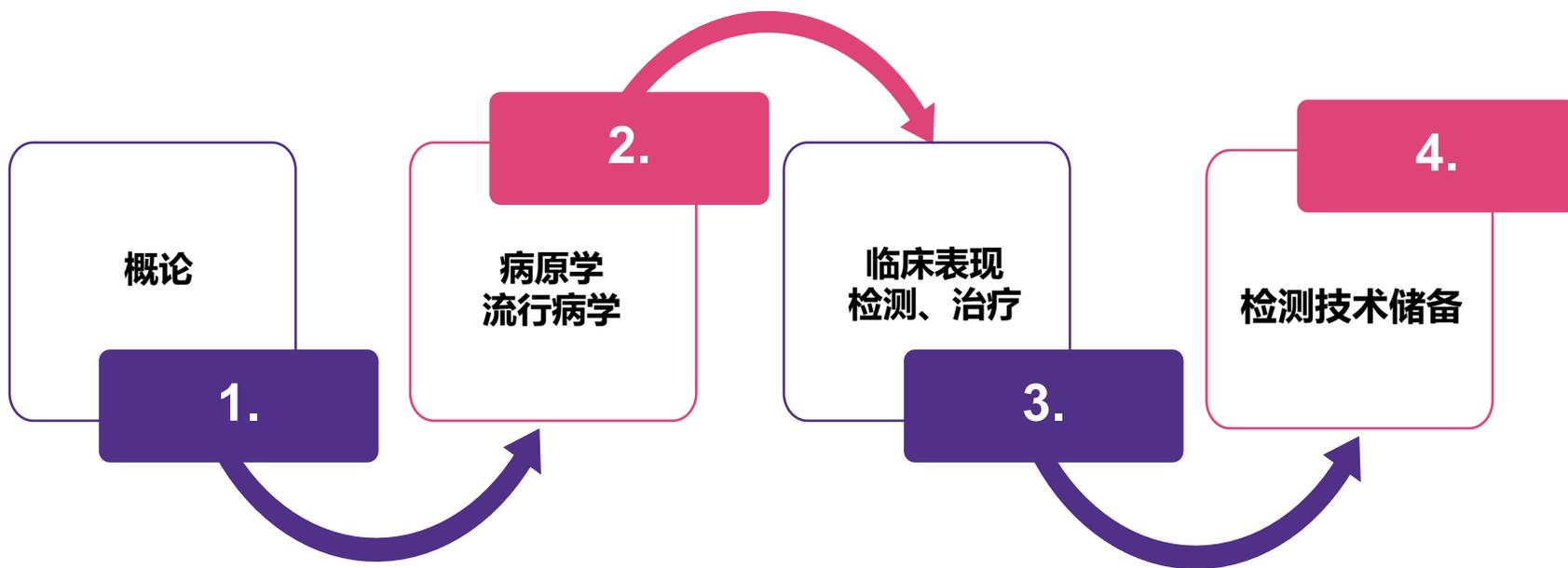




# 新型冠状病毒实验室检测技术指南

中国疾病预防控制中心

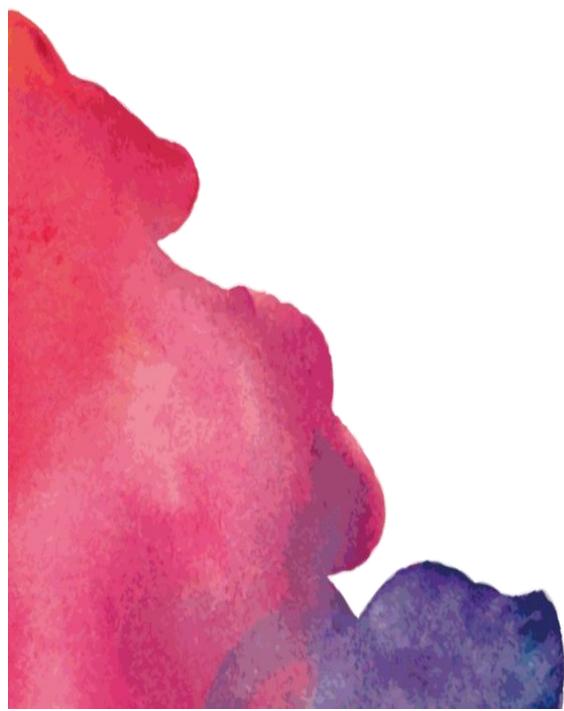
# 目录





# 概论

---



# 1.1 发现之旅



1933年，Baudette等发现鸡“哮喘病”  
1937年首次从小鸡体内分离出传染性支气管炎病毒（IBV）。  
猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）

