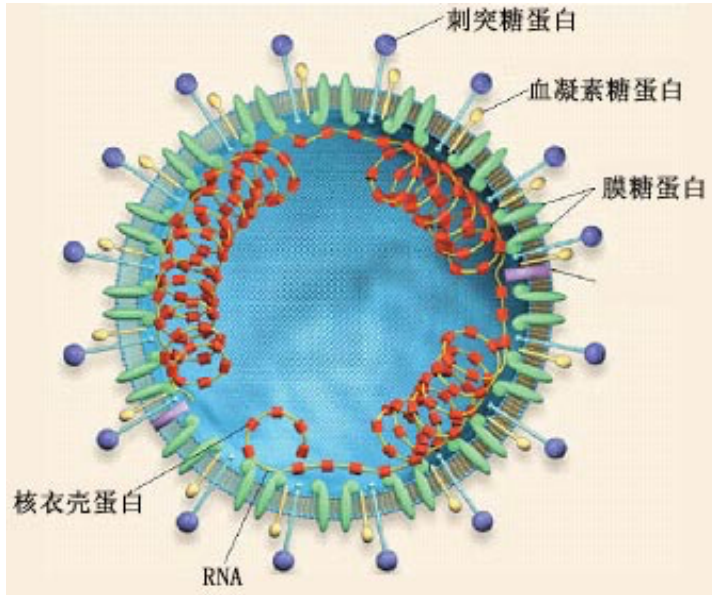




# Ключевые моменты лабораторного анализа нуклеиновых кислот и антител

West China Hospital, Sichuan University  
Ying Binwu

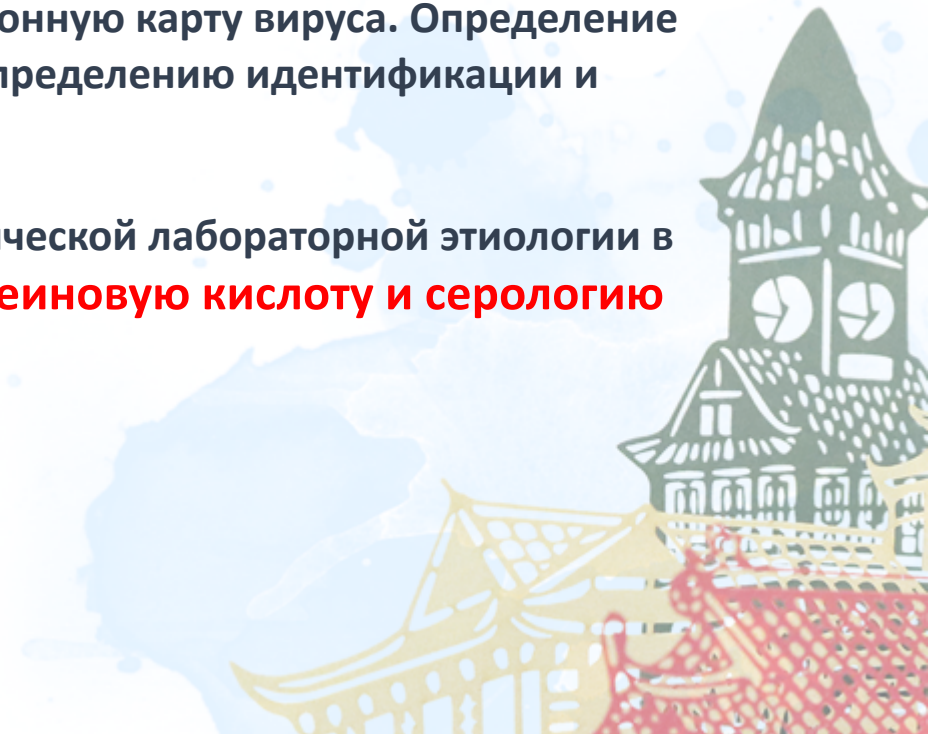
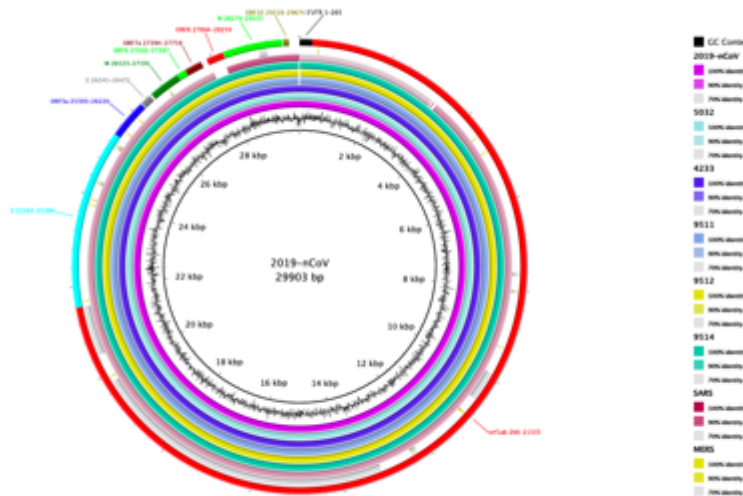
# 背景 Background



SARS-CoV-2 принадлежит к  $\beta$  семейству с оболочкой, частицы которой имеют круглую или овальную форму. Его генетические характеристики значительно отличаются от таковых у SARS-CoV и MERS-CoV, а гомология с SARS составляет 82%.

Генетическим материалом SARS-CoV-2 является РНК. РНК похожа на «отпечаток пальца» и идентификационную карту вируса. Определение нуклеиновых кислот эквивалентно определению идентификации и природы вируса

В настоящее время выявление клинической лабораторной этиологии в основном включает **вирусную нуклеиновую кислоту и серологию пациента.**

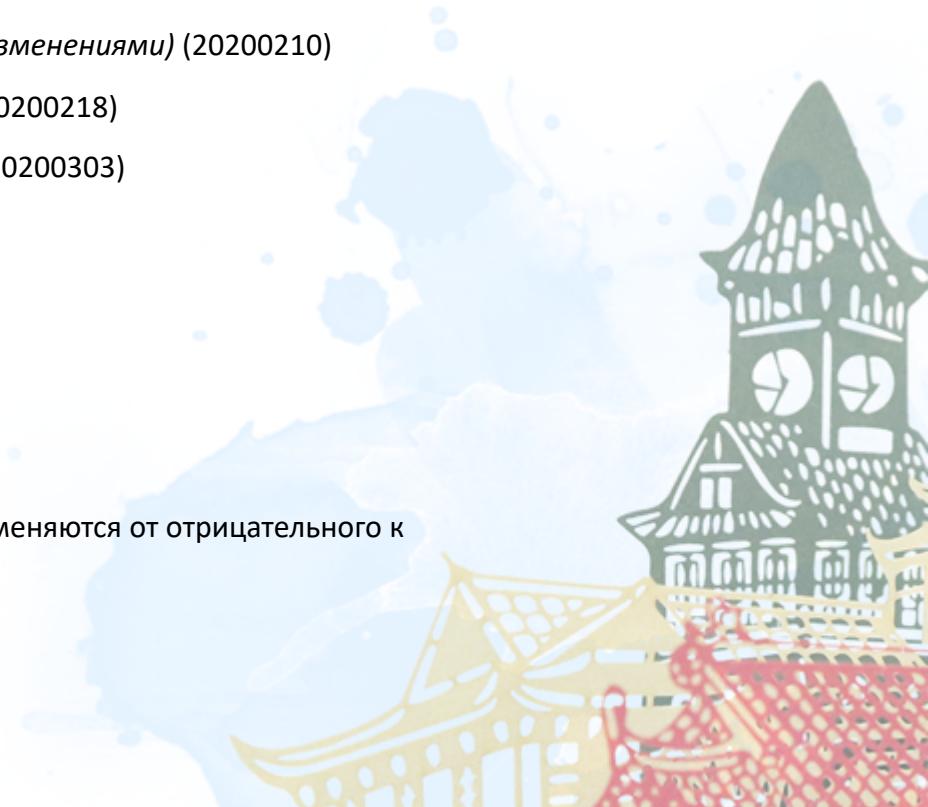


## Развитие *Китайских клинических рекомендаций диагностики и лечения пневмонии COVID-19*

- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (1<sup>я</sup> рекомендация) (20200121)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (2<sup>я</sup> рекомендация) (20200122)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (3<sup>я</sup> рекомендация) (20200123)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (4<sup>я</sup> рекомендация) (20200127)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (5<sup>я</sup> рекомендация) (20200205)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (5<sup>я</sup> рекомендация с изменениями) (20200210)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (6<sup>я</sup> рекомендация) (20200218)*
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (7<sup>я</sup> рекомендация) (20200303)*

Случаи с подозрением имеют один из следующих патогенных признаков:

1. Положительный результат ПЦР в режиме реального времени определения COVID-19.
2. Ген вируса, идентифицированный секвенированием гена, является высоко гомологичным COVID-19.
3. Специфичные IgM и IgG антитела к COVID-19 положительные; специфичные IgM и IgG антитела к COVID-19 меняются от отрицательного к положительному или увеличиваются в 4 раза в период восстановления по сравнению с острым периодом





## Клиническая манифестация

Согласно текущему эпидемиологическому исследованию, **инкубационный период COVID-19 составляет 1-14 дней**. У большинства пациентов клинические симптомы проявляются через 3-7 дней.

**Лихорадка, сухой кашель и слабость** являются основными симптомами. Другие симптомы включают заложенность носа, насморк, боль в горле, миалгию и диарею. В тяжелых случаях пациенты имели одышку и/или гипоксемию в течение одной недели после начала заболевания. Некоторые из них быстро ухудшались до острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), септического шока, рефрактерного метаболического ацидоза, коагуляционной дисфункции и полиорганной недостаточности.

**Примечательно, что у некоторых пациентов с тяжелой формой наблюдалась только легкая или умеренная лихорадка, а у некоторых даже вообще не было лихорадки.**

У некоторых детей и новорожденных проявлялись нетипичные симптомы, такие как рвота, диарея и другие желудочно-кишечные расстройства или проявлялись только сонливость и одышка.

В легких случаях пациенты имели только низкую температуру и слабую усталость без явных симптомов пневмонии.

Исходя из нашего текущего наблюдения, **у большинства пациентов хороший прогноз**, и только некоторые пациенты находятся в критическом состоянии. Прогноз для пожилых людей и лиц с хроническими сопутствующими заболеваниями является относительно худшим. **Клиническое течение пневмонии COVID-19 у беременных женщин сходно с таковым в той же возрастной группе**. Тяжесть симптомов у детей относительно легкая.





# Лабораторные исследования

## Рутинное обследование

1. На ранней стадии заболевания **общее количество периферических лейкоцитов может быть нормальным или уменьшаться, а количество лимфоцитов уменьшается**. У некоторых пациентов были повышен уровень печеночных трансаминаз, лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинкиназы и миоглобина. У некоторых пациентов в тяжелой форме тропонины также были увеличены. У большинства пациентов уровень С-реактивного белка (СРБ) и СОЭ увеличены, тогда как прокальцитонин обычно остается в пределах нормы. Примечательно, что **D-димер был значительно увеличен у тяжелых пациентов, а периферические лимфоциты постепенно уменьшались. Биомаркеры воспаления часто повышены у тяжелых и критически тяжелых пациентов.**

## Этиологическое обследование

Нуклеиновые кислоты COVID-19 могут быть обнаружены в мазках из носоглотки, мокроты и других выделений нижних дыхательных путей, крови и фекалий с помощью ПЦР в режиме реального времени и технологии секвенирования следующего поколения (NGS). Более точным является тестирование образцов нижних дыхательных путей. После сбора образец должен быть выполнен как можно скорее.

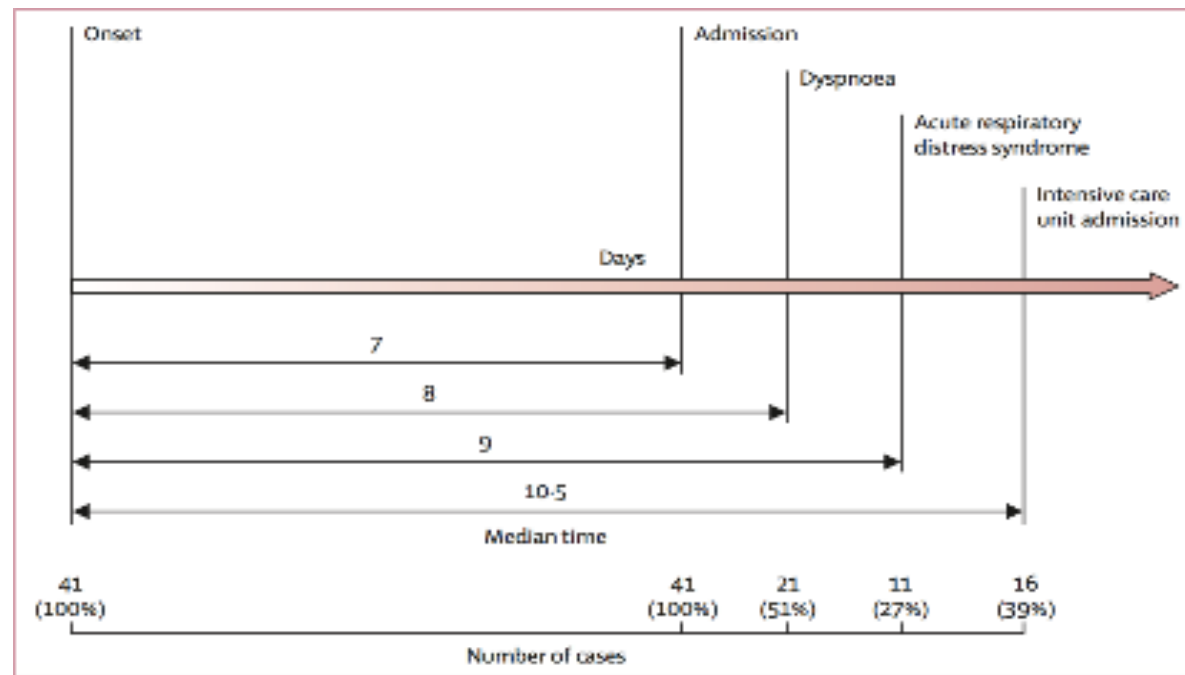
**Серологическое исследование: специфические антитела к COVID-19 IgM показывают положительный результат через 3-5 дней от начала заболевания. Для сравнения, титр специфических антител к COVID-19 IgG в период восстановления в 4 раза выше, чем в острой фазе.**

**Серологический анализ и тест на нуклеиновые кислоты дополняют друг друга**



# Лабораторные исследования

Симптомы и осложнения	N%
Лихорадка	98%
Кашель	76%
Миалгия и усталость	44%
Мокрота	28%
Диарея	3%
WBC $\leq 10 \times 10^9/L$	70%
Лимфоцитопения	63%
ALT > 40 U/L	37%
Cr > 133 mmol/L	10%
LDH > 243 U/L	73%
Чувствительный тропонин I > 28 pg/ml	12%
прокальцитонин < 0.1 ng/ml	69%
Острый респираторный дистресс синдром	29%



Симптомы и осложнения	N%
Острая сердечная недостаточность	12%
Острая почечная недостаточность	7%
Септический шок	7%
Вторичная инфекция	10%

# Лабораторные диагностические показатели Indicators



Тест	Тип	Информация	Цели
СВС+CRP	<i>Гематология/биохимия</i>	Иммунный и воспалительный ответ	Помощь в скрининге, клинической оценке и прогнозу в подозрительных случаях
прокальцитонин	<i>Иммунохимия</i>		
D-димер	<i>Гемостаз</i>	Гемостаз	
Функции печени	<i>Биохимия</i>	Оценка нарушения функций органа	
Функции почек	<i>Биохимия/анализ мочи</i>		
сердечные СК/СК-МВ+ МҮО+ тропонин	<i>Биохимия/иммунохимия</i>		
Антигены/антитела к вирусу/ Факторы воспаления	<i>Иммунохимия</i>	Вирусные белки и иммунный ответ	
ПЦР в режиме реального времени Геномное секвенирование вируса	<i>Молекулярные тесты</i>	Нуклеиновые кислоты вируса	Диагностические показатели

\*Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection, <http://www.nhc.gov.cn>

\*WHO: Clinical Management of Severe Acute Respiratory Infection When Novel Coronavirus (nCoV) Infection Is Suspected: Interim Guidance, <http://www.who.int>



# Обзор методов определения SARS-CoV-2

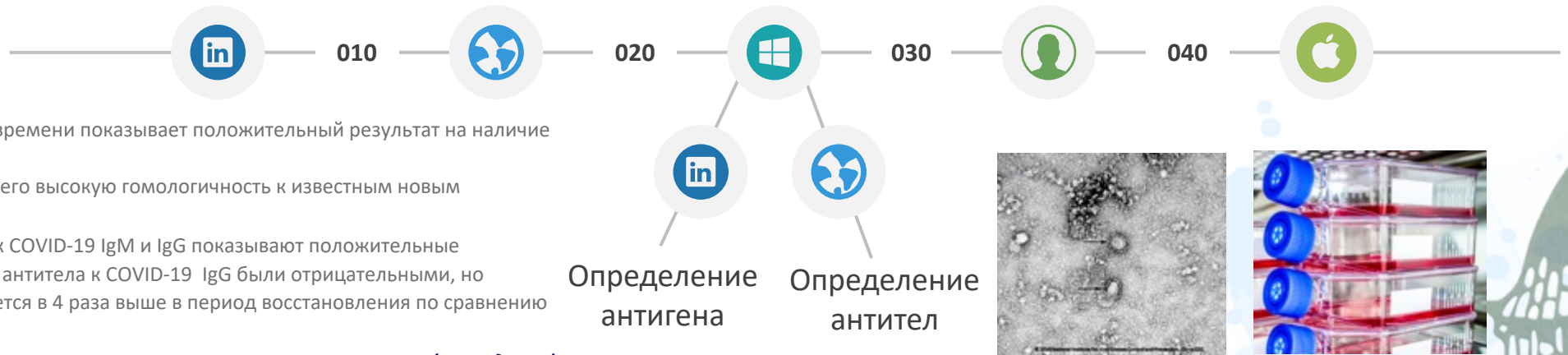
**Тест нуклеиновых кислот**  
Золотой стандарт широко используемый в клинической практике

**Секвенирование**  
Золотой стандарт широко используемый в клинической практике

**Серологическое тестирование**  
Широко используемый в клинической практике

**Исследование с помощью электронного микроскопа**  
Требуется специальное оборудование для изоляции вируса

**Вирусное культивирование**  
P3/P4  
сложность культуры



1. Тестирование методом ПЦР в реальном времени показывает положительный результат на наличие нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2;
2. Секвенирование гена вируса показывает его высокую гомологичность к известным новым коронавирусам;
3. Сывороточные специфические антитела к COVID-19 IgM и IgG показывают положительные результаты ; сывороточные специфические антитела к COVID-19 IgG были отрицательными, но становятся положительным или увеличивается в 4 раза выше в период восстановления по сравнению с острым периодом.

