

## 全球 SARS 風暴之台灣經驗

### 前 言

早在國人還未注意到非典型肺炎時，疾病管制局就早已注意到中國大陸有一種新的疫病產生，而從三月中旬至今，當台灣社會還籠罩在恐慌無助的情緒中，疾病管制局的研究團隊，甚至拋下恐懼與不安，秉懷著關愛與勇氣，密切地與 SARS 病毒搏鬥，企圖瞭解致病的原因和傳染途徑。

依據世界衛生組織資料，嚴重急性呼吸道症候群（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS）最早出現於 2002 年秋冬之際在中國大陸廣東省一帶發生，由未知的病原體引發非典型肺炎（atypical pneumonia）病例<sup>(1)</sup>，感染者在初期出現類似感冒症狀，包括發高燒、乾咳、頭痛等，嚴重者則發生呼吸困難及肺炎等病症。之後在 2003 年 2 月陸續擴散至東南亞地區包括台灣、香港、新加坡、越南等地<sup>(2)</sup>，世界衛生組織已於 3 月底對全球發出警訊，並將此種疾病正式定名為 SARS，至 4 月中已快速擴散至全球包括歐洲、美洲及澳洲等地。台灣的第一起疑似病例為一台商，他在 2 月 7 日至 21 日到中國大陸出差，在大陸時即出現類似感冒症狀，二月底回台就醫，發生呼吸窘迫症狀，肺部 X 光片亦顯示有浸潤現象，他的妻子這段期間並沒有出境，卻在 3 月 14 日也出現感染的症狀，相繼住進醫院進行隔離治療。之後陸續有患者因進出中國大陸及香港而疑似感染 SARS，除通報本局外，也在各醫院進行隔離治療，隨後啓動一連串的防疫措施，包括機場檢疫、患者的接觸者進行居家隔離等，以防止疫情擴散。

回溯 SARS 發展的初期，曾傳出導致大陸廣東地區非典型肺炎的病原體為衣原菌（*Chlamydia pneumoniae*），後來陸續在香港對於疑似因罹患非典型肺炎而死亡的遺體進行解剖後，發現致病元兇可能是病毒而非衣原菌<sup>(3,4)</sup>。此外，本局亦於 3 月初派員至香港實地瞭解相關疫情，隨後在 3 月 14 日台灣地區出現疑似病例後，本局亦馬上派人至患者就診之醫院請

其特別注意防範，並採檢該病人之喉頭部位檢體及抽血以進行相關病原與抗體檢驗工作。由於當時尚未清楚致病的病毒種類，故在取得疑似患者之檢體後，本局呼吸道病毒實驗室除進行接種各種現有細胞株嘗試進行病毒培養分離外，也將檢體接種於裸鼠及雞胚蛋內，更以分子生物學方法抽取病原體之遺傳物質（DNA或RNA）進行偵測。終於在 3 月 25 日深夜本局研究檢驗組人員由該名台商患者妻子的咽喉拭子檢體中，利用RT-PCR的方法偵測到SARS病毒（原名coronavirus）基因片段，再將基因序列連夜傳送至美國疾病管制中心，與其他從世界各地包括越南、香港等地送達之疑似患者檢體之基因序列進行比對分析，發現由不同地區所獲得的檢驗結果幾乎一致，令美國疾病管制中心深具信心的宣布初步確定導致此波SARS疫情的致病元兇可能為一種變異性冠狀病毒。

人類冠狀病毒與鼻病毒（rhinovirus）同被列為最常引起一般感冒的病原體，除引起一般呼吸道的症狀外，在成人或孩童也會有腸胃炎的情形發生。冠狀病毒因其病毒體外觀在電子顯微鏡下呈日冠狀（solar-corona）而得名，冠狀病毒具套膜，大小約 80-160 nm，基因體為一單股正股RNA的病毒，其複製早期需要一個RNA-dependent RNA聚合酶作用，產生一條全新的負股RNA，之後再以此負股RNA為模板，複製病毒的基因及其他構造性及非構造性的蛋白，以組成新的病毒粒子。病毒可藉由飛沫散播，由人類冠狀病毒引起的上呼吸道感染很類似鼻病毒所引發的感冒症狀，但潛伏期較長，嚴重時會引發肺炎。一般感染人類冠狀病毒的患者在發病一至兩個禮拜內會痊癒，並不會有致命的危險，然而此次引發SARS的冠狀病毒似乎與現有的冠狀病毒有所區別，至 6 月 6 日止全球共有 8404 個病例，共有 779 人死亡<sup>(5)</sup>，且病例還在持續增加當中，身為病管局團隊的一員，本文將闡述我國在偵測SARS病毒的努力及目前通報疑似感染SARS的個案檢驗情形，並將所得之病毒基因序列進行比較分析。

