

关于我国 2003 年临床诊断为 SARS 患者标本中新分离呼肠病毒问题的思考

范明远 李子华

2003 年的 SARS 疫情给全世界,特别是给中国造成的灾难,人们记忆犹新,虽然世界卫生组织已将 SARS 病原确定为一种新分离冠状病毒,即 SARS-CoV^[1,2],但仍有很多谜团没有解开。如到目前为止还没有很好的动物模型证明 SARS-CoV 的致病性;2004 年确诊为 SARS 的几例个案中,除北京市的实验室感染外,新加坡及我国台湾和广州市的感染者均症状较轻,且上百名密切接触者和接触者无一人感染。这些现象对 2003 年 SARS 疫情中较高的病死率无法解释,使人们怀疑 SARS-CoV 是否是 2003 年 SARS 疫情的惟一病原。

在 2003 年 SARS 患者的临床标本中,除了 SARS-CoV 外,还发现有其他病毒多病原的报道。端青等^[3]及杨怡等^[4]从多例 SARS 患者临床标本中分离出 5 株呼肠病毒(Reovirus, Reo-V),并对该病毒的生物学和分子生物学鉴定、血清学试验、实验动物(猴和豚鼠)致病性等进行了系列研究与报道,认为新分离 Reo-V 与 SARS 疫情相关,且新分离 Reo-V 感染可引起类似重症 SARS 的症状。这一发现提示 2003 年 SARS 疫情中存在多病毒联合感染(co-infection)的可能性。以上的研究引起中外学者关注,笔者对上述研究结果进行分析探讨,期望客观地思考新分离 Reo-V 是 SARS 病原之一,还是重叠感染(super-infection)病原之一?这一问题值得进一步研究阐明。

1. 5 株新分离 Reo-V 来源:从多例 SARS 患者标本中获得新分离 Reo-V,说明不是偶然现象。Reo-V 并非人类呼吸道常见寄生病毒。在 2003 年 SARS 疫情中分离出的多株 Reo-V 均为同一血清型,显示与该次爆发性流行可能存在一定关系。新分离 Reo-V 来源的背景情况见表 1。

北京市第一例 SARS 患者 A,2003 年 2 月初去广州市出差感染 SARS,2 月 22 日回原籍(太原市)发病;患者 B 因照顾患病女儿感染 SARS,2 月 27 日发病。因在山西省多家医院治疗无效而到北京市求医,3 月 4 日采集该 2 例患者痰液

液及咽拭子标本送实验室进行病原分离,即分离出 2 株 Reo-V。患者 B 3 月 11 日病死于解放军第三〇二医院;2003 年 5 月患者 J 患有高血压、肾功能衰竭等基础病,有血透治疗史,5 月 21 日因发热 38℃ 以上入住北京佑安医院,临床确诊为 SARS,6 月 5 日死亡,从患者 J 尸检肺组织中分离出 Reo-V。另外该研究者从广州同行处获得 1 株分离自 SARS 患者 K 的病毒,后经实验室鉴定为 Reo-V^[5]。11 月解放军第三〇二医院病毒研究室从死于 SARS 患者 C 尸检肺标本 SARS-CoV 传代细胞中,以新分离 Reo-V 引物进行 RT-PCR 扩增和测序,得到阳性结果,随即进行分纯,又得到 1 株 Reo-V,此例证明是两种病毒的联合感染。至此,三家实验室从 5 例 SARS 患者 5 份临床标本中分离得到 5 株 Reo-V,3 株来自咽拭子,2 株来自尸检肺组织,5 例中有 3 人死亡,2 例为重症。

Reo-V 适应的细胞系十分广泛,但从呼吸道中分离到 Reo-V 很少见报道。我国在 20 世纪 70 年代开展的全国感冒气管炎病毒病原研究中,临床分离了 236 份咽拭子标本,共获得 90 株病毒,无一株为 Reo-V^[6]。SARS 疫情爆发前,国内仅有 1982 年解放军第三〇二医院从呼吸道合并神经症状患儿和呼吸道合并肠道症状患儿的粪便中分离到 2 株 Reo-V 的报道^[7]。另外,2004 年初该研究者在解放军第三〇二医院(SARS 患者收治医院)采集 27 份不同人群的含漱液标本,其中发热待查患者标本 18 份、未发热患者标本 9 份,用同样方法分离病毒,并盲传 3 代,均未出现细胞病变,Reo-V 引物 RT-PCR 扩增结果均为阴性,即自这些人群中均未分离出 Reo-V(未发表文献)。以上结果可以说明,Reo-V 并非为人类呼吸道常见寄生病毒。

该研究者对新分离 Reo-V 中的 4 株通过单向交叉中和试验进行抗原性分析,结果证明 4 株新分离 Reo-V 均为同一血清型。从不同地区(广州市、北京市)、不同医院确诊的 SARS 患者的不同标本(咽拭子、肺脏)中分离出的 Reo-V 具

表1 5 株新分离 Reo-V 来源的背景情况

患者	籍贯	性别	年龄(岁)	可能接触原因	标本种类	结局	病原分离	
							新分离 Reo-V	SARS-CoV
A	山西	女	27	到广州市出差	咽拭子含漱液	重症痊愈	+	-
B	山西	女	51	患者 A 之母,密切接触者	咽拭子含漱液	死亡	+	-
C	山西	男	57	患者 A 之父,密切接触者	尸检肺标本	死亡	+	+
J	北京	男	54	定期去医院透析	尸检肺标本	死亡	+	-
K	贵州	女	35	广州市工作	咽拭子含漱液	重症痊愈	+	-

作者单位: 102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(范明远);复旦大学公共卫生学院(李子华)

有相同的抗原性^[8]。

2. 北京首例 SARS 患者同一家族及其他 SARS 患者血清标本中新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 中和抗体的测定^[9]: 北京首例 SARS 患者 A 的家族有 9 名密切接触者在疫情期间临床诊断为 SARS, 对这 9 例患者的血清标本进行了新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 中和抗体测定, $\geq 1:10$ 者判为阳性。表 2 显示, 9 例中除患者 B、C 外, 其余 7 例 SARS-CoV 中和抗体均为阳性; 9 例中有 6 例新分离 Reo-V 中和抗体阳性, 且其中 5 例为重症 SARS。又对包括这 9 例患者在内, 2003 年 2-4 月发病临床确诊为 SARS 的共 31 例患者双份或多份血清新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 中和抗体的测定结果进行分析(表 3)。表 3 将血清抗体检测结果分为三种类型: ① 仅有新分离 Reo-V 中和抗体; ② 仅有 SARS-CoV 中和抗体; ③ 同时有两种病毒中和抗体。

表 2 北京市首例 SARS 患者及其密切接触者血清抗两种病毒的中和抗体

患者	性别	年龄(岁)	与患者关系	中和抗体($\geq 1:10$)		临床分型
				新分离 Reo-V	SARS-CoV	
A(首例)	女	27	首例 SARS	+	+	重症 SARS
B	女	51	首例之母	+	-	死亡
C	男	57	首例之父	+	-	死亡
D	男	25	首例之弟	-	+	轻症 SARS
E	女	26	首例之弟媳	-	+	轻症 SARS
F	男	32	首例之朋友	+	+	重症 SARS
G	男	25	首例之朋友	-	+	疑似 SARS
H	男	36	首例之夫兄	+	+	轻症 SARS
I	男	28	首例之夫弟	+	+	重症 SARS

注: 患者 B、C 按发病时间计算采血日已达 9 天, SARS-CoV IgM 检测结果为阴性

表 3 31 例 SARS 患者血清标本新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 中和抗体分析

类型	阳性例数	重症例数
仅有新分离 Reo-V 中和抗体	10	6
仅有 SARS-CoV 中和抗体	4	1
含有两种病毒中和抗体	17	7

31 例 SARS 患者血清中有新分离 Reo-V 中和抗体的 27 例(10 例 + 17 例), 占总病例的 87.1% (27/31), 中和抗体呈 4 倍升高者占 22.6% (7/31), 其余患者抗体持平或先升后降, 均显示 Reo-V 的动态改变。该研究者认为, SARS 患者血清中抗新分离 Reo-V 中和抗体的阳性率如此之高, 说明新分离 Reo-V 感染与 2003 年 SARS 流行的疫情可能相关。

但有 10 例临床诊断为 SARS 的患者没有检测到 SARS-CoV 抗体。据文献报道, 大多数 SARS 患者发病 1 周左右会出现抗 SARS-CoV IgM 抗体, 发病 10 天左右出现 IgG 抗体^[10,11]。而这 10 例没有检测到 SARS-CoV 中和抗体的血清标本, 除 2 例采集于发病后 9 天(后死亡), 其他均采集于发病后 10 天或 10 天以上(包括 10 天 1 例、12 天 1 例、14 天 2 例、15 天 1 例、34 天 1 例、35 天 1 例、38 天 1 例)。这 10 例 SARS-CoV 中和抗体阴性的患者, 其新分离 Reo-V 中和抗体

均为阳性, 且其中 5 例为死亡或重症病例。

另外, 2003 年有关研究人员根据 SARS 的临床表现将 SARS 患者病症分为轻症、重症和极重症(暴发型)^[12], 以上 31 例患者病症均已在临床分型(重症 14 例, 轻症 16 例, 疑似 1 例)。表 3 分析了 Reo-V 感染与重症 SARS 的关系: 仅有新分离 Reo-V 抗体的 10 例 SARS 患者中重症 6 例, 而仅有 SARS-CoV 抗体的 4 例 SARS 患者中重症 1 例。即仅感染新分离 Reo-V 的患者多为重症 SARS, 而仅感染 SARS-CoV 的患者多为轻症或疑似 SARS。另外, 若加上同时有两种病毒抗体病例中的 7 例重症, 则 14 例重症 SARS 中有新分离 Reo-V 抗体的占 13 例, 有 SARS-CoV 抗体的 8 例。研究者认为新分离 Reo-V 感染很可能加重了 SARS 病情。

3. 动物试验证明新分离 Reo-V 具有较强的致病性: Reo-V 对人类的致病性一直未引起足够的重视, 2003 年之前国内未见有自呼吸道标本中分离出 Reo-V 的报道。美国对 Reo-V 的研究发现, Reo-V 可导致人和动物致死性间质性肺炎(fatal interstitial pneumonia)、肺组织纤维化(pulmonary fibrosis)、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome)和细支气管炎闭塞性机化肺炎(bronchiolitis obliterans organizing pneumonia)^[13-15]。端青等用新分离 Reo-V 感染食蟹猴和豚鼠, 以观察该病毒的致病性。

(1) 对食蟹猴的致病性: 用新分离 Reo-V 通过滴鼻和静脉注射两种方式接种 4 只食蟹猴, 均出现持续发热症状, 退热数天后又出现第 2 次发热, 体温最高可达 40.4℃ (平均基础体温 37.7℃), 此现象复制出大多数 SARS 患者出现 2 次发热的临床体征; 动物感染 1 周左右开始产生特异性中和抗体, 并出现毒血症。从血液和粪便中能够分离出同一种病毒, 说明除呼吸道分泌物外, 血液和粪便均是新分离 Reo-V 的载体。从病理学观察结果来看, 新分离 Reo-V 感染实验猴所侵犯的主要靶器官为肺脏、脾脏、淋巴结、中枢神经系统和全身小静脉, 主要表现为: 发病早期(7 天剖检猴)肺脏急性出血, 渗出、透明膜形成、支气管黏膜上皮细胞和纤毛脱落, 支气管周围单核细胞浸润等急性病变, 脾脏和淋巴结生发中心淋巴细胞增殖活跃; 随后(33 天剖检猴)出现由于出血、渗出、淋巴细胞浸润和肺泡上皮细胞增生造成的严重肺泡间隔增宽, 脾脏髓质瘀血, 淋巴小结萎缩, 生发中心淋巴细胞数量减少, 全身小静脉瘀血, 血管壁水肿等病变^[16,17]。该研究者还发现新分离 Reo-V 病毒侵犯中枢神经系统, 造成脑膜充血、水肿, 神经细胞脱髓鞘等神经系统损伤。Reo-V 对大脑细胞的损伤在其他实验动物模型中也有报道^[18]。回顾 2003 年部分 SARS 患者临床出现一系列精神症状, 如味觉、嗅觉丧失, 精神亢进甚至错乱, 有自杀倾向等, 该研究者提出这些临床症状很可能是病毒感染引起中枢神经系统损伤所致。

(2) 对豚鼠的致病性: 为观察新分离 Reo-V 的致病性及其在 SARS 中可能起的作用, 研究者设计了三种接种方式: 单独接种新分离 Reo-V、单独接种 SARS-CoV 和混合接种两种病毒。

用 4 种剂量(原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3})新分离 Reo-V 接种 12 只豚鼠(每组 3 只),新分离 Reo-V 组于接种后第 22 天开始死亡,至 30 天全部死亡。接种病毒的浓度越高,动物死亡越早。动物死亡前有严重的腹泻和鼻出血现象;单独接种原液 SARS-CoV 和对照组豚鼠全部存活,直到剖杀(44 天)均没有出现明显异常的临床体征。

混合接种新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 两种病毒的 27 只豚鼠,接种后第 3 天即出现死亡,7 天之内半数动物死亡,共死亡 18 只,接种病毒的浓度越低,存活动物数越多。存活的 9 只豚鼠肺脏出现肉眼可见明显病变,如表面明显的结节状突起、严重的肉芽变、肝样变和表面苍白、皱折、纤维样病变。

通过病理学观察,该研究者发现新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 感染豚鼠引起的肺脏病变有明显不同:单独 SARS-CoV 感染豚鼠,主要表现为以肺泡上皮细胞增生为特征的局部泡间隔增宽,未观察到明显的肺泡腔出血和透明膜形成等现象;而单独新分离 Reo-V 感染豚鼠肺脏损伤严重,如弥散性出血,明显的蛋白渗出液,大量的透明膜形成。由于出血严重,血液通过支气管、气管至鼻腔流出,造成豚鼠死亡前鼻出血现象。因此,单独新分离 Reo-V 感染是一个严重的急性病理损伤过程。另外,混合感染与两种病毒单独感染又不相同,混合感染豚鼠肺脏既有弥散性出血、渗出、透明膜形成等急性病理损伤现象,又有肺泡上皮细胞和成纤维细胞增生,肺纤维化征象。该研究者认为从病理学观察结果来看,新分离 Reo-V 和 SARS-CoV 混合感染豚鼠肺脏的病变更类似临床 SARS 患者肺脏的病理学改变^[19]。

据文献报道,Reo-V 感染啮齿动物可以成为很好的急性呼吸窘迫征的动物模型,但并不致死动物^[20,21]。解放军第三〇二医院曾分别用 1、2、3 型 Reo-V 感染豚鼠,未出现动物死亡。而新分离 Reo-V 感染的 12 只豚鼠全部死亡,说明新分离 Reo-V 比已知的 1、2、3 型 Reo-V 毒力更强(未发表文献)。

4. 结语:

(1)从 SARS 患者 C(已死亡)尸检肺标本中,同时分离出 SARS-CoV 和 Reo-V,提示可能是两种病毒联合感染或重叠感染,而新分离的 Reo-V 是一变异株。

(2)新分离 Reo-V 实验室感染食蟹猴发生的高热、二次发热、毒血症和肺部病变以及豚鼠的肺部病变,均酷似患者发生的病变和出现的临床体征。

(3)根据 Robert Koch 的原则:①在 2003 年 SARS 流行中,从临床诊断 SARS 患者体内新分离出 5 株 Reo-V 病原体;②从 SARS 患者新分离到的 Reo-V,能在实验室培养成功;③用培养的新分离 Reo-V 感染动物能患上同样的疾病,并能从感染动物脏器中分离出同一种病毒且在实验室可继续培养。以上三点事实能够满足 Koch 原则的要求,故可初步确定新分离 Reo-V 很可能是 2003 年 SARS 流行中的病原之一。

