

計畫編號：DOH101-DC-2017

行政院衛生署疾病管制局 101 年度科技研究發展計畫

提升台灣地區呼吸道及腸道病毒檢驗能力與檢驗
品質監測系統

研究報告

執行機構：研究檢驗中心

計畫主持人：林智暉、林翠莉

研究人員：張慧文、林廷翰

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
封面	
目錄	
中文摘要	
英文摘要	
一、 前言	(1)
二、 材料與方法	(3)
三、 結果	(8)
四、 討論	(11)
五、 結論與建議	(13)
六、 計畫重要研究成果及具體建議	(14)
七、 參考文獻	(15)
八、 圖表	(17)
附錄	(20)

共 (27) 頁

摘要

中文關鍵詞

呼吸道病毒、腸病毒、能力試驗、實驗室檢驗效能提升

中文摘要

流感病毒及腸病毒是疾病管制局(以下簡稱本局)對於持續監控與預防的重要病原體；病毒性病原體監測體系的建立是由病毒性感染症合約實驗室所架構的，現行病毒性合約實驗室大多設立於可執行病毒性病原體檢驗之醫療院所，然而目前尚有一些有能力執行之醫療單位但並非為本局之病毒性合約實驗室，由於這些醫療院所將是在傳染病開始時第一線可與病原體最直接接觸的人員，所有實驗室上的操作流程將會影響病原體後續的擴散程度，並進一步反應到防治措施、診斷、治療更甚是生物安全等層面，所以更突顯出病原體分離與鑑定能力評估與檢驗品質監測系統的重要性。

本計劃除將原有的八家病毒性感染症合約實驗室納入該品質的監測體系外，已完成其他台灣地區尚有執行病毒性病原體分離的醫療院所，包括馬偕紀念醫院、中國醫藥大學附設醫院、台南奇美綜合醫院、高雄醫學大學附設醫院、高雄榮民總醫院、高雄長庚醫院以及高雄義大醫院等共計七家醫療院所之意願調查與訓練。在整體品質監測的系統上，以細胞之敏感性試(Sensitivity test)評估現階段各醫療院所使用細胞株之現況來推估各實驗室的分離能力，以實際樣本定期進行腸病毒及包括流感病毒在內的呼吸道病毒能力測試(Proficiency test)，提昇這些實驗室的呼吸道病毒及腸病毒之分離能力與鑑定能力；同時進行對實驗室技術人員之再教育，改善其檢驗技術流程並導入新興的檢驗方法及專業知識使其維持檢驗的品質，發揮例行性檢測的功能以及提升檢驗再浮現病原的能力。透過本計畫

的執行，已使這些新增之醫療院所無論後續是否為本局的病毒性合約實驗室，都能在疫病最初始發生之際，實驗室技術人員都能同步進行相同檢驗的流程、具有相同專業知識及在同一標準的生物安全防範下執行檢驗，更強健台灣的呼吸道病毒與腸病毒之檢驗能力，提升防疫效能。

Abstract

Influenza viruses and Enterovirus cause yearly epidemics worldwide in humans, and are some of the most active pathogens in Taiwan causing significant morbidity and mortality. According to the Communicable Disease Control Act, all suspected influenza severe complicated cases need to be reported and collected specimen to either Centers for Disease Control, R.O.C. (Taiwan) or Contracted reference labs through National Notifiable Disease Surveillance System (NNDSS). However, there are some Medical Centers in Taiwan have abilities to detect and diagnosis respiratory viruses and enteroviruses but are not included in our contracted labs system. We enlarge the scope to all the medical centers in Taiwan and cultivate those medical centers be the progenitors of the epidemics/outbreaks. Under the promotion of detection and diagnostic quality will turn the whole laboratory surveillance system may serve as an “early warning” system for domestic epidemics and may be important to predict the potential emergence of pandemics.

Keywords:

Influenza viruses; Enterovirus ; Proficiency test ; Laboratory detection
Quality control

