

• 专家述评 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.18.001

# 新型冠状病毒引起的临床相关疾病及其分子生物学检测

郭雅琼<sup>1</sup>, 张 笠<sup>1</sup>, 鲁 彦<sup>2△</sup>

1. 西北民族大学直属附属医院/甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730000;

2. 中国人民解放军 96604 部队医院检验科, 甘肃兰州 730000

**摘 要:** 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)潜伏期长, 传染性强, 发病机制不明确, 在临床上引起以发热、干咳和乏力等为主要症状的新型冠状病毒肺炎(COVID-19), 同时还可引起心血管等其他系统合并症状, 临床尚无特效的治疗药物。目前抗疫工作重心倾向于防控, 治疗感染患者的同时切断病毒传播途径, 保护健康人群。因此, 及时、准确地进行 SARS-CoV-2 核酸检测将更有利于病毒的防控。该文主要介绍了 SARS-CoV-2 的基因结构特征、分子生物学检测及其所引起的相关临床疾病, 为临床诊断提供一定的参考依据。

**关键词:** 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 分子生物学检测

**中图法分类号:** R446

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-9455(2020)18-2593-04



鲁彦

SARS-CoV-2 引起的疫情发展迅速, 对于出现临床症状及疑似患者进行及时、准确的 SARS-CoV-2 核酸检测及诊断显得尤为重要。本文就 SARS-CoV-2 的基因结构特点、分子生物学检测及其引起的相关临床疾病进行了简要介绍, 以为临床诊断提供一定的参考依据。

## 1 冠状病毒

冠状病毒是目前已知最大的 RNA 病毒, 其基因组是一种具有薄膜的单股正链 RNA, 具有典型的 5' 端帽结构和 3' 端 Poly(A) 尾, 属于巢状病毒目冠状病毒科冠状病毒亚科, 该亚科包括 4 个属:  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$  冠状病毒<sup>[2]</sup>。因其在电镜下的形状似皇冠, 故命名为冠状病毒。冠状病毒感染可影响呼吸系统、消化系统和神经系统等, 同时还可感染动物导致动物患病<sup>[3]</sup>。迄今为止, 共发现 7 种冠状病毒(HCoV-229E、HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、MERS-CoV 和

SARS-CoV-2) 可感染人类<sup>[1,4]</sup>。其中 HCoV-229E 和 HCoV-NL63 属于  $\alpha$  属冠状病毒, HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-HKU1、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 均为  $\beta$  属冠状病毒<sup>[5]</sup>。

## 2 SARS-CoV-2

**2.1 SARS-CoV-2 的基因结构特征** SARS-CoV-2 是一种具有包膜, 颗粒呈圆形或椭圆形的病毒, 属于  $\beta$  冠状病毒属<sup>[1,6]</sup>。SARS-CoV-2 基因在同一条编码链上有 5 个典型的开放读码框架(ORF), 包括开放读码框架 1ab 多蛋白(ORF1ab, 7096-aa)、刺突糖蛋白(S, 1273-aa)、包膜蛋白(E, 75-aa)、膜蛋白(M, 222-aa)和核衣壳蛋白(N, 419-aa)<sup>[7]</sup>。目前对于 SARS-CoV-2 核酸检测主要针对 ORF1ab、N 基因、E 基因这 3 个位点。研究表明, SARS-CoV-2 基因组与 2003 年爆发的 SARS-CoV 基因组序列相似度达 80%, 与蝙蝠 SARS-CoV ZC45 具有更高的同源性(88%)<sup>[8-9]</sup>。

**2.2 SARS-CoV-2 的理化特性** SARS-CoV-2 对紫外线和热敏感, 56 °C 存活 30 min、75% 乙醇、含氯消毒剂、乙醚、过氧乙酸、氯仿和紫外线等对该病毒均可有效灭活, 氯己定灭活效果不佳<sup>[10]</sup>。此外有报道显示室温(22~25 °C, 湿度 40%~50%) 下, SARS-CoV-2 可存活 5 d<sup>[11-13]</sup>。以上认识多来自对 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的研究。

**2.3 SARS-CoV-2 的流行病学特点** 研究显示, 武汉早期确诊的 SARS-CoV-2 感染患者有武汉市华南海鲜市场暴露史(68.3%)<sup>[4]</sup>。随后发现部分 SARS-CoV-2 感染患者具有武汉旅居史及直接或间接接触

