

# 探讨新型冠状病毒核酸采样管、提取体系与扩增试剂匹配性的重要性

邓文华 陈梅英 邓巧芳 易小青

(龙岩市第二医院分子生物实验室 福建龙岩 364000)

**【摘要】**目的:探讨分析新型冠状病毒核酸的采样管、提取体系与扩增试剂的匹配性的重要性。方法:分别使用达安基因的采样管与广东阳光的采样管对我院康山医院37例阳性确诊患者进行采样,采用达安基因的提取体系进行核酸提取,最后分别匹配达安基因扩增试剂、上海之江扩增试剂与重庆中元扩增试剂进行交叉扩增,交叉扩增组合分别是A组(达安采样管+达安扩增试剂)、B组(达安采样管+之江扩增试剂)、C组(达安采样管+中元扩增试剂)、D组(广东阳光采样管+达安扩增试剂)、E组(广东阳光采样管+之江扩增试剂)、F组(广东阳光采样管+中元扩增试剂),比较检测结果的差异从而分析检测结果。结果:A、B、C组结果均为阳性,阳性检出率100%(13/13),结果无统计学差异;而对24份确诊病例采用了广东阳光的采样管采集和达安基因的提取系统,3种的扩增试剂进行检测,其中提取系统与扩增试剂为达安基因品牌的D组阳性检出率仍为100%(24/24),而E组的阳性检出率87.5%(21/24),F组的阳性检出率66.67%(16/24),D组和E组的阳性检出率、E组和F组的阳性检出率均无统计学差异( $P > 0.05$ ),D组和F组的阳性检出率有统计学差异( $P < 0.05$ );一致性程度由高到低:D组和E组  $>$  E组和F组  $>$  D组和F组。结论:采样管、提取试剂与扩增试剂的匹配性对实验结果有一定的影响,同一个品牌的试剂耗材配套匹配使用效果最佳,各检测机构在使用不同品牌的试剂耗材时一定要做好性能验证和匹配性验证,以确保检测结果的准确性。

**【关键词】**新型冠状病毒核酸;匹配性;交叉扩增

## The importance of matching the sampling tube, extraction system and amplification reagent was investigated

Deng Wenhua Chen Meiyang Deng Qiaofang Yi Xiaoqing

(Molecular Biology Laboratory, Longyan Second Hospital, Fujian Longyan 364000)

**[Abstract]** Objective To explore the importance of matching the sampling tube, extraction system and amplification reagent of novel coronavirus nucleic acid. Methods 37 positive patients in Kangshan Hospital were sampled using the sampling tubes of Daan Gene and Guangdong Sunshine, Nucleic acid extraction was performed using the extraction system of the Daan gene, Finally, daan gene amplification reagent, Shanghai Zhijiang amplification reagent and Chongqing Zhongyuan amplification reagent were matched for cross-amplification, Cross amplification combination is group A (Ann sampling tube + Ann amplification reagent), group B (Ann sampling tube + jiang amplification reagent), group C (Ann sampling tube + yuan amplification reagent), group D (Guangdong sunshine sampling tube + Ann amplification reagent), group E (Guangdong sunshine sampling tube + jiang amplification reagent), group F (Guangdong sunshine sampling tube + yuan amplification reagent), Compare the differences in the test results and thus analyze the test results. Results in groups A, B and C were positive, Positive detection rate is 100% (13 / 13), There was no statistical difference in the results; For 24 confirmed cases, the sampling tube collection and da'an gene extraction system were used, Three amplification reagents were tested, Among them, the positive detection rate of D group with Daan gene brand is still 100% (24 / 24), While the positive detection rate in group E was 87.5% (21 / 24), The positive detection rate in group F was 66.67% (16 / 24), There was no statistical difference between groups D and E, or between groups E and F ( $P > 0.05$ ), and between groups D and F ( $P < 0.05$ ); The degree of consistency ranged from high to low: groups D and E  $>$  E and F  $>$  D and F. Conclusion The matching of sampling tube, extraction reagent and amplification reagent has a certain impact on the experimental results. The matching effect of reagent consumables of the same brand has the best effect. Each testing institutions must do a good job of performance verification and matching verification when using reagent consumables of different brands, so as to ensure the accuracy of the test results.

