

# 不同试剂对新型冠状病毒检测效能差异的比较

瞿广胜 李显娣 王希 徐林 刘钰洁

(安顺市疾病预防控制中心 贵州省 安顺市 561000)

**摘要:**目的:比较不同核酸提取试剂和新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测试剂的检测效能差异,为实验室检测应用和结果评价提供参考依据。方法:选择国内常用的3种核酸提取试剂和4种SARS-CoV-2核酸检测试剂进行实验,样本核酸提取和检测均按照各试剂盒说明书进行操作,核酸浓度测定采用紫外分光光度法。结果:3种核酸提取试剂的提取效率存在显著差异( $F=1467.314, P<0.05$ );3种提取试剂金豪、天隆、硕世的重复性(CV)分别为2.5%、2.2%和5.9%;4种核酸检测试剂伯杰、之江、达安和卓诚惠生的重复性(CV)分别为1.4%、2.8%、2.2%和5.1%。结论:3种核酸提取试剂的提取效率间存在显著差异,所用核酸提取试剂和检测试剂重复性(CV)均有大于5%的情况,在进行SARS-CoV-2检测前,应对所用核酸提取试剂和检测试剂进行验证。

**关键词:**新型冠状病毒;实时荧光RT-PCR;核酸提取;核酸提取效率

中图分类号:R 373.1 文献标志码:A

## 引言

新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV-2),因2019年武汉病毒性肺炎病例而被发现,2020年1月12日被世界卫生组织命名<sup>[1]</sup>。新型冠状病毒肺炎(Coronavirus disease 2019, COVID-19)是由SARS-CoV-2引起的呼吸道传播疾病,其肺炎患者的临床表现以发热、乏力和干咳为主,可通过飞沫传播、气溶胶传播和接触传播<sup>[2]</sup>。从疫情初期到当前国家卫生健康委发布的第七版新冠肺炎操作指南,实时荧光RT-PCR(Quantitative Real-time PCR)检测技术作为SARS-CoV-2的有效检测手段<sup>[3]</sup>,它具有直观、重复性好、特异性强、敏感性高和易操作等优点,为COVID-19疫情防控发挥了重要作用。但由于SARS-CoV-2 RNA病毒基因片段的不稳定性、部分检测试剂检测下限较高、存在其他干扰物质和部分批次检测试剂不合格等原因,使得实验检测结果假阳性或假阴性偏高。为了给基层实验室COVID-19检测应用提供参考依据,本研究选取了我实验室常用的病毒核酸提取试剂和SARS-CoV-2检测试剂进行检测效能差异比较。

## 1. 材料和方法

### 1.1 2019 新型冠状病毒标本

所检测SARS-CoV-2标本均来自我市县区疾控中心送检样本。

### 1.2 试剂

核酸提取试剂(磁珠法)分别购自苏州天隆生物科技有限公司、北京金豪制药股份有限公司(磁珠/一步法)和江苏硕世生物科技有限公司。SARS-CoV-2核酸扩增检测试剂分别购自上海伯杰医疗科技有限公司、上海之江生物科技有限公司、中山大学达安基因股份有限公司和北京卓诚惠生生物科技有限公司。

### 1.3 仪器

LightCycler z 480 实时荧光定量PCR仪购自德国Roche公司;HSM-100 金豪核酸提取仪;NP968-C 天隆核酸提取仪;SSNP-3000A 硕世核酸提取仪;UV-5200 紫外分光光度计。

## 1.4 方法

1.4.1 样本核酸提取方法:样本核酸提取体系均参照各病毒核酸提取试剂说明书进行核酸提取,为保证实验结果的一致性,每种病毒核酸提取试剂的标本加入量均为40 μL,最后均获得500 μL无色透明的病毒核酸提取液。

