

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.03

· 新型冠状病毒肺炎 ·

新型冠状病毒核酸检测高循环阈值情况分析*

朱晓燕¹,徐俊驰¹,沈强²,吴敏娟¹,宋华峰¹,黄丽娜¹,周梅鹤¹,胥萍¹(1. 苏州市第五人民医院检验中心,江苏苏州 215131;2. 苏州市疾病预防控制中心,江苏苏州 215007)

摘要:目的 探讨新型冠状病毒核酸检测出现高循环阈值(Ct 值)情况的原因。方法 用实时荧光 RT-PCR 法检测疑似新型冠状病毒肺炎患者鼻咽拭子、肛拭子样本新型冠状病毒核酸,回顾性分析 Ct 值处于 33~38 的高 Ct 值样本在同一患者重复采样检测、不同品牌基因扩增仪检测及不同实验室相同型号仪器检测情况下结果的一致性。结果 8 例单靶位高 Ct 值阳性患者次日重复采样检测结果双靶标均为阴性。7 例高 Ct 值样本有 6 例同一样本核酸在 LC480 及 ABI 7500 2 台扩增仪上检测结果不一致,包括 ORF1ab 基因检测结果不一致 4 例,N 基因不一致 4 例,其中 ORF1ab 基因和 N 基因均不一致 2 例。5 例高 Ct 值样本不同实验室相同基因扩增仪结果均不一致。结论 该病毒核酸检测高 Ct 值时结果重复性较差,需要其他检测方法同时进行补充检测。

关键词:新型冠状病毒;核酸检测;高循环阈值

中图分类号:R446.5 文献标志码:A

新型冠状病毒属于单链 RNA 病毒,是一种新型 β 属冠状病毒,其基因组序列约 29 000 bp,含有 10 个基因,可有效编码 10 个蛋白质^[1-2]。2019 年 12 月在湖北省武汉市出现该病毒感染人类引起肺炎病例^[3],随着疫情的迅速蔓延和发展,迫切需要对具有临床症状的患者及疑似患者进行有效、快速的诊断和鉴别诊断。新型冠状病毒核酸检测能为新型冠状病毒感染诊断提供病原学证据,但受多种因素影响,检测数据易出现假阴性、假阳性情况。本研究围绕目前医院开展新型冠状病毒核酸检测中常用的 RT-PCR 法中出现高循环阈值(cycle threshold, Ct 值)样本进行初步分析和讨论。

1 材料与方

1.1 样本 2020 年 2 月 14 日至 2 月 30 日苏州市各医院新型冠状病毒核酸检测 Ct 值 ≤ 38 的样本 24 例;样本类型为鼻咽拭子及肛拭子,采样后置于同一病毒采样管中送检。

1.2 仪器及试剂 MagNA Pure 96 全自动核酸纯化仪、Light Cycle 480 实时荧光 PCR 仪(美国 Roche 公司),ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);MagNA Pure 96 纯化试剂及其配套系列耗材(美国 Roche 公司),新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(上海伯杰公司)。

1.3 方法

1.3.1 样本处理及核酸提取 样本核酸纯化处理

前于 56 °C 灭活 30 min^[4-5]。从病毒保存管中吸取 200 μL 样本至 MagNA Pure 96 处理槽,将处理槽内待检样本置于 MagNA Pure 96 全自动核酸纯化仪内,根据操作程序,机器自动进行核酸纯化。

1.3.2 核酸扩增 按新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒说明书配制 25 μL 反应体系,包括核酸扩增反应液 12 μL、酶混合液 4 μL、ORF1ab/N 反应液 4 μL,样本核酸 5 μL。检测靶点为 ORF1ab 及 N 2 个靶标,试剂盒带内参。按照试剂说明书中反应条件设定程序,进行实时荧光 RT-PCR 反应。分别在 Light Cycle 480 实时荧光 PCR 仪、ABI 7500 实时荧光 PCR 仪上进行。

1.3.3 结果分析 根据阴性对照的扩增曲线调节起止值,进行分析。根据试剂说明书提供的结果判定标准(见表 1),检测结果利用 ROC 曲线法确定 ORF1ab、N 参考值 Ct 值均为 38。将 Ct 值为 33~38 的样本定义为高 Ct 值样本。

表 1 结果判定标准

检测通道			结果判读
FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道	
Ct 值 ≤ 38	Ct 值 ≤ 38	Ct 值 ≤ 38	样本阳性
无 Ct 值或 Ct 值 > 38	无 Ct 值或 Ct 值 > 38	Ct 值 ≤ 38	样本阴性
无 Ct 值或 Ct 值 > 38	Ct 值 ≤ 38	Ct 值 ≤ 38	复测
Ct 值 ≤ 38	无 Ct 值或 Ct 值 > 38	Ct 值 ≤ 38	复测

