

两种不同释放剂核酸提取法的新型冠状病毒 RT-PCR 内标检测结果比较

关键词:

新型冠状病毒; 核酸提取; 逆转录 PCR; 内标

引言:

新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒肺炎 (coronavirus disease, COVID-19) 继续在全球肆虐。WHO 报道, 截至 2020 年 6 月 1 日 11:11am, 全球确诊病例 6040609 例, 死亡病例 230104 例。对 SARS-CoV-2 进行核酸检测, 是 WHO 目前推荐的识别感染病例的方法。李克强总理主持召开中央应对新冠肺炎疫情工作领导小组会议提出: 提高新冠病毒核酸检测能力, 加快速度便捷检测试剂和设备研发生产, 缩短检测时间, 推进重点人群“应检尽检”、其他人群“愿检尽检”, 推动各地互通互认检测结果, 促进精准防控、人员流动和全面复工复产。

深圳市宝安中医院 (集团) 检验科 PCR 实验室自 2020 年 3 月 10 日开始 SARS-CoV-2 的核酸检测工作, 截至 2020 年 5 月 11 日, 共检测 19522 份标本。采用中山大学达安生物有限公司生产的“新型冠状病毒核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)”, 试剂盒采用的内标 (IC) 为人类 RNaseP 基因 (RP)。在实验工作中, 经常出现内标扩增曲线不出现典型“S”型或者内标完全无扩增曲线的情况, 导致重复检测, 拖延了报告发放时间, 给临床诊疗工作带来不便。本实验室在经过一系列实验之后, 对达安公司试剂盒说明书中给出的实验方法进行了部分更改优化, 经优化实验步骤后, 内标的扩增曲线及起始循环 Ct 值均有明显改善, 现具体报道如下。

一、对象与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂和仪器



全自动核酸提取仪, 基于上吸磁珠法提取纯化核酸原理, 采用振荡式核酸提取纯化方式, 实现大量样本核酸的快速高效制备纯化。配合相应的核酸提取试剂, 可处理血清, 血浆, 全血, 拭子, 羊水, 粪便, 组织灌洗液, 组织, 石蜡切片, 细菌, 真菌等多种样品类型, 广泛应用于检验, 疾病防控, 动物检疫, 出入境检验检疫, 食品安全, 法医痕迹检验, 科学教研等领域。提取出的高质量核酸 (DNA 和 RNA) 可用于高灵敏的下游分析, 如定量 PCR、临床分子诊断、基因表达分析、基因分析、法医及传染性疾病研究等; 纯化后的核酸可直接应用于下一步的酶切、鉴定以及疾病诊断、治疗等。

H32全自动核酸提取仪



H48全自动核酸提取仪



全自动核酸提取仪	
样本通量	1-32个 (H32) 1-48个 (H48)
孔板类型	96深孔板
处理体积	30μL-1000μL
加热	室温至+80℃ (裂解及洗脱位)
振荡模式	高、中、低三种速度模式可选
操作界面	图形化界面, 中英文界面, 10寸触摸屏
试剂种类	开放式平台 (磁珠法)
程序管理	用户可自由设置程序并可储存200个用户程序
断电保护	意外断电再供电时, 可自由选择是否继续运行实验
消毒方式	紫外消毒 (可设时间)
提取仓照明	有
尺寸	430mm*370mm*390mm (L*W*H) (H32) 560mm*400mm*400mm (L*W*H) (H48)

H32/48 核酸提取仪 (美析仪器);

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 和样本释放剂;

荧光定量 PCR 扩增仪; 超级恒温水槽;

多管快速混合器;

迷你离心机;

1.1.2 实验对象

2020 年 3 月 10 日至 2020 年 5 月 11 日 宝安中医院发热门诊、复工门诊及隔离病房送检的进行 SARS-CoV-2 的核酸检测的咽拭子标本共 19522 份。

1.1.3 咽拭子采集及保存

采样人员着三级防护, 用达安公司生产的专用样本采集拭子擦拭扁桃体和咽后壁, 将拭子头浸入含有样本保存液和核酸释放剂的保存管中。样本采集完后置 0~4℃ 保存, 24h 内完成检测。

1.2 实验方法

实验及医护人员均严格按照国家卫生健康委办公厅印发的《新型冠状病毒实验室生物安全指南》及《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》等相关文件进行实验操作和生物安全防护。

