

計畫編號：DOH101-DC-2401

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

計畫名稱：新興/再浮現傳染病監測技術開發與應用計畫

研究報告

執行機構：研究檢驗中心

主持人：張峰義

共同主持人：吳和生

協同主持人：劉銘燦、慕蓉蓉、楊志元、許麗卿、鄒宗珮、魏嵩璽、  
洪敏南、陳婉青、趙雁南、吳芳姿

研究人員：黃元品、楊季融、陳昱汝、謝若郁、莊博丞、謝盛元、黃  
御哲、劉浩毓、詹皇奕、呂學霖、潘翊讚、黃佺龍、陳協  
成

執行期間：101 年 1 月 1 日至 101 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵  
求本署同意

## 目錄

	頁 碼
目錄	1
計畫中文摘要	2
計畫英文摘要	3-4
計畫內容	
一、前言	(5-11)
二、材料與方法	(12-26)
三、結果	(27-39)
四、討論	(40-45)
五、結論與建議	(46-47)
六、計畫重要研究成果及具體建議	(48-50)
七、參考文獻	(51-53)
八、圖、表	(54-65)
附錄一、肺炎重症收案問卷	(66-72)
附錄二、腦炎重症收案問卷	(73-77)

共 (77) 頁

## 摘要

近年來由於氣候環境變化劇烈、物種突變、基因重組、藥物濫用、人畜共通及全球化趨勢，使得各種傳染病病原體變異及傳播速度更勝以往（如NDM-1、SARS、H1N1新型流感、H5N1禽流感病毒、新型冠狀病毒等），並隨著全球化的迅速發展，國際間往來密集，新興傳染病可能由區域性疾病的發展，演變成全面性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康，且造成社會恐慌；面對變化及傳播快速的傳染病，如何在有限的時間內，運用可行的檢驗技術或平台正確偵測出感染原，以防止疫情擴散，已成為各國極為關注的議題。本計畫包括建置(1)、未知/新興傳染病監測網絡（如肺炎重症、腦炎及不明原因快速死亡、不明原因群聚及其他通報疑似法定傳染病但檢測為陰性之檢體等），收集檢體、訂定其病例定義、收件標準與檢驗流程等，並分析疾病臨床徵狀、個案流行病學資料與檢出病原體之關聯性，以探究其致病原；(2)、未知/新興感染原檢驗技術平台，透過 multiplex PCR、基因晶片檢測、高通量定序檢測與分生檢測等技術串連運用，俾即時探知不明、新興及罕見病原體；(3)、建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術，透過病毒基因序列資料及個案流病資料的分析，協助疾病感染源或感染途徑之釐清，提供疾病防治政策參考，並評估疫苗的有效性、監測病原體抗藥性，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。透過三大目標之整合與執行，本計畫期許能建置台灣未知/新興病原體研究中心，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，未來期能發展成為國際未知/新興病原體交流平台，累積足夠的實力與各國建立雙邊合作關係，更可望於未來面對疫情時能成為主動協助者，而非依賴國際援助或資訊的被動角色。

**關鍵詞：**新興/再浮現傳染病、基因晶片、高通量定序、病原體基因資料庫

## **Abstract**

Due to global climate change, species mutations, genome recombination, drug abuse and zoonoses, microorganisms are more likely to derive or mutate into novel pathogens that could be transmitted across species boundaries like NDM-1, SARS, pandemic (H1N1) 2009, H5N1 avian influenza, novel coronavirus than ever. As the development of rapid globalization and the intense international communication, emerging/re-emerging infectious diseases could arise from local diseases to global disasters, which largely threaten public and personal health. For rapidly changing and transmitting diseases like these, it is crucial to utilize practical and available diagnostic techniques or platforms to detect pathogens correctly in limited period of time to prevent their spreading. Our goals are to establish 1. the surveillance network for unknown/emerging infectious pathogens such as samples from pneumonia, encephalitis, unexplained critical illnesses or deaths due to possibly infectious cause, unexplained outbreaks and other possible but negative notifiable diseases. We will collect samples from unexplained or unusual cases, set up the case definition, standards for enrollment and procedures of diagnoses, and analyze the clinical manifestations, epidemiological information relationships with the detected pathogens to exactly find out the meaningful etiological agents; 2. the diagnostic platforms of unknown/emerging infectious diseases including multiplex PCR, microarray, high-throughput sequencing, molecular biological detection and use them complementary to detect unknown, emerging and uncommon pathogens; 3. the high-quality pathogenic genome database and techniques. 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. To sum up, 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. 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 elevate the international stage of Taiwan.

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

## 本文

### 一、前言：

#### (一) 新興/再浮現傳染病之檢驗

##### 1、 不明原因快速死亡、肺炎及腦炎

在全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交通日漸頻繁之際，各類未知/新興感染疾病的威脅日增。1997年的H5N1、2003年的SARS-CoV、2009年的pandemic H1N1、NDM-1，均為首先出現於社區之新興傳染病，顯示良好的監測及病原體診斷系統之重要性[1]。我國法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，對傳染病流行狀況提供豐富及全面的資訊；研究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，更增進吾人對許多疾病的了解；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)、腦炎與嚴重肺炎之個案優先收案並分別分析。此外亦將針對目前法定傳染病系統中常規檢驗為陰性之檢體，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(UNEX)個案由於病情嚴重，且需在短時間內排除新興傳染病或生恐攻擊事件之威脅，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，包括*Neisseria meningitides*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia pneumoniae*等細菌，及influenza, enterovirus, Epstein-Barr virus等病毒[2]。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[3]。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。此計畫之結語中強調，為了增進診斷效率，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，一直以來均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。以最近發表在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[4]。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[5]。相較於先前所進行之大規模研究約只有16-30%可找到病原[6]，可見檢驗技術之進步可減少不明原因感染之個案數。本計畫即是希望可以建立一先進之檢驗平台，藉由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、 未知/新興感染原檢驗技術平台

病原體檢測技術的發展快速，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[7-22]。而發現這些病原體的方法除了傳統細胞培養、電子顯微鏡、consensus PCR外，可同時偵測多種已知或未知病原體之病原體微陣列 (microarray)與高通量定序 (high throughput sequencing)方法也逐漸被應用[14]。本計畫將依腦炎、肺炎及不明原因快速死亡個案設計不同檢驗項目，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，針對收集到之檢體項目進行檢驗。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，因其可能只是檢驗方法或目標錯誤，不代表能排除感染症；另臨床上檢測病原體，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，除針對高度懷疑之病原體，進行小RNA病毒科 (*Picornaviridae*)的檢測外，也採用退化性引子 (degenerate primer) CODEHOP等分生檢測技術，以期探索偵測新興病原體。

## 3、 新興病毒

小RNA病毒科依據最新的分類共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，腸病毒感染可造成其他許多的臨床症狀，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[23,24]，其中有些較為嚴重之感染者，有可能造成重症甚至死亡。小 RNA 病毒科最近新興之病毒—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；局內進行病毒檢測無法分型之新興病毒檢驗之開發，已建立 HPeV 病毒之診斷，目前僅能依賴分子生物檢測方法進行核酸定序及序列比對，才能將此類新興病毒與腸病毒區分[25,26]，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，僅有透過計畫之執行，利用分子生物檢測方法，直接針對該項病毒核酸進行檢測，結果已從 2007 年至 2010 年所收集之檢體中，發現 9 株 HPeV1、6 株 HPeV3 與 2 株 HPeV6，由此可知 HPeV 病毒在國內零星出現個案，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，為一種單股 RNA 病毒，對神經組織有很強的親和性，病毒外型呈子彈型，大小約為 150×180nm。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，且幾乎全發生在開發中國家。亞洲地區的發生率最高，其中印度佔大部份。早在日據時代已有發生狂犬病的紀錄，從 1900 年起在文獻上記載的至少就有 11 起，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 1959 年起台灣地區即不再有人的病例。目前台灣為狂犬病非疫區。而在 2002 年，花蓮曾出現一名境外移入疑似病例，個案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。今年一名台商個案，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。國人雖在國內無狂犬病之威脅，但透過旅遊或經商之機會，仍有可能接觸到狂犬病，因此實驗室更應隨時準備診斷之工具。

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，可同時偵測數千種已知或未知病原體。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。

## **(二) 病原體防疫資料庫**

隨著基因體醫學研究的興盛，國際間已積極發展大型病原體基因資料庫暨分析平台，包括 National Center for Biotechnology Information (NCBI)，網址：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，包含各種基因體資訊，可供使用者免費使用；流感基因資料庫，網址：<http://www.flu.lanl.gov/>，近年已經改為需要付費方能使用的方式；愛滋病基因資料庫，網址：<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>，包含核酸及胺基酸資料及分析工具[27-29]。因此建置我國本土的病原體基因資料庫

網站不僅為時勢所趨，亦可強化不同防疫面向之資訊整合。

台灣的情況則是病原體基因資料分散於政府部門、學術單位、醫療院所、或者是生技公司，且尚無將病原體基因序列與流行病學資料結合的資料庫，因此本病原體基因資料庫(舊版)的建立與維持除了可以提供屬於本土病原基因資料，更可結合流行病學資訊達到資訊有效運用的目的，除了可以追蹤病原體的流行及分佈狀況，更可以作為後續治療藥物、疫苗開發或診斷工具的重要參考依據。本病原體基因資料庫(舊版)自設立上線以來，約有兩千四百個使用人次的登入使用，總計所包含的序列資料約六萬三千條。並本著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，統計至今至少超過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。

本局更於民國97年12月起與陽明大學「國科會進階生物資訊核心設施研究團隊 (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)」，主要功能為儲存本局相關病原體資訊，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腸病毒與流感病毒基因序列與不含個人隱私之流行病學資料 (包括性別、年齡、居住地、發病日期等)。上述資料均來自本局彙整、分析歷年病原體相關資料而成，目前規劃每半年定期更新，同時主動更新網站上儲存之美國國家生物技術信息中心 (NCBI) 及世界衛生組織 (WHO) 相關基因資料，以提供比對分析之最新國際參考資料 [30]，而這些資料皆無償供各界自由取得分析，貫徹政府資訊公開及資源共享之原則。為了因應越來越多的病原體基因資訊儲存以及功能需求，因此本基因資料庫還需要更進一步增加網站應用的即時性、便利性

及功能性以滿足需求，不僅是硬體上的汰舊換新，在使用者操作介面上也需要依照使用者意見來修改以符合較為人性化的操作，在功能上也需要增加或改良，例如統計、查詢功能的改良，而分析功能也需要更加即時、完整、增加及更新國際資料庫的搜尋比對功能，以省去資訊分析上的不便及可以節省分析所需的時間。最後則是管理者權限的設定，避免個人資料的外流，同時達到使用便利以及保護隱私的目標。

流行性感冒病毒為呼吸道病原體，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，目前為止已有16種HA (H1至H16) 與9種NA (N1至N9)[31]。腸病毒屬於微小病毒科、腸病毒屬之病毒，基因體中的VP1基因是中和抗體主要作用之區域，亦為序列中變化較大之區域[32,33]，為較常用於分析研究的基因[34]。我們持續收集病毒合約實驗室的採檢病毒株，將其定序後的序列資料合併流行病學資訊上傳至資料庫中，並針對發生流行時的病毒進行分析，以追蹤病毒來源及序列變異的目的。過去本局曾經藉由此資料庫分析發表數篇文獻，如：簡智偉等人分析2003-2006年間的流感病毒基因及流病資料[35]、分析B型流感的基因重組情況[36]、黃元品等人分析2006-2007年的腸病毒71型係屬於新引入的基因亞型B5及C5所引起[37]，更確認2008年所大流行的腸病毒71型也屬於B5基因亞型，與中國大陸所流行的C4基因亞型或新加坡所流行的C2基因亞型不同，並於同年發現C2-like基因亞型[38]、而鄒宗珮等人藉由歷年的腺病毒資料來比對分析2011年的流行[39]。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，亦可評估疫苗的有效性、監測病原體抗藥性以作為用藥選擇依據，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。

## 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、等突發急性傳染病之檢體。
- (2) 不明原因快速死亡個案。
- (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。

#### 2、 監測與檢體採集點

北、中、南、東各地教學醫院與區域醫院，與有興趣且配合度高之臨床醫師(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。