一、前言

呼吸道病毒與腸道病毒每年或每隔幾年便周期性的在台灣地區感染人群，尤其當病毒發生抗原性變異或者是群體的免疫力下降時，更常造成大規模流行，並有許多人因為併發重症而需要急性照護甚至死亡喪失生命(1, 2)。在台灣造成流行的人類腸病毒屬於微小 RNA 病毒科 (*Picornaviridae*)、腸病毒屬 (*Enterovirus*)。病毒的直徑約 20~30 nm，為不具外套膜 (nonenveloped) 呈現立體對稱的正二十面體結構。病毒基因組大小接近 7.5Kb，從 5' 端至 3' 端的順序分別為：5'-NCR、VP4、VP2、VP3、VP1、2A (protease)、2B、2C、3A、3B、3C、3D (RNA polymerase) 及 3'-NCR (3-5)。5'-NCR 約有 750 個核苷酸，在基因之演化上為高度保守區域，VP4 和病毒 RNA 的穩定性有關，VP1-3 是和細胞接受器的結合及抗體結合有關，其中 VP1 不僅是中和抗體主要作用之區域，亦是基因序列中變化較大之區域(6, 7)，由於該病毒沒有外套膜，所以可以抵抗有機溶劑如酒精及氯仿等，並在酸性狀況下仍可維持其活性。地域之不同會使得腸病毒在季節循環 (circulation) 上出現差異(8)，台灣地處亞熱帶，所以腸病毒的流行也是全年的，冬季的流行不如夏、秋二季來得明顯，且每年從四月到十月中，可以觀察出有二波的流行，第一波在 4 月~7 月；第二波~在 9~11 月，第一波的流行幅度較第二波來得明顯，部份血清型亦會呈現互換 (replacement) 的情形。

而呼吸道病原體中包括 Adenovirus、Parainfluenza virus、HSV、RSV 等在台灣也是常見的呼吸道病毒，但其中流感病毒幾乎每年冬季在台灣都會造成大規模的流行，並且造成重症及死亡病例(1, 9, 10)。流感病毒屬於正黏液病毒科 (*Orthomyxoviridae*)，屬於負股 RNA 病毒，依其抗原性的不同可

分為 A、B、C 三型(11)，其中 A 型及 B 型與人類的流感流行息息相關。A 型流行性感病毒可依其抗原特性及其表面 16 種 hemagglutinin (HA)與 9 種 neuraminidase (NA)將一步進行次分型。已知所有型別的 HA 和 NA 在禽鳥類中均有被發現過，但只有少數型別包括 H1N1、H2N2、H3N2 三型曾在人類的世界中造成廣泛性的大流行。由全球的流感的監測顯示，許多溫帶地區的流感活躍期均是在冬季期間(12, 13)。在北半球，流感通常於 11 月至隔年 3 月流行，而南半球流行期為 4 月到 9 月，而熱帶地區就沒有比較明顯的流行季節。依據本局與全國各病毒性合約實驗室監測結果顯示，流感病毒在台灣雖以冬季高峰期，但夏秋仍有零星的高峰期出現，且同一時期可以有不同的病毒株同時存在(14)。

由於檢驗技術的困難度以及所需設備成本，過去台灣地區合乎水準的病毒檢驗室屈指可數。自衛生署於八十八年三月起在全國陸續委託大型教學醫院設立病毒性感染症合約實驗室後，期間透過經費的支援以及協助其檢驗技術上的提升，目前全國病毒性感染症合約實驗室已在北中南東各區的病毒性感染症防治工作上扮演重要角色。透過這些合約實驗室的持續監測，每一例腸病毒及流感重症病患均能得到最快速而精確之實驗室診斷；然而截至目前，台灣的八家病毒性合約實驗室均設立於可執行病毒性病原體檢驗之醫療院所，因此我們透過調查，將監測體系進一步擴大至台灣地區其他尚有能執行病毒性病原體分離的醫療院所，透過密集的教育訓練以及能力試驗等評估，提升其檢驗能力使足以加入第一線立即的病毒檢驗，同時也為我國建立寶貴的病毒性感染症資料庫，使我們對於重要病毒在國內不同地區及季節的活動狀況有所瞭解。

二、材料與方法

一、建立標準操作檢驗 SOP

A、細胞株繼代培養

1. 由液態氮中取欲 recover 之細胞株
2. 迅速置於 37 °C 水浴箱中回溫，以 Virkon 消毒液擦拭瓶蓋接合處
3. 緩慢滴入 10 ml 10%胎牛血清未含抗生素生長培養基後(視細胞株本身之需求而定)，將細胞放入 75 cm² 培養瓶中，置入 36 °C，5% CO₂ 之二氧化碳培養箱
4. 隔夜後觀察細胞生長狀況並移除上清液
5. 再放入 10 ml 10%胎牛血清未含抗生素生長培養基
6. 觀察細胞生長至培養瓶底部約八到九分滿之後，便可以進行後續繼代以作為病毒病原分離用

B、微漿菌之測定(Mycoplasma Detectiom) (採用 ATCC 之試劑套組)

