

• 生物技术与方法 •

# 呼吸道病毒核酸快速检测方案的建立与应用

黄媛媛<sup>1</sup>, 王宇<sup>2</sup>, 周承星<sup>1</sup>, 周志超<sup>3</sup>, 周炳亮<sup>1</sup>, 刘文宽<sup>4</sup>, 周荣<sup>2\*</sup>, 曹虹<sup>1\*</sup>

1 南方医科大学公共卫生学院微生物学系 广东省热带病研究重点实验室, 广东 广州 510515

2 广州实验室, 广东 广州 510005

3 南方医科大学公共卫生学院放射医学系, 广东 广州 510515

4 广州医科大学 呼吸疾病国家重点实验室 广州医科大学附属第一医院, 广东 广州 510120

黄媛媛, 王宇, 周承星, 周志超, 周炳亮, 刘文宽, 周荣, 曹虹. 呼吸道病毒核酸快速检测方案的建立与应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(9): 3838-3848.

HUANG Yuanyuan, WANG Yu, ZHOU Chengxing, ZHOU Zhichao, ZHOU Bingliang, LIU Wenkuan, ZHOU Rong, CAO Hong. Development and application of a rapid scheme for detection of respiratory virus nucleic acid[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(9): 3838-3848.

**摘要:** 本研究旨在建立一套便携、准确、操作简便的呼吸道病毒核酸快速检测方案。通过实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)验证免提取的呼吸道病毒处理试剂(extraction-free respiratory virus treatment reagent, RTU)对病毒核酸处理的效果以及超快速荧光定量 PCR 仪(FQ-8A)对核酸扩增的效果; 将 RTU 和 FQ-8A 结合构建呼吸道病毒核酸快速检测方案, 通过荧光定量 PCR 仪中  $C_t$  值判断阳性检出率, 以验证该方案检测临床样本时的准确性。结果表明, RTU 与全自动核酸提取仪在提取效果上灵敏度相当; RTU 在提取不同病毒类型样本时, 与其他 3 种提取方法效果相当, 但 RTU 提取时间少于 5 min; FQ-8A 检测呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)及腺病毒(adenovirus, ADV)与对照仪器 ABI-7500 具有良好一致性, kappa 系数分别为 0.938 ( $P < 0.001$ )和 0.887 ( $P < 0.001$ ), 但 FQ-8A 耗时更短, 扩增时间仅在 0.5 h 左右; RTU 和 FQ-8A 相结合的快检方案与常规检测方案具有高度一致的检出率, 其灵敏度为 91.70%, 特异度为 100%, kappa 系数为 0.944 ( $P < 0.001$ )。总之, 通过 RTU 与 FQ-8A 的结合构建了一套可在 35 min 内完成全部流程的呼吸道病毒核酸快速检测方案。该方案准确性高、操作简便, 可为呼吸道病毒快速诊断和治疗提供重要支持。

**关键词:** 呼吸道病毒; 快速检测; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 免提取呼吸道病毒处理试剂

资助项目: 广东省重点领域研发计划项目(2022B1111020003); 广州实验室应急攻关项目(EKPG21-13)

This work was supported by the Research and Development Project in the Key Areas of Guangdong Province (2022B1111020003) and Emergency Key Program of Guangzhou Laboratory (EKPG21-13).

\*Corresponding authors. E-mail: CAO Hong, gzhcao@smu.edu.cn; ZHOU Rong, zhou\_rong@gzlab.ac.cn

Received: 2022-11-24; Accepted: 2023-03-03; Published online: 2023-03-14

# Development and application of a rapid scheme for detection of respiratory virus nucleic acid

HUANG Yuanyuan<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, ZHOU Chengxing<sup>1</sup>, ZHOU Zhichao<sup>3</sup>, ZHOU Bingliang<sup>1</sup>, LIU Wenkuan<sup>4</sup>, ZHOU Rong<sup>2\*</sup>, CAO Hong<sup>1\*</sup>

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, Department of Microbiology, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

2 Guangzhou Laboratory, Guangzhou 510005, Guangdong, China

3 Department of Radiation Medicine, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

4 State Key Laboratory of Respiratory Disease, The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, Guangdong, China

**Abstract:** This study aimed to develop a portable, accurate and easy-to-operate scheme for rapid detection of respiratory virus nucleic acid. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to verify the effect of extraction-free respiratory virus treatment reagent (RTU) on viral nucleic acid treatment and the effect of ultra-fast fluorescence quantitative PCR instrument (FQ-8A) on nucleic acid amplification, respectively. RTU and FQ-8A were combined to develop a rapid detection scheme for respiratory virus nucleic acid, and the positive detection rate was judged by  $C_t$  value using a fluorescence quantitative PCR instrument, and the accuracy of the scheme in clinical samples detection was investigated. The results showed that RTU had comparable sensitivity to the automatic nucleic acid extraction instrument, its extraction efficiency was comparable to the other 3 extraction methods when extracting samples of different virus types, but the extraction time of RTU was less than 5 min. FQ-8A had good consistency in detection respiratory syncytial virus (RSV) and adenovirus (ADV) compared with the control instrument ABI-7500, with kappa coefficients of 0.938 ( $P < 0.001$ ) and 0.887 ( $P < 0.001$ ), respectively, but the amplification time was only about 0.5 h. The RTU and FQ-8A combined rapid detection scheme had a highly consistent detection rate with the conventional detection scheme, with a sensitivity of 91.70% and specificity of 100%, and a kappa coefficient was 0.944 ( $P < 0.001$ ). In conclusion, by combining RTU with FQ-8A, a rapid respiratory virus nucleic acid detection scheme was developed, the whole process could be completed in 35 min. The scheme is accurate and easy-to-operate, and can provide important support for the rapid diagnosis and treatment of respiratory virus.

