DOI:10.16016/j.2097-0927.202210035

中国内地首例猴痘病毒样本的核酸 PCR 正交试验比对分析

宗 华[1],孙 巧[1],李彩云[1],殷 静[1],罗青梅[1],王梦佳[2] 400067 重庆,重庆市南岸区疾病预防控制中心微生物检验科[1];400016 重庆,重庆医科大学公共卫生学院[2]

[**摘要**] **目的** 验证目前国内关于猴痘病毒提取试剂、扩增试剂以及实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitativepolymerase chain reaction,RT-qPCR)仪的检出效率、灵敏度差异以及提取扩增组合的比对分析。**方法** 根据设计的正交试验方案,采用 RT-qPCR 对提取的核酸进行扩增。**结果** 本次试验中不同的 DNA 提取试剂的提取效率的差异无统计学意义($F=12.855$,$P=0.070$),扩增试剂扩增循环数的差异($F=49.832$,$P=0.019$)和 RT-qPCR 仪对荧光捕捉信号的差异($F=36.355$,$P=0.027$)均存在统计学意义。**结论** 目前国内猴痘病毒的提取和扩增试剂盒可以有效地检出该病毒,试剂和仪器的组合对检出效率存在差异。通过验证试验,发现更具有检测优势的组合,为之后国内应对猴痘病毒检测及疫情防控工作提供参考。

[**关键词**] 猴痘病毒;正交试验;实时荧光定量聚合酶链式反应

[**中图法分类号**] R195.1;R373.12;R446.61 [**文献标志码**] A

Comparative analysis of nucleic acid PCR orthogonal experiment of first monkeypox virus sample in mainland China

ZONG Hua[1], SUN Qiao[1], LI Caiyun[1], YIN Jing[1], LUO Qingmei[1], WANG Mengjia[2] [1]Department of Microbiological Laboratory, Nan'an District Center for Disease Control and Prevention, Chongqing, 400067; [2]School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the differences in detection efficiency and sensitivity of current domestic monkeypox virus extraction reagents, amplification reagents and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) instruments, and to compare among different extraction and amplification combinations. **Methods** The extracted nucleic acid of monkeypox virus were amplified using RT-qPCR, according to the designed orthogonal test protocol. **Results** There was no significance in the extraction efficiency of different DNA extraction reagents ($F=12.855$, $P=0.07$), while the differences were statistically differences in the number of amplification cycles of amplification reagents ($F=49.832$, $P=0.019$) and in the fluorescence signal capture of RT-qPCR instruments ($F=36.355$, $P=0.027$). **Conclusion** The current domestic extraction and amplification kits for monkeypox virus can effectively detect the virus, but various reagent and instrument combinations show different detection efficiency. Through the validation test, a more advantageous combination is found, which provides a reference for domestic response to monkeypox virus detection and epidemic prevention and control.

[**Key words**] monkeypox virus; orthogonal experiment; RT-qPCR

Corresponding author: SUN Qiao, E-mail: 378940993@qq.com

[**通信作者**] 孙 巧,E-mail:378940993@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

猴痘是由猴痘病毒感染所致的一种病毒性人兽共患病,病毒经黏膜和破损皮肤侵入人体,临床表现主要为发热、皮疹、淋巴结肿大,部分患者可出现并发症,包括皮损部位继发细菌感染、脑炎等[1-3]。猴痘被称为一种发疹综合征,与天花几乎没有区别,天花是一种在1970年代后期通过疫苗接种根除的疾病,猴痘则是由另一种正痘病毒引起[4-5]。猴痘最近被世界卫生组织列为国际关注的突发公共卫生事件,虽然目前大多数病例是与男男性行为者[6],但疾病蔓延到一般人群的威胁更大。2022年1月1日至2022年7月20日期间,在世卫组织所有6个区域,共有72个国家向世卫组织报告了14 533例可能病例和实验室确诊病例(包括尼日利亚的3例死亡和中非共和国的2例死亡)[7-8]。作为一种DNA病毒,MPX病毒的遗传结构不太可能发生重大和频繁的变化[9]。PCR技术由于特异性高、灵敏度强等诸多优点,已经成为分子生物学中的常规技术,RT-qPCR技术是通过荧光信号对PCR进程进行实时监测,并对未知模板进行定量分析的一种方法,如今RT-qPCR检测越来越多地运用到食品工业、医学诊断、病毒检测、病原学追踪等方面,并取得显著效果[10-13]。2022年9月14日重庆市检出中国大陆第一例猴痘病毒,本文旨在从试验室检测技术角度出发,利用现有的提取试剂、扩增试剂以及使用的RT-qPCR仪使用正交试验方案开展检测,目的在于对新发传染病的检测效率做一次比对分析。为实验室检测猴痘病毒时选择试剂仪器提供参考意见,为后续国内的猴痘的流行病学调查与处置提供数据支撑。

