

溫泉池退伍軍人菌感染事件之分子分型研究

張瑞炘、鄭麗容、譚家凱、陳英彥、慕容蓉、江春雪、吳和生

衛生署疾病管制局研究檢驗中心

摘要

退伍軍人菌(*Legionella* spp.) 普遍存在於環境水體中，傳染途徑為吸入含此菌的水霧，公共休閒用水亦可能造成感染，近年來國內曾有報導溫泉 Spa 按摩池與公立游泳池蓮蓬頭感染退伍軍人菌之案例。疾病管制局於 2008 年 4 月上旬接獲一位通報個案，尿液檢體檢驗結果為嗜肺退伍軍人菌 (*L. pneumophila*) 抗原陽性，並由痰液檢體培養分離到該菌血清型第一型菌株。疫情調查發現個案發病前曾使用某溫泉池，遂採集該溫泉池相關檢體送驗，實驗的病原菌分離培養結果顯示該溫泉池至少檢出 3 種血清型之嗜肺退伍軍人菌。以脈衝式電泳對個案痰液分離菌株與該溫泉池分離菌株進行分子分型比對，發現溫泉池中有 4 個環境菌株與個案痰液中分離的臨床菌株有相同的 DNA 指紋圖譜，此結果說明本感染個案與該溫泉池的退伍軍人菌污染有密切關係，也顯示應加強預防旅遊設施相關之退伍軍人症感染。

關鍵字：退伍軍人症、嗜肺性退伍軍人菌、脈衝式電泳、旅遊相關之退伍軍人病、溫泉池

前言

自 1976 年美國費城發生著名的飯店集體感染事件後，退伍軍人菌被認為是一個重要的社區感染與院內感染肺炎的病原體[1,

2]，退伍軍人菌目前已知至少有 48 個菌種及 70 個血清型(serogroups)，包括嗜肺退伍軍人菌(*Legionella pneumophila*)及其它退伍軍人菌種(*Legionella* species)，約有一半會造成人類呼吸道疾病[2, 3]，大部份退伍軍人症由嗜肺退伍軍人菌所引起，其中以血清型第一型佔最多數[4]。該菌傳染途徑為吸入遭污染的水霧，在人為環境中包括冷卻水塔、水龍頭、蓮蓬頭、Spa 按摩池等皆有可能成為傳播媒介，目前尚未發現人傳人的病例[5, 6]。

旅遊相關的退伍軍人病(travel-associated Legionnaires' disease)近年來逐漸受到重視，美國每年約有 8,000-18,000 人因退伍軍人病住院治療，約有 20 %與旅遊有關，美國 2005-2006 年旅遊相關感染的個案中約有 40-51 %是與飯店有關[7]。在英國，退伍軍人症個案中約有 50 %為旅行相關之感染[8, 9]。歐洲一份涵蓋 35 個國家的監測研究報告指出，2005 年該區域共有 755 個旅行相關之退伍軍人症個案，包括 93 個群聚感染事件[10]。世界各國 Spa 按摩池造成的退伍軍人菌感染事件時有所聞[6, 11, 12, 13]，美國 CDC 人員由一個 Spa 按摩池群聚感染事件的

本期文章

- 259 溫泉池退伍軍人菌感染事件之分子分型研究
- 265 人類新興冠狀病毒與其他動物冠狀病毒之回顧

創刊日期：1984年12月15日
出版機關：行政院衛生署疾病管制局
發行人：張峰義
總編輯：賴明和
執行編輯：吳麗琴、劉繡蘭
電話：(02) 2395-9825
地址：臺北市中正區林森南路6號
網址：<http://teb.cdc.gov.tw/>
文獻引用：
[Author].[Article title].Taiwan Epidemiol Bull 2010;26:[inclusive page numbers].

研究報告指出，若 Spa 池已遭退伍軍人菌污染，接觸 Spa 池的時間越長感染的機率越高 [13]。

為確認感染源，實驗室通常採用分子分型技術(molecular typing)，比對臨床菌株與環境菌株的 DNA 親源關係，以確認感染源 [6, 13]。脈衝式電泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)具有高度再現性與分型效力，常應用於各種細菌傳染病的分子分型研究[14]。台灣近年來使用脈衝式電泳技術證實休閒用水造成感染退伍軍人菌的事件有二，一件為 2005 年台北市某三溫暖 Spa 池造成的嗜肺退伍軍人菌血清型第二型感染事件[6]，另一件為 2007 年南投縣某公立游泳池蓮蓬頭造成的嗜肺退伍軍人菌血清型第一型感染事件[15]。

本中心實驗室再次利用脈衝式電泳技術證實退伍軍人菌的可能感染源，確定本文個案為國內第二件溫泉池與感染退伍軍人菌相關的案例，研究結果同時顯示，調查個案的旅遊紀錄將有助於追查感染源及防疫工作進行，同時突顯維持公共休閒用水清潔衛生的重要性。

材料與方法

一、個案描述

患者為 60 多歲男性，於 2008 年 4 月上旬持續發燒最高至 40°C，伴隨乾咳及腹瀉，並有呼吸困難及肺炎現象，就診醫院通報為

退伍軍人症疑似病例。疾病管制局收到患者之臨床檢體進行各項檢驗，尿液抗原檢驗結果為陽性，並由病患痰液中分離到退伍軍人菌。經調查得知，患者發病前 10 天內曾使用溫泉池，實驗室對該溫泉池相關環境檢體進行培養與鑑定後，從溫泉池水檢體分離出多株退伍軍人菌，其後進行血清型鑑定與分子分型比對，以利追查感染源。

二、臨床檢體

個案的臨床檢體包括痰液、尿液、發病初期與恢復期血清。個案家中用水之環境檢體共 8 件，包含水塔、水龍頭、浴室蓮蓬頭及飲用水。溫泉池相關環境檢體共 4 件，包含蓮蓬頭、水龍頭、飲用水及溫泉池水。各檢體以低溫保存方式運送到本局實驗室，收件後隨即進行各項檢驗。

