

• 新型冠状病毒肺炎 •

新型冠状病毒肺炎的实验室分子诊断及生物安全

邓少丽¹, 刘 丁^{2△}

(陆军特色医学中心:1. 检验科;2. 疾病预防控制科, 重庆 400042)

摘 要: 该文就新型冠状病毒肺炎的病原体核酸检测及生物安全等方面进行了概述,包括病例定义、检测适应证、标本类型和标本采集、标本包装和运输、标本处理和核酸提取、病毒分子检测和结果判读,以及实验室生物安全,旨在提升临床实验室的检测质量,保障生物安全。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 实验室生物安全; 分子诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.12.001

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)12-1409-04

文献标识码:A

Laboratory molecular diagnosis and biological safety of Corona Virus Disease 2019

DENG Shaoli¹, LIU Ding^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Disease Prevention and Control, Army Special Medical Center, Chongqing 400042, China)

Abstract: The paper provides an overview of nucleic acid detection and biological safety of the pathogen of Corona Virus Disease 2019, including case definition, detection indications, specimen type and specimen collection, specimen packaging and transportation, specimen handling and nucleic acid extraction, viral molecular detection and interpretation of results, and laboratory biological safety, aim to improve the quality of detection in clinical laboratory and ensure biological safety.

Key words: Corona Virus Disease 2019; laboratory biological safety; molecular diagnosis



邓少丽



刘 丁

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)是指由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染导致的病毒性呼吸道疾病。我国科学家从 SARS-CoV-2 感染者的支气管、肺泡灌洗液标本中检测出泛 β-冠状病毒核酸阳性,并利用 Illumina 二代测序和 Nanopore 三代测序技术获得了病毒的全基因序列。随后,国内各种核酸检测试剂盒相继面世,主要包括实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)、恒温扩增技术及快速卡式荧光 PCR 技术等。目前,RT-qPCR 成为 SARS-CoV-2 核酸检测的主流方法。随

着分子诊断的广泛开展, SARS-CoV-2 实验室分子诊断的灵敏度、特异度及实验室生物安全等问题成为研究的焦点。进一步规范检测技术,确保实验室生物安全是做好疫情防控工作的前提和保障。笔者根据多年的实验室工作经验,结合抗击非典型肺炎、埃博拉病毒及 COVID-19 等工作经历,从以下几方面进行系统阐述,以为临床实验室病原体核酸检测及生物安全提供参考。

1 病例定义

1.1 疑似病例 疑似病例大多有流行病学史,如在发病前 14 d 内有武汉市及周边地区或其他有病例报告社区的居住史或旅行史;发病前 14 d 内与 SARS-CoV-2 检测阳性者有直接接触史;发病前 14 d 内曾接触过来自武汉市及周边地区或其他有病例报告社区的发热或呼吸道感染症状患者;聚集性发病。针对疑似病例,可对其进行流行病学史询问,并结合临床表现进行综合分析。临床表现主要包括:发热或呼吸道感染症状;具有 COVID-19 的影像学特征;白细胞计数正常或降低,淋巴细胞计数降低。具有上述流行病学史中的任何 1 项,同时符合临床表现中的 2 项者,

专家简介: 邓少丽,医学博士、教授、主任医师、博士研究生导师,陆军特色医学中心检验科副主任。

专家简介: 刘丁,医学博士、硕士生导师、副教授,重庆市新型冠状病毒肺炎市级医疗救治专家组成员,重庆市医院感染控制中心主任,陆军特色医学中心疾病预防控制科主任。 △ **通信作者,** E-mail: cqhic@163.com。

本文引用格式: 邓少丽,刘丁. 新型冠状病毒肺炎的实验室分子诊断及生物安全[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(12): 1409-1411.

