

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 09. 002

批分析(多管同测)法检测低浓度新型冠状病毒核酸*

雷 震¹,斯志娟^{2△}

南昌大学附属感染病医院/南昌市第九医院:1. 输血科;2. 检验科,江西南昌 330002

摘 要:目的 探讨批分析(多管同测)法实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸的临床意义。**方法** 用细胞保存液将 SARS-CoV-2 全基因组假病毒质控品阶梯稀释形成 S1(1:10)、S2(1:20)、S3(1:40)、S4(1:80)、S5(1:160)、S6(1:320)、S7(1:640)系列梯度浓度样本盘,用 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂检测样本盘样本,每批各浓度平行检测 6 管,共检测 6 批次。**结果** ORF1ab 单管阳性检出率与批分析阳性检出率分别为 S1(50.00%/100.00%)、S2(47.22%/100.00%)、S3(16.67%/66.67%)、S4(13.89%/66.67%);N 基因单管阳性检出率与批分析阳性检出率分别为 S1(100.00%/100.00%)、S2(91.67%/100.00%)、S3(61.11%/100.00%)、S4(30.56%/83.33%)、S5(27.78%/100.00%)、S6(11.11%/50.00%)、S7(5.55%/33.33%)。**结论** 批分析(多管同测)法可以提高低浓度核酸样本的阳性检出率,在临床有提高检测灵敏度需求时可以采用此方法。

关键词:批分析法; 多管同测; 低浓度; 新型冠状病毒; 核酸; 检出率

中图法分类号:R34 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2023)09-1190-04

Batch analysis (multi-tube simultaneous test) on detection of SARS-CoV-2 nucleic acid at low concentrations*

LEI Zhen¹,SI Zhijuan^{2△}

1. Department of Blood Transfusion; 2. Department of Laboratory Medicine, the Affiliated Infection Hospital of Nanchang University/the Ninth Hospital of Nanchang City, Nanchang, Jiangxi 330002, China

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of SARS-CoV-2 nucleic acid detection by real-time PCR with batch analysis (multi-tube simultaneous test). **Methods** SARS-CoV-2 whole-genome pseudovirus quality control samples were diluted gradiently with cell preservation solution to form S1 (1:10), S2(1:20), S3(1:40), S4(1:80), S5(1:160), S6(1:320) and S7 (1:640) sample trays, then real-time PCR was applied to detect these sample trays, samples of each concentration were tested 6 times parallelly in one detection batch, and 6 batches in total were tested. **Results** The positive detection rates of ORF1ab single tube analysis and batch analysis were S1 (50.00%/100.00%), S2 (47.22%/100.00%), S3 (16.67%/66.67%), S4 (13.89%/66.67%), while the positive rates of N gene in single tube analysis and batch analysis were S1 (100.00%/100.00%), S2 (91.67%/100.00%), S3 (61.11%/100.00%), S4 (30.56%/83.33%), S5 (27.78%/100.00%) and S6 (11.11%/50.00%), S7 (5.55%/33.33%). **Conclusion** Batch analysis (multi-tube simultaneous test) can improve the positive detection rate of nucleic acid samples with low concentration, and it can be used in clinical practice when there is a need to improve the sensitivity of the test.

Key words: batch analysis; multi-tube simultaneous ; low concentration; SARS-CoV-2; nucleic acid; detection rate

实时荧光聚合酶链反应(PCR)用于感染性疾病的诊断(病原体检测)具有快速、简便、准确、高通量等优势。近年来,核酸检测相关产业链的各个环节更是迅猛发展,但假阴性问题也一直困扰着疫情防控各方面。临床意义上的假阴性是指患者的临床症状及影像学证据高度疑似新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染

