

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.09.010

新型冠状病毒核酸非配套检测系统性能确认方法的建立^{*}

黄 韵,王 秋,夏 勇[△]

北京大学深圳医院检验科,广东深圳 518036

摘 要:**目的** 对实验室新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸非配套检测系统性能进行确认,以确定其是否满足临床需要。**方法** 根据 ISO15189 要求,对北京大学深圳医院实验室 SARS-CoV-2 核酸达安提取试剂与伯杰扩增试剂组成非配套检测系统的符合率、精密度、检出限及交叉反应进行性能确认。**结果** 非配套检测系统在实验室内不同的荧光定量 PCR 扩增仪上检测,方法符合率为 100.00%;精密度确认试验 ORF1ab 基因和 N 基因变异系数(CV)均<5%。检出限能力 ORF1ab 基因为 98.33%(118/120),N 基因为 91.67%(110/120),有效检出率为 100.00%(120/120);与感染部位相同或感染症状相似的病原体无交叉反应。**结论** 实验室需对非配套检测系统进行性能确认,确保 SARS-CoV-2 核酸检测结果质量。

关键词:新型冠状病毒; 核酸检测; 非配套检测系统; 性能确认

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)09-1223-04

Establishment of performance confirmation method for non-matching detection system of novel coronavirus nucleic acid^{*}

HUANG Yun, WANG Qiu, XIA Yong[△]

Department of Medical Laboratory, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China

Abstract:**Objective** To confirm the performance of the non-matching detection system for SARS-CoV-2 nucleic acid in the laboratory, so as to determine whether it can meet the clinical needs or not. **Methods** According to the requirements of ISO15189, the coincidence rate, precision rate, detection limit and cross reaction of non-matching detection system composed of SARS-CoV-2 nucleic acid Daan extraction and BioGerm amplifying agent were confirmed in laboratory of Peking University Shenzhen Hospital. **Results** The non-matching detection system was tested on different fluorescent quantitative PCR amplification instruments in the laboratory, and the coincidence rate of the method was 100.00%. The results of precision confirmation test showed the coefficients of variation of ORF1ab gene and N gene were all less than 5%. The detection rate of ORF1ab gene was 98.33% (118/120), and N gene was 91.67% (110/120), but the effective detection rate was 100.00% (120/120). Pathogens with the same infection site or similar infection symptoms did not have cross-reaction. **Conclusion** The performance for the non-matching detection system should be confirmed to meet the requirement of quality assurance for the SARS-CoV-2 nucleic acid.

Key words: SARS-CoV-2; nucleic acid detection; on matching detection system; performance confirmation

新型冠状病毒(SARS-CoV-2)核酸检测是确诊 SARS-CoV-2 感染首要标准^[1],完整配套的检测系统是分析质量的重要保障。由于 SARS-CoV-2 核酸检测试剂种类很多,且涉及不同核酸提取和扩增试剂,实验室需要对由提取试剂、提取仪、扩增试剂、扩增仪等组成的检测系统进行必要的性能验证,一旦出现阳

性结果,应采用另外 1~2 种更为灵敏且扩增不同区域的核酸检测试剂进行复核检测^[2],因而实验室必需使用 2 种以上的扩增试剂。

有不少学者报道了 SARS-CoV-2 核酸检测的性能验证评估及不同核酸提取和检测试剂比较分析^[3-6],但是鲜有对实验室内非配套检测系统在多台

^{*} 基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2020B1111160001);北京大学深圳医院智慧研究院项目(2022)。

作者简介:黄韵,女,主管技师,主要从事产前诊断分子遗传学、新型冠状病毒核酸检测等研究。 [△] 通信作者, E-mail:13828738567@163.com。

