

MERS-CoV 实验室检测 WHO 暂行指南（修订版）

2014.9

1、前言

本文件为实验室和相关人员进行中东呼吸综合征冠状病毒（MERS-CoV）实验室检测提供临时参考。WHO 网站实时更新 MERS-CoV 感染进展，参见 http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/en/。

第一版技术指南发布于 2012 年 12 月，随着对 MERS-CoV 及其对人与动物致病性认识的深入，该指南于 2013 年 9 月进行了更新，新版指南加入了新的诊断实验的信息。

2014 年 6 月，WHO 在法国里昂主办了实验室专家国际会议，讨论 MERS-CoV 实验室检测的最新信息，并使用这些信息来修订暂行技术指南形成本文件。WHO 继续监测该病毒相关进展并在必要时候对暂行技术指南进行修订。若未做修订，该指南将于 2015 年 3 月 1 日失效。

这些指南涉及人感染 MERS-CoV 的实验室检测。世界动物卫生组织（OIE）成立了骆驼疾病和骆驼制品贸易特设小组，来尽可能多地收集骆驼感染 MERS-CoV 的相关信息。一些兽医实验室正在进行来自骆驼样品的 PCR 检测，另外，OIE 正在建立饲养骆驼国家的实验室网络项目。动物相关 MERS-CoV 最近进展参见 <http://www.oie.int/en/>

2、检测指征

WHO 推荐临床医生、流行病学家和实验室人员可以参考 http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/case_definition/en/index.html 来确定哪些病人应该接受检测。病例定义根据最新信息进行定期审查和更新。使用常规实验室检测方法进行其他呼吸道病原体（肺炎链球菌、B 型流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、流感病毒、腺病毒及呼吸道合胞病毒）的检测，并且根据当地管理指南确定的社区获得性肺炎也应该进行 MERS-CoV 的检测。

3、样品采集与运输

进行病例样品采集时，必须严格遵守感染控制指南。WHO 已经针对在医院存在流行和大流行趋势的急性呼吸道感染提供了预防和控制感染的指导，详细信息参见

http://www.who.int/csr/bioriskreduction/infection_control/publication/en/

关键点需详记：

- 对疑似或确诊 MERS-CoV 感染者进行样品采集的医护人员必须穿戴正确的个人防护设备（PPE），并且

- 所有采集、运输样品的人员应在安全的操作实践和溢洒净化程序方面接受培训。

大量证据表明，下呼吸道样品比如：支气管肺泡灌洗液、痰吸液及气管抽吸物中包含较高的病毒载量^[1-4]，应尽可能采集下呼吸道样品。沙特阿拉伯一份 MERS-CoV 感染检测的系列报道^[5]也证明了上呼吸道样品（鼻咽、口咽拭子）在病毒检测中的价值，不过一定要确保咽拭子是从鼻咽部取样而不仅仅局限于鼻孔处。当采集鼻咽或口咽样品时，必须使用专门设计的病毒采样拭子，这些拭子盒应该包含病毒运送液。鼻咽或口咽拭子应放于同一管来提高病毒载量。推荐尽可能收集上、下呼吸道样品。

已有通过 PCR 在血清中检出 MERS-CoV 核酸^[6,7]的报道，因此也可采集血清样品来进行病毒检测和抗体检测。

在尿液与粪便样品中也进行了 MERS-CoV 的检测，但是其检测水平要低于下呼吸道样品^[1]。

PCR 确诊的病例，强烈推荐后续重复采样进行 PCR 检测，可以采集呼吸道（上、下呼吸道）和其他样品（血清、尿液和粪便），这不仅可以明确病毒复制释放的持续时间，还能指导预防控制措施的制定。为确定病毒已清除，应连续采集呼吸道样品，直到连续两次检测结果为阴性。样品采集频率主要取决于当地的实际情况，但至少应该每 2~4 天采集一次。如果患者来自隔离病房，要求 PCR 结果持续阴性，则应每天采样。

抗体检测时需要双份血清样品以确定是否感染，但单份样品的检测对于确定疑似病例也有价值。双份血清样品间隔 14~21 天采集比较理想，第一份血清应在发病第一周内采集。如果只能采集一份样品，应该在出现症状后至少 14 天采集。表 1 列出了从有症状患者体内采样时，采样的类型及正确的储存、运输要求。不推荐对无症状接触者进行常规采样，但当遇到特殊情况，也可按表格列出的信息进行样品的采集。