1967年，McIntosh等用人胚气管培养，从感冒病人标本中分离到一批病毒，其代表株是OC43（organ culture，OC）。

## 2. B814和HCoV-229E

### 1. 传染性支气管炎病毒 Infectious bronchitis virus

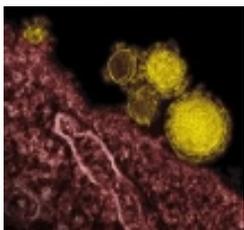
1965年，Tyrrell和Bynoe首次在体外用人胎鼻和气管培养方法，从普通感冒病人鼻洗液中分离出一株病毒，命名为B814病毒；  
1966年，Hamre和Procknow用人胚肾细胞分离到类似病毒，代表株命名为229E病毒。

### 3. HCoV-OC43

## 4. 冠状病毒的发现

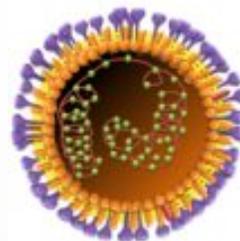
2002年，SARS-CoV；  
2004年，NL-63；  
2005年，HKU1  
2012年，MERS-CoV  
2019年，新型冠状病毒

## 1.2 命名



1968年，June Almeida和Tyrrell对这些病毒进行了形态学研究，电子显微镜观察发现这些病毒的包膜上有形状类似日冕的棘突，故提出命名这类病毒为**冠状病毒**。

01



1975年，国际病毒命名委员会（International Committee on the Taxonomy of Viruses, ICTV）正式命名了**冠状病毒科**（*coronaviridae*）。

02

# 1.3 分类

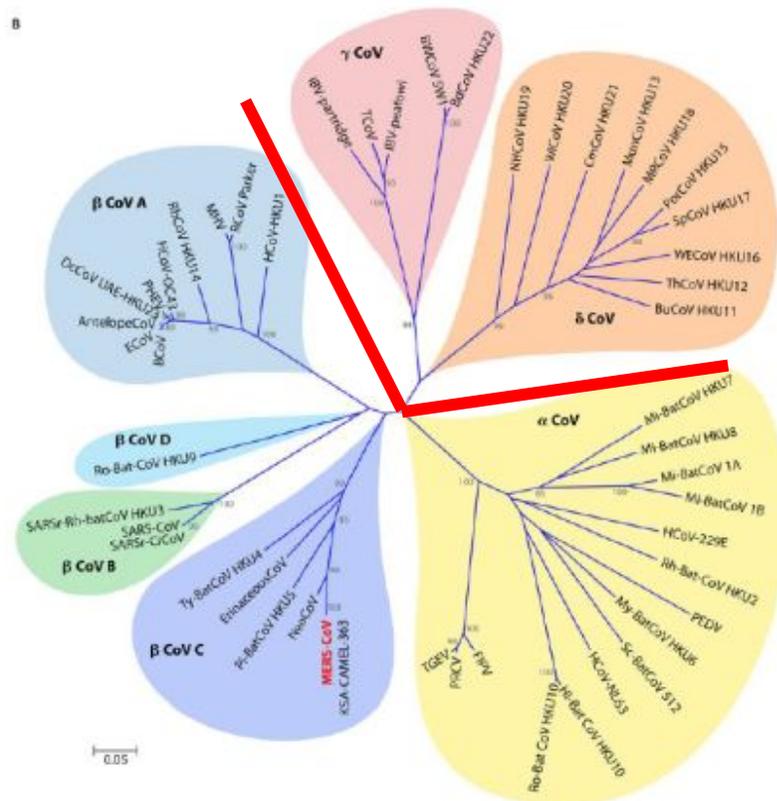
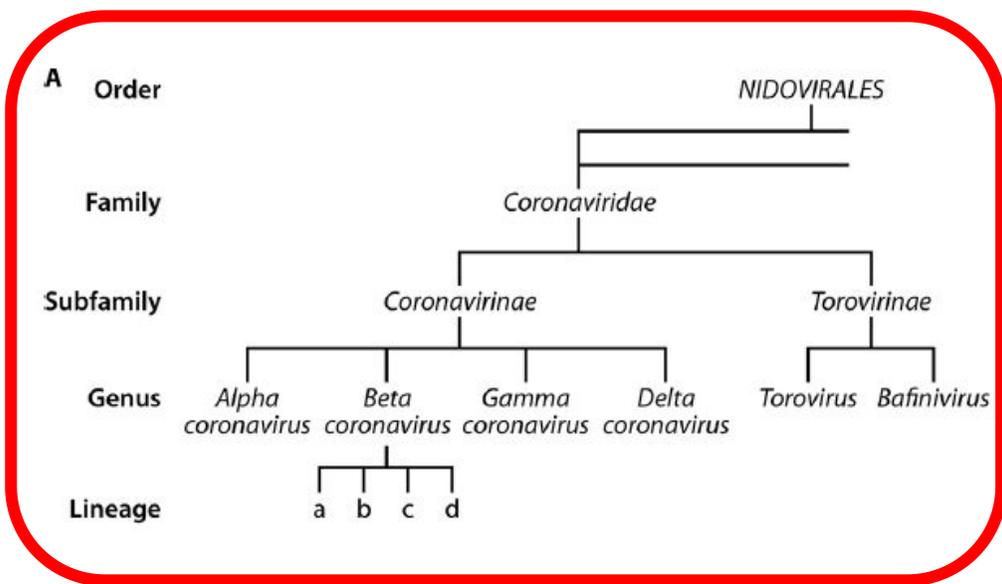


