

酶联免疫吸附试验间接抗体夹心检测 SARS-CoV 抗原方法的建立和应用

丘立文 汤汉文 王亚娣 廖金娥 郝卫 温坤 何秀敏 车小燕

【摘要】 目的 制备和鉴定严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)核衣壳(N)蛋白单克隆抗体(mAb)和多克隆抗体建立 SARS-CoV N 抗原捕获抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)方法用于 SARS-CoV 感染的早期诊断。方法 用基因重组 SARS-CoV N 蛋白免疫 BALB/c 小鼠和新西兰大白兔制备 mAb 和多克隆抗体,采用 ELISA 间接法、免疫荧光和免疫印迹进行筛选和鉴定,用单克隆抗体与兔多克隆抗体进行配对试验,建立抗原捕获抗体夹心 ELISA 法测定 SARS-CoV N 抗原。结果 获得 9 株特异性针对 SARS-CoV N 蛋白的 mAb 和高效价的兔多克隆抗体,通过高亲和力的 mAb 与兔多抗的配对试验,筛选出 3 株单抗 N1E8、N8E1 和 N10E4 混合作为捕获抗体,与兔多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 组合作为测定抗体,建立了抗体夹心 ELISA 法,测定重组 SARS-CoV N 蛋白最高灵敏度为 50 pg/ml,特异性达 99.86%,测定 420 份血清学确诊的 SARS 患者血清,其中发病 1-10 天阳性检出率为 90.1%,11-20 天检出率为 23%,21 天以上均为阴性,与其他呼吸道病毒和冠状病毒无交叉反应。结论 获得特异性好、亲和力高的单克隆抗体和高效价的兔多克隆抗体,经过抗体的配对和优化,建立了一种灵敏度高、特异性强的 SARS-CoV 抗原的 ELISA 捕捉法,可应用于 SARS 早期诊断、溯源及流行病学研究。

【关键词】 严重急性呼吸综合征冠状病毒;核衣壳蛋白;单克隆抗体

Development and application of triple antibodies-based sandwich ELISA for detecting nucleocapsid protein of SARS-associated coronavirus QIU Li-wen*, TANG Han-wen, WANG Ya-di, LIAO Jin-e, HAO Wei, WEN Kun, HE Xiu-min, CHE Xiao-yan. *Center of Laboratory, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China

Corresponding author: CHE Xiao-yan, Email: linche@pub.guangzhou.gd.cn

【Abstract】 Objective To prepare and characterize monoclonal antibodies (mAb) and polyclonal antibodies against nucleocapsid (N) protein of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) and to establish antibodies-based sandwich ELISA for detecting N protein of SARS-CoV, which might apply to early diagnosis of patients with SARS-CoV infection. **Methods** BALB/c mice were immunized with purified recombinant N protein of SARS-CoV for producing mAbs, and New Zealand white rabbits were immunized for producing polyclonal antibodies. The identification of antibodies was performed using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent-antibody assay (IFA), and Western immunoblotting. Capturing and detecting antibodies were selected by pairing the mAbs and polyclonal antibodies one by one and an antibodies-based sandwich antigen capture ELISA was used for detecting N antigen of SARS-CoV. **Results** Nine mAbs and hyperimmune rabbit polyclonal antibodies, specifically against SARS-CoV nucleocapsid protein were obtained. Using paired ELISA assay, three mAbs N1E8, N8E1 and N10E4 were selected as capturing antibody and rabbit polyclonal antibodies as detecting antibody then triple antibodies-based sandwich ELISA was established following horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G. The recombinant N protein was used as a standard to establish a detection sensitivity of approximated 50 pg/ml with this assay. When tested with 420 serum specimens from serologically confirmed SARS patients, the positive rates of serum N protein were 90.1%, 23% and 0%, in which sera collected from 1 to 10 days, 11 to 20 days and

基金项目:广东省防治非典型肺炎科技攻关项目资助(粤科社字:2003 80)

作者单位:510282 广州,南方医科大学珠江医院中心实验室(丘立文、王亚娣、郝卫、温坤、车小燕);珠海经济特区海泰生物制药有限公司(汤汉文、廖金娥、何秀敏)

通讯作者:车小燕, Email: linche@pub.guangzhou.gd.cn

beyond 21 days respectively after the onset of symptoms. The specificity of the assay was 99.86% in 715 control serum specimens. There was no cross-reaction with other respiratory viruses and coronaviruses.

