>7</sup>		3.1*10 <sup>6</sup>		31		

\*Extracted DNA from 1mL bacterial suspension 溶於 50μL TE.



圖七、*Acinetobacter baumannii*的real-time PCR檢測結果

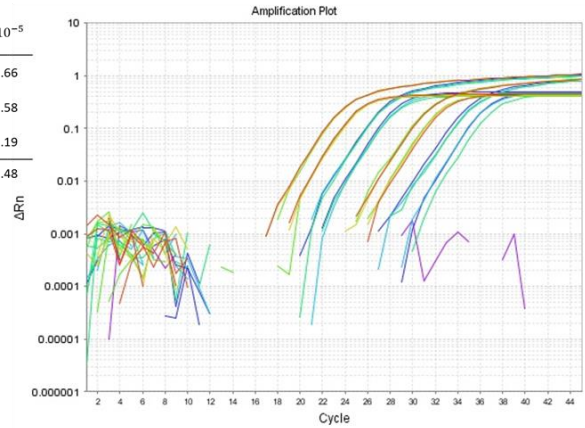


# Sp & Hi

Dilution	Sp:10 <sup>-1</sup>		Hi:10 <sup>-2</sup>		Sp:10 <sup>-2</sup>		Hi:10 <sup>-3</sup>		Sp:10 <sup>-3</sup>		Hi:10 <sup>-4</sup>		Sp:10 <sup>-4</sup>		Hi:10 <sup>-5</sup>	
CT	23.3	22.19	26.87	25.88	30.88	29.93	35.36	33.66								
	23.47	22.26	26.87	25.86	30.74	29.9	34.64	33.58								
	23.38	22.3	26.64	25.79	30.64	29.8	34.62	33.19								
mean	23.38	22.25	26.79	25.84	30.75	29.88	34.87	33.48								

	Bacterial suspension (CFU/ml)	Undiluted DNA (CFU/ul)*	Sensitivity (CFU)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5.2*10 <sup>7</sup>	1*10 <sup>6</sup>	100
<i>Haemophilus influenzae</i>	3*10 <sup>7</sup>	6*10 <sup>5</sup>	6

\*Extracted DNA from 1ml bacterial suspension;添於50ul TE



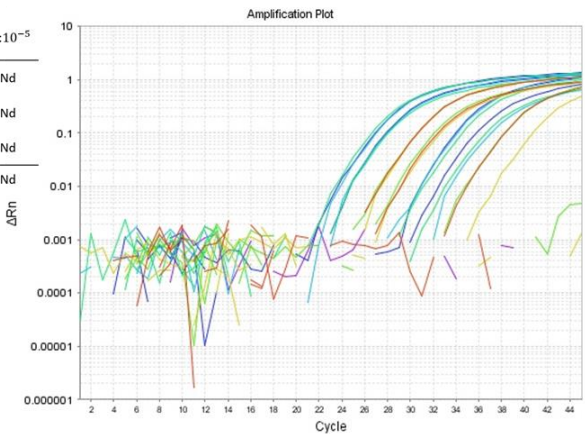
圖八、*Streptococcus pneumoniae*與*Haemophilus influenzae*的multiplex real-time PCR檢測相容性結果

# E.coli & Kp

Dilution	Ec:10 <sup>-1</sup>		Kp:10 <sup>-2</sup>		Ec:10 <sup>-2</sup>		Kp:10 <sup>-3</sup>		Ec:10 <sup>-3</sup>		Kp:10 <sup>-4</sup>		Ec:10 <sup>-4</sup>		Kp:10 <sup>-5</sup>	
CT	26.88	27.95	30.89	32.29	34.81	36.54	38.47	Nd								
	27.21	27.86	30.84	32.53	34.31	36.97	40.96	Nd								
	27.14	27.81	30.87	31.99	34.2	35.68	38.49	Nd								
mean	27.08	27.87	30.87	32.27	34.44	36.4	39.31	Nd								

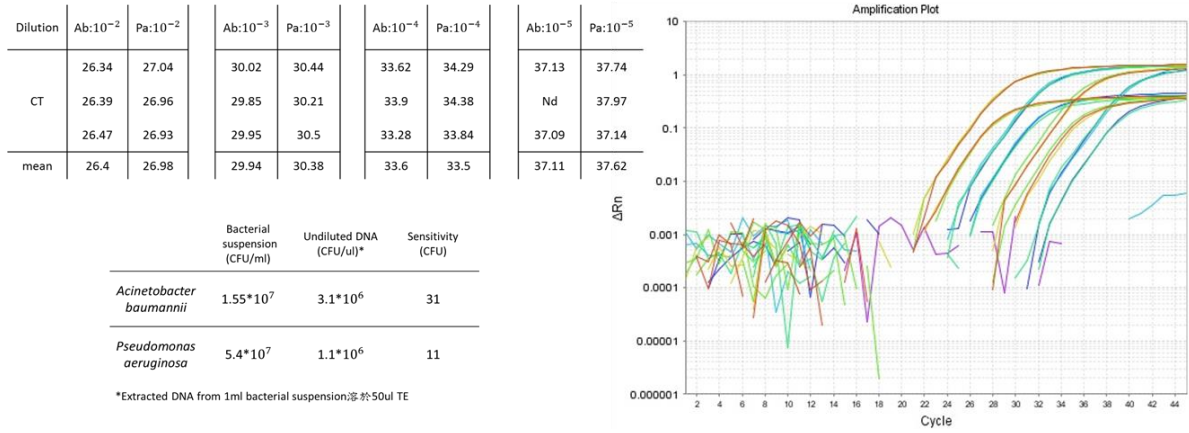
	Bacterial suspension (CFU/ml)	Undiluted DNA (CFU/ul)*	Sensitivity (CFU)
<i>Escherichia coli</i>	6.3*10 <sup>7</sup>	1.3*10 <sup>6</sup>	130
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.3*10 <sup>7</sup>	1.3*10 <sup>6</sup>	130

\*Extracted DNA from 1ml bacterial suspension;添於50ul TE



圖九、*Escherichia coli*與*Klebsiella pneumoniae*的multiplex real-time PCR檢測相容性結果

# Ab & Pa



圖十、*Acinetobacter baumannii*與*Pseudomonas aeruginosa*的multiplex real-time PCR檢測相容性結果

附錄（研究調查問卷、法規及其他重要資料均應列為研究報告附錄。）

無