表 1 有症状患者与无症状接触者样品的采集

患者	检测方法	样品类型	采样时间	储存与运输	备注
有症状	PCR	下呼吸道：-痰、抽吸物、灌洗液 上呼吸道：鼻咽拭子、口咽拭子、 鼻咽洗液/抽吸物 血清用于病毒检测：急性期血清样 品可采用 PCR 进行病毒检测	出现症状时采集 为了确定病毒已清除，应重复采样直到 连续两次检测为阴性 结果	若样品在 72 小时内 到达实验室，应在 4℃ 储存并运输。若 在 72 小时以上到达 实验室储存在 -80℃ 并置于干冰 或液氮中运输。	遵循国际规 则和三重包 装系统
有症状	血清学	血清用于血清学检测	需双份血清来确证， 第一份应于发病第一 周采集，第二份应于 2~3 周后再次采集。 单份血清样品应于出 现症状后至少 14 天 采样来确定是否是疑 似病例	同上	同上
无症状接 触者（不 推荐对无 症状接触 者进行常 规检测）	PCR	鼻咽和口咽拭子； 如有可能也可采集痰液	接触后 14 天内	同上	同上
	血清学	血清	初始血清应于接触后 14 天内采集，2~3 周 后再次采集恢复期血 清。 若仅能采集到单份血 清应于接触至少 14 天后采样。	同上	同上

样品采集后应尽快送至实验室，运输过程需合理。若呼吸道样品 72 小时以上才能到达实验室，强烈推荐将样品储存在-80℃并使用干冰进行运输，应避免样品反复冻融。从全血分离的血清应 4℃ 储存并运输，或用干冰、液氮冷冻并运输。由于无霜冰柜温度波动较大，应避免使用无霜冰柜储存呼吸道和血清样品。

WHO 公布了 2013~2014 适用的传染性物质运输规则，国家边界的样品输送应遵循适用国的国家法规。跨国 MERS-CoV 样品的输送应遵循适用国的国际法规。详见：
http://www.who.int/ihr/publication/who_hse_ihr_2012.12/en/

4、实验室生物安全

病毒检测应由接受过培训的人员在设计合理的实验室按照科学安全的操作流程进行操作。

不同国家实验室生物安全指南应根据实际情况制定。WHO 关于 MERS-CoV 实验室生物安全管理 暂 行 指 南 参 见 :

http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/NovelCoronavirus_InterimRecommendations_LaboratoryBiorisk190213/en/index.html.

关键点;

- 每个实验室应进行风险评估以确保其能安全进行检测工作;
- 处理样品时, 包括用于血清学检测的血液, 应遵循基本的实验室微生物技术操作规程;
- 处理来自疑似或确诊 MERS-CoV 感染者的样品用于其他实验室检测 (比如血气分析) 时, 应根据指南处理潜在的感染材料;
- 对来自疑似或确诊全新冠状病毒感染者的临床样品进行实验室诊断工作和 PCR 分析时, 应按照生物安全二级实验室 (BSL-2) 基本操作规程进行操作, 详见第三版 WHO 实验室生物安全手册;
- 所有样品的初步处理应在目前认证的二级或三级生物安全柜内进行;
- 所有的操作应避免气溶胶和飞沫的产生;
- 处理样品的实验室工作人员应穿戴合适正确的个人防护设备 (PPE);
- 活病毒的处理 (中和试验或病毒分离) 仅在满足其他基本需求的实验室进行, 包括推荐的生物安全三级实验室 (BSL-3)。

5、MERS-CoV 的 PCR 检测与测序

常规 MERS-CoV 感染病例的确定是基于针对病毒特定区域 RNA 实时反转录 PCR (rRT-PCR) 检测, 必要时进行序列测定。参见以下第五部分关于 MERS-CoV 血清学检测相关信息。

某些情况下, 在有经验和有适当防护设施的实验室会进行病毒的细胞分离, 但不作为常规诊断。本指南不包含病毒分离操作流程。

WHO 成员国决定本国哪些实验室可以进行 MERS-CoV 的诊断检测。每个 PCR 反应应该包含内参和外参, 并且实验室应随时参与外部质量评估方案。

已经建立了三种常规 MERS-CoV 检测的 rRT-PCR 实验, 其细节已经公布。目前检测主要是针对 E 蛋白上游 (upE)、ORF1b 及 ORF1a。针对 upE 区域的检测方法有较高的灵敏性已被推荐用于筛查, ORF1a 区域与 upE 区域有同等的灵敏性, 而 ORF1b 区的灵敏性不及 ORF1a

