

· 新型冠状病毒肺炎研究 ·

新型冠状病毒实验室检测方法及应用

周婷婷,朱 进

东部战区疾病预防控制中心,江苏 南京 210002

[摘要] 随着新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SRAS-CoV-2)分离培养与基因组测序的完成,新型冠状病毒肺炎(corona virus disease, COVID-19)的确诊主要依靠RT-PCR法检测SARS-CoV-2核酸基因,重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)等新型常温核酸扩增技术也得到进一步应用。免疫学诊断包括胶体金和ELISA IgM和IgG抗体检测技术,主要用于人群的筛查和辅助诊断。基于CRISPR技术的新型诊断技术等也在进一步完善过程中。

[关键词] 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;基因组测序;免疫学诊断

[中图分类号] R373.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)04-474-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20200403

Application and laboratory detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2

ZHOU Tingting, ZHU Jin

Huadong Medical Institute of Biotechniques, Nanjing 210002, China

[Abstract] After the completion of the severe acute respiratory syndrome coronavirus - 2 (SARS - CoV - 2) isolation, culture and genome sequencing, the diagnosis of new coronavirus pneumonia mainly depends on the detection of the SARS - CoV - 2 nucleic acid by RT - PCR. In addition, the new room temperature nucleic acid amplification technologies such as recombinase aided amplification (RAA) have been further applied in lab detection. Immunological diagnosis includes colloidal gold and IgM/IgG antibody detection by ELISA technology, which is used for screening and auxiliary diagnosis of the population. New diagnostic technologies based on CRISPR are also in the process of further improvement.

[Key words] SRAS-CoV-2; COVID-19; genome sequencing; immunological diagnosis

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(04):474-477]

新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, SRAS-CoV-2)属于 β 属、有包膜的单股正链RNA病毒,约3万个碱基,直径60~140 nm,与严重急性呼吸道综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)等属于同一家族。WHO已将该病毒引起的肺炎正式命名为COVID-19(corona virus disease 2019),其传染源主要是SRAS-CoV-2感染的患者、隐性感染者(即无症状感染者),潜伏期患者和恢复期患者的传染性还有待进一步研究^[1]。目前认为,SRAS-CoV-2最原始的宿主可能为中华菊头蝠,通过某种动物宿主扩散到人类,并引起疾病的发生^[2]。根据病毒基因组测序结

果,发现SRAS-CoV-2已于近期产生了149个突变点,并演化出了2个亚型,分别为L亚型和S亚型,且这2个亚型表现出很大差异。其中S亚型是相对古老的版本,而L亚型侵略性传染性更强^[3-4]。该病毒主要经呼吸道飞沫传播和接触传播,有部分实验室从确诊患者的粪便中检测出SRAS-CoV-2,提示其存在粪-口传播的风险,但气溶胶传播和母婴传播等途径有待更多的研究证实。COVID-19疫情经历了局部暴发、社区传播和大范围传播3个阶段。人群对这一新发传染病没有免疫力,普遍易感。老年人和患有哮喘、糖尿病、心脏病等基础疾病的人群感染病毒的风险可能会增加。COVID-19患者多数表现为普通型和轻型,其病死率约为2.1%,低于SARS和MERS^[5]。

截至目前,尚无COVID-19的特效治疗药物,疫

苗的研发尚在进行之中,目前的防治策略主要是早发现、早隔离、早治疗^[6-7]。因此,用于早期发现COVID-19的诊断试剂和诊断方法,对于疫情防控至关重要。我国在生物医学领域已经拥有了完善的研发与制造体系,有望研发获得有效用于COVID-19监测诊断的方法和技术。

1 病毒的分离与鉴定

要证明某种新发传染病是由一种新的病原体感染引起的,必须满足以下条件:从患者身上可分离出病原微生物,该病原体可在实验动物或寄主细胞中培养,在原始宿主或相关种属内能产生同样的病症并且能够重新分离出病毒^[8]。这是德国科学家科赫(Robert Koch)在1890年提出验证病原体与疾病关系的科赫法则。

病毒分离培养方法主要包括动物接种、鸡胚接种和组织培养等。动物接种是最原始的病毒培养方法,常用的动物有小鼠、大鼠、豚鼠、兔和猴等,接种的途径有鼻内、皮下、皮内、脑内、腹腔内或静脉等,要根据病毒的种类不同,选择敏感动物和适宜接种部位。鸡胚对多种病毒敏感,可根据病毒种类的不同,将病毒接种于鸡胚的羊膜腔、尿囊腔、卵黄囊或绒毛尿囊膜等。组织培养主要有器官培养、移植物培养和细胞培养。