图2 根据RdRp部分序列对50种冠状病毒进行进化树分析

## 1.4 冠状病毒结构



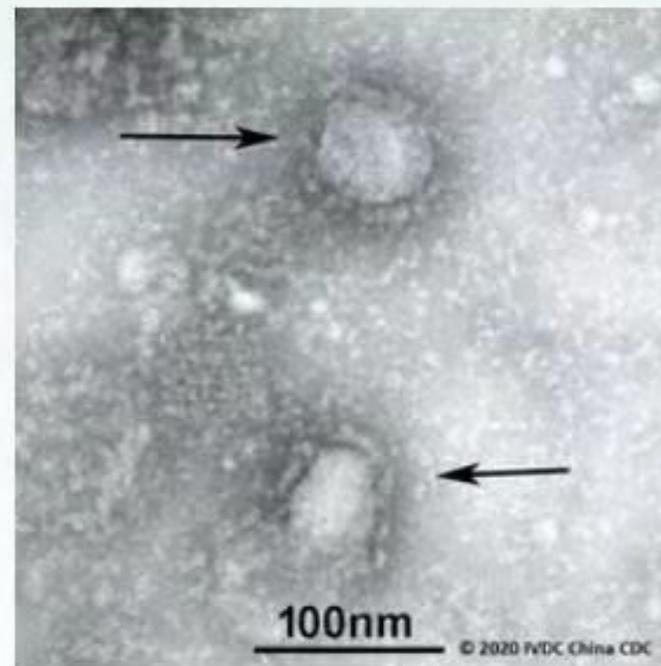
### In Focus

#### China releases genetic sequence of newly discovered coronavirus from Wuhan

The Chinese Center for Disease Control and Prevention, the Chinese Academy of Science and the Chinese Academy of Medical Science released through the GISAID Initiative the genome sequence of a newly discovered coronavirus. The virus was identified during an outbreak in the city of Wuhan, where patients were suffering from respiratory illnesses such as pneumonia since late December 2019.

The genome sequence of this betacoronavirus is crucial to develop specific diagnostic tests and to identify potential intervention options.

> [read more and access the data](#)