区域。参考文献[8]与[9]讲述了检测的具体过程。美国 CDC 建立了针对 MERS-CoV N 蛋白的 rRT-PCR 检测方法，可以补充 upE 和 ORF1a 区域进行感染筛查与确定。目前，这些 rRT-PCR 检测方法有较好的特异性，与其他呼吸道病毒及其他冠状病毒不存在交叉反应。

MERS-CoV 基因中可用于测序的两个目标位置 RdRp 及 N 蛋白区域的检测，有助于感染的确诊^[9]。

这些实验的详细操作流程可参见 <http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40>

美国 CDC 建立的方法具体信息可咨询 D.Erdman 主任 (dde1@cdc.gov)。

图 1 展示了通过 rRT-PCR 对 MERS-CoV 疑似病例的检测流程。

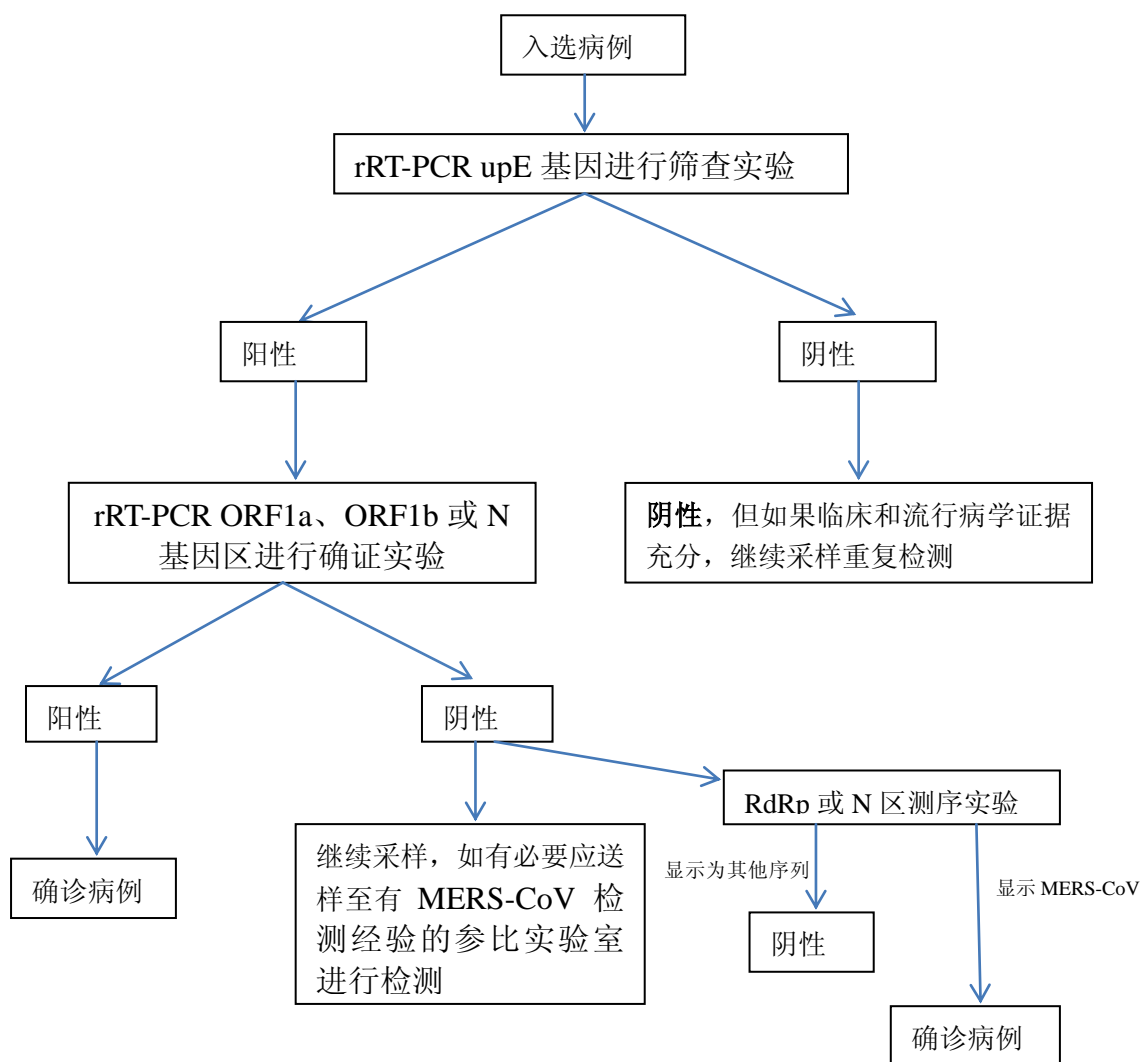


图 1 rRT-PCR 检测 MERS-CoV

鼓励 MERS-CoV 检测经验不足的实验室将其检测结果通过经验丰富的实验室复核证实。

WHO 可以帮助成员国确定哪些实验室提供这些服务。此外，这些实验室可能会重新提取核酸

重新检测样品来复核他们自己的阳性结果。

当针对 MERS-CoV 两个不同区域进行 rRT-PCR 检测结果不一致时，需要对患者进行重新采样。通过对 rRT-PCR 扩增的片段（例如 RdRp 区或 N 蛋白区）进行测序来证实检测结果。这些序列信息不仅可以确认病毒感染，还可以为了解病毒的起源和传播提供有价值的信息。因此，推荐从尽可能多的阳性样品中获得 MERS-CoV 的核酸序列。全基因序列最为理想。

四种人冠状病毒（HCoV）引起轻至中度呼吸道感染。包括β 冠状病毒属中的 HCoV-OC43 与 HCoV-HKU1 以及α 冠状病毒属中的 HCoV-229E 与 HCoV-NL63。商业化的针对呼吸道病原体的多重 PCR 实验可检测这些病毒。这些病毒的阳性结果不应该与 MERS-CoV 的检测结果混淆。

即使一系列阴性结果，也不应该完全排除 MERS-CoV 感染的可能。许多因素可能会导致假阴性，例如：

- 样品的质量
- 样品采集时间是疾病的早期或晚期
- 样品未被正确处理与运输
- 检测固有的技术原因，例如，病毒突变或 PCR 抑制。

如果高度怀疑患者是 MERS-CoV 感染者，但其检测结果是阴性，尤其是仅检测了上呼吸道样品时，应该采集并检测其他样品包括下呼吸道样品。也可以送一份或多份样品到其他实验室复核确认。

