

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-124601

衛生福利部疾病管制署 106 年度科技研究發展計畫

新興及人畜共通腹瀉病毒實驗室診斷方法建置與監測

研究報告

執行機構：檢驗中心

計畫主持人：吳芳姿

共同主持人：郭宏偉

研究人員：林民浩、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

目錄

一、前言	6
二、材料與方法	13
三、結果	18
四、討論	23
五、結論與建議	26
六、計畫重要研究成果及具體建議	26
七、參考文獻	27
八、圖、表	31

中文摘要

關鍵詞: 輪狀病毒、重組病毒株、傳播傳染途徑、流行病學調查、氣候因子分析

在 2009-2011 年間，本署執行我國腸道感染症即時監測分析與盛行率調查研究計畫中，瞭解我國小於五歲急性腸胃炎孩童感染病原主要以輪狀病毒與沙門氏菌為主；輪狀病毒感染占總收案之急性腸胃炎孩童比例為 22.6%，其中檢出之輪狀病毒株基因型別與疫苗株型別相同僅 77~84%，仍有 16~23% 為非疫苗涵蓋之特殊基因型，也包括人-畜共同重組病毒株與新興演化病毒株。輪狀病毒疫苗於 2006 年底在台灣核准上市，目前在我國仍為自費性疫苗。

從本研究計畫收案孩童的服苗紀錄估計我國 5 歲以下孩童服苗率已近 5 成左右；收案期間設計建立檢測人與主要畜產動物之病毒檢驗分析方法，以了解我國孩童感染病毒株之流行現況，以及人與動物間病毒株之相關性。分析結果顯示我國孩童感染主流病毒株，與台灣過去 10 年間(2004-2015) 主流病毒株 G1P8 型不同，改以 G3P8 病毒株為主；監測期間病毒感染流行月份亦出現往後持續流行並有延遲至夏季的現象；深入病毒株基因分析，流行之 G3P8 病毒株之基因 DS-1 backbone 與動物輪狀病毒株極為相近，或為人-動物重組病毒株感染，與近期國際許多國家流行的病毒株之基因 backbone 相近似，但由於我國長期研究中僅有孩童輪狀病毒相關監測與病毒株資料，缺乏動物輪狀病毒的相關訊息比對，因此無法明確了解該病毒株可能感染源。

輪狀病毒感染季節，主要發生於晚秋至初春的季節，而在夏季時感染病例降低，這現象在溫帶與亞熱帶較高度發展國家比熱帶的發展中國家較為顯著。在之前對於我國就醫及住院的孩童的數篇研究也發現輪狀病毒感染在一年中溫度最低之後達到高峰，此趨勢也與歐美及其他亞熱帶地區相似。因台灣橫越北回歸線因而存在於多樣氣候帶，各地

有可能受氣候影響因而有不同輪狀病毒季的趨勢，此外近年氣候變化明顯加劇，本研究為了解國內孩童感染輪狀病毒的風險與近年氣候變化的相關性，設計以模型分析我國輪狀病毒易感染期與氣象因子相關性，以線性迴歸模式或分段迴歸方式計算氣象因子影響之閾值，並作為疫情預警之警示點，提供溫度變化之警示點，將有助於提供疫情預警以及有效防制策略的參考。

英文摘要

keywords : Rotavirus, reassortant, transmission route, epidemiology

In the study of “Surveillance and Prevalence of Gastroenteritis in Taiwan” during 2009-2011, we monitored that the most prevalent infectious pathogens of hospitalized AGE children under 5 were rotavirus and salmonella. Rotavirus was responsible for an estimated 22.6% of all diarrhea-associated hospitalizations among children less than 5 years of age, causing substantial economic burden on many families. The data also indicated that only 77~84% rotavirus genotypes were similar to vaccine strain genotypes, with the remaining classified as uncommon, novel, or rotavirus of animal origin. Rotavirus vaccine was licensed by Taiwan-FDA in 2006. However, rotavirus vaccine presently is not required by the National Health Insurance program in Taiwan and is available for purchase only within the private sector.

We have been able to estimate the vaccination rate of approximately 50% for children under age of 5 years from our hospital surveillance data. We have established protocols to identify and analyze human and animal rotaviruses simultaneous to gain an understanding of current trends in rotavirus strains and zoonotic rotavirus transmission from animal to children. Our results indicate that the dominant strain has shifted from G1P8, which was the major strain from 2004-2015, to G3P8. In 2016 we have also observed a delayed rotavirus season towards summer instead of winter. Full genome analysis of the G3P8 showed that the backbone genes are similar to animal strains and reassortant DS-1 like G3P8 strains that are circulating in Asia and Europe. However due to deficiency of long term animal rotavirus data in Taiwan it would be difficult to discern the origin of these reassortants.

Rotavirus season usually peaks from late autumn to early spring and falls off in summer. This phenomenon is more apparent in developed countries in temperate and sub-tropical regions than developing countries in tropical regions. Our previous observation and studies also showed such trend in that rotavirus infection peaked after reaching the lowest temperature of the corresponding year. Since Taiwan lies on the path of the Tropics and Cancer, there may be regional tendencies in rotavirus seasons due to diverse climate zones as a result. In order to discern the impact of climate change on rotavirus seasonal trends in children, we have analyzed various weather risk factors and rotavirus season with mathematical models. We have devised a critical temperature point at which rotavirus season starts to peak, and this may serve as a warning point and mobilize preventative measures.

一、前言：

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題，大約有上百種疾病是透過食物為媒介所造成，包括細菌、病毒、寄生蟲、毒素及 prions 等。美國於 1999 年利用各監視系統收集的資料分析指出[1]，每年約有 76,000,000 人發生食因性疾病，其中 325,000 人因此住院治療，並造成 5,000 人死亡；其中，由已知病原引起的疾病約 14,000,000 人（佔 18.42%），60,000 人（佔 18.46%）住院治療，1,800 人（佔 36%）死亡。輪狀病毒(rotavirus)和諾羅病毒(norovirus)在孩童感染急性腸胃炎上扮演很重要的角色[2, 3]。在輪狀病毒疫苗上市前，輪狀病毒是引起孩童急性腸胃住院就診的主要原因，約佔 40%~60%，其次為諾羅病毒約佔 3~31% [4-7]。目前，在許多有廣泛施打輪狀病毒疫苗的國家中，諾羅病毒則是主要造成孩童腸胃炎的病毒[8, 9]。

在 WHO 主導的全球監測計畫中，輪狀病毒在已開發中國家，是引發孩童急性腹瀉疾病的主要原因，主要感染年齡群為 5 歲以下的孩童，一旦受感染後，病童會出現嘔吐及相當嚴重的水瀉(>10 次以上/天)，因此容易造成脫水、電解質不平衡之酸中毒、抽筋甚至死亡，特別在醫療不發達的第三世界國家，孩童死亡率特別高。估計全世界 5 歲以下的孩童，每年因輪狀病毒感染住院的人數高達 2 百萬人次以上[10, 11]；亞洲地區輪狀病毒監測網開會資料顯示，亞洲國家在 5 歲以下孩童輪狀病毒感染就診率約 28% 至 59% 間[12]。比較輪狀病毒感染每年直接醫療支出，在台灣地區約 7-10 百萬美金（以 2001 年就醫紀錄估計），美國約 217 百萬元美金（以 1996 年資料估計）[13]，以 2001 年當年每個國家個人淨收入值（gross national income, GNI）平均後，每人對於輪狀病毒感染就醫支出，則台灣（1.92-2.72）與美國（2.19）間負擔相近似[14]。我國在本署與國衛院合作計畫「我國腸道病原體感染監測分析與盛行率調查整合型計劃」中，以

健保資料庫就醫資料推算 2000-2009 年間，我國 5 歲以下孩童歷年急性腸胃炎病程人次介於 82~123 萬之間，就醫花費分析估計每位孩童平均住院病程 4.9 天，直接成本與社會成本合計約 1.76 萬元，以此推估 2009 年之社會成本總額介於 2.4 至 3.3 億之間，就醫成本相當高。因此，世界衛生組織積極推動各國衛生單位重視輪狀病毒感染的問題，希望疫苗政策推動[10, 15, 16]，可以降低輪狀病毒感染後的疾病嚴重度、死亡率及醫療支出。

自 1990 年起至目前，全球仍有各藥廠與國家陸續進行輪狀病毒疫苗的開發，Wyeth Ayerst 生產的 Rotashield，曾在 1991 年獲得美國 FDA 准許進行人體測試階段，於 1998 年取得美國 FDA 核准上市，並獲得美國 CDC 建議排入小兒預防接種，但很可惜在一年之後因發生服苗孩童出現腸套疊而下架。目前使用的輪狀病毒疫苗—由 GSK 及 MSD 公司生產，2006 年 GSK 及 MSD 分別對於該公司生產的輪狀病毒疫苗，分別對疫苗使用的安全性及疫苗保護效力之人體試驗結果資料發表相關論文[17, 18]，並通過 FDA 疫苗評估，於 2006 年在世界多國核准上市，2006 年 10 月於台灣也已取得核准證照，目前在台灣仍為自費性疫苗。GSK 為單價型 G1 型輪狀病毒疫苗，MSD 為 G1、G2、G3、G4、P8 五價型輪狀病毒疫苗，均採用口服的方式，分別為口服兩劑，或口服三劑。國外研究報告證實，嬰幼兒只需在出生後六個月內，完成服用疫苗，就能預防 90% 以上嚴重輪狀病毒腸胃炎，而且幾乎可以降低因輪狀病毒感染而住院的機會。

輪狀病毒屬呼腸孤病毒科(*Reoviridae*)，輪狀病毒屬，為雙股 RNA 病毒，具有 11 個基因片段，不具外蛋白套膜，病毒顆粒為二十面體構造，由 3 層蛋白質組成外殼又稱三層顆粒(triple-layered particle, TLP)。輪狀病毒血清型以 VP6 抗原分類，目前有 A 到 G 型七種血清型[19]。主要感染人類的輪狀病毒血清型為 A、B、C，其中 A 型輪狀病毒的血清型感染流行年齡層為小於 5 歲的小孩(約 100% 皆有抗體)，在世界皆有流行

病例，並有季節性流行趨勢，以糞口途徑傳染，其動物宿主也能是禽類與哺乳類，具有人畜共通傳染的證據；B 型輪狀病毒血清型流行主要為成人，流行於東亞和南亞地區，藉由水源傳播，動物宿主為豬、牛、羊、鼠，目前尚未有人畜共通傳染證據；C 型輪狀病毒血清型流行於各年齡層(60 歲流行率約 50-60%)，世界皆有流行病例，糞口傳染，動物宿主為豬、牛、狗，有人畜共通傳染的證據[20]。目前 A 型輪狀病毒之基因分型依據以 VP7 (glycoprotein, G) 和 VP4 (protease-sensitive protein, P) 抗原雙抗原方式命名區分，至今在全球已經至少有 27 種 G 基因型和 35 種基因 P 型在禽類和哺乳類中被發現[21]，根據基因分型與親緣性序列比對，可發現不同基因上之物種來源的差異。感染人類的病毒型別至少有 13 種 G 基因型及 16 種 P 基因型所組成的 70 種組合病毒[22]；雖全球多數區域主要流行輪狀病毒株以 G1P[8]、G2 P[4]、G3 P[8]、G4P[8]、G9 P[8] 及 G12 P[8] 為主[22]，但在特殊區域與國家(如非洲、東南亞國家等)的感染病毒型別差異大，其他特殊型別病毒則陸續出現於各國文獻報導中；由於輪狀病毒疫苗上市後，目前已有 77 個國家通過申請，疫苗所涵蓋的病毒株型別以主要流行病毒株為主，因此疫苗對於特殊病毒株保護情形特別受到重視。

台灣地區在 2004-2011 年間研究計畫監測顯示，主要流行病毒基因型為 G1P[8]、G2 P[4]、G3 P[8] 型，約佔所有陽性檢出個案的 77~84%，仍有 16~23% 檢出型別為非疫苗株，主要為 G9 P[8] 與其他新興或重組病毒株；以病毒核酸序列親緣性分析，發現感染重組病毒株包括 porcine-origin、canine-origin、bovine-origin 與 human-origin 重組的 G4、G5、G12 組合 P[6] 病毒，G3 與 P[25] 重組，G3 與 P[3] 重組、G3、G5、G9 組合 P[19] 病毒等[23-26]，這些病毒株感染的病童都出現較嚴重的急性腸胃炎臨床症狀，但由於缺乏個案的接觸環境史資料，我國過去也缺少本土動物輪狀病毒感染帶病毒狀況的相關資料，因此仍無法明確的推測病毒株的可能感染傳播方式與途徑。

A 型輪狀病毒是造成圈養牲畜腹瀉的主因，造成之腹瀉症狀在農業經濟上造成極大損失[20]，從動物研究資料中顯示，小牛在 4 周大時感染會有生命危險，牛隻感染也造成體重下降，其腹瀉症狀的糞便檢體中 47% 為輪狀病毒陽性[27]；豬隻感染導致腹瀉症狀，其腹瀉群聚有 70% 為 A 型輪狀病毒陽性[28]；亦是幼豬在 3 個月大前腹瀉的主因[29]。雖病毒感染具有宿主專一性，但不同宿主之輪狀病毒能感染人類與動物，其人畜共通傳染的證據也在許多文獻上被發現。1996 年美國報導，一個受感染的孟加拉嬰兒糞便中分離出牛-人的輪狀病毒重組變異株(Bovine-human reassortant strains)[30]；2000 年法國的研究，從曾經感染過輪狀病毒的 56 個小孩的家中採取飲用水樣本，56 個水樣本中檢測出 4 起輪狀病毒陽性案例，其中 3 起之基因來源為動物(豬或牛)，1 起基因來源為人類[31]。將人類致命的輪狀病毒株(Wa strain)接種至小豬，會造成腹瀉和病毒血症；然而，減毒的人類輪狀病毒株卻不會有症狀[32]。在新生老鼠的模型中，接種人類輪狀病毒株(HAL116strain)同樣也能感染造成病毒血症[33]。禽類的輪狀病毒被認為會傳給哺乳類動物，卻沒直接證據，2001 年日本的研究，鴿的輪狀病毒(PO-13 strain)會感染鼠類引起腹瀉症狀，但是火雞輪狀病毒(Ty-3 strain)卻不會有症狀，為第一篇禽類輪狀病毒感染哺乳類的報導[34]。

近年來發現一些罕見感染人類輪狀病毒基因型，藉由親緣性分析可發現跨物種的基因來源。2009 年匈牙利的研究中，感染輪狀病毒住院的小孩糞便中分離出一些不常見到的病毒株 P[9]G3、P[14]G6、P[14]G8，經分析發現與牛、豬、貓、馬和兔之輪狀病毒株有高度相似性[35]。2011 年比利時與義大利的研究中，同樣也是從住院小孩中分離出來的罕見病毒株 G3P[3]，發現與貓和狗的 A 型輪狀病毒之基因形成重組變異株[21]。保加利亞也發現罕見重組變異株 G5P[6]，為人-豬混合的輪狀病毒株[36]。在 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，輪

狀病毒型別為 P[6]、P[19]基因型與 G3、G5、G9 重組的病毒[23, 26]。2012 年臺灣也發現狗-人的重組變異株 G3P[3]，為東亞地區首次發現輪狀病毒變異株之物種來源為狗的報導[25]。輪狀病毒 VP4 是主要構成 spike 蛋白質，負責病毒黏附細胞，及穿透細胞膜使病毒進入細胞的功能。VP4 可以被裂解為兩個次單元(subunit)，VP5*和 VP8*[37-39]。VP8*被認為是參與病毒黏附到宿主細胞的主要蛋白質，而 VP5*是幫助組成病毒顆粒雙殼構造，在病毒感染時於細胞表面的 spike protein VP8*會與宿主細胞 HBGAs 結合[40]。最近研究發現感染人類的輪狀病毒基因型中，P[4]、P[6]和 P[8]會辨識人類的 HBGAs；P[4]和 P[8]會辨識 Lewis b 和 H1-type 的抗原，而 P[6]只會辨識 H1-type 的抗原[40]；另外 P[9]、P[14]和 P[25]會辨識 A 抗原[41]，亦有其他的研究下，亦發現 P[14]的 VP8*會辨識 HBGAs[42]。這些研究數據皆顯示宿主的 HBGAs 型別，對於是否被哪一種輪狀病毒病毒株感染有很高的相關性，亦可能與某些特殊的輪狀病毒株引起人-動物輪狀病毒感染具有相關性。

在輪狀病毒尚未被發現前就已知在孩童中有冬季性腸胃炎(winter gastroenteritis)的現象[43, 44]。在 1990 年 Cook et al.的一篇早期綜合分析世界 23 個國家的 34 篇監測報告後發現此現象於歐美及北亞等溫帶地區最為顯著，以秋至春季為高峰期並在夏季大幅下降甚至達到零件案例，反觀越接近赤道的國家則此現象越不明顯，一年四季都有中高度輪狀病毒的發生率[44]。但在早年世界衛生組織(WHO)尚未訂定標準檢測法前檢測方法並不一致(電子顯微鏡、免疫分析法、核酸電泳法)，因此在 2002 年 WHO 訂定了針對在醫院及社區中的兒童之輪狀病毒監測手冊，而在 2013 年 Patel et al.整理了 99 篇符合 WHO 訂定的檢測方法之監測研究報告，相較於早期 Cook et al.的研究報告，較能反映全球輪狀病毒之實際流行分布狀況與病毒之深入性研究[15, 45]；相對於 1990 年 Cook et al.的分析，這篇較新的研究顯示溫帶和亞熱帶地區，輪狀病毒感染於冬季高峰期的現象

並不如以前認為的那麼顯著，反而在於一些熱帶地區也有季節性，且溫帶地區也有全年性的輪狀病毒流行現象，但綜合來看歐美及紐澳的流行季節性仍比亞洲、非洲及南美洲的明顯許多[45]。雖然氣候及緯度因素在眾多篇研究中已經被探討過，分析中亦提出國民收入可能是比氣候還適合的輪狀病毒季節性預測指數，不論是位於溫帶或熱帶區，在較高發展的國家裡有明顯的冬季流行並且大多數為單一種病毒株流行，但發展中國家幾乎全年度都有中高的感染率且感染病毒株種類也較多樣化[22, 45]。但因各監測地區位於不同的氣候帶及地理環境，尚有雨季或颱風等氣候現象，在不同地區的研究可能會有不相應的結果。例如在英國和荷蘭溫帶地區的研究發現溫度一旦高於攝氏 5 度後上升每一度會感染率降低 13% 的輪狀病毒感染率，而降雨量及濕度是沒有顯著的影響，相反的另一篇在孟加拉的研究卻發現氣溫在過了攝氏 29 度後每上升一度則感染率會增加 40.2% 而且低濕度及高河流水位也和感染率上升有關連[46, 47]。雨季和水量在熱帶地區對於輪狀病毒流行有著顯著的影響，在南亞季風(monsoon)和颱風等帶來的雨季造成河流暴漲及淹水也會影響衛生條件及散播水中傳染病，尤其是熱帶發展中地區較常見的人畜近距離生活及不良的廢水設施，都是可能造成動物和人類輪狀病毒互相傳播的原因[48]。如所羅門群島的首都霍尼亞拉在 2014 年熱帶型低氣壓引起的水災後造成散播至全國超過六千例的重大腹瀉事件，並在 38% 案例中發現輪狀病毒[49]。在一些跨越多種氣候帶的國家的研究也發現在不同氣候帶輪狀病毒對於氣候因素的反應也不一樣，如在澳洲處於常濕溫暖氣候帶的布列斯本，輪狀病毒流行季對於溫度和濕度有較強的反應[50]。台灣土地雖小，但因為地形及跨越北回歸線因素，氣候也富有多樣化。根據柯本氣候分類法台灣有四大類：北部及東部多為常濕溫暖氣候(Cf)、中部和屏東北部為冬乾溫暖氣候(Cw)、而北回歸線以南的台南、高雄、恆春為熱帶季風氣候(Am)和屏東南部則為熱帶乾濕季氣候(Aw)[51]。在民國 2007 至 2009 年孩童腹瀉監測計畫中，從北中南三

家醫院輪狀病毒監測結果觀察到當時輪狀病毒感染有明顯的冬季輪狀病毒流行現象，並且在一年溫度最低的二個月之後(二至三月)達到高峰期[52]。本研究第一年以上述三年的資料為主初步分析，通常為十一月氣溫開始下降低於 23 度後輪狀病毒感染陽性率開始上升，而三月到四月時氣溫回暖至 20 度後病毒感染陽性率也隨之下降，可見在台灣輪狀病毒與氣候也是有關係[52]；而在台灣濕度和降雨量等其他氣候參數和輪狀病毒流行關係還尚待探討，和造成淹水或較重大災情的颱風也可能影響病毒的散播及傳染。

二、材料與方法：

一、 檢測病毒抗原

輪狀病毒檢測：

將糞便檢體與PBS 以1:10 (w/v, v/v) 混合均勻，以無菌吸管吸取至已滅菌之離心管中，於4°C，3000×g 離心15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，標示號碼及日期，繼續酵素免疫分析。另一分裝一管糞便，貼上編號貼紙及日期，保存於4°C。酵素免疫分析法使用 γ -biopharm生產的RIDACSCREEN® Rotavirus檢測，分別取處理過之糞便檢體上清液100 μ L 置於RIDACSCREEN® Rotavirus的微小孔(microwell)中，並加入2滴Enzyme Conjugate，於室溫中靜置反應60分鐘後，去除混合反應液再用清洗液300 μ L 清洗5次，拍乾微小孔中水分，之後加入2 滴 Substrate/Chromogen室溫避光靜置15 分鐘，再加1滴stop solution。經由ELISA reader (μ Quant)測450 nm的吸光值判讀結果。判讀結果：吸光值大於Cut-off值(negative control 吸光值加上0.15)，判定為陽性反應。

二、 病毒分子檢測

1. RNA 的萃取：

取處理過之檢體上清液140 μ L，利用QIAamp viral RNA mini Kit (Cat. No. 52906) 萃取病毒RNA，最後萃取出60 μ L RNA，並加入0.6 μ l RNaseOUT enzyme，置於-80°C待用。

2. 逆轉錄酶-聚合酶連鎖反應(RT-PCR)：

2.1 逆轉錄酶反應：5 μ l RNA加上1 μ l Random primer(3 μ g/ μ l)與7 μ l的水

混合均勻，65°C 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 (4 μ l 5X RT buffer, 2 μ l 10mM dNTP, 0.5 μ l RNase inhibitor(40U), 0.5 μ l Reverse Transcriptase(20U/ μ l))，總體積為20 μ l，25°C 反應10分鐘，50°C 反應45分鐘，85°C 反應 5分鐘在降溫至4°C 待用。

2.2 聚合酶連鎖反應：

測試各檢測基因引子對設計，自基因資料庫搜尋各種病毒株序列設計調整。

(1) 輪狀病毒VP7基因(G type)：以逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l 9BEG(10 μ M), 0.5 μ l 9END(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C 反應2分鐘之後進行40個循環：94°C 反應45秒，42°C 反應45秒，72°C 反應90秒。接著72°C 反應10分鐘，降溫至4°C。

(2) 輪狀病毒VP4基因(P type)：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l Con2(10 μ M), 0.5 μ l Con3(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C 反應3分鐘之後進行40個循環：94°C 反應30秒，50°C 反應2分鐘，72°C 反應1分鐘。接著72°C 反應7分鐘，降溫至4°C。

(3) 輪狀病毒VP6基因：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l VP6F(10 μ M), 0.5 μ l VP6R(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C 反應3分鐘之後進行40個循環：94°C 反

應45秒，55°C反應45秒，72°C反應2分鐘。接著72°C反應10分鐘，降溫至4°C。

(4) 輪狀病毒NSP4基因：用逆轉錄酶製成的2.5 μ l cDNA加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μ l 10X PCR buffer, 4 μ l 2.5mM dNTP, 0.8 μ l Taq (5U/ μ l), Primers: 0.5 μ l JRG30(10 μ M), 0.5 μ l JRG31(10 μ M), 14.2 μ l H₂O)，總體積為25 μ l。進行聚合酶連鎖反應，94°C反應3分鐘之後進行40個循環：94°C反應45秒，50°C反應45秒，72°C反應1分鐘。接著72°C反應10分鐘，降溫至4°C。

3. 序列分析與比對

3.1. 使用ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列分析，反應條件如下：取適量RT-PCR反應產物、1 μ M反應引子(9con1或9con2)、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於96°C作用1分鐘，之後反應條件為96°C 10秒、50°C 5秒、60°C 4分鐘，共25次循環。反應產物純化：為減少反應混合物中游離標記物之干擾，先將定序反應後之產物純化。將定序反應產物10 μ L加入等體積的ddH₂O、60 μ L的絕對酒精、5 μ L的125 mM EDTA，於室溫下靜置15分鐘，再以4000 rpm離心30分鐘；去除上清液後，以70%酒精清洗，4000 rpm離心5分鐘，最後將沉澱物烘乾，再加入10 μ L Hi-diformamide。基因定序反應：將純化後產物置於96°C作用2分鐘後，馬上置於冰上，再放入ABI 3730自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autoseqencer) 進行核酸序列分析。

3.2. 病毒基因庫分析比對：將定序後之核酸序列與NCBI基因資料庫或輪狀病毒資料庫已知之基因序列進行比對分析，以確定病毒序列宿主來源相關性。

4. 整合檢體來源分析病毒株的流行區域分布：依病毒株型別與序列比對分析結果，整理相同/相似病毒株在各區域分布的狀態，定期回饋給網絡。並將醫院與動物監測檢出輪狀病毒株之檢體，進行採檢時間、地區分布比較，討論可能時序的相關性，並將從收案端問卷資料查尋發病前的動物接觸史，推測特殊病毒株及人-畜重組病毒株之宿主環境與感染途徑。

三、 氣候變化與病毒流行相關性分析

1. 以歷年腹瀉定點監測之資料，進行氣候相關性分析。向中央氣象局取得全台灣測站歷年氣象資料包括日平均氣溫、日平均相對濕度、日累積降水量、及一小時最大降水量等數據等。這些氣象資料再與歷年收案腹瀉定點監測之輪狀病毒陽性數和陽性率依時間(月/週/日)排序。以線性回歸等統計學和建立數學模型以判定各個氣象因素與輪狀病毒之關聯性分析。
2. 腹瀉資料擷取檢體收件日介於 2014 年至 2016 年之腹瀉定點監測資料，資料期間共計自 10 家醫院、收集 3671 筆 5 歲以下兒童腹瀉住院病患檢體，參加監測醫院分布與收案個案之居住地分布如圖六，並以年週為單位計算輪狀病毒陽性檢出率，計算方式如下：

$$\text{輪狀病毒陽性檢出率} = \frac{\text{當週輪狀病毒陽性件數}}{\text{當週總收件數}} \times 100\%$$

3. 為探討氣象因素與病毒流行之關聯，本研究亦自中央氣象局觀測資料查詢系統 (<http://e-service.cwb.gov.tw/HistoryDataQuery/index.jsp>)，擷取各週氣溫、濕度與降水等氣象條件，並利用皮爾森相關係數(Pearson correlation coefficient)，初步探索前述氣象因子與輪狀病毒陽性檢出率之相關性。
4. 經前述步驟後，擇取相關係數高、預警時間早及資料取得容易之變數，建構氣

象因子與輪狀病毒陽性檢出率之線性迴歸模式：

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 x + \epsilon$$

5. 上式中， y 為輪狀病毒陽性檢出率， x 為氣象因子， α_0 為截距項， α_1 為氣象因子影響效果之參數估計值， ϵ 為殘差項。而因在描述性統計之結果中（見後文），發現氣象因子與輪狀病毒陽性檢出率之相關具有一分段點（閾值），在低於分段點時，氣象因子的影響效果與高於分段時不同。考量此一資料特徵，遂採用分段迴歸 (piecewise regression) 的方法，訂定分段點為 c ，使：

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 x + \epsilon \quad (x \leq c)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 x + \epsilon \quad (x > c)$$

整合二式，則：

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 x + (\beta_0 - \alpha_0)_{x>c} + (\beta_1 - \alpha_1)_{x>c} x + \epsilon$$

分段迴歸除可更合宜反映自變項與依變項之間的非線性相關外，其估計時更可透過迭代 (iteration) 的方式計算氣象因子影響之閾值，並作為疫情預警之警示點，兼具實務應用的意涵。

三、結果:

1. 孩童輪狀病毒感染與病毒株監測

為探討國內孩童於後疫苗時期之輪狀病毒感染現況與病毒株流行情形，本研究以腹瀉孩童定點監測收案之剩餘檢體，進行我國孩童感染之輪狀病毒分子檢測與病毒基因分析；為探討病毒株變化情況，並進行與過去幾年間收案檢體之輪狀病毒監測比較，以及病毒株型別分析比對。

本(2017)年1-10月間共收集自北中南東10家醫院腹瀉住院孩童糞便檢體1007件，檢出147件輪狀病毒陽性(陽性率14.6%)，過去分年從台灣各區8家(2014)和10家(2015-2017年10月)醫院中分別收集1,007、1,432、1,223及1,007件腹瀉孩童糞便剩餘檢體。2014、2015、2016及2017(1-10月)年輪狀病毒檢測陽性率分別為8.1% (82/1,007)、9.9% (142/1,432)、15.5% (131/1223)、14.4% (147/1007)，雖2014~2017年輪狀病毒監測期間陽性率，相較於2005~2011年有明顯降低的趨勢，年平均陽性率從16.3%~29.8%下降至8.1~14.5% (圖一、表一)，顯見疫苗有一定的保護效果，但我們也發現在2016~2017年輪狀病毒感染有出現些微增加。

我國輪狀病毒感染主要於2-5月間，感染高峰在3月，過去幾年資料與近3年感染整合如圖一(A)，近4年周趨勢如圖一(B)，流行趨勢顯示從2016年輪狀病毒感染季節有往後延續並維持10~20%間陽性率的現象；分析主要感染病毒株以G3P8為主，從2015年起已明顯增加，至今年G3P8陽性率已達(113件, 76.9%)，其他常見感染病毒株型別包括G1P8(2件, 1.4%)、G2P4(5件, 3.4%)、G9P8(13件, 8.8%)，另特殊病毒型包括G8P8(3件, 2.0%)及G10P11(1件, 0.7%)，資料如表二。

分析歷年主要流行病毒株變化，2005-2014 年主要以 G1P8 為主流病毒 (58.5%)，在 2015 年 G1P8 病毒株陽性分率下降至 22.9%，至今(2017)年 1-10 月間 G1P8 病毒株感染率非常低 (1.4%)；而 G3P8 型別病毒株從 4.9% 逐年上升至 76.9%，並於 2015-2017 年取代 G1P8 成為的主要感染型別病毒株(圖二)。此外，從孩童感染的病毒株監測中，在 2014~2017 年總共有 14 件屬於特殊型別輪狀病毒 (約占全部陽性的 2.8%)，其中 2 件 G9 基因型以基因親緣性分析疑似為豬隻輪狀病毒來源的 G9 基因型 (G9P13、G9P19)，8 件 G8 基因型以基因親緣性分析疑似為牛隻輪狀病毒來源的 G8P8 病毒株，與亞洲區國家日本、越南及泰國人類感染病例，以及印度的牛分離病毒株極相近(表二、圖七)。

2. 新型 G3P8 輪狀病毒感染與收案孩童服苗效益分析

分析我國孩童感染病毒株，其中 G1P8、G2P4、G3P8、G9P8 為全球孩童主要感染病毒型別，為疫苗可保護病毒型，台灣過去 10 年間(2004-2014)主要感染病毒以 G1P8 型為主，自 2015 年起出現主流病毒株變化改以 G3P8 病毒株為主(圖二)，因此本研究接續探討主流病毒株改變以及流行季往後延續及陽性率逐漸緩升的現象是否與孩童服苗狀態改變、病毒株的演化或重組、及疫苗保護狀態改變有相關。

以定點醫院腹瀉收案孩童之服苗紀錄資料估計孩童的服苗狀況，2009-2011 及 2014-2016 年收案孩童服苗率分別為 15~27% 及 44~54% (圖三)，同期輪狀病毒感染率為 16~20% 及 8~10%，由圖四顯示於 2009-2016 年間，我國輪狀病毒疫苗服苗率有明顯上升，服苗率提高，而感染輪狀病毒比例亦有明顯下降趨勢。此外，在 2009-2011 及 2014-2016 年期間，從收案腹瀉孩童檢驗為輪狀病毒感染者，其有服苗分別佔 1.0-1.9% 及 1.5-4.5%，顯示曾服苗但服苗後感染輪狀病毒的比率在 2014-2016 年增加(圖三)；初步分析 2009-2011 及 2014-2016 年腹瀉與輪狀病毒感染

之收案孩童中，最後一次服苗日與有症狀感染日之平均間隔天數明顯上升，排除極少數服苗 6 個月內感染或檢出病毒株與疫苗株相同的個案，間隔平均天數 746 天，最長間隔天數約 1674 天(約 4.5 年)(表三)；為探討此現象與疫苗病毒株相關性，將 2009-2011 及 2014-2016 年間感染有服苗者之病毒株型別分析(圖五)，發現在 2015-2016 年多數感染且有服苗者均感染 G3P8 型病毒，惟 G3P8 為疫苗可保護之型別，為確認 2015-2017 年 G3P8 的病毒株是否出現變異，先以病毒可以使宿主產生中和抗體相關之 G 及 P 外套膜蛋白之 VP7 及 VP4 全段基因，分別分析 2015-2017 年與過去台灣流行株及疫苗株比較，並進行親緣相關性分析(圖六)，結果顯示 2015-2017 G3P8 病毒株與國際流行的 DS-1 like 病毒歸在相同 cluster，而與疫苗株或過去台灣流行之 G3P8 非同一 cluster，相似度僅 < 90%。因此推測，主流感染病毒株之變化，以及服苗後再感染的比率增加，可能與新型病毒株或感染者離服苗間隔時間較久免疫保護不足有關。後續研究以 2014~2016 年收案的孩童探討疫苗保護效益，並將分析病毒株變化的位置是否落在 epitope site，以提供免疫保護相關的佐證。

為進行輪狀病毒疫苗效益評估，本計畫將自 2014 年 2 月至 2017 年 1 月收案之 8 個月至 5 歲以下的孩童，以輪狀病毒感染(RV+)之急性腸胃炎病例(AGE cases) 視為病例組(case group)，急性腸胃炎病例檢體檢驗呈現輪狀病毒陰性(RV-)者以及健康收案(近 2 周末出現腸胃炎)之配對對照組(Non-AGE controls) 視為兩種不同之對照組(control group 1, control group 2)，並針對收案年齡進行配對，相距歲數不超過 1 個月，並刪除疫苗狀態未知或是回答不全者。配對組數最少為 1:1，最多可達 1:4，其中配對完成之 case group、control group 1、control group 2 分別為 299 位、1193 位以及 1168 位。三組基本資料、生活環境與接觸史、服用輪狀病毒疫苗比率可參見表四。以 Conditional Logistic Regression 進行疫苗效益分析，並加入性別、教育程度以及地區修正。結果針對小於 5 歲孩童，不論是以 RV-negative 之 AGE

cases 為對照組或是以 Non-AGE controls 為對照組，甚至將兩組合併，其完整服完兩劑 Rotarix 有效保護約七成七至八成五；而完整服完三劑 RotaTeq 有效保護力約九成三至九成六(表五)。

另外，特殊病毒株 G8P8 自 2000~2014 年陸續於歐亞非洲國家陸續出現報告病例，全球孩童感染疫情與重組新病毒株有關。由於過去在台灣孩童感染此病毒株病例數不多，僅曾在 2008 年檢出 1 例 G8P14 病例，親緣演化樹分析該重組病毒株與牛隻輪狀病毒株相近似；但近年陸續在 2014-2015 年引起幾起腹瀉群聚事件，發生場所包括老人安養中心、高中、國中，分別發生在台北、桃園及台中；另在 2014-2017 年(1-5 月)間腹瀉孩童監測中陸續檢出 7 例 G8P8 型病毒株感染病例，分別於 2014(2 例)、2015(3 例)、2017(2 例)，依居住地區分有 5 例居住在北區、1 例彰化及 1 例台南，除 2015 年 1 例曾服苗外，其餘 6 例均未服苗，相關動物接觸史、出入疑似場所因病例數不多仍無法找到共通性(表六)。由於輪狀病毒感染以 2 歲以下孩童為主，過去感染病例出現群聚、或在 5 歲以上孩童、成人的病例報告不多，因此在我國群聚監測以及本研究孩童監測檢出 G8P8 病毒株感染，發生於 5 歲以上學童及成人/老人，值得特別留意。初步就我國病例及國際病例之感染病毒株比較，分析病毒外套膜 VP7 與 VP4 基因與疫苗及動物病毒株的相似性，以探討此病毒在我國感染狀況與動物株及疫苗相關性。病毒株親緣演化分析如圖七，親緣演化分析顯示，從 5 歲以下孩童監測病例以及群聚事件的收案分析病例與亞洲國家(越南、日本、泰國)病毒株落在相同 cluster，與印度牛的輪狀病毒動物病毒株相近，但與我國監測的牛隻輪狀病毒動物病毒株(VP7)不同，推測我國感染的病毒株屬亞洲共同流行病毒株，病毒重組來源可能非本土型人-動物重組病毒株。

3. 建立以分段迴歸模式分析氣象因子與輪狀病毒流行相關性

以分段迴歸模式分析輪狀陽性檢出率與各項氣象因子之皮爾森相關係數分析

結果(表七)。皮爾森相關係數分析顯示，當週平均溫度、當週最低溫、當週平均露點溫度與當週最小相對濕度和輪狀病毒陽性檢出率有低度相關。若分別以 1、2、3、4 週前的氣象條件與輪狀病毒陽性檢出率進行相關性分析，則可以發現氣溫系列(平均溫度、最高溫、最低溫)氣象因子相關係數上升，此結果說明氣溫因子對輪狀病毒流行的影響有時間延遲之效果。

儘管在表七中，相關係數最高者為 4 週前之平均露點溫度 (-0.48)，其次為 4 週前之平均溫度 (-0.42)，然而，因為兩者在數理上具有共線 (collinearity) 的關係 (圖八)，在模式建置時可能會導致估計不穩定。另一方面，考量目前中央氣象局對露點溫度沒有預報資料，僅有觀測資料，若未來要進一步應用作為提前預警指標較有限制，故此審酌下，選擇操作簡便、資料取得容易的「4 週前之平均溫度」作為預警之參數，建置分段迴歸模式。

分段迴歸結果如表八，在迭代後估計分段點為 24.96°C，4 週前平均溫度在此溫度以下，輪狀病毒陽性檢出率與 4 週前平均溫度為負相關，參數估計值為 -1.76，意即，4 週前平均溫度一旦到達 24.96°C 以下，溫度越低，則輪狀病毒陽性檢出率越高，且每下降 1 度，輪狀病毒陽性檢出率會上升 1.76%。然而 4 週前平均溫度一旦高於 24.96°C，輪狀病毒陽性檢出率與 4 週前平均溫度即無統計顯著相關。

四、討論：

本研究以腹瀉孩童定點監測收案之剩餘檢體，進行我國孩童感染之輪狀病毒分子檢測，與病毒基因分析探討病毒株變化情況。以腹瀉收案孩童之服苗紀錄資料估計服苗狀況，2009-2011 及 2014-2016 年收案孩童服苗率分別為 15~27% 及 44~54%，監測 2014~2017 年間，輪狀病毒陽性率 8.1~14.5% (圖一、表一)，相較 2006~2011 年陽性率 16.3%~29.8%，顯見疫苗有一定的保護效果。以病毒基因分析自 2015 年起，主要感染病毒株轉變以 G3P8 病毒株為主；我們也發現在 2016~2017 年輪狀病毒感染有出現些微增加，監測期間病毒感染流行月份亦出現往後持續流行並有延遲至夏季的現象；深入分析 G3P8 病毒株基因，2015 年起流行之 G3P8 病毒株與早年感染之 G3P8 病毒株不同，目前 G3P8 病毒株為 DS-1 backbone 與動物輪狀病毒株極為相近。由於，在 2014-2016 年期間收案腹瀉之輪狀病毒感染孩童，曾服苗年比率 1.5-4.5%，而在 2009-2011 年僅 1.0-1.9%，顯示曾服苗但服苗後感染輪狀病毒的比率在 2014-2016 年微幅增加(圖三)。

本計畫以 2014 年 2 月至 2017 年 1 月收案之孩童進行輪狀病毒疫苗效益分析(表四與表五)，經評估後發現完整服完 Rotarix 有效保護約為 77~85%；而完整服完 RotaTeq 有效保護力為 93~96% (表五)，比較與之前研究[53]略有不同，當時以 2009 年 5 月至 2011 年 4 月收案之孩童進行輪狀病毒效益分析，發現完整服完 Rotarix 有效保護約為 90~94%；而完整服完 RotaTeq 有效保護力為 96~97%，因此兩種疫苗的保護力皆略有下降，並且 RotaTeq 有效保護力下降近 10%，下降的原因有可能是因為近年(2015-2017)的流行病毒株已經由往年(2009-2014)的 G1P8 轉變為 G3P8 DS-1-like 新病毒株，由輪狀病毒外套膜全段基因親緣相關性分析(圖六)，顯示目前

流行的 G3P8 DS-1-like 新病毒株與往年台灣流行之 G3P8 病毒株隸屬於不同分群，相似度低於 90%，儘管 G3P8 是疫苗保護下的型別，但流行株的基因變化，可能是造成疫苗保護效益的降低的原因之一。此外，在輪狀病毒疫苗服苗率逐年增加下，亦有可能對於流行性輪狀病毒株的變化有著選擇性的壓力(selective pressure)，於美國等國家已經有研究指出在有接種輪狀病毒疫苗的區域中，輪狀病毒基因型 G2 與 G3 的發生率是比未接種前的時期有增加的現象[54]，也有可能因此選擇性的壓力，加速產生新型輪狀病毒株的出現。

近年來，輪狀病毒感染常藉由人畜共通(zoonotic)或是人類與動物病毒基因重組(human-animal reassortant)等方式發生，其型別為原好發於牛、豬以及鹿等動物的 G4P6、G10P14、G8P8 與 G6P11 等[55-57]。有文獻指出，孩童檢出輪狀病毒 DS-1-like G8P8 基因型，其起源在經過序列分析與比對後發現可能經由人畜共通方式由有蹄類動物傳至人類[58, 59]。但人類的輪狀病毒 G8P8 基因型可以同時具有 Wa-like 與 DS-1-like 的基因型背景[60]，可能因為這樣同時具有兩種基因型骨架的特性，讓 G8 可以有效率的適應與傳播至人類群體。

在我國，特殊病毒株 G8P8 自 2000~2014 年陸續於歐亞非洲國家陸續出現報告病例，全球孩童感染疫情與重組新病毒株有關。由於過去在台灣孩童感染此病毒株病例數不多，僅曾在 2008 年檢出 1 例 G8P14 病例，親緣演化樹分析該重組病毒株與牛隻輪狀病毒株相近似；但近年陸續在 2014-2015 年引起幾起腹瀉群聚事件，發生場所包括老人安養中心、高中、國中，分別發生在台北、桃園及台中；另在 2014-2017 年(1-5 月)間腹瀉孩童監測中陸續檢出 7 例 G8P8 型病毒株感染病例，分別於 2014(2 例)、2015(3 例)、2017(2 例)，依居住地區分有 5 例居住在北區、1 例彰化及 1 例台

南，除 2015 年 1 例曾服苗外，其餘 6 例均未服苗，相關動物接觸史、出入疑似場所因病例數不多仍無法找到共通性(表六)。由於輪狀病毒感染以 2 歲以下孩童為主，過去感染病例出現群聚、或在 5 歲以上孩童、成人的病例報告不多，因此在我國群聚監測以及本研究孩童監測檢出 G8P8 病毒株感染，發生於 5 歲以上學童及成人/老人，值得特別留意。初步就我國病例及國際病例之感染病毒株比較，分析病毒外套膜 VP7 與 VP4 基因與疫苗及動物病毒株的相似性，以探討此病毒在我國感染狀況與動物株及疫苗相關性。病毒株親緣演化分析如圖七，親緣演化分析顯示，從 5 歲以下孩童監測病例以及群聚事件的收案分析病例與亞洲國家(越南、日本、泰國)病毒株落在相同 cluster，與印度牛的輪狀病毒動物病毒株相近，但與我國監測的牛隻輪狀病毒動物病毒株(VP7)不同，推測我國感染的病毒株屬亞洲共同流行病毒株，病毒重組來源可能非本土型人-動物重組病毒株。因此，更需進一步加強監測輪狀病毒以及 G8P8 基因型分析。

在氣象因子的部分，本研究合宜地量化了各種氣象因子與輪狀病毒陽性檢出率的關係，釐清各個氣象參數的效果，尤其以 4 週前的週平均溫度為預警參數，能夠有效提早疫情預警時程，在防疫上有很大的助益。分段迴歸方法的導入，不僅克服數理上自變項與依變項間非單一線性相關的現象，更透過分段點計算，精準掌握預警時機。惟仍須注意氣象條件的變異極大，尤其是在季節轉換時，建議後續研究在氣象變數操作上，除考量氣象因子的平均條件之外，也應納入氣溫的變異，如高低溫差、特定溫度持續的時間...等，以期更適切捕捉氣象因子與疫情間之關聯。

五、結論與建議：

近幾年從孩童急性腸胃炎與腹瀉個案中偵測到新的重組 G3P8 型別病毒株，並成為主流病毒株在國內流行，另亦於監測中找到孩童與動物中有共同之 G9P19 病毒株，本研究透過病毒基因片段分析與國際資料病毒株親源比對的方式，更明確指出病毒株與動物病毒間傳播以及多重重組發生的可能性，同時亦指出國際輪狀病毒之病毒株監測已逐漸用全基因分析的重要性，為我國疫情監測與疫苗評估需求亦應開始建立；未來應用於新型病毒株監測分析，加入全段定序以和國際上流行的比較。

新型 G3P8 皆和歷年舊的 G3P8 病毒株差異大，這也意味著現有疫苗對於新病毒保護效果需要再確認與評估。由於仍缺少足夠我國動物輪狀病毒監測資料，我國本土動物的病原資料，在孩童與國人感染急性腸胃炎住院感染者中發現特殊病毒時無法比較與佐證，以提供相關疫情調查的線索，雖目前資料仍不足無法有效明確指出直接證據，但亦顯示未來應建置動物監測與病毒株及地點等資料，以提供更多的比較數據以提升疫情調查之溯源資料。

六、計畫重要研究成果及具體建議

本計畫結合我國醫院定點腹瀉輪狀病毒監測網絡，以建立我國輪狀病毒主要流行病毒株的流行趨勢與相關性，並深入分析主流病毒株演化及特殊型別的基因來源，以及分析了解病毒流行趨勢的變化與探討疫苗保護的狀態。長期監測病毒株的變化及活動性，可以提供，早期發現新病毒株或重組病毒株出現與分布狀態改變，並了解病毒的來源與傳播可能性。深入探討病毒株的來源與宿主之間的相關性，將有助於深入探討病毒於宿主間感染傳播的可能性。

七、参考文献：

1. Mead, P.S., et al., *Food-related illness and death in the United States*. Emerg Infect Dis, 1999. **5**(5): p. 607-25.
2. Dennehy, P.H., *Rotavirus vaccines: an overview*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(1): p. 198-208.
3. Glass, R.I., U.D. Parashar, and M.K. Estes, *Norovirus gastroenteritis*. N Engl J Med, 2009. **361**(18): p. 1776-85.
4. Patel, M.M., et al., *Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1224-31.
5. Kawai, K., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: a systematic review*. Vaccine, 2012. **30**(7): p. 1244-54.
6. Ogilvie, I., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness*. Hum Vaccin, 2011. **7**(5): p. 523-33.
7. Khoury, H., et al., *Burden of rotavirus gastroenteritis in the Middle Eastern and North African pediatric population*. BMC Infect Dis, 2011. **11**: p. 9.
8. Hemming, M., et al., *Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland*. Eur J Pediatr, 2013. **172**(6): p. 739-46.
9. Chen, S.Y., et al., *Severe viral gastroenteritis in children after suboptimal rotavirus immunization in Taiwan*. Pediatr Infect Dis J, 2013. **32**(12): p. 1335-9.
10. Parashar, U.D., et al., *Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(5): p. 565-72.
11. Miller, M.A. and L. McCann, *Policy analysis of the use of hepatitis B, Haemophilus influenzae type b-, Streptococcus pneumoniae-conjugate and rotavirus vaccines in national immunization schedules*. Health Econ, 2000. **9**(1): p. 19-35.
12. Bresee, J., et al., *First report from the Asian Rotavirus Surveillance Network*. Emerg Infect Dis, 2004. **10**(6): p. 988-95.
13. Tucker, A.W., et al., *Cost-effectiveness analysis of a rotavirus immunization program for the United States*. JAMA, 1998. **279**(17): p. 1371-6.
14. Di Giuseppe, G., et al., *Knowledge, attitude and practices of pediatricians regarding the prevention of oral diseases in Italy*. BMC Public Health, 2006. **6**: p. 176.
15. (WHO), W.H.O., *Generic protocols for (i) hospital-based surveillance to estimate the burden of rotavirus gastroenteritis in children and (ii) a community-based survey on utilization of health care services for gastroenteritis in children: field test version, in*

- Document WHO/V&B/02.15*. 2002, WHO: Geneva. p. 1-67.
16. Bresee, J.S., et al., *Rotavirus in Asia: the value of surveillance for informing decisions about the introduction of new vaccines*. *J Infect Dis*, 2005. **192 Suppl 1**: p. S1-5.
 17. Ruiz-Palacios, G.M., et al., *Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(1): p. 11-22.
 18. Vesikari, T., et al., *Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(1): p. 23-33.
 19. Saif, L.J. and B. Jiang, *Nongroup A rotaviruses of humans and animals*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1994. **185**: p. 339-71.
 20. Martella, V., et al., *Zoonotic aspects of rotaviruses*. *Vet Microbiol*, 2010. **140**(3-4): p. 246-55.
 21. Matthijnsens, J., et al., *Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains*. *Infect Genet Evol*, 2011. **11**(6): p. 1396-406.
 22. Banyai, K., et al., *Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs*. *Vaccine*, 2012. **30 Suppl 1**: p. A122-30.
 23. Hwang, K.P., et al., *Identification of porcine rotavirus-like genotype P[6] strains in Taiwanese children*. *J Med Microbiol*, 2012. **61**(Pt 7): p. 990-7.
 24. Wu, F.T., et al., *Human infection with novel G3P[25] rotavirus strain in Taiwan*. *Clin Microbiol Infect*, 2011. **17**(10): p. 1570-3.
 25. Wu, F.T., et al., *Putative canine origin of rotavirus strain detected in a child with diarrhea, Taiwan*. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2012. **12**(2): p. 170-3.
 26. Wu, F.T., et al., *Diverse origin of P[19] rotaviruses in children with acute diarrhea in Taiwan: Detection of novel lineages of the G3, G5, and G9 VP7 genes*. *J Med Virol*, 2011. **83**(7): p. 1279-87.
 27. Bendali, F., et al., *Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France*. *Vet Res*, 1999. **30**(1): p. 61-74.
 28. Martella, V., et al., *Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis*. *Vet Microbiol*, 2007. **123**(1-3): p. 26-33.
 29. Conner, M.E. and R.W. Darlington, *Rotavirus infection in foals*. *Am J Vet Res*, 1980. **41**(10): p. 1699-703.
 30. Ward, R.L., et al., *Isolation of a human rotavirus containing a bovine rotavirus VP4 gene that suppresses replication of other rotaviruses in coinfecting cells*. *Arch Virol*, 1996. **141**(3-4): p. 615-33.
 31. Gratacap-Cavallier, B., et al., *Detection of human and animal rotavirus sequences in drinking water*. *Appl Environ Microbiol*, 2000. **66**(6): p. 2690-2.

32. Azevedo, M.S., et al., *Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5428-36.
33. Crawford, S.E., et al., *Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model*. J Virol, 2006. **80**(10): p. 4820-32.
34. Mori, Y., et al., *Avian-to-mammal transmission of an avian rotavirus: analysis of its pathogenicity in a heterologous mouse model*. Virology, 2001. **288**(1): p. 63-70.
35. Banyai, K., et al., *Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003-2006, Hungary*. J Med Virol, 2009. **81**(2): p. 362-70.
36. Mladenova, Z., et al., *Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria*. Infect Genet Evol, 2012. **12**(8): p. 1676-84.
37. Fiore, L., H.B. Greenberg, and E.R. Mackow, *The VP8 fragment of VP4 is the rhesus rotavirus hemagglutinin*. Virology, 1991. **181**(2): p. 553-63.
38. Patton, J.T., J. Hua, and E.A. Mansell, *Location of intrachain disulfide bonds in the VP5* and VP8* trypsin cleavage fragments of the rhesus rotavirus spike protein VP4*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4848-55.
39. Padilla-Noriega, L., et al., *Identification of two independent neutralization domains on the VP4 trypsin cleavage products VP5* and VP8* of human rotavirus ST3*. Virology, 1995. **206**(1): p. 148-54.
40. Huang, P., et al., *Spike protein VP8* of human rotavirus recognizes histo-blood group antigens in a type-specific manner*. J Virol, 2012. **86**(9): p. 4833-43.
41. Liu, Y., et al., *Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens*. J Virol, 2012. **86**(18): p. 9899-910.
42. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
43. Kapikian, A.Z., et al., *Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with "winter" gastroenteritis in hospitalized infants and young children*. N Engl J Med, 1976. **294**(18): p. 965-72.
44. Cook, S.M., et al., *Global seasonality of rotavirus infections*. Bull World Health Organ, 1990. **68**(2): p. 171-7.
45. Patel, M.M., et al., *Global seasonality of rotavirus disease*. Pediatr Infect Dis J, 2013. **32**(4): p. e134-47.
46. Atchison, C.J., et al., *Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands*. Proc Biol Sci, 2010. **277**(1683): p. 933-42.
47. Hashizume, M., et al., *Rotavirus infections and climate variability in Dhaka, Bangladesh: a time-series analysis*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(9): p. 1281-9.
48. Levy, K., A.E. Hubbard, and J.N. Eisenberg, *Seasonality of rotavirus disease in the*

- tropics: a systematic review and meta-analysis*. Int J Epidemiol, 2009. **38**(6): p. 1487-96.
49. Jones, F.K., et al., *Increased Rotavirus Prevalence in Diarrheal Outbreak Precipitated by Localized Flooding, Solomon Islands, 2014*. Emerg Infect Dis, 2016. **22**(5): p. 875-9.
 50. D'Souza, R.M., G. Hall, and N.G. Becker, *Climatic factors associated with hospitalizations for rotavirus diarrhoea in children under 5 years of age*. Epidemiol Infect, 2008. **136**(1): p. 56-64.
 51. Kottek, M., et al., *World map of the Koppen-Geiger climate classification updated*. Meteorologische Zeitschrift, 2006. **15**(3): p. 259-263.
 52. Wu, F.T., et al., *Hospital-based surveillance and molecular epidemiology of rotavirus infection in Taiwan, 2005-2007*. Vaccine, 2009. **27 Suppl 5**: p. F50-4.
 53. Chang WC., et al., *Effectiveness of 2 rotavirus vaccines against rotavirus disease in Taiwanese infants*. Pediatr Infect Dis J. 2014 Mar;**33**(3):e81-86.
 54. Hull JJ., et al., *United States rotavirus strains surveillance from 2005 to 2008: genotype prevalence before and after vaccine introduction*. Pediatr Infect Dis J. 2011;**30**:S42-S47.
 55. Steyer A., et al., *Whole genome sequence analysis of bovine G6P[11] rotavirus strain found in a child with gastroenteritis*. Infect Genet Evol. 2008;**13**:89–95.
 56. Steyer A., et al., *Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment*. J Gen Virol. 2010; **89**:1690 – 1698.
 57. Steyer A., et al., *Rotavirus genotypes in Slovenia: unexpected detection of G8P[8] and G12P[8] genotypes*. J Med Virol. 2007; **79**:626 – 632
 58. Jamnikar-C., et al., *The first detection and whole genome characterization of the G6P[15] group A rotavirus strain from roe deer*. 2016; Vet Microbiol **191**:52–59.
 59. Steyer A., et al., *Detection and Whole-Genome Analysis of a Zoonotic G8P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea*. Genome Announc. 2017 Oct **12**;5(41).
 60. Agbemabiese C., et al., *Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan*. Infect Genet Evol. 2015;**35**:184–193.

八、圖表

表一、醫院監測 5歲以下孩童急性腸胃炎收件及輪狀病毒及檢出率

Case												
	2005 (3家)	2006 (3家)	2007 (3家)	2008 (3家)	2009 (3家)	2010 (3家)	2011 (3家)	2013(林口 only)	2014 (8家)	2015 (10家)	2016 (10家)	2017 1-10 (10家)
收件數	825	2056	1410	1289	1003	989	845	199	1007	1432	1223	1007
RV%	23.6%	23.4%	29.8%	20.7%	16.4%	16.3%	19.8%	22.6%	8.1%	9.8%	10.7%	14.6%

表二、2014~2017年10月間 孩童醫院監測之輪狀病毒株陽性分率

		2014		2015		2016		2017 (1-10)	
		#	%	#	%	#	%	#	%
	收件數 →	1007		1432		1223		1007	
常見型別	G1P8	49	59.8%	30	21.3%	0	0.0%	2	1.4%
	G2P4	1	1.2%	21	14.9%	11	8.4%	5	3.4%
	G3P8	4	4.9%	75	53.2%	95	72.5%	113	76.9%
	G9P8	24	29.3%	8	5.7%	11	8.4%	13	8.8%
特殊型別	G2P8					2	1.5%		
	G8P4			1	0.7%				
	G8P8	2	2.4%	3	2.1%			3	2.0%
	G9P13			1	0.7%				
	G9P19	1	1.2%						
疫苗株	G10P11							1	0.7%
	Rotarix	1	1.2%	2	1.4%	2	1.5%	1	0.7%
Non-typable	Rotateq					1	0.8%	1	0.7%
	G3Px					6	4.6%		
	GxP8					1	0.8%	8	5.4%
	G9Px					1	0.8%		
	GxP19							1	0.7%
	Total RV+	82	8.1%	141	9.8%	131	10.7%	147	14.6%

表三、 2009-2011 及 2014-2016 年，急性腸胃炎與輪狀病毒感染之收案孩童服苗日與感
染日間隔之平均天數分析

Year/Case	Mean days of disease onset since last vaccination		
	All AGE	RV-Negative	RV-positive
2009	263.3 (12-852)	262 (12-852)	325.7 (188-414)
2010	349.2 (2-1217)	351.5 (2-1217)	152.5 (7,298)
2011	420.6 (2-1483)	419.2 (2-1483)	531.3 (123-897)
2014	475.8 (1-1603)	472.4 (3-1603)	694.5 (1-1595)
2015	480.0 (1-1878)	467.4 (1-1878)	777.2 (14-1663)
2016	442.2 (0-1696)	426.6 (0-1696)	830 (10-1674)

表四、以 2014 年 2 月至 2017 年 1 月收案 8 個月至小於 5 歲 RV(+)cases、RV(-)AGE cases、及 Non-AGE controls 之基本資料、服用輪狀病毒疫苗比率

Variables	AGE Cases		P-value	Missing	Non-AGE controls		P-value	Missing
	RV+	RV-			No. (%)	No. (%)		
Sample size	299	1193			1168			
Demographics								
Age (mo), mean±SD	28.74 ± 14.06	28.32 ± 14.15	0.5244		28.24 ± 14.04	0.5167		
Male	171 (57.2)	670 (56.2)	0.7482		650 (55.7)	0.6322		
Premature (GA<37 weeks)	31 (10.3)	124 (10.4)	0.9895		132 (11.3)	0.6467		
Mother's education (college degree or above)	144 (49.5)	772 (65.5)	<0.0001	8_15	852 (73.4)	<0.0001	8_7	
Location of hospital			<0.0001			<0.0001		
Northern	109 (36.5)	519 (43.5)			527 (45.1)			
Middle	59 (19.7)	98 (8.2)			113 (9.7)			
Southern	119 (39.8)	547 (45.9)			488 (41.8)			
Eastern	12 (4.0)	29 (2.4)			40 (3.4)			
Season								
Winter (Dec. to Feb.)	50 (16.7)	165 (13.8)	0.2030		187 (16.0)	0.7653		
Vaccination history								
Dose of vaccine			<0.0001			<0.0001		
Unvaccinated	251 (84.0)	572 (48.0)			426 (36.5)			
1-dose Rotarix	2 (0.7)	12 (1.0)			15 (1.3)			
2-dose Rotarix	38 (12.7)	383 (32.1)			455 (39.0)			
1-or 2-dose RotaTeq	1 (0.3)	5 (0.4)			14 (1.2)			
3 dose RotaTeq	7 (2.3)	221 (18.5)			258 (22.1)			
Additional history								
Breastfed duration mean±SD (months)	6.39 ± 7.19	6.09 ± 7.06	0.9817	3_0	7.29 ± 7.24	0.0005	3_6	
Within previous week (Yes vs. no)	28 (9.6)	91 (7.7)	0.2867	6_6	131 (11.3)	0.3998	6_6	
No. of family members mean±SD	4.34 ± 1.97	4.05 ± 1.87	0.0079	0_2	3.96 ± 1.92	0.0002	0_4	

表五、2014 年 2 月至 2017 年 1 月收案 8 個月至小於 5 歲服用 Rotarix 及 RotaTeq 之疫苗效益分析

Group	Number Vaccinated	Estimated Odds Ratio (95% CI)	Estimated VE (95% CI)
Rotarix			
Cases	38/289 (13.1)		
Controls			
RV-negative	383/955 (40.1)	0.227 (0.152, 0.329)	77.3 (67.1, 84.8)
Non-AGE	455/881 (51.6)	0.151 (0.101, 0.221)	84.9 (77.9, 89.9)
Combined	838/1836 (45.6)	0.180 (0.123, 0.258)	82.0 (74.2, 87.7)
RotaTeq			
Cases	7/258 (2.7)		
Controls			
RV-negative	221/793 (27.9)	0.068 (0.026, 0.148)	93.2 (85.2, 97.4)
Non-AGE	258/684 (37.7)	0.042 (0.015, 0.095)	95.8 (90.5, 98.5)
Combined	479/1477 (32.4)	0.057 (0.022, 0.120)	94.3 (88.0, 97.8)

Reference: Unvaccinated (Exact Conditional Logistic Regression)

表六、2014-2017 腹瀉孩童監測 G8P8 感染者之相關接觸史與服苗紀錄分析

年-月	基因型別	居住(縣市)	居住(鄉鎮市區)	年齡/性別	動物接觸史	出入場所	旅遊史	疫苗史	Underlying diseases
May-14	G8P8	台南市	北區	2M/F	無	父母照顧，父母近一月	無	沒有服苗	No
May-14	G8P8	新北市	新莊區	9M/M	狗、貓、雞、鴨、浣熊、兔子	近一周曾至大賣場	無	沒有服苗	No
Jan-15	G8P8	台北市	萬華區	2Y6M/M	無	姐姐近一周有嘔吐肚子	無	Rotarix (日期不知)	No
Jan-15	G8P8	新北市	新莊區	3Y9M/F	無	近一周曾至托兒所/安	無	沒有服苗	No
Mar-15	G8P8	新北市	樹林區	1Y6M/M	狗	近一周曾至公園、夜	無	沒有服苗	No
Apr-15	G8P8	新北市	三重區	3M/M	無	診所	無	沒有服苗	沒有臨床症狀評估表
Mar-17	G8P8	彰化縣	福興鄉	4Y11M/F	養狗跟雞	公共廁所、車站、百貨	回奶奶家.溪頭	沒有服苗	No

表七、氣象因子與輪狀病毒陽性檢出率 皮爾森相關係數

氣象因子	輪狀病毒陽性檢出率				
	當週	1 週前	2 週前	3 週前	4 週前
平均溫度	-0.25	-0.34	-0.38	-0.39	-0.42
最高溫	-0.15	-0.30	-0.30	-0.37	-0.36
最低溫	-0.29	-0.34	-0.40	-0.37	-0.40
平均露點溫度	-0.26	-0.37	-0.44	-0.42	-0.48
平均相對溼度	-0.05	-0.06	-0.20	-0.09	-0.20
最小相對溼度	-0.18	-0.18	-0.24	-0.13	-0.13
累積雨量	-0.07	-0.07	-0.14	-0.09	-0.12
累積降雨時數	0.02	0.17	0.07	0.16	0.05

註：套黑底反白字表示達統計顯著。

表八、4週前平均溫度分段迴歸結果

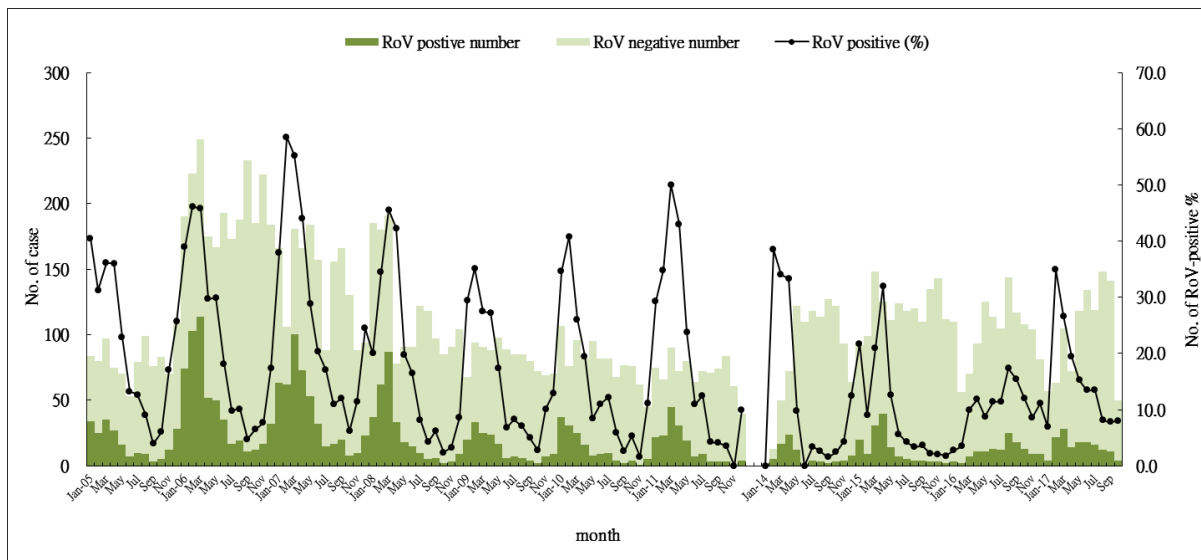
變項	參數估計值	p 值
截距項	50.64	<0.001
4 週前均溫 (分段點前)	-1.76	<0.001
4 週前均溫 (分段點後)	1.82	>0.05

分段點估計值：24.96°C (標準差 2.41)

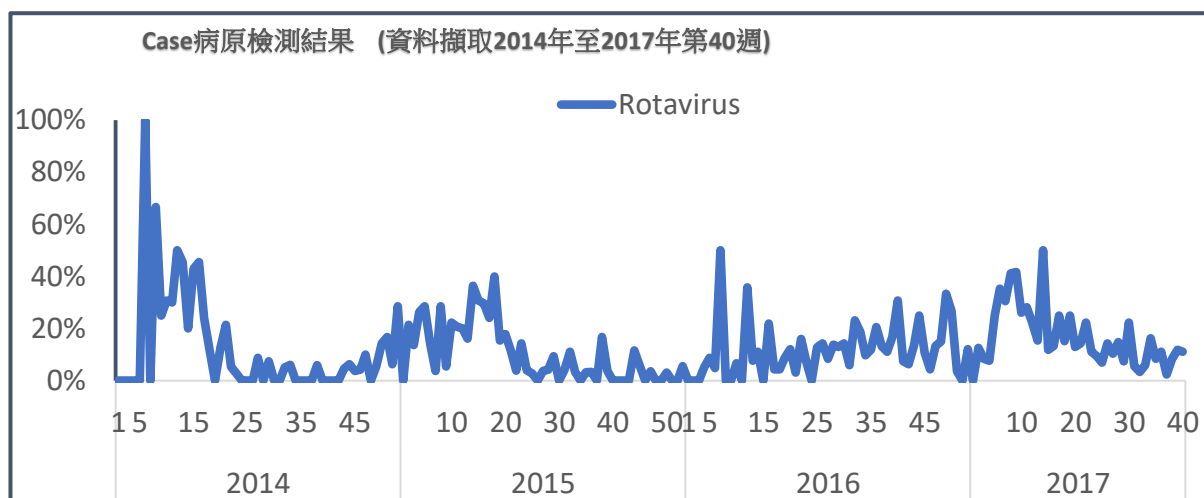
Adjusted R-squared: 0.1843

圖一、我國醫院監測 5 歲以下孩童急性腸胃炎之輪狀病毒感染趨勢

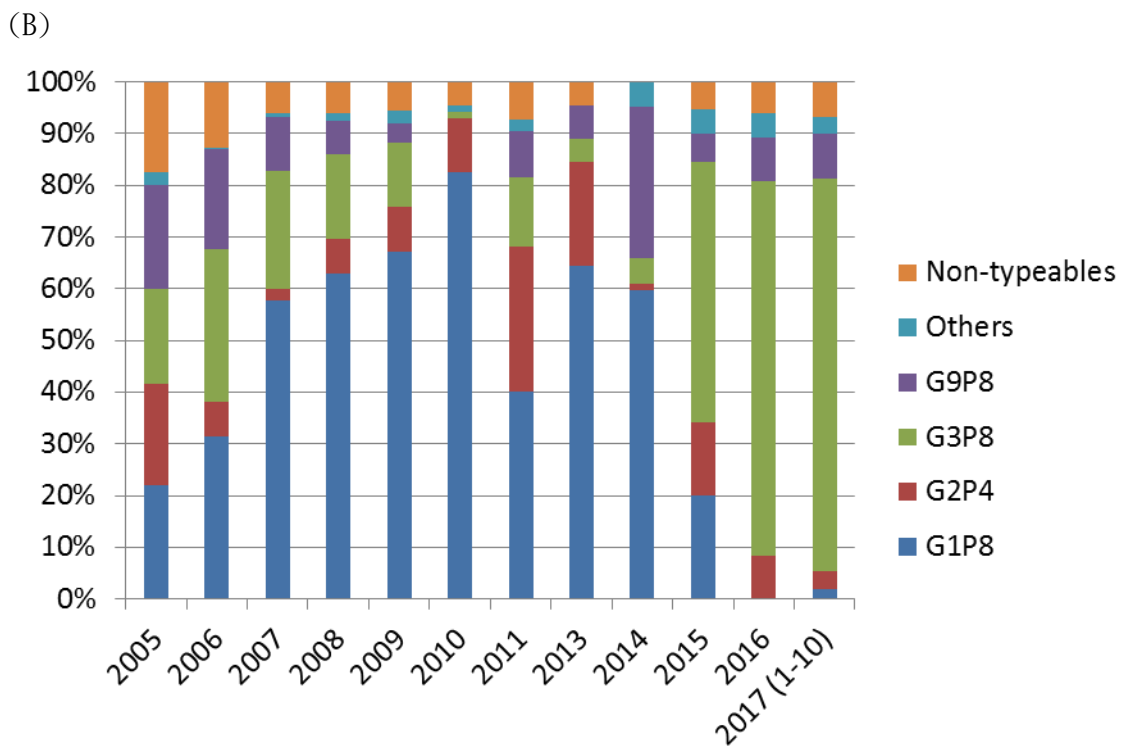
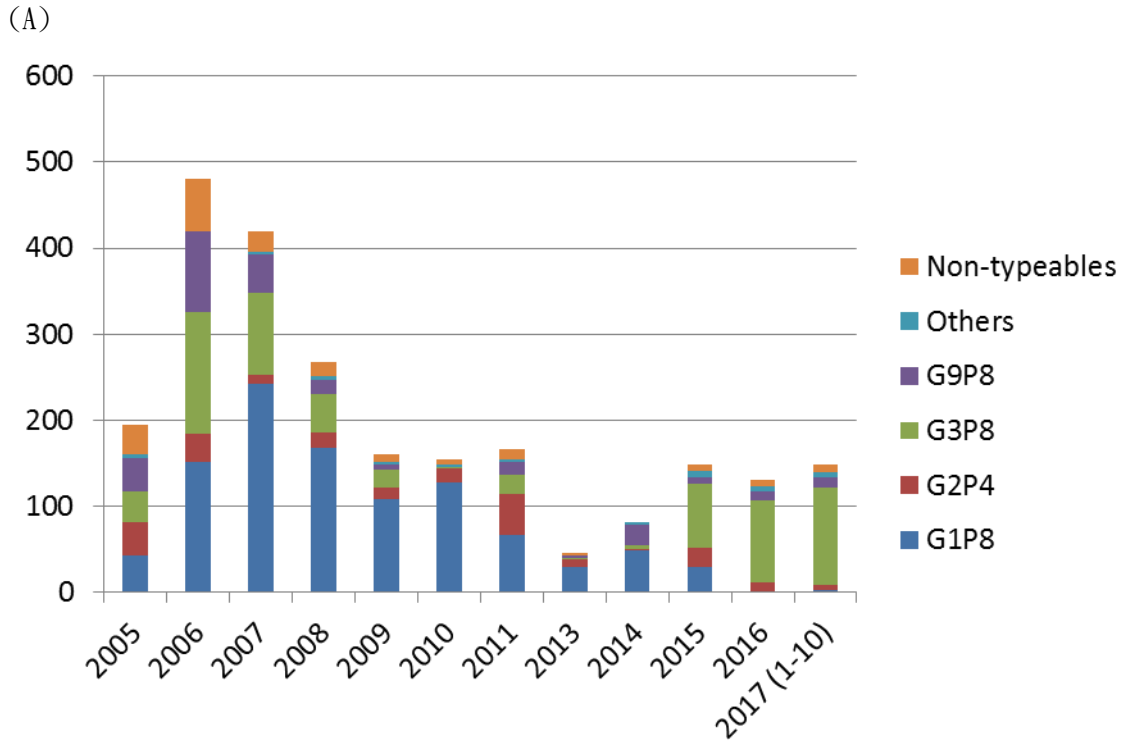
(A) 2005~2017 年 10 月間，輪狀病毒感染月收案檢驗件數及陽性率



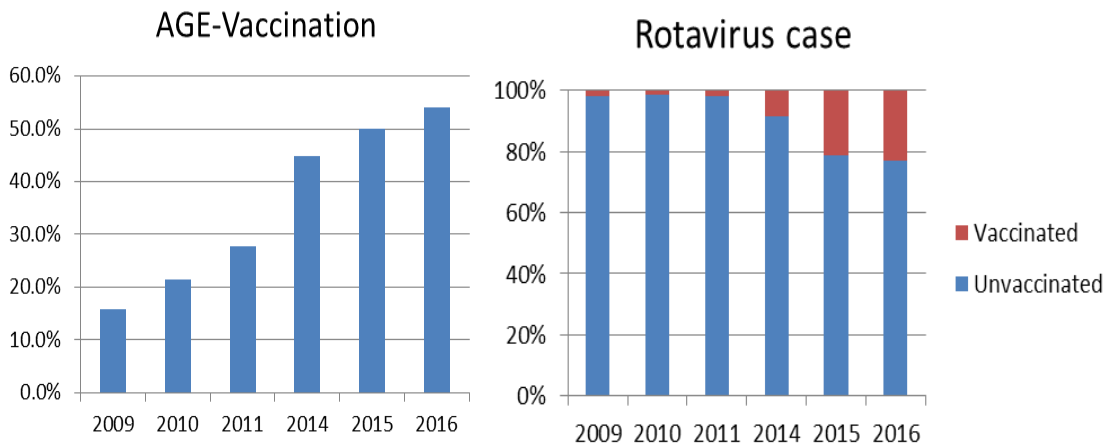
(B) 2014~2017/10 月間 輪狀病毒感染陽性周分布趨勢圖



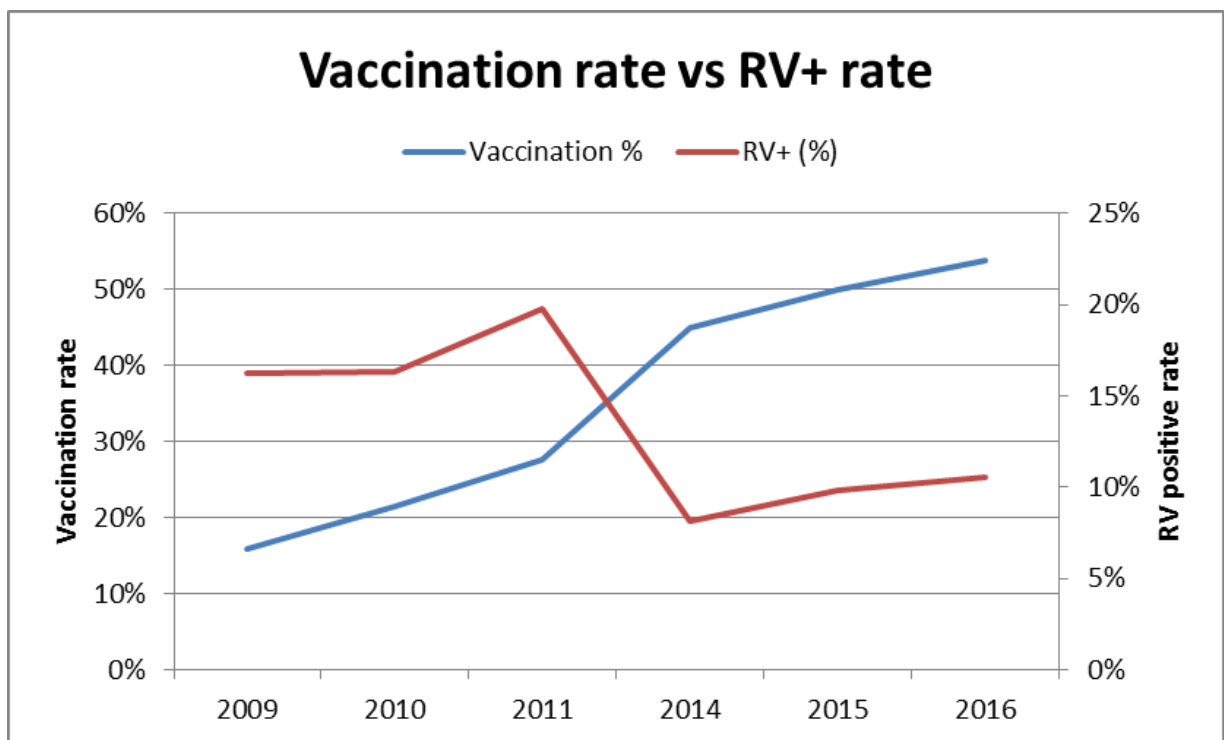
圖二、2005~2017年10月間 醫院監測 5歲以下孩童急性腸胃炎感染輪狀病毒株分布
 (A):病毒株件數表示 (B):分項型別百分比表示



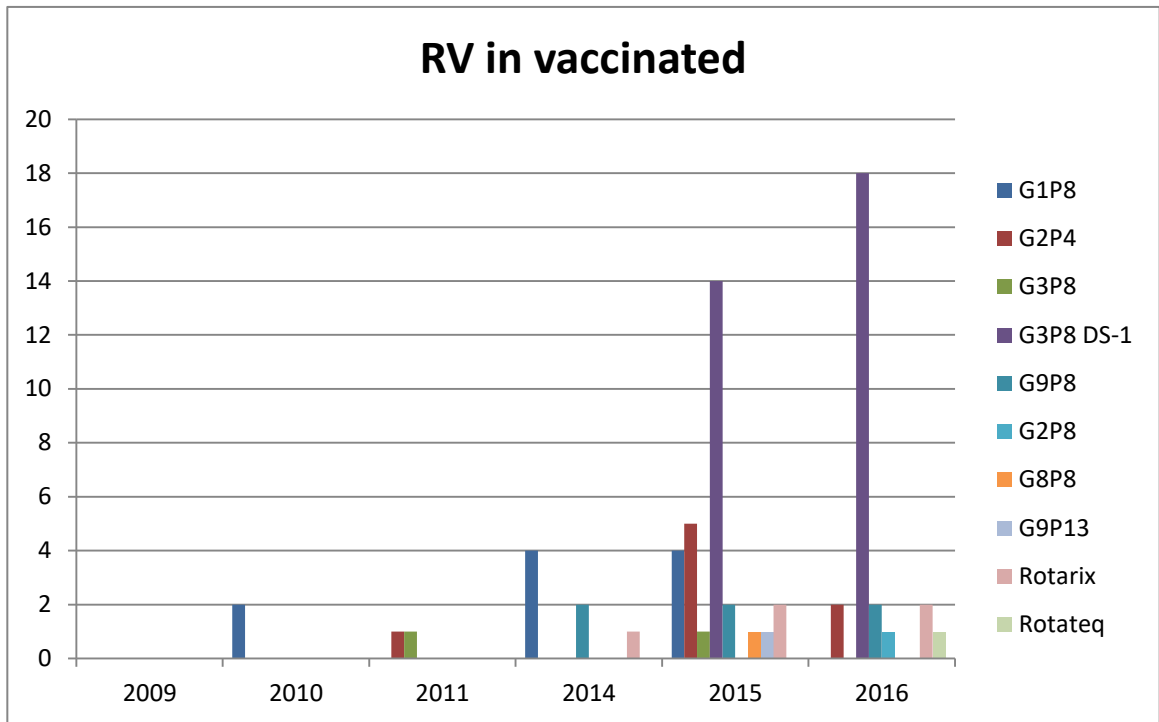
圖三、2009-2011 及 2014-2016 年，急性腸胃炎收案及輪狀病毒感染孩童之服苗狀況及病毒感染率分析



圖四、2009-2011 及 2014-2016 年 輪狀病毒感染孩童服苗率與感染輪狀病毒陽性率分析



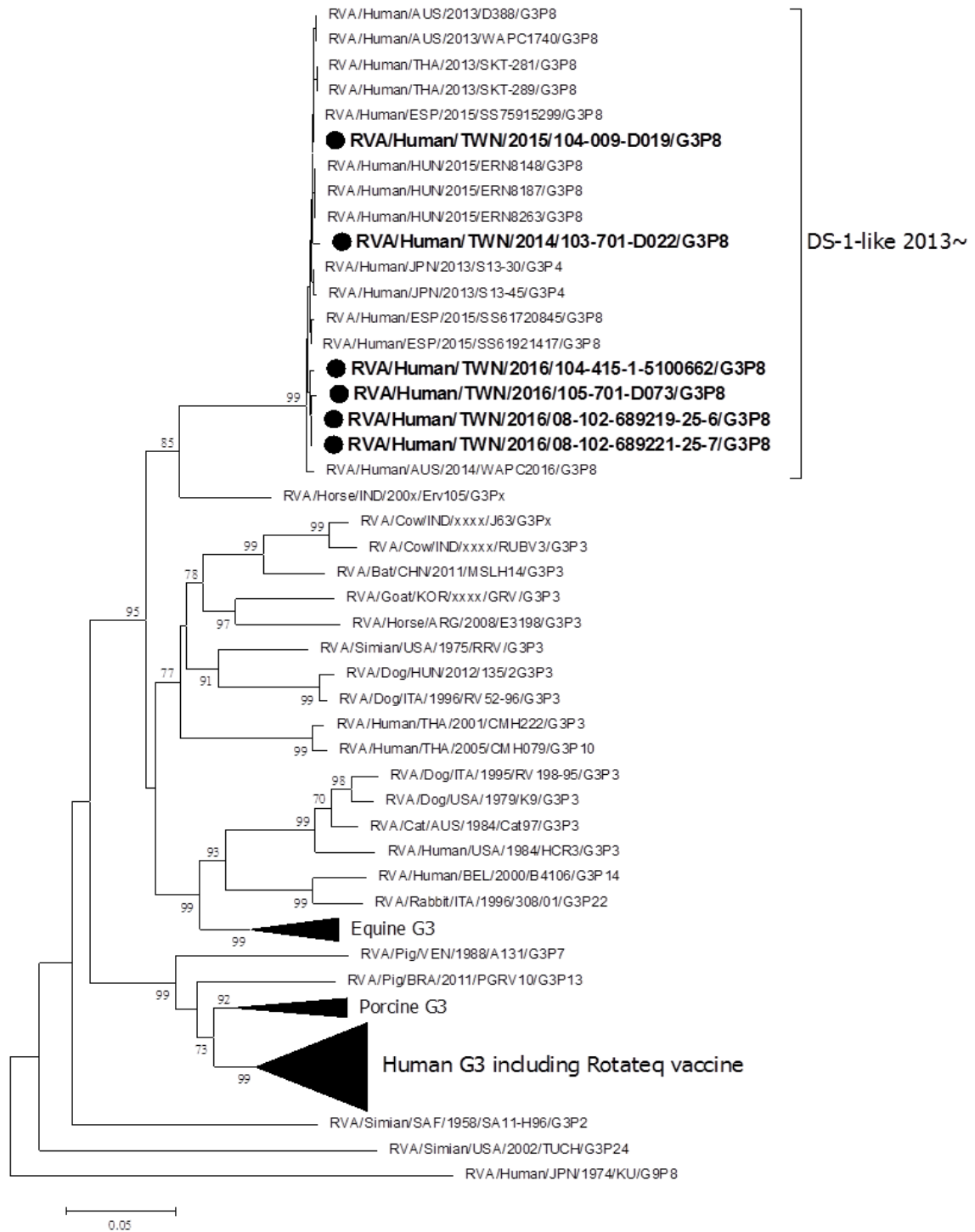
圖五、2009-2011 及 2014-2016 年間輪狀病毒感染並有服苗者之病毒株型別分析



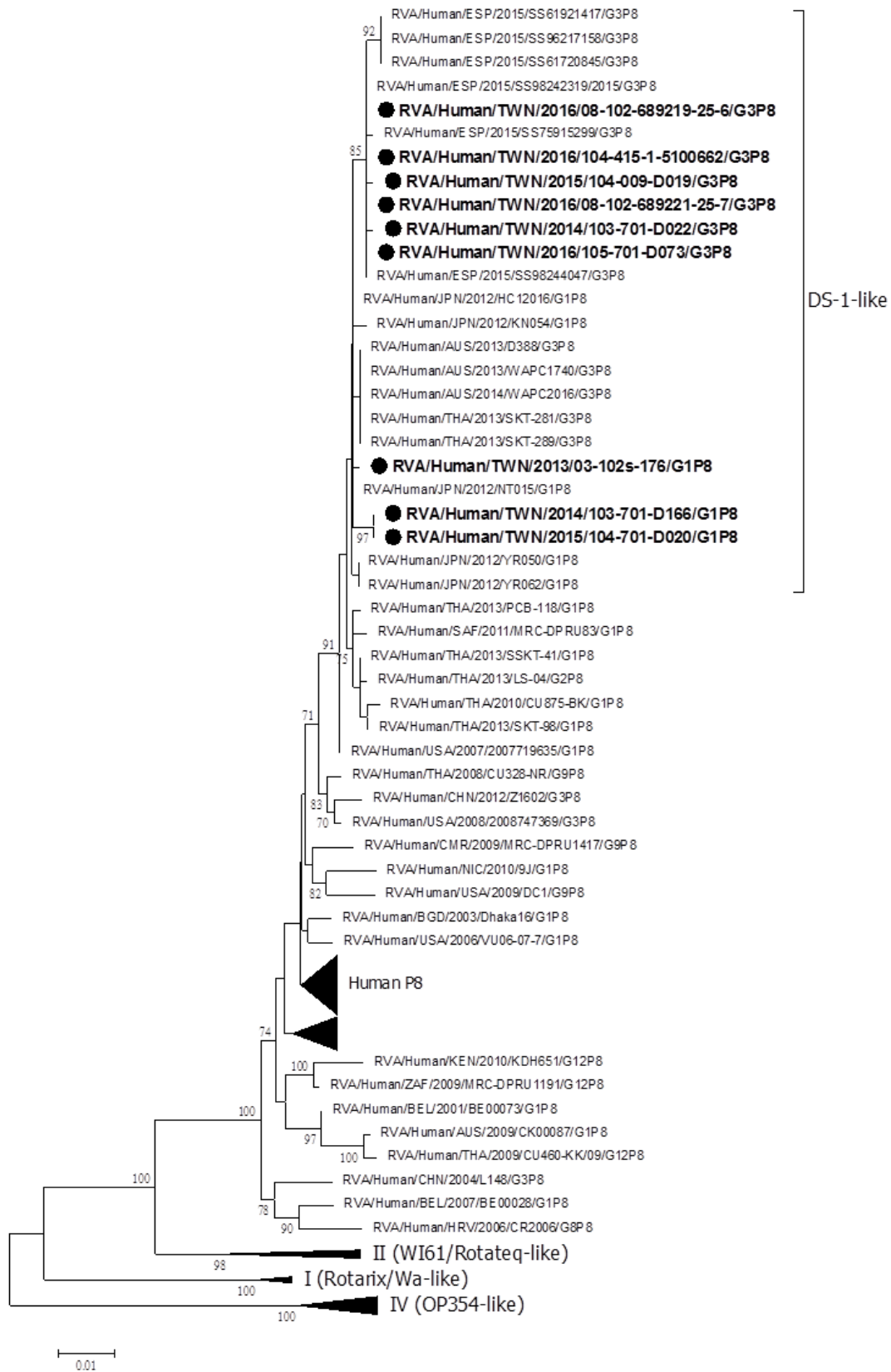
圖六、我國 G3P8 輪狀病毒株與國際流行病毒株及動物輪狀病毒株間親緣演化分析

(A) VP7 基因 (B) VP4 基因

(A) VP7 (G3)



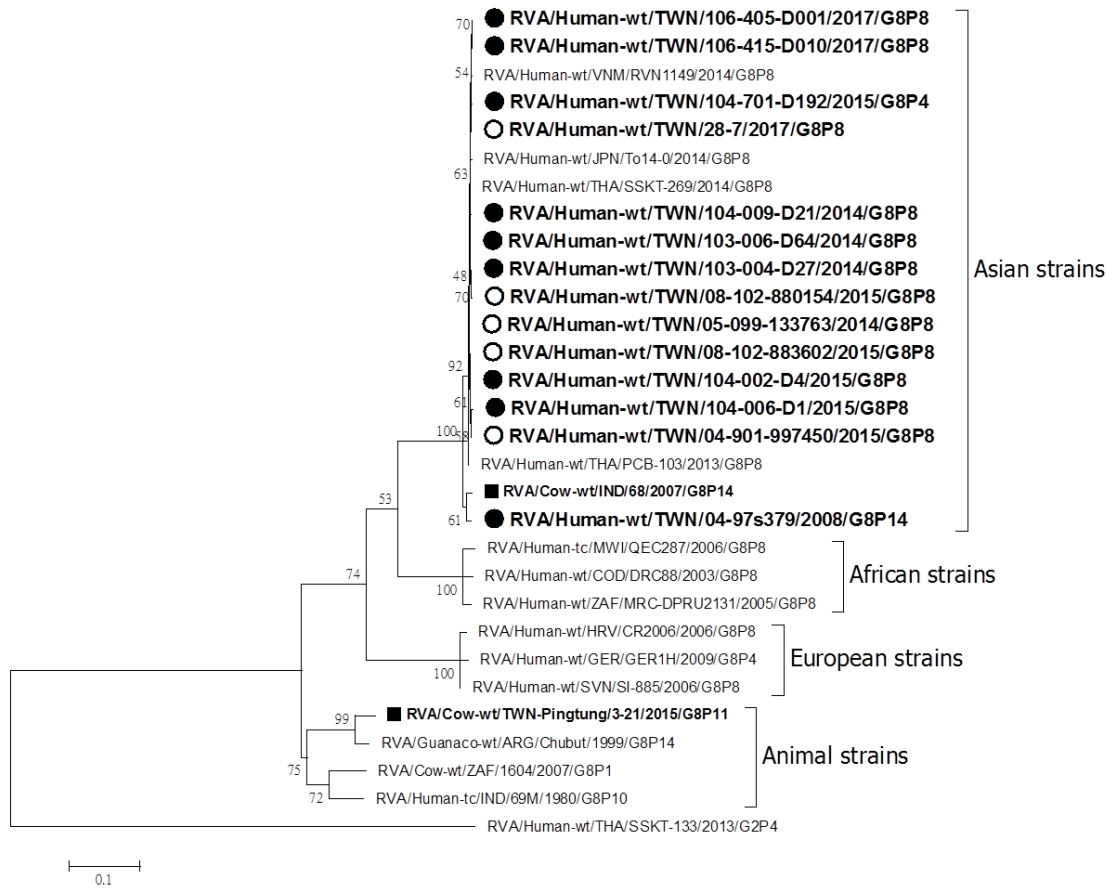
(B)VP4 (P8)



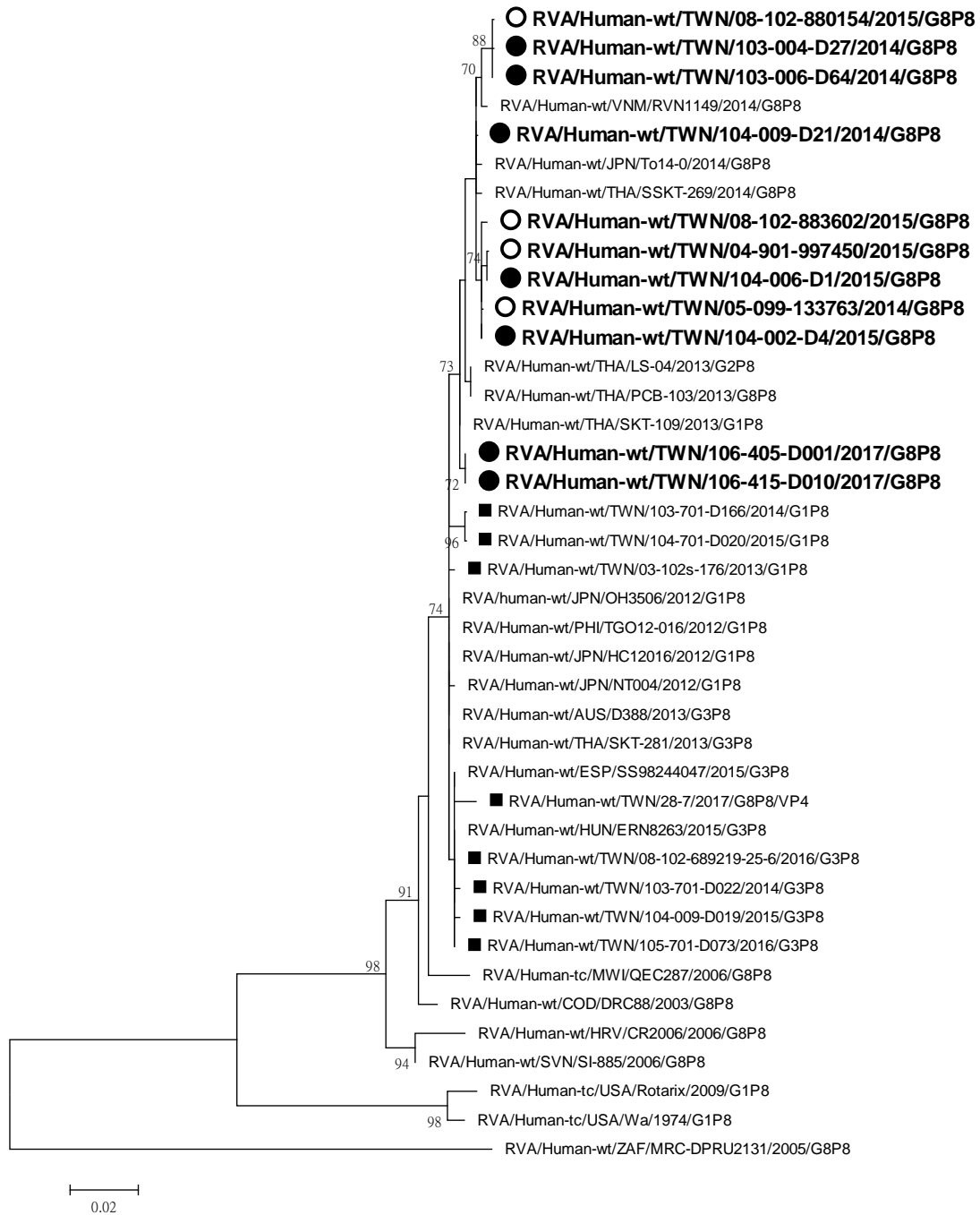
圖七、我國 G8P8 輪狀病毒株與國際流行病毒株及動物輪狀病毒株間親緣演化分析

(A) VP7 基因 (B) VP4 基因

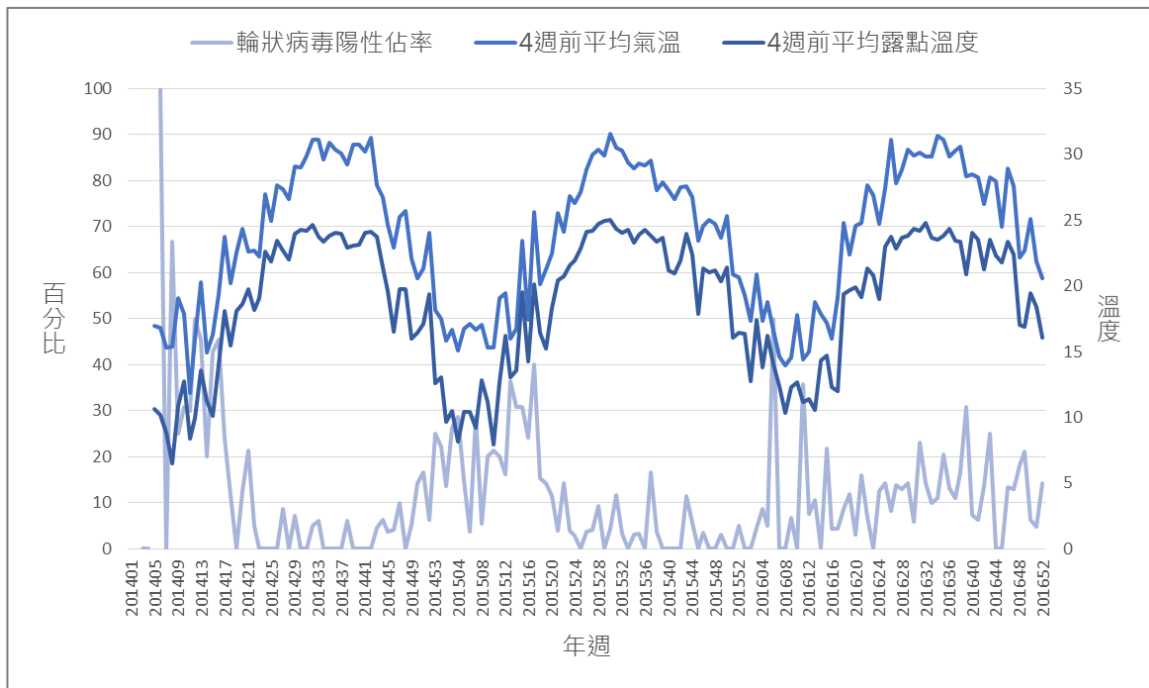
(A) VP7 (G8)



(B) VP4 (P8)



圖八、輪狀病毒陽性檢出率與4週前平均氣溫、4週前平均露點溫度時間趨勢圖



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：新興及人畜共通腹瀉病毒實驗室診斷方法建置與監測

主持人：吳芳姿

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-124601

1. 計畫之新發現或新發明

從我國腹瀉群聚流病資料、分子病毒學監測與病毒株型別鑑定，建立我國腹瀉群聚之病毒感染流行現況，以及社區流行病毒株之即時監測，從即時監測中了解病毒之變化，以了解疫情的變化。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

提供輪狀病毒流行即時監測資料，作為相關腹瀉防疫工作與提醒民眾衛教宣導；提供腹瀉孩童中感染病毒株與疫苗株之親緣相關性比對，以確認疫苗之保護相關性。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

以線性迴歸模式或分段迴歸方式計算氣象因子影響之閾值，作為疫情預警之警示點，提供溫度變化之疫情警示以及有效防制策略的參考。