

恢复期 SARS 患者排泄物中 SARS-CoV 核酸的定量检测[△]

国家 SARS 防治紧急科技行动北京组[#]

摘要 目的 探讨恢复期严重急性呼吸综合征 (SARS) 患者是否携带病毒及具有传染性。方法 选择 SARS 抗体 (ELISA 检测法) 阳性的 177 例恢复期 SARS 患者, 利用实时定量 PCR 法对患者的尿、粪便、咽漱液共 531 份标本中的 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 核酸进行定量检测。结果 177 例患者中有 49 例 (27.7%) 标本病毒核酸检测阳性, 其中 31 例 (17.5%) 1 种标本阳性, 14 例 (7.9%) 2 种标本阳性, 4 例 (2.3%) 3 种标本阳性。尿、粪便、咽漱液的检出阳性率分别为 14.7% (26 例)、11.9% (21 例) 和 13.6% (24 例)。标本中病毒核酸的拷贝数在 100~47 000 copies/ml 之间, 3 种标本中病毒核酸不同拷贝数量级的患者阳性例数经 χ^2 检验无明显差异。结论 住院中的恢复期 SARS 患者约有十分之一仍然携带 SARS-CoV。有必要将 SARS 冠状病毒核酸的实时定量 PCR 检测作为 SARS 患者出院与解除隔离的实验室指标。

关键词 严重急性呼吸综合征 SARS 冠状病毒 排泄物 实时定量 PCR 恢复期
中图分类号 R373-1

Quantitative Detection of SARS-CoV RNA in Excreta and Oropharyngeal Washing Fluid from Convalescence Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome[△]

National Research Project for SARS, Beijing Group[#]

Objective To detect the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) RNA in excreta and oropharyngeal washing fluid (OWF) from the convalescence SARS patients, and to determine whether convalescence patients carry the SARS-CoV, and whether having infectivity. **Methods** Totally 531 samples (including urine, stool, and OWF) were collected from 177 convalescence patients with positive SARS antibody which were confirmed by ELISA method. Real-time quantitative PCR was performed to detect the RNA of the SARS-CoV, and results were analyzed by SPSS analysis software. **Results** There were 49 (27.7%) cases of SARS-CoV RNA detection positive in 177 patients, including 31 (17.5%) cases with one sample positive, 14 (7.9%) cases with two samples positive, and 4 (2.3%) cases with three samples positive. The positive rates of urine, stool, and OWF were 14.7% (26/177), 11.9% (21/177), and 13.6% (24/177), respectively. The quantity of SARS-CoV RNA in samples was 100–47 000 copies/ml. No significant difference was found among urine, stool, and OWF on the difference grade quantity of SARS-CoV RNA quantity. **Conclusions** About 10% convalescence SARS patients might still carry the SARS-CoV in hospitalization. The detection of SARS-CoV RNA by real-time quantitative PCR may become a laboratory examination warranty for convalescence SARS patients to discharge hospital and relieve separation.

Key words severe acute respiratory syndrome; SARS coronavirus; excreta; real-time quantitative polymerase chain reaction; convalescence

Acta Acad Med Sin, 2004,26(3):251~254

[△] 国家 SARS 防治紧急科技行动基金 (2003AA208102) 资助 Supported by the National Research Project Foundation for SARS (2003AA208102);

[#] Corresponding author: Lu Yue-ping, Wang Chen, Basic Medical Research Center, Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020. Tel: 010-85231614, Fax: 010-65064135, E-mail: yuepinglv@hotmail.com

严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS), 主要是通过近距离接触、飞沫和其他不明途径传播^[1,2]。目前已确认 SARS 是由一种新型冠状病毒 (SARS coronavirus, SARS-CoV) 感染所致^[3-6], 利用 PCR 凝胶电泳和实时定量 PCR 核酸检测技术对发病早期 SARS 患者各种标本中 SARS-CoV 核酸检出率达到 60%~70%^[7,8], 为临床早期诊断、筛查患者提供了一种有效的实验室检测方法。迄今对恢复期 SARS 患者是否携带 SARS-CoV 及是否有传染性、患者何时出院与解除隔离均缺乏完整的标准, 只能依靠患者的临床表现和胸部 X 线影像学变化做出判断^[9]。本研究通过检测恢复期 SARS 患者咽漱液和排泄物中 SARS-CoV 核酸, 探讨恢复期 SARS 患者是否携带、排出病毒及是否具有传染性, 同时试图为临床上判定患者是否达到出院及解除隔离的标准提供实验室检测依据。

