

計畫編號：DOH98-DC-2020

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

台灣地區新興腸道病毒(諾羅病毒)
之環境調查及風險評估

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：楊辰夫、林慶豐、江大雄、洪健翔

執行期間：98 年 1 月 1 日至 98 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目 錄

封 面	頁 碼
摘要	3
壹、前言	5
貳、材料與方法	10
參、結果	19
肆、討論	27
伍、結論與建議	30
陸、參考文獻	32
柒、圖&表	35
圖一、檢測貝類樣品原產地分佈分析圖	35
圖二、文蛤與蚶處理方法流程圖：	35
圖三、97年12月到98年10月文蛤檢出諾羅病毒陽性件數(周)分布圖	36
圖四、97年12月到98年10月蚶檢出諾羅病毒陽性件數(周)分布圖	36
圖五、貝類檢體與人體檢體中之諾羅病毒序列演化分析圖	37
表一、腹瀉病毒核酸引子序列	38
表二、流行季與非流行季之人員與環境採檢病毒分析結果	39
表三、97年12月至98年10月間文蛤與鮮蚶中病毒檢測分析結果	39
表四、97年12月至98年10月間文蛤與蚶中諾羅病毒檢驗分析月統計表	40
表五、鮮蚶中諾羅病毒基因型別分析	41

摘要

計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

關鍵詞：諾羅病毒(Norovirus)、急性腸胃炎、群聚性感染監測、Real Time RT-PCR、養殖貝類、親源分析

在美國每年約 7600 萬人發生食因性疾病，其中由致病原感染發病約 1400 萬人，住院約 6 萬人，其中 1800 人因此死亡；而病毒性感染約佔已知病原感染的 79%，其中諾羅病毒感染佔 79.6%、輪狀病毒及星狀病毒感染各佔 10%[1]。在台灣，自本局 94-96 年間研究中發現，引起腹瀉感染症的主要病毒在孩童與成人族群不太相同，在孩童主要為輪狀病毒，其次為諾羅病毒，而在成人主要為諾羅病毒，其次為輪狀病毒。輪狀病毒感染率較高月份多發生於 10 月至次年 3 月間，諾羅病毒群聚案例多發生於氣溫低的冬季及早春。

諾羅病毒感染好發於成人及較大之孩童，並且容易在安養院、醫院、學校及水上活動造成群聚型感染[6-9]，全年皆有病例報告，但以冬天稍多。在臨床上主要症狀為急性水瀉、嘔吐、腹絞痛及些微發燒，許多病患主訴症狀為嘔吐，並且過往多發生於冬季因此該疾病又被稱為冬季嘔吐病 (winter vomiting disease)。其潛伏期約 12~48 小時，並且症狀會持續約 12~60 小時，感染發病之病患多數在 12~60 小時後自癒，但對於嬰幼兒及無法自我照護者，偶而會因脫水而病情加重。傳染途徑為糞-口傳染，感染者的糞便污染環境介面、飲水或食物，特別是貝殼類食物而傳染給其他人，尤其在日本、亞洲地區及法國等地，當地居民喜好食用大量生魚及貝類，

在過去許多流行病學調查中顯示，諾羅病毒引起之腸胃炎與牡蠣等貝類產收季節有相當大的相關性[10]，由於此類的病毒可以持續存在環境中一段時間，並且研究也發現貝類會濃縮病毒。台灣地區在 94-95 年間監測，諾羅病毒引起之急性腸胃炎多屬於學校或醫院及看護中心群聚感染，約佔 70% 以上，但病毒在環境間存在及傳播之相關性仍不了解，因此引起食物中毒之危險因子之監測及了解確切傳播途徑可以作為防疫上之重要參考。

至目前諾羅病毒仍無法以細胞培養方式分離與增殖病毒株，傳統以電子顯微鏡檢測腹瀉病人之糞便檢體中是否含有病毒顆粒，目前也有發展 EIA 方式檢測病毒表面蛋白抗原，但由於病毒基因及抗原變化性相當大[11]，因此檢測試劑的靈敏度受到各區域性病毒型不同影響，靈敏度僅 $10^5\sim 10^6$ PFU /mL。在流行病學調查，大部分使用 RT-PCR 或 Real Time RT-PCR 方式分析，靈敏度可達 $10\sim 10^2$ PFU /mL。本研究計劃擬就諾羅病毒引起之食物中毒案件，收集腹瀉病人之糞便檢體，及採集疑似引起腹瀉之食材及環境檢體，以 Real Time RT-PCR 方式分析，並將兩者基因序列作分子基因親源相關性比對分析；藉由此計畫，可以了解台灣地區，在急性腸胃炎中諾羅病毒之流行情形，並可了解環境及食物中相關危險因子。

在人口密集機構環境研究中，在環境樣本採檢中發現馬桶、廁所沖水把手、水龍頭、電話話筒、和廁所門帘上可以檢驗出諾羅病毒存在，檢出病毒量可高達 4.8×10^6 及 2.53×10^5 copies/swab。在諾羅病毒群聚發生時期，病毒侵襲率約 20~60%，病患在有症狀時開始排放病毒持續至症狀消失後，多數病患在 7 天之內就不再排放病毒，部分病患在無症狀後 30 天仍可在糞便檢體中檢出病毒，在無症狀期間病毒排放量仍高達 $4.87\times 10^5\sim 2.1\times 10^{10}$ copies/g，因諾羅病毒在 $10^1\sim 10^2$ copies 就具有感染力，因此，在發病後成為無症狀但仍具病毒傳播力者的情況，需要特別留意。不過，在受污染的環

境中，經定期的漂白水消毒清潔可以降低病毒量，同時病毒無法經過長時間暴露在環境中。因此，在群聚事件發生同時，藉由消毒清潔可能受污染的接觸環境介面，並區隔發病者與正常住民，可以減少疫情擴散。

貝類與水源是國外文獻中發現最容易引起諾羅病毒傳播的食因性途徑，藉由檢測環境水源與貝類等樣本中的諾羅病毒，並與諾羅病毒感染病患中的病毒基因比較，可以初略了解台灣地區諾羅病毒的存在環境或食品情況，以及了解環境污染情況。本研究中水產品（貝類）的研究中，預計持續定點監測一年（自 1 月起至 12 月止），初步發現在台灣的養殖貝類檢出諾羅病毒存在比率相當高（6~24%），在貝類中檢出的諾羅病毒基因型別種類相當多樣化，其中檢出率較高的 GII/4 型在人類群聚事件中比例最高，比對相當時間月份的貝類與發病者的 GII/4 基因序列，相似度約 90~99%。因此，推測貝類與引起諾羅病毒群聚事件是有依定的相關性，但直接的關連性必須再設計研究進一步追蹤分析。

壹、前言

在已開發中國家如美國，急性腸胃炎是僅次於急性病毒性呼吸道疾病的急症[12]，全世界每年約有大於 700,000,000 個案發生於小於 5 歲之孩童 [13]，腸胃炎在臨床上的表現大多為腹瀉、嘔吐、腹絞痛等，但在開發中國家，仍有約 5% 以上嚴重腹瀉造成脫水而死亡 [14-16]。引起急性腸胃炎之病源體包括細菌、病毒、寄生蟲等，在過去腸胃炎多數為細菌及寄生蟲所引起，並且許多無法分析感染原。在 1972 年，發現諾羅病毒也是造成急性腸胃炎之致病源，病毒性腹瀉個案數(率)急速上升[17]。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，在這些腹瀉病毒中，僅杯狀病毒仍無法以細胞培養病毒株。

諾羅病毒最早發現於 1968 年，美國俄亥厄州之 Norwalk 小城一小學爆發集體急性腸胃炎，初次感染率約 50%，再次感染率約 32%；受感染者在 12 至 24 小時內，有 90% 以上出現噁心、嘔吐，38% 出現腹瀉的現象。至 1972 年，Kapikian 利用免疫電子顯微鏡發現病毒顆粒，大小約 27nm [17]。之後陸續許多腸胃炎群聚型感染都證明與諾羅病毒相關[18-22]，才開始對此病毒有深入的研究。諾羅病毒 (Norovirus)，在早期依其外型命名為 SRSV (Small Round - Structured Viruses)。諾羅病毒 (Norovirus)，屬於杯狀病毒科 (Caliciviridae)，單股 RNA 病毒[2, 3]，不具外蛋白膜[3]，病毒顆粒大小約 27~40nm，RNA 長度 7.6 kbps，基因分成三個 ORFs。依其 RNA dependent RNA polymerase 序列差異可以分成三種基因群 (genogroup)，其中感染人之型別為第一、二群 (GI、GII) [4]，病毒基因序列演化快速，目前 Genogroup I 可至少再細分為 16 種以上 genotype，及 Genogroup II 可至少再細分 18 種以上的 genotype。

