

• 综 述 •

新型冠状病毒的研究现状与实验室诊断*

靳伟东 综述,张东云,谢凤欣,府伟灵[#],张 阳[△]审校
(陆军军医大学第一附属医院检验科,重庆 400038)

摘 要: 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)在全球范围内的传播对世界公共健康构成了巨大威胁。目前,预防和治疗 SARS-CoV-2 的选择仍然非常有限。解析病毒感染宿主的致病机制及治疗性疫苗的研制迫在眉睫。与此同时,研发快速、有效的 SARS-CoV-2 实验室检测技术,对于实现快速确诊感染病例、排除疑似病例、促进疫情的防控与临床救治至关重要。该文首先从 SARS-CoV-2 的结构特征、分子遗传变异特征、致病机制及潜在的 药物靶点等方面介绍了“如何认识 SARS-CoV-2”;同时立足于临床检验,重点介绍了现有的病毒实验室检测 技术及问题解析、即时检验及高通量病毒筛查芯片等病毒筛查新技术,回答了“如何检测 SARS-CoV-2”。最后 对实验室从业人员如何安全防护进行了要点总结。

关键词: 新型冠状病毒; 分子特征; 核酸检测; 抗体检测; 即时检验
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.020 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2020)10-1230-07 **文献标识码:**A

Research status and laboratory diagnosis of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
JIN Weidong, ZHANG Dongyun, XIE Fengxin, FU Weiling[#], ZHANG Yang[△]
(*Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China*)

Abstract: The spread of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) worldwide has been a huge threat to world public health. At present, the options for preventing and treating of SARS-CoV-2 are still very limited. It is urgent to analyze the pathogenic mechanism of viral infections and develop therapeutic vaccines. At the same time, the development of rapid and effective SARS-CoV-2 laboratory testing technology is essential for the rapid diagnosis of infection cases, the elimination of suspected cases, and the promotion of prevention and control of epidemics and clinical treatment. This article introduced "how to understand SARS-CoV-2" from the aspects of the structural characteristics, genetic variation characteristics, pathogenic mechanisms and potential drug targets of the SARS-CoV-2; Meanwhile, based on clinical testing, our review answered "How to detect SARS-CoV-2", by focusing on existing laboratory testing technology and problem analysis, point-of-care testing and high-throughput virus screening chips and other new virus screening technologies. At the end of the article, we summarized the main points of how to ensure the safety of laboratory practitioners.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; molecular characteristics; nucleic acid detection; antibody detection; point-of-care testing

自 2019 年底湖北武汉出现不明原因肺炎以来,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所联合多家科研单位先后通过高通量测序获得了新型冠状病毒(SARS-CoV-2)^[1]的全基因组序列,并成功分离了我 国第 1 株 SARS-CoV-2。这是自 2002 年严重急性呼 吸综合征病毒(SARS-CoV)和 2012 年中东呼吸综 合征病毒(MERS-CoV)暴发以来,冠状病毒再一次大规

模感染人类。尽快解析病毒复制及感染宿主的机制 对于疫情的防控与治疗性疫苗的研制至关重要。与 此同时,及时对疑似患者进行病毒核酸检测和对易感 人群进行快速筛查显得尤为重要。在前六版的新型 冠状病毒肺炎(COVID-19)诊疗方案中,核酸检测仍 是 SARS-CoV-2 感染的确证依据,病毒基因测序与实 时荧光定量 PCR(qPCR)检测为实验室检测中唯一的

* 基金项目:国家自然科学基金国际合作项目(81920108024);战创伤感染性病原体核酸分子诊断现场快速检测技术研究(BWS13C013);重 庆市技术创新与应用发展专项(cstc2019jscx-msxmX0149);国家重点研发计划“精准医学研究”项目(2017YFC0909902)。

△ 通信作者, E-mail: millen001@163. com. # 共同通信作者, E-mail: fwl@tmmu. edu. cn.

本文引用格式:靳伟东,张东云,谢凤欣,等. 新型冠状病毒的研究现状与实验室诊断[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1230-1236.

