計畫編號：DOH102-DC-2103

行政院衛生署疾病管制局 102 年度科技研究發展計畫

# 人與動物之輪狀病毒病毒株監測與流行病學分析

## 研究報告

執行機構：研究檢驗中心

計畫主持人：　吳和生 主任

協同主持人：　吳芳姿

協同主持人：　蔡向榮 所長

協同主持人：　廖明輝 教授

協同主持人：　黃玉成 主任

協同主持人：　江大雄

研究人員：　盧祉彤

研究人員：　胡書佳

執行期間：102 年 1 月 1 日至 102 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…… 4

二、材料與方法…… 8

三、結果…… 12

四、討論…… 15

五、結論與建議…… 17

六、計畫重要研究成果與具體建議…… 18

七、參考文獻…… 19

八、圖表…… 23

## 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

在 2009-2011 年間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，目前仍為自費性疫苗，初步估計我國孩童服苗率約 5 成左右；因此，監測疫苗上市前後的主流病毒株變化，將有助於衡量疫苗的保護效果。

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；過去研究資料指出，在不同宿主間 G 與 P 抗原型別有固定的組合，但近幾年在國際間發表的文獻中，逐漸發現自感染的孩童檢體中，檢出非感染人類宿主的 G/P 組合病毒株，在台灣由本署於 2004-2011 年間監測中，亦自住院孩童糞便中檢出重組病毒，重組基因來源包括豬、牛、狗等。因此本研究計畫目標在於監測我國輪狀病毒於人類與非人類宿主中之輪狀病毒型別與基因資料，將有助於初步了解本土輪狀病毒於各種宿主間病毒型別的分布狀況，並建立本土病毒資料，有助於了解我國孩童感染輪狀病毒的變異與新重組病毒株的型別變化可能的來源，將可作為防疫調查或防治方向參考。

# 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. 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.

Rotaviruses are classified into an individual genus within the family *Reoviridae*. The genome consists of 11 segments of double strained 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 animal 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.

The purpose of this study is to establish the molecular diagnosis method and gene database to identify the prevalence of rotavirus strains from human and non-human source in Taiwan. Also, monitor the distribution of rotavirus from hospitalized children and animal with diarrhea, and comparing those strains will be important information for the investigation in the outbreaks.

## 一、前言：

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題,大約有上佰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。引起食因性疾病之已知感染原中病毒性約佔 79%，細菌性只佔 14%左右，而引起嬰幼兒急性腸胃炎的病毒又以輪狀病毒（*Rotavirus A*）排名第一。在美國及日本流行病學調查中，輪狀病毒、杯狀病毒及星狀病毒感染多發生於較冷的月份約 10 月至隔年 4 月，腺病毒及全年發生率無多大差異。年齡分布：輪狀病毒易感染嬰兒及小於 5 歲之幼兒；星狀病毒及腺病毒主要感染幼童，但成人及較大之孩童也可能感染。

輪狀病毒為雙股 RNA 病毒，具有 11 個基因片段，不具外蛋白套膜，約有 6 種以上血清型，感染人類主要為 A 血清型。輪狀病毒不容易以細胞培養病毒，因此不易分離[7]。檢測方式包括：糞便檢體之電子顯微鏡檢驗（EM）、酵素免疫反應（ELISA）及乳膠凝集法（Latex agglutination）[2]，或以分子生物學方式如 RT-PCR、核酸雜交法（Probe hybridization）檢測病毒核酸基因[3]，以 RNA-PAGE 或序列分析方式可以應用於流行病學調查研究[4]。

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[5, 6]；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[7]。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）[8]，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[9]。另外，在本局委託國衛院執行的「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[5, 10, 11]，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。

早在 1990 年代，全球各藥廠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。目前新一代輪狀病毒疫苗—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[12, 13]，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。

目前通過核准上市之 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。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[14, 15, 16, 17]，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或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。

傳統上認為病毒都會有特定的宿主，但越來越多的文獻指出一些在人類分離出的新病毒株，其基因序列含有動物病毒株來源。例如：輪狀病毒[18, 19]、諾羅病毒[20]、E 型肝炎病毒[21]、冠狀病毒[22]。這些病毒皆為 RNA 病毒，並且可以藉由糞便排出到環境中，此些共同特性推測是造成人畜共通傳染的最可能原因。

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[23]。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[24]。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 型和 35 種 P 型在禽類和哺乳類中被發現[25]。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。

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[24]，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[26]；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[27]；亦是幼馬在 3 個月大前腹瀉的主因[28]。

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)[18]；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[19]。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[29]。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[30]。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，鴿的輪狀病毒(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[31]。

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]G6P、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[32]。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[25]。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[34]。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 [17,35]。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[33]。

二、材料與方法：

(一)、 檢體來源： (1)定點監測醫院收集急性腸胃炎住院孩童的糞便檢體。 (2)個案臨床為卷資料調查與生活環境接觸史資料調查。(3)定期採集國內養殖動物(豬)糞便樣本，預估分季在北中南區採樣。

(二)、 臨床問卷及生活環境史問卷表：如附件。

(三)、 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。處理情形如下：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℃，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，標示號碼及日期保存於－80℃。

(四)、 酵素免疫分析法：

輪狀病毒分析：使用 γ-biopharm 生產的 RIDACSCREEN® Rotavirus (C0901)檢測，分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μL 置於 RIDACSCREEN® Rotavirus (C0901)的微小孔(microwell)中，並加入 2 滴 Enzyme Conjugate 1，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 μL 清洗 5 次，拍乾微小孔中水分，加入 Enzyme Conjugate 2，於室溫中靜置反應 30 分鐘後之後，去除混合反應液再用清洗液 300 μL 清洗 5 次，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 (μQuant)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。

(五)、 病毒培養：目的在於保存台灣本地各型別病毒株及大量培養病毒以供後續分析使用。

（1）陽性檢體之 10% 糞便檢體懸浮液加入等量的氯仿，完全震盪混合均勻，

3,000rpm 離心 10 分鐘，上清液作為接種細胞之材料。

（2）上清液先用 0.45μm 濾膜過濾，加入等量的 20μg/mL Tripsin，於 37℃處理 20 分鐘。

（3）用含 3% 胎牛血清培養的 CaCo2 細胞，先以 EMEM 清洗 2 次，接種已經處理之檢體標本，37℃吸附 1 小時，並且每 15 分鐘將接種液在細胞表面輕輕晃動一次。

（4）去除所有的接種液。

（5)加入含 Tripsin1~4μg/mL EMEM 維持液 1~2mL，37℃旋轉培養或搖動培養。

（6）培養 6~7 天，逐日觀察細胞變化，並繼代培養三次。

(六)、 RNA 的萃取：

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

(七)、 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)：

(1) 逆轉錄酶反應：

5μl RNA 加上 1μl Random primer(3μg/μl)與 7μl 的水混合均勻，65℃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(4μl 5X RT buffer, 2μl 10mM dNTP, 0.5μl RNase inhibitor(40U), 0.5μl Reverse Transcriptase(20U/μl))，總體積為 20μl，25℃反應 10 分鐘，50℃反應 45 分鐘，85℃反應 5 分鐘在降溫至 4℃待用。

(2) 聚合酶鏈鎖反應：

1. 偵測輪狀病毒 VP7 基因(G type)：

用逆轉錄酶製成的 2.5μl cDNA 加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5μl 10X PCR

buffer, 4μl 2.5mM dNTP, 0.8μl Taq (5U/μl), Primers: 0.5μl 9BEG(10μM), 0.5μl 9END(10μM), 14.2μl $H_2O$)，總體積為 25μl。進行聚合酶連鎖反應，94℃反應 2 分鐘之後進行 40 個循環：94℃反應 45 秒，42℃反應 45 秒，72℃反應 90 秒。接著 72℃反應 10 分鐘，降溫至 4℃。