### 固定合作醫院名單

成人肺炎重症及腦炎	兒童肺炎重症及腦炎
<p>北區 台北馬偕醫院 雙和醫院 恩主公醫院 新竹馬偕醫院 亞東醫院</p> <p>中區 童綜合醫院 彰化基督教醫院 台中榮民總醫院 大甲光田醫院 沙鹿光田醫院 中港澄清醫院</p> <p>南區 小港醫院 奇美醫院 屏東基督教醫院</p> <p>東區 慈濟醫院 門諾醫院</p>	<p>北區 台北馬偕醫院 恩主公醫院 新竹馬偕醫院 亞東醫院</p> <p>中區 童綜合醫院 彰化基督教醫院 台中榮民總醫院 大甲光田醫院 沙鹿光田醫院 中港澄清醫院 中山醫大附設醫院</p>

### 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、 社區型肺炎(community-onset pneumonia)：入院後≤48 小時內發病；

C、 呼吸衰竭：需使用呼吸器或符合急性呼吸窘迫症候群(ARDS) 定義。

(2) 腦炎收案條件--病患合併以下所有條件：

A、 住院；

B、 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)。

(3) 不明原因快速死亡收案條件：

住院 7 天內死亡，經檢驗或醫師診斷，不能排除與感染症相關。

(4) 無法檢出感染原之重要群聚事件：由分局防疫醫師研判後通知送驗

#### 4、 採檢送驗

採檢項目如附表一，送驗之檢體將進行病原體實驗室檢驗鑑定，包括細菌、病毒、寄生蟲及可能未知的病原體。詳細檢驗項目將於後詳述。

#### 5、 檢驗結果告知

檢體送達本局研究檢驗中心一週內，multiplex PCR 結果將登錄於本局法傳電腦系統，回饋至臨床端參考。

#### 6、 病歷資料回顧、個案研判與分析

本局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以進行分析。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，由二至三位防疫醫師討論後研判。

## (二) 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。

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 ul 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70°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 ul DNA 與 cDNA 產物與 1x LightCycler 480 Probes Master、200nM forward primer、200nM reverse primer 以及 100nM 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 2min，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、 基因晶片檢測系統：收集並有系統分析整理已知病原體的基因序列，尋找分類階層上之保守序列(conserved sequences)與特有序列，利用這些序列為探針，與高密度之微陣列系統(24 萬條探針於 25 x75 mm 玻片)，建立可檢測數千種病原體之病原體基因晶片檢測系統，此系統可同時對多種傳染病鑑別診斷，以達到快速尋找致病原的目的。本實驗所使用的晶片收集已發表的報告與自行設計探針，建立晶片探針序列資料庫，目前資料庫為長度為 60 個寡核苷酸的序列，主要來源有病毒探針資料庫(Virus Genus and Specific Probe Database[40]及 David Wang 所發表的序列[41]，偵測範圍涵蓋 53 個科(families)，214 個屬(genera)，約五千七百多種病毒；在細菌方面，目前搜集的探針資料包括 Wang 等人[41]及 Palaniappan 等人[42]所發表的序列及 Operon 公司的晶片資料庫(Operon microarray databases, OMAD)，偵測對象涵蓋 19 個屬(genera)，約 22 種(species)細菌。我們也持續改良與增加晶片探針的組成，增加檢測病原體的種類與分型能力，特別是對一些新興及再浮現性之病原體。

實驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄、核酸放大及晶片雜交反應

與訊號分析，實驗方法主要是參考 Palacios 等人的論文[43]，實驗步驟如下：

(1) 反轉錄反應(reverse transcription)

利用自動核酸萃取系統(Roche Applied Science)進行樣品核酸萃取，並利用 DNase 去除樣品中的 DNA 後，取 5ul RNA，利用八個隨機核苷酸(random octamer)連接一段特定的序列當作引子(命名為 SIA-1; 序列為 5'- GTT TCC CAG TAG GTC TCN NNN NNN N-3')進行反轉錄反應。RNA 與 SIA-1 引子於 75°C 作用 10 分鐘後，置於冰上 5 分鐘，再利用 transcriptor reverse transcriptase (Roche Applied Science)進行反轉錄反應，反應條件為 25°C 作用 10 分鐘、48°C 作用 40 分鐘及 70°C 作用 10 分鐘，最後再利用 RNase H (Invitrogen)去除 RNA，留下 cDNA。

(2) 核酸放大(amplification)與標定(labeling)

利用兩次聚合酶連鎖反應(PCR; polymerase chain reaction)將 cDNA 進行放大。第一次 PCR 所使用的引子為 SIA-1 引子及 Extend-1 引子(序列為 5'- CGC CGT TTC CCA GTA GGT CTC-3' )，兩者使用量比例為 1:9，初始九個循環(cycles)於較低的 annealing 溫度進行，反應條件為 94 °C 作用 45 秒、25°C 作用 1 分鐘及 72°C 作用 1 分鐘，接下來 50 個循環 annealing 溫度則改為於 55°C 進行。

將第一次 PCR 的產物再次進行 PCR 反應。第二次 PCR 所使用之引子序列包含 Extend-1 及一段 3DNA dentrimer capture sequence (5'- TTC TCG TGT TCC GTT TGT ACT CTA AGG TGG ACG

CCG TTT CCC AGT AGG TCT C-3' )，使得第二次 PCR 產物有一段序列可以與 3DNA dendrimers (含有數百個螢光分子)互補，在後續雜交反應時，可與 3DNA dendrimers 作用，進行螢光標示 (fluorescent labeling)。PCR 反應條件為 94 °C 作用 45 秒、55°C 作用 30 秒及 72°C 作用 1 分鐘，一共進行 35 個循環。

### (3) 晶片雜交反應及分析(microarray hybridization and analysis)

將 48µl 第二次 PCR 產物、60µl 2X SDS 雜交反應溶液(Genisphere Inc.)及 12µl 10X Cy3 quality control targets (Agilent Technologies) 混合均勻，於 80°C 作用 10 分鐘後，與晶片於 65°C 進行雜交反應。17 個小時後，利用 Wash buffer I ( 6X SSC and 0.005% Triton X-100)於室溫下清洗 10 分鐘，及 Wash buffer II (0.1X SSC and 0.005% Triton X-100)於 4°C 清洗 10 分鐘，將多餘的樣品及非專一性雜交反應(nonspecific hybridization)去除。

晶片清洗完畢後，利用 Cy3 3DNA dendrimers (Genisphere Inc.)進行螢光標示反應。將 0.4µl Dendrimer 3DNA capture reagent、60µl 2X SDS 雜交反應溶液(Genisphere Inc.)及 60µl nuclease free water 混合均勻，於 80°C 作用 10 分鐘後，與晶片於 65°C 進行雜交反應。反應 2 個小時後再次進行晶片清洗，清洗步驟與前述相同。接著利用微陣列晶片掃描機(Agilent Technologies)掃描晶片後，再利用 Feature Extraction 軟體(Agilent Technologies)將訊號強度轉換成數值以利後續數據分析及比較。

- 3、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 ul 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70°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 Genbank 中 virus 資料庫。
- 4、腹瀉新興病毒檢測技術：建立從輪狀、諾羅病毒陰性之腹瀉群聚檢體分析其他新興病毒(如 aichi virus、sapovirus、astrovirus、salivirus/ klassevirus、Adenovirus40/41, Picobirnaviruses)之 RT-PCR 鑑定、基因定序分析及病毒培養。
- (1) aichi virus RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5µL 為模板，加入 20µL QIAGEN One-Step RT-PCR pre-mix，含有 1X Q-Solution、1X One-Step RT-PCR 反應緩衝溶液、1µL 反轉錄聚合酶混合酵素、0.4 mM each dNTP、8 U RNase 抑制劑( invitrogen Cat. No. 10777-019) 及 0.4µM 每個分析引子(Ai6261/ Ai6779)，作 3C-3D 片段序列之 RT-PCR。反應條件：於 50°C 30 分鐘反轉錄作用，之後 95°C 作用 15 分鐘，PCR 熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 55°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 7

分鐘。以 RT-PCR 產物 2.5 $\mu$ L 為模板，加入 22.5 $\mu$ L PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4  $\mu$ M 每個分析引子 (C94b/ 246k)，作 3C-3D 片段序列之 nest PCR，先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒、annealing 55 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 266bp，進一步做片段序列分析。

- (2) sapovirus RT-PCR: 病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板，加入 1 $\mu$ L 10 $\mu$ M 隨機引子及 2 $\mu$ L 20mM dNTP 於 70 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 $\mu$ L。於 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，50 $^{\circ}$ C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。Nest-PCR: 病毒分析引子對為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。以 RT 產物 2 $\mu$ L 為模板，加入 23 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 $\mu$ M 每個分析引子。反應條件：先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒、annealing 50 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 2 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。以第一次 PCR 產物 1 $\mu$ L 為模板，加入 24 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase 及 0.4 $\mu$ M 每個分析

引子 (1245Rfwd/ SV-R2)。反應條件：95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 45 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘，進行 capsid 基因片段 nest PCR。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 430bp，進一步做序列分析。

- (3) astrovirus RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板，加入 1 $\mu$ L 10 $\mu$ M 隨機引子及 2 $\mu$ L 20mM dNTP 於 70°C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 $\mu$ L。於 25°C 作用 10 分鐘，50°C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85°C 作用 15 分鐘。PCR：病毒分析引子對為 Mon269 及 Mon270。以 RT 產物 2 $\mu$ L 為模板，加入 11.5 $\mu$ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 $\mu$ M 每個分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 1 分鐘、annealing 50°C 1 分鐘、extension 72°C 1 分鐘，共 30 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 449bp，進一步做序列分析。

- (4) salivirus/ klassevirus RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板，加入 1 $\mu$ L 10 $\mu$ M 隨機引子及 2 $\mu$ L 20mM dNTP 於 70°C 作用 10 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，

內含 200U 反轉錄酵素 (Invitrogen SuperscriptIII Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 $\mu$ L。於 25 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘，50 $^{\circ}$ C 50 分鐘反轉錄作用，之後 85 $^{\circ}$ C 作用 15 分鐘。Nest-PCR：以 cDNA 產物 1.5 $\mu$ L 為模板，加入 23.5 $\mu$ L PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4  $\mu$ M 每個分析引子 (SAL-F1/ SAL-R1)，作 3C-3D 片段序列 PCR，先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 95 $^{\circ}$ C 1 分鐘、annealing 55 $^{\circ}$ C 1 分鐘、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。以第一次 PCR 產物 1 $\mu$ L 為模板，加入 24 $\mu$ L PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4  $\mu$ M 每個分析引子 (SAL-F2/ SAL-R2)，作 3C-3D 片段序列 nest PCR，先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 95 $^{\circ}$ C 45 秒、annealing 57 $^{\circ}$ C 45 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 390bp，進一步做片段序列分析。

- (5) Picobirnaviruses RT-PCR: 病毒 RNA 萃取液 5 $\mu$ L 為模板，加入 1.5 $\mu$ L 20 $\mu$ M 引子對 (B25/B43)，於 97 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後，馬上將反應管置於冰上後；再加入 40 $\mu$ L RT-PCR 混合液，反應總體積為 50 $\mu$ L。於 45 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘，95 $^{\circ}$ C 15 分鐘作用。PCR 反應條件：熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒、annealing 45 $^{\circ}$ C 30 秒、extension 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，共 35 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ C 7 分鐘。將 PCR 產物進行電泳分析。

(6) Adenoviruses PCR: 病毒核萃取液 2.5 $\mu$ L 為模板, 加入 12.5 $\mu$ L PCR premix, 含有 1X PCR Buffer、2.5 unit HotStarTaq DNA Polymerase、200 $\mu$ M of each dNTP, 及各 5mM Adhex1/Adhex2 分析引子。反應條件: 先 95 $^{\circ}$ C denaturation 作用 15 分鐘, 熱循環 denaturation 94 $^{\circ}$ C 30 秒、annealing 60 $^{\circ}$ 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。

