

# 两种 RT-PCR 检测 SARS-CoV-2 核酸试剂盒实验室应用评价

李团团<sup>1</sup>, 叶成果<sup>2</sup>, 李 振<sup>2</sup>, 高 勇<sup>1</sup>

(1. 安徽省阜阳市第二人民医院检验科, 安徽阜阳 236029; 2. 上海慈福医学检验实验室有限公司, 上海 201800)

**摘要:** **目的** 应用两个厂家生产的试剂盒平行检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染的肺炎(COVID-19)患者样本, 对其检测效果进行实验室应用评价。**方法** A, B两试剂盒共同靶基因为ORF1ab和N, B试剂盒增加靶基因E; 两试剂盒同为磁珠核酸提取, RT-PCR扩增法。**结果** 298份痰液、咽拭子、肛拭子和尿液标本中, 两种试剂盒共同确认阳性结果120份, 阴性结果178份。其检测分别表达为: A试剂盒ORF1ab阳性120份, N阳性120份, 阴性178份, 内标(IC)297份, 质控合格全覆盖; B试剂盒ORF1ab阳性120份, N阳性118份, E阳性120份, 阴性178份, 内标(IC)298份, 质控合格全覆盖; 阳性结果的Ct值有限配对的t检验, 均 $P > 0.05$  (ORF1ab:  $n=120, t=1.839, P=0.069$ ; N:  $n=118, t=1.881, P=0.063$ ), 差异无统计学意义。**结论** 两种试剂盒表达的Ct值趋同性较理想, 标本的阳性表达上符合指南规定, 结果一致。A试剂盒有内标(IC)1份未能表达, 不可忽视; B试剂盒N基因有2份缺项需找原因克服, 而具备的E基因提高了SARS-CoV-2核酸检测的可控性。

**关键词:** 2019新型冠状病毒; RT-PCR核酸检测; 试剂盒

中图分类号: R373.1; R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2020)03-090-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2020.03.023

## Evaluation of Laboratory Application of Two RT-PCR Detection Kits for SARS-CoV-2 Nucleic Acid

LI Tuan-tuan<sup>1</sup>, YE Cheng-guo<sup>2</sup>, LI Zhen<sup>2</sup>, GAO Yong<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Fuyang City, Anhui Fuyang 236029, China;

2. Shanghai CEFU Medical Laboratory Co. Ltd., Shanghai 201800, China)

**Abstract:** **Objective** The kits produced by the two manufacturers were used to detect samples of patients with pneumonia infected by new coronavirus in parallel, and their detection effects were evaluated for limited application. **Methods** The common target genes of the two kits A and B were ORF1ab and N, and the kit B adds the target gene E, both kits were magnetic beads nucleic acid extraction, RT-PCR amplification method. **Results** Of the 298 sputum, pharyngeal swabs, anal swabs and urine specimens, the two kits jointly confirmed 120 positive results and 178 negative results. The overall test expression were: 120 kits ORF1ab positive 120 and N positive 120, 178 negative, 297 internal standard (IC), full coverage of quality control, and 120 ORF1ab positive B kit, 118 N positive, 120 E positive, 178 negative, 298 internal standard (IC) and quality full coverage of control pass. The Ct value of positive results was limited paired t test ( $P > 0.05$ ) (ORF1ab:  $n=120, t=1.839, P=0.069$ ; N:  $n=118, t=1.881, P=0.063$ ). The difference was not statistically significant. **Conclusion** The Ct values expressed by the two kits were similar to each other, and the positive expression of the samples met the requirements of the guidelines, and the results were consistent. There was one internal standard (IC) in kit A that could not be expressed, which could not be ignored. There are two N genes in kit B that need to be overcome, while the E gene improves the controllability of 2019-ncov detection.

