

新冠病毒檢驗為何經常陰陽難辨——

快速準確與全方位新冠病毒檢測技術之介紹

臨床病理科 彭成立 醫檢師/組長

2019年12月起中國湖北武漢市發現不明原因肺炎群聚，疫情初期個案多與武漢華南海鮮城活動史有關，中國官方於2020年1月9日公布其病原體為新型冠狀病毒。感染新型冠狀病毒 SARS-CoV-2 至發病之潛伏期為1至14天(多數為5至6天)，確診病人發病前2天即可能具傳染力，確診病人上呼吸道檢體可持續檢測 SARS-CoV-2 核酸(RNA)陽性平均達兩週以上，且下呼吸道檢體檢出病毒的時間可能更久。

冠狀病毒不容易以組織培養方式分離出來，以分子生物學檢驗 SARS-CoV-2 核酸為急性感染期最佳與最敏感的檢驗方式，最常使用的就是即時偵測反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time reverse-transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)，且可藉由核酸定序技術(Sequencing)分析其流行病學與突變病毒株的演化情形。血清學抗體檢測(serological test)可以偵測 IgM/IgG 抗體產生的狀態，可適用於確診病人急性期(IgM)與感染後恢復期(IgG)之檢測。

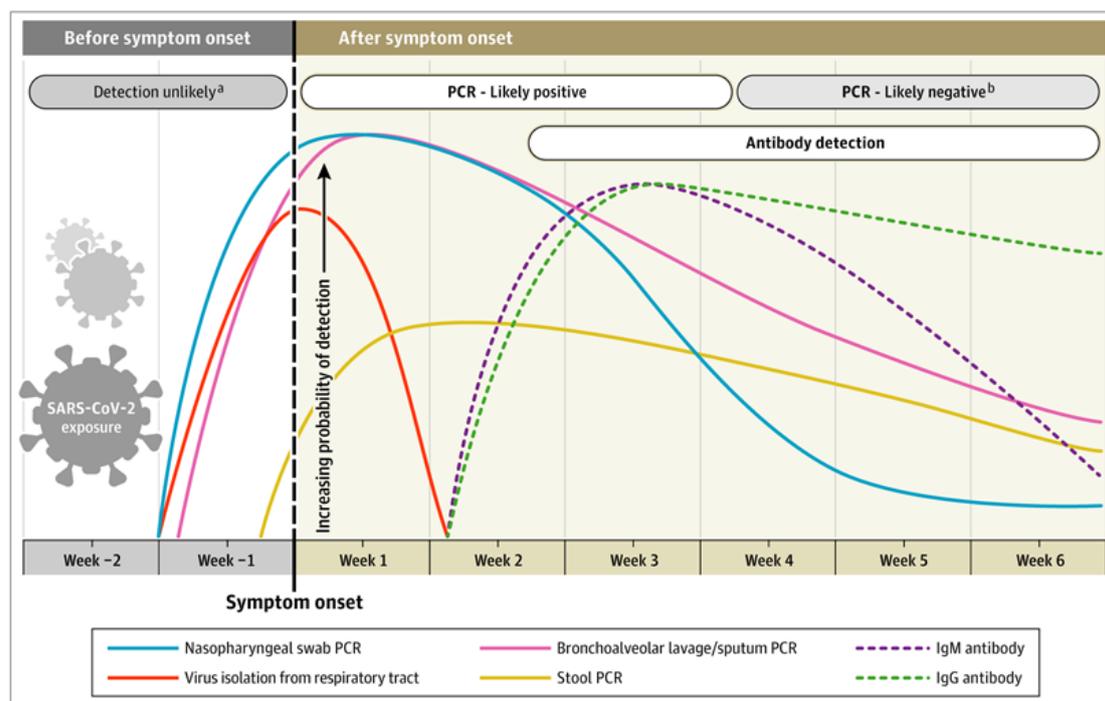
聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction; PCR)，是一項利用 DNA 雙鏈複製的原理，在生物體外複製特定 DNA 片段的核酸合成技術。透過這項技術，在有特殊引子的情形下，藉由加熱讓 DNA 雙股分開，降溫讓引子找到目標基因，再升溫至 72°C 讓引子延長複製 DNA，僅需約 1-3 分鐘完成一個循環反應，可以增加 2 倍的核酸片段，經過多次(35~40 次)循環後，便可在短時間內大量擴增目的基因或微生物基因，因此可以進行微生物的快速偵測。由於新冠病毒屬於 RNA 病毒，需要利用反轉錄 PCR(reverse transcription-PCR; RT-PCR)進行偵測，以反轉錄酶將病毒 RNA 轉變為互補 DNA，再進行 PCR 反應，如果同時使用螢光探針，就可以即時偵測螢光的訊號，當螢光訊號超過閾值(Threshold)或臨界值時，當時的 PCR 循環次數就叫做 Ct 值(Cycle of Threshold)，Ct 值越小代表原始病毒的濃度越高，Ct 值越大，代表濃度越低。

