

計畫編號：DOH 93-DC-2037

行政院衛生署疾病管制局九十三年度研究發展計畫

九十二年一至三月急性呼吸症候群通報病例檢體回溯調查 SARS-CoV  
及禽流感 A(H5 亞型)的感染

研究報告

執行機構：疾病管制局

計畫主持人：楊志元研究員

研究人員：林思鳳、邱淑君、李麗俐、楊世仰

執行期間：93 年 1 月 1 日至 93 年 12 月 31 日

\*本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見\*

## 目錄

封面	頁次
中文摘要	3
英文摘要	4
本文	
前言	6
材料與方法	8
結果	10
討論	12
結論與建議	13
參考文獻	14
圖表	15

## 中文摘要

疾病管制局於民國八十九年七月起推動「症候群監視通報」目的在以簡單而明確通報定義，加強臨床醫師的通報意願及時效，以期達到早期偵測疫情及立即防治的目標。SARS 是二十一世紀發生的第一個新興感染症，也正是評量新感染症候群通報系統及驗證留存檢體價值的時機。

本研究的目的，是回溯性調查九十二年一至三月間期間，即首例 SARS 病例為疾病管制局證實之前，是否有新型冠狀病毒或禽流感引起的病例，主要利用通報「急性呼吸症候群」所留存的檢體中，偵測 SARS 冠狀病毒及禽流感 A(H5 亞型)的基因或抗體。

九十二年一月至三月間急性呼吸症候群通報病例共有三十七例，但受限於檢體的留存，有效檢體僅十四例，佔通報例數約 38%，且皆為血清檢體，經抗體檢驗方法確定皆非 SARS 冠狀病毒感染；另禽流感 A(H5 亞型)的感染，因無適當的抗體檢驗方法，故無法判定。

三病例近期曾經出國，目的地皆是中國大陸，其中僅有一例有大於二十一病日的有效血清檢體，由抗體檢測結果，可以排除 SARS 冠狀病毒感染；另二例雖然無適當的檢，但經送醫師初、複審查，皆已經排除為急性呼吸症候群病例。

因留存的檢體大部分為血液檢體，故未來在新興感染症應用上，適用於抗體檢測，或病原體會造成菌血症或病毒血症的情況下，才適用於病原體基因或抗原的偵測。

關鍵詞(至少三個)：

急性呼吸症候群監視通報、新興感染症、SARS 冠狀病毒感染

Project title: Retrospective Surveillance of SARS Coronavirus and Avian Influenza Virus A (H5 subtype) Infections from Previously Reported Cases of Acute Respiratory Syndrome between January and March 2003

Abstract:

In order to strengthen the monitoring and control procedures of the newly emerging and reemerging infectious diseases, Center for Disease Control Taiwan (CDC-Taiwan) started a Syndrome Surveillance Reporting Program in July 2000. As the SARS outbreak is the first emerging infectious disease in the twenty-first century, it would be a great chance for us to evaluate the newly set-up surveillance program and to assess the suitability of specimens stored in the past for the purpose of future testing uses of emerging infectious diseases.

The objective of the project is to find out whether there were any SARS or avian influenza A (H5 subtype) cases that occurred in the period between January and March 2003, just before the first SARS case officially confirmed and announced by CDC-Taiwan. The specimens were originally stored as cases of acute respiratory syndrome and employed for finding both the genome and antibodies of SARS coronaviruses or avian influenza A (H5 subtype) viruses.

In the targeted time period, there were a total of 37 reported acute respiratory syndrome cases. Among them only 14 cases (38%) provided suitable specimens for testing. On top of those, they are all serum samples suitable for serological tests only. Nevertheless, none of the 14 cases tested were positive in SARS coronavirus infection verification by an ELISA IgGAM test. As the serological test procedure for avian influenza A (H5 subtype) has not been setup yet, there are no data available so far.

Besides, there are three cases having stayed in the Mainland China before they became sick. Among them, only one case had suitable serum specimen in our

collection, which was confirmed to be not a SARS case. The other two cases without proper specimens left in our inventory, though, were both disqualified and thrown out as a false alarm after the preliminary and secondary checks by some clinical specialists.