三、尿液與血清檢體之檢驗

檢驗尿液中退伍軍人菌抗原採用 *Legionella* Urine Antigen ELISA kit (BINAX, Maine, USA)。在含有 *L. pneumophila* 血清型第一型專一性的兔子多株抗體 IgG 的微量滴定盤中加入患者尿液，若有抗原存在即會被抗體吸附，抗體-酵素結合體(Anti-*Legionella* HRP conjugate)與尿液檢體同步加入，經 2 小時反應，以洗劑去除未結合之尿液及抗體-酵素結合體，最後加入呈色劑呈色，以分光光度計判定結果。

檢驗血清抗體力價採用間接免疫螢光抗體檢驗法，試劑為 *Legionella* Indirect Antibody Test System (Zeus scientific, NJ, USA)。檢體血清經兩倍序列稀釋，加入含有 *L. pneumophila* 的玻片中，於 37°C 反應後洗去未吸附血清並加入螢光抗體，再經 37°C 反應後洗去未吸附的螢光抗體，在螢光顯微鏡下觀察結果。若有典型菌體螢光反應，表示血清中含有 *L. pneumophila* 的抗體，並由稀釋終點判定其抗體力價。若發病初期與恢復期抗體力價有 4 倍以上差距，且最高力價大於或等於 128，判定為陽性。

四、臨床檢體菌株分離鑑定

痰液經過均質化及 0.2 M KCl-HCl (pH 2.0) 溶液酸處理，加入 KOH 中和劑均勻混合，取 0.1 ml 接種到 PNV 選擇性培養基，內含 BCYE 培養基(Buffered charcoal yeast extract agar, REMEL, Thermo Fisher Scientific, Kansas, USA)，半胱胺酸 L-cysteine (Mast Group Ltd., Merseyside, U.K.)，以及添加物 PNV (polymyxin B, natamycin and vancomycin, Mast Group Ltd.)；於二氧化碳培養箱內，溫度 35°C、CO₂濃度 5.0%，相對溼度 60~90% 條件下培養 7 至 14 天，若觀察到可疑菌落則挑出來再次培養，並進行革蘭氏染色、L-cysteine 生長需求測試、退伍軍人菌乳膠凝集試驗 (Legionella Latex Agglutination Test；Oxoid Limited, England)，與直接免疫螢光抗體試驗(DFA) [16]。

五、環境檢體處理與培養

使用孔徑 0.2 μ m 的濾膜過濾水檢體 500 ml，濾膜加入 3 ml 滅菌水並震盪，使濾膜上的殘留物再度懸浮於水中，取出其中 1 ml 溶液進行酸處理與培養，酸處理的過程與上述痰液檢體處理過程相同，使用的選擇性培養基為 BCYE 培養基添加 L-cysteine 與 MWY(Modified Wadowsky and Yee)添加物 (Mast Group Ltd., Merseyside, U.K.)。

六、菌株血清型鑑定

採用直接免疫螢光抗體試驗法，試劑為 Direct Fluorescent Antibody Test (Zeus scientific, NJ, USA)，為使 DFA 試驗法可檢測之血清型更齊全，增加使用另一廠牌抗體(m-TECH, Monoclonal Technologies, Inc., Alpharetta, GA, USA)。將培養 48 小時的純菌加在 1% 中性福馬林中，製成濃度為 McFarland No.1 的懸浮液 (約 3×10^8 cfu/ml)，吸取少量菌液滴於螢光染色專用玻片，自然風乾並固定，加入不同血清型之抗體共軛物，於室溫下保溼並反應 20 分鐘。取出玻片以磷酸鹽緩衝溶液沖洗浸泡後，用蒸餾水沖洗，自然風乾，

封片後以螢光顯微鏡檢視，培養分離之細菌如呈現單一桿狀，並出現亮黃綠色螢光，則認定為陽性結果。

七、脈衝式電泳分子分型

菌株培養 48 小時後挑取適當菌量加入 2 ml 緩衝溶液(100 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 8.0)調整濁度，另外配製 1% Agarose 溶解於 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)，將菌液與 Agarose 等體積混合後注入模具。凝固的膠塊放入 Proteinase K 溶液(20 mg/ml Proteinase K, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% Sarcosine)，於 56°C 水浴 2 小時，後以滅菌水及 TE Buffer 清洗數次，每次皆於 56°C 水浴 15 分鐘。

膠塊以 *Sfi*I 限制切割酵素(New England Biolabs, MA, USA)於 50°C 反應 4 小時，反應完成後將膠條黏貼上模具，以 1% Agarose 鑄膠後，使用 Bio-Rad CHEF MAPPER 電泳儀(Bio-Rad Laboratories, California, USA)進行電泳。電泳條件為電場梯度 6 V/cm、電場角度 120°，變換間距 2 秒至 40 秒，電泳總時間 20 小時。完成後以 Ethidium bromide 染色並照相，以 BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Belgium)軟體進行分析。

結果

一、臨床檢體檢驗結果

尿液檢體抗原檢驗結果顯示為嗜肺退伍軍人菌血清型第一型陽性。血清抗體免疫螢光試驗結果，發病初期力價小於 128，四週後採檢的血清抗體力價 IFA 等於 1024。患者恢復期抗體力價已超過發病初期抗體力價 4 倍並超過 128，判定為嗜肺退伍軍人菌抗體陽性。痰液檢體的分離培養成功自檢體中分離到嗜肺退伍軍人菌血清型第一型菌株，此臨床菌株之後與環境菌株進行脈衝式電泳分型分析。