*Китайское Клиническое руководство по диагностике и лечению пневмонии COVID-19 (7-е издание)*

(II) Пневмонию COVID-19 в основном отличают от других известных вирусных пневмоний и Mycoplasma pneumoniae, таких как вирус гриппа, аденовирус, респираторно-синцитиальный вирус и т. д. Особенно для подозрительных случаев необходимо определять общие респираторные патогены с использованием методов, в том числе быстрого обнаружения антигена и мультиплексной ПЦР технологии обнаружения нуклеиновых кислот.

*Китайское клиническое руководство по диагностике и лечению пневмонии COVID-19 (7-е издание)*



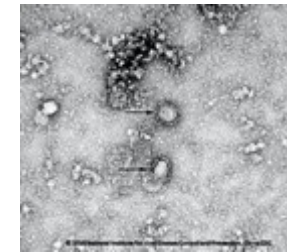
Определение антигенов к гриппу (хроматография, мазок из носа)



Чувствительность 19-59%  
Специфичность 95-100%



Высокий уровень ложно положительных результатов и отсутствия результатов



# Содержание



**1. Сбор и хранение образцов**



**2. Тестирование нуклеиновых кислот  
вируса COVID-19**



**3. Серологические тесты COVID-19**



# I. Сбор и хранение образцов

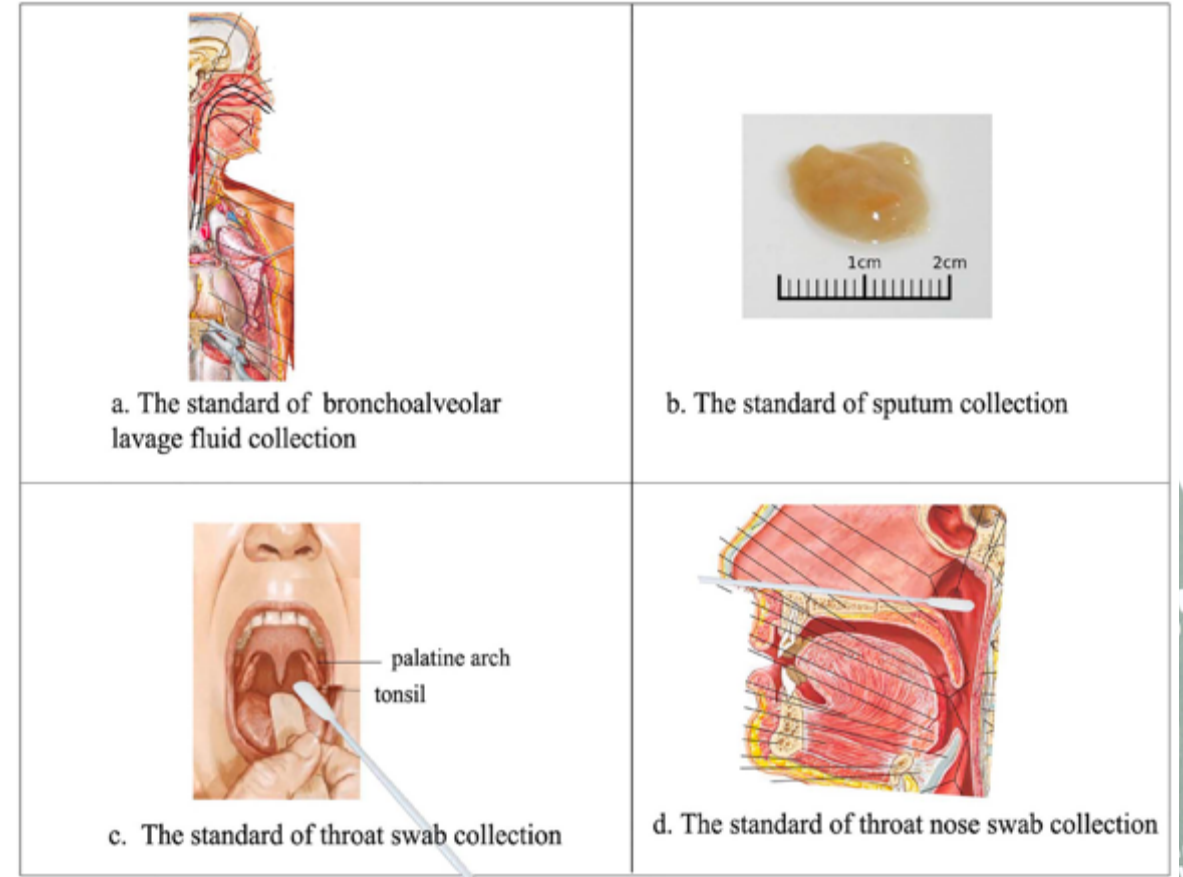
## 1. Категории образцов





## 2. Методы сбора образцов

- **Мазок из носоглотки:** осторожно вставьте ватный тампон в нёбо внутреннего носового прохода, остановитесь и медленно поверните его, чтобы вынуть. Возьмите другой тампон и таким же способом соберите образец из другой ноздри. Положите два тампона в одну пробирку, содержащую 3 мл раствора для отбора проб, выбросьте хвостовую часть, затяните крышку пробирки.
- **Мазки полости рта и глотки:** протрите обе миндалины и заднюю стенку глотки двумя тампонами, распределите головку тампона в пробирку, содержащую 3 мл раствора для отбора проб, выбросьте хвост и затяните крышку трубки

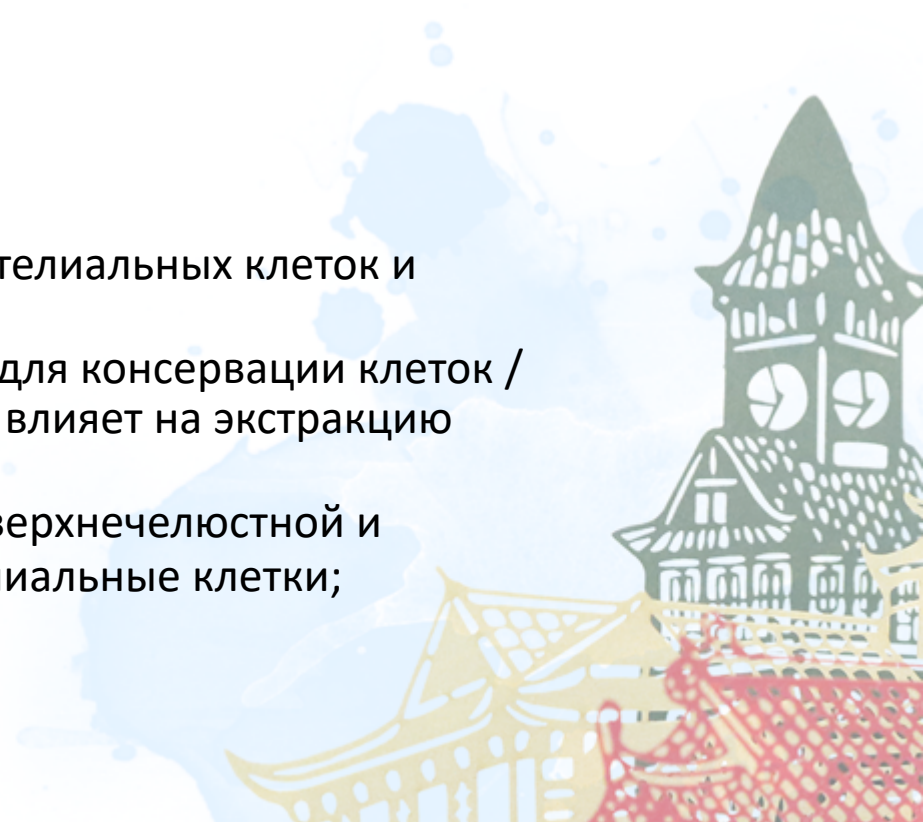


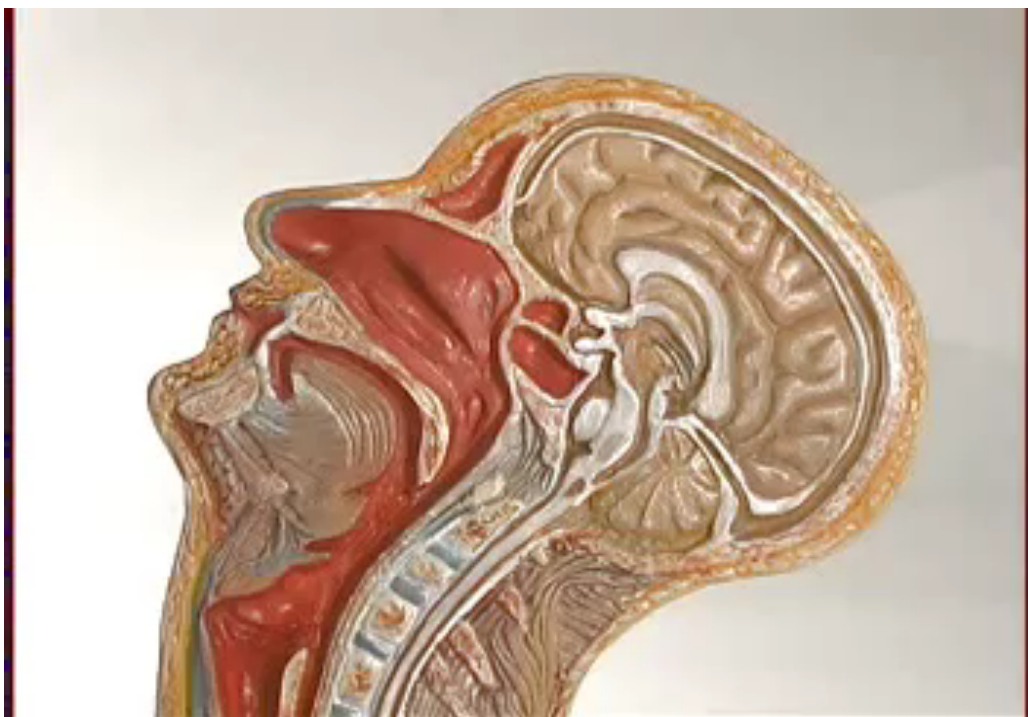
### **Внимание:**

1. Носовые тампоны: используйте **флокирующие тампоны**, чтобы собрать глубокие выделения из носа;
2. Глоточный мазок: используйте **флокирующий тампон** для сбора образцов эпителиальных клеток слизистой оболочки в перешейке глотки; (внимание: используйте депрессор языка, чтобы избежать загрязнения полости рта и языка)

### **Распространенные ошибки:**

1. Отбор проб с помощью **ватных тампонов**: влияет на вымывание эпителиальных клеток и выделение нуклеиновых кислот;
2. После взятия проб флокирующие тампоны не хранились в растворе для консервации клеток / в физиологическом растворе для тестирования: высыхание тампона влияет на экстракцию нуклеиновой кислоты;
3. Глоточные мазки не были собраны в нужном месте: неправильный верхнечелюстной и оральные сборы, невозможно получить квалифицированные эпителиальные клетки;





Демонстрация сбора мазка  
из носа / горла

*Clinical Infectious Diseases*

**BRIEF REPORT**

### Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva

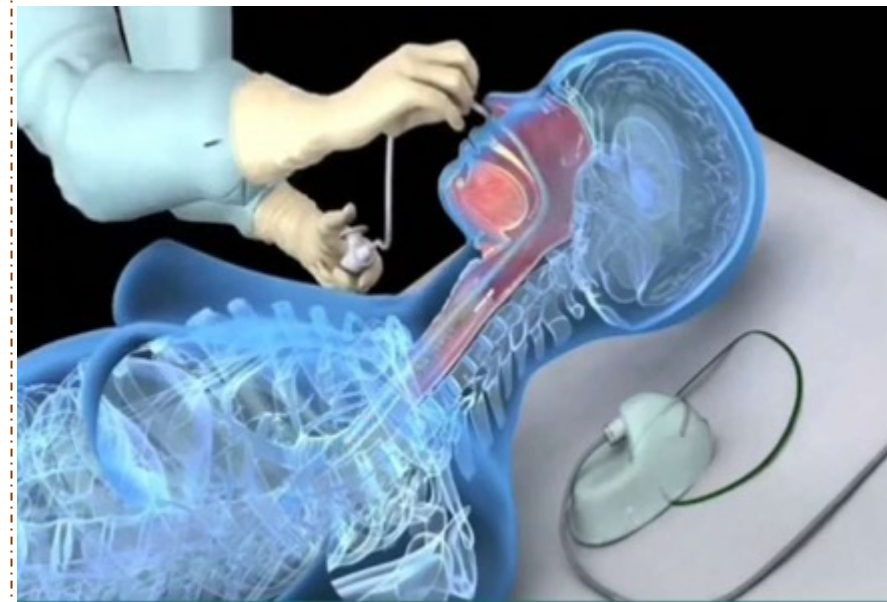
Kelvin Kai-Wang To,<sup>1,2,3,4</sup> Owen Tak-Yin Tsang,<sup>4,5</sup> Cyril Chik-Yan Yip,<sup>1,2,4</sup> Kwok-Hung Chan,<sup>1,4</sup> Tak-Chiu Wu,<sup>6</sup> Jacky Man-Chun Chan,<sup>4</sup> Wai-Shing Leung,<sup>4</sup> Thomas Shiu-Hong Chik,<sup>4</sup> Chris Yau-Chung Choi,<sup>4</sup> Darshana H. Kandamby,<sup>4</sup> David Christopher Lung,<sup>7</sup> Anthony Raymond Tam,<sup>8</sup> Rosana Wing-Shan Poon,<sup>1,2</sup> Agnes Yim-Fong Fung,<sup>1</sup> Ivan Fan-Ngai Hung,<sup>9</sup> Vincent Chi-Chung Cheng,<sup>1,2</sup> Jasper Fuk-Woo Chan,<sup>1,2,3</sup> and Kwok-Yung Yuen<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory for Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, Carol Yu Centre for Infection, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Hong Kong Special Administrative Region, China, <sup>2</sup>Department of Microbiology, Queen Mary Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China, <sup>3</sup>Department of Clinical Microbiology and Infection Control, The University of Hong Kong–Shenzhen Hospital, Shenzhen, China, <sup>4</sup>Department of Medicine and Geriatrics, Princess Margaret Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China, <sup>5</sup>Department of Medicine, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China, <sup>6</sup>Intensive Care Unit, Princess Margaret Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China, <sup>7</sup>Department of Pathology, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China, and <sup>8</sup>Department of Medicine, Queen Mary Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, China

Исследование, проведенное в Гонконге, Китай, показывает: постоянная доля нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2 в слюне и мокроте составила 91,7%, и вирус мог быть выделен из слюны. **Рекомендуется одновременно окунуть подъязычную слюну в мазок из горла.**



- **Извлечение образца из носоглотки или экстракт дыхательных путей:** используйте коллектор, соединенный с насосом отрицательного давления, чтобы извлечь слизь из носоглотки или выделения дыхательных путей из трахеи. Вставьте головку коллектора в носовую полость или трахею, подключите отрицательное давление, поверните головку коллектора, чтобы медленно выйти, соберите образец слизи и промойте коллектор раствором для отбора проб 3 мл (или замените коллектор детским катетером, подключенным к шприцу на 50 мл).
- **Suction of lower respiratory tract:** вставьте головку коллектора в трахею (около 30 см в глубину) из ноздрю или в трахею, введите 5 мл физиологического раствора, подключите отрицательное давление, и последующие действия будут такие же, как и при извлечении образца из носоглотки.