**[Key words]** Novel coronavirus nucleic acid; matching; , cross amplification

2019年12月以来,湖北省武汉市陆续发现了多例新型冠状病毒(2019-nCoV)的肺炎患者。通过基因测序证实,新型冠状病毒病原学为一种新型 $\beta$ 属冠状病毒[1]。随着疫情的发展,新冠核酸检测成为了疫情防控工作中一项非常重要的环节。影响核酸检测结果准确性的因素很多,包括了核酸检测前、中、后阶段质量控制,只有把控好各方面因素,才能做到精准检测、不漏检、不错检[2]。但是临床上暴露出新新冠核酸检测的假阳性假阴性问题,对于检测的全过程的质量把控,就成为了我们实验室管理的重中之重,我们通过不同

品牌的采集管、提取系统、扩增试剂进行交叉检测,根据结果的对比分析,评价核酸检测的整套体系的匹配性的重要性,供实验室作为参考,尽可能减少核酸检测的错误率、漏检率。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本来源

收集本院2021年11月25日,11月26日两天共37例

确诊新冠患者的的鼻咽拭子标本。

### 1.2 仪器、耗材和试剂

灭活型采样管（中山达安基因有限公司），灭活型采样管（广东阳光生物科技有限公司），全自动核酸提取仪 Stream SP96（中山达安基因有限公司）及配套提取试剂，实时荧光定量 PCR 扩增仪（上海宏石），2019-nCoV 核酸检测试剂盒（中山达安公司）批号：20220090，2019-nCoV 核酸检测试剂盒（上海之江公司）批号：20220321，2019-nCoV 核酸检测试剂盒（重庆中元公司）批号：5203038。

### 1.3 方法

1.3.1 核酸采样 分别用 a1 采样管对 13 例确诊病例进行鼻咽部采样，d 采样管对 24 例确诊病例进行鼻咽部采样。

1.3.2 RNA 的提取 采用达安全自动提取仪（提取试剂批

号 2022207，磁珠法）严格按照说明书进行提取。

### 1.4 统计学方法

本研究数据采用 SPSS 进行分析，不同组之间的差异性的比较采用卡方检验， $P < 0.05$  为差异有统计学意义，一致性的比较采用 Kappa 检验。

## 2 结果

### 2.1 3 种试剂的基本资料

中山达安试剂、上海之江试剂和重庆中元试剂 3 种试剂的基本情况见表 1

表 1 3 种扩增试剂的基本情况

试剂	检测基因	RNA 量 ( $\mu\text{l}$ )	荧光检测和 扩增循环数	结果判读		检测下限 (copies/ml)	是否含内标
				阳性	阴性		
达安	ORF1ab、N	20	55 $^{\circ}\text{C}$ ，45 循环	CT值 $\leq$ 40	CT值 $>$ 40	100	有
之江	RdRp、E、N	5	58 $^{\circ}\text{C}$ ，45 循环	CT值 $\leq$ 43	CT值 $>$ 43	500	有
中元	ORF1ab、N	10	58 $^{\circ}\text{C}$ ，45 循环	CT值 $\leq$ 40	CT值 $>$ 40	200	有

### 2.2 6 种组合交叉实验的结果

对 13 份确诊病例采用达安基因的采样管、提取系统分别进行 3 种扩增试剂的检测，结果均为阳性，阳性检出率 100% (13/13)，结果无差异；而对 24 份确诊病例采用了广东阳光的采样管采集和达安基因的提取系统提取核酸，分别用 3 种的扩增试剂进行检测，结果有差异；其中提取系统与

