

• 新型冠状病毒肺炎 •

新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验^{*}

钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 陆小军, 王旻晋, 周易, 宋佳佳,
刘堂喻亨, 巫丽娟, 周汶静, 叶远馨, 斯艳君, 周燕虹, 陶昕彤, 王念, 应斌武[△]
(四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041)

摘要: 2019 年 12 月以来, 新型冠状病毒感染引起的肺炎病例数快速攀升。因患者体内病毒核酸的存在是目前唯一的确诊依据, 而目前临床上普遍反映核酸检测阳性率不够理想, 故对病毒核酸检测的实验室条件、检验人员及检测过程中各个环节都有较高要求。本文着重阐述了新型冠状病毒核酸检测各个环节中的检测要点、最新的行业规范及共识内容, 同时探讨临床检测中的疑难问题, 以期对新型冠状病毒所致疾病的准确诊断提供理论依据。

关键词: 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 核酸检测; 诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.05.003

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2020)05-0523-06

文献标识码: A

Clinical points and experience in nucleic acid testing of SARS-CoV-2^{*}

ZHONG Huiyu, ZHAO Zhenzhen, SONG Xingbo, LU Xiaojun, WANG Minjin, ZHOU Yi,
SONG Jiajia, LIUTANG Yuheng, WU Lijuan, ZHOU Wenjing, YE Yuanxin, SI Yanjun,
ZHOU Yanhong, TAO Xintong, WANG Nian, YING Binwu[△]

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: The number of pneumonia cases caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infections has risen rapidly since December 2019. Because the presence of viral nucleic acid in patients is the only basis for the diagnosis, and the positive rate of nucleic acid detection is generally not satisfactory in clinical practice, so there are high requirements for the laboratory conditions, inspectors of viral nucleic acid detection and other aspects of the detection process. This paper focuses on the current situation, the latest industry standards and the consensus contents of the SARS-CoV-2 nucleic acid testing, and probes into the difficult problems in clinical testing, so as to provide theoretical basis for the accurate diagnosis of the COVID-2019.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; COVID-2019; nucleic acid detection; diagnosis



2019 新型冠状病毒(以下简称新冠病毒)是一种新型 β 属冠状病毒, 属于单链 RNA 病毒, 可引起人类呼吸道感染, 其基因特征与严重急性呼吸综合征(SARS)相关冠状病毒和中东呼吸综合征(MERS)相关冠状病毒有明显区别, 基因组序

列约由 29 kb 构成, 拥有 10 个基因, 可有效编码 10 个蛋白^[1]。该病毒感染人类引起的肺炎自 2019 年 12 月在湖北省武汉市发现以来, 截至 2 月 22 日 24 时, 据 31 个省(自治区、直辖市)及新疆生产建设兵团报告, 现有确诊病例 51 606 例(其中重症病例 10 968 例)^[2]。国际病毒分类委员会于 2020 年 2 月 12 日正式将其命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (SARS-CoV-2)。由于疫情发展迅速, 对不同程度临

^{*} **基金项目:** 四川省科技厅重点研发项目新冠专项(JH20200019); 四川大学华西医院新型冠状病毒肺炎疫情科技攻关项目(HX-2019-nCoV-048)。

专家简介: 应斌武, 博士后, 教授, 博士生导师。四川大学华西临床医学院医学检验系/四川大学华西医院实验医学科主任。中华医学会检验专委会第十届委员会委员/临床免疫学组委员, 中国医师协会第四届检验医师分会常委, 中国中西医结合学会第一届检验医学专委会常委。第十二批四川省学术和技术带头人, 第十二批四川省卫生计生委学术和技术带头人, 四川省医师协会第二届检验医师分会会长, 四川省医学会第十一届临床检验专委会候任主委。担任《中华检验医学杂志》、《国际检验医学杂志》等编委, 第三届“国之名医”(青年新锐)获得者。主要从事疾病的分子诊断学研究, 负责多项国家自然科学基金、科技部重大专项子课题、四川省科技厅重点研发计划等, 累计经费 2 600 余万元。已发表论文 200 余篇, 其中 SCI 收录第一作者/通信作者 90 篇。获国家发明专利 6 项。获四川省医学会医学科技(青年奖)一等奖 1 项等。参编人卫社教材、专著多部。 [△] **通信作者,** E-mail: dochwy@126.com。

本文引用格式: 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(5): 523-526.

