

計畫編號：DOH94-DC-1005

行政院衛生署疾病管制局九十四年度科技研究發展計畫

台灣兒童新型冠狀病毒（HCoV-NL63）之呼吸道疾病篩檢：  
為期一年的前瞻性研究

研 究 報 告

執行機構：台大醫學院小兒科

計畫主持人：黃立民

研究人員：吳秉昇

執行期間：94 年 1 月 1 日至 94 年 12 月 31 日

＊ ＊ 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 ＊ ＊

## 目錄

封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	5
背景	7
材料與方法	8
結果	12
討論	16
結論與建議	21
參考文獻	22
圖表	25

## 中文摘要：

背景：人類冠狀病毒 Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63)，為一種全球性的呼吸道病毒，且引起世界各國廣泛的重視。本研究的目的是，乃是研究台灣地區因呼吸道疾病住院病童之有關此病毒的感染的流行病學及臨床表現的情況。

研究材料及方法：本計畫針對年齡小於 15 歲，因急性上、下呼吸道疾病，或三個月內嬰幼兒發燒，於國立台灣大學醫學院附設醫院住院之孩童，收集其鼻咽部抽取之檢體 (nasopharyngeal aspirate) 作 HCoV-NL63 之即時反轉錄聚合酶連鎖反應篩檢。

結果：自民國 93 年 05 月 01 日至民國 94 年 04 月 30 日，在 539 個符合收案標準之病例個案檢驗出 7 隻陽性檢體，其陽性率約佔全年度之住院病童呼吸道檢體的 1.3% (7/539)。在住院病童中，人類冠狀病毒 NL63 約佔所有病毒性呼吸道感染症的 3.7%。季節分佈則以秋季之陽性率最高 (5.0%)。其年齡中位數為一歲十個月，其性別則全為男性。住院天數為 2 ~5 天。臨床症狀 (symptoms) 為：發燒 71%，咳嗽 100%，鼻炎 43%，呼吸喘 43%，腹脹或腹瀉 43%。臨床表徵 (signs) 為：哮吼 (stridor) 71%，喘鳴 (wheezing) 29%，肺部囉音 (rales/rhonchi) 29%。此七位病人之白血球之中位數為  $16200/\text{mm}^3$  ( $8260\sim28150/\text{mm}^3$ )，其中性球的比例為 45~79%，而 C 反應蛋白 (CRP) 為 0.03~4.86 mg/dl。

X 光片全部可見不正常之表現。有五例之診斷為哮吼 (croup)，其佔所有哮吼病例的 14.7%，為引起哮吼最多的病原體。感染人類冠狀病毒 HCoV-NL63 產生哮吼的風險比例 (odds ratio) 是無此病毒感染的 43.4 倍。本研究室已發展出 HCoV-NL63 的病毒培養系統，並可觀察此病毒於 LLC-MK2 細胞株所引起之細胞病變 (CPE)。根據其中一個病童感染 HCoV-NL63 前後的血清，可知間接螢光分析法可以使用於感染 HCoV-NL63 後之抗體分析。

結論：本研究建立一北部醫學中心對於人類冠狀病毒 HCoV NL63 之臨床研究方法及結果。未來的目標將是實行病童血清的分析，以及建立起台灣地區此病毒感染之流行病學資料。

中文關鍵詞：人類冠狀病毒 NL63，呼吸道疾病，即時反轉錄酶連鎖

反應，哮吼，台灣

## 英文摘要

**Background:** Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) is an important global respiratory pathogen among infants and young children. We evaluate the epidemics and diseases spectrum about the HCoV-NL63 infection in children in Taiwan.

**Material and methods:** Children with respiratory diseases who admitted to NTUH were enrolled in this study from May 2004 to Apr 2005. Real-time RT-PCR designed for nucleocapsid gene of HCoV-NL63 was used to screen the nasopharyngeal aspirate (NPA) samples and 1b gene primers were used for reconfirmation. Other respiratory virus pathogens were detected by virus culture, antigen test, serology and RT-PCR. The NC gene of positive samples were sequenced and compared to those reported in the literature.

**Results:** 539 NPA samples from children with respiratory diseases was enrolled in one year and at least one viral pathogen was detected in 187 samples. Seven cases (1.3%) of positive HCoV-NL63 NPA were detected, represented 3.7% among all viral pathogens. One, three and one case occurred in August, October and February, respectively. All cases were male and two of them had underlying morbidity. The age of patients ranged from 8 month to 2-year-10-month. Other respiratory pathogens were co-infected in 3 cases, which was respiratory syncytial virus, adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae*, and human metapneumovirus, respectively. The most common symptoms/signs of HCoV-NL63 infection among children admitted were cough (100%, ranged from 3 to 13 days), fever (71.4%, average 2 days) and stridor (71.4%). The most common diagnosis of HCoV-NL63 infection among children admitted were croup (71.4%), pneumonia (28.6%) and tonsillitis (28.6%), which was different from those reported in the literature. The admission duration was ranged from 2 to 5 days and all cases were discharged smoothly. In our study, HCoV-NL63 was the most predominant pathogen in children with diagnosis of croup (5/34), which was followed by parainfluenza type 3, influenza B and parainfluenza type 1. Amplicon of nucleocapsid gene of three positive samples were sequenced and those were very similar to other strains in the literature.

**Conclusion:** HCoV-NL63 was an important respiratory pathogens in Taiwan and the disease spectrum and seasonal distribution were different from those in temperate areas. It may be an important pathogen of croup in our study. Further serology study for this virus was necessary.

**Key words:** human coronavirus NL63, respiratory tract disease, real time reverse-transcript polymerase chain reaction, croup, Taiwan

**Background:** Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) is an important global respiratory pathogen among infants and young children. We evaluate the epidemics

and diseases spectrum about the HCoV-NL63 infection in children in Taiwan.

