

4 种核酸提取方法对 3 种新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能的比较与分析

张运洪,秦维超[△],游凤霞,何玲,赵文斌,赵宇宏

重庆市江津区中心医院检验科,重庆 402260

摘要:目的 采用不同核酸提取方法及扩增试剂对新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测性能进行比较和分析。**方法** 收集该院 3 例新型冠状病毒肺炎患者的鼻咽拭子标本,选取 4 种常用核酸提取方法(A~D),3 种核酸扩增试剂(E~G)检测,进行 RNA 提取和扩增,根据各试剂检测结果比较其性能(其中试剂 G 不支持提取方法 A 和 B)。**结果** 提取方法 A ORF 1ab 检出率为 0.00%,N 基因检出率为 0.00%,双基因同时检出率为 0.00%,有效检出率为 0.00%;提取方法 B ORF 1ab 检出率为 0.00%,N 基因检出率为 33.33%,双基因同时检出率为 0.00%,有效检出率为 33.33%;提取方法 C ORF 1ab 检出率为 33.33%,N 基因检出率为 55.56%,双基因同时检出率为 0.00%,有效检出率为 88.89%;提取方法 D ORF 1ab 检出率为 66.67%,N 基因检出率为 66.67%,双基因同时检出率为 44.44%,有效检出率为 88.89%。试剂 E ORF 1ab 检出率为 50.00%,N 基因检出率为 100.00%,双基因同时检出率为 50.00%,有效检出率为 100.00%;试剂 F ORF 1ab 检出率为 0.00%,N 基因检出率为 66.67%,双基因同时检出率为 0.00%,有效检出率为 66.67%;试剂 G ORF 1ab 检出率为 100.00%,N 基因检出率为 16.67%,双基因同时检出率为 16.67%,有效检出率为 100.00%。**结论** 核酸提取方法从优到劣为 D>C>B>A;N 基因扩增检测能力试剂 E 最优秀,ORF 1ab 基因扩增检测能力试剂 G 最优秀,试剂 E 和 G 检测能力可互补,均亟待进一步优化,提高检测性能。

关键词:新型冠状病毒; 核酸检测; 实时荧光定量 PCR; 一致性; 性能比较

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)19-2760-04

Comparison and analysis of the detection performance of four nucleic acid extraction methods on three Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 nucleic acid detection reagents

ZHANG Yunhong, QIN Weichao[△], YOU Fengxia, HE Ling, ZHAO Wenbin, ZHAO Yuhong
Department of Clinical Laboratory, Jiangjin Centre Hospital, Chongqing 402260, China

Abstract: Objective To compare and analyze the nucleic acid detection performance of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) using different nucleic acid extraction methods and amplification detection reagents. **Methods** The nasopharyngeal mixed swab samples of three cases of corona virus disease patients were collected. Four common nucleic acid extraction methods (A-D) and three nucleic acid amplification detection reagents (E-G) were selected for RNA extraction and amplification. The performance of each reagent was compared according to the test results of each reagent (the reagent G did not support extraction methods A and B). **Results** ORF 1ab detection rate of extraction method A was 0.00%, N gene detection rate was 0.00%, double genes detection rate was 0.00%, and effective detection rate was 0.00%. ORF 1ab detection rate of extraction method B was 0.00%, N gene detection rate was 33.33%, double genes detection rate was 0.00%, and effective detection rate was 33.33%. ORF 1ab detection rate of extraction method C was 33.33%, N gene detection rate was 55.56%, double genes detection rate was 0.00%, and effective detection rate was 88.89%. ORF 1ab detection rate of extraction method D was 66.67%, the N gene detection rate was 66.67%, double genes detection rate was 44.44%, and the effective detection rate was 88.89%. ORF 1ab detection rate of reagent E was 50.00%, N gene detection rate was 100.00%, double genes detection rate was 50.00%, and effective detection rate was 100.00%. ORF 1ab detection rate of reagent F was 0.00%, the N gene detection rate was 66.67%, double genes detection rate was 0.00%, and the effective detection rate was 66.67%. ORF 1ab detection rate of reagent G was 100.00%, N gene detection rate was 16.67%, double genes detection rate was 16.67%, and effective detection rate was 100.00%. **Conclusion** The methods of nucleic acid extraction from the superior to the inferior are D>C>B>A; N gene amplification detection ability E is the best, ORF 1ab gene amplification detection ability G is the best, reagent E and G detection ability can complement each other, which need to be further optimized to improve its performance.

