

2021-05-21

江西 · 赣州



如何做好新冠核酸检测的质量控制

李 蓉

江西省临床检验中心
&江西省人民医院检验科

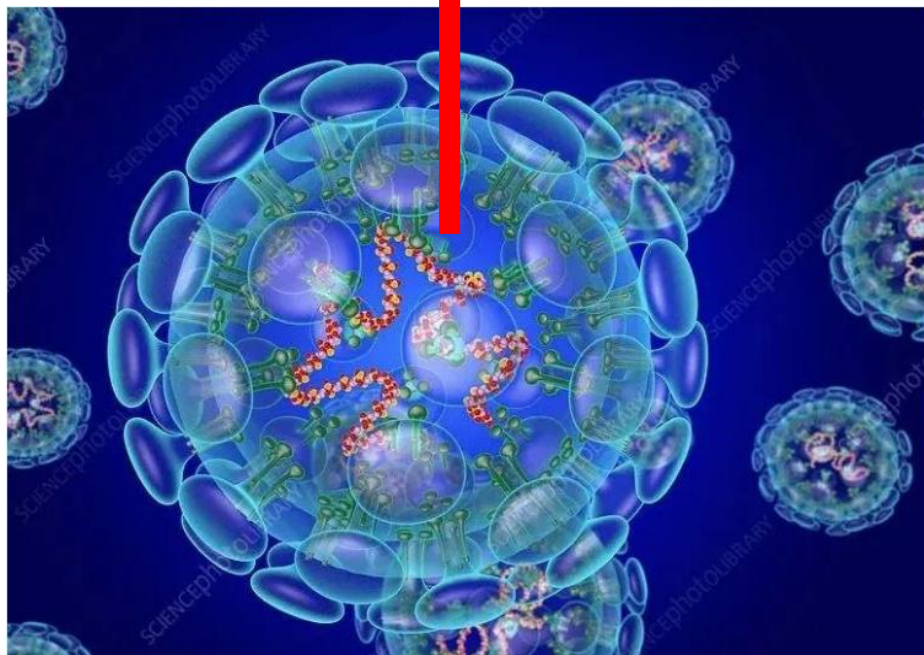


目 录

- 什么是病毒的核酸
- 新冠病毒核酸检测的意义
- 新冠病毒核酸检测的质量控制



核酸

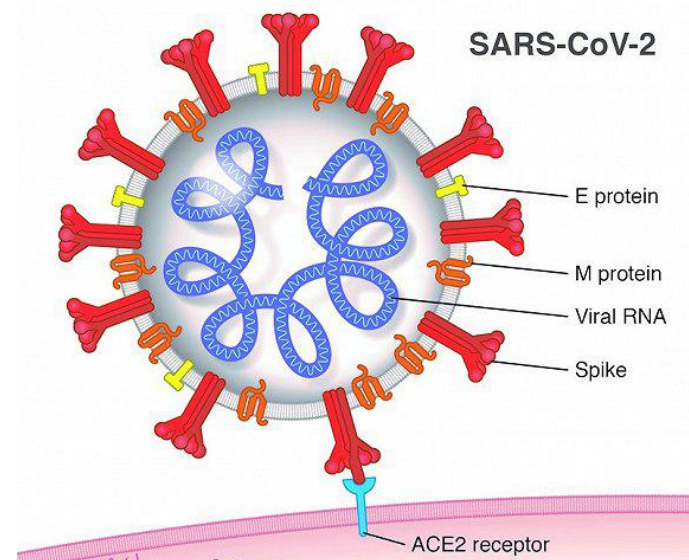


01

什么是病毒的核酸

病毒核酸的定义

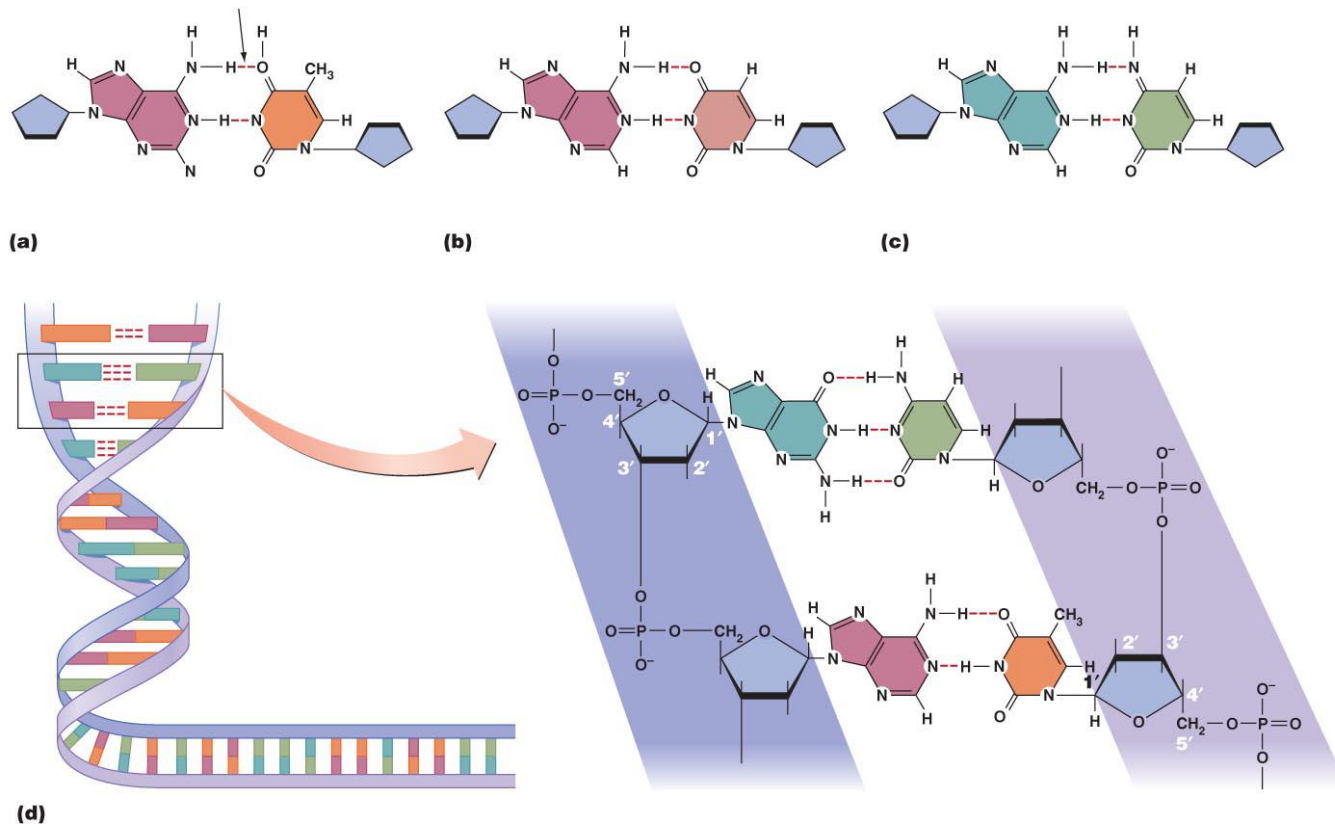
核酸 (DNA或RNA)是病毒的遗传物质，任何物种都有独一无二的核酸序列，所以我们只需要对新冠病毒的特征序列进行检测就可以确定是不是新冠病毒感染；检测出新冠病毒的核糖核酸（RNA），是病毒存在的直接证据、金标准。



