

• 论 著 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2022.03.010

新型冠状病毒核酸检测的性能验证及评价

周 丹, 何进才, 李惠贞, 黄 涛, 谷大伟, 张德明, 罗胜华
广东省深圳市中医院检验科, 广东深圳 518033

摘要:目的 验证实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)检测系统的主要性能。方法 参考《医学实验室 质量和能力的要求》第 1 部分通用要求 GB/T22576.1—2018 和第 10 部分分子生物检验学领域的要求 GB/T22576.10—2018 对该实验室 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 核酸的检测系统的符合率、重复性、检出限、抗干扰能力、交叉反应等性能特征进行验证及评价。结果 该实验室与国家卫生健康委临床检验中心 2020 年第 1、2 次 SARS-CoV-2 室间质评标本的阳性符合率为 92%, 阴性符合率为 100%, 总符合率为 95%, 其中有 1 例阳性标本未检出阳性, 系标本浓度低于最低检测限; 弱阳性标本检测的靶基因 ORF-1ab 和 N 的 Ct 值的批内变异系数(CV)分别为 1.38% 和 1.16%, 批间 CV 分别为 1.84% 和 1.72%, 均小于 5%; 检测限浓度(500 copies/mL)标本 5 次重复检测 SARS-CoV-2 核酸结果均为阳性; 在加入严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-CoV)、磷酸盐缓冲液(PBS)、人冠状病毒 NL63(NL63)、人冠状病毒 HKU1(HKU1)、人冠状病毒 229E(229E)、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)、人冠状病毒 OC43(OC43)等标本检测中, SARS-CoV-2 核酸检测结果均为阴性; 在混有血液 $\leq 50\%$ 、黏蛋白 ≤ 0.9 mg/mL 等内源性干扰物质的弱阳性标本检测中, SARS-CoV-2 核酸检测结果均为阳性。结论 RT-qPCR 检测 SARS-CoV-2 核酸的检测系统的各项性能特征与厂家声明相符, 可满足预期用途, 适用于 SARS-CoV-2 的临床常规筛查检测。

关键词:新型冠状病毒; 核酸检测; 性能验证; 聚合酶链反应

中图分类号: R446.5; R563.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2022)03-0324-06

Performance verification and evaluation of nucleic acid detection of novel coronavirus

ZHOU Dan, HE Jincai, LI Huizhen, HUANG Tao, GU Dawei, ZHANG Deming, LUO Shenghua

Department of Laboratory Medicine, Shenzhen Traditional Chinese Medicine

Hospital, Shenzhen, Guangdong 518033, China

Abstract: **Objective** To verify the main performance of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) detection system by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Methods** The coincidence rate, repeatability, sensitivity, detection limit, anti-interference ability and cross-reaction of the RT-qPCR nucleic acid detection system for SARS-CoV-2 was verified and evaluated according to the requirements of Quality and Competence of Medical Laboratories GB/T22576.1—2018 and GB/T22576.10—2018. **Results** The positive coincidence rate of the laboratory and the Clinical Laboratory Center of National Health Commission for the first and second SARS-CoV-2 laboratory interstitial assessment in 2020 was 92%, the negative coincidence rate was 100%, and the total coincidence rate was 95%. Among them, one positive sample was not detected positive, because the sample concentration was lower than the minimum detection limit. The intra-assay coefficient of variation (CV) of Ct values of target genes ORF-1ab and N detected by weakly positive samples were 1.38% and 1.16% respectively, and inter-assay CV were 1.84% and 1.72% respectively, both were less than 5%. All samples were positive for SARS-CoV-2 nucleic acid after five repeated tests at the limit of detection concentration (500 copies/mL). The results of SARS-CoV-2 nucleic acid test were all negative in sample solution containing SARS-CoV, PBS, NL63, HKU1, 229E, MERS-CoV, OC43, and other pathogens. The results of SARS-CoV-2 nucleic acid test were all positive in the weak positive samples mixed with endogenous interfering substances, such as blood $\leq 50\%$ and mucin ≤ 0.9 mg/mL. **Conclusion** The performance characteristics of the detection system for SARS-CoV-2 nucleic acid by RT-qPCR are in accordance with the manufacturer's statement and meet the expected use, which is suitable for routine clinical screening and detection of SARS-CoV-2.