## 材料與方法

### 檢體處理

採取疑似 SARS 病患急性期之咽喉拭子(throat swab)、鼻咽拭子(nasal swab)、痰液(sputum)或鼻腔清洗液(nasopharyngeal wash)檢體，全程以 4°C 低溫運送至疾管局研究檢驗組病毒實驗室，將拭子與病毒傳送培養基以震盪器(vortex)劇烈震盪混合後，以具有過濾膜之吸管尖(filter tip)將培養基吸出進行病毒 RNA 之萃取。而痰液則以等倍體積之 2X N-acetylcysteine buffer (0.9% NaCl containing 10g/L N-acetylcysteine)震盪 30 分鐘混合均勻後以 10,000 g 離心 3 分鐘後取上清液進行 RNA 之萃取。

### RNA之萃取

以 QIAGEN 廠牌之 QIAamp Viral RNA kit (USA, Cat No. 52906) 進行病毒 RNA 之萃取，將 140 $\mu$ L 之檢體加入 560 $\mu$ L 含有 carrier RNA 之 Buffer AVL，混合均勻後靜置於室溫下 10 分鐘，之後加入高純度酒精 560 $\mu$ L，混合均勻後以試劑組所附之 spin column 以 8,000 rpm 離心 1 分鐘進行過濾，之後以所附之 AW1 及 AW2 清洗液進行 wash 步驟，最後加入 50 $\mu$ L 試劑組所附之 AVE，靜置於室溫一分鐘後再以 8,000 rpm 離心 1 分鐘將 RNA 離下，所得之 RNA 可立即進行反轉錄聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)，或存於-20°C 備用。

### PCR反應

所有的 RT-PCR 反應都以 5 $\mu$ L 之 RNA template 進行，利用 QIAGEN 廠牌之單步驟核酸增殖組(one step RT-PCR, QIAGEN Cat No. 210212) 進行增幅反應。每一次測試於 0.2 mL 之 PCR 反應管中分別加入 5 $\mu$ L RNA template、5X buffer 10 $\mu$ L、dNTP 2 $\mu$ L、enzyme mix 2 $\mu$ L，所使用之 primer 序列為 corona IN-2 5'-GGGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'，corona IN-4 5'-TAACACACAAACACCATCATCA-3'，每個 primer 的反應濃度為 0.6 $\mu$ M，補足純水至最終體積為 50 $\mu$ L。RT-PCR 反應條件以 45°C 30 分鐘進行反轉錄反應(RT)後，以 95°C 15 分鐘進行 denature，接著以 95°C 30 秒、50°C 40 秒、72°C 1 分鐘進行 40 個循環反應。最後 final extension 以 72°C 作用

10 分鐘後結束反應。

若第一次 PCR 反應產物經 1.5% Agarose gel 電泳分析後沒看到明顯的 band，則進行第二次 PCR 反應(Nested-PCR)。試驗以 Promega 之 PCR master mix 試劑組 (Cat No. M7502) 進行增幅反應。取第一次 RT-PCR 反應產物 5 $\mu$ L 作為模板，分別加入 2X buffer 25 $\mu$ L，所使用之 primer 序列為 corona F2 及 corona R1(表一)，每個 primer 的反應濃度為 0.4 $\mu$ M，補純水至最終體積為 50 $\mu$ L。反應條件為 95 $^{\circ}$ C 5 分鐘，95 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 30 秒，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，進行 35 個循環，最後以 72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘。