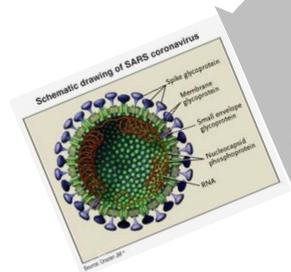
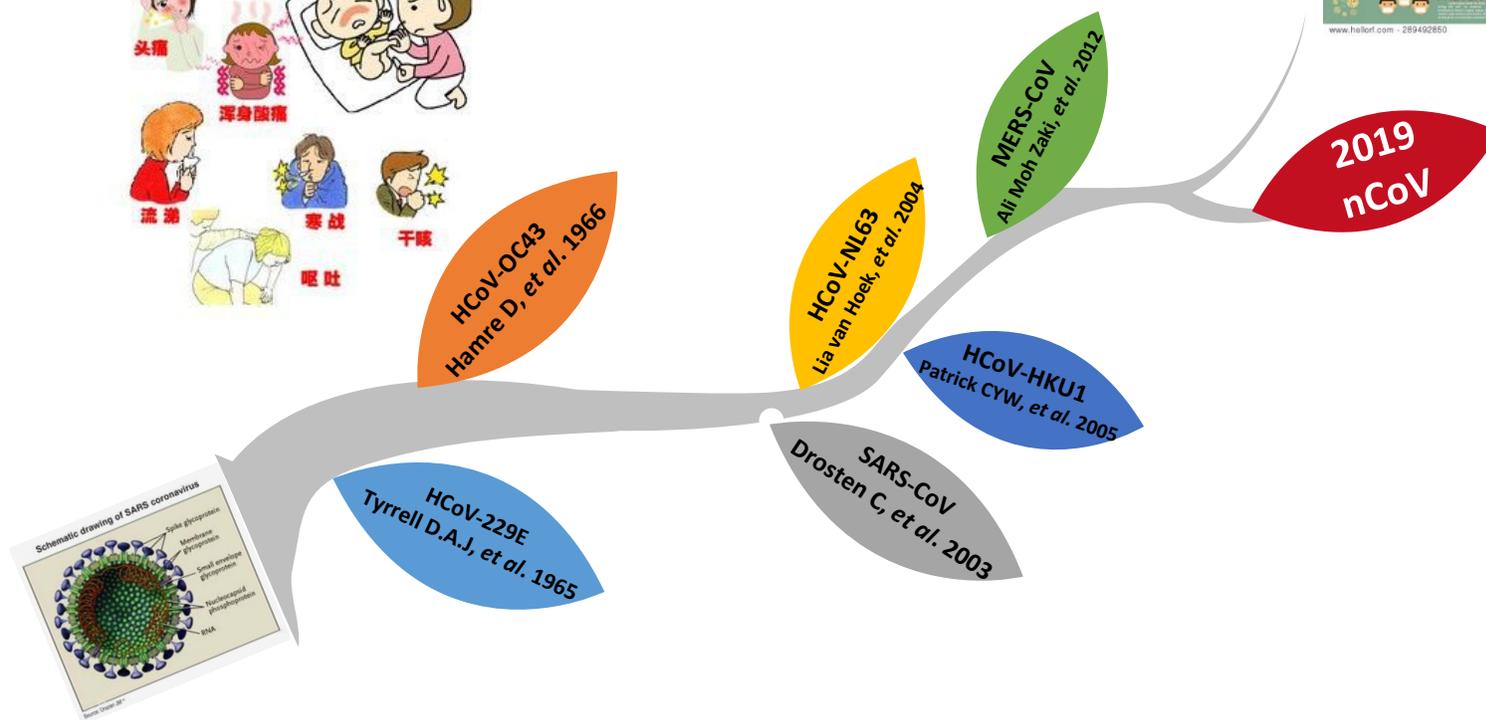
Courtesy: IVDC, China CDC



## 致病特点

---

# 人冠状病毒引发疾病症状



在确诊的41例病例中，男性为主，中老年发病人数较多。病例早期以发热和咳嗽症状为主，早期可表现为持续性轻症，年龄较大或有基础性疾病患者，易进展为重症。



# 流行病学



1. 华南海鲜市场

2. 家庭聚集

3. 医护人员感染



# 3. 临床症状、致病机理和治疗



# 3.1 临床特点



项目	MERS	SARS
临床症状	引发老人或有多种基础性疾病的患者出现急性社区或医院获得性肺炎、上呼吸道感染、流感样疾病，在儿童和免疫功能正常个体引发无症状感染	引起免疫功能正常和低下个体急性社区或医院获得性肺炎
常见肺外表现	急性肾衰竭、腹泻	腹泻
影像学改变	局部至弥散性间质性毛玻璃样改变和/或肺实变	局部至弥散性间质性毛玻璃样改变和/或肺实变伴随纵膈气肿
常见血相指标改变	白细胞、淋巴细胞、血小板减少、同时肝功能受损；随疾病进展出现肾功能障碍、白细胞增多症和中性粒细胞增多症	白细胞、淋巴细胞、血小板减少，丙氨酸和天冬氨酸氨基转移酶水平升高
严重并发症	ARDS和急性肾衰竭	ARDS
病死率	>35%	~10%
呼吸道排出病毒峰值时间	不清楚	约症状出现后10天
中和抗体出现时间	症状出现后12天以内	症状出现后5-10天内

**2019-nCoV**

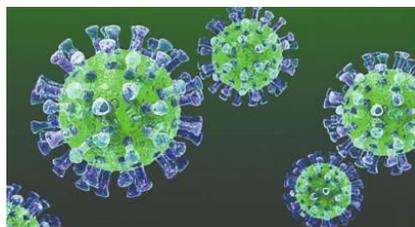
**男性为主，中老年发病人数较多。病例早期以发热和咳嗽症状为主，早期可表现为持续性轻症，年龄较大或有基础性疾病患者，易进展为重症。**

