

· 现场调查 ·

一起 SARS 爆发的血清流行病学调查

谢淑云 曾光 陈江婷 刘瑜瑄 李淑芬 尹卫东

【摘要】 目的 探讨 SARS 密切接触者的隐性感染和 SARS 患者血清中特异性抗体的消长情况。方法 采用中和试验法、间接酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫粘连法对北京一起 SARS 爆发案例中与重症 SARS 患者无防护密切接触的未发病者和续发 SARS 病例进行血清 SARS 特异性 IgG 抗体检测,采血时间为发病后或接触后 24 周左右。结果 共采集到 32 份血清,其中未发病密切接触者的血清 19 份,SARS 康复期患者血清 13 份。三种方法检测结果 57 份次未发病密切接触者的血清标本 SARS-CoV 抗体检测,结果均为阴性,39 份次 SARS 康复期患者血清标本 SARS-CoV 抗体检测,38 份次结果为阳性,1 份次(用免疫粘连法检测)结果为阴性。病后 24 周左右的中和抗体效价为 1:43 (1:16~1:203)。结论 研究中未发现 SARS 密切接触者存在隐性感染,SARS 患者病后 24 周左右血清 IgG 抗体仍维持在较高水平。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;抗体;隐性感染

Serological investigation on close contacts to patients with severe acute respiratory syndrome in an SARS outbreak XIE Shu-yun*, ZENG Guang, CHEN Jiang-ting, LIU Yu-xuan, LI Shu-fen, YIN Wei-dong. *Chinese Field Epidemiology Training Program, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

【Abstract】 Objective To study the evidence of severe acute respiratory syndrome (SARS) infection among close contacts to SARS patients and the level of sera IgG antibody in SARS cases. Methods Specific IgG antibody against SARS-CoV in serum samples from contacts to patients, five months before an SARS outbreak in Beijing. Neutralized test, ELISA and immunity adherence test were studied. Samples were collected after clinical onset of patients or close contacts to patients, for 22-24 weeks. 19 close contacts and 13 cases were included in the study. Results In close contacts, all tests were negative on three methods. All SARS cases were positive except one by immunity adherence test. The neutralized antibody levels were from 1:16 to 1:203, with medium level of 1:43. Conclusion According to our survey, there was no latent infection among close contacts. IgG antibody in sera continued to be at higher levels among SARS cases 22-24 weeks after onset.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome; Antibody; Recessive infection

2003 年 3 月下旬至 4 月中旬,北京市 J 医院发生一起 SARS 爆发性流行,首例患者于 3 月 25 日因脑卒中伴发热收入神经内科病房,28 日出现呼吸困难,经抢救无效于 3 月 30 日死亡。3 月 31 日起在其密切接触者中陆续出现一批 SARS 临床诊断病例。由中国现场流行病学培训项目学员对该起爆发进行传播链调查,为 SARS 防治提供了较有价值的依据^[1]。为了探索 SARS 的隐性感染和 SARS 患者病后特异性抗体的消长情况,选择了在该 SARS 爆发初期未采取防护措施情况下,与首例患者和 1 例

3 月 31 日发病的二代重症 SARS 患者密切接触人员进行血清学检测。现将本起爆发案例的血清学研究结果报告如下。

对象与方法

1. 研究对象:2003 年 3~4 月份在北京市 J 医院发生的一起 SARS 爆发案例中的 32 例与最初 2 例重症 SARS 患者密切接触的医护人员和陪护家属,均未进行 SARS 标准防护。并按其接触后是否发展为 SARS,分别定义为 SARS 续发病例和未发病密切接触者。

(1) SARS 续发病例:所有 SARS 续发病例均为临床诊断病例,符合卫生部 2003 年 5 月 3 日颁布的“传染性非典型肺炎临床诊断标准(试行)”。其中符

基金项目 科技部 SARS 攻关课题资助项目(2003AA208403)

作者单位:100050 北京 中国疾病预防控制中心中国现场流行病学培训项目(谢淑云、曾光)北京科兴生物制品有限公司(陈江婷、刘瑜瑄、李淑芬、尹卫东)

合重症 SARS 病例诊断标准的为重症 SARS 病例。

(2) 未发病密切接触者: 是指与 SARS 患者密切接触后 12 天内未出现任何症状或曾出现过发热、咽痛、腹泻等症状, 但很快痊愈未发展成 SARS 者^[2]。

2. 流行病学调查: 设计统一调查表, 用查阅病历、面对面调查或电话调查的方式, 对各代病例、密切接触者或知情者进行追踪和个案调查, 逐一确定接触者的接触情况和发病情况。根据调查结果判定密切接触史、SARS 续发病例和未发病密切接触者。

3. 血清学检测: 根据自愿接受检测的原则, 于本起 SARS 爆发后 22~24 周采集研究对象静脉血 10 ml, 同时用三种方法进行血清 SARS-CoV 抗体检测。在采血和检测过程中均对操作者实施盲法。

