

人類輪狀病毒現況與實驗室診斷

洪鼎鈞 廖永樑 楊義爵

財團法人奇美醫院 臨床病理科

摘要

急性胃腸炎 (acute gastroenteritis) 是相當廣泛且常見的疾病，已成為僅次於呼吸道感染症的疾病。主要是因為衛生環境較差，或是食物及水源受到病原菌污染後，而導致胃腸道發炎的現象。臨床上常見的急性胃腸炎疾病，多屬於急性發作且為具感染性的，其中以輪狀病毒胃腸炎最為常見，無論大人或小孩皆有機會被感染。成人輪狀病毒腸胃炎通常極輕微或無症狀，但常造成六個月至二歲大的嬰幼兒急性腸胃炎，嚴重時會導致病童因腹瀉大量脫水而死亡。目前已知的輪狀病毒可分七群 (A-G)，A 群是造成人類感染最重要的主因。此外依病毒表面結構可細分 14 種 G-serotype 和超過 20 種 P-serotype，其中造成人類感染大多屬 G1-4 及 G9。組合血清型中又以 G1P8 為最常見的病毒株。

關鍵詞：急性胃腸炎 (Acute gastroenteritis)
人類輪狀病毒 (Human rotavirus)
G/P 血清型 (G/P serotype)

前言

病毒是引起人類急性胃腸炎 (acute gastroenteritis) 的主要病原之一，根據世界衛生組織 (WHO) 統計，全球每年約有 6 百萬人因急性胃腸炎導致的腹瀉症狀而死亡，其中 5 歲以下嬰幼兒就佔了 19% 的比例，致死率僅次於肺炎排名第二，成為最常見的疾病¹。然而導致急性胃腸炎的病原菌種類眾多，大多以病毒感染而導致為腸炎居多，佔了 70% 左右，其餘的 10-20% 為細菌或原蟲，其中最常引起嬰幼兒腹瀉的主要病毒性致病原則是人類輪狀病毒 (human rotavirus, HRV)²。

輪狀病毒性胃腸炎是一種世界性的感染性疾病，由於其感染力很強，無論是在開發中或已開發國家，都是件困擾且棘手的問題，帶給國家許多不必要的醫療成本支出。1985 年 De Zoysa 等人統計開發中國家輪狀病毒疾病之盛行率發現，所有腹瀉病人中有 6% 是因為 HRV 所引起，而且有 20% 的死亡者都是因為腹瀉所導致³。台灣地區曾有學者針對 467 位因感染性腸胃炎而住院的孩童進行分析，結果發現有 55% 的確定病原為 HRV¹，Adenovirus 佔 8%，其餘佔 7%¹¹。2005 年 Chen, K.Y. 等學者分析 2001 到 2003 年間，2600 位五歲以下患有胃腸炎的孩童，研究其致病的病原，結果發現 52% 的患者是因為病原菌感染而

引起胃腸炎，其中HRV 佔43%，細菌性佔11%，腸道腺病毒佔2.5%⁴。此外，全球每年HRV造成大約一億一千一百萬人口（五歲以下孩童）出現胃腸炎，其中的二千五百萬人需就醫，二百萬人需住院，平均約有四十四萬人死亡^{3,5}。因此從以上數據可發現，輪狀病毒的感染已受到全世界相關單位的重視。因此，HRV的快速診斷與疾病防治，乃是當前衛生單位所要正視的課題。

分子流行病學

HRV屬於呼腸孤病毒科(reoviridae)輪狀病毒屬(genus)。澳洲學者Ruth Bishop於1973年發現，鑑於病毒其內外殼之間有輻射條狀結構連結，在電子顯微鏡下的形狀像個輪子而得名。病毒粒子外表無外套膜(nonenveloped)包覆，蛋白外殼(capsid)由三層結構組成，中央為病毒基因體。基因體由11個雙股RNA所組成。每個片段皆可編碼對應出病毒所需要的蛋白質⁶(表一)。而輪狀病毒的外殼蛋白主要由VP4及VP7構成，內殼蛋白則由VP1、VP2、VP3及VP6構成，其中VP6是輪狀病毒的群特異共同抗原(group specific antigen)，目前已知的輪狀病毒依

