

計畫編號：DOH93-DC-2038

行政院衛生署疾病管制局九十三年度科技研究發展計畫

計畫名稱：利用multiplex RT-PCR進行急性呼吸道感染症病原體偵測
及SARS陽性病患抗體之長期追蹤

研究報告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局

計畫主持人：楊志元 研究員

研究人員：楊志元、陳豪勇、李祥吉、王聖帆、林思鳳、吳秉儒

執行期間：93年1月1日至93年12月31日

目 錄

頁 碼

封面

目錄

壹、 綜合資料

貳、 計畫摘要

中文摘要 (1)

英文摘要 (3)

參、 計畫內容

一、 研究簡介 (4)

二、 材料方法 (10)

三、 結 果 (17)

四、 討 論 (20)

五、 表 圖 (24)

六、 參考文獻 (34)

中文摘要：

關鍵詞：嚴重急性呼吸道症候群(SARS)、multiplex RT-PCR、SARS 冠狀病毒抗體

嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory syndrome , SARS)是由一種具高度傳染性的新型變異冠狀病毒，經由近距離的飛沫傳染或接觸傳染途徑所散佈。SARS 疫情自西元 2003 年 3 月在越南爆發感染以來，陸續在香港、台灣、新加坡、加拿大及美國等地區出現 SARS 病例，WHO 統計全球可能病例 8,439 例，死亡病例 812 例，其中台灣地區累計通報病例 3,036 例，可能病例 671 例，死亡病例 84 例。在全球攜手合作防疫的努力下，SARS 冠狀病毒的人類宿主傳播鏈已經暫時被阻斷，但是極有可能與其他的新興傳染病病毒一樣，暫時藏匿在某些動物或環境宿主中，經過一段時間，出現適於病毒傳播的環境亦或是能再次適應環境的突變種病毒時，SARS 冠狀病毒又會再度引爆流行。目前的研究尚無法判斷 SARS 冠狀病毒會不會再次爆發流行或何時會再出現流行，但是隨著時序進入秋、冬季節，又是流行性感冒流行的時間，SARS 冠狀病毒會不會在此時再度出現？由於 SARS 冠狀病毒感染初期症狀類似感冒，鑑別 SARS 冠狀病毒感染，或是其他披衣菌、黴漿菌、流感病毒感染將是實驗室的重重大考驗。以分子生物學檢測的高度敏感性與快速為基礎，設計 multiplex RT-PCR (m-RT-PCR) 的方法，同時單管篩檢 9 種病原體，分別是引發嚴重急性上呼吸道感染的 SARS 冠狀病毒(SARS-CoV virus)，常見引起急性呼吸道感染(Acute Respiratory tract Infections , ARIs)的細菌性病原體肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)；常見引起急性呼吸道感染(ARIs)的病毒性病原體流行性感冒病毒 A 型與 B 型(influenza A and B viruses)、副流行性感冒病毒第 1 型、第 2 型與第 3 型(parainfluenzaviruses type 1 、 type 2 and type 3)、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus , RSV) 及腺病毒(adenovirus , ADV)等以單

步驟 RT-PCR 反應將溫度設定在 52 進行檢測，實驗室可以快速釐清急性呼吸道感染的病原體是否為 SARS 冠狀病毒，對於衛生單位控制疾病的流行及減輕臨床病患管控的重擔有很大的幫助。

SARS 冠狀病毒的基因序列相似性接近動物的冠狀病毒，但是序列相似性僅介於 50~60% 之間，SARS 疫情如此嚴重與一般人不具 SARS 冠狀病毒抗體有關，臨床上 SARS 冠狀病毒抗體產生時間較一般的病毒抗體慢，一般人類冠狀病毒的抗體可以維持一年，至於 SARS 冠狀病毒可以持續多久則尚無報告，本計畫採用酵素免疫分析(ELISA)與病毒中和試驗(NT)分析疾病管制局收集的可能病例血清，目前最長可以觀察到病患在發燒產生後 434 天仍可測出 Total Ig 抗體產生。

英文摘要：

簡 介 (Introduction) :

嚴重急性呼吸道症候群

嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)疫情最早出現在西元 2002 年的秋冬時期，世界衛生組織(WHO)公佈的資料指出 305 例由未知感染原引發的非典型肺炎病例被報告發生在中國大陸廣東省的六個城市，導致 5 例死亡，病患在感染初期出現乾咳、頭痛、疲倦、發冷、肌肉酸痛、發燒等類似感冒症狀，病況嚴重時產生呼吸窘迫及瀰散性肺炎等症狀，但是非典型肺炎的疫情似乎侷限在密切接觸及照顧病患的家屬及醫護人員。西元 2003 年 2 月 26 日，一位抵達越南前曾經旅遊過中國大陸、香港等地區的 47 歲美國籍商人在越南河內因非典型肺炎症狀就醫住院，2 月 28 日 WHO 義大利籍醫師 Cario Urbani 向駐越南辦公室通報該個案為非典型肺炎案例，3 月 5 日 WHO 證實越南河內爆發非典型肺炎的醫院內感染，共造成 71 位醫護人員被感染，該名指標病例在移送香港隔離治療後於 3 月 13 日死亡。接著陸續在香港、台灣、新加坡、加拿大及美國等地區出現非典型肺炎病例[28, 32, 34]，造成家屬及醫護人員感染的疫情。世界衛生組織於 3 月 15 日公布嚴重急性呼吸道症候群(Severe Acute Respiratory Syndrome : SARS)之疾病名稱[36]。台灣地區的第一起疑似病例為一台商，他在 2 月 7 日至 21 日赴中國大陸出差，當時即出現類似感冒症狀，2 月底回台灣就醫，3 月 8 日住院，住院期間出現呼吸窘迫症候群，肺部 X 光片顯示浸潤現象，其妻並未出境，卻在 3 月 14 日出現症狀，隨即住進醫院進行隔離治療，此後陸續有患者因進出中國大陸與香港地區而疑似感染 SARS，4 月中旬由於一醫院缺乏對 SARS 的認知，在院內感控的缺失導致疫情失控，繼而產生數起院內感染案件。SARS 病毒肆虐，疫情蔓延對於台灣地區的民生經濟產生了巨大的衝擊[40]。隨著強制居家隔離、發燒篩檢及入境檢疫等阻斷 SARS 傳播鏈的防疫措施的徹底實行，台灣地區 SARS 疫

情已獲得控制，WHO 在 7 月 5 日宣布將台灣自 SARS 地區性傳播名單中移除。截至西元 2003 年 7 月 15 日為止，WHO 統計全球可能病例 8,439 例，死亡病例 812 例，其中台灣地區累計通報病例 3,036 例，可能病例 671 例，死亡病例 84 例[9,10,22,27,31]。

SARS 病原體的確認

SARS 在中國大陸流行初期，中國的專家依據症狀認為其病原體是肺炎披衣菌(*Chlamidia pneumoniae*)，但是由於 SARS 病患的肺部組織病理切片出現肺泡細胞核融合的細胞病理變化，推測病原體是病毒的可能性較高。WHO 於 3 月 19 日報導德國及香港的實驗室，利用電子顯微鏡觀察找到病毒顆粒，發現引起 SARS 的病原體，可能為副黏液病毒科(paramyxoviridae)的一種，和引起腮腺炎及麻疹等的病毒屬同一科，為一單股 RNA 病毒，顆粒直徑約為 125~250nm，研究人員初步排除此病原體為已知的 Hendra virus 與 Nipah virus。香港中文大學的研究團隊宣稱已培養出 SARS 病原體，就是副黏液病毒科的 human Metapneumovirus (hMPV)，由於 SARS 流行當時亦為流行性感冒季節，副黏液病毒也通常於此季節出現傳染，只憑藉電子顯微鏡觀察尚不足證明 hMPV 即是 SARS 的病原體。3 月 24 日美國疾病管制中心(Center of Disease Control : CDC)透露引起 SARS 的病原體可能為冠狀病毒(Coronavirus)，CDC 的研究人員將香港及泰國疑似患者的檢體培養於 Vero E6 細胞株，從中分離出冠狀病毒，再藉由電子顯微鏡的觀察、反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)、免疫染色法及間接免疫螢光抗體檢測(IFA)等實驗證實。利用 RT-PCR 檢查是否含有冠狀病毒基因，定序結果發現此病毒的基因序列和已知的冠狀病毒只有 54~62%相似性，可能是一新突變種冠狀病毒。IFA 可檢查出病患體內抗體的存在，在 6 個檢體中，經 IFA 及 RT-PCR 檢測後均呈陽性反應，研究人員並從一位病患的支氣管細胞病理切片中，

利用電子顯微鏡找到冠狀病毒的病毒顆粒，其他實驗室也於檢體中發現冠狀病毒的存在[13]。CDC 比對包括越南、香港與台灣等地區疑似病例所得之基因序列，發現其相似性達 99% 以上，實驗證據顯示此種新突變種的冠狀病毒極可能是造成嚴重急性呼吸道症候群的病原體，4 月 16 日 WHO 宣布冠狀病毒為 SARS 的致病原，其病毒為變種冠狀病毒屬於冠狀病毒科 (Coronaviridae) [3]。

