

DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20206327

· 论 著 ·

15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本新型冠状病毒核酸检测结果比较

李宝林¹, 李 芹², 吴 刚², 曾章锐¹, 黄富礼², 詹小亭¹, 唐 敏¹, 刘靳波¹

(西南医科大学附属医院 1. 医学检验部; 2. 传染科, 四川 泸州 646000)

[摘 要] **目的** 探讨粪便样本作为疑似或确诊新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者筛查的可行性。**方法** 利用 Real Time RT-PCR 技术, 对 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本中新型冠状病毒的 ORF1ab、N 基因以及人体细胞管家基因核糖核酸酶 P(ribonuclease P, RNase P)进行检测, 比较痰、粪便标本检测阳性情况。**结果** 15 例患者痰、粪便标本, 人体细胞管家基因 RNase P 均呈现典型的明显的扩增信号曲线。新型冠状病毒核酸检测, 2 例患者痰、粪便标本同时为阳性, 4 例患者痰、粪便标本分别为阳性; 6 例患者痰阳性标本中有 2 例同时扩增出 ORF 1ab 基因与 N 基因, 6 例患者粪便阳性标本中有 4 例同时扩增出 ORF 1ab 基因与 N 基因。**结论** 以呼吸道标本新型冠状病毒核酸检测阴性作为排除 COVID-19 及治愈标准在实施过程中需谨慎, 可以尝试将粪便标本新型冠状病毒核酸检测阴性也纳入其中。

[关 键 词] 新型冠状病毒肺炎; 新型冠状病毒; 痰; 粪便; 标本; 核酸检测; COVID-19; SARS-CoV-2

[中图分类号] R183

Comparison of 2019-nCoV test results of sputum and fecal specimens of 15 patients with COVID-19 after treatment

LI Bao-lin¹, LI Qin², WU Gang², ZENG Zhang-rui¹, HUANG Fu-li², ZHAN Xiao-ting¹, TANG Min¹, LIU Jin-bo¹ (1. Department of Laboratory Medicine; 2. Department of Infectious Diseases, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the feasibility of fecal specimens for screening coronavirus disease 2019 (COVID-19) suspected or confirmed patients. **Methods** Novel coronavirus (2019-nCoV, SARS-CoV-2) ORF1ab, N gene and human cell housekeeping gene ribonuclease P (RNase P) in sputum and faecal specimens of 15 patients with COVID-19 after treatment were detected by real time RT-PCR, positive rates of sputum and faecal specimens were compared. **Results** Among sputum and faecal specimens of 15 patients, human cell housekeeper gene RNase P all showed typical and obvious amplification signal curve. Two patients were both positive for 2019-nCoV nucleic acid test of sputum and faecal specimens, while 4 patients were only sputum or fecal specimens positive respectively; among sputum positive specimens of 6 patients, only 2 were amplified ORF 1ab gene and N gene simultaneously, among fecal positive specimens of 6 patients, only 4 were all amplified ORF 1ab gene and N gene simultaneously. **Conclusion** Negative detection result of 2019-nCoV nucleic acid test of respiratory tract specimens as criterion for excluding and curing COVID-19 should be prudent, negative detection result of 2019-nCoV nucleic acid test for fecal specimens can be considered.

[Key words] coronavirus disease 2019; COVID-19; 2019-nCoV; sputum; faeces; specimen; nucleic acid test; SARS-CoV-2

[收稿日期] 2020-02-17

[基金项目] 四川省卫健委项目(16PJ570)

[作者简介] 李宝林(1986-), 男(汉族), 山西省大同市人, 硕士, 主要从事基因诊断研究。李芹为共同第一作者。

[通信作者] 刘靳波 E-mail: liujb7203@163.com

2019 年 12 月在中国湖北省武汉市出现新型冠状病毒肺炎病例,被发现人传人,疫情迅速向其他省份蔓延^[1-2]。新型冠状病毒感染的暴发已经成为一个公共卫生问题^[3],对新型冠状病毒的检测也迫在眉睫。促进公共卫生干预的首要优先事项之一是可靠的实验室诊断,RT-PCR 是目前已经证明最可靠、最成熟的技术^[4-6]。2020 年 2 月 11 日国际病毒分类委员会将新型冠状病毒正式命名为 SARS-CoV-2,并认定这种病毒是 SARS 冠状病毒的姊妹病毒。目前针对 SARS-CoV-2 的检测试剂主要有两种,一种是基于免疫检测患者血液中的 IgG 与 IgM,另一种是检测患者呼吸道标本中 SARS-CoV-2 核酸。在《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版)》^[7]中阐述病例诊断需具备病原学特征之一:(1)呼吸道标本或血液标本实时荧光定量 PCR 检测 SARS-CoV-2 核酸阳性;(2)呼吸道标本或血液标本病毒基因测序,与已知的 SARS-CoV-2 高度同源。因此,准确、及时的病原学核酸检测已成为诊断 SARS-CoV-2 感染的重要环节。

