

中東呼吸症候群冠狀病毒感染的 事件演變概況

曾凡真

國家衛生研究院 感染症與疫苗所助研究員

緣 由

2003 年 SARS 疫情之後，由此病毒所引起之人類呼吸道症候群似乎已經從人群中消失。但 2012 年中又有另一新型的冠狀病毒浮現，第一例實驗室確定案例是 2012 年 6 月的一名沙烏地 60 歲男性，急性呼吸道病症 7 天後才住院，期間曾分離到細菌 *Acinetobacter speices*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*，施以多種抗生素與抗病毒藥物治療，但持續惡化並產生急性腎衰竭，住院 10 天後死亡。當時作病毒培養確實造成細胞病變 (cytopathic effects)，但檢驗多項已知呼吸道病毒都呈陰性，暗示存有其他「未知病毒」；該病毒培養以免疫螢光檢驗時，只與病人自己感染多天後的血清呈陽性反應，對該地區兩千四百個病人的血清皆陰性反應，也顯示該病毒尚未有感染人的先例 [1]。荷蘭 Erasmus Medical Center

(EMC) 以核酸檢驗定序等方法瞭解該病毒之屬性，在試過多種病毒家族的廣泛引子後，只有「泛冠狀病毒」的 (pan-coronavirus reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 能作出產物，經定序近全長長基因比對後，發現與分佈於歐、非洲小蝙蝠所帶 lineage C 的 Betacoronavirus 最接近 [2]；值得注意的是 Betacoronavirus 下，也包含 lineage B 的 2003 年 SARS 冠狀病毒。2013 年 5 月「病毒命名國際委員會」(International Committee on Taxonomy of Viruses) 將此由人分離到的新型冠狀病毒統一命名為 MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus) [3]。截至 2013 年 12 月 2 日止已確認感染 MERS-CoV 至少有 163 人，當中 71 人死亡。

這次能即時地把病原體找出而且譜出其基因體等重要資料，是拜新一代的基因定序與生物資訊技術所賜。荷蘭 EMC 團隊先使用 random

amplification 與 Roche 454 GS Junior deep sequencing，所得核酸片段確認修剪後組合得到序列重疊組 (contigs)，將九成的序列拼湊出。再設計該病毒專一的引子得到各處的基因，確認並重疊序列後，得出這次共 30 多 Kb 的連續序列 (GenBank accession No. JX869059)。而自從 MERS-CoV 被發現後，德國已針對其外套基因 (envelope) 的上游 (upE) 與 ORF1 (含 RNA dependent RNA polymerase, RdRp 等基因) 發展出二階段 real-time RT-PCR，用前者引子篩選、後者確認，如此可以專一性地檢測到 MERS-CoV，不會與其他常見人類冠狀病毒混淆，此方式已在多個國家使用於不明呼吸道感染案例檢驗該病毒[4]。德國團隊也發表第二代的實驗診斷方法，針對 MERS-CoV 可能存在基因改變的區域，用 RT-PCR 得出片段，以利後續分辨株間基因親源關係。根據歐洲 CDC 調查，境內多數的國家已能使用至少第一代 MERS-CoV 的 RT-PCR 檢驗方法。2012 年 10~11 月法國針對剛去過阿拉伯年度大朝聖的 150 多人採鼻拭子，當中 83% 的人有呼吸道症狀、41% 的症狀符合類流感，用上述 MERS-CoV 的 RT-PCR 篩檢但無人為陽性[5]。

人傳人與群聚案例

2012 年 9 月後阿拉伯半島陸續傳出許多感染案例，世衛組織 (WHO)

