

· 论 著 · DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.07.018

不同灭活方式对携带新型冠状病毒的物体表面标本核酸检测结果的影响

徐建男

江苏省苏州市吴中区疾病预防控制中心检验科, 江苏苏州 215128

摘要:目的 研究不同灭活方式对携带新型冠状病毒的物体表面标本核酸检测结果的影响。方法 25 份核酸检测结果为阳性的物体表面标本, 每份标本分为 4 份, 分别采用 4~8 °C 未灭活(未灭活组), 以及 60 °C 水浴 30 min, 56 °C 水浴 45 min, 75% 乙醇 30 min 灭活处理(灭活组), 比较不同处理方式的平均循环阈值(Ct 值)。结果 未灭活组和灭活组 Ct 值比较, 差异有统计学意义(ORF 基因: $F=48.740, Eta=0.720, P<0.05$; N 基因: $F=65.597, Eta=0.781, P<0.05$); 灭活组 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min Ct 值比较, 差异无统计学意义(ORF 基因: $P=0.306$; N 基因: $P=0.920$), 60 °C 水浴 30 min 与 75% 乙醇 30 min Ct 值比较, 差异有统计学意义(ORF 基因: $P<0.05$; N 基因: $P<0.05$), 56 °C 水浴 45 min 与 75% 乙醇 30 min Ct 值比较, 差异有统计学意义(ORF 基因: $P<0.05$; N 基因: $P<0.05$)。未灭活组 ORF 基因 Ct 值为 22~26 时, 未灭活组和灭活组 ORF 基因、N 基因 Ct 值比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), Ct 值比较接近; 随着 Ct 值的增大, 未灭活组和灭活组处理差别逐渐加大, 当未灭活组 ORF 基因 Ct 值 >36 时, 灭活组不同处理方式的 ORF 基因的全部 Ct 值 >40 ; 而未灭活组 ORF 基因 Ct 值 ≥ 34 时, 75% 乙醇 30 min 处理 ORF 基因 Ct 值 >40 。结论 携带新型冠状病毒的物体表面标本在核酸检测前进行灭活处理, 核酸检测阳性结果有可能转阴, 75% 乙醇处理相比 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min 处理转阴的概率更大。

关键词: 物体表面; 新型冠状病毒; 灭活; 实时荧光定量聚合酶链反应

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)07-0934-04

The influence of different inactivation methods on SARS-CoV-2 nucleic acid detection results of object surface

XU Jiannan

Department of Clinical Laboratory, Wuzhong Center for Disease Control and Prevention, Suzhou, Jiangsu 215128, China

Abstract: Objective To study the effect of different inactivation methods on the detection results of the SARS-CoV-2 nucleic acid carried on the object surface. **Methods** A total of 25 surface specimens with positive nucleic acid test results were divided into 4 samples and were inactivated at 4~8 °C (non-inactivated group), inactivated at 60 °C for 30 min, inactivated at 56 °C for 45 min, inactivated at 75% ethanol for 30 min (inactivated group) respectively. Ct values of different treatment methods were compared. **Results** The Ct values between the non-inactivated group and the inactivated group were statistically significant (ORF gene: $F=48.740, Eta=0.720, P<0.05$; N gene: $F=65.597, Eta=0.781, P<0.05$). There was no statistical significance between 60 °C 30 min and 56 °C 45 min within inactivated groups (ORF gene: $P=0.306$; N gene: $P=0.920$), but there was statistical significance between 60 °C 30 min and 75% ethanol 30 min (ORF gene: $P<0.05$; N gene: $P<0.05$). Moreover, there was statistical significance between 56 °C 45 min and 75% ethanol (ORF gene: $P<0.05$; N gene: $P<0.05$). There was no statistical difference between the non-inactivated group and inactivated group when ORF gene Ct values between 22 and 26 in non-inactivated group ($P>0.05$), the values were relatively close. As Ct values increased, the differences between non-inactivated group and inactivated group gradually increased. When the ORF gene Ct values of non-inactivated group were >36 , all the ORF gene Ct values of inactivated group with different treatments were >40 , and when the ORF gene Ct values of non-inactivated group were ≥ 34 , the ORF gene Ct values of the 75% ethanol 30 min treatment were >40 . **Conclusion** The positive result of the SARS-CoV-2 nucleic acid carried on the object surface might