台灣和大陸都出現了一些新冠病毒病患，經過好幾次檢驗都是陰性，到了第四次、第五次才確診，為何會有這麼狀況出現？是跟技術、採檢部位、還是病毒數量有關？答案是都有關。

技術又分為採檢技術與偵測技術，以鼻咽部位的採檢為例，鼻咽拭子深入的位置是到鼻咽後段，還是只是鼻腔前段，拭子到達位置後，是否有旋轉擦取較多的黏膜細胞，是取一邊鼻孔，還是兩邊鼻孔，這都會影響採檢的品質，我們曾經大約算過，優質的採檢與敷衍的採檢，其黏膜的細胞數目可以差距約 1000 倍，這會大大的影響後續 RT-PCR 的最終結果。

另外是採檢部位與檢體種類，在發病的各個期程，其病毒的含量差距甚大，

病人是感染後症狀出現前，已就是潛伏期、症狀出現發病時、或是症狀緩解恢復期，一般以症狀出現發病時的病毒量最高，不管是咽喉或鼻咽檢體很容易就可以檢測出來，痰液檢體是病毒量最高的。中國大陸使用的肛門拭子，就是要偵測比較後期症狀緩解或無症狀的人。



另一個影響敏感度的因素，主要是 RT-PCR 偵測試劑系統，根據美國食品藥物管理局(FDA)公布各種偵測試劑的最低偵測濃度，最好的從 180 NDU/mL 到最差的 600000 NDU/mL，相差將近 3000 多倍，而國內各醫療院所，以及各個國家使用的試劑可能均不相同，因此，經常會造成時陰時陽的結果。

國內目前亦發現好幾個個案，感染後 2-4 個月還可以從咽喉檢體內偵測出 RT-PCR 陽性的結果，不過這些個案 Ct 值大多較高，可能超過 34 以上，屬於弱陽性的結果。在實驗室內，當初步結果為弱陽性時，第一時間無法確認是病毒量過低，RT-PCR 的螢光訊號一般在 34 次 PCR 循環之後，才緩慢上升；還是實驗室發生汙染事件，造成偽陽性的結果，由於這些結果可能比陽性品管濃度還低，不能排除可能是陽性品管汙染所致，因此，實驗必須先加病人檢體，開蓋關蓋後，換新手套，再取陽性品管液加入 PCR 管以避免汙染。為了確保弱陽性結果的正確性，同個檢體會再重複執行兩管 RT-PCR，結果仍然是弱陽性，而陰性品管確認為陰性時，才會發出弱陽性報告。而這弱陽性的個案有可能是感染初期，或感染後期，就目前國內情形，進入國內的任何人均需隔離兩週，因此感染初期的可能性較低，最有可能是感染後期，因此可以加做病人新冠病毒專一性抗體檢驗，一般可以獲得 IgM 陰性 IgG 陽性的結果，可以加以佐證 RT-PCR 弱陽性的結果。

期盼在不久的將來，每個人都打過疫苗後，可以對新冠病毒做有效的控制，由於疫苗並不一定會對每個人產生足夠保護的抗體，將來每個人或許必須有抗體護照，才可以自由的進出國門，恢復正常的生活。