

## 冠狀病毒及其實驗診斷

---

王貞仁 1,2,3 蔡慧頻 2 郭品樺 2

國立成功大學醫學中心 1 醫技系 2 病理部 3 國家衛生研究院台南病毒檢驗與研究實驗室

### 嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)

嚴重急性呼吸道症候群(SARS)，是 21 世紀以來最嚴重且具高度傳染性之新興疾病。從 2002 年 11 月起，在中國大陸的廣東省有數以百計，由未知的致病原造成非典型肺炎病例。第一個官方報告於 2003 年 2 月 11 日通報至世界衛生組織(World Health Organization)，同時 SARS 亦悄悄地由一名廣東的醫師帶至香港(2 月 21 日)。爾後開始由國際旅程散佈開來，類似的病例陸續在香港、越南、新加坡、多倫多等地被發現。3 月 12 日世界衛生組織依越南、香港、北京等地訊息對全球發佈警訊。至 3 月 15 日世界衛生組織則更提昇此全球警訊，並將此疾病命名為『嚴重急性呼吸道症候群』(SARS)，如表一。此警訊主要依據有五項：

一、此為一新興傳染病，且致病原未知。二、此爆發流行感染患者多為醫護人員、家人及其他近距離接觸者。三、許多抗生素及抗病毒藥物無法有效地控制病情。四、多數患者急速發展成呼吸衰竭，需呼吸加護治療，造成許多原健康之感染患者死亡。五、此急症最先出現於亞洲，但已蔓延開至北美及歐洲[1]。爾後此疾病在人類廣泛的散佈，同時造成很高的死亡率，其主要感染的病患的臨床表徵以嚴重的典型或非典型肺炎為主，且病人並無法使用現有任何抗微生物製劑，提供有效之治療。截至 7 月 11 日為止，全球已有 32 個國家有病例的報告，總共有 8,437 件病例，而其中有 813 位死亡病例，其中前三名為中國大陸、香港及台灣，加拿大、新加坡、越南等國亦有不少案例[2,3]。

### SARS 冠狀病毒之發現

由於一名中國廣東之醫師在香港發病死亡，將病原經由層層傳播散佈至世界各地，引起全球之大流行。世界衛生組織立即會同美國、香港、德國、泰國、新加坡及台灣之防疫組織，共同收集了來自 7 個國家之病人檢體。以病毒培養、電子顯微鏡及組織學觀察、分子生物技術和血清學檢查，試圖找出致病原[4,5]。病人之咽喉拭子、痰液、血液及組織檢體被接種在各種細胞上，包括 Vero

E6、NCI-H292、MDCK、LLC-MK2、B9-58 等細胞。首先在 Vero E6，出現病毒之細胞病變(細胞變圓飄浮)，這些受感染細胞，經薄切片、染色後，以電子顯微鏡觀察，發現在細胞的內質網(rough endoplasmic reticulum)、空泡 (vesicles)內及細胞膜表面，均存在有類似冠狀病毒之顆粒，此顆粒直徑約 80-140 nm。此外，以電顯觀察一患者之細支氣管肺泡沖洗液(bronchioalveolar lavage)亦發現病毒顆粒。以第一型冠狀病毒之抗體，進行免疫組織染色結果為陽性。以反轉錄-聚合酶每連鎖反應及基因定序 polymerase 基因中之 405 核苷酸，顯示該病毒與現已知之冠狀病毒第 1, 2, 3 型類似。此部分之基因序列相似度約 0.56-0.63，但由於其序列與現有冠狀病毒仍有相當大之不同，故將之命名為 SARS 冠狀病毒。12 個來自不同地區之病人，所測得之 SARS 冠狀病毒基因序列則均一致，表示均由同一感染原所引起。以免疫螢光染色或酵素免疫分析法進行血清學檢測，結果顯示恢復期之病人，血清內可出現針對 SARS 冠狀病毒之特異性抗體。以上結果顯示，此為一新興之冠狀病毒造成此一 SARS 爆發流行。值得一提的是，經由世界多個病毒研究室之努力，SARS 冠狀病毒在世衛組織發佈警訊後，短短的一個月內，整個基因序列即已完成定序之工作[6,7]。SARS-CoV 的基因體全長為 29,727 個核苷酸，其組織為典型的冠狀病毒，包括主要的結構蛋白質：突棘蛋白 spike (S protein)、套膜蛋白 envelope(E protein)、膜蛋白 membrane (M protein)、以及核殼體蛋白 nucleocapsid (N protein)等。

