

新型冠状病毒

武汉地区 8 274 例受检者新型冠状病毒核酸检测及合并感染结果分析

汪明¹, 吴青¹, 徐万洲¹, 乔斌¹, 王京伟¹, 陈振¹, 郑红云¹, 姜树朋¹, 梅骏驰¹, 吴泽刚¹, 邓亚云¹, 周方元¹, 吴薇¹, 张艳¹, 吕志华¹, 黄景涛¹, 郭晓倩¹, 冯丽娜¹, 夏尊恩¹, 李迪¹, 刘天罡², 张平安¹, 童永清¹, 徐之良³, 李艳¹

¹武汉大学人民医院检验医学中心, 武汉 430060; ²武汉大学药学院教育部组合生物合成与新药发现教育部重点实验室, 武汉 430072; ³武汉大学人民医院儿科, 武汉 430060

汪明, 吴青对本文有同等贡献

通信作者: 李艳, Email: yanlitf1120@163.com; 徐之良, Email: zlxu-rm@163.com

【摘要】目的 探讨武汉地区 2019 新型冠状病毒 (2019-nCoV) 核酸检测病例的阳性率及合并其他病原体感染的情况, 为 COVID-19 的实验室检测及临床治疗提供参考。 **方法** 本研究为横断面研究, 采用荧光定量 PCR 方法检测 2020 年 1 月 20 日至 2 月 9 日在武汉大学人民医院就诊的 COVID-19 疑似人群 8 274 例, 标本类型包括呼吸道标本 (鼻咽、口咽、痰和肺泡灌洗液) 和非呼吸道标本 (尿、粪便、肛拭子、血液和结膜囊拭子)。以核酸检测结果分组, ORF1ab 及 N 基因同时阳性归为核酸检测阳性组; 同时阴性归为阴性组; 单一基因靶标阳性归为可疑组。以性别分为男性组和女性组。同时对其中 316 例进行非 2019-nCoV 感染的 13 种常见呼吸道病原体多重 PCR 检测。 **结果** 在 8 274 例受检者中, 2 745 例 (33.17%) 2019-nCoV 核酸检测结果为阳性, 5 277 例 (63.77%) 结果为阴性, 252 例 (3.05%) 结果为可疑。2019-nCoV 阳性组和可疑组年龄均高于 2019-nCoV 阴性组 (56 岁>40 岁, $t=27.569$, $P<0.001$; 52 岁>40 岁, $t=6.774$, $P<0.001$)。2019-nCoV 阴性组中其他常见呼吸道病原体核酸阳性率 (18.4%) 高于 2019-nCoV 阳性组其他常见呼吸道病原体核酸阳性率 (5.77%), 差异有统计学意义 ($\chi^2=24.105$, $P=0.003$)。4 种呼吸道标本和 5 种非呼吸道标本均可检出 2019-nCoV 核酸。 **结论** 男性 2019-nCoV 核酸阳性率高于女性, 2019-nCoV 核酸阳性患者会发生合并感染, 非呼吸道标本也存在 2019-nCoV 病毒。

【关键词】 冠状病毒属; 严重急性呼吸综合征; 逆转录聚合酶链反应; 病毒性疾病; 临床实验室技术

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200222-00106

Analysis of 8 274 cases of new coronavirus nucleic acid detection and co-infection in Wuhan

Wang Ming¹, Wu Qing¹, Xu Wanzhou¹, Qiao Bin¹, Wang Jingwei¹, Chen Zhen¹, Zheng Hongyun¹, Jiang Shupeng¹, Mei Junchi¹, Wu Zegang¹, Deng Yayun¹, Zhou Fangyuan¹, Wu Wei¹, Zhang Yan¹, Lyu Zhihua¹, Huang Jingtao¹, Guo Xiaoqian¹, Feng Lina¹, Xia Zunen¹, Li Di¹, Xu Zhiliang³, Liu Tiangang², Zhang Pingan¹, Tong Yongqing¹, Xu Zhiliang³, Li Yan¹

¹Department of Clinical Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China; Key Laboratory of Combinatorial Biosynthesis and Drug Discovery, Ministry of Education and School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;³Department of Paediatrics, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Ming Wang and Qing Wu are contributed equally to the article