Most of the specimens stored by us for the future are serum samples suitable for serological or certain genomic tests for detecting and identifying infectious agents with potentials of causing viremia or bacteremia only.

Keyword:

emerging infectious diseases

Syndrome Surveillance Reporting Program

SARS coronavirus infections

## 前言

為了加強監測新興感染症，疾病管制局採納世界衛生組織之建議，於民國八十九年七月起推動「症候群監視通報」，包括「急性神經症候群」、「急性呼吸症候群」、「急性黃疸症候群」、「急性出血症候群」、「急性腹瀉症候群」等，目的在以簡單而明確通報定義，加強臨床醫師的通報意願及時效，以期達到早期偵測疫情及立即防治的目標。

SARS 是二十一世紀發生的第一個新興感染症，目前已知的第一個病例是發生於 2002 年 10 月 16 日中國廣東省，當時稱為「非典型肺炎」。3 月 14 日台灣地區發佈首例「嚴重急性呼吸道症候群」可能病例—勤氏台商夫婦，疾病管制局於九十二年四月二十八日發文通告所有症候群通報醫院：自九十二年四月十九日起凡藉由「新感染症候群」通報系統通報之急性呼吸性症候群個案，一律加做 SARS 檢驗。但實際上從三月中旬，勤氏台商夫婦通報出來以後，通報急性呼吸症候群的病例，若符合 SARS 通報定義，應醫師要求，就已改通報 SARS 疑似或可能病例，九十二年度有 10 例急性呼吸症候群轉通報至 SARS，其中 SARS 確定病例有一例。但在勤氏台商為媒體披露之前，是否還有其他 SARS 冠狀病毒感染案例，一直是疾管局及各醫療院所關心的議題。

2003 年二月自香港地區某對父子分離出禽流感 A(H5N1)，該家庭於 2003 年一月底回福建省省親，二月四日八歲女兒死亡，父親於二月七日發病，二月八日返港，二月十一日因肺炎入院，二月十七日死亡，二月二十日自解剖檢體分離出禽流感病毒；九歲兒子亦在福建省發病，返港後二月十二日亦因肺炎入院，二月十九日採鼻咽拭子分離出禽流感 A(H5N1)。

中國大陸疫情隱匿，故香港一向被視為檢視中國疫情的最佳窗口，而台灣地區民眾近年來亦往返大陸頻繁，故台灣地區亦有可能繼香港之後，成為中國大陸疫情散播的中途站。本研究的主要目的，是從九十二年一至三月間通報「急性呼吸症候群」所留存的檢體中，偵測 SARS 冠狀病毒及禽流感 A(H5 亞型)的基因或抗原，回溯性調查在那段期間

是否有新型冠狀病毒或禽流感引起的病例發生，探討「急性呼吸症候群」的可能感染原，並提供本局後續執行「急性呼吸症候群」檢體採檢及留存的改善建議。

## 材料與方法

### 一、九十二年度一至三月急性呼吸症候群通報病例流病及檢驗結果

### 二、申請留存檢體依據檢體性質檢驗 SARS 冠狀病毒之基因或抗體以即時定量系統偵測 SARS 病毒基因

以 ABI 7000 來分析：依據本局病毒實驗室所設計的方法，檢體以 QIAmp Viral RNA Kit 萃取 RNA 後，取 5 ul RNA 加到 Taqman one-step RT-PCR Master Mix Reagent (SN: 4309169) 中，其中引子濃度為 400nM，螢光標的探針濃度為 200nM，並且加入 TaqMan exogenous internal control (SN:4308323)，反轉錄作用 48°C 30min，接著活化 Ampli Taq DNA 聚合酶 95°C 10 min，再進行 PCR 反應 40 cycle：denature 95°C 15sec，annealing-extension 60°C 1 min，螢光訊號收集於 annealing-extension 的步驟，並以 ABI Prism SDS 軟體進行分析。

#### (二) 以酵素免疫分析法偵測 SARS 病毒抗體

依據美國疾病管制局提供的 Indirect ELISA 偵測 SARS-CoV specific IgGAM 抗體，或本局製備之螢光玻片偵測 SARS-CoV 抗體。

