

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.00598

实验室检测埃博拉病毒对诊疗的临床意义

胡宗海^{1,2}, 刘毅^{1,3}, 谢静², 邹自英², 彭燕², 刘媛², 吴丽娟^{2*}

1. 中国人民解放军第二批援利医疗队
2. 成都军区总医院实验医学中心微生物免疫科, 高湿医学全军重点实验室, 成都 610083
3. 第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433

[摘要] **目的** 分析实验室 PCR 检测结果对埃博拉病毒病患者诊疗的临床意义。**方法** 在 2014 年 11 月 14 日至 2015 年 3 月 14 日期间, 利比里亚中国埃博拉治疗中心(Ebola Treatment Unit, ETU)共收治住院患者 101 例, 送检 172 份标本, 通过实验室实时荧光 PCR 检测病毒核酸及 CT 值, 分析实验室检测结果与病情变化及预后的关系。**结果** 共有 10 例埃博拉病毒核酸阳性患者, 死亡 4 例, 治愈 6 例。4 例死亡病例中, 病毒核酸 PCR CT 值均较低, 表明其体内病毒载量较高; 在 6 例治愈病例中, 随着病情的好转, 病毒核酸 PCR CT 值逐渐升高, 表明病毒载量逐渐降低。**结论** 实验室实时荧光 PCR 检测病毒核酸及其 CT 值可为临床诊断、治疗提供指导。

[关键词] 埃博拉病毒; 埃博拉病毒病; 聚合酶链反应; 诊断; 治疗

[中图分类号] R 512.89 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)06-0598-04

Laboratory tests for clinical diagnosis and treatment of Ebola virus disease

HU Zong-hai^{1,2}, LIU Yi^{1,3}, XIE Jing², ZOU Zi-ying², PENG Yan², LIU Yuan², WU Li-juan^{2*}

1. The Second Medical Team of the Chinese People's Liberation Army to Liberia
2. Department of Microbiology and Immunology, Center of Laboratory Medicine, Key Laboratory of High Humidity Medicine of PLA, Chengdu General Hospital, PLA Chengdu Military Area Command, Chengdu 610083, Sichuan, China
3. Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To analyze the clinical significance of PCR results for diagnosis and treatment of Ebola virus disease. **Methods** From 2014 November to 2015 March, a total of 101 patients were admitted to China Ebola Treatment Unit (ETU) in Liberia, and 172 specimens were sent for laboratory test: detection of Ebola virus RNA using real time PCR. The result of detection was recorded as positive or negative. If positive, the cycle threshold (CT) in real-time PCR was also reported. The relationship of laboratory findings with illness and prognosis was analyzed. **Results** Ten patients were identified as virus positive. The results of the first detection were positive in 8 patients and negative in 2 patients, and the 2 patients were positive in a second detection performed again 48 h later. The low CT values of PCR test observed in the 4 patients suggested high virus loads, and they died finally. In the 6 survived patients the CT values increased as their condition became better, which indicated that the virus loads decreased gradually. **Conclusion** Detection of Ebola virus mRNA by real-time PCR and the CT value can provide important reference for diagnosis and treatment of Ebola virus disease.

[Key words] Ebola virus; Ebola virus disease; polymerase chain reaction; diagnosis; therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(6): 598-601]

2014 年 2 月起埃博拉疫情暴发于西非, 截至 2015 年 3 月 11 日全球已有 24 282 人疑似或感染埃博拉病毒(EBOV), 其中经实验室确认感染 EBOV 者为 14 468 人, 死亡已达 9 976 人; 除了 15 例死亡病例发生在尼日利亚、塞内加尔、英国、马里、美国、

西班牙等国, 其余病例均发生在几内亚、利比里亚和塞拉利昂等西非三国, 在西非三国造成了重大的危害, 并已造成大量医务人员感染及死亡^[1-2]。从 2014 年 11 月 14 日到 2015 年 3 月 14 日, 分别以第三军医大学及成都军区总医院两家单位为主体, 其