**Material and methods:** Children with respiratory diseases who admitted to NTUH were enrolled in this study from May 2004 to Apr 2005. Real-time RT-PCR designed for nucleocapsid gene of HCoV-NL63 was used to screen the nasopharyngeal aspirate (NPA) samples and 1b gene primers were used for reconfirmation. Other respiratory virus pathogens were detected by virus culture, antigen test, serology and RT-PCR. The NC gene of positive samples were sequenced and compared to those reported in the literature.

**Results:** 539 NPA samples from children with respiratory diseases was enrolled in one year and at least one viral pathogen was detected in 187 samples. Seven cases (1.3%) of positive HCoV-NL63 NPA were detected, represented 3.7% among all viral pathogens. One, three and one case occurred in August, October and February, respectively. All cases were male and two of them had underlying morbidity. The age of patients ranged from 8 month to 2-year-10-month. Other respiratory pathogens were co-infected in 3 cases, which was respiratory syncytial virus, adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae*, and human metapneumovirus, respectively. The most common symptoms/signs of HCoV-NL63 infection among children admitted were cough (100%, ranged from 3 to 13 days), fever (71.4%, average 2 days) and stridor (71.4%). The most common diagnosis of HCoV-NL63 infection among children admitted were croup (71.4%), pneumonia (28.6%) and tonsillitis (28.6%), which was different from those reported in the literature. The admission duration was ranged from 2 to 5 days and all cases were discharged smoothly. In our study, HCoV-NL63 was the most predominant pathogen in children with diagnosis of croup (5/34), which was followed by parainfluenza type 3, influenza B and parainfluenza type 1. Amplicon of nucleocapsid gene of three positive samples were sequenced and those were very similar to other strains in the literature.

**Conclusion:** HCoV-NL63 was an important respiratory pathogens in Taiwan and the disease spectrum and seasonal distribution were different from those in temperate areas. It may be an important pathogen of croup in our study. Further serology study for this virus was necessary.

**Key words:** human coronavirus NL63, respiratory tract disease, real time reverse-transcript polymerase chain reaction, croup, Taiwan

## 研究背景：

冠狀病毒經過 2003 年的 SARS 風暴之後，已經成為一個重要的研究課題。由荷蘭病毒學家發現的 Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63)，為人類已知的第四種冠狀病毒，屬於第一類 (group 1)，共有 27,553 個核苷酸的正股 RNA 病毒<sup>1</sup>。在之後的一年當中，澳洲<sup>2</sup>、加拿大<sup>3</sup>、比利時<sup>4</sup>、美國<sup>5</sup>、日本<sup>6</sup>、法國<sup>7</sup>及香港<sup>8</sup>又陸續發表有關此病毒的流行病學及臨床表現之論文，足見此病毒為一種全球性的人類呼吸道病毒，且引起世界各國廣泛的重視。本研究的目的，乃是研究台灣地區因呼吸道疾病住院病童之有關此病毒的感染的流行病學及臨床表現的情況。分成三方面討論：(1) 評估新型冠狀病毒 HCoV-NL63 於兒童呼吸道疾病中所佔的比例。(2) 評估新型冠狀病毒 HCoV-NL63 所表現的臨床病程及病毒量的關係。(3) 評估新型冠狀病毒 HCoV-NL63 在一年四季中的盛行率。

## 研究材料及方法：

### 第一部分：鼻咽檢體之收集，篩檢及陽性病例之臨床分析 -

本計畫針對年齡小於 15 歲，因急性上、下呼吸道疾病（診斷包括：肺炎、急性細支氣管炎、急性氣管炎、哮喘、急性中耳炎、急性鼻竇炎、急性扁桃腺炎、急性結膜炎等），或三個月內（含新生兒）嬰幼兒發燒，於國立台灣大學醫學院附設醫院住院之孩童，若診斷為疱疹性咽峽炎(Herpangina)，手足口症(Hand-foot-mouth disease) 或疱疹性齒齦口角炎 (Herpetic gingivostomatitis) 者則排除之。於住院時經醫師解釋且家屬同意後，始收集其鼻咽部抽取之檢體 (nasopharyngeal aspirate) 兩套，其中一套檢體存於  $-70^{\circ}\text{C}$  中，以為抽存病毒 RNA 及日後定序之用。檢體收集時間為民國 93 年 5 月至民國 94 年 4 月。篩檢方法利用即時反轉錄酶 (real-time RT-PCR) 的方法，設計之 primers 針對 nucleocapsid (NC) gene sequence，primers 序列為：Forward primer：5' -CTAGTTCTTCTGGTACTTCCACTCC-3'。Reverse primer：5' -TCTGGTAGGAACACGCTTCCAA-3'。

並以 nested PCR 中的內側 primers 合成的 NC gene cDNA 片段作為 template，針對目前已知之 HCoV-NL63 的所有 variant 設計出 Taqman probe，以進行定量 PCR (real-time PCR) (Lightcycler,



Roche)，其 probe 序列為：5' -TAAGCCTCTTTCTCAACCCAGGGC-3' 。

合成的 PCR 產物再經 RNA sequence alignment (利用 NCBI BLAST)，以確認是否為 HCoV-NL63 之基因序列。如果呈現陽性之檢體，為避免偽陽性反應之發生，另設計一組 primers (以 ORF 1b gene sequence 為模板) 來確認，兩組皆為陽性者方為陽性檢體。其 Primers 序列為：Forward primer：5' - GTGATGCATATGCTAATTTG-3' 。Reverse primer：5' -CTCTTGCAGGTATAATCCTA-3' 。

針對陽性檢體之住院病童，詳細收集其基本資料及臨床表現，包括性別、年齡、先前疾病史 (underlying disease)，發燒天數，住院天數，臨床症狀及胸部 X 光，呼吸道症狀如咳嗽，喘鳴的嚴重情形，及有無合併其他各系統問題進行分析。其中按月統計病例數，以觀察 HCoV-NL63 在台灣地區的流行性。另同時收集該時間內其他之呼吸道病毒 (如流行性感冒病毒 (Influenza A, B)，呼吸道融合病毒 (Respiratory syncycial virus)，及 metapneumovirus) 之住院病童資料，以比較此病毒與其他病毒之間的症狀或疾病嚴重度有無顯著差異性。