疾病,而 SARS-CoV-2 核酸检测多次或始终为阴性^[1]。引起假阴性的原因较多,包括试剂、检测、采样、储存运送、疾病病程阶段及病毒变异等因素,导致样本中无病毒或病毒载量低于试剂的检测下限^[1-6]。实时荧光 PCR 具有较高的检测灵敏度^[7],只需 1 copy 靶序列进入实时荧光 PCR 扩增体系,经过若干次循

* 基金项目:江西省卫生健康委普通科技计划项目(20204119)。
作者简介:雷震,男,副主任技师,主要从事临床检验及输血相关研究。 △ 通信作者,E-mail:190361308@qq.com。

环扩增后,就能检测到靶核酸扩增信息。因此,决定检测下限的因素只有进入实时荧光 PCR 扩增体系的实际样本量。笔者采用批分析(多管同测)的方法增加实际进入扩增体系的样本量,以提高检测灵敏度及低浓度样本的检出率。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 SARS-CoV-2 全基因组假病毒质控品(广州市赛腾医疗科技有限公司产品,批号:20210901),水平 3(L2),阳性。该产品以假病毒为载体,覆盖经过修饰优化后的 SARS-CoV-2 靶标基因,包括 ORF1ab 基因、N 基因、E 基因和 S 基因等。

1.2 仪器与试剂 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统(上海宏石医疗科技有限公司产品);SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂盒(圣湘生物科技股份有限公司产品,批号:2021155),靶区域为 SARS-CoV-2 ORF1ab 及编码核衣壳蛋白 N 基因的特异性保守序列;样本释放剂(圣湘生物科技股份有限公司产品,批号:2021004-2);细胞保存液(圣湘生物科技股份有限公司产品,批号:12021003)。

1.3 方法

1.3.1 系列梯度浓度样本盘的选择 用细胞保存液将质控品稀释为 1 : 10、1 : 100、1 : 1 000 梯度浓度样本,用 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂(样本释放剂裂解法释放核酸,一步法)检测梯度浓度样本,各平行检测 3 管;然后选择 3 管均阳性的 1 : 10 浓度样本,倍比稀释形成系列梯度浓度样本盘 S1(1 : 10)、S2(1 : 20)、S3(1 : 40)、S4(1 : 80)、S5(1 : 160)、S6(1 : 320)、S7(1 : 640)。

1.3.2 批分析(多管同测)法检测 用 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂(样本释放剂裂解法释放核酸,一步法)检测梯度浓度样本盘样本 S1~S7 共 7 个浓度,每批各浓度平行检测 6 管,共检测 6 批次。最终每个浓度得到 6 个批分析结果,36 个单管检测结果。

1.3.3 阳性判断标准 单管:ORF1ab 基因检测到典型的 S 型扩增曲线,且 Ct 值<40 判断为 ORF1ab 基因阳性;N 基因检测到典型的 S 型扩增曲线,且 Ct 值<40 判断为 N 基因阳性。批分析:单靶标基因阳性管数≥1 的批次判断为该靶标基因批阳性。

1.3.4 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂基本信息 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂扩增循环参数见表 1。样本释放剂 10 μL 加样本 10 μL,用移液器吸打 3~5 次混匀,静置 10 min 后,加入 PCR 混合液(SARS-CoV-2-PCR-反应液 26 μL 加 SARS-CoV-2-PCR-酶混合液 4 μL)上机扩增。检测通道:FAM(ORF1ab 区域)、ROX(N 基因);HEX(内标)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计软件进行数据分析,采用 Excel2010 进行数据及图表处理。计量

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。ORF1ab 与 N 基因 Ct 均值比较采用独立样本 *t* 检验;计数资料以百分率表示,单管分析与批分析阳性率比较采用 χ^2 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂
扩增循环参数

进程	温度(℃)	时间	循环数(个)
反转录	50	30 min	1
cDNA 预变性	95	1 min	1
变性	95	15 s	45
退火、延伸,荧光采集	60	30 s	45
仪器冷却	25	10 s	1