## 3.2 做好充分准备



总体指导、落实防控资金和物资，组建专家组，制订、完善技术方案，组织督导和检查，规范开展防控工作。

监测工作、现场调查、实验室检测和专业技术培训；健康教育与风险沟通。



病例发现与报告、流行病学调查、标本采集、实验室检测、医疗救治、感染防控、风险沟通等内容的培训，提高防控能力。

对可疑旅客进行重点监测。



CHINA CUSTOMS  
中国海关



# 技术储备

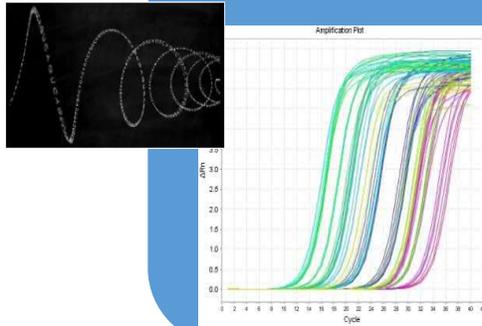
---



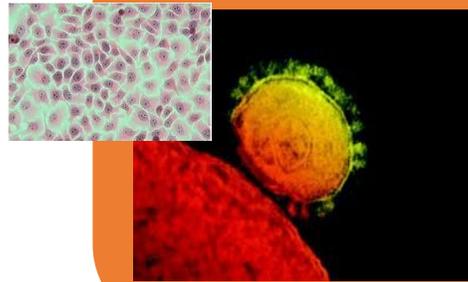
# 2019-nCoV的实验室检测技术储备



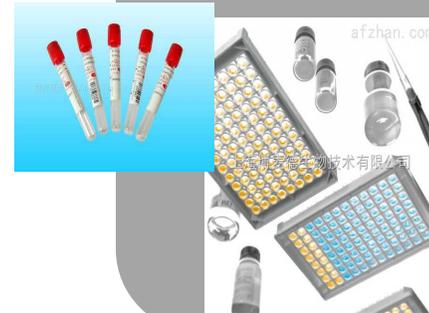
核酸检测



病毒的分离



血清学检测





# 新型冠状病毒

## 实时荧光定量RT-PCR检测技术

为指导各级疾控部门和其他相关机构开展2019新型冠状病毒的实验室检测工作，特制定本技术指南。本指南主要介绍目前已经比较成熟、易于实施的核酸检测方法。



# 参考标准

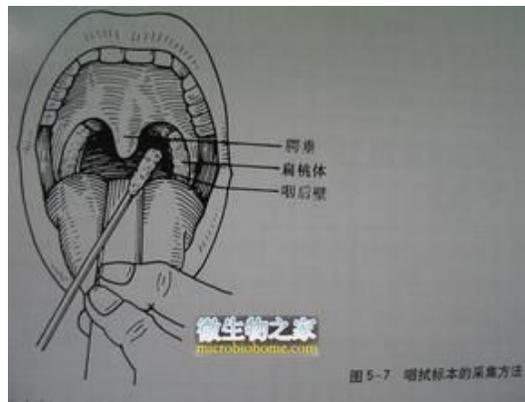


- 新型冠状病毒实验室检测技术指南
- 新型冠状病毒实验室生物安全指南

# 标本采集对象



- 新型冠状病毒感染疑似病例、疑似聚集性病例患者，
- 其他需要进行新型冠状病毒感染诊断或鉴别诊断者，
- 或其他需要进一步筛查检测的环境或生物材料（如溯源分析）。



# 标本采集要求



1. 从事新型冠状病毒检测标本采集的技术人员应经过生物安全培训（培训合格）和具备相应的实验技能。在标本采集过程中，采样人员着PPE。
2. 住院病例的标本由所在医院医护人员在当地疾控机构专业人员指导下采集。
3. 密切接触者标本由当地疾控机构负责采集。
4. 根据实验室检测工作的需要，可结合病程及研究需求多次采样。

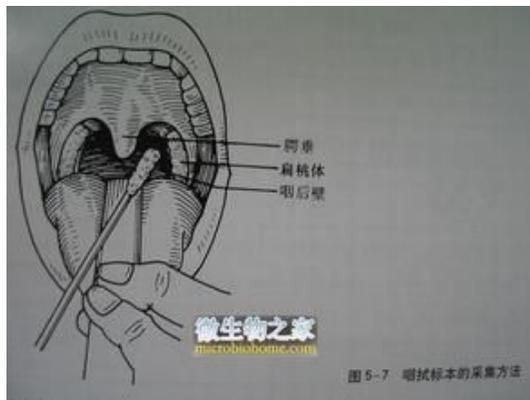


# 采集标本种类和要求

每个病例必须采集呼吸道标本；重症病例优先采集下呼吸道标本（如支气管或肺泡灌洗液等），可根据临床表现与采集样本的时间间隔决定采集。其它研究材料依据设计需求采集。

标本种类：

- 1．上呼吸道标本：包括咽拭子、鼻拭子、鼻咽抽取物、痰液。
- 2．下呼吸道标本：包括呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液。
- 3．血清标本：应尽量采集急性期血清和恢复期血清标本，建议使用真空采血管。