1 资料与方法

1.1 患者流行病学史

2022年8月24~31日,患者在国内活动。9月1~13日,在欧洲旅居。9月3日在欧洲某国发生一次高风险暴露行为,潜伏期约为6 d。9月13日乘飞机回国,9月14日到达重庆后转入某区集中隔离点,当日出现咽喉干痒、皮疹(图1)等身体不适。隔离点医疗组核实后立即向该区疾病预防控制中心报告,经重庆市疾病预防控制中心复核猴痘病毒核酸检测结果后立即转入重庆市公卫中心进行诊疗。

本研究经重庆市南岸区疾病预防控制中心伦理委员会审查批准[2022年伦审(009)号]。

1.2 样本来源

隔离点对该病例进行采样,送区疾病预防控制中心开展猴痘病毒检测,口咽拭子和鼻咽拭子混合样(Ct值:31.37,卓诚惠生)、疱疹液(Ct值:31.64,卓诚惠生)的核酸结果均为猴痘病毒阳性,当天再次采集样本送重庆市疾病预防控制中心检测为阳性,阳性样本送至中国疾病预防控制中心复核为猴痘病毒阳性,重庆市疾病预防控制中心经基因测序,确认该猴痘病毒属于西非系B.1分支。由于首例样本,标本量有限,本次试验选择采集的口咽拭子和鼻咽拭子混合样本作为研究对象,按照设计的正交试验方案,开展样品核酸检测。

1.3 仪器与试剂

两种提取试剂分别是重庆中元和江苏硕世DNA提取试剂盒(后续表格中分别用A、B表示)、4种扩增试剂分别是北京卓诚、江苏硕世、广州达安和深圳生科原猴痘病毒核酸扩增试剂盒(后续表格中分别用A、B、C、D表示),两种RT-qPCR仪分别是美国伯乐(型号:CTX96TM)和杭州博日(型号:FQD-96A)(后续表格中分别用A、B表示)。

1.4 实验方法

根据中国疾控中心下发的猴痘防控技术指南(2022版)附件3猴痘病毒试验室检测技术指南[14]的要求,按照《人间传染的病原微生物名录》[15]中的有关规定,灭活的猴痘病毒样本在生物安全二级试验室进行核酸提取和扩增。试验室设计了本次试验的方案(见表1),按照此方案进行重复3次检测。