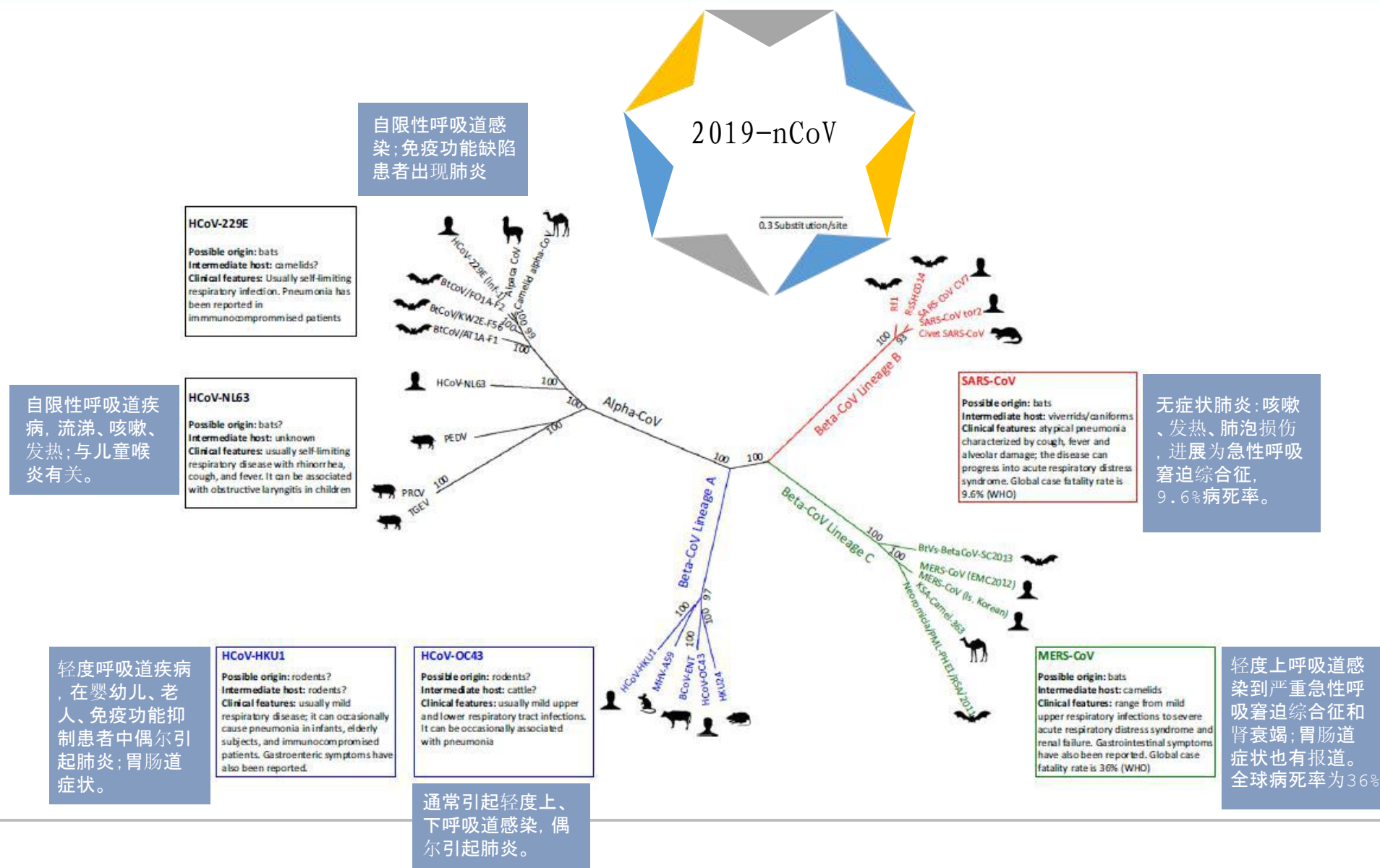
病毒的核酸分类

DNA { 双链DNA (多数)
单链DNA (很少)

RNA { 单正链RNA
单负链RNA
双链RNA
双正链RNA



核酸决定病毒的种类



新冠病毒(2019-nCoV)诊断方法

核酸检测目前是新冠病毒检测的“金标准”，
具有早期诊断、灵敏度和特异性高等特点。

➤病毒中特异性RNA序列是区分该病毒与其它病原体的标志物

➤新冠病毒常用的核酸诊断方法有两种

1. 病毒核酸特异基因检测

2. 病毒基因组测序

➤最常见的检测新型冠状病毒特异性核酸序列的方法是**荧光定量PCR**（聚合酶链式反应）

➤由于新型冠状病毒是RNA病毒，核酸检测采用反转录加实时聚合酶链式反应法（RT-PCR），
扩增病原体的核酸（RNA），同时通过荧光探针实时检测扩增产物。



新冠肺炎诊疗方案

国家卫生健康委员会办公厅 国家中医药管理局办公室

国卫办医函〔2020〕184号

关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案 (试行第七版)的通知

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团卫生健康委、中医药管理局：

