

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000601

衛生福利部疾病管制署 103 年科技研究計畫

計畫名稱：新興/再浮現傳染病監測技術開發與應用計畫

年度/全程研究報告

執行機構：研究檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳和生

協同主持人：楊志元、劉銘燦、慕蓉蓉、吳芳姿、陳婉青、  
洪敏南、魏嵩璽、李欣純、蘇家彬

研究人員：黃元品、楊季融、謝若郁

研究人員：研發替代役 8 名、研究助理 7 名

執行期間：103 年 1 月 1 日至 103 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		1
計畫中文摘要		2
計畫英文摘要		3-4
計畫內容		
一、前言		(5-10)
二、材料與方法		(11-24)
三、結果		(25-34)
四、討論		(35-38)
五、結論與建議		(39-40)
六、計畫重要研究成果及具體建議		(41-42)
七、參考文獻		(43-45)
八、圖、表		(46-52)
附錄一、肺炎重症收案問卷		(53-59)
附錄二、腦炎重症收案問卷		(60-64)

共(64)頁

## 摘要

由於氣候環境變化、演化突變、基因重組、藥物濫用及全球化趨勢，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、H7N9 禽流感病毒、中東呼吸症候群冠狀病毒、伊波拉病毒等），並隨著國際間往來密集，新興傳染病可能由區域性疾病，演變成全球性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康。為了在面對變化及傳播快速的傳染病時，能夠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，各國已經投入許多資源。而本計畫因此建置 (1)、未知/新興傳染病監測網絡（如肺炎重症、腦炎、噬血症候群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，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，透過分析病原體基因序列資料及個案流行病學資料，評估病原體抗藥性基因變化，或提供為未來疫苗研發與診斷試劑開發之重要根據。本計畫已對於造成民眾恐慌的 H7N9、H6N1 禽流感病毒、狂犬病病毒、中東呼吸症候群冠狀病毒或者伊波拉病毒皆已成功建立檢測方法，望能藉由本計畫三大目標之執行，即時釐清感染源與作為疾病防治政策參考。

**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, pathogen genomics evolution, genome recombination, drug abuse and zoonoses, microorganisms are more likely to mutate into novel pathogens that could be transmitted across species boundaries than ever before, such as NDM-1, SARS, pandemic (H1N1) 2009, H5N1, H7N9 avian influenza, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV), and Ebola virus, etc. In addition, due to the intensive international trade, business, travelling, and communication, emerging or 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, hemophagocytic syndrome, 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 their functional complementariness 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 evaluate the drug-resistance related genes of pathogens and

even provide a foundation for future developing vaccines and diagnostic techniques. We had successfully established related diagnostic methods for H7N9, H6N1 avian influenza, Rabies virus, and MERS-CoV, and Ebola virus, and expect to clarify the infectious pathogens and provide a reference for disease prevention policy assessment.

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

由於全球氣候變遷與國際間交通日漸頻繁，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、2012年的中東呼吸症候群冠狀病毒、2013年的H7N9及2014年的伊波拉病毒均為新興傳染病，顯示良好的監測及病原體診斷系統之重要性<sup>1</sup>。我國現有的法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，對傳染病流行狀況提供豐富及全面的資訊；而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，更增進對於疾病的了解；然而，仍有許多感染症病患無法得到確切診斷，為能及時偵測未知/新興感染症，需針對一般檢驗無法確定病原之感染症患者建立檢驗平台。感染症之臨床表現眾多，本計畫擬針對疑似感染症導致之不明原因重症或快速死亡(unexplained critical illnesses or deaths due to possibly infectious cause, UNEX)、腦炎與肺炎重症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個案由於病情嚴重，且需在短時間內排除新興傳染病或生恐攻擊事件之威脅，在公共衛生及傳染病防治上之重要性實不可忽視。美國CDC於1995-1998年間首次針對UNEX進行監測，在四個州內收集年齡介於1至49歲，無潛在重大疾病且疑似因感染症死亡之病患，藉由各項血清學、病毒學、分子生物學及

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

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

## 2、 未知/新興感染原檢驗技術平台

新的人類病原體不斷被發現，如human metapneumovirus, coronavirus SARS, NL63, HKU1, human bocavirus, polyomavirus KI/WU等<sup>7-22</sup>。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<sup>14</sup>。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；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，以期探索偵測新興病原體。

### 3、 新興病毒

小RNA病毒科共12個屬，分別會引起人類或動物各種的臨床症狀，引起人類疾病最常見為腸病毒屬(*Enterovirus*)，大多數腸病毒之感染是沒有任何臨床症狀或僅造成輕微或不甚明顯的臨床表徵，如：發燒或上呼吸道症狀(一般感冒)，然而，腸病毒感染可能造成其他臨床症狀，包括急性出血性結膜炎、無菌性腦膜炎、急性無力肢體麻痺症、心肌炎及新生兒敗血症等<sup>23,24</sup>，其中有些較為嚴重之病患，可能造成重症或死亡。小RNA病毒科近年新興之病毒—Human Parechovirus (HPEV)常見感染5



歲以下幼童，感染HPeV後所表現之臨床症狀包括有呼吸道、腸胃道感染症疾病，與嚴重之無菌性腦膜炎、心肌炎、腦炎、急性無力肢體麻痺症，以及新生兒敗血症等；署內陸續進行無法分型之新興病毒檢驗方法的開發，目前已建立HPeV病毒診斷方法，但僅能依賴分子生物檢測方法進行核酸定序及序列比對，才能將此病毒與腸病毒區分<sup>25,26</sup>，又由於各合約實驗室之病毒診斷，僅在細胞培養後觀察到細胞病變，再以間接螢光免疫染色法做為主要鑑別方法，而目前市售螢光抗體只針對幾種常見之腸病毒，因此不容易在第一時間發現HPeV病毒，僅有透過計畫之執行，利用分生檢測方法，直接針對該病毒核酸進行檢測，檢測結果顯示已發現到HPeV1、HPeV3與HPeV6，因此仍需持續監控病毒的變化。

狂犬病是由桿狀病毒科 (*Rhabdoviridae*) Lyssavirus引起，對神經組織有很強的親和性。狂犬病之發生屬全球性，世界衛生組織估計每年約有三至五萬人死亡病例，亞洲地區的發生率最高。1947年狂犬病從上海傳入台灣，隔年發現光復後第1個狂犬病病例，其後陸續有病例發生，1951年共發生283例，及1952年發生102例為最多，透過家犬接種、捕殺野狗等控制動物傳染窩的措施，自48年起台灣地區即不再有人的病例。而在2002年，花蓮曾出現一名境外移入疑似病例，為大陸籍來台探親人士，在大陸曾遭家犬咬傷，惟並未注射疫苗而於遭咬傷兩個月後在台灣發病，終因不治死亡，經屍體解剖證實其感染狂犬病。2012年一名台商個案，於大陸被飼養犬隻咬傷，未進行狂犬病暴露後疫苗注射，咬傷後一個月發病，並回台進行治療。2013年5月有一疑似狂犬病感染境外移入個案(菲律賓)，其唾液拭子中亦檢出狂犬病病毒核酸陽性。台灣於1961年後不再有動物病例，但行政院農業委員會於2013年公布國內野生鼬獾、錢鼠與狗檢出狂犬病毒，顯示國人萬不可掉以輕心。

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

綜上，在收集符合條件之臨床檢體後，適當串連各種分子檢驗技術之優點以建立未知感染源研究檢驗平台偵測病原體，除能快速偵測比對病原體、瞭解其可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，還可獲取更多生物資訊以增進對該病原的瞭解及認識，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。

## (二) 病原體防疫資料庫

國際間已有數個大型資料庫，包括可免費使用的National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)；流感基因資料庫(<http://www.flu.lanl.gov/>)，近年已改為需付費方能使用；人類免疫缺陷病毒資料庫(<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>)，包含核酸及胺基酸資料及分析工具<sup>27-29</sup>。顯示建置我國本土的病原體基因資料庫網站不僅為時勢所趨，亦可強化各面向之防疫資訊整合。台灣的病原體基因資料在過去是分散於政府部門、學術單位、醫療院所或者是生技公司，並且沒有與流行病學資料作結合，因此本病原體基因資料庫(舊版)結合流行病學資訊應有重要參考價值，並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，至少超過20位學者教授使用過本資料庫，分享超過兩萬五千筆基因序列及流病資料。本

署於2008年12月起與陽明大學「國科會進階生物資訊核心設施研究團隊 (Advanced Bioinformatics Core)」合作建置「病原微生物基因體資料庫對外開放網站暨分析平台 (簡稱基因資料庫)」，主要功能為儲存本署相關病原體資訊，應用生物資訊軟體進行分析，經由網頁線上呈現的方式，提供序列比對與分型功能，並輔以每筆對應的方式整合國內近年流行之病原體基因序列(主要為腸病毒與流感病毒)與不含個人隱私之流行病學資料 (包括性別、年齡、居住地、發病日期等)，上述資料均來自本署彙整、分析歷年資料而成<sup>30</sup>。期望藉由本基因資料庫的資訊，可釐清疾病感染源或感染途徑，提供疾病防治政策參考，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。

流感病毒屬於正黏液病毒科，依病毒表面之血球凝集素 (hemagglutinin; HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase; NA) 兩種抗原蛋白可區分為不同的亞型，目前已有18種HA (H1至H18) 與11種NA (N1至N11)<sup>31,32</sup>。腸病毒屬於微小病毒科的腸病毒屬，其VP1基因是中和抗體主要作用區域，亦為序列高變異區域<sup>33,34</sup>，也較常被用作分析<sup>35</sup>。我們持續收集合約實驗室病毒株，將序列合併流病資訊上傳至資料庫後，進行分析以追蹤病毒來源及序列變異。本署已藉此完成許多分析，如：簡智偉等人分析2003-2006年間的流感病毒基因及流病資料<sup>36</sup>、研究B型流感的基因重組情況<sup>37</sup>、黃元品等人分析2006-2007年的腸病毒71型係屬於新引入的B5及C5基因亞型所引起<sup>38</sup>，更確認2008年大流行的腸病毒71型也屬於B5，與中國大陸流行的C4或新加坡流行的C2不同，並於同年發現C2-like基因亞型<sup>39</sup>，以及2009年仍延續2008年的B5流行，2010-2011年轉為C4基因亞型，但2012年再度以B5亞型為主<sup>40</sup>、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<sup>41</sup>。