### RealTimeRT-PCR

關於利用 RealTime RT-PCR 技術來進行檢測 SARS 病毒的部份，使用的試劑組是 Invitrogen 公司的 Superscript II platinum Taq polymerase one step RT-PCR kit (Cat No. 10928-042)，primer 和 probe 分別為 BNITMSARS1、BNITMSARAs2 與 BNITMSARP (表一)，以 Roche 公司的 LightCycler System 進行病毒定量分析。

### 序列分析

將經增幅過後的產物再次進行電泳分析，產物長度正確的 DNA 複製片段經純化後以 ABI 377 自動核酸螢光定序儀 (Autosequencer) 進行 DNA 定序分析。將冠狀病毒複製之基因序列與 human coronavirus 229E、OC43 及 porcine、feline、avian 等其他冠狀病毒之基因序列做演化樹之分析，演化樹的操作是以 Phylogeny Inference Package (PHYLIP) version 3.57C 進行操作，分析則採用 Neighbor-joining 方法，並重複計算 (bootstrap) 100 次。

## 結 果

將由檢體萃取之 RNA，利用 corona IN-2、corona IN-4 之核酸引子對，經過 40 次反應後，可以得到長度為 452bp 的 DNA 片段 (圖一)。再以第一次 PCR 反應後之產物做為模板，以 corona F2、corona R1 的 primer set

進行 Nested-PCR，則可以獲得長度約 368 bp 的 DNA 片段（圖二）。

Nested-PCR 反應的產物經以 ABI 377 自動核酸螢光定序儀解讀序列後，將序列送往美國疾病管制中心（CDC），與其他自越南及香港之疑似感染 SARS 檢體作出之基因序列進行比對，結果相似度高達 99%，初步證實台灣之感染情形與其他地區 SARS 之病原均可能為冠狀病毒之一種。經序列分析後所得之 343 個鹼基與 NCBI 基因資料比對，發現僅有 58 個核苷酸與 Human Coronavirus 相同。利用 DNA Star 的軟體將此 Taiwan SARS 基因序列與目前現有之人類冠狀病毒 human CoV 229E 及 human OC43 兩株病毒之 L 蛋白（polymerase gene）之基因序列，及其他動物包括貓，狗及豬等的冠狀病毒基因進行相似度(similarity)及演化樹分析(如圖三)，相似度介於 54%~62%間，顯示目前所得到之 SARS 病毒基因序列，與現存的冠狀病毒均有很大的差異，和先前從人、牛、豬、狗等動物身上分離出的冠狀病毒差異很大，極可能為與動物病毒產生重組之變種病毒，或者是一種全新的病毒。

另外在定量 PCR 部份，我們分析了分屬 6 位陽性病患的不同檢體，發現在痰及鼻腔洗液中的病毒含量較一般的喉頭拭子要高，而肺組織的病毒含量又更高（表二），這顯示了病毒可能由呼吸道散放而導致疾病的傳染。

## 結論與討論

在 92 年 3 月 15 日本局獲知可能有境外移入之疑似非典型肺炎病例時，立即至疑似患者居住之醫院瞭解患者狀況，並採取包括血清、痰液及咽喉拭子等檢體，在血清的處理部分立即進行包括 A 型及 B 型流感病毒、禽流感病毒（H5 subtype）、腺病毒以及呼吸道融合病毒、單純疱疹病毒等抗體測試，而痰液及咽喉拭子部分，經以 0.45 $\mu$ m 之過濾膜過濾後，接種於例行呼吸道檢驗之細胞株包括 MDCK、H292、Hep-2、MK II 以及 A549 等。此外所有檢體均接種裸鼠(suckling mice)及 8 日齡之雞胚胎蛋(embryo

eggs)，此外也同時抽取檢體之遺傳物質（DNA 或 RNA），進行包括 influenza、parainfluenza、RSV、adenovirus、HSV、avian influenza（H5、H7、H9）以及 metapneumovirus 之檢測，但所有測試均呈現陰性反應，且將細胞培養後之上清液及細胞沉澱物均嘗試以電子顯微鏡觀察病毒粒子，但均未發現令人振奮的結果。

