



SARS 专项学术出版基金
SARS ACADEMIC PUBLICATION FOUNDATION

传染性非典型肺炎 病原学检测与诊断

康熙雄 高星 主编



科学出版社
www.sciencep.com

内 容 简 介

2002年末,SARS突袭,面对SARS,全世界医学工作者积极地进行SARS的研究,其中实验室检测是SARS诊治的重要依据之一,本书从病原学的角度出发,详细探讨了病毒的常规实验室检测方法,SARS冠状病毒的特征和最新的、特异的实验室诊断方法;在进行SARS病原学检查时的安全防护措施;SARS标本的采集、运送和保存原则;突发性流行病检测技术平台的建立和运转;SARS病原学实验室和技术检测平台的质量控制体系。希望本书为临床从事SARS诊治的医务工作者,特别是从事标本检测的一线人员、从事SARS科研工作的人员、从事病原学研究的人员以及从事SARS流行病学调查的人员全面、准确地认识SARS病毒及快速、准确、安全地检测SARS病原提供理论依据。

图书在版编目(CIP)数据

传染性非典型肺炎病原学检测与诊断/康熙雄,高星主编. —北京:科学出版社,2004.3

ISBN 7-03-012767-6

I. 传… II. ①康…②高… III. ①重症呼吸综合征-医学检验②重症呼吸综合征-诊断 IV. R563.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第001967号

策划编辑:马学海 盖 宇/文案编辑:李久进/责任校对:朱光光

责任印制:安春生/封面设计:王 浩

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2004年3月第 一 版 开本:B5(720×1000)

2004年3月第一次印刷 印张:19 3/4

印数:1—3 000 字数:382 000

定价:40.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

序 一

2003年春季,一场突如其来的严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrom, SARS)的流行,给中国乃至世界人民的健康带来了严重威胁,并造成了重大的经济损失。截至2003年6月10日,全世界共发现SARS患者8430例,死亡784例,病死率为9.3%。至6月24日世界卫生组织宣布取消对北京的旅游限制之日,中国共发现SARS患者5328例,死亡347例。据中华人民共和国国家统计局初步估计,这次SARS流行使中国全年国民经济增长率下降约0.8%。

在这场抗击SARS的斗争中,中国广大医务人员不顾个人安危,救死扶伤,治病救人,恪尽职守,表现了崇高的人道主义精神和优良的职业道德风范,为抗击SARS斗争的阶段性胜利做出了重大贡献。康熙雄、高星等同志在抗击SARS斗争的硝烟尚未散尽时,即着手总结防治SARS的经验和成果,写成《传染性非典型肺炎病原学检测与诊断》一书,系统地介绍了SARS的病原学、实验室检测技术、标本的采集、运输和保存、实验室质控及其相关的安全防护措施等,具有较高的学术水平和实用价值,不仅对从事SARS实验室工作的专业人员,而且对从事临床、预防、控制和研究的有关人员也具有重要的参考价值。

我衷心祝贺本书的及时面世。我相信,本书的出版必将为中国SARS的防治工作发挥积极的作用,为“科教兴国”做出贡献。



2003年12月8日

序 二

传染性非典型肺炎 (SARS) 的暴发流行, 牵动了亿万人民尤其是广大医务人员、公共卫生工作者和科研人员的心。SARS 疫情的控制, 是全国人民上下一心、众志成城、无私奉献、无畏拼搏的结果, 更是科学的胜利。巩固成果直至最终战胜 SARS 离不开科学技术的支持。为了防止 SARS 的再次出现, 加强疫情监控是当前工作的重点之一, 而这一工作的基础是可靠的诊断技术。

康熙雄、高星等同志编写的《传染性非典型肺炎病原学检测与诊断》一书可以说适逢其时。该书从病原学入手, 较系统、详细地介绍了 SARS 的检测技术、防护措施、标本的采集、运输和保存以及实验室质控等方面的理论、方法和进展, 具有一定的实用价值。

