

- [8] 封安保,郭纓,刘海培,等.新冠肺炎疫情期间高中生抑郁及自学能力与父母教养方式的关系[J].中国学校卫生,2021,42(5):679-682.
- [9] 黄婉霞,谢丽燕,张梅珍.护理专业大专生自主学习能力现状及影响因素调查分析[J].卫生职业教育,2018,36(14):114-116.
- [10] 孙博文,王思怡,吴蓓蔚.医学检验技术专业学生自主学习能力关键影响因素的研究[J].中国医学教育技术,2021,35(3):301-304.
- [11] 王颖.“互联网+”背景下提升高职学生自主学习能力的研究[J].商丘职业技术学院学报,2021,20(5):62-65.
- [12] 余淑珍,安德罗索夫·阿列克谢,张宝辉.学习共同体对学习的影响:基于 35 项实验和准实验研究的元分析[J].开放教育研究,2021,27(5):81-90.
- [13] 杨芳,赵楠,赵小珊等.大学生学习共同体的建构对学习力的影响研究:基于 G 大学的调查分析[J].广州广播电视大学学报,2021,21(6):59-64.
- [14] 王文涛,伊正君,付玉荣.医学检验技术专业学生在线课程学习现状及影响因素研究[J].中国高等医学教育,2021,35(1):73-74.
- [15] 孙百才,龚丽华.研究生学业奖学金制度实施状况调查研究:成效、问题及对策[J].学位与研究生教育,2021,38(3):60-66.

(收稿日期:2022-06-17 修回日期:2022-12-22)

教学·管理 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.08.038

## 新型冠状病毒核酸检测假阳性及假阴性影响因素分析\*

王莹<sup>1</sup>,姚瀚鑫<sup>1</sup>,刘真意<sup>1</sup>,王艺婷<sup>1</sup>,周琪<sup>2</sup>,许建成<sup>1△</sup>

吉林大学第一医院:1. 检验科;2. 新生儿科,吉林长春 130021

**摘要:**新型冠状病毒(简称新冠病毒)核酸检测在确诊新冠病毒感染和疫情防控中起重要作用。该文结合工作实践,从检测前、中、后质量控制 3 个方面分析标本质量、规章制度、人员培训、设备性能、试剂耗材、实验操作及结果判读等多种因素造成假阳性和假阴性结果的原因及应对策略,为探寻提升新冠病毒核酸检测的准确性、多角度优化新冠病毒核酸检测工作提供参考依据。

**关键词:**新型冠状病毒核酸检测; 假阳性; 假阴性; 影响因素

**中图分类号:**R511

**文献标志码:**B

**文章编号:**1672-9455(2023)08-1176-04

2022 年 5 月 23 日国务院联防联控机制举办“争分夺秒抓实抓细疫情防控有关情况”主题新闻发布会,国家卫生健康委员会医政医管局监察专员郭燕红介绍:“核酸检测是非常专业的一项技术,近几年受社会公众的高度关注,也慢慢走近了普通人的身边。尽管核酸检测的特异度是 100%,但在实际工作中,实验室可能会因实验过程及操作造成污染而导致假阳性。此外,还有个别实验室包括技术人员没有严格按照规定的工作程序进行操作,也会造成假阳性结果。”在新型冠状病毒(简称新冠病毒)核酸检测方法中实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)因为灵敏度高、特异性强、重复性好等特点而应用最为广泛。2022 年 6 月 2 日国家卫生健康委员会发布《关于进一步加强新冠病毒核酸检测全链条监管的通知》,核酸检测中如果出现问题,检测机构将面临严重的处理。因此,应全面评估核酸检测的诸多影响因素,强调多次进行核酸检测的必要性,提高检测试剂的灵敏度,加强质量控制,规范标本采集,从而提高诊断的准确性。现将实验室经常遇到的造成假阳性和假阴性结果的原因及应对

策略总结如下。

### 1 核酸检测

**1.1 新冠病毒核酸检测方法及原理** 目前,新冠病毒核酸检测方法主要包括实时荧光 PCR、高通量测序、恒温扩增技术、其他 PCR、血清学检测 IgM 和 IgG 抗体等<sup>[1]</sup>。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)》将核酸检测列为新冠病毒感染确诊的重要依据<sup>[2]</sup>。所有生物除朊病毒外均含有核酸,核酸包括脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA),新冠病毒是一种仅含有 RNA 的病毒,病毒中特异性 RNA 序列为区分该病毒与其他病原体的标志物。如果在患者标本中检测到新冠病毒的特异核酸序列,提示该患者可能感染新冠病毒。新冠病毒核酸检测方法主要采用实时荧光定量技术,先从标本中提取出病毒的 RNA,通过反转录技术,把病毒的 RNA“反转录”成一种更容易检出的特异 DNA,即 cDNA。接下来扩增 cDNA,让 cDNA 不断复制,让其数量呈指数增长。cDNA 每完成扩增一次,荧光信号就会增加,PCR 检测仪就能记录到荧光信号增加的 Ct 值。