**专家简介:** 鲁彦, 男, 1973 年 2 月生, 解放军第一医院检验科主任, 博士; 主持完成国家自然科学基金项目 1 项, 在研军队医学科技计划资助课题 1 项, 主要参与省部级科研项目 6 项, 获得甘肃省厅级科技进步奖 2 项; 在 SCI 期刊发表论文 16 篇, 在核心期刊发表论文 66 篇, 其中以第一作者和通信作者发表 71 篇, 参编教材 2 部; 为《中华高血压杂志》《国际检验医学杂志》《检验医学与临床》《现代医药卫生》编委, 《兰州大学学报(医学版)》《医学研究杂志》评审专家。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: lu73free@aliyun.com。

史,提示了人与人之间传播的可能<sup>[11]</sup>。目前 SARS-CoV-2 感染出现家庭聚集性发病,同时出现部分医务人员感染,主要以飞沫及接触等方式在人群中传播,少数经气溶胶与消化道传播。

### 3 SARS-CoV-2 与临床疾病

**3.1 SARS-CoV-2 与呼吸系统疾病** 研究发现, SARS-CoV-2 主要通过皮肤黏膜、眼结膜等感染人体,侵入人体后,多侵犯人体呼吸道肺泡上皮细胞等<sup>[4,6]</sup>。体外分离培养研究显示, SARS-CoV-2 感染后至被检出存在一定的窗口期,在人呼吸道上皮细胞内发现约需 96 h,而在 VeroE6 和 Huh-7 细胞系中需要 6 d。ZHU 等<sup>[6]</sup>通过对原因不明的严重肺炎患者的 3 份支气管肺泡灌洗液标本进行病毒基因组学研究,利用下一代测序、实时反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、细胞培养和电子显微镜在临床标本中首次检测到了 SARS-CoV-2。由此证实 SARS-CoV-2 感染人体后会引发新型冠状病毒肺炎(COVID-19)。

COVID-19 发病年龄集中在 40~60 岁,以男性、有基础疾病者居多,也有儿童发病。临床症状主要为发热、干咳、乏力等,并逐渐出现气短、呼吸困难,病情严重者可迅速发展成急性呼吸窘迫综合征、脓毒症等多脏器功能衰竭,甚至死亡。有研究报道血管紧张素转换酶 2(ACE2)在人体不同器官组织中表达水平并不相同,以肺泡和小肠上皮细胞表达水平尤为显著<sup>[14]</sup>。XU 等<sup>[1]</sup>通过研究认为 COVID-19 的发病机制很可能是 SARS-CoV-2 感染人体后与呼吸道和肺组织中的 ACE2 受体结合后导致的一系列信号级联反应。刘映霞等<sup>[15]</sup>通过研究发现 SARS-CoV-2 感染患者的血浆血管紧张素 II 水平明显升高,且与病毒滴度和肺损伤程度呈线性相关,提示 SARS-CoV-2 感染可能导致患者肾素-血管紧张素系统失衡,引起急性肺损伤。COVID-19 明确的发病机制有待进一步的大数据研究证实。

**3.2 SARS-CoV-2 与心血管系统** HUANG 等<sup>[4]</sup>通过对早期 41 例 COVID-19 患者的研究发现,12% COVID-19 患者合并心肌损伤,提示 SARS-CoV-2 感染会引起心肌损伤,考虑可能与 COVID-19 患者体内 Th1 与 Th2 反应平衡被破坏有关。这与部分病例最初并无发热、乏力等症状,而以心慌、胸闷等为临床首发症状相符合。赵蕊等<sup>[16]</sup>通过对 28 例 COVID-19 患者分析发现,在治疗过程中患者出现心肌酶升高,尤其肌酸激酶(CK)及其同工酶(CK-MB)升高最为明显。ACE2 在人体心血管内皮细胞和心肌细胞中也有表达<sup>[14]</sup>,因此推测 SARS-CoV-2 可能也通过 ACE2 受体结合引起一系列 ACE2 受体信号级联反应,在心脏损伤中发挥作用<sup>[17]</sup>。此外,COVID-19 伴随症状也