## 二、材料與方法

### (一) 未知/新興傳染病監測

#### 1、 檢體來源：

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

#### 2、 監測與檢體採集點

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。

#### 3、 主動監測通報之條件

- (1) 肺炎重症收案條件--住院病患合併以下所有條件：
  - A、 體溫超過 38 度且通報時無確定診斷；
  - B、 非院內感染：在社區或住院 48 小時內發病；

C、 嚴重肺炎，符合下列 I 或 II

I. 急性呼吸窘迫症，定義如下：

- i. Acute onset with bilateral infiltrates consistent with pulmonary edema (within 48 hours)
- ii.  $PaO_2/FiO_2 \leq 200$  mmHg
- iii. No clinical evidence for an elevated left atrial pressure (i.e. exclude heart failure related)

II. Respiratory failure that requires intubation

(2) 腦炎收案條件--病患合併以下所有條件：

- A、 急性發作（一個月之內）；
- B、 發燒超過  $38^{\circ}C$ ；
- C、 出現精神功能惡化(如記憶衰退、行為反常、意識減退)、抽搐、局部神經症狀等任一項。
- D、 腦脊髓液有任何一項檢驗為異常（超過該院的正常值）

(3) 不明原因快速死亡收案條件：

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

(4) 噬血症候群收案條件：8 項中至少符合 5 項診斷條件：

- A、發燒；
- B、脾腫大；
- C、2 種血球細胞系低下： $ANC < 1000/uL$ ； $PLT < 100,000 /uL$ ； $Hb < 9$  mg/dL；

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

E、嗜血現象：淋巴結、脾臟或骨髓且沒有任何惡性腫瘤之證據；

F、自然殺手細胞活性減少或缺乏；

G、Ferritin > 500 mg/dL；

H、溶解性 CD25(IL-2 接受器)大於 2400 U/ mL。

- 4、採檢項目如表一，送驗之檢體將進行病原體實驗室檢驗鑑定，包括細菌、病毒、寄生蟲及可能未知的病原體。
- 5、實驗室檢驗結果將提供臨床醫師治療參考，配合臨床症狀與治療情形，確認檢驗出的病原體與疾病的關係。
- 6、病歷資料回顧、個案研判與分析

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

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

- 1、建置 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統：針對特定病原進行初步篩檢，針對肺炎及腦炎可能病原設計不同引子組合，能有效減省檢體用量，並縮短偵測時間。本計畫建立 multiplex real-time PCR panel，針對造成肺炎以及腦炎、腦膜炎之病原體進行偵測。本實驗收集已發表的報告之引子及探針序列，進行 real-time PCR 偵

測，目前可偵測病原包括 influenza viruses, parainfluenza virus, rhinovirus, human metapneumovirus, herpes simplex virus (HSV) I and II, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, enterovirus, coronavirus, parvovirus B19, respiratory syncytial virus, parechovirus, chikungunya virus, Japanese encephalitis virus, dengue virus, *Toxoplasma gondii* 以及 *Borrelia* 等項目。

實驗流程包括樣品核酸萃取及反轉錄與 real-time PCR 反應與結果分析。實驗步驟如下：

- (1) 反轉錄反應 (Invitrogen)：利用自動核酸萃取系統 MagNA Pure Compact Instrument (Roche Applied Science) 進行樣品核酸萃取，取 10  $\mu$ l 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸(random octamer) 進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70°C 作用 10 分鐘後，置於冰上，再利用 transcriptor reverse transcriptase 進行反轉錄反應，反應條件為 45°C 作用 60 分鐘。
  - (2) Real-time PCR 反應：20  $\mu$ l DNA 與 cDNA 產物與 1x LightCycler 480 Probes Master、200 nM forward primer、200 nM reverse primer 以及 100 nM hydrolysis probe 混合。混合物以 LightCycler 480 系統(Roche Diagnostic) 進行反應，反應條件如下：50°C 2 min，95°C 10 min，接續 45 cycles 之反應(95°C 15 sec、60°C 40 sec)，最後 1 min 降溫(cooling)至 40°C。
- 2、 基因晶片檢測系統：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)，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。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<sup>42</sup>及 David Wang 所發表的序列<sup>43</sup>，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<sup>43</sup>及 Palaniappan 等人<sup>44</sup>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。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，實驗方法主要參考 Palacios 等人的論文<sup>45</sup>，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 5 $\mu$ l 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘、48 $^{\circ}$ C 作用 40 分鐘及 70 $^{\circ}$ 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 dendrimer 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 $\mu$ l 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 作用 60 分鐘。合成之第一股 cDNA 續加入 DNA ligase、DNA polymerase 及 RNase H，16 $^{\circ}$ 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 5  $\mu\text{L}$  為模板，加入 20  $\mu\text{L}$  QIAGEN One-Step RT-PCR pre-mix，含有 1X Q-Solution、1X One-Step RT-PCR 反應緩衝溶液、1 $\mu\text{L}$  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 0.4  $\mu\text{M}$  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 $\mu\text{L}$  為模板，加入 22.5 $\mu\text{L}$  PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4  $\mu\text{M}$  每個分析引子 (C94b/ 246k)，作 3C-3D 片段序列之 nest PCR，先 95°C denaturation 作用 15 分鐘，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。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  $\mu\text{L}$  為模板，加入 1  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{M}$  隨機引子及 2 $\mu\text{L}$  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 $\mu\text{L}$ 。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。Nest-PCR：病毒分析引子對為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。以 RT 產物 2 $\mu\text{L}$  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°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 2 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°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 430 bp，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 20 mM 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

個引子。反應條件：先 95°C denaturation 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 20 mM 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)、20 U 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。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°C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 95°C 1 分鐘、annealing 55°C 1 分鐘、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°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°C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 95°C 45 秒、annealing 57°C 45 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 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 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°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°C 作用 60 分鐘，95°C 15 分鐘作用。PCR 反應條件：熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 45°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 35 個 cycle，最後 extension 72°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 1X PCR Buffer、2.5 unit HotStarTaq DNA Polymerase、200  $\mu$ M of each dNTP，及各 5 mM Adhex1/Adhex2 分析引子。反應條件：95°C denaturation 作用 15 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 60°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 10 分鐘；將產物進行電泳分析。

## 5、 其他新興病毒：

(1) HPeV real-time RT-PCR<sup>46,47</sup>：以 ABI 7500 來作分析，取 5  $\mu$ l 的 RNA 加到 TaqMan one-step RT-PCR 混合反應液 (reaction mix) 中，其中引子的濃度為 400nM，螢光標的的探針濃度為 200nM。反轉錄作用為 50°C 30 分鐘，接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶 95°C 10 分鐘，再進行 PCR 反應 40 個循環：95°C 15 秒，58°C 45 秒，72°C 10 秒，螢光訊號的收集於 annealing 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。引子設計增幅的區域範圍是在 parechovirus 的高度保守的基因片段 5'UTR 區域。

(2) HPeV CODEHOP RT semi-nested PCR：取 5  $\mu$ l 的 RNA，加入 5 $\times$  PCR buffer，7.5 pmol primer mix (primers AN273, AN274, AN275,

AN276, AN277, and AN278), 加入 20 U Rnasin, 510  $\mu$ M dNTP、0.01 M DTT、100 U of SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen), 混合均勻後, 反應在 22°C, 10 分鐘; 45°C, 60 分鐘; 95°C, 5 分鐘。得到 10  $\mu$ l 的 cDNA, 將 cDNA 直接進行 PCR1 反應, 加入 2 $\times$  PCR buffer、200  $\mu$ M dNTP、50 pmol primers (AN353 and AN355), 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 補足水至 50 $\mu$ l, 混合均勻, PCR 反應條件為 95°C 30 秒, 42°C 40 秒, 72°C 60 秒, 共 35 個循環, 最後 72°C 3 分鐘完成反應。接著要進行第二次 PCR 反應 (PCR 2A 及 PCR 2B), 取出 1 $\mu$ l PCR1 產物, 加入 40 pmol primers (PCR 2A: AN353 and AN357; PCR 2B: AN369 and AN358)、200  $\mu$ M dNTP、2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), 總體積為 50  $\mu$ l, 先以 95°C 6 分鐘做熱起始, PCR 2A 反應為 95°C 30 秒, 58°C 40 秒, 72°C 60 秒, PCR 2B 反應為 95°C 30 秒, 44°C 40 秒, 72°C 60 秒, 40 個循環反應, 最後 72°C 3 分鐘完成反應。之後進行電泳分析, 陽性結果進一步進行定序反應。

(3) Rabies virus L gene RT-PCR<sup>48</sup>: 取 5 $\mu$ l 的 RNA, 加入 2 $\times$  RT-PCR buffer, 10 pmol primers (PVO5m/PVO8), 加入 20 U Rnasin, 200 U SuperScript III reverse transcriptase 及 5U Platinum Taq (Invitrogen), 混合均勻後, 反應在 25°C, 10 分鐘; 45°C, 30 分鐘; 95°C, 5 分鐘, 接著 PCR 反應條件為 95°C 30 秒, 56°C 45 秒, 72°C 40 秒, 共 40 個循環, 最後 72°C 3 分鐘完成反應。之後進行電泳分析, 陽性結果進一步進行定序反應。

(4) Ebola virus: 參考 Science paper<sup>49</sup>、日本 NIID 及歐洲 ECDC 檢驗方法, 先以 QIAamp Viral RNA Kit 萃取核酸, 接著進行 nested