統計方法之類別變項採用的是卡方分布 (chi-square) 及 Fisher' s exact test；連續變項方面之分析採用的是 student' s t test。與其他呼吸道病毒採用無母數分析 Kruskal-Wallis test 及

卡方分布。

## 第二部分：基因序列分析 -

另設計 NC gene 之 primers，將臨床上陽性鼻咽檢體取出進行 RT-PCR (*C. thermo* one step RT-PCR KIT, Roche)，其 PCR product (cDNA) transfect *E. coli* 作為 TA cloning，以得 full NC gene (約 1100 bp) 之 sequence。其 Primers 序列為：Forward primer：5' - GAATTCATGGCTAGTGTAATTGGGCC-3'。Reverse primer：5' -CTCGAGATGCAAAACCTCGTTGACAAT-3'。

其目的在於將台灣地區人類冠狀病毒 NL63 之 complete NC gene 進行基因定續，並利用 NCBI BLAST 系統與荷蘭之人類冠狀病毒 NL63 (AY 567487) 作比較，若收集足夠之可供分析之基因序列，將利用 BioEdit 軟體作出 HCoV NL63 於台灣之基因樹狀分枝圖 (phylogenetic study)。

## 第三部分：人類冠狀病毒 NL63 之病毒培養及血清反應測試 -

與荷蘭 Department of Human Retrovirology, Academic Medical Center, University of Amsterdam 之 Dr. Von der Hoek 聯繫，並取

得培養於 LLC-MK2 cell line 之人類狀病毒 NL63，在本實驗室培養之，其培養條件為：

(1) LLC-MK2 細胞培養：

LLC-MK2 cells 培養於 MEM Hanks，MEM Earle' s ， 3% FCS and Pen/Strep 之混合液中；以 1:7 稀釋，一周兩次進行 cell passage，培養細胞於 37°C

(2) HCoV-NL63 感染 LLC-MK 2 細胞：

當細胞約 80~90%融合時感染細胞(約 100ul virus stock 感染 7ml 之 culture cell)，之後培養於 34°C 環境中，約第四天可見細胞病變 (CPE)，於七天後可進行 cell harvest。

## 結果：

### 第一部分：鼻咽檢體之收集，篩檢及陽性病例之臨床分析 -

自民國 93 年 05 月 01 日至民國 94 年 04 月 30 日，總共收集了 930 之鼻咽檢體進行 HCoV-NL63 RNA 之篩檢，其中有 539 個病例個案符合收案標準。每個月有 18 至 82 個不等之個案收入，春（2，3，4 月）、夏（5，6，7 月）、秋（8，9，10 月）、冬（11，12，1 月）季之個案數各有 190，106，121，122 個。在此 539 隻受篩檢之檢體中，共有 7 隻檢體為陽性檢體，其中一隻檢體收集於八月份，五隻檢體於十月份，一隻檢體於二月份，其陽性率約佔全年度之住院病童呼吸道檢體的 1.3% (7/539)，每個月的陽性率約為 0 ~ 9.8%，季節分佈則以秋季之陽性率最高 (5.0%) (Fig 1)。又利用病毒培養及病毒抗原檢驗方式，可得知有 187 隻檢體至少可檢驗出一種呼吸道病毒（檢出率約 34.7%），如此可推測在住院病童中，人類冠狀病毒 NL63 約佔所有病毒性呼吸道感染症的 3.7%。

又分析此七個人類冠狀病毒 NL63 陽性檢體的病例 (Table 1, 2)。其年齡中位數為一歲十個月 (range 8 m to 2y10m)，其性別則全為男性。採檢時間約為發病後 2~6 天，而使用定量 PCR 發現鼻咽檢體之病毒量約為 50~9,760 RNA copies /  $\mu$ l。其過去病史中有一例為膽道閉鎖 (biliary atresia) 肝臟移植術後，並使用抗排斥藥物 FK-506，其餘並無嚴重心肺疾病或免疫功能不全之病史。在有詢問家族史的六個病童

中，有四位同時或一周內有其他家人出現呼吸道感染症狀。這七位病童的住院天數為 2~5 天。臨床症狀 (symptoms) 為：發燒 71%，咳嗽 100%，鼻炎 43%，呼吸喘 43%，腹脹或腹瀉 43%；而發燒天數約 2~6 天。臨床表徵 (signs) 為：哮鳴 (stridor) 71%，喘鳴 (wheezing) 29%，肺部囉音 (rales/rhonchi) 29%。在實驗室檢查方面，此七位病人之白血球之中位數為  $16200/\text{mm}^3$  ( $8260\sim 28150/\text{mm}^3$ )，其中性球的比例為 45~79%，而 C 反應蛋白 (CRP) 為 0.03~4.86 mg/dl。X 光片全部可見不正常之表現，其中有四例出現頸部狹窄的情況 (steeple sign)，兩例出現肺部浸潤，而一例有肺炎塊 (pneumonia patch)。而臨床診斷上，有五例 (71%) 之診斷為哮吼 (croup)，其餘診斷尚有肺炎 (兩例)、細支氣管炎 (一例) 及急性腸胃炎 (兩例)。感染人類冠狀病毒 HCoV-NL63 產生哮吼的危險比例 (odds ratio) 是無此病毒感染的 43.4 倍。

若與同時期因呼吸道病毒感染而住院之病童作比較，在去除了雙重病毒感染的病例後分析，可發現：在症狀與表徵上，發燒、咳嗽、喘、流鼻水、腹瀉、呼吸囉音等症狀的比例與其他病毒比較起來並無顯著差別，但 HCoV-NL63 之病童在喘鳴 (wheezing) 及哮鳴 (stridor) 有較高比例的表現，而在診斷上，亦於哮吼診斷有顯著意義 (Table 3)。而只有一例的急性細支氣管炎是由人類冠狀病毒 NL63 引起。

