

計畫編號：DOH94-DC-1007

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

## 腸胃炎病毒之分子流行病學研究

### 研究計畫總結報告

執行機構：國立台灣大學醫學院

計畫主持人：李君男

研究人員：黃琬婷

執行期間：93年1月1日至94年12月31日

\*\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見\*\*

## 目 錄

目錄 .....	i
中文摘要 .....	ii
英文摘要 .....	v
前言 .....	1
材料及方法 .....	8
結果 .....	14
討論 .....	21
結論與建議 .....	26
參考文獻 .....	29
圖、表 .....	33

## 摘 要

病毒是引起人類急性腸胃炎的一類主要病原，台灣地區病毒性急性腸胃炎造成經濟上的損失甚鉅，而輪狀病毒、腸腺病毒、杯狀病毒、星狀病毒等，分別所佔有的角色或重要性並不清楚，它們在不同地區流行之狀況亦不清楚，極有待加強研究。先進國家正在發展輪狀病毒的疫苗，未來這樣的疫苗是否符合我們的需求，亦必須充分掌握本地輪狀病毒的流行狀況與未來發展的趨勢，以做為訂定醫療保健相關之衛生政策之依據。

為了解台灣地區造成急性腸胃炎感染之各種病毒在不同地區流行之狀況，收集不同地區大醫院檢驗科急性腸胃炎之糞便檢體，持續以酵素免疫試劑組進行檢測輪狀病毒，於各地區流行的狀況。在輪狀病毒方面，偵測為陽性之檢體並進行 RNA 電泳分析、以 RT-PCR 進行 G 與 P 血清(基因)型之鑑定。

2004 年 1 月至 10 月在台北及高雄地區急性腸胃炎之糞便檢體中分別有 17.8% 及 29.8% 為輪狀病毒陽性，台北地區輪狀病毒的感染以二月及三月最多，高雄地區則以一月至三月最多。2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間在台北地區急性腸胃炎之糞便檢體中輪狀病毒陽性率為 7.4%，各月份並無特別多之流行狀況，此與前一年之大幅度流行有明顯之不同。高雄地區在 2004 年 11 月至 2005 年 6 月期間輪狀病毒檢出率為 22.7%，1 至 3 月稍多。

年齡的分佈狀況南北地區類似，輪狀病毒感染在 2 歲以內者佔了近 5 成，5 歲以上小孩約佔了 15-20%。

G9 輪狀病毒在 2004 年在台北地區所造成的感染佔了近 4 成，在高雄則超過了 5 成。台北地區 G1-G3 血清型均不少，且 G1、G2 皆超過 2 成；高雄地區其他血清型皆低於 2 成。綜合兩地區有近 3% 是屬於混合兩種血清型之感染。在 2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間，台北地區以 G3 輪狀病毒較

多，佔了 35.6%，G2 次之，佔了 28.8%，G1 與 G9 也分別佔了 18.3% 與 17.3%。高雄地區則以 G2 最多，佔了近 6 成，G1 與 G3 分別佔了 15.8% 與 18.4%，G9 所佔比例低於 10%。屬於混合兩種血清型之感染很少，只有 1 個。大多數輪狀病毒具有正常之 G 與 P 基因型組合，僅有少數屬於不正常之組合，應是由基因重組產生的。

在 2002 年 3 月至 2003 年 2 月間 2445 個急性腸胃炎之糞便檢體中，台北地區 4.6% 為杯狀病毒陽性，其中諾若病毒 3.3%，沙波病毒 1.3%；高雄地區 8.9% 為杯狀病毒陽性，其中諾若病毒 8.3%，沙波病毒 0.6%。諾若病毒的感染以九至十二月較多，至於沙波病毒則零星分佈各月份。年齡之分佈以三歲以下的幼兒居多，約佔了 58%。分析諾若病毒之基因群，絕大多數屬於 GII，僅有兩個檢體含有 GI 諾若病毒。

至於冠狀病毒存在之狀況，並未發現 SARS 冠狀病毒，分析台大醫院 2002 年 1 月至 2003 年 2 月間共計 1320 個檢體，針對 229E 冠狀病毒之 RT-PCR 檢測，僅有 18 個檢體呈現陽性反應，佔了 1.4%。陽性檢體集中於 1 至 4 月，其他月份多數未檢出。

在 2002 年 3 月至 2003 年 2 月間 2160 個急性腸胃炎之糞便檢體中，利用聚合酶連鎖反應偵測人類星狀病毒，台北地區 8.1% 為星狀病毒陽性，高雄地區則為 5.5%，兩地之陽性率無統計學上明顯差異。人類星狀病毒並無明顯的季節分佈。另外，台北地區輪狀病毒陽性及陰性檢體之星狀病毒陽性率相似，而高雄地區則兩者相差甚大，並無與輪狀病毒重複感染之現象。台灣地區人類星狀病毒的基因分型以第一型為主，有少數的第二、三、四、五、八型病毒存在。其中第八型的出現率較其他國家稍高。另外，第一型中以 1a 亞型為主。本研究中已成功培養出台灣地區之人類星狀病毒株，包括第一型之兩種亞型及第五型。

綜合此研究結果，各種病毒在急性腸胃炎之重要性不盡相同，輪狀病毒仍是最重要的，每年流行的狀況皆有變化，而且愈來愈複雜，亦發現重組病毒株，故仍應持續研究，以做為未來疫苗採用及發展之依據。

關鍵詞：急性腸胃炎、輪狀病毒、杯狀病毒、諾若病毒、沙波病毒、冠狀病毒、  
星狀病毒、分子流行病學

## ABSTRACT

The disease acute gastroenteritis causes a big economic loss every year. The etiologic agents related to this disease are rotavirus, enteric adenovirus, calicivirus, astrovirus, and probably coronavirus. It is still not clear what is the role of these gastroenteritis viruses in Taiwan.

Fecal samples were collected from clinical laboratories distributed in different parts of Taiwan. Rotaviruses were detected by ELISA. The samples detected as rotavirus positive were further analyzed the G and P genotypes by RT-PCR, and the electropherotypes by RNA polyacrylamide gel electrophoresis.

In the fecal samples from the patients with acute gastroenteritis in the period from January to October 2004, the rotavirus-positive detection rates in Taipei and Kaoshiung for rotavirus were 17.8% and 29.8%, respectively. Most of the positive samples were collected from January to March. In the period from November 2004 to October 2005, rotavirus-positive detection rates in Taipei and Kaoshiung for rotavirus were 7.4% and 22.7%, respectively. Approximately half of the cases were from children under age two, 15-20% from children over 5-year-old.

In the period from January to October 2004, G9 rotavirus was the most prevalent virus, it contributed about 40 % of the rotavirus infections in Taipei area, over 50% in Kaoshiung area. G1, G2, and G3 rotaviruses were detected in these regions. G1 and G2 rotaviruses each contributed more than 20% of the rotavirus infection in Taipei area. Taken together, mixed rotavirus infections were detected in about 3% of the samples. In the period from November 2004 to October 2005, G3 and G2 were the most prevalent types in Taipei and Kaoshiung, respectively. G9 contributed less than 20% of the infections.

Analysis of the G and P genotypes, and RNA electropherotypes of rotavirus samples showed that some rotaviruses had unusual combinations of G and P types or incompatible RNA electropherotypes. These rotaviruses could have been formed from genetic reassortment. We must pay attention to their

contribution in rotavirus epidemics in the future.

Caliciviruses were detected by RT-PCR. From the 2445 samples collected in one year period from 2002 to 2003, 4.6% and 8.9% of the samples from Taipei and Kaoshiung area were detected as calicivirus positive, respectively. The norovirus positive rate for Kaoshiung area was significantly higher than that for Taipei area. About 60% of these calicivirus positive samples were collected from children under age 3. The calicivirus positive samples were present in higher numbers from September to December in this study period. By sequence and phylogenetic analyses of RNA polymerase gene, these caliciviruses could be classified as Norwalk-like virus (NLV, Norovirus) and Saporo-like virus (SLV, Sapovirus). The number of NLV-positive samples was about four times that of SLV-positive samples. Of the NLV samples, majority belonged to genogroup II, only two belonged to genogroup I, and some were distantly related.

SARS coronavirus could not be detected in the samples collected before the SARS epidemic last year. However, coronavirus 229E-like viruses were detected in 1.4% of the samples, and most of the positive samples were collected from January to April, 2002.

Astrovirus was also detected by RT-PCR. From the 2160 samples collected in one year period from 2002 to 2003, 8.1% and 5.5% of the samples from Taipei and Kaoshiung area were detected as astrovirus positive, respectively. Astrovirus-positive detection rates between rotavirus-positive and rotavirus-negative samples were similar in Taipei area. However, no mixed infection detected in Kaoshiung area. Genotyping of astroviruses revealed that type 1 was most prevalent type, some strains with type 2, 3, 4, 5, and 8. Of the type 1 strains, more than 70% belonged to type 1a. We had successfully isolated type 1a and 1b, and type 5 astroviruses in CaCO<sub>2</sub> cell.

We need to keep the molecular epidemiology study of the viruses related to acute gastroenteritis for understanding the role of each viral agent and the changes from year to year. The information will be important for future selection

and development of vaccines for our needs.

Keywords: Acute gastroenteritis, rotavirus, calicivirus, norovirus, sapovirus,  
coronavirus, astrovirus, molecular epidemiology



## 前 言

病毒是引起人類急性腸胃炎的一類主要病原，其中一重要病原為輪狀病毒(Rotavirus) (1)，此外，40/41 型腺病毒(Adenovirus 40/41)、杯狀病毒(Calicivirus)、星狀病毒(Astrovirus)、冠狀病毒(Coronavirus)等亦佔有一定的角色。這些病毒共有一特性，即很難以一般的細胞培養方式將它們培養出來，故遲至 1973 年後才陸續由電子顯微鏡觀察中發現 (2, 3)。台灣地區病毒性急性腸胃炎造成經濟上的損失甚鉅，各種致病病毒所佔有的角色及其流行的狀況，仍然不十分清楚，有待加強研究。先進國家正在發展輪狀病毒的疫苗，未來這樣的疫苗是否符合我們的需求，亦必須充分掌握本地輪狀病毒的流行狀況與未來發展的趨勢，以做為訂定醫療保健相關之衛生政策之依據。

輪狀病毒屬於呼腸孤病毒科(Reoviridae)之一員，病毒粒子內含有十一個雙鏈核糖核酸(dsRNA)基因片段，外由蛋白質膜包圍著(4)。輪狀病毒的外蛋白質層(Outer capsid)主要含有 VP7 及少量的 VP4，VP7 和 VP4 均分別和輪狀病毒的中和抗體之產生有關(5-7)，一般所謂的血清型(serotype)特異性即是由此兩種蛋白質決定(8, 9)，由 VP7 決定者稱為 G 血清型，取其為 Glycoprotein 之意(4)。VP7 在大多數的輪狀病毒是由第 9 個基因片段生成，少數由第七或第八個基因片段而來(10, 11)。由 VP4 所決定之血清型稱為 P 血清型，取其為 Protease-sensitive 之意，VP4 是由第四個基因片段所生成(4, 10)。已知之 G 血清型有十四種之多，人類輪狀病毒的 G 血清型主要有四種，G1-G4，各型在不同地區之重要性不盡相同(12-17)，另外四種血清型，G8、G9、G10 及 G12 較少見(18-20)。但 G9 病毒已在歐洲、亞洲、非洲、南北美洲、澳洲等地區爆發流行(21-33)，美國 CDC 根據他們的研究預測此型病毒將在世界各地造成流行，目前已是五個重要

人類輪狀病毒之一(26)。P 血清型之鑑定較困難，單源抗體不完整，目前多以基因分析之方式進行分型，至少可分成 19 種基因型(34)。G 與 P 血清型兩者多以一定之組合存在，少數異常之組合亦時有報導。

輪狀病毒的內蛋白質層(Inner capsid)主要由 VP6 組成，VP6 是由第六個基因片段生成，是病毒粒子內含量最多之蛋白質 (1)，VP6 除了是最主要之結構蛋白質外，在結構上扮演十分重要的角色 (4)。VP6 蛋白質決定了輪狀病毒的群性(Group)及亞群性(Subgroup) (1)。以 VP6 之群性可將輪狀病毒分成 A, B, C, D, E, F, G 等七群，人類的輪狀病毒主要屬於 A 群。其他群之輪狀病毒多在動物發現，在少數地區發現 B 群及 C 群輪狀病毒亦會造成人類之感染(35, 36)。以血清流行病學(Seroepidemiology)的方式有些地區亦發現有非 A 群輪狀病毒之感染(35, 37, 38)。目前市售之診斷試劑組只能偵測到 A 群輪狀病毒，其他群之輪狀病毒則可藉由 RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction)或 RNA 電泳的方法來偵測(1)。A 群輪狀病毒依亞群之特性又可分為第一及第二亞群，分別具有第一亞群或第二亞群之 epitope。

