

SARS 患者某定点收治医院空气样本中 SARS-CoV 及其 RNA 的检测

肖文珺 王明连 魏巍 王洁 赵建军 易滨 李劲松

【摘要】 目的 了解 SARS 某定点收治医院空气中的 SARS 病毒污染情况及 SARS 病毒在空气中的分布和传播特性。方法 采用 FA-2 型空气微生物采样器在病房区及病房阳台连续采样。将采集到的空气样本洗脱后分别采用细胞分离和逆转录-聚合酶链反应分析,并对细胞分离阳性者作进一步的系列分析鉴定。结果 SARS 患者某定点收治医院病房区及阳台空气样本中均有部分 PCR 结果阳性,SARS 阳性率病房区为 29%,阳台为 20%;其中一份样品中分离出活性病原体,并稳定传代,经免疫荧光染色鉴定阳性,RT-PCR 扩增产物的测序结果显示该病原体与已知 SARS-CoV 的同源性在 98% 以上。结论 SARS 急性期后期与恢复期早期的患者仍然从呼吸道排毒,病毒在距传染源周围 1 m 之内的空气中具有感染活性,在此范围之内存在气溶胶传播的潜在威胁。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;SARS 冠状病毒;空气;序列分析

Detection of SARS-CoV and RNA on aerosol samples from SARS-patients admitted to hospital XIAO Wen-jun*, WANG Ming-lian, WEI Wei, WANG Jie, ZHAO Jian-jun, YI Bin, LI Jin-song. *Biosafety Department of Microbe-Epidemic Institute of Military Academy of Medical Science, Beijing 100071, China

Corresponding author: LI Jin-song, Email: lij-s@163.com

【Abstract】 Objective To assess the risk of aerosol transmission in severe acute respiratory syndrome (SARS) patients admitted to Hospital through testing the air samples. **Methods** Air samples were collected from 7 wards and 1 balcony of the Hospital, 3 times a day for 3 continuous days, using bioaerosol sampler type FA-2. Bioaerosol particles were then washed down from the samples by serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) culture medium. Nested-reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify the N protein gene of the SARS associated coronavirus (SARS-CoV) from these washing solutions. The residual solutions were inoculated into prepared cell cultures to isolate live virus. The positive samples were then identified by indirect immunofluorescence assay and sequence analysis of the PCR products. **Results** Positive rates of RT-PCR test on air samples were 29.03% in the wards and 20.0% in balcony respectively. Results from sequential analysis showed that the homology of amplified cDNA fragments to previously known SARS-CoV stains was 98%. A strain of live pathogen was isolated from one of the 36 samples. The isolate could cause typical cytopathic effects, similar to those SARS-CoV on Vero-E6 cells and the effects could be stably passed. Indirect immunofluorescence assay showed positive from serum of a SARS patient. **Conclusion** SARS-CoV existed in the air hospital, where SARS patients were admitted to, but the activity of SARS-CoV in air samples was rather low. SARS patients could still shed SARS-CoV even during the recovery phase. Potential possibility of aerosol transmission might exist within 1 meter square area around SARS patients.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome; SARS-CoV; Air; Sequence analysis

实验研究已经发现严重急性呼吸综合征 (SARS)是由一种新的冠状病毒(CoV)引起的^[1,2];

流行病学调查显示,其传播模式主要是,患者→家人,患者→医护人员,患者→同飞机或同火车(同车厢)乘客,患者→同宿舍居住者,患者→同旅店居住者等,并存在家庭及医院聚集性,这表明病毒可能是通过空气传播感染和密切接触感染^[3],但缺乏有力的实验证据。另外,没有 SARS-CoV 病毒在空气中的传播范围、存在条件和环境因素(例如温度、湿度等)对其存活的影响程度等方面的研究。基于此现

基金项目:全军非典型肺炎防治重大科技项目资助(03F015-02)
作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所(肖文珺、王明连、魏巍、王洁、赵建军、李劲松),解放军第三〇九医院(易滨)

