

王洁,高嵩钰,朱仁心,等. 当前新冠病毒的主要检测手段 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 120-124.
Wang J, Gao SY, Zhu RX, et al. Main detection methods of SARS-CoV-2 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(1): 120-124.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021.01.018

当前新冠病毒的主要检测手段

王洁¹,高嵩钰²,朱仁心³,肖良^{2*}

(1.海军军医大学(第二军医大学)基础医学院学员五大队十五队,上海 200433;
2.海军军医大学(第二军医大学)海医系环境与劳动卫生学教研室,上海 200433;
3.海军军医大学(第二军医大学)海军医学系,上海 200433)

【摘要】 2019年,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)被报道,随后疫情在世界上各个国家和地区暴发且迅速流行。COVID-19的传染性强、病死率高,为有效控制疫情的发展,新冠病毒的检测至关重要,国内外各研究团队及机构已研发出各种检测新冠病毒的有效手段和仪器设备,本文从背景原理、应用范围以及优缺点等方面对当前已有的针对新冠病毒的主要检测手段、仪器设备等相关知识进行综述。

【关键词】 新型冠状病毒;新型冠状病毒肺炎;核酸检测;免疫学检测;分离鉴定

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021)01-0120-05

Main detection methods of SARS-CoV-2

WANG Jie¹, GAO Songyu², ZHU Renxin³, XIAO Liang^{2*}

(1. Basic Medical Sciences, Company15 of Battalion5, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China. 2. Department of Occupational and Environmental Health, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433.
3. Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433)

【Abstract】 Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by infection with the novel coronavirus (SARS-CoV-2), was reported in 2019. Subsequently, the outbreak spread rapidly in many countries and regions. COVID-19 is highly contagious and lethal, and detecting the novel coronavirus is essential to effectively control transmission during the pandemic. Research teams and institutions in China and abroad have developed various effective method and equipment to detect the new coronavirus, and in this article, we summarized the current main detection method and equipment while considering the principles, range of applications, and advantages and disadvantages.

【Keywords】 SARS-CoV-2; COVID-19; nucleic acid detection; immunological detection; isolation and identification

新冠病毒以其极强的传染性和高致死率引发了全球范围内的大规模疫情。截至2021年1月12日12时,全国累计报告确诊病例97754例,现有确诊病例1454例,境外输入4443例,海外现有确诊病

例25484895例。为了控制疫情的进一步发展,急需快速有效针对新冠病毒的检测手段。针对这一问题,国内外各研究团队和机构开发出了不同的检测手段,当前市面上已有的新冠病毒的检测手段主要

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81770329);上海市卫健委新优青(2017YQ007)。

【作者简介】 王洁(2000—),女,本科在读,研究方向:公共卫生与预防医学。E-mail: STIGAN@126.com

【通信作者】 肖良(1983—),男,副教授,研究方向:公共卫生与预防医学。E-mail: hormat830713@hotmail.com

有核酸检测方法、免疫学检测方法、病毒分离鉴定等,本文就各种检测手段的背景原理、适用范围以及优缺点等方面作一综述。

1 核酸检测方法

目前,新冠病毒的实验室检测主要依赖核酸检测。核酸检测在感染早期即可呈现阳性,但对于样品保存、核酸提取的实验条件、操作人员的熟练程度以及操作环境等都有较高要求,给大面积早期筛查和诊断带来一定的困难。