Corresponding author: Li Yan , Email : yanlitf1120@163.com ; Xu zhiliang , Email: zlxu-rm@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the positive rate for 2019-nCoV tests and co-infections in Wuhan district. **Methods** A total of 8 274 cases in Wuhan were enrolled in this cross-sectional study during January 20 to February 9, 2020, and were tested for 2019-nCoV using fluorescence quantitative PCR. Both respiratory tract samples (nasopharynx, oropharynx, sputum and alveolar lavage fluid) and non-respiratory tract samples (urine, feces, anal swabs, blood and conjunctival sac swabs) were collected. If both orf1ab and N genes are positive, they are classified as nucleic acid test positive group; if both orf1ab and N genes are negative, they are classified as negative group; if single gene target is positive, they are classified as suspicious group. Individuals were divided into male group and female group according to sex. At the same time, 316 patients were tested for 13 respiratory pathogens by multiplex PCR. **Results** Among the 8 274 subjects, 2 745 (33.2%) were 2019-nCoV infected; 5 277 (63.8%) subjects showed negative results in the 2019-nCoV nucleic acid test; and 252 cases (3.05%) was not definitive (inconclusive result). The age of cases with COVID-19 patients and inconclusive cases was significantly higher than that of cases without 2019-nCoV infection (40 vs 56, $t=27.569$, $P<0.001$; 52 vs 56, $t=6.774$, $P<0.001$). The positive rate of 13 respiratory pathogens multiple tests was significantly lower in 104 subjects who were positive for 2019-nCoV compared with those in subjects who were negative for 2019-nCoV test (5.77% vs 18.39%, $\chi^2=24.105$, $P=0.003$). Four types of respiratory tract samples and five types of non-respiratory tract samples were found to be positive for 2019-nCoV nucleic acid test. **Conclusion** The 2019-nCoV nucleic acid positive rate in male is higher than in female. Co-infections should be pay close attention in COVID-19 patients. 2019-nCoV nucleic acid can be detected in non-respiratory tract samples.

【Key words】 Coronavirus; Severe acute respiratory syndrome; Reverse transcriptase polymerase chain Reaction; Virus diseases; Clinical laboratory techniques

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20200222-00106

自 2019 年 12 月底以来, 新型冠状病毒肺炎在中国武汉暴发并席卷全国, 目前已有 7 万多人感染, 死亡人数超过千人^[1], 且日本、泰国、新加坡、朝鲜等国家均有病例报道^[2]。2020 年 1 月 7 日, 研究人员从一名武汉患者体内成功分离出病毒并进行了全基因组测序^[3-4]。2019-nCoV 属于正冠状病毒亚科的 Sarbecoronavirus 亚属中的一个分支, 与中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 和 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 不同, 是感染人类的冠状病毒家族的第七个成员^[4]。2019-nCoV 感染者的临床特征与 SARS 冠状病毒类似, 均会引起严重呼吸道疾病, 但也有许多不同的特征^[5], 2019-nCoV 病毒更容易传播, 潜伏期更长^[6-7]。JAMA 报道了 Wu 等^[8]的一项中国地区包含 72 314 例病例的统计报告, 其中无症状病例占 1%, 无症状感染者的存在使 2019-nCoV 的传播更为隐匿, 加大了疫情防控的难度。对 2019-nCoV 感染者进行快速检测、准确诊断是疫情防控的关键。JAMA 报道了中国疾病预防控制中心汇总的全国 72 314 例新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 的流行病学特征, 但缺乏 2019-nCoV 合并感染的的数据^[8]。本研究通过分析武汉地区 8 274 例 2019-nCoV 核酸检测受检者的实验室特征及合并感染的情况, 为 COVID-19 的实验室检测及临床治疗提供参考。

对象与方法

一、对象

纳入 COVID-19 暴发初期即 2020 年 1 月 20 日至 2 月 9 日于武汉大学人民医院进行 2019-nCoV 核酸检测的所有受检者共计 8 274 例，男 3 634 例，女 4 640 例。其中新生儿 25 例，儿童 344 例，成人 7 905 例。年龄从 1 天到 105 岁，中位数 46 岁。本研究通过了武汉大学人民医院临床研究伦理委员会的批准（WDRY2020-K061），所有受试者或监护人均签署知情同意书。受检者的 2019-nCoV 开放读码框 1ab（open reading frame, ORF1ab）和核壳蛋白（nucleoprotein, N）基因同时阳性，归为阳性组；受检者以上两种靶标同时阴性归为阴性组；只有一个靶标阳性而被归为可疑组。