## SARS 冠狀病毒實驗診斷

SARS 冠狀病毒為高度傳染性病原，對於照顧 SARS 的醫護人員感染的比率最大，因此建立快速、方便、非侵犯性檢測此種病毒的方法，在監控及控制疾病上顯得非常重要。現行方法則包括：SARS 病毒核酸檢測、病毒培養及鑑定、血清學檢查[8,9]。

### 一、SARS 病毒核酸檢測

目前疾病管制局及各 SARS 病毒檢驗合約實驗室，SARS 冠狀病毒之快速檢測以檢測病毒核酸為主。現行使用即時聚合酶每鏈反應(Real-time PCR 或傳統之聚合酶每鏈反應)，來偵測不同檢體中之 SARS 冠狀病毒之核酸(RNA)。

反應中所用的特異性引子(primer)，乃是針對 polymerase 及 nucleocapsid 之基因所設計。目前用來作偵測 SARS 冠狀病毒之即時聚合酶每鏈反應，可在 3-6 小時內馬上知道結果。其原理乃是利用寡核苷酸探針(oligonucleotide probes)上標識螢光，與聚合酶每鏈反應產物結合後，再以機器偵測，隨著聚合酶每鏈反應產物增加的螢光強度，因此能即時知道反應的情形。一般而言，目前所有的核苷酸檢測具高特異性及敏感度，但有時候檢體中病毒含量太低，無法檢測出來。

因此陰性結果，不能排除病人沒有 SARS 病毒之感染。再者，在缺乏品質管制的實驗室，可能因檢體受到污染，而出現偽陽性。因此利用聚合西每鏈反應陽性結果來確定 SARS 病毒感染，必須要有兩個不同的檢體呈現陽性反應；或採同一部位，在病程內相隔至少兩天之臨床檢體；或利用兩種不同聚合西每鏈反應方法或是重做，來偵測同一個臨床檢體之核酸，才能確認。

## 二、血清學檢查

血清學抗體檢查，可反應出是否曾受 SARS 冠狀病毒感染之情形。此部份可利用間接免疫螢光染色法，或是酵素免疫吸附法。做法為將 SARS 病毒培養於 Vero E6 細胞中大量增殖，並將感染病毒之細胞刮下，以福馬林固定在免疫染色之玻片或 96 孔之微量盤中。以間接免疫螢光染色法，或是酵素免疫吸附法，偵測患者血清中之 SARS 病毒抗體。此檢測利用 goat anti-human IgG、IgA、IgM，分別鍵結 fluorescein isocyanate 或 horseradish peroxidase，做為偵測工具。血清抗體陽性反應之判讀，則是根據 1)急性期呈陰性反應、恢復期呈陽性反應；2)恢復期之抗體反應較急性期有四倍升高來判定。若發病後 21 日以上仍無法偵測到抗體產生則為陰性(此為現行有關 SARS 抗體檢測之建議，此可能隨新的研究資訊結果而改變)。以酵素免疫吸附法檢測，通常在發病 21 日內可測得 IgM 或 IgG

## 三、病毒培養及鑑定

SARS 冠狀病毒之培養及鑑定，可在生物安全等級第三級以上實驗室進行。接種由患者而來的不同之檢體(如：血液、血清、咽喉及鼻喉拭子或沖洗液、以及來自解剖中之主要器官之組織)，於 Vero E6 細胞株中培養。接種檢體後，每天觀察細胞病變，可在組織培養中看到細胞病變的情形。此時可收集感染病毒之細胞的上清液或受感染細胞，進行聚合西每鏈反應及進行基因序列的分析，確定是否為 SARS 冠狀病毒。亦可將病毒液固定後，以負染色法染色後，至電子顯微鏡下觀察病毒顆粒之形狀及大小。亦可以顱內法及腹下注射的方式將檢體送入新生裸鼠中培養後，再進行 SARS 冠狀病毒之基因分析，確認是否含 SARS 冠狀病毒。

