

2020年11月20日

关键词或短语：

空气监测、病毒采样、凝胶膜过滤器、MD8 Airport、SARS-CoV-2诊断/检测、人类致病病毒检测、Covid-19气溶胶、凝胶样品制备、RNA提取、实时逆转录-聚合酶链式反应(RT-qPCR)

气溶胶中冠状病毒的检测 使用凝胶膜过滤器采集SARS-CoV-2病毒并进行PCR检测

Diana Patzelt, PhD^{1*}, Kai Neseemann², Simone Lüert³, Sascha Knauf, PhD^{3,4}, Karl Pflanz, PhD¹

1.Sartorius Stedim Biotech实验室基础应用产品开发, 德国哥廷根

2.Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG实验室耗材产品管理, 德国哥廷根

3.Deutsches Primatenzentrum GmbH莱布尼茨灵长类动物研究所传染生物学部门“被忽视的热带病”工作组, 德国哥廷根

4.德国哥廷根大学动物科学系

*通信联系

电子邮件: Diana.Patzelt@sartorius.com

摘要

急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV-2)的爆发和传播已成为全球医疗和经济体系面临的巨大挑战之一。由于SARS-CoV-2以气溶胶作为主要传播路径的证据越来越明显,因此科学、政治和卫生机构均强调亟需进一步研究液滴或气溶胶形式的病毒传播途径。随着疾病大流行的发生,可靠的空气监测解决方案将成为衡量和管理流行病动态的关键。在本研究中,我们证明了使用凝胶膜过滤器成功采集并检测出SARS-CoV-2参考病毒,并指导如何将使用凝胶膜过滤器进行空气采样与病毒PCR检测方案相整合。

背景

越来越多的科学证据表明,空气传播是冠状病毒的关键途径^{7,8,9,11,12,13,14,15,16}。因此,世界卫生组织(WHO)更新了感染预防措施的含义^a。美国疾病控制与预防中心(CDC)更新了其对SARS-CoV-2空气传播的科学简介^b。

由于欧洲当前正面临第二波SARS-CoV-2疫情,因此医疗组织和政府正寻求制定措施以防止国家医疗系统崩溃,同时平衡经济损失和对社会产生的副作用。尽管定期监控空气传播病毒的官方法规尚未实施,但科学和医学界强烈建议在疫情期间实施空气监测^{1,5,7,8,9}。

而凝胶膜过滤法是一种能简单、有效且灵敏地监测空气中微生物和病毒的方法^{1,2,3,4,5}。水溶性凝胶膜(GMF)对于冠状病毒采样的适用性已经得到了证明^{1,3,4,5,6,7,8,11}。凝胶膜的病毒截留率高达99.8%,具有出色的病毒收集效率^{2,4}。

材料和方法

我们根据CDC建议的RT-qPCR方案评估了使用凝胶膜过滤器对空气样品中AccuPlex™ SARS-CoV-2替代病毒(Verification Panel Sera Care)进行检测的可行性¹⁰。参考材料为可用于基于PCR的SARS-CoV-2检测分析验证的全分子对照。定量的病毒替代涂层包含重组材料,可以监测逆转录之前的RNA提取和CDC公开共识序列的扩增。

用凝胶膜过滤器收集病毒替代颗粒并溶解,得到每毫升载量分别为60、600、6,000和60,000个参考颗粒的液体样品。将溶解的样品等分,并立即进行RNA提取,或在+4°C下保存长达十周,然后再次溶解。根据CDC指南(“新型冠状病毒(2019-nCoV)实时RT-PCR诊断试剂-使用说明”¹⁰),在BioRad Touch CFX96深孔和Roche Light Cycler 480PCR仪上进行了扩增和数据分析。

再结合灵敏的检测方法(例如实时逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)),凝胶膜空气采样法可应用于多种场景中,加强对由空气中病毒传播引起的流行病的监测和管理。多项研究表明,使用凝胶膜过滤器进行空气采样后再进行PCR分析,可提供优于其他检测方法的回收结果,并提供可靠的空气传播病毒检测流程^{3,6}。简而言之,在空气采样期间被水溶性凝胶膜捕获的所有病毒颗粒都可以在极少量的去离子水或任何其他适当的缓冲液或培养基中回收。这对于随后通过核酸扩增进行的检测提供了完美的条件^{1,3,5,7}。要快速、灵敏且针对性地确定是否存在微生物,定量实时PCR是适当的方法^{2,3,5,10}。要测定是否存在SARS-CoV-2,在定量PCR期间,进行病毒cDNA扩增之前先进行RNA提取和逆转录。各国和国际间的卫生组织针对使用PCR方法进行SARS-CoV-2病毒检测提供了协商一致且统一的指导。本研究中使用了SARS-CoV-2的替代病毒利用凝胶膜进行采样。

