



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

引起急性呼吸道感染的病毒及检测方法

同济大学附属上海市肺科医院检验科 余方友





目录/CONTENTS

01 + 流行病学和临床表现

02 + 诊断和管理指南

03 + 样本采集

04 + 实验室检测

05 + 新冠病毒(SARS-CoV-2)

06 + 抗病毒治疗和预防



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

01

流行病学和临床表现

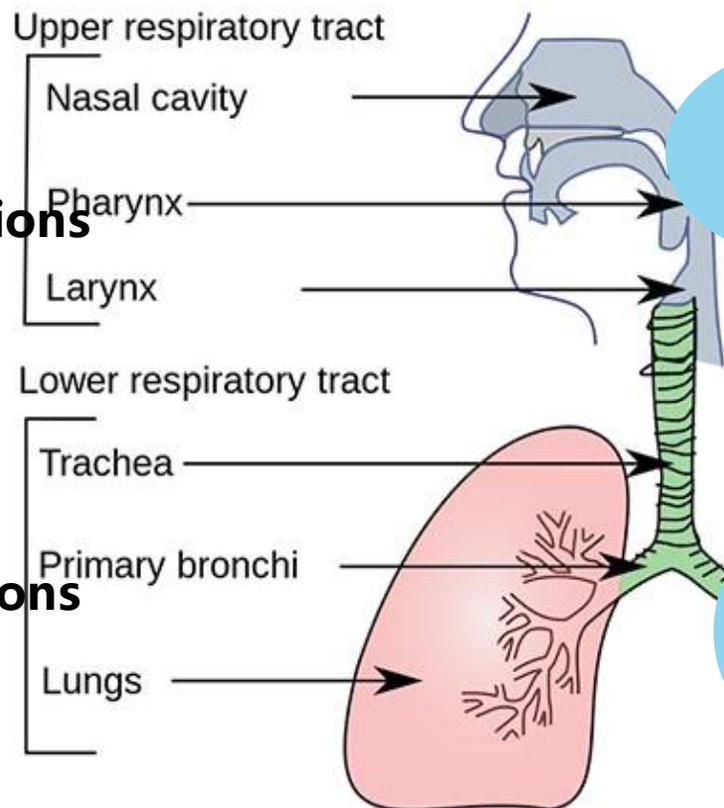
E p i d e m i o l o g y

急性呼吸道病毒



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

上呼吸道感染
Upper respiratory infections



流行性
感冒

普通
感冒

下呼吸道感染
Lower respiratory infections

支气管
扩张

支气管炎

肺炎

70-80%的病原体为病毒；
20-30% 的病原体为细菌。

病原体主要为细菌、支
原体、衣原体、病毒。

急性呼吸道病毒



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

急性呼吸道感染具有因果关系的病毒

甲型流感病毒

乙型流感病毒

呼吸道合胞病毒A和B

呼吸道肠道病毒

鼻病毒

呼吸道腺病毒

人偏肺病毒

副流感病毒1-4

冠状病毒 (SARS-CoV-1/2)

感染或从呼吸道排出但主要导致其他临床表现的病毒

单纯疱疹病毒

水痘带状疱疹病毒

巨细胞病毒

Epstein-Barr病毒

细小病毒B19

麻疹病毒

风疹病毒

腮腺炎病毒

博卡病毒

汉坦病毒

VS

病毒流行模式



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

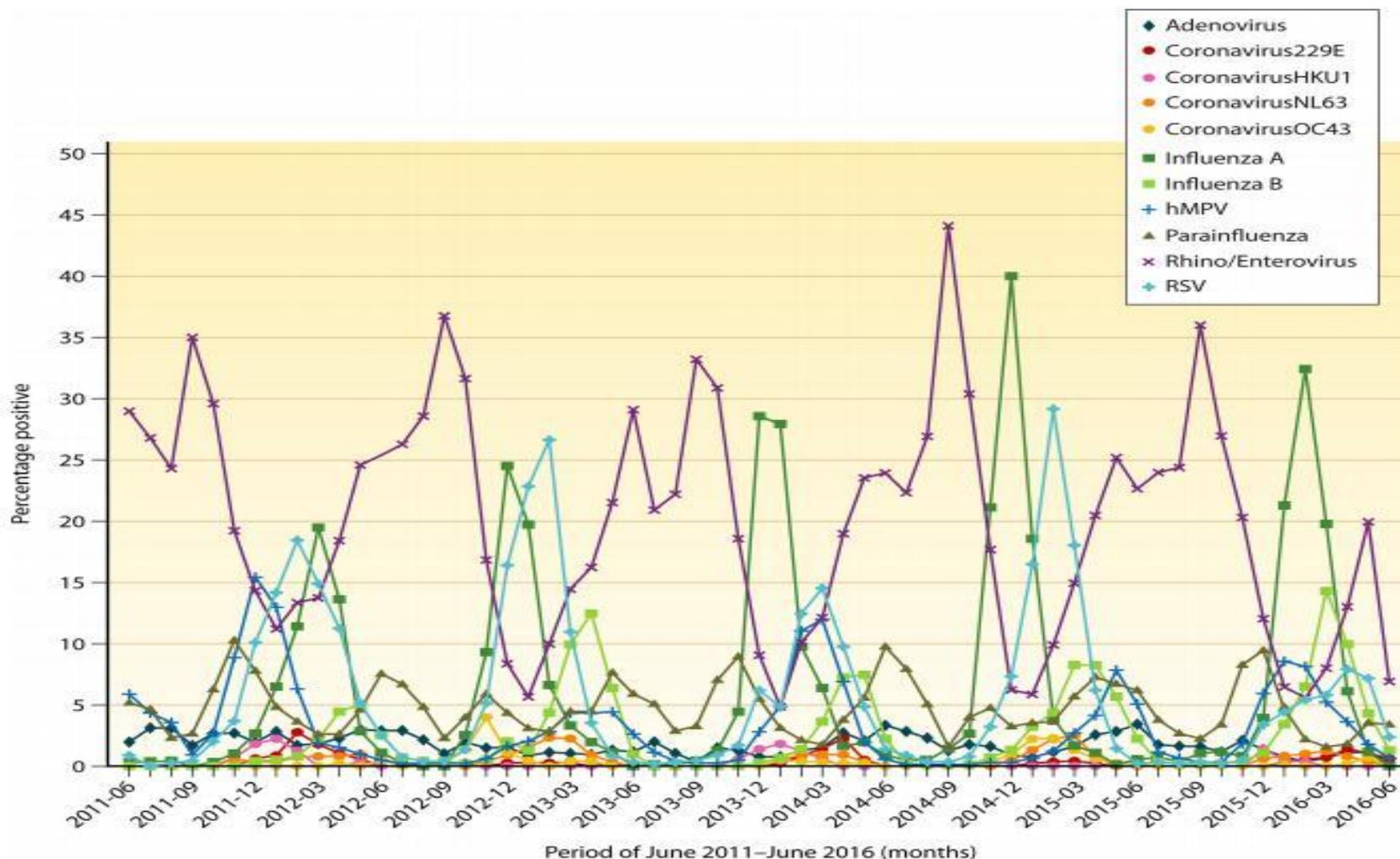


FIG 1 Circulation of common respiratory viruses in a large geographic area within the Northern Hemisphere. The data represent all acute respiratory virus testing for multiple years in a population of 4.1 million patients, using a common testing algorithm. The seasonality of viruses varies. (Generated by S. J. Drews and the ProvLab Alberta Laboratory Surveillance and Informatics Team, 2016.)

- 一些病毒保持一致的季节性，例如，在北半球，RV和呼吸EV通常在夏末和初秋（秋季）流行，而FLUA预计会在12月或1月达到峰值
- 另一些病毒的变化则很大，PIV类型具有不同的循环模式，其季节性取决于亚型，而且主要类型每年都会发生变化

吸入传染性飞沫



气溶胶传播是最常见的传染途径

大的雾化飞沫传播距离 $\leq 0.9\text{m}$ ，小的雾化飞沫在咳嗽或打喷嚏时形成气溶胶能传播至 1.8m 以外。

1. 2007. Clin Infect Dis 45:353–359
2. 2007. Appl Environ Microbiol 73:1687–1696
3. 2015. Annu Rev Anim Biosci 3:347–373
4. 2007. PLoS Pathog 3:1470 –1476.

接触污染物



呼吸道粘膜自我接种是常见感染途径

无包膜病毒比有包膜病毒更稳定

呼吸道病毒在特定环境条件下增强，例如低温和低湿度。

常见呼吸道病毒的分类和特征



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

病毒组	科	核酸	核酸结构	包膜	大飞沫传播	作为污染物的生存时间	传播方式
腺病毒	腺病毒科	线性, 非节段	双链DNA	无	有	14-30天	直接接触、飞沫
冠状病毒	冠状病毒科	线性, 非节段	(+) 单链RNA	有	有	1小时-28天	空气传播、直接接触、飞沫
呼吸道肠道病毒/鼻病毒	小RNA病毒科	线性, 非节段	(+) 单链RNA	无	有	数据有限	飞沫
流感病毒A/B	正粘病毒科	线性, 节段	(-) 单链RNA	有	有	5分钟-7天	飞沫、空气传播 ³
副流感病毒1-4	副粘液病毒科	线性, 非节段	(-) 单链RNA	有	数据有限	4-10小时	直接接触
人类偏肺病毒	肺泡病毒科	线性, 非节段	(-) 单链RNA	有	数据有限	数据有限	直接接触
呼吸道合胞病毒A/B	肺泡病毒科	线性, 非节段	(-) 单链RNA	有	有	20分钟-8小时	直接接触

1. **病毒**在干燥表面或手上存活时间受温度、湿度、表面类型的影响。
2. 不同CoV隔离措施不同, 本表格中列出的隔离措施为SARS-CoV。
3. 某些案例中可能有空气传播



急性呼吸病毒感染

引起呼吸道疾病的不同病毒存在临床症状重叠，例如咳嗽、发热（温度 $\geq 37.8^{\circ}\text{C}$ ）和/或喉咙痛，这些症状特异性很差，其他非流感呼吸道病毒也可出现类似症状，因此仅根据临床症状无法区分不同类别的病毒。

1. 2018. NCIRD overview of influenza surveillance in the United States.
2. 2015. Clin Transplant. 29(10):938-43

