

計畫編號：DOH102-DC-2601

衛生福利部疾病管制署 102 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、許麗卿、吳芳姿、
鄒宗珮、魏嵩璽、洪敏南、陳婉青、趙雁南

研究人員：黃元品、楊季融、陳昱汝、謝若郁、黃御哲、
曾于銓、蔣世峰、黃佖龍、陳協成、劉浩毓

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 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		(11-23)
三、結果		(24-34)
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		(41-43)
七、參考文獻		(44-46)
八、圖、表		(47-55)
附錄一、肺炎重症收案問卷		(56-62)
附錄二、腦炎重症收案問卷		(63-67)

共(67)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。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，已因此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、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、狂犬病病毒或者是中東呼吸症候群冠狀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, mutations, genome recombination, drug abuse and zoonoses, microorganisms are more likely to mutate into novel pathogens that could be transmitted across species boundaries like NDM-1, SARS, pandemic (H1N1) 2009, H5N1, H7N9 avian influenza, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) than ever. Due to the intense international 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 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 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 expected 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及2013年的H7N9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¹。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，仍有許多感染症患者無法得到確切診斷，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(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。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；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^{23, 24}，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，利用分生檢測方法，直接針對該病毒核酸進行檢測，過去檢測的結果已發現到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，且幾乎全發生在開發中國家，亞洲地區的發生率最高。早在日據時代已有發生狂犬病的紀錄，民國36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，40年共發生283例，及41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病例。而在91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。101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。102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。民國50年後不再有動物病例，但行政院農業委員會於102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。

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

由於國際間已建立大型病原體基因資料庫暨分析平台，包括內含各種基因體資訊的National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)，可供使用者免費使用；流感基因資料庫 (<http://www.flu.lanl.gov/>)，近年已改為需付費方能使用；愛滋病毒基因資料庫 (<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。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。本病原體基因資料庫(舊版)自設立上線以來，超過兩千四百個使用人次登入使用，所含的序列資料超過六萬條。並本署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，目前規劃每半年定期更新，同時更新NCBI及世界衛生組織(WHO)相關資料³⁰，而這些資料皆無償供各界使用，貫徹政府資訊公開及資源共享之原則。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，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。

流行性感冒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16種HA(H1至H16)與9種NA(N1至N9)³¹。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之區域，亦為序列高變異區域^{32, 33}，也較常被用作分析³⁴。我們持續收集合約實驗室的病毒株，將其序列合併流行病學資訊上傳至資料庫，並進行分析以追蹤病毒來源及序列變異。本署已藉此進行許多分析，如：簡智偉等人分析2003-2006年間的流感病毒基因及流病資料³⁵、研究B型流感的基因重組情況³⁶、黃元品等人分析95-96年的腸病毒71型係屬於新引入的B5及C5基因亞型所引起³⁷，更確認97年所大流行的腸病毒71型也屬於B5基因亞型，與中國大陸流行的C4基因亞型或新加坡流行的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100年的流行³⁹。

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。

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 \leq 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：由防疫醫師研判後通知送驗。

4、 採檢送驗

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、 檢驗結果告知

檢體送達本署研究檢驗中心一週內，multiplex PCR 結果將登錄於本署法傳電腦系統，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。

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 μ 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 μ 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：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)，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 Database⁴⁰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。並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 5µl 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 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 48 μ l 第二次 PCR 產物、60 μ l 2X SDS 雜交反應溶液(Genisphere Inc.)及 12 μ l 10X Cy3 quality control targets (Agilent Technologies) 混合均勻，於 80 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，與晶片於 65 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 0.4 μ l Dendrimer 3DNA capture reagent、60 μ l 2X SDS 雜交反應溶液(Genisphere Inc.)及 60 μ l nuclease free water 混合均勻，於 80 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘後，與晶片於 65 $^{\circ}$ 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 μ 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°C 作用 60 分鐘。合成之第一股 cDNA 續加入 DNA ligase、DNA polymerase 及 RNase H，16°C 作用 2 小時完成第二股的合成 (second strand synthesis)。將 6~8 個完成第二股 cDNA 之檢體合併一起，純化後送高通量定序。

(2) 序列分析：分析完成之序列，先過濾與人類基因相符之序列，再比對 Genebank 中 virus 資料庫。

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 µL 為模板，加入 20 µL 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 0.4 µM 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 2.5µL 為模板，加入 22.5µL PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4 µM 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 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ 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 MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μ 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 μ L 為模板，加入 23 μ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 μ 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 μ L 為模板，加入 24 μ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase 及 0.4 μ M 每個分析引子 (1245Rfwd/ SV-R2)。反應條件：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 1 分鐘，共 45 個 cycle，最後 extension 72 $^{\circ}$ 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 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M

隨機引子及 2 μ 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)、20U RNase 抑制劑及含 50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μ 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 μ L 為模板，加入 11.5 μ L PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 μ 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 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ 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 MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μ 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 μ L 為模板，加入 23.5 μ L PCR premix，含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4 μ 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 1μL 為模板, 加入 24μL PCR premix, 含有 1X QIAGEN HotStarTaq Master Mix 及 0.4 μM 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 μL 為模板, 加入 1.5 μL 20 μM 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 40μL RT-PCR 混合液, 反應總體積為 50μL。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 μL 為模板, 加入 12.5 μL PCR premix, 含 1X PCR Buffer、2.5 unit HotStarTaq DNA Polymerase、200 μM 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^{44, 45}：以 ABI 7500 來作分析，取 5 μ 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 μ 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 μ 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 μ l 的 cDNA，將 cDNA 直接進行 PCR1 反應，加入 2 \times PCR buffer、200 μ M dNTP、50 pmol primers (AN353 and AN355)，2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)，補足水至 50 μ 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 μ l PCR1 產物，加入 40 pmol primers (PCR 2A: AN353 and AN357; PCR 2B: AN369 and AN358)、200 μ M dNTP、2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen)，總體積為 50 μ 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-PCR⁴⁶：取 5 μ 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
- (4) 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。
- (5) 目前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。除了本署提供的資訊外，也將 WHO 公佈之流感疫苗資訊以及相關病原體序列資訊存入資料庫中，如：國際資料庫 NCBI。而統計報表介面，可計算使用者登入情況，以及統計資料庫中序列以及流行病學資料的數量。
- (6) 分析功能：除了維護與更新序列比對 (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)、多序列排列、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之外，亦持續規劃相關的分析功能。
- (7) 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、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，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) 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。
- (3) 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。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。
- (4) 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

102 年 1 月至 11 月 6 日止，共計 185 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 100-102 年每月通報與送驗數目，發現 1-5 月通報數較多，6-9 月較少(圖一 A)，病原體的檢出率約 55-64% (圖一 B)。102 年 185 例案中有 114 例(61.6%)檢驗出病原體，其中 41 例(36%)檢出病毒，39 例檢驗出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 19 例最多，CMV 15 例次之(圖三 A)，influenza A(H1N1)pdm09 19 例中有 6 例同時感染 *Candida albicans*，15 例 CMV 陽性中亦有 6 例有同時檢驗出 *Candida albicans*。102 年發現 3 例 parainfluenza type 3 感染，且 1 例死亡個案，parainfluenza type 3 在肺炎重症個案較少發現。在檢出細菌與真菌等病原體中，以 *Candida albicans* 41 例最多，另外有 3 例 *Legionella pneumophila* 案例，其中 1 例為少見嬰兒感染(圖三 B)。

2、 腦炎及未知感染原監測結果

102 年 1 月至 10 月，共計 142 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 1-4, 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 及 Rabies virus 等 35 種病毒檢測) 進行檢驗。比較 100-102 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 22.8-30.2% (圖四 B)。102 年 142 例個案中 36 例(25.4%)檢驗出病原體，4 例檢驗出兩種以上病原體同時感染 (圖五)。大部分病原出現於咽喉拭子檢體中，本年有 2 例個案 CSF 中檢測出病原，分別為腸病毒 Echovirus 30 及 1 個 CMV+VZV coinfection。

3、 疑似接種疫苗不良反應、噬血症候群及狂犬病監測：

102 年通報 2 起疑似接種疫苗不良反應死亡個案，檢送血液、心、肺、肝、脾及氣管等各組織，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鼻咽拭子檢驗出 parainfluenza virus type 3 及 CMV coinfection，骨髓及血清則為陰性。