则可定为疑似病例^[1]。

1.2 确诊病例 具有实验室分子诊断的病原学证据,确认为 SARS-CoV-2 核酸阳性的患者即可诊断为确诊病例^[2]。实验室分子诊断主要包括:RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 核酸阳性;病毒基因测序发现与已知的 SARS-CoV-2 高度同源;除鼻咽拭子外,采集其他体液、分泌物进行病毒核酸检测结果阳性^[1]。目前,RT-qPCR 检测病毒核酸是实验室确认的首选方法。血清 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体和 IgG 抗体阳性也可作为病原学证据,对病毒核酸检测进行有效补充^[3]。

1.3 可能病例 除了确诊病例和疑似病例的定义外,从实验室诊断的角度,笔者建议需要设置可能病例。可能病例可定义为有明确流行病学史和临床症状,但 RT-qPCR 检测结果阴性。按照国际应对埃博拉病毒、中东呼吸综合征冠状病毒的惯例,设置可能病例可减少核酸检测假阴性引起的漏诊^[4]。同时,建议对可能病例进行 SARS-CoV-2 核酸重复检测。

此外,对于接触过 COVID-19 确诊病例,且未进行有效防护的人群,也应纳入分子检测中。主要包括以下情况:与确诊病例共同生活;对 COVID-19 患者提供医疗诊治、护理时存在相关暴露;与确诊 COVID-19 的医护人员一起工作;直接接触过确诊病例的呼吸道分泌物者等。

2 临床实验室检测

鉴于现阶段 SARS-CoV-2 感染仍在流行,为更好地开展核酸检测工作,各医疗机构临床实验室应在确保生物安全和检测质量的前提下开展 RT-qPCR,用

于临床 COVID-19 诊断。RT-qPCR 核酸检测的适应证包括:(1)用于确诊疑似病例;(2)筛查有流行病学史的人群;(3)鉴别诊断发热、社区获得性肺炎及急性呼吸窘迫综合征患者等。同时建议实验室也应该检测其他呼吸道相关病原体,如流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒等,但不应该因为增加检测项目而延误对 SARS-CoV-2 的及时检测。

2.1 标本类型和标本采集 SARS-CoV-2 检测的标本类型包括呼吸道标本、血液标本、消化道标本^[1]。呼吸道标本包含鼻咽拭子、口咽拭子、鼻咽抽取物、深咳痰液、支气管灌洗液、肺泡灌洗液等,见表 1。由于 SARS-CoV-2 造成的是下呼吸道感染,对患者而言,深咳痰液和支气管、肺泡灌洗液等下呼吸道标本为核酸检测首选^[5]。但由于临床取样困难,目前核酸检测常用标本为鼻咽拭子和口咽拭子,但重症病例应优先采集下呼吸道标本,如深咳痰液和支气管、肺泡灌洗液。上呼吸道标本的采集十分重要,合格的标本是检出的关键。鼻咽拭子和口咽拭子标本应分别从鼻咽壁和口咽壁正确采集,以提高检测阳性率,而不是简单地从鼻孔或口腔采集。在标本收集中,可将鼻咽拭子和口咽拭子置于同一病毒保存液中。为保证病毒核酸的稳定性及检测的灵敏度,建议选用带塑料杆的合成纤维植绒拭子,不宜使用海藻酸钙拭子或木杆拭子,因为其可能含有灭活病毒和抑制 PCR 反应的物质。对于无症状者,诱导排痰或强迫咳痰有助于收集下呼吸道标本。在诊断标准中,血液标本也可用于检测 SARS-CoV-2,但在临床检测中其阳性率低,不建议作为 SARS-CoV-2 筛查的常规检测标本。

表 1 SARS-CoV-2 检测的标本类型、容器与保存液及转运条件

标本类型		容器与保存液	转运条件
上呼吸道标本	鼻咽拭子	含培养液的采样管	1. 所有标本放入带螺旋盖的标本采集管。 2. 涉及外部运输标本按照 A 类或 B 类感染性物质进行三重包装。 3. 建议尽快检测;24 h 内检测可置于 4 ℃ 保存;24 h 内无法检测置于-70 ℃ 或以下保存。 4. 需外部运输的标本用干冰制冷方式保存。
	口咽拭子	含培养液的采样管	
	鼻咽抽取物	含培养液的采样管	
下呼吸道标本	深咳痰液	含 3 mL 培养液或痰消化液的螺口无菌管	
	支气管灌洗液	生理盐水冲洗 30~50 mL	
	肺泡灌洗液	生理盐水冲洗 30~50 mL	
消化道标本	粪便	取黄豆粒大小(约 10 g)于 1 mL 保存液中	
	肛拭子	含培养液的采样管	
血液标本	血液	乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管	

在对有症状的确诊、疑似或可能病例进行常规标本采集时,采集人员应严格按照中国国家卫生健康委员会《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》的要求,个人防护装备包括 N95 及以上的防护口罩、护目镜、连体防护服、双层乳胶手套、防水靴套^[1]。如果接触患者血液、体液、分泌物或排泄物时,应及时更换外

层乳胶手套。此外,当气管插管、支气管或肺泡灌洗、咳痰等气溶胶暴露时,应加戴正压头套或全面型呼吸防护器。采集人员除需熟练掌握个人防护用品的使用技能外,还需经当地疾病预防控制中心或所在医疗机构的相关标本采集培训。门诊和住院患者由所在医院医护人员负责采集;密切接触者标本由当地疾病

预防控制中心采集。采集过程最好在配有负压通风系统或每小时 6~12 次换气的常压隔离单人室内进行。严格限制参与采集工作的医护人员人数,避免不必要的接触。采集人员在接触患者前后,以及在脱卸个人防护用品的每一步骤前后,均应严格进行手卫生。采集结束后,做好环境清洁与消毒工作,层流房间空气自净 30 min,普通房间用紫外线消毒。

2.2 标本的包装与运输 对于医疗机构的内部运送,可采用双层包装系统。所有标本必须先用带螺旋盖的防漏塑料主容器包装,并用 75%乙醇擦拭消毒容器表面,再用可重复、密封、抗压的二次容器包装,消毒后安全运送至实验室。随行标本中应有准确的标签或条形码,包括至少 2 个标识的患者身份信息,以避免标本混乱和污染。对于机构外的运送,则必须按照生物安全的需要,使用三重包装系统的生物安全运送箱;一重包装与医院内部运送相似,所有标本必须用双层容器包装;二重包装容器中应装有相关的信息表,如申请表格或三重包装容器中的信息表格;每重包装都需严格消毒,防止对外部环境及人员的污染。标本的容器与保存液、转运条件见表 1。

2.3 标本处理和核酸提取 标本应尽快检测,检测前建议 56 °C 45 min 灭活。若在 24 h 内检测,可置于 4 °C 保存;若 24 h 内无法检测,则置于-70 °C 或以下保存。SARS-CoV-2 RNA 的提取应根据实验室条件、试剂盒说明书要求,采用适当的人工或自动核酸提取方法,主要的核酸提取方法有磁珠法、离心柱法和一步裂解释放法。从痰液、粪便、鼻咽拭子、口咽拭子或血液中提取核酸,应根据仪器或试剂盒制造商的说明书进行。RNA 标本应储存在-70 °C 或更低的温度中。

2.4 SARS-CoV-2 的分子检测及结果判读 建议使用 RT-qPCR 对 SARS-CoV-2 的 RNA 进行分子检测。推荐选用 SARS-CoV-2 的开放读码框 1ab (ORF1ab)、核壳蛋白(N)及包膜蛋白(E)基因作为检测靶标,并提供阳性对照和内标。实验室确认阳性病例需满足以下 2 个条件中的 1 个^[1]:(1)同一份标本中 SARS-CoV-2 2 个靶标 (ORF1ab、N 或 E) RT-qPCR 检测结果均为阳性;如果出现单个靶标阳性的检测结果,则需要重新采样,重新检测;如果重新检测结果仍然为单个靶标阳性,则可判定为阳性。(2)2 种类型标本 RT-qPCR 检测结果同时出现单个靶标阳性或同种类型标本 2 次采样检测中均出现单个靶标阳性的结果,可判定为阳性。

结果判读的第一步是验证内控。内控阴性表明扩增过程失败,可能是由于存在 PCR 抑制剂或其他原因。在这种情况下,为了消除抑制作用,需要对处理后的同一标本进行重新检测,包括重新提取或稀释提取的核酸。在疑似病例中获得不确定的结果时,应立即向医院的感染控制部门报告。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,包括标本质量差,标本采集得过早或过晚,没有正确的保存、运输和处理标本,技术本身存在的原因,如病毒变异、PCR 抑制等。若有明确接触史的病例出现多次阴性结果,且不应排除 SARS-CoV-2 感染时,应通过采集其他部位的标本(特别是下呼吸道标本)来进一步检测;也可将标本送至其他有资质的单位进行检测确认^[6]。以靶标 ORF1ab、N 为例, SARS-CoV-2 核酸检测结果判读流程见图 1。

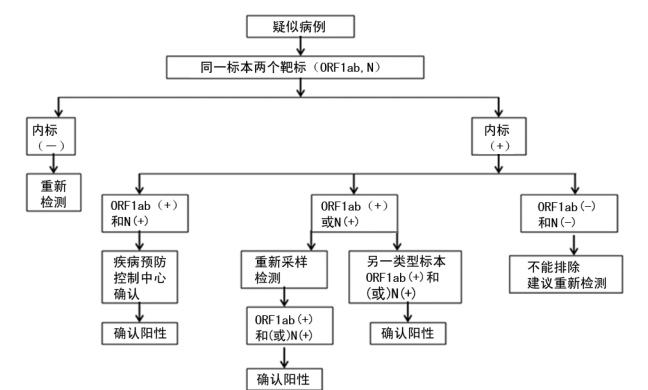


图 1 SARS-CoV-2 核酸检测结果判读流程图

3 实验室生物安全

对于疑似、确诊或可能病例的临床标本,诊断工作和 RT-qPCR 检测应在具有 BSL-2 设施的临床实验室进行。按照《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》要求,应穿戴适当的个人防护装备,所有技术程序都应在现有认证的 II 类生物安全柜中进行,尽量减少气溶胶和液滴的形成^[1]。完成检测工作后,用 75%的乙醇消毒工作空间,去除所有个人防护用品。在离开实验室之前,无论何时摘除个人防护用品,手卫生都是必要的。根据医疗废物的立法规定,所有的医疗废物和剩余标本都应该被丢弃,但是对于经 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 呈阳性的临床标本,应该在灭菌后丢弃。具有潜在传染性的操作,其稀释或分离等处理程序应在生物安全柜内进行^[6]。此外,为了防止检测过程中的污染,为实验室工作人员提供一个安全的环境,应考虑包括实验室布局、检测流程和生物安全设施等问题。

综上所述,COVID-19 流行期间实验室分子诊断对于疾病确诊和密切接触者的排查显得尤为重要。各临床实验室应积极制订应对措施以预防和控制 COVID-19 及其他新发传染病引起的公共卫生事件,进一步提升实验室分子诊断的能力建设与生物安全。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版)的通知(国卫办疾控函[2020]156 号)[EB/OL]. (2020-02-21)[2020-03-06]. http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202002/a5d6f7b8c48c451c87_dba14889_b30147_shtml. (下转第 1417 页)

- [5] 丁海涛,唐学章,贾云芳,等.冲击波联合推拿治疗肩周炎的临床疗效观察[J].中国康复医学杂志,2013,28(5):468-470.
- [6] 周宁,邵彬,陈勇,等.冲击波治疗肩周炎的单盲研究[J].中国康复医学杂志,2009,24(6):537-539.
- [7] 林孙枝,周建英,黄志雄,等.发散式冲击波疗法对肩周炎的疗效观察[J].齐齐哈尔医学院学报,2016,37(21):2656-2657.
- [8] 陈庆梅,杨卫新.放散状体外冲击波治疗肩周炎的作用[J].中国康复,2012,27(1):29-30.
- [9] 许亮,李雪萍,高明霞.体外冲击波联合关节松动术对肩周炎的治疗效果研究[J].临床和实验医学杂志,2016,15(16):1574-1577.
- [10] 高昆,朱喜春,岳立辉,等.体外冲击波配合功能锻炼治疗肩周炎的疗效观察[J].中国骨伤,2013,26(5):401-403.
- [11] 黄军,彭怡,唐荣.体外冲击波配合关节松动术治疗肩周炎的临床疗效观察[J].西南军医,2014,16(6):635-636.
- [12] 刘源吉.体外冲击波配合推拿治疗肩周炎 42 例[J].中国中医药现代远程教育,2017,15(18):116-118.
- [13] 王刚,张德清,何建永,等.体外冲击波治疗肩关节周围炎疗效观察[J].中国疼痛医学杂志,2010,16(6):364-365.
- [14] 刘志刚,熊敏,何宁,等.体外冲击波治疗肩周炎[J].郧阳医学院学报,2009,28(2):163-164.
- [15] 徐钢,朱永,赵燕邦.体外冲击波治疗肩周炎的效果观察[J].中国当代医药,2016,23(16):77-79.
- [16] 黄泰源.体外冲击波治疗肩周炎的应用效果及优越性分析[J].航空航天医学杂志,2017,28(5):543-544.
- [17] 杨健,廖仲波,周锐钧,等.体外冲击波治疗肩周炎患者疼痛的效果观察[J].中外医学研究,2017,15(2):22-23.
- [18] 蔡振宇,林山.体外冲击波治疗肩周炎临床效果观察[J].中国骨科临床与基础研究杂志,2015,7(3):157-161.
- [19] 徐鹏,陈小英,王伟琪,等.体外冲击波治疗老年性肩周炎和跟痛症[J].中国老年学杂志,2008,28(16):1625-1627.
- [20] HSU C J, WANG D Y, TSENG K F, et al. Extracorporeal shock wave therapy for calcifying tendinitis of the shoulder[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2008, 17(1):55-59.
- [21] CHEN C Y, HU C C, WENG P W, et al. Extracorporeal shock wave therapy improves short-term functional outcomes of shoulder adhesive capsulitis[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2014, 23(12):1843-1851.
- [22] VAHDATPOUR B, TAHERI P, ZADE A Z, et al. Efficacy of extracorporeal shock wave therapy in frozen shoulder[J]. Int J Prev Med, 2014, 5(7):875-881.
- [23] LEE S, JEONG M, OH H, et al. The effects of extracorporeal shock wave therapy on pain and range of motion in patients with adhesive capsulitis[J]. J Phys Ther Sci, 2017, 29(11):1907-1909.
- [24] PARK C, LEE S, YI C W, et al. The effects of extracorporeal shock wave therapy on frozen shoulder patients' pain and functions[J]. J Phys Ther Sci, 2015, 27(12):3659-3661.
- [25] 张盘德,彭小文,容小川,等.体外冲击波治疗肩周炎治疗次数与镇痛效果的关系研究[J].中国运动医学杂志,2014,33(6):519-523.
- [26] DAECKE W, KUSNIERCZAK D, LOEW M. Long-term effects of extracorporeal shock wave therapy in chronic calcific tendinitis of the shoulder[J]. J Shoulder Elbow Surg, 2002, 11(5):476-480.
- [27] 邢更彦,张鹏礼,史展,等.体外冲击波疗法联合踝关节镜治疗距骨骨软骨损伤[J].中国矫形外科杂志,2011,19(12):978-981.
- [28] 李敏,杨孝,唐瑞玲,等.体外冲击波治疗肩周炎的临床研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(14):87-88.

(收稿日期:2019-11-09 修回日期:2020-03-11)

(上接第 1411 页)

- [2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知(国卫办医函[2020]184号)[EB/OL].(2020-03-04)[2020-03-06].<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [3] 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,(2020-03-04)[2020-03-06].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200304.1041.006.html>.
- [4] KI C S, LEE H L, SUNG H, et al. Korean society for laboratory medicine practice guidelines for the molecular diagnosis of middle east respiratory syndrome during an outbreak in Korea in 2015[J]. Ann Lab Med, 2016, 36(3):203-208.
- [5] YANG Y, YANG M G, SHEN C G, et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections[EB/OL].(2020-02-17)[2020-03-06].<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.02.11.20021493v1>.
- [6] 钟慧钰,赵珍珍,宋兴勃,等.新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J].国际检验医学杂志,2020,41(5):523-526.

(收稿日期:2020-03-07 修回日期:2020-04-09)