

## 多重核酸 POCT 检测在 COVID-19 诊断及鉴别诊断中的价值

刘杰<sup>①</sup> 曲芬<sup>②</sup> 戚丽华<sup>①</sup> 任昊远<sup>③\*</sup>

①解放军总医院第七医学中心检验科 北京 100700

②航空总医院检验科 北京 100012

③解放军总医院第七医学中心卫勤部 北京 100700

**[摘要]** 由于引发呼吸道感染的病原体种类繁多,患者可能携带不止一种病原体,使得新型冠状病毒(2019-nCoV)的确诊较为困难。而多重核酸即时检验(POCT)可以快速准确、高通量检测出新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者所感染的呼吸道病原体,为临床提供快速可靠的实验室诊断依据。结合 2019-nCoV 最新研究成果,及 COVID-19 诊疗方案(试行第七版)的鉴别诊断的章节,讨论多重核酸 POCT 检测对 COVID-19 快速诊断及鉴别诊断的价值,为有效防控 COVID-19 疫情提供参考。

**[关键词]** 新型冠状病毒肺炎(COVID-19); 鉴别诊断; 多重检测; 核酸; 即时检验(POCT)

*The Diagnosis and Differential Diagnosis of novel coronavirus by multiplexed nucleic acid-POCT/LIU Jie, QU Fen, QI Li-hua, et al//China Medical Equipment,2020*

**[Abstract]** Due to the wide variety of pathogens that cause respiratory infections, patients may carry more than one pathogen, making the diagnosis of new coronaviruses more difficult. The multiple nucleic acid POCT can quickly and accurately detect high-throughput respiratory pathogens in patients with new crowns, providing a fast and reliable laboratory diagnosis basis for clinical. Against the COVID-19 outbreak, we summarize the theory and recent results concerning novel coronavirus, and the new diagnostic section of coronavirus pneumonia (Trial Seventh Edition) is a chapter of differential diagnosis. The value of multiplex nucleic acid POCT(point-of-care test) detection in the rapid diagnosis and differential diagnosis of new coronavirus(COVID-19) is discussed.

**[Key words]** COVID-19; Differential Diagnosis; Multiplexed detection; Nucleic acids; POCT

**[First-author's address]** Seventh Medical Center, PLA General Hospital, Beijing, 100700, China.

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)属于国家“乙类”传染病,采取“甲类”传染病防控措施<sup>[1-3]</sup>。感染主要为飞沫和近距离接触传播,可经人与人传播,人群普遍易感,且重症病例病亡率高<sup>[4-6]</sup>。研究表明,COVID-19有可能转成慢性的、像流感一样长期在人间存在,潜在的风险可能是长期的巨大的,对此要做好准备,发热门诊应常态化,成为一项医院的标准流程<sup>[7-8]</sup>。因此,医院如何立足于在发热门诊建立快速诊断能力的建设非常重要。通过综述多重核酸即时检验(point-of-care test, POCT)检测对国际病毒分类委员会命名的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(SARS-CoV-2)的快速诊断及鉴别诊断的价值,为有效防控 COVID-19 疫情提供参考。

### 1 COVID-19 及其他常见呼吸道病毒所致疾病的诊断与鉴别诊断

SARS-CoV-2 属于  $\beta$  属的冠状病毒,其基因特征与 SARSr-CoV 和 MERSr-CoV 有明显区别<sup>[2]</sup>。世界卫生组织将 SARS-CoV-2 感染引起的疾病正式命名为“COVID-19”。流行病学调查<sup>[9]</sup>显示,

COVID-19 大多数为轻症病例, 但具有高度传染性, 潜伏期多为 1~14 d, 病死率约 2%<sup>[10-11]</sup>。根据国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》<sup>[2]</sup>中指出, COVID-19 确诊病例须病原学检测呈阳性(实时荧光 RT-PCR 检测新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸阳性; 或病毒基因测序与已知 2019-nCoV 高度同源)。COVID-19 感染轻型表现需与其他病毒引起的上呼吸道感染相鉴别, 尤其是对疑似病例要尽可能采取包括快速抗原检测和多重聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)核酸检测等方法, 对常见呼吸道病原体进行检测<sup>[2]</sup>。造成呼吸道感染的病原体主要是各种呼吸道病毒, 以及细菌、支原体、衣原体、真菌及寄生虫等<sup>[12]</sup>。近年来, 一些呼吸道病毒如甲型流感病毒、腺病毒以及不断变异的 SARS-CoV-2 所导致爆发的疫情, 成为公共卫生领域面临的一个重要的问题, 也是要探讨的内容。

