

· 实验研究 ·

SARS 恢复期患者血液与排泄物中 SARS-CoV RNA 的检测

常昭瑞 杨仁全 王彦斌 任丽丽 王敏 杨耀武 郭丽
晁彦公 曲成毅 王健伟 洪涛

【摘要】 目的 应用巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测严重急性呼吸综合征(SARS)恢复期患者血液与排泄物中的病毒 RNA。方法 对连续 3 次收集的 23 例确诊 SARS 恢复期(病程 \geq 21 天)患者的血、尿、痰、粪便标本进行核酸提取,设计特异性内外引物,使用巢式 RT-PCR 的方法进行病毒 RNA 检测。结果 通过巢式 RT-PCR,共检测到 6 份阳性标本,其中粪便标本中检测到 4 份,检出率为 5.8%;痰标本中检测到 2 份,检出率为 2.9%。在尿液和血液标本中未检测到病毒 RNA。结论 个别 SARS 恢复期患者排泄物中有 SARS 病毒 RNA 存在,因此对恢复期患者的排泄物应慎重处理,对其引起 SARS 的再次传播的危险性需要进一步评估。

【关键词】 SARS 冠状病毒;排泄物;恢复期患者

Study on the RNA of severe acute respiratory syndrome(SARS)-associated coronavirus in the blood and excretion of convalescent patients with SARS CHANG Zhao-rui*, YANG Ren-quan, WANG Yan-bin, REN Li-li, WANG Min, YANG Yao-wu, GUO Li, CHAO Yan-gong, QU Cheng-yi, WANG Jian-wei, HONG Tao. *National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Corresponding author: WANG Jian-wei, Email: wangjw28@vip.sina.com; QU Cheng-yi, Email: quc-y@public.ty.sx.cn

【Abstract】 Objective To examine the RNA of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus(SARS-CoV) in the blood and excretion of convalescent patient with SARS for prevention and treatment of the disease. **Methods** A total of 276 samples, including plasma, urine, feces and sputum, obtained from 23 convalescent patients with SARS were studied at 3 time-points at least 21 days after the onset of symptoms. RNA was extracted and nested reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) was carried out using SARS-CoV specific primers. **Results** Among the 276 samples, SARS-CoV RNA was detected in 6 cases (38.8%) by nested RT-PCR. The positive rates of SARS-CoV RNA was 5.8% in feces and 2.9% in sputum samples but SARS-CoV RNA was not detectable in plasma and urine of all the cases. **Conclusion** The existence of SARS-CoV RNA in the excretion of some convalescent patients with SARS showed that the excretion from these patients should be carefully treated while the re-transmission of SARS by which, should be further studied.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus; Excretion; Convalescent patient

严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)是一种主要通过近距离空气飞沫

和密切接触传播的呼吸道传染病,SARS 相关冠状病毒(SARS-CoV)已被确定为该病的病原体^[1]。目前已证实 SARS 急性期患者血、尿、便、痰中都有 SARS-CoV 的存在^[2,3],但是对于恢复期(病程 \geq 21 天)患者的排毒情况还不十分清楚。因此,我们跟踪收集了 23 例 SARS 恢复期患者的血、尿、便、痰标本,使用巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对标本中的病毒 RNA 进行了检测,以探讨 SARS 恢复期患者的排毒规律,为 SARS 的防治提供依据。

基金项目:国家“863”计划专项基金资助项目(2003AA208403)

作者单位:100052 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(常昭瑞、王彦斌、任丽丽、王敏、杨耀武、郭丽、王健伟、洪涛);南京农业大学(杨仁全);清华大学附属北京酒仙桥医院(晁彦公);山西医科大学公共卫生学院(曲成毅)

常昭瑞、杨仁全同为第一作者

通讯作者:王健伟,Email: wangjw28@vip.sina.com; 曲成毅,

Email: quc-y@public.ty.sx.cn

对象与方法

1. 样本来源: 标本采集对象为临床确诊的 23 例 SARS 患者, 诊断依据卫生部修订的 SARS 诊断标准, 以出现 SARS 相关症状为病程第 1 天, 均为病程 ≥ 21 天的恢复期患者, 病程最短 21 天, 最长 63 天。每例患者都同时采集痰、尿、便、血标本, 每隔 3 天采集 1 次, 连续采集 3 次, 共采集标本 276 份。-80℃ 保存备用。

2. 阳性对照: SARS-CoV HT-1 株为分离自 SARS 患者咽拭子的 SARS-CoV 毒株, 由本室分离并鉴定。将该毒株接种于 Vero 细胞, 待细胞病变后收集细胞, 进行 RNA 提取。