我們因此針對人類冠狀病毒 NL63 與哮吼之間的關係進行分析。在

研究期間，共有 34 個診斷哮喘的個案，其中有 5 例鼻咽檢體呈現人類冠狀病毒 NL63 陽性反應 (14.7%)，為引起哮喘最多的病原體。此外另有副流感病毒第三型 (11.8%)，副流感病毒第一型 (8.8%) 及 b 型流行性感冒病毒 (8.8%)，但仍有 52% 的病例用目前的診斷方式找不到病原。又由 HCoV-NL63 及非 HCoV-NL63 兩組引起哮喘之病人進行分析，可發現其在年齡分布，臨床嚴重程度及實驗室檢查數據方面，皆無有意義之差別。

## 第二部分：基因序列分析 -

在此七個陽性鼻咽檢體當中，針對其中兩個病毒量較高之檢體 (Case No. 567, No. 754)，進行了 cDNA 之 TA cloning 及 amplicon alignment。Complete NC gene 的序列分析後可發現，與荷蘭發現之 HCoV-NL63 相比較 (AY 567487)，可發現此二檢體之 NC gene 序列幾乎完全一致，一例分別於兩處上有核苷酸序列變化 (第 27166 個序列 T→C；第 27169 個序列 C→T)，另一例亦於兩處有核苷酸序列變化 (第 26557 個序列 A→G；第 27169 個序列 C→T)。未來需更多可供分析之檢體以完成基因樹之分析 (Phylogenetic study)。

## 第三部分：人類冠狀病毒 NL63 之病毒培養及血清反應測試 -

根據由荷蘭 Dr. Von der Hoek 所提供之 HCoV-NL63 病毒培養及 LLC-MK2 細胞 (Fib 2a) 培養之檢體，本研究室已發展出 HCoV-NL63 的病毒培養系統。此病毒於 LLC-MK2 細胞株所引起之細胞病變 (Cytopathogenic effect) 為細胞變圓變大，且呈現脫落狀態 (Fib 2b)。抗原的部份採取病毒培養之檢體及合成之 NC protein，並嘗試間接螢光分析法 (IFA)。根據其中一個病童 (Case No. 497) 感染 HCoV-NL63 前後的血清，我們利用間接螢光分析法，得到感染前後的血清抗體呈色的差異，可知間接螢光分析法可以使用於感染 HCoV-NL63 後之抗體分析 (Fig3 a, b)。

## 討論：

本為期一年之前瞻性研究計畫，主要是探討人類冠狀病毒 NL63 這一全球性病毒，在台灣地區的流行病學及臨床表現。在與世界各國所發表之文獻作一比較後，得到一些異同之處（Table 4, 5）。在研究方法上，本研究使用的是 HCoV-NL63 之 NC gene primers 及定量 PCR 方式，這與一般文獻上使用 ORF 1a or 1b primers 及 RT-PCR 的篩檢檢體方式有所不同。病人族群方面，本時驗收及鼻咽檢體之對象來自因呼吸道疾病而住院之病童，而其他文獻收集的檢體則來自住院或門診追蹤之病童，因此本實驗無法推估此一呼吸道病毒對人類健康上的衝擊程度 (health impact)。就流行季節而論，台灣地區人類冠狀病毒 NL63 在住院病童之流行高峰主要為秋季，而其他溫帶國家（如加拿大、美國、法國、澳洲、比利時）之流行高峰期則集中於冬季，又香港地區的流行高峰則為夏季<sup>8</sup>。

此外，本研究發現，人類冠狀病毒 NL63 在所有住院之呼吸道疾病病童中，不分季節其所佔的比例為 1.3%，低於現今文獻所提及之發生率（2.0~8.8%），推測原因可能與本研究僅採取住院病童之呼吸道檢體有關，足見仍有一部分的人類冠狀病毒 NL63 感染屬於不需住院之輕微呼吸道疾病。而感染年齡之分布方面，則與其他文獻類似，病例多集中於 2~3 歲以下之幼兒，而且以男性居多，美國的研究甚至有發現新生兒



加護病房感染的早產兒病例。<sup>5</sup> 而此病毒感染常常合併有其他呼吸道病毒之雙重感染現象(dual infection)，常合併的病毒為呼吸道融合病毒(RSV)與(metapneumovirus)。本研究的結果亦可見此現象，但本研究可見較文獻為高之雙重感染率(11.8~38%)，是否這與雙重感染導致呼吸道疾病嚴重度增加有關，仍需更多的個案收集及院外病例研究加以證實。

臨床症狀上此病毒所引發之呼吸道症狀，與其他病毒比較起來，如發燒、咳嗽、鼻炎症狀等並無特別之處，較值得注意的是本研究發現此病毒引起哮鳴(stridor)的比例明顯高於其他文獻報告，診斷上亦可見其引起哮吼(croup)的比例很高(75%)。大部份的文獻主要指出人類冠狀病毒 NL63 引起之疾病最重要者為急性細支氣管炎(38~67%)，而本研究僅發現約 14% (1/7) 的病人出現急性細支氣管炎，並無很好之關聯性。另外美國耶魯大學所發現人類冠狀病毒 NL63 與川崎症(Kawasaki disease)之間的關聯性(odds ratio 16.0, 95% confidence interval 3.4-74.4)<sup>9</sup>，其他國家之文獻並無此發現<sup>10,11</sup>，而本研究亦無此發現。

哮吼是一種呼吸道病毒引發之感染症，主要症狀為哮喘(stridor)，聲音沙啞(hoarseness)及狗吠式咳嗽(barking cough)。其約佔兒童呼吸道感染症的 15%<sup>12</sup>，在美國每年造成 41,000 人次住院<sup>13</sup>，最高發生率出現在出生後第二年<sup>12</sup>，而主要的發生季節約為秋冬季節

