

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 热灭活咽拭子及热灭活后提取核酸样本在 4℃ 保存的稳定性研究

喻晶, 吴夏枫, 刘晓翌, 纪玲 (北京大学深圳医院检验科, 广东深圳 518029)

摘要: 目的 研究 56℃ 30 min 热灭活后的新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 咽拭子及提取的核酸在 4℃ 保存的稳定性。方法 采用多重荧光定量 PCR 方法对一例 COVID-19 患者的咽拭子样本, 56℃ 30 min 热灭活后进行 COVID-19 双靶点 (ORF1ab 和 N 基因) 核酸检测, 把原始咽拭子样本及提取的核酸保存在 4℃, 分别于 24, 48, 72 和 96h 再次检测咽拭子样本及提取核酸中新冠病毒核酸的含量 (C_t 值), 分析热灭活后咽拭子样本及提取核酸在 4℃ 保存的稳定性。结果 COVID-19 患者的咽拭子样本, 56℃ 30 min 热灭活后核酸检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性, C_t 值分别为 31.27 和 30.64, 咽拭子样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因的结果为 24h (31.41 和 30.68), 48h (34.13 和 34.28), 72h (34.06 和 34.11) 和 96h (36.22 和 40.02)。提取的核酸 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后的检测结果为 24h (31.64 和 30.06), 48h (31.62 和 29.95), 72h (31.72 和 29.75) 和 96h (31.36 和 30.09)。56℃ 30 min 热灭活的咽拭子样本在 4℃ 保存 24h 后, 对 COVID-19 核酸的检测无明显影响 (偏倚 <1%), 但 4℃ 保存 48~72h, ORF1ab 基因核酸降解约 7 倍, N 基因降解约 11 倍, 4℃ 保存 96h, ORF1ab 和 N 基因核酸分别降解 30.91 倍和 666.29 倍。但是提取的核酸 4℃ 保存 24~96h 后, 对核酸的检测结果无明显影响 (偏倚均小于 3%)。结论 研究结果表明 56℃ 30 min 热灭活后提取的核酸的稳定性比原始咽拭子样本好, 热灭活后的咽拭子样本可在 4℃ 保存 24h。

关键词: 新型冠状病毒肺炎; 热灭活; 咽拭子样本; 提取核酸; 4℃ 保存

中图分类号: R373.19; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2020) 06-132-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.06.032

Study on the Stability of Heat-Inactivated Throat Swab and Its Extracted Nucleic Acid of COVID-19 Stored at 4℃

YU Jing, WU Xia-feng, LIU Xiao-yi, JI Ling

(Department of Laboratory Medicine, Peking University Shenzhen Hospital, Guangdong Shenzhen 518029, China)

Abstract: **Objective** To explore the stability of heat-inactivated throat swab and its extracted nucleic acid sample of Novel Coronavirus Pneumonia (COVID-19) after stored at 4℃. **Methods** Multiple-quantitative real-time PCR was used to detect a throat swab sample from a patient with COVID-19. Dual-target nucleic acid detection of COVID-19 ORF1ab and N genes was performed after the swab sample was heat inactivated at 56℃ for 30 minutes. After stored at 4℃, the throat swab sample and its extracted nucleic acid was re-detected at 24, 48, 72 and 96h. The stability of the swab sample and its extracted nucleic acid was analyzed. **Results** The throat swab sample from the patient with COVID-19 was found to be double positive for ORF1ab and N genes after heat inactivation at 56℃ for 30 min. The C_t values were 31.27 and 30.64 respectively. After the swab sample and its extracted nucleic acid were stored at 4℃ for 24, 48, 72 and 96h, the ORF1ab and N genes were detected again. The C_t values of the swab sample were as follows: 24h (31.41, 30.68), 48h (34.13, 34.28), 72h (34.06, 34.11) and 96h (36.22, 40.02), but the C_t values of the extracted nucleic acid were 24h (31.64, 30.06), 48h (31.62, 29.95), 72h (31.72, 29.75) and 96h (31.36, 30.09). After stored at 4℃ for 24 hours, there was no significant effect on the detection of COVID-19 nucleic acid of the swab sample (bias <1%). But when stored at 4℃ for 48~72h, the ORF1ab gene nucleic acid was degraded approximately 7 times, and the N gene was degraded about 11 times, stored at 4℃ for 96h, the degradation of ORF1ab and N gene nucleic acid was 30.91 times and 666.29 times, respectively. However, after the extracted nucleic acid was stored at 4℃ for 24 to 96 hours, no significant degradation was found on the nucleic acid detection (all biases <3%). **Conclusion** The results showed that the stability of the extracted nucleic acid was better than that of the raw swab sample after stored at 4℃. The heat-inactivated throat swab sample could be stored at 4℃ for 24h.

