

· 论 著 ·

实时荧光聚合酶链反应检测新型冠状病毒室内质控方法初探

刘 晶, 杜晶辉, 刘瑞岩, 鲍志军, 贺 鑫, 赵 岩, 王 俊, 雷曜荣, 刘 旭[△]
天津中医药大学第一附属医院检验科/国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300193

摘要:目的 绘制实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)定性室内质控图和基于循环阈值的 Levey-Jennings 质控图,探究新型冠状病毒 RT-PCR 检测的室内质控方法。方法 使用无菌生理盐水按照 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 对第三方质控物进行倍比稀释,确定室内弱阳性质控的稀释倍数。统计该实验室 2022 年 1—2 月新型冠状病毒 RT-PCR 阴阳性质控原始记录,以自定义数值绘制定性结果散点图。统计 2022 年 1—2 月每批次弱阳性质控的靶基因 Ct 值,分别对 N 基因和 ORF1ab 基因两组 Ct 值进行正态分布检验,根据前 20 次检测结果分别计算 N 基因和 ORF1ab 基因的靶值 X 和标准差 s ,绘制 Levey-Jennings 质控图。结果 确定 1:30 为每日室内质控的弱阳性质控品的稀释倍数。定性检测散点图可直观发现 1 次弱阳性质控检出阴性的“假阴性”反应。弱阳性质控 N 基因、ORF1ab 基因 Ct 值均符合正态分布($P>0.05$)。N 基因 Ct 值靶值 X 为 34.13,变异系数为 1.91%,所有 Ct 值均在 $X\pm 3s$ 以内,5 次出现 $\pm 2s$ 警告,符合 Westgard 质控规则。ORF1ab 基因 Ct 值靶值为 35.30,变异系数为 2.58%,出现 1 次 $+3s$ 失控,5 次 $\pm 2s$ 警告,第 31~41 批次违反了 $10x$ 规则,第 73~80 批次违反了 $R 4s$ 规则。结论 应用定性室内质控散点图和 Levey-Jennings 质控图建立的新型新型冠状病毒室内质控方法具有可行性,能够有效监测和预警检测过程中的质量问题,保证检测结果准确可靠。

关键词:新型冠状病毒; 室内质控; Ct 值; 实时荧光聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.01.014 **中图法分类号:**R446.1

文章编号:1673-4130(2023)01-0074-05 **文献标志码:**A

Application on internal quality control system of SARS-CoV-2 detection by real time fluorescent polymerase chain reaction

LIU Jing, DU Jinghui, LIU Ruiyan, BAO Zhijun, HE Xin, ZHAO Yan,
WANG Jun, LEI Yaorong, LIU Xu[△]

Department of Clinical Laboratory, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine/National Clinical Research Center for Chinese Medicine
Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To explore a reasonable internal quality control system of SARS-CoV-2 nucleic acid detection by real-time PCR, real-time PCR qualitative testing quality control chart and Levey-Jennings quality control chart were draw. To explore the internal quality control method of real-time fluorescent polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of SARS-CoV-2 by drawing qualitative internal quality control chart of RT-PCR and Levey-Jennings quality control chart based on cycle threshold. **Methods** Sterile normal saline was used to dilute the third-party quality control substance at the ratios of 1:5, 1:10, 1:20, 1:30 and 1:40, and then weakly positive quality control dilution ratio was confirmed. The original records of the negative and positive control of SARS-CoV-2 by RT-PCR from January to February 2022 in the laboratory were collected to draw a scatter plot of qualitative results with custom values. The Ct values of target genes in each batch from January to February 2022 were collected, and the Ct values of N gene and ORF1ab gene were tested for normal distribution, respectively. The target value (X) and standard deviation (s) of N gene and ORF1ab gene were calculated according to the results of the first 20 tests, and Levey-Jennings quality control chart was drawn. **Results** The dilution ratio of weakly positive quality control was 1:30. Through the scatter diagram of qualitative results, the first “false negative” result could be found directly. The Ct values of N gene and ORF1ab gene obeyed a normal distribution ($P>0.05$). The target value of Ct value of N gene was 34.13, variable coefficient was 1.91%, all the Ct values were within $X\pm 3s$, and $\pm 2s$ warning occurred five times,