确诊方法。随着研究的深入,国家卫生健康委员会最新发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》中,新增“将血清 SARS-CoV-2 特异性免疫球蛋白(Ig)M 和 IgG 抗体阳性作为病原学诊断标准之一”。本文将围绕 SARS-CoV-2 分子生物学特征、实验室诊断方法的最新进展及可能影响检测结果及时性、准确性的因素进行述评。

1 SARS-CoV-2 的结构特征

冠状病毒(命名时简称为“CoV”)是大型有包膜的正链 RNA 病毒,于 1965 年被分离出来,以其在显微镜下可见如日冕般外围的冠状特征而得名,在基因型和血清学上分为四个属,即 α 、 β 、 γ 和 δ 冠状病毒^[2-3]。迄今为止被发现的冠状病毒中(包括此次发现的 SARS-CoV-2),只有 7 种可以使人类感染。其中, HCoV-OC43、SARS-CoV、HCoV-HKU1、MERS-CoV、SARS-CoV-2 都属于 β 属冠状病毒^[4-6]。

SARS-CoV-2 与 2003 年的 SARS-CoV 一样,基本结构为基因组 RNA 和磷酸化核衣壳蛋白(N 蛋白)组成的包膜结构。包膜结构嵌合 4 种蛋白:刺突糖蛋白(S 蛋白)、小包膜糖蛋白(E 蛋白)、膜糖蛋白(M 蛋白)和血凝素糖蛋白(HE 蛋白)。N 蛋白被埋在磷脂双层中被两种不同类型的刺突蛋白覆盖,负责营养物质运输的膜蛋白(M 蛋白,属于 III 型跨膜糖蛋白)和 E 蛋白位于病毒包膜的 S 蛋白之间,见图 1。2020 年 1 月 6 日,研究人员通过电子显微镜解析了 SARS-CoV-2 的显微结构:SARS-CoV-2 病毒颗粒形状并不规则,呈球形或呈多形性,直径 75~160 nm,病毒颗粒边缘有形态近似日冕的突起,约 9~12 nm,这一形态与冠状病毒科一致。1 月 16 日,上海科技大学饶子和团队率先解析了 SARS-CoV-2 病毒 RNA 复制最关键蛋白-3CL 水解酶(Mpro)的高分率晶体结构^[7]。随后,美国德克萨斯大学奥斯汀分校的研究人员利用冷冻电镜 Cryo-EM 技术成功解析了 SARS-CoV-2 刺突蛋白三聚体 3.5 埃的近原子分辨率结构^[8],从生物物理及结构生物学的角度解析了 SARS-CoV-2,为相关疫苗的研发工作奠定了基础。

2 SARS-CoV-2 的核酸分子特征与遗传变异

在 SARS-CoV-2 流行之前,21 世纪已经暴发了另外两种高致病性冠状病毒,即 SARS-CoV 和 MERS-CoV。这些病毒的暴发是由于人畜共患型冠状病毒越过物种壁垒而导致的^[9-10]。研究表明,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV、MERS-CoV 在临床表现方面显示出若干相似之处,即都能引起严重的呼吸系统疾病^[11]。

2.1 SARS-CoV-2 全基因组分析 截至目前,国家生物信息中心 2019 新型冠状病毒信息库(<https://bigd.big.ac.cn/ncov>)已收录了来自世界各地的 283 条 SARS-CoV-2 的完整或部分基因组序列。SARS-CoV-2 全基因组包含近 30 000 个核苷酸碱基,由 1a、

1ab、S、3a、3b、E、M、6、7a、7b、8b、9b、N 和 ORF14 等 14 个蛋白编码区域(CDS)构成^[12],见图 2。对 SARS-CoV-2 完整基因组进行 Blastn 搜索显示,GenBank 中与 SARS-CoV-2 最相关的病毒是 2 个蝙蝠类 SARS 样冠状病毒:SL-CoVZC45 病毒(序列同一性为 87.6%,查询覆盖率 99%)和 SL-CoVZXC21 病毒(序列同一性为 87.5%,查询覆盖率 98%)。SARS-CoV 亦起源于蝙蝠 SARS 样冠状病毒,而与 MERS 冠状病毒的距离更远。SARS-CoV-2 与 SL-CoVZC45、SL-CoVZXC21 在 5 个基因编码区域(E、M、7、N 和 14)中的序列同一性大于 90%,在 E 基因中最高(98.7%),而在 S 基因中最低,仅为 75%左右^[13]。

