



非SARS患儿体内SARS冠状病毒抗体的检测分析

当前对急性重症呼吸综合征(SARS)已进行了很多基础和临床研究[1][2][3][4][5][6]。儿童是呼吸道感染的高发人群,但在SARS流行期间这部分人却很少被感染。究竟是儿童对SARS病毒不易感,还是儿童体内可能存在天然的SARS病毒抗体,目前还有不少争议。为摸清儿童极少患SARS的原因,我们采用已经国家药品生物制品检定所正式检定通过的2种SARS病毒抗体诊断试剂对广州地区1 060例非SARS患儿血清样本进行了检测,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 样本来源

收集广州市儿童医院和广州军区广州总医院儿科住院治疗的非SARS患儿血清样本1 060份,其中男676例,女394例;年龄最小出生4 h,最大16岁,平均4.9岁。各年龄阶段分布情况为0~1岁203例,1~3岁234例,3~6岁217例,6~9岁170例,9~12岁150例,12~16岁96例。

1.2 主要试剂和仪器

SARS病毒BJ01株感染的Vero E6细胞抗原片及FITC-羊抗人IgG及FITC-羊抗人IgM μ 链抗体由军事医学科学院微生物流行病学研究所祝庆余、司炳银两位老师惠赠;SARS病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒(双抗原夹心法)由军事医学科学院生物工程研究所研制并提供。荧光显微镜为日本Olympus公司 BX51型,酶标仪和洗板机分别为上海Thermo Lab-systems公司 Multiskan MK3型和郑州Biocell公司 AW1型。

1.3 间接免疫荧光检测(IFA)

患者或健康人血清用生理盐水作1:10稀释后,56 °C灭活30 min,再行倍比稀释后取10 μ l滴加于抗原片孔内,置湿盒中孵育30 min(测IgM则孵育1.5 h)。取出自来水冲洗,PBS振荡漂洗3次,每次3~5 min。凉干后滴加10 μ l FITC-羊抗人IgG(1:40 0.02%伊文氏兰染液稀释)或FITC-羊抗人IgM μ 链(1:20)抗体孵育30 min,洗涤同前,干后荧光显微镜下观察结果。检测时同时设立阴阳性对照。

1.4 双抗原夹心ELISA法检测

原理是包被在微孔板上的重组SARS冠状病毒主要抗原和血清中SARS冠状病毒抗体结合,然后加入辣根过氧化物酶标记的重组SARS冠状病毒主要抗原,形成“三明治”样夹心结构,通过四甲基联苯胺显色来测定SARS冠状病毒抗体(一次可同时检测IgG、IgM、IgA、IgD、IgE多种抗体)。每次实验设底物空白对照1孔,阴性对照3孔,阳性对照2孔。空白孔不加液体,阴、阳性对照直接取100 μ l加入反应孔内,其余检测孔先加入样品稀释液50 μ l,再加入血清样品50 μ l,混匀后37 °C温育30 min。用洗板机清洗板孔,重复5次,拍干。除空白孔外每孔加入100 μ l酶标抗原工作液,37 °C反应30 min,洗板后加入底物A、B液各50 μ l,37 °C避光温育20 min。显色完毕后,每孔加入终止液50 μ l终止反应,以底物空白孔调零,置酶标仪双波长(450 nm和630 nm)下读取D(λ)值。阳性对照D(λ)平均值大于阴性对照D(λ)平均值0.60以上,方可认为试剂有效并且操作无误。检测阈值=0.10+阴性对照D(λ)值[若阴性对照D(λ)值>0.05,则按阴性对照实际D(λ)值算;若阴性

对照D(λ)值 <0.05 ，则按 0.05 算]。被检血清D(λ)值 \geq 阈值，则判为初步阳性，需进行双孔复测，其中任一孔为阳性，则判为阳性。

2 结果

2.1 IFA镜下形态及检测结果

SARS病毒为单股正链RNA病毒，其复制在细胞浆内进行，故结果的判定主要是观察Vero E6细胞浆内有无特异性荧光产生[7]。感染新型冠状病毒的Vero E6细胞在荧光显微镜下呈椭圆形或圆形，阳性对照染色后，胞浆内或胞膜可见大小不一的特异性黄绿色明亮荧光，阴性对照染色细胞则成砖红色或土黄色，不发荧光(图1、2)。1 060份非SARS患儿血清样本染色后，镜下与阴性对照染色结果相仿，感染新型冠状病毒的Vero E6细胞未出现荧光，IgM、IgG检测均为阴性。