**Keywords:** respiratory virus; rapid detection; quantitative real-time polymerase chain reaction; extraction-free respiratory virus treatment reagent (RTU)

呼吸道病毒一直以来都是引发全球性疾病大流行的主要因素之一<sup>[1-2]</sup>。例如,新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)从 2019 年暴发至今,全球感染

总数已超过 5.7 亿人<sup>[3]</sup>。常见的呼吸道病毒还包括:呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)、腺病毒(adenovirus, ADV)和流感病毒(influenza virus, FluV)等<sup>[4-5]</sup>。根据临床症状显示,

感染呼吸道病毒后, 从轻症到重症的表现都非常相似, 因此需要对所感染的病毒进行鉴别诊断<sup>[6]</sup>。实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)是一种基于特异性引物和探针的实验室诊断技术, 因其具有超高的灵敏度和特异性, 是诊断许多病毒感染的金标准<sup>[7-9]</sup>。然而, 普通 qRT-PCR 过程耗时长, 荧光定量 PCR 仪又多为大型精密仪器, 对实验环境要求高, 因此无法满足临床和基层对核酸检测快速、简便和准确的要求<sup>[10]</sup>。

近年来, 关于即时检测(point-of-care testing, POCT)的应用越来越多<sup>[11-12]</sup>。其中, 基于检测核酸的 POCT 以等温扩增和微流控芯片为主<sup>[13-14]</sup>, 但是多数 POCT 需要进行额外的核酸提取<sup>[9]</sup>。本实验室发明了一种免提取的呼吸道病毒处理试剂 RTU, 与常规的病毒转运培养基(viral transport medium, VTM)相比, 呼吸道病毒处理试剂(extraction-free respiratory virus treatment reagent, RTU)能灭活包膜病毒, 因而能将样本在常温下储存和运输。并且本试剂不仅操作简便, 还能在 5 min 内完成核酸的释放, 获取的样本可直接当作模板进行 PCR 扩增。本实验室还研发了一款小型的荧光定量 PCR 仪 FQ-8A, 它采用大温差模块变温技术结合高效 Peltier 控温, 实现了反应体系超快速升降温<sup>[15]</sup>。因此, 在相同的程序下, FQ-8A 比常规荧光定量 PCR 仪耗时更短, 这使得 FQ-8A 能够作为实现 POCT 的有效工具。

本研究将通过免提取呼吸道病毒处理试剂和超快速荧光定量 PCR 仪 FQ-8A 相结合的方式, 构建一套呼吸道病毒核酸快速检测方案, 旨在推动快速诊断检测应用于基层、海关、车站等场景, 促进快速 POCT 真正意义上的应用落地。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒培养物、细胞和临床样本

RSV 和 ADV4 型(ADV4)均由本实验室保存和提供, 新冠假病毒购自圣湘生物科技有限公司, 人喉癌上皮细胞 Hep2 由本实验室提供。

临床样本由金城医学检验中心及广州医科大学附属第一医院检验科提供。其中, 金城医学检验中心提供 RSV 相关阳性和阴性冻存样本 209 例, ADV 相关阳性和阴性冻存样本 221 例。广州医科大学附属第一医院检验科提供 102 例呼吸道病原体临床样本, 包括鼻病毒(rhinovirus, RhV)、3 种人冠状病毒(human coronaviruses, HCoV)(HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1)、人副流感病毒 1 型(human parainfluenza virus type 1, HPIV-1)、肺炎衣原体(chlamydia pneumoniae, CP)、人肠道病毒(enterovirus, EV)和 RSV。

### 1.2 试剂和仪器

SARS-CoV-2 检测试剂购自圣湘生物科技股份有限公司。RhV1/2、3 种 HCoV、HPIV-1、CP、EV、RSV 和 ADV 检测试剂均由广州呼研所医药科技有限公司提供。磁珠法核酸提取试剂盒分别购自朗司医疗科技有限公司和上海科华生物工程股份有限公司, ABC 法核酸提取试剂购自广东和信健康科技有限公司, 离心柱法核酸提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司, 免提取法呼吸道病毒处理试剂 RTU 由本课题组自研。以上所有核酸提取试剂, 均依据说明书进行核酸提取。

全自动核酸提取仪(朗司医疗科技有限公司); 荧光定量 PCR 仪 ABI-7500 (Applied Biosystems)、FQ-8A [呼研所生物安全科技(广州)股份有限公司]、SLAN-96P (上海宏石医疗科技有限公司)均由本实验室提供。

### 1.3 核酸提取和 RTU 处理

在处理模拟样本时,将进行 5 倍梯度稀释的等体积病毒或假病毒培养物与阴性咽拭子分别加入到 2 mL RTU 和 2 mL PBS 中。RTU 中的样本振荡混匀 10 s 后静置 1 min,从中取出 100  $\mu$ L 加入到含 0.5 mg 螯合树脂的 0.5 mL EP 管中,放置于 80  $^{\circ}$ C 金属浴中温浴 2 min,取出待其恢复室温后使用。PBS 中的样本,分别取 100  $\mu$ L 用磁珠法、离心柱法和 ABC 法进行核酸提取,并均使用 100  $\mu$ L 洗脱液收集核酸。

在处理 RSV 病毒培养物时,将 25  $\mu$ L 样本加入到 100  $\mu$ L 的 RTU 试剂中,振荡混匀 10 s 后静置 1 min,加入到含 0.5 mg 螯合树脂的 0.5 mL EP 管中,放置于 80  $^{\circ}$ C 金属浴中温浴 2 min,取出待其恢复室温后使用。随后,另取 25  $\mu$ L 样本使用朗司核酸提取仪提取,并使用 100  $\mu$ L 洗脱液收集核酸。