扩增试剂为达安基因品牌的 D 组阳性检出率仍为 100% (24/24)，而 E 组的阳性检出率 87.5% (21/24)，F 组的阳性检出率 66.67% (16/24)，详细情况见表 2；通过卡方检验，D 组和 E 组的阳性检出率、E 组和 F 组的阳性检出率均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )、D 组和 F 组的阳性检出率有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

表 2 6 组交叉实验的结果

组合类型	标本数量	阳性	阴性	阳性检出率
A组	13	13	0	100%
B组	13	13	0	100%
C组	13	13	0	100%
D组	24	24	0	100%
E组	24	21	3	87.5%
F组	24	16	8	66.67%

### 2.3 6 种组合交叉实验的结果的一致性

使用的采样管为广东阳光品牌时，A、B、C 组检测体系同时检测 13 例标本，阳性检出率均为 100%，无差异性。使用的采样管为达安基因品牌时，检测 24 例标本，D 组的

阳性检出率为 100%，E 组的阳性检出率为 87.5%，F 组的阳性检出率为 66.67%；其中 E 组 21 例阳性检出中有 3 例为单基因未检出，根据试剂说明书两个基因检出则可判读为阳性，3 例阴性均为单基因检出；结果详情见表 3、表 4[3]。

表 3 采样管为达安基因的 3 组详细结果

A组			B组				C组		
lab	N	结果	RDRP	N	E	结果	lab	N	结果
21.98	19.71	阳性	22.24	21.54	21.31	阳性	19.76	19.95	阳性
21.34	20.31	阳性	21.19	21.70	20.82	阳性	18.92	20.24	阳性
18.79	16.35	阳性	20.66	19.86	18.90	阳性	16.32	16.27	阳性
19.40	16.35	阳性	20.66	20.76	19.42	阳性	17.15	18.14	阳性
20.34	17.20	阳性	21.57	19.75	20.53	阳性	18.17	17.22	阳性
23.92	22.72	阳性	25.23	26.57	24.94	阳性	21.81	23.11	阳性
24.41	22.41	阳性	25.81	25.32	25.10	阳性	21.91	21.44	阳性
18.33	16.56	阳性	19.49	19.19	19.31	阳性	16.08	16.67	阳性
21.02	20.22	阳性	22.24	22.99	21.63	阳性	18.94	20.09	阳性
19.15	19.01	阳性	21.19	21.44	20.92	阳性	16.99	19.05	阳性
27.16	26.30	阳性	29.12	28.82	28.69	阳性	24.82	26.41	阳性
17.65	15.29	阳性	19.08	18.15	18.47	阳性	16.02	15.77	阳性
35.44	35.37	阳性	36.37	37.35	37.25	阳性	33.14	33.26	阳性

表4 采样管为广东阳光的3组详细结果

D组			E组				F组		
lab	N	结果	RDRP	N	E	结果	lab	N	结果
34.16	32.03	阳性	43.54	35.66	—	阴性	33.18	33.03	阳性
32.73	32.05	阳性	36.89	36.34	37.00	阳性	30.14	32.15	阳性
34.08	33.16	阳性	—	41.05	—	阴性	—	—	阴性
23.57	24.01	阳性	29.82	28.44	27.57	阳性	—	—	阴性
32.17	31.44	阳性	39.82	38.66	—	阳性	—	—	阴性
34.32	34.26	阳性	—	39.32	—	阴性	31.40	32.78	阳性
18.85	17.58	阳性	21.46	20.21	21.76	阳性	15.82	17.07	阳性
29.64	27.93	阳性	38.22	37.73	38.65	阳性	27.19	28.65	阳性
19.61	19.40	阳性	24.42	25.37	25.95	阳性	17.48	19.49	阳性
31.64	29.39	阳性	40.59	38.06	—	阳性	—	—	阴性
20.13	19.36	阳性	25.74	24.96	25.74	阳性	—	—	阴性
29.16	28.17	阳性	39.83	38.12	38.06	阳性	27.19	28.23	阳性
24.83	24.21	阳性	26.27	27.84	26.70	阳性	23.03	24.88	阳性
14.41	13.72	阳性	24.22	23.01	21.27	阳性	20.61	21.34	阳性
19.28	18.83	阳性	25.27	24.81	26.40	阳性	—	—	阴性
20.91	20.00	阳性	23.60	23.11	22.54	阳性	18.72	20.14	阳性
20.13	19.37	阳性	22.89	22.36	21.80	阳性	17.58	19.55	阳性
20.48	19.87	阳性	23.85	22.72	22.11	阳性	—	—	阴性
20.40	20.14	阳性	24.54	23.77	23.59	阳性	18.32	20.14	阳性
17.34	16.95	阳性	21.44	21.13	20.98	阳性	15.25	17.05	阳性
22.45	21.80	阳性	27.54	27.79	26.42	阳性	20.08	21.38	阳性
16.39	14.90	阳性	22.33	21.64	21.68	阳性	14.78	15.66	阳性
27.48	26.75	阳性	37.34	37.94	38.00	阳性	26.03	27.84	阳性
35.48	33.76	阳性	39.27	41.34	—	阳性	—	—	阴性