对象和方法

研究对象 病例来源于 2003 年 3~4 月发病的北京地区 14 所 SARS 定点医院 177 例入院患者, 年龄 16~82 岁, 平均 (37.8±1.6) 岁; 病程 28~72 d, 平均 (37.3±0.7) d; 男性 74 例, 女性 103 例。临床诊断符合中华人民共和国卫生部颁布的《传染性非典型肺炎的诊断标准》。恢复期标准参照美国 CDC2003 年 7 月 18 日公布的恢复期血清收集标准, 选择发病后 28 d (含 28 d) 以上的住院治疗患者。

标本采集 参考 WHO 公布的标本采集方法, 按下述方法收集标本, 同时收集患者的临床基本信息, 并采集患者静脉非抗凝血 2 ml 进行血清 SARS 抗体的检测。咽漱液: 在采集咽漱液前, 要求患者在饭后禁止饮水或进零食, 2 h 后采样。先用生理盐水反复冲洗咽喉部 20~30 s, 然后将咽漱液吐入 10 ml 无菌试管内封口。取咽漱液 5 ml, 存放于-80℃冰箱内待测。尿液: 使用 15 ml 灭菌离心管收集患者晨尿中后段约 10 ml, 存放于-80℃冰箱内待测。粪便: 采用医院常规粪便采集方法, 使用 50 ml 灭菌离心管收集约 20 g 粪便, 存放于-80℃冰箱内待测。

标本的处理和病毒 RNA 的提取 取 1 g 粪便, 加入 1 ml 生理盐水制成悬液, 振荡 30 min 后取 140 μl 上清用于提取病毒 RNA, 咽漱液与尿则直接取 140 μl 用于病毒 RNA 的提取。上述各项操作均在北京朝阳医院 P2 实验室生物安全柜 (LABCONCO

公司, 美国) 内进行, 使用 QIAamp Viral RNA mini Kit 试剂盒 (QIAGEN 公司, 德国), 按照说明书所述实验步骤提取 RNA, 存放于-80℃冰箱内。

RNA 反转录合成 cDNA 采用 Reverse-Transcription Kit 试剂盒 (Promega 公司, 美国), 按照说明书所述实验步骤进行 cDNA 反转录合成。

实时定量 PCR 检测 使用 SARS-CoV 核酸扩增荧光检测试剂盒 (中山大学达安基因股份有限公司, 中国), 按照说明书所述实验步骤及条件在 PE-5700 型 PCR 扩增仪 (ABI 公司, 美国) 上进行 cDNA 扩增和定量结果分析。

SARS-CoV RNA 的确认 选择实时定量 PCR 法检测阳性标本的 cDNA, 采用 PCR Amplification Kit 扩增试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本) 进行片断扩增。条件为: 93℃ 2 min; 93℃ 15 s, 55℃ 15 s, 72℃ 20 s, 10 个循环; 93℃ 15 s, 58℃ 30 s, 35 个循环。SARS-CoV 核酸引物序列: SARS (F) 5'-GAAGCT ATTGCTACGTTTCG-3'; SARS (R) 5'-TAACCAGTAGG TACAGCTAC-3'。用本实验室常规测序方法^[10], 在 ABI-373 型测序仪 (ABI 公司, 美国) 上测定扩增产物序列, 并与公布的 SARS-CoV 序列进行同源性比较, 对扩增的 SARS-CoV RNA 片段进行确认。

酶联免疫吸附试验检测法 使用 SARS-CoV 抗体 (IgM/IgG) 诊断试剂盒 (ELISA 法) (华大吉比爱生物技术有限公司, 中国), 按照说明书所述实验步骤检测患者的血清 SARS 抗体并判定结果。

统计学处理 应用 SPSS Ver. 6.0 软件包, 对统计数据中 3 种标本的病毒核酸拷贝平均数进行 *t* 检验, 对 3 种标本中病毒核酸拷贝数的不同数量级阳性例进行 χ^2 检验分析。

结果

实时定量 PCR 检测结果 判定以 Ct 值在 27 以下为病毒核酸的检出阳性, 此时检出的病毒拷贝数均大于 100 copies/ml 以上。177 例 SARS 患者中 49 例患者的标本有 SARS-CoV 核酸检出, 占总数的 27.7%, 其中 3 种标本同时阳性者 4 例 (2.3%), 2 种标本同时阳性者 14 例 (7.9%), 1 种标本阳性者 31 例 (17.5%)。尿、粪便、咽漱液病毒核酸检出阳性者分别为 26 (14.7%)、21 (11.9%) 和 24 例 (13.6%), 各组差异无显著性 (附表)。3 种标本病毒核酸定量以每毫升病毒核酸拷贝数为单位, 结果

