

• 专家述评 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.10.001

新型冠状病毒核酸检测分析*

李振昊^{1,2}, 高小玲^{1,2}, 杨小娟³, 徐 辉^{1,2△}

甘肃省人民医院:1. 临床研究与转化医学研究所;2. 国家卫生健康委胃肠肿瘤诊治重点实验室, 甘肃兰州 730030;3. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730030

摘 要:2020 年,由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)在国内和其他国家暴发流行。实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法以其高灵敏度与强特异性,被认为是 COVID-19 的确诊方法。然而,SARS-CoV-2 核酸检测对于阳性患者的阳性率仅有 30%~50%,临床较多的疑似病例需多次核酸检测之后才得到阳性结果,使 SARS-CoV-2 核酸检测阳性作为确诊标准备受质疑。本文结合相关文献及在 SARS-CoV-2 核酸检测中的工作经验,从病原学、标本采集、核酸提取过程、试剂盒等各个方面对 SARS-CoV-2 核酸检测方法的影响因素进行深入探讨,对 SARS-CoV-2 检测出现假阴性或假阳性的原因进行分析与归纳总结,为检测的准确性提供依据,也旨在为基层医院的核酸检测工作提供一定的帮助。

关键词:新型冠状病毒; 实时荧光定量 PCR; 核酸检测

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)10-1313-03



高小玲

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)所致的新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者不断增加,2020 年 3 月呈现世界范围内大流行的趋势。钟南山与李兰娟院士在 2020 年 2 月 28 日发表的论文中统计得出,COVID-19 潜伏期中位数为 4 d,最主要的症状是发热、咳嗽,少数患者伴有恶心、呕吐及腹泻。实验室检查中,83.2%的 COVID-19 患者伴有淋巴细胞减少,COVID-19 的病死率为 1.4%^[1]。

1 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 是 β 属单股正链 RNA 病毒,巢病毒目,冠状病毒科。冠状病毒根据血清型和基因组特点分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属。它们可以感染人类、哺乳动物、鸟类、蝙蝠等的呼吸系统、胃肠道、肝脏和中枢神经系统。目前,已知能够感染人的冠状病毒有 7 种,除去我国 2003 年暴发的 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)^[2]和 2012 年中东暴发的中东呼吸综合征冠状病毒(MERSr-CoV)以外,其余 4 种感染人的冠状病毒(HCoV-NL63、HCoV-229E、HCoV-OC43 和 HKU1)均可诱发轻微的上呼吸道感染,SARS-CoV-2 是继上述 6 种外第 7 个感染人的 β 属冠状病毒^[3]。SARS-CoV-2 可以通过结合各种黏膜细胞上的血管紧张素转化酶

受体 2(ACE2)进入宿主细胞内^[4],所以与外界相通的气道黏膜、口腔黏膜,以及眼睑、眼结膜均容易暴露感染。也有文献报道称,SARS-CoV-2 也可能通过与 ACE2 高度同源的 DC-SIGN 与 L-SIGN 受体进入体内^[5]。SARS-CoV-2 基因组长 29 kb,病毒基因组全长的三分之二是开放性读码框(ORF),3'端基因编码结构蛋白,包括 E 基因编码包膜蛋白、M 基因编码膜蛋白、N 基因编码核衣壳蛋白、S 基因编码刺突糖蛋白(介导病毒进入宿主)^[3]。

在疫情初期,最先检出病毒并成为确诊途径的是高通量测序技术,但这种技术成本高、耗时长、对仪器和操作人员要求高,不能满足疫情暴发大规模标本检测的需求。借鉴国内外以往的重大疫情经验,实时荧光定量反转录 PCR 技术可高效、快速地完成病毒标本的检测,兼具灵敏度高和特异性强的特点,易于普及推广,成为国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》中首推的检测方法。但近期 SARS-CoV-2 核酸检测阳性率低,检测出现的假阴性结果与临床表现不吻合等问题备受关注。这也是疫情当下临床医护人员、检验工作者、相关科研人员以及试剂厂商持续关注 and 急需解决的问题。本文结合实际工作的经验,对可能造成核酸检测假阴性和假阳性的影响因素进行分类与深入探讨,内容包括病原学、标本采集、核酸提取过程、试剂盒等各个环节。