(1) 中和试验: 采用微量滴定法测定病毒滴度和 Karber 法计算病毒滴度, 以 $\text{LgCCID}_{50}/\text{ml}$ 表示。血清经 56°C 灭活 30 min 后, 过滤除菌。根据测定的病毒滴度, 用稀释液将病毒稀释成 $100 \text{ CCID}_{50}/100 \mu\text{l}$ 病毒悬液与 $1:8 \sim 1:512$ 四倍比稀释的灭活血清等体积充分混匀后, 置 37°C 培养箱中作用 1 h。再将病毒血清混合物接种敏感细胞, 放入 37°C $5\% \text{ CO}_2$ 孵箱内培养 4 天, 观察细胞病变, 采用 Reed-Muench 法计算血清抗体的中和效价。血清抗体滴度 $\geq 1:8$ 为阳性。

(2) ELISA 法: 检测试剂由北京华大吉比爱生物技术有限公司生产, SARS 冠状病毒抗体诊断试剂批号 20030603。采用间接 ELISA 法定性检测, 设空白对照 1 孔、阴性对照 2 孔、阳性对照 1 孔, 其余加入样品稀释液, 置 37°C 温育 30 min, 洗板后加入抗 IgG 抗体 37°C 温育 20 min, 洗板后再加入底物液 A 和 B, 显色后加入终止液, 测定吸光度(A)值。求出临界值, 被检样本血清的 A 值大于临界值为抗体阳性, 小于临界值为抗体阴性。

(3) 免疫粘连法: 检测试剂由北京科兴生物制品有限公司研制, 批号 20030921。根据 SARS 病毒经灭活、提纯并标准化病毒抗原和豚鼠新鲜补体, 抗原与被检血清抗体结合后, 在补体的存在下使人的“O”型红细胞发生粘连凝集反应的原理。取“V”型孔微量血凝板, 每孔加入 1 GVB^{++} 稀释液, 取待检血清, 从第 1 孔起作倍比稀释。每孔加入 SARS 抗原, 充分混合密封, 37°C 温育 1 h 后加入补体, 充分混匀后, 再次 37°C 温育 45 min。加入 DTT 液混匀后加入红细胞, 放室温 1 h 后判定结果。根据红细胞凝集程度用“+++、++、+、-”表示, 以“++”为判定终点。

4. 统计学分析: 数据统计学处理采用 SPSS 11.0 统计分析软件, 两组中和抗体效价的比较采用对数转换后的 t 检验。

结 果

1. 流行病学调查: 共对 19 名未发病密切接触者和 13 例 SARS 续发病例进行调查和采血。其中与首例患者密切接触的未发病者 6 名, 续发病例 4 例, 与二代病例密切接触的未发病者 13 名, 续发病例 9 例。13 名 SARS 续发病例中重症病例 5 例, 其他病例 8 例。

2. 血清 SARS-CoV 抗体检测: 32 份血清标本中, 19 份未发病密切接触者(其中 16 名未出现任何症状, 1 名在接触后的 12 天内出现过咽痛, 2 名出现过咽痛和腹泻, 均自愈, 未发展为 SARS 诊断病例)血清标本用三种方法检测结果均阴性, 13 份 SARS 续发病例血清标本用三种方法检测, 除 1 份的免疫粘连法检测结果阴性, 其余均阳性。

3. 不同代次 SARS 病例中和抗体效价: 第二代 SARS 续发病例中和抗体平均效价为 $1:64$ ($1:16 \sim 1:203$), 第三代为 $1:36$ ($1:16 \sim 1:64$), 两者差异无统计学意义($t = 1.36$, $P = 0.201$), 见表 1。

表1 不同代次 SARS 病例中和抗体效价

病例代次	检测人数	GMT(1:)
第二代	4	64(16~203)
第三代	9	36(16~64)
合计	13	43(16~203)

4. 不同临床表现病例中和抗体效价: 13 例 SARS 续发病例中重症病例 5 例, 病后 22~24 周的中和抗体效价为 $1:50$ ($1:16 \sim 1:203$), 与非重症病例的中和抗体效价 $1:39$ ($1:16 \sim 1:80$) 的差异无统计学意义($t = 1.13$, $P = 0.292$), 见表 2。

表2 不同病情 SARS 病例中和抗体效价

病例类型	检测人数	GMT(1:)
重症	5	50(16~203)
非重症	8	39(16~80)
合计	13	43(16~203)

讨 论

自世界卫生组织(WHO)宣布 SARS 病原体为一种新型冠状病毒后^[3], 参与全球合作的一些实验室, 开始研制各类可用于 SARS 病毒感染诊断的方法, 主要有免疫测定法、分子诊断法和病毒培养法

等。我国临床上多使用 ELISA 或免疫荧光试验 (IFA) 作为血清 SARS-CoV 抗体检测方法^[4], 还较少应用中和试验法及免疫粘连法检测抗 SARS-CoV 抗体。