进行SARS-CoV-2样品制备时,将47mm赛多利斯凝胶膜(12602--47---ALN)与1.7毫升0.2%的吐温和相应浓度的AccuPlex™SARS-CoV-2病毒替代颗粒混合。将加入病毒的凝胶膜在37°C下溶解十分钟,摇动以加速溶解。取空白的47mm凝胶膜溶于1.7毫升0.2%的吐温中,作为提取-阴性对照(NEC)。将样品等分,然后由两个独立的实验室通过PCR检测SARS-CoV-2特异性目标序列。

取140μL凝胶膜溶解液,按照制造商手册的说明,使用“QIAamp®Viral RNA Mini试剂盒”进行RNA提取。使用试剂盒中提供的60μL AVE Buffer进行RNA洗脱。随后,将5 μLRNA提取物转移到包含2019-nCoV_N1 / N2 / RP CDC EUA混合引物/探针的TaqPath™一步RT-qPCR预混液中,以分别对SARS-CoV-2 N1、N2或RP控制基因进行特异性扩增。分别使用2019nCoV2_N_阳性对照(PC)和PCR级水(NTC)作为PCR对照。PCR反应平行重复三次。通用快速指南另请参阅表1。

表1 材料和方法快速指南

指南	材料	
将47 mm 凝胶膜 (GMF) 和SARS-CoV-2替代病毒 (或替代品) 混合, 用1.7 mL 0.2%吐温 (或替代品) 在37°C下溶解10分钟	凝胶膜 3.0μM, 47mm, 无菌 Sartorius 12602--47----ALK (50)/ 12602--47----ALN (100) AccuPlex™SARS-CoV-2验证试剂 Sera Care 0505-0129	
取140μL溶解的样品进行RNA提取	QIAamp®Viral RNA Mini试剂盒 Qiagen 50次提取52904	
分别将5μLRNA提取物 (或PC/NCT) 加入N1、N2和RP RT-PCR预混液中	TaqPath™1步RT-qPCR预混液, CG ThermoFisher A15299	
组分	每个反应的用量	
无核酸酶水	8.5 μL	
TaqPath 1-Step MMix	5 μL	
混合引物/探针 (N1、N2和RP)	1.5 μL	
样品或对照	5 μL	
总计	20 μL	
2019-nCoV_N1/N2/RP混合引物/探针CDC EUA试剂盒 Integrated DNA Technologies 225390262		
2019nCoV2_N_阳性对照 Integrated DNA Technologies 225390258		
温度	时间	循环数
25°C	2 min	1×
50°C	15 min	1×
95°C	2 min	1×
95°C	3 sec	45×
55°C	30 sec	45×

结果

我们能够从凝胶膜中检测到参考病毒。采用CDC基于RT-qPCR法的SARS-CoV-2检测方案, 病毒浓度分别为60、600、6,000和60,000颗粒/mL凝胶样品的SARS-CoV-2特异序列扩增的Ct值请见表2。由于PC、NCT和RP基因对照扩增结果正常(数据未显示), 因此认为检测结果Ct值有效。空白凝胶膜NEC对N1和N2序列无扩增。尽管病毒浓度较低的样品检测受到RNA提取效率和PCR灵敏度的挑战, 但所有检测的病毒浓度均对N1和/或N2有扩增, 且如预期结果存在差异性。与预测相同, 检测的稳定性随病毒浓度的增加而增加, 并且似乎与病毒的目标扩增区域相关(表2)。

表2: 凝胶膜 (GMF) 与不同浓度参照病毒进行SARS-CoV-2 N1和N2序列扩增Ct值。

指导	Ct N1	Ct N2
	n=6	n=6
GMF NEC	无扩增	无扩增
GMF+ 60 替代病毒/ mL	无扩增	40*
GMF+ 600 替代病毒/ mL	37	40**
GMF+ 6,000 替代病毒/ mL	36	41
GMF+ 60,000 替代病毒/ mL	32	36

* 6份中有1份** 6份中有2份

由于我们旨在进行原理验证, 对检测线仍需验证才能提供令人信服的数据。

Ct阈值和评判标准设置可能因诊断评判而异, 且随着环境空气检测方法的优化, 可以进一步提高检测方法的灵敏度。

结论

本研究中, 我们证明用于空气采样的凝胶膜可与异建立的基于RT-PCR的SARS-CoV-2检测方法成功整合。参照AccuPlex™SARS-CoV-2替代病毒在所有检测浓度下都成功扩增。