表一：The function and properties of rotavirus genome

Genome segment	Gene product	Location in virus particle	Function and properties
1	VP1	Inner capsid	RNA-dependent RNA polymerase
2	VP2	Inner capsid	Inner capsid structural protein
3	VP3	Inner capsid	1. Guanylyltransferase 2. Methyltransferase
4	VP4,5,8	Outer capsid	1. Virus infectivity enhanced by trypsin cleavage of VP4 into VP5 and VP8 2. Hemagglutinin and P-type neutralization antigen
5	NSP1	Nonstructural	1. Associates with cytoskeleton 2. Virus specific 5' -mRNA binding
6	VP6	Middle capsid	1. Major virion protein 2. middle capsid structural protein 3. subgroup antigen
7	NSP3	Nonstructural	Involved in translation regulate and host shut-off
8	NSP2	Nonstructural	Associated with viral replication
9	VP7	Outer capsid	1. Outer capsid structural glycoprotein 2. G-type neutralization antigen
10	NSP4	Nonstructural	1. Associated with virion release 2. Enterotoxin
11	NSP5,6	Nonstructural	Interacts with VP2,NSP2,VP5 and VP6

(節錄整理於：The RNAs and Proteins of dsRNA Viruses: Edited by Mertens PPC, Attoui H, Bamford DH.)

此抗原的特性分成七個群組(A-G)，其中僅有A到C群可感染人類，其餘則只在其他動物身上出現⁷。A群輪狀病毒佔有非常高的感染比例而且也是造成人類感染最主要的元兇，五歲以下之嬰幼兒的族群是其主要的感染對象。B群及C群亦可造成人感染。1983年於中國被分離出來的輪狀病毒證實為B群，其感染對象主要為成人，導致的臨床症狀類似霍亂性腹瀉⁸。而HRV Group C於1980第一次在小豬身上分離出來，直到1982年才出現在人類。其主要會造成三歲以上的孩童以及成人出現急性腹瀉症狀⁷。雖然HRV group B和C兩者的形態學與Group A相似，但利用電泳分型技術(electropherotype)，將病毒基因體中11個大小不等的dsRNA片段進行分離，在根據各片段在polyacrylamide gel中分佈情形，可清楚將其分辨^{9,10,11}。

相較於流感病毒表面的NA和HA，輪狀病毒兩個重要的表面抗原VP4和VP7是血清型(serotype)劃分的重要依據，即所謂的P血清型及G血清型。至今已有14種G血清型在人類中鑑定出，以G1到G4最常見，其中已G1的全球盛行率最高^{12,13,14}。2006年Ahmed, H.M.等者分析伊拉克地區260位患有急性腹瀉病人的檢體，

利用RT-PCR 進行分型顯示，其中G1 佔38% 為最多，其次為G4(20%)、G2(17%)和G9(11%)¹²。此外比利時學者利用type-specific-primer 進行孟加拉地區輪狀病毒分型發現，G1 的盛行率最高佔44.8%，其次為G9 (21.7%)，G2 (15.0%)，G4 (13.8%)¹⁵。然而在台灣的報告也顯示全年皆有輪狀病毒的感染，雖然有很多血清型，但仍以G1-G4 最常見¹⁶。2004年Sung,Y.L 等人發現南台灣地區，比例最高者為G1 (51%)，其次為G9(31%)、G3(12%)、G2(3%) and G4(3%)²。此外，研究也發現2001 到2003 年間台灣地區感染輪狀病毒的盛行率，以G9 病毒株盛行率最高(37%)，其次為G1 佔31%⁴。整合幾篇研究數據可得知，G9 病毒株之盛行率有逐漸增加的趨勢，成為主要常見的血清型。2006 年台大醫學院等研究團隊分析2000 至2002 年輪狀病毒感之血清型分佈比例發現，G9 病毒株盛行率逐年增加，分別為4 (3.3%)、79 (33.8) 及161 (54.8)，三年的比例總和244 (37.7%)，在其他血清型中佔第一位¹⁷。除此之外，中國地區也有類似的流行趨勢。2002 年Fang,Z.Y. 等學者收集1998-2000 年中國10 個地區共3177 個患有急性腹瀉的檢體進行HRV 的篩檢分型發現，G1 的比例最高為72.6%，其次為G3,G2,G4,G9，陽性率分別為14.2%，12.1%，2.5%，0.9%¹⁸。根據研究發現，台灣地區每年主要流行的病毒型別不同，可能使孩童出現重複感染。因此，無論是群或血清型的分類不同，都是重要的流行病學標記。

