

四种试剂盒在 SARS 实验室早期诊断中的作用分析

王鸣 高阳 周端华 吴新伟 陈小霜 狄飏 刘于飞 陈芳 杜琳
徐慧芳 顾菁 郑伯健 徐建国

【摘要】 目的 比较 4 种检测严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)基因、抗原和抗体的试剂盒在 SARS 患者早期实验室诊断的可能作用。方法 用 3 种酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测 SARS-CoV IgG、SARS-CoV IgM 和 SARS-CoV N 蛋白,用荧光定量聚合酶链反应(F-PCR)检测 SARS-CoV 核酸。结果 根据 162 份血清的检测结果,发病 1-5 天,N 抗原的阳性率可达 90.2% (55/61);发病后的第 15-18 天 IgG 和 IgM 阳性率为 92.8% (13/14);根据 82 份咽拭子的检测结果,F-PCR 法在发病后 1-5 天的阳性率可达 56.3% (14/24),6-9 天可达 71.4% (10/14)。结论 除了检测 SARS-CoV 病毒基因的 F-PCR 方法以外,对疑似患者血清标本进行 N 蛋白的检测,具有早期预报意义。

【关键词】 严重急性呼吸综合征冠状病毒;阳性率

The effects of 4 laboratory test kits in early detecting of severe acute respiratory syndrome coronavirus
WANG Ming*, GAO Yang, ZHOU Duan-hua, WU Xin-wei, CHEN Xiao-shuang, DI Biao, LIU Yu-fei, CHEN Fang, DU Lin, XU Hui-fang, GU Jing, ZHENG Bo-jian, XU Jian-guo. *Guangzhou Centre of Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

【Abstract】 **Objective** To compare the 4 test kits on severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) gene, antigen and antibody for early diagnose of SARS patients. **Methods** Three enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to detect SARS-CoV IgG, IgM and N protein and fluorescent polymerase chain reaction (F-PCR) kit was used to detect SARS-CoV RNA. **Results** In 162 serum samples, 90.2% (55/61) became N protein positive in 1-5 days and 92.8% (13/14) became positive IgM and IgG in 15-18 days after the onset of disease, respectively. On 82 gorgling samples, the positive rates of F-PCR were 56.3% (14/24) in 1-5 days and 71.4% (10/14) in 6-9 days after the onset. **Conclusion** Other than F-PCR, N protein had good effect in the early detection on dubious patients which could lead to effective prevention and control of the epidemic.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome coronavirus; Positive rates

早发现、早诊断、早隔离是有效控制严重急性呼吸综合征(SARS)爆发或流行的关键。但是,一些早期病例的临床症状往往不典型,难以和常见的非典型肺炎鉴别。仅仅依靠临床症状可延误诊断,错失有效控制疫情的最佳时机。因此,早期诊断往往依赖于实验室检测结果。目前,可以发挥早期诊断作用的主要检测方法有 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)核酸检测(RT-PCR)^[1]、病毒特异性抗原检测(酶联

免疫吸附试验,ELISA)和抗体的检测^[2,3]。SARS-CoV 特异性抗体检测方法包括 ELISA、间接免疫荧光法(IFA)和免疫印迹法(WB)。我们采用国内常用的几种检测病毒基因、抗原和抗体的方法,对收集到的 SARS 患者的血清标本和漱口液标本进行比较检测,结果报道如下。

材料与方 法

1. 标本:血清标本包括 162 份 SARS 患者血清和 73 份健康人血清标本。SARS 患者血清来源于 2003 年 2-4 月广州市住院患者,其恢复期血清(发病后 3-5 月)抗体中和试验均阳性(中和试验结果由香港大学提供)。采血时间最早为发病后第 1 天,

基金项目:广东省科技厅资助项目(2003FD02-04)

作者单位:510080 广州市疾病预防控制中心(王鸣、高阳、周端华、吴新伟、陈小霜、狄飏、刘于飞、陈芳、杜琳、徐慧芳、顾菁);香港大学微生物系(郑伯健);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(徐建国)

最晚为发病后第 59 天。还包括广州 2003 年 12 月至 2004 年 1 月确诊为 SARS 的 4 例患者的血清标本。漱口液标本 82 份, 2003 年 2-4 月, 采自广州市各级医院的 SARS 患者, 采样时间最早为发病后第 1 天, 最晚为发病后第 45 天。