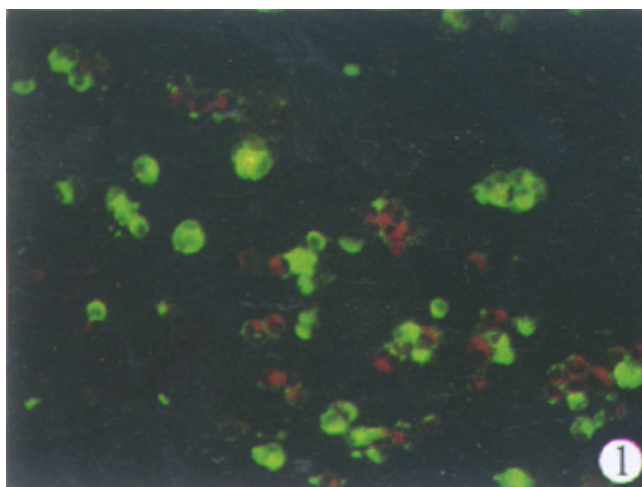


图1 阳性对照染色结果

Fig.1 Staining of the positive control

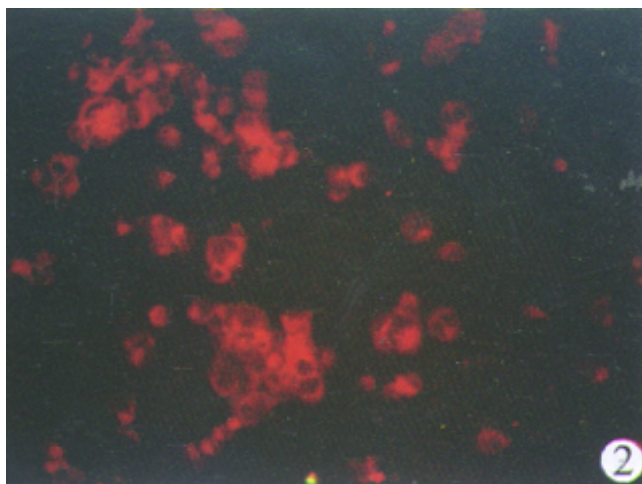


图2 阴性对照染色结果

Fig.2 Staining of the negative control

2.2 双抗原夹心ELISA法检测结果

用酶标仪读取D(λ)值后，发现阳性对照D(λ)值最小为 2.300 ，阴性对照D(λ)值最大为 0.012 ，对比非常明显。1 060份非SARS患儿血清样本经检测，1 041份D(λ)值较低，均在 0.050 以下；17份D(λ)值在 $0.050\sim 0.150$ ；仅有2份 ≥ 0.150 ，分别为 0.291 和 0.335 ，故判为阳性(表1)。

表 1 1 060 份非 SARS 患儿血清样本双抗原夹心 ELISA 检测结果

Tab.1 Results of ELISA for detecting serum SARS coronavirus-specific antibodies in 1 060 non-SARS children

D(λ)	0.000-0.010	0.010-0.050	0.050-0.100	0.100-0.150	≥ 0.150	Total
n	543	498	14	3	2	1 060

3 讨论

自2002年11月第1例传染性非典型肺炎病例出现以来,短短数月时间该传染病已在全球多个国家和地区流行。SARS主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播,其特点为起病急、病程快、传染性强、病死率高(WHO估计约为5%~15%) [8] [9]。截止到目前,全球SARS感染确诊患者已超过7000例。