與歐美等國派出團隊到中東地區開始流行病學、環境等調查，除了找可能帶原的動物與危險因子，也想瞭解人傳人或造成流行的機率有多高。調查發現其實更早在 2012 年 4 月於約旦 (Jordan) 一家醫院的加護病房，有 7 名醫護人員、1 名護士的家人與 2 名病人有呼吸道群聚感染，當時 1 名護士與 1 名病人死亡，但檢驗不出常見呼吸道病毒。2012 年 10 月 WHO 協助約旦衛生部重啟調查，使用剩餘檢體證實當時死亡兩例 MERS-CoV 呈陽性，此發現似乎指向該病毒有侷限性人傳人的可能，但回朔調查所得有限資訊也無法排除他們有曝露到環境中相同的感染源。

2013 年各國因對 MERS-CoV 的警覺性提高，多起人傳人或可能群聚感染事件陸續報導。先是 2 月一名英國中年男性在沙烏地旅行時無動物接觸史，但參加過人群聚集的回教朝聖活動，快返回英國時已有發燒呼吸道症狀，之後持續惡化住入加護病房。他先被驗出 A/H1N1 流感，但克流感治療後無改善，接著再驗出 MERS-CoV。英國衛生部啟動其接觸案例的調查與後續追蹤，包括飛機上臨近乘客、家人、醫護人員共 135 名；當中他的 1 位同住家人與 1 位前來探病者，近期皆無海外旅行史，採檢後 MERS-CoV 與 parainfluenza 皆呈陽性。而該名家人可能因治療腫瘤免疫低下，感染惡化住入加護病房一周後死亡。再對這兩位英國「境內人傳人」

案例的密切接觸史調查與追蹤，所幸並未再檢驗到陽性案例[6]。接著 4~5 月間一名法國 65 歲男性在杜拜旅行返國後，先住入區域醫院追蹤他的宿疾，當時與一名 55 歲非感染科病人同病房數天；接著 65 歲男性指標案例因肺部症狀轉到大型醫院，取得下呼吸道檢體證實感染 MERS-CoV。當地衛生部啟動疫調，共追蹤 123 位可能接觸者，而近期無出國史的那位 55 歲同房病人，出院數天後因呼吸道症狀就診驗出 MERS-CoV 陽性，再啟動 39 個接觸者的疫調，所幸並未再擴散[7]。其他包括義大利與突尼西亞也有境外移入，侷限性地傳給當地人的案例發生。

最大一宗群聚感染事件是 2013 年 4~5 月間在沙烏地西方一農業省，接連有 23 個感染案例至少 15 人死亡。一開始是一個呼吸道症狀住院之後肺浸潤的案例 A，他可能傳給了一位住隔壁房的案例 C 與一名醫護人員。案例 C 出院三天後呼吸道症狀出現，但當時案例 A 與 C 的 MERS-CoV 檢驗都呈陰性，現在回頭看這事件，很可能是此陰性結果讓醫院輕忽，才讓後續一連串「可能」被傳染的案例發生。C 他原本就固定每 2~3 天到同一家醫院的洗腎中心，在此六個與 C 同時間在洗腎中心的病友，在 2~8 天後陸續出現症狀，沙烏地衛生部懷疑是群聚感染，就在第 10 天對洗腎中心開始了感控措施，此時案例 C 已經死在了加護病房。而 C 在加護

病房的 4~5 天之間，可能藉由醫護人員接觸，不慎傳染了一位已經臥床十幾天的隔壁病人，這位加護病房案例症狀出現後使用了呼吸器七天後死亡，此時醫院緊急啟動全院的感控措施。因為 MERS-CoV 的培養檢驗一般需 5 天有時 10 天，大部分案例都是發病很多天後才驗出陽性，在感控措施延遲開始的情況下，讓一連串 MERS-CoV 的傳播有機會發生。而在洗腎中心或其他管道與 C 接觸的感染者中，後來有不少次級接觸者 (contacts of secondary cases) 陸續被檢出 MERS-CoV，包括家人、其他洗腎病友、去其他三家醫院再就診，當中的病人或醫護人員[8]。