2 实验与结果

2.1 试剂盒检出限验证结果 阳性对照(浓度为

* 基金项目:苏州市科学技术局资助项目(SS201879,SS2019074)。
作者简介:朱晓燕,1985 年生,女,主管技师,硕士,临床检验专业。
通信作者:胥萍,主任技师,硕士研究生导师,E-mail:573311485@qq.com。

$10^6 \sim 10^7$ copies/mL) 经 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000 6 个梯度稀释,验证结果与试剂盒说明书相符,检出限为 10^3 copies/mL, Ct 值最低为 23.66。

2.2 实时荧光 RT-PCR 检测结果

2.2.1 同一样本核酸在同一实验室不同品牌基因扩增仪上检测结果

9 例 Ct 值 ≤ 38 样本,其中有 7 例高 Ct 值样本 ($33 \leq$ Ct 值 ≤ 38), 2 例低 Ct 值样本

(Ct 值 < 33)。对 9 例样本分别在同一实验室 ABI 7500 扩增仪和 Light Cycle 480 扩增仪上进行实时荧光 PCR,结果 7 例高 Ct 值样本有 6 例同一样本核酸在 Light Cycle 480 及 ABI 7500 2 台扩增仪的检测结果不一致,包括 ORF1ab 基因检测结果不一致 4 例, N 基因不一致 4 例,其中 ORF1ab 基因和 N 基因均不一致 2 例,见表 2;而 Ct 值 < 33 的核酸样本复检结果一致, Ct 值仍 < 33 。

表 2 7 例高 Ct 值同一核酸样本在 ABI 7500 及 Light Cycle 480 扩增仪检测结果比较

基因	仪器	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	样本 5	样本 6	样本 7
ORF1ab	ABI 7500	37	N	N	37	N	33	N
	Light Cycle 480	N	N	37	N	N	38	36
N	ABI 7500	37	35	34	35	37	34	38
	Light Cycle 480	N	34	36	N	N	N	37

注: N, 未检出或低于检出限。

2.2.2 ORF1ab 基因单靶位高 Ct 值患者重复采样核酸检测结果

有 8 例 ORF1ab 基因单靶位高 Ct 值样本首次检测 Ct 值分别为 36.51、35.97、35.29、35.41、35.61、36.20、36.48、36.80(见图 1)。次日重复采样,同试剂同仪器再次检测,结果双靶标均为阴性(见图 2)。

后,送苏州市另一基因扩增实验室相同品牌仪器上检测,结果 5 例高 Ct 值的样本不同实验室相同基因扩增仪结果均不一致(见表 3); 2 例低 Ct 值样本不同实验室阴阳性检测结果一致, Ct 值仍 < 33 。

表 3 高 Ct 值同一样本在不同实验室相同基因扩增仪复检结果不一致

基因	实验室	样本 11	样本 5	样本 6	样本 7	样本 9
ORF1ab	本实验室	N	N	N	38	36
	他实验室	N	N	36	N	N
N	本实验室	N	N	N	N	37
	他实验室	35	36	36	N	36

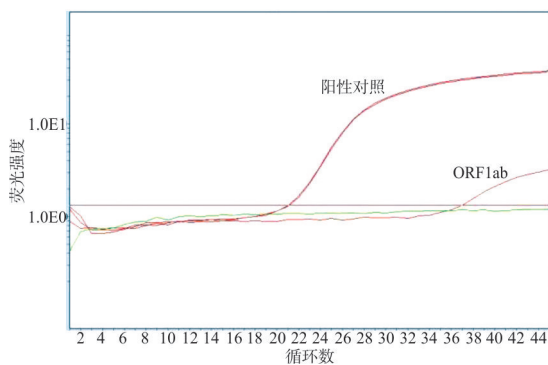


图 1 第一次单基因 ORF1ab 检测结果阳性(Ct:36.51)

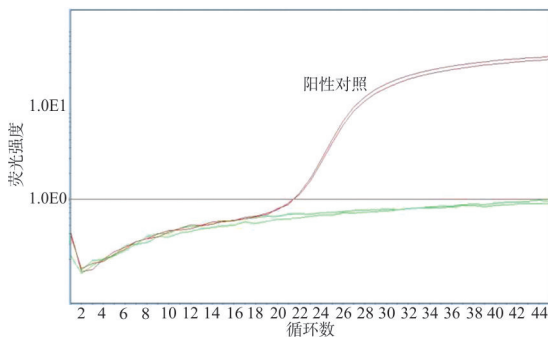


图 2 同一患者次日重新采样检测结果为阴性

2.2.3 高 Ct 值样本不同实验室相同基因扩增仪复检结果

有 7 例咽拭子肛拭子混合液样本(其中 5 例 $33 \leq$ Ct 值 ≤ 38 , 2 例 Ct 值 < 33)在本实验室检测

3 讨论

本实验自检测新型冠状病毒核酸以来出现以下现象:同一患者重复采样结果不一致;同一检测样本及其核酸在同一实验室不同基因扩增仪上结果不一致;同一样本在不同实验室间相同型号仪器检测结果不一致;同时本实验室针对试剂盒的检出限进行验证,证明所用试剂盒检测灵敏度具备本文中高 Ct 值样本的检测能力。

