

• 新型冠状病毒肺炎 •

新型冠状病毒肺炎核酸检测中的假阴性分析及对策^{*}

高维寅¹, 张 洪², 罗 阳^{3△}

(1. 南昌大学第二附属医院急诊科, 江西南昌 330006; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044;

3. 重庆大学医学院智慧检验与分子医学中心, 重庆 400044)

摘 要: 新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的疫情引发了全世界的关注。早期诊断对 COVID-19 的治疗、患者预后尤为关键。临床检验中发现早期的 COVID-19 患者核酸检测多次呈假阴性,特别是不同时间多次阴性结果后转为阳性,给临床诊断和疾病控制带来极大困扰。该文立足于疫情的早日防控,从临床、检验的不同视角,从标本采集、检测方法、产品稳定性等多方面剖析产生假阴性的可能原因,并且结合临床实践和检测技术,从整合特异性实验室指标,规范标本采集方式和过程,严格检测试剂的监管和审批等方面提出行之有效的方案,旨在为切实降低检测假阴性或假阳性率提供临床参考,为 COVID-19 临床准确诊断及疫情防控提供有力支撑。

关键词: 新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎; 核酸检测; 假阴性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.001

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)06-0641-04

文献标识码:A

Preventing false negative results in detecting new coronavirus nucleic acid^{*}

GAO Weiyin¹, ZHANG Hong², LUO Yang^{3△}

(1. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang,

Jiangxi 330006, China; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044,

China; 3. Center for Wisdom Testing and Molecular Medicine, Chongqing University School of

Medicine, Chongqing 400044, China)

Abstract: The outbreak of new coronavirus pneumonia (COVID-19) has caused worldwide concern. Early diagnosis is particularly critical for the treatment of COVID-19 and prognosis. Clinical applications indicated that false-negative results have been frequently reported during the nucleic acid detection for patients with COVID-19 in the early stage, and then the results turned positive after multiple negative results at different times, causing great distress to clinical diagnosis and disease control. Based on the epidemic situation and early prevention and control, this article analyzed the possible causes of false negatives from various aspects of clinic and laboratory, including specimen collection, testing methods, product stability, and other aspects. Then we put forward effective solutions for COVID-19 pandemic prevention, such as combining clinical practice with laboratory detection technologies of specific biomarkers, employing standard specimen collection methods and processes, providing strict supervision and approval of diagnostic reagents. These measures provide clinical references for effectively reducing false negative or false positive detection rate, and provide strong support for the accurate clinical diagnosis and epidemic prevention and control of COVID-19.

Key words: new coronavirus; COVID-19; nucleic acid detection; false negative

^{*} **基金项目:** 国家自然科学基金项目(81871733); 中央高校基本科研业务费项目(2019CDYGGZD005, 2019CDYGGZD007); 重庆大学“新型冠状病毒肺炎”应急科研专项(2020CDJYGRH-YJ05)。

专家简介: 罗阳, 现为重庆大学医学院教授、博导。中组部“万人计划”青年拔尖人才、重庆英才·创新领军人才、重庆市学术技术带头人、重庆市教委“单分子检测的基础与转化”创新团队负责人、重庆市杰出青年基金获得者。担任重庆市科技青年联合会实验医学专委会主任委员、世界华人医师协会检验医师分会副主任委员、中国医师协会检验医师分会代谢疾病专委会副主任委员、中华医学会检验分会临床生物化学组委员、美国临床化学协会(AACC)和美国化学协会(ACS)会员。先后获国家科技进步二等奖、“十一五”军队医学科技重大成果奖、中华预防医学科技进步一等奖等省部级以上奖项 10 余项。近年来以第一/通信作者在《中华检验医学杂志》、《中华医院感染学杂志》、Sci Transl Med、Nat Commun、J Am Chem Soc、Trends Biotechnol 等国内外期刊发表论文 50 余篇。获美国、英国、澳大利亚专利各 1 件, 获中国专利 23 件(发明专利 19 件), 多件专利实现转化。△ **通信作者:** E-mail: luoyan@cqu.edu.cn。

本文引用格式: 高维寅, 张洪, 罗阳. 新型冠状病毒肺炎核酸检测中的假阴性分析及对策[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(6): 641-643.



