

# 2019 冠状病毒病(COVID-19)实验室诊断方法的应用现状

杨 杰<sup>1</sup>, 曾凡胜<sup>1</sup>, 秦志强<sup>1,2\*</sup>

(1. 益阳医学高等专科学校 益阳市洞庭湖区血吸虫与病原生物控制技术重点实验室, 中国湖南 益阳 413002; 2. 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所 世界卫生组织热带病合作中心 科技部国家级热带病国际联合研究中心 国家卫生健康委寄生虫病原与媒介生物学重点实验室 国家热带病研究中心, 中国上海 200025)

**摘 要:** 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)系通过分析鉴定 2019 年武汉不明原因的肺炎病例而被发现。世界卫生组织将该新型冠状病毒感染的肺炎命名为 2019 冠状病毒病(corona virus disease 2019, COVID-19)。COVID-19 的实验室诊断方法主要有基于病毒核酸的病原学检查、通过特异性抗体检测的血清学检测以及一般检查。目前, 实时逆转录 PCR 是 COVID-19 确诊的金标准, 但该方法存在漏检和假阴性的问题, 因此, 为了更有效防控 COVID-19, 有必要发展高质量、高敏感的诊断方法。本文综述了 COVID-19 实验室诊断方法的应用现状及最新进展, 以期快速准确诊断 COVID-19 提供参考。

**关键词:** 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2); 肺炎; 2019 冠状病毒病(COVID-19); 实时逆转录PCR; 特异性抗体检测; 白细胞介素 -6 (IL-6)

中图分类号: Q93-332, R373

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2020)02-0087-08

## Situation of Laboratory Diagnosis for COVID-19

YANG Jie<sup>1</sup>, ZENG Fan-sheng<sup>1</sup>, QIN Zhi-qiang<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Control Technique for Schistosoma and Pathogen Infection for Dongting Lake Region, Yiyang Medical College, Yiyang 413002, Hunan, China; 2. National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention; WHO Collaborating Centre for Tropical Diseases; National Center for International Research on Tropical Diseases, Ministry of Science and Technology; Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, National Health and Family Planning Commission, Shanghai 200025, China)

**Abstract:** Since December 2019, a series of unexplained pneumonia cases have been reported in Wuhan, China. Subsequent investigations identified a novel coronavirus, and WHO officially named the disease as corona virus disease 2019 (COVID-19). Up to now, the detection methods for COVID-19 include nucleic acid based diagnostic methods, antibody based serological diagnosis, and peripheral blood examination. At present, quantitative real-time RT-PCR (RT-qPCR) is recommended as the gold standard for diagnosis of COVID-19. However, RT-qPCR has problems such as missed detection and false negative results. Therefore, it is critical to develop a high-quality and high-precision diagnostic procedure for control and prevention of COVID-19. Here, the latest advances and application of laboratory diagnostic methods of COVID-19 were reviewed, which would provide a reference for rapid and accurate diagnosis of COVID-19.

**Key words:** severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2); pneumonia; corona virus disease 2019 (COVID-19); quantitative real-time RT-PCR; specific antibody test; interleukin-6 (IL-6)

(Life Science Research, 2020, 24(2): 087~094)

收稿日期: 2020-03-23; 修回日期: 2020-04-09

基金项目: 益阳市科技局创新平台与人才计划

作者简介: 杨杰(1987—), 男, 湖南桃江人, 硕士, 讲师, 主要从事病原微生物的分子诊断研究; \* 通信作者: 秦志强(1972—), 男, 湖南益阳人, 博士, 中国疾病预防控制中心研究员, 主要从事感染免疫学与分子诊断研究, E-mail: qinzq@nipd.chinaacdc.cn.

自2019年12月起,湖北省武汉市出现多起不明原因病毒性肺炎病例。2020年1月,多位研究人员通过分离病原体并开展基因组序列测定,发现了一种能感染人的新型冠状病毒<sup>[1-2]</sup>。2020年2月11日,国际病毒分类委员会正式将该新型冠状病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2),世界卫生组织将该病毒引起的疾病称为2019冠状病毒病(corona virus disease 2019, COVID-19)。COVID-19传染性很强,短时间内就由武汉传播至周边地区并很快蔓延到全国。根据国家卫生健康委员会官方网站发布的疫情数据,截至2020年4月19日,我国累计报告确诊病例82 747例,累计死亡病例4 632例,累计治愈出院病例77 084例,多省病例数持续清零,表明中国疫情控制取得了阶段性胜利<sup>[3]</sup>。然而,全球多国已发生新型冠状病毒肺炎疫情,鉴于全球COVID-19病例的持续增多<sup>[4-7]</sup>,2020年3月11日,世界卫生组织宣布2019冠状病毒病疫情已构成全球大流行。截至2020年4月19日,全球COVID-19确诊病例累计逾224万例,累计死亡病例超过15万例<sup>[8]</sup>。当前,国家卫生健康委员会已经推出了第七版新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案,旨在为现阶段临床救治COVID-19患者提供规范化的操作指南<sup>[9]</sup>。实验室检测是诊断COVID-19的重要手段,现阶段COVID-19实验室检测方法包括病原学方法、血清学检查以及一般检查。