which accorded with Westgard quality control rules. The target value of Ct value of ORF1ab gene was 35.30, variable coefficient was 2.58%, +3s appeared once, ±2s warning appeared 5 times, lot No. 31-41 broke the rule of 10x, and lot No. 73-80 broke the rule of R 4s. **Conclusion** SARS-CoV-2 internal quality control system based on qualitative scatter chart and Levey-Jennings chart is feasible, which could effectively monitor and warn the quality problems in the process of detection, and ensure the accuracy and reliability of detection results.

Key words: SARS-CoV-2; internal quality control; Ct value; real-time polymerase chain reaction

新型冠状病毒核酸检测是我国常态化疫情防控的技术保障,已在全国二、三级医疗机构广泛开展,是切断病毒传播的重要防线。实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)技术具有高灵敏度、高效高通量的优势,可在疾病早期或潜伏期内识别微量的病毒核酸片段^[1],是《新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南》推荐的常规检测方法^[2]。为确保核酸检测结果的准确性,各实验室需具备完善的实验室质量控制体系。2021年5月国家卫生健康委员会颁布的《新型冠状病毒肺炎防控方案》(第八版)文件指出^[3],实验室应规范开展室内质控,每批检测至少有1份弱阳性质控品、3份阴性质控品,室内质控是全面质量控制体系的关键环节。新型冠状病毒 RT-PCR 检测方法属于定性分析,仅简单判断阴阳性质控是否在控,无法评价核酸提取效率是否达标、检测过程是否存在系统误差或偶然误差。本文在阴阳性质控在控的基础上,将定性 PCR 结果进行计量资料转换,统计弱阳性质控靶基因循环阈值(Ct 值),绘制 Levey-Jennings 质控图,回顾性分析检测系统的稳定性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 全自动核酸提取仪 BG-Flex-96, 配套核酸提取及纯化试剂 TQ-BG-003-96D-96, 新冠病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法),以上均购自上海伯杰公司。实时定量 PCR 仪 QuantStudio 5, 购自美国 ThermoFisher 公司。

1.2 质控物来源 本实验质控物来自第三方噬菌体假病毒颗粒,批号 2021005,浓度范围: $5.35 \times 10^3 + 3 \sim 5.24 \times 10^4 + 4$ copy/mL, 购自广州邦德盛生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 新冠病毒核酸检测 新冠病毒的核酸检测严格按照伯杰试剂说明书和按本实验室标准操作规程文件进行操作。使用伯杰核酸提取试剂 96 孔板吸取 200 μ L 样本,首先样本与裂解液和磁珠结合,经过两次洗涤去除蛋白质和杂质,洗脱出核酸。将 5 μ L 核酸加入 20 μ L 扩增反应液,形成 25 μ L 反应体系,在 PCR 仪进行扩增反应,应用 QuantStudio Design & Analysis 软件进行扩增曲线分析进行结果判读。每批次检测均设置 3 个阴性质控、1 个弱阳性质控。

1.3.2 弱阳性质控稀释倍数的选择 使用无菌生理盐水按照 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40 对第三方质控物进行倍比稀释,每个稀释倍数分装 8 支,每支 200 μ L,分装至 1.5 mL 离心管。配制完成后,5 个浓度水平的 40 支质控物立即进行 RT-PCR 核酸检测。

1.3.3 绘制定性检测散点图 记录每批次阴性质控和弱阳性质控的结果并按照自定义数值绘制定性结果散点图:将弱阳性质控定义为数值“1”,检测为阳性时定义数值为“2”,检测为阴性时定义数值为“-2”;将阴性质控定义为“-1”,检测为阴性时定义数值为“-2”,检测为阳性时定义数值为“2”;将质控品定义数值与检测结果定义值相加,等于“3”或“-3”为在控,等于“1”为假阳性反应,等于“-1”为假阴性反应^[4]。