罗 阳

早在 1937 年,冠状病毒首次从鸡身上分离发现,病毒颗粒的直径为 60~200 nm,平均直径为 100 nm,呈球形或椭圆形,具有多形性。病毒有包膜,包膜上存在棘突,整个病毒像日冕,不同的冠状病毒的棘突有明显的差异^[1]。冠状病毒感染细胞内有时可以见到管状的包涵体。新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是目前已知的第 7 种可以感染人的冠状病毒^[2],其余 6 种分别是 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV 和中东呼吸综合征(MERS)-CoV^[3]。冠状病毒是一个大型病毒家族,已知轻症可引起感冒类症状,重症可引起 MERS、SARS 等。

目前所知,冠状病毒科仅感染脊椎动物,与人、动物的多种疾病密切相关^[4]。研究认为,血管紧张素转化酶 2(ACE2)是冠状病毒感染的关键受体,只要表达 ACE2 受体的细胞均是冠状病毒的侵袭对象^[5]。研究观察到 ACE2 定位于心脏、肾脏、肺、结肠和睾丸等组织中^[6],也在多种组织中低表达。ACE2 在肝脏和肠等器官中具有重要作用。ACE2 通常定位于上皮细胞的腔面,这是导致冠状病毒高感染力的重要原因,因为 SARS 冠状病毒通过表达 ACE2 的细胞腔面进行感染时,其感染效力更高。

如何在早期进行病毒鉴定是感染防控的关键。临床常用的病毒病原学检查主要包括病毒分离、病毒核酸检测。病毒分离为实验室检测的“金标准”,病毒核酸检测则用于快速诊断。受病毒感染机制影响,不同组织细胞中的 SARS-CoV-2 水平差异较大;而研究显示 SARS-CoV-2 更趋向于结合肺泡上皮细胞,理论上来说其下呼吸道标本较上呼吸道标本病毒阳性检出率更高^[6]。因此收集标本时尽量留取多种标本(咽拭子、鼻拭子、鼻咽或气管抽取物、痰或肺组织、血液和粪便)进行检测和分离,可以提高准确性^[7]。但对于短时间出现大量疑似患者,病毒分离远不能满足临床工作需要,并且病毒分离需要三级生物安全实验室进行,常规实验室根本不具备上述条件,为确诊工作带来极大挑战。

1 假阴性原因分析

2020 年 2 月 18 日国家卫生健康委员会发布了 COVID-19 诊疗方案(试行第六版),明确 COVID-19 的确诊方式有两种:一种是实时荧光定量 PCR(qPCR)检测核酸呈阳性;第二种是病毒基因测序,与已知 SARS-CoV-2 高度同源。临床上,大部分的高度疑似患者都采取方法一进行检测。因为相对基因测序而言,qPCR 方式具有速度快、批量化、价格低等优

势。然而,影响 qPCR 结果的因素很多,如标本或核酸纯化过程中出现的扩增反应抑制物、扩增仪孔间温度的差异以及核酸提取中的随机误差,均可造成假阴性结果的出现。又如,以前扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染,也很容易导致假阳性结果。因此,对于 qPCR 检测结果的报告必须慎重,尤其是会导致严重后果时。本次 COVID-19 疫情暴发后,“金标准”核酸检测却多次出现假阴性结果,特别是个别病例在不同时间经 5 次以上的检测后结果由阴性转为阳性,为临床诊断和疾病控制带来极大的困难。对关键部位进行标本采集(早期为咽拭子,第六版指南建议为痰标本)成为临床科室性价比最高的选择^[1]。因此,本文重点结合临床科室的具体实践,针对临床诊断阳性而核酸检测显示为假阴性的结果进行剖析,总结出导致检测结果不准确的三大因素,希望有助于检验时机的把握,为下一步打赢疫情阻击战提供参考。