病毒组	呼吸系统疾病	注释
腺病毒	咽炎、普通感冒、喉炎、支气管炎、细支气管炎、肺炎	婴幼儿咽炎的主要原因 ；4型和7型可以引起肺炎；可以使用包括ADV的多重核酸检测；延迟和持续播散可能会混淆定性试验的解释。
冠状病毒	普通感冒、咽炎、喉炎、支气管炎、细支气管炎、肺炎、SARS、MERS	可用多重核酸检测和CoV四种基因分型（229E、OC43、NL63、HKU1）；SARS-CoV和MERS-CoV仅能通过核酸检测，通常在参考/公共卫生实验室进行。
呼吸道肠道病毒	细支气管炎、支气管炎、普通感冒、咽炎、胸膜痛	EV-D68与美国严重呼吸道病毒爆发有关（2014年）；可以使用包括EV的多重核酸检测；如文中所述，许多试剂盒无法区分EV和RV，也无法检测所有EV型（例如EV D68）。
人偏肺病毒	细支气管炎、普通感冒、喉炎、支气管炎、肺炎	hMPV感染5岁前儿童，特别是住院和门诊的大量负担相关；老年人同样易感；可使用多重核酸检测；可通过分子检测hMPV的两个型和四个亚型。
鼻病毒	细支气管炎、支气管炎、普通感冒、咽炎、肺炎	在美国，引起普通感冒和成人中最常见病毒性肺炎（8%）的首要病毒 ；可使用多重核酸检测；RVC基因只能使用多重核酸检测；某些分子试剂盒无法区分RV和EV。
流感病毒A/B	支气管炎、细支气管炎、普通感冒、喉炎、咽炎、肺炎	成人肺炎常见病原体；FLUA可使用多重核酸检测；可提供按需和即时分子检测；病毒载量测定的临床意义值得进一步研究。
副流感病毒1-4	细支气管炎、支气管炎、普通感冒、喉炎、中耳炎、咽炎、肺炎	PIV1和PIV3是支气管炎最常见的型别；PIV4尚未被确认为人类感染病原体；可使用多重核酸检测，包括区分PIV型别。
呼吸道合胞	细支气管炎、支气管炎、普通感	是导致细支气管炎主要病因和儿童中肺炎常见病原体 ；与RSV亚型相比，病毒载量与疾病严重程度相关；可使用多重核酸检

易感因素



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

宿主因素

先天性免疫：气道黏膜上皮细胞、覆盖在上皮细胞表面的黏液、向上运动的纤毛¹⁻²、白介素1、白介素18、防御素 α/β 、聚集素、I型干扰素 α/β 、免疫球蛋白A²

适应性免疫：细胞免疫、体液免疫

环境因素

家庭中兄弟姐妹数量、
环境吸烟暴露³、空气污染、气候条件和天气⁴⁻⁵

解剖学因素

上呼吸道：喉、鼻腔、鼻咽、口咽、喉咙、鼻窦、结膜、内耳，通常表现为鼻窦炎、普通感冒、急性鼻窦炎、急性喉炎、结膜炎、中耳炎。

1. 2011. Clin Micro_x0002_biol Rev 24:210 –229.
2. 2002. Br Med Bull 61:1–12.
3. 2016. Infect Dis Ther. 5(4):417-452
4. 2016. Int J Biometeorol. 60(12):1807-1817
5. 2003. Pediatr Infect Dis J. Feb;22(2 Suppl)



人 畜 共 患 病 毒 感 染

中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) -骆驼¹

猪流感病毒变异株-猪²

大流行性流感病毒-猪

禽流感病毒-禽类³

严重急性呼吸系统综合征冠状病毒-蝙蝠、果子狸⁴⁻⁵

1. 2013. Emerg Infect Dis 20:1012–1015.

2. 2016. Emerg Infect Dis 23:1551–1555.

3. 2017. Infect Dis (Lond) 50:71–74.

4. 2005. Proc Natl Acad SciUSA

102:2430–2435.

5. 2006. J Virol 80:4211– 4219.



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

02

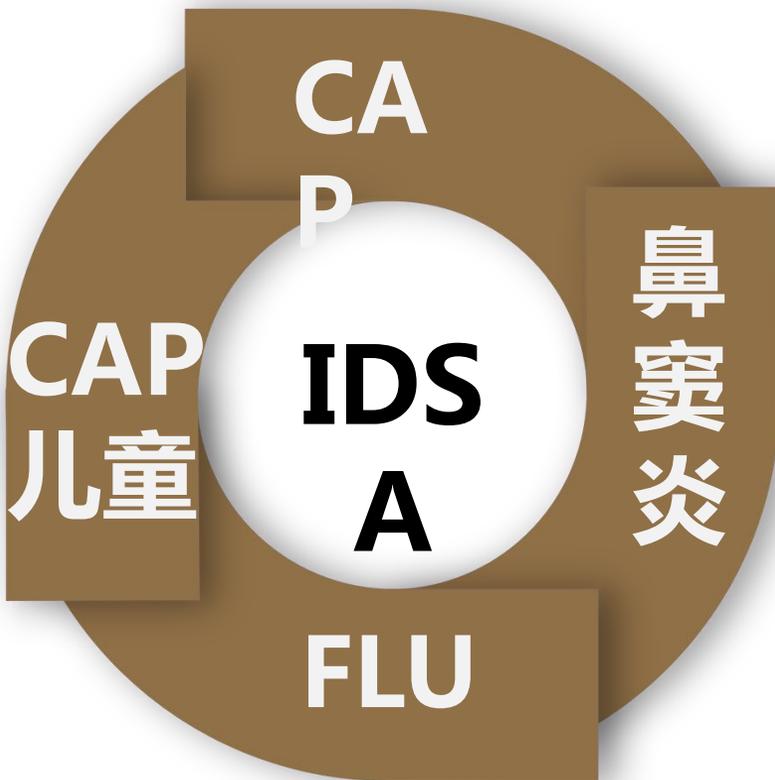
诊断和管理指南

Guidelines Addressing The
Diagnosis And Managment

美国传染病学会

支持抗病毒药物治疗季节性流感和大流行性
流感，支持疫苗预防季节性流感疾病。

不推荐利巴韦林治疗婴儿RSV，
推荐帕丽珠单抗预防RSV



使用临床方法而非实验室检
测区分病毒性和细菌性

只有当结果会影响临床治疗时才建议进行流感检测



美国移植协会

标本类型：鼻咽拭子、洗鼻液、吸出物或BAL¹

检测方法：NAAT、DFA、快速抗原检测、培养

预防：疫苗、神经氨酸酶（NA）抑制剂（NAIs）预防流感，帕丽珠单抗预防RSV

治疗：NAIs治疗流感，利巴韦林/静脉内注射免疫球蛋白（IVIG）治疗RSV，西福韦治疗ADV，不应将利巴韦林用于常规ADV治疗²

移植
患者

2013

1. 2013. Am J Transplant 13(Suppl 4):212–219.
2. 2013. Am J Transplant 13(Suppl 4):206 –211.



各个骨髓移植协会

标本类型：BAL或活检标本

检测：NAAT³

预防：疫苗接种和抗病毒预防流感，不推荐4岁以下HSC受者使用帕丽珠单

抗预防RSV¹

治疗：不推荐利巴韦林作为RSV的首选治疗¹。推荐利巴韦林和IVIG治疗

RSV，推荐单独使用利巴韦林治疗PIV²（第四届欧洲白血病感染会议指

南）。奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦治疗FLU、利巴韦林和IVIG治疗

RSV、西多福韦治疗ADV³（德国血液学和内科肿瘤学会传染病工作组）。

造血干
细胞移
植

2009

1. 2009. Biol Blood Marrow Transplant 15:1143–1238.

2. 2013. Clin Infect Dis 56:258 –266.

3. 2016. Eur J Cancer 67:200 –212.

特定人群和环境的其他美国和国际指南



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

急诊
环境

2016

美国急诊医学会

季节性流感时期仅对检测结果会改变治疗才进行检测

检测：快速抗原测试（RADT）、NAAT

治疗：RADT阴性但高度怀疑流感时应经验性抗病毒治疗¹。

特定人群和环境的其他美国和国际指南



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

美国CDC

检测：NAAT、培养、血清学和抗原检测¹。

检测时间：症状出现后尽快采集样本进行检测。

MERS-CoV指南

标本类型：上下呼吸道和血清标本

检测时间：症状出现后7天内，NAAT可延长至14天。

检测要求：在BSL-2/BSL-3设施使用标准BSL-

2/BSL-3操作²⁻³。

H7N9指南

检测时间：症状出现后7天内，儿童、免疫力低下患者、患有下呼吸道严重疾患的患者可适当延长时间⁴⁻⁵。

疫情
调查

1. 2018. Unexplained respiratory disease outbreaks (URDO).
2. 2017. Interim guidelines for collecting, handling, and testing clinical specimens from patients under investigation (PUIs) for Middle East respiratory syn_x0002_drome coronavirus (MERS-CoV)—version 2.1.
3. 2014. Interim laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS_x0002_CoV)—version 2.
4. 2018. Interim guidance on testing, specimen collection, and processing for patients with suspected infection with novel influenza A viruses with the po_x0002_tential to cause severe disease in humans.
5. 2018. Human infection with avian influenza A(H7N4) virus—China.



旅行
后感
染

CDC国际旅行健康信息

**在没有严重疾病或肺炎情况下不一定需要实验室诊断，
可跟据旅行史、症状考虑呼吸道疾病的新病因¹。**

1. 2016. The pre-travel consultation: respiratory infections, p 78 – 80



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

03

标本采集

Specimen Collection



金标准：NPA（鼻咽抽吸物）¹

**儿童：NPS（鼻咽拭子）²，而NS（鼻拭子）更容易获得
3-5**

采集容器：使用带有液体病毒转运介质的植绒拭子⁷⁻⁹

1. 2010. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 29:365–371.
2. 2015. APMIS 123:473– 477.
3. 2009. J Virol Methods 156:102–106.
4. 2001. BMJ 322:138.
5. 2002. Arch Dis Child 86:372–373.
7. 2013. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 32:381–385.
8. 2006. J Clin Microbiol 44:2265–2267.
9. 2010. J Clin Microbiol 48: 3340 –3342.

采集类型



标本种类	检测的敏感性 ¹						
	FLU A/B	RSV	RV/EV	ADV	hMPV	PIVs	CoVs ²
鼻咽拭子	++	++	++	++	++	+++	++
鼻咽抽吸物	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
口咽拭子	++ (+) ³	++	+	++	+	+	+
TS	++	++	+	++	+	++	++
痰液	+++	+++	+++	+++	++	+ (+)	++ (+) ⁴
BAL fluid	+++	+++	++	++	++	+ (+)	++
Lung biopsy specimen	++	++	+	+	+	○	+++

1 +++标本类型对所示病毒检出率高，++标本类型可用于病毒检测，但检测所用的采样或检测方法可能会降低灵敏度，+标本类型降低了对指定病毒的敏感性，++ (+)轻度降低灵敏度，+ (+)中度降低灵敏度，○使用有限。2 对于新出现的禽流感病毒或冠状病毒例如SARS、MERS，另外建议加强下呼吸道标本检测。3 FLUA使用NPS检测更敏感，FLUB使用OPS检测更敏感。4 不同冠状病毒的痰液敏感性不同。5 根据接受的标本的质量，痰液检测结果的敏感性会有很大差异。与接受细菌性痰液检测相比，病毒性检测无法进行标本筛查。

采集时间

病毒载量

症状出现后5天内（最好48小时内）
从有症状的个体采样，疾病恶化或婴幼儿、免疫力低下患者可延长至5日后，血液病患者可以延长至30天¹⁻²。

RV感染出现症状后2天NAAT检测达峰值，病毒载量7天内下降

57%的人hMPV症状出现2天内被检测到，19%在发病后4天被检测到³

RSV播散在发病2天达到峰值，平均播散时间4.5天

FLUA症状出现第1天达峰值，直到第8天被检测到。FLUB症状发作当天最高，持续到6-8天⁴

1. 2009. Clin Infect Dis 48:1003–1032.