(溫帶國家)。哮喘常見的病原為副流感病毒第一至三型 (parainfluenza types 1 to 3)，A 及 B 型流行性感冒病毒 (influenza A and B)，腺病毒 (adenovirus)，呼吸道融合病毒 (RSV)，鼻病毒 (rhinovirus) 及肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*)，但仍有約 36%~62% 的哮喘找不到病原體<sup>13,14</sup>。在本研究當中可見在研究期間，共有 34 例因哮喘診斷住院之病童，而其中有 5 例為人類冠狀病毒 NL63 所引起，所佔的比例是該研究期間引起哮喘的最多的病因 (14.7%)。由於哮喘好發的年齡與季節，與人類冠狀病毒 HCoV-NL63 感染的年齡及季節高峰皆有相似之處，又其中五例中，有三例的哮喘病例除 HCoV-NL63 PCR 陽性之外，並無其他的呼吸道病原感染之證據，故可推測人類冠狀病毒 HCoV-NL63 感染可能與哮喘的發生有所關聯性。結果與德國的文獻類似。<sup>15</sup> 若將本研究期間的 34 個哮喘病例及常見引起哮喘的病毒，依據各月份分布，可以發現自民國九十三年五月至九十四年四月這一研究期間，共有四個哮喘高峰期，第一個高峰可由副流感病毒第一型及第三型解釋，第二個高峰可由人類冠狀病毒 NL63 解釋，第三個高峰可由 b 型流感病毒引起，而第四個高峰則可能由另一未知之呼吸道病毒引起 (Fig 4)。

本實驗採用的是較為敏感之檢驗方式，亦即定量 PCR，於本研究其偵測之病毒量約為 50~9,760 RNA copies /  $\mu$ l，而病毒量與臨床嚴

重度及採檢時間點之間並無顯著關聯性。由於鼻咽檢體的採檢量並非每個病人皆相同，因此定量 PCR 呈現出的病毒量並不一定反映出該病人鼻咽感染之病毒量。此外在病毒序列分析方面，由於本研究可進行基因分析之個案數僅兩例，且比對後可發現於 NC gene 之序列幾乎與荷蘭株並無差別。由國外發表之文獻可知，HCoV-NL63 可依據其 ORF 1a gene 序列再分成 A，B 兩群<sup>4,8</sup>，本研究尚無法繪出基因樹之分析圖，此點仍需收集更多陽性檢體以證明之。

本研究仍有一些限制。首先由於陽性病例太少，故臨床症狀及診斷的分析上可能檢力（power）不足，與其他呼吸道病毒比較亦可能造成偏差，尤其呼吸道病毒可能有週期性的流行特色，對此病毒之研究可能需要更久、為數更多的檢體收集及篩檢，才能對於現今之結論作更明確之判斷。又由於陽性檢體數量少及病毒量低，造成基因分析上的困難，也是需要克服之處。其次是本研究主要是針對因呼吸道疾病之住院病童（inpatients）進行分析，並無採取門診或急診之病童檢體，因此可能低估此冠狀病毒感染實際的發生率，以及此病毒對國人健康的衝擊性。最後由於無血清學（急性期及復原期）的證實，使得此病毒感染是否只是無症狀感染（subclinical infection），抑或是真正的呼吸道致病原，仍需更進一步釐清。

目前並無人類冠狀病毒 NL63 的血清流行病學之報告，未來的目標

將是實行病童血清的分析，以及建立起台灣地區此病毒感染之流行病學資料。針對未來大規模的幼兒血清分析，必須先確定此病毒與同屬第一型冠狀病毒 HCoV-229E 之間是否有交叉抗體反應(cross reaction)，並期待能更近一步提高病毒培養的產量，進一步實施 ELISA 已完成大規模病童抗體分析。

## 結論與建議：

本研究建立一北部醫學中心對於人類新型冠狀病毒 HCoV NL63 之臨床研究方法及結果。此研究有助於瞭解此新型冠狀病毒的流行率與疾病表徵，並建立兼具敏感性與特異性的分子檢測方法，有助於衛生醫療政策的參考。

參考文獻：

1. van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10:368-73.
2. Arden KE, Nissen MD, Sloots TP, Mackay IM. New human coronavirus, HCoV-NL63, associated with severe lower respiratory tract disease in Australia. *J Med Virol* 2005;75:455-62.
3. Bastien N, Anderson K, Hart L, et al. Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J Infect Dis* 2005;191:503-6.
4. Moes E, Vijgen L, Keyaerts E, et al. A novel pancoronavirus RT-PCR assay: frequent detection of human coronavirus NL63 in children hospitalized with respiratory tract infections in Belgium. *BMC Infect Dis* 2005;5:6-15.
5. Esper F, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. 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.
6. Suzuki A, Okamoto M, Ohmi A, Watanabe O, Miyabayashi S, Nishimura H. Detection of human coronavirus-NL63 in children in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:645-6.
7. Vabert A, Mourez T, Dina J, van der Hoek L, Gouari S, Petitjean J,

- Brouard J, Freymuth F. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1225-9
8. Chiu SS, Chan KH, Chu KW, Kwan SW, Guan Y, Poon LL, Peiris JS. Human coronavirus NL63 infection and other coronavirus infections in children hospitalized with acute respiratory disease in Hong kong, China. *Clin Infect Dis* 2005;40:1721-9
9. Esper F, Shapiro ED, Weibel C, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Association between a novel human coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2005;191:499-502
10. Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Lack of association between New Haven coronavirus and Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2005;192:351-2
11. Shimizu C, Shike H, Baker SC, Garcia F, Hoek L, Kuijpers TW, Reed SL, Rowley AH, Shulman ST, Talbot HK, Williams JV, Burns JC. Human coronavirus NL63 is not detected in the respiratory tracts of children with acute Kawasaki disease. *J Infect Dis* 2005;192:1767-71
12. Denny FW, Murphy TF, Clyde WA, Collier AM, Henderson FW. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 1983;71:871-6.

