

传染性非典型肺炎的病原学研究进展

李永华 庄辉

一种人类过去从未发现的新型冠状病毒目前被确认是引起传染性非典型肺炎即严重急性呼吸道综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)的病原^[1]。世界卫生组织(WHO)已正式将此病毒命名为SARS病毒。冠状病毒属核糖核酸(RNA)病毒,多呈圆形或椭圆形,直径为80~160 nm,基因组为单股正链RNA,约30 000核苷酸,衣壳为20面立体对称,有包膜,其表面有约20 nm长的棒状或花瓣状纤突,同日冕状。该病毒家族有多个成员,包括目前已知可侵袭人类的两种冠状病毒229E型和OC43型,通常主要引起普通感冒,但在老年人、婴儿等免疫力低下者偶可引起肺炎。另有10多种冠状病毒可侵袭不同种类动物,如犬冠状病毒、牛冠状病毒、猫传染性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、鸟传染性支气管炎病毒、鼠肝炎病毒、火鸡冠状病毒等。该病毒具有较高的变异性,且易发生同源或异源重组而产生新型冠状病毒。

在临床上,有多种病原微生物可以引起感冒、肺炎等呼吸道疾病,较常见的有细菌、病毒、衣原体、支原体、立克次体等。最初出现SARS病例时,因缺乏特异性临床表现,未引起医学界足够重视,而导致该病迅速蔓延并在短时间内波及世界20多个国家和地区,其强传染性和高致死性使人们意识到这是一种不同于以往的肺炎,必须首先确定其病原,以进一步有效预防和治疗本病。因此,世界上有13个实验室加入到WHO的SARS研究项目。

研究组首先排除了细菌引起SARS的可能性,因为经过细菌的常规培养未发现特殊致病细菌,且临床上抗生素治疗无效。早期国内曾有报道衣原体是SARS的病原,其依据是从5例死亡患者的肺、肝、脾、淋巴结等组织切片的电镜照片中,观察到衣原体样颗粒。但加拿大、德国、美国、中国香港等地的一些实验室采用电镜技术以及免疫学(荧光抗体及免疫组化)和分子生物学(特异性聚合酶链反应或

逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,先后排除了流感病毒A和B型、副流感病毒1、2、3型、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、人冠状病毒、黄病毒、甲病毒、丝状病毒、麻疹病毒、肺炎衣原体及肺炎支原体等常见病原体。其间,国内外一些实验室陆续分离出冠状病毒,这一重要线索使多数科学家怀疑冠状病毒是SARS的病原,并最终通过多项实验证实。加拿大研究组^[2]收集来自6个国家患者的口咽部、鼻咽分泌物、血清及主要器官的活检组织样本,选择Vero E6、NCI-H292、HELA、HUT-292、LLC-MK2、B95-8细胞和ICR乳鼠进行接种培养,观察细胞病变(CPE)及动物反应。结果Vero E6细胞在接种一例患者的口咽分泌物后第6天出现CPE,且进展较快。电镜下发现了特征性的冠状病毒颗粒。这一结果较为特殊,因该病毒家族中只有猪传染性胃肠炎病毒能在Vero细胞内生长繁殖,但两者引起的CPE不同,序列也不同。然后设计了一对冠状病毒家族通用引物,对细胞培养阳性病毒进行扩增,所得片段再设计特异性引物,对该病毒的聚合酶基因ORF1b的405核苷酸片段进行RT-PCR扩增测序显示,该序列与冠状病毒II组有较大相似性,但在遗传学上与已知病毒明显不同,提示为一新型冠状病毒。间接荧光抗体和酶联免疫吸附试验(ELISA)从患者样本中检测到冠状病毒特异性抗体。该研究组通过病毒分离、RT-PCR及血清学试验检测出19例SARS患者,并进一步排除了人类间质性肺炎病毒、鼻病毒、流感病毒、副粘病毒、衣原体、支原体、立克次体等病原体。随后,Peiris等^[3]研究了50例香港SARS患者,年龄23~74岁。他们收集患者的鼻咽分泌物、血清(部分为双份血清)、粪便标本以及1例患者的肺活检组织进行病毒的分离培养、RT-PCR、组织病理、电镜检查及免疫学试验。结果从接种肺活检组织及1例患者的鼻咽部分泌物的恒河猴胎肾细胞(fetal rhesus kidney cell)培养物中,分离到2株冠状病毒,电镜扫描形态完全符合该病毒特点。随机引物RT-PCR扩增产物(646 bp)克隆测序与冠状病毒