该书的内容对于与 SARS 预防、控制、治疗和研究有关的人员有一定的参考意义, 相信这本书的出版将为中国 SARS 控制工作发挥积极作用。



2003 年 12 月

目 录

序一

序二

第一章 SARS 概述	1
第二章 SARS 的病原学	5
第一节 流行性呼吸道疾病病毒	5
第二节 冠状病毒科	6
第三节 SARS 病原学研究	11
第四节 SARS-CoV 导致人体脏器发生的病理及超微结构的改变	20
第三章 生物病原学检测技术平台	24
第一节 建立生物病原学检测技术平台的背景、目的和意义	24
第二节 建立生物病原学检测技术平台的基础	25
第三节 生物病原学检测技术平台的组织结构和功能	25
第四节 生物病原学检测工作程序	27
第五节 SARS 病原学检测诊断专家库	29
第六节 病原学检测与诊断网络实验室	30
第七节 案例分析	31
第四章 SARS 病原学数据库与统计信息分析	33
第一节 建立 SARS 病原学数据库的背景	33
第二节 SARS 病原学数据库的管理和运作模式	34
第三节 SARS 病原学数据库的统计分析	36
第四节 SARS 病原学数据库中应用的信息技术	42
第五节 SARS 病原学数据库的经验总结	42
第六节 SARS 病原学数据库今后的发展	43
第五章 SARS 标本采集、运输和保存	45
第一节 分泌物、排泄物及组织的采集与运送	49
第二节 血液标本采集、运送与保存	51
第三节 尿液和体液标本采集、运送和保存	53
第四节 北京 SARS 实验室标本公共资源库管理办法	53
第六章 对病原体检测的相关安全防护措施	56
第一节 实验室生物安全防护措施	56
第二节 实验人员的防护	59

第三节	样品处理防护措施	60
第四节	实验垃圾处理	62
第七章	病毒学检测方法 及原理	65
第一节	病毒学实验室诊断	65
第二节	病毒的分离培养	71
第三节	病毒的组织培养技术	77
第四节	病毒学免疫检测方法	85
第五节	标记的免疫技术及其在病毒学中的应用	106
第六节	细胞免疫实验技术	140
第七节	聚丙烯酰胺凝胶电泳技术	144
第八节	电子显微镜技术在病毒诊断和病毒病因研究上的应用	148
第九节	病毒核酸的提取和鉴定	157
第十节	病毒核酸的序列分析	162
第十一节	核酸分子杂交技术及其在病毒学上的应用	163
第十二节	聚合酶链反应技术	194
第八章	传染性非典型肺炎病原体实验室特异性检测方法	201
第一节	病原学检测	201
第二节	血清学诊断	216
第三节	病毒衣壳蛋白及疾病相关蛋白分析	219
第九章	SARS 病原学临床诊断试剂的验证与鉴定	223
第一节	SARS 检测免疫和 RT-PCR 试剂的组成	223
第二节	影响 ELISA 和 RT-PCR 试剂盒质量的因素	223
第三节	试剂盒的验证和鉴定	229
第十章	SARS 病原学实验室和技术检测平台的质量体系	232
第一节	定义	232
第二节	质量保证、室内质控和室间质评之间的关系	235
第三节	SARS 感染免疫和分子诊断的质量保证	236
主要参考文献		247
附录一	呼吸道传染病（甲类）的消毒隔离工作指南	250
附录二	世界卫生组织关于处置与 SARS 相关的临床标本的生物安全指南	252
附录三	洪灾防病指导手册（4）	254
附录四	世界卫生组织关于 SARS 标本操作的生物安全指南	293
附录五	非典型肺炎病例实验室检测标本采集技术指南（试行）	296
附录六	中华人民共和国传染病防治法	298

第一章 SARS 概述

SARS (severe acute respiratory syndrome), 严重急性呼吸综合征, 又称传染性非典型肺炎, 是指近期流行的一种呼吸道传染病, 一种累及呼吸道、血液系统、消化系统、泌尿系统、免疫系统等脏器的全身性疾病。2002 年 11 月开始在中国广东地区出现, 截至 2003 年 5 月 26 日, 全球已有 31 个国家发现了 SARS 病例, 全球累计病例数达到 8202 例, 中国内地有 25 个省市自治区有该病流行, 累计病例数达到 5316 例。这是一种对全世界产生深远影响的新型感染性疾病。它主要通过短距离飞沫传播、接触病人呼吸道分泌物及密切接触传播。人群普遍易感, 医护人员是本病的高危人群。但这种疾病的发病机制仍不完全清楚。目前尚无 SARS 的特效治疗药物和方法, 预防非典型肺炎的疫苗正在研制中。

一、病 原 学

根据 WHO 多国协作研究的结果, 美国疾病预防控制中心 (CDC) 和世界卫生组织 (WHO) 2003 年 4 月 16 日正式宣布现今在全球流行的“非典型肺炎”的致病原为一种新的冠状病毒, 命名为 SARS 病毒。虽然最近 CDC 完成了对它的基因组序列的检测, 但是它的发病原因和传播途径还不清楚。此外, 衣原体等其他可疑病原仍需进一步评估, 不排除其他病原体。

二、诊 断

(一) 诊断标准 (试行)