臨床症狀與致病機制

輪狀病毒好發在冬季，常侵犯五歲以下嬰幼兒，潛伏期一般在二天以內，主要傳染途徑為糞口傳染 (fecal-oral route)，少部份由空氣飛沫傳遞。曾有研究學者在罹患肺炎孩童之支氣管抽出物 (tracheal aspirates) 中，利用ELISA 及免疫螢光抗體分析，發現有27.6% 的檢體中檢測出HRV 抗原，作者認為HRV 有可能是藉由呼吸到感染後進入支氣管中而引發肺炎¹⁹。當病毒侵入體內後，會在位於絨毛頂端的非分化型成熟腸細胞 (nondividing mature enterocyte) 中複製，破壞

其結構使其吸收與分泌功能喪失，造成水樣性腹瀉。因此，歸納輪狀病毒腹瀉的機制主要包括腸道細胞被破壞而導致吸收不良、病毒本身毒素 (NSP4)、腸道神經系統 (ENS) 受到刺激以及腸絨毛細胞缺血性壞死等⁵。臨床症狀除了腹瀉之外，亦會伴隨噁心、嘔吐、發燒及腹痛。病人的糞便檢體並不含血絲，同時在鏡檢下亦看不到白血球。臨床實驗發現：不同血清型病毒株感染，所出現的臨床症狀亦有差異。例如感染G9-type 的患者全部出現腹瀉症狀，而non-G9 感染者中只有83%²。雖然大部分的病人感染後會自行產生抗體而痊癒，但由於其水瀉及嘔吐症狀可持續多日，若處理不當，易引起嚴重脫水 (severe dehydration) 而死亡⁴。此外，輪狀病毒的自然感染雖僅侷限在腸道細胞中，但也有可能進入血流引起病毒血症或在腸道以外的組織中複製。文獻報導指出，曾出在一些免疫缺乏的孩童肝臟及腎臟檢體中，檢測出HRV 的抗原²⁰。也在患有癲癇患者的CSF 中，檢測出HRV 的抗原。2001 年Lynch, M. 等學者從2 位病患的CSF 檢體中發現到HRV 抗原，推測病毒可能經由腸道移行到腸道以外的器官，再經由血腦障壁進入中樞神經系統²¹。

實驗室診斷

實驗室診斷方法大多是偵測糞便中的輪狀病毒抗原為主，最常用的測試方法包括酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunoassay, ELISA) 與乳膠凝集法 (latex agglutination, LA)，兩者具有較高敏感度 (sensitivity) 與特異性 (specificity)。2004 年Altindis,M. 等學者收集135 位3 歲以下孩童患有急性腸胃炎之檢體，分別利用LA 及ELISA 方法進行HRV 抗原檢測分析，相較於PAGE 檢測，其敏感度與特異性可達90% 以上²²。但由於病毒本身基因型具有變異特性，也因此偶會出現偽陰性的現象。隨者分子生物技術的進步，利用特異性引子 (primer) 進行RT-PCR (reverse transcriptase PCR)，將病毒某一基因片段進行放大 (amplification)，則可證實輪狀病毒的存在。文獻報告也顯示，相較於EIA 和EM，利用RT-PCR 方式進行HRV 檢測，可提高48% 檢測率²³。此外也可利用此法進行血清型分析。

1997年Lee,C.N.等學者利用三種鑑定VP7(G)血清型之方法,即螢光點中和試驗(FFN)、特異之單株抗體進行酶連免疫試驗(ELISA-MAb)、與反轉錄聚合酶連鎖反應(RT-PCR)。當以ELISA-MAb和RT-PCR來鑑定輪狀病毒分離株之G血清型時,顯示結果正確而且敏感度較FFN為高。以RT-PCR檢測G血清型之敏感度可達89.4%,如將兩種方法合併計算則有93.2%之檢體可定出G血清型²⁴。

除了傳統的PCR方法可將病毒核酸片段放大藉以證實病毒的存在之外,近年發展出的即時聚合酶連鎖反應(real time PCR)技術,即PCR反應過程中同時可以偵測反應增幅情形與增幅趨勢的技術。不僅方法簡單,可快速地偵測檢體中HRV基因,而且也可提高敏感性。2004年Pang等學者利用三種不同的檢測技術,即Real-time RT-PCR、Nested PCR和RT-PCR分別進行HRV檢測,分析結果發現,就敏感度而言,以Real-time RT-PCR的效果最好²⁵。

在細胞培養方面,由於人類輪狀病毒不易在體外進行培養,因此細胞株的選擇非常重要,目前唯一可培養HRV的細胞株為原代細胞株(primary cell)以及持續性細胞株(continuous cell)兩種,其中以CV-1(African green monkey kidney cells)和MA-104(Rhesus monkey kidney cells)最常使用²⁶。除此之外,病毒培養過程中於培養基中添加少量的胰蛋白酶(trypsin),則可增加病毒的感染能力²⁷。

