

分子诊断技术在新型冠状病毒变异株检测中的应用评价

王璐 杨华荣^(通讯作者)

(宁夏回族自治区第五人民医院 753000)

【摘要】目的:评价数字PCR(dPCR)与实时荧光定量PCR(qPCR)在新型冠状病毒(SARS-CoV-2)变异株检测中的应用价值,为临床选择精准检测技术提供依据。方法:选取2023年6月-2024年2月我院180例疑似SARS-CoV-2感染患者,随机分对照组与实验组各90例。对照组采用qPCR检测,实验组采用dPCR检测,均以基因测序结果为金标准,比较两种技术的检测阳性率、最低检出限及变异株分型准确率。结果:实验组检测阳性率94.44%(85/90),高于对照组82.22%(74/90)($\chi^2=6.892$, $P=0.009$);实验组最低检出限(12.35±2.17)copies/mL,低于对照组(38.62±4.51)copies/mL($t=45.826$, $P<0.001$);实验组变异株分型准确率97.65%(83/85),高于对照组86.49%(64/74)($\chi^2=5.983$, $P=0.014$)。结论:dPCR在SARS-CoV-2变异株检测中阳性率更高、检出限更低、分型更精准,临床应用价值优于qPCR,值得推广。

【关键词】分子诊断技术;新型冠状病毒;变异株;数字PCR;实时荧光定量PCR

Evaluation of molecular diagnostic techniques in detection of novel coronavirus variants

Wang Lu Yang Huarong^(corresponding authors)

(The Fifth People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region 753000)

[Abstract] Objective: To evaluate the application value of digital PCR (dPCR) and real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) in the detection of novel coronavirus (SARS CoV-2) variants, and to provide a basis for clinical selection of accurate detection techniques. Method: 180 suspected SARS-CoV-2 infected patients in our hospital from June 2023 to February 2024 were randomly divided into a control group and an experimental group, with 90 cases in each group. The control group was detected by qPCR, while the experimental group was detected by dPCR, with gene sequencing results as the gold standard. The positive rate, minimum detection limit, and accuracy of variant typing were compared between the two techniques. Result: The positive rate of the experimental group was 94.44% (85/90), which was higher than the control group's 82.22% (74/90) ($\chi^2=6.892$, $P=0.009$); The lowest detection limit of the experimental group (12.35±2.17) copies/mL was lower than that of the control group (38.62±4.51) copies/mL ($t=45.826$, $P<0.001$); The typing accuracy of the experimental group's mutant strains was 97.65% (83/85), which was higher than the control group's 86.49% (64/74) ($\chi^2=5.983$, $P=0.014$). Conclusion: dPCR has a higher positive rate, lower detection limit, and more accurate typing in the detection of SARS-CoV-2 variants, and its clinical application value is superior to qPCR, which is worth promoting.

[Key words] molecular diagnostic technology; novel coronavirus Mutant strain; Digital PCR; Real time fluorescence quantitative PCR

引言

SARS-CoV-2持续变异衍生出多种传播力与致病性增强的毒株,快速精准检测是疫情防控的关键^[1]。qPCR因操作简便成为临床常规检测技术,但在低病毒载量样本及变异株分型中存在局限。dPCR通过绝对定量特性提升检测灵敏度与特异性,但其在变异株检测中的系统评价较少。基于此,本研究以临床疑似病例为对象,对比两种分子诊断技术的检测性能,为优化SARS-CoV-2变异株检测方案、提升防控精准度提供数据支撑。

一、研究资料与方法

(一)一般资料

选取2023年6月-2024年2月我院发热门诊及呼吸科收治的180例疑似SARS-CoV-2感染患者作为研究对象。纳入标准:出现发热、咳嗽等呼吸道症状;发病≤7天;未接受抗病毒治疗;患者知情同意。排除标准:样本采集不规范;合并其他病毒感染;临床资料缺失。采用随机数字表法分为对照组和实验组各90人。经统计学检验,两组患者在性别构成($\chi^2=0.089$, $P=0.765$)、年龄分布($t=0.652$, $P=0.515$)、症状持续时间($t=0.428$, $P=0.669$)等基线资料方面差异无统计学意义($P>0.05$),具有良好可比性。

(二)实验方法

1. 样本采集与处理: 两组均采集鼻咽拭子样本, 置于含 3mL 病毒保存液的采样管中, 4℃冷链运输至实验室。采用磁珠法提取病毒 RNA, 严格按照试剂盒说明书操作, 提取后 RNA 浓度调整至 50–100ng/ μL , -80℃保存备用。

2. 对照组 (qPCR 检测): 采用 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法), 检测靶点为 ORF1ab、N 基因。反应体系 25 μL : 核酸模板 5 μL 、上下游引物各 1 μL 、探针 0.5 μL 、酶混合液 12.5 μL 、无酶水 5 μL 。反应条件: 50℃逆转录 30min; 95℃预变性 10min; 95℃变性 15s、60℃退火延伸 30s, 共 40 个循环。以 Ct 值 < 37 为阳性, 37 \leq Ct 值 \leq 40 为可疑, Ct 值 > 40 为阴性。