在处理临床样本时,取等体积同一样本分别加入到 2 mL RTU 和 2 mL VTM 中。RTU 中的样本振荡混匀 10 s 后静置 1 min,从中取出 100  $\mu$ L 加入到含 0.5 mg 螯合树脂的 0.5 mL EP 管中,放置于 80  $^{\circ}$ C 金属浴中温浴 2 min,取出待其恢复室温后使用。VTM 中的样本,取 100  $\mu$ L 用 ABC 法进行核酸提取,并使用 100  $\mu$ L 洗脱液收集核酸。

### 1.4 实时荧光定量 PCR

分别使用 SLAN-96P、ABI-7500 和 FQ-8A 进行 qRT-PCR 实验。圣湘新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂在 SLAN-96P 上扩增程序为: 50  $^{\circ}$ C 30 min; 95  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s 采集荧光,共循环 45 次。RSV 检测试剂在 SLAN-96P 或 ABI-7500 上进行扩增,扩增程序为: 48  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 2 min, 94  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 35 s 采集荧光信号,共 40 个循环;在 FQ-8A 上使用优化的扩增程序: 48  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 20 s,

94  $^{\circ}$ C 1 s, 55  $^{\circ}$ C 14 s, 收集荧光信号,循环 40 次。ADV 检测试剂在 SLAN-96P 或 ABI-7500 上程序设置为: 94  $^{\circ}$ C 2 min; 94  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 35 s, 收集荧光信号,循环 40 次;在 FQ-8A 上使用优化的扩增程序: 94  $^{\circ}$ C 20 s, 94  $^{\circ}$ C 1 s, 65  $^{\circ}$ C 14 s, 收集荧光信号,循环 40 次。各试剂均使用 TaqMan 探针法进行 qRT-PCR 反应,反应体系参照各产品说明书,当模板使用 RTU 处理样本时,模板体积为整个反应体系的 1/10,若要求上样体积大于 1/10,则只加入总体积 1/10 的 RTU 样本,其余的部分用 DEPC 水补充。

### 1.5 数据分析

圣湘新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒中, FAM 检测 *orf1ab* 基因, ROX 检测 *n* 基因, HEX/VIC 检测内标 *rnase p* 基因。若 FAM 或 ROX 通道检测到典型的扩增曲线,且  $C_t \leq 40$ , 则报告为 2019-nCoV 病毒阳性;若 FAM 或 ROX 通道检测不到典型的扩增曲线,或  $C_t > 40$ , 同时 HEX/VIC 通道有扩增曲线,且  $C_t \leq 40$ , 则报告结果为阴性。RSV 或 ADV 检测试剂盒中, FAM 分别检测 RSV 或 ADV 的病毒基因,若 FAM 通道检测到典型的扩增曲线,且  $C_t \leq 35$ , 则报告为 RSV 或 ADV 病毒阳性。

使用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计分析。两组间做比较时,使用 *t* 检验分析显著性差异,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。评估仪器和检测体系的性能,分别计算它们的灵敏度和特异性,用 Cohen Kappa 系数(k)来评价两种方法之间的一致性水平,其中  $k=1$ , 两次的结果完全一致;  $k=-1$ , 两次的结果完全不一致;  $k > 0$  时有统计学意义,  $k$  值越大一致性越好<sup>[16]</sup>。