Key words: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2; nucleic acid test; performance verifica-

作者简介: 周丹, 女, 副主任技师, 主要从事临床分子诊断方面研究。

本文引用格式: 周丹, 何进才, 李惠贞, 等. 新型冠状病毒核酸检测的性能验证及评价[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(3): 324-329.

tion; polymerase chain reaction

《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)》^[1]指出,对疑似病例采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸为阳性即可确诊为 SARS-CoV-2 感染。核酸检测具有早期、灵敏度高、特异度高、易操作等优势,但对于核酸检测结果的准确性,还需要从标本类型、质量、实验因素、试剂盒性能及患者感染周期等因素来综合分析^[2],尤其难诊断的病例应当更加严格地控制。性能验证是保证实验室开展的检验项目所应用的检测系统的分析性能或检验项目的方法学能够满足检测及临床需求,保证患者标本检测结果准确可靠所进行的一系列验证试验。性能验证参数至少应包括精密度、符合率和检出限,同时需要在临床检测过程中累积室内质量控制和临床标本检测得到的数据,并与其他实验室间结果进行对比,开展进一步评价和其他性能指标(如特异性、抗干扰能力等)验证^[3]。

为了验证本实验室采用的 SARS-CoV-2 核酸检测系统的各项性能参数是否符合要求,本研究参照《医学实验室 质量和能力的要求》第 1 部分通用要求 GB/T22576.1—2018^[4]、第 10 部分分子生物检验学领域的要求 GB/T22576.10—2018、《CNAS-CL02-A009:2018 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》^[5]等文件要求对本实验室 SARS-CoV-2 RT-qPCR 检测系统的符合率、重复性、检出限、抗干扰能力、交叉反应等性能特征进行验证及评价,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 国家卫生健康委临床检验中心(以下简称国家临检中心)2020 年第 1、2 次 SARS-CoV-2 核酸检测室间质评标本,厂家提供的 SARS-CoV-2 核酸企业参考品(可溯源),SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒阴、阳性对照,广州邦德盛 SARS-CoV-2 核酸弱阳性质控品,本实验室检测 SARS-CoV-2 核酸阴性标本等。所有标本放 -70℃ 冰箱内保存备用,避免反复冻融。

1.2 仪器与试剂 核酸提取和扩增均采用厦门安普利全自动核酸提纯及 RT-qPCR 分析系统(Anadas9850),核酸提取试剂购自厦门安普利生物科技有限公司,检测试剂为上海伯杰医疗科技有限公司 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒(RT-qPCR 法,批号:20200604)。

1.3 方法 参考《医学实验室 质量和能力的要求》第 1 部分通用要求 GB/T22576.1—2018、第 10 部分分子生物检验学领域的要求 GB/T22576.10—2018、CNAS-CL02-A009:2018《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》和 CNAS-

GL039:2019《分子诊断检验程序性能验证指南》^[6]的要求,对 SARS-CoV-2 核酸检测系统的主要性能指标进行验证。

1.3.1 符合率验证 选取国家临检中心 2020 年第 1、2 次 SARS-CoV-2 核酸检测室间质评标本用于符合率验证,共计 20 份,其中阴性标本 8 份,阳性标本(含弱阳性和强阳性标本)12 份。以国家临检中心公布的结果为靶值,分别计算阳性符合率、阴性符合率和总体符合率,检测结果应在允许范围内,且总体符合率>90%。

1.3.2 重复性(精密度)验证 选取 2 份标本,一份阴性,另一份弱阳性。由于目前处于疫情防控常态化时期,国内本土病例较少,弱阳性标本较难获得,因此将厂家提供的企业参考品(可溯源,浓度 10^5 copies/mL)用无 RNA 酶的焦碳酸二乙酯(DEPC)水 10 倍稀释后用于重复性验证。严格按照操作程序进行核酸提取和扩增,批内重复性验证是 2 份标本在一个批次内重复检测 20 次;批间重复性验证是 2 份标本连续检测 5 d,每天检测 4 次,共进行 20 次检测;分别计算 20 次检测靶基因 Ct 值的均数($\bar{x}$)、标准差(s)及变异系数(CV)。评价标准:CV≤5%。