### 3、讨论

本研究结果显示,使用达安基因的采样管和提取体系时,用3种检测试剂对13例确诊阳性病例进行核酸检测,结果均为检出阳性,结果无差异性[4]。原因可能是同品牌的采样管与提取系统适配性最佳,因此提取效果也是最佳;三种检测试剂的ct值有差异,这个可能和检测试剂的检测下限、精密度、核酸加样量等有关。而使用广东阳光的采样管对24例确诊阳性病例进行采样,当提取系统与检测试剂为同品牌的条件下,检测结果为24例全部阳性检出,结果仍准确可靠,原因可能是同品牌的提取试剂和检测试剂在研发

时做了性能调试,适配性好。而使用与提取系统不同品牌的检测试剂时,其中上海之江试剂的结果出现3例阴性,3例单基因未检出,重庆中元试剂的结果出现8例阴性;分析原因考虑是采样管与提取系统、检测试剂均为不同品牌,造成提取出来的核酸质量无法保证,与检测试剂适配性较差,无法保证结果的可靠性[5]。检测试剂说明书也是要求尽量使用同品牌的核酸提取试剂,方可达到最佳检测效果。

随着PCR技术的发展,核酸检测技术的成熟,数字PCR也逐渐投入使用,有望为新型冠状病毒核酸检测提供更好更快更准的检测手段。

### 参考文献:

- [1] 阚丽娟, 陈大洋, 莫红梅, 等. 新型冠状病毒核酸检测的主要影响因素及控制措施[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(3): 223-225.
- [2] 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) 020-02-06]. <http://bgs.satcm.gov.cn/zhengcewnjian/2020-02-06/12847.html>.
- [3] 安钢力, 实时荧光定量PCR技术的原理及其应用[J]. 中国现代教育装备, 2018, (21): 19-21. DOI: 10.13492/j.cnki.cmee.20181120.002.
- [4] 段秀枝, 王旭楚, 俞攀, 等. 病毒灭活处理对2019新型冠状病毒核酸检测弱阳性结果的影响[J/O/L]. 中华检验医学杂志[2020-03-09]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1184369.htm>.
- [5] 钟慧瑜, 赵珍珍, 宋兴勃, 等. 新型冠状病毒核酸临床检测要点及经验[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(05): 523-526. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.05.003.

作者简介: 邓文华, 男, 1990年出生, 广东湛江, 本科, 龙岩市第二医院, 主管技师, 从事临床分子生物学检验。

陈梅英, 女, 1973年出生, 福建龙岩, 大专, 龙岩市第二医院, 副主任技师, 从事临床分子生物学检验。

邓巧芳, 女, 1997年出生, 福建龙岩, 本科, 龙岩市第二医院, 检验师, 从事临床分子生物学检验。

易小青, 女, 1995年出生, 福建龙岩, 本科, 龙岩市第二医院, 检验师, 从事临床分子生物学检验。