

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-114601

衛生福利部疾病管制署 105 年度科技研究發展計畫

新興及人畜共通腹瀉病毒實驗室診斷方法建置與監測

研究報告

執行機構：檢驗中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：劉紫祁

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 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

| | |
|-----------------------|----|
| 一、前言 | 6 |
| 二、材料與方法 | 13 |
| 三、結果 | 17 |
| 四、討論 | 20 |
| 五、結論與建議 | 23 |
| 六、計畫重要研究成果及具體建議 | 24 |
| 七、參考文獻 | 25 |
| 八、圖、表 | 30 |

中文摘要

關鍵詞：輪狀病毒、重組病毒株、傳播傳染途徑、流行病學調查

本署在 2009-2011 年執行我國腸道感染症即時監測分析與盛行率調查研究計畫中，瞭解我國小於五歲急性腸胃炎孩童感染病原主要以輪狀病毒與沙門氏菌為主；其中輪狀病毒感染占總收案之急性腸胃炎孩童比例為 22.6%，檢出之輪狀病毒株基因型別與疫苗株型別相同僅 77~84%，仍有 16~23% 為非疫苗涵蓋之基因型，其中也包括人-畜共同重組病毒株與新興演化病毒株。輪狀病毒疫苗於 2006 年底在台灣核准上市，在我國目前仍為自費性疫苗，估計至 2014 年服苗率僅接近 5 成左右，因此仍需持續監測病毒變化以了解疫苗保護效益。此外，監測研究亦發現我國孩童感染的病毒株，部分病毒基因與動物輪狀病毒株極為相近，或為人-動物重組病毒株感染，但由於我國長期研究中僅有孩童輪狀病毒相關監測與病毒株資料，缺乏動物輪狀病毒病毒株監測的相關訊息可以比對，因此無法明確了解感染該病毒株之孩童的可能感染源。

輪狀病毒具有 11 段雙股 RNA，其中 VP4 與 VP7 基因轉錄為病毒外套膜 G 和 P 蛋白，可以使感染宿主產生免疫性中和抗體，是病毒主要命名與分型的基礎；雖過去研究資料指出，輪狀病毒株感染宿主具有專一性，但從近期全病毒基因研究報告陸續提出，病毒其他基因片段有部分可能曾與動物病毒進行重組。與流行性感冒相似，輪狀病毒季主要發生於晚秋至初春較乾冷的季節，而在夏季時感染病例降低，這現象在溫帶與亞熱帶較高度發展國家比熱帶的發展中國家較為顯著。在之前對於我國就醫及住院的孩童的數篇研究也發現輪狀病毒感染在一年中溫度最低之後達到高峰，此趨勢也與歐美及其他亞熱帶地區相似。因台灣橫越北回歸線因而存在於多樣氣候帶，各地有可能受氣候影響因而有不同輪狀病毒季的趨勢。

本研究為了解國內孩童感染輪狀病毒的風險，研究目標設計建立檢測人與主要畜產動物之病毒檢驗分析方法，以監測病毒株在人及動物間之流行變化，未來將有助於衡量新病毒疫情與疫苗的保護效果，同時可以提供病毒在環境中分布與傳播的可能途徑探討；另外，近年氣候變化明顯加劇，過去研究顯示輪狀病毒的感染與地區及氣溫變化有關，本研究分析我國孩童輪狀病毒感染與近年氣候變化的相關性，將提供有效防制策略的制定。

英文摘要

keywords : Rotavirus, reassortant, transmission route, epidemiology

In the study of “Surveillance and Prevalence of Gastroenteritis in Taiwan” during 2009-2011, we monitored that the most prevalent infectious pathogens of hospitalized AGE children under 5 were rotavirus and salmonella. Rotavirus was responsible for an estimated 22.6% of all diarrhea-associated hospitalizations among children less than 5 years of age, causing substantial economic burden on many families. The data also indicated that only 77~84% rotavirus genotypes were similar to vaccine strain genotypes, with the remaining classified as uncommon, novel, or rotavirus of animal origin. Rotavirus vaccine was licensed by Taiwan-FDA in 2006. However, rotavirus vaccine presently is not required by the National Health Insurance program in Taiwan and is available for purchase only within the private sector. In 2014 it was estimated the vaccination rate was only approximately 50%, therefore rotavirus surveillance is key to monitor the protectiveness of the vaccines. Through surveillance studies, it was found that some rare strains found in children bore high similarity to those found in animals, or human-animal reassortants. However only human surveillance data was available for long-term rotavirus study in Taiwan, and the corresponding study in animals was lacking, with only recent years available, therefore the origin of these human-animal viruses are still unclear.

Rotaviruses are classified into an individual genus within the family Reoviridae. The genome consists of 11 segments of double stranded RNA. The outer layer proteins, VP4 (P) and VP7(G), induce neutralizing antibodies and segregate in a dependent manner.

The various G and P types tend to segregate according to species-specific patterns across the various animal species. However, a number of publications providing evidences that animals may act as a source of virus and/or of genetic material for diversification of human rotaviruses. These findings suggest rotaviruses to be handled as potential zoonotic pathogens and possible rise-up as a new important strain after vaccination era. Similar to influenza, rotavirus exhibits a distinct seasonality which peaks in drier and colder months from autumn to spring and decreases in summer. Developed countries in temperate and subtropical regions are more likely to show such seasonal patterns than developing countries in the tropics. Previous epidemiology studies in hospitalized children in Taiwan have shown that rotavirus season peaked in winter just after the coldest period of the year, not unlike of that found in temperate and subtropical countries. Despite its size, Taiwan straddles the Tropic of Cancer and contains a diversity of climate zones, therefore we speculate that there may be regional variations in rotavirus seasonality.

The present study is to understand the risks of domestic child infected with such viruses, virus research objectives designed to establish test methods to detect people with major livestock animals, in order to monitor changes in the virus strain, the future will help to measure the protective effect of the vaccine, while distribution of the virus and may provide ways to spread in the environment in order to provide the development of effective prevention and control strategies.

一、前言：

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題，大約有上百種疾病是透過食物為媒介所造成，包括細菌、病毒、寄生蟲、毒素及 prions 等。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 人發生食因性疾病，其中 325,000 人因此住院治療，並造成 5,000 人死亡；其中，由已知病原引起的疾病約 14,000,000 人（佔 18.42%），60,000 人（佔 18.46%）住院治療，1,800 人（佔 36%）死亡。輪狀病毒(rotavirus)和諾羅病毒(norovirus)在孩童感染急性腸胃炎上扮演很重要的角色[2, 3]。在輪狀病毒疫苗上市前，輪狀病毒是引起孩童急性腸胃住院就診的主要原因，約佔 40%~60%，其次為諾羅病毒約佔 3~31% [4-7]。目前，在許多有廣泛施打輪狀病毒疫苗的國家中，諾羅病毒則是主要造成孩童腸胃炎的病毒[8, 9]。

在 WHO 主導的全球監測計畫中，輪狀病毒在已開發中國家，是引發孩童急性腹瀉疾病的主要原因，主要感染年齡群為 5 歲以下的孩童，一旦受感染後，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，特別在醫療不發達的第三世界國家，孩童死亡率特別高。估計全世界 5 歲以下的孩童，每年因輪狀病毒感染住院的人數高達 2 百萬人次以上[10, 11]；亞洲地區輪狀病毒監測網開會資料顯示，亞洲國家在 5 歲以下孩童輪狀病毒感染就診率約 28% 至 59% 間[12]。比較輪狀病毒感染每年直接醫療支出，在台灣地區約 7-10 百萬美金（以 2001 年就醫紀錄估計），美國約 217 百萬元美金（以 1996 年資料估計）[13]，以 2001 年當年每個國家個人淨收入值（gross national income, GNI）平均後，每人對於輪狀病毒感染就醫支出，則台灣（1.92-2.72）與美國（2.19）間負擔相近似[14]。我國在本署與國衛院合作計畫「我國腸道病原體感染監測分析與盛行率調查整合型計劃」中，以

健保資料庫就醫資料推算 2000-2009 年間，我國 5 歲以下孩童歷年急性腸胃炎病程人次介於 82~123 萬之間，就醫花費分析估計每位孩童平均住院病程 4.9 天，直接成本與社會成本合計約 1.76 萬元，以此推估 2009 年之社會成本總額介於 2.4 至 3.3 億之間，就醫成本相當高。因此，世界衛生組織積極推動各國衛生單位重視輪狀病毒感染的問題，希望疫苗政策推動[10, 15, 16]，可以降低輪狀病毒感染後的疾病嚴重度、死亡率及醫療支出。

自 1990 年起至目前，全球仍有各藥廠與國家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，但很可惜在一年之後因發生服苗孩童出現腸套疊而下架。目前使用的輪狀病毒疫苗—由 GSK 及 MSD 公司生產，2006 年 GSK 及 MSD 分別對於該公司生產的輪狀病毒疫苗，分別對疫苗使用的安全性及疫苗保護效力之人體試驗結果資料發表相關論文[17, 18]，並通過 FDA 疫苗評估，於 2006 年在世界多國核准上市，2006 年 10 月於台灣也已取得核准證照，目前在台灣仍為自費性疫苗。GSK 為單價型 G1 型輪狀病毒疫苗，MSD 為 G1、G2、G3、G4、P8 五價型輪狀病毒疫苗，均採用口服的方式，分別為口服兩劑，或口服三劑。國外研究報告證實，嬰幼兒只需在出生後六個月內，完成服用疫苗，就能預防 90% 以上嚴重輪狀病毒腸胃炎，而且幾乎可以降低因輪狀病毒感染而住院的機會。

輪狀病毒屬呼腸孤病毒科(*Reoviridae*)，輪狀病毒屬，為雙股 RNA 病毒，具有 11 個基因片段，不具外蛋白套膜，病毒顆粒為二十面體構造，由 3 層蛋白質組成外殼又稱三層顆粒(triple-layered particle, TLP)。輪狀病毒血清型以 VP6 抗原分類，目前有 A 到 G 型七種血清型[19]。主要感染人類的輪狀病毒血清型為 A、B、C，其中 A 型輪狀病毒的血清型感染流行年齡層為小於 5 歲的小孩(約 100% 皆有抗體)，在世界皆有流行