1.3.3 检测下限验证 将厂家提供的企业参考品(可溯源,浓度 10^5 copies/mL)用无 RNA 酶 DEPC 水梯度稀释 200 倍至厂家声明的检出限浓度 500 copies/mL,并进行检测下限的验证,同一批次重复测定 5 次,需达到 100%检出率。

1.3.4 交叉反应验证 由于用于交叉反应验证的病毒属于高致病性及传染性病毒,且不易获取,考虑到在二级生物安全实验室进行这些病毒操作的风险,故本研究选取国家临检中心第 1 次 SARS-CoV-2 病毒核酸检测室间质评的 2020001、2020005、2020006、2020007、2020012 号标本用于交叉反应的验证。这 5 份标本中在室间质评标本结果回馈后,已知其中含有的病原体的真实成分,且经过灭活处理,对操作人员无致病性。分别吸取 200 μ L 标本加入 200 μ L 标本保存液或经确认为阴性的标本中充分混匀,与常规样品一起处理和检测,重复检测 3 次以上,检测结果需均为阴性,则交叉反应验证通过。

1.3.5 抗干扰能力验证 将制备的干扰物质溶液混入弱阳性质控品中进行抗干扰能力的验证。本研究对内源性干扰物质血液和黏蛋白进行抗干扰能力验证。血液干扰液制备:取 1 mL 血液,加入 1 mL 弱阳性质控标本中混匀,制成混有 50%血液的干扰物质溶液。黏蛋白干扰液的制备:称取黏蛋白 315 mg,加入 100 mL 超纯水,混合均匀,制成 3.15 mg/mL 溶液,再取 3.15 mg/mL 溶液 100 μ L 加入 3.4 mL 弱阳性

质控标本中,混合均匀,制成含黏蛋白质量浓度为 0.9 mg/mL 干扰物质溶液。将以上含干扰物质溶液的标本重复测定 2 次以上。若检测结果仍为弱阳性,说明在混有血液 $\leq 50\%$ 、黏蛋白 ≤ 0.9 mg/mL 等内源性干扰物质时,不影响检测结果的判读,对测定无显著影响。

1.4 质控和结果判读 所有检测批次试验均需做 3 个阴性、1 个弱阳性质控,质控在控,结果才有效,否则需要重新检测。同一实验中,需同时满足阴性对照 FAM 通道、HEX/VIC 通道无 Ct 值,ROX 通道不做要求;弱阳性质控 FAM 通道、HEX/VIC 通道、ROX 通道均有扩增曲线,且 Ct 值 ≤ 40 等要求,否则本次实验无效。在符合质控要求的条件下进行结果的判读,FAM 通道和 HEX/VIC 通道 Ct 值 ≤ 40 ,SARS-CoV-2 核酸检测阳性;FAM 通道和 HEX/VIC 通道无 Ct 值或 Ct 值 > 40 ,SARS-CoV-2 核酸检测阴性;FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值 > 40 ,和 HEX/VIC 通道 Ct 值 ≤ 40 或者 FAM 通道 Ct 值 ≤ 40 和 HEX/VIC 通道无

Ct 值或 Ct 值 > 40 (即单靶标阳性)时需要复测,如果复测结果仍为单靶标阳性,则判定为 SARS-CoV-2 核酸检测阳性;若复测后双靶标 Ct 值 > 40 ,则判定为 SARS-CoV-2 核酸检测阴性。

1.5 统计学处理 采用 Excel 2019 和 SPSS19.0 软件进行数据整理和统计学分析,经检验计量资料呈正态分布,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 符合率验证 国家临检中心发放的 20 份室间质评标本(阳性 12 份,阴性 8 份),本实验室检测出阳性 11 份(其中弱阳性 4 份),阴性 9 份,以国家临检中心公布的结果为金标准,阳性符合率=92%,阴性符合率=100%,总符合率=95%,2 种方法的检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.29, P < 0.01$)。该方法的灵敏度为 92%,特异度为 100%,约登指数为 0.92。见表 1、2。

