

諾瓦克病毒 (Norovirus) 北部某醫院疫情及實驗室分析

前 言

九十三年二月二十四日本局接獲北部某醫院通報疑似腹瀉病患檢體，該批病患於二月二十日起陸續有 17 位病患及 1 位護理人員出現水瀉、發燒及嘔吐等症狀，至三月三日止前後共計三十七人有症狀。據調查該批病患為住院病人，都有氣切及使用鼻胃管，並接受呼吸道照護治療，依病患出現症狀至發病時間推估潛伏期應為 1~3 天。病毒性實驗室陸續收到病患肛門拭子 36 件、糞便檢體 2 件，及工作人員肛門拭子 11 件、糞便檢體 1 件，工作人員家屬肛門拭子 1 件。

簡 介

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題，引起腸胃炎症狀的原因很多，感染源包含細菌、寄生蟲及病毒等，而造成腸胃炎的病毒主要有杯狀病毒之諾瓦克病毒 *Norovirus* (即原先之 *Norwalk-like virus*) 及 *Sapovirus* (即原先之 *Sapo-like virus*)，輪狀病毒 (*Rotavirus A、B、C*)，星狀病毒 (*Astrovirus*)，腸道腺病毒 (*adenovirus*) 第 40、41 型，其他在腸道可發現的病毒同時也包括腸病毒、冠狀病毒、A 型肝炎病毒、疱疹病毒群等病毒，也會引起類似的腹瀉症狀。

在歐美日工業化國家，病毒性腸胃炎是主要的腹瀉原因，如歐洲及美國每年病毒性之腸胃炎約佔 60% 及 80 % (1,2)。據流行病學調查，在工業化國家中諾瓦克病毒是成人非細菌性腸胃炎的主要致病源，也是食物中毒最主要的致病源，約佔群聚性感染的 70~95 % (3~5)，好發於成人及較大之孩童，並且容易在安養院、醫院及學校造成群聚型感染，全年皆有病例報告，但以冬天稍多。主要的臨床症狀為急性水瀉、嘔吐、腹絞痛及些微發燒，由於許多病患主訴症狀為嘔吐，因此該疾病又被稱為冬季嘔吐病 (winter vomiting disease)。其潛伏期約 12~48 小時，並且症狀會持續約 12~60 小時，感染發病之病患多數在 12~60 小時後自癒，但對於嬰幼兒及無法自我照護者，偶而會因脫水而病情加重；傳染途徑為糞-口傳染，感染者的糞便污染環境介面、飲水或食物，特別是貝殼類食物而傳染給其他人，。

諾瓦克病毒，屬於杯狀病毒科 (Caliciviridae)，為單股 RNA，二十面體無外套膜病毒 (6)，基因體全長約 7.5~7.7 kb，分成三個可讀碼構 (open reading frame; ORFs)。傳統以電子顯微鏡檢驗，但糞便中必須至少有 $10^6\sim 10^7$ /mL 病毒量時才易檢出，靈敏度不高，以至於致病量低的諾瓦克病毒性感染之檢出率低，易造成偽陰性；目前已有多家廠商發展出 EIA 快速檢驗試劑，靈敏度約在 $10^4\sim 10^6$ /mL 糞便檢體量，但由於此病毒基因及抗原變異性大 (7)，因此試劑的專一性檢出率並不理想。目前，多使用 RT-PCR 方式 (8)，靈敏度可達 10^{1-3} /g 糞便檢體，惟諾瓦克病毒之基因變異性較高，需要建立多組核酸引子對同時檢測，才能提高檢測之準確性。

材料與方法

一、檢體處理

腹瀉病毒檢驗通常必須採用新鮮糞便檢體，以低溫保存從採件處運送至實驗室。此次醫院以病毒性肛門拭子採檢送驗，因僅有肉眼可見在拭子上有糞便顏色，無法取出依正確標準作業程序溶在 PBS 中，因此檢體病毒量可