目前临床上常用的标本来源有:上呼吸道标本最常见的有口咽拭子和鼻咽拭子等,其中以口咽拭子为主;下呼吸道标本有深咳痰、呼吸道抽取物、支气管灌洗液、肺泡灌洗液和肺组织活检标本等,其中以深咳痰为主。据不同检测机构及已开展 SARS-CoV-2 核酸检测情况来看,口咽拭子检出率最低,深咳痰检出率相对较高,但是取样相对困难。为更好的平衡取样便捷性与阳性检出率,同时考虑患者容易接受的样本来源,本研究对已经确诊治疗后的 15 例新型冠状病毒肺炎(COVID-19)患者深咳痰和粪便标本进行核酸检测,探讨粪便标本作为其疑似或确诊患者筛查的可行性。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2020 年 2 月 11—13 日送至西南医科大学附属医院医学检验部的 15 例 COVID-19 患者治疗后的痰、粪便标本。

1.2 SARS-CoV-2 RNA 的提取

1.2.1 痰 SARS-CoV-2 RNA 的提取 取 3 倍于痰体积的 4% NaOH 溶液,加入痰采集管中液化 30 min,液化过程中每 10 min 振荡一次,直至样本无拉丝。取 1 mL 液化后样本 13 000 rpm 离心 10 min,弃上清后用生理盐水洗涤,13 000 rpm 离心 10 min,留取 300 μ L 上清,弃除多余的上清后将剩

余的 300 μ L 上清与沉淀混匀,将混合物吸入到 EX3600 核酸自动提取仪配套的核酸提取预装板 A 孔中(一次性可以提取 36 个标本),将预装版置于设备固定位置,启动核酸提取程序提取核酸(上海之江)。

1.2.2 粪便 SARS-CoV-2 RNA 的提取 利用 PowerMicrobiome™ RNA Isolation Kit 粪便 RNA 提取试剂盒(凯杰,德国,货号:26000-50),提取粪便中 SARS-CoV-2 核酸。

1.3 SARS-CoV-2 基因扩增 采用湖南圣湘新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测试剂盒检测痰、粪便标本中 SARS-CoV-2 核酸。SARS-CoV-2 扩增的基因为 ORF 1ab 基因和 N 基因,对应扩增通道为 FAM 和 ROX,内标通道 VIC 检测人体细胞 RNase P。

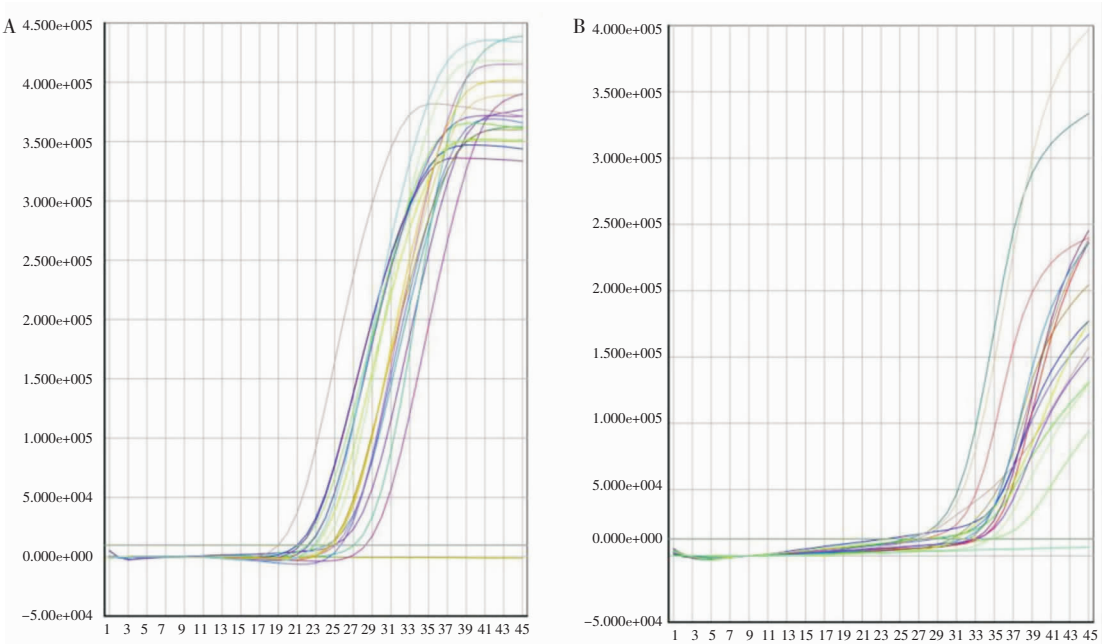
1.4 核酸扩增设备及结果判读 采用 ABI7500 扩增 SARS-CoV-2 靶基因核酸,扩增程序如下:逆转录,50℃ 30 min;预变性,95℃ 1 min;变性,95℃ 15 s;退火、延伸及荧光检测,60℃ 31 s,45 个循环;仪器冷却,25℃ 10 s。判断标准:FAM 或 ROX 通道检测到典型的 S 型扩增曲线,Ct $\leq$ 40,内标 Ct $\leq$ 40 的样本可判读为阳性;FAM 和 ROX 通道均未检测到典型的 S 型扩增曲线,或 Ct $>$ 40,VIC 通道有扩增曲线,且 Ct $\leq$ 40 的样本,结果判读为阴性。