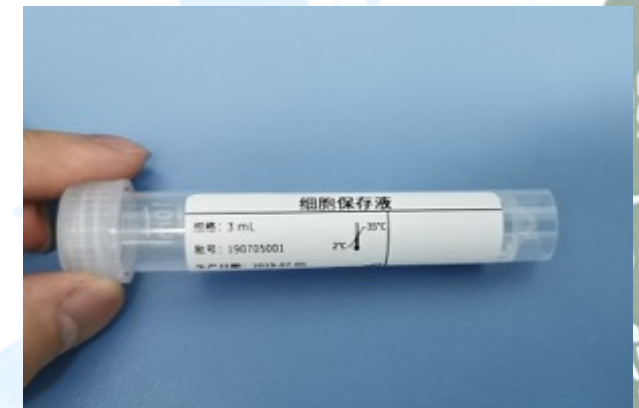


- **Раствор для глубокого откашливания:** прополощите рот чистой водой (**не используйте средство для полоскания рта, содержащее дезинфицирующее средство**) 2-3 раза, удалите зубные протезы, если таковые имеются, и соберите раствор для глубокого откашливания пациента в чашку для мокроты на 50 мл, содержащую 3 мл раствора для отбора проб (раствор для консервации клеток).
- **BALF:** после местной анестезии вставьте бронхоскоп через рот или нос в **бронх средней доли правого легкого**, закрепите его верхнюю часть в отверстие ветви бронха, медленно вводите стерилизованный физиологический раствор через отверстие для биопсии воздушной трубки, 20-60 мл каждый раз, и вывести оставшуюся БАЛ в несколько раз в пробирки для тестирования.

**Предполагается, что лучше собирать глубокую мокроту для образцов дыхательных путей, а для пациентов с интубацией трахеи следует собирать секрецию нижних дыхательных путей для анализа нуклеиновых кислот.**

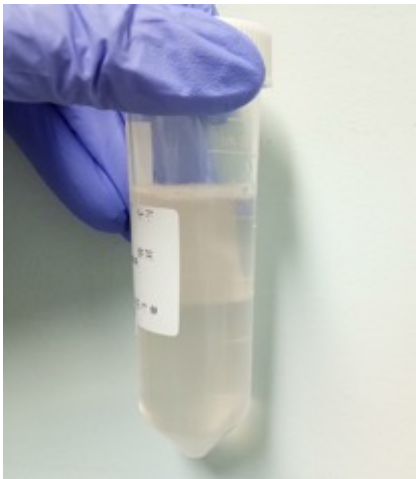


BALF



Раствор для сохранения клеток

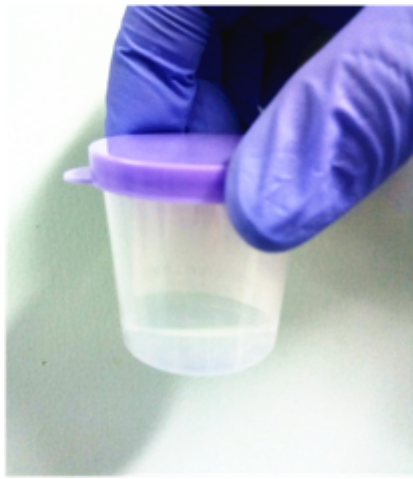
# Качество образца влияет на эффективность и точность теста экстракции нуклеиновых кислот вируса



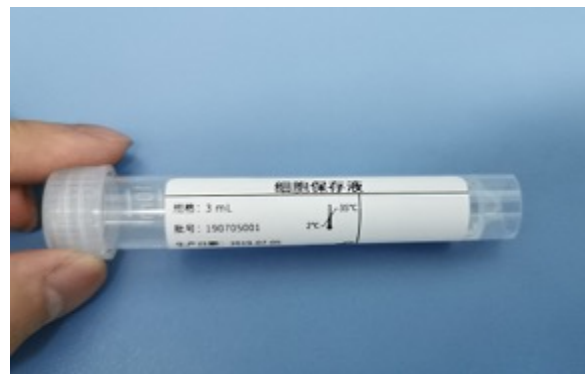
BALF



Мокрота слизистой



Слюна



Флокирующий тампон + раствор для консервации клеток

Patient bed no.	Item no.	Name	Swab	Sputum	
病人床号	项目编号	姓名	咽拭子	痰液	
3	CV-86	Negative	阴性	阳性	Positive
5	CV-87	Weak Positive	弱阳性	阳性	Positive
7	CV-88	Negative	阴性	阴性	Negative
20	CV-89	Positive	阳性	阳性	Positive
21	CV-90	Negative	阴性	弱阳性	Weak Positive
22	CV-91	Weak Positive	弱阳性	阳性	Positive
23	CV-92	Negative	阴性	阴性	Negative
25	CV-93	Positive	阳性	阳性	Positive
27	CV-94	Positive	阳性	阳性	Positive
33	CV-95	Negative	阴性	阳性	Positive
34	CV-96	Positive	阳性	阳性	Positive
35	CV-97	Positive	阳性	阳性	Positive
36	CV-98	Positive	阳性	阳性	Positive
37	CV-99	Positive	阳性	阳性	Positive
39	CV-100	Positive	阳性	阳性	Positive

На ранней стадии нашего исследования исследовались образцы мокроты и мазков из горла у 15 пациентов с высокой степенью подозрения. Частота обнаружения у образцов мокроты была значительно выше, чем у мазков из зева;



- **Образец крови:** кровь обычно собирается из локтевой вены, которая стерилизуется и осушается перед сбором. Обычно это 3-5 мл для взрослых и 1,5 мл для детей.
- **Образец кала:** отобрать 1-2 г гнойной крови или слизи фекалий и поместить их в закрытый стерильный контейнер для тестирования в течение 1 часа.
- **Образец мочи:** не менее 5 мл утренней мочи и поместите ее в стерильную чашку для мочи.

#### Серологические образцы:

Для сбора венозной крови рекомендуется собирать кровь без антикоагулянта, избегать гемолиза, избегать бактериального загрязнения и влияния фибрина.

### 3. Хранение образцов

- 1) В условиях герметичного и неповрежденного контейнера инактивируйте образцы дыхательной секреции в среде с температурой 56 ° C (инкубатор с сухим воздухом) в течение 30 минут;
- 2) Поместите инаktivированные образцы в герметичные пакеты биобезопасности и доставьте их в лабораторию для тестирования с использованием коробки для переноса образцов;
- 3) Если нет условий для своевременной передачи, образцы должны храниться при температуре 4 ° C не более 48 часов.

#### Внимание:

- 1) На ранней стадии наша исследовательская группа подтвердила, что инаktivация образцов при 56 ° C в течение 30 минут и 65°C не влияет на эффект тестирования нуклеиновых кислот;
- 2) Образцы, которые не могут быть представлены для своевременного тестирования, должны храниться надлежащим образом, чтобы избежать разложения нуклеиновой кислоты;



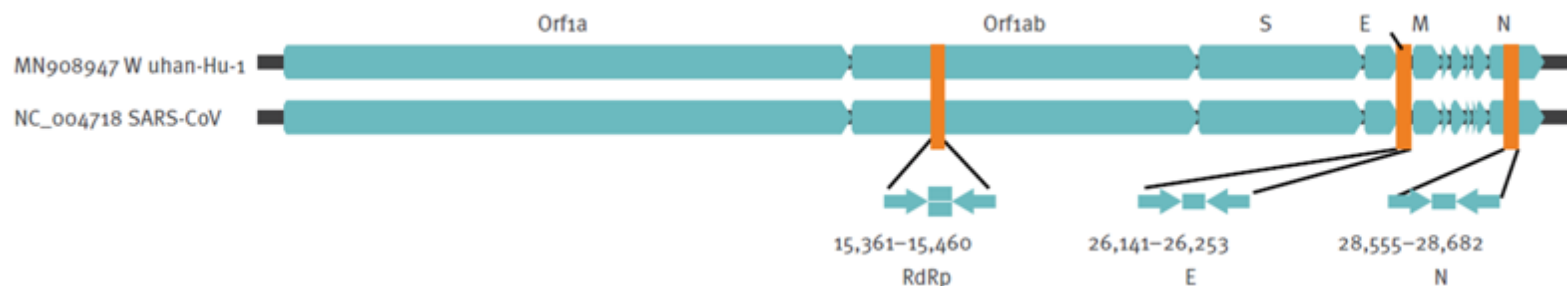
## II. Тестирование нуклеиновых кислот вируса COVID-19

### Лабораторные исследования

- На ранней стадии заболевания общее количество лейкоцитов периферической крови было нормальным или снижалось, количество лимфоцитов снижалось, и у некоторых пациентов могло наблюдаться повышение уровня печеночных ферментов, лактатдегидрогеназы, мышечного фермента и миоглобина; при некоторых критических заболеваниях было отмечено увеличение тропонина. У большинства пациентов С-реактивный белок и СОЭ увеличились, а прокальцитонин был в норме. В тяжелых случаях D-димер увеличивался, а лимфоциты периферической крови постепенно снижались. Воспалительные факторы часто усиливаются у пациентов с тяжелыми и критическими состояниями.
- Нуклеиновые кислоты вируса COVID-19 можно обнаружить в мазках из носоглотки, мокроты и других выделений нижних дыхательных путей, крови и кала.
- Для улучшения точности определения нуклеиновых кислот используйте образцы нижних дыхательных путей (экстракты мокроты или дыхательных путей). Образцы должны быть протестированы как можно скорее после сбора.
- *Китайские Клинические рекомендации диагностики и лечения пневмонии COVID-19 (7 редакция)*

Случай	Стандарт
<p><b>Подтвержденные случаи:</b> Подозреваемый случай с одним из следующих этиологических признаки</p>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. ПЦР в режиме реального времени дает положительный результат обнаружения нуклеиновых кислот COVID-19</li><li>2. Идентифицируемый геном вируса имеет высокую гомологичность к COVID-19</li><li>3. Тест на специфические антитела к COVID-19 IgM и IgG положительный; специфические антитела к COVID-19 IgG изменяется от отрицательного к положительному или увеличивается в 4 раза во время восстановительного периода по сравнению с острым периодом</li></ol>

# Интерпретация результатов тестирования нуклеиновых кислот COVID-19



	Китай	ВОЗ	CDC, США
Цель	Orf1ab и N ген	E ген, RdRp ген, N ген	N1 ген, N2 ген, N3 ген, RP ген
Интерпретация результатов	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Обнаружено:</b> ORF1ab и N являются положительными одновременно, один из ORF1ab или N является положительным, а положительный после положительного теста все еще остается положительным. Это оценивается как обнаруженный вирус;</li> <li><b>Подозреваемый:</b> значение Ct двух локусов находится между положительным значением Ct и отрицательным значением Ct, или один из них считается положительным, а значение Ct другого локуса находится между положительным значением Ct и отрицательным значением Ct; один из двух локусов отрицателен, а значение Ct другого локуса находится между положительным значением Ct и отрицательным значением Ct.</li> <li><b>Не обнаружено:</b> результаты амплификации двух локусов не показали ответа</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Предварительный скрининг-тест:</b> тест E-гена. Если положительный результат, то требуется подтверждения теста; если отрицательный, исключить;</li> <li><b>Тест подтверждения:</b> тест гена RdRp. Если положительный, это обнаружение; если отрицательный, то проведите идентификационный тест;</li> <li><b>Идентификационный тест:</b> в случае положительного результата обнаруживается как SARS-подобный коронавирус;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Обнаружено:</b> N1, N2, N3 все положительные, а ген RP ±;</li> <li><b>Неопределенный результат:</b> любой один или два из N1, N2, N3 положительны, а ген RP ±;</li> <li><b>Не обнаружено:</b> N1, N2, N3 все отрицательные, а ген RP был положительным;</li> <li><b>Неверные результаты:</b> гены N1, N2, N3 и RP отрицательны;</li> </ul>

1. 中华医学杂志, 2020, 100(00): E003-E003.

2. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR-Protocol and preliminary evaluation as of Jan 17, 2020

3. 2019-nCoV rRT-PCR Panel CDC/NCIRD/DVD Effective: 04 Feb 2020. Instructions for Use



# 1. Экстракция и ПЦР в режиме реального времени

## Общие принципы работы с образцами

Общая РНК-нуклеиновая кислота вируса должна быть экстрагирована после достаточного лизиса клеток и расщепления протеазой К респираторных образцов; Для образцов флокирующего тампона эпителиальные клетки, соскобленные тампоном, должны быть полностью элюированы перед экстракцией;

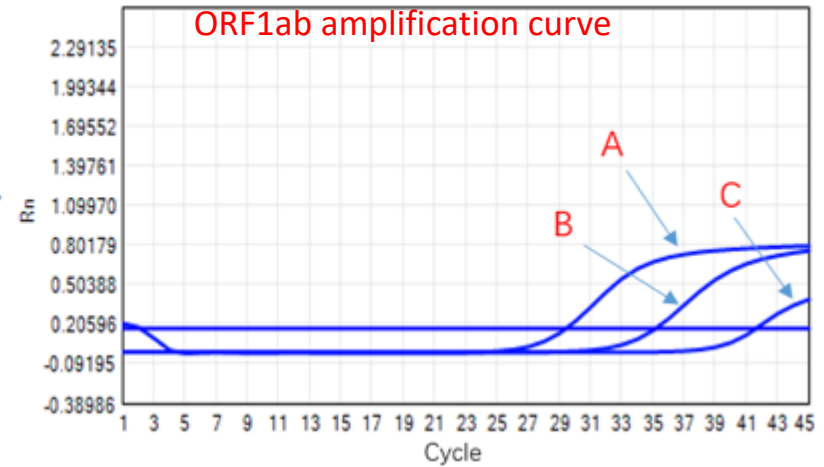
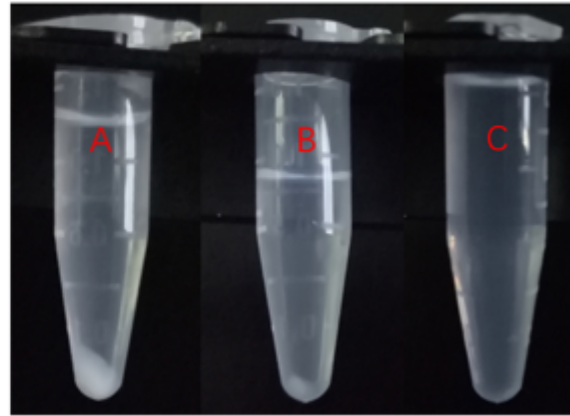
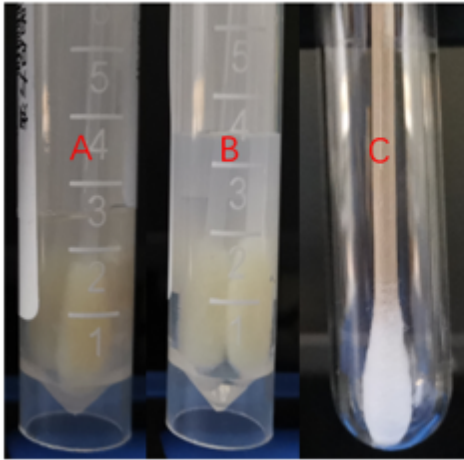
## Выбор метода экстракции:

- Для экстракции суммарной РНК нуклеиновой кислоты вируса предпочтительно использовать метод фильтрующей колонки и метод магнитных шариков. Эти методы имеют высокую чистоту;
- Метод «кипящего раствора» относительно низок по эффективности выделения нуклеиновой кислоты, что может привести к неправильному обнаружению, поэтому его не рекомендуется использовать;



Сравнение результатов выделения нуклеиновых кислот из образца, полученные различными методами

# Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Качество сбора образцов мазков из горла



Качество выборки мазка из зева:  
В пробирке А для взятия мазка из горла консервирующий раствор выглядит более мутным, в пробирке В для взятия мазка из горла консервирующий раствор выглядит прозрачным, а в пробирке С мазки из зева были непосредственно собраны сухими ватными палочками.