会对心血管系统产生影响,发热可引起心率增快、心肌耗氧量增加、心排血量下降,从而可能诱发患者缺血加重或心力衰竭。持续的缺氧导致细胞凋亡等一系列细胞损伤;低氧还会诱导炎症反应,导致组织进一步缺血,可能会造成非冠状动脉闭塞性心肌梗死<sup>[18]</sup>。此外,病毒也可能直接感染心肌细胞,造成病毒性心肌炎。

**3.3 其他** 少数病例出现轻度纳差、乏力、精神差、恶心呕吐、腹泻、头痛、结膜炎等症状<sup>[19]</sup>,考虑与 SARS-CoV-2 感染导致的其他器官或系统损伤有关,目前仍有待临床大样本研究加以证实。

### 4 SARS-CoV-2 的分子生物学检测

SARS-CoV-2 感染机体后,病毒 RNA 是最先能被检测到的标志物,而人体免疫系统产生的抗体(IgM、IgG)往往滞后于病毒核酸。因此, SARS-CoV-2 核酸检测仍然是目前 COVID-19 最主要的检测方法。

**4.1 实时荧光 RT-PCR** 实时荧光 RT-PCR 可从基因水平检测病毒,因其灵敏度高,特异性强,快速简便,成本较低,成为目前使用的主要确诊方法。

**4.1.1 标本的选择** 李萍等<sup>[20]</sup>通过对呼吸道标本核酸检测阳性的患者的粪便、血清和尿液标本进行核酸检测,结果显示粪便标本 SARS-CoV-2 阳性,而血清和尿液标本未检出阳性结果。陈炜等<sup>[21]</sup>通过对 4 例 COVID-19 确诊病例的咽拭子与痰标本进行核酸检测发现,痰液标本中病毒载量高于咽拭子标本,提示在 SARS-CoV-2 感染病例的分子生物学检测中痰标本的检测意义优于咽拭子标本。在《新型冠状病毒感染肺炎诊疗方案(试行第六版)》中核酸检测的常用标本除鼻咽拭子、痰、下呼吸道分泌物、血液外,还增加了粪便标本,同时建议为了提高核酸检测阳性,尽可能留取痰标本进行检测。

**4.1.2 标本的灭活** 由于 SARS-CoV-2 存在极强的传染性,使得实验室检测人员感染的风险大大增加,因此对于标本进行灭活处理可以在一定程度上降低感染风险。《新型冠状病毒感染肺炎诊疗方案(试行第六版)》中提到, SARS-CoV-2 在 56 ℃ 30 min 和 75%乙醇处理下会被灭活。陈培松等<sup>[22]</sup>通过回顾性分析 2 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性患者的咽拭子标本发现,56 ℃ 30 min 和 75%乙醇灭活处理对 SARS-CoV-2 核酸检测无明显影响。但该研究样本量少,后续还需大量 SARS-CoV-2 灭活后核酸检测数据进一步对该结果进行验证。

**4.1.3 实时荧光 RT-PCR 检测** 目前国家批准的产品对 SARS-CoV-2 的核酸检测均是通过靶向特定区域,对病毒的 ORF1ab、N 基因、E 基因这 3 个位点进

行荧光定量检测。根据引物和探针的不同,分为单靶标(ORF1ab)、双靶标(ORF1ab、N 基因)、三靶标(ORF1ab、N 基因和 E 基因)检测。由于 SARS-CoV-2 为 RNA 病毒,易降解,采集标本时应避免使用含 RNA 酶的储存管。获得患者标本后,首先对标本进行核酸提取,提取后先将 RNA 反转录为 cDNA,再进行扩增检测,最后通过荧光定量 PCR 得到标本 Ct 值,最终判断患者标本中是否含有 SARS-CoV-2。具体操作参照《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第二版)》<sup>[23]</sup>及《新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)》<sup>[24]</sup>等。