## SARS-冠狀病毒對環境之穩定性

世界衛生組織之實驗室的工作團隊，對 SARS-冠狀病毒做了一些實驗，以了解此病毒在環境中生存的情形[10]。其結果發現病毒在室溫下，可在糞便及尿液中存活至少 1-2 天，但是若是在下痢的糞便中，因其較鹼性環境，則可存活至 4 天。當病毒暴露在不同的消毒液及固定液中，即會失去活性。如將培養過之病毒液存放於 4°C 及 -80°C，於 21 天後，其濃度只會下降一點點病毒於室溫可穩定兩天，其濃度祇下降一個 log，此示 SARS 冠狀病毒比其他已知的人類冠狀病毒較穩定。將病毒液置於 56°C 中，每 15 分鐘即可殺死 10,000 單位病毒。做免疫螢光染色時，SARS-冠狀病毒在室溫下固定，無法有效的殺死病毒，需要將固定液-丙酮，冷卻至 -20°C 才有用。

### SARS 實驗診斷之臨床檢體採集及注意事項

世界衛生組織之實驗室的工作團隊，基於實用性之理由，要求上呼吸道之檢體，必需適合於做病毒培養及核酸檢測才行。並建議多處採檢，可提高檢出率。在 Peiris 等人[11]對社區性感染 SARS 所表現的臨床病程及病毒量相關性之研究發現，以聚合酶鏈反應偵測 14 位病人之鼻咽抽吸液、尿液及糞便。發現鼻咽抽吸液在第十天病毒量達到最高點，第 15 天則下降至入院時之量，且糞便中的病毒持續至第三週仍可偵測得到，此則可用來長期追蹤；然而尿液之檢出率則較差。因此他們建議利用抗體檢測及偵測鼻咽抽吸液、糞便之核酸以做為確認 SARS。至於 SARS 冠狀病毒之檢體採集方法、傳送方式、適用時期及檢驗方式，列於表二。

表一 世界衛生組織 SARS 重要事紀 (World Health Organization, 2003)[1]

日期	案 例
2002 年 11 月 16 日	中國廣東省報告發現第一例非典型肺炎案例。
2003 年 2 月 11 日	中國報告世界衛生組織有關廣東省非典型肺炎之爆發流行，305 案例有急性呼吸道症狀，其中 5 人死亡。
2003 年 2 月 21 日	65 歲廣東醫師宿香港某旅館 9 樓，其出發前曾照護非典型肺炎患者，且抵香港時出現類似症狀。此一醫師案例至少感染了同一旅館樓層之 12 名旅客。
2003 年 2 月 26 日	一美籍華裔商人住進越南河內之法國醫院，且有呼吸道症狀，此商人曾至前述香港旅館 9 樓訪客。
2003 年 2 月 28 日	世界衛生組織駐越南醫師 Dr. Carlo Urbani 在河內法國醫院警覺多例非典型肺炎案例，並通知世衛組織請求援助。
2003 年 3 月 1 日	新加坡出現第一名案例，一名空服員曾宿前述香港旅館 9 樓。
2003 年 3 月 4 日	香港威爾斯親王醫院收治一名患者，其曾前往前述香港旅館訪客。
2003 年 3 月 5 日	多倫多發現案例，其曾宿前述香港旅館 9 樓，其 5 名家人亦受到感染。
2003 年 3 月 7 日	香港威爾斯親王醫院陸續發現醫護人員呼吸道感染且進展成肺炎。
2003 年 3 月 8 日	河內法國醫院 14 名醫護人員有急性呼吸道感染症狀。
2003 年 3 月 12 日	世界衛生組織發佈全球警訊非典型肺炎。
2003 年 3 月 15 日	世界衛生組織提昇全球旅遊警訊有關嚴重急性呼吸症候群 (SARS)。
2003 年 3 月 17 日	世界衛生組織集結了全球 11 個實驗室，組織成一架構，共同加速鑑定可能之致病原，這些實驗室之選擇則根據以下之標準：具傑出之科學家及專門技術，符合生物安全等級第三級實驗室之設施，可從事實驗來驗證 Koch's 之四個假說來驗證致病原。此實驗室組織架構下共同分享資源與結果，此共同合作使得致病原快速被鑑定出來，且亦加速了實驗診斷方法之研發。
2003 年 3 月 27 日	發現 SARS 致病原為冠狀病毒。
2003 年 4 月 13 日	SARS 冠狀病毒基因全長 29,727 核苷酸定序完成。