輪狀病毒之十一個片段 RNA，以 SA11 為例，最小之片段僅有 667bp，最大之片段則有 3302bp(4)，在電泳膠片(Polyacrylamide gel)上，由十一個片段分佈之狀況或圖譜(電泳型)可以區分各個病毒之差異，又不同群之病毒有明顯的差異，因此 RNA 電泳圖譜分析有助於瞭解流行之狀況或病毒傳播之情形。不同之 RNA 電泳圖譜是經由不同之機制而產生的，此三種機制為點的突變(Point mutation)亦即 drift、基因重組(Genome reassortment)亦即 shift、基因重新置換(Genome rearrangement)，輪狀病毒之演化亦即經過此三種機制而來(4)。

小孩及嬰兒的急性腸胃炎常是由輪狀病毒引起的(2, 39, 40)，在

國外的報告中指出在小孩三歲以前，超過百分之八十感染過此病毒(41, 42)，通常之症狀是嚴重的下痢、發高燒、嘔吐及伴有脫水現象，重者必須住院，甚至導致死亡(6)，近年來更有報導指出輪狀病毒可能會引致神經性之症狀(7, 43-46)，常需住院治療，故輪狀病毒感染影響民生及經濟甚鉅，先進國家積極發展疫苗，期有效控制急性腸胃炎之發生。

為了解台灣地區輪狀病毒流行之狀況，本計畫主持人多年投注於輪狀病毒之研究(1981年至1989年間及1994年以來)，做過RNA電泳型、亞群性(47)、血清型及VP7基因分子演化等之分析。由早期之亞群性分析發現1981年至1985年間的輪狀病毒株以第二亞群較多，約是第一亞群的兩倍。第一亞群的輪狀病毒其RNA是屬於短的電泳型，即RNA第十、第十一片段跑得較慢，而第二亞群具有長的電泳型。亞群與血清型之間的關係，經常是G2血清型屬第一亞群，而G1、G3、G4等屬第二亞群。輪狀病毒之血清型鑑定過去多以中和試驗進行，如溶斑中和試驗及螢光點中和試驗，耗費時間且需要較大量之活病毒存在，故敏感度較低，血清型特異之單株抗體發展出來後，以之進行酶連免疫反應亦可正確鑑定血清型，惟約有三分之一的檢體無法鑑定，本實驗室比較RT-PCR與前述兩類方法，發現RT-PCR之方法可以精確的鑑定G血清型，且敏感度達90%(48, 49)。利用RT-PCR將台大醫院歷年來所搜集之檢體其所含輪狀病毒之血清型做一分析。結果顯示本地的輪狀病毒以G1血清型最多，G3、G2血清型次之，G4血清型很少，在2000年以前未曾發現G8、G9及G12等血清型存在。但在2001年本實驗室發現G9血清型病毒開始出現，至於是否會造成大流行，仍不得而知，有待陸續的監測。

本實驗室為瞭解台灣地區流行的輪狀病毒，曾分析部分輪狀病毒之VP7基因核酸序列而得以瞭解這些病毒與美國或日本流行之輪狀病

毒之關係遠近。近亦曾針對 1993 年流行之 G2 輪狀病毒，以 RNA 雜交法比較其與過去流行之輪狀病毒或國外流行之病毒之間的遺傳相關性，發現 1993 年流行之 G2 輪狀病毒有三個基因片段(一、六、七)與之前流行之 G2 病毒有顯著之差異，經分析核心蛋白質 VP1 基因之部分序列而確定此病毒應是經由基因重組而來(50)。產生基因重組的另一株 parent 病毒，不明其來源，是否可能來自動物之病毒仍不清楚。

在一些急性腸胃炎的糞便檢體中發現腸腺病毒(Enteric adenovirus)的存在，它們主要是 40 型與 41 型腺病毒，造成的症狀較少出現發高燒與脫水，但症狀持續的時間一般而言較輪狀病毒的感染為長(51)。腸腺病毒在孩童造成之感染大約是 2-26%之間(51, 52)，感染似乎與季節無關(51)，而輪狀病毒在溫帶地區則多是在冬季流行(1)。腸腺病毒屬於腺病毒科(Adenoviridae)，基因體由雙股 DNA 所組成(51)。有關腸腺病毒的偵測，早期是以電子顯微鏡觀察為主，但由型態上無法與呼吸道感染的腺病毒區分，自從單株抗體發展出來後，結合酵素免疫法可快速進行偵測(53)，故現一般實驗室多已採用此種商用試劑組。40 型與 41 型腺病毒可利用特殊的細胞如 293 細胞與 CaCo-2 細胞，進行分離培養(54, 55)，但多做為研究之用。分辨兩種型別可利用單株抗體進行酵素免疫試驗，或利用基因分型的方式進行。至於台灣地區腸腺病毒的流行狀況並不甚清楚，僅有的報告為台大醫院所做，在 1993 年七月至 1997 年十二月間，急性腸胃炎的檢測中，發現有 63 個小孩的感染與腸腺病毒有關，檢測率約為 2%，這些感染者的年齡約四分之三在兩歲以內(56)。

杯狀病毒屬於杯狀病毒科(Caliciviridae)，不具外套膜，基因體由單股正向的 RNA 所組成，與小 RNA 病毒(Picornaviruses)在基因上有相關性(51)。包括四個病毒屬，即 Norwalk-like viruses, Sapporo-like viruses, Vestivirus, 與 Lagovirus(57, 58)，人類杯

狀病毒主要與前二屬有關(51)。杯狀病毒的抗原性與遺傳性之差異很大(51, 59)，在 1970 年代與 1980 年代是由電子顯微鏡觀察而發現，在 1990 年 Norwalk virus 的基因體得以擇殖成功而定出完整的核酸序列，因而得以利用 RT-PCR 與核酸序列分析而發現更多的病毒，因病毒之間的抗原關係仍然不清楚，故病毒的名稱是以初次發現的地名而命名(51)。由種系分析目前已知之 Norwalk-like viruses，可分為兩個基因群 I 及 II，分別以 Norwalk virus 與 Snow Mountain virus 為代表，各基因群中又可再分為數種亞型(51)。Sapporo-like viruses 至少包括三種基因亞型，差異性可能更大(51)。杯狀病毒至今仍無法培養，偵測病毒可利用電子顯微鏡觀察，但敏感度較低，免疫電子顯微鏡法可增進其敏感度(60)。一般實驗室在缺乏抗血清的情況下，以 RT-PCR 較為實際可行，利用基因體較保守之部位設計引子對，是目前杯狀病毒檢測方法中最敏感者(61, 62)。目前已有實驗室以 Baculovirus 表現各種不同杯狀病毒的殼蛋白質，亦在尋找共同之抗原決定位(Common epitope)，表現的殼蛋白質除了可用以偵測抗體外，亦用以生產抗血清或單株抗體，繼而發展酵素免疫試驗以偵測檢體中之杯狀病毒抗原(63-65)。

杯狀病毒可造成各個年齡層之感染，由血清流行病學之研究發現，抗體盛行率在二至三歲時突然的升高，而在入學後與青年期又會有明顯的上升(51)。利用 RT-PCR 偵測病毒，在住院或門診的急性腸胃炎病人，約有 3-20%的糞便檢體為陽性反應。在北美的一些因食物或飲用水而爆發之急性腸胃炎，約有 50-60%由 Norwalk-like virus (Norovirus)引起 (51)，而在此種爆發之非細菌性之急性腸胃炎中，甚至有報告指出有 96%與 Norwalk-like virus 有關(66)。經常可見到遊輪或飛機上爆發群體感染的報導。杯狀病毒的感染終年皆可能發生，然而在冬季更常發生(51)。目前台灣地區尚未見到有關杯狀病

毒感染之報導，此應與技術上之困難度有關。

星狀病毒屬於星狀病毒科(Astroviridae)，不具外套膜，基因體由單股正向的 RNA 所組成。此病毒是在 1975 年由電子顯微鏡觀察小兒急性腸胃炎的糞便檢體中發現，因形態突出似星狀而命名(51)。星狀病毒依其抗原性可分為八型，報告中指出第一型佔了半數以上(67-69)。星狀病毒可生長於 CaCo-2, LLC-MK2, 與 PLC/PRF/5 等細胞，但必須添加 trypsin。偵測病毒現多以酵素免疫試驗或 RT-PCR 進行，酵素免疫試驗利用具有對抗共同抗原之單株抗體，敏感度較電子顯微鏡為高，但比 RT-PCR 為低。結合此單株抗體與各型之高度免疫抗血清，發展出以酵素免疫試驗來鑑定型別(70)。RT-PCR 操作上較繁複，不適合做為大量檢體之用。偵測病毒時，RT-PCR 所用之引子對是位於基因體 3' 端較保守之部位(71)；而在變異性較高之部位設計引子對，則可做為分型之用(72)。

星狀病毒的感染廣泛的發生於世界各地，發生率由 2%至 17%不等(51)。由抗體的測定顯示小孩在五歲時約有 60-90%感染過星狀病毒，感染多發生於兩歲以前，且常是無症狀的。因急性腸胃炎住院的病人中約有 3-5%與星狀病毒有關，星狀病毒感染中約有 25-50%是與院內感染有關，免疫缺乏的病人若是感染會持續較久，老年人的感染亦明顯的較高(51)。亦有報導因食物遭受星狀病毒的污染而爆發大規模的感染(73)。台灣地區星狀病毒感染的狀況未明，迄今尚未見相關的報導。

冠狀病毒屬於冠狀病毒科(Coronaviridae)，具外套膜，基因體由單股正向的 RNA 所組成。冠狀病毒依其抗原性可分為三群，其中感染人類的冠狀病毒 HCoV-229E 和 HCoV-OC43 分屬第一和第二群。1975 年第一次發現冠狀病毒與急性腸胃炎感染有關(74)，但目前的研究仍無法明確的建立冠狀病毒的病原學角色(75)。2003 年 3 月初，SARS 冠

狀病毒快速在人群中傳播引起高度關注，但是在此之前冠狀病毒在台灣의 流行情形並不清楚。

因台灣地區造成急性腸胃炎感染之各種病毒因子，分別所佔有的角色或重要性並不清楚，它們在不同地區流行之狀況亦不清楚。為解答這些問題，收集不同地區急性腸胃炎之糞便檢體，監測相關病毒於各地區流行的狀況。期望此研究的結果，有助於了解急性腸胃炎幾種較重要的病毒性因子流行的狀況，其中輪狀病毒流行變化的趨勢，可以做為未來採用疫苗的依據。

## 材 料 及 方 法

**收集檢體與資料：**檢體由台大醫院、高雄大學附設醫院等醫院檢驗科提供。

收集檢體之來源資料，諸如檢體採集日期、患者的姓名、病歷號碼、年齡、性別、發病日期等。此些基本資料並以電腦建檔。糞便檢體以 PBS 稀釋成 10% 的濃度，經低速離心 2000 g 20 分鐘以去除雜質，上清液置於 -70°C 保存。

### -- RNA 凝膠電泳分析 (Polyacrylamide gel electrophoresis):

#### 淬取輪狀病毒 RNA

取 1 ml 含有輪狀病毒之培養液加入 35%(w/v) 的硫酸銨混合均勻使其完全溶解後，使用 10000 g 於 4°C 離心 30 分鐘，倒掉上清液，加入 200  $\mu$ l TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)，再加入淬取溶液(0.02 M Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01 M MgCl<sub>2</sub>, 1% SDS, 2%(w/v) Ficoll)混合後，再以酚-氯仿淬取 2-3 次，上層液可做為 RNA 電泳用。做 RT-PCR 之 RNA 50  $\mu$ l 加 15 mg CF11 以去除 inhibitor(61)，並加入 2.5  $\mu$ l 5 M NaCl, 9.25  $\mu$ l 100% EtOH，振盪 10 秒後，於 4°C 旋轉混合 90 分鐘，接著離心，以含 EtOH 之 STE 清洗三次，再以 STE 將 RNA 游離出來，經 EtOH 沈澱後，加入 25  $\mu$ l TE。