二、環境檢體之菌株分離與血清型鑑定

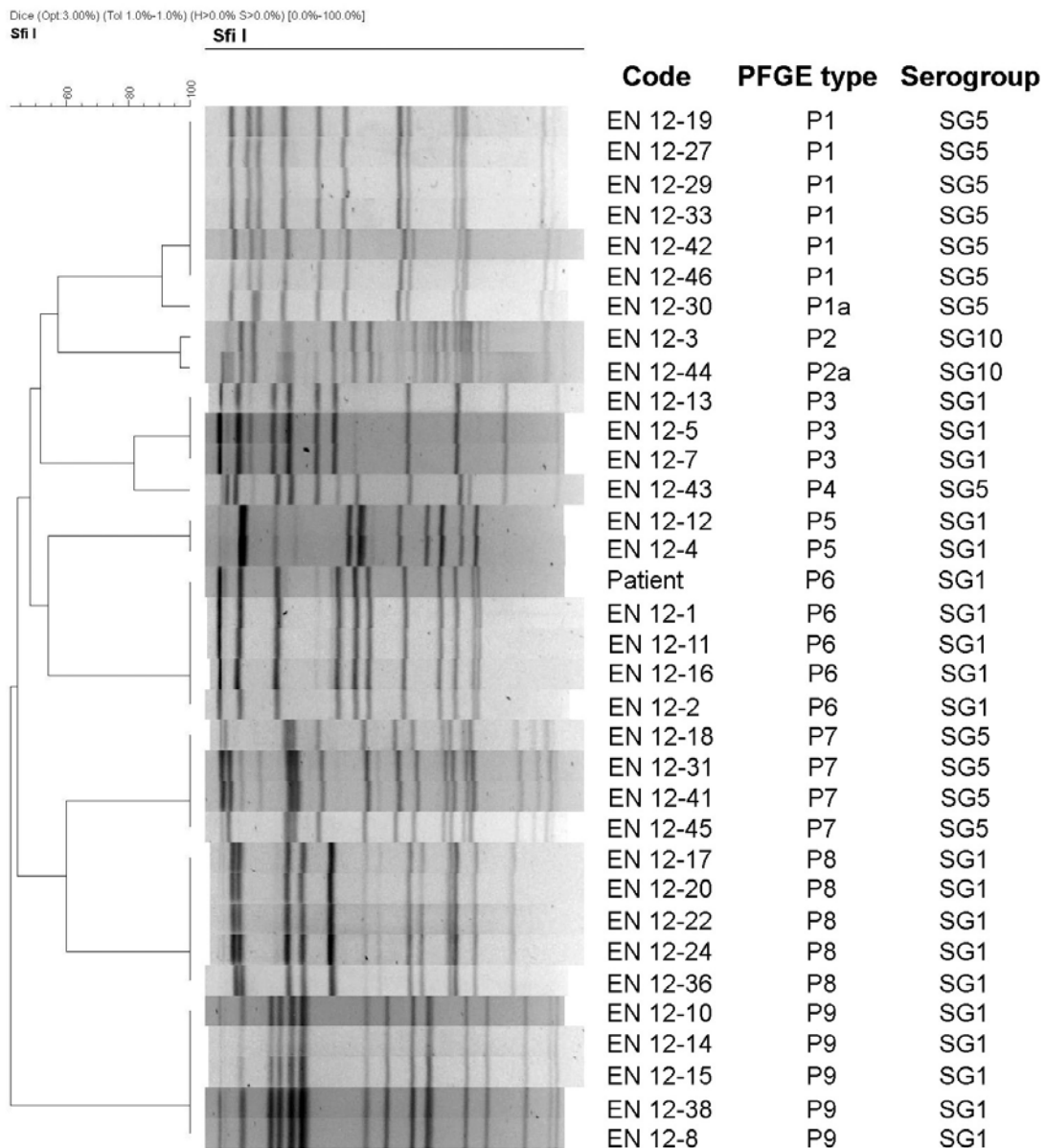
環境檢體經培養後，在溫泉池水檢體的

培養基上發現數十個疑似菌落，挑出並再次培養，經革蘭氏染色為革蘭氏陰性桿菌、L-cysteine 生長需求測試陽性、退伍軍人菌乳膠凝集試驗陽性。進行直接免疫螢光抗體試驗確認菌株之血清型，鑑定結果如圖所示，共確認 33 株退伍軍人菌，分別為嗜肺性退伍軍人菌血清型第一型 19 株、第五型 12 株、第十型 2 株。12 個環境檢體中，只有溫泉池的池水檢體有退伍軍人菌株被分離，其

他檢體包括患者家中 8 個環境檢體，則未分離到退伍軍人菌。實驗結果顯示該溫泉池水已遭到至少 3 種血清型之嗜肺退伍軍人菌污染，其中以第一型出現頻率最高，佔所有菌株的 57.6%，第五型和第十型分別佔 36.4% 與 6.1%。

三、脈衝式電泳分型(PFGE patterns)

結果如圖所示，患者之臨床分離株與 33 個環境分離株同時比對結果，發現 34 個菌



圖、退伍軍人菌血清分型及 PFGE 分型結果

33 個環境菌株與 1 個臨床菌株可分成 3 種血清型，11 個 PFGE 型，臨床菌株 (Patient) 與環境菌株中的 EN12-1、EN12-2、EN12-11、EN12-16 有 100% 相同的 PFGE 圖譜，證明此個案的感染與溫泉池有密切關係。

株可分成 11 個 PFGE 型，血清型第一型菌株可分為 P3、P5、P6、P8、P9 共 5 型，血清型第五型可分為 P1、P1a、P4、P7 共 4 型，血清型第十型為 P2、P2a 共 2 型，其中 P1 與 P1a；P2 與 P2a 相似度高於 90%。臨床分離株與 Spa 按摩池的 4 個菌株(EN12-1、EN12-2、EN12-11、EN12-16)同屬於 P6 型，DNA 指紋圖譜 100% 吻合，分析結果顯示個案之感染與溫泉池的退伍軍人菌污染有密切關係。此外由溫泉池 33 個菌株的分型實驗結果，可發現該池環境中各 PFGE 型別分布均勻，沒有一個特定 PFGE 型菌株數量超過 20%，而造成感染的 P6 型僅佔所有菌株數量的 12.1% (4/33)。