在 3 月 25 日深夜經 RT-PCR 方法，以特定之冠狀病毒核酸序列引子對進行檢測，終於在該名台商妻子的咽喉拭子檢體中出現長約 452 bp 之 PCR 反應產物，在經過序列解讀後與 BLAST 基因資料進行序列比對，證實與 human coronavirus 之 OC43 strain 的序列相似度最高（約 61% 之相似度）。再將此 PCR 產物作為模板，進行 Nested-PCR 反應，亦得到預期中之約 370 bp 之 DNA 增殖片段。在 3 月 26 日將此基因序列傳送到美國疾病控制中心，與包括越南及香港等其他地區疑似病例所得到之基因序列做比對，發現這幾個序列間的相似度高達 99% 以上，顯示冠狀病毒極有可能為此波導致全球嚴重急性呼吸道症候群的元兇，而在 3 月 27 日香港也發布新聞證實香港 SARS 病原為一種變種之冠狀病毒。經過全球實驗室不斷的努力，將此種屬於 Coronaviridae 之病毒的基因序列完全解讀出來後，WHO 認為此為一種新型病毒，故於 4 月 16 日正式將此病毒命名為 SARS 病毒（SARS virus）<sup>(6,7)</sup>。

自 3 月 15 日起至 6 月 5 日止近 3 個多月期間，疾管局共接獲 2771 起通報病例，而經專家審查完畢的案例中，判定為可能病例者共 677 例，疑似病例為 1374 例，排除案例共 720 例。經實驗室全數檢驗，到目前為止共 238 例檢驗結果為 SARS virus RT-PCR 陽性，其中 200 例為專家審查判定之可能病例，30 例為疑似病例，而所謂的可能及疑似病例之定義包括病徵符合，且有到過感染區包括大陸、香港、越南等。其中有許多實驗室檢驗結果陽性之個案並沒有出國紀錄，出現 SARS 症狀且 RT-PCR 檢驗結果呈陽性的患者，顯示國內已有社區感染案例出現。我國在三月中旬到三月

底通報的個案均有出現腹瀉的現象，但經檢驗僅有一例在糞便檢體中檢驗出 SARS virus。截至目前為止，許多經 RT-PCR 檢驗為 SARS 病毒陽性的案例，但臨床症狀卻不盡完全相同，此現象傳達的訊息是 SARS 病毒仍在快速的轉變，亦或者是被感染者因身體狀況或體質的不同，而產生病情嚴重程度不一的情形，仍待後續的研究與分析。

SARS的傳播途徑目前仍眾說紛紜，從最先的飛沫傳染，或藉由空氣散播，或與罹病患者親密接觸，到最近傳出因患者之排泄糞便污染水源而導致社區感染，更有因媒介動物如蟑螂等導致病毒擴散等假說出現，眾說紛紜且無一致性的結論。依我國及全球目前通報病例中，極大部分為到過感染區的患者，或者是與可能個案近距離接觸而遭感染<sup>(2,8)</sup>，或許飛沫傳染與接觸傳染仍為SARS病毒最可能的傳播方式。

在WHO的參考實驗室以及全球科學家的努力下，SARS 病毒的整段基因序列已陸續被解讀出來<sup>(9)</sup>，而Taiwan SARS 病毒的基因序列也已登錄至NCBI之基因序列資料庫 (AY268049)，提供全球科學家進行SARS病毒基因序列之比對與研究。目前努力的方向除了大量培養SARS病毒，朝向血清學診斷方向以及疫苗研發與量產的工作外，也將致力於降低SARS病患之死亡率與預防病毒擴散及二次感染的機率。

就衛生專業角度而言，傳染管控是傳統上長期以來的預防之道，這部份不需要非常龐大資源的投入，但需要專業、且有正確知識的人進行，醫護人員的感染數是一個指標，由於醫護人員及員工最易接觸病患，有最大的風險，必須對此戒慎小心，香港、新加坡及越南的醫護人員並未傳出大規模感染，而從台灣醫院一波波爆發出的疫情來看，當有大規模的醫護人員均遭感染時，表示傳染管控出了問題，有必要積極補強<sup>(10)</sup>。

至於接觸病例史的追蹤部份，當有病例經確認為 SARS 時，這時需有效的由公共衛生體系進行監控，查明病例相關接觸史，以阻斷傳染途徑。當有越來越多的可能或疑似病例出現，勢必增加公衛體系負擔，但也需要