为进一步做好新型冠状病毒肺炎病例诊断和医疗救治工作，我们组织专家在对前期医疗救治工作进行分析、研判、总结的基础上，对诊疗方案进行修订，形成了《新型冠状病毒肺炎诊疗方案（试行第七版）》。现印发给你们，请参照执行。各有关医疗机构要在医疗救治工作中积极发挥中医药作用，加强中西医结合，完善中西医联合会诊制度，促进医疗救治取得良好效果。



(信息公开形式：主动公开)



2020年3月3日

2. 病原学及血清学检查

(1) 病原学检查：采用 RT-PCR 或/和 NGS 方法在鼻咽拭子、痰和其他下呼吸道分泌物、血液、粪便等标本中可检测出新型冠状病毒核酸。检测下呼吸道标本（痰或气道抽取物）更加准确。标本采集后尽快送检。

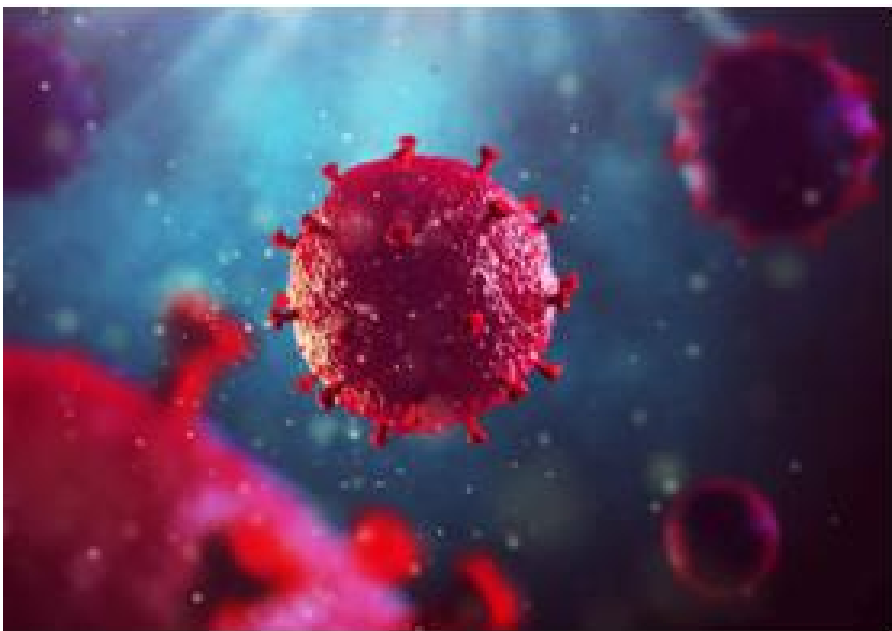
(2) 血清学检查：新型冠状病毒特异性 IgM 抗体多在发病 3-5 天后开始出现阳性，IgG 抗体滴度恢复期较急性期有 4 倍及以上增高。

(二) 确诊病例。

疑似病例同时具备以下病原学或血清学证据之一者：

1. 实时荧光 RT-PCR 检测新型冠状病毒核酸阳性；
2. 病毒基因测序，与已知的新型冠状病毒高度同源；
3. 血清新型冠状病毒特异性 IgM 抗体和 IgG 抗体阳性；血清新型冠状病毒特异性 IgG 抗体由阴性转为阳性或恢复期较急性期 4 倍及以上升高。