* 基金项目:甘肃省新型冠状病毒肺炎科技重大专项。

专家介绍:高小玲,主任技师,加拿大留学博士、博士后,专业方向为临床免疫学和微生物。现任甘肃省人民医院临床研究与转化医学研究所所长。主要从事分子诊断学、感染性疾病的临床预防以及过敏性哮喘的分子机制研究。留学期间获得加拿大多项科研奖励和中国国家留学基金委员会的表彰,曾在加拿大国家科学院人类疾病研究所从事疫苗研发,擅长基础医学成果的临床应用。主持国内外多项基础研究和临床应用课题,主持或参与完成课题多项,其中,主持国家自然科学基金 1 项,参与完成 CIHR (Canadian Institute of Health Research)的“DC 在感染抑制过敏性哮喘中的分子机制”“感染性疾病中肝脏免疫的调控机制”“鲍曼不动杆菌的多重耐药的分子机制研究”。发表 SCI 论文 25 篇。△ 通信作者, E-mail: xuhui-GSPH@hotmail.com。

2 假阴性的影响因素

2.1 病原学因素 SARS-CoV-2 是单链 RNA 病毒, 容易在传播过程中发生变异, 目前试剂盒主要针对 SARS-CoV-2 基因组开放性读码框 ORF1ab、N 基因、E 基因保守区域进行引物设计。由于对 SARS-CoV-2 的研究尚浅, 是否存在进化上保守区域的突变还未可知, 核酸检测试剂也缺乏大规模的临床验证, 若是病毒 RNA 的引物设计区域发生突变, 可直接导致检测结果的假阴性。

2.2 标本因素

2.2.1 采集标本的时间与类型不当 根据 COVID-19 诊疗方案, 采集标本类型包括上呼吸道标本(口咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽出物)、下呼吸道标本(深部痰液、支气管灌洗液、气道抽出物、肺泡灌洗液、肺组织活检), 还有 EDTA 抗凝血、眼结膜标本、粪便标本等^[6]。尽管《新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识》中已经指出, 应采集患者发病 3 d 内的标本^[7], 但多数患者潜伏期为 2~7 d, 绝大多数患者在就诊时病程已经迁延了数天至数周, 不能确定标本采集时是否为痰液、鼻咽拭子、口咽拭子等标本检测的最佳时期, 亦不能确认标本内病毒载量是否仍然处在方法学的检测范围内^[8]。

深圳市第三人民医院(南方科技大学第二附属医院)国家感染性疾病临床医学研究中心的人员对来自 213 例 COVID-19 确诊病例的 866 份标本检测结果进行分析, 结果显示, 发病后 0~7 d 采集的痰液、鼻咽拭子、口咽拭子 3 种类型标本中, 核酸检测阳性率仅为 60%, 随着病程发展这 3 种类型标本的阳性率均有所降低, 建议标本采集及检测应该在发病后的 0~7 d 进行; 标本类型方面, 除了肺泡灌洗液阳性率在 8~14 d 组达到了 100%, 痰液在各个不同检测时间段的阳性率都是最高的, 而且鼻咽拭子优于口咽拭子^[9]。在陈炜等^[10]的研究中也表明, 痰标本的病毒含量均高于咽拭子标本。SARS-CoV-2 主要感染下呼吸道甚至肺部, 病灶主要位于肺外带近胸膜处, 这提示肺泡灌洗液或纤维支气管镜刷检物也是较好的标本类型。不论是从操作的简便性, 还是从安全性来讲, 深部痰液都是一个较佳的选择, 但临床患者症状多以干咳、无痰为主^[3], 给标本采集带来了一定难度。肺泡灌洗液标本采集也存在创伤性与交叉污染的风险。

2.2.2 标本质量低 合格的标本必须采集到含有病毒的细胞, 且病毒含量能够达到核酸检测下限, 否则将导致检测结果出现假阴性。在各类采集的标本中, 鼻咽拭子、口咽拭子是最常见的标本类型。标本质量低主要源于以下 4 个方面的问题: (1) 由标本采集的操作不规范导致, 主要是采集鼻咽拭子的深度不够, 未采到鼻腔深处含有病毒的细胞等。(2) 不少就诊者存在鼻甲肥大、鼻道狭窄且伴有鼻过敏症状, 采样拭子很难顺利进入鼻腔, 在采集过程中会诱发患者打喷嚏(具有职业暴露风险), 分泌出的内容物会较大程度