MERS-CoV 之臨床特性

德國一團隊針對一位阿拉伯轉診來的病人，作了住院期間詳細的檢體分析，發現病毒量在下呼吸道檢體最高，在插管抽取或沖洗液可達 $10^6/\text{ml}$ ，但口鼻拭子大約檢測到 $5 \times 10^3/\text{ml}$ 病毒量，而在某些時間點的尿液與糞便檢體可檢測到 $10^3/\text{ml}$ 病毒量[9]。從這些案例研究、群聚或連鎖感染事件中可推論 MERS-CoV 的一些特性：1. 潛伏期 (incubation period) 平均 5.2 天但可長達兩周，感染傳遞期 (serial interval, 即前一案與被傳染案，二者發病的時間間隔) 平均 7.6 天但可長達三周，故在問及曝露史時需考慮到此；2. 隨著病人原本健康狀況與已

感染時間長短等因素，MERS-CoV 可能在體內出現的器官也會變化，單次採檢陰性結果不能排除感染，而且已驗出其他呼吸道病毒或細菌感染者，仍有同時感染 MERS-CoV 的可能，不少嚴重者被驗出陽性的檢體是來自下呼吸道，此部位通常病毒量高；3. 約半數的感染案例會需住加護病房，嚴重者多是有宿疾，如糖尿病、腎功能不佳或免疫低下者感染後，會以腎衰竭、腹瀉等症狀表現，尿或糞便中亦會有 MERS-CoV 排出具感染力；4. 在 14 個群聚或連鎖感染案件中，有 13 位指標或首先被發現的案例 (primary case) 死亡，比起次發現的案例死亡率為高；5. MERS-CoV 會侷限性人傳染人，雖不至大規模傳播，目前不同團隊用流病或病毒演化等各種資料，估算出基礎再生數 (R0) 約介在 0.8~1.3 間，但大於 1 的可能性應不高，與 2003 年 SARS 的 0.8 相近；6. 由接觸史疫調中發現至少 18 名無症狀或非常輕症狀的感染者，多是原本健康者，但輕症感染者再傳播給他人的機率還不清楚。至 2013 年 10 月底止，所有案例都與阿拉伯半島有關連，WHO 所發出的監測建議是過去 14 天曾去過中東地區的人、其接觸者 (含醫護人員)，或群聚案例有呼吸道症狀發生時，甚至在免疫不佳者有腹瀉或腎功能下降等症狀時應考慮檢測 MERS-CoV [10]。對於今年 10 月 13~18 日在麥加的回教大朝聖，阿拉伯已宣導老弱婦孺、免疫力差的與宿疾者避免前

來，故比去年少了近一百萬人，各國仍應要密切注意由中東歸來者感染等相關症狀。

源於動物宿主的冠狀病毒的角色

冠狀病毒為一大型的 RNA 病毒，基因總長達 25~32 Kb，下含有 replicase (ORF1ab), spike, envelope, membrane, nucleocapsid 等非常多個基因與蛋白產物。此種組成與複製特性使它容易進行 RNA 突變、及得到或丟掉一些基因區域，這些可能幫助它在新環境中基因逐漸演化，甚至跨越物種感染新宿主。冠狀病毒其下可分成 Alpha-, Beta-, Gamma- & Delta-coronaviruses (先前各稱為 groups 1, 2, 3 & 4)，而目前已知感染人的株分佈在 Alpha- 與 Beta- 下。Betacoronaviruses 下又分為 lineage A 含人類冠狀病毒株，lineage B 含 2003 年 SARS，而 lineage C 與 lineage D 尚未發現感染人的株，而現在的 MERS-CoV 最接近 lineage C。香港曾對冠狀病毒作了多方面的流行病學調查，於人類呼吸道感染檢體中，HCoV_OC43 較常檢出，但 HCoV-HKU1 較常有嚴重症狀，約 20~60% 的人群對 HCoV-HKU1 呈血清抗體陽性，此二株於冬季盛行，而另一株 HCoV-NL63 (屬 Alphacoronavirus) 則於夏秋盛行，過去五年從不曾於病人中檢出 Betacoronaviruses lineage C [11,12]。以在動物中的基因變異度來看，Alpha-

