

SARS 患者粪便、痰标本病毒 RNA 阳性检出率与病程变化的关系

汤芳 刘玮 张泮河 赵秋敏 詹琳 左曙青 吴晓明 杨红
方立群 魏茂提 王宏伟 曹务春

【摘要】 目的 探讨严重急性呼吸综合征(SARS)患者粪便、痰标本中病毒 RNA 阳性检出率与病程变化的关系。方法 采取一步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对不同病程的临床标本进行 SARS 冠状病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV)RNA 的扩增和序列测定,并采用趋势 χ^2 检验探讨标本阳性检出率与不同发病时间的关系。结果 被检样品中扩增出的特异性片段,经测序验证为 SARS-CoV 序列(同源性 100%)。在检测的临床标本中,粪便标本阳性检出率最高(21.55%)。趋势 χ^2 检验显示 SARS 患者粪便和痰标本中病毒阳性检出率均随着发病时间的增长而下降, $\chi^2 = 12.55$ 和 16.408 , $P = 0.0004$ 和 $P = 0.00005$ 。结论 一步法 RT-PCR 可以有效检测 SARS 患者临床标本存在的 SARS-CoV。SARS 患者粪便、痰标本 RT-PCR 阳性率随着发病时间的增长而下降。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;冠状病毒;逆转录-聚合酶链反应

Study on the correlation between positive rates of SARS RNA in clinical confirmed SARS patients and the appearance of RNA in relation to the development of the disease TANG Fang, LIU Wei, ZHANG Pan-he, ZHAO Qiu-min, ZHAN Lin, ZUO Shu-qing, WU Xiao-ming, YANG Hong, FANG Li-qun, WEI Mao-ti, WANG Hong-wei, CAO Wu-chun. Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China
Corresponding author: CAO Wu-chun

【Abstract】 Objectives To study the correlation between positive rates of RNA in clinical confirmed severe acute respiratory syndrome(SARS) patients and its appearance in relation to the development of the disease in order to provide scientific basis for early diagnosis, effective prevention and treatment of the disease. **Methods** One-step reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to amplify the SARS RNA in the clinical specimens from different courses of the disease. The representative amplicons were then sequenced. Chi-square for trend test was performed to study the correlation between positive rates of RT-PCR and at different periods after the onset of the disease. **Results** The fragments amplified from the sputum specimens of SARS patients were shown to share 100% homology with the published SARS-associated coronavirus. Of the different clinical specimens, positive rate in the stools appeared to be the highest(21.55%). Chi-square for trend test revealed that the positive rates of stools and sputa of SARS patients decreased with the development of the disease (χ^2 for trend = 12.55 and 16.408, $P = 0.0004$ and $P = 0.00005$ respectively). **Conclusion** One-step RT-PCR proved to be an effective method for the detection of SARS-associated coronavirus from clinical specimens. Data as indicated that the positive rates of SARS coronavirus were decreasing in SARS patients along with the disease progression.

【Key words】 Sever acute respiratory syndrome; SARS-associated coronavirus; Reverse transcription-polymerase chain reaction

2002 年 11 月,自中国广东地区发现第一例 SARS 病例以来,到 2003 年 7 月间已有 30 多个国家和地区出现病例^[1-3]。2003 年 4 月 16 日,WHO 正式确认一种新型的冠状病毒是导致 SARS 的病原

体^[4,5]并将该冠状病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-associated coronavirus, SARS-CoV)。由于 SARS 是一种新出现的传染病,人们对其流行特点、致病机理以及病毒变异与疾病转归关系等也还不十分清楚。因此,建立灵敏、特异和快速的病原检测方法,对于 SARS 的临床诊断和疫情控制有着重要的意义。本研究采用一步法逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)对不同临床标本中 SARS-CoV 进行检

基金项目:国家重点发展计划“863”计划资助项目(2003AA208406)
作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所
通讯作者:曹务春