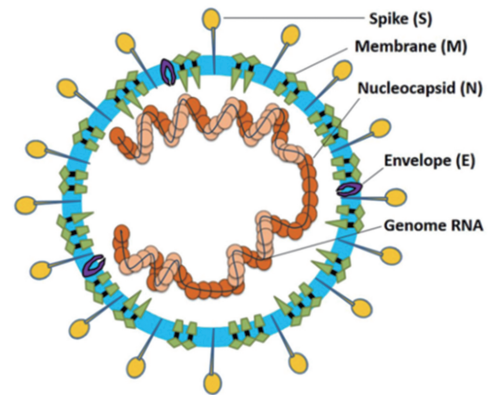


图 1 冠状病毒结构模式图

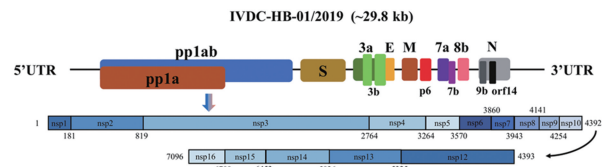


图 2 SARS-CoV-2 全基因组构成

2.2 SARS-CoV-2 的分子特征与遗传变异 流行病学调查结果表明,SARS-CoV-2 最初的感染病例与接触在动物市场上出售的活体动物有关。XU 等^[14]通过比较最初分离出来的 6 株 SARS-CoV-2 的基因型(序列号分别为:MN908947、EPI_ISL_402119、EPI_ISL_402120、EPI_ISL_402121、EPI_ISL_402123 和 EPI_ISL_402124),发现这 6 株病毒的基因型极其保守,同源性>99%。随后,他们又比较了 SARS-CoV-2 与已知感染人类的 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的基因组序列。结果显示,SARS-CoV-2 基因组与 SARS-CoV 的基因组具有比 MERS-CoV 更好的序列同源性^[14]。根据冠状病毒的系统发生树,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的同源性达到 79%,而与 MERS-CoV 的同源性仅为 50%^[14]。SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 之间的序列多样性主要存在于 ORF1a 和 S 蛋白基因中。与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 相比,SARS-CoV-2 最显著的遗传特征是其编码更长的 S 蛋白^[13]。研究发现用于冠状病毒物种分类的 ORF1ab 编码区中的 7 个保守复制酶结构域在 SARS-CoV-2 和 SARS-

CoV 之间有 94.6% 的氨基酸序列一致^[15],这意味着两者属于同种类病毒。值得注意的是,TANG 等^[16]的最新研究发现,SARS-CoV-2 已于近期发生了突变,并演化出了 L 型和 S 型 2 个不同的亚型。2 个亚型的区别在于病毒 RNA 基因组的第 28 144 位点,L 型是 T 碱基(对应亮氨酸),S 型是 C 碱基(对应丝氨酸)。根据基因组数据结果,L 型毒株在 COVID-19 患者人群中占比 70%,而 S 型仅占比 30%,推测 L 型病毒具有比 S 型更强的传染力。对不同亚型的深入研究,将有助于笔者对 COVID-19 的差异化治疗和防控。

2.3 SARS-CoV-2 的溯源分析 在病毒的溯源分析研究中,根据基因测序结果发现 SARS-CoV-2 与一种蝙蝠冠状病毒 RaTG13 的全基因组序列相似性达到 96.2%,推测 RaTG13 病毒是 SARS-CoV-2 的最初起源^[17]。进一步研究发现,SARS-CoV-2 与 RaTG13 在 S1 受体结合域的序列相似性低于 75%,表明 RaTG13 病毒不能直接传染人类,而是通过遗传变异成为 SARS-CoV-2 最终使人患病。冠状病毒的遗传变异需要有中间宿主,XIAO 等^[18]解析了从马来亚穿山甲身上分离的一株冠状病毒的基因组序列,发现该病毒与 SARS-CoV-2 在 E、M、N、S 区表现出 100.0%、98.2%、96.7% 和 90.4% 的氨基酸同一性,而在受体结构域仅相差 1 个氨基酸,推测穿山甲可能是 SARS-CoV-2 的潜在中间宿主。

3 SARS-CoV-2 致病的分子机制及潜在的药物靶点

根据病毒的作用机制找到合适的药物作用靶点,已经成为抗 SARS-CoV-2 药物研究的热点。SARS-CoV-2 感染宿主的主要过程包括附着和进入宿主细胞、复制酶的翻译和复制转录复合体的组装、基因复制和转录、结构性蛋白的翻译和病毒粒的组装和释放等。进入宿主细胞是 SARS-CoV-2 复制周期的首要步骤,主要决定因素是病毒颗粒最外层的 S 蛋白与细胞表面受体的有效结合。ZHOU 等^[15]的研究发现,SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 类似,可能是通过蛋白受体-血管紧张素转换酶 2(ACE2)的靶向识别进入细胞的,SARS-CoV-2 的 S 蛋白上的受体结合域(RBD)与 ACE2 有很强的结合自由能。因此,针对人类细胞表面受体 ACE2 蛋白进行新药研发,竞争性结合 ACE2 受体,有可能会得到理想的抗病毒效果。同时,S1 亚基的 RBD 也可作为抗 COVID-19 药物和疫苗研发的重要作用靶点。有研究报道,通过比较分析 SARS-CoV-2 及其近亲病毒在内的 1 000 个冠状病毒的 S 蛋白序列,发现和 SARS 冠状病毒相比,其 S 蛋白在 S1/S2 的酶切位点多出了 PRRA 4 个氨基酸的插入,从而形成能被人类弗林蛋白酶识别的“RRAR”序列。揭示了 SARS-CoV-2 S 蛋白中弗林蛋白酶切位点的插入可能是其传染能力增强的 1 个重要因素,提示弗林蛋白酶可能是抗 SARS-CoV-2 治疗的新靶点^[19]。此