病例，並有季節性流行趨勢，以糞口途徑傳染，其動物宿主也能是禽類與哺乳類，具有人畜共通傳染的證據；B 型輪狀病毒血清型流行主要為成人，流行於東亞和南亞地區，藉由水源傳播，動物宿主為豬、牛、羊、鼠，目前尚未有人畜共通傳染證據；C 型輪狀病毒血清型流行於各年齡層(60 歲流行率約 50-60%)，世界皆有流行病例，糞口傳染，動物宿主為豬、牛、狗，有人畜共通傳染的證據[20]。目前 A 型輪狀病毒之基因分型依據以 VP7 (glycoprotein, G) 和 VP4 (protease-sensitive protein, P) 抗原雙抗原方式命名區分，至今在全球已經至少有 27 種 G 基因型和 35 種基因 P 型在禽類和哺乳類中被發現[21]，根據基因分型與親緣性序列比對，可發現不同基因上之物種來源的差異。感染人類的病毒型別至少有 13 種 G 基因型及 16 種 P 基因型所組成的 70 種組合病毒[22]；雖全球多數區域主要流行輪狀病毒株以 G1P[8]、G2 P[4]、G3 P[8]、G4P[8]、G9 P[8] 及 G12 P[8] 為主[22]，但在特殊區域與國家(如非洲、東南亞國家等)的感染病毒型別差異大，其他特殊型別病毒則陸續出現於各國文獻報導中；由於輪狀病毒疫苗上市後，目前已有 77 個國家通過申請，疫苗所涵蓋的病毒株型別以主要流行病毒株為主，因此疫苗對於特殊病毒株保護情形特別受到重視。

台灣地區在 2004-2011 年間研究計畫監測顯示，主要流行病毒基因型為 G1P[8]、G2 P[4]、G3 P[8] 型，約佔所有陽性檢出個案的 77~84%，仍有 16~23% 檢出型別為非疫苗株，主要為 G9 P[8] 與其他新興或重組病毒株；以病毒核酸序列親緣性分析，發現感染重組病毒株包括 porcine-origin、canine-origin、bovine-origin 與 human-origin 重組的 G4、G5、G12 組合 P[6] 病毒，G3 與 P[25] 重組，G3 與 P[3] 重組、G3、G5、G9 組合 P[19] 病毒等[23-26]，這些病毒株感染的病童都出現較嚴重的急性腸胃炎臨床症狀，但由於缺乏個案的接觸環境史資料，我國過去也缺少本土動物輪狀病毒感染帶病毒狀況的相關資料，因此仍無法明確的推測病毒株的可能感染傳播方式與途徑。

A 型輪狀病毒是造成圈養牲畜腹瀉的主因，造成之腹瀉症狀在農業經濟上造成極大損失[20]，從動物研究資料中顯示，小牛在 4 周大時感染會有生命危險，牛隻感染也造成體重下降，其腹瀉症狀的糞便檢體中 47% 為輪狀病毒陽性[27]；豬隻感染導致腹瀉症狀，其腹瀉群聚有 70% 為 A 型輪狀病毒陽性[28]；亦是幼豬在 3 個月大前腹瀉的主因[29]。雖病毒感染具有宿主專一性，但不同宿主之輪狀病毒能感染人類與動物，其人畜共通傳染的證據也在許多文獻上被發現。1996 年美國報導，一個受感染的孟加拉嬰兒糞便中分離出牛-人的輪狀病毒重組變異株(Bovine-human reassortant strains)[30]；2000 年法國的研究，從曾經感染過輪狀病毒的 56 個小孩的家中採取飲用水樣本，56 個水樣本中檢測出 4 起輪狀病毒陽性案例，其中 3 起之基因來源為動物(豬或牛)，1 起基因來源為人類[31]。將人類致命的輪狀病毒株(Wa strain)接種至小豬，會造成腹瀉和病毒血症；然而，減毒的人類輪狀病毒株卻不會有症狀[32]。在新生老鼠的模型中，接種人類輪狀病毒株(HAL116strain)同樣也能感染造成病毒血症[33]。禽類的輪狀病毒被認為會傳給哺乳類動物，卻沒直接證據，2001 年日本的研究，鵪的輪狀病毒(PO-13 strain)會感染鼠類引起腹瀉症狀，但是火雞輪狀病毒(Ty-3 strain)卻不會有症狀，為第一篇禽類輪狀病毒感染哺乳類的報導[34]。

近年來發現一些罕見感染人類輪狀病毒基因型，藉由親緣性分析可發現跨物種的基因來源。2009 年匈牙利的研究中，感染輪狀病毒住院的小孩糞便中分離出一些不常見到的病毒株 P[9]G3、P[14]G6、P[14]G8，經分析發現與牛、豬、貓、馬和兔之輪狀病毒株有高度相似性[35]。2011 年比利時與義大利的研究中，同樣也是從住院小孩中分離出來的罕見病毒株 G3P[3]，發現與貓和狗的 A 型輪狀病毒之基因形成重組變異株[21]。保加利亞也發現罕見重組變異株 G5P[6]，為人-豬混合的輪狀病毒株[36]。在 2005-2010 年間，台灣孩童監測中也檢測到類似人-豬重組輪狀病毒株感染的病例，輪

狀病毒型別為 P[6]、P[19]基因型與 G3、G5、G9 重組的病毒[23, 26]。2012 年臺灣也發現狗-人的重組變異株 G3P[3]，為東亞地區首次發現輪狀病毒變異株之物種來源為狗的報導[25]。輪狀病毒 VP4 是主要構成 spike 蛋白質，負責病毒黏附細胞，及穿透細胞膜使病毒進入細胞的功能。VP4 可以被裂解為兩個次單元(subunit)，VP5*和 VP8*[37-39]。VP8*被認為是參與病毒黏附到宿主細胞的主要蛋白質，而 VP5*是幫助組成病毒顆粒雙殼構造，在病毒感染時於細胞表面的 spike protein VP8*會與宿主細胞 HBGAs 結合[40]。最近研究發現感染人類的輪狀病毒基因型中，P[4]、P[6]和 P[8]會辨識人類的 HBGAs；P[4]和 P[8]會辨識 Lewis b 和 H1-type 的抗原，而 P[6]只會辨識 H1-type 的抗原[40]；另外 P[9]、P[14]和 P[25]會辨識 A 抗原[41]，亦有其他的研究下，亦發現 P[14]的 VP8*會辨識 HBGAs[42]。這些研究數據皆顯示宿主的 HBGAs 型別，對於是否被哪一種輪狀病毒病毒株感染有很高的相關性，亦可能與某些特殊的輪狀病毒株引起人-動物輪狀病毒感染具有相關性。

在輪狀病毒尚未被發現前就已知在孩童中有冬季性腸胃炎(winter gastroenteritis)的現象[43, 44]。在 1990 年 Cook et al.的一篇早期綜合分析世界 23 個國家的 34 篇監測報告後發現此現象於歐美及北亞等溫帶地區最為顯著，以秋至春季為高峰期並在夏季大幅下降甚至達到零件案例，反觀越接近赤道的國家則此現象越不明顯，一年四季都有中高度輪狀病毒的發生率[44]。但在早年世界衛生組織(WHO)尚未訂定標準檢測法前檢測方法並不一致(電子顯微鏡、免疫分析法、核酸電泳法)，因此在 2002 年 WHO 訂定了針對在醫院及社區中的兒童之輪狀病毒監測手冊，而在 2013 年 Patel et al.整理了 99 篇符合 WHO 訂定的檢測方法之監測研究報告，相較於早期 Cook et al.的研究報告，較能反映全球輪狀病毒之實際流行分布狀況與病毒之深入性研究[15, 45]；相對於 1990 年 Cook et al.的分析，這篇較新的研究顯示溫帶和亞熱帶地區，輪狀病毒感染於冬季高峰期的現象

並不如以前認為的那麼顯著，反而在於一些熱帶地區也有季節性，且溫帶地區也有全年性的輪狀病毒流行現象，但綜合來看歐美及紐澳的流行季節性仍比亞洲、非洲及南美洲的明顯許多[45]。雖然氣候及緯度因素在眾多篇研究中已經被探討過，這篇分析提出國民收入可能是比氣候還適合的輪狀病毒季節性預測指數，不論是位於溫帶或熱帶區，在較高發展的國家裡有明顯的冬季流行並且大多數為單一種病毒株流行，但發展中國家幾乎全年度都有中高的感染率且感染病毒株種類也較多樣化[22, 45]。但因各監測地區位於不同的氣候帶及地理環境，尚有雨季或颱風等氣候現象，在不同地區的研究可能會有不相應的結果。例如在英國和荷蘭溫帶地區的研究發現溫度一旦高於攝氏 5 度後上升每一度會感染率降低 13% 的輪狀病毒感染率，而降雨量及濕度是沒有顯著的影響，相反的另一篇在孟加拉的研究卻發現氣溫在過了攝氏 29 度後每上升一度則感染率會增加 40.2% 而且低濕度及高河流水位也和感染率上升有關連[46, 47]。雨季和水量在熱帶地區對於輪狀病毒流行有著顯著的影響，在南亞季風(monsoon)和颱風等帶來的雨季造成河流暴漲及淹水也會影響衛生條件及散播水中傳染病，尤其是熱帶發展中地區較常見的人畜近距離生活及不良的廢水設施都是可能造成輪狀病毒人畜和人類互相傳播的原因[48]。如所羅門群島的首都霍尼亞拉在 2014 年熱帶型低氣壓引起的水災後造成散播至全國超過六千例的重大腹瀉事件，並在 38% 案例中發現輪狀病毒[49]。在一些跨越多種氣候帶的國家的研究也發現在不同氣候帶輪狀病毒對於氣候因素的反應也不一樣，如在澳洲處於常濕溫暖氣候帶的布列斯本的輪狀病毒流行季對於溫度和濕度有較強的反應[50]。台灣土地雖小，但因為地形及跨越北回歸線因素，氣候也富有多樣化。根據柯本氣候分類法台灣有四大類：北部及東部多為常濕溫暖氣候(Cf)、中部和屏東北部為冬乾溫暖氣候(Cw)、而北回歸線以南的台南、高雄、恆春為熱帶季風氣候(Am)和屏東南部則為熱帶乾濕季氣候(Aw)[51]。在民國 96 至 98 孩童腹瀉監測計畫中，從北中南三家醫院