\* 基金项目:吉林省教育厅科学技术研究规划项目(JJKH20211177KJ)。

△ 通信作者,E-mail:xjc@jlu.edu.cn。

实时荧光定量 PCR 按原理主要分为两类,一类是在 PCR 扩增反应过程中应用嵌入式染料与扩增产生的双链 DNA 结合,发射荧光信号,实现实时定量检测 PCR 产物;另一类是应用荧光特异性基团标记探针进行实时检测,5'和 3'端分别标记一个荧光报告基团和一个荧光淬灭基团,探针完整时报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收。PCR 扩增时 Taq 酶的 5'-3'外切酶活性将探针酶切降解,将荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统接收到荧光信号,实现荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步,PCR 检测仪就能记录到一个荧光信号增加的 Ct 值<sup>[1]</sup>。荧光探针法特异性较强,可区分常见的冠状病毒,可对多个靶标同时进行检测以提高准确性,所以,目前大多数应用的是荧光探针法。

**1.2 结果判读标准** 新冠病毒核酸检测的靶基因主要包括开放读码框(ORF1ab)、核壳蛋白、包膜蛋白和刺突糖蛋白编码基因。目前,国家药品监督管理局批准的基于荧光 PCR 的新冠病毒核酸检测试剂盒主要是针对其中一个或多个靶标检测,建议同时检测 2 个及以上靶标,至少应包括最为保守特异的 ORF1ab 区域,以保证检测结果的特异度和准确度。出现以下情况需复检:(1)PCR 扩增后标本目的基因 Ct 值大于试剂盒说明书阈值,且原始峰图有信号;(2)扩增结果为阳性,但原始峰图并非典型的“S”形曲线;(3)双靶标试剂检测结果不一致;(4)双份试剂检测结果不一致;(5)检测结果与临床症状、影像学检查表现不一致;(6)不同病程阶段可能出现不同的核酸检测结果,需连续多次采集;(7)区域大规模人群筛查阳性率极低(<0.1%)时出现阳性结果应使用 1~2 种灵敏度高且扩增区域不同的试剂复检<sup>[3]</sup>。

## 2 核酸检测报告“假阴性”原因分析及应对策略

就新冠病毒核酸检测而言,假阴性指的是在所采集标本中存在足量的病毒,但却未被检出。常见的情况是重复检测多次出现阴性结果后再出现阳性结果或咽拭子标本多次检测呈阴性但在呼吸道灌洗液标本中检测出阳性结果。

**2.1 检测前质量控制** 检测前质量控制在整个检测流程中至关重要。合格的标本是保证检测结果准确的前提。为减少核酸检测假阴性应从采样时期及部位因素、采样操作因素、采样管及采集拭子因素、标本运输时间及条件因素等采取措施。

**2.1.1 采样时期及部位因素** 不同病程、机体不同部位的病毒载量并不相同。感染初期、逐渐康复后、间歇性排毒等状态携带的病毒载量较低,可能造成“假阴性”结果。从细胞种类看,病毒载量从高到低依次为肺泡上皮细胞(下呼吸道)、气道上皮细胞(上呼吸道)、成纤维细胞、内皮细胞、巨噬细胞等<sup>[4]</sup>;从标本

类型看,病毒载量从高到低依次为肺泡灌洗液(最优)、深咳痰、鼻咽拭子、口咽拭子、血液<sup>[5]</sup>。因此,建议在感染的不同时期应进行多次核酸检测。对重点人群进行定期核酸检测,并做好临床观察与数据总结。明确采样部位优先次序,常用的采样部位依次是口咽部、鼻咽部、支气管灌洗液(操作复杂)、深部痰(常为干咳,难获得)、粪便<sup>[4]</sup>。对于重点人群可同时采集鼻咽及口咽拭子进行检测。

