

SARS-CoV 特异性抗体产生规律的初步研究

貌盼勇 朱雷 王佑春 侯俊 胡燕 沈宏辉 辛绍杰 李保森 毛远丽 庄辉

【摘要】 目的 研究严重急性呼吸综合征(SARS)患者感染后体内病毒特异性抗体产生规律。方法 收集临床确诊为 SARS 患者的血清和非 SARS 人群血清标本,用 IgM 捕获法、间接法和抗原夹心法三种不同方法检测抗 SARS 病毒特异性 IgM、IgG 和总抗体。结果 检测 146 份临床诊断为 SARS 的患者不同发病时间血清标本,三种抗体阳性率分别为 61.64%、53.43% 和 69.86% ;SARS 病毒特异性 IgM、IgG 抗体的最早检出时间分别在发病第 7 天和第 12 天,特异性 IgM 抗体最短在发病后 42 天消失。三种方法检测 70 份甲型肝炎患者血清时,均有 2 份非特异性阳性反应,检测 127 份其他病种血清均阴性,1 例密切接触 SARS 患者的医务人员 SARS 特异性 IgG 抗体和总抗体均阳性,三种检测方法均不受类风湿因子影响。结论 与其他病毒感染相比,SARS 病毒感染者的特异性 IgM 抗体检出时间较晚,且持续时间较短;三种检测方法均有较好的特异性和敏感性,可用于 SARS 的流行病学调查和临床诊断的确认和补充,但不适用于 SARS 的早期诊断。

【关键词】 严重急性呼吸综合征;病毒;特异性抗体

Study on the response of specific antibodies against SARS-CoV in patients infected with SARS MAO Pan-yong*, ZHU Lei, WANG You-chun, HOU Jun, HU Yan, SHEN Hong-hui, XIN Shao-jie, LI Bao-sen, MAO Yuan-li, ZHUANG Hui. *Institute of Infectious Diseases, Hospital 302 of the Chinese People's Liberation Army, Beijing 100039, China
Corresponding author: ZHUANG Hui, Email zhuang.hui@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the response of specific antibodies against severe acute respiratory syndrome(SARS)-CoV in patients infected with SARS. **Methods** IgM-capture, indirect and antigen-sandwiched enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) were used to detect the SARS-CoV specific IgM, IgG and total antibodies in sera of clinical SARS patients or non-SARS individuals. **Results** The positive rates of IgM, IgG and total antibodies to SARS-CoV in 146 sera of SARS patients collected in different phases of the disease were 61.64%, 53.43% and 69.86%, respectively. The earliest detectable days after onset of the disease for IgM and IgG to SRAS-CoV were 7 and 12 days, respectively. The specific IgM disappeared as early as 42 days after the onset of SARS. Of 70 sera from hepatitis A patients, 2 showed false positive results, while 127 sera from other patients were all negative, detected by the 3 methods. Serum from one medical worker who had been close contact to SARS patients was positive for anti-SARS-CoV IgG and total antibodies. These 3 methods used for detection were all not influenced by rheumatoid factor(RF). **Conclusion** All of the three methods were specific and sensitive for the detection of specific antibodies to SARS-CoV, and useful for epidemiological research and clinical diagnosis, but not for early diagnosis of SARS.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome; Virus; Specific antibody

严重急性呼吸综合征(SARS)是一种新的急性呼吸道传染病^[1]。SARS 冠状病毒(SARS-CoV)是引起该病的主要病原。研究表明^[1-6]该病毒为正链 RNA 病毒,其形态和基因组结构与冠状病毒相似,但与其他冠状病毒的核苷酸同源性仅为 30%~

50%,而且与禽传染性支气管炎病毒、鼠肝炎病毒等同属冠状病毒的核苷酸同源性高于同人冠状病毒的同源性,是一种全新的冠状病毒。为研究 SARS 患者感染后体内特异性抗体产生规律,验证 SARS 抗体检测作为实验室特异性诊断的可行性,我们采用三种方法检测了部分 SARS 患者不同时期血清中特异性 SARS-CoV 抗体,初步了解其一般规律。