## 1 病原学方法

目前,病原学方法主要是基于SARS-CoV-2核酸检测的方法,包括基因组测序与实时逆转录PCR等。

### 1.1 基因组测序

在2019年12月中国武汉市发现多例未知病毒感染性肺炎病例后,Lu等<sup>[10]</sup>对来自9名住院患者的支气管肺泡灌洗液和病毒分离培养样品进行了基因组测序,分别获得了完整的或部分的SARS-CoV-2基因组序列。通过分析发现SARS-CoV-2与2018年在中国东部舟山采集的两种蝙蝠源性SARS样冠状病毒bat-SL-CoVZC45和bat-SL-CoVZXC21的同源性达88%,而与SARS-CoV(约79%)及中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)(约50%)的同源性相差较远。基因组测序为疫情

传播早期武汉不明原因的病毒性肺炎病例的病原体鉴定提供了有力保证,为后续诊断试剂的研发以及临床救治工作的开展提供了宝贵的参考。为维护全球公共卫生安全,中国已与世界卫生组织分享在武汉发生的新型冠状病毒的基因组序列信息,目前SARS-CoV-2序列已共享至中国科学院新型冠状病毒肺炎科研文献共享平台(中英文版)、新型冠状病毒国家科技资源服务系统、病毒基因组自动化鉴定云平台(VCI)等数个公共医学信息平台。虽然基因组测序诊断COVID-19的准确度高,但因测序所需仪器昂贵,所需时间较长,因此不适用于临床快速、大批量的诊断。

### 1.2 实时逆转录PCR

实时逆转录PCR(quantitative real-time RT-PCR, RT-qPCR)在检测SARS-CoV-2感染方面具有特异性强、准确度较高等特点,并可检测出多数无相关临床症状的无症状感染者<sup>[11-14]</sup>,现已被推荐为SARS-CoV-2感染确诊的金标准。RT-qPCR的检测原理一种是借助嵌入式染料(如SYBR Green)与PCR过程中产生的DNA结合,实现对PCR产物的实时检测;另一种则通过荧光标记探针进行实时检测。研究结果显示,SARS-CoV-2感染者痰液、咽拭子、血液、粪便标本中核酸扩增实验的阳性率不同。通过RT-qPCR实验比较SARS-CoV-2感染者的痰液、粪便、血液样品发现,痰液样品的阳性率最高<sup>[15-16]</sup>。而Xie等<sup>[17]</sup>使用3种不同的RT-qPCR试剂盒比较了口咽拭子和粪便样品中SARS-CoV-2核酸扩增测试的阳性比率,发现在19例患者中,9例经口咽拭子样本检测为SARS-CoV-2感染,8例粪便样本检测呈病毒核酸阳性,粪便和口咽拭子检测的阳性率相近。通常,血液中阳性检出率较低,仅10%的急性期患者血液样本中可检测到病毒核酸<sup>[16]</sup>。上述统计数据表明,现有RT-qPCR检测方法可能存在漏检的问题。基于此,Chan等<sup>[18]</sup>开发了一种新的核酸检测方法——COVID-19-RdRp/Hel检测法,是针对SARS-CoV-2的RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)/解旋酶(Hel)、刺突(S)和核衣壳(N)基因的RT-qPCR方法,与在超过30个欧洲实验室中使用的RdRp-P2测定法相比,阳性率提高了15.4%( $P<0.001$ )。不断改进的RT-qPCR方法为SARS-CoV-2感染的确诊提供了更加准确的检测手段。

此外,患者不同标本的RT-qPCR检测可以辅助分析病毒感染的进程。Chen等<sup>[19]</sup>通过RT-

qPCR 检测已确诊病人血液和肛门拭子中的病毒存在情况,发现 6 例(6/57)血液标本中可检测到病毒 RNA 的患者均已发展为重型 COVID-19,表明血清病毒 RNA 与疾病严重程度密切相关;11 例(11/28)肛门拭子病毒阳性患者中有 8 例处于重型临床阶段;同时,患者肛门拭子中的病毒 RNA 浓度高于血液,这表明该病毒可能在消化道中复制。Ling 等<sup>[20]</sup>发现与患者口咽拭子相比,患者粪便中病毒 RNA 的清除速度较慢,中位延迟数为 2.0 (1.0~4.0) d。因此,在恢复期患者的粪便中监测病毒 RNA 非常重要。