作者简介: 徐建男, 男, 主管技师, 主要从事免疫研究。

本文引用格式: 徐建男. 不同灭活方式对携带新型冠状病毒的物体表面标本核酸检测结果的影响[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(7): 934-937.

turn negative when the object were inactivated before the test, 75% ethanol 30 min treatment gave a greater chance of turning negative than 60 °C 30 min and 56 °C 45 min treatments.

Key words: object surface; SARS-CoV-2; inactivation; Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

2020 年 2 月 11 日, 国家卫生健康委员会发布了关于修订新型冠状病毒肺炎英文命名事宜的通知, 决定将“新型冠状病毒肺炎”英文名称修订为“COVID-19”, 同时, 国际病毒分类委员会声明将新型冠状病毒命名为“SARS-CoV-2”。目前, 国家卫生健康委员会推荐的病原学检查方法是实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 和新一代测序 (NGS) 方法, 由于 NGS 方法存在价格昂贵、人员要求高等局限性, 基层医疗机构和疾病预防控制中心仍然是以 RT-PCR 检测为主^[1-2]。中华医学会检验医学分会发布的《新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识》指出, 需将待测标本 56 °C 孵育至少 45 min 或更高温度进行灭活^[3]。LECLERCQ 等^[4]对中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-Cov) 的研究表明其在 56 °C 孵育 25 min, 病毒滴度会降低 10⁻⁴, 进一步升高温度到 65 °C 处理 15 min 没有任何残留。RABENAU 等^[5]也发现 SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 在 56 °C 孵育 30 min 后, 滴度低于检测限, 温度升高到 60 °C 30 min, SARS-CoV 完全被灭活。物体上携带的新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 也可以传染给人类, 所以各级检测机构开展了对物体表面携带 SARS-CoV-2 的检测。为了明确 SARS-CoV-2 灭活后是否对核酸检测有影响, 本研究将对灭活前和不同灭活处理方式 (56 °C 45 min、60 °C 30 min、75% 乙醇 30 min 处理) 灭活后平均循环阈值 (Ct 值) 进行比较分析。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选择区级检测机构送检的物体表面标本 25 份, 经过 RT-PCR 检测结果均为阳性, 其中 14 份 (标本号 1~14) 标本为苏州市相城区疾病预防控制中心筛选送检的阳性标本, 11 份 (标本号 15~25) 标本为苏州市工业园区疾病预防控制中心筛选送检的阳性标本。

1.2 标本处理及灭活 每份标本平均分成 4 份, 采

用 DMEM 培养液 (Gibco 公司, 货号: 12430-054) 分别进行 4 种不同的处理方式: (1) 未灭活组, 100 μL 标本 + 300 μL DMEM 4~8 °C, 30 min; (2) 灭活组, ① 100 μL 标本 + 300 μL DMEM 60 °C, 30 min; ② 100 μL 标本 + 300 μL DMEM 56 °C, 45 min; ③ 100 μL 标本 + 300 μL 无水乙醇, 形成终浓度 75% 的环境, 4~8 °C, 30 min。