2 结 果

2.1 不同浓度 ORF1ab 基因与 N 基因 Ct 值比较 各浓度有 Ct 值(有光滑的 S 型扩增曲线,Ct 值<45)管 Ct 值均值见表 2;各浓度有 Ct 值管 Ct 值均值折线图见图 1;所有测定管中有 Ct 值管 Ct 值折线图见图 2。ORF1ab 基因与 N 基因在低浓度水平(1 copy/管)Ct 值存在较大差异,S2~S7 全部批次中呈典型“S”型扩增曲线的检测管 ORF1ab 基因平均 Ct 值为 40.4±10.6,Ct 值>40 的占 61.64%,最大 Ct 值为 44.08,而 N 基因平均 Ct 值为 36.96±1.07,最大 Ct 值为 39.48。不同浓度 ORF1ab 基因与 N 基因 Ct 值比较,差异均有统计学意义(*P*<0.05)。

表 2 不同浓度 ORF1ab 基因、N 基因 Ct 值
比较($\bar{x} \pm s$)

浓度	ORF1ab 基因	N 基因	<i>t</i>	<i>P</i>
S1	39.85±0.92	35.37±0.78	-21.748	<0.05
S2	40.04±1.23	36.67±1.26	-10.727	<0.05
S3	40.52±0.84	36.82±0.79	-14.740	<0.05
S4~S7	40.68±1.07	37.37±0.88	-12.265	<0.05

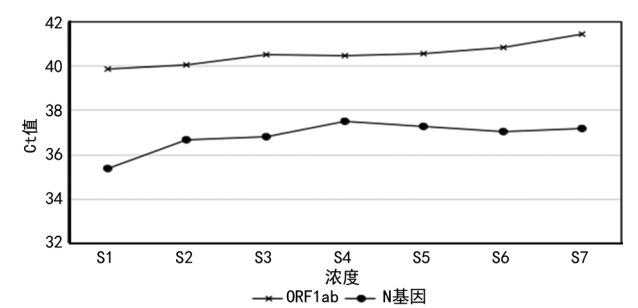


图 1 各浓度有 Ct 值管 Ct 值均值折线图

2.2 单管分析与批分析阳性检测情况比较 由表 3~4 可知,ORF1ab 基因单管分析与批分析阳性检出率分别为 S1(50.00%/100.00%)、S2(47.22%/100.00%)、S3(16.67%/66.67%)、S4(13.89%/66.67%);N 基因单管分析与批分析阳性检出率分别

为 S1(100.00%/100.00%)、S2(91.67%/100.00%)、S3(61.11%/100.00%)、S4(30.56%/83.33%)、S5(27.78%/100.00%)、S6(11.11%/50.00%)、S7(5.55%/33.33%)。ORF1ab 基因 S1、S2、S3、S4 浓度单管分析与批分析阳性检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$),N 基因 S3、S4、S5、S6、S7 浓度单管分析与批分析阳性检出率比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与单管分析比较,批分析在低浓度核酸样本检测中有更高的阳性检出率。

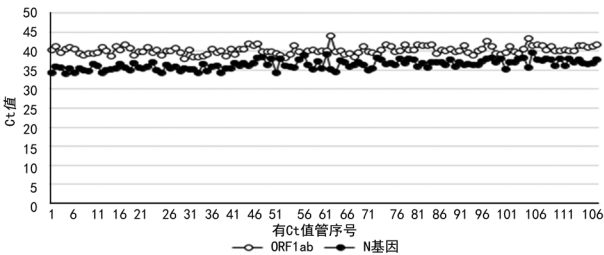


图 2 所有测定管中有 Ct 值管 Ct 均值折线图

表 3 单管分析与批分析阳性检测情况(n)

批次	n	S1		S2		S3	
		ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因
1	6	1	6	2	6	1	2
2	6	5	6	1	6	0	5
3	6	1	6	4	5	0	3
4	6	4	6	4	6	1	2
5	6	3	6	1	5	2	5
6	6	4	6	5	5	2	4
合计	36	18	36	17	33	6	22