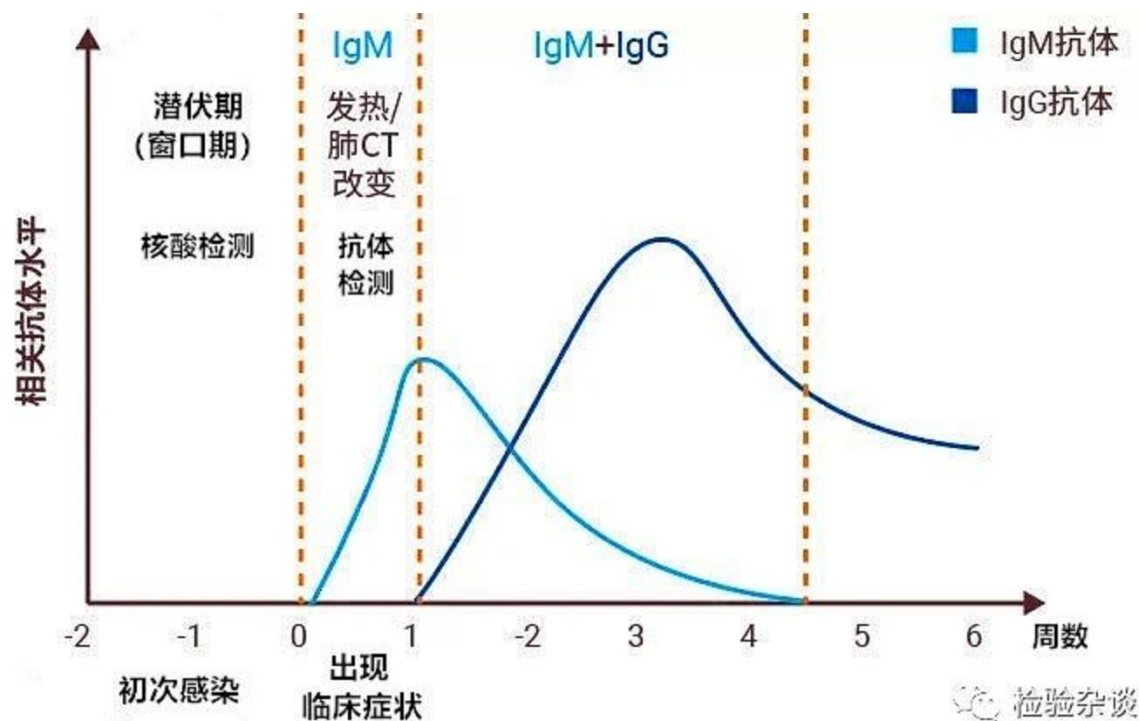
- 诊断主要结合临床表现、流行病学史和病原学、血清学检查



02

新冠病毒核酸检测的意义

新冠病毒核酸检测 vs 抗体检测



与抗体检测相比

核酸在患者感染新冠病毒早期就可以被检测到，可以更早发现新冠病毒感染患者。人体感染新冠病毒后，感染潜伏期(理论上感染后大约1-2天)即可检测到核酸，而IgM抗体大约需要5~7天产生，IgG抗体在10~15天时才产生，这就大大缩短了检测的窗口期。

但核酸检测由于标本采集因素影响，易出现假阴性，检测操作复杂，检测时间较长，而且很大程度上增加了医护人员在标本采集和检测过程中被感染的风险。

抗体检测 vs 核酸检测

与核酸检测相比

抗体检测的血液标本更易获取且标本质量有保证、操作简单检测快速，可以不依赖于特定仪器，肉眼观察结果。

很大程度上降低了医护人员在标本采集和检测过程中被感染的风险、更易于基层实验室展开筛查工作等。

但抗体检测存在窗口期，存在个体免疫应答差异，因此IgM和IgG抗体对早期新冠病毒的检测仍存在假阴性的可能，同时由于交叉反应，也可能产生假阳性；胶体金法只能定性检测，无法进行抗体的定量检测，灵敏度和特异度相对欠佳。

抗体的动态变化，更能反映感染进程

因此抗体联合核酸检测方法及其他指征进行综合判读、联合应用，才能有助于提高疾病的检出率，尽可能地找出确诊患者，更有利于疫情的控制。

核酸阴性=不具有传染性=不隔离

核酸与抗体联合检测不同结果的处理方式		
核酸 (+) 抗体 (-)	急性期感染	患者隔离及密切接触者隔离
核酸 (+) 抗体 (+)	感染者或者复阳患者	患者隔离及密切接触者隔离
核酸 (-) 抗体 (+)	既往感染者或核酸假阴性	若患者为有相应的临症状，比如发烧，咳嗽，胸部CT影像学的变化，白细胞正常或减少，淋巴细胞减少等，且有相关流行病学接触史的疑似病例，患者留观或进缓冲病房，并间隔24小时再次检测核酸，核酸转阳则按核酸阳性模式处理
核酸 (-) 抗体 (-)	窗口期或未感染	若患者为有相应的临症状，比如发烧，咳嗽胸部CT影像学的变化，白细胞正常或减少，淋巴细胞减少等，且有相关流行病学接触史的疑似病例，建议医学隔离观察，并间隔24小时再次检测核酸，核酸转阳则按核酸阳性模式处理。