COVID-19患者的临床样本主要采用人呼吸道上皮细胞、Vero-E6细胞和Huh-7细胞进行分离培养。接种4d后可观察到细胞病变效应。培养物经复染后,在透射电子显微镜下可观察到典型的冠状病毒颗粒。转入ACE2基因小鼠和恒河猴经鼻感染SARS-CoV-2后,可诱发多灶性肺炎伴间质增生,并可在受试动物的肺和肠道组织中检测并分离出该病毒^[9]。中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、浙江省疾病预防控制中心相继成功分离了病毒毒株,并发布了SARS-CoV-2病毒信息及其电子照片、核酸检测引物和探针序列等重要信息,为病毒疫苗研制、抗病毒药物的筛选以及快速检测试剂的研发奠定了坚实的基础^[10]。

2 病毒核酸检测

2.1 基因组测序技术

病原体基因组测序是目前最精确的检测方法,对于监测病毒是否变异也有重要意义^[11]。2019年底从武汉金银潭医院的不明原因肺炎患者中采集的临床样本,用 β -冠状病毒通用引物进行实时荧光

定量RT-PCR检测,结果为阳性。再利用Illumina二代测序和Nanopore三代测序技术,获得病毒的全基因组序列。生物信息学分析证实,该病毒具有冠状病毒家族的典型特征,属于 β -冠状病毒。将其全基因组序列与已有的其他 β -冠状病毒基因组进行同源性比对后发现,该病毒与蝙蝠携带的SRAS样冠状病毒RaTG13株全基因组同源性高达96%^[12]。

2.2 荧光定量RT-PCR检测

虽然科赫法则仍然适用于临床诊断,但对于快速检测病原体的需求来说,显然需要其他更加简便、快速的检测办法。最常用的病原体快速检测技术主要有两大类,一类是核酸检测,另一类是抗原抗体检测。核酸(DNA或RNA)是病毒的遗传物质,任何物种都有其独一无二的核酸序列,对特征序列的检测即可确定该病原体,目前普遍运用的是荧光定量RT-PCR法^[13]。通过采集上呼吸道(鼻咽部和咽部)和下呼吸道(深咳痰液、呼吸道吸出物和支气管肺泡灌洗液)样本进行SRAS-CoV-2核酸检测。SARS-CoV-2可在症状出现前1~2d在上呼吸道首次检查到,在普通型患者中可持续7~12d,在重症患者中持续时间达2周^[14]。

中国工程院院士、呼吸与危重症医学专家王辰指出,并不是所有感染的患者都能检测出核酸,即便是对确诊患者,最高只有30%~60%的阳性率,有大量的患者出现了“假阴性”,尤其是在发病前5d,核酸检测的阳性率不高,给防疫防控工作带来巨大困难。造成核酸诊断“假阴性”的原因主要有:①与患者的病程有关。部分患者症状较轻,早期病毒量少可能无法在咽拭子中检测出;②取样操作方法存在问题。采样时没刮到指定的位置、没有取到足够多的样本,采样部位的不同对检测结果影响明显。2020年2月20日,中山大学第五医院发文指出,对73例SRAS-CoV-2感染者的粪便进行病毒RNA检测,发现有39例(53.42%)粪便病毒RNA检测呈阳性,其中17例(23.29%)呼吸道病毒RNA转阴,而患者粪便病毒RNA仍然呈阳性^[15];③病毒RNA分子不稳定。采集的样品在运输过程中,保存不当等因素会导致病毒RNA降解,模板量减少;④目前病原体核酸检测试剂的质量难以保证,存在批次间的差异。

2.3 恒温扩增核酸检测

RT-PCR技术需要快速精准的升降温过程仪器,这类仪器相对昂贵,而等温扩增技术仅使用单一温度,对仪器的要求低。等温扩增利用特殊的酶取代PCR中高温解链的步骤,如环介导等温扩增法

(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术中的链置换DNA聚合酶和重组酶介导等温核酸扩增技术(recombinase aided amplification, RAA)中的重组酶、单链结合蛋白和链置换酶等^[16]。