1.3.4 弱阳性质控的配制与数据采集 (1)弱阳性质控的配制:首先使用生理盐水将第三方质控物按 1:3 稀释分装至 1.5 mL 离心管(无 RNase),置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱贮存备用。每批检测时取一支配制好的质控物,室温平衡,充分混匀并瞬离。进行核酸提取时,弱阳性质控位置加入 20 μ L 配制阳性质控+180 μ L 生理盐水,共 200 μ L,即再进行 10 倍稀释。(2)收集本实验室 2022 年 1-2 月每批次实验的原始数据;统计所有实验批次弱阳性质控的靶基因 Ct 值,建立 Excel 2010 数据库录入数据。分别对 N 基因和 ORF1ab 基因两组 Ct 值进行正态分布检验,当 $P > 0.05$ 表示服从正态分布,当 $P < 0.05$ 表示不服从正态分布。

1.3.5 绘制 Levey-Jennings 质控图 根据前 20 次检测结果分别计算 N 基因和 ORF1ab 基因的靶值 \bar{X} 和标准差 s ,上下限为 $\bar{X} \pm 3s$,警告限为 $\bar{X} \pm 2s$ 。以检测次数为横坐标,以 Ct 值为纵坐标绘制 Levey-Jennings 质控图。

1.4 统计学处理 使用 Microsoft Excel 2010 进行数据的统计、分析、制图。应用 IBM SPSS21.0 对数据进行正态分布检验。

2 结果

2.1 确定弱阳性质控的稀释倍数 5 个不同稀释倍数的弱阳性质控平行做 8 个样本,如表 1 所示,分别得到均值(\bar{x})、标准差(s)、变异系数(CV)。由于 1:

40 稀释倍数的 8 个样本中有 1 个样本 N 基因未检出, 2 个靶基因的 Ct 值变异系数较大, 均大于 2%, 因此 1 : 40 稀释组的结果稳定性差, 将此组排除。其他 4 组稀释倍数的靶基因 Ct 值稳定性较一致。根据本实验室使用邦德盛中值质控品的原始浓度计算, 1 : 30 稀释倍数的平均浓度为 556.7 copy/mL, 上海伯杰试剂的最低检测限(LoD)为 500 copy/mL。因此本研究选择具有良好稳定性的浓度最接近 LoD 的 1 : 30 作为每日室内质控的弱阳性质控品的稀释倍数。

2.2 RT-PCR 定性室内质控散点图 根据自定义数值绘制定性检测结果散点图, 如图 1 所示。在 97 个批次检测结果中出现 1 次失控, 即第 85 次(即 2 月 2 日第 3 批次)弱阳性质控检出阴性结果出现了“假阴性”反应。发现失控后, 立即采取纠正措施并复检。

2.3 弱阳性质控靶基因 Ct 值的正态性检验 2021 年 1—2 月份弱阳性质控靶标 N 基因、ORF1ab 基因

Ct 值进行正态性检验, 结果两组数据均符合正态分布 ($P>0.05$)。见图 2。

表 1 5 个稀释倍数的弱阳性质控靶基因 Ct 值比较 ($n=8$)

稀释倍数	靶基因	\bar{x}	s	CV(%)
1 : 5 稀释	N	32.788	0.349	1.06
	ORF1ab	31.120	0.310	0.99
1 : 10 稀释	N	33.869	0.381	1.12
	ORF1ab	32.219	0.405	1.26
1 : 20 稀释	N	34.875	0.694	1.99
	ORF1ab	33.407	0.600	1.80
1 : 30 稀释	N	34.806	0.367	1.05
	ORF1ab	33.351	0.465	1.39
1 : 40 稀释	N	36.125	0.748	2.07
	ORF1ab	35.409	1.200	3.39