表 1 SARS-CoV-2 核酸检测符合率验证结果

序号	标本编号	ORF-1ab (Ct 值)	N	检测结果	靶值	真实成分	浓度(copies/mL)	结论
1	2020001	0.00	0.00	阴性	阴性	SARS-CoV	3.00×10^6	符合
2	2020002	30.16	39.02	阳性	阳性	SARS-CoV-2	640	符合
3	2020004	39.21	37.50	阳性	阳性	SARS-CoV-2	3.20×10^3	符合
4	2020005	0.00	0.00	阴性	阴性	PBS	—	符合
5	2020006	0.00	0.00	阴性	阴性	NL63	1.60×10^6	符合
6	2020007	0.00	0.00	阴性	阴性	HKU1	9.40×10^5	符合
						229E	2.70×10^6	
7	2020008	38.97	35.67	阳性	阳性	SARS-CoV-2	1.60×10^4	符合
8	2020010	0.00	0.00	阴性	阳性	SARS-CoV-2	128	不符合
9	2020011	35.07	33.38	阳性	阳性	SARS-CoV-2	8.00×10^4	符合
10	2020012	0.00	0.00	阴性	阴性	MERS-CoV	1.00×10^4	符合
						OC43	1.00×10^6	
11	2020201	0.00	0.00	阴性	阴性	SARS-CoV	1.00×10^7	符合
12	2020202	30.90	31.45	阳性	阳性	SARS-CoV-2	5.50×10^4	符合
13	2020203	25.06	25.34	阳性	阳性	SARS-CoV-2	3.50×10^6	符合
14	2020204	33.64	32.92	阳性	阳性	SARS-CoV-2	1.40×10^4	符合
15	2020205	28.46	29.35	阳性	阳性	SARS-CoV-2	2.20×10^5	符合
16	2020206	0.00	0.00	阴性	阴性	—	—	符合
17	2020207	34.18	33.69	阳性	阳性	SARS-CoV-2	1.40×10^4	符合
18	2020208	0.00	0.00	阴性	阴性	—	—	符合
19	2020209	37.90	34.72	阳性	阳性	SARS-CoV-2	3.50×10^3	符合
20	2020210	26.58	27.10	阳性	阳性	SARS-CoV-2	8.80×10^5	符合

注:浓度来源于数字 PCR 定量检测结果,为国家临检中心网站公布的结果;SARS-CoV 为严重急性呼吸综合征冠状病毒,PBS 为磷酸盐缓冲液,NL63 为人冠状病毒 NL63,HKU1 为人冠状病毒 HKU1,229E 为人冠状病毒 229E,MERS-CoV 为中东呼吸综合征冠状病毒,OC43 为人冠状病毒 OC43;—表示无数据。

表 2 SARS-CoV-2 核酸检测符合率验证实验统计(n)

诊断试验	金标准		
	阳性	阴性	合计
阳性	11	0	11
阴性	1	8	9
合计	12	8	20

2.2 重复性(精密度)验证 2 份标本中,一份为阴

性,另一份为弱阳性(浓度约为 104 copies/mL),进行批内和批间重复性(精密度)验证,试剂盒检测的 2 个靶基因 ORF-1ab 和 N 的 Ct 值结果见表 3。阴性标本检测结果均为阴性,弱阳性标本的 2 个靶基因 ORF-1ab 和 N 的 Ct 值的批内 CV 分别为 1.38% 和 1.16%,批间 CV 分别为 1.84% 和 1.72%,均小于 5%,与试剂说明书声称的实验室内、室间的精密度 CV≤5% 符合,重复性(精密度)验证通过。

表 3 SARS-CoV-2 核酸检测重复性(精密度)验证结果(Ct 值)