據流行病學調查，在工業化國家中諾羅病毒是成人非細菌性腸胃炎的主要致病源，也是食物中毒最主要的致病源，約佔群聚性感染的 70~95

%[5]，好發於成人及較大之孩童，並且容易在安養院、醫院、學校及水上活動造成群聚型感染，全年皆有病例報告，但以冬天稍多。主要的臨床症狀為急性水瀉、嘔吐、腹絞痛及些微發燒，由於許多病患主訴症狀為嘔吐，因此該疾病又被稱為冬季嘔吐病（winter vomiting disease）。其潛伏期約 12~48 小時，並且症狀會持續約 12~60 小時，感染發病之病患多數在 12~60 小時後自癒，但對於嬰幼兒及無法自我照護者，偶而會因脫水而病情加重；傳染途徑為糞-口傳染，感染者的糞便經由污染環境介面、飲水或食物[23]，特別是貝殼類食物而傳染給其他人[18, 24, 25]。在日本及亞洲國家，人民特別喜好生食魚貝類，尤其牡蠣及文蛤，依文獻報告顯示，諾羅病毒感染引起之腸胃炎在牡蠣及文蛤收成季節時發病率特別高[10]。台灣地區，在 2004 年二月間，爆發首例諾羅病毒引起之院內感染事件[26, 27]，當時受到相當的重視，各地衛生單位才開始陸續通報疑似諾羅病毒性群聚事件[2, 6-9, 28]。本實驗室利用分子演化分析自 2004 年 11 月至 2005 年 3 月間，共 12 起通報腹瀉群聚事件，發表首篇論文關於台灣地區諾羅病毒引起群聚感染的分子流行病學分析，在 12 個諾羅病毒感染群聚事件中，依病毒之外套膜基因序列分析，共有 6 種不同諾羅病毒基因型別，分別為 GII/11、GII/14、GII/3、GII/4、GII/6、GII/18，而 GII/4 為主要流行病毒型別，佔總諾羅病毒陽性檢出率 83%[29]，其中，學校群聚事件佔 41.66%（5/12），醫院或安養

中心院內感染事件佔 33.33% (4/12)。但因缺乏即時疫情調查，對於諾羅病毒的傳染途徑仍不清楚。

95 年國內諾羅病毒 (Norovirus) 引起腹瀉群聚事件有增多趨勢，依本局症狀系統腹瀉監測資料顯示迄今共有 72 件群聚事件，其中 61 件 (85%) 群聚事件證實由諾羅病毒引起；94 年全年共有 30 件群聚事件，其中 17 件 (57%) 群聚事件證實由諾羅病毒引起。綜合本局症狀系統及人口密集機構傳染病監測系統資料分析顯示，95 年諾羅病毒腹瀉群聚事件，好發場所依序為人口密集機構 (老人養護機構(含榮民之家等)佔 22%、護理之家佔 19%、安教養機構佔 13%)、醫院 (精神科病房佔 11%、其他病房佔 22%)、學校 (國中佔 5%、國小佔 3%) 及營區 (佔 5%)。依據分局及各衛生局所疫情調查資料顯示，多數疑似為人與人密集接觸、或感染病毒之病患或工作人員間相互傳播，但實際傳播途徑是經由水源或環境介面間接傳播均無法證實。由於台灣地區在人口密集機構好發群聚感染比率高於其他國家，因此為了解台灣地區實際傳播情形，必須將環境檢測方法標準化，在實際發生群聚事件時，可以與人體檢體檢測到的病源序列一同比對，以釐清確實感染源，甚至可以阻斷二次或再次傳播。

現今諾羅病毒仍無法以細胞培養方式分離病毒株，因此過去傳統以電子顯微鏡檢測腹瀉病人之糞便檢體中是否含有病毒顆粒，目前也有發展 EIA

方式檢測病毒表面蛋白抗原，由於目前已知至少有 16 種 Genogroup I 及 18 種 Genogroup II，但在試劑的研發上很難涵蓋所有的型別，因此，試劑的專一性及敏感度無法達到很高，所以在流行病學調查中，多使用 RT-PCR 或 Real Time RT-PCR 方式分析，不僅靈敏度可達 $10\sim 10^2$ PFU /mL，所需要的檢體量較低，同時又可以進行基因比對或演化分析。因此，各國在公共衛生急性腸胃炎疾病防治業務上，多數採用 RT-PCR 來提高檢測效率，並達到防治之目的。

貳、材料與方法

在臺灣地區的腹瀉性病毒研究，本局自 2004 年起對於通報無原因腹瀉群聚事件之人體糞便檢體開始加入諾羅病毒篩檢，在通報的檢體中，主要年齡大於 10 歲以上，多數為群聚性腹瀉聚集事件，諾羅病毒檢出陽性率高達 25.23% ，檢出陽性率約為輪狀病毒的 28 倍。此外，在醫院的看護中心與安養院發生率最高佔 43%，其次為學校佔 33%，依據少數調查報告推測傳播方式約 90% 為接觸性感染，而確切引起之群聚性感染與食物及環境間之相關性尚不清楚。台灣地區諾羅病毒群聚感染發生場所，以學校、看護中心、醫院為主，和美國及加拿大發現較相似；而鄰近的日本主要以飲食店（46.8%）、旅館（17.6%）及學校（6.3%）為主，歐洲主要發生於海上活動。各國發生場所相差很多，所以，台灣地區群聚感染發生場所的差異，是否與病毒在環境分布的情形，及本國生活習慣影響傳播模式有關。

本計畫擬就諾羅病毒引起之食物中毒案件，收集腹瀉病人及接觸者之糞便檢體，及採集疑似引起腹瀉之相關食材及環境檢體，以 RT-PCR 方式分析，並將自感染者糞便分出之諾羅病毒基因序列與自環境標本分析的諾羅病毒基因序列，兩者作分子基因親源相關性比對分析。計畫中使用之分析方法及原理如下：

一、 檢體來源：

- (1) 病毒性食物中毒腹瀉個案及接觸者之糞便檢體。
- (2) 疑似引起腹瀉之食材及環境檢體等相關聯性之檢體。依據文獻資料歸納與諾羅病毒感染相關的途徑大致可以分成三類：第一類，如醫院病房、安養中心、特殊教育中心，疑似由看護者傳播，同時採集看護人員糞便檢體。第二類，如學校群聚性感染，應就指標病例、及相關可疑環境或餐盒供應途徑調查並採集檢體，包括環境水、餐盒供應工作者之糞便檢體。第三類，懷疑與水源感染相關，除腹瀉個案檢體外，同時採集水質樣本或水域養殖之貝類。

二、 檢體收集定義：

- (1) 糞便細菌性培養呈陰性
- (2) 平均潛伏期約 24~48 小時
- (3) 發病症狀出現期間約 12~60 小時
- (4) 有 50% 個案以上出現嘔吐症狀。

三、 個案臨床症狀調查表:

針對受檢者作調查，臨床症狀包括，嘔吐、腹瀉(水樣便或軟便，次/每天)、噁心、腹痛、頭痛、發燒(溫度)。

四、 環境採檢：

在環境採檢中，針對病房中的電話、水龍頭、門把等，一些員工或是病患常常會接觸的物體，其表面使用 Copan universal transport medium (UTM-RT) system swab 來採檢後置入保存液後帶回實驗室萃取 RNA。

五、 糞便檢體處理：

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°C，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°C。

六、 貝類檢體收集與處理：

1. 自 97 年 12 月開始對於台灣養殖的文蛤與鮮蚶，進行每週定期監測檢驗，到 98 年 10 月為止共監測了 48 周，每週檢驗 6 件文蛤及 6 件蚶，分別自台北的愛買購買 16 次，家樂福購買 16 次、大潤發購買 16 次，圖一為文蛤與蚶的原產地分佈。