3. 病毒 RNA 的提取: 痰、尿、便标本中的病毒 RNA 提取使用 RNA 提取试剂盒 (Qiagen 公司), 按照试剂盒操作说明书进行操作。对于血液标本, 则在分离淋巴细胞后, 使用常规方法提取。以上操作均在生物安全 3 级实验室 (BSL-3) 中进行。

4. SARS-CoV 特异性引物序列设计: 根据 GenBank 公布的 SARS-CoV 基因序列, 并与已知的冠状病毒的基因序列做比较, 选择 N 蛋白编码基因中的保守序列, 设计 SARS-CoV 特异性的引物, 由上海生工生物工程有限公司合成。引物序列为: 外侧引物: $N_{out}F: 5'-ata\ cag\ aat\ aca\ tag\ att\ gct\ gtt\ atc\ c-3'$, $N_{out}R: 5'-cac\ gtc\ tcc\ caa\ atg\ ctt\ gag\ tga\ cg-3'$; 内侧引物: $N_{in}F: 5'-gag\ gcc\ agg\ gcg\ ttc\ caa\ tc-3'$, $N_{in}R: 5'-aat\ agc\ gcg\ agg\ gca\ gtt\ tc-3'$ 。巢式 RT-PCR 扩增片段长度为 463 bp。

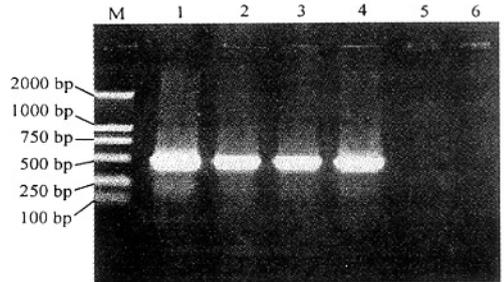
5. 巢式 RT-PCR 扩增: 逆转录和首轮 PCR 使用 Qiagen 公司的一步 RT-PCR 试剂盒, 反应总体积为 20 μ l。取第一轮 PCR 产物 5 μ l 进行第二轮 PCR: 扩增反应总体积为 50 μ l, 反应条件为: 75℃ 10 min; 94℃ 10 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 进行 35 个循环; 72℃ 10 min。取 5 μ l RT-PCR 终产物在 1% 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定。

6. 序列分析: 将第二轮 PCR 扩增产物回收后, 克隆到 pGEM-T 载体 (Promega 公司产品), 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 少量提取质粒, 经酶切鉴定正确后, 将阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。将阳性克隆的测序结果与 GenBank 已发表的 SARS-CoV 序列进行 BLAST 比较。

结 果

1. SARS-CoV 特异性 RT-PCR 方法的建立: 将

SARS-CoV 的 RNA 经巢式 RT-PCR 扩增后, 取其产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果显示阳性对照在 463 bp 大小位置有特异条带, 而阴性对照及空白对照无相应大小条带出现 (图 1), 说明核酸的提取没有污染, 巢式 RT-PCR 的检测结果可信。将 RT-PCR 产物回收, 插入中间质粒 pGEM-T, 酶切鉴定正确后送测序, 将测序结果与 GenBank 的序列进行比较, 发现与所有的 SARS-CoV 相应序列完全一致, 说明我们设计的 RT-PCR 可以特异性地检测 SARS-CoV RNA。



M: DL2000 Markers; 1~4: 阳性对照; 5: 阴性对照; 6: 空白对照

图 1 巢式 RT-PCR 对 SARS-CoV RNA 的扩增结果

2. SARS 恢复期患者排泄物中病毒 RNA 的检测结果: 应用我们建立的巢式 RT-PCR 方法, 对 23 例 SARS 恢复期患者的血、尿、便、痰样品各 69 份进行检测, 结果发现距发病时间 21~51 天时有 4 例 (5.8%) 患者的粪便和 31~41 天时 2 例 (2.9%) 患者的痰标本中可以检测到 SARS-CoV 特异 RNA 片段, 巢式 RT-PCR 阳性患者情况见表 1, 说明 SARS 恢复期患者有排毒的可能。

表 1 巢式 RT-PCR 阳性患者情况

患者编号	性别	年龄 (岁)	发病日期 (年-月-日)	检出日期 (年-月-日)	样品	检出距发病天数
1	男	44	2003-04-20	2003-05-23	痰	33
2	男	30	2003-04-17	2003-05-23	痰	39
3	男	25	2003-04-16	2003-05-20	粪便	34
4	女	35	2003-04-20	2003-05-20	粪便	30
5	女	28	2003-04-13	2003-05-26	粪便	43
6	男	40	2003-04-30	2003-05-26	粪便	26

