

新型冠状病毒肺炎实验室研究·论著 DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.06.002

新型冠状病毒核酸提取方法的性能评价及临床应用

吴永彬, 万颖, 蒋红玲, 张晶, 辛杰

广西壮族自治区南溪山医院检验科, 广西桂林 541002

摘要:目的 评价 3 种新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸提取方法的分析性能及临床应用价值。方法 采用目前临床常用的裂解法、柱提法和磁珠法提取 SARS-CoV-2 核酸,通过实时荧光反转录聚合酶链反应及自建检测系统检测 SARS-CoV-2 核酸[开放阅读框(ORF)1ab、核衣壳蛋白(N)],评价 3 种核酸提取方法下的检测精密性、正确性、最低检测限等性能指标。将 3 种核酸提取方法应用于 17 份新型冠状病毒肺炎(COVID-19)确诊病例标本的检测,分析其临床应用价值。结果 3 种核酸提取方法下检测结果的重复性精密性和中间精密性、正确性均通过验证,可满足临床需求。采用裂解法、柱提法、磁珠法提取核酸时的最低检测限(Ct 值)分别是 37.42、37.87、39.61,均符合厂家声明的最低检测限。在应用于临床标本检测时,3 种核酸提取方法下的检测结果两两之间均呈良好的线性关系($P < 0.05$),其中,采用柱提法和磁珠法提取核酸时的检测结果相关性最好($r = 0.905, P < 0.001$)。3 种核酸提取方法下的靶标(ORF1ab+/N-, ORF1ab-/N+, ORF1ab+/N+)检出率比较,差异无统计学差异($P > 0.05$)。结论 裂解法、柱提法和磁珠法提取 SARS-CoV-2 核酸在自建检测系统中的分析性能可接受,均可满足临床对 SARS-CoV-2 的检测需求。

关键词:新型冠状病毒; 核酸提取; 实时荧光反转录聚合酶链反应

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)06-0725-04

Performance evaluation and clinical application of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 nucleic acid extraction methods

WU Yongbin, WAN Ying, JIANG Hongling, ZHANG Jing, XIN Jie

Department of Clinical Laboratory, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin, Guangxi 541002, China

Abstract: Objective To evaluate the analytical performance and clinical application value of 3 Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) nucleic acid extraction methods. **Methods** The SARS-CoV-2 nucleic acid was extracted by the lysis method, column extraction method and magnetic bead method commonly used in clinical practice. SARS-CoV-2 nucleic acids [open reading frame (ORF) 1ab, nucleocapsid protein (N)] were detected by real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction and self-designed detection system. Evaluated the precision, accuracy and minimum detection limit of the 3 methods. Three nucleic acid extraction methods were applied to the detection of specimens from 17 confirmed cases of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19), and their clinical application value was analyzed. **Results** The repeatability precision, intermediate precision and accuracy of the detection results of the 3 nucleic acid extraction methods all verified, and met the clinical needs. The minimum detection limits (Ct value) for nucleic acid extraction by lysis method, column extraction method and magnetic bead method were 37.42, 37.87, 39.61 respectively, which met the minimum detection limits declared by the manufacturer. When applied to clinical specimen detection, the detection results of the 3 nucleic acid extraction methods showed a good linear relationship ($P < 0.05$). Among them, the correlation between the results of nucleic acid extraction by column extraction method and magnetic bead method was the best ($r = 0.905, P < 0.001$). There was no significant difference in the detection rate of targets (ORF1ab+/N-, ORF1ab-/N+, ORF1ab+/N+) of the 3 nucleic acid extraction methods ($P > 0.05$). **Conclusion** The analytical performance of the lysis method, column extraction method and magnetic bead method to extract SARS-CoV-2 nucleic acid in the self-designed detection system is acceptable, and can meet the clinical requirements for SARS-CoV-2 detection.

Key words: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; nucleic acid extraction; real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction

作者简介:吴永彬,男,副主任技师,主要从事病原微生物致病分子机制及诊断方法研究。

本文引用格式:吴永彬,万颖,蒋红玲,等.新型冠状病毒核酸提取方法的性能评价及临床应用[J].检验医学与临床,2021,18(6):725-728.