人類冠狀病毒會引起上呼吸道的感染，症狀與由鼻病毒 (Rhinoviruses) 引起的感冒相類似，但是冠狀病毒的潛伏期較長 (平均 3 天)，嚴重時會引發肺炎。冠狀病毒的感染常會造成慢性肺病例如氣喘、支氣管炎等疾病的嚴重程度加劇。人類冠狀病毒感染的是上呼吸道的表皮細胞，其複製的最佳溫度是攝氏 33~35 度，也正是感染部位侷限於上呼吸道的主因，病毒主要藉由飛沫傳染。此外，人類冠狀病毒在抗體存在的情況下會出現重複感染的特性，突顯出 RNA 病毒複製酵素不具校正功能，以致於易產生突變種的現象。10~15% 的上呼吸道感染及肺炎是由人類冠狀病毒所引起，主要發生在嬰兒與兒童，一般感染人類冠狀病毒的患者在發病 1~2 星期內會痊癒，並不會有致命的危險，然而 SARS 冠狀病毒似乎與已知的人類冠狀病毒有所區別，SARS 冠狀病毒的潛伏期從 2 至 7 天，最長可達 10 天以上，感染後會造成瀰散性肺泡損傷 (Diffuse Alveolar Damage : DAD)、肺臟纖維化等呼吸窘迫症候群的病理變化，最後會發展成為蜂窩肺 (Honey comb lung) [24]，致死率高達 15% 左右。依據現有的證據顯示，SARS 冠狀病毒在人與人之間的傳播需經由與病人的密切接觸，可能是接觸病人的飛沫或體液而傳染，所以目前全球發現的病例絕大部分是照顧 SARS 病患的醫護人員或 SARS 病患的親友[7]。

SARS-CoV 的檢驗

所幸在全球科學家的努力下解開 SARS 冠狀病毒基因序列，進行病毒序列分析比對，據已開發出 SARS 冠狀病毒之檢驗方法及試劑，可以快速確認以感染 SARS 冠狀病毒的人員並加以隔離，有效的控制住 SARS 疫情。目前有病毒分離、RT-PCR、免疫螢光分析法(IFA)與酵素免疫分析法(ELISA)等實驗室診斷方法可以用來檢驗 SARS 冠狀病毒的感染[11,12,16,30,33]。病毒分離是自任何檢體以細胞株培養分離出 SARS 冠狀病毒，並經 RT-PCR 確認。反轉錄聚合酵素連鎖反應(RT-PCR)是以至少 2 種不同的臨床檢體(例如鼻咽拭子及糞便)或同一種檢體但是在病程中不同的天數採取，亦或是一種臨床檢體，分別操作 2 種不同基因的 RT-PCR 實驗，結果皆為陽性，即可確認 SARS 冠狀病毒陽性。病患感染 SARS 初期，血清中含有微量的 IgM 及 IgG 兩種抗體，根據臨床實驗結果，以 ELISA 檢驗血清抗體陽轉 (seroconversion)，若是上述兩種抗體的濃度迅速增加至初期的四倍以上，即表示病患進入嚴重感染的急性期，可確認該病患為 SARS 冠狀病毒感染陽性，ELISA 檢測方法的可信度高，但是其靈敏度較低，無法早期偵測 SARS 冠狀病毒感染，還必須搭配 RT-PCR 以確認檢驗結果。IFA 則是將 SARS 冠狀病毒抗原固定在玻片表面，將檢體中的抗體與抗原進行共軛免疫反應，經清洗步驟將未結合的檢體去除後，接上標誌有螢光物質的抗人類第二抗體，觀察螢光物質的分布即可確認 SARS 冠狀病毒抗體的存在。在全球攜手合作防疫的努力下，SARS 冠狀病毒的人類宿主傳播鏈已經暫時被阻斷，但是極有可能與其他的新興傳染病病毒一樣，暫時藏匿在某些動物或環境宿主中，經過一段時間，出現適於病毒傳播的環境亦或是能再次適應環境的突變種病毒時，SARS 冠狀病毒又會再度引爆流行。目前的研究尚無法判斷 SARS 冠狀病毒會不會再次爆發流行或何時會再出現流行，但是隨著時序進入秋、冬季節，又是流行性感冒流行的時間，SARS 冠狀病毒會不

會在此時再度出現？由於 SARS 冠狀病毒感染初期症狀類似感冒，鑑別 SARS 冠狀病毒感染，或是其他披衣菌、黴漿菌、流感病毒感染將是實驗室的重大考驗。

本計畫利用 multiplex RT-PCR (m-RT-PCR) 的方法[6]，同時篩檢 SARS 冠狀病毒、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus : RSV)、副流行性感冒病毒(parainfluenza virus : PIV)及腺病毒(adenovirus)等常引起嚴重下呼吸道疾病的感染原，將針對以下十種病原體設計具專一性的引子對，利用單管反轉錄酵素聚合反應偵測病原體的存在，十一種病原體分別是引發嚴重急性上呼吸道感染的 SARS 冠狀病毒(SARS-CoV virus)，常見引起急性呼吸道感染(Acute Respiratory tract Infections : ARIs)的細菌性病原體肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)、肺炎披衣菌(*Chlamydia pneumoniae*)兩種細菌；常見引起急性呼吸道感染(ARIs)的病毒性病原體流行性感冒病毒 A 型與 B 型(influenza A and B viruses) 副流行性感冒病毒第 1 型與第 3 型(parainfluenzaviruses type 1 and 3) 呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus : RSV)、腺病毒(adenovirus)、腸病毒(enterovirus)及人類間質肺病毒(human metapneumoviruses : hMPV)(11)等[2,4,5,8,14,25,35]。在 SARS-CoV 流行期間，本局利用病毒中核試驗(NT)、免疫螢光抗體偵測(IFA)、酵素免疫分析法(ELISA)及免疫色素分析法(Immunochromatographic test : ICT)等方法偵測可能病例中 RT-PCR 及 Real-Time RT-PCR 陰性的檢體，結果陽性率都非常低，分別為 0.48%、0.39%、0.43%、0.10%，針對可能病例中 RT-PCR 及 Real-Time RT-PCR 陰性並且 SARS 冠狀病毒抗體陰性的檢體，我們擬利用單管反轉錄酵素聚合反應偵測病原體的存在，建立起單管反轉錄酵素聚合反應系統後，也可用在未來出現的新病例中進行病原體的確認。反轉錄酵素聚合反應(RT-PCR)

與及時反轉錄酵素連鎖反應系統(real-time RT-PCR)偵測 SARS-CoV 基因體的存在，在 3,000 多例的 SARS 通報病例檢體中排除不具 SARS-CoV 基因體的案例檢體，但是這些因急性呼吸道感染症狀或肺炎症狀被通報的案例卻無法釐清其感染原，利用單管反轉錄酵素聚合反應可以在短時間內對多種病原體進行偵測，縮短檢驗時間，也可以依據檢驗結果選擇細菌性或病毒性藥物治療。

本計畫的另一項重點是追蹤監測可能病例的 SARS 冠狀病毒抗體，目前本局保存的可能病例的 SARS 冠狀病毒抗體可以在發病後第 110 天偵測出 SARS 冠狀病毒抗體，我們擬利用 ELISA 及 NT 持續對台北市內的可能病例的恢復期及癒後的血清抗體進行分析，目前對於 SARS 病患的血清抗體反應可以維持多久並沒有詳細的研究報告出現，本計畫擬利用已經保存的可能病例的血清及將來定期追蹤採檢的血清完成 SARS 病患的感染過程血清抗體研究。

材料與方法 (Materials and Methods) :

檢體來源

全國醫學中心與教學醫院門診病患與住院病人，以及全國各醫師診所若病患之症狀符合我國“疑似病例”及“通報病例”之定義者皆可採檢。疑似病例患者高燒超過攝氏三十八度以上有上呼吸道之病徵如咳嗽、呼吸急促或呼吸困難或 X 光檢查有瀰漫性肺炎等[2]其患者不見得要有旅行史或接觸史皆可通報，而合乎疑似病例定義且經胸部 X 光攝影證實為肺炎者或有呼吸窘迫症候群現象者，在發病期間採取上呼吸道檢體如咽喉拭子(throat swab)以及唾液、痰、血液、糞便、尿液 等檢體並以低溫運送至疾病管制局研究檢驗組病毒實驗室，進行病毒鑑定。血清檢體由疾病管制局資源服務組收集與保存，本計畫所使用的血清檢體及詳細背景資料向資源服務組申請借調。

檢體種類與處理

由於 SARS 病毒為造成呼吸道之感染，因此在感染初期肺部的抽取液、痰檢體與咽喉拭子較容易檢驗出病原體，至於血液、尿液、糞便檢體在感染的初期到後期亦可檢驗到病原體的存在。

- a.血液檢體：血清或添加抗凝劑如 sodium citrate 或 EDTA 的血漿皆可使用，檢體以 4℃ 的運送。採集後之檢體，以 2,000 rpm 離心 10 分鐘，以分離出的血清備用。
- b.咽喉拭子檢體：咽喉拭子棉棒充分攪拌後於塑膠管壁旋轉擠乾取出。將擠出之液體於 4℃，2100 ×g 離心 15 分鐘。收集上清液裝於管子標示號碼及日期保存於-70℃。
- c.糞便檢體：取糞便 1 g，放入 15 ml 離心管中，加入玻璃圓球及 10 ml PBS

調成 10 % 懸浮液。於 4 °C , 2100 ×g 離心 15 分鐘收集上清液分裝於 2 ~ 3 支冷凍小管 , 標示號碼及日期保存於 -70 °C 。

d.痰檢體: 取痰檢體與 0.9%NaCl(內含 1% N-Acetylcysteine)體積 1: 2 攪拌靜置 30 分鐘後於 4 °C , 2100 ×g 離心 15 分鐘 , 收集上清液。