2 结果

2.1 标本人体细胞 RNase P 扩增情况 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本中,人体细胞 RNase P 均呈典型的明显的扩增曲线,但痰标本中 RNase P 基因扩增曲线信号明显强于粪便标本,Ct 值也均低于粪便标本。见图 1、表 1。

2.2 不同标本来源 SARS-CoV-2 核酸的扩增曲线

15 例患者治疗后,痰、粪便标本中均有 6 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性。病例 1、5、10、11、12 的痰、粪便标本 SARS-CoV-2 核酸扩增均为阴性,病例 6、8 的痰、粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测均为阳性,病例 3、4、7、13 的痰标本 SARS-CoV-2 核酸检测为阳性,病例 2、9、14、15 的粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测为阳性,见表 2。患者痰、粪便阳性标本 SARS-CoV-2 核酸扩增曲线见图 2、3,6 例患者痰阳性标本中有 2 例同时扩增出 ORF 1ab 基因与 N 基因(见图 2),6 例患者粪便阳性标本中有 4 例同时扩增出 ORF 1ab 基因与 N 基因,见图 3。



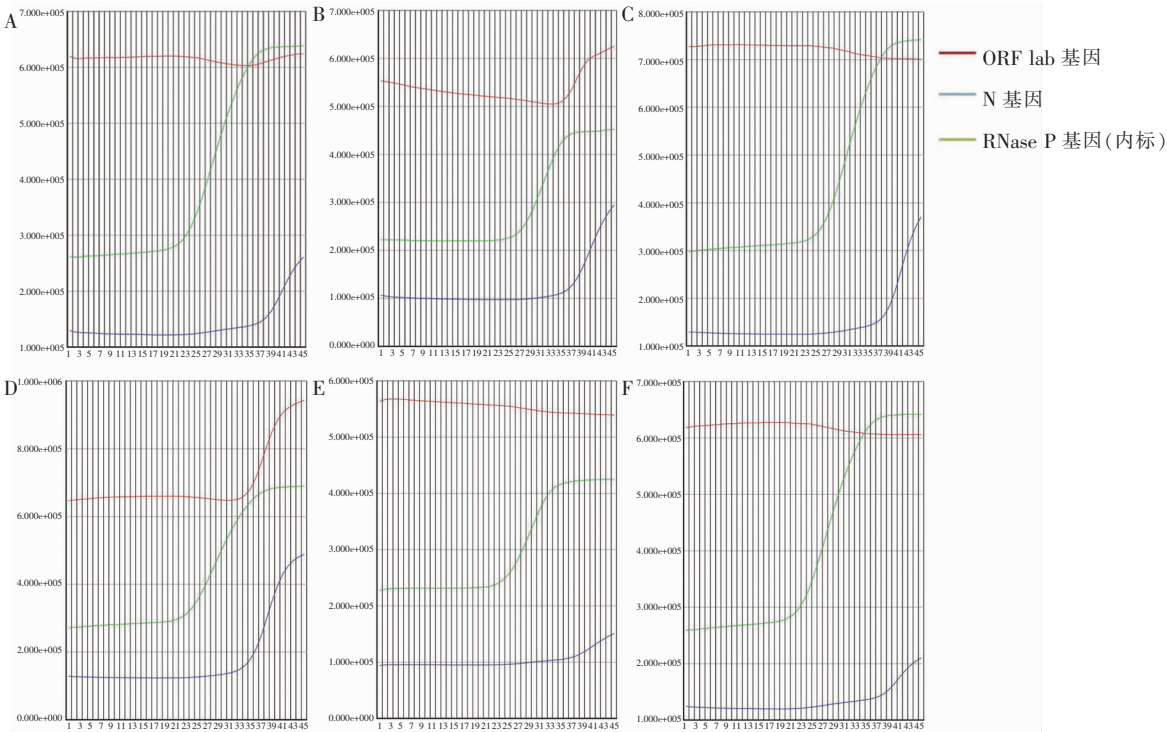
A:痰标本;B:粪便标本。

图 1 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便中管家基因 RNase P 的扩增曲线图