测,探讨机体 SARS-CoV 在不同病程的变化规律,从而为 SARS-CoV 早期诊断和防治提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:选取北京某部医院临床确诊的 121 例 SARS 患者作为研究对象,诊断标准采用国家卫生部颁发《传染性非典型肺炎临床诊断标准(试行)》(卫发电[2003]40 号及补充说明,2003 年 5 月 5 日)为准,自患者入院后每隔 1~2 周采集一次标本,直至病愈出院。

2. 试剂:用于 RNA 提取的 RNeasy Mini Kit 及核酸凝胶回收的 Qiaquick Gel Extraction Kit 均为 Qiagen 公司产品,AMV 逆转录酶和 RNA 酶抑制剂为美国 Promega 公司产品,Taq 酶购自上海生工生物工程有限公司。

3. SARS 患者标本处理及总 RNA 提取:将粪便、痰液标本加入适量的维持液(含 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青霉素和链霉素的 1640 培养基, pH 7.0)反复吹打,6000 r/min 离心 10 min,收集上清。按 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书,取上清液 210 μl 于 1.5 ml 离心管中,分别加入 3 倍体积的 RLT 液和适量 β -巯基乙醇,充分振荡后加入一定体积的无水乙醇混匀,将混合液加入到吸附柱中,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 s,弃废液。用 RWI 液洗柱一次,RPE 缓冲液洗柱两次,离心,弃废液。将吸附柱置于另一干净的离心管中,加 RNAase-free 水 40 μl ,静置 1 min 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 1 min,收集洗脱液,并加入 1 μl (40 U) RNA 酶抑制剂,混匀后于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4. RT-PCR 扩增:采用 WHO 推荐引物对 COR1~COR2 进行扩增,该引物针对 SARS 病毒聚合酶区保守序列设计,序列如下:COR1 5' CAC CGT TTV TAC AGG TTA GCT AAC GA 3'; COR2 5' AAA TGT TTA CGC AGG TAA GCG TAA AA 3',引物由北京三博远志生物技术公司合成。PCR 反应体系总体积为 30 μl ,包括 3 μl 10 \times RT-PCR 反应缓冲液,2 μl 0.1 mmol/L DDT,1 μl dNTP(10 mmol/L),1.5 μl 上、下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),1.5 μl Taq DNA 聚合酶(5 U),0.5 μl RNA 酶抑制剂(40 U),1 μl AMV 逆转录酶(30 U),5 μl RNA 模板。反应条件为:42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 反转录,95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min 预变性;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 10 s(drop 1 $^{\circ}\text{C}$),72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共 10 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,

72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 共 40 个循环。

5. PCR 产物纯化、测序:随机选取来自于不同传播链的 2 份扩增阳性标本,在其 PCR 产物中加入 3 倍体积的 QG 缓冲液及 1 倍体积的异丙醇,混匀后加入到 Qiaquick 柱中,12 000 r/min 离心 1 min;弃废液,再加入适量的 QG 缓冲液,同上离心;加入适量的 PE 缓冲液,12 000 r/min 离心 1 min,弃废液后同样离心,将 Qiaquick 柱置于另一干净离心管中,加适量洗脱液于柱中,静置 5 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,收集洗脱液,送往上海博亚公司测序。

结果

1. 研究对象的一般情况:121 例 SARS 患者的发病天数在 5~116 天不等。其中男性 76 例(62.81%),女性 45 例(37.19%)。患者平均年龄为(28.69 \pm 9.92)岁(17~73 岁)。发病人群以青壮年为主,主要集中在 20~29 岁(52.07%)和 30~39 岁(29.75%)两个年龄段。