1.3 核酸提取及 RT-PCR 检测 采用 Roche MagNA Pure 96 system 全自动核酸提取仪配套的 MagNa Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit 提取病毒核酸, 采用达安生物科技有限公司的 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒 (国械注准 20203400063), 按试剂盒说明书在罗氏 LightCycler 480 II PCR 仪进行扩增, 同时检测 ORF 和 N 基因, 阳性判读标准参考试剂说明书。所有标本重复检测 3 次, 记录 Ct 值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 未灭活组和不同灭活组间标本的 Ct 值采用 Mauchly 球形度检验和 Greenhouse-Geisser 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 未灭活组与灭活组标本 Ct 值比较 不同处理方式下 ORF 基因和 N 基因的 Ct 值分布, 见表 1。未灭活组和灭活组 Ct 值比较, 差异有统计学意义 (ORF 基因: $F = 48.740, Eta = 0.720, P < 0.05$; N 基因: $F = 65.597, Eta = 0.781, P < 0.05$); 灭活组 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min Ct 值比较, 差异无统计学意义 (ORF 基因: $P = 0.306$; N 基因: $P = 0.920$), 60 °C 水浴 30 min 与 75% 乙醇 30 min Ct 值比较, 差异有统计学意义 (ORF 基因: $P < 0.05$; N 基因: $P < 0.05$), 56 °C 水浴 45 min 与 75% 乙醇 30 min Ct 值比较, 差异有统计学意义 (ORF 基因: $P < 0.05$; N 基因: $P < 0.05$)。

表 1 未灭活组与灭活组 ORF 基因和 N 基因平均 Ct 值比较

标本号	未灭活组		灭活组					
	4~8 °C 30 min		60 °C 水浴 30 min		56 °C 水浴 45 min		75% 乙醇 30 min	
	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因
1	34.44	33.64	36.04	35.47	36.29	34.78	>40.00	37.21
2	23.75	21.81	23.89	21.65	24.14	22.25	25.21	22.87
3	24.22	23.51	24.91	23.12	25.67	24.25	26.28	24.33
4	25.09	22.84	25.87	23.56	25.68	23.47	27.23	24.98

续表 1 未灭活组与灭活组 ORF 基因和 N 基因平均 Ct 值比较

标本号	未灭活组		灭活组					
	4~8 °C 30 min		60 °C 水浴 30 min		56 °C 水浴 45 min		75%乙醇 30 min	
	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因	ORF 基因	N 基因
5	30.75	28.53	32.20	29.91	31.59	29.57	33.69	31.06
6	34.58	32.49	35.81	34.25	36.42	34.32	>40.00	37.52
7	22.58	21.12	22.97	21.01	23.61	22.21	25.31	23.92
8	34.98	32.83	36.87	34.48	36.55	34.65	>40.00	>40.00
9	34.75	32.30	36.56	33.67	35.96	34.07	>40.00	37.57
10	33.76	31.37	35.46	32.34	34.92	32.68	37.84	36.18
11	36.61	33.87	>40.00	37.78	>40.00	37.63	>40.00	>40.00
12	24.85	22.87	25.29	22.02	25.05	23.11	26.79	24.32
13	29.61	28.36	31.75	29.56	31.56	30.54	34.85	33.22
14	36.34	35.36	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
15	37.35	36.23	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
16	30.50	28.43	32.51	31.97	33.01	30.72	35.26	34.28
17	27.59	26.32	29.51	27.39	30.10	28.41	32.51	31.84
18	37.07	34.66	>40.00	36.72	>40.00	37.08	>40.00	>40.00
19	36.58	34.58	>40.00	37.22	>40.00	37.74	>40.00	>40.00
20	36.25	33.85	>40.00	36.42	>40.00	36.48	>40.00	37.01
21	33.90	31.24	34.91	32.77	35.19	32.43	36.68	35.75
22	32.36	29.90	34.97	31.92	34.17	30.76	36.56	35.54
23	36.47	36.87	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
24	36.70	35.59	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00	>40.00
25	28.86	27.46	30.15	28.84	30.48	29.87	32.95	32.21