輪狀病毒監測結果觀察到當時輪狀病毒感染有明顯的冬季輪狀病毒流行現象，並且在一年溫度最低的二個月之後(二至三月)達到高峰期，[52]。本研究以上述三年的資料為主初步分析，通常為十一月氣溫開始下降低於 23 度後輪狀病毒感染陽性率開始上升，而三月到四月時氣溫回暖至 20 度後病毒感染陽性率也隨之下降，可見在台灣輪狀病毒與氣候也是有關係[52]；而在台灣濕度和降雨量等其他氣候參數和輪狀病毒流行關係還尚待探討，和造成淹水或較重大災情的颱風也可能影響病毒的散播及傳染。

二、材料與方法：

一、配合腹瀉定點監測及動物定點監測網絡研究後之剩餘檢體。

二、檢測病毒抗原

輪狀病毒檢測：

將糞便檢體與PBS 以1:10 (w/v, v/v) 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，收集上清液分裝至冷凍小管中，標示號碼及日期，繼續酵素免疫分析。另一分裝一管糞便，貼上編號貼紙及日期，保存於4°C。酵素免疫分析法使用 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、病毒分子檢測

1. RNA 的萃取：

取處理過之檢體上清液140 μ L，利用QIAamp viral RNA mini Kit (Cat. No. 52906) 萃取病毒RNA，最後萃取出60 μ L RNA，並加入0.6 μ l RNaseOUT enzyme，置於-80°C待用。

2. 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)：

2.1 逆轉錄酶反應：5 μ l RNA加上1 μ l Random primer(3 μ g/ μ l)與7 μ l的水混合均勻，65°C反應5分鐘，接著放置冰上5分鐘。加入逆轉錄酶反應混合液(4 μ l 5X RT buffer, 2 μ l 10mM dNTP, 0.5 μ l RNase inhibitor(40U), 0.5 μ l Reverse Transcriptase(20U/ μ l))，總體積為20 μ l，25°C反應10分鐘，50°C反應45分鐘，85°C反應5分鐘在降溫至4°C待用。

2.2 聚合酶連鎖反應：

測試各檢測基因引子對設計，自基因資料庫搜尋各種病毒株序列設計調整。

(1) 輪狀病毒VP7基因(G type)：以逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l 9BEG(10 μ M), 0.5 μ l 9END(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C反應2分鐘之後進行40個循環：94°C反應45秒，42°C反應45秒，72°C反應90秒。接著72°C反應10分鐘，降溫至4°C。

(2) 輪狀病毒VP4基因(P type)：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l Con2(10 μ M), 0.5 μ l Con3(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C反應3分鐘之後進行40個循環：94°C反應30秒，50°C反應2分鐘，72°C反應1分鐘。接著72°C反應7分鐘，降溫至4°C。

(3) 輪狀病毒VP6基因：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l VP6F(10 μ M), 0.5 μ l VP6R(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為

25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C 反應3分鐘之後進行40個循環：94°C 反應45秒，55°C 反應45秒，72°C 反應2分鐘。接著72°C 反應10分鐘，降溫至4°C。

(4) 輪狀病毒NSP4基因：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l JRG30(10 μ M), 0.5 μ l JRG31(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C 反應3分鐘之後進行40個循環：94°C 反應45秒，50°C 反應45秒，72°C 反應1分鐘。接著72°C 反應10分鐘，降溫至4°C。

3. 序列分析與比對

3.1. 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(9con1或9con2)、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°C 作用1分鐘，之後反應條件為96°C 10秒、50°C 5秒、60°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°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。

3.2. 病毒基因庫分析比對：將定序後之核酸序列與NCBI基因資料庫或輪狀病毒

資料庫已知之基因序列進行比對分析，以確定病毒序列宿主來源相關性。

4. 整合檢體來源分析病毒株的流行區域分布：依病毒株型別與序列比對分析結果，整理相同/相似病毒株在各區域分布的狀態，定期回饋給網絡。並將醫院與動物監測檢出輪狀病毒株之檢體，進行採檢時間、地區分布比較，討論可能時序的相關性，並將從收案端問卷資料查尋發病前的動物接觸史，推測特殊病毒株及人-畜重組病毒株之宿主環境與感染途徑。

四、氣候變化與病毒流行相關性分析

以歷年腹瀉定點監測之資料，進行氣候相關性分析。向中央氣象局取得全台灣測站歷年氣象資料包括日平均氣溫、日平均相對濕度、日累積降水量、及一小時最大降水量等數據等。這些氣象資料再與歷年收案腹瀉定點監測之輪狀病毒陽性數和陽性率依時間(月/週/日)排序。以線性回歸等統計學和建立數學模型以判定各個氣象因素與輪狀病毒之關聯性分析。

三、結果:

為探討孩童輪狀病毒近期間的流行的變化，以及了解非疫苗涵蓋之特殊病毒株與動物病毒株分布的相關性，研究中回溯進行於 2014-2015 年間收案檢體之輪狀病毒基因定序與型別分析，同時繼續進行 2016 年檢體的收案；分年從台灣各區 8 家 (2014) 和 10 家 (2015-2016) 醫院中分別收集 1,009、1,435 及 993 件腹瀉孩童糞便剩餘檢體。2014、2015 及 2016 年輪狀病毒檢測陽性率分別為 8.1% (82/1,009)、9.9% (142/1,435)、10.5% (104/993)，2011~2016 年輪狀病毒監測在每年高峰期之陽性率與 2005~2011 年(35.1%~61%)比較有明顯降低的趨勢，年平均陽性率也從 12%~26.6%下降至 8.1~10.5% (圖一、表一)。分析歷年主要流行病毒株變化，2005-2014 年主要以 G1P8 為主流病毒 (58.5%)，在 2015 年 G1P8 病毒株陽性分率下降至 22.9%，而今年感染率非常低 (2%)；期間 G2P4 型病毒株從 1.2% 上升到 12%；G3P8 型別病毒株從 4.9% 上升至 54.3-75.5%，2015-2016 年並取代 G1P8 成為的主要感染型別病毒株(圖二)。此外，從孩童感染的病毒株監測中，在 2014~2016 年總共有 9 件屬於特殊型別輪狀病毒 (約占全部陽性的 2.7%)，其中 2 件疑似豬隻輪狀病毒來源的 G9 基因型 (G9P13、G9P19)(表二)。

在動物輪狀病毒監測中，回溯以在 2014 和 2015 年從全省各地區養豬場總共從小豬(小於一個月)、肥豬(六個月)及種豬(大於十二個月)不同年齡層收集了 2,430 件豬隻糞便檢體。各依縣市定義為北區(台北市、新北市、基隆市、宜蘭縣、桃園市、新竹縣/市、苗栗縣)、中區(台中市、彰化縣、雲林縣、南投縣)、南區(嘉義縣/市、台南市、高雄市、屏東縣)及東區(花蓮縣、台東縣)。利用酵素免疫分析初篩檢測輪狀病毒，陽性檢體再利用聚合酶鏈鎖反應與定序分析鑑定病毒基因型別。

2014~2015 年總陽性率為 6.5% (159), 其中檢出輪狀病毒型別共有 99 件 (62.2%), 以 G9P13、G9P19、G3P19 與 G5P13 為主要型別(圖三、表三); 這些輪狀病毒株型別與 2014~2015 年孩童檢體比較, 其中 G9P13 及 G9P19 在孩童中也有相同的病毒型別, 比較早期 2005~2011 年間曾經檢出之孩童輪狀病毒特殊型別, 總共在豬隻及急性腸胃炎孩童中檢測發現五種人畜(豬)共通的 G-P 型別組合病毒, 分別就各病毒株之 VP7(G)基因與 VP4(P)基因比對, 發現豬隻與孩童分離病毒株間基因相似性極高(表四)。因此, 我們希望透過孩童生活史問卷調查資料, 探討患者在發病前是否曾經至農場或曾經與豬有相關接觸史的活動, 但很可惜從這些孩童的問卷資料中, 並無法找到孩童在發病前並無與豬隻相關的接觸史, 僅部分孩童家中有飼養或接觸貓狗。另外, 以患病孩童之居住地和養豬場地點定位, 從地點分布可觀察到部分檢出相同基因型之患者居住地與養豬場地點位於相同縣市(如 G9 在高屏地區及 P13/P19 於屏東縣) (表五)。各豬隻病毒型別統計如圖三, 相對於北、東區, 中、南區病毒型別較多樣化; 而 G9P19 只有分布在南部, 和帶有 G9 和 P19 的患者居住地涵蓋相同範圍 (彰化、高屏)。研究中以 G9 的型別(G9P13、G9P19、G9P23)病毒株, 利用 NJ 及 ML 兩種演化樹方法分析從孩童及豬隻的人畜輪狀病毒 VP7(G)和 VP4(P)基因序列, 皆顯示每一種基因型至少都有一個人類的序列和豬隻的序列排在同一群組裡(圖四 A、B), 顯示病毒株間非常相近似。在 2016 年一月至十月共回收了 898 件豬隻糞便監測中剩餘檢體, 先初步利用酵素免疫分析檢測 74 件(8.2%)為輪狀病毒陽性, 而各陽性檢體之病毒型別再進行病毒之 VP7(G)和 VP4(P)基因序列確認。

關於氣候與輪狀病毒盛行率的關聯性, 以近十年的平均氣溫和輪狀病毒孩童監測之平均陽性率進行相關性分析, 在 2005~2011 與 2014~2016 年間, 輪狀病毒