#### 電泳

取適量淬取好的 RNA 溶液加入追蹤染料(5x tracking dye: 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 75 mM EDTA)，小心注入含 4% 積聚凝膠 (stacking gel) (4% Acrylamide, [Acrylamide: Bis=37.5:1], 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 7.5 mM EDTA, 0.1% TEMED, 0.2% Ammonium persulfate) 和 10% 分離凝膠 (Separating gel)(10% acrylamide, [acrylamide: bis=37.5:1], 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 7.5 mM EDTA, 0.05% TEMED, 0.125% Ammonium persulfate) 的每一



齒槽內，電泳槽內倒入電泳緩衝液(50 mM Tris-HCl, 0.384 M Glycine, 1 mM EDTA)，將整個電泳槽裝置架設妥當後，使用 EC570 的電源供應器，固定所使用的電流，若是只跑一片凝膠，則可設定為 32 mA 5 小時，跑兩片凝膠則設定為 65 mA 5 小時。

### 銀染色法

取出電泳完的膠片，先以 10% ethanol 和 0.5% acetic acid 之固定液進行固定作用(pre-stain fixation)，5 分鐘後，加入 0.2% silver nitrate 於 10% ethanol 和 0.5% acetic acid 的固定液中進行染色 5 分鐘，之後用水稍微清洗膠片，再加入 3% NaOH, 0.1% formaldehyde 進行呈色反應，待呈色完全後，加入固定液作用 5 分鐘，最後用水清洗，用玻璃紙封好膠片，以夾子固定在玻璃上。風乾後的膠片，即可做為保存之用。

### -- Caco-2 細胞與星狀病毒之培養

Caco-2 細胞株 (ATCC-HTB37) 培養液使用 sp1MEM，含 MEM/1.5 克碳酸氫鈉、非必需氨基酸、sodium pyruvate，另加入 20% 胎牛血清。人類星狀病毒的培養選擇為聚合酶連鎖反應陽性之檢體。將 10% 糞便懸浮液離心，取出上清液過濾，與含 Trypsin (10  $\mu$ g /ml) 之 sp1MEM (sp1MEM/T) 1:1 稀釋，加入已長有 90% Caco-2 細胞之培養瓶，37°C 作用 1.5 小時，加入 sp1MEM/T 補充體積，於 37°C 培養至第三天，細胞由於 Trypsin 的作用脫落，冰凍解凍三次，離心並移除細胞殘餘物，收集病毒上清液於 -80°C 保存。

### -- 以 RT/PCR 鑑定輪狀病毒 G 血清型與 P 基因型:

此方法十分敏感，特異性亦高。惟必須注意污染的問題，除了操作上必須特別小心外，試劑必須少量分裝，反應前後必須在不同的地方操作，每次反應必須同時做弱陽性檢體及陰性對照組。此方法分兩次增幅反應: 第一次增幅反應包括用反轉錄酶及 DNA 聚合酶。將淬取好

之輪狀病毒 dsRNA 加入 reaction buffer 內含 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, MgCl<sub>2</sub>, 200 mM 四種 dNTPs, 5 mM dithiothreitol, 3.5% dimethyl sulfoxide, RNase inhibitor (5 units), 100 pmole 兩種 primers。此混合物 97°C 加熱 5 min. 後, 馬上置於冰上, 加入 10 units of avian reverse transcriptase and 2.5 units of Taq enzyme, 再加上一滴 mineral oil。利用聚合酶連鎖反應器, 設定 42°C 一小時, 接下來 25 cycles: 94°C 1 min, 42°C 1 min, 72°C 2 min, 最後 72°C 10 min。第一次增幅反應產物是整個 VP7, 基因長度 1062bp。第二次增幅反應與第一次反應略同, 用 1  $\mu$ l 第一次反應產物, 加入 G1-G4、G8、G9 血清型特異性之 primers 混合在一起(48)。聚合酶連鎖反應器設定 25 cycles: 94°C 40 sec, 42°C 1min, 72°C 2 min, 最後亦是 72°C 10 min。PCR 反應產物取 10  $\mu$ l 在 1.2% agarose gel 上跑電泳, 經 EtBr 染色, 以紫外線照射, 如見 749 bp 的 band 即知是 G1 血清型, 由大小之不同而得知是何種 G 血清型。

以 RT-PCR 鑑定輪狀病毒 P 基因型的做法與 G 血清型之方法相似, 只是採用不同的 primers(74)。第一次增幅反應之反應產物為 887bp, 第二次增幅反應之反應產物之大小不一, 由之可分辨為何種 P 基因型。

## 檢測杯狀病毒

### -- 反轉錄反應

取 5  $\mu$ l 經 QIAamp viral RNA mini kit 純化的 RNA 與 25  $\mu$ M 隨機引子 (pd(N)6) 均勻混合, 覆以礦物油, 在 97°C 加熱變性 10 分鐘, 置於冰上冷卻 5 分鐘 1xSuper RT reaction buffer (25mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, HT Biotechnology), 0.2mM dNTP, 5.25 U Super RT (HT Biotechnology), 20U human placental ribonuclease inhibitor (HT Biotechnology), 置於聚合酶連鎖反應器中(Perkin Elmer, DNA

Thermal cycler 480)，反應條件為 42°C 90 分鐘，72°C 10 分鐘，產物置於-20°C 保存。

#### -- Calicivirus RNA polymerase 基因之聚合酶連鎖反應

以反轉錄反應所得之 cDNA 為模板使用針對 Calicivirus 的 ORF1 上的 RNA polymerase 所設計的引子 p290-1、p289-1，利用核酸聚合酶增幅這段基因。反應總體積為 50  $\mu$ l，包含 5  $\mu$ l cDNA，10 $\times$  Taq polymerase reaction buffer，0.2 mM dNTP，各 7.5 pmole 之 p290-1、p289-1 引子，1U Taq DNA polymerase，反應物混合均勻後覆以礦物油，置於聚合酶反應連鎖器中 (Perkin Elmer, DNA Thermal cycler 480)，反應條件為 94°C 3 分鐘變性，94°C 30 秒，49°C 1 分 20 秒，72°C 1 分鐘，重複 40 次，72°C 10 分鐘，最後保持在 4°C。

取 5  $\mu$ l 聚合酶連鎖反應之產物，以 1.5% 洋菜膠經 100 mV 30 分鐘電泳確認基因大小約在 319bp 與 331bp 之間。

#### 以 RT/PCR 檢測冠狀病毒：

以反轉錄反應所得之 cDNA 為模板，第一次 PCR 使用根據冠狀病毒參考病毒株 229E 之核蛋白質所設計的正向核酸引子 outer 229E-1，5' -GGT ACT CCT AAG CCT TCT CG-3'，反向核酸引子 outer 229E-2，5' -TGC ACT AGG GTT AAG AAG AGG-3'，反應溫度為 94°C 5 分鐘後 94°C 1 分鐘 60°C 1 分鐘 72°C 100 分鐘重複 35 次，72°C 10 分鐘 4°C 保存；第二次個正向核酸引子 inner 229E-3，5' -TTT GGA AGT GCT GGT GTT GTG G-3'，反向核酸引子 inner 229E-4，5' -GAC TAT CAA ACA GCA TAG CAG C-3'，反應溫度為 94°C 5 分鐘後，94°C 1 分鐘、60°C 1 分 30 秒、72°C 2 分鐘，重複 35 次，72°C 10 分鐘 4°C 保存。

#### 以 RT/PCR 檢測星狀病毒：

以隨機引子進行反轉錄反應所得之 cDNA 做為模板，聚合酶連鎖反應所使用引子為 Mon269(5' -CAACTCAGGAAACAGG GTGT-3') 及 HstV-2

(5' -TTGGTRTTTGTBARCCACCA-3' )，分別位於核酸序列 4526~4545、4940~4959，位於病毒殼蛋白質基因之 5' 端。反應過程為 94°C 30 秒、50°C 30 秒、72°C 45 秒，經過 40 次循環，72°C 10 分鐘，最後停留於 4°C。可得 PCR 產物大小為 434 bp。

### 核酸序列測定

欲利用螢光自動分析儀(ABI-373A-18 DNA sequencer)分析核酸的序列，首先以 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core Kit(Perkin-Elmer)做核酸定序反應。取事先混合好的前混合液 (premix: 5X sequencing buffer 4  $\mu$ l，dNTP mix 1  $\mu$ l，A dye terminator 0.5  $\mu$ l，T dye terminator 0.5  $\mu$ l，C dye terminator 0.5  $\mu$ l，G dye terminator 0.5  $\mu$ l，AmpliTaq DNA polymerase FS 1  $\mu$ l)，加入 0.6  $\mu$ g 雙股形式的 DNA 模板，及定序用的引子 3.2 pmole，加入適量的二次蒸餾水，使反應的總體積為 20  $\mu$ l，最後並覆以一層礦物油。將反應物置於聚合酵素連鎖反應器中(Perkin Elmer DNA Thermal cycler 480)，反應的溫度設定為 94°C 30 秒，50°C 15 秒，60°C 4 分鐘，共計重覆 25 次，之後保持在 4°C。

### 純化核酸定序反應之產物

為移除核酸定序反應完成後產物內多餘的 dye terminators 和 primer，將核酸定序反應產物的礦物油移除後加入 2  $\mu$ l 3M sodium acetate, pH 4.6, 和 50  $\mu$ l 95% ethanol，混合均勻並置於冰上 10 分鐘，之後 14000 rpm 離心 15~30 分鐘，小心吸除上清液，並以 70% ethanol 清洗沈澱物，真空乾燥後的 DNA 沈澱物可保存於 -20°C，待上機前才將之溶於 3  $\mu$ l loading buffer 中(deionized formamide: 25 mM EDTA, pH 8.0 = 5:1)。已溶於 loading buffer 之核酸定序反應

產物，先經 94° C 加熱 2 分鐘，然後馬上置於冰上，依序注入膠片的齒槽後，固定電流 25 mA 跑 8 小時，電腦將自動收集結果並自動分析出核酸序列。

### 病毒基因之分析比較

經螢光自動核酸定序儀分析出的基因序列，應用電腦軟體 GeneWorks (IntelliGenetics) 做序列的連結與比較, 利用電腦程式 MEGA 建立病毒株的種系樹(phylogenetic tree)。

### 分析方法

各病毒在不同月份盛行之狀況，以 EXCEL 即可進行簡單的統計分析，分析各病毒之間、各不同地區之間、年齡層之間、或是性別之間等，檢出率之差異是否有統計學上的意義，以 chi-square test ( $\chi^2$ ) 進行單變項分析， $p < 0.01$  則具統計學上之意義。

## 結 果

### 輪狀病毒於台灣不同地區檢出之狀況

由 2004 年 1 月至 10 月期間，急性腸胃炎之病人採得之糞便檢體經檢測輪狀病毒陽性者，在台北及高雄地區分別佔了 17.8% 及 29.8%；2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間，在台北及高雄地區分別佔了 7.4% 及 22.7%（表一）。在此二時段，台北地區與高雄地區之間輪狀病毒陽性率皆有顯著之差異，以  $\chi^2$  計算程式算出  $p$  值  $< 0.05$ 。

分析輪狀病毒陽性檢體於不同月份分佈之狀況，圖一顯示台北地區在 2004 年 1 月至 4 月間，每月有超過 20 個檢體輪狀病毒被檢出，2 月、3 月則每月有超過 60 個檢體被檢出輪狀病毒。高雄地區在 1 至 3 月間，每月有超過 30 個檢體輪狀病毒被檢出，在 2 月則超過 40 個檢體被檢出輪狀病毒。而在 2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間，不論在台北及高雄地區，各月輪狀病毒被檢出之檢體數皆小於 20 個；台北地區各月份並無特別多之流行狀況，無明顯的季節分佈，高雄地區 1 月至 3 月稍多。

在輪狀病毒陽性之檢體中，台北地區男性所佔的比例二年分別為 56.7% 及 63.3%，高雄為 64.1% 及 55.4%（表二）。男女之間所佔比例之差異，以  $\chi^2$  計算程式算出  $p$  值均  $< 0.05$ 。台北地區在男性檢體及女性檢體中，輪狀病毒檢出率分別為 2004 年 17.8% 及 17.9%，2005 年

8.0%及 6.6%；高雄地區在男性檢體及女性檢體中，輪狀病毒檢出率分別為 2004 年 31.6%及 27.0%，2005 年 22.7%及 22.7%（表三）。男女之間檢出率之差異以  $\chi^2$  計算程式算出  $p$  值均  $>0.1$ 。

輪狀病毒陽性之檢體中，在不同年齡層分佈之狀況，以 0-2 歲之間年齡層所佔比例較高，台北地區二年度分別為 48.8%及 45.0%，高雄地區則分別為 46.0%及 43.5%（表四、圖二）；5 歲以上年齡層所佔比例，台北地區二年度分別為 15.1%及 15.8%，高雄地區則分別為 21.1%及 18.5%。