在确诊病例诊断中的应用

确诊病例

- 流行病学史

- 临床表现

- 有流行病学史中的任何一条，符合临床表现中任意2条；
- 无明确流行病学史的，符合临床表现中的3条。

- 具备以下病原学证据之一者：

- 实时荧光 RT-PCR检测新型冠状病毒核酸阳性；
- 病毒基因测序，与已知的新型冠状病毒高度同源。

在排除病例诊断中的应用

排除病例

与新型冠状病毒感染者有密切接触的患者，即便常见呼吸道病原检测阳性，

➤也建议及时进行新型冠状病毒病原学检测。

➤疑似病例连续两次呼吸道病原核酸检测阴性(采样时间至少间隔1天)，
方可排除。

在解除隔离和出院标准中的应用

解除隔离与出院标准

- 体温恢复正常3天以上;
- 呼吸道症状明显好转;
- 肺部影像学显示炎症明显吸收;
- 连续两次呼吸道病原核酸检测阴性(采样时间间隔至少1天);
- 可解除隔离出院或根据病情转至相应科室治疗其他疾病。

新冠病毒核酸检测的优势

荧光定量 PCR 检测优势

- 缩短病毒检测窗口期，实现早期检测；
- 全自动化快速灵敏检测，特异性高；
- 可实现多靶标基因片段检测，排查病原体感染可能；
- 多种病原体感染联合检测，全面筛查疾病根源。

03

新冠病毒核酸检测的质量控制



国家卫健委发布：医疗机构新冠病毒核酸检测工作手册

医政医管局

主站首页 | 首页 | 最新信息 | 政策文件 | 工作动态 | 关于我们 | 图片集锦 | 专题专栏

通知公告

您现在所在位置： 首页 > 最新信息 > 医疗与护理 > 通知公告

关于印发医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行）的通知

发布时间：2020-07-13 来源：医政医管局



联防联控机制医疗发〔2020〕271号

联防联控机制医疗发〔2020〕271号

各省、自治区、直辖市及新疆生产建设兵团应对新冠肺炎疫情联防联控机制（领导小组、指挥部）：

为指导各医疗机构做好新冠病毒核酸检测工作，我们组织制定了《医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册（试行）》（可在我委官网“医政医管”栏目下载）。现印发给你们，请参照执行。

国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制医疗救治组
(代章)

2020年7月10日

核酸检测技术人员资质控制

医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册

(试行)

为落实国务院应对新型冠状病毒感染肺炎疫情联防联控机制《关于做好新冠肺炎疫情常态化防控工作的指导意见》（国发明电〔2020〕14号）要求，进一步规范新型冠状病毒（以下简称新冠病毒）核酸检测的技术人员、标本采集、标本管理、实验室检测、结果报告等工作，保证检测质量，提高检测效率，满足新冠病毒核酸检测需求，特制定本手册。本手册适用于所有开展新冠病毒核酸检测的医疗机构。

一、技术人员基本要求

（一）采样人员。从事新冠病毒核酸检测标本采集的技术人员应当经过生物安全培训（培训合格），熟悉标本种类和采集方法，熟练掌握标本采集操作流程及注意事项，做好标本信息的记录，确保标本质量符合要求、标本及相关信息可追溯。

（二）检测人员。实验室检测技术人员应当具备相关专业的大专以上学历或具有中级及以上专业技术职务任职资格，**并有2年以上的实验室工作经历和基因检验相关培训合格证书**。实验室配备的工作人员应当与所开展检测项目及标本量相适宜，以保证及时、熟练地进行实验和报告结果，保证结果的准确性。



核酸检测实验室资质控制

- 符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院令 第424号)和《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发[2010]194号)有关规定
- 具备经过卫生健康行政部门审核备案的生物安全二级及以上实验室条件, 以及临床基因扩增检验实验室条件。
- 独立设置的医学检验实验室还应当符合《医学检验实验室基本标准(试行)》《医学检验实验室管理规范(试行)》等要求。