综上所述可知,患者不同标本的 RT-qPCR 检测对 SARS-CoV-2 感染诊断及分析病毒感染进程具有重要作用,且 RT-qPCR 临床检测普及率较高,目前仍是 SARS-CoV-2 感染确诊不可替代的金标准。

### 1.3 巢式 RT-PCR

巢式 RT-PCR (nested RT-PCR)是利用两套 PCR 引物(巢式引物)进行两轮 PCR 扩增反应,其敏感性及准确性与 RT-qPCR 相似<sup>[21-23]</sup>。巢式 RT-PCR 广泛应用于多种呼吸道病毒的临床检测。Wu 等<sup>[24]</sup>利用巢式 RT-PCR 方法对 30 例 SARS 患者和 9 例对照患者的全血标本进行了 SARS-CoV 检测,发现巢式 RT-PCR 检测 SARS-CoV 的特异性和敏感性分别为 100%和 83%。Yu 等<sup>[25]</sup>开发的巢式 RT-PCR 方法可同时鉴定包括人鼻病毒(human rhinovirus, HRV)在内的 12 种呼吸道病毒。2020 年,Shirato 等<sup>[26]</sup>开发了两种巢式 RT-PCR 分析方法和两种 RT-qPCR 方法,并将它们一起用于 SARS-CoV-2 感染者检测。截至 2020 年 2 月 8 日,该套方法已成功检测出日本 25 例阳性感染病例。巢式 RT-PCR 可作为 RT-qPCR 方法的补充,以提高 COVID-19 临床检测的准确性。

### 1.4 生物芯片检测

恒温扩增芯片法是在恒温(65 °C)条件下利用具有链置换功能的聚合酶进行反应,使用荧光染料掺入法进行实时荧光检测,阳性样品在分析仪中会产生和实时荧光类似的 S 形扩增曲线。目前,人们已开发多种基于智能手机平台的恒温扩增检测法,使用简便,具有较高的实用性<sup>[27-28]</sup>。康蓓佩等<sup>[29]</sup>利用恒温扩增芯片法检测了常见的 13 种下呼吸道病原体,与普通培养法相比,该方法的检出率较高;而且,检测时间缩短为 2~2.5 h,具备快速诊断的能力。据报道,程京团队开发的“六项

呼吸道病毒核酸检测试剂盒(恒温扩增芯片法)”,能在 1.5 h 内检测包括 SARS-CoV-2 在内的 6 项呼吸道病毒核酸,并可快速区分 COVID-19 和其他呼吸道疾病<sup>[30]</sup>;朗道实验室利用生物芯片阵列技术(Biochip Array Technology)新开发了可针对 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV、MERS-CoV 等其他 9 种呼吸道病毒的综合检测技术<sup>[31]</sup>。总之,多种高敏感性生物芯片检测技术的开发为 COVID-19 确诊提供了可靠快捷的筛查方法。但是生物芯片检测技术难度和设备要求较高,目前普及率也不高,因此不适用于临床大批量的诊断。

### 1.5 逆转录环介导等温扩增法

当前,中国防控 COVID-19 的重点已由控制境内病例转向防控境外输入。境外输入人员的病毒检测工作量较大,时间要求紧,因此防控境外输入需要开发一种可以在现场快速完成筛查的诊断试剂。逆转录环介导等温扩增法(reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP)是在 63 °C 等温条件下,一步进行 RNA 逆转录和核酸扩增的方法。Yang 等<sup>[32]</sup>在预印本平台 medRxiv 发表文章指出,其团队开发的 RT-LAMP 法可同时检测 SARS-CoV-2 的 ORF1ab 基因、E 基因和 N 基因,且测定的灵敏度与 RT-qPCR 相似,所检测的 208 个临床标本的特异性为 99%。RT-LAMP 法的优点在于不需要昂贵的设备,可在 30 min 内快速获得结果。所以,RT-LAMP 法具有协助进行入境口岸潜在感染者筛查工作的潜力。

### 1.6 逆转录数字 PCR

我国 COVID-19 确诊病例已逐步减少,现阶段 COVID-19 无症状感染者是否会引起疫情反弹的问题备受关注。COVID-19 无症状感染者的定义为无临床症状,呼吸道等标本 SARS-CoV-2 病原学检测阳性者<sup>[9]</sup>。据统计,COVID-19 无症状感染者从医学观察开始至 SARS-CoV-2 核酸检测阳性的时间为 1~18 d,平均 6.0 d,核酸检测存在“窗口期”,且需要多次采样检测<sup>[33]</sup>。如果能通过敏感性更高的检测方法缩短 COVID-19 无症状感染者病毒核酸检出阳性的时间,做到“早发现、早诊断、早治疗”,对疫情防控工作将具有重要意义。逆转录数字 PCR (reverse transcription digital PCR, RT-dPCR)是基于单分子 PCR 方法来进行计数的核酸定量,可直接计数出 DNA 分子的个数,是灵敏度极高的绝对定量方法。Dong 等<sup>[34]</sup>在 medRxiv 发文指出,对于 103 例发热疑似病例,SARS-CoV-2

