

非 SARS 患儿体内 SARS 冠状病毒抗体的检测分析

李林海¹ 石玉玲¹ 李平³ 徐德兴¹ 袁根平² 顾晓琼² 张小玲² 马清钧³ 曹诚³ 渊广州军区广州总医院检验科袁广东 广州 510010 日广州市儿童医院检验科袁广东 广州 510120 日军事医学科学院生物工程研究所袁北京 100071 冤

摘要目的 探讨非急性重症呼吸综合征渊ARS冤患儿体内是否存在 SARS 冠状病毒相关抗体遥 方法 采用国家药品生物制品检定所正式检定通过的 2 种 SARS 抗体诊断试剂渊间接免疫荧光检测试剂和双抗原夹心 ELISA 试剂冤对广州地区 1 060 例非 SARS 患儿血清样本进行检测遥 结果 1 060 例非 SARS 患儿血清样本渊间接免疫荧光法检测 IgM 和 IgG 均为阴性渊双抗原夹心 ELISA 法检测也仅有 2 例出现弱阳性渊结论 非 SARS 患儿体内并未存在 SARS 病毒相关抗体遥 关键词 急性重症呼吸综合征渊ARS冤 儿童 抗体 袁 SARS 冠状病毒 / 分析 日 诊断试剂
中图分类号 院 563.13 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588(2003)10-1085-03

Detection and analysis of SARS coronavirus-specific antibodies in sera from non-SARS children

LI Lin-hai¹, SHI Yu-ling¹, LI Ping³, XU De-xing¹, WAN Gen-ping², GU Xiao-qiong², ZHANG Xiao-ling², MA Qing-jun³, CAO Cheng³

¹Department of Clinical Laboratory, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China; ²Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Children's Hospital, Guangzhou 510120, China; ³Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Objective To examine the presence of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus-specific antibodies in the sera from non-SARS children. Methods Indirect immunofluorescent assay and double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were used to detect the virus-specific antibodies in sera of 1 060 non-SARS children in Guangzhou. Results All the serum samples from the 1 060 non-SARS children were negative for both IgG and IgM antibodies against SARS coronavirus as determined by indirect immunofluorescent assay, with only two serum samples showing weak positivity for SARS coronavirus-specific antibodies identified by double-antigen sandwich ELISA. Conclusion No SARS coronavirus-specific antibody are present in the sera of non-SARS children.
Key words: severe acute respiratory syndrome (SARS), children; antibody, SARS coronavirus/ analysis; diagnosis reagent

当前对急性重症呼吸综合征渊ARS冤已进行了很多基础和临床研究^{渊-6}遥儿童是呼吸道感染的高发人群袁但在 SARS 流行期间这部分人却很少被感染遥究竟是儿童对 SARS 病毒不易感袁还是儿童体内可能存在天然的 SARS 病毒抗体袁目前还有不少争议遥为摸清儿童极少患 SARS 的原因袁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袁结果报告如下遥

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 份袁其中男 676 例袁女 394 例袁年龄最小出生 4 h袁最大 16 岁袁

平均 4.9 岁遥各年龄阶段分布情况为 0~1 岁 203 例袁 1~3 岁 234 例袁 4~6 岁 217 例袁 7~9 岁 170 例袁 10~12 岁 150 例袁 13~16 岁 96 例遥

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 链抗体由军事医学科学院微生物流行病学研究所祝庆余尧炳银两位老师惠赠渊SARS 病毒抗体酶联免疫诊断试剂盒渊双抗原夹心法冤由军事医学科学院生物工程研究所研制并提供遥荧光显微镜为日本 Olympus 公司 BX51 型袁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 型遥

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 颀稀释后袁 56 益灭活 30 min袁再行倍比稀释后取 10 滋滴加于抗原片孔内袁置湿盒中孵育 30 min 渊渊渊 IgM 则孵育 1.5 h 冤冤取出自来水冲洗袁 PBS 振荡漂洗 3 次袁每次

收稿日期 院 003-07-23
作者简介 院李林海渊972- 冤男袁云南洱源人袁 2002 年毕业于第一军医大学袁士尧主管技师遥电话 院 20-61653458 袁 e-mail: linhaili@hotmail.com

3~5 min 遥凉干后滴加 10 滋 FITC- 羊抗人 IgG 渊颀 0.02% 伊文氏兰染液稀释 颀 FITC- 羊抗人 IgM 滋链 (1 颀) 抗体孵育 30 min 颀洗涤同前 颀后荧光显微镜下观察结果 遥检测时同时设立阴阳性对照 遥

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 颀后加入辣根过氧化物酶标记的重组 SARS 冠状病毒主要抗原 颀形成野 明治洋夹心结构 颀通过四甲基联苯胺显色来测定 SARS 冠状病毒抗体 渊一次可同时检测 IgG 颀 IgM 颀 IgA 颀 IgD 颀 IgE 多种抗体 颀每次实验设底物空白对照 1 孔 颀阴性对照 3 孔 颀阳性对照 2 孔 颀空白孔不加液体 颀阴性对照直接取 100 滋 加入反应孔内 颀其余检测孔先加入样品稀释液 50 滋 颀再加入血清样品 50 滋 颀混匀后 37 益温育 30 min 遥用洗板机清洗板孔 颀重复 5 次 颀拍干 遥除空白孔外每孔加入 100 滋 酶标抗原工作液 颀 7 益反应 30 min 颀洗板后加入底物 A 颀液各 50 滋 颀 7 益避光温育 20 min 遥显色完毕后 每孔加入终止液 50 滋 终止反应 颀以底物空白孔调零 颀置酶标仪双波长 (450 nm 和 630 nm) 下读取 D(姿