能多少受影響，處理情形如下：將病毒性肛門拭子中糞便檢體與拭子內輸送培養液（約 1mL）混合均勻，以無菌吸管吸取至已滅菌之離心管中，於 4°C，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至 2 隻冷凍小管中，標示號碼及日期保存於 -70°C。

二、酵素免疫分析法

（一）諾瓦克病毒分析：

使用 γ -biopharm 生產的 RIDACSCREEN® Norwalk-like Virus 檢測 Norovirus。分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μ L 置於 RIDACSCREEN® Norwalk-like Virus 的微小孔(microwell)中，靜置在室溫中 1 小時後，用清洗液清洗 5 次，將微小孔中水分拍乾，再加入 100 μ L Enzyme conjugate 於室溫中靜置 30 分鐘反應後，再用清洗液清洗 5 次，拍乾微小孔中水分，之後加入 100 μ L Substrate 避光靜置 15 分鐘，再加 50 μ L 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 值(negative control 吸光值加上 0.15)，判定為陽性反應。

（二）輪狀病毒分析：

使用 γ -biopharm 生產的 RIDACSCREEN® Rotavirus 檢測，分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μ 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 μ 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 值(negative control 吸光值加上 0.15)，判定為陽性反應。

三、RNA的萃取

使用 QIAGEN 生產之 QIAmp Viral RNA kit 萃取純化 RNA。取處理過之糞便檢體上清液 140 μ L 加入 560 μ L Buffer AVL 室溫作用 10 分鐘，再加入 560 μ L 絕對酒精 vortexing 混合均勻，將上述全部混合液通過 QIAmp spin

column，將過濾後之混合液丟棄，取 column 以 Buffer AW 清洗兩次後，以 Buffer AVE 將 RNA 溶出。

四、RT-PCR反應標準模板之建立

由於諾瓦克病毒目前尚無法以細胞培養方式分離，因此至目前為止尚無法取得標準病毒株，為配合 RT-PCR 陽性對照組實驗需求，將 RT-PCR 反應對應基因區段以人工合成 oligomer，兩端酵素切點設計為 EcoR I 及 BamH I，以 T4 ligase 接到 pUC19 載體合成 03Q401CDC1 質體，再轉染至大腸桿菌 DH5α 勝任細胞中，大量繁殖後冷凍保存。

五、RT-PCR反應引子設計

(一) 諾瓦克病毒分析：

諾瓦克病毒基因變異性較大，在挑選引子對時必須考慮基因序列穩定性，因此選用病毒基因穩定性高的 RNA dependent RNA polymerase 區域及核蛋白 N 端區域。以 RNA dependent RNA polymerase 區域設計的引子 SR33、SR46、SR48、SR50 及 SR52（如表一），為配合病毒高變異性，並且找出各種基因型別之諾瓦克病毒，設計以 SR33 為 forward 引子，SR46、SR48、SR50 為 G1 之 Reverse 引子，SR52 為 G2 之 Reverse 引子，可以分別與 G1 或 G2 反應，得到反應產物 123bp（2）。另外，引子對 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434，是以 RNA dependent RNA polymerase 和核蛋白 N 端基因序列交界區間設計，此區為高穩度區間（如表一）（CDC design）。

(二) 輪狀病毒分析：

輪狀病毒之 VP6 為主要的內核結構性蛋白，為群專一性蛋白質，可將輪狀病毒區分成 A~E 共五群，其中 A、B、C 三群感染人類，而 A 群又是最常見之一，因此引子選用輪狀病毒 Group A VP6 基因片段，分別為 con1 及 con2（如表一），反應產物為 201bp（2）。