2. 文蛤與蚶處理方法：將貝類用已經滅菌消毒的小刀或鑷子打開，取出肉質部分並將外側斧足等肉質部位儘可能剪掉去除，留下中腸管部分做為檢體，放入 15 mL 離心管中，加入 2 mL PBS 震盪 30 秒。分成兩部份：(1) 取出 1 mL 混合液放入均質管 (MagNA Lyser Green Bead, Roche, Germany) 中，利用組織均質機 (MagNA Lyser, Roche, Germany) 6500 rpm 震盪 20 秒共 2

次，打碎腸道組織後，取出以 8000 rpm 離心 10 分鐘後，吸取出上清液。(2) 剩餘 PBS 混合液，以 3000 rpm 離心 15 分鐘後，吸取出上清液。將(1)與(2) 的上清液混合後抽核酸分析，詳細步驟如圖二。

七、 水樣檢體處理：

水樣檢體必須經過過濾處理。將已滅菌之過濾用漏斗、過濾管、幫浦架設好，將 0.22um 過濾膜置放於通管中，放入水樣檢體。過濾後將濾膜以滅菌之鏢子稍加摺疊，取出置放於 15ml 離心管中，加入 3ml AVL-Buffer，搖晃試管使所有濾膜均浸泡到，利用 QIAamp viral RNA Mini Kit (Cat NO.52906) 抽取 RNA。

八、 RNA 的萃取：

使用 Roche 的 MagNA Pure Compact 全自動核酸萃取機純化病毒 RNA。取處理過之檢體上清液 200 μ L，利用 MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1(Cat. No. 03 730 964 001) 萃取病毒 RNA，最後萃取出 100 μ L RNA，加入 5U DNase I (Takara, Tokyo, Japan)，置於-80 $^{\circ}$ C 待用。

九、 諾羅病毒分析：

1. Reverse Transcriptase reaction

病毒 RNA 萃取液 10 μ L 為模板，加入引子於 95 $^{\circ}$ 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 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. Nested PCR：

PCR primer sets：諾羅病毒分析引子對在 GI 為 COG1F/G1SKR、GII 為 COG2F/G2SKR(表一)。反應條件：denaturation 94°C 30 秒、annealing 54°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 30 個 cycle。

Nested-primer sets：取出 1st round PCR 反應產物作為模版，再重複 30cycle 相同反應 30 cycle。

十、 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，引子對及探針序列如表一，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 MnCl₂，dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300 μ M，2.5U rTth DNA Polymerase，0.25U AmpErase UNG，引子均為 200nM，及探針 150nM。反應程序為：60°C 30min，之後進入 45 個循環：94°C 20sec，60°C 1min。結果由 ABI Prism 7500 sequence detector (Applied Biosystems)偵測分析。

十一、沙波病毒分析：

1. Reverse Transcriptase reaction

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、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 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. 即時聚合酵素鏈反應分析 (Real-time PCR)：引子對設計主要原理依 Similarity Plot 分析沙波病毒基因，於 RNA-dependent RNA polymerase 及 Capsid 基因的連接位置上具高度穩定性區域[31]，設計引子對及探針於 5078 至 5181 之間的序列上，引子分別為 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SaV1245R，探針為 SaV124TP、SaV5TP。加入 2.5 μ L 病毒 cDNA 於混合液中，內含 12.5 μ L QuantiTect Probe PCR Master Mix 緩衝液 (Qiagen)、400 nM 引子 SaV124F、SaV1F、SaV5F、SaV1245R 及探針 200nM SaV124TP、SaV5TP。反應程序為：95°C 15 分鐘，之後進入 40 個循環：95°C 作用 15 秒，62°C 作用 1 分鐘，使用 ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems)偵測分析

十二、Aichivirus 分析：

1. Reverse Transcriptase reaction

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、10U Reverse Transcriptase 反轉錄酵素(Roche Cat. No.03 531 287)、40U RNase 抑制劑及反應緩衝液含 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. Nested PCR：Aichivirus 反應引子對設計在病毒 3C-3D 間。

PCR primer sets：反應引子對 C(+)/C(-) (表一)；反應條件：denaturation 94°C 30 秒、annealing 55°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 40 個 cycle。

Nested-primer sets：反應引子對 C94b(+)/246K(-)(表一)；反應條件：denaturation 94°C 30 秒、annealing 50°C 30 秒、extension 72°C 1 分鐘，共 35 個 cycle。

十三、 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、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為 10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於 96°C 作用 1 分鐘，之後反應條件為 96°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分鐘，共 25 次循環。

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

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

十四、 病毒基因庫分析比對

(1) 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。

(2) 將歷年病毒序列比對分析，比較病毒變異性。

十五、 病毒基因親源演化分析比對

RT-PCR 產物經核酸定序分析後，將自臨床糞便、水樣或環境檢體分析得到之病毒基因序列，與基因資料庫擷取之各國諾羅病毒基因片段，利用 MEGA 4.0 程式進行多序列並列分析 (multiple sequence alignment) 及病毒株演化親源分析，分析的相關性資料將有助於即時疫情調查，並可將各次群聚性案件之資料進行流行病學資料分析，有助於了解台灣地區諾羅病毒之基因

流行型別。

參、結果

雖然腹瀉症狀通報與食物中毒事件均不屬於法定傳染病，各衛生機關在轄區發生相關群聚事件，並不需要採檢通報送驗。自 94 年起之所有通報送驗腹瀉與食物中毒之群聚事件中分析，諾羅病毒引起的腹瀉群聚事件正逐年上升中，95 年經由實驗室確認為諾羅病毒引起之群聚事件數占有所有通報之腹瀉群聚事件之八成，並為 94 年同類事件數的 8 倍以上。分析這些諾羅病毒陽性群聚事件，主要發生場所為人口密集機構及醫院病房，其次為學校；分析發生的原因有二：一、自 94 年起，本局研檢中心開始對於腹瀉症狀通報（含食物中毒事件）開始加入諾羅病毒檢驗項目，在通報群聚檢體中，發現許多為諾羅病毒感染，為提升衛生局(所)對於諾羅病毒感染的認識，並在防疫調查時能夠拿捏調查方向，本實驗室配合衛生局在各縣市上課宣導，有助於各地方單位在發生疫情時正確通報，而使隔年後諾羅病毒陽性群聚通報數上升。二、分析諾羅病毒陽性群聚主要發生場所為人口密集機構及醫院病房，其次為學校，與外國發生場所，如餐廳或旅遊時食用貝類飲食引起、水上活動等，不太相同。在台灣衛生條例規定，人口密集機構發生腹瀉群聚事件時，必須通報腹瀉症候群監測並採檢送驗；但如果腹瀉群聚事件發生在其他的其他地方時，是依食物中毒方式通報，並且多數只採細菌性肛拭，而不通報病毒性檢驗。

目前的衛生局(所)疫情調查，多數依照細菌性食物中毒調查方式設計，無法清楚了解台灣地區諾羅病毒群聚事件的傳播途徑，或病毒的存在模式，因此擬以本研究計畫，依台灣地區主要通報場所，逐步分析諾羅病毒可能在環境存在特性及傳播媒介，並將提供研究結果做為防疫阻斷之政策參考。

本年研究的重點主要分成二部份：一、在人口密集機構環境中諾羅病毒存狀況；二、諾羅病毒在台灣貝類養殖產品季節分布。

一、在人口密集機構環境中諾羅病毒存狀況：

本研究計畫共與三個密集機構合作採樣，在這三個採樣點的住民的型態不同，在八里療養院的住民為精神病患者；在員山榮民總醫院的住民，有一半為行動不方便之榮民，另一半為精神病患者；在仁愛醫院安養中心，多數為行動不方便的年老者，許多住民除醫院看護人員外，還有私人看護協助照料。採集時間點分為流行季與非流行季，其中流行季與非流行季的定義是依照世界各國目前在諾羅病毒群聚事件流行病學研究，流行季節的廣義定義為諾羅病毒引起群聚事件數較高的月份稱之，其他僅有零星的個案或群聚的月份稱之為非流行季。因此，在本研究中，以台灣 95-97 年間通報腹瀉群聚事件中，其中檢出諾羅病毒的群聚事件數歸納來區分。