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)是一种具有包膜结构的正链单股RNA病毒,不仅可感染人类,还能感染其他哺乳类动物和鸟类,可引起呼吸道、肠道、肝脏和神经系统等病变^[1]。目前,实时荧光反转录聚合酶链反应检测SARS-CoV-2核酸是筛查和诊断新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的重要手段^[2],通过对SARS-CoV-2序列中的开放阅读框(ORF)1ab、核衣壳蛋白(N)及包膜蛋白(E)基因的特异性保守序列设计靶区域来实现标本核酸检测。然而,该方法自临床应用以来仍缺乏可靠的质量控制,已开展SARS-CoV-2核酸检测的实验室或机构大多采用自建体系进行检测,没有形成统一的技术标准。就试剂而言,各厂家推荐的标本前处理方法及核酸提取方法并不统一,试剂之间的差异可能会导致检测结果的不一致。当某项定量检测项目在正式用于标本检测前或检测系统有重大改变后,必须对检测系统的分析性能做出详细、充分的评价,确认检测系统符合临床要求^[3]。本研究评价了3种不同的SARS-CoV-2核酸提取方法用于核酸定量检测时的分析性能及临床应用价值,以期对COVID-19的实验室检测和临床诊断提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取SARS-CoV-2核酸检测阳性的COVID-19确诊病例17例,其中男8例,女9例;年龄24~79岁,中位年龄42岁;病程4~24d;危重型4例,普通型13例。所有患者SARS-CoV-2核酸检测标本于2020年2月12—19日在本院感染性疾病病区收集,其中深咳痰液标本13份,大便标本4份。COVID-19诊断标准参考《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案(试行第五版)》^[4]。本研究经本院伦理审查委员会审核通过(批准文号2020NXSYEC-003)。

1.2 仪器与试剂 电热恒温水浴箱(型号:HH.W21.600S,上海跃进医疗器械有限公司),漩涡混合器(型号:XH-B,江苏康健医疗用品有限公司),全自动核酸提取系统(型号:Natch CS,湖南圣湘生物科技有限公司),荧光定量PCR扩增系统(型号:SLAN-96P,上海宏石医疗科技有限公司)。样本释放剂(批号:S1014,湖南圣湘生物科技有限公司,裂解法),核酸提取及纯化试剂(批号:SDK60102,江苏硕世科技股份有限公司,柱提法),核酸提取或纯化试剂(批号:S1002,湖南圣湘生物科技有限公司,磁珠法),核酸扩增试剂(批号:2020088,湖南圣湘生物科技有限公司,荧光PCR法)。

1.3 方法

1.3.1 SARS-CoV-2核酸检测 所有标本在检测前先进行56℃、30min灭活,并混匀5~10s后待检。使用3种SARS-CoV-2核酸提取方法(裂解法、柱提法、磁珠法),按操作说明书提取核酸,最后均提取

20μL SARS-CoV-2核酸液作为扩增模板。在荧光定量PCR扩增系统上选择FAM(ORF1ab)和ROX(N)通道检测SARS-CoV-2核酸,选择HEX通道检测内标。设置50℃、热循环30min进行反转录;在95℃下反应1min使cDNA预变性;然后按照95℃、15s,60℃、30s循环45次。最后根据扩增信号得出Ct值,并根据核酸扩增试剂说明书判定检测结果。

1.3.2 性能验证

1.3.2.1 精密度验证 选取高、低两个水平且双靶标(ORF1ab、N)Ct值接近的阳性标本,按一定比例混合后得到低、中、高3个水平的标本,分别用3种方法提取SARS-CoV-2核酸并检测,每一水平标本在同一批次中重复检测4次,连续检测3d,计算各水平标本12次检测得到的双靶标(ORF1ab、N)Ct值的均值(\bar{x})和标准差(s),计算重复性精密度(CV_r)和中间精密度(CV_i)^[5],当 CV_r 和 CV_i 均小于目标CV(5%)时,符合厂家声明的精密度标准。

