doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.04.020

· 综述 ·

浅谈儿童新型冠状病毒肺炎的核酸检测

谭俊杰,何晓燕,邹琳(重庆医科大学附属儿童医院,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童健康与疾病研究教育部重点实验室,重庆市儿科学重点实验室,重庆 400014)

[中图分类号]R446.1 [文献标识码]A [文章编号]1672-108X(2020)04-0063-03

Discussion of Nucleic Acid Detection on Corona Virus Disease 2019 in Children

Tan Junjie, He Xiaoyan, Zou Lin (*Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China*)

2019 年 12 月首发于湖北省武汉市的新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019,COVID-19)疫情火速蔓延,并迅速扩散,2020 年 2 月 11 日国际病毒学分类委员会正式将新型冠状病毒命名为严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)[1]。2020 年 2 月 2 日,国家卫生健康委员会发布的《关于做好儿童和孕产妇新型冠状病毒感染的肺炎疫情防控工作的通知》中明确指出,儿童和孕产妇是 COVID-19 的易感人群。为了更好地指导和规范全国 COVID-19 的诊治工作,国家卫生健康委员会发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》将核酸检测和基因测序作为 COVID-19 的确诊依据。

但在临床诊疗过程中,临床医师不断反映 SARS-CoV-2 核酸检测阳性率低、重复检测多次阴性后才出现阳性结果、咽拭子标本多次检测阴性但最后在呼吸道灌洗液标本中检测出阳性结果、CT 影像筛查出现 COVID-19 特征但核酸检测阴性等问题。综合现有文献与临床实践中的心得,本文重点就利用实时荧光逆转录-聚合酶链扩增反应技术(RT-PCR)检测儿童 SARS-CoV-2 核酸作一综述。

1 SARS-CoV-2 的生物学特征

冠状病毒是一种常见的、易引发呼吸道疾病的病原体。根据血清型和基因组特点,冠状病毒亚科分为 4 个属:α-冠状病毒、β-冠状病毒、γ-冠状病毒和 δ-冠状病毒。目前发现的新型冠状病毒属于 β 属[2]。

2 SARS-CoV-2 感染的流行病学特征

传染源:主要是 SARS-CoV-2 感染患者,无症状感染者也可能成为传染源[3]。

传播途径:呼吸道飞沫传播和接触传播是主要传播途径,气溶胶和消化道传播途径尚待明确,不排除存在母婴垂直传播。

易感人群:人群普遍易感,有明显的聚集性传播特征。

潜伏期:根据对我国 31 个省份的病例分析,发现 SARS-CoV-2 感染潜伏期最短是 0 d,最长是 24 d,中位数为 3 d[4]。

3 儿童 SARS-CoV-2 感染的临床特征

COVID-19 最常见症状是发热、咳嗽和乏力,但对儿童的临床症状与特征描述较少[4]。儿童仍以发热、干咳、咽部不适为主,部分伴有乏力、肌痛、鼻塞、流涕、头晕、呕吐、腹痛、腹泻等表现,少数患儿可以无发热,仅表现为咳嗽或腹泻,极少数患儿可以无任何症状仅为病毒携带者。患儿绝大多数出现发热症状,热程多为 2~3 d,最长 8 d。从目前报道的儿童病例中,大部分起病症状轻,病程短,恢复较快,多在 1 周后恢复,预后良好;极少数患儿特别合并某些基础疾病时,可迅速进展为重症甚至危重症型[5]。

4 诊断标准

4.1 临床表现

发热是目前常见的症状之一。发热患儿无论有无明确/可疑 SARS-CoV-2 感染者接触史,均应进行筛查。易发生家族聚集性发病,有研究报道了 9 例 1 岁以下感染 SARS-CoV-2 婴儿的临床特征,4 例出现发热,其共同点是家人中均有 SARS-CoV-2 感染者[6]。

4.2 血常规及生化检查

儿童 SARS-CoV-2 感染者大多数外周血白细胞计数和淋巴细胞绝对计数正常,少数可出现白细胞计数减少,T 淋巴细胞绝对计数减少,T 淋巴细胞亚群也有降低,C 反应蛋白正常或轻度升高,部分可出现肝酶、肌酶增高。

