

計畫編號：DOH93-DC-2018

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究計畫

病毒性腹瀉症候群 Real Time RT- PCR 之發展及流行病學研究

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局研究檢驗組

計畫主持人：陳豪勇

研究人員：吳芳姿、王明琴、連怡佳

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

目 錄

封 面	頁 碼
摘要	3
壹、前言	5
貳、材料與方法	8
參、結果	19
肆、討論	22
伍、結論與建議	24
陸、參考文獻	25
柒、圖、表	29
表 一、RT-PCR 引子對序列表	29
表 二、Real-time RT-PCR 引子對序列表.....	30
表 三、臨床檢體分析結果陽性率.....	32
圖 一、 RT-PCR 反應結果	33
圖 二、定序後之序列送入 NCBI 做 Nucleotide-nucleotide BLAST 的結果	35
圖 三、Real Time RT-PCR 反應結果。	39
圖 四、合作醫院之腹瀉病毒流行狀況.....	42

摘要

關鍵詞：腹瀉症候群、病毒性腸胃炎、輪狀病毒、星狀病毒、腺病毒、

杯狀病毒

引起腸胃炎症狀的原因很多，致病感染原包含細菌、寄生蟲及病毒等，在工業化國家，病毒是主要的感染原，如歐洲及美國每年病毒性引起之腸胃炎約佔 60 % 及 80 % (1,2) 能引起腸胃炎的病毒主要為輪狀病毒(*Rotavirus A*)，星狀病毒 (*Astrovirus*)，腺病毒 (adenovirus) 第 40、41 型，杯狀病毒之 *Sapovirus* (即原先之 Sapo-like virus) 及 *Norovirus* (即原先之 Norwalk-like virus)，其他如冠狀病毒 (Coronavirus)、A 型肝炎病毒 (Hepatitis A virus)、E 型肝炎病毒 Hepatitis E virus 及 Aichivirus 等也會有相似的症狀。主要的臨床症狀為水瀉及嘔吐，感染發病之病患多數都能自癒，但對於嬰幼兒及無法自我照護者，會因脫水而病情加重；傳染途徑多經由水或食物傳染。

病毒檢查鑑定方式不外乎：以電子顯微鏡 (EM) 方式直接觀察檢體中之病毒顆粒；以 ELISA 或 Latex 方式檢測病毒性蛋白；以 Probe 或 PCR 方式檢測病毒性基因；或以特定細胞培養病毒。觀察是否為病毒性腸胃炎需檢驗病患糞便檢體，無法以血清學方式檢測。因此，傳統方式藉由電子顯微鏡下觀察糞便懸浮液中是否存在病毒來鑑定，但受限於病毒的濃度需達

$10^{5-6}/g$ 糞便檢體 以上才能驗出，靈敏度不高且耗費人力（3）；目前對於 rotavirus、astrovirus、adenovirus 第 40、41 型及 Norovirus 已可用 ELISA 方式檢測，此外，rotavirus、astrovirus、Sapovirus 亦可以 RT-PCR 方式檢測病毒之核酸，靈敏度可達 $10^{1-3}/g$ 糞便檢體。惟 Norovirus 病毒之基因變異性較高，要建立單一種核酸檢測方式較為困難；細胞培養病毒之靈敏度最好（ $10^1/g$ 糞便檢體），但食因性腸胃炎病毒不容易在細胞中生長。

在台灣，對於引起腸胃炎之病毒，目前並未有完整的研究。本局自 91 年起開始接受急性腹瀉性症候群通報，檢驗項目包括病毒性感染源 Rotavirus、Norovirus、Adenovirus 第 40 及 41 型、Astrovirus，細菌性之 *Campylobacter jejuni*、*Clostridium diffici*、*Salmonella*、*Shigella*、*Cholera* 及 *E. coli* O157 等，檢出陽性率約佔 23 %；由於此類致病病毒感染量低，經由水或食物傳染，很容易在人口密集之托嬰中心、看護中心等公共場所造成群聚性感染，因此，需要建立靈敏度高及快速簡便之的檢測方式，一方面可以容易發現陽性病患並且可以防範疫情再度擴散。因此本研究計劃第一部份之研究重點，將發展以靈敏度高且快速之 Real time RT-PCR 建立病毒性腹瀉症候群檢測方法。另一方面，廣泛收集台灣地區歷年及各地之腹瀉症狀檢體，以建立之 Real time RT-PCR 方法，分析本土地區各病毒性腹瀉症候群之年齡、季節分布及流行趨勢。

壹、前言

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題，引起腸胃炎的病毒主要為輪狀病毒 (*Rotavirus A*)，星狀病毒 (*Astrovirus*)，腺病毒 (adenovirus) 第 40、41 型，杯狀病毒之 *Sapovirus* (即原先之 Sapo-like virus) 及 *Norovirus* (即原先之 Norwalk-like virus)。在美國流行病學調查中，輪狀病毒及星狀病毒多發生於較冷的月份約 10 月至隔年 4 月，腺病毒全年發生率無多大差異。年齡分布：輪狀病毒易感染嬰兒及小於 5 歲之幼兒；星狀病毒及腺病毒主要感染幼童，但成人及較大之孩童也可能感染；*Norovirus* 對成人及較大之孩童感染率較高。本局曾對 2001 年 4 月至 2002 年 10 月間，至醫院就診之腹瀉孩童，作輪狀病毒之流行病學調查，結果顯示，於 10 歲以下之孩童感染率較高，並且在 1-2 月間為一高峰期。臺大醫院李君男教授對於急性腸胃炎中輪狀病毒研究分析結果，在 2002 年以前 G9 型輪狀病毒約佔 6 成，2003 年起病毒流行型別有轉變跡象，G9 型輪狀病毒僅佔 2 成，G1、2 型輪狀病毒約各佔 2 成，G3 型輪狀病毒約佔 4 成。

輪狀病毒為雙股 RNA 病毒，具有 11 個基因片段，不具外蛋白套膜，約有 6 種以上血清型，感染人類主要為 A 血清型。輪狀病毒不容易以細胞培養病毒，因此不易分離 (Martin et al., 1987)。檢測方式包括：糞便檢體之電子顯微鏡檢驗 (EM)、酶連免疫反應 (ELISA) 及乳膠凝集法 (Latex

agglutination) (Kapikian and Chanock, 1990) , 或以分子生物學方式如 RT-PCR、核酸雜交法 (Probe hybridization) 檢測病毒核酸基因 (Gouvea et al., 1990) , 以 RNA-PAGE 方式可以應用於流行病學分析 (Herring et al., 1982) 。

星狀病毒屬於 *Astroviridae* , 小 (28nm) 圓型、單股 + RNA 病毒 , 以其電顯觀察下星狀外型命名 (Madeley , 1990 ; Carter , 1994) 。病毒引起的腸胃炎潛伏期約 3~4 天 , 症狀持續約 2~3 天 , 在免疫力差或免疫不全之病患症狀可持續至 12 天左右。其感染多發生於醫院、社區、家庭中或成人活動密集場所 , 在日本就曾發生大型的群聚性感染 (Utagawa et al., 1994 ; Oishi et al., 1994) 傳統以電子顯微鏡檢驗 , 但約只有 10 % 會表現典型星狀外觀 , 並且病毒顆粒極小 , 因此容易產生偽陰性結果 (Willcocks et al., 1992) 而低估感染情形 ; 目前檢測方法有 dot blot hybridization、PCR、EIA (Willcocks et al., 1991 ; Jonassen et al., 1993 ; Herrman et al., 1990) 。

Norovirus , 屬於 *Caliciviridae* 單股 RNA 病毒 (Jiang et al., 1990) 具有三種基因型 , 其中第一、二型會感染人 (Ando et al., 2000) 。大型群聚性感染通常發生於醫院、學校及居家附近 , 目前多數感染源多為飲水或食物受污染 , 特別是貝殼類食物 , 並且多在冬天季節發病。傳統以電子顯微鏡檢驗 , 目前也有發展 EIA , 但由於病毒基因及抗原變化性大 (Nakata et al.,

1998), 因此試劑的專一性效果並不好, 至於流行病學調查, 多使用 RT-PCR 方式 (Wolfaardt et al., 1997)。

在台灣, 對於引起腸胃炎之病毒, 除輪狀病毒有較詳細研究外, 目前並未有完整的研究。在本局急性腹瀉症候群通報中檢出病源體機率亦相當低, 因此, 為了解完整的腹瀉病因及台灣地區之流行情形, 需將有關之致病原研究分析, 並發展有效的檢測方法。

貳、材料與方法

一、檢體來源：

1. 新感染症症候群監視通報系統：區域級以上醫院及志願參加之地區級醫院。
2. 定點醫師通報系統：志願參加之診所。
3. 合作醫院：於北、中、南分別各找一家合作醫院，如林口長庚醫院、彰化基督教醫院和高雄長庚醫院，收集腹瀉孩童糞便檢體。

二、檢體收集定義：過去為健康個人，出現急性腹瀉之 10 歲以下孩童為主。

三、檢體處理：腹瀉病毒檢驗通常必須採用新鮮糞便檢體，以低溫保存從採件處運送至實驗室。處理情形如下：將糞便檢體與 PBS 以 1:10 (w/v, v/v) 混合均勻，以無菌吸管吸取至已滅菌之離心管中，於 4℃，3000×g 離心 15 分鐘，收集上清液分裝至 2 隻冷凍小管中，標示號碼及日期保存於 -70℃。

四、酵素免疫分析法：

諾瓦克病毒分析：使用 -biopharm 生產的 RIDACSCREEN® Norwalk-like Virus 檢測 Norovirus。分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μL

置於 RIDACSCREEN[®] Norwalk-like Virus 的微小孔(microwell)中，靜置在室溫中 1 小時後，用清洗液清洗 5 次，將微小孔中水分拍乾，再加入 2 滴 Enzyme conjugate 於室溫中靜置 30 分鐘反應後，再用清洗液清洗 5 次，拍乾微小孔中水分，之後加入 2 滴 Substrate/Chromogen 於室溫避光靜置 15 分鐘，再加 1 滴 stop solution。經由 ELISA reader (μ Quant)測 450 nm 的吸光值判讀結果。判讀結果：吸光值大於 Cut-off 值(negative control 吸光值加上 0.15)，判定為陽性反應。

輪狀病毒分析：使用 -biopharm 生產的 RIDACSCREEN[®] Rotavirus 檢測，分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μ L 置於 RIDACSCREEN[®] Rotavirus 的微小孔(microwell)中，並加入 2 滴 Enzyme Conjugate，於室溫中靜置反應 60 分鐘後，去除混合反應液再用清洗液 300 μ L 清洗 5 次，拍乾微小孔中水分，之後加入 2 滴 Substrate/Chromogen 室溫避光靜置 15 分鐘，再加 1 滴 stop solution。經由 ELISA reader (μ Quant)測 450 nm 的吸光值判讀結果。判讀結果：吸光值大於 Cut-off 值(negative control 吸光值加上 0.15)，判定為陽性反應。

星狀病毒分析：使用 -biopharm 生產的 RIDACSCREEN[®] Astrovirus 檢測，分別取處理過之糞便檢體上清液 100 μ L 置於 RIDACSCREEN[®] Astrovirus 的微小孔(microwell)中，並加入 2 滴 Enzyme Conjugate，於室溫

中靜置反應 60 分鐘後，去除混合反應液再用清洗液 300 μ L 清洗 5 次，拍乾微小孔中水分，之後加入 2 滴 Substrate/Chromogen 室溫避光靜置 15 分鐘，再加 1 滴 stop solution。經由 ELISA reader (μ Quant)測 450 nm 的吸光值判讀結果。判讀結果：吸光值大於 Cut-off 值(negative control 吸光值加上 0.15)，判定為陽性反應。

五、RNA 的萃取：

使用 Roche 生產的 MagNA Pure LC DNA isolation kit 萃取純化病毒 RNA。取處理過的糞便上清液 250 μ L 加入 20 μ L 的 proteinase K，將其混合液經由 MagNA Pure LC 自動核酸化機器萃取出 RNA，保存於-70 。

六、反應標準模板之建立：

1. 諾瓦克病毒

由於諾瓦克病毒目前尚無法以細胞培養方式分離，因此至目前為止尚無法取得標準病毒株，為配合 RT-PCR 陽性對照組實驗需求，將陽性檢體經由 RT-PCR 所產生的核酸片段(MON 及 genotype G2)，經由 T4 DNA ligase 接到 pGEM®-T Easy Vector 合成 NoroMON 質體及 NoroG2 質體，再分別轉染至大腸桿菌 JM 109 勝任細胞中，大量繁殖後冷凍保存。另一段將 genotype G1 之 RT-PCR 反應對應基因區段以人工合成 oligomer，兩端酵素切點設計

為為 *EcoRI* 及 *BamHI* , 以 T4 ligase 接到 pUC19 載體合成 03Q401CDC1 質體 , 再轉染至大腸桿菌 DH5 勝任細胞中 , 大量繁殖後冷凍保存。

為配合諾瓦克病毒 real-time RT-PCR 陽性對照組實驗需求 , 將陽性檢體經由 real-time RT-PCR 所產生的核酸片段 , 經由 T4 DNA ligase 接到 pGEM®-T Easy Vector 合成 NoroRTRING2 質體 , 再分別轉染至大腸桿菌 JM 109 勝任細胞中 , 大量繁殖後冷凍保存。

2. 輪狀病毒

配合輪狀病毒 real-time RT-PCR 陽性對照組實驗需求 , 將陽性檢體經由 RT-PCR 所產生的核酸片段 , 經由 T4 DNA ligase 接到 pGEM®-T Easy Vector 合成 RotaRTNVP3 質體 , 再分別轉染至大腸桿菌 JM 109 勝任細胞中 , 大量繁殖後冷凍保存。

3. 星狀病毒

配合星狀病毒 RT-PCR 陽性對照組實驗需求 , 將 RT-PCR 所產生的核酸片段 , 經由 T4 DNA ligase 接到 pGEM®-T Easy Vector 合成 AstroMON289 質體 , 再分別轉染至大腸桿菌 JM 109 勝任細胞中 , 大量繁殖後冷凍保存。

七、RT-PCR 反應引子設計及反應分析：

諾瓦克病毒分析：諾瓦克病毒基因變異性較大，在挑選引子對時必須考慮基因序列穩定性，引子對 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434，是以 RNA dependent RNA polymerase 和核蛋白 N 端基因序列交界區間設計，此區為高穩度區間 (CDC design)。另外，利用此區間設計的引子 SR33、SR46、SR48、SR50 及 SR52 (如表一)，為配合病毒高變異性，並且找出各種基因型別之諾瓦克病毒，設計以 SR33 為 forward 引子，SR46、SR48、SR50 為 G1 型之 Reverse 引子，SR52 為 G2 型之 Reverse 引子，可以分別與 G1 或 G2 反應，得到反應產物 123bp (2)。實驗設計先以 Mon 引子對檢測諾瓦克病毒，再以 SR 引子對區分 G1、G2 型別。

輪狀病毒分析：輪狀病毒之 VP6 為主要的內核結構性蛋白，為群專一性蛋白質，可將輪狀病毒區分成 A~E 共五群，其中 A、B、C 三群感染人類，而 A 群又是最常見之一，因此引子選用輪狀病毒 Group A VP6 基因片段設計，分別為 con1 及 con2 (如表一)，反應產物為 201bp (2)。

星狀病毒分析：星狀病毒之 ORF 1a 為基因低變異區域，在 protease 基因上游，實驗設計以此 ORF 1a 基因片段設計病毒引子，分別為 Mon340 及 Mon348 (如表一)，反應產物為 289 bp (2)。

(一) 諾瓦克病毒 RT-PCR 作用條件：

1. SR/RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，分別作 G1 (引子 SR33、

SR48、SR50、SR52) 及 G2 (引子 SR33、SR46) 反應，各引子最終反應濃度為 $0.3 \mu\text{M}$ ，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-PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP 、 5 U M-MuLV 反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase)、 $2.5 \text{ U Taq DNA Polymerase}$ 、 40 U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl 、 75 mM KCl 、 3 mM MgCl_2 、 $10 \text{ mM dithiothreitol}$ ，反應總體積為 $50 \mu\text{L}$ 。於 42°C 60 分鐘作反轉錄作用，之後 94°C 作用 3 分鐘，直接進行 PCR 40 循環： 94°C 1 分鐘， 52°C 1 分 30 秒， 60°C 2 分鐘，隨後 72°C 加長作用 7 分鐘。如圖一 a。

2. Mon/RT-PCR：病毒 RNA 萃取液 $5 \mu\text{L}$ 為模板，分別加入引子 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434 做反應，各引子最終反應濃度為 $0.6 \mu\text{M}$ ，再加入 RT-PCR 混合液，內含 0.625 mM dNTP 、 5 U M-MuLV 反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase)、 $2.5 \text{ U Taq DNA Polymerase}$ 、 40 U RNase 抑制劑及反應緩衝溶液含 50 mM Tris-HCl 、 75 mM KCl 、 3 mM MgCl_2 、 $10 \text{ mM dithiothreitol}$ ，反應總體積為 $50 \mu\text{L}$ 。於 42°C 15 分鐘作反轉錄作用，隨後 94°C 作用 3 分鐘，直接進行 PCR 40 循環： 94°C 30 秒， 52°C 1 分 30 秒， 60°C 30 秒，之後 72°C 加長作用 7 分鐘。如圖一 b。

諾瓦克病毒 RT-PCR 反應產物取 $10 \mu\text{L}$ 於以 $1\times$ Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2 % SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular

Application), 以 100 伏特電泳跑膠, 進行產物大小分析。

(二) 輪狀病毒分析 RT-PCR 作用條件:

取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板, 加入引子混合液於 97 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後, 馬上將反應管置於冰上; 再加入 RT-PCR 混合液, 內含 0.625 mM dNTP、5U 反轉錄酵素 (Reverse Transcriptase) 2.5U Taq DNA Polymerase、20U RNase 抑制劑及緩衝溶液, 反應總體積為 50 μ L, 於 42 $^{\circ}$ C 反轉錄作用 30 分鐘 隨後取出反轉錄作用產物加入 PCR 混合液, 內含 0.625 mM dNTP、反應引子 con1 及 con2 分別 0.4 μ M 5U Taq DNA Polymerase 20U RNase 抑制劑及緩衝溶液, 於 94 $^{\circ}$ C 作用 3 分鐘後, 進行 PCR 40 循環: 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 42 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分鐘, 之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

反應產物取 10 μ L 於以 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2 % SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular Application), 以 100 伏特電泳跑膠, 進行產物大小分析。如圖一 c。

(三) 星狀病毒分析 RT-PCR 作用條件:

1. step 1: 取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板, 加入引子混合液, 內含 3 μ g Random primer、1.6 mM dNTP, 於 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後, 馬上將反應管至於冰上; 再加入混合液, 內含緩衝溶液及 20U RNase 抑制劑

(Invitrogen), 於 25 °C 作用 2 分鐘後, 立即將反應管至於冰上; 再加入 200U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 於 25 °C 作用 10 分鐘, 42 °C 作用 50 分鐘, 最後於 70 °C 作用 15 分鐘。

2. step 2: 取已製備完成的病毒 cDNA 5 μ L 為模板, 加入 PCR 混合液, 內含 0.625 mM dNTP、反應引子 Mon340 及 Mon348 分別 0.6 μ M、5U Taq DNA Polymerase 及緩衝溶液, 進行 PCR 30 循環: 94 °C 30 秒, 50 °C 30 秒, 72 °C 30 秒, 之後 72 °C 加長作用 5 分鐘。如圖一 d。

八、序列分析:

使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列分析, 反應條件如下: 取適量 RT-PCR 反應產物 1 μ M 反應引子 SR33、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液, 最後總體積為 10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於 96 °C 作用 1 分鐘, 之後反應條件為 96 °C 10 秒、50 °C 5 秒、60 °C 4 分鐘, 共 25 次循環。

反應產物純化: 為減少反應混合物中游離標記物之干擾, 先將定序反應後之產物純化。將定序反應產物 10 μ L 加入等體積的 ddH₂O、60 μ L 的絕對酒精、5 μ L 的 125 mM EDTA, 於室溫下靜置 15 分鐘, 再以 4000 rpm 離心 30 分鐘; 去除上清液後, 以 70 % 酒精清洗, 4000 rpm 離心 5 分鐘, 最後將沉澱物烘乾, 再加入 10 μ L Hi-diformamide。

基因定序反應：將純化後產物置於 96 作用 2 分鐘後，馬上置於冰上，再放入 ABI 3730 自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autoseqencer) 進行核酸序列分析。

九、病毒基因庫分析比對：將定序後之鹼基序列與 NCBI 基因資料庫中已知之基因序列進行比對分析，以確定其相關性。如圖二。

十、Real Time RT-PCR 反應引子設計及反應分析：

(一) 諾瓦克病毒分析：諾瓦克病毒基因於 RNA dependent RNA polymerase 區域至核蛋白 N 端區間具極高穩定性，G1 型於病毒核酸序列 4754 至 4876 間之 123 bp，而 G2 型依 Similarity Plot 分析 (13) 於病毒核酸序列 4988 至 5108 間之 120bp。

Real-time RT-PCR 反應條件分成兩管作 G1 或 G2 反應，取 5 μ L 病毒 RNA 抽取液為模板，混合液內含 5 μ L 5 \times TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems)，3mM Mn(OAc)₂，dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300nM，2.5U rTth DNA Polymerase，0.25U AmpErase UNG，再分別加入 G1 引子 300 μ M SR33、SR48、SR50、SR52 及 TaqMan 探針 200 nM NoroG1D7(如表二)，或 G2 引子 400nM COG2F、COG2R 及 TaqMan 探針 200nM RING2(如表二)進行 Real Time RT-PCR。反應程序為：50 2min，60 30min，95 denature

5min, 之後進入 45 個循環: 94 20sec, 56 1min, 結果由 ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems)偵測分析。結果如圖三 a1 及 a2。

(二) 輪狀病毒分析: 引子設計選擇 A 群輪狀病毒非結構性蛋白 NSP3 基因片段中核酸序列高穩定區, 反應產物 87bp。

Real-time RT-PCR 為單步驟反應, 反應總體積 25 μ L, 加入 5 μ L 病毒 RNA 抽取液, 及混合液內含 5 μ L 5 \times TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems), 3mM Mn(OAc)₂, dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300 μ M, 2.5U rTth DNA Polymerase, 0.25U AmpErase UNG, 引子為 200nM 的 NVP3-F、NVP3-R(如表二), 及探針 150nM。反應程序為: 50 2min, 60 30min, 95 denature 5min, 之後進入 45 個循環: 94 20sec, 60 1min。結果由 ABI Prism 7000 sequence detector (Applied Biosystems)偵測分析。結果如圖三 b。

(三) 星狀病毒分析: Real-time RT-PCR 反應條件分成兩階段, (1) 反轉錄(reverse transcription)反應: 取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板, 加入引子混合液, 內含 3 μ g Random primer, 1.6 mM dNTP, 於 65 作用 5 分鐘後, 馬上將反應管至於冰上; 再加入混合液, 內含緩衝溶液及 20U RNase 抑制劑 (Invitrogen), 於 25 作用 2 分鐘後, 立即將反應管至於冰上; 再加入 200U SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), 於 25 作用 10 分鐘

後，再於 42 °C 作用 50 分鐘後，最後於 70 °C 作用 15 分鐘，保存於 -20 °C。(2)

Real-time PCR 反應：反應總體積 20 μ L；取已製備完成之病毒 cDNA 5 μ L 為模板，加入混合液，內含 4 μ L LightCycler RT-PCR Reaction Mix SYBR Green I、6mM $MgCl_2$ 、引子均為 0.5 mM、0.4 μ L LightCycler RT-PCR Enzyme Mix。反應程序為：(Denature) 90 °C 30 秒，之後進入 40 個循環 (Amplification) 95 °C 5 秒，50 °C 5 秒，72 °C 12 秒，80 °C 0 秒，於 80 °C 時進行單點的螢光偵測；於 40 個循環結束後，緊接著測 Melting curve，反應程序為：95 °C 0 秒，65 °C 45 秒，95 °C 0 秒，於 95 °C 時進行持續的螢光偵測；(Cooling) 40 °C 60 秒；結果由 LightCycler 1.0 (Roche) 偵測分析。結果如圖三 c。

十一、輪狀病毒株細胞培養分離：

經 PCR 確認陽性之糞便檢體，與 1xPBS 以 1:10 (w/v, v/v) 混合均勻，於 4 °C，3000xg 離心 15 分鐘，收集上清液，加入含 10 μ g/ml trypsin-tpck (Sigma) 之 DMEM 於 37 °C 處理 20min 後，感染 MA104 細胞，於含 5% CO₂ 培養箱 37 °C 吸附 90min 後，抽棄之，再以含 3 μ g/ml trypsin-tpck 之 DMEM 培養三天後，再繼代培養三次以上，取出置於 -70 °C 分裝備用。

參、結果

自 92 年 9 月至 93 年 12 月底止，共收集糞便檢體—定點醫師 67 件、腹瀉症候群 271 件、主動監視 129 件、合作醫院 850 件，分別以酵素免疫法及 RT-PCR 分析，實驗中所使用之核酸引子對序列如表一、表二。檢體反應陽性率如表三，本實驗以引起急性病毒性腸胃炎最主要之致病源作檢測分析，分別為輪狀病毒、諾瓦克病毒及星狀病毒。以 RT-PCR 分析結果，輪狀病毒、諾瓦克病毒及星狀病毒之陽性率，分別為 27.08 %、13.65 % 及 0.49 %，以 ELISA 檢測試劑檢驗結果分別為 24.25 %、16.97 % 及 3.21 %；總陽性率為 41.22 % 及 44.63 %。輪狀病毒感染，在定點醫師通報檢體中陽性率佔約 5 成，而主動監測系統收集之檢體，最低僅 12.90 %；諾瓦克病毒感染，以腹瀉症候群通報收集之檢體陽性率較高 26.17 %；星狀病毒僅在合作醫院收集到檢體中檢測出 4 件陽性檢體。

在傳統檢測腹瀉病毒性腸胃炎，由於除了輪狀病毒外無法以細胞培養方式分離病毒進行病毒檢測，因此許多實驗室多以酵素免疫分析法分析檢驗，但試劑有價格偏高又無法同時分析三種病毒，所需檢體量較多之缺點，因此考慮到急性腹瀉腸胃炎多發生於 5 歲以下孩童，而且以嬰幼兒偏多，糞便檢體採集不易，所以必須發展核酸分析系統，以達到快速檢驗三種病毒之目的。本實驗室在本計畫中以 RT-PCR 進而升級至 Real Time PCR 建立

此檢驗架構。

在 RT-PCR 引子的選取考量方面如下：

(一) 諾瓦克病毒分析：諾瓦克病毒基因變異性較大，在挑選引子對時必須考慮基因序列穩定性，引子對 Mon431、Mon432、Mon433 及 Mon434，是以 RNA dependent RNA polymerase 和核蛋白 N 端基因序列交界區間設計，此區為高穩度區間 (CDC design)。另外，利用此區間設計的引子 SR33、SR46、SR48、SR50 及 SR52 (如表一)，為配合病毒高變異性，並且找出各種基因型別之諾瓦克病毒，設計以 SR33 為 forward 引子，SR46、SR48、SR50 為 G1 型之 Reverse 引子，SR52 為 G2 型之 Reverse 引子，可以分別與 G1 或 G2 反應，得到反應產物 123bp (2)。實驗設計先以 Mon 引子對檢測諾瓦克病毒，再以 SR 引子對區分 G1、G2 型別。

(二) 輪狀病毒分析：輪狀病毒之 VP6 為主要的內核結構性蛋白，為群專一性蛋白質，可將輪狀病毒區分成 A~E 共五群，其中 A、B、C 三群感染人類，而 A 群又是最常見之一，因此引子選用輪狀病毒 Group A VP6 基因片段設計，分別為 con1 及 con2 (如表一)，反應產物為 201bp (2)。

(三) 星狀病毒分析：星狀病毒之 ORF 1a 為基因低變異區域，在 protease 基因上游，實驗設計以此 ORF 1a 基因片段設計病毒引子，分別為 Mon340 及 Mon348 (如表一)，反應產物為 289 bp (2)。

將 RT-PCR 及 Real Time PCR 反應片段經序列分析無誤後，製備成標準病毒載子模板，進行靈敏度分析。常見之諾瓦克病毒主要為 G1 及 G2 型別其靈敏度測試結果如圖三 a1、a2，G1 型別可達 1.5×10^2 copy no/ μ L 及 G2 型別可達 3.24×10^2 copy no/ μ L；輪狀病毒靈敏度測試結果如圖三 b，274 copy/mL，星狀病毒靈敏度測試結果如圖三 c，12.25 copy/mL。

以建立條件之 RT-PCR 進行臨床收集檢體分析，如圖一 a、b 為檢測諾瓦克病毒陽性檢體結果，圖一 c、為輪狀病毒陽性檢體結果，圖一 d、為星狀病毒陽性檢體結果。臨床檢體 RT-PCR 產物，經由定序分析後，將完成之序列送入 NCBI 與已知之病毒序列作比較，結果如圖二。

將 93 年 3 月至 93 年 11 月間，自合作醫院收集到之糞便檢體分析結果，依月份分析病毒感染之流行概況顯示(圖四)，輪狀病毒在 3 月為一高峰期，並隨月份增加天氣變熱後逐步遞減，在 10 月後並有增加之趨勢，但因未完成一整年之收集，必須至下一年度才可看出完整概況。諾瓦克病毒流行情形在 9 月至 10 月間有感染率提高的趨勢，但至 10 月後又逐步下降。星狀病毒感染流行情形似乎與月份及天氣較無相關性，但在台灣地區由於陽性個案數太低，仍無法確切評斷。

肆、討論

在本研究的結果中顯示，台灣地區病毒性腹瀉腸胃炎主要感染原以輪狀病毒為主，其次為諾瓦克病毒，輪狀病毒性感染陽性率 27.08%，諾瓦克病毒感染陽性率 13.65%。在四種糞便檢體收集管道中，輪狀病毒性感染陽性率在定點醫師送驗檢體中佔 51.56%，其次為合作醫院收集之檢體 29.65%，推測定點醫師送驗之檢體陽性率高的主要原因，為診所門診之幼童比率較高，而文獻中也指出各國統計資料中輪狀病毒感染以 5 歲以下孩童為主，尤其是嬰幼兒；另外，合作醫院為教學醫院，其採集腹瀉糞便檢體之對象為 10 歲以下孩童，年齡層散佈較均勻，因此輪狀病毒檢出陽性率為 3 成，此數據與其他國家之統計數相近似。諾瓦克病毒的感染模式多為群聚性感染，因此自我們收集之檢體中可以發現，以腹瀉症候群通報收集的管道中陽性率較高，可見感染較無年齡層限制。在此批檢體中，由於星狀病毒陽性僅佔 4 件，感染陽性率僅 0.49%，無法推測其感染流行情形。

將 93 年 3 月至 93 年 11 月間，自合作醫院收集到之糞便檢體分析結果，依月份分析病毒感染之流行概況顯示(圖四)，輪狀病毒在 3 月為一高峰期，並隨月份增加天氣變熱後逐步遞減，在 10 月後並有增加之趨勢，但因未完成一整年之收集，必須至下一年度才可看出完整概況。諾瓦克病毒流行情形在 9 月至 10 月間有感染率提高的趨勢，但至 10 月後又逐步下降。星狀

病毒感染流行情形似乎與月份及天氣較無相關性，但在台灣地區由於陽性個案數太低，仍無法確切評斷。因此，完整流行概況必須配合第二年度結果再做詳細討論。

在檢測方法中，我們選定市售之 EIA 檢測試劑與實驗室建立之 RT-PCR 及 Real Time PCR 比較，輪狀病毒、諾瓦克病毒及星狀病毒之專一性。因檢測試劑選擇檢驗之病毒性抗原與 RT-PCR 或 Real Time PCR 基因片段為不同區間，而諾瓦克病毒基因具有高度變異性，在檢驗陽性率上會有差異，但原則上差異不大，惟星狀病毒檢測試劑反應不太穩度，因此實驗室以建立之標準模板作專一性及靈敏度（序列稀釋、二重複）測試後（圖三 d），由反應產物溫度 T_m 值均落在同一點可見專一性佳，並且靈敏度達 12.25 copy/mL，因此星狀病毒臨床檢體檢驗以 RT-PCR 為判定標準。

伍、結論與建議

目前台灣地區病毒性腸胃炎，主要感染原為輪狀病毒，其次為諾瓦克病毒。輪狀病毒感染多發生於較冷的月份，及門診之嬰幼童，而諾瓦克病毒交無明顯之差異，但由於本次收集之臨床檢體尚未整年，必須至下一年度完成後再做完整評估，並且繼續分型分析後，將可提供疫苗政策參考。

陸、參考文獻

1. Allard A, Kajon A, Wadell G : Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1994 ; 44 : 250-257.
2. Ando, T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI : Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 64-71.
3. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL : Genetic classification of “Norwalk-like viruses”. *J Infect Dis* 2000 ; 181(suppl 2) : S336-48.
4. Atmar RL, Estes MK : Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 2001 ; 14 : 15-37.
5. Ben AL, Mark HR, Yvonne VD, Francois-Xavier H, David B, Marion K : Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003 ; 9 : 90-96.
6. Carter MJ : Genomic organisation and expression of astroviruses and caliciviruses. *Arch Virol* 1994 ; 9(suppl) : 429-439.
7. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, Wannet WJ, Vinje J, van Leusden F : Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001 ; 154 : 666-74.

8. Gouvea V, Glass RI, Wood P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 276-282.
9. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD : Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982 ; 16 : 473-477.
10. Herrman JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR : Diagnosis of Astrovirus Gastroenteritis by Antigen Detection with Monoclonal Antibodies. *J Infect Dis* 1990 ; 161 : 226-229.
11. Jiang X, DY Graham, K Wang, MK Estes : Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990 ; 250 : 1580-1583.
12. Jonassen TO, Kjeldsberg E, Grinde B : Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993 ; 44 : 83-88.
13. Kapikian AZ, Chanock RM : Rotaviruses. In: Fields, B. N. Knipe D.M. (Eds.), *Virology*, Second ed. Raven Press, New York, pp. 1990 ; 1353-1404.
14. Martin AL, Follet AC : An assessment of the sensitivity of three methods for the detection of rotavirus. *J Virol Meth* 1987 ; 16 : 39-44.
15. Madeley CR : Viruses associated with Acute Diarrhoeal Disease. In *Principles and Practices of Clinical Virology*. (eds A.J. Zuckerman et al).

John Wiley and Sons Ltd., 1990 : 188-189.

16. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C : Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999 ; 121 : 139-49.
17. Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukei PM, Chiba S : Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 3160-3163.
18. Nassar BG Rasool, Stephan SM, Roger IG : Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. *J Virol Meth* 2002 ; 100 : 1-16.
19. Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, Inouye S, Grohmann GS, Monroe SS, Stine SE, Carcamo C, Ando T, Glass RI : A large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan. *J Inf Dis* 1994 ; 170 : 439-443.
20. Utagawa ET, Nishizawa S, Sekine S, Hayashi Y, Ishihara Y, Oishi I, Iwasaki A, Yamashita I, Miyamura K, Yamazaki S, Inouye S, Glass RI : Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Japan. *J Clin Microbiol* 1994 ; 1841-1845.
21. Vizzi E, Ferraro D, Cascio A, Di Stefano R, Arista S : Detection of enteric adenoviruses 40 and 41 in stool specimens by monoclonal antibody-based

enzyme immunoassays. *Res Virol* 1996 ; 147 : 333-339.

22. Willcocks MM, Carter MJ, Silcock JG, Madeley CR : A dot-blot hybridisation procedure for the detection of astrovirus in stool samples. *Epidemiol Infect* 1991 ; 107 : 405-410.
23. Willcocks MM, Carter MJ, Madeley CR : Astroviruses. Reviews. *Med Virol* 1992 ; 2 : 97-106.
24. Wolfaardt M, Taylor MB, Booyesen HF, Engelbrecht L, Grabow WO, Jiang X : Incidence of human calicivirus and rotavirus infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J Med Virol* 1997 ; 51 : 290-296.

柒、圖、表

表 一、RT-PCR 引子對序列表

核酸引子	5' 3' 序列	Localization
Norovirus		
SR 33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	4856-4876
SR 46	TGG AAT TCC ATC GCC CAC TGG	4754-4773
SR 48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	4754-4773
SR 50	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	4754-4773
SR 52	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	4754-4773
Mon 431	TGG ACI AGR GGI CCY AAY CA	5093-5112
Mon 432	TGG ACI CGY GGI CCY AAY CA	5093-5112
Mon 433	GAA YCT CAT CCA YCT GAA CAT	5305-5285
Mon 434	GAA SCG CAT CCA RCG GAA CAT	5305-5285
Rotavirus		
con 1	TTG CCA CCA ATT CAA AAT AC	666-685
con 2	ATT TCG GAC CAT TTA TAA CC	862-881
Astrovirus		
Mon 340	CGT CAT TAT TTG TTG TCA TAC T	1182-1203
Mon 348	ACA TGT GCT GCT GTT ACT ATG	1450-1470

表 二、 Real-time RT-PCR 引子對序列表

核酸引子	5 ' 3 ' 序列	Localization
Rotavirus		
Rota NVP3-F	ACC ATC TAC ACA TGA CCC TC	963-982
Rota NVP3-R	GGT CAC ATA ACG CCC C	1034-1049
TagMan probe	FAM-ATG AGC ACA ATA GTT AAA AGC TAA CAC TGT CAA-TAMRA	984-1016
Astrovirus		
Mon 340	CGT CAT TAT TTG TTG TCA TAC T	1182-1203
Mon 348	ACA TGT GCT GCT GTT ACT ATG	1450-1470
Norovirus		
G1		
SR 33	TGT CAC GAT CTC ATC ATC ACC	4856-4876
SR 48	GTG AAC AGC ATA AAT CAC TGG	4754-4773
SR 50	GTG AAC AGT ATA AAC CAC TGG	4754-4773
SR 52	GTG AAC AGT ATA AAC CAT TGG	4754-4773
NoroG1D7Probe	FAM-CCT TTG TGC ATT GTC TG- MGBNFQ	4781-4796
G2		
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	5003-5023

COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100-5121
RING2-TP Probe	FAM-TGG GAG GGC GAT CGC	5048-5068
	AAT CT-TAMRA	

Y=C or T ; R=A or G ; B=not A ; N=any

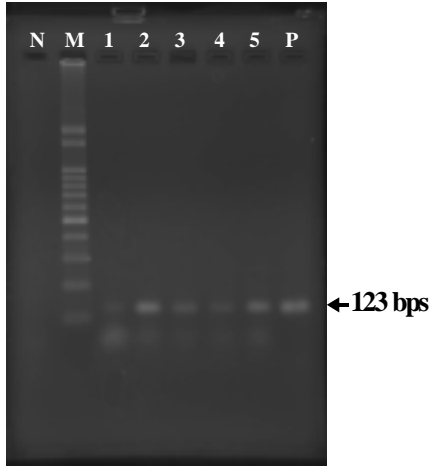
表 三、臨床檢體分析結果陽性率

自 92 年 9 月至 93 年 12 月止

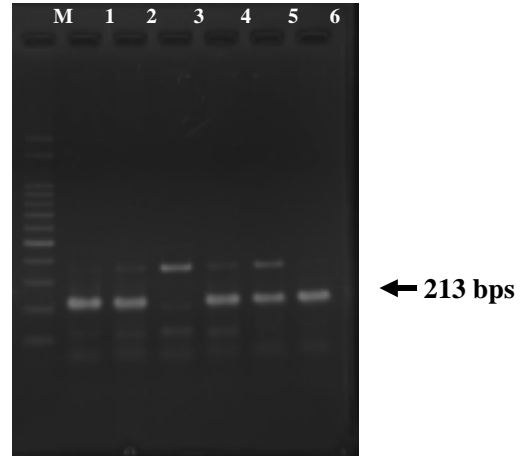
	RT-PCR			EIA		
	Rotavirus (%)	Norovirus (%)	Astrovirus (%)	Rotavirus (%)	Norovirus (%)	Astrovirus (%)
定點醫師	33/64 (51.56)	9/64 (14.06)	0/67 (0.00)	0/4 (0.00)		
腹瀉症候群	28/177 (15.82)	67/256 (26.17)	0/39 (0.00)	48/201 (23.88)	52/271 (19.19)	0/57 (0.00)
主動監測	16/124 (12.90)	0/4 (0.00)		23/129 (17.83)		
合作醫院	252/850 (29.65)	65/709 (9.17)	4/704 (0.57)	209/811 (25.77)	117/725 (16.14)	22/629 (3.50)
總計	329/1215 (27.08)	141/1033 (13.65)	4/810 (0.49)	280/1145 (24.45)	169/996 (16.97)	22/686 (3.21)

圖 一、 RT-PCR 反應結果

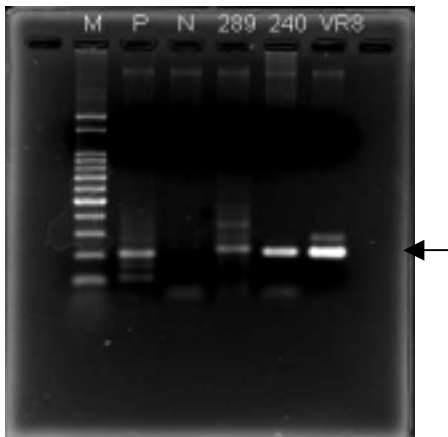
a.



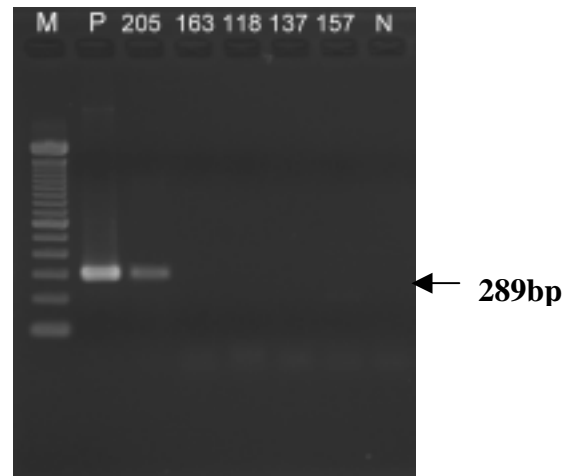
b.



c.



d.



a. SR/RT-PCR Norovirus G1 基因型 (primer : SR33、SR48、SR50、SR52) ;
產物大小為 123 bps。Band 1~5 為病人檢體。 b. Mon/RT-PCR Norovirus
(primer : Mon431、Mon432、Mon433、Mon434) ; 產物為 213 bps。 Band 1~6

為病人檢體。 c. Rotavirus (primer : con1、 con2) : 產物大小為 201 bps , P 為標準病毒株 , N 為陰性對照組 , 289、 340、 VR8 為臨床檢體。 d. Astrovirus (primer : Mon340、 Mon348) : 產物大小為 289 bps ; P 為陽性對照組、 N 為陰性對照組、 205 為陽性檢體、 163、 118、 137、 157 為陰性檢體。

圖 二、定序後之序列送入 NCBI 做 Nucleotide-nucleotide BLAST 的結果

1. Norovirus

[gi|8388810|dbj|AB044360.1](#) Norwalk-like virus gene for RNA polymerase, partial cds,

Identities = 60/61 (98%)

Query: 12 ataagccagtagcctcagacaatgcacaaagggatgattatccagtgatttatgctgttca 71

|||||

Sbjct: 254 ataagccagtagcctcagacaatgcacaaagggatgattatccagtgatttatgctattca 195

Query: 72 c 72

|

Sbjct: 194 c 194

2. Astrovirus

[gi|4731637|gb|AF141381.1|AF141381](#) Human astrovirus putative serine protease gene, complete cds;

Identities = 276/288 (95%)

Query: 2 cgtcattatttgttgtcataacttgtaggtttatacgaatggcaacagttttattg 61

|||||

Sbjct: 1182 cgtcattatttgttgtcataacttgtaggtttatacgaatggcaacagttttattg 1241

Query: 62 gcaccagatttgagatccgtgatgctaattgggaaggtcgttgctactgtaccaactagga 121

|||||

Sbjct: 750 ttacaatttctaatacgtacaagtggttggtgacagttcaatttatgattgactccatc 691

Query: 121 tacaacgtcagtgatcactaattttcagctgttgcaacttcttcaaacggttgatc 180

|||||

Sbjct: 690 tacaacgtcagtgatcactaattttcagctgttgcaacttcttcaaacggttgatc 631

Query: 181 agttgtaggcaccaattcctaagtggtgcgatttagtggacataaccttatagtaca 240

|||||

Sbjct: 630 agttgtaggcaccaattcctaagtggtgcgatttagtggacataaccttatagtaca 571

Query: 241 agatgatcccatgaaatccatttatggcctcatcagttgttgataataatacaaagt 300

|||||

Sbjct: 570 agatgatcccatgaaatccatttatggcctcatcagttgttgataataatacaaagt 511

Query: 301 aatatccataggattacataaccactcattaagtaacaaatttgctagttggacatgtc 360

|||||

Sbjct: 510 aatatccataggattacataaccactcattaagtaacaaatctgctagttcgacatgtc 451

Query: 361 cagttgcagtgtagcgtcatattcattaataccaaattataatcacaatacagttgtgg 420

|||||

Sbjct: 450 cagttgcagtgtagcgtcatattcattaataccaaattataatcacaatacagttgtgg 391

Query: 421 atcgactgaaaacgaggcaatatcagtataatctttaaataaatagatcctgttgcca 480

|||||

Sbjct: 390 atcgactgaaaacgaggcaatatcagtataatctttaaaataaatagatcctgttggcca 331

Query: 481 tcctttgattaaaaatagctgagaaagtgtatccttccatgaattatcatttatttctgt 540

|||||

Sbjct: 330 tcctttgattaaaaatagctgagaaagtgtatccttccatgaattatcatttatttctgt 271

Query: 541 tgctgcttcagttgggtaatacaaacataaagtcgaagtaggaatacttctctcgcg 600

|||||

Sbjct: 270 tgctgcttcagttgggtaatacaaacataaagtcgaagtaggaatacttctctcgcg 211

Query: 601 tgagttcgtatatggtgtgtccattgagccagtaatcggaagattattccataatttg 660

|||||

Sbjct: 210 tgagttagttatatggtgtgtccattgagccagtaatcggaagattattccataatttg 151

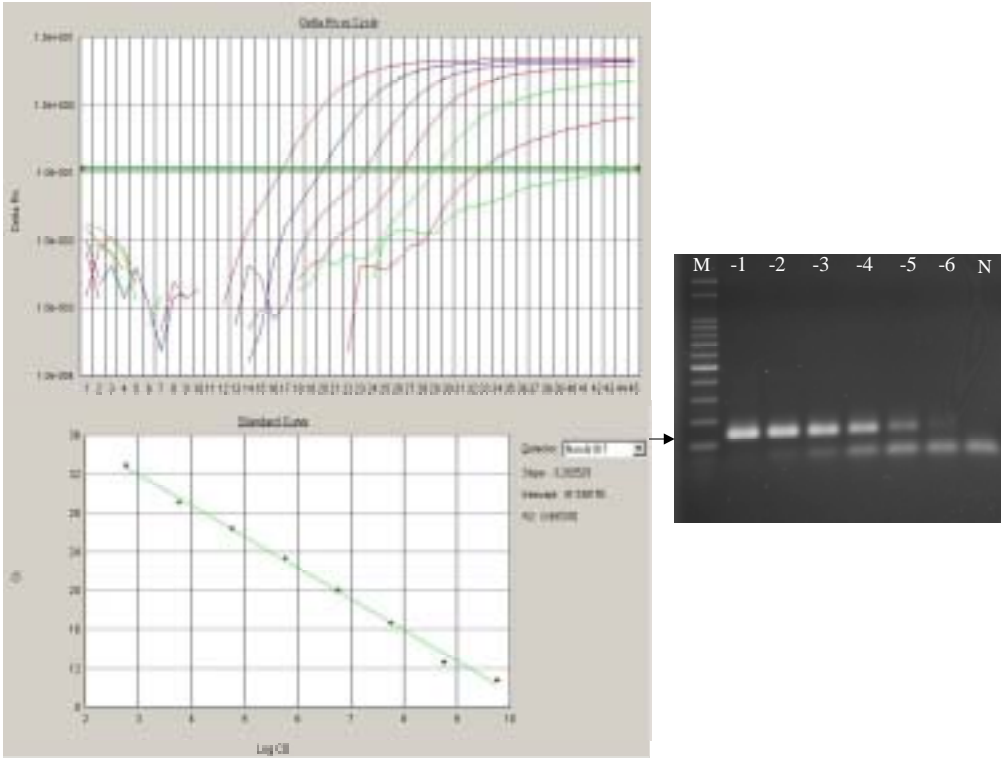
Query: 661 tgcattaaggagtggtgataatataactataattaaaagaaatctg 706

|||||

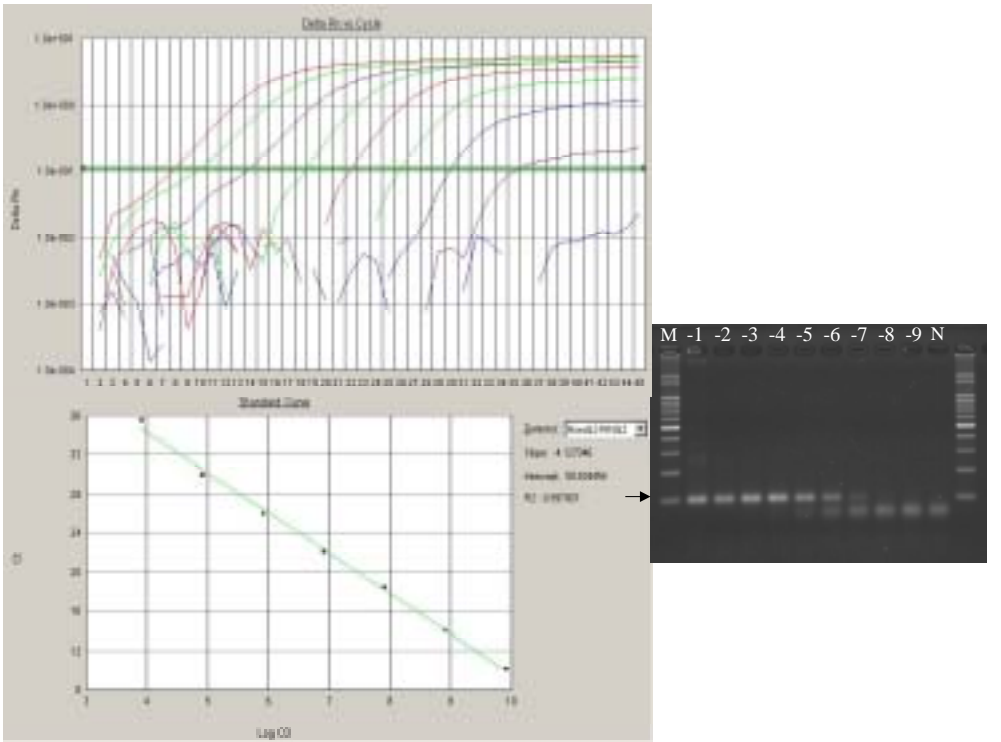
Sbjct: 150 tgcattaaggagtggtgataatataactgtaattaaaagaaatctg 105

圖 三、Real Time RT-PCR 反應結果。

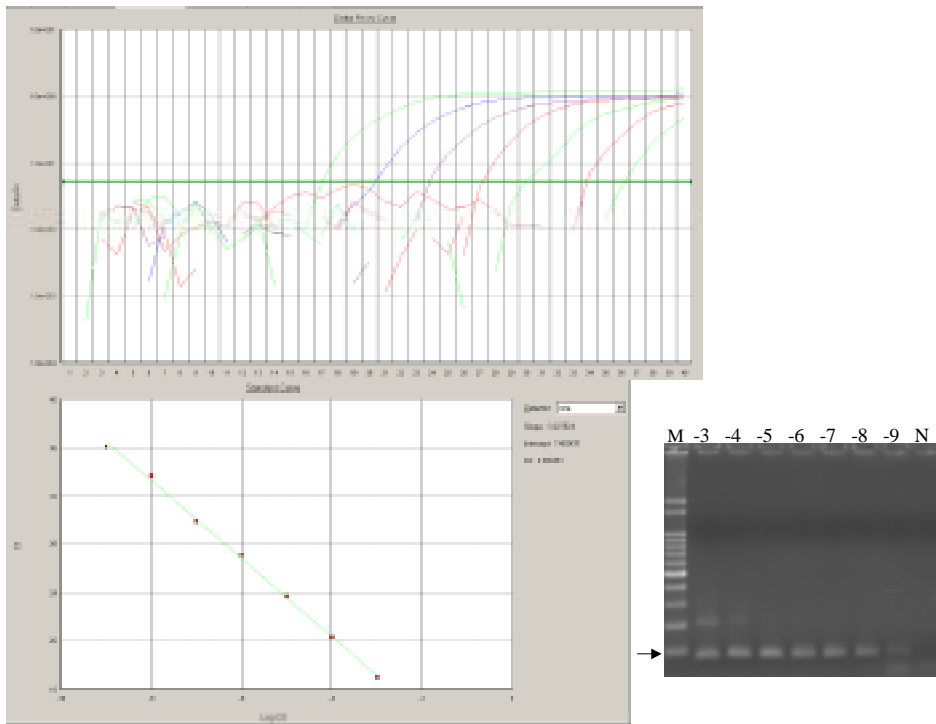
a1.



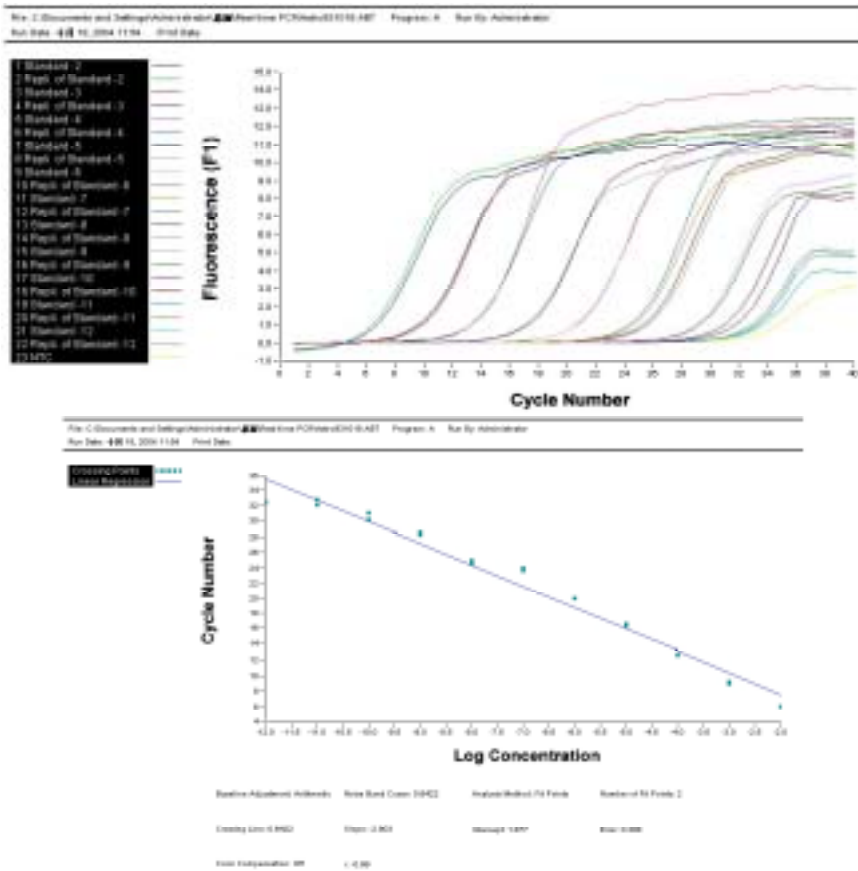
a2.

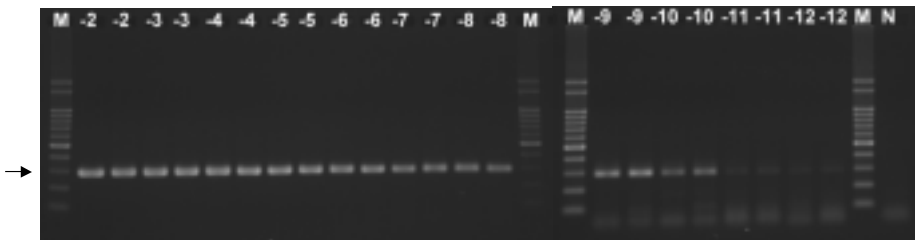
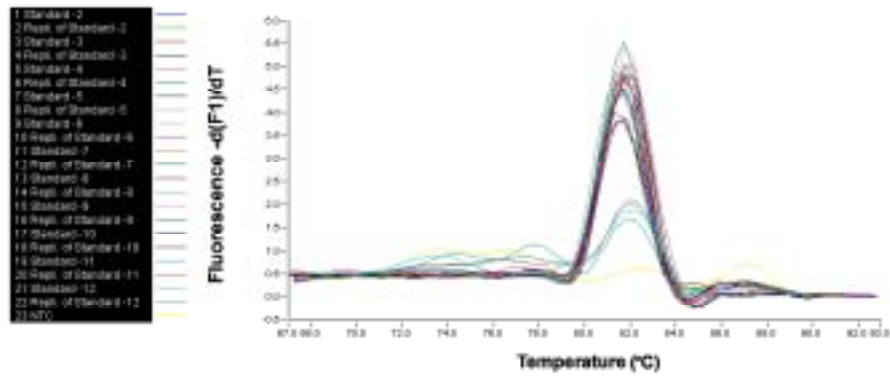


b.



c.





a1. Norovirus G1 : 陽性檢體 RNA 10×序列稀釋反應結果 , a2. Norovirus G2 :
plasmid DNA 10×序列稀釋反應結果 , b. Rotavirus : plasmid DNA 10×序列
稀釋反應結果 , c. Astrovirus : plasmid DNA 10×序列稀釋反應結果

圖 四、合作醫院自 93 年 3 月至 93 年 11 月間腹瀉病毒流行狀況

