

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.01

新型冠状病毒核酸检测循环阈值变化规律浅析*

石玉如¹, 常文娇², 岳莉¹, 刘婷¹, 刘佳星¹, 刘杨¹, 谷妍¹, 王云¹, 戚应杰¹(1 中国科学技术大学附属第一医院感染病医院检验科, 合肥 230000; 2 中国科学技术大学附属第一医院检验科, 合肥 230001)

摘要:目的 初步探讨新型冠状病毒感染者呼吸道标本核酸扩增循环阈值(cycle threshold, Ct 值)变化规律。方法 筛选 2020 年 1 月 21 日至 2020 年 3 月 2 日间安徽省某定点医院收治的 45 例新型冠状病毒感染确诊患者, 用实时荧光逆转录聚合酶链反应技术对患者的痰液与咽拭子混合液进行检测, 观察 Ct 值与发病天数、性别、年龄、疾病分型的变化规律。结果 随着发病天数的增加, ORF1ab 基因、N 基因及 E 基因 Ct 值均不断升高, E 基因首先消失, 其次是 ORF1ab 基因, 最后是 N 基因。出现症状后 1~6 d 男性与女性核酸 Ct 值均为最低值, 差异无统计学意义($P>0.05$); 7~12 d Ct 值逐渐升高, 男性低于女性 Ct 值, 两者差异有统计学意义($P<0.05$)。不同年龄段间 Ct 值差异无统计学意义($P>0.05$)。不同病情分型间 Ct 值差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 Ct 值与患者出现症状的天数、性别有关, 与年龄、疾病分型无关。

关键词:新型冠状病毒; 核酸检测; 循环阈值

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

A preliminary study on change rules of cycle threshold value in detection of SARS-CoV-2 nucleic acid

SHI Yuru¹, CHANG Wenjiao², YUE Li¹, LIU Ting¹, LIU Jiaxing¹, LIU Yang¹, GU Yan¹, WANG Yun¹, QI Yingjie¹(1. Department of Clinical Laboratory of Infection Hospital, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230000, Anhui; 2. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001, Anhui, China)

Abstract: Objective To explore the change rules of cycle threshold (Ct value) of nucleic acid amplification in respiratory specimens from the patients with SARS-CoV-2 infection. **Methods** Forty-five patients with COVID-19 who were admitted to a designated hospital in Anhui province from January 21, 2020 to March 2, 2020 were enrolled. The mixture of sputum and pharyngeal swab of the patients was detected by real-time fluorescence reverse transcription polymerase chain reaction. The relationship between Ct value and the features of patients including disease onset days, sex, age and disease clinical type was observed. **Results** The Ct values of ORF1ab, N and E genes increased with the prolonged days of disease onset. E gene disappeared firstly, and then ORF1ab and N gene disappeared in turn. Ct value was the lowest during the period from the day 1 to 6 after symptom onset, and no significant difference of Ct value between male and female was found ($P>0.05$), but the Ct value was gradually elevated during the period of day 7 to 12 of onset, and Ct value of male was lower than that of female ($P<0.05$). There was no statistically significant difference of Ct value among various age groups ($P>0.05$). There was no statistically significant difference of Ct values between different types of disease ($P>0.05$). **Conclusion** Ct value of nucleic acid amplification for SARS-CoV-2 may relate to the days of symptomatic onset and the gender of patients, but not relate to the age of patients and the types of the disease.

Key words: SARS-CoV-2; nucleic acid detection; cycle threshold value

新型冠状病毒核酸检测作为早诊断、早治疗、早隔离的依据, 一直受到临床治疗及防疫一线医务人员的重视。核酸检测结果是确诊 2019 冠状病毒病 (corona virus disease 2019, COVID-19) 的关键, 但由于目前没有定量的试剂, 无法评价病毒在体内复制情况。循环阈值(cycle threshold, Ct 值)是每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环次数, 是一个半定量的数值, 与体内的病毒载量呈负相关, Ct 值越低, 说明标本中病毒载量越高^[1]。本研

究拟探讨 COVID-19 患者核酸检测 Ct 值的变化规律。

1 资料和方法

1.1 一般资料 筛选中国科学技术大学附属第一医院感染病医院 2020 年 1 月 21 日至 3 月 2 日收治的 45 例 COVID-19 患者。其中, 男性 24 例, 女性 21 例, 年龄 4~91 岁。COVID-2019 的诊断标准和临床分型方法参照根据国家卫生健康委员会颁布的《新