2. 2011. J Clin Microbiol 49:S44 –S48.

3. 2010. BMC Infect Dis 10:170.

4. 2016. Clin Infect Dis 64:736 –742.

呼吸道病毒检测

病人类型	病毒	病毒靶点	技术	与实时PCR敏感性对比 (%)	与实时PCR特异性对比 (%)	标本类型	一般TAT
临床患病，无年龄限制。	FLUA , FLUB	抗原	免疫色谱技术 (第一代)	FLUA 15-56, FLUB 24-56, 组合23-69	FLUA 99-100, FLUB 99-100, 组合96-97	NPS, NS, NW/鼻抽吸物	数分钟
临床患病，初生儿和不同年龄儿童。	RSV	抗原	免疫色谱技术 (第二代)	58-80	91-100	NPS, NS, NW/鼻咽洗液	数分钟
临床患病，无年龄限制。	FLUA , FLUB	抗原	辅助/自动读取免疫分析 (第二代)	FLUA 67-81, FLUB 33-92	FLUA 98-100, FLUB 90-100	NPS, NS, NW/鼻抽吸物	数分钟
临床患病，不同年龄儿童。	RSV	抗原	辅助/自动读取免疫分析 (第二代)	78-82	97-99	NPS, NW/鼻抽吸物	数分钟
临床患病，无年龄限制。	FLUA , FLUB	核酸	管道扩增和分子信标探针检测	FLUA 73-94, FLUB 75-97	FLUA 63-100, FLUB 54-100	直接NS或NPS	≤1h
临床患病	FLUA , FLUB	核酸	自动标本准备、扩增、检测、结果报告, 实时PCR	FLUA 98-99, FLUB 99-100	FLUA 99-100, FLUB 99-100	NPS	≤1h
临床患病	FLUA , FLUB , RSV	核酸	自动标本准备、扩增、检测、结果报告, 实时PCR	FLUA 95, FLUB 100, RSV 99	FLUA 98, FLUB 99, RSV 99	NPS	≤1h
	FLUA H3N2亚型						



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

04

实验室检测

Laboratory Detection

实验室检测方法



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

金标准
特异性强
灵敏度低
TAT长
专业性强
对新发病毒重要

直接荧光抗体
免疫荧光抗体
商业化试剂盒
无需活病毒
TAT短
专业性强
人工判读

专业性弱
TAT短
敏感性较弱
不能排除感染
流行季节FLU和RSV可行

高灵敏性
高特异性
污染后易导致假阳性
高成本

疑难、罕见、新发
病原体筛查
设备人员要求高
易漏检
费用高昂



病毒分离培养——仅限于常见呼吸道病毒，为金标准



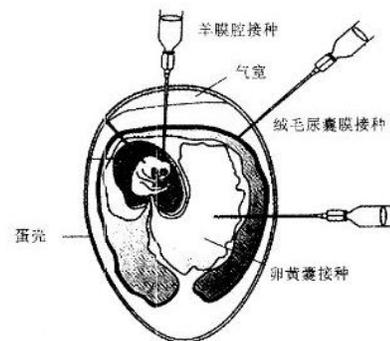
上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

✦ 鸡胚接种——尿囊腔、软黄囊、尿囊膜、羊膜腔等

✦ 细胞培养——原代细胞

二倍体细胞

传代细胞

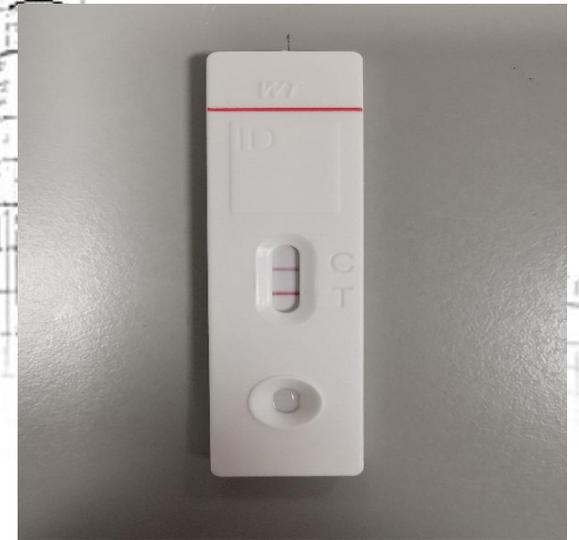
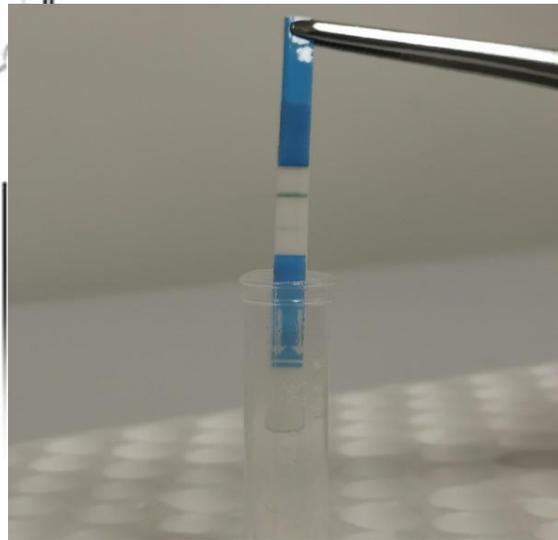
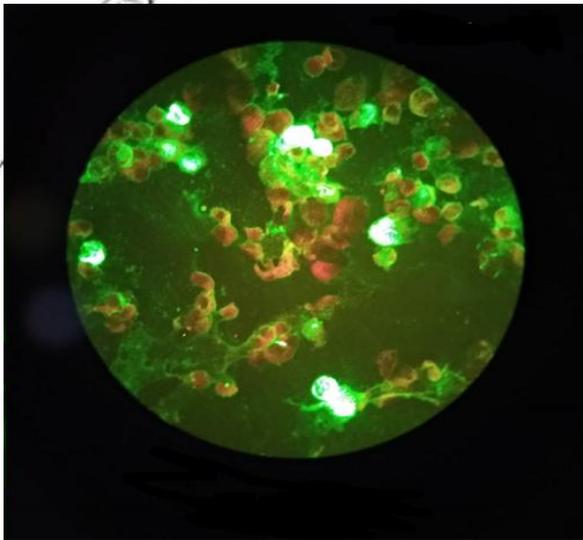


缺点

常规检测不适用，多用于科研

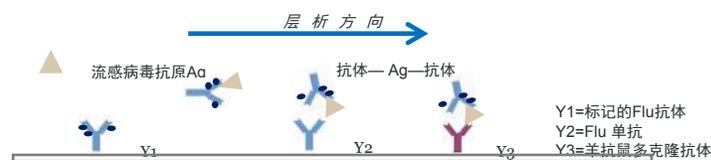
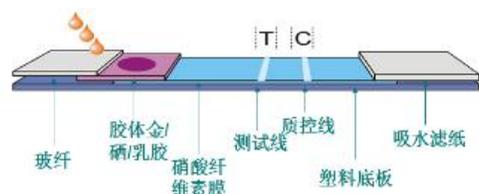
病毒抗原检测

- **病毒抗原**：在病毒侵入呼吸道上皮细胞后活跃复制、增殖的过程中产生的**病毒蛋白**
- **疾病早期**，抗原检测的诊断价值较好
- **直接或间接免疫荧光法**——敏感、特异，住院患者多用
- **免疫层析法**——敏感和特异偏低，但操作简便、快速，门急诊患者可选



快速流感抗原检测

Clearview 甲型/乙型流感抗原检测试剂盒（胶体金法）



可以检测出包含Flu A病毒7个H1N1亚型，5个H3N2亚型，2个H5N1亚型，1个H9N2亚型，1个H7N3亚型；以及FluB病毒5个型。

快速：15分钟快速的抗原检测，更早更快的帮助临床诊断。

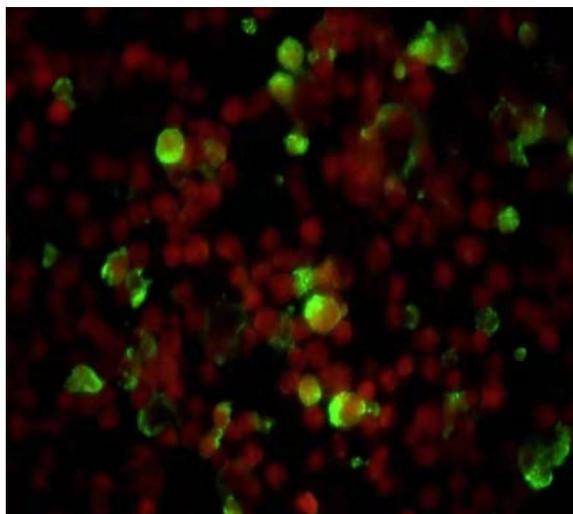
准确：高敏感性和特异性，单人份检测，适合门诊初筛使用。

病毒抗体检测



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

- 制备不同型别的毒株或抗原
- 细胞培养方法检测型特异性中和抗体滴度（中和实验）
- ELISA\化学发光等（IgM/IgG定量，全自动）
- 免疫荧光、免疫金标法（IgM/IgG定性快检，门急诊可用）

