

計畫編號：DOH100-DC-2019

行政院衛生署疾病管制局 100 年度科技研究發展計畫

新興/再浮現等重要傳染病病原體的偵測與應用

## 研究報告

執行機構：研究檢驗中心

計畫主持人：吳和生主任

協同主持人：劉銘燦、慕蓉蓉、楊志元、黃智雄、舒佩芸、許麗卿、  
黃元品、林智暉、楊季融、鄒宗珮、魏嵩璽、陳婉青、  
趙雁南、洪敏南

研究人員：陳昱汝、謝若郁、莊博丞、謝盛元、陳政男、潘翊讚、洪  
瑞辰、詹皇奕、高英訓、傅子佑、王詠中、張淑芬

執行期間：100 年 1 月 1 日至 100 年 12 月 31 日

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

## 目錄

|                 | 頁 碼     |
|-----------------|---------|
| 目錄              | 2       |
| 計畫中文摘要          | 3       |
| 計畫英文摘要          | 4       |
| 計畫內容            |         |
| 一、前言            | (5-9)   |
| 二、材料與方法         | (10-20) |
| 三、結果            | (21-27) |
| 四、討論            | (28-31) |
| 五、結論與建議         | (32-33) |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | (34-35) |
| 七、參考文獻          | (36-40) |
| 八、圖、表           | (41-62) |
| 附錄一、肺炎重症收案問卷    | (63-68) |
| 附錄二、腦炎重症收案問卷    | (69-72) |

共 (72) 頁

## 摘要

**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

微生物因地球氣候環境變遷、物種突變、基因重組、藥物濫用及人畜共通等方式，可能會衍生出跨物種感染的新興病原體(如 SARS、H1N1 新型流感、H5N1、H7N7、H9N2 禽流感病毒等)，因人類對此類病原體並無自然免疫力，容易爆發大量感染，造成嚴重災難。隨著全球化的迅速發展，國際間往來密集，新興傳染病可能由區域性疾病的發展，演變成全面性的災難，嚴重威脅公共衛生和人類的健康，且造成社會大眾的恐慌；面對變化及傳播快速的傳染病，如何在有限的時間內，運用可行的檢驗技術或平台正確偵測出感染原，以防止疫情擴散，實為當前重要的課題。本計畫包括建置 1、未知/新興傳染病監測網絡(如肺炎重症、腦炎及不明原因快速死亡、不明原因群聚及其他通報疑似法定傳染病但檢測為陰性之檢體等)，主動收集不明或異常疾病之檢體，訂立其病例定義、收件標準與檢驗流程等，並分析疾病臨床徵狀、個案流行病學資料與檢出病原體之關聯性，以探究其致病原，2、未知/新興感染原檢驗技術平台，透過 multiplex PCR、基因晶片檢測、高通量定序檢測與分生檢測等技術交叉串連運用，來即時探知不明及罕見病原體，3、流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫，透過病毒基因序列及個案流病資料的分析，協助疾病感染源或感染途徑之釐清，提供疾病防治政策參考，並評估疫苗的有效性、監測病原體抗藥性，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。透過三大目標之整合與執行，本計畫期許能建置台灣未知/新興病原體探索中心，近程以即時解決國內不明原因傳染病、發現新興病原體為目標，以強化防疫時效並且降低社會衝擊，未來期能發展成為國際未知/新興病原體交流平台，累積足夠的能量與各國建立雙邊合作關係，於未來面對疫情時，將不再只依賴國際援助或資訊，更可望成為主動協助者。

## **Abstract**

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

Due to global climate change, species mutations, genome recombination, drug abuse and zoonoses, microorganisms are more likely to derive or mutate into novel pathogens that could be transmitted across species boundaries like SARS, pandemic (H1N1) 2009, H5N1, H7N7 and H9N2 avian influenza than ever. Because humans are lack of exhibit natural immunity for these emerging/re-emerging pathogens, these diseases could cause outbreaks quickly and easily and become serious catastrophes. As the development of rapid globalization and the intense international communication, emerging/re-emerging infectious diseases could arise from local diseases to global disasters, which largely threaten public and personal health. For rapidly changing and transmitting diseases like these, it is crucial to utilize practical and available diagnostic techniques or platforms to detect pathogens correctly in limited period of time to prevent their spreading. Our goals are to establish 1. the surveillance network for unknown/emerging infectious pathogens such as samples from pneumonia, encephalitis, unexplained critical illnesses or deaths due to possibly infectious cause, unexplained outbreaks and other possible but negative notifiable diseases. We will actively 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, microbiology and use them complementary to detect unknown and uncommon pathogens; 3. the genome database of influenza virus, enterovirus and diarrhea virus. Through the analysis of their gene sequences and related epidemiological information, we can assist the clarification of infectious pathogens and infection routes, provide a reference for disease prevention policy assessment and formulating, evaluate the effectiveness of vaccines, monitor the drug resistance of pathogens and even provide a foundation for future developing vaccines and diagnostic techniques. To sum up, we expect ourselves to be an emerging/re-emerging pathogen research center in Taiwan. In the short run, our aim is to instantly resolve domestic unexplained infectious disease and discover novel pathogens, and further strengthen the effectiveness of disease prevention as well as reduce the social impact. In the long run, we hope to accumulate enough knowledge and techniques to become an international platform for the information exchange and sharing of unknown/emerging infections and elevate the international stage of Taiwan.

## 一、前言：

### (一) 新興/再浮現傳染病之檢驗

#### 1、不明原因快速死亡、肺炎及腦炎

在全球氣候變遷、環境過度開發、國際間交通日漸頻繁之際，各類未知/新興感染疾病的威脅日增，是不爭的事實。1997 年的 H5N1、2003 年的 SARS-CoV 及 2009 年的 pandemic H1N1，均為首先出現於社區之新興傳染病，顯示良好的監測及病原體診斷系統之重要性 [1]。我國法定傳染病通報系統、病毒合約實驗室監測系統及症狀監測系統等多種監測管道，對傳染病流行狀況提供豐富及全面的資訊；本局研究檢驗中心各實驗室與時俱進的檢驗技術，包括病毒學、血清學及分子診斷學，更增進吾人對許多疾病的了解；然而，仍有許多感染症病患無法得到確切診斷。為能及時偵測未知/新興感染症，需針對一般檢驗無法確定病原之感染症患者建立檢驗平台。感染症之臨床表現眾多，本計畫針對疑似感染症導致之不明原因重症或快速死亡(unexplained critical illnesses or deaths due to possibly infectious cause, UNEX)、腦炎與嚴重肺炎之個案優先收案並分別分析。此外亦將針對目前法定傳染病系統中常規檢驗為陰性之檢體，依疾病類別挑選收案。

疑似感染症之不明原因重症或快速死亡(UNEX)個案由於病情嚴重，且需在短時間內排除新興傳染病或生恐攻擊事件之威脅，在公共衛生及傳染病防治上之重要性實不可忽視。美國 CDC 於 1995-1998 年間首次針對 UNEX 進行監測，在四個州內收集年齡介於 1 至 49 歲，無潛在重大疾病且疑似因感染症死亡之病患，藉由各項血清學、病毒學、分子生物學及病理學檢驗結果判定病因及其公共衛生威脅。在四年間所收集之 137 名個案中，以神經系統重症(29%)及呼吸道系統重症(26%)最多，其中有 28%可經由各樣檢驗找到確定或可能之致病原，包括 *Neisseria meningitides*, *Bartonella henselae*, *Chlamydia pneumonia* 等細菌，及 influenza, enterovirus, Epstein-Barr virus 等病毒 [2]。值得一提的是，美國東部於 1999 年發生之 West-Nile virus encephalitis 群聚事件亦由此系統通報並確診，顯示 UNEX 監測之價值[3]。目前在 Arizona、Washington、Minnesota、California 等州均將以 UNEX 納入法定傳染病之方式持續此項監測。此計畫之結語中強調，為了增進診斷效率，除了即時通報、取得適當檢體及與臨床醫師持續溝通外，建立症狀導向之監測系統，增加收案特定性(syndrome-specific surveillance)也可增強對特定病原體之診斷能力。因此除不明原因快速死亡個案外，本計畫擬針對腦炎及肺炎重症病患優先收案。

腦炎病患由於症狀具特異性，病程快速且極易產生嚴重後遺症，一直以來均是臨床診斷上一大難題，各國也陸續對腦炎病原進行全國性、大規模之研究。以最近發表在英國所進行為期兩年之全國性研究為例，203 名腦炎個案在經過兩階段病毒學、分子生物學及免疫學相關檢查後，有 42%可找到感染性病因，包括 herpes simplex virus、varicella zoster virus 及 *Mycoplasma 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。本計畫希望建立一先進之檢驗平台，藉由分子生物學檢驗技術增進國內腦炎診斷能力。肺炎由於個案數眾多且嚴重程度各異，本計畫僅收集臨床產生急性呼吸窘迫症之重症個案，期望能增進對重症肺炎個案病因之了解，並及時診斷如 hantavirus、avian influenza 等具有公共衛生重要性之新興傳染病。

## 2、新興呼吸道病毒

急性呼吸道感染 (acute respiratory tract infection ARTI) 是世界性罹病率與致死率極高的疾病，在嬰幼兒、老人、成人、心肺疾病患者及免疫不全之患者，都有可能發展出嚴重的疾病。然而呼吸道感染的案例中，仍有高達 40% 以上的比例無法確認感染源 [15, 23, 24, 48]。

HBoV 為主要是由瑞典科學家以分子生物技術所發現的一個新興病毒 [49]。由於 2005 年 Allander 等人的初步的演化樹分類，國際病毒分類委員會 (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) 暫時將 HBoV 分在 Parvoviridae 科、Parvovirinae 亞科、Bocavirus 屬。HBoV 在世界各地都有傳出感染的案例，於呼吸道感染的病人之呼吸道分泌物檢體當中，盛行率由 1.5~18.3 % 不等 [50]。綜合所有的研究，HBoV 並沒有明顯的發生季節 [51-56]。

自 2003 年 SARS 病毒爆發流行後，全球對於 human coronavirus 的研究便趨於積極，而除了 HCoV-229E 以及 HCoV-OC43 以外，2005 年又有 HCoV-HKU1 以及 HCoV-NL63 等 [57-59]。HCoV 陸續在嬰幼兒及成年人的上呼吸道 (URTIs) 以及下呼吸道 (LRTIs) 檢體中被偵測到 [57, 60]。病毒基因全長依各 HCoV 病毒的不同而有所差異，總體而言基因體約有 28~30K，為 positive single-strand RNA 基因體。研究顯示 HCoV 病毒於呼吸道感染的盛行率約為 1%~10% [61, 62]。

2007 年新發現兩種 human polyomavirus，並依照發現他們的機構瑞士 Karolinska Institute 以及美國 Washington University 而命名為 KI polyomavirus (KIPyV) 以及 WU polyomavirus (WUPyV) [20, 63]，而 2008 年又由 Feng H 等人發現另一新興病毒並命名為 Merkel cell polyomavirus (MCPyV) [65]。在 KIPyV、WUPyV 以及 MCPyV 病毒均由鼻腔清洗液 (nasopharyngeal aspirates, NPA) 檢體中被發現後，病毒的基因便陸續全球各地的呼吸道檢體中被偵測到 [24, 66-70]，根據研究報告資料，KIPyV 的疾病盛行率約為 0.5%~3%，WUPyV 的盛行率則為 1%~9%，而 MCPyV 為 1.3%~4.25% [71-76]。

由於目前已發現的新興病毒包括 HBoV、HCoV-HKU1、HCoV-NL63 以及 KIPyV、WUPyV、MCPyV 等病毒目前均仍無法進行體外培養，故檢體量是這些新興呼吸道病毒檢驗上最大的瓶頸。建置並發展這些新興病毒的同步偵測方法，不但可減低檢測這些病毒的檢體消耗量，大幅縮減目前未知病源的檢體偵測時間，減低群聚或大規模流行時可能引起的民眾的恐慌。此外，若能再結合傳統已建立的呼吸道致病原，建立同步偵測技術，將可完善呼吸道病毒的快速

檢驗，以作為防疫政策的參考依據。

### 3、立克次體

國際間交通往來日益頻繁，全球氣候也因溫室效應影響，使得各種新興及再浮現傳染病，尤其是病媒性傳染病，在全世界散佈情形正急速增加，發生頻率也愈趨頻繁與嚴重。恙蟲病是台灣最主要的立克次體傳染病[47,64,82]。恙蟲病（又稱叢林型斑疹傷寒），為患者遭帶有病原 *Orientia tsutsugamushi* 之恙蟲幼蟲叮咬所引起的急性傳染性疾病[85]。恙蟲病的潛伏期約 1-2 週，通常為 9-12 天，特徵為在螫口處形成特有的無痛性洞穿式潰瘍性焦痂 (eschar)，主要臨床症狀包括發熱、頭痛、肌肉酸痛、紅疹與淋巴結病變等症狀。在缺乏治療的情形下，可能造成患者的無尿、肺水腫與心衰竭。本病的死亡率依地區、立克次體株、感染史與治療與否有關，有 1-30% 之差異，但若經正確診斷適當用藥則死亡率可低於 1%。恙蟲病之地理分佈，北由日本北部與俄羅斯東部，南至澳洲北部與西太平洋群島，西至阿富汗均有病例發生[86,87]。雖然恙蟲病可藉由抗生素治療而痊癒，但由於錯誤的診斷與抗生素的選用不當，世界上每年仍有零星致死的案例發生。而台灣在 1955 年即將恙蟲病列為通報傳染病，現歸類為第三類傳染病。台灣的恙蟲病近年來每年約有 300-500 個確定病例，在各縣市均有病例報告，但主要是在金門縣、台東縣、花蓮縣、高雄縣市及南投縣，發生月份以每年 5 月至 10 月較多，感染的年齡層多為 20~29 歲。台灣地區的傳播媒介主要為地里恙蟎 (*Leptotrombidium deliense*)，恙蟲的動物宿主主要為嚙齒類 (rodent)，哺乳類 (羊、豬、狗、貓)，鳥類 (鳥、雞) 等，其中又以嚙齒類為最主要的宿主。目前立克次體的實驗室診斷以免疫螢光染色法為主，以抗體陽轉或成對血清抗體效價 4 倍上升為診斷依據，但因需要有經驗的技術人員及較長的檢驗時間，所以近年來分子診斷及 ELISA 檢驗方法是實驗室積極開發的目標。本計畫的目標在建立立克次體傳染病快速血清學診斷系統，包括 ELISA 及 ICT 檢驗方法，縮短檢驗時間，使治療工作更具成效。

### 4、未知/新興感染原檢驗技術平台

病原體檢測技術的發展快速，新的人類病原體不斷被發現，如 human metapneumovirus, coronavirus SARS, NL63, HKU1, human bocavirus, polyomavirus KI/WU 等 [7-23]。而發現這些病原體的方法除了傳統細胞培養、電子顯微鏡、consensus PCR 外，可同時偵測多種已知或未知病原體之病原體微陣列 (microarray) 與高通量定序 (high throughput sequencing) 方法也逐漸被應用 [15]。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。

### 5、陰性檢體之檢驗

對於高度懷疑感染症卻檢驗陰性者，仍可進一步調查、嘗試找出其病原體，因其可能只是檢驗方法或目標錯誤，不代表能排除感染症；另臨床上檢測

病原體，以病原體分離培養為主，但它往往耗時彌久或為無法培養之病原體，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 病毒科的檢測外，也採用退化性引子 (degenerate primer) CODEHOP 等分生檢測技術，以期探索偵測新興病原體。

綜上，在收集符合條件之臨床檢體後，適當串連各種分子檢驗技術之優點以建立未知感染源研究檢驗平台，可同時偵測數千種已知或未知病原體。如此面對未知的新興傳染病時，除能快速偵測比對病原體、瞭解其可能的感染源、疾病的流行趨勢及協助疫情調查外，還可獲取更多生物資訊以增進對該病原的瞭解及認識，作為未來防疫政策擬訂及相關疾病研究的重要參考。

## (二) 流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫

隨著基因體醫學研究的興盛，國際間亦積極發展大型病原體基因資料庫暨分析平台，建置我國本土的病原體基因資料庫網站不僅為時勢所趨，亦可強化不同防疫面向之資訊整合。國際間眾多基因資料庫包括 National Center for Biotechnology Information (NCBI)，網址：<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>，包含各種基因體資訊，可供使用者免費使用；流感基因資料庫，網址：<http://www.flu.lanl.gov/>，近年已經改為需要付費方能使用的方式；愛滋病基因資料庫，網址：<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>，包含核酸及胺基酸資料及分析工具 [25-27]。

在台灣則是病原體基因資料分散於政府部門、學術單位、醫療院所、或者是生技公司，且尚無將病原體基因序列與流行病學資料結合的資料庫，因此本病原體基因資料庫(舊版)的建立與維持除了可以提供屬於本土病原基因資料，更可結合流行病學資訊達到資訊有效運用的目的，除了可以追蹤病原體的流行及分佈狀況，更可以作為後續治療藥物、疫苗開發或診斷工具的重要參考依據。本病原體基因資料庫(舊版)自設立上線以來，已經超過兩千兩百個使用人次的登入使用，總計所包含的序列資料已超過五萬五千條。此外，本著政府資訊公開及資源共享之原則，也已提供外界申請序列資料及流病資訊的使用，統計至今至少超過20位學者教授使用過本資料庫，分享超過兩萬五千筆基因序列及流病資料。

本局更於民國97年12月起與陽明大學「國科會進階生物資訊核心設施研究團隊 (Advanced Bioinformatics Core)」合作建置「病原微生物基因體資料庫對外開放網站暨分析平台 (簡稱基因資料庫)」，以每筆對應的方式整合國內近年流行之腸病毒與流感病毒基因序列與不含個人隱私之流行病學資料 (包括性別、年齡、居住地、發病日期等)萬餘筆，供各界自由取得分析。上述資料均來自本局彙整、分析歷年病原體相關資料而成，目前規劃每半年定期更新，同時主動更新網站上儲存之美國國家生物技術信息中心 (NCBI) 及世界衛生組織 (WHO) 相關基因資料，以提供比對分析之最新國際參考資料 [28]。為了因應越來越多種類的病原體基因資訊儲存以及功能需求，因此本基因資料庫還需要更進一步



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

流行性感冒病毒為呼吸道病原體，屬於正黏液病毒科，依病毒表面之血球凝集素 (hemagglutinin; HA) 及神經胺酸酶 (neuraminidase; NA) 兩種抗原蛋白可區分為不同的亞型，目前為止已有16種HA (H1至H16) 與9種NA (N1至N9) [29]。腸病毒屬於微小病毒科、腸病毒屬之病毒，基因體中的VP1基因是中和抗體主要作用之區域，亦為序列中變化較大之區域 [30,31]，為較常用於分析研究的基因 [32]。我們持續收集病毒合約實驗室的採檢病毒株，將其定序後的序列資料合併流行病學資訊上傳至資料庫中，並針對發生流行時的病毒進行分析，以追蹤病毒來源及序列變異的目的。過去曾經藉由此資料庫分析發表數篇文獻，如：簡等人分析2003-2006年間的流感病毒基因及流病資料 [33]、分析B型流感的基因重組情況 [34]、黃等人分析2006-2007年的腸病毒71型係屬於新引入的基因亞型B5及C5所引起 [35]，更確認2008年所大流行的也屬於B5基因亞型，與中國大陸所流行的C4基因亞型或新加坡所流行的C2基因亞型不同，並於同年發現C2-like基因亞型 [36]。