2. 偵測輪狀病毒 VP4 基因(P type)：

用逆轉錄酶製成的 2.5μl cDNA 加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5μl 10X PCR buffer, 4μl 2.5mM dNTP, 0.8μl Taq (5U/μl), Primers: 0.5μl Con2(10μM), 0.5μl Con3(10μM), 14.2μl $H_2O$)，總體積為 25μl。進行聚合酶連鎖反應，94℃反應 3 分鐘之後進行 40 個循環：94℃反應 30 秒，50℃反應 2 分鐘，72℃反應 1 分鐘。接著 72℃反應 7 分鐘，降溫至 4℃。

3. 偵測輪狀病毒 VP6 基因：

用逆轉錄酶製成的 2.5μl cDNA 加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5μl 10X PCR buffer, 4μl 2.5mM dNTP, 0.8μl Taq (5U/μl), Primers: 0.5μl VP6F(10μM), 0.5μl VP6R(10μM), 14.2μl $H_2O$)，總體積為 25μl。進行聚合酶連鎖反應，94℃反應 3 分鐘之後進行 40 個循環：94℃反應 45 秒，55℃反應 45 秒，72℃反應 2 分鐘。接著 72℃反應 10 分鐘，降溫至 4℃。

4. 偵測輪狀病毒 NSP4 基因：

用逆轉錄酶製成的 2.5μl cDNA 加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5μl 10X PCR buffer, 4μl 2.5mM dNTP, 0.8μl Taq (5U/μl), Primers: 0.5μl JRG30(10μM), 0.5μl JRG31(10μM), 14.2μl $H_2O$)，總體積為 25μl。進行聚合酶連鎖反應，94℃反應 3 分鐘之後進行 40 個循環：94℃反應 45 秒，50℃反應 45 秒，72℃反應 1 分鐘。接著 72℃反應 10 分鐘，降溫至 4℃。

(八)、 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、1μM 反應引子(9con1 或 9con2)、1μL BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為 10 μL。將裝有反應物之微量離心管於 96℃ 作用 1 分鐘，之後反應條件為 96℃ 10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 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 10μL 加入等體積的 ddH2O、60μL 的絕對酒精、5μL 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 10μL Hi-diformamide。

基因定序反應：將純化後產物置於 96 ℃ 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。

(九)、 病毒基因庫分析比對：將定序後之鹼基序列與 NCBI 基因資料庫中已知之基因序列進行比對分析，以確定病毒序列宿主來源相關性。

三、結果

為了找出輪狀病毒之人-畜共通傳染證據與輪狀病毒之可能傳染源，本年監測以收集輪狀病毒感染孩童之檢體進行輪狀病毒分析及環境接觸調查資料；同時建立動物輪狀病毒檢測方法，採集我國主要畜產動物(豬)之糞便檢體，進行豬之輪狀病毒檢測與流行概況分析。收案醫院於 102 年 4 月底通過 IRB 審查後，自 5 月起開始進行腹瀉住院孩童之收案與檢驗工作；動物之輪狀病毒來源與「國立屏東科技大學」和「家畜衛生研究所」合作，由此兩單位分季進行各農場之豬隻檢體採樣與檢驗工作。研檢中心進行孩童收案病毒型別分析，及人和豬隻之輪狀病毒序列比對與分子演化分析。

(一) 定點監測醫院收集急性腸胃炎住院孩童糞便檢體之輪狀病毒分析

5-10 月份從林口長庚醫院共收到 172 件符合定義之檢體，依 RT-PCR 檢測結果分析，輪狀病毒檢出率為 25% (介於 6.25%~39.7%)；分析病毒 VP4/VP7 基因型別，今年檢出輪狀病毒陽性檢體以 G1P[8]為主，占 65.1% (28/43)，其次 G2P[4]占 20.9% (9/43)，及 G9P[8]、G3P[8]、Guntype P[8]分別各占 4.7% (2/43)，結果整理如 Table 1。與過去監測全國 5 歲以下腹瀉住院孩童資料比較，輪狀病毒月份流行趨勢如圖一，輪狀病毒在台灣孩童感染持續維持穩定性的季節性變化，冬季與春季為主要感染季節；本年與過去整體趨勢無多大變化，但由於收案自 5 月份至 10 月份間，為我國輪狀病毒流行低點；本年僅以北區一家醫院為收案監測點，與過去全國資料或北區資料比較，在 5 月與 9 月二個月分陽性率略高於過去全國歷年陽性率，9、10 月陽性率亦略高於過去同一醫院歷年陽性率。雖本年收案在輪狀病毒非流行季，但比較本年收案孩童與過去三家醫院收案時之臨床症狀(Table 4)，今年多數收案在 6-35 個月間(74%)，但以 12-24 個月居多，在臨床症狀表現無多大差異。

(二) 分季豬場輪狀病毒流行監測與病毒分析

國立屏東科技大學與家畜衛生研究所，分季於各養豬場採集於出生一月齡以下之豬隻糞便檢體，採集樣本多以有出現下痢症狀之豬隻為主，採樣之豬場分散於北區(桃園)、中區(彰化、雲林、嘉義)及南區(台南、屏東)，分季採樣，總收案數共 537 件。本年研究目的也在建立適合用於豬隻檢測輪狀病毒的檢體採檢方法及分生檢測方法，但為配合後續比對分析，分別設計適合人與豬可以共同使用之 VP4、VP7、VP6 及 NSP4 基因引子對，目前各檢體均已完成 VP4 及 VP7 基因檢測，依這兩個基因檢出結果分析各季各豬場檢驗結果如 Table 2。依分季檢測結果，從豬檢體在二、三、四季均有檢出輪狀病毒陽性，但陽性數集中於第四季，豬場檢出陽性率介於 11~30% 之間，除 2013 年 5 月在雲林採樣的檢體，VP7 基因檢出陽性率偏高應需再確認，但受限於檢體量不足，已無法再以其他引子對分析。另依檢出輪狀病毒農場分布分析，陽性樣本分散在北區(桃園)、中區(雲林、嘉義)及南區(台南、屏東)。主要檢出的季節與台灣孩童腹瀉監測中輪狀病毒的主要流行季節相似。

為瞭解本土豬隻之流行病毒株型別，檢出輪狀病毒陽性檢體以定序比對方式，進行病毒株 G/P (VP7/VP4)基因型別分析，結果如 Table 3。檢出 VP7 基因型以 G9 為主(37.8%, 14/37)、其次為 G3(16.2%, 6/37)、G11(5.4%, 2/37)、G4(2.7%, 1/37)，仍有部分序列不完整或無法與基因資料庫比對較相近的參考序列;檢出 VP4 基因型以 P[13]與 P[19]為主分別占 35.1% (13/37)，其次為 P[6] (10.8%, 4/37)、P[17] (2.7%, 1/37)，部分序列不完整或無法與基因資料庫比對較相近的參考序列。

(三) 人與豬主要輪狀病毒株比對分析

以本年收集樣本分析自孩童檢出與自豬隻檢出之輪狀病毒病毒株，檢出感染病毒型別均不相同，孩童感染病毒株型別為 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]等，豬隻感染病毒株型別為 G3P[19]、G4P[13]、G11P[13]、G9P[6]、G9P[13]、G9P[17]等。

雖本年無檢出相同病毒株，但部分豬隻病毒卻與過去我國腹瀉孩童輪狀病毒之病毒株型別相同，在 2004-2011 年孩童監測中，曾檢測到特殊病毒型別包括 P[3]、P[6]、P[8]、P[9]、P[11]、P[14]、P[19]與 P[25]，因此分別以 VP4 及 VP7 基因核酸序列演化樹分析相關性。