1. 署立八里療養院：諾羅病毒存在情形調查，定期於流行季及非流行季節，

採檢環境、住民及工作人員糞便檢體，至該批檢測結果由陽性轉呈陰性為止。檢驗樣品數及檢驗結果如表二。

流行季調查採樣分析：在 96 年 11 月 28 日，該院發生群聚事件，群聚期間前往發病病房採檢環境檢體及人體檢體，並配合醫院衛教宣導及對醫護人員座談。對於群聚事件中檢出陽性個案，徵得同意後持續追蹤篩檢，每隔 7 天採檢一次糞便至檢出為陰性為止。另外，在群聚事件發生時，針對有症狀發病者病房樓層採集環境檢體。第一位指標病例發病日為 11 月 28 日，在 12 月 7 日環境採檢之時，在馬桶內緣以病毒性拭子採樣並檢出病毒，推測可能檢出原因為病患持續在排出病毒，或諾羅病毒可以在環境中存在數日，而且八里療養院的病房廁所是屬於病患共用，藉由廁所傳播病毒的機會更大，因此在隔離方面更是困難。

在群聚發生後，就發病期間檢出陽性個案同意後定期追蹤，篩檢諾羅病毒在人體中可以持續排出天數及病毒量，參加持續追蹤 8 人，共收到 22 件檢體。以病患問卷中註明的發病日為第 0 天，定期追蹤糞便定量分析人體排放病毒的天數，以 real time RT-PCR 分析，持續追蹤的陽性個案，病毒排放天數最短在 7 天內便測不到病毒，最長可達 35 天。

非流行季追蹤採檢：在 96 年 10 月、97 年 5 月、98 年 2 月，還未有諾羅病毒群聚事件流行時，就曾發生群聚事件的相同病房，採集工作人員、住民

及環境進行採樣，經採樣檢驗後，馬桶、廁所沖水把手及電話話筒採樣的樣本可檢測出諾羅病毒。

2. 宜蘭員山榮民醫院於 95.11.23 及 96.12.10 曾通報並證實為諾羅病毒群聚，經與該院院長聯繫，合作以該院作為研究諾羅病毒存在情形調查，採檢環境、住民及工作人員糞便檢體，至該批檢測結果由陽性轉呈陰性為止。

96 年 9 月非流行季，曾初步對宜蘭員山榮民醫院做環境檢體採樣，但均呈現陰性。在 96 年 12 月 10 日，該院發生一起諾羅病毒群聚事件，在本次群聚期間前往發病病房採檢環境檢體及人體檢體，並配合醫院對醫護人員座談及衛教宣導。對於群聚事件中檢出陽性個案，徵得同意後持續追蹤篩檢，每隔 7 天採檢一次糞便至檢出為陰性為止。

96 年 12 月群聚事件發生時，就有症狀發病者住房為環境採集地點，並且間隔 7 日後再次採檢，就檢驗樣品數及檢驗結果如表二。第一位指標病例發病日為 12 月 10 日、第二位為 12 月 12 日，在 12 月 14 日分別在兩位病患住房的馬桶內緣，及廁所沖水把手，以病毒性拭子採樣並檢出諾羅病毒，病毒量高達 4.8×10^6 及 2.53×10^5 copies/swab。推測可能檢出原因為病患持續在排出病毒，或諾羅病毒可以在環境中存在 2-4 天，但必須再詳加研究。

在群聚發生後，就發病期間檢出陽性個案同意後定期追蹤，篩檢諾羅病毒在人體中可以持續排出天數及病毒量，參加持續追蹤 71 人，共收到 92

件檢體。以病患問卷得知的發病日為第 0 天，定期追蹤糞便定量分析人體排放病毒的天數，多數病患持續排出病毒天數在 8-14 天，最長達 30 天。

非流行季追蹤採檢:在 97 年 5 月我們也針對宜蘭員山榮民醫院做了例行性的環境採檢，諾羅病毒檢測皆為陰性。

3. 仁愛醫院安養中心：

98 年 2 月在該中心發生腹瀉群聚，採集住民及工作人員檢體共 86 件，檢出諾羅病毒陽性 25 件，陽性率 29%，病毒量約 $1.93 \times 10^5 \sim 9.86 \times 10^{10}$ copies/g stool。在群聚發生後，就發病期間檢出陽性個案同意後定期追蹤，篩檢諾羅病毒在人體中可以持續排出天數及病毒量；就群聚發生時檢出諾羅病毒陽性之 25 人採檢，在發病後第一周，檢出 15 人仍為陽性；第二周，就第一周檢出之 15 人檢測，僅剩 1 人仍為陽性。在發病期間，病患住房的水龍頭，及廁所門帘，以病毒性拭子採樣並檢出諾羅病毒陽性。

二、貝類產品的監測：

在日本，因食用水產貝類（如牡蠣、文蛤等...），導致諾羅病毒感染之群聚事件約佔諾羅病毒群聚事件的 5 成。貝類的中腸管具有過濾進水的功能，能夠濃縮多種的病毒，如 A 型肝炎病毒、腸病毒、輪狀病毒、諾羅病毒及沙波病毒等；多數貝類養殖場設在河水出海口或河岸、海岸邊，因此與人體排泄息息相關。雖然在目前台灣食物中毒群聚事件的疫情調查資料

中，無法得知是否有因食用貝類引起的諾羅病毒群聚事件。因此，隨著檢測貝類病毒方法的建立，希望能藉由本研究，先對本土養殖貝類中病毒的含量進行檢測分析，有助於了解部分諾羅病毒食因性的傳播途徑。根據 2007 年漁業年報得知，在雲嘉南一帶，養殖漁業盛行，其貝類養殖為台灣主要之產地，尤其以蚵和文蛤為主要產物。

自 97 年 12 月至 98 年 10 月間共 48 周，每週購買檢測用文蛤與鮮蚵各 6 件，一共總計 288 件，樣本產地分佈如圖一。檢體經處理並經核酸萃取後分別檢驗諾羅病毒、輪狀病毒、沙波病毒以及 Aichivirus 四種病毒，檢驗結果如表三：

(1) 在鮮蚵樣本中，檢出諾羅病毒陽性共 70 件，檢出率 24.3%，其中 GI 型陽性 29 件 (10.1%)，GII 型陽性 27 件 (9.4%)，同時檢出兩種 GI 和 GII 型諾羅病毒陽性有 14 件 (4.9%)，輪狀病毒陽性 1 件；在文蛤樣本中，共檢出諾羅病毒陽性 17 件，檢出率 5.9%，其中 GI 型 11 件陽性 (3.8%)，GII 型 6 件陽性 (2.1%)。在鮮蚵及文蛤樣本中沙波病毒與 Aichivirus 均未有檢測陽性之檢體。

(2) 在鮮蚵及文蛤樣本中檢出的諾羅病毒陽性的月分布如表四，檢出諾羅病毒陽性週別分布如圖三及圖四，在鮮蚵樣本中，可以比較明顯的看到，在 12 月至 4 月間諾羅病毒檢出率偏高，在文蛤樣本中，僅在去年 12 月及

今年 9 月的有較高諾羅病毒檢出率。以目前檢測結果，在氣溫較低的月份中諾羅病毒存在於貝類中腸道的比率較高，而在兩種貝類中諾羅病毒存在情形的差異，是否與養殖場所狀況有關，仍須繼續後續的追蹤分析，才能較清楚了解台灣地區兩種貝類諾羅病毒存在情形。

(3) 在鮮蚶檢出的諾羅病毒陽性分型檢測：諾羅病毒陽性檢體的 PCR 產物，經定序後與基因資料庫比對進行基因分型，結果如表五所示，至少可以分出 5 種 GI 型 genotype，以及至少 12 種 GII 型 genotype，其中檢出最多 GI 的型別為 GI /4 有 16 件，其次為 GI /14 有 10 件；檢出最多 GII 型的為 GII /4 有 14 件，其次為 GII /16 有 7 件。在分析中，也發現有 3 株 GII 陽性經與基因資料庫序列比對後，與 swine 型之諾羅病毒株序列較為相近。

(4) 貝類與人體分析檢出之諾羅病毒株親源性分析：近年的監測中發現在台灣引起腹瀉群聚事件的主要病原體以諾羅病毒為主，其中 GII/4 佔感染諾羅病毒群聚事件的多數，在疫情調查資料中，目前仍無法證實食物或食材與感染者間的相關性。本研究挑選自貝類檢出諾羅病毒陽性 GII/4 型別的序列，與引起台灣地區諾羅病毒群聚事件的感染者中諾羅病毒 GII/4 序列，進行親源性比對，希望初步了解台灣養殖貝類中存在的諾羅病毒是否與感染者有關。依諾羅病毒 capsid 部分序列分析，結果如圖五，貝類的諾羅病毒株大致分散在 GII/4 的 3 種 cluster 中，在 2008 年 12 月至 2009 年 4 月間