检测的敏感性从 RT-qPCR 的 28.2% 提升到 RT-dPCR 的 87.4%; RT-dPCR 的总体敏感性、特异性和诊断准确性分别为 90%、100% 和 93%; 而且, RT-dPCR 检测极灵敏, 检测限仅为 2 个拷贝/反应。由此可知, RT-dPCR 适用于低病毒载量的无症状感染者标本检测。

## 2 血清学检查

### 2.1 特异性 IgM、IgG 抗体检测

随着核酸检测漏检问题的发现, 临床迫切需要可以弥补核酸漏检的其他检测方法。SARS-CoV-2 感染后机体会产生特异性抗体。IgM 是机体初次免疫应答最早产生的抗体, 随后机体产生 IgG 抗体。有研究指出 COVID-19 症状发作 5.5 d 后, IgM 酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)的检测效率高于 RT-qPCR 方法。将 IgM ELISA 检测与 RT-qPCR 结合使用时, 每位患者的阳性检出率提高至 98.6%, 显著高于单次 RT-qPCR 检测的检出率 51.9%<sup>[35]</sup>。由于 COVID-19 发作 10 d 后患者血清 IgM 的阳性率明显增加<sup>[36]</sup>, 所以 IgM ELISA 适用于 COVID-19 发作 10 d 后患者血清样品的检测。白少丽等<sup>[37]</sup>的调查显示, 在聚集性发病的 7 例 COVID-19 患者中, 特异性 IgM 抗体阳性者占 5 例; 而且在该聚集性发病群体中, 有 4 例患者无症状, 但核酸检测结果和 IgM 抗体检测结果均为阳性。该结果表明特异性 IgM 抗体筛查对于早期发现和早期隔离无症状感染者也非常重要。但是, IgM 抗体筛查同样存在检测结果假阴性、敏感度不够高的问题。Li 等<sup>[38]</sup>开发了一种快速简单的即时侧向流动免疫测定法, 该方法可以在 15 min 内同时检测人血中针对 SARS-CoV-2 病毒的 IgM 和 IgG 抗体, 从而可以检测出处于不同感染阶段的患者。使用 397 个 RT-qPCR 确诊的 COVID-19 患者和 128 个 SARS-CoV-2 阴性的对照个体的血液样本来测量该方法的临床检测灵敏度和特异性, 结果显示总体测试的灵敏度为 88.66%, 特异性为 90.63%。此外, 研究者评估了从不同类型的静脉和指尖血液样本获得的临床诊断结果, 发现在指尖血液、血清和静脉血血浆各样品之间具有很高的 IgM 和 IgG 抗体检测一致性。总的来讲, 与单次 IgM 或 IgG 测试相比, IgM-IgG 联合检测具有更好的实用性和敏感性。它可以用于医院、诊所和测试实验室中有症状或无症状 SARS-CoV-2 携带者的快速筛查。

### 2.2 白细胞介素-6 检测

经临床初步观察, COVID-19 重症患者存在白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和  $\gamma$ -干扰素 (interferon gamma, IFN- $\gamma$ ) 等促炎性细胞因子的显著升高, 表现出细胞因子风暴的特征<sup>[39]</sup>。IL-6 是免疫系统在应对损伤和感染的最初反应中所表达的重要细胞因子, 在急性炎症反应中 IL-6 处于核心地位, IL-6 的升高处于细胞因子启动的非常早期, 而且持续时间长, 因此可用来辅助急性感染的早期诊断。Huang 等<sup>[40]</sup>系统阐述了 COVID-19 的临床特点, 通过对患者外周血的多因子检测分析发现重症监护病房(intensive care unit, ICU)患者的 IL-6 水平显著高于对照组。Zhou 等<sup>[41]</sup>发现新型冠状病毒感染后, 迅速激活抗原性 T 细胞, 产生粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)和 IL-6 等细胞因子。GM-CSF 会进一步激活 CD14<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup> 炎症性单核细胞, 产生更大量的 IL-6 和其他细胞因子, 从而形成细胞因子风暴, 导致肺部和其他器官的免疫损伤。上述结果证明 IL-6 是引发 COVID-19 患者炎症风暴的关键因子。因此, IL-6 具有成为细胞因子风暴中预警、监测和预后的生物标志物的潜力。在国家卫生健康委员会办公厅和国家中医药管理局办公室 2020 年 2 月 14 日联合发布的“关于印发新型冠状病毒肺炎重型、危重型病例诊疗方案(试行第二版)的通知”中, 已经明确将 IL-6 进行性上升作为病情恶化的临床警示指标, 需对重症患者及时监控。