但奇怪的是,本应是呼吸道感染高发人群的儿童,在此次SARS流行过程中却较少被累及。中华医学会儿科分会呼吸学组进行了相关调查,结果显示,北京14岁以下儿童确诊病例仅占SARS总病例的2.7%。从总体上看,在本次SARS流行中,儿童病例多为散发,在学校和托幼机构里没有出现流行情况。全国没有1个儿童因病情严重需要使用呼吸机治疗。SARS患儿死亡率也很低,在北京没有1例儿童死于SARS。这个值得关注的现象引起了科研人员的重视。首都儿科研究所采用华大吉比爱生物技术有限公司生产的SARS冠状病毒抗体间接ELISA诊断试剂盒(中国科学院和军事医学科学院微生物流行病学研究所联合研制),对249名今年和前年曾在该所就诊的儿童血清SARS抗体进行检测,竟发现有108名儿童SARS抗体阳性,阳性率高达43.37% [10]。这是否说明相当一部分儿童体内存有SARS相关抗体?为了验证此结论,作者选用了已经国家药品生物制品检定所正式检定通过的2种SARS抗体诊断试剂(间接免疫荧光检测试剂和双抗原夹心ELISA试剂)对广州地区1 060例涵盖各个年龄段的非SARS患儿血清样本进行了检测。结果显示,间接免疫荧光法检测 IgM、IgG均为阴性。而双抗原夹心ELISA法检测发现,1 058例患儿血清特异性抗体为阴性,且绝大多数(1 041/1 058)D(λ)值较低,均在0.050以下,17例D(λ)值介于0.050~0.150,仅有2例D(λ)值大于检测阈值。由于双抗原夹心ELISA试剂盒采用的是基因工程手段,在大肠杆菌中高效表达了SARS病毒的主要抗原,并在此基础上研制而成 [11],是否由于重组抗原纯度等因素导致了这2例弱阳性血清的出现,有待进一步探讨。

作者于今年4~7月在军事医学科学院微生物流行病学研究所参与SARS科研协作,先后对3种SARS抗体诊断试剂进行了对比研究。发现3种SARS抗体检测试剂中,双抗原夹心ELISA试剂和间接免疫荧光检测试剂特异性和灵敏度接近,而优于全病毒间接ELISA试剂 [12]。双抗原夹心ELISA试剂阳性样品的检测D(λ)值普遍较全病毒间接ELISA试剂高1~3倍,而在非SARS病人和健康人群中,平均D(λ)值较全病毒间接ELISA试剂低,且全病毒间接ELISA试剂可有2%~3%的假阳性率(待发表)。

因此,从我们的结果来看,可以初步认定,非SARS患儿体内并未存在SARS相关抗体。这进一步说明,SARS病原是一种全新的冠状病毒,以前从未在人群中流行过,在未感染者包括儿童体内都没有相应抗体的存在。首都儿科研究所采用全病毒间接ELISA在非SARS患儿血清中检测到如此高的阳性率,作者认为结果值得商榷。至于此次SARS流行过程中儿童较少被累及的真正原因,尚待进一步深入研究。

致谢: 本文承蒙第一军医大学热带医学研究所董文其教授指导,特此致谢。

(责任编辑: 杨金星)

参考文献:

[1] 蔡绍曦. 后“非典”时期“非典”的鉴别诊断[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 535-7.

Cai SX. Differential diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) in “post-SARS” stage [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 535-7.