### 四、依據檢體類別偵測禽流感 A(H5 亞型)基因

#### (一) 依據世界衛生組織 WHO Global Influenza Program Manual on Animal Influenza

Diagnosis：Identification of influenza viruses by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)設計之方法及引子對，病毒 RNA 以 Quiagen RNAeasy™ Total RNA isolation kit (catalog #74104)抽取後；取 4 ul RNA 加 0.5 ul 引子‘Uni12’ AGCAAAGCAGG (1 µg/µl)，72°C 5 min 作用後，加 5.5 ul cocktail (含 AMV Reverse Transcriptase 等)，42°C 作用 1 hr 合成 cDNA 後，95°C 5 min 不活化；PCR 反應分成 A、B、C 三組：A 組引子對 HA-1144 and HA-Reverse，H5, H6, H9 之 PCR 產物皆 600 bp，B 組引子對 H5: HA-1144 and



H5-1735R, 591 bp PCR 產物証實 H5 亞型的存在；C 組陽性對照, 1015 bp PCR product M segment 確定 RT-PCR 反應正常；另陰性對照確定實驗無污染。PCR 作用時間: 94 °C for 2 minutes 後, 94 °C for 1 minute (denature)、50 °C for 1 minutes (anneal)、72 °C for 3 minutes (extend) 重覆 30 次後, 72 °C for 8 minutes, 置 4 °C 靜置。

## 結果

### 一、九十二年度一至三月急性呼吸症候群通報病例流病及當時審查結果分析

九十二年一月至三月間急性呼吸症候群通報病例共有三十七例，其中一例同時通報急性神經症候群，一例同時通報腹瀉症候群；九十一年十二月發病有四例、九十二年一月發病有十二例、二月發病有十二例、三月發病有九例，詳如表一。

病例審查部分，經醫師初、複審後，有八例判為確定病例，二十三例排除，二例建議追蹤，四例尚未回覆；治療結果，有十五例死亡，二十二例存活，詳如表二。

八例確定病例之最後診斷，有七例歸咎於致病原，分別為流感病毒、Klebsiella pneumoniae、Legionellosis、Mycoplasma Pneumonia、Staphylococcus aureus、Streptococcus pneumoniae、TB 等；二十三例排除病例中，亦有三例亦找出致病原，分別為 Chlamydiae、Mycoplasma、Streptococcus pneumoniae 等；至於建議追蹤或尚未回覆案例，皆未有任何陽性檢驗結果。詳如表三。

三十七例病患中有三例近期曾經出國，皆赴中國大陸，如表四；分別於回國 69 日、12 日、14 日內發病，最後確定診斷為 Legionellosis、高血壓心臟病合併心肺功能衰竭及黴漿菌感染，病患詳細資料如表五。

### 二、申請留存檢體

綜合以上的分析及文獻上對嚴重急性呼吸症候群 (SARS) 的描述，上述三十七例急性呼吸症候群病例，不論最後確診的結果為確定或排除，或致病原是否確定，都無法排除 SARS-CoV 重覆感染的機率，故向本局生物材料科申請上述三十七例所儲存的檢體。

### 三、偵測 SARS 病毒及禽流感 A(H5 亞型)基因或抗體

生材科提供支氣管洗液 1 支(編號 270)、痰液 2 支(編號 299 及 112)、血漿檢體 44 支(每管約 200ul)、尿液檢體 24 支(每管約 1ml)，以 real time PCR 檢測 SARS 及 influA(H5) 基因，結果皆為陰性；另 62 支血清檢體以美國疾病管制局製備之 GAM 酵素免疫法檢測 SARS 抗體，亦皆為陰性。

#### 四、檢體種類與採檢時間分析

以檢體種類而言，僅支氣管洗液 1 支為呼吸道檢體，採檢病日為十六病日，另痰液二支皆已經乾涸，無法使用；血漿檢體及尿液檢體，皆非檢測 SARS-CoV 及 Influenza A(H5N1) 基因的適合檢體，如表六。

以 SARS-CoV 抗體檢測，如依據美國疾病管制局訂定之二十八日血清檢體，十一支血清檢體符合，另有十四血清檢體為二十一病日內，詳如表七。

## 討論

本研究的主要目的，是回溯性調查九十二年一至三月間期間是否有發生新型冠狀病毒或禽流感引起的病例，利用通報「急性呼吸症候群」所留存的檢體中，偵測 SARS 冠狀病毒及禽流感 A(H5 亞型)的基因或抗體。