#### 輪狀病毒之血清型與基因型分析

以 Multiplex RT-PCR 的方法分析輪狀病毒 G 血清型，進而分析各種 G 血清型於台北及高雄地區分佈之狀況。2004 年 1 至 10 月期間，台北地區 G1 佔了 20.2%，G2 佔了 25.8%，G3 佔了 14.2%，G9 佔了 38.6%；高雄地區 G1 佔了 17.9%，G2 佔了 7.7%，G3 佔了 11.1%，G9 佔了 57.3%（表五、圖三）。在少數檢體中同時偵測到兩種或以上 G 血清型輪狀病毒，台北及高雄地區分別佔了 1.3%及 6.0%。2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間，台北地區以 G3 輪狀病毒較多，佔了 35.6%，G2 次之，佔了 28.8%，G1 與 G9 也分別佔了 18.3%與 17.3%。高雄地區則以 G2 最多，佔了 59.2%，G1 與 G3 分別佔了 15.8%與 18.4%，G9 所佔比例 5.3%。屬於混合兩種血清型之感染很少，只有 1 個。

另以 Multiplex RT-PCR 的方法分析輪狀病毒 P 基因型，發現多半的病毒之 G 血清型與 P 基因型的組合都屬於正常的型式，如 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8] 等，但亦可見一些較不尋常的組合型式，如 G1P[4]、G3P[4]、G3P[9]、G9P[4]、G2P[8] 等。此外，在 RNA 電泳型分析中，多數呈現正常的電泳型，除了 G2 病毒屬於短的電泳型，其他 G 血清型之病毒屬於長的電泳型。由 2004 年 2 至 5 月之檢體發現 4 個 G1P[4] 及 1 個 G1P[8] 病毒株，具有短的電泳型。

#### 杯狀病毒檢出之狀況

諾若病毒及沙波病毒經聚合酶連鎖反應增幅後，產物大小分別為 319 bp、331 bp，在電泳膠上無法用肉眼直接區分，但可經由序列分析後依長度而區別。

分析台大醫院在 2002 年至 2003 年 2 月間共 1803 個檢體中，59 個檢體中含有諾若病毒(佔 3.3%)，23 個檢體中含有沙波病毒(佔 1.3%)(表六)。分析高雄醫學大學附設醫院在 2002 年 3 月至 2003 年 2 月間收集共 642 個檢體中，53 個檢體中含有諾若病毒(佔 8.3%)，4 個檢體中含有沙波病毒(佔 0.6%)。高雄地區諾若病毒之檢出率明顯較台北地區為高，以  $\chi^2$  計算程式算出  $p$  值  $< 0.05$ 。

在本研究之期間，諾若病毒於各月份多有檢測陽性之個案，但以 9 至 12 月較多，台大於 10、11 月呈現一高峰，分別有 12 及 10 個陽



性個案(圖四)；高醫於9、10、11、12月呈現一高峰，分別有11、21、10及8個陽性(圖五)。至於沙波病毒則零星分佈各月份，未出現明顯的高峰。

至於杯狀病毒陽性個案之年齡分佈狀況，以三歲以下之幼兒居多，約佔58% (圖六)。

諾若病毒RNA聚合酶基因之核酸序列在種系分析中，可區分為至少兩個基因群GI、GII (圖七)。在本研究期間之112個諾若病毒陽性檢體中，GI僅佔1.8% (2/112)，GII佔98.2% (110/112)。GI與GII於核酸序列之相似度僅介於55-61%間，胺基酸序列相似度僅介於56-62%間(表七)。

根據國外之報告，GI可再細分為7個群集(GI.1 - GI.7)，而GII可再細分至少12個群集(GII.1 - GII.12) (75, 76)。在本地的諾若病毒中，屬於GI之病毒僅有兩個，其中一個為GI.2，與國外同屬GI.2的Southampton病毒株之核酸序列相似度達94.6%，胺基酸序列相似度高達100%。另一個GI病毒，則與現有參考病毒株之核酸序列最接近者相似度僅有77%，胺基酸序列最接近者相似度僅達94%，屬於那一個雲集尚不清楚。

GII中則以GII.4最多，佔總數的66.1% (74/112)，與國外同屬於GII.4的Camberwell、Lordsdale病毒株之核酸序列相似度達

89.1-92.7%，胺基酸序列相似度達 94.5-98.9%。GII.1 佔總數 4.5% (5/112)，GII.3 佔總數 3.6% (4/112)，GII.5 佔總數 2.7% (3/112)。本研究在使用病毒 RNA 聚合酶基因之核酸序列進行種系分析時，有 8.9%(10/112)檢體之核酸序列與胺基酸序列相似百分比介於 GII.2 和 GII.4 的基因群，無法明顯區分。另有 12.5%(14/112)檢體無法區別屬於那一個雲集。

### **冠狀病毒檢出之狀況**

由本實驗室收集台大醫院之糞便檢體中，以 SARS 冠狀病毒設計之引子對進行 RT-PCR 檢測，並未測得陽性結果。而以人類冠狀病毒 229E 設計之引子對進行 RT-PCR 檢測，2002 年 1 月至 2003 年 2 月共計 1320 個檢體，僅有 18 個檢體冠狀病毒 PCR 反應呈現陽性反應，檢出率 1.4%，經核酸序列分析確定為冠狀病毒。陽性檢體集中於 1 至 4 月，共計 16 個陽性，另外兩個陽性檢體出現於 8 月。其他月份無檢出陽性之個案。

### **利用聚合酶連鎖反應偵測人類星狀病毒**

在 2002 年 3 月至 2003 年 2 月間共計 2160 個急性腸胃炎之糞便檢體，利用聚合酶連鎖反應偵測人類星狀病毒，台北地區 1520 個檢體中 8.1% 為星狀病毒陽性，高雄地區 640 個檢體中則有 5.5% 為星狀病毒陽性，兩地之陽性率無統計學上明顯差異。在季節分佈方面，台

北地區以夏季 7、8 月出現較多，高雄地區之高峰期則出現在 4 月，二者無顯著關聯性。另外，台北地區輪狀病毒陽性及陰性檢體之星狀病毒陽性率相似，而高雄地區則兩者相差甚大，並無與輪狀病毒重複感染之現象（表八）。

### 人類星狀病毒之基因分型

研究顯示，對 ORF2 5' 端基因進行序列之分析結果可與其血清型分析相符。故對 PCR 陽性檢體此段基因之 348 bp 進行序列分析，配合參考病毒株進行分型。發現台灣地區除第六、七型外，其他各型皆有出現。主要以第一型出現率最高，佔 89%，第四型次之，佔 6.3%，第八型佔了 2.5%（表九）。

### 人類星狀病毒基因種系分析

台灣地區之人類星狀病毒 PCR 陽性檢體與世界各不同地區之參考病毒株進行種系分析。發現台灣地區星狀病毒第一型主要可分為 1a 與 1b 兩種亞型，且以 1a 亞型較多，佔了 71%，與英國地區之病毒株較為相似。1b 亞型則為 29%，與德國分離之病毒株較為相似。另外，第二、四型之檢體也有相同的現象（圖八）。

### 核酸與胺基酸序列分析

分析台灣地區星狀病毒殼膜基因之 5' 端 348 bp 核酸序列及胺基酸序列。第四、第八型較為相似，差異性在 10%~12% 之間，其他

不同基因型之核酸序列差異性皆大於 20%。第一型之 1a 亞型與 1b 亞型之差異介於 11%~13% 之間。第四型之亞型差異介於 4%~6% 之間，台灣的第二型與德國的病毒株則較為相近 (1%~2%)，與英國病毒株相比則差異較大 (16%)，應屬不同之亞型。在胺基酸序列分析方面，第一型亞型間，台灣病毒株之間差異極小，但與參考病毒株之間差異較大，約 4%。其他不同型之差異皆於 5%~11% 之間，但第四、第八型差異仍較小，甚至有完全相同的情形。

#### **Caco-2 細胞與星狀病毒之培養**

星狀病毒 PCR 檢測陽性檢體以 Caco-2 細胞進行培養，由於受高濃度之 Trypsin 影響，接種後第三天細胞會脫落，不易觀察 CPE。收集之病毒液經過 PCR 再次測試，並以核酸序列分析確定是同一病毒株。目前已分離出人類星狀病毒株為第一型之兩種亞型及第五型。之後仍將繼續對其他型病毒培養。

## 討 論

本研究收集 2004 年 1 月至 2005 年 10 月期間由急性腸胃炎之病人採得之糞便檢體，經檢測輪狀病毒，顯示 2004 年 1 至 3 月間南北兩地區均有大幅度流行之狀況，而在 2005 年輪狀病毒陽性個案明顯的減少。各年流行的狀況不斷的變化，大幅度流行之後第二年是否流行的幅度就會較小，大流行是否隔年發生，仍有待後續的觀察。

輪狀病毒陽性個案男女所佔之比例，2004-2005 兩年的情況相似，仍維持約男三女二之比例。

由 2004 年開始，輪狀病毒的感染中 5 歲以上小孩所佔比例升至 15.1%至 21.1%。在 2005 年，5 歲以上的感染仍維持 15.8%至 18.5%，此可能與 G9 輪狀病毒對大多數的人來說體內的免疫抵抗力不足有關，造成 5 歲以上的孩童感染人數比例增加。

G9 輪狀病毒首先於 2000 年出現，次年 5 月開始明顯的增多，進而造成大規模的流行，2002 年 G9 輪狀病毒在台北地區所造成的感染佔了六成之多，2003 年則已降至約二成，似乎 G9 輪狀病毒在台北地區感染之高峰期已過；但在 2004 年 G9 輪狀病毒又再度造成大幅度之流行，所佔比例近 4 成。在 2004 年之流行中，G1、G2 與 G3 輪狀病毒造成之感染亦不少，特別是 G1 與 G2 輪狀病毒所佔比例皆超過 2

成。屬於混合兩種血清型之感染很少，只有 1 個。台北及高雄地區各種 G 血清型所佔的角色不盡相同，在高雄地區，G9 輪狀病毒 2002 年所造成的感染佔了 44%，2003 年仍然高達 46%，2004 年更高達 57%。2004 年除了 G9 病毒外，尚有 G1、G2 與 G3 病毒的存在，G1 病毒稍高，約佔了 18%。2005 年 G9 輪狀病毒的感染已明顯減少。台北地區以 G3 最多，G2 次之；高雄地區則以 G2 最多，G3 次之。南北兩地在此期間並未見 G4 病毒。

當一個地區同時流行四種輪狀病毒，顯示輪狀病毒的流行愈來愈複雜。在此種情況下，混合感染更是容易發生。在此二地區，於少數的檢體中發現可能存在著兩種 G 血清型或 P 基因型的病毒。混合感染就可能產生新的重組病毒株，也確在少數的檢體中帶有 G 與 P 基因型不正常組合或是電泳型不合的輪狀病毒，這些應是新產生的重組病毒株，未來是否會造成流行值得特別留意。

至於杯狀病毒之檢出率，若統計 2002 年 3 月至 2003 年 2 月間所蒐集全部之檢體，其中包括輪狀病毒陽性及陰性之檢體，諾若病毒在高雄地區之檢出率(8.3%)高於台北地區(3.3%)，在統計學上有顯著意義( $p < 0.05$ )。此期間綜合台灣南北兩地區諾若病毒檢出率為 5.6%，相較於荷蘭 18%、芬蘭 20%、德國 35% 為低(77, 78)。此差異是否與人種之間對病毒之感受性不同而來(80)，或是因偵測所採用之引

子對不同所造成之差異，仍有待後續研究探討。

在本研究期間之 112 個諾若病毒陽性檢體中，GI 僅佔 1.8 % (2/112)，GII 佔 98.2 % (110/112)。此結果也與英國的流行情形相似，GI 小於 10 %、GII 有 80 % 以上，另有約 10 % 無法區分(79)。本研究仔細分析諾若病毒之基因群集，發現各群集數量不等，此一數據可提供未來發展酶連免疫法塗料抗原時之參考。

杯狀病毒陽性檢體中，有 13 個檢體經輪狀病毒酶連免疫法檢測亦呈陽性，但其中只有 4 個檢體之輪狀病毒 NSP4 基因 RT-PCR 為陽性，RNA 為長電泳型，且皆為 G9P[8] 型之輪狀病毒，顯示有輪狀病毒和杯狀病毒同時感染的情形；3 個檢體是諾若病毒，1 個是沙波病毒。至於其他 9 個檢體，輪狀病毒之 NSP4 基因 RT-PCR、RNA 電泳、G 及 P 分型試驗皆為陰性，推測可能是輪狀病毒酵素連結免疫分析法檢測呈現偽陽性。國外的研究中也曾有相關的報告，指出諾若病毒最常與輪狀病毒發生同時感染，但感染兩種病毒或僅感染一種病毒其臨床症狀並無差異(78, 79)。