1. 流行病学史

1) 与发病者有密切接触史, 或属受传染的群体发病者之一, 或有明确传染他人的证据。

2) 发病前两周内曾到过或居住于报告有传染性非典型肺炎病人并出现继发感染病人的区域。

2. 症状与体征

起病急, 多以发热为首发症状, 体温一般大于 38°C , 偶有畏寒; 可伴有头痛、关节酸痛、肌肉酸痛、乏力、腹泻; 常无上呼吸道其他症状; 可有咳嗽, 多

为干咳、少痰，偶有血丝痰；可有胸闷，严重者出现呼吸加速、气促或明显呼吸窘迫。肺部体征不明显，部分病人可闻少许湿啰音，或有肺实变体征。注意有少数病人不以发热为首发症状，尤其是有近期手术史或基础疾病的病人。

3. 实验室检查

外周血白细胞计数一般不升高，或降低；常有淋巴细胞计数减少。

4. 胸部 X 射线检查

肺部有不同程度的片状、斑片状浸润性阴影或呈网状改变，部分病人进展迅速，呈大片状阴影；常为双侧改变，部分非典型肺炎病人的胸部 X 射线检查呈单侧多叶改变，阴影吸收消散较慢。肺部阴影与症状体征可不一致。若检查结果阴性，1~2 天后应予复查。

5. 抗菌药物治疗无明显效果

疑似诊断标准：符合上述 1、2、3 条标准或 2、3、4 条标准。

临床诊断标准：符合上述 1 (1)、2、4 条标准及以上，或 1 (2)、2、3、4 条标准或 1 (2)、2、4、5 条标准。

符合医学观察标准的病人，如条件允许应在指定地点接受隔离观察；也可允许患者在家中隔离观察。在家中隔离观察时应注意通风，避免与家人的密切接触，并由疾病控制部门进行医学观察，每天测体温。观察中的病人病情符合疑似或临床诊断标准时要立即由专门的交通工具转往集中收治传染性非典型肺炎和疑似病人的医院进行隔离治疗。

鉴别诊断：临床上要注意排除上感、流感、细菌性或真菌性肺炎、艾滋病合并肺部感染、军团病、肺结核、流行性出血热、肺部肿瘤、非感染性间质性疾病、肺水肿、肺不张、肺栓塞、肺嗜酸性粒细胞浸润症、肺血管炎等临床表现类似的呼吸系统疾患。

(二) 重症非典型肺炎诊断标准

符合下列标准中的 1 条即可诊断为重症“非典型肺炎”。

- 1) 呼吸困难，呼吸频率大于 30 次/min。
- 2) 低氧血症，在吸氧 3~5L/min 条件下，动脉血氧分压 (PaO_2) 小于 70mmHg，或脉搏容积血氧饱和度 (SpO_2) 小于 93%；或已可诊为急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。
- 3) 多叶病变且病变范围超过 1/3 或 X 射线胸片显示 48h 内病灶进展大于 50%。

- 4) 休克或多器官功能障碍综合征 (MODS)。
- 5) 具有严重基础性疾病或合并其他感染或年龄大于 50 岁。

三、一般性和对症治疗

- 1) 卧床休息, 避免劳累、用力。
- 2) 避免剧烈咳嗽, 咳嗽剧烈者给予镇咳; 咳痰者给予祛痰药。
- 3) 发热超过 38.5°C 者, 可使用解热镇痛药。高热者给予物理降温。
儿童忌用阿司匹林, 因该药有可能引起 Reye 综合征。
- 4) 有心、肝、肾等器官功能损害, 应该作相应的处理。
- 5) 加强营养支持。注意水电解质平衡。
- 6) 出现气促或 $\text{PaO}_2 < 70\text{mmHg}$ 或 $\text{SpO}_2 < 93\%$ 时, 给予持续鼻导管或面罩吸氧。
- 7) 糖皮质激素的应用。应用指征为: ①有严重中毒症状, 高热 3 天不退; ②48h 内肺部阴影进展超过 50%; ③有急性肺损伤或出现 ARDS。一般成人剂量相当于甲基强的松龙 $80\sim 320\text{mg}/\text{天}$, 必要时可适当增加剂量, 大剂量应用时间不宜过长。具体剂量及疗程根据病情来调整, 待病情缓解或胸片上阴影有所吸收后逐渐减量停用。建议采用半衰期短的激素。注意糖皮质激素的不良反应。儿童慎用糖皮质激素。
- 8) 预防和治疗继发细菌感染。根据临床情况, 可选用喹诺酮类等适用抗生素。
- 9) 早期可试用抗病毒药物。
- 10) 重症可试用增强免疫功能的药物。
- 11) 可选用中药辅助治疗。治则为: 温病, 卫、气、营、血和三焦辨证施治。
- 12) 重症病例的处理。① 加强对患者的动态监护。② 使用无创正压机械通气 (NPPV)。模式通常使用持续气道正压通气 (CPAP), 压力水平一般为 $4\sim 10\text{cmH}_2\text{O}$; 吸入氧流量一般为 $5\sim 8\text{L}/\text{min}$, 维持血氧饱和度大于 93%, 或压力支持通气 + 呼气末正压 (PSV + PEEP), PEEP 水平一般为 $4\sim 10\text{cmH}_2\text{O}$, 吸气压力水平一般为 $10\sim 20\text{cmH}_2\text{O}$ 。NPPV 应持续应用 (包括睡眠时间), 暂停时间不宜超过 30min, 直到病情缓解。③ 若病人不耐受 NPPV 或氧饱和度改善不满意, 应及时进行有创正压机械通气治疗。④ 出现休克或 MODS, 予相应支持治疗。