尿液为 128~14 000 copies/ml, 平均 (2 300 ± 599) copies/ml; 粪便 100~47 000 copies/ml, 平均 (6 663 ± 2 765) copies/ml; 咽漱液 190~15 000 copies/ml, 平均 (2 671 ± 676) copies/ml。3 种标本的平均拷贝

数经 *t* 检验显示各标本拷贝数的平均值差异无显著性 ($P > 0.05$)。

标本阳性率与患者性别、年龄和病程经分组统计分析及 χ^2 检验均无明显差异 (数据未列出)。

附表 各种标本阳性率及标本中不同数量级的阳性病例数与 χ^2 检验结果

Grade quantity	Urine (%)	Stool (%)	OWF (%)	χ^2 test <i>P</i> value
10 ²	11 (42.4%)	10 (47.7%)	9 (37.5%)	0.986
10 ³	14 (53.8%)	7 (33.3%)	14 (58.3%)	0.208
10 ⁴	1 (3.8%)	4 (19.0%)	1 (4.2%)	0.143
Total	26 (14.7%)	21 (11.9%)	24 (13.6%)	0.715

OWF: oropharyngeal washing fluid

激素使用情况 177 例患者中 143 例使用过激素, 占总数的 80.8%; 激素总用量为 35~12 280 mg, 平均 (2 492 ± 211.2) mg; 使用天数 2~54 d, 平均 (20.6 ± 0.9) d。18 例患者未使用, 16 例无纪录。

测序结果 通过对 RT-PCR 扩增的 SARS-CoV 核酸序列 140 bp 长度片段产物进行测序, 并与 WHO 公布的 SARS-CoV 序列进行同源性比较分析, 确认与 WHO 公布的 SARS-CoV 核酸片段的序列相同 (数据未列出)。

血清 SARS 抗体结果判定 IgG 数值以大于临界值为阳性, 临界值=0.13+阴性对照 OD 均值。177 例患者均为 SARS 特异性抗体 IgM 或 IgG 阳性, 参照 WHO 与中国 CDC 的 SARS 血清学诊断标准, 确诊 177 例患者为 SARS-CoV 感染患者。

讨 论

SARS 是一种高度传染性疾病, 除近距离接触和呼吸道飞沫传播外, 还有其他未知的传播途径。在发病早期 SARS 患者的痰、尿、粪便、咽漱液中均可检测出 SARS-CoV, 并具有强烈的传染性^[3,4,7,8], 因此患者需要在一个严密隔离的状态下进行治疗。但经过治疗的患者应何时出院及解除隔离尚没有一个十分明确的依据。利用 PCR 凝胶电泳和实时定量 PCR 方法检测病毒所致疾病病原体, 已作为实验室检测与诊断方法广泛应用于临床^[11], 其特点为操作相对简单、快速, 特异性和灵敏度高, 用于 SARS 患者各种标本 SARS-CoV 检测也有多篇研究报告^[3,4,7,8], 故本研究选择实时定量 PCR 法检测所收集标本中的 SARS-CoV 核酸。

本研究选择 SARS 患者排泄物及咽漱液为检测标本有两个原因: (1) SARS-CoV 传播的一种途径为与 SARS 患者接触, 经飞沫通过呼吸道传播; 而香港陶大花园的局部暴发则是通过排泄物传播所致^[12]。(2) 排泄物、咽漱液的采集相对于血、鼻、咽拭子等标本的采集简单易行, 既可减少患者的痛苦, 也降低了医护人员被传染的危险。

本组病例检测结果显示, 177 例恢复期 SARS 患者中仍有约 27.7% 的患者标本有 SARS-CoV 核酸检出, 特别是 10.2% 的患者有两份以上的标本同时检出阳性, 按照 SARS 实验室诊断依据, 在同一患者不同部位的标本有 SARS-CoV 检出, 可以确定患者是 SARS-CoV 感染者, 所以本研究结果提示在恢复期部分 SARS 患者体内仍可能有 SARS-CoV 的存在。另外, 本组患者的抗 SARS 抗体检测均为阳性, 说明患者体内的免疫机能已经发挥了对病毒的免疫作用, 但部分患者的排泄物和咽漱液中仍有病毒核酸检出, 推测可能在患者的呼吸道粘膜细胞和消化道粘膜细胞中有 SARS-CoV 的存在, 尽管机体的免疫机制发挥了作用, 血液中的病毒被中和, 病毒不能大量复制而导致 SARS 临床症状, 但是存在于患者体内细胞中的病毒却不能被完全清除, 从而使患者成为病毒携带者。由于本研究未对患者出院时标本进行采集与检测, 故无出院时的检测结果。但为防止 SARS 的传染与扩散, 建议最好对这类患者继续采取严格的消毒和隔离措施, 直到其标本中的病毒检测呈阴性为止。