## 3 一般检查

外周血一般检查是医院常规的检测项目, 通过监测生化指标变化辅助早期诊断疾病以及判断预后。多项研究观察了 COVID-19 患者存在的生化指标变化。通过对研究结果的总结发现, 多数患者外周血中的淋巴细胞计数减少, 白细胞总数正常或减少, 部分患者可出现嗜酸性粒细胞和 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞减少<sup>[42-43]</sup>, 提示嗜酸性粒细胞减少症和淋巴细胞减少可能是 COVID-19 诊断的潜在指标。此外, 多数重症患者 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和血清乳酸脱氢酶(serum lactate dehydrogenase, LDH)显著升高; 部分重症患者白蛋白(albumin, ALB)降低, 降钙素原正常<sup>[44-45]</sup>, 提示 ALB 降低和 CRP、LDH 升高可能是 COVID-19 严重程

度的预测指标。需要指出的是,一般检查项目的特异性不高,只能作为 COVID-19 辅助诊断或判断预后的参考指标,不能单独用于确诊。

自疫情发生以来,各种实验室诊断方法已快速发展并在临床诊断得以应用,现有的关于 COVID-19 的实验室诊断方法的优点和缺点的总结见表 1。

#### 4 讨论

快速、准确诊断对于 COVID-19 的精准治疗非常关键。当前,批准上市的新型冠状病毒肺炎检测试剂主要包括两类,一类是核酸检测试剂,一类是抗体检测试剂。核酸检测是 COVID-19 临床诊断主要的检测手段,其平均检测时间为 2~3 h,特异性强、灵敏度较高。但是当前广泛应用的核酸检测方法存在一定缺陷。1) 漏检问题。相关报道指出,通过鼻咽拭子筛查出新型冠状病毒阳性的患者中有 35%在第 1 天通过口咽拭子检测的结果为阴性,导致在低度感染者的咽拭子中难以查见病原体,从而影响确诊<sup>[46]</sup>; 2) 文献报道 14%的两次核酸检测阴性出院患者出现“复阳”的现象,给 COVID-19 的防治带来新的问题<sup>[47]</sup>。上述核酸检测漏检或者出院后“复阳”现象的原因可能与样本采集、病毒在人体排毒时期、试剂质量以及实验者操作等因素相关。血清抗体检测能从另一个维度来反映病毒感染的情况,是对病毒核酸检测的有效补充。血清特异性 IgM 和 IgG 阳性,或恢复期特异性 IgG 抗体滴度较急性期升高 4 倍及以上,可作为核酸检测阴性疑似病例的诊断依据<sup>[9]</sup>。但是,抗体检测存在窗口期,相对核酸检测要滞后几天到几周,而且有些体液免疫功能偏弱的患者体内产生的抗体含量较低,容易造成抗体检测假阴性,因此抗体检测不能完全替代核酸检测方法。

针对目前临床的核酸诊断所出现的问题,建议从以下几方面予以加强:一是加强联合方法的应用,比如出院时增加特异性抗体指标的测定。多项研究表明,血清学抗体检测与核酸检查同时使用可以提高 SARS-CoV-2 检测阳性率<sup>[48-49]</sup>。而且,结合抗体和核酸检测可以帮助分析病毒感染的进程。例如:检测出 SARS-CoV-2 特异性 IgM 抗体且核酸检测阳性,提示是早期感染;如果 IgG 抗体含量较高且核酸阴性,表明存在感染并已获得一定的免疫保护;二是为了弥补采集鼻咽拭子和口咽拭子引起受试者恶心、咳嗽等不适感的不足,建议开辟 SARS-CoV-2 感染诊断的新途径。相关文献报道,COVID-19 病人粪便样本中的 SARS-CoV-2 核酸检测同样较准确<sup>[50]</sup>,有的患者虽然 14 次口咽拭子和鼻咽拭子的核酸检测呈阴性,但最后粪便拭子的检测结果却是阳性<sup>[51]</sup>。尿液是一种方便快捷的取样方式,但目前尿液中病毒核酸检出率较低,仅 6.9%<sup>[20]</sup>。罗格斯大学旗下 RUCDR Infinite Biologics 开发了一种主要通过唾液检测 SARS-CoV-2 的新型检测方法。通过采集 60 名 COVID-19 患者的唾液和拭子样本来测试该方法的准确性,发现病人唾液样本的检测方法与拭子的结果 100%吻合<sup>[52]</sup>。基于粪便、唾液和尿液的取样途径简便、快速且无创,若能进一步提高其检出率,则可弥补现有的取样方法的不足;三是继续开发新的 SARS-CoV-2 检测技术。有研究组运用高分辨率质谱设备取得了 COVID-19 轻重症患者血清样本的蛋白质组和代谢组谱图,发现了一系列生物标志物,这有望为预测轻症患者向重症发展提供导向<sup>[53]</sup>。Broughton 等<sup>[54]</sup>开发了一种基于 CRISPR-Cas12 的侧向流动检测技术,该检测技术可快速(<40 min)从呼吸道拭子的 RNA 提取物中检测 SARS-CoV-2。使用 36 例 COVID-19 患者

