

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的起源和检测方法

侯宁宁, 陈颖, 任晋生, 李闻涓, 李慧, 罗兴洪*

江苏先声药业有限公司, 转化医学与创新药物国家重点实验室, 江苏 南京 210042

摘要: 自2019年12月, 中国武汉爆发了新型冠状病毒(SARS-CoV-2)导致的新型冠状病毒肺炎(COVID-19), 截至2020年2月26日, 已导致累计78 190人确诊感染, 超过2 700人死亡, 除中国外, 亚洲、北美、欧洲、非洲等已有20多个国家发现新型冠状病毒确诊病例。中国疾病预防控制中心研究结果表明, 无症状感染者比例占1.2%, 这些无症状传染者在潜伏期很可能具有传染性。确定SARS-CoV-2的起源和了解目前常见的检测方法, 将对战胜这次疫情以及日后防范其卷土重来至关重要。

关键词: 新型冠状病毒; 起源; 检测方法; 实时荧光定量PCR; 数字PCR; 纳米孔技术测序; 酶联免疫法; 胶体金法

中图分类号: R373.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2020)04-0620-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.04.006

Origin and detection methods of SARS-CoV-2

HOU Ningning, CHEN Ying, REN Jinsheng, LI Wenjuan, LI Hui, LUO Xinghong

Jiangsu Xiansheng Pharmaceutical Co., Ltd., State Key Laboratory of Translational Medicine and Innovative Drug Development, Nanjing 210042, China

Abstract: In December 2019, corona virus disease 2019 (COVID-19) outbreak caused by a new coronavirus, the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2), began in Wuhan, China. As of february 26, 2020, SARS-CoV-2 has infected a total of 78 190 people and killed more than 2 700 people. Except China, Asia, Europe, North America, Africa, etc. Confirmed cases have been found in more than 20 countries. In addition, research data from the Chinese Center for Disease Control and Prevention showed that the proportion of asymptomatic new coronavirus infections accounted for about 1.2%. Besides, Asymptomatic infections are likely to remain infectious during the incubation periods. Conform the origin of SARS-CoV-2 and common detection methods will be vital for us to fight against this epidemic and to prevent a comeback of the new coronavirus in the future.

Key words: coronavirus; origins; detection methods; Real time fluorescence quantitative PCR; digital PCR; nanopore sequencing; enzyme-linked immunosorbent assay; colloidal gold method

新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019, COVID-19)是指由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的肺炎,是一种急性呼吸道传染性疾病。自2019年12月以来,我国湖北武汉陆续发现多例SARS-CoV-2确诊感染患者。随着疫情的不断蔓延,我国其他地区及境外也相继发现了多起此类病例。目前确诊患者早期会出现严重的急性呼吸道感染,其中部分患者迅速发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、急性呼吸衰竭等严重并发症^[1]。2020年1月7日,中国疾病预防控制中心(The Chinese Center for Disease Control and Prevention, CDC)从一名患者的咽拭子样本中发现了一种全新

的冠状病毒,并随后被世界卫生组织(WHO)暂命名为2019-nCoV,随后被命名为SARS-CoV-2^[2]。根据对其他冠状病毒的认知,SARS-CoV-2在人群中传播主要途径可能是呼吸道飞沫以及接触。截至2020年2月26日,统计数据表明,此次疫情对中国构成严重的流行病威胁,中国的确诊病例呈快速增长,达到77 789例,死亡病例2 666例;受灾最严重的城市武汉确诊病例47 071例(占中国总病例的60.51%),死亡2 043例(占中国总死亡的76.63%)。由于一些疑似病例以及一些无症状患者的存在,他们在得不到及时治疗和有效隔离的情况下,又会大规模发生传染。因此确定SARS-CoV-2的起源和了

收稿日期: 2020-02-26

第一作者: 侯宁宁,女,硕士,从事新药研究工作。Tel:(025)85566666 E-mail:houningning@simcere.com

*通信作者: 罗兴洪,男,博士,主任药师,从事新药研究和企业经营管理工作。Tel:(025)85566666 E-mail:luoxinghong@simcere.com