**Keywords:** 2019 novel coronavirus; Rt-PCR nucleic acid detection; test kit

在举国抗击新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 19, COVID-19)初期, 临床诊断治疗对实验室病原体核酸检测结果产生过诸多评价, 提出了较高的要求。应急选择试剂, 谨慎检测实验, 是每一个新冠病毒检测实验室的唯一专业取向。我们严格遵照国家卫健委“新型冠状病毒实验室生物安全

指南”<sup>[1]</sup>规定和“医疗机构开展新型冠状病毒核酸检测有关要求的通知”<sup>[2]</sup>精神及“新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第四版)”<sup>[3]</sup>的程序, 使用指定的实时荧光RT-PCR核酸检测技术, 用两种新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)RT-PCR核酸检测专

作者简介: 李团团(1983-), 男, 医学硕士, 副主任检验师, 主要从事临床分子生物学检验, E-mail: 29515230@qq.com, Tel: 15856880327。

通讯作者: 高勇(1973-), 男, 医学硕士, 副教授, 主任检验师, 主要从事临床检验, E-mail: fyeryuangy8@126.com。

用试剂盒,对疑似排查、入院诊断和治疗评价的156例受检者采集到的298份各类标本进行 SARS-CoV-2 核酸的即时平行检测,以期对临床提供较准确的信息,同时对所选试剂的应用做简单评价如下。

## 1 材料与方法

1.1 研究对象 收集从2020年2月19日~2月29日就诊于阜阳市第二人民医院疑似 COVID-19 患者(156例)不同类型标本共298份。其中痰液标本128份、咽拭子131份、肛拭子38份、尿液1份。标本均由临床专业医生采集并派专人送至检验科采用两种 SARS-CoV-2 RT-PCR 核酸检测专用试剂盒进行 SARS-CoV-2 核酸检测。

### 1.2 试剂与仪器

1.2.1 试剂: A 试剂盒购于上海伯杰医疗科技有限公司; B 试剂盒购于苏州华益美生物科技有限公司。磁珠核酸提取试剂为江苏硕世生物科技有限公司产品。A 和 B 试剂盒均属应急批准的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测试剂盒(PCR 荧光法)。

1.2.2 仪器: SLAD14800 全自动核酸提取仪(苏州华益美生物科技有限公司); SLAN-96 全自动 PCR 分析仪(上海宏石医疗科技有限公司); 生物安全柜购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 方法 收集的298份样本使用 A 试剂盒(A 组)和 B 试剂盒(B 组)进行 SARS-CoV-2 核酸检测,并评价分析两种试剂盒核酸检测结果。采用磁

珠核酸提取试剂盒提取样本核酸,将提取的核酸模板液 20  $\mu$ l 转移至已分装扩增混合液的 PCR 反应管中,盖上盖子,混匀,离心后放入多通道核酸检测仪并根据两种试剂盒说明书设置检测所用通道,实施 RT-PCR 荧光核酸扩增。同时检测试剂盒所带的阴、阳性对照质控品,按照试剂盒的判断标准判断实验结果。

1.4 统计学分析 用 SPSS17.0 统计软件做统计学分析, ORF1ab 和 N 两基因组计量数据采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 两种试剂盒性能比较 A 和 B 试剂盒的最低检测限分别为  $1 \times 10^3$  (copies)/ml 和  $5 \times 10^2$  (copies)/ml, 检测基因也有区别, B 试剂盒添加检测一个 E 基因<sup>[4]</sup>, 试剂盒都有各自的内标, 判定结果的标准稍微有差异, A 试剂盒阳性判断标准是  $Ct \leq 38$ ,  $> 38$  或者没有  $Ct$  值判断为阴性。而 B 试剂盒阳性判断标准是  $Ct \leq 40$ , 没有  $Ct$  值判断为阴性。

2.2 两种试剂盒检测 298 份样本核酸结果分析 两种试剂盒检测 298 份样本 SARS-CoV-2 核酸结果判定见图 1, 阳性结果为 120 份, 占比 40.27%。其中, 痰液阳性 83 份, 占比 69.17%; 咽拭子阳性 31 份, 占比 25.83%; 肛拭子阳性 6 份, 占比 5.0%。尿液 1 份阴性。在 120 份阳性检测中, B 试剂盒 2 份 N 基因未能表达; A 试剂盒有 1 份重要的内标(RNase P 基因)未能表达。经按规定必须的重复检测后的确认状况见表 1。

表 1 两种试剂盒对 298 份标本 SARS-CoV-2 靶基因检测确认结果

试剂盒	阳性结果	ORF1ab	N	E 基因	阴性结果	内标(IC)	质控成功覆盖
A	120	120	120		178	297	298
B	120	120	118	120	178	298	298

