

分子诊断技术在新型冠状病毒核酸检测中的应用及发展

谢昭宁

南宁市邕宁区人民医院 广西南宁 530200

【摘要】自新型冠状病毒肺炎爆发以来,新冠疫情迅速蔓延至全国各地,及时并准确地对新型冠状病毒实行诊断对疫情防控 and 患者治疗具有重要意义。鉴于此,本文结合新冠疫情现状以及目前最新标准指南,对不同分子诊断技术展开综述,并对分子诊断技术在将来传染病爆发中的应用及发展前景提出相关意见,具体内容如下。

【关键词】新型冠状病毒;核酸检测;分子诊断技术;逆转录聚合酶链反应;数字 PCR

【中图分类号】R446

【文献标识码】A

【文章编号】1002-3763 (2022) 08-129-02

自 2019 年 12 月新型冠状病毒爆发以来,该疾病在我国迅速传播,并在全球出现了大范围的蔓延,有很多欧洲国家的肺炎疫情已十分严重,感染人数高达百万^[1-2]。截止到目前型肺炎疫情仍然处在全球扩散当中,且还不能确定何时才可完全控制。新型冠状病毒主要传播方式有密切接触、呼吸道飞沫传播,其不同感染者之间的临床症状表现存在一定差异,从无明显症状到常见的干咳、发热等症状,甚至还会出现严重急性呼吸综合征。新型冠状病毒实验室检测涵盖以下几种^[3-4]:(1)核酸检测:是诊断病原体感染的金标准;(2)病毒分离培养及鉴定:为病原学鉴定传统金标准;(3)血清学检测:主要检测机体产生新冠病毒特异性抗体。本文重点论述不同分子诊断技术,并针对上述检测技术在今后传染病爆发中的应用及发展提出建议,相关内容如下。

1 核酸检测样本

(1)样本类型^[6]:A.鼻咽拭子和口咽拭子:主要针对无症状病人以及普通人群;B.采取呼吸道标本:主要针对急性期患者;C.采集下呼吸道标本:主要针对重症患者。(2)采样形式:混合样本在临床检测中具有一定风险,例如不能经过内参监控样本质量、混合样本异质性。针对医疗机构就诊病人以及重点区域人群,还是建议采用单采单检的方式^[7]。

2 核酸检测技术

新型冠状病毒系正义单链 RNA 病毒,其转录 29 周蛋白质,基因组全长是 29903 个核苷酸。新型冠状病毒存在基因组校对机制,能预防病毒积累可能减弱自身突变^[8]。但是随着时间不断推移以及人际传播,自然选择依旧可对罕见但有助于病毒突变发挥作用,取得仍存在适应度优势以及免疫抗性突变。自新冠疫情暴发以来,全球各地研究人员与整个体外诊断领域投身于技术攻关,使得科研成果落地转化,以达到满足一项防治对迅速准确诊断检测需求的目的^[9]。国家药品监督管理局美获得食品药品监督管理局紧急使用权的核酸检测试剂当中,可发现现阶段新型冠状病毒核酸检测所应用的分子诊断技术原理都存在差异,提供了全场景化核酸检测策略^[10-11]。

3 常态化防控诊治

3.1 常规检测

疾控中心、医院检验科以及第 3 方检测机构主要承担了大范围筛查工作,保障了“应检尽检”的有序实施,适用于本次大范围暴发的新冠肺炎疫情。通过给予规模化检测服务,满足常规检测需求,利于为临床提供确切信息,进而提升人民健康水平^[12]。逆转录聚合酶链式(RT-PCR)反应是当前临床上用于新冠肺炎疫情的重要手段。RT-PCR 检测新型冠状病毒核酸时使得 RNA 逆转录成 cDNA,将 cDNA 作为模板实施扩增,利用荧光标记或者荧光染料的特异性探针,对 PCR 产物开展跟

踪,同时实施产物分析^[13-1]。除常见的 N 基因与 QRFlab 为靶点的 RT-PCR 检测外,同时还具有针对 E 基因的临床检测。此外,对已经知晓的多种病原体同时实施意向性筛查亦为临床需求,也就是在识别新型冠状病毒同时得以其他引发相类似症状的病毒进行排查。基因芯片应用微阵列技术,使用已知序列的核酸探针针对未知序列核酸展开大规模集合而成的固相杂检测 DNA^[15]。双扩大法使用特异性探针及标记有多生物素的放大探针杂交,致使病原体把核酸信号增大。总之,严格区分健康人群和新冠病毒感染者以及其他呼吸道感染患者,做到对就诊人群的迅速检测和及时、准确分类,进而在较大程度上减低疑似病例数,减少医患纠纷,协助疫情防控和临床诊治。