Figure 1 Amplification curve of RNase P gene in sputum and feces of 15 patients with COVID-19 after treatment

表 1 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本中相关基因检测 Ct 值

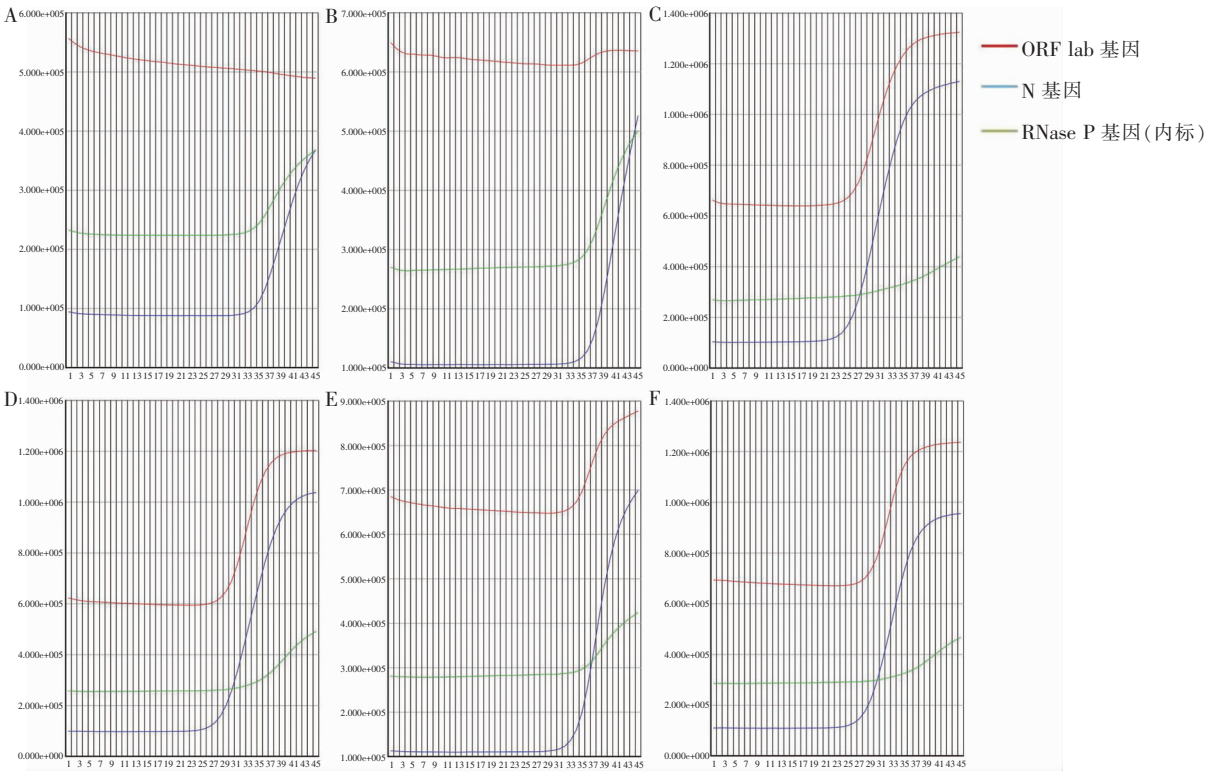
Ct 值					Ct 值				
病例	标本类型	VIC (RNase P)	FAM (ORF 1ab)	ROX (N)	病例	标本类型	VIC (RNase P)	FAM (ORF 1ab)	ROX (N)
1	痰	28.28	—	—	9	痰	25.09	—	—
	粪便	34.97	—	—		粪便	31.35	28.68	27.87
2	痰	24.44	—	—	10	痰	21.32	—	—
	粪便	33.13	—	36.32		粪便	27.58	—	—
3	痰	21.19	—	38.56	11	痰	22.96	—	—
	粪便	30.86	—	—		粪便	34.01	—	—
4	痰	22.79	34.27	31.81	12	痰	25.63	—	—
	粪便	37.53	—	—		粪便	33.27	—	—
5	痰	24.48	—	—	13	痰	21.04	—	39.46
	粪便	33.94	—	—		粪便	33.08	—	—
6	痰	19.02	—	36.52	14	痰	22.14	—	—
	粪便	34.95	—	37.39		粪便	34.59	34.45	34.16
7	痰	22.25	35.26	34.15	15	痰	23.62	—	—
	粪便	34.61	—	—		粪便	31.18	28.46	27.63
8	痰	24.72	—	37.85					
	粪便	28.41	25.85	24.91					