1.2.1 原样本释放剂使用说明书中实验方法

将样本采集管置于 56℃ 水浴箱灭活 30min，室温条件下，将采集管振荡 1min，静置 5min，重复 3 次后，瞬时离心，直接吸取上清液 5 μL 为模板加入 PCR 体系进行扩增。

1.2.2 本实验室优化后实验方法

样本采集管置于 56℃ 水浴箱灭活 40min[8-9]。室温条件下，2800r/min 充分振荡 2min，立即 4000r/min 离心 30s，直接吸取上清液 5 μL 为模板加入 PCR 体系进行扩增（加样时如吸到杂质或混浊物弃去，重新吸取上层澄清液体）。

1.2.3 优化后实验方法的阳性标本检测性能评价

取 2020 年第一次广东省临检中心室间质量评价（external quality assessment, EQA）SARS-CoV-2 阳性标本 7 份（2020004~2020010），用 1.2.1 及 1.2.2 所述方法分别检测，每份样本平行检测 3 次，重复 3 次实验，观察两种方法对阳性结果 Ct 值的影响。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.00 软件分析统计数据，计量资料用 (x±s) 表示，采取单因素方差分析与配对 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

二、结果

2.1 优化前后各样本内标扩增曲线比较

优化前，各样本内标扩增曲线在 Ct24~44 之间散在分布，Ct38 之后大多无明显“S”型曲线，不少样本内标未出现扩增曲线；经优化后，各样本内标的扩增曲线明显优于优化前，扩增曲线集中在 22~34 之间，且全部呈现典型“S”型曲线，见图 1。

2.2 优化前后复查率比较

经优化后，样本复查率较优化前有明显下降，差异有统计学意义（F=3.889，P=0.0258），结果详见表 1，图 2A。

2.3 优化前后各样本内标 Ct 值比较

经优化后，各样本内标的扩增起始循环 Ct 值明显小于优化前（t=5.937，P<0.01），阳性对照 N 基因及 ORF1a/b 基因的 Ct 值，差异无统计学意义（P>0.05）。见图 2。

2.4 优化前后阳性质评标本 Ct 值

优化前后，阳性质评标本 N 基因（F=1.032，P=0.9701）与 ORF1a/b 基因（F=1.262，P=0.7848），Ct 值均无统计学意义（P>0.05）。见图 3。

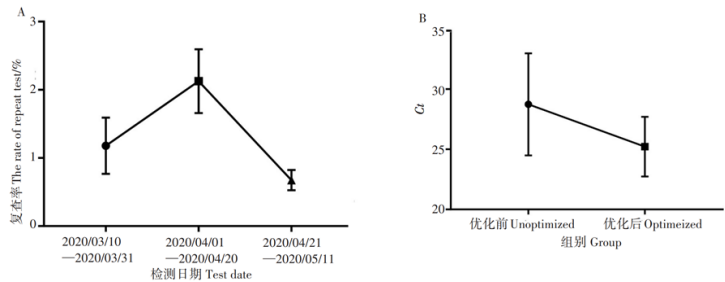


表 1 优化前后样本复查率的比较
Table 1 Comparison of the repeat test rate of samples before and after optimization

检测时间 Test date	检测量 Number of tests	复查数 Number of repeat tests	复查率 Rate of repeat tests/%	t	P
2020/03/10—2020/03/31(优化前 Unoptimized)	3 907	69	1.766		
2020/04/01—2020/04/20(优化前 Unoptimized)	6 875	153	2.226*	1.833	0.082 5
2020/04/21—2020/05/11(优化后 Optimized)	9 136	62	0.679**	2.945	0.008 3

注：*，与 2020/03/10—2020/03/31 相比；**，与 2020/04/01—2020/04/20 相比。Note：*，Compared with 2020/03/10—2020/03/31；**，Compared with 2020/04/01—2020/04/20.