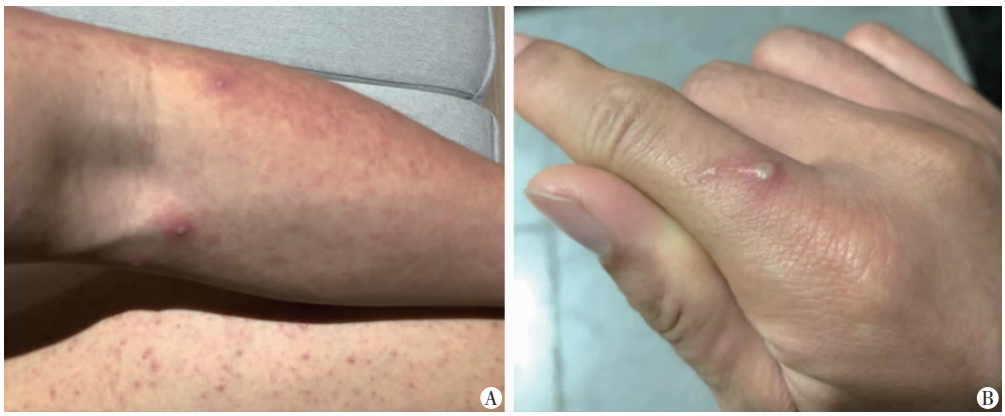


图1 猴痘病例的皮疹(A)和脓疱(B) (患者成年男性,于2022年9月14日在重庆市公共卫生中心诊疗)

表 1 猴痘病毒样本的核酸 PCR 正交试验设计方案

试验编号	因子 1（提取试剂）	因子 2（RT-qPCR 仪）	因子 3（扩增试剂）
1	A	A	A
2	A	A	C
3	A	B	B
4	A	B	D
5	B	A	D
6	B	A	B
7	B	B	C
8	B	B	A

1.5 结果判断

按照 4 种扩增试剂盒说明书对结果进行判读。具体如下:卓诚扩增试剂 Ct 值≤36,阳性,最低检出限:1 000 copies/mL。硕世扩增试剂 Ct 值≤37,阳性,最低检出限:1 000 copies/mL。达安扩增试剂 Ct 值≤40,阳性,最低检出限:200 copies/mL。生科原扩增试剂 Ct 值≤35.5,阳性,最低检出限:500 copies/mL。

1.6 统计分析

猴痘病毒样本的核酸 PCR 检测结果 Ct 值,使用 SPSS 26.0 版本对正交试验结果进行多因素极差分析和多因素方差分析,对验证试验结果进行 *t* 检验。

1.7 实验的质量控制

核酸检测试验室质控是一系列措施的集合[16]。RT-qPCR 技术具有灵敏度高、重复性好等特点,整个检测过程受样本采集、人员操作、试剂、环境等因素影响。本次试验用试剂盒自带的阴阳对照以及内标进行样本质控,检测人员具备核酸检测培训及岗位授权,同时按照《医学试验室质量和能力认可准则》的要求,每年至少参加了 1 次国家级或省级的能力验证考核,试剂耗材、仪器设备经过了试剂验收、性能验证等措施后用于本次检测。

2 结果

2.1 正交试验检测结果

正交试验检测结果取样本按正交试验设计方案开展试验,3 次试验阴性、阳性质控均正常,核酸检测结果见表 2,可见从提取到扩增均能准确检出核酸样本,但不同试剂和仪器间的组合的确存在差异。

表 2 猴痘病毒样本的核酸 PCR 正交试验 3 次检测(Ct 值)结果

试验编号	第 1 次检测	第 2 次检测	第 3 次检测
1	23.65	23.25	26.09
2	20.20	22.02	22.69
3	20.56	20.91	22.63
4	22.29	22.33	24.76
5	24.41	26.13	24.55
6	23.01	25.45	22.82
7	20.61	22.51	20.65
8	22.65	24.46	22.83

2.2 不同稀释浓度检测结果

不同稀释浓度检测结果按正交试验方案,对其中一次提取的核酸进行 10 倍和 100 倍稀释,核酸检测结果见表 3,可见低拷贝浓度下,用于本次扩增的 4 种核酸检测试剂盒均能检出不同浓度的核酸样本。

表 3 猴痘病毒样本的核酸 PCR 不同稀释浓度核酸检测(Ct 值)结果

试验编号	1∶1	1∶10	1∶100
1	23.65	26.45	29.75
2	20.20	27.53	29.14
3	20.56	24.38	28.39
4	22.29	25.64	29.56
5	24.41	27.83	31.47
6	23.01	27.02	30.11
7	20.61	25.21	28.6
8	22.65	27.89	31.45