因應狂犬病在台灣出現，以回溯性方式檢測 99-102 年通報本監測計畫之 CSF 剩餘檢體 175 個，均為 rabies 陰性。並於 11 月正式將 rabies 加入 multiplex RT-real time PCR 例行檢測套組，進行狂犬病即時監測。

(二) 特殊案例

1、 H7N9 感染

102 年 2 月中中國大陸發生人類感染 H7N9 案例，迄今(11 月)共確認 138 例 H7N9 流感病例(其中 45 例死亡)。台灣自今年 4 月 3 日起將「H7N9 流感」列為第五類傳染病，迄今累計共 450 例通報病例(其

中 40 例為中國大陸來台人士)，1 例境外移入確定病例，447 例排除 H7N9 感染(其中 56 例檢出 H1N1 流感，40 例檢出 H3N2 流感，6 例檢出 B 型流感)。

2、 H6N1 感染

H6N1 禽流感病毒是家禽間普遍存在的病原，但其感染人類的案例在過去卻不曾發現。102 年 5 月 23 日台灣發現一名患者感染 H6N1 亞型病毒，這是人類首度感染 H6N1 禽流感病毒之案例。該患者為一名 20 歲女性，在早餐店工作，發病前未曾出國也未有相關禽鳥接觸史。其症狀包括發燒、咳嗽、頭痛、肌肉痠痛以及輕微肺炎，在投予抗病毒藥物克流感後，症狀好轉並已康復出院。除了從呼吸道檢體分離 H6N1 病毒外，自該名患者所採集的成對血清以紅血球凝集抑制試驗檢測的效價分別為 1:40 以及 1:80，可再次佐證病患確實曾被該 H6N1 感染。經由一系列的相關接觸者採檢送驗，以及患者住家附近養禽場家禽檢體檢驗均未檢出 H6N1 禽流感病毒；故目前仍無法得知此 H6N1 病毒之感染源。此外，病毒全基因序列分析結果顯示，本次感染人類的 H6N1 病毒與流行於台灣家禽間的 H6N1 病毒具高度同源性，可能透過禽類不同 clade H6N1 病毒基因重配 (inter-clade reassortment) 產生(圖六)。值得注意的是，此人類 H6N1 流感病毒與部分台灣禽類 H6N1 病毒均具有 HA 蛋白 G228S 胺基酸的特有突變，表示此突變可能藉由增強病毒 HA 蛋白對人類上呼吸道受體之親和力，使其更容易由禽鳥傳染至人類，也增加在人類間互相傳播的可能性。故此病毒未來對人類的潛在威脅仍需持續監控，而各國對於禽流感病毒的整備工作亦不可忽視。

(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 101 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 Human Parechovirus (HPeV) 共 5 株；經序列分析與演化樹排列，皆屬於第一型，其序列與當年發現之 HPeV1 相近，與以往病毒在序列上發生變異，獨立形成一亞型(圖七)。今年收件 111 支無法分型與定序之檢體，檢測出 Human Rhinovirus (HRV) 共 16 件為最多，其次為 CA6 有 11 件，其他有 4 件 EV68，2 件 CA4、CA10、CA16 及 CB2，CA9、CA21 及 ECHO30 各 1 件。
- 2、為釐清歷年病毒合約實驗室分離之腸病毒株，挑選培養後仍能產生細胞病變之病毒 22 株，其中非腸病毒共有 11 株，包括 7 株 HSV、3 株 HRV 與 1 株腺病毒，而腸病毒則發現 2 株 EV68、1 株 E3 與 CB4，在 97 年病毒株發現 4 株 C4 亞型之 EV71。
- 3、分析腹瀉病毒實驗室初步結果陰性之檢體共 247 件，檢測 HPeV 與 Cardiovirus，結果皆為陰性。
- 4、病毒合約實驗室送驗 1 株無法分型之 A 型流感，經基因序列分析為 H6N1 亞型。

(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) 102 年肺炎重症檢驗流程新增檢驗項目至 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。腦炎或未

知感染原檢驗流程新增檢驗項目至 35 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 1-4, 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 及 Rabies virus。

- (2) 因應 A 型流感 H7N9 與 H6N1 次亞型人類感染案例的出現，建立具專一性與區分次亞型的 RT- real time PCR 方法。
 - (3) 因應中東呼吸症候群冠狀病毒(Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS-CoV) 感染案例增加，為加強監測 MERS-CoV，建立 MERS-CoV real-time RT-PCR 方法，並加入肺炎重症通報個案檢驗項目。
- 2、 102 年共通報 118 件呼吸道感染群聚，其中 A 型流感 H1N1pdm09 37 件、H3N2 36 件、B 型流感 1 件、RSV 9 件、adenovirus 3 件。
 - 3、 檢測病毒合約實驗室通報 enterovirus，無法進行 enterovirus 或 HPeV 之 PCR 及其序列分析之檢體：

收集 101 年病毒合約實驗室通報 enterovirus，無法進行 enterovirus 或 HPeV 之 PCR 及其序列分析之檢體共 21 個，以 multiplex RT-real time PCR 套組檢測，其中 3 例為 RSV，2 例 Rhinovirus。剩餘 16 個陰性檢體，以高通量定序分析其他可能病原(請見新世代高通量定序)。
 - 4、 微陣列晶片：

- (1) 本署病原體微陣列晶片更新第三版(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。
- (2) 102 年共 8 例肺炎重症通報個案，經 multiplex real-time RT-PCR 與培養陰性者，進行微陣列晶片檢測，結果亦為陰性。累計至 102 年經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 102 年檢測之陽性樣本。

5、 新世代高通量定序：

102 年 1 月至 7 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、抽搐或意識改變之個案共 21 名。取其剩餘血清或腦脊髓液共 56 個檢體，合併病毒合約實驗室通報 enterovirus，經 multiplex RT-real time PCR 分析後之 16 個陰性檢體，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。

上述 72 個檢體分成 A 及 B 兩組以 barcoding 同時進行 Ion torrent 之高通量定序，並 spike in parainfluenza virus 3 之 RNA (RNA virus)及 HSV1 之 DNA (DNA virus) 作為 detection limit indicators。其中 A 組 spike in 10^3 copy 之 parainfluenza virus 3 RNA 及 10^2 copy 之 HSV1 DNA; B 組 spike in 10^4 copy 之 parainfluenza virus 3 RNA 及 10^1 copy 之 HSV1 DNA。經病毒資料庫序列比對後 A 組得到 2256 筆病毒序列，包括 spike in 之 10 筆 HSV1 序列，沒有 parainfluenza virus 3 序列產生。B 組得到 5661 筆病毒序列，包括 spike in 之 9 筆 HSV1 序列，27 筆 parainfluenza virus 3 序列，其餘病毒序列如表(表四)。經 PCR 確認，saffold virus 出自病毒合約實驗室通報之 11 個檢體，來自中部兩家醫院，分別為 9 個及 2 個檢體，有群聚現象。尚有 1 個來自病毒合約實驗室通報之檢體為 reovirus。而 HCV 序列雖然只有一筆，經 PCR 確認後，存在 3 個通報不明原因腦炎個案檢體中。其中 1 個案血清，1 個案 CSF，1 個案血清及 CSF 檢體中存有 HCV 核酸。

6、 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

102 年 1-10 月期間，各地腹瀉群聚事件或食物中毒群聚事件，經由各地衛生單位與醫院通報與採檢發病個案與疑似接觸者的糞便檢體，以常規檢驗諾羅病毒、輪狀病毒或部分細菌性檢驗後，排除兩項病毒與細菌已檢出之群聚事件，從各檢驗均陰性之群聚挑選仍有剩餘糞便檢體的個案，進行新興腹瀉病毒之分析。本年共挑選 486 件糞便檢體，進行其他腹瀉新興病毒分子檢測：項目包括 adenovirus、aichivirus、astrovirus、sapovirus、picobirnavirus、echovirus 與 salivirus/klassevirus 之 RT-PCR 或

nested- PCR 檢測與病毒序列確認分析。

依所有通報個案檢驗結果統計，檢出為諾羅病毒陽性件數占 19.5%、輪狀病毒陽性占 3.7%、部分有通報檢測細菌陽性數 43 件，其餘檢出各類病毒陽性個案數如下：sapovirus 陽性 8 件(1.6 %，8/486)、astrovirus 陽性 1 件(2.0‰，1/486)、aichivirus 陽性 3 件(6.2‰，3/486)、Echovirus 陽性 2 件(4.1‰，2/486)、picobirnavirus 陽性 32 件(6.6%，32/486)、另 1 件 aichivirus 與 picobirnavirus co-infection (2.0‰，1/486)，新興病毒總檢出率占所有通報陰性個案之 9.67%。分析無法檢測出任何病原可能的因素，包括通報樣本中因防疫調查需求而採集的疑似接觸者樣本，但非有症狀的個案，或者採檢日期離發病日過長(超過 7 日)，病人在這期間採樣糞便中含病毒量過低，致使無法檢出；這些都可能使檢出陽性率偏低的原因。