與 Beta- 的 gene pools 可能存在蝙蝠，而 Gamma-coronaviruses 的 gene pools 可能存在於鳥類；在動物的病毒分離率，曾發現約 20% 的蹄鼻蝠帶有一株與 2003 年 SARS 基因相近的冠狀病毒株，8% 的家兔帶有一株 Betacoronaviruses lineage A [13]。而與 MERS-CoV 接近的 Betacoronaviruses lineage C 的蝙蝠宿主在地理位置上分佈很廣，歐亞非大陸都有蹤跡，如果該系種的病毒可以由蝙蝠直接傳染到人身上，為何這次的人案例都在阿拉伯半島？還是暗示中間先跳到當地某一物種，類似當初 SARS 病毒可能先感染了果子狸 (civet cat) 才再傳到人？多個團隊作了動物調查，希望找出它可能的中間宿主。

美國團隊在第一個確診的沙烏地案例，他工作地與住家方圓一到十二公里內搜集到七個種類的蝙蝠共近百隻，採集其血液、翅膀、糞便、喉頭與肛門拭子、巢穴中的遺留糞便等各式檢體，以 RT-PCR 檢驗了八百多個糞便與肛門拭子後，對泛 Alpha- 與 Beta- 冠狀病毒引子的陽性率約有 28%；當中一種分佈於非洲、阿拉伯半島與印度的「埃及墓蝠」有一個糞便檢體，在 RdRp 一個演化保守的基因處得到約 190 bp PCR 序列，與該沙烏地人案例的 MERS-CoV 有 100% 相似度；由於之前在非洲與歐洲某種類蝙蝠的糞便所檢測到的 lineage C-betacoronaviruses 株，在此基因區域跟 MERS-CoV 最高相似度分別約為 93%

與 98%，在沙烏地調查則看到人案例居所附近的蝙蝠帶了一隻與 MERS-CoV 非常接近的病毒株[14]；但奇怪的是所採檢的 29 隻埃及墓蝠中僅一隻有 PCR 陽性結果，且在冠狀病毒 30 Kb 長的基因序列中只能檢測到這一小段，還需持續在蝙蝠身上尋找其他感染的證據。接著荷蘭團隊在阿拉伯半島的阿曼與非洲西北海外離島採集約 50~100 隻單峰駱駝血清，針對 MERS-CoV 的 spike 作血清抗體中和反應，發現所有阿曼的都呈陽性，而 14% 非洲的呈陽性，其他動物如牛、山羊、綿羊、雙峰駱駝血清都呈陰性，此結果暗示單峰駱駝曾感染一株與 MERS-CoV 相近的冠狀病毒，且陽性率與人感染的地域性有關連[15]；但 WHO 表示該血清檢驗對 MERS-CoV 的專一度，與是否有其他相近的 Beta- 冠狀病毒在該動物中盛行都還不清楚，希望以檢測到 MERS-CoV 或其 RNA，作為確認某物種為中間宿主的直接證據。最近香港領導的團隊剛發表兩個針對 spike 所發展的微量血清抗體中和反應試驗，其中一個方式使用 lentivector system 偽病毒顆粒表現 spike proteins，再以所啟動之報導基因 (luciferase) 高低來判讀抗體效價 (titer)，因為不需用到活的 MERS-CoV 或 SARS 病毒，可以在生物安全第二等級操作，可望能讓更多檢驗實驗室使用。他們在埃及(與阿拉伯半島隔著紅海相臨)與香港採檢 500~800 多人(包括感染過 2003-SARS 病毒的人)，