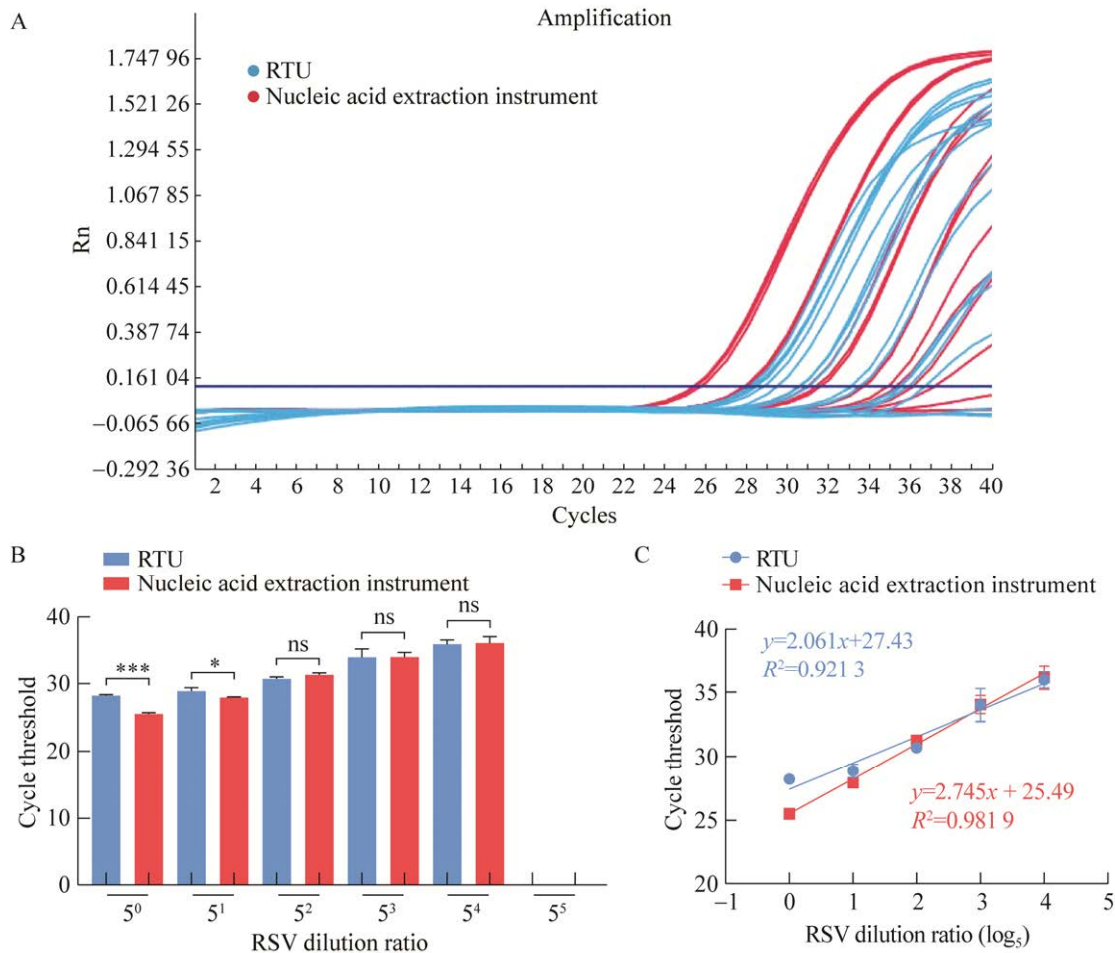
## 2 结果与分析

### 2.1 RTU 的灵敏度检测

将 RSV 病毒培养物进行梯度稀释后,分别

用 RTU 和全自动核酸提取仪获得目标核酸, 并通过 qRT-PCR 检测各稀释度下的  $C_t$  值。结果显示 RTU 或全自动核酸提取仪获取的核酸在不同浓度下均有明显的梯度曲线(图 1A)。在提取原浓度的 RSV 病毒时, RTU 提取效果相较于全自动核酸提取仪高约 3 个  $C_t$ , 但随着 RSV 的梯度

稀释, RTU 的提取效果逐渐与全自动核酸提取仪持平, 当 RSV 稀释到  $5^5$  倍时, 两种方法均检测不到  $C_t$  值(图 1B)。绘制回归曲线看到, 全自动核酸提取仪得到的回归直线拟合度更好, RTU 得到的高浓度  $C_t$  值分布回归直线两端, 中低浓度  $C_t$  值则坐落于直线上(图 1C)。说明 RTU



**图 1 RTU 的灵敏度验证** 使用 PBS 对 RSV 进行 5 倍梯度稀释, 每个梯度分别使用 RTU 或全自动核酸提取仪提取, 每个梯度各提取 3 个样本, 通过  $C_t$  值来判读 RTU 处理效果。A: 检测 RSV 的荧光扩增曲线图。B: 不同稀释度下检测 RSV 的  $C_t$  值比较。C: RTU 和核酸提取仪处理 5 倍梯度稀释 RSV 的标准曲线。使用  $t$  检验进行统计学分析, ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

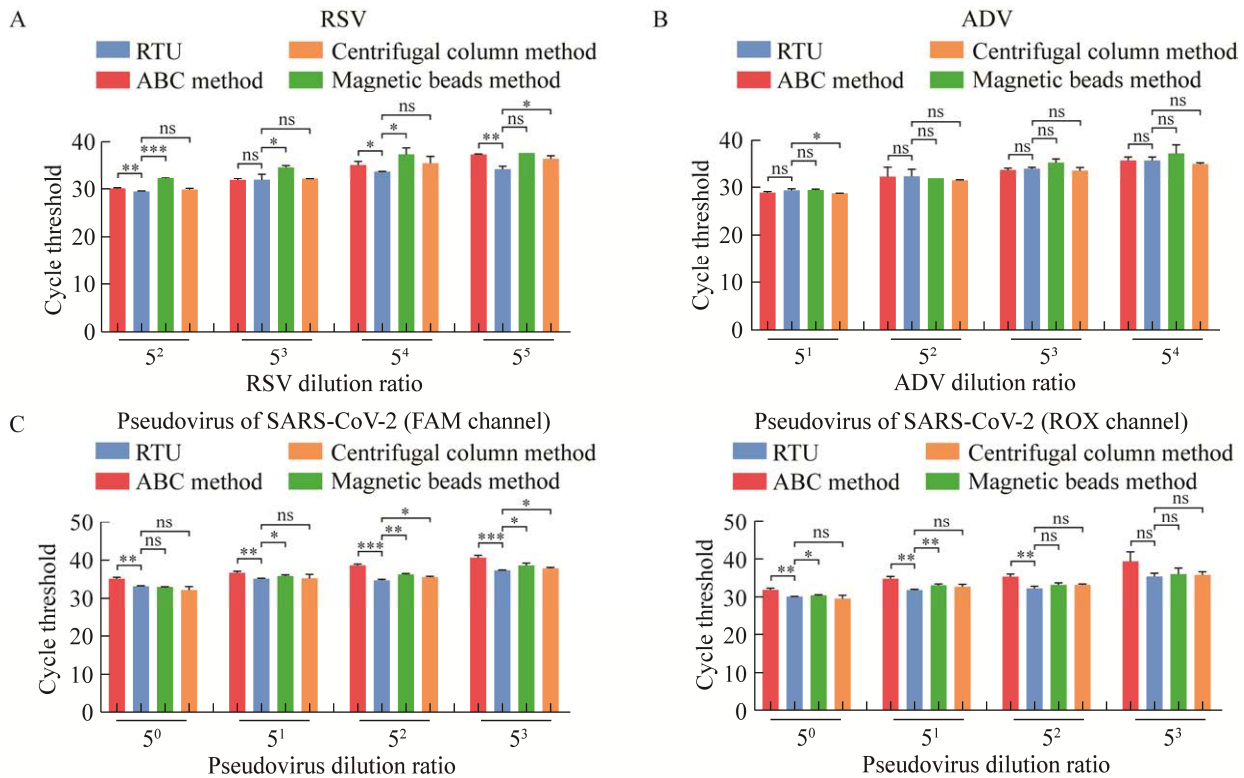
Figure 1 RTU sensitivity verification. RSV was diluted by 5 times gradient using PBS, and each gradient was separately treated by RTU or nucleic acid extraction instrument. Three samples were extracted from each gradient,  $C_t$  values were used to judge the treatment effect of RTU. A: Fluorescence amplification curve of RSV. B: Comparison of  $C_t$  values of RSV in different dilution. C: Standard curves of 5-fold diluted RSV treated with RTU and nucleic acid extraction instrument. The statistical significances were calculated by  $t$  test, ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