**4.1.4 检测结果判断** 要确认一个病例为阳性,需满足同一份标本中 SARS-CoV-2 的三靶标或者双靶标特异性实时荧光 RT-PCR 检测结果均为阳性。如受实验室检测试剂盒限制,只能做一个靶标检测,应至少针对 SARS-CoV-2 最为保守及特异的 ORF1ab 区域进行检测,两份标本(不同部位及不同类型)检测均为阳性才能判读为阳性结果。同时,阴性结果不能排除 SARS-CoV-2 感染,应考虑实验中导致假阴性的原因(标本采集是否合格、采集时间是否准确及时、标本保存运输及处理是否符合条件、是否处于方法学窗口期、实验人员技术误差、是否存在 PCR 抑制物等)<sup>[23]</sup>,对原因进行逐一排除。

**4.2 基因测序技术** 宏基因组二代测序法(mNGS)是以宏基因组为研究对象,直接利用高通量测序对临床标本中的基因组进行检测,实现病原微生物的快速识别、性能鉴定、功能研究以及微生物间、微生物与环境间相互关系的研究<sup>[25]</sup>。CHEN 等<sup>[25]</sup>通过 mNGS 对 COVID-19 患者的肺泡灌洗液进行快速检测,检出了 SARS-CoV-2,并通过分析发现 SARS-CoV-2 基因组与蝙蝠 SARS-CoV ZC45 基因组具有高度同源性。相较于实时荧光 RT-PCR, mNGS 既可以鉴定新的病毒株,也可用于检测早期低病毒含量标本,更能对实时荧光 RT-PCR 检测可疑或灰区结果进行确认。但目前大多数医院缺乏测序设备,缺乏相关专业人员来协助测序结果的解读,缺乏研发阶段的流程和试剂配比的优化,缺乏阳性和阴性参考品的设立以及初步预临床试验的支持;同时 mNGS 成本较高、检测周期较长,故不适合于常规临床检测。

**4.3 数字 PCR(dPCR)** dPCR 是指通过将一个标本分成几十到几万份,分配到不同的反应单元,每个单元包含一个或多个拷贝的目标分子(DNA 模板),在每个反应单元中分别对目标分子进行 PCR 扩增,扩增后对各个反应单元的荧光信号进行统计学分析。与传统 PCR 相比,其采用绝对定量的方式,不依赖于标准曲线和参照标本,直接检测目标序列的拷贝数,

具有更高的灵敏度、特异性、精确性,而且在极微量核酸标本检测、复杂背景下稀有突变检测和表达量微小差异鉴定方面具有优势。与 RT-PCR 相比, dPCR 可检测到单分子级别的靶标 DNA,甚至可以检出 0.001% 以下的突变率,可快速检出痕量病毒,为有效筛选病毒携带者提供了条件。但 dPCR 系统成本高,通量有限、操作繁琐,使得临床应用受限。

**4.4 其他检测方法** 目前,针对 RNA 病毒较成熟的核酸诊断技术还有反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)、依赖核酸序列扩增(NASBA)、基于 CRISPR/Cas 基因核酸检测技术、重组酶聚合酶扩增技术(RPA)和基因芯片等,但尚未出现上述方法在 SARS-CoV-2 检测中具体应用的相关报道。

## 5 小 结

目前 SARS-CoV-2 尚无特效治疗方法,主要的治疗仍是对症支持治疗。但在疫苗研制的科研攻关应急项目中并行安排了多条技术路线,包括灭活疫苗、mRNA 疫苗、重组蛋白疫苗、病毒载体疫苗、DNA 疫苗等并行推进,部分疫苗制剂已经进入动物实验阶段。虽然目前我国 SARS-CoV-2 感染的新增病例数逐渐减少,治愈病例数逐渐增加,但防控任务仍然艰巨,疫情防控各项措施仍需要严格落实,应继续控制传染源、及时检测、早期诊断、报告、隔离、支持性治疗和及时发布疫情信息。对个人来说,良好的个人卫生习惯、注意个人防护、室内保持通风等也均有助于预防 SARS-CoV-2 的感染。

## 参考文献

- [1] XU X, CHEN P, WANG J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(3): 457-460.
- [2] WEISS S R, NAVAS-MARTIN S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(4): 635-641.
- [3] RICHMAN D D, WHITLEY R J, HAYDEN F G. *Clinical virology* [M]. 4th ed. Washington: ASM Press, 2016.
- [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] CHEN Y, LIU Q Y, GUO D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 418-423.
- [6] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [7] 国家生物信息中心. 2019 新型冠状病毒信息库 [EB/