**2.1.2 采样操作因素** 采样深度、力度均可能导致病毒载量不同。采样操作不当,如采集口咽部时拭子的深度不够;采集鼻咽部时拭子未到达鼻腔深处,造成采集的标本不合格。采集、运送、分拣等过程中因乙醇、氯等消毒剂进入,导致病毒 RNA 提取和 PCR 扩增失败。因此,应优化标本采集,确保采样准确。不同专业的医务人员支援核酸检测采样工作,应警惕采样操作是否合格。采样深度、力度要够,鼻咽、口咽拭子采集均应取到较深部的上皮细胞,才能检测到病毒核酸。

**2.1.3 采样管及采集拭子因素** 采样管和采集拭子的要求应参照国家指南,管帽及管体应为聚丙烯材质,螺旋口可密封,管体透明<sup>[6]</sup>。采集管高度(含管帽)为(100±5)mm,容量企业定标 20~30 mL,内含 11~12 mL 胍盐或其他有效病毒灭活剂的保存液。采集拭子宜选聚酯、尼龙等非棉质、非藻酸钙材质,柄部应是非木质材料。折断点位于距拭子头顶端 3 cm 左右,易折断。

**2.1.4 标本运输时间及条件因素** 标本运输时间过长或者温度过高可导致 RNA 降解<sup>[7]</sup>。《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)》要求采样后尽快送检,标本在 2~8℃下保存和转运,采样后应尽可能在 2~4 h 送到。

**2.2 检测中质量控制** 检测中质量控制包括仪器设备因素、诊断试剂因素、规范操作因素及室内质控因素,避免产生假阴性。

**2.2.1 仪器设备因素** 应定期校准与维护基因检测实验室的仪器设备,包括生物安全柜、移液器、离心机、冰箱、核酸提取仪、荧光定量 PCR 仪等。如冰箱温度不稳定,会影响标本 RNA 酶的稳定性<sup>[8]</sup>;移液器量程不精确、反应体系不一致和加样误差均会导致假阴性。因此,在操作中应保证相关的仪器设备处于清洁无核酸污染状态,定期进行维护保养,确保仪器的性能状态良好。

**2.2.2 诊断试剂因素** 核酸提取的效率与纯度低、体外诊断试剂灵敏度差、试剂批间差异大、病毒变异导致试剂无法检测到相应核酸片段等因素均可造成假阴性<sup>[9]</sup>。如不同核酸检测试剂间存在批间差问题,可能影响后续弱阳性标本的检出,可出现多个标本单

靶标通道的扩增曲线翘尾。因此,应对比试剂盒质量差异,进行比对试验验证,增进试剂检测效能。临床试剂盒的研究处于边探索、边实践、边完善的过程,研发的试剂盒不同基因的灵敏度存在差异<sup>[10]</sup>,应逐渐改进试剂的检测效能,提高分析灵敏度和特异度。为提升检测效率,可探寻优化试剂盒的反应参数,缩短反转录退火、延伸时间,提高解旋及扩增阶段的温度,优化核酸提取及扩增程序,改进流程。但改进流程后是否对灵敏度有影响,特别是病毒载量低的标本或是单靶标阳性复检标本,尚有待进一步验证。因试剂问题造成的假阴性可以选择不同厂家的试剂进行比对检测,验证各试剂的检测能力,建议选用外源和内源性内标不同的试剂盒交叉使用,复查和验证同一标本,可尽量选择检出限较低、灵敏度较高的试剂盒。

**2.2.3 规范操作因素** 操作不当也是导致假阴性的重要因素。必须规范实验室操作,强化检验人员培训,完善实验室质量管理体系、保证合理分区、提升检验人员操作水平,避免漏加、错加、丢失等人为因素,最大限度地减少假阴性。

**2.2.4 室内质控因素** 规范开展室内质控是避免出现假阴性的重要措施。实验室如果未按照要求设置阴性、阳性室内质控或室内质控品并未参与核酸提取过程,有些弱阳性质控品设置浓度过高或部分批次的室内质控结果失控,但未进行原因分析和采取纠正措施等均有造成假阴性的可能。所以,必须规范开展室内质控,质控品应按国家要求,包括每批检测至少有 1 份弱阳性质控品(第 3 方质控品,通常为检出限的 1.5~3.0 倍)、3 份阴性质控品(生理盐水)。阴、阳性质控品应随机分布在患者标本中间,不是一成不变地固定于具体孔位,应对所有孔位起到监测作用。质控品应参与从提取到扩增的全过程,失控后应及时进行原因分析及采取纠正措施。