[收稿日期] 2015-04-02 **[接受日期]** 2015-05-20

[作者简介] 胡宗海, 硕士, 副主任技师。E-mail: 13658027531@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 028-86571052, E-mail: wli1638@126.com

他兄弟单位参与组成的中国人民解放军第一、二批援利医疗队赴西非利比里亚参加抗击埃博拉疫情,在二批医疗队3个多月的时间里,共收治患者101例,EBOV 确诊阳性患者10例,其中4例患者不幸死亡,通过支持对症治疗,治愈出院6例。我们将此次收治病例的实验室检测结果及其对治疗的临床意义作一简要分析。

1 材料和方法

1.1 标本收集 中国人民解放军援利埃博拉治疗中心(Ebola Treatment Unit, ETU)从2014年12月5日开始收治患者,至2015年3月14日3个多月的时间内,收治患者共计101例。根据要求^[3],所有新入院患者应即时采集标本送实验室进行PCR检测EBOV 核酸(Ebola virus PCR, EBOV-PCR),如初次检测结果为阴性,间隔不低于48 h再次抽血复查EBOV-PCR,两次阴性则患者可排除EBOV 感染,阳性病例根据病情需要定期采集标本进行复查。患者采集全血(whole blood)标本,死亡病例采集口腔黏液(oral swab)标本,共采集标本172份。其中全血标本160份,采用EDTA 抗凝的真空采集管采集静脉血,每管4 mL;口腔黏液标本12份,采用WHO 推荐并提供的专用容器。标本按照生物防护要求,用4℃专用送检箱保存,由专人、专车及时护送指定实验室,护送过程中应采取相应的防护措施。

1.2 检测方法 所有标本均送至利比里亚生物医学研究所埃博拉检测中心[the Liberian Institute

for Biomedical Research, Ebola Testing Center, 也称利比里亚国家参考实验室(the Liberian National Reference Laboratory, LIBR LAB)],该检测中心由国际社会援建并负责检测。仪器为美国生产的ABI 7500 THERMOCYCLER PCR 仪,Ebola Zaire 试剂为经过美国FDA 验证。采用实时荧光PCR 进行病毒核酸检测,操作过程按仪器及试剂说明书进行,每份标本采用双管平行测定,两份结果如均为阳性,则报告结果为阳性(positive),并报告循环阈值(cycle threshold, CT);两份结果均为阴性,则报告结果为阴性(negative);两份结果如不一致(一阴一阳),则报告为不确定性(indeterminate),实验室应在次日再次进行双管平行测定,按前述原则进行报告,如仍有疑问须及时与送检单位取得联系,并重新送检标本。实验室人员核对报告无误后,将结果通过电子邮件发送给送检单位相关人员。

2 结果

2.1 总体情况 中国ETU 在3个多月期间共收治101例患者,送检标本172份,18人次标本为EBOV 阳性,共有10例EBOV 阳性患者,其中4例死亡,6例治愈出院。

2.2 死亡病例EBOV-PCR 检测结果 4例死亡病例,初次采集标本检测时间距发病时间均在3~5 d,初次检测结果即为阳性,PCR CT 值除病例3(标本为咽拭子)较高,其余结果均在18~23之间(表1),表明4例死亡病例其体内EBOV 载量均较高。

表1 4例埃博拉病毒阳性死亡病例EBOV-PCR 检测结果

病例	性别	年龄(岁)	发病日期	检测日期	标本种类	CT1	CT2	结果	死亡日期
1	男	0.5	2014-12-19	2014-12-24	全血	20	19	阳性	2014-12-29
2	女	23	2014-12-19	2014-12-23	全血	18	18	阳性	2014-12-25
3	女	32	2015-02-04	2015-02-08	咽拭子	32	34	阳性	2015-02-08
4	男	56	2015-02-11	2015-02-14	全血	23	21	阳性	2015-02-20
				2015-02-17	全血	22	22	阳性	
				2015-02-20	咽拭子	22	22	阳性	