同源性高,其演绎的氨基酸序列与牛冠状病毒和鼠肝炎病毒的 RNA 聚合酶同源性高达 57%,蛋白序列的进化分析显示,该病毒尽管非常接近抗原 II 群冠状病毒,但实为一独立病毒。根据该核苷酸序列设计的特异引物进行 RT-PCR,结果从 44 例患者的鼻咽分泌物中检测到冠状病毒 RNA 阳性标本 22 例,并从 18 份粪便样本中测到 10 例阳性。同时 50 例患者血清中,35 例冠状病毒抗体阳性;32 例双份血清中,或抗体阳转,或恢复期抗体滴度等 4 倍以上增高。但从 200 例正常献血者和 80 例其他患者血清中均未测到该病毒抗体。与此同时,Drosten 等^[4]也用同样方法证实新型冠状病毒是 SARS 的病原。目前,加拿大 Smith 基因科学中心已公布了全球首份 SARS 病毒基因图谱,分析发现病毒基因组是一种全新冠状病毒,与任何已知的人类和动物病毒均不同。同时,我国香港、北京等地也成功地完成了新型冠状病毒的全基因组序列测定及基因图谱排列,与加拿大公布的图谱相似。由于 SARS 病毒的基因序列不同于已知的人类冠状病毒,因此科学家们怀疑 SARS 病毒很可能来源于动物。Derisi 等用其制作的病毒芯片与 SARS 患者样本进行杂交反应,该芯片上点阵了 12 000 个代表约 1 000 种病毒的 DNA 片段,结果显示,鸟传染性支气管炎病毒和牛冠状病毒呈强阳性反应^[5]。推测是病毒间的结合重组导致了新型病毒的出现,且该病毒可能一直潜伏在某种动物体内,当人体接触此种动物时,这种原来对动物不致病的病毒可能发生变异,侵入人体后造成严重损害,引起 SARS。但此推测尚需进一步证实。

一种新的传染病病原体的确定必须首先符合郭霍 4 项法则:①特殊病原体应在同一种疾病中查见,健康者中不存在;②该特殊病原体能被分离培养获得纯种;③该纯培养物接种至易感动物能产生同样病症;④从人工感染的实验动物体内能重新获得该病原体。John 等在追踪 SARS 起因的研究中发现,某些患者身上存在一种属于副粘液病毒家族的人类间质性肺炎病毒,他们检测 53 例 SARS 患者的样本,25 例有该病毒^[6]。同时加拿大和德国的一些实验室也有相同的发现。人类间质性肺炎病毒能使儿童、老年人和免疫力弱的人患呼吸系统疾病。因此,有人提出,该两种病毒可能都有作用:一种导致非典型肺炎,另一种使病情加重。为证实 SARS 病原,荷兰 Osterhaus 等进行了动物实验。他们给一组猴子

(短尾猴)感染新型冠状病毒,另一组感染人类间质性肺炎病毒,第三组则先感染冠状病毒,然后再感染人类间质性肺炎病毒。结果第一组猴子感染后出现的症状与死于非典型肺炎患者完全一致。第二组猴子的症状不明显,不属于非典型肺炎。第三组猴子的病情并不比第一组更严重。说明单独冠状病毒就可以导致非典型肺炎。

由于 SARS 病原已基本确定,针对该新型冠状病毒的特异性检测方法也已初步建立,包括抗体检测和分子生物学检测。SARS 患者在临床症状出现后 20 天左右,血清中可用 ELISA 和免疫荧光法检测到特异性 IgG 和 IgM 抗体,且与人类冠状病毒无交叉反应。目前 WHO 已公布了 7 对引物,可通过 RT-PCR 特异性地扩增 SARS 病毒基因片段,以协助临床诊断,尤其是确诊早期疑似病例。德国生物技术公司已研制出 SARS PCR 诊断试剂盒。但上述试剂的敏感度和特异性有待进一步证实。目前已有多株来自不同国家的 SARS 病毒基因组序列。运用这些信息,科学家可以探索出更为敏感而准确的实验室诊断方法。

明确病原是 SARS 研究的一大突破,但该病目前依然肆虐猖獗,今后的防治任务仍十分艰巨。目前尚有许多问题有待研究:如继续追踪病毒的起源;探索更敏感准确的实验室诊断方法;明确病毒感染细胞的方式、致病机理、感染者排毒持续时间;寻找有效的药物和研制疫苗;建立 SARS 基因库等;以期尽快控制该病毒的传播,降低病死率。

参 考 文 献

- 1 WHO. Update 31-coronavirus never before seen in humans is the cause of SARS. 16 April, 2003.
- 2 Thomas G, Ksiaszek DVM, Eroman D, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1947-1958.
- 3 Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003 (in press).
- 4 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 (in press).
- 5 Knight J. Researchers get to grips with cause of pneumonia epidemic. *Nature*, 2003, 422: 547-548.
- 6 Pearson H. Labs crack killer's code. *Nature*, 2003 (in press).

(收稿日期 2003-04-25)

(本文编辑:张林东)