通讯作者:李劲松,Email:lij-s@163.com

状,本课题研究旨在通过了解 SARS 患者定点收治医院空气中 SARS-CoV 及其 RNA 的检测,从而对上述问题有一个较为系统的认识和了解。

资料与方法

1. 空气样本的采集方法:①采用 FA-2 级空气微生物采样器(中国辽阳应用技术研究所产品),以表面涂有一层水溶性胶的普通琼脂培养基为采样介质。②采样时间自 2003 年 6 月 10~12 日,选择以下时段及地点,每天采集 12 份样品,三天共 36 份样品。

2. 病房内空气样本采集方案:选择北京某 SARS 患者定点收治医院还收治有 SARS 患者的 7 个病房作为采样对象(表 1),共 7 个室内采样地点。室内通风换气量较大,影响样本的采集,为了能够采集到病毒,在每次采样之前,停止通风 20 min,待样品采集完之后恢复通风换气。在采样期间,无新发病例入院。医院收治的 7 例患者均处于恢复期,陆续于 6 月 10~14 日出院。在患者床头附近采样,距离患者呼出气体的距离在 1 m 以内,采样高度 1 m,每次采样 15 min。每天采样 3 次(时间 08:00、11:00、16:00),采样连续 3 天。

3. 病房外空气样本采集方案:在病房阳台设一采样点,采样高度 1~1.5 m,每次采样 15 min,每天采样 3 次(时间 08:40、13:30、16:40),采样连续 3 天,流量 28.3 L/min。

4. 样品的包装、处理:对采集平皿表面进行消毒处理,处理后的采样平皿用塑料袋密封包装,并对塑料袋外进行消毒处理,放 4℃ 冰箱保存。

5. 细胞株、菌株及主要试剂:Vero-E6 细胞、

E. coli DH5 α (本室保存);Trizol 购于 Invitrogen 公司;Pre-Mix-PCR 试剂盒:赛百盛公司产品;Sph I、Pst I、T₄DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司;RNasin、M-MLV 逆转录酶、pGEM-T 载体试剂盒购于 Promega 公司;SARS 恢复期患者血清、羊抗人 FITC 标记荧光抗体均为司炳银老师惠赠。

6. 基因特异型引物(巢式聚合酶链反应, nPCR):外引物,上游:5'-AGCCCCAGATGG TACTTCTA-3',下游:5'-AATTACCGCGACTA CGTGAT-3';内引物,上游:5'-AACTGAGGGAG CCTTGAATA-3',下游:5'-GGCAATGTTG TTCCTTGAG-3';内引物、外引物均由杨瑞馥教授惠赠。外引物扩增片段长 268 bp,内引物扩增片段长 106 bp。目的片段为 SARS 病毒 N 蛋白的一段保守区域。

7. 空气样本的洗脱及细胞接种(BSL-3 实验室)空气样本的洗脱和收集:以含青霉素 1000 U/ml,链霉素 1000 U/ml 的 DMEM 为洗脱液,每一份空气样本都由上、下两个平皿组成,分别在每个平皿中加入 5 ml 洗脱液,轻轻晃动平皿 2 min,使粘附有空气中粒子的水溶性胶充分溶解其中,再将两平皿中的液体混合,置与试管中,静置 1 h。一般约能收集到 6~8 ml 洗脱液。

细胞的分离与接种:预先准备好一定数量的接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,生长状态良好,达到 70%~80% 融合的 Vero-E6 细胞。从收集到的洗脱液中取 2 ml 加入等体积 Trizol,轻柔混匀,-80℃ 冻存留作提取空气中粒子的 RNA,进行 RT-PCR 检测之用。剩余液体经 0.22 μ m 滤器滤过后,再接种至 Vero-E6 细胞中,作好来源样本的标记。37℃,5%