1.4.2 实时荧光RT-PCR定量方法:用SARS-CoV-2核酸扩增荧光定量检测试剂盒(双重荧光PCR法)进行实时荧光RT-PCR检测,实时荧光RT-PCR扩增体系配制及其运行程序设定参照厂家说明书,4种核酸检测试剂均是FAM通道检测ORF1ab基因,HEX/VIC通道检测N基因。

1.4.3 核酸浓度测定:在260nm波长下用紫外分光光度法测定提取病毒核酸的吸光度值;为避免提取试剂干扰,将已提取核酸溶液转入5mL离心管中加入1.0ml酸性乙醇沉淀剂,摇匀后置冰箱内30min,使核酸沉淀完全,取出3500r/min离心10min,用0.5mL 0.1mol/L NaOH溶解,蒸馏水定容至1mL,上机测定,通过 $A_{260}$ 吸光度值计算核酸浓度。

1.4.4 统计分析:应用Excel2010及SPSS 22.0软件进行数据分析,通过变异系数(CV)进行重复性比较,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 2. 结果

### 2.1 3种核酸提取试剂的核酸提取效率比较

用3种核酸提取试剂分别对同一阳性样本提取10次,在260nm波长下测定病毒核酸提取液吸光度值,计算核酸浓度( $C_{RNA} = \frac{A_{260}}{0.022} \times f$ ,式中C为RNA浓度,单位mg/L;  $A_{260}$ 为RNA吸光度;f为样液稀释倍数;0.022为核糖核酸的比消光系数)。对测定结果进行方差分析, $F=1467.314, P<0.05$ ,3种核酸提取试剂所提取的核酸浓度存在差异,见表1。

表1 3种核酸提取试剂的核酸浓度分析

提取试剂品牌	测定次数	吸光度值	核酸浓度 $\bar{x} \pm s$ (mg/L)	F	P
金豪提取试剂	10	0.068	3.08 ± 0.084	1467.314	0.000
天隆提取试剂	10	0.088	4.00 ± 0.115		
硕世提取试剂	10	0.121	5.50 ± 0.100		

从表中可见,在260nm波长下测定提取核酸浓度,所用提取试剂中,硕世核酸提取试剂所提取的核酸浓度最大,如果将它提取的核酸浓度作为100%,金豪和天隆核酸提取试剂的提取效率分别为56%和73%。

### 2.2 核酸提取试剂重复性比较

用3种核酸提取试剂分别对同一阳性样本提取10次,各取5 μL提取液加分别加入到同种SARS-CoV-2核酸检测试剂中进行实时荧光RT-PCR测定。3种核酸提取试剂中,硕世核酸提取试剂的

重复性(CV)为5.9%,其他两种核酸提取试剂的重复性(以CV计算)均小于5%。

### 2.3 4℃下3种核酸提取试剂的核酸降解度比较

将3种核酸提取试剂所提取的核酸在4℃条件下放置不同时间,在260nm波长下测定核酸浓度,并绘制核酸降解曲线,在0-3小时内,金豪、天隆和硕世3种提取试剂的核酸浓度分别降低31.6%、24.4%和33.2%。

### 2.4 病毒灭活对3种核酸提取试剂提取浓度的影响

用3种提取试剂分别对未灭活和经56℃水浴1小时灭活的同一阳性标本各提取10次,在260nm波长下测定核酸浓度,对测定结

果进行t检验分析,3种提取试剂对病毒灭活前后核酸提取浓度差异无统计学意义( $P>0.05$ ),见表2。

表2 病毒灭活对3种核酸提取试剂提取浓度的影响

提取试剂品牌	测定次数	灭活前核酸浓度 $\bar{x} \pm s$ (mg/L)	灭活后核酸浓度 $\bar{x} \pm s$ (mg/L)	t	P
金豪提取试剂	10	4.013 ± 0.102	4.035 ± 0.101	-0.487	0.638
天隆提取试剂	10	4.177 ± 0.120	4.188 ± 0.178	-0.233	0.821
硕世提取试剂	10	5.559 ± 0.160	5.437 ± 0.139	1.625	0.139

