

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000301

衛生福利部疾病管制署 108 年署內科技研究計畫

計畫名稱：A、C、E 型肝炎群聚監測與基因庫建立

年度/全程研究報告

執行機構：疾病管制署檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：楊志元

研究人員：黃偉倫、潘磊

執行期間：108 年 1 月 1 日至 108 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 165 萬元 5 仟元整

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
壹、 中文摘要	3
貳、 英文摘要	4
參、 本文	
1. 前言	5
2. 材料與方法	11
3. 結果	16
4. 討論	23
5. 結論與建議	25
6. 重要研究成果及具體建議	25
7. 參考文獻	27
8. 圖、表	30

壹、 中文摘要

關鍵詞：病毒性肝炎、分子檢驗方法、關聯性分析

病毒性肝炎由肝炎病毒所引起，並且會進一步造成肝硬化及肝癌，每年約有 13,000 國人因肝炎相關疾病死亡，對國人健康造成極大威脅。近年台灣發生多起病毒性肝炎群聚事件，2014 年 10 月因馬蹄蛤污染引起急性 A 型肝炎群聚事件，造成當月本土確定病例達 30 人；2015 年 6 月國內爆發另一起經由 MSM 途徑散布的急性 A 型肝炎疫情，2018 年底尚有 12 例通報急性 A 型肝炎個案與 MSM 個案序列高度相關，2019 年目前僅 1 例與 MSM 個案序列高度相關。

本年共分析 11 案血液透析室之疑似 HCV 群聚事件，確認 3 案具高度關連性，其餘 8 案送驗檢體研判並無相關。相較於 A 型及 C 型肝炎，E 型肝炎確診數較低。

本計畫目的在於透過分生親緣性比對方法的建立，針對急性 A、C 及 E 型肝炎，以分子生物學方法輔助分析個案病毒基因序列之關聯性，進一步了解可能造成群聚感染之途徑，提供更多資訊給一線防疫人員，做為疫情防治政策之依據，抑止疫情擴散並預防再次爆發類似群聚事件。並且利用所得到的病毒序列建立國內肝炎病毒基因資料庫供比對分析，了解國內肝炎病毒流行病毒株之變異情形及其散佈趨勢。

貳、 英文摘要

keywords : viral hepatitis, molecular epidemiology, phylogenetic analysis

Viral hepatitis refers to hepatitis caused by hepatitis viruses, which may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Each year, liver disease causes about 13,000 deaths in Taiwan. Over the last few years, several outbreak of hepatitis virus occurred in Taiwan. In October 2014, about 30 confirm cases of hepatitis A occurred due to contamination of local clams. After that, another outbreak involving the MSM population had occurred since June 2015, which may be one of the most severe hepatitis A outbreak in Taiwan. There were still 12 acute HAV cases had highly relationship in phylogenetic analysis compared with MSM population last year. Up to date in this year, the number of cases associated with HAV outbreak has sharply decline to only 1 confirmed case.

A total of 11 cases of suspected HCV clustering in the hemodialysis room were analyzed in this year, and it was confirmed that the 3 cases were highly related. The other 8 cases were not related. Compared with HAV and HCV cases, the number of confirmed cases of hepatitis E is lower in Taiwan.

This project will focus on hepatitis A and hepatitis C since they were the very type of virus that causes national outbreaks these years in Taiwan. To help formulate proper strategies for viral hepatitis epidemic preventing, it is important to explore the infection route of the outbreaks and then provide more information to relevant departments. Thus, the purpose of this project is to digger deeper by using molecular epidemiology method and phylogenetic analysis to see if these confirm cases have any correlation with each other. Furthermore, by building up a national hepatitis A and hepatitis C virus gene databank, it would be able to keep investigate the trends of hepatitis virus genetic variation and its geographical distribution in Taiwan.

參、 本文

1. 前言

病毒性肝炎由肝炎病毒所引起，傳染途徑可分成二類，一類是透過糞口傳播，如：A型及E型肝炎病毒，藉由食用、飲用受病毒污染的食物^{1,2}、或與感染者密切接觸而感染，主要引起急性病毒性肝炎；另一類由體液或血液傳染，如：B、C及D型肝炎病毒，可經由不安全性行為、共用沾血之個人器具（如刮鬍刀、牙刷等）、接觸污染針具、注射器等方式而遭受感染。病毒性肝炎在2015年造成全球134萬人死亡，而B型肝炎及C型肝炎病毒帶原者達到3.25億人³。而在國內，所有急性肝炎有97.6%屬於A、B、C型肝炎（圖一），疾病管制署統計2014年成人B型肝炎帶原率估計約為15%，約250萬人；C型肝炎感染率約4.2%，約40至70萬人，另外每年約有13,000人死於肝炎相關疾病，顯見肝炎疾病對國人健康的威脅不容小覷。透過建立分生親緣性比對方法可輔助判定群聚事件之關聯性，進一步了解群聚感染之途徑，做為疫情防治政策之依據，抑止疫情擴散並預防再次爆發類似群聚事件。利用所得到的病毒序列建立國內肝炎病毒基因資料庫供比對分析，可在群聚事件後監控肝炎病毒流行病毒株之變異情形，了解其散佈趨勢。

A型肝炎病毒（Hepatitis A Virus, HAV）目前有七種基因型¹，I到III型可感染人類，其中 Genotype I 可以再次分型為 I-A 與 I-B，為造成全球超過 90%感染之主要型別。HAV 可能引發急性肝炎但不會演變為慢性肝炎，病毒進入人體後有二至六星期的潛伏期，於腸道複製後透過血液傳到肝臟⁴，發病前一至兩周時即開始由患者糞便排出大量病毒，甚至在痊癒後一周仍具感染力；患者多數會痊癒並產生抗體，10~15%的病人在急性發病後 6 個月內有可能症狀復發。A 型肝炎的致死率約 0.3%，造

成死亡的情形多半為猛爆型肝炎，通常發生於老年人或慢性肝病患（包括慢性 B 型、C 型肝炎病毒感染者）。受汙染之水源是感染 HAV 的途徑之一⁴，國內於 2014 年 10 月發生一起因馬蹄蛤污染所引起的急性病毒性 A 型肝炎群聚事件，造成當月本土確定病例達 30 人。除此之外，因為口肛直接或間接接觸為急性 A 型肝炎感染的重要途徑，男性間性行為族群（men who have sex with men, MSM）在已開發國家亦為感染 HAV 的高危險群^{5,6}，美國科羅拉多州公共健康和環境部門（Colorado Department of Public Health and Environment, CDPHE）分析該州 2017 年至 7 月止，43 例 A 型肝炎確定病例中就有 15 例屬於該族群；在台灣，2012~2016 年間的 2088 位愛滋病毒（Human Immunodeficiency Virus, HIV）感染者中有 90.2% 屬於 MSM 族群，而整體的 HAV 血清陽性率為 34.3%，遠高於老年及非 MSM 族群⁷。疾病管制署監測資料顯示國內急性病毒性 A 型肝炎疫情自 2015 年 6 月起上升（表一），於 2016 年 5-8 月個案數達高峰，綜合研判為 MSM 相關群聚事件⁸，確定病例合併 HIV 感染者的個案數異常增加，經序列分析皆屬於基因型 IA-1，年齡集中於 18 至 39 歲並以男性為多，地理分布上自北部地區漸往中南部主要城市擴散，2018 年起發病人數已趨緩，至今(2019)年底僅有 1 例 MSM 相關個案發生（表二）。疾病管制署因應疫情實施「擴大 A 型肝炎公費疫苗接種試辦計畫」，新增 A 型肝炎公費疫苗接種對象，針對確診 HIV 感染或新確診梅毒、淋病，且為 1977 年（含）1 月 1 日以後出生者，提供 1 劑公費 A 型肝炎疫苗；一般接種一劑疫苗後，約有 95% 以上的民眾可產生保護抗體，按期完成兩劑疫苗接種，則產生的免疫力可維持 20 年以上。過去因受限於疫苗基金財源有限，政府僅能優先提供山地鄉等 A 肝高風險地區幼童接種 A 肝疫苗，實施多年成效顯著，2018 年 1 月 16 日

起，更針對 106 年 1 月 1 日（含）以後出生，年滿 12 個月以上的幼童，讓 A 肝疫苗順利納入幼兒常規疫苗接種項目。然而目前國內年輕族群多不具 A 肝抗體，加上國際間交流頻繁，民眾往來 A 肝盛行地區頻率增加，使得國內潛藏爆發 A 肝流行之風險。2018 年研究計畫分析顯示，2 例個案於 2018 年 3 月，參加前往摩洛哥旅行團後，於 4 月分別發病後，由於 A 型肝炎的潛伏期約為 15 至 50 天，平均為 28 至 30 天。其中 1 例個案由於多重時間旅遊史，因此在疫情調查研判感染地區時，初判為其他地區感染。由於 2 案例均有摩洛哥旅遊史，且序列經比對後完全一致，基因型屬於較不常見之 IA-others，基因定序結果與歐洲地中海區域國家發表之序列結果（義大利、西班牙等國）具高度相關，上述國家並與旅遊地北非摩洛哥具相當之地緣關係，綜合實驗室基因分型結果及個案旅遊史，研判 2 例個案應屬於一起旅行團境外移入急性 A 型肝炎群聚感染事件，藉由分子親緣比對結果，可協助公衛端研判個案之基因型別及判定群聚事件之關聯性。