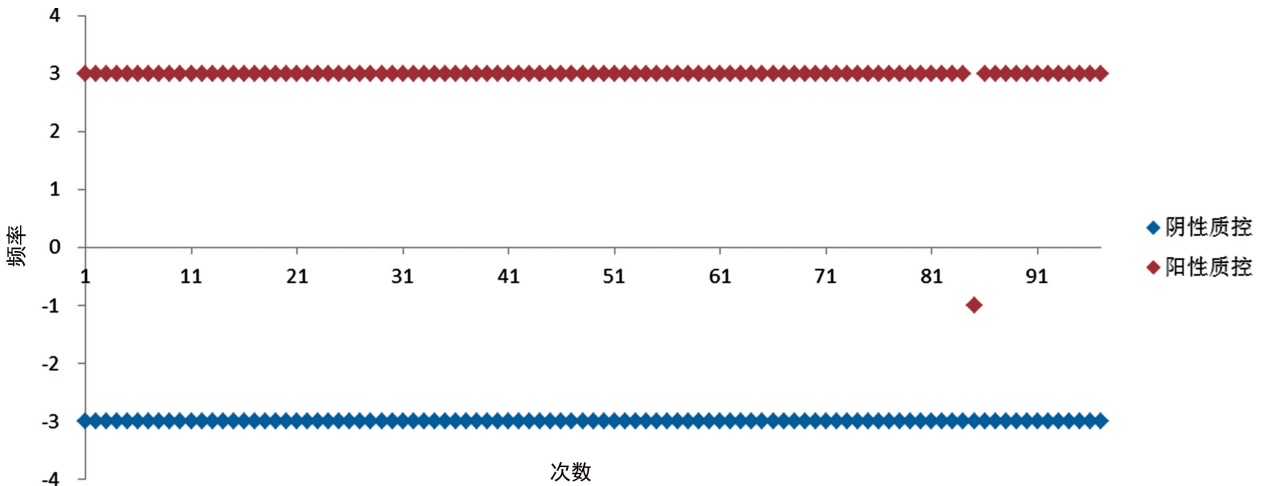
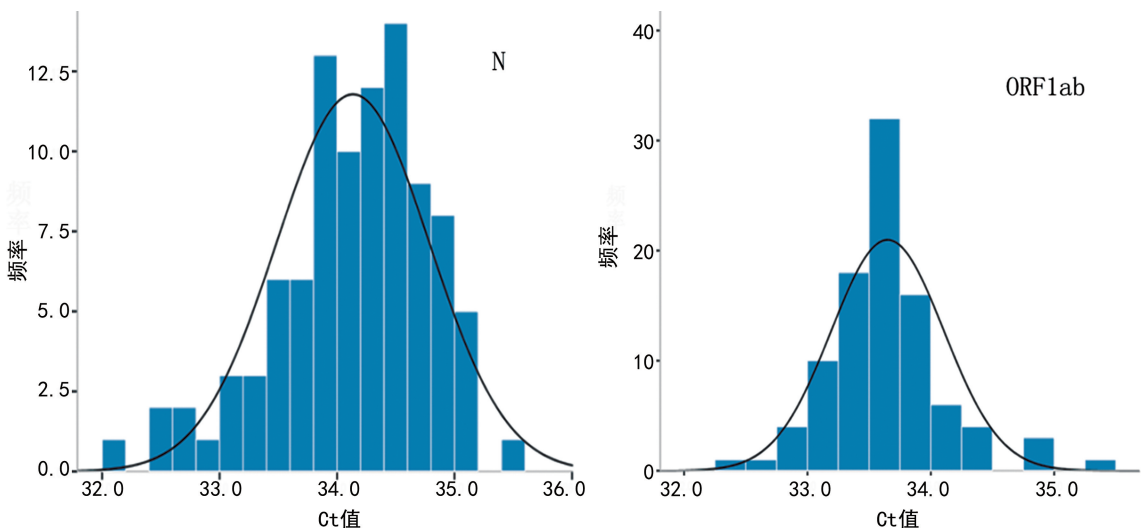