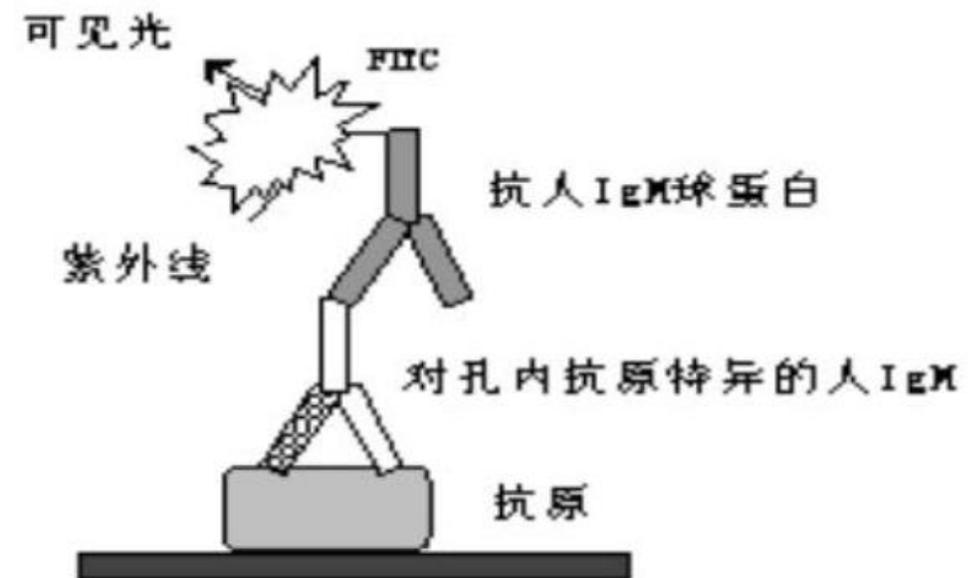
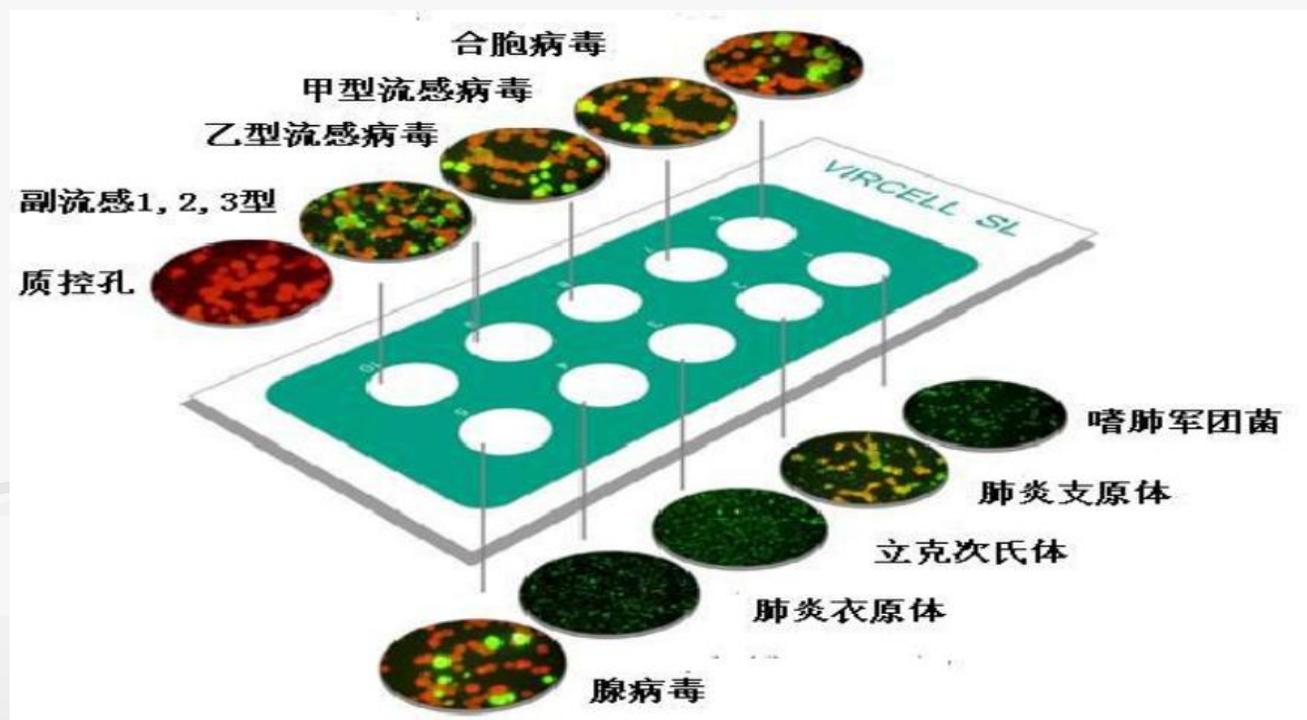


九项呼吸道病原体抗体联检项目

原理：间接免疫荧光法（IFA）

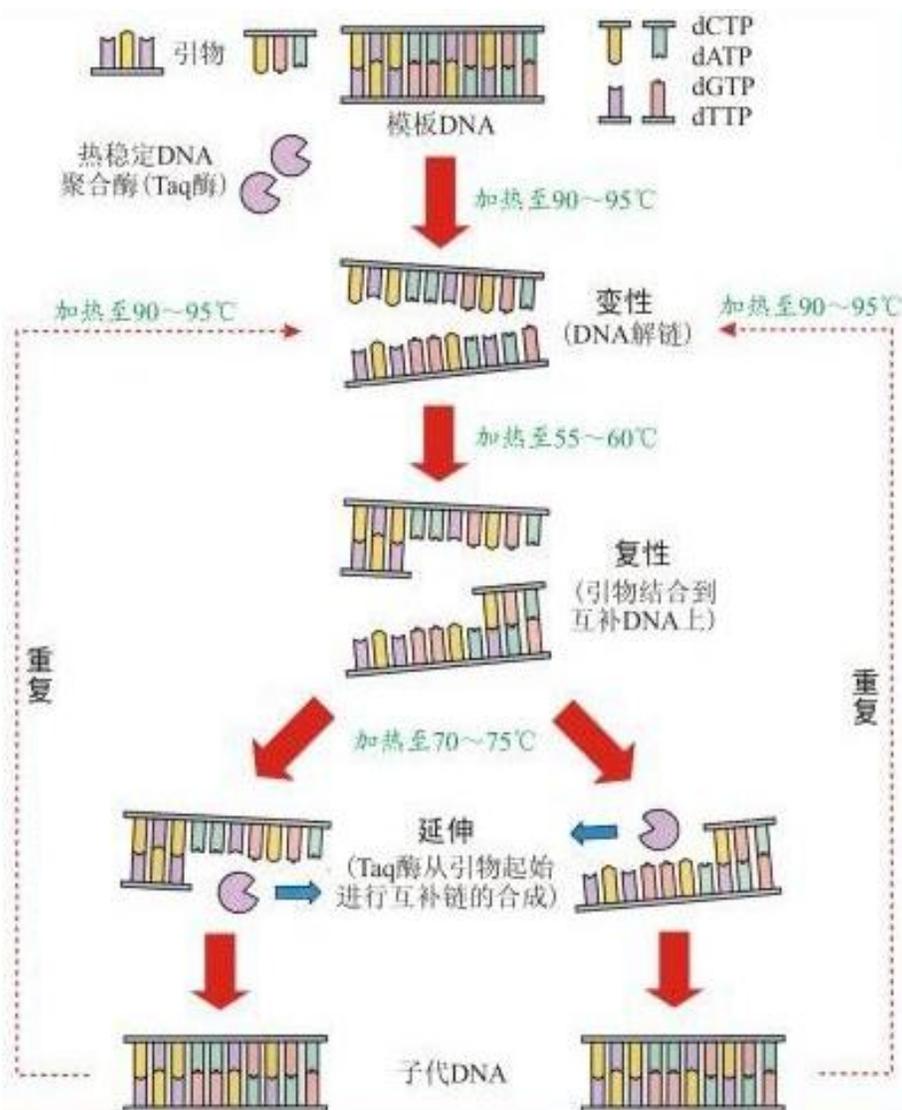
检测优势：1、IgM抗体，利于早期诊断

2、血清标本，易采集



抗体产生时间

病原体	潜伏期	IgM产生时间
嗜肺军团菌	2-10天	1周左右
肺炎支原体	14-21天	1周左右
Q热立克次体	12-19天	2周左右
肺炎衣原体	30天左右	2-3周
腺病毒	2-14天	1周左右
呼吸道合胞	3-7天	1周左右
流感病毒	1-7天	1周左右
副流感	2-7天	1周左右



实时荧光PCR：同时1-3种呼吸道病毒

多重PCR系统：同时多种呼吸道病毒

等温扩增：快速核酸检测

普通PCR+测序+进化树分析：鉴定不同型别

NGS：同时检测所有病原体

污 染 控 制

污染原因：采集破坏样本完整性、实验室早期处理过程中破坏了完整性¹、气溶胶污染²、医疗单位中拭子不当处置³、实验室工作人员本身。

控制方法：紫外光产生胸苷二聚体，使用修饰核苷酸改变扩增化学，添加尿嘧啶DNA糖基化酶（UNG）以及使用羟胺来防止后续反应中胞嘧啶和鸟嘌呤碱基配对，当然也可以使用化学方法⁴⁻⁶。

1. 2015. Molecular diagnostic methods for infectious diseases: MM03- A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

2. 2014. Report on the inadvertent cross-contamination and shipment of a laboratory specimen with influenza virus H5N1

3. 2016. Medicine (Balti_x0002_more, MD) 95:e3014.

4. 1992. Mol Cell Probes 6:251–256.

5. 1990. Gene 93:125–128.

6. 2004. Ann Clin Lab Sci 34:389 –396.

减少污染事件的实验室规范

分子系统类型的建议^a

	打开	关闭
单向流（从干净到脏）	推荐	不需要
预检区和工作后区域的物理分离	推荐	不需要
定期清理工作区域	推荐	推荐
使用抗气溶胶移液器吸头	推荐	推荐
在处理步骤之间更换 PPE	推荐	不需要
扩增后限制工作人员移动	推荐	不需要
离心试剂	推荐	推荐
确保一次只打开一个样本	推荐	推荐
监测污染事件的流程	推荐	推荐
放大前和放大后区域的专用设备	推荐	不需要
监测污染环境（例如，通过环境滑动测试）	推荐	推荐

^a根据分子系统的类型，建议或不需要实验室减少污染的做法 (217, 221–223, 228)。



阳性预测值和假阳性

原因：NAAT有较高的灵敏度和出色的阴性预测值，结果为阴性可排除感染。由于分子扩增比培养法更敏感¹，培养方法阴性很难确定分子结果是否为假阳性。

措施：使用不同基因靶点的第二次分子检测来解决分子与培养不一致，它的敏度应等于或优于第一次²。

1. 2002. Clin Infect Dis 34:177–183.
2. 2009. Arch Pathol Lab Med 133:743–755.



POCT

优点：试剂易于保存，可移动性强，易于使用和减少流程步骤，允许结果更快解读，减少污染的封闭系统¹⁻⁴，满足基层医疗机构和资源匮乏地区的检测需求

缺点：对实验室造成压力，对中心实验室以外资源利用的影响，可使用样本类型有限⁵⁻⁷。

1. 2014. J Clin Microbiol 52:3339 –3344.
2. 2015. J Clin Microbiol 53:706 –709.
3. 2015. Influenza Other Respir Viruses 9:151–154.
4. 2015. J Clin Microbiol 53:2353–2354.
5. 2015. Lancet Glob Health 3:e663– e664.
6. 2015. Expert Rev Mol Diagn 15:853– 855.
7. 2012. Future Virol 8.