依所有通報個案以群聚分析統計，分別為諾羅病毒群聚數 61 起、輪狀病毒群聚數 13 起、部分有通報檢測細菌群聚數 37 起，其餘檢出各類病毒陽性群聚數: sapovirus 3 起、astrovirus 1 起、aichivirus 4 起、Echovirus 1 起、picobirnavirus 12 起，其中 co-infection 不同病毒或細菌之群聚 8 起。

(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)，以達到序列比對的準確性，例如 2014 南半球疫苗株及 2013-2014 北半球疫苗株皆含 A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus 與

B/Massachusetts/2/2012-like virus，而 H3 的建議疫苗株則分別為 A/Texas/50/2012 (H3N2)-like virus 與 A/Victoria/361/2011 (H3N2)-like virus，歷年建議疫苗株亦已整理列表供大眾下載利用。此外，今年於腸病毒 71 型參考序列中新增一株 B5 亞型序列，目前總計有 A、B1-B5、C1-C5 及 C2-like 亞型可供比對。

- (2) 「流病資料或序列資料查詢」：使用者可使用年份、月份、流病資料類別的下拉選單查詢目前收錄的流行病學資料（包括流水號、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）。截至 102 年，基因資料庫儲存之病原體資訊共包含 94 年至 101 年間發生之流感病毒 14,685 筆（含近千筆 NA 基因序列）、腸病毒 10,848 筆、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（圖八）。
- (3) 在資料庫的使用狀況部份，截至 102 年 11 月為止，已有 467 位的註冊者，以及將近三千五百人次之登入次數與超過三萬五千人次的瀏覽次數。註冊者的身份經過分析顯示約有 52% 屬於各學校人員、約 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（圖九）。
- (4) 現有功能包含「序列資料比對」：可得知目標序列與台灣或世界各國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/未知病原體，例如 98 年時，利用序列比對確認國內首例新型流感重症病例。「多重序列排比及親緣樹狀圖之繪製」：可繪製親緣樹狀圖分析彼此間的親緣關係。「序列引子設計」：採用 Primer3 套件，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。「腸病毒 71 型病毒亞型比對」以及「流感病毒疫苗株比對」：使用者經由單筆序列或者多筆資料批次輸入並比對後，分別得到最可能的腸病毒 71 型基因亞型或流感病毒疫苗株型別。

- (5) 新增「Proteotype 分析功能」，使用者上傳序列後可分析高變異的位點，接著上傳流行病學資料，即可與位點序列資料合併後產出視覺化的圖形，使用者可依流行病學資料進行排序，而不同胺基酸序列則標記不同的顏色，提供直觀的時序演化分析（圖十）。

2、 基因資料庫的防疫成效：

- (1) 在先前的研究中，腸病毒 71 型經由序列資料比對，證實台灣 95-96 年間出現新引入的腸病毒 71 型 C5 以及 B5 亞型³⁷；97 年年初則是確認當年腸病毒重症主要為腸病毒 71 型之 B5 基因亞型引起，與中國大流行之 C4 基因亞型不同，並提出該年腸病毒可能大流行之預警。而今年更進一步分析 98-101 年間的資料，分析結果顯示 98 年主要為延續 97 年的 B5 亞型(B5b)，但是 99-100 年主要流行亞型則轉為 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 101 年則是再度以 B5 亞型為主，但其序列已稍有變異(B5c)，至於 C5 亞型則是於 99 年之後就沒有再被監測到。此外，在胺基酸分析中顯示 VP1 基因的位點 145 發生變異可能與病毒株的毒力高低有關。
- (2) 流感病毒的部份則是與 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，此結果可用來判斷病毒株型別、確認病毒來源，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。

- (3) 今年度新增的「Proteotype 分析功能」已應用在時序演化分析中，例如在 96-101 年的克沙奇病毒 B3 相關研究中用來分析歷年病毒株的位點與基因群變化⁴⁷。

四、討論

(一) 未知/新興傳染病監測

- 1、 102 年國內外發生新興傳染病有 H7N9、MERS-CoV 與台灣 H6N1 和狂犬病毒。102 年 2-3 月大陸爆發 H7N9 流感病毒，迄今已確認 138 例 (其中 45 例死亡)，11 月後仍有案例出現。101 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 150 例確診病例，其中 64 例死亡。台灣發現 1 例 H6N1 人類感染以及爆發動物狂犬病毒感染。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，涵蓋流感病毒 H7N9、H6N1、MERS-CoV 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，以目前的人力與檢驗量能仍無法全面開放至各醫療院所，成為類似以前之症候群通報系統，故本監測系統可能存在監測代表性，與無法推估疾病盛行率等問題。本計畫著力點為未知與新興病原體的檢驗，過多通報與檢驗的個案，會使計畫淪為例行的檢驗，以 102 年為例，有 24 例檢出 A 型流感病毒 H1N1pdm09 與 H3N2，較不尋常有 3 例 parainfluenza type 3。如何將有限資源應用在”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、 102 年新增噬血症候群檢驗及通報，後續會與醫院研究單位合作，利用已建立的檢驗平台，齊力解決臨床上不明的感染，如移植或化療後之發燒感染症。

(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 35 個病原體的 real time PCR 方法。
- 2、 因 multiplex real time PCR 建立需目標基因的序列，故發現新病原體，其基因序列的公布與分享對防疫檢驗很重要，MERS-CoV 發現即時就公布其基因序列，大陸 H7N9 亦是如此；本次台灣發現 H7N9、H6N1 病毒與狂犬病毒，也是第一時間就公布其基因序列，訊息與資料透明化，才能因應無國界的新興傳染病。
- 3、 高通量定序或下世代定序(NGS)的進步，對未知與新興病原體的檢驗與發現有很大的助益，同時也可能取代原多重檢驗方法，如 microarray 微陣列晶片檢測，本計畫因有專家委員建議停止病原體微陣列晶片的檢測，改開發建立新的高通量檢測方法，目前微陣列晶片檢測已不再更新探針數目與種類，將持續建立下世代定序(NGS)的檢測方法。
- 4、 高通量定序實驗中 spike in parainfluenza virus 3 (RNA virus)及 HSV1 (DNA virus) 作為 detection limit indicators，結果 parainfluenza virus 3 之序列只出現在 10^4 copy 之 B 組，HSV 之序列在 10 及 10^2 copy 之 B 及 A 組均出現，由此實驗推估 RNA virus detection limit 大約在 10^4 copy/reaction 左右，DNA virus 在 10 copy/reaction。RNA virus 較 DNA virus 敏感性(sensitivity)較差可

能因為 RNA 須經過反轉錄 RT 及第二股 cDNA 合成(second strand synthesis) 之過程形成完整的雙股 DNA 結構，才能構築定序所需之 library。一連串的過程造成耗損，因而敏感度降低。從 DNA virus 之 sensitivity 結果可發現高通量定序之 sensitivity 不輸 real-time PCR，因此，只要克服 RT 過程之損耗，使 RNA virus 敏感度提升，則可使高通量定序達到較佳之效能。

- 5、 從症狀通報、群聚事件而檢測為諾羅病毒與輪狀病毒陰性檢體中驗出 sapovirus、astrovirus、aichivirus、echovirus、picobirnavirus、aichivirus 與 picobirnavirus co-infection。分析無法檢測出任何病原可能的因素，包括通報樣本中因防疫調查需求而採集的疑似接觸者樣本，但非有症狀的個案，或者採檢日期離發病日過長(超過 7 日)，以及病人在這期間採樣糞便中含病毒量過低，導致無法檢出。