討論

本文是國內第二篇與溫泉池相關之退伍軍人菌感染報導，退伍軍人菌具有耐高溫的特性，使得溫泉設施易滋生此菌，並造成長期的污染，因此定期消毒溫泉管路與水質監控實為一項重要的工作。加氯消毒是維持溫泉池池水衛生常用的方式，而大眾池的氯溶解量消耗的速度比個人池快，因此較容易被細菌污染[17]。隨著檢驗技術與分子分型技術逐漸成熟，菌株的分子分型實驗得以使感染源被證實，近年來的研究報告更逐漸突顯出公共休閒用水受退伍軍人菌污染的重要性，也意味著國內業者應該重視公共休閒用水中退伍軍人菌的監控。本文所提之溫泉池在檢驗出退伍軍人菌後，業已經過消毒處理，複驗之環境檢體並無檢出退伍軍人菌。定期監測水質並進行消毒工作、加裝必須的過濾設備、以及更新老舊的供水管路等工作將可避免日後再度發生相同的事件。

本文患者為旅遊相關感染的個案，旅遊感染退伍軍人菌的個案一般不易被發現，由於旅客通常是返家數日後才發病，難以判斷自身的可能感染源。而旅遊造成群聚感染的事件也不易發現，因旅客來自各縣市，個案

發病的時間點也有差異，各地的醫療單位不容易警覺這些個案皆感染於相同旅遊地點，因此需要一個整合性的監測系統，收集各地通報個案的旅遊紀錄，加以整合以便發現共同的感染源，並驗證來源與消毒[13]。

歐洲的退伍軍人症監測網路(EWGLINET)非常完整，以 2005 年為例，涵蓋 35 個國家的監測系統共找到 93 個群聚感染事件，其中有 36.6% 是藉由該監測系統而發現[10]。美國 CDC 於 2005-2006 年提供一個輔助系統，有 32 州共同參與，各醫院可使用 E-mail 的方式進行通報，以期及早發現旅遊感染退伍軍人菌的感染源，兩年間共找到 10 個旅行群聚感染事件，其中 7 件與飯店有關而 3 件與郵輪有關[7]。我國於 1999 年將退伍軍人病納入第三類法定傳染病監測與通報系統，並於 2004 年中開始對陽性個案採集其潛伏期間相關之環境檢體，包括居家、娛樂及旅遊場所，因此詳實的疫調及採檢，將有助於找到退伍軍人菌感染源。

在同一溫泉池環境內發現並分離兩種以上之退伍軍人菌相當常見[6,18,19]，本次研究自環境中分離培養的菌株皆為嗜肺退伍軍人菌(*L. pneumophila*)，其中血清型第一型佔 57.6%，第五型和第十型分別佔 36.4% 與 6.1%，顯示此遭受污染的溫泉池檢體中有超過 40% 的菌株是屬於非血清型第一型的嗜肺退伍軍人菌。國內外均有過非第一型菌株造成溫泉池感染的案例[6, 13]，而目前最常用的尿液抗原免疫試驗，只能偵測血清型第一型的感染，若為非第一型的病患將可能被遺漏[20]。因此處理溫泉池感染事件時應注意非第一型的案例是否可能被低估。

環境分離菌株中的血清型第一型菌株可分成 5 種 PFGE 型別，分別是 P3、P5、P6、P8、P9，使用 Bionumerics 軟體分析的結果，相似度皆不到 60%，顯示各菌株間之親源關係疏遠。而各菌株間是否有致病性的差異？本次造成感染的 P6 型菌株是否具有較強的

致病性？值得進一步針對相關致病基因進行分子生物學實驗深入研究探討。

參考文獻

1. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977;297:1189-97.
2. Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506-26.
3. Benson RF, Fields BS. Classification of the genus *Legionella*. *Semin Respir Infect* 1998;13:90-9.
4. Jonas D, Meyer HG, Matthes P, et al. Comparative evaluation of three different genotyping methods for investigation of nosocomial breaks of legionnaires' disease in hospitals. *J Clin Microbiol* 2000;38:2284-91.
5. Bernander S, Jacobson K, Lundholm M. A hospital-associated outbreak of legionnaires' disease caused by *Legionella pneumophila* serogroups 4 and 10 with a common genetic fingerprinting pattern. *APMIS* 2004;112:210-7.
6. Su HP, Tseng LR, Tzeng SC, et al. A legionellosis case due to contaminated spa water and confirmed by genomic identification in Taiwan. *Microbiol Immunol* 2006;50:371-7.
7. CDC. Surveillance for travel-associated legionnaires disease---United States, 2005-2006. *MMWR* 2007;56:1261-3.
8. Joseph CA, Harrison TG, Ilijic CD, et al. Legionnaires' disease in residents of England and Wales: 1996. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1997;7:153-9.
9. Joseph CA, Harrison TG, Ilijic CD, et al. Legionnaires' disease in residents of England and Wales: 1998. *Commun Dis Publi Health* 1999;2:280-4.
10. Ricketts KD, McNaught B, Joseph CA, et al. Travel-associated legionnaires' disease in Europe: 2005. *Euro Surveill* 2007;12:60-3.
11. Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, et al. Outbreak of legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet* 1996;347:494-9.
12. Den Boer JW, Yzerman EPF, Schellekens J, et al. A large outbreak of legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerg Infect Dis* 2002;8:37-43.
13. Benin AL, Benson RF, Arnold KE, et al. An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: The need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *J Infect Dis* 2002;185:237-43.
14. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
15. Chang JH, Tseng LR, Zeng SJ, et al. Laboratory diagnosis and analysis of a *Legionella* infection event in a public swimming pool in Nantou County. *Taiwan Epidemiol Bull* 2007;23:396-405.
16. Sue HB, Tseng LR, Chou JY: The detection of *Legionella pneumophila*. *Epidemiol Bull* 2005 ; 21: 930-40.
17. CDC. Final Recommendations to Minimize Transmission of Legionnaires'

- Disease from Whirlpool Spas on Cruise Ships. Atlanta: 1997.
18. Nozue T, Chikazawa H, Miyanishi S, et al. Legionella pneumonia associated with adult respiratory distress syndrome caused by *Legionella pneumophila* serogroup 3. Intern Med. 2005 ;44:73-8.
19. Faris B, Faris C, Schousboe M, et al. Legionellosis from *Legionella pneumophila* serogroup 13. Emerg Infect Dis 2005;11:1405-9.
20. Benin AL, Benson RF, Besser RE. Trends in legionnaires disease, 1980-1998: declining mortality and new patterns of diagnosis. Clin Infect Dis 2002;35:1039 -46.

