

一种新型肠道病毒核酸检测试剂的初步评价^{*}

黄长武¹, 单幼兰², 唐彦^{3△}, 谭俊杰⁴, 张晓清⁵ (1. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400010; 2. 重庆医科大学附属第二医院传染病实验室 400010; 3. 重庆市中医骨科医院检验科 400012; 4. 重庆医科大学附属儿童医院分子生物实验室 400014; 5. 重庆医科大学检验医学院 400016)

【摘要】 目的 评价新型磁珠法肠道病毒核酸检测试剂(以下简称“磁珠法试剂”)的灵敏度和精密度。**方法** 对 204 份标本分别用磁珠法试剂和 Trizol 法试剂进行肠道病毒 RNA 定性检测, 评价其一致性和等效性, 并比较两种试剂的灵敏度和精密度。**结果** 磁珠法试剂与 Trizol 法试剂的阳性符合率为 97.58%, 阴性符合率为 100.00%, 总符合率为 98.53%, $Kappa$ 值为 0.969 4。磁珠法试剂的灵敏度高于 Trizol 法试剂。对两个中、低浓度标本各重复检测 10 次, 磁珠法试剂的变异系数(CV)为 0.84%、0.96%, Trizol 法试剂为 2.01%、1.43%。**结论** 新型磁珠法试剂盒与 Trizol 法试剂盒具有较高的一致性, 其灵敏度、精密度优于 Trizol 法试剂盒, 可以用于临床肠道病毒核酸检测。

【关键词】 肠道病毒; 磁珠法; Trizol 法; 内标

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.07.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)07-0907-03

Preliminary evaluation of a new reagent of enterovirus nucleic acid detection^{*} HUANG Chang-wu¹, SHAN You-lan², TANG Yan^{3△}, TAN Jun-jie⁴, ZHANG Xiao-qing⁵ (1. Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Infectious Diseases Laboratory, the Second Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Chinese Medicine Orthopaedic Hospital, Chongqing 400012, China; 4. Molecular Biology Laboratory, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China; 5. Inspection Medical School of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the quality of the new beads method reagent for enterovirus detection(hereinafter referred to "beads method") and the role of inter control system. **Methods** A total of 204 clinical specimens were qualitatively detected by beads method and Trizol assay. The consistency and equivalence of two assays were evaluated. The sensitivity and precision of two assays were compared. **Results** Comparing beads method with Trizol assay, the positive consistency was 97.58%, the negative consistency was 100.00%, the total consistency was 98.53%, and $Kappa$ value was 0.969 4. One sample with medium concentration and one sample with high concentration were respectively detected 10 times for the calculation of precision. The CVs of beads method were 0.84% and 0.96%, for the medium and high concentration sample respectively, while those of Trizol assay were 2.01% and 1.43% respectively. **Conclusion** The new beads method kit has high consistency with Trizol method kit, which shows better sensitivity and precision than Trizol method and can be used for enterovirus detection in clinical.

【Key words】 enterovirus; beads method; Trizol method; inter control

肠道病毒是引起手足口病的主要病原体。肠道病毒感染会引起发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹, 少数患者可能出现无菌性脑膜炎、脑炎、急性弛缓性麻痹、神经源性肺水肿和心肌炎等, 个别重症患儿病情进展快, 可致死亡^[1-3]。

目前, 国内检测肠道病毒一般采用 Trizol 法提取核酸, 需要多次离心、洗涤、吸弃废液等一系列繁琐操作过程, 在操作过程中存在标本交叉污染的风险, 而且大部分试剂没有预防假阴性的内标监控系统, 影响检测结果的准确性和重复性。在国家传染病防治重大专项的支持下, 基于磁珠法核酸提取的国产检测试剂已成为主流研发方向。本研究对新型磁珠法肠道病毒核酸检测试剂(以下简称“磁珠法试剂”)进行灵敏度、精密度和临床应用质量考评^[4-7]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月至 2014 年 5 月重庆医科大学附属儿童医院和重庆市中医骨科医院(解放碑社区卫生服务中心、南纪门社区卫生服务中心)咽拭子标本 204 份, 其中男 128 例, 女 76 例, 年龄 1~9 岁。手足口病按照原卫生部颁布的《手足口病诊疗指南》(2010 年版)进行确诊。

1.2 仪器与试剂 磁珠法试剂购自湖南圣湘生物科技有限公司; 对比的 Trizol 法试剂购自广州达安基因生物科技有限公司。按照两种试剂盒的说明书步骤, 分别进行核酸提取和检测, 上机检测在 LifeTechnology 公司的 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行。