Keywords: COVID-19; heat-inactivation; throat swab samples; extracted nucleic acid; 4℃ storage

基金项目: 深圳市三名工程项目 (SZSM201812088)。

作者简介: 喻晶 (1967-), 女, 医学硕士, 主任技师, 主要从事临床分子生物学研究, E-mail: jing_yu2004@aliyun.com。

新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 自从 2019 年 12 月首次在湖北武汉发现以来, 短时间内在武汉暴发流行并蔓延至全国, 严重危害人民的生命健康, 影响人们的生活方式, 此病毒对人的传染性强, 目前尚无特效治疗, 最有效的方式是早发现、早隔离, 早治疗、尽早阻断传染源^[1]。新冠病毒核酸检测可以为新型冠状病毒肺炎的早期诊断提供直接的实验室证据, 也是目前最新诊疗方案 (试行第八版) 中 COVID-19 的确诊依据^[2]。由于此病毒传染性极强, 使实验室检测人员处于极大的感染风险中, 根据第五版新型冠状病毒肺炎防控方案^[3], 该病毒对热敏感, 56℃ 30 min 可有效灭活病毒, 本实验室在核酸检测前会对样本进行 56℃ 30min 热灭活处理。目前对热灭活后的新冠样本和提取核酸在 4℃ 保存的稳定性, 其对检测结果的影响尚未见报道, 样本保存是保证检验质量的重要环节, 直接影响检测的结果, 本研究把热灭活后的样本及提取的核酸保存在 4℃, 分别于 24, 48, 72 和 96h 再次检测样本及提取核酸中 SARS-CoV-2 核酸的含量 (*Ct* 值), 分析热灭活后样本和核酸在 4℃ 保存的稳定性, 为样本的合理保存提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2020 年 2 月 5 日在本院发热门诊就诊的 1 例 SARS-CoV-2 核酸检测阳性患者的咽拭子样本, 样本保存在 Hanks 液 (广州邦硕生物技术有限公司)。该患者为武汉人, 发热、咳嗽、肺部 CT 表现为病毒性肺炎, 最终诊断为新型冠状病毒肺炎 (COVID-19)。

1.2 仪器与试剂 全自动核酸提取仪 (Stream SP96, 中山大学达安基因股份有限公司), 荧光定量 PCR 扩增仪 (ABI 7500, 美国 Thermofisher)。恒温水浴箱 (ED-19, 德国 JULABO), 核酸提取试剂盒及新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒均为中山大学达安基因股份有限公司产品。咽拭子

采样管和保存液为广州邦硕生物技术有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取: COVID-19 患者咽拭子样本先采用 56℃ 水浴 30min 灭活病毒, 振荡混匀后取 200 μl 样本加入核酸提取试剂板, 按照说明书要求提取样本的核酸, 然后进行检测。将原始咽拭子样本和提取的核酸保存在 4℃ 冰箱, 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次对其进行 SARS-CoV-2 核酸 ORF1ab 和 N 基因检测。

1.3.2 基因扩增: 采用 RT-PCR 荧光定量 PCR 技术, 检测新型冠状病毒 ORF1ab 基因和 N 基因, 每管为 25 μl 反应体系, 其中 PCR 反应液体系 20 μl, 样本核酸或阴阳对照品 5 μl, 混匀后, 按下面程序在荧光 PCR 扩增仪中扩增: 50℃ 15 min, 95℃ 15 min, 94℃ 15 s, 55℃ 45 s, 共 45 个循环, 荧光收集在 55℃ 45 s。每次扩增时设置空白和阴阳性对照。以循环阈值 (cycle threshold, *Ct* 值) 来进行核酸检测差异的比较。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 采用 *t* 检验比较两组数据的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 咽拭子样本 4℃ 保存的稳定性分析 咽拭子样本检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性, *Ct* 值分别为 31.27 和 30.64, 咽拭子样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因, 结果见表 1。4℃ 保存 24h, 咽拭子检测结果与原始结果差异不大, ORF1ab 和 N 基因的 ΔCt 分别为 0.14 和 0.04 (偏倚均小于 1%), 但是 4℃ 保存 48, 72 和 96h 后, ORF1ab 和 N 基因的 ΔCt 明显增大, 4℃ 保存 48~72h, ORF1ab 基因核酸降解了大概 7 倍, N 基因降解了大概 11 倍, 4℃ 保存 96h, ORF1ab 和 N 基因核酸分别降解了 30.91 倍和 666.29 倍。

表 1 咽拭子样本 4℃ 保存不同时间的检测结果

保存时间 (h)	ORF1ab 基因 (<i>Ct</i> 值)	ΔCt	降解倍数	偏倚 (%)	N 基因 (<i>Ct</i> 值)	ΔCt	降解倍数	偏倚 (%)
0	31.27				30.64			
24	31.41	0.14	1.10	0.45	30.68	0.04	1.03	0.13
48	34.13	2.86	7.26	9.11	34.28	3.64	12.47	11.86
72	34.06	2.79	6.92	8.17	34.11	3.47	11.08	10.12
96	36.22	4.95	30.91	14.53	40.02	9.38	666.29	27.50

2.2 核酸样本 4℃ 保存的稳定性分析 核酸样本检测结果为 ORF1ab 和 N 基因双阳性, *Ct* 值分别为 31.27 和 30.64, 提取的核酸样本 4℃ 保存 24, 48, 72 和 96h 后再次检测 ORF1ab 和 N 基因, 结果见

表 2。核酸 4℃ 保存 24, 48, 72h 和 96h 后, 其检测结果与原始结果 *Ct* 值差异不大 (均在 ± 1 以内, 偏倚均小于 3%), 表明核酸 4℃ 保存 24~96h 后, 无明显降解。

表2 提取的核酸4℃保存不同时间的检测结果

保存时间 (h)	ORF1ab 基因 (Ct 值)	ΔCt	降解倍数	偏倚 (%)	N 基因 (Ct 值)	Ct	降解倍数	偏倚 (%)
0	31.27				30.64			
24	31.64	0.37	1.29	1.18	30.06	-0.58	0.67	-1.89
48	31.62	0.35	1.27	1.11	29.95	-0.69	0.62	-2.30
72	31.72	0.45	1.37	1.42	29.75	-0.89	0.54	-2.97
96	31.36	0.09	1.06	0.28	30.09	-0.55	0.68	-1.85

2.3 咽拭子样本和提取核酸4℃保存不同时间结果
 比对 采用 t 检验比较咽拭子和核酸4℃保存0, 24, 48, 72 和 96h 后, ORF1ab 和 N 基因检测的结果, 均具有显著性差异 ($t_{\text{ORF1ab}}=2.023, P=0.039$; $t_N=2.239, P=0.028$)。核酸4℃保存24~96h 的稳定性更好。

3 讨论

新型冠状病毒为单链 RNA 病毒, 是一种新型 β 属冠状病毒, 基因特征与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 有明显区别^[2], 其传染性强, 人群普遍易感, 自2019年12月在武汉发现以来, COVID-19 的病例数快速上升, 引起了世界范围的关注, 给全球带来巨大挑战^[4]。SARS-CoV-2 核酸检测可以为 COVID-19 的诊断提供确诊依据^[2], 但是由此病毒在检测过程中对人体的致病力和危害程度尚未明确, 使检测人员处于极大的感染风险中。根据最新的专家共识^[5], SARS-CoV-2 对热敏感, 56℃ 30 min 可有效灭活病毒, 实验室在检测前对病人样本进行热灭活处理, 降低检测中的感染风险。目前对热灭活后的样本和提取的核酸样本在4℃保存的稳定性尚未见报道, 本研究主要分析热灭活后样本和提取核酸在4℃保存24~96h 后的稳定性, 为制定合理的样本保存温度和时间提供实验室依据。