目前輪狀病毒疫苗有兩種廠牌—GSK及MSD，已通過疫苗評估，於2006年10月在台灣取得核准證照。目前通過核准上市之GSK為單價型G1型輪狀病毒疫苗（對G1、G2、G3、G4和G9型具有保護力），MSD為G1、G2、G3、G4、P8五價型輪狀病毒疫苗，而台灣地區在2004-2006年間研究計畫監測結果顯示，主要流行病毒基因型為G1、G2、G3、G9型[37]。

藉由本基因資料庫的資訊，可釐清疾病感染源或感染途徑，提供疾病防治政策參考，亦可評估疫苗的有效性、監測病原體抗藥性以作為用藥選擇依據，更可提供未來疫苗研發或診斷試劑開發之重要根據。

## 二、材料與方法

### (一) 未知/新興傳染病監測

#### 1、檢體來源：

- (1) 主動監測通報之肺炎重症、腦炎、不明原因快速死亡等突發急性傳染病之檢體。
- (2) 法定傳染病陰性之檢體。
- (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、主動監測收案與檢體採集點

北、中、南、東各地教學醫院與區域醫院(表一)，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)」。

#### 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-acquired 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、急性發作（一個月之內）；
  - B、發燒超過 38°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。

#### 4、採檢送驗

採檢項目如表二，送驗之檢體將進行病原體實驗室檢驗鑑定，包括細菌、病毒、寄生蟲及可能未知的病原體。詳細檢驗項目將於下詳列。

#### 5、檢驗結果告知

檢體送達本局研究檢驗中心一週，multiplex PCR 結果將登錄於本局法傳

電腦系統。依病況進展，院方主治醫師與防疫醫師將互相聯繫，告知最新檢驗結果並討論後續檢驗項目。

## 6、 病歷資料回顧、個案研判與分析

本局將定期以公文函知通報醫院，派遣防疫醫師至醫院進行通報個案病歷調閱，根據病歷資料填寫 case report form (附件一、二)。病例資料及檢驗結果將建檔以進行疾病臨床徵狀、個案流行病學資料與檢出病原體之關聯性分析。

根據個案臨床表現及病原體來源、檢驗方法、致病特性等，將造成肺炎重症之病原體分為確定病因、極可能病因及可能病因三大類(表三)。將由三名防疫醫師綜合檢驗及臨床資料，於完成病歷回顧後進行個案研判。

### (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:包含 influenza virus, parainfluenza virus, rhino virus, human metapneumovirus, herpes simplex virus (HSV) I and II, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, enterovirus, coronavirus, parvovirus B19, respiratory syncytial virus, parechovirus, chikungunya, Japanese encephalitis, dengue virus, *Toxoplasma gondii* 以及 borrelia 等。

2、高通量定序：目前市面上能執行高通量定序之儀器有三種，分別為 Roche Genome Sequencer FLS Titanium System (Roche 454)、Illumina/ SOLEXA Genome Analyzer II 以及 Applied Biosystems SOLiD。三種儀器進行高通量定序方式如下：

(1) Roche Genome Sequencer FLS Titanium System (Roche 454)：以油滴包覆核酸進行 PCR，需調整核酸與油滴形成最佳比例。以 pyrosequencing 方式進行高通量定序，完成一次實驗大約 3~4 天，可得到大約 40 萬筆序列資料，每筆序列 1000 bp，一次實驗可讀出總長大約 500Mb 的核酸序列。

(2) Illumina/ SOLEXA Genome Analyzer II：以一定流速鑲嵌核酸至 solid phase 進行 PCR，過程較易進行，以 sequencing by synthesis 進行高通量定序，以 Reversible-terminator dNTPs 取代傳統 sanger sequencing 的 ddNTPs。完成一次實驗需 7~10 天，可得到上千萬筆序列資料，目前每筆序列 100 bp，一次實驗可讀出總長約 2.5Gb 的核酸序列。

(3) Applied Biosystems SOLiD：與 Roche 454 相似以油滴包覆核酸進行 PCR，但由於以 solid phase 進行 PCR，可完成上億筆序列分析，因此並不調整核酸與油滴之最佳比例。以 ligation 方式進行高通量定序為該公司之新發明，確保每個核甘酸都經過兩次分析。但此法耗時，一次定序便需 8 天，加上分析，完成一次約需 2 個星期，可產生上億筆序列資料，每筆序列 50 bp，一次實驗可讀出總長約 4~6 Gb 的核酸序列。

三種儀器均有其優缺點，大致來說單筆序列可讀的較長的，給予的總筆

數少。反之，單筆序列讀的較短的，會給予上千萬或上億筆資料以彌補其短序列之不足。

#### 實驗方法：

本實驗方法分成兩部份，進行檢體處理萃取核酸，以及序列分析。

(1) 核酸萃取：反轉錄反應 (Invitrogen)：取 10 ul 萃取之核酸，利用八個隨機核苷酸(random octamer)進行反轉錄反應，合成第一股 cDNA (first strand cDNA)：核酸與引子於 70°C 作用 10 分鐘後，置於冰上，再利用 transcriptase 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)。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：

A、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。找出可能的病原，最後以 real-time PCR 或 PCR 校驗以確認檢體中之病原體。

B、除找出可能之已知病原外，本計畫另一個重點將著重在無法比對人類及任何已知病原體之序列，分析這些序列是否有新興、未知感染源存在之可能。

### 3、微陣列晶片：

本實驗所使用的晶片收集已發表的報告與自行設計探針，建立晶片探針序列資料庫，目前資料庫為長度為 60 個寡核苷酸的序列，主要來源有病毒探針資料庫 (Virus Genus and Specific Probe Database; <http://genestamp.sinica.edu.tw/virus/index.htm>) [38]及 David Wang 所發表的序列 [39]，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 [39]及 Palaniappan 等人 [40]所發表的序列及 Operon 公司的晶片資料庫(Operon microarray databases, OMAD; <http://omad.operon.com/download/index.php>)，偵測對象涵蓋 19 個屬(genera)，約 22 種(species)細菌。目前持續改良與增加晶片探針的組成，特別針對新興及再浮現性之病原體，以增加檢測種類與分型能力。建立病原體探針序列資料庫經 Agilent 公司製作成晶片約需 2 週，訂購 1 片亦可。金額 1 片(4X44k, 可操作 4 個樣本)約 4 萬元。

#### 實驗方法：

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 [41]，實驗步驟如下：

(1) 反轉錄反應(reverse transcription)：利用自動核酸萃取系統(Roche Applied Science)進行樣品核酸萃取，並利用 Dnase 去除樣品中的 DNA

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

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

將第一次 PCR 的產物再次進行 PCR 反應。第二次 PCR 所使用之引子序列包含 Extend-1 及一段 3DNA 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。

#### 4、建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法

- (1) 新興病毒的基因資料收集及核酸引子設計

至 NCBI 基因資料庫中收集已發表的各新興病毒序列，經由 MEGA5 序

列分析軟體進行排比分析 (alignment) [77]之後，針對病毒的具特異性的區域進行目標基因設定，並以 SCPrimer 軟體進行 multiple alignment 核酸引子對設計[78]。

## (2) 檢體收集

檢體包括定醫系統中疑似呼吸道感染之病患咽喉部位檢體，或通報呼吸道感染重症，但例行性檢驗中檢測不出病原體的送驗個案，所使用的檢體依照送驗程序中所採檢的檢體項目；病毒性合約實驗室無法檢測或無法分型的檢體，均在低溫狀態下送至本局研究檢驗中心進行檢測。

## (3) 病毒核酸萃取

病毒核酸萃取方式以商業化試劑（包括 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini kit、QIAamp viral RNA Kit）萃取，步驟依照試劑所建議的操作程序進行，操作步驟簡述如下：

### A、QIAamp DNA Mini kit：

- a、20  $\mu$ l proteinase K 與 200  $\mu$ l 檢體混合，檢體混合液加入 200  $\mu$ l AL，於 56°C 作用 10 分鐘。
- b、10 分鐘後作用完成，加入 200  $\mu$ l 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000 rpm 1 分鐘。
- c、丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500  $\mu$ l，離心 8000 rpm 1 分鐘。
- d、丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500  $\mu$ l，離心 14000 rpm 3 分鐘。
- e、將 column 置於以標示完整之 1.5 ml 離心管，加入 150  $\mu$ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000 rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20°C 備用。

### B、QIAamp viral RNA Kit：

- a、560  $\mu$ l 之 carrier RNA+ AVL 混合液與 140  $\mu$ l 檢體混合均勻，室溫靜置 10 分鐘。
- b、10 分鐘後，加入 560  $\mu$ l 絕對酒精，通入 spin column，離心 8000 rpm 1 分鐘。
- c、丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW1 500  $\mu$ l，離心 8000 rpm 1 分鐘。
- d、丟棄離心液，將 column 置於新收集管中，加入 AW2 500  $\mu$ l，離心 14000 rpm 3 分鐘。
- e、將 column 置於以標示完整之 1.5 ml 離心管，加入 50  $\mu$ l 之 DEPC 水，於室溫下放置 3 分鐘，以 8000 rpm 1 分鐘離心，收集離心液，置於-20°C

備用。

#### (4) 核酸引子對專一性分析

針對各新興病毒與目前所有呼吸道病毒所設計的核酸引子對包括 human metapneumovirus、human coronavirus HKU1、NL63、OC43、229E、HBoV、human polyomavirus WUPyV、KIPyV、MCPyV 及 influenza A virus、influenza B virus、RSV、adenovirus、parainfluenza virus 1~3 等，進行 PCR 連鎖反應，確認核酸引子對不會夾出對目標病毒以外的基因片段。

#### (5) 核酸定序

利用 ABI 3130xl sequence analyzer 進行核酸序列的分析。以 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AB applied biosystem company) 試劑組進行定序。操作程序依照試劑組建議進行，將 BigDye Terminator v3.1 與 5X buffer 依照分析片段比例混合後，加入 1  $\mu$ l 反應核酸引子，再加入 2  $\mu$ l 純化之 cDNA 模板之後，以 95°C 5 秒、60°C 4 分鐘進行 25 個循環的反應。之後以 100% 酒精沉澱後風乾，再將反應產物溶於 HiDi-Formamide 後，加入 96 孔反應盤上機。

#### (6) 序列比對及分析

得到的序列至 NCBI 基因資料庫進行 BLAST 之後，確認病毒種類，並將序列與已發表的新興病毒進行序列排比與分析，以了解台灣病毒與其他已發表序列間的相似性及演化分析。

### 5、病毒檢測陰性檢體之新興/再浮現病毒檢驗之開發

#### (1) 檢體來源

- A、病毒合約實驗室無法分型之腸病毒檢體
- B、症狀通報、群聚事件而檢測為陰性檢體

#### (2) 分生檢測

- A、來自病毒合約實驗室之檢體，以小 RNA 病毒科為主要目標
  - a、EV CODEHOP [92]：針對腸病毒 VP1 區域設計出適合的 primers。首先進行反轉錄反應，取 5  $\mu$ l 的 RNA，加入 5x PCR buffer，10  $\mu$  M primer mix (primers AN32, AN33, AN34, and AN35)，加入 20 U Rnasin，100  $\mu$  M dNTP、0.01 M DTT、100 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen)，混合均勻後，反應在 22°C，10 分鐘；42°C，60 分鐘；95°C，5 分鐘。得到 10  $\mu$ l 的 cDNA，進行 PCR1 反應，2x PCR buffer、200  $\mu$  M dNTP、50 pmol primers 224 and 222，0.5 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 30 秒，60°C 45 秒，共 40 個循環，產物大小約為 700bp。接著要進行第二次 PCR 反應，取出 1  $\mu$ l PCR1 產物，加入 40 pmol primers AN89 and AN88、200  $\mu$  M dNTP、2.5 U Taq DNA polymerase

(Invitrogen), 總體積為  $50 \mu\text{l}$ , PCR 條件為  $95^\circ\text{C}$  30 秒,  $60^\circ\text{C}$  20 秒,  $72^\circ\text{C}$  15 秒, 40 個循環反應, 之後進行電泳分析, 產物大小約為 320bp。

b、HPEV real-time RT-PCR [43-45]: 以 ABI 7900 來作分析, 取  $5 \mu\text{l}$  的 RNA 加到 Taq Man 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  $48^\circ\text{C}$  30 分鐘, 接著為活化 AmpliTaq DNA 聚合酶  $95^\circ\text{C}$  10 分鐘, 再進行 PCR 反應 40 個循環: denature 為  $95^\circ\text{C}$  15 秒, annealing-extension 為  $60^\circ\text{C}$  1 分鐘, 螢光訊號的收集於 annealing-extension 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。

#### B、症狀通報、群聚事件而檢測為陰性檢體

a、使用 MediPro 磁珠自動化操作平台, 將  $200 \mu\text{l}$  的原始檢體或病毒培養液, 置入自動盤之裂解液中, 將自動盤放置於操作平台, 機器將利用包覆二氧化矽的磁珠表面帶有氫氧基, 能吸附帶負電之核酸分子, 經過檢體與裂解液反應吸附後, 以清洗液去除雜質, 最後溶出  $100 \mu\text{l}$  核酸。製備的病毒核酸可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應。

b、Aichivirus RT-PCR 分析 [93]: 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、 $0.4 \text{ mM}$  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  $50^\circ\text{C}$  30 分鐘反轉錄作用, 之後  $95^\circ\text{C}$  作用 15 分鐘, PCR 熱循環 denaturation  $94^\circ\text{C}$  30 秒、annealing  $55^\circ\text{C}$  30 秒、extension  $72^\circ\text{C}$  1 分鐘, 共 40 個 cycle, 最後 extension  $72^\circ\text{C}$  7 分鐘。再以 RT-PCR 產物  $2.5 \mu\text{L}$  為模板進行 nest PCR, 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。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。

c、Astrovirus RT & PCR [94]: 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  $2 \mu\text{L}$   $20 \text{ mM}$  dNTP 於  $70^\circ\text{C}$  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、20U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液, 反應總體積為  $20 \mu\text{L}$ 。於  $25^\circ\text{C}$  作用 10 分鐘,  $50^\circ\text{C}$  50 分鐘反轉錄作用, 之後  $85^\circ\text{C}$  作用 15 分鐘。以 RT 產物  $2 \mu\text{L}$  為模板, 加入  $11.5 \mu\text{L}$  PCR premix, 分析引子 Mon269 及 Mon270。反應條件: 先  $95^\circ\text{C}$  denaturation 作用 5 分鐘, 熱循環 denaturation  $94^\circ\text{C}$  1 分鐘、annealing  $50^\circ\text{C}$  1 分鐘、extension  $72^\circ\text{C}$  1 分鐘, 共 30 個 cycle, 最後 extension  $72^\circ\text{C}$  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。

- d、Sapovirus PCR [95]: 取 RT 產物 2  $\mu$ L 為模板，加入 23  $\mu$ L PCR premix，分析引子對為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。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，分析引子 1245Rfwd/ SV-R2。進行 capsid 基因片段 nest PCR，將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物約 430bp，進一步做序列分析。
- f、Salivirus/Klassevirus PCR [96]: 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。

## 6、立克次體核酸及抗體快速檢驗試劑之開發

- (1) 基因重組蛋白質之製備與純化：主要以大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的蛋白質 TSA-56kD 為標的，構築質體 (plasmid)，表現其基因重組蛋白質。由於大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 可提供便宜、快速且能大量生產蛋白質的多種優點，故採其表現重組蛋白質。首先利用 PCR 得到 TSA-56kD gene DNA 片段，將這些片段選殖至 pET 表現系統 (Novagen)，產生 N 端 (或 C 端) 為 His-tag 的重組蛋白質。將 plasmid 構築完成後，轉殖至蛋白質表現系統 BL-21 (DE3)，以 1 mM IPTG 誘導標的蛋白質產生。抽取該菌液蛋白質後，利用 AKTA 液相色層分析儀 (LPLC) 將不同分子量分子加以分離，再將純化後收集之蛋白質溶液混合後，以梯度透析及 PEG 濃縮等方法，得到純化之重組蛋白質。再利用 mAb against His-tag (正對照組)、老鼠抗立克次體單株抗體等，決定重組蛋白質是否帶立克次體抗原決定位置 (Western blot, Immuno-precipitation)，再大量表現純化之。並利用 ELISA 的方法評估其發展 ELISA 及 ICT 檢驗試劑之可能性，並將有潛力的各種重組蛋白質片段，做適當的混合 (cocktail)，製成更高靈敏度、高專一性的酵素免疫診斷試劑。
- (2) 融合瘤之製備：將 5 至 6 週齡之 BALB/c 雌性小鼠經由腹腔內或皮下

注射約 20-50  $\mu\text{g}$  的 TSA-56kD 重組蛋白質，加等體積之 Freund' s complete adjuvant (Sigma)。分別間隔三週後，使用相同抗原，再追加免疫注射二次，但改用 Freund' s incomplete adjuvant。第四次免疫時，採用靜脈注射，使用不加佐劑之抗原。免疫四次後之小鼠抽取其尾巴血，以 ELISA 測定血清中抗 TSA-56kD 抗體之效價。將高效價小鼠之脾臟細胞以無菌技術取出後和 FO 骨髓瘤細胞在含有 PEG 之溶液中融合，在經含有 HAT 之培養液篩選會分泌抗 TSA-56kD 之抗體的融合瘤細胞用 ELISA 免疫酵素法挑選出來，以限制稀釋法進行單一細胞培養成單株細胞，再重覆進行 ELISA 篩選出分泌抗 TSA-56kD 單株抗體的融合瘤細胞株。FO 細胞應於細胞融合前 4~7 天增殖培養，使 FO 細胞在細胞融合當天的生長處於對數期 (log phase)，且細胞數目要在  $3 \times 10^7$  以上。取出小鼠的脾臟細胞直接以 Incomplete RPMI 培養液清洗 3 次後，將它和 FO 骨髓瘤細胞混合，在 50 ml 離心管中小心把細胞離心下來，倒去上清液後以殘留的 RPMI 把細胞打散，放在  $37^\circ\text{C}$  內保溫準備加入 PEG 1500 (polyethylene glycol) 進行細胞融合。在 1.5 分鐘內慢慢加入 1.5 ml PEG，同時一邊輕輕搖動讓 PEG 均勻的混合細胞。靜置 1.5 分鐘，然後在 5 分鐘內加入 5 ml RPMI，邊加邊混勻；再於 2 分鐘內加入 20 ml RPMI。離心去掉上清液後輕輕加入 45 ml HT medium ( hypoxanthine (H) and thymidine (T) )並均勻懸浮細胞，把細胞均分到 6 片 96 孔培養盤中，每孔加約 2~3 滴 (約 75  $\mu\text{l}$ )。第二天起加入等量的 H2AT medium (H - hypoxanthine; A - aminopterin; T - thymidine)。第三天起置換 75  $\mu\text{l}$  HAT medium，每 3-4 天置換一次，當控制組的 FO 細胞死亡後，置換成 75  $\mu\text{l}$  HT medium，每 3-4 天置換一次。最後每孔只剩下 1 或 2 個穩定細胞群落，再以 ELISA 篩選抗體效價較高者，將該細胞株稀釋重新平分到 96 孔細胞培養盤中 (每孔中只含有一個細胞)，待其生長成群落後再用 ELISA 篩選抗體效價較高者而得到的單株融合瘤，經大量培養後，保存至液態氮中。