A~F:分别为病例3、4、6、7、8、13痰标本。

图 2 6 例 SARS-CoV-2 感染患者痰标本 SARS-CoV-2 基因扩增曲线

Figure 2 Amplification curve of SARS-CoV-2 gene in sputum specimens of 6 patients infected with SARS-CoV-2



A~F:分别为病例2、6、8、9、14、15粪便标本。

图 3 6 例 SARS-CoV-2 感染患者粪便标本 SARS-CoV-2 基因扩增曲线

Figure 3 Amplification curve of SARS-CoV-2 gene in fecal specimens of 6 patients infected with SARS-CoV-2

2.3 不同住院、发病时长患者痰、粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测阳性情况 患者发病时间确定来源于微信公众号“泸州发布”中发布的确诊患者病例通报,患者发病后被收入传染病医院,15 例患者中,治疗>5 d 的患者中痰、粪便标本均有 SARS-CoV-2 核酸检测阳性。由于病例较少,未收集到治疗 5 d 以内患者标本,但患者粪便标本 SARS-CoV-2 核酸

检测阳性与患者治疗周期没有必然联系。对不同发病时长患者痰、粪便标本进行 SARS-CoV-2 核酸检测,不同发病时长患者的粪便中都有 SARS-CoV-2 核酸检测阳性,发病时间 5~10 d 内的患者有 4 例,其中有 1 例仅粪便标本中检出病毒核酸,其余 3 例粪便与痰标本均未检出病毒核酸。见表 2。

表 2 不同治疗、发病周期痰、粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测阳性情况

Table 2 Positive detection result of SARS-CoV-2 nucleic acid in sputum and fecal specimens during different treatment and disease course

时长(d)	住院治疗			发病		
	检测例数	粪便阳性病例	痰阳性病例	检测例数	粪便阳性病例	痰阳性病例
≤5	0	/	/	4	病例 8、14、15	病例 4、8
5~	5	病例 8、15	病例 4、8	4	病例 2	无
10~	6	病例 2、14	病例 3、7	6	病例 9	病例 3、7、13
>15	4	病例 6、9	病例 6、13	1	病例 6	病例 6

3 讨论

本研究对 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本进行了 SARS-CoV-2 核酸扩增分析。2020 年 2 月 1 日深圳市第三人民医院在 COVID-19 患者粪便中检出 SARS-CoV-2 核酸阳性^[8],至此,从粪便标本检测 SARS-CoV-2 核酸开始引起人们的重视。在国家卫生健康委发布的 COVID-19 预防指南中也明确提出,部分患者有消化道症状,如腹泻^[9],2020 年 2 月 10 日钟南山团队从一例 COVID-19 患者的粪便标本中分离到一株 SARS-CoV-2^[10]。本研究发现随着病程进展,有患者下呼吸道标本 SARS-CoV-2 核酸检测为阴性,但其粪便标本检测为阳性,提示在病程发展过程中,SARS-CoV-2 会进入消化道。李萍等^[11]认为可以在疾病的早期或轻症患者中选择粪便标本进行核酸检测,而在本研究中由于缺乏早期患者标本,结合李萍的研究认为,在疑似病例有消化道症状者、经治疗出院时均应采集粪便标本进行 SARS-CoV-2 核酸检测。2020 年 2 月 21 日成都市公卫中心通过微博发布“新型肺炎疫情防

控”:一例出院患者复查核酸阳性^[12]。提示可能对于 COVID-19 患者出院标准不应限于当前指南,可以尝试纳入粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测;以呼吸道标本 SARS-CoV-2 核酸检测阴性作为排除 COVID-19 及治愈标准在实施过程中需谨慎,应考

