

計畫編號：MOHW109-CDC-C-315-144419

衛生福利部疾病管制署 109 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

## 研究報告

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：林智暉

研究人員：李以彬、黃楷超

執行期間：109 年 1 月 1 日至 109 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

## 目錄

一、	前言.....	7
二、	方法.....	16
三、	結果.....	20
四、	討論.....	23
五、	結論與建議.....	25
六、	計畫重要研究成果及具體建議.....	26
七、	參考文獻.....	27
八、	圖表.....	30

## 中文摘要

腹瀉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)與輪狀病毒(rotavirus)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與輪狀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。第四年目標針對具高變異度及重組率的諾羅病毒，分析本國近年諾羅病毒型別演化，利用已建置完成之高速核酸定序平台具備之高通量及高效率之特性，完成病毒全基因體定序，分析諾羅病毒近年演化趨勢。

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。

## 英文摘要

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 and rotavirus 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 strains were found in animal stool samples, animal meat and shellfish, respectively. These results suggested that norovirus and rotavirus 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.

## 一、前言

### (一) 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. 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 [1]；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[1]。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[1]。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[2]。

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%)[1, 2]。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[1]。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%[3]。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。因此，諾羅病毒與輪狀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。

## 2. 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)[4, 5]，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[6]；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[7]；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[8]。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[9]；其他國家亦有發現人類-豬隻重組輪狀病毒株[10-12]；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[13]。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[14]。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。

## (二) 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，對較重要的型別鑑定和基因分型進行介紹。

### 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) 的核苷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) [15, 16]，因此，此段特殊的核苷酸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 [16-18]。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 [19]。

### 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、核苷酸序列保守度高，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[16]。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[6]，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[20]。

### 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，過去文獻指出，利用諾羅病毒基因組的 ORF2 (Region C、D 與 E) 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) [14, 21-23]；但仍無法確定在諾羅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[24]。

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。

#### 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。

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 [25-29]。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 [30, 31]、人類免疫缺乏病毒 [32, 33] 與人類皰疹病毒 [34, 35]

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[30]。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[36, 37]，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。但受限於定序儀器價格高昂，一般實驗室無法獨立購買與維護，因此需要與委外廠商簽訂合約，前端核酸抽取由實驗室進行，後端建庫與上機由廠商提供服務，最後再將定序結果回送實驗室進行組裝分析。而委外廠商為顧及成本，經常等待核酸樣本蒐集到足夠數量後再行上機，等待時間動輒二至四週，在緊急疫情發生後並無法有效即時反應，提供迅速的定序服務，且次世代定序成本雖已下降，但相較於常規檢驗仍顯昂貴，在經費有限的情況下，無法提高送件數量。本實驗室囿於上述原因，積極開發合適之新世代核酸定序系統，希冀以低成本、快速且可供實驗室獨立操作之新世代核酸定序系統取代現行之次世代定序系統。

本計畫採用新型高速核酸定序系統，可達到全檢驗過程在實驗室內完成之目標，由核酸純化，建庫，上機到資料分析，有效縮短疫情反應時間，提升本國疫情防護之成效。

## 二、 方法

### (一) 檢體收集及處理

#### 1. 糞便檢體收集

挑選各年度(2017 年至 2020 年)諾羅病毒檢測陽性檢體，並挑選不同型別之檢體進行後續處理。

#### 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°C，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，保存於-80°C。

#### 3. 腹瀉食源性病毒 RNA 之萃取

##### (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°C 待用。

### (二) 新型高速核酸定序

傳統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。新型高速核酸定序主要特點為長片段定序，不須將檢體核酸片段化(fragmentation)，可將最完整之檢體核酸進行資料庫建置(library construction)、利用PCR放大(PCR amplification)微量檢體核酸，同時利用條碼(barcoding)進行多檢體操作，完成資料庫建置之檢體可透過小型化儀器MinION進行核酸定序(sequencing)，定序同時進行電流擾動解碼(basecalling)，取得檢體核酸序列，後續利用網路平台資源進行分析，詳細的實驗步驟將在下述段落與結果中進行說明。

## 1. 樣本製備

為順利進行新型高速核酸定序，參考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。純化後之檢體 RNA 以 real-time PCR 確認 RNA 確實含有目標檢體核酸。因檢體核酸不足，且有大量定序之需求，後續資料庫(library)建置法選擇，以 cDNA-PCR barcoding Kit 進行製備資料庫。

## 2. cDNA-PCR barcoding Kit

參照 Nanopore 官方網站提供之流程圖，利用 cDNA-PCR barcoding Kit 將檢體核酸 RNA 轉錄為 cDNA，並藉由 PCR 方式同時進行核酸擴增與條碼加註，最後接上 adaptor 序列與 motor protein，完成上機前建

庫程序。

### 3. 上機定序

建庫後檢體依照 Nanopore 官方網站提供之步驟完成上機前準備，注入完成檢測之定序晶片後，即可使用小型化定序儀器 MinION 進行定序，定序時間設定 48 小時，可於定序中進行手動停止，選用一般解碼進行定序電流檔之解序(basecalling)，依照數據產出量及定序時間推斷，預留足夠之電腦固態硬碟(SSD)之儲存容量，一般需留存 80 GB 空間。

### (三) 資料分析

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ML樹狀圖分析，以確定其病毒株與各宿主來源相關性。

#### 1. EPI2ME 上傳資料分析

定序後取得的原始 FASTQ 檔先上傳至 Nanopore 提供之分析軟體 EPI2ME 進行初步分析，如此次定序之品質、read 片段大小與分佈、檢體可能含有病原種類與各編碼檢體 read 比例，後續同樣利用 EPI2ME 將檢體依照編碼進行分離，取得個別編碼檢體獨立 FASTQ 序列檔。

## 2. Galaxy Europe 線上資料處理分析

個別檢體 FASTQ 序列檔，依序上傳線上資料處理網站 Galaxy Europe (<https://usegalaxy.eu/>) 進行後續分析。依序利用 Canu 進行 adaptor 與 barcode 去除，並進行 *De novo* assemble，取得之 Contigs 可進行送至 NCBI 進行初步序列分析，查看檢體核酸可能含有之致病原。Canu 除可產生 Contigs 可進行分析外，另可提供去除 adaptor 與 barcode 之序列。利用該序列，配合諾羅病毒各型別之 Reference 序列進行 Map to reference，此步驟使用 LASTZ 軟體進行，可得拼裝後檔案 BAM 與 BAI 檔。配合 Reference 序列之 FAI 檔，可利用單機可視化軟體 IGV 查看 Mapping 後的結果，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。最後利用 Galaxy CRS4 (<https://orione.crs4.it/>) 從 BAM 檔案中取出 Consensus 序列。

## 3. 親緣樹狀樹繪製

分析後得到之完整標的物基因，可利用 MEGA[38] 等基因 ML 樹狀圖繪製軟體，繪製諾羅病毒各型別 ML 樹狀圖，分析近年度諾羅病毒變異趨勢。

### 三、 結果

#### (一) 評估近年諾羅病毒流行型別組成

本次計畫為分析本國2017到2020年諾羅病毒變異趨勢，並挑選各年度諾羅病毒檢體進行全基因體定序。整理歷年檢驗結果，根據諾羅病毒GI型別及GII分析流行株趨勢(GI:圖一A，GII:圖一B)。由圖一A可知，本國諾羅病毒GI型別，近年主流型別為GI.3，佔比約53%(圖二A)，並無主要流行季節；GI.1型別為相對少數型別，主要聚集出現在2017年底至2018年初，且今年度(2020年)初亦出現短期流行；GI.4於2017年底發生較高比例流行，且在今年年中後亦出現大量流行，其中今年度(2020年)八月礁溪老爺酒店食物中毒事件聚焦全國媒體及國民關注，經檢驗其病原即是GI.4。圖一B為諾羅病毒GII型別組成分析，相對於GI.3為諾羅病毒GI主要流行型別，諾羅病毒GII主要為GII.2主要流行型別，佔比約67%(圖二B)，且無特別流行季節；GII.4主要發生於各年度下半年，其中2018年下半年度出現大規模流行，且今年度(2020年)9月後的盛行比例亦出現明顯增幅；GII.6型別在2019年出現大規模流行，且今年度下半年亦出現較高的檢出比例；GII.17雖為較少數型別，但每年度均有相關腹瀉群聚發生，本次計畫針對上述型別進行全基因定序及分析。

#### (二) 挑選各年度諾羅病毒檢體進行全基因體定序

將諾羅病毒陽性檢體上機定序，流程包括檢體(糞便)前處理、樣本病毒核酸萃取、建製資料庫 (library construction)、PCR放大(PCR amplification)、定序(sequencing)、分析 (analysis)，本次計畫採用 Nanopore 平台定序系統進行病毒基因組上機，並以 Nanopore 官方軟體 EPI2ME 與線上分析網站 Galaxy Europe 進行後續資料分析，獲得本國近年各型別之諾羅病毒全基因序列後，整合實驗室諾羅病毒序列進行比對與 ML 樹狀圖建立，結果如圖三至圖九。

### (三) 諾羅病毒各型別年度演化

圖三為諾羅病毒 GI. P1-GI. 1 型別 ML 樹狀圖，可觀察除了 2017 兩株病毒株獨立分群外，其餘 2017 至 2020 年的諾羅 GI. 1 皆歸類於同樣群組，但細分群組可發現近年 (2019 年至 2020 年) 的 GI. 1 仍與過往 (2017 年至 2018 年) 有差異，表示諾羅病毒 GI. P1-GI. 1 雖無大規模變異，但各年度間病毒可能些微差異度存在。圖四為諾羅病毒 GI. 3 型別 ML 樹狀圖，觀察 ML 樹狀圖可明顯分為兩群，即為 GI. Pd-GI. 3 與 GI. P3-GI. 3 兩群基因型，細部觀察檢體年份，可發現 GI. P3-GI. 3 主要為 2017 年與 2018 年病毒株，而 2019 至 2020 年主要流行 GI. Pd-GI. 3，雖同為 GI. 3 型別，但細項型別在各年度仍有流行差異度。圖五為諾羅病毒 GI. P4-GI. 4 型別 ML 樹狀圖，相較於本國諾羅病毒主流株 GI. 3，GI. P4-GI. 4 的數量較少，只發生於 2017 年底、

今年初期(2020年)及下半年度，並無明顯分群現象。

圖六為諾羅病毒 GII.P16-GII.2 ML 樹狀圖，GII.2 為本國 GII.2 主要流行株，因病毒株數量過大，圖四 ML 樹狀圖以縮減方式顯示，可觀察到部分年度可群聚於各別的群組，但並無明顯演化差異。圖七為諾羅病毒 GII.4 ML 樹狀圖，圖中可明顯分為兩族群，即為 GII.P16-GII.4 及 GII.Pe-GII.4 兩種基因型，由年份可初步分類 2017 年與 2018 年主要為 GII.Pe-GII.4，另外 GII.P16-GII.4 則由 2018 年度少量出現，而後續成為 2019 年至 2020 年 GII.4 主要流行型別，且於今年度(2020 年)下半年度成為諾羅病毒 GII 型的主要型別。圖八為諾羅病毒 GII.P7-GII.6 ML 樹狀圖，圖中可明顯分為兩個族群，雖型別皆為 GII.P7-GII.6，但內部可細分不同亞族群。2017 年與 2018 年度，GII.6 可歸類於同一亞群組；而另一亞群組主要為 2019 年及 2020 年度，該群組基因型最早出現於 2017 年度 8 月份，而後成為 2019 年度 GII.6 大規模盛行的主要流行株，該流行株延續至今年度(2020 年)。圖九為諾羅病毒 GII.17 ML 樹狀圖，除了 2018 年度出現一株 GII.Pe-GII.17 重組諾羅病毒株外，其餘皆為 GII.P17-GII.17 型別，且族群內無明顯分群現象。

#### 四、 討論

本計畫建立之檢體處理流程可成功從糞便檢體抽出病原 RNA，並利用全基因體定序技術組成病原基因序列，後續將可應用於未知病原的檢體偵測。圖一為本國 2017 年至 2020 年本國諾羅病毒流行株趨勢，由其中挑選具代表性病毒株型別，利用上述技術可快速取得大量病毒全基因定序，取得相關資訊後，與實驗室現有資料庫進行比對，分析諾羅病毒株演化變異。

GI. P1-GI. 1 本國盛行率較低，由圖一可發現 GI. P1-GI. 1 易發生於各年度的 11 月至隔年 3 月，透過序列分析及 ML 樹狀圖繪製，可發現其基因並無大規模變異，但可依年度大致分作兩群組：2017 年至 2018 年與 2019 年至 2020 年，表示病毒在各年度的流行有差異性存在，是否會有新變異或重組發生仍需監測。GI. 3 為國內諾羅病毒 GI 型主要流行型別，好發於學齡前及學生族群 [39]，於 ML 樹狀圖內可明顯分為兩群組：GI. Pd-GI. 3 與 GI. P3-GI. 3，雖其中有少數個別案例差異，但可大致依照年份進行型別的區分：2017 年至 2018 年為 GI. P3-GI. 3，2018 下半年至今年度(2020 年)則主要為 GI. Pe-GI. 3。GI. 4 原本為少數型別，只在 2017 年底及今年初(2020 年)有小規模的流行，而今年(2020 年)自八月分起出現較大規模的流行，該流行仍在持續中，由 ML 樹狀圖中並無顯示明顯的分群出現。

諾羅病毒 GII 型別為本國好發病原，其中尤以 GII.2 為主要流行株，雖主要型別皆為 GII.P16-GII.2，但各年份有部分的差異出現並持續流行，後續是否會出現大規模重組或變異造成新流行，需要持續監測。圖五中可明顯觀察到 GII.4 可分為兩大族群: GII.Pe-GII.4 及 GII.P16-GII.4，雖有少數特別案例，但仍可大致歸類 2017 年及 2018 年主要流行為 GII.Pe-GII.4，但自 2018 下半年開始，主要流行株已轉變為 GII.P16-GII.4，且該型別的 ML 樹狀圖內部可依照年份進行分群，如今年度(2020 年)即可集中歸類於同一族群。GII.6 在 2019 年度出現大規模流行，且流行株持續延續至今年度，該流行株相較於往年(2017 年至 2018 年)有明顯差異，雖型別同樣為 GII.P7-GII.6，但大規模的差異導致該型別成為國內流行株之一。GII.17 在分析中並無明顯亞族群產生，在 ML 樹狀圖中可見一株 2018 年出現的重組病毒，由主流的 GII.P17-GII.17 重組為 GII.Pe-GII.17，但並未產生大規模流行。雖 GII.17 在本國屬較少數型別，但因其發生曾重組，仍需持續監測其持續變異的可能。



## 五、 結論與建議

本計畫為提升實驗室檢測病原的能力，已完成建立新型高速核酸定序平台，本次挑選各年度諾羅病毒檢體，透過平台可同時高通量及快速定序之特性，取得各年度諾羅病毒序列資訊，結合實驗室數據，比對分析諾羅病毒演化變異。各型別間有不同的變異，表示諾羅病毒的高度變異性及重組性仍會產生不同的諾羅病毒感染國人。今年度(2020 年)上半年因肺炎疫情導致旅遊人數大幅下降，且國人注重衛生安全，造成腹瀉檢體量下降。但國內疫情趨緩後，復甦的國內旅遊及國人防疫意識的降低，導致諾羅病毒檢出率大幅提升，且流行型別相較過往有些許的差異。除需宣導國人注意個人衛生外，提升檢驗實驗室檢驗量能也是改進的方向，本計畫建立的高速核酸定序平台及可發揮作用，提供快速、準確的病源資訊供疫調單位使用。

## 六、計畫重要研究成果及具體建議

今年度本計畫利用新世代核酸定序系統高通量及高效率定序之特性，進行 2017 至 2020 年本國諾羅病毒各型別病毒株之全基因體定序，分析近年度本國諾羅病毒基因序列與演化差異。各型別諾羅病毒在本國持續傳播引發群聚事件，且病毒隨時間不斷演變，其中 GI1、GI4、GII.2 型別流行株在 ML 樹狀圖內可得知，各年度間差異較小，但仍可見親緣性變異的出現；GI.3 及 GII.4 依照年度不同，出現了流行型別的更換，且型別內部分群明顯，各年度間有較大的親緣性差異；GII.6 於 2019 年度出現大規模的變異，造成本國的流行；GII.17 則在 2018 年度時出現了基因重組現象，幸未出現大規模傳播流行。諾羅病毒的易傳播性與高度變異性，在國際間常造成大型群聚感染，在有效疫苗上市且具規模施打之前，仍需持續監控並分析其變異，即時偵測及反應，以避免變異諾羅病毒可能造成的經濟及健康危害。另外，在傳染病檢驗上經常出現急迫性之防疫需求，須盡速確認病患的感染病原，經由本計畫建立之新型高速核酸定序平台，透過進一步實驗步驟優化，亦可適用於其他病原菌之檢測，提供快速且確實之病原追蹤，有助於防疫網的迅速建立與保護本國國民之健康安全。

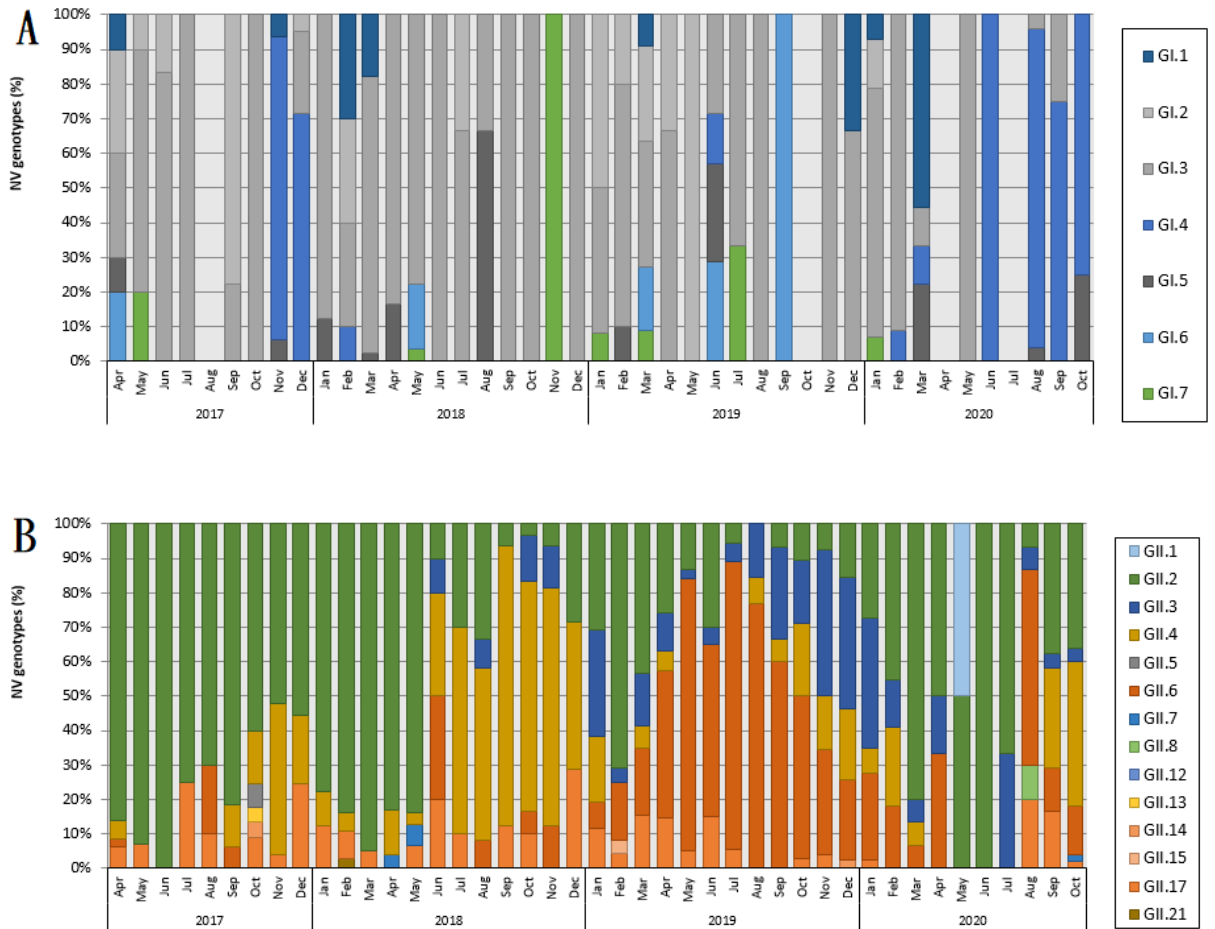
## 七、 参考文献

1. World Health, O., *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015*. 2015, Geneva: World Health Organization.
2. Hall, A., et al., *Vital Signs: Foodborne Norovirus Outbreaks - United States, 2009-2012*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, 2014. **63**: p. 491-495.
3. Liu, L., H.L. Johnson, and S. Cousens, *Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000 (vol 379, pg 2151, 2012)*. Lancet, 2012. **380**(9850): p. 1308-1308.
4. Wang, Q.H., et al., *Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(12): p. 5963-5972.
5. Zheng, D.P., et al., *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology, 2006. **346**(2): p. 312-323.
6. Mattison, K., et al., *Human noroviruses in swine and cattle*. Emerging Infectious Diseases, 2007. **13**(8): p. 1184-1188.
7. Sisay, Z., et al., *First detection and molecular characterization of sapoviruses and noroviruses with zoonotic potential in swine in Ethiopia*. Archives of Virology, 2016. **161**(10): p. 2739-2747.
8. Etherington, G.J., J. Dicks, and I.N. Roberts, *High throughput sequence analysis reveals hitherto unreported recombination in the genus Norovirus*. Virology, 2006. **345**(1): p. 88-95.
9. Banyai, K., et al., *Genetic Diversity and Zoonotic Potential of Human Rotavirus Strains, 2003-2006, Hungary*. Journal of Medical Virology, 2009. **81**(2): p. 362-370.
10. Yahiro, T., et al., *Human-porcine reassortant rotavirus generated by multiple reassortment events in a Sri Lankan child with diarrhea*. Infection Genetics and Evolution, 2018. **65**: p. 170-186.
11. Chen, D.Y., et al., *Genetic characterization of a novel G9P[23] rotavirus A strain identified in southwestern China with evidence of a reassortment event between human and porcine strains*. Archives of Virology, 2019. **164**(4): p. 1229-1232.
12. Banyai, K., et al., *Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador*. Archives of Virology, 2009. **154**(11): p. 1823-1829.
13. Hwang, K.P., et al., *Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children*. Journal of Medical Microbiology, 2012. **61**(7): p. 990-997.
14. Shibata, S., et al., *Complete Genome Sequence of a Novel GV.2 Sapovirus Strain, NGY-1, Detected from a Suspected Foodborne Gastroenteritis Outbreak*. Genome

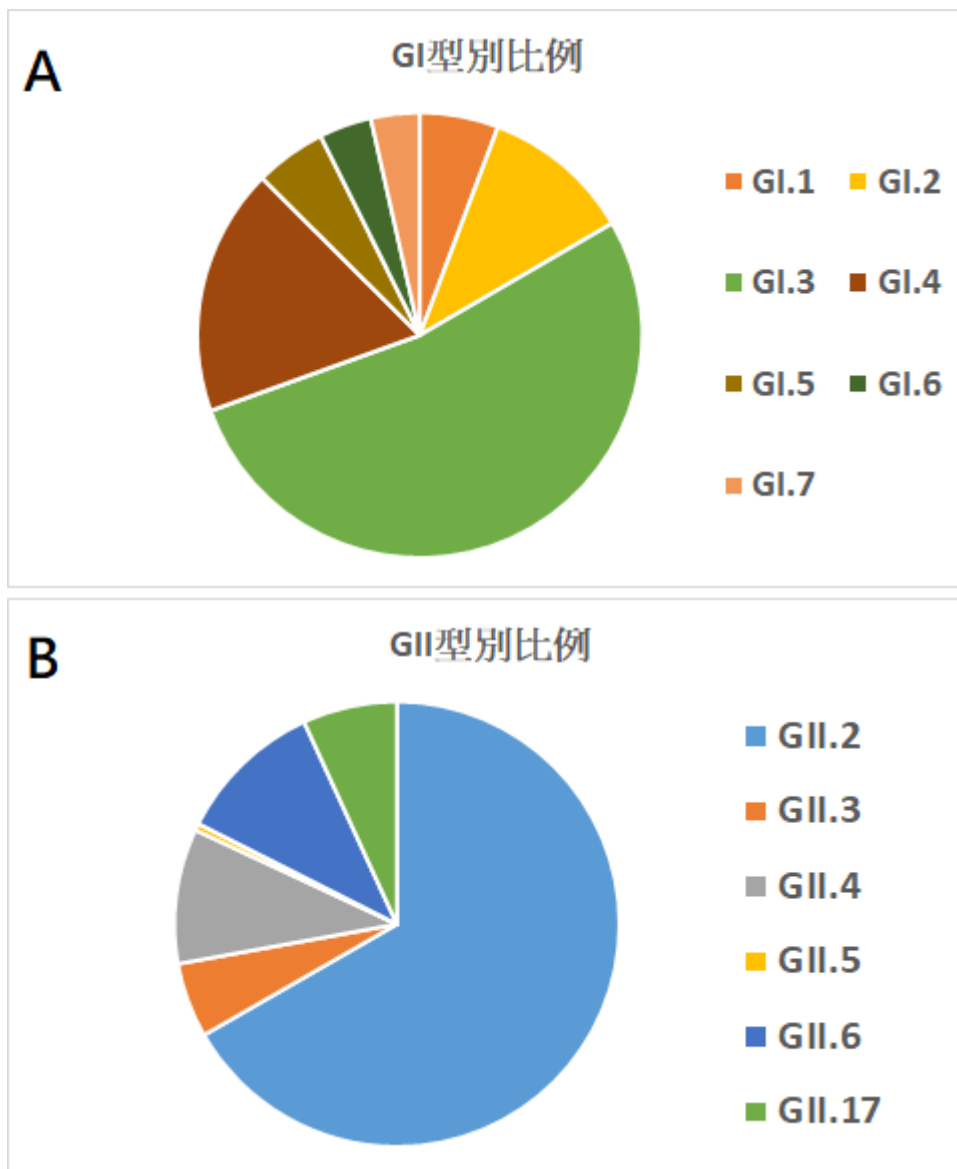
- Announc, 2015. **3**(1).
15. Katayama, K., et al., *Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses*. *Virology*, 2002. **299**(2): p. 225-239.
  16. Kageyama, T., et al., *Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR*. *Journal of clinical microbiology*, 2003. **41**(4): p. 1548-1557.
  17. Jothikumar, N., et al., *Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. **71**(4): p. 1870-1875.
  18. Wolf, S., et al., *Sensitive multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for the detection of human and animal noroviruses in clinical and environmental samples*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. **73**(17): p. 5464-5470.
  19. Scipioni, A., et al., *Animal noroviruses*. *Veterinary Journal*, 2008. **178**(1): p. 32-45.
  20. Sdiri-Loulizi, K., et al., *Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. **46**(4): p. 1349-1355.
  21. Siebenga, J.J., et al., *High prevalence of prolonged norovirus shedding and illness among hospitalized patients: A model for in vivo molecular evolution*. *Journal of Infectious Diseases*, 2008. **198**(7): p. 994-1001.
  22. Carlsson, B., et al., *Quasispecies dynamics and molecular evolution of human norovirus capsid P region during chronic infection*. *Journal of General Virology*, 2009. **90**: p. 432-441.
  23. Li, L.L., et al., *Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses*. *Journal of General Virology*, 2011. **92**: p. 2534-2541.
  24. Vinje, J., et al., *International collaborative study to compare reverse transcriptase PCR assays for detection and genotyping of noroviruses*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003. **41**(4): p. 1423-1433.
  25. Lopez-Bueno, A., et al., *High Diversity of the Viral Community from an Antarctic Lake*. *Science*, 2009. **326**(5954): p. 858-861.
  26. Pantaleo, V., et al., *Deep sequencing analysis of viral short RNAs from an infected Pinot Noir grapevine*. *Virology*, 2010. **408**(1): p. 49-56.
  27. Capobianchi, M.R., E. Giombini, and G. Rozera, *Next-generation sequencing technology in clinical virology*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2013. **19**(1): p. 15-22.
  28. Wong, K., et al., *Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters*. *Environment International*, 2012. **45**: p. 151-164.
  29. Rutvisuttinunt, W., et al., *Simultaneous and complete genome sequencing of influenza*

- A and B with high coverage by Illumina MiSeq Platform. Journal of Virological Methods*, 2013. **193**(2): p. 394-404.
30. Bartolini, B., et al., *Assembly and characterization of pandemic influenza A H1N1 genome in nasopharyngeal swabs using high-throughput pyrosequencing*. *New Microbiologica*, 2011. **34**(4): p. 391-397.
  31. Croville, G., et al., *Field Monitoring of Avian Influenza Viruses: Whole-Genome Sequencing and Tracking of Neuraminidase Evolution Using 454 Pyrosequencing*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012. **50**(9): p. 2881-2887.
  32. Bruselles, A., et al., *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 Research and Human Retroviruses*, 2009. **25**(9): p. 937-942.
  33. Willerth, S.M., et al., *Development of a Low Bias Method for Characterizing Viral Populations Using Next Generation Sequencing Technology*. *Plos One*, 2010. **5**(10).
  34. Szpara, M.L., L. Parsons, and L.W. Enquist, *Sequence Variability in Clinical and Laboratory Isolates of Herpes Simplex Virus 1 Reveals New Mutations*. *Journal of Virology*, 2010. **84**(10): p. 5303-5313.
  35. Kwok, H., et al., *Genomic Sequencing and Comparative Analysis of Epstein-Barr Virus Genome Isolated from Primary Nasopharyngeal Carcinoma Biopsy*. *Plos One*, 2012. **7**(5).
  36. Fonager, J., et al., *A universal primer-independent next-generation sequencing approach for investigations of norovirus outbreaks and novel variants*. *Scientific Reports*, 2017. **7**.
  37. Dung, T.T.N., et al., *A universal genome sequencing method for rotavirus A from human fecal samples which identifies segment reassortment and multi-genotype mixed infection*. *Bmc Genomics*, 2017. **18**.
  38. Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura, *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Molecular Biology and Evolution*, 2016. **33**(7): p. 1870-1874.
  39. Chiu, S.C., et al., *Molecular Epidemiology of GI.3 Norovirus Outbreaks from Acute Gastroenteritis Surveillance System in Taiwan, 2015-2019*. *Biomed Research International*, 2020. **2020**.

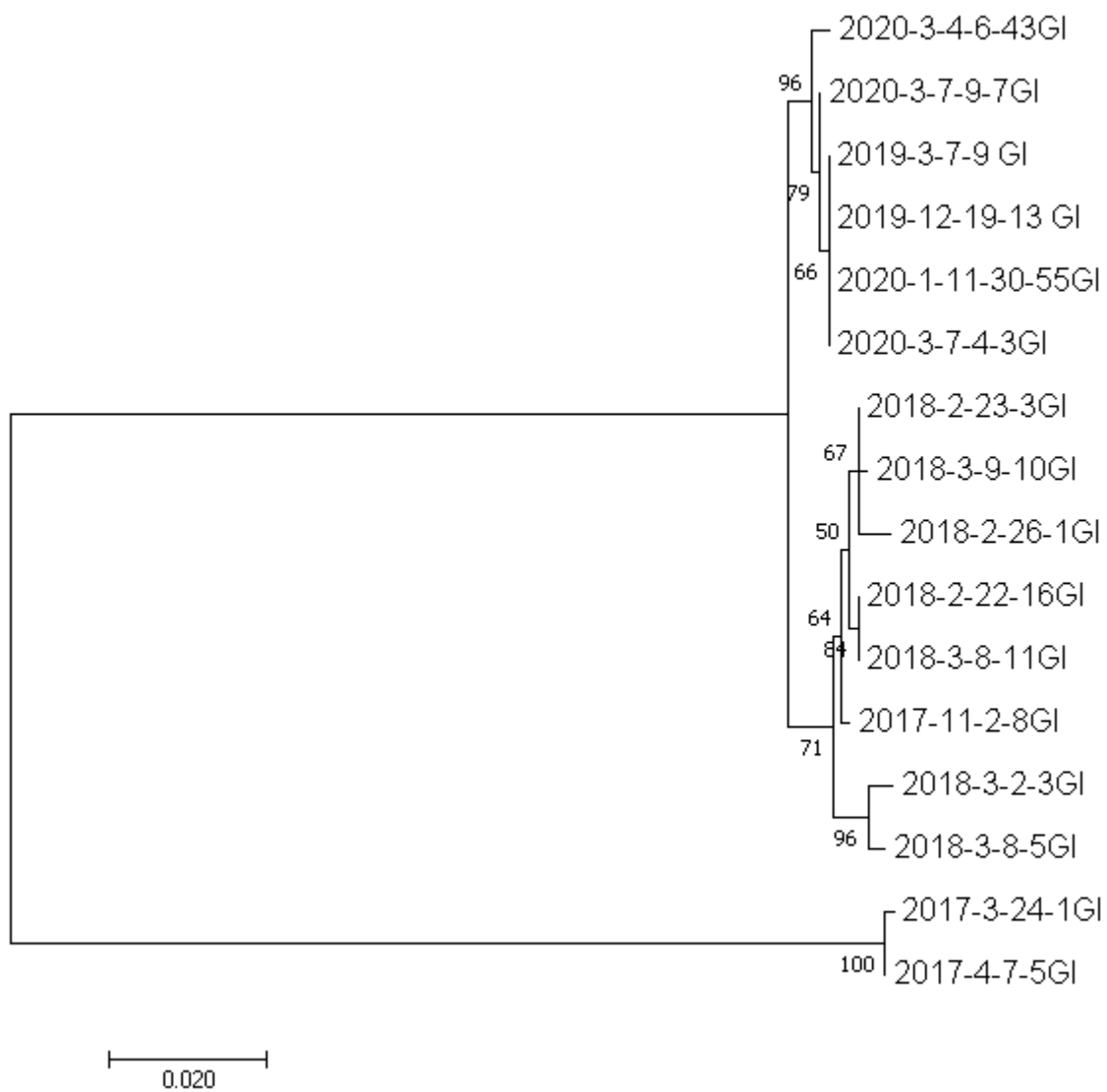
## 八、圖表



圖一、2017至2020年本國諾羅病毒GI型別(A)、GII型別(B)檢出型別。

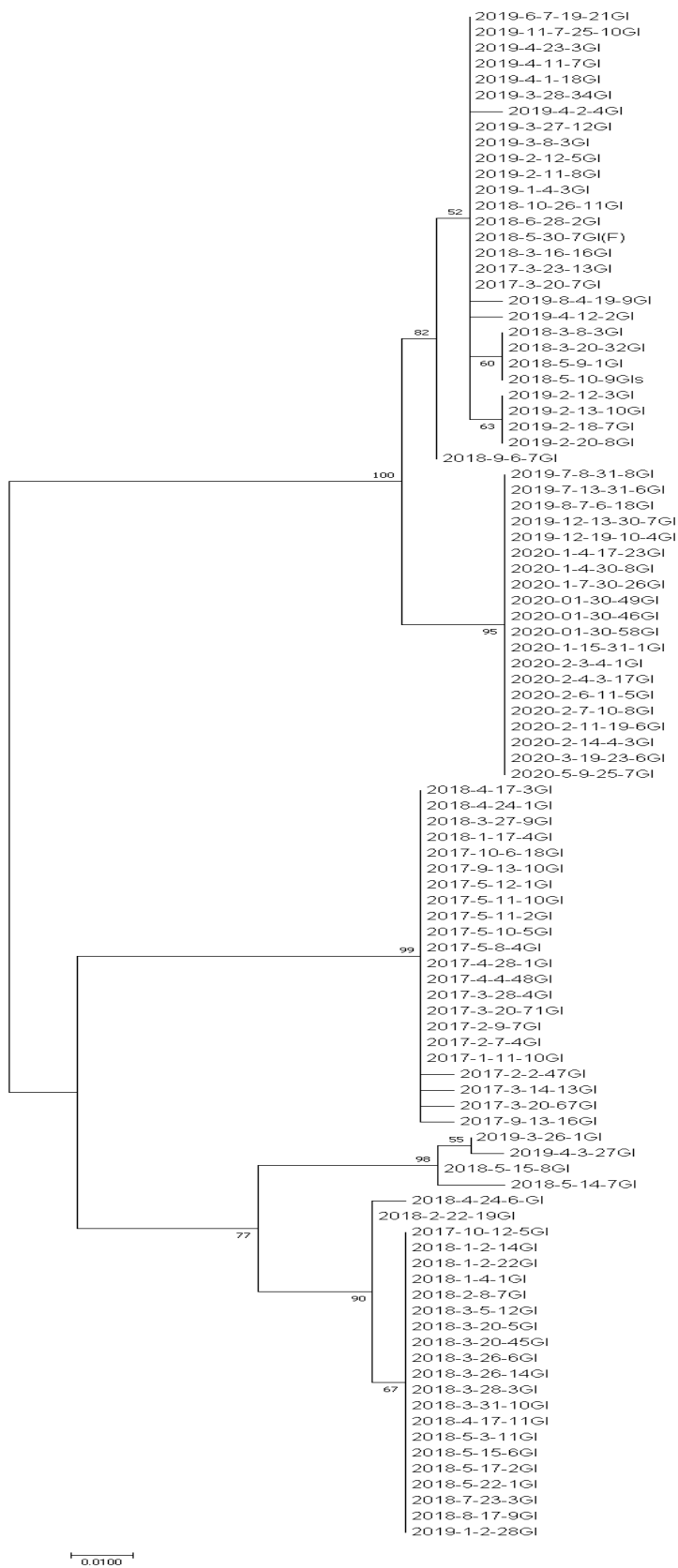


圖二、2017年至2020年本國諾羅病毒GI型別(A)、GII型別(B)檢出型別比例。

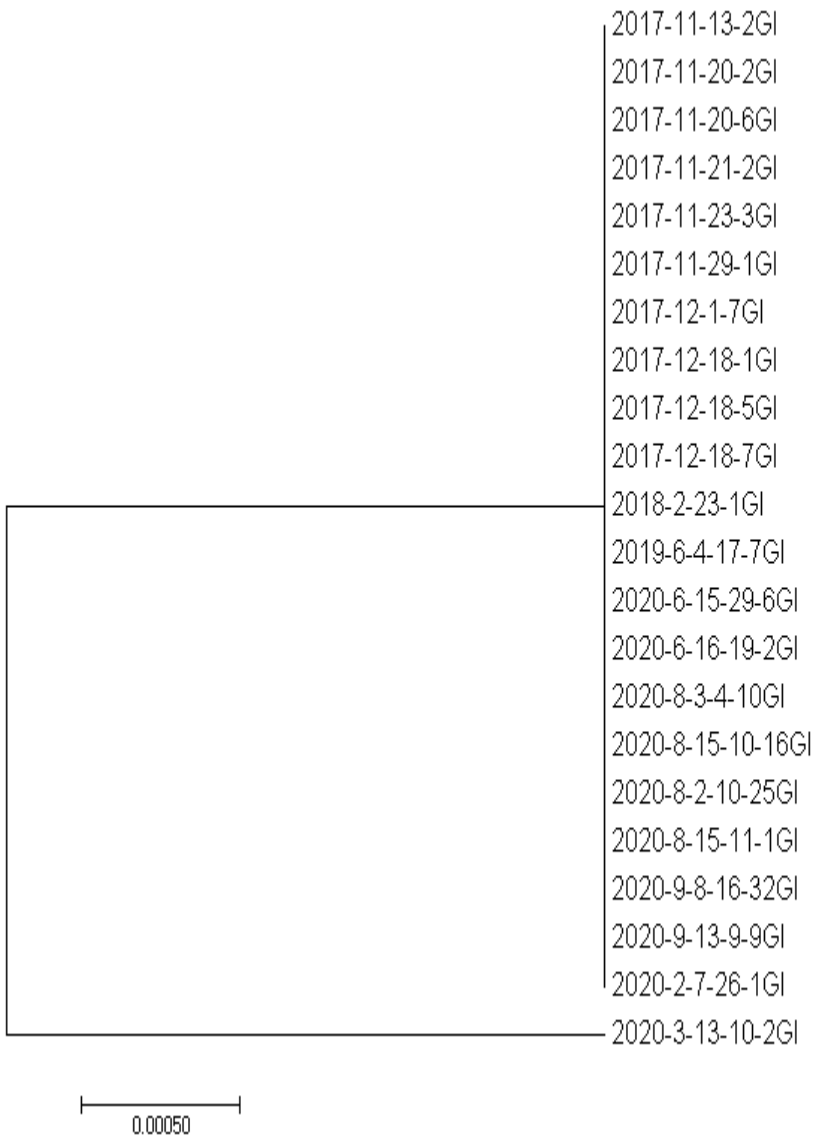


圖三、諾羅病毒GI.P1-GI.1 ML樹狀圖。

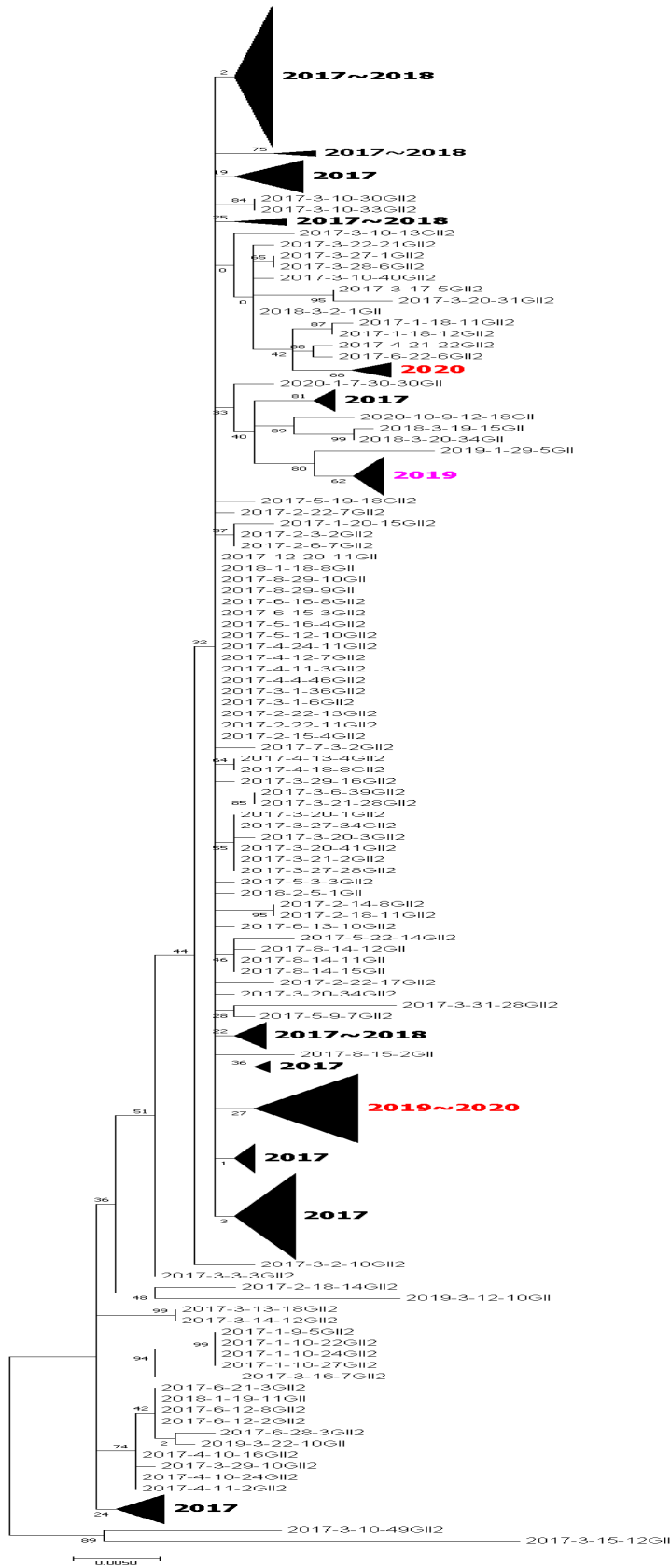




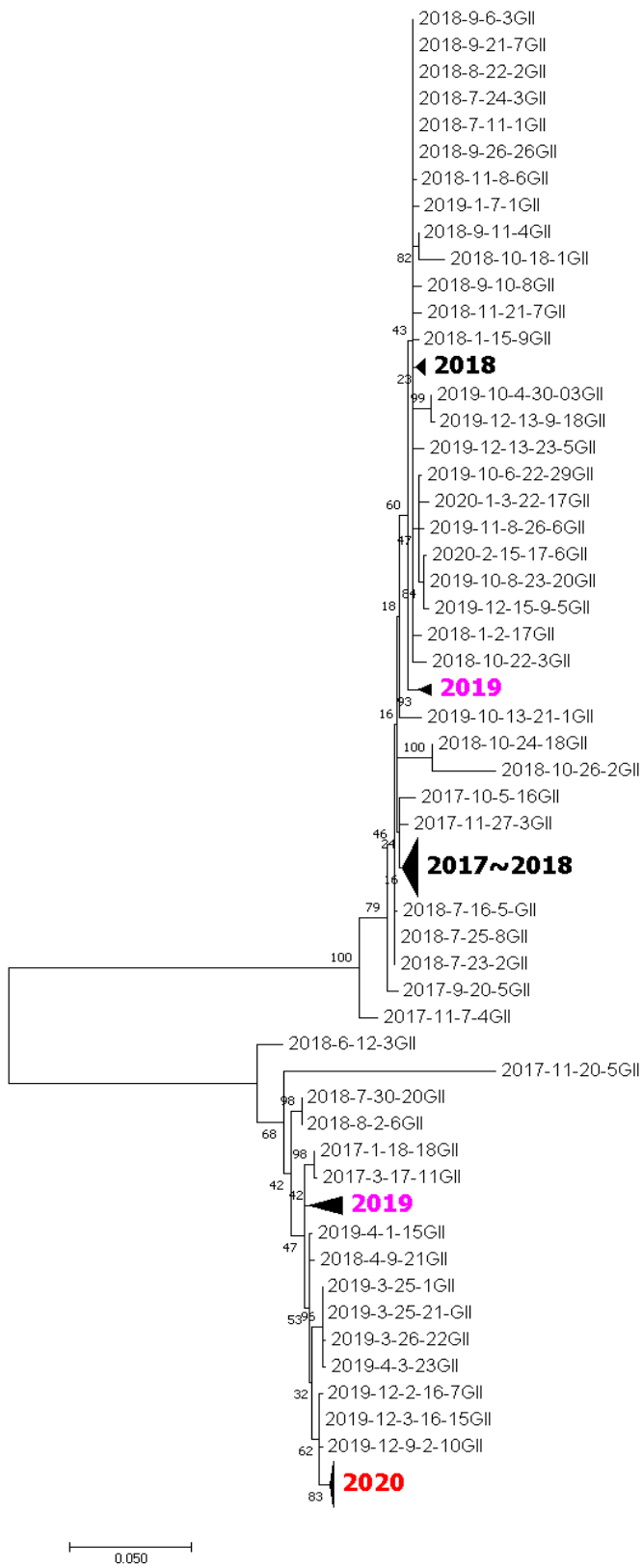
圖四、諾羅病毒GI.3 ML樹狀圖



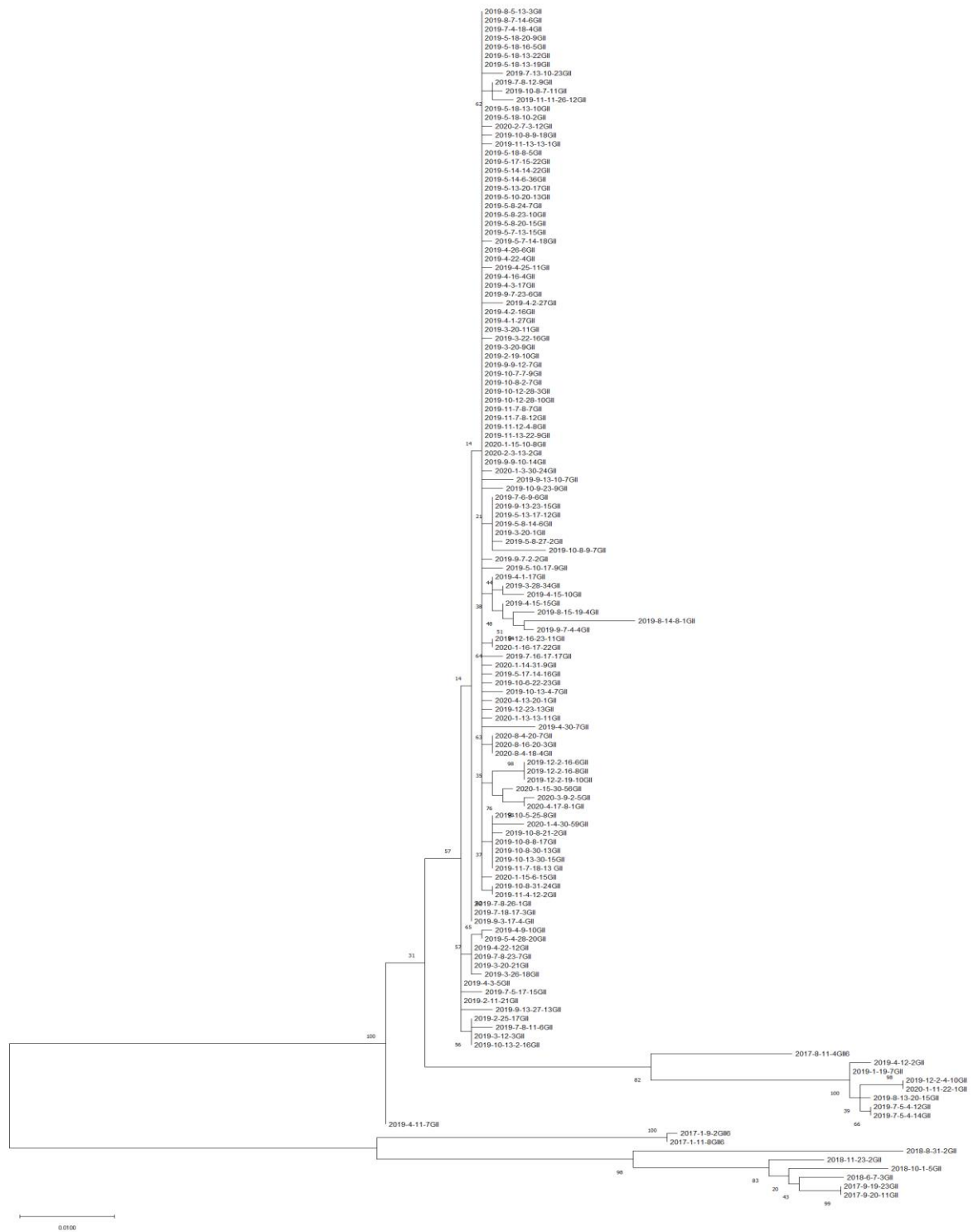
圖五、諾羅病毒 GI.P4-GI.4 ML 樹狀圖。



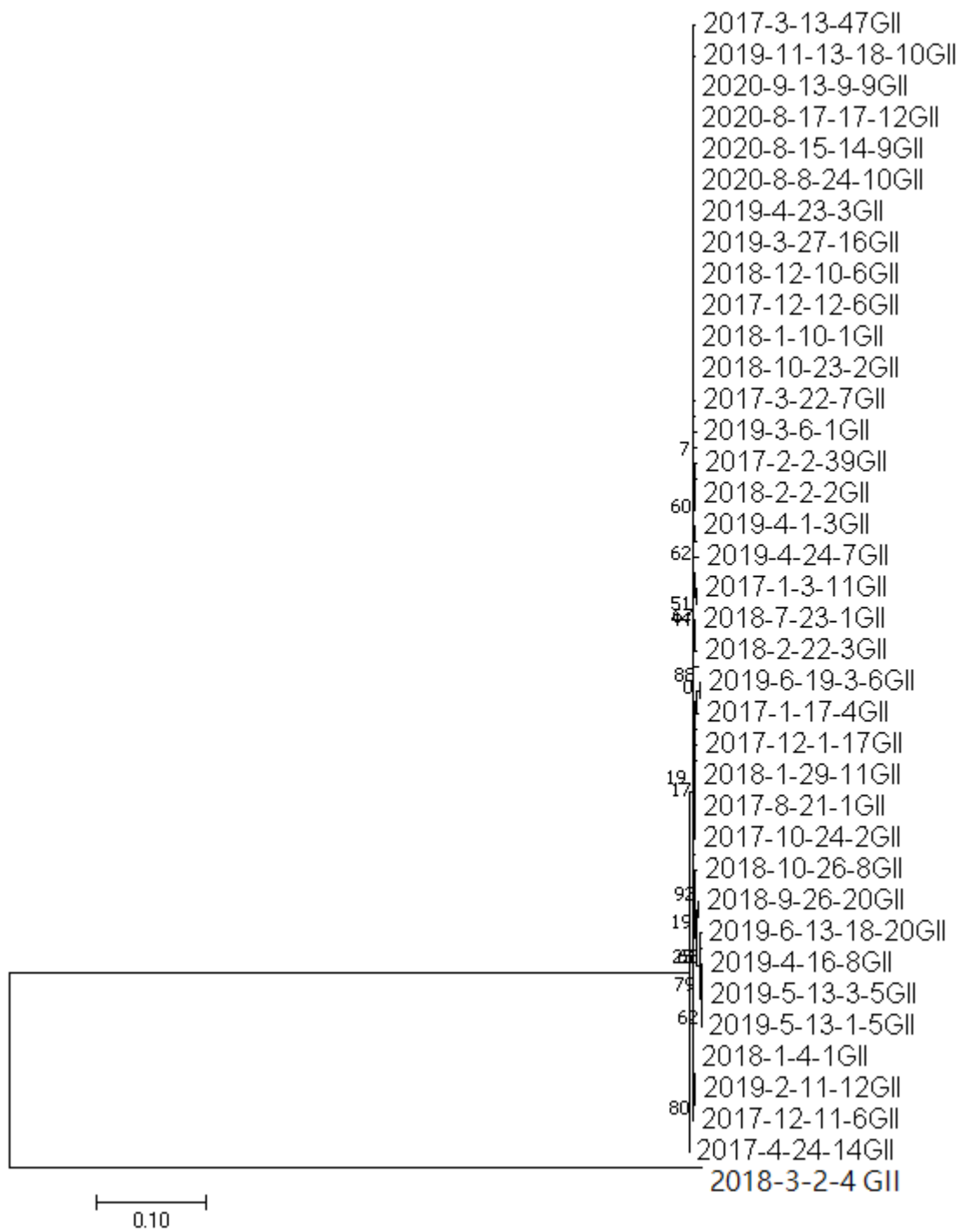
圖六、諾羅病毒 GII.2 ML 樹狀圖。



圖七、諾羅病毒 GII.4 ML 樹狀圖。



圖八、諾羅病毒 GII.6 ML 樹狀圖。



圖九、諾羅病毒 GII.17 ML 樹狀圖

## 109 年度科技研究計畫期末執行進度審查意見回復表

計畫名稱：建立高通量腹瀉性病毒全基因序列分析平台

計畫主持人：林智暉

填報日期：109.12.21

\*修正處請在報告中以紅字標示

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處頁碼
1	為新演化或新興病毒(諾羅)的基因體定序，但抗體的反應如何？在流行病學的定義為何？	本計畫未針對抗體進行分析，根據美國 CDC 統計，每人一生中會感染諾羅病毒 5 次，不同型別諾羅病毒可能會發生重複感染，且每次感染產生之抗體效力約為 2 週至 2 年。演化產生之重組或新興病毒，可能因其隨機變異位點影響抗體結合或人體內抗體已過效力保護期，造成感染。	
2	諾羅病毒疫苗的發展現況呢？	目前複數諾羅病毒疫苗研發中，進度最快為 Takeda 研發之二價疫苗，進展為臨床二期。	
3	沙波病毒的傳染原為何？存在於哪種食物？	沙波病毒與諾羅病毒同屬杯狀病毒科 (Caliciviridae)，且，上述兩種病毒都可能透過食用受汙染之甲殼類(如牡蠣、蛤蠣)生物感染人類。	
4	建議加入諾羅病毒基因型與流病資訊(含感染源)關聯性，以利政策或相關應用。若研究對象有重複 ID 者(歷年資料)，其諾羅病毒是否重	感謝委員建議，分析 106 至 109 年資料，共 12217 筆腹瀉通報中，3911 人次為諾羅病毒陽性，其中三筆重複 ID 者。兩筆為同年度先後感染 GII.6 及 GII.4；另一筆為間	

序號	審查意見	辦理情形說明	修正處 頁碼
	複感染？請補充說明之。	隔兩年感染 GII.2。	

備註：如有修正期末報告內容，請註明頁碼，並務必於 109 年 12 月 23 日

前至 GRB 系統完成資料抽換。