外,冠状病毒的非结构蛋白对病毒的复制和组装等过程同样起着非常重要的作用,其中 3-胰凝乳蛋白酶、木瓜样蛋白酶参与多肽翻译,RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RdRp)参与病毒复制。因此,这 3 种蛋白酶也可作为抗病毒药物研发的重要靶点^[20-21]。

4 SARS-CoV-2 感染的实验室检测

由于该病毒传播速度快,潜伏期较长,因此 SARS-CoV-2 的实验室检测技术受到人们的广泛关注。目前冠状病毒的检测主要有 2 个发展趋势:方法的多样性和多种方法互补联合使用。当前针对 SARS-CoV-2 感染病例的实验室检测主要包括一般血常规检查、呼吸道病原学检查和血清学检查等。

4.1 患者常规实验室诊断异常表现 根据国家卫生健康委员会最新公布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》,患者以发热、干咳、乏力为主要临床表现。少数患者伴有鼻塞、流涕、咽痛、肌痛和腹泻等症状。重症患者多在发病 1 周后出现呼吸困难和(或)低氧血症,严重者可快速进展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和凝血功能障碍及多器官功能衰竭等。

钟南山团队在 NEJM 杂志上发表的一篇文章详细报道了 SARS-CoV-2 感染患者的临床特征^[22]。该研究发现,与 SARS 病毒类似,SARS-CoV-2 感染患者以发热和咳嗽为主要临床表现,而胃肠道症状并不常见。从血液检查结果来看,有 83.2% 的患者出现淋巴细胞减少,36.2% 的患者血小板减少,33.7% 的患者白细胞减少。多数患者的 C-反应蛋白水平升高,而较不常见的临床生化特征是丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、肌酸激酶和 D-二聚体水平的升高。该研究还指出,重症患者的实验室结果异常(包括淋巴细胞减少和白细胞减少)比非重症患者表现更为突出。针对 COVID-19 的疾病分型和预后,TAN 等^[23]提出了一种起病时间-淋巴细胞模型,该模型能够通过外周血淋巴细胞百分比判断 COVID-19 患者的轻重程度、疾病预后及治疗反应。此外,还有研究指出中性粒细胞/淋巴细胞比值和红细胞分布宽度标准差也有可能是鉴别 COVID-19 普通型与重型的重要指标。

4.2 病原学检测 病毒的病原学检测方法有细胞培养、血清学检测、核酸检测、电镜检测等。与其他方法相比,核酸分子的检测具有快速、灵敏度和特异度高等特点,已成为冠状病毒检测的主流方法^[24]。现有的冠状病毒核酸检测方法包括全基因组测序、qPCR 法、CRISPR/反转录环介导等温扩增法(RT-LAMP)和实时 RT-LAMP 等。针对 SARS-CoV-2 核酸的检测,当前最为普遍适用的方法是 qPCR 法,即通过对标本中的病毒 RNA 进行提取、反转录、PCR 扩增特定保守序列后,通过荧光等常规方法进行显示。依赖于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的密切遗传相关性,临床

上对 SARS-CoV-2 的核酸检测所选用的引物设计靶点和 SARS-CoV 一致,通过扩增 RNA 依赖性的 RdRp 基因、E 蛋白基因和 N 蛋白基因序列来检测 SARS-CoV-2 是否存在^[25]。SARS-CoV-2 病毒核酸检测的 3 个基因靶标在全基因组中的位置见图 3。

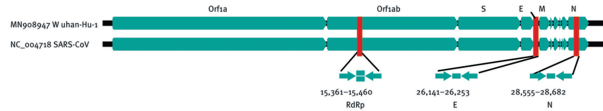


图 3 SARS-CoV-2 和 SARS 冠状病毒基因组上扩增靶标的相对位置^[25]。

在 COVID-19 患者的早期诊断中,具有以下病原学证据之一的患者可被确诊为 SARS-CoV-2 感染:一是呼吸道标本或血液标本 qPCR 检测 SARS-CoV-2 核酸阳性;二是呼吸道标本或血液标本病毒基因测序,与已知的 SARS-CoV-2 高度同源。目前市场上绝大部分 SARS-CoV-2 病毒核酸检测试剂盒采用一步法或磁珠法进行病毒核酸的提取,以 ORF1ab 和 N 基因作为检测靶标进行扩增,最后通过荧光检测得到所需的结果,具有快速、易操作等特点。