RNA 的萃取

使用 QIAGEN 公司的 QIAmp Viral RNA kit 進行 RNA 的純化。吸取檢體 140 ul 加入 560 ul Buffer AVL 於室溫下作用 10 分鐘 , 再加入 560 ul 絕對酒精混合完全(vortexing) , 上述混合液再通過 QIAmp spin column , column 以 Buffer AW 清洗兩次以後 , 用 80 µl 純水(RNase Free)將 RNA 溶出。製備的病毒 RNA 可用於反轉錄及聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)。

單管反轉錄聚合酵素反應(multiplex RT-PCR : m RT-PCR)

檢測急性呼吸道感染病原體系統方法

建立引起急性呼吸道感染的 9 種病原體的陽性對照基因體 RNA , 包括 SARS 冠狀病毒(SARS-CoV virus) , 常見引起急性呼吸道感染(Acute Respiratory tract Infections , ARIs)的細菌性病原體肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*); 常見引起急性呼吸道感染(ARIs)的病毒性病原體流行性感胃病毒 A 型與 B 型(influenza A and B viruses)、副流行性感胃病毒第 1 型、第 2 型與第 3 型(parainfluenzaviruses type 1 、 type 2 and 3 , PIV-1、 PIV-2 and PIV-3)、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus , RSV)、腺病毒(adenovirus , ADV)等。

針對以上 9 種病原體設計專一性的引子對 11 組，如下：

SARS-CoV (SARS-1)

SARSF1 5'-GAAGCTATTCGTCACGTTTCG-3'
SARSR1 5'-CTGTAGAAAATCCTAGCTGGAG-3' 109bp

SARS-CoV (SARS-2)

SARSF2 5'-TTTCTACAGGTTAGCTAACGA-3'
SARSR2 5'-AGCATAAGCAGTTGTAGCATC-3' 118bp

SARS-CoV (SARS-3)

SARSF3 5'-TCAACTGCATTGGGCAAGCT-3'
SARSR3 5'-CAAGTCGCGAAAGGATATCA-3' 130bp

Influenza A

INFAF 5'-AAGGGCTTTCACCGAAGAGG-3'
INFAR 5'-CATTCAAGTCCTCCGATGAG-3' 120bp

Influenza B

INFBF 5'-ATGGCCATCGGATCCTCAAC-3'
INFBR 5'-GTCTCCCTCTTCTGGTGATA-3' 137bp

Parainfluenzaviruses type 1 (PIV-1)

PIV-1F 5'-CCGGTAATTTCTCATACTATG-3'
PIV-1R 5'-CTTTGGAGCGGAGTTGTAAAG-3' 317bp

Parainfluenzaviruses type 2 (PIV-2)

PIV-2F 5'-CCATTTACCTAAGTGATGGAAT-3'
PIV-2R 5'-GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA-3' 204bp

Parainfluenzaviruses type 3 (PIV-3)

PIV-3F 5'-ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT-3'
PIV-3R 5'-TAAATCTTGTTGTTGAGATTG-3' 103bp

Respiratory syncytial virus (RSV)

RSVF 5'-GAACAACAGACTACTAGAGA-3'
RSVR 5'-TGTTATAGGCATATCATTGA-3' 124bp

Adenovirus (ADV)

ADVF 5'-TGGTCAGAGTGCACCAGCC-3'

ADVR 5'-TTATGTGGTGGCGTTGCCGGC-3' 86bp

M.Pneumoniae

MPMF 5'-AAGGACCTGCAAGGGTTCGT-3'

MPMR 5'-GTATGGGCCGTGTCTCAGTC-3' 138bp

使用 QIAGEN one-step RT-PCR Kit (Cat. No. 210212)進行反應，加入 5X QIAGEN One-Step RT-PCR buffer、dNTP Mix (10 mM)、5X Q-Solution、enzyme Mix 最後加入 11 組引子對(最終濃度為每隻引子 1 μ M 與 5 μ l Viral RNA, 終體積為 80 μ l, 不足體積的部份以 Rnase-free water 補足。反應是利用 PE GeneAmp PCR 9700 Thermocycler (Perkin-Elmer) 進行, 首先設定 RT-PCR 反應, 病毒 RNA 與引子對混合液在 94 $^{\circ}$ C 下作用 2 分鐘, 接著每管加入其他試劑的混合液, 設定 42 $^{\circ}$ C 作用 45 分鐘進行反轉錄作用合成病毒的單股 cDNA, 接著設定 PCR 增幅反應, 於 94 $^{\circ}$ C 變性 10 分鐘後, 進行 40 次循環的變性反應(denaturation) 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 黏合反應(annealing) 50 $^{\circ}$ C 45 秒, 及延伸反應(extension) 72 $^{\circ}$ C 60 秒, 最後將反應終止在 72 $^{\circ}$ C 作用 10 分鐘。每次實驗時進行陽性對照品及以無菌二次水取代病毒 RNA 的陰性對照實驗, 確保該次實驗的正確性。將經過增幅後的產物進行電泳分析, 確定產物的正確 DNA 片段長度, 再將產物以酒精沉澱法純化後, 以 ABI 377 自動化核酸螢光定序儀 (DNA autosequencer) 作定序分析, 以確定病原體的序列。

酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)

由於 SARS 病毒目前已經被衛生署列為第四類法定傳染病, 因此處理 SARS 檢體及進行血清學實驗, 根據生物安全實驗室隔離設施之規定須於第

二級(P2)以上實驗室內進行。酵素免疫分析是利用美國疾病管制中心(CDC, USA)提供之 Cor-SARS Human IgA, IgG, IgM (H&L) 檢驗試劑組進行，試劑組包含以下成份：

1. SARS E6 coronavirus antigen，稀釋成 1:2000 使用。
2. Uninfected Vero E6 antigen，稀釋成 1:2000 使用。
3. 陽性對照血清，稀釋至 1:25 使用。
4. PVC 96 孔盤(Falcon)。
5. K&P anti-IgG, A, M conjugate 第二抗體。

反應首先是利用 PBS 溶液(不含 Tween)，pH7.4，於 4℃ 作用 overnight 將 SARS coronavirus Vero E6 antigen 及 Uninfected Vero E6 antigen coat 在 PVC 96 孔盤底部，利用試劑組內的陽性對照血清進行測試，以 1:100 為起始稀釋價數，作連續 4 倍稀釋(100、400、1600、6400 等 4 個稀釋倍數)，分別加入不同孔洞測試，於 37℃ 作用 60 分鐘，接著以 wash buffer 清洗 3 次，每孔分別加入 anti-human IgA, IgG, IgM (H&L) (1:4000) 於 37℃ 作用 60 分鐘，接著再以 wash buffer 清洗 3 次，最後加入 K&P ABTS 呈色受質呈色於 37℃ 作用 30 分鐘後，接著測定其波長 410 nm、490nm 下的吸光值。計算出相對孔洞(Positive antigen 與 Negative antigen)的吸光值差異，最後加總出所有特定稀釋比例 1:100、1:400、1:1600、1:6400 孔洞的吸光值差異。此實驗定義 SARS 冠狀病毒陽性的標準是檢體血清的四個特定稀釋比例 1:100、1:400、1:1600、1:6400 孔洞的吸光值差異總和必須大於 1.25，此時可以判定該血清檢體的效價為 1:400 或大於 1:400。實驗的血清檢體必需經過加熱去活化病毒的處理(Heat Inactivation)，使用 1:20 體積比的 Triton X-100 / 5% skim milk (wt/volume) PBS 溶液以 1:25 倍稀釋血清檢體，將稀釋液在 56℃ 作用 30 分鐘後，即完成去活化病毒的處理，確保實驗操作者的

安全。

病毒中和血清抗體試驗(Neutralization test)

由於 SARS 病毒目前已經被衛生署列為第四類法定傳染病，因此處理 SARS 檢體根據生物安全實驗室隔離設施之規定須於第二級(P2)以上實驗室，若需分離培養 SARS 病毒則需第三級(P3)以上之實驗室。因此，從事病毒中和血清抗體試驗必須在第三級(P3)實驗室內進行。

依據 Marx 等發表的文獻作修正[23]，對血清檢體進行病毒中和試驗。病毒中和能力效價數由 Vero E6 細胞決定。首先將疑似 SARS 病患的血清檢體培育在 56 的水浴槽中 30 分鐘。接著，將各 50 μ l，2 倍數系列稀釋的血清檢體(從 8 倍稀釋到 1024 倍稀釋)，加入等體積內含 SARS 冠狀病毒(50 tissue culture infective dose, TCID₅₀)於 96 孔盤的培養基中，在 37 中，培育 1 小時。最後，加入 100 μ l 調好細胞濃度的 Vero E6 細胞液(2×10^5 ml)於每孔穴中，蓋上蓋子後放入 37，5% CO₂ 培養箱，每天觀察有無細胞病理現象(Cytopathic effect, CPE)的出現。觀察 3~5 天後，記錄具有完全中和現象之最高稀釋倍數即為該疑似 SARS 病患的血清檢體的抗體中和效價。病毒中和試驗中，病患的血清檢體必須進行二重複試驗並且伴隨陽性與陰性對照組一同試驗。陽性對照組血清的來源是台灣地區確定 SARS 病患的血清檢體，陰性對照組血清的來源是健康自願者所捐贈的血清檢體。若同一病患的血清檢體二重複試驗差異超過 4 倍或更大，則此次試驗結果視為無效，必須重新進行試驗再確認。單一次疑似 SARS 病患的血清檢體的抗體中和效價大於或等於()1:16，判定該檢體為陽性；疑似 SARS 病患的急性期與恢復期配對血清檢體的抗體中和效價必須具備 4 倍上升，判定