感染高峰期總是發生於當年氣溫最低之後的一到二個月之後(圖五)。但和往年反常的，今年輪狀病毒感染季節有延遲的現象，病例數從三月才開始上升且在八、九月才達到高峰期(圖五 B)，此外監測醫院也發現今年主要發病孩童年齡比過去年紀大(輪狀病毒感染孩童通常主要以 2 歲以下孩童為主)，此異常的輪狀病毒流行現象，初步分析今年的氣溫變化和前幾年並無明顯差異；因此，分析近幾年輪狀病毒株的流行變化，自 2014 年以前均以 G1P8 為主要流行病毒株，但 2015 年起，2 個流行季間 G3P8 型別開始流行並在 2015~2016 年成為主流病毒，同時以病毒序列和各種病毒來源參考株演化分析的結果指出，這些 G3P8 幾乎都是屬於 2012 年才於澳洲和泰國發現的 DS1-like 亞型別之類豬源型新病毒株(圖六~九)。為了解該新病毒株在我國的流行開始，因此往前回溯病毒序列分析，結果顯示從 2013 年起，在我國孩童監測病毒中出現第一件 DS1-like 亞型別的 G3P8 病毒株，但在 2014 年有些微個案出現，並在 2015 和 2016 年病毒株數明顯上升，完全取代之前的 G3P8 亞型別也取代了 G1P8 病毒株成為 2015~2016 年的主要流行株(圖二、六、七)。由於新的型別 DS1-like 亞型別 G3P8 與疫苗株及從前流行的 G3P8 病毒株截然不同(圖八、九)，這有可能與 2016 年的輪狀病毒流行期延後以及和感染孩童年紀偏大以及出現較嚴重的病例有所關聯。

四、討論：

近三年自監測 5 歲以下腹瀉住院孩童的輪狀病毒流行趨勢，在流行病毒株以及流行月份均有著明顯的變化。首先，最盛行的病毒株從以往的 G1P8 被 G3P8 型取代(圖一)，並且該流行的 G3P8 病毒株，幾乎皆為世界近年多個國家新發現的非典型亞型別(圖六~九)。此新亞型別最大的特徵是除了 VP7 及 VP4(原 G3P8 及 G1P8 皆是典型的 Wa-like 株 如: G3-P8-I1-R1-C1-M1-A1-T1-E1-H1)以外的九段其他 backbone 基因都是類似一般在 G2P4 DS-1-like (G2-P4-I2-R2-C2-M2-A2-T2-E2-H1)病毒株中才有的；也就是這些新病毒株很有可能是由 Wa-like G3P8 和另一株 DS-1-like G2P4 兩個重組所產生而形成 G3-P8-I2-R2-C2-M2-A2-T2-E2-H2，但亦可能更複雜的重組過程。最早有 DS-1-like 和 Wa-like 重組的病毒株是於 2012 年三月在日本岡山發現的特殊 DS-1-like G1P8 株，並在同年六月已快速散佈至日本各地如關西、愛知和東北 [53-55]。在同年六月於菲律賓也發現第一件日本以外的同型別 DS-1-like G1P8 株(未出版，accession: KP007159~KP007169)，而後在 2013 年泰國和越南輪狀病毒監測也發現此病毒株，可見 DS-1-like G1P8 在亞洲已經快速蔓延開來[56, 57]。本次在台灣發現的 G3P8 型別的 VP7 首次在 2013 年於日本以 G3P4 的型別被偵測到，初步研判此 G3 是最接近一株印度的馬分離出的 G3Px 輪狀病毒而和其他 G3 都相差遠(圖八，上方 Ia 群組為台灣及世界各地的 DS-1-like G3，下方 III 群組為人類和疫苗株)[58]。由於這株印度的馬隻病毒相關資訊多數欠缺(年分和 VP4 皆不明)，目前這群新亞型別的 G3 演化關係還有待釐清。DS-1-like G3P8 株的形成推測可能是前述之 DS-1-like G1P8 和馬匹的輪狀病毒的兩種病毒株又重組而成，也就是所謂的三重重組病毒(triple-reassortant)，先由 DS-1-like G2P4 給予 Wa-like G1P8 後面九段 backbone 基因

形成 DS-1-like G1P8，再和馬的 G3Px 輪狀病毒重組最後變成 DS-1-like G3P8。顯然的這株新 G3P8 病毒在流行病上是成功的，因不僅在台灣造成流行，在泰國 (2013 年)、匈牙利和西班牙 (2015 年)、澳洲 (2013 年)和巴西 (2016 年)都已發現 DS-1-like G3P8 的蹤跡[59-63]。除了和印度馬的 G3Px 病毒株之 VP7 基因相近似以外，我國 G3 和其他動物的 VP7 基因親緣性相差甚遠，部分可能原因是我國在動物之輪狀病毒資料不齊全而無法比較，另從親緣分析亦發現我國 G3P8 病毒株和世界其他地區的 G3P8 具高相似度，因此推測目前台灣發現的 G3P8 可能從境外進入的機會較大。至於其餘九段基因則尚須再分析判定，以更了解在全球流行之其他 G3P8 病毒株的重組與演化過程。

新型 G3P8 病毒株在 2015~2016 年才造成較大流行，病毒株分析與疫苗株相差甚大，在 2015~2016 年相較往年遲緩的輪狀病毒高峰期 (通常:三月，2015: 四月，2016:八月)或許和新病毒株的出現有所關聯 (圖一、五)。如果參考文獻，單純以近十年每月平均氣溫的因素分析，每逢秋冬十一月當氣溫降至攝氏 23 度以下輪狀病毒率也隨之上升，反之三月氣溫回暖至攝氏 20 度以上時病毒率也開始下降 (圖十、虛線交叉處)。但去年雖冬天和今年夏天都創高低溫紀錄但平均氣溫曲線和從前並無大差 (圖五)，推測可能和許多其他因素有所關聯，例如溼度、降雨量以及間接被環境影響的生活習慣、衛生、飲食、作息等。如因今年夏天較熱而多數人待在室內有空調處，因此人和人之間的接觸增加因而可能提升感染輪狀病毒的風險等。與在最先 (2012 年)發現 DS-1-like G1P8 的日本輪狀病毒流行趨勢相較，2015 年雖然還是 G1P8 (40.8%) 和 G2P4 (34.3%) 為主流，但在 2016 年 G1P8 (1.3%) 和 G3P8 (1.5%) 都是算少數的，但不清楚病毒株是否也是 DS-1 like G3P8，反而 G2P4 病毒株陽性率偏高

(37.9%) (來源:日本國立感染症研究所

<http://www0.nih.go.jp/niid/idsc/iasr/Byogentai/Pdf/data63j.pdf>) ; 顯然日本的 DS-1 like G1P8 病毒株並未在日本國內發生再與 G3Px 病毒株重組的過程，與台灣 G3P8 DS-1 like 病毒株的重組或傳播途徑似乎不太相同，因此 G3P8 在鄰近的日本並沒有造成流行而取代的是 G2P4，而 G3P8 DS-like 新病毒株的流行，也似乎代表台灣的某些因素使這病毒株成為適合生存的環境。

從動物輪狀病毒監測與人類孩童輪狀病毒株監測兩個監測系統中，本研究中同時比較與分析中初步證實，自孩童監測到疑似動物重組病毒株與株之中的輪狀病毒株一致。5 歲以下腹瀉住院孩童在 2014~2016 年有兩件為疑似豬隻輪狀病毒的發現，分別為 G9P13 和 G9P19 型別，而在 2014~2015 動物監測這兩種型別也各發現 11 件 (表四)。基於人類和豬隻型別的相似度和農場及住家的相近地點，這些病毒由動物來源的可能性是非常高的 (表四、五)。雖然無法確認患者有無與農場動物直接接觸，但也有可能傳染過程透過其他媒介如用水、食物和其他動物從豬傳至人類，在經過多次人傳人的方式再傳給發病孩童，如最近越南調查湄公河三角洲流域的腹瀉患者及養豬場所發現的病毒多樣化和一件疑似豬傳人的病毒株[57]。以演化樹分析更進一步的確認了這些人類特殊型別和豬的病毒之關係，以 G9 來說台灣的人與豬病毒都是位於兩個群組的其中一個 (sublineage I, II)，代表兩種物種上的病毒都應來自於同一源頭 (圖四)。VP4 方面，和 VP7 看到的情形相同，在 P13 和 P19 型別人與豬均排在同一組裡 (圖五)。可見在台灣人畜共通輪狀病毒互相存在密切的關係。

五、結論與建議：

近兩年從孩童急性腸胃炎與腹瀉個案中偵測到新的重組 G3P8 型別病毒株，並成為主流病毒株在國內流行，本研究透過病毒基因片段分析與國際資料病毒株親源比對的方式，更明確指出病毒株與動物病毒間之多重重組發生的可能性，同時亦指出國際輪狀病毒之病毒株監測已逐漸用全基因分析的重要性，為我國疫情監測與疫苗評估需求亦應開始建立；未來應用於新型病毒株監測分析，加入全段定序以和國際上流行的比較。

另以臨床角度探討新型輪狀病毒之疾病負擔，顯示在病毒株之監測更加重要，尤其今年造成臨床症狀較為嚴重，也會增加對患者家屬和醫療的負擔。新型 G3P8 皆和其他舊的 G3P8 病毒株差異大，這也意味著現有疫苗對對於新病毒保護效果需要再確認與評估。動物的輪狀病毒監測提供在孩童端急性腸胃炎住院孩童發現特殊病毒的比較與佐證，未來將進行持續監測與病毒株分型。

六、計畫重要研究成果及具體建議：

本計畫結合我國腹瀉病毒監測與動物監測網絡，以建立我國輪狀病毒主要流行病毒株的流行趨勢與相關性，並深入分析主流病毒株演化及特殊型別的基因來源，可以了解病毒流行趨勢的變化與疫苗保護的狀態；長期監測病毒株的變化及活動性，可以提供，早期發現新病毒株或重組病毒株出現與分布狀態改變，並從二種監測中互相了解病毒的來源與傳播可能性。深入探討病毒株的來源與宿主之間的相關性，將有助於深入探討病毒於宿主間感染傳播的可能性。