# 标本的包装



标本采集后在生物安全二级实验室生物安全柜内分装。

- 1．所有标本应放在大小适合的带螺旋盖内有垫圈、耐冷冻的样本采集管里，拧紧。容器外注明样本编号、种类、姓名及采样日期。
- 2．将密闭后的标本放入大小合适的塑料袋内密封，每袋装一份标本。

# 标本的保存



- 用于病毒分离和核酸检测的标本应尽快进行检测，24小时内能检测的标本可置于4°C保存；24小时内无法检测的标本则应置于-70°C或以下保存（如无-70°C保存条件，则于-20°C冰箱暂存）。血清可在4°C存放3天，可在-20°C以下长期保存。标本运送期间应避免反复冻融。

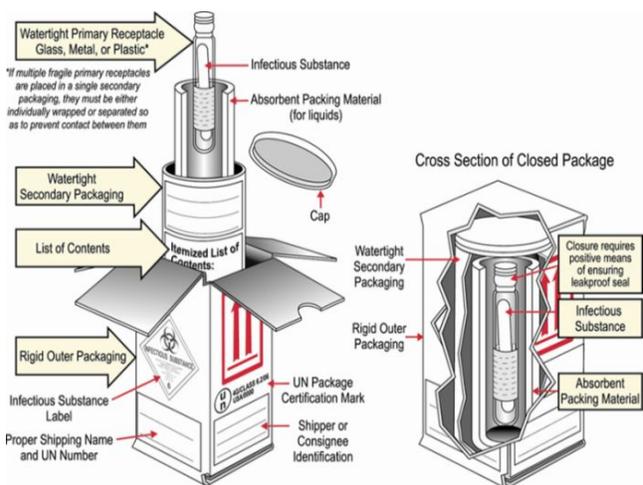
# 上送标本



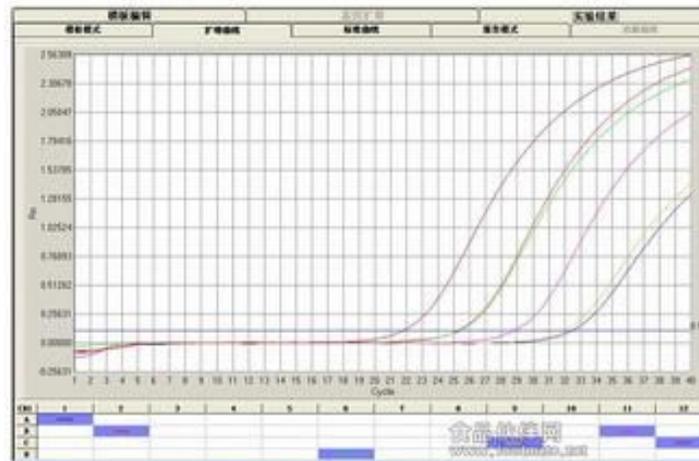
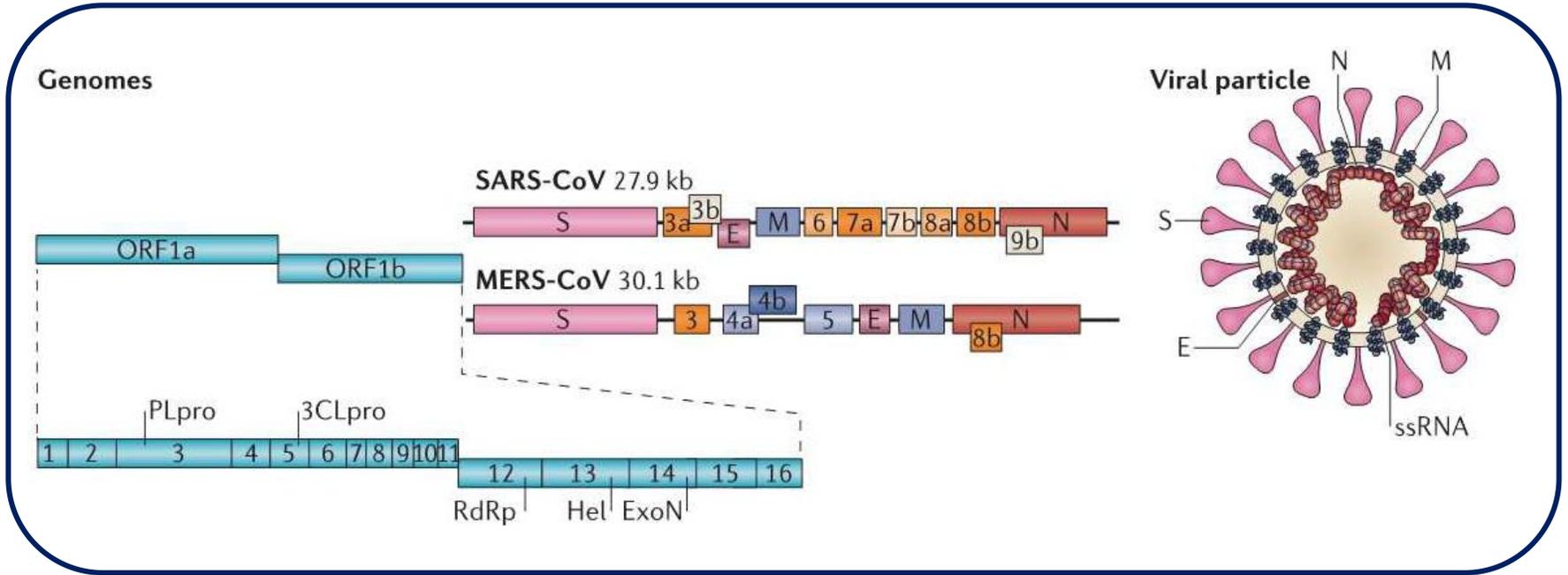
各省（自治区、直辖市）首例检测结果阳性，或疑似聚集性病例或聚集性病例的标本，上送中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所进行检测复核。