四、传染性非典型肺炎病例出院参考标准

同时具备下列三个条件：

- 1) 体温正常 7 天以上。
- 2) 呼吸系统症状明显改善。
- 3) X 射线胸片有明显吸收。

五、控制措施

主要是控制传染源、切断传播途径、保护易感人群三个方面。

第二章 SARS 的病原学

当前研究认为目前流行的 SARS 是由一种冠状病毒 (Coronavirus) 亚型变种引起的一种传染病, 不排除其他病原体。

第一节 流行性呼吸道疾病病毒

呼吸系统常见疾病包括感染、慢阻肺、肺癌三大类。呼吸道病毒可引起人群中一些重要的疾病, 包括急性局部的和全身的疾病。常见的有感冒、流感, 以及根据病毒对上、中呼吸道感染的解剖部位不同引起咽炎、喉炎和气管炎、支气管炎。引起感染的病毒主要包括: 呼吸道合胞病毒 (RSV)、腺病毒 (AV)、腮腺炎病毒、流感病毒 A/B (IFV-A、B)、副流感病毒 (PIV-I、II、III)、肠病毒、单纯疱疹病毒、鼻病毒、呼肠孤病毒。在一定的人群中, 呼吸道病毒可引起相当数量的致死性病例。流感病毒和呼吸道合胞病毒可能是最具杀伤力的。

引起感冒的是小核糖核酸病毒, 特别是鼻病毒和某些埃可病毒及柯萨奇病毒。冠状病毒也可引起某些流行。流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒和腺病毒感染尤其在重复感染的成人中也可表现为感冒。

流感由流感病毒引起, 流感病毒属正黏液病毒科成员。病毒为多形态, 有包膜, 且包含分节段的单链反义 RNA 基因组, 直径范围为 80~120nm。根据核蛋白和基质蛋白的补体结合抗体将其分为 A 型、B 型或 C 型。流感病毒 A 型和 B 型的主要疾病谱相同。然而医源性 A 型感染约比 B 型多 4 倍, 且 B 型更普遍地导致肌炎和胃肠疾病。流感病毒 C 型很少引起下呼吸道疾病, 但可引起散发性上呼吸道疾病。成人中几乎所有人都有 C 型病毒的抗体。流感病毒具有两种主要的表面糖蛋白, 即血凝集素 (HA) 和神经氨酸苷酶 (NA), 它们使病毒能够附着并感染易感宿主。病毒通过 HA 与细胞唾液酸结合进而与宿主细胞膜融合。NA 功能为去除唾液酸, 以防止从感染细胞芽生出的新病毒的自身聚集, 并促进其扩散。

急性病毒性咽炎多由鼻病毒、腺病毒、流感病毒、副流感病毒以及肠病毒、呼吸道合胞病毒等引起, 临床特征为咽部发痒和灼热感, 疼痛不持久, 也不突出。疱疹性咽峡炎常由柯萨奇病毒 A 引起。咽结膜热主要由腺病毒、柯萨奇病毒等引起。

急性病毒性喉炎多由鼻病毒、流感病毒甲型、副流感病毒及腺病毒等引起。急性病毒性支气管炎多由呼吸道合胞病毒、流感病毒、冠状病毒、副流感病毒、鼻病毒、腺病毒等引起。

腺病毒是由多种病毒组成的一组病毒，其中一些病毒可引起以呼吸道黏膜和眼结膜炎症以及黏膜下组织和局部淋巴样组织增生为特征的急性发热性疾病。腺病毒还与几种胃肠紊乱疾病、7%~17%的小儿胃肠炎、肠套叠、急性出血性膀胱炎和脑脊髓炎有关。腺病毒为DNA病毒，有三种与核壳有关的主要抗原（六邻体、五邻体和纤维）。这些抗原可用于病毒的鉴定和分型。有时腺病毒伴有一种较小的DNA病毒，后者被称为腺相关病毒，这是一种缺陷病毒，必须有腺病毒的辅助才能复制。