本研究结果还显示, 在 11.9% 的患者粪便标本中有 SARS-CoV 核酸检出, 对 SARS-CoV 核酸定量检测结果分析表明, 3 种标本在病毒核酸拷贝数方面

虽然差异无显著性,但粪便标本中含有 10^4 数量级病毒核酸拷贝数的标本检出例数较多,且病毒核酸的平均拷贝数量也高于尿和咽漱液。由于 SARS-CoV 的完整性如被破坏,病毒的核酸会很容易被肠道中的细菌降解,相对来说检出比较困难,因此粪便中 SARS-CoV 核酸的阳性检出表示有完整的病毒颗粒存在,具有潜在的传染性^[8]。香港陶大花园居住区内引发局部 SARS 广泛传播事件的原因,就是由于居住区内的污水排泄系统被具有传染性的 SARS 患者排泄物污染而致,提示经由粪便排出病毒是一个重要的污染源^[8,12],本研究结果也支持这一观点。

笔者还发现,在 SARS 患者的治疗中普遍使用了激素,而且时间较长(平均 20.6 d)、用量较大(平均 2 492 mg)。由于激素的使用对机体免疫系统的影响较大,特别是抑制机体免疫反应,因此长期大量的使用激素对病毒在患者体内存在、排出是否有一定的影响,尤其是与恢复期 SARS 患者体内存在、排出 SARS 病毒的时间延长有否关系,尚需进一步研究。

为了控制实时定量 PCR 的检测质量,本研究在检测中均加有阳性、阴性对照和空白对照,而且使用了已为成品的试剂盒,减少了操作步骤,并注意防止污染,所以结果是可靠的。实时定量 PCR 法对恢复期 SARS 患者排泄物及咽漱液进行病毒核酸检测,除具有操作相对简便、迅速等优点外,还可以测定病毒核酸拷贝的具体数量。特别是对粪便标本中病毒颗粒的检出,具有较高的灵敏度和可靠性,有可能作为临床上判定 SARS 患者出院或解除隔离的实验室检查指标。参照 WHO 提出的建议,笔者认为对于恢复期 SARS 患者的同一种标本,间隔时间在 2 d 以上重复采集后,使用同一种核酸检测法(推荐使用实时定量 PCR 法)检测结果均为阴性的,可以判断此种标本无 SARS-CoV 存在,并可作为判断 SARS 患者出院和解除隔离的实验室检测指标。

国家 SARS 防治紧急科技行动北京组部分参与单位:首都医科大学附属北京朝阳医院(吕月平,肖白,丁洁,谭淑珍,王臻,徐莉莉,梁燕,闫梅,童朝辉,刘敬忠,王辰),北京地坛医院(李兴旺),首都医科大学附属北京佑安医院(吴昊),北京胸科医院(冯俐),中国医学科学院、中国协和医科大学北京协和医院(徐作军),北京大学神经科学研究所(于常海),军事医学科学院微生物流行病

学研究所(祝庆余),中国科学院北京基因组研究所(汪建)。

参 考 文 献

- Inouye S. SARS transmission: language and droplet production. *Lancet*, 2003, 12:362:170
- Hawkey PM, Bhagani S, Gillespie SH. Severe acute respiratory syndrome (SARS): breathtaking progress. *J Med Microbiol*, 2003, 52:609-613
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348:1953-1966
- 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, 348:1967-1976
- World Health Organization. Summary on major findings in relation to coronavirus by members of the WHO multi-centre collaborative network on SARS an etiology and diagnosis. Geneva: WHO, 2003
- Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361:1319-1325
- 吴新伟,程钢,狄飏,等. 荧光聚合酶链反应检测严重呼吸综合征冠状病毒的方法建立及临床初步应用. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(5):300-320
- 任翊,丁惠国,吴清发,等. RT-PCR 对 SARS 患者粪便 SARS 冠状病毒 RNA 的连续测定及临床意义. *中国医学科学院学报*, 2003, 25(3):368-371
- 中华医学会呼吸病学分会. 传染性非典型肺炎临床诊治标准专家共识. *中华结核与呼吸杂志*, 2003, 26(6):323-324
- Liu JZ, Xiang H, Zhou Y, *et al.* A new technique of screening gene mutation-fluorescent fingerprinting. *Gene Anal Boimolecul Eng*, 1998, 14:113-116
- Martell M, Gomez J, Esteban I, *et al.* High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:327-332
- Riley S, Eraser C, Donnelly CA, *et al.* Transmission dynamic of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science*, 2003, 300(5627):1961-1966
- Yang J, Wang ZH, Chen JJ, *et al.* Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus. *J First Mil Med Univ*, 2003, 23(5):424-427