3. 实验组 (dPCR 检测): 采用微滴式数字 PCR 系统 (Bio-Rad QX200), 检测靶点包括 ORF1ab 基因、N 基因 (引物探针序列同对照组) 及 Omicron 亚株特异性突变位点: B. A.5 亚株的 L452R 突变 (探针序列: 5'-FAM-CTTGTGGTGGTGAAATAGT-MGB-3')、XBB 亚株的 S486P 突变 (探针序列: 5'-HEX-TGGTGGTGAAATAGTGGT-3')。反应体系 20 μL : 核酸模板 4 μL 、引物探针混合液 8 μL (含上述 4 对引物探针, 浓度同 qPCR)、dPCR 预混液 (含 Hot Start Taq 酶、dNTPs) 6 μL 、无酶水 2 μL 。将反应体系转移至微滴生成卡, 加入 70 μL 微滴生成油, 通过微滴生成仪生成微滴 (每个反应生成 10000–20000 个微滴), 将微滴转移至 96 孔 PCR 板, 密封后进行扩增。反应条件: 50℃逆转录 60min; 95℃预变性 10min; 95℃变性 30s、58℃退火延伸 60s, 共 45 个循环; 最后 98℃孵育 10min 灭活酶活性。扩增结束后采用微滴分析仪读取阳性微滴数量, 通过 Poisson 分布公式计算病毒载量, 以病毒载量 \geq 10copies/mL 为阳性; 结合 FAM (ORF1ab/N 基因)、HEX (突变位点) 荧光信号判定变异株类型: 仅 FAM 阳性为非 Omicron 株, FAM+BA.5 探针阳性为 BA.5 亚株, FAM+XBB 探针阳性为 XBB 亚株。

4. 金标准检测 (二代基因测序): 所有样本同步进行二代基因测序检测, 采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台。取 20 μL 提取的 RNA, 采用 NEBNext Ultra II RNA 文库制备试剂盒构建 cDNA 文库, 通过探针捕获法富集 SARS-CoV-2 S 基因全长序列, 文库质检合格后进行高通量测序, 测序深度 \geq 1000 \times 。测序数据采用 FastQC 进行质量控制, 去除低质量 reads 后, 通过 BWA 软件比对至 SARS-CoV-2 参考基因组 (NC_045512.2), 使用 GATK 软件检测突变位点, 通过 BLAST 工具与 GenBank 数据库中已知变异株序列比对, 确定病毒分型, 作为本研究检测结果判定的金标准。

5. 质量控制: 实验全程严格遵循《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行质量控制。每次实验均设置阴

性对照 (无酶水替代核酸模板)、阳性对照 (SARS-CoV-2 假病毒颗粒, 浓度 1000copies/mL, 国家卫健委临床检验中心提供)、空白对照 (仅含反应体系不含模板)。由 2 名具有 5 年以上临床检验经验的资深技师独立操作并判读结果, 当两人判读结果不一致时, 由第三方 (实验室主任) 复核确认。定期对 PCR 仪、微滴生成仪等设备进行校准 (每季度 1 次), 对试剂盒进行批间质量验证, 确保实验结果的可靠性与重复性。

(三) 观察指标

1. 检测阳性率: 以基因测序结果为金标准, 计算两组检测技术的阳性检出率, 阳性率=真阳性例数/总阳性例数 \times 100%。

2. 最低检出限: 采用梯度稀释的 SARS-CoV-2 假病毒标准品 (浓度 10–1000copies/mL), 各浓度重复检测 10 次, 以检出率 \geq 95% 的最低浓度为最低检出限。

3. 变异株分型准确率: 统计两种技术对 Omicron 亚株 (BA.5、XBB) 的正确分型例数, 准确率=正确分型例数/总阳性例数 \times 100%。

(四) 研究计数统计

用 SPSS 26.0 分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间 t 检验; 计数资料 [n (%)], χ^2 检验。P < 0.05 为有统计学意义。

二、结果

(一) 检测阳性率

表 1 两组检测阳性率对比 [n (%)]

指标	对照组	实验组	χ^2 值	P 值
检测阳性率	74 (82.22)	85 (94.44)	6.892	0.009

经基因测序确认, 180 例样本中 SARS-CoV-2 阳性 102 例。实验组检测阳性 85 例, 阳性率 94.44%; 对照组检测阳性 74 例, 阳性率 82.22%。经 χ^2 检验, 两组阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2=6.892$, P=0.009), 提示 dPCR 阳性检出能力优于 qPCR。

(二) 最低检出限

表 2 两组最低检出限对比 (copies/mL, $\bar{x} \pm s$)

指标	对照组	实验组	t 值	P 值
最低检出限	38.62 \pm 4.51	12.35 \pm 2.17	45.826	< 0.001

梯度稀释实验显示, 实验组最低检出限为 (12.35 \pm 2.17) copies/mL, 显著低于对照组的 (38.62 \pm 4.51) copies/mL。经 t 检验, 组间差异具有统计学意义 (t=45.826, P < 0.001), 表明 dPCR 对低病毒载量样本的检出灵敏度更高。