床症状患者及疑似患者进行诊断需要快速有效的方法,而新冠病毒核酸检测可为诊断提供直接证据,在目前最新版本诊疗方案中,新冠病毒核酸的检出仍是唯一确诊依据^[3]。由于是新发疾病,从新冠病毒所致感染病程到新冠病毒核酸检测技术等各个方面均缺乏大量科学数据支撑,在开展核酸检测过程中的各个环节中存在较多问题。本文将围绕目前新冠病毒核酸检测中的关键环节及其中可能影响核酸检测结果及时性、准确性的因素进行评述。

1 新冠病毒核酸检测方法

在疫情初期,最先检出新的病原体的方法是下一代测序技术/高通量测序(NGS)技术,并很快确定了新冠病毒的核酸序列。随着疫情发展,国内迅速研发出多种应用于新冠病毒核酸检测的试剂盒,绝大多数都基于实时荧光定量 PCR(qPCR)技术。此外也有非常多的快速基因检测技术推出,如现场快速检验(POCT)技术、卡式荧光 PCR 技术等,整个检测流程时间较短,最多可以节约 3~4 h。和传统的 qPCR 技术相比,一体化 POCT 确实便携、操作简单,但是如果过于强调其“快速”的特性,其灵敏度可能受到影响,而现实的问题是传统 PCR 技术都受到“假阴性”结果的挑战,在现有条件下,时间的缩短可能会进一步带来一定程度的灵敏度降低。从技术角度看,在灵敏度和特异性的平衡上,相较一些快速检测方法,目前平衡性最好的是 qPCR 检测技术。从过往的重大疫情来看,无论是西非埃博拉病毒、甲型流感还是 MERS, qPCR 仍是各个部门主推的检测手段,目前我国已批准上市的试剂盒也均以 qPCR 技术为主。

目前新冠病毒核酸检测针对的位点主要包含病毒基因组中 3 段保守基因序列,即以开放读码框 1ab (ORF1ab)、核壳蛋白(N)基因以及包膜蛋白(E)基因作为检测靶标,也有少数商品试剂盒同时检测刺突糖蛋白(S)基因。根据国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第五版)》(以下简称“实验室检测技术指南”),在实验室要确认一个病例为阳性,需满足同一份标本中新冠病毒的 ORF1ab 及 N 基因 2 个靶标特异性 qPCR 检测结果均为阳性,或单靶标阳性患者重新采样/另一类型标本检测仍为单靶标阳性^[4],故实验室针对新冠病毒的核酸检测应至少包含最为保守及特异的 ORF1ab 区域以及 N 基因。

2 新冠病毒核酸检测标本类型及病毒核酸检出情况

2.1 不同标本类型中新冠病毒的核酸检测 在最新版诊疗方案中,其确诊所提到的核酸检测标本类型不仅包含呼吸道标本及血液标本,同时在实验室检查中增加“粪便标本中可检测新型冠状病毒核酸”^[3]。实

验室检测技术指南中,又将标本类型细分,呼吸道标本包含鼻咽拭子、咽拭子、鼻咽抽取物或呼吸道抽取物、深咳痰液、支气管灌洗液、肺泡灌洗液;消化道标本包含粪便及肛拭子;血液标本包含全血及血清标本,并分别有相应的采集及保存要求^[4]。由于新冠病毒造成的肺炎为下呼吸道感染,对于已有症状及肺部 CT 改变的患者来说,下呼吸道标本(如深咳痰液、灌洗液等)为核酸检测首选,而在新冠肺炎不同病程中取上呼吸道标本(如鼻咽拭子)也能检出病毒核酸。临床上由于多数患者咳痰困难,取下呼吸道灌洗液标本操作的生物安全风险极大,故呼吸道标本以鼻咽拭子及咽拭子为主,而拭子标本采用目前的 qPCR 试剂盒进行检测,只有 30%~50% 的阳性检出率,大量的假阴性结果无法避免,必须进行多次取样检测或结合其他类型标本检查结果进行确诊。笔者所在研究团队对临床上的新冠病毒疑似病例分别采集不同类型呼吸道标本进行核酸检测,结果初步提示在新冠病毒感染者中,取咽拭子标本及深咳痰液标本的病毒核酸检出率之间有明显差异,咽拭子标本中新冠病毒阳性检出率低于深咳痰液标本。

