

新冠病毒核酸检测室内质控品应用探讨

汪芬芳¹, 徐礼松², 潘飞¹, 常中宝¹, 张举^{1*}

¹南京金域医学检验所实验诊断部 江苏南京

²宝应县第二人民医院检验科 江苏扬州

【摘要】目的 按照《CNAS-CL02-A009 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》对于定性检测项目质控物的要求,进行新冠核酸病毒检测的质量控制,探讨不同质控品在新冠病毒核酸检测中的应用效果,为常规及应急状态下的新冠核酸检测质量保证提供依据。**方法** 根据试剂盒阳性质控检测 ct 值将试剂盒阳性对照品进行稀释,达到检测限 1.5~3 倍的浓度作为自配的弱阳性质控品使用。**结果** 试剂盒阳性对照稀释后作为自配质控品稳定性较好,但不能监测样本提取步骤,用于日常样本检测时质量控制受限于各试剂盒厂家,不能通用于不同厂家的试剂盒。**结论** 试剂盒阳性对照稀释作为弱阳性质控品使用可临时用于新的项目或应急情况使用,实验室进行长期的质量控制推荐使用自配质控品和第三方质控品联合应用的方式。

【关键词】 自配质控品; 第三方质控品; 新型冠状病毒检测; 联合检测

Discussion on the Application of SARS-CoV-2 for Nucleic Acid Detection

Fengfang Wang¹, Lisong Xu², Fei Pan¹, Zhongbao Chang¹, Ju Zhang^{1*}

¹Laboratory diagnostic Department, KingMed Clinical Laboratory, Nanjing, Jiangsu, China;

²Clinical Lab, Baoying Baoying County Second Hospital, Yangzhou, China

【Abstract】Objective The quality control of coronavirus detection was carried out in accordance with the requirements of quality control materials for qualitative detection items in the "Instructions on the Application of CNAS-CL02-A009 Medical Laboratory Quality and Capability Accreditation Criteria in the Field of Molecular Diagnosis", then explore the application effect of different quality control substances in the nucleic acid detection of SARS-CoV-2, to provide a basis for the quality assurance of SARS-CoV-2 testing under routine and emergency conditions. **Method** The positive control substance of the kit was diluted according to the CT value of the positive quality control test of the kit, and the concentration reached 1.5~3 times of the detection limit was used as the self-formulated weakly positive quality control substance. **Results** the positive control of the kit can be used as the self-matched quality control product with good stability after it was diluted, but the sample extraction steps cannot be monitored. The quality control of the kit used in daily sample testing is limited by each kit manufacturer, and it cannot be used in the kit of different manufacturers. **Conclusions** The positive control dilution of the kit can be used as a weakly positive quality control product, which can be used temporarily for new projects or emergency situations. For long-term quality control in the laboratory, it is recommended to use self-supplied quality control product and third-party quality control product combined application.

【Keywords】 Self-matched Quality Control Products; Third Party Quality Control; SARS-CoV-2; Combined Detection

2019 年底爆发于武汉的新型冠状病毒肺炎在 2020 年年初迅速蔓延至全国及全球,新型冠状病毒肺炎作为急性呼吸道传染病已纳入《中华人民共和

国传染病防治法》规定的乙类传染病,按照甲类传染病管理^[1]。在 2020 年 1 月 16 日发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(试行)中已将呼吸

道标本进行病毒全基因组测序与已知的新冠病毒高度同源作为新型冠状病毒肺炎确诊的依据, 2021年4月14日发布的《新型冠状病毒感染的肺炎诊疗方案》(第八版修订版)继续将荧光 RT-PCR 检测新型冠状病毒核酸阳性作为确诊患者的诊断依据, 那么, 严格做好新冠病毒核酸检测的质量保证成为了疫情防控工作非常重要的环节。《CNAS-CL02-A009 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》对于定性检测项目要求在每次实验时应设置阴性、弱阳性和/或阳性质控物。那么对于一个新的病毒, 在没有外部质控品的情况下, 如何做好质量保证工作是检验人员必须思考的问题。

1 材料与检测方法

1.1 质控材料的选择

考虑到新冠病毒的特殊性及低风险地区阳性标本较少, 不便于留取临床阳性样本进行自配质控品制作, 故收集湖南圣湘生物科技有限公司提供的试剂盒阳性对照进行稀释(试剂盒批号: 2020089, 有效期: 20201219; 阳性质控批号: 20200612-3; 生产日期: 20200612, 有效期: 20220611), 阳性质控主要成分为含目标基因(ORF1ab、N 基因)、内标基因片段(Rnase P 的体外转录 RNA)。