1.3 方法

^{*} 基金项目: 重庆市渝中区科技三费资助科技计划项目(20130143)。

作者简介: 黄长武, 男, 副主任检验师, 硕士, 主要从事细菌致病与耐药研究。△ 通讯作者, E-mail: yan77526@yeah.net。

1.3.1 临床标本试验 对 204 例咽拭子临床标本提取核酸后,在荧光定量 PCR 仪上进行检测,计算两种试剂的一致性和 *Kappa* 值,对 *Kappa* 值的参考评价原则如下: $0.75 < Kappa \leq 1$,诊断一致性好; $0.4 < Kappa \leq 0.75$,诊断一致性一般; $0 \leq Kappa \leq 0.4$ 时,诊断一致性差,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。考察试剂的等效性。

1.3.2 磁珠法操作步骤 在 1.5 mL 灭菌离心管中依次加入 600 μ L RNA 提取溶液 1、200 μ L 待测标本、100 μ L RNA 提取溶液 2,混匀 10 s 后,室温静置 30 min;瞬时离心后,将离心管置于分离器上,3 min 后吸弃废液;向离心管中依次加入 600 μ L RNA 提取溶液 3、200 μ L RNA 提取溶液 4,震荡混匀 5 s,将离心管置于分离器上,3 min 后吸弃废液;向离心管中加入 30 μ L RNA 洗脱液,冲洗磁珠,室温静置 10 min,将离心管置于分离器上,静置 3 min,将核酸溶液移入新的离心管中。

1.3.3 Trizol 法操作步骤 在 1.5 mL 灭菌离心管中依次加入标本 500 μ L、Trizol 试剂 500 μ L,充分混匀,室温放置 10 min;加入 200 μ L 氯仿,拧紧离心管盖,用力震荡离心管,直至溶液充分乳化,呈乳白状、无分相现象,室温静置 10 min;于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,吸取上层液相移入另一离心管;加入等体积异丙醇,轻轻颠倒离心管,充分混匀液体,室温放置 10 min;于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,弃上清液;向离心管内加入 75%乙醇 1 mL,震荡混匀,于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,在超净台中干燥 5 min;向离心管内加入试剂盒中的焦碳酸二乙酯(DEPC)水 50 μ L,溶解核酸。

1.3.4 灵敏度试验 选取 1 例强阳性肠道病毒标本,用生理盐水稀释 10、100、1 000、10 000、20 000、40 000 倍;分别标记为 EV-1、EV-2、EV-3、EV-4、EV-4.2、EV-4.4。用磁珠法和 Trizol 法检测后,选取两种方法中,临界阳性较高检出限梯度浓度和下一个梯度浓度标本作为灵敏度检测标本,每个标本重复检测 20 次,计算标本的阳性率,考察试剂的灵敏度。

1.3.5 精密度试验 从上述梯度标本中选取 EV-2、EV-4 (中、低)两个浓度作为精密度检测标本,每个标本重复检测 10 次,计算标本的变异系数(CV),考察试剂的精密度的。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS15.0 软件包进行统计学处理,一致性分析采用 *Kappa* 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床检测结果及分析

2.1.1 两种方法对 204 份标本的检测结果 两种方法的阳性符合率为 97.58%,阴性符合率为 100.00%,总符合率为 98.53%,见表 1。经统计学处理, $Kappa = 0.969\ 4$, $P < 0.05$ 。在 $\alpha = 0.05$ 检验水准下,磁珠法试剂和 Trizol 法试剂及复核检测结果的一致性有统计学意义,提示诊断一致性好。表明磁珠法试剂与 Trizol 法试剂对临床标本的检测结果具有等效性,准确度更好。

表 1 磁珠法试剂与 Trizol 法试剂检测结果比较(*n*)

磁珠法试剂	Trizol 法试剂		合计
	+	—	
+	121	3	124
—	0	80	80
合计	121	83	204

2.1.2 不符标本的复核结果及分析 将 3 份磁珠法试剂与 Trizol 法试剂的检测结果不符标本进行复检,对复检不符的标本再进行测序复核,复检及测序的结果见表 2。检测结果不一致标本产生原因的分析:上述 3 份标本,磁珠法试剂盒检测为阳性,Trizol 法试剂盒检测为阴性,经测序复核为阳性。可能是由于这些标本的病毒载量较低,Trizol 法试剂盒在提取低浓度标本时,容易出现操作失误,没有提取到肠道病毒核酸;也有可能是这些标本在 Trizol 法试剂盒引物探针设计的区域基因发生稀有突变,导致无法检出。