1. 取至少經繼代二次而未加抗生素之細胞且不經 trypsin-EDTA 處理
2. 於 4 °C 下離心 20 分鐘 12000xg，並去除上清液
3. 加入 100µl 的 Lysis Buffere 混合均勻
4. 加熱 95 °C 10 分鐘
5. 取出 5µl 之檢體量(含待測檢體及陽性與陰性對照組)
6. 加入 1µl 之引子、45µl Taq polymerase buffer 及 0.2µl(lumit)Taq

polymerase

7. 混合均勻離心
8. 94°C 2 分鐘
9. 設定 30cycles (Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ;
Extention : 72°C , 60 秒)
10. 由第一階段完成 PCR 之產物中取出 5 μ l
11. 放入 1 μ l 之引子、45 μ l Taq polymerase buffer 及 0.2 μ l (1 unit) Taq
polymerase
12. 混合均勻離心
13. 94°C 2 分鐘
14. 設定 30cycles (Denature : 94°C , 30 秒 ; Annealing : 55°C , 30 秒 ;
Extension : 72°C , 60 秒)
15. Hold 4°C
16. 取出第二階段 PCR 產物 10 μ l 以電泳分析觀察最後結果，若遭黴漿
菌感染，則進行滅菌銷毀。

C、病毒株增量(15, 16)

腸道病毒

1. 將已發育完成細胞(RD 或其他細胞株)之培養基液體丟棄
2. 以 PBS 緩衝液清洗細胞表面
3. 接種適量病毒株

4. 置於二氧化碳培養箱培育 1 小時，每間隔 15 分鐘搖晃培養瓶，使病毒液均勻散佈在細胞之表層，以利吸附，隨即加入所需之培養液
5. 置於二氧化碳培養箱繼續培養
6. 翌日以倒立顯微鏡觀察細胞病變的發生
7. 當接種細胞呈現 4 價細胞病變(CPE)時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次
8. 4°C，2100g 離心 15 分鐘
9. 將上清液移至耐氣仿的離心瓶中，放入適量的玻璃珠及體積十分之一氣仿強烈振盪十分鐘
10. 4°C，2100g 離心 15 分鐘
11. 步驟重覆 10、11
12. 吸取上清液進行 CCID₅₀ 之測定

流感病毒

1. 將已發育完成 MDCK 細胞株之培養基液體丟棄
2. 以 PBS 緩衝液清洗細胞表面
3. 加入未含胎牛血清培養並置於二氧化碳培養箱繼續培養
4. 翌日以倒立顯微鏡觀察細胞病變的發生
5. 當接種細胞呈現 4 價細胞病變(CPE)時，則置於-70°C 及 37°C 冷凍、解凍二次
6. 4°C，2100g 離心 15 分鐘

7. 吸取上清液進行 CCID₅₀ 之測定

D. Viral Titration and Determination of CCID₅₀

1. 取 8 支 4 ml 容量塑膠管依序標示 1,2...8 各加 1.8 ml 之細胞維持培養基。
2. 取已增量之病毒株上清液 0.2 ml 加入第 1 管混合後取 0.2 ml 至第 2 管，依次稀釋至第 8 管。病毒稀釋液由 10^{-1} 至 10^{-8} 每一稀釋倍數 10 孔 (Micro plate)，每孔加 50 μ l 稀釋病毒、細胞對照 10 孔，每孔加 100 μ l 細胞維持培養基。
3. 置於二氧化碳培養箱繼續培養
4. 由翌日起每天以倒立顯微鏡觀察細胞形態是否改變
5. 觀察終止依 Reed & Muench 法計算病毒感染價 (CCID₅₀)。

二、能力試驗

分別針對腸病毒及流感病毒進行盲樣檢體能力試驗

A. 盲樣檢體之準備：

1. 所挑選病毒株佐以中和試驗、間接免疫螢光染色法及基因定序等方法鑑定型別，增殖後並以 CCID₅₀ 計算病毒量，並換算成每 200 μ l 所含 CCID₅₀ 以為盲樣檢體測試用。
2. 盲樣檢體之設計：每次測試檢體均準備 5 支，檢測結果包含分離陽性、陰性及型別鑑定結果，依參與家數決定測試件之組數，並經亂數編組處理後以條碼標示作編號。
3. 盲樣檢體體積：1~2ml/管，並已經穩定性測試及內部前行測試及分裝放入 -80°C 之狀態下保存。

4. 放入各能力測試之說明書

B. 盲樣檢體之運送：

測試檢體之運送全程均以乾冰為運送之條件，以快遞方式使所有檢測檢體均可於規定時間內到達所有各受測單位，並檢附說明，若有檢體狀況不佳的情形均可以立即回報並進行檢體的再寄送；原寄送檢體則馬上進行銷毀(以高壓滅菌方式進行)。