然而,在大量的临床应用过程中发现核酸检测存在假阴性等不确定的情况。鉴于此,国家卫生健康委员会印发《新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版)》,在实验室检测技术指南中明确指出,核酸检测结果阴性不能排除 SARS-CoV-2 感染,需要排除可能产生假阴性的因素。核酸检测假阴性的原因应考虑以下几个方面:(1)被感染者体内病毒未达到一定水平;(2)采集患者标本时,未采集到含有病毒的标本;(3)体外诊断试剂不够灵敏;(4)不规范的核酸检测程序。此外,通过对 6 种国产 SARS-CoV-2 核酸检测试剂的检测性能进行了比较和分析,发现 6 种试剂对弱阳性标本的检测能力参差不齐,少数试剂对 SARS-CoV-2 (ORF1ab 和 N 基因)均能检出,而部分试剂只能检测出其中 1 个^[26],说明当前各试剂的准确性和重复性还有待提高。

4.3 血清学检查 炎症细胞因子风暴是在高致病性冠状病毒感染(如 SARS、MERS)中被观察到的典型异常,且被认为与疾病严重程度有关。最近也有研究报道,SARS-CoV-2 感染患者的血清中出现炎症细胞因子水平升高的现象^[27]。根据目前最新的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》,血清学抗体检测已被纳入 COVID-19 确诊标准之一。与核酸检测相比,抗体检测具有采样简单、检测效率高等特点。IgM 抗体是免疫应答中首先分泌的抗体,是病毒感染自体免疫过程中最早出现的抗体,可作为近期急性感染的标志。在通常情况下,IgM 抗体产生早,一经感染,快速产生,多在 3~5 d 后开始出现阳性,维持时间短,消失快,血液中 IgM 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、滴度恢复期较

急性期有 4 倍及以上增高,血液中检测阳性可作为感染和既往感染的指标。因此,通过检测患者血清中 IgM 和 IgG 的阳性情况,将有助于判断患者所处 SARS-CoV-2 感染的不同时期。

5 其他病毒感染筛查技术的发展

虽然核酸检测是 SARS-CoV-2 检测的最常用的手段,但也受到诸多因素的限制,比如实施核酸检测需要有专门的仪器和标准的分子检测实验室,防止检测人员受到待检血液或其他体液标本的感染,且取样过程或其他原因可能会导致 qPCR 结果出现假阴性或漏检,从而使检测灵敏度降低。因此,研发出新的 SARS-CoV-2 病毒筛查诊断技术将有利于推动本次及今后的疫情防控工作。

5.1 基于抗原/抗体检测的即时检验(POCT)产品和核酸检测相比,基于抗体检测的 POCT 可在数分钟内出结果,操作简单方便,适用于大批量标本的快速筛查。目前已有多家 SARS-CoV-2 抗体快速检测试剂盒获批上市。抗体检测法主要是采集 COVID-19 患者血清或血浆,通过检测其中 IgM 或 IgG 抗体浓度值间接检测 SARS-CoV-2,可用于疑似病例中核酸检测为阴性的患者的辅助诊断,同时也可以部分反映确诊患者的免疫情况。2020 年 3 月 5 日,电子科技大学杨正林教授团队研发的 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测试剂盒(胶体金法)获得欧盟准入资格,可快速、准确检查人体血清中病毒特异性 IgM 和 IgG 抗体。与此同时,重庆医科大学黄爱龙教授团队牵头研发的 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测试剂盒(磁微粒化学发光法),通过国家药品监管局审批。李泉等^[28]临床一线工作人员通过 25 例确诊患者与 17 例疑似病例分析了上述 IgM/IgG 抗体检测在 SARS-CoV-2 肺炎诊断中的应用价值,临床检测结果灵敏度达到了 96%,特异度为 100%。此外,钟南山院士团队近期发表论文描述了 SARS-CoV-2 IgM/IgG 联合抗体检测试剂的研发及在 SARS-CoV-2 感染性疾病临床诊断中的应用^[29]。该检测试剂只需滴血可验,约 15 min 就能出结果,相比需要 3~4 h 出结果的病毒核酸 qPCR 检测,大大缩短了检测的时间。经过多中心的临床标本检测评价证实,该检测试剂的临床检测的灵敏度高达 88.66%,检测特异度为 90.63%;IgM/IgG 联合抗体检测的敏感性(灵敏度为 94.83%)远高于 IgM 或 IgG 单抗体检测(灵敏度分别为 1.72%、3.45%)。另外,该抗体检测试剂采用指尖血与静脉血检测结果作对比,发现两者检测的一致性基本吻合,提示 SARS-CoV-2 IgM/IgG 联合抗体快速检测试剂盒可用于 POCT,可以在床旁用指尖采血进行检查。这一便捷、快速、安全,灵敏度高的抗体检测试剂盒,既可作为病毒核酸检测阴性患者的补充检测提高临床诊断率,也可以作为快速筛查的手段,在全国复工、复产、复学等大面积人员流动和聚集的时期发挥