#### 5、 其他新興病毒:

(1) HPeV real-time RT-PCR[44,45]: 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 400nM, 螢光標的的探針濃度為 200nM。反轉錄作用為 50 $^{\circ}$ C 30 分鐘, 接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘, 再進行 PCR 反應 40 個循環: 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 58 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 10 分鐘; 45 $^{\circ}$ C, 60 分鐘; 95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 30 秒, 42 $^{\circ}$ C 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒，共 35 個循環，最後 72 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 6 分鐘做熱起始，PCR 2A 反應為 95 $^{\circ}$ C 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒, PCR 2B 反應為 95 $^{\circ}$ C 30 秒, 44 $^{\circ}$ C 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒，40 個循環反應，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。

- (3) Rabies virus L gene RT-PCR[46]：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。

### (三) 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的更新

- (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) 依據使用者之使用建議或功能需求，定期更新或新增系統功能。例如：因應可能的新增病原體資料，更新基因分型資訊，規劃設

計適合的資料上傳及儲存模式。而更新後的統計報表介面，可計算使用者登入情況，以及進行資料庫中序列以及流行病學資料數目的統計。

- (3) 目前擬定的病原體基因資料庫開放原則為前半年蒐集完成之序列與對應流行病學資料，如：採檢日、性別與年齡。除了本局提供的資訊外，也將 WHO 公佈之流感疫苗資訊以及國際上相關病原體序列資訊存入資料庫中，如：國際間最知名的資料庫 NCBI，可以增加使用者的操作便利性，亦可節省比對所需的時間。
- (4) 分析功能：除了更新現有之即時比對、多序列排列、親緣樹狀圖繪製、序列比對 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)、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功能之外，亦不斷規劃設計相關的分析功能。
- (5) 規劃增加相關資源項目，提供使用者常見的網路資源連結、參考文件或工具軟體下載使用。
- (6) 使用者若需要完整資料則須向權責單位依本網站所提供病原體基因資料序列申請規範文件來申請，其申請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再培養、入庫保存。
- (2) 進行病毒核酸的萃取、反轉錄酶及聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)、PCR 產物純化以及 Cycle Sequencing 等，進行核酸染劑純化後上機 (現有機型

為 ABI 3730 核酸定序儀) 進行序列判讀,最後進行序列修補及比對分型。

- (3) 挑選病毒核酸序列, 連同國內外參考病毒株序列, 使用 BioEdit 軟體進行多序列排列比對。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。
- (4) 將整理過後的序列進行各序列位點變化的分析, 並將變異程度較大或者是抗原決定位、抗藥性相關的位點進行分析。
- (5) 使用 ClustalW2 套件或於本機使用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 5 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。
- (6) 合併流行病學資料 (包含年齡、性別、城市及發病日等詳細資料) 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) 肺炎、腦炎、未知感染原及不明原因快速死亡與群聚事件監測結果

##### 1、 肺炎重症監測結果

2012年1月至11月，共計201個肺炎重症通報個案，其中呼吸道檢體，使用病毒 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組(包含 influenza A, influenza B, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinoviruses, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type1, 2, 3, 4, coronavirus 229E/OC43/NL63/HK, human bocavirus, HHV6, HPeV, VZV, enterovirus 等 22 個病毒檢測)與細菌培養方式進行檢驗，201 例案中 110 例(55%) 檢驗出病原體，其中 38 例檢驗出兩種以上同時感染 (表四)。15 例 CMV 陽性中有 11 例有同時檢驗出其他感染；11 例 HSV1 陽性中有 7 例有同時檢驗出其他感染。相對的，11 例 rhinovirus 陽性中只有 1 例有同時檢驗出其他感染，4 例 metapneumovirus 陽性中沒有同時檢驗出其他感染 (表四)。在時間分布上，B 型流感有 10 例、H3N2 8 例、H1N1pdm09 3 例，B 型流感與 A 型流感 H3N2 主要集中在 1-3 月與社區病毒流行時間相似 (圖一)。

##### 2、 腦炎及未知感染原監測結果

2012年1月至11月，共計119個腦炎或未知感染原通報個案，使用病毒 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組 (包含 influenza A, B, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinoviruses, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type1-4, coronavirus 229E/OC43/NL63/HK, human bocavirus, parvovirus B19, HHV6-8, HPeV, VZV, enterovirus, Japanese Encephalitis virus, dengue virus, West Nile virus, *Toxoplasma gondii*, mycoplasma,等 30 種病毒檢測) 進行檢驗，119 例個案中 34 例(28.6%)

檢驗出病原體。共 306 個檢體中 108 件血清檢體，7 件檢驗出病原體，其中 1 件驗出兩種病原 (表五)；99 件腦脊髓液檢體，4 件檢驗出病原體 (表六)；94 件咽喉拭子，28 件檢驗出病原體，其中 5 件檢驗出兩種病原 (表七)；其他檢體(包括胸水、腹水及前房液等)5 件，2 件檢驗出病原體 (表八)。HHV7 最常出現在咽喉拭子檢體中，亦常伴隨著其他病原同時檢測出，例如 HHV6，Rhinovirus 及 human metapneumovirus (表七)。

### 3、 疑似接種疫苗不良反應、群聚事件及快速死亡個案監測：

2012 年 1 月至 11 月，共計 2 個疑似接種疫苗不良反應、1 個疑似群聚事件及 5 個快速死亡通報個案。其中一起疑似接種疫苗不良反應解剖檢體中驗出高量之 human parvovirus B19 病毒。個案為 11 個月大女嬰，接種流感疫苗隔天猝死，經法醫研究所解剖後通報，送驗 20 個檢體，包括心臟、脾臟、肺臟、肝臟、基底核、骨髓等組織以及肋膜、氣管、心包膜液、軟顎、顱底、腦幹等病毒拭子以及心臟血。經 30 種病毒檢測之 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組檢驗，組織檢體中心、肝、肺、脾臟及心臟血均驗出 human parvovirus B19 病毒，腦幹、基底核及骨髓中未驗出病毒。其餘檢體拭子擦拭檢體部分亦驗出 human parvovirus B19 病毒 (表九)。其接觸者(個案女嬰之母親與姐姐)血液檢體亦驗出 human parvovirus B19 病毒 (表九)。

疑似群聚事件指標個案為台中某大學牙醫系學生因呼吸道及腦炎症狀住院後死亡，其同學陸續出現呼吸道感染亦或步態不穩症狀，經 30 種病毒檢測之 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組檢驗，指標個案腦脊髓液檢體中偵測出 human Bocavirus 病毒基因。7 名接觸者中，5 名咽喉拭子檢體中偵測出 human herpesvirus 7;這 5 名中的其中兩名，另偵測出 human coronavirus HKU1 (表九)。5 個快速死亡通報個案中 3 起驗出病

原，分別為 FluB，EBV 及 parainfluenza virus 3 (表九)。

## (二) 病例分析

本研究對於所通報的病例會進行通報條件審閱，如果不符通報條件，即不納入分析。病例的研判主要參考 Glaser CA 等的分類進行研判(表三)[6]。如果對於所檢出的病原體在歸類上仍有所疑義，則會參考 Granerod J 等的作法進行研判[47]。對於沒有病原體檢出且血清學檢驗亦為陰性的病例，由於判斷病因不易，因此將之全歸為”其他”這類，並參酌出院病摘附加說明可能的診斷 (如 ADEM 或 CVA 等)。

### 1、 通報腦炎病例分析：

研究計畫期間收集的腦炎個案扣除無法進行病歷查閱及排除收案的個案後，共查閱 32 位個案病歷，其中男性佔 22 位(69%)，年齡 18 歲以下、18-64 歲，65 歲以上個案分別有 9 位(28%)，17 位(53%)，6 位(19%)，所有個案的年齡中位數為 45.7 歲(最小 1.0 歲，最大 82.5 歲)。這些個案在發病時的症狀如表二所示。除上述症狀外，另有部分出現半癱、流口水、人格改變等症狀。32 名個案中，9 名(28%)有糖尿病，2 名(6%)為 HIV 帶原者，1 名(3%)為慢性腎功能不全患者。這些個案除一名在發病時有呼吸道症狀，家人亦有呼吸道症狀(但無神經系統症狀)外，其餘都是散發個案，無群聚現象出現。

這 32 名個案中，27 名(84%)在腦部電腦斷層或核磁共振檢驗有異常的影像。所有個案皆為住院病患，其中收治於 ICU 者共 23 位(72%)，插管治療者共 16 位(50%)。治療的藥物上，13 位(41%)曾使用類固醇藥物治療，22(69%)曾使用抗病毒藥物治療，另 6 位(19%)使用 IVIG 治療。經過治療後，有 9 名(28%)痊癒，14 名(44%)急性期後仍有神經學後遺症，5 名(16%)死亡，另有 4 名(13%)因轉診其它醫院治療失去追蹤。這些神

經學後遺症包含智能障礙(1名, 3%), 語言障礙(2名, 6%), 植物人狀態(2名, 6%), 呼吸功能障礙(仰賴呼吸器)(1名, 3%), 肢體運動障礙或偏癱(7名, 22%), 人格改變(2名, 6%), 情緒障礙(1名, 3%), 癲癇(1名, 3%)。

## 2、 通報腦炎可能及確定病例分析：

這 32 名個案經研判後，有 2 名為確定病因個案，皆診斷為 HPeV encephalitis，另有 8 名(25%)個案為可能病因個案，包含 5 名為疑似流感病毒腦炎/腦病變，1 名疑似 Human herpes virus 1 腦炎個案，一名疑似 *Mycoplasma pneumoniae* 造成的腦炎個案，及一名同時自有分泌物的咽喉分離出 Adenovirus 及血清檢測 Epstein-Barr virus IgM 陽性的個案。22 名(69%)未檢測出病原的個案中，經由臨床表現及其它檢驗，醫師診斷 1 名 HIV 帶原者為 progressive multifocal leukoencephalopathy，1 名為 cerebral amyloid angiopathy，有 2 名診斷為疑似結核性腦膜腦炎，有 3 名診斷為疑似缺血性腦中風，4 名診斷為疑似自體免疫相關的腦病變，1 名診斷為高血壓性腦病變，另 1 名診斷為 subcortical arteriosclerotic encephalopathy。

確定病因的 2 名 HPeV 腦炎，其中一名是 72 歲的女性，她曾在 2005 年因水腦接受腦脊液引流手術，此後有癲癇的病史。她因持續的肌肉無力及抽搐而被送至北部某醫學中心，入院時的昏迷指數為 E2V1M3，院方給予插管急救治療，最後雖然存活下來，她須仰賴呼吸器維生而轉至呼吸照護病房治療。她的腦脊液及血清都檢測到 HPeV，咽喉拭子則檢測出 HSV1 及 HPeV。另一位為 49 歲女性，有糖尿病及高血壓病史。她因複視及下肢麻木到北部某醫學中心就醫，住院期間的核磁共振檢查發現背側中腦，腦室旁白質，及兩側下視丘等有病灶，曾接受類固醇治療

後痊癒出院。她的腦脊液，血清都檢測出 HPeV，另咽喉檢測出 HHV7。

### 3、 通報肺炎重症病例分析：

本計畫研究期間，累計完成 288 名肺炎重症病例調閱，研判後符合收案定義計 102 名病患，另尚有 62 名病例待研判。在 102 名病例中，男性 64 名，女性 38 名，年齡中位數為 57 歲（範圍未滿一歲至 93 歲）。79 (77%) 名具慢性疾病史，包含：慢性肺病 12 (12%) 人，糖尿病 36 (35%) 人，惡性腫瘤 11 (11%) 人，腎臟疾病 11 (11%) 人，肝臟疾病 8 (8%) 人，心血管疾病（含高血壓）44 (43%) 人。住院中位天數為 24 天（範圍 2-175 天），加護病房（含呼吸照護中心）住院中位天數為 14 天（範圍 2-131 天）。以病程嚴重度而言，有 10 (10%) 名病患需接受血液透析，97 (95%) 名需要呼吸器治療，20 (20%) 名需葉克膜治療，37 (36%) 名病患死亡，其中 17 (17%) 名病患於住院 30 天內死亡。