1.3.2.2 正确度验证 使用试剂盒自带的阳性质粒标本,参考文献^[6]获得暂定靶值,用阴性对照标本按10倍梯度进行稀释,配制成3个不同水平的标本,分别用3种方法提取SARS-CoV-2核酸并检测,每个水平重复检测4次,计算各水平4次检测得到的双靶标(ORF1ab、N)Ct值的 \bar{x} 和 s ,计算实测值与理论值的偏倚,以小于能力验证/室间质评评价界限($\pm 2/5Ct$ 值)为可接受^[7]。

1.3.2.3 最低检测限验证 选取低水平且双靶标(ORF1ab、N)Ct值接近的弱阳性标本8份,用阴性对照标本依次按1:1的比例稀释为8个水平接近试剂盒定量检测下限的标本,分别用3种方法提取SARS-CoV-2核酸并检测,每份标本重复检测4次,连续检测10d。参考EP7-A2^[7],计算阳性检出率及最低检测限。

1.3.2.4 临床应用评估 取17份COVID-19确诊病例标本,分别采用3种方法同时提取并检测SARS-CoV-2核酸,每个标本重复检测3次,计算3种核酸提取方法下检测结果的阳性符合率、靶标检出率,分析3种核酸提取方法两两之间检测结果的相关性。

1.4 统计学处理 采用SPSS19.0软件进行数据分析。所有超出检测限的Ct值均替换为其检测限。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法;最低检测限采用Probit回归分析计算;相关性分析采用Pearson相关。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 精密度验证结果 3种核酸提取方法下高、中、低水平标本检测结果的 CV_r 和 CV_i 均小于目标CV

(5%),符合厂家声明的精密度标准,可满足临床需求。见表 1。

2.2 正确度验证结果 3 种核酸提取方法下检测 3 个水平标本的偏倚均小于允许偏倚,可接受,其中采用裂解法提取核酸时的偏倚较柱提法和磁珠法大,采用磁珠法提取核酸时 3 个水平标本的检测偏倚均最小。见表 2。

2.3 最低检测限验证结果 3 种核酸提取方法下 8 个水平标本的检出率见表 3。Probit 回归分析结果显示,模型拟合度均可接受,采用裂解法、柱提法、磁珠

法提取核酸时的最低检测限(Ct 值)分别是 37.42、37.87、39.61,均符合厂家声明的最低检测限。

2.4 方法学比较 在 17 份 COVID-19 确诊病例标本中,有 15 份标本在 3 种核酸提取方法下均检测为阳性,其中裂解法和柱提法、磁珠法和柱提法的阳性符合率均为 94.11%,裂解法和磁珠法的阳性符合率为 88.23%。3 种核酸提取方法下的检测结果两两之间均呈良好的线性关系($P < 0.05$),其中,采用柱提法和磁珠法提取核酸时的检测结果相关性最好($r = 0.905, P < 0.001$)。见图 1。