C. 檢測結果統計分析及成績計算：

各受測單位需於十四~二十一日內填妥相關資料回覆測試結果，能力試驗辦理單位經統計分析後再回覆各受測單位成績。

三、能力試驗檢討及操作人員之再教育訓練：

A. 能力試驗檢討

根據整體能力試驗之結果缺失進行檢討，除了由實驗紀錄中發現問題外，並實地派員至受測結果不理想的實驗室，自檢體的收件處理流程至操作全程過程，觀察日誌以及結果的判讀及檢驗報告發送，逐步分析及教育正確操作流程。

B. 操作人員之再教育訓練

提供各實驗室操作人員之教育訓練機會，由各實驗室派檢驗人員至本局實驗室進行為期一至兩週的教育訓練課程。課程內容涵蓋標準檢驗作業流程、生物安全作業的防範、實際操作流程之演練、腸病毒及流感病毒流行趨勢之分析及相關檢驗新知等，訓練完成將提供受訓

人員再次能力檢定，以進一步確認教育訓練成果。

三、結果

一、調查有意願之合約實驗室

本研究計畫主要執行內容為扶植有能力執行病毒性病原體分離與鑑定之醫療院所，協助其建立包括流感病毒以及腸病毒的標準檢驗流程並提升檢驗效率及結果的正確性。由於這些醫療機構的檢驗人員是傳染病開始發生時的第一線工作者，將會影響我們與病原體接觸的時間點，以及反應至防疫措施、診斷、治療、及生物安全等層面，突顯出病原體檢驗能力與檢驗品質監測系統的重要性。

本計畫完成調查有意願參與病毒能力測試與檢驗品質監測系統之醫療院所，總計十五家，包括疾病管制局八家病毒性合約實驗室(台大醫院、三軍總醫院、林口長庚醫院、台中榮民總醫院、彰化基督教醫院、國立成功大學附設醫院、高雄榮民總醫院、佛教慈濟綜合醫院)及七家具有執行病毒性檢驗能力之醫療院所(台北榮民總醫院、馬偕紀念醫院、中國醫藥大學附設醫院、奇美綜合醫院、高雄義大醫院、高雄大學附設醫院、高雄長庚醫院)。

二、檢驗細胞株敏感性測試

有關建立各醫療院所執行病毒性病原性檢驗的細胞株本資料亦是本計畫的重點之一，藉由各醫療院所目前所使用細胞株的情形，初步可以了解各醫療院所病毒實驗室可分離出病毒性病原體之範圍及種類，例行性檢驗時所使用之細胞株詳如表一，基本上 RD 及 MDCK 這二株細胞為各受測醫

療院所共同具備的細胞株，其他包括 Vero、MK2、H292、A549、MRC5 及 Hep-2 等細胞株則因應不同實驗室所需以為臨床病原體分離之用；而分析各實驗室細胞株的來源則包括下列數種：

- (1) ATCC (American Type Culture Collection)
- (2) 財團法人食品工業發展研究所(Bioresource Collection and Reserch Centere；BCRC)
- (3) Taiwan CDC
- (4) 各醫療院實驗室相互提供

細胞株基本資料的建立可以反應出相同來源及不同源的細胞株在不同實驗室實際的應用情形，並進一步可以協助分析病毒的分離率、操作的流程，實驗室技術人員的經驗等的差異；並藉由細胞標準操作規範(SOP)的檢視，可因應疫病發生時，若為分離出病原體之需，即可導入相對應敏感性之細胞株，如 2002 年 SARS 發生時，所需之細胞株為 Vero E6 即可隨時因應。

三、能力試驗評估

本計畫於 2 月完成腸病毒的盲樣檢體建置，選取台灣地區歷年流行株作為能力試驗樣本，如 EV71、Coxsackie virus A and Coxsackie virus B group 等病原體進行設計臨床檢體感染模式，測試範圍包括病原體之分離與鑑定及細胞株敏感性試驗，腸病毒能力試驗說明書設計如附件一，實際以本局已有簽約之 8 間合約實驗室及 7 間具有執行檢驗病毒能力之醫療院所，進行為期一個月的檢驗能力測試，結果共計有 11 家在腸病毒能力試驗成績答題正確率為 100%，其中四家未能達 100%，結果如表二所示。

