

· 现场调查 ·

严重急性呼吸综合征康复病例血清中和抗体三年追踪观察

谢淑云 曾光 夏时畅 张泮河 尹卫东 刘碧瑶 杨仕贵 曹务春

【摘要】 目的 了解严重急性呼吸综合征(SARS)康复病例病后3年血清中和抗体水平及其变化规律,为SARS疫苗的研制和使用决策提供理论依据。**方法** 对SARS康复病例进行随访,分别采集病后第5个月、第20个月和第35个月的血清,每份血清标本均采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)和微量中和试验二种方法进行血清SARS-CoV特异性抗体的检测。中和抗体效价采用Reed-Muench方法计算。3个时间点中和抗体效价的趋势分析采用对数转换后的数据进行重复测量方差分析。**结果** 分别采集到病后第5个月、第20个月和第35个月的血清标本13份、17份和13份,采用ELISA法检测的抗体阳性率分别为100%、82.4%和84.6%,而采用中和试验法检测的中和抗体阳性率均为100%,中和抗体效价依次为1:43(1:16~1:203)、1:36(1:17~1:59)和1:21(1:10~1:39),其差异具有统计学意义($F=60.419, P<0.001$)。病后第35个月时有30.8%(4/13)的病例血清中和抗体效价高于1:36,但另有30.8%(4/13)的病例血清中和抗体效价等于或略高于1:10(临界水平1:8)。**结论** SARS病例血清中和抗体至少可持续3年,但中和抗体效价随康复时间延长呈逐渐下降趋势;血清中和抗体效价个体差异较大,病后第35个月时部分病例的血清中和抗体效价已降至较低水平,何时完全消失尚需进一步追踪观察。

【关键词】 严重急性呼吸综合征; 抗体; 中和试验; 随访调查

A three-year follow-up study on sera specific antibody in severe acute respiratory syndrome cases after the onset of illness XIE Shu-yun*, ZENG Guang, XIA Shi-chang, ZHANG Pan-he, YIN Wei-dong, LIU Bi-yao, YANG Shi-gui, CAO Wu-chun. *Department of Epidemic Control and Prevention, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310009, China

【Abstract】 Objective To study the variation of specific antibody among convalescent of severe acute respiratory syndrome(SARS) patients through a three-year program. **Methods** Sera samples were collected from SARS cases in the 5th, 20th and 35th month after onset of the illness. The SARS-CoV specific antibody was detected for all of them by ELISA and neutralized test simultaneously. The titer of neutralizing antibodies was calculated using Reed-Muench method, and the comparison between different time groups was analyzed regarding the variance of data on repeated measures after logarithm conversion. **Results** 13, 17 and 13 sera samples were collected in the 5th, 20th and 35th month after onset. Results showed that despite the fact that the positive rates of ELISA antibody were 100%, 82.4% and 84.6% respectively, the neutralizing antibody was still positive for all the samples. The average neutralizing antibody titers were 1:43(1:16-1:203), 1:36(1:17-1:59) and 1:21(1:10-1:39) on the 5th, 20th and 35th month after onset, and the differences were statistically significant ($F=60.419, P<0.001$). On the 35th month after the onset, 30.8%(4/13) of the patients were still having the neutralizing antibody level of above 1:36, but the neutralizing antibody level in another 30.8%(4/13) of the patients had decreased to as low as 1:10, when the cut-off level was set as 1:8. **Conclusion** Results of the study indicated that the neutralizing antibody of SARS cases could last for at least three years, but the sera specific antibody in SARS cases decreased gradually when time went by. However, neutralizing antibody in some of the cases decreased to a lower level on the 35th month. Further follow-up study was worthwhile to observe the long-lasting profile of antibody existence on SARS cases.

【Key words】 Severe acute respiratory syndrome; Antibody; Neutralized test; Follow-up

严重急性呼吸综合征(SARS)2003 年流行结束后,康复病例血清保护性抗体的变化规律和持续时间是指导疫苗研制和免疫决策的关键,成为医学界十分关注的问题。为了探讨 SARS 康复病例血清抗体的变化和持久性,为其预防控制,特别是为疫苗的研制和应用策略提供理论参考依据。本研究同时采用间接酶联免疫吸附试验(ELISA)和中和试验对北京市某起 SARS 暴发传播链中部分 SARS 病例的血清抗体进行了 3 年左右的追踪观察。结果报告如下。

材料与方法

1. 研究对象:2003 年 3-4 月发生在北京市 J 医院的一起 SARS 暴发事件中的 SARS 康复病例,发病时间在 2003 年 3 月 31 日至 4 月 15 日。共对 18 例康复病例进行了随访,其中男 2 例,女 16 例,年龄最小的 17 岁,最大的 48 岁,平均年龄 29.6 岁。重症病例 5 例,非重症病例 13 例;其中第二代 SARS 续发病例 4 例,第三代 SARS 续发病例 14 例。

2. 血清采集:

(1)知情同意:事先告知本次采血检测的目的和意义,由研究对象自愿选择是否接受采血检测。

(2)血清采集与处理:分别于 2003 年 9 月、2004 年 12 月、2006 年 3 月采集病例病后第 5 个月、第 20 个月和第 35 个月的血清标本。在空腹状态下采用一次性无菌负压采血管采集其静脉血 5 ml,无菌状态下分离血清,置血清冻存管, -20℃ 保存待检。

3. 血清抗体检测:每份血清标本同时采用两种方法进行血清 SARS-CoV 抗体的定性和定量检测。①由北京科兴生物制品有限公司采用间接 ELIAS 对血清 SARS-CoV 特异性抗体 IgG 进行定性检测。选择冠状病毒(变异株)IgG 抗体检测试剂盒(北京华大吉比爱生物技术有限公司,批准文号:国药试字 S20030004)。酶标仪型号:Bio-Red, Model 550。②由军事医学科学院微生物流行病研究所采用微量中和试验法对血清 SARS-CoV 中和抗体效价进行测定。细胞株:Vero-E6 细胞,批号 03115,引自该所细胞库;SARS 病毒株:SARS 病毒 BJ01,第 4 代,病毒滴度 $10^{6.5}$,批号 031215,由该所提供;中和抗体效价采用 Reed-Muench 方法计算。

4. 统计学分析:对血清 SARS-CoV 特异性抗体检测结果进行描述分析。并采用重复测量资料的方差分析对 3 个时间点的中和抗体效价之间的差异进行比较和趋势分析。统计分析软件为 SPSS 13.0。

结 果

1. 采血情况:3 次随访共采集到有效血清标本分别为 13、17 和 13 份。其中有 9 例病例连续 3 次均参加采血。

2. 定性检测情况:ELISA 结果显示:病例病后第 5 个月、第 20 个月和第 35 个月时的血清 SARS-CoV 抗体阳性率依次为 100%、82.4% 和 84.6%,在第 20 个月和第 35 个月的血清标本分别出现 3 份和 2 份阴性;而经中和试验检测,所有血清均具有中和病毒的能力,3 个时间点的血清中和抗体阳性率均为 100% (表 1)。

表1 SARS 康复病例 43 份血清标本两种方法检测的定性结果

病后采血时间	样品份数	ELISA		中和试验	
		阳性份数	阳性率(%)	阳性份数	阳性率(%)
第 5 个月	13	13	100.0	13	100.0
第 20 个月	17	14	82.4	17	100.0
第 35 个月	13	11	84.6	13	100.0

3. 全部病例的血清中和抗体效价:SARS 康复病例病后第 5 个月、第 20 个月和第 35 个月时血清中和抗体平均效价依次为 1:43、1:36 和 1:21 (表 2)。将中和抗体效价进行对数转换,转换后的数据经重复测量方差分析,显示 3 个时间点中和抗体效价的差异具有统计学意义 ($F = 60.419, P < 0.001$)。经两两比较, P 值均 ≤ 0.001 , 差异均有统计学意义,提示 SARS 病例血清中和抗体效价随康复时间总体呈逐渐下降趋势,变化趋势见图 1。其中病后第 35 个月时,有 30.8% (4/13) 的病例血清中和抗体效价高于 1:36, 但另有 30.8% (4/13) 的等于或略高于 1:10 (临界水平 1:8)。

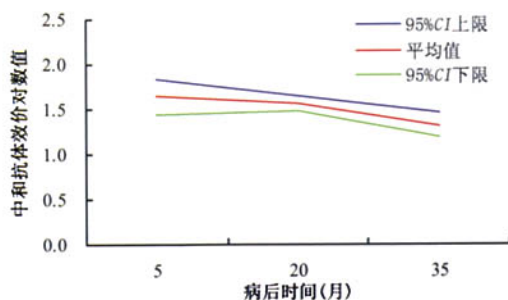


图1 全部 SARS 病例病后血清中和抗体效价变化趋势

4. 连续 3 次采血检测病例的血清中和抗体效价:9 例连续 3 次均参加采血病例,其病后第 5 个月、第 20 个月和第 35 个月时的血清中和抗体效价

见表 3, 中和抗体效价变化趋势见图 2。其中病后第 5 个月时血清中和抗体效价最低的 2 例病例, 其病后第 20 个月时的血清中和抗体效价有所增高, 病后第 35 个月时又下降至最低。

表2 SARS 病例病后不同时间血清中和抗体效价比较

病后时间	检测份数	GMT(1:)
第 5 个月	13	43(16~203)
第 20 个月	17	36(17~59)
第 35 个月	13	21(10~39)

注: $F = 60.419, P < 0.001$

表3 SARS 病例病后 3 个时间点的血清中和抗体效价

病例编号	病后血清中和抗体效价(GMT 1:)		
	第 5 个月	第 20 个月	第 35 个月
j-32	203	59	39
j-36	51	39	26
j-39	16	24	11
j-41	64	55	36
j-43	51	39	26
j-44	32	17	16
j-45	16	24	12
j-1	80	55	39
j-2	80	55	18