自從 2003 年爆發 SARS 冠狀病毒流行，對於過去大家所忽視的冠狀病毒，頓時變為大家關注的焦點，在台灣第一個 SARS 案例發生之前，是否有潛藏之案例存在不得而知。但由本實驗室收集台大醫院之糞便檢體中，以 SARS 冠狀病毒設計之引子對進行 RT-PCR 檢測，並

未測得陽性結果。而以人類冠狀病毒 229E 設計之引子對進行 RT-PCR 檢測，由 2002 年至 2003 年 2 月超過一千個檢體，陽性結果只有 1.4%。陽性檢體多集中於 2002 年 1 至 4 月。冠狀病毒在急性腸胃炎所扮演的角色仍不是很清楚，但由如此低之檢出率推測其重要性應不高。

本研究中以人類星狀病毒之聚合酶連鎖反應，對台灣地區台大醫院及高雄醫學大學附設醫院 2002 年 3 月至 2003 年 2 月之幼兒糞便檢體進行偵測。陽性率介於 5.5%~8.1%，與先前國外之人類星狀病毒之流行病學研究結果，各地之流行率皆於 2~16.5% 間相符合。在季節分佈方面，台大以夏季七、八月出現較多，高醫之高峰期則出現在四月，二者無顯著關聯性。另外，台大輪狀病毒陽性及陰性檢體之星狀病毒陽性率相似，而高醫則兩者相差甚大，並無與輪狀病毒重複感染之現象。

研究顯示，對 ORF2 5' 端基因進行序列之分析結果可與其血清型分析相符。故對 PCR 陽性檢體此段基因之 348 bp 進行序列分析，配合參考病毒株進行分型。發現台灣地區除第六、七型外，其他各型有出現。主要以第一型出現率最高，佔 89%，第四型次之，佔 6.3%。先前於歐洲，如英國、匈牙利，美洲之墨西哥、西班牙及非洲奈及利亞研究結果皆顯示，人類星狀病毒在一地區中，會有一種基因型



長時間持續流行，且皆為第一型流行率最高，數種基因型可能同時或是輪流出現。其中，第二、三、四、五型居次，第六、七、八型只在某些地區偶爾零星出現。但於西班牙的研究中，也曾有第八型出現率較高的現象（11%）。此外，偶有同時感染不同基因型的現象。本研究的結果顯示台灣地區之情形與國外結果相似。值得注意的是，第八型出現的比例較先前其他研究結果為高。雖然本研究中並未發現同時感染兩種或以上之基因型的現象，但進行核酸序列分析時，有數個檢體之序列呈現難以分析的情況。由於不同型混合感染之現象不易由序列分析測出，故仍須以各型之特異性抗體反應進行血清分型，以確定其感染情況。

台灣地區人類星狀病毒無明顯的季節性分布，基因分型則以第一型為主，有少數的第二、三、四、五、八型病毒存在。其中第八型的出現率較其他國家稍高。另外，第一型明顯分為兩種亞型，其差異性顯著，值得繼續深入探討。而本研究中成功培養出台灣地區之人類星狀病毒株，第一型之兩種亞型及第五型。除期望可培養出更多不同基因型病毒外，對於病毒差異與所造成之疾病關係也是值得後續研究之方向。

## 結 論 與 建 議

本計畫輪狀病毒之研究仍是持續進行。至於其他的急性腸胃炎病毒則受限於人力及經費之嚴重不足，本計畫只能將 2002 至 2003 一整年收集之檢體，完成杯狀病毒(包括諾若病毒及沙波病毒)、冠狀病毒、星狀病毒等之檢測與分析，得以了解這些病毒流行的狀況。

針對杯狀病毒累積檢測了 2445 個檢體，其中包括輪狀病毒陽性及陰性之檢體，杯狀病毒陽性所佔比例為 5.6%，較輪狀病毒之檢出率低了不少。杯狀病毒在 2002 年 10 月及 11 月較多，其他月份亦有少數個案。陽性檢體近 6 成來自三歲以下的小孩，顯示杯狀病毒應是一種普遍存在的病毒。核酸序列及種系分析可將杯狀病毒區分為諾若病毒及沙波病毒，諾若病毒較多，約為沙波病毒之四倍。不論是諾若病毒或沙波病毒均有明顯的變異性，諾若病毒中極大多數屬於第二基因群，僅有兩病毒株屬於第一基因群，亦有一些病毒株與二基因群有明顯的差異。

2003 年爆發 SARS 冠狀病毒流行，在台灣第一個 SARS 案例發生之前，是否有潛藏之案例存在不得而知。但由本研究檢測台大醫院收集之糞便檢體之結果，並未測得 SARS 冠狀病毒之存在。而以人類冠狀病毒 229E 設計之引子對進行 RT-PCR 檢測，僅有 1.4%之檢體呈現

陽性反應。冠狀病毒在急性腸胃炎所扮演的角色仍不是很清楚，但由如此低之檢出率推測其重要性應不高。

針對星狀病毒共計檢測了 2160 個檢體，其中包括輪狀病毒陽性及陰性之檢體，星狀病毒陽性所佔比例為 7.3%。在季節分佈方面，台北地區以夏季七、八月出現較多，高雄地區則在四月出現較多，二者無顯著關聯性。核酸序列及種系分析可將星狀病毒區分為八種與血清型相當的基因型，台灣地區以第一型最多，佔了近 9 成。第一型又可分為 1a 與 1b 兩種主要的亞型，在第一型中，台灣地區以 1a 較多，佔了約 7 成。亦有少數的第二、三、四、五、八型病毒存在。其中第八型的出現率較其他國家稍高。

在 2004 年 11 月至 2005 年 10 月期間，急性腸胃炎檢體中輪狀病毒檢出率甚低，輪狀病毒陽性檢體較之前一年明顯的減少，但仍有多種輪狀病毒同時的流行，此現象似乎形成一種趨勢。各年流行的狀況不斷的變化，大幅度流行之後第二年是否流行的幅度就會較小，大流行是否隔年發生，仍有待後續的觀察。

在 2004 年 G9 輪狀病毒所造成的感染近 4 成至近 6 成，2005 年 G9 輪狀病毒所造成的感染已降至 2 成以下，此應與大多數人已經感染過相關。

由分析輪狀病毒的 G 血清型與 P 基因型，發現少數的病毒其 G

血清型與 P 基因型的組合屬於較不尋常的組合型式，或是電泳型呈現例外的型式。這些可能是經由基因重組而形成的，必須注意後續的發展，觀察它們是否會造成流行。RNA 電泳型分析除了由電泳型的長短或其型式，可了解流行病毒的變化，亦可幫助發現特殊的病毒。

我們應持續加強急性腸胃炎之致病病毒之分子流行病學研究，以了解各種病毒之重要性，以及每年是否有變化，以做為未來疫苗採用及發展之依據。

## 參考文獻

1. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1996. Rotaviruses, pp. 1657-1708. In B.N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope (ed.), *Fields Virology*. 3<sup>rd</sup> ed., Raven Press, New York.
2. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283.
3. Flewett, T. H., A. Bryden, and H. Davies, 1973. Viral particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497.
4. Estes, M. K., and J. Cohen. 1996. Rotaviruses and their replication. pp. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope(ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
5. Andrew, M. E., D. B. Boyle, B. E. Coupar, P. L. Whitfeld, G. W. Both, and A. R. Bellamy. 1987. Vaccinia virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 61:1054-1060.
6. Flewett, T. H. 1982. Clinical features of rotavirus infections. In *Virus Infections of the Gastrointestinal Tract*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
7. Lin, S. C., H. Y. Hsu, P. J. Wang, C. N. Lee, M. H. Chang, Y. Z. Shen, and S. M. Wang. 1996. Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile seizure in childhood. *Acta Paed. Sin.* 37:204-207.
8. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores A. Z. Kapikian, R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82:8701-8704.
9. Matsui, S., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1989. The molecular determinants of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36:181-214.
10. Estes, M. K., E. L. Palmer, and J. F. Obijeski. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 105:123-184.
11. Holmes, I. H. 1988. Reoviridae: the rotaviruses. p. 384-413. In E. H. Lennette, P. Halonen, and F. A. Murphy (ed.). *Laboratory diagnosis- principles and practice. Viral, rickettsial and chlamydial diseases.* vol. 2. Springer Verlag. New York.
12. Begue, R. O., P. H. Dennehy, J. Huang, and P. Martin. 1992. Serotype variation of group A rotaviruses over nine winter epidemics in Southeastern New England. *J. Clin. Microbiol.* 30:1592-1594.
13. Bern, C., L. Unicomb, J. R. Gentsch, N. Banul, M. Yunus, R. B. Sack, and R. I. Class. 1992. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 30:3234-3238.
14. Masendycz, P. J., L. E. Unicomb, C. D. Kirkwood, and R. F. Bishop. 1994. Rotavirus serotypes causing severe acute diarrhea in young children in six Australian cities, 1989 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* 32:2315-2317.
15. Matson, D. O., M. K. Estes, J. W. Burns, H. B. Greenberg, K. Taniguchi, and S. Urasawa. 1990. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. 162:605-614.
16. Rasool, N. B. G, K. Green, and A. Z. Kapikian. 1993. Serotype analysis of rotaviruses from different locations in Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* 31:1815-1819.
17. White, L., D. Garcia, Y. Boher M. Blanco, M. Perez, J. Flores, and I. Perez- Schael. 1991. Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1, 2, 3, and 4 in Venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J. Med. Virol.* 34:79-84.
18. Clark, H. F., Y. Hoshino, L. M. Bell, J. Croff, G. Hess, P. Bachman and P. A. Offit. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25:1757-1762.
19. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukoyama, and S. Inouye. 1985. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54:623-624.
20. Wyatt, R. G., H. D. James, Jr., A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greeuherg, A. R. Kalica, J. Flores, and A. Z. Kapikian. 1983. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18:310-317.
21. Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gomez JA. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 65(1):190-198.
22. Nguyen VM, Nguyen VT, Huynh PL, Dang DT, Nguyen TH, Phan VT, Nguyen TL, Le TL, Ivanoff B, Gentsch JR, Glass RI; Vietnam Rotavirus Surveillance Network. 2001. The epidemiology and disease burden of rotavirus in Vietnam: sentinel surveillance at 6 hospitals. *J Infect Dis*