* 基金项目: 新型冠状病毒感染应急科技攻关专项(YD9110002001)。

作者简介: 石玉如, 1984 年生, 女, 主管技师, 硕士研究生, 主要从事感染性疾病分子生物学诊断。

通信作者: 戚应杰, 主任技师, E-mail: 7yingjie@sina.com。

型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》。根据患者病情严重程度,分为轻型 5 例(占 11.11%)、普通型 28 例(62.22%)、重型 10 例(22.22%)、危重型 2 例(4.44%)。所有研究对象的咽拭子及痰液混合液新型冠状病毒核酸检测均为阳性。本研究为回顾性研究,所有临床资料均为正常诊疗活动中的检查项目,提取数据仅限于患者性别、年龄及临床诊疗资料,对于姓名、家庭住址等资料无任何涉及。研究经过中国科学技术大学附属第一医院伦理委员会批准[文件编号:2020-XG(H)-001]。

1.2 主要仪器与试剂 全自动 RNA 提取仪(江苏硕世公司),SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪(上海宏石公司);病毒 RNA 提取试剂盒、实时荧光逆转录 PCR 试剂(江苏硕世公司)。

1.3 样本采集及处理 患者出现发热、咳嗽、胸闷等症状时,每隔 6 天采集患者痰及咽拭子标本,直至患者核酸检测转阴,最长监测 34 d。痰及咽拭子标本于 65 °C 30 min 灭活后充分振荡混匀。

1.4 实时荧光 RT-PCR 取 200 μL 混合样本加入提取试剂盒,在全自动 RNA 病毒核酸提取仪上进行提取。在实时荧光 PCR 仪上机进行实时荧光

RT-PCR 扩增检测,严格按照试剂说明书进行。循环参数:50 °C 逆转录 30 min,1 个循环;95 °C 预变性 5 min,1 个循环;95 °C 变性 10 s,55 °C 40 s 退火、延伸,45 个循环;55 °C 检测荧光信号。FAM 通道检测开放阅读框(ORF1ab)基因,VIC 通道检测包膜蛋白基因 E,ROX 通道检测核壳蛋白基因 N。结果判读:新型冠状病毒核酸 Ct 阳性阈值为 38,38<Ct<40 记录检测 Ct 值,无 Ct 值或 Ct>40 均记录为 40。

1.5 统计学分析 用 SPSS 23.0 统计软件及 Graphpad Prism 5 进行统计学分析及图形绘制。非正态分布的计量资料用四分位数表示,两组资料比较采用 Mann-Whitney U 检验,多组样本间的比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,Spearman 等级相关系数用于两组连续变量之间的线性相关分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 核酸 Ct 值随发病天数变化情况 随着发病天数的增加,ORF1ab、N、E 基因的 Ct 值不断增高。E 基因首先转阴性、N 基因最后转为阴性。见表 1。

表 1 Ct 值随时间变化情况

发病天数	ORF1ab 基因	N 基因	E 基因
1~6	28.46(21.67,30.31)	26.40(20.48,28.26)	31.22(24.75,33.16)
7~12	33.97(28.88,36.15)	32.44(26.92,34.63)	35.37(38.37,30.40)
13~18	35.10(33.38,38.18)	34.20(31.81,37.56)	37.13(34.94,39.23)
19~24	36.07(32.50,38.25)	34.95(31.82,37.40)	39.24(36.27,40.00)
>25	38.01(36.10,40.00)	37.99(35.61,39.61)	40.00(40.00,40.00)

2.2 核酸 Ct 值与性别的关系 从出现症状之日起至第 6 天,此时男性与女性的核酸 Ct 值最低,男性、女性差异无统计学意义(P>0.05);从出现症状第 7 天至第 12 天 Ct 值逐渐升高,但此时男性 Ct 值低于

女性,差异有统计学意义(ORF1ab:Z=2.238;N 基因:Z=2.446;E 基因:Z=1.985,P 均<0.05);13 d 后男性与女性 Ct 值均不断升高,男性、女性差异无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

表 2 不同性别间 Ct 值的比较

发病天数	性别	ORF1ab 基因	N 基因	E 基因
1~6	女	28.14(20.48,35.01)	26.64(19.18,34.08)	28.66(21.72,34.67)
	男	29.34(28.78,29.89)	26.89(26.16,27.61)	31.82(31.38,32.25)
7~12	女	35.90(33.91,37.24)*	34.14(31.13,36.53)*	36.87(30.19,39.12)*
	男	32.16(28.33,34.24)	30.03(26.62,32.46)	34.18(29.47,37.11)
13~18	女	36.18(30.20,37.55)	35.22(28.61,37.39)	37.45(31.16,38.98)
	男	34.60(33.30,39.27)	33.21(31.98,36.89)	37.13(35.68,40.00)
19~24	女	36.89(33.21,40.00)	36.88(33.50,40.00)	40.00(40.00,40.00)
	男	37.46(33.65,39.98)	36.55(32.28,39.53)	39.04(37.60,40.00)
>25	女	38.32(36.04,40.00)	38.08(35.77,40.00)	40.00(40.00,40.00)
	男	38.23(36.65,40.00)	37.96(36.11,40.00)	40.00(40.00,40.00)