上降低获取到的标本质量。(3) 未使用专用的病毒核酸采样拭子与保存液。病毒核酸专用植绒采样头能增加采集的细胞数量, 如果用无菌棉签代替不仅会使数量减少, 而且棉丝混入标本会抑制后续扩增反应。病毒保存液含有核酸抑制酶, 如果采样后不能立即放入保存液中, 标本中的 RNA 很容易降解。(4) 运输时间过长或者温度过高, 会导致 RNA 降解。标本采集后应尽快送检, 采集后应尽可能在 2~4 h 送到实验室。在 2~8 °C 下转运, 运送时间应不超过 72 h。

2.3 人员因素 由于核酸提取过程中手工操作较多, 检测人员需要经过专业培训, 具备基本的分子生物学知识与熟练的实践技能。实验各个环节中, 人为操作不当, 会影响 PCR 结果的准确性。提取过程中的注意事项如下: (1) 痰液标本需提前加入蛋白酶 K, 所有标本加样前需用移液器吹打混匀(慢速且所调体积应小于加样枪最大量程); (2) 加入病毒裂解液后, 吹打混匀或振荡混匀; (3) 柱提法空柱子离心后, 需静置 3 min 晾干残留的乙醇, 否则会影响后续检测; (4) 最后洗脱核酸时, 双蒸水(ddH₂O)一定要加在滤膜上(加在侧壁会减少洗脱后的体积), 静置 5 min 后再离心洗脱。

2.4 仪器设备因素 PCR 实验室的设备仪器(冰箱、移液器、生物安全柜、离心机、水浴锅、荧光定量 PCR 仪等)都需要定期校准与维护。例如: 冰箱温度不稳定, 会影响标本 RNA 的稳定性, 导致假阴性。移液器量程不准确, 反应体系的不一致性和标本加样误差也是导致检测结果假阴性的原因之一。

2.5 试剂因素

2.5.1 提取试剂因素 核酸的提取因试剂品牌和方法学多有不同, 选择不适合的提取试剂或者提取过程中不正确的操作, 都会导致核酸提取失败, 进而影响病毒的检出。提取试剂盒应购买病毒 RNA 提取专用的试剂盒, 可选择国外或国内的产品, 具体提取效率之间的比较, 目前相关报道较少。

2.5.2 扩增试剂因素 核酸扩增试剂应选择至少含 SARS-CoV-2 基因的两个位点(开放读码框 ORF1ab、N 基因或 E 基因)。目前, 各个厂商研发有 ORF1ab、N 基因的双靶标试剂盒, 同时包含 ORF1ab、N 基因与 E 基因的三靶标试剂盒。结果判读: 根据《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第三版)》, 在实验室要确认一个病例为阳性, 须满足以下条件, 即同一份标本中 SARS-CoV-2 两个靶标(ORF1ab、N 基因)特异性荧光定量 PCR 检测结果均为阳性。如果出现单个靶标阳性的检测结果, 则需要重新采样, 重新检测。使用商品化试剂盒则以厂家提供的说明书为准^[11]。

根据郭元元等^[12]对国产 6 种 SARS-CoV-2 核酸检测试剂对弱阳性 COVID-19 患者的检测结果研究发现, 6 种国产试剂中有 2 种试剂检测能力较好, 对 SARS-CoV-2 弱阳性标本(ORF1ab 和 N 基因)均能

检出,而其余 4 种试剂只能检出其中之一。这说明在这种突发的公共卫生事件下,很多试剂盒引物设计的位点欠佳,后续还需优化。为了提高病毒核酸检测的准确性,建议医疗机构在有条件的前提下,同时使用两种厂家试剂进行检测。