ELISA 法的灵敏性高, 实验条件不需要 P3 实验室, 但据报道存在假阳性可能^[5], 为了排除本研究的假阳性, 我们同时又采用了中和实验和免疫粘连法。免疫粘连定性和定量检测方法, 特异性强、灵敏度偏低, 实验材料需要大量灭活、提纯并标准化病毒抗原和豚鼠新鲜补体, 虽然不需要 P3 实验室, 但一般实验室很难具备这样条件, 适用于其他诊断方法的特异性验证; 中和试验定性和定量检测方法, 特异性强、灵敏度高, 但实验条件严格, 需要有 P3 实验室和标准化 SARS 病毒毒种, 建立标准操作方法, 一般实验室很难达到要求, 该方法能够用于流行病学调查、科研开发和疫苗评价等。

本次研究选择的对象是一起 SARS 爆发案例中未采取防护措施情况下与重症 SARS 患者有密切接触史的人员, 其流行病学暴露史明确。同时采用中和试验法、ELISA 法和免疫粘连法对研究对象的血清进行 SARS-CoV 抗体检测, 三种方法进行相互验证, 保证了检测的高灵敏度和高特异性。研究结果显示: 所有未发病密切接触者, 包括个别接触后曾有咽痛或/和腹泻症状, 但很快痊愈者的血清 SARS-CoV 抗体均为阴性, 未发现隐性感染, 这与石玉玲等^[6]、北京大学附属第一医院和北京大学基础医学院联合进行的研究结果相一致: SARS-CoV 主要引起显性感染, 可能不具有隐性感染性。而姜庆五课

题组对百余份 SARS 病例密切接触者血清样本进行测试, 结果表明有 5% 的样本有感染 SARS 病毒的证据, 血液中含有 SARS 病毒抗体^[7]。不同的研究获得不同的结果, 是否与样本数、采样时间、检测方法或检测试剂质量等因素有关, 有待进一步研究。

SARS-CoV 抗体在感染后的不同时期, 抗体阳性率和抗体水平有所不同。中山大学附属第三医院传染科李刚教授等专家经过对 21 例 SARS 患者不同时期血清的调查, 发现 IgG 抗体可在病后 90 天时仍维持在高水平。本研究中 13 例 SARS 患者在病后 (160 ± 10) 天时血清 IgG 抗体仍维持在较高水平, 但与病情的严重程度相关性不大, 至于该抗体能持续时间多长有待进一步观察。

参 考 文 献

- 1 谢淑云, 曾光, 雷杰, 等. 一起传染性非典型肺炎爆发的超级传播者和传播链分析. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 449-453.
- 2 彭国文, 何剑峰, 林锦炎, 等. 广东省传染性非典型肺炎流行病学特征初步调查. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 350-352.
- 3 WHO. Update 31-coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. <http://www.who.int>
- 4 中华医学会, 中华中医药学会. 传染性非典型肺炎 (SARS) 诊疗方案. 中华传染病杂志, 2003, 21: 1731-1752.
- 5 Wang YS, Shen H, Sun SH, et al. Analysis of false-positive associated with antibody tests for SARS-CoV in SLE patients. Acta Biologica Experimentalis Sinica, 2003, 36: 314-317.
- 6 石玉玲, 李林海, 徐德兴, 等. 广东地区严重急性呼吸综合征患者血清流行病学调查. 解放军医学杂志, 2003, 28: 572-575.
- 7 SARS 研究新进展. 儿童血清中存在抗非典病毒物质. <http://online.cri.com.cn/773/2003-11-5/123@342664.htm>

(收稿日期: 2004-04-09)

(本文编辑: 张林东)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

关于文稿申请“快速通道”发表的规定和要求

为了使反映我国流行病学领域中, 有重大研究成果内容的论文尽快、及时在我刊发表, 本刊自 2003 年起, 对作者的来稿从审查到正式发表的程序, 开辟了“快速通道”。为了使广大作者、读者了解文稿申请“快速通道”的规定和要求, 特将申请“快速通道”的规定和要求公布如下: (1) 凡内容涉及有重大创新和为国内首创, 达到或超过国内或国际先进水平的论文, 均可申请进入“快速通道”, 以使论文快速发表; (2) 作者本人提出进入“快速通道”申请; (3) 作者提供国内外数据库的查新报告; (4) 作者提供两位同行知名专家 (作者所在单位的专家和作者的导师应回避) 的推荐信, 推荐信内容应包括本研究为“最新”、“首创”, 及申请快速发表论文的理由; (5) 作者提供申请快速发表论文的作者署名无争议、发明权 (即首创权) 无争议的证明; (6) 作者提供论文一式 3 份 (包括软盘); (7) 作者提供由作者单位科研部门开具的介绍信。

凡符合上述规定和要求, 获准进入“快速通道”的论文, 将由本刊编委会总编辑、相关专业编委共同审议决定是否刊登 (每篇论文需交纳快速审稿费 200 元, 并请通过邮局汇款), 如编委会审查后同意论文发表, 本刊郑重承诺, 该论文于收稿后 4 个月内正式刊出。