注:* ,与同时间段男性患者比较,P<0.05。

2.3 核酸 Ct 值与年龄的关系 各年龄组间 ORF1ab、N、E 基因 Ct 值差异无统计学意义

(ORF1ab:P=0.675;N 基因:P=0.660;E 基因:P=0.838)。见表 3。

表 3 不同年龄组 Ct 值的比较

年龄组(岁)	ORF1ab 基因	N 基因	E 基因
<25	34.49(32.46,37.13)	32.82(30.65,36.22)	37.38(35.49,39.60)
25~40	33.74(29.52,36.62)	31.84(27.31,35.84)	36.30(31.91,40.00)
41~60	33.35(27.50,35.52)	32.35(26.05,34.13)	36.91(30.45,39.26)
>60	34.15(29.27,36.54)	32.77(27.46,35.74)	36.38(32.01,35.98)

2.4 Ct 值与疾病分型的关系 33 例轻型/普通型患者和 12 例重型/危重型患者间 ORF1ab 基因、N 基因、E 基因 Ct 值差异无统计学意义。见表 4。

表 4 Ct 值与疾病分型的关系

疾病分型	ORF1ab 基因	N 基因	E 基因
轻型/普通型(n=33)	37.20(34.62,40.00)	36.75(33.08,40.00)	38.41(36.05,40.00)
重型/危重型(n=12)	36.07(33.20,40.00)	34.95(31.97,40.00)	34.15(37.25,40.00)
Z 值	0.656	0.979	0.495
P 值	0.512	0.327	0.621

3 讨论

引起此次新型冠状病毒肺炎疫情的是一种 β 属冠状病毒(SARS-CoV-2),直径 60~140 nm,有包膜,颗粒呈圆形或椭圆形,常为多形性^[2]。目前采用的实时荧光 RT-PCR 技术以 ORF1ab 基因、N 基因以及 E 基因作为检测靶标。

本研究发现,随着时间的增加,患者 Ct 值不断增加,E 基因最先消失,其次是 ORF1ab 基因,最后是 N 基因,所以不能以 E 基因作为患者转阴的标准,否则可能造成假阴性结果。有研究指出,在细胞中新型冠状病毒的 mRNA 数倍于病毒的基因组 RNA,且将转录出不同长度的 mRNA,这些 mRNA 都带有 N 基因,而只有少数带有 ORF1ab;试剂盒的检测多为细胞内的病毒 mRNA,因此患者样本中 N 基因 mRNA 的拷贝数远高于 ORF1ab 基因,故在新型冠状病毒拷贝数较低的情况下,N 基因检测单通道阳性的比例较高^[3],N 基因也是最后消失的基因。

研究显示,在出现发热、咳嗽、胸闷等症状起至第 6 天这段时间,Ct 值最低,此时进行核酸检测为最佳检测时期。随着时间的推移,在第 7 天至第 12 天,男性核酸 Ct 值低于女性,女性体内病毒核酸水平比男性下降得快。Xiong 等^[4]研究团队认为,女性免疫力要高于男性。可能正是由于女性具有高于男性的免疫力,抵御及清除新型冠状病毒的能力要高于男性。同时发现不同年龄组 Ct 值差异无统计学意义($P>0.05$),与曾希鹏等^[5]研究结果一致,可能是由于病毒载量反映病毒在体内的复制情况,不同年龄组对 SARS-CoV-2 在体内复制的情况基本一致。同时对轻/普通型、重/危重型患者进行 Ct 值检

测,未发现疾病分型与 Ct 值有关,与刘映霞等^[6]报道不一致,可能与不同研究者所选取的病例处于起病的不同阶段有关,本文对患者全程进行监测。

综上所述,Ct 值随发病天数增加而增高,最佳检测时间为出现症状后的 1~6 d,女性在 7~12 d Ct 值明显上升,患者病情逐渐恢复。E 基因最先消失,不能以 E 基因的消失判断患者是否转阴,患者的疾病分型、年龄与 Ct 值无关。

4 参考文献

- [1]李贵玲,杜宁宁,余斐.住院患者感染甲型流感病毒早期病毒载量与疾病严重程度关系的研究[J].中国微生态学杂志,2016,28(10):1168-1171.
- [2]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.
- [3]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):523-526.
- [4]Xiong QT, Xu M, Zhang JX, et al. Women may play a more important role in the transmission of the corona virus disease (COVID-19) than men[J/OL]. Preprints with the Lancet, 2020[2020-03-03]. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3546061&download=yes.
- [5]曾希鹏,谢朝梅,谢燕湘,等.常德市 79 例新型冠状病毒肺炎确诊病例本底资料及核酸检测结果分析[J/OL].实用预防医学,2020(2020-03-09)[2020-03-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1223.r.20200306.1249.006.html>.
- [6]刘映霞,杨扬,张聪,等.新型冠状病毒(2019-nCoV)感染患者肺损伤相关的临床及生化指标研究[J].中国科学:生命科学,2020,50(3):258-269.

(收稿日期:2020-03-15)

(本文编辑:刘群)