在 102 名病例中，檢驗均陰性的比例為 38% (39/102)，檢驗陽性的病原體以病毒為主，佔 45% (46/102)。其中有 12 (12%) 名病患，檢出兩種以上的病原體。依病原體臨床表徵和流行病學的特徵分析檢驗結果，共 54 (53%) 名為確定病因，7 (7%) 名為極可能病因，7 (7%) 名為可能病因，詳細資料如表十。初步分析，檢驗皆陰性的個案，除入院時白血球指數較高外 (WBC:13536 VS. 9462,  $p=0.01$ )，其他血液、生化檢驗數值、慢性疾病史、住院天數、接受血液透析、呼吸器治療、或葉克膜治療等，與檢驗陽性者無統計上差異。

### (三) 病毒合約實驗室之陰性檢體、未知或無法分型之病毒株

收集 2011 至 2012 年病毒合約實驗室分離之腸病毒株，篩選無法分型與定序之病毒，以新興病毒分生檢測方法找到 HPeV 共 17 株。再將 HPeV 之核酸序列以軟體 Molecular Evolutionary Genetics Analysis



(MEGA) version 4 進行多重序列排比，採用“Neighbor-joining”方法，重複計算 (Bootstrap) 1,000 次作演化樹分析，其中 11 株為 HPeV1，另外 6 株為 HPeV3，經演化樹排列，發現與 2007 年主要之 HPeV3 產生較大的變異 (圖二)。在 117 支無法分型與定序之檢體，檢測出 Human Rhinovirus (HRV) 共 28 件為最多，其次為 EV68 有 11 件，其他有 Coxsackievirus A 型 10 件 (A2, A6, A10)、Coxsackievirus B 型 9 件 (B3, B4)，EV71 有 3 件，2 件 Ecovirus (E3, E6) 與 1 件 Adenovirus。其中有兩株病毒株發現同時存在兩種病毒，分別為 HPeV3 與 Coxsackievirus B4、HPeV1 與 EV71。

#### (四) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

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

- (1) 2012 年肺炎重症檢驗流程新增檢驗項目至 24 種病毒，包含 influenza A, B viruses, human adenovirus, RSV, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, new novel CoV 2012), human metapneumovirus, parainfluenza type 1-4, HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, parvovirus B19, enterovirus, rhinovirus, HPeV。腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至 31 種病原，除上述 24 種病毒外，新增 HHV7,8, Japanese Encephalitis virus, dengue virus, West Nile virus, *Toxoplasma gondii* 及 mycoplasma。
- (2) 2012 年沙烏地阿拉伯與卡達發現新型冠狀病毒案例，依據文獻 [48-50] 建立兩組 real-time RT-PCR, (upE-Fwd-GCAACGCGCGATTCAGTT, upE-Rev-GCCTCTACACGGGACCCATA, upE-Prb-FAM-CTCTTCACATAATCGCCCCGAGCTCG-TAMRA,

ORF1b-Fwd-TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT,  
ORF1b-Rev-TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG,  
ORF1b-Prb-FAM-CCCGTAATGCATGTGGCACCAATGT-TAMRA  
)，並製備 positive control。另建立兩組 RT-PCR 方法可檢測  
coronavirus (Pan-CoVF (1st and 2nd nested)  
-ATGGGITGGGAYTATCCWAARTGTG, Pan-CoVR1 (1st nested)  
-AATTATARCAIACAACISYRTCRTCA, Pan-CoVR2 (2nd nested)  
-CTAGTICCACCIGGYTTWANRTA,  
Cor-FW-ACWCARHTVAAYYTNAARTAYGC,  
Cor-RV-TCRCAYTTDGGRTARTCCCA。將 upE real-time RT-PCR  
加入肺炎重症檢測之例行檢測套組。

- (3) 釐清通報個案檢驗結果陰性個案之可能病原體，例如：某精神科醫院上呼吸道症狀群聚事件，通報疑似 influenza、adenovirus 及 RSV 等三項病原感染，經前述檢驗陰性後，以 virus panel 檢驗，發現為 human metapneumovirus 群聚感染。

## 2、微陣列晶片：

- (1) TWCDCCChip 病原體微陣列檢測晶片更新第三版，總計 32,264 條探針，包含 55 科 1,070 種病毒、31 屬細菌與 6 屬寄生蟲之序列。2012 年增加檢測出 HHV7 與 rabies virus，累計經實際實驗確認已可檢測出 34 種病毒，包含 adenoviruses, enteroviruses-EV71, rhinoviruses, influenza A H1N1, H3N2 viruses, influenza B virus, rotaviruses, norovirus, dengue virus type 1-4, yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, chikungunya virus, coronavirus, human cytomegalovirus (CMV), human respiratory syncytial virus (RSV), human parainfluenza virus type 1, 2, herpes

simplex virus type 1 (HSV1), TT virus, mammalian orthoreovirus, cardiovirus, human metapneumovirus, HIV, HCV, HBV, EBV, aichi virus, human parechovirus, HHV7, rabies virus。

(2) 臨床檢體中，12 例肺炎重症通報個案為 multiplex real-time RT-PCR 與培養陰性者，進行微陣列晶片檢測，檢測結果陰性臨床檢體中，1 例為 HHV7 (經 PCR 確認)，其餘仍無發現其他病原體。

(3) 2012 年本局持續與美國 LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL LABORATORY(LLNL) 合作，使用其 pan-Microbial Detection Array (MDA)的晶片與分析系統 (LLNL-MDA 病原體微陣列檢測晶片第二版)[51]，分析 38,000 個病毒序列(約 2,200 種病毒)和 3,500 個細菌序列(約 900 種細菌)，設計的探針數目為每條病毒序列 10 個以上探針，細菌序列 15 個以上探針，總計約 72,000 條探針，探針序列儘可能除去與人類染色體序列反應之區域。

### 3、 新世代高通量定序：

2012 年 1 月至 6 月底通報腦炎或未知感染原之個案，有腦脊髓液檢體共 59 個，去除 19 個個案有病原檢出(包含血清、拭子或其他檢體)，剩餘 40 個陰性個案之腦脊髓液檢體分別以新一代高通量定序儀 Ion torrent 及 Pacific Bio 進行核酸序列分析。此次實驗 spike in parainfluenza virus 2 (RNA virus)及 HSV1 (DNA virus)作為 indicators。由於腦脊髓液內含核酸量極少，經 Reverse transcription 後之量恐不足以進行高通量定序。因此，此次以 NuGen 之 Ovation RNA-Seq System V2 之 SPIA primer，在 RT 過程中進行增幅 (amplification)，較傳統 RT 方法可取得大量之 cDNA，利於高通量之進行。合成完之 cDNA 分別以 Ion torrent

及 Pacific Bio 進行核酸序列分析。Ion torrent 共得到 22,717 筆非人類基因序列，比對後 spike in 之 parainfluenza virus 2 (RNA virus)及 HSV1 (DNA virus)分別出現 107 及 12 筆序列，其餘病毒序列如表格，進一步 PCR 確認正進行中。

以 Pacific Bio 進行之高通量序列分析中，其 library 無法成功建置，目前尚無法得知真正原因，刻正與廠商討論分析可能原因。

#### 4、 症狀通報、群聚事件而檢測為陰性檢體

透過今年通報腹瀉群聚或食物中毒採檢之糞便檢體，先以常規檢驗諾羅病毒與輪狀病毒，挑選檢驗均陰性之群聚，進行新興腹瀉病毒之分析。本年共挑選 312 件糞便檢體，分別來自 91 起群聚，進行腹瀉新興病毒：adenovirus、aichivirus、astrovirus、sapovirus 與 salivirus/klassevirus 之 RT-PCR 或 nest PCR。

陽性數如下：astrovirus 陽性 35 件(11.2%)，其中有 1 件 astrovirus 陽性與 norovirus 混合感染；sapovirus 陽性 23 件(7.4%)；adenovirus 陽性 9 件(2.9%)；aichivirus 陽性 1 件(0.3%)。

Astrovirus 35 件陽性檢體，分別屬於 18 起群聚(食因性 14 起及 4 起腹瀉群聚)，年齡分布 6-61 歲，但主要發病者以成人為主，群聚散佈在 1-7 月間。sapovirus 23 件陽性檢體，分別屬於 7 起群聚(食因性 5 起及 2 起腹瀉群聚)，年齡分布 0-20 歲與 41-60 歲間，群聚散佈在 1-6 月間，以 6 月群聚最多；本年流行的 sapovirus 病毒株與過去我國病毒基因序列比對分析，均屬於 GI/2，病毒分析如圖三。adenovirus 9 件陽性檢體，分別屬於 8 起群聚(食因性 5 起及 3 起腹瀉群聚)，分布於 3-7 月間。aichivirus 1 件陽性檢體，為發生於中學之食因性群聚。各病毒

引起的群聚事件月份分布如圖四。

#### (五) 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) 「序列資料比對」功能，藉由序列資料比對，可得知與台灣或世界各國的序列資料之相似程度，並可初步判斷此病原體種類及型別，或探知是否為新型的未知病原體。此外，我們每半年便更新國際資料庫以求比對結果的完整性。例如 2009 年時，便利用序列比對確認國內首例新型流感重症病例。而「多重序列排比及親緣樹狀圖之繪製」功能可以繪製親緣樹狀圖來更進一步分析序列彼此間的親緣關係。
- (2) 「序列引子設計」功能採用 Primer3 套件，使用者僅需上傳序列及設定參數後即可計算出合適的引子，並可下載結果報表作為設計之參考。
- (3) 「腸病毒 71 型病毒亞型比對」以及「流感病毒疫苗株比對」功能，使用者經由單筆序列或者大量資料批次輸入並比對後，分別可得知最可能的腸病毒 71 型基因亞型或流感病毒疫苗株型別。我們定期更新 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)，以達到序列比對的準確性，例如 2013 南半球疫苗株及 2012-2013 北半球疫苗株皆為 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus、A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus 與 B/Wisconsin/1/2010-like virus，而歷年來的建議疫苗株亦已整理列表供大眾下載利用；而腸病毒 71 型的部份則是於今年新增 C2-like 亞型資料，目前總計

有 A、B1-B5、C1-C5 及 C2-like 亞型可供比對。

- (4) 「流病資料或序列資料查詢」，本資料庫彙整序列資料以及流行病學資訊，使用者可以年份、月份、流病資料類別的下拉選單查詢系統目前收錄的流行病學資料（包括流水號、病人編號、年齡、性別、城市及發病日等詳細資訊）、以及序列的詳細資訊報表（包括序列編號、類型、Virus、Locus、發病日等不同欄位）。截至 2012 年，基因資料庫儲存之病原體資訊共包含 2005 年至 2011 年間發生之流感病毒 13,904 筆（含近千筆 NA 基因序列）、腸病毒 10,125 筆、腺病毒 1,206 筆序列資料，對於基因演化分析或流行病學分析皆可提供極高的參考價值（圖五）。
- (5) 在資料庫的使用狀況部份，截至 2012 年 11 月為止，已有 420 位的註冊者，以及將近三千人次之登入次數與超過三萬一千人次的瀏覽次數。註冊者的身份經過分析顯示約有 52% 屬於各學校人員、約 16% 屬於醫院相關人員，顯示本資料庫可以提供學術或臨床研究上的參考（圖六）。

## 2、 基因資料庫的防疫成效：

- (1) 在今年擴充病原體相關資料之後，本資料庫的內容更加豐富，可對於國內腸病毒、流感病毒、腺病毒研究有著重大幫助，如：影響國人甚鉅的腸病毒 71 型經由我們序列資料的比對，證實台灣地區 2006-2007 年間出現新引入的腸病毒 71 型 C5 以及 B5 亞型；2008 年年初則是確認當年腸病毒重症之病原體主要為腸病毒 71 型之 B5 基因亞型，與中國大陸大流行之 C4 基因亞型不同，證實兩岸腸病毒疫情無直接關係，並提出該年腸病毒可能大流行之預警；2010-2011 年主要流行亞型為 C4 基因亞型，並由親緣樹狀