2.3 治愈病例EBOV-PCR 检测结果 由表2可知,病例5、6在入院第1次检测均为阴性,48 h后重新采集标本检测结果为阳性。病例6第3次双份平行检测时,一管为阳性,而另一管则为阴性,报告结果为不确定性,于第2日重新检测两管结果同为阴性,则报告结果是阴性。病例5、6、7是患者在确认

为EBOV 感染后,经治疗症状消失后进行复检;病例8、9、10在治疗中调整为间隔72 h进行抽血复检,以观测患者体内病毒变化。随着患者在诊疗中心的支持对症治疗后,EBOV-PCR CT 值逐渐升高,表明患者体内EBOV 病毒载量逐渐下降,至完全检测不到。6例治愈病例均在临床症状消失后,两次

采集血液标本检测结果均为阴性,且两次间隔时间均超过 48 h,符合 WHO 制定的治愈标准^[4]出院。

表 2 6例埃博拉病毒阳性治愈病例结果

病例	性别	年龄(岁)	发病日期	检测日期	CT1	CT2	结果
5	男	7	2014-12-19	2014-12-22	-	-	阴性
				2014-12-24	19	25	阳性
				2014-01-05	37	39	阳性
				2014-01-08	-	-	阴性
				2014-01-11	-	-	阴性
6	女	21	2014-12-14	2014-12-22	-	-	阴性
				2014-12-24	33	33	阳性
				2014-01-08	-	38	不确定性
				2014-01-09	-	-	阴性
				2014-01-11	-	-	阴性
7	女	31	2014-12-28	2014-12-30	32	31	阳性
				2015-01-08	-	-	阴性
				2015-01-11	-	-	阴性
8	女	49	2015-01-23	2015-01-31	26	24	阳性
				2015-02-03	35	34	阳性
				2015-02-06	37	33	阳性
				2015-02-09	-	-	阴性
				2015-02-13	-	-	阴性
9	男	35	2015-02-11	2015-02-17	42	40	阳性
				2015-02-20	40	38	阳性
				2015-02-23	-	-	阴性
				2015-02-28	-	-	阴性
				2015-02-19	32	35	阳性
10	女	58	2015-02-14	2015-02-23	43	38	阳性
				2015-02-28	-	-	阴性
				2015-03-03	-	-	阴性

3 讨论

实验室对 EVD 的诊断内容包括病毒病原学、血清学、病毒核酸等检测。病毒分离是 EVD 诊断的可靠方法,特异度高,但活病毒的研究对实验室的要求很高,必须在 P4 级实验室内才能进行。血清学检测最早可从发病后 2 d 的患者血清中检出特异性 IgM 抗体,IgM 抗体可维持数月,可采用 ELISA 捕获方法检测,IgM 抗体阳性可确诊;发病后 7~10 d 可检出 IgG 抗体,康复者 IgG 抗体可维持数年,目前采用间接 ELISA 法检测 IgG 抗体;病毒核蛋白抗原可用 ELISA 检测,阳性可确诊,但目前血清学检测没有在临床广泛开展。核酸检测采用实时荧光 PCR

检测病毒核酸,结果报告为阴性或阳性,阳性具有确诊意义,实验室会在阳性结果报告清单中告知实时 PCR 的 CT,CT 值与病毒核酸载量成反比^[5-6]。该方法为目前广泛在西非三国所使用的检测方法,由于实验室及其他辅助检查条件的限制,病毒核酸检测也是目前西非三国对 EVD 患者唯一的实验室检测指标。临床医生根据患者有无接触史、有无临床症状、实验室检查,将患者分为 EVD 疑似(suspected)、可能(probable)和确诊(confirmed)病例,只有通过实验室进行 EBOV-PCR 检测,结果阳性才能确认为 EVD 患者。