筛查的优势。截至目前,国家药品监督管理局共批准 SARS-CoV-2 抗体检测试剂 8 个,采用的检测方法主要有胶体金法和化学发光法,见表 1。除了 IgM/IgG 抗体检测外,还有一类抗原检测的策略,被检测对象

为血浆中的病毒抗原包括 N 蛋白和 S 蛋白^[30],通过免疫胶体金法、免疫荧光层析法和高通量化学发光技术等发展为特异性的 POCT 产品。

表 1 目前获批上市的 SARS-CoV-2 抗体检测试剂

产品名称	检测方法	注册
SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒	胶体金法	广州万孚生物技术有限公司
SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒	胶体金法	英诺特(唐山)生物技术有限公司
SARS-CoV-2 IgM 抗体检测试剂盒	磁微粒化学发光法	奥博赛斯(重庆)生物科技有限公司
SARS-CoV-2 IgG 抗体检测试剂盒	磁微粒化学发光法	奥博赛斯(重庆)生物科技有限公司
SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒	化学发光微粒子免疫检测法	厦门万泰凯瑞生物技术有限公司
SARS-CoV-2 IgM 抗体检测试剂盒	胶体金法	广东和信健康科技有限公司
SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测试剂盒	胶体金法	南京诺唯赞医疗科技有限公司
SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测试剂盒	胶体金法	珠海丽珠试剂股份有限公司

5.2 高通量呼吸道感染病原体筛查芯片 早期筛查诊断是 SARS-CoV-2 疫情防控的关键环节之一。为了有效解决集中检测造成的医疗资源透支和交叉感染的问题,亟需发展核酸提取与扩增一体化、减少“开盖关节”与气溶胶污染、不依赖专业技术人员的现场快速分子检测新技术。上海交通大学谭蔚泓院士团队开发了一种 SARS-CoV-2 家庭简易快速检测试剂盒,该试剂盒突破了核酸快提、恒温反转录扩增、便携式实时荧光检测和比色检测等关键技术,可根据病毒或病原体相关基因信息设计不同的引物,实现对包括 SARS-CoV-2 在内的各种病原体的快速现场和家庭检测。近期由清华大学程京团队共同设计开发的包括 SARS-CoV-2 在内的“六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒(恒温扩增芯片法)”也获得了国家药监局 SARS-CoV-2 应急医疗器械审批批准。该技术是用于呼吸道感染多病毒检测的全新微流控芯片系统,只需采集患者的咽拭子等呼吸道分泌物标本,便可在 1.5 h 内一次性检测包括 SARS-CoV-2 在内的 6 种呼吸道常见病毒,具有高通量快速检测、多指标联合检测等特点。此外,基因芯片技术在病毒的检测中也扮演着十分重要的角色。与传统的分子生物学技术相比,基因芯片最大的特色在于其能够实现对病原体的高通量筛查。

6 SARS-CoV-2 的生物安全防护策略

大量的流行病学研究证实,SARS-CoV-2 的主要传播途径仍然是呼吸道飞沫传播和密切接触传播。此外,日本“钻石公主号”邮轮在海上隔离,1 例患者致该船上数百名游客陆续感染的案例,间接证明了 SARS-CoV-2 可经气溶胶传播。在生物标本方面,先后从 COVID-19 患者的粪便和尿液标本中分离出了 SARS-CoV-2,证实了患者体液中存在活病毒,提示 COVID-19 患者体液标本存在实验室污染的可能性,

对实验室标本处理与安全防护提出了新的挑战。2 月 6 日,国家卫生健康委员会发布了《新型冠状病毒肺炎防控方案(第四版)》,其中对标本的采集和处理做了具体的指示和说明,现将实验室生物安全防护要点总结如下。

6.1 标本处理 标本采集后须在生物安全二级实验室生物安全柜内进行分装,标本包装要求要符合《危险品航空安全运输技术细则》相应的标准。涉及外部标本运输的,应根据标本类型,按照 A 类或 B 类感染性物质进行 3 层包装。废弃标本的处理应该按照《医疗废物管理条例》进行,对废弃物中可能含病原体的标本、耗材、实验废液等高风险废弃物,实验人员需要在实验室就地进行压力蒸汽灭菌或者化学消毒处理。而对于感染性废液,需要用有效氯含量 0.55% 消毒剂浸泡,并验证灭菌效果后,排入实验室水处理系统。