处理中低浓度样本时,与全自动核酸提取仪的检测灵敏度相当。

## 2.2 RTU 与常规核酸提取方法在不同呼吸道病毒样本上的比较

用 RTU、ABC 法、磁珠法和离心柱法提取含不同浓度的呼吸道病毒的咽拭子样本。通过

qRT-PCR 检测到的 Ct 值分析发现,对于 RSV 咽拭子样本,在各个浓度下,RTU 和离心柱法的处理效果均较好,磁珠法和 ABC 法的效果则略差一些(图 2A)。对于 ADV4 咽拭子样本,这 4 种提取方法在各浓度下的处理效果均接近一致(图 2B)。对于 SARS-CoV-2 假病毒咽拭子样



**图 2 RTU 处理不同类型病毒的效果** 将含有等量 RSV、ADV4 和 SARS-CoV-2 假病毒的咽拭子分别放入到 RTU 和 PBS 溶液中,再分别使用 RTU、ABC 法、磁珠法和离心柱法提取核酸。每个梯度浓度的病毒样本均使用 4 种方法重复提取 3 次。A: 比较不同提取方法处理 RSV 咽拭子样本, FAM 通道检测 RSV。B: 比较不同提取方法处理 ADV 咽拭子样本, FAM 通道检测 ADV。C: 比较不同提取方法处理 SARS-CoV-2 假病毒咽拭子样本, FAM 通道检测 *orf1ab* 基因, ROX 通道检测 *n* 基因。使用 *t* 检验进行统计学分析, ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$

Figure 2 The effect of the RTU on different types of viruses. Throat swabs containing RSV, ADV4 and SARS-CoV-2 pseudoviruses were homogenized and placed into RTU or PBS solutions. Nucleic acid was extracted by RTU, ABC, magnetic beads and centrifugal column methods, respectively. 4 extraction methods were used for each gradient virus concentration sample, and 3 replicated were performed. A: Comparison of the effect of different extraction methods in RSV-containing throat swabs, FAM channel for RSV detection. B: Comparison of the effect of different extraction methods in pharyngeal swab containing ADV. FAM channel was used to detect ADV4. C: Comparison of the effect of different extraction methods in pharyngeal swabs containing SARS-CoV-2 pseudovirus. FAM channel was used to detect the *orf1ab* gene, and ROX channel was used to detect the *n* gene. The statistical significances were calculated by *t* test, ns:  $P > 0.05$ ; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

本, 在各浓度下, 仍然是 RTU 与离心柱法的处理效果相对更好, 磁珠法略差于离心柱法, 而 ABC 法效果相对最差(图 2C)。此外, 使用 RTU 提取时, 耗时低于 5 min, 而使用全自动核酸提取仪(磁珠法)所消耗的时间为 22 min, ABC 法和离心柱法所耗时间则更长。因此, RTU 能在极短的时间内完成不同呼吸道病毒样本的处理, 并且整体效果上甚至更优于 3 种常规核酸提取方法。

### 2.3 临床样本在 FQ-8A 上的检测分析

RSV 临床样本在 FQ-8A 上的检测分析。对 209 例冻存的 RSV 相关阳性和阴性样本使用上海科华提取试剂提取后, 使用相同的模板和检测试剂分别在 FQ-8A 和 ABI-7500 上进行扩增。结果显示, FQ-8A 的灵敏度为 100%, 特异性为 92.31%, 总体符合率为 97.13%; 两者一致性 kappa 系数为 0.938 ( $P < 0.001$ ), 表明结果具有高度一致性(表 1)。此外, 超快速荧光定量 PCR 仪 FQ-8A 检测到的  $C_t$  值较小于 ABI-7500 检测到的  $C_t$  值, 根据判读结果, 在 ABI-7500 上为临界值或阴性的结果在 FQ-8A 上可能为阳性, 这也提示 FQ-8A 具有更高的阳性检出率。

ADV 临床样本在 FQ-8A 上的检测分析。对 221 例冻存的 ADV 相关阳性和阴性样本使用上海科华提取试剂提取后, 使用相同的模板和检测试剂分别在 FQ-8A 和 ABI-7500 上进行扩增。结果显示, FQ-8A 的灵敏度为 99.22%, 特异性为 88.04%, 总体符合率为 94.57%; 两者一致性 kappa 系数为 0.887 ( $P < 0.001$ ), 其中 FQ-8A 仅有 1 例阳性未检出, 总的来说二者结果一致性较高(表 2)。但 FQ-8A 上所需检测时间较 ABI-7500 显著减少, 说明 FQ-8A 更适合对临床样本进行快速的病毒基因检测(表 3)。

### 2.4 呼吸道病毒快速检测方案的建立和应用

本研究将 RTU 与 FQ-8A 相结合, 构建呼

表 1 RSV 临床样本在 FQ-8A 与 ABI-7500 上的一致性分析

Table 1 Consistency analysis of RSV clinical samples in FQ-8A and ABI-7500

Instrument	ABI-7500		Total
	Positive (+)	Negative (-)	
FQ-8A Positive (+)	131	6	137
Negative (-)	0	72	72
Total	131	78	209