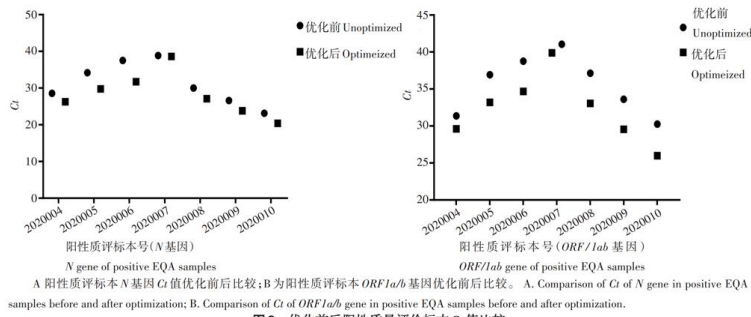


Fig. 3 Comparison of cycle threshold of positive EQA samples before and after optimization

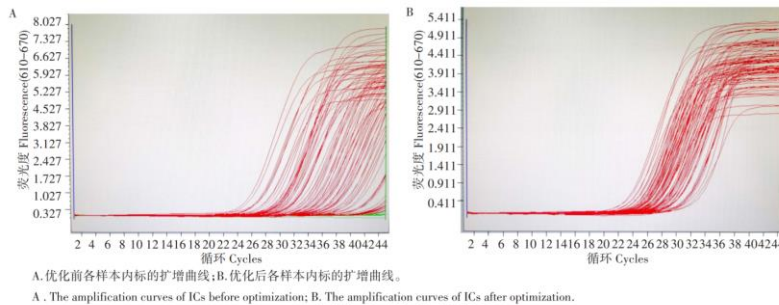


Fig. 1 Comparison of amplification curves of internal control before and after optimization

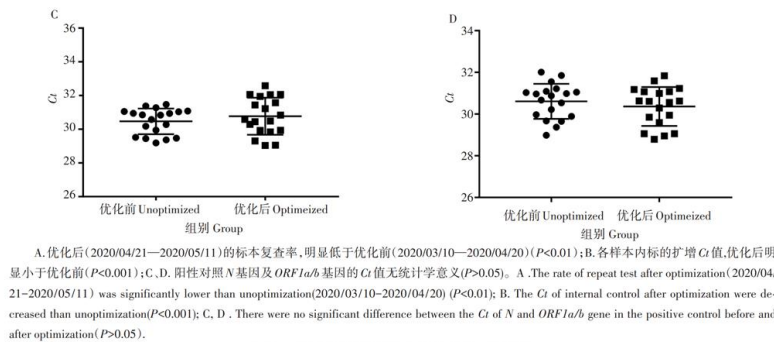


图2 优化前后复查率及各样本内标Ct值比较
Fig. 2 Comparison of the repeat test rate and cycle threshold of internal control before and after optimization

三、讨论

2003 年 SARS-CoV-2 及 2012 年 MERS-CoV 引起的流行病学数据证明，对 COVID-19 建立快速、高通量、高敏感及高特异性的实验室诊断对于病例早诊断、密切接触者追踪和感染控制措施合理化制定至关重要。因为 SARS-CoV-2 至少需要 3d 才能在选定的细胞系中引起明显的细胞病变，且病毒分离培养需要 3 级生物安全设施，大多数医疗机构都不具备，因此以病毒培养来建立快速诊断是不现实的；而 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 存在 82% 的基因同源性，血清学抗原抗体检测可能存在交叉反应[11]。由于这些局限性，应用逆转录-PCR (RT-PCR) 技术对 SARSCoV-2 进行核酸检测仍然是最主要的全球 COVID-19 切实可行的实验室诊断检测方法。虽然因为“假阴性”的问题使得 SARS-CoV-2 核酸检测存在争议，自 2020 年 1 月 15 日至 3 月 15 日，国家卫生健康委员会先后共发布了七版《新型冠状病毒肺炎诊疗方案》（试行 1-7 版），核酸检测阳性一直是确诊病例的诊断标准之一。由于国内大部分检测点都是采集咽拭子做为标本，在疾病早期或是无症状潜伏期，上呼吸道局部病毒载量低；标本采集后没有按正确方法贮存及运输等等原因都可能造成检测结果的假阴性。另外，由于新冠病毒在呼吸道是寄生于呼吸道上皮细胞，如果没有采集到足够数量的细胞，也会造成检测结果的假阴性。因此，目前国内各检测试剂公司开发的试剂盒内多采用了 RNaseP 基因 (RP) 做为内标 (IC)，