對於腸病毒能力試驗正確率未達 100%的醫療院所，首先已電話連繫方

式處理，並依所出現之問題再進行測試；並進行該醫療院所之實地訪查與執行檢驗人員之後續再教育訓練，確認其已找出未正確原因之矯正與改善。之後本計畫於9月完成呼吸道病毒盲樣檢體之設計與內部測試評估，並於10月進行為期一個月的檢驗能力測試，能力試驗說明書設計如附件二，能力試驗結果本局八家病毒性合約實驗室已於11月底完成測試結果之回覆，結果如表三所示，八家本局合約實驗室的呼吸道病毒能力試驗正確率均達到100%。而另外七家非本局合約實驗室醫療院所預計於12月進行呼吸道病毒能力試驗。

四、討論

台灣地區對於病毒性病原體的監測，主要是以呼吸道病毒及腸病毒為主，不僅為傳染病監測之需，且該例行性檢驗系統亦建構在能執行病毒性檢驗的醫療院所，對於疫病發生時，如能提昇第一線的檢測流程與品質將有助於傳染病防治上的敏感度，在腸病毒能力試驗，測試範圍包括病原體之分離與鑑定及細胞株敏感性試驗。經過為期一個月的檢驗能力測試，結果共計有 11 家在腸病毒能力試驗成績答題正確率為 100%，其中四家未能達 100%的原因分析結果可能原因如下列數項：

(1) 未能於規定時間內分離出病原體及型別鑑定不完全(如表二)

(2) 本計畫不同於其他的能力測試模式如 CAP, 另外進行了所謂的“細胞敏感性試驗”，事實上該方法是為病原體分離過程中相當重要的一個內部品質監控指標，它不僅可以監控細胞的生長狀況、每位技術人員的操作更能反應至整體病毒的分離率，本次的能力測試是採用相同的病毒株(腸病毒七十一型)並完成定量測定，同步寄送至各受測醫療院所進行再一次的定量檢測，即使相同的 RD 細胞株所呈現的敏感性亦有所不同，以 CCID₅₀ 所示，測得最高的單位為彰化基督教醫院 CCID₅₀： $10^{-8.72}/50\mu\text{l}$ ，最低為奇美綜合醫院 CCID₅₀：為 $10^{-6.0}/50\mu\text{l}$ ，差異可達 500x，這樣的情形間接的反應出每個實驗室臨床檢體在進行病毒分離時，其分離率的受限於相當多的影響，如檢體的採檢、實驗室人員對於檢體的前處理、細胞的敏感性、實驗操作的流程、觀察細胞病變的能力及鑑定的流程等因素。

針對腸病毒能力試驗正確率未達 100%的醫療院所，所處理的後續程序是先以電話連繫方式處理，解決操作人員在操作步驟上的程序確認，之後並依所出現之問題再進行測試；同時在實驗室操作人員時間得以配

合的情形下到實驗室進行該醫療院所之實地訪查與執行檢驗人員之後續再教育訓練。

隨著季節轉換台灣開始進入流感病毒的流行季，由於 2012 年 9-10 月全省流感病毒的分離率較低，因此本計畫於 10 月進行第二階段的呼吸道病毒能力試驗，測試內容除了不同次型別的 A 型流感、B 型流感以及其他會造成類流感症狀的其他呼吸道病毒病原體共計 5 支盲測檢體，以使實驗室人員在接受完整的訓練過程後，得以銜接流感病毒的流行季。目前已回收的合約實驗室呼吸道病毒能力試驗結果正確率均已達 100%，顯示經過完整的能力試驗以及教育訓練，醫療院所對於病毒性感染症的檢驗能力都已達到水平之上。透過實驗室操作人員的技術指導，檢驗流程的標準化以及兩次能力試驗的評量，落實這些具醫療院所之呼吸道及腸道病毒性病原檢驗，達到提升檢驗品質及量能的目的。

五、結論與建議

隨著分子生物學的進步，使得臨床的檢驗導向了另一個檢測模式，但對於病毒性的病原體目前仍以傳統的檢驗方法檢測，即是細胞培養(cell culture)作為標準檢驗方法(golden standard)；惟病原體是否能夠被分離到，事實上受到相當多因素的影響，如檢體部位的採集、檢體的運送、運送的條件、細胞株的選取、檢體之處理恰當與否、實驗操作的流程、細胞病變觀察及鑑定病原體的能力等。病毒性病原體的分離與鑑定，對個案有著診斷、治療及癒後等影響；藉由系統性的能力測試及檢驗品質的提昇，可於疫病發生之際，健全整個防疫架構體系的一環，並可作為全國性之防疫檢驗網建制及監督之重要依據。