六、反轉錄聚合酵素連鎖反應RT-PCR

(一) 諾瓦克病毒分析：

1. SR/RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，分別作 G1（引子 SR33、SR48、SR50、SR52）及 G2（引子 SR33、SR46）反應，各引子最終反應濃度為 0.3 μ M，於 95 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘後，馬上將反應管置於冰上；再加入單管 RT-PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP、5U M-MuLV 反轉錄酵素（Reverse Transcriptase）、2.5U Taq DNA Polymerase、40U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol，反應總體積為 50 μ L。於 42 $^{\circ}$ C 60 分鐘作反轉錄作用，之後 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘，直接進行 PCR 40 循環：94 $^{\circ}$ C 1 分鐘，52 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，60 $^{\circ}$ C 2 分鐘，隨後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

2. Mon/RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，分別加入引子 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434 做反應，各引子最終反應濃度為 0.6 μ M，再加入 RT-PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP、5U M-MuLV 反轉錄酵素（Reverse Transcriptase）、2.5U Taq DNA Polymerase、40U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol，反應總體積為 50 μ L。於 42 $^{\circ}$ C 15 分鐘作反轉錄作用，隨後 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘，直接進行 PCR 40 循環：94 $^{\circ}$ C 30 秒，52 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，60 $^{\circ}$ C 30 秒，之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

諾瓦克病毒 RT-PCR 反應產物取 10 μ L 於以 1 \times Tris-acetate-EDTA（TAE）配置之 2 % SeaKem LE Agarose（BMA, BioWhittaker Molecular Application），以 100 伏特電泳跑膠，進行產物大小分析。

(二) 輪狀病毒分析：

取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入引子混合液於 97 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後，馬上將反應管置於冰上；再加入 RT-PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP、5U 反轉錄酵素（Reverse Transcriptase）、2.5U Taq DNA Polymerase、20U

RNase 抑制劑及緩衝溶液，反應總體積為 50 μ L，於 42 $^{\circ}$ C 反轉錄作用 30 分鐘。隨後取出反轉錄作用產物加入 PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP、反應引子 con1 及 con2 分別 0.4 μ M、5U Taq DNA Polymerase、20U RNase 抑制劑及緩衝溶液，於 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘後，進行 PCR 40 循環：94 $^{\circ}$ C 30 秒，42 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

反應產物取 10 μ L 於以 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2 % SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular Application)，以 100 伏特電泳跑膠，進行產物大小分析。

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 μ M 反應引子 SR33、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為 10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於 96 $^{\circ}$ C 作用 1 分鐘，之後反應條件為 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：為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 μ L 加入等體積的 ddH₂O、60 μ L 的絕對酒精、5 μ 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 μ 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 (DNA Autoseqencer) 進行核酸序列分析。

七、病毒基因分析比對

將定序後之鹼基序列與 NCBI 基因資料庫中已知之 Norovirus 序列進行比對分析，以確定其相關性。

結果與討論

病毒實驗室自二月二十四日收到北部某醫院一件以新感染症症候群監視通報系統之腹瀉症候群送驗之病毒性肛門拭子檢體，之後陸續再收到病患肛門拭子 36 件、糞便檢體 2 件，及工作人員肛門拭子 11 件、糞便檢體 1 件，工作人員家屬肛門拭子 1 件。據疫情調查顯示，自二月二十日起已有病患開始出現腹瀉等症狀，隨後個案數陸續增加，到二月二十三日個案發病高峰時，開始有工作人員及醫護人員出現類似症狀（如圖一）。臨床上，本次群聚案件的病患在短期內接連出現腹瀉、嘔吐的現象，潛伏期約 1~3 天，且無共同食物傳染源現象，因此，本實驗室推測很有可能為 **Norovirus** 或 **Rotavirus** 感染。