Key words: severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; nucleic acid detection; real-time quantitative PCR; consistency; performance comparison

2019 年 12 月底,发生了以呼吸道为主要症状的不明原因肺炎,经二代测序、病毒分离和鉴定等手段,确定是由一种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起^[1-2],其导致的肺炎被命名为新型冠状病毒肺炎(COVID-19)^[3]。流行病学数据表明,SARS-CoV-2 正在发生人际传播^[4]。采用实时荧光定量 PCR (qPCR)检测 SARS-CoV-2 核酸阳性是诊断 COVID-19 的“金标准”^[5]。

本研究拟通过对 3 例 SARS-CoV-2 感染患者不同时间点送检标本、不同核酸提取方法、不同 qPCR 扩增试剂检测结果进行比较分析,评价不同核酸提取方法、不同扩增试剂盒性能,讨论目前 SARS-CoV-2 核酸提取方法、扩增试剂不足之处,提高筛查准确性,为 COVID-19 核酸检测标准化提供实验室参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 3 例 COVID-19 确诊病例(鼻咽拭子 SARS-CoV-2 核酸检测阳性,临床 CT 影像存在双肺感染),经规范治疗后病毒核酸呈弱阳性,在不同时间点(2020-02-15、2020-02-16、2020-02-18)分别采集 3 份鼻咽拭子标本,记为标本 1、标本 2、标

本 3。

1.2 仪器与试剂 主要仪器有多孔磁力架、圣湘 Nathch S 全自动核酸提取仪、Eppendorf Thermo-Mixer 振荡恒温金属浴、Eppendorf Centrifuge 5427R 高速冷冻离心机、宏石 SLAN-96S qPCR 仪、宏石 SLAN-96P qPCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 选取 2 个企业生产的 4 种 RNA 提取方法,分为 A~D 组提取方法。A 组(普通一步法):取等量的原始标本和核酸裂解液混匀作为提取产物,最后按说明书要求点样。B 组(浓缩一步法):取 200 μ L 原始标本 12 000 r/min 高速离心 10 min,去掉上清液,再加入 30~50 μ L 核酸裂解液混匀作为提取产物,最后按说明书要求点样;C 组(机器磁珠法):圣湘 S1006 磁珠提取试剂配套圣湘 Nathch S 全自动核酸提取系统提取产物,中间核酸裂解采用常温平置 30 min,最后按说明书要求点样;D 组(手工磁珠法):圣湘 S1002 磁珠提取试剂,利用磁力架手工提取产物,中间核酸裂解采用 60 $^{\circ}$ C,500 r/min 匀速振荡 10 min,最后按说明书要求点样。见表 1。

表 1 各核酸提取方法的基本情况

方法分组	提取试剂生产厂家	主要设备	标本加样量	操作要点	适配的扩增试剂厂家
A	圣湘/卡尤迪	手工	与配套核酸裂解液等量	不经浓缩及提纯	分别适配于圣湘/卡尤迪
B	圣湘/卡尤迪	手工	200 μ L	标本高速离心浓缩裂解	分别适配于圣湘/卡尤迪
C	圣湘 S1006	Nathch S	200 μ L	室温裂解 30 min	通用适配于圣湘/卡尤迪/达安
D	圣湘 S1002	手工+磁力架	200 μ L	60 $^{\circ}$ C 恒温振荡裂解 10 min	通用适配于圣湘/卡尤迪/达安