2.3 正交试验结果分析

统计分析显示,RT-qPCR 仪检测中循环数(即 Ct 值)与扩增效率成负相关。多因素极差分析结果显示 3 种试验因子中 RT-qPCR 仪对试验结果的影响最大,提取试剂对比 A<B,扩增试剂对比 C<B<A<D,RT-qPCR 仪对比 B<A(表 4);各个因素各个水平的试验数据平均值见图 2。

表 4 猴痘病毒样本的核酸 PCR 多因素极差分析结果

项目	水平	因子 1（提取试剂）	因子 2（RT-qPCR 仪）	因子 3（扩增试剂）
K 值	A	90.47	94.76	47.64
	B	93.36	89.07	45.13
	C	—	—	42.90
	D	—	—	48.16
Kavg 值	A	22.62	23.69	23.82
	B	23.34	22.27	22.57
	C	—	—	21.45
	D	—	—	24.08
最佳水平	2	1	4	
R	0.72	1.42	2.63	
水平数量	2	2	4	
每水平重复数 *r*	4.0	4.0	2.0	
折算系数 *d*	0.71	0.71	0.45	
R’	1.03	2.02	1.67	

K 值:某因素某水平时试验数据求和;*Kavg* 值:对应的平均值;最佳水平:某因子时最佳 *Kavg* 值对应的水平编号;*R*:因素的极差值,该值=某因素时,*Kavg* 最大值减去 *Kavg* 最小值,可结合因素极差值对比各因素的优劣;水平数量:某因素的水平数;每水平重复数 *r*:水平的平均试验重复次数;混合型正交表则提供折算系数 *d*(结合水平数量在折算系数表中找到)和 *R*’值

多因素方差分析显示,因子 1(提取试剂)并不会对结果(Ct 值)产生差异关系(P>0.05),因子 2(PCR 仪器)、因子 3(扩增试剂)会对结果(Ct 值)产生显著性差异关系(P<0.05,表 5)。

表 5　猴痘病毒样本的核酸 PCR 多因素方差分析结果

差异源	平方和	*df*	均方	*F*	*P*
截距	4224.184	1	4 224.184	52 013.959	0.000[b]
因子 1(提取试剂)	1.044	1	1.044	12.855	0.070
因子 2(RT-qPCR 仪)	4.047	1	4.047	49.832	0.019[a]
因子 3(扩增试剂)	8.857	3	2.952	36.355	0.027[a]
残差	0.162	2	0.081		