《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》

总则

第二条 临床基因扩增检验实验室是指通过扩增检测特定的DNA或RNA, 进行疾病诊断、治疗监测和预后判定等的实验室, 医疗机构应当集中设置, 统一管理。

第三条 本办法适用于开展临床基因扩增检验技术的医疗机构。

第五条 以科研为目的的基因扩增检验项目不得向临床出具检验报告, 不得向患者收取任何费用。

核酸检测实验室分区控制

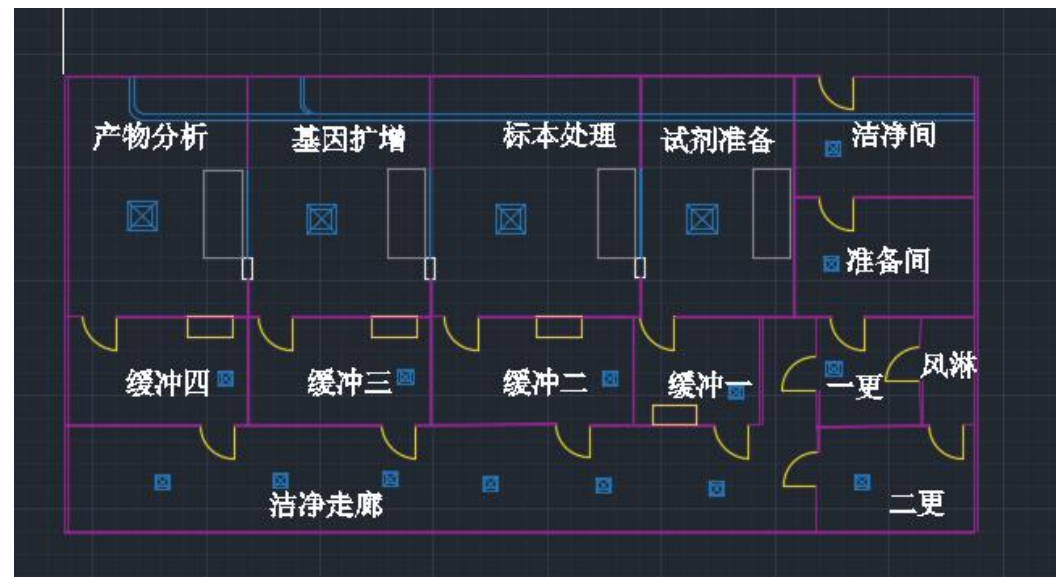
试剂储存和准备区、标本制备区、扩增和产物分析区。

这3个区域在物理空间上应当是完全相互独立的，不能有空气的直接相通。各区的功能是：

1.试剂储存和准备区：贮存试剂的制备、试剂的分装和扩增反应混合液的制备，以及离心管、吸头等消耗品的贮存和准备。

2.标本制备区：转运桶的开启、标本的灭活，核酸提取及其加入至扩增反应管等。

3.扩增和产物分析区：核酸扩增和产物分析。根据使用仪器的功能，区域可适当合并。如采用标本处理、核酸提取及扩增检测为一体的自动化分析仪，标本制备区、扩增和产物分析区可合并。



核酸检测标本操作程序控制

实验室接到标本后,应当在生物安全柜内对标本进行清点核对,并对标本进行灭活处理。按照标准操作程序进行试剂准备、标本前处理、核酸提取、核酸扩增、结果分析及报告。实验室应当建立可疑标本和阳性标本复检的流程。

1.试剂准备。应当选择国家药品监督管理部门批准的试剂,并在选择标本保存液和核酸提取试剂时,使用试剂盒说明书上建议的配套试剂。核酸提取方法与标本保存液和灭活方式相关,有些核酸提取试剂(如磁珠法或者一步法),容易受到胍盐或保存液中特殊成分的影响,特别是一步法提取多需要使用试剂厂家配套的标本保存液。

2.标本前处理。已经使用含胍盐的灭活型标本保存液的实验室,这一环节无需进行灭活处理,直接进行核酸提取,而使用非灭活型标本保存液的实验室,则有56°C孵育30分钟热灭活、化学灭活的处理方式。

3.核酸提取。将灭活后的标本取出,在生物安全柜内打开标本采集管加样。核酸提取完成后,立即将提取物进行封盖处理。在生物安全柜内将提取核酸加至PCR扩增反应体系中。

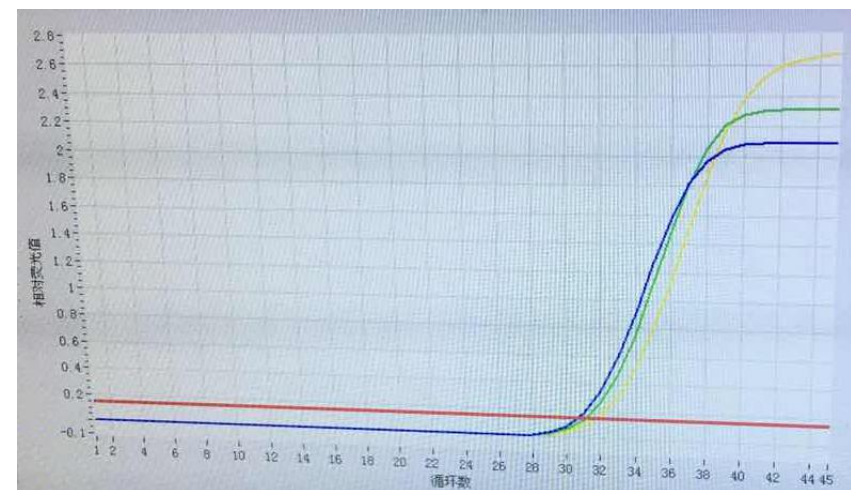
4.核酸扩增。将扩增体系放入扩增仪,核对扩增程序是否与试剂说明书相符,启动扩增程序。扩增后产物置于含1 mol/L的盐酸中,应将产物全部浸泡至液体中,浸泡后将扩增产物转移出实验室。

