

台灣地區首例沙波病毒腹瀉群聚感染事件

吳芳姿¹、江大雄²、莫之欣¹、梁淑媛¹、
洪健翔¹、楊志元¹、楊辰夫¹、吳和生¹

- 1.衛生署疾病管制局研究檢驗中心
- 2.衛生署疾病管制局應用流行病學專業人員訓練班

摘要

沙波病毒(Sapovirus)與諾羅病毒同是引發人類腸胃炎的主要原因。其中諾羅病毒在冬季非常活躍，為全球腹瀉群聚事件主要元兇，而沙波病毒較常在春夏交接月份引發散發性腸胃炎事件。疾病管制局於西元 2007 年 5 月 9 日接獲台北縣某大學通報學生爆發腹瀉群聚事件。該校學生於 5 月 4 日至 14 日間，陸續有 55 名學生出現噁心、嘔吐及腹瀉等腸胃不適的症狀。採集其中 8 位個案的糞便檢體，並以腹瀉群聚事件送疾病管制局研究檢驗中心檢驗。在腹瀉群聚事件通報檢測項目中，不論諾羅病毒、輪狀病毒及細菌的檢測結果均為陰性。由於發病者徵狀、潛伏期均與諾羅病毒或沙波病毒感染極為相似，故進一步檢測沙波病毒。檢驗結果確認為台灣地區首例沙波病毒感染腹瀉群聚事件。

關鍵字：沙波病毒、腸胃炎、腹瀉群聚事件、分子核酸分析

簡介

杯狀病毒科 (*Caliciviridae*) 包含四個屬，沙波病毒 (Sapovirus)、諾羅病毒 (Norovirus)、Lagovirus 及 Vesivirus[1]，其中沙波病毒和諾羅病毒同為人類腸胃炎之主要感染源。諾羅病毒在冬季非常活躍，常引起大型腹瀉群聚事件，成人是主要感染對象；而沙波病毒較常在春夏交界月份引起散發性腸

民國 96 年 6 月 28 日受理；民國 96 年 8 月 21 日接受刊載

通訊作者：吳芳姿；聯絡地址：台北市南港區昆陽街 161 號

E-mail：fang@cdc.gov.tw

胃炎，孩童及成人均為感染的主要對象。感染的病患會出現腸胃炎症狀，包括腹瀉、嘔吐、發燒。早在 1977 年，日本札幌地區一間家庭式托嬰中心爆發群體腸胃炎事件後首度被發現，因此以該地名命名為 Sapporo virus[2]，之後於 2002 年全球病毒分類學會議（ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses）中更名為 Sapovirus[3]。由於，全球對於沙波病毒的研究並不多，大部分為群聚事件或散發個案的報導[2, 4-7]，因此，無法作為該病毒檢出率、罹病率或盛行率的流行病學分析。

沙波病毒為單股 RNA 病毒，共分為五種基因型別（GI~GV），其中 GIII 型主要感染宿主為豬，其他四型為感染人類。由於病毒無法以細胞培養或動物模式增殖複製，因此，早期利用電子顯微鏡檢驗，在鏡檢下病毒呈現相當典型的 Star-of-David 外觀，且因病毒顆粒極小僅約 41-46 nm[8, 9]，檢測靈敏度不高。由於該方法之檢體處理過程繁複並費時，近幾年，已有實驗室開發酵素免疫法或分子核酸檢測，但放入常規檢驗的國家並不多。

分子核酸檢測方法相當快速及靈敏，極適合用於防疫上之快速檢驗鑑定，以早期提供防疫工作人員作為圍堵疫情擴散的工具。疾病管制局研究檢驗中心實驗室於 2006 年開發 Real-time RT-PCR 檢測沙波病毒[10]，並應用於腸胃炎監測研究計劃及本次台北縣某大學之腹瀉群聚事件中，首次證實台灣地區之沙波病毒群聚感染。