13. Marx A, Török TJ, Holman RC, Clarke MJ, Anderson LJ. Pediatric hospitalizations for croup (laryngotracheobronchitis): biennial increases associated with human parainfluenza virus 1 epidemics. *J Infect Dis* 1997;176:1423-7
14. Hall CB, McBride JT. Acute laryngotracheobronchitis (Croup). In: Mandell GL, Bennett JE, Raphael B, eds. Principle and practice of infectious diseases, 5<sup>th</sup> ed. Vol 1, New York: Churchill Livingstone, 2000:663-9.
15. van der Hoek L, Sura K, Ihorst G, Stan A, Pyrc K, Jebbink MF, Petersen G, Forster J, Berkhout B, Uberla K. Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med* 2005;2:e240



Table 1. Clinical data of children with HCoV NL63 infection admitted to NTUH from May 2004 to Apr 2005 (I)

	Age	Sex	Underlying diseases	Family history	Admission duration	Month	Clinical manifestation	Signs
403	2y4m	M	-	No	2	Aug 2004	Fever, barking cough, hoarseness, dyspnea	Stridor
493	8m	M	Prematurity, GA 36 wk	Yes	2	Oct 2004	Fever, cough, dyapnea, diarrhea	Stridor
497	2y8m	M	BA s/p OLT	Yes	5	Oct 2004	Fever, cough, coryza, diarrhea	Wheezing, rales
520	1y8m	M	Psychomotor retardation	-	3	Oct 2004	Cough, coryza, seizure	Stridor
530	9m	M	Prematurity, GA 36wk	Yes	4	Oct 2004	Fever, cough, dyspnea, poor appetite	Stridor, wheezing, retraction
567	2y10m	M	-	Yes	2	Oct 2004	Fever, cough, coryza, abdominal distension, poor appetite	Rhonchi, exudative tonsillitis
754	1y10m	M	-	No	3	Feb 2005	Cough	Stridor, rhonchi

Table 2. Clinical data of children with HCoV NL63 infection admitted to NTUH from May 2004 to Apr 2005 (II)

	Hemogram	CRP	Image	Diagnosis	NPA	Viral load	Other	Treatment
	(N/L)	(mg/dl)			date	(copies/ml)	pathogens	
403	20030 (61/32)	1.61	Steeple sign	Croup	Day 3	420	-	O2, Bosmin IH, Rinderon IM
493	10260 (48/38)	1.48	Steeple sign	Croup, pharyngo- tonsillitis, AGE	Day 3	90	RSV	O2, Bosmin IH, Rinderon IV
497	21190 (62/27)	3.75	RLL patch	Bronchopneumonia, AGE	Day 4	60	-	O2, Bosmin IH, Unasyn, Zithromax
520	28150 (79/15)	0.03	Steeple sign	Croup	Day 1	260	-	Bricanyl IH, Rinderon IM
530	16200 (48/39)	0.35	Increased infiltration	Croup, acute bronchiolitis	Day 2	50	-	O2
567	8260 (45/45)	4.86	Increased infiltration	Acute tonsillitis, pneumonia	Day 6	9760	Adenovirus	Anal tube insertion, Zithromax
754	10330 (64/24)	0.08	Steeple sign	Croup	Day 2	1560	Metapneumo- virus	Bosmin IH, Rinderon IM

Table 3. Comparisons of clinical symptoms / signs among children with different respiratory tract pathogens infection

Clinical symptoms and signs	HCoV-NL63 n=4(%)	RSV n=61(%)	hMPV n=20 (%)	Flu A n=6(%)	Flu B n=15(%)	Para III n=9(%)	<i>p</i> value
Fever (%)	3(75)	44(72)	18(90)	5(83)	14(93)	9(100)	0.06
Coryza (%)	2(50)	45(74)	13(65)	5(83)	10(67)	3(33)	0.085
Cough (%)	4(100)	60(98)	20(100)	5(83)	13(87)	8(89)	0.053
Dyspnea (%)	2(50)	37(61)	8(40)	2(33)	4(27)	2(22)	0.04
Diarrhea (%)	1(25)	13(21)	3(15)	1(17)	3(20)	2(22)	1.0
Stridor (%)	3(75)	1(2)	2(10)	0(0)	2(13)	4(44)	<0.001
Wheezing (%)	2(50)	27(69)	9(45)	2(33)	2(13)	1(11)	0.001
Rhonchi/rales (%)	1(25)	56(92)	15(75)	5(83)	4(27)	5(56)	<0.001
Retractions (%)	1(25)	31(51)	8(40)	1(17)	2(13)	4(44)	0.035

Table 4. Comparison between reports among published paper about HCoV

NL63 infection in different areas in the literature (I)

	France (Vabret et al)	Belgium (Moes et al)	Canada (Bastien et al)	Australia (Arden et al)	New Haven (Esper et al)	Taiwan (Wu et al)
Duration	Nov 2002 to Apr 2003	Winter seasons of 2003 to 2004	Nov 2002 to Dec 2003	Nov 2001 to Feb 2004	Jan 2002 to Feb 2003	May 2004 to Apr 2005
Seasonal distribution	Peak in Feb 2003	Jan/Feb 2003	Peak in Mar 2003	Peak in July (mid-winter)	Most in first 10 weeks of the year	Peak in Oct 2004
Method	RT-PCR (NC, S gene)	RT-PCR (NC, ORF 1a, ORF1b)	RT-PCR (NC, ORF 1a)	RT-PCR (ORF 1a, 1b)	RT-PCR (ORF 1a)	Real-time PCR (NC, ORF 1b)
population	Inpatients	Inpatients	Outpatients and inpatients	Outpatients and inpatients	Inpatients, NICU	Inpatients
Case No	28/300	7/279	26/1240	16/840	79/895	7/539
Incidence*	9.3%	2.3%	2.1%	2.0 %	8.8 %	1.3 %
Susceptible population	18 cases under 2 years	6 cases under 2 year, 4 males	22 cases under 2 years, 17 males	14 cases under 2y4m, all male	50 cases under 1 year, 49 males, 11 children in NICU	All cases under 3 years
Co-infection rate	-	-	-	38 % (hMPV, RSV, parainfluenza III, <i>B. pertussis</i> , <i>L. pneumoniae</i> )	11.8 % (hMPV, parainfluenza, RSV)	42.8 % (hAdV, hMPV, RSV)