二、方法

1. 标本的收集：受检者标本由专业医护人员采集，及时转运至分子病原实验室检测。标本检测前置于 56 °C 灭活 45 min。同时收集了部分非呼吸道标本进行 2019-nCoV 核酸检测。标本类型包括呼吸道标本（鼻咽、口咽、痰和肺泡灌洗液）8 274 份和非呼吸道标本（尿、粪便、肛拭子、血液和结膜囊拭子）175 份；呼吸道标本为临床常规检测标本，非呼吸道标本为尝试性检测标本，不作主要临床诊断依据。

2. 仪器：PCR 仪为美国 Thermo 公司的 Veriti 梯度 PCR 仪、Quantstudio Dx 及 7500 型荧光 PCR 仪，毛细管电泳使用美国 Thermo 公司的 3500Dx 测序仪。

3. 试剂及判断标准：2019-nCoV 核酸检测试剂盒分别为上海捷诺公司、上海伯杰公司、江苏硕世公司、上海辉睿公司和湖南圣湘公司的新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒，以 2019-nCoV 核壳蛋白 N 基因、开放读码框 ORF1ab 为检测靶标。最初使用上海捷诺公司的试剂盒，用其核酸阳性再去筛选其他四种试剂盒；选择阳性率高，且单一基因阳性少的试剂盒作为常规检测试剂盒。13 项呼吸道病原体检测由宁波海尔施基因公司提供。2019-nCoV 核酸检测结果确认为阳性需满足同一份标本中 ORF1ab 及 N 基因双靶标检测结果同时阳性，或两种标本同时出现单靶标阳性，或同类型标本两次单靶标阳性的检测结果，该患者被定义为实验室确认（laboratory-confirmed）^[9]。

4. 2019-nCoV 核酸提取及 RT-PCR 检测：灭活后的样本取 300 μ l，使用半自动核酸提取仪及配套试剂盒提取核酸，核酸检测采用 RT-PCR 法（一步法）检测，检测结果判读以各厂家说明书建议为准，对可疑结果应通知临床重新采样复查。

5. 非 2019-nCoV 呼吸道病原体检测：13 项呼吸道病原体检测项目可用于筛查腺病毒（B 亚群、C 亚群、E 亚群）、博卡病毒、甲型流感病毒（INFA、H7N9、H1N1、H3N2、H5N2）、乙型流感病毒（V 系、Y 系）、冠状病毒（229E、OC43、NL63、HKU1）、偏肺病毒（A1、A2、B1、B2）、副流感病毒（1 型、2 型、3 型、4 型）、呼吸道合胞病毒（A 型、B 型）、鼻病毒（A、B、C）、肺炎支原体、沙眼衣原体、肺炎衣原体等 13 种常见呼吸道病原。核酸提取后对病原核酸进行多重 PCR 扩增，扩增完成后使用测序仪进行毛细管电泳分离不同病原核酸片段，结果判读遵循生产商使用说明。

三、统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理。非正态分布的连续变量以中位数（四分位数）表示，分类变量以百分数表示， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、8 274 例受检者年龄和性别特征

1. 在 8 274 例 2019-nCoV 核酸受检者中，年龄经 Shapiro-Wilk 检验为非正态分布，中老年者居多。2019-nCoV 核酸检测结果阳性为 2 745 例（33.17%），阴性为 5 277 例（63.77%），

可疑为 252 例 (3.05%)。2019-nCoV 核酸阳性年龄中位数为 56 岁, 可疑组年龄中位数为 52 岁, 阴性年龄中位数为 40 岁, 其前二组人群高于后一组人群 ($t=-27.569$, $t=-6.774$, P 均 <0.001)。男性阳性率 35.99%, 高于女性阳性率 30.97%, 差异具有统计学意义 ($\chi^2=234.803$, $P<0.001$)。结果见表 1。