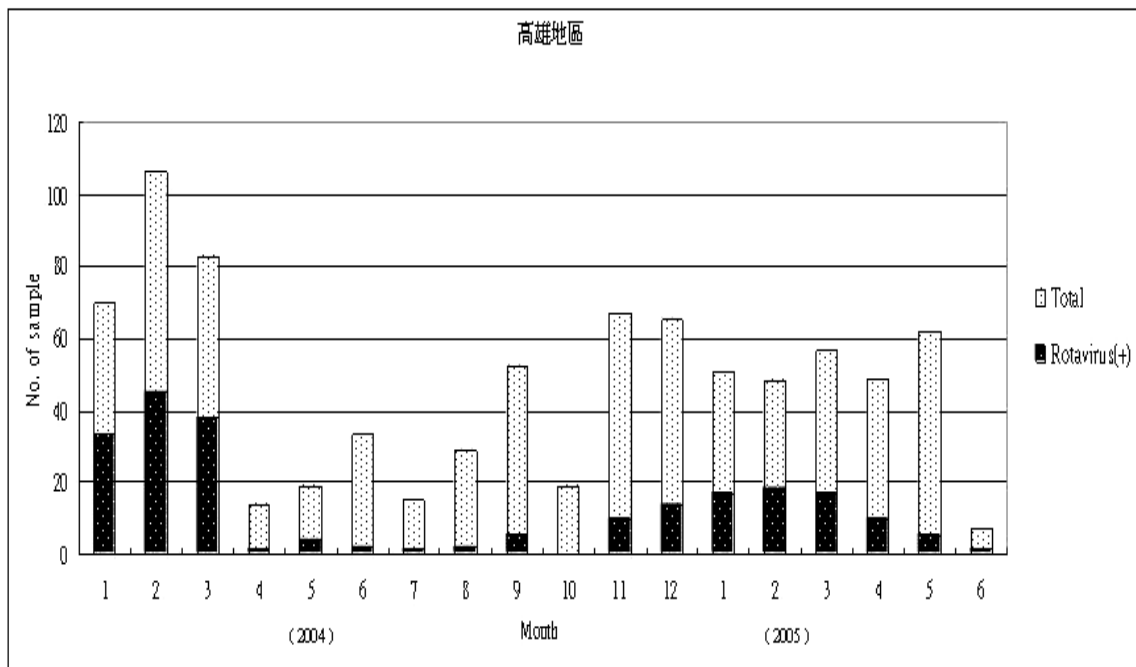
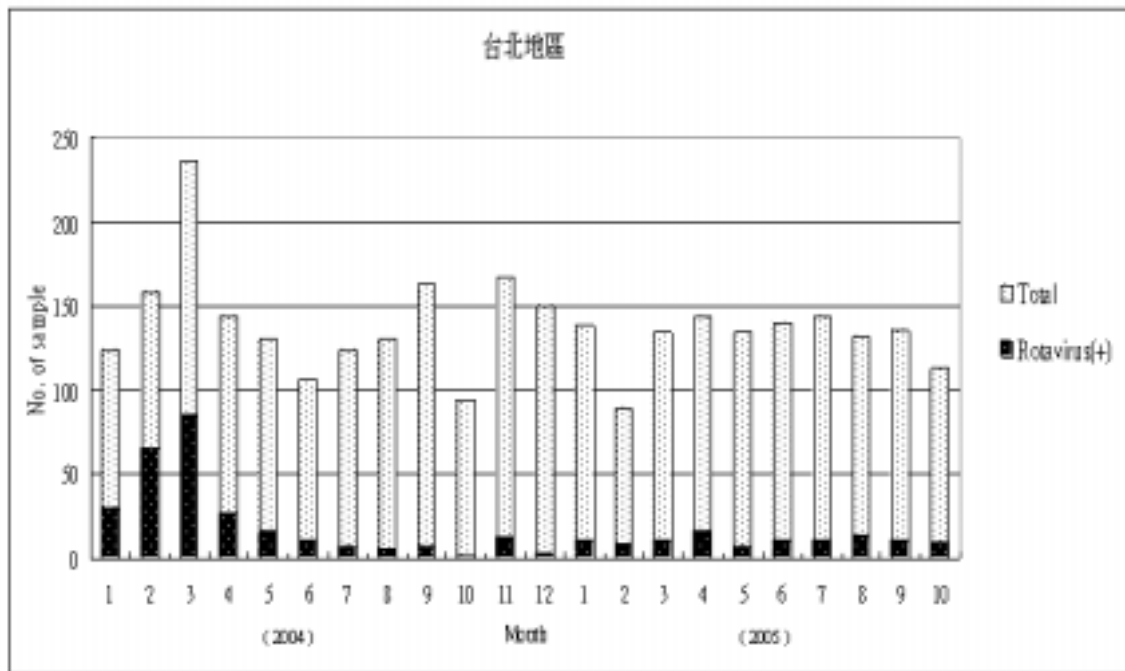
- 183(12):1707-1712.
23. Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Pereira CF, Chizhikov V, Hoshino Y. 2001. Rotavirus strains bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39(3):1157-1160.
  24. Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39(3):836-843.
  25. Oka T, Nakagomi T, Nakagomi O. 2000. Apparent re-emergence of serotype G9 in 1995 among rotaviruses recovered from Japanese children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiol Immunol* 44(11):957-961.
  26. Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK, Clark HF, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology* 278(2):436-444.
  27. Widdowson MA, van Doornum GJ, van der Poel WH, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. 2000. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet* 356(9236):1161-1162.
  28. Maneekarn N, Ushijima H. 2000. Epidemiology of rotavirus infection in Thailand. *Pediatr Int* 42(4):415-421.
  29. O'Halloran F, Lynch M, Cryan B, O'Shea H, Fanning S. 2000. Molecular characterization of rotavirus in Ireland: detection of novel strains circulating in the population. *J Clin Microbiol* 38(9):3370-3374.
  30. Iturriza-Gomara M, Cubitt D, Steele D, Green J, Brown D, Kang G, Desselberger U, Gray J. 2000. Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. *J Med Virol* 61(4):510-517.
  31. Ahmed MU, Alam MM, Chowdhury NS, Haque MM, Shahid N, Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1999. Analysis of human rotavirus G serotype in Bangladesh by enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction. *J Diarrhoeal Dis Res* 17(1):22-27.
  32. Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. *J Clin Microbiol* 38(7):2784-2787.
  33. Palombo EA, Masendycz PJ, Bugg HC, Bogdanovic-Sakran N, Barnes GL, Bishop RF. 2000. Emergence of serotype G9 human rotaviruses in Australia. *J Clin Microbiol* 38(3):1305-1306.
  34. Taniguchi, K., and S. Urasawa. 1995 Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6: 123-131.
  35. Bridger, J. C. 1994. Non-group A rotaviruses. In: A. Z. Kapikian, ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2nd ed, New York, Marcel Dekker, Inc., pp.369-408.
  36. Hung, T. 1988. Rotavirus and adult diarrhea. *Adv. Virus Res.* 35:193-218.
  37. Bridger, J. C., S. Pedley, and M. A. McCrae. 1986. Group C rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.* 23:760-763.
  38. Nekata, S., M. K. Estes, D. Y. Graham, S. Wang, G. W. Gary, and J. L. Melnick. 1987. Detection of antibody to group B adult diarrhea rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.* 25:812-818.
  39. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick. 1974. Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2:61-63.
  40. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, et al. 1974. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serological tests. *Science* 185:1049-1053.
  41. Black, R. E., H. B. Greenberg, A. Z. Kapikian, K. H. Brown, and S. Becker. 1982. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 145:483-489.
  42. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, W. L. Cline, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, W. J. Rodriguez, D. A. Sack, R. M. Chanock, and R. H. Parrott. 1976. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N. Eng. J. Med.* 309:72-76.
  43. Keidan, I., I. Shif, G. Keren, and J. H. Passwell 1992. Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous involvement during rotavirus infection. *Pediatr. Infect. Dis.* 11:773-775.
  44. Nishimura, S, H. ushijima, S. Nishimura, H. Shiraiishi, C. Kanazawa, T. Abe, K. Kaneko, and Y. Fukuyama. 1993. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 15:457-459.

45. Ushijima, H., K. Bosu, T. Abe, and T. Shinozaki. 1986. Suspected rotavirus encephalitis. *Arch. Dis. Child* 1:692-694.
46. Wong, C. J., M. T. Zane Price, and A. Bruckner. 1984. Aseptic meningitis in an infant with rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3:244-246.
47. Lee, C. N., C. L. Kao, J. A. Pai, M. H. Chang, and C. Y. Lee. 1987. Identification of human rotaviruses in stools from children with gastroenteritis. *J. Formosan Med. Assoc.* 86:392-399.
48. Lee, C. N., C. L. Kao, H. C. Ning, S. Fuh, and C. Y. Lee. 1997. Identification of VP7 serotypes of human rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Paed. Sin.* 38:454-62.
49. Chiu, T. F., C. N. Lee, P. Y. Lee, C. L. Kao, H. C. Lin, C. Y. Lu, and L. M. Huang. 2000. Rotavirus gastroenteritis in children: 5-year experience in a medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 33:181-186.
50. Zao C. L., W. N. Yu, C. L. Kao, C. Y. Lee, and C. N. Lee. 1999. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.* 80:1407-1415.
51. Matson, D. O., M. L. O'Ryan, X. Jiang, and D. K. Mitchell. 2000. Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis. pp.270-294. In S. Specter, R. L. Hodinka, and S. A. Young. (ed.), *Clinical Virology Manual*. 3<sup>rd</sup> ed., ASM Press, Washington DC.
52. McIver CJ, Hansman G, White P, Doultree JC, Catton M, Rawlinson WD. 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. *Pathology* 33(3):353-358.
53. Singh-Naz, N., W. J. Rodriguez, A. H. Kidd, and C. D. Brandt. 1988. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and typing of subgroup F adenoviruses. *J Clin Microbiol* 26:297-300.
54. Ahluwalia, G. S., T. H. Scott, B. G. Klisko, and W. Hammond. 1994. Comparison of detection methods for adenovirus from enteric clinical specimens. *Diag Microbiol Infect Dis* 18:161-166.
55. Pinto, R. M., J. M. Diez, and A. Bosch. 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. *J Med Virol* 44:310-315.
56. Lin, H. C., C. L. Kao, C. Y. Lu, C. N. Lee, T. F. Chiu, P. Y. Lee, H. Y. Tseng, H. L. Hsu, C. Y. Lee, and L. M. Huang. 2000. Enteric adenovirus infection in children in Taipei. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 33:176-180.
57. Berke, T., B. Golding, X. Jiang, D. W. Cubitt, M. Wolfaardt, A. W. Smith, and D. O. Matson. 1997. Phylogenetic analysis of the caliciviruses. *J Med Virol* 52:419-424.
58. Green, K., Y. T. Ando, M. S. Balayan, I. N. Clarke, M. K. Estes, D. O. Matson, S. Nakata, J. D. Neil, M. J. Studdert, and H.-J. Thiel. 1998. Caliciviridae. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus Taxonomy*. 7<sup>th</sup> Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, Orlando, Fla.
59. Jiang, X., W. D. Cubitt, T. Berke, W. M. Zhong, X. Dai, S. Nakata, L. K. Pickering, and D. O. Matson. 1997. Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. *Arch Virol* 142:1813-1827.
60. Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, and R. M. Chanock. 1972. Visualization by immune electronmicroscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075-1081.
61. Green, J., C. I. Gallimore, J. P. Norcott, D. Lewis, and D. W. Brown. 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 47:392-398.
62. Jiang, X., P. W. Huang, W. M. Zhong, T. Farkas, W. D. Cubitt, and D. O. Matson. 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83:145-154.
63. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DW, Estes MK. 2000. Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol* 38(4):1656-1660.
64. Jiang X, Zhong W, Kaplan M, Pickering LK, Matson DO. 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J Virol Methods*. 78(1-2):81-91.
65. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 181:S349-S359.
66. Fankhauser, R. L., J. S. Noel, S. S. Monroe, T. Ando, and R. I. Glass. 1998. Molecular