Table 5. Comparison between reports among published paper about HCoV

NL63 infection in different areas in the literature (II)

	France (Vabret et al)	Belgium (Moes et al)	Canada (Bastien et al)	Australia (Arden et al)	New Haven (Esper et al)	Taiwan (Wu et al)
Diagnosis	Bronchiolitis and pneumonia 39%, AGE 33%, otitis 28%, pharyngitis 22%, conjunctivitis 17%	3 URTI, 4 LRTI	8 bronchiolitis, 1 croup, 1 asthma exacerbation	81% LRTI, Acute bronchiolitis (38%), coup, (13%), pneumonia	-	Croup (71%), pneumonia, AGE, bronchiolitis
Clinical symptoms and signs	Fever 61%, rhinorrhea 39%,	Fever 86%, cough 57%, wheezing 29%, respiratory distress 43%, diarrhea 29%	Fever 42%, cough 75%, dyspnea 17%, desaturation 17%	Fever 69%, cough 81%, coryza 56%, Respiratory distress 50%, wheezing 44%, rales 25%, stridor 6%	Fever 53.6%, cough 76.8%, rhinorrhea 67.9%, tachypnea 53.6%, , rhonchi or rales 42.9%, retractions 33.9%, wheezing 35.7%, stridor 7.1%	Fever 71%, cough 100%, coryza 43%, dyspnea 43%, GI problems 43%, stridor 71%, wheezing 29%, rales or rhonchi 29%
Image study	-	-	Abnormal CXR 92%	Abnormal CXR 56%	Abnormal CXR 65.8%	Abnormal CXR 100%
Treatment	-	-	6 antibiotics, 8 bronchodilator, 5 steroid	-	Unknown	4 O2 usage, 4 steroid, 2 bronchodilator, 2 antibiotics

Fig 1. Seasonal incidence rate of HCoV-NL63 infection from children admitted to NTUH from May 2004 to Apr 2005

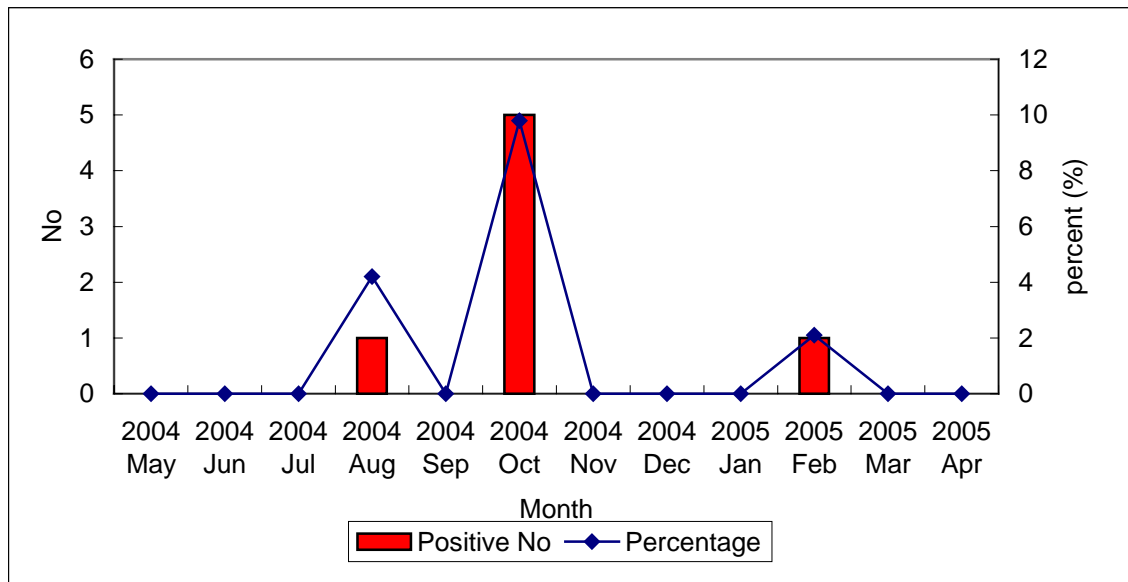
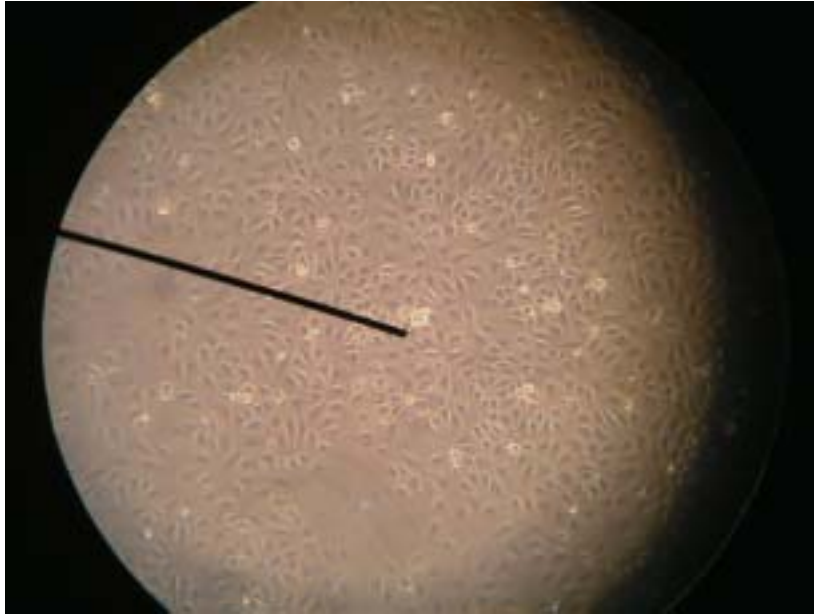