在空气采样过程中使用可溶性凝胶膜截留的SARS-CoV-2等病毒或其他微生物可浓缩至极小的体积, 以适于后续核酸提取等处理。因此, 赛多利斯凝胶膜过滤器可将灵敏的空气监测方法与基于RT-PCR的灵敏、快速的病毒检测相结合, 从而有助于了解流行病动态, 并促进实施有效的传播和污染控制措施以及采取预防措施。

致谢

感谢C.Bierschenk和S.Schimkowiak在定量PCR检测中提供的支持。

参考文献

- a. WHO "Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions": <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions> (29.10.2020)
- b. CDC "Scientific Brief: SARS-CoV-2 and Potential Airborne Transmission": <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/more/scientific-brief-sars-cov-2.html> (05.10.2020)
1. Azhar EI, Hashem AM, El-Kafrawy SA, Sohrab SS, Aburizaiza AS, Farraj SA, Hassan AM, Al-Saeed MS, Jamjoom GA, Madani TA. 2014. Detection of the Middle East respiratory syndrome coronavirus genome in an air sample originating from a camel barn owned by an infected patient. *mBio* 5(4).
2. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg.* 51(2):143-51.
3. Friese A. 2010. Aerogene Ausbreitung von Viren: Eine Studie verschiedener Sammelgeräte und Quantifizierungsmethoden zur Virusisolierung aus der Luft. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.) am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.
4. Jaschhof H. 1992. Sampling virus aerosols—comparative studies on the efficiency of gelatin membrane filters, impaction collectors and impingers. *Bio Tec;* 4
5. Liu Y, Ning Z, Chen Y, et al. 2020. Aerodynamic characteristics and RNA concentration of SARS-CoV-2 aerosol in Wuhan hospitals during COVID-19 outbreak. *bioRxiv.*
6. Jaschhof H. 1992. Sampling virus aerosols using the gelatin membrane filter-collection using a membrane filter at a high sampling rate. *Bio Tec;* 6
7. van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, et al. 2020. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. *N Engl J Med.*
8. van Doremalen N, Bushmaker T, Munster VJ. 2013. Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Euro Surveill.* 18(38).
9. Joshua L. Santarpia, Danielle N. Rivera, Vicki Herrera, M. Jane Morwitzer et. al. 2020. Transmission Potential of SARS-CoV-2 in Viral Shedding Observed at the University of Nebraska Medical Center. *medRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.23.20039446>.
10. CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Instructions for Use Catalog # 2019-nCoV-EUA-011000 reactions. For In-vitro Diagnostic (IVD) Use. CDC-006-00019, Revision: 02 CDC/DDID/NCIRD/ Division of Viral Diseases Effective: 3/15/2020
11. Katia Razzini, Marta Castrica, Laura Menchetti et. al. 2020. SARS-CoV-2 RNA detection in the air and on surfaces in the COVID-19 ward of a hospital in Milan, Italy. *Science of the Total Environment:* 742 (2020) 140540
12. Joshua L. Santarpia, Vicki L. Herrera, Danielle N. Rivera et. al. 2020. The Infectious Nature of Patient-Generated SARS-CoV-2 Aerosol. *medRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.20041632>
13. Zhang R, Li Y, Zhang AL, Wang Y, Molina MJ. 2020 Jun 11. Identifying airborne transmission as the dominant route for the spread of COVID-19. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*
14. Anderson EL, Turnham P, Griffin JR, Clarke CC. 2020. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk Anal;* 40(5):902-907. doi:10.1111/risa.13500
15. Ma, J., Qi, X., Chen, H., Li, X. et. al. 2020. Exhaled breath is a significant source of SARS-CoV-2 emission. *medRxiv.*
16. Zhou, L., Yao, M., Zhang, X., et. al. 2020. Detection of SARS-CoV-2 in Exhaled Breath from COVID-19 Patients Ready for Hospital Discharge. *medRxiv.*

销售与服务 联系方式

更多联系信息，请访问
www.sartorius.com.cn

服务热线 400 920 9889 | 800 820 9889
邮箱 lab.cn@sartorius.com

赛多利斯（上海）贸易有限公司
上海市浦东新区盛荣路 388 弄百佳通
产业园 3 号楼，7-11 层，200120
电话 +86 21 6066 6100