表 1 北京某 SARS 定点收治医院 SARS 患者住院情况

患者情况	发病时间 (年.月.日)	入院治疗时间 (年.月.日)	临床 SARS 诊断情况	出院时间
1 床(男,49 岁)	2003.04.07	2003.04.07	患者入院前 1 周在该医院诊治 SARS 患者,因有明显的接触史,有发热症状,诊断为 SARS	2003 年 6 月 11 日,继续抗炎治疗
9 床(男,51 岁)	2003.05.13	2003.05.18	无明显诱因发热,左中肺异常阴影,以疑似病例收入医院治疗	2003 年 6 月 12 日,出院医嘱:医学隔离 2 周
13 床(女,49 岁)	2003.04.29	2003.05.18	连续间断发热 19 日,发现右下肺有阴影,入院后经专家组会诊,确诊为 SARS	2003 年 6 月 10 日,出院医嘱:医学隔离 2 周,择期复查胸片
34 床(女,35 岁)	2003.05.18	2003.05.23	患者丈夫 2003 年 5 月 1 日被诊断为 SARS,双方有密切接触史。入院时胸片左下肺斑片状密度不均条索状阴影,两次抗体检测呈弱阳性反应。经专家组确诊为 SARS	2003 年 6 月 13 日,出院医嘱:医学隔离 2 周
43 床(女,31 岁)	2003.04.05	2003.04.30	患者有接触史,4 月 26 日体温高达 39℃,肺部病灶明显增多。双下肺片状阴影,左肺明显,边界不清,内部未见空洞,确诊为 SARS	2003 年 6 月 12 日,出院医嘱:医学隔离 2 周

CO₂ 培养箱中吸附 1 h 之后,倒掉瓶中液体,换含 2% 小牛血清的 DMEM(维持液),6 ml/瓶,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每日观察记录细胞生长状况。连续观察 8 天,如果未出现细胞病变迹象,继续盲传。连续盲传 3 代未见细胞病变者记录为阴性;如出现细胞变圆、拉网状病变,再经连续传代证实该致病变效应可稳定传代,照相记录,并采用免疫荧光法进一步鉴定。

8. 洗脱液中总 RNA 的提取:从 -80℃ 取出已和 Trizol 按比例混合好的空气样品洗脱液,Trizol 法提取总 RNA。

9. 逆转录反应体系(20 μl):10.5 μl DEPC. H₂O 充分溶解 RNA 沉淀,转移至 1.5 ml 的 EP 管中,另加入 1 μl 随机引物,70℃ 水浴 5 min。取出后立即投入冰浴,分别加入 5×buffer 4 μl, dNTP 1 μl, RNasin 0.5 μl, DTT 2 μl, M-MLV Reverse Transcriptase 1 μl;于 37℃ 反应 60 min。

10. PCR 反应体系(20 μl):模板 5 μl, 外引物 1 μl, 双蒸水补足 20 μl。扩增:94℃ 预变性 2.5 min, 然后进入以下 30 个循环,94℃ 变性 45 s, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 30 s。循环完毕,72℃ 延伸 5 min。将 PCR 产物自凝胶中纯化备用。

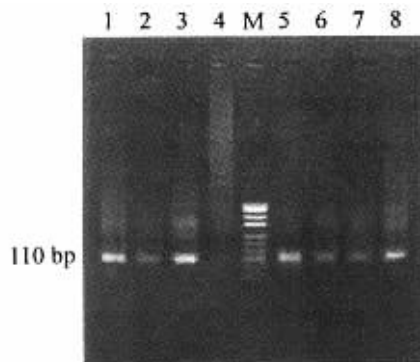
11. SARS 特异性片段测序鉴定、同源性分析和进化树分析:将巢式 PCR 扩增得到的 SARS 特异性片段克隆至 T 载体后测序,目的基因测序由上海生工生物技术有限公司完成。采用 BLAST(basic local alignment search tool)http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/将克隆测序获得的核苷酸序列与 GenBank 登记的目前已知 SARS-CoV 基因序列进行同源性比较。