表 1 COVID-19 实验室诊断方法  
Table 1 Laboratory diagnosis for COVID-19

检测方法 Detection method	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
基因测序技术	准确度高,能鉴定未知病原体	不适用于快速、大批量诊断
实时逆转录 PCR	特异性强,准确度高,诊断金标准	确诊结果有漏检或假阴性
巢式 RT-PCR	可作为 RT-qPCR 的补充,以提高准确度	检测效率较低,普及率低
生物芯片技术	可批量检测多种呼吸道病原体	技术难度和设备要求较高
逆转录环介导等温扩增法	操作简单,可用于现场快速筛查	确诊结果易出现假阳性
逆转录数字 PCR	准确度高,灵敏度高,适用于低病毒载量标本检测	成本较高,不适用于快速、大批量诊断
白细胞介素-6 检测	灵敏度高,病情恶化的临床警示指标	用于辅助诊断,不能确诊
IgM-IgG 联合检测	简单快速,可大样本筛查	存在检测窗口期,不能确诊
一般检查	常规检测项目,自动化分析	用于辅助诊断,仅有参考意义

和 42 例其他呼吸道病毒感染的患者对该方法进行验证,发现阳性预测率达 95%,阴性预测率达 100%。基于 CRISPR 的 DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted Crispr Trans Reporter)测定法为 RT-qPCR 法提供了直观、快速的替代方法;四是需要加强临床诊断检测试剂的标化问题。迄今为止,国家药品监督管理局已应急审批通过了 23 款新型冠状病毒检测试剂盒,其中 15 款属于新型冠状病毒核酸检测试剂,8 款属于胶体金法抗体检测试剂。但这些试剂质量依然存在批间差异和不够稳定的问题,郭元元等<sup>[55]</sup>选取了 6 种核酸检测试剂对 COVID-19 弱阳性样品进行检测,发现部分试剂的准确性、灵敏度、重复性欠佳。因此,建议国家有关部门尽快开展 COVID-19 诊断试剂的质量评价,可通过制备参考物质(如核酸、血清)开展实验室间比对,遴选出公认的优良的检测试剂,进而推广应用。

如前所述,虽然我国在 COVID-19 疫情防控方面取得了阶段性成效,但是随着 COVID-19 疫情在全球的不断扩散,我国输入病例明显增多,目前我国疫情防范仍处于紧张态势。现阶段我们仍需要精准防控,精准防控的关键是需要精准诊断。我们期待将来的检测产品较之前检测产品在检测时间上有明显的缩短,检测的结果也更为精准、客观,为 COVID-19 的临床诊治以及大规模的人群流行病学调查提供更为适宜的诊断工具。

#### 参考文献(References):

- [1] ZHU N, ZHANG D, WANG W, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(8): 727-733.
- [2] 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]. *Science China-Life Sciences*, 2020, 63(3): 457-460.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 截至 4 月 19 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. [2020-04-20]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202004/fceb99a885cd436980656f29-2a1c7282.shtml>.
- [4] BERNARD STOECKLIN S, ROLLAND P, SILUE Y, *et al.* First cases of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in France: surveillance, investigations and control measures[J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(6): 2000094.
- [5] PARK W B, KWON N J, CHOI S J, *et al.* Virus isolation from the first patient with COVID-19 in Korea[J]. *Journal of Korean Medical Science*, 2020, 35(7): e84.
- [6] DAY M. Covid-19: surge in cases in Italy and South Korea makes pandemic look more likely[J]. *British Medical Journal*, 2020, 368: m751.
- [7] GILBERT M, PULLANO G, PINOTTI F, *et al.* Preparedness and vulnerability of African countries against importations of COVID-19: a modelling study[J]. *Lancet*, 2020, 395(10227): 871-877.
- [8] World Health Organization. Situation report -90 coronavirus disease 2019 (COVID-19) [EB/OL]. [2020-04-20]. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/2020-0419-sitrep-90-covid-19.pdf?sfvrsn=551d47fd\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/2020-0419-sitrep-90-covid-19.pdf?sfvrsn=551d47fd_2).
- [9] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)[J]. *全科医学临床与教育(National Health Commission, National Administration of Traditional Chinese Medicine. A new diagnosis and treatment plan of pneumonia caused by SARS-CoV-2 (trial version 7)[J]. Clinical Education of General Practice*, 2020, 18(2): 100-105.
- [10] 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.
- [11] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3): 2000045.
- [12] 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]. *Clinical Chemistry*, 2020, 66(4): 549-555.
- [13] TIAN S, HU N, LOU J, *et al.* Characteristics of COVID-19 infection in Beijing[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2020, 80(4): 401-406.
- [14] ARASHIRO T, FURUKAWA K, NAKAMURA A. COVID-19 in 2 persons with mild upper respiratory symptoms on a cruise ship, Japan[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2020, 26(6): 10.
- [15] TO K K, TSANG O T, YIP C C, *et al.* Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2020, ciaa149. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>.
- [16] 徐凯进, 蔡洪流, 沈毅弘, 等. 2019 冠状病毒病 (COVID-19) 诊疗浙江经验[J/OL]. *浙江大学学报(医学版)* (XU Kai-jin, CAI Hong-liu, SHEN Yi-hong, *et al.* Management of coronavirus disease-19 (COVID-19): the Zhejiang experience[J/OL]. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*), 2020, 49(1). DOI: 10.3785/j.issn.1008-9292.2020.02.02.
- [17] XIE C, JIANG L, HUANG G, *et al.* Comparison of different samples for 2019 novel coronavirus detection by nucleic acid amplification tests[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2020, 93: 264-267.
- [18] CHAN J F, YIP C C, TO K K, *et al.* Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/HeI real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay validated *in vitro* and with clinical specimens[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020. DOI: 10.1128/JCM.00310-20.
- [19] CHEN W, LAN Y, YUAN X, *et al.* Detectable 2019-nCoV viral RNA in blood is a strong indicator for the further clinical severity[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 469-473.