值 遥阳性对照 D(姿平均值大于阴性对照 D(姿平均值 0.60 以上 颀方可认为试剂有效并且操作无误 遥检测阈值 = 0.10+ 阴性对照 D(姿值 [若阴性对照 D(姿值 > 0.05 颀则按阴性对照实际 D(姿值算 E 若阴性对照 D(姿值 < 0.05 颀则按 0.05 算] 遥被检血清 D(姿值逸阈值 颀判为初步阳性 颀需进行双孔复测 颀其中任一孔为阳性 颀则判为阳性 遥

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 颀其复制在细胞浆内进行 颀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 颀 颀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 颀阳性对照染色后 颀胞浆内或胞膜可见大小不一的特异性黄绿色明亮荧光 颀阴性对照染色细胞则成砖红色或土黄色 颀不发荧光 颀 1 尧 颀 1 060 份非 SARS 患儿血清样本染色后 颀镜下与阴性对照染色结果相仿 颀感染新型冠状病毒的 Vero E6 细胞未出现荧光 颀 IgM 颀 IgG 检测均为阴性 遥

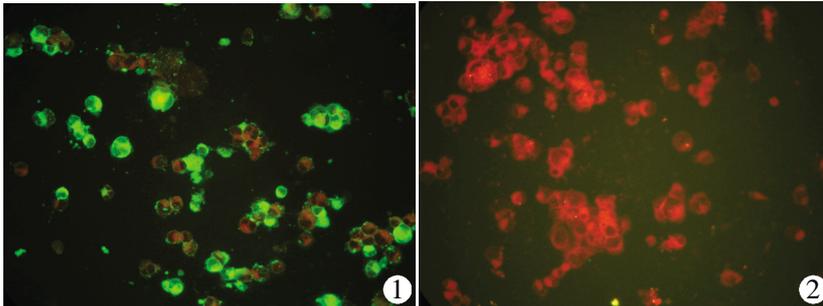


图 1 阳性对照染色结果
Fig.1 Staining of the positive control
图 2 阴性对照染色结果
Fig.2 Staining of the negative control

2.2 双抗原夹心 ELISA 法检测结果

用酶标仪读取 D(姿值后 颀发现阳性对照 D(姿值最小为 2.300 颀阴性对照 D(姿值最大为 0.012 颀对比非常明显 遥 1 060 份非 SARS 患儿血清样本经检测 颀 041 份 D(姿值较低 颀均在 0.050 以下 曰 7 份 D(姿值在 0.050~0.150 曰 仅有 2 份 逸 0.150 颀分别为 0.291 和 0.335 颀故判为阳性 颀表 1 颀

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(姿	0.000-0.010	0.010-0.050	0.050-0.100	0.100-0.150	逸 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 颀短短数月时间该传染病已在全球多个国家

和地区流行 遥 SARS 主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播 颀其特点为起病急 颀病程快 颀传染性强 颀病死率高 渊 WHO 估计约为 5%~15% 颀 颀截止到目前 颀全球 SARS 感染确诊患者已超过 7 000 例 遥

但奇怪的是 颀本应是呼吸道感染高发人群的儿童 颀在此次 SARS 流行过程中却较少被累及 遥 中华医学会儿科分会呼吸学组进行了相关调查 颀结果显示 颀北京 14 岁以下儿童确诊病例仅占 SARS 总病例的 2.7% 遥 从总体上看 颀在本次 SARS 流行中 颀儿童病例多为散发 颀在学校和托幼机构里没有出现流行情况 遥 全国没有 1 个儿童因病情严重需要使用呼吸机治疗 遥 SARS 患儿死亡率也很低 颀在北京没有 1 例儿童死于 SARS 遥 这个值得关注的现象引起了科研人员的高度重视 颀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 渊中国科学院和军事医学科学院微生物流行

病研究所联合研制,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,发现有 108 名儿童 SARS 抗体阳性,阳性率高达 43.37%。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 和 G 均为阴性,而双抗原夹心 ELISA 法检测发现 058 例患儿血清特异性抗体为阴性,且绝大多数 (041/1 058) 的 D 值较低,均在 0.050 以下,只有 7 例 D 值介于 0.050~0.150,又有 2 例 D 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,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。双抗原夹心 ELISA 试剂阳性样品的检测 D 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 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,特发表。

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,ARS 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,笔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:院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。

参考文献

- 咱 蔡绍曦. 后非典时期非典的鉴别诊断. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun

Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(6): 535-7.

- 咱 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. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 640-2.
- 咱 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. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(7): 637-9.
- 咱 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. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 414-5.
- 咱 王艳, 马文丽, 宋艳斌, 等. 反转录巢式 PCR 方法检测 SARS 冠状病毒. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 421-3.
- 咱 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. 咱 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. 咱 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2003, 23(5): 424-7.
- 咱 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 等. 典型肺炎病例中新型冠状病毒的分离与鉴定. 咱 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. 咱 Chin Biotech, 2003, 23(4): 106-12.
- 咱 Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. 咱 N Engl J Med, 2003, 348(20): 1995-2005.
- 咱 Lee N, Hui D, Wu A, et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. 咱 N Engl J Med, 2003, 348(20): 1986-94.
- 咱 新华网. 科研单位最新调查显示四成儿童体内有 SARS 抗体. 咱 京华时报, 2003-07-01.
- 咱 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. 咱 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. 咱 Chin J Biotech, 2003, 18(4): 100-5.
- 咱 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. 咱 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. 咱 Med J Chin PLA, 2003, 28(7): 572-4.

责任编辑 陶金星 冤