VP4 基因核酸序列比對如圖二，各序列以黑、紅、綠顏色區分為參考病毒株、豬隻檢出病毒株、及孩童檢出病毒株序列。在 P[19] 基因型中大致可以分為 2 個 cluster，自屏東檢出的豬輪狀病毒(C18,C26,C34,C41,C42,C43,C46,C47,C51,C88)與過去孩童檢體編號 03-98s-185-P、07-96s-1118-P 屬於相同 cluster，自嘉義檢出的豬輪狀病毒(N2,N9,P16,P19,P24)與 04-97s-51-P、07-94s-126-P、07-97s-684 屬於相同 cluste。在 P[6]基因型中，自桃園檢出的豬輪狀病毒(O3,O14,O15,O21)與過去孩童檢體編號 03-98s-140-P、07-98s-256-P 相同 cluster。在 P[13]基因型中，過去還未從我國孩童檢出該基因型病毒株，在本年豬隻檢測序列大致可以區分為 3 個 cluster，分別各屬於從屏東、雲林與台南檢出。

VP7 基因核酸序列比對如圖三，各序列以黑、紅、綠顏色區分為參考病毒株、豬隻檢出病毒株、及孩童檢出病毒株序列。在 G3 基因型中，從屏東豬場檢出之豬輪狀病毒(C26,C41,C43,C46,C47C51)與人的輪狀病毒分屬不同 cluster。在 G9 基因型中，本年孩童檢體編號 03-102s-21-G 與 03-102s-73-G 與豬隻序列分屬不同群，但在 2007 與 2009 年自孩童檢出的檢體編號 07-98-256-G 與 07-96-1118-G 與嘉義檢出的豬輪狀病毒(N1,N2)較為相近，大致上本次 G9 豬輪狀病毒可以區分為至少 4 群，各分屬於自雲林、嘉義與屏東農場；與基因資料庫比對，台灣豬隻 G9 輪狀病毒與美國 G9 病毒株序列最為相近。

四、討論

本次研究計畫的主要動機在於為食媒性計畫先建立自動物採樣與檢驗病毒的方法，並以分季抽樣的方式自台灣各地不同農場採集樣本，初步了解於動物中輪狀病毒的分布與本土輪狀病毒株型別。此外，亦為了瞭解之前研究監測計畫中曾檢出疑似人-畜重組特殊輪狀病毒株，希望探討在台灣的分布狀況，由於當時檢出之疑似人-畜重組特殊輪狀病毒株，以基因序列比對分析以人-豬輪狀病毒基因重組個案比例最多，因此本年研究計畫動物檢體以採集豬檢體為優先。

從 2004-2011 年間自 5 歲以下腹瀉住院孩童監測中，收集 8500 件檢體其中檢出輪狀病毒陽性占 1818 件 (21.3%)，主要病毒型別以 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]為主，占總檢出輪狀病毒陽性之 84.4% (1534/1818)，其他陽性檢體檢出特殊基因型別包括 G4、G5、G8、G12 及 P[3]、P[6]、P[9]、P[14]、P[19]、P[25]等，約占總檢出輪狀病毒陽性之 8%。參考國外文獻資料，相關之特殊基因型別多發表來自非洲國家、亞洲國家及開發中國家，並且與動物的輪狀病毒的相似度極高，因此專家學者推測輪狀病毒的多段雙股 RNA 基因片段，具有易重組的特性，而在開發中國家的農牧生活型態亦可能為引起重組特殊新病毒的可能原因。

過去我國在動物的輪狀病毒檢測或型別監測並無文獻相關資料可以參考，因此對於自腹瀉孩童檢出的疑似重組病毒株，仍無法與國內的相關動物資料進行比對分析。本次研究結果可以初步顯示我國豬隻輪狀病毒的型別分布，在相同型別病毒間隨豬場的地區性不同亦產生演化差異。以 VP4 基因比較: P[19]基因型病毒株區隔成屏東與嘉義二群，分別與基因資料庫中日本與東埔寨病毒株最為相近，相似度約 85~86%；P[13]基因型病毒株區隔成屏東、雲林與台南三群，分別與基因資料庫中泰國、日本與巴西豬隻輪狀病毒株最為相近，相似度約 86~90%；P[6]基因型病毒株自桃園豬隻檢出，與日本豬隻輪狀病毒株序列相似度 94%。在 VP7 基因比較: G3 基因型病毒株自屏東豬隻檢出，與泰國豬隻輪狀病毒株最為相近，相似度約 90%，而 2009 年孩童檢出的 G3P[19]與泰國豬隻的基因序列相似度 89%； G9 基因型病毒株分布最廣，分別自桃園、嘉義、

雲林、屏東之豬隻檢出，與美國人類輪狀病毒株最為相近，相似度約 90-93%，其中嘉義的豬隻病毒株與 2009 年孩童檢出的 G9P[6]及 G9[19]之 VP7 基因相近似，但今年孩童檢出的 G9P[8]之 VP7 基因與豬的不同。

五、結論與建議：

本研究已建立自豬場採樣、樣本挑選、檢體樣本體積、前處理流程與檢測輪狀病毒的分子生物學方法，但仍有部分基因檢測條件或引子的設計需要再稍作調整，以確認在豬的檢測陽性率的正確性，但整體的運作流程，已可以提供未來研究計畫執行的參考。建議持續性在孩童及動物病毒監測，並擴大至他種國人經常接觸的動物，可以更完整了解輪狀病毒在不同宿主的病毒株差異，將可以儲備未來在進行感染源調查時的基本資料。對於在孩童與豬隻同時檢出的病毒型別，雖本研究僅完成部分豬隻 VP4 與 VP7 序列，在初步的比對基因資料，更能了解病毒的可能來源，未來將需有更多的我國動物病毒基因資料才可以有明確結論。

輪狀病毒疫苗於 2006 年底在台灣核准上市，目前仍為自費性疫苗，初步估計我國孩童服苗率僅約 5 成左右，相較於在國外的文獻資料顯示，開始全面使用輪狀疫苗的國家對於降低 5 歲以下孩童腹瀉感染或疾病嚴重度均具有明顯保護效果。因此，我國的輪狀病毒疫苗對於孩童的保護效果，以及監測疫苗上市前後的主流病毒株變化，將有助於衡量疫苗的在我國的保護效益。

**六、計畫重要研究成果及具體建議：**

1. 持續監測並延續我國住院孩童腹瀉病毒監測，與輪狀病毒主要流行病毒株分析，將可以提供評估疫苗使用及疫苗株選殖參考。
2. 建立自豬場採樣、樣本挑選、檢體樣本體積、前處理流程與檢測輪狀病毒的分子生物學方法，已可以提供未來研究計畫執行的參考。建議持續性在孩童及動物病毒監測，並擴大至他種國人經常接觸的動物。

## 七、參考文獻：

依一般科學論文之參考文獻撰寫方式，列出所引用之參考文獻，並於計畫內容引用處標註之。


1. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe, *Food-related illness and death in the United States.* Emerg Infect Dis, 1999. **5**(5): p. 607-25.
2. Kapikian AZ, C.R., *Rotavirus*. Second ed. Virology, ed. B.N.K. D.M. 1990, New York. 1353-1404.
3. Gouvea, V., R.I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H.F. Clark, B. Forrester, and Z.Y. Fang, *Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.* J Clin Microbiol, 1990. **28**(2): p. 276-82.
4. Herring, A.J., N.F. Inglis, C.K. Ojeh, D.R. Snodgrass, and J.D. Menzies, *Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels.* J Clin Microbiol, 1982. **16**(3): p. 473-7.
5. Parashar, U.D., E.G. Hummelman, J.S. Bresee, M.A. Miller, and R.I. Glass, *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children.* Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
6. 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.
7. Bresee, J., Z.Y. Fang, B. Wang, E.A. Nelson, J. Tam, Y. Soenarto, S.A. Wilopo, P. Kilgore, J.S. Kim, J.O. Kang, W.S. Lan, C.L. Gaik, K. Moe, K.T. Chen, C. Jiraphongsa, Y. Ponguswanna, V.M. Nguyen, V.T. Phan, T.L. Le, E. Hummelman, J.R. Gentsch, and R. Glass, *First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network.* Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 988-95.
8. Tucker, A.W., A.C. Haddix, J.S. Bresee, R.C. Holman, U.D. Parashar, and R.I. Glass, *Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States.* Jama, 1998. **279**(17): p. 1371-6.
9. Di Giuseppe, G., C.G. Nobile, A. Marinelli, and I.F. Angelillo, *Knowledge, attitude and practices of pediatricians regarding the prevention of oral diseases in Italy.* BMC Public Health, 2006. **6**: p. 176.
10. *Protocals on rotavirus sureillance and health care services utilization for gastroenteritis in children*, in *WHO Department of vaccines abd Biologicals*. 2000, WHO/V&B/02.15.
11. Bresee, J.S., E. Hummelman, E.A. Nelson, and R.I. Glass, *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.