更多人力投入相關追蹤，這部份仍是我國仍需加強之處。防杜 SARS 並非只靠政府採取措施，須加強整個公衛體系。經由專家評估，台灣目前無論是醫院內或院外的公衛措施均有所欠缺，在防止疫情擴散上做的並不夠，特別是病例接觸史的追蹤管控方面必須加強，才能有效遏止疫情在社區擴散開來。

由於現今大眾運輸工具的便捷，已成為病毒擴散的最佳途徑，民眾唯有注重身體的營養，增強免疫力，避免出入感染盛行的區域，並積極配合目前防疫政策的執行，如此才能防止 SARS 的快速擴散。而在科技愈來愈發達的同時，許多未知的新興及再浮現的病原微生物，也因環境的過度開發或者是生態失衡而再度出現，更甚者可能重組產生新型病毒，危害人類健康，唯有珍惜現有的自然資源，避免人為破壞，才能與大自然和平共處，永續不絕。

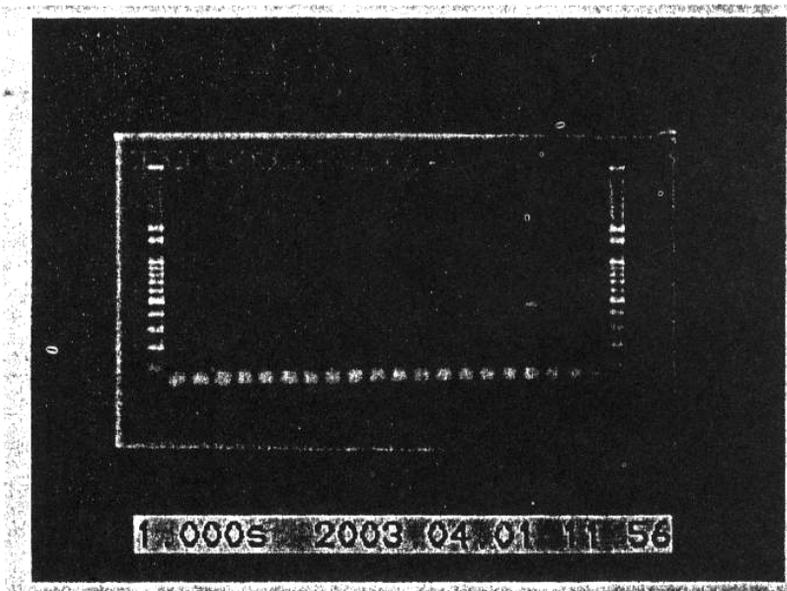
**撰稿者：**林智暉、邱淑君、林永政、王聖帆、楊志元、金芝源、陳雨凡、黃莉芳、陳豪勇