2.2 未灭活组和灭活组 ORF 基因和 N 基因 Ct 值区间变化 从图 1 和图 2 中可以看出当未灭活组 ORF 基因 Ct 值为 22~26 时,未灭活组和灭活组 Ct 值比较接近,两组 ORF 基因、N 基因 Ct 值比较,差异无统计学意义($P>0.05$);随着未灭活组 ORF 基因 Ct 值的增大,未灭活组和灭活组 Ct 值差异逐渐加大,当未灭活组 ORF 基因 Ct 值 >36 时,灭活组不同处理方式下 ORF 基因的全部 Ct 值 >40 ;而未灭活组 ORF 基因 Ct 值 ≥ 34 时,75%乙醇 30 min 处理 ORF 基因 Ct 值 >40 。

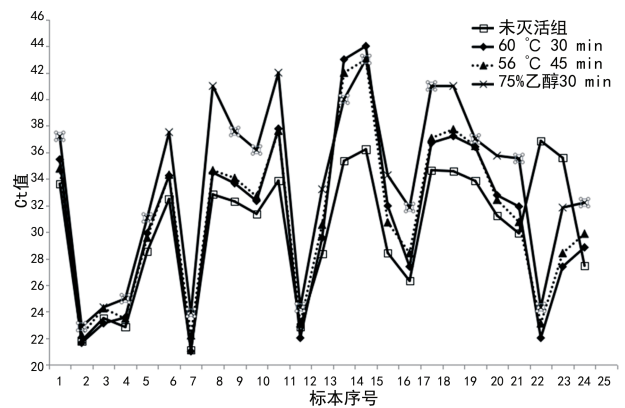


图 2 未灭活组和灭活组 N 基因 Ct 值的区间变化

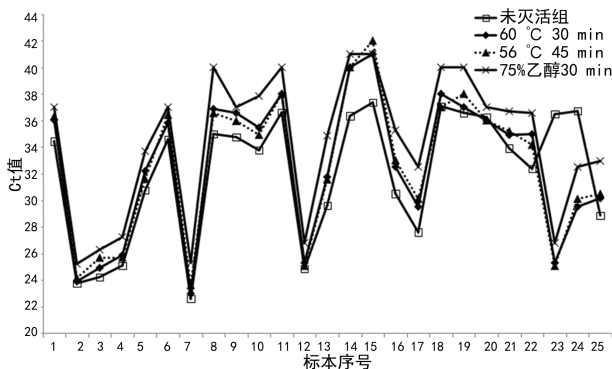


图 1 未灭活组和灭活组 ORF 基因 Ct 值的区间变化

3 讨论

新型冠状病毒肺炎作为突发公共卫生事件,其传播速度快,感染性强,给全人类带来了严重的健康威胁和经济负担。核酸检测作为目前确诊新型冠状病毒肺炎最主要的方法,灵敏度高,特异性强,在疾病早期快速诊断和动态观察抗病毒治疗效果中具有优势^[6]。SARS-CoV-2 属于 β 属冠状病毒,与蝙蝠 SARS 样冠状病毒同源性超过 85%,具有高度的传染

性^[7]。《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(第四版)》中指出 SARS-CoV-2 对紫外线和热敏感, 56 °C 30 min、乙醚、75%乙醇、含氯消毒剂、过氧乙酸和氯仿等脂溶剂均可有效灭活病毒^[8]。