快速（便携式）微生物分子诊断技术要求



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市第十人民医院

- **快速（便携式）分子诊断仪器的理想条件是可以接受未经处理的样本，实现“样品进-结果出”检测，并能在不到一小时内提供完全解释的结果。**
- **“样品进-结果出”**
- **仪器体积小、重量轻且对温度、湿度条件无严格要求，可移动性强。**
- **试剂在各种环境条件下运输和储存的稳定性也是重要要求，无需冷链运输和保存。**
- **单样本检测成本的控制有利于在基层医疗机构的广泛应用**
- **本检测流程、缩短检测时间**
- **自带电源且蓄电时间长，与云端连接传输数据的功能且有相对大的数据存储功能。**
- **扩增体系的设计及优化，独特的温控系统结构可加快反应速度**
- **此外快速核酸扩增技术的应用，如环介导等温扩增技术，重组酶聚合酶技术等不需要复杂的热循环系统，可将反应时间缩小到十几分钟。**

便携式（快速）分子诊断产品的应用现状



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

✓病毒检测方面

流感病毒A/B

呼吸道合胞病毒

新型冠状病毒

POCT快速检测减少流感院内传播



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

在2017/18流感季节期间，评估急诊科(ED)的流感即时检测(POCT)和流感病房的患者分组对感染预防和控制及临床结果的影响：

- ✓ 医院获得性流感病例（每天）减少 (0.66 vs 0.95, $P < 0.0001$)
- ✓ 平均住院时间缩短 (5.5天 vs 7.5天, $P = 0.005$)
- ✓ 使用抗病毒药物的频率增加 (80% vs 64.1%, $P < 0.0001$)。

Table II
Impact of influenza point-of-care testing in an emergency department and patient cohorting on an influenza ward on hospitalized patients with confirmed influenza

	2016/17 season (N = 154)	2017/18 season (N = 654)	P-value	2016/17 season (N = 154)	Pre-intervention (N = 223)	P-value	Pre-intervention (N = 223)	Post-intervention (N = 431)	P-value
Patient characteristics									
Age in years, median (IQR)	60 (29–79)	71 (50–82)	<0.0001	60 (29–79)	72 (50–83)	<0.0001	72 (50–83)	70 (50–82)	0.237
Male sex, N (%)	79 (51.3)	305 (46.6)	0.32	79 (51.3)	104 (46.6)	0.37	104 (46.6)	201 (46.6)	1.00
Severe immunosuppression, N (%)	23 (14.9)	71 (10.9)	0.16	23 (14.9)	23 (10.3)	0.18	23 (10.3)	48 (11.1)	0.75
Virus strain									
Influenza A, N (%)	143 (92.9)	343 (52.4)	<0.0001	143 (92.9)	107 (48.0)	<0.0001	107 (48.0)	236 (54.8)	0.1
Influenza B, N (%)	11 (7.1)	304 (46.5)	<0.0001	11 (7.1)	112 (50.2)	<0.0001	112 (50.2)	192 (44.5)	0.12
Influenza A&B, N (%)	0 (0)	7 (1.1)	0.20	0 (0)	4 (1.8)	0.10	4 (1.8)	3 (0.7)	0.20
Outcome measures									
Hospital-acquired influenza, N (%)	36 (23.4)	143 (21)	0.68	36 (23.4)	77 (34.5)	0.02	77 (34.5)	66 (15.3)	<0.0001
Hospital-acquired influenza per day, N	0.20	0.79	<0.0001	0.2	0.95	<0.0001	0.95	0.66	<0.0001
GP IFI consultations in England per 100,000, N – (A)	246	527.4		246	236.5		236.5	290.9	
Influenza-related blocked-bed-days, N	167	729		167	224		224	505	
Influenza-related blocked-bed-days per day, N – (B)	0.92	4.03	<0.0001	0.92	2.77	<0.0001	2.77	5.05	<0.0001
Influenza-related blocked-bed-days weighted by GP IFI rate – (B/A)*100, N	0.37	0.76	0.001	0.37	1.17	<0.0001	1.17	1.74	0.003
Antiviral drugs prescribed, N (%)	73 (47.4) [‡]	488 (74.6)	<0.0001	73 (47.4) [‡]	143 (64.1)	0.001	143 (64.1)	345 (80.0)	<0.0001
Length of admission in days, median (IQR)	4.5 (1.8–11.5)	5.5 (2.5–14.5)	0.019	4.5 (1.8–11.5)	7.5 (2.5–19.5)	0.001	7.5 (2.5–19.5)	5.5 (2.5–12.5)	0.005
30-day all-cause mortality, N (%)	9 (5.8)	52 (7.9)	0.37	9 (5.8)	23 (10.3)	0.13	23 (10.3)	29 (6.7)	0.11

enza-like illness; IQR, interquartile range.
April 2017 (181 days), 2017/18 = 1st November 2017–30th April 2018 (181 days), pre-intervention = 1st November 2017–20th January 2018 (81 days), post-30th April 2018 (100 days).
figures from discharge summaries and To Take Out prescriptions only) so this is likely to be an underestimate.

J. Youngs et al. / Journal of Hospital Infection 101 (2019) 276–284

- 2018年1月21日开始使用Cobas Liat POCT检测
- 干预前定义为2017年11月1日至2018年1月20日住院的患者

在当前新冠疫情已波及全球背景下，出于对疫情防控的要求，多个快速核酸测试剂盒通过国家应急审批，极大推动了国内分子诊断POCT的开发及应用。

Table 3. Diagnostic devices cleared in China for laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 infections.

Registration number	Manufacturer	Date registered	Specimen type	Principle and method	Instrument	Targets	Remarks
20203400057	Shanghai ZJ Bio-Tech	26 January 2020	Sputum, BAL, NPS	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, E, N	LOD: 1000 copies/ml
20203400058	Shanghai GeneDx Biotech	26 January 2020	Sputum, pharyngeal swab	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N	
20203400060	BGI Biotech (Wuhan)	26 January 2020	BAL, pharyngeal swab	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab	Single target
20203400061	MGI Tech	26 January 2020	Undefined	NGS	Genetic sequencer (DNBSEQ-T7)	Microbial DNA and RNA including SARS-CoV-2 genome	
20203400063	Da An Gene	28 January 2020	Pharyngeal swab, sputum	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N and IC	LOD, 500 copies/ml
20203400064	Sansure Biotech	28 January 2020	NPS, BAL	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N, IC	LOD, 200 copies/ml; One-step RNA with 10 min specimen pretreatment
20203400065	Shanghai BioGerm Medical Biotech	31 January 2020	NPS, OPS, sputum	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N	
20203400176	Wongfo Biotech	22 February 2020	Serum, plasma, whole blood	Immune colloidal gold technique	Not needed	Antibody against SARS-CoV-2	
20203400177	Innovita Biological Technology	22 February 2020	Serum, plasma	Immune colloidal gold technique	Not needed	IgM/IgG antibody against SARS-CoV-2	
20203400178	CapitalBio (Chengdu)	22 February 2020	NPS	Isothermal amplification and microarray	RTisochip™-A (20173401354)	S, N and IC. Also covers Flu A (universal, H1N1, H3N2), Flu B and RSV	LOD, 50 copies/reaction; Total TAT, 1.5 h
20203400179	Beijing Applied Biological Technologies (X-ABT)	27 February 2020	Sputum, NPS	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N, E, IC	LOD, 200 copies/ml; TAT, 90 min
20203400182	Bioscience (Chongqing)	1 March 2020	Serum	Magnetic particle chemiluminescence	Automated magnetic analyser: Axceed 260	IgM antibody against SARS-CoV-2	
20203400183	Bioscience (Chongqing)	1 March 2020	Serum	Magnetic particle chemiluminescence	Automated magnetic analyser: Axceed 260	IgG antibody against SARS-CoV-2	
20203400184	Maccura Biotechnology	1 March 2020	Pharyngeal swab, sputum	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N, E	
20203400198	Xiamen Wantai Kairui Biotechnology	6 March 2020	Serum, plasma	Chemiluminescence immunoassay	Caris 200 Automatic Chemiluminescence Analyser	Total antibody (IgM, IgG and IgA) against SARS-CoV-2	TAT, 29 min; Throughput, 400 tests/hour; Sensitivity, 94.8%; Specificity, 99.7%
20203400199	Guangdong Hecin-Scientific	11 March 2020	Serum, plasma	Immune colloidal gold technique	Not needed	IgM antibody against SARS-CoV-2	
20203400212	Wuhan Easydiagnosis Biomedicine	12 March 2020	NPS, OPS, sputum	Fluorescence RT-PCR	Real-time thermocycler, e.g. ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument	ORF1ab, N	

Note: LOD, limit of detection; TAT, turnaround time; NPS, nasopharyngeal swabs; OPS, oropharyngeal swabs; BAL, bronchoalveolar lavage; NGS, next-generation sequencing; Flu, influenza; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction.

新型冠状病毒检测试剂盒



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

存在的问题

- ✓ 未经过充分的性能验证和临床应用评估
 - ✓ 灵敏度不足
- ✓ 需加强临床性能验证
 - ✓ 需要在不降低特异性的前提下不断提高灵敏度，减少漏检。

表1 7种国产2019-nCoV核酸检测试剂盒的基本特征汇总

试剂盒名称	检测原理	内标	目标基因	检出限(拷贝/ml)	标本类型	扩增仪	核酸提取试剂	反应体系模板/总体积(μl)	循环数/cut-off值(Ct值)
a 梓健	双重荧光PCR	RNase P	ORF1ab/N	1 000	咽拭子/痰液	ABI7500/Roche480	QIAamp Viral RNA Mini Kit/梓健核酸提取或纯化试剂	5/25	40/37
b 达安	双重荧光PCR	有	ORF1ab/N	1 000	咽拭子	ABI7500/Roche480	适当核酸提取纯化试剂	5/25	45/40
c 伯杰	双重荧光PCR	无	ORF1ab/N	1 000	上、下呼吸道标本/组织培养物	ABI7500/BioCFX96/Roche480	上海伯杰医疗科技有限公司核酸提取及纯化试剂	5/25	40/38
d 之江	三重荧光PCR	装甲RNA	ORF1ab/N/E	1 000	咽拭子/痰液/肺泡灌洗液	ABI7500/7900/Bio-Rad CFX96/SLAN	QIAamp Viral RNA Mini Kit/上海之江核酸提取试剂	5/25	45/43
e 圣湘	双重荧光PCR	RNase P	ORF1ab/N	200	咽拭子/肺泡灌洗液	ABI7500/Stratagene/SLAN-96P/96S	圣湘生物科技股份有限公司标本释放剂	20/50	45/40
f 亚能	三重荧光PCR	装甲RNA	ORF1ab/N/S	1 000	咽拭子/痰液/肺泡灌洗液	ABI7500/SLAN-96P/96S/Bio-Rad CFX96	广州美基生物科技有限公司核酸提取试剂	5/25	45/40
g 华大	荧光PCR	有	ORF1ab	100	咽拭子/肺泡灌洗液	ABI7500/SLAN-96P	QIAamp Viral RNA Mini Kit/天根生化科技有限公司核酸提取试剂	10/30	40/38

目前所用试剂盒最低检出限大多在
400~1000copies/ml

当前病原体快速分子诊断技术存在的问题



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

- 单次检测通量低
- 检测病原体靶标不够多
- 检测灵敏度不够高
- 检测数据存储量不够大
- 检测环境要求不够宽
- 智能化程度不够高
- 检测速度还不够快
- 性能还没有得到充分的验证
- 缺乏相应的管理规范