C型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV）及B型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）對全球健康上的影響甚鉅，根據世界衛生組織（World Health Organization, WHO）報告³，B、C型肝炎占病毒性肝炎死亡人口的96%。HCV具有高度變異性之病毒基因，大致可分成1~7基因型(genotype)^{9,10}，各基因型中核酸序列的差異在30~35%以上，每種基因型可再區分a、b、c、d等數種亞型(subtype)，各亞型之間核酸的差異約在20~25%¹¹⁻¹³，在台灣以基因型1b感染最廣泛，佔50~70%，而1b基因亞型的感染患者通常病況較嚴重，容易演變為肝癌^{14,15}。C型肝炎病毒RNA不會進入宿主細胞核中，因此不會直接傷害基因，但肝細胞再經由反覆破壞及修復後基因會產生變異，感染後有高機率會演變為慢性肝炎並可能形成肝癌，至

2015年全球有7100萬人為慢性C型肝炎患者，此外，亦有可能造成人體除肝以外的病變，如：代謝性疾病、心血管、腎、中樞神經系統等相關疾病¹⁶。目前由於抗HCV新藥成功開發¹⁷，HCV的感染是可以被治癒的，然而其病毒很容易產生變異，粗估HCV感染個案每天約產生 10^{12} 病毒顆粒，而其RNA polymerase 錯誤率約 2.5×10^{-5} pre nt/cycle¹⁸，因此並無有效疫苗能加以預防，為我國民重要之健康問題。2016年肝病防治學術基金會公佈最新調查指出，國內C型肝炎盛行率約4.2%¹⁹。WHO統計¹⁷全球每年死於HCV感染相關之併發症如肝硬化、肝癌、肝功能失調(Liver Failure)仍有70萬人，且持續增加中；但由於多數感染者並無自覺症狀，因此不清楚自己是否感染HCV。

由於感染途徑相同，因此患者也可能同時感染HBV及HCV²⁰，慢性B型肝炎患者因肝病死亡率與慢性C型肝炎患者相比約為兩倍²¹，但HBV主要經由母嬰垂直感染^{22,23}，而HCV雖然亦可能經由母嬰垂直感染、性接觸或其它因素(如：刺青、穿耳洞等)²⁴感染，但主要傳染途徑仍是經由醫療照顧相關之血液暴露(如：不安全的針具使用²⁵、洗腎透析或輸血感染等)及靜脈藥癮者針頭、針具或稀釋液共用造成感染，因此C型肝炎較容易延燒成大規模的群聚感染。2017年初，桃園市楊梅區一診所因重複使用針具抽取藥物進行針劑注射而暴發群聚事件，經病毒基因型鑑定及親緣性分析，已知在7例確定個案中有4例基因型為1b，其中3例親緣性分析具高度關聯性。

以往C型肝炎治療主要以長效型干擾素加Ribavirin組合療法，治癒率雖然可達70-85%，但需打針，療程長達半年至一年，除了干擾素常見的副作用外，Ribavirin也會造成虛弱、貧血、腹痛、腹瀉、皮膚紅疹等副作用。2014年以來，有五種不需要加干擾素的C型肝炎全口服

藥物問市，包括：Harvoni、Sovaldi、Viekirax+Exviera、Daklinza+Sunvepra、Zepatier。全口服新藥的選擇，必須考慮C型肝炎病毒的基因型。**表三**為不同基因型C肝個案因應有無肝硬化、是否曾接受治療(長效干擾素加Ribavirin)等因素，選擇不同全口服藥物之組合進行不同療程治療²⁶。全口服新藥優點是大幅提升治癒率，絕大多數為90%以上，甚至可達95%，且副作用小，療程更可縮短至12~24週。針對台灣常見之基因型1b個案，使用Daklinza+Sunvepra前，及病毒基因型1a病人使用Zepatier前，皆須先抽血檢測是否有NS5A之抗藥性。因口服新藥屬於病毒蛋白酶抑制劑，主要效能為直接結合到HCV NS5A，進而抑制病毒RNA的複製。因此，藥物仿單中建議，臨床治療前，宜先進行C型肝炎病毒NS5A胺基酸多型性之檢測評估。若於治療前在藥物作用的核酸部位已發生突變，藥物療效便會降低，最常發生藥物作用的核酸部位如胺基酸序列codon 31 (L31M、L31V、L31F、L31I)及codon 93 (Y93H、Y93C、Y93N)位置發生變異，此外亦有文獻指出codon 28、codon30及codon 58也與抗藥有相關。因此，在C型肝炎患者使用該藥治療前，應先檢驗病毒基因型，確認NS5A基因沒有突變，才能發揮最大的效用；若有NS5A突變，則會降低治療藥物的療效，治癒率會降至40-50%。但我國常見之基因型1b個案，NS5A基因序列是否易產生突變，相關背景資訊未明朗，故本計畫將針對急性C型肝炎個案核酸陽性檢體，進行NS5A基因序列分析，嘗試了解C肝病毒與NS5A突變基因是否具一定的關聯性。

E型肝炎病毒為一種球形、無套膜、單股RNA病毒，平均潛伏期從26~42天。感染急性期的初期可在患者糞便中發現32至34 nm大小類似病毒狀的粒子。根據資料顯示E型肝炎病毒至少有四種以上的基因型，

中國大陸東南的廣州和台灣分離出的屬於第四基因型，2016年Nakano等人針對總數102名個案血清(47 Japanese, 40 Chinese, 1 Indian, 8 Indonesian, 1 Korean, 1 Taiwanese, 2 Danish and 2 Italian)，研究E型肝炎病毒基因 open reading frame 2 (核酸序列412 nt)，以Bayesian inference分析，此例1990年採檢的台灣個案屬第四基因型，親緣分析結果此例台灣個案與中國個案屬同一分群之分支，推測此例台灣個案應可能由中國傳入，同樣的結果也發現在一例1987年採檢的第四基因型韓國個案，亦可能有中國傳入。顯見急性E型肝炎的傳播具高度地緣關係²⁷。

流行病學特徵及臨床病程與A型肝炎類似，E型肝炎主要經糞口途徑傳染，藉受污染的水傳播最常見，另人與人之間的糞口途徑感染亦可能發生，最近研究顯示E型肝炎可能為人畜共通傳染病²⁸。E型肝炎侵襲以年輕人及中年人最高，通常男性感染率較高。兒童及老年人發生E型肝炎的情形較不常見，除孕婦外，其他人口感染E型肝炎的致死率與A型肝炎類似，懷孕第三期的孕婦感染E型肝炎時，其致死率有報告達20%。E型肝炎病毒流行區通常發生於環境衛生較差的開發中國家包括印度、尼泊爾、緬甸、蘇聯、阿爾及利亞、巴基斯坦、利比亞、索馬利亞、墨西哥及中國大陸。另根據國外研究資料顯示，在豬血及豬糞中可以分離出基因序列相當近似人類E型肝炎病毒的病毒，這也顯示豬隻所攜帶的HEV可能會經過接觸或食用到未煮熟的內臟而傳播給人。

我國自2009年迄今，雖每年急性E型肝炎法定通報個案數小於20例(圖二)，但其感染途徑與急性A型肝炎類似，且豬隻肉品仍屬我國畜產主要產業及國民飲食主要選項。雖2012年中國正式核准E肝疫苗上市，然我國現今尚無符合藥證許可之急性E型肝炎診斷試劑。故發展急性E肝分子診斷技術及基因分型之量能，是本計畫另一努力的目標。

2. 材料與方法

檢體收集

收集國內病毒性肝炎(含 A、C、E)通報之陽性或疑似檢體，A 型肝炎檢體包含血清及糞便。

(一) 糞便檢體處理：

將糞便以 1:10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液，於 4°C，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，保存於-70°C。

核酸萃取

(一) A 型肝炎病毒 RNA 萃取

使用 TANBead 自動核酸萃取儀器純化病毒 RNA。取處理過之血清及糞便檢體上清液 200μL，利用 TANBead Viral Auto Kit (Cat. No. 635A46) 萃取病毒 RNA，最後萃取出 100μL RNA，置於-80°C 待用，所製備的病毒 RNA 可用於反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

(二) C、E 型肝炎病毒 RNA 萃取

使用 Qiagen®QIAamp Viral RNA mini Kit (Cat. No. 52906)，取血清 140uL 加入 560 μL lysis buffer 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 uL 絕對酒精混合完全，上述混合液再通過 spin column，column 以 wash buffer 清洗兩次以後，用 elution buffer 將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)。

肝炎病毒基因片段分析

(一) 病毒基因片段 PCR 增幅

1. 引子選擇

(1) HAV

forward	HA021	5'-ATTGCAAATTAYAAYCAYTCTGATG-3'
reverse	HA022	5'-TTRTCATCYTTCATTTCTGTCC-3'
nest forward	HA023	5'-CATTCTGATGAATAYTTGTC-3'
nest reverse	HA024	5'-CATTTCTGTCCATTTYTCATC-3'

(2) HCV :

forward	C/E2 F1	5'-GCCGACCTCATGGGGTACAT-3'
	NS5B F1	5'-GGSTTYTCNTATGAYACCMG VTGYTTTGA-3'
reverse	C/E2 R1	5'-ARTTBTYDGTRCANGGRTARTGCCA-3'
	NS5B R1	5'-CTACCCCTACNGHDAGTAGG AGTAGGC-3'
nest forward	C/E2 F1	5'-GCCGACCTCATGGGGTACAT-3'
	C/E2 F2	5'-CCYGGTTGCTCYTTYTCTATCTT-3'
	NS5B F2	5'-GCTGYTTTGAYTCAACNGTCAC-3'
nest reverse	C/E2 R3	5'-TTCATCATCATRTCCANGCCAT-3'
	C/E2 R2	5'-GTNADCCANGGNCCNGMNCCRCA-3'
	NS5B R2	5'-GRGCHYGVGACACGCTGTGA TANATGTC-3'