檢體經離心前處理後，分別以酵素免疫分析法檢測，及萃取 RNA 後進行 RT-PCR 及基因序列分析。感染人類的諾瓦克病毒有兩種基因型，分別為 G1 及 G2，本實驗引用之 SR33、SR46、SR48、SR50 及 SR52 引子，可以檢測諾瓦克病毒並且同時區分其基因型別，RT-PCR 產物大小皆為 123 bp，檢體反應結果如圖二 a，Lane N 為陰性對照組，Lane M 為 100bp DNA Ladder Marker (Violet, Taiwan)，Lane 1~5 為此次臨床檢體中部分 RT-PCR 產物電泳結果，Lane P 以合成之 03Q401CDC1 標準株為模板得到之陽性對照組；RT-PCR 結果顯示為 **Norovirus G1** 陽性。為確定 RT-PCR 產物確實為諾瓦克病毒，將反應產物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，確實為諾瓦克病毒 (**Norovirus**；以前稱之為 **Nowalk-like virus**)，基因位於 RNA dep polymerase 區域相同且基因序列相似度達 98 % (圖三)。此外，本實驗另外引用美國 CDC 提供之引子對 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434，作為 RT-PCR 平行試驗，引子設計是選擇以 RNA dependent RNA polymerase 和核蛋白 N 端基因序列交界區間設計，此區為諾瓦克病毒基因序列中高穩度區間；本次檢體反應結果如圖二 b，RT-PCR 反應產物為 213bp，Lane M 為 100bp DNA Ladder Marker (Violet, Taiwan)，Lane 1~6 為此次臨床檢體中部分 RT-PCR 產物電泳結果。

總受檢之病患共 36 人，醫護及工作人員共 11 人，工作人員家屬 1 人，分別以酵素免疫分析法（RIDACSCREEN® Norwalk-like Virus 檢測試劑）及 SR、Mon 兩組 RT-PCR 分析，全部結果列於表二，三種方法之總陽性率分別為 29.17%、89.5% 及 18.75%，陽性率差異頗大，分析原因可能如下：

1. 酵素免疫分析法選用外核蛋白片段製造單株抗體作為檢測檢體用，自 Katayama et al. 研究資料顯示 (9)，ORF2 為製造外核蛋白之基因片段，變異性相當大，可以反映出 Norovirus 之抗原變異程度。
2. SR 引子群設計原理在於符合各種可能之 Norovirus 病毒基因序列，並且在 RNA dependent polymerase 為病毒核酸序列中較穩度區。
3. Mon 引子設計在 ORF1-ORF2 接合處，屬高度穩定區間。
4. 酵素免疫分析試劑可能會因區域性病毒之差異而使陽性結果與 RT-PCR 不同。
5. SR/RT-PCR 與 Mon/RT-PCR 陽性率的差異推測可能是基因特性差異的影響，或因病毒量太少而 PCR 取樣模板量又很低，使得人為操作取樣之誤差所造成。另外檢體中，有 2 件為 Rotavirus 陽性，使用的酵素免疫分析試劑及 RT-PCR 分別針對 A 群 Rotavirus VP6 設計單株抗體及引子檢測。

發病案例中多數為呼吸治療病患，年齡層以 60 歲以上為主，尤其 70~80 歲約佔 35.4%，相關工作人員約佔 25%，相關病患及工作人員年齡層分布情形整理如表三。實驗結果顯示本次群聚突發事件感染原應該為 Norovirus，與病患臨床症狀的表現及潛伏期的推算也相符合。諾瓦克病毒致病病毒感染量相當低（可低至 10^2 病毒量），因此很容易在環境介面及人與人之間迅速散播，此次結果顯示院內感染的重要，此外，特別是料理食物的廚師或處理病患排泄物者，因此在人口密集之托嬰中心、看護中心等公共場所特別容易造成群聚性感染；依本次的案例，推測應為二月二十日腹瀉病患發病後，經由該院工作人員傳播至其他病患或醫護人員。因此以公共衛生角度來思考，在台灣，對於引起急性腸胃炎之病毒，尚未有完整的臨床流行病學分析研究資料，此次結果可以作為以後的參考，並可建立實驗室的檢驗模式，將來可