序号	批内精密度				批间精密度			
	阴性		弱阳性		阴性		弱阳性	
	ORF-1ab	N	ORF-1ab	N	ORF-1ab	N	ORF-1ab	N
1	0.00	0.00	33.14	30.93	0.00	0.00	33.14	30.93
2	0.00	0.00	33.07	30.81	0.00	0.00	33.07	30.85
3	0.00	0.00	33.42	31.15	0.00	0.00	33.42	31.13
4	0.00	0.00	33.83	31.63	0.00	0.00	33.83	31.64
5	0.00	0.00	33.57	31.12	0.00	0.00	35.26	31.11
6	0.00	0.00	33.12	31.17	0.00	0.00	33.17	31.17
7	0.00	0.00	33.13	31.53	0.00	0.00	34.13	31.18
8	0.00	0.00	32.63	30.26	0.00	0.00	32.69	31.26
9	0.00	0.00	34.09	31.08	0.00	0.00	34.12	32.08
10	0.00	0.00	33.46	31.22	0.00	0.00	33.48	31.25
11	0.00	0.00	33.74	31.34	0.00	0.00	33.74	31.33
12	0.00	0.00	34.54	31.57	0.00	0.00	34.56	31.57
13	0.00	0.00	33.61	30.98	0.00	0.00	33.78	31.48
14	0.00	0.00	32.66	30.54	0.00	0.00	32.66	30.54
15	0.00	0.00	33.59	31.04	0.00	0.00	33.59	31.04
16	0.00	0.00	33.55	30.74	0.00	0.00	33.55	31.74
17	0.00	0.00	33.04	30.59	0.00	0.00	33.78	32.48
18	0.00	0.00	33.11	30.65	0.00	0.00	33.05	31.14
19	0.00	0.00	33.66	31.17	0.00	0.00	33.68	32.17
20	0.00	0.00	33.61	31.14	0.00	0.00	33.94	32.61
$\bar{x}$	—	—	33.43	31.03	—	—	33.63	31.44
s	—	—	0.46	0.36	—	—	0.62	0.54

注:—表示无数据。

2.3 检测下限(灵敏度)验证 重复检测 5 次检出限浓度 500 copies/mL 的标本,检测结果均为阳性,满足说明书声称的最低检测限要求,检测下限验证通过。见表 4。

2.4 交叉反应验证 将 200 μL 标本加入 200 μL 保存液或经确认为阴性的标本中充分混匀,与常规标本一起处理和检测,重复检测 3 次,检测结果见表 5。5 个标本检测结果均为阴性,在加入其他病原体后,对检测结果的判读不造成影响,满足试剂说明书中的要求,交叉反应验证通过。

表 4 SARS-CoV-2 核酸检测下限验证结果

重复次数	ORF-1ab(Ct 值)	N(Ct 值)	检测结果
1	36.16	36.44	阳性
2	35.96	35.65	阳性
3	36.74	36.19	阳性
4	36.21	36.04	阳性
5	36.14	36.42	阳性

2.5 抗干扰验证 在弱阳性标本中加入干扰物质溶

液,使干扰物质的终浓度与厂家声明的浓度相同,将该弱阳性标本重复测定 2 次,检测结果见表 6。加入干扰物质后的弱阳性标本均能检测出阳性结果,说明在混有血液 $\leq 50\%$ 、黏蛋白 $\leq 0.9\text{ mg/mL}$ 等内源性干扰物质时,不影响检测结果的判读,对测定无显著影响,满足试剂说明书中的要求,抗干扰验证通过。

表 5 SARS-CoV-2 核酸交叉反应验证结果

序号	标本号	真实成分	检测结果
1	2020001	SARS-CoV	阴性
2	2020005	PBS	阴性
3	2020006	NL63	阴性
4	2020007	HKU1/229E	阴性
5	2020012	MERS-CoV/OC43	阴性

表 6 SARS-CoV-2 核酸检测抗干扰验证实验结果

标本	重复次数 (n)	ORF-1ab (Ct 值)	N (Ct 值)	检测结果
弱阳性标本+血液	1	34.47	33.68	阳性
	2	34.68	33.36	阳性
弱阳性标本+黏蛋白	1	34.79	33.35	阳性
	2	34.89	33.64	阳性

3 讨 论

性能验证是指实验室通过实验数据验证检验程序的性能特征是否符合厂商的声明。《医学实验室 质量和能力的要求》第 1 部分通用要求 GB/T22756.1—2018^[4]指出,检验方法或试剂在使用前必须经过实验室独立验证,以确保其性能指标在本实验室能达到厂商声明的要求。因此,性能验证不仅是实验室认可的需要,也是确保检测结果准确可靠的内在要求。

在进行符合率验证时,可通过与参比方法进行比较,来判定检测结果的符合率,参比方法通常为诊断的金标准、行业公认方法、经性能验证符合要求能满足临床预期用途的方法,如通过 ISO15189 认可实验室使用的相同检测方法等。在实际工作中,通常采用参加国家/省临检中心室间质量评价标本结果来进行评价,检测国家/省临检中心质评物,检测结果均在允许范围内,则符合率验证通过。本研究采用国家临检中心发放的室间质评标本进行验证,共 20 份标本,其中阴性 8 份,阳性 12 份,本研究检测到阳性 11 份,阴性 9 份,阳性符合率 92%,阴性符合率 100%,总符合率 95%,其中有 1 例阳性标本未检测出阳性,根据国家临检中心最后公布的结果可知,该标本的真实成分是 SARS-CoV-2,其数字 PCR 定量的浓度是 128 copies/mL,已经低于了本检测系统的最低检测限 500 copies/mL,未检测出阳性结果在可接受范围内,同时