# 标本运输

1. 新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性生物材料的运输包装分类属于A类，对应的联合国编号为UN2814，包装符合国际民航组织文件Doc9284《危险品航空安全运输技术细则》的PI602分类包装要求；
2. 环境样本属于B类，对应的联合国编号为UN3373，包装符合国际民航组织文件Doc9284《危险品航空安全运输技术细则》的PI650分类包装要求；通过其他交通工具运输的可参照以上标准包装。
3. 新型冠状病毒毒株或其他潜在感染性材料运输应按照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（原卫生部令第45号）办理《准运证书》。



# 新型冠状病毒感染实验室检测方法





# 新型冠状病毒的实验室检测靶标

在实验室要确认一个病例为阳性，满足以下条件：

同一份标本中新型冠状病毒2个靶标（orf1ab、N）特异性rRT-PCR检测结果为阳性。



# 分子检测引物与探针



靶标一 ( orf1ab ) :

正向引物 ( F ) : CCCTGTGGGTTTTACACTTAA

反向引物 ( R ) : ACGATTGTGCATCAGCTGA

荧光探针 ( P ) : 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTA  
TGG-BHQ1-3'

靶标二 ( N ) :

正向引物 ( F ) : GGGGAACTTCTCCTGCTAGAAT

反向引物 ( R ) : CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG

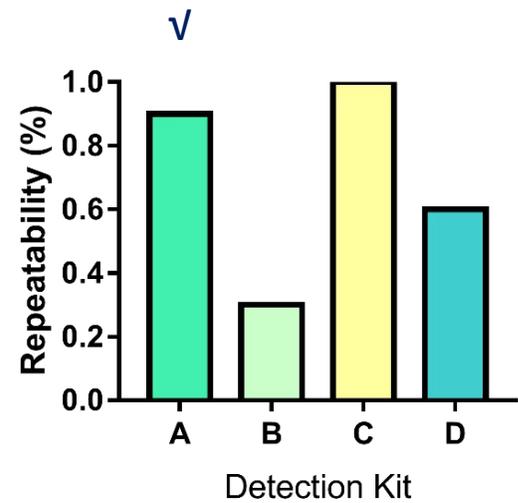
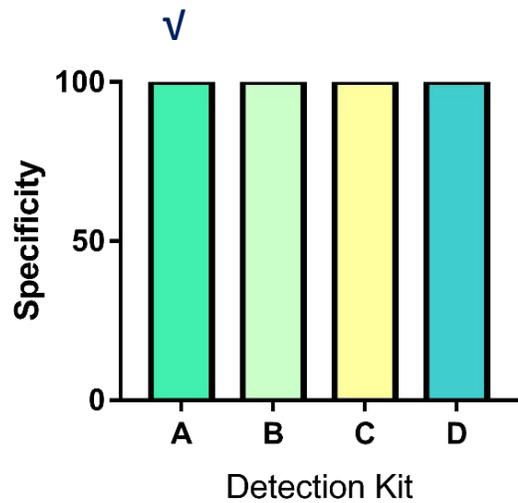
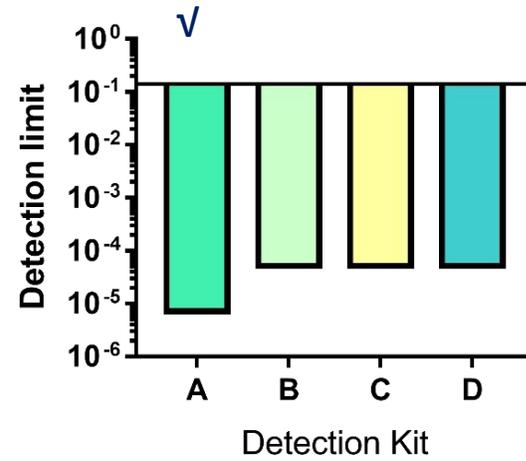
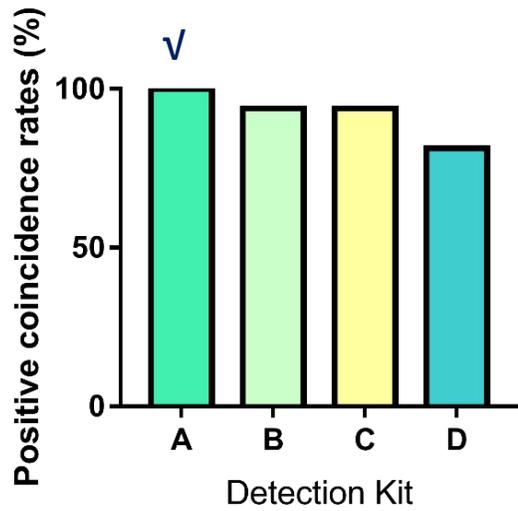
荧光探针 ( P ) : 5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA  
-3'



# 荧光定量RT-PCR检测结果判断

1. 阴性: 无Ct值或Ct为40。