Conclusion Specific and high affinity mAbs and rabbit polyclonal antibodies were obtained. By paired and optimized sandwich ELISA, a sensitive and specific antigen capture ELISA was established for detecting N antigen of SARS-CoV, which might apply to early diagnosis, source tracing and epidemiological studies of SARS.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome-CoV; Nucleocapsid protein; Monoclonal antibodies

严重急性呼吸综合征(SARS),是一种由新型冠状病毒(CoV)引起的突发性传染性疾病^[1]。该病传播快,病死率高^[2];其临床表现无特异性且无特效药。由于 SARS 特异性抗体的产生平均需要 17-20 天的时间^[3],所以早期的诊断依赖于病原的测定。目前已有的逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)可用于测定鼻咽部样本中的 SARS-CoV 核酸,但是该方法需要在配备有专门仪器和人员的实验室中进行,而且鼻咽部样本采集对于采样者和测定者均存在着较大的危险,这样很大程度上限制了该方法的推广使用。本研究采用针对 SARS-CoV 核衣壳蛋白(N)的单克隆抗体(mAb)和特异性多克隆免疫血清,通过抗体的配对及优化,建立了抗原捕获抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法,用于测定患者血清中 SARS-CoV N 蛋白,解决 SARS 早期诊断的难题。

材料与方法

1. 材料:

(1)辣根过氧化物酶(HRP,纯度值RZ=3.0)为 Sigma 公司产品。HRP 标记羊抗小鼠 IgG、HRP 标记羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗小鼠 IgG、FITC 标记羊抗兔 IgG 均为 Zymed 公司产品。

(2)病毒株:3 株 SARS-CoV(HKU-39849、GZ01 和 BJ01)灭活培养上清分别由香港大学微生物系、广东省疾病预防控制中心和军事医学科学院提供。犬冠状病毒株(CCV-4)和禽传染性支气管病毒株(IBV-9)由华南农业大学兽医学院提供,人冠状病毒株 229E(ATCC No. CCL-171)和 OC43(ATCC No. CCL-26)购于美国 ATCC 公司。

(3)临床样本:SARS 患者和 SARS 密切接触者血清样本由广州市和广东省疾病预防控制中心及南方医科大学南方医院等单位提供,义务献血员样本和不同病种包括肝炎、肺炎等血清样本由南方医科大学珠江医院提供。

2. SARS-CoV N 蛋白由本实验室制备^[4]。

3. 兔抗 SARS-CoV N 蛋白免疫血清的制备:首次用福氏完全佐剂与抗原乳化后给予 4 只新西兰大

白兔皮下多点注射,500 μg/只,以后每隔 10 天以福氏不完全佐剂与抗原乳化后皮下多点注射,共免疫 4 次,最后以 100 μg 抗原静脉注射,3 天后采血,以间接 ELISA 法测定血清效价,并以间接免疫荧光法进行特异性鉴定。

4. 抗 SARS-CoV N 蛋白 mAb 的制备和鉴定:动物的免疫、杂交瘤细胞株的建立、抗体亲和常数的测定以及抗体特异性鉴定均参照文献[5]的方法进行。mAb 的制备和纯化方法参照文献[5],基本步骤:每只小鼠腹腔注射 2.5×10^6 个杂交瘤细胞制备腹水,采用常规的辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水中的抗体,用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析其纯度,并用 ELISA 间接法检测腹水和抗体效价。

5. mAb 识别抗原表位的测定:采用固相竞争抑制实验,用基因重组 SARS-CoV N 蛋白 1 μg/ml 包被聚苯乙烯微 96 孔板,封闭后每孔先加入 10 mg/ml 纯化的 mAb 50 μl,再加入从 1:100~1:2000 系列稀释的 HRP 标记 mAb 50 μl,37℃ 孵育 1 h, PBS-Tween20 洗涤后加入 TMB 显色液,室温、避光显色 10 min,测定 $\lambda = 450$ nm 的吸光度(A 值)。以 mAb 对同一 HRP 标记 mAb 的抑制为阳性对照,以已知无关 mAb 对标记 mAb 的抑制为阴性对照,计算各 mAb 间的抑制率。抑制率计算公式为:(1-各孔测定值/阴性对照值)×100。抑制率>75%为相关,>50%为不完全相关,<50%为不相关,<25%为完全不相关。

6. 抗体夹心 ELISA 法建立:

(1)捕获和测定抗体的配对试验:采用夹心 ELISA 法。根据 mAb 识别抗原表位不同,在 9 株单抗和兔多抗之间相互配对筛选捕获抗体和测定抗体的最佳组合:①用 1 株或多株不同抗原表位的 mAb 包被,分别加入不同稀释度的 3 株 SARS-CoV 病毒株灭活培养上清、基因重组 N 蛋白和阴性对照的正常人血清,37℃ 反应 1 h,再分别加入与包被 mAb 抗原表位不同的 HRP 标记的 1 株或多株 mAb,37℃ 反应 1 h,加 TMB 显色,测定 $\lambda = 450$ nm 的 A 值。②以 1 株或多株不同抗原表位的 mAb 包被,加

入上述的测定样品于 37℃ 反应 1 h, 再加入兔多抗, 37℃ 反应 1 h, 最后加入 HRP 标记的羊抗兔抗体, 37℃ 反应 1 h, 加 TMB 显色, 测 $\lambda = 450 \text{ nm}$ 的 A 值。

(2) 抗体夹心 ELISA 法建立: 采用方阵滴定法选择包被 mAb、兔多抗和 HRP 标记的羊抗兔抗体的工作浓度。mAb 分别以 10、15、20 $\mu\text{g/ml}$ 于 4℃ 包被过夜, 1% 酪蛋白封闭后, 加入 3 株 SARS-CoV 毒株灭活培养上清、基因重组 N 蛋白和阴性对照的正常人血清, 37℃ 反应 1 h, 再加入 1:500~1:6000 稀释的兔多抗血清, 37℃ 反应 1 h, 最后加入 1:2000~1:8000 稀释的 HRP 标记羊抗兔抗体, 37℃ 反应 1 h, 加 TMB 显色, 测 $\lambda = 450 \text{ nm}$ 的 A 值。

7. 临床血清样本的测定: 用建立的抗体夹心 ELISA 法测定 2003 年发生在广东省的经血清学确诊的 317 例 SARS 患者的 420 份血清 (包含有系列血清), SARS 密切接触者血样本 315 份, 以及 2002 年以前采集不同病种包括肝炎、肺炎等血样本 400 份 (注: SARS 患者样品测定在 P3 实验室进行)。

结 果

1. 兔抗 SARS-CoV N 蛋白免疫血清的制备及特异性鉴定: 成功获得高效价的兔多抗血清, 其中 2 号兔的血清效价最高, 间接 ELISA 效价为 1:10⁶, 间接免疫荧光证实兔多抗血清与 SARS-CoV 特异性结合, 与人冠状病毒 (OC43 和 229E)、IBV-9 和 CCV-4 等无交叉反应。

2. mAb 的制备、纯化及其特异性鉴定: 经细胞融合及克隆化共获得 9 株稳定分泌抗体的杂交瘤细胞株。腹水效价为 1:10⁶~1:10⁷, SDS-PAGE 电泳鉴定纯化抗体的纯度达 95% 以上, 间接 ELISA 检测抗体效价为 0.20~1.56 ng/ml、抗体亲和常数为 7.9×10⁻⁸ mol/L~8.8×10⁻⁹ mol/L。用 ELISA 法和免疫荧光法测定 9 株 mAb 均与 SARS-CoV 特异性结合, 与其他呼吸道病毒如人冠状病毒 (OC43 和 229E)、IBV-9 和 CCV-4 等无交叉反应。免疫印迹证明 9 株 mAb 分别与 SARS-CoV 灭活培养上清 N 和基因重组 SARS-CoV N 抗原特异性结合。

3. 捕获和测定抗体的最佳配对: 固相竞争抑制实验测定 mAb 识别抗原表位结果显示 9 株单抗识别 5 个不完全相同的抗原位点: N1A7 和 N14A3, N8E1 和 N14E7, N10A4、N10E2 和 N10E4, 分别识别 1 个不同的抗原位点, 另外 2 株单抗 N1E8 与 N14B6 识别 2 个不同的抗原位点。并且识别相同

抗原位点的单抗之间竞争抑制率均在 75% 以上, 显示为相关。根据 mAb 识别抗原表位不同设计配对组合的实验比较显示, 捕捉 mAb 与兔多抗血清和 HRP 标记的羊抗兔抗体组合测定 SARS-CoV 和 N 蛋白的敏感性高于 mAb 与酶标记 mAb 组合, 而不同的捕捉 mAb 组合测定病毒敏感性出现较大差异 (结果未显示)。通过筛选最终确定 N1E8、N8E1 和 N10E4 3 株识别不同抗原位点的 mAb 混合作为捕获抗体与兔多抗血清配对构建夹心 ELISA 法, 其结果测定 3 株 SARS-CoV 毒株和 N 蛋白敏感性最高。