人類新興冠狀病毒與其他動物冠狀病毒之回顧

賴治民¹、黃柏桐²

1. 國立嘉義大學獸醫學系
2. 馬來西亞博大大學獸醫學系

摘要

冠狀病毒(coronavirus)一般認為僅造成局限性且易自我恢復的感染。至今，已有三亞群、16種以上的冠狀病毒被發現。本病毒核酸大小為RNA病毒中最大的，在電子顯微鏡下呈現皇冠状，顆粒大小約為100nm。可利用自身合成的複製酶(replicase)及蛋白酶(proteinase)合成棘蛋白(spike protein)、封套蛋白(envelope protein)、膜蛋白(membrane protein)及核殼蛋白(nucleocapsid protein)四個結構蛋白及其它非結構蛋白(non-structural proteins)，部份冠狀病毒可合成血球凝集素酯化酶(Haemagglutinin-esterase

protein)。病毒傳播以飛沫及口糞傳染為主，感染患者後，病毒就會開始複製，至今已有多種抗原或抗體檢驗套組可檢驗並確診。然而嚴重急性呼吸道症候群(severe acute respiratory syndrome, SARS)卻在病患發燒之後，才會開始大量複製，使得世界衛生組織仍用臨床症狀當作是SARS的指標，良好的診斷試劑仍待專家努力發展。至今，已有即時聚合酶連鎖反應套組，可以在發燒4天內檢出病毒；應用免疫色層分析法(immuno-chromatography test)發展的套組，可以在發燒10天內檢出抗體。人類冠狀病毒現已發現五型。除SARS-CoV外，HCoV-OC43可造成患者下痢，HCoV-229E及2004年後發現的HCoV-HKU1及HCoV-NL63均與呼吸道感染有關。後者於成人發現之HCoV-NH株與幼兒Kawasaki病之關聯性仍待證實。

關鍵字：冠狀病毒、嚴重急性呼吸道症候群病毒、致病機轉

前言

哺乳類之冠狀病毒感染一直被認為通常僅造成局限性且易自我恢復的症狀，但至今，已有五種人類冠狀病毒被發現，並包括可造成下呼吸道嚴重感染的急性呼吸道症候群病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)。本文將討論冠狀病毒的種類、複製、致病機轉、症狀及感染方式，並進而討論SARS-CoV疫苗及診斷試劑發展的困難，並提及其他可感染人的新興冠狀病毒。

冠狀病毒的發現及其家族

冠狀病毒於1937年首次從雞分離出，但遲至1965年，Tyrrell及Bynoe利用帶有纖毛的人類胚胎氣管細胞(human ciliated embryonal trachea cells)才首次於體外培養出

人類冠狀病毒[1]。由於在電子顯微鏡下呈現皇冠的形狀，於 1975 年，正式被命名為冠狀病毒科(Coronaviruses)[1-3]。Corona 在拉丁文為皇冠(Crown)的意思。

Spaan 等指出，冠狀病毒科屬於 *Nidovirales* 目，同目的病毒科有 *Arteriviridae*，及 *Roniviridae*。冠狀病毒科則有二個屬：*Coronaviruses* 及 *Toroviruses*。冠狀病毒屬可以分為三個亞群(subgroup)，16 種以上的病毒[4]。第一亞群和第二亞群冠狀病毒主要感染哺乳類，第三亞群則感染鳥禽類。第一亞群中，主要的病毒有感染人的 HCoV-229E、感染豬的傳染性腸胃炎(transmissible gastroenteritis virus, TGE) 及 porcine respiratory coronavirus (PRCV)、貓冠狀病毒(feline coronavirus)：含貓傳染性腹膜炎病毒(feline infectious peritonitis virus, FIPV)和貓腸炎病毒(feline enteritis virus, FEV)及狗冠狀病毒(canine coronavirus)，第二亞群則有感染人的 HCoV-OC43，牛冠狀病毒(bovine coronavirus)，鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV) 及大鼠之 rat sialodacryoadenitis virus (RAT-SDAV)，第三亞群有雞傳染性支氣管炎病毒(chicken infectious bronchitis virus, IBV) [5]。病毒通常都可以分到這三亞群中，然而加拿大的研究團隊將 SARS-CoV 多倫多株 (Tor2)定序，發現其基因序列與 HCoV-OC43 比較接近，血清反應和第一亞群比較接近，所以其特性和原來的三亞群都不同，因而建議將 SARS-CoV 列在第四亞群中[6]，但是更多的研究顯示，SARS-CoV 仍應列於第二亞群中[3,6]。

冠狀病毒構造及複製方式

冠狀病毒為正向單股 RNA (+ssRNA)之病毒。其病毒顆粒直徑約為 75 - 160nm，平均為 100nm，核酸為長鏈狀，大小 27 - 31kb。其核酸不分段，分子量為所有 RNA 病毒中最大的。病毒外表有封套(envelope)，在封套