預防

輪狀病毒的傳染力極強,只要有少量的病毒粒子就足以使人引發急性胃腸炎症狀。如何避免被HRV感染及做好疾病預防措施,乃是目前相關單位所要重視的課題。由於HRV多半是經由手接觸病人排泄物,再傳染給他人,所以個人衛生的觀念就非常重要,不僅要勤加洗手之外,飲食的清潔也是注意重點項目,因此,只要徹底執行避免生食或不潔的食物,重視清潔及環境衛生,就可控制HRV的感染。

1998年8月經美國FDA核准上市的疫苗(RotaShield),該疫苗具有對抗G1-4不同血清

型病毒的能力,當時的確帶給各界相當大的震撼,但卻也使服用者出現可能危害生命的消化道疾病—腸套疊(intussusception),因此於1999年正式退出市場²⁹。目前已知多家研究單位與知名藥廠正積極研發HRV疫苗,疫苗的製備原理大多採用基因重組的方式進行,也就是重組人類及牛或猴的病毒基因,以口服的方式進行接種。此外亦可用單一人類輪狀病毒株,經滅毒化處理後,藉由口服方式促使體內產生對抗病毒之免疫反應。無論是何種輪狀病毒疫苗,臨床試驗結果證實皆有不錯的預防及治療效果^{30,31}。第一種由GlaxoSmithKlin公司製造研發的單價疫苗(Rotarix),接受兩劑活性滅毒疫苗後,即可對G1P[8]病毒株產生保護效果。根據實驗統計發現:Rotarix疫苗的防止住院效果高達85%,若以Vesikari score計分方式將輪狀病毒引起的腸胃炎依症狀區分等級,則此疫苗對預防重症疾病高達100%²⁸。此外,Merck藥廠透過人類與牛輪狀病毒株(WC3)進行重組製程所研發出的新一代疫苗(Rotateq),亦可提供消費者另一種不同的選擇。此種五價活性滅毒疫苗,可針對不同的血清型病毒株(G1-4,P8)產生保護效力。2006年Vesikari等人利用該疫苗進行研究調查發現,服用完三劑疫苗後,對血清型G1-4輪狀病毒胃腸炎防止急診及住院的保護能力可達94.5%³²。因此,給予適當的輪狀病毒疫苗,的確可達到不錯的預防效果。

結論

隨著秋、冬季節的到來,氣溫逐漸下降,正是輪狀病毒好發的高峰期。流行病學家發現每年出現的病毒輪狀血清型均不同,在加上病毒基因體由11個片段組成,證據顯示經由病毒共同感染(co-infection)後會出現基因重組的現象,進而出現新的病毒株³³。但透過例行性的診斷技術,皆能準確檢測並提高實驗室掌握輪狀病毒的流行動態。因此,藉由流行病學上的新發現,以及高敏感性及專一性分析技術,希望能提供醫療界及學術界在人類輪狀病毒研究與診斷上一項重要參考之依據。