RT-PCR 或 real-time RT-PCR。nested RT-PCR 條件如下：取 5  $\mu$ l 的 RNA，加入 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  buffer，3  $\mu$ l primers (primers FiloNP-Fe and FiloNP-Re)，0.5  $\mu$ l RNaseOUT，1  $\mu$ l SSIII/Ptaq，3  $\mu$ l DEPC-ddH<sub>2</sub>O，混合均勻後，反應在 50 $^{\circ}$ C, 30 分鐘；95 $^{\circ}$ C, 10 分鐘，接著 PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 60 秒, 52 $^{\circ}$ C 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒，共 50 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘完成反應。將 1  $\mu$ l 產物進行第二個 PCR 反應，加入 12.5  $\mu$ l Takara PCRMAS-TER MIX，3  $\mu$ l primers (Sudan Zaire 2nd F1 and Sudan Zaire 2nd R1)，8.5  $\mu$ l DEPC-ddH<sub>2</sub>O，混合均勻，反應在 95 $^{\circ}$ C, 10 分鐘；PCR 反應條件為 95 $^{\circ}$ C 60 秒, 54 $^{\circ}$ C 60 秒, 72 $^{\circ}$ C 60 秒，共 30 個循環，最後 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘完成反應。之後進行電泳分析。real-time RT-PCR 則使用 RealStar<sup>®</sup> Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (altona)，依產品說明進行檢驗，反應條件為 55 $^{\circ}$ C, 30 分鐘，95 $^{\circ}$ C, 2 分鐘，接著 PCR 反應為 95 $^{\circ}$ C 15 秒, 58 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 15 秒，共 50 個循環。

### (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

- (1) 基因資料庫採用 Redhat Enterprise Linux 5 作業系統，以 Apache2 網頁伺服器配合資料庫系統 MySQL 5.0.77 及開發語言 PHP Version 5.1.6 進行基因資料庫之建立。
- (2) 資料庫內容為序列資料與對應流行病學資料，如：採檢日、性別與年齡等。除了本署提供的資訊外，也包含 WHO 公佈之流感疫苗資訊以及相關病原體序列資訊。另有統計報表介面，可計算使用者登入情況，以及統計序列或流行病學資料數量。



- (3) 分析功能：包括序列比對 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)、多序列排比、親緣樹狀圖繪製、引子設計 (Primer3)及腸病毒 71 型基因亞型分型及流感疫苗建議疫苗株比對功能。
- (4) 使用者若需要完整資料則須向權責單位依病原體基因資料序列申請規範文件申請，其內容包含計畫摘要表和使用協議書，而申請者利用本資料發表之有關論文或著作，應詳細書明資料出處。

## 2、病原體防疫資料庫基因序列的分析流程

- (1) 將合約實驗室送檢病毒株進行病毒核酸的萃取、RT-PCR、PCR 產物純化以及 Cycle Sequencing 等，並經過核酸染劑純化後進行序列判讀，最後進行序列整理及比對分型。
- (2) 所定序的基因片段為流感病毒的 HA 基因 (約定序 1,000 bp)及 NA 基因 (約定序 600bp)、腸病毒的 VP1 基因 (約定序 500-700 bp)、腺病毒的 hexon 基因 (約定序 800 bp)，若是序列長度不足或品質不良者皆予剔除。
- (3) 使用 ClustalW2 套件或於本機端使用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 來進行親緣樹狀圖的繪製，藉以確認所流行的病毒株之基因型別與各國病毒株之親緣關係，或合併流行病學資料 (包含年齡、性別及發病日等資料)分析流行之病毒株的來源、基因型別變化、傳播過程或演化速率等。

### 三、 結果

#### (一) 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

2014 年 1 月至 10 月，共計 243 個肺炎重症通報個案，其中呼吸道檢體，使用病毒 multiplex RT-realtime PCR 檢測套組(包含 influenza A virus, influenza B virus, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinovirus, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type 1, 2, 3, 4, coronavirus 229E/OC43/NL63/HK/MERS, human bocavirus, HHV6, HHV7, EBV, HPeV, VZV, enterovirus 等 25 個病毒檢測)與細菌培養方式進行檢驗，比較 2011-2014 年每月通報與送驗數目，發現 2014 年 3 月通報數較多，往年 6-9 月通報數較少，但 2014 年 6-9 月通報數無明顯下降(圖一 A)，病原體的檢出率約 55-71%。2014 年 243 例案中有 173 例(71.2%)檢驗出病原體(圖一 B)，其中 122 例(70%)檢出病毒，包含 64 例單檢出病毒與 58 例兩種以上病原體同時感染(圖二)。在檢出病毒的個案中，以 influenza A(H1N1)pdm09 29 例最多，CMV 24 例次之。檢驗出 4 例人類冠狀病毒陽性(1 例 229E, 2 例 OC43, 1 例 HK)(圖三 A)。在檢出細菌與真菌等病原體中，Candida 有 49 例，另外有 5 例 Legionella pneumophila 陽性，顯示退伍軍人症在臨床上可能易被忽略(圖三 B)。本年通報個案例無 MERS-CoV 陽性。

##### 2、 腦炎及未知感染原監測結果

2014 年 1 月至 10 月，共計 182 個腦炎或未知感染原通報個案，使用病毒 multiplex RT-real time PCR 檢測套組(包含 Influenza A, B viruses, Human adenovirus, RSV, Coronaviruses (229E, OC43, NL63,

HKU1), HSV1, HSV2, VZV, CMV, Human metapneumovirus, parainfluenza type 1-3, parainfluenza type 4a, 4b, HHV6, HHV7, HHV8, Bocavirus, Polyomavirus (JC, BK, WU, KI), Parvovirus, Enterovirus, Rhinovirus, Japanese Encephalitis virus, Dengue virus, West Nile virus, Toxoplasma gondii, Mycoplasma, Hendra virus, Rabies virus, Balamuthia, Acanthamoeba, Naegleria, Borrelia 等 40 種病毒檢測) 進行檢驗。比較 2012-2014 年每月通報與送驗數目，並無季節關聯性(圖四 A)，病原體的檢出率約 20.9-30.2% (圖四 B)。2014 年 182 例個案中 38 例 (20.9 %) 檢驗出病原體，6 例檢驗出兩種以上病原體同時偵測陽性 (圖五)。大部分病原出現於咽喉拭子檢體中，本年有 4 例個案尿液中檢測出單一病原，均為 JC polyomavirus，1 例個案 CSF 中檢測出 parvovirus 病原，且此個案尿液中同時偵測 parvovirus 及 CMV 陽性。

### 3、 疑似接種疫苗不良反應、噬血症候群及死亡個案：

103 年通報 1 起疑似接種疫苗不良反應死亡個案，檢送血液、心及腦膜等各組織，另法醫通報兩件死亡個案，送驗檢體各 22 及 24 件，以 multiplex RT- real time PCR 檢測套組檢驗均為陰性。1 例通報噬血症候群個案檢測亦為陰性。1 例通報漢他及鈎端檢驗陰性之個案，血清中驗出微量 Dengue virus，尿液中驗出 JC polyomavirus，最後以 ELISA 確診登革熱陽性。有 1 例兒童死亡案例，通報腸病毒重症，檢驗結果陰性，後續進行檢驗，發現 parainfluenza type 1 感染。

### 4、 狂犬病監測：

因應狂犬病 2013 年在台灣出現，2014 年持續以狂犬病 RT-PCR 檢

驗通報不明原因腦炎個案共 43 例，臨床檢體共 76 件，結果皆為陰性。

## (二) 特殊案例

### 1、 H7N9 感染

2013-2014 年 4 例境外移入之 H7N9 病毒基因序列分析：台灣於 2013 年 4 月、12 月，2014 年 4 月(2 例)分別發現自大陸移入 H7N9 確診個案，第一例屬於疫情第一波，第二至四例則於第二波。為探討 H7N9 病毒於此兩波段期間可能的演化情形，本研究分析 4 株於上述境外移入個案分離病毒株之全基因體序列，並與中國同時期之 H7N9 人類、禽類及環境病毒株相比較。病毒演化樹分析結果顯示，H7N9 病毒之內蛋白基因 (internal protein gene)歧異度很大，本研究之 4 株 H7N9 病毒株皆屬於少數基因型(1 株 G1.1、2 株 G2.9、1 株 3.6)(圖六)，其內蛋白基因與中國主流病毒 G0 的組成不同，而 G3.6 屬於本研究首度發現之新興病毒基因型。相較於內蛋白基因，本研究之 4 株 H7N9 病毒表面蛋白基因 hemagglutination (HA)以及 neuraminidase (NA)於各自演化樹中屬同一個演化群，亦與中國多數病毒相近；此外，該 4 株病毒之抗原性經分析後顯示與預期疫苗株 A/Anhui/1/2013 相似。綜合以上發現，H7N9 病毒內蛋白基因組成於病毒演化扮演重要角色，這也表示此病毒目前的演化情形相當複雜，H7N9 病毒與不同來源之 H9N2 病毒皆可能藉由重組產生新興病毒。因此，持續對此病毒進行監測及演化分析將是防疫工作不可或缺的一環。

2、 嬰兒退伍軍人病案例：通報肺炎重症發現嬰兒退伍軍人病案例，經疫調，調查結果發現分離出的退伍軍人菌和分別自飲水機分離出來

的退伍軍人菌的 PFGE 型別一致，這些飲水機的水是作為嬰兒配方奶調配之用。這是首次報告嬰兒因食用受退伍軍人菌污染的飲水機所調配的配方奶時，呼吸道吸入遭污染的配方奶而致退伍軍人病的案例。本案例提醒市售飲水機可能會附著退伍軍人病菌造成嬰兒感染致病，嬰兒發燒及肺炎應注意退伍軍人病的可能性。