解 SARS-CoV-2 常用的检测方法具有十分重要的意义。

1 SARS-CoV-2 的起源

1.1 确定 SARS-CoV-2 是不明新型肺炎的病原体

截止目前,冠状病毒家族的成员已是第3次肆虐人类。严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)病毒和中东呼吸综合征病毒(Middle East respiratory syndrome, MERS)曾分别在2003和2012年两次突然降临人类世界,给中国和中东地区留下了惨痛经历。

人类体内一直和平寄生着数亿种不同的细菌和病毒等微生物,一直以来,确认一种新传染病的病原微生物是抗击疫情的至关重要步骤。当代科学家判断传染病的病原体一直遵循科赫法则(Koch's Postulates),该法则由德国细菌学家科赫于1884年提出,以判断某种病原体和传染病的因果关系。这条法则主要包括:可从得病宿主身上体外纯培养病原微生物,这种纯培养微生物能感染新的健康宿主,且发生同样疾病,并能再次分离出该微生物。此法则大概过程是在每一个病例中都会出现相同的微生物,且该微生物在健康者体内不存在;可从得病宿主体内分离得到这种的微生物并在培养基中得到纯培养;当这种培养的微生物被接种健康而敏感的宿主体内,会导致相同的疾病。并能再次从试验发病的宿主中能再度分离并培养出此微生物。虽然这一法则在一定情况下仍然适用于临床诊断,但对于快速检测病原体的需求来说,显然需要其他确诊办法。

科学家们通过电子显微镜技术、实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和高通量DNA测序等方法在最早发病的几十位患者体内检测到了SARS-CoV-2病毒的存在^[3-4];也成功分离出了病毒,并且证明了它们在体外实验中仍具有够侵染人的上皮细胞的能力^[3]。2020年2月20日江苏省产业技术研究院比较医学研究所成功构建人源化血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)小鼠模型,同时也证实SARS-CoV-2能够感染人源化ACE2小鼠,也从这种患病小鼠中分离出来SARS-CoV-2。SARS-CoV-2的表面由刺突蛋白组成,这种刺突蛋白能够与人体细胞的ACE2受体作用从而入侵人类细胞。人与鼠的ACE2受体在基因上的差异,导致SARS-CoV-2能够感染人但不能直接感染鼠^[5]。

1.2 SARS-CoV-2 的天然宿主

最新的研究结果表明,SARS-CoV-2与SARS病

毒的基因序列相似度约为80%,这只能说明他们虽属于冠状病毒家族,但并非SARS病毒的突变体。目前,已获得了SARS-CoV-2的完整基因序列^[6],将其与目前已知的许多冠状病毒基因序列进行比对,发现其与一种寄生在云南菊头蝠体内冠状病毒基因序列相似度高达96%^[7],提示SARS-CoV-2的天然宿主指向蝙蝠。

1.3 SARS-CoV-2 从天然宿主到人的中间宿主

SARS-CoV-2和云南菊头蝠体内的病毒基因有96%的相似度,提示蝙蝠体内的病毒可能无法直接传染人。同时也没有直接证据证明华南海鲜市场里贩卖野生动物蝙蝠,或者武汉居民对云南菊头蝠有食用兴趣。另外,确诊患者体内的病毒样本基因序列彼此之间高度一致,提示新冠病毒很可能是在某种中间宿主体内完成突变进化,之后开始在人群中大规模爆发^[8]。

初期科学家们猜测早期的病例大多和武汉华南海鲜市场有关,但最新研究发现,新冠病毒肺炎最早的一位感染者并没有华南海鲜市场的接触经历,最早的几位患者中有不少人从来没有去过这个市场^[4]。目前还没有办法确定SARS-CoV-2从天然宿主到人的中间传播宿主,推测这种中间宿主很可能是一种半野生状态且能够较大规模饲养的哺乳动物,他们为SARS-CoV-2的突变和积累提供大量的时间^[9]。

