花蓮縣某醫院疑似間質性肺炎病毒群聚感染事件

李政壕、林智暉、林永政、邱淑君、張琇媚、陳豪勇
衛生署疾病管制局研究檢驗中心

序言

1960 年代，人們期待冠狀病毒 (coronavirus)的發現，可以為一些不明的呼吸道疾病找到原因，但在SARS (sever acute respiratory syndrome)疫情未發生前，冠狀病毒也只能為一些少數的上呼吸道的疾病找到合理的解釋。小兒中一些常見的呼吸道病毒中，如呼吸道融合病毒 (RSV，respiratory syncytial virus)、副流感病毒 (parainfluenza viruses) 與流感病毒(influenza virus) 都是主要引起支氣管炎 (bronchiolitis) 以及下呼吸道疾病 (lower respiratory tract infection) 的原因之一。但所有的病例當中，仍然有三分之一左右病例找不到病原體[1]，而在上呼吸道疾病中亦有一半左右的病例找不到確定的病原體[2]。

歷經二十年的研究，荷蘭的研究人員發現共有 28 個臨床檢體確定會對細胞造成毒殺作用 (cytopathic effect)，在顯微鏡下可以發現其呈現絲狀病毒似的顆粒，因此懷疑其為病毒顆粒，其極有可能是由一個未知的病原體所造成[3]。在動物實驗中，這些檢體確實可以引起呼吸道的感染與症狀，而從哪些受感染動物所採集的檢體亦同樣具有感染力。在經過一些已知病毒的免疫試驗中，利用已知常見病毒的抗體並無法偵測到這一株病原體，而針對特定常見呼吸道病毒的 PCR 設計的 primer 亦無法夾出片段，最後經由隨機序列引子 (random arbitrarily primer) 所主導的 PCR 後，終於夾出一個特定片段，經過序列比對後終於證實其為一全新之病毒，與 RSV 關係非常相近，同樣屬於負黏液病毒科 (paramyxoviridae) ，是人類發現首株屬於間質性肺炎病毒屬 (metapneumovirus) 的新病毒，因此命名為人類間質性肺炎病毒 (hMPV) [3]。

hMPV 其來源尚不清楚，但其與 C 群禽類肺炎病毒 (avian pneumovirus type C)有較相近的關係[3,4]。系統發生分析中 (phylogenetic analysis)顯示 hMPV 基因型分爲兩大類，分別是 CAN97-83 與 CAN98-75[5]，而 F (fusion) protein 是主要用來分析其抗原相對性的主要標的[6]，但亦有文獻指出利用部分的 F (fusion) protein 與完整的 G (attachment) protein ORF (open reading frame) 所做系統發生分析所得到的結果，可分爲 A、B 兩個族群，其可以再分爲 A1、A2 與 B1、B2。在血清學的研究方法，抗原性的表現，不同的族群亦表現出明顯的不同[7]。

hMPV 傳染具有季節性，影響年齡層也相當廣泛，但主要爲年紀較小(五歲以下)以及較年長的老年人。引起的症狀與 RSV (respiratory syncytial virus)有許多類似之處，遍及上呼吸道與下呼吸道常見的疾病[8]。在一些研究當中甚至發現，hMPV 可能是幾近十分之一左右不明原因呼吸道感染的病原體[3,9]。隨著 2001 年 hMPV 的發現，有越來越多的研究發現其在呼吸道疾病所扮演的重要性，特別在急性呼吸道感染 (ARTIs, acute respiratory tract infections) 與下呼吸道感染 (LRTIs, lower respiratory tract infections)[10,11]。ARTI 與寒冬所造成的死亡在英國研究中有決定性的關連，而與 ARTI 相關的病原體包括流感病毒、人類呼吸道融合瘤病毒與腺病毒 (adenovirus)等，但仍有一些個案未檢驗出已知病原體，而 hMPV 被發現似乎與社區感染(community -acquired) 造成的 ARTI 有關[12]。Hmpv 的感染與其他呼吸道病毒亦有相當的關連性，研究指出三歲以下的兒童在同時感染 RSV 與 hMPV 時會引起更嚴重的 ARTIs[10]。

hMPV 在台灣的傳染分佈是否與世界上其他各國一樣，擁有主要年齡對象與流行季節，這些仍未有明確的答案，最主要是台灣對 hMPV 研究並不多，2005 年的五月，從花蓮送來疑似流感的檢體中，雖排除感染流感的可能性，卻赫然發現 hMPV 的存在，雖然這絕非台灣首例發現，但卻讓我們不得不正視這株新病毒對台灣的影響以及這株 hMPV 所可能造成的疫情。