疫情介紹

2007 年 5 月 9 日上午接獲台北縣某大學通報學生爆發腹瀉群聚事件。該校學生於 5 月 4 日開始陸續有學生出現噁心、嘔吐及腹瀉等腸胃不適的症狀，直至 5 月 8 日共計 49 位曾出現以上症狀。5 月 8 日衛生局人員採集 8 名發病學生糞便，送研究檢驗中心進行腹瀉症狀群聚事件通報檢驗。後續經該校自行調查結果顯示，5 月 4 日至 5 月 13 日累計 55 名學生出現腸胃不適症狀，5 月 14 日以後無新增個案，相關腹瀉群聚流行曲線如圖一。

實驗室診斷

沙波病毒的檢驗過程可以分下列五個過程描述：

- 一、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 μ L 加入 20 μ L 的 proteinase K，將其混合液經由 MagNA Pure LC 自動核酸純化機器萃取出 RNA，保存於 -70°C。
- 二、逆轉錄反應：取病毒 RNA 萃取液 6.8 μ L 為模板，加入混合液，內含 3 μ g Random Primer、1.6 mM dNTP、10U SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)、40U RNase 抑制劑(Invitrogen)、10mM DTT 及緩衝溶液，反應總體積為 20 μ L，於 25°C 作用 15 分鐘，50°C 作用 50 分鐘，最後 85°C 作用 5 分鐘。
- 三、即時聚合酵素鏈反應分析 (Real-time PCR)：引子對設計主要原理依 Similarity Plot 分析沙波病毒基因[10]，於 RNA-dependent RNA polymerase 及 Capsid 基因的連接位置上具高度穩定性區域，設計引子對及探針於 5078 至 5181 之間的序列上[10]，引子分別為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SaV1245R，探針為 SaV124TP、SaV5TP。加入 2.5 μ L 病毒 cDNA 於混合液中，內含 12.5 μ L QuantiTect Probe PCR Master Mix 緩衝液 (Qiagen)、400 nM 引子 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SaV1245R 及探針 200nM SaV124TP、SaV5TP。反應程序為：95°C 15 分鐘，之後進入 40 個循環：95°C 作用 15 秒，62°C 作用 1 分鐘，使用 ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems)偵測分析。
- 四、逆轉錄聚合酵素鏈反應(RT-PCR)：沙波病毒引子設計在 RNA-dependent RNA polymerase 及 Capsid 基因的連接位置上[11]，分別為 SV-F11 及 SV-R1，反應產物約為 780 bps。RT-PCR 作用條件：取 2.5 μ L 病毒 cDNA 為模板，加入混合液，內含 200nM 引子 SV-F11 及 SV-R1，200nM dNTP、1.25U Taq DNA Polymerase (Violet)及緩衝溶液，反應總體積為 25 μ L，於

94°C 作用 2 分鐘後，進行 PCR 35 循環：94°C 30 秒，55°C 30 秒，72°C 2 分鐘，之後於 72°C 加長作用 10 分鐘。反應產物取 3 μ L，以 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2% SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular Application)，100 伏特電泳跑膠，進行產物大小分析。

五、序列分析：使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列分析。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，以確定感染病原型別。

結果與討論

研究檢驗中心依據腹瀉症狀群聚事件模式對某大學通報腹瀉症狀群聚事件之 8 位發病者之糞便檢體，分別進行細菌性及病毒性檢驗。檢測病原項目包括桿菌性痢疾、腸炎弧菌、輪狀病毒及諾羅病毒。其一週後的檢驗結果未檢出任何病原體。

某大學自行調查的結果顯示，自 5 月 4 日至 5 月 13 日期間累計有 55 名學生出現腸胃不適症狀，5 月 14 日以後無新增個案。相關腹瀉群聚流行曲線如圖一，該圖呈現單一波峰圖形，顯示本次群聚事件的傳播途徑可能為共同感染源。尤其，波峰後續出現數個零星個案，推測應與共同水源引起的感染性較高。

該校學生總人數約 1 千餘人，設有外包餐廳提供學生餐點，大部份學生在供餐時間（早、中、晚餐）會在學校內用餐。但在疫情調查資料中顯示，發病的 55 名中仍有 52 人在發病前有外食紀錄。因此，衛生局調查人員推測與該校餐廳提供的餐點相關性較低，故未採集相關廚餘或環境檢體送實驗室檢驗。而 5 月 10 日至 5 月 13 日還有 5 人發病，5 月 10 日發病的 3 人中，其中有一人並無外食紀錄，推測應該是與先前發病者親近接觸、或使用共同浴廁設備及飲用共同水源等所引起。但因為實驗室並未再接到該 5 名的糞便檢