12. Vesikari, T., D.O. Matson, P. Dennehy, P. Van Damme, M. Santosham, Z. Rodriguez, M.J. Dallas, J.F. Heyse, M.G. Goveia, S.B. Black, H.R. Shinefield, C.D. Christie, S. Ylitalo, R.F. Itzler, M.L. Coia, M.T. Onorato, B.A. Adeyi, G.S. Marshall, L. Gothefors, D. Campens, A. Karvonen, J.P. Watt, K.L. O'Brien, M.J. DiNubile, H.F. Clark, J.W. Boslego, P.A. Offit, and P.M. Heaton, *Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine.* N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 23-33.
13. Ruiz-Palacios, G.M., I. Perez-Schael, F.R. Velazquez, H. Abate, T. Breuer, S.C. Clemens, B. Cheuvart, F. Espinoza, P. Gillard, B.L. Innis, Y. Cervantes, A.C. Linhares, P. Lopez, M. Macias-Parra, E. Ortega-Barria, V. Richardson, D.M. Rivera-Medina, L. Rivera, B. Salinas, N. Pavia-Ruz, J. Salmeron, R. Ruttimann, J.C. Tinoco, P. Rubio, E. Nunez, M.L. Guerrero, J.P. Yarzabal, S. Damaso, N. Tornieporth, X. Saez-Llorens, R.F. Vergara, T. Vesikari, A. Bouckenooghe, R. Clemens, B. De Vos, and M. O'Ryan, *Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis.* N Engl J Med, 2006. **354**(1): p. 11-22.
14. Kao-Pin Hwang, Fang-Tzy Wu, Krisztián Bányai, Ho-Sheng Wu, Dustin Chen-Fu Yang, Yhu-Chering Huang, Jen-Shiou Lin, Chao Agnes Hsiung, Jason C. Huang, Baoming Jiang and Jon R. Gentsch. *Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children.* J Med Microbiol. 2012; **61**(7):990-7.
15. Fang-Tzy Wu, Krisztia´n Ba´nyai, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu, Feng-Yee Chang, Chao Agnes Hsiung, Yhu-Chering Huang, Jen-Shiou Lin, Kao-Pin Hwang, Baoming Jiang and Jon R. Gentsch. *Human infection with novel G3P[25] rotavirus strain in Taiwan.* Clin Microbiol Infect. 2011; **17**(10):1570-3.
16. Fang-Tzy Wu, Krisztia´n Ba´nyai, Jen-Shiou Lin, Ho-Sheng Wu, Chao Agnes Hsiung, Yhu-Chering Huang, Kao-Pin Hwang, Baoming Jiang, and Jon R. Gentsch. *Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan.* Vector-borne and zoonotic diseases 2012; **12**(2):170-3.
17. Fang-Tzy Wu, Krisztia´n Ba´nyai, Jason C. Huang, Ho-Sheng Wu,* Feng-Yee Chang, Jyh-Yuan Yang, Chao Agnes Hsiung, Yhu-Chering Huang, Jen-Shiou Lin, Kao-Pin Hwang, Baoming Jiang, and Jon R. Gentsch. *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.* Journal of Medical Virology 2011; **83**(7):1279-87.
18. Ward RL, Jin Q, Nakagomi O, Sander DS, Gentsch JR. *Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotaviruses in coinfected cells.* Arch Virol. 1996; **141**(3-4):615-33.
19. B. Gratacap-Cavallier, O. Genoulaz, K. Brengel-Pesce, H. Soule, P. Innocenti-Francillard,

M. Bost, L. Gofti, D. Zmirou, and J. M. Seigneurin. *Detection of Human and Animal Rotavirus Sequences in Drinking Water.* Applied and Environmental Microbiology. 2000; **66**(6): 2690–2.

20. Wim H.M. van der Poel, Jan Vinjé, Reina van der Heide, Maria-Inmaculada Herrera, Amparo Vivo, and Marion P.G. Koopmans. *Norwalk-Like Calicivirus Genes in Farm Animals.* Emerging Infectious Diseases. 2000; **6**(1):36-41.
21. R. E. Engle, C. Yu, S. U. Emerson, X.-J. Meng, and R. H. Purcell. *Hepatitis E Virus (HEV) Capsid Antigens Derived from Viruses of Human and Swine Origin Are Equally Efficient for Detecting Anti-HEV by Enzyme Immunoassay.* Journal of Clinical Microbiology, 2002; **40**(12):4576-80.
22. Xiu-Xia Qu, Pei Hao, Xi-Jun Song, Si-Ming Jiang, Yan-Xia Liu, Pei-Gang Wang, Xi Rao, Huai-Dong Song, Sheng-Yue Wang, Yu Zuo, Ai-Hua Zheng, Min Luo, Hua-Lin Wang, Fei Deng, Han-Zhong Wang, Zhi-Hong Hu, Ming-Xiao Ding, Guo-Ping Zhao, and Hong-Kui Deng. *Identification of Two Critical Amino Acid Residues of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Its Variation in Zoonotic Tropism Transition via a Double Substitution Strategy.* The Journal of Biological Chemistry, 2005; 280(33): 29588–95.
23. Saif LJ and Jiang B. *Nongroup A rotaviruses of humans and animals.* Curr Top Microbiol Immunol. 1994; **185**:339-71.
24. V. Martella, Krisztia'n Ba' nyai, Jelle Matthijnssens, Canio Buonavoglia, Max Ciarlet. *Zoonotic aspects of rotaviruses.* Veterinary Microbiology. 2010; **140**:246–55.
25. Jelle Matthijnssens, Simona De Grazia, Jan Piessens, Elisabeth Heylen, Mark Zeller,Giovanni M. Giammanco, Krisztia'n Ba' nyai, Canio Buonavoglia, Max Ciarlet, Vito Martella, Marc Van Ranst. *Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains.* Infection, Genetics and Evolution. 2011; **11**:1396–1406.
26. Bendali F, Bichet H, Schelcher F, Sanaa M. *Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France.* Vet Res. 1999; **30**(1):61-74.
27. Vito Martella , Krisztia´n Ba´nyai, Eleonora Lorusso, Anna Lucia Bellacicco, Nicola Decaro, Michele Camero, Giancarlo Bozzo, Paschalina Moschidou, Serenella Arista, Giovanni Pezzotti, Antonio Lavazza, Canio Buonavoglia. *Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis.* Veterinary Microbiology. 2007; **123**:26–33.
28. Conner ME, Darlington RW. *Rotavirus infection in foals.* Am J Vet Res. 1980;**41**(10):1699-703.
29. M. S. Azevedo, L. Yuan, K.-I. Jeong, A. Gonzalez, T. V. Nguyen, S. Pouly, M. Gochnauer,W. Zhang, A. Azevedo, and L. J. Saif. *Viremia and Nasal and Rectal Shedding*

*of Rotavirus in Gnotobiotic Pigs Inoculated with Wa Human Rotavirus.* Journal of Virology. 2005; 79(9):5428–36.