(2003-12-19 收稿)

恢复期SARS患者分泌物中SARS-CoV核酸的定量检测

作者: [国家SARS防治紧急科技行动北京组](#)
作者单位:
刊名: [中国医学科学院学报](#) **ISTIC PKU**
英文刊名: [ACTA ACADEMIAE MEDICINAE SINICAE](#)
年, 卷(期): 2004, 26(3)
引用次数: 0次

参考文献(13条)

1. [Inouye S SARS transmission: language and droplet production](#) 2003
2. [Hawkey PM, Bhagani S, Gillespie SH Severe acute respiratory syndrome \(SARS\): breathtaking progress](#) 2003
3. [Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome](#) 2003
4. [Drosten C, Gunther S, Preiser W Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome](#) 2003
5. [World Health Organization Summary on major findings in relation to coronavirus by members of the WHO multi-centre collaborative network on SARS an etiology and diagnosis](#) 2003
6. [Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome](#) 2003
7. 吴新伟, 程钢, 狄飏, 尹爱华, 何蕴韶, 王鸣, 周新宇, 何丽娟, 罗凯, 杜琳 荧光聚合酶链反应检测严重急性呼吸综合征冠状病毒的方法建立及临床初步应用[期刊论文]-中华检验医学杂志 2003(5)
8. 任翊, 丁惠国, 吴清发, 陈唯军, 陈东, 包志英, 杨玲, 赵春惠, 汪健 RT-PCR对SARS患者粪便SARS冠状病毒RNA的连续测定及其临床意义[期刊论文]-中国医学科学院学报 2003(3)
9. [中华医学会呼吸病分会 传染性非典型肺炎临床诊治标准专家共识](#) 2003(6)
10. [Liu JZ, Xiang H, Zhou Y A new technique of screening gene mutation-fluorescent fingerprinting](#) 1998
11. [Martell M, Gomez J, Esteban I High-throughput realtime reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus](#) 1999
12. [Riley S, Eraser C, Donnelly CA Transmission dynamic of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions](#) 2003(5627)
13. [YANG J, Wang ZH, Chen JJ Clinical detection of polymerase gene of SARS-associated coronavirus](#) 2003(5)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [周世力, 卫灿东, 熊朝晖, 段淑敏, 李德新, 王健伟, 冷文川, 梁米芳, 金奇, 侯云德 严重急性呼吸综合征\(SARS\)冠状病毒核蛋白的鉴定与分析 -病毒学报2003, 19\(2\)](#)
利用蛋白质组学技术, 对纯化的严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒颗粒所含核蛋白进行初步分离与鉴定. 质谱分析结果最终表明, SARS冠状病毒核蛋白的分子量位于47kD与52kD之间, 所获得的SARS冠状病毒核蛋白的质谱分析数据覆盖了所预测病毒核蛋白氨基酸序列的87%, 且符合率为100%. 从而首次从蛋白质水平对SARS冠状病毒核蛋白的氨基酸序列进行了证实.
2. 期刊论文 [周世力, 熊朝晖, 冷文川, 段淑敏, 李德新, 王健伟, 梁米芳, 卫灿东, 喻子牛, 金奇, 侯云德 严重急性呼吸综合征\(SARS\)冠状病毒S蛋白的鉴定与分析 -病毒学报2003, 19\(4\)](#)
利用293细胞对SARS病人样品进行病毒扩增, 培养上清中病毒颗粒经过纯化后, 利用蛋白质组学技术, 对纯化得到的SARS冠状病毒颗粒蛋白进行初步分离与鉴定. 其中质谱分析结果最终表明, 分子量约150kD的蛋白质的氨基酸序列与SARS-CoV基因组所预测S蛋白序列高度吻合, 从而首次从蛋白质水平对SARS冠状病毒S蛋白的氨基酸序列进行了证实.