作者单位:100039 北京 解放军第三〇二医院传染病研究所(貌盼勇、朱雷、侯俊、胡燕、沈宏辉、辛绍杰、李保森、毛远丽);中国药品生物制品检定所细胞室(王佑春);北京大学医学部病原微生物学系(庄辉)

对象与方法

通讯作者:庄辉,Email zhuang.hui@hotmail.com

1. 血清标本来源: SARS 血清标本 146 份, 采自

解放军第三〇二医院 2003 年住院的 SARS 患者, 临床诊断符合国家卫生部颁布的 SARS 患者诊断标准, 抗甲型肝炎(甲肝)病毒 IgM 抗体阳性血清 70 份, 乙肝患者血清 30 份, 丙肝抗体阳性血清 30 份, 抗麻疹病毒 IgM 抗体阳性血清 10 份, 抗流行性腮腺炎病毒 IgM 抗体阳性血清 6 份, 抗风疹病毒 IgM 抗体阳性血清 3 份, 疑似 SARS 患者血清 7 份, 均采自解放军第三〇二医院住院患者, 献血员血清 35 份, 采自北京志愿献血员, 密切接触 SARS 患者人员血清 26 份采自解放军第三〇二医院医务人员。

2. 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)检测抗 SARS 病毒 IgG 抗体: 试剂盒由北京华大吉比爱生物技术有限公司提供, 按照说明书操作, 固相为灭活 SARS 全病毒包被酶联反应板, 待测血清 1:10 稀释, 酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体, TMB 显色, 临界值等于阴性对照平均值加 0.13, 结果判定以标本吸光度(A)值大于临界值为阳性。

3. IgM 捕获法检测抗 SARS 病毒特异性 IgM 抗体: 试剂由北京万泰生物药业有限公司提供, 鼠抗人 IgM(μ 链)抗体包被酶联反应板, 待测血清 1:10 稀释, 酶标记物为辣根过氧化物酶标记的 SARS 病毒基因重组抗原, 结果判定以标本 A 值大于临界值为阳性, 临界值等于阴性对照平均值加 0.15。

4. 抗原夹心法检测抗 SARS 病毒特异性总抗体: 试剂由北京万泰生物药业有限公司提供, 固相为 SARS 病毒基因重组抗原包被酶联反应板, 待测血清 1:2 稀释, 酶标记物为辣根过氧化物酶标记的 SARS 病毒基因重组抗原, 临界值等于阴性对照平均值加 0.15。

结 果

1. SARS 患者血清检测结果: 146 份临床诊断为 SARS 患者的不同发病时间血清标本中三种抗体检测结果见表 1。特异性 IgM 最早可在第 7 天检出, 特异性 IgG 最早可在第 12 天检出, 总抗体与特异性 IgM、IgG 的检出结果不完全相同, 在发病第 16 天后患者血清中 SARS 总抗体检测全部为阳性; 2 例患者血清中自始至终未检测到特异性 IgM 抗体。1 例患者直至发病第 15 天死亡时血清中特异性 IgG 抗体仍阴性。

2. 不同发病时间血清检测结果: 4 例临床诊断 SARS 患者的不同发病时间血清特异性 IgM、IgG 和总抗体检测结果见表 2。总抗体检测与特异性

IgM 抗体结果在早期时相同, 1 例患者在发病第 42 天时特异性 IgM 抗体消失。

表1 三种方法检测 146 份 SARS 患者血清特异性抗体结果

发病时间 (d)	阳 性 率 (%)		
	SARS-IgG	SARS-IgM	SARS 总抗体
1~	0.00(0/18)	0.00(0/18)	0.00(0/18)
6~	0.00(0/26)	11.54(3/26)	7.69(2/26)
11~	43.75(7/16)	56.30(9/16)	87.50(14/16)
16~	92.86(13/14)	100.00(14/14)	100.00(14/14)
21~	70.00(7/10)	80.00(8/10)	100.00(10/10)
26~	100.00(16/16)	100.00(16/16)	100.00(16/16)
30~	100.00(15/15)	100.00(15/15)	100.00(15/15)
36~	100.00(13/13)	100.00(13/13)	100.00(13/13)
40~60	100.00(18/18)	66.67(12/18)	100.00(18/18)
合计	53.43(78/146)	61.64(90/146)	69.86(102/146)