2. 检测方法: 采用第一军医大学珠江医院开发的检测 N(nucleocapsid)蛋白的试剂盒和北京华大吉比爱公司发展的检测 IgM 和 IgG 抗体的试剂盒^[4], 以及达安基因公司的检测 SARS-CoV 基因荧光定量 PCR 试剂盒^[5]。均按厂家提供的说明书严格操作。第一军医大学珠江医院开发的 ELISA 方法, 是用基因工程表达的 SARS-CoV N 蛋白, 制备单克隆抗兔抗体, 包被微孔板, 以辣根过氧化物酶(HRP)标记的双抗体夹心 ELISA 法。北京华大吉比爱的 ELISA 方法, 是用纯化的 SARS-CoV 裂解液为抗原包被微孔板, 为间接 ELISA 法。达安基因公司的荧光定量 PCR 试剂盒是以 SARS-CoV 的 pol 基因 1b 区的一个保守区为靶基因, 扩增片段长度为 85 bp, 设计特异性引物及荧光探针, 利用逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA, 再将 cDNA 进行 PCR 扩增, 利用全自动荧光 PCR 检测仪在线检测荧光信号, 用于漱口液等标本中的 SARS-CoV 核酸。

结 果

1. 特异性抗原、抗体检测结果: 采用 3 种 ELISA 试剂盒检测 162 例 SARS 患者血清标本的结果见表 1。

表1 3种 ELISA 试剂盒检测 162 例 SARS 患者血清的结果

血清采集时间 (发病后天数)	检测份数	N 抗原		IgM		IgG	
		阳性份数	阳性率 (%)	阳性份数	阳性率 (%)	阳性份数	阳性率 (%)
1-5	61	55	90.2	1	1.6	0	0.0
6-9	25	19	76.0	5	20.0	3	12.0
10-14	24	9	37.5	17	70.8	16	66.7
15-18	14	1	7.1	13	92.8	13	92.8
>19	38	0	0.0	24	63.1	35	92.1

珠江医院研制生产的检测 N 抗原的试剂盒在发病后第 1-5 天检测阳性率 90.2%, 6-9 天为 76.0%, 10 天以后检测阳性率明显下降($\chi^2 = 7.41, P = 0.01$)。北京华大吉比爱公司的检测 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA 试剂盒在发病后的第 15-18 天检测率达 92.8%。以后随着发病后天数的增加, IgM 抗体阳性率下降($\chi^2 = 4.40, P = 0.04$), IgG 抗

体阳性率不变($\chi^2 = 0.01, P = 0.93$)。73 份健康者血清的 N 蛋白和 IgM 和 IgG 抗体的检测结果均为阴性。

横向比较不同检测方法在发病后同一时间的检测阳性情况发现, 感染后 1-5 天 N 抗原的阳性率最高($\chi^2 = 175.17, P < 0.01$), 6-9 天仍为 N 抗原的阳性率最高($\chi^2 = 26.39, P < 0.01$), 发病后 10-14 天, IgM 抗体和 IgG 抗体的阳性率高于 N 抗原($\chi^2 = 6.51, P = 0.04$), 发病后 15-18 天 IgM 和 IgG 抗体的阳性率仍然高于 N 抗原($\chi^2 = 29.87, P < 0.01$), 发病后 19 天以上者, IgG 抗体的阳性率最高($\chi^2 = 67.52, P < 0.01$)。

2. 核酸检测结果: 采用荧光定量 PCR 法检测 82 例 SARS 患者漱口液标本结果见表 2。采用达安基因公司研制的荧光定量 PCR 试剂盒, 发病后第 1-5 天检测阳性率 56.3% (14/24), 6-9 天为 71.4% (10/14), 10-14 天为 63.6% (14/22), 15 天以后检测阳性率明显下降。

表2 荧光定量 PCR 试剂盒检测 70 份 SARS 患者漱口液的结果

发病天数	标本份数	阳性份数	阳性率 (%)
1-5	24	14	56.3
6-9	14	10	71.4
10-14	22	14	63.6
15-18	12	2	16.6
>19	10	0	0.0

图 1 为发病后的不同时间 4 种检测方法的灵敏度曲线变化。

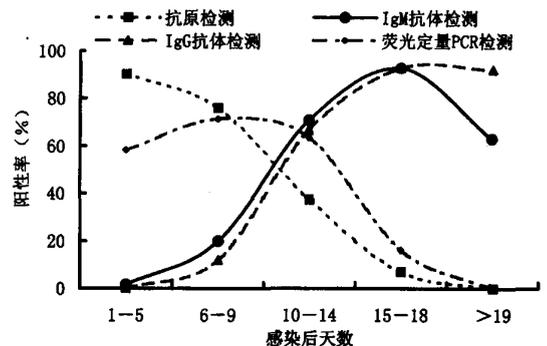


图1 4种试剂盒在 SARS 发病后不同时间的检出阳性率

3. 2003 年末以后新发 4 例 SARS 病例检测结果: 对 2003 年 12 月至 2004 年 1 月在广州发现的 4 例 SARS 患者的血清和漱口液标本采用上述 4 种方法的检测结果见表 3。