該個案為 SARS 感染陽性病患。

hMPV 即時定量 PCR 試驗 (hMPV real-time PCR)

實驗所使用的引子以及探針序列參考 Mackay 等人所發表之文獻，依據 GenBank accession no. AF371337 hMPV 病毒株之 N 基因序列設計。

(1) 反轉錄實驗 (Reverse transcription)

利用 Invitrogen 廠牌之 SuperScript II Reverse Transcriptase 試劑組 (Cat. No. 18064-014)，反應總體積為 20 μ l，反應劑量依試劑說明書建議配製，反股引子 MPV01.1、dNTP 各加 2 μ l 與 8 μ l 的病原體萃取 RNA 混合，在 65 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘，接著放置於冰上加入 5 \times 第一股反應緩衝液 4 μ l、0.1 M DTT 2 μ l 與 RNase OUT inhibitor 1 μ l，放置 42 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘，最後加入 SuperScript II Reverse Transcriptase 1 μ l，接著進行反轉錄作用 42 $^{\circ}$ C 50 分鐘，70 $^{\circ}$ C 15 分鐘，可以得到單股 cDNA 片段。

(2) 即時定量 PCR 試驗 (real-time PCR)

即時定量 PCR 試驗以 Roche 公司之 LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} Hybridization Probes 試劑組 (Cat. No. 10928-042) 進行試驗，反應總體積為 20 μ l，引子濃度分別為 MPV 01.2 0.2 μ M MPV 02.2 1 μ M 反應終濃度，探針 TM 濃度為 0.25 μ M，即時定量 PCR 反應的實驗條件：

(A) 加熱 Activation 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘。

(B) 增幅 Amplification 95 $^{\circ}$ C 5 秒; 64 $^{\circ}$ C 10 秒; 72 $^{\circ}$ C 12 秒，進行 55 個循環。

(C) 冷卻 Melting and cooling 72 $^{\circ}$ C 30 秒; 40 $^{\circ}$ C 30 秒。

結果 (Result) :

單管反轉錄聚合酵素反應(multiplex RT-PCR : m RT-PCR)

檢測急性呼吸道感染病原體系統方法

本計畫利用 multiplex RT-PCR (m-RT-PCR)的方法，同時篩檢 SARS 冠狀病毒、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus , RSV)、副流行性感
冒病毒(parainfluenza virus , PIV)及腺病毒(adenovirus , ADV)等常引起嚴重
下呼吸道疾病的感染原，將針對以下 9 種病原體設計具專一性的引子對，
利用單管反轉錄聚合反應偵測病原體的存在，9 種病原體分別是引發嚴重
急性上呼吸道感染的 SARS 冠狀病毒(SARS-CoV virus)，常見引起急性
呼吸道感染(Acute Respiratory tract Infections , ARIs)的細菌性病原體肺炎
黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)；常見引起急性呼吸道感染(ARIs)的病毒
性病原體流行性感
冒病毒 A 型與 B 型(influenza A and B viruses) 副流行性
感冒病毒第 1 型、第 2 型與第 3 型(parainfluenzaviruses type 1 , type 2 , and
type 3)、呼吸道融合病毒(respiratory syncytial virus , RSV)、腺病毒
(adenovirus , ADV)等。由圖一(Figure 1.)所示，進行 SARS 冠狀病毒、流
行性感
冒病毒 A 型、流行性感
冒病毒 B 型、副流行性感
冒病毒第 1 型、副
流行性感
冒病毒第 3 型、呼吸道融合病毒、腺病毒及細菌性病原體肺炎黴
漿菌等 8 種病原體的個別單管 RT-PCR 反應，實驗分兩個步驟進行，先進行
RT 反應 42 ， 50 分鐘，接著進行聚合酵素鏈鎖反應黏合(annealing)步驟溫
度範圍分佈在 48~54 之間，可以看出單管個別進行 RT-PCR 反應，陽性對
照組皆可以被偵測出。將 8 種病原體的引子對混合在單一管進行偵測時，
初步將黏合步驟溫度設定在 50 ，目前可以偵測出包括 SARS 冠狀病毒、
流行性感
冒病毒 A 型、流行性感
冒病毒 B 型、腺病毒及細菌性病原體肺炎
黴漿菌等 5 種病原體，見圖二(Figure 2.)，其他 3 種病原體由於黏合步驟溫
度差異較大，有待進一步調整反應溫度再進行確認。初期實驗所使用的方

法為 RT 及 PCR 兩步驟分開進行，因應 SARS 病毒迅速傳播的特性，為了節省檢驗時間，達到增加檢驗時效的目的，利用 One step RT-PCR 的試劑組 (QIAGEN Inc., CA, USA)，單管一次反應進行病原體偵測，將 multiplex RT-PCR 實驗黏合步驟溫度在 50 ~54 之間尋找最適當的溫度，當黏合步驟溫度設定在 52 時可以得到 SARS-CoV 1、SARS-CoV 2、SARS-CoV 3、Inf A、Inf B、PIV-2、PIV-3、RSV、ADV 與 MP 等 8 種病原體明顯的 PCR 確認產物，見圖三(Figure 3.)，惟 PIV-1 的產物 317 bp 在此溫度下產量少，band 不明顯，無法明確的判斷病原體基因存在與否，進一部調整溫度至 53.5

可以得到 PIV-1 的產物 317 bp 明顯的 band，但是會出現 SARS-CoV 3、Inf B、PIV-2、PIV-3 與 ADV 消失或 band 不明顯的情況，故仍將 multiplex RT-PCR 實驗黏合步驟溫度設定在 52。以 SARS 即時定量 RT-PCR 的質體標準品當作檢體進行測試，使用 multiplex RT-PCR 方法，最低可以測出 10^2 copies/rxn 的標準品，見圖四(Figure 4.)。本實驗室已經蒐集 10 隻 SARS 陽性及弱陽性檢體，以及 200 隻陰性檢體作為測試樣本，檢驗本實驗方法，其中 SARS 弱陽性檢體共 4 隻，SARS 即時定量 RT-PCR 的測定值介於 $10^2 \sim 10^0$ copies/rxn 皆無法測出，其餘 6 隻 SARS 陽性檢體均可以 3 對 SARS 引子對 SARS-1、SARS-2 及 SARS-3 正確放大出分別為 109 bp、118bp 及 130 bp 大小的產物。此外，200 隻陰性檢體的測試樣本，僅偵測出 12 隻細菌性病原體肺炎黴漿菌(*Mycoplasma pneumoniae*)陽性檢體，比例為 6%，其餘病原體則未檢驗出。

截至繳交期末報告為止，細菌性病原體肺炎披衣菌(*Chlamydia pneumoniae*)及人類間質肺病毒(human metapneumoviruses, hMPV) 2 種病原體的陽性對照標準品尚在建立中，尚無法將這 2 種病原體加入 multiplex PCR 的檢驗中，其中人類間質肺病毒(hMPV)由於國內並無臨床檢體病毒

株作為研究的來源，本實驗室自美國愛荷華大學採購病毒株，自行進行病毒繁殖複製的工作，礙於該病毒繁殖複製觀察期長達 28 天，一次實驗週期冗長且著手進行，將其分別培養在 LLC-MK2 與 Hep-2C 細胞株中，希望可以大量繁殖複製病毒，用以當作陽性對照標準品，目前仍持續進行。hMPV 病原體確認方法已建立，利用 LightCycler (Roche Inc., CA, USA) 平台建立人類間質肺病毒的即時定量聚合酵素反應偵測系統(Real-Time RT-PCR Detection System)，以 N 基因為標的構築的質體系列稀釋建立標準曲線，見圖五(Figure 5.)。惟細菌性病原體肺炎披衣菌的樣本來源有問題，正設法解決陽性對照標準品及檢體來源等相關問題，所以 multiplex RT-PCR 的反應先進行其他 9 種引發嚴重急性上呼吸道感染病原體的偵測方法的建立。

追蹤監測可能病例的 SARS 冠狀病毒抗體

利用酵素連結免疫吸附分析(ELISA)及病毒中和抗體試驗(NT)持續對台北市內的可能病例的恢復期及癒後的血清抗體進行分析，利用本局實驗室資源管理組已經建檔保存的可能病例的血清及將來定期追蹤採檢的血清完成 SARS 病患的感染過程血清抗體研究。本計畫所使用的酵素連結免疫吸附分析是利用美國疾病管制中心(CDC, USA)提供之 Cor-SARS Human IgA, IgG, IgM (H&L) 檢驗試劑組進行，以病毒中和抗體試驗當作標準，則 ELISA 與之相比，其敏感性與特異性分別為 98.2%、98.7%，見表四(Table 4.)[38]。ELISA 實驗選擇台北市地區 SARS 疑似病例 74 人進行分析，年齡範圍介於 1 歲~62 歲之間，平均年齡 35 歲，標準差(SD)為 11.6 歲，可以觀察出抗 SARS-CoV IgM 的 121 件檢體中，在病患發燒症狀出現後第 85~223 天時間間距中出現下降的趨勢，見表二(Table 2.)；抗 SARS-CoV Total Ig 的 208 件檢體中，在病患發燒症狀出現後第 365~434 天時間間距中陽性率

達 71.87 %，見表三(Table 3.)，第 400 天後的 Total Ig 陽性率達 73.33 % (22/30)，目前偵測到最長天數為發燒症狀出現後 434 天。

討論:

截至今日 SARS-CoV 病原體的序列已經被完整的解開，數種檢驗 SARS-CoV 的方法也發展得很完備。然而感染 SARS 後的有效治療方法仍不明，所以早期精確的檢驗是有效控制 SARS 疫情的關鍵。目前普遍被使用於 SARS 的檢驗方法有三種，分別是酵素連結免疫吸附分析(enzyme-link immunosorbent assay，簡稱 ELISA)、分子生物學檢驗與細胞培養分離法。這三種方法分別具有不同的優點及缺點：酵素連結免疫吸附分析偵測 SARS 抗體，藉由偵測 SARS 病患出現症狀 21 天之後的血清抗 SARS 抗體來確定病患是否確實感染 SARS。酵素連結免疫吸附分析具有很高的專一性，但缺點是知道檢驗結果時已經太遲，不具檢驗時效性，無法提供有效防止疫情擴散的資訊。分子生物學檢驗主要是聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，PCR 可以檢測各種不同檢體內是否存在 SARS 基因體的存在(各種不同種類檢體，包括血液、糞便、呼吸道分泌物與組織切片等)。PCR 反應同樣具備高度專一性，但缺乏敏感性，主要是因為病毒可能尚未出現在病患的上述種類檢體中，或病毒量過低無法藉由增幅反應放大到可被偵測的量，有鑑於此，本計畫在實驗設計上分別針對 SARS-CoV 不同部位的基因設計引子對，見表一(Table 1.)，除了在病毒大量表現的棘蛋白(spike protein)設計外，另外設計在非結構蛋白基因 ORF 1b (nsp 11) 與參與病毒複製的 RNA-RNA polymerase 基因，希望藉此提高實驗的敏感性。雖然如此，陰性的 PCR 反應結果未必表示病患未感染 SARS。細胞培養病毒分離法主要是偵測活病毒的存在，病患的檢體接種細胞株，

若活病毒存在可以在特定的細胞株中繁殖複製。細胞培養病毒分離法是證實病毒存在不可或缺的檢驗方法，卻也是具高度危險性的方法，特別是面對像 SARS 這種高度傳染性病毒的情況。不過，細胞培養病毒分離法是目前唯一可以偵測活病毒存在的方法。

針對 SARS-CoV 的高危險性與高傳染性，可以快速釐清隔離被感染的病患，有效控制並且防止疫情擴散蔓延是衛生單位的第一目標。聚合酵素連鎖反應具備的快速與高度專一性正符合以上的需求，可以藉由敏感性的提升使得此方法更加完善。現行國內各大實驗室用以偵測 SARS-CoV 的即時定量 RT-PCR 系統是快速、精確的可同時定性與定量檢驗方法。在 SARS-CoV 被確認為感染原的初期，所有的檢驗方法都聚焦在 SARS-CoV，忽略會引起嚴重急性上呼吸道感染的其他種病原體，從衛生單位防疫者的觀點來看，可以同時區分並且鑑定多種引起嚴重急性上呼吸道感染病原體的方法是最佳選擇。現行的即時定量 RT-PCR 系統受限於儀器內部分析系統的限制及實驗原理的限制，目前最多以同時分析 3 種病原體 multiplex RT-PCR 為最理想的實驗設計。本計畫藉由傳統 RT-PCR 平台進行 multiplex RT-PCR 同時釐清可能引起嚴重急性上呼吸道感染 9 種病原體，篩檢去年 SARS 期間所蒐集 10 隻 SARS 陽性檢體及 200 隻陰性檢體，其中 SARS 弱陽性檢體共 4 隻，SARS 即時定量 RT-PCR 的測定值介於 $10^2 \sim 10^0$ copies/rxn 皆無法測出，其餘 6 隻 SARS 陽性檢體均可以 3 對 SARS 引子對 SARS-1、SARS-2 及 SARS-3 正確放大出分別為 109 bp 118bp 及 130 bp 大小的產物，本計畫 multiplex RT-PCR 的靈敏度在 10^2 copies/rxn。此外，200 隻陰性檢體的測試樣本，僅偵測出 12 隻細菌性病原體肺炎黴漿菌 (*Mycoplasma pneumoniae*) 陽性檢體，比例為 6%，其餘病原體則未檢驗出，相較於本局於 92 年 5 月肺炎黴漿菌與披衣菌檢出率 75%，甚至較低的 92 年 3、4 月檢

出率 25~40%而言，明顯偏低許多，其可能原因推測與病原體 RNA 的保存有關，RNA 在保存的過程中分解斷裂，尚需進一步以實驗證明。

就台灣地區的研究資料顯示，SARS 病患在發病 2 週內，以 real-time RT-PCR 偵測病毒 RNA 最為敏感，陽性率最高[38~40]，而在恢復期時(發病 3 週以上)，則以血清抗體的檢驗較佳。在抗體檢測方面，發現 ELISA 與 NT 之間相關性很高，其敏感性與特異性均高達 98% 以上，就檢驗時效及操作方便性而言，以 ELISA 較佳，但須注意的是目前本實驗室使用的是以全病毒當抗原的 ELISA 試劑組，對實驗操作人員極具威脅性，必需在 P3 等級實驗室進行，危險性很高，無法廣泛為一般等級實驗室使用，欲廣泛推廣 ELISA 檢驗方法，以重組蛋白作為抗原是當前許多實驗室研究的方向，SARS 病患的抗體反應比一般傳統病毒感染會延遲反應 1~2 週，以 ELISA 測試 SARS 抗體，在發病後 2 週可達 50%，3 週可達 80%，1 個月後可達 98%，在台灣地區有極少數病患被病毒感染確無抗體反應。本計畫所使用的 ELISA 試劑組是由美國疾病管制局所提供，具有高度敏感性與專一性，可偵測病患血清檢體內抗 SARS-CoV IgM 與 Total Ig 的組成。由實驗結果可以觀察出抗 SARS-CoV IgM 持續的時間較抗 SARS-CoV Total Ig 短，約在發燒症狀出現後第 84 天後開始下降，相較於中國大陸地區的研究顯示為發燒症狀出現後第 78~84 天後消失[1]，稍有差異但還算接近，有兩隻檢體在發燒症狀出現後第 200 天後仍出現抗 SARS-CoV IgM 則無法解釋。抗 SARS-CoV Total Ig 在發燒症狀出現後第 85~279 天的範圍內仍可以 100% 被偵測出。本計畫所使用的 ELISA 試劑組無法評估抗原專一性的抗 SARS-CoV IgG 與抗 SARS-CoV IgM 在抗原結構上的競爭效應。由持續性的抗 SARS-CoV Total Ig 偵測可以推測抗 SARS-CoV IgG 不只是在體液免疫反應中扮演對抗 SARS-CoV 感染的重要角色，同時在病患恢復期擔任清除殘餘病毒的工作，

還需更進一步的實驗加以證明。

圖表:



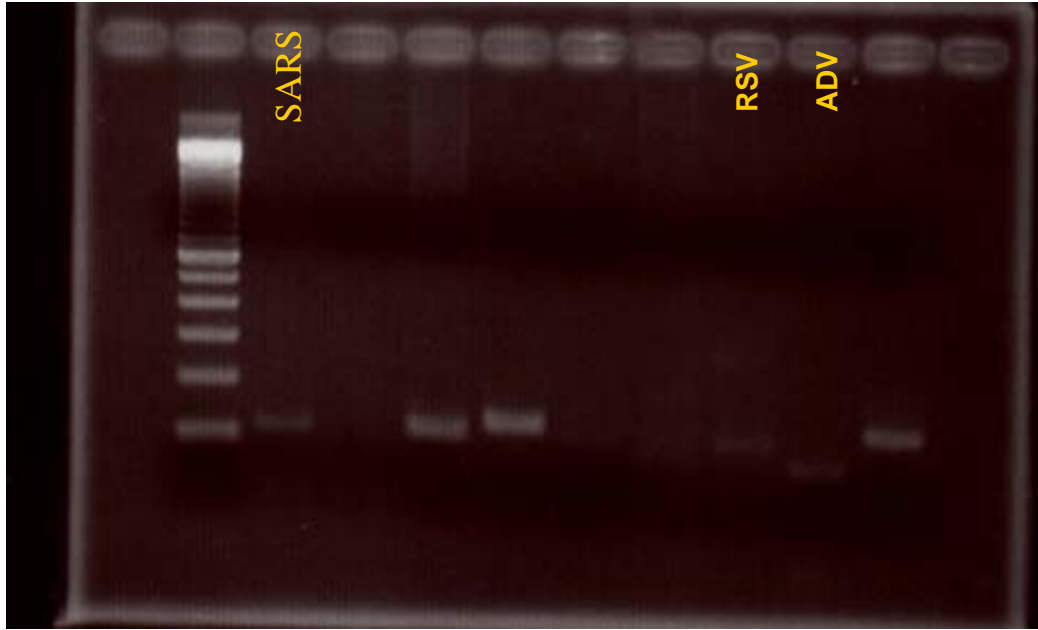


Figure 1. Separation of single tube RT-PCR products of each pathogens on agarose gel. A total 10 μ l of each of the single tube products was separated on a 2% agarose gel. The single tube RT-PCR was performed with 9 μ l of viral or bacterial nucleic acid as the template, as described in Materials and Methods. The expected product lengths are given in the text. The size of the DNA fragments of the 100 bp Marker (Invitrogen Inc, CA, USA) are as follows: 2,072 bp; 1,500 bp; 600 bp; 500bp; 400bp; 300bp; 200bp and 100 bp, respectively. Inf A, InfB, PIV-1, PIV-3, RSV, ADV and M P, influenza A, influenza B, parainfluenza type 1, parainfluenza type 3, respiratory syncytial virus, adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae*, respectively.