表 2 ADV 临床样本在 FQ-8A 与 ABI-7500 上的一致性分析

Table 2 Consistency analysis of ADV clinical samples in FQ-8A and ABI-7500

Instrument	ABI-7500		Total
	Positive (+)	Negative (-)	
FQ-8A Positive (+)	128	11	139
Negative (-)	1	81	82
Total	129	92	221

表 3 FQ-8A 与 ABI-7500 检测时间对比

Table 3 Comparison of experimental time between FQ-8A and ABI-7500

Instrument	Time (min)	
	RSV	ADV
FQ-8A	31	22
ABI-7500	68	55

吸道病毒核酸快速检测方案。对 RTU 和 FQ-8A 组成快速检测方案, 与 ABC 法和 ABI-7500 组成的常规检测方案进行比较。在采集的 102 例患者咽拭子样本中, 使用快速检测方案检测出阳性样本为 22 例, 阴性样本为 80 例; 常规检测方案检测出阳性样本为 24 例, 阴性样本为 78 例(国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0000181)。其中, 快速检测未检出的 2 例阳性为临界值样本, 快速检测方案的  $C_t$  值普遍高于常规检测方案的  $C_t$  值。呼吸道病毒核酸快速检测方案灵敏度为 91.70%, 特异度为 100%, 总体符合率为 98.04%, 经统计分析, kappa 值

为 0.944 ( $P < 0.001$ ), 两者结果具有良好的一致性(表 4)。从样本处理到扩增结果, 常规检测方案所需时间至少为 2 h, 但快速检测方案耗时仅为 35 min (图 3)。这也说明, 依赖于 RTU 和 FQ-8A 的快速检测方案能在 30 min 左右完成呼吸道病毒临床样本的快速鉴定。

### 3 讨论与结论

呼吸道病毒如 SARS-CoV-2 引起的新型冠状病毒感染(corona virus disease 2019, COVID-19) 仍然是严重威胁人类健康的呼吸道疾病之一,

准确和尽早地发现 SARS-CoV-2 的感染对最大限度地减少病毒传播和启动治疗至关重要。在所有的检测方法中, qRT-PCR 被认为是鉴定病毒核酸的金标准, 而其中“核酸提取”和“核酸扩增”是整个检测的限速步骤<sup>[17]</sup>。有报道表明, 样本的采集和储存方式<sup>[18]</sup>, 样本核酸的提取方法甚至选择不同的提取试剂盒, 都会影响到 qRT-PCR 的检测结果, 而这也可能导致假阳性或假阴性的出现<sup>[19]</sup>。同时, 常规 qRT-PCR 检测需要昂贵的大型仪器、专用的实验室以及专业的操作人员, 这些因素都限制了 qRT-PCR 被更

表 4 快速检测与常规检测方案一致性分析

Table 4 Consistency analysis between rapid detection scheme and conventional detection scheme

Detection scheme	Conventional detection scheme		Total
	Positive (+)	Negative (-)	
Rapid detection scheme	Positive (+)	22	22
	Negative (-)	2	78
	Total	24	102

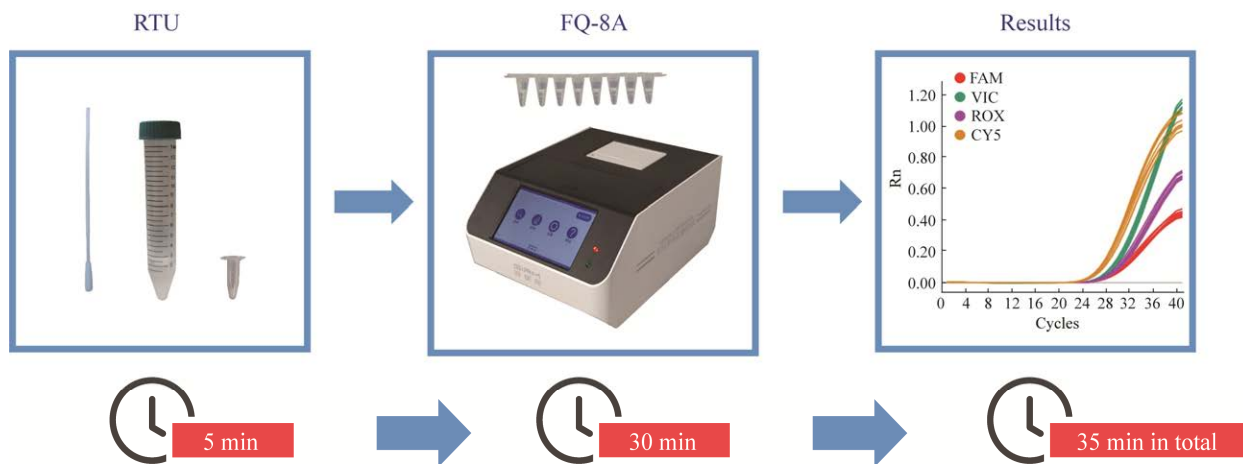


图 3 呼吸道病毒核酸快速检测方案 采集咽拭子样本至 RTU 保存液中, 取出 100  $\mu$ L 样本混合液加入 0.5 mg 树脂并进行加热, 取反应体系总体积的 1/10 作为模板, 使用快速扩增程序在 FQ-8A 上扩增, 整个过程用时 35 min

Figure 3 Rapid scheme for detection nucleic acid of respiratory viruses. After pharyngeal swab samples were collected into RTU preservation solution, 100  $\mu$ L sample mixture was taken out and added with 0.5 mg resin for heating treatment, one-tenth of the total volume of reaction system was taken out as template, and the rapid amplification procedure was used for amplification on FQ-8A, the whole process took about 35 min.