**2.3 检测后质量控制** 检测后质量控制主要为临床实验室管理问题,临床实验室的质量控制、规范操作及结果判读等是保证检验结果精准的关键因素<sup>[11]</sup>。人员操作及单靶标阳性判读能力不足、质量控制方面欠缺等均可造成假阴性。如果选择核酸扩增仪的“自动”模式判读结果,对可疑结果应手动设置基线和阈值线参数进行查看复核,避免结果误判。因此,应加强检验人员能力培养,提高数据分析能力。在审核检测结果时应认真观察和比较扩增曲线,认真核对结果及时准确上报,避免出现假阴性。同时,在核酸检测的基础上补充特异性抗原检测技术等其他实验方法,进一步提高早发现能力。

### 3 核酸检测报告“假阳性”原因分析及应对策略

假阳性是指患者没有感染新冠病毒,但核酸检测出现阳性结果。常见的情况是标本检测为阳性,但是

流行病学史和临床症状不支持新冠病毒感染的诊断,再次检测或多次检测结果均为阴性。

**3.1 检测前质量控制** 检测前质量控制主要包括标本因素和规范实验室结构。

**3.1.1 标本因素** 采集操作不规范,如采样者手套接触阳性标本后未消杀或消杀不彻底导致邻近标本管污染。因质量或操作不当导致阳性标本漏液,污染同批次标本。采集后标本盖没有旋紧,运送过程中振荡剧烈均可造成交叉污染。应严格培训,优化流程,增加采样人员,避免错误操作。采集过程中实验人员要严格按照《区域新型冠状病毒核酸检测组织实施指南(第三版)》(联防联控机制医疗发〔2022〕28 号)执行,优化标本采集。

**3.1.2 规范实验室结构** 核酸检测操作应在生物安全二级防护实验室进行,核酸检测实验室应严把实验室工程建设质量关,按照试剂配制区、标本制备区、核酸扩增区实行独立分区,确保人流、物流的单向流通,不逆向流动。生物安全防护应按照《新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)》<sup>[6]</sup>执行。

**3.2 检测中质量控制** 检测中质量控制主要包括临床实验室操作及管理问题、仪器设备因素、扩增产物遗留污染。

**3.2.1 核酸提取因素** 大部分实验室采用全自动核酸提取仪进行核酸提取,在提取过程中加热、剧烈振荡极易造成标本之间或待检标本和阳性对照之间交叉污染而出现假阳性。操作不当是导致交叉污染的主要原因<sup>[12]</sup>。应确保核酸提取不交叉污染,每个操作环节均应谨慎,轻缓弃掉移液器枪头,使用后的移液器放置在移液器架上,及时更换被污染的手套。操作前应离心阳性质控品,轻缓开盖,吸取加样,使用带滤芯枪头,减少因操作不当出现的假阳性。检测结束后应使用紫外线灯照射实验室。

**3.2.2 检测过程中标本之间发生交叉污染因素** 检验人员生物安全防护意识不强或实验操作不标准导致结果出现假阳性。在操作过程中剧烈晃动采集管、用力拧盖、快速吸样均可能形成气溶胶而导致污染。如被阳性质控品或阳性标本污染的阴性标本,导致假阳性结果。因此,检验人员应参加相关生物安全培训,获得临床基因扩增检验实验室技术人员培训证且熟悉岗位操作,遵守标准操作规程,明确结果审核规则和掌握质量控制措施,全方面落实生物安全与感染控制的管理。

**3.2.3 扩增产物的遗留污染因素** 气溶胶污染是造成 PCR 产物污染的主要原因。扩增过程中如果八联排管密封不严则会在高温条件下产生气溶胶而导致假阳性<sup>[13]</sup>。气溶胶里含有扩增序列的小颗粒在实验室里积累,沉降到实验台面、PCR 仪器、移液器等部

位,当达到一定浓度弥散到环境中可导致假阳性,荧光通道曲线可呈斜直线上升。应确保扩增产物不污染环境,严格选择密闭性良好的反应管,扩增前确保逐孔按紧,混匀离心后再次检查八连排管无渗漏,扩增时再次确认盖紧八联排管盖,以防止扩增过程中爆裂导致污染。

**3.2.4 仪器设备因素** 核酸提取仪、荧光定量 PCR 仪、生物安全柜、离心机等仪器设备的性能不佳或清洁不到位或荧光定量 PCR 仪温控不准造成非特异性扩增等均可导致假阳性。应定期维护、保养仪器设备,确保仪器性能状态良好。如生物安全柜使用后应进行清洁、消毒<sup>[3]</sup>。