4. 抗体夹心 ELISA 法的建立:

(1) 抗体包被、兔多抗血清及 HRP 标记羊抗兔抗体工作浓度的确定: 经方阵滴定法确定, 3 株单抗等量混合包被总浓度为 15 $\mu\text{g/ml}$, 兔多抗血清和 HRP 标记的羊抗兔抗体工作浓度分别为 1:4000 和 1:8000。

(2) 灵敏度: 以纯化的 N 蛋白作为标准测定品, 以牛血清白蛋白作为非相关抗原的阴性对照, 并用正常人血清作为稀释液以排除血清对该方法敏感性的影响, 结果显示对重组 N 蛋白检出的灵敏度可达 50 pg/ml。

(3) 重复性: 分别进行了批内和批间试验, 将 SARS-CoV 培养上清按 1:100、1:1000 和 1:5000 稀释成为 3 份样品。对 3 份样本重复测定 20 次的批内差异试验结果显示, 其变异系数 (CV) 分别为 6.3%、7.3% 和 10.8%。对 3 份样品逐天进行 10 次试验的批间重复性测定结果, 其 CV 值分别为 8.8%、13.9% 和 12.0%。

(4) 特异性: 测定其他相关病毒的培养上清, 如人冠状病毒 229E 和 OC43、CCV-4、IBV-9、鼻病毒、腺病毒、流行性感病毒和呼吸道合胞体病毒, 结果均为阴性, 证实该 ELISA 捕获法只与 SARS-CoV 特异性反应而与以上相关病毒无交叉反应。

(5) 临界值的确定: 测定 2002 年以前采集的义务献血员样品 400 例, 统计结果显示 A 值均数 ± 标准差为 0.078 ± 0.023。以 A 值 = 均数 ± 5 个标准差 (0.193) 作为阳性判断的临界值, 即 A 值 ≥ 0.193 判断为阳性。

5. 临床样本测定结果: 对 2002 年以前采集不同病种包括肝炎、肺炎等血样本 400 份, 检出 1 份阳性, 对 SARS 密切接触者 315 份血样本测定结果均为阴性, 假阳性率为 0.14% (1/715), 特异性为 99.86%。测定经血清学确诊的 317 例 SARS 患者

的 420 份血清(包含有系列血清),其中发病 1-10 天阳性检出率为 90.1%, 11-20 天检出率为 23%, 21 天以上测定结果均为阴性。图 1 显示 SARS 患者和对照病例 N 蛋白测定 A 值的分布情况。

讨 论

SARS 是一种具有强传染性的急性病毒性疾

病。早诊断、早隔离、切断传播途径是控制该病流行和蔓延的重要手段。但因其临床表现存在个体差异且无特异性,难以通过流行病学资料和临床症状确诊,而需依赖于实验室的诊断。针对 SARS-CoV 抗体的 ELISA 或间接免疫荧光方法的血清学试验至今仍是病例回顾研究中采用的金标准,但是病毒特异性抗体的产生需要 10-28 天的较长“窗口期”^[6],因此,血清学试验不能作为早期诊断方法。目前对 SARS-CoV 的测定主要是针对鼻咽分泌物中病毒核酸的 RT-PCR 方法,但由于病毒 RNA 容易降解,测定结果易受样品采集和处理的影响。而测定血清中的病毒抗原的方法能很好解决鼻咽分泌物的采集和分子学诊断中的难题。目前,测定血清抗原已被成功的运用于监测多种病毒感染,如 HIV (p24)、HBV (HBsAg, HBeAg)、HCV (核心抗原)、病毒性出血热(核蛋白)和 CMV(晚期 pp65 抗原)病毒感染^[7-11]。特异性的 mAb 或多克隆抗体已成熟运用于捕获 ELISA 试验,早期抗原测定阳性可以缩短测定抗体中的窗口期。因此,建立一种 SARS-CoV 抗原测定方法,对 SARS 患者提供早期、准确的实验室诊断是可行而必要的。