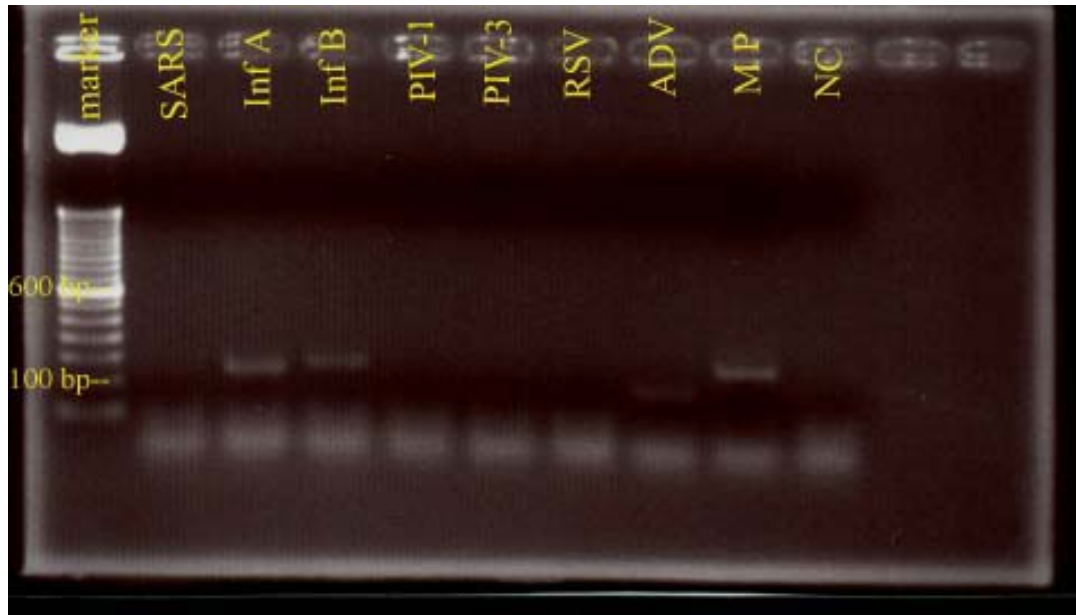


Figure 2. Separation of single tube RT-PCR products on agarose gel. A total 10 μ l of each of the single tube products was separated on a 2% agarose gel. The single tube RT-PCR was performed with 9 μ l of viral or bacterial nucleic acid as the template, as described in Materials and Methods. The expected product lengths are given in the text. The size of the DNA fragments of the 50 bp Marker (Invitrogen Inc, CA, USA) are as follows: 2,072 bp; 1,500 bp; 600 bp; 500bp; 400bp; 300bp; 200bp, 100 bp and 50 bp respectively. Inf A, InfB, PIV-1, PIV-3, RSV, ADV and M P, influenza A, influenza B, parainfluenza type 1, parainfluenza type 3, respiratory syncytial virus, adenovirus and *Mycoplasma pneumoniae*, respectively.

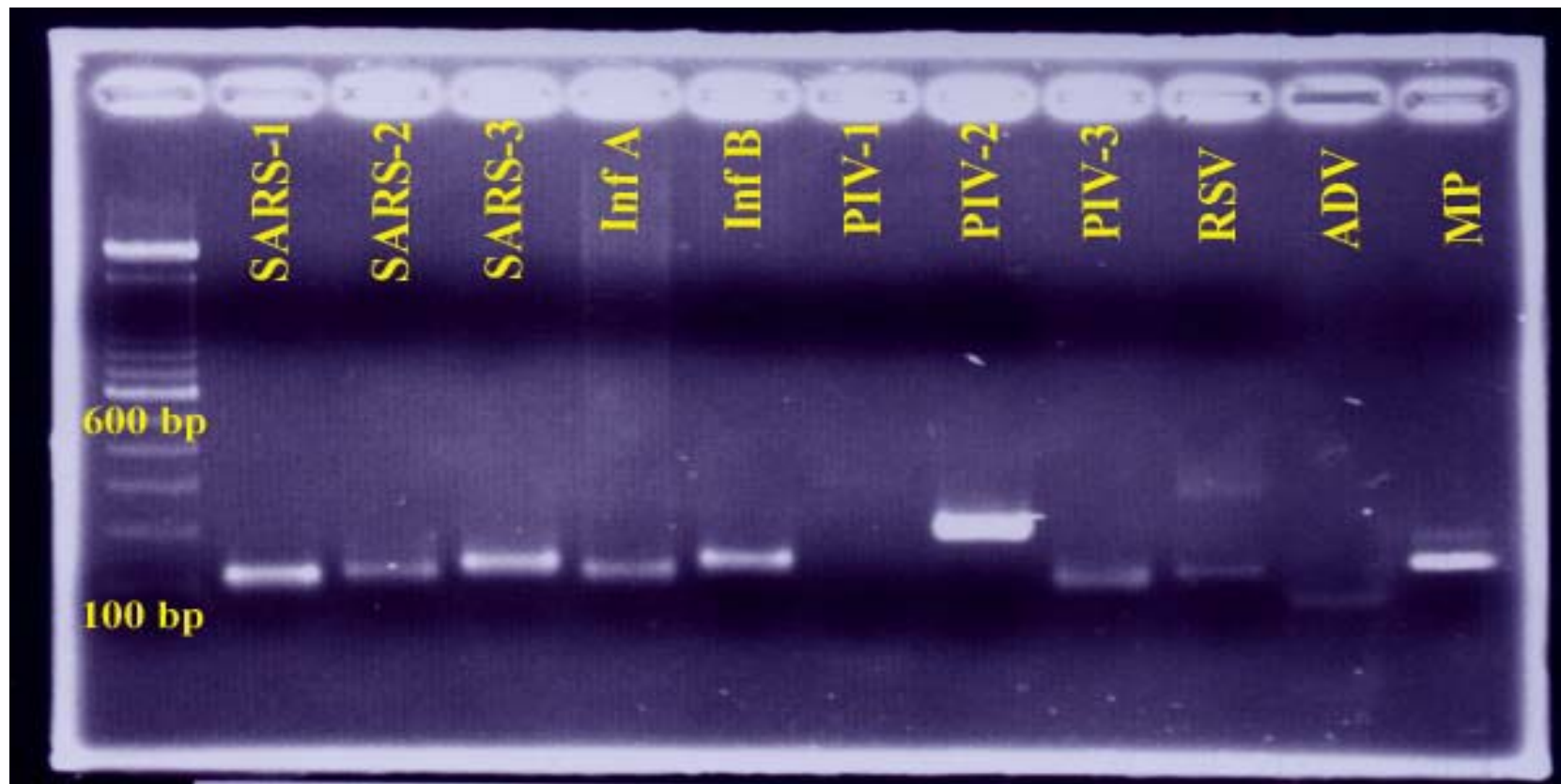


Figure 3. Separation of multiplex RT-PCR products on agarose gel. The single tube RT-PCR was performed with 9 μ l of viral or bacterial nucleic acid as the template, as described in Materials and Methods. The size of the DNA fragments of the 100 bp Marker (Invitrogen Inc, CA, USA) are as follows: 2,072 bp; 1,500 bp; 600 bp; 500bp; 400bp; 300bp; 200bp and 100 bp, respectively. Inf A, InfB, PIV-1, PIV-2, PIV-3, RSV, ADV and M P, **influenza A, influenza B, parainfluenza type 1, parainfluenza type 2, parainfluenza type 3, respiratory syncytial virus, adenovirus and Mycoplasma pneumoniae,** respectively.

