

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000201

衛生福利部疾病管制署 103 年度科技研究發展計畫

病毒性腹瀉群聚之監測與腹瀉病毒快速篩檢試劑之研發

全 程 研 究 報 告

執行機構：研究檢驗中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：吳靜怡、張哲源、陳協成

執行期間：101 年 1 月 1 日至 103 年 10 月 30 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	11
三、結果	24
四、討論	32
五、結論與建議	42
六、計畫重要研究成果及具體建議	43
七、參考文獻	44
八、圖、表	47

中文摘要

關鍵詞：腹瀉群聚，諾羅病毒，沙波病毒

本研究主要目的在於建構日本與台灣間之研究網絡，建立沙波病毒群聚之流行病學資料，為本局與日本國立感染症研究所(NIID)簽署合作議題之一。輔以引起腹瀉最常見之諾羅病毒，共同監測其分子流病變化與研發快速篩檢方法。

諾羅病毒與沙波病毒同為杯狀病毒科，諾羅病毒為引起腹瀉群聚事件之主因；目前的研究，仍無法以細胞培養之方式偵測諾羅病毒與沙波病毒，所以確診仰賴分子生物診斷法(RT-PCR)，雖有國外幾家廠商研發諾羅病毒之免疫檢驗試劑(EIA 及 ICT)，但以臨床檢體測試，其靈敏度不足(61%及67%)仍不盡理想，原因在於流行之病毒株變異性高、群聚感染可能由多種不同型別病毒株引起，或與國外開發試劑時挑選之病毒株抗原不同所致，因此目前免疫檢驗試劑僅在部分國家於群聚性大型疫情篩檢使用，並未廣泛用於發病個案的疾病診斷。另，沙坡病毒感染群聚事件中，病患檢體病毒量相對於諾羅病毒感染者稍低，仍未有市售有關沙波病毒檢測試劑，國際上沙坡病毒檢測仍以 nested RT-PCR 確認。

為釐清國內諾羅病毒與沙波病毒流行病毒株變化與傳染途徑，及加快檢測速度提供疫情調查參考，減少檢體運送時間，本研究以通報腹瀉症狀

群聚，進行諾羅病毒與沙波病毒之分子流病監測，選定候選病毒設計檢驗方法，並測試其靈敏度與專一性，及對其他病毒交叉反應。

101 年至 103 年 10 月通報腹瀉群聚或食物中毒事件並送驗病毒檢測之通報數共有 757 起群聚，經分生實驗檢測群聚感染原以諾羅病毒為主 (41.2%，312/757)，101 年有 174 起群聚占該年總群聚數之 57.4 %，102 年有 78 起群聚占該年總群聚數之 31.3%，103 年有 60 起群聚占本年總群聚數之 29.3%，以外殼基因序列比對，感染病毒株仍以 101-102 年國際主流病毒株 GII.4 Sydney 及 GII.6 基因型為最多；學校與人口密集機構為最常發生感染之場所。同期間沙波病毒共引起 21 起群聚事件占期間總群聚數之 2.8%，經基因序列比對感染病毒株基因型主要為 GI.2。依送驗群聚編號或法定傳染病系統電腦編號同時搜尋細菌檢驗結果，共有 114 起細菌引起之腹瀉群聚，占總群聚之 15.1%。

在試劑研發中，選定我國主要流行 GII.4 型諾羅病毒進行先期開發，並參考諾羅病毒外殼基因演化分析與胺基酸變化，建置近年引起大流行群聚主要病毒株 GII.4 2008、GII.4 2009、GII.4 2010 和 GII.4 2012(雪梨株)之類病毒與 P 顆粒，作為病毒抗原樣板及製備動物免疫抗體，進行各種組合檢測使用；目前已完成各種多株抗體搭配，並以 RT-PCR 確認之各種基因型別諾羅病毒陽性與陰性糞便，及其他病毒檢體進行臨床檢體測試。

英文摘要

Norovirus, sapovirus and rotaviruses are the major causes of epidemic gastroenteritis in children and adults. The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of norovirus and sapovirus gastroenteritis in Taiwan and to establish a rapid diagnosis method. A total of 3324 fecal specimens collected from 757 reported diarrheal clusters and foodborne outbreaks were identified by RT-PCR of noroviruses and rotaviruses from 2012 to 2014. Norovirus was the mostly detectable in a relatively high detection rate (41.2%; 312/757). The sequencing genotyping data showed that norovirus GII.4 Sydney and GII.6 strains were the major pathogen causing diarrheal outbreak which mostly occurred in school and long-term care facility. In regard to rotavirus, the detection rate was 8.2% (62/757), and most of the outbreaks were happened in school with the major genotype G1P[8]. As for sapovirus, the detection rate was 2.8% (21/757) and the genotypes contained GI.2 and GII.2. According to the epi-information of reporting system, bacteria were responsible for 15.1% of the outbreaks (114/757).

Norovirus GII.4 is the predominant strain and the amino acid substitution changes every year. Based on the phylogenetic tree of norovirus capsid nucleic acid sequence, GII.4 2008, GII.4 2009, GII.4 2010 and GII.4 2012(Sydney strain) strains was in the same cluster. Also, those strains were the dominant noroviruses caused outbreaks in these few years. Nevertheless, in the developing of rapid diagnosis method we selected these dominant strains as the template strain to construct recombinant VLP and GST-fusion protein then as immunoantigen to prepare polyclonal antibodies.

一、前言：

諾羅病毒為國內最常引起腹瀉群聚之病毒性病原體，主要流行季尤其以冬季時特別明顯，每年常造成學校上百人或安養人口密集機構之腹瀉群聚，同期間亦可從急診腹瀉監測系統發現社區性與家庭性的民眾交叉感染事件；而沙波病毒的傳播力相較於諾羅病毒則稍低，每年引起的群聚總數及每起群聚的個案人數也較少，國內首例沙波病毒群聚事件發生在 96 年的北部地區一所大學，之後幾年雖群聚數並不多，但以歷年群聚資料分析以發生於餐廳與學校為主。

諾羅病毒(Norovirus)屬杯狀病毒科(Caliciviridae)，核酸為正股單股 RNA (ssRNA)，長度約 7.7 kb，含有 3 個蛋白質轉譯區 (open reading frame)，不具有套膜(envelope)，蛋白殼體為正 20 面體，大小約 27~38 nm[1]，過去的文獻資料顯示病毒主要藉由糞-口途徑傳染，但在近期許多文獻顯示，因感染諾羅病毒患者主要的臨床症狀以嘔吐與急性水瀉為主，因此含大量病毒之嘔吐物與水瀉物飛沫可以大量散播病毒。過去的監測與病毒株演化研究顯示，諾羅病毒在外套膜具有高變異性，曾感染的患者並無法產生具有長期免疫保護力，常造成各年齡層之急性腸胃炎、嘔吐及腹瀉，甚至引起免疫力不佳之年長者死亡[2]，顯示病毒具高傳染力(infectious dose 10~100 copies)，目前仍無法以細胞培養或小動物模式增幅病毒[3]。諾羅病毒的 3

個蛋白質轉譯區 (open reading frame)，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，依據 VP1 部位之基因序列之差異可再區分為 GI~GV，主要感染人類的基因群為 GI、GII，目前全球性感染最主要的諾羅病毒基因型別為 GII.4，其基因變異度最高[4]。檢測諾羅病毒的方法最初依賴電子顯微鏡，尋找糞便檢體中病毒顆粒，以受諾羅病毒感染者之抗體先進行病毒之染色，再至電子顯微鏡下找尋染色的病毒顆粒，此法為檢測諾羅病毒之黃金標準法(Gold Standard)[5]；後來發展出 ELISA 抗原檢測，市售有英國與德國等多家廠牌，其專一性高但靈敏度低，適用在大流行期間，作為初步之篩檢[6]。但電子顯微鏡與 ELISA 兩種方法的靈敏度皆不佳，以專一性的引子設計出之 RT-PCR 為目前確認諾羅病毒感染的檢驗方法[7, 8]。

沙波病毒(Sapovirus)與諾羅病毒(Norovirus)同屬於杯狀病毒科，最早在 1977 年於日本 Sapporo 一家孤兒院腹瀉群聚事件中發現[9]，由於病毒顆粒相當小 (41-46nm)，並且糞便中病毒量低，因此極難診斷。沙波病毒共分成五個基因群組 (GI~GV)，除 GIII群感染宿主為豬，其他均以人類為感染宿主[10]。沙波病毒為急性腸胃炎的病毒性感染源之一，以糞-口途徑傳播，引起的臨床症狀有噁心、嘔吐、腹瀉、腹痛等，容易發生於天氣寒冷的季節[11]；許多國外報導顯示嬰幼兒托育中心及幼稚園等容易發生群聚感

染[12, 13]，但陸續發現沙波病毒亦會造成年長者之人口密集場所腹瀉群聚，尤其病毒能夠常態持續存在於自然環境中，因此更難防範[14]。透過分子核酸檢測技術能提高檢測的靈敏度[15]，對於不同基因型別之病毒，採取多組引子對同時進行偵測，不受限於單一型別[25]，為目前國內所使用之方法，並在 96 年與 99 年分別發現台灣之沙波病毒群聚感染，引起學校與餐廳兩處共同用餐者多人感染[16]。

諾羅病毒(Norovirus)係臨床引起病毒性急性腸胃炎(主要症狀是腹痛、嘔吐、腹瀉、發燒、食慾降低、倦怠)之病原體中最常見的病毒[28]，目前國內對於該項病毒引發之腹瀉群聚設有症狀通報系統，採檢之糞便檢體送至實驗室診斷檢驗，主要是依靠「分子生物學核酸檢測方法」：收取以低溫冷藏 4°C 送檢之新鮮糞便檢體，經由步驟繁複的檢體前處理，並萃取病毒核酸 RNA，使用專一性之引子，進行反轉錄及聚合酵素連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)，以膠體電泳法分析結果，檢驗時間需要三至五個工作天，方可確認是否感染諾羅病毒[17]，並能將分析之產物作核酸定序，做後續分子流病之研究，對病毒之流行趨勢有更進一步之瞭解[24]。目前市售已取得 CE 或 FDA 執照之快速檢驗試劑，如南韓製造之 BioTracer，經實驗室初步檢測，其相對於諾羅病毒之 RT-PCR 之敏感度僅 67%。日本亦曾對其國內生產之諾羅病毒快篩試劑(NoV IC;

ImmunoProbe Co., Ltd. 與 Morinaga Milk Industry Co., LTD.) 進行評估，其敏感度約 71~88%[20-22]。而英國針對 RIDAQUICK (R-Biopharm, Darmstadt, Germany) 進行研究，發現對於諾羅病毒之敏感度約 69%[23]。

雖以酵素免疫分析法檢驗和以分子生物學方法在準確度與靈敏度差異大，但在防疫上的應用應以時效性做為區隔，如在發生大型群聚事件時，早期的防疫工作相當重要，此時可先以酵素免疫分析法進行篩檢的工作，雖靈敏度不盡理想，但如檢測 2 件以上的陽性個案，便可以即早提醒第一線防疫人員，配合以諾羅病毒消毒與防治法進行圍堵防止第二波的流行；分子生物學檢測方法，雖實驗時間耗時且需使用特殊儀器，但因諾羅病毒的病毒株變化較大，其演化的路徑類似於流感病毒株演化，同時由於國內所流行之基因型別或亞型與其他國家不盡相同[18]，雖諾羅病毒歷年流行是以基因型 GII.4 為主，與國外主要流行概況類似 [19]，但近年群聚型別逐步出現多元化，如 GI 基因型與 GII.2、 GII.3 與 GII.12 皆曾佔每年陽性分率百分比 10% 以上，這些的基因型別無法即時以酵素免疫分析法檢測，顯示在以免疫分析法初步篩檢之後，仍須隨時監測並檢視病毒的流行與演化，以修正目前的檢驗方法。

美國 CDC 於 2012 年公布對於諾羅病毒檢驗的建議，由於各種檢驗方法在檢測諾羅病毒的靈敏度與專一性差異相當大，因此應依檢測或監測目

的不同，選擇檢驗方式；如用於大型群聚事件，可以使用市售之 ELISA 或快篩試劑，先找出引起群聚的感染病原，其次在找到疑似病原後須後送檢體至實驗室確認，可以用 RT-PCR 與定序方式輔助。因此方法互相搭配，將可先提供更有效率之防治作為，並確認感染性病毒與病原變化。

二、材料與方法：

製備諾羅病毒與沙波病毒之抗原以準備抗體

(一)、 群聚事件流病資料調查、流行病毒株分析監測

1. 監測檢體與資料收集：

以 101-103 年通報腹瀉群聚或食物中毒事件之通報檢體，作為諾羅病毒與沙波病毒檢測與分子流行與病毒株監測，以衛生局所通報及疫情調查上傳資料進行群聚歸類與疫情相關資料彙整；並彙整 96-103 年間通報腹瀉群聚之諾羅病毒資料，進行病毒株型別比較分析與資料建置；比對台灣近幾年病毒株的變化，以作為表現抗原病毒株選定與測試參考。

2. 糞便檢體處理：將糞便以 1:10 之比例加入 PBS 強力震盪成懸浮液，於 4°C，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至冷凍小管中，進行病毒核酸檢測或置於-80°C 保存。

3. RNA 的萃取：

取經處理過之檢體上清液 140 μL，使用 Qiagen 核酸萃取試劑 Viral RNA Extraction Kit 純化病毒 RNA，最後萃取出 60μL RNA，置於 -80°C 待用。

4. 諾羅病毒分析[26]：

(1) Reverse transcriptase reaction: 以病毒 RNA 萃取液 10 μ L 為模板，加入引子於 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、10 U Reverse Transcriptase 反轉錄酵素(Roche Cat. No.03 531 287)、40 U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol，反應總體積為 20 μ L。於 50°C 50 分鐘作反轉錄作用，之後 85°C 作用 15 分鐘。

(2) PCR: 諾羅病毒分析引子對在 GI 為 G1SKF/G1SKR、GII 為 G2SKF/G2SKR。反應條件: denaturation 94°C 30 秒、annealing 54°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽性反應之 PCR 產物，進一步做序列分析。

5. 沙波病毒分析[27]:

(1) Reverse Transcriptase reaction: 病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 1 μ L 10 μ M 隨機引子及 2 μ L 20 mM dNTP 於 70°C 作用 3 分鐘後，馬上將反應管置於冰上 1 分鐘後；再加入單管 RT 混合液，內含 200 U 反轉錄酵素 (Invitrogen Superscript III Reverse Transcriptase Cat. No. 18080-085)、20 U RNase 抑制劑及含 50

mMTris-HCl、75 mM KCl、3 mM MgCl₂、10 mM dithiothreitol 反應緩衝溶液，反應總體積為 20 μL。於 25°C 作用 10 分鐘，50°C 進行 50 分鐘反轉錄作用，之後 85°C 作用 15 分鐘。

(2) 第一次 PCR：病毒分析引子對為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SV-R13 及 SV-R14。以 RT 產物 1 μL 為模板，加入 11.5 μL PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen Cat. No. 10966-034) 及 0.8 μM 每個分析引子。反應條件：先 95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 2 分鐘，共 40 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘。

(3) Nested PCR：以第一次 PCR 產物 1 μL 為模板，加入 24 μL PCR premix，含有 20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、Platinum Taq DNA Polymerase 及 0.4 μM 每個分析引子 (1245Rfwd/ SV-R2)。反應條件：95°C denaturation 作用 5 分鐘，熱循環 denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 45 個 cycle，最後 extension 72°C 7 分鐘，進行 capsid 基因片段 nest PCR。將 PCR 產物進行電泳分析，得到陽

性反應之 PCR 產物約 430bp，進一步做序列分析。

6. 輪狀病毒分析

(1) 逆轉錄酶反應：

5 μL RNA 加上 1 μL Random primer(3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)與 7 μL 的水混合均勻，65 $^{\circ}\text{C}$ 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 μL 5X RT buffer, 2 μL 10 mM dNTP, 0.5 μL RNase inhibitor(40 U), 0.5 μL Reverse Transcriptase(20 U/ μL)，總體積為 20 μL ，25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 10 分鐘，50 $^{\circ}\text{C}$ 反應 45 分鐘，85 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 分鐘在降溫至 4 $^{\circ}\text{C}$ 待用。

(2) 聚合酶連鎖反應：

1. 偵測輪狀病毒 VP7 基因(G type)：

用逆轉錄酶製成的 2.5 μL cDNA 加上聚合酶連鎖反應混液(2.5 μL 10X PCR buffer, 4 μL 2.5 mM dNTP, 0.8 μL Taq (5 U/ μL), Primers: 0.5 μL 9BEG(10 μM), 0.5 μL 9END(10 μM), 14.2 μL H₂O)，總體積為 25 μL 。進行聚合酶連鎖反應，94 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 分鐘之後進行 40 個循環：94 $^{\circ}\text{C}$ 反應 45 秒，42 $^{\circ}\text{C}$ 反應 45 秒，72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 90 秒。接著 72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 10 分鐘，降溫至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

2. 偵測輪狀病毒 VP4 基因(P type)：

用逆轉錄酶製成的 2.5 μL cDNA 加上聚合酶連鎖反應混合液(2.5 μL 10X PCR buffer, 4 μL 2.5mM dNTP, 0.8 μL Taq (5 U/ μL), Primers: 0.5 μl Con2(10 μM), 0.5 μL Con3(10 μM), 14.2 μl H₂O), 總體積為 25 μL 。進行聚合酶連鎖反應，94 $^{\circ}\text{C}$ 反應 3 分鐘之後進行 40 個循環：94 $^{\circ}\text{C}$ 反應 30 秒，50 $^{\circ}\text{C}$ 反應 2 分鐘，72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 1 分鐘。接著 72 $^{\circ}\text{C}$ 反應 7 分鐘，降溫至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

7. 序列分析：

- (1) 使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列標記。
- (2) 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。

8. 病毒基因分析比對

將定序後之序列與 NCBI 及 NoroNet 資料庫中之參考病毒基因序列進行比對分析，確定病毒基因型別，以及病毒株彼此序列相似性。

(二)、依主要流行諾羅病毒之型別進行基因選殖、表達蛋白、純化抗原

1. 諾羅病毒之 capsid 為最外層裸露在外的結構蛋白質，是由 ORF2-ORF3 基因轉錄 VP1 與 VP2 結合成二十面體所組成，本研究設計將這 ORF2-ORF3 基因片段之 RT-PCR 產物，載入真核細胞

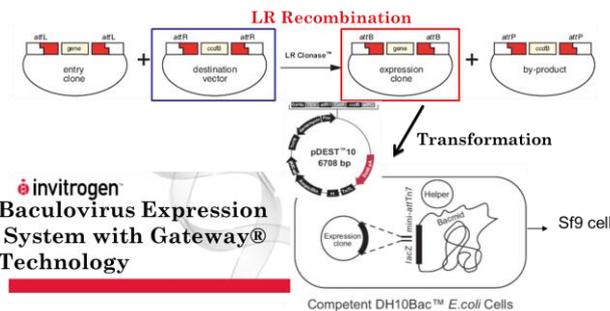
蛋白質表現系統之 expression vector 中，進行蛋白質表現。

Expression system 分別利用桿狀病毒 Baculovirus 製備所需要之蛋

白質並另用系統產生類病毒顆粒(VLP)，置備過程詳述如下：

(1) 類病毒顆粒 (Virus Like Particle, VLP)：

因諾羅病毒與沙波病毒無法培養，故擬以桿狀病毒架構嵌入諾羅病毒之 ORF2 與 ORF3 基因片段(外殼基因)，再以昆蟲細胞表現系統，生產相關之病毒外套膜抗原(示意圖如下)。



設計引子為：G2-SKF-clone: CACCCNTGGGAGGGCGATCGCAA

TX30SXN: GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCCC(T)₃₀

將該引子產製之 2.5 kb PCR 產物接至 pENTR-D-TOPO vector (Life technologies)，挑出正確菌落後萃取重組後之質體，此質體利用 LR ligase 和重組互換序列(attL/attR)將諾羅病毒之外殼基因置換到 pDEST10 vector，挑出正確菌落後萃取重組後之質體，將 pDEST10-Norovirus Capsid 轉型到勝任細胞 DH10Bac，挑出正確菌落後萃取 Bacmid，再將 Bacmid 轉染至 Sf9 細胞產製重組桿狀病毒。

(1.1) 諾羅病毒類病毒顆粒之生產

將 High-five 細胞以 6×10^6 /flask 的數量種於 75T flask。於 27°C 恆溫培養箱培養 1 小時，待細胞貼附後，吸除上清液，加入 0.4 mL 第三代昆蟲桿狀病毒液(sf9 細胞產製)及 14 mL 細胞培養液。於 27°C 恆溫培養箱培養。觀察細胞之 CPE，待所有細胞都有 CPE 之情形 (約 7 天)，將細胞與培養液一起收集至 50 mL 離心管。用高速離心機以 6000 rpm，於 4°C 離心 60 分鐘。上清液以 0.45 μ m 過濾膜過濾，保存於 4°C 冰箱。將細胞萃取液冷凍解凍三次，離心 13000 rpm，4°C，5 分鐘，取上清液保存於 -80°C 冰箱。以 SDS-PAGE 分析細胞萃取液上清液與離心後之上清液中的蛋白大小。

(1.2) 諾羅病毒類病毒顆粒之純化

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，以 SW41Ti rotor 離心 32000 rpm，4°C，3 小時。

倒掉上清液，加入 100 μ L 滅菌 PBS，放入 4°C 冰箱回溶隔夜。將回溶後的蛋白液於高速離心機 15000 g，4°C 離心 30 分鐘，取上清液。在超高速離心管中加入約 3 mL 0.4 g/mL CsCl 溶液，並在上層緩慢加入上一步驟之上清液，再以 SW55Ti

rotor，離心 35000 rpm，10°C，24 小時。小心將超高速離心管從 bucket 中取出，並在管壁上貼透明膠帶。以 18G 針頭緩慢抽取蛋白質層帶，再以滅菌 PBS 三倍稀釋抽取出的蛋白質層帶，SW41Ti rotor，32000 rpm，4°C 離心 5 小時，去除 CsCl。去除上清液，加入 500 uL 滅菌 PBS 回溶蛋白。以 SDS-PAGE 分析回溶後的蛋白，確認為諾羅病毒外殼蛋白。

2. 諾羅病毒外殼蛋白中的 P 蛋白為結構蛋白中最為突出的部分，將 ORF2 中的 P 片段以 RT-PCR 產物，載入 GST 融合蛋白載體，以 E.coli 進行大量蛋白質表現，P 蛋白產物可組成 24 個單體 P particle，因此能快速生產具多個 epitope 免疫抗原。詳細置備方法如下：

(2) Norovirus P 蛋白：

(2.1) P 區域基因放大

以台灣諾羅病毒株 2008a(08-F-2) (NCBI accession no. HQ456335)之序列為基礎，建構諾羅病毒 P 區域之克隆。放大 P 區域核酸序列之引子設計為：P1256-Sal I-CNGRC-Fw 5'-acgcgtcactctgcaacggccgttgctcaagaactaaaccattcaccgt -3' 與 P423-Not I-Rv 5- ataagaatgcggccgcttataatgcacgtctgcgccc -3'。

(2.2) 聚合酶鏈鎖反應(PCR)增幅 P 區域基因

使用 pDEST-2008a(ORF2-3)質體當做模板，增幅 ORF2 中 P 區域片段，所增幅大小約為 1 kb。PCR 反應的溶液共 50 μ L，成分包含有 100 ng 的質體 DNA、10X PCR buffer、200 μ M dNTP、200 nM 引子(P1256-Sal I-CNGRC-Fw)、200 nM 引子(P423-Not I-Rv)、0.15 U ExSel High Fidelity DNA polymerase 和無核酸分解酶的水。溫度循環條件如下：質體 DNA 變性 94°C，5 分鐘。之後進行 40 個溫度循環(變性 94°C，30 秒、黏合 50°C，1 分鐘、延長 68°C，2 分鐘)，最後 72°C，10 分鐘。以 1%瓊脂凝膠電泳確認 PCR 產物大小。

(2.3) T-A clone 與選殖

確認 PCR 產物大小後，以 Gel-MTM Gel Extraction System Kit 純化 PCR 產物，進行 T-A 載體接合反應。接合反應溶液共 20 μ L，成分包含：8 μ L 的 PCR 產物，1 μ L 的 pGEM-T-easy vector (50 ng/ μ L)，1X 接合酶緩衝液和 1 μ L 的 T4 接合酶。於 16°C 反應 16 小時，再以 70°C 高溫作用 10 分鐘使接合酶失去活性。將 10 μ L 接合反應溶液加至 100 μ L 的 DH5 α 勝任細胞，靜置冰上 30 分鐘後以 42°C 水浴槽進行 Heat-shock 作用迅速移置冰上 2 分鐘，再加入 900 μ L 的 LB 培養液，37°C 培養箱震盪培養 1 小時，將菌液均勻塗在

含 100 ng/mL Ampicillin、50 mg/mL X-gal 及 0.1 M IPTG 的瓊脂培養基上過夜培養於 37°C。培養基在過夜培養後呈現藍白兩種菌落，挑選數個白色的單一菌落，進行菌落 PCR 確認重組菌株。將確認之菌株培養於 100ng/mL Ampicilin 之 LB 中 37°C 搖晃過夜培養。利用 Mini-MTM Plasmid DNA Extraction System 萃取重組質體 DNA。

(2.4) P 區域建構至表現 GST-tag 融合蛋白之 pGEX-4T-1 載體

將 P 區域核酸序列建構至 T-A 載體後，使用限制性內切酶 Sal I 和 Not I 將 P 區域切下，20 μ L 的反應溶液包含 2 μ g 的 pGEM-T-2008a 質體或 pGEX-4T-1 載體，1 μ L NotI，1 μ L Sall，2 μ L Buffer O 和滅菌水。於 37°C 反應 16 小時，將限制性內切酶作用過之 DNA 片段純化在進行接和反應。經過轉形、塗盤 37°C 過夜培養、挑選菌落進行菌落 PCR 確認。

(2.5) GST 融合蛋白之表現與純化

質體轉形至 BL21(Yeastern Biotech Co., Ltd)勝任細胞株中以進行蛋白質表現。在 IPTG 0.5 mM，27°C，4 小時的誘導後，以離心方式(7000 G，10 分鐘)收下勝任細胞，將勝任細胞懸浮在 1% Triton X-100 的 1X PBS 中並用超音波震盪破菌後 (將菌液瓶置於冰上，

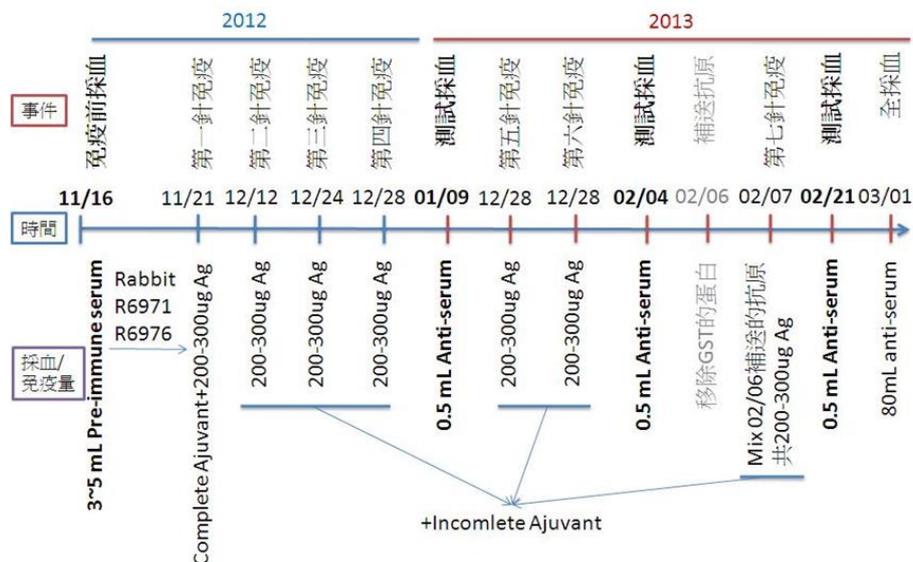
震盪 10 秒，休息 30 秒，重複 6~10 次），以離心方式(12000 G，4 °C，20 分鐘)去除細胞碎片，上清液和 GST beads (GE Healthcare) 在 4°C 下緩慢旋轉過夜。次日，將含有 GST beads 的上清液以重力方式通過空的管柱將 GST beads 留在管柱中，1X PBS 沖洗過後，加入 Elution buffer 將 GST 融合蛋白純化出，做為免疫用抗原。附註：Elution buffer 10 mL 包含 10 mM reduced glutathione、50 mM Tris-HCl (pH=8)和滅菌水。

3、多株抗體之製備與 IgG 純化

(3.1) 多株抗體

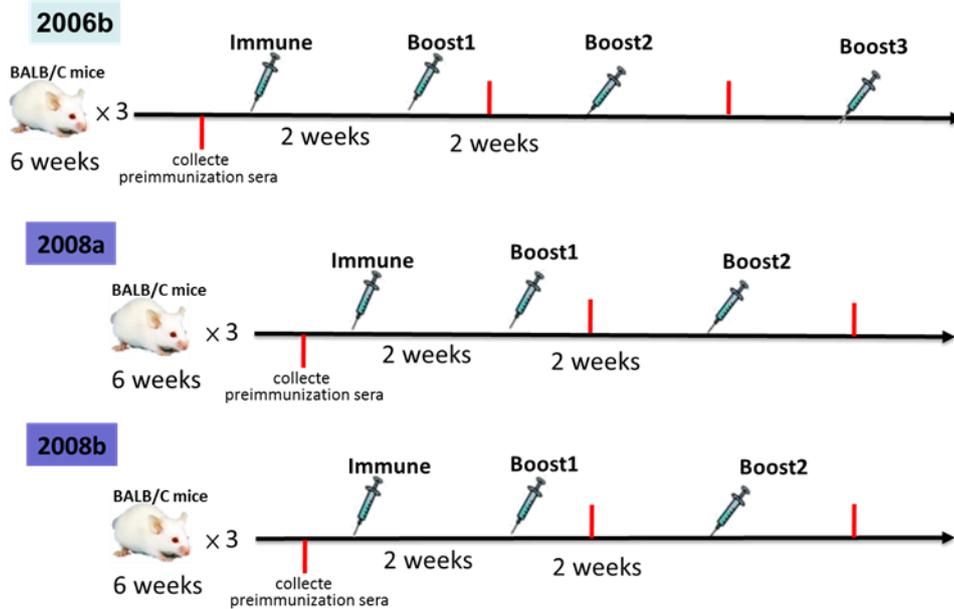
以適量之抗原(諾羅病毒 VLP 或 fusion GST-P)進行動物免疫，免疫後先採血以進行免疫測試決定免疫動物是否有足以辨識抗原之抗體，此部份即為多株抗體。下圖為老鼠免疫時程與兔子免疫時程：

兔子免疫時程 (免疫抗原: GST-08a-P protein)



老鼠免疫時程

(免疫抗原: 類病毒顆粒/病毒株 GII.4 2006b、GII.4 2008a、GII.4 2008b)



(3.2) Protein A/G 親和性介質 IgG 純化

Protein A/G 親和性介質加入

10ml 的 binding buffer (20 mM sodium phosphate, pH: 7), 流乾後將免疫之血清加入, 通過 Protein A/G 親和性介質, 加入 15 mL 的 binding buffer, 流乾後加入 3-5 mL Elution

buffer (0.1 M glycine-HCl, pH: 2.7), 收集的流出液每毫升加入

Antibody purification protocol

This protocol is suitable for rProtein A GraviTrap, Protein G GraviTrap and rProtein A/Protein G GraviTrap columns described in Section 1.

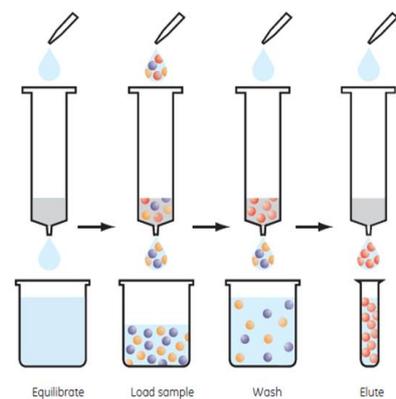


Fig 1. Purifying antibodies with rProtein A GraviTrap, Protein G GraviTrap and rProtein A/Protein G GraviTrap columns is a simple four-stage procedure.

200 μL 的中和試劑(1 M Tris-HCl, pH: 9)。IgG 純化後，再以 SDS-PAGE 確認純度與半

定量。

4、間接酵素免疫分析法評估重組蛋白抗原與多株抗體之交互作用

分別將測試抗原和多株抗體先進行蛋白定量，再使用 ELISA DIY kit (REGA Biotech.) 進行結合測試，每種測試抗原 Coating 50 ng 在反應盤中 4°C 過夜，用清洗液洗 3 次後，每格加入 100 μL Blocking 溶液，37°C 反應 1.5 小時後倒掉，分別加入序列稀釋之多株抗體(100 ng/ μL)，37°C 反應 2 小時後倒掉，用清洗液洗 5 次後拍乾，加入 2 級抗體(conjugated HRP) 1:6000，37°C 反應 1 小時後倒掉，用清洗液洗 5 次後拍乾，每格加入 100 μL 受質溶液，避光室溫反應 15 分鐘，每格加入 100 μL 加入停止溶液，用分光光度計 OD450nm 讀取反應數值。

三、結果

(一)群聚事件流病資料調查、流行病毒株分析

1. 樣本收集與病毒檢測:

101 年至 103 年 10 月間，通報 757 起腹瀉群聚或食物中毒事件，共採檢 3324 件糞便檢體，檢出 893 件為諾羅病毒陽性、99 件為輪狀病毒陽性與 60 件為沙波病毒陽性；以衛生局所通報及疫情調查上傳資料進行群聚歸類，分析各種病原群聚，病毒群聚檢出陽性率依序為 67.0%(101 年)、52.2%(102 年)、50.7%(103 年至 10 月)，總病毒群聚檢出陽性率為 57.7%；細菌群聚檢出陽性率依序 10.2%(101 年)、15.7%(102 年)、21.5%(103 年至 10 月)，總細菌群聚檢出陽性率為 15.1%；同一群聚中檢出病毒與細菌共同感染依序占 8.3%(101 年)、4.4%(102 年)、6.8%(103 年至 10 月)占總共同感染群聚 6.6%；無檢出任何通報檢測病原項目之總群聚占 20.6% (圖一、表一)。

2. 群聚事件與病毒流行病學分析:

分析 101-103 年群聚事件，以諾羅病毒為主(41.2%，312/757)，101 年有 174 起群聚占該年總群聚數之 57.4%，102 年有 78 起群聚占該年總群聚數之 31.3%，103 年有 60 起群聚占本年總群聚數之 29.3%，其中檢出為諾羅病毒單項病毒感染 101 年 138 起、102 年 65 起、103 年 34 起，共 237

起，其中 236 起皆為諾羅病毒 GII 型，另一起則為 GI 型；以基因型別細分感染諾羅病毒之病毒株，101 年及 102 年以 GII.4 病毒株感染為主(101 年占 70.2%，125/178；102 年占 69.6%，55/79；103 年占 40%，24/60)，其次為 GII.6(占 13.1%，31/237)，其他群聚感染之諾羅病毒型別，至少有 11 種以上，呈單獨或與其他病原共同感染。以群聚數統計分析諾羅病毒群聚之月份分布，諾羅病毒群聚在 101-103 年間，延續 101-102 年全球大流行疫情至 103 年三月成為 2 個流行感染高峰，至 103 年 3 月後群聚數則逐漸減少，如圖二所示。疫情調查資料歸類分析諾羅病毒群聚發生場所，三年皆以學校為主(101 年 39.1%；102 年 47.4%；103 年 40.0%)，其次為人口密集機構(101 年 18.4%；102 年 17.9%；103 年 26.7%)、餐廳(101 年 14.4%；102 年 16.7%；103 年 6.7%)、醫院(101 年 14.4%；102 年 6.4%；103 年 6.7%)、其他(101 年 11.5%；102 年 9.0%；103 年 20.0%)等，發生疫情場所分布如圖三。分析諾羅病毒群聚事件中通報個案之年齡分布，主要感染年齡層分布於 0~10 歲、其次為 11~20 歲(圖四)。

輪狀病毒群聚以 VP4 與 VP7 基因定序，依感染病毒株基因型分析期間出現型別為 G1P[8]、G9P[8]、G3P[8]、G2P[4]、G-P[8]，其中以 G1P[8] 為主要感染病毒株(102 年 7 起，33.3%、103 年 4 起，14.8%)；以感染場所配感染病毒株分析，孩童(幼兒園、國小)感染為 G1P[8]、G2P[4]與 G3P[8]，

另外多起無法分型均自食物中毒事件送驗。沙波病毒群聚以基因序列比對感染病毒株基因型，主要感染病毒株為 GI.2，101 年出現 7 起(77.8%)、102 年 3 起(75.0%)、103 年 6 起(75%)，各年份分別出現其他零星型別，分別為 GI.1、GII.2、GII.3 與無法分型。

(二)、依主要流行諾羅病毒之型別進行基因選殖、表達蛋白、純化抗原

(1)諾羅病毒表現類病毒抗原之病毒株選殖:

GII.4 諾羅病毒為引起全球大流行之主要病毒，諾羅病毒雪梨變異株 (GII.4/2012)在 101 年二月首次在台灣被偵測到，並在 101 年 9 月之後完全取代舊有的 GII.4 諾羅次分型病毒株(GII.4/2006, 2008, 2009, 2010)，成為 101-103 年間主要流行病毒株(圖五)。自 101 年 9 月至 103 年 10 月期間，諾羅病毒株 GII.4/2012 為引起我國通報腹瀉群聚或食物中毒群聚事件之主要致病病毒。從各月份不同群聚之 GII.4 2012 病毒株序列，分析病毒之 Antigenic site 胺基酸的變化，發現胺基酸序列比過去 GII.4 病毒株多了數個變異位點，將病毒胺基酸序列以結構分析，GII.4/2012 病毒株變化位置在與宿主細胞 receptor binding site 之邊緣。因此，推測由於諾羅病毒抗原決定位改變，造成免疫系統無法辨識因而造成大流行。

由於目前仍無細胞培養增幅病毒的方法，參考文獻與我國監測檢出之諾羅病毒以 VP1 外套膜基因的演化樹分析結果，顯示諾羅病毒的外套膜基因主要以 3 群在逐年演化(圖六)，因此，在試劑研發中，選定我國主要流行 GII.4 型諾羅病毒進行先期開發，並參考諾羅病毒外殼基因演化分析與胺基酸變化，建置近年引起大流行群聚主要病毒株 GII.4 2008、GII.4 2009、GII.4 2010 和 GII.4 2012(雪梨株)之類病毒(VLP)與 GST-P 融合蛋白，作為病毒抗原樣板及製備動物免疫抗體，進行各種組合檢測使用。

(2) 類病毒顆粒表現與純化

以昆蟲細胞表現之諾羅病毒外殼蛋白釋放在培養基中，並組成類病毒顆粒，收集培養基利用超高速離心進行初步濃縮，濃縮後以 1X PBS 回溶，進行氯化銫層析純化，分層示意圖如(圖七)，各層皆進行蛋白電泳(SDS-PAGE)確認其蛋白大小，之後再次超高速離心將層析後的蛋白離心到管底，去除氯化銫，加入 1X PBS 回溶，為待用之類病毒顆粒抗原。

(3) GST-P 融合蛋白表現與純化

將建構好的 pGEM-T-2008a 質體或 pGEX-4T-1 載體送入大腸桿菌 BL21 中，在 0.5mM IPTG，27°C，4 小時的誘導下，收集細菌並將之用

超音波震破(Total lysate)，跑膠確認是否有誘導出的蛋白，離心去除細菌碎片將上清液用 0.45 μm 之濾膜過濾，跑膠評估可溶性蛋白的量，過濾後之上清液與 GST beads 於 4°C 下均勻混合過夜，次日將有 GST beads 之混合液通入空管柱，GST beads 卡在管柱上方，底下廢液丟棄(Flow-through)，跑膠確認是否有過多未被 GST beads 結合的蛋白，用 1X PBS 沖洗(Wash1 和 Wash end)，再用含 reduced glutathione 沖洗出 GST 融合蛋白(Elution)，為待用之融合蛋白抗原(圖八)。

(4) 免疫血清製備

類病毒顆粒因受限於產量的因素，因此挑選較小型動物，老鼠(BALB/c)各 3 隻，每次免疫 50 μg 之類病毒顆粒，第一次免疫混合完全佐劑，之後每間隔兩周以同樣劑量和不完全佐劑混合進行 3 次免疫。GST-P 融合蛋白則委外進行兔子與天竺鼠免疫，每次免疫 200~300 μg ，第一次免疫混合完全佐劑，之後每間隔兩周以同樣劑量和不完全佐劑混合進行 6 次的免疫。最後皆採全血，低溫離心取血清備用。

(5) 定量待測抗原與多株抗體免疫血清 IgG 純化

前述之類病毒顆粒與 GST-P 融合蛋白均定量到 20 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 並進行蛋白電泳(SDS-PAGE)確認濃度與純度(圖九)，免疫血清經 Protein A/G 親

和性介質純化 IgG，並定量取 100 ng/ μ L 進行蛋白電泳(SDS-PAGE)確認濃度與純度(圖十)，其中 GST-08a-P protein 免疫兔子血清達 80 mL 其中 40 mL 委外進行 IgG 純化，另外 40 mL 以市售套組(GE Healthcare)進行 IgG 純化；以類病毒顆粒免疫老鼠之血清量不多均採用自行純化。

(6) 間接酵素免疫法測試抗原(類病毒、重組蛋白)-抗體交互作用

取每個待偵測抗原 50 ng 包覆(coating)於反應盤，並與 5 種多株抗體 (100 ng/ μ L)各稀釋 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 4 種 titer 進行交互作用，結果顯示 Anti-08a-P protein 純化後，皆能辨認各年份之類病毒顆粒(GII.4 2006b、GII.4 2008a、GII.4 2008b、GII.4 2012 VLP)及 GST-P 融合蛋白(GST-08a-P protein 和 GST-VA387-P protein)，在與陰性對照組 BSA 及 His-08a S protein 均無太大反應；Anti-08a VLP 多株抗體對每種抗原的效果次之，雖然吸光讀值較低但也是一樣皆能辨認各年份之類病毒顆粒(GII.4 2006b、GII.4 2008a、GII.4 2008b、GII.4 2012 VLP)，但無法辨認 GST-P 融合蛋白(GST-08a-P protein 和 GST-VA387-P protein)，陰性對照組沒有太高讀值；其餘的 Anti-06b VLP、Anti-08b VLP、Anti-GII.4 2012 VLP 多株抗體皆無法很有效辨認多種不同病毒株製備的抗原(圖十一)。

(7) 三明治酵素免疫法測試免疫抗體之靈敏度與專一性：

將四種多株抗體交互搭配，使用三明治酵素免疫法偵測重組蛋白，分為四種組合：1. 捕捉抗體 anti-mouse-08a VLP 與偵測抗體 anti-rabbit-GST-08a-P、2. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-mouse-08a VLP、3. 捕捉抗體 anti-rabbit-His-08a-S 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P、4. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P。四種組合檢測結果如圖十五，皆能偵測到各型 GII.4 重組蛋白與類病毒顆粒，但以 4. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P 組合，效果最好。

(8) 臨床檢體檢測評估四種抗體組合(三明治酵素免疫法)：

挑選測試 65 件臨床檢體(處理過之糞便上清液)，65 件檢體已由 RT-PCR 及定序確認感染病原，分別為 14 件諾羅病毒 GII.4 型(不同年份病毒株/2012、2009b、2006b)、9 件諾羅病毒 GII.6 型、10 件諾羅病毒 GII 其他型別 (GII.2、3、5、7、8、13、14、17)、6 件諾羅病毒 GI 型(GI.2、3、4、14)、10 件輪狀病毒、11 件沙波病毒、3 件星狀病毒、1 件愛知病毒與 1 件未檢出已知病原檢體，同時，也加入其他標準品包括 3 件輪狀病毒能力試驗之輪狀病毒抗原與 2 件大腸桿菌菌株(1×10^6 CFU/mL)，共 70 件樣本(檢體或標準品)進行測試。以 BSA 吸光值二倍值當判讀陽

性的閾值(Cut-off value)，低於 BSA 吸光值為陰性，同時比較檢測諾羅病毒或杯狀病毒之敏感性和專一性，以捕捉抗體 anti-rabbit-His-08a-S 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P 的組合結果優於其餘 3 種(敏感性 64%，專一性 68%)，相同的檢測樣本以市售套組做評估，其結果(敏感性 67%，專一性 77%)稍優於四種自製免疫抗體配對測試結果，如表二。

四、討論：

在台灣地區，諾羅病毒加入通報檢測項目開始於 93 年 2 月，近年通報至本局的腹瀉群聚事件中，其中收集完整檢體並通報病毒性及細菌性檢測的群聚事件中，檢出諾羅病毒感染陽性占檢出任何病原之群聚事件數將近 5 成。103 年檢出病毒性腹瀉群聚占總群聚約 51%，病毒與細菌混合感染的腹瀉群聚約 7%，細菌性腹瀉群聚約 21%，未知病原群菌約 21%(圖一)。雖在地方衛生局與醫院通報的初期，因採集糞便檢體不易或無法明確知道病毒採檢的正確方式等因素，部分群聚事件只有通報送驗細菌性檢驗，因此，細菌性腹瀉群聚事件數稍有低估的現象。此外，無法檢測出任何病原之群聚事件，除了可能為非病原感染因素外，其他原因包括通報樣本中因防疫調查需求而採集的疑似接觸者樣本，屬於無症狀者的通報檢體，或者採檢日期離發病日過長(超過 7 日)，病人在這期間採樣糞便中含病毒量過低，致使無法檢出；這些都可能使檢出陽性率偏低的可能原因。

台灣各地早在 95 年 8 月底至 9 月初，開始陸續通報疑似腹瀉群聚，並檢測確定為諾羅病毒群聚事件，類似的狀況也發生在 98-99 年流行季。在國外監測資料亦顯示，在 95-96、98-99 年流行季出現諾羅病毒大流行，研究發現該 2 波流行季均出現 GII.4 variant 新病毒株後並開始擴散引起全球大流行；我國實驗室檢測病毒株並結合疫調與流病資料顯示，造成這兩

個流行季之 GII.4 variant 病毒株，在該年早於流行季前的夏季即開始造成零星病例。

在 101 年 3 月 NCBI 發表了 GII.4 2012 雪梨株序列之後，外國文獻陸續報導歐洲各國、澳洲、美國、中國、南韓、巴西和孟加拉皆有 GII.4 2012 雪梨株造成的大規模群聚感染。本計畫整合 101-103 年間監測資料，確認諾羅病毒基因序列後，經統計諾羅病毒中以 GII.4 2012 雪梨株為優勢主流病毒株，我國 GII.4 2012 雪梨株在 101 年 2 月即有零星案例，之後通報的腹瀉群聚事件逐月上升，101 年 9 月至 102 年 2 月為群聚感染高峰期，每月皆有 15 起以上確診之 GII.4 2012 群聚感染，直到 102 年 3 月之後疫情才逐漸趨緩(圖五)，102 年疫情延續至 103 年 3 月，之後整體的諾羅病毒腹瀉群聚的疫情均呈現低度流行，至今(103)年 9 月才出現微幅上升趨勢(圖二)。

依據歷年群聚事件疫情調查資料，彙整群聚發生場所分析，台灣地區諾羅病毒群聚通報地點主要發生在醫院、護理之家、學校和餐廳。過去數年之病毒株感染以發生在人口密集機構為主；從疫調資料顯示，本次 GII.2014 Sydney 諾羅病毒株引起的疫情主要通報發生以學校為主，其次為人口密集機構(圖三)，感染年齡層，以 0~10 及 11~20 歲為主、其次為 >65 歲(圖四)。GII.2014 Sydney 諾羅病毒株引起的疫情，發生以學校群聚感染

孩童或人口密集機構群聚感染年長者為主，此現象推測在中壯年齡層過去有類似新病毒株感染，另新病毒可能透過感染免疫力較差的孩童，並在人群密集的環境中持續重複感染以散播病毒，而過去幾年在人口密集機構或安養中心經常發生群聚，亦可能因免疫力較差成為 GII.4 2012 雪梨株的次要感染場所；由於我國對於諾羅病毒感染的通報僅限於群聚事件，透過食物中毒事件或腹瀉群聚通報，因此，事件發生在特定的場所，如學校、人口密集機構、醫院或餐廳，通報的機會較高，而散發性個案或零星至各場所後感染的案例，部分民眾選擇不就醫或就醫後因散發個案而未能通報，因此在未經廣泛調查的狀況，不容易發現；亦有文獻資料討論，諾羅病毒具有在外套膜蛋白產生變異特性，因此，過去曾流行的病毒株引起的免疫仍具有部分保護新病毒株感染效果。因此，推測我國民眾在成人年齡層中，過去可能曾有類似 GII.4 2012 雪梨株病毒株或 GII.6 抗原感染的經歷，因此在今年的疫情中，主要流行族群與場所差異，但缺少過去血清流行病學與病毒監測資料可以驗證。

依據群聚事件疫情調查相關資料，建檔統計分析感染族群、發生群聚場所分析，在學校、醫院、護理之家等人口密集機構是諾羅病毒群聚最常發生的地點，特別是精神病房及養護中心。曾經實地觀察幾個人口密集機構了解住民的居住狀況及活動情形，發現在發生群聚事件的場所，是屬於

較封閉式的活動區域，平時有許多共同生活互動的機會，因此透過生活共同空間相互傳染的狀況機會較大；特別在精神病房，腹瀉生病的住民無法像平常人正確的確實處理排泄物，因此，在第一個個案發生時，醫護或照護者如果沒有即時處理，極容易在整個病房內散播成群聚事件。在醫院或安養護理之家，多數住民為臥床或無法自由行動者，平時照護需要看護或護理人員照料，無法自理者長期包尿布或導尿，醫護人員處理尿布及排泄物工作如無法在每人次處理後洗手或手部消毒，極容易在病房間將腹瀉疾病傳播。從本研究期間監測諾羅感染群聚場所，發生在學校感染的比率已明顯偏高，除可能因新型病毒株在該年齡層仍無抗體保護，或感染力與傳播力較強外，學生的衛生習慣與共同飲食引起的群聚因素因加以考慮，加強學校校園內諾羅病毒群聚事件的防護與宣導，已降低群聚擴大的可能性。

實驗室在歷年間整合腹瀉群聚通報與食物中毒事件，彙整個別檢驗項目結果與疫調資料，並進行諾羅病毒株與流行疫情整合分析，對於諾羅病毒造成的各種疫情場所可能性將提供防治工作訂定新的工作準則。另對病毒株的即時監測，將可以預期該流行季的疫情發展，整體的實驗室監測與國際近幾年建立國際性諾羅病毒株監測網 NoroNet 目標相當一致。

外國文獻中以病毒學特性分析探討，推測主要流行病毒株變化，應該

在於誘發免疫反應的相關基因及胺基酸位點產生突變，導致多數人對於當季流行的新型諾羅病毒株缺乏免疫抗體，造成大規模的群聚流行事件。因此，為了解歷年間病毒株的變化，在本研究中先以 RT-PCR 增幅病毒外套膜短片段基因，並定序分析病毒基因型，從分群組中挑選病毒株再次進行外套膜基因全長序列分析；本次先以台灣地區主要流行 GII.4 病毒 VP1 基因序列比較，利用 MAGA 4.0 進行病毒株演化分析，結果如(圖六)；由病毒演化中可以發現在台灣大致可區分為 3 群病毒演化，在 2006-2007 年流行季，當年有 2 株新型 GII.4 諾羅病毒流行，其中 2006a 病毒株與 Hunter (93 年)基因序列較為相近，但當年只有少數群聚事件由 2006a 引起，多數群聚事由 2006b 所造成，而 2006b 病毒株持續感染並延伸到 96-97 年流行季。在 97-98 流行年與 98-99 流行年，從病毒演化分析資料顯示，分別有兩株病毒株產生- 2008a/2008b 與 2009a/2009b。初步從演化資料顯示，確定病毒在這兩個流行季中出現新的病毒株，與群聚疫情上升應有相關性。在 101-102 大流行(季)中，從病毒演化分析資料顯示 2012 雪梨株與其他歷年病毒株序列有明顯區隔，國外文獻也發現在抗原決定位點有數個胺基酸位點發生突變。

諾羅病毒檢測先期研發部分，挑選近年來在我國造成大規模流行群聚之 GII.4 諾羅病毒株作為建構免疫原基礎的病毒株，分別為 GII.4 2006b、

GII.4 2008a、GII.4 2008b、GII.4 2009b 與 GII.4 2012，優先以桿狀病毒 (Baculovirus) 感染昆蟲細胞系統建構類病毒顆粒(圖七)，另建構大腸桿菌 (BL21) 系統表現重組諾羅病毒 P 蛋白作為免疫原(圖八)。運用基因選殖技術將諾羅病毒之外套膜蛋白(capsid protein)VP1 基因，建構至桿狀病毒 (Baculovirus) 系統表現，每 180 個單體 VP1 外套膜蛋白會自動形成類病毒顆粒，大小與 native 病毒相近似，類病毒顆粒為真核細胞產製之蛋白，具有轉譯後修飾更為接近真實病毒。P 區域為諾羅病毒變異最大的區域，亦是病毒誘發免疫抗原決定位，將諾羅病毒之 P 區域基因建構至大腸桿菌 (BL21) 系統表現 GST 融合蛋白，藉由 GST 標誌的純化得到諾羅病毒 P 蛋白，表現蛋白能以 24 單體組成一個 P particle；雖原核生物產製之蛋白不具轉譯後修飾，但大腸桿菌系統表現的量與速度均高於桿狀病毒 (Baculovirus) 系統表現，可以縮短製備免疫抗血清時程。

在本研究中挑選主要流行病毒株製備之類病毒顆粒(GII.4 2006b、GII.4 2008a、GII.4 2008b)進行老鼠免疫，GST 融合蛋白(GST-08a-P protein)進行兔子與天竺鼠免疫。製備好之各種抗原和純化過之 IgG 進行蛋白定量並以蛋白電泳(SDS-PAGE)確認大小(圖九、十)，GST 融合蛋白(GST-08a-P 和 GST-VA387-P)大小約為 61 kDa (P 蛋白 35 kDa，GST 蛋白 26 kDa)，BSA 約 69 kDa，類病毒顆粒(GII.4 2006b、GII.4 2008a、GII.4 2008b、GII.4 2012

VLP)約 60 kDa。純化後之 IgG 經蛋白電泳可看出抗體重鍊約 55kDa 和抗體輕鍊 25 kDa，唯免疫老鼠之 IgG (Anti-GII.4 2008a，Anti-GII.4 2008b，Anti-GII.4 2006b)純化略差，有較多雜的蛋白在其中。

將各式抗原 50 ng 包覆於反應盤，進行間接酵素免疫法測試各種不同多株抗體的效果。多株抗體(100ng/μL)各稀釋 4 種 titer (1:500，1:1000，1:2000 和 1:4000)，二級抗體 conjugated HRP (老鼠、兔子、人)皆 1:6000 稀釋，結果顯示 Anti-08a-P protein 效果最好，而 Anti-08a VLP 的效果次之。

由於目前開發以檢測 GII.4 型諾羅病毒為基礎，可能會導致其他不同型別的諾羅病毒無法辨識。參考文獻[30]指出用細菌產製之完整病毒蛋白免疫之單株抗體，能辨認多型別之諾羅病毒，其辨認抗原位為 S 蛋白片段；在結構上諾羅病毒之 S 蛋白病毒位置在 P 蛋白下層，雖非主要抗原決定位，但其序列在各種型別諾羅病毒中相似性很高，以同一杯狀病毒科的沙波病毒序列分析也有相似保留序列。因此，本研究第二階段亦擴充以諾羅病毒之外套膜中之 S 蛋白作為另一免疫抗原，利用桿狀病毒系統產製之 S 蛋白可形成 S 粒子，為沒有 P 蛋白包覆之薄殼；也利用細菌產製 S 的融合蛋白進而免疫動物，以期得到之多株/單株抗體能提高辨識各型別諾羅病毒。整體計畫期間彙整研究流程簡圖如圖十二。已完成表現與純化之蛋白抗原分別為: GST-08a-P, GST-VA387-P, His-08a-S 和 VLPs (2006b、2008a、2008b、

2009b、Sydney/2012 病毒株)，定量後之蛋白電泳，如圖九，其中製備抗血清並 IgG 純化(多株抗體)為：anti-rabbit-GST-08a-P、anti-guinea pig-GST-08a-P、anti-rabbit-His-08a-S、anti-mouse 2006b VLP、anti-mouse 2008a VLP 和 anti-mouse 2008b VLP，定量後之蛋白電泳，如圖十三。

免疫抗原製備方法區分為：(1) P 與 S 蛋白之基因選殖，表現蛋白與純化(BL21 表現系統)。P 區域為諾羅病毒變異最大的區域，而 S 區域為諾羅病毒高度保留的區域，運用基因選殖技術將諾羅病毒之 P 區域/S 區域基因，建構至大腸桿菌(BL21)系統表現 GST/His 融合蛋白，藉由 GST/His 標誌的純化得到諾羅病毒 P 蛋白/S 蛋白，此兩種蛋白分別用於免疫動物中。(2) 類病毒顆粒之基因選殖，表現蛋白與純化(baculovirus/insect cell 表現系統)。運用基因選殖技術將諾羅病毒之殼蛋白(capsid protein)VP1 和次要結構蛋白 VP2 基因，建構至桿狀病毒(Baculovirus)系統表現蛋白形成類病毒顆粒，將此類病毒顆粒將建置各病毒株抗原與免疫動物使用。

篩選偵測抗原敏感度較佳的免疫抗體：將重組蛋白抗原塗在 96 孔盤，以直接酵素免疫法偵測多株抗體與類病毒抗原交互作用強度，結果顯示 anti-rabbit-GST-08a-P 與 anti-guinea pig-GST-08a-P 最佳，anti-mouse-08a VLP 次之，而 anti-rabbit-His-08a-S 雖反應訊號較弱但能與各種型別類病毒顆粒反應，如圖十四。

以三明治酵素免疫法測試免疫抗體之靈敏度與專一性：將此四種多株抗體交互搭配使用三明治酵素免疫法偵測，分為四種組合分別偵測重組蛋白：1. 捕捉抗體 anti-mouse-08a VLP 與偵測抗體 anti-rabbit-GST-08a-P、2. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-mouse-08a VLP、3. 捕捉抗體 anti-rabbit-His-08a-S 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P、4. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P。四種組合皆能偵測到重組蛋白與類病毒顆粒(圖十五)，以 4. 捕捉抗體 anti-rabbit-GST-08a-P 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P 組合，效果最好。

另以四種抗體組合的三明治酵素免疫法，測試 65 件臨床檢體(處理過之糞便上清液)，65 件檢體已由 RT-PCR 及定序確認感染病原，分別為 14 件諾羅病毒 GII.4 型(不同年份病毒株/2012、2009b、2006b)、9 件諾羅病毒 GII.6 型、10 件諾羅病毒 GII 其他型別 (GII.2、3、5、7、8、13、14、17)、6 件諾羅病毒 GI 型(GI.2、3、4、14)、10 件輪狀病毒、11 件沙波病毒、3 件星狀病毒、1 件愛知病毒與 1 件未檢出已知病原檢體，同時，也加入其他標準品包括 3 件輪狀病毒能力試驗之輪狀病毒抗原與 2 件大腸桿菌菌株(1×10^6 CFU/mL)，共 70 件樣本(檢體或標準品)進行測試。以 BSA 吸光值二倍值當判讀陽性的閾值(Cut-off value)，低於 BSA 吸光值為陰性，

同時比較檢測諾羅病毒或杯狀病毒之敏感性和專一性，以捕捉抗體 anti-rabbit-His-08a-S 與偵測抗體 anti-guinea pig-GST-08a-P 的組合結果優於其餘 3 種(敏感性 64%，專一性 68%)，相同的檢測樣本以市售套組做評估，其結果(敏感性 67%，專一性 77%)稍優於四種自製免疫抗體配對測試結果，如圖十六。分析比較市售試劑與四種自製組合檢測試劑，均無法檢測諾羅病毒 GII.4 2006、GII.8、GI.4、GI.2，但我們的組裝試劑對於今年流行病毒株 GII.6 檢測陽性率較市售試劑佳，依外國研究指出[29]，諾羅病毒不斷改變抗原決定位，單獨任一種抗體均無法達到中和各型別病毒效果，因此在檢測方法開發過程中，也可能發生抗體無法辨識變異太多之新型諾羅病毒或不同型別病毒，因此開發檢測試劑下一階段時，須增加 Group I 或以多種不同病毒株免疫血清做為檢測抗體，以提高檢出率。此外，評估專一性不足的部分，市售試劑與四種自製組合檢測試劑，對部分輪狀病毒陽性之臨床檢體檢出呈陽性反應，但以純病毒為檢體檢測呈陰性，推測在檢體處理過程所致，將以純病毒株或無感染糞便檢體進一步釐清問題。

近期有文獻比較各廠牌之諾羅病毒快篩套組(如表三)，表中為目前可多數實驗室使用的市售試劑套組，由分析比較表得知不論是哪個廠牌都無法有效的辨認多型別之諾羅病毒，4 個套組中針對 GI 型別之敏感度最高的為 52%，針對 GII 型別敏感度最高的為 64% 準確度仍不理想。因此應用

於防疫業務調查與防治工作，可以仍依美國疾病管制中心建議在大型腹瀉群聚事件調查時先以試劑篩選找到疑似病原，已讓第一線防疫人員依照諾羅病毒感染方式進行調查與現場清消的工作；但為達到預測疫情及提早對於民眾宣導工作，仍必須配合分生檢測方法進行病毒株持續監測。

五、結論與建議：

1. 諾羅病毒為台灣目前引起腹瀉群聚事件或食物中毒的主要病毒，從歷年通報監測與實驗室檢測顯示，諾羅病毒主要引起群聚的場所依舊以人口密集機構與學校為主。隨主流病毒株在引起免疫保護抗體 epitope 位置胺基酸改變，受感染的族群會因過去曾感染保護抗體不足的影響下，而有流行年齡層的差異。但仍以免疫保護力差的孩童與年者者為主，防治與教育應以這兩種族群為首要對象。
2. 快速檢測方法開發主要為建構台灣與日本共同合作的研究計畫，目前已完成台灣本土諾羅病毒主要感染型別之抗原(類病毒顆粒與 P 蛋白)製備，並部分完成免疫動物，製備與純化多株抗體，已建構初步篩檢用的 EIA 方法。後續將持續進行篩選單株抗體及不同病毒型別抗原製備，並進行方法改善以提高靈敏度與專一性，應用於臨床檢體效果評估。

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，探討病毒的演化，並配合疫調發生場所與感染年齡層，與探討病毒的致病特性。將作為該病毒相關的防疫資料，以及開發檢測方法的基礎。目前研發諾羅病毒檢測方法，應用於目前的臨床檢體測試，仍需要再更改以提高敏感度與專一性。

七、参考文献：

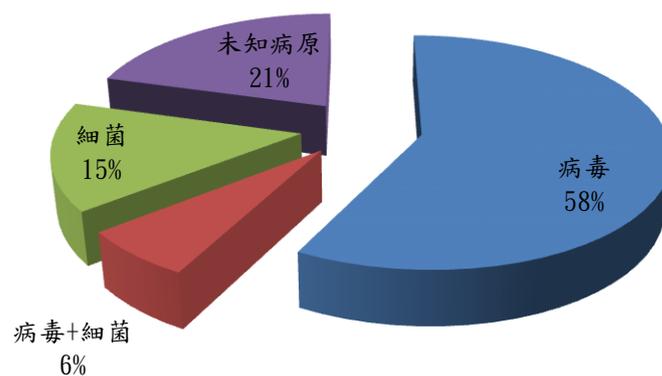
- [1] Cubitt D, *et al.* *Caliciviridae*. ICTVdB Index of Viruses. 2003.
- [2] Harris, J, *et al.* *Deaths from norovirus among the elderly, England and Wales*. *Emerg Infect Dis.*, 2008. **14**(10): p. 1546-1552.
- [3] Teunis PF, *et al.* *Norwalk virus: how infectious is it?* *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1468-76.
- [4] Siebenga JJ, *et al.* *Norovirus illness is a global problem: emergence and spread of norovirus GII.4 variants, 2001-2007*. *J Infect Dis.* 2009 Sep 1;200(5):802-12.
- [5] Kapikian AZ, *et al.* *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis*. *J Virol.* 1972 Nov;10(5):1075-81.
- [6] Costantini V, *et al.* *Diagnostic accuracy and analytical sensitivity of IDEIA Norovirus assay for routine screening of human norovirus*. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug;48(8):2770-8.
- [7] Rabenau HF, *et al.* *Laboratory diagnosis of norovirus: which method is the best?* *Intervirology.* 2003;46(4):232-8.
- [8] de Bruin E, *et al.* *Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR*. *J Virol Methods.* 2006 Nov;137(2):259-64. Epub 2006 Aug 9.
- [9] Chiba S, *et al.* *An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home*. *J Med Virol.* 1979;4(4):249-54.
- [10] Schuffenecker I, *et al.* *Genetic classification of "Sapporo-like viruses"*. *Arch Virol.* 2001;146(11):2115-32.
- [11] Dey SK, *et al.* *Seasonal pattern and genotype distribution of sapovirus infection in Japan, 2003-2009*. *Epidemiol Infect.* 2011 Mar 4;1-4.
- [12] Hansman GS, *et al.* *Outbreak of gastroenteritis due to sapovirus*. *J Clin Microbiol.* 2007 Apr;45(4):1347-9.
- [13] Ike AC, *et al.* *Detection and characterization of sapoviruses in outbreaks of gastroenteritis in south-west Germany*. *J Clin Virol.* 2008 Sep;43(1):37-41.

- [14] Svraka S, *et al.* *Epidemiology and genotype analysis of emerging sapovirus-associated infections across Europe.* J Clin Microbiol. 2010 Jun;48(6):2191-8.
- [15] Okada M, *et al.* *The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers.* Arch Virol. 2006 Dec;151(12):2503-9.
- [16] Wu FT, *et al.* *Acute gastroenteritis caused by GI/2 sapovirus, Taiwan, 2007.* Emerg Infect Dis. 2008 Jul;14(7):1169-71.
- [17] Wu FT, *et al.* *Norovirus Infection in A Taipei Regional Hospital and Its Laboratory.* Taiwan Epidemiology Bulletin. 2004 **20**(8): p. 407-419.
- [18] Wu FT, *et al.* *Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005.* Arch Virol. 2006 Jul;151(7):1319-27.
- [19] Bull RA, *et al.* *Mechanisms of GII.4 norovirus evolution.* Trends Microbiol. 2011 May;19(5):233-40
- [20] Khamrin P, *et al.* *Evaluation of the newly developed immunochromatography test kit for rapid detection and differentiation of norovirus GI and GII.* J Trop Pediatr. 2010 Oct;56(5):368-9.
- [21] Khamrin P, *et al.* *Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens.* J Virol Methods. 2009 May;157(2):219-22..
- [22] Khamrin P, *et al.* *Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples.* J Virol Methods. 2008 Feb;147(2):360-3.
- [23] Kirby A, *et al.* *An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens.* J Clin Virol. 2010 Dec;49(4):254-7.
- [24] Koo HL, *et al.* *Noroviruses: The leading cause of gastroenteritis worldwide.* Discov Med. 2010 Jul;10(50):61-70.
- [25] Ootsuka Y, *et al.* *Molecular characterization of sapoviruses detected in sporadic gastroenteritis cases in 2007 in Ehime Prefecture, Japan.* Jpn J Infect Dis. 2009 May;62(3):246-8.
- [26] Kojima S, *et al.* *Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses.* J Virol Methods. 2002 Feb;100(1-2):107-14.

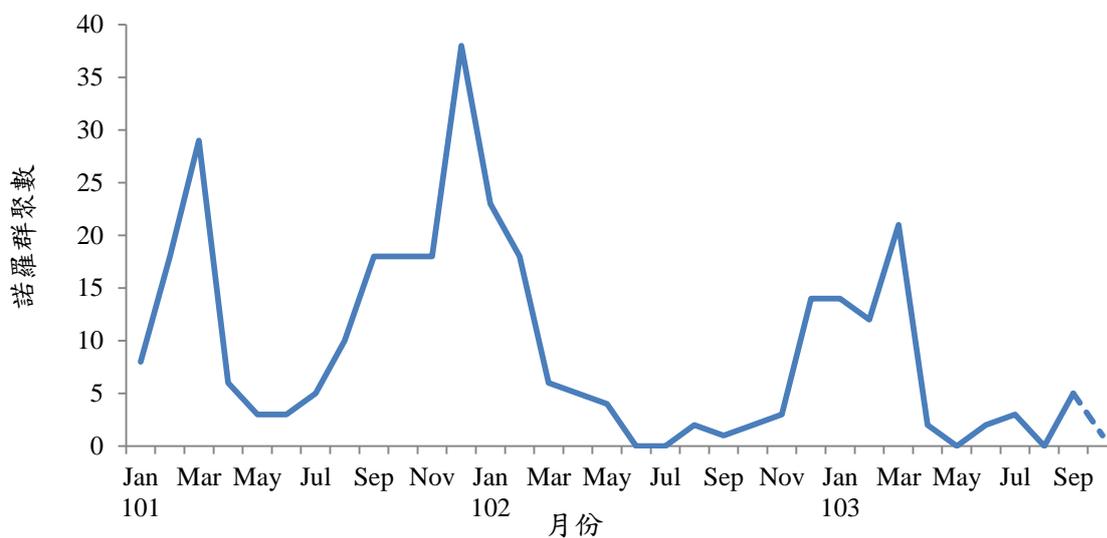
- [27] Kitajima M, *et al.* *Detection and genetic analysis of human sapoviruses in river water in Japan.* *Appl Environ Microbiol.* 2010 Apr;76(8):2461-7.
- [28] Everardo Vega, *et al.* *Novel GII.12 Norovirus Strain, United States, 2009–2010.* *Emerging Infectious Diseases.* 2011 Aug;17(8):1516-18.
- [29] Lisa C. Lindesmith, *et al.* *Immunogenetic Mechanisms Driving Norovirus GII.4 Antigenic Variation.* *PLoS Pathog.* 2012;8(5):e1002705
- [30] Xiao Li, *et al.* *Characterization of a cross-reactive monoclonal antibody against Norovirus genogroups I, II, III, and V.* *Virus Res.* 2010 Aug;151(2):142-7.

八、圖表

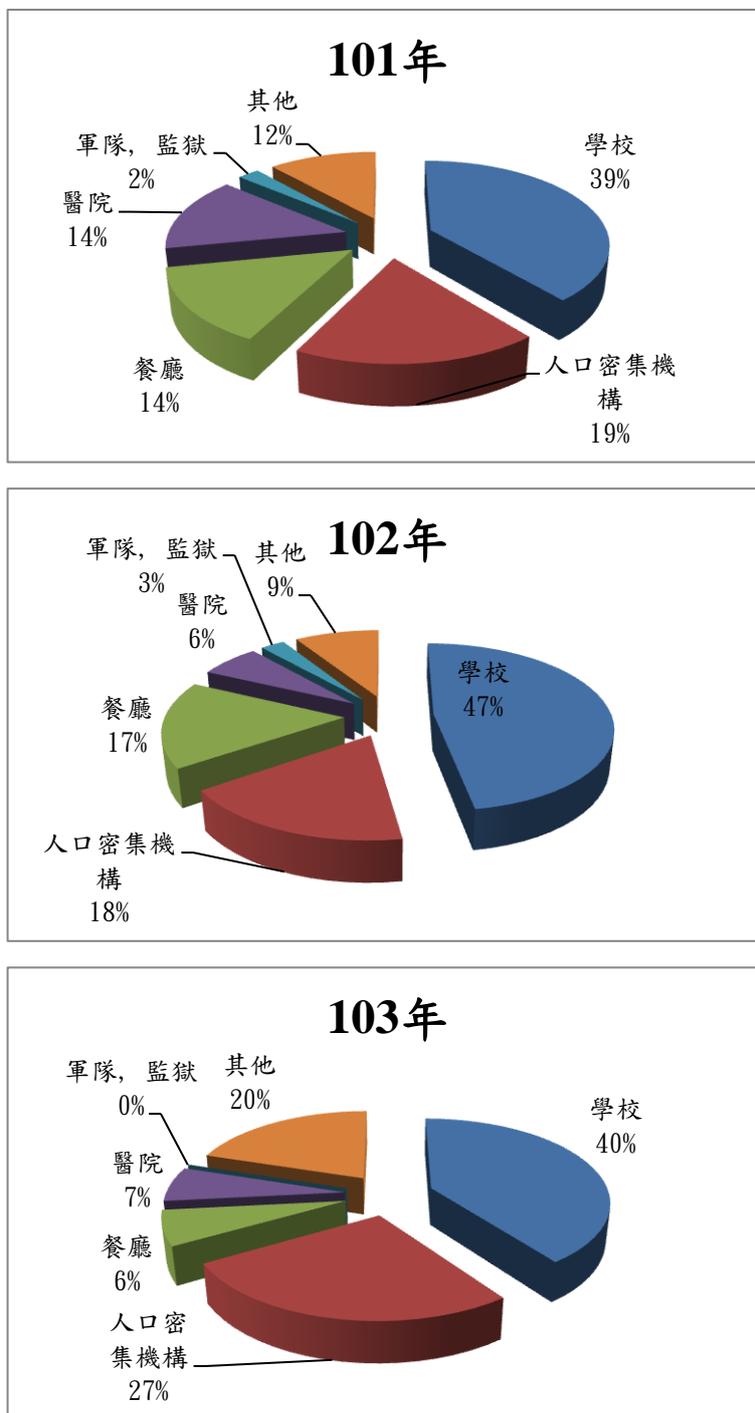
圖一、101 年至 103 年 10 月間通報腹瀉群聚或食物中毒事件之病原檢測分析



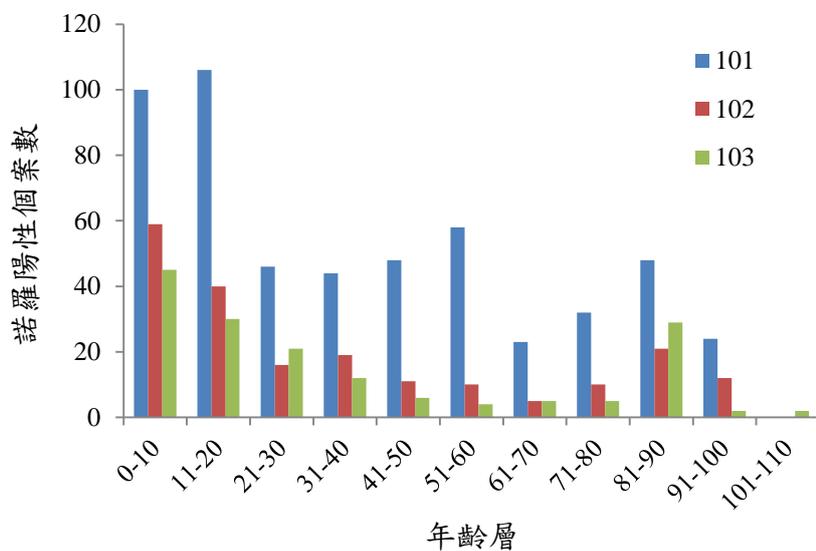
圖二、101 年至 103 年 10 月間諾羅病毒群聚之月份分布(統計截至 103/10/11)



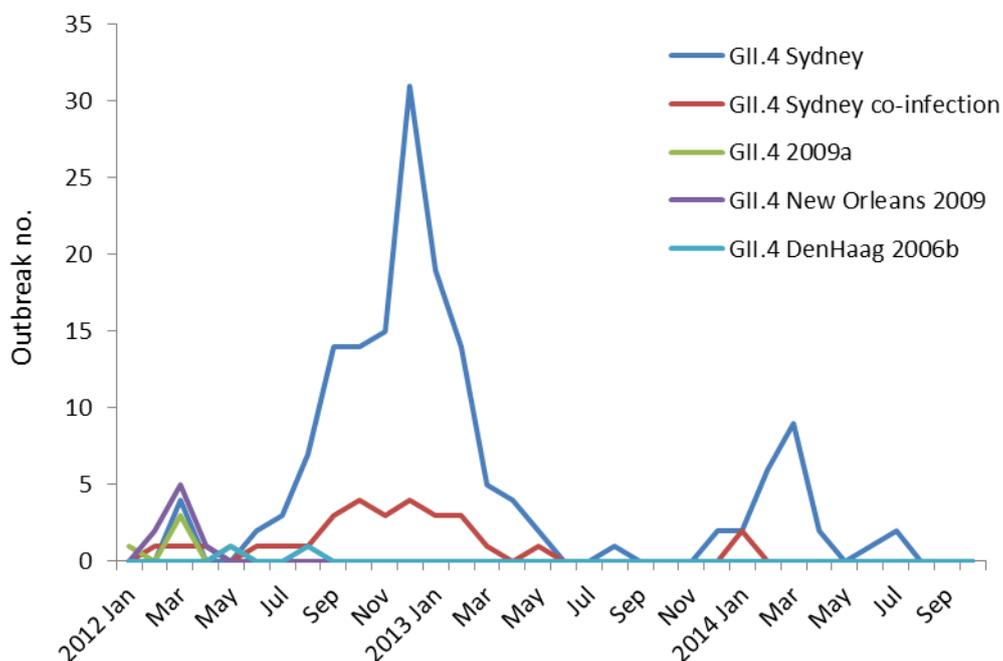
圖三、101-103 年諾羅病毒群聚發生場所分析



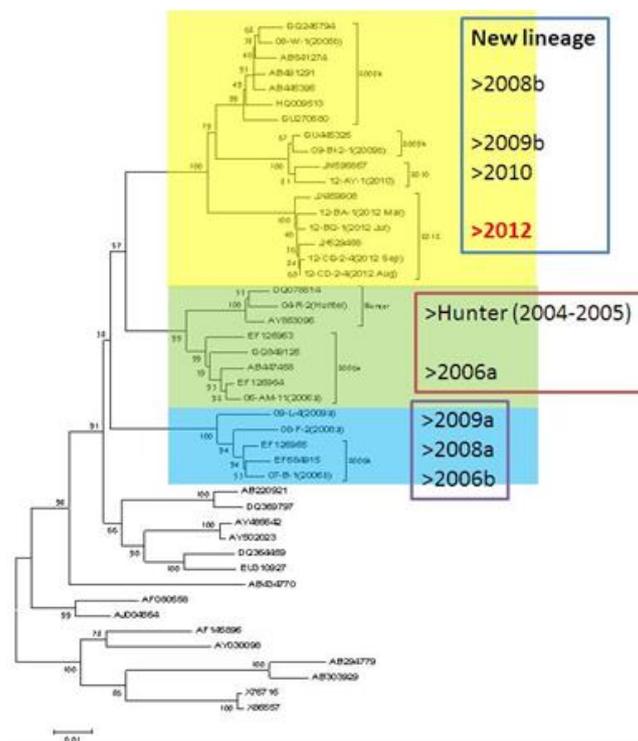
圖四、101-103 年諾羅病毒群聚事件中通報個案之年齡分布



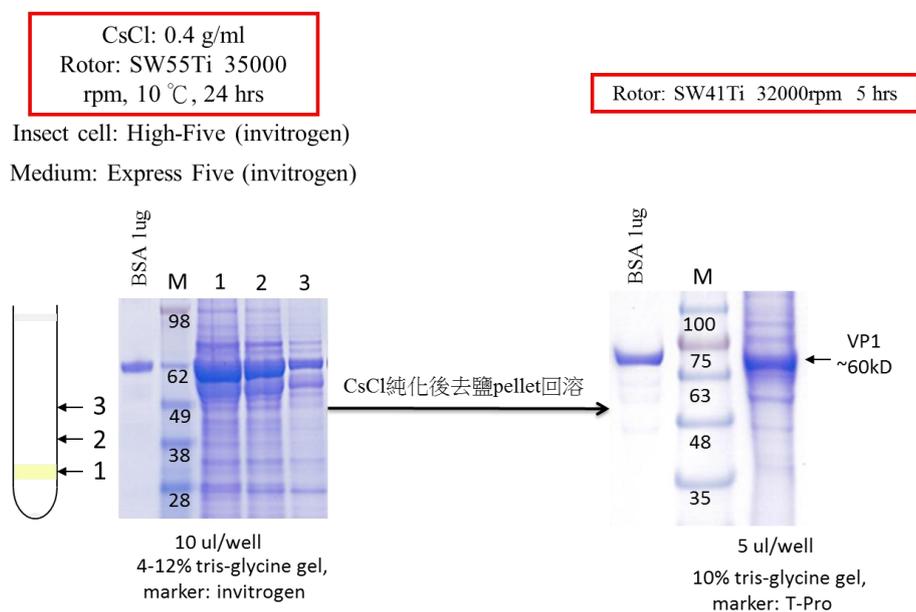
圖五、101 年至 103 年 10 月間諾羅病毒 GII.4 各次分型之腹瀉群聚分月分布圖



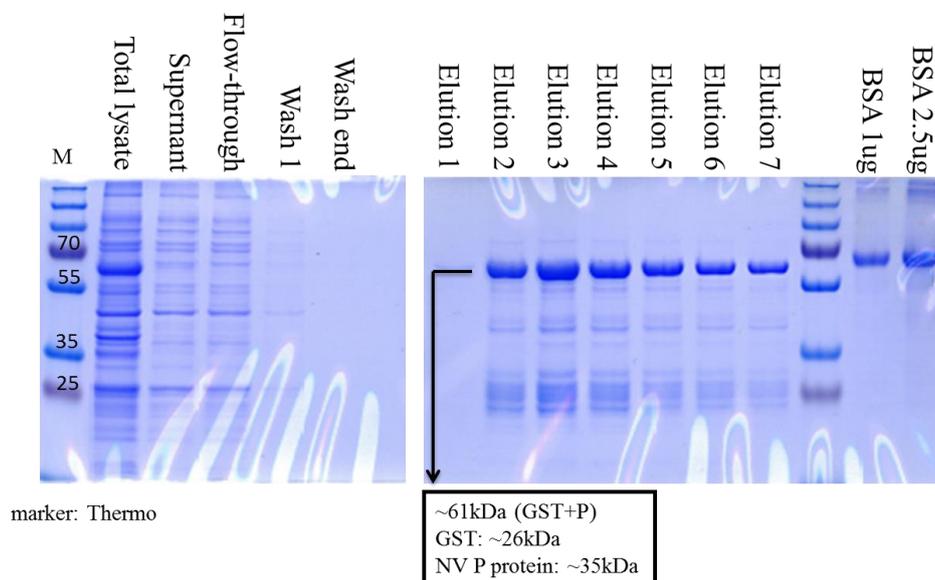
圖六、93-101 諾羅病毒 GII.4 病毒株之分子演化分析 (VP1 基因, 1623bp)



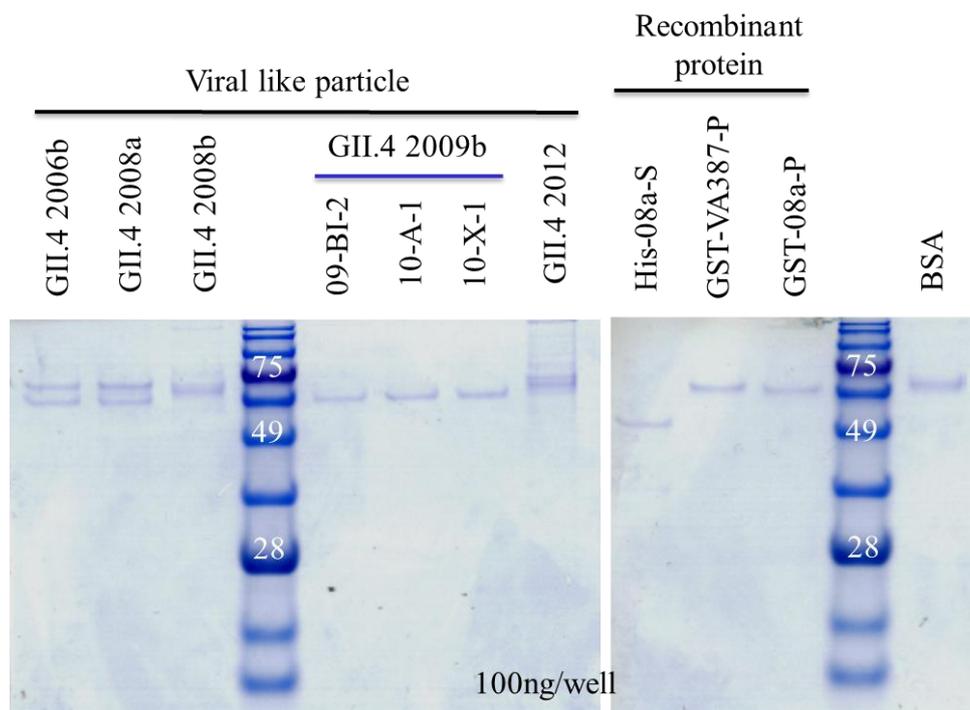
圖七、類病毒顆粒氯化鈯層析純化



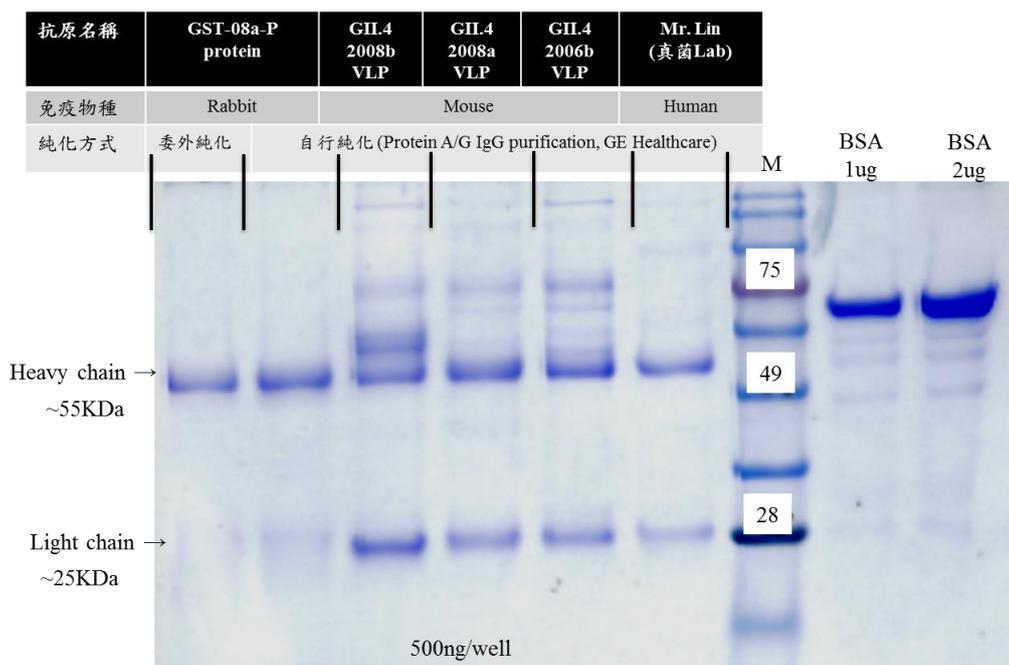
圖八、GST-08a-P protein 純化蛋白 SDS-PAGE 電泳分析圖



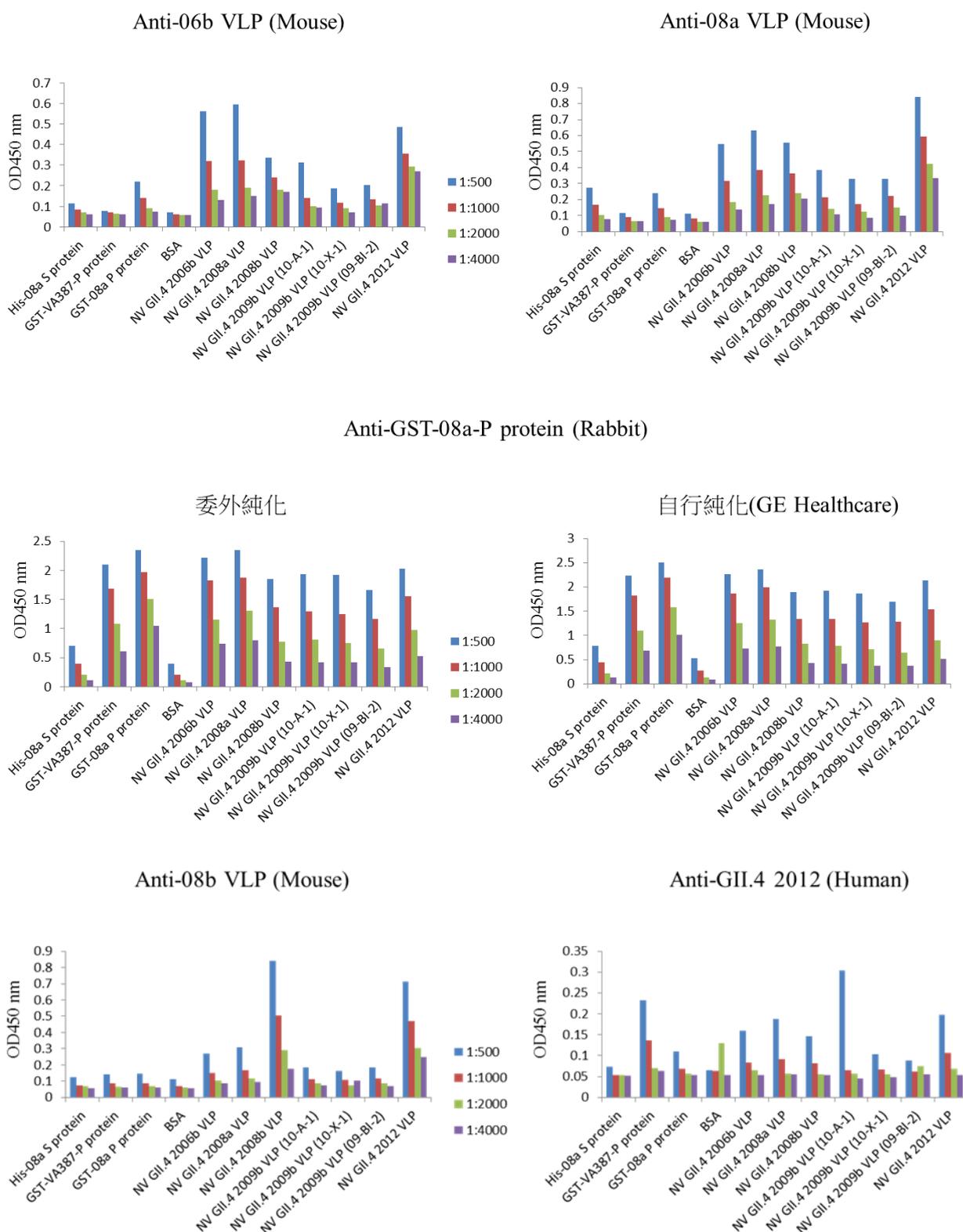
圖九、類病毒顆粒(Viral like particle)與重組蛋白之蛋白定量



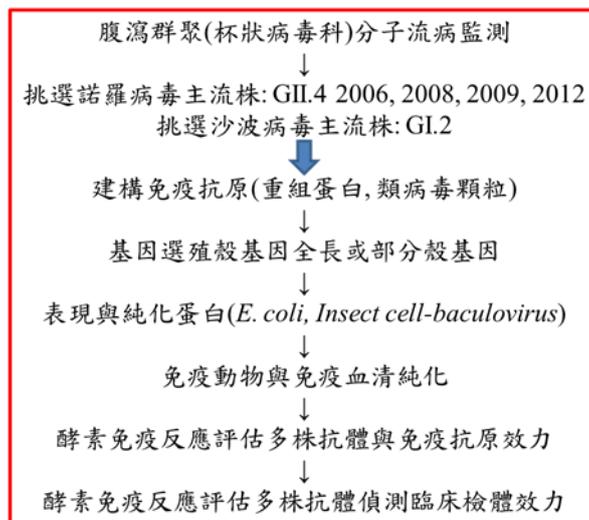
圖十、免疫血清之IgG 純化與定量



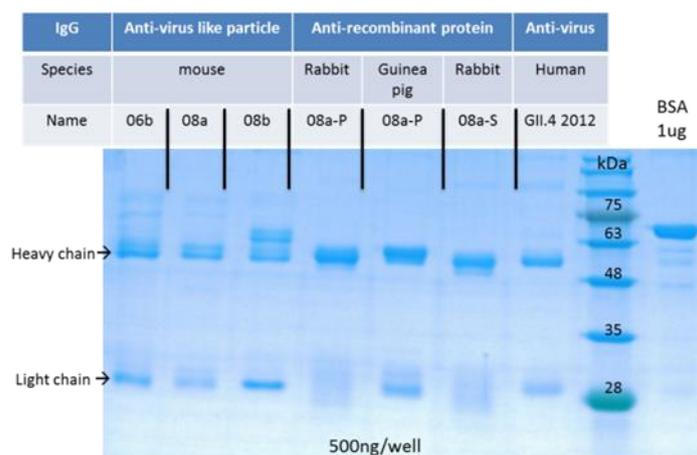
圖十一、多株抗體與抗原(類病毒顆粒(VLP)及重組蛋白)之交互作用結果



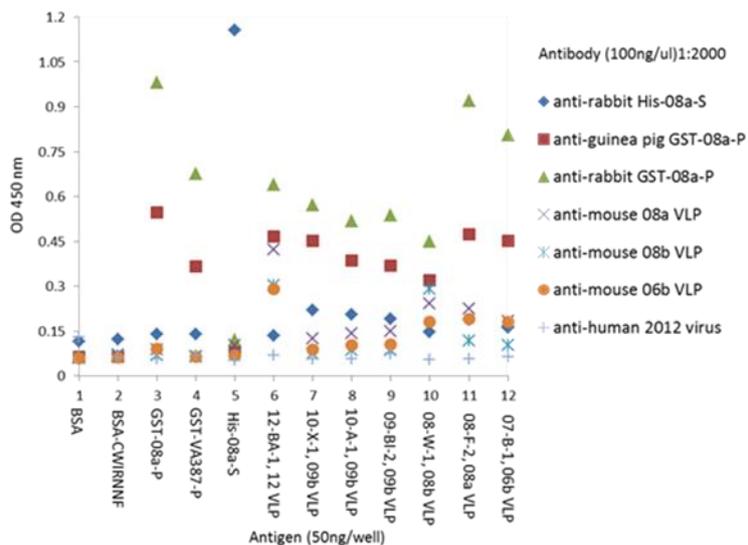
圖十二、腹瀉病毒快速篩檢方法之研發流程簡圖



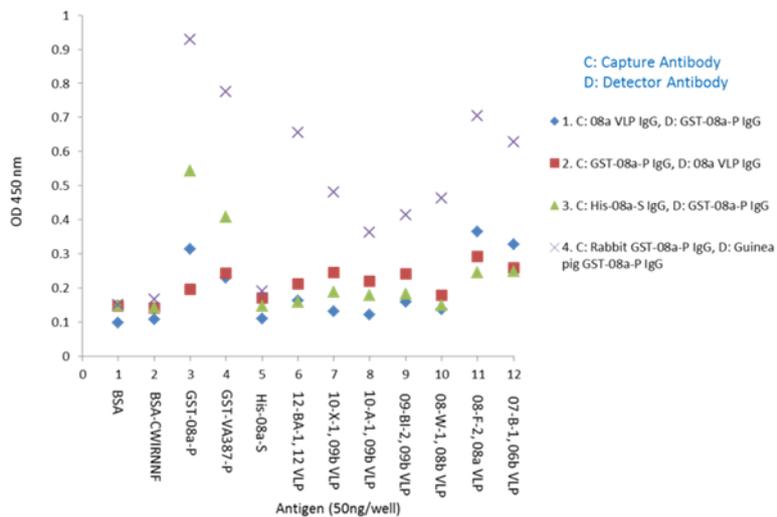
圖十三、免疫血清純化後 IgG 定量之蛋白電泳膠圖



圖十四、多株抗體與病毒抗原(重組蛋白或類病毒顆粒)之交互作用



圖十五、三明治酵素免疫法偵測病毒抗原(重組蛋白或類病毒顆粒)反應



表一、101-103 年 10 月間通報腹瀉群聚或食物中毒事件之病原檢測分析表

Pathogen	病毒		病毒+細菌		細菌		未知病原		Total
	群聚數								
	437	57.7%	50	6.6%	114	15.1%	156	20.6%	757
2012	203	67.0%	25	8.3%	31	10.2%	44	14.5%	303
2013	130	52.2%	11	4.4%	39	15.7%	69	27.7%	249
2014	104	50.7%	14	6.8%	44	21.5%	43	21.0%	205

表二、三明治酵素免疫法偵測臨床檢體

C: Capture D: Detector	市售諾羅病毒 EIA 套組	C: 08a VLP Ab D: GST-08a-P	C: GST-08a-P Ab D: 08a VLP Ab	C: His-08a-S Ab D: GST-08a-P	C: rabbit GST-08a-P D: guinea pig GST-08a-P
諾羅病毒敏感度	67%	54%	44%	64%	46%
諾羅病毒專一性	77%	55%	58%	68%	77%
杯狀病毒科敏感度	-	60%	50%	68%	46%
杯狀病毒科專一性	-	75%	75%	65%	85%

表三、各廠牌之諾羅病毒快篩套組檢測分析(參考 JCV, 56 (2013):194-198.)

Table 1
Sensitivity of RIDA®QUICK Norovirus, ImmunoCard STAT®I Norovirus, NOROTOP® and SD BIOLINE Norovirus tests for different norovirus genotypes in thawed stool samples.

Genotypes ^b	RIDA®QUICK Norovirus		ImmunoCard STAT®I Norovirus		NOROTOP®		SD BIOLINE Norovirus	
	No. of samples tested ^a	No. of samples positive by ICG (% sensitivity)	No. of samples tested ^a	No. of samples positive by ICG (% sensitivity)	No. of samples tested ^a	No. of samples positive by ICG (% sensitivity)	No. of samples tested ^a	No. of samples positive by ICG (% sensitivity)
GI.1	4	3 (75%)	4	2 (50%)	4	2 (50%)	8	3 (37%)
GI.2	7	0	5	0	5	1 (20%)	9	2 (22%)
GI.3	7	2 (28%)	5	3 (60%)	6	2 (33%)	11	3 (27%)
GI.4	11	0	7	3 (43%)	15	10 (67%)	20	5 (25%)
GI.5	8	2 (25%)	7	0	6	1 (17%)	4	0
GI.7	3	0	3	0	6	3 (50%)	8	0
GI.8	5	0	4	0	4	2 (50%)	4	0
GI.b/GI.6	6	1 (17%)	5	1 (20%)	5	5 (100%)	8	2 (25%)
GI.d/NA2	6	2 (33%)	7	3 (43%)	7	4 (57%)	6	2 (33%)
GI.e/n.a. ^c	1	0	1	1 (100%)	1	1 (100%)	1	1 (100%)
GI. n.a.	0	0	1	0	2	1 (50%)	2	1 (50%)
GI total	58	10 (17%)	49	13 (26%)	61	32 (52%)	81	19 (23%)
GII.1	2	0	1	0	0	0	2	0
GII.2	10	6 (60%)	6	1 (17%)	6	2 (33%)	6	1 (17%)
GII.3	7	6 (86%)	7	4 (57%)	7	5 (71%)	5	5 (100%)
GII.4	77	60 (78%)	54	32 (59%)	28	17 (61%)	33	22 (67%)
GII.5	1	0	1	0	1	0	1	0
GII.6	17	12 (70%)	9	4 (44%)	9	6 (67%)	12	7 (58%)
GII.7/GII.6	2	0	1	0	1	0	7	1 (14%)
GII.7	4	2 (50%)	4	0	4	3 (75%)	6	2 (33%)
GII.8	2	1 (50%)	2	0	2	2 (100%)	2	2 (100%)
GII.12/13	8	2 (25%)	8	1 (12%)	6	1 (17%)	6	4 (67%)
GII.17	1	1 (100%)	1	0	1	0	1	0
GII.b/GII.3	16	10 (62%)	13	4 (31%)	10	4 (40%)	12	6 (50%)
GII.g/GII.1	5	1 (20%)	5	1 (20%)	5	1 (20%)	7	2 (28%)
GIIg/GII.12	8	2 (25%)	14	1 (7%)	7	2 (28%)	8	6 (75%)
GII total	160	103 (64%)	126	49 (39%)	87	44 (50%)	108	59 (54%)
GI+GII total	218	113 (52%)	175	62 (35%)	148	76 (51%)	189	78 (41%)

^a The presence of norovirus in the samples tested for sensitivity was detected by RT-PCR and confirmed by real time RT-PCR if necessary.

^b The genotypes were characterized by partial viral genome sequencing of an RNA polymerase gene fragment and a capsid gene fragment. For recombinant strains, both genotypes determined in polymerase and in capsid were indicated (polymerase/capsid).

^c n.a. = not assigned.