上的棘蛋白(spike, S protein)則突出於病毒體(virion)表面，形成冠狀結構[2]。

冠狀病毒有 11 到 17 個開放讀碼區(open reading frame, ORF)，通常轉錄 7 到 9 個 mRNA。病毒進入細胞後，先利用宿主的酵素系統，製造出一個含全部基因的負向單股 RNA (-ssRNA)，並利用這為模板，再利用本身之 ORF1 轉譯出蛋白切割酶(proteinase)及核酸複製蛋白酶(replicase)，負責接下來的 mRNA 的轉錄及轉譯的工作[2,3]。接下來，核酸複製酶會依序將每一個開放讀碼區轉譯依序製作出棘蛋白、血球凝集素酯化酶(Haemagglutinin-esterase, HE protein)、膜蛋白(membrane, M protein)、封套蛋白(envelope, E protein)、及最後的核殼(nucleocapsid, N protein)，凝血蛋白僅第二亞群的部份病毒會合成[4,5]。在轉譯過程中，也會合成一些非結構性蛋白，這些非結構性蛋白可能與病毒的毒力有關，如 SARS-CoV 中之非結構蛋白[5]。SARS-CoV 有 14 個有功能的開放讀碼區，製造出 4 個結構蛋白、8 個附屬蛋白及 16 個非結構蛋白[3]。

冠狀病毒的傳播方式

病毒主要的傳播方式為經飛沫由呼吸道進入或經糞口傳染，由於飛沫傳染的距離通常不會超過一公尺，因此經由被污染的器具接觸傳染也是一個重要的途徑[7]。除此之外，其他的傳播方式在許多冠狀病毒中也很重要。例如貓傳染性腹膜炎則是以垂直傳染為主[5]。冠狀病毒對環境的抗性很強。SARS-CoV 的存活時間比一般的冠狀病毒稍久，它可以在乾的塑膠表面及糞便中存活 48 小時、在尿液中可達 24 小時，患者的下痢便中可以存活 4 天，主要的原因是它的封套結構使其較耐酸及耐腸道酵素[5]。病毒可被 254nm 波長之紫外光、高於 65°C 之溫度、高於 14 或低於 3 之 pH 值環境去活性。福馬林或戊二醛(glutaraldehyde)也可以去活化

SARS-CoV。由於 SARS-CoV 的高風險性，因此，此病毒僅能於 BSL3 級(biosafety level 3) 之實驗室操作[8]。

冠狀病毒的結構蛋白

棘蛋白是由 S1 和 S2 二個次單位(subunit) 構成。S 蛋白是第一型的膜轉化醣蛋白(type I transmembrane glycoprotein)，當病毒與細胞接觸後，就借此蛋白與細胞膜上的受體接觸，而將細胞膜開孔，使核酸能進入細胞內，故也是一個重要的中和蛋白[8]。其受體可以有很多種，第一亞群病毒的受體是胺基胜肽酶(aminopeptidase N, APN) [9]；第二亞群的受體，以鼠肝炎病毒為例，為癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)。SARS-CoV 的受體為血管加壓素轉換酶(angiotension-converting enzyme 2) [10, 11]，S1 蛋白就是和此受體結合，而 S2 蛋白負責將病毒與細胞融合，使核酸進入宿主細胞。在微酸的環境中，其結合的效率會更好[11]。

封套蛋白和膜蛋白為病毒在組裝時所須的蛋白，均在內質網系統中完成醣化，而運到細胞膜表面，核酸會和核殼蛋白結合，形成螺旋狀結構，穩定並包裹核酸，並靠近細胞膜而與上述二種蛋白質形成的顆粒結合而後芽出(budding) [5]。核殼蛋白可以與棘蛋白合作，而在當細胞膜被打開後，將核酸送入宿主細胞內[3]。

某些冠狀病毒，如鼠肝炎病毒，可以合成血球凝集素。這個核酸序列應是從 influenza C 病毒獲得。它的主要功能是利用 acetylesterase 的活性，破壞具有 sialic acid 的蛋白，而使細胞膜破壞，尤其是紅血球。它也可以協助 S 蛋白，使病毒更容易進入細胞中，因此也被認定為毒力因子之一[5]。

冠狀病毒對動物的致害

Weiss 等於 2005 年指出，通常冠狀病毒感染之動物，在有足夠的營養下，可以耐過

疾病的侵害[3]。貓冠狀病毒於城市中的貓的盛行率為 30%以上[12]，通常感染症狀輕微，但是如病毒突變，尤其經垂直感染的貓冠狀病毒，病毒可穿過腸道至腹腔，因體液性免疫反應所產生的抗體抗原結合反應，而造成組織液中蛋白沈澱，最後造成纖維蛋白(fibrin)堆積在腹腔，而形成自體免疫性之腹膜炎，病貓最後常因惡體質而死亡[3]。老鼠之鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)為一種高傳染力、高致死率的老鼠疾病，於英國家鼠中之盛行率為 86%[13]。此病可以作為一個非常好的冠狀病毒感染動物模型[5]。

病毒株的變異

由於 RNA 聚合酶(RNA polymerase)的錯誤率為 1×10^{-4} ，因此，RNA 病毒複製時的突變率是相當高的，例如每一株貓傳染性腹膜炎的病毒序列都不相同[5]。因此，冠狀病毒也容易越過物種的差異，而侵襲其他動物。人的 HCoV-OC43 和牛的冠狀病毒(BCoV)的基因序列就很相似[5,13]。但是不同的開放讀碼區，其突變速率也不相同。如 RNA 核酸複製酶的基因部份，相對而言，就比較穩定，適合當作聚合酶連鎖反應時的基因檢測序列[5]。

傳統的人類冠狀病毒有二型，第一種為 HCoV-OC43，造成嬰幼兒腸胃道疾病，臨床症狀以下痢為主，病毒通常僅感染腸道上皮部上 1/3 處，因養份無法被絨毛吸收，而有水樣下痢，小於 12 個月的嬰兒會有乳糜狀下痢。第二種為 HCoV-229E，通常僅感染上皮細胞(epithelial cell)，造成輕微症狀的上呼吸道感染。臨床上，大部份的感染都是很輕微的、局限性的，而無法和類流感區分，除了極少數感染會有神經症狀[5]。在人類，呼吸道型的冠狀病毒感染通常與季節有關，冬天為好發時期。病毒可由巨噬細胞攜帶至其他器官，而造成肝、腎、心及眼的隨機感染，極少有神經