表 2 不符合标本检测及复检复核结果

标本编号	对比试验检测结果		复检结果		测序复核
	磁珠法试剂	Trizol 法试剂	磁珠法试剂	Trizol 法试剂	
024	+	—	+	—	含肠道病毒核酸
142	+	—	+	—	含肠道病毒核酸
154	+	—	+	—	含肠道病毒核酸

2.1.3 内标系统对检测结果的影响 在临床标本的检测结果中,有 6 份标本磁珠法和 Trizol 法检测目标基因均为阴性,但是磁珠法内标通道结果也为阴性,由此判断为假阴性。将标本稀释 10 倍后用磁珠法和 Trizol 法检测目的基因均为阳性。内标监测了标本提取和检测的整个过程,对内标的结果进行分析后可以采取相应的对策,保证检测结果的准确性。

2.2 灵敏度结果比较 梯度标本检测结果见表 3,发现磁珠法试剂的最低检出限低于 Trizol 法试剂,Trizol 法的临界阳性标本检出浓度为 EV-4.2 的浓度,所以选取 EV-4.2、EV-4.4 两个标本的浓度作为灵敏度试验标本,两个标本采用两种试剂各检测 20 次,计算标本的阳性率,磁珠法试剂检测 EV-4.2、EV-4.4 的阳性率均为 100.00%,而 Trizol 法试剂检测 EV-4.2 的阳性率为 50.00%,检测 EV-4.4 的阳性率为 0.00%,磁珠法试剂的灵敏度高于 Trizol 法试剂。

表 3 梯度标本检测结果

方法	EV-1	EV-2	EV-3	EV-4	EV-4.2	EV-4.4
磁珠法试剂	+	+	+	+	+	+
Trizol 法试剂	+	+	+	+	+	—

2.3 精密度结果比较 磁珠法试剂对 EV-2、EV-4 两个标本重复 10 次检测的 CV 值分别为 0.84%、0.96%,Trizol 法试剂的 CV 值分别为 2.01%、1.43%。磁珠法试剂的 CV 值均小于 Trizol 法试剂的 CV 值,说明磁珠法试剂的精密度优于 Trizol 法试剂。

3 讨 论

病毒核酸检测是基于核酸扩增检测技术的体外诊断技术,目前已经广泛用于病原体检测、特定疾病的早期诊断和基因型别鉴定等不同领域,而核酸的提取是核酸检测中的关键步骤。目前常用的核酸提取方法有加热裂解法、酚-氯仿抽提法、柱提法等^[8],这些方法都采用手工操作,需要加热、反复离心、洗涤等比较繁琐的过程。由于操作方法上的缺陷,在处理大量临床标本时,容易造成标本间的交叉污染和核酸丢失,导致检测结果出现假阳性和假阴性,影响检测结果的准确性和重复性。磁珠法是近年发展迅速且被广泛应用的一种核酸提取方法,它将

生物科学和纳米材料科学结合,具有传统核酸提取方法无法比拟的优势,主要体现在:操作简单、用时短,整个提取流程只有裂解、结合、洗涤、洗脱 4 步,大多可以在 30~90 min 完成;安全无毒,不使用传统方法中的苯、氯仿等有毒试剂,对试验操作人员的伤害减少到最少;提取效率高,磁珠与核酸的特异性结合使得提取的核酸纯度高、浓度大;可实现自动化、大批量操作,目前已有 96 孔的核酸自动提取仪,用一个样品的提取时间即可实现对 96 个样品的处理,满足临床大批量标本检测的需求。