體，而無法從檢測病原或序列資料證實是否是相同感染事件。

發病的 55 名學生當中，平均年齡為 20 歲，其中男生 26 人、女生 29 人。臨床表現症狀分佈依序為腹瀉 45 人（81.8%）、嘔吐 22 人（40.0%）、腹痛 17 人（30.9%）及發燒 2 人（3.6%）。發病者症狀大約持續 2~10 天，平均 4.7 天。由於發病感染者的臨床症狀表現與急性腸胃炎病毒性感染相近，但諾羅病毒及輪狀病毒檢測結果卻呈現陰性，而且本次發病者的臨床症狀較諾羅病毒感染輕微，因此，本實驗室推測應是與諾羅病毒同屬的沙波病毒感染，並進行沙波病毒檢測。

沙波病毒即時逆轉錄聚合酵素鏈反應[10]，主要以 TaqMan MGB 設計沙波病毒探針，可以同時檢測感染人類沙波病毒的 GI、GII、GIV 及 GV 四種型別，其中 GI 型別於 Ct 值 38.90 時，靈敏度可達 2.5×10^1 copies/tube。本次事件 8 件送驗糞便檢體中，以即時逆轉錄聚合酵素鏈反應進行檢測，有 7 件呈現沙波病毒反應陽性，Ct 值均低於 33，如圖二。因國內尚未檢驗出任何沙波病毒陽性，為證實檢測無誤，該 8 件檢體再以另一引子對（SV-F11 及 SV-R1）之逆轉錄聚合酵素鏈反應增殖，其中 7 件陽性反應產物(780bps)，再進行核酸序列定序分析，定序後之鹼基結果與 NCBI 基因資料庫比對，為 GI 型沙波病毒，如圖三。因此，依臨床症狀、發病時間長短及實驗分析結果，證實本群聚事件的致病原為沙波病毒。

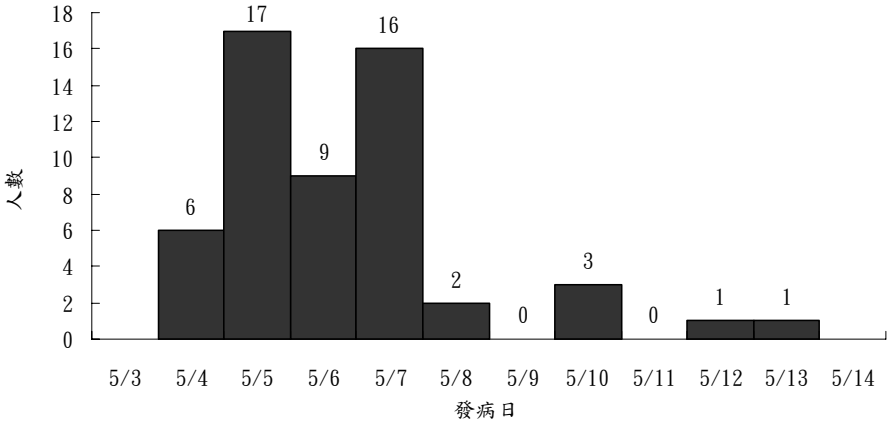
本次事件發生時，未能收集到所有發病者及餐廳工作人員等之糞便檢體，以及疑似與病毒傳播途徑相關之環境水樣品或接觸物品之檢體。僅有依據衛生單位簡單的疫情調查資料，實無法釐清病毒傳播途徑。此外，雖然本次群聚事件為台灣首次被發現的沙波病毒感染群聚事件，因為沙波病毒檢測並未列入腹瀉症狀群聚常規檢驗項目之中，故無法排除過去台灣地區存在沙波病毒的可能性。尤其，疾病管制局傳染病通報自 2005 年開始增加病毒性腹瀉群聚事件通報檢測項目，在推行初期，因醫院或地方衛生單位的檢體採集方式不正確或未知有病毒檢測項目，以 2005 年整年份通報腹瀉群聚或食