(3) HEV

forward	HEV-F1	5'- GGBGTBGCNGAGGAGGAGGC-3'
reverse	HEV-R2	5'- TGYTGGTTRTCRTARTCCTG-3'
nest forward	HEV-F2	5'- TAYCGHAAYCAAGGHTGGCG-3'
nest reverse	HEV-R1	5'- CGACGAAATYAATTCTGTCTG-3'

(4) HCV genotype 1a NS5A 抗藥基因²⁹

forward	1a-NS5A-F0	5'- GACATCTGGGACTGGATATGYGA-3'
reverse	1a-NS5A-R0	5'- GTCCAGGWRTARGACATYGAGCA-3'
nest forward	1a-NS5A-F1	5'- GATATGYGAGGTGYTGAGCGA-3'
nest reverse	1a-NS5A-SeqR	5'- AAGGAGTCCARRATCACCAC-3'
nest forward	1a-NS5A-SeqF	5'- ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG-3'
nest reverse	1a-NS5A-R0	

(5) HCV genotype 1b NS5A 抗藥基因²⁹

forward	1b-NS5A-F0	5'- GAYGTTTGGGAYTGGATATGCAC--3'
reverse	1b-NS5A-R0	5'- GTCCAYGWRTARGACATYGAGCA-3'
nest forward	1b-NS5A-F1	5'- GATATGYACGGTGYTGAYTGA-3'
nest reverse	1b-NS5A-SeqR	5'- AARGAGTCCARRATYACYAC-3'
nest forward	1b-NS5A-SeqF	5'- ARCTGTCYGCWCCATCTCTCAAGG-3'
nest reverse	1b-NS5A-R0	

2. 反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)

使用 Invitrogen OneStep RT-PCR Kit 進行 RNA 反轉錄聚合酶連鎖反應。

	HAV	HCV	HEV
sample viral RNA	2.5 μ L	5 μ L	5 μ L
2x RT-PCR Buffer	12.5 μ L	10 μ L	10 μ L
RT-PCR Enzyme Mix	1 μ L	0.4 μ L	0.4 μ L
forward primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L	0.6 μ L
reverse primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L	0.6 μ L
ddH ₂ O	7 μ L	3.4 μ L	3.4 μ L
RT-PCR 流程	50°C 30min →94°C 2min →以 94°C 30sec 53°C 30sec 72°C 1min 反應 35 次 →72°C 7min	55°C 20min →94°C 2min →以 94°C 15sec 55°C 30sec 68°C 90sec 反應 45 次 →68°C 5min	55°C 30min →95°C 15min →以 95°C 30sec 55°C 30sec 72°C 60sec 反應 45 次 →72°C 10min

3. 巢式聚合酶連鎖反應(Nest PCR)

使用 Takara Kit，以 RT-PCR 反應得到之 cDNA 作為模板(template)，進行 RNA 反轉錄聚合酶連鎖反應。

	HAV	HCV	HEV
sample cDNA	0.5 μ L	2 μ L	2 μ L
2x PCR Master Mix	12.5 μ L	10 μ L	10 μ L
forward primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L	0.6 μ L
reverse primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L	0.6 μ L
ddH ₂ O	10 μ L	6.8 μ L	6.8 μ L
Nest PCR 流程	94 $^{\circ}$ C 2min →以 94 $^{\circ}$ C 30sec 53 $^{\circ}$ C 30sec 72 $^{\circ}$ C 1min 反應 35 次 →72 $^{\circ}$ C 7min	94 $^{\circ}$ C 1min →以 98 $^{\circ}$ C 10sec 55 $^{\circ}$ C 30sec 72 $^{\circ}$ C 10sec 反應 45 次 →72 $^{\circ}$ C 5min	95 $^{\circ}$ C 15min →以 95 $^{\circ}$ C 30sec 55 $^{\circ}$ C 30sec 72 $^{\circ}$ C 60sec 反應 45 次 →72 $^{\circ}$ C 10min

(二) 基因定序

將 Nest-PCR 的產物以洋菜膠電泳分析，預期可見到的基因片段，再作定序分析。使用 NCBI 核酸比對網站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>)比對定序的結果以判斷病毒亞型。

病毒親緣性分析及演化樹建立

Maximum likelihood 和 Bayesian inference 是目前譜系分析 (phylogenetic analyses) 常用的兩種方法。但是由於兩者使用的觀念或多或少都牽涉到機率與統計的範疇，Maximum likelihood 用的是統計方法計算譜系樹的 likelihood，搜尋最佳譜系樹；Bayesian inference 則是應用 Bayes' Theorem 來計算譜系樹為真的機率 (probability)。Likelihood：用已知的 (實驗) 資料作出 (影響實驗結果的) 參數的函數，藉以求取參數的數值。Probability：用已知的 (影響實驗結果的) 參數作出 (能夠預測實驗結果的) 函數，藉以預測實驗的結果。在邏輯上，likelihood 和 probability 關注的是同樣的東西，可是在操作上使用的角度不同，得出的結果也不會一樣。

將定序得到的病毒基因片段以 Lasergene 軟體進行 assemble 組合成可進行分析之序列資料。再以 MEGA 7.0 軟體進行序列對比調整與位點對準後，利用 BEAST v1.8.3 軟體以 Markov Chain Monte Carlo (MCMC)演算法進行序列分析，並建構貝氏親緣演化樹(Bayesian tree)²⁶。

貝氏估計法(Bayesian inference method)是近年才漸漸被提出用於親緣演化分析^{27,28}，其推論主要建立於親緣演化樹的事後檢定機率(posterior probability)的分布，即計算演化樹支持數據的機率。

BEAUti-BEAST 是以貝氏估計法進行一系列演化分析的軟體。BEAUti 為 Bayesian Evolutionary Analysis Utility 的簡稱，而 BEAST 則為 Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees 的縮寫。將欲分析的序列增加採檢時間資料後，將序列經多重排比整理，以 BEAUti 軟體將序列資料讀入後分別由功能鍵進行 Tip Dates、Site Model、Clock Models、Trees、Priors、Operators 以及 MCMC 等分析參數的設定，再以 BEAST 軟體進行資料分析運算及建構 Bayesian tree²⁶。Maximum likelihood 設定 Bootstrap value 1000，選取 GTR G+I model; Bayesian inference(貝氏估計法)以 BEAST v1.8.4 軟體以馬爾科夫蒙特卡洛(MCMC)演算法設定分析參數進行序列分析，建構貝氏親緣演化樹(Bayesian tree)。去年計畫已證實 Maximum likelihood 和 Bayesian inference 在分析上均可得到一致的結果，本年度將先以 Maximum likelihood 分析法呈現。

3. 結果

以下分別就 HAV、HCV 及 HEV 進行親緣性分析探討

1. HAV 分生親緣性分析 (Maximum likelihood 分析法)

2019 年 HAV 確定病例數大幅下降，且無 HAV 群聚事件通報，本年度截至 10 月底僅 84 例，遠低於近 10 年確定病例平均值(圖三)。為宏觀了解近 2 年急性 A 型肝炎通報個案之基因型流行趨勢，故以截至今年 10 月 31 日回溯至 2017 年 11 月計算，送驗急性 HAV 個案之基因型結果進行分析(表四)。分析 107 例陽性個案 VP1-2A 基因型別分佈，62 例(58%)為本土個案，45 例(42%)屬境外個案。本土個案中，55 例(88.7%)個案均為基因型 IA，45 例境外個案其中 44 例(97.8%)屬基因型 IA。依核酸序列進行親緣分析分群後，本土與境外個案分佈明顯不同。55 例 IA 本土個案，其中 35 例(63.6%)為 IA-1 基因型，44 例 IA 境外個案，僅 8 例(18.2%)為 IA-1 基因型。另有 7 例本土個案分屬 IB(1 例)及 IIIA(6 例)基因型。依個案旅遊史分析 45 例境外個案地緣性，境外感染地區包括 16 個國家，以馬來西亞 12 例(27%)最多，基因型別為 IA-1、IA-3、IA-4，其次為印尼 7 例，韓國 4 例，菲律賓、摩洛哥、中國各 3 例，泰國、日本、柬埔寨各 2 例，其餘 7 國家各僅 1 例個案。依分析結果，近 2 年我國急性 HAV 個案基因型別以 IA 為主(92.5%)，細分亞型則以 IA-1 基因型為主要型別。

然而值得注意的是，若將本年度送驗急性 HAV 個案檢測結果獨立進行分析(表五)，可發現本年度由於 IA-1 個案數大幅下降，我國主要流行之 HAV 基因亞型已有自 IA-1 演變為 IA-others 之趨勢。

獨立分析本年度 28 例核酸陽性個案 VP1-2A 基因型別分佈，12 例(43%)為本土個案，16 例(57%)屬境外個案。在各別 2 群中，本土個案

有3例(25%)為基因型 IIIA，另外9例(75%)及境外移入個案16例(100%)個案為基因型 IA。依核酸序列進行親緣分群，本年度通報急性 A 型肝炎與 MSM 個案序列高度相關的個案已下降至 1 例(表二)。16 例境外個案全為 IA 基因型，境外感染地區分屬 10 個國家，以韓國 3 例(18.8%)為最多，中國、印尼、馬來西亞及菲律賓各 2 例(12.5%)，其餘國家(柬埔寨、法國、日本、摩洛哥及加拿大)各僅 1 例個案。依核酸序列進行親緣分群，日本及柬埔寨旅遊史個案為基因型 IA-1，印尼旅遊史個案為基因型 IA-2，菲律賓及馬來西亞旅遊史個案為基因型 IA-4，其餘境外個案基因型皆為 IA-others。利用 Maximum likelihood 樹狀圖分析本年度 28 例 HAV 陽性個案(標示○)VP1-2A 基因(487 nt)與 h904(2015 年群聚事件指標個案，標示●)之親緣性(圖四)，搭配 SIAS 相似度分析(data not shown)，3 例 IA-1 基因型個案中，本土個案僅有 1 例(編號 h7355)核酸序列與 MSM 個案(編號 h904)相似度為 99.58%。

