

計畫編號：MOHW106-CDC-C-315-000136

衛生福利部疾病管制署 106 年署內科技研究計畫

計畫名稱：疑似 C 型肝炎群聚感染病毒基因關聯性分析方法之
建立與評估

年度研究報告

執行單位：疾病管制署

計畫主持人：楊志元 研究員

協同主持人：鄔豪欣 醫師

研究人員：廖郁昕、林雨韻

執行期間：106 年 7 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

封面

目錄

壹、計畫中文摘要	3
貳、計畫英文摘要	4
參、計畫內容:	
一、研究簡介	5
二、材料與方法	7
三、結果與討論	11
四、圖表	14
五、參考文獻	19

共(21)頁

壹、計畫中文摘要：

關鍵字：C 型肝炎病毒、分子檢驗方法、關聯性分析

疾病管制署於 2017 年初經由通報系統勾稽發現 5 例連續通報急性病毒性 C 型肝炎確定病例，經衛生局疫調後發現，該 5 名個案均曾至桃園市楊梅區診所就醫，並曾於該診所注射藥物，經調查該診所針具並未於使用後即時丟棄，有重複使用情形。疾病管制署已掌握曾於該診所就醫個案名冊至少有 700 名疑似接觸者，已陸續聯繫通知其抽血檢驗進行追蹤，以確認其是否受到 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)感染。

除透過防疫相關人員進行之流病調查資料外，若能同時利用分子生物學方法了解其病毒序列之相似性等資訊，屆時將能提供更多資訊給一線防疫人員，以綜合驗證研判是否為群聚感染。因此本計畫的目的為瞭解不同 HCV 感染者體內 HCV 之關聯性，將以分子生物學方法來區分、分析是否具有關聯性，將針對 HCV genome 結構蛋白 C/E1/E2 (約 1kb) 及非結構蛋白 NS5B (約 900bp) 進行 C 肝病患 HCV 基因定序，以 HCV 核苷酸比對之相似度，統計分析結合演化模式親緣演化分析，以提供防疫人員更多防疫的相關資訊。

本次計畫中，進行 HCV NAT 檢測的高風險接觸者共 436 人，檢測結果陽性共 93(21.3%)人，扣除因檢體量不足及病毒量過低無法分析者後，有 36 件(83.7%)分析結果為基因型 1b，5 件(11.6%)為基因型 2a，1 件(2.3%)為基因型 2b，1 件(2.3%)為基因型 6。經親緣演化分析可發現此次事件中的高風險接觸者，HCV 基因序列主要形成兩個族群具有高度同源性，而臺灣其它地區參考株序列並不在這兩個族群之中，配合疫情調查可推論此確實為一起群聚感染事件。另外，針對 NS5B 及 C/E1/E2 片段，發現 C/E1/E2 片段較容易取得其 PCR 產物以進行基因序列分析，同樣的 cohort 共取得 43 件 C/E1/E2 序列，但在 NS5B 區域，只成功獲取 28 件序列；其它臺灣不同地區的參考序列 C/E1/E2 區域取得 14 件序列，NS5B 取得 13 件。

貳、計畫英文摘要：

At the beginning of 2017, 5 cases of acute hepatitis C were confirmed by the nationally notifiable disease reporting system. The 5 cases were found in Taoyuan City, and the only correlation of these cases were medical injection in the same clinic. According to epidemiological investigation, injection needle reusing may be the cause of this event. These confirm cases are highly likely to be an outbreak event, and there are at least 700 suspected contacts. All the contacts have been contacted to inform them of Hepatitis C virus (HCV) testing. In addition to the epidemic investigation data, molecular biology data of the virus sequence information will be more informative to determine the outbreak.

To address these issues, the purpose of this project is to understand the correlation of HCV in different HCV-infected individuals. It will be distinguished by molecular phylogenetic analysis focus on the structural protein C/E1/E2 (about 1kb) and the non-structural protein NS5B (about 900bp) of HCV genome. The similarity of HCV nucleotide alignment and phylogenetic analysis combined with evolutionary model were used to provide more information about epidemic.

In this project, 436 suspected contacts has undergone HCV NAT, and there were 93(21.3%) positive cases. All these positive cases were further analyzed except for insufficient specimens and low viral load cases, and the HCV genotyping results came out to be 36 (83.7%) cases of genotype 1b, 5 (11.6%) cases of genotype 2a, 1 case of genotype 2b, and 1 case of genotype 6. In the phylogenetic analysis result, the HCV sequences of suspected contacts constitute 2 cluster which sequences from other region in Taiwan were not included. Accordingly, it could be confirm to be an outbreak event. Besides, this project obtain 43 HCV sequences in C/E1/E2 region from suspect contacts but only obtain 28 sequences in NS5B; as to the reference sequences from other region in Taiwan, there were 14 sequences in C/E1/E2 region and 13 sequences in NS5B

Keywords: HCV, phylogenetic analysis, molecular epidemiology

參、計劃內容

一、研究簡介

C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是屬於 Flaviviridae 之一種,30 nm~50 nm 直徑大小, ss (+)RNA 病毒具外套膜,全長約 9.6 kb,由於 HCV RNA 而不會進入宿主細胞核中,因此病毒株不會直接傷害基因,但肝細胞再經由反覆破壞及修復後基因會產生變異而可能形成肝癌。HCV 具有高度變異之病毒基因,大致可分成 1~7 基因型(genotype)¹,各基因型中核酸序列的差異在 30~35%以上;每種基因型中又可區分出 a、b、c、d...等數種亞型(subtype),各亞型之間核酸的差異約在 20~25%²⁻⁴。全球最為常見之基因型為第一型,感染比例約為 46%^{2,3,5,6},全球詳細分布情形如圖一。台灣 HCV 基因亞型以 1b 感染最廣泛,佔 50-70%,而 1b 基因亞型的感染患者通常病況較嚴重,容易演變為肝癌^{7,8}。HCV 之感染途徑包括:與醫療照顧相關之傳染(如:不安全的針具使用⁹、洗腎透析或輸血感染等);靜脈藥癮者共用針頭、針具或稀釋液;母親嬰兒之垂直感染;性接觸或其它(如:刺青、穿耳洞等)¹⁰。

依據 WHO 之統計分析發現全球每年死於 C 型肝炎病毒(HCV)感染相關之併發症如肝硬化、肝癌、肝功能失調(Liver Failure)仍有 70 萬人,且持續增加中,目前由於抗病毒藥物之成功開發¹¹,HCV 的感染是可以被治癒的,但是由於 HCV 感染多數人是沒有症狀的,因此很多人是不清楚自己是否感染了 HCV。

粗估 HCV 感染個案每天約產生 10^{12} 個病毒顆粒,而其 RNA polymerase 錯誤率約 2.5×10^{-5} pre nt/cycle,且 HCV 為了適應宿主體內的免疫機制,並抵抗病毒藥物的攻擊,因而產生了適應性突變,尤以 HCV 結構中的 E 區域及 NS 區域更為常見,在 E 區域中有一段高度變異區(hyper variable region 1, HVR-1),藉此逃避宿主體內抗體的作用¹²。

HCV 的感染可分為急性與慢性，急性 C 肝感染是指近 6 個月內暴露而感染了 HCV，會隨著感染 HCV 後而開始出現 HCV RNA、HCV 抗原(D22Ag)與 Anti HCV 抗體，隨後可能有些 HCV 會被清除掉(約 15~45%)¹³，有些會成為慢性感染，體內抗體、抗原及病毒核酸分布情形如圖二，若慢性感染患者沒有加以治療有可能會轉變成肝硬化、肝功能失調或肝癌。台灣地區 104 年共 217 例急性病毒性 C 型肝炎確定病例（每十萬人口確定病例發生率 0.92），較 103 年 205 例確定病例（每十萬人口確定病例發生率 0.88）¹⁴ 多。一般篩檢是用血清學檢測是否具有 anti-HCV，如果陽性可加做 NAT 以確認是否為慢性患者。

HCV 感染有長達 6 個月的潛伏期，加上約有 7 成感染是沒有症狀或輕微，所以使得防疫人員欲追蹤或調查是否群聚時顯得困難重重。由於分子生物的進步發展，分生檢測方法被開發來追蹤調查病毒的感染，愈加的可行與普及。最常被用來分析 HCV 基因片段為 HVR-1，為 HCV 結構中的 E2 區域；另一片段為 NS5B 區域¹⁵⁻¹⁸。雖然用 consensus viral 序列高度關聯性可來偵測是否有群聚感染發生，但是因為 RNA 病毒之特性會展現出 heterogeneous population HCV (Quasispecies)，因此有時僅以單一 PCR 產物之序列來代表所有可能之 HCV 之基因序列並不恰當，故必要時得進行 PCR Cloning 來找尋可能其它的 minor HCV lineages，因為有可能是這個 minor lineage 傳染給下一個感染者，而非原本以為之 major lineage。¹⁹ 在調查是否為共同病毒性感染源時，病毒的基因序列如果相同或相近往往可視為同一傳染鏈，但是遺憾的是解讀不同株或個體的病毒基因序列之關聯性，並非是可以武斷的加以判定，RNA 病毒如 HIV、HCV 等，演化、突變速度是相當地迅速，因此病毒再人傳人後，會因突變、演化產生變異的加上 heterogeneous population HCV (Quasispecies) 讓情況更加的複雜。一般而言，如果兩成相近的基因序列可被視為具相關性，美國 CDC 依 HCV hypervariable region 1 (HVR-1) 序列之比對，發現兩條基因序列差異在 $3.77 \pm 1.37\%$ 內可視為具有高度相關性^{20,21}。在台大發生的 HCV 院內感染事件，研究調查發現感染者與被感染者在 HVR-1 基因序列之差異在 5.1% 以內²²。除此之外，也利用 Bayesian 統計演算或

bootstrap 分析親緣性，尋找具有高度親緣相關者。

疾病管制署於 2017 年初經由通報系統勾稽出同日通報 2 例居住於桃園市楊梅區之急性病毒性 C 型肝炎確定病例，經疫調 2 人除具地緣關係外，潛伏期間皆只曾至同一診所就醫，無暴露於其他危險因子，3-5 月陸續新增通報，該區自 2017 年 1 至 5 月累計 7 例確定病例。經疫調，7 例個案皆曾至同一診所就醫且於該診所有針劑注射行為，另查該診所除未落實感控措施外，有重複使用針具抽取藥物之行為；而經病毒基因型及親緣性分析，7 例確定個案中，已知 4 例基因型為 1b，其中 3 例親緣性分析具高度關聯性，故研判為 1 起群聚事件並和該診所有關，進而展開就醫接觸者追溯性調查。為了協助釐清疑似 C 型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)群聚感染，利用疾病管制署北區管制中心及衛生局收集之血清檢體，使用分子生物學方式進行 HCV 基因定序，以 HCV 核苷酸比對之相似度、統計分析並結合演化模式進行親緣演化分析，並且配合防疫相關人員進行流病調查資料，以驗證研判這些 HCV 群聚感染是否具有關聯性或只是獨立偶發事件。此外，將蒐集國內感染 C 型肝炎病毒的陽性檢體，建立病毒序列資料庫，以利往後 HCV 基因比對。藉由實驗室資料，也能提供給第一線防疫人員進行流行病學調查以確認群聚感染發生之可能性與相關性。

二、材料與方法

(一) 檢體的收集

由疾病管制署檢驗中心、各區管制中心、縣市衛生局與各醫院所收集臺灣各地區 C 型肝炎病毒陽性驗餘檢體以及曾至該診所就醫且具高風險民眾之檢體(檢體收集流程如圖三)。HCV 高風險民眾中，核酸檢測陽性且檢體量足以進行 HCV 片段基因序列之定序分析者共 55 件；臺灣各地區 HCV NAT 陽性參考序列共 15 件，包含新北市 1 件、臺北市 1 件、桃園縣 6 件、新竹縣 5 件、高雄市 2 件。所有檢體資料皆為去連結之防疫相關病歷資料，並無可供辨識研究對象之個人資料

及資訊。

(二) 核酸檢測 NAT

使用 Abbott™ *mSample Preparation System DNA* (Abbott Molecular Inc.)及 *m24sp* (Abbott Molecular Inc.)進行全自動核酸萃取，並使用 *m2000 RealTime System* 進行核酸檢測。C 型肝炎病毒負荷量檢驗的 0.5mL 程式每支檢體最少需要 1.0mL，核酸萃取完成後，直接進行即時定量 RT-PCR，所需的試劑量如下：

試劑	加入體積
活化試劑(試劑一)	11.3 μ L
寡核酸試劑(試劑二)	39.5 μ L
rTth DNA 聚合酶酵素試劑(試劑三)	5.9 μ L

取 50 μ L 上述混合液至 StrataCooler 96-well reaction plate 上，再加入 50 μ L sample or control 後，總體積為 100 μ L 並封上光學膜後啟動核酸檢測程序。試劑的敏感度及偵測極限如表一。

(三) HCV 基因片段之定序與分析

1. 病毒 RNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。取血清 140 μ L 加入 560 μ L Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘，再加入 560 μ L 絕對酒精混合完全(vortexing)，上述混合液再通過 QIAmp spin column，column 以 Buffer AW 清洗兩次以後，用 AVE buffer (RNase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)。

2. HCV 基因片段 PCR 增幅

(1) 引子選擇

根據 HCV H77 基因進行亞型分析，將萃取好的病毒 RNA 以 RT-PCR 與 Nest-PCR 的方法來增幅引子^{16,23}所結合之特定片段，再定序分析²⁴。RT-PCR 所選定的引子為 C/E2-F1、C/E2-R1、C/E2-F2、C/E2-R2；nested-PCR 所選定的引子為 NS5B-F1、NS5B-R1、NS5B-F2、NS5B-R2，詳細分析片段及引子序列如圖四。

(2) 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

使用 OneStep RT-PCR Kit 進行 RNA 反轉錄聚合酶連鎖反應。取病毒 RNA 5 μ L 加入 2x OneStep RT-PCR Buffer 10 μ L、40U/ μ l RNase out 0.3 μ l、OneStep RT-PCR Enzyme Mix 0.4 μ L、forward primer 和 reverse primer 10 μ M 各 0.6 μ L 的混合物中，補水至 20 uL，進行 55 $^{\circ}$ C 20 分鐘，再 94 $^{\circ}$ C 2 分鐘(Hot Start)後，以 94 $^{\circ}$ C 15 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、68 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒，進行 45 次反應，最後在 68 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘。

(3) 巢式聚合酶連鎖反應(Nested-PCR)

將第一次 PCR 的產物取 2 μ L 當模板(template)加入 2x PCR Master Mix 10 μ L、forward primer-和 reverse primer 10 μ M 各 0.6 uL 的混合物中，補水至 20uL，進行 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘裂解後，以 98 $^{\circ}$ C 10 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 10 秒，進行 45 次反應，最後在 72 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘。

(4) 基因定序與演化樹分析

將 Nested-PCR 的產物先以洋菜膠電泳分析，預期可見到的基因片段，再作以定序分析。將定序的結果直接使用 NCBI 核酸比對網站進行分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>)，依據比對的結果判斷亞型。Maximum likelihood 和 Bayesian inference 是目前譜系分析(phylogenetic analyses)常用的兩種方法。但是由於兩者使用的觀念或多或少都牽涉到機率與統計的範疇，Maximum likelihood 用的是統計方法計算譜系樹的 likelihood，搜尋最佳譜系樹；Bayesian inference 則是應用 Bayes' theorem 來計算譜系樹為真的機率(probability)。Likelihood：用已知的(實驗)資料作出(影響實驗結果的)參數的函

數，藉以求取參數的數值。Probability: 用已知的(影響實驗結果的)參數作出(能夠預測實驗結果的)函數，藉以預測實驗的結果。在邏輯上，likelihood 和 probability 關注的是同樣的東西，可是在操作使用的角度不同，得出的結果也不會一樣。

(5) 病毒基因序列組合與親緣演化分析

將定序得到的病毒基因片段以 Lasergene 軟體進行 assemble 組合成可進行分析之序列資料。再以 MEGA 6.0 軟體進行序列對比調整與位點對準後，利用 BEAST v1.8.3 軟體以 Markov Chain Monte Carlo (MCMC)演算法進行序列分析，並建構貝氏親緣演化樹(Bayesian tree)²⁵。

貝氏估計法(Bayesian inference method)是近年才漸漸被提出用於親緣演化分析^{26,27}，其推論主要建立於親緣演化樹的事後檢定機率(posterior probability)的分布，即計算演化樹支持數據的機率。

BEAUti-BEAST 是以貝氏估計法進行一系列演化分析的軟體。BEAUti 為 Bayesian Evolutionary Analysis Utility 的簡稱，而 BEAST 則為 Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees 的縮寫。將欲分析的序列增加採檢時間資料後，將序列經多重排比整理，以 BEAUti 軟體將序列資料讀入後分別由功能鍵進行 Tip Dates、Site Model、Clock Models、Trees、Priors、Operators 以及 MCMC 等分析參數的設定，再以 BEAST 軟體進行資料分析運算及建構 Bayesian tree²⁵。

三、結果與討論

(一) 結果

1. HCV NAT 檢測及個案基因型

此事件首先針對發病個案以核酸相似度、利用馬爾科夫蒙特卡洛(MCMC)演算法及貝葉斯統計推論所得出之親緣演化樹(Bayesian tree)進行分析(圖五)，有 11 件個案的 HCV 序列具高度關聯性，並在 Bayesian tree 呈現 2 個分支，研判此為一群聚事件並和該診所有關，進而擴大展開就醫接觸者追溯性調查。本次計畫中，進行 HCV NAT 檢測的高風險接觸者共 436 人，檢測結果陽性共 93(21.3%)人，扣除因檢體量不足及病毒量過低無法分析者後，有 36 件(83.7%)分析結果為基因型 1b，5 件(11.6%)為基因型 2a，1 件(2.3%)為基因型 2b，1 件(2.3%)為基因型 6。

2. 病毒基因序列組合與親緣演化分析

本次計畫針對 NS5B 及 C/E1/E2 片段之反應，發現 C/E1/E2 片段較容易取得其 PCR 產物以進行基因序列分析，同樣的 cohort 共取得 43 件 C/E1/E2 序列，但在 NS5B 區域，只成功獲取 28 件序列；其它臺灣不同地區的參考序列 C/E1/E2 區域取得 14 件序列，NS5B 取得 13 件。

(1) HCV C/E1/E2 基因片段

將 C/E1/E2 基因序列以 Maximum likelihood Tree 架構親緣演化樹分析(圖六)，發現共有兩個族群具有高度同源性，高風險接觸者主要為基因型 1b，而在 2a 也有一族群具高度同源性。除放入其它臺灣不同地區的參考序列外，並取得桃園當地 2016 及 2017 年 HCV 感染個案序列作為參考比較用(TW.ref.h5761-Taoyuan~TW.ref.5766-Taoyuan)，其與高風險接觸者並不在同一群體中。

(2) HCV NS5B 基因片段

將 NS5B 基因序列以 Maximum likelihood Tree 架構親緣演化樹分析(圖七)，同樣放入其它臺灣不同地區的參考序列，及桃園當地 2016 及 2017 年 HCV 感染個案序列作為參考比較用。發現共有兩個族群具有高度同源性，並且不與臺灣其它地區參考株序列畫在同一群體內，屬於基因型 1b 的族群有較多個案，而 2a 那群僅有 2 名個案為同源。此外，有些 HCV 序列並沒有歸屬於這兩群之中而成為獨立事件。

(二) 討論

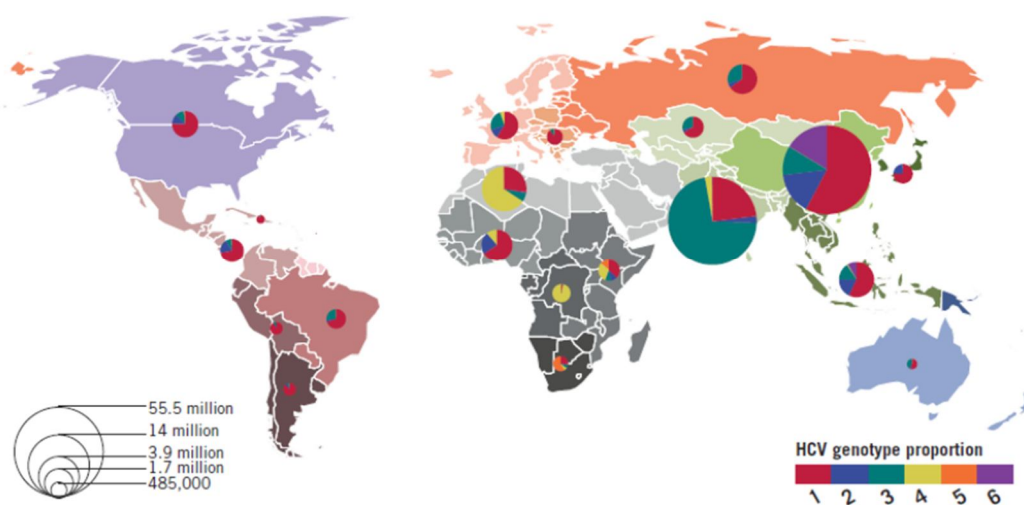
本署於 2010 年應用國民健康署於 2002 年開始進行之國民健康問卷調查所收集之全國具代表性的民眾抽樣分析之檢體，分析臺灣地區 6,310 位居民(男性 3,038 人，女性 3,272 人)之 C 型肝炎感染情形，結果顯示 1948-1982 年出生樣本的 C 型肝炎抗體陽性率男性為 3.1%，女性為 3.5%，且較早出生年代的人具有較高的陽性率，顯示抗體陽性率有隨著年齡增加而上升的趨勢。在 1962 年以後出生者其陽性率為 2.9%以下，而 1962 年及 1962 年以前出生者(至 101 年為 50 歲)，其陽性率增加至 4.0%以上；若依地理區域來看，大台北都會區 C 型肝炎的盛行率最低約為 2.1%、宜花東為最高 10.2%，以地區而言統計上具顯著差異 ($p < 0.0001$)²⁸。而 2016 年依據肝病防治學術基金會公佈最新調查指出，臺灣地區國人 C 型肝炎盛行率約 4.2%²⁹。本次計畫中，高風險接觸者 436 人中就有 93(21.3%)人為 HCV 核酸陽性，陽性率遠高於國人平均。

參考桃園當地 2016 及 2017 年 HCV 感染個案序列，其與高風險接觸者並不在同一群體中，顯示高風險接觸者 HCV 基因序列的高度關聯性並非地域性差異造成。經親緣演化分析可發現此次事件中的高風險接觸者，HCV 基因序列主要形成兩個族群具有高度同源性，而臺灣桃園及其它地區參考株序列並不在這兩個族群之中，配合疫情調查可推論此確實為一起群聚感染事件。

醫源性之 C 型肝炎群聚事件多肇因於醫護人員未落實感染管制措施，因此由數個指標感染源於同時時間內各自形成獨立之醫源性 C 型肝炎群聚事件並不罕見³⁰⁻³²。該診所就醫之病患不乏慢性 C 型肝炎患者，此次事件可能牽涉數個感染源，經調查後無法得知該診所不安全注射行為從何時開始、持續多久，不同於單一傳染源頭的案例¹⁹，故難以斷言某位個案就是感染的源頭，亦不排除此一群聚事件可能有 heterogeneous population HCV (Quasispecies)。

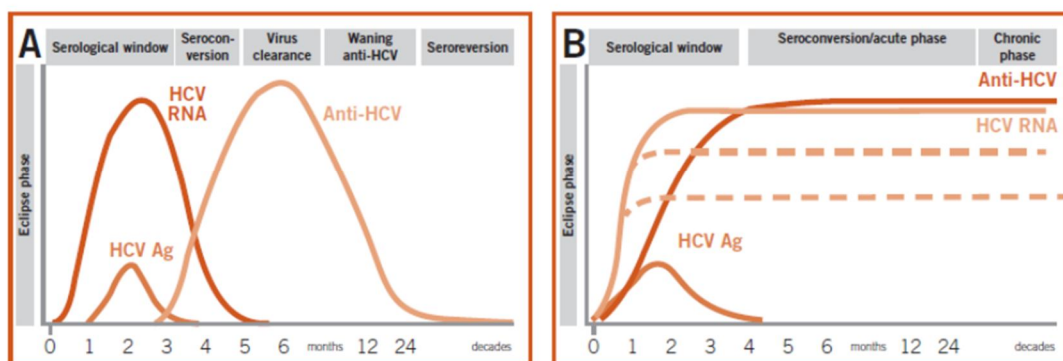
HCV 可轉譯約 3000a.a. 的 polyprotein，每天約可製造出 10^{12} 個病毒顆粒，而主要的複製酵素 RNA-dependent RNA polymerase 便是由 NS5B 基因轉譯而來，因為欠缺 proof-reading 的能力，所以突變的機會大增，造成 HCV 變異性大的特性。基因序列分析可提供我們深入了解其分子流行病學與 HCV 感染病毒演化之變異，HCV genotyping 與 subtyping 的研究日益完善成熟，對於運用親緣演化分析時應該採用 HCV 哪個部位之基因序列，有研究指出會干擾影響其 phylogenetic clustering 分析結果²⁴。最常被用來分析 HCV 基因片段為 HVR-1，為 HCV 結構中的 E2 區域；另一片段為 NS5B 區域¹⁵⁻¹⁸。證據顯示 C/E1/E2 序列所得的分析結果最佳，NS5B 的效果較不理想；本次計畫針對 NS5B 及 C/E1/E2 片段，發現 C/E1/E2 片段較容易取得其 PCR 產物以進行基因序列分析，結果符合文獻所述。

四、圖表

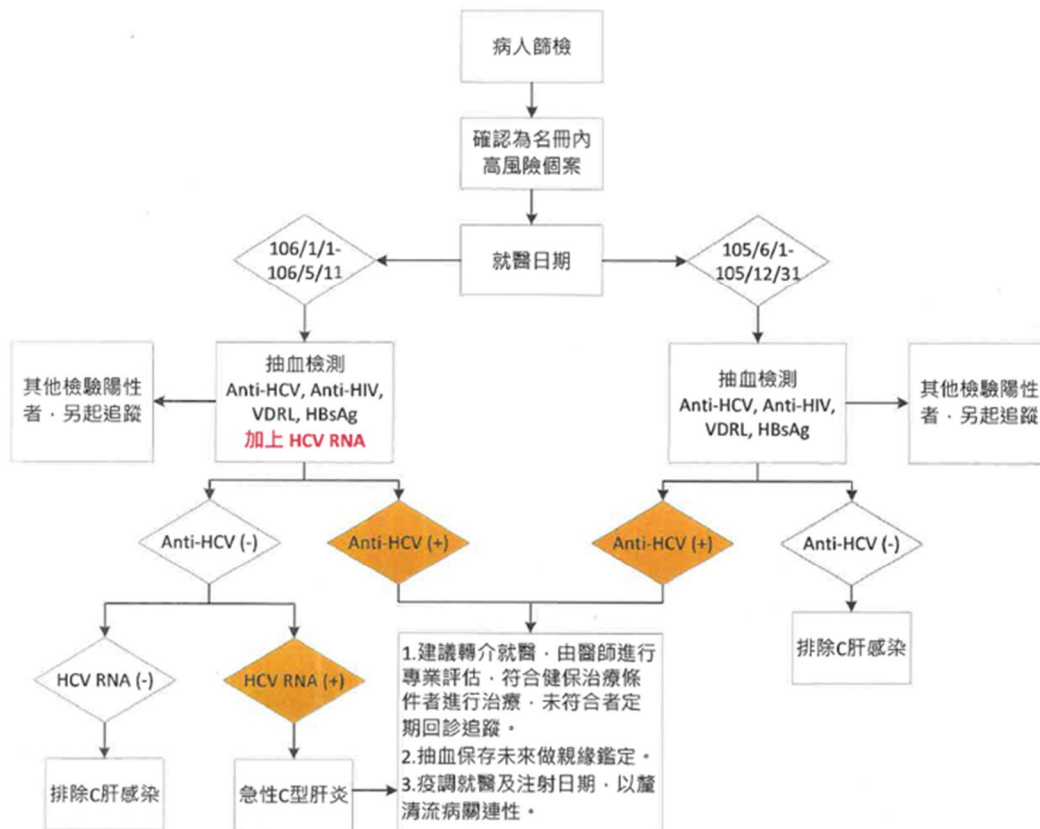


圖一 全球 C 型肝炎基因型別分布情形

HCV infection with (A) Self-resolving HCV infection, and (B) Chronic HCV infection



圖二 C 型肝炎病毒感染後體內抗體、抗原及核酸產生的時間序



圖三 高風險民眾檢體採集流程

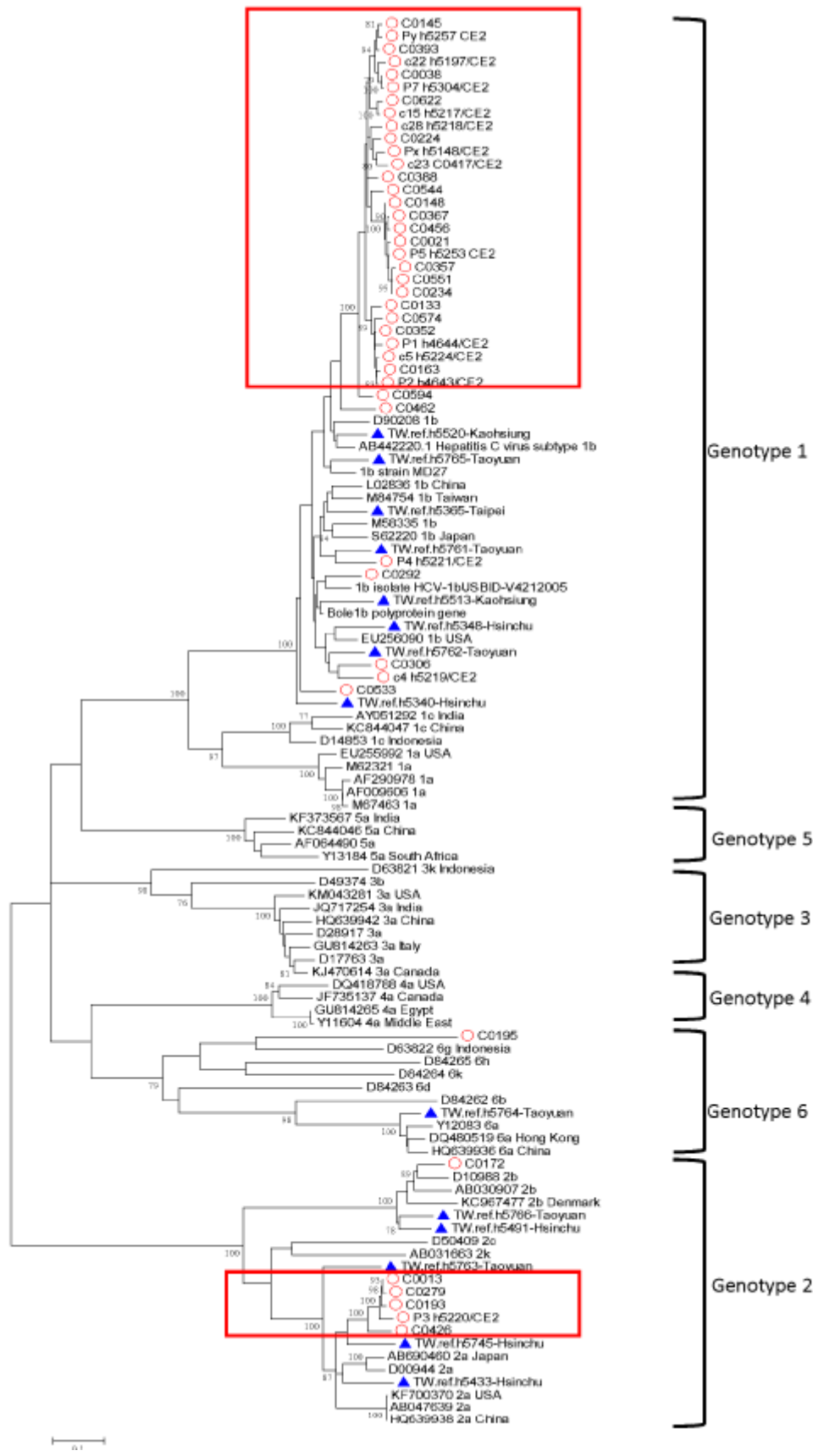
表一 Abbott RealTime 試劑敏感度及偵測極限

Sample Volume	Result	Interpretation
0.5 mL	Not Detected	Target not detected
	< 1.08 Log IU/mL ^a	Detected
	1.08 to 8.00 Log IU/mL	
	> 8.00 Log IU/mL	> ULQ ^c
0.2 mL	Not Detected	Target not detected
	< 1.48 Log IU/mL ^b	Detected
	1.48 to 8.00 Log IU/mL	
	> 8.00 Log IU/mL	> ULQ

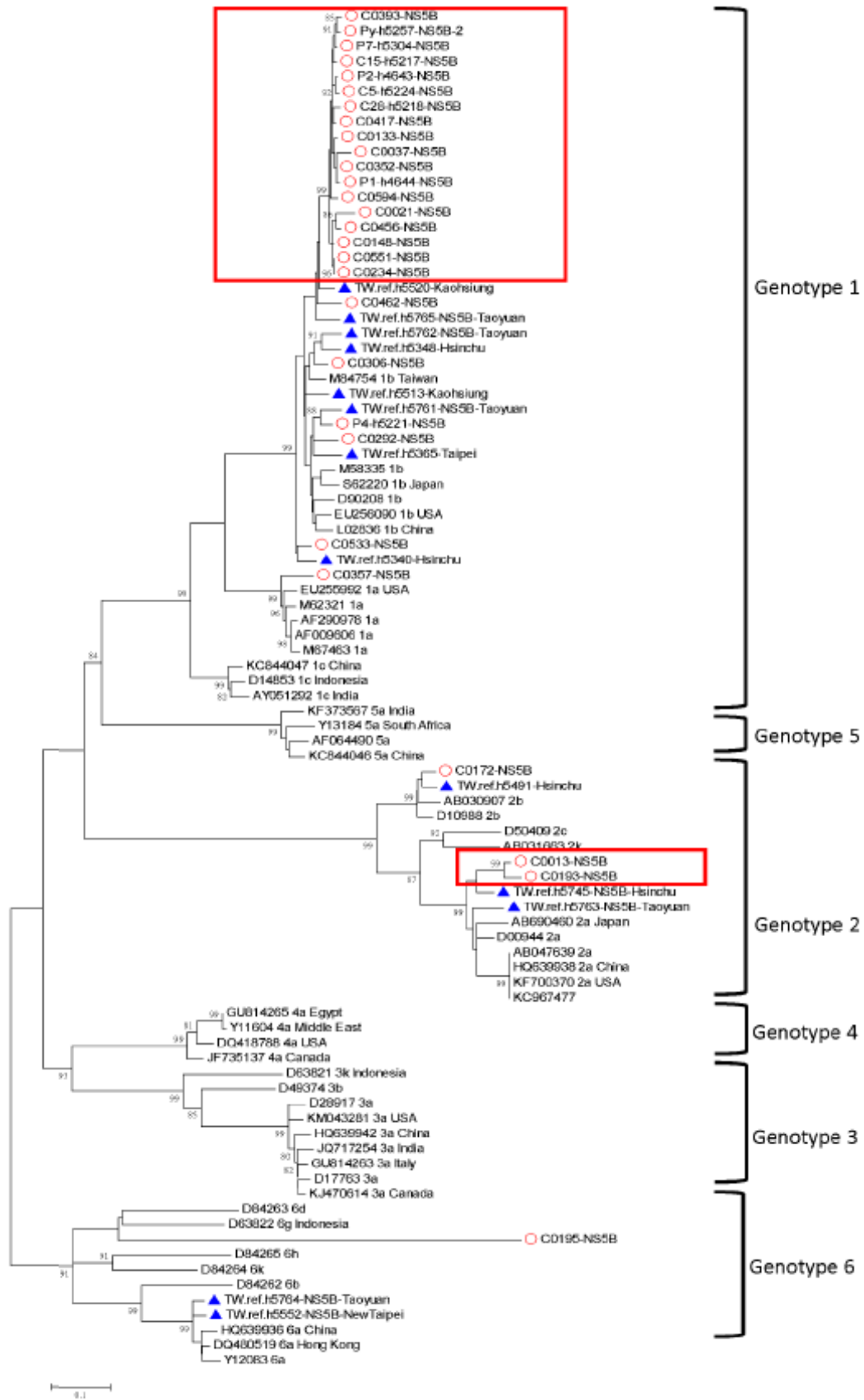
^a 12 IU/mL

^b 30 IU/mL

^c ULQ = upper limit of quantitation



圖六 Maximum likelihood 分析 C/E1/E2 片段
 ○：高風險接觸者 ▲：臺灣各地區參考序列



圖七 Maximum likelihood 分析 NS5B 片段
 ○：高風險接觸者 ▲：臺灣各地區參考序列

五、参考文献

1. Simmonds P, Alberti A, Alter HJ, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology*. 1994;19(5):1321-1324.
2. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol*. 2004;85(Pt 11):3173-3188.
3. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):223-235.
4. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. 2014;59(1):318-327.
5. Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005;42(4):962-973.
6. Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015;61(1):77-87.
7. Lee CM, Hung CH, Lu SN, et al. Viral etiology of hepatocellular carcinoma and HCV genotypes in Taiwan. *Intervirology*. 2006;49(1-2):76-81.
8. Lee CM, Lu SN, Hung CH, et al. Hepatitis C virus genotypes in southern Taiwan: prevalence and clinical implications. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(8):767-774.
9. Comstock RD, Mallonee S, Fox JL, et al. A large nosocomial outbreak of hepatitis C and hepatitis B among patients receiving pain remediation treatments. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2004;25(7):576-583.
10. Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ. Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(2):108-117.
11. Organization WH. Hepatitis C. 2017; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
12. Pawlotsky JM, Pellerin M, Bouvier M, et al. Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*. 1998;54(4):256-264.
13. Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2014;59(1):109-120.

14. 衛生福利部疾病管制署. 傳染病統計暨監視年報-104 年. 衛生福利部疾病管制署; 2016.
15. Olmstead AD, Joy JB, Montoya V, et al. A molecular phylogenetics-based approach for identifying recent hepatitis C virus transmission events. *Infect Genet Evol.* 2015;33:101-109.
16. Peng J, Lu Y, Liu W, et al. Genotype Distribution and Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus in Hubei, Central China. *PloS one.* 2015;10(9):e0137059.
17. Feray C, Bouscaillou J, Falissard B, et al. A novel method to identify routes of hepatitis C virus transmission. *PloS one.* 2014;9(1):e86098.
18. Li H, Stoddard MB, Wang S, et al. Single-Genome Sequencing of Hepatitis C Virus in Donor-Recipient Pairs Distinguishes Modes and Models of Virus Transmission and Early Diversification. *Journal of virology.* 2015;90(1):152-166.
19. Gonzalez-Candelas F, Bracho MA, Wrobel B, Moya A. Molecular evolution in court: analysis of a large hepatitis C virus outbreak from an evolving source. *BMC Biol.* 2013;11:76.
20. Campo DS, Xia GL, Dimitrova Z, et al. Accurate Genetic Detection of Hepatitis C Virus Transmissions in Outbreak Settings. *J Infect Dis.* 2016;213(6):957-965.
21. Olmstead AD. Digging Deeper Into Hepatitis C Virus Outbreaks. *J Infect Dis.* 2016;213(6):880-882.
22. Liu CH, Chen BF, Chen SC, Lai MY, Kao JH, Chen DS. Selective transmission of hepatitis C virus quasi species through a needlestick accident in acute resolving hepatitis. *Clin Infect Dis.* 2006;42(9):1254-1259.
23. Zhang C, Wu N, Liu J, et al. HCV subtype characterization among injection drug users: implication for a crucial role of Zhenjiang in HCV transmission in China. *PLoS One.* 2011;6(2):e16817.
24. Lamoury FM, Jacka B, Bartlett S, et al. The Influence of Hepatitis C Virus Genetic Region on Phylogenetic Clustering Analysis. *PLoS One.* 2015;10(7):e0131437.
25. Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 2007;7:214.
26. Yang Z, Rannala B. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Mol Biol Evol.* 1997;14(7):717-724.
27. Mau B, Newton MA, Larget B. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics.* 1999;55(1):1-12.
28. Yu ML, Chuang WL, Chen SC, et al. Changing prevalence of hepatitis C virus

- genotypes: molecular epidemiology and clinical implications in the hepatitis C virus hyperendemic areas and a tertiary referral center in Taiwan. *J Med Virol.* 2001;65(1):58-65.
29. 肝病防治學術基金會. 2016; <http://www.liver.org.tw/>.
 30. Bracho MA, Gosalbes MJ, Blasco D, Moya A, Gonzalez-Candelas F. Molecular epidemiology of a hepatitis C virus outbreak in a hemodialysis unit. *J Clin Microbiol.* 2005;43(6):2750-2755.
 31. Fischer GE, Schaefer MK, Labus BJ, et al. Hepatitis C virus infections from unsafe injection practices at an endoscopy clinic in Las Vegas, Nevada, 2007-2008. *Clin Infect Dis.* 2010;51(3):267-273.
 32. Nguyen DB, Gutowski J, Ghiselli M, et al. A Large Outbreak of Hepatitis C Virus Infections in a Hemodialysis Clinic. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2016;37(2):125-133.