

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-114503

衛生福利部疾病管制署 105 年度科技研究發展計畫

開發類病毒顆粒表現系統於快速檢測試劑應用

期 末 報 告

執行機構：衛生福利部疾病管制署-檢驗及疫苗研製中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：張哲源、郭庭佑

執行期間：105 年 1 月 1 日至 105 年 12 月 31 日

*本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先
徵求本署同意*

中文摘要

諾羅病毒為我國引起急性腸胃炎及腹瀉群聚之主要感染病毒，病患感染後極易透過人傳人或食物、環境汙染方式散播而引起大型群聚事件。目前對於諾羅病毒的檢測以分子檢測為標準方法，為現階段全球共通性的比對方式；但面對大型群聚疫情，為提供防疫單位及早控制與追蹤疫情的時效性考量，開發方便的篩檢工具能夠減短病例研判時間，將有助於提醒民眾感染狀況提早就醫治療與自我隔離，亦有助於有效控制疫情擴散。惟諾羅病毒不易培養，本研究以建置類病毒顆粒產製方法與利用類病毒之 3D 構型的優勢，進行檢測試劑之抗原製備開發研發的工具之一，並持續監測我國腹瀉群聚疫情以及病毒株之活動，以提供產製類病毒抗原之選株參考。

依據本署腹瀉群聚監測與致病病原研究資料顯示，諾羅病毒是台灣冬季造成急性腹瀉、群聚與食品中毒事件的主要原因，根據群聚病毒株活動監測顯示，諾羅病毒 GII.4 型病毒株是歷年造成群聚感染的主要病毒株；但 2014 至 2015 年期間，病毒株監測腹瀉群聚或食品中毒事件發現，自 2014 年底起新病毒株 GII.17 出現並幾乎取代過去之主要 GII.4 Sydney 病毒株，因 GII.17 引起腹瀉群聚在 2014 年約 9.1% (19/210)、2015 年約 40.9% (280/683)。分析群聚調查之流行病學資料顯示，病毒株 GII.17 和病毒株 GII.4 Sydney 皆造成全年齡層的感染，稍不同處在於病毒株 GII.17 發生場所主要為學校和餐廳，GII.4 Sydney 則主要發生在長期照護機構及養護中心。在本研究中，我們分析諾羅病毒的病毒株 GII.17 和 GII.4 Sydney 可能傳染機制。並根據 2012 至 2015 年間流行之病毒株進行類病毒顆粒表現之基因構築，建立類病毒顆粒表現平台製備動物免疫用抗原，做為未來諾羅病毒快速檢

測試劑開發計畫檢測用抗體之前端免疫抗原。

Abstract

Norovirus is one of the major causes of outbreaks of acute gastroenteritis (AGE) and diarrhea in Taiwan. It is extremely infectious and can spread through contaminated persons, food, and objects in the environment (fomite), leading to large outbreaks of AGE. The global standard for norovirus detection is through means of molecular diagnosis ie. reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). However this could be time-consuming and labor-intensive for large outbreaks and community cases. As time is crucial for authorities in controlling and monitoring outbreak progression, more efficient methods will reduce the time required for diagnosis. This in turn could ensure the patient in seeking timely medical attention and for taking proper preventative measures.

Norovirus (NoV) is the majority cause of outbreaks of acute gastroenteritis and foodborne illness in winter season in Taiwan. From activity monitor of food-borne-associated and diarrhea-associated outbreaks virus strains showed that GII.4 strains were the dominant strain caused outbreaks in the past few years. But in 2014-2015, a new norovirus strain named GII.17 which caused 9.1% (19/210) in 2014 and 40.9% (280/683) in 2015 of reported food-borne-associated and diarrhea-associated outbreaks in Taiwan were replaced former GII.4 Sydney became the predominant cause agent of gastroenteritis outbreaks. According to epidemiology of outbreak cases, norovirus GII.17 was similar to all GII.4 affected all ages and settings. Half of the GII.17 reported outbreaks were from schools and restaurant but most of the GII.4 outbreaks were reported from long-term care facility or nursing care center. In this study, we analyze the transmission association of between novel GII.4 and GII.17 NoV strain. We constructed and expressed the virus-like particle

from the dominant norovirus strain caused outbreaks in the 2012-2015. Then, we set up the virus-like particle expression platform for manufacturing the animal immunization antigen.

目錄

中文摘要	1
Abstract	3
一、 前言	7
二、 方法	11
腹瀉群聚事件監測與病毒株分析：	11
諾羅病毒之基因選殖、表達蛋白、純化抗原：	13
昆蟲桿狀病毒液製備：	14
諾羅病毒類病毒顆粒(VLP)生產：	17
諾羅病毒類病毒顆粒(VLP)純化：	17
多株抗體製備與 IgG 純化	18
Protein A/G 親和性介質 IgG 純化	18
單株抗體製備：	19
酵素免疫分析法評估類病毒顆粒與抗體之交互作用	20
酵素免疫分析法評估類病毒顆粒與豬胃蛋白黏膜之交互作用	20
穿透式電子顯微鏡	21
三、 結果	21
腹瀉群聚諾羅病毒檢測與病毒株監測：	21
群聚事件與流行病學分析	22
諾羅病毒陽性年齡分布	22
台灣第二群諾羅病毒消長趨勢	22

台灣諾羅病毒群聚發生場所分析	23
台灣第二群主流病毒株場所分布	24
台灣諾羅病毒 GII.17 型 ORF2 基因親緣性分析	24
台灣 GII.17 型諾羅病毒 VP1 抗原決定位變化	25
台灣諾羅病毒 GII.3 型 ORF2 基因親緣性分析	26
諾羅病毒表現類病毒抗原之病毒株選殖	26
確認表達之諾羅病毒類病毒顆粒與豬胃黏膜蛋白的鍵結	27
確認表達之諾羅病毒類病毒顆粒型態	28
四、 討論	29
五、 結論與建議	32
六、 計畫重要研究成果及具體建議	32
七、 參考文獻	34
八、 圖表	40

一、 前言

諾羅病毒是主要造成人類病毒性腸胃炎的病原菌之一，其傳播能力可引發全球大流行。根據 2008 至 2014 年發表共 175 筆文章統計，諾羅病毒引發的病毒性腸胃炎佔 18%(Ahmed *et al.*, 2014)，估計每年於美國約有 800 人因諾羅病毒死亡、7 萬人因諾羅病毒住院；開發中國家每年平均約有 2 萬人因諾羅病毒死亡(Wikswa *et al.*, 2012)。諾羅病毒好發於密閉空間與場所，如：醫院、長期照護機構、軍營、監獄等；長時間人與人接觸的空間，如：學校、郵輪、餐廳等。諾羅病毒感染對象涵蓋全部年齡層，依群聚與就醫特性分析特別好發於幼兒、老人及免疫力較低弱的成年人。諾羅病毒傳染方式可藉由糞-口傳染、人與人的接觸(Hall *et al.*, 2012)，或是接觸到受感染病人的嘔吐物與排泄物飛沫與污染物品，再藉由糞-口途徑感染(Ohe, 2013)。

諾羅病毒屬杯狀病毒科、不具有外套膜、具有正 20 面體蛋白殼體、大小約 27~38nm、核酸長度約 7.5~7.7 kb 的正股單股 RNA 病毒，病毒基因含有三個轉譯區 (open reading frame ; ORF)，3 個蛋白質轉譯區中 ORF1 轉譯非結構性蛋白質，ORF2 與 ORF3 分別負責轉譯結構性蛋白質 VP1 與 VP2，病毒外蛋白殼主要由 180 個 VP1 所組成，VP2 蛋白的功能並不明確，但依目前研究顯示，可能僅以極少個數參予病毒顆粒組合。近年來依照其蛋白殼體序列可將諾羅病毒分成 6 個基因群(genogroup I-VI)及超過 40 個基因型(genotypes)，其中可感染人類的基因群為 GI、GII 和 GIV(Ayukekbong *et al.*, 2015)，但僅少部分的報告指出 GIV 型諾羅病毒引起散發病例感染，目前引起全球性主要急性感染性腹瀉與群聚事件的諾羅病毒感染病例，有 89% 屬 GII 基因型別及 11% 為 GI 型，當中又以第 II 群的第 4 型(GII.4)最為常見(Donaldson *et al.*, 2008; Glass *et al.*, 2009)。在過去二十年間，GII.4 一直

是造成全球性腸胃炎的主流病毒株，依照親緣性分析可再細分成更多叢 (cluster)，文獻顯示過去最少有 5 株 GII.4 曾造成全球大流行，其中 Houston 病毒株在 1990 年代的侵襲率曾佔美國群聚事件的一半，1995 至 2002 年由 Netherlands 取代，2002 至 2004 年主流株轉為 Farmington Hill，2004 至 2006 年再轉為 Hunter，而後於 2010 年再轉為 New Orleans 病毒株，直至近年 2012 年被 Sydney 病毒株取代(*Greening et al., 2012; Siebenga et al., 2008; Vega et al., 2011; Vinje et al., 1997; Widdowson et al., 2004; Zheng et al., 2010*)。由於主要感染病毒株不斷演化，研究歷年間主流病毒株發現病毒在抗原決定位點之胺基酸產生改變，可能利用這機制而躲過人體免疫系統，而導致曾受諾羅病毒感染者的抗體無法有效進行辨識新病毒株而無法達到長期免疫保護效果(*Lindesmith et al., 2012; Lindesmith et al., 2008*)。

在本研究我們藉由腹瀉病毒群聚檢測建立我國諾羅病毒的流行趨勢，並深入分析病毒株外套膜基因序列建立病毒株的活動狀態監測，從相關病毒株的活動監測，可以從病毒的抗原決定外點變化或新病毒株的活動狀態，作為疫情監測與預警防治的參考。研究中並以兩波流行季 2012-2014 年間主流株 GII.4 Sydney 與 2014-2016 年新的 GII.17 主流株，透過胺基酸分析病毒之抗原決定位改變與免疫機制，探討病毒與細胞間的作用位置的變化。

諾羅病毒的檢測方法最初依賴電子顯微鏡，尋找糞便檢體中病毒顆粒，或以受諾羅病毒感染者的抗體先將病毒反應固定染色，再至電子顯微鏡下找尋染色的病毒顆粒，此法曾為檢測諾羅病毒之黃金標準法(Gold Standard) (*Kapikian et al., 1972*)；後來逐漸有多家藥廠開發 ELISA 抗原檢測試劑，文獻報告以散發性個案或群聚事件病患檢體，或以不同型別之諾羅病毒檢體評估，結果指出試劑在某些病毒株之檢測專一性不錯但檢驗的靈敏度低，因此建議 ELISA 抗原檢測僅適用在大流行期間或大型群聚事件進行初步篩

檢使用，並未大量用於發病個案的疾病診斷(Costantini, V. et al., 2010)。目前全球公認使用 RT-PCR 方法檢測諾羅病毒固定基因片段，為目前確認諾羅病毒感染的檢驗方法(Rabenau, H. F. et al., 2003, de Bruin, E. et al., 2006)。雖分子生物學檢測或以酵素免疫分析法檢測，兩種方法各有缺點：分子生物學方法檢測方式，雖檢驗需要較多儀器設備與工作時間，但除提供腹瀉群聚事件中感染個案的檢測判定外，在疫情調查時，可應用在食物處理者、照護者、環境與食物感染原的病毒比對與溯源分析，可以協助釐清感染原與傳播途徑；酵素免疫分析法檢測，雖檢測時間較短，但受限於靈敏度與專一性的問題，目前多數的國家在用於疫情監測時，僅用於群聚事件的初步篩檢，但考量防疫的時效性，對於群聚事件亦可考慮先以快篩試劑做初步篩選工作，對檢出陽性的個案檢體須再加作分子生物學鑑定研判，並提供病毒相關性比對搭配疫調問卷以找出真正的致病傳播來源；因此，如開發專一性與靈敏度佳的快速篩檢之試劑，將可以提供更有效率之防治作為。

由於諾羅病毒株型別多樣性與主流病毒株持續性基因演化，在開發快速篩檢試劑時，其抗體針對不同諾羅病毒株的廣效反應性為快篩試劑敏感度高低之關鍵。受限於諾羅病毒及不易培養，近期研究以腸道組織細胞於培養系統中模擬腸道狀態，成功培養繼代病毒株；但病毒株的培養系統與產量仍不穩定，因此本研究擬開發結合以類病毒表現系統生產製備多樣化的病毒株，以開發符合各種病毒檢測之抗體庫及檢測平台，適合疫情篩檢所使用之快速檢驗方法，並可隨時加入涵蓋新病毒株將有助於監測使用。

類病毒顆粒(Viral-like particles; VLPs)是由多單元病毒表現結構蛋白組成，組成的結構與天然的病毒近似因此稱之為類病毒，但結構內不含病毒核酸，為非感染性病毒顆粒。許多研究顯示，類病毒在結構上的特性，能夠刺激 B-與 T-細胞免疫，產生更好的免疫反應，目前已有多種應用於疫苗開發；類病

毒的顆粒組成微小以及結構彈性是相當好的基因載體工具，利用此特性已有許多遺傳疾病與基因治療上的應用；此外，類病毒體積與 3D 構型的優勢，目前已成為許多生化奈米試劑開發正在研發的工具之一。多數研究結果指出，類病毒顆粒表面表現的結構和密集重複胺基酸序列的片段，會引發類病毒顆粒的高免疫反應刺激活性，及促進 B 細胞活化與高效價抗體的生產(Bachmann, M. F., and Zinkernagel, R. M., 1997, Brun, A. et al., 2011)。另外，奈米尺度的類病毒顆粒會被抗原呈現細胞吞噬並降解，最終會導致 T 細胞活化(Bachmann, M. F. et al., 2004)。更甚者，因為其對稱性高重複性的胺基酸結構，類病毒顆粒在缺少常用的佐劑下，依然可以引起強烈的細胞免疫反應(Bachmann, M. F. et al., 1993)。

除了以類病毒顆粒作為疫苗及基因治療工具的潛力，最近特別關注由不同病毒和類病毒顆粒組成的新的奈米材料的開發。這個被稱為生物奈米技術的新生技領域，代表跨學科領域的作法，是採用了生物學、化學、物理學及工程學的方法與概念(Soto, C. M. et al., 2010)。作為新的奈米材料，病毒或類病毒顆粒較以化學合成生產的產品，具有數項優勢，包括尺寸大小，其範圍從 10 到 2000 nm，結構可分析成高解析度的三維結構，使用化學及分子生物學技術進行構築的靈活性，在自然宿主或異重宿主中可以獲得很高的產量，而且每一種型別的病毒或類病毒顆粒，各自有統一的結構(Lee, L. Y. et al., 2009)。

二、 方法

腹瀉群聚事件監測與病毒株分析：

腹瀉通報系統及流行病學資料：

諾羅病毒監測透過腹瀉症狀群聚通報系統及食物中毒事件通報(於2014年起併入腹瀉症狀群聚通報系統)進行全國性監測。群聚通報之流行病學資料包含身分別(病人、接觸者或工作人員)、年齡、場所及發病日等，並藉由地方衛生局依疫情調查研判其傳染途徑與食物媒介相關或腹瀉症狀之群聚。群聚事件定義：最少有兩位或以上於同一場所及時間攝食相關食物或出現腹瀉或嘔吐症狀。諾羅病毒群聚事件定義：通報之群聚個案檢體中最少有一件檢體經由分子生物學技術鑑定為諾羅病毒陽性。

1. 糞便檢體處理：

研究收集2012至2016年10月期間群聚通報系統共7376件糞便檢體(2012年1418件、2013年1019件、2014年1106件、2015年2113件、2016年1-10月底前1720件)。糞便檢體以1:10磷酸緩衝溶液(PBS)進行稀釋並強力震盪，再以3000 g轉速於4°C離心15分鐘去雜質，取上清液移至冷凍小管進行後續處理，或保存於-80°C。

2. 病毒RNA萃取：

處理後的檢體上清液，取200 µL使用MagNA Pure Compact system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)，依試劑建議步驟處理後取得100 µL RNA；或取上清液140 µL使用QIAamp Viral RNA mini

kit (QIAGEN, Germany)，依試劑建議步驟處理後取得 60 μ L RNA。抽取之 RNA 接續執行後續反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 反應或保存於 -80°C 待用。

3. 反轉錄反應 (Reverse Transcription)：

以病毒 RNA 萃取液 10 μ L 為模板，加入隨機引子於 95°C 作用 3 分鐘後，馬上將反應管置於冰上；再加入單管 RT 混合液，內含 3.2 mM dNTP、10U Reverse Transcriptase 反轉錄酵素(Roche Cat. No.03 531 287)、40U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl_2 、10 mM dithiothreitol (DTT)，反應總體積為 20 μ L。於 50°C 作用 50 分鐘，之後 85°C 作用 15 分鐘。

4. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)：

依據不同群諾羅病毒選用各群適用的引子。G1 為 G1SKF/ G1SKR、G2 為 G2SKF/ G2SKR (Kojima et al., 2002)。反應條件：denaturation 94°C 30 秒、annealing 54°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個循環。將 PCR 產物以電泳進行分析，陽性反應之產物約 330 bp 大小，反應產物可再進一步做序列分析。

5. 序列分析：

- 使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列標記。
- 定序反應：將純化後產物放入 ABI 3730 自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autoseqencer) 進行核酸定序反應。
- 核酸序列以 MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis - Phylogenetic) 軟體進行序列比對 (Tamura et al., 2007)，先以 Models-Find Best DNA/Protein Models 篩選最適分析方法，並以

Construct Maximum Likelihood Tree 進行親緣性分析。

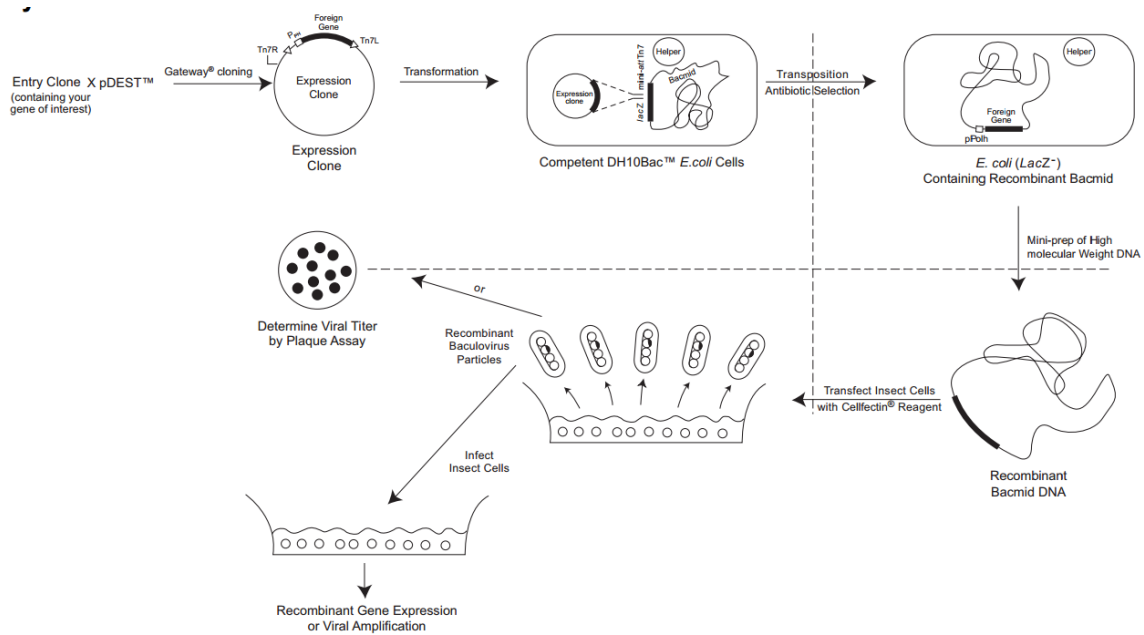
6. 病毒基因序列比對：

將核酸定序反應後得到的序列與 Norovirus Genotyping Tool Version 1.0 (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>) 以及和 NCBI 資料庫中病毒基因序列進行比對，確認檢體的病毒基因型。

諾羅病毒之基因選殖、表達蛋白、純化抗原：

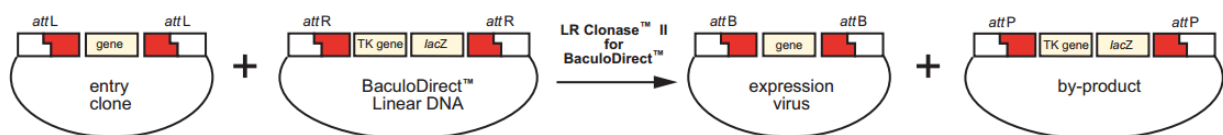
諾羅病毒裸露在外層的殼蛋白，主要由病毒的 ORF2、ORF2 基因表現所得之蛋白 VP1 與 VP2 構成。由於諾羅病毒無法藉由感染細胞株進行增殖，因此關於諾羅病毒的相關研究目前仍以類病毒顆粒(Viral-like particle；VLP)為主要平台模擬病毒於自然環境下的型態，進行諾羅病毒抗原決定位探討、病毒演化及感染機制的研究。

類病毒顆粒之基因構築，是將病毒殼蛋白之序列 ORF2、ORF3 以傳統聚合酶連鎖反應進行：針對不同型別之 GI、GII 諾羅病毒，設計專一引子 G1-SKF_clone(5'-CAC CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA)/TX30SXN (5'-GAC TAG TTC TAG ATC GCG AGC GGC CGC CC(T)₃₀-3')、G2-SKF_clone (5'-CAC CCN TGG GAG GGC GAT CGC AA 3')/TX30SXN 進行 RT-PCR，反應條件：denaturation 94°C 30 秒、annealing 60°C 30 秒、extension 72°C 2.5 分鐘，共 40 個 cycle。所得之約 2.5 kb 的 PCR 產物連接至 pENTR-D-TOPO vector (品號：K240020；Thermo Fisher Scientific)；先使用套組建議之 M13 引子對進行菌落篩選，篩選已含構築病毒基因質體(entry clone)之菌落再進行質體萃取並定序確認序列。挑選正確之菌落(entry clone)進一步使用重組互換酵素(Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix，Cat. no.



11791-020)，將基因換至適合進行表現的載體(pDEST 系統)並挑選正確菌落。確認菌落後將質體萃取出並送至適合昆蟲細胞表現的載體(Bacmid)，最後送至昆蟲細胞產製重組桿狀病毒，流程如下。

(Publication Part number 25-0650 ; Thermo Fisher Scientific)



(Publication Part number 25-0516 ; Thermo Fisher Scientific)

昆蟲桿狀病毒液製備：

I. 第一代昆蟲桿狀病毒液。

1. 將 Sf9 細胞以 8×10^5 /well 的數量種於 6 well plate，培養液為不含血清及抗生素之 Grace's insect medium。
2. 於 27°C 培養箱培養 1 小時待細胞貼附。

3. 等待同時配置轉染所需的試劑，方法如下：
 - A. 取 8 μL Cellfectin Reagent (使用前須充分混合，上下倒轉 5-10 次)至 100 μL 不含血清及抗生素之 Grace's insect medium 中稀釋，此混合液需在室溫放置超過 30 分鐘。
 - B. 取 1 μg 已嵌入諾羅病毒類病毒顆粒蛋白基因的 Bacmid DNA，於 100 μL 不含血清及抗生素之 Grace's insect medium 中稀釋，與稀釋之 Cellfectin Reagent 混合後置於室溫作用 30 分鐘。
4. 待細胞貼附後將調配好之轉染試劑緩慢滴入 6 well plate 中，於 27°C 培養箱培養 5 小時。
5. 移除轉染用的培養基，加入 2 mL 含有胎牛血清及抗生素的 Grace's insect medium，於 27°C 培養箱培養 5-7 天，觀察細胞之細胞病變效應 (Cytopathic effect, CPE)。
6. 待所有細胞都有細胞病變效應之情形，且約有 50% 細胞漂起時，將細胞與培養液一起收集至 15 mL 離心管。
7. 於 4°C 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除細胞碎片後收取上清液，此為第一代昆蟲桿狀病毒液，存放於 -80°C 冰箱。

II. 第二代昆蟲桿狀病毒液(為放大重組桿狀病毒之效價)。

1. 將 Sf9 細胞以 $6 \times 10^6/\text{flask}$ 的數量種於 25T flask，培養液為含有 10% 胎牛血清及 1% 抗生素的 Grace's insect medium。
2. 於 27°C 培養箱培養 1 小時待細胞貼附。
3. 待細胞貼附後，吸去上清液，加入混和好之病毒液(400 μL 第一代病毒液+ 600 μL 含有 10% 胎牛血清及 1% 抗生素的 Grace's insect medium)。

4. 將細胞置於震盪器上，於 27°C 恆溫培養箱中以最低轉速搖晃培養 1 小時。
5. 補充 5 mL 昆蟲培養基/flask，於 27°C 恆溫培養箱培養 5-7 天，觀察細胞之細胞病變效應。
6. 待所有細胞都有細胞病變效應之情形，且約有 50% 細胞漂起時，將細胞與培養液一起收集至 15 mL 離心管。
7. 於 4°C 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除細胞碎片後收取上清液，此為第二代昆蟲桿狀病毒液，存放於-80°C 冰箱。

III. 第三代昆蟲桿狀病毒液(再次放大重組桿狀病毒之效價)。

1. 將 Sf9 細胞以 2×10^7 /flask 的數量種於 75T flask，培養液為含有胎牛血清及抗生素的 Grace's insect medium。
2. 於 27°C 培養箱培養 1 小時待細胞貼附。
3. 待細胞貼附後，吸去上清液，加入混和好之病毒液(400 μ L 第二代病毒液+ 3.6 μ L 含有 10% 胎牛血清及 1% 抗生素的 Grace's insect medium)。
4. 將細胞置於震盪器上，於 27°C 恆溫培養箱中以最低轉速搖晃培養 1 小時。
5. 補充 16 mL 昆蟲培養基/flask，於 27°C 恆溫培養箱培養 5-7 天，觀察細胞之細胞病變效應。
6. 待所有細胞都有細胞病變效應之情形，且約有 50% 細胞漂起時，將細胞與培養液一起收集至 50 mL 離心管。
7. 於 4°C 3000 rpm 離心 20 分鐘，去除細胞碎片後收取上清液，此為第三代昆蟲桿狀病毒液，存放於-80°C 冰箱。

諾羅病毒類病毒顆粒(VLP)生產：

1. 將 High-five 細胞以 6×10^6 /flask 的數量種於 75T flask，同時加入 0.4 mL 第三代昆蟲桿狀病毒液(先加入 14 mL 培養液，加入細胞後再加入昆蟲桿狀病毒液)，於 27°C 恆溫培養箱培養。
2. 觀察細胞細胞病變效應，待所有細胞都有細胞病變效應之情形，且約有 50% 細胞漂起時(約 7 天)，將細胞與培養液一起收集至 50 mL 離心管。
3. 用高速離心機以 6000 rpm，於 4°C 離心 60 分鐘。
4. 用針筒抽取上清液並用 0.45 μ m 過濾膜過濾，保存於 4°C 冰箱。
5. 將細胞萃取液冷凍解凍三次，再以 13000 rpm，於 4°C 離心 20 分鐘，取上清液保存於 -80°C 冰箱。
6. 以 SDS-PAGE 分析上清液與細胞萃取液之上清液中的蛋白大小是否符合諾羅病毒類病毒顆粒蛋白的大小。

諾羅病毒類病毒顆粒(VLP)純化：

1. 將保存於 4°C 冰箱的上清液取出，取 12 mL/tube 至超高速離心管中，並將超高速離心管放入 bucket 中，用微量天平平衡至小數點下第三位。
2. 將平衡後的 bucket 掛到 SW41Ti rotor 上，注意是否確實掛好。
3. 離心 32000 rpm，4°C，3 小時。
4. 倒掉上清液，加入 100 μ L 滅菌 PBS，放入 4°C 冰箱回溶 16 小時。
5. 將回溶後的蛋白液於高速離心機 13000 rpm，4°C 離心 30 分鐘，取上清液。
6. 為移去培養液並將類病毒顆粒置換至 PBS 中，收集上一步驟之

上清液，加入 PBS 至 10-12 mL 後，移至超高速離心管中，並將超高速離心管放入 bucket 中，用微量天平平衡至小數點下第三位。

7. 將平衡後的 bucket 掛到 SW41Ti rotor 上，注意是否確實掛好。
8. 離心 32000 rpm，4°C，3 小時。
9. 去除上清液，將 PBS 補入至 500 μ L 左右。
10. 以 SDS-PAGE 分析類病毒顆粒蛋白之大小是否正確(約 55 kDa/58 kDa)。
11. 之後使用梯度氯化銫溶液在超高速離心下(125,000g，10 小時，10°C)進行類病毒顆粒純化，最後用電子顯微鏡確認是否有類病毒顆粒。

多株抗體製備與 IgG 純化

以 2.5 mg 至 3.5 mg 經純化後諾羅病毒類病毒顆粒作為抗原進行動物免疫。免疫前採血以酵素免疫分析法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，確認選用免疫的動物對抗原不具有辨識能力。免疫後同樣進行採血，以西方墨點法(Western blot)及酵素免疫分析法確認對免疫抗原的辨識能力。

Protein A/G 親和性介質 IgG 純化

Protein A/G 親和性介質管 (rProtein A Protein G GraviTrap, GE Healthcare Life Science) 加入 10 mL 的 binding buffer，帶緩衝液流乾後將免疫之血清加入，通過 Protein A/G 親和性介質，再加入 15 mL 的 binding buffer，待流乾後加入 3~5 mL Elution buffer，收集的流出液每毫

升加入 200 μL 的中和試劑。IgG 純化後，再以 SDS-PAGE 確認純度與重量。

單株抗體製備：

1. 準備 2.5 mg 至 3.5 mg 經純化後諾羅病毒類病毒顆粒作為抗原進行動物免疫。
2. 每隻小鼠抗原量為 200-300 μg ，免疫前採血以酵素免疫分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，確認選用免疫的動物對抗原不具有辨識能力。
3. 免疫後同樣進行採血，以西方墨點法及酵素免疫分析法確認對免疫抗原的辨識能力。
4. 犧牲第一隻小鼠並取出脾臟細胞與 B 細胞進行融合，以先前提供免疫的抗原進行酵素免疫分析以篩選具有生產抗體能力之細胞，並將其單株化；先將細胞株稀釋，重新平分到 96 槽細胞培養盤中，以計算使得每槽中只含有一個細胞，使其生長成群落後，再次以酵素免疫分析法確認篩選出之細胞確實具有產生抗體，即能辨識到抗原而呈現陽性反應的細胞株。
5. 為了從陽性細胞株中挑選效價較高的抗體。將首四株單株抗體細胞上清液(每株 10 mL)進行酵素免疫分析，以吸光值做挑選，選出較高效價抗體(及稀釋多倍後仍具有辨識能力)的細胞株(四株)，進行腹水抗體量產。
6. 將取得之腹水抗體，取部分抗體從原濃度 10 mg/mL 稀釋至 0.1 mg/mL，再進一步連續稀釋抗體，測試與原抗原的效價以獲得較適合的反應濃度。

酵素免疫分析法評估類病毒顆粒與抗體之交互作用

將抗原(VLP)與抗體分別進行蛋白質定量

1. 將 50 ng 抗原黏於反應盤上，靜置 4°C 16 小時。
2. 以清洗液 (wash buffer) 洗 3 次，每格反應孔加入 100 μ L 阻斷液 (blocking buffer)，37°C 反應 1 小時後倒掉。
3. 加入已序列稀釋之抗體，37°C 反應 1 小時後倒掉。
4. 清洗液洗 5 次後拍乾，加入 2 級抗體，37°C 反應 1 小時後倒掉。
5. 清洗液洗 5 次後拍乾，每格加入 100 μ L 受質溶液(substrate)，避光室溫反應 15 分鐘。
6. 每格加入 100 μ L 加入停止溶液 (stop solution)，用分光光度計 $OD_{450\text{ nm}}$ 讀取反應數值。

酵素免疫分析法評估類病毒顆粒與豬胃蛋白黏膜之交互作用

將類病毒顆粒(VLP)與抗體分別進行蛋白質定量

1. 將 1 μ g 豬胃蛋白黏膜 (PGM) 作為抗原黏於反應盤上，靜置 4°C 16 小時。
2. 以清洗液 (wash buffer) 洗 3 次，每格反應孔加入 100 μ L 阻斷液 (blocking buffer)，37°C 反應 1 小時後倒掉。
3. 加入已序列稀釋之類病毒顆粒，37°C 反應 1 小時後倒掉。
4. 加入已序列稀釋之針對類病毒顆粒的 1 級抗體，37°C 反應 1 小時後倒掉。
5. 清洗液洗 5 次後拍乾，加入 2 級抗體，37°C 反應 1 小時後倒掉。
6. 清洗液洗 5 次後拍乾，每格加入 100 μ L 受質溶液(substrate)，避光室溫反應 15 分鐘。

7. 每格加入 100 μL 加入停止溶液 (stop solution)，用分光光度計 $\text{OD}_{450\text{ nm}}$ 讀取反應數值。

穿透式電子顯微鏡

1. 取 10 μL 已純化之類病毒顆粒與等體積之 1% BSA 混和均勻
2. 用自夾式鑷子夾出新的銅片，小心不要碰到中間放置樣本的區域，也要小心避免損傷銅片
3. 將步驟 1. 之液體小心滴到銅片的正面(顏色較深那面)，小心 tip 不要碰到銅片表面，靜置 2 分鐘
4. 用撕破的濾紙邊緣吸去多餘液體，小心不要觸碰到銅片表面
5. 滴上 20 μL 之 2% 磷鎢酸(phosphotungstic acid)溶液，小心 tip 不要碰到銅片表面，靜置 2 分鐘
6. 用撕破的濾紙邊緣吸去多餘液體，小心不要觸碰到銅片表面
7. 靜置於乾燥箱至少 16 小時，讓剩餘液體風乾
8. 至陽明大學貴儀中心使用穿透式電子顯微鏡 JSM-5300 (放大倍率為 15 萬倍，功率為 10KV)

三、 結果

腹瀉群聚諾羅病毒檢測與病毒株監測：

2012 至 2016 年 10 月期間，共通報 1588 起疑似食品中毒事件與腹瀉群聚事件(於 2015 年 4 月合併為腹瀉群聚事件)，共採集 7360 件(2012 年 1418 件、2013 年 1011 件、2014 年 1099 件、2015 年 2112 件、2016 年 10 月底前 1720 件)糞便檢體。經實驗室以聚合酶連鎖反應分析，7360

件檢體中諾羅病毒檢出數為 2236(佔 30.3% , 2236/ 7360)、輪狀病毒為 217(佔 2.9% , 217/7360)、細菌為 426(佔 5.8% , 426/7360) (表一)。以群聚事件歸類共 1588 起腹瀉群聚事件，諾羅病毒陽性群聚數為 804 起(佔 50.6% , 804/1588) (圖一)。

群聚事件與流行病學分析

2012 至 2016 年 10 月期間通報之腹瀉群聚數共計 1588 起，每年諾羅病毒群聚事件發生數介於 75-262 起。統計資料顯示，諾羅病毒平均檢出率佔腹瀉群聚 50.6% 且好發於冬季，每年約於 9 月陽性群聚數開始上升，並於隔年 3-4 月下降。過去諾羅病毒群聚陽性率於夏季時降至最低，平均低於 10%，但於 2015 年起諾羅病毒夏季之陽性率始終維持在 40% 以上，於今年(2016 年)夏季時亦達到 30% (圖二)。

諾羅病毒陽性年齡分布

本研究將通報腹瀉群聚檢體，依照年齡分布分為低年齡層(0-12 歲)、中年齡層(13-60 歲)、高年齡層(61-100 歲)，其中低、中、高年齡層再細分為 0-6 歲、7-12 歲，13-24 歲、25-36 歲、37-48 歲、49-60 歲，61-100 歲(表二)。資料顯示，台灣腹瀉群聚個案分布於各年齡層，在 13-24 歲些微偏高(圖三)，而諾羅病毒陽性個案年齡則偏在低、高年齡層 (表三)，顯示台灣諾羅病毒感染年齡層與國際相似，主要分布於幼兒及老年人 (圖四)。

台灣第二群諾羅病毒消長趨勢

由文獻統計及台灣過去資料顯示，第二群(GII)諾羅病毒一直是引發全球大流行的病毒株，其中又以第二群第四型(GII.4)為主流病毒株，平

均每 2 至 3 年會造成全球大流行(Hoa Tran et al., 2013)。依照諾羅病毒陽性群聚檢出結果，將其進一步做分型，分析結果顯示，第二群諾羅病毒每年流行病毒株及百分比皆不相同，2012 年主流株為 GII.4 Sydney，2013 及 2014 年主流株為 GII.4 Sydney 與 GII.6，2015 年起由 GII.17 取代為主流病毒，但仍偶出現十幾起 GII.3 及 GII.4 群聚，2016 年 10 月前結果大致與 2015 年相同 (圖五)。依照諾羅病毒分布月份結果顯示，GII.4 Sydney 盛行於 2012 至 2013 年間，雖其後每年主流株被其他病毒株取代，但仍持續占有一定發生率，好發於冬季；GII.6 盛行於 2013 至 2014 年間，其後只有零星幾起群聚事件檢出該型別； GII.17 自 2014 年末開始流行，於 2015 年盛行至今，是為現今台灣主流病毒株，但在 2016 年 8 月末，GII.17 病例數開始下降；相反的，GII.2 的病例數於 2016 年 9 月開始增加；GII.3 出現於 2015 年春季，每月檢出數維持在 10 件上下 (圖六)。

台灣諾羅病毒群聚發生場所分析

依據地方衛生局調查結果，台灣腹瀉病毒群聚事件通報場所，大致歸類為學校、餐廳、醫院、長期照護機構、監獄/軍營、其他共六大項。依照各年度通報群聚數及諾羅病毒陽性結果分析，2012 至 2014 年諾羅陽性場所主要分布在學校 (表四)，陽性率介於 38.6 至 53.3%；其次為長期照護機構，陽性率介於 17.5 至 24.0%，學校及長期照護機構是為 2015 年前台灣諾羅病毒主要發生場所。2015 年起學校雖仍為諾羅病毒主要發生場所，陽性率佔 39.3%，但原次要發生場所-長期照護機構則明顯下降至 7.3%，比 2015 年前下降超過 10%，發生場所-餐廳躍升為 2015 年次要發生場所，陽性率佔 28.2%，比 2015 年前上升超過 10%(2012 至 2014 年陽性率介於 12.0 至 16.3%)。2016 年起餐廳成為主要發生場所，

陽性率佔 43%，其次為學校，陽性率佔 30% (圖七)。

台灣第二群主流病毒株場所分布

雖諾羅病毒感染主要在冬季流行，但非流行季間仍有諾羅病毒腹瀉群聚事件低度流行，因此我們嘗試以全年度的病毒株監測資料合併群聚事件的流行病學訊息，分析是否可提供下一流行季流行期開始時間或預測可能流行病毒株之參考。在本研究中以群聚通報監測系統自地方衛生局通報腹瀉群聚資料，以及衛生福利部食品藥物管理署所通報的食品中毒群聚案件調查資訊，找出發生場所與調查資料，匯入 826 起諾羅陽性群聚發生場所及病毒株資料，分析比較發現在歷年主要流行病毒株之發生場所確實有差異(表五)，調查資料與病毒株整合分析資料中顯示，GII.4 Sydney 發生場所主要為學校(佔 31.3%，85/272)，其次為長期照護機構(佔 27.2%，74/272)；GII.6 發生場所主要為學校(佔 69.5%，41/59)，其次為餐廳(佔 15.3%，9/59)；GII.17 發生場所主要為餐廳(佔 57.8%，144/249)，其次為學校(佔 24.9%，62/249)；GII.3 發生場所主要為學校(佔 62.2%，23/37)，其次為餐廳(佔 29.7%，11/37) (圖八)。因此，初步推測病毒株好發或適合感染的場所可能和病毒株之傳播途徑或易感年齡層有關，後續研究將加入病毒株與傳播途徑或年齡層因子分析，本年先以 2014-2016 年間相對應於 GII.4 外之主流病毒株型別(GII.17 及 GII.3)進行分析。

台灣諾羅病毒 GII.17 型 ORF2 基因親緣性分析

根據病毒與群聚監測資料顯示，GII.17 型自 2014 年 12 月突然取代 GII.4 Sydney 型別成為 2015-2016 年之主流株，過去在台灣監測資料顯示，僅在 2013 年曾有一起 GII.17 型群聚案件，為探討病毒株成為主流

病毒株的可能機制，研究中挑選 2013-2015 年間病毒株針對病毒外套膜區與抗原決定位置進行分析，以了解病毒的演化特性，同時也分析台灣 GII.17 型與國際出現之 GII.17 型親緣性是否相近(Khamrin *et al.*, 2016; LeBlanc *et al.*, 2016)，實驗室以 MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) 進行親緣性分析；分析資料共納入 11 株國內(2013~2015 年)及 19 株國際 GII.17 型病毒株，取其 ORF2 基因內相同片段，以 Maximum Likelihood 方法、Kimura 2-parameter model 模組重複 1000 次進行演算 (圖九 A)。演算結果顯示，包括國內病毒株 NCBI 編號：KJ156329 與自 2013 年起出現於亞洲其他國家的 GII.17 同屬於分支 C 第 1 群；於 2014 至 2015 年間盛行於亞洲國家為主之 GII.17 則分屬於分支 C 第 2 群，顯示諾羅病毒感染之 GII .17 型別在國際間一致，同時病毒在外套膜區核酸亦逐年進行變化(圖九 B)，另分析 2013-2015 年外套膜區間抗原決定位點之胺基酸變化，2013 年病毒株與 2014-2015 年已產生些微改變(表六)。

台灣 GII.17 型諾羅病毒 VP1 抗原決定位變化

台灣 GII.17 型基因親緣性分析結果顯示，台灣 GII.17 型與國際盛行之 GII.17 型分屬相同分支，為了解台灣 GII.17 型抗原決定位是否與國際型相同，以國際期刊中病毒之抗原決定位做為參考(Chan *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2016)，並以得出結構之序列做為參考株(病毒株 NCBI 編號：AB983218、LC037415)比較其胺基酸差異 (表六)。結果顯示本實驗室得到之病毒序列 NCBI 編號 KJ156329 與 AB983218 相同，KT732275 與 LC037415 相同；三級結構模擬軟體顯示，變異的抗原決定位於第 1 群及第 2 群上有明顯的改變：抗原決定位 A 形狀不同、抗原決定位 D 形狀不同、抗原決定位 E 電荷不同 (圖十)。

台灣諾羅病毒 GII.3 型 ORF2 基因親緣性分析

為研究於 2015-2016 年流行季中，新起的 GII.3 型，與過去出現於各國之 GII.3 型基因親緣性是否相近，故隨機挑選一支我國 GII.3 型陽性檢體進行 ORF2 基因構築。定序後之序列同樣以 Maximum Likelihood 方法、Kimura 2-parameter model 模組重複 1000 次進行演算(圖十一 A)。演算結果顯示，國內病毒株 NCBI 編號：KT732274 與 2010 年參考株最為相近，但其核酸序列與國際基因資料庫比對，目前僅能取得各國病毒株仍稍有差異 (圖十一 B)，顯示 GII.3 在國內環境中持續演化並感染流行。

諾羅病毒表現類病毒抗原之病毒株選殖

諾羅病毒 GII.4 Sydney 於 2012 年 9 至 10 月出現於本國後，成為我國腹瀉群聚及食物中毒事件主要病毒株，再於 2014 年 12 月由 GII.17 取代。基於人類免疫系統對於已感染之病原應具有免疫抗體之特性，本研究推測，諾羅病毒藉由改變抗原決定位胺基酸，使得免疫系統無法對改變抗原決定位之諾羅病毒進行辨識，致使新病毒株出現即造成大流行。

由於尚無法藉細胞培養進行諾羅病毒增殖，且其對人感染機制尚不明確，故無法以傳統方式進行病毒放大，因而以目前最為廣泛使用之類病毒顆粒進行殼蛋白表現 (Gao et al., 2016; Malm et al., 2016)，以此為平台製備動物免疫抗原，並進行動物免疫生產抗體 (圖十二)。

目前實驗室以 2012 GII.4 Sydney 及 2014 年 GII.17 二株主流病毒株，以及 GI.4 構築諾羅病毒外套膜表現質體，並以昆蟲細胞表現系統置備諾羅病毒類病毒顆粒，經純化以電子顯微鏡確認表現顆粒大小及外

觀，因諾羅病毒無法培養進行中和試驗，因此以國際公認之 blockade assay 方法取代以確認諾羅病毒之抗原性。目前已完成三株病毒之類病毒(2012年 GII.4 Sydney、2014年 GII.17及 GI.4)製備與確認；開始進行多株與單株抗體製備工作。兩株多株抗體 (GII.17, 15-AP-1 與 GI.4, 14-H-2)以及一株單株抗體 (GII.4, 12-BA-1)，並且經由西方墨點法與酵素免疫分析法皆可以辨識到抗原。

確認表達之諾羅病毒類病毒顆粒與豬胃黏膜蛋白的鍵結

從過去的研究發現 HBGA 可能是諾羅病毒感染細胞的受體 (Huang *et al.*, 2003 and Huang *et al.*, 2005).；因諾羅病毒無法培養進行中和試驗，由 Ralph S. Baric 團隊研究可以得知，豬胃黏膜蛋白(Porcine gastric mucin, PGM) 具有相當高程度的 H 以及 A 抗原以及少部份的 Lewis Y 抗原；並且，豬胃黏膜蛋白(Pig gastric mucin type III, PGM; Sigma Chemicals) 已經被確認會與諾羅病毒類病毒顆粒鍵結，更可以做為諾羅病毒類病毒顆粒抗體阻斷反應(NoV VLP antibody blockade assays)的基質 (Lindesmith LC *et al.* 2012 & Debbink K *et al.* 2012) ，因此我們初步以本研究所生產的諾羅病毒類病毒顆粒 (GII.17, 15-AP-1 與 GII.4, 12-BA-1) 確認是否可與豬胃黏膜蛋白產生鍵結，並可被這兩株病毒類病毒顆粒的專一抗體所辨識。結果顯示，諾羅病毒類病毒顆粒 (GII.17, 15-AP-1 與 GII.4 Sydney, 12-BA-1)會隨著加入的類病毒顆粒量增加，隨之的吸光值(OD_{450nm})也上升 (圖十三)，同時，在盤上未黏豬胃黏膜蛋白並處理類病毒顆粒時，是沒有吸光值的；此外，在有盤上黏豬胃黏膜蛋白且沒有加入類病毒顆粒時，也是沒有吸光值的。在這兩組 negative control 初步證實下，生產的諾羅病毒類病毒顆粒 (GII.17, 15-AP-1 與 GII.4, 12-BA-1)可能會與豬胃黏膜蛋白上的 H 以

及 A 抗原鍵結，代表著本研究生產的諾羅病毒類病毒顆粒維持和病毒一致的抗原性 (antigenicity)。

確認表達之諾羅病毒類病毒顆粒型態

電子顯微鏡技術是目前公認可用於確認病毒存在的方法，因此為測試本研究中所生產之諾羅病毒類病毒顆粒是否真具有病毒型態，申請至陽明大學使用其貴儀中心的穿透式電子顯微鏡 JSM-5300 來觀察類病毒顆粒，由結果可以發現，本研究生產的類病毒顆粒與諾羅病毒具有相似的形狀大小相近似，並且外圍可見許多特殊的凸起 (圖十四)；代表本研究所生產的類病毒顆粒是具有與病毒相似於病毒外觀構造。

四、 討論

2012 年起諾羅病毒病毒株 GII.4 Sydney 於美國、加拿大、歐洲、澳洲、香港等地引起群聚性腸胃炎(Bennett *et al.*, 2013; Centers for Disease and Prevention, 2013; Chan and Chan, 2013; Fonager *et al.*, 2013; van Beek *et al.*, 2013)，該病毒株首次分離地點位於澳洲，於 2012 年下半年迅速於全球各地造成許多起群聚感染；台灣亦同，且同樣於 2012 年分離出病毒株 GII.4 Sydney。根據台灣流行病學資料統計，病毒株 GII.4 Sydney 感染年齡層遍及全部，相較其他型病毒株，GII.4 Sydney 對高年齡層影響更劇；諾羅病毒發生場所資料統計顯示，GII.4 Sydney 主要發生場所為學校；從親緣性分析結果來看，GII.4 Sydney 與 GII.4 Apeldoorn 2007 及 New Orleans 2009 相近；以序列相似度進行比較，顯示 GII.4 Sydney 裸露殼蛋白區域 P2 與 GII.4 Apeldoorn 2007 和 GII.4 New Orleans 2009 相似度為 93.3 %和 92.5 %。2012 年驗出病毒株 GII.4 Sydney 前，同樣屬於 GII.4 型諾羅病毒群聚事件是由 GII.4 New Orleans 2009 型引起，推測 GII.4 Sydney 可能與 GII.4 Apeldoorn 2007 和 New Orleans 2009 演化自同一祖先。

由於諾羅病毒屬於 RNA 病毒，RNA 依賴性 RNA 聚合酶(RdRp)不具有修飾功能，因此 RNA 病毒突變機率高於 DNA 病毒。此外 RNA 病毒具有重組能力，因而諾羅病毒突變產生變異株的速度非常快(Siebenga *et al.*, 2007)。此外諾羅病毒僅需非常少的量便足以造成感染(小於 18 顆病毒)，且對化學、壓力、熱具有很高的耐受性(Hall, 2012)。

本篇研究顯示，諾羅病毒 GII.4 Sydney 自 2012 年出現便為台灣腹瀉群聚主流病毒株，期間幾乎取代其他型諾羅病毒，場所分析結果顯示 GII.4 Sydney 主要發生在學校(31.3%)，其次為長期照護機構(27.2%)；依照各年齡層做諾羅病毒週發生時間統計，表四結果顯示 GII.4 Sydney 低年齡層發生時間於 2012 年 12、13 週，中、高年齡層發生時間則於 2012 年 23 週之後，顯示低年齡層發生時間比中、高年齡層早約 10 週，推測可能原因為低年齡層過去未受諾羅病毒感染，一旦病毒突變並迅速傳播，尚未具有免疫力的低年齡層即較容易受諾羅病毒感染，因而發生時間較中、高年齡層早。此情形於 GII.6、GII.17、GII.3 亦同。

2014 至 2016 年 GII.17 取代先前 GII.4 Sydney 成為主流病毒株。同一時間亞洲等國亦發生許多起 GII.17 群聚事件(*LeBlanc et al., 2016; Thanh et al., 2016*)，但此現象並未出現於歐洲、美國等西方國家。數據顯示 GII.17 發生場所與年齡和過去引起較多群聚事件之病毒株不同，GII.4、GII.6、GII.3 主要發生年齡層為幼、高年齡層，GII.17 發生年齡層於 2016 較偏向於中年齡層，且發生場所與過去以學校及長期照護機構為主要發生場所之 GII.4、GII.6、GII.3 亦不同，GII.17 主要發生場所為餐廳。關於 GII.17 型好發於餐廳且感染年齡層較偏向中年齡層，目前尚無證據可指出造成原因，詳細原因需持續進行監測或其他證據證明，如：食品檢驗結果證明諾羅病毒是否易存在於食品中？魚貝水產品或肉品食品是否為諾羅病毒污染與傳播來源？疫情發生有關的食品是否有採集與檢測等，都是未來進行深入研究探討分析的重點。因以目前的通報方式，食品中毒事件通報時在疫情初步調查研判與食物有關，而腹瀉群聚通報事件在疫情通報時初步研判與食物無關，若證明食物無諾羅病毒，就必須調查工作人員諾羅病毒來源？

在過去研究文獻中指出諾羅病毒類病毒顆粒是會藉由鍵結人類組織血

型抗原受體 (histo-blood group antigen, HBGA) 的受體，此種作用對於人類感染諾羅病毒產生腹瀉有著高度的相關性 (Huang et al., 2013)，而豬胃粘膜蛋白也具有人類組織血型抗原受體中的 A, H 以及 Lewis Y 抗原，是可以用作篩選生產出的諾羅病毒類病毒顆粒可否作為諾羅病毒顆粒阻斷試驗的方法，本研究所生產的諾羅病毒類病毒顆粒是可以與豬胃粘膜蛋白產生鍵結，並且吸光值與加入的病毒類顆粒量有著正相關，合併純化的類病毒顆粒之電顯掃描結果，代表本實驗室生產的類病毒顆粒是正確的。

五、 結論與建議

諾羅病毒傳播途徑及不同病毒株之偏好感染機制目前尚不明確，本研究統計資料顯示，諾羅病毒新病毒株開始流行時感染對象傾向於低年齡層為主，但各年齡層都會是感染的對象；而過去的研究也指出諾羅病毒型別多樣性，部分的病毒株間產生的抗體可能有部分交叉反應，但抗體保護效果與病毒株間的關係，將會是現階段疫苗開發以及疫苗株選用的重點，同時感染族群的變化，將是未來疫苗建議施打對象的重要資訊。本研究將持續進行相關病毒各種因子之分析，若未來有其他證據證明此現象，將可用於易感染族群、長期照護機構相關重症感染者等之疫苗選用基礎，即使疫苗無法涵蓋廣泛性病毒株，仍有機會避免高年齡層、免疫力低弱之族群受感染。

因新型 GII.17 主要發生於餐廳場所，若未來有其他調查證據證明 GII.17 並不存在或不易殘留於食品，即可能源自於工作人員操作過程的汙染，應在調查與衛教中多教訓訓練或管控食品相關業者之食材處理機制以此降低諾羅病毒發生率。

本研究已建立完整的諾羅病毒類病毒顆粒生產流程，並以穿透式電子顯微鏡的方式確認表達的類病毒顆粒的外型與諾羅病毒相同，因此，將會更進一步的探究本研究中所生產的諾羅病毒的抗原性，以建立諾羅病毒快篩平台的良好基礎。

六、 計畫重要研究成果及具體建議

本研究計畫持續性以實驗室監測全國性通報腹瀉群聚與食物中毒，配

合疫調資料的彙整，以建置近年我國諾羅病毒株病毒序列分析比對方法，在彙整病毒株與流行病學資訊中探討病毒的傳播與感染；並建置完善的諾羅病毒類病毒顆粒表達及純化方法，將以此作為開發專一性抗體與快速檢測試劑的基礎。

七、 参考文献

Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D., Koopmans, M., and Lopman, B.A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* *14*, 725-730.

Allen, D.J., Noad, R., Samuel, D., Gray, J.J., Roy, P., and Iturriza-Gomara, M. (2009). Characterisation of a GII-4 norovirus variant-specific surface-exposed site involved in antibody binding. *Virology* *6*, 150.

Ayukekbong, J.A., Mesumbe, H.N., Oyer, O.G., Lindh, M., and Bergstrom, T. (2015). Role of noroviruses as aetiological agents of diarrhoea in developing countries. *J Gen Virol* *96*, 1983-1999.

Bachmann, M. F., and Zinkernagel, R. M. (1997) Neutralizing antiviral B cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 235-270

Bachmann, M. F., and Dyer, M. R. (2004) Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 81-88

Bachmann, M. F., Rohrer, U. H., Kundig, T. M., Burki, K., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1993) The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* **262**, 1448-1451

Bennett, S., MacLean, A., Miller, R.S., Aitken, C., and Gunson, R.N. (2013). Increased norovirus activity in Scotland in 2012 is associated with the emergence of a new norovirus GII.4 variant. *Euro Surveill* *18*.

Brun, A., Barcena, J., Blanco, E., Borrego, B., Dory, D., Escibano, J. M., Le Gall-Recule, G., Ortego, J., and Dixon, L. K. (2011) Current strategies for subunit and genetic viral veterinary vaccine development. *Virus Res.* **157**, 1-12

Centers for Disease, C., and Prevention (2013). Emergence of new norovirus strain GII.4 Sydney--United States, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62, 55.

Chan, M.C., and Chan, P.K. (2013). Complete Genome Sequence of a Novel Recombinant Human Norovirus Genogroup II Genotype 4 Strain Associated with an Epidemic during Summer of 2012 in Hong Kong. *Genome Announc* 1.

Chan, M.C., Lee, N., Hung, T.N., Kwok, K., Cheung, K., Tin, E.K., Lai, R.W., Nelson, E.A., Leung, T.F., and Chan, P.K. (2015). Rapid emergence and predominance of a broadly recognizing and fast-evolving norovirus GII.17 variant in late 2014. *Nat Commun* 6, 10061.

Costantini, V., Grenz, L., Fritzinger, A., Lewis, D., Biggs, C., Hale, A., and Vinje, J. (2010) Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2770-2778

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., and Baric, R.S. (2008). Norovirus pathogenesis: mechanisms of persistence and immune evasion in human populations. *Immunol Rev* 225, 190-211.

de Bruin, E., Duizer, E., Vennema, H., and Koopmans, M. P. (2006) Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J. Virol. Methods* 137, 259-264

Fonager, J., Hindbaek, L.S., and Fischer, T.K. (2013). Rapid emergence and antigenic diversification of the norovirus 2012 Sydney variant in Denmark, October to December, 2012. *Euro Surveill* 18.

Gao, X., Esseili, M.A., Lu, Z., Saif, L.J., and Wang, Q. (2016). Recognition of Histo-Blood Group Antigen-Like Carbohydrates in Lettuce by Human GII.4 Norovirus. *Appl Environ Microbiol* 82, 2966-2974.

Glass, R.I., Parashar, U.D., and Estes, M.K. (2009). Norovirus gastroenteritis. *N Engl J Med*

361, 1776-1785.

Greening, G.E., Hewitt, J., Rivera-Aban, M., and Croucher, D. (2012). Molecular epidemiology of norovirus gastroenteritis outbreaks in New Zealand from 2002-2009. *J Med Virol* 84, 1449-1458.

Hall, A.J. (2012). Noroviruses: the perfect human pathogens? *J Infect Dis* 205, 1622-1624.

Hall, A.J., Eisenbart, V.G., Etingue, A.L., Gould, L.H., Lopman, B.A., and Parashar, U.D. (2012). Epidemiology of foodborne norovirus outbreaks, United States, 2001-2008. *Emerg Infect Dis* 18, 1566-1573.

Hasing, M.E., Lee, B.E., Preiksaitis, J.K., Tellier, R., Honish, L., Senthilselvan, A., and Pang, X.L. (2013). Emergence of a new norovirus GII.4 variant and changes in the historical biennial pattern of norovirus outbreak activity in Alberta, Canada, from 2008 to 2013. *J Clin Microbiol* 51, 2204-2211.

Hoa Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N.A., and Nakagomi, O. (2013). Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *J Clin Virol* 56, 185-193.

Iritani, N., Kaida, A., Kubo, H., Abe, N., Murakami, T., Vennema, H., Koopmans, M., Takeda, N., Ogura, H., and Seto, Y. (2008). Epidemic of genotype GII.2 noroviruses during spring 2004 in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 46, 2406-2409.

Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R., and Chanock, R. M. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.* **10**, 1075-1081

Khamrin, P., Kumthip, K., Yodmeeklin, A., Supadej, K., Ukarapol, N., Thongprachum, A.,

Okitsu, S., Hayakawa, S., Ushijima, H., and Maneekarn, N. (2016). Molecular characterization of norovirus GII.17 detected in healthy adult, intussusception patient, and acute gastroenteritis children in Thailand. *Infect Genet Evol* 44, 330-333.

Kojima, S., Kageyama, T., Fukushi, S., Hoshino, F.B., Shinohara, M., Uchida, K., Natori, K., Takeda, N., and Katayama, K. (2002). Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 100, 107-114.

LeBlanc, J.J., Pettipas, J., Gaston, D., Taylor, R., Hatchette, T.F., Booth, T.F., Mandes, R., McDermid, A., and Grudeski, E. (2016). Outbreak of Norovirus GII.17 in the Canadian Province of Nova Scotia. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016, 1280247.

Lee, L. Y., Ng, H. Y., Ong, S. L., Hu, J. Y., Tao, G., Kekre, K., Viswanath, B., Lay, W., and Seah, H. (2009) Ozone-biological activated carbon as a pretreatment process for reverse osmosis brine treatment and recovery. *Water Res.* 43, 3948-3955

Lindesmith, L.C., Beltramello, M., Donaldson, E.F., Corti, D., Swanstrom, J., Debbink, K., Lanzavecchia, A., and Baric, R.S. (2012). Immunogenetic mechanisms driving norovirus GII.4 antigenic variation. *PLoS Pathog* 8, e1002705.

Lindesmith, L.C., Donaldson, E.F., Lobue, A.D., Cannon, J.L., Zheng, D.P., Vinje, J., and Baric, R.S. (2008). Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5, e31.

Malm, M., Tamminen, K., Vesikari, T., and Blazevic, V. (2016). Type-specific and cross-reactive antibodies and T cell responses in norovirus VLP immunized mice are targeted both to conserved and variable domains of capsid VP1 protein. *Mol Immunol* 78, 27-37.

Ohe, M. (2013). A "Blind Spot" Regarding the Norovirus Infection Pathway. *Tohoku J Exp Med* 229, 125-128.

Rabenau, H. F., Sturmer, M., Buxbaum, S., Walczok, A., Preiser, W., and Doerr, H. W. (2003)

Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best? *Intervirology* **46**, 232-238

Shanker, S., Choi, J.M., Sankaran, B., Atmar, R.L., Estes, M.K., and Prasad, B.V. (2011). Structural analysis of histo-blood group antigen binding specificity in a norovirus GII.4 epidemic variant: implications for epochal evolution. *J Virol* **85**, 8635-8645.

Siebenga, J., Kroneman, A., Vennema, H., Duizer, E., Koopmans, M., and Food-borne Viruses in Europe, n. (2008). Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GII.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill* **13**.

Siebenga, J.J., Vennema, H., Renckens, B., de Bruin, E., van der Veer, B., Siezen, R.J., and Koopmans, M. (2007). Epochal evolution of GGII.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol* **81**, 9932-9941.

Soto, C. M., and Ratna, B. R. (2010) Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 426-438

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.

Tan, M., Huang, P., Xia, M., Fang, P.A., Zhong, W., McNeal, M., Wei, C., Jiang, W., and Jiang, X. (2011). Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production. *J Virol* **85**, 753-764.

Thanh, H.D., Than, V.T., Nguyen, T.H., Lim, I., and Kim, W. (2016). Emergence of Norovirus GII.17 Variants among Children with Acute Gastroenteritis in South Korea. *Plos One* **11**.

van Beek, J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Eden, J.S., Fonager, J., Hewitt, J., Iritani, N., Kroneman, A., Vennema, H., Vinje, J., *et al.* (2013). Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Euro Surveill* **18**, 8-9.

Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., and Vinje, J. (2011). Novel surveillance network for norovirus gastroenteritis outbreaks, United States. *Emerg Infect Dis* *17*, 1389-1395.

Vinje, J., Altena, S.A., and Koopmans, M.P. (1997). The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *J Infect Dis* *176*, 1374-1378.

Widdowson, M.A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, R.S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G, *et al.* (2004). Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002. *J Infect Dis* *190*, 27-36.

Wikswa, M.E., Hall, A.J., Centers for Disease, C., and Prevention (2012). Outbreaks of acute gastroenteritis transmitted by person-to-person contact--United States, 2009-2010. *MMWR Surveill Summ* *61*, 1-12.

Xue, L., Wu, Q., Cai, W., Zhang, J., and Guo, W. (2016). Molecular characterization of new emerging GII.17 norovirus strains from South China. *Infect Genet Evol* *40*, 1-7.

Zakikhany, K., Allen, D.J., Brown, D., and Iturriza-Gomara, M. (2012). Molecular evolution of GII-4 Norovirus strains. *PLoS One* *7*, e41625.

Zheng, D.P., Widdowson, M.A., Glass, R.I., and Vinje, J. (2010). Molecular epidemiology of genogroup II-genotype 4 noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *J Clin Microbiol* *48*, 168-177.

八、 圖表

表一、2012 至 2016 年 10 月通報個案收案情形

	2012	2013	2014	2015	2016(Oct)	Total
Suspected case No.	1418	1011	1099	2112	1720	7360
NoV(+) No. (%)	522 (36.8%)	198 (19.4%)	210 (19.0%)	684 (32.4%)	622 (36.2%)	2236 (30.3%)
RoV(+) No. (%)	19 (1.3%)	29 (2.8%)	58 (5.2%)	78 (3.7%)	33 (1.9%)	217(2.9%)
Bac (+) No. (%)	43 (3.0%)	54 (5.3%)	88 (8.0%)	157 (7.4%)	84 (4.9%)	426 (5.8%)
Total outbreak No.	308	249	265	430	348	1588
NoV(+) outbreak No. (%)	176 (57.1%)	80 (32.1%)	75 (28.3%)	262 (60.9%)	232 (66.6%)	804 (50.6%)

表二、2012 至 2016 年 10 月通報個案年齡分布

	2012	2013	2014	2015	2016(Oct)	Total
Suspected case No.	1418	1011	1099	2112	1720	7360
0-6	102 (7.2%)	72 (7.1%)	90 (8.1%)	168 (8.0%)	101 (5.8%)	533 (7.2%)
7-12	240 (16.9%)	163 (16.0%)	176 (15.9%)	299 (14.2%)	201 (11.6%)	1079 (14.6%)
13-24	288 (20.3%)	224 (22.0%)	261 (23.6%)	504 (23.9%)	375 (21.8%)	1652 (22.4%)
25-36	175 (12.3%)	146 (14.3%)	184 (16.6%)	337 (15.9%)	326 (18.9%)	1168 (15.8%)
37-48	201 (14.2%)	160 (15.7%)	162 (14.6%)	335 (15.9%)	287 (16.6%)	1145 (15.5%)
49-60	203 (14.3%)	145 (14.2%)	120 (10.8%)	317 (15.0%)	281 (16.3%)	1066 (14.9%)
61-100	209 (14.7%)	101 (9.9%)	106 (9.6%)	152 (7.2%)	149 (8.6%)	717 (9.7%)

表三、2012 至 2016 年 10 月諾羅陽性個案年齡分布

Year	2012	2013	2014	2015	2016(Oct)	Total
NV(+) No.	332	156	148	337	622	1595
0-6	46 (13.9%)	13 (8.3%)	24 (16.2%)	81 (24.0%)	68 (10.9%)	232 (14.5%)
7-12	55 (16.6%)	51 (32.7%)	45 (30.4%)	90 (26.7%)	103 (16.6%)	344 (21.6%)
13-24	44 (13.3%)	18 (11.5%)	19 (12.8%)	46 (13.6%)	129 (20.7%)	256 (16.1%)
25-36	26 (7.8%)	8 (5.1%)	9 (6.1%)	25 (7.4%)	101 (16.2%)	169 (10.6%)
37-48	20 (6.0%)	15 (9.6%)	5 (3.4%)	22 (6.5%)	68 (10.9%)	130 (8.2%)
49-60	29 (8.7%)	8 (5.1%)	3 (2.0%)	30 (8.9%)	69 (11.1%)	139 (8.7%)
61-100	112 (33.7%)	43 (27.6%)	43 (29.1%)	43 (12.8%)	84 (13.5%)	325 (20.4%)

表四、2012 至 2016 年 10 月諾羅病毒群聚場所分布

	2012	2013	2014	2015	2016 (Oct)
NoV positive No.	176	80	75	262	232
School	68 (38.6%)	38 (47.5%)	40 (53.3%)	103 (39.3%)	71 (30.6%)
Restaurant	29 (16.5%)	13 (16.3%)	9 (12.0%)	74 (28.2%)	99 (42.7%)
others	20 (11.4%)	8 (10.0%)	4 (5.3%)	41 (15.6%)	25 (10.8%)
Hospital	23 (13.1%)	5 (6.3%)	4 (5.3%)	19 (7.3%)	7 (3.0%)
Long-term case facility	32 (18.2%)	14 (17.5%)	18 (24.0%)	19 (7.3%)	26 (11.2%)
Prison/Military	4 (2.3%)	2 (2.5%)	0	6 (2.3%)	4 (1.7%)

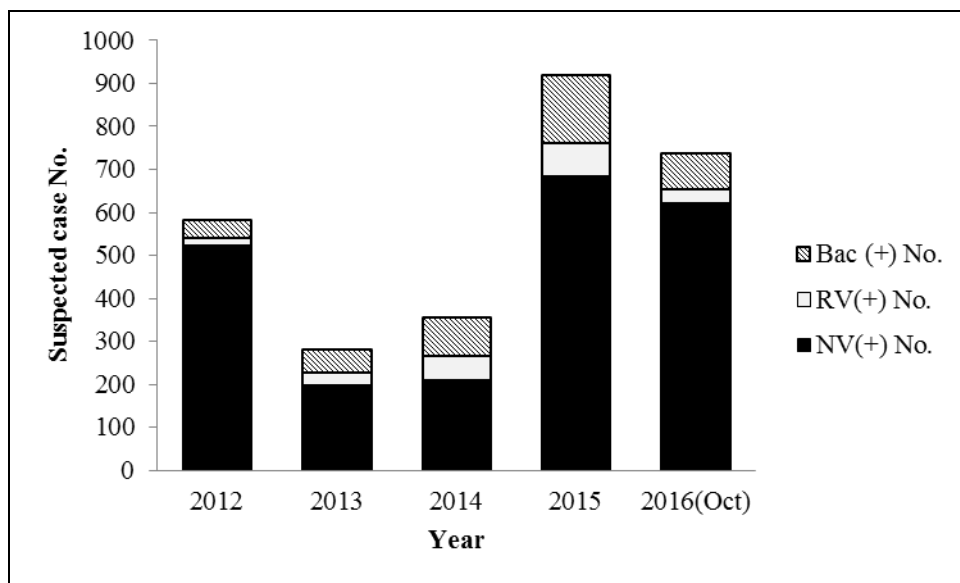
表五、2012 至 2016 年 10 月台灣主流病毒株分布場所

Settings	2012-2016(Oct)					
	Total outbreak No. (n=1584)	All NV(+) outbreak No. (n=826)	GII.4 Sydney outbreak No. (n=272)	GII.6 outbreak No. (n=59)	GII.17 outbreak No. (n=249)	GII.3 outbreak No. (n=37)
School	644 (40.7%)	322 (39.0%)	85 (31.3%)	41 (69.5%)	62 (24.9%)	23 (62.2%)
Restaurant	482 (30.4%)	224(27.1%)	54 (19.9%)	9 (15.3%)	144 (57.8%)	11 (29.7%)
others	207(13.1%)	97 (11.7%)	30 (11.0%)	4 (6.8%)	38 (15.3%)	1 (2.7%)
Hospital	72 (4.5%)	58 (7.0%)	26 (9.6%)	0	19 (7.6%)	0
Long-term care facility	145(9.2%)	109 (13.2%)	74 (27.2%)	5 (8.5%)	19 (7.6%)	2 (5.4%)
Prison/Military	34 (2.1%)	16 (1.9%)	3 (1.1%)	1 (1.7%)	6 (2.4%)	0

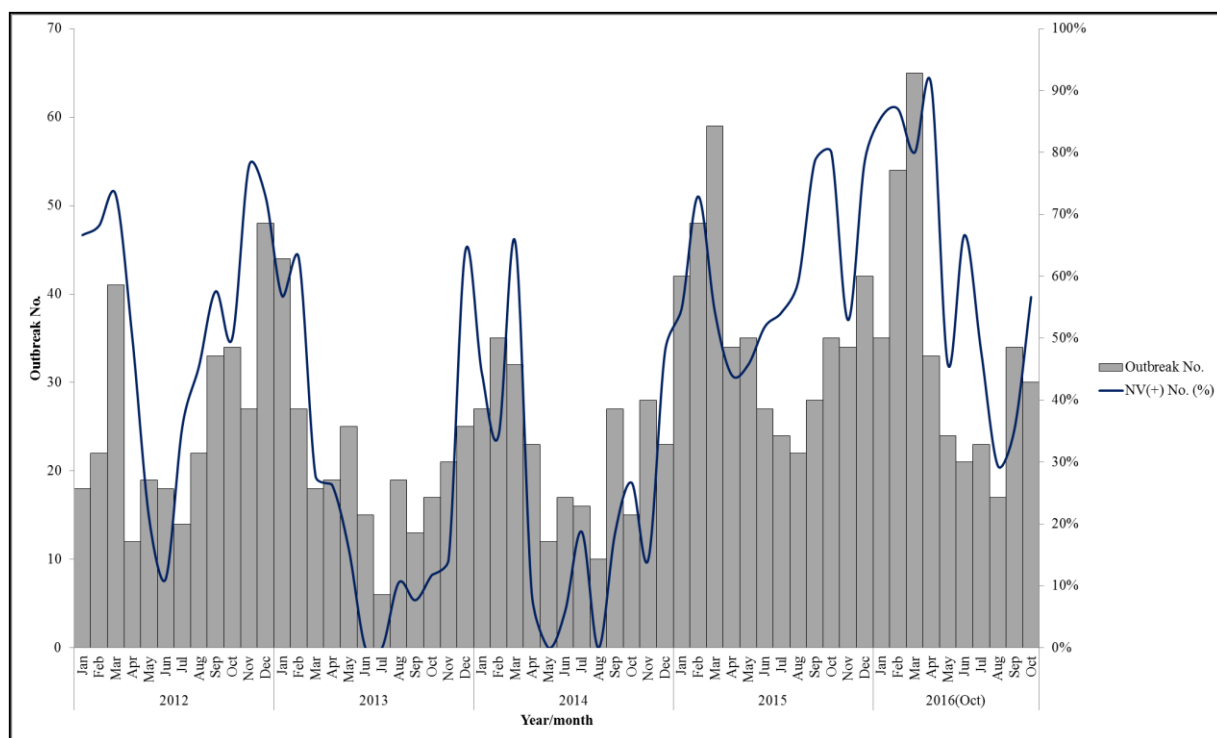
表六、台灣 GII.17 型諾羅病毒類病毒顆粒抗原決定位置換

Residue position	293	294	295	296	297	298	299	336	337	343	344	373	374	375	376
AY502009 Hu/GII.17/CS-E1/2002/USA	D	V	D	G	S	H	D	V	A	G	-	F	G	-	S
KJ196286 Hu/GII.17/Saitama/T87/2002/JP
DQ438972 Hu/GII.17/Katrina-17/2005/USA	.	.	Q	N	.	.	Q	.	.	.	G
JF970609 Hu/GII.17/INCMNSZ-01/2007/Mexico	.	A	Q	N	.	.	Q	.	.	.	G
KJ156329 Hu/GII.17/13-BH-1/2013/TW	E	T	R	.	.	.	N	.	R	.	.
AB983218 Hu/GII.17/Kawasaki323/2014/JP	E	T	R	.	.	.	N	.	R	.	.
KT732275 Hu/GII.17/15-EN-9/2015/TW	Q	I	N	.	.	Q	R	M	V	.	N	L	R	I	.
KR083017 Hu/GII.17/Gaithersburg/2014/US	Q	I	N	.	.	Q	R	M	V	.	N	L	R	I	.
KT346356 Hu/GII.17/PR668/2015/ITA	Q	I	N	.	.	Q	R	M	V	.	N	L	R	I	.
LC037415 Hu/GII.17/Kawasaki308/2015/JP	Q	I	N	.	.	Q	R	M	V	.	N	L	R	I	.

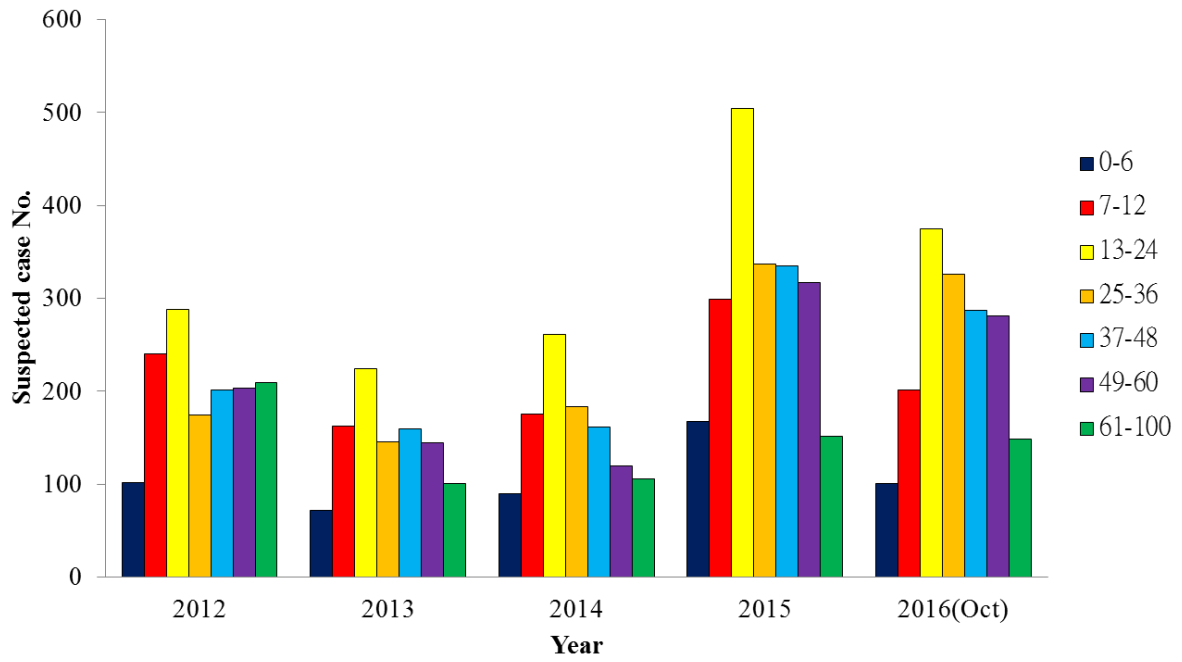
Residue position	377	378	379	395	398	399	400	401	402	403	414
AY502009 Hu/GII.17/CS-E1/2002/USA	T	S	T	K	E	S	G	H	E	F	H
KJ196286 Hu/GII.17/Saitama/T87/2002/JP
DQ438972 Hu/GII.17/Katrina-17/2005/USA	E	.	E	.	.	T	.	.	S	.	A
JF970609 Hu/GII.17/INCMNSZ-01/2007/Mexico	E	.	D	.	.	T	.	.	P	.	A
KJ156329 Hu/GII.17/13-BH-1/2013/TW	N	D	N	N	D	G	D	.	P	.	L
AB983218 Hu/GII.17/Kawasaki323/2014/JP	N	D	N	N	D	G	D	.	P	.	L
KT732275 Hu/GII.17/15-EN-9/2015/TW	D	N	D	N	D	D	.	.	P	.	E
KR083017 Hu/GII.17/Gaithersburg/2014/US	D	N	D	N	D	D	.	.	P	.	E
KT346356 Hu/GII.17/PR668/2015/ITA	D	N	D	N	D	D	.	.	P	.	E
LC037415 Hu/GII.17/Kawasaki308/2015/JP	D	N	D	N	D	D	.	.	P	.	E



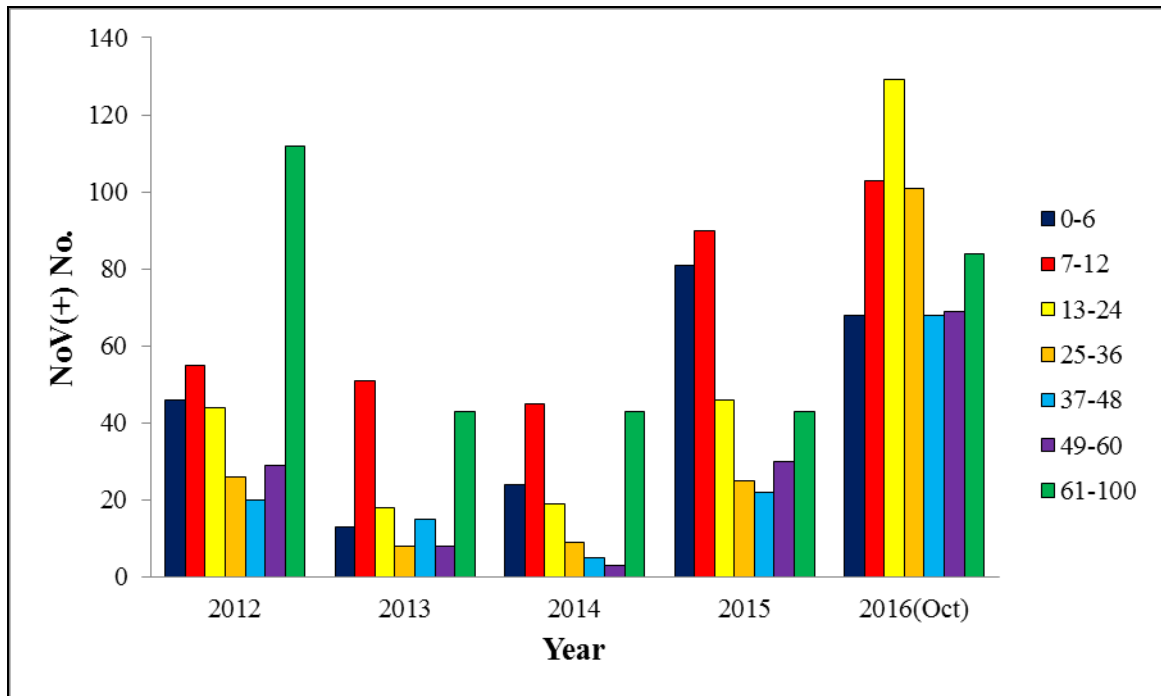
圖一、2012 至 2016 年 10 月通報個案收案情形



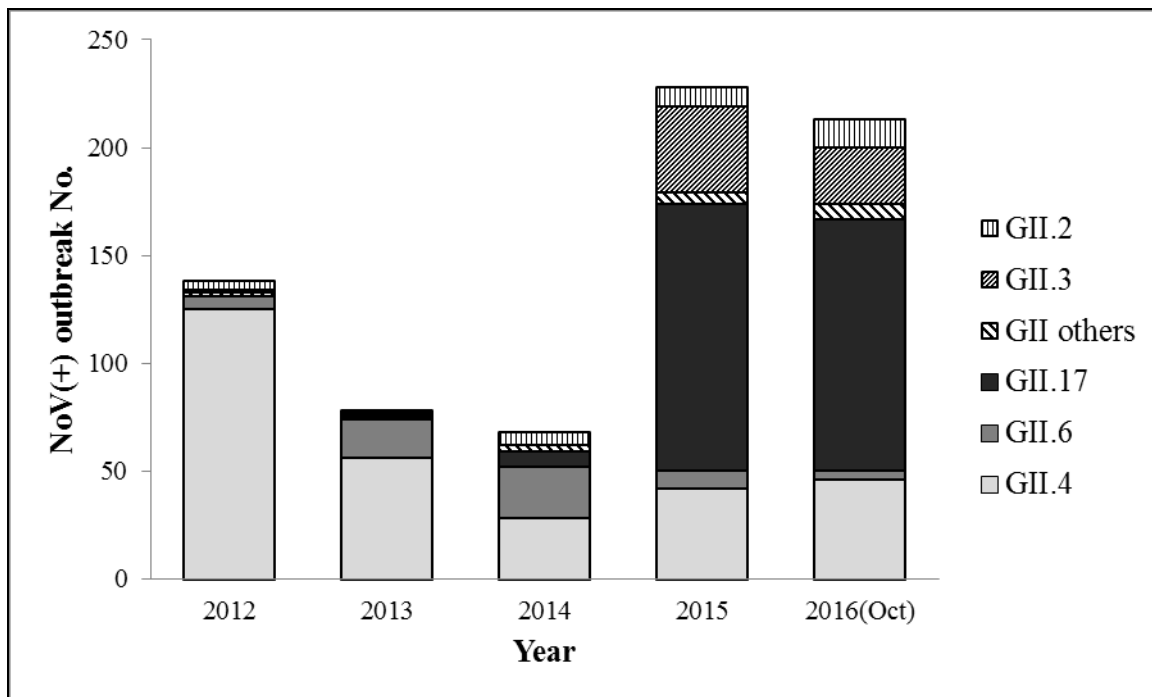
圖二、2012 至 2016 年 10 月諾羅病毒群聚月分布情形



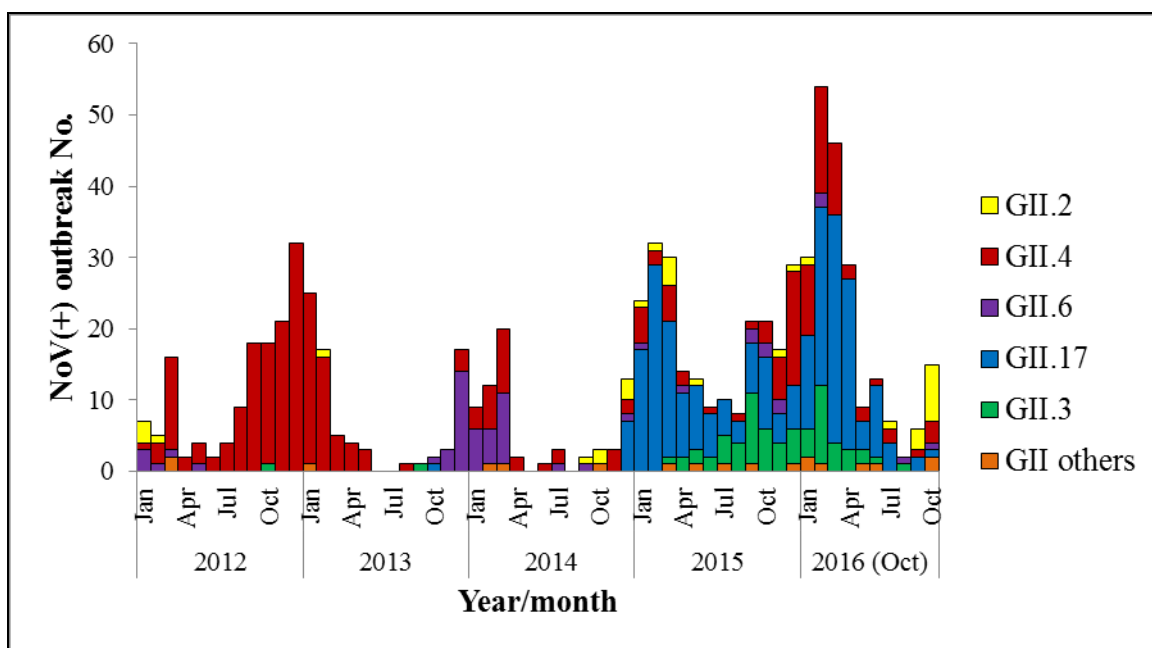
圖三、2012 至 2016 年 10 月通報腹瀉個案年齡分布



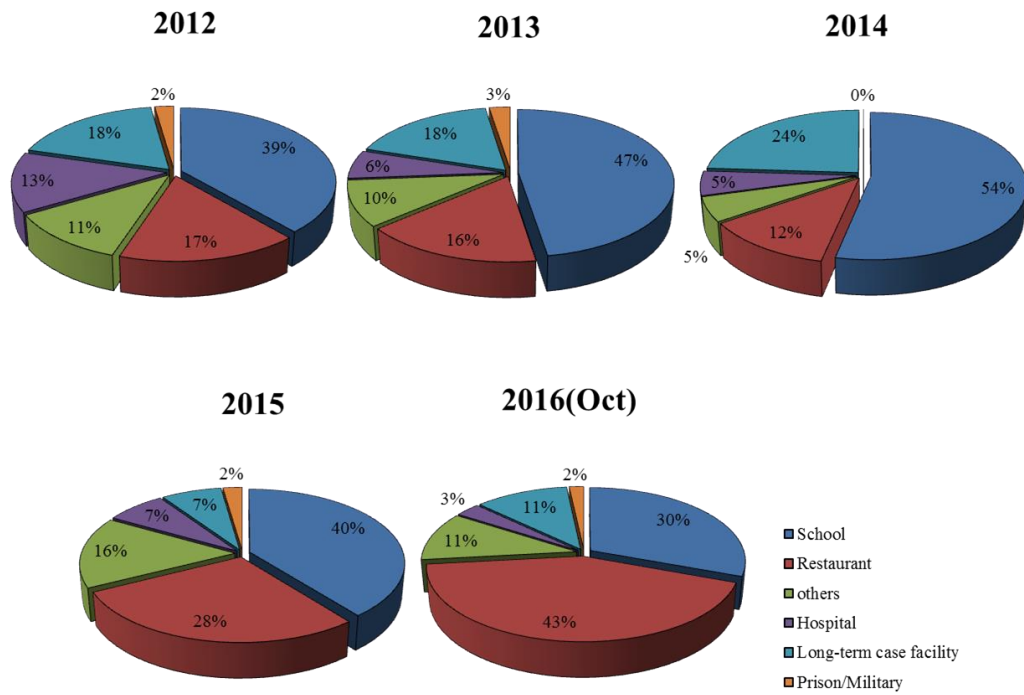
圖四、2012 至 2016 年 10 月諾羅陽性個案年齡分布



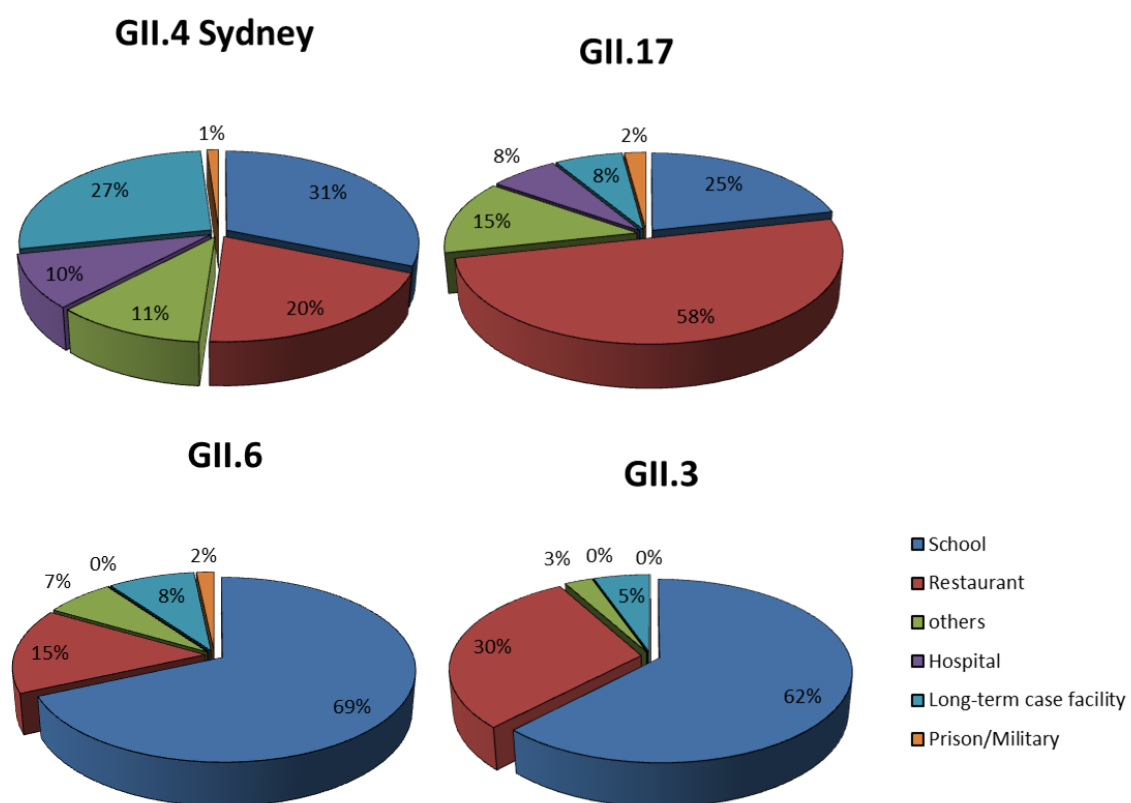
圖五、2012 至 2016 年 10 月台灣第二型諾羅病毒年分布情形



圖六、2012 至 2016 年 10 月台灣第二型諾羅病毒月分布情形



圖七、2012 至 2016 年 10 月諾羅病毒群聚場所分布

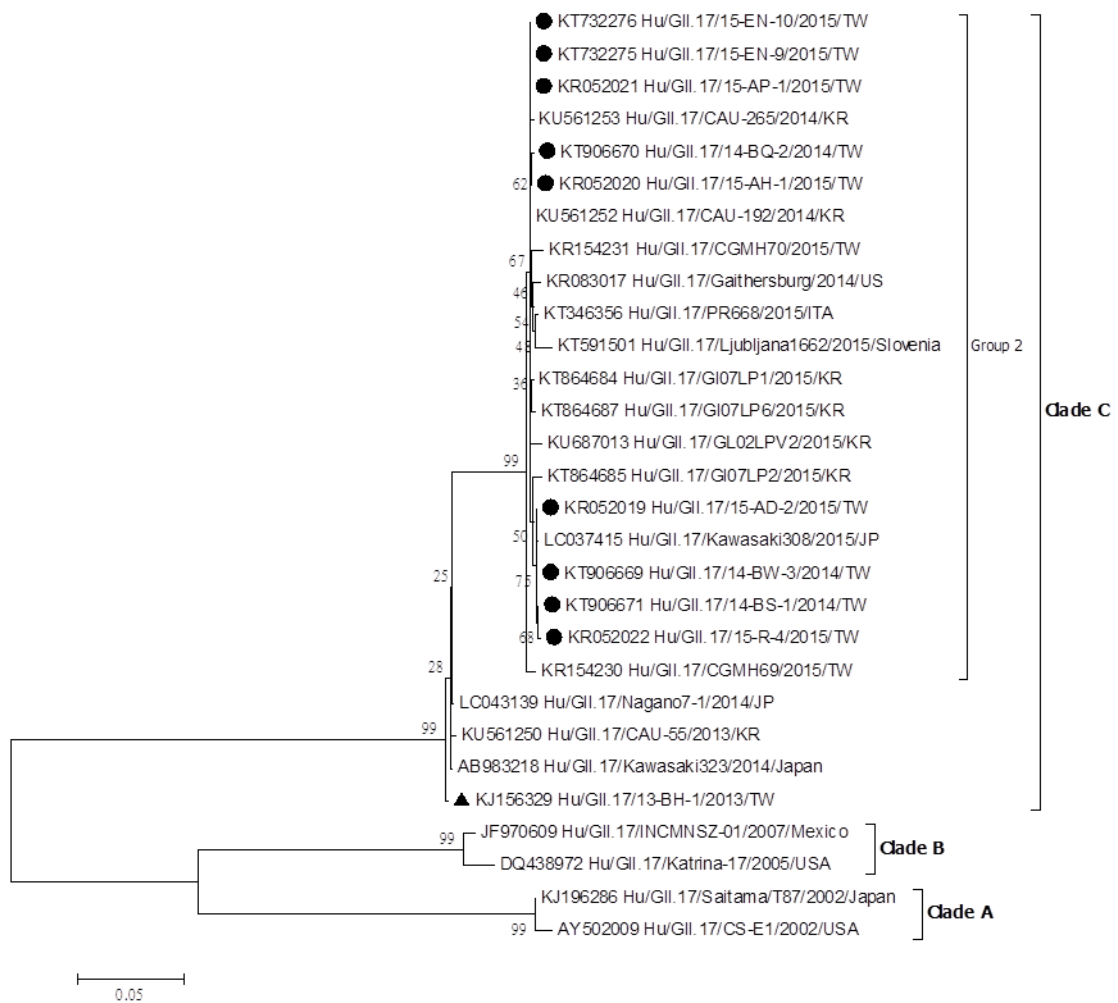


圖八、2012 至 2016 年 10 月台灣主流病毒株分布場所

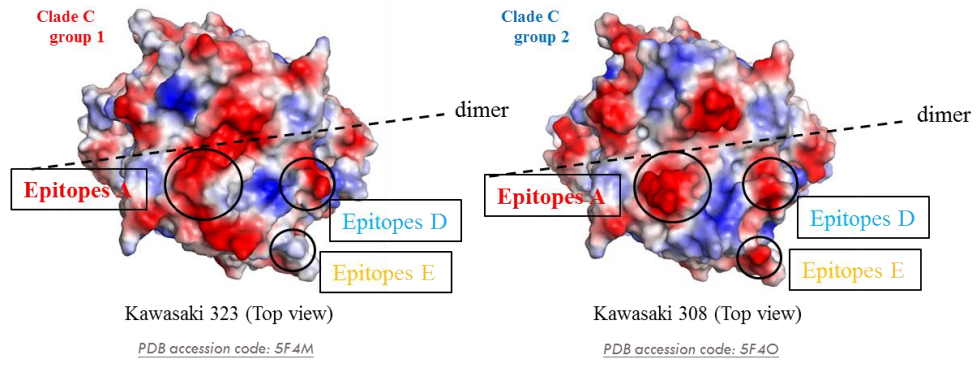
(A)

Nucleotide	1293 bp
Statistical Method	Maximum Likelihood
No. of Bootstrap Replications	1000
Model/Method	Kimura 2-parameter model
Rates among Sites	Gamma Distributed (G)

(B)



圖九、2013 至 2015 年台灣 GII.17 型諾羅病毒親緣性分析

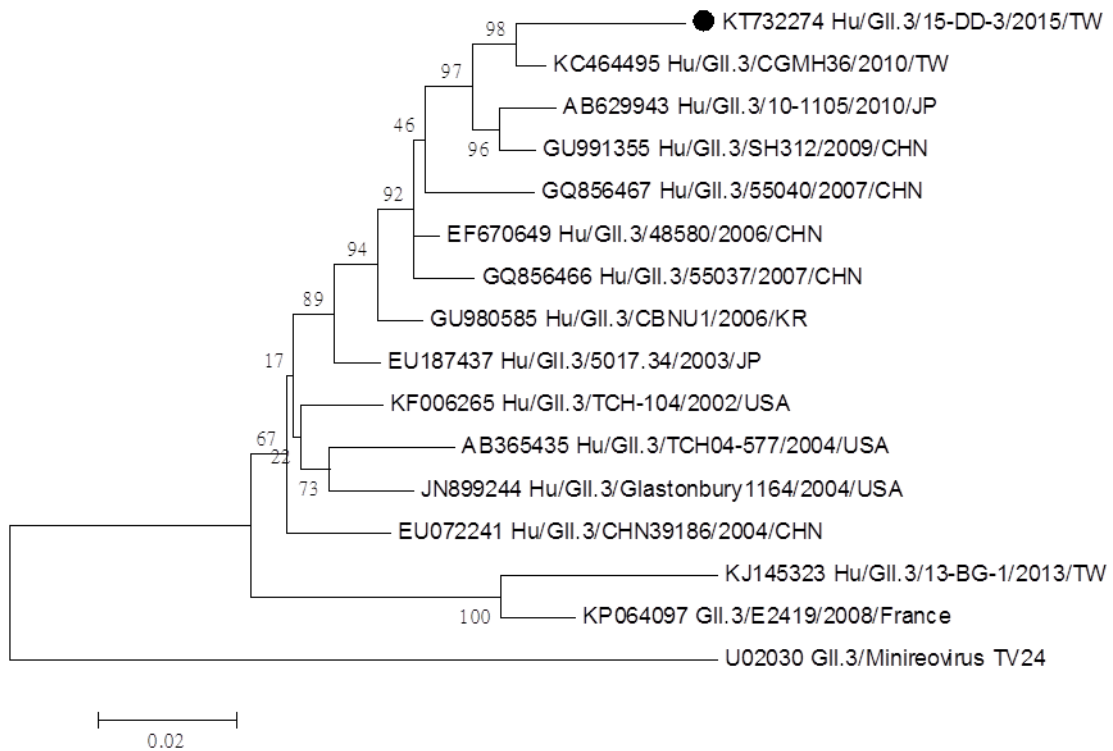


圖十、台灣 GII.17 型諾羅病毒類病毒顆粒抗原決定位比較 (圖片修改自 Hansman, G.S. *et al.*, 2015).

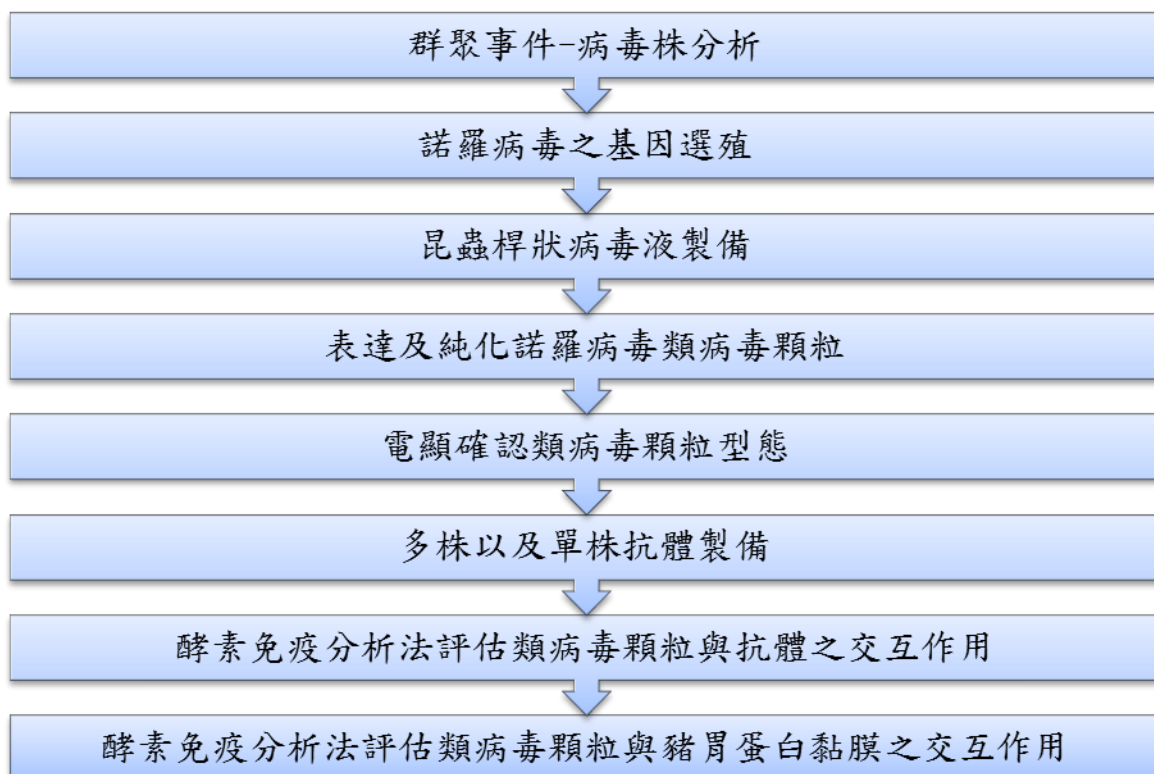
(A)

Nucleotide	1647 bp
Statistical Method	Maximum Likelihood
No. of Bootstrap Replications	1000
Model/Method	Kimura 2-parameter model
Rates among Sites	Gamma Distributed (G)

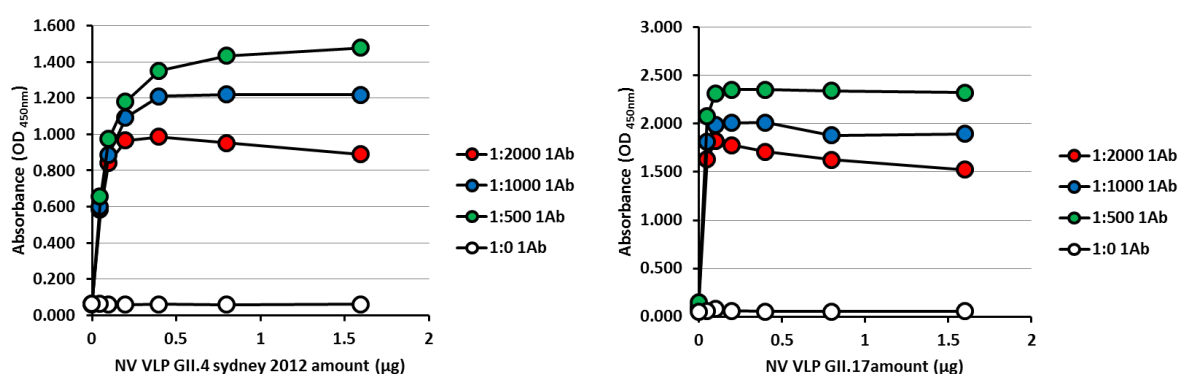
(B)



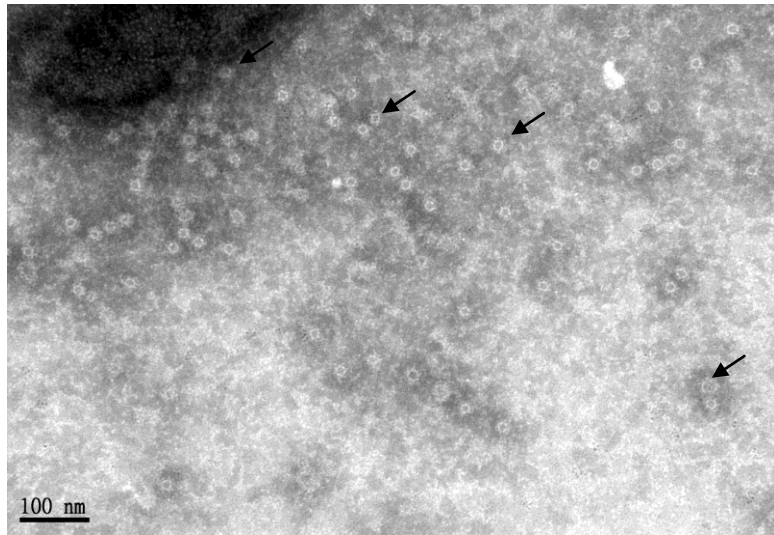
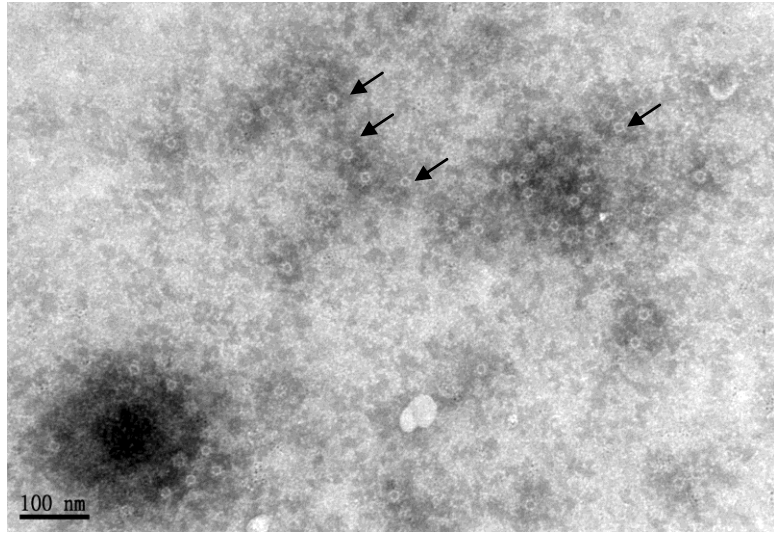
圖十一、2015 年台灣 GII.3 型諾羅病毒親緣性分析



圖十二、表達及產製諾羅病毒類病毒顆粒流程



圖十三、GII.4 Sydney 與 GII.17 型諾羅病毒類病毒顆粒與豬胃黏膜蛋白作用試驗



圖十四、電子顯微鏡觀察諾羅病毒類病毒顆粒型態

衛生福利部疾病管制署委託科技研究計畫
105 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：開發類病毒顆粒表現系統於快速檢測試劑應用

主持人：吳芳姿

計畫編號：MOHW105-CDC-C-315-114503

1.計畫之新發現或新發明

從我國腹瀉群聚之諾羅病毒之流病資料、分子病毒學監測與病毒株型別鑑定，建立我國腹瀉群聚之諾羅病毒感染流行現況，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。今年年初延續去年的腹瀉疫情以及主流病毒株已 GII.17 為主，但從監測料發現在 10 月底時病毒株改變並群聚通報以學校為主，因接近諾羅病毒流行季節，於疫情會議報告與提醒疫情與病毒株變化現狀，以進行防治加強工作。

2.計畫對民眾具教育宣導之成果

- (1). 提供諾羅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。
- (2). 針對 2015-2016 流行的諾羅病毒 GII.17 病毒株，可能好發於餐廳的中年齡層，因此建議民眾於餐廳用餐之個人清潔，以及食材需熟食避免感染。

3.計畫對醫藥衛生政策之具體建議

由於諾羅病毒為近幾年熟知引起腹瀉群聚的主要病原，各國與藥廠在疫苗研發工作也進入測試階段，本計畫之監測與病毒株之資料，將可提供醫藥衛生以及疫苗政策、疾病負擔分析等之相關參考。