## 2 呼吸道感染病原体的检测现状

呼吸道病原体的检测方法主要有病原体培养法、胶体金筛查流感抗原、免疫血清学检测抗体以及实时荧光定量 PCR 检测核酸。抗原初筛检测尽管快速, 但其敏感性低且不能区分亚型; 血清学方法只能检测免疫球蛋白 M(Immunoglobulin M, IgM)和免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG), 且耗时较长; 核酸检测方法敏感性高, 特异性强, 可以区分亚型, 但需要专业的实验室和昂贵的仪器设备, 操作复杂, 对检验人员的资质要求较高, 不能满足基层单位筛查防控的需求。

### 2.1 呼吸道感染病原体抗体检测

针对 COVID-19 的疫情, 许多高新企业已成功研发了 SARS-CoV-2 的 IgM 抗体检测试剂盒(胶体金免疫层析法)以及 SARS-CoV-2 的 IgM 抗体检测试剂盒(酶联免疫法)2 种检测方法学的产品<sup>[13]</sup>。胶体金免疫层析法检测试剂的特点为: 15 min 出结果, 无需仪器, 适合现场快速筛查。

呼吸道病原体九联检<sup>[14]</sup>采用九项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测试剂(间接免疫荧光法), 同时检测甲型流感病毒(influenza A virus, INFA), 乙型流感病毒(influenza B virus, INFB), 副流感病毒 1 型、2 型及 3 型(Parainfluenza virus type 1, 2, 3 PIV), 嗜肺军团菌(legionella pneumophila, LP), 肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP), Q 热立克次体(Q rickettsia, QFB), 肺炎衣原体(chlamydia pneumoniae, CPn), 腺病毒(adenovirus, ADV), 呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)等 9 项病原体的 IgM 抗体。呼吸道病原九联检的检测方法在呼吸道感染检测中检出的阳性率高, 能够同时检测 9 种病原体, 及时发现感染的病原体, 对临床呼吸道感染疾病的诊断及鉴别诊断提供一定的支持依据。

### 2.2 单一呼吸道病原体的扩增和检测

#### 2.2.1 甲型流感病毒快速基因分型 POCT 方法

ParaDNA 核酸 POCT 检测仪及其配套的 HyBeacon 荧光探针检测技术, 是当前 POCT 分子诊断的前沿代表<sup>[15]</sup>。该方法建立一种基于 Beacon-ParaDNA 技术平台对甲型流感病毒进行快速基因分型的方法, 由于具有准确度和灵敏度高、设计灵活、兼容性好、无交叉污染及支持现场快速检测等特点, 已广泛应用于法医学鉴定、病原微生物检测、食品卫生安全以及药物基因组学等领域。

#### 2.2.2 基于 CRISPR-Cas 系统的 CRISPR-nCoV 试剂盒

2018 年, Science 封面文章表明, 基因编辑工具 CRISPR-Cas 系统用于病原检测, 可实现 2 h 内鉴定区分人体样本中的寨卡、登革热、黄热病毒和西尼罗河病毒。2019 年 9 月, 微远基因与华山医院感染科合作, 快速超敏结核分枝杆菌诊断方法 CRISPR-MTB 发表<sup>[16]</sup>。COVID-19 疫情暴发, 微远基因利用自有 CRISPR 病原诊断平台, 基于 GISAID 公布的 SARS-CoV-2 序列 (BetaCoV/Wuhan/IPBCAMS-WH-01/2019, Collection date: 2019-12-24), 设计特定 CRISPR 检测位点, 开发出超高敏 CRISPR-nCoV 检测试剂盒。CRISPR-nCoV 试剂盒灵敏度可低至单个拷贝, 具

备与其他冠状病毒明确区分的高特异性，可检测痰液、拭子、肺泡灌洗液等多种样本类型，用样量可以低至 100  $\mu$ l，实现了高特异性、单拷贝级别灵敏度以及 40 min 快速的 SARS-CoV-2 核酸检测，并且检测仪器便携可拓展，具有实现床旁 POCT 的应用潜力。