2. HCV 分生親緣性分析 (Maximum likelihood 分析法)

截至本年度10月底止，以肝炎病毒分生檢測及親緣性分析法，共針對11件血液透析室HCV疑似群聚事件進行分析(表六)。所有檢體均使用 Abbott RealTime HCV kit 偵測檢體有無HCV RNA，檢測敏感度為 12 IU/mL，Linear Dynamic Range 為 $12 - 10^8$ IU/ml，陽性結果檢體進行基因分型試驗，親緣性分析採用 Maximum likelihood 方法，分析方法均以 75 株 HCV 參考病毒株序列搭配案件核酸序列目標基因 C/E1/E2 進行分析。

【案一】

北區新竹市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h6701)核酸檢測陽性，基因型別 2a；個案 2 (h6702)核酸檢測陰性，2 例送驗檢體並無關聯。

【案二】

台北區新北市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h6745)核酸檢測陰性；個案 2 (h6746)核酸檢測弱陽性，核酸檢測值為 40 IU/mL，核酸含量過低無法進行基因分型實驗，2 例送驗檢體並無關聯。

【案三】

中區台中市某醫院於一年內通報 4 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示僅 1 個案 (h6820) 核酸檢測陽性，基因型別 2b；其餘 3 例個案(h6821, h6819, h6818)核酸檢測均為陰性，4 例送驗檢體並無關聯。

【案四】

台北區台北市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h6928)核酸檢測陽性，基因型別 6；個案 2 (h6946)核酸檢測陽性，基因型別 1b，2 例送驗檢體並無關聯。

【案五】

台北區新北市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h7012) 核酸檢測陽性，基因型別 1b；個案 2 (h7013)核酸檢測陰性，2 例送驗檢體並無關聯。

【案六】

中區台中市某醫學中心 2019 年通報 1 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h6757) 核酸檢測陽性，基因型別 1b；疫調後發現共 2 例通報個案，於該醫學中心血液透析室進行血液透析時間重疊，因此進行 2018 年另一個案分析，個案 2 (h6260) 核酸檢測陽性，基因型別亦為 1b，C/E1/E2 核酸序列相似度結果，分析長度 1197 nt，2 例個案核酸序列相似度為 99.66 %；NS5B 核酸序列相似度結果，分析長度 908 nt，2 例個案核酸序列相似度為 100 %。依據分析結果，2 例個案具高度關聯性。

【案七】

台北區基隆市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示個案 1 (h7118) 核酸檢測陽性，基因型別 1b；個案 2 (h7117) 核酸檢測陰性，2 例送驗檢體並無關聯。

【案八】

北區苗栗縣某醫院 2019 年通報 3 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示 3 例個案均為核酸陽性。個案 1 (h7128) 基因型別 1b；個案 2 (h7129) 與個案 3 (h7138) 基因型別均為 2b，C/E1/E2 核酸序列相似度結果為 97.49 %；NS5B 核酸序列相似度為 98.27 %。依據分析結果，個案 2 (h7129) 與個案 3 (h7138) 具高度關聯性。

【案九】

北區桃園市某醫院通報 2 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示 2 例個案均為核酸陽性。個案 1 (h7186) 基因型別 2a；個案 2 (h7187) 基因型別 1b，2 例送驗檢體並無關聯。

【案十】

台北區新北市某醫院 2019 年通報 3 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示 2 例個案為核酸陽性，另 1 例則為核酸陰性。個案 2 (h7215)與個案 3 (h7216)基因型別均為 1a，C/E1/E2 核酸序列相似度結果為 99.37 %；NS5B 核酸序列相似度為 99.88 %。依據分析結果，個案 2 (h7215)與個案 3 (h7216)具高度關聯性。

【案十一】

北區桃園市某醫院通報 6 例 HCV 個案於一年內抗體陽轉，送驗血清分析結果顯示顯示 2 例個案為核酸陽性，另 4 例則為核酸陰性。個案 4 (h7488)與個案 6 (h7437)均為基因型別 2a；C/E1/E2 核酸序列相似度結果為 95.04 %，依現今基因序列關連性判定指標(>95.1-96.23%)，2 例個案送驗檢體無法推論具關聯性。

3. HEV 分生親緣性分析

本年度並無 HEV 群聚事件通報，故以今年送驗急性 HEV 個案檢體檢測結果進行分析。截至 10 月底止，急性 HEV IgM 陽性共 11 例，分析核酸基因型別，以國際間通用之基因分型片段(open reading frame 2, ORF2)進行親緣性分析 (圖五)，並搭配參考序列建置 4 種基因型資料庫。總共獲得 6 例序列結果 (包含 1 件西方墨點法陰性個案)，4 例為基因型 G4 (其中 2 例為本土個案)，2 例為基因型 G3 (1 例為本土個案)。

4. 香港發生人感染大鼠 HEV 事件，取樣分析我國臨床檢體

(此研究未包含於本年度所提計畫中，係為使用計畫經費執行本署政策

分析研究)

E 型肝炎病毒在病毒學屬 Orthohepevirus，可區分 4 物種分類，其中 A 物種主要感染人、豬、駱駝等哺乳動物；B 物種主要感染禽類；C 物種主要感染鼠和雪貂；D 物種主要感染蝙蝠。目前本署昆陽實驗室執行 HEV 的基因分型係針對感染人類之 A 物種進行，以 ORF 2 目標基因進行分型，可分為 G1-G4 共 4 種基因型。

香港發生人感染鼠類 HEV 事件後，該研究分析針對 HEV 病毒屬 (Orthohepevirus) 分類進行多物種的 PCR，針對 ORF1 目標基因進行，最後進行親緣關係樹分析，發現病人的 HEV 病毒和老鼠分為同一群，和原本的人感染 HEV 親緣樹不同。ORF1 由於核酸序列在物種內差異不大，由於人感染的 HEV G1-G4 變異不大，有可能會畫成同一群，因此 ORF1 不能做基因分型使用，僅能做為物種鑑定分類用。

依日本國立傳染病研究所建議文獻及香港大學發表文獻，我們以 ORF1 巢式 PCR 建立 Orthohepevirus 跨物種間之 ORF1 親緣分析樹(圖六)。
●為 A 物種人類 HEV，●為 C 物種鼠類 HEV，▲為香港 C 物種感染人類 HEV，●為 B 物種禽類 HEV，●為 D 物種蝙蝠 HEV。香港研究之人感染大鼠的 HEV 序列確實與 C 物種鼠類 HEV 分在同一群，與我國人感染 HEV 序列屬不同群。

本計畫進一步以 ORF1 巢式 PCR 分析本年度急性 E 肝 IgM 陽性、ORF2 PCR 陰性檢體，及 55 例急性 E 肝 IgM 陰性檢體，結果均為陰性，並未發現與香港大鼠傳播物種 C 的 HEV 序列有相關。利用已建置完成之 ORF1 親緣分析資料庫，本年 10 月針對帶原的老鼠血清純化核酸檢體，我們協助確認由本署檢驗中心病媒實驗室提供 2 件鼠類 HEV 核酸檢體(▲HEV29 及 ▲HEV30)，親緣性確屬 HEV-C 鼠類 HEV。而與 HEV-A 人類 HEV

不同(圖七)。

5. NS5A 抗藥基因序列分析

期中報告時審查委員建議，目前 C 型肝炎治療新藥效果佳、幾乎已無抗藥性，建議早期藥物之抗藥基因分析研究，可先暫時擱置。因本計畫於去年提報時，我國尚未全面進行全基因型口服新藥之政策，現階段計畫所建置 1b 基因型 NS5A 抗藥基因(790 bp)定序技術，目前已完成 20 件 1b 基因型分析結果，僅發現 1 件(5%)核酸檢體胺基酸序列 codon 28 (L28M)發生突變，相關分析將先暫緩，日後有需要即可重新進行分析。

4. 討論

本計畫研究目標為持續建置國內 A、C、E 型肝炎感染個案之病毒基因資料庫供比對分析，監控 A、C、E 型肝炎病毒流行病毒株之基因型別趨勢。輔助判定群聚事件之關聯性。

於急性 A 型肝炎 HAV 親緣分析中，藉由 Maximum likelihood 親緣性分析可區分 5 個 clusters，為 IA-1、IA-2、IA-3、IA-4 及 IA-others，IA-1 為東南亞泰國、越南、緬甸及柬埔寨等地區，IA-2 為東南亞印尼群島等區域，IA-3 為東南亞菲律賓等區域，IA-4 為東南亞各區域；IA-others 為基因型別分析未達統計顯著差異，標示於未定義群組。由於近 2 年 A 型肝炎防疫成果顯現，過去國人主要感染 IA-1 大幅下降，使本年度統計 IA-others cluster 成為國人感染的大宗(50%)，其中有半數為境外移入個案。