仪器设备上性能确认的相关研究。本研究根据 ISO15189 要求,对北京大学深圳医院实验室的非配套检测系统进行性能确认,为实验室建立非配套 SARS-CoV-2 检测系统提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源 选取 2022 年国家卫生健康委临床检验中心 3 月 28 日(样本号:C1-C5)和 2022 年广东省卫生健康委临床检验中心 4 月 20 日(样本号:C6-C10)的 SARS-CoV-2 核酸检测室间质量评价标本各 5 份;第三方弱阳性质控品(广州邦德盛 SARS-CoV-2 RNA)(试剂盒检测限 1.5~3.0 倍);上海伯杰 SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒阳性对照;中国计量科学研究院 SARS-CoV-2 核酸(低浓度)标准物质;SARS-CoV-2 核酸检测分析特异性参考品(广州邦德盛 SARS-CoV-2 RNA)。

1.2 仪器与试剂 3 台 7500 实时荧光定量 PCR 仪及 1 台 Quant Studio 5 实时荧光定量 PCR 仪均购自美国 Applied Biosystems 公司;核酸提取或纯化试剂盒(批号:2022066)购自中山大学达安基因股份有限公司(以下简称达安),SARS-CoV-2 核酸检测试剂盒(批号 1:20211101N;批号 2:20220309P)购自上海伯杰医疗科技有限公司(以下简称伯杰)。

1.3 方法

1.3.1 检测方法 根据伯杰扩增试剂盒说明书操作,扩增反应条件为 50℃ 10 min;95℃ 5 min;95℃ 10 s,55℃ 40 s,共 45 个循环,在 55℃ 条件下采集荧光信号。

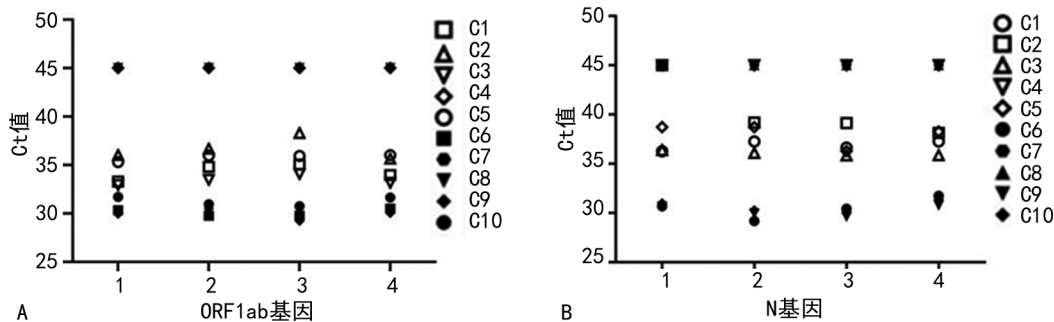
1.3.2 性能确认方法及指标 (1)方法符合率。又叫阴阳符合率。10 例 SARS-CoV-2 室间质量评价标本分别在 4 台实时荧光定量 PCR 仪上进行检测,统计阴、阳性符合率。符合率 100%,则判断试剂盒一致性符合要求。(2)精密度确认。使用第三方弱阳性质控品和试剂盒配套阳性质控品进行评价。参考《定量

测量程序精度的评定》^[7],每批做 1 个弱阳性质控品和 1 个试剂盒配套阳性质控品,试剂为同一批号,实验室 4 台实时荧光定量 PCR 仪每天检测 1 次,连续检测 20 d,弱阳性质控品和阳性质控品各 80 个数据一起计算双靶标基因循环数阈值(Ct 值)重复性(每日不精密度)和实验室内(总不精密度)变异系数(CV),若 $CV \leq 5\%$,则认为该试剂盒不精密度符合要求。(3)检出能力的确认。使用无核酸酶水将 SARS-CoV-2 核酸标准物质稀释到 500 copy/mL。使用伯杰 2 个不同批号的扩增试剂,在 4 台实时荧光定量 PCR 仪上对提取的标本进行扩增,分 3 d 实验,共 120 个结果,判定要求参照《临床检验方法检出能力的确立和验证》^[8]中测量结果总数与临界值观察比例对照表。(4)交叉反应。使用邦德盛分析特异性参考品,对其感染部位相同,感染症状相似 5 种病毒(甲型流感病毒、乙型流感病毒、人副流感病毒、呼吸道合胞病毒和腺病毒)阳性而 SARS-CoV-2 阴性的非定值质控品进行检测。每个样本重复测量 3 次,记录循环数 Ct 值评价试剂特异性。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2020 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析和图表绘制,不精密度以标准差(s)和 CV 表示,计数资料以例数或百分率表示。