### 2.2.3 等温扩增技术在呼吸道病原体的应用

等温扩增技术与传统 PCR 相比，仪器简单、扩增时间短，还保持了高灵敏性及特异性，适合快速检测，在结核分枝杆菌等病原体检测中被广泛应用<sup>[17]</sup>。等温扩增技术的反应原理不同，分为环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)、依赖核酸序列型扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、链置换扩增(strand displacement amplification, SDA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)、单引物等温扩增(single Primer Isothermal Amplification, SPIA)、交叉引物等温扩增(cross priming amplification, CPA)以及新型等温多自配引发扩增(isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA)等。但等温扩增技术也具有对引物设计要求高、不能扩增较长目的片段及易产生假阳性等局限性，因此，此方法在 SARS-CoV-2 的检测中能否克服上述缺陷，达到快速精准检测的目的，仍有待于临床进一步应用评估。

### 2.2.4 Alere i 的 COVID-19 分子即时检测 POCT 产品

Alere i 检测试剂盒是采用恒温核酸扩增技术-切口延伸扩增技术(nicking enzyme amplification reaction, NEAR)来检测病毒核酸，使用特定捕获酶来驱动扩增反应，该试剂一般包括有切口酶、前向模板核酸及反向模板核酸和聚合酶等。操作方法为：①将待测样品加入到离心管 A 中；②用移液枪取一定体积待测样品加入到离心管 B 中，该离心管中有反应所需的各种试剂；③将离心管 B 放入检测仪器中进行反应，如 PCR 扩增仪等，反应一段时间后通过仪器检测得出结果。这一检测在 5 min 内就可给出阳性结果，在 13 min 内给出阴性结果，是目前速度最快的即时检测之一。该测试基于雅培的 Abbott ID NOW 诊断平台。ID NOW™是一种快速、基于仪器的恒温扩增检测系统，用于感染性疾病的定性检测，将在医生办公室、紧急护理诊所和医院急诊科等广泛的医疗保健环境中提供快速的结果。ID NOW 于 2014 年首次推出，是甲型和乙型流感、甲型链球菌和呼吸道合胞病毒(RSV)的分子床旁检测平台<sup>[18]</sup>。SARS-Co V-2 试剂是新开发的产品，Alere i 检测仪器和试剂盒见图 1。



图 1 Alere i 检测仪器和试剂盒

## 3 多重核酸 POCT 在呼吸道病原体检测中的研究进展

由于可引发呼吸道感染的病原体种类繁多，患者可能携带不止一种病原体，不同病毒之间以及病毒和细菌之间的临床体征和症状相互重叠，往往使得仅基于临床表现的病因诊断变得困难，无法确定致病原因，导致经常规治疗无效，造成抗生素滥用以及医源性交叉感染，因此鉴别诊断 COVID-19 中最常见的病原体，如流感病毒，便于及时隔离不同型别和亚型的流感患者，对防止病

毒的传播意义重大。在排除样本质量、样本收集时机以及污染和技术问题的情况下，从咽拭子或其他呼吸道样本中，多次、多种标本和使用多种荧光定量 PCR 检测试剂盒，检查出 SARS-CoV-2 的 RNA 阳性，对病原学诊断有重要支持意义。但是如何能快速准确高通量检测出患者所感染的呼吸道病原体，一直是临床诊断面临的难点。

### 3.1 核酸 POCT 技术

核酸 POCT 技术<sup>[19]</sup>是现场使用便携式核酸仪器及配套试剂，该仪器将核酸扩增、信号收集与结果分析功能整合，能够快速完成检测，并能有效防止交叉污染。目前国内已有多家企业宣布研发出全自动核酸扩增检测分析仪及配套试剂盒，其操作简便，结果快速、准确，这对基层开展快速筛查具有重要意义，并缓解疫情患者诊断及鉴别诊断的压力。随着免疫层析技术、微流控芯片技术和环介导等温扩增技术等核酸 POCT 产品的不断研发及应用，能够对当前检测形成有效补充，加快疫情结束速度。

### 3.2 多重核酸 POCT 进展

多重核酸扩增检测<sup>[20]</sup>是一种速度快、灵敏度高且特异性强的检测方法，能提供多目标产物的共扩增，从而对呼吸道疾病混合感染的预后和复发提供重要信息。多重核酸扩增可以显著减少检测操作时间和成本，并且能够快速得到结果。博奥生物集团应用恒温扩增和微流控碟式芯片相结合的技术，对 13 种常见下呼吸道病原体靶基因进行扩增和检测，可为临床提供更为快速可靠的实验室诊断依据，且能提供多目标产物的共扩增，从而对呼吸道疾病混合感染的预后和复发提供重要信息。