表3 2003-2004 年广州 4 例 SARS 患者的检测结果

病例号	标本采集时间 发病天数	N 抗原	IgM 抗体	IgG 抗体	RT-PCR
1	7	+	+	+	+
2	7	+	-	-	-
3	9	+	+	+	-
4	17	-	+	+	-

讨 论

本研究所选择血清标本来源于 162 例 SARS 患者,其临床症状均符合卫生部颁发的《传染性非典型肺炎临床诊断标准(试行)》,其相应的恢复期血清均经抗体中和试验检测为阳性,为确诊的 SARS 病例。所选择的咽拭子标本来自于上述患者。

研究发现,对于早期诊断来说,在发病后 1-5 天采取患者血样标本,使用检测 N 蛋白的试剂盒进行检测,阳性率可达 90.2%。采取咽拭子、肛拭子等标本进行病毒基因的检测,使用荧光定量 PCR 阳性率则为 56.3% (14/24)^[6,7]。检测 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA 等试剂盒尽管在实践中表现出一定价值,但是由于 SARS-CoV 侵入机体、感染靶细胞、产生抗体需要一定的时间,在发病 1-6 天基本上检测不到针对 N 蛋白的特异性抗体^[8-10]。因此从理论上讲,检测 N 蛋白同时合并 SARS-CoV 基因检测的方法,可获得更早的有诊断意义的数据。检测 N 蛋白的试剂阳性率比较高的原因,可能是因为 N 蛋白为 SARS-CoV 的主要蛋白,合成的量大,在病程早期以可溶性抗原的形式释放到患者血液中^[4]。

对 2003 年末广州新发 4 例 SARS 患者血清和漱口液的检测结果,提供了进一步的资料。从检测结果来看,N 蛋白仍然表现出很好的早期诊断价值。但由于 2003 年末发病的患者临床表现不典型,症状轻,预后好,没有发现传播的证据,而 S 基因的序列资料分析结果表明,导致 2003 年末感染的 SARS-CoV 是动物源性的,和 2003 年上半年人间流行的 SARS-CoV 有很大的区别,因此两者之间表现出的差异,可能是因为病毒株的不同造成的^[11,12]。

虽然我们选择的患者均经过临床诊断和血清中和试验的确诊,但是血清标本和患者的相对应关系,及与咽拭子标本之间的相对应关系不清。尽管 2003 年疫情的特殊情况给分析结果带来了遗憾,但

仍然提供了非常有价值的参考数据^[13]。我们的研究认为,除了检测 SARS-CoV 基因的 PCR 方法以外,对疑似患者血清标本进行 N 蛋白的检测,具有早期预报意义,虽然还不能够明确诊断,但是可提醒我们及时采取有效的预防和控制措施,防止疫情的扩散,并密切注视患者的抗体变化,及时明确诊断。

参 考 文 献

- WHO. PCR primers for SARS developed by WHO network laboratories. <http://www.who.int/entity/csr/sars/primers/2003-04-17/en>.
- 王月丹, 谢雍, 陈魁峰, 等. SARS 病毒表面蛋白抗原决定簇的免疫信息学分析. 北京大学学报, 2003, 增刊: 70-71.
- WHO. Severe acute respiratory syndrome (SARS): laboratory diagnostic tests. <http://www.who.int/mediacentre/releases/2003-04-29>
- Che XY, Qiu LW, Pan YX, et al. Sensitive and specific monoclonal antibody-based capture enzyme immunoassay for detection of nucleocapsid antigen in sera from patients with severe acute respiratory syndrome. J Clin Microbiol, 2004, 42: 2629-2635.
- 吴新伟, 程钢, 狄鹰, 等. 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. 中华医学检验杂志, 2003, 26: 300-302.
- Jiang, SS, Chen TC, Yang JY, et al. Sensitive and quantitative detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection by real-time nested polymerase chain reaction. Clin Infect Dis, 2004, 38: 293-296.
- Lau LT, Fung YW, Wong FP, et al. A real-time PCR for SARS-coronavirus incorporating target gene pre-amplification. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 312: 1290-1296.
- 车小燕, 郝卫, 丘立文, 等. SARS 病人 SARS 冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律. 第一军医大学学报, 2003, 23: 637-639.
- 方立群, 张泮河, 杨宝安, 等. 间接免疫荧光抗体试验在传染性非典型肺炎诊断中的应用. 中华流行病学杂志, 2003, 24: 484-486.
- Liu X, Shi Y, Li P, et al. Profile of antibodies to the nucleocapsid protein of the severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus in probable SARS patients. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11: 227-228.
- Normile D. Infectious diseases. Viral DNA match spurs China's civet roundup. Science, 2004, 303: 292.
- Webster RG. Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza? Lancet, 2004, 363: 234-236.
- Update 71-status of diagnostic tests, training course in China. 2003-06-02. <http://www.who.int/mediacentre/releases>

(收稿日期: 2004-09-16)

(本文编辑: 张林东)