- OL]. (2020-02-13) [2020-02-13]. <https://bigd.big.ac.cn/ncov/#progress>.
- [8] CHENG V C C, WONG S C, TO K K W, et al. Preparedness and Proactive infection control measures against the emerging novel coronavirus in China [J]. J Hosp Infect, 2020, 104(3): 254-255.
- [9] CHENG V C, TAI J W, WONG L M, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(4): 660-694.
- [10] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL]. (2020-02-18) [2020-02-18]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2/files/b218cfef1bc54639af227f922bf6b817.pdf>.
- [11] LI Q, GUAN X, WU P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(13): 1199-1207.
- [12] TAN W J, ZHAO X, MA X J, et al. A novel coronavirus genome identified in a cluster of pneumonia cases-Wuhan, China 2019-2020 [J]. China CDC Weekly, 2020, 2(4): 61-62.
- [13] CHAN J F W, YUAN S, KOK K H, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission; a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 514-523.
- [14] HAMMING I, TIMENS W, BULTHUIS M L, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis[J]. J Pathol, 2004, 203(2): 631-637.
- [15] 刘映霞, 杨扬, 张聪, 等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染患者肺损伤相关的临床及生化指标研究[J/OL]. 中国科学·生命科学, [2020-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5840.Q.20200212.0801.006.html>.
- [16] 赵蕊, 梁运光, 林艳荣, 等. 新型冠状病毒肺炎 28 例的临床特征分析[J]. 中华传染病杂志, 2020, 38(2): 90-93.
- [17] OUDIT G Y, KASSIRI Z, JIANG C, et al. SARS-coronavirus modulation of myocardial ACE2 expression and inflammation in patients with SARS[J]. Eur J Clin Invest, 2009, 39(7): 618-625.
- [18] TAMIS-HOLLAND J E, JNEID H, REYNOLDS H R, et al. Contemporary diagnosis and management of patients with myocardial infarction in the absence of obstructive coronary artery disease: a scientific statement from the american heart association[J]. Circulation, 2019, 139(18): 891-908.
- [19] 史河水, 韩小雨, 樊艳青, 等. 新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的肺炎临床特征及影像学表现[J/OL]. 临床放射学杂志, [2020-02-21]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFQ&dbname=CJFDLAST2020&filename=LCFS202001003&v=MTE3OTkxRnJDVVI3cWZYT2R2Rnkzblc3dk5LUZdOZmJHNEhOSE1ybzlGWjRSOGVYMUx1eFlTN0RoMVQzcVRyV00=>.
- [20] 李萍, 赵四林, 陈煜枫, 等. 2 例新型冠状病毒肺炎粪便 SARS-CoV-2 核酸阳性临床启示[J/OL]. 国际检验医学杂志, [2020-02-21]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFQ&dbname=CJFDLAST2020&filename=GWSQ202004001&v=Mjk3MjJlEaDFUM3FUCldNMUZyQ1VSN3FmWU9kdKZ5M2dVN3ZOSWpyW-WY3RzRITkhNcTQ5RlpZUjhlWDFMdXhZUZc=>.
- [21] 陈炜, 张春阳, 朱颖, 等. 4 例新型冠状病毒感染病例咽拭子与痰标本病毒核酸检测的比较[J/OL]. 中国人兽共患病学报, [2020-02-25]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFQ&dbname=CJFDAUTO&filename=ZRSZ202005003&v=MTA4MjNMdXhZUZdEaDFUM3FUCldNMUZyQ1VSN3FmWU9kdKZ5M2dVYnZNUHovWWRMRzRITkhNcW85Rl0UjhlWDE=>.
- [22] 陈培松, 何宇婷, 黄裕立, 等. 不同方式灭活口咽拭子标本对 2019 新型冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测结果的影响[J/OL]. 中华检验医学杂志, [2020-02-25]. <http://rs.yiigle.com/CN114452202004/1196441.html>.
- [23] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第二版)[EB/OL]. (2020-01-22) [2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/c67cfe29ecf1470e8c7fc47d3b751e88.shtml>.
- [24] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[EB/OL]. (2020-01-23) [2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>.
- [25] CHEN L, LIU W, ZHANG Q, et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 313-319.

(收稿日期: 2020-02-28 修回日期: 2020-07-13)