- 3、今年一個案同時通報漢他及鉤端檢驗陰性，此個案入院後情急遽惡化，安裝葉克膜，經 multiplex RT- real time PCR 分析，尿液中有  $10^7$  copy/ml JC polyomavirus，全血檢體呈微弱 Dengue virus 陽性反應，經轉病媒病毒實驗室以 ELISA 確認登革熱陽性。

#### 4、伊波拉病毒監測

2014 年 8 月至 9 月 15 日止，以伊波拉病毒 RT-PCR 檢驗通報伊波拉病毒感染及疑似感染個案，共兩例，臨床檢體共 4 件，結果皆為陰性。

### (三) 病毒合約實驗室之陰性檢體、未知或無法分型之病毒株

- 1、自 2014 年病毒合約實驗室分離無法分型與定序之腸病毒共 30 件；其中檢出 Human Rhinovirus 7 件，Echovirus 3 件，Coxsackievirus 15 件，Enterovirus 1 件，Human Parechovirus (HPEV) 2 件。進一步分析 HPEV 2 株，經序列分析與演化樹排列，皆屬於第一型。
- 2、分析腹瀉病毒實驗室初步結果陰性之檢體共 35 件，檢測 HPEV，結果皆為陰性。
- 3、自呼吸道病毒及腸病毒檢測結果皆陰性的檢體中，以 IFA 及 RT-PCR 檢測到 22 例 Saffold virus 陽性，經過序列比對後顯示皆

屬於 SAFV-3。這些病患年齡層分布為 0-13 歲，且以小於 6 歲為主。接著以 2005-2013 年間的 841 個血清樣本進行中和試驗，結果顯示約六成的小孩具有中和抗體。

#### (四) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

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

- (1) 2014 年肺炎重症檢驗流程新增 multiplex RT- real time PCR 檢驗項目至 25 種病毒，包含 influenza A, B viruses, human adenovirus, RSV, coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1, MERS), human metapneumovirus, parainfluenza type 1-4, HSV1, HSV2, VZV, CMV, HHV6, HHV7, bocavirus, parvovirus B19, enterovirus, rhinovirus, HPeV，另 2 種細菌 (Mycoplasma pneumonia, Legionella pneumophila) 之 multiplex RT- real time PCR 評估測試中，預計 2015 年加入檢驗項目。腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至 40 種病原體，包含 Influenza A, B viruses, Human adenovirus, RSV, Coronaviruses (229E, OC43, NL63, HKU1), HSV1, HSV2, VZV, CMV, Human metapneumovirus, parainfluenza type 1-3, parainfluenza type 4a, 4b, HHV6, HHV7, HHV8, Bocavirus, Polyomavirus (JC, BK, WU, KI), Parvovirus, Enterovirus, Rhinovirus, Japanese Encephalitis virus, Dengue virus, West Nile virus, Toxoplasma gondii, Mycoplasma, Hendra virus, Rabies virus, Nipah virus, Balamuthia, Acanthamoeba, Naegleria, Borrelia 等。
- (2) 開發泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法: 2012 年 9 月，一種新型冠狀病毒「中東呼吸症候群冠狀病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus ; MERS-CoV)」源自中東地區被確認，為人類冠狀病毒 HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63 以及

HCoV-HKU1 病毒被發現以來，第六種可感染人類的冠狀病毒。有鑑於新型冠狀病毒持續於各國造成人類的感染，加強國內新型冠狀病毒檢測有其必要。故開發可檢測泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法(pan-CoV RT-PCR)，分析各種冠狀病毒之 RNA polymerase 基因序列，並於保守區域設計 primers，測試可檢測各種冠狀病毒的情形，目前已測試可檢驗人類 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1 與鳥類 Infectious bronchitis virus、豬 Porcine epidemic diarrhea virus 與貓 Feline coronavirus。

- (3) 2014 年共通報 165 件呼吸道感染群聚，其中 A 型流感 H1N1pdm09 19 件、H3N2 32 件、B 型流感 55 件、RSV 6 件、adenovirus 3 件。

## 2、微陣列晶片：

本署病原體微陣列晶片維持第三版(TWCDCChip-v3)，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。與美國勞倫斯利佛摩國家實驗室(Lawrence Livermore National Laboratory, LLNL)合作設計之晶片總計約 72,000 條探針，2,200 種病毒和 900 種細菌。累計實際由晶片檢測可檢測出 35 種病毒，包含 adenoviruses, enteroviruses-EV71, rhinoviruses, influenza A H1N1, H3N2, H7N9 viruses, influenza B virus, rotaviruses, norovirus, dengue virus type1-4, 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，

其中 H7N9 與 Rabies virus 為 2013 年檢測之陽性樣本。

### 3、 新世代高通量定序：

本年度完成 3 次次世代高通量定序，檢體包含

- (1) 2014 年 1 月至 8 月底通報腦炎或未知感染原，其中經 multiplex RT-real time PCR 分析後未檢出病原且通報系統註明有發燒、昏迷、抽搐或意識改變之 15 個案檢體。
- (2) 通報腸病毒合約實驗室，無法進行序列分析之 3 個陰性檢體。
- (3) 2014 年通報日本腦炎年齡 30 歲以下個案，檢驗陰性共 13 個 CSF 檢體。
- (4) 通報肺炎重症，無法檢驗出病原體之個案 13 例，進行高通量定序檢驗。

以上四類檢體以新一代高通量定序儀 Ion torrent 進行高通量定序分析，分析其他可能病原之存在。spike in 之 DNA virus (adenovirus) detection limit 在  $10 - 10^2$  copy/reaction，RNA virus (coronavirus 293E) detection limit 在  $10^2 - 10^3$  copy/reaction。經病毒資料庫序列比對有 RSV 及 parechovirus，目前正確認是出自哪個檢體。

### 4、 症狀通報、群聚事件而檢測為諾羅病毒與輪狀病毒陰性檢體：

2014 年截至 10 月份，共收到 205 起有關腹瀉群聚或食物中毒事件通報案件，其中 162 起群聚檢出諾羅病毒、輪狀病毒或相關細菌性病原，檢出率占所有通報群聚 79%，仍 43 起未檢出。為完整了解引起群聚事件之各種致病原分布概況，本研究設計以 (RT)-PCR 方式檢測另外 5 種新興腹瀉病毒 Sapovirus、Astrovirus、



Adenovirus、Aichivirus、picobirnavirus，從通報群聚中共檢出 57 起陽性，包括 Sapovirus 8 起(3.9%)、Astrovirus 2 起(1.0%)、Adenovirus 8 起(3.9%)、Aichivirus 2 起(1.0%)、picobirnavirus 37 起(18%)。依通報方式與相關疫調資料分析 picobirnavirus 37 起群聚事件(如下所示)，其中 12 起同時亦檢出其他病毒(Sapovirus、Astrovirus、Adenovirus、Norovirus、Rotavirus)，21 起為 picobirnavirus GI，4 起群聚中病患同時檢出 picobirnavirus GI/GII。主要通報方式與食物中毒群聚事件相關。

2014 PBV	群聚數	腹瀉群聚	食物中毒	未知
Adeno+PBVGI	5		5	
NV GII+PBV GI	1	1		
NV GII+PBV GI/II	1	1		
NV GII+PBV GII	1		1	
PBV GI	21	4	16	1
PBV GII/II	4	1	3	
RV+PBV GI	2		2	
SaV+PBVGI	1		1	
Astro+PBV GI	1		1	
total	37	7	29	1

#### (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) 資料庫定期更新 WHO 建議流感病毒疫苗株序列資料 (2 月份公佈北半球建議疫苗株，9 月份公佈南半球建議疫苗株)，例如 2015 年南半球疫苗株及 2014-2015 年北半球疫苗株皆含 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus，而 H3 的建議疫苗株則分別為 A/Switzerland/9715293/2013 與 A/Texas/50/2012 (H3N2)-like virus，B 型流感建議疫苗株則分別為 B/Phuket/3073/2013-like virus 與 B/Massachusetts/2/2012-like virus。歷年建議疫苗株亦已整理列表供大眾下載利用。此外，腸

病毒 71 型則維持 A、B1-B5、C1-C5 及 C2-like 亞型可供比對。

- (2) 截至 2014 年底，基因資料庫儲存之病原體資訊共包含 2005 年至 2013 年間發生之流感病毒 15,417 筆 (含近千筆 NA 基因序列)、腸病毒 11,250 筆及腺病毒 1,206 筆序列資料，可作為基因演化或流行病學分析之重要參考依據 (圖七)。在資料庫的使用狀況部份，截至 2014 年 11 月為止，已有 499 位的註冊者，以及將近三千九百人次之登入次數與超過三萬八千人次的瀏覽次數。註冊者的身份約有 51% 屬於各學校人員、約 15% 屬於醫院相關人員，顯示本資料庫可以提供學術及臨床研究上的參考 (圖八)。
- (3) 現有功能包含「序列資料比對」、「多重序列排比及親緣樹狀圖之繪製」、「序列引子設計」、「腸病毒 71 型病毒亞型比對」、「流感病毒疫苗株比對」以及「Proteotype 分析功能」。此外，使用者可在「流病資料或序列資料查詢」內查詢目前收錄的流行病學資料 (包括年齡、性別、城市及發病日等資訊)、以及序列的資訊報表 (包括序列編號、類型、Virus、Locus、發病日等欄位)。

## 2、 基因資料庫的防疫成效：

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

實台灣 2006-2007 年間出現新引入的腸病毒 71 型 C5 以及 B5 基因亞型<sup>38</sup>；2008 年年初則是確認當年腸病毒重症主要由腸病毒 71 型之 B5 基因亞型引起，與中國大流行之 C4 基因亞型不同。更進一步分析 2009-2012 年間的資料，顯示 2009 年主要為延續 2008 年的 B5 亞型(B5b)，但是 2010-2011 年主要流行亞型則轉為與中國大陸病毒株相當類似的 C4 基因亞型，2012 年再度以 B5 亞型為主，但其序列已稍有變異(B5c)，C5 亞型則是於 2010 年之後就沒有再被監測到<sup>40</sup>。此外，在已發表的克沙奇病毒 B3 以及 HPeV 相關研究中亦有利用「Proteotype 分析功能」來分析歷年病毒株的位點與基因群變化<sup>50,51</sup>。