2 结果

2.1 方法符合率 根据国家卫生健康委临床检验中心、广东省卫生健康委临床检验中心室间质量评价回报结果显示,3 例阴性质量评价样本(C4、C7 和 C8)双靶标基因未检出,阴性符合率为 100.00%;7 例阳性质量评价样本 ORF1ab 靶标基因检出率为 100.00%(28/28),N 靶标基因检出率为 96.43%(27/28),有效检出率 100.00%(28/28),阳性符合率为 100.00%。10 例室间质量评价样本的 ORF1ab 和 N 基因的检测结果和 Ct 值的分布见图 1。



注:A 为伯杰试剂对 10 例室间质量评价样本 ORF1ab 基因的检测结果;B 为伯杰试剂对 10 例室间质量评价样本 N 基因的检测结果。

图 1 10 例室间质量评价样本 ORF1ab 和 N 靶标基因检测 Ct 值

2.2 精密度确认 弱阳性质控品和阳性质控品在实验室内 4 台实时荧光定量 PCR 仪上检测,共 160 个数

据 Ct 值,计算其标准差和 CV,见表 1,ORF1ab 基因和 N 基因重复性、实验室内总不精密度 CV 均 $< 5\%$,

结果符合要求。

2.3 检出限能力的确认 伯杰扩增试剂批号 20211101N 有 1 例 ORF1ab 基因未检出和 6 例 N 基因未检出;伯杰扩增试剂批号 20220309P 有 1 例 ORF1ab 基因未检出和 4 例 N 基因未检出。2 个不同批号扩增试剂检出率结果见表 2,ORF1ab 基因检出率为 98.33%(118/120),N 基因检出率为 91.67%(110/120),有效检出率为 100.00%(120/120),检出限满足要求。

表 1 弱阳性质控品和阳性质控品 ORF1ab 基因、N 基因精密度情况

样本 (质控品)	ORF1ab 基因 Ct 值				N 基因 Ct 值			
	每日精密度		总不精密度		每日精密度		总不精密度	
	s	CV(%)	s	CV(%)	s	CV(%)	s	CV(%)
弱阳性	1.011	2.957	0.946	2.766	0.743	2.208	0.637	1.893
阳性	0.917	3.699	0.794	3.202	0.501	1.964	0.479	1.876

2.4 交叉反应 5 例分析特异性质控品 3 次检测结果 ORF1ab 和 N 基因均为阴性,表明 5 种病毒间不存在交叉反应,该试剂盒特异性良好。

表 2 2 个不同批号扩增试剂检出率[n(%)]

批号	n	单个基因检出率		双基因 同时检出	有效检出
		ORF1ab 基因	N 基因		
20211101N	60	59(98.33)	54(90.00)	53(88.33)	60(100.00)
20220309P	60	59(98.33)	56(93.33)	55(91.67)	60(100.00)

3 讨 论

《医学实验室质量和能力认可准则》^[9]要求实验室应对非标准方法检验程序进行确认,方法确认应尽可能全面,来证实满足检验预期用途的特定要求。本研究通过对达安提取仪器、提取试剂及伯杰扩增试剂组成的非配套 SARS-CoV-2 核酸检测系统进行性能确认。性能确认结果显示,伯杰扩增试剂在 4 台扩增仪与达安提取试剂组成的非配套检测系统的方法符合率、精密度、检出限及特异性均能够满足实验室检测性能要求。

方法符合率结果显示 ORF1ab 基因阳性符合率达 100.00%,N 基因阳性符合率约为 96.43%,总阳性符合率可达 100.00%,其双靶标基因阴性符合率均为 100.00%,满足要求。本研究中上海伯杰试剂盒的 N 基因阳性符合率并未完全检出。蔡侃儒等^[10]研究发现,核酸 Ct 值>36 时,提示病毒载量较低,任意试剂检测都可能出现假阴性风险。郭元元等^[11]研究也显示,国产试剂对弱阳性样品的检出率参差不齐,少部分试剂只能检测出其中一个靶基因。由此可见,实验室使用 2 种或 2 种以上试剂进行结果复核,除可针