本年度在急性 A 型肝炎 HAV 親緣分析結果中，1 例編號為 h7355 疫調顯示雖具國外旅遊史，且職業身分為導遊，個案自述為日本線導遊，自我懷疑是因為帶團時飲食所致，原疫調將其歸類為境外移入個案。由於核酸序列結果顯示其基因型 IA-1 與 MSM HAV(+)序列相似度高達 99.58%，且該例個案疫調單問卷具同性伴侶及行為史，經討論後將其歸為本土個案，並由公衛端持續監測 IA-1 此一基因型是否有再次盛行的現象。此項分析結果即藉由分子親緣比對結果，協助公衛端研判個案之基因型之關聯性。

本年確認 3 案屬於血液透析室之 HCV 群聚事件，其餘 8 案送驗檢體研判並無關聯性。依統計結果，個案基因型別 7 例為基因型 1b，4 例為基因型 2a，3 例為基因型 2b，2 例為基因型 1a，基因型 6 僅 1 例(表六)。顯示近 2 年我國急性 C 型肝炎洗腎透析室疑似 HCV 感染，主要仍

以基因型 1b 為主，此次分析中首次發現基因型 6。該基因型在我國急性 C 型肝炎個案所佔比例為何值得進一步研究。

急性病毒性 E 型肝炎部分，由文獻資料得知 Genotype 1、2 主要是侷限於人類宿主，常見於落後或開發中國家的大規模群聚，主要感染途徑為飲用污染水源，導致引發人與人之間群聚感染事件，在開發中或已開發國家的散發型個案中較常出現。Genotype 3、4 除人類感染外，相類似之序列也出現在家畜相關製品(如肉、內臟、奶製品)。Genotype 4 型別常見於我國和中國大陸，近年歐洲等已開發國家主要傳播型別為第 3 型，而今年境外移入的基因型 G3 個案在發病前旅遊史為義大利，是否有可能是藉由飲食感染尚不得知，雖然我國每年仍有零星第 3 基因型個案之偶發事件。由此可知除接觸遭 HEV 污染水源外，飲食感染 HEV 亦是新興的傳播途徑，值得持續關注。

由於 HEV 屬於人畜共通傳播疾病，因此需特別注意食用肉品之安全性。除此以外，生食或加熱不全之生鮮貝類亦是感染的途徑之一。由於畜養的豬隻於屠宰後，仍有肉品檢測出 HEV 核酸陽性反應，因應此一現象，2015 年起日本全國已全面禁止販賣生食用之豬肉產品，以杜絕因食用未加熱完全之豬肉產品，感染急性 E 型肝炎之疑慮，由於國人並未如日本一般有生食豬肉的習慣，但仍須具相當的風險觀念。

本年度我國 6 例 HEV PCR 陽性檢體中有 3 例疫調顯示為本土個案，非屬境外移入個案。若排除與飲用受污染水之因素，則可合理懷疑是攝食相關未經煮熟動物製品或其他可能之感染之貝類所致。由於個案分屬 Genotype 3 及 Genotype 4 基因型，此 2 型別常見於我國歷年 HEV 個案。本計畫已成功建立我國 HEV 親緣分析資料庫，一旦發生疑似 HEV 群聚事件時，可進一步進行事件之比對。

5. 結論與建議

本計畫已建置完成我國急性 A、C、E 型肝炎病毒基因資料庫，可因應特殊疫情之發生，藉由分子親緣比對，進行疑似個案之基因型別確認及群聚事件之研判。但由於現行 C 型肝炎基因資料庫之建置，為疑似群聚事件之送驗個案及疑似輸血感染個案，而非我國一般急性 C 型肝炎個案之基因資料庫，故 C 型肝炎病毒核酸基因資料庫之代表性仍須強化，此現象以獲得本署權責組協助於本年 9 月 1 日發文，請各醫療院所即日起將通報急性病毒性 C 型肝炎個案抗體陽性剩餘血清送回本署實驗室，以建置 HCV 基因資料庫。

6. 重要研究成果及具體建議

本年度在急性 A 型肝炎 HAV 親緣分析結果中，1 例個案疫調顯示雖具國外旅遊史，且職業身分為導遊，自我懷疑是因為帶團時飲食所致，原疫調將其歸類為境外移入個案。由於核酸序列結果顯示其基因型 IA-1 與 MSM HAV(+) 序列相似度高達 99.58%，且該例個案疫調單問卷具同性伴侶及行為史，經討論後將其歸為本土個案。此項分析結果即藉由分子親緣比對結果，協助公衛端研判個案之基因型之關聯性。

本年確認 3 案屬於血液透析室之 HCV 群聚事件，近 2 年我國急性 C 型肝炎洗腎透析室疑似 HCV 感染，主要仍以基因型 1b 為主，此次分析中首次發現基因型 6。該基因型在我國急性 C 型肝炎個案所佔比例為何值得進一步研究。

本年度我國 6 例 HEV PCR 陽性檢體中有 3 例疫調顯示為本土個案，非屬境外移入個案。若排除與飲用受污染水之因素，則可合理懷疑是攝食相關未經煮熟動物製品或其他可能之感染之貝類所致。由於個案分屬

Genotype3 及 Genotype4 基因型，此 2 型別常見於我國歷年 HEV 個案。

具體建議為肝炎資料庫應持續建置，以因應特定事件之調查。並逐年完善資料庫之完整性與代表性。

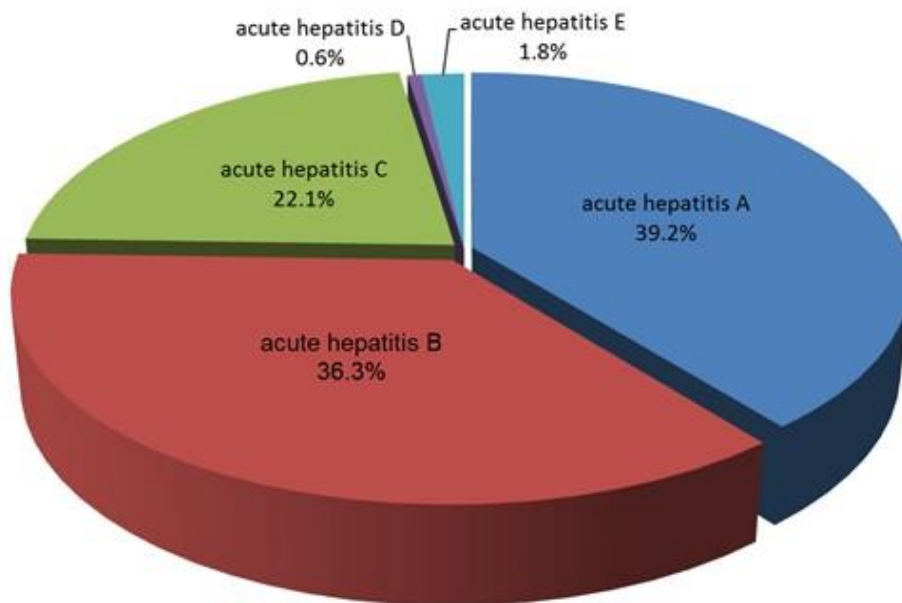
7. 參考文獻

1. Sanchez G, Bosch A, Pinto RM. Hepatitis A virus detection in food: current and future prospects. *Lett Appl Microbiol.* 2007;45(1):1-5.
2. Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, et al. Epidemiological and genetic analysis of a 2014 outbreak of hepatitis A in Japan. *Vaccine.* 2015;33(45):6029-6036.
3. WHO. Global Hepatitis Report. 2017. 2017.
4. Sinclair RG, Jones EL, Gerba CP. Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review. *J Appl Microbiol.* 2009;107(6):1769-1780.
5. Ali H, Regan DG, Guy RJ, et al. Increasing hepatitis A immunity in men who have sex with men in Sydney, 1996-2012. *Vaccine.* 2015;33(38):4745-4747.
6. WHO. Hepatitis A. 2017.
7. Chen GJ, Lin KY, Sun HY, et al. Incidence of acute hepatitis A among HIV-positive patients during an outbreak among MSM in Taiwan: Impact of HAV vaccination. *Liver Int.* 2017.
8. Chen NY, Liu ZH, Shie SS, Chen TH, Wu TS. Clinical characteristics of acute hepatitis A outbreak in Taiwan, 2015-2016: observations from a tertiary medical center. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):441.
9. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology.* 1994;19(5):1321-1324.
10. Preciado MV, Valva P, Escobar-Gutierrez A, et al. Hepatitis C virus molecular evolution: transmission, disease progression and antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2014;20(43):15992-16013.
11. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 11):3173-3188.