随着对新冠病毒核酸检测的科技攻关,目前已有较多报道提出在患者的粪便标本中可检出病毒核酸,粪便标本将成为临床患者筛查的重要标本类型^[5-6]。目前笔者所在研究团队对呼吸道标本核酸检测确诊的患者进行治疗过程中及出院前的粪便标本进行核酸检测,结果显示粪便标本是患者诊疗过程中一种非常好的标本类型,其核酸检出的持续时间普遍较呼吸道标本更长,同时粪便中新冠病毒核酸阳性与患者的疾病发展进程具有重要的相关性,可能作为一种疗效评估和出院标准的重要检测指标。

2.2 不同呼吸道标本取样材料对新冠病毒核酸检测结果的影响 目前相关的诊疗方案及实验室检测技术指南并未提及用于采集鼻咽拭子及咽拭子的拭子种类,但对于呼吸道标本的病毒核酸检测来说,不同的拭子及保存管很大可能将影响核酸检测结果,但相关影响因素尚未见报道。笔者所在研究团队初步在确诊患者中对比了带病毒保存液的植绒拭子标本及无病毒保存液的普通棉签拭子标本的新冠病毒核酸检测结果,发现普通棉签拭子的核酸检出率明显低于带病毒保存液的植绒拭子($P<0.05$),普通棉签拭子即便检出,其阳性 CT 值也明显大于植绒拭子。

3 新冠病毒核酸检测标本核酸提取方法及病毒核酸检出情况

实验室检测技术指南等文件中,并未明确提及或推荐新冠病毒标本的核酸提取方法,但由于目前临床常见鼻咽拭子标本存在核酸检出率较低的问题,对提

取方法及提取流程进行有实验数据依据的选择及优化是有必要的,提取流程的优化可由各实验室根据自身情况及比对实验结果来进行。

新冠病毒核酸检测所采用的 qPCR 是临床分子检测中常用的检测方法,在以往采用 qPCR 对病毒核酸进行的检测中,磁珠法是较为常用的核酸提取方法,普遍认为其提取病原体的核酸时具有简便、高效、提取浓度及纯度较高等优势^[7-8]。此外因各实验室条件不同及各检测试剂盒要求,离心柱法、煮沸裂解法、一步裂解释放法等也在临床大量应用。不同的病毒核酸提取方法因其提取产物浓度、纯度的差别及对 RNA 的保护程度不同,将在一定程度上影响病毒核酸尤其是临界阳性标本的核酸检出。笔者所在研究团队初步对 58 例已确诊患者原始标本(均为带病毒保存液的咽拭子标本)同时采用不同提取方法后的核酸检测结果显示,分别采用离心柱法及磁珠法提取后,PCR 检测的 CT 值差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 新冠病毒核酸检测实验室生物安全要求

4.1 实验室及检验人员生物安全 自新冠肺炎疫情暴发以来,各医院检验科在面对新冠病毒标本检测量增加、确诊/疑似病例和普通患者的标本不易区分、实验室空间限制、生物安全防护物资不足等各类问题时,临床实验室特别是进行新冠病毒核酸检验科室的生物安全防护措施尤为关键。目前国家卫生健康委员会对新冠病毒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,根据实验室检测技术指南及实验室生物安全指南,如无法对原始标本进行可靠的灭活,则对其进行的核酸检测应当在生物安全二级实验室进行,同时采用生物安全三级实验室的个人防护(建议至少穿戴工作服、一次性工作帽、双层手套、医用一次性防护服、医用防护口罩或动力送风过滤式呼吸器、防护面屏或护目镜、工作鞋或胶靴、防水靴套),各实验室还可根据自身情况增加进一步的防护^[9];同时标准预防、不定期通风和手卫生等重要的防护措施必不可少。

