

1 例新型冠状病毒肺炎多次核酸检测的异同结果原因分析

张文佳, 廖 璞[△]

(重庆市人民医院检验科 400014)

[关键词]

[中图分类号]

[文献标识码] C

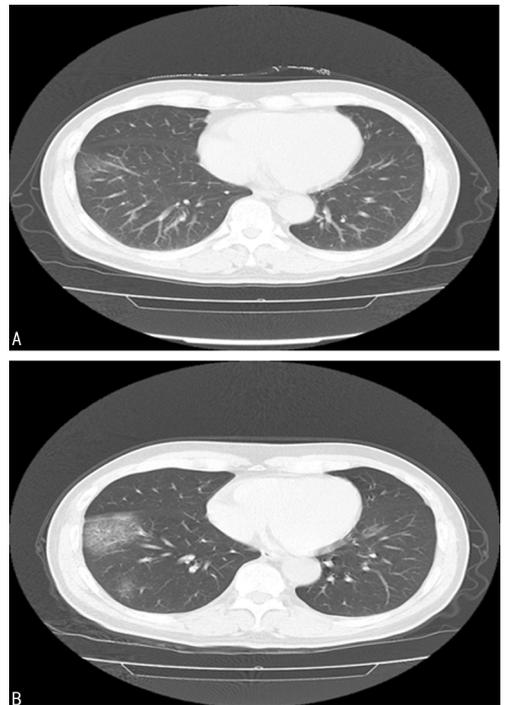
[文章编号] 1671-8348(2020)14-0-0

新型冠状病毒肺炎是由一种具有包膜的正链单股 RNA 新型冠状病毒感染所致^[1]。国际病毒分类委员会将该病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)^[2]。目前为止,新型冠状病毒肺炎的诊断除依据流行病学史、临床表现、影像学表现外,其确诊主要依靠实验室核酸检测^[3]。也有学者指出,核酸检测对于阳性患者大概只有 30%~50% 的阳性率,那么核酸检测究竟是不是“金标准”?作者就本院 1 例新型冠状病毒肺炎 5 次核酸检测结果的阴阳逆转历程报道如下。

1 病例资料

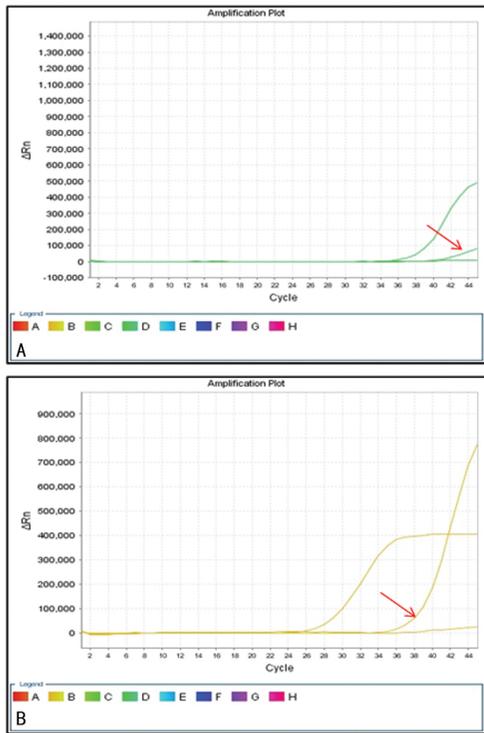
患者,男性,52 岁,自由职业,因“3 d 前一过性发热”于 2020 年 1 月 26 日晚至本院门诊就诊,偶有咳嗽,自测最高体温 38.5℃。患者就诊前 20 d 曾有武汉旅游史。既往体健。查体:体温 38.2℃,脉搏 84 次/min,呼吸 18 次/min,血压 120/75 mm Hg。双肺呼吸音稍低,未闻及干湿罗音,余无异常。血常规:白细胞(WBC)计数: $5.69 \times 10^9/L$,中性粒细胞(N)百分比:54.3%,淋巴细胞(L)百分比:34.8%,血小板(PLT)计数: $118 \times 10^9/L$ (↓),红细胞比积 0.524(↓)。胸部 CT 显示:右下肺磨玻璃样改变(图 1A)。诊断:发热待查,疑似新型冠状病毒肺炎。予以就地隔离,给予对症支持治疗,并于 2020 年 1 月 27 日取鼻咽拭子送本院检验科行 SARS-CoV-2 核酸检测,结果显示阳性(图 2A)。于 1 月 28 日、1 月 29 日再次取鼻咽拭子送某疾病预防控制中心(CDC)行核酸检测结果皆为阴性,遂建议患者 2 d 后取样。于 1 月 31 日复查血常规示:WBC 计数: $6.23 \times 10^9/L$,N 百分比:62.3%,单核细胞(MON)百分比:10.4%(↑);心肌损伤标志物显示:肌钙蛋白 I(TnI_{dx}) < 0.030 ng/mL,肌红蛋白(MYO)16.0 ng/mL(↓),肌酸激酶同工酶(CK-MB)0.48 ng/mL(↓);肺炎衣原体 IgG 检测:41.10 AU/mL(↑);肾功能显示 β-微球蛋白(β-MG)4.46 mg/L;血糖、肝功能、降钙素原、凝血试验正常,再次取 1 份鼻咽拭子行核酸检测显示阳性(图 2B),复查胸部 CT 显示右下肺磨玻璃样改变(图