## 四、討論

### (一) 未知/新興傳染病監測

- 1、 2014 年國內外發生重大新興傳染病有 H5N1、H7N9、MERS-CoV、伊波拉病毒與台灣狂犬病毒。大陸爆發 H7N9 流感病毒感染，已經歷 2 波疫情(2013 年 3 至 8 月、2013 年 10 月至 2014 年 5 月)，迄今已確認 456 例 (其中 175 例死亡)，2014 年 10 月後仍有案例出現。2012 年發現中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)感染案例，病例持續發生，迄今累計 885 例確診病例，其中 319 例死亡。西非伊波拉病毒感染人類案例，WHO 於 2014 年 10 月統計累計病例數為 13,567 例，其中 4,951 例死亡，實際死亡率約 70%。累計 523 名醫護人員感染，其中 269 人死亡。這些新興傳染病仍然威脅大眾的健康，本計畫監測肺炎與腦炎，涵蓋新型流感病毒 H7N9、H5N1 等、新型冠狀病毒 MERS-CoV 等與狂犬病毒所引起的症狀，當有個案出現時，期望能在最短時間內監測，爭取時效並俾利防疫的進行。
- 2、 本計畫監測點分布台灣北中南東各區，目前每年通報個案逐年增加，臨床醫師遇到無法解釋病因之個案，已會提高警覺，加強通報。這對可能未知可能爆發的傳染疾病的監測非常重要。這亦是本計畫重要的項目，提供不明與未知感染源檢驗平台。特別的案例有：H7N9 境外移入個案、嬰兒退伍軍人病感染、死亡個案 parainfluenza type 1 感染、腦炎個案 JC polyomavirus，parvovirus 感染、社區中 saffold virus 感染等。本計畫陽性個案中仍以常見的病原體為多，如流感病毒等。而 15 例肺炎重症陰性檢體進行 NGS 檢測，仍為陰性。如何將有限資源應用在「未知感染源對的檢體」

上，進而發現未知與新興的病原體，達到防疫與研究兼顧，是我們須思考解決的。

- 3、 分析不同時間分離之感染人類 H7N9 病毒基因序列，結果發現，H7N9 病毒之內蛋白基因(internal protein gene)歧異度很大，來自不同的 H9N2 病毒，顯示感染人類 H7N9 病毒，仍高度不穩定且持續變異中，H7N9 病毒與不同來源之 H9N2 病毒皆可能藉由 reassort 產生新病毒，若新組合病毒獲得較佳感染人類適應能力，將造成大規模流行。因此，持續對此病毒進行監測及演化分析將是防疫工作不可或缺的一環。
- 4、 狂犬病之病毒檢驗：因應 2013 年農委會於野生動物鼬獾檢出狂犬病病毒與民眾被狂犬病病毒陽性反應之鼬獾咬傷事件，實驗室已擴充分生檢測、血清學檢驗與病毒培養細胞等檢驗量能，而今年持續進行檢驗，所幸結果皆為陰性。
- 5、 今年伊波拉病毒之疫情，除了在西非造成嚴重的疫情外，尚有西班牙及美國的本土性個案皆因照顧病患時被感染。此外，世界各國支援的西非的非政府組織(NGO)、醫療團隊亦有少數人因而感染伊波拉，這些包含有美國、德國、西班牙、英國、法國及挪威的志工或醫護人員，雖然截至目前為止，只有發生在美國的一名旅客是由西非當地感染伊波拉後所帶入的，加上目前並無由台灣與西非國家直航的班機，所以伊波拉入侵台灣的風險極低。雖然如此，實驗室仍積極準備了針對伊波拉病毒的 RT-PCR 及 qRT-PCR 檢驗方法。這些檢驗方法有參考 Science paper (DOI:10.1126/science1259657)、日本 NIID 及歐洲 ECDC。截至目前共有四例來自奈及利亞發燒的疑似病例，經過實驗室診斷後，

皆為陰性排除感染。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

- 1、 multiplex real time PCR 因其敏感度高與專一性佳，已成為臨床分子檢驗主流的方法，目前只要有目標基因的序列，就可依序列設計出引子對與探針，加上基因 DNA 合成的便利，容易依基因序列製作陽性對照組(positive control)，且易組合不同檢測標的，形成針對不同症候群的檢測套組，有很好的便利性，目前本計畫已累積建立數十個病原體的 real time PCR 方法。multiplex real time PCR 方法除了可即時提供臨床檢驗資料，協助臨床醫師診治參考外，在本計畫整合檢驗技術平台中，real time PCR 方法也是敏感度高的篩選進入下一個與檢驗平台 NGS 的依據，因目前 NGS 檢驗方法在費用與時間上，無法涵蓋所有通報檢體，故目前搭配 real time PCR 方法，採兩階段整合的方式進行檢驗，以節省檢驗資源。
- 2、 高通量定序實驗中，spike in 之 DNA virus detection limit 在  $10 - 10^2$  copy/reaction 與往年相當。經更換新一代試劑進行 reverse transcription，RNA virus 敏感度提升至  $10^2 - 10^3$  copy/reaction，比去年  $10^4$  copy/reaction 較佳。此外，已與日本 NIID 生統部門合作進行初步合作，亦尋求與國內及其他國外生統專家合作，以增進分析方式的多元性。
- 3、 今年一個個案同時通報漢他及鉤端檢驗陰性，經 multiplex RT real time PCR 分析全血檢體有微弱 Dengue virus 陽性反應。經轉病媒病毒實驗室以 ELISA 確認登革熱陽性，顯示個案感染已有一段時間，抗體已出現。因此，案例的確診常需要實驗室的細心判斷以及各實驗室間的合作，才能達成。

- 4、 新型冠狀病毒感染人類不斷被發現，從 2003 年 SARS-CoV 後，陸續出現 HCoV-NL63、HCoV-HKU1 與 2012 年中東呼吸症候群冠狀病毒，故可能仍有其他新型冠狀病毒尚未被確認。為了加強國內新型冠狀病毒檢測，開發可檢測泛冠狀病毒 RT-PCR 檢測方法(pan-CoV RT-PCR)，並對通報肺炎重症個案進行檢測，應可提早發現新型冠狀病毒。

### (三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

- 1、 隨著生子生物技術與時俱進，序列資料結合流行病學資料，可協助鑑定以往傳統方法無法區分血清型之病原體，以及用作追蹤疫情、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。而我們不斷更新本署病原體資料、流感疫苗株資訊或腸病毒 71 型亞型資料等，輔以分析工具，能讓使用者獲得最佳的使用效率。
- 2、 資料庫目前收錄流感病毒的 HA 與 NA 基因、腸病毒的 VP1 基因、腺病毒的 hexon 基因，都是與抗原性、基因分型或抗藥性相關的區域。除此之外，由於分析基因重組或抗藥性等需求，腸病毒的 VP4 基因與 3C、3D 基因、流感病毒的 M 基因或者是增加收錄的重要病原體種類，都是未來的擴充目標。

## 五、結論與建議

- (一) 近年國內外所發生的H7N9、MERS-CoV、台灣H6N1、狂犬病毒、伊波拉病毒、例行檢驗陰性群聚感染、不明原因之死亡個案等社會大眾關切的事件，都有賴於即時建立檢驗方法以釐清感染源。尤其隨著交通便利與全球化國際間往來密集，新興傳染病可能由區域性的疾病，演變成全球性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康，今年的伊波拉疫情便是很好的例子，因此我們需要持續強化監測網與檢驗平台，同時建立未知與新興傳染病團隊，包含檢體收集與檢驗、疫調、臨床資料收集、防疫策略的推行等人員，當發現新的傳染病時，能即時獲得完整資料，了解此新興傳染病的生物與流行特性，以制定最佳防疫策略。
- (二) 目前建立的未知與新興傳染病團隊，持續穩定地執行計畫，通報個案亦逐年增加，檢驗平台亦持續精進。當發現新的傳染病時，檢體收集與檢驗、疫調、臨床資料收集、防疫策略的推行等可即時進行，並獲得完整資料，了解此新興傳染病的生物與流行特性，以制定最佳防疫策略。此外，未來將建議增加公共衛生及統計學等人才以利分析。
- (三) 精進未知與新興病原體的檢驗平台，並鼓勵相關醫院檢驗室提供未知或無法分型的病原體或檢體，如H7N9境外移入個案、台灣H6N1個案，快速死亡個案 parainfluenza type 1感染、嬰兒感染退伍軍人症等皆是加強通報後發現的個案，故加強精準通報與精進病原體檢驗平台，為未知與新興病原體監測的雙翼。
- (四) 基因資料庫目前所含資料以流感病毒、腸病毒及腺病毒為主，這些都是本國常見的病原體，而本資料庫是基因序列資料與流行病學資訊的



整合分享，已被應用在病毒流行趨勢監測、病原體演化特徵和抗藥性相關研究中，對於需大量資料分析的公共衛生研究及防疫應用層面皆有著重要參考價值，更期望能夠藉此資料庫促進資訊交流以及生技產業發展。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 形成未知與新興傳染病團隊，完成建立監測不明原因疾病，包含肺炎、腦炎、噬血症候群、不明原因快速死亡之收案條件、監測據點、通報流程、檢體收集流程與檢體檢驗流程。
- (二) 肺炎重症檢驗流程的multiplex real-time PCR檢測套組已新增檢驗項目至25種病毒、2項細菌(評估中)，腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至40種病原體，這些檢驗項目已包含近年的新興病原體，相信對於防疫能有效作為，亦可整合高通量基因定序檢驗方法。
- (三) 嬰兒發燒及肺炎亦有可能退伍軍人菌引起，嬰兒因食用受退伍軍人菌污染的飲水機所調配的配方奶時，呼吸道嚥入遭污染的配方奶而導致退伍軍人菌感染。
- (四) 新型流感病毒如H5N1、H7N9等病毒持續演化改變中，對人類的威脅增加，因此新型流感病毒監測仍需持續加強。
- (五) 感染人類的新型冠狀病毒不斷被發現，應加強國內新型冠狀病毒檢測。

### (六) 相關學術論文發表

#### 1. 已發表或已被接受：

- (1) Huang YP, Hsieh JY, Wu HS, Yang JY. Molecular and epidemiological study of human parechovirus infections in Taiwan, 2007-2012. *Journal of Microbiology Immunology Infection*. (Epub ahead of print)
- (2) Wei SH, Chou P, Tseng LR, Lin HC, Wang JH, Sheu JN., Liu MT, Liu FC, Wu HH, Lin MC, Ko CF, Lin HY, Kao PH, Hwang KP, Hsu YL, Kuo TL, and Chiang CS. (2014). Nosocomial neonatal legionellosis associated with water in infant formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 20:1921-4.