病例为实验室 PCR 确诊病例，必须满足下面的一种情形：

至少 MERS-CoV 两个不同区域 PCR 检测结果阳性，或者，

MERS-CoV 一个特定区域 PCR 检测结果为阳性，经测序病毒某靶基因序列为 MERS-CoV 的序列。

某一个特定区域 PCR 检测结果阳性但未进行进一步检测，有潜在的暴露史和持续的临床表现认为是疑似病例。

6、MERS-CoV 的血清学检测

两种检测 MERS-CoV 抗体的免疫荧光实验已经发表^[9]，使用这两种实验加上血清中和实

验,对在德国医院进行治疗的确诊病例的接触者进行筛查时,表现出了很好的灵敏性与特异性。应用蛋白质芯片技术检测 MERS-CoV 抗体的实验已经建立^[12],并表现出较好的特异性。美国 CDC 建立了一种两阶段 MERS-CoV 抗体检测方法,基于 ELISA 重组 N 蛋白筛查实验之后,使用全病毒间接免疫荧光试验 (IFA) 或微量中和试验进行确证检测。一种基于反转录病毒假病毒颗粒的中和试验^[13]检测 MERS-CoV 表现出较高的特异性。

在下列两种情况下实验室更希望使用血清学方法进行 MERS-CoV 检测,即:

1) 根据国际卫生条例 (IHR) 需要报告血清学定义的 MERS-CoV 病例

2) 血清学调查

1) 根据国际卫生条例 (IHR) 使用血清学定义的 MERS-CoV 病例

病人在至少一次血清学筛查实验 (ELISA、IFA) 中有血清转化的证据,并在间隔至少 14 天后重新采样通过中和试验确证而不考虑 PCR 的结果,则该病例可被认为是确诊病例。我们对 MERS-CoV 抗体反应的认识仍有限,但是根据从 SARS 病人获得的经验结合 MERS 病人的基本信息,可认为血清转化,即血清滴度至少有四倍升高。

当有症状的病人至少一次血清学筛查实验 (ELISA、IFA) 结果阳性,且单一样品中和试验结果阳性,则该病例为疑似病例。

当病例经 PCR 检测已确诊,如果能连续采集血清学样品,则能补充完善抗体反应动力学相关知识。

不推荐对确诊病例的无症状密切接触者进行常规检测。无症状接触者单一样品血清学检测结果阳性不满足目前 WHO 规定的确诊病例或疑似病例的定义。

2) 基于人群的血清学调查与暴露史

在调查中,通常从每个人体内仅可采集一份样品。上面提到的标准同样可以应用于无症状的接触者,例如:至少一次筛查实验结果阳性 (ELISA、IFA) 加上中和试验阳性可认为是既往感染。但是单一样品无法确定感染时间。