4.3 核酸检测

患者呼吸道样本、尿液、大便等中可检测出 SARS-CoV-2 核酸[7]。

4.4 影像学检查

成人胸部 CT 早期呈现多发小斑片影及间质改变,以肺外带明显。进而发展为双肺磨玻璃样密度影或浸润性病变,严重者可出现肺实变,胸腔积液少见。但儿童轻症感染病例胸部 CT 可以无明显异常病变,其影像学特点还需更多病例总结。

5 儿童 SARS-CoV-2 核酸检测

已有文献对 SARS-CoV-2 核酸的检测原理、实验步骤、质量控制、生物安全防护等进行详尽描述[7-8],本文仅就涉及儿童 COVID-19 病例的 RT-PCR 核酸检测重点内容进行阐述。

作者简介:谭俊杰(1981.09-),男,硕士,助理研究员,主要从事病原体分子诊断研究,E-mail:11602368@qq.com。
通讯作者:邹琳(1974.07-),女,博士,研究员,主要从事儿童肿瘤及代谢疾病研究,E-mail:zoulin74@126.com。

5.1　检测条件

根据国家卫健委诊疗规范[3]要求，开展 SARS-CoV-2 核酸检测必须在二级及以上生物安全实验室内完成，检测操作人员按照三级生物安全防护，样本按照传染性、高致病性样本进行运输、储存与检测后处理[8]。

5.2　检测原理与方法

根据 SARS-CoV-2 的核糖核酸（RNA），设计病毒相应特异基因 ORF1ab 和 N 基因保守序列的引物，通过实时荧光 RT-PCR 方法，检测与确认样本中是否存在 SARS-CoV-2 核酸。

5.3　取样

收集疑似病例呼吸道或其他类型样本[7]进行检测，各种不同类型的样本比较见表 1。

表 1　儿童 SARS-CoV-2 核酸检测的样本比较

样本类型		取样部位	推荐采样管	优点	缺点
上呼吸道样本	口咽拭子	扁桃体两侧	植绒拭子	无创、取样简便	取材部位和手法不当可能导致假阴性
	鼻咽拭子	鼻咽腔后壁	植绒拭子	无创、取样简便	取材部位和手法不当可能导致假阴性
下呼吸道样本	痰液	患者自行咳出	生理盐水密闭瓶	无创、取样简便	有气溶胶污染可能、部分患者无法获得
	肺泡灌洗液	肺部插管抽取	生理盐水密闭瓶	阳性率较高	有创，操作要求高
其他样本	大便（肛拭子）	可自行采集	植绒拭子	无创，操作简便	阳性率较低
	尿液	可自行采集	干燥密闭瓶	无创，操作简便	阳性率较低
	血液	全血或血清	EDTA 抗凝	操作简便	阳性率较低

根据文献报道与《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第六版）》，可增加肛拭子作为检测样本，尽可能留取痰液，实施气管插管患者采集下呼吸道分泌物提高检测阳性率。但需特别提醒的是，儿童在实际采样过程中，因为年龄小，存在不配合的情况，要事先做好儿童的情绪安抚和心理疏导。

5.4　核酸提取

目前核酸提取的方法主要有手工法和自动提取法（仪器法），自动提取法的效率要优于手工法。不同提取试剂和提取流程对提取到的核酸数量和质量存在差别，从而直接影响到后续的检测结果，推荐使用与检测试剂配套的提取方法和试剂[9]，有条件者可对所提取的核酸进行质量与含量检测。

5.5　核酸检测

由于本次疫情的特殊性，研发时间紧迫，某些商品化的试剂研发未能完成性能评价，无法获得一定数量临床患者标本的验证。对于临床某些高度疑似病例，或检测结果难以确定的病例，建议用 2 种以上品牌的试剂进行平行检测与验证[9]。

5.6　样本检测后处理

严格防止样品核酸和核酸扩增产物污染环境造成检测假阳性，扩增完成后须用 75% 酒精对房间进行擦拭，并用过氧化氢对空气进行消毒。所有实验室一次性耗材与扩增产物均浸泡于含 500 mg/L 有效氯消毒液中，浸泡时间≥1 h，浸泡后用医疗废物包装袋装好并扎紧，经高压后按医疗废物处理[7-8]。