图 1 荧光 PCR 定性室内质控散点图



注: N 基因 Ct 值正态分布 ($P=0.574$) ORF1ab 基因 Ct 值正态分布 ($P=0.08$)。

图 2 弱阳性质控 N 基因、ORF1ab 基因 Ct 值正态曲线

2.4 2022 年 1—2 月弱阳性质控靶基因 Ct 值 Levey-

Jennings 质控图 弱阳性质控 N 基因靶值 X 为

34.13, 标准差 s 为 0.652, 变异系数 CV 为 1.91%。结果如图 3 所示, 所有 Ct 值均在 $X \pm 3s$ 以内, 5 次出现 $\pm 2s$ 警告, 根据 Westgard 多规则法分析, 符合质控规则。弱阳性质控 ORF1ab 基因靶值 X 为 35.30, 标准差 s 为 0.910, CV 为 2.58%。第 73 次检测(2 月

20 日) Ct 值超过 $+3s$, 见图 4。经原始曲线分析, 该次检测 ORF1ab 曲线第 1~10 个循环基线波动较大, 整体信号强度较低。5 次出现 $\pm 2s$ 警告, 根据 Westgard 多规则法分析, 第 31~41 批次检测违反了 $10x$ 规则, 第 73~80 批次违反了 $R 4s$ 规则。