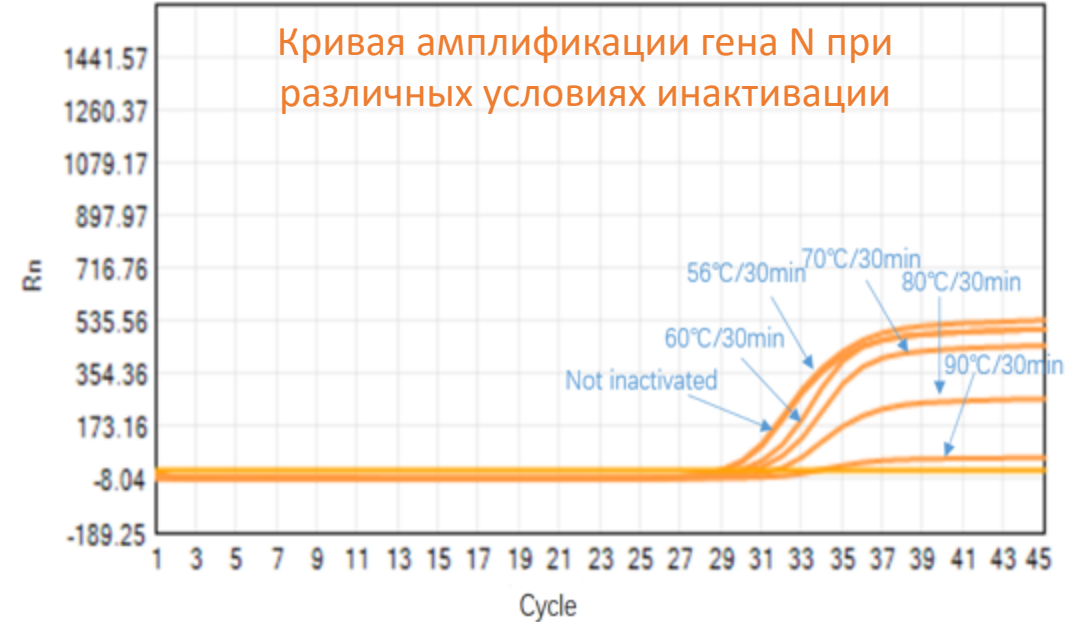
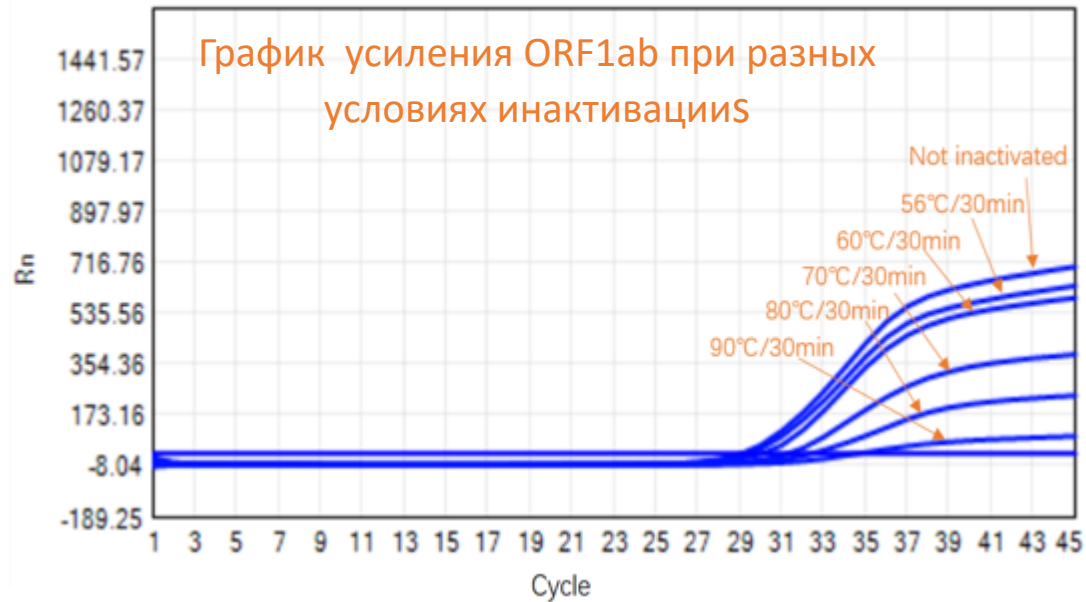
Клетки после центрифугирования:  
В образцах мазка из зева было больше клеток после центрифугирования, в образцах мазка В было меньше клеток после центрифугирования, а в образцах из сухого ватного тампона С практически не было клеток, которые можно было бы увидеть невооруженным глазом после центрифугирования.

Результаты ПЦР (ORF1ab):  
СТ значение образца А мазка из зева было наименьшим после амплификации, СТ значение образца В было большим после амплификации, а СТ значение образца С сухого ватного тампона С было наибольшим после амплификации.

Примечание: вышеуказанные образцы были взяты у одного и того же пациента при одном и том же течении заболевания.е

## Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Различные условия инактивации

Исследовательская группа инактивировала 27 образцов мазков из носоглотки и 6 образцов фекалий пациентов с положительным результатом на наличие нуклеиновой кислоты COVID-19 с различными температурными градиентами, такими как не инактивированные, 56°C / 30 мин (рекомендуется Руководством), 60 °C / 30 мин, 70 °C / 30 мин, 80 °C / 30 минут, 90 °C / 30 минут соответственно, а затем экстрагировали РНК из образцов с помощью магнитного шарикового экстрактора NucliSENS easyMAG. Результаты приведены ниже:



С увеличением температуры инактивации СТ значение RT-PCR также увеличивается

## Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Различные условия инактивации

Предварительное заключение исследования различных температуры инактивации:

1. Не было статистической разницы между отсутствием инактивации и условием инактивации 56 °C / 30 минут, рекомендованным Руководством по экстракции нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2.
2. СТ значение гена ORF1ab демонстрирует разницу при 70 °C / 30 мин.
3. N ген показывает разницу при 90 °C / 30 мин.

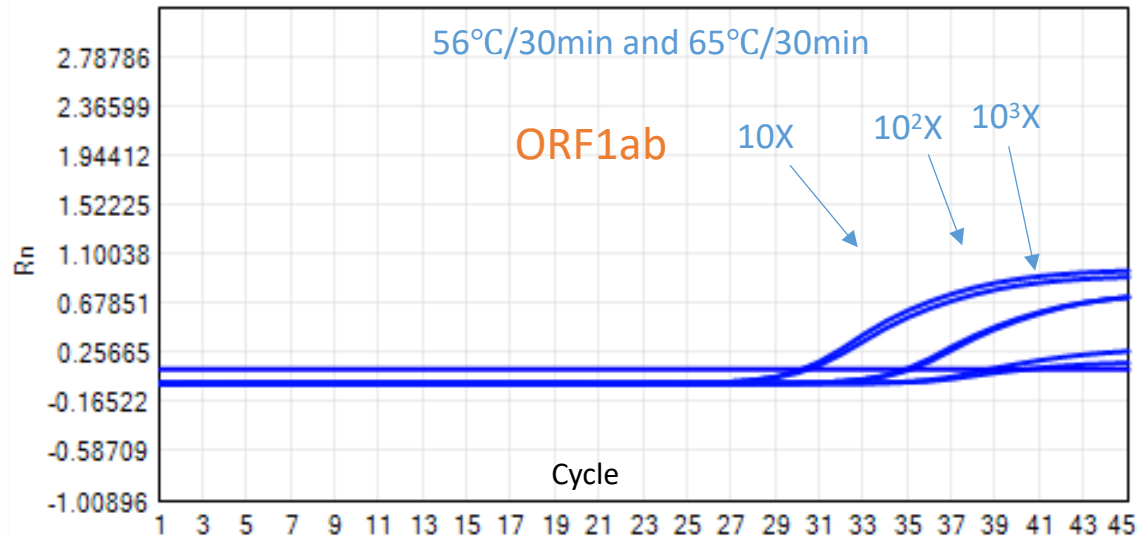
Чтобы найти более подходящую биобезопасную температуру инактивации, исследовательская группа провела сравнение между 56 °C / 30 мин инактивацией и 65 °C / 30 мин инактивацией.

### Влияние различных условий инактивации на PHK SARS-CoV-2

Gene (n=33)	The sixth edition of the guide recommends inactivation conditions: 56°C/30min	Inactivated conditions	CT value	P
ORF1ab		Not inactivated	33.52 ± 3.66	0.588
		60°C/30min	34.64 ± 4.54	0.395
		70°C/30min	36.86 ± 5.44	0.000
		80°C/30min	39.08 ± 6.01	0.000
		90°C/30min	40.33 ± 5.93	0.000
N		Not inactivated	32.87 ± 2.87	0.222
		60°C/30min	32.71 ± 2.58	0.316
		70°C/30min	33.96 ± 3.88	0.493
		80°C/30min	34.86 ± 3.66	0.063
		90°C/30min	36.65 ± 4.45	0.000



## Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Различные условия инактивации

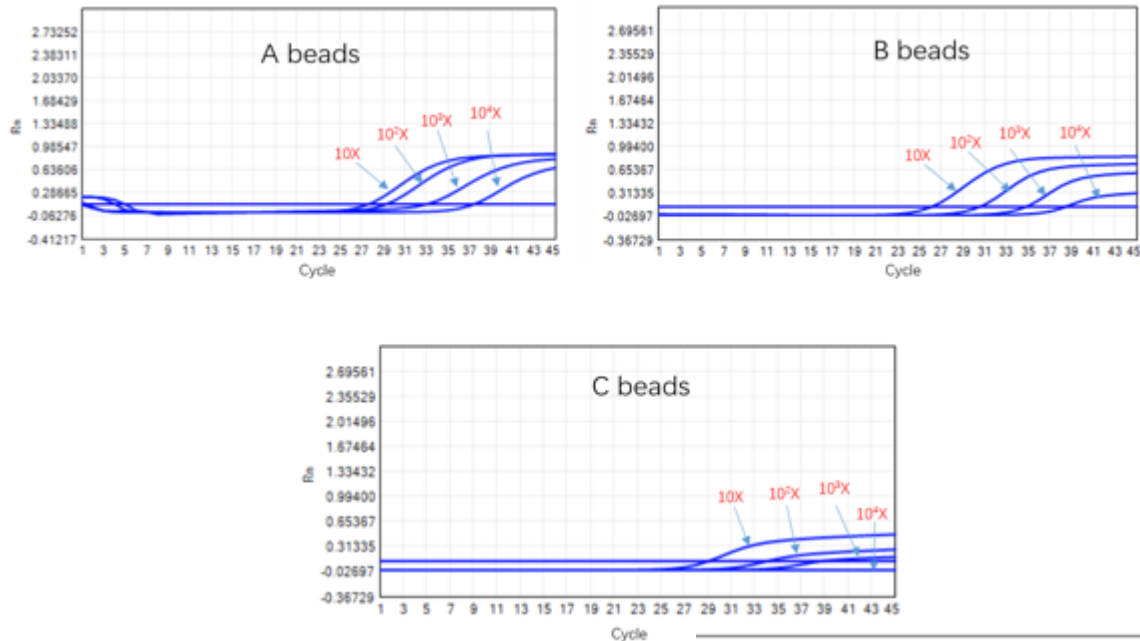


Один и тот же образец разводили в 10, 100 и 1000 раз, а затем инактивировали при 56 мкл / 30 мин и 65 мкл / 30 мин соответственно. ПЦР анализ показал, что не было различий в эффекте инактивации при 56 мкл / 30 мин и 65 мкл / 30 мин на экстракцию нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2.

**Исследовательская группа предположила, что: для экстракции нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2 сначала следует провести инактивационную обработку и температура инактивации не должна превышать 70 °С.**

# Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Различные реагенты для экстракции

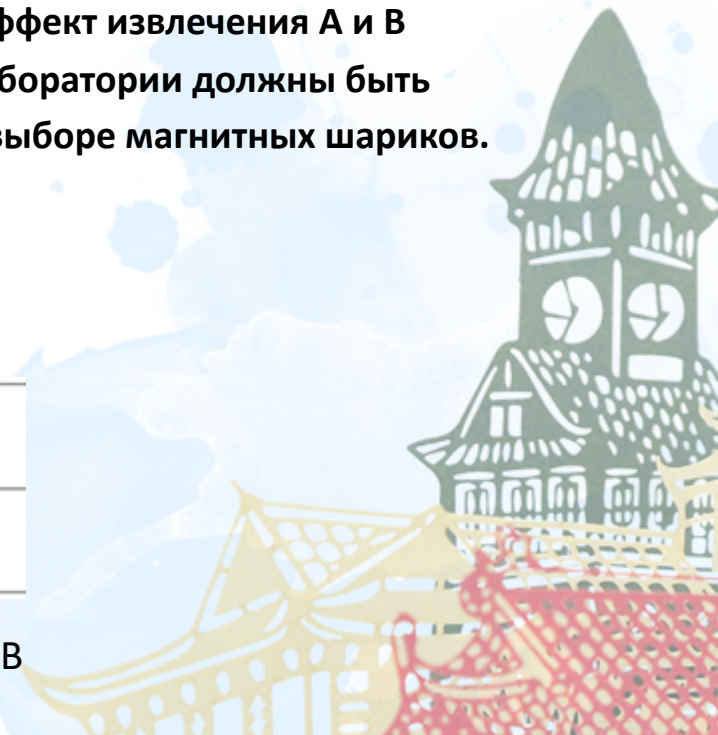
Кривая амплификации гена ORF1ab с различными экстракционными реагентами



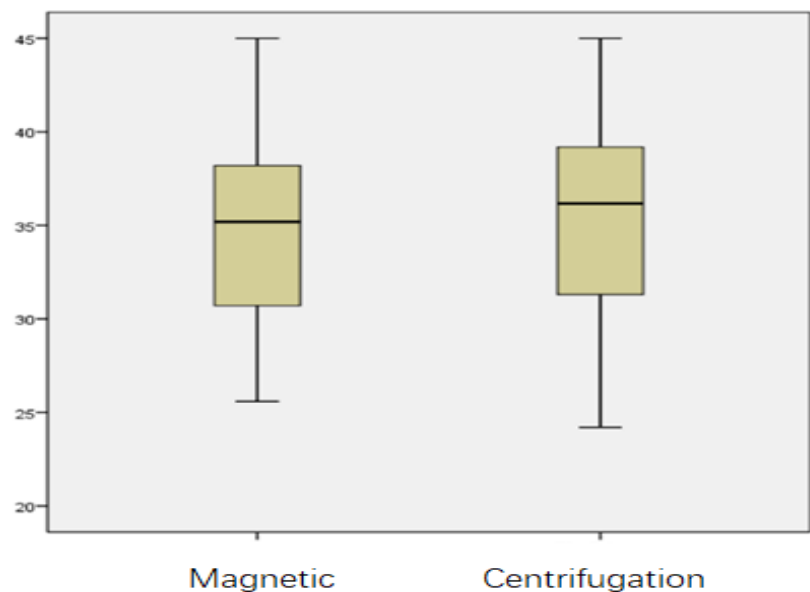
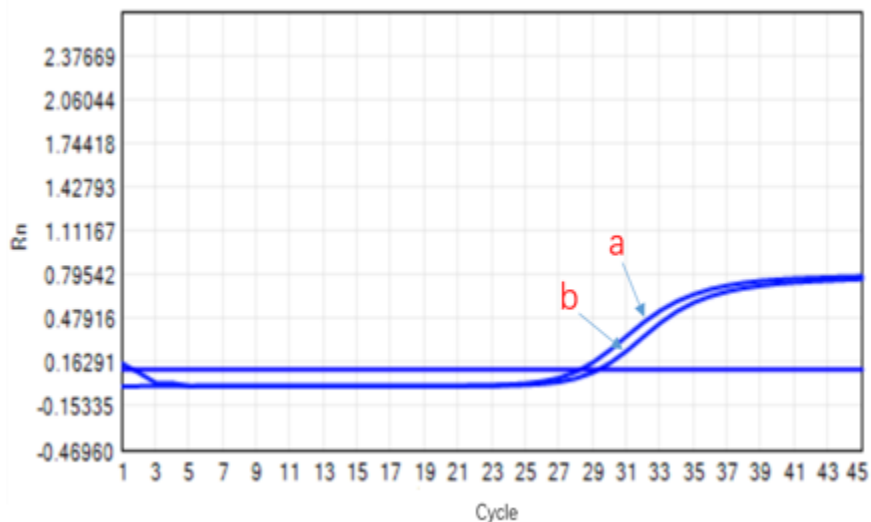
Для образцов с различными разбавлениями эффект извлечения А и В значительно лучше, чем у С. Специально для образцов с низкими концентрациями эффект извлечения А и В намного лучше. Лаборатории должны быть внимательны при выборе магнитных шариков.

A vs B magnetic based-protocol (n=14)	CT value	P
A magnetic based-protocol	33.52 ± 3.84	0.100
B magnetic based-protocol	32.49 ± 4.27	

Нет существенной разницы между эффектом извлечения А и В



## Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- Различные реагенты для экстракции



**MB vs SC(n=58)**

**CT value**

**P**

Magnetic based-protocol

$34.75 \pm 4.74$

0.236

Centrifugation based-protocol

$35.23 \pm 5.64$

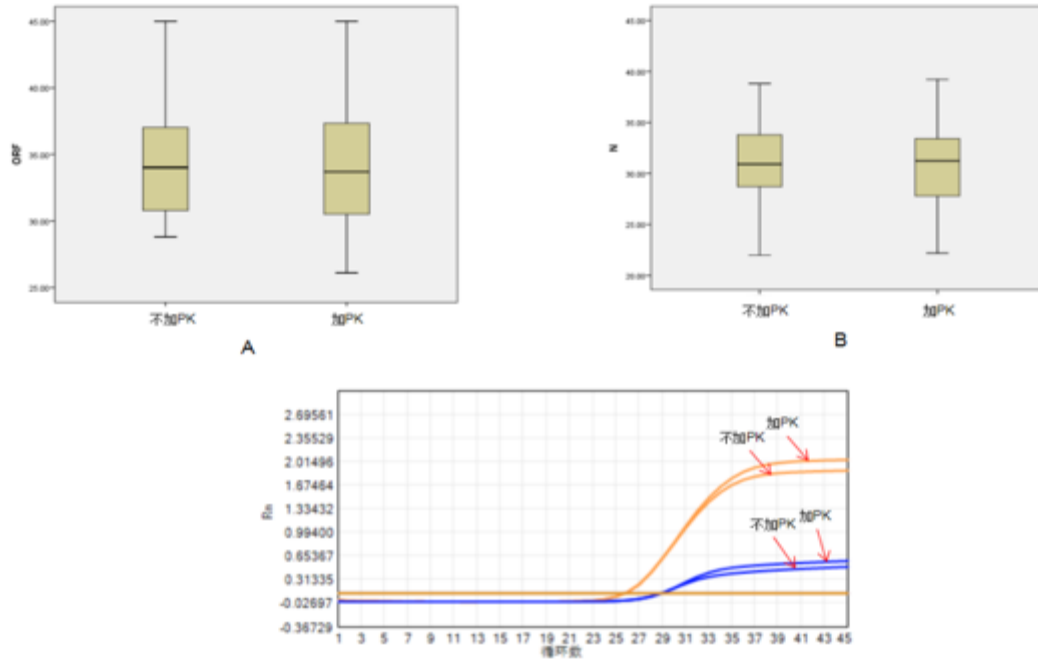
Исследовательская группа выбрала шарики А (время выделения РНК SARS-CoV-2 короткое) и метод экстракции на фильтрующей колонке для сравнения, результаты не имеют статистической разницы.