- (3) 單株抗體之篩選：以 ELISA 方法檢測單株抗體的效價及專一性。ELISA 檢測系統的專一性及靈敏度皆高，且與動物抗體中和效價測定法相比較，兩者結果相符合，故採用 ELISA 方法作為快速篩選抗體之檢測系統。首先將純化出之 TSA-56kD 重組蛋白質抗原，用 pH9.6 carbonate buffer 吸附在 96 microwell immunoassay strips， $4^\circ\text{C}$  隔夜後，以 1% BSA 進行 Block， $37^\circ\text{C}$  反應一小時，清洗 3 次後，加入以 PBS-0.5%Tween20-1%BSA-2.5%NRS 適當稀釋之待測檢體及陽性、陰性控制組，放置於  $37^\circ\text{C}$  保溫箱中震盪半小時。清洗 3 次，再加入 Goat anti-mouse IgG-alkaline phosphatase conjugates 二次抗體，作用於  $37^\circ\text{C}$  保溫箱中震盪半小時，清洗 3 次。最後，每孔中加入 100 $\mu\text{l}$  pNPP 呈色劑，放置於室溫暗處，呈色反應約一小時，以 ELISA 吸光儀讀取波長 405nm 及 620nm 吸收光。

- (4) 抗體之製備、純化與分析：單株抗體以 BALB/c 小白鼠之腹水方式生產，再以 protein A sepharose 4B Fast Flow 親和力管柱(Pharmacia Biotech) 純化。

### (三) 流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫的建置及防疫應用

#### 1、病原微生物基因體資料庫對外開放網站暨分析平台的建置與更新

- (1) 依據使用者之使用建議或功能需求，定期更新或新增系統功能。
- (2) 更新統計報表介面，方便進行資料庫中序列以及流行病學資料數目的統計，並可計算使用者登入情況。
- (3) 為了因應各種類型的基因資訊儲存，除了現有之核酸序列，亦包括新式基因分型資訊，規劃設計適合的資料上傳及儲存模式。
- (4) 目前規劃病原體基因資料庫開放的原則為上半年完成之序列與對應流行病學資料，如：採檢日、性別與年齡，除了本局提供的資訊外，也將 WHO 公佈之流感疫苗資訊以及國際上相關病原體序列資訊存入資料庫中，如：國際間最知名的資料庫 NCBI，以便使用者瀏覽分析，進行不同條件的搜尋比對或者是在不同資料庫內進行搜尋，不但可以增加使用者的操作便利性，亦可節省比對所需的時間。
- (5) 更新與新增分析功能，除更新現有之即時比對、多序列排列、親緣樹狀圖繪製、及腸病毒 71 型與流感病毒分型功能之外，亦設計新的序列分析相關功能。
- (6) 增加相關資源項目，提供使用者常見的網路資源連結、參考文件及工具軟體下載使用。
- (7) 使用者若需要完整資料須向權責單位依本網站所提供病原體基因資料序列申請規範文件來申請，其申請內容包含計畫摘要表和使用協議書，而申請者利用本資料發表之有關論文或著作，應詳細書明資料出處。

#### 2、腸病毒與流感病毒、腹瀉病毒基因的分析流程

- (1) 將合約實驗室送檢病毒株進行病毒再培養、入庫保存。
- (2) 進行病毒核酸的萃取、反轉錄酶及聚合酶連鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)、PCR 產物純化以及 Cycle Sequencing 等，進行核酸染劑純化後上機 (現有機型為 ABI 3730 核酸定序儀) 進行序列判讀，最後進行序列修補及比對分型。
- (3) 挑選病毒核酸序列，連同自國內外資料庫下載的參考病毒株序列，使用 BioEdit 軟體進行多序列排列比對。
- (4) 將整理過後的序列進行各序列位點變化的分析，並將變異程度較大或者是抗原決定位的位點進行分析。

- (5) 使用 ClustalW2 套件或於本機使用 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 4 來進行親緣樹狀圖的繪製，藉以確認所流行的病毒株之基因型別與各國病毒株之親緣關係。
- (6) 合併流行病學資料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) 未知/新興傳染病監測

##### 1、肺炎重症監測結果

自 2010 年 1 月至 2011 年 10 月止，各醫院共通報 209 名肺炎重症個案，包括 2010 年 89 名及 2011 年 120 名，至今已完成 186 名個案之病歷回顧及 2010 年 1 至 9 月間共 63 名個案之研判。

在完成個案研判之 63 名個案中，有 27 名(43%)因非社區性肺炎等因素不符收案條件而被排除，餘 36 名個案納入最終分析。個案年齡中位數為 54 歲，男女比為 1.8:1，有三分之二個案於病歷中記載有潛在性疾病，其中以糖尿病(28%)為最多。所有個案均入住加護病房，死亡率為 50%，其他基本及臨床資料詳見表四。

36 名個案中，有 22 名(61.1%)有檢出病原體，包括兩名個案同時檢出兩種以上病原體。檢出病原體包括病毒(n=14)、細菌(n=7)、分枝桿菌(n=1)及真菌(n=2)，詳列如表五。根據研判，17 名個案有確定病因，2 名個案有極可能病因，5 名個案有可能病因。

比較 18 名死亡個案與 18 名存活個案，可見兩組在潛在疾病、住院天數、重症治療及病原體檢驗結果方面均無顯著差異(表六、七)。

針對 14 名符合收案條件但檢驗均陰性之個案，篩選出其中年齡較輕(<65 歲)、病況嚴重(死亡)且採檢日距發病日較近的個案共 14 名，利用其呼吸道檢體進一步進行 microarray，然並未檢出其他病原體。

##### 2、腦炎重症監測結果

自 2010 年 1 月至 2011 年 10 月止，各醫院共通報 94 名腦炎個案，包括 2010 年 31 名及 2011 年 63 名，至今已完成 53 名個案之病歷回顧及 2010 年間 29 名個案之統計。

29 名腦炎個案之基本及臨床資料如表八，其中 9 名(29%)檢驗陽性，研判具有確定(n=4)、極可能(n=4)或可能(n=1)病因。確定病因包括 influenza A、HSV 與 echovirus type I。

##### 3、腺病毒肺炎重症個案監測結果

自 2010 年底起，實驗室即發現數名通報肺炎重症個案病患，其呼吸道檢體均分離出腺病毒；同時間通報法定傳染病流感重症肺炎之病患，亦有多名於呼吸道檢體中分離出腺病毒。佐以本局病毒合約實驗室的監測資料，研究團隊發現在 2011 年有一波社區腺病毒流行，遂針對此波流行之腺病毒肺炎個案進行病歷回顧及病毒分型。

自 2010 年第 40 週起至 2011 年第 17 週止，共有 34 名腺病毒肺炎個案納入研究，其基本資料詳列如表九。病毒分型結果顯示其中 50%(n=17)為第三型腺病毒，35.3%(n=12)為第七型腺病毒，14.7%(n=5)為第二型腺病毒。第二型腺

病毒感染造成之肺炎重症較易發生於具有潛在疾病之個案( $p<0.01$ )，且個案年齡較大( $p<0.01$ )，第三型腺病毒感染之個案較常有接觸史( $p<0.05$ )。分型比較詳列於表十。

利用未知感染原肺炎重症之檢驗，在 34 名腺病毒肺炎之個案中，有 18 名 (52.9%) 可找到其他確定或極可能病因，包括 influenza A, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* 等，詳列於表十一。

**4、建立檢體檢驗流程：**檢體檢驗流程如圖一。咽喉病毒拭子液、痰液、肺泡沖洗液、CSF、組織等利用 multiplex real-time RT-PCR 檢驗，另痰液與 CSF 等檢體進行細菌培養。

**5、檢體生物材料庫的建立：**100 年 1 月至 10 月底，共計 131 個肺炎重症通報個案，407 個檢體，131 個案中 79 個(60%)檢驗出病原體，包含檢驗出病毒有 50 例（兩例同時感染兩種病毒）、檢驗出細菌或真菌 43 例，同時檢驗出病毒與細菌或真菌者有 14 例。檢出病原體名稱如表十二。未知感染原及腦炎通報共計 82 個案，227 個檢體，82 個通報個案中 16 個個案驗出病毒，檢出率 19.5%。檢出病原體名稱如表十三。

## (二) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

### 1、已建置 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統：

包含 influenza virus, parainfluenza virus, rhinovirus, human metapneumovirus, herpes simplex virus (HSV) 1 and 2, VZV, CMV, HHV6, bocavirus, enterovirus, coronavirus, parvovirus B19, respiratory syncytial virus (RSV), parechovirus, chikungunya, Japanese encephalitis, dengue virus, *Toxoplasma gondii* 以及 *Borrelia*。100 年 1 月至 10 月底，共計 131 個肺炎重症通報個案，其中呼吸道檢體，使用病毒 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組(包含 influenza A, influenza B, RSV, adenovirus, metapneumovirus, rhinoviruses, HSV1, HSV2, CMV, parainfluenza type1, 2, 3, 4, coronavirus 229E/OC43/NL63/HK, human bocavirus, HHV6, HPeV, VZV, enterovirus 等 22 個病毒檢測)，131 個案中 79 個(60%)檢驗出病原體，包含檢驗出病毒有 50 例（兩例同時感染兩種病毒）(表十二)。100 年 1 月至 10 月底，共計 82 個腦炎或未知感染原通報個案，其中血清、病毒拭子、組織及腦脊髓液檢體使用病毒 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組(包含上述呼吸道 22 個病毒，加上 parvovirus B19, chikungunya, Japanese encephalitis, dengue virus, West Nile virus, hendra virus, Nipah virus, *Toxoplasma gondii* 以及 *Borrelia* 等 31 種病原體檢測)，82 個案中 16 個(19.5%)檢驗出病原體（5 例同時檢測出兩種以上病毒）(表十三)。

**2、檢測病毒合約實驗室通報 enterovirus，生材料無法進行 PCR 或序列分析之檢體：**收集 2009 年 7 月至 2010 年 7 月病毒合約實驗室通報 enterovirus，生材料無法進行 PCR 或序列分析之檢體共 66 個，三例 CODEHOP 陰性檢體經 multiplex PCR/RT-PCR 檢測套組分析得到 chikungunya virus, adenovirus 及

rhinovirus(表十四)。另一有 CPE 但 PCR/RT-PCR 檢測套組無法分析之檢體，將以 high throughput sequencing 進行檢測分析。

**3、高通量定序：**病毒合約實驗室送至本局之病毒培養呈現 cytopathic effect (CPE) 陽性，但 multiplex PCR/RT-PCR 無法檢測出病原之檢體，續由高通量定序檢測系統分析，刻正進行中。

**4、微陣列晶片：**TWCDCCChip 病原體微陣列檢測晶片更新第三版，總計 32,264 條探針，包含 55 科 1,070 種病毒，31 屬細菌與 6 屬寄生蟲之序列。2011 年增加檢測出 human metapneumovirus, aichi virus, human parechovirus，累計經實際實驗確認已可檢測出 32 種病毒，包含 adenoviruses, enteroviruses-EV71, rhinoviruses, influenza A H1N1, H3N2 viruses, influenza B virus, rotaviruses, norovirus, dengue virus type 1-4, yellow fever virus, West Nile virus, Japanese encephalitis virus, chikungunya virus, coronavirus, human cytomegalovirus (CMV), human respiratory syncytial virus (RSV), human parainfluenza virus type 1, 2, herpes simplex virus type 1 (HSV1), TT virus, mammalian orthoreovirus, cardiovirus, human metapneumovirus, HIV, HCV, HBV, EBV, aichi virus, human parechovirus。2011 年，將 20 例 multiplex real-time RT-PCR 檢驗陰性者，進行微陣列晶片檢測，仍無法發現其他病原體。

2011 年本局與美國 LAWRENCE LIVERMORE NATIONAL LABORATORY(LLNL)合作，使用其 pan-Microbial Detection Array (MDA)的晶片與分析系統 (LLNL-MDA 病原體微陣列檢測晶片第二版)，分析 38,000 個病毒序列(約 2200 種病毒)和~3500 個細菌序列(約 900 種細菌)，設計的探針數目為每條病毒序列 10 個以上探針，細菌序列 15 個以上探針，總計約 72,000 條探針，探針序列儘可能除去與人類染色體序列反應之區域。測試 influenza A H1N1 virus, adenovirus type 7 與 Aichi virus 陽性樣品，皆可正確檢測如圖二。

## 5、建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法

### (1) 目標基因片段選取及偵測之核酸引子對設計

將各 alignment 好的病毒選擇序列保守性較高的基因片段，設計小於 500 bp 以下的目標基因片段，進行核酸引子對設計。各病毒的目標基因片段經設計結果，HBoV 病毒所選擇目標基因位於 NS gene 基因片段；HCoV-HKU1、HCoV-NL63、HCoV-OC43 以及 HCoV-229E 選擇位於 polymerase gene 基因片段；KIPyV 病毒、WUPyV 以及 MCPyV 病毒則均選取位於 VP1 gene 片段做為目標基因。經由 multiplex PCR 進行核酸引子專一性檢測，結果如圖三所示，針對各病毒的專一性效果良好。

### (2) 新興病毒的同步偵測

為加強提高臨床檢體的靈敏度，以及面臨臨床檢體可能具有一種以上的病毒同時感染(dual infection)的情形，我們將各病毒已完成最佳化的核酸引子，以 suspension array 的方式建置多重病毒同步偵測平台，將各專一性的

核酸引子分別標記螢光後，經由設定 PCR 條件，在完成增幅反應後以電腦系統判讀螢光數值，透過計算而判定檢測結果。PCR 複製反應條件經測試後設定為 RT 50°C 40 分鐘，之後以 94°C 30 秒進行 template denature，再以 94°C 30 秒、52°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘的條件進行 15 個循環的第一階段複製反應，之後以 94°C 15 秒、70°C 90 秒進行 6 個循環的第二階段增幅反應；再以 94°C 15 秒、52°C 15 秒以及 72°C 15 秒進行第三階段的 PCR 產物複製，最後以 72°C 3 分鐘進行最終延長 (final elongation)，結果顯示各病毒標準品的監測可提高至 1-10 copies/25  $\mu$ l 的靈敏度，更提高臨床檢體的檢出率，而各新興病毒的詳細專一性及靈敏度的偵測結果，整理如表十五所示，除包括 WUPyV、KIPyV 以及 MCPyV 等部分病毒以外，靈敏度均可達 1-10 copies/ $\mu$ l，大幅提升檢測靈敏度。

### (3) 2011 年呼吸道感染檢體檢測結果

將 2011 年截至 10 月 31 日止之疑似呼吸道感染檢體以建置之呼吸道多重病毒偵測平台進行呼吸道病毒檢測。共計 3299 支待測檢體中，檢測出包括流感病毒、腺病毒、副流感病毒、單純疱疹病毒，以及呼吸道融合病毒，等例行性呼吸道檢測病毒，同時也檢測到包括 HCoV-HKU1 病毒，HCoV-NL63 病毒、HCoV-OC43 病毒、HCoV-229E 病毒以及 HBoV 病毒，肺間質病毒(human metapneumovirus)等新型病毒，詳如表十六所示。整體而言呼吸道病毒的檢出陽性率為 3.82%，其中去除送驗為血清檢體，在咽喉拭子、痰液以及鼻腔沖洗液等較可能採檢至病原體的檢體共計 403 支檢體中，共有 126 支陽性的檢體被檢出，檢出率達到 31.27%，而其中新興病毒陽性率約佔其中的 11.8%，顯示新興呼吸道病毒的檢測方法，可協助解決具有呼吸道病徵的患者檢體中，原本分離不出病原體的窘境，同時也顯示新興病毒在台灣地區確實有存在。

## 6、病毒檢測陰性檢體之新興/再浮現病毒檢驗之開發

### (1) 病毒合約實驗室無法分型之腸病毒檢體

由各合約實驗室經細胞培養分離出無法分型之病毒，經生物材料科收集病毒株，初步以分子檢測法，仍有未能分析出型別之病毒，2010 年共 76 件，2011 年至 10 月完成分析共 52 件。此檢體來源為腸病毒監測系統中，疑似腸病毒之臨床症狀，經定點醫師採檢臨床檢體，其種類大部分為咽喉拭子。以腸病毒 CODEHOP-RT semi-nested PCR 進行檢測，發現這兩年檢體中，最多的病毒為 CA 9 有 45 件，次之為 HRV (Human Rhinovirus) 有 27 件，CA 24 有 9 件，CA 21 有 7 件，Echo 9 有 5 件，EV68 與 CB2 各兩件，各一件的有 CA6、CA10、CB4、Echo 3、Echo 7、Echo 25 與 EV71。EV71 病毒經 NCBI 序列比對，與 2010 年英國與日本相繼分離出之 EV71 序列最為相近(98%)，為 C2 之基因亞型。CA 9 病毒於 2010 年至 2011 年有一小波之流行，而現行分子檢測法對於 CA 9 的敏感度偏低，因此成為本次分析檢體中，最常見之無法分型腸病毒 (圖四)。



## (2) 症狀通報、群聚事件而檢測為陰性檢體

透過今年通報腹瀉群聚或食物中毒採檢之糞便檢體，以常規檢驗諾羅病毒與輪狀病毒為陰性結果後，共挑選 212 件糞便檢體，分別進行腹瀉新興病毒: aichivirus、astrovirus、sapovirus 與 salivirus/klassevirus 之 RT-PCR 或 nest PCR。

陽性數如下:aichivirus 陽性 1 支,astrovirus 陽性 1 支,sapovirus 陽性 18 支, salivirus 陽性 2 支。sapovirus 有兩支為醫院通報食物中毒之零星個案，其餘 16 支分別為 5 起群聚事件，2 起為醫院內病房之腹瀉群聚，3 起為國小及托兒所之群聚事件，平均發病年齡為 30.3 歲（最小 6 歲，最大 71 歲）。發生月份分別為 2 月有 3 起事件，發生於宜蘭縣、新北市與嘉義縣，3 月有一起發生於宜蘭縣，4 月一起發生於台北市。國內 sapovirus 主要型別為 GI/2，2 月份一起嘉義縣之國小群聚型別為 GI/3，兩個零星個案之基因型別則分別為 GI/3 與 GV 型（圖五、表十七）。

## 7、立克次體核酸及抗體快速檢驗試劑之開發

(1) 表現 *Orientia tsutsugamushi* Karp, Gilliam 及 Kato TSA-56kD 基因之片段或全長的重組蛋白質：由於台灣恙蟲病立克次體之基因型別複雜，為提高恙蟲病 ELISA 檢驗之靈敏度，除了表現 Karp strain 之重組蛋白質外，亦表現 Gilliam 及 Kato TSA-56kD 基因之片段的重組蛋白質。本研究所使用的含 TSA-56kD 基因之片段或全長的重組蛋白質之質體(圖六)，為 96 年研究計畫已產出者，本研究應用此質體加以改良並重新表現及純化 TSA-56kD 重組蛋白質。表十八所示為利用 Karp TSA-56kD-(kp2-5), Gilliam TSA-56kD-(g2-4)及 Kato TSA-56kD-(kt2-4)基因片段的重組蛋白質與恙蟲病陽性及陰性病例血清檢體之測試結果。顯示此三種重組蛋白質均可與恙蟲病陽性血清作用，可作為免疫小鼠之抗原來源，以生產抗恙蟲病立克次體之單株抗體，並利用此三種重組蛋白質篩選單株抗體。

(2) 產生抗 TSA-56kD 之單株抗體與專一性測試：表十九為以 Karp TSA-56kD-(kp2-5), Gilliam TSA-56kD-(g2-4)及 Kato TSA-56kD-(kt2-4)三種重組蛋白質免疫小鼠所產生之單株抗體，以不同重組蛋白質[包括恙蟲病立克次體 *Orientia tsutsugamushi* (kp2-5, kt2-4, g2-4, kp1-5)、地方性斑疹傷寒立克次體 *Rickettsia typhi* (OmpB-1), 斑點熱立克次體 *Rickettsia japonica* (OmpA-28fa), 斑點熱立克次體 *Rickettsia conorii* (OmpB-f)]作專一性測試分析。由表中可見單株抗體 1B8, 5C3-6 及 5C3-1 只對恙蟲病立克次體(kp2-5, kt2-4, g2-4, kp1-5)之重組蛋白質具有專一性，對地方性斑疹傷寒及斑點熱立克次體重組蛋白質則無親和性。

(3) 恙蟲病 Capture IgM/IgG ELISA 之建立：在 Goat Anti-human IgM/IgG coated plate 加入 100  $\mu$ L, 1:100 稀釋之恙蟲病確定病例陽性及陰性成對血清檢體，37°C 作用 30min，倒去血清，清洗後，加入 1B8 單株抗體腹

水(最終濃度 1:1000)與 kp2-5, kt2-4, g2-4 重組蛋白質 (最終濃度各為 1 mg/mL) 混合液, 37°C 作用 30min, 倒去血清, 清洗後, 加 Goat anti-mouse-alkaline phosphatase, 37°C 作用 30min, 加 pNpp 呈色。表二十為 Capture IgM/IgG ELISA 所得的結果, 顯示 1B8 單株抗體與恙蟲病立克次體(kp2-5, kt2-4, g2-4, kp1-5)之重組蛋白質可應用於偵測恙蟲病病人血清之 TSA-56kD 抗體。

### (三) 流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫的建置及防疫應用

#### 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) 已建立之基因資料庫功能及應用：

- A、網站最基本且最重要的「序列資料比對」功能, 藉由序列資料比對, 可得知與台灣或世界各國的序列資料之相似程度, 並可初步判斷此病原體種類及型別, 或探知是否為新型的未知病原體。例如 2009 年時, 便利用序列比對確認國內首例新型流感重症病例。而「多重序列排比及親緣樹狀圖之繪製」功能可以繪製親緣樹狀圖來更進一步分析序列彼此間的親緣關係。
- B、「序列引子設計」功能採用 Primer3 套件, 使用者僅需上傳序列及設定參數後即可計算出合適的引子, 並可下載結果報表作為研究參考。
- C、「腸病毒 71 型病毒亞型比對」以及「流感病毒疫苗株比對」功能, 使用者經由單筆序列或者大量資料批次輸入並比對後, 分別可得知腸病毒 71 型病毒之基因亞型或者是流感病毒疫苗株型別。我們定期更新 WHO 建議流感病毒疫苗株之序列資料 (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。
- D、「流病資料或序列資料查詢」, 本資料庫彙整序列資料以及流行病學資訊, 使用者可以年份、月份、流病資料類別的下拉選單查詢系統目前收錄的流行病學資料 (包括流水號、病人編號、年齡、性別、城市及發病日等詳細資訊)、以及序列的詳細資訊報表 (包括序列編號、類型、Virus、Locus、發病日等不同欄位)。截至 2011 年上半年, 基因資料庫儲存之病原體資訊共包含 2005 年至 2010 年間之流感病毒 10,943 筆、腸病毒 9,353 筆、腺病毒 1,189 筆序列資料, 對於基因演化分析或流行病學分析皆具極高的參考價值 (圖七)。
- E、在資料庫的使用狀況部份, 截至 2011 年 10 月為止, 已有超過 370 位的註冊者, 以及超過 2,400 人次之登入次數與超過 2 萬 5 千的瀏覽次數。註冊者的身份經過分析顯示約有 51% 屬於各學校人員, 顯示本資料庫可以提供學術研究上的參考(圖八)。

#### 2、基因資料庫的防疫成效：

- (1) 在今年擴充病原體相關資料之後, 本資料庫的內容更加豐富, 可對於國內腸病毒、流感病毒、腺病毒研究有著重大幫助, 如：影響國人甚鉅

的腸病毒 71 型方面，我們經由序列資料的比對證實台灣地區 2006-2007 年間出現新引入的腸病毒 71 型 B5 以及 C5 亞型；2008 年初藉序列比對確認當年腸病毒重症之病原體主要為腸病毒 71 型之 B5 基因亞型，與中國大陸大流行之 C4 基因亞型不同，證實兩岸腸病毒疫情無直接關係，並提出腸病毒可能大流行之預警；2010-2011 年主要流行亞型為 C4 基因亞型，並由親緣樹狀圖得知與中國大陸病毒株相當類似，推測為其可能傳播之來源。

- (2) 流感病毒的部份則是可與 WHO 建議之流感疫苗株資料庫 (2 月份公佈北半球建議疫苗株，9 月份公佈南半球建議疫苗株) 進行 BLAST 比對或繪製親緣樹狀圖，藉此了解所比對序列的最相近疫苗株為何，除可分析病毒株的亞型、確認病毒來源，還可初步判斷流行病毒株與建議疫苗株的抗原性差異，亦可輔以抗體相關資料來評估疫苗保護力是否足夠，對於流行趨勢的預測、疫苗株的研發選擇或防疫政策的制定都有相當大的參考價值。
- (3) 今年度新增加的流感病毒 NA 基因序列資料，可以作為抗病毒藥物 (Neuraminidase 抑制劑) 之抗藥性產生的參考依據，例如序列比對後發現 H275Y (N1) 的胺基酸突變，即為已有抗藥性 (圖九)。

## 四、討論

### (一) 未知/新興傳染病監測

新興/再浮現等重要傳染病病原體的偵測其重要性無庸致疑，而病原體需來自於臨床檢體，因此，如何即時取得有意義之臨床檢體，乃是建立有效率監測系統最重要的關鍵。

本計畫藉由主動監測，與有意願之臨床醫師合作，鼓勵其通報符合收案條件之個案檢體送驗。自 2010 年至今，肺炎及腦炎收案數目均穩定上升，顯見此一模式合作良好，目前收案數量亦符合實驗室量能。針對本年度肺炎重症、腦炎與腺病毒肺炎計畫，分別討論如下。

#### 1. 肺炎重症監測

有部份肺炎個案於病歷回顧時發現並不符合收案條件。不符收案條件之原因包括非「重症」肺炎(未使用呼吸器或未達 ARDS 標準)(16.9%)及非社區型肺炎(10.7%)。此兩類個案雖的確有其診斷需求，然由於檢驗資源限制，本計畫將以較具公共衛生重要性(public health impact)之社區型肺炎重症為主要監測對象，日後將加強與臨床醫師溝通，盼能減少此兩類個案數量以增進檢驗效能。

本計畫使用目前檢驗技術，有四成個案仍無法找到病因。此比例與先進國家報告相仿，根據 Thomas 在 2003 年的報告，一般社區型肺炎有 17-48%無法找到病因，嚴重社區型肺炎則有 19-70%無法找到病因。本計畫在 53%個案中找到病原體感染之證據，包括 human enterovirus 68、parvovirus、human metapneumovirus、*Legionella longbechae* 等新興病原體，可見現今所使用之診斷方法可彌補醫院端例行診斷之不足，並發現新興病原體。雖於研究期間並未發現具公共衛生重要性之群聚事件，但我們相信此一診斷平台之存在，對及時發現日後任何可能威脅國人健康之新興病原體，有相當程度的助益。

#### 2. 腦炎個案監測

腦炎病患之臨床表現具特異性，但收案困難處在於必須要有腦脊髓液檢體，才容易根據檢驗結果做出確定診斷，因此於 2010 年僅通報 31 名個案。2011 年間收案數目已達 2010 年之兩倍，可見收案系統已漸上軌道，日後將可累積更多資料。

本計畫使用目前檢驗技術，有七成個案仍無法找到病因，此比例與他國之報告相近。Glaser 等人於 1998-2005 年收集 1570 名腦炎病患的研究顯示，有 63%個案無法找到病因，另外有 8%個案為非感染性病因造成之腦炎，主要以免疫疾病為主。Granerod 等人於 2010 年的報告中統計 203 名腦炎病患，其中 42%可找到感染症病因，21%為免疫疾病，而 37%在進行所有檢驗後仍無法找出病因。可見相當一部份之腦炎為免疫疾病所致，該類病患無法由目前計畫之檢驗技術診斷，也因此腦炎個案之診斷率低於肺炎重症個案。此外，同一個案腦脊髓液中病原體檢出率較呼吸道檢體或血清檢體為低，也是腦炎個案難以有確定診斷的另一原因。

### 3. 腺病毒肺炎個案

腺病毒是常見的呼吸道感染病原體，可於成人及孩童造成肺炎。本局合約實驗室收集之呼吸道檢體中，每年均約有 10% 會培養出腺病毒，但並未常規進行分型。2011 年我們觀察到此一腺病毒流行，即利用本計劃之平台，配合本局合約實驗室資料進行相關研究。顯示此一合作模式可有效應用於新興疫情，即時進行資料收集與分析。

台灣曾於 1999-2000 及 2004-2005 年間，發生過兩次社區型腺病毒流行。但比較合約實驗室之病毒分離率，以本次流行之規模最大。腺病毒流行常見於軍營及孩童，然在此次流行中，我們發現孩童(<5 歲)與成人(19-55 歲)個案各佔約 45%，顯示當大規模社區流行時，成人與孩童一樣會受到腺病毒感染並造成重症。另外，我們也發現腺病毒與其他病毒同時感染之情形並不少見，顯示當大規模社區流行時，腺病毒可經由單獨感染個案而造成肺炎，或加重其他病原體造成肺炎之嚴重性。

#### (二) 未知/新興感染原檢驗技術平台的開發

1、本年度通報腦炎及未知感染原個案：15 個為咽喉/肛門病毒拭子檢體，一 2 歲男童，其咽喉拭子同時檢出 HHV6、HHV7，HHV7 為初次出現於本計畫之 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統中，HHV6 與 HHV7 常造成三歲以下小孩感染，並非罕見，且其血清中並無檢測出，因此是否與其腦炎症狀相關，須待病例回顧完成。5 個血清檢體檢出病毒；1 個 CA9，2 個 CMV 以及 2 個 HPeV，其中血清中檢出 CA9 為 1 個 2 歲女童。而血清中檢出 HPeV 之 2 個案其腦脊髓液檢體中亦檢出 HPeV，且由同家醫院通報，其中是否有關聯須待病例調查與型別比對後才可得知。上述個案之病例回顧皆在進行中，完成後將可協助了解臨床症狀、檢測結果與疾病研判之關連度，以及評估本計畫未來的方向。

#### 2、建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法

本計畫今年度建置之多重病毒同步偵測平台，經由與目前例行性檢驗常見之呼吸道病毒包括 influenza virus、parainfluenza virus、adenovirus、HMPV、RSV 以及已檢測到新興病毒進行專一性檢測，均無非特異性的 PCR 產物產生，顯示所使用的各病毒核酸引子的專一性效果良好且靈敏度約在 1-100 copies 之間，與各自獨立的 real-time 快速偵測方法靈敏度及專一性的結果相當，同時也與過去國際間已發表研究的靈敏度效果相近[79-81]。然而由於同步偵測平台可同時偵測多重呼吸道病毒病原體，在檢測未知檢體的時效性，以及節省檢體用量上，具有更大的實質助益。

2011 年疑似呼吸道病毒檢體共 3299 支進行初步篩檢，透過 PCR 檢測以及複製片段之核酸定序比對，結果共檢測出 126 支陽性病毒株，陽性率約 3.82%，其中 2896 支檢體種類為血清檢體，根據已發表文獻顯示，這些呼吸道病毒包含新興病毒會造成病毒血症(Viremia)的機率很低[7,83]，而本實驗以血清檢體進行呼吸道病毒及新興病毒的篩檢，確實也未發現有新興病毒或例行性呼吸道病毒的存在。其中 HCoV 病毒群，包括 HCoV-HKU1 病毒、HCoV-NL63 病毒、

HCoV-OC43 病毒，以及 HCoV-229E 病毒，其陽性率為 6.3%，與過去研究顯示 HCoV 於呼吸道感染的盛行率約為 1%-10%的結果相符[84]。整體而言新興病毒的偵測率佔檢測出病毒的 11.8%，顯示有許多呼吸道感染症，可能與這些新興病毒有關，值得進行持續性監測，以建立台灣呼吸道病毒的流行資料庫。

### 3、病毒檢測陰性檢體之新興/再浮現病毒檢驗之開發

今年度所收集無法分型之腸病毒，經本計畫執行後，分析出 99 支病毒，成功率達 81.3%，能以敏感度較高之腸病毒 CODEHOP 分生檢測方法驗出其病毒種類。而 CA9 佔陽性結果 43.3%，這與前兩年結果不同，先前主要分析出之病毒為 HRV 與 EV68，今年依據基因體實驗室所統計之腸病毒定序結果(圖四)，可發現到出現 CA9 的流行，使得無法分型之腸病毒也跟著上升。其中分析出一件 EV71 病毒為高雄榮總合約實驗室送驗，個案為五歲男童於今年 6 月發病，經醫師診斷為疱疹性咽峽炎之腸病毒感染並進行採檢，病毒序列與 2008 年國內所發現 EV71 之 C2-like 基因亞型相似度並不高 (88%)，而與日本大阪及英國 2010 年流行之 EV71 較相近 (99%)，應持續注意此不常見之亞型後續變化。

經由腹瀉常規檢驗陰性之檢體中，發現到零星個案之新興病毒：aichivirus、astrovirus、與 salivirus，雖然並非造成群聚之主要病原，但可證明這些新興病毒仍有造成疾病之威脅。

2007 年國內首例 sapovirus 引起腹瀉群聚，發生於新北市 (原台北縣)一所大學，造成 55 名師生出現噁心、嘔吐、腹瀉等不適症狀，送驗 8 件檢體中，有 7 件為 sapovirus 陽性，其基因型為 GI/2 [97]；去年 sapovirus 也引起台中市(原台中縣)一家餐廳腹瀉群聚 [98]；今年藉由計畫之執行擴大檢驗範圍，找出 18 例之 sapovirus (表十七)，為五起群聚事件之元兇，而分析其基因型別與發生地點，則顯示國內存在有多株之 sapovirus 並散佈於不同縣市。

### 4、立克次體核酸及抗體快速檢驗試劑之開發

目前立克次體之實驗室診斷，主要是以血清學 IFA 方法為主[88-91]。本研究建立以酵素免疫分析法為基礎的立克次體血清學檢驗方法，偵測病人血清中抗立克次體的 IgM 及 IgG 抗體，用以診斷立克次體傳染病。表現恙蟲病立克次體細胞膜上主要外套膜重組蛋白，TSA-56 kD，除了 karp strain 外，也表現 Gilliam 及 Kato 之重組蛋白以增加檢驗的靈敏度，且生產出抗 TSA-56kD 之單株抗體，並應用此重組蛋白質與單株抗體發展出 Capture ELISA 方法，用於偵測恙蟲病病人之感染。Capture ELISA 具有操作簡便、可全自動化及同時處理大量檢體的優點。若能提高重組蛋白質的品質並增加種類，並配合高親和性的單株抗體，以提升檢驗的靈敏度及專一性，則將可取代傳統的螢光免疫法 (immunofluorescence assay)，縮短檢驗時間，使治療工作更具成效。

### (三) 流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫的建置及防疫應用

本資料庫所包括的基因序列資料，可協助鑑定以往由傳統方法無法區分血清

型之病原體，流行病學資料則可用於追蹤疫情、探討病源、預測流行幅度及擬訂防治策略的重要參考依據，而這些為數眾多的資料皆經過彙整整合過，極具有實用性與樣本代表性。

在建置資料庫之後，我們接著所要面對的挑戰則為資訊安全的考量、網站推廣的效果、分析工具的深度、序列資料的更新頻率以及序列資料量的多寡等，因此我們不斷地定期更新資料以及設計小工具便於資料分析。目前我們每半年進行一次資料庫資料的更新，包括了本局的病原體資料、流感疫苗株資訊以及 NCBI 的序列資料等等，力求使用者能夠獲得最佳的使用效率。

目前資料庫中包含了流感病毒的 HA 與 NA 基因、腸病毒的 VP1 基因、腺病毒的 hexon 基因，這些基因位置的挑選乃是基於抗原性相關性、基因分型便利性、以及抗藥性相關的區域。除了上述基因序列之外，與腸病毒分型相關的 VP4 基因及可能與病毒重組有關的非結構蛋白基因 (3C, 3D 基因)等，或者是流感病毒另外一個與抗藥性相關的基因 (M 基因)，皆是未來基因資料庫的擴充目標。

## 五、結論與建議

- (一) 完成建立並持續監測肺炎重症、腦炎、不明原因快速死亡之個案，完成建立監測據點、通報流程與檢體收集流程。
- (二) 2011 年，收集 131 個肺炎重症個案，407 個檢體，未知感染原及腦炎通報共計 82 個案，227 個檢體。
- (三) 增加 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統偵測之病原體種類，除病毒外，細菌與寄生蟲等病原也將陸續加入。
- (四) 高通量定序敏感度較微陣列檢測方法高，可與 real-time PCR 比擬。加上其強大 de novo sequencing 的能力，在面對未知感染源疫情爆發時，是目前最有效的檢測方法。在未來新一代 single molecule sequencing 技術成熟後，將更能提高未知感染源偵測平台的能量。
- (五) 病原體微陣列檢測方法的建立，可同時檢驗上千種病原體，對未知病原體檢驗幫助很大。惟其檢驗的靈敏度不足與特異性較低，需搭配其他方法確認檢驗結果。但其用途可縮小可疑的感染原標的，應用上仍是未知病原體檢驗的有效工具。
- (六) 藉由新興病毒多重檢測方法之建置，不但可加速偵測多種病原體偵測的效能，降低民眾恐慌，而且能瞭解各病毒之盛行率，建立更為完整之臺灣各類呼吸道病毒流行病學資料。透過快速檢驗，亦可及時得知該等病毒之流行趨勢，做為流行預警之參考於防治實務具有助益。
- (七) 本計畫開發大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的主要蛋白質 TSA-56kD 之重組蛋白質，且生產出抗 TSA-56kD 之單株抗體，並應用此重組蛋白質與單株抗體發展出 Capture ELISA 方法，用於偵測恙蟲病病人之感染。Capture ELISA 具有操作簡便、可全自動化及同時處理大量檢體的優點。若能提高重組蛋白質的品質並增加種類，並配合高親和性的單株抗體，以提升檢驗的靈敏度及專一性，則將可取代傳統的螢光免疫法 (immunofluorescence assay)，縮短檢驗時間，使治療工作更具成效。
- (八) 流感病毒與腸病毒、腹瀉病毒基因資料庫的建置及防疫應用

基因資料庫過去所含資料以流感病毒 (HA 基因)、腸病毒 (VP1 基因) 及腺病毒 (hexon 基因) 為主，在今年度新增流感病毒 NA 基因，這些都是本國十分常見的病原體，因此應用本資料庫便可協助進行病毒流行趨勢監測與預測模式之建立、研究病原體演化特徵和抗藥性變化、以及可提供防疫政策制定上的重要參考資料。

而且本資料庫的特色為基因序列資料與流行病學資訊的整合分享，不僅僅為國內外資料庫的先例，更對於本土公共衛生的分析研究及防疫應用層面頗具價值，在近程中不僅能提升防疫績效，放遠未來亦可增進國人健康及國際合作交流之實力。



除此之外，本資料庫的運作上乃是本著資源共享的原則，任何人皆可使用資料庫中的公開資訊，期望藉此促進資訊交流以及產業發展，更希望可以達到拋磚引玉的效果，與各學術單位共同分享資源以及合作開發更理想的分析工具及更豐富的資料庫內容。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

- (一) 完成建立並持續監測肺炎重症、腦炎、不明原因快速死亡之個案，完成建立監測據點、通報流程與檢體收集流程。
- (二) 目前本實驗 multiplex real-time PCR 在血清、痰、病毒拭子甚至 CSF 檢體中均可偵測出病原，未來將繼續將入可偵測之病原種類，並嘗試合併檢體偵測，以符合經濟效益。
- (三) 本實驗目前以合併檢體進行高通量定序，可分攤昂貴的實驗費用，未來再加上標誌系統(barcode indexing)將可在一次定序實驗中進行更多檢體的分析。
- (四) 病原體微陣列檢測系統，TWCDCChip-v3 檢測晶片，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。2011 年增加檢測出 human metapneumovirus, aichi virus, human parechovirus，累計經實際實驗確認已可檢測出 32 種病毒。與美國 LLNL 合作，其 LLNL-MDA-v2，總計 72,000 條探針，包含 2200 種病毒與 900 種細菌。
- (五) 建立新興呼吸道病毒的快速檢驗方法
  - 1、建置台灣呼吸道病毒包括 influenza virus、adenovirus、RSV、HSV、parainfluenza virus 以及 human bocavirus (HBoV)、human Coronavirus-HKU1 (HCoV-HKU1)、human Coronavirus-NL63 (HCoV-NL63)、human polyomavirus KI (KIPyV)、human polyomavirus WU (WUPyV)以及 human polyomavirus MC (MCPyV)等多重呼吸道病毒快速同步偵測平台。
  - 2、藉由新興病毒檢測系統之建置，可瞭解該等病毒之盛行率，建立更為完整之臺灣各類呼吸道病毒流行病學資料。透過快速檢驗，可及時得知該等病毒之流行趨勢，做為流行預警之參考，於防治實務具有助益。
- (七) 本計畫開發大量表現於恙蟲病立克次體細胞膜上的主要蛋白質 TSA-56kD 之重組蛋白質，且生產出抗 TSA-56kD 之單株抗體，並應用此重組蛋白質與單株抗體發展出 Capture ELISA 方法，用於偵測恙蟲病病人之感染。Capture ELISA 具有操作簡便、可全自動化及同時處理大量檢體的優點。若能提高重組蛋白質的品質並增加種類，並配合高親和性的單株抗體，以提升檢驗的靈敏度及專一性，則將可取代傳統的螢光免疫法 (immunofluorescence assay)，縮短檢驗時間，使治療工作更具成效。
- (八) 病原體基因資料庫對外開放網站暨分析平台已於 2009 年完成主體建構與對外開放，並於 2010 年開始持續地進行系統程式的維護與更新，目前本資料庫包括的重點項目有五大部份：1、資料庫簡介、最新資訊及網站操作說明，2、資料庫查詢及各項分析工具，包括序列比對、基因分型、引子設計等功能，3、資料庫管理介面，4、人事管理介面以及 5、其他，包括意見交流、申請須知等細項。2011 年更針對舊有資料庫的病原體資料進行更新，並

新增流感病毒 NA 基因序列資料，且已初步規劃及設計 proteotyping 功能，預計可於 2012 年完成功能新增後，可提供序列比較與時序呈現的圖示化功能，增加分析的便利性。

(九) 口頭報告：「2010-2011 年臺灣社區性腺病毒流行」。臺灣兒科醫學會第 208 屆學術演講會，2011.11.26-27。

## 七、參考文獻：

- 1、Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL and Daszak P: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451:990-993.
- 2、Hajjeh RA, Relman D, Cieslak PR et al. Surveillance for unexplained deaths and critical illnesses due to possibly infectious causes, United States, 1995-1998. *Emerging Infectious Diseases* 2002;8(2):145-153.
- 3、Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of West Nile-like virus encephalitis- New York. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report* 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, Ward KN, Lunn MP, Irani SR, Vincent A, Brown DW, Crowcroft NS; UK Health Protection Agency (HPA) Aetiology of Encephalitis Study Group. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis.* 2010 Dec;10(12):835-44
- 5、Mailles A, Stahl JP; Steering Committee and Investigators Group. Infectious encephalitis in France in 2007: a national prospective study. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec 15;49(12):1838-47.
- 6、C. A. Glaser, S. Honarmand, L. J. Anderson, D. P. Schnurr, B. Forghani, C. K. Cossen, F. L. Schuster, L. J. Christie, and J. H. Tureen. Beyond Viruses: Clinical Profiles and Etiologies Associated with Encephalitis. *Clin Infect Dis.* 2006 ;43:1565-77
- 7、Osiowy C. 1998. Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 36(11): 3149-54.
- 8、Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al. 2004. 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.* 42(4): 1564-9.
- 9、Morris DJ, Cooper RJ, Barr T, et al. 1996. Polymerase chain reaction for rapid diagnosis of respiratory adenovirus infection. *J Infect.* 32(2): 113-7.
- 10、World Lung Fundation. 2010. The Acute Respiratory Infections Atlas. First Edition. <http://www.ariatlas.org/>
- 11、Amold JC, Singh KK, Spector SA, et al. 2008. Undiagnosed respiratory viruses in children. *Pediatrics* 121(3):e631-7.
- 12、Jih-Hui Lin, Shu-Chun Chiu, Cheng-Hao Lee, et al. 2008. Genetic and antigenic analysis of epidemic influenza viruses isolated during 2006-2007 season in Taiwan. *J Med Virology* 80(2): 316-322.
- 13、Lin JH, Chiu SC, Shaw MW, et al. 2007. Characterization of the epidemic influenza B viruses isolated during 2004-2005 season in Taiwan. *Virus Res.* 124(1-2):204-11
- 14、Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, et al. 2005. Characterization of Viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clin Infect Dis.* 41(6):822-8.
- 15、Sloots TP, Whiley DM, Lambert SB, et al. 2008. Emerging respiratory agents: new viruses for old disease? *J Clin Virol* 42(3):233-43.
- 16、Arden KE, McErlean P, Nissen MD, et al. 2006. Frequent detection of human rhinoviruses, paramyxoviruses, coronaviruses, and bocavirus during acute respiratory tract infections. *J Med Virol* 78(9):1232-40.
- 17、Kahn JS. 2007. Newly discovered respiratory viruses: significance and implications. *Curr Opin Pharmacol* 7(5):478-83.
- 18、van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 7(6):719-24.
- 19、Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med.* 348(20):1953-66.

- 20 · Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, et al. 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3(5):595-604.
- 21 · van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. 2004. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J*. 23:S25-32.
- 22 · Lin JH, Chiu SC, Lin YC, et al. 2009. Clinical and genetic analysis of Human Bocavirus in children with lower respiratory tract infection in Taiwan. *J Clin Virol*. 44(3):219-24.
- 23 · Chieochansin T, Simmonds P, Poovorawan Y. 2010. Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Arch Virol*. 2010 Aug 5. [Epub ahead of print].
- 24 · Abed Y, Wang D, Boivin G : WU polyomavirus in children, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1939-41.
- 25 · <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 26 · <http://www.flu.lanl.gov/>
- 27 · <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>
- 28 · Huang YP, Yao CY, Chen YJ, Chuang PC, Hsu LC, Wu HS. 2010. Taiwan Pathogenic Microorganism Genome Database and Its Applications. *Taiwan Epidemiology Bulletin*. 26:364-374.
- 29 · Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79(5):2814-2822.
- 30 · Herrero LJ, Lee CS, Hurrelbrink RJ, Chua BH, Chua KB, McMinn PC. 2003. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in peninsular Malaysia, 1997-2000. *Archives of virology* 148(7):1369-1385.
- 31 · Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. 2000. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal of clinical microbiology* 38(3):1170-1174.
- 32 · Cardosa MJ, Perera D, Brown BA, Cheon D, Chan HM, Chan KP, Cho H, McMinn P. 2003. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerging infectious diseases* 9(4):461-468.
- 33 · Jian JW, Chen GW, Lai CT, Hsu LC, Chen PJ, Kuo SH, Wu HS, Shih SR. 2008. Genetic and epidemiological analysis of influenza virus epidemics in Taiwan during 2003 to 2006. *J Clin Microbiol* 46(4):1426-1434.
- 34 · Jian JW, Lai CT, Kuo CY, Kuo SH, Hsu LC, Chen PJ, Wu HS, Liu MT. 2008. Genetic analysis and evaluation of the reassortment of influenza B viruses isolated in Taiwan during the 2004-2005 and 2006-2007 epidemics. *Virus Res* 131(2):243-249.
- 35 · Huang YP, Lin TL, Kuo CY, Lin MW, Yao CY, Liao HW, Hsu LC, Yang CF, Yang JY, Chen PJ, Wu HS. 2008. The circulation of subgenogroups B5 and C5 of enterovirus 71 in Taiwan from 2006 to 2007. *Virus research* 137(2):206-212.
- 36 · Huang YP, Lin TL, Hsu LC, Chen YJ, Tseng YH, Hsu CC, Fan WB, Yang JY, Chang FY, Wu HS. 2010. Genetic Diversity and C2-like Subgenogroup Strains of Enterovirus 71, Taiwan, 2008. *Virology Journal* 7(1):277.
- 37 · Fun-Tz Wu , Ho-Sheng Wu ,Jr-Yuan Yang Shu-Yuan Liang ,Jr-Shing Mo ,Chung-Guei Hung ,Gou-Chian Tsao ,Chi-Yung Lin , Cheng-Shiu Lin, Cheng-Yu Su, Fu-Liu Shing ,Yi-Chung Hung ,Pei-Jr Chen. Molecular Epidemiological Investigation of Childhood Rotavirus Infection in Taiwan between 2004 and 2006. *Taiwan Epidemiology Bulletin* 2007 ; 23(8): 448-460
- 38 · Chou, C.C., Lee, T.T., Chen, C.H., Hsiao, H.Y., Lin, Y.L., Ho, M.S., Yang, P.C., and Peck, K. (2006). Design of microarray probes for virus identification and detection of emerging viruses at the genus level. *BMC bioinformatics [electronic resource]* 7, 232.

- 39 · Wang, D., Urisman, A., Liu, Y.T., Springer, M., Ksiazek, T.G., Erdman, D.D., Mardis, E.R., Hickenbotham, M., Magrini, V., Eldred, J., et al. (2003). Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS biology* 1, E2.
- 40 · Palaniappan, R.U., Zhang, Y., Chiu, D., Torres, A., Debroy, C., Whittam, T.S., and Chang, Y.F. (2006). Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. *Journal of clinical microbiology* 44, 1495-1501.
- 41 · Palacios, G., Quan, P.-L., Jabado, O.J., Conlan, S., Hirschberg, D.L., Liu, Y., Zhai, J., Renwick, N., Hui, J., Hegyi, H., et al. (2007). Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 13, 73-81.
- 42 · Nix, W. A., M. S. Oberste, and M. A. Pallansch.: Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2698–2704.
- 43 · Allan NW, 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: 2519–2524.
- 44 · Baumgarte, S., L. Kleber de Souza Luna, K. Grywna, M. Panning, J. F. Drexler, C. Karsten, H. I. Huppertz, and C. Drosten: Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses in patients with acute enteritis, including a sixth parechovirus type. *J. Clin. Microbiol.* 2008;46:242–248.
- 45 · Noordhoek, G. T., J. F. L. Weel, E. Poelstra, M. Hooghiemstra, and A. Brandenburg: Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J. Clin. Virol.* 2008; 41:75–80.
- 46 · Blinkova O, Kapoor A, Victoria J, Jones M, Wolfe N, Naeem A, Shaukat S, Sharif S, Alam MM, Angez M, Zaidi S, Delwart EL. Cardioviruses are genetically diverse and cause common enteric infections in South Asian children. *J Virol.* 2009 ;83(9):4631-41.
- 47 · Tamura A, Ohashi N, Koyama Y, Fukuhara M, Kawamori F, Otsuru M, Wu PF, Lin SY. Characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan by immunofluorescence and restriction fragment length polymorphism analyses. *FEMS Microbiol Lett* 1997;150: 225-31.
- 48 · Kahn JS: Newly identified respiratory viruses. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:745-6.
- 49 · Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al.: Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:12891-6.
- 50 · Allander T: Human bocavirus. *J Clin Virol* 2008;41:29-33.
- 51 · Bastien N, Chui N, Robinson JL, et al.: Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study. *J Clin Microbiol* 2007;45:610-3.
- 52 · Allander T, Jartti T, Gupta S, et al.: Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin Infect Dis* 2007;44:904-10.
- 53 · Bastien N, Brandt K, Dust K, et al.: Human Bocavirus infection, Canada. *Emerg Infect Dis* 2006;12:848-50.
- 54 · Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, et al.: Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195: 1038-45.
- 55 · Kesebir D, Vazquez M, Weibel C, et al.: Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J Infect Dis* 2006;194:1276-82.
- 56 · Manning A, Russell V, Eastick K, et al.: Epidemiological profile and clinical associations of human bocavirus and other human parvoviruses. *J Infect Dis* 2006;194: 1283-90.
- 57 · Woo PC, Lau SK, Chu CM, et al.: Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
- 58 · Pyrc K, Jebbink MF, Berkhout B, et al.: Genome structure and transcriptional regulation of human coronavirus NL63. *Virol J* 2004;1:7.

- 59 · van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al.: Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368-73.
- 60 · Dominguez SR, Robinson CC, Holmes KV: Detection of four human coronaviruses in respiratory infections in children: a one-year study in Colorado. *J Med Virol* 2009;81:1597-604.
- 61 · Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, et al.: Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2005;192:1898-907.
- 62 · van der Hoek L, Sure K, Ihorst G, et al.: Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2005;2:e240.
- 63 · Allander T, Andreasson K, Gupta S, et al.: Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 2007;81:4130-6.
- 64 · Qiang Y, Tamura A, Urakami H, Makisaka Y, Koyama S, Fukuhara M, Kadosaka T. Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *Microbiol Immunol* 2003;47:577-583.
- 65 · Feng H, Shuda M, Chang Y, et al.: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008;319:1096-100.
- 66 · Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, et al.: Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood, cerebrospinal fluid and respiratory samples. *J Clin Virol* 2009;45:249-54.
- 67 · Han TH, Chung JY, Koo JW, et al.: WU polyomavirus in children with acute lower respiratory tract infections, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1766-8.
- 68 · Norja P, Ubbilos I, Templeton K, et al.: No evidence for an association between infections with WU and KI polyomaviruses and respiratory disease. *J Clin Virol* 2007;40:307-11.
- 69 · Payungporn S, Chieochansin T, Thongmee C, et al.: Detection and discrimination of WU/KI polyomaviruses by real-time PCR with melting curve analysis. *J Virol Methods* 2008;153:70-3.
- 70 · Babakir-Mina M, Ciccozzi M, Perno CF, et al.: The novel KI, WU, MC polyomaviruses: possible human pathogens? *New Microbiol* 2011;34:1-8.
- 71 · Le BM, Demertzis LM, Wu G, et al.: Clinical and epidemiologic characterization of WU polyomavirus infection, St. Louis, Missouri. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1936-8.
- 72 · 28. Mourez T, Bergeron A, Ribaud P, et al.: Polyomaviruses KI and WU in immunocompromised patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 2009;15:107-9.
- 73 · Ren L, Gonzalez R, Xu X, et al.: WU polyomavirus in fecal specimens of children with acute gastroenteritis, China. *Emerg Infect Dis* 2009;15:134-5.
- 74 · Bialasiewicz S, Lambert SB, Whiley DM, et al.: Merkel cell polyomavirus DNA in respiratory specimens from children and adults. *Emerg Infect Dis* 2009;15:492-4.
- 75 · Goh S, Lindau C, Tiveljung-Lindell A, et al.: Merkel cell polyomavirus in respiratory tract secretions. *Emerg Infect Dis* 2009;15:489-91.
- 76 · Kantola K, Sadeghi M, Lahtinen A, et al.: Merkel cell polyomavirus DNA in tumor-free tonsillar tissues and upper respiratory tract samples: implications for respiratory transmission and latency. *J Clin Virol* 2009;45:292-5.
- 77 · Kumar S, Nei M, Dudley J, et al.: MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 2009;9:299-306.
- 78 · Jabado OJ, Palacios G, Kapoor V, et al.: Greene SCPrimer: a rapid comprehensive tool for designing degenerate primers from multiple sequence alignments. *Nucleic Acids Res* 2006;34:6605-11.
- 79 · Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB, et al.: Development and evaluation of real-time PCR assays for the detection of the newly identified KI and WU polyomaviruses. *J Clin Virol* 2007;40:9-14.
- 80 · Lu X, Chittaganpitch M, Olsen SJ, et al.: Real-time PCR assays for detection of bocavirus in

- human specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44:3231-5.
- 81 · Dare RK, Fry AM, Chittaganpitch M, et al.: Human coronavirus infections in rural Thailand: a comprehensive study using real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assays. *J Infect Dis* 2007;196:1321-8.
  - 82 · Lu HY, Tsai KH, Yu SK, Cheng CH, Yang JS, Su CL, Hu HC, Wang HC, Huang JH, Shu PY\*. Phylogenetic analysis of 56-kDa type-specific antigen gene of *Orientia tsutsugamushi* isolates in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:658-663.
  - 83 · Templeton KE, Bredius RG, Scheltinga SA, et al.: Parainfluenza virus 3 infection pre- and post-haematopoietic stem cell transplantation: re-infection or persistence? *J Clin Virol* 2004;29:320-2.
  - 84 · McIntosh K, Kapikian AZ, Turner HC, et al.: Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Am J Epidemiol* 1970;91:585-92.
  - 85 · La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715-2727.
  - 86 · Fournier PE, Fujita H, Takada N, Raoult D. Genetic identification of Rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J Clin Microbiol* 2002;41:2176-2181.
  - 87 · Odorico DM, Graves SR, Currie B, Catmull J, Nack Z, Ellis S, Wang L, Miller DJ. New *Orientia tsutsugamushi* strain from scrub typhus in Australia. *Emerg Infect Dis* 1998;4:641-4.
  - 88 · Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:694-719.
  - 89 · Ching WM, Rowland D, Zhang Z, Bourgeois AL, Kelly D, Dasch GA, Devine PL. Early diagnosis of scrub typhus with a rapid flow assay using recombinant major outer membrane protein antigen (r56) of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:409-414.
  - 90 · Coleman RE, Sangkasuwan V, Suwanabun N, Eamsila C, Mungviriyaya S, Devine P, Richards AL, Rowland D, Ching WM, Sattabongkot J, Lerdthusnee K. Comparative evaluation of selected diagnostic assays for the detection of IgG and IgM antibody to *Orientia tsutsugamushi* in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2002;67:497-503.
  - 91 · Wang YC, Jian TY, Tarn LJ, Hung YW, Chao HY, Ji DD, Liu HW. Development of a recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay and its applications in field surveillance of rodent mice for presence of immunoglobulin G against *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:451-458.
  - 92 · Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA: Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2698–2704.
  - 93 · Pham NT, Khamrin P, Nguyen TA, Kanti DS, Phan TG, Okitsu S, Ushijima H: Isolation and molecular characterization of Aichi viruses from fecal specimens collected in Japan, Bangladesh, Thailand, and Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2007 ;45(7):2287-8
  - 94 · Guo L, Xu X, Song J, Wang W, Wang J, Hung T: Molecular Characterization of Astrovirus Infection in Children With Diarrhea in Beijing, 2005–2007. *J Med Virol.* 2010 ;82(3):415-23
  - 95 · Kitajima M, Oka T, Haramoto E, Katayama H, Takeda N, Katayama K, Ohgaki S: Detection and Genetic Analysis of Human Sapoviruses in River Water in Japan. *Appl Environ Microbiol.* 2010 ;76(8):2461-7.
  - 96 · Li L, Victoria J, Kapoor A, Blinkova O, Wang C, Babrzadeh F, Mason CJ, Pandey P, Triki H, Bahri O, Oderinde BS, Baba MM, Bukbuk DN, Besser JM, Bartkus JM, Delwart EL: A novel picornavirus associated with gastroenteritis. *J Virol.* 2009 ;83(22):12002-6.
  - 97 · Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, Liang SY, Hung CH, Dah-Shyong Jiang D, Hsin Chang J, Yang JY, Wu HS, Yang CF: Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1169-71.
  - 98 · 簡郁珊;陳姝良;周淑媛;黃頌恩;吳芳姿;陳南松;蘇家彬;郭宗文: 2010年台中縣某中餐廳沙波病毒腹瀉群聚事件. *疫情報導* 2011;127:36-42



## 八、圖、表

表一、合作醫院名單

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

表二、通報肺炎重症及腦炎個案採檢項目表

## 檢體採集與運送

| 法傳通報<br>其它             | 採檢項目<br>(必要)                      | 採檢項目<br>(選擇性)                                 | 運送     |
|------------------------|-----------------------------------|---|--------|
| 未知感染源-<br>肺炎重症         | 血清(~2 ml)、病毒咽喉/鼻<br>咽拭子、痰(1ml)    | 肺沖洗液(2ml)<br>，Pleural<br>effusion,<br>empyema | 4°C 運送 |
| 未知感染源-<br>腦炎           | 血清(~2 ml)、病毒咽喉/鼻<br>咽拭子、CSF (1ml) | anal swab(懷疑<br>腸病毒)                          |        |
| 未知感染源-<br>不明原因快速<br>死亡 | 血清(~2 ml)、病毒拭子、<br>細菌拭子           | 組織  |        |

血清之採集：取靜脈血 3~5 ml，或檢驗部離心後，血清(~2ml)置於紅頭管(生化管)中  
寄送地址臺北市南港區11561 昆陽街161 號  
收件人：疾病管制局研檢中心單一窗口

表三、肺炎重症個案病因判定標準

| 檢體來源部位         | 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<br>管洗出液、肺部組織檢<br>體、肋膜液、呼吸道拭<br>子<br>2. 血液                         | 不拘   | 不拘  |
| 檢驗方法           | 1. 病原分離陽性<br>2. PCR 陽性<br>3. 恢復期血清較急性期<br>血清抗體效價 $\geq 4$ 倍上升                   | 除病原分離或 PCR 外之其他<br>方法檢驗陽性(如抗原快速<br>檢測)，或血清一採檢驗陽性 | 不拘  |
| 檢驗陽性病原體<br>之特性 | 已知可造成嚴重人類肺<br>炎，且臨床表現與該個案<br>表現相符   | 已知可造成嚴重人類肺炎，<br>且臨床表現與該個案表現相<br>符                | 非已知可造成嚴重人類肺<br>炎，或臨床表現與該個案不<br>相符                       |
| 例子             | 1. 個案痰檢體流感 PCR/<br>培養陽性<br>2. 個案血液檢體肺炎鍊<br>球菌培養陽性<br>3. 個案恢復期 MAT 有 $>4$<br>倍上升 | 1. 個案咽喉拭子流感快速<br>檢測陽性<br>2. 個案單一血清黴漿菌抗<br>體陽性    | 1. 個案咽喉拭子 HSV 培養<br>陽性<br>2. 個案痰檢體<br>rhinovirus PCR 陽性 |

表四、肺炎重症個案基本及臨床資料統計(N=36)

|                                       | No. (%)     |
|---------------------------------------|-------------|
| Age (median, range) yrs               | 54 ( 3- 88) |
| F:M                                   | 13/23       |
| Travel history                        | 4 (11%)     |
| Cluster                               | 1 (3%)      |
| Any underlying diseases               | 24 (67%)    |
| Chronic lung diseases                 | 4 (11%)     |
| DM                                    | 10 (28%)    |
| Malignancy                            | 4 (11%)     |
| HIV/AIDS                              | 1 (3%)      |
| Chronic kidney disease                | 2 (6%)      |
| Liver cirrhosis                       | 5 (14%)     |
| Immunosuppressant                     | 1 (3%)      |
| Hospital Stay (median, range) days    | 23 (1-86)   |
| Intensive care                        |             |
| ICU admission                         | 36 (100%)   |
| Mechanical ventilation                | 35 (97%)    |
| ECMO                                  | 8 (22%)     |
| Dialysis                              | 4 (11%)     |
| Time interval (median, range) days    |             |
| Date of onset - sample collection     | 6 (0-17 )   |
| Date of admission - sample collection | 3 (0-13)    |
| Bilateral lung lesion                 | 29 (81%)    |
| Mortality                             | 18 (50%)    |

表五、肺炎重症個案檢驗結果

|                           | No. cases | Definite<br>N=17 | Probable<br>N=2 | Possible<br>N=5 | Mortality |
|---------------------------|-----------|------------------|-----------------|-----------------|-----------|
| <b>Virus (n=14)</b>       |           |                  |                 |                 |           |
| swH1N1                    | 7         | 7                |                 |                 | 3         |
| Influenza A               | 1         |                  | 1               |                 | 1         |
| Metapneumovirus           | 0         |                  |                 |                 |           |
| CMV                       | 2         | 1                |                 | 1               | 2         |
| parovirus B-19            | 1         | 1                |                 |                 |           |
| EV-68                     | 1         |                  |                 | 1               |           |
| Rhinovirus                | 2         |                  |                 | 2               | 2         |
| <b>Bacteria (n=7)</b>     |           |                  |                 |                 |           |
| S. aureus                 | 1         | 1                |                 |                 | 1*        |
| S. pneumoniae             | 2         | 1                | 1               |                 | 1         |
| Legionella pneumophila    | 2         | 2                |                 |                 |           |
| Legionella longbeachae    | 1         | 1                |                 |                 |           |
| Pseudomonas aeruginosa    | 1         | 1                |                 |                 |           |
| <b>Mycobacteria (n=1)</b> |           |                  |                 |                 |           |
| M. kansasii               | 1         |                  |                 | 1               |           |
| <b>Fungus (n=2)</b>       |           |                  |                 |                 |           |
| PPP                       | 1         | 1                |                 |                 | 1         |
| Aspergillus fumigatus     | 1         | 1                |                 |                 | 1         |
| Co-infection              | 2         |                  |                 |                 |           |
| Unknown                   | 14        |                  |                 |                 | 7         |

表六、存活與死亡肺炎重症個案之基本與臨床資料比較

|   | Survival<br>n=18  | No-survival<br>n=18 | P value     |
|---|-------------------|---------------------|-------------|
| <b>Age (median, range) yrs</b>                | <b>53(3-81)</b>   | <b>55(20-88)</b>    | <b>0.38</b> |
| <b>F:M</b>                                    | <b>8/10</b>       | <b>5/13</b>         | <b>0.49</b> |
| <b>Any underlying diseases</b>                | <b>10 (56%)</b>   | <b>14 (78%)</b>     | <b>0.29</b> |
| <b>Chronic lung diseases</b>                  | <b>1</b>          | <b>3</b>            | <b>0.60</b> |
| <b>DM</b>                                     | <b>7</b>          | <b>3</b>            | <b>0.26</b> |
| <b>Malignancy</b>                             | <b>1</b>          | <b>3</b>            | <b>0.60</b> |
| <b>HIV/AIDS</b>                               | <b>0</b>          | <b>1</b>            | <b>1.00</b> |
| <b>Chronic kidney disease</b>                 | <b>0</b>          | <b>2</b>            | <b>0.49</b> |
| <b>Liver cirrhosis</b>                        | <b>1</b>          | <b>4</b>            | <b>0.34</b> |
| <b>Immunosuppresnats</b>                      | <b>1</b>          | <b>0</b>            | <b>1.00</b> |
| <b>Hospital Stay<br/>(median, range) days</b> | <b>25 (13-59)</b> | <b>13.5 (1-86)</b>  | <b>0.05</b> |
| <b>Intensive care</b>                         |                   |                     |             |
| <b>Mechanical ventilation</b>                 | <b>17 (94%)</b>   | <b>18 (100%)</b>    | <b>0.50</b> |
| <b>ECMO</b>                                   | <b>4 (22%)</b>    | <b>4 (22%)</b>      | <b>0.65</b> |
| <b>Dialysis</b>                               | <b>0 (0%)</b>     | <b>4 (22%)</b>      | <b>0.05</b> |

表七、存活與死亡肺炎重症個案之檢驗結果比較

|                   | Survival<br>n=18  | No-survival<br>n=18  |
|-------------------|---|--|
| Unknown etiology  | 7 (39%)   | 7 (39%)  |
| Definite etiology | swH1N1(4)<br><i>Legionella spp.</i> (3)<br>Parovirus B-19 (1)<br>Metapneumovirus (1)<br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1) | swH1N1(3)<br>CMV (1)<br><i>S. Pneumoniae</i> (1)<br><i>S. aureus</i> (1)<br><i>Aspergillus famigatus</i> (1)<br>PJP(1) |

表八、腦炎個案之基本及臨床資料表(N=29)

| Parameter                     |                     |
|-------------------------------|---------------------|
| Male                          | 14 (50)             |
| Median age in years (range)   | 29 (0.6-79)         |
| Region 北：中：南：東                | 12：8：6：3            |
| Animal contact history (%)    | 1 (3) <sup>1</sup>  |
| Travel history (%)            | 2 (6) <sup>2</sup>  |
| Underlying diseases (%)       |                     |
| DM                            | 3 (10)              |
| HTN                           | 5 (17)              |
| Cirrhosis                     | 2 (7)               |
| Any malignancy                | 0 (0)               |
| HIV/AIDS                      | 1 (3)               |
| Immunosuppressive agent use   | 1 (3)               |
| CKD                           | 2 (7)               |
| CSF                           |                     |
| WBC                           | 11 (0-720)          |
| RBC                           | 14 (0-8350)         |
| Protein                       | 61 (16-282)         |
| Median day of hospitalization |                     |
| ICU admission (%)             | 21 (70)             |
| Diagnosis                     |                     |
| confirmed cases               | 4 (13) <sup>3</sup> |
| probable (all TB)             | 4 (13) <sup>4</sup> |
| possible                      | 1 (3) <sup>5</sup>  |
| unknown                       | 20(71)              |

表九、腺病毒肺炎重症個案基本資料(N=34)

| Parameter                             |                        |
|---------------------------------------|------------------------|
| M : F                                 | 20 : 14                |
| Median age in years (range)           | 11.5 (0.67-80)         |
| Region 北 : 中 : 南                      | 18 : 8 : 8             |
| Cases with contact history (%)        | 7 (20.6) <sup>1</sup>  |
| Any underlying condition (%)          | 13 (38.2) <sup>2</sup> |
| Median day of hospitalization (range) | 12 (4-43)              |
| Cases admitted to ICU (%)             | 19 (55.9)              |
| Mechanical ventilation (%)            | 10 (29.4)              |
| ECMO (%)                              | 3 (8.8)                |
| Mortality (%)                         | 1 (2.9)                |

表十、腺病毒肺炎個案分型比較(N=34)

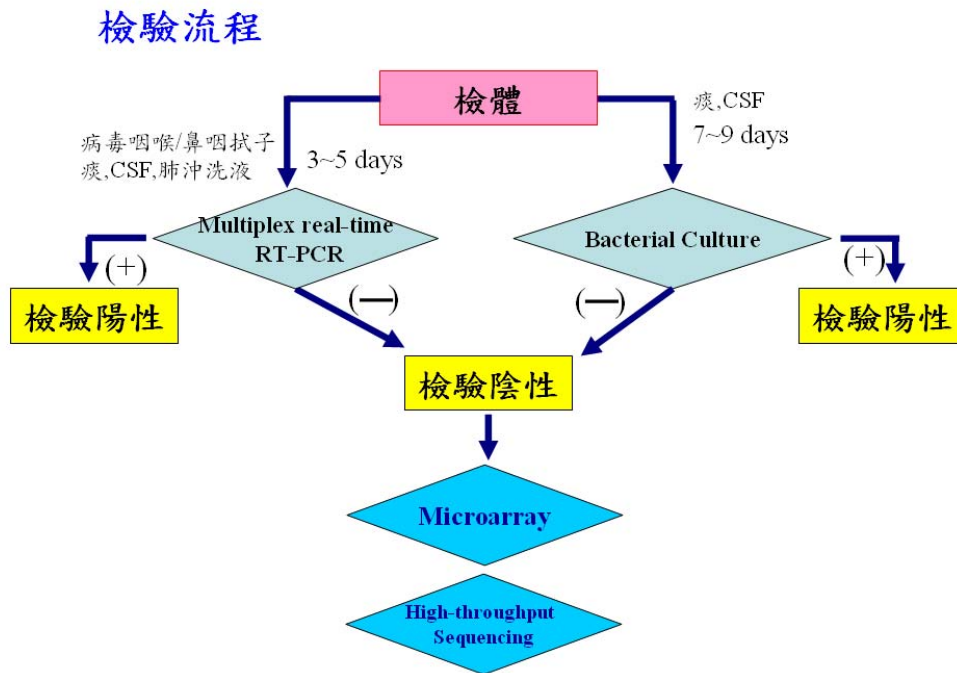
|                        | Adenovirus type |          |         |         | p-value |
|------------------------|-----------------|----------|---------|---------|---------|
|                        | Type 3          | Type 7   | Type 2  | All     |         |
| <b>Demographics</b>    |                 |          |         |         |         |
| Number of cases        | 17 (50)         | 12 (35)  | 5 (15)  | 34      |         |
| Patient age (years)    |                 |          |         |         |         |
| Median                 | 2.7             | 27.0     | 46.7    | 11.5    | <0.05   |
| Range                  | 0.7-80          | 0.67-46  | 29.5-70 | 0.67-80 |         |
| Male: Female           | 8:9             | 9:3      | 3:2     | 22:14   |         |
| Underlying disease     | 5 (29)          | 3 (25)   | 5 (100) |         | <0.01   |
| Contact history        | 6 (35)          | 1 (8)    | 0 (0)   |         | 0.04    |
| <b>Symptoms</b>        |                 |          |         |         |         |
| Fever                  | 17 (100)        | 12 (100) | 3 (60)  | 32 (94) | <0.01   |
| Cough                  | 15 (88)         | 11 (92)  | 3 (60)  | 29 (85) |         |
| Rhinorrhea             | 10 (59)         | 5 (42)   | 0 (0)   | 15 (44) |         |
| Vomiting               | 5 (29)          | 3 (25)   | 0 (0)   | 8 (24)  |         |
| Chills                 | 0 (0)           | 7 (58)   | 0 (0)   | 7 (21)  | <0.01   |
| Diarrhea               | 2 (12)          | 5 (42)   | 0 (0)   | 7 (21)  |         |
| Nausea                 | 0 (0)           | 3 (25)   | 0 (0)   | 3 (9)   | 0.049   |
| <b>Signs</b>           |                 |          |         |         |         |
| Tachypnea <sup>a</sup> | 13 (76)         | 6 (50)   | 2 (40)  | 21 (62) |         |
| Rales                  | 9 (53)          | 5 (42)   | 2 (40)  | 16 (47) |         |
| Hypoxemia <sup>b</sup> | 5 (29)          | 4 (33)   | 2 (40)  | 11 (32) |         |
| Wheezing               | 5 (29)          | 2 (17)   | 1 (20)  | 8 (24)  |         |
| Pleural effusion       | 3 (18)          | 1 (8)    | 0 (0)   | 6 (18)  |         |
| Hypotension            | 0 (0)           | 1 (8)    | 2 (40)  | 3 (9)   | 0.02    |
| Conjunctivitis         | 3 (18)          | 0 (0)    | 0 (0)   | 3 (9)   |         |
| Exudative tonsillitis  | 2 (12)          | 0 (0)    | 0 (0)   | 2 (6)   |         |



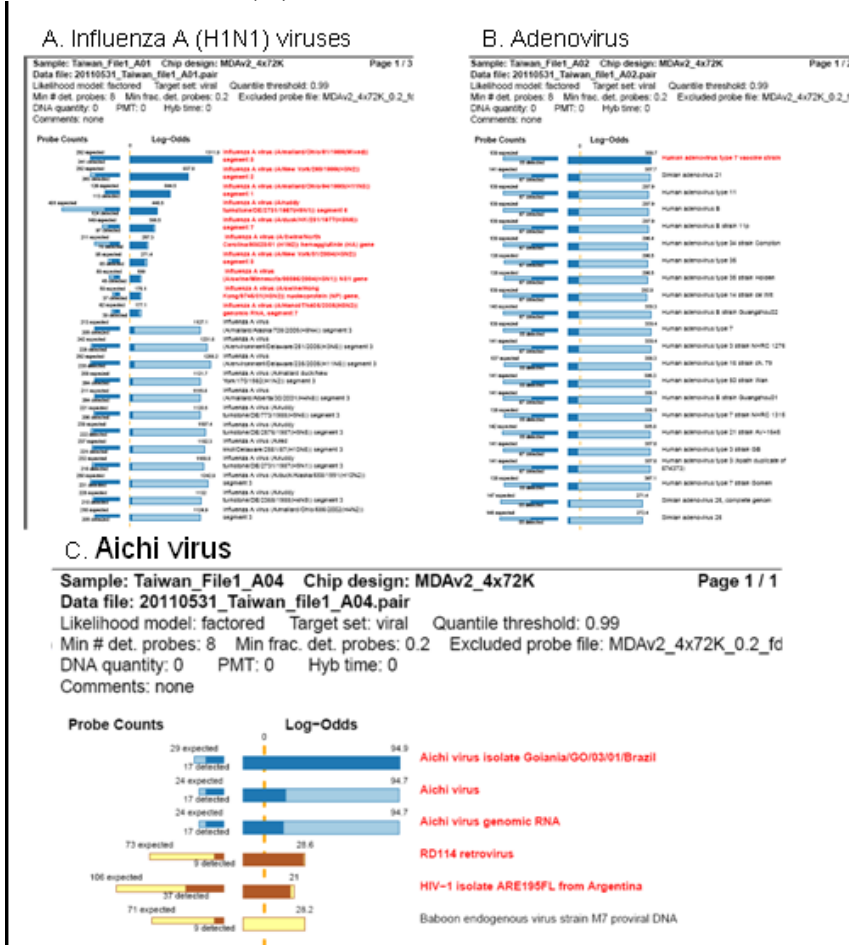
表十一、腺病毒肺炎個案其他病原體檢驗結果

|   | Adenovirus type |        |        |
|---|-----------------|--------|--------|
|   | Type 3          | Type 7 | Type 2 |
| No. of patients                                     | 17              | 12     | 5      |
| No. of patients with any concurrent infection       | 10              | 5      | 3      |
| No. of patients with confirmed concurrent infection |                 |        |        |
| Influenza A (H1N1)                                  | 2               | 1      | 2      |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                     | 1               | 0      | 0      |
| <i>Haemophilus influenzae</i>                       | 2               | 2      | 0      |
| <i>Staphylococcus aureus</i>                        | 0               | 1      | 1      |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                        | 1               | 0      | 0      |
| <i>Nontuberculus mycobacterium</i>                  | 0               | 0      | 1      |
| No. of patients with probable concurrent infection  |                 |        |        |
| Influenza A   | 4               | 1      | 1      |
| <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                        | 3               | 0      | 0      |
| <i>Chlamydia pneumoniae</i>                         | 0               | 1      | 0      |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i>                     | 1               | 0      | 0      |
| <i>Cytomegalovirus</i>                              | 0               | 0      | 1      |

圖一、檢驗流程



圖二、 LLNL-MDA v2 results for influenza A H1N1 virus (A), adenovirus type 7 (B) and Aichi virus (C).



表十二、2011年通報肺癌重症檢出之病原體

|          |          |
|----------|----------|
| Overall  |          |
| positive | 79 (60%) |
| negative | 52 (40%) |
| Total    | 131      |

| swap-virus detection      | N         |
|---------------------------|-----------|
| Influenza A/H3N2          | 1         |
| A/H1N1pdm2009             | 6         |
| FluB                      | 1         |
| adenovirus                | 6         |
| adenovirus+ A/H1N1pdm2009 | 1         |
| coronavirus, OC43         | 1         |
| CMV                       | 4         |
| HSV1                      | 1         |
| metapneumovirus           | 2         |
| parainfluenza 2           | 1         |
| parainfluenza 3           | 1         |
| parovirus B19             | 1         |
| Rhinovirus                | 3         |
| RSV/A                     | 1         |
| positive                  | 30(25.2%) |
| negative                  | 89(74.8%) |
| Total                     | 119       |

| sputum-virus detection | N         |
|------------------------|-----------|
| Influenza A/H3N2       | 1         |
| A/H1N1pdm2009          | 15        |
| Flu B                  | 3         |
| adenovirus             | 7         |
| coronavirus, OC43      | 1         |
| CMV                    | 3         |
| HSV1+ CMV              | 1         |
| HSV1                   | 2         |
| metapneumovirus        | 3         |
| parainfluenza 2        | 1         |
| parainfluenza 3        | 2         |
| parovirus B19          | 1         |
| Rhinovirus             | 2         |
| RSV/A                  | 1         |
| positve                | 43(35.5%) |
| negative               | 78(64.5%) |
| Total                  | 121       |

| Bacterial and Fungus detection                     | N        |
|--|----------|
| Acinetobacter baumannii                            | 2        |
| Blastoschizomyces capitatus (Geotrichum capitatum) | 1        |
| Candida albicans                                   | 13       |
| Candida albicans, Candida tropicalis               | 1        |
| Candida glabrata                                   | 1        |
| Candida parapsilosis                               | 1        |
| Candida tropicalis                                 | 3        |
| Enterococcus faecium                               | 1        |
| Enterococcus faecium+Candida albicans              | 1        |
| Klebsiella pneumoniae+Staphylococcus aureus        | 1        |
| Klebsiella pneumoniae +Candida albicans            | 1        |
| Legionella pneumophila                             | 1        |
| Mycoplasma pneumoniae                              | 2        |
| Pseudomonas aerugosa +Candida albicans             | 1        |
| Staphylococcus aureus                              | 3        |
| Staphylococcus epidermidis+Candida albicans        | 3        |
| Staphylococcus haemolyticus                        | 1        |
| staphylococcus spp+Candida albicans                | 2        |
| Streptococcus pneumoniae                           | 2        |
| $\alpha$ -streptococcus spp                        | 3        |
| positve  | 44 (40%) |
| negative   | 66 (60%) |
| Total  | 110      |

表十三、2011年通報腦炎及未知感染原檢出之病原體

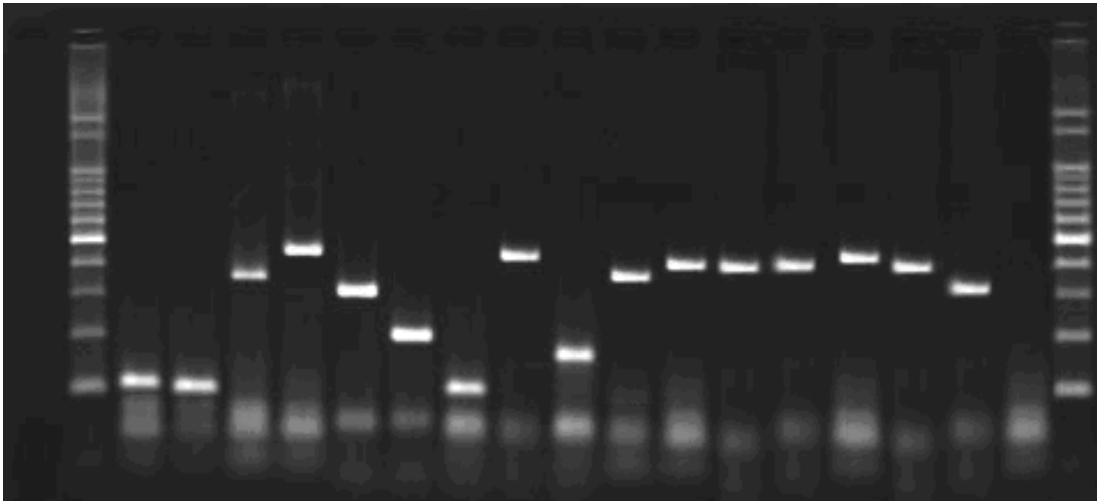
| Overall               |            |                     |            |                         |            |
|-----------------------|------------|---------------------|------------|-------------------------|------------|
| positive              | 16 (19.5%) |                     |            |                         |            |
| negative              | 66 (80.5%) |                     |            |                         |            |
| Total                 | 82         |                     |            |                         |            |
|                       |            |                     |            |                         |            |
| serum-virus detection | N          | CSF-virus detection | N          | swab-virus detection    | N          |
| CMV                   | 2          | parechovirus        | 2          | adenovirus              | 1          |
| parechovirus          | 2          |                     |            | CMV                     | 1          |
| enterovirus           | 1          |                     |            | RSV                     | 1          |
|                       |            |                     |            | HHV7                    | 1          |
|                       |            |                     |            | bocavirus               | 1          |
|                       |            |                     |            | Rhinovirus              | 2          |
|                       |            |                     |            | HSV-1                   | 2          |
|                       |            |                     |            | adenovirus+ Rhinovirus  | 1          |
|                       |            |                     |            | adenovirus+ enterovirus | 1          |
|                       |            |                     |            | parechovirus+HSV1       | 1          |
|                       |            |                     |            | Rhinovirus+HHV6+HHV7    | 1          |
| positive              | 5 (7.1%)   | positive            | 2 (2.9%)   | positive                | 13 (17.6%) |
| negative              | 70 (92.9%) | negative            | 68 (97.1%) | negative                | 61 (82.4%) |
| Total                 | 75         | Total               | 70         | Total                   | 74         |

表十四、以 multiplex PCR/RT-PCR 檢測系統檢測病毒合約實驗室通報無法序列分析之檢體

**From contract labs**

| Type of specimens | Virus detected | No. |
|-------------------|----------------|-----|
| CODEHOP (-)       | chikungunya    | 1   |
|                   | Adenovirus     | 1   |
|                   | Rhinovirus     | 1   |
|                   | (-)            | 1   |
| CPE(+)            | enterovirus    | 13  |
|                   | HSV1           | 3   |
|                   | adenovirus     | 1   |
|                   | Rhinovirus     | 1   |
|                   | FluB           | 1   |
|                   | (-)            | 1   |
| Total             |                | 24  |

圖三、各病原體的核酸引子對混合後，分別以各建置之病毒標準品進行 multiplex PCR 反應所得到的 PCR 增幅結果，顯示各引子間的條件設定已達最佳化，呈現良好的專一性。Lane1:Marker; Lane2: FluA; Lane3: FluB; Lane4: PIF1; Lane5: PIF2; Lane6: PIF3; Lane7: HMPV; Lane8: RSV; Lane9: AdV; Lane10: HBoV; Lane11: HCoV-HKU1; Lane12: HCoV-NL63; Lane13: HCoV-229E; Lane14: HCoV-OC43; Lane15: WUPyV; Lane16: KIPyV; Lane17: MCPyV; Lane18: negative control; Lane19: Marker。



表十五、以呼吸道多重病毒同步偵測平台評估各病毒偵測的靈敏度及專一性

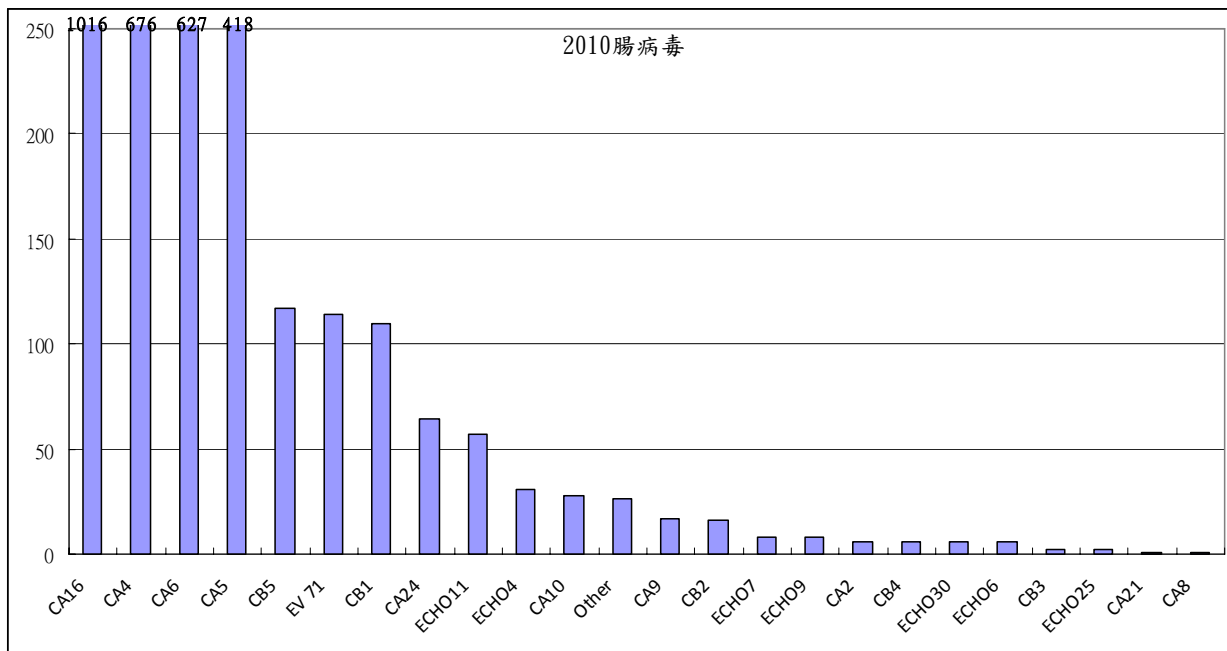
| PCR set | Specimen Pos (+)(copies) or Neg (-) |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
|---------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|         | FluA                                | FluB                  | PIF*1                 | PIF2                  | PIF3                  | HMPV                  | RSV                   | AdV                   | HBoV                  | HKU1                  | NL63                  | 229E                  | OC43                  | WUPyV                 | KIPyV                 | MCPyV                 |
| FluA    | +(1.0E <sup>1</sup> )               | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| FluB    | -                                   | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| PIF1    | -                                   | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| PIF2    | -                                   | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| PIF3    | -                                   | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| HMPV    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| RSV     | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| AdV     | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| HBoV    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| HKU1    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| NL63    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     |
| 229E    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>1</sup> ) | -                     | -                     | -                     | -                     |
| OC43    | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) | -                     | -                     | -                     |
| WUPyV   | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) | -                     | -                     |
| KIPyV   | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) | -                     |
| MCPyV   | -                                   | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | -                     | +(1.0E <sup>2</sup> ) |

表十六、2011 年 ILI 陽性檢體各呼吸道病毒陽性數及比例

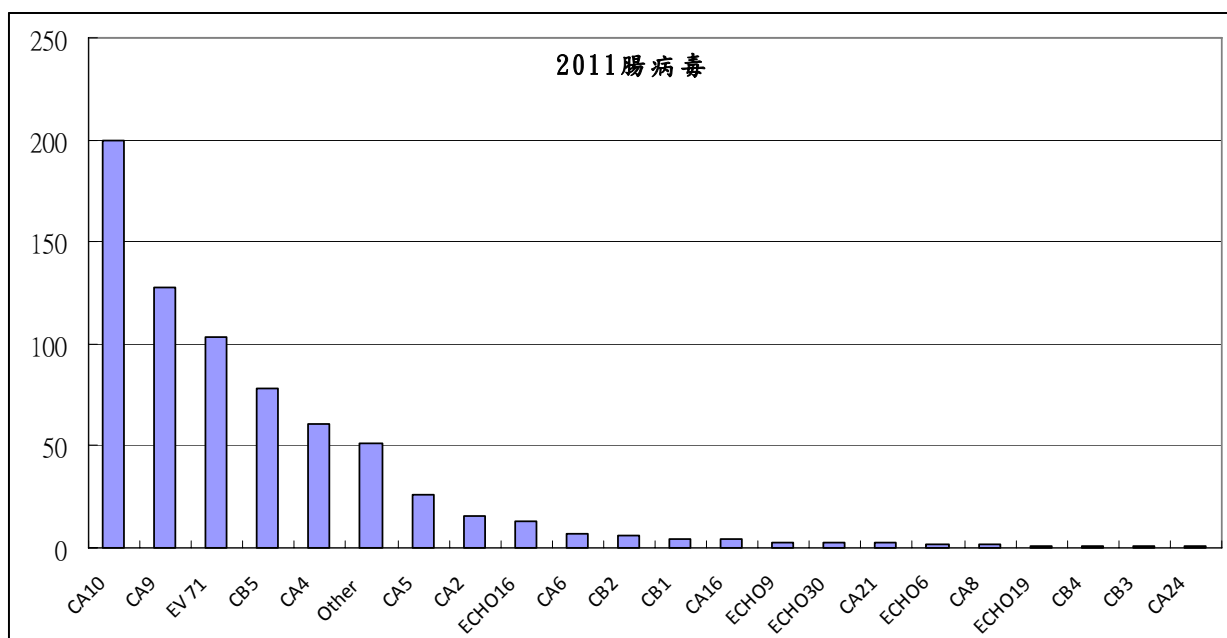
| Diagnosis         | Number (N=126) | %    |
|-------------------|----------------|------|
| FluA              | 48             | 38.1 |
| FluB              | 23             | 18.3 |
| Parainfluenza I   | 5              | 4.0  |
| Parainfluenza II  | 1              | 0.8  |
| Parainfluenza III | 1              | 0.8  |
| RSV               | 2              | 1.6  |
| HMPV              | 2              | 1.6  |
| Adenovirus        | 31             | 24.6 |
| HBoV1             | 3              | 2.3  |
| HBoV2             | 1              | 0.8  |
| HBoV3             | 1              | 0.8  |
| HBoV4             | 0              | 0    |
| HCoV-229E         | 2              | 1.6  |
| HCoV-HKU1         | 1              | 0.8  |
| HCoV-NL63         | 3              | 2.3  |
| HCoV-OC43         | 2              | 1.6  |
| MCPyV             | 0              | 0    |
| KIPyV             | 0              | 0    |
| WUPyV             | 0              | 0    |

圖四、2010年與2011年病毒合約實驗室之腸病毒流行趨勢(依基因體實驗室基因序列)

(A)

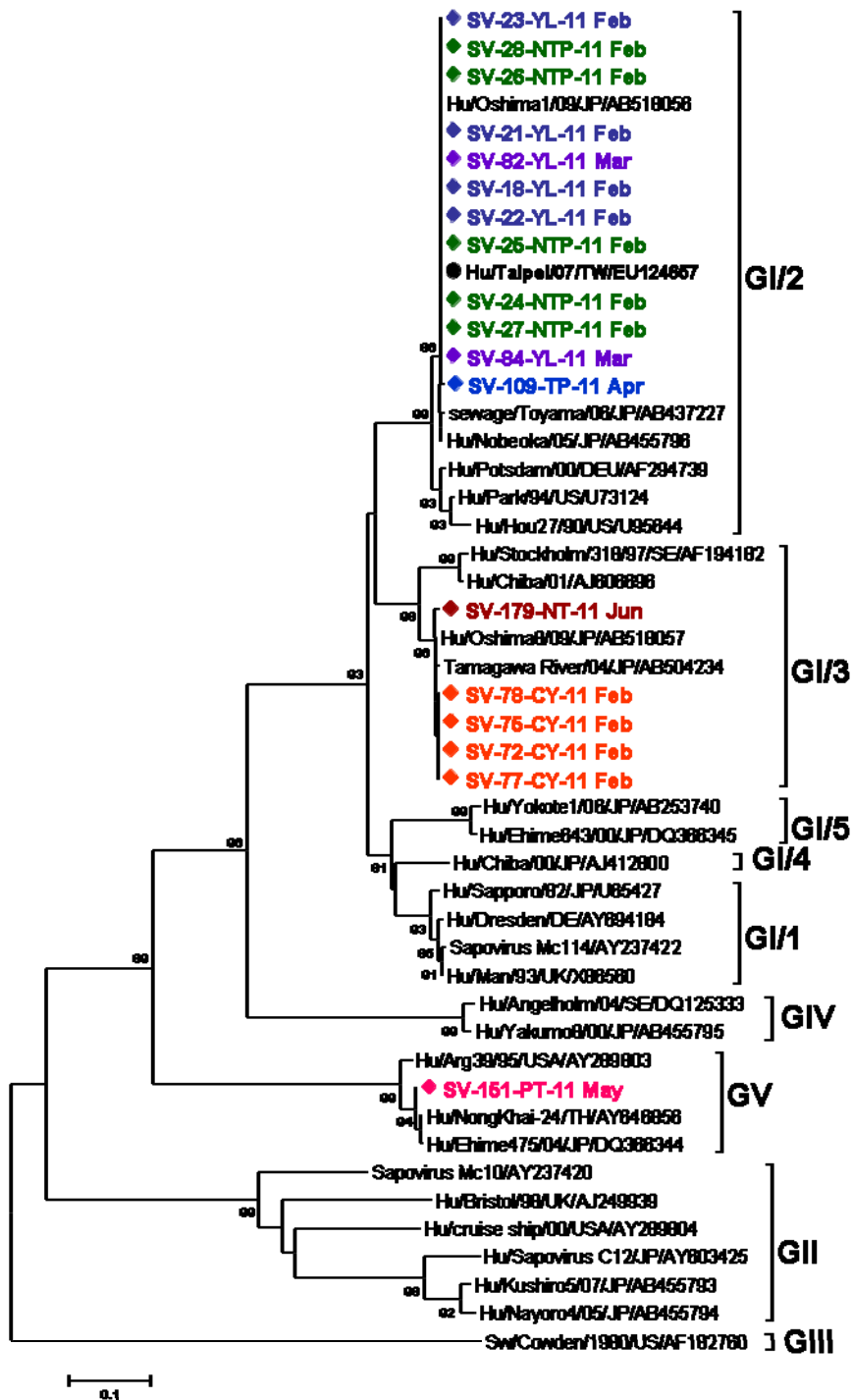


(B)





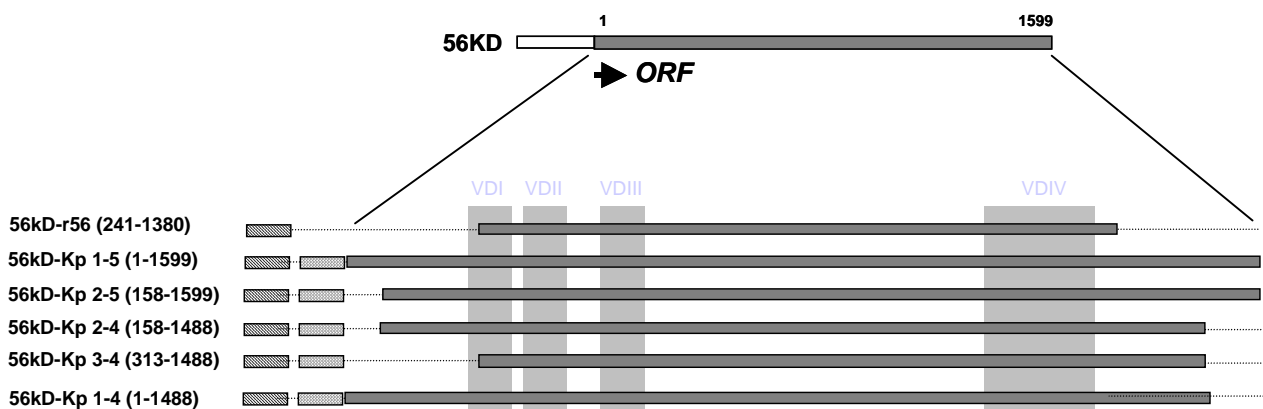
圖五、今年 Sapovirus 與各國病毒之基因序列演化樹 (部分 VP1 區域，Neighbor joining method)



表十七、今年 Sapovirus 群聚與個案資料 (群聚發生縣市與機構，個案性別、發病日、年齡與 Sapovirus 基因型別)

| No.       | Cluster City    | Cluster institution     | Sex | Onset Date | Age | Sapovirus Genotype |
|-----------|-----------------|-------------------------|-----|------------|-----|--------------------|
| SV-18-YL  | Yilan County    | Hiten Hospital          | F   | 2011/2/24  | 32  | GI/2               |
| SV-21-YL  | Yilan County    |                         | M   | 2011/2/25  | 30  | GI/2               |
| SV-22-YL  | Yilan County    |                         | F   | 2011/2/25  | 55  | GI/2               |
| SV-23-YL  | Yilan County    |                         | F   | 2011/2/25  | 71  | GI/2               |
| SV-24-NTP | New Taipei City | Bali Psychiatric center | F   | 2011/2/11  | 53  | GI/2               |
| SV-25-NTP | New Taipei City |                         | F   | 2011/2/6   | 55  | GI/2               |
| SV-26-NTP | New Taipei City |                         | F   | 2011/2/16  | 70  | GI/2               |
| SV-27-NTP | New Taipei City |                         | F   | 2011/2/18  | 47  | GI/2               |
| SV-28-NTP | New Taipei City |                         | F   | 2011/2/13  | 57  | GI/2               |
| SV-72-CY  | Chiayi County   | Dalin elementary school | M   | 2011/2/17  | 7   | GI/3               |
| SV-75-CY  | Chiayi County   |                         | F   | 2011/2/17  | 6   | GI/3               |
| SV-77-CY  | Chiayi County   |                         | F   | 2011/2/16  | 7   | GI/3               |
| SV-78-CY  | Chiayi County   |                         | M   | 2011/2/17  | 7   | GI/3               |
| SV-82-YL  | Yilan County    | Gu Ting                 | F   | 2011/3/4   | 6   | GI/2               |
| SV-84-YL  | Yilan County    | Kindergarten            | M   | 2011/3/6   | 5   | GI/2               |
| SV-109-TP | Taipei City     | Green-hill Nursery      | F   | 2011/4/22  | 6   | GI/2               |
| SV-151-PT | Pingtung County | Poachien Hospital       | M   | 2011/5/8   | 11  | GV                 |
| SV-179-NT | Nantou County   | Puli Hospital           | M   | 2011/6/23  | 20  | GI/3               |

圖六、*Orientia tsutsugamushi* Karp 56kD 基因全長及片段的重組蛋白質之基因圖譜



表十八

| 血清/重組蛋白             | Kp2-5        | G2-4         | Kt2-4        |
|---------------------|--------------|--------------|--------------|
| 陽性血清-1<br>(960529B) | <b>1.069</b> | <b>2.577</b> | <b>2.628</b> |
| 陽性血清-2<br>(960594B) | <b>1.149</b> | <b>0.641</b> | <b>1.050</b> |
| 陰性血清-1<br>(960104B) | <b>0.369</b> | <b>0.234</b> | <b>0.214</b> |
| 陰性血清-2<br>(960128A) | <b>0.223</b> | <b>0.139</b> | <b>0.153</b> |

表十九

| rProtein/<br>mAb | O.<br>Tsutsuga<br>mushi<br>Kp2-5 | O.<br>Tsutsuga<br>mushi<br>Kt2-4 | O.<br>Tsutsuga<br>mushi<br>G2-4 | O.<br>Tsutsuga<br>mushi<br>Kp1-5 | R.<br>japonica<br>OmpA-<br>28f | R. conorii<br>OmpB-<br>tail | R. Typhi<br>OmpB-1 |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|
| <b>1B8</b>       | <b>0.429</b>                     | <b>0.789</b>                     | <b>2.110</b>                    | <b>0.299</b>                     | <b>0.293</b>                   | <b>0.244</b>                | <b>0.251</b>       |
| <b>5C3.6</b>     | <b>1.656</b>                     | <b>0.846</b>                     | <b>1.880</b>                    | <b>1.495</b>                     | <b>0.095</b>                   | <b>0.099</b>                | <b>0.097</b>       |
| <b>5C3.1</b>     | <b>0.870</b>                     | <b>0.556</b>                     | <b>1.464</b>                    | <b>1.004</b>                     | <b>0.087</b>                   | <b>0.085</b>                | <b>0.086</b>       |

表二十

| Serum        | Capture IgM | Capture IgG |
|--------------|-------------|-------------|
| 960634A      | 0.208       | 0.142       |
| 960634B      | 1.239       | 0.160       |
| 960489A      | 0.291       | 0.234       |
| 960489B      | 0.309       | 0.590       |
| 941314A      | 0.356       | 0.165       |
| 941314B      | 1.973       | 0.159       |
| 941371A      | 0.198       | 0.179       |
| 941371B      | 3.171       | 0.205       |
| 941373A      | 0.187       | 0.143       |
| 941373B      | 2.566       | 0.151       |
| 950014A      | 0.450       | 0.169       |
| 950014B      | 1.221       | 0.154       |
| 960548A      | 0.214       | 0.144       |
| 960548B      | 0.758       | 0.213       |
| 960019A (NC) | 0.163       | 0.153       |
| 960019B (NC) | 0.173       | 0.207       |
| 961808A (NC) | 0.174       | 0.159       |
| 961808B (NC) | 0.167       | 0.183       |

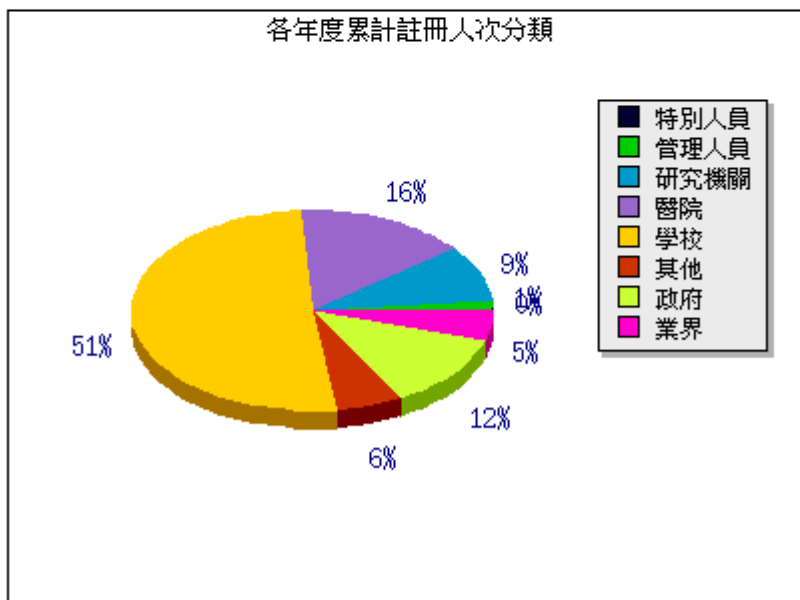
圖七、基因資料庫序列收錄種類及數量

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 | 總筆數   |
|------|-------------------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 序列資料 | Influenza         | 5    | 1234 | 1777 | 1124 | 4377 | 2426 | 10943 |
|      | Human Enterovirus | 0    | 31   | 1822 | 2793 | 1864 | 2843 | 9353  |
|      | Human Adenovirus  | 0    | 30   | 346  | 103  | 318  | 392  | 1189  |
| 全部   | 所有                | 5    | 1295 | 3945 | 4020 | 6559 | 5661 | 21485 |

圖八、基因資料庫之註冊人數與分類

| 累計註冊人次分類/年份 | 各年度累計 |       |       |     |
|-------------|-------|-------|-------|-----|
|             | 2009年 | 2010年 | 2011年 | 總數  |
| 特別人員        | 1     | 0     | 0     | 1   |
| 管理人員        | 4     | 1     | 0     | 5   |
| 研究機關        | 21    | 7     | 5     | 33  |
| 醫院          | 33    | 16    | 9     | 58  |
| 學校          | 105   | 57    | 28    | 190 |
| 其他          | 13    | 2     | 7     | 22  |
| 政府          | 31    | 10    | 4     | 45  |
| 業界          | 9     | 5     | 4     | 18  |
| 合計          | 217   | 98    | 57    | 372 |



## 圖九、流感病毒 NA 基因比對結果

```
>dbj|INF-09-04303|INFLUENZA ASWH1 NA gene, Forward partial cds
      Length = 210

Score = 427 bits (1098), Expect = e-120, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 209/210 (99%), Positives = 210/210 (100%)

Query: 15  GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPDSGQASYKIFRIEK 74
          GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPDSGQASYKIFRIEK
Sbjct: 1   GAVAVLKYNGIITDTIKSWRNNILRTQESECACVNGSCFTVMTDGPDSGQASYKIFRIEK 60

Query: 75  GKIVKSVEMNAPNYHYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGNSRNPWVSFNQNLEYQIGYICSG 134
          GKIVKSVEMNAPNY+YEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGNSRNPWVSFNQNLEYQIGYICSG
Sbjct: 61  GKIVKSVEMNAPNYYYEECSYCPDSSEITCVCRDNWHGNSRNPWVSFNQNLEYQIGYICSG 120

Query: 135 IFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSEFKYNGVWIGRTKISSRNGFEMIWDPNGW 194
          IFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSEFKYNGVWIGRTKISSRNGFEMIWDPNGW
Sbjct: 121 IFGDNPRPNDKTGSCGPVSSNGANGVKGFSEFKYNGVWIGRTKISSRNGFEMIWDPNGW 180

Query: 195 TGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHP 224
          TGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHP
Sbjct: 181 TGTDNNFSIKQDIVGINEWSGYSGSFVQHP 210
```

附錄一、肺炎重症收案問卷(共六頁)

不明原因肺炎

1 DEMOGRAPHIC INFORMATION

填表人：

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

日期記錄統一以 (yyyy/ mm/ dd)

2 HOSPITALIZATION

|  |
|--|
| <p>* Date of illness onset: ____ / ____ / ____</p> <p>* Enrolled criteria:</p> <p><input type="checkbox"/> Fever(BT <math>\geq</math> 38°C),</p> <p><input type="checkbox"/> Community acquired pneumonia (<math>\leq</math> 48 hrs after admission)</p> <p><input type="checkbox"/> Severe illness: ARDS or Respiratory failure with MV support</p> <p><input type="checkbox"/> No definite diagnosis when case reported</p> <p>* Date of admission : ____ / ____ / ____</p> <p>* Travel history within 3 months: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____</p> <p>* Animal contact history(including pets): <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____</p> <p>* Inset bite history : <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes, specify _____</p> <p>* Cluster: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Unknown <input type="checkbox"/> Yes: <input type="checkbox"/> family, <input type="checkbox"/> school, <input type="checkbox"/> workplace <input type="checkbox"/> others _____</p> <p>* Admitted to ICU: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, (date) ____ / ____ / ____ 至 ____ / ____ / ____</p> <p>* Date of discharge: ____ / ____ / ____</p> <p>* Final diagnosis: (可簡要 summary)</p> <p>1.</p> <p>2.</p> <p>3.</p> <p>4.</p> <p>5.</p> |
|--|

Past History

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> | Chronic lung diseases: <input type="checkbox"/> COPD <input type="checkbox"/> Asthma <input type="checkbox"/> Ventilation dependent<br><input type="checkbox"/> Others: _____   |
| <input type="checkbox"/> | Acquired immune deficiency: <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Solid tumor <input type="checkbox"/> Hematologic Malignancy<br><input type="checkbox"/> HIV/AIDS <input type="checkbox"/> Chronic kidney disease <input type="checkbox"/> Liver cirrhosis<br><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<br><input type="checkbox"/> Others: _____ |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> HTN, <input type="checkbox"/> CAD, <input type="checkbox"/> CVA, <input type="checkbox"/> HBV carrier, <input type="checkbox"/> HCV carrier                     |
| <input type="checkbox"/> | Other specific history: _____  |

#### 4 LABORATORY DATA (請注意單位)

| Admission                        | ± 24hrs | 48-72 hrs |
|----------------------------------|---------|-----------|
| Date                             |         |           |
| <b>Hematology</b>                |         |           |
| Hemoglobin g/dL                  |         |           |
| WBC count / $\mu$ L              |         |           |
| Band %                           |         |           |
| Neutrophil %                     |         |           |
| Lymphocyte%                      |         |           |
| Eosinophil%                      |         |           |
| Monocyte%                        |         |           |
| Platelet $\times 10^3$ / $\mu$ L |         |           |
| <b>Blood Chemistry</b>           |         |           |
| BUN mg/dL                        |         |           |
| Creatinine mg/dL                 |         |           |
| Total protein g/dL               |         |           |
| Albumin g/dL                     |         |           |
| Total bilirubin mg/dL            |         |           |
| AST (SGOT) IU/L                  |         |           |
| ALT(SGPT) IU/L                   |         |           |
| CK IU/L                          |         |           |
| LDH U /L                         |         |           |
| CRP mg/dL                        |         |           |
| Procalcitonin ng/mL              |         |           |
| <b>ABG</b>                       |         |           |
| FiO2                             |         |           |
| Arterial pH                      |         |           |
| O2                               |         |           |
| CO2                              |         |           |
| serum bicarbonate                |         |           |
| <b>Pleural fluid</b>             |         |           |
| WBC(L/N)                         |         |           |
| RBC                              |         |           |
| Total protein g/dL               |         |           |
| Glucose mg/dL                    |         |           |
| LDH U /L                         |         |           |

Culture Results:  $\leq$  admission 72 hrs (except BAL, tissue, TB study or significant findings)

| 檢體種類   | Date | Result   |
|--------|------|--|
| Sputum |      | Gram stain: PMN: _____/LPF ; Epi: _____/LPF<br><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<br><input type="checkbox"/> Positive:_____  |
|               |  | AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM   |
| Pleural fluid |  | Gram stain: PMN:_____/LPF<br><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<br>TB culture: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> TB <input type="checkbox"/> NTM   |
| BAL           |  | Gram stain: PMN:_____/LPF ; Epi:_____/LPF<br><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<br><input type="checkbox"/> Positive:_____  |
|               |  | AFB: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>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<br>IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive  |
| Chlamydia  |      | IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive  |
| HSV-1      |      | IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive  |
| HSV-2      |      | IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive  |
| CMV        |      | IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive  |
| EBV        |      | VCA IgM: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>VCA IgG: <input type="checkbox"/> Negative <input type="checkbox"/> Positive<br>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"/> Bilateral <input type="checkbox"/> Air-bronchogram <input type="checkbox"/> Interstitial pneumonia |
|     |      | <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<br><input type="checkbox"/> Air-bronchogram |
|                  |  | <input type="checkbox"/> Bilateral   | <input type="checkbox"/> Lobar   |
|                  |  | <input type="checkbox"/> Effusion/empyema <input type="checkbox"/> Abscess<br><input type="checkbox"/> No active lung lesion<br><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<br>Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____   |
| <input type="checkbox"/> Failure                  | No apparent response to therapy; persistence or progression of most/all pre-therapy signs and symptoms   |
| <input type="checkbox"/> Mortality<br>Date: _____ | For patients who expired due to any causes<br>The primary cause of death is related to this infectious episode reported:<br><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<br>2. 血液                           | 不拘                                       | 不拘   |
| 檢驗方法       | 1. 病原分離陽性<br>2. PCR 陽性<br>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<br>2. 個案血液檢體肺炎鏈球菌培養陽性<br>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<br>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<br>2. 個案痰檢體 rhinovirus PCR 陽性 |

附錄二、腦炎重症收案問卷(共四頁)

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 \_\_\_\_\_

\* 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.

3 CLINICAL PRESENTATION

|   |  |
|---|--|
| * 發燒 (≥38C) <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 ;<br><input type="checkbox"/> HIV/AIDS, <input type="checkbox"/> Chronic kidney disease, <input type="checkbox"/> Liver cirrhosis,<br><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<br><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 <input type="checkbox"/> , 異常 <input type="checkbox"/> , 未作 <input type="checkbox"/> 。  |
| 若是異常, 部位在:<br>temporal lobe <input type="checkbox"/> , white matter demyelination <input type="checkbox"/> , hydrocephalus <input type="checkbox"/> , brain edema <input type="checkbox"/> ,<br>any others: _____。 |
| * Brain MRI 日期__月/__日。 結果: 正常 <input type="checkbox"/> , 異常 <input type="checkbox"/> , 未作 <input type="checkbox"/> 。   |
| 若是異常, 部位在:<br>temporal lobe <input type="checkbox"/> , white matter demyelination <input type="checkbox"/> , hydrocephalus <input type="checkbox"/> , brain edema <input type="checkbox"/> ,<br>any others: _____。 |
| * EEG 日期__月/__日。 結果: 正常 <input type="checkbox"/> , 異常 <input type="checkbox"/> , 未作 <input type="checkbox"/> 。   |
| 若是異常, 結果為:<br>Diffuse slowing <input type="checkbox"/> , temporal epileptiform activity <input type="checkbox"/> , PLEDs <input type="checkbox"/> ,<br>any others: _____。  |

**6. 一般檢驗結果**

|   |
|---|
| * CBC (最早採檢日 __月/__日)<br>WBC=_____, DC= __/__/__/__(seg/lymph/mono/eos), Hct=____, PLT=_____。 |
| * CSF (最早採檢日 __月/__日)   |

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

**7. Serology**

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

**8. Direct Pathogen detection**

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

**9. CLINICAL OUTCOME:** (at discharge)

| Clinical Response                                 | Criteria   |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Cure                     | All or most of pretreatment signs and symptoms of the index infection had resolved, and no further therapy was required.   |
| <input type="checkbox"/> Improved                 | The major signs and symptoms of infection had improved<br>Sequel: <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes, specify: _____   |
| <input type="checkbox"/> Failure                  | No apparent response to therapy; persistence or progression of most/all pre-therapy signs and symptoms   |
| <input type="checkbox"/> Mortality<br>Date: _____ | For patients who expired due to any causes<br>The primary cause of death is related to this infectious episode reported:<br><input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Yes |

**10. COMMENTS:**

---



---



---