分子检测

多重NAAT

优点：同时检测病毒的多个靶点，有助于鉴别混合病毒感染。

缺点：无法区分密切相关的病毒或以同等灵敏度检测所有靶点，某些时候单位点检测更有效¹。

血液科和肿瘤科患者：
单一感染或混合感染

移植患者

重症监护病房（ICU）

患有潜在疾病的儿科患者



Xpert Xpress Flu/RSV Assay (流感病毒A/B , 呼吸道合胞病毒+SARS-CoV-2)

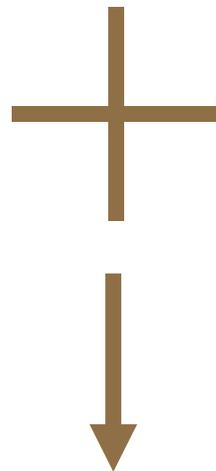
- **即时**- 简单三步手动操作 , 30分钟同时报告Flu A、Flu B和RSV
- **分子**- 基于RT-PCR原理 , 全自动完成 RNA 提取、纯化、逆转录及临床样本的靶序列检测
- **诊断**- 分子检测方法具有高灵敏度和高特异性 , 可作流感的确诊



Xpert即时分子诊断技术的优势

PCR技术

- 准确率高，灵敏度高
- 耗时长，操作复杂
- 需要专业人员判读



胶体金快检

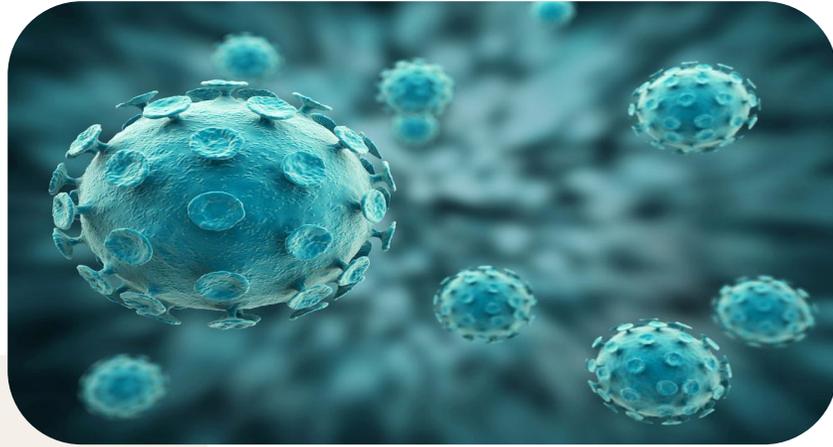
- 时间短，操作简单
- 可以进行床旁检测
- 灵敏度低
- 无法检测亚型

即时分子诊断技术

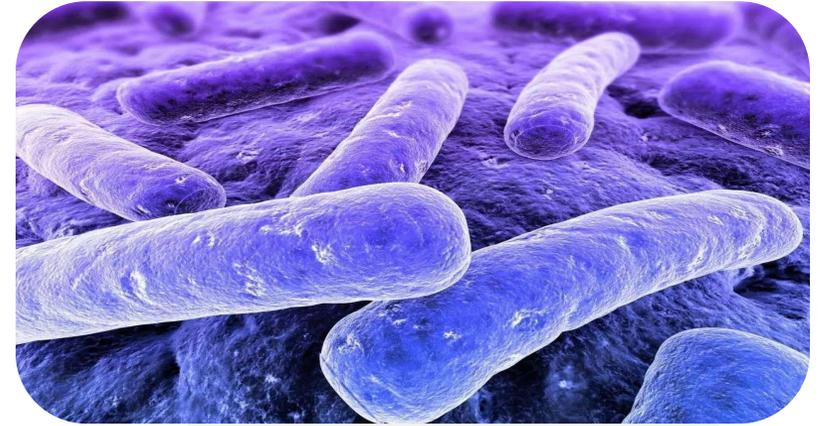
- 准确率高，灵敏度高
- 耗时短，实时检测
- 操作简单，可进行床旁检测



FilmArray RP Panel上呼吸道感染测试（20种病原靶标）



腺病毒
冠状病毒HKU1
冠状病毒NL63
副流感病毒2型
冠状病毒229E
冠状病毒OC43
人类偏肺病毒
人鼻病毒 / 肠病毒
甲型流感病毒
甲型流感病毒H1亚型
甲型流感病毒H1-2009亚型
甲型流感病毒H3亚型



百日咳杆菌
肺炎衣原体
肺炎支原体

乙型流感病毒
副流感病毒1型
副流感病毒2型
副流感病毒3型
副流感病毒4型
呼吸道合胞病毒



呼吸道感染多靶标检测系统

呼吸道三联检

1. 新型冠状病毒
2. 甲型流感病毒
3. 乙型流感病毒

呼吸道六联检

1. 甲型流感病毒
2. 乙型流感病毒
3. 呼吸道合胞病毒
4. 鼻病毒
5. 腺病毒
6. 肺炎支原体

提升呼吸道病原精准鉴别

优化和改进感染性疾病的精准治疗



分子检测 (mNGS)



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

- mNGS是直接针对样本中所有核酸进行无偏性测序，结合病原微生物数据库及特定算法，检测样本中含有的可能病原微生物序列。几乎可以检测所有类型的感染性病原体，包括病毒、细菌、真菌、寄生虫、支原体、钩端螺旋体等，甚至可以检测到新的微生物。
- 优点：准确性和可靠性高，可通过WGS提供大量的生物信息，未知病原体确认快，TAT短。
- 缺点：WGS检测费用高，潜在的新耐药基因或突变，故容易发生读码错误，缺乏标准化，数据的隐私受到挑战，高质量的序列读码有待改善，RNA病毒无法测试。



Metagenomic Next-Generation Sequencing of Nasopharyngeal Specimens Collected from Confirmed and Suspect COVID-19 Patients

Heba H. Mostafa,^a John A. Fissel,^a Brian Fanelli,^b Yehudit Bergman,^a Victoria Gniazdowski,^a Manoj Dadlani,^b Karen C. Carroll,^a Rita R. Colwell,^{b,c} Patricia J. Simner^a

mNGS应用于新冠病毒COVID-19的检测



Application of Metagenomic Next-Generation Sequencing in the Diagnosis of Pulmonary Infectious Pathogens From Bronchoalveolar Lavage Samples

OPEN ACCESS

Edited by:
Chao Qi

Yuqian Chen¹, Wei Feng¹, Kai Ye², Li Guo², Han Xia³, Yuanlin Guan³, Limin Chai¹, Wenhua Shi¹, Cui Zhai¹, Jian Wang¹, Xin Yan¹, Qingting Wang¹, Qianqian Zhang¹, Cong Li¹, Pengtao Liu¹ and Manxiang Li^{1*}



Improving Pulmonary Infection Diagnosis with Metagenomic Next Generation Sequencing

Yi-Yi Qian¹, Hong-Yu Wang¹, Yang Zhou¹, Hao-Cheng Zhang¹, Yi-Min Zhu¹, Xian Zhou¹, Yue Ying¹, Peng Cui¹, Hong-Long Wu^{2,3}, Wen-Hong Zhang^{1,4,5,6}, Jia-Lin Jin^{1*} and Jing-Wen Ai^{1*}

¹ Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai, China; ² RGI PathoGenes

支气管肺泡灌洗液样本的mNGS可为肺部感染提供更准确的诊断信息，并显示不同基础疾病中呼吸道微生物组的变化。

mNGS有助于提高对呼吸道感染病原体的识别



三代测序技术（Nanopore）原理

技术原理——纳米孔技术

基于纳米孔技术的三代基因测序原理及特点

原理：单个碱基通过纳米孔通道时，引起通道**电学性质**的变化。4种碱基（A/T/C/G）化学性质的差异会导致它们穿越纳米孔时引起的电学参数变化量不同，通过检测这些变化从而相应的识别出**不同碱基**类型。

特点：一、单分子实时测序，可以**边测序边分析**，大大缩短其检测周期；
二、相比于其他测序技术，有着**超长的读长优势**（目前最长读长可以达到2.2Mb），序列比对的特异性有明显的提升；
三、便携式，不需要通过检测光、颜色或pH来实现碱基序列的读取，基于电信号的测序技术，**空间要求低**，而且**通量灵活**。

Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection

Themoula Charalampous ^{1,8}, Gemma L. Kay ^{1,2,8}, Hollian Richardson^{1,8}, Alp Aydin ²,
Rossella Baldan^{1,3}, Christopher Jeanes⁴, Duncan Rae⁴, Sara Grundy⁴, Daniel J. Turner⁵, John Wain^{1,2},
Richard M. Leggett ⁶, David M. Livermore^{1,7} and Justin O'Grady ^{1,2*}

The gold standard for clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infections (LRIs) is culture, which has poor sensitivity and is too slow to guide early, targeted antimicrobial therapy. Metagenomic sequencing could identify LRI pathogens much faster than culture, but methods are needed to remove the large amount of human DNA present in these samples for this approach to be feasible. We developed a metagenomics method for bacterial LRI diagnosis that features efficient saponin-based host DNA depletion and nanopore sequencing. Our pilot method was tested on 40 samples, then optimized and tested on a further 41 samples. Our optimized method (6 h from sample to result) was 96.6% sensitive and 41.7% specific for pathogen detection compared with culture and we could accurately detect antibiotic resistance genes. After confirmatory quantitative PCR and pathobiont-specific gene analyses, specificity and sensitivity increased to 100%. Nanopore metagenomics can rapidly and accurately characterize bacterial LRIs and might contribute to a reduction in broad-spectrum antibiotic use.

PacBio sequencing

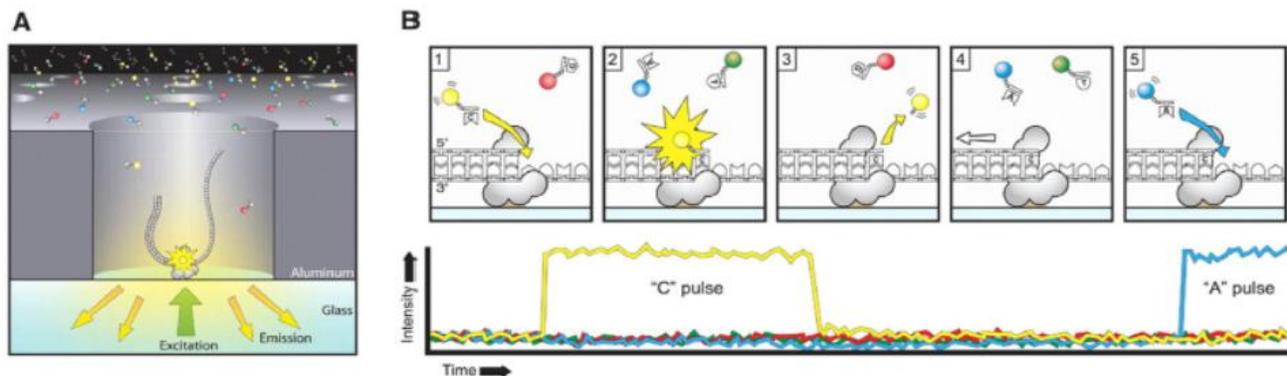


Figure 3 Sequencing via light pulses

A. A SMRTbell (gray) diffuses into a ZMW, and the adaptor binds to a polymerase immobilized at the bottom. B. Each of the four nucleotides is labeled with a different fluorescent dye (indicated in red, yellow, green, and blue, respectively for G, C, T, and A) so that they have distinct emission spectrums. As a nucleotide is held in the detection volume by the polymerase, a light pulse is produced that identifies the base. (1) A fluorescently-labeled nucleotide associates with the template in the active site of the polymerase. (2) The fluorescence output of the color corresponding to the incorporated base (yellow for base C as an example here) is elevated. (3) The dye-linker-pyrophosphate product is cleaved from the nucleotide and diffuses out of the ZMW, ending the fluorescence pulse. (4) The polymerase translocates to the next position. (5) The next nucleotide associates with the template in the active site of the polymerase, initiating the next fluorescence pulse, which corresponds to base A here. The figure is adapted from [4] with permission from The American Association for the Advancement of Science.