Fig 2. LLC-MK2 cell line revealed (a) pre-infected cell line and (b) cytopathogenic effect after infected with HCoV-NL63, Day 7

(a)



(b)

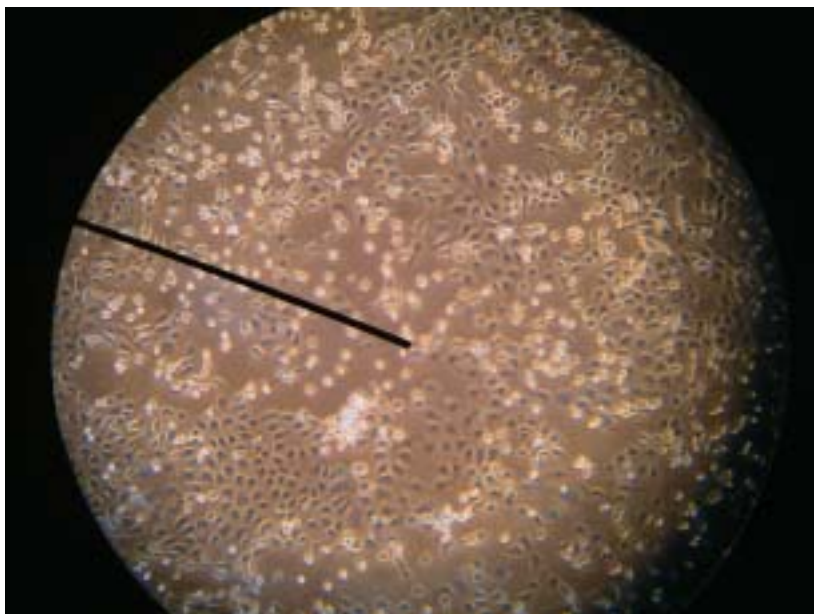
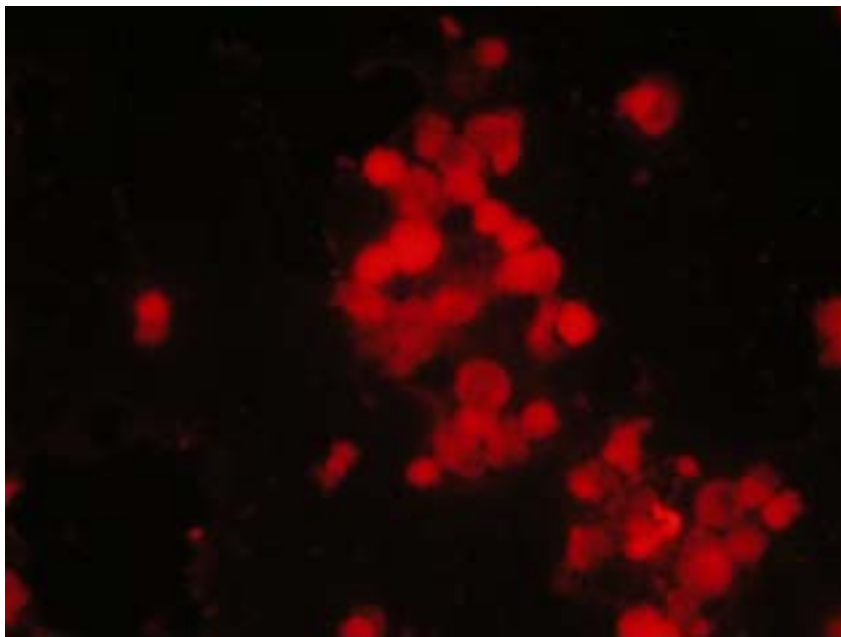


Fig 3. The indirect immunofluorescence assay (IFA) after serum treatment from pre-HCoV NL63 infected patient (a) and post-HCoV NL63 infected patients (b)

(a)



(b)

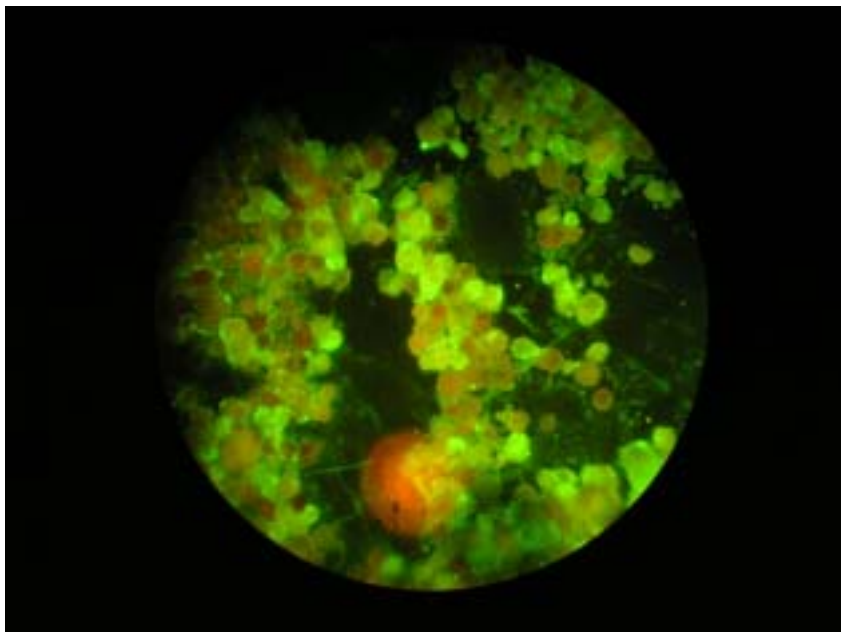




Fig 4. Children with croup admitted to NTUH and viral epidemics from May 2004 to Apr 2005