(3) Marjuki H, Mishin VP, Chesnokov AP, Jones J, De La Cruz JA, Sleeman K, Tamura D, Nguyen HT, Wu HS, Chang FY, Liu MT, Fry AM, Cox NJ, Villanueva JM, Davis CT, and Gubareva LV. (2014). Characterization of Drug-Resistant Influenza A(H7N9) Variant Viruses Isolated from an Oseltamivir-Treated Patient in Taiwan. *J Infect Dis* 2014.(accepted)

2. 已投稿：

(1) Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, et al. (2014) Characterization of Influenza A(H7N9) Viruses isolated from Human Cases Imported into Taiwan. *PloS ONE*.

(2) Huang TZ, Lauderdale TL, Liao TL, Hsu MC, Chang FY, Chang SC, Chen YT, Kuo SC, Chen TL, Mu JJ, Tsai SF. (2014) Effective Transfer of a 47-kb NDM-1 Positive Plasmid among *Acinetobacter* Species. *Science Translational Medicine*.

## 七、參考文獻：

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;**451**:990-3.
2. Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR, Sofair AN, Passaro D, Flood J, et al. Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerg Infect Dis* 2002;**8**:145-53.
3. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis--New York, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1999;**48**:845-9.
4. Granerod J, Ambrose HE, Davies NW, Clewley JP, Walsh AL, Morgan D, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis* 2010;**10**:835-44.
5. Mailles A, Vaillant V, Stahl JP. [Infectious encephalitis in France from 2000 to 2002: the hospital database is a valuable but limited source of information for epidemiological studies]. *Med Mal Infect* 2007;**37**:95-102.
6. Glaser CA, Honarmand S, Anderson LJ, Schnurr DP, Forghani B, Cossen CK, et al. Beyond viruses: clinical profiles and etiologies associated with encephalitis. *Clin Infect Dis* 2006;**43**:1565-77.
7. Osiowy C. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:3149-54.
8. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;**42**:1564-9.
9. Morris DJ, Cooper RJ, Barr T, Bailey AS. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *J Infect* 1996;**32**:113-7.
10. Arnold JC, Singh KK, Spector SA, Sawyer MH. Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 2008;**121**:e631-7.
11. Lin JH, Chiu SC, Lee CH, Su YJ, Tsai HC, Peng YT, et al. Genetic and antigenic analysis of epidemic influenza viruses isolated during 2006-2007 season in Taiwan. *J Med Virol* 2008;**80**:316-22.
12. Lin JH, Chiu SC, Shaw MW, Lin YC, Lee CH, Chen HY, 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, Mark J, Maselli JH, Yagi S, et al. Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clin Infect Dis* 2005;**41**:822-8.
14. Sloots TP, Whitley DM, Lambert SB, Nissen MD. Emerging respiratory agents: new viruses for old diseases? *J Clin Virol* 2008;**42**:233-43.
15. Arden KE, McErlean P, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol* 2006;**78**:1232-40.
16. Kahn JS. Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Curr Opin Pharmacol* 2007;**7**:478-83.
17. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;**7**:719-24.

18. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;**348**:1953-66.
19. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, et al. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 2007;**3**:e64.
20. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004;**23**:S25-32.
21. Lin JH, Chiu SC, Lin YC, Chen HL, Lin KH, Shan KH, et al. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan. *J Clin Virol* 2009;**44**:219-24.
22. Chieochansin T, Simmonds P, Poovorawan Y. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Arch Virol* 2010;**155**:2023-8.
23. Legay V, Chomel JJ, Fernandez E, Lina B, Aymard M, Khalfan S. Encephalomyelitis due to human parechovirus type 1. *J Clin Virol* 2002;**25**:193-5.
24. Stanway G, Joki-Korpela P, Hyypia T. Human parechoviruses--biology and clinical significance. *Rev Med Virol* 2000;**10**:57-69.
25. Al-Sunaidi M, Williams CH, Hughes PJ, Schnurr DP, Stanway G. Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. *J Virol* 2007;**81**:1013-21.
26. Watanabe K, Oie M, Higuchi M, Nishikawa M, Fujii M. Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:889-95.
27. <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, Chuang PC, Hsu LC, Wu HS. Taiwan pathogenic microorganism genome database and its applications. *Taiwan Epidemiol Bull* 2010;**26**:364-74.
31. Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;**79**:2814-22.
32. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013;**9**:e1003657.
33. Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000;**38**:1170-4.
34. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Arch Virol* 2003;**148**:1369-85.
35. Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerg Infect Dis* 2003;**9**:461-8.
36. Jian JW, Chen GW, Lai CT, Hsu LC, Chen PJ, Kuo SH, et al. Genetic and epidemiological analysis of influenza virus epidemics in Taiwan during 2003 to 2006. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:1426-34.
37. Jian JW, Lai CT, Kuo CY, Kuo SH, Hsu LC, Chen PJ, et al. Genetic analysis and

- evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004-2005 and 2006-2007 epidemics. *Virus Res* 2008;**131**:243-9.
38. Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, et al. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus Res* 2008;**137**:206-12.
  39. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virol J* 2010;**7**:277.
  40. Huang YP, Lin TL, Lin TH, Wu HS. Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLoS One* 2013;**8**:e80942.
  41. Tsou TP, Tan BF, Chang HY, Chen WC, Huang YP, Lai CY, et al. Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;**18**:1825-32.
  42. Chou CC, Lee TT, Chen CH, Hsiao HY, Lin YL, Ho MS, et al. Design of microarray probes for virus identification and detection of emerging viruses at the genus level. *BMC Bioinformatics* 2006;**7**:232.
  43. Wang D, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003;**1**:E2.
  44. Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, Torres A, Debroy C, Whittam TS, et al. Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. *J Clin Microbiol* 2006;**44**:1495-501.
  45. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007;**13**:73-81.
  46. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, et al. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;**46**:2519-24.
  47. Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol* 2008;**41**:69-74.
  48. Dacheux L, Reynes JM, Buchy P, Sivuth O, Diop BM, Rousset D, et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2008;**47**:1410-7.
  49. Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science* 2014;**345**:1369-72.
  50. Huang YP, Lin TL, Chen YJ, Hsu CC, Lin TH, Wu HS. Phylogenetic analysis and development of an immunofluorescence assay for untypeable strains of coxsackievirus B3. *J Microbiol Immunol Infect* 2013.
  51. Huang YP, Hsieh JY, Wu HS, Yang JY. Molecular and epidemiological study of human parechovirus infections in Taiwan, 2007-2012. *J Microbiol Immunol Infect* 2014.

## 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

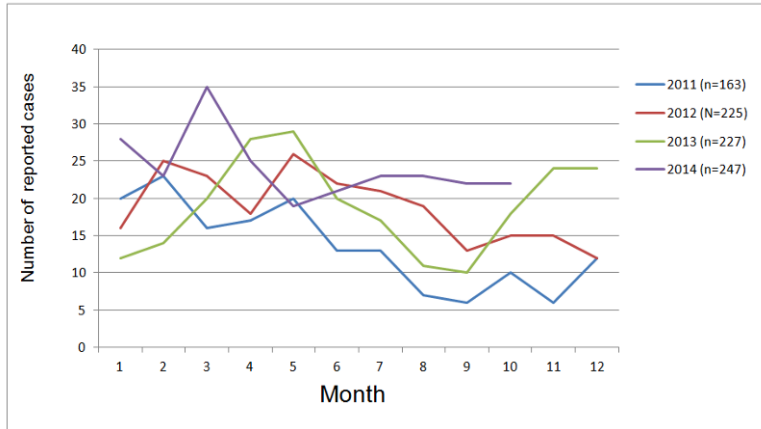
	確定病因	極可能病因	可能病因
檢體來源部位	1. 感染部位，包括痰、氣管 洗出液、肺部組織檢體、肋 膜液、呼吸道拭子 2. 血液	不拘	不拘
檢驗方法	1. 病原分離陽性 2. PCR陽性 3. 恢復期血清較急性期血清 抗體效價 $\geq 4$ 倍上升	除病原分離或PCR外之其他方 法檢驗陽性(如抗原快速檢 測)，或血清一採IgM檢驗陽性	不拘
檢驗陽性病原體 之特性	已知可造成嚴重人類肺炎， 且臨床表現與該個案表現相 符	已知可造成嚴重人類肺炎，且 臨床表現與該個案表現相符	非已知可造成嚴重人類肺 炎，或臨床表現與該個案不 相符
例子	1. 個案痰檢體流感PCR/培養 陽性 2. 個案血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