申請到的檢體中，僅有一支為呼吸道檢體—支氣管洗液，但採檢病日為十六日，已經過了急性期。另痰液二支皆已經乾涸，無法使用；血漿檢體 44 支，尿液檢體 24 支，皆非檢測 SARS 冠狀病毒及禽流感 A(H5 亞型)的基因的最適當檢體，故檢驗結果如預期皆為陰性。

另血清檢體有 62 支，使用美國疾病管制局提供的 Indirect ELISA 偵測 SARS-CoV specific IgGAM 抗體，皆為陰性。分析血清檢體的採血病日，有 14 例大於二十一病日，其中有 11 例大於二十八病日。

故九十二年一月至三月間急性呼吸症候群通報病例共有三十七例，但受限於檢體的留存，有效檢體僅十四例，且皆為血清檢體，經抗體檢驗方法確定皆非 SARS 冠狀病毒感染；另禽流感 A(H5 亞型)的感染，因無適當的抗體檢驗方法，故無法判定。

三例近期曾經出國，且恰好皆至中國大陸的案例當中，僅有一例有大於二十一病日的有效血清檢體，發病日距回國日 69 天，從如此長的潛伏期及 SARS 抗體檢測結果，可以排除 SARS 冠狀病毒感染，且實驗結果也已經証實為退伍軍人症；另二例分別於回國 12 及 14 日發病，其中有一例 81 歲病患死亡，診斷為高血壓心臟病合併心肺功能衰竭，另一例 38 歲病患診斷為黴漿菌感染，但此二例僅採到 12、3 病日血清檢體，故本實驗無法判定，僅能依賴醫師的臨床判定，經送醫師初、複審查，皆已經排除為急性呼吸症候群病例。

## 結論與建議

- 一、SARS 是二十一世紀發生的第一個新興感染症，也是評量新感染症候群通報系統及留存檢體價值的時機。
- 二、九十二年一月至三月間共有三十七例急性呼吸症候群通報病例，經申請雖然提領到支氣管洗液 1 支、痰液 2 支、血漿檢體 44 支、尿液檢體 24 支，及 62 支血清檢體，但有效檢體僅有十四例，佔通報例數約 38%，且全部為血液檢體，最適用的檢測方法為偵測抗體。
- 三、因留存的檢體大部分為血液檢體，故未來在新興感染症應用上，除非是病原體會造成菌血症或病毒血症，應用在直接偵測病原體基因或抗原的機率較低。
- 四、痰液檢體不適合於冰櫃中長期保存，因會乾涸；尿液可離心後，儲存沉澱層。

## 參考文獻

1. Zhao, Z 1. Zhang, F 2. Xu, M 2. Huang, K 1. Zhong, W 1. Cai, W 2. Yin, Z 2. Huang, S 3. Deng, Z 4. Wei, M 5. Xiong, J 1,6. Hawkey, P M 6. Description and clinical treatment of an early outbreak of severe acute respiratory syndrome (**SARS**) in Guangzhou, PR China. *Journal of Medical Microbiology*. 52(8):715-720, August 2003.
2. Maskalyk, James editorial fellow 2002-3. **SARS Reference** . *BMJ*. 326(7403):1402, June 21, 2003.
3. Rubenfeld, Gordon D. MD, MSc. Is **SARS** Just ARDS?. *JAMA*. 290(3):397-399, July 16, 2003.
4. Lew, Thomas W. K. MMed, EDIC. Kwek, Tong-Kiat MMed. Tai, Dessmon FRCPE, FCCM. Earnest, Arul MSc. Loo, Shi MMed, EDIC. Singh, Kulgit MMed. Kwan, Kim Meng MMed. Chan, Yeow MMed. Yim, Chik Foo MMed. Bek, Siam Lee MBBS. Kor, Ai Ching MRCP. Yap, Wee See MRCP. Chelliah, Y. Rubuen MMed. Lai, Yeow Choy MMed. Goh, Soon-Keng FRCPE, EDIC. Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome. *JAMA*. 290(3):374-380, July 16, 2003.
5. Fowler, Robert A. MD, MS. Lapinsky, Stephen E. MB, BCh, MSc. Hallett, David MSc. Detsky, Allan S. MD, PhD. Sibbald, William J. MD. Slutsky, Arthur S. MD. Stewart, Thomas E. MD. for the Toronto **SARS** Critical Care Group. Critically Ill Patients With Severe Acute Respiratory Syndrome. *JAMA*. 290(3):367-373, July 16, 2003.
6. <http://www.SARSreference.com> by Bernd Sebastian Kamps and Christian Hoffmann (editors)
7. <http://www.who.int/emc-documents/influenza/docs/animalinfluenza/HTML/> Manual on Animal Influenza Diagnosis