12. 间接免疫荧光染色:感染细胞片的制备:将待鉴定的感染细胞培养悬液接种单层的 Vero-E6 细胞,37℃ 孵箱中吸附 1 h,换含 2% 小牛血清的 DMEM(维持液),6 ml/瓶,放 37℃ 继续培养;待细胞刚刚出现病变时,取感染细胞滴片,自然晾干;冷丙酮 -20℃ 固定 30 min,取出晾干;-20℃ 密封保存备用。

13. 间接免疫荧光抗体染色:将 SARS 恢复期阳性患者灭活血清标本 1:10 稀释后滴加到细胞抗原片上,置 37℃ 湿盒中作用 30 min, PBS 振荡洗 3 次,晾干,然后加羊抗人 FITC 标记荧光抗体,置 37℃ 湿盒中作用 30 min, 冲洗同前,在荧光显微镜下观察染色结果。

结 果

1. SARS 患者定点医院空气样本洗脱液 PCR 检测结果:空气 RT-PCR 检测结果见图 1。病房区共检测 31 例样本,其中 9 例阳性,阳性率 29.03%;而病房阳台的 5 例样本中,1 例阳性,阳性率为 20.0%。



M: PUC19 DNA/MSP1 标准相对分子量;1~8: 43 床、34 床、13 床、13 床阳台、1 床、9 床、16 床和 14 床的空气样本洗脱液 RT-PCR 产物

图 1 北京某 SARS 患者定点收治医院空气样本洗脱液 RT-PCR 产物(1.5% 琼脂糖电泳图)

2. 细胞分离实验:全部 36 份样品中 35 份细胞分离阴性。只有 6 月 10 日 13 床病房内采集的空气样品经细胞分离传至第三代时细胞出现变圆,细胞间隙增大、拉网状等典型 SARS-CoV 所致细胞病变。连续传代证实,这种致病变效应能稳定传代。

3. 免疫荧光鉴定结果:细胞抗原片经间接免疫荧光检测,发出绿色荧光的细胞为感染 SARS-CoV 的阳性细胞。

4. 序列测定及同源性比较:我们将分离到的这株 SARS-CoV 命名为 LK309, RT-PCR 获得的特异性片段 TA 克隆测序、同源性比较显示与目前已分离到的其他 15 株 SARS 病毒该片段序列同源性在 98% 以上。

讨 论

从流行病学调查来看,SARS 主要通过近距离空气和密切接触传播,但没有可供参考的相关科学数据,因而不能真正说明 SARS-CoV 的传播途径。为此,我们对某 SARS 定点收治医院的 SARS 患者病房空气进行了采样检测分析,结果不仅证明了 SARS-CoV 通过空气传播的可能性,而且证明了我们所采用的采样及分析方法是有效、可靠的。

1. SARS 病房空气采样及分析方法:要获得 SARS-CoV 的是否通过空气传播的数据,必须对 SARS 定点收治医院 SARS 患者病房空气进行有效的采集和可靠的分析方法。我们采用的 FA-2 级空气微生物采样器是国际空气微生物学会推荐的标准空气微生物采样器,但其采样介质是普通琼脂培养基,采集空气中的 SARS-CoV 不太合适。为了能够有效采集空气中的 SARS-CoV 样品,并保持其活性,我们在普通琼脂培养基表面涂上一层无毒的水溶性胶作为采样介质,使空气中的粒子易于粘附到采样介质上,并且处于一种湿润环境中,从而保证 SARS-CoV 的活性。

作为研究的某医院 SARS 病房始终向室外抽气,换气量较大,故影响空气样本的采集。为了能够采集到病毒,在每次采样之前,停止通风 20 min,从而使病房内的空气处于一个相对静止状态,空气中的各种粒子处于布朗运动状态。每次采完样后,采样皿立即置于 4℃ 保存,这些措施都最大限度的保障了所采集到空气中的生物粒子及其生物学活性。