症狀。因血清型眾多，又無交叉保護力，所以重覆感染是可能發生的[5]。

SARS-CoV 的病症及其致病機轉

SARS-CoV可造成嚴重的下呼吸道症狀，27%的病人有下痢症狀，13%的病人有腹痛症狀，其潛伏期約為6.4天。此病的死亡率在小於60歲以下的病患為13.2%，在60歲以上者為43.3%[14]。Gu等表示，SARS-CoV可感染肺部、腎上皮細胞、腸黏膜細胞、神經原及免疫細胞並造成多發性器官衰竭死亡。主要的病變仍然是在肺部，和細胞性免疫反應及其相關的連鎖反應有關。因被感染造成細胞凋零現象(apoptosis)，自體抗體(autoantibody)、不適量的干擾素(interferon)反應、過量的細胞素(cytokine)分泌及過多巨噬細胞及T細胞，造成瀰漫性的肺泡傷害(diffuse alveolar damage)，最後因肺臟細胞大量的被破壞，肺產生空泡化及間質化，並充滿組織液，病患會因無法換氣(ventilation)而死亡[15]。

冠狀病毒的演化，以 SARS-CoV 為例

當SARS於2003到2004年爆發流行時，科學家首先注意到的是流感病毒或其他病原，而之後才發現是冠狀病毒；此病毒和果子狸的冠狀病毒有99%以上的基因都相同，所以被認為是由果子狸的冠狀病毒傳到人而造成。但是SARS-CoV是否能在動物間傳播仍然是個疑問[5]。此病毒也可以感染家貓(domestic cats)，短尾猿(macque monkeys)及雪貂(ferrets)等宿主[5]，然而於實驗環境中，其僅造成局限性的上下呼吸道症狀[3]。

當跨越物種感染初期，很容易造成高致病率及高死亡率。但是在病毒適應新宿主的過程中，其演化的方向就會慢慢修改成與宿主共存，但是保有最大的感染力，當達到平衡時，病毒的變異率就會下降並穩定，這就是所謂的宿主適應性(host adaptation)，

SARS-CoV的演化符合這種原則[5]。Zhang等指出，SARS-CoV每一個基因每一年的平均突變率為 $0.8-2.38 \times 10^{-3}$ (nucleotide substitution per site per year) [16]。依據SARS-CoV棘蛋白的演化，SARS-CoV的演化可分為三階段：2002-04跨物種時期、2003年早期流行期及2003年晚期流行期。於SARS爆發之前及2003年初期，其演化方向為正向選擇(positive selection)。初期，棘蛋白的變異幅度大，以謀能跨越物種的障礙；在03年初期時，其變異的方向為加強在人類之間的感染；在流行期末期，其變異的方向為純化選擇(purifying selection)，主要目的是為能與人類和平共存而在人類中大量繁衍。SARS-CoV的演化模型為一個典型的病毒跨越物種的演化模型[16]。Groneberg等也指出，SARS-CoV所產出的核酸變異率和其他冠狀病毒比較，是比較穩定的，這可能是他的核酸複製酶具有如核酸外切酶(exonuclease)的校正的功能。因此，在這麼長的流行期中，只發展出香港淘大株及加拿大多倫多株二個不同型別的病毒世代(lineage)。同時，其病毒核酸的變異速率雖然沒有改變，但是其轉譯出來的蛋白質變異速率卻有變慢的情形[5]，表示所轉錄出的蛋白質趨近於相同。因此疫苗的發展是值得期待的。

SARS-CoV 的疫苗發展

雖然SARS-CoV的疫苗發展仍是一個艱難之路，但至今的研究均指出SARS-CoV的疫苗發展，是很有潛力的。不活化病毒疫苗、重組抗原、DNA疫苗、利用各類病毒為載體的組合疫苗都在發展中。利用被動性免疫法以研究抗體的效力也已以動物模型進行多方面瞭解[3]。

與棘蛋白相關疫苗的試驗為一重要的課題，也有許多研究已位於前臨床試驗的階段(preclinical stage)。DNA重組棘蛋白載體疫

苗，可以使小白鼠產生足夠的抗體對抗 SARS-CoV 的攻擊[17]。利用鼻腔接種或肌肉注射之載體疫苗如 Ankara 疫苗，也證明能產生足夠的抗體[18]。而以非洲綠猴所做的研究中，利用重組棘蛋白的副流感疫苗病毒 (parainfluenza virus)，也可以使動物對抗 SARS-CoV 的攻擊[19]。雖然至今，所有的研究，都還未能進入人體試驗領域，由以上報告指出，已發展出的疫苗應可以在未來有效保護人類免受病毒侵害[3]。

其他感染人的新興冠狀病毒

自 SARS-CoV 被發現後，至今已至少有三種新興的冠狀病毒可以感染人[4]。Dominguez 等於 2004 年在荷蘭發現第四種人類冠狀病毒，HCoV-NL63，隨後其他國家也在幼童呼吸道中鑑定出此病毒[20]。HCoV-NL63 和 HCoV-229E 相似度高，所以被歸於第一亞群。本病好發於冬季，主要感染對象為五歲以下的幼童，主訴為上呼吸道感染症狀及氣管炎症狀，少數出現肺炎症狀[13]，可能與幼兒喘鳴(stridor)有關[3]。病毒在細胞培養中生長速度較慢，因此聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)技術為主要的診斷方式[14]。此病毒於 New Haven 被 Esper 等人發現並稱之為 HCoV-NH，並認為可能和小兒之 Kawasaki 疾病有關[3,21,22]。第五種為 HCoV-HKU1，於 2004 年在香港的一位 71 歲的肺炎患檢體中發現，研究證明這病毒與上呼吸道及腸胃疾病有關[14]，屬於第二亞群的病毒[3]。

SARS-CoV 診斷試劑發展現狀

一般的病毒，在侵入宿主體內後就會開始複製病毒，而後造成臨床症狀，但是 SARS-CoV 在潛伏期的病毒量很低，直至發燒症狀出現後，SARS-CoV 才開始大量複製[23,24]，這使其不易發展出可以在發燒前準確診斷 SARS 感染的診斷試劑。再者，由於