3.2 快速检测

快速检测是新冠肺炎疫情常规化防控的基石。最大分子化诊断检测效益有效消除了核酸检测对于仪器、人员以及场地的依赖性,明显改善周转周期问题,符合快速报告要求。床边检测中的分子诊断技术到了专业实验室的局限,落实了去中心化,使得应用场景扩展至火车、出境、基层医院等^[16]。其中等温扩增技术于恒定温度的情形中,通过增添不同酶与特异性引物实施快速核酸扩增。当前主要采用的恒温扩增技术有:环介等温、滚环核酸、链替代以及依赖核酸序列扩增等。现阶段已经存在给予该技术的 POCT1 类商品化试剂盒,但是尚未有临床验证。且因此技术对引物设计复杂,有可能存在假阳/阴性的干扰^[17]。除上述主流 POCT 方式外,还有部分获得 NMPA 或者 FDA 批准的检测技术,如杂交捕获免疫荧光分析法、RNA 捕获探针法等,这 2 种方法试剂商宣称的特异性以及灵敏度可达到传统 PCR 方法的水准。

3.3 病毒溯源和变异检测

病毒溯源与变异检测是新冠肺炎疫情防控的重要内容。及时获得所有病毒基因信息,利于解释病毒溯源、传播和变异演化等问题,为今后流行病学调查方向指明方向^[18]。得益于高通量测序技术于疫情初期,仅在 5 天内获取了 SARS-Co-2 基因组序列,为实施溯源工作以及抗击病毒奠定了坚实的基础。高通量测序主要是对于临床样本中提取的核酸开展大规模平行测序,再通过数据库比对生物学分析,完成涵盖病毒在内的多种病原体检测。基于高通量测序的核酸检测包含探针捕获、宏基因组以及扩增子测序^[19]。其操作流程繁琐、检测周期较长,且对生物信息专业背景等限制导致高通量测序难以成为临床一线实行核酸检测的方法。

当前,全球各地都已经检测出各种变异新型冠状病毒,依靠高通量测序技术,各方也在实施相关病毒株变异检测工作,及时对防疫措施实行评估,保证各环节防控效果^[20]。一般情况下病毒按每月 1-2 个左右碱基突变的速度进行积累突变,

这表明今日测序的诸多基因组和 2020.01 最早测序基因组相隔 20 个位点。关于 SARS-CoV-2 突变株的研究表明, 突变株在 S 蛋白(尤其 RBD 区域)上出现的突变不会对以 ORF1ab、N、E 基因为靶点的核酸检测试剂的检测能力造成不良影响^[21-22]。但新发突变株 B. 1. 1. 7 中发现的 69/70 缺失突变已被证实会对针对 S 基因的聚合酶链反应检的性能产生影响^[23]。

4 小结

总之, 上文所提及的所有核酸检测技术, 均可作为标准新型冠状病毒方法的补充, 互为验证。除多技术检测的核酸结果外, 影像学、流行病史以及 IgM/G 抗体结果和临床症状表现都具有一定帮助, 需要依据实际情况进行合理选择。将来, 还需进一步提升核酸检测质量, 进而减低临床假阴性风险, 以更好地控制病毒传播, 科学家们应对于研发更准确、更迅速的核酸检测技术始终保持热度, 最大程度改善疫情偶发与常态化现状, 满足疫情防控需求。

参考文献

- [1] 吕晶南, 余方友. 分子生物学技术在感染性疾病诊断中的应用进展[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(2):81-85.
- [2] 陈馨宁, 黄斐, 张春燕, 等. 分子诊断技术在新型冠状病毒核酸检测中的应用及发展[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(6):401-406.
- [3] 赵扬阳, 许颖, 常晓松. 新一代分子诊断技术在输入性传染病快速检测中的应用[J]. 成都医学院学报, 2021, 16(6):809-812, 816.
- [4] 孙秀兰, 付旭冉, 鲍琦, 等. 新一代诊断技术:CRISPR 系统及其在分子诊断中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(7):57-70.
- [5] 李萍, 谢小兵. 分子诊断技术在遗传代谢性疾病中的应用及问题分析[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(7):697-701.
- [6] 蒋晓飞, 倪语星. 分子诊断技术在细菌耐药性检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(7):702-706.
- [7] 丁陈玲, 陈剑潇. 病原微生物分子检测技术在脓毒症诊断与预后评估中的临床价值[J]. 临床急诊杂志, 2022, 23(1):76-80.
- [8] 张雪健, 吴向未, 谢松松, 等. 布鲁氏菌分子诊断与分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(6):533-538.
- [9] 谢春梅, 武海萍, 马雪萍, 等. 用于临床新型冠状病毒毒核酸检测的分子诊断新技术[J]. 遗传, 2020, 42(9):870-881.

[10] 谢凤欣, 靳伟东, 田晖艳, 等. 数字 PCR 技术在精准分子诊断中的应用: 机遇与挑战[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(3):214-219.

[11] 李樱. 分子检测技术对结核性脑膜炎的诊断应用[J]. 武警医学, 2021, 32(11):1003-1006.