虑是否将粪便标本 SARS-CoV-2 核酸检测阴性也纳入其中。

粪便标本中检出 SARS-CoV-2 核酸阳性,同时有活的病毒存在,因此,防止生态环境的污染也应引起重视,应对患者排泄物进行彻底消毒^[13]。SARS-CoV-2 是 SARS 冠状病毒的姊妹病毒,2003 年,我国学者首先评估了 SARS-CoV 在外界环境物品中生存的能力,结果显示,SARS-CoV 在模拟污染的玻璃片、不锈钢片、塑料片上可以存活至少 2 d,在模拟污染的滤纸片、木片、棉布片、土壤上至少可存活 4~6 h,随后又有多个实验室进行了验证^[14-16]。目前还缺少 SARS-CoV-2 对环境污染的评估数据,但对患者排泄物进行定时清洁与消毒处理,是非常必要的。

研究探讨 COVID-19 患者在不同标本,如咽拭子、痰、血、尿、粪便中的病毒含量及存在时间,对实验室诊断 COVID-19 尤为重要。由于纳入病例较少,尚不具有代表性,尤其缺乏治疗早期患者标本。期待在后续研究中纳入更多的标本类型,进行进一步的数据分析,为疾病防控措施提供一些建议。同时也希望相关部门积极制定环境消毒策略,从不同的方面对 SARS-CoV-2 传播做好防控。

[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, 395(10223): 497-506.

[2] Wang C, Horby PW, Hayden F, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern[J]. Lancet, 2020, 395(10223): 470-473.

[3] Patel A, Jernigan DB, 2019-nCoV CDC Response Team. Initial public health response and interim clinical guidance for the 2019 novel coronavirus outbreak-United States, December 31, 2019 - February 4, 2020[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2020, 69(5): 140-146.

[4] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.

[5] Corman VM, Rasche A, Baronti C, et al. Assay optimization for molecular detection of Zika virus[J]. Bull World Health Organ, 2016, 94(12): 880-892.

[6] Corman VM, Eickmann M, Landt O, et al. Specific detection by real-time reverse-transcription PCR assays of a novel avian influenza A(H7N9) strain associated with human spillover infections in China[J]. Euro Surveill, 2013, 18(16): 20461.

[7] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎治疗方案(试行第五版)[EB/OL]. (2020-02-04)[2020-02-08]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.

[8] 中国新闻网. 深圳在某些确诊患者粪便中检测出新型冠状病毒阳性[EB/OL]. (2020-02-03)[2020-02-15]. <http://www.chinanews.com/gn/2020/02-02/9075769.shtml>.

[9] 中国青年网. 国家卫健委发布新型冠状病毒感染肺炎预防指南[EB/OL]. (2020-01-29)[2020-02-15]. http://news.youth.cn/gn/202001/t20200129_12180135.htm.

[10] 南方新闻网. 广东省政府新闻办疫情防控第十九场新闻发布会[EB/OL]. (2020-02-13)[2020-02-15]. http://gdio.southcn.com/g/2020-02/13/content_190320546.htm.

[11] 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]. 国际检验医学杂志. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20200213.1516.002.html>.

[12] 成都市公共卫生中心. 新冠肺炎疫情防控[EB/OL]. (2020-02-21)[2020-02-21]. <https://new.qq.com/omn/20200221/20200221A0DU0K00.html>.

[13] 魏秋华, 任哲. 2019 新型冠状病毒感染的肺炎疫源地消毒措施[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(1): 59-62.

[14] 李敬云, 鲍作义, 刘思扬, 等. SARS 病毒在外界环境物品中生存和抵抗能力的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2003, 20(2): 110-112.

[15] WHO. Guidelines, recommendations, descriptions: First data on stability and resistance of SARS coronavirus compiled by members of WHO laboratory network[S]. WHO, 2003.

[16] 王新为, 李劲松, 金敏, 等. SARS 冠状病毒的抵抗力研究[J]. 环境与健康杂志, 2004, 21(2): 67-71.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:李宝林,李芹,吴刚,等. 15 例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本新型冠状病毒核酸检测结果比较[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(3): 239-244. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20206327.

Cite this article as: LI Bao-lin, LI Qin, WU Gang, et al. Comparison of 2019-nCoV test results of sputum and fecal specimens of 15 patients with COVID-19 after treatment [J]. Chin J Infect Control, 2020, 19(3): 239-244. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20206327.