2 SARS-CoV-2 的检测方法

面对SARS-CoV-2导致的传染病,目前没有特效药能够帮助杀灭病毒,没有疫苗帮助快速形成免疫力,防止病毒的侵袭。药物开发和疫苗研制,从研究启动到批量生产,需要很漫长的一段时间。

现阶段能做就是把感染患者快速识别并隔离治疗。2019年12月31日,发现27例,其中7例病情危重,但截止当前,全国31个省市自治区均出现了确诊病例,导致我国很多城市交通中断、小区封闭、餐饮酒店旅游停业、学校延迟开学、工业延迟开工,给中国的经济带来无法估量的巨大损失。目前SARS-CoV-2在中国以外的多个国家和地区也在进行大规模的快速传播,截止2020年2月26日,确诊2819例,死亡45例,其中日本确诊病例862例,死亡5例,韩国确诊总数1146例,死亡11例,意大利确诊总数323例。

因此国际经济学家担心此次疫情很可能将发展成为一次世界范围大爆发的流行病,对世界各国的经济造成不可逆转的破坏,并可能致命的严重后果

果。由于一些疑似病例不能得到及时确诊,在得不到及时治疗和隔离的情况下,又会发生传染。因此开发 SARS-CoV-2 的快速、准确检测至关重要。

目前,最常用的检测方法主要分为两大类,一类是核酸的检测,另一类是抗原抗体的检测。SARS-CoV-2 的遗传物质是 RNA,其核酸序列是独一无二的,因此通过对其特殊序列的检测,即可确定该病毒。人感染 SARS-CoV-2 后,机体的免疫系统首先通过天然免疫阻断病毒,进而产生特异性的抗体结合到病毒表面,感染后 1~2 周左右即可出现 IgM 抗体^[10],IgM 抗体反映急性感染,出现最早、消失最快,IgG 抗体随后产生,并维持较高的浓度,在机体免疫中发挥主要作用,因此通过检测特异性的 IgM、IgG 抗体,可以鉴定新冠病毒并测定病毒滴度,为临床诊断提供血清学的证据。下面就这两种检测方法简单阐述。

2.1 RT-qPCR 法检测 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 核酸检测原理是以病毒特殊的基因序列作为检测靶标,通过 PCR 不断扩增,指数级增加,由于引物中有荧光标记,每一个扩增出来的 DNA 片段,都可与预先加入荧光标记探针结合,产生荧光信号,扩增出来的靶基因产物越多,累积的荧光信号就越强。在没有此病毒的样本中,由于没有靶基因的扩增,所以检测不到荧光信号的存在。RT-qPCR 方法核酸检测就是通过检测荧光信号的累积,确定样本中是否有病毒的核酸,进而确定 SARS-CoV-2 颗粒。目前,SARS-CoV-2 感染的常规核酸检测方法是通过 RT-qPCR 鉴定^[11]。《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》中的核酸检测方法主要针对 SARS-CoV-2 基因组中开放阅读框 1a/b(open reading frame 1ab, ORF1ab)基因序列和可诱导免疫效应的核壳蛋白(nucleocapsid protein, N)基因序列^[12]。

根据《指南》要求,在实验室要确认一个病例为阳性,满足同一份标本中 SARS-CoV-2 2 个靶标(ORF1ab、N)特异性 RT-qPCR 检测结果均为阳性。但阴性结果也不能完全排除 SARS-CoV-2 感染情况,需要排除包括样本质量差和技术本身等造成的假阴性的因素。

2.2 数字 PCR 检测方法检测 SARS-CoV-2

中国计量科学研究院(NIM)前沿中心生命科学计量团队成功研发出了高灵敏数字 PCR 检测法,可应用于 SARS-CoV-2 的新型核酸检测方法^[12]。该方法主要基于数字 PCR 系统完成相应的内参基因、引

物、阴性对照、阳性对照、探针设计及优化等工作,并进行了实际临床样本的检测,阳性和阴性样本与临床判断一致。该方法与 RT-qPCR 检测法相比,灵敏度显著提升,为解决漏检问题开辟了新途径^[13]。

2.3 纳米孔技术测序检测 SARS-CoV-2

纳米孔测序工作与传统的基因测序技术不同,该技术不是通过检测光、荧光信号颜色、或 pH 来实现碱基序列的读取,而是基于电信号的测序技术。通过实时监测核酸通过蛋白纳米孔时的电流变化,来解码这些电流信号以确定碱基序列,从而可以直接实时分析 DNA 或 RNA 片段^[14]。其便携式测序仪产品 MinION 还以其 U 盘大小的体积,灵活控制的测序通量,实时数据产生的测序速度,以及测序与数据分析同步并行的算法,突破了时间和空间上的限制,完美地契合了临床检测的需求。基于纳米孔的测序技术,实现 6~24 h 快速病原体检测和分析。对临床样本进行高通量测序,实时分析,可对新型冠状病毒实现快速高效的检出,有利辅助临床诊断,降低医疗压力。

2.4 酶联免疫法和胶体金法抗体检测 SARS-CoV-2

丽珠试剂联合中国科学院武汉病毒研究所联合研发,分别研发出 SARS-CoV-2 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)、SARS-CoV-2 IgG 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)以及 SARS-CoV-2 IgM 抗体检测试剂盒(胶体金法)、SARS-CoV-2 IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)^[15]。2 种胶体金法试剂盒可以在 15 min 以内出具检测结果,单人份检测,既可手工操作也可上机操作,可助力基层医疗机构早期筛查诊断^[15]。

近期,南开大学与国内多所科研院所及相关生物医药企业的科研团队联合攻关,成功研制出 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体快速检测试剂盒和快速测试卡,结合聚集诱导发光、量子点、胶体金等技术手段,实现 15 min 内快速检测,检出率约为 75%,具有操作简便、灵敏度高、易观察等优点^[16]。

钟南山院士团队联合中科院广州研究院等团队研发出了新型冠状病毒 IgM 抗体快速检测试剂盒,团队应用胶体金免疫层析技术,仅需采取一滴血就能在 15 min 内肉眼观察条带,能够检出相当一部分的核酸检测阴性患者,目前已在实验室和临床完成初步评价,有望广泛用于家庭和医疗机构的初步检测^[17]。

深圳大学等研究单位也联合开发单人份化学发光新冠病毒抗体检测试剂盒,可以在 22 min 完成

对新冠病毒感染的快速诊断^[18]。

3 结语

每种检测方法都有其优缺点,由于各种检测方法的试剂的稳定性、各试剂配比、引物序列设计的合理性、引物纯度、抗杂质干扰能力等因素,导致灵敏度还不是非常高,很多患者需要反复多次检测才得以最终确诊。从准确度角度讲,RT-qPCR方法核酸检测 SARS-CoV-2 是最主流的检测方法。但该方法检测仪器成本较大、技术要求较高,测序技术还不适用于大规模检测用。此外核酸检测时间相对较长,其中 RT-qPCR 法核酸检测 2~4 h;数字扩增法可以实现 1 h 以内的检测,但其真正临床样本的有效性还需进一步验证。核酸检测基于核酸分子的碱基互补配对原理,需要经过不断放大扩增的循环才能检测到信号,因此需要较长的时间增强信号。免疫学检测方法则是抗原抗体的结合,通过凝集反应、显色反应即可快速、灵敏鉴定,无需进行样品的纯化、提取。抗原抗体检测方法只需 15 min,无需特殊仪器,但目前该方法的灵敏度和特异性有限,无法检测潜伏期和感染初期的病人。此外,抗体检测容易受到血液标本中的因素干扰造成假阳性结果,所以抗体检测必须采用 IgM 和 IgG 同时且多次动态检测来确认。抗原抗体法虽然方便、检测快,但目前不能作为确诊的唯一标准。