副流感病毒分为副黏病毒1、2、3、4型。各型病毒虽然结构和生物学上相似，但它们所引起的疾病严重程度不同。副流感病毒1型和2型为喉气管炎（假膜性喉炎）的主要致病病原体，来自3型感染的疾病在小于1岁的婴儿中最为严重。

呼吸道合胞病毒属于副黏病毒科，有包膜，多形态，直径为150~300nm，具有单链RNA基因组。

第二节 冠状病毒科

冠状病毒于1937年从小鸡中分离得到。1965年，Tyrrell等用人胚纤毛气管培养方法，体外扩增出了第一株人类冠状病毒。1968年由科学家秦瑞发现并根据病毒毒粒的形态正式命名为“冠状病毒”。1975年中国国家病毒命名委员会正式命名了冠状病毒科（Coronaviridae）。

一、冠状病毒的分类

除SARS冠状病毒之外，目前发现的冠状病毒可分为3组共16种病毒株，第1组、第2组主要感染哺乳动物，第3组的宿主为禽类。感染人的冠状病毒主要是第1组的Hcov-229E，第2组的HCV-OC43以及SARS冠状病毒。根据病毒的血清学特点和核苷酸序列的差异，目前冠状病毒分为冠状病毒和环曲病毒两个属。代表株为禽传染性支气管炎病毒（Avian infectious bronchitis virus, IBV）。其他成员有：人冠状病毒（Human coronavirus, HCoV），鼠肝炎病毒（Murine virus hepatitis, MHV），猪血凝性脑脊髓炎病毒（Porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, HEV），猪传染性胃肠炎病毒（Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV），初生犊腹泻冠状病毒（Neonatal calf diarrhea coronavirus, BCV），大鼠冠状病毒（Rat coronavirus, RCV），火鸡蓝冠病毒（Turkey bluecomb virus），猫传染性腹膜炎病毒（Feline infectious peritonitis virus, FIPV）。可能成员有：犬冠状病毒（Canine coronavirus, CCoV），大鼠涎腺炎病毒（Sialodacryoadenitis virus of rat, SDAV），人肠道冠状病毒（Human enteric coronavirus, HECov）。

二、冠状病毒结构

冠状病毒结构如图 2.1 所示。该病毒在电子显微镜下，病毒颗粒呈球形或椭圆形，具有多形性，直径约为 60~220nm，平均直径为 100nm。病毒有包膜，其表面有梅花形的棘突，状如皇冠，故称为冠状病毒 (coronavirus)，不同的冠状病毒的棘突有明显的差异。颗粒中心在负染电子显微镜下呈不定形态，核壳体呈疏松状态。在冠状病毒感染细胞内有时可以见到管状的包含体。冠状病毒对脂溶剂、去污剂敏感，不耐酸和紫外线。常用的病毒灭活剂如 β -丙内酯、甲醛、过氧化氢等可以灭活冠状病毒。外壳带有三种糖蛋白：S 蛋白 (spike protein)，棘突糖蛋白，是主要的抗原，与受体结合，进行细胞融合，诱导中和抗体产生，产生细胞免疫应答。与其他 RNA 病毒相比，冠状病毒的宿主范围相当狭窄，宿主范围主要由 S 蛋白上的糖基序列决定；M 蛋白 (membrane protein)，跨膜蛋白，参与跨膜-出芽和壳蛋白的形成。核蛋白为磷酸化蛋白，可以与基因组 RNA 结合形成核衣壳，可以诱导细胞免疫，可能和 RNA 合成的调节有关。E 蛋白 (envelope protein)。HE (hemagglutinin-esterase protein) 红细胞凝集素酯酶糖蛋白，分子小，为壳相关蛋白，主要作用是产生血凝和血吸附，和细胞膜上乙酰唾液酸结合，不是所有的冠状病毒都有 HE 糖蛋白。