7、试剂

rRT-PCR 检测 MERS-CoV 的引物与探针序列已公布,可自行合成,具体信息可参考:
<http://www.virology-bonn.de/index.php?id=40>.

rRT-PCR 实验 upE 与 ORF1a 区的阳性对照可从欧洲病毒管理库预定:
http://www.european-virus-archive.com/Portal/produit.php?ref=1386&id_rubrique=9

成员国若需要 rRT-PCR 实验的对照材料可向 WHO 求助。

美国 CDC 已经研发出了 rRT-PCR 实验检测 MERS-CoV 的试剂盒，并使其在有限的基础上可以使用。详细信息可咨询 D.Erdam 主任 (dde1@cdc.gov)。

至少有两种商业化的 MERS-CoV 检测试剂盒可以使用。Altona 诊断公司生产的试剂盒详细信息可参见：

<http://www.altona-diagnostics.com/index.php/brealstar-mers-cov-rt-pcr-kitb-101.html>

也有快速诊断试剂盒具体信息可见：<http://www.fast-trackdiagnostics.com/products/50/ftd-hcov-emc/>

商业化的血清学诊断试剂盒目前正在研发，期望不久的将来可以使用。

WHO 未支持任何特定的产品，不同实验室可根据自身实际情况决定使用哪种试剂盒。

8、全球实验室网络

及时准确地获得实验室检测结果是突发感染事件监测的重要组成部分。所有的国家应该使用准确的检测结果，不论是国内还是国际实验室应进行初筛与确证检测。如有必要，WHO 可协助成员国获得国际实验室检测结果。在样品运输前，成员国与国际实验室可签署材料转移协议 (MTAs)，涉及临床资料和知识产权归属权问题。

9、病例报道与检测结果

实验室应按照国家要求进行报告，总的来说，国内没有确诊病例或仅有散发的 MERS-CoV 感染病例，相关的公共卫生机构应尽快通知实验室接收标本。不论检测结果是阳性还是阴性，应立即报告上级部门。若感染已经流行，实验室每发现一例确诊病例或阳性筛查结果（确证结果有延迟）应立刻通知公共卫生机构。实验室也应定期向公共卫生机构报告阴性结果。成员国应立刻向 WHO 报告所有的确诊病例和阳性筛查结果（若确证结果有延迟或样品正送往国际确证实验室）。同时应报告具体的实验细节。

10、参考文献

1. Drosten C et al. Clinical features and virological analysis of a case of Middle East respiratory syndrome coronavirus infection. *Lancet* 2013; published online June 17. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70154-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70154-3)
2. Guery B et al. Clinical features and viral diagnosis of two cases of infection with Middle

Eastrespiratory syndrome coronavirus: a report of nosocomial transmission. *Lancet* 2013; published online May 29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60982-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60982-4)

3. Memish ZA et al. Respiratory tract samples, viral load, and genome fraction yield in patients with Middle East respiratory syndrome. *J Infect Dis* 2014; published online May 15. [http://J Infect Dis. \(2014\)doi:10.1093/infdis/jiu292](http://journals.pubs.lit.edu/doi/10.1093/infdis/jiu292)

4. Kapoor M et al. Clinical and laboratory findings of the first imported case of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS - CoV) into the United States. *Clin Infect Dis* 2014; published online August 6. <http://cid.oxfordjournals.org/content/early/2014/08/05/cid.ciu635.long>

5. Assiri A et al. Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet* 2013; published online July 26. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70204-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70204-4)

6. Kraaij – Dirkzwager M et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS - CoV) infections in two returning travellers in the Netherlands, May 2014. *Eurosurveillance* 2014; 19:20817 <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20817>

7. Abroug F et al. Family Cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections, Tunisia, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014 Sep. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2009.140378>

8. Corman VM et al. Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Eurosurveillance* 2012; 17:20285. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20285>

9. Corman VM et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Eurosurveillance* 2012; 17:20334. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20334>

10. Novel Coronavirus 2012 Real-Time RT-PCR Assay, Centers for Disease Control and Prevention. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/Safety/EmergencySituations/UCM355572.pdf> Accessed 25 July 2014.

11. Buchholz U et al. Contact investigation of a case of human coronavirus infection treated in a German hospital, October-November 2012. *Eurosurveillance* 2013 ;18:20406. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20406>

12. Reusken C et al. Specific serology for emerging human coronaviruses by protein microarray. *Eurosurveillance* 2013;18:20441. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20441>

13. Perera RA, et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels

in Egypt, June 2013. *Eurosurveillance* 2013;18:20574.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20574>

(应急技术中心 李亚敏译)