2.3 两种试剂盒检测 298 份样本 SARS-CoV-2 核酸  $Ct$  值分析 对阳性结果的两种试剂盒 SARS-CoV-2 核酸  $Ct$  值进行了 *t* 检验, 其中 ORF1ab 基因  $Ct$  值 120 对, N 基因  $Ct$  值 118 对, 经两组数据配对 *t* 检验显示  $P > 0.05$ , 差异无统计学意义(ORF1ab:  $t=1.839$ ,  $P=0.069$ ; N:  $t=1.881$ ,  $P=0.063$ )。

## 3 讨论

RT-PCR 实时荧光核酸检测技术在病毒性感染疾病诊断上所具有的早期、灵敏、特异性高等优势, 国家卫健委从《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第五版)》<sup>[5]</sup>开始, 就将该项检测手段列为“SARS-CoV-2”确诊依据之一。由于 SARS-CoV-2 突发事件的复杂与试剂研制和临床实践的局促, 为谨慎应急对待每一个

有症状的患者样本, 故采用两种设计略有差异的检测试剂对同一份标本进行平行检测, 以求结果的准确并籍此得出有限的体会与评价。

本次 A, B 两种试剂盒检测实验, 在扩增前的核酸提取中均采用了含磁珠的核酸富集技术, 提高了随后的核酸扩增病毒基因成分的检出概率。虽各自检测限有差异, 遵循 ORF1ab 或 N 只要一项阳性(经复检)即可确认原则<sup>[3]</sup>, 最终定性实验的报告结果都是一致的。

在 RT-PCR 核酸扩增仪器通道的选择上, A, B 两种试剂盒, 各自设计不同。选用通道有别, 意味着荧光波长表达的不同, 最终这一切将反映在仪器扩增曲线起峰上各具自有特点效果难分伯仲。