2. 阳性 : Ct值 $<37$  , 可报告为阳性。
3. Ct值在37-40之间 , 建议重复实验 , 若重做结果Ct值 $<40$  , 扩增曲线有明显起峰 , 该样本判断为阳性 , 否则为阴性。

Detection kit A was supplied by China CDC.



# 新型冠状病毒生物安全实验活动要求

根据目前掌握的新型冠状病毒的生物学性状、传播特性、致病性、临床资料等信息，考虑到新型冠状病毒感染聚集性发病且有重症病例，并有死亡病例的特点，实验活动暂按照病原微生物危害程度分类中**第二类病原微生物**进行管理。



# 病原生物安全实验活动要求



## （一）病毒的培养：

指病毒的分离、培养、滴定、中和试验、活病毒及其蛋白纯化、病毒冻干以及产生活病毒的重组试验等操作。利用活病毒或其感染细胞（或细胞提取物），不经灭活进行的生化分析、血清学检测、免疫学检测等操作视同病毒培养。上述操作应在BSL-3实验室进行。使用病毒培养物提取核酸，裂解剂或灭活剂的加入必须在与病毒培养等同级别的实验室和防护条件下进行，可靠方法灭活后的病毒培养物，可在BSL-2或BSL-1级实验室操作。BSL-3实验室应具有开展相应活动的资质。





## **(二) 动物感染实验**

指以活病毒感染动物的实验。应在ABSL-3实验室操作。

ABSL-3实验室应具有开展相应活动的资质。

## **(三) 未经培养的感染性材料的操作**

未经培养的感染性材料在采用可靠的方法灭活前进行的病毒抗原检测、血清学检测、核酸检测、生化分析等操作，应在生物安全二级实验室操作，但个人防护装备参照生物安全三级实验室的防护要求。未经可靠灭活或固定的人和动物组织标本因含病毒量较高，其操作的防护级别应比照病毒培养。



## **(四) 灭活材料的操作**

感染性材料或活病毒在采用可靠的方法灭活后可在BSL-1实验室操作。

## **(五) 无感染性材料的操作**

指针对确认无感染性的材料的各种操作，包括但不限于无感染性的病毒DNA或cDNA操作，应在BSL-1实验室进行。

# 中国CDC病毒病所实验室检测技术储备和前期工作

1. 已建立新型冠状病毒的核酸rRT-PCR检测方法；
2. 测定新型冠状病毒的基因组序列；
3. 分离获得新型冠状病毒毒株；
4. 撰写并上报《2019新型冠状病毒的实验室检测技术指南》。
5. ....



谢谢！