1.1 太早 (1)检测试剂不成熟:一个新病毒的出现,从分离到测序、鉴定,研发出成熟的试剂盒,需要一定的时间周期。随着人类对疾病认识的深入,试剂盒本身还会逐渐优化,其特异性和准确性必定会进一步提升。目前核酸检测多采用 qPCR 技术,其检测原理决定了大多数试剂盒的检测灵敏度为 100~500 拷贝,这些试剂盒对于高浓度病毒检出问题不大,但是不同厂家甚至于不同批次的试剂盒对于“灰区”的判断则明显不一致。(2)疾病病程早:大部分假阴性患者处于疾病发展的早期。从现有文献报道来看,COVID-19 潜伏期长达 14 d,个别病例甚至达到了 29 d,早期临床表现不典型,一旦进入快速发展期,病程进展极快^[8]。在感染早期,病毒复制数量达不到 qPCR 检测阈值的时候,出现假阴性不可避免。

1.2 太多 待测的疑似病例数量多,有待排除感染的标本多,检测操作步骤多。根据国家对传染病管理的规定,阳性病例标本必须要送至疾病预防控制中心才能够确认。然而,这样长时间转运标本极易导致病毒 RNA 的降解。后来国家下放确认权限,允许具备临床扩增实验室资质并且防护验收合格的医疗机构检验科开展检测。但在本次疫情之前,大多数实验室均处于基本满足临床需要的状态,少有富余检测能力,在疑似病例大量出现的情况下,每日检测数量超过实验室既定极限,有的标本不得被延迟检测(只有达到标准的实验室才有发布报告的权限)。标本难以做到即时送检,只能是采集 1 批,留存 1 批,检测 1 批,报告 1 批。许多标本都处于保存和检测时间范围的极值,甚至部分标本已经超过检测的最佳时限(后来这种情况随着实验室的快速改建扩容,送检流程的优化得到明显的改善)。

由于疫情严重、发展迅速。在疫情暴发初期,防护装备极为匮乏,为减少医务人员感染病毒的风险,临床上在留取标本的时候也尽可能采取集中采样的方式,这也会影响标本采集的效果。医护人员工作量过多,迫使大量非重症和呼吸专业的医护人员补充进来,对鼻、咽拭子采集流程和规范的不熟悉导致采样标准的不统一,取样部位不准确,导致标本阳性率下降。

1.3 太杂 从有确诊患者以来,COVID-19 诊治指南已发布多个版本。从湖北版指南、广东版指南到最后的全国统一标准,尽管标准逐渐统一,但是很多一线操作人员对临床具体取样过程缺乏统一认识,仍旧采用陈旧的操作方式。目前的取样涵盖了血液、鼻拭子、咽拭子、肺泡灌洗液、排泄物、普通患者的痰液、插管患者的下呼吸道分泌物等标本类型。同时,对同一患者不同部位取样进行核酸检测,阳性率的统计学差异极有可能源于生理性差异。第六版诊治指南发布以后,公开报道的假阴性患者明显减少,这与全面实施规范化采样过程关系密切。

2 对 策

COVID-19 具有高传染性、高隐匿性和高致病性,人们对于 COVID-19 的致病机制、临床特点以及传播途径均存在着认识上的局限^[9],相信随着人类与 COVID-19 疫情的斗争,对疾病的认识会进一步深入和更加全面。目前可以从以下几个方面进行规范,以减少检测中的假阴性。