来监测标本是否采集合格。在结果判读时，如果 IC 没有出现典型的扩增曲线或者 Ct 值>40，则被认为标本质量差，没有采集到足够的人类上皮细胞，需要复查。

本实验室采用的达安公司出品的“新型冠状病毒 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）”也是采用 RP 做为 IC。同时为了最大程度减少职业暴露，加大生物安全防护力度，达安基因在开发试剂盒的同时，推出了采用样本释放剂一步法提取 SARS-CoV-2 核酸，力求在病毒核酸提取操作时减少开盖次数，减少暴露风险，从而在最大程度保护实验人员的基础上高质高效地提取到足够数目的 RNA 模板进行扩增。

但是在实验过程中，发现经一步法提取核酸进行扩增后，经常有 IC 没有典型的扩增曲线或者 Ct 值>40 的情况。此种情况，一般只能延迟报告发放，同时实验室采用达安基因给出的补救方法进行进一步的复查实验，IC 出现典型的扩增曲线且 Ct 值<40 后，实验室才能发放报告。大多数标本在经补救方法复查后，IC 会有典型的“S”型扩增曲线。但仍有少部分补救方法处理后仍有 IC 无扩增现象，则考虑为标本质量不合格，通知临床科室重新采集标本送检。由于临床上发热门诊及手术室都依据 SARS-CoV-2 核酸检测结果才开展下一步的诊疗，报告发放的延迟给临床上的诊疗工作带来了一定的影响。因此，降低复查率势在必行。

目前主流的磁珠法提取核酸过程中由于磁珠与核酸的特异性结合使得提取的核酸纯度高，浓度大，并且灵敏度，重复性都很好。而一步法虽然快速高效，但却没有磁珠法提取的核酸纯度高，可能是一步法提取的核酸模板中存在有非特异性物质干扰其与引物的特异性结合，导致扩增结果不理想。因此，本实验室考虑优化实验方法，延长振荡时间至 2min，力求让标本中的核酸充分释放；增加了离心力和离心时间，并且确保吸取上层澄清液体加样，从而减少非特异性物质的干扰。

优化前后比较的结果显示，优化前，样本中内标的扩增曲线会有少数没有出现典型的“S”型，且有个别内标没起，平直地处于阈值线以下的情况，Ct 值明显靠后且分散；经优化后，不但所有样本的内标都出现了典型的“S”型扩增曲线，而且扩增起始循环 Ct 值的平均值明显小于优化前；同时阳性对照 N 基因与 ORF1a/b 基因 Ct 值与优化前比较差异无统计学意义。实验中采用了广东省临检中心下发的 2020 年第一批次的室间质评阳性标本对优化方法的阳性标本检出能力进行性能评价，结果各标本的 N 基因及 ORF1a/b 基因 Ct 值两种方法比较差异无统计学意义。这说明在不影响阳性标本检测结果的情况下，优化方法大大提高了内标的检出率，复查率从优化前的 2.226%降至 0.679%，整体较优化前有了明显地改善。

经过优化后，虽然大大提高了内标检出率，但还是存在一定比例的复查率，很多内标不出的标本出现或浑浊、或粘稠、或为咖啡色血性样本，存在太多干扰物影响检测结果，因此建议临床科室重新采集标本送检。并加强对标本采集人员的技术培训。

科室由于实验室设备及人员紧张，暂时不具备应用磁珠法提取 SARS-CoV-2 核酸的条件，故整个实验过程仅是优化前后方法比较，存在一定的局限性。本实验室 2020 年两次参加广东省临检中心 SARS-CoV2 核酸检测室间质评成绩均为优秀，表明虽然释放剂一步法提取核酸的效率没有传统磁珠法高，但尚可满足临床诊疗及复工复学筛查需求。此法操作简便，降低了实验室工作人员的职业暴露风险，且经本实验室优化部分实验操作后，实验结果可接受。

关于美析

美析主营光谱类仪器：可见分光光度计、紫外可见分光光度计、原子吸收光谱仪、原子荧光光度计、ICP-AES、ICP-MS，生命科学仪器：超微量分光光度计、全自动核酸提取仪，目前，我们的产品已广泛应用于有机化学、无机化学、生物化学、医药、环保、冶金、石油、农业等领域。同时美析利用在产品机械结构、光学设计、电气应用和软件开发方面积累的丰富经验，结合市场的最新实际需求，近期将陆续推出一批全新的分析类仪器。