2. SARS 患者标本 RT-PCR 检测结果:从 2003 年 5~8 月共采集 121 例 SARS 患者的粪便标本、痰标本和血标本 608 份,RT-PCR 检测结果显示,在检测不同种类的临床标本中,粪便标本检出的阳性率最高,可达 21.55%(50/232)。痰液标本阳性率为 18.75%(27/144)。SARS 患者粪便、痰液标本 RT-PCR 阳性率与病程的关系见表 1。对粪便、痰液标本阳性率随发病时间的变化进行趋势 χ^2 检验,结果显示 SARS 患者标本 RT-PCR 阳性率随着发病时间的增长而下降。粪便 RT-PCR 的趋势检验 $\chi^2 = 12.55$, $P = 0.0004$;痰标本 RT-PCR 的趋势 $\chi^2 = 16.408$, $P = 0.00005$ 。粪便标本、痰标本阳性检出率经反正弦变换后(0 值赋予较小的值)进行 Spearman 相关分析, $r = 0.698$, $P = 0.017$,从而说明 SARS 患者的粪便标本、痰标本 SARS-CoV 的检出率有一定的相关性。

3. 核酸序列测定及分析:测序结果应用 ClustalX(5.0)及 DNAClub 进行分析和比较,结果显示其与网上已公布的 SARS-CoV 序列同源性较高。通过绘制系统进化树(图 1)显示,2 份标本与 BJ01、GZ01、BJ03、BJ04 等 SARS-CoV 序列完全一致,同源性 100%,属于一个小分支。

表1 SARS 患者临床标本阳性例数与病程的关系

发病 天数	粪便标本			痰标本		
	病例 数	阳性 份数	阳性率 (%)	病例 数	阳性 份数	阳性率 (%)
< 10	3	3	100.00	2	4	50.00
10 ~	15	8	53.33	11	6	54.54
20 ~	37	14	37.81	27	9	33.33
30 ~	32	9	28.25	30	6	20.00
40 ~	58	4	6.90	36	2	5.56
50 ~	21	3	14.28	24	2	16.67
60 ~	18	4	22.22	9	0	0.00
70 ~	15	0	0.00	2	0	0.00
90 ~	9	0	0.00	6	0	0.00
100 ~	10	3	30.00	2	0	0.00
110 ~	14	2	14.29	3	0	0.00

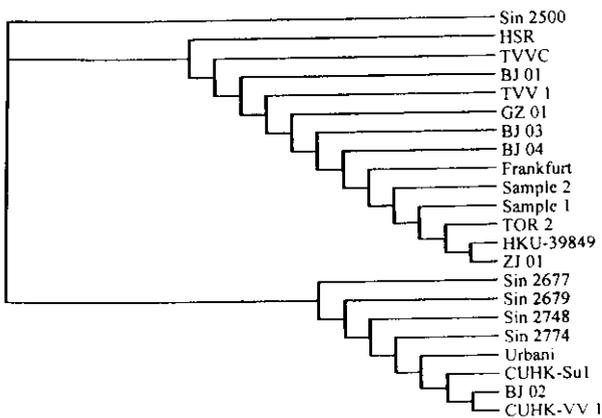


图1 SARS 患者病毒分离株部分核苷酸序列所构建的系统发生树

讨 论

目前对 SARS 缺乏早期诊断的手段,主要靠流行病学和临床来诊断。酶联免疫吸附法(ELISA)能在发病 21 天后检测到机体对病毒产生的抗体,免疫荧光法(IFA)则在感染 10 天后的患者血清中检测到抗体。这两种方法在临床早期诊断中的应用受到限制。本项研究也发现 8 例早期确诊 SARS 病例的 12 份粪便标本和 9 份痰液标本检测为阳性,而 ELISA 检测结果却是阴性,说明 PCR 早期检测 SARS-CoV 的方法优于 ELISA 和 IFA 等抗体检测方法。

本研究所采用的一步法 RT-PCR 检测避免了两步法可能造成的交叉污染,在一定程度上减少了假阳性的发生。另外,由于采用的 SARS-CoV 特异性引物所扩增的 DNA 片段位于聚合酶基因,其保守性强,适合建立 RT-PCR 法检测 SARS-CoV。从 SARS 患者粪、痰标本中,扩增出与预期大小相同的 DNA 片段,对其序列测定的结果表明,与已测定的 SARS-