1.1 全基因组测序

目前使用最为广泛的一种基因测序技术为高通量测序(high-throughput sequencing, HTS),也叫做新一代测序(next generation sequencing, NGS)。其中,病原体宏基因组测序(mNGS)是目前临床实践中最常用的病原体基因测序方法。它是一种基于新一代测序技术的无偏好性的技术,可以一次性完成细菌、真菌、病毒以及各种病原体(例如寄生虫)的检测。mNGS 技术首先需要将病毒 RNA 制备成测序仪可以识别和分析的 DNA 文库,然后使用测序仪同时对数以百万计的核酸序列进行检测。检测结果经生物信息学软件处理,最终展现出与病毒序列相关的信息。2003 年鉴定 SARS 耗时 5 月余、2013 年鉴定 H7N9 耗时 1 月余,而在此次武汉的疫情爆发后短短 2~3 周内,中国科学家就通过基因测序的方法鉴定出新型冠状病毒,并成功绘制出其全基因组序列信息。但因 mNGS 技术操作较为复杂、检测时间相对较长(24~72 h)、检测灵敏度相对较低等原因,在检测新型冠状病毒上不易实现大范围推广和快速诊断^[1]。而 Parabricks 软件可辅助 mNGS 技术检测新冠病毒以应对疫情,通过利用 NVIDIA Parabricks 软件的 Genome Analysis Toolkit 工具包以及 GPU 加速计算,可以大幅度提高序列数据分析的速度^[2]。Parabricks 团队的软件可以在一台服务器上快速分析一个人的全部基因组变异,并且将分析时间缩短至 1 h 以内。此次疫情的传播速度是历史上前所未有的,如此的效率提升将极大地促进人们对病毒进化和疫苗开发的了解。

1.2 RT-PCR

实时荧光 RT-PCR,即实时荧光反转录聚合酶链式反应。它首先将提取的病毒基因组 RNA 通过反转录变成互补 DNA(cDNA),然后再用病原体特异性的引物,以 cDNA 作为模板扩增病原体核酸序

列,扩增的过程中荧光染料能同步整合在产物上,研究者可以通过荧光信号的强弱,进行实时检测。RT-PCR 诊断耗时短,检测样本多,结果判定简单快速,检测成本低,特别适合本次大面积流行的新冠肺炎疫情。但是该检测方法需要分子检测实验室和专业的仪器以及操作人员,操作不当或者实验室条件不足都可能会因气溶胶污染而造成假阳性。

新冠病毒的检测可以通过基于 RT-PCR 的试剂盒进行。由华西医院应斌武教授团队与柯博文教授、耿佳教授团队合作自主研发的多重荧光 RT-PCR 检测试剂盒以新型冠状病毒 ORF1ab 基因和 N 基因中的保守序列为靶点,设计特异性引物和寡核苷酸荧光探针,以高特异性的操作对病毒核酸进行检测^[3]。该产品创新性构建了防污染系统,有效降低了产物气溶胶的污染。但是该试剂盒使用时不仅需要试剂本身,还需要运作 RT-PCR 的精密仪器和经过训练的操作人员。而且,现有试剂盒中的试剂和测试条件可能没有得到进一步的优化,这将会影响检测本身的灵敏度和特异性,出现“假阳性”和“假阴性”结果。所谓假阳性指的是体内没有病毒,却检测出了新冠病毒 RNA,一般是系统污染造成的。所谓假阴性指的是一个新冠肺炎患者应该被确诊为阳性,但却未检测到新型冠状病毒 RNA。产生假阴性的原因可能包括:①因病毒变异,引物和探针不能识别变异后的序列。②采样部位不含病毒或病毒含量较低,不能真实反映疾病情况。③提取核酸质量差,或提取效率低,病毒核酸有损失。④试剂检测下限不够,或试剂性能、仪器设备稳定性欠佳⑤实验操作不当。为规避假阴性,可以从以下几个方面做出改进:①采集达到一定数量的病毒 RNA:要求采样部位含有病毒并且病毒含量要达到检测的试剂下限。可通过对疑似病人多个部位同时采样或同一部位反复检测来增加采集到病毒 RNA 的几率。②辅助 CT 影像:CT 检测只需几分钟,比较快捷。但新冠肺炎是一种病毒性肺炎,其影像学表现与许多其他病毒性肺炎的影像学发现相似,因此难以做出鉴别诊断。因此 CT 影像诊断只能作为辅助手段检测新冠病毒,在一定程度上规避假阴性。以往使用 RT-PCR 检测盒检测新冠病毒必须在中心实验室进行,检测效率较低。欧洲的 Novacyt 公司开发的便携式 RT-PCR 仪器,能够在 2 h 内获得检测结果。Qiagen 和 Biomeme 公司也开发了将样本处理和 RT-PCR 检测整合在一起的可移