物中毒案件中，其中無法檢出感染原之事件數將近四成。直到 2006 年全面宣導病毒性腹瀉檢測之正確檢體採集後，已將無法檢出感染原的事件數降低至 5%。由此可見，在台灣地區腹瀉群聚事件之致病原因正在轉變，過去常見的細菌性食物中毒已漸由病毒性感染原取代，且事件數或病例數正在增加中，特別是新種的病原體，本次的疫情就是一種警訊。不僅如此，更應該思考的是，民眾的生活及飲食習慣的改變，是否已成爲病毒性腹瀉群聚事件漸漸成長的主要原因之一，因此，對於一般民眾的衛教宣導，以及對於地方衛生單位的教育訓練工作內容應多加強病毒性資料的提供。此外，在流病疫情調查上，應檢討目前問卷資料，並新增病毒性感染源可能傳播途徑之選項，以提早發現可疑之感染指標。由於目前尚無台灣地區沙波病毒流行病學資料，衛生單位應加強沙波病毒在環境中之存在情形，及環境與人之間互動的研究。

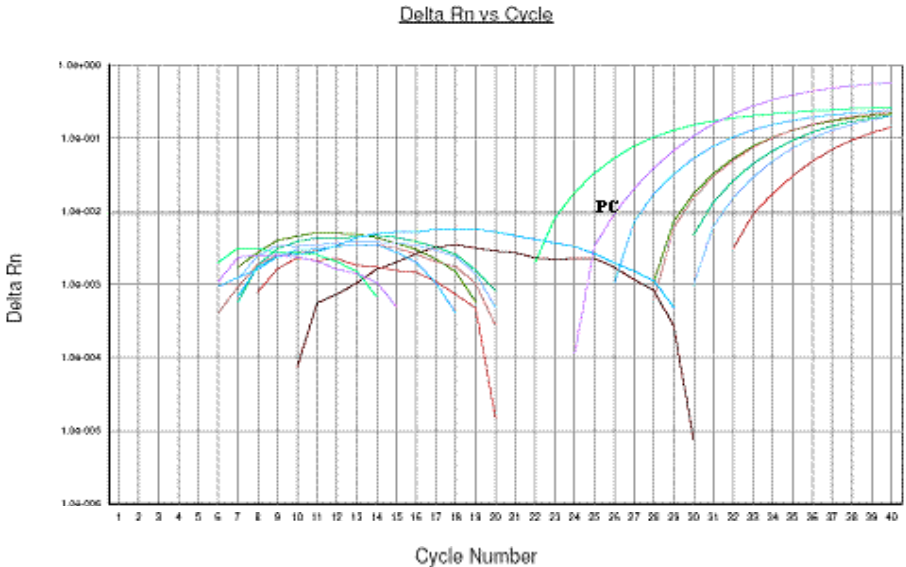
參考文獻

1. Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000; 181 Suppl 2: S322-30.
2. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, et al. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J Med Virol* 1979; 4: 249-54.
3. Pringle CR. Virus taxonomy--San Diego 1998. *Arch Virol* 1998; 143: 1449-59.
4. McSwiggan DA, Cubitt D, and Moore W. Calicivirus associated with winter vomiting disease. *Lancet* 1978; 1: 1215.
5. Spratt HC, Marks MI, Gomersall M, et al. Nosocomial infantile gastroenteritis associated with minirovirus and calicivirus. *J Pediatr* 1978; 93: 922-6.
6. Suzuki H, Konno T, Kutsuzawa T, et al. The occurrence of calicivirus in infants with acute gastroenteritis. *J Med Virol* 1979; 4: 321-6.
7. Chiba S, Sakuma Y, Kogasaka R, et al. Fecal shedding of virus in relation to

- the days of illness in infantile gastroenteritis due to calicivirus. *J Infect Dis* 1980; 142: 247-9.
8. Madeley CR, Cosgrove BP. Letter: Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; 1: 199-200.
 9. Flewett TH, Davies H. Letter: Caliciviruses in man. *Lancet* 1976; 1: 311.
 10. Oka T, Katayama K, Hansman GS, et al. Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2006; 78: 1347-53.
 11. Okada M, Shinozaki K, Ogawa T, et al. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. *Arch Virol* 2002; 147: 1445-51.