七、参考文献：

1. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(5): p. 607-25.
2. Dennehy, P.H., *Rotavirus vaccines: an overview*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 198-208.
3. Glass, R.I., U.D. Parashar, and M.K. Estes, *Norovirus gastroenteritis*. N Engl J Med, 2009. **361**(18): p. 1776-85.
4. Patel, M.M., et al., *Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1224-31.
5. Kawai, K., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review*. Vaccine, 2012. **30**(7): p. 1244-54.
6. Ogilvie, I., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness*. Hum Vaccin, 2011. **7**(5): p. 523-33.
7. Khoury, H., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population*. BMC Infect Dis, 2011. **11**: p. 9.
8. Hemming, M., et al., *Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland*. Eur J Pediatr, 2013. **172**(6): p. 739-46.
9. Chen, S.Y., et al., *Severe viral gastroenteritis in children after suboptimal rotavirus immunization in Taiwan*. Pediatr Infect Dis J, 2013. **32**(12): p. 1335-9.
10. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
11. Miller, M.A. and L. McCann, *Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules*. Health Econ, 2000. **9**(1): p. 19-35.
12. Bresee, J., et al., *First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 988-95.
13. Tucker, A.W., et al., *Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States*. JAMA, 1998. **279**(17): p. 1371-6.
14. Di Giuseppe, G., et al., *Knowledge, attitude and practices of pediatricians regarding the prevention of oral diseases in Italy*. BMC Public Health, 2006. **6**: p. 176.
15. (WHO), W.H.O., *Generic protocols for (i) hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a community-based survey on utilization of health care services for gastroenteritis in children: field test version*, in Document WHO/V&B/02.15. 2002, WHO: Geneva. p. 1-67.

16. Bresee, J.S., et al., *Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines*. J Infect Dis, 2005. **192 Suppl 1**: p. S1-5.
17. Ruiz-Palacios, G.M., et al., *Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 11-22.
18. Vesikari, T., et al., *Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine*. N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 23-33.
19. Saif, L.J. and B. Jiang, *Nongroup A rotaviruses of humans and animals*. Curr Top Microbiol Immunol, 1994. **185**: p. 339-71.
20. Martella, V., et al., *Zoonotic aspects of rotaviruses*. Vet Microbiol, 2010. **140**(3-4): p. 246-55.
21. Matthijnssens, J., et al., *Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(6): p. 1396-406.
22. Banyai, K., et al., *Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs*. Vaccine, 2012. **30 Suppl 1**: p. A122-30.
23. Hwang, K.P., et al., *Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 7): p. 990-7.
24. Wu, F.T., et al., *Human infection with novel G3P[25] rotavirus strain in Taiwan*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1570-3.
25. Wu, F.T., et al., *Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2012. **12**(2): p. 170-3.
26. Wu, F.T., et al., *Diverse origin of P[19] rotaviruses in children with acute diarrhea in Taiwan: Detection of novel lineages of the G3, G5, and G9 VP7 genes*. J Med Virol, 2011. **83**(7): p. 1279-87.
27. Bendali, F., et al., *Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France*. Vet Res, 1999. **30**(1): p. 61-74.
28. Martella, V., et al., *Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis*. Vet Microbiol, 2007. **123**(1-3): p. 26-33.
29. Conner, M.E. and R.W. Darlington, *Rotavirus infection in foals*. Am J Vet Res, 1980. **41**(10): p. 1699-703.
30. Ward, R.L., et al., *Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotaviruses in coinfecting cells*. Arch Virol, 1996. **141**(3-4): p. 615-33.
31. Gratacap-Cavallier, B., et al., *Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(6): p. 2690-2.
32. Azevedo, M.S., et al., *Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in*

- gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5428-36.
33. Crawford, S.E., et al., *Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4820-32.
 34. Mori, Y., et al., *Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model*. Virology, 2001. **288**(1): p. 63-70.
 35. Banyai, K., et al., *Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary*. J Med Virol, 2009. **81**(2): p. 362-70.
 36. Mladenova, Z., et al., *Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria*. Infect Genet Evol, 2012. **12**(8): p. 1676-84.
 37. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. Virology, 1991. **181**(2): p. 553-63.
 38. Patton, J.T., J. Hua, and E.A. Mansell, *Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4848-55.
 39. Padilla-Noriega, L., et al., *Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3*. Virology, 1995. **206**(1): p. 148-54.
 40. Huang, P., et al., *Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 4833-43.
 41. Liu, Y., et al., *Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens*. J Virol, 2012. **86**(18): p. 9899-910.
 42. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
 43. Kapikian, A.Z., et al., *Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children*. N Engl J Med, 1976. **294**(18): p. 965-72.
 44. Cook, S.M., et al., *Global seasonality of rotavirus infections*. Bull World Health Organ, 1990. **68**(2): p. 171-7.
 45. Patel, M.M., et al., *Global seasonality of rotavirus disease*. Pediatr Infect Dis J, 2013. **32**(4): p. e134-47.
 46. Atchison, C.J., et al., *Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands*. Proc Biol Sci, 2010. **277**(1683): p. 933-42.
 47. Hashizume, M., et al., *Rotavirus infections and climate variability in Dhaka, Bangladesh: a time-series analysis*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(9): p. 1281-9.
 48. Levy, K., A.E. Hubbard, and J.N. Eisenberg, *Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis*. Int J Epidemiol, 2009. **38**(6): p.

- 1487-96.
49. Jones, F.K., et al., *Increased Rotavirus Prevalence in Diarrheal Outbreak Precipitated by Localized Flooding, Solomon Islands, 2014*. *Emerg Infect Dis*, 2016. **22**(5): p. 875-9.
 50. D'Souza, R.M., G. Hall, and N.G. Becker, *Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age*. *Epidemiol Infect*, 2008. **136**(1): p. 56-64.
 51. Kottek, M., et al., *World map of the Koppen-Geiger climate classification updated*. *Meteorologische Zeitschrift*, 2006. **15**(3): p. 259-263.
 52. Wu, F.T., et al., *Hospital-based surveillance and molecular epidemiology of rotavirus infection in Taiwan, 2005-2007*. *Vaccine*, 2009. **27 Suppl 5**: p. F50-4.
 53. Kuzuya, M., et al., *Prevalence and molecular characterization of G1P[8] human rotaviruses possessing DS-1-like VP6, NSP4, and NSP5/6 in Japan*. *J Med Virol*, 2014. **86**(6): p. 1056-64.
 54. Fujii, Y., et al., *Spread and predominance in Japan of novel G1P[8] double-reassortant rotavirus strains possessing a DS-1-like genotype constellation typical of G2P[4] strains*. *Infect Genet Evol*, 2014. **28**: p. 426-33.
 55. Yamamoto, S.P., et al., *Gastroenteritis outbreaks caused by a DS-1-like G1P[8] rotavirus strain, Japan, 2012-2013*. *Emerg Infect Dis*, 2014. **20**(6): p. 1030-3.
 56. Komoto, S., et al., *Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0141739.
 57. Phan, M.V.T., et al., *Unbiased whole-genome deep sequencing of human and porcine stool samples reveals circulation of multiple groups of rotaviruses and a putative zoonotic infection*. *bioRxiv*, 2016. **058875**.
 58. Malasao, R., et al., *Human G3P[4] rotavirus obtained in Japan, 2013, possibly emerged through a human-equine rotavirus reassortment event*. *Virus Genes*, 2015. **50**(1): p. 129-33.
 59. Cowley, D., et al., *Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children*. *J Gen Virol*, 2016. **97**(2): p. 403-10.
 60. Sylvia, F., et al., *Detection of a novel equine-like G3 Rotavirus associated with acute gastroenteritis in Brazil*. *Journal of General Virology*, 2016.
 61. Arana, A., et al., *Emergence and spread of G3P[8] rotaviruses possessing an equine-like VP7 and a DS-1-like genetic backbone in the Basque Country (North of Spain), 2015*. *Infect Genet Evol*, 2016. **44**: p. 137-44.
 62. Doro, R., et al., *Equine-like G3 rotavirus in Hungary, 2015 - Is it a novel*

intergenogroup reassortant pandemic strain? Acta Microbiol Immunol Hung, 2016. **63**(2): p. 243-55.

63. Komoto, S., et al., *Reassortment of Human and Animal Rotavirus Gene Segments in Emerging DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148416.

八、圖表

表一：2005~2016年10月間醫院監測 5歲以下孩童急性腸胃炎收件及輪狀病毒及檢出率

| Case | | | | | | | | | | | |
|------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------------|-----------|------------|-----------------|
| | 2005 (3家) | 2006 (3家) | 2007 (3家) | 2008 (3家) | 2009 (3家) | 2010 (3家) | 2011 (3家) | 2013(林口only) | 2014 (8家) | 2015 (10家) | 2016 1-10 (10家) |
| 收件數 | 974 | 2415 | 1848 | 1515 | 1003 | 956 | 855 | 199 | 1009 | 1435 | 993 |
| RV% | 21.9% | 22.5% | 26.7% | 19.6% | 16.4% | 16.2% | 20.0% | 22.6% | 8.1% | 9.8% | 10.5% |

表二：2005~2016年10月5歲以下孩童醫院監測輪狀病毒株之陽性分率

| | | 2014 | | 2015 | | 2016 (Oct) | |
|-------------|-----------|------|-------|------|-------|------------|-------|
| | | # | % | # | % | # | % |
| | 收件數 -> | 1009 | | 1435 | | 993 | |
| 常見型別 | G1P8 | 50 | 61.0% | 32 | 22.4% | 2 | 1.9% |
| | G2P4 | 1 | 1.2% | 21 | 14.7% | 11 | 10.6% |
| | G3P8 | 4 | 4.9% | 76 | 53.1% | 76 | 73.1% |
| | G9P8 | 24 | 29.3% | 8 | 5.6% | 10 | 9.6% |
| 特殊型別 | G2P8 | | | | | 1 | 1.0% |
| | G8P4 | | | 1 | 0.7% | | |
| | G8P8 | 2 | 2.4% | 3 | 2.1% | | |
| | G9P13 | | 0.0% | 1 | 0.7% | | |
| | G9P19 | 1 | 1.2% | | | | |
| Non-typable | G3Px | | | | | 3 | 2.9% |
| | GxP8 | | | | | 1 | 1.0% |
| | Total RV+ | 82 | 8.13% | 142 | 9.90% | 104 | 10.5% |