30. Sue E. Crawford, Dinesh G. Patel, Elly Cheng, Zuzana Berkova, Joseph M. Hyser, Max Ciarlet, Milton J. Finegold, Margaret E. Conner, and Mary K. Estes. *Rotavirus Viremia and Extraintestinal Viral Infection in the Neonatal Rat Model.* Journal of Virology. 2006; **80**(10): 4820–32.
31. Yoshio Mori, Makoto Sugiyama, Mutsuyo Takayama, Yasuro Atoji, Toshiaki Masegi, and Nobuyuki Minamoto. *Avian-to-Mammal Transmission of an Avian Rotavirus: Analysis of Its Pathogenicity in a Heterologous Mouse Model.* Virology. 2001; **288**:63-70.
32. Krisztia´n Ba´ nyai, A´ gnes Bogda´ n, Gertrud Domonkos, Pe´ter Kisfali, Pe´ter Molna´ r, Andra´s To´ th, Be´la Melegh, Vito Martella, Jon R. Gentsch, and Gyo¨rgy Szu″ cs. *Genetic Diversity and Zoonotic Potential of Human Rotavirus Strains, 2003–2006, Hungary.* Journal of Medical Virology. 2009; **81**:362–70.
33. Fang-Tzy Wu, Krisztia´n Ba´nyai, Jen-Shiou Lin, Ho-Sheng Wu, Chao Agnes Hsiung, Yhu-Chering Huang, Kao-Pin Hwang, Baoming Jiang, and Jon R. Gentsch. *Putative Canine Origin of Rotavirus Strain Detected in a Child with Diarrhea, Taiwan.* Vector-borne and zoonotic diseases 2012; **12**(2):170-3.
34. Zornitsa Mladenova ,Hajnalka Papp, Gyorgy Lengyel, Peter Kisfali, Andrej Steyer, Adela F. Steyer, Mathew D. Esona, Miren Iturriza-Gomara, Krisztian Banyai. *Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria.* Infection, Genetics and Evolution. 2012 (in press).
35. Kao-Pin Hwang, Fang-Tzy Wu, Krisztián Bányai, Ho-Sheng Wu, Dustin Chen-Fu Yang, Yhu-Chering Huang, Jen-Shiou Lin, Chao Agnes Hsiung, Jason C. Huang, Baoming Jiang and Jon R. Gentsch. *Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children.* J Med Microbiol. 2012; **61**(7):990-7.

## 八、圖表

| Table 1 醫院監測5歲以下腹瀉住院孩童之輪狀病毒基因檢測與型別分析 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 月份 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月* | 累積件數 |
| 總件數 | 58 | 33 | 25 | 16 | 23 | 17 | 172 |
| VP7(+) | 21 | 6 | 5 | 1 | 5 | 3 | 41 |
| VP4(+) | 23 | 6 | 5 | 1 | 5 | 3 | 43 |
| VP6(+) | 21 | 6 | 5 | 1 | 5 | 3 | 41 |
| NSP4(+) | 23 | 6 | 5 | 1 | 5 | 3 | 43 |
| Rotavirus (+) | 23 (39.7%) | 6 (18.2%) | 5 (20.0%) | 1 (6.25%) | 5 (21.7%) | 3 (17.6%) | 43 (25.0%) |
| G1P[8] | 15 | 2 | 5 | 0 | 4 | 2 | 28 |
| G2P[4] | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | 9 |
| G3P[8] | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| G9P[8] | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| G- P[8] | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| G untype/P untype | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Table 2 分季農場豬之輪狀病毒基因檢測

| | | | 輪狀病毒分析 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 季節 | 年月 | 地區 | VP4 | VP7 | 陽性件數 | 陽性率(%) | 總檢驗件數 |
| 2012/三 | 2012.8 | 屏東 | 14 | 13 | 17 | 18.48 | 92 |
| | 2012.8 | 彰化 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 36 |
| 2012/四 | 2012.12 | 桃園 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 30 |
| 2013/一 | 2013.3 | 嘉義 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 25 |
| | 2013.3 | 屏東 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 26 |
| 2013/二 | 2013.5 | 雲林 | 6 | 44 | 44 | 74.58 | 59 |
| | 2013.5 | 台南 | 3 | 3 | 3 | 10.00 | 30 |
| | 2013.6 | 桃園 | 0 | 1 | 1 | 3.85 | 26 |
| | 2013.6 | 嘉義 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 38 |
| 2013/三 | 2013.8 | 桃園 | 0 | 0 | 0 | 0.00 | 30 |
| | 2013.8 | 嘉義 | 4 | 4 | 4 | 10.00 | 40 |
| 2013/四 | 2013.10 | 桃園 | 4 | 3 | 4 | 11.43 | 35 |
| | 2013.10 | 嘉義 | 5 | 0 | 5 | 12.50 | 40 |
| | 2013.10 | 屏東 | 9 | 0 | 9 | 30.00 | 30 |

Table 3 豬之輪狀病毒型別分析 (部分未完成定序分析)

| | 2012/三 | 2013/二 | | | 2013/三 | 2013/四 | | | 累積件數 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 屏東 | 雲林 | 台南 | 桃園 | 嘉義 | 桃園 | 嘉義 | 屏東 | |
| 年月 | 2012.8 | 2013.5 | 2013.5 | 2013.6 | 2013.8 | 2013.10 | 2013.10 | 2013.10 | |
| 總檢驗件數 | 92 | 59 | 30 | 26 | 40 | 35 | 40 | 30 | 352 |
| RT-PCR 分析 | | | | | | | | | |
| VP7(+) | 13 | 44 | 3 | 1 | 4 | 3 | 0 | 0 | 68 |
| VP4(+) | 14 | 6 | 3 | 0 | 4 | 4 | 5 | 9 | 45 |
| VP6(+) | NA | 54 | 6 | NA | NA | NA | NA | 14 | 60 |
| NSP4(+) | NA | 50 | 5 | NA | NA | NA | NA | 17 | 55 |
| Rotavirus 陽性數(陽性率)* | 17 (18.48%) | 44 (74.58%) | 3 (10.00%) | 1 (3.85%) | 4 (10.00%) | 4 (11.43%) | 5 (12.50%) | 9 (30.00%) | 87 (24.72%) |
| 病毒型別 | | | | | | | | | |
| G3P[19] | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 6 |
| G4P[13] | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 1 |
| G11P[13] | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 2 |
| G9P[6] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | NA | 2 |
| G9P[13] | 4 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | NA | 7 |
| G9P[17] | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 1 |
| G untype P[13] | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | NA | 3 |
| G untype P[19] | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | NA | 7 |
| G untype P[6] | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | NA | 2 |
| G9 P untype | 3 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | NA | 4 |
| G untype P untype | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | NA | 2 |