样品检测分析方法,我们选择世界卫生组织推荐的 RT-PCR 技术和细胞培养技术两者结合共同对采集样品进行检测^[4]。细胞分离培养采用 Vero 细胞分离培养 SARS-CoV 病毒,能检测出活的 SARS-CoV 病毒。PCR 技术则对检测微生物没有死活的要求,具有敏感、快速、特异性强的特点。近年来,PCR 技术已经在病毒气溶胶检测方面得到了应用^[5]。1994 年 Sawyer 等^[6]在 1994 年通过 PCR 技术对医院一些场所中采集的空气样本中的水痘-带状疱疹病毒(VZV)进行了检测分析,证实了 VZV 可以通过气溶胶形式传播。本文的研究结果也说明应用 PCR 技术检测空气传播的致病微生物是非常有效、快速的。

2. SARS-CoV 空气传播的可能性:表 2 的数据显示,病房内空气中的病毒 RT-PCR 检测阳性率为 29.03%,病房阳台空气中为 20.0%,证实了某 SARS 患者定点收治医院的病房及阳台的空气中均有 SARS 病毒的存在。而且这种分布显示出随距患者(传染源)的距离增加而有减小的趋势。此外,从病房的空气样本中分离得到了活性 SARS-CoV 病毒株,间接免疫荧光实验及序列测定也证实我们得到的是 SARS-CoV 病毒,这也进一步证实了 SARS-

CoV 空气传播的可能性。而采自阳台的 6 份样品中,RT-PCR 阳性率虽达到 20.0%,但细胞分离均为阴性。我们推测 SARS-CoV 病毒可以在空气中存活,但对于外界的抵抗力较差。在我们停止通风进行采样的 20 min 期间,病房中的空气中的 SARS-CoV 病毒能随机播散到阳台,病毒活性受到环境因素的影响,可能已经死亡,因而难以分离到活性病毒。病毒在体外的生存实验表明,病毒能在适宜的环境中存活较长的时间,但抵抗力较差。在干燥表面仅能存活 3 h^[7]。空气中存在各种物理、化学等因素,具体有哪些因素影响病毒在空气中的活性及其影响程度还有待于进一步的实验研究。

由于除采样期间以外,其他时间病房都处于 24 h 通风状态,这充分说明我们分离的这株病毒是在停止通风的 20 min 期间内患者新排出的。这些病房收治的都是急性后期恢复期早期的患者,说明患者虽处于恢复进程中,仍然能从呼吸道排毒,有感染他人的可能性。有报道采用 PCR 技术检测到恢复期患者大便中存在 SARS-CoV 病毒^[8]。但目前尚不能肯定恢复期患者作为传染源的意义,还需结合流行病学资料综合评价。根据采样点的位置和距离患者的远近我们可以推测医院病区 1 m 之内的近距离范围内病毒气溶胶传播的威胁性很高,提示与 SARS 患者有密切接触的医护人员必须十分注意个人防护。我们的实验数据及流行病学资料目前都不支持病原体经空气快速远程传播^[7]。

参 考 文 献

- 1 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Eng J Med*, 2003, 348:1953-1966.
- 2 Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al. The Genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2000; 287:1399-1404.
- 3 陈金军,侯金林.严重急性呼吸道综合征的病原学、流行病学现状. *中华传染病学杂志*, 2003, 21:78-83.
- 4 Guidelines and recommendations Guidelines for Laboratory Diagnosis of SARS-CoV Infection, <http://www.cdc.gov/ncidod/sars/labdiagnosis.htm>
- 5 李劲松.生物气溶胶在分子生物学方面的研究进展. *中国粉体技术*, 1999, 5:24-29.
- 6 Sawyer MH, Chamberlin CJ, Wu YN, et al. Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *J infect Dis*, 1994, 169:91-94.
- 7 Update: cumulative number of reported probable cases of severe acute respiratory syndrome (SARS), <http://www.who.int/esr/sarscountry/en2003-04-10>

(收稿日期 2004-01-28)

(本文编辑:尹廉)