批次	n	S4		S5		S6		S7	
		ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因
1	6	0	3	0	1	0	1	0	0
2	6	1	2	0	3	0	2	0	1
3	6	2	2	0	1	0	0	0	0
4	6	1	0	0	1	0	0	0	1
5	6	1	2	0	3	0	1	0	0
6	6	0	3	0	1	0	0	0	0
合计	36	5	11	0	10	0	4	0	2

表 4 单管分析与批分析阳性检测率比较[n(%)]

批次	n	S1		S2		S3	
		ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因
单管阳性	36	18(50.00)	36(100.00)	17(47.22)	33(91.67)	6(16.67)	22(61.11)
批阳性	6	6(100.00)	6(100.00)	6(100.00)	6(100.00)	4(66.67)	6(100.00)
χ^2		5.25	0	5.796	0.533	7.085	3.294
P		<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

批次	n	S4		S5		S6		S7	
		ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因	ORF1ab 基因	N 基因
单管阳性	36	5(13.89)	11(30.56)	0(0.00)	10(27.78)	0(0.00)	4(11.11)	0(0.00)	2(5.55)
批阳性	6	4(66.67)	5(83.33)	0(0.00)	6(100.00)	0(0.00)	3(50.00)	0(0.00)	2(33.33)
χ^2		8.509	6.069	0	11.374	0	5.600	0	4.605
P		<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05	>0.05	<0.05

3 讨 论

在实时荧光 PCR 中,Ct 值是指荧光强度大于最小检出水平(即荧光阈值)时的 PCR 循环数^[7]。它是实时荧光 PCR 的基本参数,是获得准确且重现性好的数据的基础。影响 Ct 值的因素包括进入扩增体系靶核酸的数量和靶核酸的扩增效率,当进入扩增体系

的靶核酸数量恒定时,影响 Ct 值的因素就只是靶核酸的扩增效率。影响扩增效率的因素较多^[3],包括引物/靶核酸的特性与变性、退火、延伸温度,扩增体系环境(参与扩增反应各成分的相对量,尤其是 TaqDNA 聚合酶/靶核酸比例等),扩增仪器性能(包括扩增仪孔间温度的不均一性、信标荧光的检出效能等),临

床标本中 TaqDNA 聚合酶抑制物去除不完全,扩增体系中扩增试剂的有限和扩增产物的抑制等。

有研究比较分析国产 SARS-CoV-2 核酸实时荧光 PCR 检测试剂盒检测性能发现,部分试剂检测弱阳性标本时 N 基因呈现单阳结果,研究者认为试剂因素可能有:(1)与引物设计有关;(2)与各位点灵敏度有关^[8-9];SOLA 等^[10]认为可能是冠状病毒 ORF1ab 基因 copy 数相对于 N 基因、S 基因和 E 基因等编码结构蛋白的基因 copy 数更低;多靶标同管扩增可能由于多种引物互相竞争而影响某个靶标点检测的灵敏度^[1]。本研究显示,ORF1ab 基因与 N 基因在低浓度水平(1 copy/管)阳性检出率及 Ct 值均存在较大差异,S2~S7 全部批次中呈典型“S”型扩增曲线的有 Ct 值检测管 ORF1ab 基因平均 Ct 值为 40.4±1.06,Ct 值>40 的占比为 61.64%,最大 Ct 值为 44.08,而 N 基因平均 Ct 值为 36.96±1.07,最大 Ct 值为 39.48。笔者认为:(1)ORF1ab 基因的引物靶核酸的特性导致其扩增效率低于 N 基因;(2)仪器对 ORF1ab 基因的信标荧光 FAM 的检出效能低于 N 基因的信标荧光 ROX。笔者在另外一组检测低浓度乙型肝炎病毒(HBV) DNA 的实验中 Ct 值>40 的占比为 60%,其与 ORF1ab 基因都是 FAM 荧光信标^[11]。这可能是临床单管阳性的重要原因之一。本研究的标本是假病毒质控物,ORF1ab 基因与 N 基因分属 2 段序列,在低浓度时出现较多的单基因阳性。本院未保留 SARS-CoV-2 核酸阳性样本,无法检测临床阳性样本。在临床阳性样本中,ORF1ab 基因与 N 基因应该有多数的并行结果。