R^2=0.988,a:P<0.05,b:P<0.01

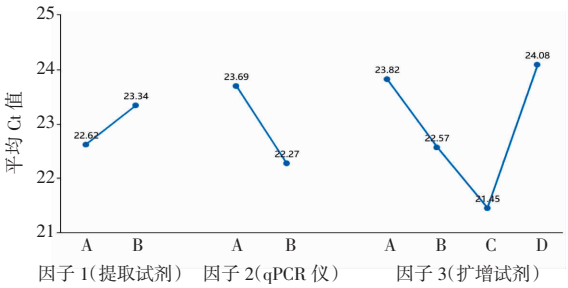


图 2　猴痘病毒样本的核酸 PCR 多因素分析比对结果

2.4　验证试验比对结果

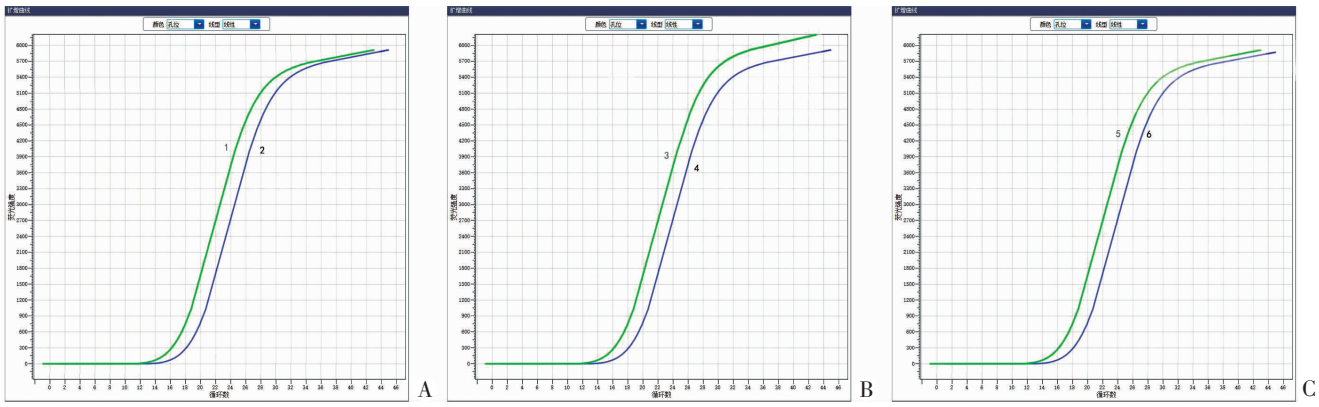
将上述统计学处理的结果进行组合,选取提取试剂 A、RT-qPCR 仪 B、扩增试剂 C 作为最优组合,与比对组(提取试剂 A、RT-qPCR 仪 B、扩增试剂 B)的组合进行验证试验,由于提取试剂无统计学意义,试验编号 3 的组合是 8 次正交试验中 Ct 值最低的组合之一,所以选择该组合作为比对组来开展检测,每次检测均带入水痘-带状疱疹病毒阳性样本的核酸进行试验,作为试验避免假阳性的质控方式。

验证试验利用 t 检验分析,最优组和比对组对于 Ct 值全部均呈现出显著性差异关系(P<0.05)。图 3A 中曲线 1Ct 值(19.70,最优组)小于曲线 2(21.09,比对组);图 3B 中曲线 3Ct 值(19.93,最优组)小于曲线 4(21.18,比对组);图 3C 中曲线 5Ct 值(19.83,最优组)小于曲线 6(21.11,比对组),可见最优组的检测效率高于比对组。本次试验带入水痘-带状疱疹病毒阳性样本,用猴痘试剂盒检测结果全为阴性,说明质控手段和数据结果真实有效。

3　讨论

疾病预防控制中心在处理流感、诺如病毒引起的聚集性疫情以及应对新冠、猴痘病毒等新发传染病时首选 RT-qPCR 技术,其发挥了重要作用。本次试验对提取的核酸进行 10 倍和 100 倍稀释,循环数增加 3.3 个循环左右[17-18],运用 RT-qPCR 技术进行检测,试验结果较为吻合。同时在稀释到低拷贝浓度的情况下,检测试剂对猴痘病毒的核酸检出效率较为稳定,质控对照均正常,目前国内上述的 DNA 提取试剂和猴痘扩增试剂的质量准确可靠。

鉴于该猴痘病例为中国内地首例发现,可能对新发传染病认识还不足,对病原体检测还存在不确定性,我们设计了正交试验方案开展试验。正交试验设计是研究多因素多水平的重要数理方法,也是对试验因素作合理的、有效的安排,最大限度地减少试验误差,是一种高效率、快速、经济的试验设计方法[19-21]。从本次试验结果看,提取试剂提取效率存在差异,但比对结果无统计学意义。扩增试剂盒检测循环数、PCR 仪器



A:第 1 次验证试验;B:第 2 次验证试验;第 3 次验证试验

曲线 1、3、5:最优组;2、4、6:比对组

图 3　猴痘病毒样本的核酸 PCR 验证试验比对结果

在对荧光信号的捕捉上差异具有统计学意义,提示我们在新发传染病的检测中需要对检测试剂和仪器进行验证,是提高检测效率很重要的手段。根据极差分析结果,PCR 仪器的荧光捕捉信号的差异在本次试验的多因素中最为关键,不同品牌 PCR 仪在荧光捕捉方式,使用者对仪器的定期维护保养,使用过程中对仪器的熟练程度等都直接关系到检测结果的准确性和有效性,提升仪器的使用管理水平也是检测过程的重要环节。

