

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.02.019

不同灭活温度对新型冠状病毒核酸检测的影响

严 谨, 陈小凤, 熊金萍, 蒋佳辰, 夏凤霞, 何九宏[△]
重庆市渝北区疾病预防控制中心微生物科, 重庆 401120

摘 要:目的 探讨不同灭活温度处理对新型冠状病毒核酸检测的影响。方法 收集该中心 2020 年 1 月 25 至 2 月 25 日采集的新型冠状病毒核酸检测阳性标本 14 份, 每份标本分别采取未灭活 56 ℃、35 min 和 65 ℃、15 min 恒温金属浴灭活处理, 比较未灭活标本和灭活标本循环阈值(Ct 值), 并进行统计学分析。结果 未灭活组和 56 ℃、35 min 灭活处理组, 未灭活组和 65 ℃、15 min 灭活处理组, 56 ℃、35 min 灭活处理组和 65 ℃、15 min 灭活处理组开放读码框 1ab(ORF1ab)、核衣壳蛋白(N)基因扩增 Ct 值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在 Ct 值 ≥ 34 的标本中未灭活组和 56 ℃、35 min 灭活处理组, 未灭活组和 65 ℃、15 min 灭活处理组, 56 ℃、35 min 灭活处理组和 65 ℃、15 min 灭活处理组 ORF1ab、N 基因扩增 Ct 值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。在 Ct 值 < 34 的标本中未灭活组和 56 ℃、35 min 灭活处理组, 未灭活组和 65 ℃、15 min 灭活处理组, 56 ℃、35 min 灭活处理组和 65 ℃、15 min 灭活处理组 ORF1ab、N 基因扩增 Ct 值差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 使用 56 ℃、35 min 灭活处理和 65 ℃、15 min 灭活处理新型冠状病毒标本对核酸检测结果无明显影响, 对 Ct 值较大标本也未发现有明显影响, 对于试验条件有限的基层检测机构可以采用上述方式处理标本以保护实验人员安全。

关键词:新型冠状病毒; 实时荧光定量 PCR; 核酸; 病毒灭活

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)02-0214-03

Effect of the thermal inactivation on SARS-CoV-2 at different temperatures on real-time quantitative PCR detection

YAN Jin, CHEN Xiaofeng, XIONG Jinping, JIANG Jiachen, XIA Fengxia, HE Jiuhong[△]
Department of Microbiology, Chongqing Yubei District Center for Disease Control and Prevention,
Chongqing 401120, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of the thermal inactivation on SARS-CoV-2 at different temperatures. **Methods** A total of 14 clinical samples from patients whose nucleic acid tests were positive for SARS-CoV-2 from January 25 to February 25, 2020 in our medical center were collected. Each sample was treated at 56 ℃ and 65 ℃ for 35 minutes and 15 minutes in a constant temperature metal bath, respectively. The differences of cycle threshold (Ct) between non-inactivated samples and inactivated samples were determined, and the data were statistically analyzed. **Results** There were no statistically significant differences in the ORF1ab or N amplified Ct value between non-inactivated group and the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group ($P > 0.05$), the non-inactivated group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$), as well as the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$). In samples with a Ct value greater than 34, there were no statistically significant differences in the ORF1ab or N amplified Ct value among non-inactivated group and the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group ($P > 0.05$), the non-inactivated group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$), as well as the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$). In samples with a Ct value less than 34, there were no statistically significant differences in the ORF1ab or N amplified Ct value among non-inactivated group and the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group ($P > 0.05$), the non-inactivated group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$), as well as the inactivated at 56 ℃ for 35 minutes group and the inactivated at 65 ℃ for 15 minutes group ($P > 0.05$). **Conclusion** The thermal inactivation of SARS-CoV-2 at different temperatures for selected treated time (56 ℃, 35 minutes and 65 ℃, 15 minutes) has no significant effect on the nucleic acid detected results, including in the samples with a large

作者简介: 严谨, 男, 主管技师, 主要从事微生物检验技术方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 1171251@qq.com。

本文引用格式: 严谨, 陈小凤, 熊金萍, 等. 不同灭活温度对新型冠状病毒核酸检测的影响[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(2): 214-216.

Ct value. For the basic institutions with limited experimental conditions, clinical samples of SARS-CoV-2 could be processed in the manner described in this study to protect laboratory personnel.