CoV 的相应序列完全一致,同源性 100%,进一步证实本方法对标本检测的特异性和准确性。

Peiris 等对 50 例香港 SARS 患者进行了研究,他们收集患者的鼻咽部分泌物、血清、粪便标本以及 1 例患者的肺活检组织进行病毒的分离培养、RT-PCR 及免疫学等试验。结果从 44 例患者的鼻咽部分泌物中检测到 SARS-CoV,并从 18 份粪便标本中测到 10 份阳性,同时 50 例患者血清中 35 例 SARS-CoV 抗体阳性,但血浆中病毒的量非常少。在对 SARS-CoV 的检测中我们也发现,在粪便标本和痰液标本中 SARS-CoV 的检出率较高,分别为 21.55%(50/232) 和 18.75%(27/144)。相比之下血液病原体阳性检出率很低,30 例患者血清中均未检测出阳性标本,这可能与血液中 SARS-CoV 的含量较低或其中病毒存在时间较短有关。所以,我们在进行临床标本检测时,应该尽量使用粪便标本和痰液标本,以提高 SARS-CoV 的检出率。此外,本研究结果显示,发病 10 天内 SARS 患者粪便、痰标本的阳性检出率分别为 100% 和 50%,而发病 10 天后标本的阳性检出率开始下降,即 SARS 患者标本 RT-PCR 阳性率随着发病时间的增长而下降。但是对于临床确诊的 SARS 病例,如果出现阴性 PCR 结果,也不能由此排除 SARS,这可能由标本采集的时机或实验条件不当所致,因为我们在试验中发现标本处理延误或反复冻融等都会对扩增效率产生影响。

本研究中 SARS 患者粪便 RT-PCR 阳性率与病程的关系显示,发病时间在 100 天以上的 24 份标本中有 5 份标本的病毒 RNA 检测为阳性,阳性率高达 20.83%。需要指出的是,此结果并不具有很好的外推性,因为其中 4 份阳性标本采自危重患者或有合并感染发生的 SARS 患者,这部分患者的免疫力与一般患者相比明显低下。同时,对于阳性的 PCR 结果亦不能说明有活病毒的存在,这部分患者是否具有传染性或可能存在的传染性的强弱,还有待于深入研究。如果粪便中新检出的病原体是存活的病毒,那么 SARS-CoV 是否通过“粪-口方式”传播也需进一步研究。关于 SARS-CoV 检测的临床意义 WHO 指出,阳性结果表明,患者现在或过去被 SARS-CoV 感染,但不一定出现症状,阴性结果则不一定出现,表明患者没有被 SARS-CoV 感染。

作为一种新的传染病,SARS 的传播速度之快,涉及范围之广,使世界为之震惊。历史经验告诉我们,一种新的传染病流行后,会与人类长期共存。关

于 SARS-CoV 排泄规律、持续时间以及病毒变异与疾病转归关系等至今尚不清楚。如此迅猛出现,很可能像绝大多数呼吸道传染病一样形成季节流行高峰,疫情有再度回升的可能。因此,开展 SARS 患者临床标本病毒 RNA 的检测,为防止 SARS 复发、保护医务工作者和易感人群制定科学可行的策略和预防措施有着重要的意义。

参 考 文 献

1 Tsang KW, Wang T, Seto WH, et al. A cluster of cases of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030685v3.pdf> (accessed May 5, 2003).

- Schlagenhauf P, Ashraf H. Severe acute respiratory syndrome spreads worldwide. *Lancet* 2003; 361:101-103.
- WHO. Cumulative number of reported cases of severe acute respiratory syndrome (SARS). <http://www.WHO.int/csr/sars/country/2003-05-17/en/>.
- Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith C, 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*, Apr 10, 2003. <http://content.nejm.org/cgi/reprint/NEJMoa030747v2.pdf>.