1.2 稀释材料的准备

使用广州市微米生物科技有限公司生产的一次性病毒采样管中保存液进行稀释(物料编号产品编号为: A0420011, 生产日期: 2020.06.24; 批号: 20200601; 有效期: 20220623, 型号 WM-2, 储存条件: 4-30℃), 该产品主要组成部分是 HALA, ARG, 葡萄糖, 牛血清, 青霉素-链霉素(0.1%), 在有效期内符合条件情况下储存。

1.3 质控品的分装材料的准备

采用 Axygen 厂家提供的 SCT-050-SS-C/0.5ml 冻存管进行分装, 螺口带盖。

1.4 检测方法

采用圣湘试剂(批号: 2020089, 有效期: 20201219), 一步法进行检测。

(1) 取出样本释放剂, 待平衡至室温后, 混匀瞬时离心待用

(2) 吸取 10ul 样本释放剂加入到八联管中, 每管加入待处理样本 10ul, 用移液器轻轻吸打 3-5 次混匀, 静置 10min 后待用

(3) 将 30ul 配制好的 PCR-混合液加入到装有 20ul 上述处理后的 PCR 扩增管中, 在实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司 型号 7500)上扩增。

(4) 核酸扩增: 实时荧光 RT-PCR 扩增程序: 50℃30 分钟; 95℃1 分钟; 95℃15 秒, 60℃30 秒, 共 45 个循环, 25℃10 秒 在 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪上扩增, 检测新冠病毒 ORF 1ab 和 N 基因。

2 配制步骤及性能验证

2.1 预实验检测

按要求分别配制稀释倍数为 100 倍、200 倍、500 倍和 1000 倍的样本各三例进行预实验检测, 检测结果(CT 值)见表 1。

根据试剂盒说明书结果判读标准(CT 值 \geq 40 为阴性)及该项目的特殊性, 最终选择 200 倍为最终弱阳性质控制备稀释倍数。

2.2 均一性验证

按照稀释倍数 200 倍进行稀释阳性对照, 并混匀后分装冻存管, 随机留取 20 例样本用于该项目的均一性评估并填写定性项目自配质控品性能评估记录表, 均一性需符合要求, 无统计学差异或 CV<5%, 检测结果见表 2。

表 1 预实验检测结果记录表

检测频次	1		2		3		4		5	
	N	ORF	N	ORF	N	ORF	N	ORF	N	ORF
100 倍	34.1	33.25	33.65	33.27	33.41	33.21	33.31	33.58	34.24	33.73
*200 倍	35.63	33.98	34.63	34.16	34.86	34.55	35.16	34.43	33.93	34.58
500 倍	35.48	35.57	37.59	36.75	35.33	35.70	35.77	36.02	35.75	36.51
1000 倍	36.56	37.04	36.14	36.91	36.55	37.57	36.80	37.74	36.30	36.25

ORF、N: 新型冠状病毒推荐的检测位点; *表示经倍比稀释后达到弱阳标准的梯度。

表 2 均一性检测结果记录表

样本号/基因型	N	ORF	样本号/基因型	N	ORF
1	35.77	36.32	11	36.99	36.18
2	36.35	35.48	12	35.77	35.64
3	35.67	36.08	13	36.01	36.44
4	36.07	36.82	14	36.11	36.11
5	36.19	35.67	15	36.57	35.36
6	35.81	36.13	16	35.43	35.45
7	36.98	36.29	17	36.49	35.87
8	36.5	35.73	18	35.65	35.89
9	35.68	35.2	19	36.15	35.73
10	35.96	35.24	20	36.69	34.69

均值: N 36.142、ORF 35.816 ; 变异系数: N 1.242%、ORF 1.399%

ORF、N: 新型冠状病毒推荐的检测位点, N、ORF 变异系数均<5%。

2.3 分装

按照每天使用量进行单独装入密封袋, 并在密封袋上写上质控品名称、配制人、批号、配制时间、暂定有效期半年、储存要求等信息。

2.4 反复冻融验证

将配制号的质控品置-70℃进行保存, 每天使用前取出当天需要量, 避免质控品反复冻融影响其稳定性, 反复冻融 10 次验证结果见表 3。

表 3 反复冻融验证结果记录表

序号	N	ORF
1	35.3	34.77
2	35.49	34.77
3	35.4	34.83
4	36.07	34.88
5	35.2	34.73
6	36.09	34.86
7	36.41	34.42
8	36.08	34.62
9	35.36	34.84
10	35.53	35.12
CV	1.19%	0.52%