(三) 建立高質化病原體防疫資料庫及創新應用技術

- 1、 基因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。目前每半年進行一次資料庫資料的更新，包括本署的病原體資料、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，同時也持續設計小工具有利於資料分析，尤其今年度的「Proteotype 分析功能」能以直覺式的顏色、圖形呈現出分析結果，更是能提高大量資料分析的效率。
- 2、 目前資料庫包含流感病毒的 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，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，皆是未來資料庫的擴充目標。另一方面，我們正規劃一項結合流行病學資訊與序列資料進行分群的功能，相信更能增加大量資料分析時的便利性。

- 3、 狂犬病之病毒檢驗：今年 5 月 11 日接獲疑似狂犬病感染境外移入個案，針對該個案檢體（唾液拭子與腦脊髓液），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，結果僅唾液拭子結果呈陽性，經核酸序列比對結果，該個案確定為狂犬病病毒感染，且發現序列與菲律賓發表之序列(EU086202, Rabies virus isolate 94280PHI)最為相似，確定其感染源為於菲律賓咬傷該個案之犬隻。並為了因應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，實驗室已擴充檢驗量能，含分生檢測、血清學檢驗與病毒培養細胞等，以支應外界恐慌性的送驗檢體及釐清感染與否。

五、結論與建議

- (一) 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，並造成社會大眾的恐慌，因此持續強化監測網與檢驗平台，仍是必要的。近年所發生的H7N9、MERS-CoV、台灣H6N1、狂犬病毒、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，大大降低這些事件對社會的衝擊，其成果亦可作為防疫策略制定的參考。
- (二) 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。
- (三) 厚實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，例如本次台灣H6N1的個案，為病毒合約實驗室分離培養，並送到疾病管制署，做進一步分離鑑定後發現。
- (四) 目前以合併檢體方式進行高通量定序，可分攤昂貴的實驗費用，再加上標誌系統(barcode indexing)，可在一次定序實驗中進行更多檢體的分析。
- (五) 高通量定序敏感度可與real-time PCR比擬。此次從高通量定序實驗中發現一些較少見或意想不到的病毒出現，但實驗中仍有大部分序列無法找出其涵義，因此，需藉助Bioinformatics的協助擬定分析策略，以建置完整的分析平台。
- (六) 基因資料庫所含資料以流感病毒、腸病毒及腺病毒為主，這些都是本國十分常見的病原體，而本資料庫也已經被應用在病毒流行趨勢監測

與預測模式之建立、病原體演化特徵和抗藥性相關研究中，以及可提供防疫政策制定上的重要參考資料，希望能夠在未來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。由於本資料庫是基因序列資料與流行病學資訊的整合分享，能提供更完整的資訊，加上新增的同步呈現序列與流行病學資訊的proteotype功能，可直覺地顯示分析結果，不僅僅為國內外資料庫的先例，更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。除此之外，本著資源共享的運作原則，任何人皆可使用資料庫中的公開資訊，僅有需要更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，並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。

六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 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) 臺灣自48年起不再有人類狂犬病的病例，傳染病個案通報系統自89至102年共計通報11例狂犬病個案，91年及101年各發生一例自中國大陸境外移入病例，102年發生一例自菲律賓境外移入病例。回溯99-102年不明原因腦炎個案檢驗檢體，狂犬病檢測均為陰性。為加強人類疑似感染狂犬病監測，以有效早期偵測感染病例，現階段規劃針對「需加護病房治療」之不明原因腦炎病患進行通報，並採集唾液、腦脊髓液及背頸髮根部皮膚切片送驗狂犬病。
- (三) 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，腦炎或未知感染原檢驗流程新增檢驗項目至35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。此外，高通量基因定序能快速地累積龐大資料，利用這些資料可轉化成病原體檢測的利器並強化防疫策略。
- (四) 102年2月中國大陸發生人類感染H7N9案例，台灣自今年4月3日起將「H7N9流感」列為第五類傳染病，迄今累計共450例通報病例(其中40例為中國大陸來台人士)，1例境外移入確定病例，447例排除H7N9感染(其中56例檢出H1N1流感，40例檢出H3N2流感，6例檢出B型流感)。此外，今年5月首度發現H6N1禽流感病毒感染人類的案例，並建立H6N1 real-time PCR 檢測方法。除了從呼吸道檢體分離H6N1病毒外，自該名患者所採集的成對血清以紅血球凝集抑制試驗檢測的效

價分別為1:40以及1:80，可再次佐證病患確實曾被該H6N1感染，但是目前仍無法得知此H6N1病毒之感染源。此外，病毒全基因序列分析結果顯示此人類H6N1病毒與流行於台灣家禽間的H6N1病毒具高度同源性，可能透過禽類H6N1病毒基因重配(inter-clade reassortment)產生。值得注意的是，此人類H6N1流感病毒與部分台灣禽類H6N1病毒均具有HA蛋白G228S胺基酸的特有突變，可能藉由增強病毒HA蛋白對人類上呼吸道受體之親和力，使其更容易由禽鳥傳染至人類，也增加在人類間互相傳播的可能性，故仍需持續監控此病毒對人類的威脅。

- (五) 自症狀通報、群聚事件而檢測為諾羅病毒與輪狀病毒陰性檢體中驗出 sapovirus、astrovirus、aichivirus、echovirus、picobirnavirus、aichivirus 與picobirnavirus co-infection，其中新興病毒總檢出率占所有通報陰性個案之9.67%。
- (六) 病原體基因資料庫對外開放網站暨分析平台於98年完成網站建構與對外開放，目前包含五大部份：1、資料庫簡介、最新資訊及操作說明，2、查詢及各項分析工具，包括序列比對、基因分型、引子設計、proteotype等功能，3、資料庫管理介面，4、人員管理介面，5、意見交流、申請須知等其他細項。本計畫持續更新病原體資料，所儲存的序列資料已超過兩萬六千筆，而今年新增的proteotype功能，能夠直覺地顯示分析結果，不僅僅為國內外資料庫的先例，更能夠提高使用大量資料分析的便利性。同時，我們已規劃一項結合流行病學資訊與序列資料進行分群的功能，期待能夠簡化大量資料分析的步驟；另外一個打算規劃的功能則是流感病毒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具有抗藥性相關的突變。

(七) 相關學術論文發表

- 1、 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. *Journal of Microbiology Immunology Infection*. 2013 (in press) (SCI 1.631)
- 2、 Huang YP, Lin TL, Lin TH, Wu HS. Antigenic and genetic diversity of human enterovirus 71 from 2009 to 2012, Taiwan. *PLOS ONE* 2013 (accepted) (SCI 3.73)
- 3、 Lo YC, Chen WC, Huang WT, Lin YC, Liu MC, Kuo HW, Chuang JH, Yang JR, Liu MT, Wu HS, Yang CH, Chou JH, Chang FY. Surveillance of avian influenza A(H7N9) virus infection in humans and detection of the first imported human case in Taiwan, 3 April to 10 May 2013. *Euro Surveill*. 2013 May 16;18(20). (SCI 5.491).
- 4、 Wang SJ, Chiu SH, Lin YC, Tsai YC, Mu JJ. Carbapenem resistant Enterobacteriaceae carrying New Delhi metallo- β -lactamase gene (NDM-1), Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jun;76(2):248-9. (SCI 2.263).
- 5、 Wei SH, Pan CH, Lin MC, Mu JJ, Chang FY. Parvovirus B19 associated myocarditis with hemophagocytosis in an infant following influenza immunization. *BMC Infectious Disease* (submitted)
- 6、 Wei SH, Tseng LR, Tan JK, Cheng CY, Hsu YT, Cheng EC, Lu CS, Hsiao YC, Wu TH, Hsu JF, Liu MT, Mu JJ, Chen WC, Tsou TP, Hung MN, Chiang CS. Legionnaires' disease caused by *Legionella longbeachae* in Taiwan, 2006-2010. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013 (accepted) (SCI 2.357)
- 7、 Wei SH, Yang JR, Wu HS, Chang MC, Lin JS, Lin CY, Liu YL, Lo YC, Yang CH, Chuang JH, Lin MC, Chung WC, Liao CH, Lee MS, Liu MT, Chang FY. Human infection with avian influenza A (H6N1) virus. *The Lancet Respiratory Medicine*. 2013 (in press)
- 8、 Yang JR, Kuo CY, Huang HY, Wu FT, Huang YL, Cheng CY, Su YT, Chang FY, Wu HS, Liu MT. Newly emerging mutations in matrix genes of human influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of real-time RT-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 (in press) (SCI 4.068)
- 9、 Yang JR, Huang YP, Chang FY, Hsu LC, Huang HY, Pan YT, Lin YC, Wu HS, Liu MT. Characterization of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses in Taiwan in 2009-2011. *2013 J Med Virol* 85:379-387. (SCI 2.373)

七、參考文獻：

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008;451:990-3.
2. Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR, Sofair AN, Passaro D, Flood J, Johnson J, Hacker JK, Shieh WJ, Hendry RM, 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, Cunningham R, Zuckerman M, Mutton KJ, Solomon T, 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, Schuster FL, Christie LJ, Tureen JH. 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, Wu HS. 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, Klimov A. 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, Drew WL. 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, Osterhaus AD. 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, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, 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, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. 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, Wu HS, Liu HF. 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, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. 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, 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.
33. 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.
34. Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P. 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, Hsu LC, Chen PJ, Kuo SH, Wu HS, Shih SR. 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, Kuo SH, Hsu LC, Chen PJ, Wu HS, Liu MT. 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, Lin MW, Yao CY, Liao HW, Hsu LC, Yang CF, Yang JY, Chen PJ, Wu HS. 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, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, Fan WB, Yang JY, Chang FY, Wu HS. Genetic diversity and C2-like subgenogroup strains of enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virol J* 2010;7:277.
 39. Tsou TP, Tan BF, Chang HY, Chen WC, Huang YP, Lai CY, Chao YN, Wei SH, Hung MN, Hsu LC, et al. Community Outbreak of Adenovirus, Taiwan, 2011. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1825-32.
 40. Chou CC, Lee TT, Chen CH, Hsiao HY, Lin YL, Ho MS, Yang PC, Peck K. 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, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, Mardis ER, Hickenbotham M, Magrini V, Eldred J, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biol* 2003;1:E2.
 42. Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, Torres A, Debroy C, Whittam TS, Chang YF. Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. *J Clin Microbiol* 2006;44:1495-501.
 43. Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, Zhai J, Renwick N, Hui J, Hegyi H, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007;13:73-81.
 44. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, Oberste MS. 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, Wolthers K, Beld M. 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, Sivuth O, Diop BM, Rousset D, Rathat C, Jolly N, Dufourcq JB, Nareth C, et al. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens. *Clin Infect Dis* 2008;47:1410-7.
 47. 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.

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

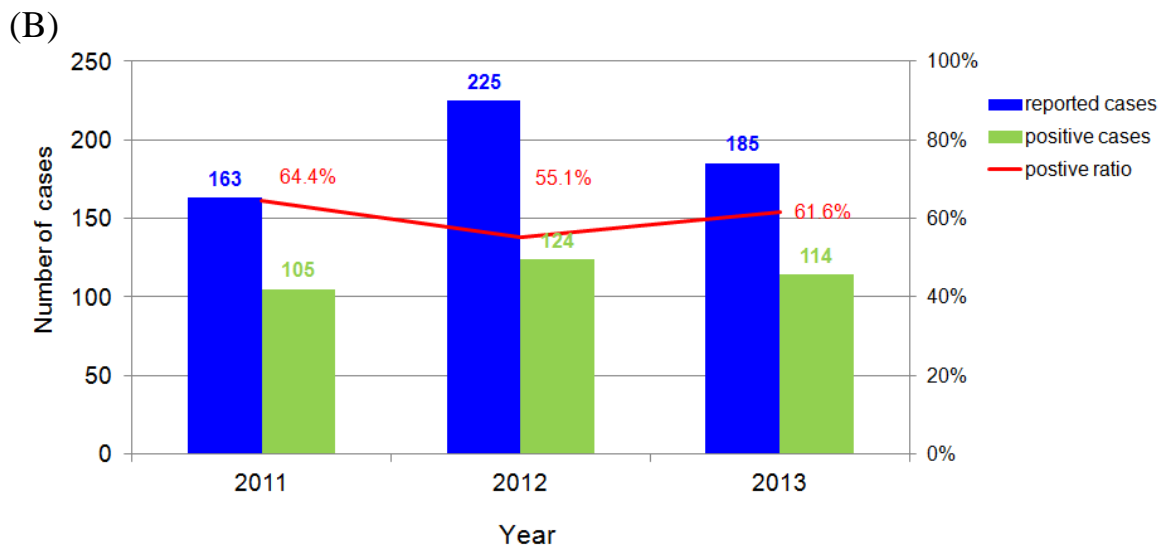
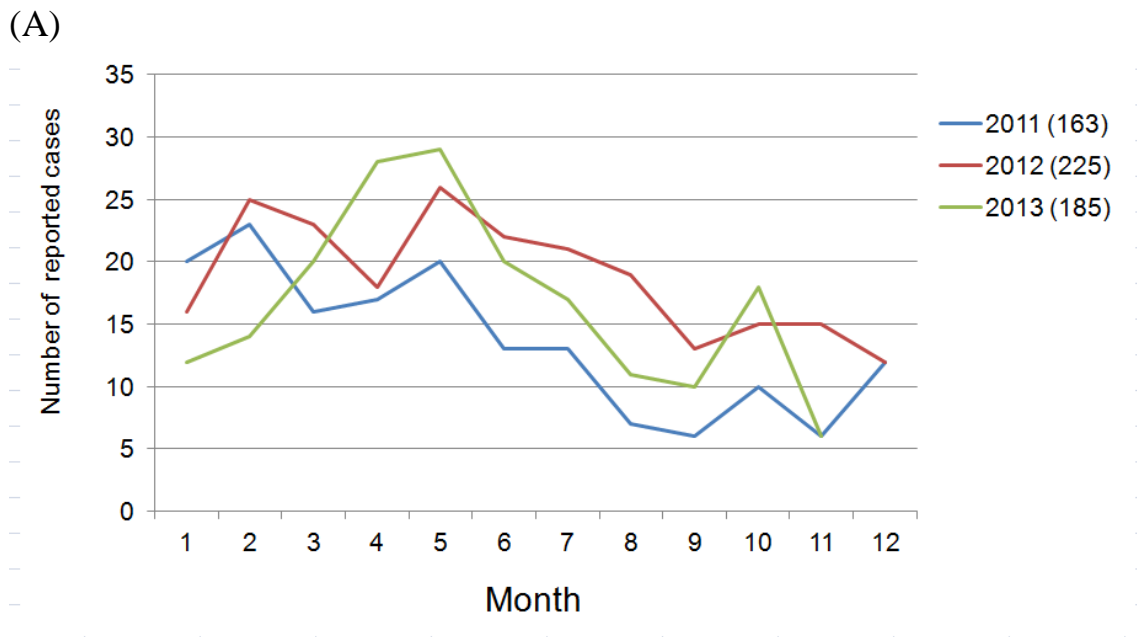
	確定病因	極可能病因	可能病因
檢體來源部位	1. 感染部位，包括痰、氣管 洗出液、肺部組織檢體、肋 膜液、呼吸道拭子 2. 血液	不拘	不拘
檢驗方法	1. 病原分離陽性 2. PCR陽性 3. 恢復期血清較急性期血清 抗體效價 ≥ 4 倍上升	除病原分離或PCR外之其他方 法檢驗陽性(如抗原快速檢 測)，或血清一採IgM檢驗陽性	不拘
檢驗陽性病原體 之特性	已知可造成嚴重人類肺炎， 且臨床表現與該個案表現相 符	已知可造成嚴重人類肺炎，且 臨床表現與該個案表現相符	非已知可造成嚴重人類肺 炎，或臨床表現與該個案不 相符
例子	1. 個案痰檢體流感PCR/培養 陽性 2. 個案血液檢體肺炎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

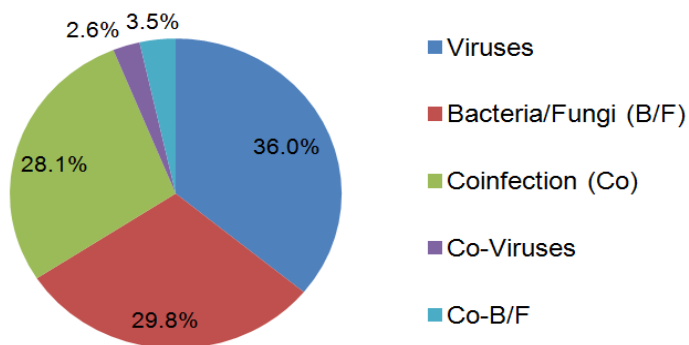
分類	確定病因	極可能病因		可能病因	
		I	II	I	II
檢驗結果	1. CSF 或腦組織偵測到病原體(如 PCR 或培養陽性)或 2. CSF 抗體陽性(當 PCR 非建議的診斷工具時)	CSF 或腦組織 PCR 或培養陽性	血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清檢測為疑似陽性(如只有 IgM 陽性)	1. CSF 或腦部組織之外的檢體病原檢測(含 PCR、培養與抗原檢測)陽性或 2. 血清學檢測陽性(陽轉或抗體有 4 倍以上的上升)
病原體之特性	已被確認會造成人類腦炎，且病患臨床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、2013 年陰性檢體高通量定序結果分析

Group	A		B	
	virus name	No of sequences	virus name	No of sequences
spiked NA	Parainfluenza 3 (10 ³ copy)	0	Parainfluenza 3 (10 ⁴ copy)	27
	HSV1 (10 ² copy)	10	HSV1 (10 copy)	9
virus hit (verified)	Saffold virus	2246	Saffold virus	5619
			othoreovirus	5
			HCV	1
total		2256		5661

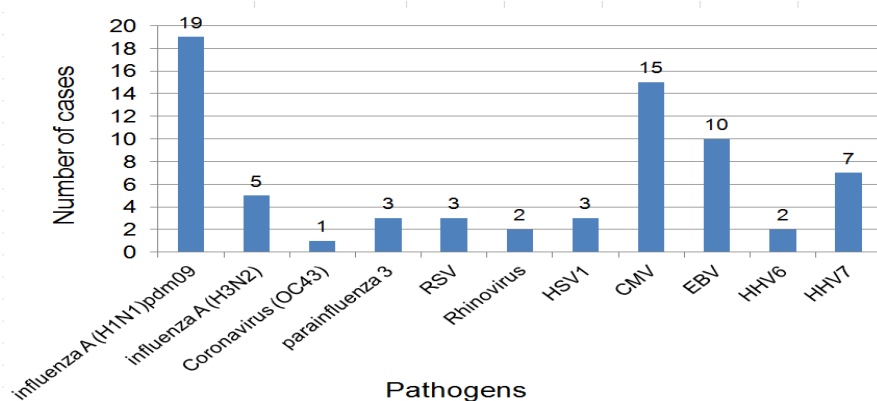


圖一、2010-2013 年肺炎重症 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。

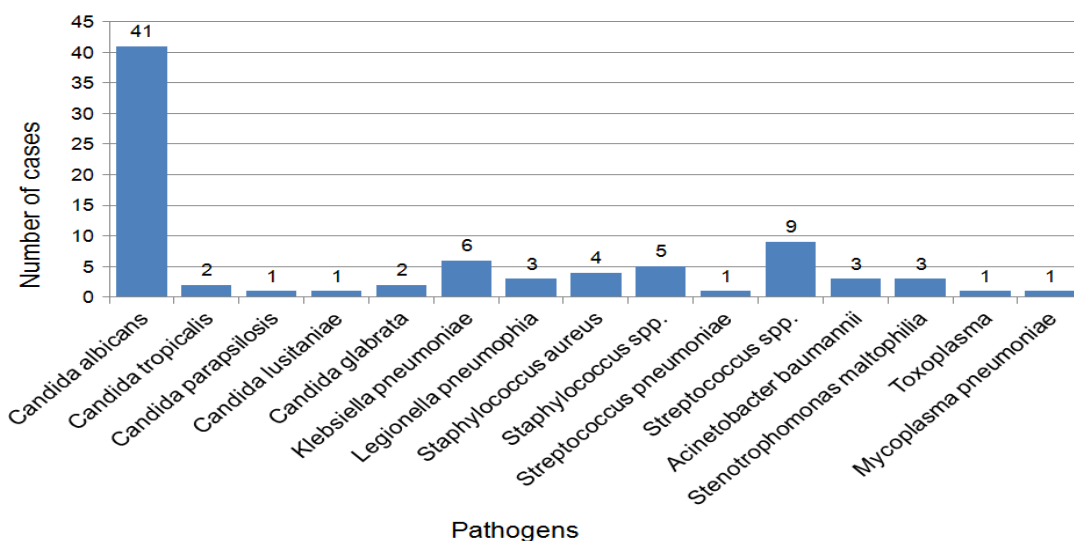


圖二、2013 年肺炎重症檢出各類病原體之比例。

(A)

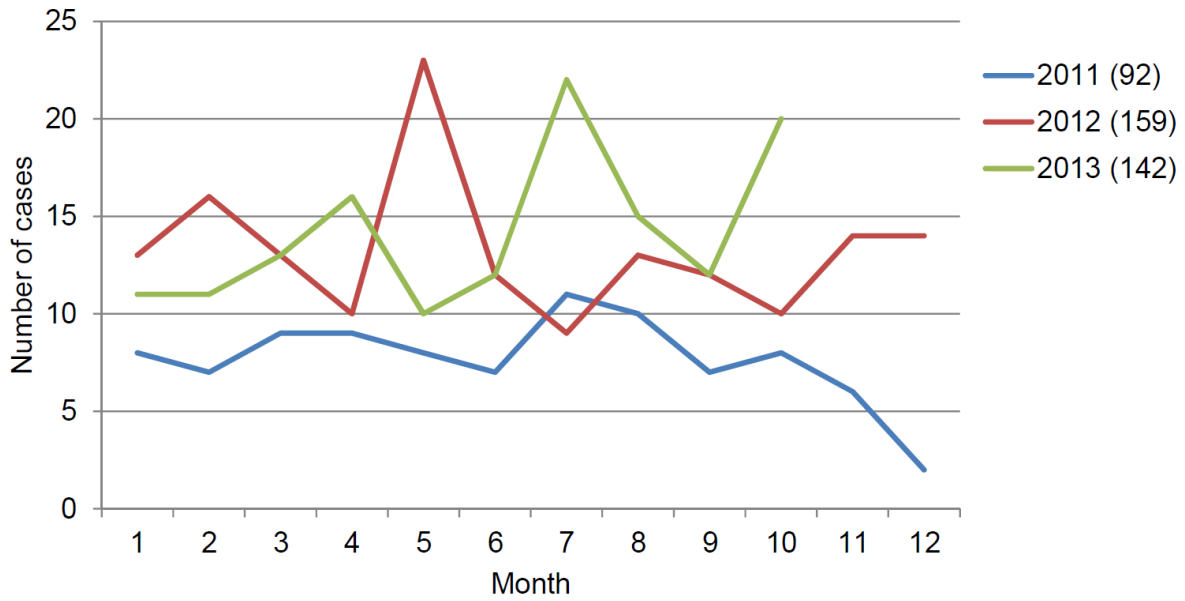


(B)

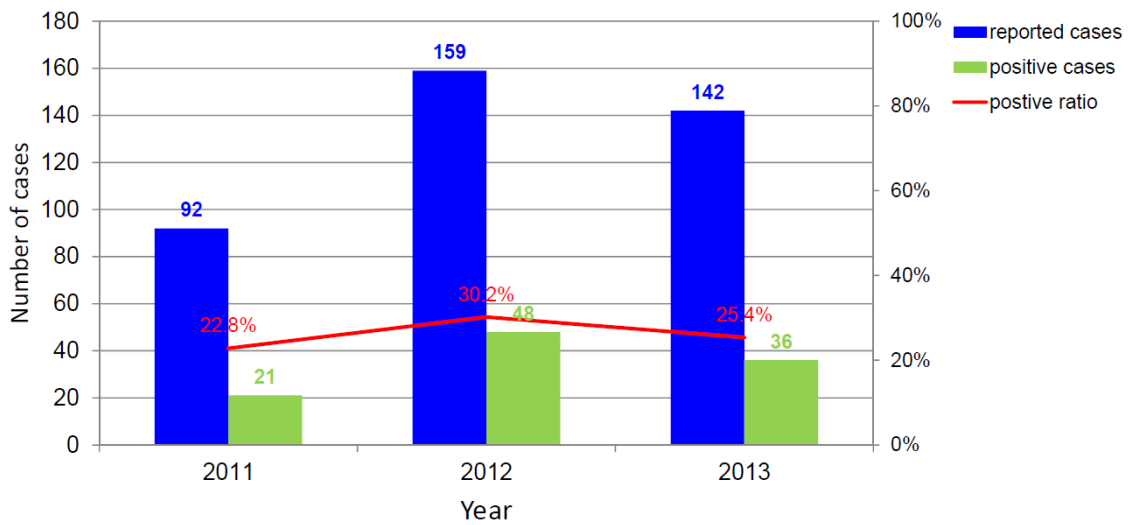


圖三、2013 年肺炎重症各類病原體之個案數 (A)病毒、(B)細菌、真菌及寄生蟲。

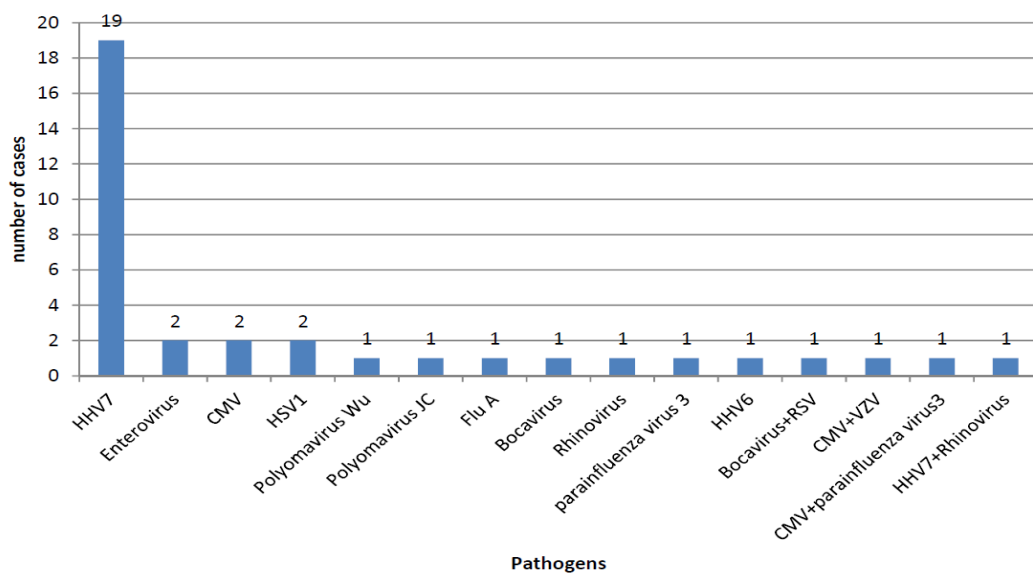
(A)



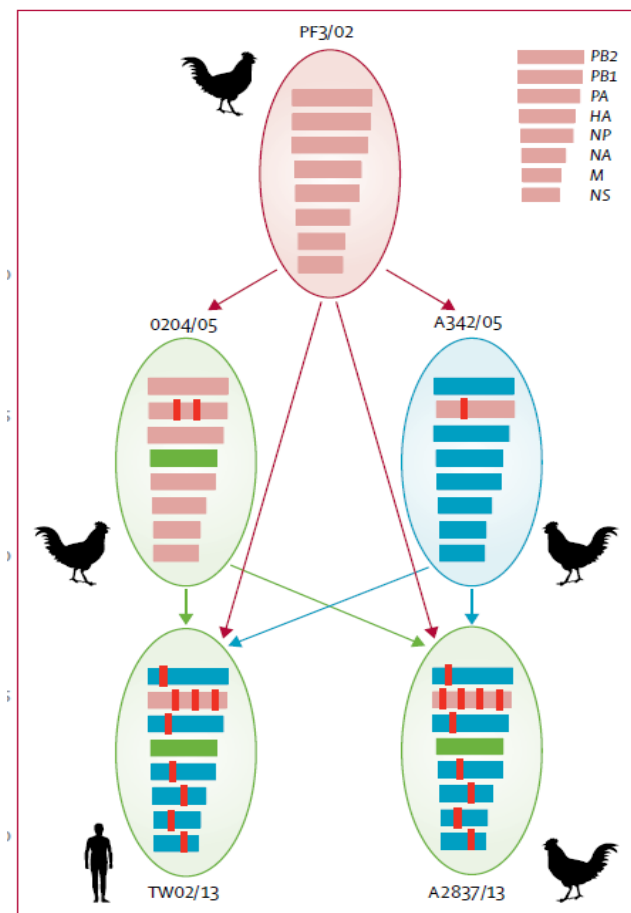
(B)



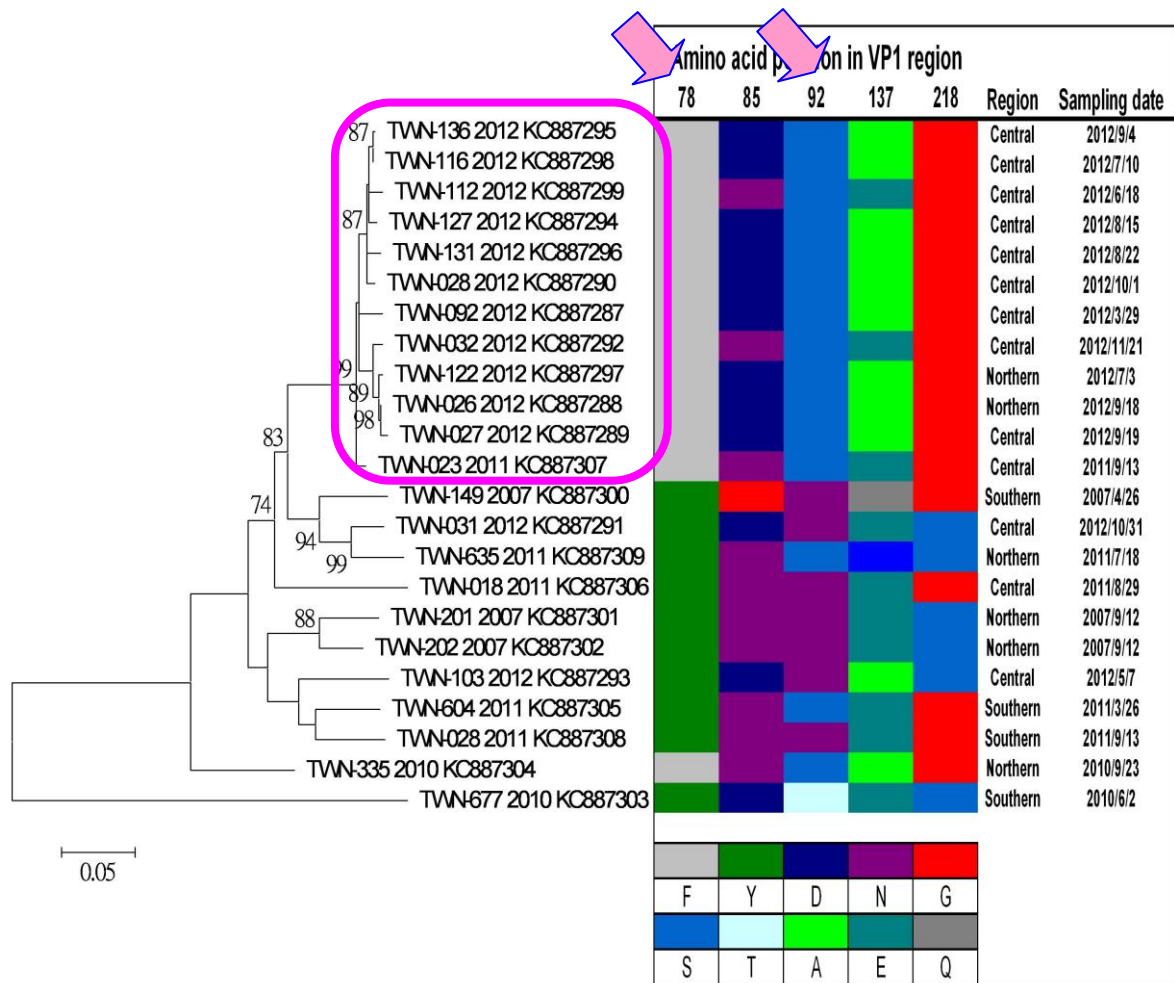
圖四、2010-2013 年腦炎及不明原因重症 (A)每月通報個案數，(B)檢驗陽性個案數及陽性率。