(收稿日期:2003-09-29)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

浙江省嘉兴市秀洲区学生中七起传染病爆发的流行病学调查

沈月根 顾谢君 周建红 王加伟

2003 年 1~6 月,浙江省嘉兴市秀洲区先后发生水痘、麻疹、腮腺炎的传染病爆发,疫情波及 6 所学校,现将调查结果报道如下。

1. 流行病学调查 对学校疫情爆发期间所有缺课和有不适的学生通过逐个询问填写流行病学调查表,结合临床表现、体征、流行病史,对麻疹调查时用 ELISA 酶标法检测患者血清 IgM 抗体作出诊断。新塍镇洛东小学麻疹发病 29 例,罹患率 2.73%,病例主要集中在六年级,占 82.76%。现代实验学校腮腺炎发病 28 例,罹患率 2.81%,全部为初中一年级学生;王店镇建农小学水痘发病 47 例,罹患率为 34.06%,病例以幼儿班和四年级为主,占 70.21%;王店镇三建小学水痘发病 21 例,罹患率为 6.21%,病例以一、二年级为主,占 80.95%。新塍镇洛东中学水痘发病 4 例,罹患率为 0.60%,全部为初中二年级学生;新塍镇中学水痘发病 8 例,罹患率为 0.59%,病例以初中二年级为主,占 87.50%;现代实验学校水痘发病 10 例,罹患率为 1.00%,病例以初中三年级为主,占 90%。爆发从首例发病到报告,最短 3 天,最长 45 天,平均 26 天;从首例发病到末例病例,最短 14 天,最长 55 天,平均 40 天。水痘和腮腺炎患者普遍没有免疫史,新塍镇洛东小学的 29 例麻疹患者 20 例曾接受过免疫,占 68.96%,其中接种 1 次 2 例,接种 2 次 13 例,接种 3 次 5 例,免疫史不详 6 例。采集了 31 份麻疹疑似病例的血清标本,初次麻疹 IgM 抗体阳性 16 例,对其中 8 例阴性患者 7~10 天再次采集血标

本,测得 IgM 抗体阳性 3 例。

腮腺炎发病主要以张口咀嚼疼痛、腮腺单侧肿大(28.57%)、双侧肿大(71.43%)、发热(64.28%)、头痛(42.86%)、食欲减退(39.28%)为主,无并发症。麻疹患者发热一般在 39℃ 以上,持续 3 天左右出疹,出疹持续 4 天左右,以咳嗽(93.10%)、卡他性鼻炎(44.83%)、结膜炎(48.27%)症状为主,流行病史和临床表现确诊的患者症状相对较轻。水痘症状普遍都较轻,大部分患者有不同程度出现发热、咽痛、头痛、食欲不佳、全身不适的症状,疱疹发生时以躯干为主,皮疹呈向心性分布,症状较为典型。

2. 结论 爆发最主要原因是疫情报告不及时,从首例病例发生到报告,最长时间为 45 天,报告时多数学校已出现二代病例,由于报告的不及时,致使传染源得不到及时有效的控制和处理,措施不落实造成了疫情的进一步蔓延,症状轻的学生仍就在上课,未满足隔离期甚至还有症状的学生也来上课,教室内学生们聚集、空气流通不畅,密切接触也给传播增加了机会。疫情监测网络不敏感也是造成爆发的一个因素,腮腺炎、水痘在我区虽都属监测传染病,但漏报情况比较严重。人群的易感性也是传染病爆发的一个十分重要的因素,水痘和腮腺炎患者普遍没有免疫史;虽然 68.96% 的麻疹患者有免疫史,但该地的计划免疫工作一直比较薄弱,疫苗接种的质量值得考虑。

作者单位 314001 浙江省嘉兴市秀洲区疾病预防控制中心

(收稿日期:2003-09-03)

(本文编辑:尹廉)