3. 期刊论文 [陈心春, 王火生, 李美忠, 杨桂林, 徐六妹, 王辉, 李丽雄, 周伯平](#) 严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒抗原的检测及其临床意义 - [病毒学报](#)2003, 19(3)

自2002年底出现的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)严重影响全球经济, 危害着人民的健康。2003年4月16日, WHO确定一种新型冠状病毒为SARS的病因[1-3]。随着对SARS病因的确认以及全球特别是中国的SARS疫情发展, 困扰广大医学工作者的突出问题是SARS的防治, 包括预防性疫苗的研制及SARS的病原学早期诊断。WHO相应地公布了SARS的实验室诊断标准[4]。为了了解SARS冠状病毒特异性抗体产生的规律及其临床意义, 以进一步了解SARS病毒感染免疫的特点, 采用中国军事医学科学院研制的SARS病毒IgG/IgM抗体检测试剂, 对深圳东湖医院收治的SARS患者的系列血清进行了抗体检测, 现将结果简报如下。

4. 期刊论文 [鲍琳琳, 涂新明, 蒋虹, 佟巍, 丛喆, 魏强, 朱华, 张扬清, 高虹, 邓巍, 黄澜, 刘亚莉, 王健伟, 秦川](#) SARS冠状病毒分离培养和鉴定的实验研究 - [病毒学报](#)2005, 21(1)

建立严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒分离、培养方法, 为SARS冠状病毒动物模型的建立提供实验依据, 并根据病毒在体内存活的时间确定检测指标。选用已鉴定为SARS冠状病毒的毒株, 经过鼻腔接种感染恒河猴, 定期采集咽拭子标本, 分离血清或血浆, 用Vero细胞进行病毒培养、分离。结果显示, 在SARS冠状病毒感染恒河猴后2、5、7天, 可以从拭子中分离到病毒, 5~15天可在猴肺、脾、肝、肾和淋巴组织中分离到病毒, 并用免疫荧光法和RT-PCR方法进行了确定。首次实验证实了SARS冠状病毒可在恒河猴体内复制。SARS病毒的成功分离是SARS冠状病毒动物模型建立的主要依据, 在进行疫苗安全性和药效评价等工作中, 病毒分离可作为药物筛选、疫苗评价的重要指标。

5. 期刊论文 [郝东, 何礼贤, 瞿介明, 潘瑶, 胡必杰, 张静, 李倬哲, HAO Dong, HE Li-xian, QU Jie-ming, PAN Jue-HU Bi-jie, ZHANG Jing, LI Zhuo-zhe](#) SARS冠状病毒N蛋白致大鼠肺部炎症及糖皮质激素对其的作用 - [中华内科学杂志](#)

2005, 44(12)

目的探讨严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒N蛋白所致大鼠肺部炎症反应及糖皮质激素(以下简称激素)对其的调节作用。方法 24只SD大鼠随机分为4组, 每组6只:A组大鼠气管内滴入无菌生理盐水0.2 ml, B组(6 h)、C组(24 h)大鼠气管内滴入SARS 病毒N蛋白溶液0.2 ml, D组大鼠气管内滴入SARS 病毒N蛋白溶液0.2 ml的同时腹腔内注射10 mg/kg地塞米松。测4组大鼠外周血、支气管肺泡灌洗液(BALF)中WBC总数及分类;测4组大鼠肺组织湿/干(W/D)比值;观察4组大鼠肺组织病理学变化;ELISA测4组大鼠血清及BALF 中IL-6、IL-10、转化生长因子(TGF)β1水平。结果 (1)外周血淋巴细胞比例C组较A组低(P<0.05), D组较A、C组均低(P值均小于0.01);D组WBC总数较A、C组均低(P<0.01)。BALF中WBC总数C组较A组高(P<0.05), D组较C组低(P<0.05);B、C组BALF中肺泡巨噬细胞占98%~99%。(2)肺脏W/D比值B、C组较A组高(P<0.05), D组较C组低(P<0.01)。(3)肺组织病理学变化:B、C组大鼠肺泡间隔明显增宽, 有较多的炎性细胞渗出, 包括中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、成纤维细胞等, 血管充血、淤血, 有的支气管腔内有炎性细胞渗出, C组变化较B组无明显加重。D组大鼠肺组织炎性反应较B、C组减轻, 肺泡间隔变薄, 炎性细胞渗出减少。(4)血清及BALF 中IL-6、IL-10、TGF β1水平B组较A组高(P<0.01), C组进一步升高(P<0.01), D组较C组低(P<0.01)。结论 SARS冠状病毒N蛋白具有致病性, 能够引起大鼠肺部炎症反应和(或)急性肺损伤, 肺损伤与促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子的升高及失衡有关;激素可有效地减轻SARS冠状病毒N蛋白所致的肺部炎症反应。