本計劃之主要目的在於落實並提升各實驗室之檢驗品質，由最基礎的細胞培養到病原檢測以及檢驗結果發佈的時效性逐步進行確認，本計劃不同於 CAP 的測試，最大的差別在於不是只求正確的檢驗結果，而是一步一步的藉由能力試驗的設計，如細胞敏感性試驗即可反應出平時操作流程及品質；並進一步針對操作人員後續的再教育，包括了操作流程、鑑定及新知的導入；藉由平日奠定紮實的基本檢驗功力以使第一線操作人員足以應付大規模流行，甚至進一步對於檢測新興及再浮現病原能力將有莫大的提升。

六、計畫重要研究成果及具體建議

重要研究成果

完成其他台灣地區尚有執行病毒性病原體分離的醫療院所，包括馬偕紀念醫院、中國醫藥大學附設醫院、台南奇美綜合醫院、高雄醫學大學附設醫院、高雄榮民總醫院、高雄長庚醫院以及高雄義大醫院等共計七家醫療院所之整體品質監測之提升，強化呼吸道病毒及腸病毒之分離與鑑定能力，以期健全並活化台灣的防疫網絡。

具體建議

1. 訓練病毒性病原體常規檢驗之種籽技術人員，並紮根於醫療檢驗體系
2. 已具基本病毒檢測能力的醫療院所持續進行再教育訓練，維持其第一線檢驗室人員的檢驗能力與品質
3. 貯備檢驗能力，因應疫病提昇最高檢驗量能
4. 進一步培養其對於新興及再浮現病毒的警覺性，加強台灣的新興疾病檢出能力，提升檢驗效能。

七、參考文獻：

1. 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 research*. 2007 Mar;124(1-2):204-11.
2. Wang HY, Tsao KC, Hsieh CH, Huang LM, Lin TY, Chen GW, et al. Inferring nonneutral evolution from contrasting patterns of polymorphisms and divergences in different protein coding regions of enterovirus 71 circulating in Taiwan during 1998-2003. *BMC evolutionary biology*. 2010;10:294.
3. Martin J, Dunn G, Hull R, Patel V, Minor PD. Evolution of the Sabin strain of type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *Journal of virology*. 2000 Apr;74(7):3001-10.
4. Nugent CI, Johnson KL, Sarnow P, Kirkegaard K. Functional coupling between replication and packaging of poliovirus replicon RNA. *Journal of virology*. 1999 Jan;73(1):427-35.
5. Vuorinen T, Vainionpaa R, Heino J, Hyypia T. Enterovirus receptors and virus replication in human leukocytes. *The Journal of general virology*. 1999 Apr;80 (Pt 4):921-7.
6. Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Archives of virology*. 2003 Jul;148(7):1369-85.
7. Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus research*. 1998 Nov;58(1-2):35-43.
8. Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, et al. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008.

- Virology journal. 2010;7:277.
9. Chien YS, Su CP, Tsai HT, Huang AS, Lien CE, Hung MN, et al. Predictors and outcomes of respiratory failure among hospitalized pneumonia patients with 2009 H1N1 influenza in Taiwan. *The Journal of infection*. 2010 Feb;60(2):168-74.
 10. Li WC, Shih SR, Huang YC, Chen GW, Chang SC, Hsiao MJ, et al. Clinical and genetic characterization of severe influenza B-associated diseases during an outbreak in Taiwan. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2008 May;42(1):45-51.
 11. Palese P, Young JF. Variation of influenza A, B, and C viruses. *Science*. 1982 Mar 19;215(4539):1468-74.
 12. Nelson MI, Simonsen L, Viboud C, Miller MA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals the global migration of seasonal influenza A viruses. *PLoS pathogens*. 2007 Sep 14;3(9):1220-8.
 13. Pybus OG, Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature reviews Genetics*. 2009 Aug;10(8):540-50.
 14. Shih SR, Chen GW, Yang CC, Yang WZ, Liu DP, Lin JH, et al. Laboratory-based surveillance and molecular epidemiology of influenza virus in Taiwan. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Apr;43(4):1651-61.
 15. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology*. 1980;12(6):329-34.
 16. Schmidt NJ, Lennette EH. Advances in the serodiagnosis of viral infections. *Progress in medical virology Fortschritte der medizinischen Virusforschung Progres en virologie medicale*. 1973;15:244-308.