- [20] LING Y, XU S B, LIN Y X, *et al.* Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients[J]. Chinese Medical Journal (English), 2020, 133. DOI: 10.1097/CM9.0000000000000774.
- [21] FERONATO C, LEME R A, DINIZ J A, *et al.* Development and evaluation of a nested-PCR assay for *Senecavirus A* diagnosis[J]. Tropical Animal Health and Production, 2018, 50(2): 337-344.
- [22] PICHON M, LABOIS C, TARDY-GUIDOLLET V, *et al.* Optimized nested PCR enhances biological diagnosis and phylogenetic analysis of human parvovirus B19 infections[J]. Archives of Virology, 2019, 164(11): 2775-2781.
- [23] NUNES B T D, DE MENDONÇA M H R, DE BRITO SIMITH D, *et al.* Development of RT-qPCR and semi-nested RT-PCR assays for molecular diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2019, 13(12): e0007884.
- [24] WU Q, XU Z, WEI T, *et al.* Development of Taqman RT-nested PCR system for clinical SARS-CoV detection[J]. Journal of Virological Methods, 2004, 119(1): 17-23.
- [25] YU X, GHILDYAL R. Nested-RT-PCR and multiplex RT-PCR for diagnosis of rhinovirus infection in clinical samples[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1221: 11-24.
- [26] SHIRATO K, NAO N, KATANO H, *et al.* Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2020. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2020.061.
- [27] ULEP T H, DAY A S, SOSNOWSKI K, *et al.* Interfacial effect-based quantification of droplet isothermal nucleic acid amplification for bacterial infection[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 9629.
- [28] LIAO S C, PENG J, MAUK M G, *et al.* Smart cup: a minimally-instrumented, smartphone-based point-of-care molecular diagnostic device[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 229: 232-238.
- [29] 康蓓佩, 周磊, 付晓蕊, 等. 恒温扩增芯片法在下呼吸道病原体检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志(KANG Bei-pei, ZHOU Lei, FU Xiao-rui, *et al.* Clinical value of isothermal amplification chip method in the detection of pathogens of lower respiratory tract infection[J]. International Journal of Laboratory Medicine), 2018, 39(22): 2767-2770.
- [30] 博奥生物. 战“疫”利器问世! 博奥生物呼吸道常见多病毒[含新型冠状病毒(2019-nCoV)]检测芯片获国家药监局应急审批批准! [EB/OL]. [2020-04-20]. <http://cn.capitalbio.com/2020nyjd/27795.shtml>.
- [31] 朗道. 朗道 SARS-CoV-2 检测[EB/OL]. [2020-04-20]. <https://cn.randox.com/coronavirus-test-available-at-randox-laboratories/>.
- [32] YANG W, DANG X, WANG Q, *et al.* Rapid detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription RT-LAMP method[J/OL]. medRxiv, 2020.03.02.20030130. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.20030130>.
- [33] 李锦成, 徐勤, 王艳, 等. 江苏省扬州市新型冠状病毒肺炎无症状感染者的特征分析[J/OL]. 实用临床医药杂志(LI Jin-cheng, XU Qin, WANG Yan, *et al.* Analysis in characteristics of asymptomatic infection patients with coronavirus disease 2019 in Yangzhou City of Jiangsu Province[J/OL]. Journal of Clinical Medicine in Practice), 2020, 24(5). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1697.R.20200317.1546.006.html>.
- [34] DONG L, ZHOU J, NIU C, *et al.* Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR[J/OL]. medRxiv, 2020.03.14.20036129. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.20036129>.
- [35] GUO L, REN L, YANG S, *et al.* Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19)[J]. Clinical Infectious Diseases, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
- [36] LIU W, LIU L, KOU G, *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2020. DOI: 10.1128/JCM.00461-20.
- [37] 白少丽, 王建云, 周莹莹, 等. 甘肃省首起新型冠状病毒肺炎家庭聚集性疫情分析[J]. 中华预防医学杂志(BAI Shao-li, WANG Jian-yun, ZHOU Ying-guan, *et al.* Analysis of the first cluster of cases in a family of novel coronavirus pneumonia in Gansu Province[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine), 2020, 54(2): E005.
- [38] LI Z, YI Y, LUO X, *et al.* Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for COVID-19 infection diagnosis[J]. Journal of Medical Virology, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25727.
- [39] CAO X. COVID-19: immunopathology and its implications for therapy[J]. Nature Reviews Immunology, 2020. DOI:10.1038/s41577-020-0308-3.
- [40] 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.
- [41] ZHOU Y G, FU B Q, ZHENG X H, *et al.* Aberrant pathogenic GM-CSF<sup>+</sup> T cells and inflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes in severe pulmonary syndrome patients of a new coronavirus[J]. bioRxiv, 2020.02.12.945576. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.02.12.945576>.
- [42] ZHANG J J, DONG X, CAO Y Y, *et al.* Clinical characteristics of 140 patients infected with COVID-19 in Wuhan, China[J]. Allergy, 2020. DOI: 10.1111/all.14238.
- [43] LIU Y, YANG Y, ZHANG C, *et al.* Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury[J]. Science China-Life Sciences, 2020, 63(3): 364-374.
- [44] 彭昱东, 孟凯, 官红权, 等. 心血管病患者感染新型冠状病毒肺炎 112 例临床特点及转归 [J/OL]. 中华心血管病杂志(PENG Yu-dong, MENG Kai, GUAN Hong-guan, *et al.* Clinical characteristics and outcomes of 112 cardiovascular disease patients infected by 2019-nCoV[J/OL]. Chinese Journal of Cardiology), 2020, 48. DOI: 10.3760/cma.j.cn112148-20200220-00105.
- [45] 陈蕾, 刘辉国, 刘威, 等. 2019 新型冠状病毒肺炎 29 例临床特征分析[J]. 中华结核和呼吸杂志(CHEN Lei, LIU Hui-guo, LIU Wei, *et al.* Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases), 2020, 43(3): 203-208.