本研究显示在低浓度区域,2 种基因阳性检出率均明显高于单管分析。PCR 试验中扩增产物的量以指数方式增加,只要反应管中有 1 copy 靶核酸,就能将其扩增至能检出的水平。因此,只需增加批分析的扩增管数就可提高 PCR 试验的灵敏度。本研究在现有商品检测试剂的基础上,采用批分析(多管同测)的方法,增加单批次检测时实际进入扩增体系的样本量,以提高检测灵敏度。即采用商品试剂,按试剂盒要求提取核酸模板,在扩增分析时,每个样本同时扩增多管,将整个分析批视为一个批扩增体系。如此,在不改变单管扩增体系的条件下,实际提高了进入批扩增体系的原始样本量,从而使检测灵敏度显著提

高。圣湘生物可提供磁珠法和样本释放剂法 2 种核酸提取方法。与磁珠法比较,采用样本释放剂法操作更简单,研究结果更容易呈现。在临床检测中,用磁珠法富集核酸后再多管批扩增分析可得到更高的灵敏度。

综上所述,批分析(多管同测)法可以提高低浓度核酸样本的阳性检出率,在临床有提高检测灵敏度需求时可以采用此方法。

参考文献

[1] 张瑞,李金明. 如何减少新型冠状病毒核酸检测的假阴性[J]. 中华医学杂志,2020,100(11):801-804.
[2] 莫茜,秦炜,傅启华,等. 正确认识新型冠状病毒核酸检测的影响因素[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):213-216.
[3] 里进,叶光明,陈良君,等. 新型冠状病毒核酸检测假阴性结果原因分析及对策[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(3):221-225.
[4] 于河山,任峰,张艺凡. 六种新型冠状病毒核酸检测试剂的性能评价及其与核酸提取试剂匹配性分析[J]. 中华检验医学杂志,2021,44(9):841-848.
[5] 吕莉琨,李力,刘小畅,等. 天津市 COVID-2019 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.
[6] 李振昊,高小玲,杨小娟,等. 新型冠状病毒核酸检测分析[J]. 检验医学与临床,2020,17(10):1313-1315.
[7] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社,2016:12-15.
[8] 熊丹,阚丽娟,王萌萌,等. 七种国产新型冠状病毒核酸检测试剂盒的一致性和检出能力评价研究[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(8):787-793.
[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] SOLA I, ALMAZÁN F, ZÚÑIGA S, et al. Continuous and discontinuous RNA synthesis in coronaviruses[J]. Annu Rev Virol,2015,2(1):265-288.
[11] 斯志娟,雷震. 批分析(多管同测)法超敏检测低浓度乙型肝炎病毒核酸[J]. 实验与检验医学,2022,40(5):550-553.

(收稿日期:2022-10-16 修回日期:2023-01-23)

(上接第 1189 页)

[15] ERTZ-ARCHAMBAULT N, KOSIOREK H, TAYLOR G E, et al. Association of Therapy for autoimmune disease with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia[J]. JAMA Oncol,2017,3(7):936-943.
[16] KAYSER S, DOHNER K, KRAUTER J, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed

AML[J]. Blood,2011,117(7):2137-2145.
[17] HULEGARDH E, NILSSON C, LAZAREVIC V, et al. Characterization and prognostic features of secondary acute myeloid leukemia in a population-based setting: a report from the Swedish Acute Leukemia Registry[J]. Am J Hematol,2015,90(3):208-214.

(收稿日期:2022-04-25 修回日期:2022-11-20)