表三：2014~2015年全國牧場豬隻輪狀病毒監測病毒株型別統計

| 2014~2015常見豬隻輪狀病毒型別 | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 牧場地點 | G3P19 | G9P13 | G5P13 | G9P19 | G9P6 | G3P13 | G9P23 |
| 北區 | | 6 | 8 | | | | 4 |
| 中區 | 6 | 1 | | | 1 | | 2 |
| 南區 | | 3 | 1 | 11 | | 1 | 1 |
| 東區 | 2 | 1 | | | | 1 | |
| Total | 8 | 11 | 9 | 11 | 1 | 2 | 7 |
| 2014~2015非常見豬隻輪狀病毒型別 | | | | | | | |
| 牧場地點 | G4P6 | G2P13 | G2P27 | G4P19 | G5P23 | G5P19 | G4P13 |
| 北區 | 1 | | | | | | |
| 中區 | 2 | | 1 | 1 | | | |
| 南區 | | 1 | | 4 | 3 | | |
| 東區 | | | | | | 1 | 4 |
| Total | 3 | 1 | 1 | 5 | 3 | 1 | 4 |

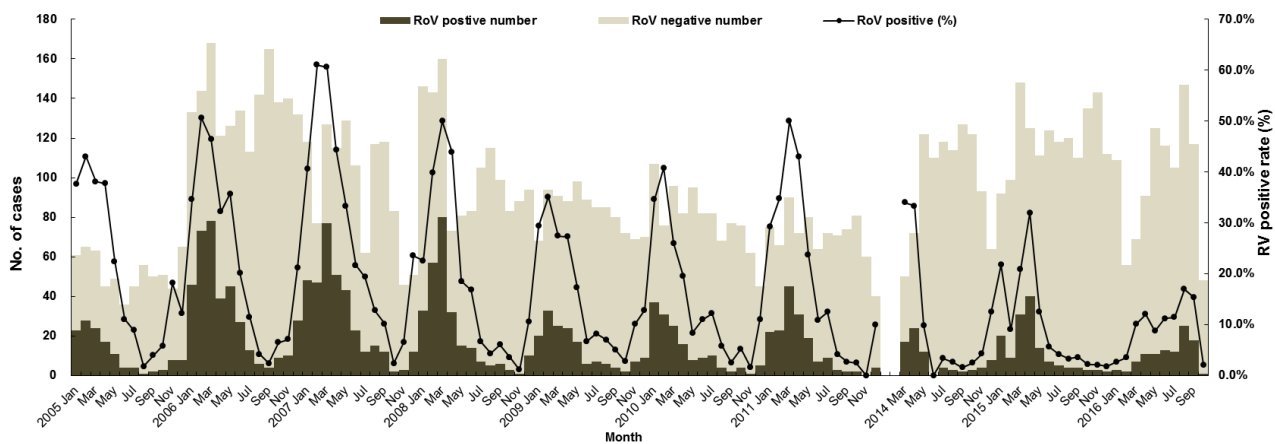
表四：孩童監測與株之監測之人畜共通輪狀病毒型別統計

| 人畜共通輪狀病毒型別 | G3P19 | G4P6 | G5P19 | G9P13 | G9P19 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 人類檢體 (2014-2015) | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 人類檢體 (2005-2011) | 3 | 2 | 1 | 0 | 2 |
| 豬隻檢體 (2014-2015) | 8 | 3 | 1 | 11 | 11 |
| 人類與豬隻G基因型相似度 (%) | 92~98 | 81~94 | 95 | 91~98 | 89~99 |
| 人類與豬隻P基因型相似度 (%) | 91~97 | 93~97 | 94 | 80~96 | 93~96 |

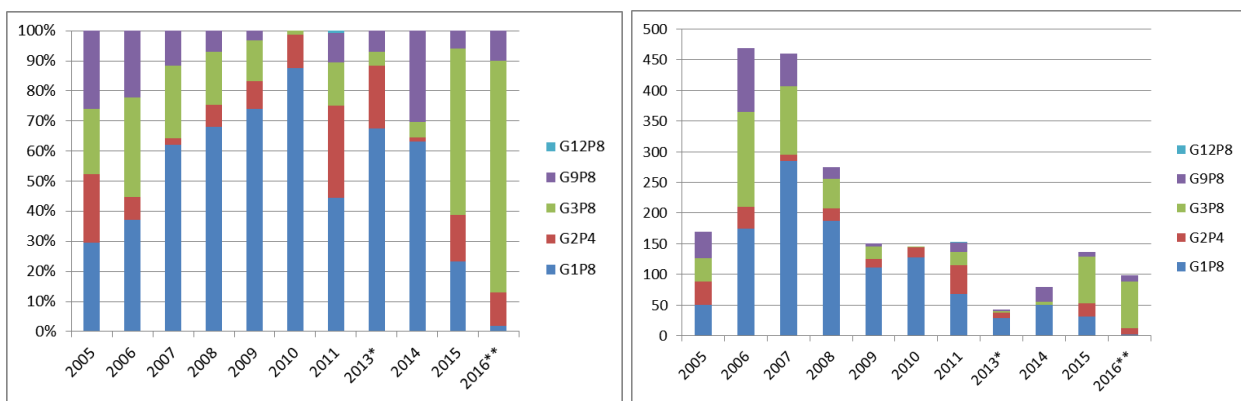
表五：人畜共通輪狀病毒依 VP7(G)及 VP4(P)基因型別統計病患居住地與養豬場分布

| G/P型別 | 患者居住地 | 養豬場所在地 |
|-------|-----------------|-------------------------------------|
| G3 | 桃園市、屏東縣 | 彰化縣、雲林縣、高雄市、台東縣 |
| G4 | 新北市 | 桃園市、雲林縣、嘉義縣、台東市 |
| G5 | 彰化縣 | 苗栗縣、桃園市、高雄市、屏東縣、台東縣 |
| G9 | 高雄市、屏東縣 | 苗栗縣、新北市、桃園市、雲林縣、南投縣、高雄市、屏東縣、嘉義縣、台東縣 |
| P6 | 新北市、屏東縣 | 桃園市、雲林縣、南投縣 |
| P13 | 屏東縣 | 苗栗縣、桃園市、南投縣、雲林縣、高雄市、台東縣、花蓮縣、屏東縣 |
| P19 | 桃園市、彰化縣、屏東縣、高雄市 | 雲林縣、嘉義縣、台東縣、屏東縣、彰化縣 |

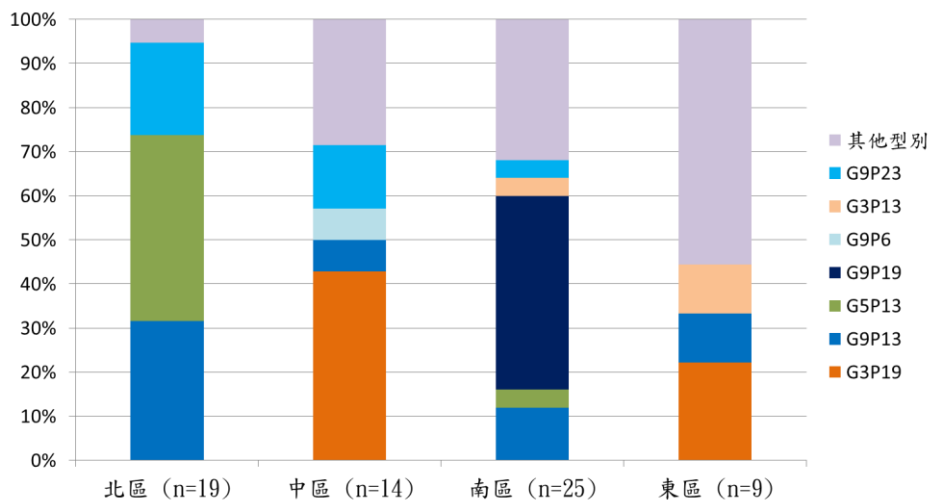
圖一：2005~2016年10月間，醫院監測5歲以下孩童急性腸胃炎之輪狀病毒感染趨勢