參考文獻

- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, et al. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365: 1114-6.
- Sung YL, Huang YF, Huang CF, et al. Emergence of G9 serotype rotavirus as a major cause of infection gastroenteritis in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2004; 37: 322-6.
- Parashar UDEG, Hummelman JS, Bresee MA, et al. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 565-72.
- Chen KY, Chen PY, Tang RB, et al. Sentinel hospital surveillance for rotavirus diarrhea in Taiwan, 2001-2003. *J Infect Dis* 2005; 192: S44-8.
- Ramig RF. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. *J Virol* 2004; 79: 10213-20.
- Okitsu-Negishi S, Nguyen TA, Phan TG, et al. Molecular epidemiology of viral gastroenteritis in Asia. *Pediatrics International* 2004; 46: 245-52.
- Rahman M, Banik S, Faruque Abu SG, et al. Detection and characterization of human group C rotaviruses in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4460-5.
- Sanekata T, Ahmed MU, Kader A. Human group B rotavirus infection cause severe diarrhea in children and adults in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2187-90.
- Kasule M, Sebunya TK, Gashe BA, et al. Detection and characterization of human rotavirus among children with diarrhea in Botswana. *Trop Med Int Health* 2003; 8: 1137-42.
- Gouvea V, Allen R, Glass RI, et al. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 519-23.
- Spencer EG, Avendano LF, Garcia BI. Analysis of human rotavirus mixed electrophoresis. *Infect Immun* 1983; 39: 569-74.
- Ahmed HM, Coulter JBS, Nakagomi O, et al. Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdistan. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 824-6.
- Castello AA, Arguelles MH, Rota RP, et al. Molecular epidemiology of group A rotavirus diarrhea among children in Buenos Aires, Argentina, from 1999 to 2003 and emergence of the infrequent genotype G12. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2046-50.
- Sanchez-Fauquier A, Wilhelmi I, Colomina J, et al. Diversity of group A human rotavirus types circulating over a 4-type period in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1609-13.
- Rahman M, Sultana R, Podder G, et al. Typing of human rotaviruses: Nucleotide mismatches between the VP7 gene and primer are associated with genotyping failure. *Virology* 2005; 2: 24-8.
- Tsai CH, Chiu HH, Abe T. Epidemiology features of rotavirus infection in Taiwan: A review. *Pediatrics International* 2000; 42: 411-4.
- Lin YP, Chang SY, Kao CL, et al. Molecular epidemiology of G9 rotaviruses in Taiwan between 2000 and 2002. *J Clin Microbiol* 2006; 40: 1875-8.
- Fang ZY, Yang H, Qi J, et al. Diversity of rotavirus strains among children with acute diarrhea in China: 1998-2000 surveillance study. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1875-8.
- Zhaori GT, Fu LT, Xu YH, et al. Detection of rotavirus antigen in tracheal aspirates of infants and children with pneumonia. *Chin Med J* 1991; 104: 830-3.
- Lynch M, Shieh WJ, Tatti K, et al. The pathology of rotavirus-associated deaths, Using new molecular diagnostics. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1327-33.
- Lynch M, Lee B, Azimi P, et al. Rotavirus and central nervous system symptoms: cause or contaminant? Case reports and review. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 932-8.
- Altindis M, Yavru S, Simsek A, et al. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. *Indian Pediatrics* 2004; 41: 590-4.
- Logan C, O'Leary JJ, O'Sullivan N. Real-time reverse transcription PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3189-95.
- Lee CN, Kao CL, Ning HC, et al. Identification of VP7 serotypes of human rotaviruses by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription polymerase chain reaction. *Acta Paediatrica Sinica* 1997; 38: 454-62.
- Pang XL, Lee B, Boroumand N, et al. Increase detection of rotavirus using a real time reverse transcription polymerase chain reaction(PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *J Med Virol* 2004; 72: 496-501.
- Ward RL, Knowlton DR, Pierce MJ. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 748-53.
- Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, et al. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. *J Clin Microbiol* 1977; 6: 610-7.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Raul-Velazquez F, et al. Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006; 354: 11-22.
- Glass RI, Parashar UD. The promise of new rotavirus vaccines. *N Engl J Med* 2006; 354:75-7.
- Matson DO. The pentavalent rotavirus vaccine, RotaTeq(trade mark). *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17: 195-9.
- Bernstein DI. Live attenuated human vaccine, Rotarix(trade mark). *Semin Pediatr Infect Dis* 2006; 17: 188-94.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al. Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006; 354: 23-33.
- Ward RL, Knowlton DR, Greenberg HB. Phenotypic mixing during coinfection of cells with two strains of human rotavirus. *J Virol* 1988; 62: 4358-61.

Current Status in Human Rotavirus and Laboratory Methods

Ting-Chun Hung, Yung-Liang Liao, and Yih-Jyue Yang

*Department of Pathology, Chi-Mei Foundation
Hospital, Tainan, Taiwan*

Acute infectious gastroenteritis is a quite extensive and common disease, has already become the disease second only to respiratory tract infection. The illness is often spread through the poor hygiene and sanitation, or contaminated food and water. According to the investigation of epidemiology, all syndrome of the gastroenteritis belongs to acute and infectious rotavirus gastroenteritis is responsible for the significant gastrointestinal disease no matter the adult or the child all have an opportunity to be infected. Usually mild or asymptom in adult with rotavirus gastroenteritis, but often cause the severe diarrheal diseases in infant of six months to two years of age, and deaths because of severe dehydrating diarrhea. In presence, rotaviruses are divided into seven major groups (A-G), group A is the most important pathogen. In addition can subdivide 14 kinds of G-serotype and exceed 20 kinds of P-serotype in accordance with the virus surface structure of which G1-G4 and G9 are commonly found in human, and the G-P combination G1P8 is common type worldwide. (J Intern Med Taiwan 2007; 18: 256- 261)