检测阈值是探针设计过程中对该试剂相对稳定的检测临界值体现,各品牌试剂的检测 Ct 值和最低检出限存在差异,对高浓度核酸标的物进行检测并无太大影响。检测时需注意弱阳性样本的检测质量。此次病例标本量较少,对提取试剂、扩增试剂以及 RT-qPCR 仪的比对结果还缺少一定的数据支撑,下一步工作我们收集到一定数量的样本可运用 ROC 曲线深入分析各试剂盒的灵敏度和特异性。

在应对新发传染病检测中,RT-qPCR 技术快速灵敏,应注意试剂和仪器的选择及检测流程的质量把控,力求试验结果精准有效。

参考文献:

[1] BHATTACHARYA M, DHAMA K, CHAKRABORTY C. Recently spreading human monkeypox virus infection and its transmission during COVID-19 pandemic period: a travelers´ prospective[J]. Travel Med Infect Dis, 2022, 49: 102398. DOI:10.1016/j.tmaid.2022.102398.

[2] AL-MUSA A, CHOU J, LABERE B. The resurgence of a neglected Orthopoxvirus: Immunologic and clinical aspects of monkeypox virus infections over the past six decades[J]. Clin Immunol, 2022, 243: 109108. DOI:10.1016/j.clim.2022.109108.

[3] MCCOLLUM A M, DAMON I K. Human monkeypox[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2): 260-267. DOI:10.1093/cid/cit703.

[4] NÖRZ D, TANG H T, EMMERICH P, *et al*. Rapid adaptation of established high-throughput molecular testing infrastructure for monkeypox virus detection[J]. Emerg Infect Dis, 2022, 28(9): 1765-1769. DOI:10.3201/eid2809.220917.

[5] PATRONO L V, PLÉH K, SAMUNI L, *et al*. Monkeypox virus emergence in wild chimpanzees reveals distinct clinical outcomes and viral diversity[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(7): 955-965. DOI:10.1038/s41564-020-0706-0.

[6] 宁玲, 李磊. 人类猴痘的研究进展[J]. 安徽医学, 2022, 43(7): 851-855. DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.07.026.
NING L, LI L. Research progress of human monkeypox[J]. Anhui Med J, 2022, 43(7): 851-855. DOI:10.3969/j.issn.1000-0399.2022.07.026.

[7] MBALA P K, HUGGINS J W, RIU-ROVIRA T, *et al*. Maternal and fetal outcomes among pregnant women with human monkeypox infection in the democratic republic of Congo[J]. J Infect Dis, 2017, 216(7): 824-828. DOI:10.1093/infdis/jix260.

[8] WHO. Monkeypox[EB/OL]. 2022-9-16. https://www.who.int/zh/news/item/23-07-2022-second-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr)-emergency-committee-regarding-the-multi-country-outbreak-of-monkeypox.

[9] LI Y, OLSON V A, LAUE T, *et al*. Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays[J]. J Clin Virol, 2006, 36(3): 194-203. DOI:10.1016/j.jcv.2006.03.012.

[10] 刘莹,刘海娟,黄志娟. miR-200a-3p 靶向转甲状腺素蛋白对妊娠期高血压疾病滋养细胞生物学行为的影响[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(1): 1-8. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.01.001.
LIU Y, LIU H J, HUANG Z J. Effect of miR-200a-3p targeting transthyretin (TTR) on the biological behavior of placental trophoblasts in hypertensive disorder complicating pregnancy[J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(1): 1-8. DOI:10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.01.001.

[11] 顾卫芹, 瞿旭东, 沈忠培, 等. ABI 7300 实时荧光定量 PCR 技术在肝癌患者基因检测效果[J]. 现代仪器与医疗, 2021, 27(5): 1-3, 8. DOI:10.11876/mimt202105001.
GU W Q, QU X D, SHEN Z P, *et al*. Gene detection effect of ABI 7300 real-time fluorescence quantitative PCR in patients with liver cancer[J]. Mod Instrum Med Treat, 2021, 27(5): 1-3, 8. DOI:10.11876/mimt202105001.