SARS 的案例近幾年沒有出現，因此，已開發出來的套組，也無法進行臨床上實際的評估。這也是 SARS-CoV 至今仍然使用臨床症狀來定義疾病的原因[25]。由於 SARS 被衛生署定義為第一類法定傳染病，因此，發展一個良好且準確的檢測方法，仍為疾病預防中，很重要的一環。

至今已有多種方式可以檢測 SARS-CoV。電子顯微鏡檢查是一種快速的病毒檢驗方式，以負染色法可以在二小時內利用電子顯微鏡下看到病毒，然而，其缺點為每一毫升必須至少約要有 10^7 個病毒顆粒才可以看到，並且無法確診。但是當各種方法都找不到病原時，本法非常適用。例如此次的 SARS 疫情，就是因為在電子顯微鏡下看到冠狀病毒的顆粒，才引出正確的方向[6]。

利用細胞培養出病毒應為最正確的檢驗方式，也就是所謂的基準檢驗法(gold standard)，然而由於細胞培養費時，細胞病變有時不容易看到，敏感度低，某些病毒的培養又具有高度的危險性，因此，此法也不常用於快速診斷。

利用 PCR 技術可大量及快速的增殖特定病毒核酸片段，樣本可以由鼻腔、口腔、糞便等部位收集。聚合酶連鎖反應是 WHO 認可的 SARS-CoV 檢驗方式，也是至今唯一證明可在感染後十天內檢測出 SARS-CoV 的方法[26]。其優點是可以在早期就從檢體中判斷出病患是否感染，操作需時約 2 到 4 小時。缺點是必須要用特殊的儀器，受過訓練的操作員及在國家級的實驗室或國家委託的實驗室才可以進行。

血清學檢驗的優點是能快速及大量篩檢。在感染初期，如果能進行大量篩檢，則可達到早期發現及治療的目的。螢光抗體檢測(fluorescent antibody test)，為最早開發出來的方法，利用間接螢光抗體反應可在發燒後 10 天檢驗出感染[26]。酵素免疫分析(enzyme

link immunosorbent assay, ELISA), 及免疫色層分析法(immuno-chromatography test, ICT)雖然都已發展出來, 但還無法達到世界衛生組織的要求。由於 SARS-CoV 的特性, 依世界衛生組織的建議, 最好的判定方式先以臨床症狀表現加上流行病學資料來做初診, 再結合至少一種的檢驗方法, 如為疑似病例則再送參考實驗室確診[25]。

結論

冠狀病毒由於體外培養比較困難, 加上病毒變異速率快, 因此, 在未來一定會有更多的病毒株被發現, 也可能有新病毒跳到新宿主的形態發生, 瞭解其致病機轉、疫苗及診斷方式的發展, 當新興疾病爆發時, 公共衛生防疫人員, 可以利用過去的經驗, 達到疾病防治的效果。

參考文獻

1. Caul EO, Paver WK, Clarke SK. Letter: Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet* 1975; 1:1192.
2. Spaan W, Cavanagh D, Horzinek MC. Coronaviruses: structure and genome expression. *J Gen Virol* 1988;69:2939-52.
3. Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005;69:635-64.
4. Spaan WJM, Brian D, Cavanagh D, et al. ICTVdB Index of Viruses - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_coron.htm#Genus1.htm
5. Groneberg DA, Hilgenfeld R, Zabel P. Molecular mechanisms of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Respir Res* 2005;6:8.
6. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
7. CDC. Frequently asked questions about SARS. Available: <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/faq.htm>
8. Tripet B, Howard MW, Jobling M, et al. Structural characterization of the SARS-coronavirus spike S fusion protein core. *J Biol Chem* 2004;279:20836-49.
9. Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, et al. Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature* 1992;357:417-20.
10. Li F, Li W, Farzan M, et al. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science* 2005;309:1864-8.
11. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003;426:450-4.
12. Becker SD, Bennett M, Stewart JP, et al. Serological survey of virus infection among wild house mice (*Mus domesticus*) in the UK. *Lab Anim* 2007;41:229-38.
13. Patrick DM, Petric M, Skowronski DM, et al. An outbreak of human coronavirus OC43 infection and serological cross-reactivity with SARS coronavirus. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2006; 17:330-6.
14. 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;361:1761-6.
15. Gu J, Korteweg C. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Pathol* 2007;170:1136-47.
 16. Zhang CY, Wei JF, He SH. Adaptive evolution of the spike gene of SARS coronavirus: changes in positively selected sites in different epidemic groups. *BMC Microbiol* 2006;6:88.
 17. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, et al. A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice. *Nature* 2004;428:561-4.
 18. Bisht H, Roberts A, Vogel L, et al. Neutralizing antibody and protective immunity to SARS coronavirus infection of mice induced by a soluble recombinant polypeptide containing an N-terminal segment of the spike glycoprotein. *Virology* 2005;334:160-5.
 19. Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, et al. Mucosal immunisation of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) with an attenuated parainfluenza virus expressing the SARS coronavirus spike protein for the prevention of SARS. *Lancet* 2004;363:2122-7.
 20. Dominguez SR, Anderson MS, Glode MP, et al. Blinded case-control study of the relationship between human coronavirus NL63 and Kawasaki syndrome. *J Infect Dis* 2006;194:1697-701.
 21. Esper F, Shapiro ED, Weibel C, et al. Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2005;191:499-502.
 22. Esper F, Weibel C, Ferguson D, et al. Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children. *J Infect Dis* 2005;191:492-8.
 23. Drosten C, Doerr HW, Lim W, et al. SARS molecular detection external quality assurance. *Emerg Infect Dis* 2004;10:2200-3.
 24. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 2003;300:1394-9.
 25. WHO. WHO guidelines for the global surveillance of severe acute respiratory syndrome (SARS) - updated recommendations October 2004. Available: http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_CSR_ARO_2004_1/en/index.html
 26. Quikpac onestep SARS-CoV test. Tyson Bioresearch. Available: http://www.tysonbio.com/product_SARS.html
-