表二 SARS 冠狀病毒之檢體採集 [12]

檢體部位	方法	培養液 / 容器 / 傳送方式	送檢時間	實驗方法
鼻咽	抽吸法、用無菌尼龍棉棒採檢	抽吸液需置於無菌容器、棉棒需放置在傳送液中	發病初期之任何時間內皆可採檢	病毒培養、核酸檢測、電顯
氣管、支氣管肺泡、胸水	抽吸液 (aspirate) 沖洗液 (lavage)	將抽吸液或沖洗液離心、細胞沉澱物可在室溫下用福馬林固定，未固定之細胞則凍於-70 °C	適用於初期及晚期嚴重肺部疾病之插管病人	病毒培養、核酸檢測、電顯、可在有細胞之玻片上做免疫螢光染色及分子診斷
尿液	無菌之容器	需離心，將沉澱物溶解在 2-3 毫升之無菌傳送液或是 PBS 中	急性期	抗原偵測、病毒培養、核酸檢測
糞便		10-50 毫升放在糞便盒中	任何時間皆可，最好的時間是在第十天	病毒培養、核酸檢測、電顯
結膜	採尼龍棉棒	放在無菌的病毒傳送液	病程的最早期	病毒培養、核酸檢測、電顯
血清		需大於 200 uL	急性期 : <7 天；恢復期 : 3-4 週後	偵測特異性抗體 (IgM, IgA, IgG)
全血		EDTA	任何時間	
血液		標準的血液培養瓶		培養、核酸檢測
組織 (活體、解剖)	肺、上呼吸道	放在無菌的病毒傳送液、新鮮之組織需凍於-70 °C		電顯、免疫螢光染色及分子診斷
	主要器官	用福馬林固定		電顯

註：做病毒培養之檢體需於冰上傳送；用福馬林固定之檢體及血清則可於室溫傳送。

## 參考文獻

1. World Health Organization. Severe acute respiratory syndrome (SARS): status of the outbreak and lessons for the immediate future. *CSR/WHO* 2003; 20 May 2003 1-10.
2. Lipsitch M, Cohen T, Cooper B, et al: Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;300:1966-70.
3. Cumulative number of reported probable cases of SARS. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed July 11, 2003 at [http://www.who.int/csr/sars/country/2003\\_7\\_11/en/print.html](http://www.who.int/csr/sars/country/2003_7_11/en/print.html))
4. Ksiazek TG, Erdman E, Goldsmith C, et al: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
5. Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1967-76.
6. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al: Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;300:1394-9.
7. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al: The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003;300:1399-404.

8. Severe acute respiratory syndrome (SARS): laboratory diagnostic tests. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed April 29, 2003 at <http://www.who.int/csr/sars/diagnostictests/en/print.html>)

9. Use of laboratory methods for SARS. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed 2003 at <http://www.who.int/csr/sars/labmethods/en/print.html>)

10. First data on stability and resistance of SARS coronavirus compiled by members of WHO laboratory network. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed May 4, 2003 at [http://www.who.int/csr/sars/survival\\_2003\\_05\\_04/en/print.html](http://www.who.int/csr/sars/survival_2003_05_04/en/print.html))

11. Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC, et al: Prospective study of the clinical progression and viral load of SARS associated coronavirus pneumonia in a community outbreak. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed 2003 at <http://www.who.int/csr/sars/prospectivestudy/en/print.html>)

12. Sampling for severe acute respiratory syndrome (SARS) diagnostic tests. Geneva: World Health Organization, 2003. (Accessed April 29, 2003 at <http://www.who.int/csr/sars/sampling/en/print.html>)