RAA是一种新型常温核酸扩增技术,利用大肠杆菌的recA重组酶在常温下可与DNA紧密结合的特性,与引物形成聚合体扫描双链DNA,在与引物同源的序列处使双链DNA解旋。在单链结合蛋白(single-strand binding protein, SSB)和DNA聚合酶的作用下,新的DNA片段可以在体外快速扩增。这个体外DNA扩增的过程不需要高温,一般在37℃或者室温下反应5~20 min即可得到与传统高温PCR相同的目的片段^[17]。相对于LAMP,RAA法的反应时间缩短,更能满足快速简便检测的需求,反应产物为单一的特定长度的基因片段。但是,RAA检测方法是在较低温度下的扩增反应,引物非特异性结合的可能性会增加,容易造成假阳性。

由江苏奇天基因生物科技有限公司研制的SARS-CoV-2核酸等温扩增快速检测试剂盒,目前已经完成3家临床评估,可实现8~15 min出检测结果。经与药监局批准的商业化定量PCR试剂盒平行比较,该试剂盒的阳性符合率为100%,阴性符合率100%,总符合率100%。

3 病毒抗体检测

病毒感染人体后可刺激机体免疫细胞产生特异性抗体。利用抗原与抗体特异性结合的原理,可通过抗原来检测抗体的存在,从而间接证明人体已感染病毒^[18-19]。检测的抗体主要分为IgM和IgG两类。目前对SARS-CoV-2这两类抗体的产生和持续时间有待进行系统性研究,通常情况下,IgM抗体在病毒感染3~5 d可快速产生,但维持时间短,血液中检测阳性可作为早期感染的指标。IgG抗体产生晚,维持时间长,消失慢,血液中IgG检测阳性可作为感染和既往感染的指标。

SRAS-CoV-2抗体胶体金检测试剂盒,主要用于体外定性检测人血清、血浆和全血样本中的SRAS-CoV-2抗体(IgM/IgG),可在10~15 min判断检测结果,为COVID-19的疑似患者、无症状患者、密切接触者、核酸检测阴性者提供快速、便捷的现场检测手段,是对核酸检测的补充或协同。武汉疫区对比苏州尼沃诺斯公司研制的胶体金检测试剂与广州万孚、珠海丽珠等公司IgM/IgG检测试剂,其检出结果(阳性/阴性)基本一致。该方法检测简便,无需特

殊仪器,但灵敏度和特异性有限,同时几乎无法检测潜伏期和感染初期的患者,因此不能作为COVID-19确诊和排除的唯一依据。

有研究表明,SRAS-CoV-2 IgM和IgG免疫检测的临床敏感度分别为70.24%与96.10%,因此IgM和IgG的联合检测可以提高COVID-19临床检测的敏感度^[20]。然而,这项研究中的COVID-19患者大多处在感染中期或晚期,IgG在病毒感染的后期才会大量产生,因而在此研究中IgG的阳性率高于IgM的阳性率。回顾之前对SARS的研究,在感染的第16~17天,SARS患者血液中的IgG、IgM抗体才会在ELISA检测中呈阳性^[21]。除了胶体金检测方法外,ELISA检测同样适合COVID-19比较大规模的筛查,包括疑似人群和接触人员,可以作为核酸检测的互补,但ELISA检测时间相对较长,对实验人员的操作技能和实验场所安全防护的要求更高。

抗体诊断具有特异性与快速的特点,可作为一个辅助诊断的方法。抗体检测易受到血液标本中一些干扰物质(如类风湿因子、非特异性IgM、溶血所致的高浓度血红蛋白等)的存在而出现假阳性结果^[22-23],所以抗体检测必须采用IgM和IgG同时检测且通常需多次动态监测来确认。COVID-19患者抗体产生和持续时间还未被系统地研究,因此抗体诊断法在早期疫情监测中的作用仍需进一步考量。

另外,在此次疫情爆发初期,由Jennifer Doudna成立的Mammoth Biosciences,与加州大学旧金山分校(UCSF)雅培病毒诊断与发现中心主任Charles Chiu的团队合作,开发出以CRISPR Cas12a为基础的诊断试纸——DETECTR,实现30 min快速诊断,并在患者样本上完成测试^[24]。CRISPR诊断技术暂时还没有通过美国FDA批准,还不能运用于COVID-19的临床诊断。若基于CRISPR技术的诊断试纸能够在国内外尽快被批准并实现产业化,将有望大规模、迅速检测冠状病毒,加快疫情控制进展。

4 小结与展望

截至2020年2月23日,国家药品监督管理局共审批10个种类的SARS-CoV-2检测试剂盒,包括6个RT-PCR试剂盒、1个恒温扩增芯片核酸检测试剂盒、1个测序产品和2个胶体金抗体检测试剂盒,其他一些检测试剂如免疫荧光检测等也已进入应急审批程序。COVID-19的暴发,再次提醒人类开发针对新发和再发传染病防控措施的紧迫性和重要性。期待通过国内外、多学科的通力协作,尽早研发