6.2 人员防护 国家卫生健康委员会公布的《新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)》对实验活动生物安全的个人防护作了明确要求。按照指南,活病毒感染动物、感染动物取样、感染性标本处理和检测、感染动物特殊检查、感染动物排泄物处理等实验操作,应当在生物安全三级实验室操作。未经培养的感染性材料在采用可靠的方法灭活前进行的病毒抗原检测、血清学检测、核酸提取、生化分析及临床标本的灭活等操作,应当在生物安全二级实验室进行,同时采用生物安全三级实验室的个人防护。感染性材料或活病毒在采用可靠的方法灭活后进行的核酸检测、抗原检测、血清学检测、生化分析等操作应当在生物安全二级实验室进行。

7 展 望

SARS-CoV-2 病毒在全球范围内的传播对世界公共健康构成了巨大威胁。实验室检测手段的加强能够在一定程度上减少甚至遏制 SARS-CoV-2 的传

播。虽然核酸检测仍是 SARS-CoV-2 感染的确诊依据,但是目前也有许多实验室研发出了基于抗原、抗体检测的新技术。这些新兴诊断技术与核酸检测优势互补,联合使用后可以大大提高 SARS-CoV-2 的排查率。鉴于实验室检查结果在疾病诊断中的重要作用,多技术联合核酸检测有望成为今后确诊 SARS-CoV-2 感染的发展方向。

参考文献

- [1] World Health Organization. Laboratory testing of human suspected cases of novel coronavirus(nCoV) infection[S/OL]. 2020[2020-03-08]. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/330374/WHO-2019-nCoV-laboratory-2020.1-eng.pdf>.
- [2] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [3] LI G, FAN Y, LAI Y, et al. Coronavirus infections and immune responses[J]. *J Med Virol*, 2020, 92(4): 424-432.
- [4] CHU D K W, PAN Y, CHENG S M S, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia[J/OL]. *Clin Chem*, 2020[2020-03-08]. <https://academic.oup.com/clinchem/advance-article/doi/10.1093/clinchem/hvaa029/5719336>.
- [5] WASSENAAR T M, ZOU Y. 2019_nCoV/SARS-CoV-2: rapid classification of betacoronaviruses and identification of Traditional Chinese Medicine as potential origin of zoonotic coronaviruses[J/OL]. *Lett Appl Microbiol*, 2020[2020-03-08]. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/lam.13285>.
- [6] SU S, WONG G, SHI W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses[J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(6): 490-502.
- [7] LIU X, ZHANG B, JIN Z, et al. The crystal structure of COVID-19 main protease in complex with an inhibitor N3[EB/OL]. (2020-03-01)[2020-03-06]. <http://www.rcsb.org/structure/6LU7>.
- [8] WRAPP D, WANG N, CORBETT K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [9] LI W, SHI Z, YU M, et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses[J]. *Science*, 2005, 310(5748): 676-679.
- [10] KUPFERSCHMIDT K. Emerging diseases: researchers scramble to understand camel connection to MERS[J]. *Science*, 2013, 341(6147): 702.
- [11] CHAN J F, 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.
- [12] WU A, PENG Y, HUANG B, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus(2019-nCoV) originating in China[J]. *Cell Host Microbe*, 2020, 27(3): 325-328.
- [13] LU R, ZHAO X, LI J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): 565-574.
- [14] 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.
- [15] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [16] TANG X, WU C, LI X, et al. On the origin and continuing evolution of SARS-CoV-2[J/OL]. *Nat Sci Rev*, 2020[2020-03-09]. <https://academic.oup.com/nsr/advance-article/doi/10.1093/nsr/nwaa036/5775463>.
- [17] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [18] XIAO K, ZHAI J, FENG Y, et al. Isolation and characterization of 2019-nCoV-like coronavirus from Malayan pangolins[J/OL]. *BioRxiv*, 2020[2020-03-08]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.17.951335v1>.
- [19] WU C, LIU Y, YANG Y, et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods[J/OL]. *Acta Pharm Sin B*, 2020[2020-03-06]. <https://www.researchgate.net/publication/339535019>.
- [20] PARK J Y, KO J A, KIM D W, et al. Chalcones isolated from Angelica keiskei inhibit cysteine proteases of SARS-CoV[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31(1): 23-30.
- [21] RICCIO F, TALAPATRA S K, OXENFORD S, et al. Development and validation of RdRp screen, a crystallization screen for viral RNA-dependent RNA polymerases[J]. *Biol Open*, 2019, 8(1): bio037663.
- [22] GUAN W J, NI Z Y, HU Y, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China[J/OL]. *N Engl J Med*, 2020[2020-03-07]. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2002032>.
- [23] TAN L, WANG Q, ZHANG D, et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study[J/OL]. *MedRxiv*, 2020[2020-03-06]. <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.01.20029074v1>.
- [24] 马洲, 曹国君, 关明, 等. 人冠状病毒的研究现状与进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(5): 518-522.
- [25] 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): 2000045.
- [26] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. *重庆医学*, 2020, 49[2020-03-07]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1176.r.20200212.0900.006.html>.