自鮮蚶中分離到的諾羅病毒株與 2008 年人類群聚的諾羅病毒株 2008b 序列相近，但在 5 月以後病毒株的分布不同，而與 2006a 及 2008a 較近似。

肆、討論

一、分析人口密集機構諾羅病毒存在模式：

在過去幾年間，在八里療養院與宜蘭員山榮民總醫院，諾羅病毒的群聚發生較高。因此，我們與這家醫院進行長時間的合作計畫，觀察在非流行期與流行期中環境是否含有病毒的存在，並且釐清環境中病毒與群聚之間的關係。在非流行期間，由我們實驗結果可以發現環境中沒有引起腹瀉的病毒存在，但是若有群聚發生後，醫院會採取將病患隔離治療直到病人症狀消失，在隔離的環境中還是可以檢出病毒的存在。曾有研究論文指出，諾羅病毒在正常人體內的半衰期約為 2.5 天，也就是當受到病毒感染後，病毒量在人體達到最高峰後，每 2.5 天便會減少一半，而看到我們的環境採檢中，採檢日期與病人發病日期比照後，發現我們的採檢日因該是屬於病人正在排放病毒的最高峰時期，而病毒量在人體達高峰期時約為 $10^7\sim 10^9$ copies/g stool[32]，由此推測，當腹瀉個案出現後，病人正在環境中大量的排放病毒，但可能因醫護人員未發覺或是環境的消毒不夠完全，導致在原本沒有病毒存在的環境中卻被病毒污染，最後造成群聚。

在病房的環境採檢項目中，我們參考了數篇論文[33-35]，雖然這幾篇論文主要採檢的病房為收治小兒科病房與免疫不全病患的病房，陽性率最高發生在水龍頭、電燈開關和電視開關等病人與醫護人員最常碰觸到的物

體，因此本研究中，我們參考這幾種採樣點，並且了解採檢病房的活動情形，而規劃出該採檢的項目，在採樣檢測中發現馬桶、廁所沖水把手、水龍頭、電話話筒、和廁所門帘上可以檢驗出諾羅病毒存在。在受污染的環境中，經定期的消毒清潔可以降低病毒量，同時病毒無法經過長時間暴露在環境中。因此，在群聚事件發生同時，藉由消毒清潔可疑的接觸環境介面，並即時釐清病毒引起群聚的傳染途徑，以降低群聚事件的擴散。

二、貝類產品的監測：

由 2007 漁業年報中得知台灣地區在 2007 年牡蠣產量為 28,085 公噸、文蛤產量為 35,629 公噸、蜆產量為 14,547 公噸；而在水產進口上，牡蠣進口 1,914 公噸、文蛤為 1,361 公噸。由此可知，在台灣牡蠣、文蛤、蜆等貝類動物絕大多數是本土產的居多，並不一定仰賴進口。因此，檢測台灣生產的活體貝類中是否含有病毒是一個很重要的研究。引起腸胃炎的病毒都是由糞口傳染，病毒由口而入；若本身所食用的貝類就帶有病毒的存在，更是會大大的增加病毒感染的可能性。由文獻中我們得知，在日本大約有 10% 的牡蠣帶有諾羅病毒，在法國約有 20% 的牡蠣帶有諾羅病毒，在挪威約有 7% 的貝類帶有諾羅病毒[36]。從本研究自 97 年 12 月到 98 年 10 月的監測中，發現台灣常食用的牡蠣也就是鮮蚶，帶有諾羅病毒的比率相當高（24.3 %），與國外論文發現的現況相似。

以基因型別角度分析，從台灣的腹瀉群聚事件中[29]，檢出諾羅病毒陽性的檢體中諾羅病毒基因型別以 GII/4 為主，佔所有群聚事件中檢出諾羅病毒陽性個案的 83%。在本研究中，自貝類檢出的諾羅病毒 GII/4 基因型陽性率約佔所有檢出諾羅病毒的 18.7%。GI/4 基因型諾羅病毒在人類群聚事件中分離率不高，但在貝類中陽性率卻高達 21%，甚至高過 GII/4 基因型；整體來看，貝類中檢出諾羅病毒 GI 型別件數和 GII 型別件數相當，曾經有期刊指出諾羅病毒 GI 基因型在環境中較 GII 基因型更為穩定[37]，因此，推測 GI 基因型在環境中的穩定度使得在貝類中檢出率較高。也有論文提到 GII 基因型的感染力較 GI 基因型感染力強，因此 GII 基因型造成的群聚事件數會相對比較高，但確切的致病機轉仍不清楚。在本研究的採樣期間，從貝類中分析得到的諾羅病毒基因型別種類，與同時期的群聚事件分離到的諾羅病毒型別比，貝類存在的諾羅病毒基因型較多樣，如 GI/1、GI/9、GII/5、GII/6、GII/11、GII/14、GII/16；此外，在鮮蚶的檢體中，也發現 3 個檢體帶著 swine 的諾羅病毒。至於這些基因型別諾羅病毒在人類宿主、動物宿主或環境存在的情形，以及在養殖環境中，諾羅病毒如何進入環境的水源或養殖場中的情形，均需要再繼續深入的探討。

伍、結論與建議

本研究希望藉由觀察醫院與人口密集機構的環境中諾羅病毒存在情況，了解病毒在不同時間點存在的狀況。在研究結論中，我們在發病病房場所幾種採樣點，藉了解病房的活動情形，而規劃出幾類採檢的項目，在採樣檢測中發現馬桶、廁所沖水把手、水龍頭、電話話筒、和廁所門帘上可以檢驗出諾羅病毒存在。在受污染的環境中，經定期的消毒清潔可以降低病毒量，同時病毒無法經過長時間暴露在環境中。因此，在群聚事件發生同時，建議藉由消毒清潔可疑的接觸環境介面，並即時釐清病毒引起群聚的傳染途徑，以降低群聚事件的擴散。

由於諾羅病毒是屬於糞口傳染，容易造成食因性的食物中毒，而貝類與水源是國外文獻中發現最容易引起諾羅病毒傳播的食因性途徑，在台灣地區，目前還未有完整的研究報告，因此藉由檢測環境水源與貝類等樣本中的諾羅病毒，並與諾羅病毒感染病患中的病毒基因比較，可以初略了解台灣地區諾羅病毒的存在環境或食品情況，以及了解環境污染情況。本研究中水產品(貝類)的研究中，預計持續定點監測一年(自1月起至12月止)，雖目前發現在台灣的養殖貝類檢出諾羅病毒存在比率相當高，將在完成一整年監測資料後，將結果彙整建議權責疾病組及分局或衛生局，未來可在進行疫情調查時，能夠詢問病患是否在發病前曾食用的貝類或其他水產種

類及地點；同時並建議能夠採集相關食物送權責機關檢驗，屆時可與發病者人體檢體中之諾羅病毒型別分析及序列比對。本研究中已有初略的貝類與人病毒序列相關性分析，未來將更詳細深入的探討傳播方式，研究結果將可提供作為宣導衛教觀念參考，英對於降低食物中毒有更大的幫助。