讨 论

SARS 是 21 世纪第一个重要的新发传染病, 虽然目前 SARS 的流行已得到有效控制, 其相关研究也在不断深入, 有关 SARS 的许多问题仍悬而未决, 例如患者通过呼吸道、粪便及体液释放病毒的持续时间和规律等, 而这些问题的解决直接关系到

SARS 的有效控制。因此,本文着重检测了恢复期患者的带毒情况以了解其排毒规律。

RT-PCR 可特异地检测 SARS 病毒的 RNA 片段,是 WHO 推荐使用的检测 SARS-CoV 的方法之一,但是由于标本采集和保存不当导致 RNA 易降解或操作不规范引起的样品污染等原因,容易出现假阳性和假阴性^[4,7]。为了确保 RT-PCR 结果的可靠性,我们采取了以下措施:①根据 WHO 提供的实践经验,采集尿液、痰液、粪便和血液标本等多部位样品以提高检测阳性率^[4];②为避免 RNA 降解和污染,在 RNA 提取过程中使用的标本大多为新鲜标本,并以 DEPC 水作为阴性对照;③针对 SARS 病毒 RNA 序列保守区域设计并筛选出实用、可靠、灵敏度高、特异性好的引物;④采用巢式 RT-PCR 方法,通过外侧及内侧引物两次扩增提高检测的灵敏度;⑤为避免 RT-PCR 过程中的假阳性,特设阴性对照和空白对照;⑥对可疑标本至少测定 2 次以上,以确保结果的准确性;⑦为避免交叉污染,操作人员戴口罩和手套,使用专用的 PCR 加样器及带滤芯的 Tip 头,所有操作过程均在生物安全柜中进行,在操作前后对生物安全柜进行清洁消毒。以上措施在一定程度上克服了假阳性的问题,同时也提高了阳性检出率。

本研究应用自行建立的巢式 RT-PCR 方法,对 SARS 恢复期患者的血、尿、便、痰标本检测结果发现,在患病 26、30、34、43 天的 4 例 SARS 患者粪便中检测到了病毒 RNA;在患病 33、39 天的 2 例 SARS 患者痰液中也检测到了病毒 RNA;而在尿液和血液标本中未检测到。以往实验也证实呼吸道和粪便样品更适合于使用 RT-PCR 诊断,并且发病晚期粪便是较好的检测标本^[8]。我们的检测结果与之相符。

研究表明,SARS 病毒受体 ACE2 在肺和小肠上皮中大量存在^[9],提示 SARS-CoV 可以感染肺和小肠上皮细胞,并大量复制。因此,RT-PCR 在恢复期患者痰液和粪便中检测到 SARS-CoV 的 RNA,可能来自于肺和小肠上皮细胞中复制的 SARS-CoV。巢式 RT-PCR 的阳性结果表明样本中存在病毒的遗传物质,但并不意味着一定存在具有感染性的活

病毒颗粒,也不能说明存在足够感染剂量的活病毒,只能推测恢复期患者有排毒可能性。从检测结果推断,SARS 恢复期患者可能通过痰液和粪便途径排毒。

SARS-CoV 存活力较强,随粪便和呼吸道分泌物排出后,能在环境中及物体表面存活一定时间。因此对恢复期患者要足够重视,在其出院前一定要检测其痰液和粪便中的带毒情况,确保其不排毒后方可出院,并且在出院后一个月内,至少要跟踪检测两次,以确认该患者是否排毒。对恢复期患者的排泄物应慎重处理。恢复期 SARS 患者粪便等标本中的病毒是否可引起再次传播尚需要进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361:1319-1325.
- 2 Chan KH, Poon LL, Cheng VC, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10:294-299.
- 3 Peiris JS, Chu CM, Cheng VC, et al. Clinical progression and viral load in a community outbreak of coronavirus-associated SARS pneumonia: a prospective study. *Lancet*, 2003, 361:1767-1772.
- 4 Poon LL, Wong OK, Luk W, et al. Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS). *Clin Chem*, 2003, 49:953-955.
- 5 Yam WC, Chan KH, Poon LL, et al. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *J Clin Micro*, 2003, 41:4521-4524.
- 6 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348:1953-1966.
- 7 Poon LL, Chan KH, Wong OK, et al. Early diagnosis of SARS coronavirus infection by real time RT-PCR. *J Clin Virol*, 2003, 28: 233-238.
- 8 张政,徐东平,王福生,等. SARS 患者 SARS 冠状病毒 RNA 的动态检出特点及其意义. *解放军医学杂志*, 2004, 29:418-420.
- 9 Hamming, Timens W, Bulthuis MLC, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*, 2004, 203: 631-637.

(收稿日期:2004-09-09)

(本文编辑:尹廉)