圖一、台北縣某大學腹瀉群聚發病時間流行曲線圖



圖二、即時逆轉錄聚合酶鏈反應結果

>dbj|AB258427.1| Sapporo virus (Hu/Chiba/041413/2004/JP) gene for polyprotein,
 hypothetical protein, structural protein, partial and complete
 cds
 Length=2308

Score = 1290 bits (698), Expect = 0.0
 Identities = 698/698 (100%), Gaps = 0/698 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ATGGAGGGCAATGGCTCCCAGTTGCCAACCAATCAAAATGGTGGTCATGTTGGCCAGGAT 60
|
Sbjct 1 ATGGAGGGCAATGGCTCCCAGTTGCCAACCAATCAAAATGGTGGTCATGTTGGCCAGGAT 60

Query 61 GTTGACCCGCTGGCGCGACTGGTCCGACCACATCCCATGTTGTTGTGTCTAATCCAGAA 120
|
Sbjct 61 GTTGACCCGCTGGCGCGACTGGTCCGACCACATCCCATGTTGTTGTGTCTAATCCAGAA 120

Query 121 CAACCCAATGGGCCCGCACACGCCTGGAAATGGTGTGCTACTGGTTCCATCCAATCA 180
|
Sbjct 121 CAACCCAATGGGCCCGCACACGCCTGGAAATGGTGTGCTACTGGTTCCATCCAATCA 180

Query 181 AATGTCCCTGAAGCGATACGCAACTGCTTTGCAGTCTGTCGTACTTTTGCTTGGAAATGAC 240
|
Sbjct 181 AATGTCCCTGAAGCGATACGCAACTGCTTTGCAGTCTGTCGTACTTTTGCTTGGAAATGAC 240

Query 241 AGAATGCCCACTGGAACCTTTCCTGGGATCTTTATCGCTTCATCCCAACATTAATCCATAC 300
|
Sbjct 241 AGAATGCCCACTGGAACCTTTCCTGGGATCTTTATCGCTTCATCCCAACATTAATCCATAC 300

Query 301 ACATCCCATCTTTTCAGGCATGTGGGCAGGGTGGGAGGTAGCTTTGAGGCCCGCATCTCA 360
|
Sbjct 301 ACATCCCATCTTTTCAGGCATGTGGGCAGGGTGGGAGGTAGCTTTGAGGCCCGCATCTCA 360

Query 361 ATTTCTGGGTCTGGCATGTTTGCTGGGAGGATCATTGCTTCTGTGCATACCACCTGGGGTT 420
|
Sbjct 361 ATTTCTGGGTCTGGCATGTTTGCTGGGAGGATCATTGCTTCTGTGCATACCACCTGGGGTT 420

Query 421 GACCCACGTCGATCAGGGATCCGGGCGTGCTCCCTCACGCTTTCGTTGATGCTCGTGTC 480
|
Sbjct 421 GACCCACGTCGATCAGGGATCCGGGCGTGCTCCCTCACGCTTTCGTTGATGCTCGTGTC 480

Query 481 ACTGATCCAGTATCATTTATGATCCCTGATGTGAGAAACATTGATTACCACAGGATGGAC 540
|
Sbjct 481 ACTGATCCAGTATCATTTATGATCCCTGATGTGAGAAACATTGATTACCACAGGATGGAC 540

Query 541 ACCACTGAACCCACTTGCTCCCTTGGGTTCTGGGTCTACCAACCACTGCTAAACCCATTT 600
|
Sbjct 541 ACCACTGAACCCACTTGCTCCCTTGGGTTCTGGGTCTACCAACCACTGCTAAACCCATTT 600

Query 601 TCCACCACAGCAGTCACAACATGCTGGGTGCCATAGAAACCAAGCCTGGTGGTGATTTT 660
|
Sbjct 601 TCCACCACAGCAGTCACAACATGCTGGGTGCCATAGAAACCAAGCCTGGTGGTGATTTT 660

Query 661 GATTTTTGCCTCTTGAGGCCCCCTGGTCAACAGATGGA 698
|
Sbjct 661 GATTTTTGCCTCTTGAGGCCCCCTGGTCAACAGATGGA 698
  
```

圖三、陽性個案序列與 NCBI 序列資料庫比對結果