表 1 武汉地区 2019-nCoV 核酸受检者年龄、性别特征

组别	例数	男/女	中位数年龄 (四分位数, 岁)	年龄分布 (例, %)			
				<15 岁	15~<45 岁	45~<65 岁	≥65 岁
阳性组	2 745	1 308/1 437	56 (40~<67)	28 (1.02)	823 (29.98)	978 (35.63)	916 (33.37)
阴性组	5 277	2 214/3 063	40 (29~56)	181 (3.43)	2 801 (53.08)	1 577 (29.88)	718 (13.61)
可疑组	252	112/140	52 (33~68)	4 (1.59)	95 (37.70)	78 (30.95)	75 (29.76)
合计	8 274	3 634/4 640	46 (31~62)	213 (2.57)	3 719 (44.95)	2 633 (31.82)	1 709 (20.66)
χ^2 值		23.803	675.476			629.772	
P 值		<0.001	<0.001			<0.001	

二、2019-nCoV 合并其他呼吸道病原体感染情况分析

对 316 例受检者同时检测了 13 种其他常见呼吸道病原体核酸。2019-nCoV 核酸阳性的受检者 104 例, 2019-nCoV 核酸阴性的受检者 212 例。在 2019-nCoV 核酸阳性的受检者中, 13 种其他常见呼吸道病原体合并感染者占 5.77%。2019-nCoV 核酸阳性的受检者感染其他呼吸道病原体比例低于 2019-nCoV 核酸阴性者, 差异有统计学意义 ($5.77% > 18.4%$, $\chi^2=24.105$, $P<0.001$), 结果见表 2。

表 2 2019-nCoV 核酸检测阳性组与阴性组呼吸道病原体检出情况 (例, %)

2019-nCoV 核酸检测	例数	甲型流感病 毒	甲流 H3N2 型	鼻病毒	呼吸道合 胞病毒	乙型流感 病毒	偏肺病毒	冠状病毒 (普通型)	合计
阳性组	104	2 (1.94)	1 (0.96)	2 (1.94)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (2.88)	6 (5.77)
阴性组	212	12 (5.66)	12 (5.66)	10 (4.72)	7 (3.30)	6 (2.83)	4 (1.89)	2 (0.94)	39 (18.39)

三、不同类型样本 2019-nCoV 核酸检出情况

对多种呼吸道标本和非呼吸道的标本进行 2019-nCoV 核酸的检测, 结果发现, 8 274 份呼吸道标本 (鼻咽、口咽、痰和肺泡灌洗液) 和 175 份非呼吸道标本 (尿、粪便、肛拭子、血液和结膜囊拭子) 中均可检出 2019-nCoV 核酸阳性, 见表 3。

表 3 2019-nCoV 患者不同类型标本核酸检出情况

标本类型	总数 (份)	2019-nCoV 阳性 (份, %)
呼吸道标本	8 274	2 745 (33.17)
鼻咽+口咽双拭子	3 127	647 (20.69)
鼻咽拭子	4 992	2 047 (41.01)
口咽拭子	48	23 (47.92)
痰液	102	25 (24.51)
肺泡灌洗液	5	3 (60.00)
非呼吸道标本	175	24 (13.71)
尿	54	4 (7.41)
粪便	38	10 (26.32)

肛拭子	23	8 (34.78)
血液	34	1 (2.94)
结膜囊拭子	26	1 (3.85)

讨 论

对于 2019-nCoV 核酸阳性率,本研究发现在 8 274 例核酸受检者中,2 745 例(33.17%) 2019-nCoV 核酸检测阳性,5 277 例(63.77%)阴性,252 例(3.05%)由于只有一个靶标基因阳性而归为可疑。初次检测仅一个靶基因阳性的检测结果,是一种值得关注的情况。从临床检验的角度来看,可能有以下原因:(1)样本采集问题。样本的好坏会极大影响临床检测结果。首先,关于样本种类,一般公认下呼吸道样本检出率高于上呼吸道样本;其次,关于耗材,应选用柔韧的鼻咽拭子,这种拭子可随鼻咽部的生理弯曲而改变形状,从而深入到鼻咽部采样,有利于采集到病毒含量更高的样本。再次,关于操作人员,应充分培训并考核采样人员,指定经验丰富的专门人员采集样本。最后,关于环境,取样时应确保环境清洁,避免所采样本受到环境中 2019-nCoV 的污染。(2)样本前处理问题。需选择合适的样本提取方案,确保所提取的 RNA 浓度和纯度达标,部分厂家提供一步法提取试剂盒能快速裂解细胞及病毒释放核酸,进而快速构建反应体系,以期简化操作,提高检测效率,但在实际应用效果有待商榷,检出率相较磁珠法提取要低,值得关注。(3)检测问题。需注意检测试剂盒投用前应进行最基本的性能评估,本研究中涉及多种试剂盒,每种试剂盒的检测效能各不相同,这也是本研究的不足之处;此外,试剂入库验收及保存是否规范,PCR 仪是否及时校准,老化光源是否及时更换等也会对检测结果有一定影响。(4)方法学限制。所检测的基因位点和结果的解读可能有改进的空间。