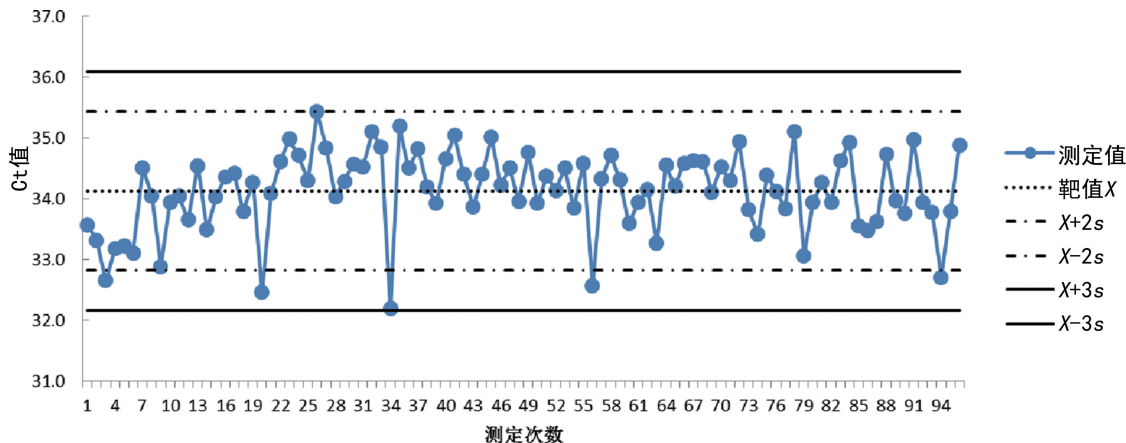


图 3 2022 年 1—2 月弱阳性质控 N 基因 Levey-Jennings 质控图

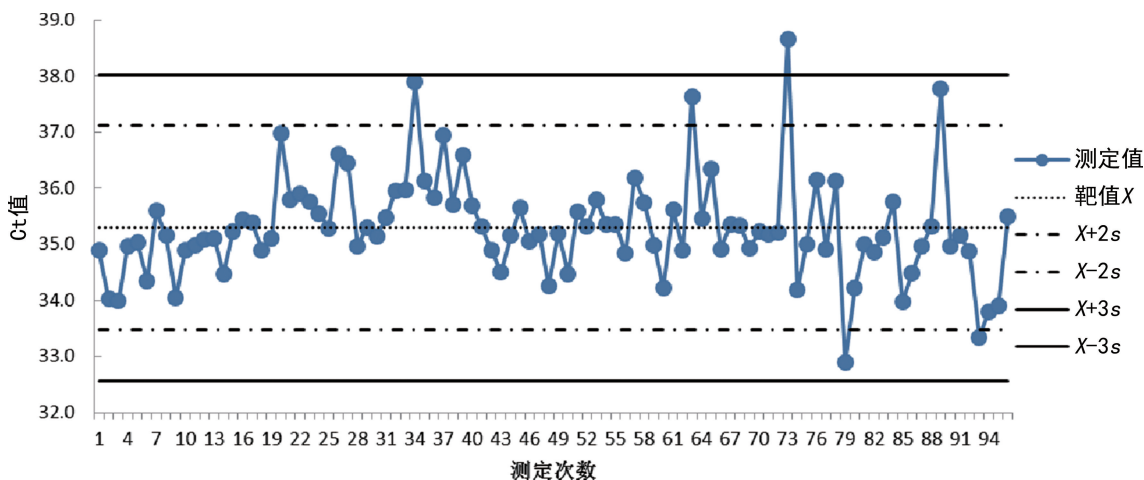


图 4 2022 年 1—2 月弱阳性质控 ORF1ab 基因 Levey-Jennings 质控图

3 讨 论

目前 RT-PCR 法是临床上广泛应用的新冠病毒核酸检测方法, 是确诊 COVID-19 的直接证据^[3], 因此准确的核酸检测结果在疾病诊断和疫情防控中承担重要作用。《新型冠状病毒实验室检测专家共识》指出^[5], 实验室应从试剂质量控制、操作质量控制、设置对照、多指标诊断等多方面避免假阴性、假阳性结果出现。因此做好全过程质量控制, 特别是室内质量控制尤为重要, 它是连续评价实验室工作可靠性程度的方法, 是确定检测结果是否可靠、可否发出报告的关键环节^[6]。

首先, 本研究选用第三方假病毒技术的阳性质控品, 原因是假病毒技术以 MS2 噬菌体外壳蛋白为载体, 包裹核酸检测的靶标 RNA, 具有真实病毒相似的物理结构, 可参与核酸提取、反转录、扩增全过程, 实现核酸检测的全过程质量控制^[7-8]。第三方邦德盛的

阳性质控品(浓度范围: $5.35 \times 10^3 + 3 \sim 5.24 \times 10^4 + 4$ copy/mL), 为确定弱阳性质控的稀释倍数, 进行 5 个稀释倍数的平行试验, 结果表明, 确定最接近检出限且稳定性高的稀释倍数为 1 : 30, 平均浓度为 556.7 copy/mL(浓度范围: 178.3 ~ 1 746.7 copy/mL), 是核酸检测试剂检出限(500 copy/mL)的 1.2 倍左右, 符合弱阳性质控品的浓度要求。

其次, 关于核酸检测荧光 PCR 法的室内质控, 文件规定“每批检测至少有 1 份弱阳性质控品(第三方质控品)、3 份阴性质控品(生理盐水)^[3]。”“核酸检测试验以及其他定性试验可选择适当浓度的质控物, 采用定性检测结果合格即判为在控的方法^[9]。”据此本研究采用自定义弱阳性质控及阴性质控数值的方法, 绘制核酸检测定性室内质控散点图, 直观地反映出质控品的检测结果与预期检测结果不一致的情况并判定为“失控”, 绘制定性质控散点图简单易行, 符合国

家相关规定。

最后, Ct 值是扩增曲线与阈值线的交叉点, 是判读结果是否为阴(阳)性的重要依据, 是荧光 PCR 反应中靶标浓度的相对测量^[10]。为更加精细的进行 PCR 实验室质控管理, 本研究参照定量测定室内质控的方法, 基于靶基因 Ct 值建立室内质控的 L-J 质控图, 可分辨检测过程的系统误差和偶然误差, 提高检测的准确性和精密度。本研究共累积 2022 年 1—2 月每批次检测的弱阳性质控 Ct 值 97 个, 对两组靶基因 Ct 值数据进行正态性检验后, 均符合正态分布, 适宜采用 L-J 质控图分析其离散程度和变化趋势。本研究对上述弱阳性质控 Ct 值进行了 L-J 图分析, 如图 3、4 所示。结果表明, N 基因的 CV 为 1.91%, ORF1ab 基因的 CV 为 2.58%, 尽管目前没有明确的病毒核酸可接受的 CV 范围, 但可以肯定的是长期统计室内质控 CV 值是反映实验室每个检测环节的稳定性, 能够检测操作中的长期变化趋势, 及时发现测定过程中存在的问题^[11-12]。