背景

民國九十四年五月十三日花蓮某醫院，送進實驗室六支通報急性呼吸之新感染症候群檢體，在收進檢體後 24 小時內，實驗室依標準檢驗流程發出檢驗結果報告。五月十八日昆陽實驗室收到 13 支咽喉喉子，即刻進行標準檢驗流程，亦在 24 小時內發出檢驗結果報告。由於檢驗結果報告顯示流感、SARS、腺病毒病毒 PCR 均為陰性，因此花蓮某醫院再次送來七支請求檢驗 hMPV 之新感染症候群咽喉拭子。

檢驗方法

病毒核酸萃取 (QIAamp viral RNA mini Kit)

將咽喉拭子vortex後以 1 mL pipettmen取出 140μl病毒液，加入分裝好 560μlcarrier RNA與AVL混和液，混和均勻後在室溫靜至十分鐘。待十分鐘後加入 560μl96-100 %的酒精，混和均勻後取 630μl加入 spin column，4℃離心 6000g (8000 rpm) 一分鐘，重複兩次。丟棄離心液，將spin column裝入新的collection column，加入 500μlAW1，4℃離心 6000g (8000 rpm) 一分鐘。丟棄離心液，將spin column裝入新的collection column，加入 500μlAW2，4℃離心 20000g (14000 rpm) 三分鐘，再丟棄離心液，不加入AW2下再離心一分鐘。將spin column裝置標定好的 1.5ml離心管，加入 50μlDEPC-H_2O，於室溫放置一分鐘，以 4℃離心 6000g (8000 rpm) 一分鐘，保存離心液至-20℃。

Real-time RT-PCR 試驗

本實驗室所進行之 Influenza A & B 與 SARS virus real-time RT-PCR 是以 ABI 廠牌之 FG, KIT RGTS TQMN 1-STEP RT-PCR 進行試驗，反應總體積為 25μl，primer 的濃度為 400nM，probe 濃度為 200nM。Influenza A 與 SARS所選用的 probe dye 為 FAM，而 Influenza B 為 VIC。Real-time PCR 試驗的反應條件為: (1)RT：48℃，30 分鐘。(2) 95℃ 10 分鐘。(3) Amplification: 95℃ 10 秒；60℃ 1 分鐘，進行 40 個反應循環。

RT-PCR 試驗

本實驗所進行的 hMPV 檢驗乃是利用 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit，進行 RT-PCR，反應總體 50 l，primer 的濃度爲 600nM。試驗的反應條件爲: (1)RT: 50℃，30 分鐘。(2) 95℃ 15 分鐘。(3) Amplification: 95℃ 30 秒；55℃ 30 秒；72℃ 1 分鐘，進行 35 個反應循環。(4) 72℃ 七分鐘。

電泳試驗

將 RT-PCR 進行完後之 PCR 產物，放在 4℃冰箱暫時保存。利用瓊脂膠粉 (agarose)與 TBE 緩衝液泡成 1.5%的膠片，待其凝固將 PCR 產物與 6X loading dye 混和注入膠片之空的 well，電壓 100 V 下進行電泳，外染 Ethidium Bromide，最後照 UV 拍電泳膠片。

結果：

五月十三日花蓮某醫院，送進實驗室六支通報急性呼吸之新感染症候群檢體，經 ABI 7000 機型所進行 real-time PCR 結果，如圖一顯示 Influenza A & B 均爲陰性，且 SARS 亦爲陰性。五月十八日再次送來通報流感群聚之 13 支咽喉喉子，一樣經 ABI 7000 機型所進行之 real-time PCR 結果呈現 A 型與 B 型流感均爲陰性，因此首先排除花蓮某醫院流感群聚感染之可能性。五月十九日實驗室收到花蓮某醫院送來七支請求檢驗其他呼吸道病毒，其中包括 hMPV 之新感染症候群咽喉拭子。經傳統 RT-PCR 以及電泳檢驗結果顯示，其中編號 2005-UN-1430 之檢體，呈現高度陽性反應，而編號 2005-UN-1436 及 2005-UN-1442 亦有呈現弱陽性的反應，因此判斷 hMPV 在這次群聚感染中可能扮演著相當的角色之一。