新一代简便、快速、敏感的检测方法,为全人类控制 SARS-CoV-2传播与危害,提供真正有效的防控措施。

[参考文献]

- [1] 中国-世界卫生组织新型冠状病毒肺炎(COVID-19)联合考察报告[EB/OL].[2020-03-09]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqfkdt/202002/87fd92510d094e4b9bad597608f5cc2c.shtml>
- [2] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 579(7798):270-273
- [3] CERAOLO C, GIORGI F M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(5):522-528
- [4] TANG X L, WU C C, LI X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2[J]. *Natl Science Rev*, 2020, doi:n 10.1093/nsr/nwaa036
- [5] JIANG S B, XIA S, YING T L, et al. A novel coronavirus (2019-nCoV) causing pneumonia-associated respiratory syndrome[J]. *Cell Mol Immunol*, 2020, doi: 10.1038/s41423-020-0372-4
- [6] 国家卫生健康委办公厅. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL].[2020-03-09]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>
- [7] WANG D W, HU B, HU C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China[J]. *JAMA*, 2020, doi:10.1001/jama.2020.1585
- [8] RYU S, CHUN B C. An interim review of the epidemiological characteristics of 2019 novel coronavirus[J]. *Epidemiol Health*, 2020, 42:e2020006
- [9] BAO L L, DENG W, HUANG B Y, et al. Pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice[J]. *bioRxiv*, 2020, doi:https://doi.org/10.1101/2020.02.07.939389
- [10] 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
- [11] CHEN L J, LIU W Y, 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
- [12] LEE P I, HSUEH P R. Emerging threats from zoonotic coronaviruses - from SARS and MERS to 2019-nCoV[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2020, doi: 10.1016/j.jmii.2020.02.001
- [13] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. *Euro Surveill*, 2020, 25(3), doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045
- [14] NOH J Y, YOON S W, KIM D J, et al. Simultaneous detection of severe acute respiratory syndrome, Middle East respiratory syndrome, and related bat coronaviruses by real-time reverse transcription PCR[J]. *Arch Virol*, 2017, 162(6):1617-1623
- [15] XIAO F, TANG M W, ZHENG X B, et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2[J]. *Gastroenterology*, 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.055
- [16] SHEN X X, QIU F Z, SHEN L P, et al. A rapid and sensitive recombinase aided amplification assay to detect hepatitis B virus without DNA extraction[J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1):229
- [17] LI X N, SHEN X X, LI M H, et al. Applicability of duplex real time and lateral flow strip reverse-transcription recombinase aided amplification assays for the detection of Enterovirus 71 and Coxsackie virus A16[J]. *Virol J*, 2019, 16(1):166
- [18] ZHOU E M, RIDD D, RIVA J, et al. Development and evaluation of an IgM-capture ELISA for detection of recent infection with blue tongue viruses in cattle[J]. *J Virol Methods*, 2001, 91(2):175-182
- [19] GOWRI SANKAR S, DHANANJEYAN K J, PARAMASIVAN R, et al. Evaluation and use of NS1 IgM antibody detection for acute dengue virus diagnosis: report from an outbreak investigation[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(1):E8-10
- [20] 徐万洲,李娟,何晓云,等. 血清2019新型冠状病毒IgM和IgG抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, doi:10.3760/cma.j.cn114452-20200223-0010
- [21] WOO P, LAU S, WONG B, et al. Longitudinal profile of immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies against the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein in patients with pneumonia due to the SARS coronavirus[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(4):665-668
- [22] SHI Y L, WAN Z Y, LI L H, et al. Antibody responses against SARS-coronavirus and its nucleocapsid in SARS patients[J]. *J Clin Virol*, 2004, 31(1):66-68
- [23] BARUAH V, BOSE S. Immunoinformatics-aided identification of T cell and B cell epitopes in the surface glycoprotein of 2019-nCoV[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(5):495-500
- [24] BROUGHTON J, DENG W, FASCHING C, et al. White Paper - A protocol for rapid detection of SARS-CoV-2 using CRISPR: SARS-CoV-2 DETECTR[EB/OL].[2020-03-09]. <https://mammoth.bio/2020/02/15/white-paper-a-protocol-for-rapid-detection-of-sars-cov-2-using-crispr-sars-cov-2-detectr/> [收稿日期] 2020-03-09