对实验室假阳性标本进行复核外,在一定程度上是避免病毒载量较低的样本出现假阴性结果的重要措施。

检测系统良好的精密度是进行其他方法学验证实验的前提^[12-13]。本实验室前期采用 CLSI EP15-A3 方案(同一台仪器每天重复 5 次,连续 5 d)对达安配套系统进行性能验证,结果与何吕芬等^[14]研究一致,ORF1ab 基因和 N 基因 Ct 值的 CV 值均<5%,说明达安试剂盒重复性好。而针对达安提取试剂与伯杰扩增试剂组成非配套检测系统,则参考 CLSI EP5-A3 进行精密度性能确认。本研究并未在 1 台扩增仪进行 4 次重复试验,而是使用质控品在实验室内 4 台扩增仪分别进行检测的数据作为每日数据,由实验室不同工作人员常规检测过程累计 20 d 数据,能更加真实地反映日常检测样本随机分配不同仪器的实际情况,重复性、实验室总不精密度 CV 均<5%,精密度性能确认结果满足要求。

本研究同时使用 2 个不同批号伯杰扩增试剂对 500 copy/mL 检出限性能确认结果显示,ORF1ab 基因未检出各有 1 例,N 基因未检出分别有 6 例和 4 例,但未发现 ORF1ab 基因和 N 基因同时漏检情况。这也提醒实验室需密切关注单基因检出复核流程及试剂批号的性能验证(确认)方案应采用更为灵敏且扩增不同区域的核酸检测试剂进行复核^[2],以降低实验室假阴性漏检风险。

核酸检测在方法学上特异性强,是确定 SARS-CoV-2 感染的“金标准”,本研究中伯杰扩增试剂对常见 5 种呼吸道病毒无交叉反应,满足要求。本研究也存在以下不足:(1)本研究中方法符合率、交叉反应等性能确认方法均为室间质量评价或质控等样品来源,缺乏真实的临床样本验证;(2)由于 SARS-CoV-2 核酸检测为定性试验,精密度确认方案采用 Ct 值作为精密度来源并非传统意义上的绝对定量;(3)实验室 4 台实时荧光定量 PCR 仪均来自美国 ABI 公司,其他实验室应用的仪器设备种类和数量可能会更多,性能确认方案会更加复杂。

综上所述,实验室应尽量选用配套检测系统,如选用非配套检测系统,实验室应完善性能验证和性能确认程序,合理选择试剂盒及扩增仪,加强人员培训,严格对非配套检测系统进行性能确认,确保 SARS-CoV-2 核酸检测结果质量。

参考文献

[1] 国家卫生健康委办公厅,国家中医药管理局办公室. 新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第九版)[EB/OL]. (2022-03-14) [2022-12-15]. https://www.sohu.com/a/530243797_121106884.
[2] 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联 (下转第 1230 页)

肝硬化患者肝脏硬度值、肝功能及脂联素水平的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(22): 4303-4306.

[4] 江佳莉, 常建兰, 李园. LECT2 在肝脏疾病中的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2021, 21(88): 56-58.

[5] 李艳丽, 刘宁, 赵丹彤, 等. 自身免疫性肝炎患者血清趋化因子水平与生物化学指标的相关性[J]. 中华肝脏病杂志, 2013, 21(4): 299-303.

[6] 中华医学会肝病学分会, 中华医学会消化病学分会, 中华医学会感染病学分会. 自身免疫性肝炎诊断和治疗共识(2015)[J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24(1): 23-35.

[7] 胡明礼, 王绮夏, 马雄. 自身免疫性肝炎发病机制进展与临床干预新靶点[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(4): 743-747.

[8] 张玲, 陈美才, 吴丽华, 等. 6 项指标在自身免疫性肝炎中的临床价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(10): 1258-1259.