陸、參考文獻

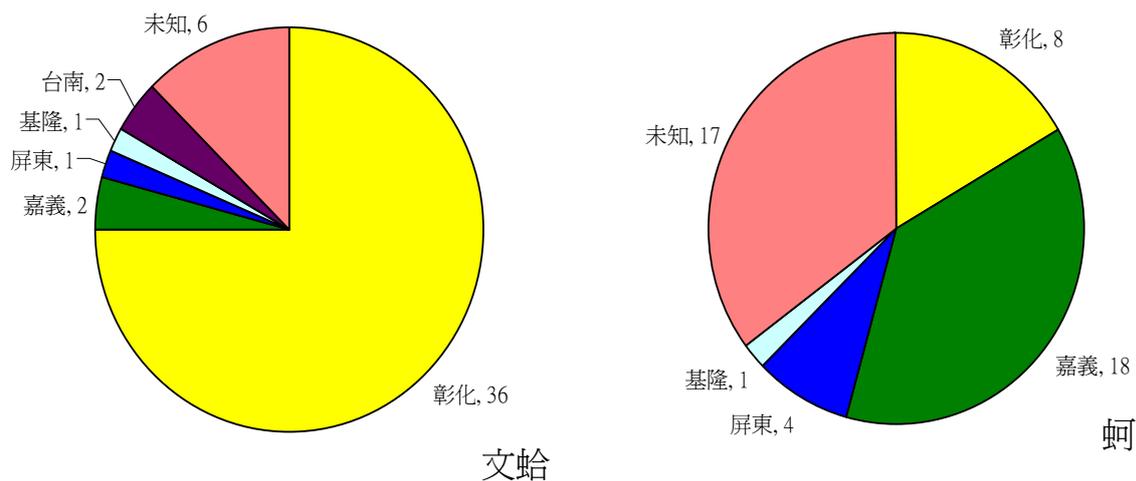
1. Mead, P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. McCaig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe, *Food-related illness and death in the United States*. *Emerg Infect Dis*, 1999. **5**(5): p. 607-25.
2. 吳芳姿、江大雄、莫之欣、梁淑媛、洪健翔、楊志元、楊辰夫、吳和生。 , 台灣地區首例沙波病毒腹瀉群聚感染事件。 . 疫情報導, 2007. **23**(12): p. (In press).
3. Xi, J.N., D.Y. Graham, K.N. Wang, and M.K. Estes, *Norwalk virus genome cloning and characterization*. *Science*, 1990. **250**(4987): p. 1580-3.
4. Ando, T., S.S. Monroe, J.R. Gentsch, Q. Jin, D.C. Lewis, and R.I. Glass, *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**(1): p. 64-71.
5. Noel, J.S., R.L. Fankhauser, T. Ando, S.S. Monroe, and R.I. Glass, *Identification of a distinct common strain of "Norwalk-like viruses" having a global distribution*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(6): p. 1334-44.
6. 潘淑玲、蔡韶慧、張罔年、吳芳姿、蘇勳璧、李翠鳳, 台中縣某醫院精神科病房 *Norovirus* 引起之腹瀉群聚事件。 . 疫情報導, 2006. **22**(12): p. 805-810.
7. 蔡麗淑、蔡韶慧、吳芳姿、賴佩芳、巫旻靜、陳安汝、楊志元、蘇勳璧、葉彥柏、李翠鳳, 彰化縣某殘障教養院院民集體發燒及腹瀉群聚事件調查. 疫情報導, 2006. **22**(8): p. 525-530.
8. 江大雄、林茹玉、吳芳姿、郭馨蔚、莊莘、許雲霞、林詩晴, 台北市某重殘照顧中心住民與員工腹瀉、嘔吐群聚事件調查. 疫情報導, 2007. **23**(8): p. 420-430.
9. 廖盈淑、劉玉蓮、吳芳姿、劉士豪、岳瑞雪、鄭萬金、林文斐, 宜蘭縣員山鄉某醫院 *Norovirus* 腸胃炎群聚之調查與防治策略. 疫情報導, 2007. **23**(9): p. (In press).
10. Mounts, A.W., T. Ando, M. Koopmans, J.S. Bresee, J. Noel, and R.I. Glass, *Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses*. *J Infect Dis*, 2000. **181 Suppl 2**: p. S284-7.
11. Nakata, S., S. Honma, K. Numata, K. Kogawa, S. Ukae, N. Adachi, X. Jiang, M.K. Estes, Z. Gatheru, P.M. Tukei, and S. Chiba, *Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(11): p. 3160-3.
12. Dolin, R., J.J. Treanor, and H.P. Madore, *Novel agents of viral enteritis in humans*. *J Infect Dis*, 1987. **155**(3): p. 365-76.
13. Snyder, J.D. and M.H. Merson, *The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data*. *Bull World Health Organ*,

1982. **60**(4): p. 605-13.
14. Bern, C., and R. I. Glass., *Impact of diarrheal diseases worldwide*. Viral infections of the gastrointestinal tract, ed. A.Z. Kapikian. 1994, New York. p. 1-26.
 15. Guerrant, R.L., J.M. Hughes, N.L. Lima, and J. Crane, *Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special settings, and etiologies*. Rev Infect Dis, 1990. **12 Suppl 1**: p. S41-50.
 16. Warren, K.S., *Tropical medicine or tropical health: the Heath Clark lectures, 1988*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(1): p. 142-56.
 17. Kapikian, A.Z., R.G. Wyatt, R. Dolin, T.S. Thornhill, A.R. Kalica, and R.M. Chanock, *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1075-81.
 18. Beuret, C., D. Kohler, A. Baumgartner, and T.M. Luthi, *Norwalk-like virus sequences in mineral waters: one-year monitoring of three brands*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(4): p. 1925-31.
 19. Chiba, S., Y. Sakuma, R. Kogasaka, M. Akihara, K. Horino, T. Nakao, and S. Fukui, *An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home*. J Med Virol, 1979. **4**(4): p. 249-54.
 20. Beuret, C., *A simple method for isolation of enteric viruses (noroviruses and enteroviruses) in water*. J Virol Methods, 2003. **107**(1): p. 1-8.
 21. Cubitt, W.D., D.A. McSwiggan, and S. Arstall, *An outbreak of calicivirus infection in a mother and baby unit*. J Clin Pathol, 1980. **33**(11): p. 1095-8.
 22. Lodder, W.J., J. Vinje, R. van De Heide, A.M. de Roda Husman, E.J. Leenen, and M.P. Koopmans, *Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(12): p. 5624-7.
 23. Kukkula, M., L. Maunula, E. Silvennoinen, and C.H. von Bonsdorff, *Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses*. J Infect Dis, 1999. **180**(6): p. 1771-6.
 24. Belliot, G.M., R.L. Fankhauser, and S.S. Monroe, *Characterization of "Norwalk-like viruses" and astroviruses by liquid hybridization assay*. J Virol Methods, 2001. **91**(2): p. 119-30.
 25. Hafliger, D., P. Hubner, and J. Luthy, *Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water*. Int J Food Microbiol, 2000. **54**(1-2): p. 123-6.
 26. 吳芳姿、王明琴、莫之欣、連怡佳、楊志元、陳豪勇, *諾瓦克病毒 (Norovirus) 署立台北醫院疫情及實驗室分析*. 疫情報導, 2004. **20**(8): p. 407-419.
 27. 柯政欽、吳芳姿、陳豪勇、呂玫嬌、林世華、廖皓宏、陳建源、張上淳, *類諾瓦克病毒在呼吸照護病房引起的群突發感染*. 感染控制雜誌, 2004. **14**(5): p. 267-277.