基于 mAb 的病毒抗原诊断方法的建立不但需要特异性很高的抗体,还需要筛选出最佳抗体配对,这是一个技术难点。我们在获得高特异性的 mAb 和高效价多克隆抗体的基础上,对 9 株 mAb 和兔多抗之间进行各种组合的配对试验以筛选最佳捕获抗体和测定抗体,建立抗原捕获抗体夹心 ELISA 法。在 mAb 与酶标记 mAb 之间的配对实验中发现,虽然测定 SARS-CoV N 蛋白灵敏度很高,但对于 3 株 SARS-CoV 的测定却存在明显的差异,即有的组合

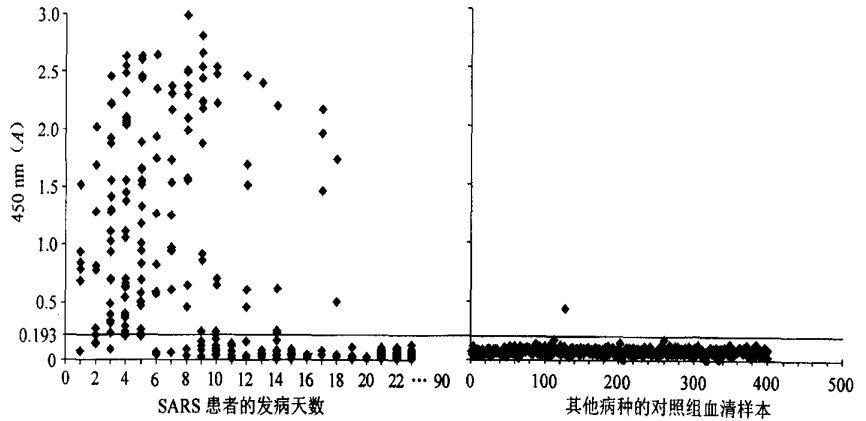


图1 抗原捕获抗体夹心 ELISA 法测定 SARS 患者和对照病例血样中 N 蛋白 A 值的分布

对 BJ01 株测定较灵敏而对 GZ01 株和 HKU-39849 株的反应弱,有的却只对 HKU-39849 株敏感,总之没有一种组合能同时对 3 株病毒产生较强的反应,这是 mAb 特异性高而灵敏度相对较差的特性所决定的。而不同的单抗组合作为捕获抗体与作为测定抗体的兔多抗的配对实验中发现,虽然对 3 株 SARS-CoV 毒株测定敏感性有所不同,但所有的组合都能检测到 3 株病毒,尤其是识别不同抗原位点的 N1E8、N8E1 和 N10E4 3 株单抗共同作为捕获抗体时测定 3 株 SARS-CoV 毒株和 N 蛋白敏感性均较高。经配对和优化建立的抗原捕获抗体夹心 ELISA 法测定 N 蛋白最高灵敏度可达到 50 pg/ml, SARS-CoV 的培养上清稀释 10 000 倍仍能测定出其中的 N 蛋白。

抗原捕获抗体夹心 ELISA 法具有抗原抗体反应的高度特异性和酶促反应的高度敏感性的特点。由于抗原抗体反应和酶促反应均具有高度特异性,从而保证了试验的特异性,同时酶分子的极大催化活性保证了试验的高度敏感性。我们采用夹心法 ELISA 原理,将针对 SARS-CoV N 蛋白单克隆抗体包被在固相载体聚苯乙烯微孔板上,加入待检样本,待测抗原与固相载体表面的抗体形成抗原抗体复合物,加入兔抗 N 蛋白抗体形成双抗体夹心免疫复合物;然后加入羊抗兔酶标记抗体,形成(抗体-病毒抗原-二抗体-抗二抗体酶标记物)免疫复合物,加入底物后在酶作用下产生颜色反应,由于多加一层抗体,放大倍数高,大大提高了试验的敏感性。研究结果显示,该方法对血清学确诊病例发病早期血清样本测定,在发病 1-10 天血清病毒抗原测定阳性率达 90.1%,特异性为 99.86%,其敏感度和特异性均高

于以往报道的测定方法^[12,13]。该方法与 PCR 方法相比,具有简单、易操作、重复性好、快速、成本低及适合基层单位广泛使用等优点。对早期发现和甄别 SARS 病例,特别是在基层单位的广泛应用和大规模筛查,从而实现 SARS 的早期诊断有重要意义。