冠状病毒是一个大型病毒家族,易引起感冒以及 MERS、SARS 等较严重疾病。SARS-CoV-2 是以前从未在人体中发现的冠状病毒新的病原体。人感染了 SARS-CoV-2 后,常会出现呼吸道症状、发热、咳嗽、气促和呼吸困难等。同时,在较为严重病例中,确诊感染可导致肺炎、SARS、肾衰竭,甚至死亡。由于一些疑似病例不能得到及时确诊,在得不到及时治疗 and 隔离的情况下,又会发生传染。因此确定 SARS-CoV-2 起源和了解常用检测方法,对于临床早发现、早诊断、早隔离、早治疗至关重要,也是有效防控新冠肺炎疫情的关键步骤。

参考文献

- [1] Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 507-513.
- [2] WHO. Clinical management of severe acute respiratory infection when Novel coronavirus (nCoV) infection is suspected: interim guidance [S]. 2020.
- [3] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus

from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020. Doi: 10.1056/NEJMoa2001017

- [4] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [5] Nie Y, Wang P, Shi X, et al. Highly infectious SARS-CoV pseudotyped virus reveals the cell tropism and its correlation with receptor expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(4): 994-1000.
- [6] Wu A P, Peng Y S, Huang B Y, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) originating in China [J]. *Cell Host Microbe*, 2020. Doi:10.1016/j.chom.2020.02.001.
- [7] Zhou P, Yang X, Wang X, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin [J]. *BioRxiv*, 2020. Doi:10.1101/2020.01.22.914952.
- [8] 国家卫健委. 仍未发现新型冠状病毒变异证据 [EB/OL]. (2020-01-26) [2020-02-26]. <http://www.chinanews.com/gn/2020/01-26/9070200.shtml>.
- [9] 王立铭. 新型冠状病毒从何而来?疫情将会如何发展. [EB/OL]. (2020-01-28) [2020-02-26]. <https://www.jiemian.com/article/3920366.html>.
- [10] 孙辉, 蒋争凡. 抗病毒天然免疫研究 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2013, 43(10): 21-29.
- [11] 张丽, 高恩明, 向金忠, 等. 新型冠状病毒核酸扩增 (PCR) 荧光检测试剂盒说明书内容介绍 [A]//第 6 次全国微生物学与免疫学大会论文摘要汇编 [C]. 2004.
- [12] 李振勇. 新型冠状病毒实验室诊断方法学研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2005.
- [13] 中国计量科学研究院. 中国计量院成功研发新冠病毒高灵敏数字 PCR 检测方法和检测试剂盒 [EB/OL]. (2020-02-11) [2020-02-26]. <http://news.cnpowder.com.cn/53909.html>.
- [14] 实时监控新型冠状病毒演化与变异即将成为现实 [EB/OL]. (2020-02-02) [2020-02-26]. <http://client.sina.com.cn/2020-02-02/doc-iimxxste8305146.shtml>.
- [15] 丽珠集团病毒试剂盒提交审批 4 款与武汉病毒所合作研发 [EB/OL]. (2020-02-04) [2020-02-26]. <https://finance.sina.com.cn/roll/2020-02-04/doc-iimxyqvz0101052.shtml>.
- [16] 南开大学. 15分钟快速检测!南开团队研获新冠病毒抗体检测试剂盒 [EB/OL]. (2020-02-15) [2020-02-26]. <http://news.sina.com.cn/c/2020-02-15/doc-iimxxstf1752992.shtml>.
- [17] 钟南山指导!新冠病毒 IgM 抗体快速检测试剂盒样品已被送至湖北 [EB/OL]. (2020-02-14) [2020-02-26]. https://www.sohu.com/a/373119161_162522.
- [18] 化学发光新冠病毒检测试剂盒在深研发成功, 22 分钟出结果 [EB/OL]. (2020-02-12) [2020-02-26]. <http://www.innomd.org/article/5e435f46e214f3152bf57d29>.