* Rotavirus VP4或VP7任一陽性即為陽性

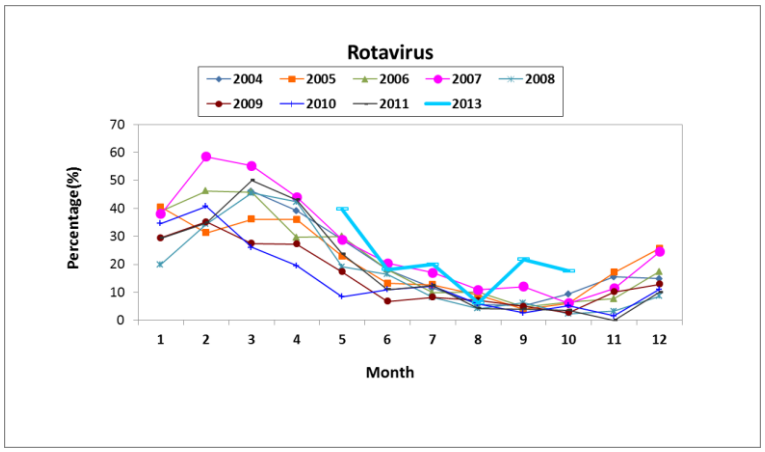
NA: Non-assay

Table 4. 小於五歲急性腸胃炎孩童收案年齡層與臨床症狀比較

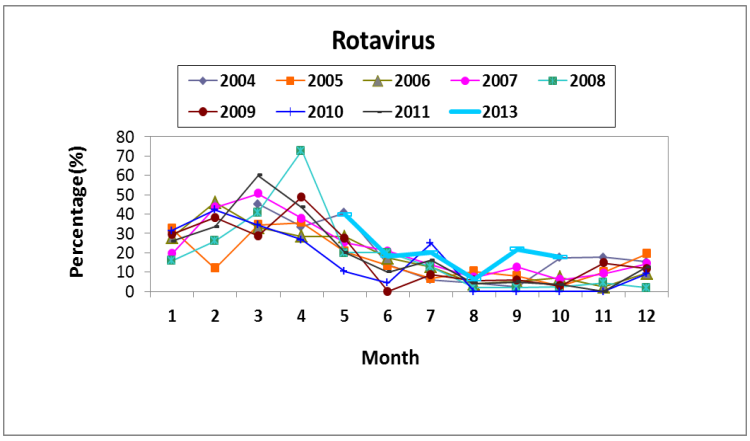
| Features | Rotavirus<br>林口長庚<br>2013/5/3~2013/11/12*<br>(n=35)<br>No. | (%) | Rotavirus<br>三家醫院<br>2011/1/1~2011/8/31<br>(n=166)<br>No. | (%) |
|---|---|---|---|---|
| Male gender | 29 | 82.9 | 92 | 55.4 |
| **Age (months)** | | | | |
| Mean±SD | 28.6±15.4 | | 29.6±15.5 | |
| Median | 23.7 | 67.7 | 28.8 | |
| Range | ~60.67 | | ~58.1 | |
| <6 | 0 | 0.0 | 5 | 3.0 |
| 6-11 | 6 | 17.1 | 18 | 10.8 |
| 12-23 | 12 | 34.3 | 45 | 27.1 |
| 24-35 | 8 | 22.9 | 33 | 19.9 |
| 36-47 | 4 | 11.4 | 40 | 24.1 |
| 48-60 | 5 | 14.3 | 25 | 15.1 |
| Hx of household member with AGE | 8 | 22.9 | 54 | 32.5 |
| **Symptoms** | | | | |
| Fever alone | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| Vomiting alone | 0 | 0.0 | 0 | 0.0 |
| Diarrhea alone | 0 | 0.0 | 1 | 0.6 |
| V and Fever | 32 | 91.4 | 0 | 0.0 |
| D and Fever | 33 | 94.3 | 19 | 11.5 |
| V and D | 34 | 97.1 | 8 | 4.8 |
| V + D + Fever | 32 | 91.4 | 138 | 83.1 |
| Bloody stool | 2 | 5.7 | 17 | 10.2 |
| Mucoid stool | 5 | 14.3 | 46 | 27.7 |
| **Duration of symtoms (days)** | | | | |
| Vomiting, mean±SD | 2.2±1.3 | | 1.9±1.7 | |
| >2 days | 15 | 42.9 | 38 | 22.9 |
| Diarrhea, mean±SD | 5.8±1.7 | | 4.8±2.1 | |
| >5 days | 19 | 54.3 | 43 | 25.9 |
| >8 days | 1 | 2.9 | 9 | 5.4 |
| Fever, mean±SD | 2.9±1.6 | | 3.3±2.3 | |
| >2 days | 20 | 57.1 | 96 | 57.8 |
| >39.0 degree (Before) | 4 | 11.4 | 48 | 28.9 |
| >39.0 degree (After) | 4 | 11.4 | 45 | 27.1 |
| Hospital stay (days) | | | | |
| Mean±SD | 4.7±1.6 | | 4.3±2.2 | |
| >5 days | 8 | 22.9 | 24 | 14.5 |
| **URI symptoms (+)** | 8 | 22.9 | 104 | 62.7 |

圖一、5 歲以下腹瀉住院孩童之輪狀病毒分月檢出率及與過去流行趨勢比較圖
(A) 與全國資料比較 (B) 相同醫院資料比較

(A)

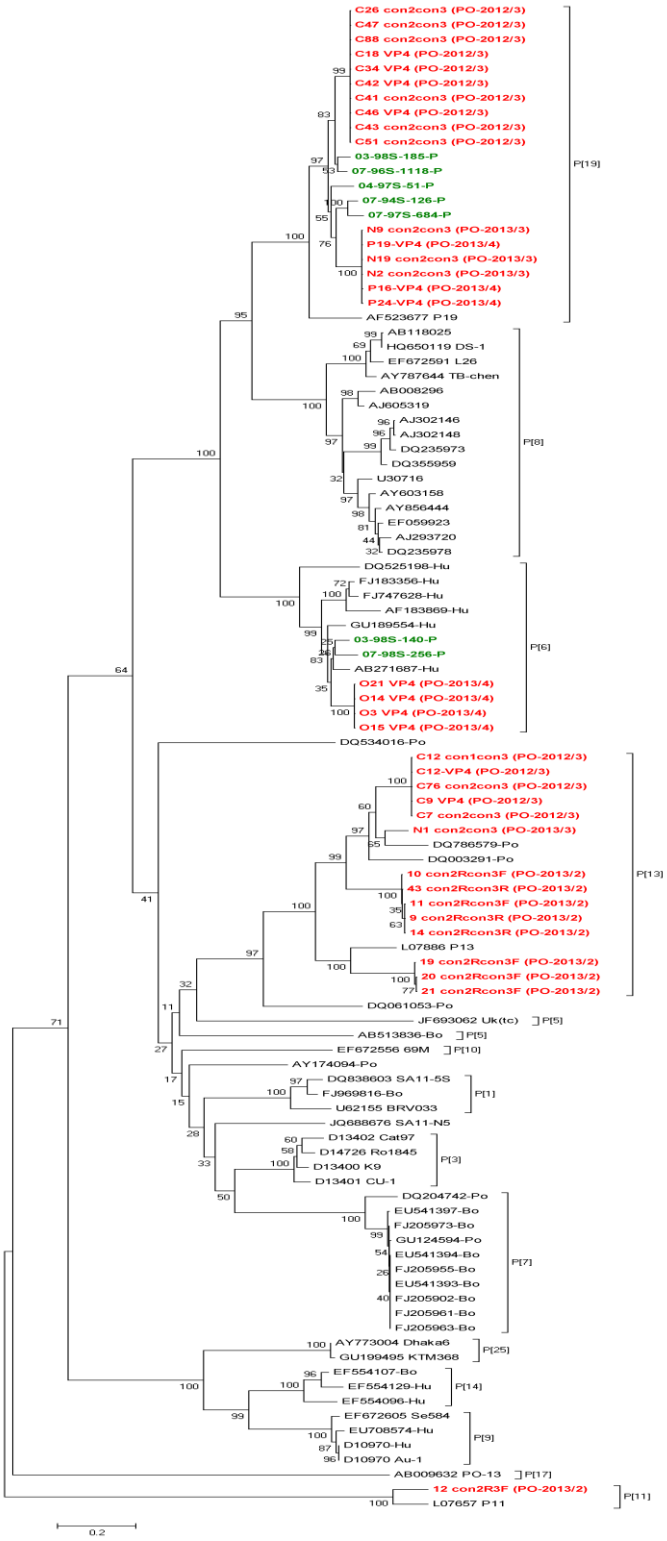



(B)