圖表

表一、發病年月與通報症候群

發病月年	症候群			總計
	急性呼吸	急性呼吸 及神經	急性呼吸 及腹瀉	
Dec-02	4			4
Jan-03	10	1	1	12
Feb-03	12			12
Mar-03	9			9
總計	35	1	1	37

表二、審查結果與病例存歿

審查結果	死	存	總計
	亡	活	
確定	5	3	8
追縱	1	1	2
排除	7	16	23
(空白)	2	2	4
總計	15	22	37

表三、審查結果與最後確定診斷 (n=37)

加總/count	審查結果				總計
	確定	追縱	排除	(空白)	
最後確定診斷					
Influenzae virus		1			1
Klebsiella pneumoniae		1			1
Legionellosis		1			1
Mycoplasma Pneumonia with ARDS Sepsis		1			1
Staphylococcus aureus		1			1
Streptococcus pneumoniae		1			1
活動性肺結核		1			1
ARDS, pneumonia		1			1
細菌性肺炎				1	1
Bil pneumonia (Chlamydial)				1	1
Streptococcus pneumoniae				1	1
黴漿菌感染				1	1
ARDS			1	1	2
ARDS, Pneumonia, Hepatoma				1	1
aspiration pneumonia				1	1
Atypical pneumoniae				2	2
Bil pneumonia				1	1
multilobar pneumonia				1	1
paradoxical reaction 引起之 Pneumonia bil ,ARDS				1	1
Pleuritis with acute pulmonary edema				1	1
Sepsis				1	1
Unstable angina				1	1
心衰竭				1	1
肺炎				1	1
肺炎--不明病原			1	1	2
肺炎併急性呼吸窘迫症及呼吸衰竭				1	1
急性心肌炎				1	1
急性胰臟炎				1	1
高血壓心臟病				1	1
敗血性休克				1	1
(空白)				2	2
總計	8	2	23	4	37



表四、近期出國與否及出國別

出國與否	出國別	急性呼吸	急性呼吸及神經	急性呼吸及腹瀉	總計
否		32	1	1	34
是	中國大陸	3			3
總計		35	1	1	37

表五、三名近期出國者之最後診斷

發病日	年齡	發病距出國	最後確定診斷	審查結果	死亡	死亡距發病日	最後採血病日
2003/1/6	57	69	Legionellosis 確定	確定 (存)	N		31
2003/2/13	81	12	高血壓心臟 病合併心肺 功能衰竭	排除	Y	25	12
2003/3/25	38	14	黴漿菌感染	排除	N		3

表六、檢測 SARS-CoV 及 Influenza A(H5) 基因的檢體

檢體種類	檢體數	Real time PCR	
		SARS-CoV	Influenza A(H5)
支氣管洗液(十六病日)	1	negative	negative

\*86 歲男性病患近期末出國，2/19 發病，3/7 (16 病日) 採支氣管洗液送驗，退伍軍人症、adenovirus、influenza virus、RSV 皆陰性，審查結果排除，最後診斷為 Atypical pneumonia，病患存活。

\*\*另申調其他病患痰液檢體二管，已經乾燥無法抽取 RNA。

\*\*\*另血漿檢體 44 支、尿液檢體 24 支，皆非檢測 SARS-CoV 及 Influenza A(H5) 的適合檢體。

表七、血清檢體的採檢病日

採檢病日 $\geq 28$	採檢病日 $\geq 21$		總計
	是	否	
是	11		11
否	3	23	26
總計	14	23	37