核酸检测靶标的控制

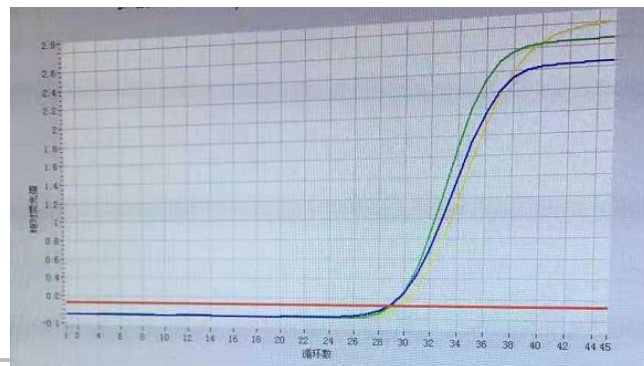
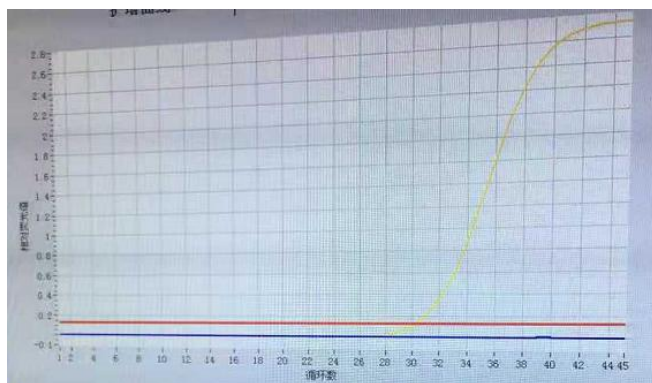
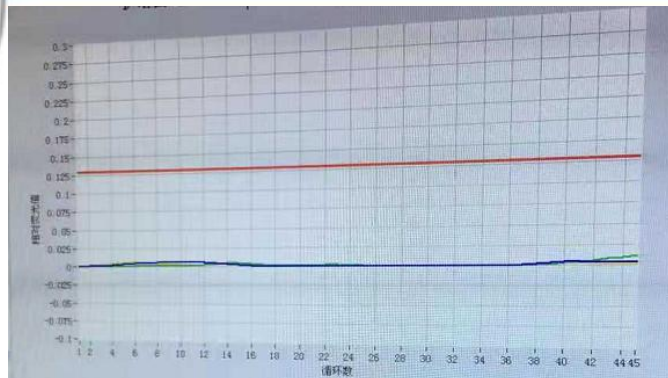
➤目前批准产品均基于新型冠状病毒基因组中开放读码框1a/b (open reading frame 1ab, ORF1ab)、包膜蛋白 (Envelope protein, E) 和核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N) 进行选择。

➤不同产品的检测原理基本一致，但是其引物、探针设计存在不同的检测和判读差别：

1. 单靶区段 (ORF1ab)
2. 双靶区段 (ORF1ab、N蛋白)
3. 三靶区段 (ORF1ab、N蛋白和E蛋白)：**E蛋白非特异性蛋白**
一般检测位于病毒ORF1ab和N基因上的两个靶标，同一份标本需满足双靶标阳性或重复检测为单靶标阳性或两种标本同时满足单靶标才能确认病毒核酸阳性。



核酸检测报告解读的质量控制



新型冠状病毒核酸检测报告单

(参考样式)

医疗机构名称:

姓名:

性别:

年龄:

联系电话:

人员类型:

ID 号/住院号:

病区/床号:

送检科室:

申请医师:

标本类型:

标本编号:

检验项目	检测结果	参考区间	检测方法
新型冠状病毒核酸检测	阴性		实时荧光 PCR 法
<p>声明:</p> <p>1. 本检测结果可能受到采样时间、采样部位及方法学局限性等因素影响, 结果需结合临床进行分析。</p> <p>2. 此报告仅对本次送检标本负责。</p>			

签发时间: (此处加盖医疗机构公章)

采样时间:

接收时间:

检验人:

审核人:

联系地址:

联系方式:

“假阳性”问题

新冠病毒核酸荧光检测从引物和探针设计的原理看，不应该有假阳性的，分析特异性也好。

但实际工作中，还是有可能出现检测“假阳性”。

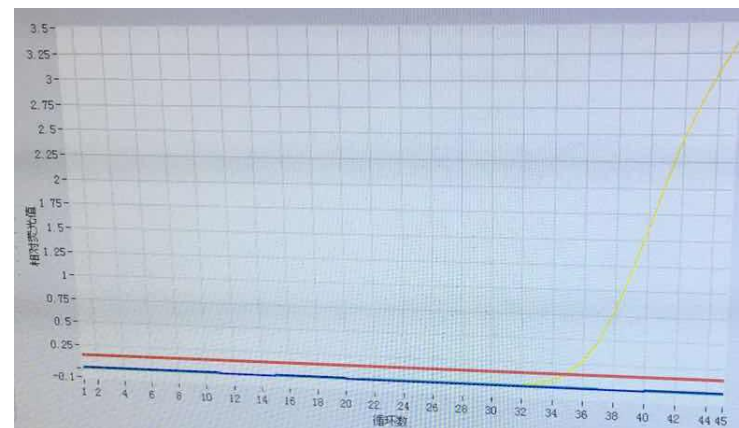
通常是由于实验室检测人员操作时，发生了标本间交叉污染（cross-contamination）或实验室扩增产物的遗留污染（carry-over）所致。

一个临床实验室如严格执行“三个阴性样本随机放在临床样本中间同时参与检测全过程”的质控策略，应可有效避免病毒核酸检测假阳性结果的报出，这也是病毒核酸检测阳性可以作为新冠病毒感染的确诊依据的原因。

“假阴性”问题

2020年2月21日，国家卫健委印发《新型冠状病毒肺炎防控方案（第五版）》，在实验室检测技术指南中明确指出，核酸检测结果阴性不能排除新冠病毒感染，需要排除可能产生假阴性的因素。

“假阴性”，首先要解决的是“被感染者的细胞中有一定量的病毒、采集标本时采集到含有病毒的细胞”这两个环节的问题。所以在新冠的核酸检测试剂中最好是要有内源性内标来监测采样的环节。