與多種動物包括牛、羊、豬、駱駝、野生候鳥等多達兩千個血清中，發現只有來自埃及的單峰駱駝血清，約 93~98% 呈陽性，其他的物種與人的血清都沒有中和 spike protein 的抗體；而駱駝對 SARS 病毒沒有血清中和反應，顯示該 MERS-CoV 血清學檢驗對於同屬於 Beta- 冠狀病毒、但不同系種的 SARS (lineage B) 不會交叉反應。這個結果再次顯示在阿拉伯半島與臨近的東、北非地區，一株與 MERS-CoV 相近的 Beta-冠狀病毒 lineage C 在單峰駱駝間有算高的感染率。更直接的證據就在卡達一處農莊 2013 年 11 月底，兩名農工感染了 MERS-CoV 所幸存活，詳細的環境與流病接觸調查後，發現 14 隻飼養的駱駝近期都健康無症狀，但有 3 隻的鼻腔拭子呈現 MERS-CoV 陽性，基因定序後與人的病毒極相似，證實駱駝能感染 MERS-CoV，雖無法確認人與駱駝間的傳染順序或方向。另外在「非人傳人」的社區感染病人，僅有少數曾接觸過駱駝，中間宿主可能還有其他動物？還是有何特殊的環境因子也都尚待釐清。

結 語

此次的中東呼吸道冠狀病毒與 2003/SARS 有感染與傳播特徵上的不同，但重要的帶原動物或宿主、傳播途徑與危險因子等至今尚未明朗。所幸病毒基因的資料已經快速地被解

出，病毒偵測或血清學的實驗診斷已被發展，並且於一些國家篩檢了幾批的人群，初步發現僅侷限地人傳人，但病毒可能繼續演化適應人群，仍需持續監測。經過 2003 年的經驗，這回人類在多方面都有準備，希望能將 MERS-CoV 病毒株的衝擊降到最低。

參考文獻

1. Severe respiratory illness associated with a novel coronavirus-Saudi Arabia and Qatar. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2012;61:820.
2. van Boheemen S, de Graaf M, Lauber C, et al: Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. MBio 2012;3(6).
3. de Groot RJ, Baker SC, Baric RS, et al: Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. J Virol 2013;87:7790-2.
4. Corman VM, Müller MA, Costabel U, et al: Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. Euro Surveill 2012;17(49).
5. Gautret P, Charrel R, Belhouchat K, et al: Lack of nasal carriage of novel corona virus (HCoV-EMC) in French Hajj pilgrims returning from the Hajj 2012, despite a high rate of respiratory symptoms. Clin Microbiol Infect 2013;19:E315-7.
6. Evidence of person-to-person transmission within a family cluster of novel coronavirus infections, United Kingdom. Euro Surveill 2013;18:20427.
7. Guery B, Poissy J, el Mansouf L, et al: Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. Lancet 2013;381:2265-72.
8. Assiri A, McGeer A, Perl TM, et al: Hospital outbreak of Middle East respiratory syndrome coronavirus. N Engl J Med 2013;369:407-16.
9. Drosten C, Seilmaier M, Corman VM, et al: Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus

- infection. *Lancet Infect Dis* 2013;13:745-51.
10. Updated Information on the Epidemiology of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Infection and Guidance for the Public, Clinicians, and Public Health Authorities, 2012 - 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2013;62:793.
 11. Leung TF, Li CY, Lam WY, et al: Epidemiology and clinical presentations of human coronavirus NL63 infections in hong kong children. *J Clin Microbiol* 2009;47:3486-92.
 12. Leung TF, Chan PK, Wong WK, et al: Human coronavirus NL63 in children: epidemiology, disease spectrum, and genetic diversity. *Hong Kong Med J* 2012;18 Suppl 2:27-30.
 13. Yuen KY, Lau SK, Woo PC: Wild animal surveillance for coronavirus HKU1 and potential variants of other coronaviruses. *Hong Kong Med J* 2012;18 Suppl 2:25-26.
 14. Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, et al: Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg Infect Dis* 2013;19:456-9.
 15. Reusken CB, Haagmans BL, Muller MA, et al: Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis* 2013.