在实验室检测中如何能降低实验风险, 这对全国范围内各级医疗机构开展核酸检测有着非常重要的作用, 目前可采用前处理灭活病毒方式降低实验人员感染的风险。本研究发现, 未灭活组和灭活组 Ct 值比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 在未灭活组 ORF 基因 Ct 值为 22~26 时, 未灭活处理和各灭活组 ORF 基因、N 基因 Ct 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这与陈培松等^[9] 研究结果一致。随着未灭活组 ORF 基因 Ct 值增加, 灭活组 ORF 基因 Ct 值相应也会增大, 但是当未灭活组 ORF 基因 Ct 值 > 36 时, 灭活组 ORF 基因 Ct 值增加更大, Ct 值会超过 40, 依据试剂盒说明书要求 Ct 值 > 40 判为阴性, 由此会出现漏检的可能。在灭活组中 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min Ct 值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 两种灭活方式相差不大, 而 75%乙醇 30 min 相比 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min 处理, Ct 值增加更多, 当未灭活处理 Ct 值 ≥ 34 时, 75%乙醇 30 min 处理就有可能超过 40, 从而判为阴性。本研究中 12 份标本(标本号 1、6、8、9、11、14、15、18、19、20、23、24)未灭活时 ORF 基因 Ct 值 ≥ 34 , 标本 14、15、23 和 24 号如果选择灭活处理就非常有可能判为阴性, 造成漏筛。本研究发现灭活处理确实会造成 RNA 降解, 特别是当标本携带病毒水平比较低时, 灭活处理对检测结果影响较大, 有可能造成漏检, 这也与段秀枝等^[10] 研究结果一致。

由此可见, 物体表面携带 SARS-CoV-2 的标本在核酸检测前进行灭活处理, 核酸检测阳性结果有可能转阴, 采用 75%乙醇 30 min 处理相比 60 °C 水浴 30 min 和 56 °C 水浴 45 min 处理转阴的概率更大。因此, 在保障生物安全的前提下, 是否进行标本灭活处理, 各实验室需慎重选择, 避免出现漏检。

本研究分析了采用不同灭活方式对物体表面 SARS-CoV-2 核酸检测结果的影响, 这是目前实验室检测过程中遇到的现实问题, 市一级疾病预防控制中心为了确保后续研究和满足阳性标本的复核需要, 一般不进行灭活检测, 但是目前开展检测的医疗机构都对拟检测标本进行了灭活, 而且灭活的条件还不尽相同, 遇到核酸滴度很低的标本时极易漏检, 而这种漏检在特殊情况下有较大传播风险, 尤其是在大面积筛查时应注意这种风险。另外, 由于灭活会升高临床检测标本的 Ct 值, 而这在实际检测中会导致该类灭活

标本(临界标本)结果不易判读, 结果经常出现单靶阳性, 复核也不易得到准确结果, 造成漏检或误判。因此, 在高度怀疑标本为阳性标本时不建议事先进行灭活处理, 可以在做好个人防护的情况下利用提取核酸的过程完成灭活, 这样能尽量避免漏检。

本研究中的实验室数据还比较粗糙, 样本量较小, 还不能很好地推广结论。因此, 建议扩大样本量, 并使用其他高灵敏度的方法或抗原抗体方法来验证是否漏检, 以进行更可靠的评价。

参考文献

- [1] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [2] 国家卫生健康委办公厅, 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(试行第七版)的通知: 国卫办医函[2020]184号[EB/OL]. (2020-03-03)[2021-06-02]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-03/04/content_5486705.htm.
- [3] 中华医学会检验医学分会. 2019 新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(13): 968-973.
- [4] LECLERCQ I, BATÉJAT C, BURGUIÈRE A M, et al. Heat inactivation of the middle east respiratory syndrome coronavirus[J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2014, 8(5): 585-586.
- [5] RABENAU H F, CINATL J, MORGENSTERN B, et al. Stability and inactivation of SARS coronavirus[J]. *Med Microbiol Immunol*, 2005, 194(1/2): 1-6.
- [6] 许金和, 王水良, 张胜行, 等. 新型冠状病毒核酸检测方法[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(17): 2138-2142.
- [7] CHU D K, PAN Y, CHENG S M, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 549-555.
- [8] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(第四版): 国卫办医函[2020]109号[EB/OL]. (2020-02-06)[2021-06-02]. <http://www.nhc.gov.cn/jkj/s3577/202002/573340613ab243b3a7f61df260551dd4.shtml>.
- [9] 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.
- [10] 段秀枝, 王旭楚, 余攀, 等. 病毒灭活处理对 2019 新型冠状病毒核酸检测弱阳性结果的影响[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(4): 358-363.