

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000304

衛生福利部疾病管制署 107 年署內科技研究計畫

計畫名稱：肝炎病毒分生親緣性分析方法之建立與評估

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：廖郁欣、謝若郁、黃偉倫、林佳賢

執行期間：107 年 1 月 1 日至 107 年 12 月 31 日

研究經費：新臺幣 195 萬元 9 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	8
3. 結果	13
4. 討論	19
5. 結論與建議	22
6. 重要研究成果及具體建議	22
7. 參考文獻	23
8. 圖、表	26

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，至今仍在延續當中，本年度尚有 12 例通報急性 A 型肝炎個案與 MSM 個案序列高度相關。自 2017 年 1 月起疾病管制署陸續接獲急性 C 型肝炎個案通報，經疫調研判為地方診所因重複使用受汙染針具造成的群聚感染。

本計畫目的在於透過分生親緣性比對方法的建立，針對 A 型及 C 型肝炎，以分子生物學方法輔助分析群聚事件之關聯性，進一步了解群聚感染之途徑，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。依據資料庫分析，本年度共確認 1 起旅行團境外移入感染 HAV 群聚事件及 4 起 HCV 群聚事件。

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. Up to date in this year, there are 12 acute HAV cases had highly relationship in phylogenetic analysis compared with MSM population. At the beginning of 2017, several cases of acute hepatitis C were confirmed by the nationally notifiable disease reporting system.

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. Based on phylogenetic analysis, there are one travel group of overseas migrants infected with acute HAV and 4 confirmed HCV outbreaks in this year.

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)。受污染之水源是感染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（圖二），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，迄今疫情漸趨和緩但仍持續。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。

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。

2. 材料與方法

檢體收集

收集國內病毒性肝炎通報之陽性檢體，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 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'-CATTCTGTCCATTTYTCATC-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'-TTCATCATCATRTCCCANGCCAT-3'
	C/E2 R2	5'-GTNADCCANGGNCCNGMNCCRCA-3'
	NS5B R2	5'-GRGCHYGVGACACGCTGTGA TANATGTC-3'

2. 反轉錄聚合酵素鏈鎖反應(RT-PCR)

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

	HAV	HCV
sample viral RNA	2.5 μ L	5 μ L
2x RT-PCR Buffer	12.5 μ L	10 μ L
RT-PCR Enzyme Mix	1 μ L	0.4 μ L
forward primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L
reverse primer	1 μ L	0.6 μ L

10 μ M		
ddH ₂ O	7 μ L	3.4 μ L
RT-PCR 流程	50 $^{\circ}$ C 30min →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	55 $^{\circ}$ C 20min →94 $^{\circ}$ C 2min →以 94 $^{\circ}$ C 15sec 55 $^{\circ}$ C 30sec 68 $^{\circ}$ C 90sec 反應 45 次 →68 $^{\circ}$ C 5min

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
sample cDNA	0.5 μ L	2 μ L
2x PCR Master Mix	12.5 μ L	10 μ L
forward primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L
reverse primer 10 μ M	1 μ L	0.6 μ L
ddH ₂ O	10 μ L	6.8 μ L
Nest PCR 流程	94 $^{\circ}$ C 2min →以 94 $^{\circ}$ C 30sec 53 $^{\circ}$ C 30sec	94 $^{\circ}$ C 1min →以 98 $^{\circ}$ C 10sec

	72°C 1min	55°C
	反應 35 次	30sec
	→72°C 7min	72°C
		10sec
		反應 45 次
		→72°C 5min

(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)。

3. 結果

以下分別就 HAV 及 HCV 進行親緣性分析探討

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

2018 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 70 例，遠低於近 10 年確定病例平均值(圖二)。故以截至今年 9 月回溯至 2017 年 11 月計算，送驗急性 HAV 個案之檢測結果進行分析(表一)。分析 69 例陽性個案 VP1-2A 基因型別分佈，45 例(65%)為本土個案，24 例(35%)屬境外個案。本土個案中，42 例(93.3%)個案均為基因型 IA，24 例境外個案其中 23 例(95.8%)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。42 例 IA 本土個案，其中 34 例(81%)為 IA-1 基因型，23 例 IA 境外個案，僅 6 例(26%)為 IA-1 基因型。另有 3 例本土個案分屬 IB(1 例)及 IIIA(2 例)基因型。依分析結果，近期我國急性 HAV 個案基因型別以 IA 為主(93.3%)，細分亞型則以 IA-1 基因型為主要型別。本年度尚有 12 例通報急性 A 型肝炎個案與 MSM 個案序列高度相關。

分析 24 例境外個案結果，與期中結果相較，境外感染地區由 6 個國家增加至 12 個國家，以馬來西亞 10 例(42%)最多，基因型別為 IA-1、IA-3、IA-4，其次為泰國及印尼各 3 例，其餘 9 國家各僅 1 例個案。

利用 Maximum likelihood 樹狀圖分析 69 例 HAV 陽性個案 VP1-2A 基因(487 nt)與 h904(2015 年群聚事件指標個案，標示●)之親緣性(圖三)，搭配 SIAS 相似度分析(data not shown)，40 例 IA-1 基因型個案(標示○)，於 34 例本土個案中，僅 1 例編號 20180105918 核酸相似度為 97.11%，5 例相似度介於 99.38-99.79%，其餘 28 例核酸序列與 h904 相似度為 100%。4 例基因型為 IA-2 境外個案(標示●)，除 1 例具柬埔寨旅遊史，另 3 例均具印尼旅遊史，其中更有 1 名個案為印尼籍郵輪員工。9 例分屬 IA-3 及 IA-4 基因型個案，均具馬來西亞旅遊史；1 例較不常出現的 IIIA

境外個案具尼泊爾旅遊史。

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6件HCV群聚事件及7件疑似輸血感染HCV事件進行分析。所有檢體均使用Abbott RealTime HCV kit 偵測檢體有是否檢出HCV RNA，檢測敏感度為 12 IU/mL，Linear Dynamic Range為12 -108 IU/ml，陽性結果檢體核酸進行基因分型試驗，親緣性分析採用Maximum likelihood和Bayesian inference兩項方法，兩種分析方法均以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。以下針對13事件進行分析：

【案一: HCV 群聚事件】

高屏區 A 醫院 RCW 病房於同一時期有 6 例個案 HCV 抗體陽轉，疫調顯示疑似源頭個案為 h5520 及 h5521 兩例，實驗室針對疑似個案血清進行親緣性分析。表二為 C/E1/E2 核酸序列相似度結果，分析長度 903 nt 中，h5520 之基因序列差異度較大，與另 5 位個案(h5513, h5515, h5516, h5521, h5524)序列相似度低於 86.33%，推論個案 h5520 屬獨立事件，其餘 5 例個案核酸序列差異度介於 0.38-1.04%。以 Maximum likelihood 分析親緣性，圖四顯示 6 例(標示●)個案均為基因型 1b, h5520 親緣性與其他 5 例個案不同，屬單獨事件。另 5 例個案具高度關聯性，就分生親緣分析結果，研判此 5 例個案屬一群聚事件。

【案二:HCV 群聚事件】

南區區管中心通報 3 例 HCV 個案於嘉義地區醫院疑似洗腎發生群聚事件，表三為 C/E1/E2 核酸序列相似度結果，分析長度 903 nt 中，h5864

之基因序列差異度較大，與另 2 位個案序列相似度為 86.8%，推論個案 h5864 屬獨立事件，其餘 2 例個案 h5862、h5863 核酸序列差異度為 1.1%，具高度關聯性。以 Maximum likelihood 分析親緣性，圖四顯示 3 例(標示●)疑似個案均為基因型 1b，h5864 親緣性與其他 2 例個案不同，屬單獨事件。h5862 及 h5863 分析結果則有高度同源性，研判 2 例個案屬一群聚事件。

【案三：疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於南部某醫學中心 MDS(骨髓造血不良症候群)個案疑似頻繁輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及捐血者(9 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果顯示受血者及捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。

【案四：疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於南部某醫學中心 ESRD(腹膜炎)個案疑似輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及捐血者(1 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果顯示受血者及捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。

【案五：疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於南部某醫學中心 other specified inflammatory liver disease 個案疑似輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及捐血者(2 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果僅受血者 h5998 檢測出 C 型肝炎 RNA，圖四顯示 h5998 (標示■)基因型分析結果為 2b；捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。就現有收件之血清檢體研判，研判受血者感染之 C 型肝炎病毒與捐血者並無關聯。

【案六：疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於北部某醫學中心進行血漿置換術個案疑似輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及捐血者(36 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果僅受血者 h6002 檢測出 C 型肝炎 RNA，圖四顯示 h6002 (標示■)基因型分析結果為 1b；其餘 36 例捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。就現有收件之血清檢體研判，研判受血者感染之 C 型肝炎病毒與捐血者並無關聯。

【案七: 疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於北部某醫學中心進行部份肝臟切除個案疑似輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及捐血者(14 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果僅受血者 h6140 檢測出 C 型肝炎 RNA 陽性，但核酸含量<12 IU/mL，此微量核酸檢體無法進一步進行基因型分析。14 例捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。就現有收件之血清檢體研判，研判受血者感染之 C 型肝炎病毒與捐血者並無關聯。

【案八:HCV 群聚事件】

北部基隆某醫院疑似洗腎發生群聚事件，針對 h6236 與 h6237 個案進行病毒基因型分析，圖四顯示 h6236 (標示●)基因型分析結果為 1b 型，h6237 (標示●)為 2a 型。序列相似度為 66.96 % 初步判定 2 例受感染之 C 型肝炎病毒 h6236 與 h6237 為獨立事件。

【案九:HCV 群聚事件】

北部新竹某醫院疑似洗腎發生群聚事件，通報 3 例個案進行分析，除 1 例個案 h6186 送驗血清未檢測出 C 型肝炎 RNA，另 2 例個案(h5745, h6226)檢體 C 型肝炎 RNA 核酸檢測陽性，針對 h5745 與 h6226 進行病毒基因型分析，C/E1/E2 2 者序列相似度為 96.96%，具高度關聯性。圖

四顯示 2 例個案(標示●)均為基因型 2a，屬一群聚事件。

【案十: 疑似輸血感染 HCV 事件】

一例於中部某醫學中心個案 h6260 疑似輸血感染 C 型肝炎抗體陽轉事件，針對受血者(1 管)及輸血血袋(2 管)血清進行病毒基因分析，檢測結果顯示捐血者血清檢體均未檢出 C 型肝炎 RNA，圖四顯示受血者 h6260(標示■) 基因型為 1b。研判受血者感染之 C 型肝炎病毒與捐血者並無關聯。

【案十一:HCV 群聚事件】

北部新竹縣某診所通報 10 例疑似 C 型肝炎個案群聚事件，10 例個案血清檢體中，1 例個案 h6296 核酸檢測陰性，另 1 例個案 h5656 核酸檢測弱陽性，無法進一步分析基因型;其餘 8 例 C/E1/E2 核酸序列相似性分析(表四)，h5491 之基因序列差異度較大，與另 7 例(h5688, h5619, h6286, h6289, h6288, h6287, h5348)個案序列相似度僅 61.42%，推論個案 h5491 屬獨立事件。剩餘 7 例個案核酸序列差異度介於 1-2%，具高度關聯性。以 Maximum likelihood 分析親緣性(標示●)，圖四顯示 7 例疑似個案均為基因型 1b，h5491 則為基因型 2b，親緣性分析結果顯示 h5491 屬一單獨事件。其它 7 例分析結果則有高度同源性，研判此 7 例個案屬群聚事件。

【案十二: 疑似輸血感染 HCV 事件】

本案屬案八後續追蹤調查，針對 h6236 及 h6237 兩例進行疑似輸血血袋調查分析，h6236 輸血血袋兩袋，h6237 輸血血袋五袋，針對輸血血袋(7 管)血清進行病毒核酸檢測，檢測結果顯示捐血者血清檢體均未檢測出 C 型肝炎 RNA。研判受血者感染之 C 型肝炎病毒與捐血者並

無關聯。

【案十三:HCV 群聚事件】

南部雲林縣某密醫診所發生 2 例疑似 C 型肝炎個案群聚事件，2 例個案 h6371 與 h6353 (標示●)核酸序列相似為 65.7% ，屬個別獨立事件，以 Maximum likelihood 分析親緣性，h6371 與 h6353 分別為 1b 與 2a 基因型(圖四)。研判此案非屬群聚事件。

分生親緣性關係分析時，同時進行 HCV 肝炎病毒核酸貝氏親緣演化樹分析，以比較兩者之異同。貝氏親緣演化樹結果如圖五顯示，本次研究共發現 4 案之疑似個案，於 Maximum likelihood 分析中各具高度親緣性，以 Bayesian inference method 分析顯示，案一 6 例疑似個案(藍字標示)均為基因型 1b，但個案 h5520 親緣性與其他 5 例個案不同，案一 5 例個案於親緣演化樹屬一群聚事件。案二顯示 3 例疑似個案(粉紅字標示)同為基因型 1b，h5864 親緣性與其他 2 例(h5862 及 h5863)個案不同，案二 2 例個案屬一群聚事件。案九 3 例個案進行分析，2 例個案 h5745 與 h6226(紅字標示)核酸列具高度關聯性屬一群聚事件。案十一 8 例疑似個案除 h5491 為基因型 2b 外，其餘 7 例(綠字標示)均為基因型 1b，案十一 7 例個案於親緣演化樹屬一群聚事件。綜上，本研究不論使用 Maximum likelihood 分析或 Bayesian inference method 分析，在案件親緣分析上，均可獲得一致的分析結果。

4. 討論

本計畫研究目標有二:一為建立分生親緣性比對方法，輔助判定群

聚事件之關聯性。二為建立國內 A 型及 C 型肝炎病毒基因資料庫供比對分析，監控 A、C 型肝炎病毒流行病毒株之變異情形，了解其散佈趨勢。

本計畫已成功建立 Bayesian inference 分析法與 Maximum likelihood 分析法，進行疑似群聚事件及例行陽性個案之基因型分析及親緣關係研判，由於 Bayesian inference 分析法可增加採檢時間資料後，推論物種的演化速率，但因為缺乏流行病學的資料，及個別傳染者或被感染者之間的明確關係。本計畫以建置 C 型肝炎病毒分生親緣性分析方法及基因資料庫供比對及監測為首要目標。

急性 A 型肝炎 HAV 親緣分析結果中，2 例編號為 20180106114 與 20180106117 個案，於傳染病通報系統註記為境外感染個案，感染地區傳染病通報系統原註記分別為摩洛哥及中國，但比對 VP1-2A 基因序列結果完全一致，Maximum likelihood 親緣分析並將 2 例個案歸類於 IA-others(標示 ▲)(圖三)。分析旅遊史，個案 20180106114 於 2018 年 3 月 8 日至 23 日，參加前往摩洛哥旅行團後，4 月 18 日發病後，由於 A 型肝炎的潛伏期約為 15 至 50 天，平均為 28 至 30 天。研判感染地區為摩洛哥；另 1 例個案 20180106117 亦於同一時間參加同一團摩洛哥旅行，回國後於 2018 年 3 月 25-28 日及 29-31 日前往中國，2018 年 4 月 15 日發病後，感染地區初判為中國。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地緣性，綜合實驗室基因分型結果及個案旅遊史資料，初步研判 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，個案 20180106117 初判感染地區應與中國無關。此項分析結果符合本計畫執

行之目的，即藉由分子親緣比對結果，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。

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，針對 6 件 HCV 群聚事件及 7 件疑似輸血感染，共 13 件 HCV 事件進行分析。基因型顯示如表五，合計 26 例可分析基因型之個案中，20 例(76.9%)為基因型 1b，4 例(15.4%)為 2a 及 2 例(7.7%)為 2b。可知我國急性 C 型肝炎群聚及疑似輸血感染個案，主要以基因型 1b 為主，次為 2a 及 2b。此次分析中並未發現基因型 3-6。是否我國急性 C 型肝炎個案之感染基因型亦雷同，需要持續研究分析。此外，案十一北部新竹縣某診所通報疑似 C 型肝炎個案群聚事件，原區管中心疫調後進行個案之親緣比對，實驗室分析後於資料庫系統發現一例原屬參考病毒株序列(非通報事件個案)(h5348)，其結果與 6 例調查個案高度相關，為 1b 基因型。經告知區管中心進行了解，h5348 該個案為調查事件起算日前一天之門診患者，由於起算時間點之因素，疫調資料一度忽略此一個案，幸該個案基因資料庫已完成建置，才能於後續調查事件過程中，發現此一具高度關連性的個案。

血液基金會自 2013 年起，比照歐美日先進國家做法，擴大全面辦理病毒核酸擴增檢驗(NAT)，包括 HBV、HCV 及 HIV，來彌補 EIA 空窗期的不足，以降低輸血後病毒感染的風險，提升輸血安全，近 2 年(2016-2017)血疫基金會年報資料顯示，捐血者血袋 HCV 核酸陽性比例均為 0.02%。文獻指出²⁹⁻³⁰，NAT 檢驗可將 B 型肝炎的空窗期由 56 天縮短至 36 天；C 型肝炎可由 82 天縮短到 23 天；HIV 可由 22 天縮短至 11 天。各別檢體核酸擴大檢驗(ID NAT)則可更進一步將 HBV 空窗期縮短至 20 天；HCV 及 HIV 縮短到 3 天。本年度 8 例疑似輸血感染個案分

析結果顯示，僅有 5 例核酸陽性受血者個案，檢測出 C 型肝炎核酸陽性反應進行基因分型，基因型主要仍以 1b(60%)為主。所有 8 例個案的事件，合計 71 袋捐血者血袋中均未檢出 C 型肝炎病毒核酸，回溯 2015 年迄今，合計 15 例疑似輸血感染通報個案事件，91 袋捐血者血袋均未檢出 C 型肝炎病毒核酸(表六)。就現有疑似輸血感染 HCV 通報個案分析，均未發現有輸血者檢出 HCV 核酸陽性之事件。

綜上，依據資料庫分析，本年度確認一起旅行團境外移入急性 A 型肝炎群聚感染事件，另於 6 起通報疑似 HCV 群聚事件中，確認 4 起為 HCV 群聚事件。

5. 結論與建議

本計畫已建置完成我國急性 A 型及 C 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 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，以符合我國急性 C 型肝炎個案之完整性。

6. 重要研究成果及具體建議

本計畫建置之 A 型肝炎基因資料庫，於本年度釐清一起旅行團境外移入急性 A 型肝炎群聚感染事件，2 例個案原始疫調雖同屬境外移入個案，但 2 者感染地區確分別註記中國及摩洛哥，具中國旅遊史之個案亦有相同時間摩洛哥旅遊史，由於疫調研判是以最近一次旅遊史為基準，故將 2 例個案感染區域判定不同，經由親緣資料庫比對，2 者同屬 IA-others 基因型，且為地中海區域特殊基因型，始確定此為一起旅行團境外移入急性 A 型肝炎群聚感染事件。C 型肝炎基因資料庫於本年度協助疫調事件，將一例原不在疫調時間範圍內之個案，釐清該個案 C 型肝炎病毒序列與其他調查個案高度相關。其差異僅在於該個案疫調起算時間點之因素，疫調資料一度忽略此一個案非屬群聚事件，幸該例個案序列已於建置基因資料庫內，故能迅速釐清該個案亦屬同一群聚事件。

具體建議為 A 型肝炎及 C 型肝炎資料庫應持續建置，以因應特定事件之調查。同時應考慮擴大至 E 型肝炎基因資料庫，逐年完善資料庫之完整性與代表性。

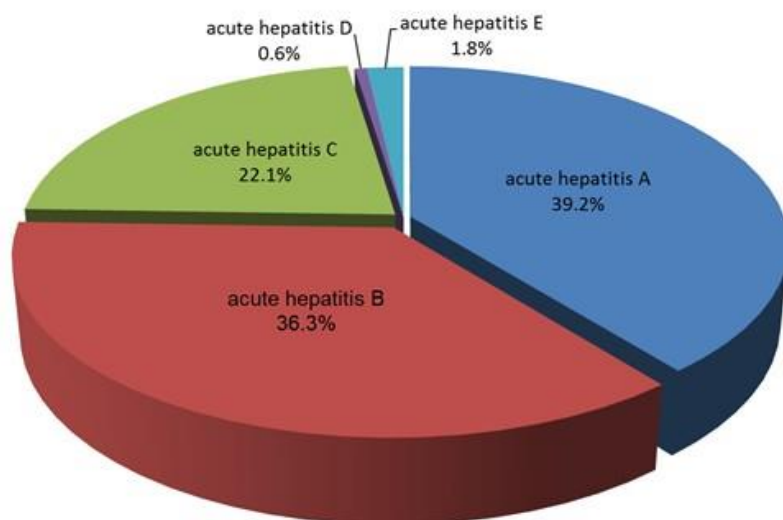
7. 參考文獻

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. *Theor 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

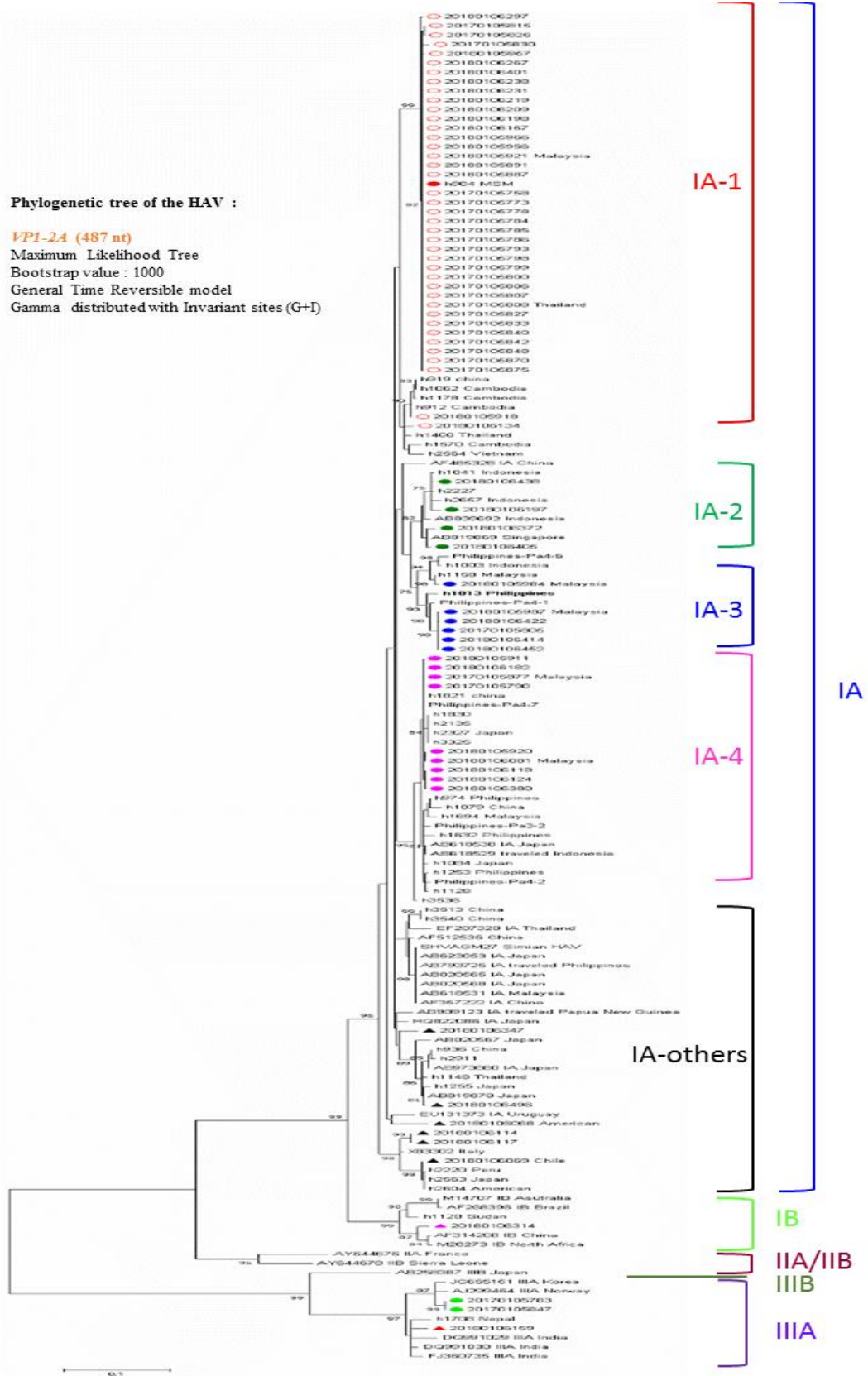


圖一 台灣各型急性肝炎比例 2001-2016

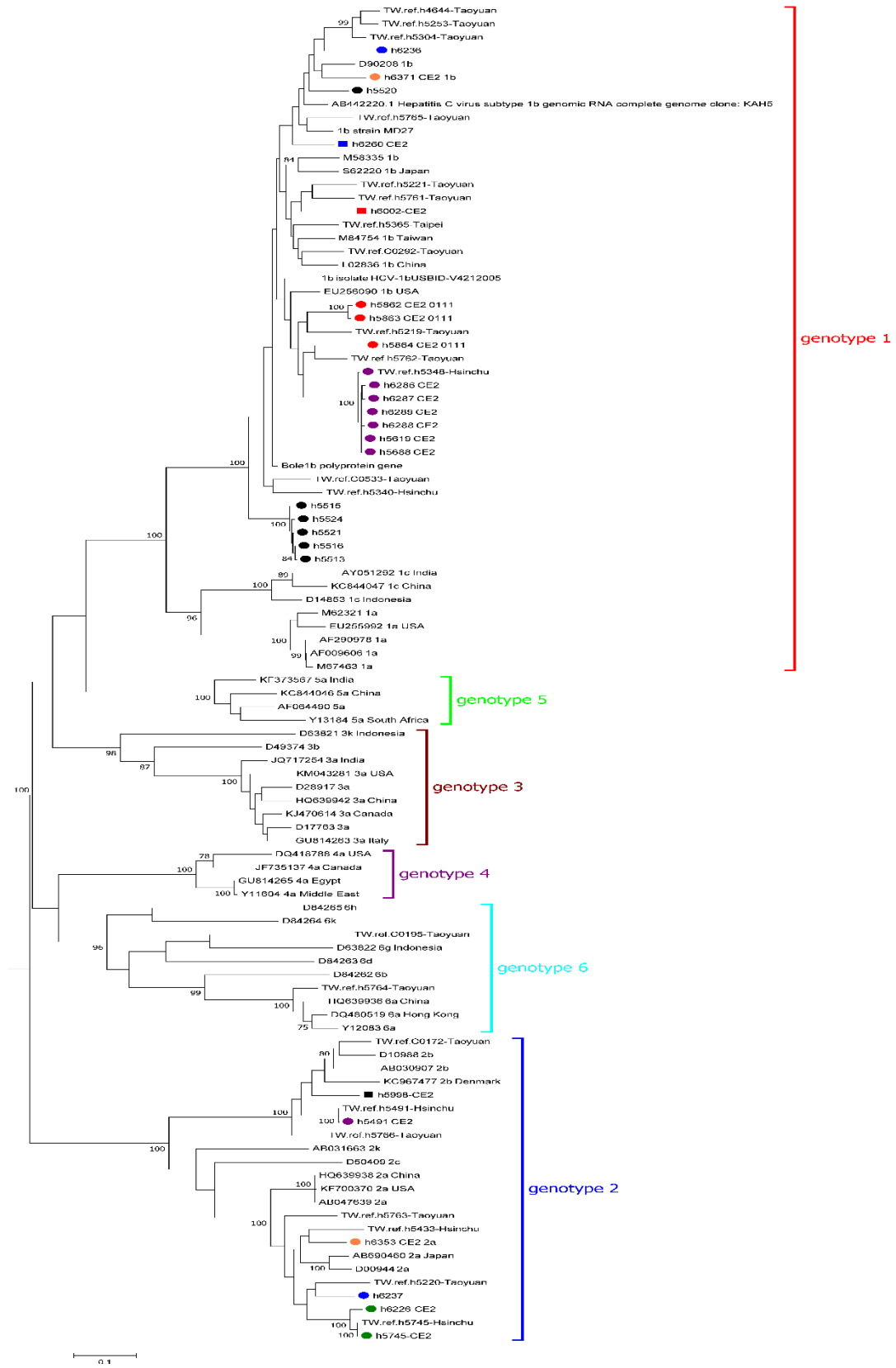
全國急性病毒性A型肝炎本土及境外移入病例趨勢圖(2009-2018.10)



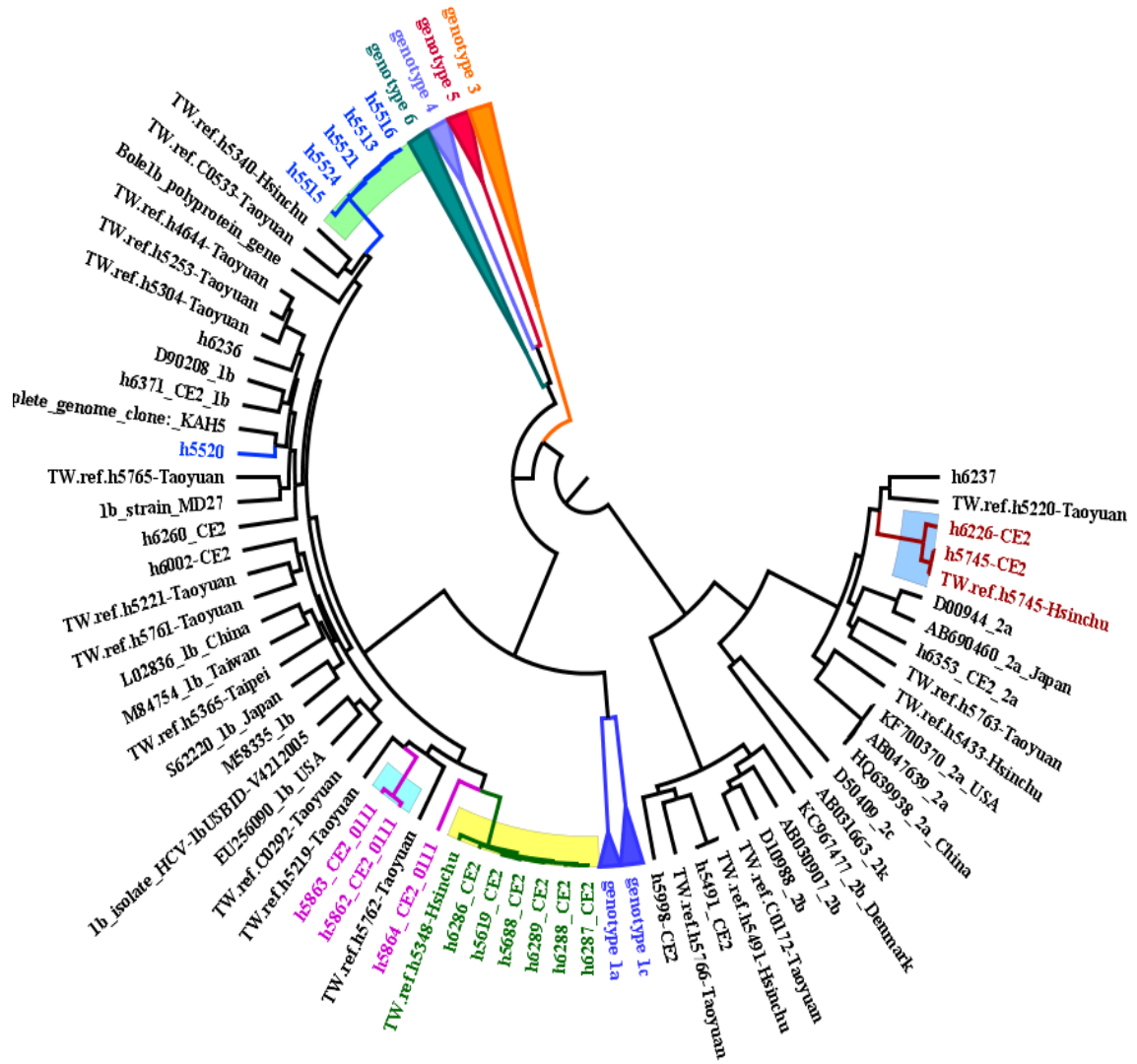
圖二 全國急性病毒性 A 型肝炎本土及境外移入病例趨勢圖



圖三 Maximum likelihood 分析 HAV VP1-2A 片段



圖四 Maximum likelihood 分析 HCV C/E1/E2 片段



圖五 Bayesian inference 分析 HCV C/E1/E2 片段

表一：69 例急性 A 型肝炎個案基因型分析(2017.11-2018.9)

基因型	本土個案 (N=45)	境外個案 (N=24)	境外感染地區
IA-1	34	6	泰國(2)、韓國(1)、馬來西亞 (1)、 比利時(1)、日本(1)
IA-2	-	4	印尼(3)、柬埔寨(1)
IA-3	2	4	馬來西亞(4)
IA-4	4	5	馬來西亞(5)
IA-others	2	4	美國(1)、智利(1)、 摩洛哥(1) 、 中國(1)
IB	1	-	
IIIA	2	1	尼泊爾(1)