3 假阳性的影响因素

假阳性主要来源于核酸污染、非特异性扩增、结果判读失误[基线(baseline)设置不当]。

3.1 核酸污染因素 可分为提取前污染(PCR 试剂污染)、提取环节的污染(样本间、对照品的交叉污染、气溶胶污染)、上机扩增期间的污染。解决方案:(1)PCR 实验室必须是独立的 4 个区域(试剂准备区、标本处理区、核酸扩增区、产物分析区),应保持人流、物流的单向流通,不得跨区操作。(2)生物安全柜使用前、后应擦拭干净,标本处理区(非负压条件下)应保持勤通风。操作时剧烈地摇动试管,开盖、吸样时都可形成气溶胶而导致污染,故提取的各个环节操作应轻柔。为避免交叉污染,上机检测前病毒模板加样顺序可调整为阴性对照品、标本、阳性对照品。部分试剂的阳性对照品交叉污染严重,应保持远距离、轻柔开盖。(3)上机扩增期间,高温条件下产生的气溶胶逸出,因此上机前应盖紧 PCR 管盖。

3.2 非特异性扩增的因素 非特异性扩增的原因主要是引物设计不够特异,产生了引物二聚体(引物与引物之间互补结合后扩增)或上、下游引物自身形成发卡结构,产生非特异性荧光导致假阳性。这类假阳性的特点是 S 型扩增曲线起线较晚,在最后几个循环内扩增,荧光信号弱,循环阈值(Ct 值)较大。

3.3 结果判读失误的因素 baseline 的作用是扣除扩增起始阶段的背景荧光信号,绝大部分扩增仪的软件会自动设置 baseline 的范围。但如果背景信号过强,软件可能会将背景信号误认为扩增信号,这时 baseline 的范围也会很小。这类曲线的特点是曲线起线较早,呈曲折样上升型或不规则上升型,而不是光滑的 S 型曲线,此时需要手动调整 baseline 范围,同时对原始曲线和扩增曲线形态进行判别。

4 小 结

综上所述,本文分析并阐明了造成 SARS-CoV-2 核酸检测假阴性或假阳性各个环节的影响因素,包括标本的正确采集、运输,以及提高临床实验室人员的规范操作、正确的结果判读、完善 PCR 实验室质量控制,这些环节对于保证检测结果准确性十分重要,同时也能为基层医院核酸检测工作的开展提供一定的帮助。目前,对 COVID-19 的发病机制、临床病程、治疗手段还在不断认识中,病毒核酸检测作为确诊方法,依然是快速、可靠且不可缺少的检测手段。快速研发的试剂盒稳定性有待提高,SARS-CoV-2 的 IgM 与 IgG 抗体检测试剂盒已经获批,许多研究者也在积极探索数字 PCR 等更好的检测手段,这些将有助于

更早、更快、更精准地检测出 SARS-CoV-2,对控制病程、早期治疗及疫情防控都起着至关重要的作用。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 截至 2 月 29 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. (2020-03-01)[2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqtb/202003/9d462194284840ad96ce75eb8e4c8039.shtml>.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 2003 年 8 月 16 日非典型肺炎疫情通报[EB/OL]. (2003-08-16)[2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/zcjd/201304/a0d4975881e44d389195779773afaabc.shtml>.
- [3] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17(3): 181-192.
- [4] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin[J/OL]. BioRxiv, 2020 (2020-01-22)[2020-03-03]. <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>.
- [5] CAI G S, CUI X. A hint on the COVID-19 risk: population disparities in gene expression of three receptors of SARS-CoV[EB/OL]. (2020-02-04)[2020-03-03]. <https://www.preprints.org/manuscript/202002.0408/v1>.
- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)[S/OL]. (2020-02-19)[2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [7] 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/OL]. 中华医学杂志, 2020[2020-03-02]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1180140.htm>.
- [8] GUAN W J, NI Z Y, HU Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China[J/OL]. N Engl J Med, 2020(2020-02-28)[2020-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32109013>.
- [9] YANG Y, YANG M H. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections[J/OL]. medRxiv, 2020(2020-02-11)[2020-03-03]. <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>.
- [10] 陈炜, 张春阳, 朱颖, 等. 4 例新型冠状病毒感染病例咽拭子与痰标本病毒核酸检测的比较[J/OL]. 中国人兽共患病学报, 2020(2020-02-12)[2020-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/35.1284.R.20200211.2118.002.html>.
- [11] 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)[2020-03-03]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202001/c67cfe29ecf1470e8c7fc47d3b751e88.shtml>.
- [12] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学, 2020(2020-02-12)[2020-03-03]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200212.0900.006.html>.