2.1 综合采用其他实验室检测手段 可以采用数字 PCR 等技术来对 qPCR 进行补充,特别是对于 qPCR 检测阴性或者弱阳性标本,可以有效克服 qPCR 灵敏度不足的难题,适用于早期感染的判断及患者治愈后的出院诊断。同时,对 SARS-CoV-2 抗原和抗体进行动态定量检测也有助于识别感染者。目前,基于抗原检测的试剂不多,大多数试剂盒采用免疫球蛋白(Ig)M/IgG 联合检测以提高准确性。最新的研究报道,核酸检测阴性但临床症状确诊的 COVID-19 患者中,IgM 阳性率达到 84.21%,IgG 阳性率达到 94.74%。联合抗体和核酸检测诊断 COVID-19 的总符合率为 88.03%^[10]。另外,结合实验室的其他炎症、凝血等指标进行综合分析,也具有指导意义。联合白细胞、淋巴细胞、C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白 A 等检测指标可以提高诊断 COVID-19 的特异度和灵敏度,对重型和危重型 COVID-19 的诊断同样有较高的参考价值^[11]。淋巴细胞亚群和白细胞介素-6 等炎症指标也可以用于辅助病情诊断。另外,降钙素原可用来评估 COVID-19 患者是否有继发感染及感染的严重程度。

2.2 规范标本采集方式和过程 有条件的地区,在规范进行呼吸道标本采集和检测的基础上,尽可能完

善其他部位标本采集(特别是合并消化道症状患者),对减少假阴性结果可能有积极的意义。建议进行不同临床标本检测结果差异比对的临床试验,从而进一步规范标本来源;通过正规培训和监管来规范采样过程并重视检验前的标本采集和保存工作。

2.3 严格检测试剂的监管和审批 即便是再先进的检测技术,也需要检测仪器和试剂来承载。因此,不同厂家的试剂盒质量、阴(阳)性质控品、批间差异等指标显得尤为重要。在疫情趋于平缓后,相关部门应该加强对各种检测试剂盒的监管工作,鼓励各检测产品和临床扩增实验室配合临床检验中心进行室内质评以进行系统性评估。

总而言之,实验室诊断只是能作为 SARS-CoV-2 检测的重要手段之一,不能孤立地据此进行结果判断。因为对该病毒的了解还不够深入,有效的潜伏期筛查手段尚未建立,临床上更应该重视患者的早期症状和影像学表现,将核酸检测作为临床诊断的“守门人”,并且配合多项实验室检查进行判断。实验室检测和临床诊断应当结合起来共同应对这个新型的病毒。

参考文献

- [1] CHAN P K S, CHAN M C W. Tracing the SARS-coronavirus[J]. J Thorac Dis, 2013, 5(2): 118-121.
- [2] WANG C, HORBY P W, HAYDENET F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 470-473.
- [3] SKARIYACHAN S, CHALLAPILLI S B, PACKIRISA MY S, et al. Recent aspects on the pathogenesis mechanism, animal models and novel therapeutic interventions for middle east respiratory syndrome coronavirus infections[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 569.
- [4] ZHU N, ZHANG D Y, WANG W L, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.
- [5] 晏黎, 项杰, 崔天盆. 人类冠状病毒功能性细胞受体[J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-12)[2020-03-01]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1180575.htm>.
- [6] HAMMING I, TIMENS W, BULTHUIS M L C, et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus: a first step in understanding SARS pathogenesis[J]. J Pathol, 2004, 203(2): 631-637.
- [7] 中国疾病预防控制中心新型冠状病毒肺炎应急响应机制流行病学组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(2): 145-151.
- [8] BAI Y, YAO L S, WEI T, et al. Presumed asymptomatic carrier transmission of COVID-19[J]. JAMA, 2020, 2(2020-02-21)[2020-03-01]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.