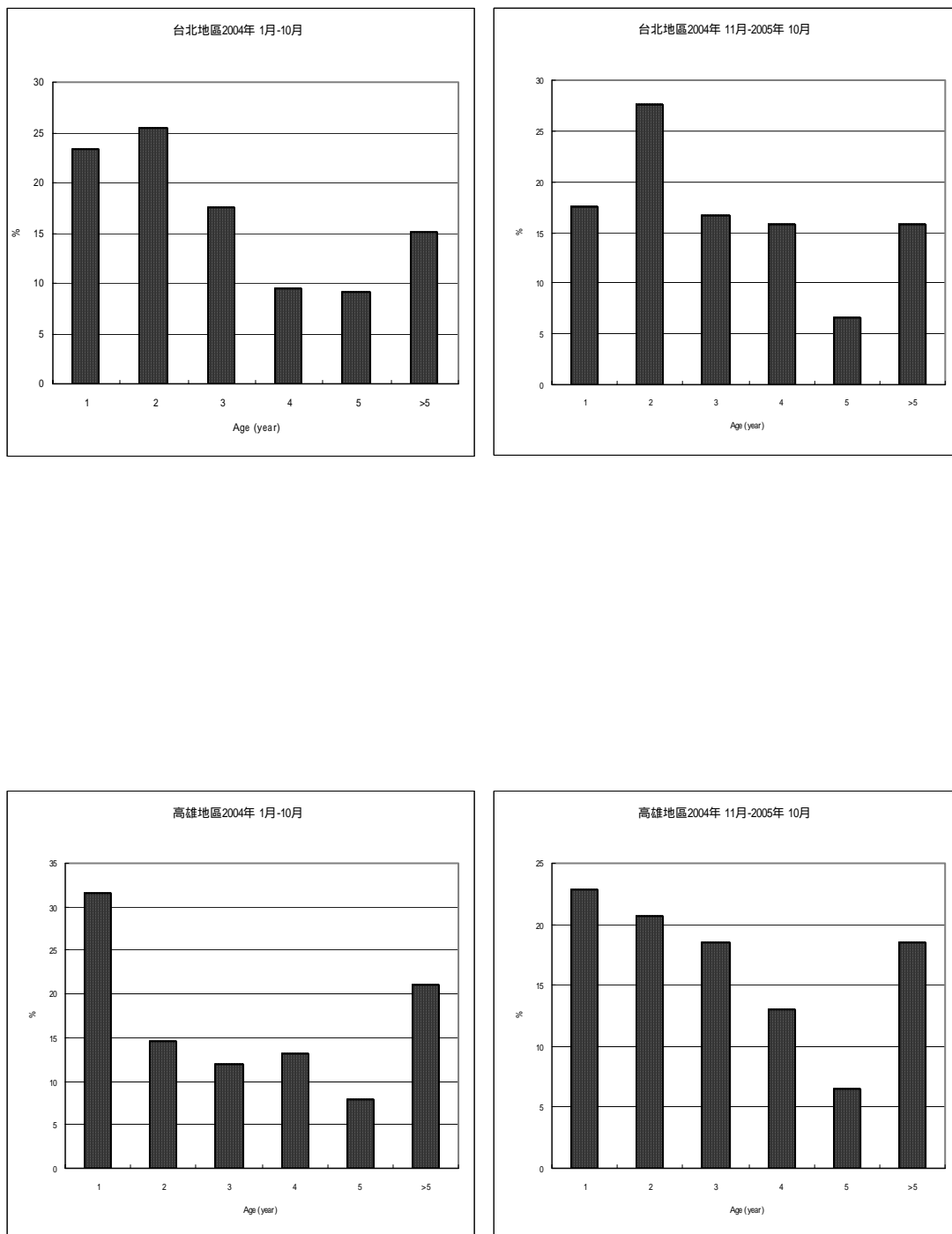
- epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178:1571-1578.
67. Lee, T. W., and J. B. Kurtz. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 112:187-193.
  68. Gaggero, A., M. O’Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, and L. F. Avendano. 1998. Prevalence of astrovirus infection among children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 36:3691-3693.
  69. Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, and D. M. Bass. 1998. Prevalence of astroviruses in a children’s hospital. *J Clin Microbiol* 36:2571-3574.
  70. Noel, J. S., T.W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33:797-801.
  71. Jonassen, T. O., C. Monceyron, T. W. Lee, J. B. Kurtz, and B. Grinde. 1995. Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 52:327-334.
  72. Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, and J. B. Kurtz. 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol* 42:539-547.
  73. Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, C. Cacamo, T. Ando, and R. I. Glass. 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka Japan. *J Infect Dis* 170:439-443.
  74. Lee CN, Lin CC, Zao CL, Kao CL, Lee CY. 1998. Identification of VP4 Genotypes of Rotaviruses by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J. Biomed. Lab. Sci.* 10: 178-187.
  75. Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B., Aymard, M. 2001. Genetic classification of “Sapporo-like viruses”. *Arch. Virol.* 146, 2115-2132.
  76. Jiang. X., Huang. P.W., Zhong. W.M., Farkas. T., Cubitt. D.W., Matson.O.D. 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 83, 145-154.
  77. Vinjé, J., Hamidjaja, R. A., Sobsey, M. D. 2004. Development and Application of A Capsid VP1 (Region D) Based Reverse Transcription RCR Assay for Genotyping of Genogroup I and II Noroviruses. *J. Virol. Meth.* 116(2004)109-117.
  78. Oh, D-Y, Gaedicke, G., Schreier, E. 2003. Viral Agents of Acute Gastroenteritis in German Children: Prevalence and Molecular Diversity. *J. Med. Virol.* 73:82-93.
  79. Froggatt, P. C., Vipond, I. B., Ashley, C. R., Lambden, P. R., Clarke, I. N., Caul, E. O. 2004. Surveillance of Norovirus Infection in a Study of Sporadic Childhood Gastroenteritis in South West England and South Wales, During One Winter Season (1999-2000). *J. Med. Virol.* 72:307-311.
  80. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. 2002. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO Histo-blood group type. *J. Infect. Dis.* 185:1335-1337.



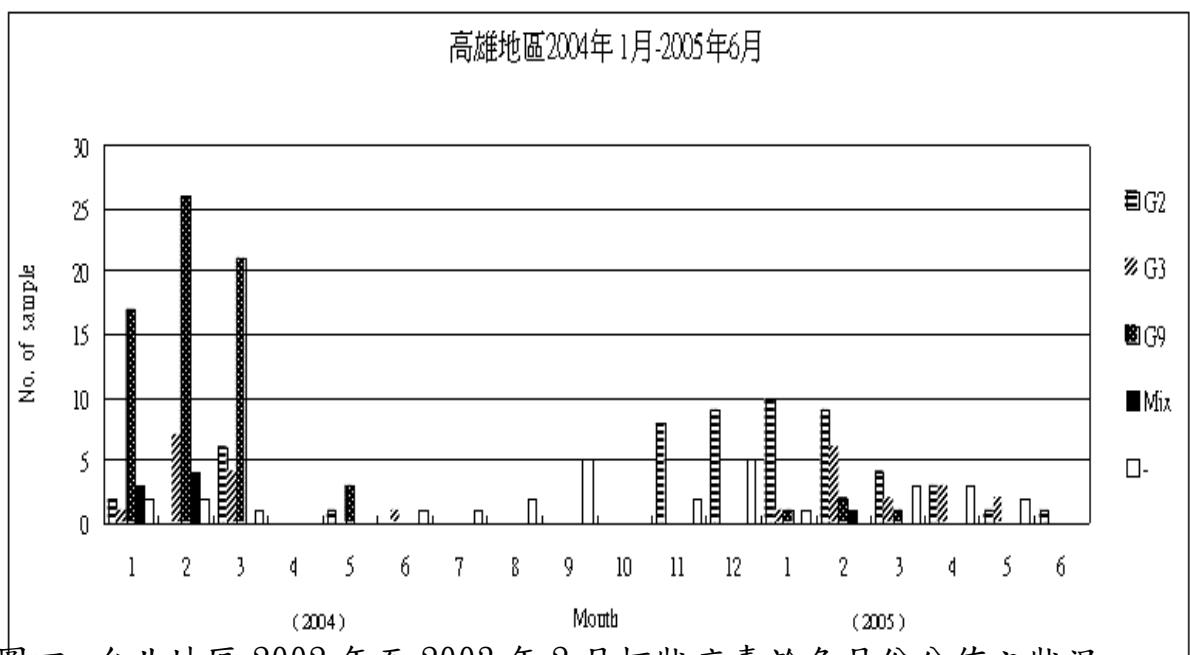
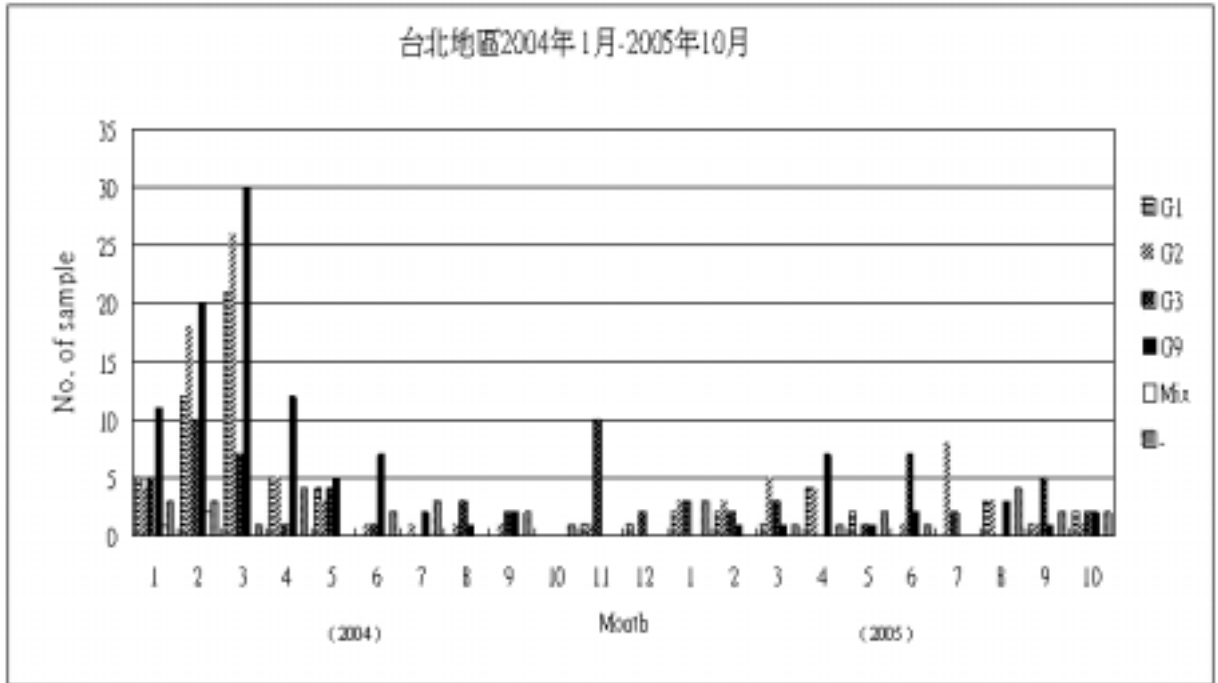
圖一、2004-2005 年急性腸胃炎檢體在各月份輪狀病毒檢出率之狀況