1.3.2 扩增检测 选取 3 个企业生产的 3 种 SARS-CoV-2 ORF 1ab/N 基因扩增试剂,检测方法均为多重 qPCR,分为 E~G 组。E 组:湖南圣湘(批号:2020001),F 组:北京卡尤迪(批号:T2001-27Y),G 组:中山达安(批号:2020003)。G 组试剂不适用核酸提取方法 A 和 B,不参与核酸提取方法 A 组和 B 组研究。E 组和 G 组试剂均以非添入的内源细胞管家基因作内标,F 组试剂未设计内标。使用 SLAN-96S 或 SLAN-96P qPCR 仪根据不同厂家试剂说明书设置反应程序后扩增检测并对检测结果进行阴性、阳性的判定。见表 2。

1.4 质量控制 每批试验均带阴性对照 2~3 孔和阳性对照 1 孔(除使用试剂盒自带阴性对照外,还使用实验用蒸馏水或生理盐水作为阴性对照随机插入标本中检测),按照标准操作程序严格执行。E 组和 G 组试剂还设计有内源性管家基因内标,可以监控取样和检测全过程;F 组试剂未设计内标无此监控。

2 结果

2.1 不同核酸提取方法/不同核酸扩增试剂检测结

果 按标准操作程序检测得到有效检测结果,见表 3。

2.2 不同核酸提取方法的结果分析 分析结果显示,核酸提取方法 D 最优,C 次之,从优到劣为:D>C>B>A。见表 4。

表 2 各核酸扩增试剂的基本情况

试剂分组	生产厂家	扩增循环数	结果判断[循环阈值(Ct)]			最低检测限 (copy/mL)	是否含内标
			阳性	阴性	可疑		
E	圣湘	45	<40	∞	40~45	500	是
F	卡尤迪	15+30 ^a	<25	∞	25~30	500	否
G	达安	45	<38	∞	38~45	1 000	是

注: ∞ 表示 Ct 值无穷大,即没有出现阳性扩增曲线;^a表示试剂 F 检测,前 15 个循环未读荧光,未计入循环数。

2.3 不同核酸扩增试剂检测的结果分析 因扩增试剂 G 不适用提取方法 A 和提取方法 B,本统计未列入提取方法 A 和提取方法 B 的数据。分析结果显示,ORF 1ab 基因扩增检测能力试剂 G 最好,N 基因扩增检测能力试剂 E 最好,ORF1ab/N 基因同时检出能力试剂 E 优于 G,但两者均不理想。见表 5。

表 3 不同核酸提取方法/不同核酸扩增试剂检测结果 (Ct 值)

项目	提取方法 A		提取方法 B		提取方法 C		提取方法 D	
	ORF 1ab	N	ORF 1ab	N	ORF 1ab	N	ORF 1ab	N
试剂 E								
标本 1	∞	∞	∞	37.02	∞	38.32	40.26	36.36
标本 2	∞	∞	∞	∞	∞	36.92	39.51	36.03
标本 3	∞	∞	∞	∞	∞	38.03	39.81	33.97
试剂 F								
标本 1	∞	∞	∞	23.52	∞	22.37	∞	22.36
标本 2	∞	∞	∞	∞	∞	22.83	∞	19.73
标本 3	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
试剂 G								
标本 1	—	—	—	—	42.65	∞	40.06	∞
标本 2	—	—	—	—	41.09	∞	38.51	∞
标本 3	—	—	—	—	39.41	∞	38.04	42.87

注:—表示不适用;∞表示 Ct 值无穷大,即没有出现阳性扩增曲线。

表 4 不同核酸提取方法的检出率 [n (%)]

方法	检测总数 (n)	单个基因检出率		双基因同时检出率	有效检出率
		ORF 1ab	N		
A	6	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
B	6	0(0.00)	2(33.33)	0(0.00)	2(33.33)
C	9	3(33.33)	5(55.56)	0(0.00)	8(88.89)
D	9	6(66.67)	6(66.67)	4(44.44)	8(88.89)

表 5 不同核酸扩增试剂检出率 [n (%)]

试剂	检测总数 (n)	单个基因检出率		双基因同时检出率	有效检出率
		ORF 1ab	N		
E	6	3(50.00)	6(100.00)	3(50.00)	6(100.00)
F	6	0(0.00)	4(66.67)	0(0.00)	4(66.67)
G	6	6(100.00)	1(16.67)	1(16.67)	6(100.00)