Поэтому мы рекомендуем, чтобы лаборатория без возможностей автоматизации рассмотрела возможность извлечения колонки из РНК SARS-CoV-2.

Note: a: Magnetic based-protocol, b: centrifugation based-protocol.

# Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- РК

Сравнение результатов предварительной обработки РК образцов мазка из носоглотки



В 50 образцах мазков из носоглотки пациентов с SARS-CoV-2 мы сравнили влияние предварительной обработки РК перед экстракцией нуклеиновой кислоты на результаты теста. Результаты показали, что не было статистической разницы ( $P > 0,05$ ) между средним значением СТ гена ORF и гена N в группе без РК и таковым в группе с РК в двух группах в параллельных экспериментах.

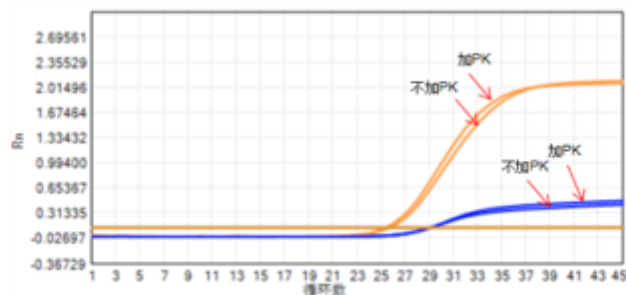
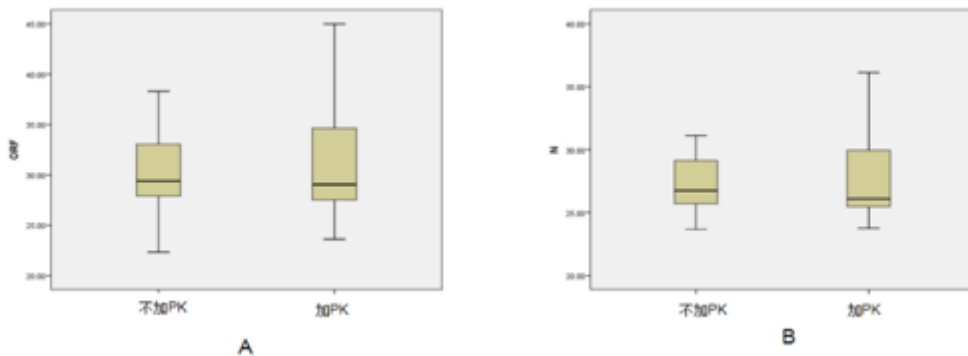
gene	without PK	with PK	P value
基因 (n=50)	不加 PK	加 PK	P 值
ORF gene ORF 基因(ct)	33.92±4.42	34.21±3.99	0.253
N gene N 基因 (ct)	30.83±3.99	31.12±4.31	0.244

Примечание: на рисунках A и B соответственно показано количество циркулирующих генов ORF и N. На рисунке C показана кривая амплификации ПЦР того же образца мазка из носоглотки после двух групп параллельных экспериментов (синий для гена ORF и желтый для гена N)



# Факторы влияющие на экстракцию SARS-CoV-2 нуклеиновых кислот -- PK

Сравнение результатов предварительной обработки PK образцов мазка из носоглотки

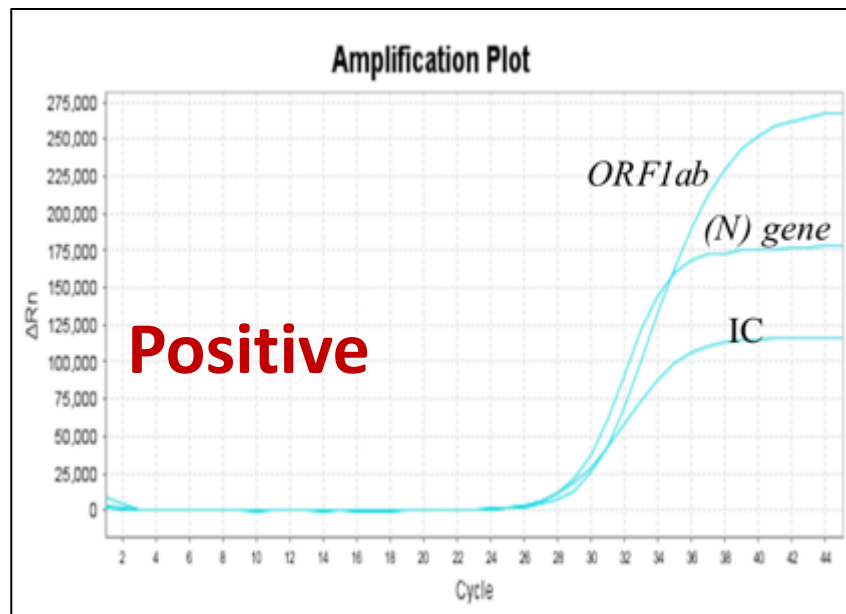


gene	without PK	with PK	P value
基因 (n=20)	不加 PK	加 PK	P 值
ORF gene ORF 基因(ct)	31.37±5.90	31.08±5.71	0.456
N gene N 基因 (ct)	27.74±3.47	27.80±3.29	0.692

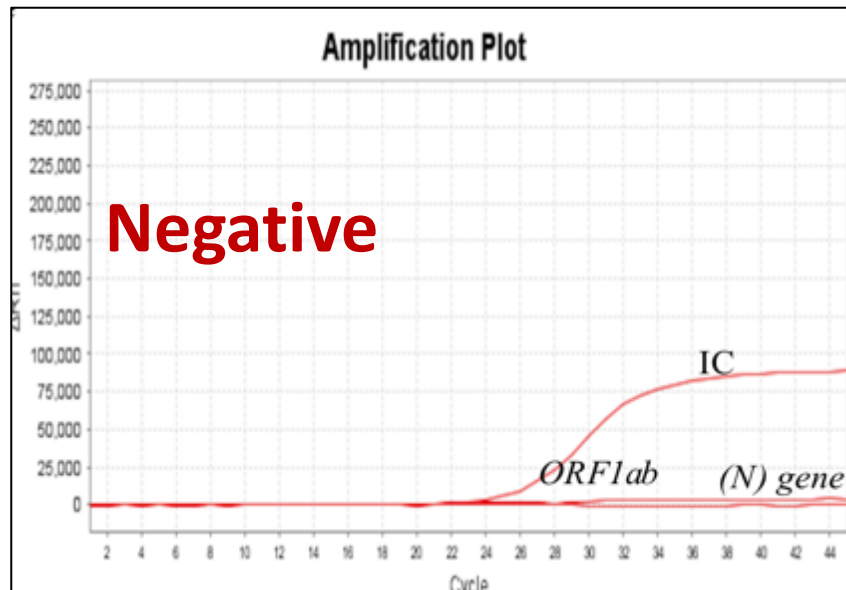
В 20 образцах фекалий SARS-CoV-2-положительных пациентов среднее значение CT гена ORF и гена N в группе предварительной обработкой PK и без предварительной обработки PK не имело статистической разницы ( $P > 0,05$ ). При извлечении SARS-CoV-2 из образцов мазков из носоглотки и фекалий предварительная обработка протеазой K (PK) не оказала влияния на результаты анализа нуклеиновой кислоты, поэтому можно было бы рассмотреть возможность не использовать PK. Тем не менее, PK может гомогенизировать мокроту и другие вязкие образцы, и неоднородность образцов будет влиять на результаты испытаний. Таким образом, исследовательская группа предлагает добавлять PK в вязкие образцы должным образом в соответствии с вязкостью.

Примечание: на рисунках A и B соответственно показано количество циркулирующих генов ORF и N. На рисунке C показана кривая амплификации ПЦР того же образца фекалий после двух групп параллельных экспериментов (синий для гена ORF и желтый для гена N)

## Интерпретация ПЦР анализа

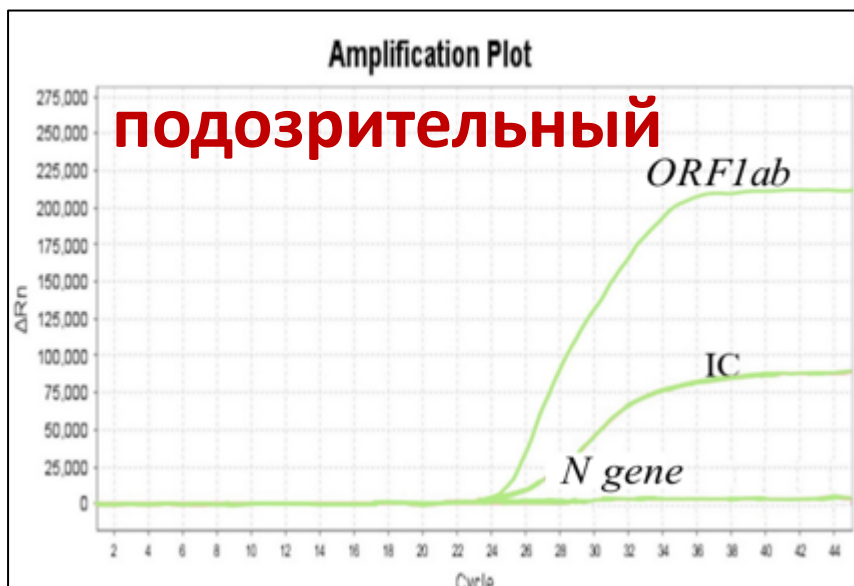


Положительный результат амплификации: IC (внутренний стандарт): амплификация S-типа ORF1ab и положительная амплификация гена N / E гена (значение CT <35)



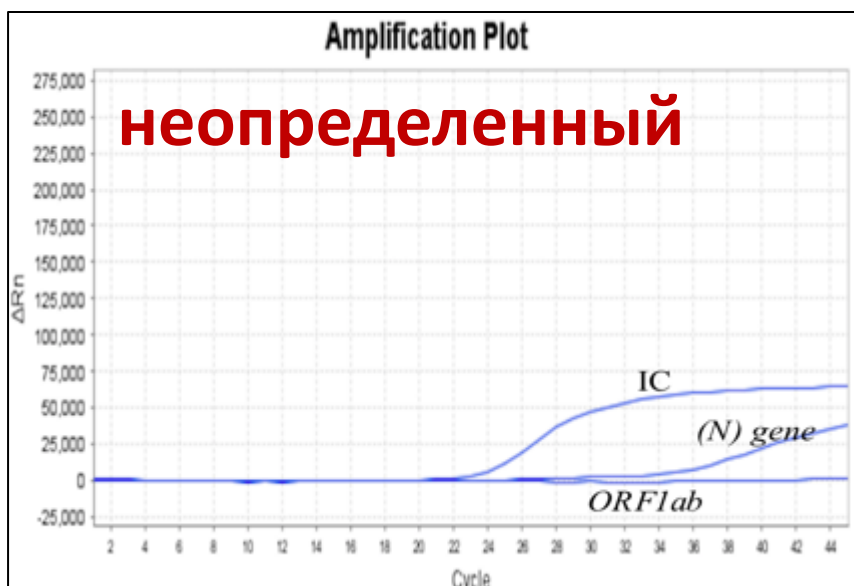
Отрицательный результат амплификации: IC (внутренний стандарт): S-тип амплификации гена ORF1ab, отрицательный результат амплификации гена N / гена (CT > 35)

## Интерпретация ПЦР анализа



Весьма подозрительный результат: IC (внутренний стандарт): амплификация S-типа ORF1ab положительная амплификация (значение  $CT < 35$ ) N-ген / амплификация гена E отрицательная

Провести повторный тест с другим набором реагентов; или провести повторный тест другим методом обнаружения; или секвенирование



Неопределенный результат: IC (внутренний стандарт): амплификация ORF1ab S-типа, отрицательная амплификация ORF1ab, положительная амплификация гена N / E (значение  $CT < 35$ )

Провести повторный тест с другим комплектом; или собрать новый образец для повторного тестирования

# Резюме: факторы, влияющие на ПЦР анализ вирусных нуклеиновых кислот

## Характеристика заболевания

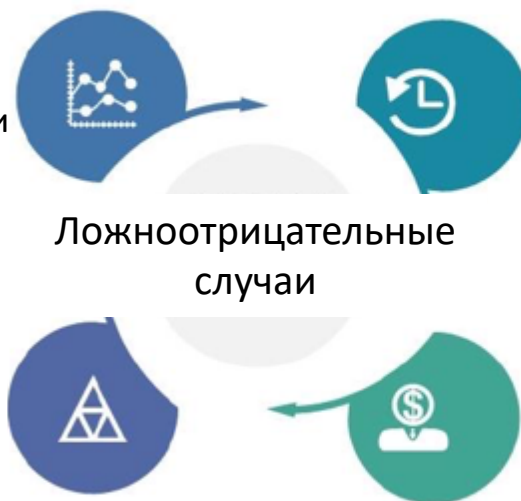
1. На различных стадиях заболевания, распределение вирусной нагрузки разное
2. Имеется специфическая разница в инвазии вируса в различные органы

## Транспортировка, хранение и другое

1. Раствор для консервации вируса следует поместить в коллектор
2. Температура хранения / транспортировки, время и другие внешние факторы
3. РНК вируса легко разрушается

## Решение:

- Собирайте образцы из разных мест: мазок из носоглотки, глубокая мокрота, BALF ...
- Установить единый стандарт отбора проб, тестирования COVID-19 и оценку качества терапии
- Создание новых и более эффективных методов обнаружения COVID-19



## Ограничение использования мазка из зева

1. Процедура: влияет место сбора образца, объем образца;
2. Polyester or artificial cotton head plastic handle throat swab suitable for virus detection and PCR operation is required
3. Не соблюдение стандартов при взятии образца

## Дефекты наборов для ПЦР анализа

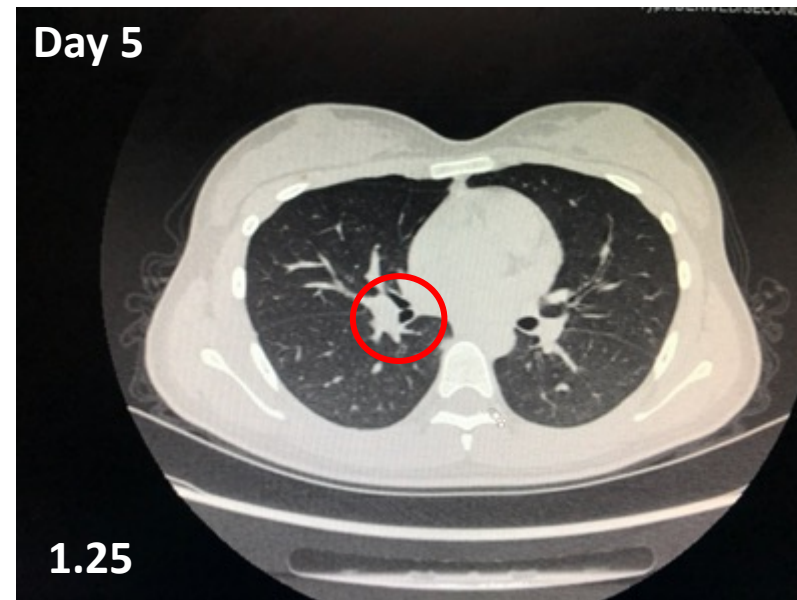
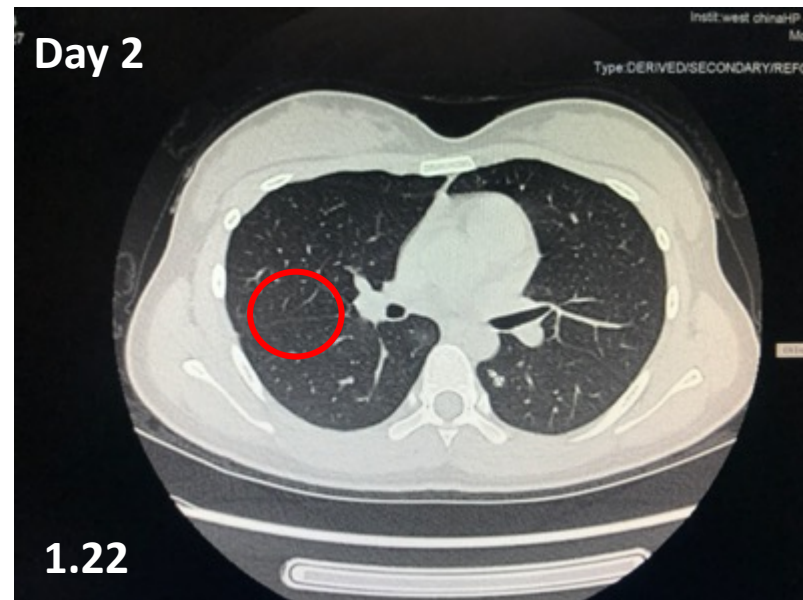
1. Мало времени на разработку методик, низкая стабильность продукции
2. Нет клинической верификации
3. Недостаток разработки: недостаточно специфический генный локус
4. Качество ПЦР разных производителей варьируется



Пациентка: женщина, 19 лет, студентка колледжа. 19 января она вернулась в Чэнду из Ухани. 21 января она почувствовала жар, кашель и насморк. 22 января она обратилась в отделение неотложной помощи нашей больницы для лечения.

Проведено КТ и тест на нуклеиновую кислоту COVID-19

Поставлен диагноз COVID-19



1.22. Тест на нуклеиновую кислоту мазка из горла показал, что у пациента был обнаружен COVID-19, но никаких специфических изменений на КТ изображениях обнаружено не было.

1.25 Тест на нуклеиновую кислоту мокроты показал наличие COVID-19. КТ показали воспалительные поражения легких, что свидетельствует об инфекции.

.....

2.10 Симптомы пациентов явно улучшились. Результаты КТ показали, что поражение легких были значительно сокращено, тест на нуклеиновую кислоту вируса мазка из зева был отрицательным, но тест на нуклеиновые кислоты с фекалиями был положительным.

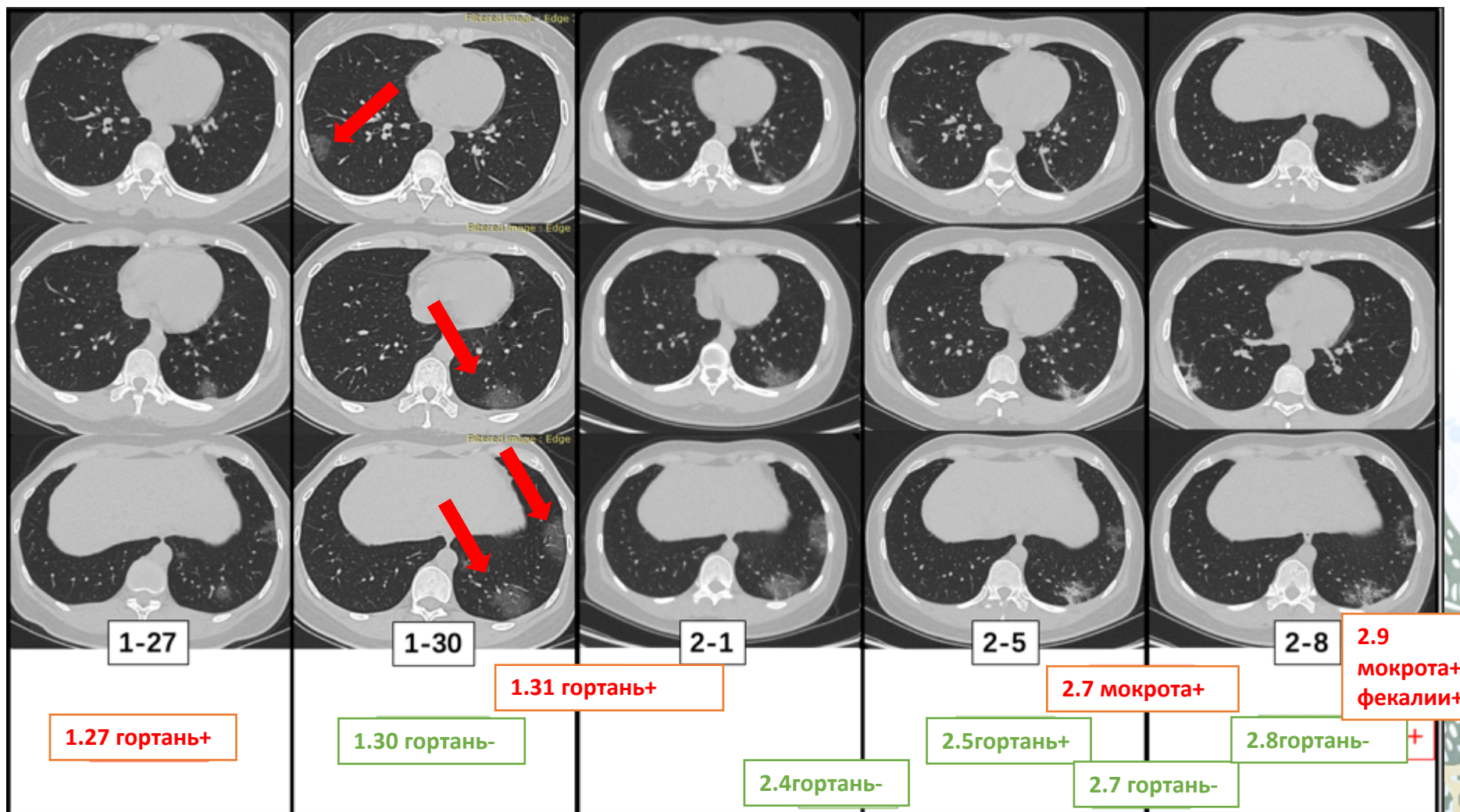
Пациенты продолжали оставаться для лечения в изоляции;

## Клиническое значение анализа нуклеиновых кислот, случай 2

Пациентка: женщина, 57 лет, жительница, прибыла в Чэнду из Уханя со своей семьей 22 января. 24 января в семье у всех начался жар и кашель. 27 января она обратилась в отделение неотложной помощи нашей больницы для лечения.

Проведено КТ и тест на COVID-19

Поставлен диагноз COVID-19

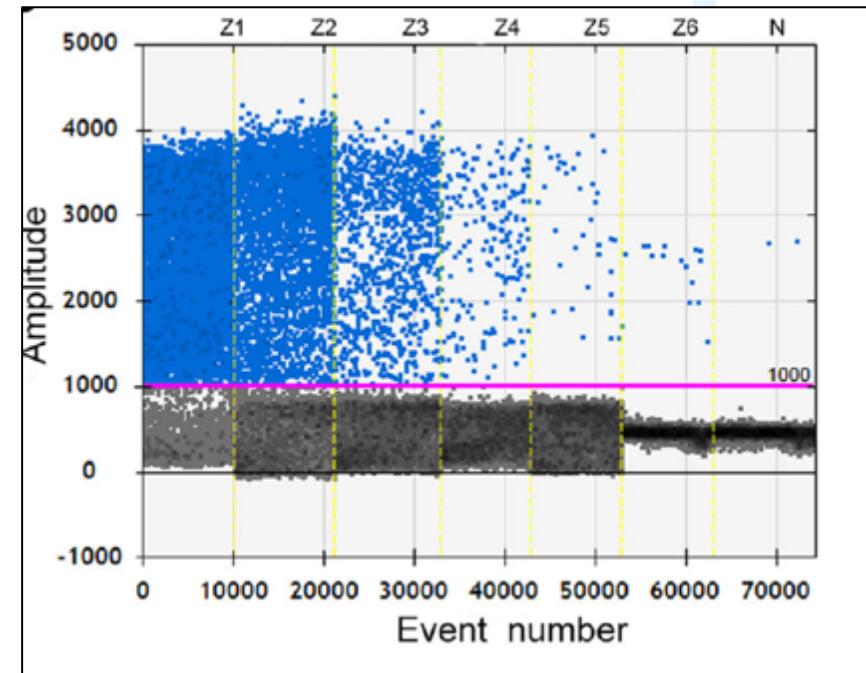
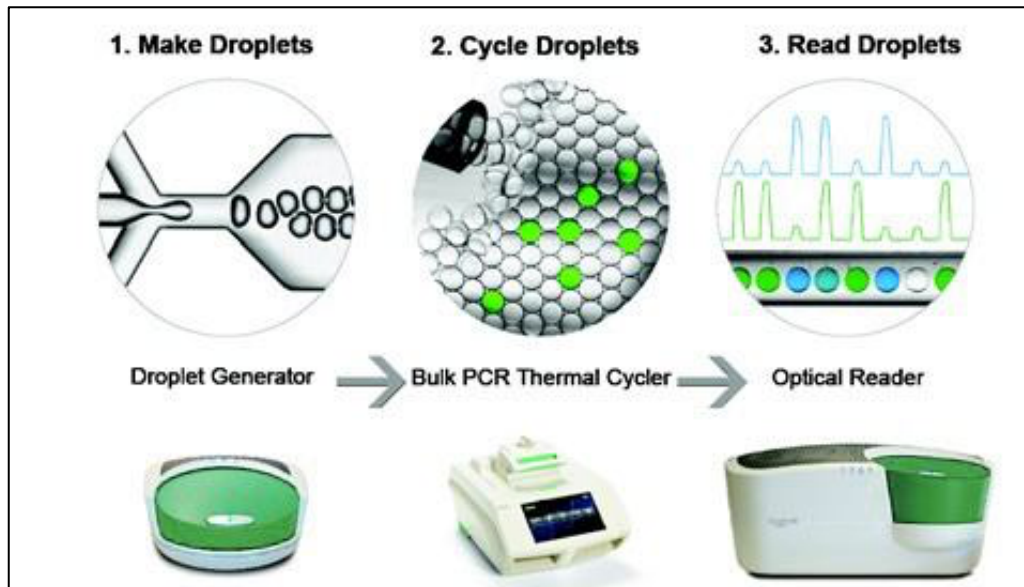


После лечения анализы на нуклеиновую кислоту вируса мазка из зева несколько раз были отрицательными, но результаты из образца мокроты и кала были положительными, поэтому пациент продолжил оставаться для наблюдения и лечения в изоляции



## 2. Цифровая ПЦР (цПЦР)

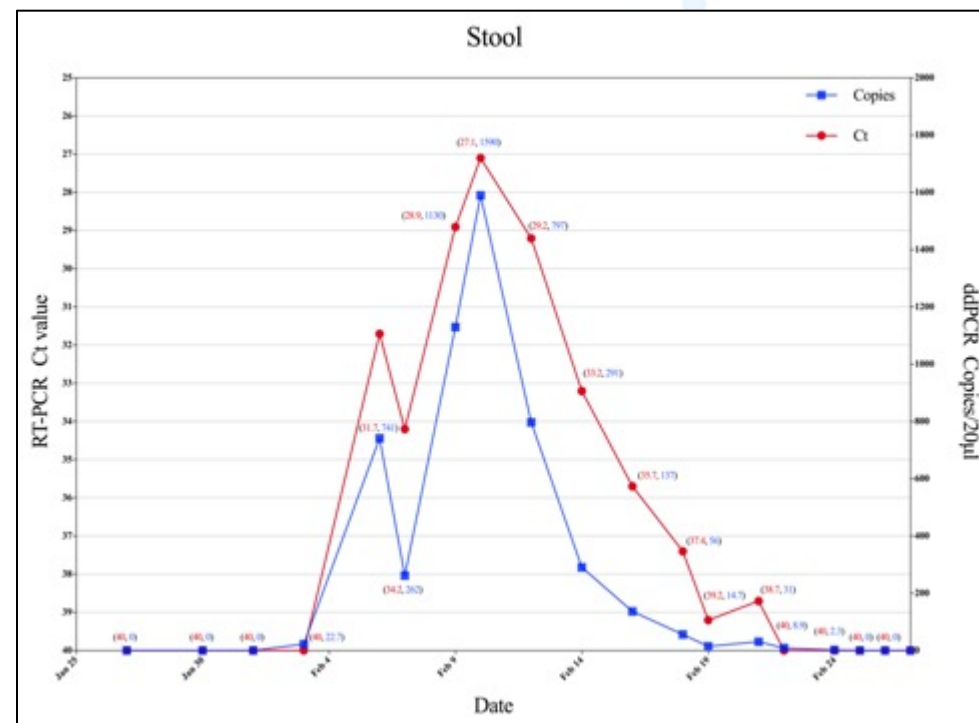
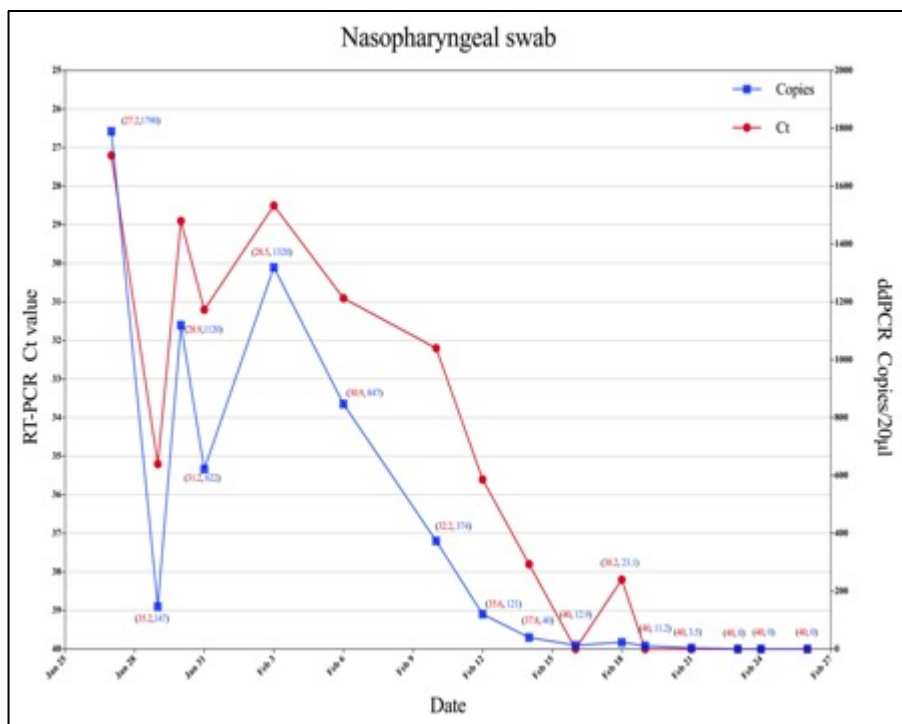
- цПЦР- это вид амплификации ПЦР, основанный на одномолекулярной матрице, который можно использовать для точного количественного анализа числа копий нуклеиновых кислот. У цПЦР есть много преимуществ, с которыми не могут сравниться другие распространенные виды ПЦР, такие как точность и чувствительность.
- Он может обнаруживать образцы SARS-CoV-2 с низкой клинической концентрацией и проводить раннюю диагностику и отслеживание лечения пациентов с COVID-19.



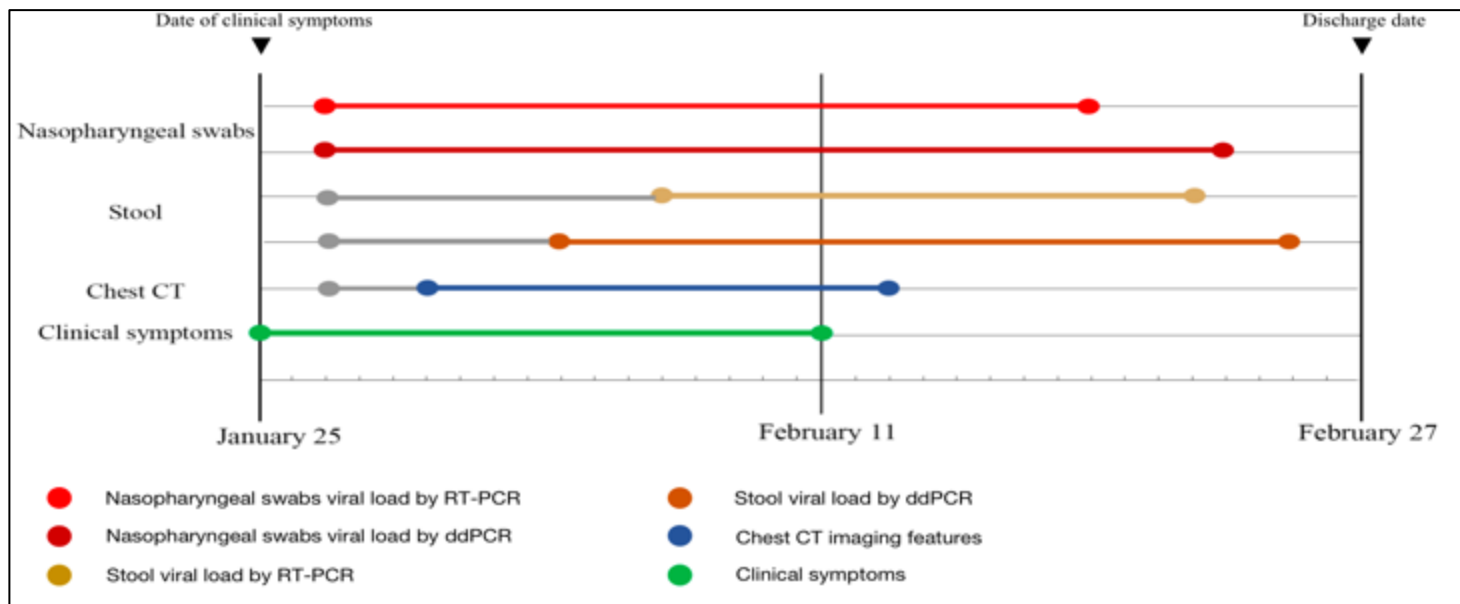
# цПЦР

Мы использовали ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) и цПЦР одновременно, чтобы определить вирусную нагрузку пациента с COVID-19 от начала до конца, от диагноза до излечения.

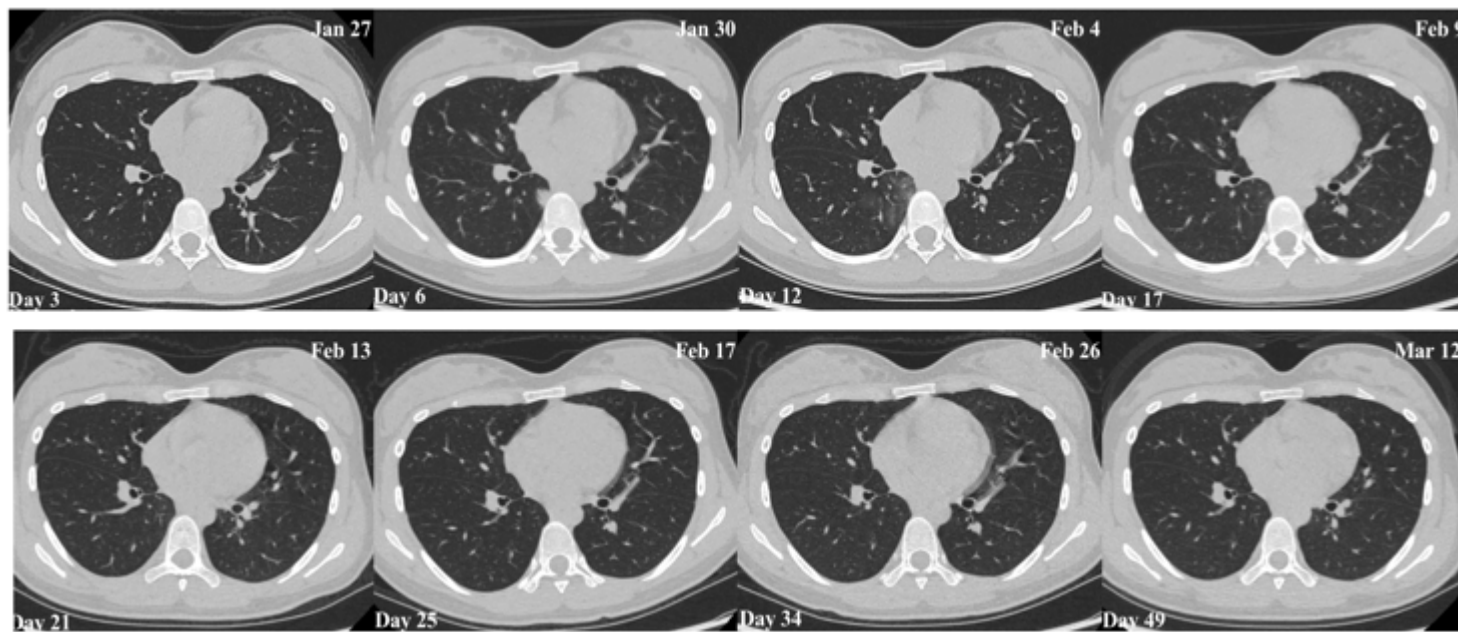
Мы обнаружили, что цПЦР может отражать изменение вирусной нагрузки более чувствительно, чем RT-PCR, особенно для обнаружения вирусов с низким числом копий, что является более точным и чувствительным. Избегайте ложноотрицательных результатов, которые приводят к неверному клиническому диагнозу, а также неверной оценки риска заражения.







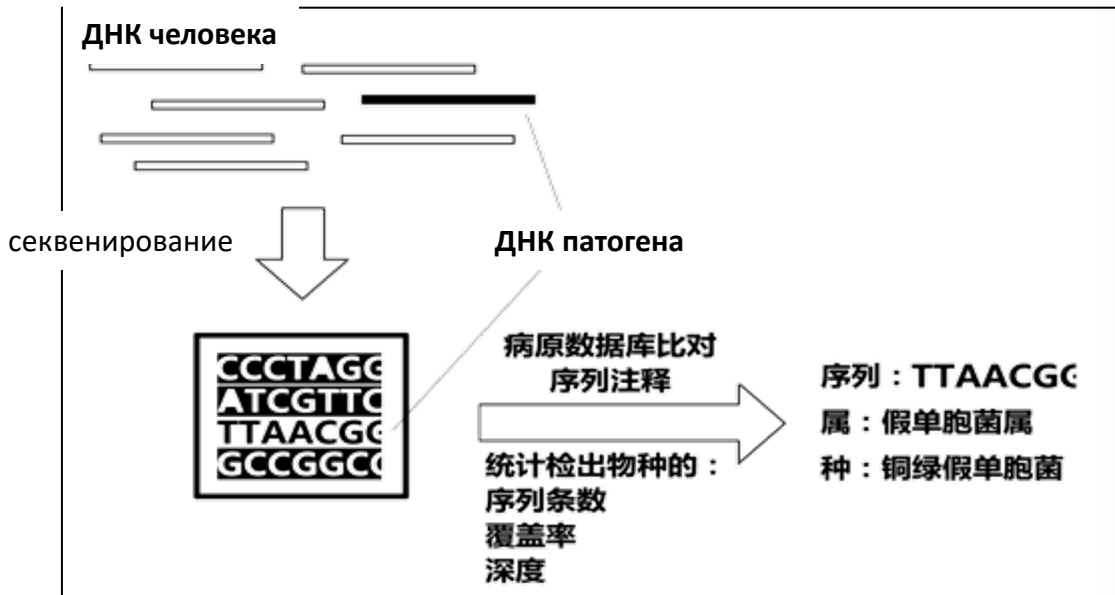
- По сравнению с методами визуализации (КТ грудной клетки), мы обнаружили, что RT-PCR / цПЦР определяет вирусную нуклеиновую кислоту раньше, чем появляются изменения в ходе обследования методами визуализации. Это очень важный лабораторный показатель для ранней диагностики COVID-19 и имеет важное значение для ранней диагностики, ранней изоляции и раннего лечения пациентов;



- Мы также обнаружили, что даже после восстановления клинических симптомов и улучшения визуализации (КТ грудной клетки) вирус в мазке из носоглотки / фекалии пациентов все еще существует в течение длительного времени, поэтому нам необходимо отслеживать изменение вирусной нагрузки у пациентов, проводя анализ RT-PCR / цПЦР в течение всего процесса лечения, продолжать противовирусное лечение, чтобы избежать рецидива заболевания или дальнейшего распространения инфекции после выхода из больницы из-за ложноотрицательных результатов.

### 3. mNGS Macrogenomic Detection

Для пациентов с подозрением на COVID-19, в дополнение к традиционному ПЦР-тестированию, мы также используем стратегию макрогеномного обнаружения (mNGS), основанную на технологии секвенирования второго поколения, для непосредственного извлечения нуклеиновых кислот всех микроорганизмов в зараженных образцах для высокопроизводительного секвенирования. Путем сравнения специальной микробной базы данных с интеллектуальным алгоритмом анализа мы можем получать информацию о видах подозреваемых патогенных микроорганизмов и одновременно обнаруживать различные респираторные патогены, включая вирус SARS-CoV-2, обеспечивая более точную и всестороннюю картину заражения.

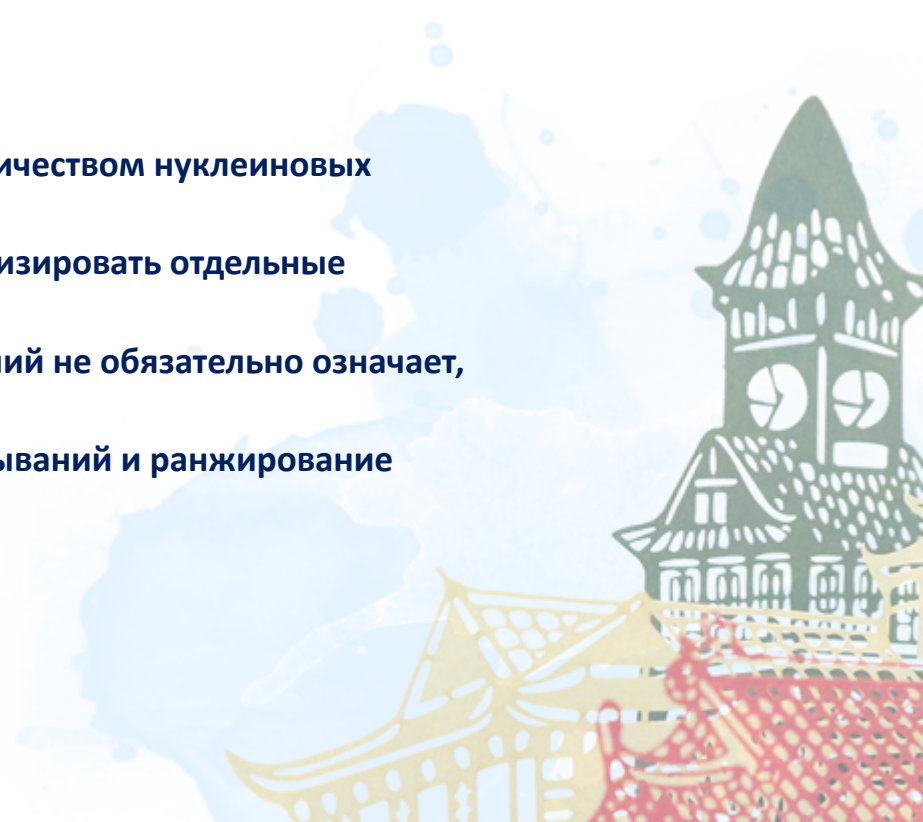


Получите положительные результаты, обнаружив относительное число чтений (на примере SARS-CoV-2):

- 1) SARS-CoV-2: mNGS обнаружил число считываний, по меньшей мере, одной специфической последовательности;
- 2) последовательность считываний, не скрещенная с другими известными коронавирусами и патогенами, является специфической;

**Значение количества считываний:**

- Считывание - это номер последовательности, которая соответствует возбудителю.
- Число считываний связано с содержанием патогенных микроорганизмов в образце, количеством нуклеиновых кислот, извлеченных из образца, и долей человеческой последовательности в образце.
- Разные патогены имеют разные характеристики считывания, поэтому очень важно анализировать отдельные патогены по одному.
- Большое число чтений не обязательно означает, что оно патогенное, а низкое число чтений не обязательно означает, что оно непатогенное.
- Клинический анализ может работать лучше, если принять во внимание количество считываний и ранжирование патогенных микроорганизмов.



## Параметры контроля качества исходных данных

### Объем данных

Это относится к общему количеству последовательностей нуклеиновых кислот, обнаруженных методом высокопроизводительного секвенирования. Метод mNGS случайным образом отбирает фрагменты нуклеиновой кислоты, содержащиеся в образцах, для секвенирования. Когда объем данных больше, вероятность обнаружения патогенных микроорганизмов будет выше, а число обнаруженных последовательностей будет выше.

### Соотношение человеческих последовательностей

Чувствительность обнаружения прямо коррелирует с общим количеством последовательностей обнаружения. Чем выше общее количество последовательностей обнаружения, тем выше чувствительность. Процент последовательности нуклеиновой кислоты человека, обнаруженный в образце, связан с количеством клеток человека и содержанием микроорганизмов в образце, обычно на уровне 95-98%. Когда количество клеток человека низкое или содержание микроорганизмов высокое, отношение человеческих последовательностей будет уменьшаться, <95%, в противном случае оно будет увеличиваться, > 98%.

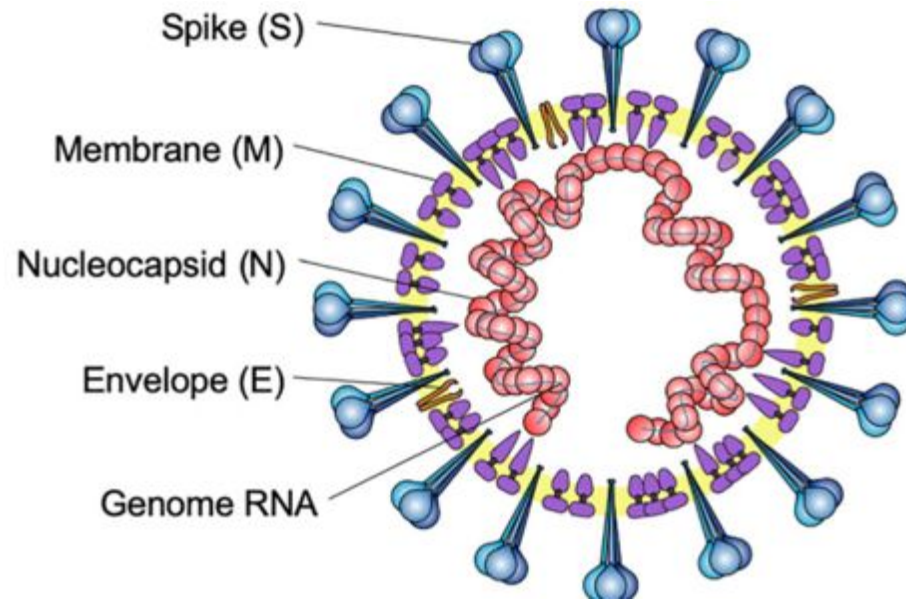
### Внутренний референс

Добавьте контроля качества образца. Если обнаружено, это означает, что тест квалифицирован

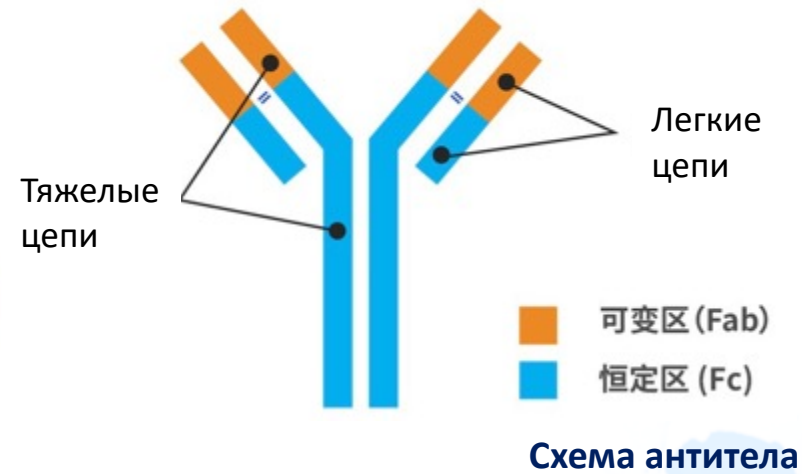


## II. Серологическое определение COVID-19

### COVID-19 и антитела



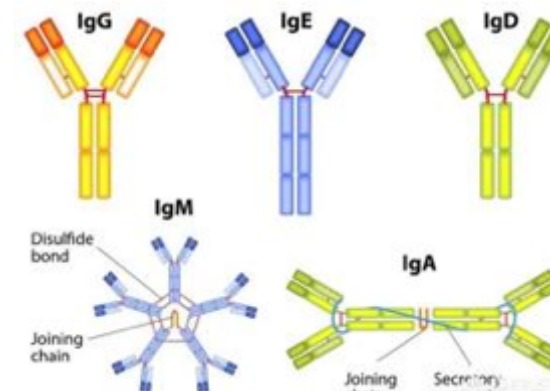
COVID-19 схема



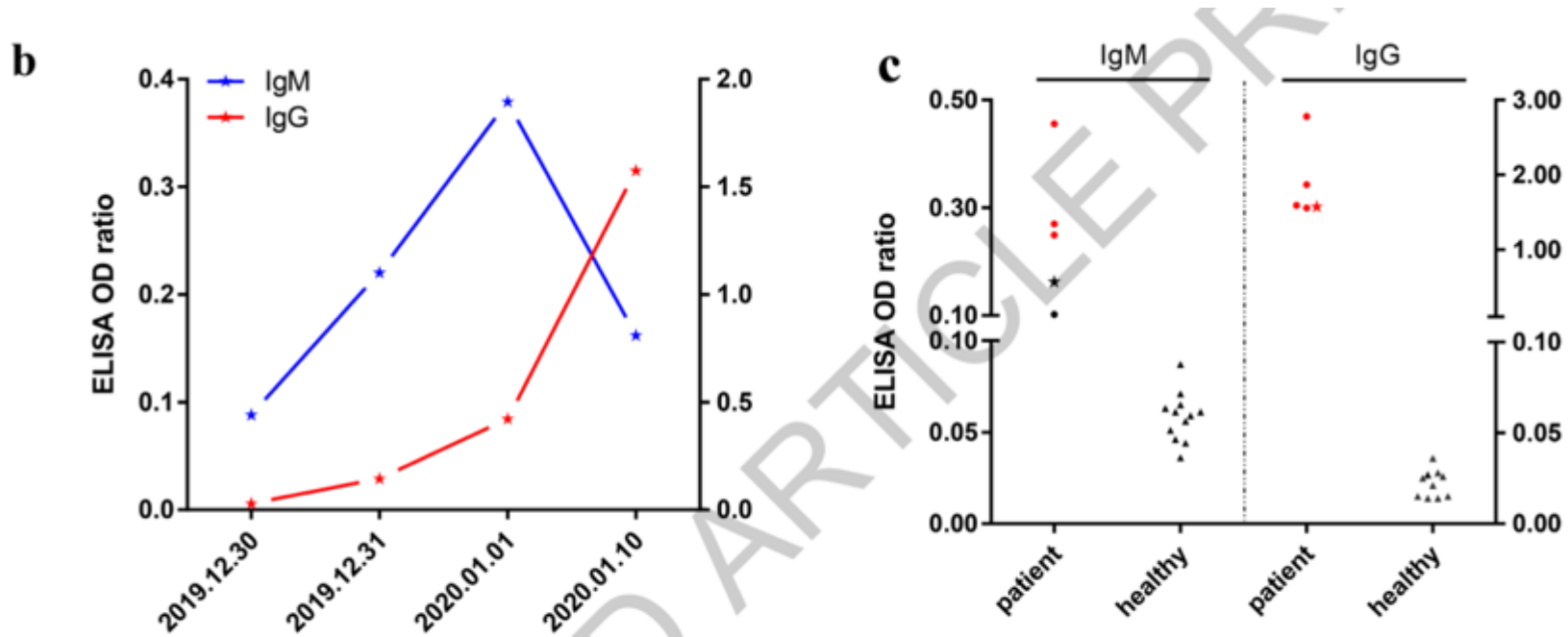
Продуцируется антигенной стимуляцией, Гликопротеин с иммунной функцией, который может специфически связываться с соответствующим антигеном.

**IgM, как первое продуцируемое антитело в организме человека, является «острием» противoinфекционного иммунитета человека.**

**IgG является самым распространенным антителом в сыворотке и тканевой жидкости, составляя 75% от общего сывороточного IgG. Это основная противoinфекционная сила с высокой аффинностью, широким распространением *in vivo* и с иммунным эффектом.**



# Антитела к COVID-19



**Fig. 2 | Molecular and serological investigation of patient samples. a,** molecular detection of 2019-nCoV in seven patients during two times of sampling. Patient information can be found in Extended Data Table 1 and 2. Details on detection method can be found in material and methods. BALF, bronchoalveolar lavage fluid; OS, oral swab; AS, anal swab. **b,** dynamics of

2019-nCoV antibodies in one patient who showed sign of disease on 2019.12.23 (ICU-06). **c,** serological test of 2019-nCoV antibodies in five patients (more information can be found in Extended Data Table 2). Star indicates data collected from patient ICU-06 on 2020.01.10. For b and c, cut-off was set up as 0.2 for IgM test and 0.3 for IgG test, according to healthy controls.

b: уровень антител IgM и IgG у 1 пациента с пневмонией COVID-19 на 7, 8, 9 и 18 день после начала заболевания

c: Антитела IgG у 5 пациентов с пневмонией COVID-19 были положительные на 20 день после начала заболевания

Zhou P, Yang XI, Wang XG et al. NATURE, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

*Chinese Clinical Guidance for COVID-19 Pneumonia Diagnosis and Treatment (7th edition) Clinical Manifestation*

Текущие эпидемиологические исследования показывают, что инкубационный период составляет 1-14 дней, чаще всего 3-7 дней

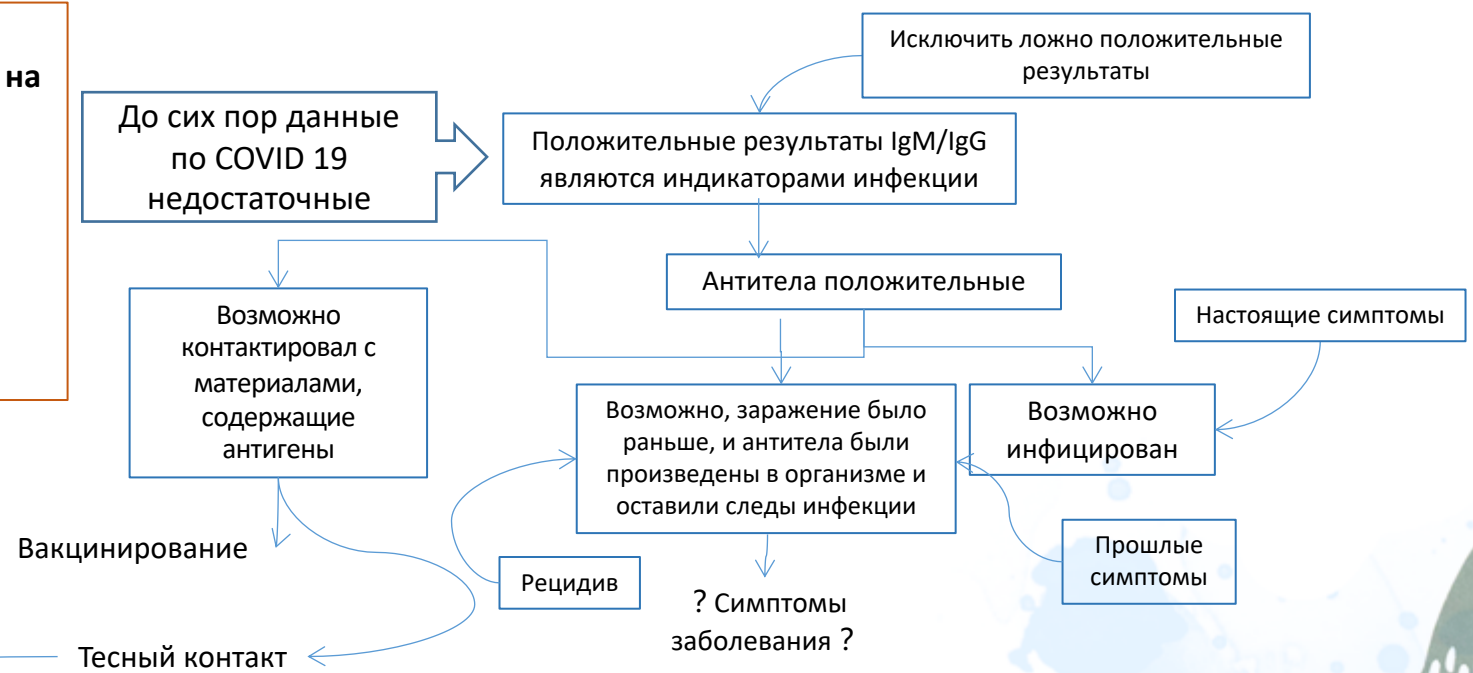
# Клиническое значение определения антител к COVID-19

Считается, что:

- Обнаружение IgM в сыворотке крови указывает на возникновение инфекции COVID-19, которую можно использовать для ранней диагностики инфекции.
- Антитело IgG можно использовать в качестве индикатора обнаружения для ретроспективной диагностики и эпидемиологического исследования.

Требуются медицинские доказательства

В течение периода SARS в 2003 году положительный уровень антител, специфичных к вирусу SARS, составлял 2,23% в сыворотке медицинских работников, находящихся в тесном контакте, у всех из которых не было клинических симптомов SARS.  
中华内科杂志 2004, 43 (6): 454-455



«Инфицирование» в иммунологии включает в себя вторжение микроорганизмов в организм и серию микро и макро реакций

Инфицирование означает наличие клинических симптомов

Как правило, организм вырабатывает антитела после заражения.

Обнаружение антител в организме указывает на то, что существует стимуляция антигена (включая текущее заболевание или предыдущую инфекцию или контакт с антигеном), но не обязательно инфекционное заболевание.

IgM	IgG	Интерпретация результатов <sup>а, б</sup>
+	-	1. предполагается возможность раннего заражения; 2. не исключает возможность ложно положительного результата (особенно в районах с низкой распространенностью).
+	+	Возможно инфицированный
-	+	1. Возможно инфицированный 2. Двойной сывороточный титр IgG был увеличен более чем в 4 раза для ретроспективной диагностики.
-	-	1. Не инфицирован ; 2. период «окна» ; 3. ложно отрицательный результат

а: в интерпретациях результатов отсутствуют соответствующие клинические исследования, основанные только на предыдущем опыте случаев вирусной инфекции;

б: клиническая интерпретация должна сочетаться с клиническим состоянием и эпидемиологией;

с: Невозможно провести различие между настоящей инфекцией, прошлой инфекцией или близким контактом.

Процент ложно-отрицательных и ложно-положительных результатов не известны  
Может ли быть использовано для скрининга пока не ясно

CLIA

2019-nCoV IgM

2019-nCoV IgG

Чувствительность 70.24% ( 144/205 ) , 96.10% ( 197/205 )

Специфичность 96.20% ( 76/79 ) , 92.41% ( 73/79 )

	IgM		IgG	
	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
ELISA	54	100	71	100
Экспресс-тесты	64	91	82	92



**ПЦР**  
 Подтверждение наличия вируса  
 Текущее решение для детектирования

N



**Определение антител**  
 Косвенные доказательства  
 Нужны доказательства для  
 диагностики

B

**Определение антигенов**  
 Доказательство наличия вируса  
 В процессе доработки

A

- +
- 1 : True positive, present infection;
  - 2 : True positive, previous infection;
  - 3 : True positive, close contact;
  - 4 : False positive;
  - 5 : .....

- 
- 1 : Sampling issues;
  - 2 : Sampling/True negative;
  - 3 : True negative;
  - 4 : True negative;
  - 5 : .....

} estimate with clinical findings

- +

**Extended Data Table 2 | Laboratory detection results**

Patient No.	Test No.	First sampling-2019.12.30			Second sampling-2020.01.10			
		BALF	Oral Swab	Blood (Ab)	Oral Swab	Anal Swab	Blood (PCR)	Blood (Ab)
ICU-01	WIV01	-	Ct=32.0	NA	NA	NA	NA	NA
ICU-04	WIV02 <sup>†</sup>	Ct=17.6	Ct=26.6	NA	-	-	-	+
ICU-05	WIV03	Ct=27.0	Ct=31.9	NA	-	-	-	+
ICU-06	WIV04 <sup>†*</sup>	Ct=18.3	Ct=27.7	+	-	-	-	+
ICU-08	WIV05 <sup>†</sup>	Ct=24.1	-	NA	NA	NA	NA	NA
ICU-09	WIV06 <sup>†</sup>	Ct=21.6	Ct=29.4	NA	-	-	-	+
ICU-10	WIV07 <sup>†</sup>	Ct=25.7	Ct=24.0	NA	-	-	-	+

Samples from two patients (ICU-01 and ICU-08) were not available during the second investigation. They have been discharged from hospital. We did serial test for ICU-06 patient at the following date: 19.12.30, 19.12.31, 20.01.01 and 20.01.10, corresponding to seven, eight, nine and eighteen days upon disease onset (19.12.23). Table shows molecular and serological (IgM and IgG) detection results for 2019-nCoV. <sup>†</sup>Full-length genome obtained. <sup>\*</sup>Virus isolated.

SARS coronavirus		
Days	IFA	ELISA
IgG	17	17
IgM	16.5	20.5
IgA	17.5	17

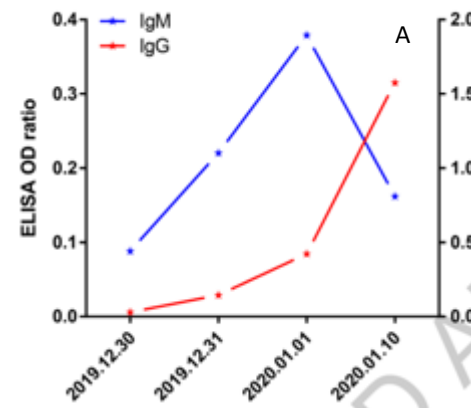
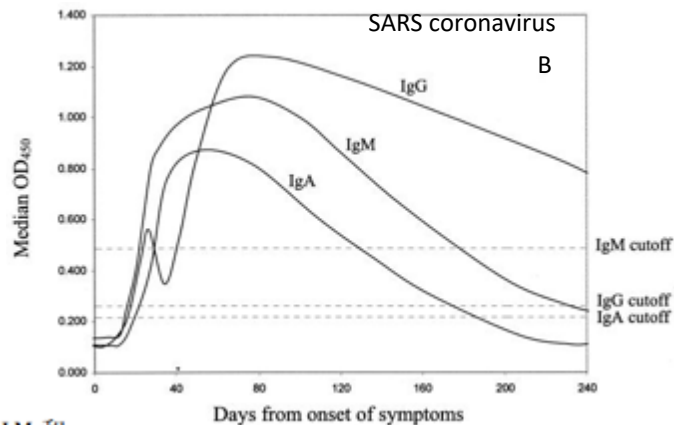


Таблица 1

SARS patients serum anti-SARS-CoV IgM and IgG total antibody follow-up test results

表 1 SARS 患者血清抗-SARS-CoV IgM 和 IgG 总抗体随访检测结果

发病后天数	例数	血清份数	抗-SARS-CoV IgM		抗-SARS-CoV IgG	
			阳性例数 (%)	阳性份数 (%)	阳性例数 (%)	阳性份数 (%)
≤ 20	43	59	20 (46.5)	24 (40.1)	15 (34.9)	24 (40.1)
21~40	31	39	25 (80.6)	25 (64.1)	31 (100)	34 (87.2)
41~60	40	47	26 (65.0)	27 (57.5)	40 (100)	45 (95.7)
61~90	31	33	15 (45.5)	15 (45.5)	31 (100)	33 (100)
91~249	35	40	12 (34.3)	13 (32.5)	35 (100)	40 (100)
450~510	73	73	6 (8.2)	6 (8.2)	73 (100)	73 (100)
600~660	71	71	0	0	70 (98.6)	70 (98.6)

No.	В госпитале ≤ 7 дней	В госпитале > 7 дней
	IgM	IgM
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	+	+
6	-	+

A: IgM and IgG antibody levels in 1 COVID-19 pneumonia patient at 7, 8, 9 and 18 days after onset. Zhou P, Yang XI, Wang XG et al. NATURE, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

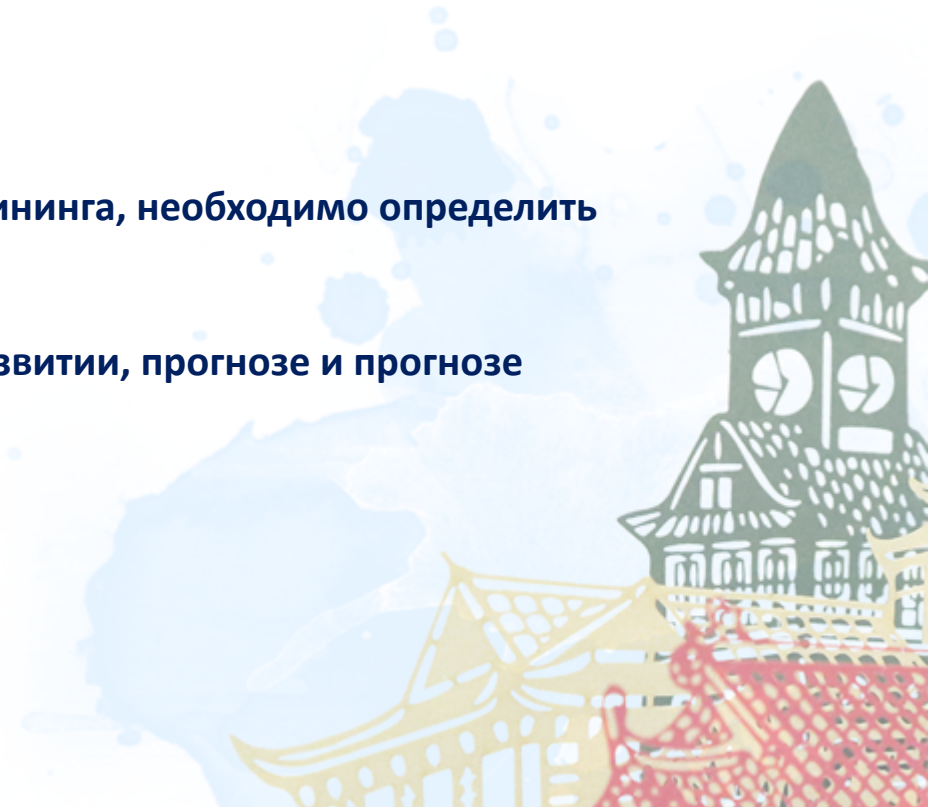
B: Woo PC1, Lau SK, Wong BH, Chan KH, et al. Clin Diagn Lab Immunol. 2004, 11(4):665-8.

C: Yan Huiping, Tan Yufen, Zhuang Hui, et al. Chinese Journal of Internal Medicine 2006. 45(11):896

# Выводы об определении антител

- Обнаружение антител - это быстрый и простой метод обнаружения;
- Обнаружение антител является эффективным дополнением к обнаружению нуклеиновых кислот;
- Результаты обнаружения антител имеют эпидемиологическое значение.

- Чтобы определить, может ли он использоваться для скрининга, необходимо определить цель скрининга;
- Это не является свидетельством инфекции COVID-19;
- Чтобы понять клинические данные о возникновении, развитии, прогнозе и прогнозе инфекции COVID-19.





谢谢！  
Thank you!