“假阴性”的原因

1 病毒载量差异

- 不同患者机体中的病毒存在量不同
- 不同病程也会导致差异

2 采样问题

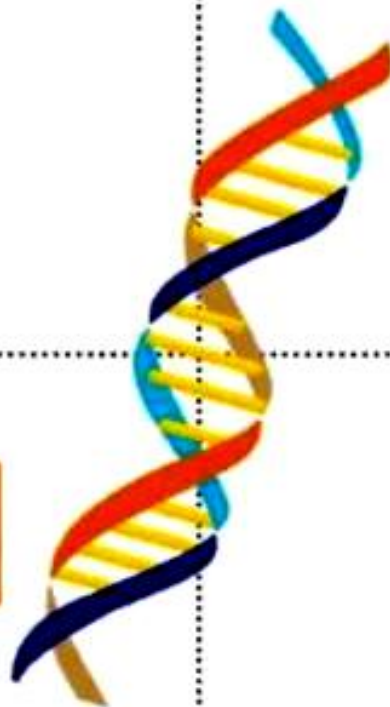
- 只有在合适采样部位，才能采取到含有病毒的细胞

3 检测试剂质量问题

- 试剂设计不够完善，灵敏度不够
- 批次间差异大

4 检测操作问题

- 检测操作的规范性、质量管理体系的严格性对结果产生影响



提高核酸检测阳性率的条件

- **被感染者的细胞中有一定量的病毒。**不同病程、不同病情患者机体中的病毒存在量可能不同，已有病毒感染，但由于在相关部位采集不到病毒或采集到的病毒量太少，以致现有方法检测不到，也称窗口期。
- **采集标本时，必须采集到含有病毒的细胞。**采集部位不当，如采集口咽拭子时，采集深度不够；采集鼻咽拭子没有采到鼻腔深处等，采集到的细胞可能大部分都不含病毒，即可能造成假阴性。
- **可靠的体外诊断试剂。**国家卫健委临床检验中心也表示，部分厂家的试剂产品由于研发时间短，也没有使用已知临床样本进行必要的性能确认，可能存在对试剂优化不充分以及试剂批间差异大等问题。从试剂方面分析原因，可能与试剂引物设计有关，也可能与各位点检测灵敏度相关。
- **规范的临床核酸检测实验室（合理的分区、有能力的检测人员和严格的质量管理体系）。**除了检测试剂本身，实验室规范与否也会对检测结果产生重要影响。标本运输保存条件、临床实验室的规范操作、结果判读和质量控制等都是保证检测结果准确可靠的关键因素。

检测试剂入门关的控制

- 首先把好病毒核酸检测试剂入门关。
- 选择试剂时要至少对检测限（分析敏感性）和重复性进行性能验证, 每批试剂应用前要质检;
- 可通过检测限和重复性验证, 可以了解拟选择的几种（可选两到三种）试剂在上述各方面的差异, 形成自己实验室最优的检测系统（人、机、料、法、环），建立具有可操作性的SOPs。

设置内源性内标

新冠核酸检测试剂盒中内源性内标的重要性——内源性内标，防止假阴性

内源性内标



- ① 外源性物质
- ② 核酸提取时需要额外加入
- ③ 仅能监测检测过程，不能监测提取过程



① 内源性管家基因，核糖核酸酶P (RNase P)

② 检测时不需要加入

RNase P在人体各器官组织细胞中普遍存在，能够对人体来源样本的RNA核酸片段进行检测

④ RNase P内参可以对样本的采集、运输储存、核酸提取等步骤起到监控的作用，保障了检测结果的准确性



外源性内标

做好室内质量控制

做好室内质量控制，每批检测至少有一份弱阳性质控（通常可为检测限的3倍，其最能监控弱阳性样本是否能成功检出）和3份阴性质控（如生理盐水），随机放在临床标本中间参与从提取到扩增检测的全过程。

设3份阴性质控，实时监控实验室“污染”的存在，保证阳性结果的准确可靠，只有通过多份阴性质控才能最有效的监测是否有“污染”发生。

此外，检验人员上岗前的操作培训、各种消除及防止污染的措施（每次实验后用10%次氯酸钠溶液擦拭实验台面、地面、试管架等；仪器设备的日常维护及清洁；良好的通风等）、仪器设备的定期校准等也是有效减少实验室层面上的“假阳性”和“假阴性”的有效措施。

正确佩戴和摘除医用防护口罩

医用防护口罩佩戴方法（参考）



1、手托口罩，鼻夹面背向外



2、将口罩罩住鼻、口、下巴



3、将下方系带拉过头置于颈后耳下



4、将上方系带拉至头顶中部



5、双手指从中间向两侧按压鼻夹



6、进行正压及负压测试

注意事项：

1、须双手按压调整鼻夹。

2、佩戴防护口罩后须进行密合性检查，方法如下：

正压测试：双手遮着口罩，用力呼气，如空气从口罩边缘溢出，即佩戴不密合，须再次调校头带及鼻夹。

负压测试：双手遮着口罩，用力吸气，如口罩不下陷，或有空气从口罩边缘进入，即佩戴不密合，须再次调校头带及鼻夹。

医用防护口罩摘除方法（感染）



1、先解开下面的系带



2、再解开上面的系带



3、丢入医疗废物桶

注意事项：

摘口罩时手勿接触口罩的污染面。

做好个人防护——护佑你、我、他



Thank you!