計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114715

衛生福利部疾病管制署 106 年度科技研究發展計畫

建立高通量腹瀉性病毒全基因序列分析平台

期 末 報 告

執行機構：衛生福利部疾病管制署-檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：劉紫祁、郭庭佑

執行期間：106 年 1 月 1 日至 106 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

中文摘要

腹瀉部分為因腸胃感染所引發的感染症狀，可藉由細菌、寄生蟲與病毒造成感染，感染引起的原因通常為食物、飲水受汙染或經由已感染者傳播給其他健康個人而致病，由於與民眾生活息息相關，多數感染仍無藥物或疫苗可以治療與預防，唯有透過早期偵測予以控制，減少感染病例擴散。

在眾多的致病原中，諾羅病毒(norovirus)、輪狀病毒(rotavirus)與沙波病毒(sapovirus)為近年常見引起成年人與幼童罹患急性腸胃炎主要致病原。雖然大多數的病毒具有宿主專一性，然而因諾羅病毒與沙波病毒具基因高變異與演化的特性，輪狀病毒具多段基因可因於不同病毒株同時感染而基因重組，而衍生新型病毒株；從過去監測疫情中顯示新病毒株竄起與感染病例數急驟上升具有相關；從研究文獻資料指出，在人類感染病例中可以發現由人-畜重組基因之新病毒株，而在動物的糞便、肉類製品與海鮮貝類等食品亦檢驗出人類諾羅與輪狀病毒株等。這些現象顯示諾羅病毒與輪狀病毒具有新興病原及人-畜共通感染風險。

目前普遍用於諾羅病毒、輪狀病毒與沙波病毒鑑定以逆轉錄聚合酶鏈鎖反應分析（reverse transcription polymerase chain reaction）為主，檢測之引子對以常見之病毒株或基因型別設計，較難以應用於新病毒感染之偵測，此外感染引起腹瀉的病原太多而無法每項都設計單一檢測，以通報的腹瀉群聚為例約有 30~40%無法找到真正感染原。本研究為釐清特殊感染個案及疫情，以及了解病毒的演化情形以對感染疫情趨勢作預測，並提升實驗室檢測病原的能力，在第一年以建立與評估應用以次世代定序法平台（next generation sequencing platform）來研究腹瀉感染特殊個案之最適當檢體前處理、方法與流程以及病毒演化機制，並探討人類以及動物間病毒株變化。

關鍵詞：腹瀉、腹瀉病毒、人畜共通感染、逆轉錄聚合酶鏈鎖反應分析、次世代定序分析平台。

Abstract

Diarrhea is usually a symptom of gastrointestinal infection, which can be caused by a variety of bacterial, viral and parasitic organisms. Infection is spread through contaminated food or drinking-water, or from person to person as a result of poor hygiene. To date, no efficient drug or vaccine against diarrhea has been developed. Therefore, early detection and diagnosis is still an important health issue for infection control. Norovirus, rotavirus and sapovirus are the common pathogens which causes of acute gastroenteritis in adults and children. Although most viruses are host specific (e.g., a human enteric virus typically attacks humans, not other animals), however, the segment features of norovirus and rotavirus provide the potential to create diversity within its genome and generate a wide variety of new virus strains. Previous reports have indicated that the number of patients with gastroenteritis were associated with infection with new virus strains that contained a reassortment of genes from human and animal strains. In addition, previous studies have shown that human norovirus, rotavirus and sapovirus strains were found in animal stool samples, animal meat and shellfish, respectively. These results suggested that norovirus, rotavirus and sapovirus have high zoonotic risk and can be transmitted between animals and humans. The method commonly used for norovirus and rotavirus detection is based on reverse transcription-PCR (RT-PCR). However, the primers which designed based on previously identified virus strains used in RT-PCR were difficult for virus strain identification. Previous reports of cluster of diarrhea have also indicated that 30~40% of patients infected with diarrhea virus cannot be identified.

To characterize these cases and outbreaks of unknown etiology and improve pathogen detection, a next-generation sequencing platform (NGS platform) was proposed. We aimed to optimize aspects including sample preparation, library construction, sequence analysis, and workflow to study the diarrhea virus genome in special cases and investigate the sequence variation between human and animal.

Keywords: diarrhea disease; diarrhea virus; zoonotic; reverse transcription-PCR (RT-PCR); next generation sequencing platform.

目錄

中文摘要 1

Abstract 2

一、 前言 4

二、 方法 16

三、 結果 26

四、 討論 31

五、 結論與建議 32

六、 計畫重要研究成果及具體建議 32

七、 參考文獻 33

八、 圖表 39

一、 前言

1. 腹瀉與食媒性疾病（foodborne diseases）與人畜共通病毒（zoonotic virus）關係之簡介

1.1 常見腹瀉疾病及食媒性病毒與全球性疾病負擔現況之關係

腹瀉疾病常發生於透過食品、水源等媒介物引起疾病，引起病因之生物性物質，如：細菌、病毒與寄生蟲等，所引發之疾病稱之為食媒性疾病（foodborne disease）。又因食源性疾病急性發作最常見症狀為腹瀉，因此腹瀉疾病監測與食媒性疾病監測在國際衛生政策推動上是相同的，其它嚴重併發症包括腎和肝功能衰竭、腦和神經疾病、反應性關節炎、癌症與誘發死亡等。根據世界衛生組織食源性疾病負擔流行病學參考小組（Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group）在 2015 年所發表的估算報告指出，針對腹瀉疾病物質(diarrhoeal disease agents)、侵襲性感染疾病物質(invasive infectious disease agents)、寄生蟲和化學物等 31 種致病因子所引發的 32 種疾病所造成的全球食源性疾病負擔，每年有多達 6 億人或近十分之一的人因食用受到污染的食品而生病，其中造成 42 萬人死亡（WHO, 2015）；若以失能調整損失人年（Disability-adjusted Life Years; DALYs）來估算此疾病負擔的估算值，全球人口在 2010 年因為食媒性疾病所導致之失能調整損失人年高達了 3 千 3 百萬（WHO, 2015）。其中，5 歲以下兒童承擔 40%的食源性疾病負擔，每年發生 12.5 萬例死亡（WHO, 2015）。另外，根據美國疾病控制與預防中心（US Centers for Disease Control and Prevention）在 2011 年所提出的報告顯示，美國每年有多達 4 千 8 百萬會得到食媒性疾病，有 12 萬 8 千人需要住院，其中造成 3 千人死亡（Hall *et al.*, 2012）。

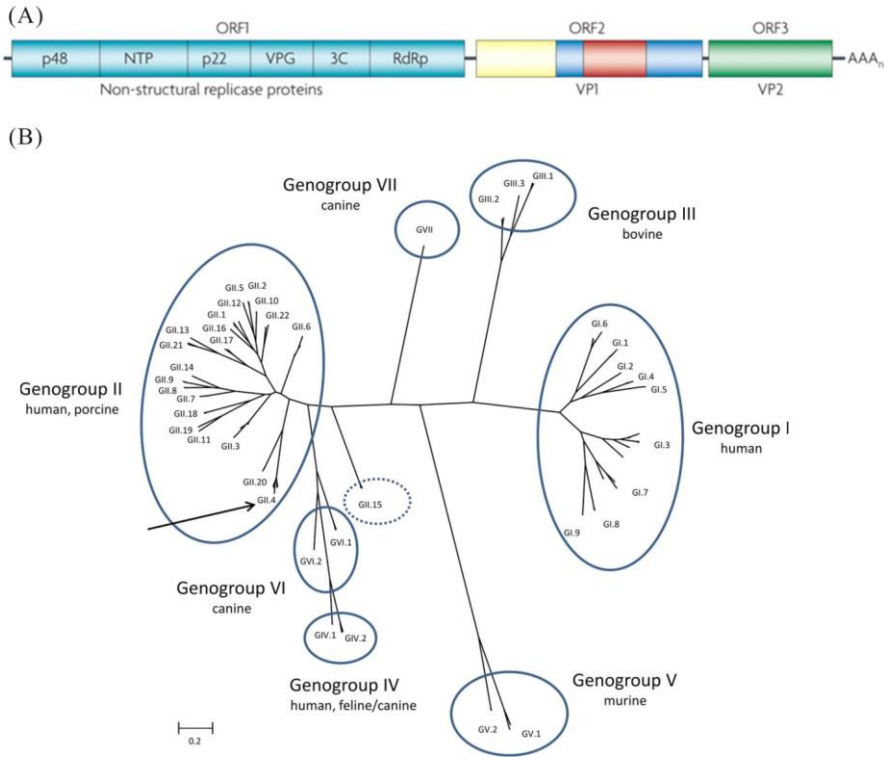
若是以致病原來評估全球食源性疾病負擔，排名前 5 名致病原，以食媒性病毒（foodborne viruses）中的諾羅病毒(norovirus)佔 58%最多，其它依序為 non-typhoidal *Salmonella* (11%) 、 *Clostridium perfringens* （10%）、 *Campylobacter* spp.(9%) 與 *Staphylococcus aureus* (3%)（Hall *et al.*, 2012; WHO, 2015）。除了諾羅病毒，屬於食媒性病毒中的輪狀病毒(rotavirus)是導腹瀉最常見的原因之一。腹瀉每年導致 5.5 億人患病，23 萬人死亡（WHO, 2015）。輪狀病毒主要感染 5 歲以下幼童，常在 2 歲以下與第一次罹病的幼兒引發嚴重的腹瀉和脫水症狀(American Academy of Pediatrics Committee

on Infectious Diseases, 2007)，並且腹瀉為 5 歲以下兒童的主要致死因子，占每年兒童死亡數的 10%(Liu *et al.*, 2010)。若依照我國疾病管制署資料顯示，近年在食媒性疾病腹瀉群聚事件中，以病毒性腹瀉群聚(以諾羅病毒為主)所造成疫情最為常見，常在冬天與初春季節中造成人口密集機構之群聚事件。另外，沙波病毒(sapovirus)亦是人類腸胃炎之主要感染源，較常在春夏接界月份引起散發性腸胃炎，孩童及成人均為感染的主要對象。因此，諾羅病毒、輪狀病毒與沙波病毒被視為造成食媒性與腹瀉疾病之重要因子；除了已知的致病原，食餘檢體可能殘存未知病毒，由於病毒致病量低，該檢體可能因無法檢出而不能判定病因物質，成為未知病毒腹瀉。

1.2 簡介重要食媒性病毒

1.2.1 諾羅病毒

諾羅病毒屬於 *Caliciviridae* 家族，基因組全長約為 7-4~7.7 kb，為正股單鏈 RNA(RNA positive-sense single-stranded RNA)的無封套病毒。諾羅病毒基因組(genome)由三個開放讀序框(open reading frame，ORF)所組成，包含：OF1、OF2 與 OF3(*Green et al., 2000*)(圖一 A)。若根據主要結構蛋白 VP1(major structural protein VP1)的胺基酸鑑別度(amino acid identity)進行分類，可將諾羅病毒分類成 7 個基因型組(genogroups)，包含：Genogroup I(GI)、GII、GIII、GVI、GV、GVI 與 GVII（Zheng *et al.*, 2006; Vinje´, 2015)。主要能感染人類的病毒株為 GI、GII 與 GIV，稱之為人類諾羅病毒（human norovirus)；GIII、GV 與 GVII 則感染牛、老鼠與犬(圖一 B)。在過去十年，人類諾羅病毒在全球的感染主要以 GII.4 為主。近年，GII.17 則曾在亞洲地區爆發流行(台灣、中國與日本等)，並有文獻指出 GII.17 可能取代 GII.4 Sydney 2012 成為感染的主要流行株（de *et al.*, 2015)。



圖一、(A)諾羅病毒的基因體組結構(以 GII.4 為例)，共含有 ORF1、ORF2 與 ORF3。ORF1 可表達出非結構性蛋白質；ORF2 與 ORF3 可表達出結構性蛋白質（*Green et al.*, 2000）。(B)根據諾羅病毒的主要結構蛋白 VP1 的胺基酸鑑別度可將其分類成 7 種基因型組（Zheng *et al.*, 2006; Vinje´, 2015）。

1.2.2 輪狀病毒

輪狀病毒屬於 *Reoviridae* 家族，基因組全長約為 18.5 kb，內含 11 個雙股 RNA(double-stranded RNA)片段無封套病毒，依照分子尺寸由大到小依次編號為 1 到 11（Segments 1~11）(表一)，並可表達出結構蛋白(VPs)與非結構蛋白(NSPs)。若依照 VP6 蛋白抗原性的不同進行分類，可分類成 7 大群組(Groups A~G)。能感染人類的輪狀病毒為 A~C 型，稱之為人類輪狀病毒(human rotavirus)。A 型為主要感染型別；B 型的感染在嬰兒較不常見，但曾經在中國的成人間造成大流行(Krishnan *et al.*, 1999)；C 型感染則是僅造成少數的臨床疾病。因此，目前疫苗的研發是以 A 型為基準。在 A 型輪狀病毒中，若根據病毒表面的 VP7 蛋白(glycoprotein; G-protein)和 VP4(protease cleaved protein; P-protein)加以細分，可以再細分出至少 27 種 G 血清型與 37 種 P 血清型(Browning et al., 1991; Hoshino and Kapikian,1996; Kapikian *et al.*, 1996; Matthijnssens

et al., 2011)。由於 G 血清型與 P 血清型的組合兩者可以是獨立的，因此 G 和 P 雙命名系統可用於確定毒株類型。目前全球主要感染人類的病毒株為 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G9P[8]和 G12P[8]（Gentsch *et al*., 2005; Armah *et al*., 2010, Iturriza-Gomara *et al*., 2011)，佔人類輪狀病毒感染的 90%左右，其中以 G1P[8]最常見。若以全基因體種系分析(whole-genome classification system)針對輪狀病毒上的 11 個基因(VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5)進行分類，主要感染人類的病毒株基因分型（genotyping）為 Wa-like (G1/3/4/9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) 與 DS-1-like (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2)(Matthijnssens *et al*., 2008)。

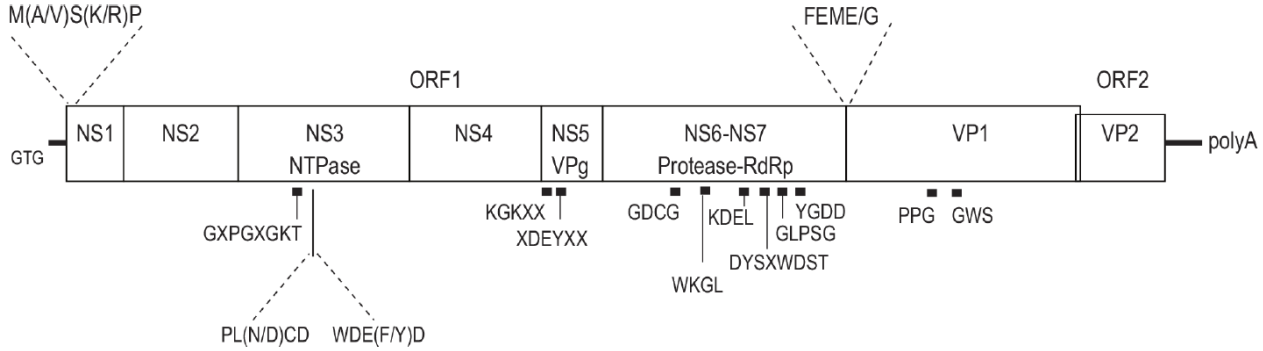
表一、輪狀病毒的基因體片段與轉譯蛋白質簡介(以 G6P6[1]為例)。

基因片段	長度（bp）	表達蛋白	尺寸（kDa）	存在位置	功能
1	3302	VP1	125	Core	RdRp; ss RNA binding; complex with VP3
2	2687	VP2	94	Core	Core shell; RNA binding; required for RdRp activity
3	2592	VP3	88	Core	Guanylyltransferase;methyltransferase; 2’5-phosphodiesterase; ssRNA binding; complex with VP1
4	2362	VP4a	86	Outer layer	Homotrimer; P type neutralization antigen; attachment protein; protease enhanced infectivity; virulence; fusion with cell membrane
5	1581	NSP1	58	Nonstructural	Interferon antagonist; E3 ligase; RNA binding
6	1356	VP6	44	Middle layer	Homotrimer, species determinant; protection (intracellular neutralization); required for transcription
7	1062	VP7b	37	Outer layer	Homotrimer; glycoprotein; G type neutralization antigen; Ca2+ dependent
8	1059	NSP2	36	Nonstructural	Octamer; binds RNA; NTPase; NDP kinase; helix destabilizing; essential for viroplasm formation
9	1074	NSP3	34	Nonstructural	Dimer; binds to: 3’terminus of viral ss

					(+) RNA, cellular eIF4G, Hsp90; displaces PABP; inhibits host protein translation
10	751	NSP4	20	Mainly nonstructural	Dimer; phospho- and O-glycosylated protein; RNA binding; kinase; essential for viroplasm formation; interaction with VP2
11	666	NSP5	21	Nonstructural	Interaction with NSP5 localized in viroplasm
		NSP6c	12	Nonstructural	

1.2.3 沙波病毒

沙波病毒和諾羅病毒同屬於 *Caliciviridae* 家族，基因組全長約為 7.1~7.7 kb，為正股單鏈 RNA 的無封套病毒。沙波病毒基因組由兩個開放讀序框所組成，包含：ORF1、與 ORF2（Oka *et al.*, 2015）（圖二）。若根據主要結構蛋白 VP1 的胺基酸鑑別度進行分類，可將沙波病毒分類成 14 個基因群組(genogroups)，包含：GI~GXIV(Scheuer *et al.*, 2013)。主要能感染人類的病毒株為 GI、GII、GIV、GV；GIII 與 GVI~GXIV 則能感染動物。在不同基因群組但表達相同蛋白質功能的基因體上，存在特定保守性的胺基酸序列(conserved amino acids)，例如，在沙波病毒的 GI~GV 基因型組中，表達 NS3 蛋白會存在 GAPGIGKT 序列；表達 NS5 蛋白會存在 KGKTK 與 DDEYDE 序列（Oka *et al.*, 2015）。



圖二、沙波病毒的基因群組結構，共含有 ORF1 與 ORF2。ORF1 可表達出六個非結構性蛋白質(包含：NS1、NS2、NS3、NS4、NS5 與 NS6-7)與一個主要結構性蛋白質 VP1；ORF2 與可表達出一個次要結構性蛋白質 VP2（Oka *et al.*, 2015）。在沙波病毒基因體上表達特定蛋白存在保守性的胺基酸序列：NS3 為 GXPGXGKT；NS5 為 KGKXX 與 XDEYXX；NS6-NS7 為 GDCG、WKGL、KDEL、DYSXWDST、

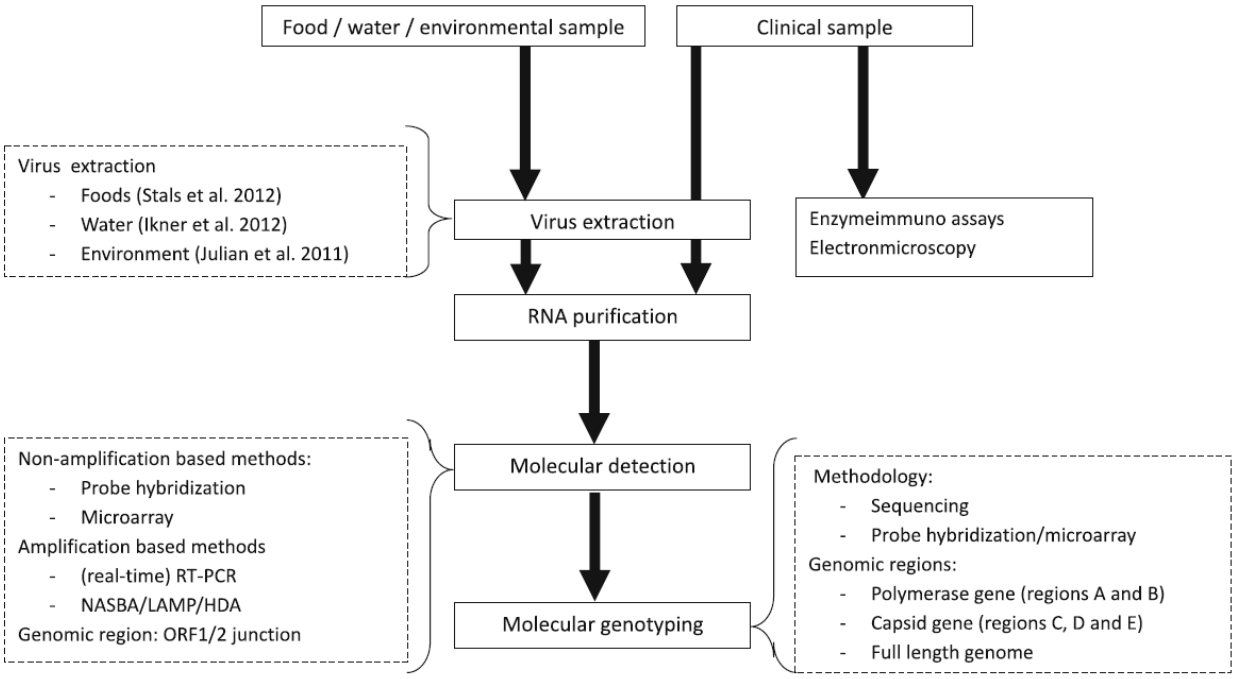
GLPSG、YGDD；VP1 為 PPG 與 GWS（Oka *et al*., 2015）。

1.4 食源性病毒具人畜共通感染可能性

人畜共通傳染病(zoonotic diseases)是指人與動物之間會自然傳染的疾病。可透過人畜之間直接傳播或藉由病媒或媒介物之間接傳播。人畜共通傳染疾病可透過食物鏈或與動物直接接觸而傳播，再經由動物源病毒傳染給人，若被此重組變異後之病毒感染可能引起之疾病病程將比原人類病毒株感染更嚴重。由於病毒的高變異性，並且，諾羅病毒、輪狀病毒與沙波病毒已知可在人類與其他動物體內存活，有可能成為人畜共通病毒（zoonotic virus）。以諾羅病毒為例，先前的文獻報告指出，在自然感染的豬隻檢測到 GII 基因群的諾羅病毒(GII.11、GII.18 與 GII.19)（Wang *et al*., 2005; Zheng *et al*., 2006)，但是豬隻與人類感染的病毒是屬於 GII 基因群中的不同基因分群。2006 年的研究指出人類 GII.4 基因型的病毒株曾經以實驗的方式證實可在無菌豬體內進行複製並引起免疫反應（Cheetham *et al*., 2006）；2007 年於加拿大的研究指出，從生豬肉與豬的糞便中檢測到能感染人類的 GII.4 基因型的諾羅病毒株（Mattison *et al*., 2007）；在 2016 年於埃塞俄比亞的報告也從豬隻的糞便中採集到諾羅病毒 GII.1 基因型的病毒株(Sisay *et al*., 2016)；雖然以上報告無法證實指出該感染是否為進行屠宰、加工或包裝過程中人為所造成的汙染。除了豬隻外，也有研究報告指出，感染牛隻的諾羅病毒經過基因重組後可能可以感染人類（Etherington *et al*., 2003）。在輪狀病毒方面，近年來各國文獻報告中指出發現病患感染罕見人類輪狀病毒基因型，藉由親緣性基因分析，可發現跨物種的基因來源。如在 2009 年匈牙利的研究中，感染輪狀病毒小孩糞便中分別分離出與牛、豬、貓、馬和兔之輪狀病毒株有高度相似性的病毒株（Bányai et al., 2009）；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（Hwang et al., 2012）。除了諾羅與輪狀病毒，沙波病毒在過去文獻已報導在動物糞便的檢體中檢驗出屬於人類流行株的 GV 基因群型的沙波病毒株（Oka *et al*., 2015）。綜合上述的結果，間接認為在動物上可能同時發生人類與動物病毒株的交互感染，並產生新型具致病力的新病毒株，再透過肉、乳製品等作為食媒性病毒人畜共通的間接傳播來源。因此，如何對食媒性病毒進行監控與其致病毒力分析，以降低食媒性病毒從豬隻或牛群傳播給人群的機率為現今重要的課題。

2. 現今腹瀉/食媒性病毒檢測方法與改良方向

為了要鑑定食物或實驗檢體內是否含有腹瀉與食媒性病毒，一般進行的檢測包含了三大步驟：病毒抽取(virus extraction)、RNA 純化(RNA purification)與型別鑑定及基因分型(molecular detection and genotyping)。現今普遍使用反轉錄聚合酶鏈鎖反應分析(reverse transcription-polymerase chain reaction assays; RT-PCR assays）進行病毒型別鑑定及基因分型，下述段落將以檢測諾羅病毒為例(圖三)，對較重要的型別鑑定和基因分型進行介紹。

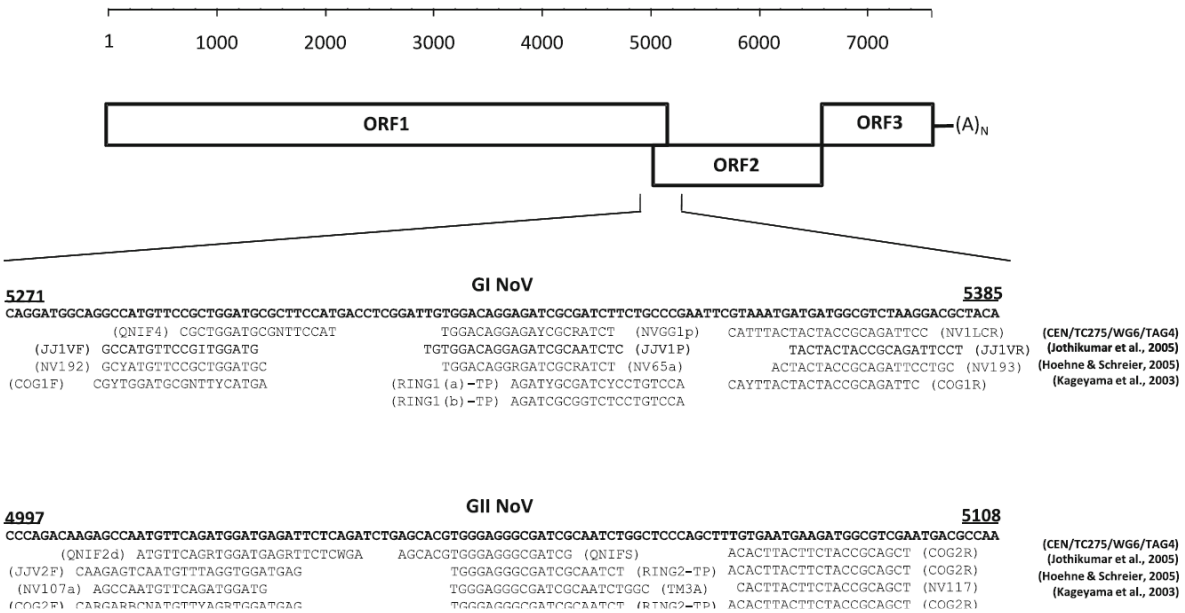


圖三、在臨床個案、食物、水源以及實驗檢體中檢測人類或動物諾羅病毒的檢測流程圖（Stals *et al*. 2012）。

2.1 病毒株型別鑑定(molecular detection)

諾羅病毒基因體中，ORF1~ORF2 交界處(junction region）的核甘酸序列在不同病毒株間及同一種基因型組內仍保有很高的序列鑑別度(sequence identity）（Katayama *et al*., 2002; Katayama *et al*., 2003)，因此，此段特殊的核甘酸序列序列適合用來設計引子並利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應分析來鑑定是否為諾羅病毒。圖四為針對人類諾羅病毒 GI 與 GII 基因型組其 ORF1~ORF2 交界處所設計的專一性引子之示意圖

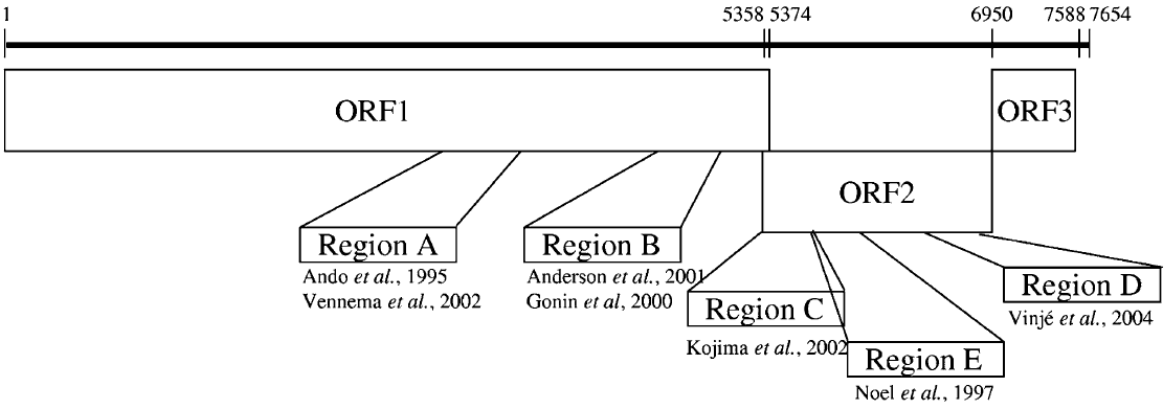
(Jothikumar *et al*., 2005; Kageyama *et al*., 2003; Wolf *et al*., 2007)。但要在不同物種中進行檢測，就必須要設計廣效性的引子或針對各個物種設計專一性的引子，造成檢驗上不易訂定常規來執行(Scipioni et al., 2008)。



圖四、針對人類諾羅病毒 GI 與 GII 基因型組其 ORF1~ORF2 交界處所設計的專一性引子之示意圖(Jothikumar *et al*., 2005; Kageyama *et al*., 2003; Wolf *et al*., 2007)。

2.2 基因分型(genotyping)

相較於諾羅病毒鑑定所使用的基因組區域(genomic region)為較短、核甘酸序列保守度高，諾羅病毒分型所使用的基因組區域則較長、在不同諾羅病毒間基因型間變異較大(Kageyama *et al*. 2003)。圖五為針對人類諾羅病毒 GI 基因型組可適合作為基因分型的 5 段基因組區域(Mattison *et al*. 2009)，包含:Region A、Region B、Region C、Region D 與 Region E。Region A 與 B 位在 ORF1，主要可轉譯出和聚合酶相關的蛋白；Region C、D 與 E 則位在 ORF2，可轉譯出主要外殼蛋白 VP1。在人類諾羅病毒的 GII 基因型組中常使用 Primer Pairs Amplifying 法來進行分型(Sdiri-Loulizi *et al*., 2008)。



圖五、人類諾羅病毒可適合作為基因分型的 5 段基因組區域(Mattison *et al*. 2009)。

2.3 以 RT-PCR 進行基因分型方法之缺點

針對屬於同家族的諾羅病毒與沙波病毒，過去文獻指出，利用諾羅病毒基因組的 ORF2(Region C、D 與 E)與沙波病毒基因組的 RdRp 區域、RdRp-VP1 交界處與 RdRp 區域進行基因分型已成功在不同年份或病毒株中找出多種突變，顯現出遺傳多樣性(genetic diversity)(Siebenga *et al*., 2008; Carlsson *et al*., 2009; Li *et al*, 2011; Shibata *et al*., 2015)；但仍無法確定在諾羅或沙波病毒基因組的其他區域是否也會對宿主的感染造成影響。並且，若使用不同的基因組區域進行分型，必須使用不同的引子來分別結合該區域所分型出來的結果，但需要以多組小片段、分散、不連續的 RT-PCR 反應個別分析，較繁複並且每個實驗室使用的區域多有差異，因此彼此間較難有一致性數據進行比較(Vinjé J *et al*., 2003)。

針對輪狀病毒，自2006年底已有至少兩種疫苗在全球多個國家上市，包含：Rotarix™(GSK藥廠產品)與RotaTeq™ (MSD藥廠產品)。Rotarix™的病毒株來源為人類單價輪狀病毒，genetic backbone為G1-P[8]-I2-R2-C2-M1/M2-A3-N2-T6-E2-H3；RotaTeq™的病毒株來源為人牛重組五價輪狀病毒，genetic backbone為G1/G2/G3/G4-P[8]-I2-R2-C2-M1/M2-A3-N2-T6-E2-H3(Matthijnssens *et al*., 2010)。Rotarix™與RotaTeq™在臨床上已證實都可預防常見型別G1、G2、G3、G4與G9基因型的感染。然而輪狀病毒型別多並具有基因重組特性，先前的研究已指出，比較近年來所分離出的病毒株和作為疫苗使用的病毒株的胺基酸序列，在能夠誘導中和抗體(neutralizing antibodies)產生的中和抗原表面位點(neutralizing antigenic epitopes)上的胺

基酸已發生多處突變，此現象可能會對疫苗的效能產生影響(Morozova *et al*., 2010)。因此，在疫苗上市後時期仍必須持續監測流行病毒株的變化，以評估疫苗的保護效果。然而，利用RT-PCR分型方法無法有效地了解在施打疫苗前後病毒株流行差異及病毒株的演化情形，亦無法有效的追蹤主流病毒株與確保疫苗的可用性。

除了上述所提到主要腹瀉與食媒性病毒及常見腹瀉細菌所造成的感染外，在臨床檢測上仍有一定比例依現行檢測病原方式無法得知感染病原，由於未知感染病毒(原)可能在檢體樣本中病原量不高，或致病基因表現量少，或以特定基因篩選之RT-PCR方法無法檢驗確定是哪種病原所造成的感染，導致無法找出新興病原而無法追溯可能感染源。因此，為了改良這些問題，科學家開始普遍使用具有高通量的次世代定序方式來取代傳統的分生檢測與基因分型方法。

2.4 以次世代定序進行基因分型法(genotyping by next generation sequencing)

次世代定序在近年的快速發展下，技術已漸趨成熟，而高通量定序的成本也不斷下降，在全球許多研究室已經可以獨立進行，目前已普遍用於疾病診斷、個人基因組資訊分析及檢測生物體中的整體 RNA 表現等基礎研究上。另外，先前的檢驗技術(如RT-PCR)礙於檢體量不足，無法檢測多組不同的病原致許多的病原體可能無法被測出，現在可以利用次世代定序來改善此缺點，表二為歸納目前常被使用的次世代定序之平台(Barba *et al*. 2014)，以及各平台的特性。

表二、常見次世代定序之平台(Barba *et al*. 2014)。

定序平台/ 廠牌	定序長度 (bp)	定序速度 (bp/小時)	最大產 出數據	準確度
454/Roche	400~700	13 Mbp	700 Mbp	99.9
Illumina/Illumina	100~300	25 Mbp	600 Gbp	99.9
SOLiD/ Life Technologies	75~85	21-28 Mbp	80~360 Gbp	99.9
PacBio/ Pacific Biosciences	4,000~5,000	50-115 Mbp	200 Mbp~ 1 Gbp	95.0

Helicos/Helicos Biosciences	25~55	83 Mbp	35 Gbp	97.0
Ion Torrent/ Life Technologies	100~400	24 Mbp~16 Gbp	100 Mbp~ 64 Gbp	99.0

目前，次世代定序在病毒學的運用主要有三大部分，包含：病毒的鑑定(virus discovery)、建構病毒全基因組(whole viral genome reconstruction)與找出病毒在宿主內的基因變化差異(characterization of intra-host variability)。在病毒的鑑定方面，先前文獻已成功利用次世代定序從已知的目標病毒的臨床與環境檢體中鑑別出新型的病毒株(López-Bueno *et al*., 2009; Pantaleo *et al*., 2010; Wong *et al*., 2012; Capobianchi *et al*., 2013; Rutvisuttinunt *et al*., 2013)。在建構病毒全基因組方面，先前文獻利用次世代定序將流感病毒(Bartolini *et al*., 2011; Croville *et al*., 2012)、人類免疫缺乏病毒(Bruselles *et a*l., 2009; Willerth *et al*., 2011)與人類皰疹病毒(Szpara *et al*., 2010; Kwok *et al*., 2012)等其他病毒的全基因體建構完成。在找出病毒在宿主內的基因變化差異方面，先前文獻也成功利用次世代定序將流感病毒在單一個體中序列變異之程度及其種類進行研究(Bartolini *et al*., 2011)。近年也發展出許多針對於腹瀉性病毒(諾羅病毒、輪狀病毒等)的次世代定序方式的前處理、核酸萃取及泛用性引子對等方法(Fonager *et al*., 2017; Dung *et al*., 2017)，應用於群聚事件協助疫情追蹤與調查；此外，次世代定序用於追蹤病毒於人口密集機構或醫院院內感染等，較傳統利用片段基因序列來的解析度更高。因此，以諾羅病毒等腹瀉病毒的分子流行病為例，以次世代定序分析病原基因體，對於追蹤、溯源及病原傳播及汙染場所的定義，將更可以明確地應用於未來防治政策制定。然而，針對其他應用於腹瀉及食源性病毒(原)方面，在國際及台灣現今仍缺乏相關資料，相信在近幾年儀器的普及化及方法不斷地改良後，及加入各病毒基因差異性、變異與流行模擬的演化資料，以次世代定序應用於防治疫情將更快速簡便與有效。並且，目前尚無一個有系統性的以次世代定序研究人類腹瀉食源性病毒與動物食源性病毒交互感染之可能，有鑑於此，本計畫將利用蒐集到之臨床檢體，進行次世代定序最適反應條件之建立，以及相關應用性的研究。過去分生檢驗技術(如 RT-PCR)受限於必須就已知病原來設計引子與探針等，許多的特殊病原體或病原變化後可能無法被檢出，現在可以利用次世代定序來改善此缺點。本研究就腹瀉病毒感染檢體的特性，主要發展尋找適合微量、低病毒量、特殊性檢

體、無法培養複製病毒之次世代定序處理流程與分析方法，應用於防疫用途之群突發事件之病毒溯源比較分析、特殊個案病毒的鑑定。

二、 方法

1. 檢體收集及處理

1.1 糞便檢體收集

收集近年腹瀉群聚或食物中毒事件之陽性剩餘檢體，並依過去初步篩檢病毒株資料自其中挑選檢出諾羅、輪狀、沙波病毒陽性檢體。利用剩餘檢體測試次世代定序各種反應條件使用。

1.2 糞便檢體處理

處理情形如下：將糞便以 1:10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液，於 4℃，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，保存於-80℃。

1.3 腹瀉食源性病毒之鑑定

1.3.1 RNA 萃取

取經處理過之檢體上清液 140μL，使用 Qiagen 核酸萃取試劑 Viral RNA Extraction Kit 純化病毒 RNA，最後萃取出 60μL RNA，置於-80℃待用。

1.3.2 反轉錄合成cDNA與PCR

1.3.2.1 諾羅病毒

（1） 逆轉錄酶反應

病毒RNA萃取液10μL為模板，加入引子於95℃作用3分鐘後，馬上將反應管置於冰上；再加入單管RT混合液，內含3.2 mMdNTP、10U Reverse Transcriptase反轉錄酵素(Roche Cat. No.03 531 287)、40U RNase抑制劑及反應緩衝溶液含50 mMTris-HCl、75 mMKCl、3 mM MgCl2、10 mMdithiothreitol，反應總體積為20μL。於50℃ 50分鐘作反轉錄作用，之後85℃作用15分鐘。

（2）聚合酶鏈鎖反應

諾羅病毒分析引子對在GI為G1SKF/G1SKR、GII為G2SKF/G2SKR。反應條件：denaturation 94℃ 30秒、annealing 54℃，30秒、extension 72℃，1分鐘，共40個cycle。將PCR產物進行電泳分析，得到陽性反應之PCR產物，進一步做次世代定序分析。

1.3.2.2 輪狀病毒

（1）逆轉錄酶反應

RNA 10μL 加上110μL Random primer(3μg/10μL)與710μL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 H2O)，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 H2O)，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℃。

1.3.2.3 沙波病毒

(1)逆轉錄酶反應

病毒RNA萃取液5μL為模板，加入1μL 10μM隨機引子及2μL 20mM dNTP於70℃作用3分鐘後，馬上將反應管置於冰上1分鐘後；再加入單管RT混合液，內含200U反轉錄酵素(Invitrogen SuperscriptⅢ Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20U RNase抑制劑及含50 mM Tris-HCl、75mM KCl、3 mM MgCl2、10 mM dithiothreitol反應緩衝溶液，反應總體積為20μL。於25℃作用10分鐘，50℃進行50分鐘反轉錄作用，之後85℃作用15分鐘。

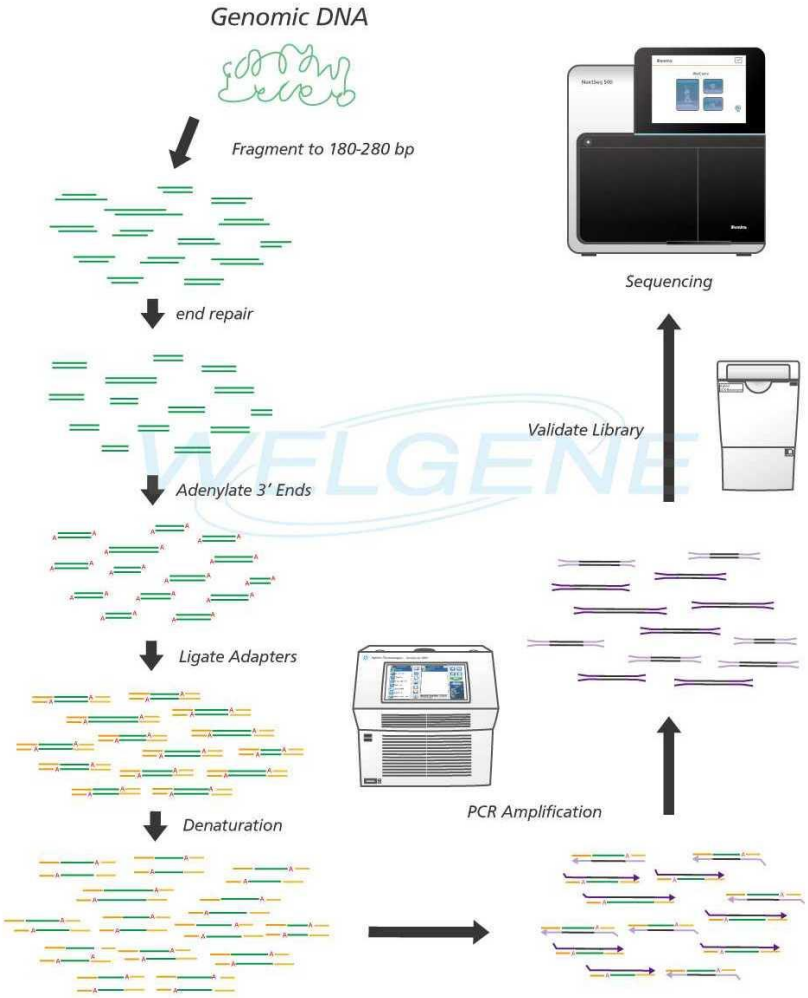
（2） 聚合酶鏈鎖反應

第一次PCR病毒分析引子對為SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13及SV-R14。

以RT產物1μL為模板，加入11.5μL PCR premix，含有20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl2、Platinum Taq DNA Polymerase（Invitrogen Cat. No. 10966-034）及0.8μM 每個分析引子。反應條件：先95℃ denaturation作用5分鐘，熱循環denaturation 94℃ 30秒、annealing 50℃ 30秒、extension 72℃ 2分鐘，共40個cycle，最後extension 72℃ 7分鐘。再以第一次PCR產物1μL為模板，加入24μL PCR premix，含有20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mMKCl、1.5 mM MgCl2、Platinum Taq DNA Polymerase及0.4μM 每個分析引子（1245Rfwd/ SV-R2）。反應條件：95℃ denaturation作用5分鐘，熱循環denaturation 94℃ 30秒、annealing 50℃ 30秒、extension 72℃ 1分鐘，共45個cycle，最後extension 72℃ 7分鐘，進行capsid基因片段nest PCR。將PCR產物進行電泳分析，得到陽性反應之PCR產物約430bp，進一步做序列分析。

2. 次世代定序法

次世代定序的基本概念就是將核酸片段化後同時進行大規模的定序分析，可從實驗得知已知或未知的序列資訊。若序列已知，序列資料可先根據該實驗樣品之參考序列(reference sequence)將定序結果先進行相似度比對(Mapping)與組裝分析；若序列未知，必須透過組裝（assembling）的方式，再進一步預測與驗證序列資訊。次世代定序主要實驗流程包含核酸片段化（fragmentation）、建製資料庫（library construction）、PCR放大(PCR amplification）、定序(sequencing)、分析（analysis）共五個步驟(如圖八所示)。目前本中心以購置的平台為Illumina平台系列，因此，本研究計畫將採用Illumina平台系列定序系統進行食源性病毒基因組全定序條件的設計與評估反應結果後再調整，詳細的實驗步驟將在下述段落與結果中進行說明。



圖八、次世代定序主要實驗流程示意圖(http://www.welgene.com.tw/service/ngs/NGS_overview.html)。中

2.1 樣本製備

為順利進行次世代定序，參考需可製備出符合上機要求樣品的相關資訊，本研究過程中測試多種處理方式，找出適合用於腹瀉症狀樣本之方法整理歸納於結果。

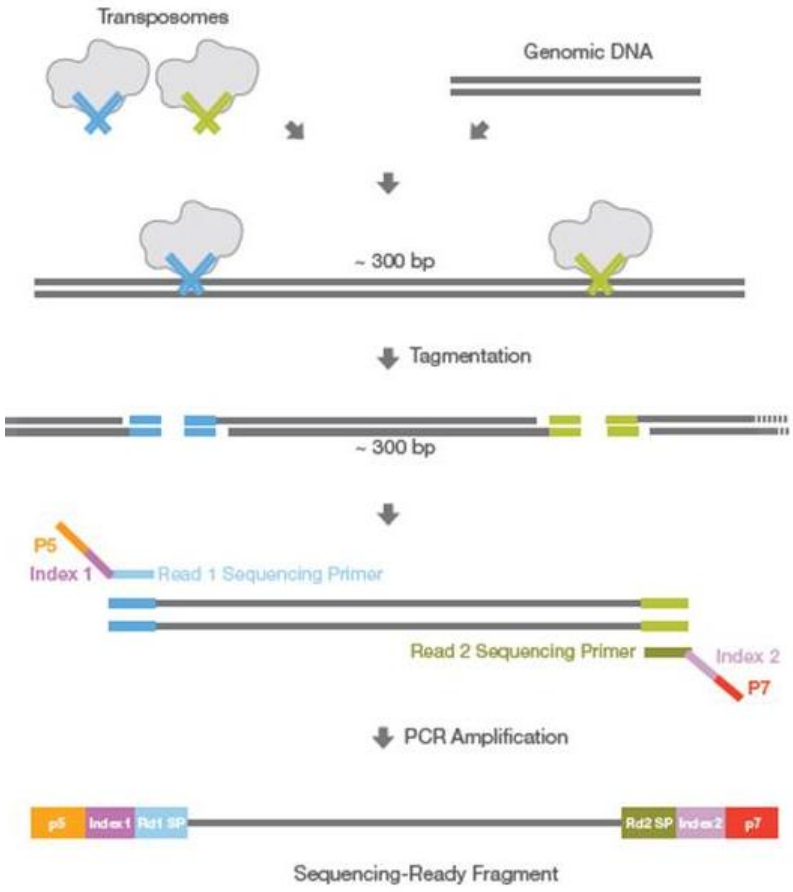
純化後之RNA以real-time PCR或Qubit進行RNA定量或以Bioanalyzer (Agilent)電泳方式來做確認RNA品質。

後續資料庫(library)建置法選擇，依RNA多寡決定選用NEBNext Ultra RNA或Agilent SureSelect Strand-Specific RNA直接從RNA製備資料庫。

2.2 library資料庫建立

2.2.1 隨意引子RT-PCR及Nextera XT DNA Library Prep

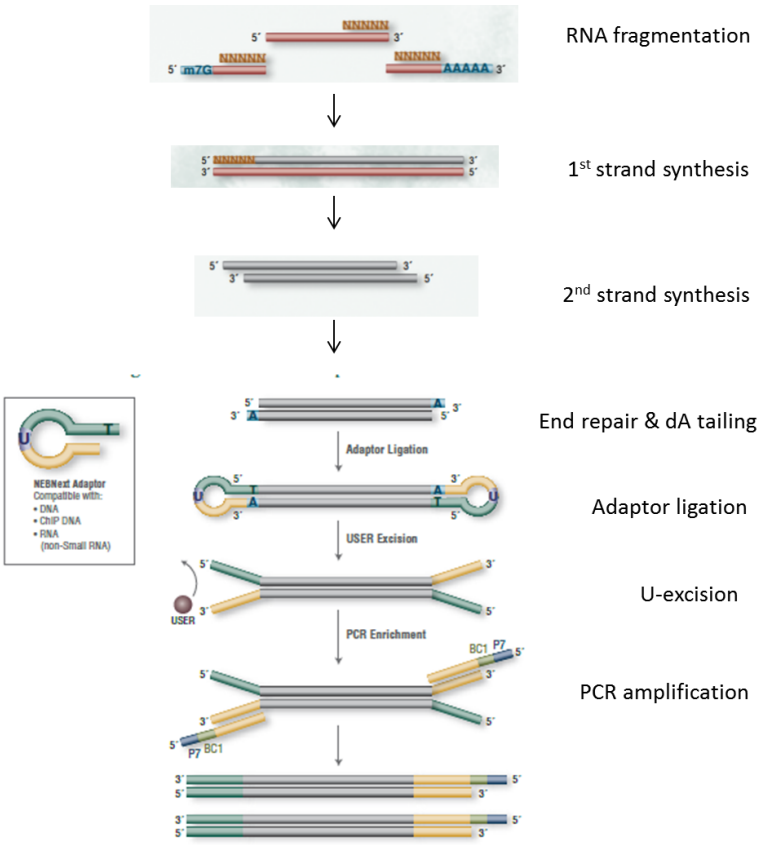
利用Nextera XT DNA Sample Preparation Kit製備資料庫。原理如圖九所示。利用Transposomes先將DNA檢體切成約300bp大小的片段，並在將DNA形成片段的同時將Adaptor序列加入DNA片段的5'端和3'端。完成反應後，利用PCR反應，將Index序列及其餘adaptor序列加入DNA片段，進行純化即完成樣品製備。所獲得的有雙重index序列的DNA資料庫便能使用於Illumina定序系統上機進行反應。



圖九、Nextera XT DNA sample preparation kit作用之原理（http://www.illumina.com/products/nextera_xt_dna_library_prep_kit.html）。

2.2.2 NEBNext Ultra RNA Library Prep

利用NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit製備資料庫。原理如圖十所示將RNA置於NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer於94℃十分鐘作用下片斷化。隨後cDNA合成，End repair和dA tailing反應。有著dA tail的DNA就可在Blunt/TA Ligase Master Mix反應下接上adapter，並用USER Enzyme切除U以打開環狀結構之adapter。

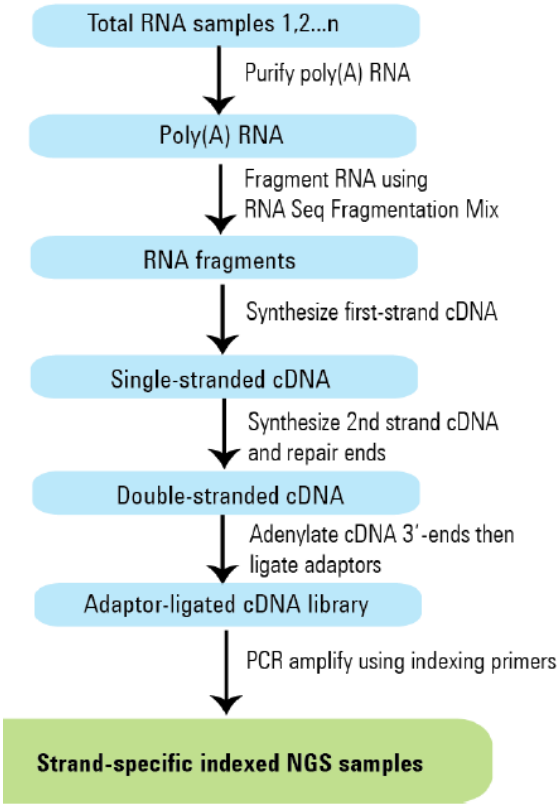


圖十、NEBNext Ultra RNA Library Prep kit作用之原理

（截自https://www.neb.com/-/media/nebus/files/brochures/nebnextillumina.pdf）。

2.2.3 Agilent SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep

Agilent之資料庫製備方式與前面NEBNext相似，原理如圖十一。



圖十一、Agilent SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep kit作用之原理（http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9691-90010.pdf）。

2.3 Library資料庫驗證

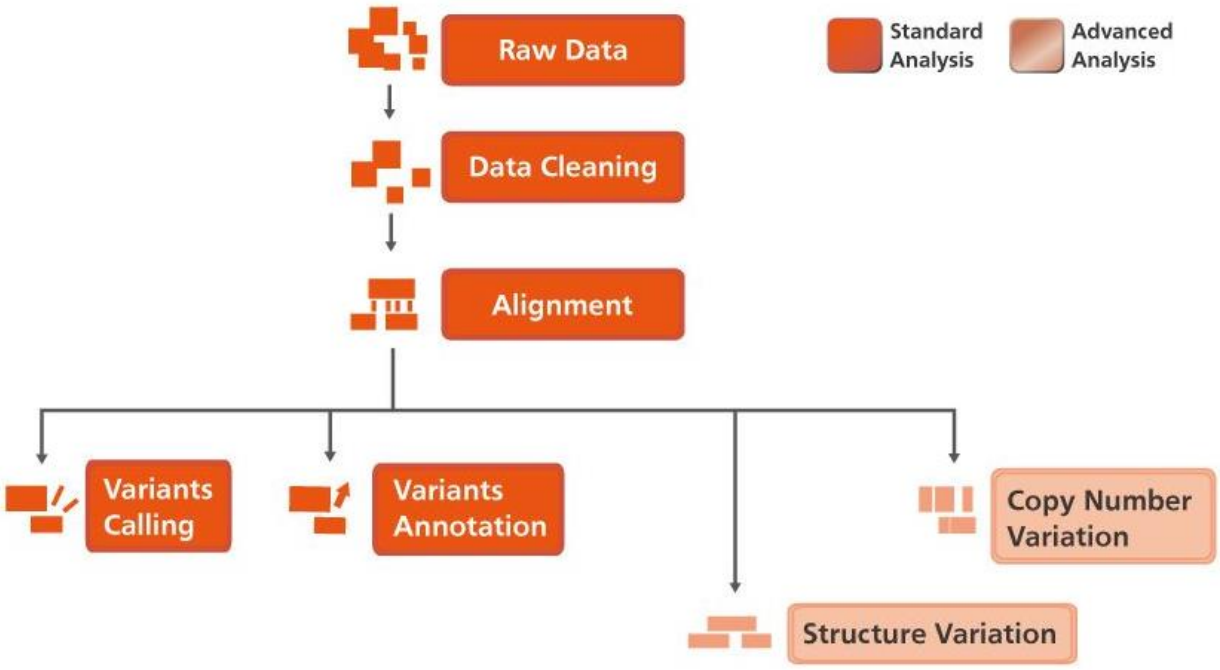
上個階段所得到之DNA資料庫會再以Bioanalyzer (Agilent) 電泳方式來做確認片段大小分布。最後以 Qubit® dsDNA BR Assay 量測 DNA 濃度。通過驗證後的DNA資料庫便可進行上機。

2.4 定序與結果分析 (結果圖一C)

定序完之後的原始FASTQ檔先載入CLC Genomics Workbench (QIAgen)進行QC報告以確認該序列之定序品質、read片段大小和GC含量等數據。首先先去除(trimming)品

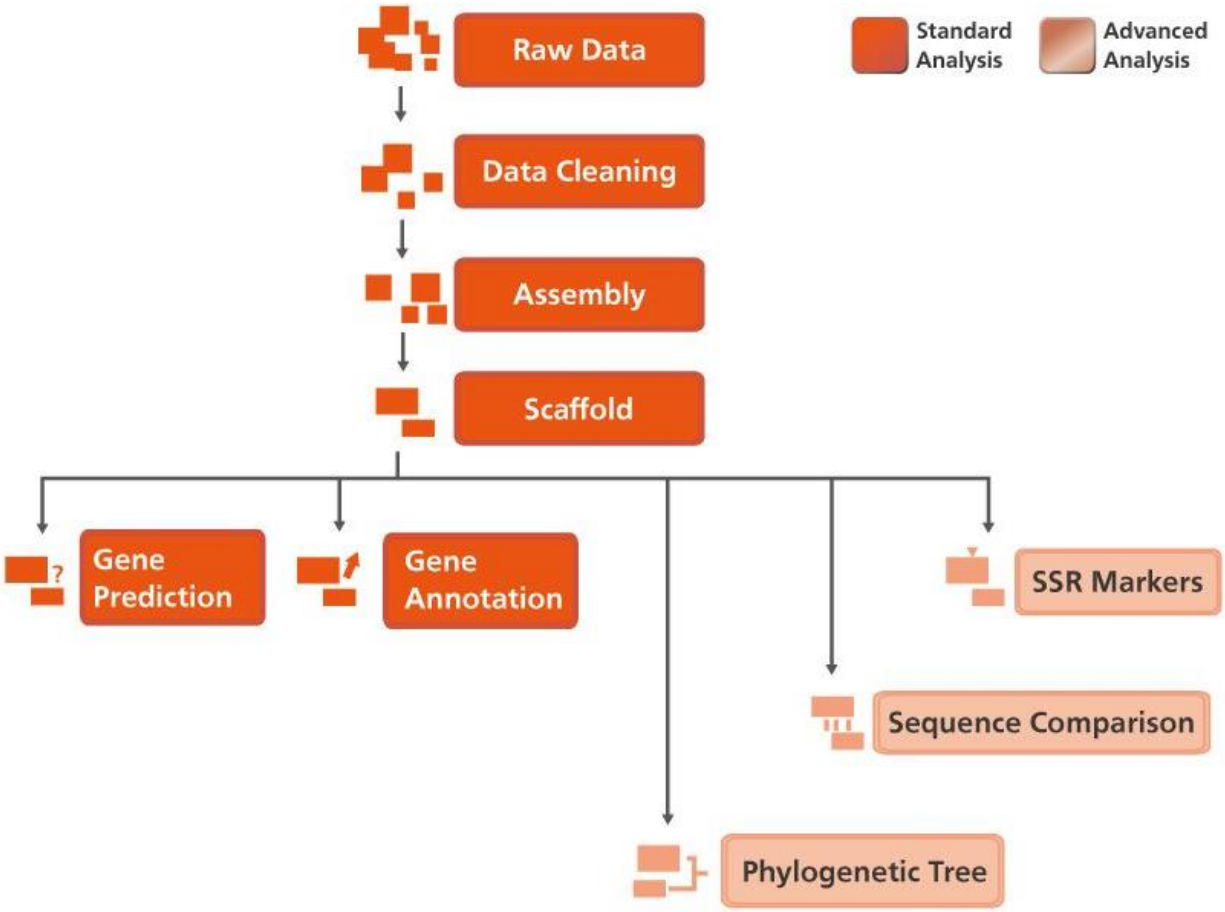
質低於Q30部分和adapter序列，並過濾小於50bp之reads。清理完之reads再次進行QC檢查後即進行de novo組裝。為避免大量小片段的產生，設定為只保留大於500bp之片段和similarity fraction設為0.8，即只將相似度80%以上的片段進行組裝。組裝完之contig釋出後因礙於上傳和NCBI伺服器接受的檔案大小限制，以電腦本機上的資料庫以BLASTn進行序列比對。比對完有結果的病毒序列再從NCBI資料庫取得參考序列將reads比對回參考序列上並檢查最終取得各序列。

針對已有參考病毒株的腹瀉食源性病毒，將採用重新定序法(Resequencing)將已知序列物種之全基因體進行定序(圖十二)。定序完成的短片段會與參考序列進行比對，透過軟體找出變異(Variants)與其改變之型態(如SNPs or InDels)，便可知道其改變是否會造成胺基酸變化，間接可了解基因型與表現型之間的關連性為何。針對未有參考病株的未知感染源我們將採用全基因體從頭定序法(Genome de novo)將未知序列物種進行定序(圖十三)。組裝完成後之Contig與Scaffold資訊可粗略估計該物種之全基因體大小；另外可進行基因、蛋白質編碼區等預測及註解分析，可快速的獲得這些未知序列物種在親源性演化上的差異。



圖十二、重新定序法之標準分析流程圖。進行步驟：一、Data Cleaning：去除Quality較差之數據確保後續分析的正確性。二、Alignment：clean data與參考序列進行比對。三、Variants Calling：找出與參考序列之差異。四、Variants Annotation：預測每

個核苷酸變異對胺基酸改變之影響（http://www.welgene.com.tw/service/ngs/NGS_dna_resequencing.html）。



圖十三、全基因體從頭定序法之標準分析流程圖。進行步驟：一、Data Cleaning：去除Quality較差之數據確保後續分析的正確性。二、Assembly：以clean data進行組裝。三、Gene Prediction：針對Scaffold進行基因預測分析。四、Gene Functional Annotation：針對Scaffold進行蛋白質編碼區註解（http://www.welgene.com.tw/service/ngs/NGS_dna_ genome_de_novo.html）。

3. 親緣性分析

先搜尋各種宿主與病毒基因型之序列資料建置本研究需要之各病毒基因資料庫。各檢測樣本之定序分析資料，經組裝完成後與基因資料庫中已知之基因序列進行演化樹分析，以確定其病毒株與各宿主來源相關性。

4. 建構我國諾羅病毒、輪狀病毒、沙波病毒及其他腹瀉病原序列資料庫與次世代定序分析平台

透過分析近年收集我國腹瀉群聚與食物中毒監測之諾羅病毒及輪狀病毒樣本，建立腹瀉檢體進行次世代分析平台操作之流程。並將分析完成的數據將上傳到雲端資料庫，並根據病毒的型別與親源性演化分析，建構我國諾羅病毒、輪狀病毒與沙波病毒主要流行之基因資料庫。並透過全基因資料比對不同宿主來源之病毒株之結果，進行演化與病毒傳播之探討。

三、 結果

一、次世代分析方法測試

分析方法測試流程包括檢體(糞便)前處理、樣本核酸萃取(配合病毒特性)、核酸片段化（fragmentation)、建製資料庫（library construction)、PCR 放大(PCR amplification）、定序(sequencing)、分析（analysis)，本計畫採用 Illumina 平台系列定序系統進行病毒基因組上機，以 CLC Genomics Workbench 9.0 分析軟體進行後續分析。本研究中挑選腹瀉個案經由 RT-PCR 檢測為輪狀病毒及諾羅病毒陽性的檢體，評估可成功定序的方法包括：1) 經由 real-time RT-PCR 將病毒定量，2) 測試上機可成功建置 library 所需的 RNA 濃度，3) 以 Illumina 平台 Miseq 反應後可得到訊息足夠組合 contiq 分析的方法。方法簡述及流程圖一

糞便檢體以 PBS buffer 前處理為 10%懸浮液，去除額外核酸，抽取 RNA，先以 real-time RT-PCR 估計病毒數，及以 Qubit 測量 RNA 濃度。因 RNA 量皆足夠，以 Agilent SureSelect 套件建庫後進行 Illumina Miseq 上機定序反應。其結果以 FASTQ 格式輸出後以 CLC Genomics Workbench 軟體進行組裝和以 BLAST 方法和 NCBI Genbank 資料庫已知的序列進行比對。簡易流程圖如圖一。研究過程中，依樣本不同、樣品中病毒量等每個步驟經測試改良修飾方法如下:

1. 為順利進行次世代定序，參考需可製備出符合上機要求樣品的相關資訊，本研究過程中測試多種處理方式，找出適合用於腹瀉症狀樣本之方法整理歸納如下(結果圖一A)：檢體於PBS稀釋10倍後之160uL上清液首先通過0.45 um過濾器以去除顆粒雜質，再以Turbo DNase (Thermo Fisher)、Benzonase (Sigma)及RNase A (Thermo Fisher)等核酸腖於37℃作用一小時，去除病毒外核酸以減少人類和細菌等核酸之干擾。如遇到腦脊髓液或一般PCR結果較差等特殊檢體，必須以原倍腦脊髓液或2至5倍PBS稀釋之上清液以320uL(正常之兩倍體積)進行上述過濾及核酸腖處理步驟。
2. 病毒RNA抽取則用前述之處理過上清液以QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)進行。本研究經測試多種樣本測試條件後，核酸萃取步驟修改與廠商說明書不同之處

如下:

(1) AVL buffer未添加poly A carrier以避免carrier RNA對於含有poly A之病毒RNA降低核酸萃取效率。如遇到病毒數量低之特殊檢體則採用Yeast RNA (Thermo Fisher)替代之。

(2) 因病毒含量低之檢體體積較高，必須分兩管進行AVL混合步驟，並將兩管已加入純乙醇之內容物載入同一column以濃縮病毒RNA量。

(3) 在核酸萃取第一步AW1 wash步驟後，加以RNase-free DNase (QIAGEN)室溫靜置十分鐘以去除抽取過程中殘餘之DNA。隨後再進行一次AW1 wash步驟去除DNase。

(4) AW2 wash步驟後將離心管靜置於生物安全櫃中，抽氣風乾十分鐘去處殘留之AW2 wash 液體。

(5) AVE Elution步驟使用80 uL之AVE buffer並靜置室溫十分鐘，以充分回溶column中之RNA。

3. 純化後之RNA以real-time PCR或Qubit進行RNA定量或以Bioanalyzer (Agilent) 電泳方式來做確認RNA品質。

4. 後續資料庫(library)建置法選擇，依RNA多寡決定: 如RNA量少於10 ng/uL則先以隨意引子反轉錄PCR合成cDNA再以Nextera XT DNA製備資料庫。如RNA量多於10 ng/uL則可用NEBNext Ultra RNA或Agilent SureSelect Strand-Specific RNA直接從RNA製備資料庫。

5. library資料庫建立

(1) 隨意引子RT-PCR及Nextera XT DNA Library Prep (結果圖一B左)

首先以隨意引子和病毒RNA以Superscript IV (Thermo Fisher)進行反轉錄PCR反應，隨後反轉錄產物再以Klenow聚合酶片段進行第二股cDNA合成。雙股cDNA以AmpliTaq Gold (Thermo Fisher) 聚合酶PCR增幅放大。最後以AMPure XP (Beckman Coulter) 磁珠純化PCR產物，並以Bioanalyzer (Agilent) 電泳方式來做確認片段大小分布並以 Qubit® dsDNA BR Assay (Thermo Fisher)測 DNA 濃度，適當調整濃度後再進行建立library資料庫。

本階段將利用Nextera XT DNA Sample Preparation Kit製備資料庫。原理如方法段中圖九所示。利用Transposomes先將DNA檢體切成約300bp大小的片段，並在將DNA形成片段的同時將Adaptor序列加入DNA片段的5'端和3'端。完成反應後，利用PCR反應，將

Index序列及其餘adaptor序列加入DNA片段，進行純化即完成樣品製備。所獲得的有雙重index序列的DNA資料庫便能使用於Illumina定序系統上機進行反應。

(2) NEBNext Ultra RNA Library Prep (結果圖一B中)

將RNA置於NEBNext First Strand Synthesis Reaction Buffer於94℃十分鐘作用下片斷化。隨後再加入ProtoScript II反轉錄酶進行第一股cDNA合成，完成後馬上加入Second Strand Synthesis Enzyme Mix和buffer進行第二股cDNA合成。之後以AMPure XP磁珠純化cDNA。純化後cDNA混合NEBNext End Prep Enzyme Mix和buffer進行End repair和dA tailing反應。有著dA tail的DNA就可在Blunt/TA Ligase Master Mix反應下接上adapter，並用USER Enzyme切除U以打開環狀結構之adapter(方法段圖十)。再次以磁珠純化後，再以barcode的primer進行PCR產物放大及最後純化之步驟。

(3) Agilent SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep (結果圖一B右)

Agilent之資料庫製備方式與前面NEBNext相似。首先於RNA Seq Fragmentation Mix中在94℃條件下片斷化RNA，再加入Actinomycin D和RNA Seq First Strand Master Mix進行strand-specific第一股cDNA合成。產物純化後在RNA Seq Second Strand 及 End Repair Enzyme Mix和RNA Seq Second Strand 及 End Repair Oligo Mix反應中實行第二股cDNA合成，並再次純化。之後用RNA Seq dA Tailing Master Mix加上dA tail，最後再連上adapter然後純化。純化之後有adapter的cDNA用index引子再進行PCR增值後再最後純化。

二、臨床個案應用

特殊個案病例簡述: 於腹瀉孩童監測網絡計畫中,接獲中部監測點醫師通報一例特殊個案,該名 7 歲孩童於急診收案時仍有意識但精神不佳、行動遲緩,BT: high(42℃), HR: 159, RR: 31, BP: 84/36 mmHg，經 challenge 300cc 後住院，住院後 4 天發燒嘔吐昏迷出現休克，懷疑為 encephalopathy related hyperthermia 轉至兒科加護病房治療。急診抽血實驗室報告 WBC 25400，於加護病房時進行腰椎穿刺，CSF 細菌檢驗 (Haemophilus influenzae type b、Streptococcus pneumoniae、Neisseria meningitidis

type A/B/C、Streptococcus agalactiae (Group B)) 培養均陰性，病毒培養(throat, rectal and CSF)、血清(EBV/Influenza/JE)抗原抗體檢測、及分生檢測均陰性；檢驗報告中僅病患住院後第 2 及 7 天收案之糞便檢體，輪狀病毒抗原 ELISA 檢測及 RT-PCR 為陽性。回溯問卷中病患母親曾表示病患於急診收治前，曾連續數天出現腹瀉嘔吐及發燒症狀。

回收剩餘糞便檢體經實驗初步輪狀病毒 VP4 及 VP7 基因經 RT-PCR，及定序基因型別分析，確認為輪狀病毒 G3P8 型病毒株，並經親緣演化比對屬 G3P8 DS-1 like cluster；但 CSF 檢體檢驗仍為陰性。經與臨床醫師討論以及文獻回顧，因輪狀病毒感染出現 acute encephalopathy 或 encephalitis 病例相當少見，為了解該病例感染病毒株的情形，將該樣本以不經訊息放大方式直接進行次世代定序分析，以了解病毒在該樣本中的存在狀態。

分析方法如前述，經次世代定序實驗與 CLC 軟體分析，本次樣本共產生 Total reads 4,984,392，其中排除與致病原無關後之 virus reads 2,259,423(43.32%)，全部 read 可組成 227 contigs，其中包括 Astrovirus type 4 及 Rotavirus G3P8 VP1, VP3 及 NSP1(如圖二)，經 NCBI Genbank 比對，其中 Rotavirus 各基因與 G3P8 DS-1 like 病毒株極相近(圖三)。為確認次世代定序分析中之 Astrovirus type 4 結果，本實驗再以 real-time PCR 進行病毒量分析並發現糞便檢體抽出 RNA 中 Astrovirus 含量也相當高($1.02X10^{8}$ copies/uL RNA，即每 1mL 檢體上清液含 $3.05X10^{10}$ copies)。由於從 CLC 分析組出 contigs 中，Astrovirus type 4 reads 比 Rotavirus reads 比高出非常多，和 real-time PCR 定量也偵測到非常高 Astrovirus 含量結果一致，因此推測本個案感染之嚴重度可能與 Astrovirus 感染，或病毒 co-infection 有關；過去期刊文獻中亦有 Astrovirus 引起 encephalitis 相關病例，雖 Astrovirus 引起 encephalitis 病例個案相當罕見，本研究將繼續進行病毒 viral load 分析以及文獻探討。

三、輪狀病毒之序列組裝

為釐清台灣和國際上流行 DS-1 like G3P8 和 G1P8 型別之關聯性，本次挑選近年來以 PCR 和親源演化樹分析確認之 DS-1 like 型別檢體進行 NGS 定序。結果幾乎全數完成

完整 11 段基因定序如圖四 A。在糞便檢體抽出 RNA 裡輪狀病毒含量從微量(佔 < 1% reads 數)到幾乎佔滿全 RNA 含量(99.12%)。表示輪狀病毒 RNA 在糞便裡可達到極高量。每一段完整定序基因的涵蓋量(coverage)也能達到 100X 以上(圖四 B)，表示在絕大部分檢體中都能得到完整大量之輪狀病毒序列。NGS 定序後各段基因 reads 數也可當成相對的病毒基因表現量，如圖四 C 所示 NSP1 基因在許多檢體中表現量均是最高，而相對 VP7、NSP4、NSP5 都為偏低。各段基因涵蓋範圍也十分不一(圖四 D)，例如在某些區域涵蓋量相當高但在其他區域則非常低，推測可能和病毒每段基因序列特性，以及 RNA 二級結構有著關係。因定序涵蓋量不一，目前定序之輪狀病毒檢體中有一件無法組成全長片段，而依照圖四 E 所示，有部分片段甚至是斷裂的因而無法組成完整基因片段。研究將探討這些定序量極少區段的基因特性，並繼續研究對於序列特性造成定序 bias 高低不一之相關性，以作為優化反應條件之調整。

四、 討論

本實驗室建立之次世代定序流程可成功從糞便檢體抽出之RNA組成完整輪狀病毒序列，並應用於未知病原體之特殊個案。利用此方法我們在特殊個案中原先以為由輪狀病毒感染造成的嚴重併發症，以次世代定序方法發現檢體中還存在其他的病原Astrovirus，透過分析結果訊息再以該病毒專一性引子確認，發現Astrovirus病毒量高於原來檢測陽性的輪狀病毒，從此一案例了解，過去以專一性病原檢測方法，再使用的檢測標的品項不多時，就容易遺漏而無法找到感染病因；此外，如果分項檢驗就需要更多的檢體，再部分的病例缺少足夠的檢體時，檢驗的項目就受到限制。因此，由此案例讓我們了解，次世代定序在特殊個案的應用的優勢。

由於Astrovirus感染以腹瀉症狀為主，感染盛行率不高，因此在監測與臨床檢驗上，多數不檢驗因此也不會發現亦不非常瞭解Astrovirus感染致病的程度與病程。本次特殊個案的次世代定序，讓我們了解在encephalitis個案檢體中是更有可能由Astrovirus所引起，雖然過去文獻發現這種型別Astrovirus type 4只會在免疫不全或低下患者造成中樞神經症狀，其他Astrovirus型別均有在免疫不全或骨髓移植兒童和成人造成腦炎和腦膜炎等個案(Vu et al. 2016)；因此，表示次世代定序是偵測新病原體或已知病原體造成前所未見疾病之利器。

在次世代定序組裝和分析部分，針對宿主和細菌等序列干擾，我們也參考文獻及在檢體前處理時通過0.45um濾網和利用多種核酸酶以消除病毒顆粒外之核酸，增加萃取病毒RNA之純度及下游程序效率(Victoria et al. 2009)。針對病毒數量低之檢體，也增加檢體體積及lysis和elution等待時間以提升回溶RNA量。目前因檢體RNA含量皆夠高，資料庫建立皆以Agilent SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep製作。如針對RNA含量低(< 10 ng/uL)之檢體則必須使用SISPA隨意引子反轉錄PCR先轉成cDNA將其利用PCR放大之後再進行Nextera XT DNAseq建庫。此方法優點是先行增幅cDNA量以確保有較高的cDNA量建庫，所以微量RNA也能夠被放大但相較於其他方法錯誤率也較高(Kugelman et al. 2017)。對於輪狀病毒基因coverage不完全的部分(圖四D-E)，除了增加抽取RNA時檢體量或建庫用RNA量，盡量去除會造成干擾之其他核酸也

是重點。由圖四 E 可見，整段基因 coverage 十分不均勻，就算成功完成定序還是會有部分 coverage 較低(如 VP6 後端部分)，而且在不同檢體中在此一片段其現象一致性頗高，推測可能是和序列特性有所關聯。因輪狀病毒基因 AT 含量較高(約 70%)，可能造成二級結構或逆轉錄酶(RdRP)或 DNA 聚合胺在合成時的困難性，因此可能需要再嘗試各種不同聚合胺針對高 AT 合成之特性，例如瘧疾病原 AT 含量相當高，在次世代定序結果不一的情況下，過去研究專家也嘗試了數種聚合胺和添加物對於定序結果之改進(Oyola et al. 2012)。針對此點，未來也是本計畫值得改進和研究的重點。

五、 結論與建議

本研究為釐清特殊感染個案及疫情，以及了解病毒的演化情形以對感染疫情趨勢作預測，並提升實驗室檢測病原的能力，在第一年挑選了不同病毒量的檢體進行實驗各個過程的調整以建立以次世代定序法平台（next generation sequencing platform）來研究腹瀉感染特殊個案之最適當檢體前處理、方法與流程以及病毒演化機制；此外，建置的方法成功的應用於特殊的個案，並找到另一疑似致病原。雖以次世代定序法平台檢測的成本仍高於目前傳統檢測方法，但目前已逐漸成為國際上應用於疾病分析與疫情調查使用的重點工具，未來如果在使用率高、經費成本下降時，將可更廣泛的應用於檢驗。

六、 計畫重要研究成果及具體建議

本計畫第一年建置的方法未來結合我國腹瀉病毒監測，可應用於群聚事件的追蹤溯源；此外，每年仍有許多群聚案件調查時，以傳統檢驗方法無法找到真正感染源而無法有明確的結論，未來可應用次世代分析結果結合流行病學調查的資料，深入探討深入分析主要的感染原因與來源。

七、 參考文獻

American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Prevention of rotavirus disease: guidelines for use of rotavirus vaccine. *Pediatrics* 2007;119:171-82.

Armah GE1, Steele AD, Esona MD, Akran VA, Nimzing L, Pennap G. Diversity of rotavirus strains circulating in west Africa from 1996 to 2000. *J Infect Dis* 2010;1:202.

Bányai K1, Bogdán A, Domonkos G, Kisfali P, Molnár P, Tóth A, Melegh B, Martella V, Gentsch JR, Szucs G. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary. *J Med Virol* 2009;81:362-70.

Barba M, Czosnek H, Hadidi A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 2014;6:106-36

Bartolini B, Chillemi G, Abbate I, Bruselles A, Rozera G, Castrignanò T, Paoletti D, Picardi E, Desideri A, Pesole G, Capobianchi MR. Assembly and characterization of pandemic influenza A H1N1 genome in nasopharyngeal swabs using high-throughput pyrosequencing. *New Microbiol* 2011;34:391-397.

Browning GF, Fitzgerald TA, Chalmers RM, Snodgrass DR. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. J Clin Microbiol 1991;29:2043-2046.

Bruselles A, Rozera G, Bartolini B, Prosperi M, Del Nonno F, Narciso P, Capobianchi MR, Abbate I. Use of massive parallel pyrosequencing for near full-length characterization of a unique HIV Type 1 BF recombinant associated with a fatal primary infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;9:937-942

Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:15-22.

Carlsson B, Lindberg AM, Rodriguez-Diaz J, Hedlund KO, Persson B, Svensson L. Quasispecies dynamics and molecular evolution of human norovirus capsid P region during chronic infection. *J Gen Virol* 2009;90:432-441.

Cheetham S, Souza M, Meulia T, Grimes S, Han MG, Saif LJ. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs. *J Viro*l 2006 ;80:10372-10381.

Croville G, Soubies SM, Barbieri J, Klopp C, Mariette J, Bouchez O, Camus-Bouclainville C, Guérin JL. Field monitoring of avian influenza viruses: whole-genome sequencing and

tracking of neuraminidase evolution using 454 pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2012 ;50:2881-2887

de Graaf M, van Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, Templeton K, Mans J, Nordgren J, Reuter G, Lynch M, Rasmussen LD, Iritani N, Chan MC, Martella V, Ambert-Balay K, Vinjé J, White PA, Koopmans MP. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era *Euro Surveill* 2015 2;20. pii: 21178.

Dung TTN, Duy P, Sessions OM, Sangumathi UK, Phat VV, Tam PTT, To NTN, Phuc TM, Hong Chau TT, Chau NNM, Minh NN, Thwaites GE, Rabaa MA, Baker S.A universal genome sequencing method for rotavirus A from human fecal samples which identifies segment reassortment and multi-genotype mixed infection. BMC Genomics. 2017 Apr 24;18(1):324.

Etherington GJ, Dicks J, Roberts IN. High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus. *Virology* 2006 5;345:88-95.

Fonager J, Stegger M, Rasmussen LD, Poulsen MW, Rønn J, Andersen PS, Fischer TK.A universal primer-independent next-generation sequencing approach for investigations of norovirus outbreaks and novel variants. Sci Rep. 2017 Apr 11;7(1) :813.

Gentsch JR1, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, Jain V, Cunliffe NA, Nakagomi O, Kirkwood CD, Fischer TK, Parashar UD, Bresee JS, Jiang B, Glass RI. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis* 2005;192:S146-159.

Green KY, Ando T, Balayan MS, et al. Taxonomy of the caliciviruses. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 2):S322-S30.

Hall AJ, Wikswo ME, Pringle K, Gould LH, Parashar UD. Vital signs: foodborne norovirus outbreaks — United States, 2009–2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014; 63:491-495.

Hoshino Y, Kapikian AZ. Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes. *Arch Virol* 1996;12:99-111.

Hwang KP, Wu FT, Bányai K, Wu HS, Yang DC, Huang YC, Lin JS, Hsiung CA, Huang JC, Jiang B, Gentsch JR. Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children. *J Med Microbiol* 2012;61:990-997.

Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Koopmans M, Korsun N, Koukou D, Kroneman A, László B, Lappalainen M,

Maunula L, Marques AM, Matthijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Nawaz S, Poljsak-Prijatelj M, Pothier P, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Steyer A, Sidaraviciute-Ivaskeviciene I, Syriopoulou V, Tran AN, Usonis V, VAN Ranst M, DE Rougemont A, Gray J. Rotavirus genotypes co-circulating in Europe between 2006 and 2009 as determined by EuroRotaNet, a pan-European collaborative strain surveillance network. *Epidemiol Infect* 2011;13:895-909.

Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR, Vinjé J. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;;71:1870-1875.

Kapikian AZ, Chanock RM. Rotaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP et al. editors. Virology. 3d ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996;1657-1708.

Katayama K, Shirato-Horikoshi H, Kojima S, *et al*. Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses. *Virology* 2002; 299:225–539.

Kageyama T, Kojima S, Shinohara M, et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:1548–1557.

Krishnan T, Sen A, Sinha Choudhury J, Das S, Naik TN, Bhattacharya SK. Emergence of adult diarrhea rotavirus in Calcutta, India. *Lancet* 1999;353:380-381.

Kugelman JR, Wiley MR, Nagle ER, Reyes D, Pfeffer BP, Kuhn JH, Sanchez-Lockhart M, and Palacios GF. Error baseline rates of five sample preparation methods used to characterize RNA virus populations. *PLoS ONE*. 2017;12:e0171333.

Kwok H, Tong AH, Lin CH, Lok S, Farrell PJ, Kwong DL, Chiang AK. Genomic sequencing and comparative analysis of Epstein-Barr virus genome isolated from primary nasopharyngeal carcinoma biopsy. *PLoS One* 2012;7:e36939.

Li L, Pesavento PA, Shan T, Leutenegger CM, Wang C, Delwart E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. *J Gen Virol* 2011; 92:2534-2541.

Liu L, Johnson HL, Cousens S, Perin J, Scott S, Lawn JE, Rudan I, Campbell H, Cibulskis R, Li M, Mathers C, Black RE; Child Health Epidemiology Reference Group of WHO and UNICEF. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet* 2012;379:2151-2161.

López-Bueno A, Tamames J, Velázquez D, Moya A, Quesada A, Alcamí A. High diversity of the viral community from an Antarctic lake. *Science* 2009;6:858-861

Martella V, Decaro N, Lorusso E, Radogna A, Moschidou P, Amorisco F, Lucente MS, Desario C, Mari V, Elia G, Banyai K, Carmichael LE, Buonavoglia C. Genetic heterogeneity and recombination in canine noroviruses. *J Virol* 2009;83:11391-11396

Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E, Arijs I, Delbeke T, McDonald SM, Palombo EA, Iturriza-Gómara M, Maes P, Patton JT, Rahman M, Van Ranst M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol* 2008;82:3204-3219

Matthijnssens J, Joelsson DB, Warakomski DJ, Zhou T, Mathis PK, van Maanen MH, Ranheim TS, Ciarlet M: Molecular and biological characterization of the 5 human-bovine rotavirus (WC3)-based reassortant strains of the pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq. *Virology* 2010; 403:111-127.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, Buesa J, Esona MD, Estes MK, Gentsch JR, Iturriza-Gómara M, Johne R, Kirkwood CD, Martella V, Mertens PP, Nakagomi O, Parreño V, Rahman M, Ruggeri FM, Saif LJ, Santos N, Steyer A, Taniguchi K, Patton JT, Desselberger U, Van Ranst M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol* 2011;156:1397-1413.

Mattison K, Shukla A, Cook A, Pollari F, Friendship R, Kelton D, Bidawid S, Farber JM. Human noroviruses in swine and cattle. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1184-1188.

Morozova OV, Sashina TA, Fomina SG, Novikova NA. Comparative characteristics of the VP7 and VP4 antigenic epitopes of the rotaviruses circulating in Russia (Nizhny Novgorod) and the Rotarix and RotaTeq vaccines. *Arch Virol* 2015;160:1693-703.

Oka T, Wang Q, Katayama K, Saif LJ. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28:32-53.

Oyola SO, Otto TD, Gu Y, et al. Optimizing Illumina next-generation sequencing library preparation for extremely AT-biased genomes. BMC Genomics;13:1.

Pantaleo V, Saldarelli P, Miozzi L, Giampetruzzi A, Gisel A, Moxon S, Dalmay T, Bisztray G, Burgyan J. Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine. *Virology* 2010;408:49-56.

Patton JT. Rotavirus diversity and evolution in the post-vaccine world. *Discov Med* 2012;13:85-97.

Rutvisuttinunt W, Chinnawirotpisan P, Simasathien S, Shrestha SK, Yoon IK, Klungthong C, Fernandez S. Simultaneous and complete genome sequencing of influenza A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. *J Virol Methods* 2013;193:394-404

Scheuer KA, Oka T, Hoet AE, Gebreyes WA, Molla BZ, Saif LJ, et al. Prevalence of porcine noroviruses, molecular characterization of emerging porcine sapoviruses from finisher swine in the United States, and unified classification scheme for sapoviruses. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2344-2353.

Scipioni A, Mauroy A, Vinjé J, Thiry E. Animal noroviruses. *Vet J* 2008 ;178:32-45.

Sdiri-Loulizi K, Gharbi-Khélifi H, de Rougemont A, Chouchane S, Sakly N, Ambert-Balay K, Hassine M, Guédiche MN, Aouni M, Pothier P. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol* 2008;46:1349-1355.

Shibata S, Sekizuka T, Kodaira A, Kuroda M, Haga K, Doan YH, et al. Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak. *Genome Announc* 2015; 3.

Siebenga JJ, Beersma MF, Vennema H, van Biezen P, Hartwig NJ, Koopmans M. High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: a model for in vivo molecular evolution. *J Infect Dis* 2008;198:994-1001.

Sisay Z, Djikeng A, Berhe N, Belay G, Abegaz WE, Wang QH, Saif LJ. First detection and molecular characterization of sapoviruses and noroviruses with zoonotic potential in swine in Ethiopia. *Arch Virol* 2016.

Szpara ML, Parsons L, Enquist LW. Sequence variability in clinical and laboratory isolates of herpes simplex virus 1 reveals new mutations. *J Virol* 2010;84:5303-5313.

Victoria JG, Kapoor A, Li L, *et al.* Metagenomic Analyses of Viruses in Stool Samples from Children with Acute Flaccid Paralysis. *J. Virol.* 2009;83:4642-4651.

Vinjé J, Vennema H, Maunula L, von Bonsdorff CH, Hoehne M, Schreier E, Richards A, Green J, Brown D, Beard SS, Monroe SS, de Bruin E, Svensson L, Koopmans MP. International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses. *J Clin Microbiol*. 2003;41:1423-1433

Vinje´ J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *J Clin Microbiol* 2015;53:373-381.

Verhoef L, Williams KP, Kroneman A *et al*. Selection of a phylogenetically informative region of the norovirus genome for outbreak linkage. Virus Genes 44(1), 8–18 (2012).

Vu D, Cordey S, Brito F, and Kaiser L. Novel human astroviruses: Novel human diseases? *J. Clin. Virol.* 2016;82:56-63

Wang QH, Han MG, Funk JA, Bowman G, Janies DA, Saif LJ. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *J Clin Microbiol* 2005;43:5963-5972.

Willerth SM, Pedro HA, Pachter L, Humeau LM, Arkin AP, Schaffer DV. Development of a low bias method for characterizing viral populations using next generation sequencing technology. *PLoS One*. 201;5:e13564.

Wolf S, Williamson WM, Hewitt J, Rivera-Aban M, Lin S, Ball A, Scholes P, Greening GE. Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples. *Appl Environ Microbio*l 2007;;73:5464-5470

Wong K, Fong TT, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int* 2012;45:151-164.

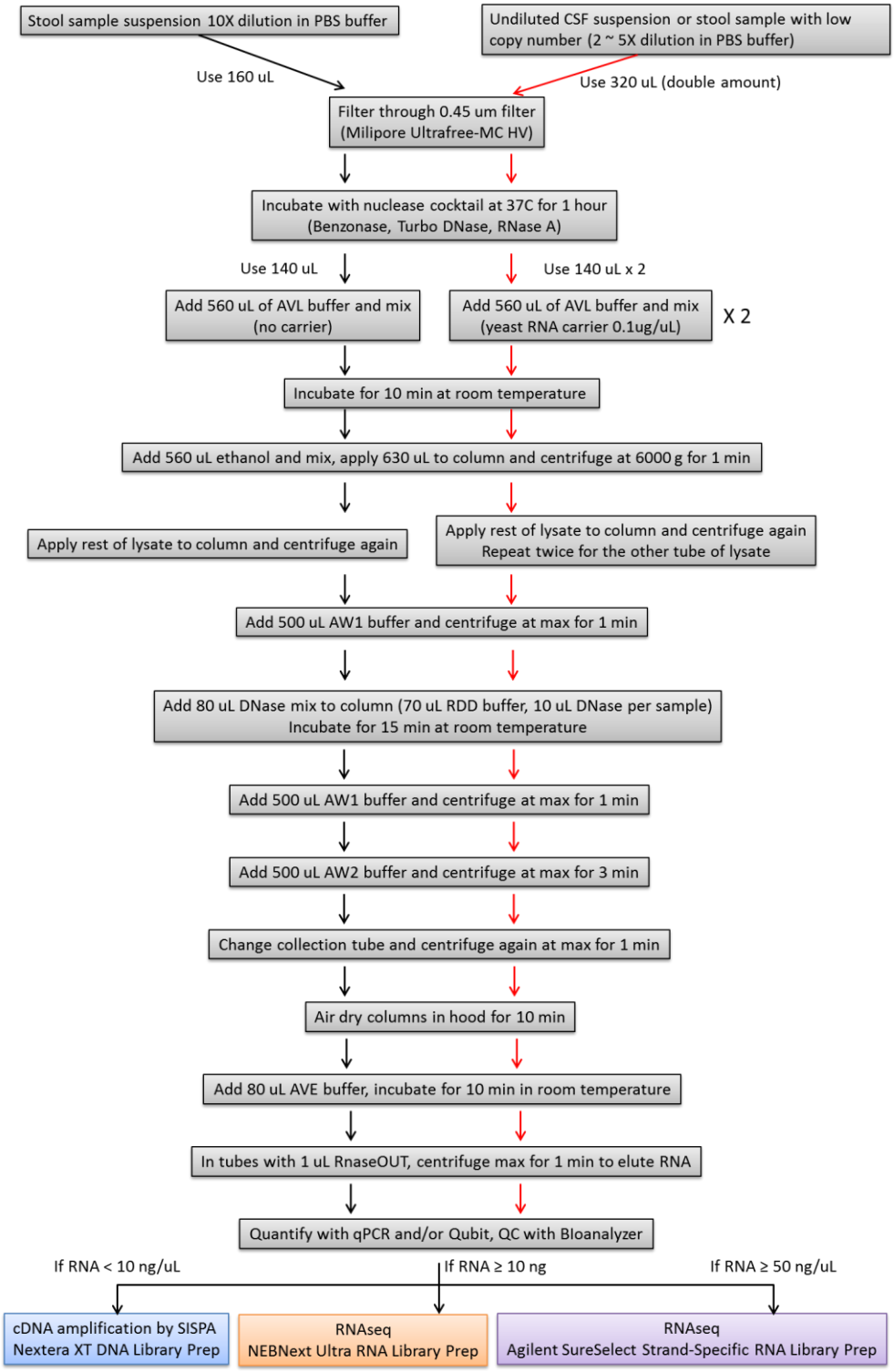
WHO: WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. 2015.

Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, Beard RS, Glass RI, Monroe SS. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 2006;346:312-323.

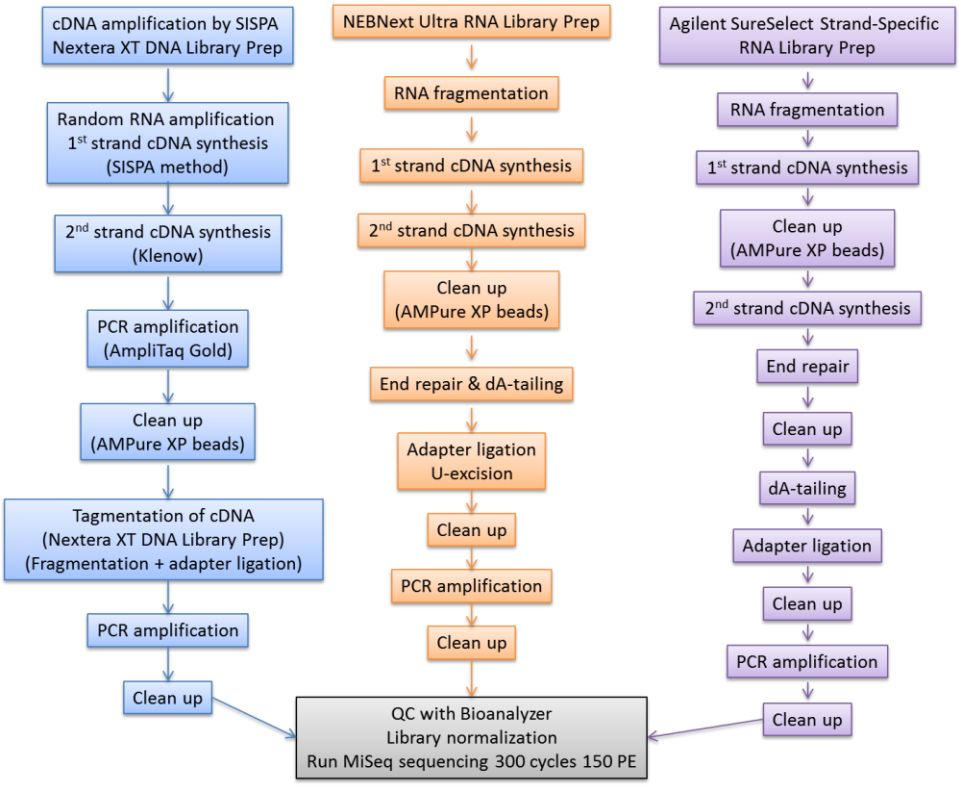
八、 圖表

圖一、次世代定序流程圖

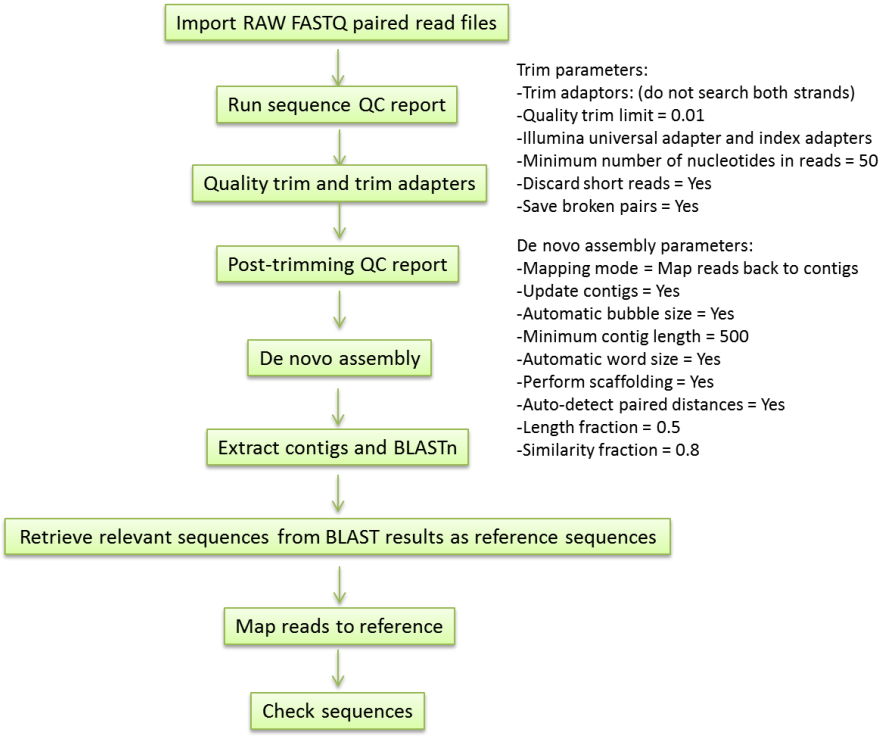
(A) Sample preparation & RNA extraction



(B) Library Preparation

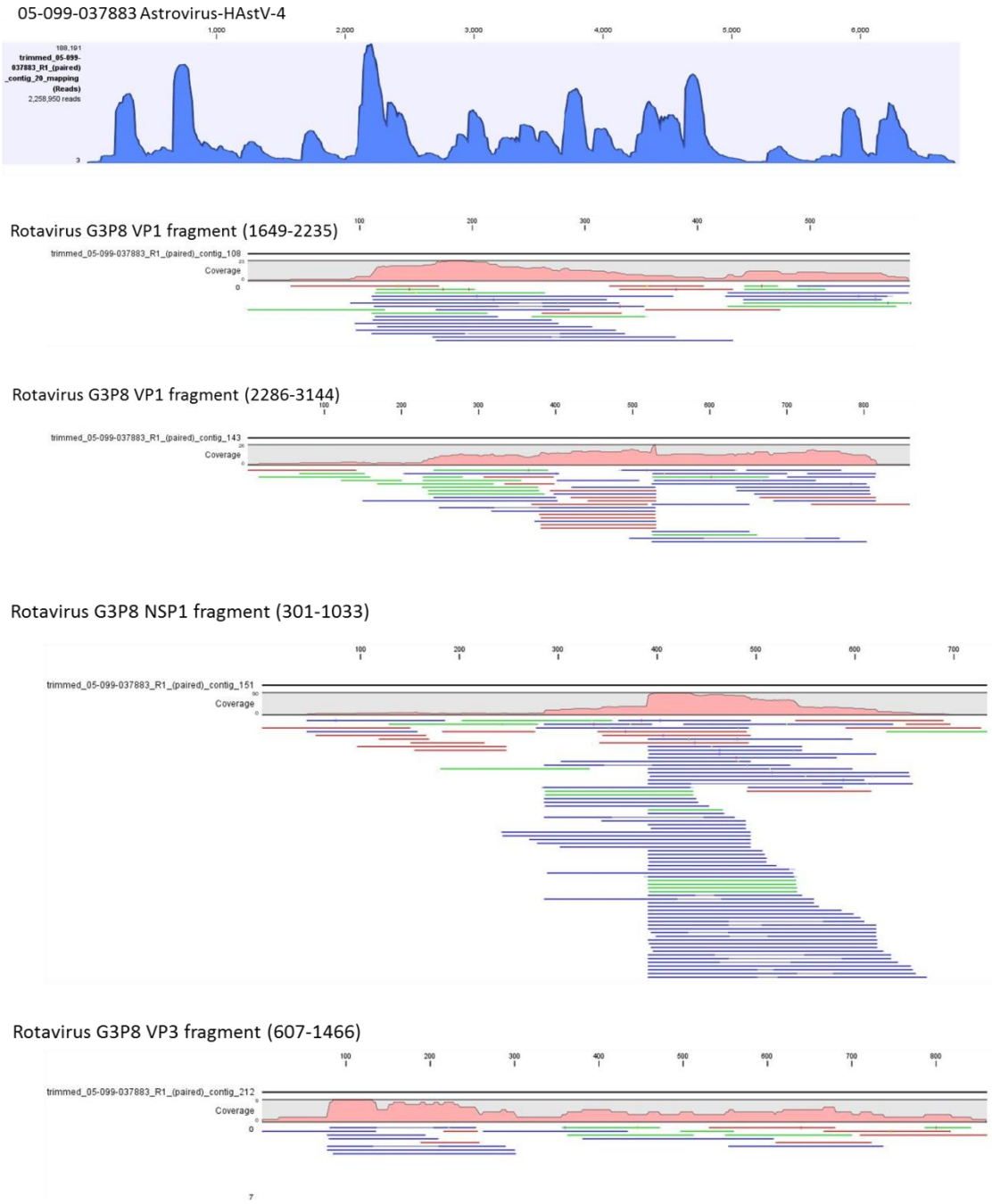


(C) CLC Genomics Workbench Analysis



圖二、次世代定序實驗經 CLC 軟體分析(A)組裝之病毒基因結果 (B)組裝完成後各基因的定序數

(A)

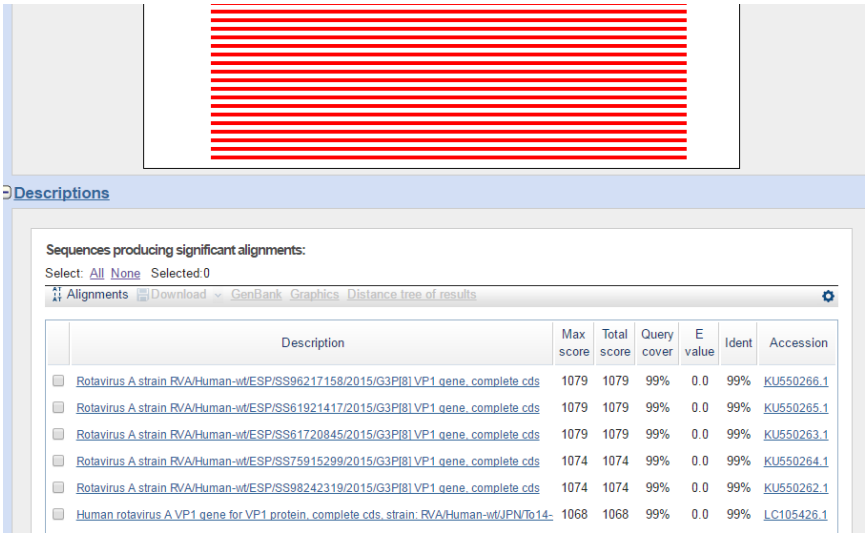


(B) 組裝完成後各基因的定序數

Pathogen	Reads	Average coverage
Astrovirus-HAstV-4	2,259,118	40,852.63
Rotavirus G3P8 VP1 fragment (1649-2235)	48	9.62
Rotavirus G3P8 VP1 fragment (2286-3144)	73	10.14
Rotavirus G3P8 VP3 fragment (607-1466)	31	4.12
Rotavirus G3P8 NSP1 fragment (301-1033)	153	25.94

圖三、Rotavirus VP1、VP3 及 NSP1 與 NCBI 資料庫比對結果

(A) Rotavirus VP1 fragment BLAST 結果



Descriptions

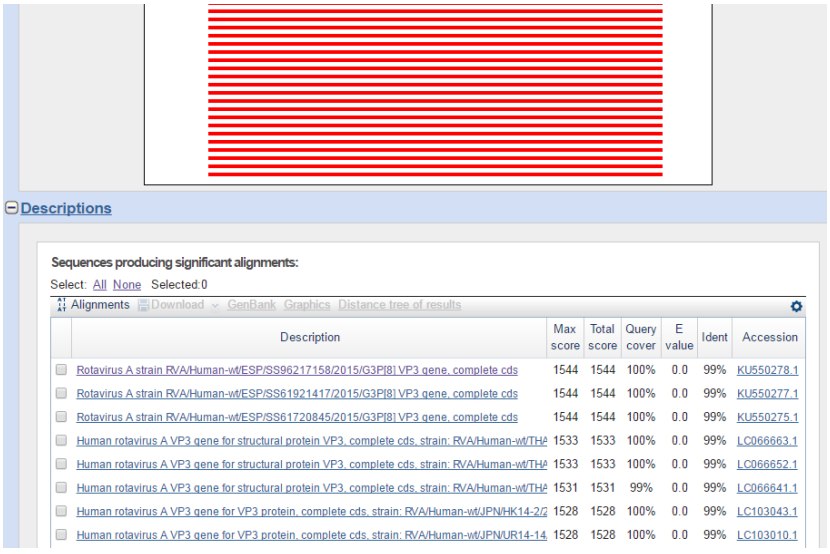
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS96217158/2015/G3P[8] VP1 gene, complete cds	1079	1079	99%	0.0	99%	KU550266.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61921417/2015/G3P[8] VP1 gene, complete cds	1079	1079	99%	0.0	99%	KU550265.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61720845/2015/G3P[8] VP1 gene, complete cds	1079	1079	99%	0.0	99%	KU550263.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS75915299/2015/G3P[8] VP1 gene, complete cds	1074	1074	99%	0.0	99%	KU550264.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS98242319/2015/G3P[8] VP1 gene, complete cds	1074	1074	99%	0.0	99%	KU550262.1
Human rotavirus A VP1 gene for VP1 protein, complete cds, strain: RVA/Human-wt/JPN/To14-	1068	1068	99%	0.0	99%	LC105426.1

(B) Rotavirus VP3 fragment BLAST 結果



Descriptions

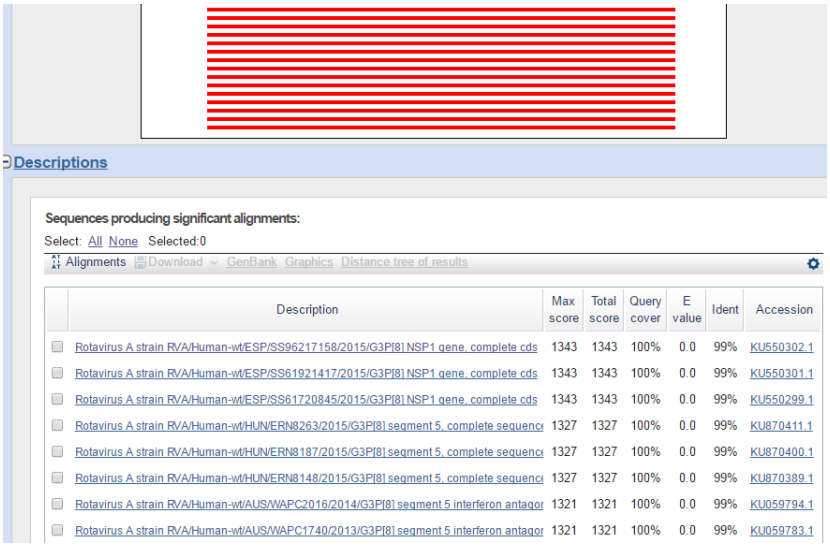
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS96217158/2015/G3P[8] VP3 gene, complete cds	1544	1544	100%	0.0	99%	KU550278.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61921417/2015/G3P[8] VP3 gene, complete cds	1544	1544	100%	0.0	99%	KU550277.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61720845/2015/G3P[8] VP3 gene, complete cds	1544	1544	100%	0.0	99%	KU550275.1
Human rotavirus A VP3 gene for structural protein VP3, complete cds, strain: RVA/Human-wt/THA	1533	1533	100%	0.0	99%	LC066663.1
Human rotavirus A VP3 gene for structural protein VP3, complete cds, strain: RVA/Human-wt/THA	1533	1533	100%	0.0	99%	LC066652.1
Human rotavirus A VP3 gene for structural protein VP3, complete cds, strain: RVA/Human-wt/THA	1531	1531	99%	0.0	99%	LC066641.1
Human rotavirus A VP3 gene for VP3 protein, complete cds, strain: RVA/Human-wt/JPN/HK14-2/2	1528	1528	100%	0.0	99%	LC103043.1
Human rotavirus A VP3 gene for VP3 protein, complete cds, strain: RVA/Human-wt/JPN/UR14-14	1528	1528	100%	0.0	99%	LC103010.1

(C) Rotavirus NSP1 fragment BLAST 結果



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS96217158/2015/G3P[8] NSP1 gene, complete cds	1343	1343	100%	0.0	99%	KU550302.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61921417/2015/G3P[8] NSP1 gene, complete cds	1343	1343	100%	0.0	99%	KU550301.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/ESP/SS61720845/2015/G3P[8] NSP1 gene, complete cds	1343	1343	100%	0.0	99%	KU550299.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/HUN/ERN8263/2015/G3P[8] segment 5, complete sequenc	1327	1327	100%	0.0	99%	KU870411.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/HUN/ERN8187/2015/G3P[8] segment 5, complete sequenc	1327	1327	100%	0.0	99%	KU870400.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/HUN/ERN8148/2015/G3P[8] segment 5, complete sequenc	1327	1327	100%	0.0	99%	KU870389.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/AUS/WAPC2016/2014/G3P[8] segment 5 interferon antagor	1321	1321	100%	0.0	99%	KU059794.1
Rotavirus A strain RVA/Human-wt/AUS/WAPC1740/2013/G3P[8] segment 5 interferon antagor	1321	1321	100%	0.0	99%	KU059783.1

圖四、挑選腹瀉檢體中 Rotavirus GP83 次世代定序結果

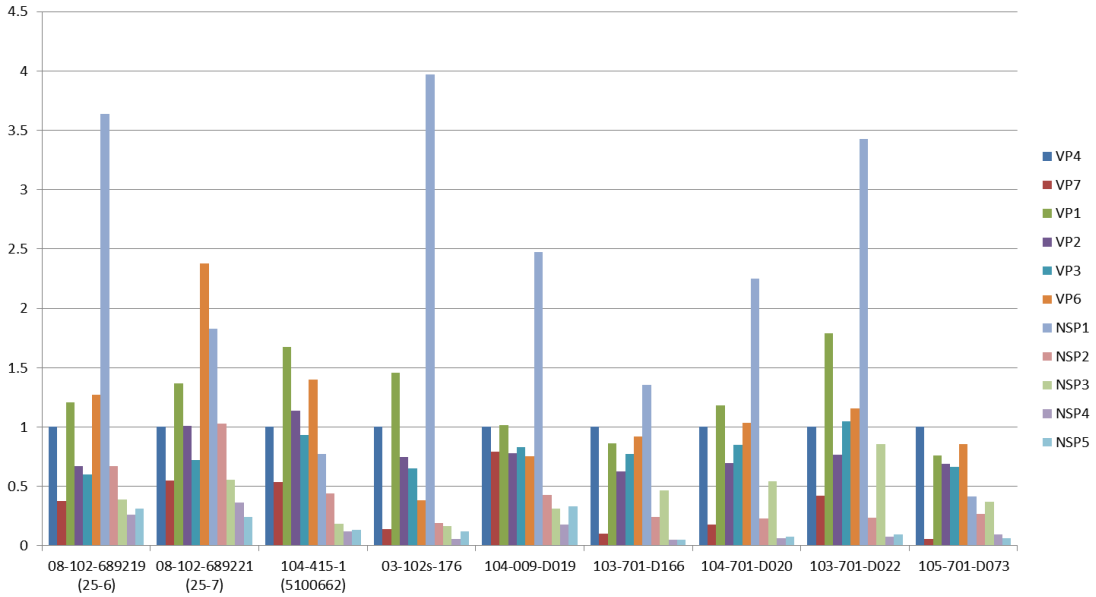
(A) Rotavirus NGS 定序數據結果

ID	Year	Genotype	Total reads	Reads after trim	Virus reads	Virus reads %	Total contigs
08-102-689219 (25-6)	2016	G3P8	9,098,814	8,626,655	68,970	0.80%	808
08-102-689221 (25-7)	2016	G3P8	9,076,352	8,325,929	1,509,566	18.13%	3,879
104-415-1 (5100662)	2016	G3P8	7,752,388	7,487,500	382,216	5.10%	2,596
03-102s-176	2013	G1P8	5,374,810	5,070,132	442,401	8.73%	5,303
104-009-D019	2015	G3P8	3,357,258	3,169,505	30,162	0.95%	5,287
103-701-D166	2014	G1P8	5,117,746	4,847,242	1,065,319	21.98%	2,779
104-701-D020	2015	G1P8	5,071,654	4,815,270	225,765	4.69%	7616
103-701-D022	2014	G3P8	4,721,442	4,434,419	775,822	17.50%	7,756
105-701-D073	2016	G3P8	4,045,230	3,831,008	2,415,443	63.05%	980
03-102s-014	2013	G1P8	3,852,222	3,743,092	3,710,137	99.12%	19
103-004-D173	2014	G1P8	3,547,046	3,411,095	377,635	11.07%	109
103-006-D025	2014	G3P8	3,437,286	3,295,855	252,217	7.65%	143
103-006-D086	2014	G3P8	3,578,556	3,452,985	4,049	0.12%	30
104-002-D024	2015	G1P8	3,470,936	3,310,238	271,107	8.19%	109
105-006-D161	2016	G3P8	3,669,146	3,512,165	30,437	0.87%	415
105-606-D014	2016	G3P8	3,759,618	3,624,830	3,331,811	91.92%	52

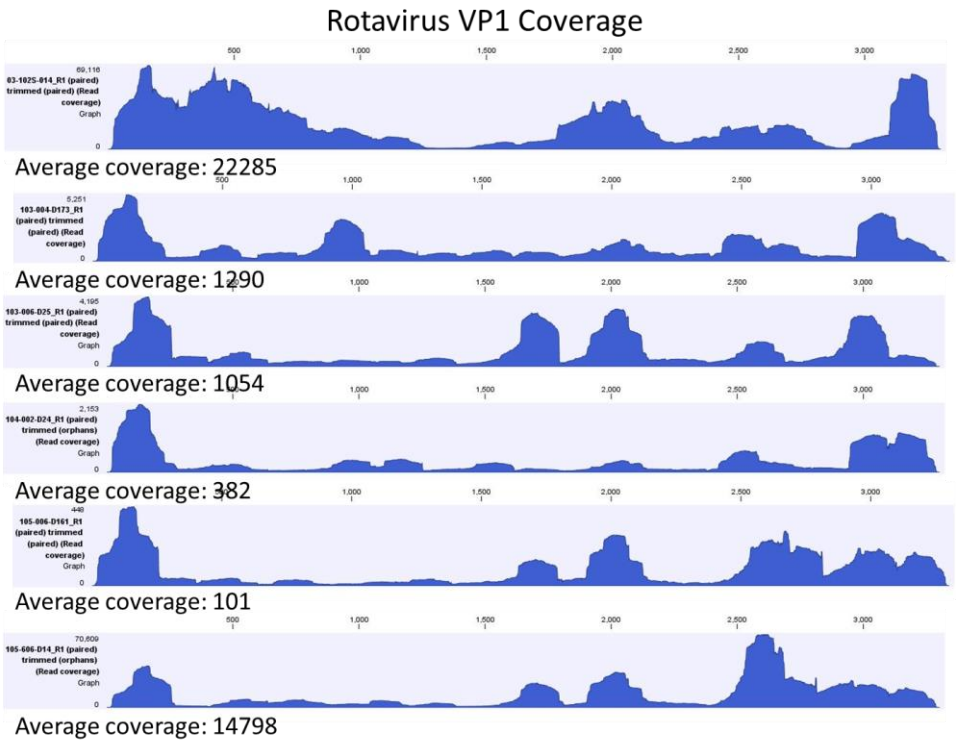
(B) Rotavirus 各片段 coverage 數據

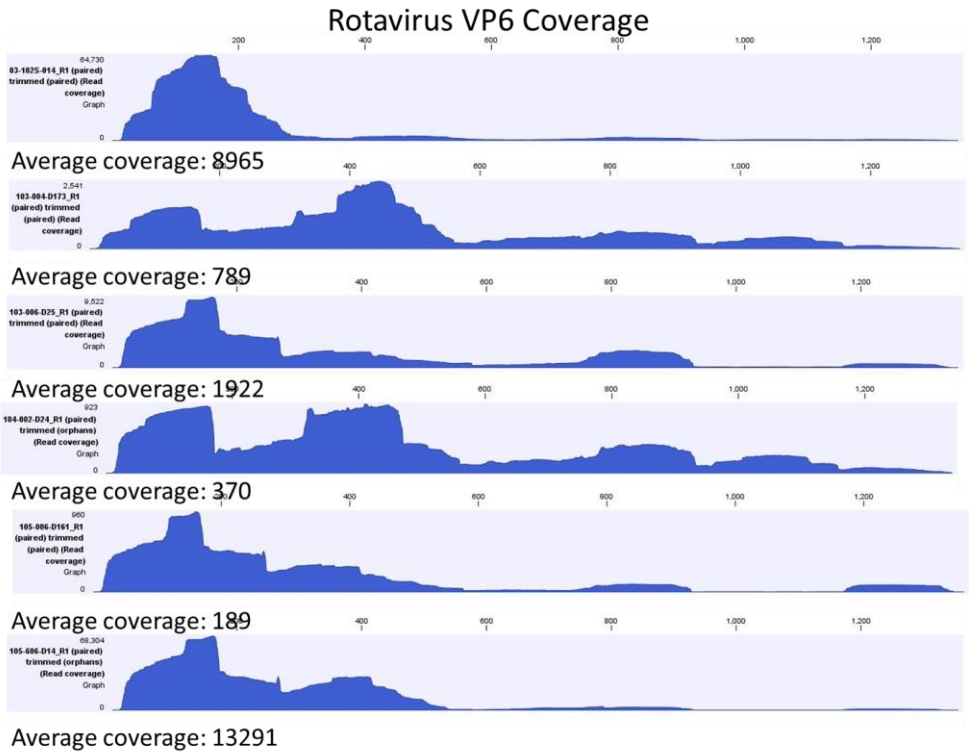
	Average Coverage										
ID	VP4	VP7	VP1	VP2	VP3	VP6	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5
08-102-689219(25-6)	388.83	337.22	356.71	227.45	217.84	907.07	2159.42	613.09	354.7	319.87	371.44
08-102-689221(25-7)	7761.15	10105.16	8097.52	7422.93	5493.83	34784.76	21935.71	20022.49	9992.58	8858.19	5798.94
104-415-1(5100662)	3952.18	4457.18	4791.53	3981.23	3357.13	9881.86	4513.99	3938.86	1614.64	1551.08	1578.86
03-102s-176	2750.28	843.56	2806.42	1800.92	1582.31	1804.69	16467.05	1146.94	1009.76	473.21	986.41
104-009-D019	187.62	302.37	139.33	129.78	142.82	256.71	708.11	173.7	131.46	102.56	183.37
103-701-D166	8883.77	1942.94	5460.49	5013.02	6322.19	14431.83	18847.22	4392.88	9544.53	1359.63	1123.2
104-701-D020	1505.46	557.36	1302.04	939.47	1183.61	2915.91	5279.98	848.38	1890.87	286	356.3
103-701-D022	3703.88	3407.3	5027.18	2646.86	3773.07	7850.3	20435.99	1986.9	7591.42	913.41	1066.71
105-701-D073	20736.93	24691.65	12323.18	14095.57	13927.11	35086.29	14115.9	13305.24	18886.26	7116.2	4233.54

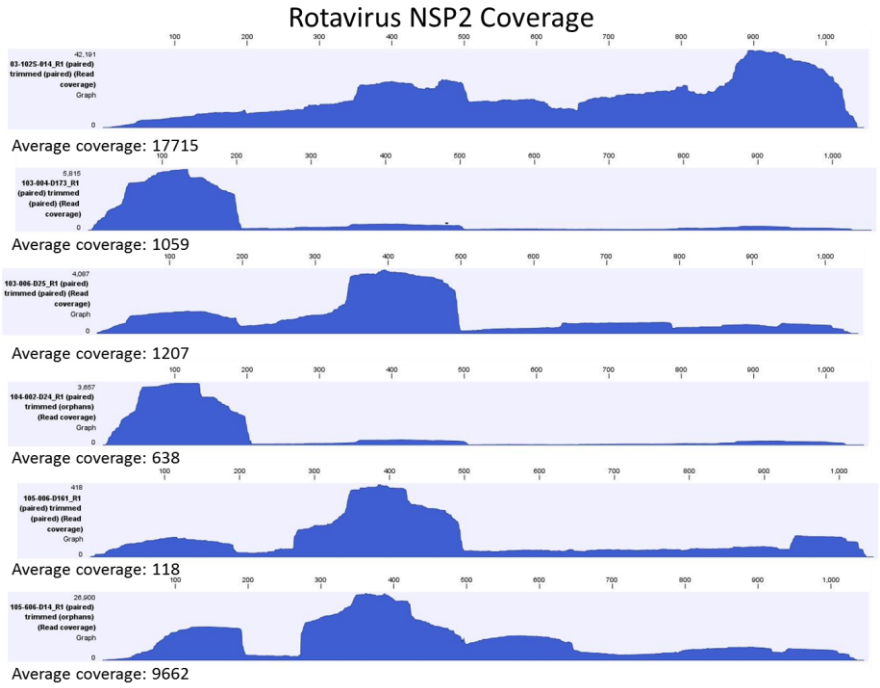
(C) Rotavirus 各片段之 reads 數與 VP4 reads 相對量



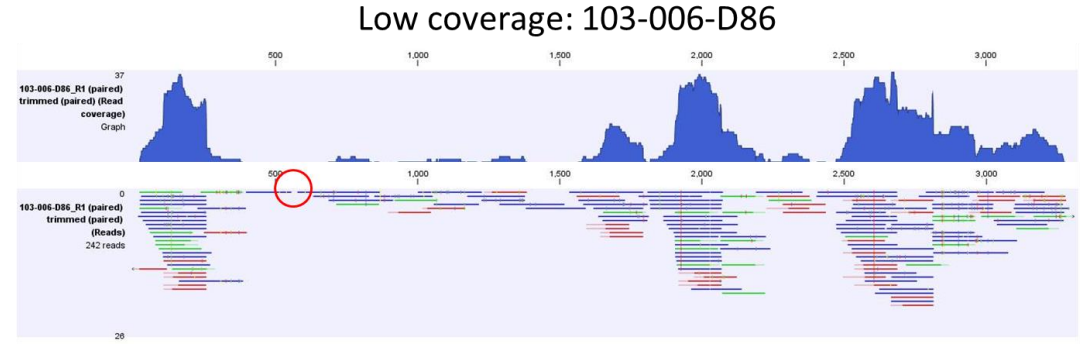
(D) Rotavirus VP1, VP6, NSP2 之 NGS 定序涵蓋圖



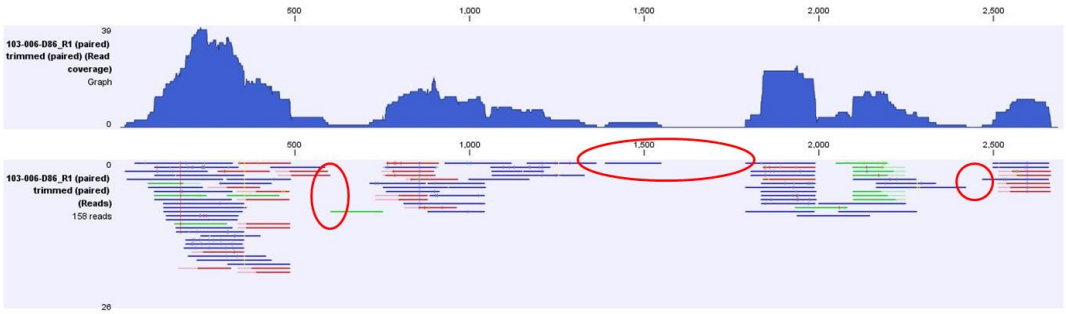




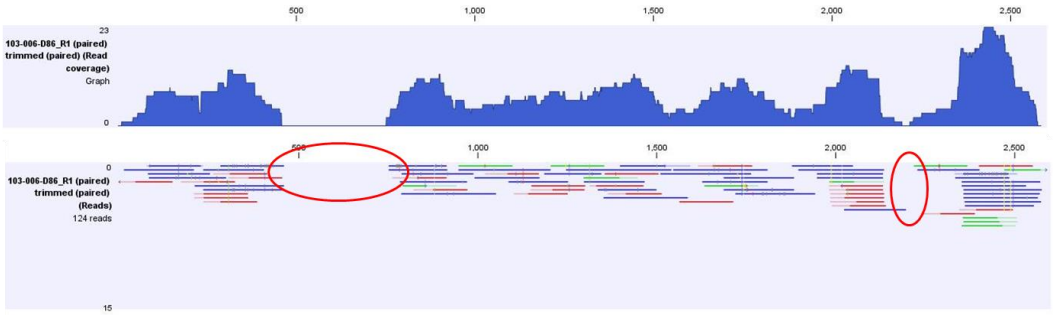
(E) Rotavirus 低涵蓋片段示意



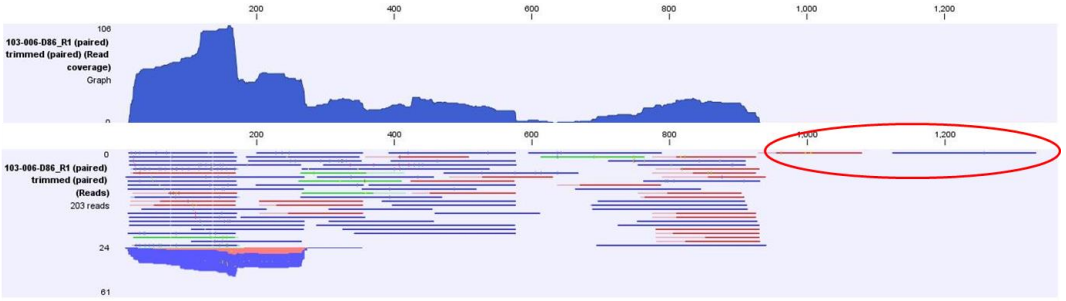
VP1 Average coverage: 10.88



VP2 Average coverage: 21.89



VP3 Average coverage: 7.58



VP6 Average coverage: 32.26

附件 6

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
106 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：建立高通量腹瀉性病毒全基因序列分析平台

主 持 人：吳芳姿

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-114715

1.計畫之新發現或新發明

1. 建立之次世代定序流程可成功從糞便檢體抽出之 RNA 組成完整輪狀病毒序列，並應用於未知病原體之特殊個案。
2. 利用此方法我們在特殊個案中原先以為由輪狀病毒感染造成的嚴重併發症，以次世代定序方法發現檢體中還存在其他的病原。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

由於 Astrovirus 感染以腹瀉症狀為主，感染盛行率不高，因此在監測與臨床檢驗上，多數不檢驗因此也不會發現亦不非常瞭解 Astrovirus 感染致病的程度與病程。本次特殊個案的次世代定序，讓我們了解在 encephalitis 個案檢體中是更有可能由 Astrovirus 所引起，雖然過去文獻發現這種型別 Astrovirus type 4 只會在免疫不全或低下患者造成中樞神經症狀，其他 Astrovirus 型別均有在免疫不全或骨髓移植兒童和成人造成腦炎和腦膜炎等個案(Vu et al. 2016)；因此，表示次世代定序是偵測新病原體或已知病原體造成前所未見疾病之利器。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

1. 建置的方法未來結合我國腹瀉病毒監測，可應用於群聚事件的追蹤溯源
2. 並於群聚案件調查時，以傳統檢驗方法無法找到真正感染源而無法有明確的結論，未來可應用次世代分析結果結合流行病學調查的資料，深入探討深入分析主要的感染原因與來源。