圖得知與中國大陸病毒株相當類似，推測為其可能傳播之來源；而 2012 年則是再度以 B5 亞型為主，但其序列與前幾年病毒相比則稍有變異。

- (2) 流感病毒的部份則是與 WHO 建議之流感疫苗株資料庫 (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) 進行 BLAST 比對或繪製親緣樹狀圖，藉此了解所分析比對序列的最相近疫苗株究竟為何，此結果除了可分析病毒株的型別、確認病毒來源，還可初步判斷流行病毒株與建議疫苗株的抗原性差異，亦可輔以抗體相關資料來評估疫苗保護力是否足夠，對於流行趨勢的預測、疫苗株的研發選擇或防疫政策的制定都有相當大的參考價值。另一方面，目前新增的 NA 基因序列包含了 Neuraminidase 抑制劑抗藥株與非抗藥株資料，亦可作為抗藥性相關研究的參考依據。
  - (3) 除此之外，腺病毒的歷年序列資訊亦提供作為 2011 年腺病毒流行的分析參考依據，並發現到一直存在的 HAdV type3 及新興的 HAdV type7 可能為其主因，此結果亦已發表於國際期刊。
- 3、發現今年腸病毒 71 型有部分檢體出現傳統 RT-PCR 陰性而培養結果為陽性之情形，但進一步比對其 VP1 序列與 RT-PCR 所使用之引子，兩者間無太大差異，可能為病毒量的多寡影響 RT-PCR 之敏感度。
  - 4、狂犬病之病毒檢驗，今年 7 月 23 日接獲一分局通知疑似狂犬病感染個案自大陸返台就醫，針對該個案檢體，實驗室緊急進行分生檢驗，檢測臨床檢體之狂犬病病毒核酸，結果唾液拭子與腦脊髓液檢體皆呈陽性，經核酸序列比對結果，該個案確定為狂犬病病

毒感染，且比對後發現與大陸湖北省武漢實驗室發表之序列 (EU159377, Rabies virus isolate QC nucleoprotein gene) 最為相似。



## 四、討論

### (一) 未知/新興傳染病監測

- 1、 在目前收案定義下，需呼吸器治療的病患佔九成以上，確實反應肺炎重症的病患族群；雖近四成的病患者找不出病原體，但就目前收案的資料分析，尚未發現特定的臨床表徵或潛在疾病等因素，可協助釐清可能的病原體。
- 2、 在過去的研究，病毒佔社區性肺炎的病因比例為 10-23% [52]。本計畫中，病毒佔約四成五的病因，推測可能的原因如下：(1) 因為監測的目標族群為無確定診斷的肺炎重症病患，因此若有明確病因者，就不會被納入，故有可能高估病毒的比例。(2) 由於目前檢驗技術的進步，可能過去無法診斷的病毒性肺炎，可藉由 mutiplex PCR 進行診斷。
- 3、 美國感染症或胸腔學會於 2007 年曾建議，針對嚴重社區型肺炎的病患，應進行 legionella urine antigen 和 pneumococcal urine antigen 檢測，本研究收案的病患，細菌學的檢驗以醫院端為主，儘管絕大多數個案進行一般性細菌學檢驗，但曾進行 legionella urine antigen 檢驗的比例佔 55%，而 pneumococcal urine antigen 的比例為 37%。近年來，加拿大、西班牙、美國、英國等國家，陸續報導退伍軍人菌群聚的疫情，也許未來可以朝非典型肺炎的細菌性病原體，研擬進行 PCR 檢測的可能性，以偵測是否有嚴重疫情的發生。
- 4、 在腦炎病例分析期間，32 名個案中僅有 10 名 (31%)找到確定病因或極可能病因。腦炎或腦病變的確定診斷，有賴於在腦組織或

腦脊髓液中檢測出致病原。這樣的條件在大部分的情況下，都無法達成。因此，腦炎或腦病變的診斷常是由臨床表現或其它檢驗診斷推測研判而來。這也說明未來未知感染原計畫的腦炎病原的診斷更進一步發展的空間仍很大。

- 5、本研究期間檢測出兩例確定病因的 Human parechovirus (HPeV)腦炎，HPeV 是近年來新命名的病毒，它是屬於 *Picornaviridae* 科，包含以往命名為 Echovirus 22 及 Echovirus 23 的腸病毒。它可以引起呼吸道或是腸胃道的症狀[24]。HPeV 也是引起腦炎的病原之一[23,53,54]。我們的病例除了在腦脊液中檢測到 HPeV 外，另在血清中亦檢測到此病毒，其中一位另在咽喉拭子中檢測到此病毒。加上這兩例個案都有明顯的神經學症狀，臨床上符合腦炎的表現，我們認為 HPeV 應是她這兩個個案感染性腦炎的致病原。以往文獻上 HPeV 造成的人類疾病，主要為兒童或新生兒的感染。就我們文獻查閱的結果，成人因 HPeV 感染導致的腦炎病例非常罕見[55]。我們的發現可能增加了醫學界對於這個病毒的瞭解，這個病毒對於人類腦炎的致病性須要未來更多的研究才能更清晰。
- 6、中部某大學學生呼吸道群聚感染及腦炎群聚調查中無法直接證明指標個案與接觸者相關，但相關接觸者偵測出 HHV7 及 coronavirus HKU1，為避免恐慌，本局對衛生局及校方說明檢驗結果及後續持續監測，並未有疫情擴大之虞。
- 7、此次經由本計畫開發之檢驗平台及監測，第一時間釐清個案死因與疫苗接種之相關性，由於接種流感疫苗後產生的不良事件一旦經由媒體擴大解讀，將嚴重影響民眾接種流感疫苗的意願，甚至

導致流感疫苗接種政策失敗。因此，面對流感疫苗的不良事件，迅速正確地提供社會大眾不良事件調查結果將有助於釐清民眾的疑慮。

- 8、 在分析無法定序分型之腸病毒中，Human rhinovirus (HRV)為目前細胞培養檢驗方法最不容易鑑定出之病毒，這可能是因為 HRV 與腸病毒都屬於小 RNA 病毒科，在腸病毒高度保留區之序列變異不大，因此以腸病毒分生檢測可同時分析到 HRV 之病毒，而部分型別之 HRV 病毒也可能造成細胞病變，但卻無法以間接螢光染色法鑑定病毒種類，造成合約實驗室培養出無法分型之 HRV 病毒，最終研判為腸病毒感染；但 HRV 病毒為引起普通感冒常見的病毒，主要造成上呼吸道的感染，藉由腸病毒的監測，也可同時分析國內 HRV 出現之型別，以今年為例，HRV44 為最常出現之型別，佔所有 HRV 病毒比例 57%。
- 9、 今年發現 HPeV 的總數量較往年為多，其個案發病年為 2011 年 9 件、2012 年 7 件。而 6 件 HPeV3 有 5 件個案為 2011 年發病，且其居住地集中於台中市、雲林縣與彰化縣，疑有地緣關係，且於演化樹分析中，與 2007 年之 HPeV3 於不同分支，可能為不同亞型，但個案發病期間較為分散 (8~11 月)，無法定義為群聚感染。2012 年發現之 HPeV1 病毒也與往年病毒序列有較大的差異，約有 10.6~14.9% 的變異，但與 2010 年所找到之 HPeV1-TWN-139\_2010 較相似，在演化樹中形成同一群。綜觀歷年之 HPeV，其發病年齡多為 3 歲以下之幼童，比例為 73.5%，僅有兩例個案年齡大於 25 歲，皆為 HPeV3，從性別來看，發生於男生的比例較女生稍高，男女比為 1.4:1。HPeV 的病人最常見之

臨床症狀為發燒 (88.2%)，HPeV1 最常伴隨鼻炎與頭痛，HPeV3 則多有咽喉疱疹之症狀而被診斷為手足口病，其症狀無特異性，使得臨床醫師也可能懷疑為呼吸道病毒感染，而國外文獻指出 HPeV3 感染之個案症狀較 HPeV1 嚴重，會影響中樞神經造成短暫性麻痺，或者在新生兒造成敗血症[56]，但在國內感染 HPeV1 或 HPeV3 造成疾病的嚴重程度並沒有太大的差別。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

1、 Pacific Bio 無法完成 library 之建置，推測有二，與 NuGen 之 Ovation RNA-Seq System V2 合成之 cDNA 有關。一、是否因 Ovation RNA-Seq System V2 之 SPIA primer 5'端沒有 phosphate，使 Pacific Bio 無法進行 ligation 製作 circular DNA 之 library。二、cDNA 中形成太多 nick。由於 Pacific Bio 合成序列以 rolling circle 方式進行，因此會以 exonuclease 去除 nicked cDNA，因此若有太多 nick，將無法製造足量的 library。

2、 病毒檢測陰性檢體之新興/再浮現病毒檢驗之開發 (腹瀉病毒)：

(1) 本研究計畫經由腹瀉常規檢驗陰性之檢體中，增加多項與腹瀉相關病毒檢測項目，檢出群聚總數占本年 1-9 月間群聚總數之 31.45%。由於過去國內腹瀉群聚或食物中毒事件之監測以諾羅病毒與輪狀病毒為主，對於其他可能引起腹瀉之相關病毒監測資料並不多，本年分析資料顯示 astrovirus、adenovirus 及 sapovirus 等引起群聚數不低值得特別留意，此外，雖 aichivirus、astrovirus 與 salivirus 群聚數不多，但可證明這些新興病毒仍有造成疾病之威脅。因此該項病毒值得持續監測，以了解我國食媒性與腹瀉性病原之感染與流行整體概況。

(2) 2007 年國內首例 sapovirus 引起腹瀉群聚，發生於新北市（原台北縣）一所大學，造成 55 名師生出現噁心、嘔吐、腹瀉等不適症狀，送驗 8 件檢體中，有 7 件為 sapovirus 陽性，其基因型為 GI/2[57]；2010 年 sapovirus 也引起台中市（原台中縣）一家餐廳腹瀉群聚[58]；2011 年由於本計畫之執行擴大檢驗範圍，共找出 18 例之 sapovirus，為五起群聚事件之主要致病原，另分析其基因型別與發生地點，則顯示國內存在有之 sapovirus 散佈於不同縣市。本(2012)年群聚事件共 8 起，主要發生場所以學校與餐廳為主，其中一起發生於國內著名連鎖餐廳之疑似進口生蠔引起的食物中毒事件。從發生場所與年齡層，推測 sapovirus 的傳播途徑與諾羅病毒類似，可透過人傳人或由食媒性途徑散播，但因食物中毒事件仍缺乏足夠的疫調系統，無法將每起事件發生原因詳加分析比較。

### (三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

- 1、 本資料庫所包括的基因序列資料，可協助鑑定以往傳統方法無法區分血清型之病原體，流行病學資料則可用於追蹤疫情、探討致病原、預測流行幅度及擬訂防治策略的重要參考依據，而這些為數眾多且橫跨數年的資料皆經過彙整整合過，極具有實用性與樣本代表性。除了持續更新資料庫之外，我們亦不斷地設計小工具以便於資料分析。目前我們每半年進行一次資料庫資料的更新，包括了本局的病原體資料、流感疫苗株資訊、腸病毒 71 型亞型資料以及 NCBI 的序列資料等，力求使用者能夠獲得最佳的使用效率。目前資料庫中包含了流感病毒的 HA 與 NA 基因、腸病毒的 VP1 基因、腺病毒的 hexon 基因，這些基因位置的挑選乃是基於

抗原性相關性、基因分型便利性、以及抗藥性相關的區域。

- 2、除了上述基因序列之外，與腸病毒分型相關的 VP4 基因、與病毒重組有關的非結構蛋白基因 (3C, 3D 基因)，或者是流感病毒另外一個與抗藥性相關的基因 (M 基因)，皆是未來基因資料庫的擴充目標。當然，擴大收錄的重要病原體種類亦是我們所努力的另一重要目標。除此之外，我們已規劃一項結合流行病學資訊與序列資料位點分析的 proteotyping map 功能，近期內測試完畢後即可開放給大眾使用。
- 3、透過此次狂犬病個案檢體之檢驗，因配合其醫療過程，每週送檢唾液檢體，實驗室以敏感度較高之分子生物診斷方法進行檢驗，最初一個月皆呈陽性反應，第二個月有三次送檢檢體結果為陰性，但後續又再採檢確認，結果仍有陽性反應，可知狂犬病病毒有間歇性釋出的情形。