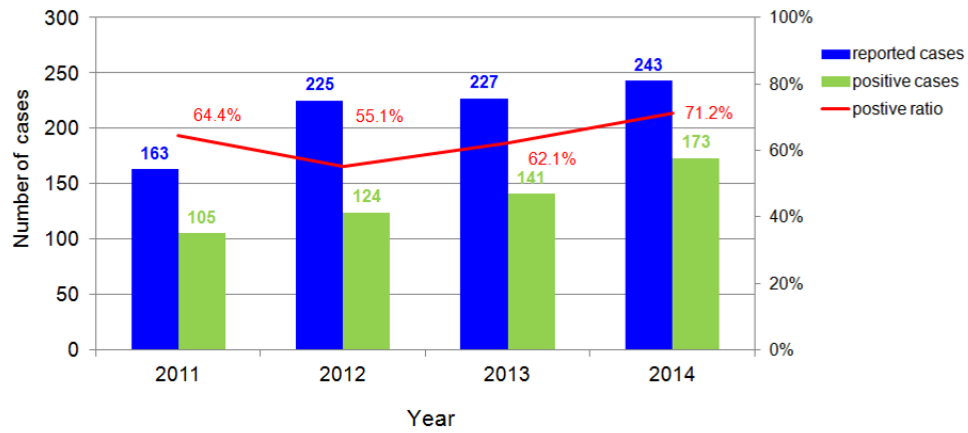
分類	確定病因	極可能病因		可能病因	
		I	II	I	II
檢驗結果	1. CSF 或腦組織偵測到病原體(如 PCR 或培養陽性)或 2. CSF 抗體陽性(當 PCR 非建議的診斷工具時)	CSF 或腦組織 PCR 或培養陽性	血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清檢測為疑似陽性(如只有 IgM 陽性)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)
病原體之特性	已被確認會造成人類腦炎，且病患臨床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



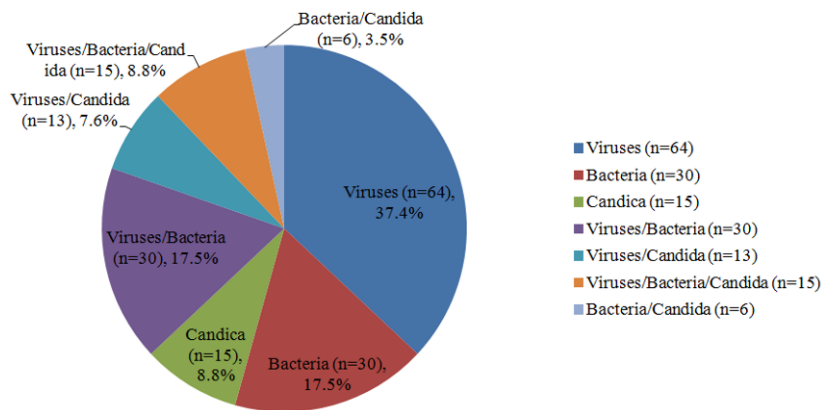
(A)



(B)

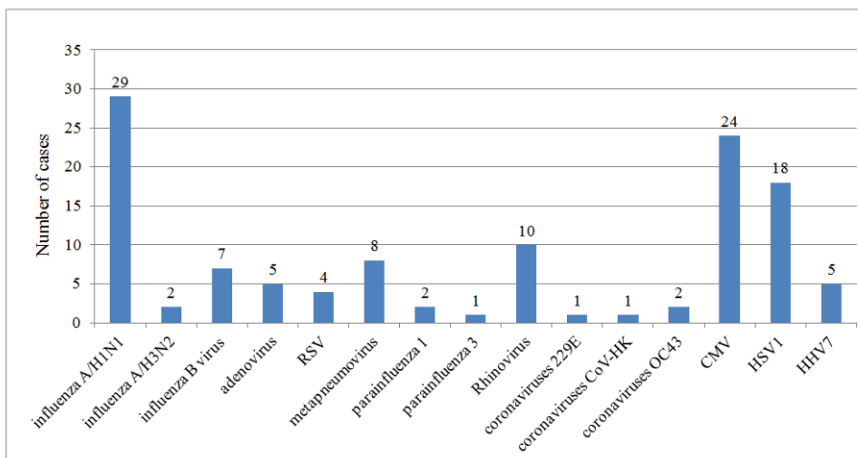


圖一、2011-2014 年肺炎重症 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。

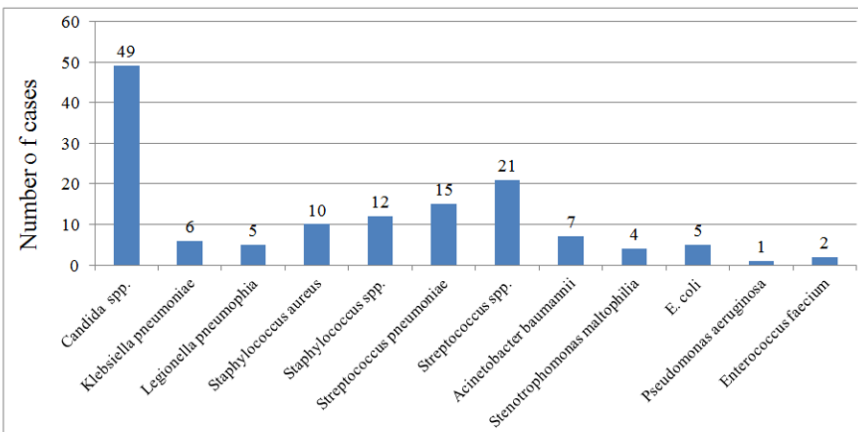


圖二、2014 年肺炎重症檢出各類病原體之比例

(A)

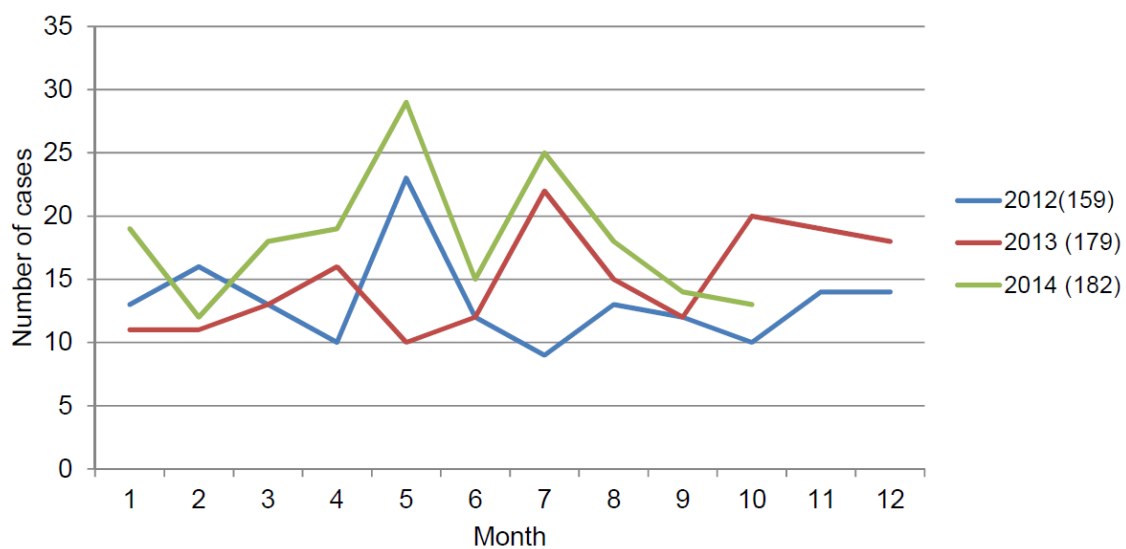


(B)

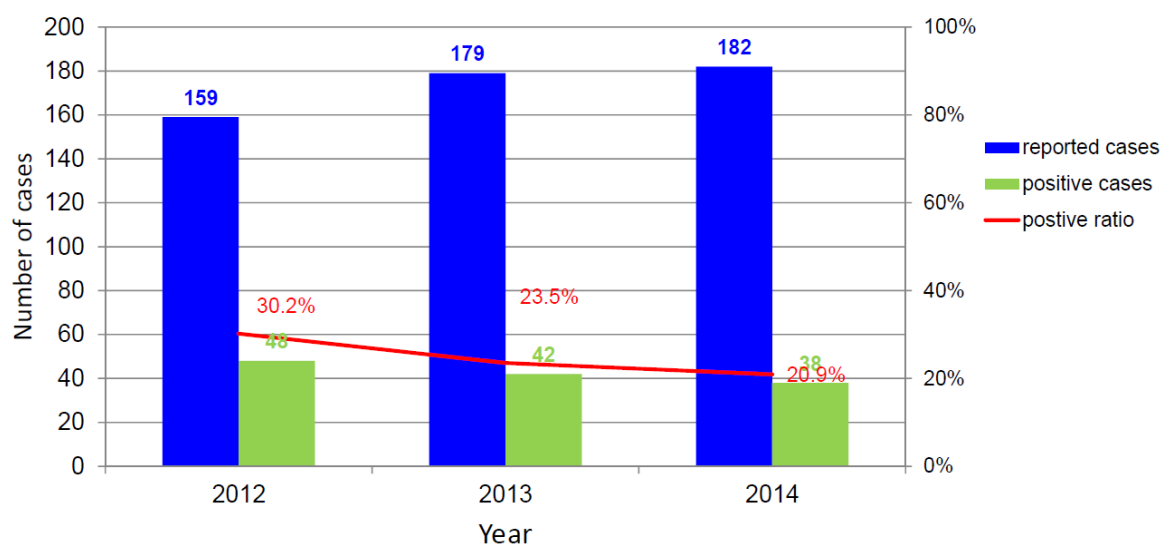


圖三、2014 年肺炎重症各類病原體之個案數 (A)病毒、(B)細菌及真菌。

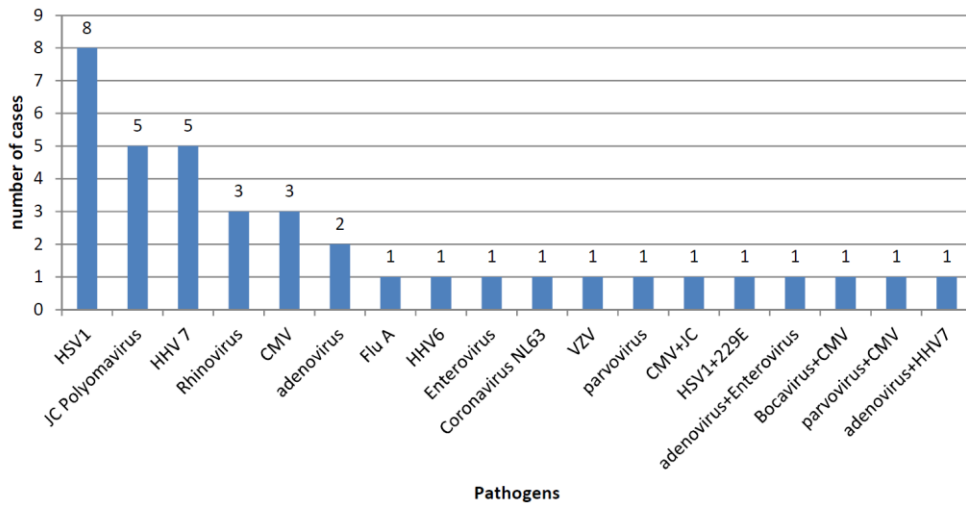
(A)