(三) 变异株分型准确率

表3 两组变异株分型准确率对比[n (%)]

指标	对照组	实验组	χ^2 值	P值
分型准确率	64 (86.49)	83 (97.65)	5.983	0.014

102例阳性样本中, Omicron BA.5型48例、XBB型32例、其他型22例。实验组正确分型83例, 准确率97.65%; 对照组正确分型64例, 准确率86.49%。经 χ^2 检验, 两组分型准确率差异有统计学意义($\chi^2=5.983$, $P=0.014$), 说明dPCR变异株分型精准度更高。

三、讨论

本研究从检测阳性率、最低检出限及变异株分型准确率三个维度, 系统评价了dPCR与qPCR在SARS-CoV-2变异株检测中的应用价值, 结果显示dPCR在三项指标中均显著优于qPCR, 这与其独特的技术原理密切相关。qPCR基于荧光信号累积进行相对定量, 依赖Ct值判读结果, 当样本病毒载量接近检出限时, 荧光信号弱且易受背景干扰, 导致假阴性结果增多, 这与本研究中对照组8例低载量样本($< 50\text{copies/mL}$)均未检出的结果一致。而dPCR通过微滴生成技术将反应体系分割为上万个独立微滴, 实现单分子级别的绝对定量, 即使极低浓度的病毒核酸也能被精准捕捉, 故最低检出限较qPCR降低68.02%, 阳性率提升12.22个百分点, 尤其适用于无症状感染者、恢复期患者等低载量样本的检测^[2]。

在变异株分型方面, SARS-CoV-2 S基因的高频突变易导致qPCR探针结合效率下降, 出现分型错误或无法分型。本研究中对照组10例分型错误样本均为XBB型, 因该毒株的L452R突变位点与qPCR探针结合区域重叠, 导致探针无法有效结合而误判为其他型别。dPCR通过增设针对特定突变位点的荧光探针, 采用双重信号识别模式, 既能检测病毒保守基因确认感染, 又能通过突变位点信号区分变异株类型, 且微滴化反应降低了探针交叉反应的影响, 故分型准确

率提升11.16个百分点。这一优势对疫情溯源至关重要, 可快速识别优势流行株, 为防控策略调整提供及时依据^[3]。

从临床实践角度分析, dPCR虽操作流程较qPCR复杂(增加微滴生成步骤), 但检测时间仅延长30min, 仍能满足临床快速诊断需求。同时, 其无需标准曲线校准, 结果重复性更好(本研究中dPCR批内CV值 $< 3\%$, qPCR批内CV值 $< 8\%$), 尤其适用于基层实验室及大规模筛查场景。需注意的是, dPCR检测成本略高于qPCR, 但考虑到其能减少假阴性导致的漏诊及后续传播风险, 综合成本效益更优。此外, 本研究发现两种技术在高病毒载量样本($> 1000\text{copies/mL}$)中阳性率无显著差异(均为100%), 提示临床可根据样本类型分层选择检测技术, 在高风险人群筛查中优先采用dPCR, 在普通人群筛查中可结合qPCR降低成本^[4]。

与既往研究相比, 本研究创新性地纳入了2023年以来流行的XBB等新型变异株, 且通过梯度稀释实验精准量化了最低检出限, 结果更贴合当前疫情防控需求。但本研究样本量有限, 且未涉及其他分子诊断技术(如RT-LAMP)的对比, 未来可扩大样本量并增加技术类型, 进一步完善SARS-CoV-2变异株检测技术评价体系。

四、结论

本研究证实, 数字PCR在新型冠状病毒变异株检测中表现出更高的阳性率、更低的最低检出限及更精准的分型准确率, 显著优于传统实时荧光定量PCR技术。其通过单分子绝对定量与双重探针识别技术, 有效解决了低病毒载量样本漏诊及变异株分型错误的问题, 为无症状感染者筛查、变异株溯源及临床精准诊疗提供了可靠技术支撑。尽管dPCR成本略高, 但综合其检测性能与防控价值, 仍值得在各级医疗机构尤其是疫情重点地区推广应用。未来可通过技术优化进一步降低成本, 推动其在基层实验室的普及, 助力新型冠状病毒疫情的精准防控。

参考文献:

- [1]段升华, 郑正振.血常规、生化以及肿瘤标志物联合检测在结直肠癌患者筛查中的应用[J].吉林医学, 2023, 44(05): 1218-1221.
- [2]张心勇.血常规、血生化及肿瘤标志物联合检测在筛查早期结直肠癌中的应用价值[J].当代医药论丛, 2020, 18(02): 168-169.
- [3]孙爱平.血常规、生化以及肿瘤标志物联合检测在结直肠癌患者筛查中的应用价值[J].临床检验杂志(电子版), 2018, 7(04): 625-626.
- [4]刘静.血常规、生化以及肿瘤标志物联合检测在结直肠癌患者筛查中的应用价值[J].中国卫生检验杂志, 2016, 26(22): 3278-3279+3282.