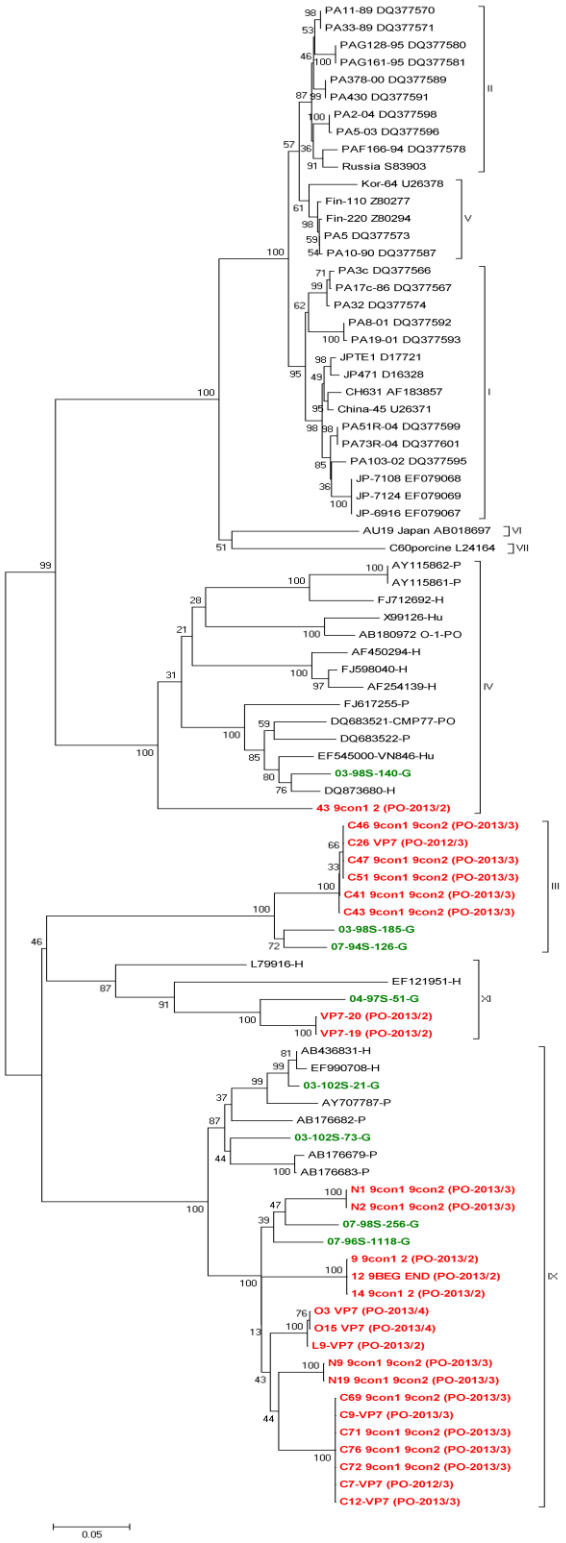
圖二、本年自孩童或豬隻檢出輪狀病毒之 VP4 序列分析

自孩童檢出之輪狀病毒序列以紅色字體表示，自豬隻檢出之輪狀病毒序列以綠色字體表示



圖三、本年自孩童或豬隻檢出輪狀病毒之 VP7 序列分析

自孩童檢出之輪狀病毒序列以紅色字體表示，自豬隻檢出之輪狀病毒序列以綠色字體表示



## 附件一　　生活環境與接觸史問卷

兒童姓名：_____　　收案編號：

出生日期：民國　　年　　月　　日　　性別：□男　　□女

填表時間：民國　　年　　月　　日　　連絡電話：_____

受訪者姓名：_____　　關係：_____

**基本資料**

1. 您的寶貝最近一週內第一次嘔吐或腹瀉日期: 民國___年___月___日 (若症狀超過一週者請填實際發生日期)
2. 您的寶貝家中排行第幾?　　排行第_____
3. 您的寶貝還有幾位兄弟姊妹?　共_____個　(不含兒童本人)
4. 同住的家人有幾位?　　共_____位　(不含兒童本人)
5. 您的寶貝是否曾經口服輪狀病毒疫苗?　(0)無　　(1)有 (第___劑/共___劑)　(9)不知道

**病史**

6. 您的寶貝最近一週是否曾經發燒?　(0)否　(1)是　(9)不知道
7. 您的寶貝最近一週是否曾經嘔吐?　(0)否　(1)是 (共_____次)　(9)不知道
8. 您的寶貝最近一週是否曾經腹瀉?　(0)否　(1)是 (共_____次)　(9)不知道
9. 您的寶貝最近一週是否曾就醫且醫師確診為腸胃炎?　(0)否　(1)是
10. 最近一週與您寶貝接觸的照顧者、家人或親友是否曾經發燒?　(0)否　(1)是　(9)不知道
11. 最近一週與您寶貝接觸的照顧者、家人或親友是否曾經嘔吐?　(0)否　(1)是　(9)不知道
12. 最近一週與您寶貝接觸的照顧者、家人或親友是否曾經腹瀉?　(0)否　(1)是　(9)不知道
13. 最近一週與您寶貝接觸的照顧者、家人或親友是否曾就醫且醫師確診為腸胃炎?　(0)否　(1)是　(9)不知道

**接觸史**

14. 您的寶貝最近一週是否到過下列公共場所? **(可複選)**　(01)公園　(02)操場　(03)傳統市場　(04)夜市 (05)園遊會 (06)博覽會/展覽　(07)動物園　(08)遊樂場　(09)寺廟　(10)車站　(11)捷運　(12)公共廁所　(13)百貨公司 (14)大賣場　(15)超商　(16)托兒所/幼稚園/安親班/學校　(17)書店/圖書館 (18)速食店 (19)餐廳 (20)餐飲店 (21)診所/醫院/療養院　(90)其他_____　(00)無　(99)不知道
15. 您的寶貝最近一週是否曾接觸動物?　(0)否 **[跳至第 23 題]**　(1)是　(9)不知道
16. 若[**是**], 接觸過的動物是 **(可複選)**　(1)狗 (2)貓 (3)鼠 (4)兔 (5)魚 (6)鳥 (7)雞 (8)鴨 (9)鵝 (10)牛 (11)羊 (12)馬　(13)豬　(14)烏龜　(15)青蛙 (16)蛇　(17)蜥蜴 (18)猴子　(19)昆蟲　(90)其他_____ (99)不知道
17. 您的寶貝最近一週是否曾經出國探親或旅遊?　(0)否　(1)是, 國家_____　(9)不知道
18. 您的寶貝最近一週是否曾與剛回國之親友接觸過? (0)否　(1)是, 國家_____ (9)不知道

19. 您的寶貝最近一週是否曾與他人共用澡盆或馬桶? (0)否 (1)是 (9)不知道
20. 您的寶貝最近一週是否曾與他人共用玩具? (0)否 (1)是 (9)不知道
21. 您的寶貝最近一週是否曾與他人共用枕頭、棉被或床鋪? (0)否 (1)是 (9)不知道
22. 您的寶貝最近一週是否曾與他人共用餐具或茶杯? (0)否 (1)是 (9)不知道
23. 您的寶貝最近一週是否曾與他人共用(或共洗)毛巾、衣物、鞋襪? (0)否 (1)是 (9)不知道
24. 您的寶貝是否會飯前洗手? (0)不洗手 (1)偶爾洗手 (2)經常洗手 (3)一定洗手 (9)不知道
25. 您的寶貝用的尿布是如何清洗? (0)不用尿布 (1)免洗 (2)手洗 (3)洗衣機洗 (9)不知道

**生活環境 (第 32-42 題詢問白天主要照顧者; 第 43-50 題詢問白天主要照顧者所在之照顧場所)**

26. 您的寶貝白天**主要**由誰照顧?
(1)父母 (2)祖父母或其他長輩 (3)親戚朋友 (4)褓母 (5)托兒所/幼稚園/安親班 (9)不知道
27. 您的寶貝是否需由大人餵食? (0)不需要 (1)自己會, 但需大人協助才吃完 (2)全程需大人餵食 (9)不知道
28. 主要照顧者是否也須照顧其他孩童? (0)否 **[跳至第 37 題]** (1)是 (9)不知道
29. 若**[是]**, 最近一週主要照顧者照顧的其他孩童是否有腹瀉嘔吐症狀? (0)否 (1)是 (9)不知道
30. 主要照顧者也須同時照顧成年病人或老人? (0)否 **[跳至第 39 題]** (1)是 (9)不知道
31. 若[**是**], 最近一週主要照顧者照顧的成年病人或老人是否有腹瀉嘔吐症狀? (0)否(1)是(9)不知道
32. 最近一週主要照顧者身體狀況是否良好? (0)否 (1)是 (9)不知道
33. 最近一週主要照顧者是否曾出入公共場所? (0)否 (1)是 (9)不知道
34. 最近一週主要照顧者是否烹煮下列食物? (1)奶 (2)蛋 (3)魚、海鮮 (4)雞 (5)鴨 (6)鵝 (7)牛 (8)羊 (9)豬 (10)蔬菜 (11)點心 (90)其他_____ (0)否 (99)不知道
35. 主要照顧者每天幫您的寶貝換尿布或換褲子幾次? 每天換尿布_____次; 換褲子_____次
36. 照顧場所是否養寵物、家禽或家畜? (0)否 **[跳至第 45 題]** (1)是 (9)不知道
37. 若[**是**], 養的動物是**(可複選)** (1)狗 (2)貓 (3)鼠 (4)兔 (5)魚 (6)鳥 (7)雞 (8)鴨 (9)鵝 (10)牛 (11)羊 (12) 馬 (13)豬 (14)烏龜 (15)青蛙 (16)蛇 (17)蜥蜴 (18)猴子 (19)昆蟲 (90)其他_____ (99)不知道
38. 照顧場所提供給寶貝的飲用水來源? (可複選) ＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿

| |
|---|
| 代碼填寫: 前填飲水來源(兩碼), 後填過濾加熱代碼(兩碼) |

| |
|---|
| 飲水來源代碼: 00.否 01.井水 02.山泉水 03.河水或湖水 04.加水站水 05.自來水 06.瓶裝水 (廠牌_____ ) 90.其他_____ 99.不知道 |

| |
|---|
| 過濾加熱代碼: 00.否 01.生飲 02.濾水器過濾 03.瓦斯爐煮沸 04.開飲機煮沸 05.濾水器過濾&瓦斯爐煮沸 (02+03) 06.濾水器過濾&開飲機煮沸 (02+04) 90.其他_____ 99.不知道 |

**食物**

39. 您的寶貝是否在最近一週到過下列地方用餐? ＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿

40. 最近一週您寶貝曾食用下列地點的外帶食物? ＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿

| |
|---|
| 代碼填寫: 前填用餐地點(兩碼), 後填次數(兩碼) |

| |
|---|
| 用餐地點(或外帶食物來源)代碼: 00.否 01.園遊會/博覽會 02.美食街 03.中式外燴 (辦桌/流水席) 04.歐式外燴 (Buffet) 05.幼稚園餐點 06.小吃店/麵館/早餐店 07.傳統市場/夜市/路邊攤 08.速食店 09.超商 10.大賣場 11.生鮮超市 12.中式、西式自助餐 13.日式料理店 14.餐廳(非自助式) 15.火鍋店 16.燒烤店 17.茶鋪/飲品店 18.咖啡/蛋糕複合餐飲店(如:星巴客、85 度 C) 19.麵包坊/糕餅店 20.試吃活動 21.外賣便當店 90.其他 _____ 99.不知道 |
| 次數代碼: 00.否 NN.最近一週次數 99.不知道 |

41. 您的寶貝以母奶哺乳月數? 共_____月

42. 您的寶貝是否在最近一週食用下列食物?

(A) 奶 (01)母奶 (02)鮮牛奶 (廠牌:_____) (03)鮮羊奶 (廠牌:_____)
(04)奶粉 (廠牌: _____) (05)優酪乳 (06)保久乳 (07)養樂多 (08)煉乳 (09)起司條
(10)起司片 (11)奶油起司醬 (12)乳酪醬 (13)優格醬 (14)蛋糕
(90)其他_____ (00)否 (99)不知道

**[三個月以下新生兒問卷到此結束]**

(B) 蛋 (0)否 (1)生蛋(蛋蜜汁) (2)半熟蛋 (拌沙茶火鍋/加熱豆漿牛奶)
(3)加工蛋(皮/滷/鹹鴨蛋) (4)熟食 (5)其他_____
(9)不知道

(C) 冰品 (00)否 (01)冰淇淋 (02)霜淇淋 (03)冰砂 (04)冷藏盒裝甜點(布丁/奶酪等) (05)豆花 (06)愛玉 (07)仙草 (08)綠豆沙 (09)粉圓 (10)刨冰
(90)其他_____ (99)不知道

(D) 冷飲 (0)否 (1)現打果汁 (2)罐裝飲料 (3)封口杯冰茶/珍奶 (4)其他_____ (9)不知道

(E) 隔餐(過期或腐敗)食物 ＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿、＿＿＿＿

| |
|---|
| 代碼填寫: 前填食物種類(兩碼), 後填冷藏代碼(一碼), 加熱食用方式(一碼) |

| |
|---|
| 食物種類代碼: 00.否 01.五穀雜糧 02.涼麵 03.三明治 04.漢堡 05.堅果 06.奶 07.蛋 08.魚或海鮮 09.肉 10.豆類 11.生菜沙拉 12.蔬菜(生) 13.菜餚(熟) 14.湯 15.水果 16.醬料 17.餅乾零食 18.飲料 19.蛋糕甜點 90.其他_____ 99.不知道 |
| 冷藏代碼: 0.否 1.未知保存期限且未冷藏(凍) 2.保存期限內但未冷藏(凍) 3.過期未冷藏(凍) 4.無確切保鮮期內冷藏(凍) 5.保存期限內冷藏(凍) 6.冷藏(凍)但過期 9.不知道 |
| 加熱食用方式代碼: 0.否 1.未加熱即食用 2.已加熱再食用 9.不知道 |

(F) 魚、海鮮 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿

代碼填寫: 前填海鮮種類(兩碼), 後填料理方式代碼(一碼)

海鮮種類代碼:

**<魚>** 01.魚肉 02.魚卵 03.生魚片 04.河豚

**<貝類>** 05.貝 06.干貝 07.蛤 08.蠔 09.蚵 10.螺類 11.鮑魚 12.海瓜子

**<八爪十足>** 13.章魚 14.章魚燒 15.花枝(烏賊或墨魚) 16.透抽 17.小卷 18.魷魚

**<蝦>** 19.蝦 20.蝦卵 **<蟹>** 21.蟹 22.蟹黃

**<棘皮動物>** 23.海參 24.海膽 **<水母>** 25.海蜇皮 **<兩棲類>** 26.青蛙 27.鱉

**<加工海鮮>** 28.鹹魚 29.烏魚子 30.魚丸 31.蝦丸 32.花枝丸 33.魚餃 34.蝦餃

35.魚翅 36.魚鬆 39.魷魚絲 90.其他＿＿＿＿ 00.否 99.不知道

料理方式代碼: 0.否 1.生食 2.冷凍生食 3.握壽司 4.冷凍熟食 5.外買熟食

6.外買生食材自行烹煮 7.自養自煮 8.其他＿＿＿＿＿＿ 9.不知道

(G) 肉類

J1 雞 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿ J2 鴨 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿

J3 鵝 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿ J4 牛 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿

J5 羊 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿ J6 豬 ＿＿＿、＿＿＿、＿＿＿

代碼填寫: 前填肉品種類(兩碼), 後填料理方式代碼(一碼)

肉品種類代碼: 00.否 01.內臟 02.滷味 03.香腸 04.火腿 05.漢堡肉 06.火鍋肉片 07.肉鬆 08.肉乾 09.排骨 10.肋排 11.大骨 12.罐頭 13.貢丸 14.肉丸 15.餃 16.肉包 17.湯包(燒賣) 18.煎包 19.餡餅 20.臘肉 21.割包 22.披薩 23.肉捲 24.派 25.肉 26.肉湯 90.其他＿＿＿＿＿ 99.不知道

料理方式代碼: 0.否 1.生食 2.冷凍生食 3.握壽司 4.冷凍熟食 5.外買熟食

6.外買生食材自行烹煮 7.自養自煮 8.其他＿＿＿＿＿＿ 9.不知道

訪視者： ＿＿＿＿＿＿＿＿(簽名) 日期：＿＿年＿＿月＿＿日

計畫主持人： ＿＿＿＿＿＿＿＿(簽名) 日期：＿＿年＿＿月＿＿日