- [2] 车小燕, 丘立文, 潘玉先, 等. SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 640-2.
- Che XY, Qiu LW, Pan YX, et al. Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 640-2.
- [3] 车小燕, 郝卫, 丘立文, 等. SARS病人SARS冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 637-9.
- Che XY, Hao W, Qiu LW, et al. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) to nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 637-9.
- [4] 朴英杰, 徐锡金, 朴仲贤, 等. 感染冠状病毒的大鼠胸腺组织超微结构观察[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 414-5.
- Piao YJ, Xu XJ, Piao ZX, et al. Ultrastructural observation of rat thymus tissue with coronavirus infection[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 414-5.
- [5] 王艳, 马文丽, 宋艳斌, 等. 反转录巢式PCR方法检测SARS冠状病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 421-3.
- Wang Y, Ma WL, Song YB, et al. Gene sequence analysis of SARS-associated coronavirus by nested RT-PCR[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 421-3.
- [6] 杨洁, 王战会, 陈金军, 等. SARS冠状病毒多聚酶基因临床检测方法的建立[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 424-7.
- Yang J, Wang ZH, Chen JJ, et al. Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 424-7.
- [7] 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 等. 典型肺炎病例中新生型冠状病毒的分离与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 106-12.
- Zhu QY, Qin ED, Wang CE, et al. Isolation and identification of a novel coronavirus from patients with SARS[J]. Chin Biotech, 2003, 23(4): 106-12.
- [8] Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20):1995-2005.
- [9] Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1986-94.
- [10] 新华网. 科研单位最新调查显示四成儿童体内有SARS抗体[N]. 京华时报, 2003-07-01.
- [11] 易艳萍, 李楚芳, 石玉玲, 等. SARS病毒核衣壳蛋白、膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达和纯化[J]. 中国生物工程学报, 2003, 18(4): 100-5.
- Yi YP, Li CF, Shi YL, et al. Expression and purification of nucleocapsid protein and membrane protein of SARS coronavirus in E.coli[J]. Chin J Biotech, 2003, 18(4): 100-5.
- [12] 石玉玲, 李林海, 徐德兴, 等. 广东地区严重急性综合征患者血清学调查[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(7): 572-4.
- Shi YL, Li LH, Xu DX, et al. Serological investigation on SARS patients in Guangdong province[J]. Med J Chin PLA, 2003, 28(7): 572-4.

参考文献:

- [1] 蔡绍曦. 后“非典”时期“非典”的鉴别诊断[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 535-7.

- Cai SX. Differential diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS) in “post-SARS” stage [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 535-7.
- [2] 车小燕, 丘立文, 潘玉先, 等. SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 640-2.
- Che XY, Qiu LW, Pan YX, et al. Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 640-2.
- [3] 车小燕, 郝卫, 丘立文, 等. SARS病人SARS冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 637-9.
- Che XY, Hao W, Qiu LW, et al. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) to nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 637-9.
- [4] 朴英杰, 徐锡金, 朴仲贤, 等. 感染冠状病毒的大鼠胸腺组织超微结构观察[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 414-5.
- Piao YJ, Xu XJ, Piao ZX, et al. Ultrastructural observation of rat thymus tissue with coronavirus infection[J]. J First Mil Med Univ/ Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 414-5.
- [5] 王艳, 马文丽, 宋艳斌, 等. 反转录巢式PCR方法检测SARS冠状病毒[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 421-3.
- Wang Y, Ma WL, Song YB, et al. Gene sequence analysis of SARS-associated coronavirus by nested RT-PCR[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 421-3.
- [6] 杨洁, 王战会, 陈金军, 等. SARS冠状病毒多聚酶基因临床检测方法的建立[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(5): 424-7.
- Yang J, Wang ZH, Chen JJ, et al. Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 424-7.
- [7] 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 等. 典型肺炎病例中新生型冠状病毒的分离与鉴定[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 106-12.
- Zhu QY, Qin ED, Wang CE, et al. Isolation and identification of a novel coronavirus from patients with SARS[J]. Chin Biotech, 2003, 23(4): 106-12.
- [8] Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20):1995-2005.
- [9] Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong[J]. N Engl J Med, 2003, 348(20): 1986-94.
- [10] 新华网. 科研单位最新调查显示四成儿童体内有SARS抗体[N]. 京华时报, 2003-07-01.
- [11] 易艳萍, 李楚芳, 石玉玲, 等. SARS病毒核衣壳蛋白、膜蛋白在大肠杆菌中的高效表达和纯化[J]. 中国生物工程学报, 2003, 18(4): 100-5.
- Yi YP, Li CF, Shi YL, et al. Expression and purification of nucleocapsid protein and membrane protein of SARS coronavirus in E.coli[J]. Chin J Biotech, 2003, 18(4): 100-5.
- [12] 石玉玲, 李林海, 徐德兴, 等. 广东地区严重急性综合征患者血清学调查[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(7): 572-4.
- Shi YL, Li LH, Xu DX, et al. Serological investigation on SARS patients in Guangdong province[J]. Med J Chin PLA, 2003, 28(7): 572-4.