Key words: SARS-CoV-2; real-time quantitative PCR; nucleic acid; virus inactivation

在开展新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测的工作中,生物检材有极强的传染性,给实验室操作人员带来较大的生物安全隐患和心理压力。冠状病毒不耐高温,严重急性呼吸综合征(SARS)病毒在 56 ℃、30 min,70 ℃、15 min 时已经失活^[1],这提示可以采取高温方式灭活 SARS-CoV-2 来保护实验操作人员的生物安全。SARS-CoV-2 和 SARS 病毒同属 β 属冠状病毒,理化性质具有参考性,但温度过高可能会对核酸完整性产生破坏,降低 PCR 检测效果,另外,考虑到温度传导速度,本研究选择 56 ℃、35 min 和 65 ℃、15 min 两组试验条件。已有研究显示,使用 56 ℃、30 min 处理咽拭子标本灭活病毒对后续 SARS-CoV-2 核酸检测无明显影响^[2],但由于标本量少且循环阈值(Ct 值)较低,无法对 Ct 值较高的标本是否具有相同的一致性进行评价。因此本研究将探讨不同 Ct 值标本,特别是 Ct 值较高的标本在不同灭活温度处理后对检测 SARS-CoV-2 核酸的结果是否存在影响。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本中心 2020 年 1 月 25 日至 2 月 25 日采集的 SARS-CoV-2 核酸检测阳性标本 14 份。

1.2 试剂与仪器 达安基因 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法,批号:2020018),达安基因核酸提取和纯化试剂(DA0633),达安 Stream 全自动核酸提取仪,Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex 实时定量 PCR 仪,Eppendorf ThermoMixer™ C 振荡器。

1.3 方法 实验人员按照《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)》^[3]进行实验操作和生物安全防护。(1)各标本取病毒采样液 210 μL 分装到 3 个 EP 管中,做好标记,由于恒温金属浴温度波动系数更小^[4],标本间不易污染,分别用 Eppendorf Thermo-Mixer™ C 振荡器 56 ℃、35 min,65 ℃、15 min 灭活处理。(2)核酸提取和体系配制使用达安 Stream 全自动核酸提取仪以及配套提取试剂(DA0633)。(3)核酸扩增使用 Applied Biosystems™ QuantStudio™ 7 Flex 实时定量 PCR 仪,每批结果设阴阳性对照,在阴阳性对照结果正常的情况下,结果有效。每个测试设置 3 次复孔,取平均 Ct 值进行计算。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,对 SARS-CoV-2 的开放读码框 1ab (ORF1ab)和核衣壳蛋白(N)基因在未灭活组和灭活

组中的 Ct 值通过 Anderson-Darling、D' Agostino-Pearson、omnibus、Shapiro-Wilk、Kolmogorou-Smirnou 进行正态性检验, $P>0.05$ 符合正态分布。对不同温度灭活的 Ct 值差异采用非参数检验的 Mann-Whitney *U* 检验进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 未灭活处理及不同温度灭活处理后标本的荧光定量 PCR 检测结果 对标本进行荧光定量 PCR 检测,并对检测结果进行统计分析,见表 1。对未灭活组和不同温度灭活组的结果进行非参数检验 Mann-Whitney *U* 分析,结果显示,56 ℃、35 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值差异无统计学意义($U=95.50,95.00,P>0.05$),65 ℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值的差异无统计学意义($U=94.00,94.50,P>0.05$),56 ℃、35 min 和 65 ℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值的差异无统计学意义($U=96.00,P>0.05$)。

表 1 不同灭活温度处理对 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值的影响

标本号	未灭活组		56 ℃、35 min 灭活处理组		65 ℃、15 min 灭活处理组	
	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N
1	39.52	38.56	41.37	38.47	40.33	39.26
2	37.63	36.44	37.52	37.95	38.77	36.75
3	37.55	35.86	37.24	37.93	37.66	35.75
4	37.24	35.63	37.20	36.12	37.16	35.68
5	36.76	34.95	37.00	35.02	36.66	35.65
6	35.69	34.77	36.98	34.92	36.23	34.94
7	35.17	34.40	36.23	33.22	35.16	32.91
8	35.12	32.94	34.56	32.83	34.02	31.27
9	33.19	30.88	32.58	30.51	31.99	30.12
10	28.32	27.77	28.66	26.32	28.03	26.98
11	26.33	25.34	27.14	26.11	27.38	25.97
12	24.38	23.58	25.29	25.65	26.39	24.78
13	22.68	22.97	22.98	22.87	23.34	23.69
14	21.25	20.17	22.56	22.33	21.58	22.97

2.2 不同 Ct 值标本在不同灭活温度处理下对 SARS-CoV-2 核酸检测结果的影响 本研究选择了 Ct 值≥34 和 Ct 值<34 的标本在未灭活和不同灭活温度处理下的荧光定量 PCR 结果进行非参数检验 Mann-Whitney *U* 分析。对于 Ct 值≥34 的标本,结