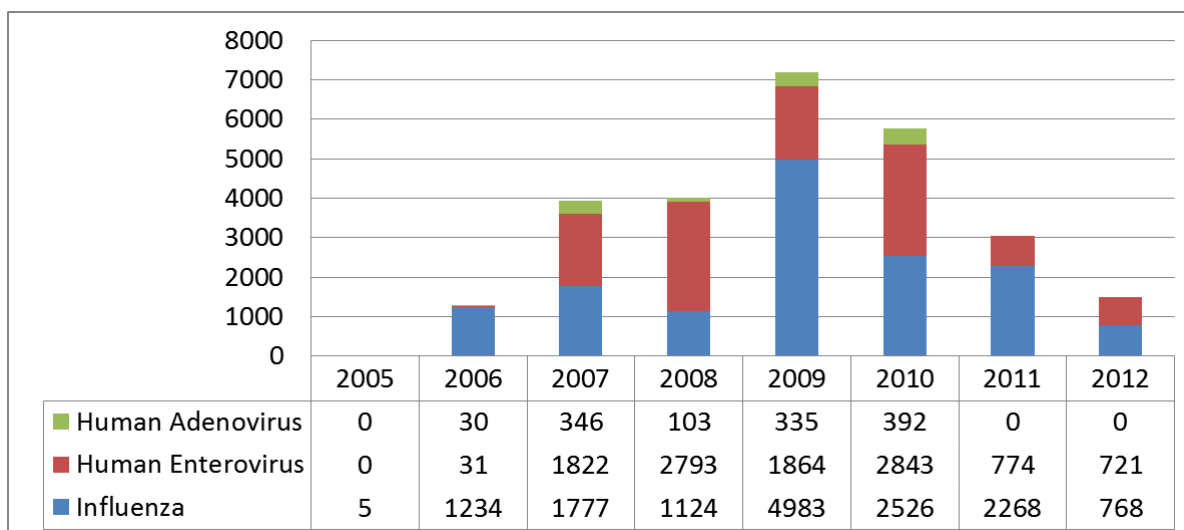
圖五、2013 年腦炎及不明原因重症各類病原體之個案數。



圖六、2013 年台灣 H6N1 流感病毒基因片段演變圖示，A/Taiwan/2/2013 (H6N1), TW02/13 為分離自人類之病毒。

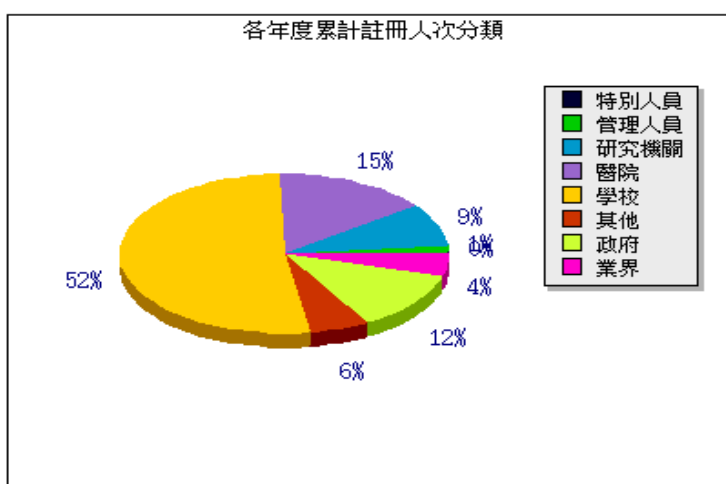


圖七、序列分析 HPeV 與演化樹排列，皆屬於第一型，但在序列上發生變異，獨立形成一亞型。

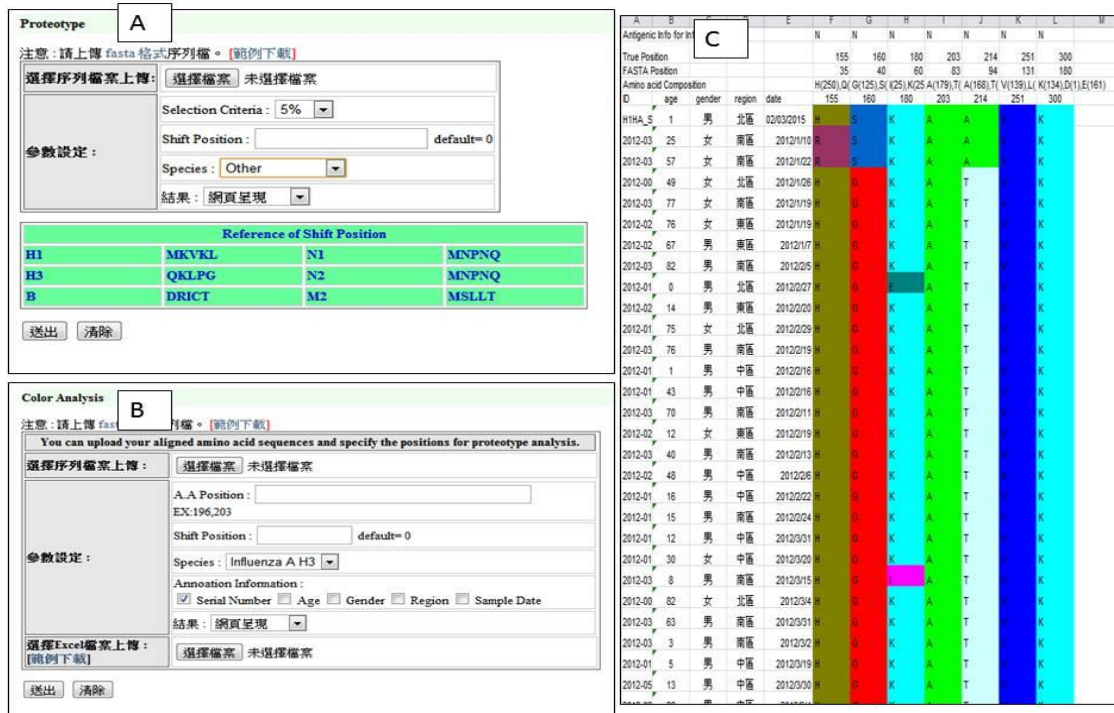


圖八、基因資料庫序列收錄種類及數量

累計註冊人次分類/年份	各年度累計					總數
	2009年	2010年	2011年	2012年	2013年	
特別人員	1	0	0	0	0	1
管理人員	4	1	0	1	0	6
研究機關	21	7	6	2	5	41
醫院	33	16	11	7	4	71
學校	105	57	36	21	24	243
其他	13	2	7	3	2	27
政府	31	10	5	6	5	57
業界	9	5	4	0	3	21
合計	217	98	69	40	43	467



圖九、基因資料庫之註冊人數與分類



圖十、基因資料庫之位點分析功能。(A)分析序列的變異位置；(B)輸入流行病學資料與位點序列結合；(C)合併不同顏色標記的位點序列與流行病學資料。

附錄一

不明原因肺炎

通報醫院：

1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人：

Patient's Name: _____	Patient's ID No.: _____
Date of birth: ____ / ____ / ____	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 onset pneumonia (≤ 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 _____

* Insect 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		
Hematology		
Hemoglobin g/dL		
WBC count /μL		
Band %		
Neutrophil %		
Lymphocyte%		
Eosinophil%		
Monocyte%		
Platelet *10 ³ /μL		
Blood Chemistry		
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		
ABG		

FiO2		
Arterial pH		
O2		
CO2		
serum bicarbonate		
Pleural fluid		
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 ≥ 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: ____ / ____ / ____	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 <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:
