2004-2006 年間台灣地區孩童感染輪狀病毒之分子流行病學調查

吳芳姿¹、吳和生¹、楊志元¹、梁淑媛¹、莫之欣¹、黃瓊瑰²、曹國倩²、 林其勇³、林正修³、蘇承瑜⁴、邢福柳⁴、黃懿娟⁴、陳培哲⁵

- 1.衛生署疾病管制局研究檢驗中心
- 2.林口長庚醫院病理科病毒組
- 3.彰化基督教醫院檢驗醫學科病毒室
- 4.高雄長庚醫院病理系臨床病理科
- 5.臺大醫院臨床醫學研究所

摘要

輪狀病毒是引發孩童時期嚴重腹瀉的主要原因,感染主要族群為孩童,一旦受感染,病童會出現嘔吐及相當嚴重的水瀉(>10 次以上/天),因此容易造成脫水、電解質不平衡之酸中毒、抽筋甚至死亡。本研究以台灣地區急性腸胃炎門診或急診轉住院之孩童為分析對象,自 2004 年 4 月起持續進行至 2006 年間,分別收集 820 件、801 件及 1946 件糞便檢體,輪狀病毒分年檢出陽性率為 14.15%、18.73% 及 23.78%。台灣本地之月份流行季節分布在 11 月至次年 5 月間,高峰期約在 3 月份。以 RT-PCR 檢測輪狀病毒 Group A VP7 G 基因型別分析,分年(2004/2005/2006)流行趨勢如下:G1(11..9%, 23.4%, 34.4%),G2(35.9%, 17.6%, 6.3%),G3(26.1%, 19.1%, 34.4%),G4(0, 0.68%, 0),G9(26.1%, 21.7%, 24.6%),並於今年度發現一新病毒株 G12 型。臨床上常出現嚴重腹瀉或嘔吐,近九成孩童必須住院觀察治療。

關鍵字:輪狀病毒、急性腸胃炎、分子流行病學分析、G基因型別

壹、前言

急性腸胃炎爲全球性重要的健康衛生問題,大約有上百種疾病是透過

民國 96 年 3 月 26 日受理;民國 96 年 4 月 9 日接受刊載通訊作者:吳芳姿;聯絡地址:台北市昆陽街 161 號

e-mail: fang@cdc.gov.tw

物爲媒介所造成,包括細菌、病毒、寄生蟲、毒素及 prions 等,在開發中 國家主要以細菌性或寄生蟲爲主要感染致病原,而在已開發國家則以病毒 性爲主。美國於 1999 年利用各監視系統收集的資料分析指出(1),每年 約有 76,000,000 人出現食因性的疾病,325,000 人因此住院治療,並造成 5,000 人死亡;其中由已知病原引起約 14,000,000 (佔 18.42%)人發病, 60,000 人(佔 18.46%)因此住院治療,並造成 1,800 人(佔 36%)死亡。 引起食因性疾病之已知感染原,病毒性約佔79%,細菌性只佔14%左右, 而引起嬰幼兒急性腸胃炎的病毒又以輪狀病毒(Rotavirus A)排名第一。 在美國及日本流行病學調查中,輪狀病毒感染多發生於較冷的月份約 10 月至隔年4月;輪狀病毒易感染嬰兒及小於5歲之幼兒,約九成以上孩童 在 2 歲以前均已曾經被輪狀病毒感染。依據世界衛生組織於 2003 年的報 告之中指出,腹瀉是造成孩童死亡及罹病的主要原因之一,統計數字顯 示,5 歲以下孩童發生腹瀉的平均中位數爲 3.2 次/人-年(2),其中,輪狀 病毒在全球每年約造成 61 萬名孩童死亡,占全球 5 歲以下孩童死亡率的 5 %;在美國,醫藥如此先進的國家,每年仍有7萬名(1/80)孩童因感染 輪狀病毒住院治療,40名孩童死亡(1/100,000)(3)。

輪狀病毒最早在 1973 年,由 Ruth Bishop 博士自一位嚴重腹瀉孩童的 腸道組織切片中,以電子顯微鏡觀察而發現。輪狀病毒爲雙股 RNA 病毒,具有 11 個基因片段,不具外蛋白套膜,利用病毒蛋白 VP6 可區分成 7 種血清型,感染人類主要爲 A 血清型;另外,以分子生物學方法,利用病毒蛋白 VP4 及 VP7,可分別區分病毒之 20 種以上 P 基因型及 14 種 G 基因型 (4)。輪狀病毒不容易以細胞培養病毒,因此不易分離 (5)。檢測方式包括:糞便檢體之電子顯微鏡檢驗 (EM)、脢連免疫反應 (ELISA) 及乳膠凝集法 (Latex agglutination)(6),或以分子生物學方式如 RT-PCR、核酸雜交法 (Probe hybridization)檢測病毒核酸基因 (7)。

輪狀病毒的感染病毒量相當低,約10顆病毒顆粒就可傳染給另一位而

造成感染,通常爲病毒飛沫落在孩童的指尖,孩童在因吸允手指或由使用的玩具污染手部,進入口中而感染。病毒落在小腸中侵襲小腸細胞,在 24 小時內病毒可複製達上佰萬顆,受侵襲的小腸上皮細胞被病毒毒素破壞死亡,同時釋出細胞液至整個腸道中,病人在感染第二~三天即出現嘔吐及相當嚴重的水瀉(>10 次以上/天),約 10% 受感染孩童常因此出現脫水,若未即時治療,過一~二天內極容易引起電解質不平衡之酸中毒、抽筋甚至死亡。特別在醫療不發達的第三世界國家,孩童死亡率特別高,而在已開發國家,因輪狀病毒就醫住院之醫療支出,及附加之社會成本也相當高。在美國每年直接造成醫療成本約 5 億多美元,社會成本超過 10 億美元以上(3)。因此,目前世界衛生組織積極推動各國衛生單位重視輪狀病毒感染以及疫苗政策推動(3,8,9),同時也推動世界各藥廠對輪狀病毒的研發及上市,同時也對疫苗上市價格進行評估。

目前全球各藥廠自 1980 年起,陸續進行輪狀病毒疫苗的開發,Wyeth Ayerst 生產的 Rotashield,曾在 1991 年獲得美國 FDA 准許進行人體測試階段,於 1998 年取得美國 FDA 核准上市,並獲得美國 CDC 建議排入小兒預防接種中,但也很可惜在一年之後因發生接受疫苗孩童出現腸套疊而下架。目前新一代輪狀病毒疫苗—GSK 及 MSD,已通過疫苗評估,於 2006 年在世界多國核准上市,今年 10 月於台灣也已取得核准證照。在 2006 年,GSK 及 MSD 分別對於該公司生產之輪狀病毒疫苗,在安全性及疫苗保護效力上之人體試驗資料發表相關論文(10,11)。目前通過核准上市之 GSK 爲單價型 G1 型輪狀病毒疫苗,MSD 爲 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爲 G1、G2、G3、G9 型。

本研究以台灣地區北中南大型醫院急性腸胃炎門診或急診轉住院之 10歲以下孩童爲分析對象,進行輪狀病毒基因型別分析,及臨床症狀資料 統計。已建立台灣本地之輪狀病毒之月份流行趨勢、流行基因型別分析,

及病童臨床症狀表現。

貳、材料與方法

- 一、檢體來源:林口長庚醫院、彰化基督教醫院和高雄長庚醫院。
- 二、**檢體收集定義**:過去爲健康個人,出現急性腹瀉之 10 歲以下孩童爲 主。

三、酵素免疫分析法:

輪狀病毒分析:使用RIDACSCREEN® Rotavirus(R-Biopharm AG, Germany)檢測,分別取處理過之糞便檢體上清液 $100~\mu$ L置於RIDACSCREEN® Rotavirus的微小孔(microwell)中,並加入 2 滴Enzyme Conjugate,於室溫中靜置反應 60~% 分鐘後,去除混合反應液再用清洗液 $300~\mu$ L清洗 5~次,拍乾微小孔中水分,之後加入 2~滴 Substrate/Chromogen室溫避光靜置 15~分鐘,再加 1~滴stop solution。經由ELISA reader (μ Quant)測 450~nm的吸光值判讀結果。判讀結果:吸光值大於Cut-off値(negative control吸光值加上 0.15),判定爲陽性反應。

四、RNA 的萃取:

使用 Roche 生產的 MagNA Pure LC DNA isolation kit III (Roche Diagnostics GmbH, Germany) 萃取純化病毒 RNA。取處理過的糞便上清液 $250\,\mu$ L 加入 $20\,\mu$ L 的 proteinase K,將其混合液經由 MagNA Pure LC 自動核酸化機器萃取出 RNA,保存於- 70° C。

五、RT-PCR 反應引子設計及反應分析:

引子設計以轉錄輪狀病毒 Group A VP7 之第九對基因片段設計,引子對分別為 Beg 9 及 End 9 (5),合成反應產物為 1062bp。

六、基因型別分析:

取 Beg 9 及 End 9 之 RT-PCR 產物為模板,在第九對基因另外設計 9con1 與 9con2,作為定序作用之引子,反應後之序列與 GeneBank 比對分析 G 基因型別,目前可以訂出台灣之基因型別包括 $G1 \cdot G2 \cdot$

G3、G4、G9 及 G12。

七、序列分析:

使用 ABI PRISM(BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit)作核酸序列分析,反應條件如下:取適量 RT-PCR 反應產物、 $1\,\mu$ M 反應引子(9con1 或 9con2)、 $1\,\mu$ L BigDye3.1、反應緩衝液,最後總體積爲 $10\,\mu$ L。將裝有反應物之微量離心管於 $96\,^{\circ}$ C 作用 $1\,$ 分鐘,之後反應條件爲 $96\,^{\circ}$ C $10\,$ 秒、 $50\,^{\circ}$ C $5\,$ 秒、 $60\,^{\circ}$ C $4\,$ 分鐘,共 $25\,$ 次循環。反應產物純化:爲減少反應混合物中游離標記物之干擾,先將定序反應後之產物純化。將定序反應產物 $10\,\mu$ L 加入等體積的 ddH2O、 $60\,^{\circ}$ L 的絕對酒精、 $5\,\mu$ L 的 $125\,$ mM EDTA,於室溫下靜置 $15\,$ 分鐘,再以 $4000\,$ rpm 離心 $30\,$ 分鐘;去除上清液後,以 $70\,$ % 酒精清洗, $4000\,$ rpm 離心 $5\,$ 分鐘,最後將沉澱物烘乾,再加入 $10\,^{\circ}$ L Hi-diformamide。基因定序反應:將純化後產物置於 $96\,^{\circ}$ C 作用 $2\,$ 分鐘後,馬上置於冰上,再放入 ABI $3730\,$ 自動化核酸螢光定序儀(Applied Biosystems,CA)進行核酸序列分析。

八、病毒基因庫分析比對:將定序後之鹼基序列與 NCBI 基因資料庫中已 知之基因序列進行比對分析,以確定其流行趨勢相關性。

參、結果

一、10歲以下孩童急性腸胃炎之輪狀病毒感染流行病學分析

爲了解台灣本地因急性腸胃炎門診或急診轉住院之 10 歲以下孩童之主要感染原,及病原之月份流行分布。自 2004 年 4 月起持續進行至 2006 年 10 月止,分年收集 820 件、801 件及 1946 件糞便檢體,輪狀病毒檢測年度總陽性率爲 14.15%、18.73%及 23.78%,此外,中部陽性率比北部及南部高,而南部在 2006 年輪狀病毒陽性率也比前兩年增加許多。

以個案發病就醫後檢體採檢日統計分析輪狀病毒月份流行趨勢(圖

第 23 卷第 8 期 疫情報導 453

一),三年間分析資料顯示台灣本地之流行季節分布在 11 月至次年 5 月間,高峰期約在 3 月份,月份檢出輪狀病毒陽性率介於 3.2~57.8% 間,感染陽性率高峰的三月分年分別為 57.8%、32.6% 及 44.6%,似乎輪狀病毒感染高峰有每間隔一年提高許多的趨勢。

10 歲以下孩童感染輪狀病毒的年齡層分析(圖二),在 5 個月大至 2 歲間爲一感染高峰期,在台灣將近 5 成孩童至 2 歲前已曾被輪狀病毒感染過;在 2 歲之後感染情形稍緩,但在 5-6 歲間似乎又有一小波感染高峰;累計至 6 歲前約 98%的孩童已被輪狀病毒感染。

二、病毒基因型別分析

使用 RT-PCR 檢測輪狀病毒 Group A VP7 基因,定序相關基因序列已 經存檔鍵入本局基因資料庫網站中。依產物定序結果與 GeneBank 比對分析,分年(2004/2005/2006)流行趨勢如下(圖三): G1(11.9%, 23.4%, 34.4%),G2(35.9%,17.6%,6.3%),G3(26.1%,19.1%,34.4%),G4(0,0.5%,0),G9(26.1%,21.7%,24.6%),並於 2006 年發現一新病毒株 G12,與其他國家序列比對之後發現較接近於印度流行株。

輪狀病毒的 G 基因型別的主要流行型具有相當大的變化,在 2004 年度,以 G2 為主要流行型別,其次為 G3 及 G9;在 2005 年度,型別稍有轉換,G1 為主要流行型別,G9、G3 陽性率仍高,但是 G1 陽性成長率由 11.9% 急速上升至 23.4%,另外在 2005 年度出現一件 G4 型陽性;在 2006 年度至九月為止,G1、G3 已成為主要流行株,而 G9 陽性率稍微下降,但整體上 G1、G3、G9 的陽性個數均較往年高許多(圖三)。在地區型別轉換的分析上,在 2004 年至 2006 年三年間,各地醫院流行型別變化,北部醫院前兩年以 G2 為主今年 G3 及 G9 均呈上升趨勢,中部醫院這三年均有極大變化,由 G3 至 G9 至 G1,南部醫院 2004 年以 G2 為主,2005 年 G1、G2、G3 均很高但以 G1 為主,但今年仍以 G1 及 G3 為主要流行株。2006 年型別改變多發生在中南部地區,尤其南部輪狀病毒檢出陽性率較前兩年高出許多。

三、輪狀病毒陽性個案臨床症狀分析

就 2004 年度收集檢體中輪狀病毒陽性個案,回溯性病歷調查,輪狀病毒感染病患主要臨床症狀爲水樣便(大於 4~6 次/天)、嘔吐(3 次/天)、發燒(高於 38℃)、脫水、腹痛及腸胃道不適等症狀,此外,部份較爲特殊約有 33.78% 具有上呼吸道症狀。

肆、討論

在本研究結果顯示,台灣地區在 2004 至 2006 年間,10 歲以下孩童感染輪狀病毒性腹瀉之流行槪況。

一、10歲以下孩童急性腸胃炎之輪狀病毒感染流行病學分析

自 2004 年至 2006 年,輪狀病毒陽性分年年度總檢出陽性率 14.15%、 18.73%、 23.78%; 結果顯示,在台灣地區 10 歲以下孩童發生輪狀病毒感染率相當高。尤其在南部地區,每年陽性率均上升 1.6 倍;北部地區,第二年及第三年分別對前一年之陽性率提高 1.1 倍及 1.46 倍;中部地區,第二年及第三年分別對前一年之陽性率提高 1.27 倍及 1.03 倍,稍爲提高。因檢體收案定義及地點均無變更,推測在台灣地區受輪狀病毒感染情形似乎增強,並且有南移的趨勢,改變的原因是否與輪狀病毒 G 基因型別逐年變化,使得病毒致病力改變,或南部地區原本輪狀病毒感染的孩童數不高,缺少對該病毒的抗體,因此才有逐年上升趨勢,均需要再詳細研究探討。

依月份分析病毒檢出陽性之流行概況顯示(圖一),輪狀病毒在3月爲一高峰期,並隨月份增加天氣變熱後逐步遞減,第二年在10月開始上升至隔年4月逐漸下降,第三年月份分布曲線與第二年近似;就每年高峰期3月來看,病毒感染率似乎有每間隔2年增強,是否如此必須持續監測。整體來看,實驗分析結果在9月至隔年3月爲腹瀉性病毒的主要流行期(圖一),與本局2003-2006年定點醫師監視通報系統趨勢圖比較(圖四),在第4週到第10週爲通報病歷高峰期,高峰期出現在第7-8週,另外在第

25-40 週也有一小波感染;若與學校傳染病監視通報系統趨勢比較(圖五),通報腹瀉症狀學生人數較多出現在每年的第2-16 週及第40-45 週,特別高峰在3月左右。定點醫師監視通報主要爲診所,通報個案數多以小孩爲主;學校傳染病監視通報系統包含全國134 所公立小學及附設幼稚園;本研究以大型教學醫院爲主,配合二個監測系統與實驗室分析比較發現,監測通報高峰與實驗室檢測出輪狀病毒感染陽性曲線之高峰時間點相近。因此,推斷孩童感染腹瀉症狀,應以輪狀病毒爲主要感染原。

在台灣地區 10 歲以下孩童感染輪狀病毒的年齡層分析(圖二),在 5個月大至 2歲間爲一感染高峰期,將近 5成孩童至二歲前已曾被輪狀病毒感染;在 2歲之後感染情形稍緩,但在 5-6歲間似乎又有一小波感染高峰;累計至 6歲前將近 98%的孩童已曾被輪狀病毒感染。文獻報導中也指出(10),各國統計資料中輪狀病毒感染以 5歲以下孩童爲主,尤其是嬰幼兒;另外,本研究合作醫院爲教學醫院,其採集腹瀉糞便檢體之對象爲 10歲以下孩童,年齡層散佈較均勻,因此輪狀病毒陽性檢出率約爲 2成,此數據與其他國家之統計數相近似,在國外的研究報告中,5歲以下孩童因輪狀病毒感染引起急性腸胃炎而住院的比率介於 25%至 50%之間。

台灣地區自 1995 年起開始實施全民健保,至 2000 年已將近 96%加入, 資料登入採用 ICD-9-CM 系統,並未有明確輪狀病毒感染選項,無法確切 得知輪狀病毒感染人口數,因此,雖然台灣地區近幾年有許多輪狀病毒研 究報告,但尚未有全台灣地區盛行率調查研究報告。

二、病毒基因型別分析

輪狀病毒在台灣地區基因型流行情形,在 2004 年度,以 G2 爲主要流行型別,其次爲 G3 及 G9;在 2005 年度,型別稍有轉換,G1 爲主要流行型別,G9、G3 陽性率仍高,但是 G1 陽性成長率由 11.9%急速上升至 23.4%,另外在 2005 年度出現一件 G4 型陽性;在 2006 年度至十月爲止,G1、G3已成爲主要流行株,而 G9 陽性率稍微下降,但整體上 G1、G3、G9 的陽

性個數均較往年高許多(圖三)。在地區型別轉換的分析上,在 2004 年至 2006 年三年間,各地醫院主要流行型別變化,北部醫院前兩年以 G2 爲主 今年 G3 及 G9 均呈上升趨勢,中部醫院這三年均有極大變化,由 G3 轉換至 G9 在轉換至 G1,南部醫院 2004 年以 G2 爲主,2005 年 G1、G2、G3 均很高但以 G1 爲主,但今年仍以 G1 及 G3 爲主要流行株。

三、輪狀病毒陽性個案臨床症狀分析

輪狀病毒感染的孩童在臨床症狀表現相當明顯,出現水便性腹瀉次數高於5次以上的個案相當多,而嘔吐的情形也相當嚴重。分析就診資料中顯示,有九成以上孩童必須急診並住院觀察與治療。若參考美國曾於1999年發表論文(5),急性腸胃炎造成美國的醫療成本爲上億元,評估計算在台灣醫療支出及照顧者之社會成本將會相當高昂。

在 2006 年 10 月台灣地區已經核准兩家輪狀病毒疫苗上市,兩家上市疫苗中,其中一家爲 G1 型,另外一家爲 G1、G2、G3、G4、P8 五價型疫苗。在我們監測研究中,台灣地區輪狀病毒流行型別爲 G1、G2、G3 及 G9 型,上市疫苗對於台灣地區流行型別是否具有有效保護效果,必需要持續監測及追蹤以回答此一重要的問題。此外,輪狀病毒爲人畜共通性病毒,在疫苗上市前,本實驗室曾檢出一株 G12 新型輪狀病毒,此一型別多發現於動物之輪狀病毒感染,因此,在疫苗上市推廣後,是否會壓制人類流行株,造成罕見的輪狀病毒型別株流行,仍必須多加重視。目前輪狀病毒疫苗售價並不便宜,而疫苗服用後之成效是否能夠與疫苗預期達到保護效力之降低醫療支出抗衡,相當值得後續探討。

伍、致謝

感謝第五組林秋香小姐提供監視通報系統分析資料

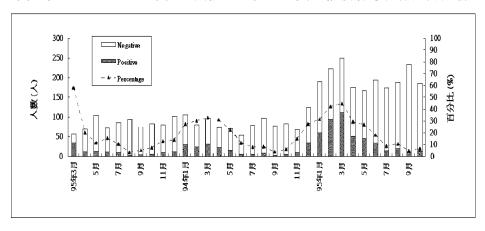
陸、參考文獻

- 1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, et al. Food-Related Illness and Death in the United States. Emerg Infect Dis 1999; 5: 607-25.
- 2. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The Global Burden of Diarrhoeal Disease,

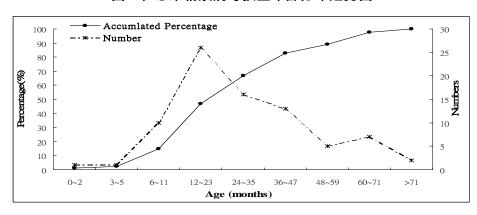
as Estimated from Studies Published between 1992 and 2000. Bull World Health Organ 2003; 81: 197-204.

- 3. Parashar UD, Hummelman E, Bresee JS, et al. Global Illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. Emerg Infect Dis 2003; 9: 565-72.
- Matson DO, O'Ryan ML, Jiang X et al. Rotavirus, Enteric Adenoviruses, Caliciviruses, Astroviruses, and Other Viruses Causing Gastroenteritis. In: Specter S, Hodinka RL, Young SA, eds. Clinical Virology Manual 3rd. 2000; 271p.
- 5. Martin AL, Follet AC. An assessment of the sensitivity of three methods for the detection of rotavirus. J Virol Meth 1987; 16: 39-44.
- 6. Kapikian AZ, Chanock RM: Rotaviruses. In: Fields, B. N. Knipe D.M. (Eds.), Virology, Second ed. Raven Press, New York, pp. 1990; 1353-404.
- Gouvea V, Glass RI, Wood P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. J Clin Microbiol 1990; 28: 276-82.
- 8. WHO Department of vaccines abd Biologicals. Protocals on rotavirus surveillance and health care services utilization for gastroenteritis in children. 2000; Document WHO/V&B/02.15.
- Bresee JS, Hummelman E, Nekson EAS, et al. Rotavirus in Asia: The Value of Surveillance for Informing Decisions about the Introduction of New Vaccines. J Infec Dis 2005: 192 (Suppl 1) S1-5.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et.al. Safety and Efficacy of a Pentavalent Human-Bovine (WC3) Reassortant Rotavirus Vaccine. N Engl J Med 2006; 354: 23-33.
- 11. Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR., et al. Safety and Efficacy of an Attenuated Vaccine against Severe Rotavirus Gastroenteritis. N Engl J Med 2006; 354: 11-22.

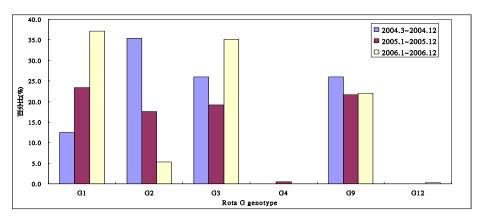
圖一、2004至 2006年間造成孩童急性腸胃炎之輪狀病毒流行趨勢分析



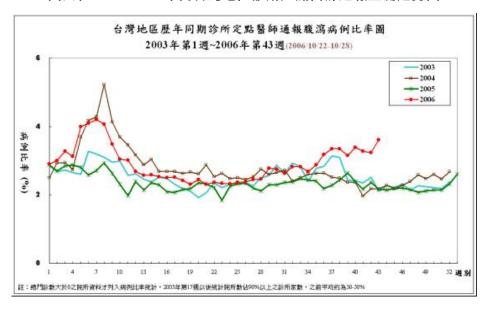
圖二、感染輪狀病毒孩童年齡分布趨勢圖



圖三、2004-2006 年間輪狀病毒 G 基因型別分析



圖四、2003-2006 年間台灣地區診所定點醫師通報監測趨勢圖



圖五、學校傳染病監視通報系統分項疾病流行趨勢圖