果显示,56℃、35 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值的差异无统计学意义($U=31.50, 31.00, P>0.05$),65℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值的差异无统计学意义($U=14.00, 15.00, P>0.05$),56℃、35 min 和 65℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值差异无统计学意义($U=16.00, P>0.05$)。

对于 Ct 值 <34 的标本在未灭活和不同灭活温度方式下进行荧光定量 PCR 分析,结果显示,56℃、35 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值差异无统计学意义($U=16.00, 16.00, P>0.05$),65℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值与未灭活组 Ct 值差异无统计学意义($U=24.00, 23.00, P>0.05$),56℃、35 min 和 65℃、15 min 灭活处理组的 ORF1ab 和 N 基因 Ct 值的差异无统计学意义($U=32.00, P>0.05$)。

3 讨论

生物安全是开展病原微生物操作处理工作必须考虑的首要因素,在标本的采集以及核酸提取过程中要采取相应的防护措施或应在一定生物安全防护等级的实验室进行。据研究发现,SARS-CoV-2 可能的传播方式是经飞沫传播、接触传播以及呼吸道气溶胶近距离传播^[6],由于在相对密闭的环境中长时间暴露于高浓度气溶胶情况下存在气溶胶传播的可能,加大了实验室操作人员感染的风险。为减少病毒的生物危害,研究者对高压^[6]、超声波^[7]、伽马射线照射^[8]、乙醇等方式处理标本进行探讨,但这些方法需要额外的设备或试剂,且可能降低核酸检测的敏感性,同时,各实验室条件不尽相同,不易推广。SARS-CoV-2 是一种包膜脂质病毒,对温度敏感,高温处理标本简单易行,对降低实验室人员感染风险有重要意义,但由于高温可能会使标本 RNA 降解,影响检测结果准确性,目前,市面上 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒检出限大都在 500~1 000 copy/mL,阳性判读 Ct 值在 30~40^[9],对于灰区标本,由于接近试剂盒本身检出限,样品处理不当可能会造成检测结果假阴性。本研究结果表明,56℃、35 min 和 65℃、15 min 恒温金属浴灭活处理灰区标本对后续核酸检测结果并无明显影响,为后续 SARS-CoV-2 核酸检测提供了不同的策略。分析原因,核酸降解的因素众多,首先 SARS-CoV-2 是单链 RNA 病毒,不如双链 DNA 稳定;其次,细胞的内源性 RNA 酶和外源性 RNA 酶较多,且活性强,高温使 RNA 酶活性增强,不利于 RNA 病毒

的提取和保存。然而,商品化核酸提取试剂的裂解液对 RNA 酶有充分的灭活作用^[10],降低了高温对核酸降解的不利影响。虽然高温对病毒灭活效果较好,但研究表明不同蛋白溶液和稳定剂对灭活效果存在影响^[11]。因此,实验室检测人员在处理标本的过程中仍然应按照生物安全三级防护要求做好个人防护。

参考文献

- [1] 鲍作义,刘永健,刘思扬,等. SARS 病毒对温度耐受性的实验研究[J]. 中国消毒学杂志,2003,20(3):161-162.
- [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] 中华人民共和国国家卫生健康委员会办公厅,国家中医药管理局办公室. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第六版)的通知:国卫办医函[2020]145 号[EB/OL]. (2020-02-19)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/8334a8326dd94d329df351d7da8aefc2.shtml>.
- [4] 刘东勃. 金属恒温塑性力学过程的热力学研究[J]. 工程热物理学报,1981,2(3):205-210.
- [5] 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.
- [6] ESPY M J, UHL J R, SLOAN L M, et al. Detection of vaccinia virus, herpes simplex virus varicella-zoster virus, and Bacillus anthracis DNA by Light Cycler polymerase chain reaction after autoclaving; implications for biosafety of bioterrorism agents[J]. Mayo Clin Proceed, 2002, 77(7):624-628.
- [7] LUNA V A, KING D, DAVIS C, et al. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of Bacillus anthracis spores in environmental powders and nasal swabs[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(30):1252-1255.
- [8] DANG J L, HEROUX K, KEARNEY J, et al. Emanuel. Bacillus spore inactivation methods affect detection assays[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8):3665-3670.
- [9] 郭元元,王昆,张宇,等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J]. 重庆医学,2020,49(15):2435-2439.
- [10] 刘洪波. 流感病毒核酸测定分析前变量和生物危害暴露风险评估[D]. 武汉:华中科技大学,2012.
- [11] KONKLE B A, SKINNER M, IORIO A, et al. Hemophilia trials in the twenty-first century: defining patient important outcomes[J]. Res Pract Thromb Haemost, 2019, 3(2):184-192.