Figure 2 A single SMRT cell

Each SMRT cell contains 150,000 ZMWs. Approximately 35,000–75,000 of these wells produce a read in a run lasting 0.5–4 h, resulting in 0.5–1 Gb of sequence. The image is adapted with permission from Pacific Biosciences [3]. ZMW, zero-mode waveguide.

- 实时单分子测序，比二代测序读长更长，属第三代全基因组测序。
- 可弥补一、二代测序的读长有限、基因组重复序列多等短板，可用于发现新基因、检测碱基修正（如甲基化）等，也可应用于细菌全基因组装配等
- 虽然读码错误率高于二代测序，但该平台的高覆盖率读长或混合测序已大幅度地提高了准确性

Iso-Seq由PacBio开发,用于转录本测序，血液细胞成分的可变剪接描述有助于解释突变对遗传性疾病和血液系统肿瘤发生的影响。

基于CRISPR/Cas技术在感染性疾病的应用

规律间隔成簇短回文重复序列 (CRISPR) /CRISPR相关蛋白 (Cas) 能够识别高度特异的核酸序列，通过联合高灵敏小型生物传感器运用于感染性疾病中。

CRISPR 核酸检测技术特点

核酸检测技术	效应蛋白	扩增技术	目标核酸分子	敏感度	特异度	多路复用	荧光报告基团
SHERLOCK	LwaCas13a CcaCas13b	RPA	dsDNA/RNA	aM	1nt	否	特异性
SHERLOCKv2	PsmCas13b LwaCas13a	RPA	dsDNA/RNA	zM	1nt	是	特异性
HUDSON+SHERLOCK	LwaCas13a	RPA	dsDNA/RNA	aM	1nt	否	非特异性
DETECTR	LbCas12a	RPA	dsDNA	aM	6nt	否	非特异性
Cas14-DETECTR	Cas14a	PT等温扩增	ssDNA	未知	未知	否	非特异性

注：aM 示 10^{-18} mol/L；zM 示 10^{-21} mol/L；nt 示核苷酸；LwCas13a 示 *Leptotrichia wadei* Cas13a，是来自细毛菌属的酶；CcaCas13b 示 *Capnocytophaga canimorsus* Cc5 Cas13b，是来自犬咬二氧化碳嗜纤维菌的酶；PsmCas13b 示 *Prevotella* sp. MA2016 Cas13b，是来自普雷沃菌属 MA2016 的酶；LbCas12a 示 *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 Cas12a，是来自毛螺菌科 ND2006 的酶；RPA 示重组酶聚合酶扩增技术；dsDNA 示双链脱氧核糖核酸；RNA 示核糖核酸；ssDNA 示单链脱氧核糖核酸

基于CRISPR/Cas技术在感染性疾病的应用

优点：（1）操作简单且便携

（2）高灵敏度和特异度；

（3）检测所需的时间较短；

（4）结果读取简单方便，通过荧光信号或肉眼即可进行结果读取；

（5）相应的试剂可以冻干粉形式存放，便于保存和携带。

缺点：（1）离子水平、温度、pH值等诸多因素可能会干扰系统中Cas效应蛋白的切割活性，从而造成检测不准确性。

（2）不能对核酸进行定量分析，只能定性分析。

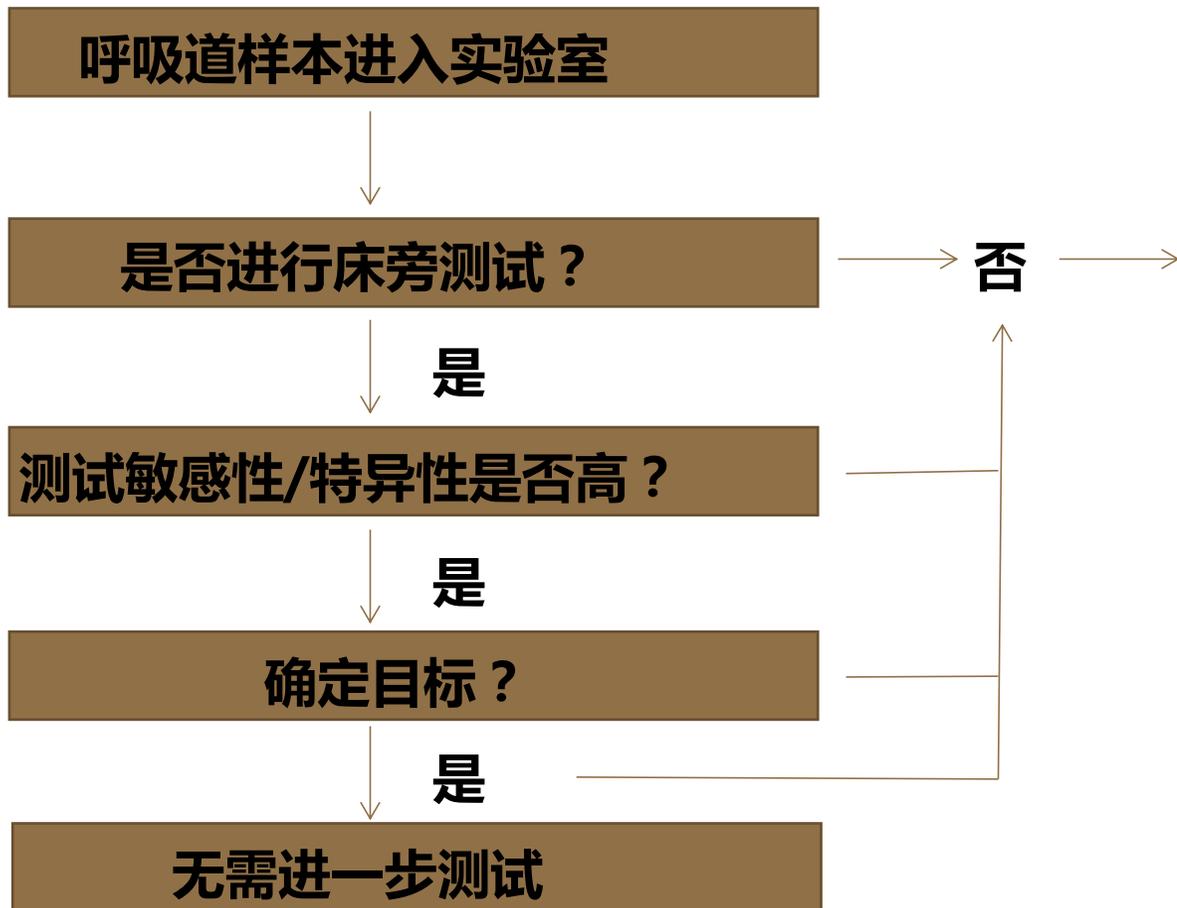
（3）采集信号的方法受限，且多个检测步骤之间可能存在互相干扰和交叉反应。

（4）受到待测样本中靶标浓度的限制，多项研究的CRISPR检测方法仍需结合核酸扩增技术。

风险评估方法



阶段1



考虑患者：
所处科室/环境
年龄
疾病概要
旅行史
免疫状态
并发症风险
疾病进程
可疑下呼吸道疾病
严重疾病

考虑流行呼吸道病毒

对上述因素进行风险评估
考虑使用PGCM文件确定的指南

进入阶段2



阶段2

实验室算法：
确定风险水平
潜在的微生物检查
潜在的临床医生咨询

低风险

进一步测试可能没有必要

为临床医生提供咨询和重新评估检测需求的机会

高风险

考虑测试



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

05

新冠病毒

COVID-19

新冠肺炎



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

- ◆ 从2019年12月，中国湖北省武汉市发现多起“不明原因肺炎”
- ◆ 2020年1月7日，研究人员检出新型冠状病毒
- ◆ 1月10日，完成病原体核酸检测
- ◆ 1月12日，WHO将其命名为2019新型冠状病毒（2019-nCoV）
- ◆ 2月11日，更名为“Corona Virus Disease 2019”，简称“COVID-19/SARS-CoV-2”
- ◆ 10月，印度发现德尔塔变异株
- ◆ 2021年11月，南非发现奥密克戎变异株