[12] 金春燕, 徐天慧, 陈姣, 等. 20 三体嵌合体: 细胞和分子遗传学产前诊断技术的差异[J]. 中华医学遗传学杂志, 2022, 39(7):773-776.

[13] 刘跃华, 刘昭, 张帆, 等. 新发重大传染病疫情下分子诊断技术应急评估与相关防控策略[J]. 中国卫生经济, 2020, 39(8):5-8.

[14] 詹晓芬, 翁雪芬, 杨时煌, 等. 基于血清蛋白质组分析技术鉴定鼻咽癌 ENO1 自身抗体诊断分子标志物[J]. 国际肿瘤学杂志, 2020, 47(9):513-517.

[15] 叶泽辉, 郭惠玲, 陈茂生, 等. 多重 PCR 病原体分子检测技术在下呼吸道感染诊断中的应用价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2021, 13(4):518-521.

[16] 欧维正, 雷毅娜, 王琼, 等. 三种分子诊断技术对肺外结核诊断价值的比较[J]. 贵州医药, 2021, 45(3):406-408.

[17] 洪璇, 曾臻, 谭强来, 等. 虚拟仿真实验在分子诊断技术课程中的应用[J]. 生命的化学, 2021, 41(9):2088-2093.

[18] 曹清, 张巧珍, 朱阅, 等. 核酸分子检测技术在儿童感染性疾病中的诊断价值及卫生经济学评价[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2020, 35(22):1689-1693.

[19] 戡佳兴, 文雪霞, 张莹. CRISPR-Cas 技术在病毒性传染病诊断中的应用[J]. 动物医学进展, 2022, 43(7):107-112.

[20] 沙巍. 规范合理使用分子生物学检测技术以早期精准诊断结核病[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(10):983-986.

[21] 刘春平, 熊德芳, 谭耀驹. 两种分子检测技术对结核分枝杆菌临床分离株耐药性诊断价值的评价[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(6):815-819.

[22] 李津, 李昌锦, 杨洁, 等. Geno-type MTBDRplus 分子线性探针杂交技术在结核病诊断与耐药性检测中的应用价值[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(4):119-121.

[23] 曹楠楠, 钟艺绮, 司徒博. 影像学联合三种分子诊断技术诊断结核病的价值[J]. 分子影像学杂志, 2021, 44(3):462-466.

(上接第 128 页)

疾病无法保持坐位时, 也要尽量以侧卧或半卧体位, 并将床头适当抬高接受雾化。护理人员还要指导患者练习正确的吸入方法, 将口含器放入口中, 以口进行吸气, 用鼻呼气。注意深度吸气缓慢呼出, 在反复练习的过程中, 护理人员需定时检查方法是否正确, 并给予纠正与适当的鼓励。治疗前后都要确保患者呼吸道通畅, 完成治疗后, 协助患者翻身、叩背, 间接地使黏附在肺泡周围及支气管壁上的痰液松动脱落, 利于排出。针对痰液黏稠无法顺利排出者, 可为其实施负压吸痰^[4]。雾化完成后, 护理人员需提醒患者马上使用清水漱口, 并对雾化装置进行消毒处理, 以免发生二次感染。由于老年患者普遍健忘, 因此, 应将各项事宜为其反复讲解, 并建议家属参与护理中。医院不仅要重视护理人员对患者的面对面讲解与演示, 还要以张贴宣传图片, 制作图册的方式增加患者的认知度。

4 结语

雾化吸入治疗是针对老年支气管肺炎的首选治疗方法, 不仅能快速为患者缓解不适症状, 且风险性较低, 效果较为理想,

受到了患者与家属的一致认可。但在实践应用中, 由于老年患者的体质较为特殊, 因此, 更需要科学而全面护理措施的辅助。只有通过基础护理, 心理护理, 饮食指导与病情观察等多方面的干预, 才能促进雾化治疗的顺利开展, 减少患者的不良反应, 取得令人满意的临床疗效。

参考文献

- [1] 支景凤, 付蔚, 王强, 吴细梅, 周宇. 中医定向透药治疗仪联合中药浴足护理在老年支气管肺炎患者中的应用效果[J]. 光明中医, 2021, 36(08):1341-1343.
- [2] 姚丹, 李荣, 汪霞, 周季花, 韩玮. 护患沟通技巧系统护理在支气管肺炎患儿雾化吸入治疗中的应用及对患儿肺功能的影响[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(07):979-981.
- [3] 探究 PDCA 护理对老年支气管肺炎患者自我效能与心理状态的临床效果[C]//. 全国科研理论学术研究成果汇编. [出版者不详], 2020:163-165
- [4] 蔡萌, 曾明梅. PDCA 护理对老年支气管肺炎患者自我效能与心理状态的临床效果[J]. 贵州医药, 2019, 43(11):1845-1846.