[12] 郭艳蕊. 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 核酸诊断方法的建立[D]. 长春: 长春理工大学, 2021.
GUO Y R. Establishment of novel coronavirus SARS-CoV-2 nucleic acid diagnostic method[D]. Changchun: Changchun University of Science and Technology, 2021.

[13] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 876.
SHANG H, WANG Y S, SHEN Z Y. National Guide to Clinical Laboratory Procedures. 4 edition. Beijing. People´s Medical Publishing House, 2015:876.

[14] 国家卫生健康委员会. 痘防控技术指南(2022 年版)[J]. 中国病毒病杂志, 2022, 12(4): 245-254. DOI:10.

16505/j.2095-0136.2022.0050.
National Health Commission of the People's Republic of China. Technical guidelines for monkeypox control in China (2022 version)[J]. Chin J Viral Dis, 2022, 12(4): 245-254. DOI:10.16505/j.2095-0136.2022.0050.

[15] 中华人民共和国卫生部. 卫生部关于印发《人间传染的病原微生物名录》的通知[J]. 中华人民共和国卫生部公报, 2006(2): 32-52.
Ministry of Health of the People's Republic of China, Notice of the Ministry of Health on the Issuance of the List of Pathogenic Microorganisms Transmitted in Human [J]. Gazette Minist Heal People's Repub China, 2006, (2): 32-52.

[16] 倪紫菱, 王小合, 王莹, 等. 医院感染管理在新型冠状病毒肺炎疫情防控中的执行力提升策略研究[J]. 中国医院管理, 2020, 40(7): 14-17, 26.
NI Z L, WANG X H, WANG Y, *et al*. Research on enhancement strategy of nosocomial infection management implementation in prevention and control of COVID-19[J]. Chin Hosp Manag, 2020, 40(7): 14-17, 26.

[17] PROCOP G W, TUOHY M, RAMSEY C, *et al*. Asymptomatic patient testing after 10: 1 pooling using the xpert xpress SARS-CoV-2 assay[J]. Am J Clin Pathol, 2021, 155(4): 522-526. DOI:10.1093/ajcp/aqaa273.

[18] JONES M E, MAYNE G C, WANG T T, *et al*. A fixed-point algorithm for estimating amplification efficiency from a polymerase chain reaction dilution series [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1): 372. DOI:10.1186/s12859-014-0372-4.

[19] 马艳玲, 苏思韵, 刘玉美, 等. 正交试验法优化酰胺酶PCR条件[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2017, 35(1): 60-63. DOI:10.13797/j.cnki.jfosu.1008-0171.2017.0011.
MA Y L, SU S Y, LIU Y M, *et al*. Orthogonal experiment method in exploring the PCR amplification system[J]. J Foshan Univ Nat Sci Ed, 2017, 35(1): 60-63. DOI:10.13797/j.cnki.jfosu.1008-0171.2017.0011.

[20] 王梅, 赵晨迪, 胡忠良, 等. CYP2C19基因多态性PCR扩增体系的正交优化与验证[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 1990-1996. DOI:10.13417/j.gab.038.001990.
WANG M, ZHAO C D, HU Z L, *et al*. Orthogonal optimization and verification of PCR amplification system for CYP2C19 gene polymorphism[J]. Genom Appl Biol, 2019, 38(5): 1990-1996. DOI:10.13417/j.gab.038.001990.

[21] 李鹏, 林威, 卢正才, 等. 多指标综合平衡正交实验设计法优化液相色谱分析饮料中食品添加剂的操作条件[J]. 职业与健康, 2017, 33(3): 331-336. DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2017.0098.
LI P, LIN W, LU Z C, *et al*. Multi-index and synthetical balanced orthogonal experimental design optimized the liquid chromatography operation conditions in analysis of food additives in drinks[J]. Occup Heal, 2017, 33(3): 331-336. DOI:10.13329/j.cnki.zyyjk.2017.0098.

(**收稿**:2022-10-08;**修回**:2022-10-21)
(编辑 栾 嘉)