3 讨 论

本研究所提供标本均来源于 COVID-19 确诊患者,病毒核酸呈弱阳性,检测出的 Ct 值大多在 40 左右的灰区,但均有明显的抬头曲线和拐点,结合各试剂检出情况,综合判断各标本的 SARS-CoV-2 为低水平。本研究采用 4 种核酸提取方法,3 种核酸扩增试剂,进行 RNA 的提取和扩增,对 3 个低水平 SARS-CoV-2 进行检测,根据检测结果比较不同核酸提取方法及不同核酸扩增试剂的性能。结果显示:核酸提取方法 D 最优,C 次之,从优到劣为:D>C>B>A。ORF 1ab 基因扩增检测试剂 G 能力最好,N 基因扩增检测试剂 E 能力最好,试剂 E 和 G 检测能力可互补。双基因同时检出能力试剂 E 优于 G,但两者均不理想,3 种试剂均亟待进一步优化,提高检测性能。本文中采用的核酸提取方法 D 联合扩增试剂 E 是本研究中最有力的检测手段。

本研究中手工磁珠法提取效率最高,但步骤繁琐,对操作人员熟练程度要求高,不同人员之间结果差别大,且本实验室为提高阳性率还用到了特殊的恒温振荡金属浴。由于手工磁珠法和机器磁珠法两者有效检出率一致,可以在有条件的实验室同时采用。手工磁珠法在本实验室一般用于复查和验证。

手工磁珠法与机器磁珠法比较,笔者认为最大不同是前者可以在 60 °C 的温度下边孵育边振荡,可以更充分地促进核酸释放,一般保持 10 min 裂解时间即可。而机器磁珠法通常是在室温下进行核酸裂解释放,通常要保持 30 min 以上裂解时间,可能也没有充分裂解释放。还有本次机器磁珠法提取试剂是通用型的核酸提取试剂,而手工磁珠法提取试剂是专门针对 RNA 的提取试剂,可能后者优化更好。

浓缩一步法优于普通一步法,两者虽都能直接裂解释放核酸,但都没有进行核酸提纯,对于复杂标本的抗干扰能力均较弱。厂家均没有推荐优先使用这 2 种核酸提取方法,提示可在没有更好提取方法时使用,若在某些条件下非要使用一步法,建议在裂解前先进行浓缩并洗涤。

试剂 E 检测低水平 SARS-CoV-2 的 ORF 1ab 基因能力有欠缺;试剂 G 检测低水平 SARS-CoV-2 的 N 基因能力有欠缺,且试剂 G 检测 ORF 1ab 基因有多次 Ct 值介于 40~45,信号极弱,极易漏检。双基因同时检出能力试剂 E 优于 G,试剂 G 对 3 个低水平标本双基因均没有同时检出。试剂 E 和试剂 G 能力互补,联合检测对 SARS-CoV-2 的 ORF 1ab 基因和 N 基因检出有利;F 试剂对低水平 SARS-CoV-2 的 ORF 1ab 基因和 N 基因检测能力待观察。建议有条件时,可采用 2 种或 2 种以上试剂平行检测避免漏检。

由于此次疫情暴发之初,相应的核酸检测试剂难于进行完整的临床验证。全国有上百家分子诊断企

业陆续开发出了相应的核酸检测试剂盒。为了迅速控制疫情,国家药品监督管理局启动相应审批程序,陆续批准了一批 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒,但试剂盒质量也存在参差不齐的情况。厂家说明书中给定的最低检测限,是基于出厂前最优的提取方法和最好的实验条件得出的结论,临床验证数据缺乏,还有厂家试剂未设计内标系统来监测实验过程。在特殊情况下,临床使用中要注意配套使用提取方法,必要时进行验证,否则会影响检测阳性率。本实验研究提示,建议对核酸提取避免使用快速一步法,减少可能出现漏诊或者假阴性的情况。

SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒,约 3 万个碱基,不同区域和其他冠状病毒的相似性有所不同,有些区域相似度在 90% 以上,因此核酸检测试剂往往选择相似度低的区域进行,这样就可以特异地识别 SARS-CoV-2^[6]。区域识别是通过引物和探针的结合来实现,因此试剂中的探针和相应区域的高度匹配决定了病毒核酸检测具有很好的特异性,一旦检测到,即为阳性,证明有病毒的存在。