自第一例 SARS 病例出现至今的一年多时间里,全世界的研究者在各自不同领域对这突如其来的急性传染病进行全方位的研究,可迄今为止病毒的来源尚未完全清楚,尽管果子狸被认为是最有可能的动物来源^[14],但是仍然缺乏充分的证据。本研究建立抗原捕获抗体夹心 ELISA 法用于测定血中 SARS-CoV 抗原,不仅可作为 SARS 实验室早期诊断的可靠技术,而且可在大规模 SARS 溯源及流行病学研究中发挥重要作用。

参 考 文 献

- 1 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1967-1976.
- 2 World Health Organization. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003 [monograph on the Internet]. 2003 Dec 31 [cited 2004 Aug 26]. Available from <http://www.who.int/csr/sars/country/table2004.04.21/en/>
- 3 Chan KH, Poon LL, Cheng CV, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with suspected SARS. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 294-299.
- 4 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.
- 5 车小燕,丘立文,潘玉先,等. SARS 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究. 第一军医大学学报, 2003, 23: 640-642.
- 6 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.
- 7 Cano H, Candela MJ, Lozano ML, et al. Application of a new enzyme-linked immunosorbent assay for detection of total hepatitis C virus core antigen in blood donors. *Transfus Med*, 2003, 13: 259-266.
- 8 Clement F, Dewint P, Leroux-Roels G. Evaluation of a new rapid test for the combined detection of hepatitis B virus surface antigen and hepatitis B virus e antigen. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4603-4606.
- 9 Mourton C, Romestand B, Kinkelin P, et al. Highly sensitive immunoassay for direct diagnosis of viral hemorrhagic septicemia which uses antinucleocapsid monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 2338-2345.
- 10 St George K, Boyd MJ, Lipson SM, et al. A multisite trial comparing two cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia test kits, biotest CMV brite and Bartels/Argene CMV antigenemia. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 1430-1433.
- 11 Sutthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, et al. p24 antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 1016-1022.
- 12 Grant PR, Garson JA, Tedder RS, et al. Detection of SARS coronavirus in plasma by real-time RT-PCR. *N Engl J Med*, 2003, 349: 2468-2469.
- 13 Hai J, Briese T, Dai E, et al. Real-time polymerase chain reaction for detecting SARS coronavirus, Beijing, 2003. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 300-303.
- 14 Uan Y, Zheng BJ, He YQ, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*, 2003, 302: 276-278.

(收稿日期:2004-11-04)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

一起盐酸克伦特罗引起的食物中毒

张贵来 蔡顺成 吴月娇

2002 年 7 月 9 日福建省漳州市芗城区浦南镇发生一起一家 4 人因食用含有盐酸克伦特罗的猪肺引起的食物中毒事件。该村民当天上午从个体屠宰户购买 0.5 kg 猪肺和一条猪胰脏,炖汤、烹炒全家 4 人食用,12 时食用的 4 人先后出现呕吐、头晕、手震颤、胸闷、心悸、心跳加快等症状,约 13 时前往渡头村卫生所就诊,病情未缓解,当日下午 4 人全部住进漳州市长泰县医院。患者发病急剧,潜伏期 10~30 min。患者年龄最小 5 岁、最大 68 岁,男女各 2 例。所有患者的临床表现相似,均出现呕吐、头晕、心悸、手震颤、四肢乏力、心率 112~127 次/min,其中 1 例出现呼吸困难、腹泻。经对症治疗,于住院 7 天后陆续出院。采集当餐剩余食物猪肺和猪胰脏混合物约 200 g 及喂饲该批生猪饲料 2 份(分别为“紫竹

牌”和“太湖牌”饲料)送福建省卫生防疫站检验。结果报告:送检的猪肺、猪胰脏混合食品中检出盐酸克伦特罗,含量高达 1.8 mg/kg;“紫竹牌”饲料中盐酸克伦特罗含量为 0.095 mg/kg,“太湖牌”饲料中检出与盐酸克伦特罗结构、功能类似的物质。

根据流行病学调查、临床表现和实验室检测结果,可以确定这是一起食用含有盐酸克伦特罗的猪内脏引起的食物中毒事件。盐酸克伦特罗又称“瘦肉精”,动物摄入后,不易破坏分解,残留时间长。人食用含“瘦肉精”残留的食物,特别是动物内脏后,就会出现全身肌肉颤抖、头晕、呕吐等中毒症状。因此,动物性食品的安全问题已成为社会各界极为关注的食品安全热点。

(收稿日期:2004-11-25)

(本文编辑:张林东)