討論：

hMPV 自 2001 年首度在荷蘭被發現以來，在全球各地已引起相當的注意，各國相關的文獻報導也絡繹不絕的發表，但國內的研究卻仍就相當不足。加拿大亞伯達(Alberta)大學的一份研究報告指出，當地 hMPV 與 RSV 流行

分佈的季節比起其他的呼吸道病毒相近，B 型流感病毒亦比 A 型流感病毒相對於 hMPV 具相關性，而春季是其感染高峰期[13]。hMPV 被認爲與冬季引發的的 ARTI 相關[3]，在各年齡層中亦與部份的社區內感染具關連性[12]。

在這次群聚感染當中，流感、SARS 病毒與腺病毒檢驗爲陰性，但卻從中發現 hMPV 的存在，雖然最後的結果必須由臨床醫師來判斷，但 hMPV 在這一次群聚事件當中肯定扮演相當角色之一。根據先前的研究指出，雖然 hMPV 的感染主要對象是小孩與老年人，但在這一次群聚檢體中，檢驗中發現一例感染者爲五十四歲之壯年男子，而發病日期在春夏之際，代表台灣亦有 hMPV 的存在，甚至感染的年齡層，也不侷限在小孩與老年人，而其出現在春天的時刻亦與一些國家的研究吻合。現在我們知道，台灣確實有 hMPV 的存在，但我們並不知道台灣 hMPV 的存在是由於境外感染亦或是本土既有的感染。它在台灣是否也如其他國家一樣，對急性呼吸道感染與下呼吸道感染影響甚大，甚至它在台灣流行的季節我們也一無所知，如此對防疫來說，將會是一個不可輕視的漏洞，因此發展高品質與高敏感度的檢驗方法，以及針對不同年齡與季節性的統計資料更是具有高度的參考價值。本文雖只是概略的疫情報導，未有深入的研究，但盼望引起台灣各地的注意以投入相關的研究，期能加強台灣當地疫情的瞭解與控制。

爲加強傳染性疾病的監控，未來有必要發展一套針對 hMPV 設計的快速檢驗方法，以利縮短檢驗時效，使疫情易於掌控。Real-time PCR 的發展，乃是快速檢驗方法的趨勢，因此我們也正積極的投入與發展這方面的研究，以期國內在 hMPV 的監控能擁有更高效率的方法。

參考文獻

1. Wright AL, Taussig LM, Ray CG, et al. The Tucson Children's Respiratory Study. II. Lower respiratory tract illness in the first year of life. *Am J Epidemiol* 1989, 129:1232-1246.

2. Nokso-Koivisto J, Pitkaranta A, Blomqvist S, et al.Viral etiology of frequently recurring respiratory tract infections in children. *Clin Infect Dis* 2002, 35:540-546.
3. van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001, 7:719-724.
4. Collins MS, Gough RE: Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J Gen Virol* 1988, 69 (Pt 4):909-916.
5. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, et al. Genetic diversity between human meta- pneumovirus subgroups. *Virology* 2003, 315:1-9.
6. Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* 2004, 78:6927-6937.
7. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004, 10:658-666.
8. McIntosh K, McAdam AJ: Human metapneumovirus--an important new respiratory virus. *N Engl J Med* 2004, 350:431-433.
9. Esper F, Boucher D, Weibel C, et al. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003, 111:1407-1410.
10. Konig B, Konig W, Arnold R, et al. Prospective study of human metapneumovirus infection in children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004, 42:4632-4635.
11. Esper F, Martinello RA, Boucher D, et al. A 1-year experience with human

metapneumovirus in children aged <5 years. *J Infect Dis* 2004, 189:1388-1396.