作流行病及防疫的參考，因此除加強民眾衛生宣導及醫護人員衛生教育外，亦可加強本土性相關研究。

誌 謝

感謝北區分局蔡玉芳協助提供檢體相關資料。

撰稿者：吳芳姿、王明琴、莫之欣、連怡佳、楊志元、陳豪勇

衛生署疾病管制局研究檢驗組

參考文獻

- 1、Allard A, Kajon A, Wadell G: Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Med Virol.* 1994; 44: 250-257.
- 2、Ando T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI: Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 64-71.
- 3、Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T, Glass RI: Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 1998; 178: 1571-1578.
- 4、Vinje J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* 1996; 174: 610-615.
- 5、Inouye S, Yamashita K, Yamadera S, Yoshikawa M, Kato N, Okabe N: Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. *J Infect Dis* 2000; 181: S270-274.
- 6、Xi JN, Graham DY, Wang KN, and Estes MK: Norwalk virus genome cloning

and characterization. *Science*. 1990; 250: 1580-1583.

- 7 · Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukei PM, Chiba S: Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol*. 1998; 36: 3160-3163.
- 8 · Wolfaardt M, Taylor MB, Booyesen HF, Engelbrecht L, Grabow WO, Jiang X: Incidence of human calicivirus and rotavirus infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J Med Virol*. 1997; 51: 290-296.
- 9 · Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, Kageyama T, Oka T, Hoshino FB, Fukushi S, Shinohara M, Uchida K, Suzuki Y, Gojobori T, Takeda N: Phylogenetic Analysis of the complete genome of 18 norwalk-like viruses. *Virol*. 2002; 299: 225-239.

表一、RT-PCR 引子對序列表

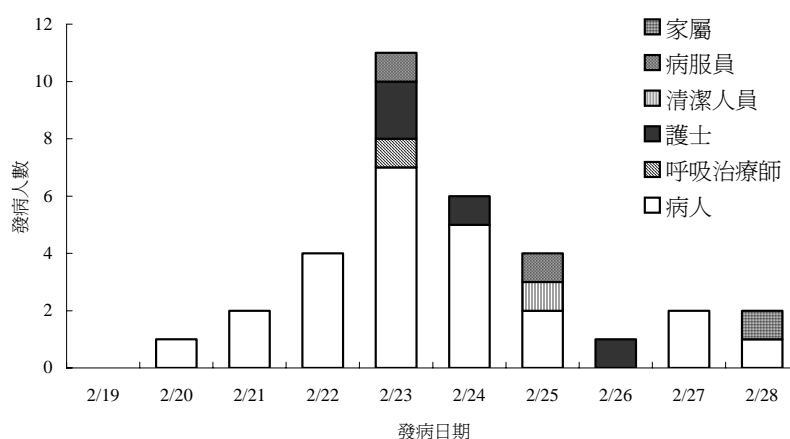
核酸引子	5'→3' 序列	Localization
<u>Norovirus</u>		
SR 33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	4856-4876
SR 46	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	4754-4773
SR 48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	4754-4773
SR 50	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	4754-4773
SR 52	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	4754-4773
Mon 431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	5093-5112
Mon 432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	5093-5112
Mon 433	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	5305-5285
Mon 434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	5305-5285
<u>Rotavirus</u>		
con 1	TTG CCA CCA ATT CAA AAT AC	666-685
con 2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	862-881