- [46] WU J, LIU J, ZHAO X, *et al.* Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu Province: a multicenter descriptive study[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2020. DOI: 10.1093/cid/ciaa199.
- [47] ZHANG J, WANG S, XUE Y. Fecal specimen diagnosis 2019 novel coronavirus-infected pneumonia[J]. *Journal of Medical Virology*, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25742.
- [48] TO K K, TSANG O T, LEUNG W S, *et al.* Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30196-1.
- [49] ZHANG W, DU R H, LI B, *et al.* Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 386-389.
- [50] 周灵, 刘馗, 刘辉国. 新型冠状病毒肺炎患者出院后“复发”原因分析及治疗策略[J]. *中华结核和呼吸杂志*(ZHOU Ling, LIU Kui, LIU Hui-guo. Cause analysis and treatment strategies of “recurrence” with novel coronavirus pneumonia (COVID-19) patients after discharge from hospital[J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*), 2020, 43(4): 281-284.
- [51] 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*(LI Quan, LIU Ding-bin, QIAO Zheng-rong, *et al.* Value of SARS-CoV-2 IgM/IgG antibody detection in diagnosis of new coronavirus pneumonia[J/OL]. *International Journal of Laboratory Medicine*), 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.r.20200304.1041.006.html>.
- [52] RUCDR Infinite Biologics, Spectrum Solutions, Accurate Diagnostic Labs. A new rutgers coronavirus test based on a simple spit into a tube will come to a N.J. testing site this week [EB/OL]. [2020-04-20]. <https://www.nj.com/coronavirus/2020/04/a-new-rutgers-coronavirus-test-based-on-a-simple-spit-into-a-tube-will-come-to-a-nj-testing-site-this-week.html>.
- [53] SHEN B, YI X, SUN Y T, *et al.* Proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 patient sera[J/OL]. medRxiv, 2020. 04.07.20054585. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.2005-4585>.
- [54] BROUGHTON J P, DENG X, YU G, *et al.* CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2[J]. *Nature Biotechnology*, 2020. DOI: 10.1038/s41587-020-0513-4.
- [55] 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*(GUO Yuan-yuan, WANG Kun, ZHANG Yu, *et al.* Comparison and analysis of the detection performance of six new coronavirus nucleic acid detection reagents[J/OL]. *Chongqing Medicine*), 2020, 49. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.