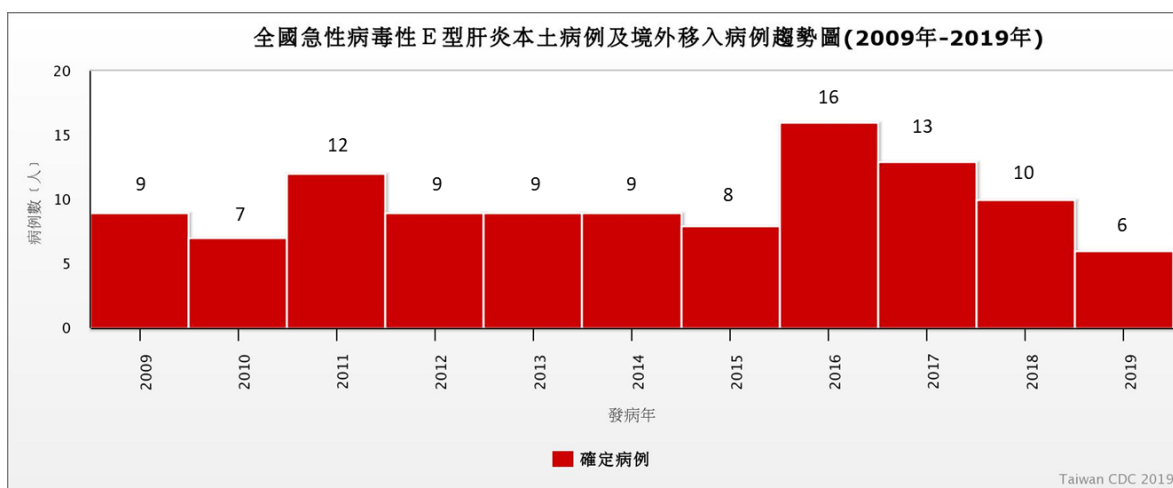
12. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(2):223-235.
13. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318-327.
14. Lee CM, Hung CH, Lu SN, et al. Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan. *Intervirology.* 2006;49(1-2):76-81.
15. Lee CM, Lu SN, Hung CH, et al. Hepatitis C virus genotypes in southern Taiwan: prevalence and clinical implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006;100(8):767-774.
16. Cacoub P, Comarmond C, Domont F, Savey L, Desbois AC, Saadoun D. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C virus infection. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):3-14.
17. WHO. Hepatitis C. 2017; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
18. Ribeiro RM, Li H, Wang S, et al. Quantifying the diversification of hepatitis C virus (HCV) during primary infection: estimates of the in vivo mutation rate. *PLoS Pathog.* 2012;8(8):e1002881.
19. 肝病防治學術基金會. 2016; <http://www.liver.org.tw/>.
20. Tyson GL, Kramer JR, Duan Z, Davila JA, Richardson PA, El-Serag HB. Prevalence and predictors of hepatitis B virus coinfection in a United States cohort of hepatitis C virus-infected patients. *Hepatology.* 2013;58(2):538-545.
21. Falade-Nwulia O, Seaberg EC, Rinaldo CR, Badri S, Witt M, Thio CL. Comparative risk of liver-related mortality from chronic hepatitis B versus chronic hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis.* 2012;55(4):507-513.
22. Wait S, Chen DS. Towards the eradication of hepatitis B in Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci.* 2012;28(1):1-9.

23. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. *N Engl J Med.* 1997;336(26):1855-1859.
24. Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ. Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(2):108-117.
25. Comstock RD, Mallonee S, Fox JL, et al. A large nosocomial outbreak of hepatitis C and hepatitis B among patients receiving pain remediation treatments. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2004;25(7):576-583.
26. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007;7:214.
27. Yang Z, Rannala B. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Mol Biol Evol.* 1997;14(7):717-724.
28. Mau B, Newton MA, Larget B. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics.* 1999;55(1):1-12.
29. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med.* 1996 ;334:1685-90.
30. Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, Brown DE Jr, Yawn DH, McAllister HA Jr, Reitz BA, Nelson KE. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 1992 ;327 :369-73.

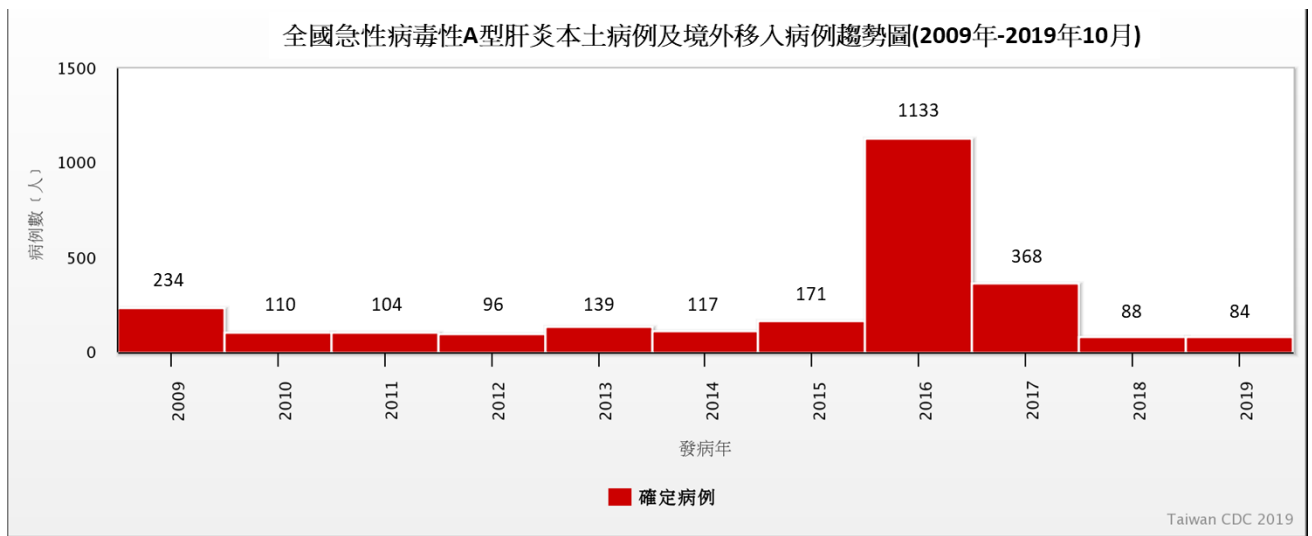
8. 圖、表



圖一 台灣各型急性肝炎比例 2001-2016



圖二 台灣急性E型肝炎本土及境外移入病例趨勢 2009-2019



圖三 全國急性病毒性 A 型肝炎本土及境外移入病例趨勢圖

Phylogenetic tree of the HAV :

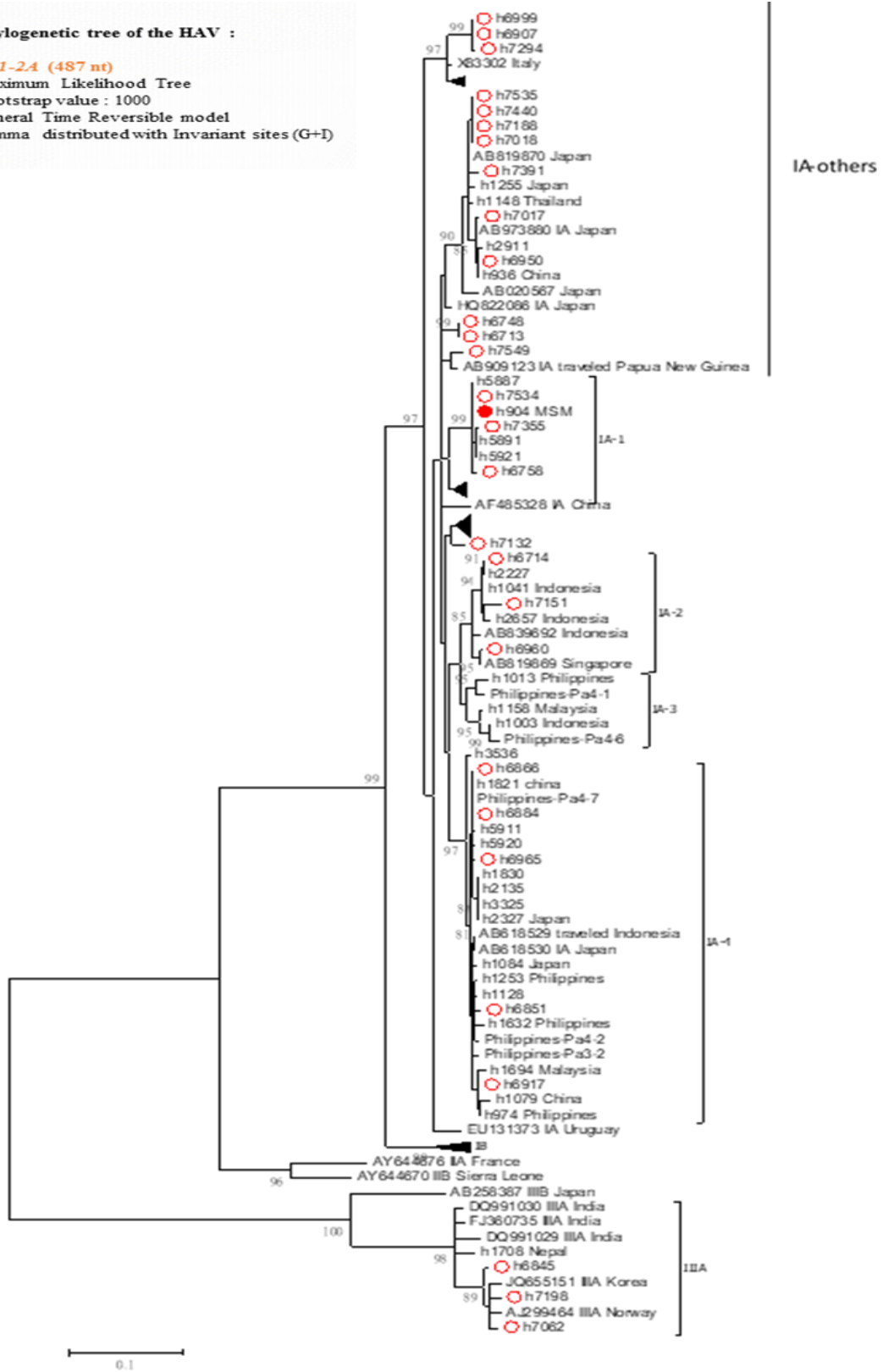
VP1-2A (487 nt)