圖二：2005~2016年10月間 醫院監測 5歲以下孩童急性腸胃炎感染輪狀病毒株分布
左：百分比表示 右：檢體數表示



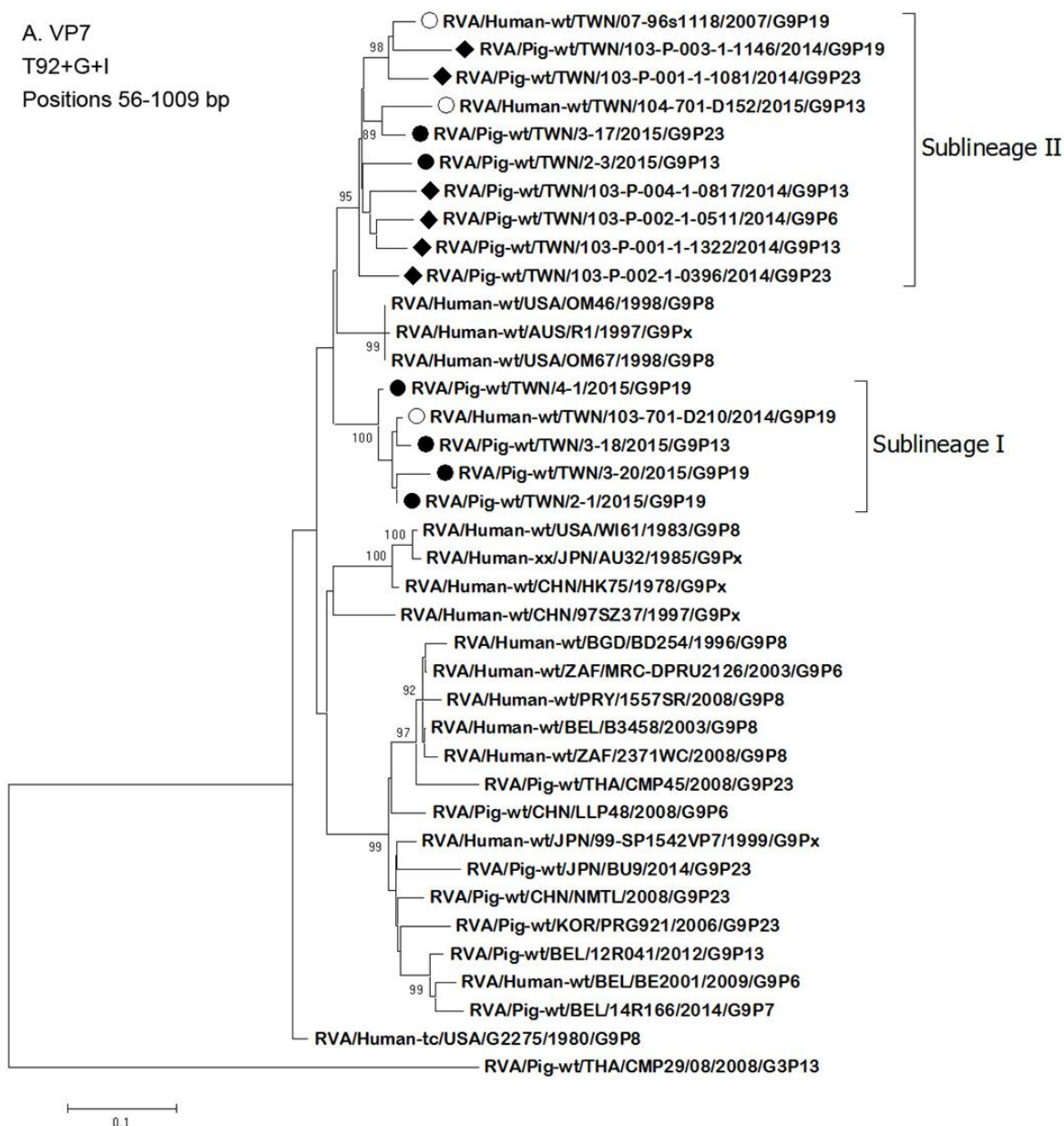
圖三：2014~2015 年全國牧場豬隻輪狀病毒監測病毒株型別與地區分布 (%)



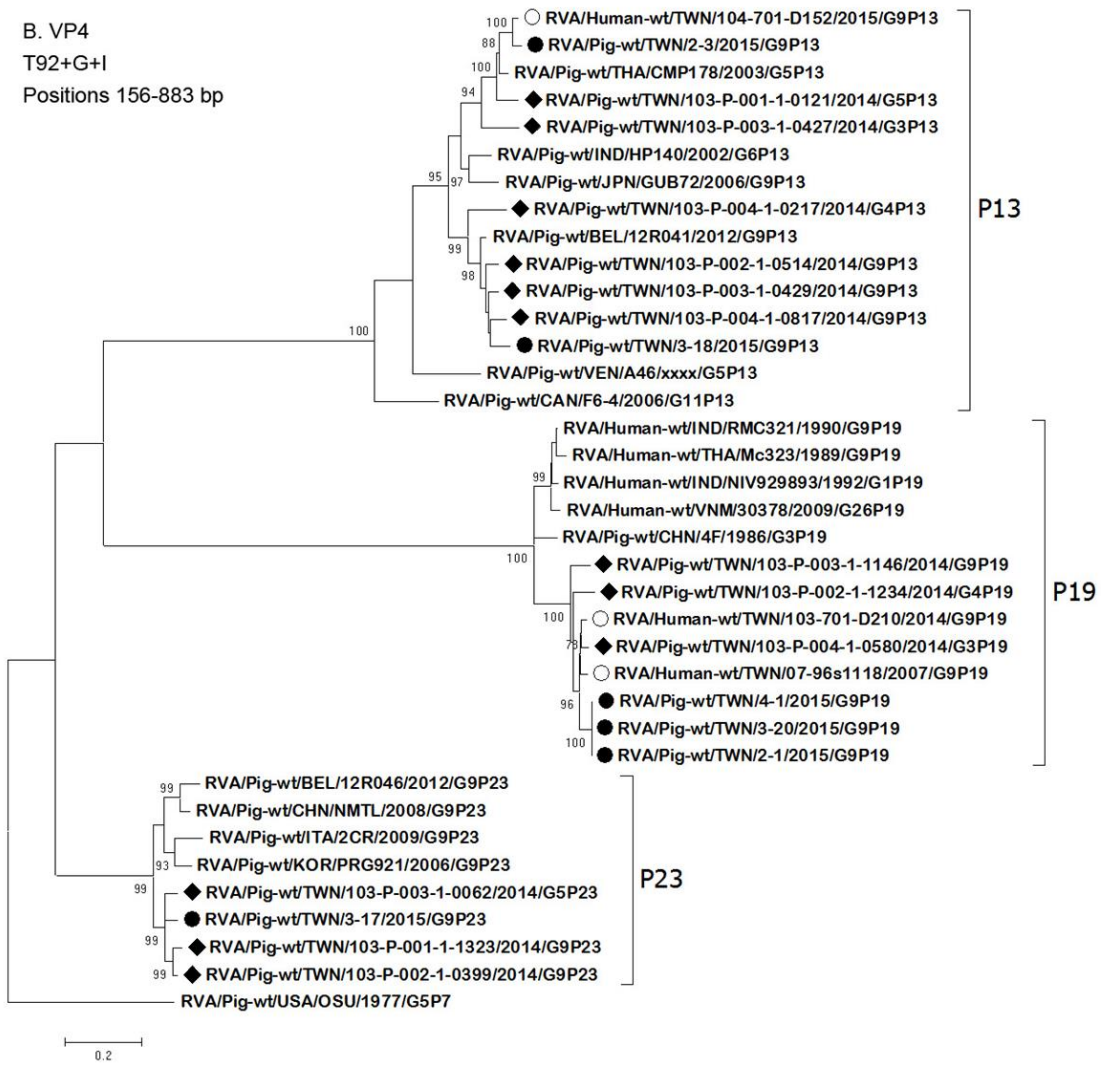
圖四、孩童與豬隻檢出之輪狀病毒 VP7 極 VP4 基因演化分析

A 圖: VP7(G9)基因演化樹； B 圖: VP4 (P13、P19、P23)基因演化樹

(圖示:白色圓形為人類檢體、黑色菱形為 2014 年豬隻檢體、黑色圓型為 2015 年豬隻檢體)