广泛地应用。因此,一种便于携带,对场地和人员操作要求均不高的PCR仪的研发就显得非常重要。同时,构建一套快速准确、灵敏度高、操作简便的核酸检测方案,对快速诊断和疫情防控都具有非常重要的现实意义。

目前,全球对样本的处理普遍采用2种方法,传统核酸提取法和释放剂法<sup>[20-21]</sup>。传统核酸提取法如异丙醇沉淀法、离心柱纯化和磁珠提取法等,虽然能提取到纯度较高的核酸,但操作步骤繁琐、耗时长。释放剂法是一种将保存液、灭活液和裂解液3种功能合一的免提取快速处理方法,释放剂法一般只需要处理5-10 min,但这种方法得到的核酸通常纯度较低,对于较复杂的样本如痰液、肺泡灌洗液等,通常处理效果较差<sup>[22]</sup>。本课题组的前期工作中,研发了一种免提取的呼吸道病毒处理试剂RTU。在这里,首先进一步验证了RTU的灵敏度和RTU对不同呼吸道病毒的检测效果。本研究观察到,RTU具有和市售核酸提取仪相当的检测灵敏度,特别当样本是中浓度或低浓度时,RTU的处理效果甚至更好(图1)。RTU对不同呼吸道病毒样本进行处理时,在各个浓度梯度下,甚至展现出了更优于传统核酸提取方法的效果(图2)。本研究认为这种更好的效果一方面是RTU更适合处理这种不含抑制剂的纯净样本,另一方面只有当RTU体积远多于样本体积时才能保证样本被充分地裂解(图1和图2)。除了处理效果好,RTU还操作简便,所用时间少于5 min,因此能极大地缩短样本处理过程。FQ-8A则是本课题组研发的一款便携式超快速实时荧光定量PCR仪,为验证FQ-8A在临床样本上的检测准确性,本研究比较了ABI-7500和FQ-8A对ADV和RSV临床样本的检测差异性。其中,RSV和ADV的总体符合率分别为97.13%和94.57%,结果表现出了高度一致性(表1和表2),但

FQ-8A能大幅减少所用时间(表3)。接下来,将RTU与FQ-8A结合构建整套快速检测方案,并与常规检测方案一起对不同的临床样本进行检测,其总体符合率为98.04%(表4)。相比之下,快速检测方案只需要35 min就能完成多种呼吸道病毒感染的筛查(图3),能大大缩短患者的等待时间。此外,本研究还发现RTU中的样本易于保存,室温中放置3 d也未见明显降解。FQ-8A则实现了PCR仪的小型化,它的重量为3 kg,占地面积仅为A4纸大小,因此便于携带<sup>[15]</sup>。但是,本研究所构建的方案也有一定的缺陷,对于模板量较低的样本,整套方案的检测灵敏度有所降低,但这也是所有检测所面临的一大难题<sup>[23]</sup>。同时,本研究所使用的检测试剂均为液体,这就需要在-20 °C进行储存和运输,未来将考虑替换成冻干型试剂,这样既可以减少上样操作时间,又可以省去冷链运输和储存的成本。

总的来说,本研究构建了一套结果准确、操作简便且易于携带的呼吸道病毒核酸快速检测方案,为推动分子检测应用于社区医院、门诊、药店等基层医疗机构奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] VOS T, LIM SS, ABBAFATI C, ABBAS KM, ABBASI M, ABBASIFARD M, ABBASI-KANGEVARI M, ABBASTABAR H, ABD-ALLAH F, ABDELALIM A, ABDOLLAHI M, ABDOLLAHPOUR I, ABOLHASSANI H, ABOYANS V, ABRAMS EM, ABREU LG, ABRIGO MRM, ABU-RADDAD LJ, ABUSHOUK AI, ACEBEDO A, et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [2] LI ZJ, ZHANG HY, REN LL, LU QB, REN X, ZHANG CH, WANG YF, LIN SH, ZHANG XA, LI J, ZHAO SW, YI ZG, CHEN X, YANG ZS, MENG L, WANG XH, LIU YL, WANG X, CUI AL, LAI SJ, et al.

- Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 5026.
- [3] SHAH NN, KHAN Z, AHAD H, ELDERDERY AY, ALOMARY MN, ATWAH B, ALHINDI Z, ALSUGOOR MH, ELKHALIFA AME, NABI S, BASHIR SM, YAQUB T, RATHER GA, ANSARI MA. Mucormycosis an added burden to covid-19 patients: an in-depth systematic review[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2022, 15(11): 1299-1314.
- [4] WANG CC, PRATHER KA, SZNITMAN J, JIMENEZ JL, LAKDAWALA SS, TUFEKCI Z, MARR LC. Airborne transmission of respiratory viruses[J]. *Science*, 2021, 373(6558): eabd9149.
- [5] JAVANIAN M, BARARY M, GHEBREHEWET S, KOPPOLU V, VASIGALA V, EBRAHIMPOUR S. A brief review of influenza virus infection[J]. *Journal of Medical Virology*, 2021, 93(8): 4638-4646.
- [6] SOLOMON DA, SHERMAN AC, KANJILAL S. Influenza in the covid-19 era[J]. *JAMA*, 2020, 324(13): 1342-1343.
- [7] CORMAN VM, LANDT O, KAISER M, MOLENKAMP R, MEIJER A, CHU DK, BLEICKER T, BRÜNINK S, SCHNEIDER J, SCHMIDT ML, MULDER DG, HAAGMANS BL, van der VEER B, van den BRINK S, WIJSMAN L, GODERSKI G, ROMETTE JL, ELLIS J, ZAMBON M, PEIRIS M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3): 2000045.
- [8] SAFIABADI TALI SH, LeBLANC JJ, SADIQ Z, DAMILOLA OYEWUNMI O, CAMARGO C, NIKPOUR B, ARMANFARD N, SAGAN SM, JAHANSHAHI-ANBUHI S. Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/covid-19 detection[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2021, 34(3): e00228-20.
- [9] NELSON PP, RATH BA, FRAGKOU PC, ANTALIS E, TSIODRAS S, SKEVAKI C. Current and future point-of-care tests for emerging and new respiratory viruses and future perspectives[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 181.
- [10] KANG TJ, LU JM, YU T, LONG Y, LIU GZ. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): covid-19 point-of-care diagnostics as an example[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 206: 114109.
- [11] LBLANC JJ, GUBBAY JB, LI Y, NEEDLE R, ARNESON SR, MARCINO D, CHAREST H, DESNOYERS G, DUST K, FATTOUH R, GARCEAU R, GERMAN G, HATCHETTE TF, KOZAK RA, KRAJDEN M, KUSCHAK T, LANG ALS, LEVETT P, MAZZULLI T, McDONALD R, et al. Real-time PCR-based SARS-CoV-2 detection in Canadian laboratories[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2020, 128: 104433.
- [12] ROGAN DT, KOCHAR MS, YANG S, QUINN JV. Impact of rapid molecular respiratory virus testing on real-time decision making in a pediatric emergency department[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2017, 19(3): 460-467.
- [13] ROBERTS A, CHOUHAN RS, SHAHDEO D, SHRIKRISHNA NS, KESARWANI V, HORVAT M, GANDHI S. A recent update on advanced molecular diagnostic techniques for covid-19 pandemic: an overview[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 732756.
- [14] SONG WD, ZHANG TY, LIN HC, YANG YJ, ZHAO GZ, HUANG XW. Conventional and microfluidic methods for the detection of nucleic acid of SARS-CoV-2[J]. *Micromachines*, 2022, 13(4): 636.
- [15] LIU WK, ZHOU ZC, ZHANG L, LI L, WANG L, SONG LX, QIU SY, ZHANG L, XU D, TIAN XG, LI X, YANG YJ, LIANG JX, LIU Y, LI XB, ZHOU R. Establishment and evaluation of a 30-minute detection method for SARS-CoV-2 nucleic acid using a novel ultra-fast real-time PCR instrument[J]. *Journal of Thoracic Disease*, 2021, 13(12): 6866-6875.
- [16] 孙果梅. 体外诊断试剂临床评价常用统计学方法概述[J]. *中国医疗器械杂志*, 2021, 45(4): 438-441.
- SUN GM. Summary of statistical methods commonly used in clinical evaluation of *in vitro* diagnostic reagents[J]. *Chinese Journal of Medical Instrumentation*, 2021, 45(4): 438-441 (in Chinese).
- [17] RAHBARI R, MORADI N, ABDI M. rRT-PCR for SARS-CoV-2: analytical considerations[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2021, 516: 1-7.
- [18] RADBEL J, JAGPAL S, ROY J, BROOKS A, TISCHFIELD J, SHELDON M, BIXBY C, WITT D, GENNARO ML, HORTON DB, BARRETT ES, CARSON JL, PANETTIERI RA Jr, BLASER MJ. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is comparable in clinical samples preserved in saline or viral transport medium[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2020, 22(7): 871-875.
- [19] AMBROSI C, PREZIOSO C, CHECCONI P, SCRIBANO D, SARSHAR M, CAPANNARI M,

- TOMINO C, FINI M, GARACI E, TERESA PALAMARA A, de CHIARA G, LIMONGI D. SARS-CoV-2: comparative analysis of different RNA extraction methods[J]. *Journal of Virological Methods*, 2021, 287: 114008.
- [20] BRUCE EA, HUANG ML, PERCHETTI GA, TIGHE S, LAAGUIBY P, HOFFMAN JJ, GERRARD DL, NALLA AK, WEI YL, GRENINGER AL, DIEHL SA, SHIRLEY DJ, LEONARD DGB, HUSTON CD, KIRKPATRICK BD, DRAGON JA, CROTHERS JW, JEROME KR, BOTTEN JW. Direct RT-qPCR detection of SARS-CoV-2 RNA from patient nasopharyngeal swabs without an RNA extraction step[J]. *PLoS Biology*, 2020, 18(10): e3000896.
- [21] HASAN MR, MIRZA F, AL-HAIL H, SUNDARARAJU S, XABA T, IQBAL M, ALHUSSAIN H, YASSINE HM, PEREZ-LOPEZ A, TANG P. Detection of SARS-CoV-2 RNA by direct RT-qPCR on nasopharyngeal specimens without extraction of viral RNA[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0236564.
- [22] SMYRLAKI I, EKMAN M, LENTINI A, RUFINO de SOUSA N, PAPANICOLAOU N, VONDRACEK M, AARUM J, SAFARI H, MURADRASOLI S, ROTHFUCHS AG, ALBERT J, HÖGGER B, REINIUS B. Massive and rapid covid-19 testing is feasible by extraction-free SARS-CoV-2 RT-PCR[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4812.
- [23] TEYMOURI M, MOLLAZADEH S, MORTAZAVI H, NADERI GHALE-NOIE Z, KEYVANI V, AGHABABAEI F, HAMBLIN MR, ABBASZADEH-GOUDARZI G, POURGHADAMYARI H, HASHEMIAN SMR, MIRZAEI H. Recent advances and challenges of RT-PCR tests for the diagnosis of covid-19[J]. *Pathology-Research and Practice*, 2021, 221: 153443.

(本文责编 陈宏宇)