Maximum Likelihood Tree

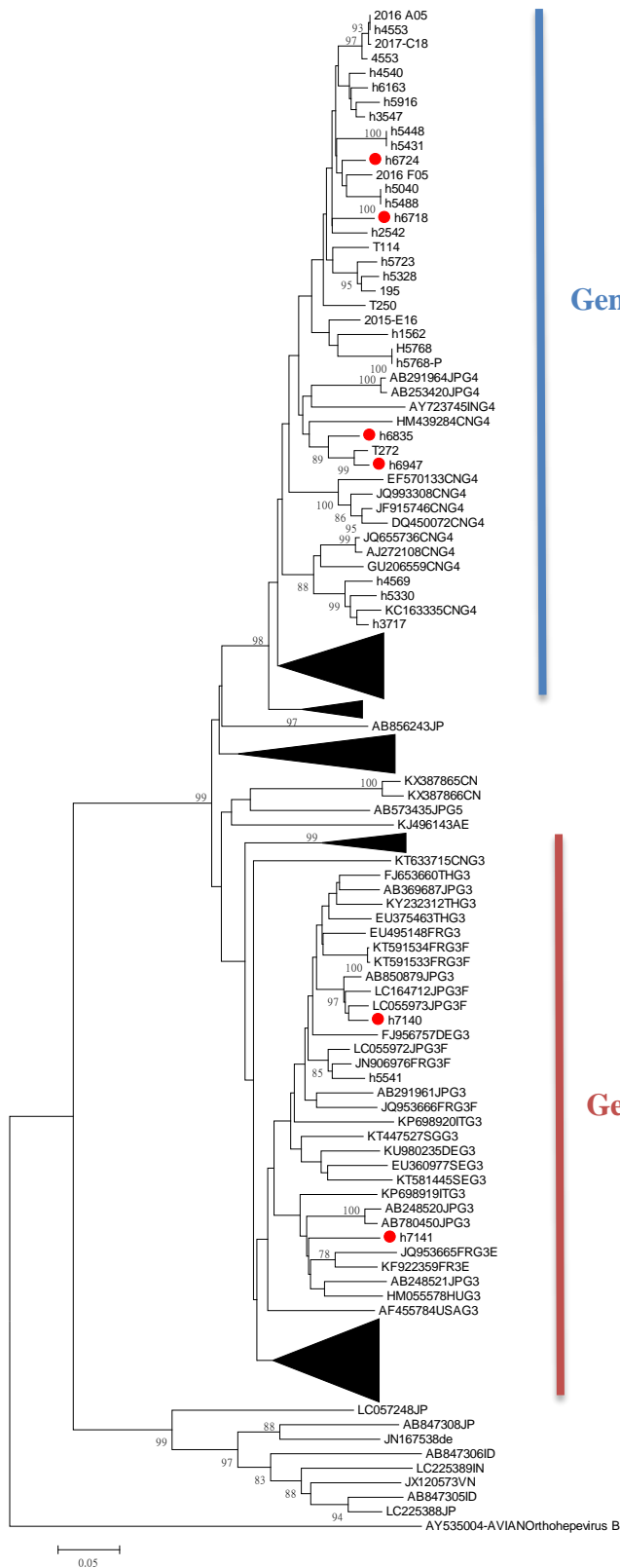
Bootstrap value : 1000

General Time Reversible model

Gamma distributed with Invariant sites (G+I)



圖四 Maximum likelihood 分析 HAV VP1-2A 片段



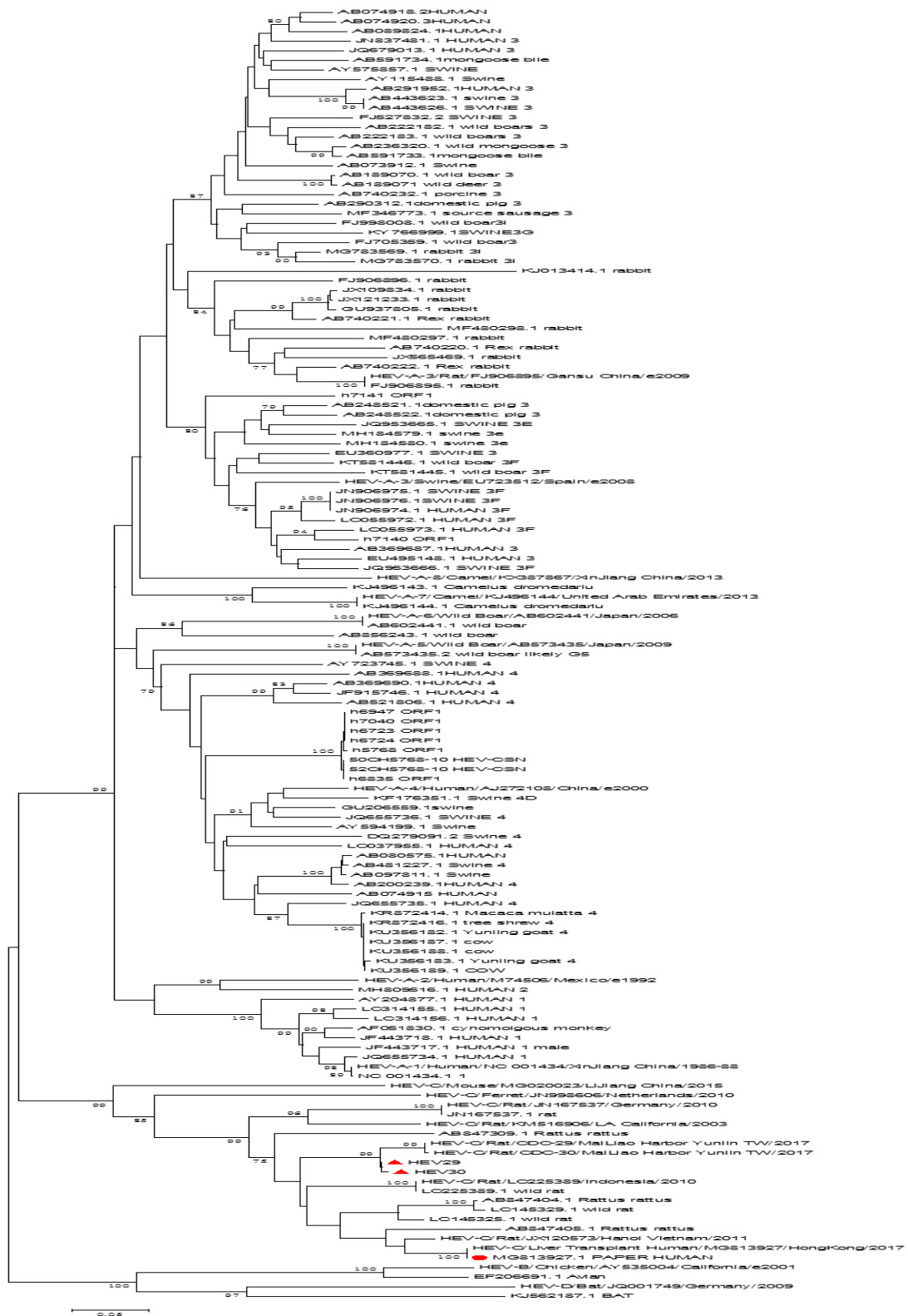
Genotype 4

Genotype 3

圖五 Neighbor-Joining 分析 HEV open reading frame 2(ORF2)片段



圖六 Maximum likelihood 分析 HEV ORF1 片段



圖七 Maximum likelihood 分析我國鼠類 HEV ORF1 片段

表一 全國急性病毒性A型肝炎通報病例分年同期比較趨勢表

月	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
2012	6	14	8	4	7	5	12	8	10	5	8	9
2013	10	7	18	16	24	10	6	20	6	5	4	13
2014	14	11	15	6	8	4	7	8	5	26	8	5
2015	12	5	6	5	8	9	14	13	28	20	20	31
2016	36	35	83	84	143	137	143	111	92	93	94	82
2017	65	62	54	37	35	28	15	18	12	9	22	11
2018	6	5	8	10	10	5	12	8	3	5	8	8
2019	6	9	12	8	6	9	6	13	4	11		

表二：與 MSM 個案 HAV 基因序列具同源親緣性分析(2015-2019)

年份	男性	女性
2015	90	0
2016	508	43
2017	183	25
2018	11	1
2019	1	0

表三 C 型肝炎 (1)病毒基因型 1b、(2)病毒基因型 1a、
(3)病毒基因型 2 型全口服藥物用藥表

(1)

病毒基因型 1b

有無肝硬化	是否曾接受治療 (長效型干擾素加雷巴威林 Ribavirin)	藥品	療程	治癒率
無肝硬化	不論是否曾接受治療	Harvoni 夏奉寧	12週	99%
		Viekirax+Exviera 維建樂+易奇瑞	12週	>97%
		Daklinza+Sunvepra 坦克干+速威干	24週	>97%
		Zepatier 質肝樂	12週	97%
有肝硬化 (肝功能仍為Child-Pugh A)	未曾接受治療者	Harvoni 夏奉寧	12週	97%
		Viekirax+Exviera 維建樂+易奇瑞	12週	99%
		Daklinza+Sunvepra 坦克干+速威干	24週	96%
		Zepatier 質肝樂	12週	99%
	曾治療失敗者	Harvoni+Ribavirin 夏奉寧+雷巴威林	12週	96%
		Harvoni 夏奉寧*	24週	99%
		Viekirax+Exviera 維建樂+易奇瑞	12週	98%
		Daklinza+Sunvepra 坦克干+速威干	24週	92%
		Zepatier 質肝樂	12週	99%
有肝硬化且肝功能已代償不全 (Child-Pugh B、C)	不論是否曾接受治療	Harvoni+Ribavirin 夏奉寧+雷巴威林	12週	50+~80%
		Harvoni 夏奉寧*	24週	50+~80%

(2)