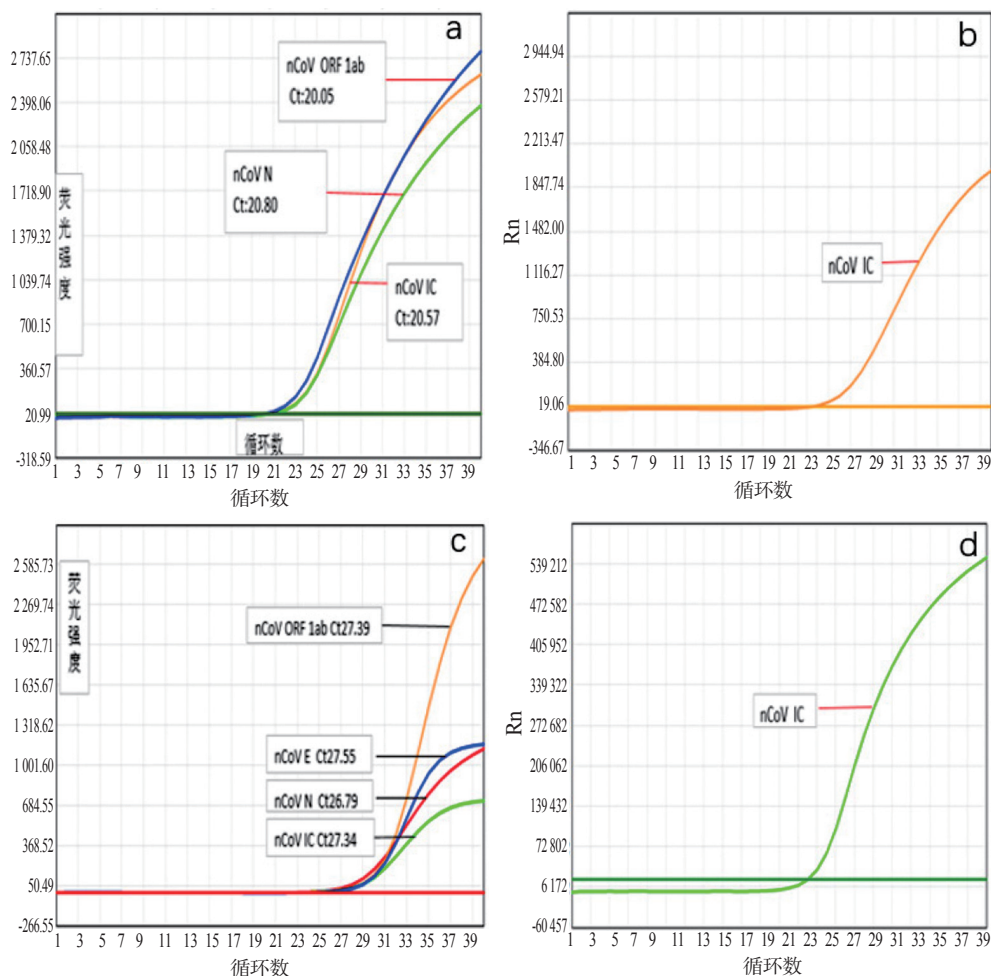


图1 A试剂盒样本检测阳性/阴性结果表达见图a/b. B试剂盒样本检测阳性/阴性结果表达见图c/d

检测靶基因的设计 A, B 两种试剂盒有所不同。A 试剂盒检测靶标是 ORF1ab 基因和 N 基因, 符合国家卫健委相关规定要求<sup>[3]</sup>。而 B 试剂盒检测的靶标除了 ORF1ab 基因和 N 基因还多设计了 E 基因表达。资料提示 E 基因为新冠病毒和 SARS 病毒的共有基因, 其表达为新型冠状病毒膜蛋白, 在新型冠状病毒中保守性更好, 根据 WHO 有关新冠病毒核酸检测的早期建议, 用 E 基因先行筛查, 阳性者再行 ORF1ab 和 N 基因的确认及 SARS-CoV-2 RNA 检测的“综合控制”可以通过 E 基因检测实现<sup>[4]</sup>。依此可以认为 B 试剂盒多一个新冠病毒检测可靠性的前置保障。

从表 1 标本结果表达可见, 在关键项“内标”(RNase P)的检测结果中, A 试剂盒有 1 份未检出, 而 B 试剂盒对标本 N 基因报告有 2 份未检出; 尽管不影响结果判断的原则规定, 但究其原因, 也不能排除可能有引物设计、通道选择和抗多因素干扰能力等诸方面存在的瑕疵或尚待完善之处。

本次 298 份标本检测结果显示有 178 份为阴性 (占比 59.73%)。其中呼吸道痰液, 咽拭子标本

合计 259 份, 检测结果阴性 145 份, 占标本数的 55.98%, 这些标本可能存在除采集的最时段外, 不能排除咽拭子的采集操作技巧和痰液标本的合适程度 (是否合格的上、下呼吸道及气道灌洗液) 等重要环节的不足。对核酸检测阴性结果患者, 应最好再进行 SARS-CoV-2 血清学抗体 IgM 和 IgG 的确认<sup>[6]</sup>, 这是本次用于临床评价的局限。

肛拭子标本 38 份, 核酸检测阳性 6 份, 该项检测结果提示新型冠状病毒在人体的可能存在状态及通过粪便传播的可能性<sup>[7]</sup>。其采样的方便和一定的检出率, 能否适合作为疑似或诊断患者的筛查项目值得进一步实践研究<sup>[8]</sup>。

高品质专用 SARS-CoV-2 核酸检测试剂, 是对新冠病毒肺炎患者早发现、早隔离、早治疗至关重要的前提。资料显示, 目前市售试剂盒由于多种原因造成质量参差不齐, 有些无内标物及其表达程序<sup>[9]</sup>, 这些既影响实验结果判定, 也无疑给紧张的疫情中的救治造成时间延误甚至带来负面效应。从多年来的 RT-PCR 检测实践和本次紧急应对 298 份疫情标本, 我们体会到, 一个专用试剂盒从引物设计的全面性



到通道选择都应充分论证,反复验证。试剂盒不仅有高品质的质控品,还必须具有对内标物的表达程序,这应是 SARS-CoV-2 核酸定性检测试验中不能或缺的选择和考虑。