也说明了 RT-qPCR 检测出核酸的灵敏度还有待提高。此外,还可采用厂商或第三方提供的参考物质的检测来进行符合率的验证。但是,符合率的验证并不等同于正确度的验证,在《WS/T505—2017:定性测定性能评价指南》^[7]中也提到,符合率的一个重要缺陷是其并不是一个“正确性”的量度,事实上 2 种检测方法可能高度符合,但是灵敏度和特异度都很低,相反,2 种方法不符合也并不意味着待评估的方法是错误的,比较方法是正确的。其次,在采用室间质评标本进行研究方法的检测性能验证时,由于室间质评标本存在基质效应,可能会带来 2 种方法比对时结果不一致的错误结论,例如室间质评标本中分析物水平在接近阴性或阳性阈值时,可能无法检测出真实结果。

精密度是在规定条件下,对同一检测对象多次重复测量所得到的结果的一致程度,通常以 s 或 CV 表示^[8]。定性项目的精密度评价应选择接近临界水平的标本进行试验,每次试验均应设立阴性和阳性质控,质控数据在控为试验数据有效的前提。在疫情防控常态化时期,由于本院为非定点收治医院,阳性标本不易获得,因此本研究用无 RNA 酶 DEPC 水 10 倍稀释厂家提供的企业参考品(可溯源,浓度 10^5 copies/mL)获得浓度 10^4 copies/mL 的弱阳性标本用于重复性验证,结果显示 2 个靶基因 ORF-1ab 和 N 的 Ct 值的批内 CV 分别为 1.38% 和 1.16%,批间 CV 分别为 1.84% 和 1.72%,均小于 5%,符合厂家声明,说明试剂性能稳定,重复性较好。

当所有检验程序在厂家试剂使用说明书等有声明检出限时,检测项目在有标准物质时,或以定量形式表达定性结果时,应进行检出限的验证。对检出限的验证,也是对检测系统灵敏度的验证。灵敏度是指仪器或试剂对待测标本的检测能力,若灵敏度过低,则可能导致假阴性出现^[9-10]。用于检测限验证的标本应是定值标准物质(国际参考品、国家参考品、厂家参考品),将定值标准物质梯度稀释至厂家声明的检出限浓度,重复测定 5 次或不同批次内对该标本进行 20 次重复测定,如果是 5 次重复,则需达到 100% 检出率,如果是分批次 20 次检测,需至少 18 次检出核酸,检出率 90% 以上。本研究用无 RNA 酶 DEPC 水梯度稀释厂家提供的企业参考品(可溯源,浓度 10^5 copies/mL) 200 倍至厂家声明的检出限浓度 500 copies/mL,用于验证检出限,重复测定 5 次的检测结果均为阳性,满足说明书的检测限要求,说明该试剂具有足够的检测能力。

交叉反应验证需验证于检测对象可能存在交叉反应的病原体对检测的影响,这类病原体主要是与检测对象核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状的病原体,并宜在病原体感染的医学决定水平进

行验证。本研究运用了国家临检中心 2020 年第 1 次 SARS-CoV-2 核酸检测的室间质评标本,在室间质评结果回馈后已知其中一些阴性标本的真实成分,这些病原体刚好可用于交叉反应验证,且都经过灭活处理,对操作人员无致病性。本研究分别吸取 200 μ L 已知病原体标本加入 200 μ L 标本保存液或经确认为阴性的标本中充分混匀,与常规样品一起处理和检测,重复检测 3 次的检测结果均为阴性,检测结果可接受,交叉反应验证通过。