2A)。于次日取样两份鼻咽拭子送某 CDC 行核酸检测显示阳性,最终确诊为新型冠状病毒肺炎,转至市公共卫生医疗救治中心继续治疗,本实验室采用中山达安 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)(ORF1ab/N)核酸检测试剂盒,其分析灵敏度为 1.0×10^3 copies/mL。



A:1 月 26 日胸部 CT 提示右下肺少许磨玻璃样改变;B:1 月 31 日胸部 CT 提示右下肺磨玻璃样改变增多。

图 1 胸部 CT 平扫



A:1月27日核酸检测扩增曲线图,ORF1ab基因荧光通道CT值为42.7,N基因荧光通道CT值大于40;B:1月31日核酸检测扩增曲线图,SARS-CoV-2 ORF1ab基因荧光通道CT值为33.6,N基因荧光通道CT值大于40。

图2 SARS-CoV-2 核酸检测扩增曲线图

2 讨论

SARS-CoV-2 核酸检测假阴性问题,尤其是潜伏期无症状感染者未能有效识别,给疾病防控工作带来极大的挑战。精准核酸检测对于新型冠状病毒肺炎的诊断至关重要,新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版)明确指出新型冠状病毒肺炎确诊必须具备以下病原学证据之一:(1)实时荧光 RT-PCR 检测 SARS-CoV-2 阳性;(2)病毒基因测序,与已知的 SARS-CoV-2 高度同源^[3]。无论是 RT-PCR 或是基因测序,或者是近期一些专家推荐的更灵敏的数字 PCR、高通量核酸质谱法均属于核酸检测的范畴。考虑目前大多数实验设备条件、人员技术、质量控制等各个环节,RT-PCR 核酸检测仍是目前条件下临床确诊的重要手段^[4]。王成彬^[5]提出,虽然核酸检测在病毒感染诊断中具有重要价值,但也要客观考虑其方法学特点、疾病发展过程、标本采集、标本保存与运输、核酸提取、扩增体系、人员操作等因素。该病例核酸检测历时 5 d,先后取样 5 次,辗转两个实验室,结果从阳“转”阴再“转”阳,作者分析至少可能有以下 3 个方面原因。

2.1 标本采集 第五版诊疗方案明确指出在鼻咽拭子、痰、下呼吸道分泌物、血液、粪便等标本中可检测出 SARS-CoV-2 核酸^[3]。《新英格兰医学杂志》报道,美国首例确诊新型冠状病毒肺炎患者存在消化道症状,粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测阳性^[6]。杨智炜

等^[7]报道 3 例新型冠状病毒肺炎患者经治疗后咽拭子病毒核酸转阴,但粪便核酸仍呈阳性。这些都提示取样部位可多样化,推荐采样部位为肺泡灌洗液等下呼吸道标本,必要时多次多部位送检以提高检出率。该患者先后由 4 名医务人员取样,且都为鼻咽拭子标本。鼻咽拭子取样有先天局限性,其随机性较高。此外,操作者采样操作的规范性有待考究,刮取标本的位置或力度和时间不够等都有可能造成检测结果阴性。就这一问题,中华医学会检验医学分会 2020 年 2 月 4 日在公众号上发布标准的咽拭子采样教程,为临床一线标准化采样提供规范。

2.2 标本采样时机 鼻咽拭子核酸检出率与病毒感染进程息息相关。以甲型流感病毒感染为例,一般在发病 24~72 h 内病毒在鼻咽部的浓度达到高峰,之后迅速下降;快速抗原检测往往 1 周左右呈阴性^[8]。至今为止,有关 SARS-CoV-2 的研究成果主要是针对流行病学、生物学特性及潜在治疗药物筛查^[6]等,而对于机体感染病毒后,体内病毒的含量、分布与病程的发生、发展关系尚未知晓。从患者 27 日和 31 日核酸扩增曲线看,ORF1ab 基因荧光通道 CT 值由 42.7 降低为 33.6,与其同时期影像学改变相符,疾病呈进展状态^[9],由此作者认为导致此次结果逆转的原因之二可能是采样时机不合适,不同病程、不同病情患者机体中不同采样部位病毒载量可能不同。是否疾病早期分泌病毒量少,是否存在间歇排毒可能性未可知。另疾病病程进展中标本内病毒载量是否仍然在方法的检测范围内还有待确定。