### 3.3 RNA 恒温扩增-金探针层析法

RNA 恒温扩增-金探针层析法<sup>[21]</sup>是新一代的核酸检测技术，通过胶体金条带判读结果的方法，对 SARS-CoV-2 和甲型、乙型流感病毒核酸及其他呼吸道病毒进行快速定性检测，对临床上确诊 SARS-CoV-2 有重要意义，其特点是以病原体的 RNA 为靶标核酸，在逆转录酶和 T<sub>7</sub>RNA 聚合酶的作用下，经过逆转录和转录过程，实现 RNA 核酸片段的扩增。然后采用金探针层析法，将 RNA 扩增产物-特异探针-金标探针复合物在 NC 膜上固定形成条带，结果判读一目了然。该方法可以将胶体金免疫层析技术的操作简单、快速且价格低廉等特点应用到核酸的多重检测中来，实现甲型、乙型流感病毒核酸+SARS-CoV-2 核酸的胶体金标核酸 POCT 诊断试剂的开发，其原理是在核酸检测试纸条上，将通用探针标记上胶体金颗粒后，固定于玻璃纤维素膜上，检测病原体核酸时，设计两套特异探针，即特异探针 A 和特异探针 B。两套探针的使用使得其中任何一套探针和病原体核酸扩增片段杂交失败，都不能够形成被试纸条检出的复合物，也就出现不了阳性检测结果，保证了检测的特异性。只要设计针对不同病原体核酸的特异探针即可完成同一张试纸条多种核酸的检测，可以大幅降低检测成本。核酸检测试纸原理见图 2。

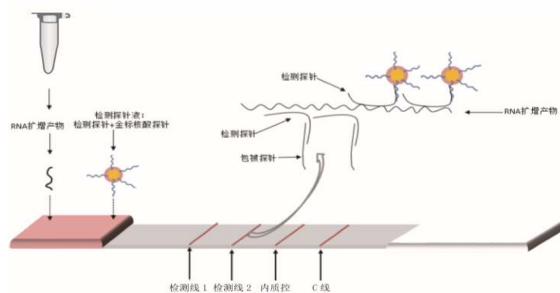


图 2 核酸检测试纸原理

该方法无需核酸提取,无需专业实验室,无需生物安全柜和荧光 PCR 仪就可进行实验,仅需直接将患者鼻咽拭子标本加入仪器,就可快速而准确地检测出 SARS-Co V-2 和各种流感病毒,应用在门诊或急诊,患者可以快速获得检验报告,推荐向基层和偏远地区的医疗机构普及,特别是适合于发热门诊内的快速筛查 2019-nCoV 之用。

#### 4 核酸 POCT 在疫情中的应用

目前,我国社会正在逐步回归正常轨道,但未来不能放松警惕,而在本次疫情防控工作中,方舱医院发挥了至关重要的作用<sup>[22]</sup>。在方舱医院经过实践检验之后,将拓展到更多的使用场景。为此,需要将核酸检测 POCT 化,配置到方舱医院中,同时多重核酸 POCT 成为发热门诊的标配。对于当下 POCT 的局势,检测项目的选择要比平台的建立更为重要,因此可用于鉴别诊断 COVID-19 与常见呼吸道病原体的多重呼吸道病原学核酸检测,包括临床常见呼吸道病毒和支原体及衣原体感染的检测,涵盖腺病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、支原体、衣原体、甲型和乙型流感病毒及 SARS-Co V-2 核酸,以及鉴别诊断 SARS 和 SARS-CoV-2 的双项目检测系统,可能为核酸 POCT 的终极方向。

SARS-Co V-2 核酸检测在 COVID-19 的诊断、疗效监测及疫情防控中发挥了重要作用,而多重核酸 POCT 技术在呼吸道病毒检测中的意义更加重要。作为一种包括 SARS-Co V-2 核酸试纸条检测技术,成功的融合了胶体金快速的特点。通过试纸条检测核酸,只需 10 min 左右即可进行结果判读,在操作上也十分简单,只需将核酸特异扩增物和检测探针混合后滴到检测试纸上即可,对实验人员技术要求低,更无需特殊的仪器设备,易于核酸检测向基层及偏远农村医疗机构的推广。