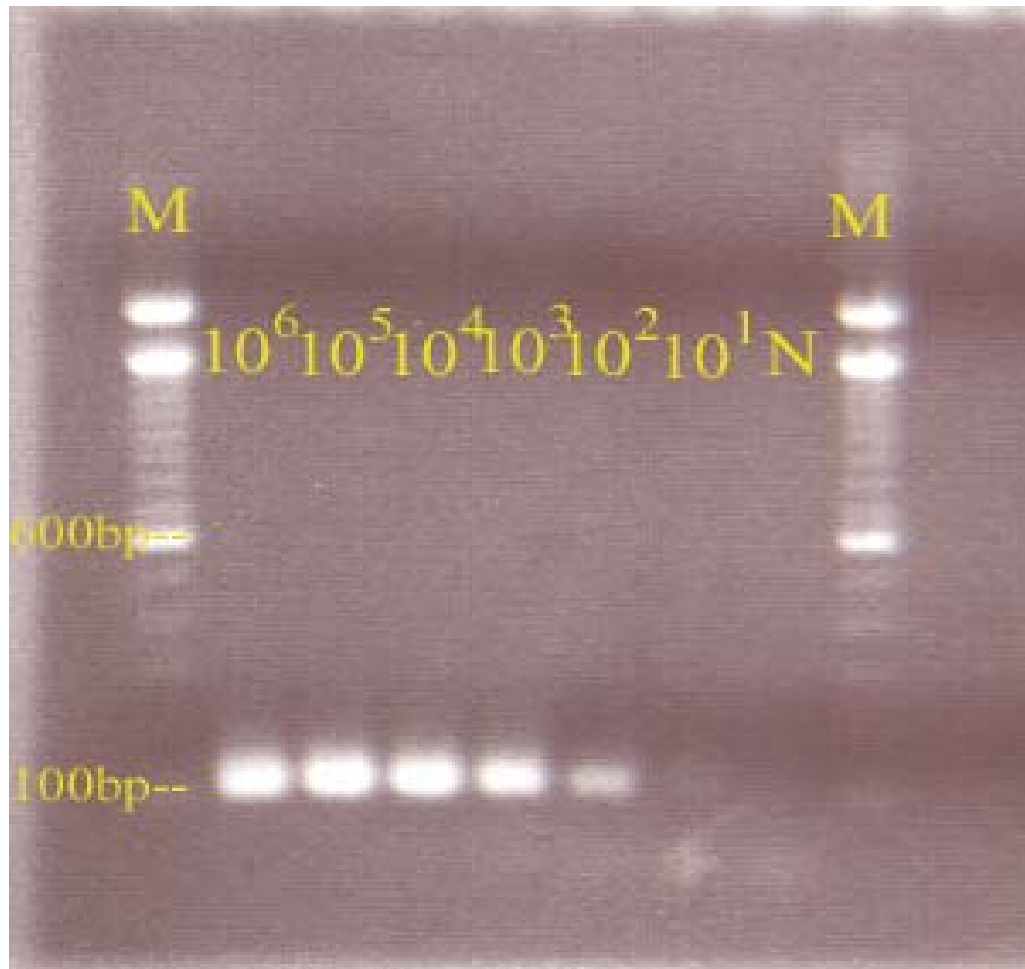


Figure 4. Multiplex RT-PCR was carried out with SARS real-time RT-PCR plasmid standard 10^6 copies/rxn, 10^5 copies/rxn, 10^4 copies/rxn, 10^3 copies/rxn, 10^2 copies/rxn, 10^1 copies/rxn and negative control. A 109 bp SARS RNA-RNA polymerase fragment was amplified using QIAGEN one-step RT-PCR kit. M: markers.

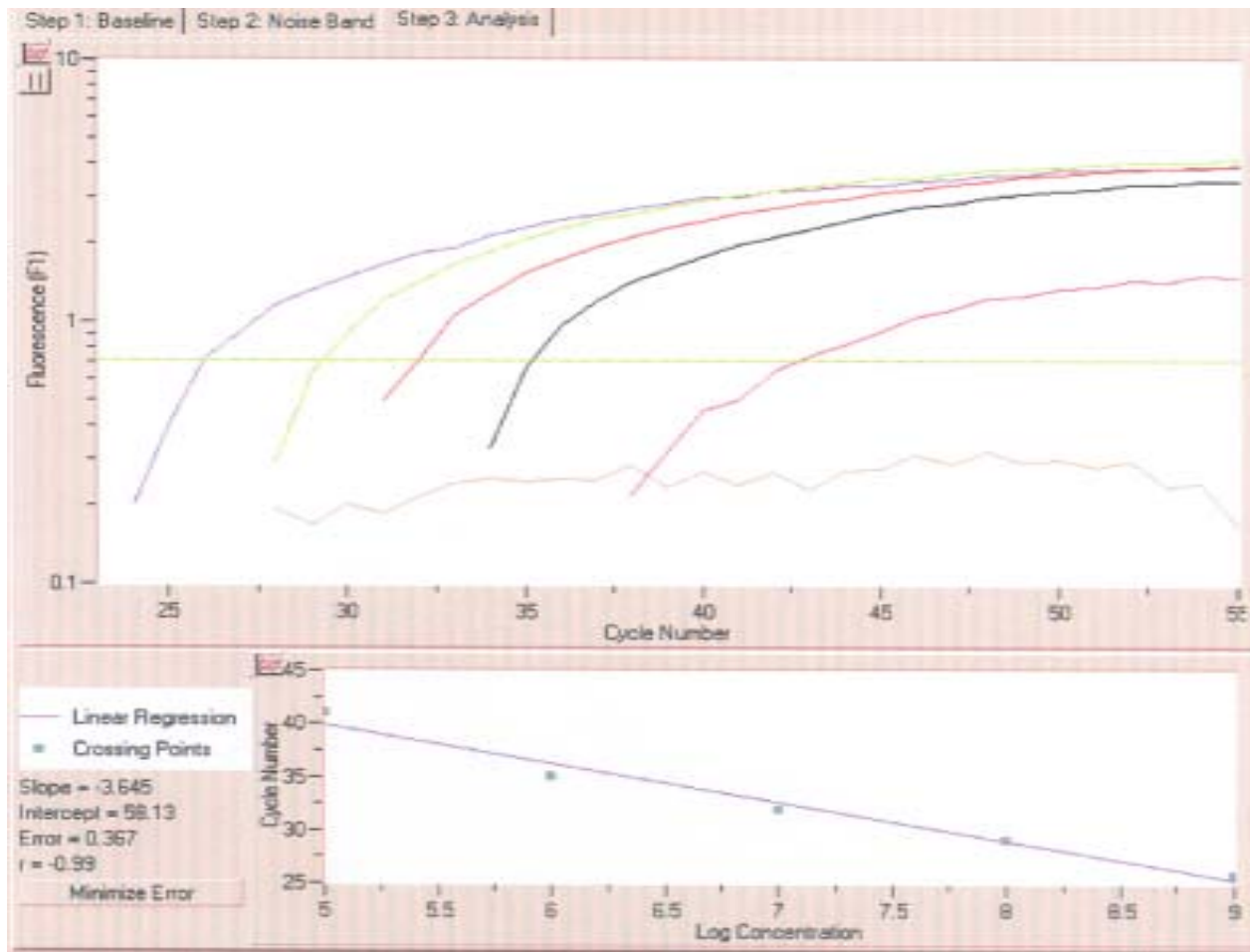


Figure 5. Standard curve of hMPV real-time PCR reaction.

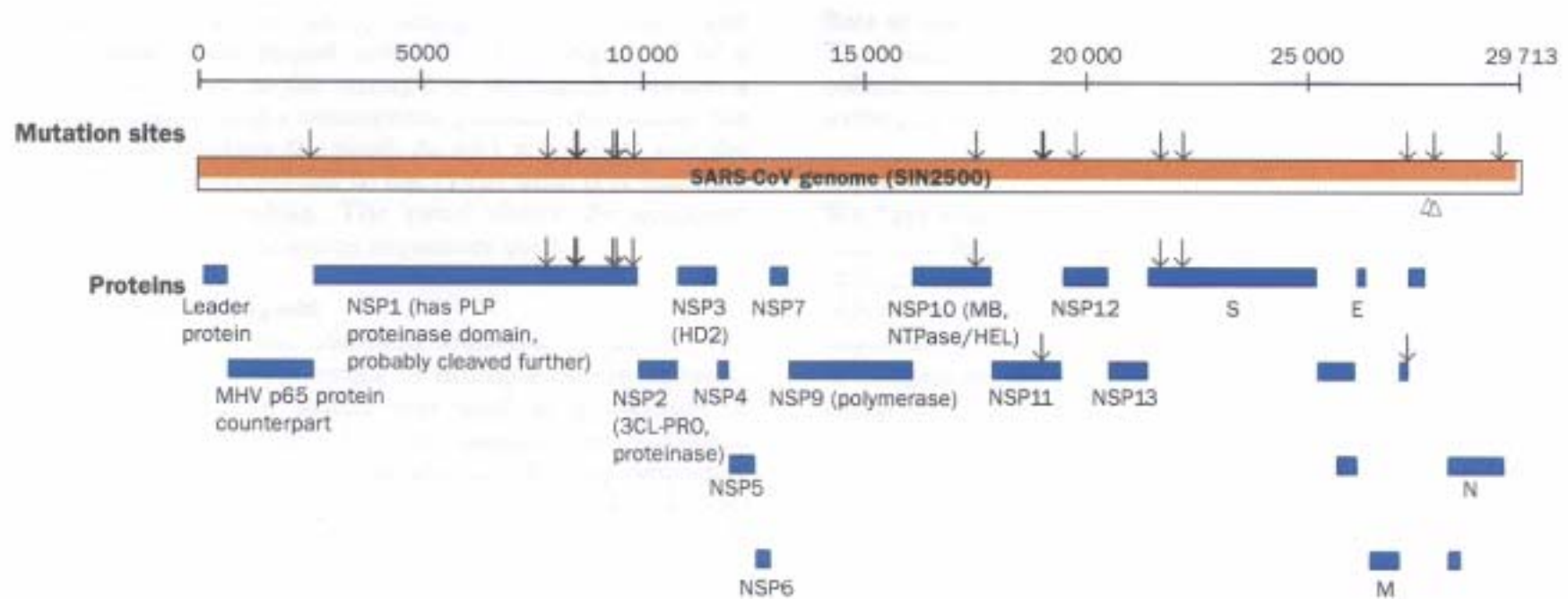


Figure 6. Genome structure of SARS-CoV

NSP=Non-structural proteins. S=spike protein. E=small envelop protein. N=nucleocapsid. M=Membrane protein. MHV=murine hepatitis virus. MD=metal binding. 3CL-PRO=3C-like proteinase. (According to Ruan Y-J, *et al.* Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *The Lancet.* 2003;361:1779-1785.

Table 1. Representative list of applications of multiplex PCR to the diagnosis of acute respiratory tract infections

Microorganisms	Target Gene	Product Sizes	Reference Strain
SARS-1	RNA-RNA polymerase	109 bp	AY278741
SARS-2	ORF 1b (nsp 11)	118 bp	AY278741
SARS-3	Surface Spike Protein	130 bp	AY278741
Influenza A	Nonstructural protein	120 bp	Buonagurio et al., 1986.
Influenza B	Nonstructural protein	137 bp	Yamashita et al., 1988.
PIV1	Haemagglutinin	317 bp	AF016280
PIV2	Haemagglutinin	204 bp	AF039937
PIV3	Haemagglutinin	103 bp	Z26523
RSV	Fusion glycoprotein	124 bp	Paton et al., 1992.
ADV	Hexon gene	86 bp	Hierholzer et al., 1993.
MP	16S rRNA	138 bp	Van Kuppeveld et al., 1992

Table 2. Detection of long –term surveillance of SARS-specific IgM antibodies

Course of disease (days)*	Samples (n)	Positives [n (%)]
		IgM
D1-D7	35	7 (20.0 %)
D8-D63	69	62 (89.95 %)
D64-D84	8	8 (100 %)
D85-D223	9	4 (44.44 %)
Total	121	

* Days were counted from fever onset.