注: 括号内数据为阳性份数/标本份数

表2 4 例 SARS 患者不同发病时间血清中特异性抗体检测结果

发病 时间 (d)	标本 1		标本 2		标本 3		标本 4	
	IgM	总抗体	IgM	总抗体	IgM	总抗体	IgM	总抗体
6	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	-	+	+	+	-	+	+
14	+	-	+	+	+	+	+	+
			42	-	+	+		

3. 非 SARS 患者血清检测结果: 三种方法检测 70 份甲肝患者血清时, 均有 2 例阳性, 但各为不同标本, 其中 IgG 抗体和总抗体均有 1 例强阳性, 6 例检测阳性的血清中类风湿因子均阴性。1 例密切接触 SARS 患者的医务人员 SARS 特异性 IgG 抗体和总抗体阳性, 其他血清均为阴性(表 3)。

表3 三种方法检测 197 份其他疾病血清特异性抗体结果

血清来源	阳 性 率 (%)		
	SARS-IgM	SARS-IgG	SARS-Ab
甲肝患者	2.86(2/70)	2.86(2/70)	2.86(2/70)
乙肝患者	0.00(0/30)	0.00(0/30)	0.00(0/30)
丙肝患者	0.00(0/30)	0.00(0/30)	0.00(0/30)
麻疹患者	0.00(0/10)	0.00(0/10)	0.00(0/10)
流腮患者	0.00(0/6)	0.00(0/6)	0.00(0/6)
风疹患者	0.00(0/3)	0.00(0/3)	0.00(0/3)
献血员	0.00(0/15)	0.00(0/15)	0.00(0/15)
疑似 SARS 者	0.00(0/7)	0.00(0/7)	0.00(0/7)
接触 SARS 者	0.00(0/26)	3.85(1/26)	3.85(1/26)
合 计	1.07(2/197)	1.52(3/197)	1.52(3/197)

注: 括号内数据为阳性份数/标本份数

讨 论

SARS 是一种全身损伤性疾病, 死亡率较高, 主

要靶器官为肺、免疫器官和小静脉^[7-10]。研究证实 SARS-CoV 在系统发生学上与其他已知冠状病毒无密切关系,为冠状病毒属中的一种新病毒^[11-13]。它引起机体产生的免疫应答也与其他病毒不同。一般人体感染病毒后,3~5 天即可产生特异性 IgM 抗体,如麻疹患者发病第 3 天时约有 80% 以上的特异性抗麻疹病毒抗体阳性,在发病第 5 天达 100% 阳性,且一般可维持 3 个月以上。而在本研究中,SARS-CoV 感染后发病的第 7~10 天的血液中才能检测到特异性 IgM 抗体,特异性 IgM 抗体最短在发病后 42 天消失。特异性 IgG 抗体的最早检出时间在发病第 12 天,与其他病毒感染相比,抗体产生也较晚。这可能与 SARS 病毒感染机体的特殊致病机理、发病快等因素有关。

发病第 21~25 天时标本中特异性抗体阳性率低于第 15~20 天时标本,可能由于标本例数较少的缘故。2 例发病第 21~25 天时特异性 IgM 阴性的标本与特异性 IgG 阴性的标本来自不同患者,3 例发病第 21~25 天特异性 IgG 阴性的患者年龄分别为 45 岁、28 岁和 22 岁,其中 45 岁患者第 30 天时抗体阳转,另外 2 例未采集到晚期血清,特异性抗体的产生与患者年龄关系不明显,3 例患者病情均较轻。