表二、檢體來源及 Norovirus 檢驗陽性率

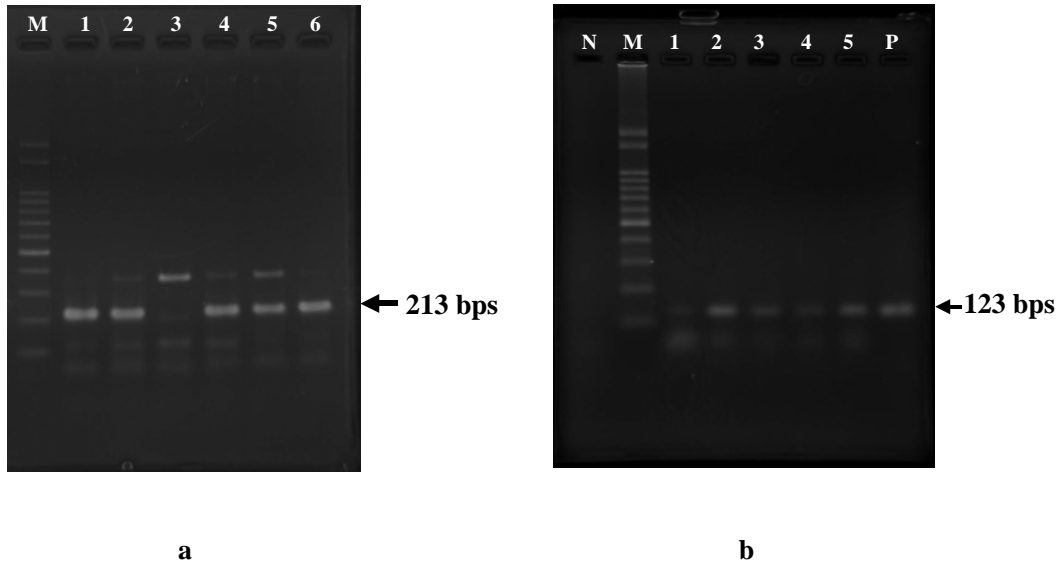
檢體身分	檢體數	陽性數 (百分比)		
		RT-PCR (SR)	RT-PCR (Mon)	RIDASCREEN
病患	36	34 (94.4)	6 (16.67)	13 (36.11)
醫護工作人員	11	8 (72.7)	3 (27.27)	1 (9.09)
工作人員家屬	1	1 (100)	0	0
總計	48	43 (89.5)	9 (18.75)	14 (29.17)

表三、呼吸治療病患及工作人員集體腹瀉、發燒及嘔吐症狀之年齡分布情形

年齡	性別	病患人數 (百分比)	工作人員人數 (百分比)	總計 (百分比)
60 以下	男性	2 (4.17)	0	2 (4.17)
	女性	1 (2.08)	11 (22.92)	12 (25.00)
60~70	男性	3 (6.25)	0	3 (6.25)
	女性	3 (6.25)	1 (2.08)	4 (8.33)
70~80	男性	10 (20.83)	0	10 (20.83)
	女性	7 (14.58)	0	7 (14.58)
80~90	男性	4 (8.33)	0	4 (8.33)
	女性	4 (8.33)	0	4 (8.33)
90 以上	男性	0	0	0
	女性	2 (4.17)	0	2 (4.17)



圖一、呼吸治療病患及工作人員集體腹瀉、發燒及嘔吐症狀之發病日期分布情形



圖二、 RT-PCR 反應結果

- a. SR/RT-PCR Norovirus G1 基因型 (primer : SR33、SR48、SR50、SR52) ; 產物為 123bps。Band 1~5 為病人檢體。
- b. Mon/RT-PCR Norovirus (primer : Mon431、Mon432、Mon433、Mon434) ; 產物為 213bps。Band 1~6 為病人檢體。

gi|8388810|dbj|AB044360.1 Norwalk-like virus gene for RNA polymerase, partial cds,
 Identities = 60/61 (98%)

```

Query: 12  ataagccagtagcctcagacaatgcacaaagggtgattatccagtgatttatgctgttca 71
          |||
Sbjct: 254 ataagccagtagcctcagacaatgcacaaagggtgattatccagtgatttatgctattca 195
Query: 72  c 72
          |
Sbjct: 194 c 194
  
```

圖三、定序後之序列送入 NCBI 做 Nucleotide-nucleotide BLAST 的結果