2.5.4 种 SARS-CoV-2 核酸检测试剂的重复性比较

将同一份 COVID-19 患者标本用同一核酸提取试剂提取10次,分别用伯杰、之江、达安和卓诚惠生四种的检测试剂进行实时荧光 RT-PCR 测定,卓诚惠生检测试剂的变异系数为5.1%,其他检测试剂的变异系数均小于5%。对4种检测试剂进行弱阳性样本检测分析,见表3。

表3 4种检测试剂对弱阳性样本的检测结果

检测试剂品牌	检测位点及结果		是否含内标
	N 基因	ORF1ab 基因	
伯杰检测试剂	阳性	阴性	否
之江检测试剂	阳性	阳性	是
达安检测试剂	阳性	阴性	是
卓诚惠生检测试剂	阳性	阳性	是

3. 讨论

通过比较分析,3种核酸提取试剂提取效率存在显著性差异( $F=1467.314, P<0.05$ );对3种提取试剂提取液核酸浓度在4℃降解情况进行研究,金豪、天隆和Z硕世3种提取试剂的核酸浓度分别降低31.6%、24.4%和33.2%,在实验中,为避免核酸自然降解而导致假阴性结果,应尽快上机测定;通过病毒灭活对提取试剂影响的研究,病毒灭活不会对核酸提取浓度产生显著影响,与陈培松等人的研究结果相符<sup>[13]</sup>;再对3种核酸提取试剂进行重复性比较,金豪、天隆和硕世三种提取试剂的重复性(CV)分别为2.5%、2.2%和5.9%,根据提取试剂说明书产品性能描述,批内/批间重复性(CV)均 $\leq 5\%$ ,硕世提取试剂的重复性不满足要求;对3种核酸提取试剂差异进行分析:(1)金豪核酸提取试剂采用磁珠一步法提取核酸,不对核酸提取液进行洗脱风干,提取液中存在部分未分解完全的蛋白质等杂质,从而影响核酸浓度及纯度。(2)硕世核酸提取试剂要进行两步磁珠洗涤和20min长时间磁珠风干,这样可有效的提高核酸浓度及纯度。(3)病毒核酸提取效率与蛋白酶K的活性有很大关系,核酸提取试剂如果在常温下长时间放置,会影响蛋白酶K的活性,从而导致其重复性较差。

对4种核酸检测试剂比较进行分析,结果显示:伯杰、之江、达安和卓诚惠生四种核酸检测试剂的重复性(CV)分别为1.4%、2.8%、2.2%和5.1%,根据说明书产品性能描述,批内/批间重复性(CV)均 $\leq 5\%$ ,D检测试剂的重复性不满足要求;;用4种检测试剂对弱阳性样本进行检测,伯杰和达安的批内试剂ORF1ab基因呈阴性。综合分析原因:(1)SARS-CoV-2 RNA病毒单基因片段具有不稳定性,病毒提取液中的基因片段容易断裂,影响检测结果。(2)伯杰和达安检测试剂的检出限较高,检测试剂引物设计特异性不强,因而导致弱阳性标本假阴性结果。(3)卓诚惠生检测试剂批内重复性较差,可能是检测试剂检测位点和探针设计不合理,使得检测试剂灵敏度较低。(4)卓诚惠生检测试剂重复性差还可能与缓冲盐体系和逆转录酶体系兼容性较差有关,在不同的检测阶段会存在相互干扰,使得检测结果波动较大。

综上所述,在COVID-19疫情实验室检测过程中,基层实验室检测人员除了要充分掌握实验室检测技术外,还要对可能影响实验室检测结果的关键环节加以把控,对所用检测试剂盒和检测方法加以验证,以保证实验室检测结果的准确性,降低检测结果假阳性和假阴性率。在本研究中,仅对我实验室常用的检测试剂进行了验证,所用检测试剂的种类较少,且由于条件限制,未能对所用试剂的灵敏度加以验证,如条件允许,可参考本研究进行延伸设计,以满足基层实验室检测的临床应用,推动实时荧光RT-PCR检测技术为疫情防控发挥重要作用,并为在研究中和实际使用过程中的方法比较奠定科学基础。