患者标本可以为血液、口腔黏液、分泌物、其他体液等,但由于血液标本病毒核酸容易进行提取,因

此主要采集患者血液标本,标本可用 EDTA (SPS) 抗凝的真空采集管或分离胶无菌真空促凝管(宜用塑料试管,不能采用玻璃试管,以免破碎造成标本泄漏);死亡病例应即时采集心脏血液(post-mortem heart blood)或用棉签取口腔黏液(oral swab)^[4]进行检测。由于 EOBV 的高传染性及其高致死率,所有操作包括标本采集、送检、检测等均应按照生物防护要求采取相应的防护措施,穿戴个人防护装备(personal protective equipment, PPE),须确认所有防护设备完好,如果有体表开放式伤口时不宜参加实验活动,且必须有两人以上进行,可相互提醒、监督,检测应在 BSL-3 实验室内进行^[7]。

从表 1、2 可知,10 例 EOBV 阳性患者中,病例 5、6 在入院后第 1 次 EBOV-PCR 检测结果均为阴性,间隔 48 h,第 2 次采集标本复查为阳性;其余 8 例入院后第 1 次采集标本检测均为阳性。资料表明症状出现前 3 d,由于患者体内病毒载量可能会较低,不足以达到检测水平,发病后 3~10 d 血标本病毒载量达最高^[3,8]。患者入院应即时采集标本,如果第 1 次结果为阴性,并不能排除 EOBV 感染,应在间隔不低于 48 h 后再次抽血复查 EBOV-PCR,两次阴性则可排除 EOBV 感染,阳性则转入治疗病房。治疗病房的 EVD 患者经治疗后,当患者症状消失后可以采集标本复查,如两次标本检测结果均为阴性,采集间隔时间不低于 48 h,则表明患者体内病毒已消除,达到治愈标准。

从表 1 可知 4 例死亡 EVD 患者在 6 次标本检测中,EBOV-PCR 结果除病例 3 标本为咽拭子其 CT 值较高(两份结果平均值为 33)外,其余标本 CT 值均在 18~23 之间。实时 PCR 的 CT 值可在一定程度上反映患者血液中病毒滴度^[5-6],即 CT 值越低,病毒滴度越高,反之亦然。病毒滴度与患者病情的严重程度和进展速度呈一定正相关关系,病毒滴度越高,患者的初始症状越重,病情进展也极为迅速。4 例死亡病例其体内 EOBV 病毒载量均较高也证明了这点。同时,从 6 例治愈患者的检测结果可知,随着病情的好转,其 PCR CT 值逐渐升高,表明病毒载量逐渐降低,说明 CT 值可能为临床判断病

情提供一定的指导意义。但因病例数少,尚缺乏有统计学意义的数据支撑。

[参考文献]

- [1] CDC. Ebola (Ebola Virus Disease). U. S. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) [R]. (2015-03-11). <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/index.html>.
- [2] Dixon M G, Schafer I J; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Ebola viral disease outbreak—West Africa, 2014 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2014, 63: 548-551.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Interim guidance for specimen collection, transport, testing, and submission for persons under investigation for Ebola virus disease in the United States [S]. 2014. <http://www.cdc.gov/vhf/ebola/hcp/interim-guidance-specimen-collection-subm>
- [4] World Health Organization (WHO). Laboratory guidance for the diagnosis of Ebola virus disease [S]. (2014-09-19). <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/laboratory-guidance/en/>
- [5] Spengler J R, McElroy A K, Harmon J R, Ströher U, Nichol S T, Spiropoulou C F. Relationship between Ebola virus real-time quantitative polymerase chain reaction-based threshold cycle value and virus isolation from human plasma [J]. Infect Dis, 2015 May 3. pii: jiv187. [Epub ahead of print]
- [6] 黄庆,张宏雁,毛青,枉前,游建平.埃博拉病毒病实验室检测的方案规划与实践[J].第三军医大学学报, 2015, 37: 295-299.
- [7] Iwen P C, Smith P W, Hewlett A L, Kratochvil C J, Lisco S L, Sullivan J N, et al. Safety considerations in the laboratory testing of specimens suspected or known to contain ebola virus [J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143: 4-5.
- [8] Hill C E, Burd E M, Kraff C S, Ryan E L, Duncan A, Winkler A M, et al. Laboratory test support for ebola patients within a high-containment facility [J]. Lab Med, 2014, 45: e109-e111.

[本文编辑] 孙岩