三种方法检测 146 份临床诊断为 SARS 的患者不同发病时间血清,SARS 病毒特异性 IgM、IgG 抗体和总抗体阳性率,以总抗体检测敏感性最高,但总抗体检测的结果并非完全与特异性 IgM 和 IgG 抗体检测结果之和相等,有少数特异性 IgM 或 IgG 抗体阳性标本中总抗体阴性,这可能与不同检测方法所使用的抗原不同有关。特异性 IgM 和 IgG 抗体的最早检出时间分别在发病第 7 天和第 12 天,特异性 IgM 抗体持续最短者在发病后 42 天消失。

三种方法检测了 197 例其他血清,除甲肝患者血清外,其他血清中 SARS 病毒特异性 IgM、IgG 抗体和总抗体均阴性。70 例甲肝患者血清中,三种方法检测均有 2 例阳性,但各为不同标本。其中特异性 IgG 抗体和总抗体均有 1 例强阳性,说明血清中可能存在与 SARS 病毒相交叉的非特异性抗体。该 6 例 SARS 抗体阳性的甲肝患者血清中类风湿因子检测均阴性,排除了类风湿因子干扰的影响。同时,甲肝患者血清均为解放军第三〇二医院 2001 年住院患者,也排除了隐性感染 SARS 病毒的可能。鉴于三种方法检测时出现的非特异性反应各不相同,

因此使用两种以上的检测方法将有助于排除非特异性反应的影响。1 例密切接触 SARS 患者的医务人员血清中 SARS 病毒特异性 IgG 抗体和总抗体均阳性,但未出现临床症状,提示 SARS 病毒感染可能存在亚临床或隐性感染。

2 例确诊 SARS 患者血清中始终未检测出特异性 IgM 抗体,但在发病 15 天后检测特异性 IgG 抗体均阳性,患者预后良好。而 1 例重症患者至死亡前(发病后 15 天)血清中一直未检测到特异性 IgG 抗体,且特异性 IgM 抗体滴度较低,是否说明特异性 IgG 抗体与疾病的恢复直接相关,又或是感染病毒的变异致使抗体检测阴性,有待进一步深入研究。

研究结果表明,三种检测方法均有较好的特异性和敏感性,可用于 SARS 的流行病学调查和临床诊断的确认和补充。其中以特异性总抗体检测方法因能同时检测特异性 IgM 和 IgG 抗体,所以敏感性最高,但均不能满足 SARS 感染早期诊断的需要。

参 考 文 献

- 1 Kuiken T, Fouchier RAM, Schutten M, et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 362:263-270.
- 2 Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science*, 2003, 300:1394-1399.
- 3 Poutanen SM, Low DE, Henry B, et al. Identification of severe acute respiratory syndrome in Canada. *N Engl J Med*, 2003, 348:1995-2005.
- 4 Drosten C, Günther 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.
- 5 Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361:1319-1325.
- 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 赵景民,周光德,孙艳玲,等.一例地方传染性非典型肺炎病例病理及病原学发现. *解放军医学杂志*, 2003, 28 增刊:14-17.
- 8 丁彦青.传染性非典型肺炎的病理学及发病机制. *解放军医学杂志*, 2003, 28 增刊:18-19.
- 9 周先志,李勇纲,赵敏,等.传染性非典型肺炎的临床发病特点相关问题的研究. *解放军医学杂志*, 2003, 28 增刊:36-37.
- 10 Cinatl J, Morgenstern B, Bauer G, et al. Treatment of SARS with human interferons. *Lancet*, 2003, 362:293-294.
- 11 Holmes KV. SARS-associated coronavirus. *N Engl J Med*, 2003, 348:1948-1951.
- 12 Marra MA, Jones SJM, Astell CR, et al. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. *Science*, 2003, 300:1399-1404.
- 13 刘涛,李伍举,范明.传染性非典型肺炎可能病原—冠状病毒的系统发生学分析. *解放军医学杂志*, 2003, 28 增刊:1-5.

(收稿日期:2003-11-05)

(本文编辑:尹廉)