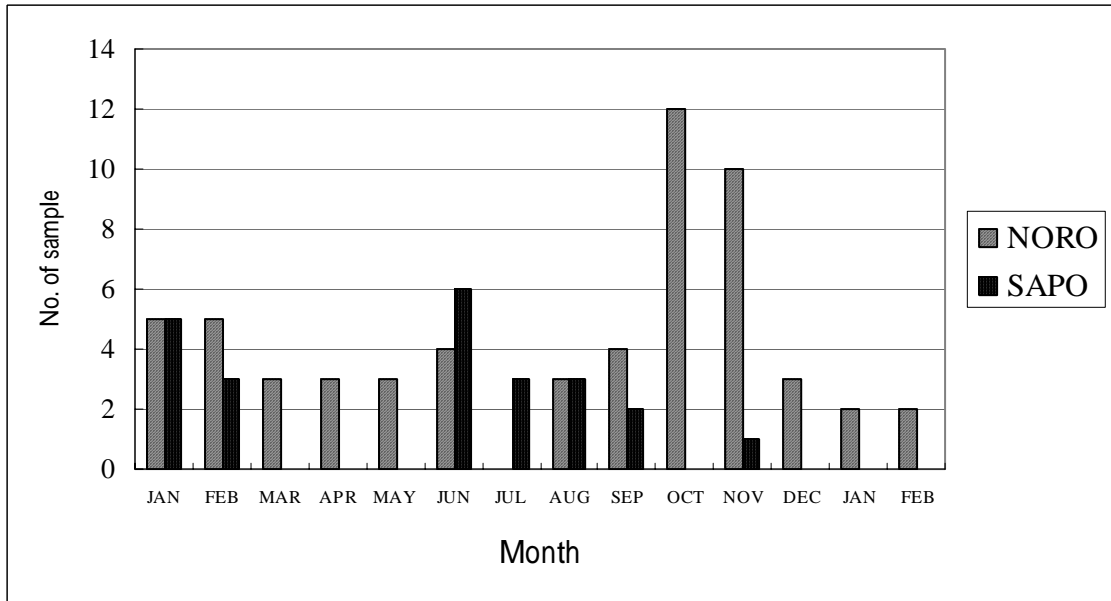
圖二、2004-2005 年輪狀病毒在各不同年齡層分佈之百分比



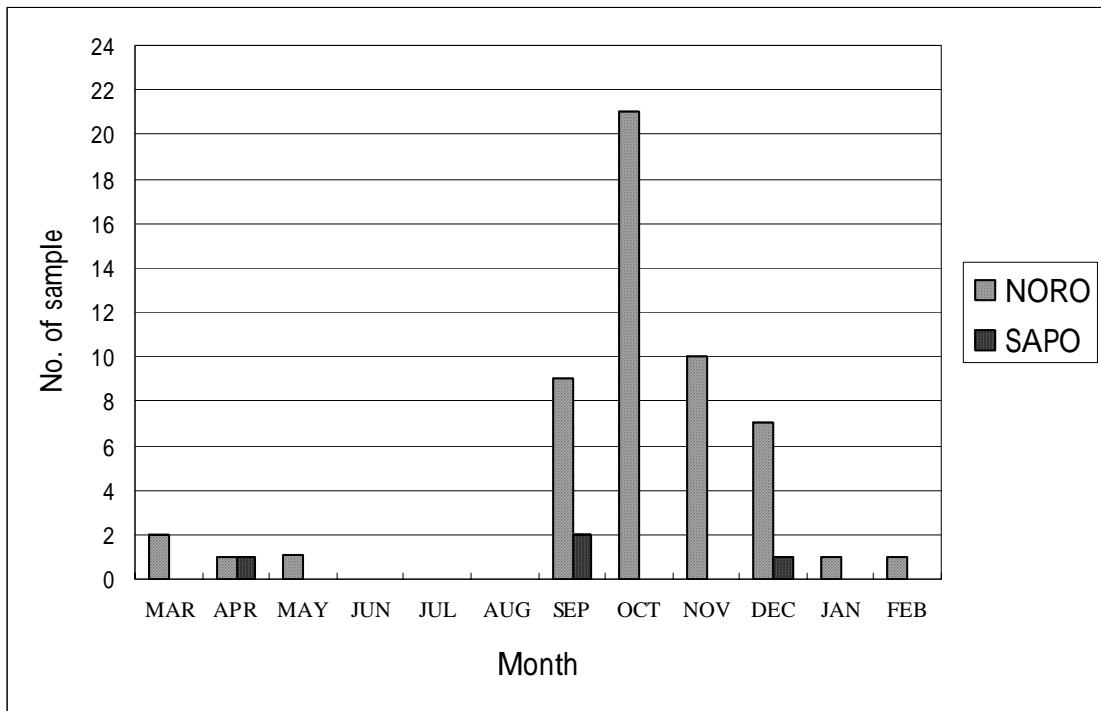
圖三、2004-2005 年各血清型輪狀病毒在不同月份分布之狀況



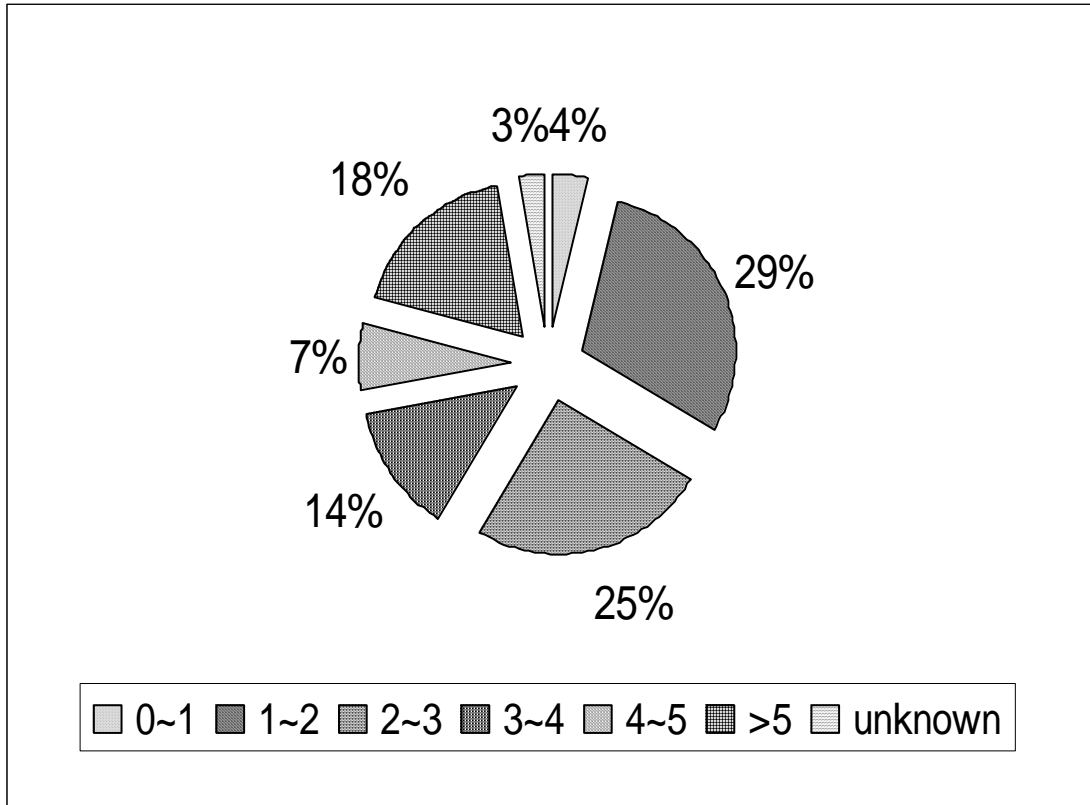
圖四、台北地區 2002 年至 2003 年 2 月杯狀病毒於各月份分佈之狀況



圖五、高雄地區 2002 年 3 月至 2003 年 2 月杯狀病毒於各月份分佈之狀況



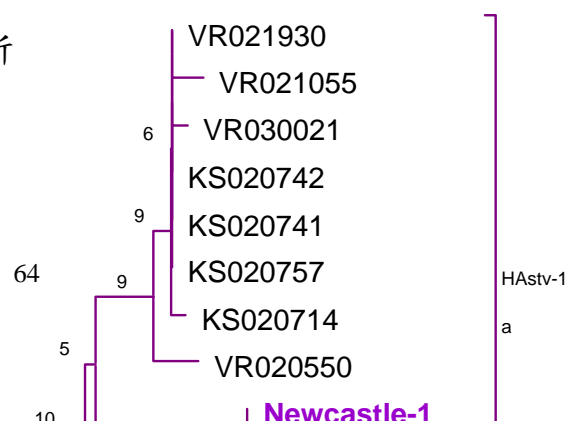
圖六、杯狀病毒陽性檢體年齡分佈之狀況



圖七、諾若病毒種系分析圖

TW022122  
 TW022262  
 TW022120  
 TW022032  
 TW021901  
 TW021918  
 TW022163

圖八、人類星狀病毒之種系分析



表一、輪狀病毒於台灣不同地區檢出率之比較

年度	地區	檢體個數	陽性檢體個數	檢出率(%)
2004年 1月~10月	台北	1412	252	17.8
	高雄	440	131	29.8
	總計	1852	383	20.7
2004年11月~2005 年10月	台北	1619	120	7.4
	高雄	406	92	22.7
	總計	2025	212	10.5

表二、台灣不同地區輪狀病毒陽性檢體中男女性所佔比例之比較

年度	地區	輪狀病毒陽性檢體個數(%)		
		男性	女性	總計
2004年 1月~10月	台北	143(56.7)	109(43.3)	252
	高雄	84(64.1)	47(35.9)	131
	總計	227(59.3)	156(40.7)	383
2004年11月 ~2005年10月	台北	76(63.3)	44(36.7)	120
	高雄	51(55.4)	41(44.6)	92
	總計	127(59.9)	85(40.1)	212

表三、輪狀病毒於台灣不同地區及不同性別中檢出率之比較

年度	地區	男性			女性		
		檢體個數	陽性檢體個數	檢出率(%)	檢體個數	陽性檢體個數	檢出率(%)
2004年 1月~10月	台北	802	143	17.8	610	109	17.9
	高雄	266	84	31.6	174	47	27.0
	總計	1068	227	21.3	784	156	19.9
2004年11月 ~2005年10月	台北	952	76	8.0	667	44	6.6
	高雄	225	51	22.7	181	41	22.7
	總計	1177	127	10.8	848	85	10.0

表四、台灣不同地區輪狀病毒在各年齡層分布狀況之比較

年齡層	陽性檢體個數(%)			
	台北		高雄	
	2004年1月-10月	2004年11月 -2005年10月	2004年1月-10月	2004年11月 -2005年10月
0~1	59(23.4)	21(17.5)	24(31.5)	21(22.8)
>1~2	64(25.4)	33(27.5)	11(14.5)	19(20.7)
>2~3	44(17.5)	20(16.7)	9(11.8)	17(18.5)
>3~4	24(9.5)	19(15.8)	10(13.2)	12(13.0)
>4~5	23(9.1)	8(6.7)	6(7.9)	6(6.5)
>5	38(15.1)	19(15.8)	16(21.1)	17(18.5)
總計	252	120	76	92

表五、輪狀病毒各種 G 血清型在台灣不同地區分布狀況之比較

年度	地區	檢體個數 (%)						總計
		G1	G2	G3	G4	G9	Mixed	
2004年 1月~10月	台北	47 (20.2)	60 (25.8)	33 (14.2)	0 (0)	90 (38.6)	3 (1.3)	233
	高雄	21 (17.9)	9 (7.7)	13 (11.1)	0 (0)	67 (57.3)	7 (6.0)	117
	總計	68 (19.4)	69 (19.7)	46 (13.1)	0 (0)	157 (44.9)	10 (2.9)	350
2004年11月 ~2005年10月	台北	19 (18.3)	30 (28.8)	37 (35.6)	0 (0)	18 (17.3)	0 (0)	104
	高雄	12 (15.8)	45 (59.2)	14 (18.4)	0 (0)	4 (5.3)	1 (1.3)	76
	總計	32 (17.5)	75 (41.0)	52 (28.4)	0 (0)	23 (12.6)	1 (0.6)	183



表六、由台北地區與高雄地區急性腸胃炎檢體中偵測諾若病毒與沙波病毒

地區	PCR 結果			陰性檢體數	總計
	陽性檢體數(%)				
	NORO	SAPO	小計		
台北	59 (3.27)	23 (1.28)	82 (4.55)	1721	1803
高雄	53 (8.26)	4 (0.62)	57 (8.88)	585	642
總計	112 (4.58)	27 (1.10)	139 (5.69)	2033	2445

表八、台北地區及高雄地區 2002 年 3 月至 2003 年 2 月輪狀病毒陰性及陽性糞便檢體之人類星狀病毒聚合酶連鎖反應檢測結果

地區		檢體個數 (%)		總計
		PCR (+)	PCR (-)	
台北	Rota (-)	99 (8.2)	1110	1209
	Rota (+)	24 (7.8)	287	311
總計		123 (8.1)	1397	1520
高雄	Rota (-)	35 (6.2)	529	564
	Rota (+)	0 (0)	88	88
總計		35 (5.5)	605	640

表九、PCR 陽性檢體之人類星狀病毒序列分型

基因型	PCR 陽性檢體個數 (%)		
	台北地區	高雄地區	總計
1	110(89.4)	30(86)	140(88.6)
2	2(1.6)	—	2(1.3)
3	1(0.8)	—	1(0.6)
4	5(4.1)	5(14)	10(6.3)
5	1(0.8)	—	1(0.6)
6	—	—	—
7	—	—	—
8	4(3.3)	—	4(2.5)
總計	123	35	158

表七、Norovirus 之 RNA polymerase 核酸與胺基酸序列之相似性比較

	TW022148	Camberwell	Lordsdale	Snow_mountain	TW021969	Hawaii	TW021458	MOH	TW020093	Toronto_24	Mexico_89	TWK020618
TW022148		92.7	90.5	79.9	85.8	86.1	85	76.6	76.3	75.9	75.2	75.5
Camberwell	95.6		94.2	83.2	88.7	89.1	88	76.6	76.3	77.4	75.9	77
Lordsdale	95.6	100		84.7	89.4	88	88.3	75.9	75.5	77.4	75.9	77
Snow_mountain	92.3	96.7	96.7		85	82.5	82.1	77.4	76.3	76.6	75.5	76.3
TW021969	95.6	98.9	98.9	95.6		84.7	84.7	75.5	75.2	74.1	72.3	73.4
Hawaii	94.5	96.7	96.7	93.4	96.7		91.2	73.7	74.8	75.5	74.5	75.5
TW021458	96.7	98.9	98.9	95.6	98.9	97.8		75.9	75.9	74.8	74.5	74.8
MOH	87.9	87.9	87.9	86.8	89	87.9	87.9		95.6	74.5	74.1	74.5
TW020093	87.9	87.9	87.9	86.8	89	87.9	87.9	100		76.3	75.2	75.5
Toronto_24	87.9	89	89	91.2	87.9	86.8	87.9	90.1	90.1		97.1	96.4
Mexico_89	84.6	85.7	85.7	87.9	84.6	83.5	84.6	86.8	86.8	96.7		94.9
TWK020618	87.9	89	89	91.2	87.9	86.8	87.9	90.1	90.1	100	96.7	
Desert	62.6	62.6	62.6	59.3	62.6	63.7	63.7	58.2	58.2	58.2	56	58.2
Southampon	61.5	61.5	61.5	61.5	61.5	62.6	62.6	61.5	61.5	62.6	60.4	62.6
TW022128	61.5	61.5	61.5	61.5	61.5	62.6	62.6	61.5	61.5	62.6	60.4	62.6
Hesse	61.5	61.5	61.5	63.7	61.5	62.6	62.6	61.5	61.5	63.7	61.5	63.7
TW020111	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	61.5	61.5	60.4	60.4	61.5	59.3	61.5
Norwalk	58.2	58.2	58.2	58.2	58.2	59.3	59.3	59.3	59.3	59.3	57.1	59.3

\* 右上半數字為核酸序列之相似性百分比，左下半數字為胺基酸序列之相似性百分比