表 1 精密度验证结果

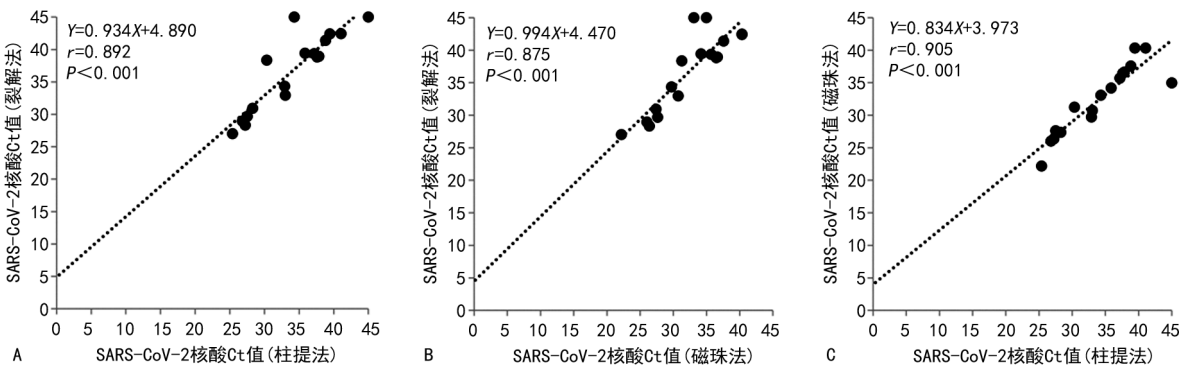
提取方法	检测次数(次)	Ct 值($\bar{x} \pm s$)			CV _r (%)			CV _i (%)		
		低水平	中水平	高水平	低水平	中水平	高水平	低水平	中水平	高水平
裂解法	12	37.38±1.30	32.51±0.84	25.69±0.59	1.46	1.31	1.23	3.15	2.24	1.94
柱提法	12	36.83±1.07	32.23±0.67	25.71±0.53	1.52	1.18	1.22	2.47	1.70	1.65
磁珠法	12	36.73±1.16	32.44±0.68	25.38±0.51	1.41	1.28	1.15	2.81	1.65	1.62

表 2 正确度验证结果

提取方法	检测次数(次)	Ct 值($\bar{x} \pm s$)			暂定靶值			偏倚		
		水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3	水平 1	水平 2	水平 3
裂解法	4	29.15±0.20	32.52±0.30	35.87±0.62	28.36	31.63	34.85	-0.79	-0.89	-1.02
柱提法	4	28.47±0.20	31.82±0.31	35.31±0.26	28.36	31.63	34.85	-0.11	-0.19	-0.46
磁珠法	4	28.28±0.12	31.46±0.59	35.08±0.35	28.36	31.63	34.85	0.08	0.17	-0.23

表 3 3 种核酸提取方法下的检出率比较[n(%)]

提取方法	检测次数(次)	水平 1	水平 2	水平 3	水平 4	水平 5	水平 6	水平 7	水平 8
裂解法	40	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	37(92.5)	32(80.0)	16(40.0)	5(12.5)
柱提法	40	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	39(97.5)	33(82.5)	28(70.0)	13(32.5)
磁珠法	40	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	40(100.0)	37(92.5)	31(77.5)	21(52.5)



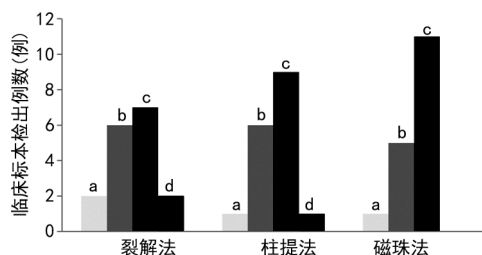
注:A 为柱提法与裂解法检测结果的相关性分析;B 为磁珠法与裂解法检测结果的相关性分析;C 为柱提法与磁珠法检测结果的相关性分析。

图 1 相关性分析结果

2.5 3 种核酸提取方法下的靶标检出率比较 17 例 COVID-19 确诊病例标本中,采用裂解法提取核酸时检出 15 例阳性,阳性率为 88.2%,柱提法提取核酸时检出 16 例阳性,阳性率为 94.1%,磁珠法提取核酸时

检出 17 例阳性,阳性率为 100.0%。进一步分析靶标检出率,双靶标(ORF1ab+/N+)检出率最高的是磁珠法,为 64.7%(11/17),其次是柱提法的 52.9%(9/17)和裂解法的 41.2%(7/17);单靶标中,ORF1ab-/N+

在3种核酸提取方法中的检出率相当,而ORF1ab+/N-的检出率均较低。3种核酸提取方法下的靶标(ORF1ab+/N-、ORF1ab-/N+、ORF1ab+/N+)检出率比较,差异无统计学差异($P>0.05$)。见图2。