如图 4 所示, 结果表明 ORF1ab 基因第 73 批次超过 3s 属于偶然误差, 产生偶然误差的原因可能是(1)核酸提取过程中靶基因丢失、或存在 PCR 抑制物的残留^[13]; (2)试剂问题, 如反转录酶的失活; (3)人员操作失误。根据 Westgard 多规则质控法, 第 31~41 批次违反了 10x 规则属于系统误差, 第 73~80 批次违反了 R 4s 规则, 离散程度较大, 同样属于系统误差, 通过分析, 产生系统误差的原因是 PCR 反应前 10 个循环基线波动较大, 扩增曲线不平滑, S 型曲线在对数增长长期斜率偏低。查找原因发现八连排离心管由于质量问题与扩增仪小孔不服帖, 导致受热不均匀, 影响扩增结果。因此通过弱阳性质控靶基因 Ct 值的 L-J 质控图, 可分析出偶然误差和系统误差出现的原因, 及时采取纠正措施, 从而提高核酸检测结果的可靠性。

本研究中, 定性室内质控散点图是判断该批次检测是否有效、是否可发出报告的依据, L-J 质控图用作回顾性分析荧光 PCR 检测系统稳定性的方法, 分析偶然误差或系统误差的原因, 及时发现操作过程失误或试剂耗材质量问题。当定性室内质控散点图和 L-J 质控图两种方法结果不一致时, 本实验室以定性质控散点图“失控”作为质控失败重新复检的依据。

综上所述, 本文创新性的提出将定性质控散点图及 L-J 质控图联合应用于荧光 PCR 检测新冠病毒的室内质控, 能够较全面地反映核酸检测的有效性和稳

定性, 监控核酸提取、扩增全过程。这 2 种方法在本实验室已应用近 1 年时间, 效果优于既往的“阴性性质控在控即合格”单一判断方法, 具有很好的预警功能。

参考文献

- [1] 王旭东, 施健, 丁伟峰, 等. 2019 新型冠状病毒核酸检测的研究状况与应用探讨[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(2): 81-84.
- [2] 中国疾病预防控制中心. 新型冠状病毒肺炎实验室检测技术指南(国卫办疾控函〔2020〕156 号)[EB/OL]北京: 国家卫生健康委员会. 2020.
- [3] 国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎防控方案(第八版)(联防联控机制综发〔2021〕51 号)[EB/OL]北京: 国务院应对新型冠状病毒肺炎疫情联防联控机制综合组. 2021.
- [4] 何子毅, 余霖, 王庆, 等. Z-score 分数和泊松分布在血站血液核酸筛查室内质控的应用[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(1): 11-14.
- [5] 徐英春, 胡继红, 王瑶, 等. 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.
- [6] 李金明. 实时荧光 PCR 技术(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 134
- [7] 林婧, 胡啟龙, 王尚君, 等. 假病毒标准物质在传染性病毒核酸检测质量控制中的应用[J]. 计量与测试技术, 2021, 48(2): 1-2.
- [8] 黄维金, 王佑春. 假病毒技术在新发病病毒性传染病防控产品评价中的应用[J]. 病毒学报, 2020, 36(6): 1177-1186.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 中华人民共和国卫生行业标准 WS/T 641-2018. 临床检验定量测定室内质量控制[S]. 北京: 国家卫健委临检中心, 2018.
- [10] 传坤, 赵峰峰, 吴国球, 等. 新型冠状病毒核酸检测模拟室内质控品的研制[J]. 临床检验杂志, 2020, 38(11): 835-837.
- [11] 文良雪, 张澜艺, 苏丽, 等. 血站核酸检测实验室 HBV DNA 项目室内质量控制方法探讨[J]. 检验医学, 2021, 36(4): 437-440.
- [12] 吴忠兰, 樊佩苗, 沈湜, 等. HIV-1 核糖核酸病毒载量检测室内质量控制方法的建立和应用[J]. 中国艾滋病性病, 2019, 25(10): 997-1001.
- [13] 蒋义, 张钢, 郭咚, 等. 血液病毒核酸筛查系统室内质控方法的建立及评价[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(7): 542-544.

(收稿日期: 2022-02-12 修回日期: 2022-07-16)