在物资匮乏及实验室条件不足等限制下,实验室可根据物资短缺的情况,对检验标本及检验岗位等启动分级、分层的生物安全防护预案,根据拟定的不同防护级别,最大限度满足生物安全防护要求。如针对不同的检验岗位,建议至少应保证对确诊患者、疑似患者标本进行呼吸道标本病毒核酸提取和抗原检测的相关人员的核心防护,即三级生物安全防护、二级生物安全柜,有条件时应佩戴正压防护头套及在负压实验室中操作,其他实验室检测人员酌情采取重点防护或标准防护^[10]。同时应加强所有实验室人员的安

全意识,在日常进行新冠病毒核酸检测的实验室内,所有实验人员均应严格遵循新冠病毒实验室生物安全指南中的相应要求,结束核酸检测工作后,对进行新冠病毒核酸检测操作的安全柜、台面及实验室环境及时进行有效的消毒;同时应严格按照相关文件要求进行防护装备的脱卸,注意尽量少地触碰到污染面,且脱卸的每一步后均应有手消毒,防护服、医用帽及医用口罩等一次性物品尽量不重复使用,在全部脱卸完成后,再进行相应的手卫生及消毒。对于严格分区的实验室,在相应区域完成防护装备脱卸及手卫生即可进入清洁区,未严格分区的实验室中检验人员在完成防护装备脱卸及手卫生后,还可增加其他有效的消毒措施^[11]。

4.2 原始标本的灭活及对核酸检测的影响 新冠病毒实验室检测指南中未对原始标本的有效灭活条件进行规定或建议,在目前最新的新冠病毒核酸检测专家共识中,建议采用 56 °C 水浴 45 min,并可根据提取试剂在标本裂解时所采用的温度调整灭活温度,但不低于 56 °C,此条件是依据以往对 MERS 等病毒灭活条件的研究。同时专家共识也建议各实验室对原始标本的灭活条件有预实验结果的支持^[12]。由于目前常见标本类型的新冠病毒核酸阳性检出率仍不高,故任何可能降低病毒核酸提取效果及检出率的因素,如标本灭活条件及灭活时间等均应引起重视。此前,华中科技大学附属同济医院检验科的专家学者对 PCR 检测病毒核酸(以乙型流感病毒为例)进行了相应的小标本量比对,结果发现未灭活处理、56 °C 水浴 30 min 及 50 °C 干浴 1 h 的同一标本其 PCR 检测阳性结果的扩增曲线 CT 值无明显变化,可作为新冠病毒标本灭活的参考。根据笔者所在研究团队对 20 例新冠病毒感染者的同一阳性标本分别进行 56 °C 干浴 30 min 及 65 °C 干浴 30 min 后,其 PCR 检测的阳性 CT 值差异无统计学意义($P > 0.05$),该研究结果尚未发表。

5 新冠病毒核酸检测结果判读

根据目前最新版新冠病毒诊疗指南、防控方案及实验室检测专家共识,对新冠病毒的核酸检测均应至少检测 ORF1ab 及 N 基因(或 E 基因),检测的通道同时阳性时可判定为阳性,并均提到阴性结果不能排除新冠病毒感染,应考虑各环节中导致假阴性的原因。同时在实验室检测技术指南中,对于单通道阳性结果,不仅要求重新采样及检测,对结果判定也增加了新的要求,即重新检测结果仍为单通道阳性时,判定核酸检测结果为阳性;同时增加了 2 种类型标本均检测得到单靶标阳性结果时,应判定核酸检测结果为阳性^[4]。