(下转第 647 页)

配子更易合成及储存,有助于降低免疫检测方法的成本,提高检测的稳定性。

为了使免疫传感器的性能达到最佳,本文对检测条件进行了优化,结果表明,适配子溶液离子强度对检测结果影响不明显; Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 同时存在时,免疫传感器检测结果最佳;当适配子水平达到 $6\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,免疫反应达到饱和;加急反应显示修饰好捕获抗体的芯片在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 7 d 仍能保持很高的反应性。在最优的反应条件下,该免疫传感器在 15 min 内即可获得检测结果,最低检出限为 0.5 ng/mL ,检测范围为 $10\sim 5\,000\text{ ng/mL}$,灵敏度高,特异性强。本方法平均回收率为 $96.8\%\sim 101.2\%$,批内变异系数及批间变异系数均小于 15% ,呈现出良好的精密度和重现性。免疫传感器的下一步研究可以使用适配子取代捕获抗体,从而进一步降低检测成本;与微流体技术相结合,将检测方法集成为微流体芯片,使用一步法检测 CRP,从而更适用于临床的快速检测。

4 结 论

本研究使用适配子代替标记抗体,建立了基于硅片表面可视化免疫检测方法快速检测 CRP 的方法。本方法利用可大量廉价合成的适配子代替昂贵的抗体,大大降低了检测的成本,而且不会出现抗体在制作过程中批间活性不一致的现象。本方法中 CRP 的检测范围及检出限能够满足一定的临床需求,而且检测简便、快速。并且本方法在医学检测的其他领域也具有巨大的应用价值。

参考文献

- [1] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(30): 818.
- [2] WANG H, HUANG X, WEN G, et al. A dual-model SERS and RRS analytical platform for $\text{Pb}(\text{II})$ based on Ag-doped carbon dot catalytic amplification and aptamer regulation[J]. Sci Rep, 2019, 9: 9991.
- [3] TUEK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase[J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.
- [4] TORRES-CHAVOLLA E, APCILJA E C. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(11): 3175-3182.

- [5] HOON S, ZHOU B, JANDA K D, et al. Aptamer selection by high-throughput sequencing and informatic analysis[J]. Biotechniques, 2011, 51(6): 413-416.
- [6] HUANG C J, LIN H I, SHIESH S C, et al. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1761-1766.
- [7] KANG K, SACHAN A, NILSEN-HAMILTON M, et al. Aptamer functionalized microcantilever sensors for cocaine detection [J]. Langmuir, 2011, 27(23): 14696-14702.
- [8] KIM Y H, SUNG H J, KIM S, et al. An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells[J]. Cancer Letters, 2011, 313(1): 76-83.
- [9] ANSAR W, BANDYOPADHYAY S M, CHOWDHURY S, et al. Role of C-reactive protein in complement-mediated hemolysis in Malaria[J]. Glycoconj J, 2006, 23(3/4): 233-240.
- [10] YU Q, LIN Y, YANG P, et al. C-reactive protein is associated with the progression of acute embolic stroke in rabbit model[J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 33(4): 301-307.
- [11] CHAKRABORTY C, AGRAWAL A. Computational analysis of C-reactive protein for assessment of molecular dynamics and interaction properties [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 67(2): 645-656.
- [12] HIOKI H, WATANABE Y, KOZUMA K, et al. Effect of serum C-reactive protein level on admission to predict mortality after transcatheter aortic valve implantation [J]. Am J Cardiol, 2018, 122(2): 294-301.
- [13] LIU F, CHEN H Y, HUANG X R, et al. C-reactive protein promotes diabetic kidney disease in a mouse model of type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2011, 54(10): 2713-2723.
- [14] 霍卫松, 张磊, 高宇哲, 等. 心衰标志物可视化联合检测方法研究[J]. 影像科学与光化学, 2015, 33(4): 275-284.
- [15] YANG Y N, LIN H I, WANG J H, et al. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(10): 3091-3096.

(收稿日期: 2019-09-11 修回日期: 2019-12-29)

(上接第 643 页)

- [9] 中国医学会检验分会. 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(2): E003.
- [10] 徐万洲, 李娟, 何晓云, 等. 血清 2019 新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-27) [2020-03-01]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182736>.

htm.

- [11] 石亚玲, 区静怡, 陈星, 等. 多种炎症指标在 2019 新型冠状病毒肺炎的表达水平及临床应用价值 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-27) [2020-03-01]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182737>. htm.

(收稿日期: 2020-03-01 修回日期: 2020-03-09)