#### 5 展望

应用 POCT 检测 SARS-Co V-2,操作简便,结果迅速,适合现场检测操作,及早发现和控制 COVID-19 传染源,同时满足有关单位和个人多样化的检测需求的措施和手段。

#### 参考文献

- [1] Zhu N,Zhang D,Wang W,et al.A novel coronavirus from patients with pneumonia in China,2019[J].N Engl J Med,2020.
- [2] 国家卫生健康委员会.新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第七版)[S].国家卫生健康委员会,2020-03-04.
- [3] World Health Organization.Clinical management of severe acute respiratory infection when Novel coronavirus(nCoV)infection is suspected:Interim Guidance[S].January,2020.
- [4] Nanshan C,Min Z,Xuan D,et al.Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China:a descriptive study[J].Lancet,2020.
- [5] Li Q,Guan X,Wu P,et al.Early transmission dynamics in Wuhan,China,of novel coronavirus-infected pneumonia[J].N Engl J Med,2020.
- [6] 石云锋,师小函,李世闻,等.2019 新型冠状病毒肺炎重症病例临床特点分析[J].中山大学学报(医学科学版),2020,41(2):184-190.
- [7] 龚维斌.当代中国社会风险的产生、演变及其特点——以抗击新冠肺炎疫情为例[J].中国特色社会主义研究,2020(1):17-25.
- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委办公厅.关于加强重点地区重点医院发热门诊管理及医疗机构内感染防控工作的通知[EB/OL].(2020-02-04)[2020-03-05].<http://www.nhc.gov.cn/zwygj/s3594/202002/70d10964d54e4fe9a2539c58356906f9.shtml>.
- [9] Chen N,Zhou M,Dong X,et al.Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel

- coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J].Lancet,2020, 395(10223):507-513.
- [10]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.
- [11]Chan JF,Yuan S,Kok KH,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]贾雪洋,任红宇,聂旭冬,等.下呼吸道感染病原体检测方法研究进展[J].中国人兽共患病学报,2019,35(3):263-270.
- [13]第一财经.热景生物:已成功研发了新型冠状病毒三种检测方法学的产品[OL].第一财经,(2020-02-04)[2020-03-04].<https://www.yicai.com/brief/100488303.html>.
- [14]郭玲娜,管修标,袁琿,等.呼吸道九联检检测对儿科呼吸道疾病的诊断价值[J].临床合理用药杂志,2019,12(4):154-155.
- [15]王大刚,王雅杰,潘美晨,等.甲型流感病毒快速基因分型 POCT 方法的建立[J].传染病信息,2019,32(4):307-311.
- [16] Ai JW,Zhou X,Xu T,et al.CRISPR-based rapid and ultra-sensitive diagnostic test forMycobacterium tuberculosis[J].Emerg Microbes Infect,2019,8(1):1361-1369.
- [17] 赵娜,孙殿兴,刘金霞.环介导等温扩增技术可视化检测结核分枝杆菌[J].生物医学工程学杂志,2017,34(1):72-77.
- [18] Nie,Shuping, Roth,Richard B,Stiles, Jeffrey,etc. Evaluation of Alere i Influenza A&B for Rapid Detection of Influenza Viruses A and B[J].Journal of Clinical Microbiology,2014,52(9):3339-3344.
- [19]华文浩,盛琳君,王清涛.感染性疾病诊断中 POCT 应用的进展[J].中华检验医学杂志,2019,42(5):333-337.
- [20]徐佳楠,潘明,李天舒,等.运用多重 PCR 检测技术快速诊断儿童急性呼吸道病毒感染[J].热带医学杂志,2019,19(12):1468-1471,1476.
- [21]王诗婵,叶光明,陈良君,等.RNA 恒温扩增-金探针层析法在肺炎支原体检测中的应用[J/OL].武汉大学学报(医学版), 2020(2):260-263[2020-02-05].<https://doi.org/10.14188/j.1671-8852.2019.0323>.
- [22] 张贝贝,肖辉,李成伟,等.新型冠状病毒肺炎防治工作中方舱医院信息化快速支撑方案探讨[J].中国医院管理,2020,40(3):15-17.

**\*通信作者: 1280871580@qq.com**

**作者简介: 刘杰, 男, (1968-), 硕士, 主任技师, 从事临床检验工作。**