对于临床新冠病毒核酸检测中经常出现的单靶标阳性结果,可有如下几点考虑。(1)不同厂家双位点 qPCR 试剂盒对于新冠病毒 N 蛋白基因的扩增灵敏度可能高于 ORF1ab 检测,将可能导致部分病毒含量较低的标本检测结果为单通道阳性。(2)专研 SARS 病毒的专家学者认为,理论上讲新冠病毒的 mRNA 转录模式与 SARS 类似,在细胞中新冠病毒的 mRNA 数倍于病毒的基因组 RNA,且将转录出不同长度的 mRNA,这些 mRNA 都带有 N 基因,而只有少数带有 ORF1ab;目前的试剂盒实际检测多为细胞内的病毒 mRNA,因患者标本中 N 基因 mRNA 的拷贝数远高于 ORF1ab 基因,故在新冠病毒拷贝数较低的情况下,N 基因检测单通道阳性的比例较高。(3)N 基因在新冠病毒的核酸序列中保守程度不及 ORF1ab,故还可能存在少数标本由于其他冠状病毒等的核酸序列与其有交叉,导致 N 基因扩增阳性而 ORF1ab 阴性。

6 结 论

综上所述,目前新冠病毒所致疾病其病理过程及临床病程还未完全阐明,实验室检测路径未标准化,加上其核酸检测试剂盒研发时间紧迫,没有足够的评估及大样本量的临床验证,检测效果良莠不齐,故对于临床上新新冠病毒核酸检测结果为阴性或单通道阳性的标本均需要谨慎对待,考虑到各环节中可能造成结果不准确的影响因素。各临床实验室应在现有研究报道及文件和指南的基础上,根据自身条件对新冠病毒核酸检测全过程进行严格的质量控制及合理的优化。同时,目前实验室已开始检测新冠病毒 IgM 及 IgG 抗体,更灵敏的核酸检测方法如数字 PCR 也开始应用于新冠病毒的核酸检测,部分研究团队着力于探索更加高效的新冠病毒实验室诊断模型,有望在新冠病毒的实验室检测方面大大降低假阴性率,并为更好地确诊新冠病毒感染者提供事实依据。

参考文献

[1] LI Q, GUAN X, WU P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J/OL]. NEJM, (2020-01-29) [2020-02-24]. <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2001316>.

[2] 中华人民共和国卫生健康委员会. 截至 2 月 22 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. (2020-02-23)

[2020-02-24]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202002/07e5b22758364f2482d83537ef3975d2.shtml>.

[3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第六版)[EB/OL]. (2020-02-18) [2020-02-24]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2/files/b218cfeb1bc54639af227f922bf6b817.pdf>.

[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版)[EB/OL]. (2020-02-21) [2020-02-21]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/a5d6f7b8c48c451c87dba14889b30147/files/3514cb996ae24e2faf65953b4ecd0df4.pdf>.

[5] 李萍, 赵四林, 陈煜枫, 等. 2 例新型冠状病毒肺炎粪便 SARS-CoV-2 核酸阳性临床启示[J/OL]. 国际检验医学杂志: 1-7 [2020-02-13]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20200213.1516.002.html>.

[6] 施绍瑞, 聂滨, 郭渝, 等. 新型冠状病毒肺炎病例多种生物样本的病毒核酸检测结果[J/OL]. 华西医学: 1-5 [2020-02-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/51.1356.R.20200214.1828.024.html>.

[7] YERA H, FILISETTI D, BASTIEN P, et al. Multicenter comparative evaluation of five commercial methods for toxoplasma DNA extraction from amniotic fluid[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 3881-3886.

[8] 刘亚楠, 李珺, 华文浩, 等. 两种病毒核酸提取方法在流行感冒诊断中的比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2017, 11(5): 474-478.

[9] 中华人民共和国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(第二版)[S/OL]. (2020-01-22) [2020-02-24]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202001/c67cfe29ecf1470e8c7fc47d3b751e88.shtml>.

[10] 肖玉玲, 陆小军, 康梅, 等. 新型冠状病毒疫情下医院检验科的生物安全实施方案探讨[J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43 [2020-02-21]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182595.htm>.

[11] 钱扬会, 董建英. 2019 新型冠状病毒实验室检测与防护研究[J/OL]. 检验医学与临床: 1-13 [2020-02-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20200218.1654.002.html>.

[12] 中华医学会检验医学分会. 新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识[J]. 中华医学杂志, 2020, 100(00): E003-E003.

(收稿日期:2020-02-25 修回日期:2020-02-29)