表二：案一急性 C 型肝炎 C/E1/E2 核酸序列相似度結果

similarity results (C/E1/E2)						
h5520	100%					
h5521	86.14%	100%				
h5513	86.14%	99.43%	100%			
h5515	86.14%	98.96%	98.77%	100%		
h5516	86.33%	99.62%	99.81%	98.96%	100%	
h5524	86.14%	99.15%	98.96%	98.86%	99.15%	100%
	h5520	h5521	h5513	h5515	h5516	h5524

表三：案二急性 C 型肝炎 C/E1/E2 核酸序列相似度結果

similarity results (C/E1/E2)			
h5862	100%		
h5863	98.90%	100%	
h5864	86.80%	86.80%	100%
	h5862	h5863	h5864

表四：案十一急性 C 型肝炎 C/E1/E2 核酸序列相似度結果

similarity results (C/E1/E2)								
h5348	100%							
h5491	61.42%	100%						
h5688	99.32%	60.85%	100%					
h6286	98.86%	60.97%	99.32%	100%				
h6587	98.86%	60.63%	99.43%	98.98%	100%			
h6288	98.86%	60.52%	99.54%	98.86%	99.20%	100%		
h6289	98.98%	60.74%	99.66%	98.98%	99.09%	99.32%	100%	
h5619	99.32%	60.79%	100%	99.32%	99.43%	99.54%	99.66%	100%
	h5348	h5491	h5688	h6286	h6287	h6288	h6289	h5619

表五：26 例急性 C 型肝炎個案基因型分析(2018.1-2018.10)

事件別	案例	基因型		
		1b	2a	2b
群聚事件	案 1	6		
	案 2	3		
	案 8	1	1	
	案 9		2	
	案 11	7		1
	案 13	1	1	
輸血感染	案 5			1
	案 6	1		
	案 10	1		
	合計	20	4	2

表六：2015-2018 年 15 例疑似輸血感染 HCV 個案分析結果

案例	調查年	性別	發病年齡	個案檢體 HCV 核酸檢測結果	HCV 基因型	輸血血袋數	輸血血袋核酸檢測結果	備註(輸血因素)
1	2018	男	66	陽性	1b	2	陰性	血液透析
2	2018	女	84	陽性	2a	5	陰性	血液透析
3	2018	女	85	陽性	1b	2	陰性	腹膜炎
4	2018	女	70	陽性	NA*	14	陰性	部份肝臟切除
5	2018	女	41	陽性	1b	36	陰性	血漿置換術
6	2018	男	64	陽性	2b	2	陰性	其他明示的發炎性肝疾病
7	2018	男	38	陰性	-	1	陰性	腹膜炎
8	2018	女	43	陰性	-	9	陰性	骨髓造血不良症候群
9	2017	男	82	陽性	NA*	5	陰性	泌尿道感染引發敗血症
10	2017	男	63	陰性	-	1	陰性	腹膜炎
11	2017	女	74	陰性	-	1	陰性	腹膜炎
12	2016	女	61	陽性	1b	1	陰性	血液透析
13	2016	女	51	陽性	2a	6	陰性	貧血輸血
14	2015	女	64	陽性	1b	3	陰性	升結腸惡性腫瘤
15	2015	女	46	陽性	2a	3	陰性	乳癌及腦腫瘤手術

*,NA 核酸檢測值<12 IU/mL 無法進行後續基因分型實驗

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
107 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：肝炎病毒分生親緣性分析方法之建立與評估

主持人：楊志元

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000304

1.計畫之新發現或新發明

肝炎基因資料庫協助疫調事件，將一例原不在疫調時間範圍內之個案，因疫調起算時間點之因素，一度忽略此一個案非屬群聚事件，資料庫迅速釐清該個案亦屬同一群聚事件。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

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

肝炎基因資料庫應持續建置，以因應特定事件之調查。

衛生福利部疾病管制署 107 年科技研究計畫

期末審查意見回復

計畫編號：MOHW107-CDC-C-315-000304

計畫名稱：肝炎病毒分生親緣性分析方法之建立與評估

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	本研究主題及目標符合本署傳染病防治之需要，報告已建立病毒性肝炎分子檢驗方法包括：基因定序、親緣性分析、演化樹建立。蒐集各項檢驗方法之資訊，提升疾管署分子研究分析能力，運用有效的基因關聯性方法進行群聚感染發生之分析。	謝謝委員意見	
2	本研究病毒基因檢測之方法適宜，可做為群聚感染發生之重要佐證。建置完成 A 型及 C 型肝炎病毒基因資料庫，提供後續疑似群聚事件感染確認之佐證資料。	謝謝委員意見	
3	A 型及 C 型肝炎病毒基因資料庫之完善，有助於即時確認該群聚事件感染發生之可能性及相關性，可做為防治之參考，爰應持續建置，以完備該資料庫之完整性與代表性。	謝謝委員意見	

備註：請將此表單附在計畫書後方，如有修正期末報告內容請註明頁碼，

並務必至 GRB 系統完成資料抽換。