6. 期刊论文 [褚小刚, 龚作炯, 黄书岚, 刘建军, 王鲁文, 孙小梅, 叶林柏](#) 发热患者SARS冠状病毒抗体分析 - [中国公共卫生](#)2006, 22(4)

目的了解临床发热患者中是否存在严重急性呼吸综合征(SARS)冠状病毒(SARS-CoV)隐性感染或亚临床感染。方法对2003年5月~7月, SARS流行期间湖北地区临床发热患者373例血清进行SARS冠状病毒(SARS-CoV)抗体(IgG、IgM、N蛋白抗体)酶联免疫吸附法(ELISA)检测和分子生物学(RT-PCR)检测。结果373例发热患者中, 检出冠状病毒抗体阳性者24例, 阳性率6.43%(24/373), 其中SARS IgG抗体、IgM抗体、N蛋白抗体阳性率分别为0.54%、1.34%和5.09%, 但SARS-CoV RT-PCR检测均为阴性。结论临床发热患者可能存在SARS-CoV隐性或亚临床感染, 患者体内产生针对SARS-CoV的保护性抗体, 应具有免疫力和抵抗力。

7. 学位论文 [王艳鸽](#) SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的研制及初步应用 2006

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是一种以发热和严重肺部感染为主要特征的新发急性传染病。2003年4月16日, WHO正式宣布: SARS的病原体是一种新型冠状病毒, 并命名为SARS冠状病毒(SARS-CoV)。研究表明, SARS-CoV与人类普遍易感的冠状病毒OC43株和229E株无抗体交叉反应, 是一种新的从未在人类或动物中发现过的冠状病毒。尽管目前SARS的流行已经得到控制, 但迄今为止, SARS的起源、动物宿主、传播途径及致病机理等仍不完全清楚, SARS对人类的威胁依然存在。由于临床症状及其发病体征很难与其它病原体引起的发热性呼吸系统疾病区分, 所以早期特异实验诊断显得更加重要。本实验利用基因工程表达的重组SARS冠状病毒N蛋白免疫2月龄的BALB/c小鼠, 免疫后的小鼠脾淋巴细胞与SP2/0小鼠骨髓瘤细胞进行融合, 建立了10株能稳定分泌SARS冠状病毒N蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 通过制备腹水, 对这些单克隆抗体进行纯化、分析和鉴定。对这些单克隆抗体进行了如下的免疫学鉴定: ①效价测定: 10株单克隆抗体中, 除7#腹水效价稍低一些为1:104外, 其他腹水效价均在1:107~1:108之间, 显示出这些单抗有较高的抗SARS冠状病毒N蛋白活性。②免疫球蛋白类型及其亚类特异性鉴定: 采用双向琼脂扩散和酶联免疫吸附试验鉴定10株单克隆抗体, 结果表明这10株抗N蛋白抗体的单克隆抗体都为IgG类型, IgG1亚类。③亲和力分析: 对10株单克隆抗体的亲和力进行分析, 结果表明: a#、b#、c#号单抗与N蛋白的亲和力最高, 其亲和常数分别为: 1.50×10⁹L/mol、7.50×10⁸L/mol、1.05×10⁹L/mol; d#、1#、2#、4#、5#次之, 其亲和常数分别为: 3.75×10⁸L/mol、3.00×10⁸L/mol、3.00×10⁸L/mol、1.80×10⁸L/mol、1.80×10⁸L/mol; 3#、7#与N蛋白的亲和力最低, 其亲和常数分别为: 4.39×10⁶L/mol、6.00×10⁶L/mol。④配对组合: 利用制备的单克隆抗体, 通过对各株单克隆抗体特性和捕捉SARS冠状病毒N蛋白能力的比较以及单抗初步配对测定, 发现有三组组合可以配对: a#和a#-HRP、1#和d#-HRP、a#和4#-HRP, 其中以a#单抗作为包被抗体, 4#单抗标记辣根过氧化物酶(HRP)作为标记抗体为最佳配对组合, 由此建立了单克隆抗体夹心法ELISA特异检测SARS冠状病毒抗原的方法。初步试验结果证明, 所建立的单克隆抗体夹心ELISA检测方法具有较好的特异性和灵敏度, 灵敏度达到5ng/ml, 通过进一步的改进和完善, 有望更好地用于SARS病毒感染的特异诊断。通过系统鉴定, 证明这些单克隆抗体针对冠状病毒N蛋白的不同抗原决定簇, 具有较高的特异性, 不仅为开发SARS病毒早期诊断(抗原诊断)试剂的研究提供了单抗支持, 而且解决了抗体检测阳性对照无危害的问题, 同时对于SARS-CoV保护性抗原研究、SARS免疫学和发病机制的研究提供了有力的手段。

