

• 临床经验 •

传染性非典型肺炎患者不同病程粪便标本中SARS-CoV的分离与鉴定

田 薇, 邓亚军, 吴清发, 王绪敏, 杨 玲, 张 峰, 刘晨辉, 包其郁, 汪 建, 杨焕明, 刘明旭

田薇, 西安交通大学医学院卫生部法医学重点实验室 陕西省西安市710061
邓亚军, 杭州华大基因研发中心 浙江省杭州市 310008
吴清发, 王绪敏, 杨玲, 张峰, 刘晨辉, 汪建, 杨焕明, 刘明旭, 中科院北京基因组研究所, 北京华大基因研究中心 北京市 101300
包其郁, 浙江大学沃森基因组科学研究院, 杭州华大基因研发中心 浙江省杭州市 310008
项目负责人: 刘明旭, 101300, 北京市, 北京空港工业开发区 B-6, 北京华大基因研究中心. liumx@genomics.org.cn
电话: 010-80481102 传真: 010-80498676
收稿日期: 2003-12-12 接受日期: 2004-01-13

摘要

目的: 从粪便标本中分离并鉴定SARS-CoV.

方法: 粪便浸出液接种 Vero-E6 细胞, 盲传至出现明显的细胞病变效应(CPE), 并能稳定传代. 采用电镜法和 RT-PCR 技术鉴定细胞培养物中的 SARS-CoV (本实验均在 BSL-3 实验室完成).

结果: 大部分样本用 Vero-E6 细胞盲传 3 代后发现明显的 CPE, 并能稳定传代. 电镜负染检查, 出现 CPE 的细胞可查见病毒颗粒; 培养物上清 RT-PCR 扩增均为阳性. 粪便样本直接用 RT-PCR 检测, 阳性率仅为 50%, 细胞培养的检出率为 73%.

结论: 采用细胞培养结合 RT-PCR 技术检测粪便标本 SARS-CoV 比粪便标本直接 RT-PCR 的阳性率高.

田薇, 邓亚军, 吴清发, 王绪敏, 杨玲, 张峰, 刘晨辉, 包其郁, 汪建, 杨焕明, 刘明旭. 传染性非典型肺炎患者不同病程粪便标本中 SARS-CoV 的分离与鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1246-1248

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1246.asp>

0 引言

SARS 冠状病毒(SARS-CoV)是一种新的冠状病毒^[1-6], 经呼吸道传播, 传染性强, 潜伏期短, 死亡率高, 主要分布在人体的肺、肝等器官及全身的淋巴组织, 同时也可存在于血液和粪便^[3,7].

迄今为止, 关于 SARS-CoV 的分离培养, 主要见于对鼻咽拭子等呼吸道样本以及尸解组织器官的病毒培养, 尚未见对患者粪便标本进行 SARS-CoV 分离培养的报道. 我们采用体外病毒分离技术从北京佑安医院 2003-05-16/06-09 收集的 12 例患者 30 份标本中, 分离获得了 SARS-CoV 原始分离物. 电镜和 RT-PCR 技术均证实细胞培养物中含有 SARS-CoV. 现报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料 病例与样品: 粪便标本由北京佑安医院提供,

时间 2003-05-16/06-09, 所有患者都符合 WHO 对 SARS 疑似病例的诊断定义 (<http://www.who.int/csr/sars/guidelines/en>). 12 例 SARS 患者中男 5 例, 女 7 例, 27-63 岁, 病程 12-65 d (从发病之日计算), 共 30 份粪便样本(部分样本来自同一患者的不同病程). 引物: 根据 SARS-CoV BJ01 株基因组序列(A Y278488), 设计 4 对引物(其中 2 对为巢式引物), 序列如下: SARS73: 5' CA AACCCCAACTTTGAAAT 3' 和 5' CAGAGGTGCA AACTGTAA 3', 扩增产物长度为 226 bp, SARS73 巢式引物(SARS73N): 5' CTTTTATTGAGGACTTGCTCT 3' 和 5' ACTTCTGCGCACAAATGAG 3', 扩增产物长度 118 bp; SARS81: 5' AACTCCTGGAACAATGGAAC 3' 和 5' TAAGCCACATCAAGCCTACA 3', 扩增产物长度为 238 bp, SARS81 巢式引物(SARS81N): 5' TTCC TAGCCTGGATTATGTT 3' 和 5' AGCACAAAACAAG CAAGTGT 3' 扩增产物长度 120 bp. 上述引物分别位于 SARS 冠状病毒 S 糖蛋白和 M 蛋白基因的保守区.

1.2 方法

1.2.1 粪便样本处理 挑取少许样本至 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 生理盐水, 振荡混匀, 室温 5 000 rpm 离心 3 min. 取上清液 140 μ L 用来提取病毒 RNA, 其余上清通过 0.22 μ m 滤膜过滤, 获得粪便浸出液, 用于病毒分离.