## 五、結論與建議

- (一) 不明病原體以及新興與再浮現性病原體所引起的傳染性疾病，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，且造成社會大眾的恐慌。當疾病發生時，正確與儘早地尋找致病的病原體，可降低此疾病的衝擊，且提供防疫策略制定的參考，故建立一個探索與檢驗未知病原體的團隊，有其必要性。2012年新型冠狀病毒、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，因有完整的團隊，即時建立檢驗方法與釐清感染源，可避免這些事件對社會造成衝擊。
- (二) 高通量DNA定序方法日新月異，基因序列資訊快速累積，病原體序列亦是如此，應加強培育生物資訊人才，分析與應用大量的病原體序列資訊，轉化成檢驗病原體的知識，並能應用於疾病的防治。
- (三) 持續引起腹瀉與食因性感染病原之監測，已建置完整的監測流行病學與流行病毒資料。
- (四) 為了解群聚事件之發生原因與病毒感染之相關性，有必要建置完整的食物中毒或食因性群聚事件疫調資料庫，未來與病原監測整合後，將更有利於各腹瀉性病原感染來源與途徑之分析。
- (五) 自1959年後台灣沒發現過狂犬病本土案例，直至2002年花蓮發生一例中國境外移入個案，十年後，1名國人在中國經商，被飼養之犬隻咬傷，未作狂犬病之暴露後疫苗注射，造成重症後返台就醫，這說明著國人在境內雖不受狂犬病之威脅，但在國外絕不可掉以輕心，尤其鄰近國家仍存在有狂犬病疫情。

(六) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術：基因資料庫過去所含資料以流感病毒 (HA基因)、腸病毒 (VP1基因) 及腺病毒 (hexon基因) 為主，近年則是新增了流感病毒的NA基因，這些都是本國十分常見的病原體，因此應用本資料庫便可協助進行病毒流行趨勢監測與預測模式之建立、研究病原體演化特徵和抗藥性變化、以及可提供防疫政策制定上的重要參考資料。而且本資料庫的特色為基因序列資料與流行病學資訊的整合分享，我們更規劃了同步分析序列與流病資訊的proteotyping map功能，不僅僅為國內外資料庫的先例，更對於本土公共衛生的分析研究及防疫應用層面有著重要參考價值。除此之外，本資料庫的運作上乃是本著資源共享的原則，任何人皆可使用資料庫中的公開資訊，僅有需要更為詳細的資料時才需要依規範向權責單位申請，期望能夠藉此促進資訊交流以及生技產業發展，更希望可以達到拋磚引玉的效果，與各學術單位共同分享資源以及合作開發更理想的分析工具及更豐富的資料庫內容。同時，我們另外一個不斷努力的目標就是擴大所涵蓋的病原體種類，以求能夠提供更全面的比對分析資訊。



## 六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 完成建立並持續監測肺炎重症、腦炎、不明原因快速死亡之個案，建立監測據點、通報流程與檢體收集流程。
- (二) 肺炎重症檢驗流程新增檢驗項目至24種病毒，包含influenza A, B viruses, human adenovirus, RSV, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, new novel CoV 2012), human metapneumovirus, parainfluenza type 1-4, HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, parvovirus B19, enterovirus, rhinovirus, HPeV。腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至31種病原，除上述24種病毒外，新增HHV7,8, Japanese Encephalitis virus, dengue virus, West Nile virus, *Toxoplasma gondii*及mycoplasma。
- (三) 病原體微陣列檢測晶片更新第三版，總計32,264條探針，包含55科1,070種病毒、31屬細菌與6屬寄生蟲之序列。2012年增加檢測出HHV7與rabies virus，累計經實際實驗確認已可檢測出34種病毒。持續與美國LLNL合作LLNL-MDA病原體微陣列檢測晶片第二版，總計約72,000條探針。
- (四) 從通報腹瀉群聚或食物中毒採檢之糞便檢體中，鑑定到新興病毒astrovirus、sapovirus、adenovirus以及aichivirus。
- (五) 收集病毒合約實驗室分離之腸病毒株，篩選無法分型與定序之病毒，以新興病毒分生檢測方法找到HPeV共17株，其中11株為HPeV1，另外6株為HPeV3，經演化樹排列，發現與2007年主要之HPeV3產生較大的變異。
- (六) 病原體基因資料庫對外開放網站暨分析平台於2009年完成主體建構

與對外開放，並持續地進行系統的維護與更新，目前本資料庫包括五大部份：1、資料庫簡介、最新資訊及網站操作說明，2、資料庫查詢及各項分析工具，包括序列比對、基因分型、引子設計等功能，3、資料庫管理介面，4、人員管理介面，5、其他（包括意見交流、申請須知等細項）。定期更新病原體資料、已新增流感病毒NA基因序列資料，並設計proteotyping map功能，預計於2013年開放功能上線。同時，我們正規劃流感病毒NA基因抗藥性位點分析功能，希望能夠讓使用者更便利地判斷所分析的序列是否有抗藥性相關的突變發生。

- (七) 使用本檢驗平台的multiplex PCR/RT-PCR檢測套組，於一起疑似群聚事件之死亡個案腦脊液檢體中偵測出human Bocavirus病毒基因。7名接觸者中，5名咽喉拭子檢體中偵測出human herpesvirus 7；這5名中的其中兩名，另偵測出human coronavirus HKU1。
- (八) 本局合約實驗室於2011年監測一波社區adenovirus type 3與type 7流行，其中adenovirus type 7病毒型別與2008年曾在中國山西省造成肺炎群聚之型別相近。
- (九) 經由本計畫開發之檢驗平台及監測，能迅速釐清個案死因與疫苗接種之相關性，有助於釐清民眾的疑慮，避免經由媒體擴大解讀，而嚴重影響民眾接種流感疫苗的意願。例如：從一起個案解剖檢體中驗出高量之human parvovirus B19病毒，其接觸者（個案女嬰之母親與姐姐）血液檢體亦驗出human parvovirus B19病毒。
- (十) 今年7月一名疑似狂犬病感染個案自大陸返台就醫，檢驗臨床檢體序列與大陸湖北省武漢發表之序列 (EU159377, Rabies virus isolate QC) 最相似。這結果顯示國人在境內雖不受狂犬病之威脅，但在國外卻不可掉以輕心，尤其鄰近東南亞國家仍存在有狂犬病疫情，雖然本局已

於網站上詳列國外旅遊需注意各國疫情，雖然大多數出境旅客可能仍未特別重視；另外除了旅行前至旅遊門診諮詢外，對於長期在外經商之國人，亦需要建立其對疫病之警覺心。除了對入境旅客作發燒篩檢，進行生病後之防堵，也應在遊客或台商出境前，發送宣導文宣，達到事先預防，以及遭受疫病威脅之應變措施，如狂犬病能於感染後接受疫苗注射治療，配合境外就診紀錄，回台後完成免疫療程並持續追蹤，以防止發病後造成嚴重之腦炎及死亡。

## 七、参考文献：

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;451:990-3.
2. Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR, et al: Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerg Infect Dis* 2002;8:145-53.
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, 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, 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, et al: 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, et al: Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *J Infect* 1996;32:113-7.
10. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, et al: Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 2008;121:e631-7.
11. Lin JH, Chiu SC, Lee CH, 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. Lin JH, Chiu SC, Shaw MW, et al: Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan. *Virus Res* 2007;124:204-11.
13. Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, 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, Whitley DM, Lambert SB, et al: Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008;42:233-43.
15. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, et al: 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, 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, et al: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
19. Gaynor AM, Nissen MD, Whitley DM, 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, 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, et al: 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, et al: 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, et al: Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 2007;13:889-95.
  27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
  28. <http://www.flu.lanl.gov/>.
  29. <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>.
  30. Huang YP, Yao CY, Chen YJ, et al: Taiwan pathogenic microorganism genome database and its applications. *Taiwan Epidemiol Bull* 2010;26:364-74.
  31. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, et al: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;79:2814-22.
  32. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al: Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:1170-4.
  33. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, et al: Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003;148:1369-85.
  34. Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, 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.
  35. Jian JW, Chen GW, Lai CT, et al: Genetic and epidemiological analysis of influenza virus epidemics in Taiwan during 2003 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008;46:1426-34.
  36. Jian JW, Lai CT, Kuo CY, 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.
  37. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, et al: The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res* 2008;137:206-12.
  38. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, et al: Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virol J* 2010;7:277.
  39. Tsou TP, Tan BF, Chang HY, et al: Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1825-32.
  40. Chou CC, Lee TT, Chen CH, et al: Design of microarray probes for virus identification and detection of emerging viruses at the genus level. *BMC Bioinformatics* 2006;7:232.
  41. Wang D, Urisman A, Liu YT, et al: Viral discovery and sequence recovery using DNA

- microarrays. *PLoS Biol* 2003;1:E2.
42. Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, et al: Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. *J Clin Microbiol* 2006;44:1495-501.
  43. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, et al: Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007;13:73-81.
  44. Nix WA, Maher K, Johansson ES, et al: Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46:2519-24.
  45. Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, et al: Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 2008;41:69-74.
  46. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, et al: A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2008;47:1410-7.
  47. Granerod J, Cunningham R, Zuckerman M, et al: Causality in acute encephalitis: defining aetiologies. *Epidemiol Infect* 2010;138:783-800.
  48. Corman V, Eckerle I, Bleicker T, et al: Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 2012;17.
  49. Tong S, Conrardy C, Ruone S, et al: Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg Infect Dis* 2009;15:482-5.
  50. Vijgen L, Moes E, Keyaerts E, et al: A pancoronavirus RT-PCR assay for detection of all known coronaviruses. *Methods Mol Biol* 2008;454:3-12.
  51. Gardner SN, Jaing CJ, McLoughlin KS, et al: A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection. *BMC Genomics* 2010;11:668.
  52. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, et al: Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264-75.
  53. Renaud C, Kuypers J, Ficken E, et al: Introduction of a novel parechovirus RT-PCR clinical test in a regional medical center. *J Clin Virol* 2011;51:50-3.
  54. Harvala H, Wolthers KC, Simmonds P: Parechoviruses in children: understanding a new infection. *Curr Opin Infect Dis* 2010;23:224-30.
  55. Katano H, Kano M, Nakamura T, et al: A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses. *J Med Virol* 2011;83:322-30.
  56. Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, et al: Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis* 2006;42:204-10.
  57. Wu FT, Oka T, Takeda N, et al: Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1169-71.
  58. Chien YS, Chen SL, Chou SY, et al: Gastroenteritis Outbreaks Associated with Sapovirus in a Restaurant-Taichung County, 2010. *Taiwan Epidemiol Bull* 2011;27:50-57.

## 八、圖、表

表一、通報肺炎重症及腦炎個案採檢項目表

法傳通報 其它	採檢項目 (必要)	採檢項目 (選擇性)	運送
未知感染源- 肺炎重症	血清(~2 ml)、病 毒咽喉/鼻咽拭 子、痰(1ml)	肺沖洗液(2ml) ，Pleural effusion, empyema	4°C 運送
未知感染源- 腦炎	血清(~2 ml)、病 毒咽喉/鼻咽拭 子、CSF (1ml)	anal swab (懷疑腸病毒)	

表二、不明原因肺炎重症研判標準

	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IgM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. 個案血液檢體肺炎鏈球菌 培養陽性 3. 個案恢復期MAT有 $>$ 4倍上 升	1. 個案咽喉拭子流感快速檢測 陽性 2. 個案單一血清微漿菌抗體陽 性	1. 個案咽喉拭子HSV培養陽 性 2. 個案痰檢體rhinovirus PCR 陽性

表三、不明原因腦炎研判標準

分類	確定病因	極可能病因		可能病因	
		I	II	I	II
檢驗結果	1. CSF 或腦組織偵測到病原體(如 PCR 或培養陽性)或 2. CSF 抗體陽性(當 PCR 非建議的診斷工具時)	CSF 或腦組織 PCR 或培養陽性	血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清檢測為疑似陽性(如只有 IgM 陽性)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)
病原體之特性	已被確認會造成人類腦炎，且病患臨床表現符合該病原體之感染	非已確認會造成人類腦炎的病原體	已被確認會造成人類腦炎，且病患臨床表現符合該病原體之感染	已被確認會造成人類腦炎，且病患臨床表現符合該病原體之感染	病患臨床表現符合該病原體之感染，但非已確認會造成人類腦炎的病原體
例子	Infection due to Baylisascaris procyonis, enterovirus, HSV-1, VZV, and WNV; measles causing SSPE; rabies, HPeV	Infection due to hepatitis C virus, HHV-6, M. pneumoniae, and rotavirus	Infection due to Bartonella species, EBV, and HSV-1	Infection due to Brucella species, enteroviruses, HSV-1, influenza A and B viruses, and VZV	Infection due to adenovirus, Chlamydia species, M. pneumoniae, and RSV