5.7　质量控制

检测过程中，严格实验室质量控制，每次实验均需包括试剂对照、阴性对照和阳性对照。阴性对照可选用无菌水，每天实验结束后配制 3～5 份无菌水（2 mL 试管加入无菌水）分别放置于标本制备区和扩增区，用于实验室污染控制。阴性对照和质控品均应与标本平行操作。需满足以下任一条：（1）ORF1ab 和 N 基因同时阳性时，判定为阳性；（2）若仅 ORF1ab 或 N 基因其中之一检测结果阳性时，需重新提取原标本的核酸进行复查，复查后 ORF1ab 或 N 基因仍为阳性时，判定为阳性。并及时参加国家与省市级室间质评项目，用以评价实验室质量控制体系。

6　检测中需要注意的问题

6.1　提高儿童 COVID-19 检测阳性率

SARS-CoV-2 核酸检测是 COVID-19 确诊的金标准和早期筛查的最佳手段，核酸检测结果阴性是解除隔离和治愈评价的标准[3]，但由于标本采集部位及操作手法、运输方式不当导致核酸降解以及实验室操作等多种因素的影响，目前在疫区，确诊患者也仅 30%～50% 的阳性率。提高患者检测阳性率，尤其对儿童患者，应注意以下几方面。

（1）样本采集与保存：对临床高度疑似患者，应连续多次、且每次至少间隔 24 h 采集标本进行核酸检测；在患者的不同病程进行采样送检；同一患者同次可进行多部位采样，肺泡灌洗液优于鼻咽拭子与口咽拭子，且可以同时采集鼻咽拭子与口咽拭子；多种不同类型的样本采集与检测，尽快送检。若不能及时送检，样本必须放病毒保存液内 2～8 ℃储存，不超过 12 h，否则放−70 ℃保存。

国家卫生健康委员会相关指南要求在提取样本核酸前需将样本置于 56 ℃以上以灭活病毒，但也有文献指出，与不经灭活的对照组比较，高温灭活会促进样品内的病毒核酸的降解，从而导致样品中的病毒核酸数量不足，最终导致部分样品出现假阴性。建议加紧研发保护新冠病毒核酸免受高温灭活损坏的样品保存液，提高新冠病毒核酸的可检出量[10]。目前因缺乏来自 SARS-CoV-2 的直接证据，需进一步在临床检测中验证。

（2）检测方法：可加快研发灵敏度更高的检测手段如数字 PCR 等检测技术。

（3）核酸提取质量：建议采用与检测试剂配套的核酸提取试剂和仪器，对所提取到的核酸，有条件者可先进行核酸质量与浓度的测定。

6.2　与其他病毒感染鉴别

有研究发现，在 316 例患者中，5.8% 的 SARS-CoV-2 感染者和 18.4% 的非 SARS-CoV-2（主要包括流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、人偏肺病毒、SARS 冠状病毒等）感染者发生了合并感染，需与其他引起上呼吸道感染的病毒相鉴别[11]，还需与其他已知病毒性肺炎、支原体肺炎、衣原体肺炎及细菌性肺炎等鉴别。此外，还要与非感染性疾病，如血管炎、皮肌炎和机化性肺炎等鉴别。新生儿还需要与肠道病毒、单纯疱疹病毒等病毒感染，无乳链球菌、大肠埃希菌等细菌感染以及围生期缺氧等引起持续性肺动脉高压造成的低氧性呼吸衰竭相鉴别。严重呼吸暂停引起间歇性低氧或明

显咳嗽的新生儿还需要考虑新生儿百日咳的可能性。多种检测方法联用,可从核酸水平对不同病原体进行鉴别诊断,从而确定患儿感染病原体类别,以方便临床诊断。因不同病原体的核酸序列不相同,从分子水平可将其准确地鉴别,从而保证不同病原体包括 SARS-CoV-2 核酸检测的准确性和专一性。

6.3 多种实验室核酸检测方法联用

多种呼吸道感染病原体 PCR 多重检测技术[12]、CRISPR-Cas 基因编辑[13]等技术的联合应用有利于及时、准确地鉴别呼吸道疾病、排查 COVID-19。还可引入宏基因组测序等技术手段,提升复杂样本核酸检测灵敏度,追踪监测病毒在传播过程中可能会发生的变异情况。

由于儿童群体普遍免疫能力相对较低的特殊性,包括流感病毒在内的各种呼吸道疾病相关病原体的感染可能性均高于成人,单从临床表现、胸部影像学、抗体类检测项目难以鉴别,需依靠多种技术手段鉴别病原,尤其是鉴别流感病毒和新冠病毒。因此,综合临床表现、实验室检查、胸部影像学与核酸检测来判断,对于儿童 COVID-19 的诊断至关重要。

参考文献:

[1] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

[2] 国家卫生健康委员会. 截至 2 月 7 日 24 时新型冠状病毒肺炎疫情最新情况[EB/OL]. (2020-02-08) [2020-02-09]. http://www.nhc.gov.cn/.