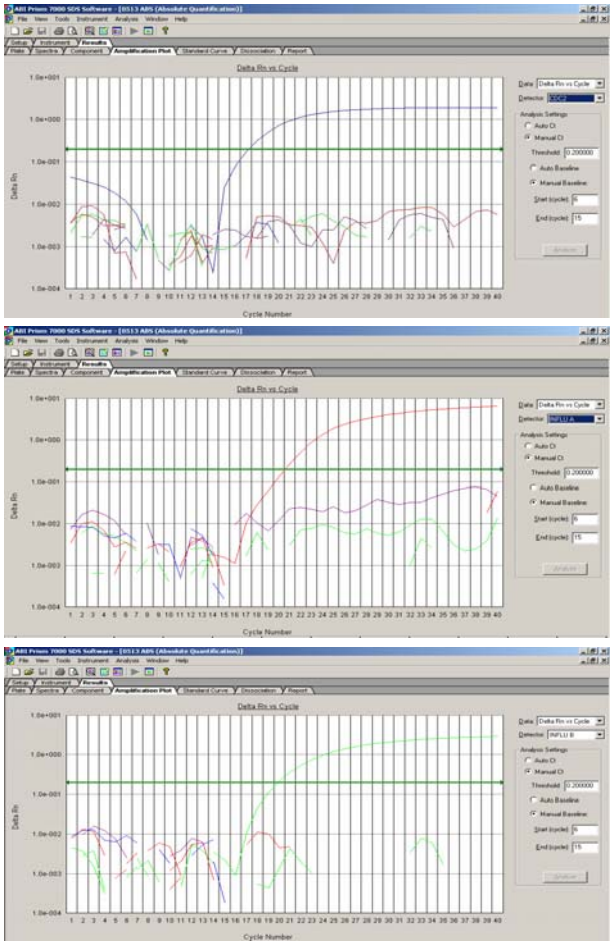
12. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, et al. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002, 8:897-901.
13. Robinson JL, Lee BE, Bastien N, et al. Seasonality and clinical features of human meta- pneumovirus infection in children in Northern Alberta. *J Med Virol* 2005, 76:98-105.

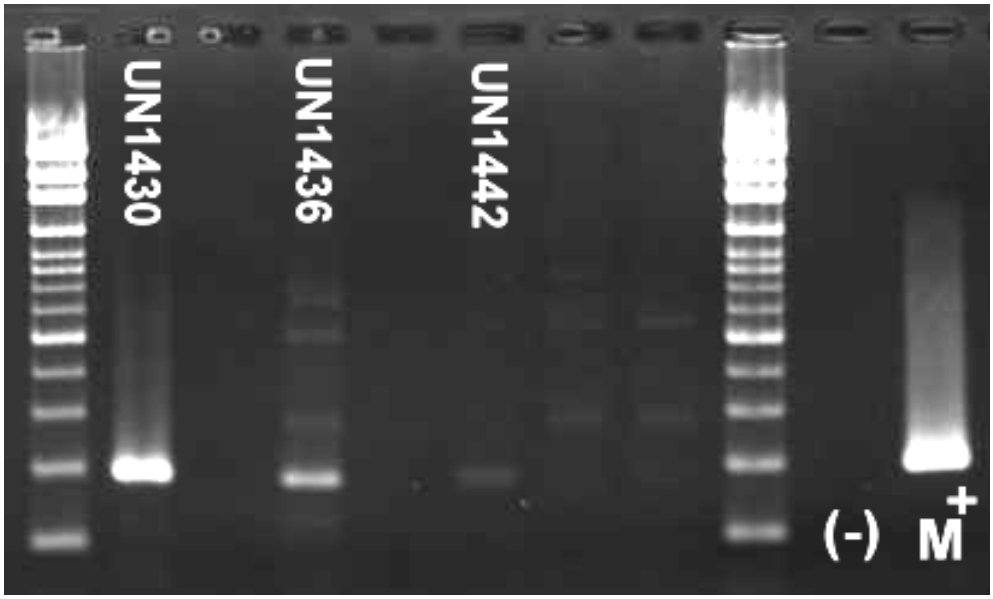
圖一、以 ABI 7000 儀器進行 A、B 行流感及 SARS real-time RT-PCR 檢驗結果

a

b

c



其中圖(a)爲 SARS real-time RT-PCR 畫面，只有 positive control 出現陽性結果，此試驗中所設計的 probe reporter 爲 FAM。圖(b)爲 A 型流感 real-time RT-PCR 畫面，只有 positive control 出現陽性結果，此試驗中所設計的 probe reporter 爲 FAM。圖(c) 爲 B 型流感 real-time RT-PCR 畫面，只有 positive control 出現陽性結果，此試驗中所設計的 probe reporter 爲 VIC。

圖二、以傳統RT-PCR跑膠所得到得hMPV檢驗之結果。膠片中可以發現除了UN1430之外尚有兩支呈現弱陽性，分別是編號UN1436 與UN1442。M^+爲hMPV之positive control，(-)爲negative control。