行政院衛生署疾病管制局檢驗研究組病毒實驗室

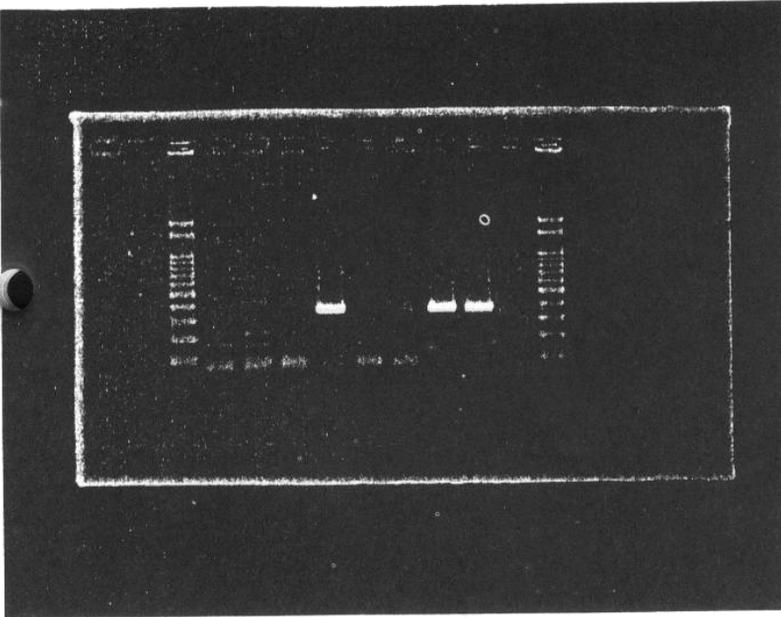
### 參考文獻

1. Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome-worldwide, 2003. MMWR Mor Mortal Wkly Rep 2003;52:241-6.
2. Tsang KW, Ho PL, Ooi GC, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):1977-85.
3. Drosten C, Günther S, Preiser W, et al. Identification of a Novel Coronavirus in -Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):1967-76.
4. Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome in Canada. N Engl J Med. 2003 May 15;348(20):1995-2005.
5. World Health Organization. Cumulative number of reported cases of severe acute respiratory syndrome (SARS). Available at [http://www.who.int/csr/sarscountry/2003\\_06\\_06/en](http://www.who.int/csr/sarscountry/2003_06_06/en).

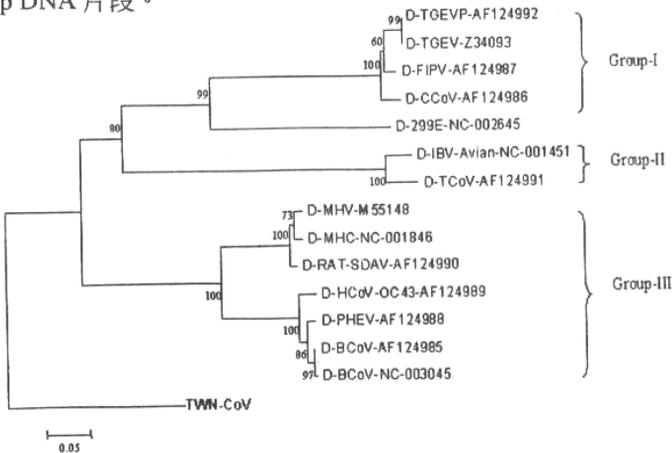
6. World Health Organization. Update31- Coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. Available at [http://www.who.int/csr/sars/archive/2003\\_04\\_16/en](http://www.who.int/csr/sars/archive/2003_04_16/en).
7. Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. Lancet. 2003 Apr 19;361(9366):1319-25.
8. Severe acute respiratory syndrome (SARS). Wkly Epidemiol Rec 2003; 78:81-3.
9. Ruan YJ, Chia LW, Ling AE, et al. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. Lancet 2003; 361:1779-85.
10. Donnelly CA, Ghani AC, Leung GM, et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. Lancet. 2003 May 24;361(9371):1761-6.



圖一、SARS 病毒以 corona-IN 2, corona-IN 4 進行 RT-PCR 反應後所獲得的 425 bp DNA 片段。



圖二、SARS 病毒以 corona-F2, corona-R1 進行 nested-PCR 反應後所獲得的約 370 bp DNA 片段。



圖三、台灣 SARS 病毒之分子序列演化分析

表一、核酸引子及探針序列

(reference:[http://www.who.int/csr/sars/primers/en\\*](http://www.who.int/csr/sars/primers/en*) : N Engl J Med. 2003; 348(20):1967-76.)

corona IN-2	5'-GGGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'
corona IN-4	5'-TAACACACAAACACCATCATCA-3'
corona F2	5'-CTAACATGCTTAGGATAATGG-3'
corona R1	5'-CAGGTAAGCGTAAACTCATC-3'
BNITMSARS1	5'-TTATCACCCGCGAAGAAGCT-3'*
BNITMSARAs2	5'-CTCTAGTTGCATGACAGCCCTC-3'*
BNITMSARP	6FAM-TCGTGCGTGGATTGGCTTTGATGTXT—PH

表二、檢體種類與測得 SARS 病毒量經定量 PCR 定量後之比較

	檢體種類	病毒量
Case 1	Sputum	6.76E+07
Case 2	sputum	3.53E+07
Case 3	Throat swab	6.50E+03
Case 4	Throat swab	5.04E+03
Case 5	Throat swab	3.83E+04
Case 6	Lung tissue	7.36E+08
Case 7	Nasal aspirate	1.15E+04
Case 8	Nasal aspirate	9.16E+05