本研究运用磁珠法试剂盒和传统的 Trizol 法试剂盒,对 204 例肠道病毒临床标本进行检测。发现磁珠法试剂与 Trizol 法试剂的阳性符合率为 97.58%,阴性符合率为 100.00%,总符合率为 98.53%。对此结果进行 $Kappa$ 检验一致性分析,结果表明磁珠法试剂与 Trizol 法试剂检测的诊断结果具有很好的-一致性,符合临床检测要求。在临床检测的过程中,还发现了 6 份标本的目的基因检测结果为阴性,而磁珠法内标通道也为阴性,由此推断这 6 例标本的结果可能是假阴性。将这些标本稀释后复检,证实为阳性。分析造成假阴性的原因,可能是由于标本中含有 PCR 抑制物,经提取后仍未能去除;也可能是操作过程中失误,没有提取到病毒核酸造成的。当检测结果为阴性的标本内标通道也为阴性时,试验操作人员可以通过稀释标本(稀释抑制物)或重新提取的方法进行复查,从而获得准确的检测结果。在我国医药行业标准 YY/T 1182-2010《核酸扩增检测用试剂(盒)》中,对我国最常见的传染病 HIV、HBV、HCV 核酸扩增试剂盒产品设计要求中规定:在产品设计中,应加入全程参与的内标。可见内标系统的设计是重要且必要的。

通过磁珠法试剂和 Trizol 试剂对肠道病毒低浓度标本的灵敏度对比检测,发现磁珠法试剂的阳性检出率高,说明磁珠法试剂的灵敏度较高。对肠道病毒中、低浓度标本进行精密度检测,发现磁珠法试剂检测结果的 CV 值小于 Trizol 法试剂的 CV 值,说明磁珠法试剂的重复性较好。

综上所述,磁珠法是一种快速有效的病毒核酸提取方法,其内标系统可预防假阴性,在检测结果的分析中起到重要作用。湖南圣湘生物科技有限公司的新型磁珠法肠道病毒核酸检测试剂盒,将这两个技术有机地结合起来,是一种灵敏度高、精密度好、可靠的肠道病毒核酸检测试剂,具有较高的临床应

用价值。

参考文献

[1] Kaku Y, Sarai A, Murakami Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses[J]. J Gen Virol, 2001, 82(2): 417-424.

[2] Hyypia T, Hovi T, Knowles NJ, et al. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties [J]. J Gen Virol, 1997, 78(1): 1-11.

[3] Miura T, Masago Y, Sano D, et al. Development of an effective method for recovery of viral genomic RNA from environmental silty sediments for quantitative molecular detection[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(12): 3975-3981.

[4] Knepp JH, Geahr MA, Forman MS. Comparison of automated and manual nucleic acid extraction methods for detection of enterovirus RNA[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8): 3532-3536.

[5] Hamilton MS, Jackson MA, Abel D, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction testing for enteroviral meningitis[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(6): 533-537.

[6] Oberste MS, Schnurr D, Maher K, et al. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype[J]. J Gen Virol, 2001, 82(2): 409-416.

[7] Nijhuis M, Van MN, Schuurman R, et al. Rapid and sensitive routine detection of all members of the genus enterovirus in different clinical specimens by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3666-3670.

[8] Verheyden B, Thielemans A, Rombaut B, et al. RNA extraction for quantitative enterovirus RT-PCR: comparison of three methods[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33(4): 819-823.

(收稿日期:2014-10-05 修回日期:2014-12-28)

(上接第 906 页)

[4] 徐建设,陈辉,傅卫军. SLIPA 喉罩用于全麻短小手术的观察[J]. 临床麻醉学杂志, 2009, 24(11): 992-993.

[5] 黄建盛,张蓉,熊义英. 喉罩在小儿脑瘫矫形手术中的应用[J]. 四川医学, 2013, 34(10): 1561-1563.

[6] 顾志清,金泉英,陈莲华. 喉罩在小儿麻醉中的应用进展[J]. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(8): 822-824.

[7] 康芳,李娟,汪树东,等. 复方利多卡因乳膏对小儿先天性心脏病快通道麻醉拔管反应的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(10): 1004-1005.

[8] Larijani GE, Cypel D, Gratz I, et al. The efficacy and safety of EMLA Cream for awake fiberoptic endotracheal intubation[J]. Anesth Analg, 2000, 91(4): 1024-1026.

[9] Jagannathan N, Sohn LE, Chang E, et al. A cohort evaluation of the Laryngeal Mask Airway-SupremeTM in children [J]. Pediatr Anesth, 2012, 22(8): 759-764.

[10] 赵泽宇,刘建波,张蓉,等. 右美托咪定对脑瘫患儿七氟醚麻醉苏醒期躁动的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(6): 676-679.

[11] Abu-Shahwan I, Chowdary K. Ketamine is effective in decreasing the incidence of emergence agitation in children undergoing dental repair under sevoflurane general anesthesia[J]. Paediatr Anaesth, 2007, 17(9): 846-850.

(收稿日期:2014-10-05 修回日期:2014-12-12)