八、圖、表

表一、各醫療院所例行性檢驗細胞株使用分析表

醫療院所	細胞株							
	RD	Vero	A549	Hep-2	MK2	MRC5	MDCK	H292
台大醫院	Green		Yellow	Green	Yellow		Green	
三軍總醫院	Green		Blue			Orange		
台北榮民總醫院	Orange			Orange		Orange	Orange	
林口長庚醫院	Orange		Orange		Orange	Orange		
馬偕紀念醫院	Orange		Orange	Orange		Orange		
中國醫藥大學附設醫院	Green		Orange		Purple			
台中榮民總醫院	Green		Orange		Orange	Pink		
彰化基督教醫院	Green	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange	
成功大學附設醫院	Green		Orange			Orange	Blue	
奇美綜合醫院	Yellow	Yellow	Yellow		Yellow	Yellow	Yellow	
高雄醫學大學附設醫院	Green		Orange	Orange	Yellow	Orange	Orange	
高雄榮民總醫院	Yellow	Yellow	Yellow		Yellow	Orange	Yellow	
高雄長庚醫院	Orange		Orange	Orange	Yellow	Orange	Orange	
高雄義大醫院	Yellow		Yellow		Yellow		Yellow	
佛教慈濟綜合醫院	Orange	Yellow		Yellow		Orange	Yellow	Orange

顏色區塊表示細胞株來源：

	CDC		BCRC		ATCC
	林口長庚		彰基		北榮

表二、一零一年腸病毒能力試驗分析表

合約實驗室	分離與鑑定 (50%)					敏感性試驗 (50%)	總分
	CA16	CB3	CB3+EV71	CA5	Neg		
台大醫院	3	4	4	3	*	$10^{-7.433}/50\text{u1}$	100
三軍總醫院	3	2	2	3	*	$10^{-7.19}/50\text{u1}$	100
台北榮民總醫院	7	3	3(EV71 未 檢出)	7	*	$10^{-7.5}/50\text{u1}$	95
林口長庚醫院	6	3	3	3	*	$10^{-8.17}/50\text{u1}$	100
馬偕紀念醫院	3	3(Hep-2)	3	10	*	$10^{-7.8}/50\text{u1}$	100
中國醫藥大學附設 醫院	3	3	2	3	*	$10^{-7.5}/50\text{u1}$	100
台中榮民總醫院	3	2	2	3	*	$10^{-7.5}/50\text{u1}$	100
彰化基督教醫院	4	2	2	2	*	$10^{-8.72}/50\text{u1}$	100
成功大學附設醫院	5	4	3	4	*	$10^{-8.44}/50\text{u1}$	100
奇美綜合醫院	5	6	6	6	*	$10^{-6.0}/50\text{u1}$	100
高雄醫學大學附設 醫院	3	2	2(CB3 未檢 出)	3	*	$10^{-8.3}/50\text{u1}$	95
高雄榮民總醫院	8	3(MK2)	3	4	*	$10^{-7.8}/50\text{u1}$	100
高雄長庚醫院	5(MRC5)	3(A549)	3(MRC5)	3	*	$10^{-6.5}/50\text{u1}$	100
高雄義大醫院	4	7	3(CB3 未檢 出)	4	*	$10^{-8.2}/50\text{u1}$	95
佛教慈濟綜合醫院	3	2(判定 NPEV)	2(CB3 未檢 出)	2	*	$10^{-7.83}/50\text{u1}$	90

備註：

1. 在分離與鑑定部份，數字代表出現細胞病變之天數，主要以 RD 細胞株為主，若分離天數較少 RD 細胞株，則標示出分細胞株名稱
2. *代表時間觀察終止未分離出病原體

表二、一零一年呼吸道病毒能力試驗分析表

合約實驗室	分離與鑑定					總分
	InfluA (H1)	InfluA (H3)	InfluB	Adenovirus	Neg	
台大醫院	v	v	v	v	*	100
三軍總醫院	v	v	v	v	*	100
林口長庚醫院	v	v	v	v	*	100
台中榮民總醫院	v	v	v	v	*	100
彰化基督教醫院	v	v	v	v	*	100
成功大學附設醫院	v	v	v	v	*	100
佛教慈濟綜合醫院	v	v	v	v	*	100
高雄榮民總醫院	v	v	v	v	*	100

1. v 代表正確分離出該病原體

(統計日至 11/16 日止)

2. *代表觀察時間終止仍未檢出病原

附錄

附件一

腸病毒能力試驗說明書

●測試目的：腸病毒之分離與鑑定能力與細胞敏感性試驗。

●檢體說明：

1. **分離與鑑定**：每一受測單位共有 5 支檢體，檢體量為 1.5ml，檢體收件後，請即刻觀察測試檢體之保存狀況，若於當日執行檢測，請將冰凍狀態之檢體置於 37°C 水浴中回溶後，靜置 30 分鐘(2-8°C)，方可接種；隔日接種則應將檢體置入-80°C 中保存，進行接種時步驟如當日執行檢測流程。
2. **細胞株敏感性試驗**：測試檢體計有 1 株，測試細胞以 RD 細胞株為其來源；操作前請將冰凍狀態之檢體置於 37°C 水浴中回溶後，靜置 30 分鐘(2-8°C)進行 CCID₅₀ 之測定。
(操作流程請依各實驗室自訂之標準作業程序進行)