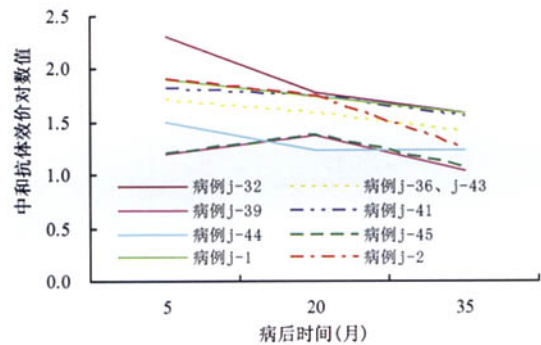


图2 9 例连续 3 次采血的 SARS 病例病后血清中和抗体效价变化趋势

讨论

关于 SARS 病例血清抗体水平动态观察的文献报道较多^[1-6], 但除个别报道是 2 年的观察结果外^[7], 绝大多数是观察 1 年左右的结果。尚未见病后 3 年左右的研究报道。本研究通过对 SARS 病例血清抗体进行连续 3 年左右的追踪观察, 结果显示, 采用 ELISA 法检测分别在病例病后第 20 个月和第 35 个月时的血清标本中检出 3 份和 2 份的阴性标本, 而采用中和试验法检测的血清中和抗体阳性率均为 100%。但中和抗体效价随康复时间的延长呈逐渐下降趋势, 部分病例已经降至较低水平。据此推断, 再经过一段较长的时间后, 体内中和抗体有可能会

消失, 这在一定程度上提示了 SARS-CoV 感染者获得终身免疫的可能性较小。因此, 在进行疫苗免疫决策时, 需要考虑加强免疫。

目前国内最常采用 ELISA 进行 SARS 血清抗体的检测, 对于该方法的灵敏度、特异度等评价褒贬不一。郭采平等^[6]发现采用 ELISA 测定 SARS 抗体, 特异性达 99.7%, 且重复性良好; 李穗芬等^[7]认为 ELISA 对于弱阳性的患者要注意追踪, 排除假阳性; 石玉玲等^[8]认为 ELISA 存在一定的假阳性。中和试验特异性强、灵敏度高, 是全球公认的经典方法, 其检测保护性抗体的中和效价是评价感染后免疫水平和保护能力的一个重要指标。本项研究所有血清标本在采用 ELISA 检测的基础上, 均同时采用了中和试验法进行检测。结果提示 ELISA 法同样可能存在一定的假阴性。

本项研究每次采血间隔 15 个月, 时间跨度相对较大, 不能详尽地绘制出中和抗体的消长曲线图, 但是可以在一定程度上反映康复病例病后血清中和抗体效价的变化趋势。其中病后第 5 个月时血清中和抗体效价最低的 2 例病例, 其病后第 20 个月时的血清中和抗体效价有所增高, 是否与该病例免疫功能在病后第 5 个月时尚未完全恢复有关有待研究。

本研究发现 SARS 病例血清中和抗体至少可持续 3 年, 但中和抗体效价随康复时间的延长呈逐渐下降趋势。病后第 35 个月时部分病例的血清中和抗体效价已降至较低水平, 究竟能维持多长时间, 是否会真正消失, 有待进一步追踪观察。

参 考 文 献

[1] 李勇, 徐军, 莫红缨, 等. SARS 患者恢复期血清中特异性抗体保护作用的研究. 中国危重病急救医学, 2004, 16(7): 409-412.

[2] 石玉玲, 李林海, 万卓越, 等. 严重急性呼吸综合征患者恢复期血清的中和反应及抗体滴度变化. 中华医学杂志, 2004, 84(13): 1084-1087.

[3] 余传霖, 叶天星, 陆德源, 等. 现代医学免疫学. 上海: 上海医科大学出版社, 1998: 499-500.

[4] 谢正德, 魏新苗, 胡英惠, 等. 严重急性呼吸综合征患儿血清抗严重急性呼吸综合征相关冠状病毒免疫球蛋白 G 远期随访. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(4): 203-205.

[5] 董石成, 岑枝梅. 46 例 SARS 抗体远期临床综合分析. 内蒙古医学杂志, 2006, 38(3): 221-222.

[6] 郭采平, 洪计灵, 张信, 等. ELISA 法测定 SARS 抗体效价. 药品评价, 2005, 2(5): 358-361.

[7] 李穗芬, 谭奕洲, 唐淡波, 等. ELISA 法检测 SARS 病毒特异性抗体. 实用医技杂志, 2005, 12(11): 1380-1382.

[8] 石玉玲, 李林海, 徐德兴, 等. 广东地区严重急性呼吸综合征患者血清学调查. 解放军医学杂志, 2003, 28(7): 572-574.

(收稿日期: 2006-12-15)

(本文编辑: 张林东)