参考文献:

[1] Lu Roujian, Zhao Xiang, Li Juan, Niu Peihua, Yang Bo, Wu Honglong, Wang Wenling, Song Hao, Huang Baoying, Zhu Na, Bi Yuhai, Ma Xuejun, Zhan Faxian, Wang Liang, Hu Tao, Zhou Hong, Hu Zhenhong, Zhou Weimin, Tan Wenjie. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding[J]. The Lancet, 2020(Pre-publiish).

[2] 中华预防医学会新型冠状病毒肺炎防控专家组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征的最新认识[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(2): 139-144.

[3] 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(试行第七版)[J]. 全科医学临床与教育(National Health Commission, National Administration of Traditional Chinese Medicine. A new diagnosis and treatment plan of pneumonia caused by SARS-CoV-2 (trial version 7)[J]. Clinical Education of General Practice, 2020, 18(2): 100-105.

[4] Heng Li, Shang-Ming Liu, Xiao-Hua Yu, Shi-Lin Tang, Chao-Ke Tang. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2020.

[5] 杨航, 杨林承, 张瑞涛, 凌云鹏, 葛庆岗. 合并高血压、冠心病、糖尿病的新型冠状病毒肺炎患者发生病的危险因素分析[J/OL]. 北京大学学报(医学版): 1-8[2020-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20200507.1713.006.html>.

[6] 郭元元, 王昆, 张宇, 张文佳, 王丽英, 廖璆. 6种国产新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能比较与分析[J/OL]. 重庆医学: 1-10[2020-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.

[7] 胡建雄, 刘涛, 肖建鹏, 等. 广东省21个地级市新型冠状病毒肺炎输入风险评估与预警[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(5): 658-662.

[8] 郭岩, 黄咏木, 黄捷, 金音子, 姜雯, 刘培龙, 刘芳静, 马郡雄, 马继炎, 王昱, 谢铮, 尹慧, 赵春山, 周书铎, 张俊, 郑志杰. 新型冠状病毒肺炎疫情的全球流行现状和其对中国的影响及政策建议[J/OL]. 中华流行病学杂志, 2020(05): 643-648[2020-05-08].

[9] Seo Giwan, Lee Geonhee, Kim Mi Jeong, Baek Seung-Hwa, Choi Minsuk, Ku Keun Bon, Lee Chang-Seop, Jun Sangmi, Park Daewi, Kim Hong Gi, Kim Seong-Jun, Lee Jeong-O, Kim Bum Tae, Park Edmond Changkyun, Kim Seung Il. Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor-Based Biosensor[J]. ACS nano, 2020, 14(4).

[10] 中国疾病预防控制中心新型冠状病毒肺炎应急响应机制流行病学组. 新型冠状病毒肺炎流行病学特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(2): 145-151.

[11] 符婷, 黄丽菊, 杨进军, 雷谢芬, 石挺丽, 盛广震, 林玲. 55例新型冠状病毒肺炎流行病学特征及重症影响因素[J/OL]. 中华医院感染学杂志: 1-4[2020-05-08]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3456.R.20200430.1559.002.html>.

[12] Han Xiaoyu, Fan Yanqing, Wan Yung-Liang, Shi Heshui. A Diabetic Patient With 2019-nCoV (COVID-19) Infection Who Recovered and Was Discharged From Hospital[J]. Journal of thoracic imaging, 2020, 35(3).

[13] 陈培松, 何宇婷, 黄裕立, 等. 不同方式灭活咽拭子标本对2019新型冠状病毒实时荧光定量PCR检测结果的影响[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-11).