[9] 肖萱, 钱金李, 李婷. 自身免疫性肝炎治疗后应答不佳或不耐受的预测因素分析[J]. 肝脏, 2021, 26(8): 907-909.

[10] 俞立飞, 金洁. 自身免疫性肝炎中 Th17/Treg 细胞平衡变化的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(9): 1366-1368.

[11] 王志亮, 逢越, 李庆伟. 白细胞衍生趋化因子 2 及其受体介导的信号通路与疾病[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(9): 879-885.

[12] 王璇, 郭会敏, 赵艳超, 等. 老年自身免疫性肝炎患者治疗后应答不佳的危险因素及风险模型构建[J]. 老年医学与保健, 2022, 28(4): 902-906.

[13] 王维钊, 向晓星. Treg/Th17、Th1/Th2 平衡在自身免疫性肝炎中的免疫学机制及诊疗新靶点[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(8): 1874-1877.

[14] 徐朝艳, 刘维雪, 卢宏凯. 自身免疫性肝病患者血清 LECT2 的表达水平及临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(10): 1157-1161.

[15] 崔海霞, 金春梅, 吴政燮, 等. 自身免疫性肝炎患儿外周血单个核细胞 miRNA-181c 表达与干扰素 γ 、趋化因子配体 10、Toll 样受体 4 的相关性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(10): 2236-2240.

[16] 汪永强, 周振忠, 项明, 等. 肝病相关自身抗体与 Th17、Treg 细胞在自身免疫性肝炎中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(10): 1422-1425.

[17] 董雯迪, 张海蓉, 李瑞, 等. 调节性 T 淋巴细胞/辅助性 T 淋巴细胞 17 在自身免疫性肝炎发生发展中的作用机制及其相关治疗靶点[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(10): 2456-2460.

[18] 凌晶, 张友健, 宋雄峰. 自身免疫性肝炎患者血清趋化因子和 GP73 水平变化及其临床意义研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2020, 23(6): 825-828.

(收稿日期: 2022-10-11 修回日期: 2023-01-08)

(上接第 1225 页)

联防联控机制医疗救治组. 关于印发医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)的通知[EB/OL]. (2020-12-30)[2022-12-15]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7659/202012/b89bcd0813da41788688eb14787b3c72.shtml?from=singlemessage>.

[3] 张运洪, 泰维超, 游风霞, 等. 4 种核酸提取方法对 3 种新型冠状病毒核酸检测试剂检测性能的比较与分析[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(19): 2760-2763.

[4] 余汉忠, 牛璐璐, 孔倩倩, 等. 不同核酸提取方法和新型冠状病毒核酸检测试剂室间质评结果分析[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(2): 146-147.

[5] 崔蕾蕾, 夏爱华, 王伟, 等. 不同检测系统对新型冠状病毒核酸的检测结果分析[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(11): 823-826.

[6] 何维芝, 许彬, 蒋立. 不同提取及扩增方法检测新型冠状病毒核酸的性能比较分析[J]. 华南预防医学, 2022, 48(1): 135-138.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A3 evaluation of precision of quantitative measurement procedures: approved guideline-third edition[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.

[8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床检验方法检出能力的确立和验证: WS/T 514-2017[S]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2017.

[9] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则: CNAS-CL02: 2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.

[10] 蔡倪儒, 张洁云, 彭亚柏, 等. 两种新型冠状病毒核酸试剂检测结果的对比研究[J/CD]. 新发传染病电子杂志, 2021, 6(1): 18-21.

[11] 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(15): 2435-2439.

[12] 伊洁, 吴洁, 肖艳, 等. ABI7900 实时荧光 PCR 系统监测腺病毒 DNA 性能验证[J]. 中国医学装备, 2020, 17(1): 13-16.

[13] CAROLINA I C, JUAN C R, MARCELO R, et al. Comparative study and analytical verification of PCR methods for the diagnosis of congenital chagas disease[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(5): 673-681.

[14] 何吕芬, 李沙, 利振坤, 等. 新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的性能验证[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(7): 848-851.

(收稿日期: 2022-11-16 修回日期: 2023-01-26)