**3.3 检测后质量控制** 检测后质量控制主要为非特异性扩增因素、结果判读因素及疫苗引起的“假阳性”因素。

**3.3.1 非特异性扩增因素** 试剂盒中的扩增引物特异性不好,形成引物二聚体或上、下游引物形成发卡结构,引起非特异性荧光造成假阳性<sup>[13]</sup>。其特点是 S 型扩增曲线起线时间较迟,常常在最后几个循环内扩增,荧光信号弱,Ct 值较大<sup>[8]</sup>。应按照说明书要求配置扩增反应液,提取得到的核酸应及时进行后续处理,及时封盖,避免混入阳性质控品或其他干扰物。实验室应每天按时清洁、消毒,以消除潜在的干扰因素。排除污染原因后重新复检标本,必要时可使用不同的检测试剂进行确认。

**3.3.2 结果判读因素** 检测结果判读有误、基线调整不当、非特异性荧光等原因可导致假阳性。大部分荧光定量 PCR 仪的软件均可自动设置基线范围,但过强的背景信号可被误认为是扩增信号,基线范围变小,导致假阳性。其特点是曲线起线时间较早,为曲折样上升型或不规则上升型,而非典型的 S 形曲线,此时应手动调整基线设置范围,通过比对原始曲线及扩增曲线的形态进行判定<sup>[8]</sup>。应减少结果判读失误的因素,需对实验室仪器进行性能验证,建立室内质控标准操作规程,严格执行质控要求,明确复检规则,避免假阳性结果发生。应加强培养检验人员能力,提升结果判读能力。认真钻研和分析扩增曲线的不同变化趋势,重视审核检测结果。

**3.3.3 疫苗引起的“假阳性”因素** 疫苗中含有浓度较高的灭活病毒,尽管灭活病毒不具备传染性,但完整的病毒核酸片段仍存在。采样时间在核酸片段被降解前就有可能造成假阳性结果。因此,新冠病毒疫苗接种点要远离采样点,新冠病毒疫苗接种人员与采样人员不可兼职。应定期清理接种工作台面上的一次性无纺布,按压的棉签应按医疗废物处理规定在接

种点统一收集处理,如果发生容器破裂等现象应及时处理,防止污染扩散。

#### 4 小 结

新冠病毒核酸检测是确诊新冠病毒感染病例的重要依据,对解除隔离管理、出院预后判断具有指导意义。分析和掌握新冠病毒核酸检测假阴性和假阳性的原因,采取应对策略,多角度优化新冠病毒核酸筛查工作,对早期诊断、控制病程、监测疗效和防控疫情至关重要。

#### 参考文献

- [1] 姜博,叶尔林·阿斯哈尔,刘隽雯,等. 新型冠状病毒突变及其检测技术研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2022,36(3):354-360.
- [2] 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(试行第九版)[J]. 中华临床感染病杂志,2022,15(2):81-89.
- [3] 徐英春,胡继红. 新型冠状病毒实验室检测专家共识[J]. 协和医学杂志,2021,12(1):18-26.
- [4] 刁艳君,杨柳,苏明权,等. SARS-CoV-2 实验室核酸检测要点[J]. 检验医学,2021,36(3):352-356.
- [5] WANG W L, XU Y L, GAO R Q, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical Specimens[J]. J Am Med Associat,2020,323(18):1843-1844.
- [6] 中华人民共和国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)[J]. 中国实用乡村医生杂志,2020,27(3):4-5.
- [7] 莫茜,秦炜,傅启华,等. 正确认识新型冠状病毒核酸检测的影响因素[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):213-216.
- [8] 李振昊,高小玲,杨小娟,等. 新型冠状病毒核酸检测分析[J]. 检验医学与临床,2020,17(10):1313-1315.
- [9] 王达,董梁,卿松,等. 新型冠状病毒核酸检测中的思维误区[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(8):1167-1170.
- [10] 黄斐,张春燕,郭玮,等. SARS-CoV-2 核酸检测的现状和问题[J]. 检验医学,2021,36(5):554-559.
- [11] GUO W J, ZHOU Q, XU J C. Negative results in nucleic acid test of COVID-19 patients; assessment from the perspective of clinical laboratories [J]. Ann Palliat Med, 2020,9(6):4246-4251.
- [12] 侯盼飞,潘艳,祝丽晶,等. 新冠病毒核酸检测中假阳性问题分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2021,44(5):373-374.
- [13] 刘若锦,李挥,王丽,等. 新型冠状病毒核酸与抗体检测影响因素的分析评价[J]. 医疗装备,2020,33(10):186-188.