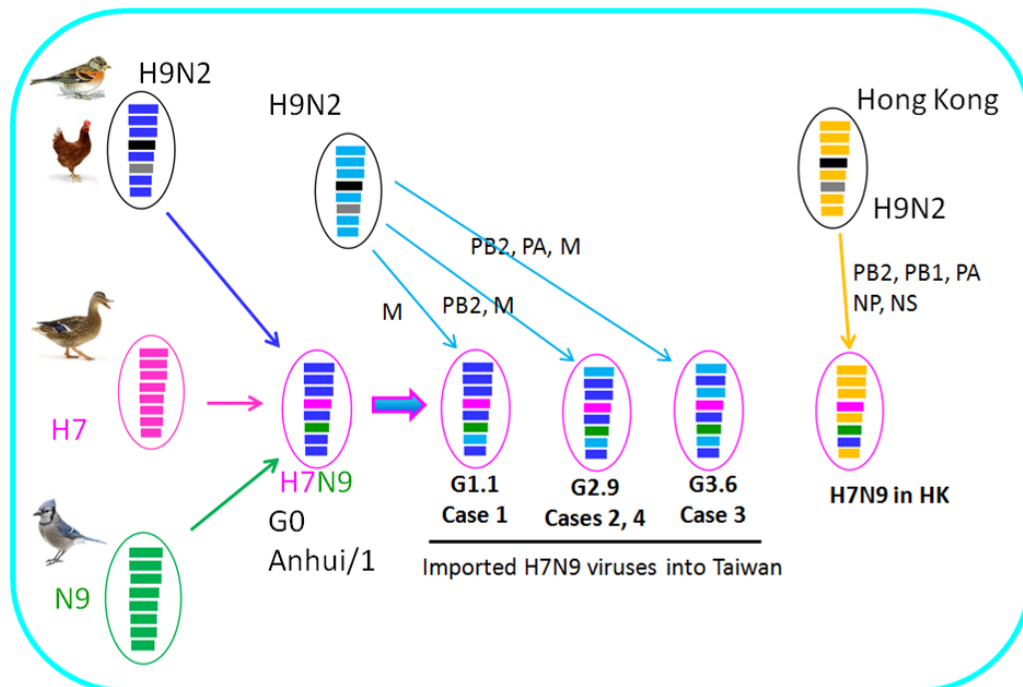
(B)



圖四、2012-2014 年通報腦炎及不明感染 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。



圖五、2014 年通報腦炎及不明原因各類病原體之個案數。



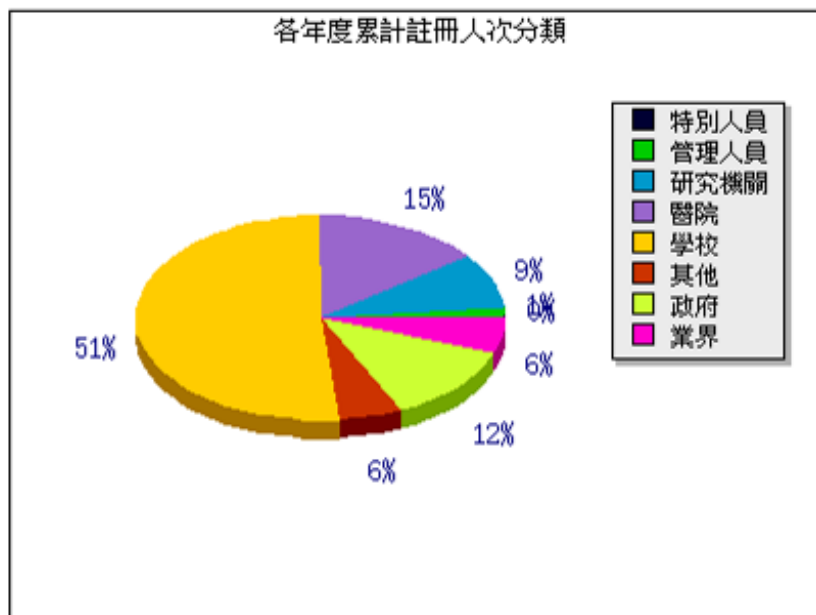
圖六、2013-2014 年台灣境外移入 H7N9 流感病毒基因片段演變圖示。自 4 例 H7N9 個案分離之病毒，依其基因片段不同組合可分成 3 種不同基因型。

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	2012	2013	總筆數
序列資料	Influenza	5	1234	1777	1124	4983	2526	2268	768	732	15417
	Human Enterovirus	0	31	1822	2793	1864	2843	774	723	400	11250
	Human Adenovirus	0	30	346	103	335	392	0	0	0	1206
全部	所有	5	1295	3945	4020	7182	5761	3042	1491	1132	27873

圖七、基因資料庫序列收錄種類及數量

累計註冊人次分類/年份	各年度累計						
	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	總數
特別人員	1	0	0	0	0	0	1
管理人員	4	1	0	1	0	1	7
研究機關	21	7	6	2	5	2	43
醫院	33	16	11	7	5	3	75
學校	105	57	36	21	25	12	256
其他	13	2	7	3	2	1	28
政府	31	10	5	6	6	3	61
業界	9	5	4	0	3	7	28
合計	217	98	69	40	46	29	499



圖八、基因資料庫之註冊人數與分類

不明原因肺炎

通報醫院：

1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人：

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

日期記錄統一以 (yyyy/ mm/ dd)

2 HOSPITALIZATION

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

\* Enrolled criteria:

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

Community onset 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
<b>Date</b>		
<b>Hematology</b>		
Hemoglobin g/dL		
WBC count /μL		
Band %		
Neutrophil %		
Lymphocyte%		
Eosinophil%		
Monocyte%		
Platelet *10 <sup>3</sup> /μL		
<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:_____
		AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
BAL		Gram stain: PMN:_____ /LPF ; Epi:_____ /LPF <input type="checkbox"/> GPC <input type="checkbox"/> GPB <input type="checkbox"/> GNC <input type="checkbox"/> GNB <input type="checkbox"/> yeast-like <input type="checkbox"/> No bacteria seen
		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Normal flora <input type="checkbox"/> Positive:_____
		AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Urine		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Blood		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM
Tissue (Site)		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive:_____ TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM



Throat swab		Virus isolation: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____
Others (Site)		Bacterial culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____
		Fungus culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive: _____
		TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM

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

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

**Serology result**

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

**PCR result**

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

**Other pathogen detection results:**

---



---



---

**5. IMAGE STUDY RESULTS: (within 7 days 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 but medical treatment was still required. Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____
<input type="checkbox"/> Transfer out	The patient was transferred out to _____ hospital on (____/____/____)(date), and the outcome was unknown.
<input type="checkbox"/> Mortality Date:_____	For patients who expired due to any causes The primary cause of death is related to this infectious episode reported: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes

**8. COMMENTS:**

---



---



---



---

## 9. Case Classification(初判)

- 不符收案定義  
 符合收案定義  
      有其他明確診斷非感染症  
      感染症  
          非肺炎  
          肺炎重症： 確定病因， 極可能病因， 可能病因， 檢驗均陰性

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

不明原因腦炎

1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人:

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

日期記錄統一以 (yyyy/ mm/ dd)

2 HOSPITALIZATION

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

\* Enrolled criteria:

(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 <input type="checkbox"/> |
| * 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) 之前的最糟狀況)                     |                 |                                                        |

### 4. Past History

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

### 5. 影像學檢查結果

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

若是異常，部位在：

temporal lobe ，white matter demyelination ，hydrcephalus ，brain edema ，  
any others：\_\_\_\_\_。

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

若是異常，部位在：

temporal lobe ，white matter demyelination ，hydrcephalus ，brain edema ，  
any others：\_\_\_\_\_。

\* EEG 日期\_\_月/\_\_日。 結果：正常 ，異常 ，未作 。

若是異常，結果為：

Diffuse slowing ，temporal epileptiform activity ，PLEDS ，  
any others：\_\_\_\_\_。

## 6. 一般檢驗結果

\* CBC (最早採檢日\_\_月/\_\_日)

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

\* CSF (最早採檢日\_\_月/\_\_日)

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

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

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

## 7. Serology

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

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

### 8. CSF testing

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

### 9. Other testing

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

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

Outcome	Criteria
<input type="checkbox"/> Cure	All or most of pretreatment signs and symptoms of the index infection had resolved, and no further therapy was required.
<input type="checkbox"/> Improved	The major signs and symptoms of infection had improved but medical treatment was still required. Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify:



<input type="checkbox"/> Transfer out	The patient was transferred out to _____ hospital on (     /     /     ) (date), and the outcome was unknown.
<input type="checkbox"/> Mortality  Date: _____	For patients who expired due to any causes  The primary cause of death is related to this infectious episode reported: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes

**11. COMMENTS:**

---



---



---