#### 参考文献:

- [1] 国家卫生健康委办公厅. 新型冠状病毒实验室生物安全指南 [EB/OL]. 2版. (2020-01-23) [2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/qijys/s7948/202001>. General Office of the National Health Commission. Novel coronavirus laboratory biosafety guidelines [EB/OL]. 2nd edition. (2020-01-23) [2020-02-06]. <http://www.nhc.gov.cn/qijys/s7948/202001>.
- [2] 中华人民共和国卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于医疗机构开展新型冠状病毒核酸检测有关要求的通知 (国卫办医函〔2020〕53号) [EB/OL]. (2020-01-15). <http://www.nhc.gov.cn/wjw/zcfg/list.shtml>. Health Commission, PRC. The general office of the national health commission launched a new type of medical institutions Notification of requirements for nucleic acid testing of coronavirus [national health office medical letter (2020) No. 53] [EB/OL]. (2020-01-15). <http://www.nhc.gov.cn/wjw/zcfg/list.shtml>.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国家卫生健康委办公厅关于印发新型冠状病毒实验室生物安全指南 (4版) 的通知. 附件4 新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南. 国卫办疾控函〔2020〕109号 [EB/OL]. (2020-02-06). <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/07/content.5475813.html>. Health Commission, PRC. Notice of novel coronavirus laboratory biosafety guideline (Fourth Edition) issued by the general office of the national health and Health Committee. Annex 4 novel coronavirus infection laboratory guidelines for pneumonia detection, [2020]109, CDC [EB/OL]. (2020-02-06). <http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/07/content.5475813.html>.
- [4] Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR-Protocol and preliminary evaluation as of Jan 17, 2020. Charite Virology, Berlin, Germany. Berlin, Jan 17th, 2020
- [5] 国家卫生健康委办公厅, 国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第五版) [OB/OL]. (2020-02-04) [2020-02-06]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-06/12847.html>. National Health Commission of the PRC, National Administration of Traditional Chinese Medicine. Novel coronavirus pneumonia diagnosis and treatment plan (trial version 5) [OB/OL]. (2020-02-04) [2020-02-06]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewenjian/2020-02-06/12847.html>.
- [6] 童伟, 陈登奕, 陈俊文, 等. 2019-nCoV 总抗体两种免疫学检测方法的应用评价 [J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35 (2): 80-82. TONG Wei, CHEN Dengyi, CHEN Junwen, et al. Application evaluation of two immunological detection methods of 2019 nCoV specific antibodies [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35 (2): 80-82.
- [7] ZHANG Wei, DU Ronghui, LI Bei, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes [J]. Emerg Microbes & Infections. 2020, 9(1): 386-389.
- [8] 李宝林, 李芹, 吴刚, 等. 15例 COVID-19 患者治疗后痰、粪便标本新型冠状病毒核酸检测结果比较 [J]. 中国感染控制杂志. 2020, 19(3): 239-244. LI Baolin, LI Qin, WU Gang, et al. Comparison of 2019-nCoV test results of sputum and fecal specimens of 15 patients with COVID-19 after treatment [J]. Chin J Infect Control. 2020, 19(3): 239-244.
- [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检测性能比较与分析 [J]. 重庆医学, 2020, 49(2020-02-28). <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182786.html>. GUO Yuanyuan, WANG Kun, ZHANG Yu, et al. Comparison and analysis of the detection performance of six new coronavirus nucleic acid detection reagents [J]. Chongqing Medical. 2020, 49(2020-02-28). <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182786.html>.

收稿日期: 2020-05-19  
修回日期: 2020-05-26

#### (上接 86 页)

- [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检测性能比较与分析 [J]. 重庆医学: 2020, 49(2020-02-28): DOI:10.3760/cma.j.issn.9999-998X.2020.0023. GUO Yuanyuan, WANG Kun, ZHANG Yu, et al. Comparison and analysis of the detection performance of six new coronavirus nucleic acid detection reagents [J]. Chongqing Medicine: 2020, 49(2020-02-28): DOI:10.3760/cma.j.issn.9999-998X.2020.0023.
- [10] MO Hongying, ZENG Guangqiao, REN Xiaolan, et al. Longitudinal profile of antibodies against SARS-coronavirus in SARS patients and their clinical significance [J]. Respirol, 2006, 11(1): 49-53.
- [11] ZHANG Wei, DU Ronghui, LI Bei, et al. Molecular and serological investigation of 2019-nCoV infected patients: implication of multiple shedding routes [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 386-389.
- [12] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案 (试行第五版) [EB/OL]. (2020-02-05). <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202002/3b09b894ac9b4204a79db5b8912d4440/files/7260301a393845fc87fc6dd52965ecb.pdf>.

收稿日期: 2020-03-25  
修回日期: 2020-04-26