综上所述,2003 年 SARS 疫情中的新分离 Reo-V 问题值得思考,我们应将思路放宽,分析 2003 年 SARS 流行的多病原的病因学的诸问题。要真正揭开 SARS 流行的谜团,还有许多工作要做。

参 考 文 献

- 1 Peiris JS, Lai ST, Poon LLM, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361: 1319-1325.
- 2 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsnlith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348:1953-1966.
- 3 Duan Q, Zhu H, Yang Y, et al. Reovirus, isolated from SARS patients. *Chin Sci Bull*, 2003, 48:1293-1296.
- 4 杨怡,李卫华,端青,等.再次从 SARS 患者肺组织中分离与检出呼肠病毒. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27: 封二.
- 5 左庭婷,檀华,何君,等.从 SARS 患者标本中分离的呼肠病毒的分纯及鉴定. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27:241-243.
- 6 中国人民解放军某部队感冒防治小组.北京地区 1971-1973 年感冒患者的病毒病原检查. *中华医学杂志*, 1975, 55:728-731.
- 7 吴慎,李印堂,范文光,等.两株呼吸道肠道孤病毒的分离鉴定. *中华医学杂志*, 1982, 62:146-151.
- 8 何君,貌盼勇,胡燕,等.我国新分离呼肠病毒血清型鉴定. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27: 封二.
- 9 朱虹,貌盼勇,何君,等. SARS 患者双份血清中抗呼肠病毒和冠状病毒中和抗体的测定. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28: 封二.
- 10 Nicholls J, Dong XP, Jiang G, et al. SARS: clinical virology and pathogenesis. *Respirology*, 2003, 8 suppl:6-8.
- 11 李靖,陈昊. SARS 患者血清中 SARS 相关冠状病毒抗体产生规律的初步分析. *第二军医大学学报*, 2003, 24:713-715.
- 12 邹正升,杨永平,陈菊梅,等.严重急性呼吸综合征临床分型特点及其意义探讨. *解放军医学杂志*, 2003, 28:777-780.
- 13 Tihltson JR, Lerner AM. Reovirus type 3 associated with fatal pneumonia. *N Engl J Med*, 1967, 276:1060-1063.
- 14 Bellum SG, Dove D, Harley RA, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of intraluminal fibrosis. A model for the study of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *Am J Pathol*, 1997, 130:2243-2254.
- 15 London L, Majeski EI, Paintlia MK, et al. Respiratory reovirus 1/L infection of diffuse alveolar damage: a model of acute respiratory distress syndrome. *Exp Mol Pathol*, 2003, 72:24-36.
- 16 朱虹,左庭婷,何君,等.新分离呼肠病毒 BYD1 株实验感染食蟹猴动物模型的建立. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27:327-329.
- 17 何诚,朱虹,何君,等.新分离呼肠病毒 BYD1 株实验感染食蟹猴的病理学改变及发病机制. *军事医学科学院院刊*, 2003, 27:404-405.
- 18 DeBiasi RL, Clarke P, Meintzer S, et al. Reovirus-induced alteration in expression of apoptosis and DNA repair genes with potential roles in viral pathogenesis. *J Virol*, 2003, 77:8934-8947.
- 19 朱虹,何君,何诚,等.呼肠病毒 BYD1 株毒力及其与 SARS 相关性的初步实验研究. *军事医学科学院院刊*, 2004, 28:295-297.
- 20 London L, Majeski EI, Paintlia MK, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: a model of acute respiratory distress syndrome. *Exp Mol Pathol*, 2002, 72:24-36.
- 21 London L, Majeski EI, Altman-Hamamdzić S, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: pulmonary fibrosis is not modulated by corticosteroids in acute respiratory distress syndrome in mice. *Clin Immunol*, 2002, 103(3 Pt 1):284-295.

(收稿日期:2004-09-03)

(本文编辑:张林东)