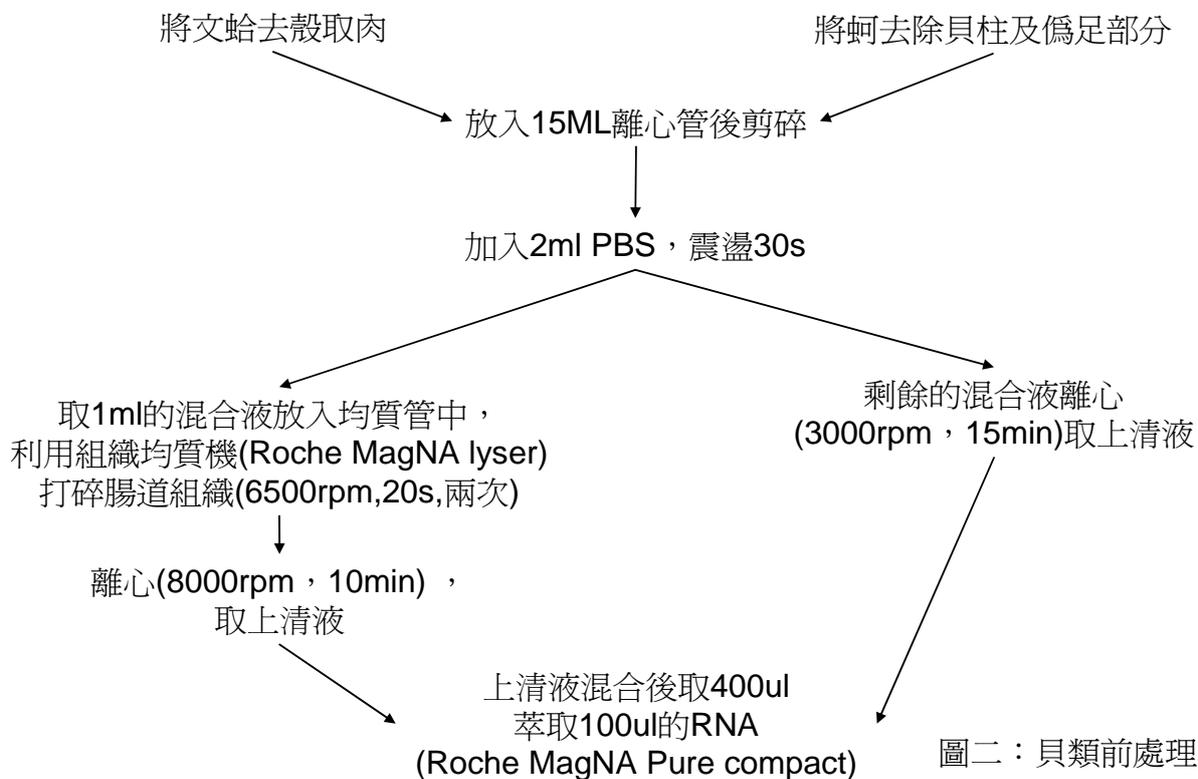
28. 賴珮芳、周娟秀、洪淑娟、吳芳姿、張蕊仙、楊志元、羅財樟、李翠鳳, 某醫院精神科病房 *Norovirus* 引起之住民腹瀉群聚事件. 疫情報導, 2006. **22**(4): p. 220-223.
29. Wu, F.T., T. Oka, K. Katayama, H.S. Wu, D.S. Donald Jiang, T. Miyamura, N. Takeda, and G.S. Hansman, *Genetic diversity of noroviruses in Taiwan between November 2004 and March 2005*. Arch Virol, 2006. **151**(7): p. 1319-27.
30. Hansman, G.S., K. Natori, H. Shirato-Horikoshi, S. Ogawa, T. Oka, K. Katayama, T. Tanaka, T. Miyoshi, K. Sakae, S. Kobayashi, M. Shinohara, K. Uchida, N. Sakurai, K. Shinozaki, M. Okada, Y. Seto, K. Kamata, N. Nagata, K. Tanaka, T. Miyamura, and N. Takeda, *Genetic and antigenic diversity among noroviruses*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 4): p. 909-19.
31. Oka, T., K. Katayama, G.S. Hansman, T. Kageyama, S. Ogawa, F.T. Wu, P.A. White, and N. Takeda, *Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction*. J Med Virol, 2006. **78**(10): p. 1347-53.
32. Tu, E.T., R.A. Bull, M.J. Kim, C.J. McIver, L. Heron, W.D. Rawlinson, and P.A. White, *Norovirus excretion in an aged-care setting*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2119-21.
33. Gallimore, C.I., C. Taylor, A.R. Gennery, A.J. Cant, A. Galloway, D. Lewis, and J.J. Gray, *Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(8): p. 3890-4.
34. Gallimore, C.I., C. Taylor, A.R. Gennery, A.J. Cant, A. Galloway, M. Iturriza-Gomara, and J.J. Gray, *Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a pediatric primary immunodeficiency unit*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 395-9.
35. Gallimore, C.I., C. Taylor, A.R. Gennery, A.J. Cant, A. Galloway, J. Xerry, J. Adigwe, and J.J. Gray, *Contamination of the hospital environment with gastroenteric viruses: comparison of two pediatric wards over a winter season*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 3112-5.
36. Nishida, T., O. Nishio, M. Kato, T. Chuma, H. Kato, H. Iwata, and H. Kimura, *Genotyping and quantitation of noroviruses in oysters from two distinct sea areas in Japan*. Microbiol Immunol, 2007. **51**(2): p. 177-84.
37. Le Guyader, F.S., J.C. Le Saux, K. Ambert-Balay, J. Krol, O. Serais, S. Parnaudeau, H. Giraudon, G. Delmas, M. Pommepuy, P. Pothier, and R.L. Atmar, *Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(12): p. 4011-7.

柒、圖&表

圖一、檢測貝類樣品原產地分佈分析圖

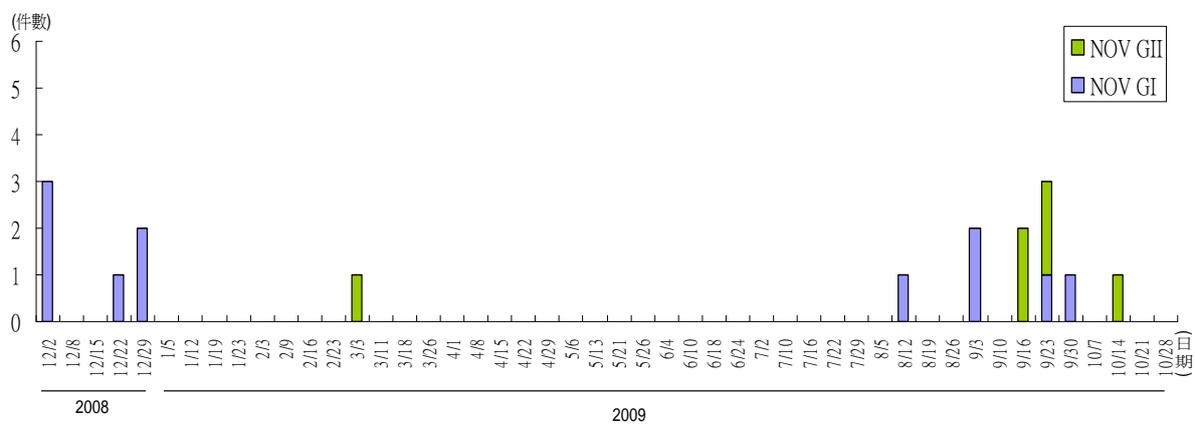


圖二、文蛤與蚶處理方法流程圖：

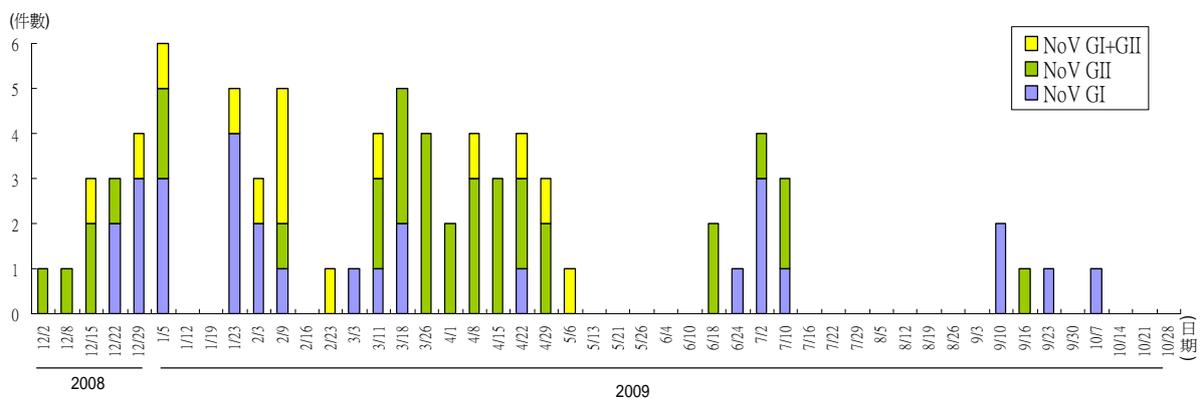


圖二：貝類前處理

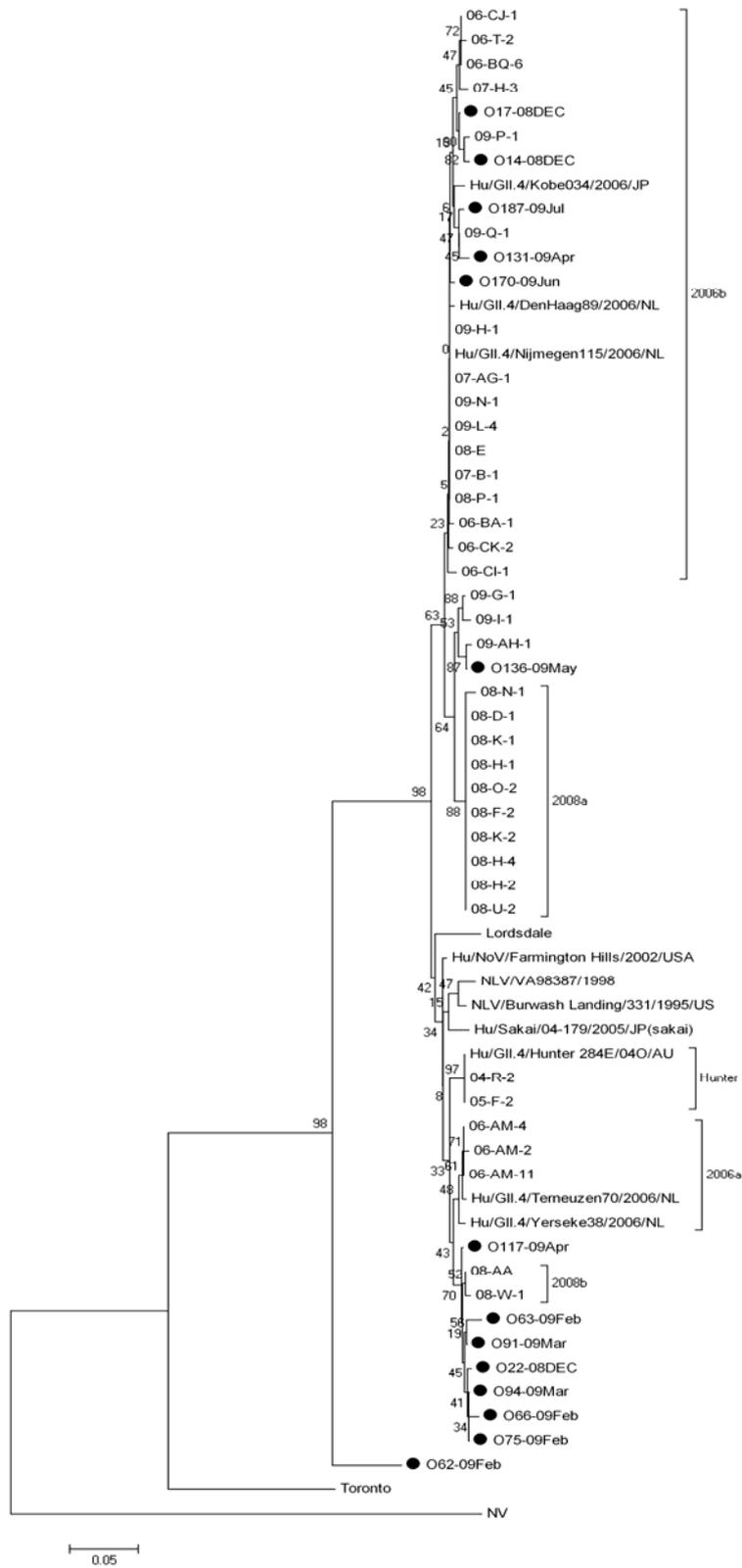
圖三、97年12月到98年10月文蛤檢出諾羅病毒陽性件數(周)分布圖



圖四、97年12月到98年10月蚶檢出諾羅病毒陽性件數(周)分布圖



圖五、貝類檢體與人體檢體中之諾羅病毒序列演化分析圖



表一、腹瀉病毒核酸引子序列

表一引子對序列

核酸引子	5'→3' 序列	Localization
Rotavirus		
Rota NVP3-F	ACCATCTACACATGACCCTC	963-982
Rota NVP3-R	GGTCACATAACGCCCC	1034-1049
Norovirus		
COG1F	CGYTGGATGCGNTTYCATGA	5291-5331
G1-SKF	CTGCCCGAATTYGTAATGA	5342-5361
G1-SKR	CCAACCCARCCATTRTACA	5652-5671
COG2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	5003-5029
G2-SKF	CNTGGGAGGGCGATCGCAA	5058-5077
G2-SKR	CCRCCNGCATRHCCRTTRTACAT	5378-5401
Sapovirus		
Sav124F	GAYCASGCTCTCGCYACCTAC	5078-5098
SaV1F	TTGGCCCTCGCCACCTAC	5082-5098
SaV5F	TTTGAACAAGCTGTGGCATGCTAC	5075-5098
SaV1245R	CCCTCCATYTCAAACACTA	5163-5181
SaV124TP	FAM-CCRCCTATRAACCA-MGB-NQF	
SaV5TP	FAM-TGCCACCAATGTACCA-MGB-NQF	
Aichivirus		
C(+)	ACACTCCCACCTCCCGCCAGTA	6261-6282
C(-)	GGAAGAGCTGGGTGTCAAGA	6779-6760
C94b(+)	GACTTCCCCGGAGTCGTCGTCT	6398-6419
264k(-)	GACATCCGGTTGACGTTGAC	6663-6644

表二、流行季與非流行季之人員與環境採檢病毒分析結果

地點 時間	人員		馬桶		廁所沖水把手		門把		水龍頭		其他環境項目	
	採檢數	陽性數	採檢數	陽性數	採檢數	陽性數	採檢數	陽性數	採檢數	陽性數	採檢數	陽性數
八里												
96.10	81	0 (0%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)	3	0 (0%)
96.11~12	71	17 (24%)	3	1 (33%)	3	1 (33%)	1	0 (0%)	0	0 (0%)	0	0 (0%)
96.12	-	-	3	0 (0%)	3	0 (0%)	6	0 (0%)	0	0 (0%)	0	0 (0%)
97.5	93	0 (0%)	23	0 (0%)	23	0 (0%)	23	0 (0%)	23	0 (0%)	6	0 (0%)
98.2	-	-	9	2 (22%)	9	0 (0%)	9	0 (0%)	9	0 (0%)	12	1* (8%)
總數	245	17	41	3	41	1	42	0	35	0	21	1
員山												
95.11	8	3 (38%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96.12	16	8 (50%)	3	1 (33%)	3	0 (0%)	4	0 (0%)	2	0 (0%)	4	0 (0%)
97.9	45	0 (0%)	5	0 (0%)	5	0 (0%)	11	0 (0%)	19	0 (0%)	13	0 (0%)
總數	69	11	8	1	8	0	15	0	21	0	17	0
仁愛												
98.2	86	25 (29%)	5	0 (0%)	-	-	6	0 (0%)	7	2 (29%)	32	1# (3%)
98.3	25	15 (60%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
98.3	15	1 (7%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
總數	126	41 (33%)	5	0 (0%)	-	-	6	0 (0%)	7	2 (29%)	32	1 (3%)

備註：* 電話話筒；# 廁所門帘

表三、97年12月至98年10月間文蛤與鮮蚶中病毒檢測分析結果

	鮮蚶		文蛤	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Norovirus GI	29	245	11	277
Norovirus GII	27	247	6	282
Norovirus GI+GII	14	274	0	288
Rotavirus	1	287	0	288
Aichivirus	0	288	0	288
Sapovirus	0	288	ND	ND
Total	71(24.6%)	217	17(5.9%)	271

表四、97 年 12 月至 98 年 10 月間文蛤與蚶中諾羅病毒檢驗分析月統計表

Month/year	蚶				文蛤			
	No. of tested samples	NV GI	NV GII	GI+GII	No. of tested samples	NV GI	NV GII	GI+GII
Dec/2008	30	5	5	2	30	6	0	0
Jan/2009	24	7	0	2	24	0	0	0
Feb/2009	24	3	1	5	24	0	0	0
Mar/2009	24	4	6	1	24	0	1	0
Apr/2009	30	1	9	3	30	0	0	0
May/2009	24	0	0	1	24	0	0	0
Jun/2009	24	1	2	0	24	0	0	0
Jul/2009	30	4	3	0	30	0	0	0
Aug/2009	24	0	0	0	24	1	0	0
Sep/2009	30	3	1	0	30	4	4	0
Oct/2009	24	1	0	0	24	0	1	0
Total number (positive rate)	288	29 (10.1%)	27 (9.4%)	14 (4.9%)	288	11 (3.8%)	6 (2.1%)	0

表五、鮮蚶中諾羅病毒基因型別分析

Oyster										
Norovirus	2008	2009								Subtotal
	Dec	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	
GI/1	1	3								4
GI/2	3	1								4
GI/4	2	1	6	3	3	1				16
GI/9				1						1
GI/14	1	4	2	1	1		1			10

GII/2					1					1
GII/3					3					3
GII/4	3		4	2	2	1	1	1		14
GII/5					1					1
GII/6					1					1
GII/7				1						1
GII/11	2	1	1	2						6
GII/12					1					1
GII/13	1									1
GII/14				1						1
GII/16	1	1	1	1	3					7
GII/Swine							1	2		3
Subtotal	14	11	14	12	16	2	3	3	0	75