8. 期刊论文 [叶沁媛, 郑珩, 王昱, 吴梧桐, 叶波平, 郑苏婷, YE Qin-yuan, ZHENG Heng, WANG Min, WU Wu-tong, YE Bo-ping, ZHENG Su-ting](#) SARS冠状病毒半胱氨酸蛋白酶3CLpro的克隆表达及分离纯化 - [药物生物技术](#)2005, 12(4)

SARS(严重急性呼吸综合征)是由一种新型的人类冠状病毒引起的。由于SARS冠状病毒3CL蛋白酶在病毒的复制翻译中起关键作用, 所以成为抗SARS药物设计的关键靶标之一。该研究中, 利用以pET28a为载体的高效原核表达系统, 克隆表达出SARS冠状病毒3CL蛋白酶, 然后由NTT-Ni²⁺亲和层析柱对表达的蛋白进行分离纯化。3CL蛋白酶在大肠杆菌表达系统中的成功表达为今后进一步筛选抗SARS病毒药物奠定基础。

9. 期刊论文 [王海宝, 刘景汉, 欧阳锡林, 于洋, 马曙轩, 李锡金, 吕留彩, 田亚平, 刘红鹰, 许红民, 姚伟](#) 156例SARS患者血清抗SARS冠状病毒抗体的观测 - [中国实验血液学杂志](#)2003, 11(5)

本研究的目的是观察严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)患者抗SARS-冠状病毒(SARS-CoV)抗体IgG和IgM的产生及抗体效价变化特征, 探索采集SARS痊愈患者抗血清的时机。应用ELISA方法对随机抽取的156名SARS患者血清标本进行抗SARS-CoV抗体IgG和IgM抗体效价测定。结果表明, 156名SARS患者于病后3至9周期间, IgG抗体阳性率为75.6%, IgM抗体阳性率为41.7%, IgG和IgM抗体均阳性为41%, IgG和IgM抗体均阴性为23.7%; IgG抗体阳性患者中抗体效价为18.23±24.72, IgM抗体阴性患者抗体效价为2.18±1.13; IgG和IgM抗体效价与SARS患者的性别、年龄、病程、体温正常天数无显著相关性; 结论: 并非所有SARS患者都能产生抗SARS-CoV抗体, 即使产生抗体, 其效价的个体差异也较大, 并不能通过性别、年龄、病程及体温正常天数等因素较准确地评估抗体的效价。因此, 在SARS抗血清采集前, 应重新进行抗体效价测定, 遴选具有高效价抗SARS-CoV抗体的SARS痊愈患者

进行抗血清的采集,才能提高所采集的抗血清在临床的治疗效果,同时又可为患者抗体输注提供量化指标。

10. 期刊论文 [周光德, 赵景民, 王松山, 孙艳玲, 潘登, 杨建法, 李文淑, 于海丽, 张泰和 SARS冠状病毒对心脏及其传导系统影响的病理学研究](#)—[解放军医学杂志](#)2004, 29(1)

目的探讨严重急性呼吸综合征(SARS)对心脏、尤其是心脏传导系统的影响。方法应用HE、组织化学及核酸原位杂交等方法,对6例SARS死亡患者的心脏组织及其中1例死者的心脏传导系统进行病理研究。结果SARS患者的心脏损伤表现为心肌细胞空泡变性、萎缩和少数心肌细胞肌浆溶解,心肌间质轻度水肿、少量炎细胞浸润及轻度小血管炎Macchiavello染色示心肌细胞胞质内偶见病毒包涵体;核酸原位杂交示部分心肌细胞及心脏传导系统特化心肌细胞内呈现明确的冠状病毒(SARS-CoV)阳性杂交信号。结论SARS-CoV不仅能够感染心肌细胞,而且可感染心脏传导系统中的特化心肌细胞,可引起心脏轻度病毒性心肌炎性改变。该研究结果为解释临床上SARS患者心律失常和心肌酶谱异常提供了重要的病理学依据。

引证文献(1条)

1. [刘家森 SARS冠状病毒复制酶蛋白nsp8和nsp9受体蛋白的研究](#)[学位论文]博士 2005

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgykxyxb200403008.aspx

下载时间: 2010年2月26日