Table 3. Detection of long –term surveillance of SARS-specific total Ig antibodies

Course of disease (days)*	Samples (n)	Positives [n (%)]
		IgM and/or IgG
D1-D7	35	0 (0 %)
D8-D63	82	76 (92.68 %)
D64-D84	16	15 (93.75 %)
D85-D279	39	32 (82.05 %)
D280-D365	4	3 (75 %)
D366-D434	32	23 (71.87 %)
Total	208	

*** Days were counted from fever onset.**

Table 4. Specificity, sensitivity, positive and negative predictive values of the tests evaluated for the ELISA serodiagnosis of SARS, in comparison to the neutralization test

Method	Results	No.	Neutralization test	
			Positive	Negative
ELISA	Positive	223	220	3
	Negative	246	4	242

Sensitivity: 98.2%; Positive predictive value: 98.7%; Specificity: 98.7%; Negative predictive value: 98.4%.

(According to Wu H-S, Chiu S-C, Tseng T-S, Lin S-F, Lin J-H, Hsu Y-C, Wang M-C, Lin T-L, Yang W-Z, Ferng T-L, Huang K-H, Hsu L-C, Lee L-L, Yang J-Y, Chen H-Y, Su S-P, Yang S-Y, Lin T-H, S I-J: Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2004;10:304-10.)

參考文獻：

1. Chen W-J, Xu Z-Y, Mu J-S, Yang L, Gan H-X, Mu F, Fan B-X, He B, Huang S-Y, You B, Yang Y-K, Tang X-J, Qiu L, Qiu Y, Wen J, Fang J-Q, Wang J: Antibody response and viraemia during the course of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus infection. *J Med Microbiol* 2004: 53:435-38.
2. Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, Beek Rv, Quint WGV, Masurel N: Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Meth* 1992:39:1-13.
3. Drosten C, Gunther S, Preiser W, *et al*: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003:348:1967-76.
4. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE: Multiplex PCR : optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000:13:559-70.
5. Echevarria JE, Erdman DD, Swierkosz EM, Holloway BP, Anderson LJ: Simultaneous detection and identification of human parainfluenza viruses 1, 2, and 3 from clinical samples by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1998:36:1388-91.
6. Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JAI, Schmitt HJ: Rapid identification of nine microorganism causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999:37:1-7.
7. **Hawkey PM, Bhagani S, Gillespie SH**: Severe acute syndrome (SARS) : breath-taking progress. *J Med Microbiol* 2003:52:609-13.
8. Hierholzer JC, Halonen PE, Dahlen PO, Bingham PG, Mcdonough MM: Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. *J Clin Microbiol* 1993:31:1886-1891.
9. Hoek LVD, Pyrc K, Jebbink MF, Vermeulen-Oost W, Berkhout RJM, Wolthers KC, Dillen PMEW, Kaandrop J, Berkhout B: Identification of a new human coronavirus. *Nature Med* 2004:21:1-6.
10. Hon KLE, Li AM, Cheng FWT: Personal view of SARS confusing definition, confusing diagnosis. *Lancet* 2003:361:1984.
11. Hourfar MK, Roth WK, Seifried E, Schmidt M: Comparison of two real-time quantitative assays for detection of Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 2004:42:2094-2110.
12. Hsueh P-R, Kao C-L, Lee C-N, Chen L-K, Ho M-S, Sia C, Fang XD, Lynn S,

- Chang T-Y, Liu S-K, Walfield AM, Wang C-Y: SARS antibody test for serosurveillance. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1558-62.
13. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS: A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-66.
 14. Kuppeveld FJMv, VAN DER LOGT JTM, Angulo AF, VAN Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, Galama JMD, Melchers WJG: Genus- and specific-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2606-15.
 15. Leong H-N, Chan K-P, Khan AS, Oon L, Se-Thoe S-Y, Bai XL, Yeo D, Leo YS, Ang B, Ksiazek TG, Ling A-E: Virus-specific RNA and antibody from convalescent-phase SARS patients discharged from hospital. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1745-50.
 16. Leung DTM, Tam FCH, Ma C-H, Chan PKS, Cheung JLK, Niu H, Tam JSL, Lim PL: Antibody response of patients with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) targets the viral nucleocapsid. *J Infect Dis* 2004;190:379-86.
 17. Leung GM, Chung P-H, Tsang T, Lim W, Chan SKK, Chau P, Donnelly CA, Ghani AC, Fraser C, Riley S, Ferguson NM, Anderson RM, Law Y-L, Mok T, Ng T, Fu A, Leung P-Y, Peris JSM, Lam T-H, Hedley AJ: SARS-CoV antibody prevalence in all Hong Kong patient contacts. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1653-56.
 18. Liang G-D, Chen Q-S, Xu J-G, Liu Y-F, Lim W, Peiris JSM, Anderson LJ, Ruan L, Li H, Kan B, Di B, Cheng P, Chan KH, Erdman DD, Gu S-Y, Yan X-G, Liang W-L, Zhou D-H, Haynes L, Duan S, Zhang X, Zheng H, Gao Y, Tong S-X, Li D-X, Fang L, Qin P-Z, Xu W-B, SARS Diagnosis Working Group. Laboratory diagnosis of four recent sporadic cases of community-acquired SARS, Guangdong province, China. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1774-81.
 19. Li G, Chen X, Xu A: Profile of specific antibodies to the SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med* 2003;349:508-9.
 20. Li L, Wo J, Shao J-B, Zhu H-H, Wu N-P, Li M-W, Yao H-P, Hu M-J, Dennin RH: SARS-coronavirus replicates in mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) from SARS patients. *J Clin Virol* 2003;28:239-44.
 21. Liu X, Shi Y-L, Li P, Li L-H, Yi Y-P, Ma Q-J, Cao C: Profile of antibodies to the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in probable SARS patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:227-228.
 22. Marra MA, Jones SJM, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, *et al*: The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science* 2003;300:1399-1404.

23. Marx PA, Bryant ML, Osborn KG, Maul DH, Lerche NM, Lowenstine LJ, *et al*: Isolation of a new serotype of simian acquired immune deficiency syndrome type D retrovirus from Celebes black macaques (*Macaca nigra*) with immune deficiency and retroperitoneal fibromatosis. *J Virol* 1985;56:571-8.
24. Nicholls JM, Peiris JSM, *et al*: Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. *The Lancet* 2003;361:1773-8.
25. Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harris RJ: Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1992;30:901-904.
26. Pearson H: Antibodies to SARS-like virus hint at repeated infections. *Nature* 2004;427:185.
27. Peiris JSM: Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *J Clin Virol* 2003;28:245-47.
28. Peiris JSM *et al*: Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus- associated SARS pneumonia: a prospective study. *The Lancet* 2003: 361 :1767-72.
29. Peret TCT, Boivin G, Anderson LJ, *et al*: Characterization of Human Metapneumoviruses Isolated from Patients in North America. *J Inf Dis* 2002;185: 1660-63.
30. Poon LLM, Chan K-H, Wong O-K, Yam W-C, Yuen K-Y, Guan Y, Lo YMD, Peiris JSM: Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol* 2003;28:233-38.
31. Poutanen SM, Low DE, Henry B, *et al*: Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med* 2003;348:1995-2005.
32. Riely S, Fraser C, and Anderson RA *et al*: Transmission Dynamics of the Etiological Agent of SARS in Hong Kong : Impact of Public Health Interventions. *Science* 23 May 2003.
33. Shi Y-L, Yi Y-P, Li P, Kuang T-J, Li L-H, Dong M, Ma Q-J, Cao C: Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:5781-82.
34. Tsang KW, *et al*: Temporal Relationship between Contact and the Onset of Symptoms in the 10 Patients with SARS. *N Engl J Med* 2003;March 31.
35. Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MFC, Kroes ACM, Claas ECJ: Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564-69.

36. Update: outbreak of severe acute respiratory syndrome – worldwide, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003;52:269-72.
37. Woo PCY, Lau SKP, Tsoi H-W, Chan K-H, Wong BHL, Che X-Y, Tam VKP, Tam SCF, Cheng VCC, Hung IFN, Wong SSY, Zheng B-J, Guan Y, Yuen K-Y: Relative rates of non-pneumonic SARS coronavirus infection and SARS coronavirus pneumonia. *Lancet* 2004;363:841-845.
38. Wu H-S, Chiu S-C, Tseng T-S, Lin S-F, Lin J-H, Hsu Y-C, Wang M-C, Lin T-L, Yang W-Z, Ferng T-L, Huang K-H, Hsu L-C, Lee L-L, Yang J-Y, Chen H-Y, Su S-P, Yang S-Y, Lin T-H, S I-J: Serologic and molecular biologic methods for SARS-associated coronavirus infection, Taiwan. *Emerg Infect Dis* 2004;10:304-10.
39. 王聖帆、李祥吉、陳豪勇及楊志元等:SARS 即時定量系統的建立與分析。 *疫情報導* 2003;19:153-168。
40. 林智暉、邱淑君、陳豪勇等:全球 SARS 風暴之台灣經驗。 *疫情報導* 2004;19:306-16.