[27] WANG D, HU B, HU C, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 Novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China[J]. JAMA, 2020, 323 (11):1061-1069.

[28] 李泉, 刘钉宾, 乔正荣, 等. SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体检测在新型冠状病毒肺炎诊断中的价值[J/OL]. 国际检验医学杂志, 2020 [2020-03-05]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200304.1041.006.html>.

[29] LI Z, YI Y, LUO X, et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis[J/OL]. J Med Virol, 2020 [2020-03-06]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jmv.25727>.

[30] ZHANG N, WANG L, DENG X, et al. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans[J]. J Med Virol, 2020, 92(4):408-417.

(收稿日期:2020-03-10 修回日期:2020-03-24)

• 综 述 •

正常清蛋白尿糖尿病肾病的认识及研究进展*

冯 倩¹综述, 俸家富^{2△}审校

(1. 成都中医药大学医学技术学院, 四川成都 611137; 2. 绵阳市中心医院检验科, 四川绵阳 621000)

摘 要:糖尿病肾病(DKD)是糖尿病最主要的微血管并发症,同时也是导致糖尿病患者终末期肾病(ESKD)的主要原因。临床上,清蛋白尿被普遍认为是 DKD 从发生到发展至终末期肾病的最显著的临床症状之一,更是诊断 DKD 的主要依据。然而,近些年,越来越多的研究发现临床上有一部分的患者在发生肾损伤后,虽伴有肾小球滤过功能的减退,但仍然表现为“正常清蛋白尿”,即称为正常清蛋白尿 DKD(NADKD)。文献检索显示,目前国内外对 NADKD 的相关研究报道较少,尚未引起临床的足够重视。该文就 NADKD 的定义、患病率、实验室检测、可能的分子机制及国内外研究现状进行综述。

关键词:尿清蛋白肌酐比; 糖尿病肾病; 肾脏损伤; 肾小球滤过率

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.021 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2020)10-1236-06 **文献标识码:**A

Recognition and research progress of normoalbuminuric diabetic kidney disease*

FENG Qian¹, FENG Jiafu^{2△}

(1. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 611137, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Diabetic kidney disease (DKD) is the most important microvascular complication of diabetes mellitus, and it is also the main cause of end-stage kidney disease (ESKD) in diabetic patients. Clinically, albuminuria is generally considered to be one of the most significant clinical symptoms of DKD from occurrence to progression to ESKD, and is the main basis for the diagnosis of DKD. However, more and more studies have found that a portion of diabetes patients in the clinic in recent years, have accompanied by glomerular filtration dysfunction after kidney injury, but still appear as "normal albuminuria", which is named normoalbuminuric DKD (NADKD). Literature search shows that there are few reports on the research of NADKD at home and abroad, and it has not yet attracted enough clinical attention. In this paper, the incidence, prevalence, laboratory testing, possible molecular mechanism and research status of NADKD were reviewed.

Key words: urine albumin-creatinine ratio; diabetic kidney disease; kidney injury; glomerular filtration rate

糖尿病肾病(DKD)是糖尿病患者极易发生的一种慢性并发症,其临床特征常表现为清蛋白尿[尿清蛋白/肌酐比(UACR)>30 mg/g]、肾小球滤过率(GFR)降低和(或)肾组织结构异常。传统观念认为, DKD 的发展将经历正常蛋白尿阶段(UACR<30 mg/g)、微量清蛋白尿阶段(30 mg/g≤UACR≤300 mg/g)和明显清蛋白尿阶段(UACR>300 mg/g)。因此,临床将蛋白尿,特别是微量清蛋白尿作为糖尿

* 基金项目:国家 973 计划子项目(2015CB755402-043);四川省科技支撑计划项目(2015SZ0117);四川省应用基础项目(2019YJ0701)。
△ 通信作者, E-mail: jiafufeng@aliyun.com。
本文引用格式:冯倩, 俸家富. 正常清蛋白尿糖尿病肾病的认识及研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10):1236-1241.