针对以上高 Ct 值样本复检后结果出现不符的现象,笔者分析影响检测结果各环节中的因素。首先,目前新型冠状病毒实验室检测路径未标准化,所用的核酸测试剂盒研发时间紧迫,尚缺乏足够的评估及大样本的临床验证。其次,不同样本类型对新型冠状病毒的核酸检测结果产生影响,本实验标本为咽拭子及肛拭子病毒采样液,而在最新版诊疗方案中,其确诊所提到的核酸检测样本类型不仅包含呼吸道样本及血液样本,同时在实验室检查中增加“粪便样本中可检测新型冠状病毒核酸^[1]”。临

床上多数患者咳痰困难,下呼吸道灌洗液样本难以取得,且操作的生物安全风险极大,故呼吸道样本以鼻咽拭子及咽拭子为主,而拭子样本采用目前的 RT-PCR 试剂盒,据估计阳性检出率只有 30%~50%,大量的假阴性结果无法避免,必须多次取样检测或结合其他类型样本检查结果。

有研究发现,分别采集新型冠状病毒疑似病例呼吸道不同类型样本进行核酸检测,咽拭子样本中新型冠状病毒阳性检出率低于深部痰样本,差异有统计学意义;病毒含量的降低可出现同一患者重复采样核酸检测结果不一致的现象。不同呼吸道样本取样材料对新型冠状病毒核酸检测结果也产生影响。有研究在确诊患者中比较了带病毒保存液的植绒拭子样本及无病毒保存液的普通棉签拭子样本中新型冠状病毒核酸检测结果,发现普通棉签拭子的核酸检出率明显低于带病毒保存液的植绒拭子($P < 0.05$),普通棉签拭子即便检出,其阳性 Ct 值也显著大于植绒拭子^[6]。本实验室所用采样样本为普通棉签拭子和植绒拭子各自取样后置于同一病毒采样管中形成的混合溶液,可能会降低核酸的阳性检出率。目前相关的诊疗方案及实验室检测指南并未提及用于采集鼻咽拭子及咽拭子的拭子种类,但对于呼吸道样本的病毒核酸检测来说,不同的拭子及保存管可能影响核酸检测结果,但相关影响因素尚未见报道。目前我们采用的病毒采样管的保存液为 Hanks 液,其对于新型冠状病毒 RNA 保存的稳定性尚无研究,另外采样过程中 RNA 酶的污染也可导致核酸检测阳性率随着保存时间的延长而降低。因此,本实验室出现当天检测的阳性样本经过 4℃ 保存、次日检测出现阴性结果的现象。

至于本实验室出现当天检出阳性样本的核酸,经-20℃冻存过夜,次日复溶后再次在另一台核酸

扩增仪上进行扩增,高 Ct 值出现结果不一致的现象,分析原因可能是,RNA 病毒经冻融后出现降解。次日检测未同时在 2 台仪器上检测,在今后的研究中可增加样本量并进行 2 台仪器同时检测。

针对目前出现的以上关于新型冠状病毒核酸检测的问题及疑惑,仅以核酸检测为金标准,同时在某个阶段配合新型冠状病毒抗原或 IgM 及 IgG 抗体;或者采用更灵敏的核酸检测方法,如数字 PCR;或通过病毒快速富集仪进行富集,提高病毒浓度,进而增加检测的灵敏度和准确性等措施,可提高新型冠状病毒核酸检测能力,尽可能降低假阴性或假阳性。

4 参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [2] Huang CL, Wang YM, Li XW, *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [3] 王旭东, 施健, 丁伟峰, 等. 2019 新型冠状病毒核酸检测的研究状况与应用探讨[J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(2): 81-84.
- [4] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒实验室生物安全指南(第二版)[EB/OL]. (2020-01-23)[2020-03-05]. <http://www.nhc.gov.cn/qijys/s7948/202001/0909555408d842a58828611dde2e6a26.shtml>.
- [5] 江苏省临床检验中心. 关于开展 2019 新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测的质量控制要求[OL]. (2020-02-06)[2020-03-05]. <http://jscl.clinet.cn/qc/?type=detail&id=47>.
- [6] 钟慧钰, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(5): 1-8.

(收稿日期:2020-03-06)

(本文编辑:刘群)