2.3 标本运输与保存 SARS-CoV-2 为 RNA 病毒,非常容易因试剂耗材等外源性或细胞破坏后所释放的内源性 RNA 酶降解,从而影响最终检测结果^[10]。虽然使用防止核酸降解的标本采集管及保存液,但此类产品的厂家较少,实际应用效果尚未评价,标本在转运至 CDC 途中放置时间过长也可能是造成最后结果假阴性的原因之一。建议标本采集后及时送检(4 h),如因某些原因标本采集后不能及时送检或及时检测,应将其置于 4 °C 保存(24 h)。24 h 内不能检测的标本,建议于-70 °C 以下保存并避免反复冻融^[11]。

除此之外,造成某实验室假阴性原因可能还有诸多因素,如 RNA 提取的方法及质量未有效监控^[12];不同 SARS-CoV-2 核酸检测试剂包含有不同靶标基因位点,其检测敏感性、特异性不同,试剂中酶、金属离子等成分质量差异^[13];扩增试剂种类繁多,且品质参差不齐;病毒基因位点核酸序列变异;缺乏样品间、样品内的重复;实验室专业技术人员不规范操作等,从采样、运输与储存、RNA 提取、扩增、报告各环节都可能影响到最终的核酸检测结果。

综上所述,由于 SARS-CoV-2 的特殊性,采样部位、采样量、采样时机选择、运输和贮存环节、试剂盒、实验室检测条件和人员操作经验等诸多环节因素的

影响都可能造成核酸检测的假阴性。毋庸置疑的是,核酸检测最终一定是新型冠状病毒肺炎无创诊断的金标准。理论上说,相对于抗体筛查及影像学表现,核酸检测是更早能确诊 SARS-CoV-2 感染的方法。在保证检测试剂性能质量、检验全过程操作规范准确的前提下,核酸检测阳性可以确诊,阴性者应重复进行核酸检测,并结合患者流行病学史、临床症状及影像学综合评估下达临床管理决策。在当前严峻疫情、检测实验室有限、试剂盒供不应求且性能不确定情况下,降低假阴性率,快速准确出具核酸检测结果,对大量疑似病例进行确诊,是实验室工作亟需解决问题,也是保障目前疫情防控的当务之急。

参考文献

- [1] WANG C, HORBY P W, HAYDEN F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 15-21.
- [2] GORBALENYA A E, BAKER S C, BARIC R S, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group[J/OL]. *BioRxiv*. (2020-02-07) [2020-02-08]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>.
- [3] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)[EB/OL]. (2020-02-04) [2020-02-19]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-06/12847.html>.
- [4] 陶悦, 傅启华, 莫茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战[J/OL]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43 (2020-02-16) [2020-02-19]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1181377.htm>.
- [5] 王成彬. 核酸检测用于确诊新型冠状病毒肺炎阳性率低的原因分析[J/OL]. *中华医学杂志*, 2020, 100 (00): E010. (2020-02-13) [2020-02-19]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182332.htm>.
- [6] Holshue M L, DeBolt C, Lindquist S, et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 929-936.
- [7] 杨智炜, 李干文, 戴小灵, 等. 新型冠状病毒肺炎咽拭子转阴但粪便核酸检测仍阳性三例[J/OL]. *中华消化杂志*, 2020, 40(00): E002-E002. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0002.
- [8] NOH J Y, SONG J Y, HWANG S Y, et al. Viral load dynamics in adult patients with A (H1N1)pdm09 influenza[J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(4): 753-758.
- [9] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2016.
- [10] 原国家卫生部. 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: 中华人民共和国卫生部令(第 45 号)[S]. (2005-12-28) [2020-02-19]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/201304/8a35fd88e46e4c07801e55c403a4dd01.shtml>.
- [11] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第三版): 国卫办疾控函[2020]80 号[S/OL]. (2020-01-28) [2020-02-04]. <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-01/29/5472893/files/2efb7f97b77d42d6bf4baba8569ac73c.pdf>.
- [12] 刘建礼, 刘翌, 焦艳丽, 等. 三种核酸提取方法在甲型流感病毒临床样本检测中的效果对比[J]. *口岸卫生控制*, 2019, 24(2): 13-16.
- [13] PHAN T. Novel coronavirus: from discovery to clinical diagnostics [J/OL]. *Infect Genet Evol*, 2020, 79: 104211. [2020-02-19]. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104211>.

(收稿日期: 2019-12-18 修回日期: 2020-02-02)