新冠肺炎临床表现



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

常见的体征和症状（及其表现）

咳嗽

喉咙痛

发烧

肌肉骨骼症状（例如关节痛或肌痛）

疲劳

头痛

不常见的临床表现：

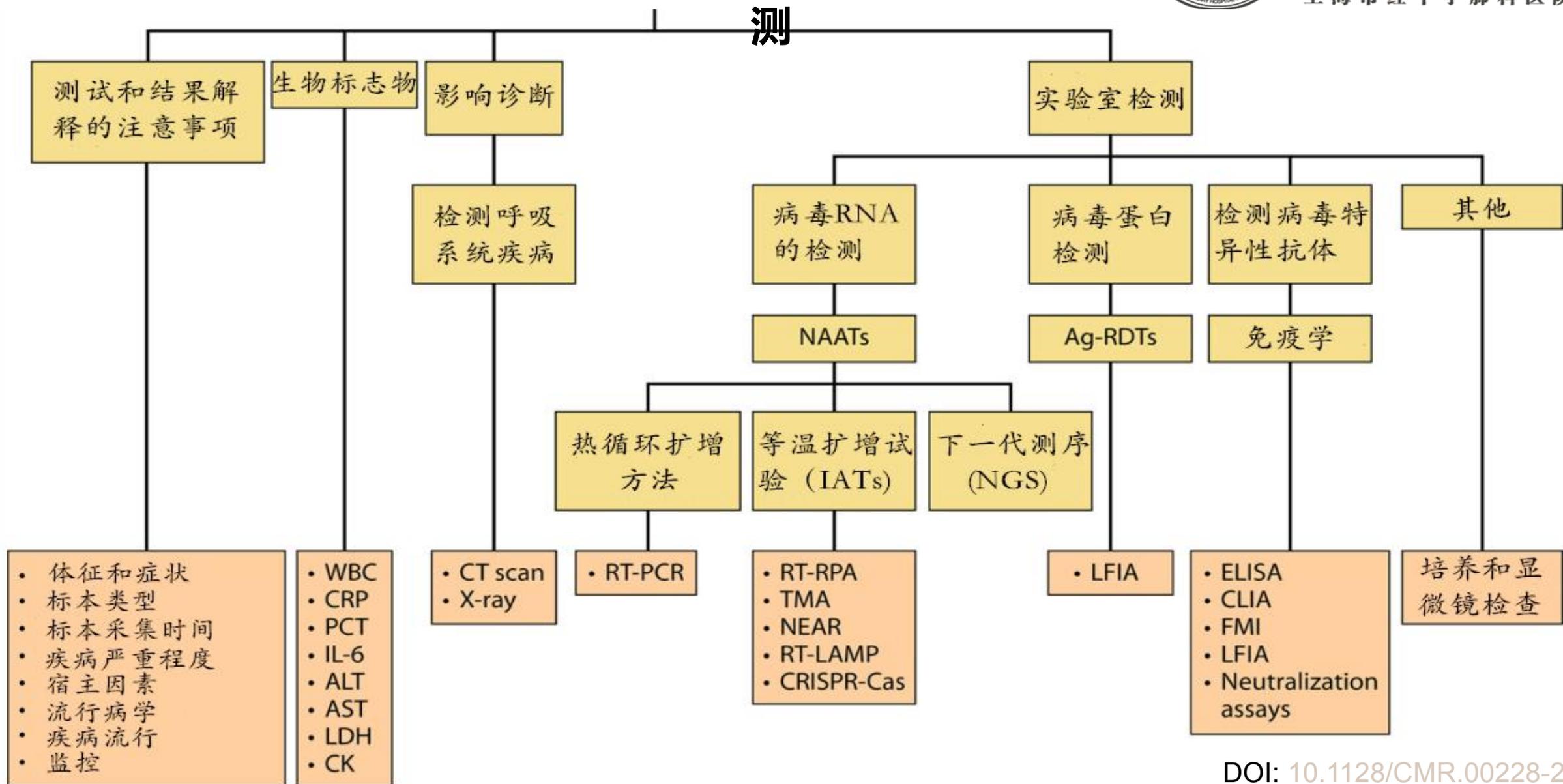
嗅觉丧失或味觉障碍

神经或皮肤表现



图 4 新型冠状病毒肺炎临床表现

SARS-CoV-2(COVID-19)的检测



新冠肺炎分子检测



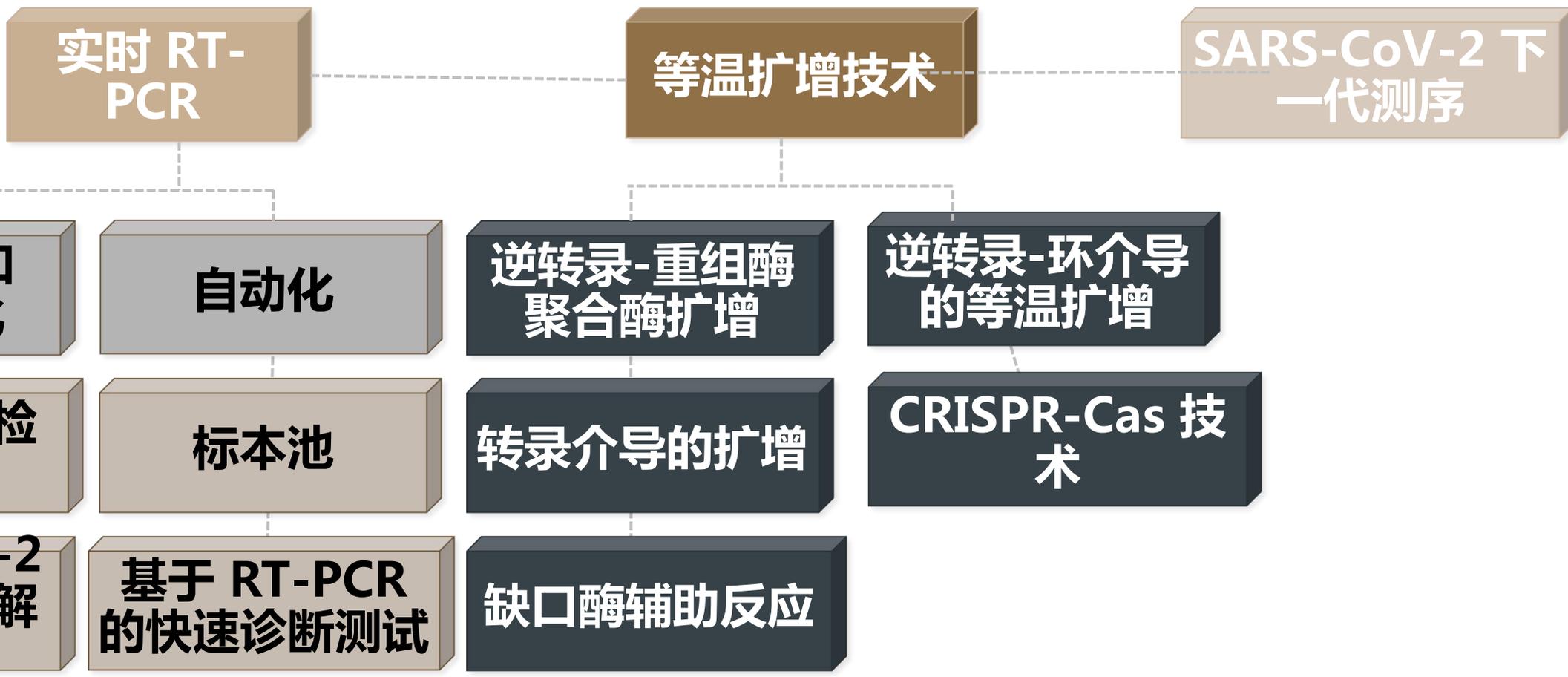
上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

- **标本类型**：用植绒鼻咽部拭子从上呼吸道采集的标本被置于通用或病毒运输介质中
- **标本采集时间**：症状出现后 2~3 天进行检测，症状出现的平均时间为暴露后 5 天，上呼吸道轻度病例出现症状后 7.9~20 天，中度至重度疾病例为 6~30.8 天，下呼吸道轻度病例为 8~38.4 天，中度至重度病例为 6~26.9 天。
- **标本预处理要求**：在核酸提取和扩增或测试之前使用胍盐进行热裂解或灭活

新冠肺炎分子检测



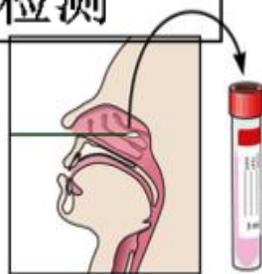
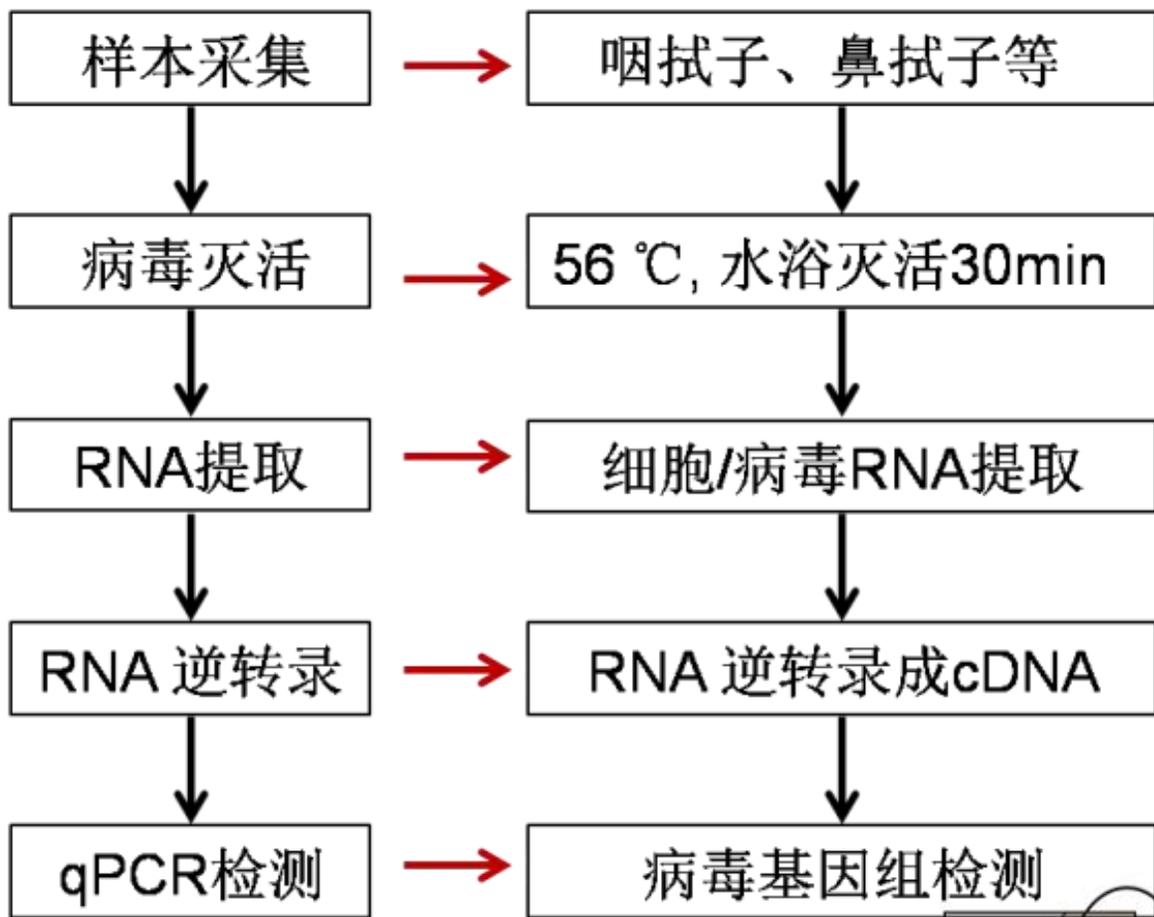
上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院



新冠肺炎分子检测流程



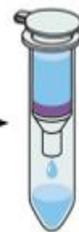
上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院



鼻咽拭子



将样品运送到实验室



标本裂解和病毒RNA提取



实时 RT-PCR 分析



总 结

- 病毒培养、荧光免疫法、直接抗原检测等技术使用较少。
- 目前分子生物学技术是检验呼吸道病毒的首选检测方法，更易于实现自动化和高通量。
- 每种检测方法都有不同的优缺点，只有多种分子生物学方法联合应用，并与传统培养鉴定相结合，才有助于感染性疾病的诊断。



上海市肺科医院
SHANGHAI PULMONARY HOSPITAL
上海市职业病防治院
同济大学附属上海市肺科医院
上海市红十字肺科医院

Thanks !