1.2.2 SARS-COV 分离 Vero-E6 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养传代, 细胞接合度达到 80-90% 时, 接种粪便浸出液 1 mL, 感染 2 h. 随后吸出粪便浸出液, 加 1 mL 上述 DMEM, 置 CO₂ 培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养. 2 d 后每天在显微镜下观察细胞状态, 记录是否出现细胞病变效应(CPE). 如果不出现 CPE, 4-6 d 盲传 1 次. 传代至出现 90% CPE 时, 收集病毒液, 转到 25 cm² 细胞培养瓶中放大增生. 富集足够的病毒, 保存毒种, 进行电镜鉴定.

1.2.3 电镜和 RNA 样本制备 用 QiAamp Viral RNA 提取试剂盒(GIAGEN 产品)分别从粪便浸出液和出现 CPE 的细胞培养上清液中提取 RNA, 用于逆转录 PCR. 出现 CPE 的培养细胞用 20-30 mL/L 戊二醛固定液固定 2 h, 用于电镜检查.

以上操作均在中国科学院北京基因组学研究所/北京华大基因研究中心的 BSL-3 实验室内进行.

1.2.4 电镜鉴定 以 30 g/L 磷钨酸溶液负染色, 透射电镜观察.

1.2.5 RT-PCR 检测 病毒 RNA 逆转录用 Promega 的 Reverse Transcription System, 按说明书操作. PCR 及巢

式 PCR 按常规方法进行^[2, 8].

1.2.6 血清抗体的测定 采用 ELISA 方法, 用酶标仪 (Multiskan Ascent, Finland) 测定 AD₄₅₀ (参考波长为 630 nm), IgG 大于 0.18, IgM 大于 0.16 判为阳性.

2 结果

2.1 病毒分离和电镜鉴定 从 12 例患者共 30 份标本中成功分离得到 19 株原始分离物, 多数标本用 Vero-E6 细胞盲传 3 代后即出现明显的 CPE (图 1), 并能稳定传

代. 电镜负染检查从粪便浸出液接种的病变 Vero-E6 细胞, 均查见病毒颗粒 (图 2).

2.2 RT-PCR 扩增结果 临床粪便样本 30 份直接用 RT-PCR 法扩增, 其中阳性 15 份, 阳性率为 50% (15/30); 细胞培养病毒阳性 19 份, 经 RT-PCR 检测全为阳性, 阳性率为 73% (19/26) (表 1). 对其中 12 例的粪便标本和细胞培养分离物同时进行 RT-PCR 和巢式 PCR (SARS73 和 SARS81 引物及其相应的巢式引物), PCR 反应产物的大小与预期结果完全相同.

表 1 12 例 SARS 患者粪便标本 SARS-COV 的不同方法鉴定结果

病例	年龄/性别	取样时间	病程(d)	临床样本 RT-PCR 结果	分离结果	分离后 RT-PCR 结果	IgG		IgM	
							5.24	6.3	5.24	6.3
1	63/女	03-5-16	24	+	+	+				
		03-5-20	28	+	+	+				
		03-5-23	31	+	+	+	0.489	ND	0.073	ND
		03-5-27	35	-	+	+				
2	48/女	03-6-03	42	-	+	+				
		03-5-16	27	+	+	+	0.242	ND	0.076	ND
3	56/女	03-5-16	32	+	+	+	ND	ND	ND	ND
		03-5-20	36	+	+	+				
4	60/男	03-5-16	58	-	+	+				
		03-5-20	62	+	NS	NS	ND	ND	ND	ND
5	35/女	03-5-23	65	+	+	+				
		03-6-06	53	+	+	+	0.352	0.462	0.112	0.150
6	41/女	03-5-16	33	+	+	+	ND	ND	ND	ND
		03-5-16	30	-	+	+				
		03-5-20	34	-	-	-				
		03-5-27	41	+	+	+	0.711	1.026	0.054	0.041
7	50/女	03-6-3	48	-	-	-				
		03-6-6	51	-	NS	NS				
		03-6-9	54	-	+	+				
		03-5-27	12	-	+	+				
8	27/男	03-5-30	15	-	+	+	ND	0.127	ND	0.031
		03-6-6	22	-	-	-				
		03-6-09	25	+	+	+				
9	48/男	03-5-16	16	+	+	+				
		03-5-23	23	-	NS	NS	0.061	0.148	0.057	0.072
10	48/女	03-5-30	62	+	-	-	0.529	ND	0.041	ND
11	48/男	03-5-27	19	-	-	-	0.051	0.115	0.010	0.016
		03-5-30	19	-	NS	NS				
12	30/男	03-6-6	26	-	-	-				
		03-6-9	29	+	-	-	ND	0.118	ND	0.021

ND 未做, NS 无结果.

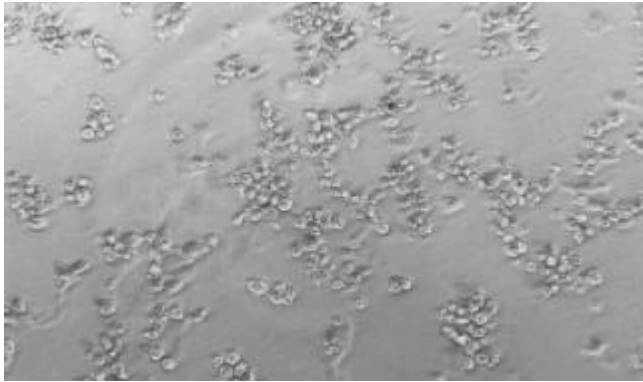


图1 粪便样本传第3代 Vero-E6 细胞。

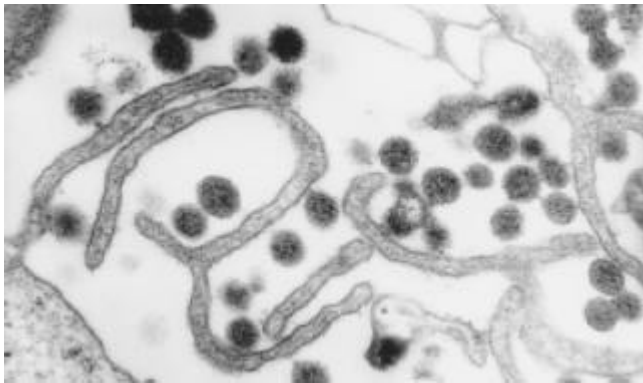


图2 粪便标本接种 Vero-E6 细胞培养液中的病毒颗粒。

3 讨论

在 SARS 患者体内的肺组织、肾脏、粪便中已发现冠状病毒^[7, 9], 可是从粪便中分离冠状病毒较为困难^[10], 至今为止没有报道从粪便分离病毒的例子. 我们对佑安医院 2003-05 住院的 12 例临床诊断 SARS 患者的粪便标本进行 SARS-CoV 检测, 从多数标本(19/26)中成功地分离出 SARS-CoV(其中包含病程长达 65 d 的 SARS 患者粪便标本), 并通过电镜形态学、血清学及 RT-PCR 扩增, 对分离的病原体予以鉴定. 所以 SARS-CoV 能否通过消化道传播, 值得进一步研究.

RT-PCR 是目前用来检测 SARS 病原体的重要方法之一, 在我们检测的 30 份标本中, 粪便标本直接 RT-PCR 的阳性率只有 50%(15/30), 经过病毒培养后阳性率为 73%(19/26), 表明病毒培养可提高粪便标本 SARS-CoV 的检出率.

由于标本来自多个患者的不同病程, 病毒载量不同, 出现 CPE 的时间也不同. 1 号患者 2003-05-20 的样本, 在传第二代 48 h 即出现 CPE, 第三代后即可接种到单层 Vero 细胞的培养瓶中稳定传代. 大多数样本由于病毒载量较低, 在盲传三代后方可观察到 CPE. 另外传代过程中收集的病毒培养液和细胞, 须在 -20℃ 反复冻融, 并吸附染毒 2 h, 这是成功分离病毒的关键.

4 参考文献

- 1 祝庆余, 秦鄂德, 王翠娥, 于曼, 司炳银, 范宝昌, 常国辉, 彭文明, 杨保安, 姜涛, 李豫川, 邓永强, 刘洪, 甘永华. 非典型肺炎病例标本中新型冠状病毒的分离与鉴定. 中国生物工程杂志 2003;23:106-112
- 2 Ruan YJ, Wei CL, Ee AL, Vega VB, Thoreau H, Su ST, Chia JM, Ng P, Chiu KP, Lim L, Zhang T, Peng CK, Lin EO, Lee NM, Yee SL, Ng LF, Chee RE, Stanton LW, Long PM, Liu ET. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. *Lancet* 2003;361:1779-1785
- 3 Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, Nicholls J, Yee WK, Yan WW, Cheung MT, Cheng VC, Chan KH, Tsang DN, Yung RW, Ng TK, Yuen KY. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003; 361:1319-1325
- 4 Drosten C, Gunther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A, Burguiere AM, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Muller S, Rickerts V, Sturmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus AD, Schmitz H, Doerflinger HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 348:1967-1976
- 5 Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota P, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes JM, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ. SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003;348:1953-1966
- 6 聂青和, 罗新栋, 惠武利. 一种新型传染病: 严重急性呼吸综合征. 世界华人消化杂志 2003;11:881-887
- 7 Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *J Clin Invest* 2003;111:1605-1609
- 8 Wang Y, Ma WL, Song YB, Xiao WW, Zhang B, Huang H, Wang HM, Ma XD, Zheng WL. Gene sequence analysis of SARS-associated coronavirus by nested RT-PCR. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:421-423
- 9 田耕, 张泰昌, 杨惠青. 老年 SARS 患者 41 例消化系统损害的临床分析. 世界华人消化杂志 2004;12:233-235
- 10 陆海英, 霍娜, 童一帆, 王广发, 李海潮, 聂立功, 阙呈立, 李楠, 马静, 徐小元. SARS 伴腹泻病例的临床特点. 世界华人消化杂志 2003;11:1929-1931