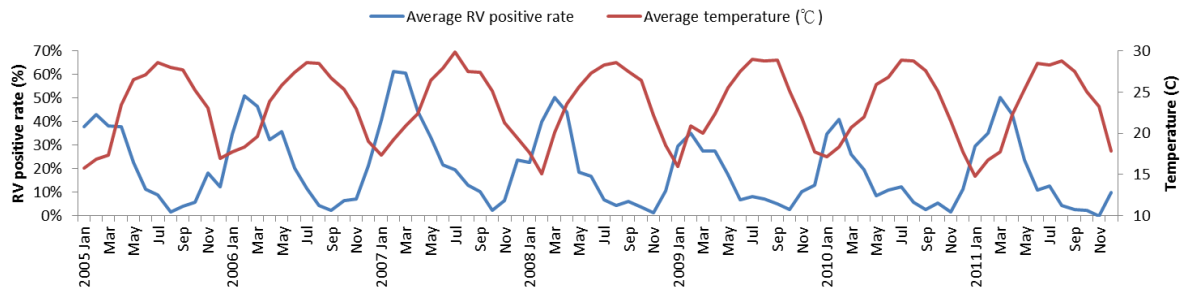


B. VP4
T92+G+l
Positions 156-883 bp

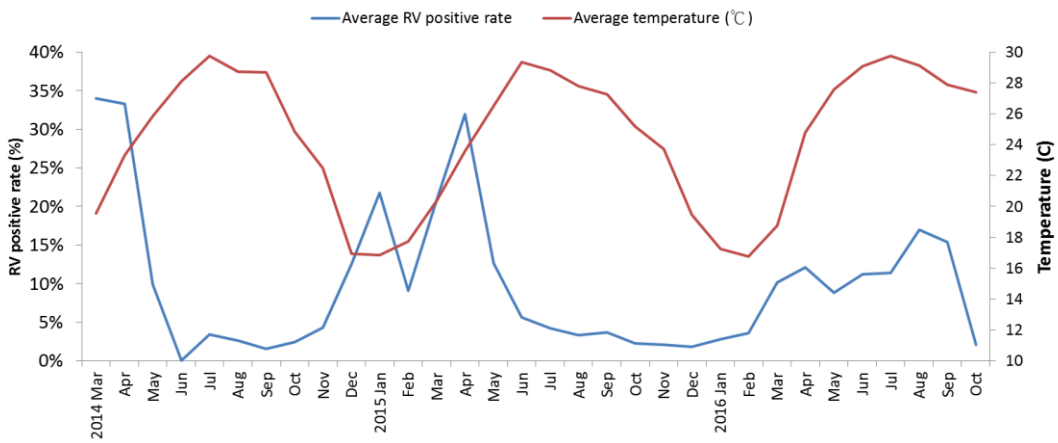


圖五：台灣平均氣溫和我國孩童急性腸胃炎輪狀病毒相關性分析
 (A 圖) 2005~2011 年及(B 圖) 2014-2016 年 10 月

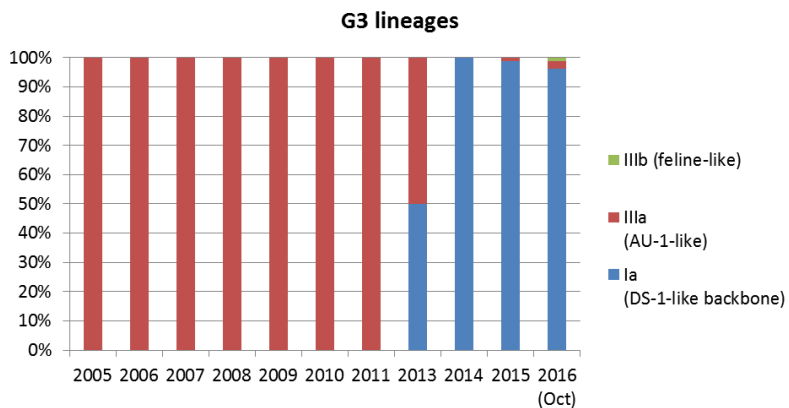
A



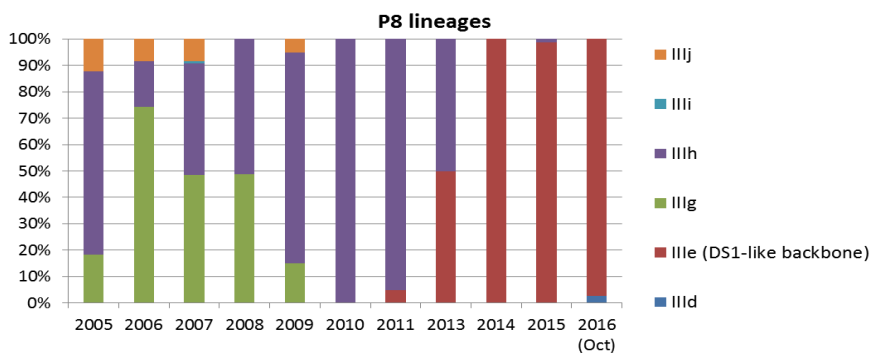
B



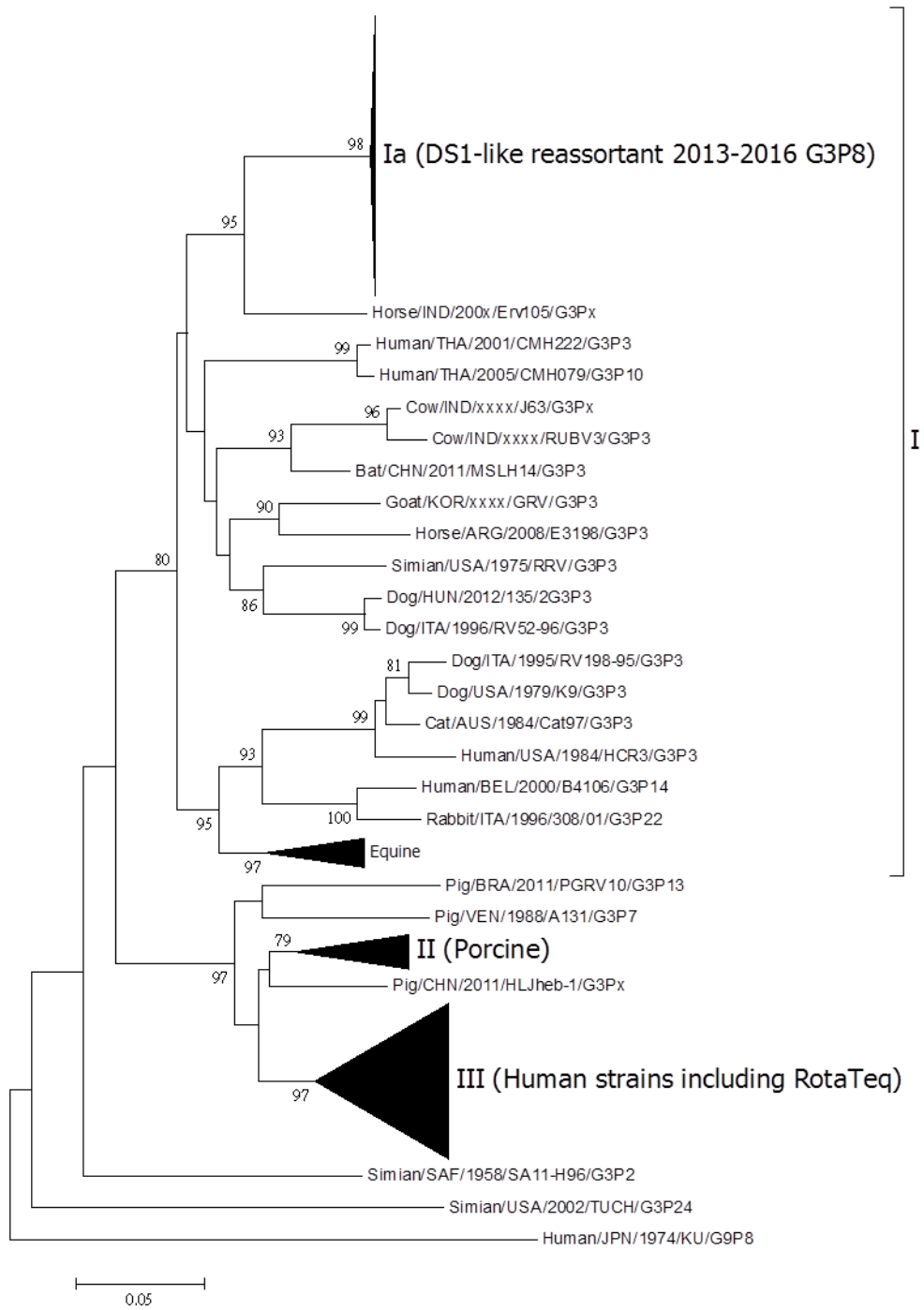
圖六： 我國孩童急性腸胃炎輪狀病毒 G3 亞型別分布



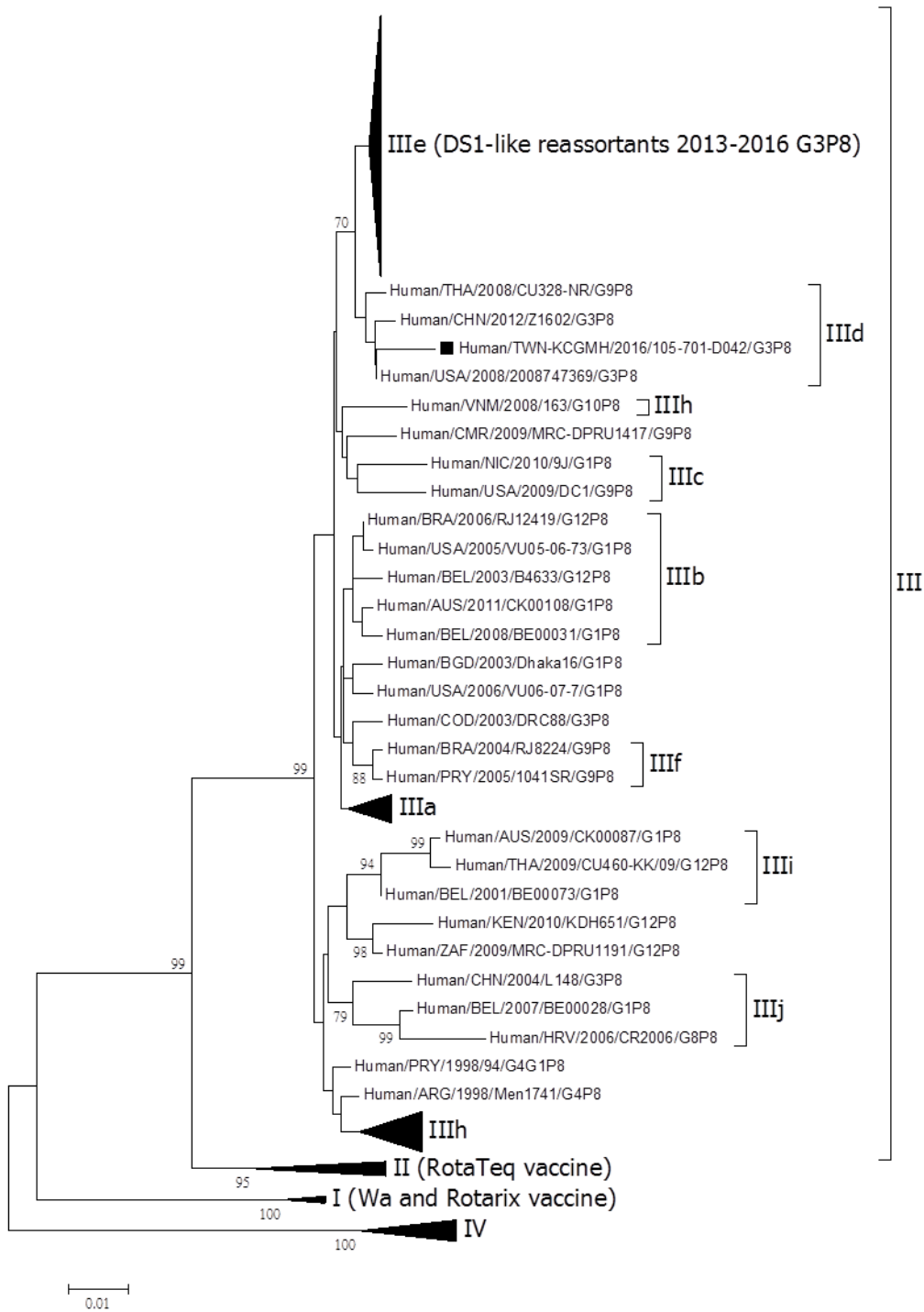
圖七： 我國孩童急性腸胃炎與豬之輪狀病毒 G3P8 之 P8 亞型別分布



圖八：我國孩童急性腸胃炎與豬之輪狀病毒 G3 型(VP7) 基因演化樹分析



圖九：我國孩童急性腸胃炎之輪狀病毒 P8 型(VP4) 基因演化樹分析演化樹



圖十: 2005~2015 年每月品均氣溫與孩童監測輪狀病毒陽性率相關分析圖