●檢驗試劑之選擇及操作程序注意事項：

1. 以實驗室例行性檢驗之標準操作程序，進行培養及鑑定工作，惟檢體之接種量應為每管 0.2ml(0.2ml/tube)，每支檢體應接種 2 管；以 10 天觀察終止。
2. 各實驗室可選擇三株常用於分離腸病毒之細胞株進行培養，惟 RD 細胞為必需接種之細胞株。
3. 由於病原體對於細胞的感受性不一，建議每日觀察細胞病變並注意細胞外觀之變化及非腸病毒病原體之干擾。
4. 參考選用試劑之說明書，訂定檢驗標準作業程序手冊，並依規範進行操作。

●測試檢體寄送時間：101 年 3 月 12 日

●測試檢體抵達時間：101 年 3 月 13 日

●參與測試實驗室注意事項：

1. 執行此測試時，請詳閱並遵循說明書內指示進行。
2. 請先檢視檢體狀況(若容器有破損情形，請立刻以高壓滅菌處理)，核對支數及文件之完整(含能力測試說明書及報告單)；另檢體若呈現不當之狀況(如破損、外漏污染等現象)，請立即以高壓滅菌處理，並於當日收件後通知疾病管制局研究檢驗中心以利補寄作業。
3. 請依常規作業進行病毒之分離及鑑定，病原體型別之鑑定以間接免疫螢光染色法為主(病毒合約實驗室螢光鑑定需含由疾病管制局所提供之螢光試劑)；其餘鑑定方式則不列入計分標準。
4. 應用於實驗室常規運作狀況下執行此測試樣品之檢測，其泛指人員、儀器、試劑、選用方法及相關程序等。
5. 執行檢測時請於第二等級生物安全操作櫃內進行，作業完成後樣品及相關廢棄物

均需經高壓滅菌處理始可丟棄。

6. 測試檢體代碼均黏貼於檢體瓶上，請詳細核對。

●檢驗結果回覆注意事項：

1. 請於收件後**十五日**(以郵戳為憑)內將結果報告單及每日觀察記錄表(可影印)傳真或郵寄至行政院衛生署疾病管制局昆陽辦公室研究檢驗中心林翠莉小姐，若檢驗結果填寫不完整或逾期回覆，將視同未參加此次測試。
2. 請各實驗室在報告回覆後並將所分離出之病原體放置於-80℃冰箱保存，俾利因測試結果之需將病毒株回寄疾病管制局，二個月後即可高壓滅菌丟棄。

●聯絡人：

行政院衛生署疾病管制局昆陽辦公室研究檢驗中心林翠莉小姐

電話：(02)27850513-402

傳真：(02)26530403

地址：115 台北市南港區昆陽街 161 號

附件二



病毒性合約實驗室呼吸道病毒品管測試說明書

一、品管測試檢體寄出時間：101 年 10 月 16 日 15:00，以檢體運送箱寄送，檢體收到後若有疑問，請與本局 郭禮文 小姐 聯絡，電話 (02) 2785-0513 轉 820。

二、測試內容：

一、內容物

1. 5 支檢體—VR2012-01 至 VR2012-05
2. 細胞感受性測試標準品乙支。請以 MDCK 細胞株進行。
3. 說明書乙份
4. 結果表乙份 (本次測試之結果表另以電子郵件寄送至貴院)

二、保存及操作說明

1. 測試檢體如不立即進行檢測，請保存於 4°C (**請勿放置於-20°C**)
2. 送達檢體如有破損情況，請立即以高溫高壓滅菌處理，減低感染或污染機率，並立即知會本局研檢中心。
3. 有關測試檢體操作說明如下：

VR2012-01 至 VR2012-05 等 5 支檢體請依照**防疫檢體**操作程序，進行流感病毒 real time RT-PCR 快速檢驗及病毒培養、螢光染色及 A 型流感 PCR 次分型。

三、請於檢驗完成後將結果及細胞感受性記錄於 **101 年 11 月 16 日**之前以電子郵件、傳真或郵寄回本局 (本次測試之結果表將另以電子郵件寄送至貴院)

郵寄地址：115 台北市南港區昆陽街 161 號

傳真電話：(02) 27853944

電子信箱：jeffy320@cdc.gov.tw