

不同灭活温度及时间下实时荧光定量 PCR 对新型冠状病毒核酸检测的影响分析

黄 廷

(重庆大学附属涪陵医院 医学检验科 408000)

摘要: 目的: 分析不同灭活温度及时间下实时荧光定量 PCR 对新型冠状病毒核酸检测的影响。方法: 以 2020 年 9 月—2021 年 8 月为研究时限, 收集 46 份 2019 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR) 核酸检测的咽拭子标本, 根据不同的温度以及时间灭活法, 予以核酸提取和扩增, 进行实时荧光定量 PCR (Quantitative Real-time PCR), 分析在灭活条件的差异下, 核酸检测平均循环阈值 (Cycle threshold, Ct 值)。结果: 在 56℃ (60/90) min、65℃ (30/60/90) min、75℃ (15/30) min 灭活处理后, 标本测定结果 (CT) 和 56℃30min 灭活标本比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。结论: 对灭活时间延长, 提升灭活温度到 65℃ (90min)、75℃ (30min), 对病毒测定无影响。但是 95℃灭活不适合应用于病毒核酸检测。

关键词: 灭活温度; 灭活时间; 荧光定量 PCR; 新型冠状病毒; 核酸检测

前言

新型冠状病毒肺炎 (Corona Virus Disease 2019, COVID-19)^[1], 简称“新冠肺炎”, 起始于 2019 年末。新型冠状病毒具有极强的传染性, 经流行病学的研究证实, 无症状感染者也具有传染性, 且传播途径较为广泛, 包含飞沫传播甚至是密切接触, 人群普遍易感。经研究证实^[2], 新型冠状病毒的传染性 > SARS 病毒和 MERS 病毒。当前实时荧光定量 PCR 技术 (Quantitative Real-time PCR) 是诊断 SARS-CoV-2 的主要方式。目前经实验室测定指南建议, 应用 56℃30min 灭活病毒, 灭活后也不会对核酸提取情况和扩增效率进行影响。但因日常工作量相对较大, 因此在灭活阶段时间有所差异。基于此本文将分析不同灭活温度及时间下的测定结果。

1 资料和方法

1.1 基本数据

在 2020 年 9 月—2021 年 8 月, 共计纳入 46 份 SARS-CoV-2 qPCR 核酸检测咽的拭子标本。

1.2 方法

标本编号设定 A/B, 将其分别装进 1.5 毫升 RP 管, 一管容量 200 μl, 编号设定 A1—A12/B1—B12。灭活条件: 分别包括 56℃ (60/90) min、65℃ (30/60/90) min、75℃ (15/30) min、95℃ (5min/10min/15min/30min)。

根据上述条件对标本予以灭活处理, 进行 RNA 提取。扩增: 应用试剂, 应用核酸扩增 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)^[3]反应液 7.5 μl 联合酶混合液 5 μl, +2019 病毒反应液 4 μl+DEPC 水 3.5 μl+核酸提取物 5 μl。

1.3 统计学分析

Excel SPSS17.0 为本次研究软件, 对不同温度和条件的 CT 进行单因素分析, 56℃30min 为参照组。

2 结果

在 56℃ (60/90) min、65℃ (30/60/90) min、75℃ (15/30) min 灭活处理后, 标本测定结果 (CT) 和 56℃30min 灭活标本比较, 组间不具有差异性 (P>0.05), 详情见表 1 (选取 5 份特殊样本)。同时 95℃ (5min/10min/15min/30min) 灭活后标本 qPCR 测定未出现扩增。

表 1: 不同灭活温度及时间下 qPCR 结果 (CT 值)

序号	检测位点	条件							
		1	2	3	4	5	6	7	8

1	ORFlab	37.69	36.80	36.95	35.99	37.35	37.46	37.30	35.95
	N	37.94	37.16	37.81	36.97	37.81	36.33	36.69	36.25
2	ORFlab	37.90	37.19	36.91	38.10	37.91	37.52	37.25	36.60
	N	37.87	37.13	37.00	38.03	37.23	37.81	36.94	37.22
3	ORFlab	37.67	36.99	38.14	37.60	36.87	37.06	38.14	37.85
	N	37.52	36.96	37.99	37.32	36.69	37.18	37.98	37.60
4	ORFlab	36.71	36.77	37.25	37.84	36.90	36.60	37.07	36.66
	N	37.47	36.50	36.91	37.23	36.31	37.16	36.87	36.50
5	ORFlab	36.58	36.77	36.99	37.58	37.34	36.67	36.87	37.75
	N	35.47	36.00	36.90	37.05	36.87	36.29	36.35	36.40

3 讨论

因新型冠状病毒肺炎传染性极强, 且病情进展快, 同时当前无特异性的治疗形式。因此临床对新型冠状病毒肺炎患者实施及早诊断、及早隔离以及及早治疗的方法。而当前新型冠状病毒肺炎感染的肺炎诊疗指南中, RT-PCR 测定是确诊的关键方式^[4]。

通过本文结果证实: 在 56℃ (60/90) min、65℃ (30/60/90) min、75℃ (15/30) min 灭活处理后, 标本测定结果 (CT) 和 56℃30min 灭活标本比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。说明上述灭活条件不会影响病毒的核酸提取以及扩增, 而灭活温度在 95℃时会对核酸提取以及扩增产生影响, 由此说明 95℃灭活条件并不适用于核酸测定。

综上所述, 在适当条件下提升灭活的温度和延长灭活时间, 不会影响病毒核酸测定结局。

参考文献:

- [1] 周帅锋,李世康,陈雨,等.微滴式数字 PCR 和实时荧光定量 PCR 对新型冠状病毒肺炎患者不同时间血便尿中核酸检测结果初步探讨[J].实用预防医学,2020,27(11):1316-1320.
 - [2] 陈培松,何宇婷,黄裕立,等.不同方式灭活口咽拭子标本对 2019 新型冠状病毒实时荧光定量 PCR 检测结果的影响[J].中华检验医学杂志,2020,43(4):364-367.
 - [3] 吕莉琨,李力,刘小畅,等.天津市 COVID-19 患者治疗后不同类型标本中新型冠状病毒核酸检测结果分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2020,40(6):405-409.
 - [4] 袁晓宁,孟庆阳,沈宁,等.新型冠状病毒肺炎病区环境及医务人员防护设备表面 SARS-CoV-2 核酸污染的检测与评价[J].北京大学学报 (医学版),2020,52(5):803-808.
- 第一作者: 黄廷, 男, 1983-05-07 出生, 本科, 主管技师, 检验专业组长, 研究方向: 检验医学