表四、2012年通報肺炎重症檢出之病原體

Detected Pathogens	Number of cases
Acinetobacter baumannii	3
Acinetobacter baumannii, calcoaceticus complex	2
Acinetobacter baumannii, calcoaceticus complex, Staphylococcus haemolyticus (MRS), Candida albicans	1
Acinetobacter baumannii, calcoaceticus complex, Enterococcus faecium	1
adenovirus	1
adenovirus, Candida tropicalis	1
Candida albicans	12
Candida albicans, Candida glabrata	1
Candida albicans, Candida famata	1
Candida albicans, Candida tropicalis	1
CMV	4
CMV, HSV1, Rhinovirus	1
CMV, PJP, Burkholderia cepacia, Stenotrophomonas maltophilia	1
CMV, Acinetobacter baumannii	1
CMV, Burkholderia cepacia	1
CMV, Candida albicans	2
CMV, E. coli (ESBL), Candida krusei	1
CMV, Pseudomonas aeruginosa	1
CMV, Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus epidermidis (MRS)	1
coronavirus-229E	1
coronavirus-NL63	1
coronavirus-NL63, CMV	1
E. coli (ESBL)	2
E. coli, Enterococcus faecium	1
E. coli, Enterobacter cloacae	1
enterovirus	1
enterovirus, Candida albicans	1
Escherichia coli	1
Flu B	8
Flu B, Enterobacter cloacae, Staphylococcus haemolyticus (MRS)	1
Flu B, Klebsiella pneumoniae	1
Flu B, PJP	1

H1N1pdm09	2
H1N1pdm09, Candida albicans	1
H3N2	3
H3N2, Candida glabrata	1
H3N2, Enterobacter cloacae, Enterococcus faecium	1
H3N2, Legionella pneumoniae	1
H3N2, Pseudomonas aeruginosa	1
H3N2, Staphylococcus aureus	1
HHV6	1
HHV7	1
HSV1	4
HSV1, CMV	1
HSV1, Candida albicans	2
HSV1, Candida tropicalis, Staphylococcus aureus (MRSA)	1
HSV1, Klebsiella pneumoniae	1
HSV1, Stenotrophomonas maltophilia	1
Klebsiella pneumoniae	1
Legionella pneumoniae	1
metapneumovirus	4
PJP	3
Pseudomonas aeruginosa	1
Rhinovirus	10
RSV	3
RSV, CMV, PJP	1
Staphylococcus aureus (MRSA)	1
Staphylococcus aureus (MRSA), Klebsiella pneumoniae	1
Staphylococcus haemolyticus (MRS)	2
Stenotrophomonas maltophilia	1
Streptococcus pneumoniae	1
undetected	91
Total	201

表五、2012年通報腦炎及未知感染原血清檢體檢出之病原體

Detected Pathogens	Number of cases
HPeV	2
HHV7	1
CMV	1
VZV	1
JE	1
HHV7,CMV	1

表六、2012年通報腦炎及未知感染原腦脊髓液檢體檢出之病原體

Detected Pathogens	Number of cases
VZV	2
HPeV	1
Enterovirus	1

表七、2012年通報腦炎及未知感染原拭子檢體檢出之病原體

Detected Pathogens	Number of cases
HHV7	11
Enterovirus	3
Rhinovirus	2
Flu B	2
Parainfluenza virus 1	1
VZV	1
CMV	1
HHV6	1
Mycoplasma	1
HHV7,Rhinovirus	2
HHV7, HHV6	1
HHV7, human metapneumovirus	1
FluB, HPeV	1

表八、2012年通報腦炎及未知感染其他檢體檢出之病原體

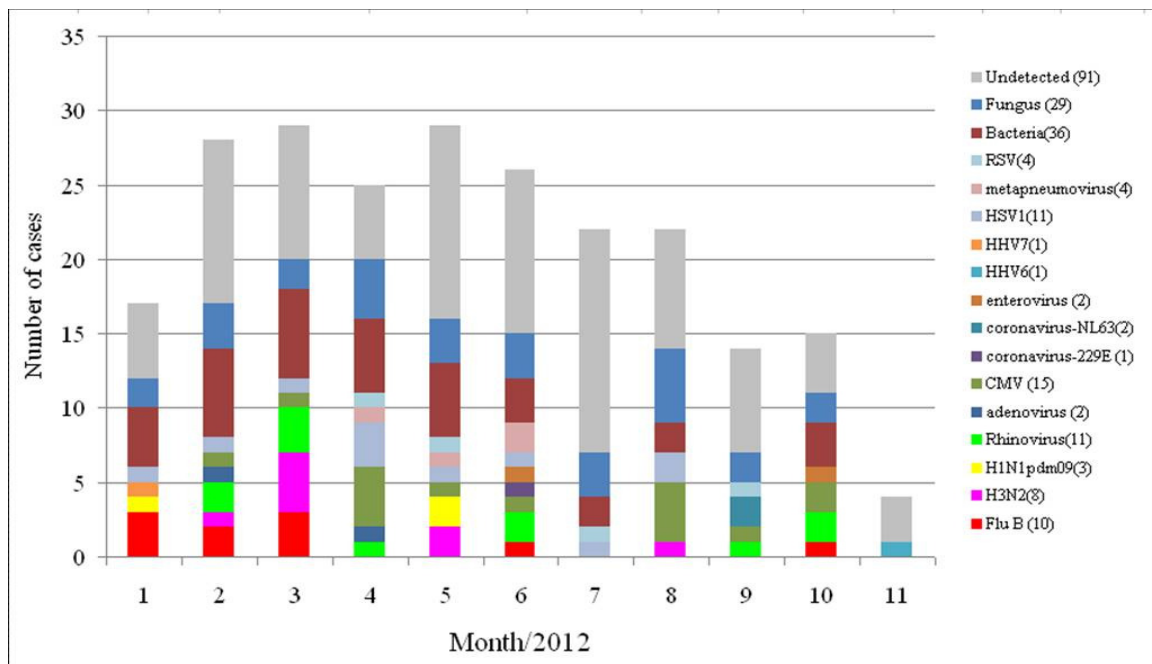
Detected Pathogens	Number of cases
CMV	2

表九、2012年通報疑似接種疫苗不良反應、群聚事件及快速死亡個案檢體檢出之病原體

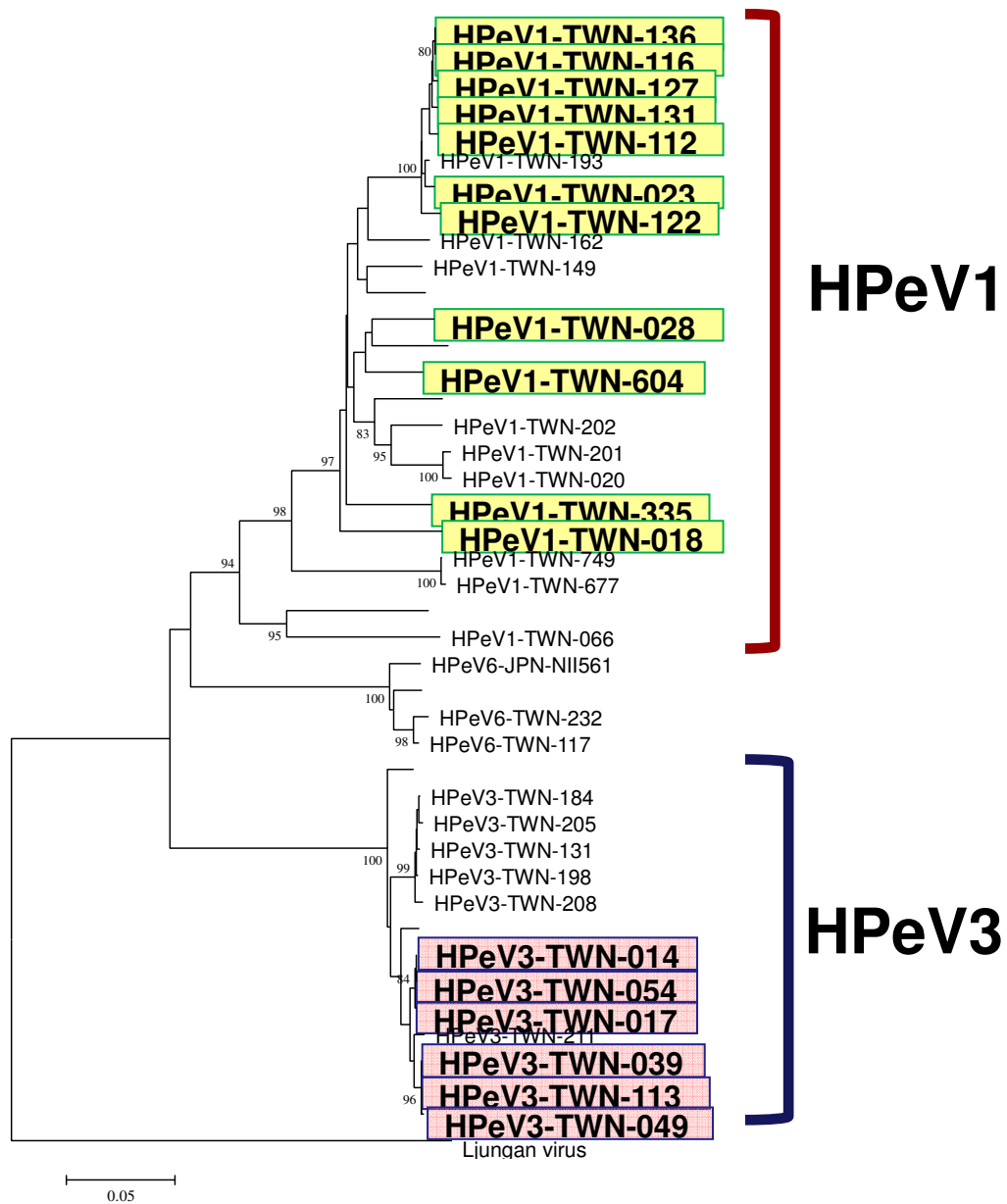
Detected Pathogens	檢出病原檢體	Number of cases
1. FluB	左肺、右肺、氣管拭子	1
2. EBV	血清	1
3. Parainfluenzavirus 3	痰	1
4. Parvovirus B19	拭子：左肋膜、左下肺、右下肺、脾臟、軟顎、氣管、心臟 組織：心臟、肝臟、肺臟、脾臟 血液	1
5. Parvovirus B19	血液(4之接觸者)	2
6. Bocavirus	CSF	1
7. HH7	鼻咽拭子(6之接觸者)	5
8. Human coronavirus HKU1	鼻咽拭子(6之接觸者)	2