动检测仪,让对样本的检测更为自动化,并且可以在疫情一线进行。

1.3 CRISPR

CRISPR 系统由向导 RNA (gRNA) 和 Cas 蛋白组成,gRNA 能够指导 Cas 蛋白识别并切割带有特异序列的 RNA 或者 DNA 分子。Cas13a 蛋白在特异性切割靶标 RNA 时,会继续切割非靶标 RNA,利用这一特点,在整个体系中加入带有荧光标记的 RNA 信号分子,当带有荧光的 RNA 被切开时就会发出荧光信号。该技术检测时间相较于 RT-PCR 更短,但是 CRISPR 系统出现时间尚短,仍存在有脱靶的可能,其灵敏度和特异性还有待考证。

CRISPR 技术的先驱张峰教授的团队^[4]使用基于 CRISPR 的技术开发了一种检测新型冠状病毒 RNA 的方法。该方法仅需纯化的核酸分子样品,并且只需简单的三个步骤即可在 1 h 内完成检测。它的优势在于不需要复杂的仪器,且最后的检测在试纸上即可进行。此外,新开发的工具利用了 SHERLOCK 技术,这套系统无论对 RNA 还是 DNA,灵敏度都达到了单分子级。

总体来看,仅通过从患者体内分离和纯化 RNA,然后使用上述步骤,就预期能够在 1 h 内进行诊断,而无需各种复杂的设备。但目前这一手段尚未用于检测患者样本,还不能直接用于临床诊断。

1.4 逆转录环介导等温扩增法 (RT-LAMP)

环介导的等温扩增 (LAMP) 技术的特点是为目标基因的特定区域设计特异性引物,并使用链置换 DNA 聚合酶在恒温条件下保温数十分钟以实现核酸扩增。RT-LAMP 法具有扩增快、操作简便、检测简便、检测结果可直观判断等优点,有助于 COVID-19 的快速、可靠的临床诊断。

沈阳化工大学尹秀山团队^[5]开发了一种基于 RT-LAMP 技术的新冠病毒检测方法 iLACO,可在 15~40 min 内快速检测新冠病毒。由于当新冠病毒 RNA 与反应混合物中的 pH 指示剂耦合时,可以通过观察颜色的变化获得检测结果。阳性反应可导致 pH 指示剂从粉红色变为黄色,阴性反应时 pH 指示剂仍保持粉红色。

从方法学上来看,核酸检测技术是最直接最本质的病原学证据,优于其他临床表现、临床体征及 CT 检测等经验判读。这就是我们说病毒核酸检测是确诊感染的“金标准”的原因。但核酸检测法的缺点在于:检测程序较复杂,需要花费数小

时,且检测结果需要经过复核,重复实验则需要花费更多的时间,导致在确诊之前,很多患者得不到及时的隔离和治疗;此外,由于口咽拭子病毒含量较低、病毒 RNA 易降解等原因,核酸检测常出现假阴性结果。

2 免疫学检测方法

2.1 间接免疫荧光法

间接免疫荧光法以荧光素标记抗球蛋白抗体,抗体与相应抗原结合后,荧光标记的抗球蛋白抗体与已结合的抗体发生作用,从而推知抗原或抗体的存在。间接免疫荧光法因其方法简便、特异性强、阳性与阴性样品的信号强度对比明显、能够精确地判断组织或细胞内荧光的分布等优点,成为各类呼吸道病原体的有效检测工具。其缺点是敏感性偏低、不能量化指标、周期长。

呼吸疾病国家重点实验室从一例新冠病毒感染重症患者的粪便中成功分离出活的新冠病毒^[6]。目前已利用间接免疫荧光实验结果显示患者血浆可识别该分离株感染细胞。

2.2 荧光免疫层析法

荧光免疫层析法是将免疫层析法与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法,通过荧光素所发的荧光即可在荧光显微镜下对抗原进行细胞定位。

目前,万孚生物公司已成功研发出 2019-nCoV 新型冠状病毒 IgM 抗体检测试剂(荧光免疫层析法)。该试剂的优点是全自动穿刺进样,封闭独立操作,可最大程度避免产生气溶胶,降低了对操作者和环境污染的风险,可在 10 min 内完成检测,可广泛用于发热门诊、急诊、门诊检验、中心实验室以及基层医疗等各级医疗卫生机构,能快速分流病人和缓解临床诊疗压力^[7]。

此外,由河南省生物工程技术研究中心王云龙教授团队成功研制出的全场景新冠病毒免疫荧光层析快检试剂盒,只需患者一滴血就可在 10 min 内完成新冠病毒的快速筛查^[8]。该试剂盒可以无需设备,多种应用场景快速、方便的筛查新冠病毒疑似感染人群。与核酸检测方式联合应用,可缩短检测窗口期,提高阳性检出率,在新冠肺炎的辅助诊断方面,具有十分重要的作用。

2.3 免疫胶体金层析技术

氯金酸在还原剂如白磷、抗坏血酸等作用下,

可聚合成一定大小的金颗粒,并由于静电形成带负电的疏水胶溶液,故称胶体金。胶体金在弱碱环境下带负电荷,可与蛋白质分子的正电荷基团形成牢固的结合。

目前,由华西医院应斌武教授团队与柯博文教授、耿佳教授团队合作,自主研发了"新型冠状病毒 2019-nCoV IgG/IgM 抗体联合检测试剂盒(胶体金法)"诊断产品^[9]。该试剂盒采用肉眼观察的方法,只需一滴血清、血浆或全血即可在 10 min 内完成所有测试,无需任何设备,操作简单,可快速筛查可疑患者,从而提供了有效的排除手段。但是此方法敏感性较低,如果材料等质量有误差,会影响检测结果,也会因病人感染时间较短或者采样部位导致病毒含量较低,导致出现假阴性。

2.4 IgG 及 IgM 抗体免疫检测

研究表明,新型冠状病毒入侵人体 3~5 d 后,其特异性 IgM 抗体多会呈现阳性,随后特异性 IgG 抗体开始由阴转阳,且恢复期其滴度较急性期大幅增高。因此,以检测病人 IgM 抗体和 IgG 抗体为主的免疫检测方法是核酸检测方法的重要补充。

目前,南开大学科研团队成功研制出新冠病毒 IgM/IgG 抗体联合检测试剂盒。其中的快速测试卡可在 15 min 左右完成检测,具有操作简便、容易判读、灵敏度高等优势^[10]。但在感染早期,人体内可能还没有产生抗体,抗体检测存在窗口期。因此,抗体检测可用于对核酸检测阴性的病例进行辅助诊断,也可以对病例进行排查筛查,但不能代替核酸检测方法。

2.5 酶联免疫吸附测定(ELISA)

酶联免疫吸附剂测定法是利用抗原与抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测方法。冠状病毒有四种主要的结构蛋白:S 蛋白、M 蛋白、E 蛋白、N 蛋白。针对 SARS 冠状病毒的质谱分析发现 N 蛋白是引起 SARS 患者产生抗体的主要抗原。由于新冠病毒与 SARS-CoV 的 N 蛋白具有高度的序列相似性,据此推测,N 蛋白也可作为抗原用于新冠病毒的 ELISA 法检测^[11]。对新冠病毒的 N 蛋白基因进行扩增与克隆,构建 N 蛋白基因的重组表达质粒,利用大肠杆菌得到大量重组质粒的表达产物 N 蛋白,纯化后的 N 蛋白就可以作为抗原进行 ELISA 检测。

ELISA 检测法的优点是其临床标本容易采集,而且患者血清中一般不含冠状病毒或者含量低,大

大降低检测人员感染风险;有较高的特异性和灵敏度;仪器操作简单^[12]。其缺点是血清中的 IgG、IgM 一般在感染后 7~14 d 才会出现,尚不能达到早期诊断的目的。

3 病毒分离培养

病毒培养是诊断流感病毒感染的传统方法之一。病毒分离培养可以在前期确定侵害性病原物起到关键作用,但是传统的分离鉴定方法需要连续培养多天,敏感性和特异性都会低于核酸检测方法,且较为耗时,不能满足大量疑似患者筛查需求。

上海市疾病预防控制中心和复旦大学上海医学院基础医学院医学分子病毒学重点实验室新型冠状病毒攻关团队,利用病毒分离培养技术成功分离并鉴定出新冠病毒毒株^[13]。经进一步纯化、扩增和鉴定后,该毒株将为新型冠状病毒疫苗、抗病毒药物研制和致病机理研究等提供重要的毒种资源,并可实时进行药物筛选及抗体中和试验和对病毒变异的监测。

4 其他方法

4.1 基因芯片技术

4.1.1 呼吸道疾病多病原体测序芯片

生捷科技公司和浙江清华长三角研究院共同研制了呼吸道疾病多病原体测序芯片,该芯片基于新一代原位合成超高密度基因芯片技术,可以同时包括新冠病毒在内的 100 多种病毒进行高通量测序,实现精确检测新冠病毒和其他常见呼吸道病原体^[14]。该测序芯片具备成本低、数据分析简单的特点,非常适合作为临床精准诊断的辅助检测工具。

4.1.2 全新微流控生物芯片

博奥生物研发成功的快速检测呼吸道多病毒的全新微流控生物芯片,通过采集患者咽拭子、痰液等分泌物样本,1.5 h 内便可一次性检测包括新冠病毒在内的 19 种呼吸道常见病毒^[15]。该芯片系统能达到快速确认新冠病毒、同时排查其他引起相似症状病毒的目的,可以对大量就诊人群实现快速及分类鉴别,从而大幅降低疑似病例数量。

4.2 快速检测方法

ID NOW 是美国使用最广泛的分子即时检测技术之一,由于其易用性、便携性和快速的结果,ID NOW 在 COVID-19 大流行中为一线医护人员提供了重要工具。ID NOW 应用 RPA (recombinase

polymerase amplification) 技术, 利用专有酶和恒温控制来实现快速的 RNA 扩增。这种成熟的分子系统将 RNA 放大了数亿倍, 从而使病毒可在 13 min 或更短的时间内被检测到。目前 ID NOW 检测 COVID-19 仅获得 FDA 在紧急使用下的授权, 可用于实验室和患者护理场所^[16]。

除此之外, 以色列希伯来大学研究人员研发出一种比传统方法更快速、材料更易得的新冠病毒检测新方法。该方法使用磁性纳米粒子材料, 可以更快从拭子样本中提取核糖核酸分子, 检测速度是原有方法的 4 至 10 倍, 且这种材料在以色列市场供应充足, 价格低廉^[17]。

5 小结

在本次疫情中, 可通过流行病学史、临床表现、核酸检测、基因测序以及抗体检测等手段来综合判断患者是否感染新冠病毒, 但在检测过程中要特别注意“假阳性”和“假阴性”的问题。从目前来看, 不同检测方法均存在着各自的优势和弊端, 只有综合运用各种检测工具, 才能实现快速高效的检测, 缩短新冠患者的诊断周期。目前新冠病毒的检测方法追求的是检测时间缩短、检测步骤简化、检测成本降低、检测环境安全、检测结果精确, 因此检测方法的改进依然值得进一步地探索。

参考文献:

- [1] 陶悦, 傅启华, 莫茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战 [J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(3): 217-220.
- [2] 英伟达中国. NVIDIA 为 COVID-19 研究人员免费提供 Parabricks [R/OL]. 英伟达中国, (2020-03-26) [2020-04-25]. <https://blogs.nvidia.cn/2020/03/26/coronavirus-research-parabricks/>.
- [3] 柯博文. 华西医院科技联合攻关团队成功研发多款新型冠状病毒检测试剂盒 [R/OL]. 四川大学华西医院, (2020-02-19) [2020-04-25]. <http://www.wchscu.cn/comprehensive/50848.html>.
- [4] Feng Zhang OOA, Jonathan SG. A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [R/OL]. (2020-03-21) [2020-04-25], <https://broad.io/sherlockprotocol>.
- [5] Yan C, Cui JH, Huang L, et al. Rapid and visual detection of

2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Clin Microbiol Infect. 2020, 26(6): 773-779.

- [6] 呼吸疾病国家重点实验室. 实验室联合广州海关及中山五院成功从新型冠状病毒肺炎患者粪便中分离出病毒 [R/OL]. 呼吸疾病国家重点实验室, (2020-02-13) [2020-04-25]. <http://www.skld.cn/show.php?id=1372>.
- [7] 万宇. 万孚生物: 新型冠状病毒抗体检测试剂获得注册证 [N/OL]. 中国证券报·中证网, (2020-02-23) [2020-04-25]. http://www.cs.com.cn/ssgs/gsxw/202002/t20200223_6028643.html.
- [8] 孙晓艳. 采一滴血, 十分钟检出! 河南成功研制快速筛查新冠病毒感染试剂盒 [N/OL]. 大河报, (2020-02-25) [2020-04-25]. <https://www.henan100.com/news/2020/910373.shtml>.
- [9] 王彦东. 我校疫情防控科研成果在国务院新闻发布会上受肯定 [N/OL]. 四川大学, (2020-03-19) [2020-04-25]. <http://www.scu.edu.cn/info/1207/14622.htm>.
- [10] 叶攀. 科研团队研获新冠病毒抗体检测试剂盒 15 分钟快速检测 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-02-15) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/jk/2020/02-15/9092269.shtml>.
- [11] 乔静, 庞晓峰. SARS 冠状病毒主要蛋白酶的结构及药物设计 [C]. 中国生物医学工程学会. 中国生物医学工程学会第六次会员代表大会暨学术会议论文摘要汇编. 中国生物医学工程学会: 中国生物医学工程学会, 2004: 547.
- [12] 吴桐, 马健. 新冠病毒的免疫学检测方法——ELISA 法 [N/OL]. 中国免疫学会, (2020-02-14) [2020-04-25]. <http://www.csi.org.cn/article/content/view?id=1012>.
- [13] 孙静波. 上海科学家成功分离新冠病毒毒株 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-02-11) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/sh/2020/02-11/9087457.shtml>.
- [14] 王峰. 生捷科技发布新一代超高密度测序芯片, 新冠病毒检测精度极大提升 [N/OL]. 中国网科学, (2020-03-11) [2020-04-25]. http://science.china.com.cn/2020-03/11/content_41087930.htm.
- [15] 房家梁. 程京团队争分夺秒完成病毒检测试剂盒研发 [N/OL]. 中国新闻网, (2020-03-16) [2020-04-25]. <http://www.chinanews.com/gn/2020/03-16/9126755.shtml>.
- [16] Abbot. How ID NOW Tackles COVID-19 [R/OL]. (2020-05-04) [2020-06-01]. <https://www.abbott.com/corpnnewsroom/diagnostics-testing/how-id-now-tackles-covid-19.html>.
- [17] 张樵苏. 以色列研发出新冠病毒快速检测法 [N/OL]. 新华网, (2020-04-13) [2020-04-25]. http://www.xinhuanet.com/2020-04/13/c_1125848834.htm.

[收稿日期] 2020-09-03