冠状病毒是一类单链的正义 RNA 病毒 [single-stranded, (+) sense RNA

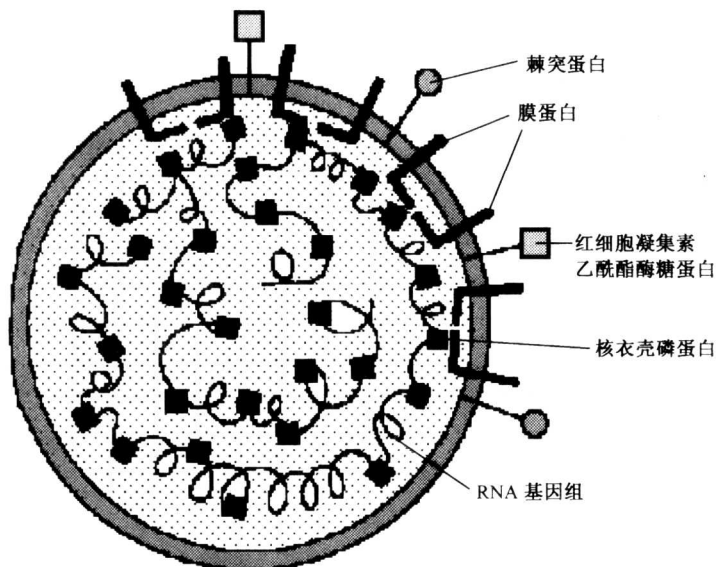


图 2.1 冠状病毒毒粒结构示意图

(引自 <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>, 2003.4.13)

virus], 拥有 RNA 病毒中最大的基因组, 长度约 27~32kb。冠状病毒基因组具有 5'端帽状结构和 3'端 PolyA 尾。基因组的 5'端有 60~80 个碱基的先导序列, 随后是 200~500 个碱基的非编码区。从基因组 5'端起约 20kb, 占基因组长度的 60% 为两个重叠的可译框 (ORF1a 和 ORF1b), 这些基因编码依赖 RNA 的 RNA 聚合酶、蛋白酶和其他一些功能尚不明的蛋白。在 ORF1a 和 ORF1b 之间有 7 个碱基的序列, 是核糖体框架移动所必需的。所有冠状病毒的基因排列顺序均相同, 为聚合酶-S 蛋白-M 蛋白-N 蛋白。此外, 还有一些可译框编码非结构蛋白和 HE 蛋白, 编码这些蛋白基因的数量、核苷酸序列和顺序在不同的冠状病毒中是不同的, 这些蛋白的功能尚不清楚。

冠状病毒的分离工作难度很大, 需用人胚胎细胞、气管及鼻黏膜细胞, 经器官培养方能分离。增殖病毒亦很困难, 也要用上述材料。正因为这种难度, 病毒分离工作需要较长时间。

三、冠状病毒的繁殖周期

冠状病毒本身无细胞结构, 不能自行复制, 一旦进入了人体细胞中, 就能利用细胞的各种资源不断地复制自己。这类病毒基因组 RNA 自身就可以发挥 mRNA 样的功能, 参与病毒蛋白质的合成。冠状病毒以独特的方式进行复制, 并可以导致高频率的基因重组。冠状病毒的繁殖周期示意图 (图 2.2): 冠状病毒粒子外膜的糖蛋白 (S) 与敏感细胞的受体相结合, 通过内吞作用进入宿主细胞, 病毒复制完全在细胞质内进行。毒粒进入细胞后, 首先以病毒基因组 (+) RNA 为模板从病毒基因组的 5'端直接翻译出早期依赖于 RNA 的病毒 RNA 聚合酶。并以 (+) RNA 为模板复制和转录出 (-) mRNA, 它是病毒基因组转录成全长的互补链, 两个不同的 RNA 聚合酶结合引导序列并沿 (-) mRNA 滑动, 在不同位点选择性转录产生六条亚 (+) mRNA。转录成正链 RNA 和一套约 6 个 mRNA 的片段。这些 mRNA 的 5'端戴帽, 3'端加聚 (A), 即所谓同末端成套结构。所有 mRNA 的 5'端还有同一先导 RNA 序列 (leader sequence, UCUAAAC), 约 72 个核苷酸。3'端有相同的终止位点。先导 RNA 序列可通过先导 RNA-引物转录模式进行转录。大多数编码蛋白质的亚 mRNA 都含有多个可译框 (open reading frame, ORF), 但通常都是从 5'端的可译框开始翻译。然而, 某些 (+) 亚 mRNA 不是从第一个可译框开始翻译, 而是通过序列内部的核糖体进入位点 (internal ribosome entry site, IRES) 选择第二或第三个可译框开始翻译蛋白质。此外, 某些亚 mRNA 含有两个重叠的可译框, 它们都可被转录。冠状病毒与其他单链 RNA 病毒的不同之处是基因组容易发生重组。冠状病毒家族中 1/4 的基因组有重组。翻译的结构蛋白有 E1、E2 和 N。毒粒包装通过粗糙内质网进行, 形成囊泡。E2 在翻译时同时糖基化, E1 在高尔基体内糖基