[3] 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) [S/OL]. [202-02-19]. http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/ 202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml.

[4] GUAN W J, NI Z Y, HU Y, et al. Clinical characteristics of 2019 novel coronavirus infection in China [J]. MedRxiv preprint, 2020. doi: 10.1101/2020.02.06.20020974.

[5] 中华医学会儿科学分会, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童 2019 新型冠状病毒感染的诊断与防治建议(试行第一版) [J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(3). doi: 10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2020.0004.

[6] WEI M, YUAN J, LIU Y, et al. Novel corona virus infections in hospitalized infants under 1 year of age in China [J]. JAMA, 2020. doi: 10.1001/jama.2020.2131.

[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]. 中华检验医学杂志, 2020, 100: E003. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.0003.

[8] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[S/OL]. [2020-01-23]. http://www.nhc.gov.cn/qjjys/s7948/202001/ 0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml.

[9] 王成彬. 对新型冠状病毒核酸检测阳性率低的一点看法[EB/OL]. [2020-02-11]. http://kuaibao.qq.com/s/20200211A08GDL00?refer=spider

[10] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎防控方案(第五版) [S/OL]. [2020-02-07]. http://www.gov.cn:8080/zhengce/2020-02/22/ content_5482011.htm.

[10] 张沁欣, 赵庆顺. 病毒核酸提取前的高温灭活过程显著降低可检出病毒核酸模板量[J/OL]. ChinaXiv: 2020. doi: 10.12074/202002.00034.

[11] WANG M, WU Q, XU W Z et al. Clinical diagnosis of 8,274 samples with 2019-novel coronavirus in Wuhan [J]. medRxiv, 2020. doi: https://doi.org/ 10.1101/2020.02.12.20022327.

[12] West China Hospital: COVID-19 diagnosis can be done in just 10 minutes with a single drop of blood [EB/OL]. [2020-02-24]. http://en.scu.edu.cn/info/1065/3515.htm.

[13] A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics [EB/OL]. [2020-02-16]. https://broad.io/sherlockprotocol.

(编辑:杨丹)
(收稿日期:2020-02-28)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.04.021

· 经验交流 ·

1 例轻症新型冠状病毒肺炎婴儿用药方案分析

焦守峰,杨文,潘德城 (南昌大学第一附属医院,江西南昌 330006)

[中图分类号]R725.1 [文献标识码]B [文章编号]1672-108X(2020)04-0065-02

新型冠状病毒肺炎(corona virus disease 2019,COVID-19)是由严重急性呼吸综合征冠状病毒 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)感染导致的肺炎。潜伏期多为 3~7 d,轻症主要表现为发热、乏力、干咳,重症多表现为呼吸困难/低氧血症,甚至危及生命[1]。据指南[2-3]报道,儿童 COVID-19 病例症状相对较轻,但考虑到儿童用药的特殊性,临床对治疗方案和用药的选择必须慎重。本研究对 1 例轻症 COVID-19 婴儿治愈病例的药物治疗过程进行分析,旨在为相似病例的药物治疗提供参考。

1 病例资料

患儿,女,7 个月,与疑似 COVID-19 家属接触,连续 2 d 出现发热、流清涕、咳嗽、喉中痰鸣等症状,无药品过敏史。行胸部 CT 示肺炎(见图 1),新型冠状病毒核酸检测阳性,立即收治入院隔离治疗。住院期间给予抗病毒、抗感染、化痰等对症治疗后病情逐渐好转,无发热,无咳嗽咳痰,胸部 CT 明显好转(见图 2),经两次新型冠状病毒 N 基因检测阴性。即解除隔离予以出院,嘱居家医学观察 14 d,定期复查。

作者简介:焦守峰(1990.01-),男,硕士,主管药师,主要从事临床药学工作,E-mail: jiao0109@yeah.net。