表十、依肺炎重症研判標準與檢出病原體之病因分類結果

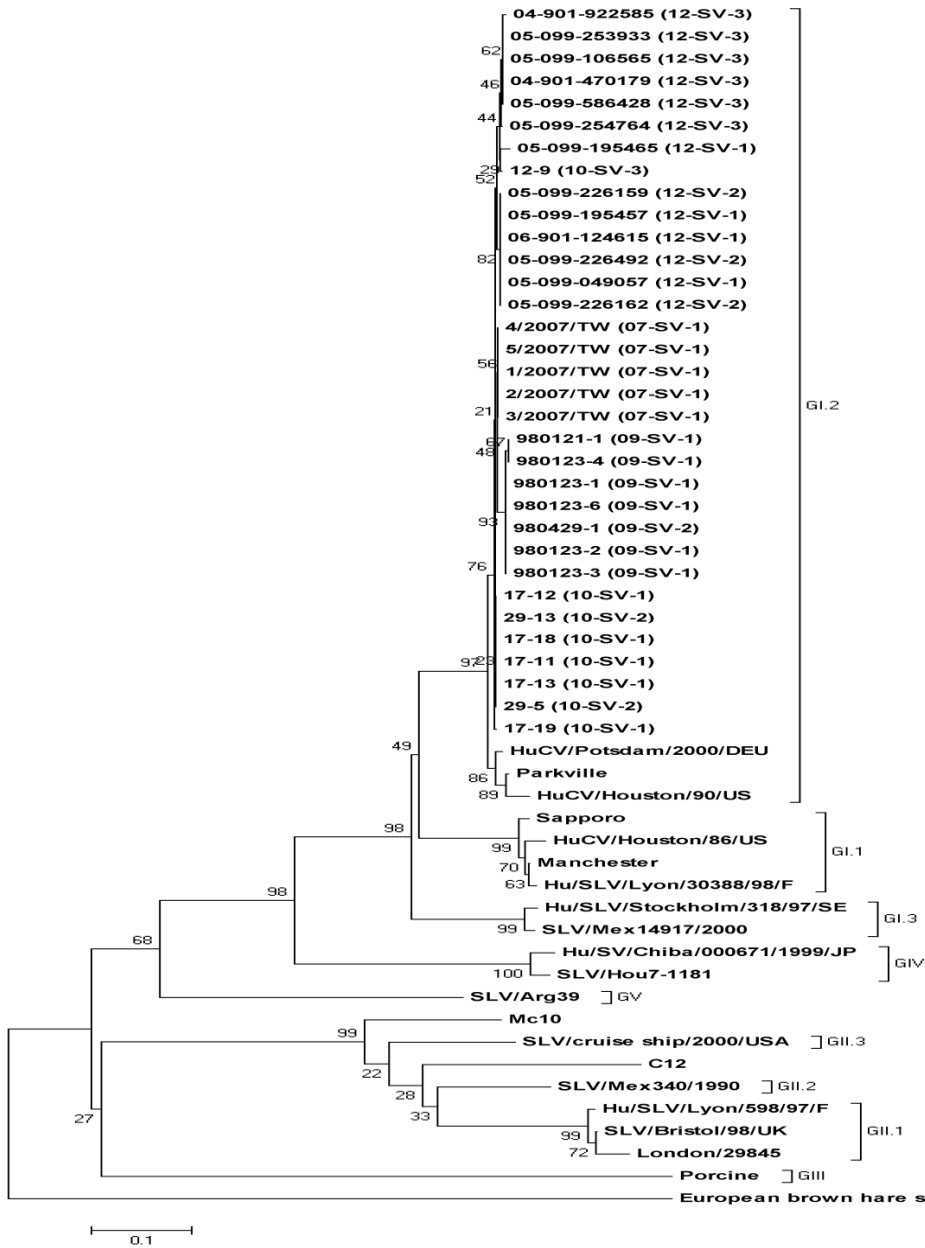
	個案數	確定病因	極可能病因	可能病因
<b>Virus</b>				
swH1N1	30	30		
Influenza AH3	2	2		
Influenza B	1	1		
Flu A	2		2	
Metapneumovirus	2	2		
CMV	3	2		1
parovirus B-19	1	1		
parainfluenza 3	1	1		
coronavirus OC43	1	1		
EV-68	1			1
Rhinovirus	3			3
<b>Bacteria</b>				
<i>S. aureus</i>	5	5		
<i>S. pneumoniae</i>	2	1	1	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	2		2	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	1		1	
<i>Streptococcus mitis</i>	1	1		
<i>Legionella pneumophila</i>	3	2	1	
<i>Legionella longbeachae</i>	1	1		
<i>H. influenzae/parainfluenza</i>	3	3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	4		
<i>Enterobacter colacae</i>	1	1		
NFGNB	3	3		
<b>Mycobacterium</b>				
TB	1	1		
<i>M. kansasii</i>	1			1
<i>M. abscessus</i>	1			1
<b>Fungus</b>				
PJP	1	1		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1	1		



圖一、2012年通報肺炎重症各月份檢出之病原體

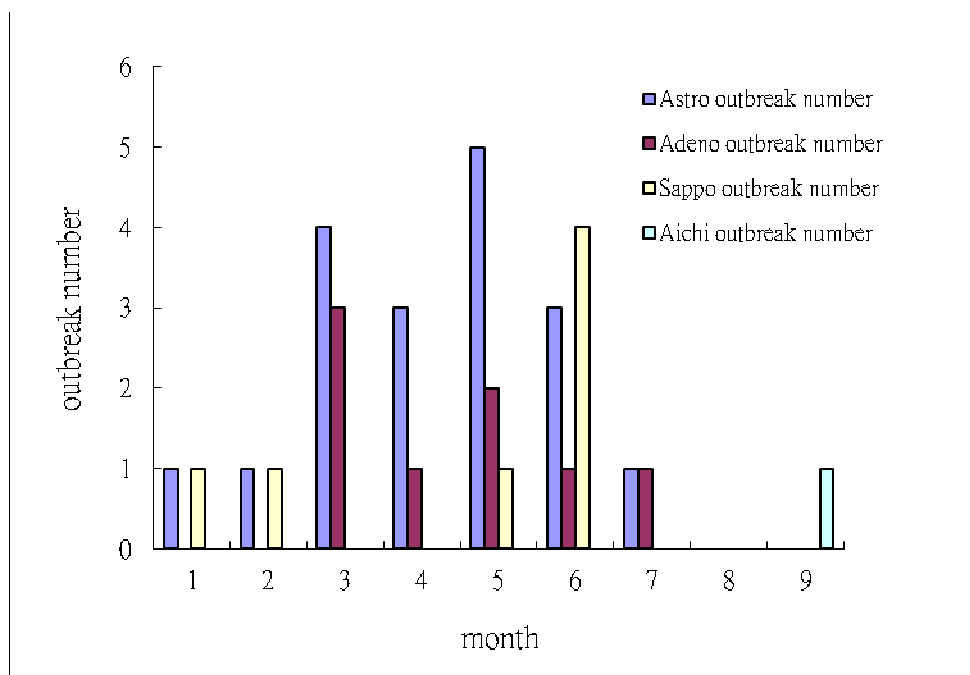


圖二、利用 MEGA 4 將今年所分析之 HPeV 序列進行分析，並與往年計畫所分析出之序列進行比對



圖三、2007-2012 年 Sapovirus 病毒之基因序列演化樹 (部分 VP1 區域，Neighbor joining method)





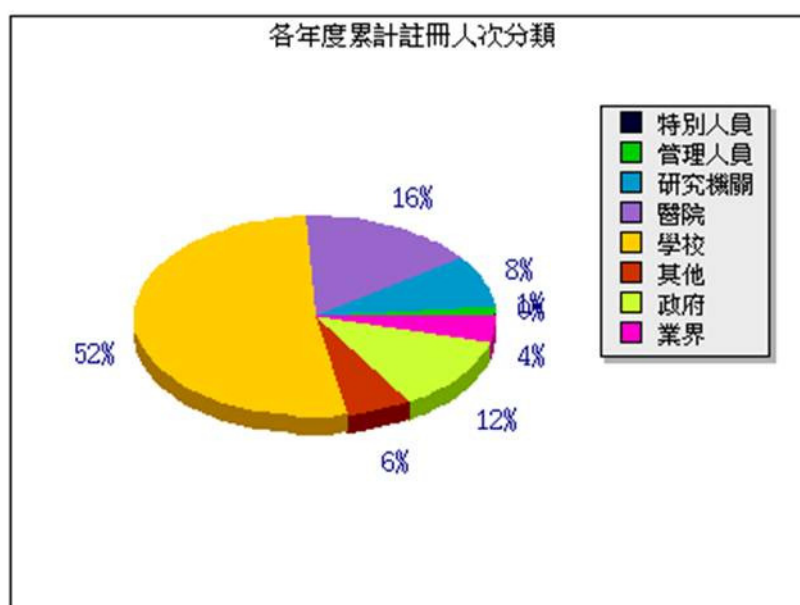
圖四、本(2012)年 adenovirus/Astrovirus/Sapovirus/Aichivirus 群聚事件之月份流行分布圖

### 年度序列資料收錄筆數報表

資料類型	資料細目	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	總筆數
序列資料	Influenza	5	1234	1777	1124	4983	2526	2255	13904
	Human Enterovirus	0	31	1822	2793	1864	2843	772	10125
	Human Adenovirus	0	30	346	103	335	392	0	1206
全部	所有	5	1295	3945	4020	7182	5761	3027	25235

圖五、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	總數
特別人員	1	0	0	0	1
管理人員	4	1	0	1	6
研究機關	21	7	6	1	35
醫院	33	16	11	7	67
學校	105	57	36	20	218
其他	13	2	7	3	25
政府	31	10	5	4	50
業界	9	5	4	0	18
合計	217	98	69	36	420



圖六、基因資料庫之註冊人數與分類

附錄一

不明原因肺炎

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:

Fever(BT  $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ),

Community acquired pneumonia ( $\leq 48$  hrs after admission)

Severe illness: ARDS or Respiratory failure with MV support

No definite diagnosis when case reported

\* 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.

### 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>		
FiO2		
Arterial pH		
O2		
CO2		
serum bicarbonate		
<b>Pleural fluid</b>		
WBC(L/N)		
RBC		
Total protein g/dL		
Glucose mg/dL		
LDH U /L		

**Culture Results: ≤ 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:_____
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"/> Consolidation <input type="checkbox"/> Non-consolidation
		<input type="checkbox"/> Unilateral <input type="checkbox"/> Patches <input type="checkbox"/> Infiltration <input type="checkbox"/> <i>Air-bronchogram</i> <input type="checkbox"/> Interstitial pneumonia
		<input type="checkbox"/> Bilateral <input type="checkbox"/> Lobar <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"/> Consolidation <input type="checkbox"/> Non-consolidation
		<input type="checkbox"/> Unilateral <input type="checkbox"/> Patches <input type="checkbox"/> Infiltration <input type="checkbox"/> <i>Air-bronchogram</i> <input type="checkbox"/> Interstitial pneumonia
		<input type="checkbox"/> Bilateral <input type="checkbox"/> Lobar <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 Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____
<input type="checkbox"/> Failure	No apparent response to therapy; persistence or progression of most/all pre-therapy signs and symptoms
<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. 個案血液檢體肺炎鏈球菌培養陽性 3. 個案恢復期 MAT 有 $>4$ 倍上升	1. 個案咽喉拭子流感快速檢測陽性 2. 個案單一血清黴漿菌抗體陽性	1. 個案咽喉拭子 HSV 培養陽性 2. 個案痰檢體 rhinovirus PCR 陽性

附錄二

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 ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ) | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 躁動不安          | <input type="checkbox"/> 無，有                          |
| * 上呼吸道症狀                           | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 幻覺            | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 腸胃道症狀                            | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 步態失調          | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 皮疹                               | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 局部神經功能障礙      | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 頭痛                               | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 肌肉無力          | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 倦怠                               | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | * 抽搐            | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 意識混亂                             | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | ◎ intractable?  | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 失語症或緘默                           | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               | ◎ induced coma? | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> |
| * 其他特殊表現                           | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> ，請敘述：_____    |                 |   |
| * 氣管插管                             | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> 首次插管日為__月/__日 |                 |   |
| * 使用 steroid                       | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               |                 |   |
| * 使用 IVIG                          | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/>               |                 |   |
| * 使用抗病毒藥                           | <input type="checkbox"/> 無，有 <input type="checkbox"/> 種類為_____。     |                 |   |
| * 昏迷指數：GCS=                        | E__V__M__ (選擇 induced coma (如果有執行) 之前的糟狀況)                          |                 |   |

### 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= \_\_/\_\_/\_\_\_/\_\_(seg/lymph/mono/eos) , Hct=\_\_\_\_\_ , PLT=\_\_\_\_\_

\* CSF (最早採檢日\_\_\_月/\_\_\_日)

RBC=\_\_\_\_\_ , RBC=\_\_\_\_\_ , DC= \_\_/\_\_/\_\_\_/\_\_(seg/lymph/mono/eos) , Protein=\_\_\_\_\_ ,  
Glucose=\_\_\_\_\_ (Blood glucose=\_\_\_\_\_ ) , VDRL=\_\_\_\_\_ , Cryptococcal Ag=\_\_\_\_\_

## 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. Direct Pathogen detection

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

### 9. 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 Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____
<input type="checkbox"/> Failure	No apparent response to therapy; persistence or progression of most/all pre-therapy signs and symptoms

<input type="checkbox"/> Mortality	For patients who expired due to any causes
Date: _____	The primary cause of death is related to this infectious episode reported: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes

**10. COMMENTS:**

---

---

---

---