化，两种糖蛋白插入胞膜，E2 毒粒内部分与核衣壳相连结。虽然 E2 糖蛋白可插入宿主细胞膜，但是毒粒不在细胞膜上装配。N 蛋白是病毒的核衣壳蛋白，当完整的 (+) mRNA 被转录后，N 蛋白与其结合形成病毒的核心颗粒。E 蛋白和 M 蛋白均是跨膜的糖蛋白。病毒核心颗粒在高尔基体与 M 蛋白结合。M 蛋白和 E 蛋白相互作用形成病毒出芽颗粒。经内质网和高尔基体加工后，S 蛋白被插入到病毒颗粒包膜结构中。最后，充满毒粒的囊泡与细胞膜相互融合而释放毒粒。并通过高尔基体分泌到细胞外，完成其整个病毒的生命周期。冠状病毒 mRNA 的转录机制又为分子病毒学家提供了另一种 RNA 拼接机制 (Soe et al. 1986)。可见冠状病毒科在分子病毒学中也有相当重要的地位。

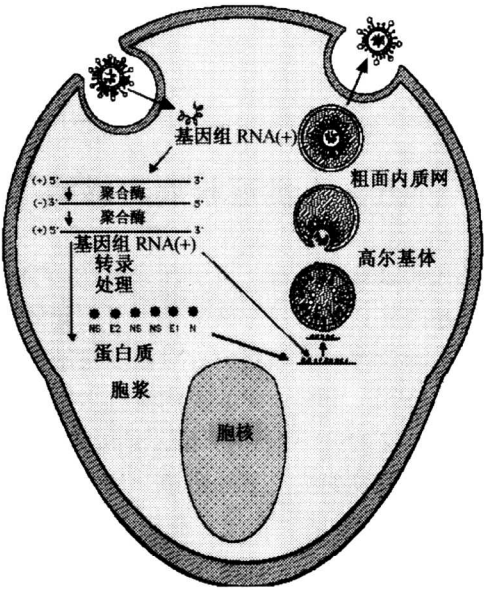


图 2.2 冠状病毒的繁殖周期示意图

(引自 <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Coronaviruses.html>, 2003.4.13)

四、冠状病毒的致病性

冠状病毒科的病毒只感染脊椎动物，具有胃肠道、呼吸道和神经系统的嗜性。不但感染人类，还感染牛、猪、啮齿类动物、猫、狗和鸟类，与人和动物的许多疾病有关。不同型别病毒的致病力不同，引起的临床表现也不尽相同 (表 2.1)。自 1980 年召开第一届国际冠状病毒讨论会以来，日益受到医学、兽医学和分子生物学家的广泛重视。

表 2.1 冠状病毒对自然宿主的组织嗜性

抗原组	病毒	宿主	呼吸道感染	消化道感染	神经系统感染	其他
I	HCV-229E	人	+			+
	TGEV	猪	+		+	
	CCV	狗		+		
	FECV	猫		+		
	FIPV	猫	+	+	+	+
	RbCV	兔				+
II	HCV-OC43	人	+	?		
	MHV	小鼠	+	+	+	
	SDAV	大鼠			+	
	HEV	猪	+	+	+	
	BCV	牛	+			
	RbECV	兔		+		
	TCV	火鸡		+		
III	IBV	鸡	+		+	+

五、人类冠状病毒感染

冠状病毒可感染人和家禽、家畜，可引起家禽的传染性支气管炎、鼠肝炎、猪脑脊髓炎、猫传染性腹膜炎等，很有破坏性。可引起的人类疾病有两类，首先是呼吸道感染，其次是肠道感染。冠状病毒对温度很敏感，33℃生长良好，35℃就受到抑制。由于这个特性，由它引起的疾病流行多发生在秋冬和早春季节。人冠状病毒分别属于 OC43 和 229E 两个抗原型，是成人普通感冒的主要病毒之一，可引起上呼吸道感染，一般很少波及下呼吸道。潜伏期一般为 2~5 天，平均为 3 天。冠状病毒感染可以出现发热、寒战、流涕、呕吐等症状。病程一般在 1 个星期左右，临床过程轻微，没有后遗症。冠状病毒可以引起婴儿、新生儿急性肠胃炎，主要症状是水样大便、发热、呕吐，每天 10 余次，严重者可以出现血水样便。