病毒基因型 1a

有無肝硬化	是否曾接受治療 (長效型干擾素加雷巴威林 Ribavirin)	藥品	療程	治癒率
無肝硬化	不論是否曾接受治療	Harvoni 夏奉寧	12週	99%
		Viekirax+Exviera+Ribavirin 維建樂+易奇瑞+雷巴威林	12週	96%
		Zepatier 質肝樂	無抗藥性12週	95%
		Zepatier+Ribavirin 質肝樂+雷巴威林	有抗藥性16週	99%
有肝硬化 (肝功能仍為Child-Pugh A)	未曾接受治療者	Harvoni 夏奉寧	12週	97%
		Viekirax+Exviera+Ribavirin 維建樂+易奇瑞+雷巴威林	12週	97%
		Zepatier 質肝樂	無抗藥性12週	97%
		Zepatier+Ribavirin 質肝樂+雷巴威林	有抗藥性16週	99%
	曾治療失敗者	Harvoni 夏奉寧	24週	99%
		Harvoni+Ribavirin 夏奉寧+雷巴威林	12週	96%
		Viekirax+Exviera+Ribavirin 維建樂+易奇瑞+雷巴威林	24週	95%
		Zepatier 質肝樂	無抗藥性12週	99%
		Zepatier+Ribavirin 質肝樂+雷巴威林	有抗藥性16週	99%
有肝硬化且肝功能已代償不全 (Child-Pugh B、C)	不論是否曾接受治療	Harvoni+Ribavirin 夏奉寧+雷巴威林	12週	50+~80%
		Harvoni 夏奉寧	24週	50+~80%

(3)

病毒基因型第二型

有無肝硬化	是否曾接受治療 (長效型干擾素加雷巴威林 Ribavirin)	藥品	療程	治癒率
無肝硬化	不論是否曾接受治療	Sovaldi+Ribavirin 索華迪 + 雷巴威林	12週	94%
		Sovaldi+Daklinza 索華迪 + 坦克干	12週	可能向上，但需要更長時間證實
有肝硬化 (肝功能仍為Child-Pugh A)	未曾接受治療者	Sovaldi+Ribavirin 索華迪 + 雷巴威林	12週	90%
		Sovaldi+Daklinza 索華迪 + 坦克干	12週	可能向上，但需要更長時間證實
	曾治療失敗者	Sovaldi+Ribavirin 索華迪 + 雷巴威林	12週	70%
			16週	80%
Sovaldi+Daklinza 索華迪 + 坦克干	12週	可能向上，但需要更長時間證實		
	16週			
有肝硬化且肝功能已代償不全 (Child-Pugh B、C)	不論是否曾接受治療	Sovaldi+Daklinza+Ribavirin 索華迪 + 坦克干 + 雷巴威林	12週	~70%
		Sovaldi+Ribavirin 索華迪 + 雷巴威林	24週	~70%
		Sovaldi+Daklinza 索華迪 + 坦克干	24週	~70%

表四：107 例急性 A 型肝炎個案基因型分析(2017.11-2019.10)

基因型	本土個案 (N=62)	境外個案 (N=45)	境外感染地區
IA-1	35	8	泰國(2)、韓國(1)、馬來西亞(1)、 比利時(1)、日本(2)、柬埔寨(1)
IA-2	2	8	印尼(7)、柬埔寨(1)
IA-3	3	5	馬來西亞(4)、菲律賓(1)
IA-4	5	9	馬來西亞(7)、菲律賓(2)
IA-others	10	14	美國(1)、智利(1)、摩洛哥(3)、 中國(3)、所羅門群島(1)、加拿大(1)、韓國(3)、法國(1)
IB	1	-	
IIIA	6	1	尼泊爾(1)

表五：28 例急性 A 型肝炎個案基因型分析(2019.01-2019.10)

基因型	本土個案 (N=12)	境外個案 (N=16)	境外感染地區
IA-1	1	2	柬埔寨(1)、日本(1)
IA-2	1	2	印尼(2)
IA-3	-	-	
IA-4	1	4	馬來西亞(2)、菲律賓(2)
IA-others	6	8	法國(1)、摩洛哥(1)、中國(2)、 韓國(3)、加拿大(1)
IB	-	-	
IIIA	3	-	

表六：2019 年我國醫療機構洗腎透析室疑似 HCV 群聚事件調查分析

案別	地區	疑似 HCV 群聚案由	個案數	分析結果
1	北區	新竹市醫院洗腎透析室	2	1 例基因型 2a ，另 1 例核酸未檢出
2	台北區	新北市醫院洗腎透析室	2	1 例核酸含量過低無法進行基因分型，另 1 例核酸未檢出
3	中區	台中市醫院洗腎透析室	4	1 例基因型 2b ，另 3 例核酸未檢出
4	台北區	台北市醫院洗腎透析室	2	1 例基因型 6 ，另 1 例基因型 1b
5	台北區	新北市醫院洗腎透析室	2	1 例基因型 1b ，另 1 例核酸未檢出
★6	中區	台中市醫學中心洗腎透析室	2	2 例基因型均為 1b
7	台北區	基隆市醫院洗腎透析室	2	1 例基因型 1b ，另 1 例核酸未檢出
★8	北區	苗栗縣醫院洗腎透析室	3	1 例基因型 1b ，另 2 例基因型 2b
9	北區	桃園市醫院洗腎透析室	2	1 例基因型 2a ，另 1 例基因型 1b
★10	台北區	新北市醫院洗腎透析室	3	2 例基因型 1a ，另 1 例核酸未檢出
11	北區	桃園市醫院洗腎透析室	6	2 例基因型 2a ，另 4 例核酸未檢出

**衛生福利部疾病管制署 108 年科技研究計畫
期末審查意見回復**

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000301

計畫名稱：A、C、E 型肝炎群聚監測與基因庫建立

計畫主持人：楊志元

*修正處在報告中加底線標示

序號	審查意見	主持人回復說明	修正 處 頁 碼
1	符合流行風險監控肝炎之業務及計畫需要，精進傳染病病原體檢驗診斷及親緣性分析。	謝謝委員意見。	
2	本計畫萃取臨床檢體之病毒核酸，並以 Maximum likelihood 分析法呈現檢體中病毒核酸之親緣性，親緣關係建立清楚明瞭。建立 A、C、E 型肝炎病毒基因關聯性分析方法及病毒基因序列資料庫，於後續疑似群聚事件發生後，可即時確認該群聚感染發生之可能性與相關性。	謝謝委員意見。	
3	以本年度急性 A 型肝炎某個案為例，透過基因庫的建置，能有效協助公衛端研判該個案之基因型關聯性及可能感染來源。今年監測結果主要流行之 HAV 基因亞型已有演變為 IA-others 之趨勢，與往年(2018)不同，值得進一步觀察變化。	謝謝委員意見，實驗室將持續監測 HAV 基因亞型的變化。	

4	今年度的報告，與往年的報告相較，各種肝炎的傳染型態有所改變，需要持續做分生監測，才能有效瞭解傳染途徑。多年來已經可看見對施政效益的幫助，每年的問題不同，當然有時效性的效益。	謝謝委員意見。	
5	美國和歐洲近年皆有 HAV 爆發疫情，可依據國際疫情變化，取樣分析我國臨床檢體，以評估是否存在風險，作為政策參考。	<p>1. 2019 年 Foster 等人於 MMWR 發表 2013-2018 年 HAV 在全美的分析結果，主要型別以 IB(83%)為主，次為 IA(16%)，IIIA(1%)基因型個案數於 2016-2018 年快速新增。比較我國主要型別為 IA，2019 年並未有 IB 個案發生。</p> <p>2. 在荷蘭 2016-2017 年爆發 MSM 間 HAV 群聚事件，基因型別與我國 2016 年群聚事件的病毒序列相同，皆為 IA 基因型，其次流行型別為 IB。</p>	
6	結論可提供我國急性病毒性肝炎重要資訊，對於急性病毒性肝炎的走勢了解及防疫有相當大的幫助，宜持續執行。	謝謝委員意見。	
7	相關文獻收集有更新，應用於研究，可與各醫中心分享。是否可將資料庫之定序資料公開，並要求各醫學中心提供地區性檢體或基因序列，以豐富資料庫。	謝謝委員建議，將納入日後後續研究規劃。	

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
108 年度計畫重要研究成果及具體建議
(本資料須另附乙份於成果報告中)

計畫名稱：A、C、E 型肝炎群聚監測與基因庫建立

主持人：楊志元

計畫編號：MOHW108-CDC-C-315-000301

1.計畫之新發現或新發明

本年度在急性 A 型肝炎 HAV 親緣分析結果中，1 例個案疫調顯示雖具國外旅遊史，且職業身分為導遊，自我懷疑是因為帶團時飲食所致，原疫調將其歸類為境外移入個案。由於核酸序列結果顯示其基因型 IA-1 與 MSM HAV(+)序列相似度高達 99.58%，且該例個案疫調單問卷具同性伴侶及行為史，經討論後將其歸為本土個案。此項分析結果即藉由分子親緣比對結果，協助公衛端研判個案之基因型之關聯性。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

由於近 2 年 A 型肝炎防疫成果顯著，過去國人主要感染 IA-1 大幅下降，使本年度統計 IA-others cluster 成為國人感染的主要型別，其中有半數為境外移入個案。藉由基因資料庫之建置，可使民眾了解防疫單位對於發生傳染病群聚事件時，配合疫情調查的科學研判作為。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

各種肝炎的傳染型態有所改變，需要持續做分生監測，才能有效瞭解傳染途徑。多年來已經可看見對施政效益的幫助。