ZHU 等^[7] 在研究中获得 3 个完整 SARS-CoV-2 基因组,并设计了几种针对 SARS-CoV-2 基因组 ORF 1ab、N 和 E 3 个靶标区域的特异度和灵敏度的检测方法,以检测临床标本中的病毒 RNA。CHU 等^[8] 研发了 2 个一步 qPCR 检测方法检测病毒基因组的 2 个不同区域(ORF 1ab 和 N),该方法可以实现 SARS-CoV-2 在标本中的快速检测。其研究还表明,在临床标本中使用 qPCR 检测 N 基因灵敏度更高。

郭元元等^[9] 也对 6 种国产 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒的检测性能进行了比较与分析,其结果显示弱阳性患者的核酸可能不易检出,各试剂的结果存在一定的差异,其建议为满足低水平检测能力要求,实验室在使用新试剂前,或在更换试剂批号时,应做相应的性能验证,以满足实验室的检测要求。陈炜等^[10] 研究显示痰标本中的病毒核酸量高于咽拭子标本,痰标本的检测效果优于咽拭子标本,这可能与 SARS-CoV-2 侵袭感染下呼吸道和肺有关。由于咽拭子不易采集到足量的合格标本导致早期诊断的不准确性,因此使用咽拭子病毒核酸检测作为筛查手段需谨慎。

总之,对于 SARS-CoV-2 核酸检测结果的准确性,需要从标本类型、标本采集保存与运输,以及患者感染周期等影响因素来综合分析,了解在不同标本中病毒水平及出现的时间,是确诊 SARS-CoV-2 感染患者及判断患者治疗恢复的关键点。另外,人员操作、核酸提取、试剂盒性能等都是造成检测结果假阴性或假阳性的原因,故实验室在做好质量控制的同时结合临床评价试验数据进行分析也是重要的环节^[11]。在被感染者中检出核酸,需同时满足以下 4 个条件,即(1)被感染者的细胞中有一定量的病毒;(2)采集标本时,必须采集到含有病毒的细胞;(3)可靠的体外诊断

试剂;(4)规范的临床核酸检测实验室(合理的分区、有能力的检测人员和严格的质量管理体系)。

本研究仅为初步探索性分析,存在一定不足,样本量有限,缺少重型/危重型病例,缺少连续观察,病例追踪时间短,观察时间不统一。目前检测手段尚需继续完善,避免假阴性结果影响其分析和判断,需扩大样本量及更高质量的研究来获得更为准确的结论。

参考文献

- [1] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269.
- [2] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [3] GORBALENYA A E, BAKER S C, BARIC R S, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses—a statement of the coronavirus study group[EB/OL]. *BioRxiv*, (2020-02-11) [2020-02-11]. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.07.937862v1>.
- [4] HUANG C, WANG Y, LI X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知(国卫办医函[2020]184号)[EB/OL]. (2020-03-04) [2020-04-06]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>.
- [6] WIT D E, DOREMALEN V N, FALZARANO D, et al. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14(8): 523-534.
- [7] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019[J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8): 727-733.
- [8] CHU D K W, PAN Y, CHENG S M S, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia[J]. *Clin Chem*, 2020, 66(4): 549-555.
- [9] 郭元元, 王昆, 张宇, 等. 6 种国产新型冠状病毒核酸检测试剂盒检测性能比较与分析[J/OL]. *重庆医学*, (2020-02-14) [2020-02-14]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20200212.0900.006.html>.
- [10] 陈炜, 张春阳, 朱颖, 等. 4 例新型冠状病毒感染病例咽拭子与痰标本病毒核酸检测的比较[J/OL]. *中国人兽共患病学报*, (2020-02-10) [2020-02-14]. <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/35.1284.R.20200211.2118.002.html>.
- [11] 钱扬会, 董建英. 2019 新型冠状病毒实验室检测与防护研究[J]. *检验医学与临床*, 2020, 17(10): 1457-1459.