

計畫編號：DOH92-DC-1047

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

急性腸胃炎致病病毒性因子之探討

研究報告

執行機構：國立台灣大學醫學院

計畫主持人：李君男

研究人員：宋雅惠

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

** 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 **

目 錄

目錄	i
中文摘要	ii
英文摘要	iv
前言	1
材料及方法：	7
結果：	12
討論	16
結論與建議	19
參考文獻	21
圖、表	28

摘 要

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

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

2003 年在台北及高雄地區急性腸胃炎之糞便檢體中分別有 14.7% 及 17.8% 為輪狀病毒陽性，輪狀病毒的感染沒有明顯的季節性，在氣溫較低的月份稍多；超過六成是在 2 歲以內的感染，5 歲以上小孩所佔比例小於 10%。

在 2002 年急性腸胃炎之糞便檢體中約有 5% 為杯狀病毒陽性，七成來自三歲以下的小孩，杯狀病毒的感染無明顯的季節分佈之差異。杯狀病毒中包含了 NLV 及 SLV，NLV 稍多。NLV 中有的屬於第一基因群，亦有屬於第二基因群，亦有的與二基因群有明顯的差異。SLV 主要分為兩群，分別與參考病毒株 Hou7 及 Lyon 較接近。

G9 輪狀病毒在 2003 年在台北地區所造成的感染約佔了二成，在高雄則都超過了四成。各種 G 血清型在不同地區所佔的角色不盡相同，兩地區均有 G1、G2 與 G3 病毒的存在。

由分析輪狀病毒的 G 血清型與 P 基因型，發現少數的病毒其 G 血清型與 P 基因型的組合屬於較不尋常的組合型式，或是電泳型呈現例外的型式。這

些可能是經由基因重組而形成的，必須注意後續的發展，觀察它們是否會造成流行。由種系分析 G9 輪狀病毒之 VP7 基因及 NSP4 基因，發現台灣近來出現的 G9 輪狀病毒應該是新形成的基因重組株。

我們應加強急性腸胃炎之致病病毒性因子的探討，以了解各種病毒之重要性，以及每年是否有變化，以做為未來疫苗採用及發展之依據。

關鍵詞：急性腸胃炎、輪狀病毒、腸腺病毒、星狀病毒、分子流行病學

ABSTRACT

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

Fecal samples were collected from clinical laboratories distributed in different parts of Taiwan. Rotaviruses were detected by ELISA. The samples detected as rotavirus positive were further analyzed the G and P genotypes by RT-PCR, and the electropherotypes by RNA polyacrylamide gel electrophoresis. The VP7, VP4, and NSP4 genes of G9 rotaviruses were sequenced and analyzed phylogenetically.

In the fecal samples from the patients with acute gastroenteritis, the positive detection rates in Taipei and Kaoshiung for rotavirus were 14.7% and 17.8%, respectively.

Caliciviruses were detected by RT-PCR. About 5% of the rotavirus-negative samples from 2002 were detected as calivirus positive. About 70% of these calicivirus positive samples were collected from children under age 3. The calicivirus positive samples did not show distinct seasonal distribution. By sequence and phylogenetic analyses, these caliciviruses could be classified as Norwalk-like virus (NLV, Norovirus) and Saporo-like virus (SLV, Sapovirus). The number of NLV-positive samples was more than that of SLV-positive samples. In the NLV samples, majority belonged to genogroup II, one belonged to genogroup I, and 5 were distantly related. SLV strains could be differentiated as two groups, similar to reference strains, Hou7 and Lyon, respectively.

The rotavirus infections in 2003 did not show distinct seasonal distribution, though more cases were found in the cooler months. Calicivirus infections did not show seasonal distribution in 2002. More than 60% of the rotavirus infections were from children under the age of two, 10% were from the age group older than 5.

G9 rotavirus contributed about 20% of the rotavirus infection in Taipei, over 40% of the infection in Kaoshiung. G1, G2, and G3 rotaviruses were detected in these regions.

Analysis of the G and P genotypes, and RNA electropherotypes of rotavirus samples showed that some rotaviruses had unusual combinations of G and P types or incompatible RNA electropherotypes. These rotaviruses could have been formed from genetic reassortment. We must pay attention to their contribution in rotavirus epidemics in the future. Phylogenetic analysis of VP7 and NSP4 genes showed that the major prevalent G9 rotavirus strain was a newly emerged reassortant.

We need to keep the study of the virological agents related to acute gastroenteritis for understanding the role of each viral agent and the changes from year to year. These information will be important for future selection or development of vaccine for our needs.

Keywords: Acute gastroenteritis, rotavirus, enteric adenovirus, astrovirus, molecular epidemiology

前 言

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

輪狀病毒屬於呼腸孤病毒科(Reoviridae)之一員，病毒粒子內含有十一個雙鏈核糖核酸(dsRNA)基因片段，外由蛋白質膜包圍著(4)。輪狀病毒的外蛋白質層(Outer capsid)主要含有 VP7 及少量的 VP4，VP7 和 VP4 均分別和輪狀病毒的中和抗體之產生有關(5-7)，一般所謂的血清型(serotype)特異性即是由此兩種蛋白質決定(8,9)，由 VP7 決定者稱為 G 血清型，取其為 Glycoprotein 之意(4)。VP7 在大多數的輪狀病毒是由第 9 個基因片段生成，少數由第七或第八個基因片段而來(10,11)。由 VP4 所決定之血清型稱為 P 血清型，取其為 Protease-sensitive 之意，VP4 是由第四個基因片段所生成(4,10)。已知之 G 血清型有十四種之多，人類輪狀病毒的 G 血清型主要有四種，G1-G4，各型在不同地區之重要性不盡相同(12-17)，另外四種血清型，G8、G9、G10 及 G12 較少見(18-20)。但 G9 病毒已在歐洲、亞洲、非洲、南北美洲、澳洲等地區爆發流行(21-33)，美國 CDC 根據他們的研究預測此型病毒將在世界各地造成流行，目前已是五個重要人類輪狀病毒之一(26)。P 血清型之鑑定較困難，單源抗體不完整，目前多

以基因分析之方式進行分型，至少可分成 19 種基因型(34)。G 與 P 血清型兩者多以一定之組合存在，少數異常之組合亦時有報導。

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

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

小孩及嬰兒的急性腸胃炎常是由輪狀病毒引起的(2,39,40)，在國外的報告中指出在小孩三歲以前，超過百分之八十感染過此病毒(41,42)，通常之症狀是嚴重的下痢、發高燒、嘔吐及伴有脫水現象，重者必須住院，甚至導致死亡(6)，近年來更有報導指出輪狀病毒可

能會引致神經性之症狀(7,43-46) ,常需住院治療,故輪狀病毒感染影響民生及經濟甚鉅,先進國家積極發展疫苗,期有效控制急性腸胃炎之發生。

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

本實驗室為瞭解台灣地區流行的輪狀病毒,曾分析部分輪狀病毒之VP7基因核酸序列而得以瞭解這些病毒與美國或日本流行之輪狀病毒之關係遠近。近亦曾針對1993年流行之G2輪狀病毒,以RNA雜交法比較其與過去流行之輪狀病毒或國外流行之病毒之間的遺傳相關性,發現1993年流行之G2輪狀病毒有三個基因片段(一、六、

七)與之前流行之 G2 病毒有顯著之差異,經分析核心蛋白質 VP1 基因之部分序列而確定此病毒應是經由基因重組而來(50)。產生基因重組的另一株 parent 病毒,不明其來源,是否可能來自動物之病毒仍不清楚。

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

杯狀病毒屬於杯狀病毒科(Caliciviridae),不具外套膜,基因體由單股正向的 RNA 所組成,與小 RNA 病毒(Picornaviruses)在基因上有相關性(51)。包括四個病毒屬,即 Norwalk-like viruses, Sapporo-like viruses, Vestivirus,與 Lagovirus(57,58),人類杯狀病毒主要與前二屬有關(51)。杯狀病毒的抗原性與遺傳性之差異很大(51,59),在 1970 年代與 1980 年代是由電子顯微鏡觀察而發現,在 1990 年 Norwalk virus

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

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

星狀病毒屬於星狀病毒科(Astroviridae)，不具外套膜，基因體由單股正向的 RNA 所組成。此病毒是在 1975 年由電子顯微鏡觀察小兒

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

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

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

材 料 及 方 法

收集檢體與資料：檢體將由台大醫院、高雄大學附設醫院等醫院檢驗科提供。

檢測星狀病毒及腸腺病毒：均使用 ELISA 原理之檢測試劑組，星狀病毒採用的是 DAKO 公司的 Amplified IDEIA™ Astrovirus，腸腺病毒採用的是 Meridian Diagnostic 公司出產的 Premier Adenoclone®-Type 40/41。

檢測杯狀病毒

-- 反轉錄反應

取 5 μ l 經 QIAamp viral RNA mini kit 純化的 RNA 與 25 μ M 均勻混合，覆以礦物油，在 97 $^{\circ}$ C 加熱變性 10 分鐘，置於冰上冷卻 5 分鐘 1 \times Super RT reaction buffer (25mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, MgCl₂, 2mM DTT, HT Biotechnology), 0.2mM dNTP, 5.25 U Super RT (HT Biotechnology), 20U human placental ribonuclease inhibitor (HT Biotechnology), 置於聚合酶連鎖反應器中(Perkin Elmer, DNA Thermal cycler 480), 反應條件為 42 $^{\circ}$ C 90 分鐘, 72 $^{\circ}$ C 10 分鐘, 產物置於-20 $^{\circ}$ C 保存。

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

以反轉錄反應所得之 cDNA 為模板使用針對 Calicivirus 的 ORF1 上的 RNA polymerase 所設計的引子 p290-1、p289-1, 利用核酸聚合酶增幅這段基因。反應總體積為 50 μ l, 包含 5 μ l cDNA, 10 \times Taq polymerase reaction buffer, 0.2 mM dNTP, 各 7.5 pmole 之 p290-1、p289-1 引子, 1U Taq DNA polymerase, 反應物混合均勻後覆以礦物油, 置於聚合酶連鎖反應器中(Perkin Elmer, DNA Thermal cycler 480), 反應條件為 94 $^{\circ}$ C 3 分鐘變性, 94

30 秒，49 1 分 20 秒，72 1 分鐘，重複 40 次，72 10 分鐘，最後保持在 4 。

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

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

淬取輪狀病毒 RNA

取 1 ml 含有輪狀病毒之培養液加入 35%(w/v)的硫酸銨混合均勻使其完全溶解後，使用 10000 g 於 4 離心 30 分鐘，倒掉上清液，加入 200 μ l TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA)，再加入淬取溶液(0.02 M Tris-HCl pH 7.4，0.15 M NaCl，0.01 M MgCl₂，1% SDS，2%(w/v) Ficoll)混合後，再以酚-氯仿淬取 2-3 次，上層液可做為 RNA 電泳用。做 RT-PCR 之 RNA 50 μ l 加 15 mg CF11 以去除 inhibitor(61)，並加入 2.5 μ l 5 M NaCl，9.25 μ l 100% EtOH，振盪 10 秒後，於 4 旋轉混合 90 分鐘，接著離心，以含 EtOH 之 STE 清洗三次，再以 STE 將 RNA 游離出來，經 EtOH 沈澱後，加入 25 μ l TE。

電泳

取適量淬取好的 RNA 溶液加入追蹤染料(5X tracking dye: 0.1% bromophenol blue, 50% glycerol, 75 mM EDTA)，小心注入含 4% 積聚凝膠 (stacking gel)(4% Acrylamide, [Acrylamide: Bis= 37.5:1], 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 7.5 mM EDTA, 0.1% TEMED, 0.2% Ammonium persulfate) 和 10% 分離凝膠 (Separating gel)(10% acrylamide, [acrylamide: bis=37.5: 1], 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 7.5 mM EDTA, 0.05% TEMED, 0.125% Ammonium persulfate)的每一齒槽內，電泳槽內倒入電泳緩衝液(50 mM Tris-HCl, 0.384 M Glycine, 1 mM EDTA)，將整個電泳槽裝置架設妥當後，使用 EC570 的電源供應器，固定所使用的電流，若是只跑一片凝膠，則可設定為 32 mA 5 小時，跑兩片

凝膠則設定為 65 mA 5 小時。

銀染色法

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

-- 輪狀病毒之分離與培養:

由糞便檢體中分離病毒糞便檢體以 PBS 稀釋成 10% 的濃度，取 1.5 ml 的稀釋液用低速離心 2000 g 20 分鐘以去除雜質，上清液以 0.22 μm 的無菌濾膜過濾後，加入等量體積的 10 $\mu\text{g/ml}$ 胰蛋白酶(trypsin)在 37°C 作用 30 分鐘以活化病毒。之後取 1ml 接種於玻璃管的細胞，每一糞便檢體共接種二管的細胞(MA104 或 CaCo-2)，於 37°C 吸附 1 小時後，移除未吸附的病毒，加入 1 ml 含有 0.5 $\mu\text{g/ml}$ trypsin 的 maintenance medium(並含有 100 mM HEPES)置於旋轉培養架(Bellco roller drum)上，在 37°C 旋轉培養 3~7 天，每天觀察細胞的變化。1 個星期後，將玻璃管內的細胞進行冰凍解凍三次，收集病毒的培養液，並紀錄為第一代的病毒。欲做病毒的繼代培養時，同樣須先將冰凍解凍三次過後的第一代病毒培養液加入等量體積的 10 $\mu\text{g/ml}$ 胰蛋白酶，於 37°C 作用 30 分鐘後才接種於細胞。腺病毒利用 293 細胞培養，不需胰蛋白酶的處理。待病毒繼代培養至第四代以後，若開始有明顯的細胞病變出現時，可用 Latex agglutination 的方法或酵素免疫試驗來快速偵測病毒的存在。

-- 以 RT/PCR 鑑定輪狀病毒 G 血清型與 P 基因型:

此方法十分敏感，特異性亦高。惟必須注意污染的問題，除了操作上必須特別小心外，試劑必須少量分裝，反應前後必須在不同的地方操作，每次反應必須同時做弱陽性檢體及陰性對照組。此方法分兩次增幅反應:第一次增幅反應包括用反轉錄酶及 DNA 聚合酶。將淬取好之輪狀病毒 dsRNA 加入 reaction buffer 內含 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 40 mM KCl, MgCl₂, 200 mM 四種 dNTPs, 5 mM dithiothreitol, 3.5 % dimethyl sulfoxide, RNase inhibitor (5 units), 100 pmole 兩種 primers。此混合物 97 加熱 5 min.後，馬上置於冰上，加入 10 units of avian reverse transcriptase and 2.5 units of Taq enzyme, 再加上一滴 mineral oil。利用聚合酶連鎖反應器，設定 42 一小時，接下來 25 cycles: 94 1 min, 42 1 min, 72 2 min, 最後 72 10 min。第一次增幅反應產物是整個 VP7, 基因長度 1062bp。第二次增幅反應與第一次反應略同，用 1 ul 第一次反應產物，加入 G1-G4、G8、G9 血清型特異性之 primers 混合在一起(48)。聚合酶連鎖反應器設定 25 cycles: 94 40 sec, 42 1min, 72 2 min, 最後亦是 72 10 min。PCR 反應產物取 10 ul 在 1.2 % agarose gel 上跑電泳，經 EtBr 染色，以紫外線照射，如見 749 bp 的 band 即知是 G1 血清型，由大小之不同而得知是何種 G 血清型。

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

核酸序列測定

欲利用螢光自動分析儀(ABI-373A-18 DNA sequencer)分析核酸的序列，首先以 ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Core

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

純化核酸定序反應之產物

為移除核酸定序反應完成後產物內多餘的 dye terminators 和 primer , 將核酸定序反應產物的礦物油移除後加入 2 μ l 3M sodium acetate, pH 4.6,和 50 μ l 95% ethanol, 混合均勻並置於冰上 10 分鐘 , 之後 14000 rpm 離心 15~30 分鐘 , 小心吸除上清液 , 並以 70% ethanol 清洗沈澱物 , 真空乾燥後的 DNA 沈澱物可保存於-20°C , 待上機前才將之溶於 3 μ l loading buffer 中(deionized formamide: 25 mM EDTA, pH 8.0=5:1)。已溶於 loading buffer 之核酸定序反應產物 , 先經 94° C 加熱 2 分鐘 , 然後馬上置於冰上 , 依序注入膠片的齒槽後 , 固定電流 25 mA 跑 8 小時 , 電腦將自動收集結果並自動分析出核酸序列。

病毒基因之分析比較

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

分析方法

各病毒在不同月份盛行之狀況，以 EXCEL 即可進行簡單的統計分析，分析各病毒之間、各不同地區之間、年齡層之間、或是性別之間等，檢出率之差異是否有統計學上的意義，血清型與疾病的嚴重程度是否有相關，將以 chi-square test

(²) 進行單變項分析， $p < 0.01$ 則具統計學上之意義。

結 果

輪狀病毒於台灣不同地區檢出之狀況

由 2003 年急性腸胃炎之病人採得之糞便檢體經檢測輪狀病毒陽性者，在台北及高雄區分別佔了 14.7% 及 17.8% (表一)。高雄地區與台北地區之間輪狀病毒陽性率之差異以 χ^2 計算程式算出 P 值均 >0.1 。

分析輪狀病毒陽性檢體於不同月份分佈之狀況，圖一顯示台大醫院在二月、三月及十月每月有超過 20 個檢體輪狀病毒被檢出。高雄醫學大學附設醫院在四月較多。

在輪狀病毒陽性之檢體中，男性所佔的比例為 61.3-62.0%，女性則為 38.0-38.6% (表二)。而在男性檢體中，輪狀病毒檢出率於不同地區為 15.2-18.5%，女性檢體中，輪狀病毒檢出率則為 13.8-16.0% (表三)。男女之間檢出率之差異以 χ^2 計算程式算出 P 值均 >0.1 。

輪狀病毒陽性之檢體中，在不同年齡層分佈之狀況，以 0-1 歲之間年齡層所佔比例最高，44.0-54.0% (表四、圖二)，5 歲以上佔了 0-9.5%。

輪狀病毒之血清型與基因型分析

以 Multiplex RT-PCR 的方法分析輪狀病毒 G 血清型，進而分析各種 G 血清型於台北及高雄地區分佈之狀況。台北地區 G1 佔了 35.8%，G2 佔了 14.2%，G3 佔了 28.3%，G9 佔了 20.8%；高雄地區 G1 佔了 30.7%，G2 佔

了 5.1% , G3 佔了 15.4% , G9 佔了 46.1% (表五、圖三)。在少數檢體中同時偵測到兩種或以上 G 血清型輪狀病毒。

另以 Multiplex RT-PCR 的方法分析輪狀病毒 P 基因型,發現多半的病毒之 G 血清型與 P 基因型的組合都屬於正常的型式,如 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]等,但亦可見一些較不尋常的組合格式,如 G1P[4]、G4P[4]、G9P[4]、G2P[8]等。此外,在 RNA 電泳型分析中,多數呈現正常的電泳型,除了 G2 病毒屬於短的電泳型,其他 G 血清型之病毒屬於長的電泳型;G4P[4] 病毒為短的電泳型, G2P[8]及少數 G2P[4]為長的電泳型。

輪狀病毒之 VP7 基因、VP4 基因及 NSP4 基因分析

G9 輪狀病毒自從 2000 年 3 月開始持續造成流行,為瞭解此病毒之來源,分析 VP7、VP4 與 NSP4 基因的核酸序列,與國外的病毒比較,進行種系分析。所採用的 G9 病毒檢體,包括不同年代的各種電泳型共 54 個檢體,如果將全部 54 個 G9 病毒株的分析結果呈現,種系分析圖很龐大,不過因為有些病毒株彼此之間極為相似,於是挑了 8 個病毒株,使結果的呈現較簡化且具代表性,此 8 個病毒株為 00TW0473、01TW0591、01TW1288、01TW1640、02TW0498、02TW0543、02TW0569、02TW1532。

由 VP7 基因之種系分析(圖四)顯示台灣的 G9 輪狀病毒株聚集在同一個分支,與之前流行於日本、巴西、美國、馬拉威、孟加拉、印度的病毒

株較靠近，但是與 80 年代的 G9 原生型病毒株 (WI61、F45、116E) 分屬不同群。

種系分析 G9 輪狀病毒之 VP4 基因 (圖五)，發現台灣 G9P[8]病毒與英國 G9P[8]病毒株 892-97 (1997)及本地的 G1P[8] (94TW1266)、G3P[8] (00TW0668, 00TW0964) 病毒株非常相似，雖然亦與國外早期的 G9P[8]病毒 F45、WI61 聚集在一起，但是距離較遠。台灣 G9P[4]病毒與其他 P[4]標準病毒株 DS-1、E210 及本地 1998 到 2000 年之 G2P[4]聚集在一起。

另分析 G9 輪狀病毒之 NSP4 基因，與台灣及國外的各種 G 血清型病毒比較，進行種系分析。由 NSP4 基因之種系分析 (圖六) 顯示台灣的 G9 輪狀病毒中只有 02TW0569 與屬於 NSP4 A 基因型的病毒聚集在一起，其中與美國 (如 US1205)、馬拉威 (如 MW69) 等 G9 病毒及本地 1998 到 2000 年之 G2 病毒很相似。其他的 G9 輪狀病毒如 00TW0473、01TW0591、01TW1288、01TW1640、02TW0498、02TW0543、02TW1532 與屬於 NSP4 B 基因型的病毒聚集在一起，除了 00TW0473 以外的其他台灣 G9 病毒與本地的 G1 輪狀病毒、2000 年的 G3 輪狀病毒十分相近。而 00TW0473 與本地的 G4 病毒相似。

杯狀病毒於台北地區檢出之狀況

由 2002 年急性腸胃炎病人採得之糞便檢體，確定為輪狀病毒陰性檢體

經 RT-PCR 檢測為杯狀病毒陽性者，佔了 5.01%（表六）。再以核酸序列分析並利用種系演化分析進行杯狀病毒分型，顯示 NLV 與 SLV 在杯狀病毒陽性檢體中分別佔 2.23%和 2.78%。

分析杯狀病毒陽性檢體於各月份分佈之狀況（圖七），顯示台大醫院在一月、二月、六月及八月杯狀病毒稍多，每月被檢出之檢體超過 5 個。

杯狀病毒陽性檢體中，在不同年齡層分佈狀況，以 1-2 歲之間年齡層所佔比例最高，35.6%，其中 NLV 與 SLV 分別佔 22.2%和 13.3%（表七、圖八），5 歲以上佔了 13.3%。

討 論

收集 2003 年由急性腸胃炎之病人採得之糞便檢體，經檢測輪狀病毒，在台北地區及高雄地區分別測得之陽性率為 14.7% 及 17.8%。兩地之間陽性率尚稱接近。

由分析輪狀病毒陽性檢體於不同月份分佈之狀況，顯示今年在氣溫較低的月份有較多的輪狀病毒感染，在較熱的月份如六月至八月也有少數的輪狀病毒感染。

輪狀病毒陽性個案男女所佔之比例，2003 年與 2002 年相似，仍維持約男三女二之比例。至於男女之間在輪狀病毒檢出率方面並無顯著的差異；台北地區與高雄地區皆是如此。

2003 年中的輪狀病毒感染，2 歲以內的感染約在六成至七成之間，5 歲以上的感染在台北地區 2002 年佔了 33.3%，2003 年則降至 9.5%。此可能與 2002 年 G9 輪狀病毒感染較多之故，G9 輪狀病毒對大多數的人來說體內的免疫抵抗力不足，造成 5 歲以上的孩童感染人數增加，2003 年 G9 輪狀病毒感染者下降，因而 5 歲以上的孩童感染之比例回復正常。

G9 輪狀病毒首先於 2000 年出現，次年 5 月開始明顯的增多，進而造成大規模的流行，2002 年 G9 輪狀病毒在台北地區所造成的感染佔了六成之多，2003 年則已降至約二成，顯示 G9 輪狀病毒在台北地區感染之高峰期

已過。G9 輪狀病毒在高雄地區 2002 年所造成的感染佔了 44%，2003 年仍然高達 46%。台北及高雄地區各種 G 血清型所佔的角色不盡相同，2003 年除了 G9 病毒外，兩地區均有 G1、G2 與 G3 病毒的存在，並未見 G4 病毒。台北地區在 2003 年的上半年以 G3 與 G9 病毒較多，下半年以 G1 病毒較多。高雄地區在 2003 年的上半年以 G1、G3 與 G9 病毒較多，下半年以 G1 與 G9 病毒較多。當一個地區同時流行兩種或以上的輪狀病毒時，混合感染的狀況是可能發生的，在此二地區均於少數的檢體中發現可能存在著二至三種 G 血清型的病毒，但此結果仍需進一步確認。

由種系分析 G9 輪狀病毒之 VP7 基因，發現台灣 2000 年至 2002 年出現的 G9 輪狀病毒皆十分相近，與美國、印度、馬拉威、巴西、班格拉德斯等國家流行的 G9 病毒很相似。但一個 1982 年在台北發現的 G9 病毒卻與這些近數年來出現的病毒明顯的不同。

但在種系分析 NSP4 基因時發現，台灣的 G9 輪狀病毒（B2 型的 NSP4 基因）多半與美國、馬拉威、班格拉德斯等之 G9 病毒（A4 型的 NSP4 基因）明顯不同，卻與台灣一株 1978 年出現的 G1 輪狀病毒及 2000 年出現的 G3 輪狀病毒十分相近。

由於台灣 G9 輪狀病毒的 NSP4 基因與台灣其他 G 血清型的病毒相似，顯示此 NSP4 基因可能來自其他 G 血清型的輪狀病毒，推測這應該是經由

基因重組而產生的。至於 G9 輪狀病毒可能是何時進入台灣的，由於台灣在 1998 年有一個 G2 病毒帶有 A4 型的 NSP4 基因，因之判斷有可能 G9 輪狀病毒在 1998 年之前就已進入台灣了。

2002 年由臺大醫院急性腸胃炎之病人採得之糞便檢體，經檢測輪狀病毒陰性者，其中杯狀病毒陽性所佔比例並不高，約為 5%。杯狀病毒在各月份均有檢出，並無明顯的季節性。杯狀病毒陽性檢體，超過五成來自 2 歲以下的小孩，或者說七成來自三歲以下的小孩，5 歲以上小孩佔了 13%。此顯示杯狀病毒應是一種普遍存在的病毒。

經核酸序列及種系分析顯示杯狀病毒中包含了 NLV 及 SLV，NLV 稍多。不論是 NLV 或 SLV 均有明顯的變異性，在 25 個 NLV 中，有 19 個屬於第一基因群，1 個屬於第二基因群，另有 5 個與兩個基因群有明顯的差異。18 個 SLV 主要分為兩群，一群與參考病毒株 Hou7 較接近，另一群與參考病毒株 Lyon 較接近，有一個 SLV 與參考病毒株 Manchester 較為接近。

結 論 與 建 議

本年度的計畫因經費嚴重不足，無法進行星狀病毒及腸腺病毒之檢測，去年在高雄地區星狀病毒的陽性率偏高，可惜無法繼續研究是否因院內感染而造成。輪狀病毒之研究仍持續進行。去年收集的檢體，因人力及經費有限而無法檢測杯狀病毒，故今先將此部份完成，得以了解杯狀病毒流行的狀況。

經檢測在輪狀病毒陰性之檢體中，杯狀病毒陽性所佔比例並不高，約為 5%。杯狀病毒在各月份均有檢出，並無明顯的季節性。陽性檢體七成來自三歲以下的小孩，顯示杯狀病毒應是一種普遍存在的病毒。經核酸序列及種系分析顯示其中包含了 NLV 及 SLV，NLV 稍多。不論是 NLV 或 SLV 均有明顯的變異性，NLV 中有的屬於第一基因群，亦有屬於第二基因群，亦有的與二基因群有明顯的差異。SLV 主要分為兩群，分別與參考病毒株 Hou7 及 Lyon 較接近。

與 2002 年相似，2003 年輪狀病毒在氣溫較低的月份有較多的輪狀病毒感染，在較熱的月份如六月至八月也仍然有輪狀病毒的感染。2003 年中的輪狀病毒感染，超過六成是在 2 歲以內的感染，5 歲以上小孩所佔比例小於 10%。

G9 輪狀病毒在 2003 年在台北地區所造成的感染已降至約二成，在高雄

則仍維持約四成。不同地區各種 G 血清型所佔的角色不盡相同，除了 G9 病毒外，兩地區均有 G1、G2 及 G3 病毒的存在。

由分析輪狀病毒的 G 血清型與 P 基因型，發現少數的病毒其 G 血清型與 P 基因型的組合屬於較不尋常的組合型式，或是電泳型呈現例外的型式。這些可能是經由基因重組而形成的，必須注意後續的發展，觀察它們是否會造成流行。RNA 電泳型分析除了由電泳型的長短或其型式，可了解流行病毒的變化，亦可幫助發現特殊的病毒。2003 年有三個檢體含有 C 群輪狀病毒，有趣的是一般輪狀病毒檢驗試劑僅能檢出 A 群輪狀病毒，為何此三個 C 群輪狀病毒會被檢出，值得研究。後續並應研究 C 群輪狀病毒是否存在於輪狀病毒陰性檢體之中。

由種系分析 G9 輪狀病毒之 VP7 基因及 NSP4 基因，發現台灣近來出現的 G9 輪狀病毒應該是經由基因重組而產生的。至於 G9 輪狀病毒可能是何時進入台灣的，判斷有可能在 1998 年之前就已進入台灣了。

我們應加強急性腸胃炎之致病病毒性因子的探討，以了解各種病毒之重要性，以及每年是否有變化，以做為未來疫苗採用及發展之依據。

參 考 文 獻

1. Kapikian, A. Z., and R. M. Chanock. 1996. Rotaviruses, pp. 1657-1708. In B.N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope (ed.), *Fields Virology*. 3rd ed., Raven Press, New York.
2. Bishop, R. F., G. P. Davidson, I. H. Holmes, and B. J. Ruck. 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 2:1281-1283.
3. Flewett, T. H., A. Bryden, and H. Davies, 1973. Viral particles in gastroenteritis. *Lancet* 2:1497.
4. Estes, M. K., and J. Cohen. 1996. Rotaviruses and their replication. pp. 1625-1655. In B. N. Fields, D. N. Knipe, R. M. Chanock, J. L. Melnick, B. Roizman, and R. E. Shope(ed.), *Virology*. Raven Press, New York.
5. Andrew, M. E., D. B. Boyle, B. E. Coupar, P. L. Whitfeld, G. W. Both, and A. R. Bellamy. 1987. Vaccinia virus recombinants expressing the SA11 rotavirus VP7 glycoprotein gene induce serotype-specific neutralizing antibodies. *J. Virol.* 61:1054-1060.
6. Flewett, T. H. 1982. Clinical features of rotavirus infections. In *Virus Infections of the Gastrointestinal Tract*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel.
7. Lin, S. C., H. Y. Hsu, P. J. Wang, C. N. Lee, M. H. Chang, Y. Z. Shen, and S. M. Wang. 1996. Rotavirus gastroenteritis associated with afebrile seizure in childhood. *Acta Paed. Sin.* 37:204-207.
8. Hoshino, Y., M. M. Sereno, K. Midthun, J. Flores A. Z. Kapikian, R. M. Chanock. 1985. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci* 82:8701-8704.
9. Matsui, S., E. R. Mackow, and H. B. Greenberg. 1989. The molecular determinants of rotavirus neutralization and protection. *Adv. Virus Res.* 36:181-214.
10. Estes, M. K., E. L. Palmer, and J. F. Obijeski. 1983. Rotaviruses: a review. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 105:123-184.
11. Holmes, I. H. 1988. Reoviridae: the rotaviruses. p. 384-413. In E. H. Lennette, P. Halonen, and F. A. Murphy (ed.). *Laboratory diagnosis-principles and practice. Viral, rickettsial and chlamydial diseases.* vol. 2. Springer Verlag. New York.
12. Bogue, R. O., P. H. Dennehy, J. Huang, and P. Martin. 1992. Serotype

- variation of group A rotaviruses over nine winter epidemics in Southeastern New England. *J. Clin. Microbiol.* 30:1592-1594.
13. Bern, C., L. Unicomb, J. R. Gentsch, N. Banul, M. Yunus, R. B. Sack, and R. I. Class. 1992. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 30:3234-3238.
 14. Masendycz, P. J., L. E. Unicomb, C. D. Kirkwood, and R. F. Bishop. 1994. Rotavirus serotypes causing severe acute diarrhea in young children in six Australian cities, 1989 to 1992. *J. Clin. Microbiol.* 32:2315-2317.
 15. Matson, D. O., M. K. Estes, J. W. Burns, H. B. Greenberg, K. Taniguchi, and S. Urasawa. 1990. Serotype variation of human group A rotaviruses in two regions of the USA. *J. Clin. Microbiol.* 162:605-614.
 16. Rasool, N. B. G, K. Green, and A. Z. Kapikian. 1993. Serotype analysis of rotaviruses from different locations in Malaysia. *J. Clin. Microbiol.* 31:1815-1819.
 17. White, L., D. Garcia, Y. Boher M. Blanco, M. Perez, J. Flores, and I. Perez-Schael. 1991. Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1, 2, 3, and 4 in Venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. *J. Med. Virol.* 34:79-84.
 18. Clark, H. F., Y. Hoshino, L. M. Bell, J. Croff, G. Hess, P. Bachman and P. A. Offit. 1987. Rotavirus isolate WI61 representing a presumptive new human serotype. *J. Clin. Microbiol.* 25:1757-1762.
 19. Matsuno, S., A. Hasegawa, A. Mukoyama, and S. Inouye. 1985. A candidate for a new serotype of human rotavirus. *J. Virol.* 54:623-624.
 20. Wyatt, R. G., H. D. James, Jr., A. L. Pittman, Y. Hoshino, H. B. Greeuherg, A. R. Kalica, J. Flores, and A. Z. Kapikian. 1983. Direct isolation in cell culture of human rotaviruses and their characterization into four serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 18:310-317.
 21. Bok K, Castagnaro N, Borsa A, Nates S, Espul C, Fay O, Fabri A, Grinstein S, Miceli I, Matson DO, Gomez JA. 2001. Surveillance for rotavirus in Argentina. *J Med Virol* 65(1):190-198.
 22. Nguyen VM, Nguyen VT, Huynh PL, Dang DT, Nguyen TH, Phan VT, Nguyen TL, Le TL, Ivanoff B, Gentsch JR, Glass RI; Vietnam Rotavirus Surveillance Network. 2001. The epidemiology and disease burden of rotavirus in Vietnam: sentinel surveillance at 6 hospitals. *J Infect Dis* 183(12):1707-1712.
 23. Santos N, Volotao EM, Soares CC, Albuquerque MC, da Silva FM, de Carvalho TR, Pereira CF, Chizhikov V, Hoshino Y. 2001. Rotavirus strains

- bearing genotype G9 or P[9] recovered from Brazilian children with diarrhea from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39(3):1157-1160.
24. Cunliffe NA, Gondwe JS, Graham SM, Thindwa BD, Dove W, Broadhead RL, Molyneux ME, Hart CA. 2001. Rotavirus strain diversity in Blantyre, Malawi, from 1997 to 1999. *J Clin Microbiol* 39(3):836-843.
 25. Oka T, Nakagomi T, Nakagomi O. 2000. Apparent re-emergence of serotype G9 in 1995 among rotaviruses recovered from Japanese children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiol Immunol* 44(11):957-961.
 26. Ramachandran M, Kirkwood CD, Unicomb L, Cunliffe NA, Ward RL, Bhan MK, Clark HF, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Molecular characterization of serotype G9 rotavirus strains from a global collection. *Virology* 278(2):436-444.
 27. Widdowson MA, van Doornum GJ, van der Poel WH, de Boer AS, Mahdi U, Koopmans M. 2000. Emerging group-A rotavirus and a nosocomial outbreak of diarrhoea. *Lancet* 356(9236):1161-1162.
 28. Maneeakarn N, Ushijima H. 2000. Epidemiology of rotavirus infection in Thailand. *Pediatr Int* 42(4):415-421.
 29. O'Halloran F, Lynch M, Cryan B, O'Shea H, Fanning S. 2000. Molecular characterization of rotavirus in Ireland: detection of novel strains circulating in the population. *J Clin Microbiol* 38(9):3370-3374.
 30. Iturriza-Gomara M, Cubitt D, Steele D, Green J, Brown D, Kang G, Desselberger U, Gray J. 2000. Characterisation of rotavirus G9 strains isolated in the UK between 1995 and 1998. *J Med Virol* 61(4):510-517.
 31. Ahmed MU, Alam MM, Chowdhury NS, Haque MM, Shahid N, Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S. 1999. Analysis of human rotavirus G serotype in Bangladesh by enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction. *J Diarrhoeal Dis Res* 17(1):22-27.
 32. Griffin DD, Kirkwood CD, Parashar UD, Woods PA, Bresee JS, Glass RI, Gentsch JR. 2000. Surveillance of rotavirus strains in the United States: identification of unusual strains. The National Rotavirus Strain Surveillance System collaborating laboratories. *J Clin Microbiol* 38(7):2784-2787.
 33. Palombo EA, Masendycz PJ, Bugg HC, Bogdanovic-Sakran N, Barnes GL, Bishop RF. 2000. Emergence of serotype G9 human rotaviruses in Australia. *J Clin Microbiol* 38(3):1305-1306.
 34. Taniguchi, K., and S. Urasawa. 1995 Diversity in rotavirus genomes. *Virology* 6: 123-131.

35. Bridger, J. C. 1994. Non-group A rotaviruses. In: A. Z. Kapikian , ed. *Viral infections of the gastrointestinal tract*, 2nd ed, New York, Marcel Dekker, Inc., pp.369-408.
36. Hung, T. 1988. Rotavirus and adult diarrhea. *Adv. Virus Res.* 35:193-218.
37. Bridger, J. C., S. Pedley, and M. A. McCrae. 1986. Group C rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.* 23:760-763.
38. Nekata, S., M. K. Estes, D. Y. Graham, S. Wang, G. W. Gary, and J. L. Melnick. 1987. Detection of antibody to group B adult diarrhea rotaviruses in humans. *J. Clin. Microbiol.* 25:812-818.
39. Flewett, T. H., A. S. Bryden, H. Davies, G. N. Woode, J. C. Bridger, and J. M. Derrick. 1974. Relationship between virus from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 2:61-63.
40. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, et al. 1974. Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serological tests. *Science* 185:1049-1053.
41. Black, R. E., H. B. Greenberg, A. Z. Kapikian, K. H. Brown, and S. Becker. 1982. Acquisition of serum antibody to Norwalk virus and rotavirus and relation to diarrhea in a longitudinal study of young children in rural Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 145:483-489.
42. Kapikian, A. Z., H. W. Kim, R. G. Wyatt, W. L. Cline, J. O. Arrobio, C. D. Brandt, W. J. Rodriguez, D. A. Sack, R. M. Chanock, and R. H. Parrott. 1976. Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children. *N. Eng. J. Med.* 309:72-76.
43. Keidan, I., I. Shif, G. Keren, and J. H. Passwell 1992. Rotavirus encephalopathy: evidence of central nervous involvement during rotavirus infection. *Pediatr. Infect. Dis.* 11:773-775.
44. Nishimura, S, H. ushijima, S. Nishimura, H. Shiraishi, C. Kanazawa, T. Abe, K. Kaneko, and Y. Fukuyama. 1993. Detection of rotavirus in cerebrospinal fluid and blood of patients with convulsions and gastroenteritis by means of reverse transcription polymerase chain reaction. *Brain Dev.* 15:457-459.
45. Ushijima, H., K. Bosu, T. Abe, and T. Shinozaki. 1986. Suspected rotavirus encephalitis. *Arch. Dis. Child* 1:692-694.
46. Wong, C. J., M. T. Zane Price, and A. Bruckner. 1984. Aseptic meningitis in an infant with rotavirus gastroenteritis. *Pediatr. Infect. Dis.* 3:244-246.
47. Lee, C. N., C. L. Kao, J. A. Pai, M. H. Chang, and C. Y. Lee. 1987.

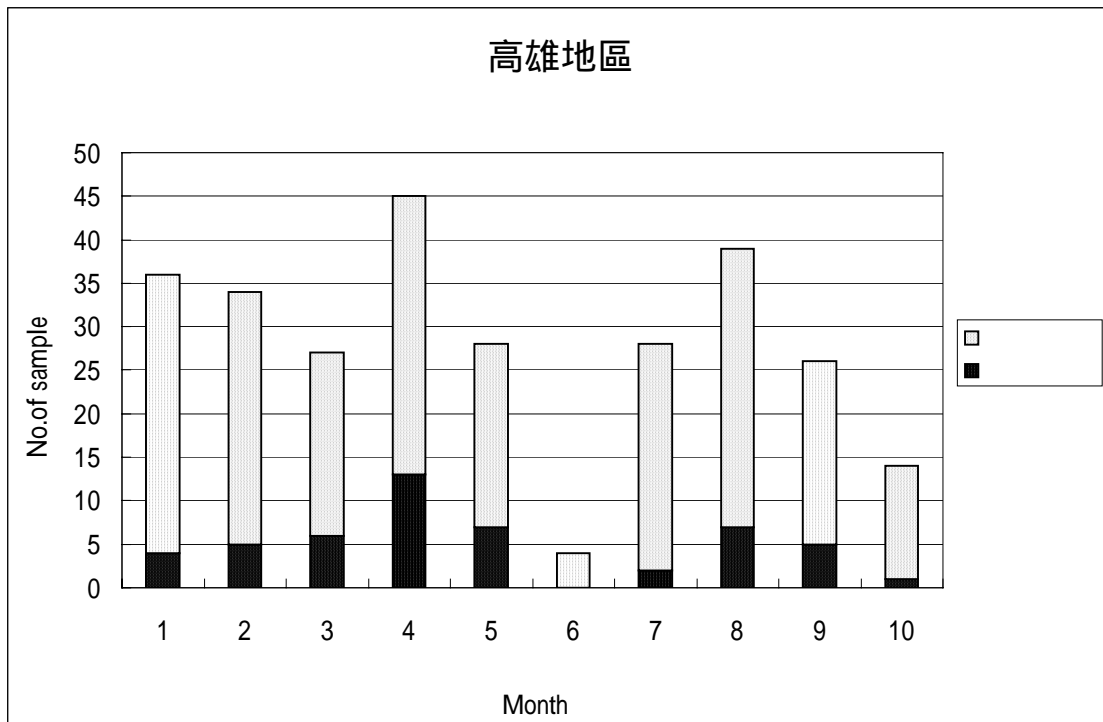
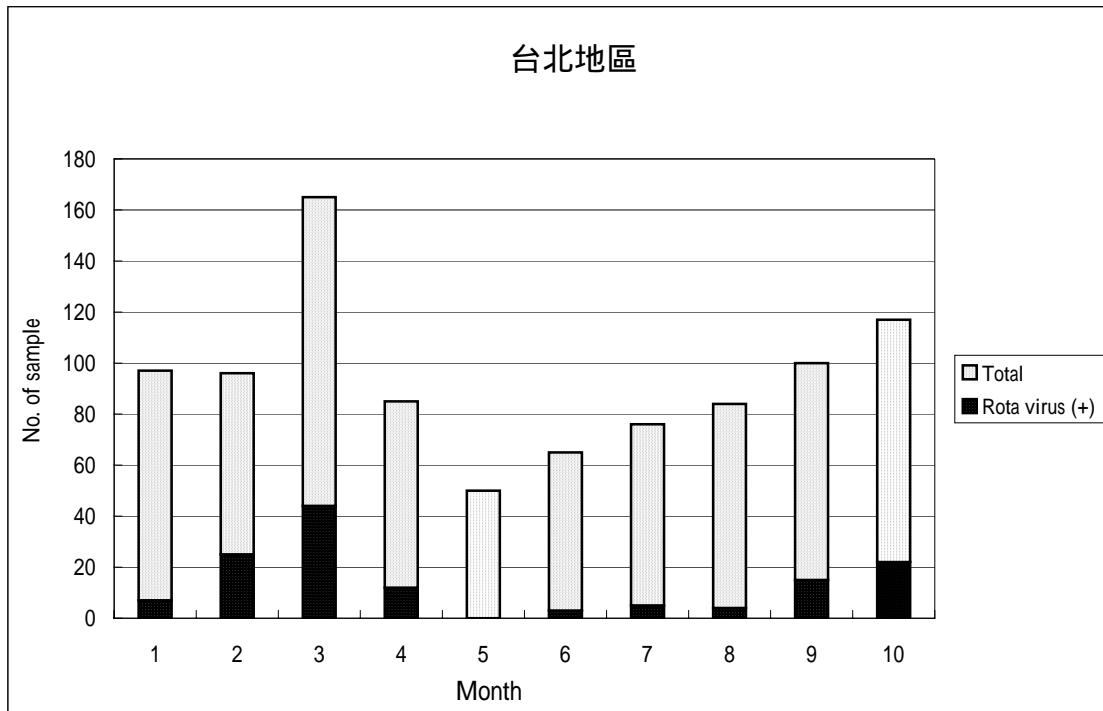
- Identification of human rotaviruses in stools from children with gastroenteritis. *J. Formosan Med. Assoc.* 86:392-399.
48. Lee, C. N., C. L. Kao, H. C. Ning, S. Fuh, and C. Y. Lee. 1997. Identification of VP7 serotypes of human rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Acta Paed. Sin.* 38:454-62.
 49. Chiu, T. F., C. N. Lee, P. Y. Lee, C. L. Kao, H. C. Lin, C. Y. Lu, and L. M. Huang. 2000. Rotavirus gastroenteritis in children: 5-year experience in a medical center. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 33:181-186.
 50. Zao C. L., W. N. Yu, C. L. Kao, C. Y. Lee, and C. N. Lee. 1999. Sequence analysis of VP1 and VP7 genes suggests occurrence of a reassortant of G2 rotavirus responsible for an epidemic of gastroenteritis. *J. Gen. Virol.*80:1407-1415.
 51. Matson, D. O., M. L. O’Ryan, X. Jiang, and D. K. Mitchell. 2000. Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis. pp.270-294. In S. Specter, R. L. Hodinka, and S. A. Young. (ed.), *Clinical Virology Manual*. 3rd ed., ASM Press, Washington DC.
 52. McIver CJ, Hansman G, White P, Doultree JC, Catton M, Rawlinson WD. 2001. Diagnosis of enteric pathogens in children with gastroenteritis. *Pathology* 33(3):353-358.
 53. Singh-Naz, N., W. J. Rodriguez, A. H. Kidd, and C. D. Brandt. 1988. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and typing of subgroup F adenoviruses. *J Clin Microbiol* 26:297-300.
 54. Ahluwalia, G. S., T. H. Scott, B. G. Klisko, and W. Hammond. 1994. Comparison of detection methods for adenovirus from enteric clinical specimens. *Diag Microbiol Infect Dis* 18:161-166.
 55. Pinto, R. M., J. M. Diez, and A. Bosch. 1994. Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. *J Med Virol* 44:310-315.
 56. Lin, H. C., C. L. Kao, C. Y. Lu, C. N. Lee, T. F. Chiu, P. Y. Lee, H. Y. Tseng, H. L. Hsu, C. Y. Lee, and L. M. Huang. 2000. Enteric adenovirus infection in children in Taipei. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 33:176-180.
 57. Berke, T., B. Golding, X. Jiang, D. W. Cubitt, M. Wolfaardt, A. W. Smith, and D. O. Matson. 1997. Phylogenetic analysis of the caliciviruses. *J Med*

Viol 52:419-424.

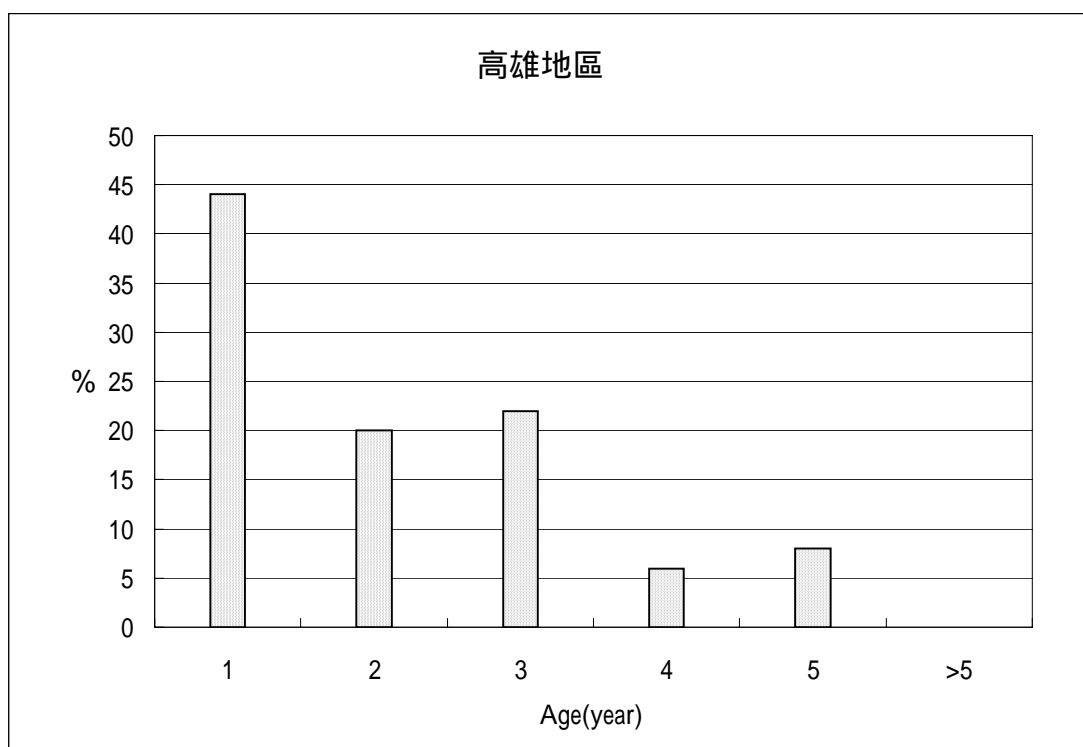
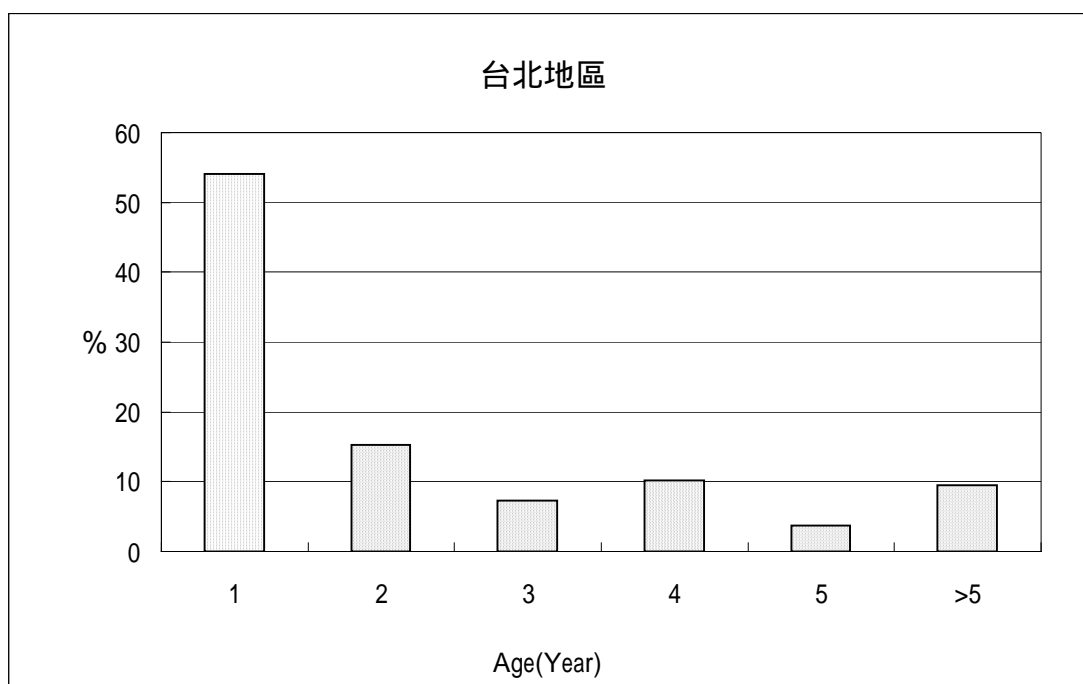
58. Green, K., Y. T. Ando, M. S. Balayan, I. N. Clarke, M. K. Estes, D. O. Matson, S. Nakata, J. D. Neil, M. J. Studdert, and H.-J. Thiel. 1998. Caliciviridae. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus Taxonomy*. 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, Orlando, Fla.
59. Jiang, X., W. D. Cubitt, T. Berke, W. M. Zhong, X. Dai, S. Nakata, L. K. Pickering, and D. O. Matson. 1997. Sapporo-like human caliciviruses are genetically and antigenically diverse. *Arch Virol* 142:1813-1827.
60. Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica, and R. M. Chanock. 1972. Visualization by immune electronmicroscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. *J Virol* 10:1075-1081.
61. Green, J., C. I. Gallimore, J. P. Norcott, D. Lewis, and D. W. Brown. 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *J Med Virol* 47:392-398.
62. Jiang, X., P. W. Huang, W. M. Zhong, T. Farkas, W. D. Cubitt, and D. O. Matson. 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83:145-154.
63. Hale AD, Tanaka TN, Kitamoto N, Ciarlet M, Jiang X, Takeda N, Brown DW, Estes MK. 2000. Identification of an epitope common to genogroup 1 "norwalk-like viruses". *J Clin Microbiol* 38(4):1656-1660.
64. Jiang X, Zhong W, Kaplan M, Pickering LK, Matson DO. 1999. Expression and characterization of Sapporo-like human calicivirus capsid proteins in baculovirus. *J Virol Methods*. 78(1-2):81-91.
65. Jiang X, Wilton N, Zhong WM, Farkas T, Huang PW, Barrett E, Guerrero M, Ruiz-Palacios G, Green KY, Green J, Hale AD, Estes MK, Pickering LK, Matson DO. 2000. Diagnosis of human caliciviruses by use of enzyme immunoassays. *J Infect Dis* 181:S349-S359.
66. Fankhauser, R. L., J. S. Noel, S. S. Monroe, T. Ando, and R. I. Glass. 1998. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178:1571-1578.
67. Lee, T. W., and J. B. Kurtz. 1994. Prevalence of human astrovirus serotypes in the Oxford region 1976-1992, with evidence for two new serotypes. *Epidemiol Infect* 112:187-193.

68. Gaggero, A., M. O’Ryan, J. S. Noel, R. I. Glass, S. S. Monroe, N. Mamani, V. Prado, and L. F. Avendano. 1998. Prevalence of astrovirus infection among children with acute gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 36:3691-3693.
69. Shastri, S., A. M. Doane, J. Gonzales, U. Upadhyayula, and D. M. Bass. 1998. Prevalence of astroviruses in a children’s hospital. *J Clin Microbiol* 36:2571-3574.
70. Noel, J. S., T.W. Lee, J. B. Kurtz, R. I. Glass, and S. S. Monroe. 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *J Clin Microbiol* 33:797-801.
71. Jonassen, T. O., C. Monceyron, T. W. Lee, J. B. Kurtz, and B. Grinde. 1995. Detection of all serotypes of human astrovirus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 52:327-334.
72. Matsui, M., H. Ushijima, M. Hachiya, J. Kakizawa, L. Wen, M. Oseto, K. Morooka, and J. B. Kurtz. 1998. Determination of serotypes of astroviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and homologies of the types by the sequencing of Japanese isolates. *Microbiol Immunol* 42:539-547.
73. Oishi, I., K. Yamazaki, T. Kimoto, Y. Minekawa, E. Utagawa, S. Yamazaki, S. Inouye, G. S. Grohmann, S. S. Monroe, S. E. Stine, C. Cacamo, T. Ando, and R. I. Glass. 1994. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka Japan. *J Infect Dis* 170:439-443.
74. Lee CN, Lin CC, Zao CL, Kao CL, Lee CY. 1998. Identification of VP4 Genotypes of Rotaviruses by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J. Biomed. Lab. Sci.* 10: 178-187.

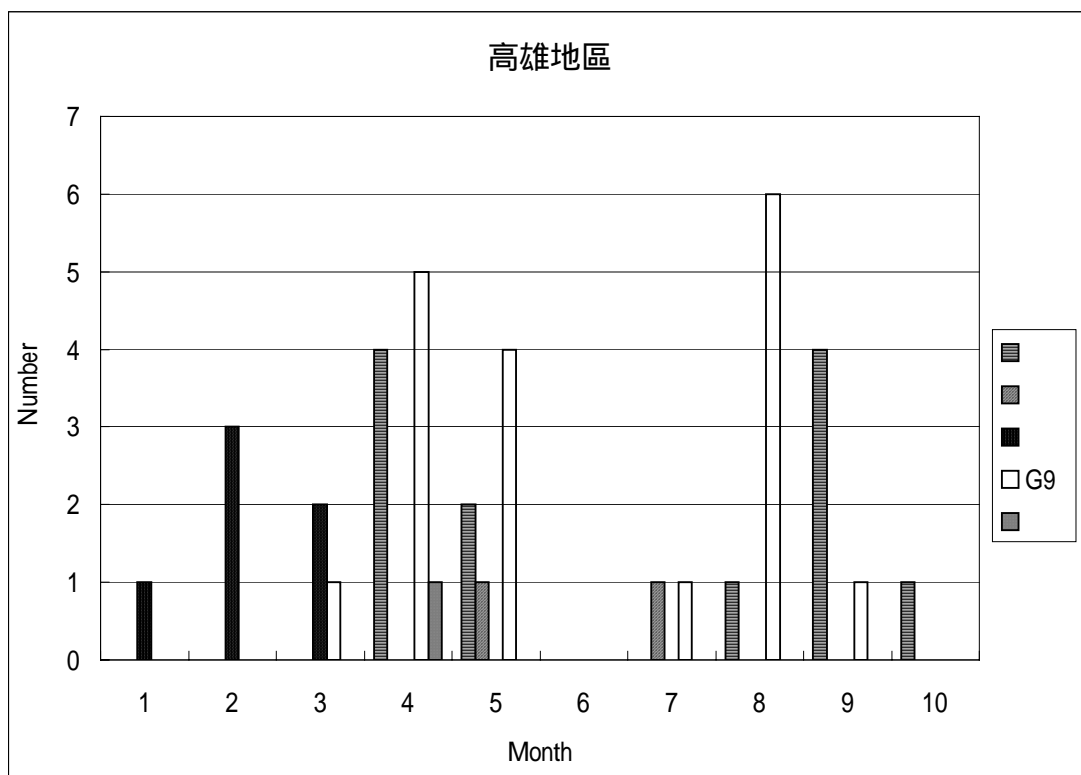
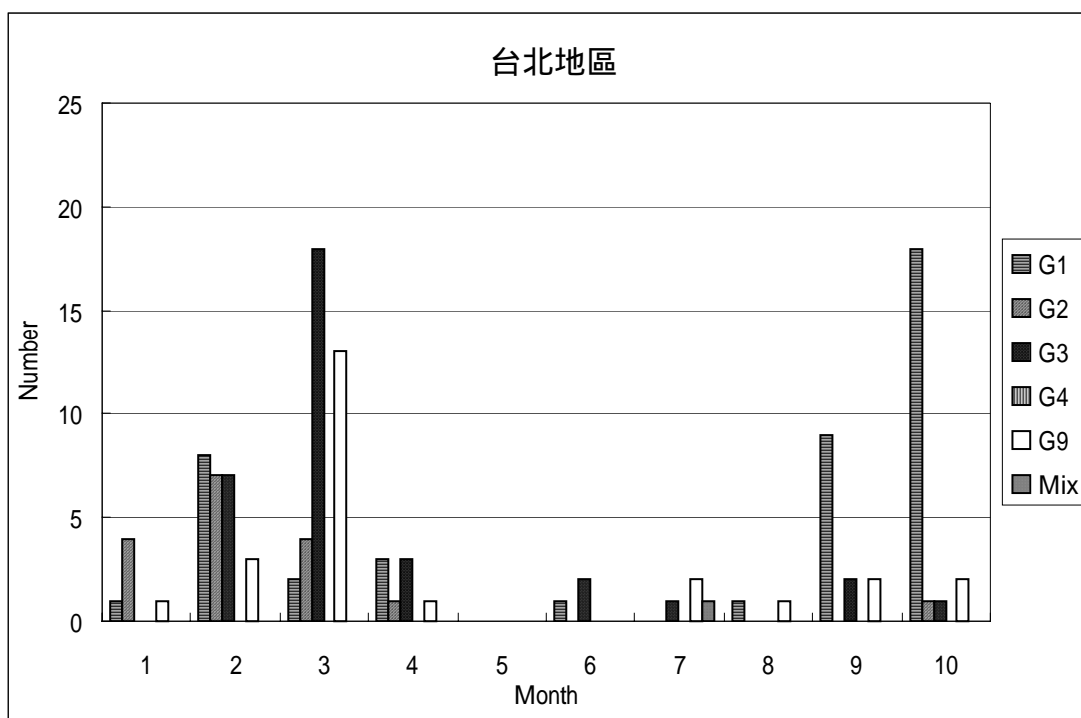
圖一、2003 年急性腸胃炎檢體在各月份輪狀病毒檢出之狀況



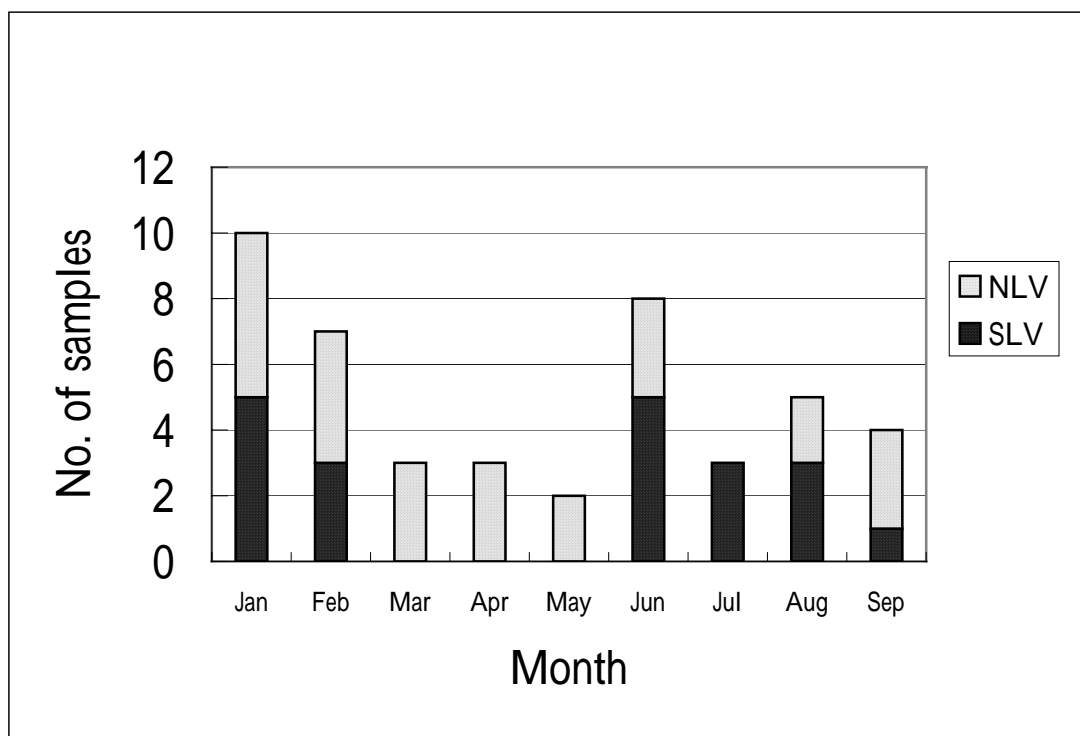
圖二、2003 年輪狀病毒在各不同年齡層分佈之百分比



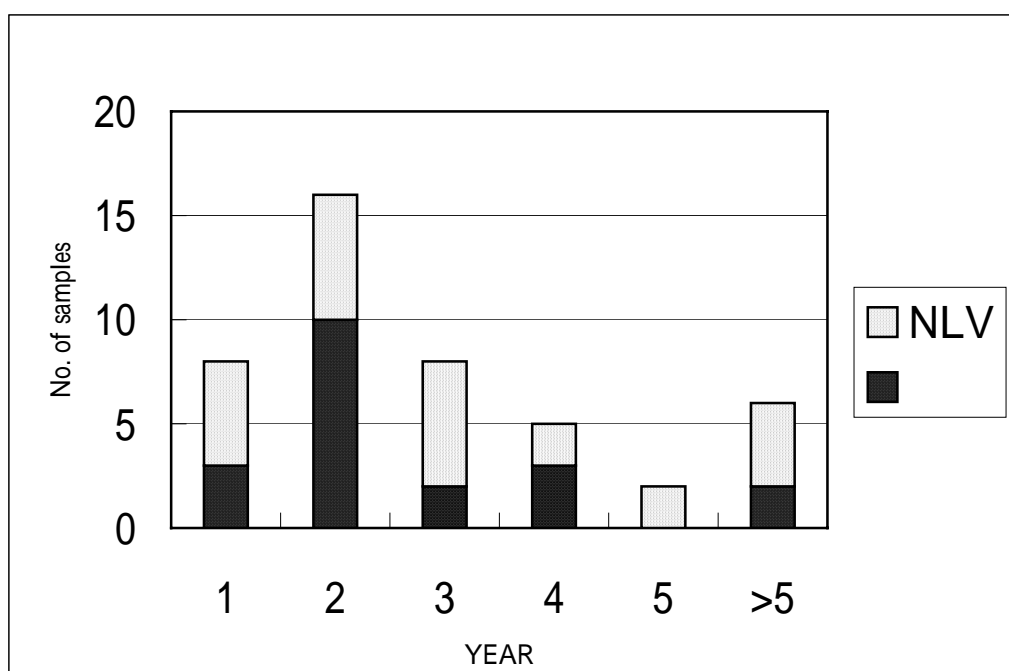
圖三、2003 年各血清型輪狀病毒在不同月份分佈之狀況



圖七、2002 年 PCR 檢測杯狀病毒陽性檢體於各月份分佈之狀況



圖八、杯狀病毒陽性檢體年齡分佈之狀況



表一、輪狀病毒於台灣不同地區檢出率之比較

地區	檢體個數	陽性檢體個數	檢出率(%)
台北	935	137	14.7
高雄	281	50	17.8
總計	1216	187	15.4

表二、台灣不同地區輪狀病毒陽性檢體中男女性所佔比例之比較

地區	輪狀病毒陽性檢體個數(%)		
	男性	女性	總計
台北	84 (61.3)	53 (38.6)	137
高雄	31 (62.0)	19 (38.0)	50
總計	115 (61.4)	72 (38.5)	187

表三、輪狀病毒於台灣不同地區及不同性別中檢出率之比較

地區	男性			女性		
	檢體個數	陽性檢體 個數	檢出率 (%)	檢體個數	陽性檢體 個數	檢出率 (%)
台北	551	84	15.2	384	53	13.8
高雄	168	31	18.5	119	19	16.0
總計	719	115	16.0	503	72	14.3

表四、台灣不同地區輪狀病毒在不同年齡層分佈狀況之比較

年齡層	台北		高雄	
	陽性檢體個數	%	陽性檢體個數	%
0~1	74	54.0	22	44.0
>1~2	21	15.3	10	20.0
>2~3	10	7.3	11	22.0
>3~4	14	10.2	3	6.0
>4~5	5	3.6	4	8.0
>5	13	9.5	0	0.0
總計	137		50	

表五、各種 G 血清型輪狀病毒在台灣不同地區分佈狀況之比較

地區	輪狀病毒 G 血清型之檢體個數 (%)						合計
	G1	G2	G3	G4	G9	混合	
台北	43 (35.83)	17 (14.2)	34 (28.3)	0 (0)	25 (20.8)	1 (0.8)	120
高雄	12 (30.7)	2 (5.1)	6 (15.4)	0 (0)	18 (46.1)	1 (2.6)	39
合計	55 (34.6)	19 (11.9)	40 (25.2)	0 (0)	43 (27.0)	2 (1.3)	159

表六、2002 年 PCR 檢測及序列分析杯狀病毒陽性檢體於各月份分佈之狀況

Month	PCR			Negative	Total
	Positive		Subtotal (%)		
	SLV (%)	NLV (%)			
Jan	5 (5.38)	5 (5.38)	10 (10.75)	83	93
Feb	3 (3.66)	4 (4.88)	7 (8.54)	75	82
Mar	0	3 (4.11)	3 (4.11)	70	73
Apr	0	3 (2.85)	3 (2.85)	75	78
May	0	2 (2.06)	2 (2.06)	95	97
Jun	5 (4.03)	3 (2.42)	8 (6.45)	116	124
Jul	3 (2.50)	0	3 (2.50)	117	120
Aug	3 (2.94)	2 (1.96)	5 (4.90)	97	102
Sep	1 (0.78)	3 (2.33)	4 (3.10)	125	129
Total	20 (2.23)	25 (2.78)	45 (5.01)	853 (94.99%)	898

表七、2002 年 PCR 檢測及核酸序列分析杯狀病毒陽性檢體之年齡分佈狀況

Age	SLV	NLV	Total No. (%)
	No. of positive sample (%)	No. of positive sample (%)	
0~1	3 (6.7)	5 (11.1)	8 (17.8)
>1~2	10 (22.2)	6 (13.3)	16 (35.6)
>2~3	2 (4.4)	6 (13.3)	8 (17.8)
>3~4	3 (6.7)	2 (4.4)	5 (11.1)
>4~5	0	2 (4.4)	2 (4.4)
>5	2 (4.4)	4 (8.9)	6 (13.3)

總計

20

25

45