本研究发现保存在 hanks 液中的咽拭子样本, 在4℃保存24h, 其核酸无明显降解, 但是在4℃保存48~72h 后, 其核酸出现明显降解, 其中 N 基因降解比 ORF1ab 基因降解更明显 (11~12 倍 vs 7-8 倍), 样本4℃保存96h 后, 核酸降解更加明显, 其中 ORF1ab 基因降解30 倍, N 基因降解666 倍, 其 Ct 值为 40.02, 处于检测的临界值。有趣的是, 我们发现提取的核酸样本4℃保存24~96h 后, 核酸无明显降解, 其 ΔCt 均在 ± 1 以内, 偏倚均小于3%。核酸4℃保存的稳定性明显比咽拭子样本好, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。我们把核酸样本在4℃保存2 周, 再次检测发现核酸仍然无明显降解 (结果未显示), SARS-CoV-2 的 RNA 为什么会这么稳定? 这个问题值得我们进一步探讨。有研究表明^[6], COVID-19 非常稳定, 可在气溶胶中和物体表面上保持稳定数小时至数天的时间。

本研究的局限性在于: ①受阳性样本例数的限

制, 本研究的阳性样本的例数太少, 最好对处于高中低不同 Ct 值范围的阳性样本进行验证。②未对保存在不用类型保存液中的咽拭子阳性样本进行验证, 不同类型的保存液是否存在差异? ③本研究只采用了一家公司的试剂, 本文的结果是否适合于其他公司的试剂, 有待进一步验证。

参考文献:

- [1] LI Qun, GUAN Xuhua, WU Peng, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia(Review)[J]. The New England Journal of Medicine, 2020, 382(13):1199-1207.
- [2] 国家卫生健康委员会办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第八版) [EB/OL]. (2020-08-18) [2020-08-18]. <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-08/19/5535757/files/da89edf7cc9244fbb34ecf6c61df40bf.pdf>.
General Office for National Health Commission and National Administration of Traditional Chinese Medicine. Novel coronavirus pneumonia diagnosis and treatment plan (Trial Version 8) [EB/OL]. (2020-08-18) [2020-08-18]. <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-08/19/5535757/files/da89edf7cc9244fbb34ecf6c61df40bf.pdf>.
- [3] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒肺炎防控方案 (第五版) [EB/OL]. (2020-02-21) [2020-02-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/a5d6f7b8c48c451c87dba14889b30147/files/3514cb996ae24e2faf65953b4ecd0df4.pdf>.
General Office for National Health Commission. Prevention and control plan of COVID-19 (5th edition) [EB/OL]. (2020-02-21) [2020-02-23]. <http://www.nhc.gov.cn/xcs/zhengcwj/202002/a5d6f7b8c48c451c87dba14889b30147/files/3514cb996ae24e2faf65953b4ecd0df4.pdf>.
- [4] WANG Chen, HORBY P W, HAYDEN F G, et al. A novel coronavirus outbreak of global health concern [J]. Lancet, 2020, 395 (10223):470-473.
- [5] 中华医学会检验医学分会. 2019 新型冠状病毒核酸检测专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2020, 100(13):968-973.
Chinese Medical Association Laboratory Medicine Branch. Expert consensus on nucleic acid detection of COVID-19 [J]. Chinese Medical Journal, 2020, 100(13): 968-973.
- [6] VAN DOREMALEN N, BUSHMAKER T, MORRIS D H, et al. Aerosol and surface stability of SARS-CoV-2 as compared with SARS-CoV-1 (Letter) [J]. New England Journal of Medicine, 2020, 382(16):1564-1567.

收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2020-09-05