注:a为ORF1ab+/N-;b为ORF1ab-/N+;c为ORF1ab+/N+;d为ORF1ab-/N-。

图2 3种核酸提取方法下的靶标检出情况比较

3 讨论

目前,国内大多数实验室常使用自建检测系统检测SARS-CoV-2^[8],对于实验室自建检测系统,我国《临床实验室管理办法》和《医学实验室质量和能力认可准则》均要求需对检验程序的性能进行验证,证实其能满足预期用途后方可用于临床检测。但国内目前对SARS-CoV-2自建检测系统性能验证的具体方法尚未达成广泛共识,本研究对3种核酸提取方法下自建检测系统的精密度、正确度、最低检测限等指标进行了性能分析,并将其用于临床评价。

为使检测结果具有可比性,本研究采取了除核酸提取过程不同外,其余操作均相同的检测方案,整体来看,3种核酸提取方法下自建检测系统检测SARS-CoV-2的精密度、正确度均通过验证,但采用磁珠法提取核酸时的检测偏倚、 CV_r 和 CV_i 普遍比裂解法与柱提法小(除磁珠法低水平标本的 CV_i 和中水平标本的 CV_r 略大于柱提法外),表明与人工操作相比,自动化操作可减少操作误差,提高检测结果的准确度。此外,采用磁珠法提取核酸时的最低检测限(C_t 值)稍优于裂解法与柱提法,检测灵敏度更高,这有利于低水平病毒RNA的检出。考虑出现上述差异与试剂提取原理有关,裂解法是一种通过简化的蛋白变性剂和生化试剂混合来抽提核酸的方法,操作简单,标本量仅需10 μ L,适合病毒载量高、杂质少的标本,但如果标本不满足上述要求则易漏检,产生“假阴性”结果。柱提法是采用特殊玻璃纤维滤膜高效吸附核酸片段来提取核酸,操作环节较多,易造成核酸丢失,但其最终获得的核酸纯度较高。磁珠法是以磁珠为载体进行分离和转移来实现核酸提取的方法,在保证核酸提取纯度的同时,也保证了模板纯度。

本研究以17例COVID-19确诊病例标本为临床研究对象,比较了3种核酸提取方法下检测结果的阳性符合率及结果间的相关性,结果显示,3种核酸提取方法下检测结果的阳性符合率较高,且结果间两两均呈线性相关。本研究还比较了3种核酸提取方法下靶标的检出情况,结果显示,3种核酸提取方法下的靶标(ORF1ab+/N-、ORF1ab-/N+、ORF1ab+/N+)检出率比较,差异无统计学差异($P>0.05$),说明这3种核酸提取方法均可用于SARS-CoV-2核酸检测。但值得注意的是,本研究纳入的临床样本量较少,患者的标本类型、发病时间、病情严重程度、用药情况等因素也不一致,因此结果有待后续的大样本研究进一步验证。

综上所述,本研究评价的这3种核酸提取方法均可满足临床SARS-CoV-2的检测需求,且磁珠法相较裂解法与柱提法具有更好的性能。

参考文献

- [1] SCHOEMAN D, FIELDING B C. Coronavirus envelope protein; current knowledge[J]. Virol J, 2019, 16(1): 69-73.
- [2] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 Novel Coronavirus(2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveill, 2020, 25(3): 2000045.
- [3] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.
- [4] 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(试行第五版)的通知: 国卫办医函(2020)103号[EB/OL]. (2020-02-04)[2020-04-20]. <http://www.nhc.gov.cn/zyygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440.shtml>.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness, approved guideline-second edition; EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA; CLSI, 2005.
- [6] International Organization for Standardization. Medical laboratories, requirements for quality and competence; BS EN ISO 15189; 2012[S]. Geneva; ISO, 2012.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference testing in clinical chemistry, approved guideline-second edition; EP7-A2[S]. Wayne, PA, USA; CLSI, 2005.
- [8] CERAOLO C, GIORGI F M. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus[J]. J Med Virol, 2020, 92(5): 522-528.

(收稿日期:2020-07-28 修回日期:2020-12-22)