冠状病毒感染分布在全世界各个地区，中国以及英国、美国、德国、日本、俄罗斯、芬兰、印度等国均已发现本病毒的存在。呼吸道冠状病毒感染通过空气飞沫传播，感染高峰在秋冬和早春。在美国华盛顿地区，连续 4 年的血清流行病学研究表明，冠状病毒占成人上呼吸道感染的 10%~24%。在美国密执安州的一次家庭检查中，证明冠状病毒可以感染各个年龄组，0~4 岁占 29.2%，40 岁以上占 22%，在 15~19 岁年龄组发病率最高。这与其他上呼吸道病毒的流行情况不尽相同，例如，呼吸道合胞病毒，大多随着年龄的增加而发病率降低。另外，当冠状病毒流行时鼻病毒却不常见。儿童的冠状病毒感染虽不常见，但是，5~9 岁儿童有 50% 可检出中和抗体，成人中 70% 中和抗体阳性。各国报道的人群抗体阳性率不同，我国人群以往冠状病毒中和抗体阳性率在 30%~60%，原

苏联的抗体阳性率则在 53% ~ 97%。有报道认为不同病毒的流行有不同的周期性，一般间隔 2~3 年流行一次。冠状病毒感染引起的免疫应答较差，再次感染较常见。无特异性治疗和预防手段。

第三节 SARS 病原学研究

一、SARS 病原体发现过程

著名微生物学家 Koch 对确定未知感染性疾病病原所提出的原则（Koch 要点）：①能从患某病的宿主中分离出一种微生物；②能在实验室培养这种微生物；

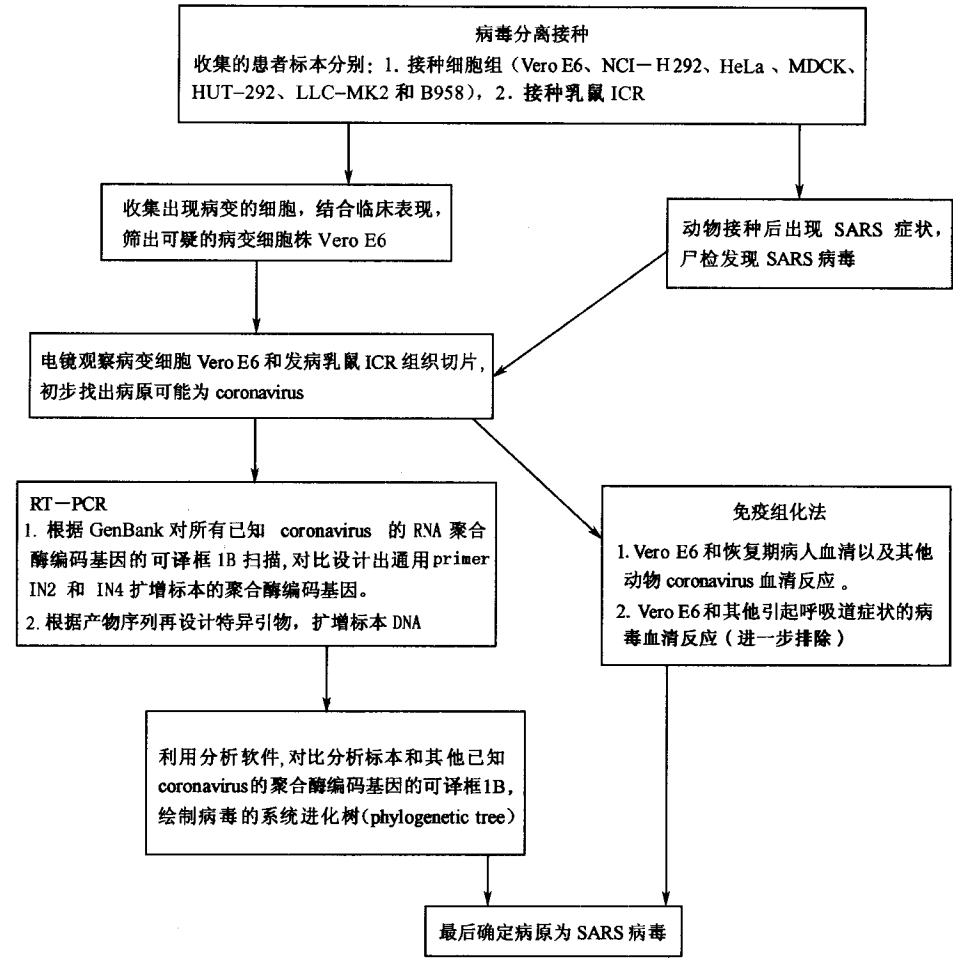


图 2.3 SARS 冠状病毒的识别、确定过程