对于 2019-nCoV 核酸阳性率与年龄性别的关系,本研究发现男性核酸阳性率(35.99%)高于女性(30.97%)。2019-nCoV 核酸检测阳性组年龄中位数为[56(40~67)岁],相比早期报道的 425 例患者年龄相近[59(15~89)岁]^[10]。本研究中 2019-nCoV 核酸检测阳性组与可疑组的中位数年龄十分相近,均显著高于非 2019-nCoV 组,提示年龄是 2019-nCoV 感染的一个高危因素。

对于合并感染,本研究中发现在 316 例 2019-nCoV 核酸阳性患者中,存在其他呼吸道病院合并感染者占 5.77%。Chen 等^[11]研究了 99 例 2019-nCoV 感染患者,发现 1 例(1%)合并细菌感染,4 例(4%)合并真菌感染,由此对临床检测提出了新的检测病原体的要求。针对非 2019-nCoV 感染的病原体检测本研究开展了 13 种呼吸道病原体筛查,通过筛查发现 2019-nCoV 核酸阳性患者能检出其他呼吸道病毒核酸,暗示着可能存在其他病原体的合并感染。这些合并感染的病原体有普通型冠状病毒,甲型流感病毒和鼻病毒;因而在诊断 COVID-19 的同时,还要关注其他病毒的检测与诊断。

对于不同类型的样本,本研究发现常见的呼吸道标本如鼻咽拭子、口咽拭子、痰、肺泡灌洗液和非呼吸道标本如血液、尿液、粪便、肛拭子、结膜囊拭子均可检出 2019-nCoV 核酸。不同样本类型为 2019-nCoV 核酸检测提供了多样化的样本取材途径,但对每种样本类型的检测效能(阳性率、阴性率、假阳性率、假阴性率等)有待进一步评估;非呼吸道标本 2019-nCoV 核酸检测阳性结果提示尿液、粪便、血液和结膜分泌物等均存在潜在的传染性,可能成为新的传播途径。

综上所述,我们分析了 8 274 例受检者的实验室检测数据,提供了 2019-nCoV 核酸检测的实验室特征。有 3.05%的受检者无法明确诊断,5.77%的 2019-nCoV 核酸阳性患者合并有其他呼吸道感染。一方面,临床上应该重视可能存在合并感染,另一方面临床检验需要开发更好的检测手段,以减少可疑患者,可以同时筛查与呼吸道疾病相关的多种病原体,为临床疾病的诊断提供更准确的诊疗依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Young BE, Ong S, Kalimuddin S, et al. Epidemiologic Features and Clinical Course of Patients Infected With SARS-CoV-2 in Singapore[J]. JAMA, 2020, DOI: 10.1001/jama.2020.3204.
- [2] World Health Organization. Novel coronavirus (COVID-19) situation [EB/OL]. (2020). <http://who.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/c88e37cfc43b4ed3baf977d77e4a0667>.
- [3] Armstrong GL, MacCannell DR, Taylor J, et al. Pathogen Genomics in Public Health[J]. N Engl J Med, 2019, 381(26):2569-2580. DOI: 10.1056/NEJMSr1813907.
- [4] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019[J]. N Engl J Med, 2020, 382(8):727-733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- [5] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. Lancet, 2020, 395(10223):497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- [6] Chan JF, Yuan S, Kok KH, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster[J]. Lancet, 2020, 395(10223):514-523. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30154-9.
- [7] Guan WJ, Ni ZY, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China[J]. N Engl J Med, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2002032.
- [8] Wu Z, McGoogan JM. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention[J]. JAMA, 2020, DOI: 10.1001/jama.2020.2648.
- [9] 中国疾病预防控制中心. 新型冠状病毒核酸检测引物和探针序列 [EB/OL]. http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html.
- [10] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, DOI: 10.1056/NEJMoa2001316.
- [11] Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study[J]. Lancet, 2020, 395(10223):507-513. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.

(收稿日期: 2020-02-22)

(本文编辑: 唐栋)