抗干扰能力验证应验证说明书中涉及干扰物质对测定的影响,常见干扰物质主要包括血红蛋白、三酰甘油、胆红素、免疫球蛋白、类风湿因子、黏蛋白、抗核抗体和药物等。SARS-CoV-2 核酸检测一般采集的标本为鼻咽或口咽拭子,可能存在血红蛋白或黏蛋白的干扰,因此在本研究中验证了血液和黏蛋白 2 种内源性干扰物质的影响,在弱阳性标本中加入干扰物质溶液,使干扰物质的终浓度与厂家声明的浓度相同,将含有干扰物质的弱阳性标本重复测定 2 次,检测结果仍为弱阳性,说明在混有血液 $\leq 50\%$ 、黏蛋白 ≤ 0.9 mg/mL 等内源性干扰物质时,不影响检测结果的判读,对测定无显著影响,满足试剂说明书中的要求。

综上所述,核酸检测是 SARS-CoV-2 诊断的重要方法。本研究结果显示该检测系统的结果准确可靠,精密度好,灵敏度高,抗干扰能力强,与试剂说明书提供的检测性能一致,可以满足目前 SARS-CoV-2 初筛检测的要求。本研究提供了一套 SARS-CoV-2 核酸检测的性能验证方案,在阳性标本不易获取的条件下可以适当使用室间质评的标本进行检测系统的性能验证。检测系统的性能验证或评价不仅是实验室认可的需求,更是保证检测结果准确可靠的需求,实验室应建立文件化的性能验证程序,注意性能验证的时机,制订相应的验证方案,在开展新项目时做好性

能评价。

参考文献

- [1] 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(试行第八版修订版)的通知[EB/OL]. (2021-04-15)[2020-04-19]. http://www.nhc.gov.cn/zyyji/s7653p/202104/7de0b3837c8b46_06a0594aeb0105232b.shtml.
- [2] 潘柏申,尚红. 检验医学在抗击新型冠状病毒肺炎中的发展[J]. 中华检验医学杂志,2021,44(1):1-2.
- [3] 上海市医学会检验医学分会. 新型冠状病毒核酸和抗体检测临床应用专家共识[J]. 国际检验医学杂志,2020,41(14):1665-1669.
- [4] 国家市场监督管理总局,中国国家标准化管理委员会. 医学实验室 质量和能力的要求第 1 部分通用要求:GB/T22756.1-2018[S]. 北京:中国标准出版社,2019.
- [5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A009:2018 医学实验室质量和能力认可准则在临床分子诊断领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2018.
- [6] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL039:2019 分子诊断检验程序性能验证指南[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2019.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 定性测定性能评价指南:WS/T505-2017[S]. 北京:中国标准出版社,2017.
- [8] 祝丽晶,侯盼飞,潘艳,等. 一种新型冠状病毒核酸检测试剂的性能验证[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2020,43(6):389-392.
- [9] 张瑞,李金明. 如何减少新型冠状病毒核酸检测的假阴性[J]. 中华医学杂志,2020,100(11):801-804.
- [10] 中国医院协会临床微生物实验室专业委员会. 新型冠状病毒实验室检测专家共识[J]. 协和医学杂志,2021,12(1):18-26.

(收稿日期:2021-04-09 修回日期:2021-11-11)

(上接第 323 页)

- 新生儿耳聋基因筛查结果分析[J]. 听力学及言语疾病杂志,2021,29(5):531-534.
- [10] 秦梦瑶,冯永,吴学文. GJB2 突变相关的迟发性遗传性聋研究进展[J]. 中华耳科学杂志,2021,19(2):316-321.
 - [11] YAO J, LU Y, WEI Q, et al. A systematic review and meta-analysis of 235delC mutation of GJB2 gene[J]. J Transl Med,2012,10:136.
 - [12] 梁少明,李卫红,郑恒,等. 粤西部分地区耳聋患者耳聋基因检测结果分析[J]. 中华耳科学杂志,2020,18(1):126-

132.

- [13] 余红,杨晶群,樊洁敏. 2 653 例新生儿常见耳聋基因筛查结果分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2018,26(8):91-92.
- [14] 李湘珺. 大港新生儿听力和耳聋基因联合筛查结果分析[J]. 医学理论与实践,2017,30(9):1273-1275.
- [15] LIU Q, LIU P, DONG X J, et al. A novel method for detection the deafness-associated mitochondrial A1555G and C1494T mutations[J]. Clin Lab,2016,62(3):477-481.

(收稿日期:2021-06-18 修回日期:2021-10-29)