ORF、N: 新型冠状病毒推荐的检测位点; CV: 变异系数。

2.5 稳定性验证

该实验为检测时评估实验检测结果是否稳定可靠, 自配质控品分装完成后每天同临床样本同时进行检测, 如有质控品检测结果出现异常时需要分析原因, 必要时对样本及质控品进行复测, 持续检测结果异常可能为自配质控品稳定性异常, 需用其他质控品进行验证。累积第一周至第十二周周的期间不精密度数据, 见表 4。

表 4 稳定性评估 (CV 值)

日期	N	ORF
第一周	0.77%	1.60%
第二周	0.92%	1.18%
第三周	1.04%	1.05%
第四周	1.46%	2.32%
第五周	2.42%	1.39%
第六周	1.19%	0.80%
第七周	1.88%	1.48%
第八周	1.16%	1.19%
第九周	1.07%	1.18%
第十周	2.42%	1.54%
第十一周	1.38%	0.94%
第十二周	2.06%	2.18%
CV	1.48%	1.40%

ORF、N: 新型冠状病毒推荐的检测位点; CV: 变异系数。

3 结果

按照此方法配制的自配质控品均一性和反复冻融检测结果均在实验要求范围内, 十二周内该质控品稳定性检测结果(Ct 值)无趋势性变化, 基本满足临床对于质量控制的需求。

4 讨论

最为理想的核酸病毒检测室内质控品应该具有以下条件[2]: (1)基质(根据 ISO17511, 基质指的是某物质体系中除了被分析物之外的所有组分的总称)与待测标本一致, 质控品基质与待测标本一致; (2)所含待测物浓度应接近检测的决定性水平, 新冠病毒核酸检测要求达到检测限 1.5~3 倍; (3)稳定性和均一性良好, 稳定性最好不低于半年, 避免频繁验证; (4)靶值或预期检测结果已定; (5)无已知的生物传染危险; (6)单批可大量获得, (7)价廉和使用方便。我中心在本研究中使用的自配质控品也是按照以上要求进行制作并进行严格的指标验证的。本次研究我中心自配的质控品稳定性和均一性均能满足实验室对质量控制的要求, 成本较低, 方法简单, 并且可以大批量获得, 可有效监测新冠病毒核酸检测质量。

本次研究中同时发现了自配质控品的两个缺点: 一、自配质控品仅能监测扩增检测环节, 无法监测核酸提取环节, 且质粒浓度相对较高, 稍有不慎就可能造成实验室污染, 此问题在的研究中^[3]也有提到; 二、由于试剂盒生产厂商不同, 所使用的原料、引物和工艺均有差别, 导致部分厂家试剂盒无法检出弱阳性自配质控品的问题出现^[4], 如上海之江、上海科华、中山达安、卡尤迪等试剂均未检出。因此, 本研究制作的自配质控品仅可用于原装厂商生产的新冠核酸检测试剂盒使用, 这也是该项目自配质控品的缺陷。另一方面, 第三方质控品大部分为人工模拟的假病毒, 具有无生物危险、稳定、预期结果已知、单批可大量获得并持续供应等优点^[5], 且改善了不同试剂盒结果表达不一致的缺点, 但是价格相对昂贵, 存在潜在的基质效应, 所以综

合比较下来, 建议实验室结合自身条件, 灵活使用厂家原装试剂盒质控品和第三方质控品的有效浓度, 严格做好性能验证, 使新冠病毒核酸的检测质量得到有效保证。

参考文献

- [1] 李莉, 柳娇娇, 金荣华, 等.法定乙类传染病——新型冠状病毒(2019-nCov)感染的肺炎[J].医学新知, 2020(1): 14-21.
- [2] 李金明. 新型冠状病毒感染临床检测技术[M]. 北京科学出版社, 2021: 293-293.
- [3] 李艳伟, 曾其莉, 江永忠, 等.生物安全实验室新型冠状病毒污染现状初步调查[J].公共卫生与预防医学, 2020, 31(3):19-21.
- [4] 王卓、刘宏波、金美松, 等.多种类型检测试剂及不同样本处理方式对新型冠状病毒核酸检测结果的影响[J].解放军预防医学杂志, 2020, v.38; No.233 (08):107-109+114.
- [5] 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年41卷14期, 1665-1669页, ISTIC CA, 2020, 41 (14): 1665-1669.

收稿日期: 2021年9月23日

出刊日期: 2021年10月26日

引用本文: 汪芬芳, 徐礼松, 潘飞, 常中宝, 张举, 新冠病毒核酸检测室内质控品应用探讨[J]. 国际医学与数据杂志, 2021, 5(1): 1-4.
DOI: 10.12208/j.ijmd.20210001

检索信息: RCCSE 权威核心学术期刊数据库、中国知网(CNKI Scholar)、万方数据(WANFANG DATA)、Google Scholar 等数据库收录期刊

版权声明: ©2020 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS