

## 新型冠状病毒核酸检测工作常见问题分析

朱友全

新疆哈密第十三师红星一场医院, 新疆 哈密 839108

**[摘要]**2020年初,全球爆发的新冠肺炎疫情让人类陷入了一场没有硝烟的战争。在这场战斗中,检验工作者们义无反顾地冲向了疫情防控的第一线。作为其中的一员,我亲身参与了方舱实验室的核酸检测工作,深感责任重大。本分享我在核酸检测工作中的实践经验,特别是从接样到报告发出的各个环节中遇到的常见问题和需要特别注意的事项。通过深入剖析操作流程中的关键步骤,我希望能够为同仁们提供实用的参考,以应对这场前所未有的健康危机。

**[关键词]**新型冠状病毒;核酸;常见问题

DOI: 10.33142/cmn.v1i2.11045

中图分类号: R446.9

文献标识码: A

### Analysis of Common Problems in Nucleic Acid Detection of Novel Coronavirus

ZHU Youquan

Hongxingyichang Hospital of Xinjiang Hami 13th Division, Hami, Xinjiang, 839108, China

**Abstract:** At the beginning of 2020, the global outbreak of COVID-19 has plunged mankind into a war without gunpowder smoke. In this battle, inspectors rushed to the front line of epidemic prevention and control without hesitation. As one of them, I personally participated in the nucleic acid testing work of the makeshift laboratory and felt deeply responsible. I would like to share my practical experience in nucleic acid testing, especially the common problems and special considerations encountered in various stages from sample collection to report issuance. By deeply analyzing the key steps in the operation process, I hope to provide practical references for colleagues to cope with this unprecedented health crisis.

**Keywords:** novel coronavirus; nucleic acid; common problems

2020年1月初,全国人民面对新冠肺炎疫情,迎来了一场没有硝烟的战争。身为一名检验工作者,我义无反顾地投身疫情防控第一线。在方舱实验室,我积极参与新冠病毒的核酸检测工作。特别是在疫情爆发的时刻,我对核酸检测工作有了更为深刻的体会,从接样到报告发出的各个环节中,总结了常见问题和注意事项,愿意与同仁们分享并供其参考。

#### 1 接样

接样是核酸检测中至关重要的一环,为确保质量,接样人员必须接受专业培训并戴上二级个人防护。在接样过程中,我们严格遵循操作规程,使用75%酒精或0.2%含氯消毒剂喷洒,以确保转运箱外表的彻底消毒,降低交叉感染的风险。在实际工作中,我们常常面临实际管数和电子版对不上的情况。为了规范操作,我们制定了详细的登记流程,包括送样单位、人采、环采、管数、人数、例数以及送样时间等信息的记录,并实施双签字确认,以最大程度地减少错误发生的可能性。在接样后,我们重点关注接收到的电子版信息,对照登记的详细信息进行核对,确保信息的一致性。这一步骤不仅有助于发现和纠正可能存在的错误,还能够提高核酸检测的准确性和可靠性。

#### 2 试剂储存和准备区(一区)

##### 2.1 PCR上岗证人员及个人防护

在试剂储存和准备区,所有操作人员必须持有PCR

上岗证,并佩戴二级个人防护,确保在操作过程中的安全性和准确性。

##### 2.2 体系配制的分次进行

针对全民核酸检测时大量样本的实际需求,我们强调分次进行PCR体系的配制。一个班次涉及数十板检测,不宜一次性全配齐试剂。分两次或三次配制并冷藏,以防蒸发和长时间放置对体系质量的影响。

##### 2.3 预防溶液溅出及气溶胶污染

在处理阴性对照、阳性对照、质控管时,将离心后的管立即放置于传递窗中。这一措施有效避免在加样拧盖时开盖瞬间溶液溅出,减少气溶胶污染的风险。

##### 2.4 冰箱温度检测和使用记录

为确保试剂的质量,我们严格把控冰箱温度,进行定期的温度检测。同时,对所有使用过的试剂和设备,做好详细的使用记录,包括使用日期、数量、有效期等信息,以便随时追溯和核查。

在试剂储存和准备区,清洁和消毒工作也是不可或缺的一环。保持工作区域的清洁卫生,对使用过的工具和仪器进行及时的清理和消毒,以防止交叉污染和影响下一步操作。

#### 3 标本制备区(二区)

在标本制备区(二区),我们执行严格的操作流程以确保核酸检测的准确性和可靠性。以下是我们在标本制备

区实施的各项措施的详细描述:

### 3.1 PCR 上岗证和三级个人防护

所有涉及标本制备的操作人员必须持有 PCR 上岗证,并配备三级个人防护装备。这包括全面防护的口罩、防护服、护目镜等。团队成员之间相互监督个人防护情况,严防工作人员感染。

### 3.2 开箱清点和标本消杀

在处理标本前,我们进行开箱清点,并使用 75%酒精或 0.2%含氯消毒剂喷洒包装,确保标本表面的消杀工作得当。在标本溯源摆管的过程中,我们采取了按序号依次摆管的方法,使得填写“标本制备原始记录表”更为便捷。通过合理的管位标记和记录,我们能够大大减轻工作强度,并确保加样时的准确性。

### 3.3 提取前的处理和阳性对照

在加完提取之前,我们采取了一系列措施以降低阳性对照污染的风险。通过将管盖盖住已加好提取的八连管、再加阳性对照,最后盖好阳对这排八连管,我们有效减少了可能的污染风险。

### 3.4 排枪使用的规范性

操作人员在使用排枪时必须熟练掌握使用手法、规范的走位,以避免加样时对其他孔位造成污染。一次按到位,不要进行二次按压或来回按压,以防产生气泡。气泡在三区离心时难以消除,可能影响结果的准确性。

### 3.5 特殊样本后的设备清理

每个班次中途或处理完隔离点、病区等特殊样本后,我们对涉及的生物安全柜、加样枪、提取仪等设备进行一次彻底擦拭和消杀,以杜绝后续实验污染的发生。

### 3.6 使用记录和清洁消毒工作

我们强调做好各种使用记录的登记,对二区的环境、生物安全柜、提取仪等设备进行定期的清洁和消毒工作,以杜绝可能发生的环境污染。

通过这些严格的措施,我们在标本制备区确保了操作的规范性、准确性和安全性,为后续的核酸检测工作奠定了坚实的基础。我们将持续提高操作水平,为疫情防控提供可靠的检测支持。

## 4 扩增、产物分析区(三区)

在核酸扩增的过程中,我们采取了严格的措施,确保操作的规范性和结果的准确性。以下是在扩增和八连管处理阶段我们执行的详细步骤:

### 4.1 PCR 上岗证和二级个人防护

所有从事核酸扩增的操作人员必须取得 PCR 上岗证,并佩戴二级个人防护,确保在整个操作过程中的安全性。

### 4.2 气泡处理的关键性

在八连管离心过程中,我们注意到个别管可能会出现气泡,这可能影响最终的扩增结果。为解决这一问题,我们采用了先震荡再离心的方法,通过震荡可以迅速消除气

泡。这一步骤不仅关键而且起到混匀的作用,尤其是在实验前期未进行震荡时,可能导致弱阳性的情况<sup>[1]</sup>。在有条件的情况下,我们还考虑使用 96 孔 PCR 扩增板,这样既能减轻工作强度,又能提高操作的效率。

### 4.3 小心取八连管,防止污染

在扩增完成后,取八连管的过程中我们格外小心。我们建议从中间取,避免提两头。由于高温可能使管盖变软,很容易将管盖揭开,从而造成潜在的污染风险。为降低这一风险,我们将取出的八连管置于一次性密封袋中,并密封后放入医废袋中,以确保污染的防范工作得当。

### 4.4 产物分析时常见的问题

#### (1) 出现翘尾

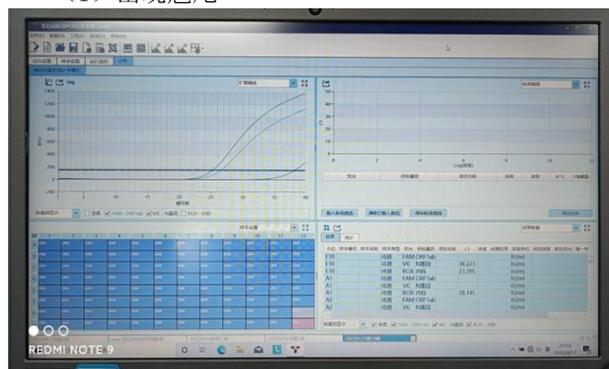


图 1 翘尾示意图

①阴参曲线末尾起跳,通常表示存在污染;

②非特异性扩增的可能性;

③正常样本也可存在曲线末尾起跳,表示样本浓度低或者加样量不准确。

解决方案:

排除是否存在污染;

排除污染原因后复检样本,如果复检后曲线为阴性直线则说明之前的末尾起跳为非特异性扩增,如果复检后曲线仍与之前一致则说明末尾起跳表示该样本中待检病毒核酸的浓度偏低。

不管是 FAM 还是 VIC 通道,CT 值只要有数值就要按照要求复查,建议对原有样本进行重新提取复查,如果复查阴性判读阴性,如果复查还是同一通道翘尾,就要对结果仔细审核,一是要排除实验室污染,二是要重新采样复查,如有必要可以采用另一家试剂来验证。如果出现大量的扩增翘尾现象,首要原因是考虑实验室污染,可以通过做环境样本和阴性对照做验证排除。

#### (2) 人采内标不起

原因如果是单采可能是采样不合格,如果是混采就不会是采样不合格,不可能是管内所有人都采样不合格。其他原因(加错样、摆错管、提取没加上等)核查标本并复查,如果是单采标本复查后内标还是不起通知重新采样。

(3) 斜直线型扩增曲线,复检后多为正常。

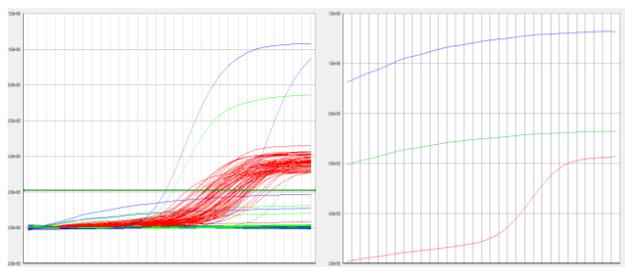


图2 斜直线型扩增曲线

原因出现此种情况可以注意下检测完的反应管里面该孔位的标本是否出现反应液面明显低于其他反应孔位的液面,大多数是由于在分装试剂时分液不准确造成,或是因为实验所采用的 PCR 反应管气密性较差,八连管盖没盖紧、反应过程溶液蒸发引起探针浓度逐渐增加导致曲线呈斜直线。

解决方案:

试剂分液时应注意液面是否在同一水平线上,上机检测前应将 PCR 反应管用力盖严,并仔细检查有无缝隙。使用配套的八连管和管盖,离心前检查气密性。

(4) 整板扩增后无 CT 值(包括阴对、阳对),此种现象多为体系配制时间太长引物或探针降解失效造成,所以体系现用现混现配。

(5) 离散型曲线,曲线相对离散不集中

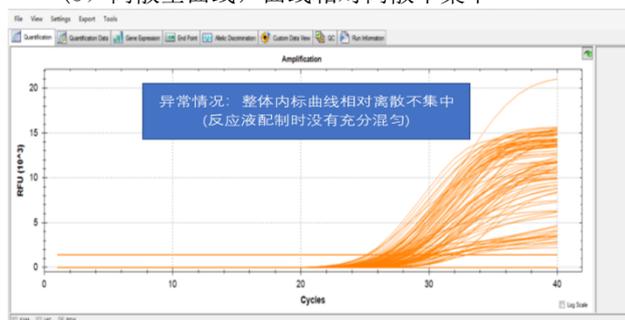


图3 离散型曲线图

原因分析:

在核酸检测过程中,我们经常会面对各种曲线异常的情况,而这些异常往往源于多种原因。以下是对可能导致曲线异常的七个常见原因的详细分析:

①标本固有的采样误差

标本采样误差可能是由于采样时的不准确或不规范操作引起的。同时,不同标本放置的时间长短不一,也可能导致核酸质量的差异。为降低这一误差,我们建议在采样过程中强调标本的准确采集,并在标本收集后尽早进行处理,以避免时间差异可能带来的问题。

②操作误差

在核酸检测前,如果标本加样前没有充分振荡混匀,或者在反应液配制时没有充分混匀,都可能导致扩增曲线的异常<sup>[2]</sup>。为规避这一问题,我们强调在每个操作步骤中

都要确保充分混匀,特别是在涉及标本加样前的处理环节。

③提取仪器故障

提取仪器故障可能导致提取效率的差异,进而影响扩增曲线。我们建议对提取仪器进行定期维护和检查,确保其正常运行,以减少故障可能带来的影响。

④反应液的混合使用

新配制的反应液与旧的剩余反应液联合使用可能导致酶的活性不同,从而影响扩增结果。我们强调在每次实验中都要使用新鲜配制的反应液,避免与旧液混用,以确保反应的一致性。

⑤PCR 八联管的差异使用

不同批次的 PCR 八联管联合使用可能导致荧光信号透过强度有区别。我们建议在实验中保持一致性,尽量选择同一批次的 PCR 八联管,以确保信号的可比性。

⑥提取试剂的品牌差异

不同品牌的提取试剂联合使用可能导致提取效率的差异。我们建议在实验中坚持使用同一品牌的提取试剂,以确保提取效率的一致性。

⑦样本放置时间的差异

同一批样本放置时间不同,时间较长的部分可能发生降解。为规避这一问题,我们强调在处理样本时要注意时间的一致性,并及时处理已采集的标本,以防止核酸质量受到时间因素的影响。

通过认真分析这些可能导致异常曲线的原因,我们能够更好地应对核酸检测中的挑战,提高检测结果的可靠性和准确性。

## 5 结语

### 5.1 实践经验积累

在核酸检测领域,通过长期的实际操作,我们逐渐熟悉了核酸检测的方方面面,掌握了各个环节的关键技能。实践经验的积累使我们能够更加灵活应对各种突发情况,提高了实验操作的效率和准确性。在样本接触方面,实践经验告诉我们接样人员应经过专业培训,穿戴二级个人防护,并在接样时使用消毒剂喷洒转运箱,以确保样本的纯净度<sup>[3]</sup>。实际操作中,我们经常面临实际管数与电子版对不上的情况,因此在接样阶段,严格的登记和双签字流程成为保证数据一致性的关键。在标本制备阶段,实践经验告诉我们要关注标本的溯源,通过详细记录每个单位的标本信息,降低摆管时的工作强度,确保加样时的准确性。

### 5.2 异常曲线的多样性

异常曲线在核酸检测我们要关注的是曲线中的翘尾现象。当阴性参曲线末尾起跳时,往往提示可能存在污染;而非特异性扩增的可能性也需被考虑。另一种情况是曲线的斜直线型,这可能源于标本在分装试剂时分液不准确,或是 PCR 反应管气密性不佳。在扩增完毕取样时,小心地从中间取样、避免提取两头,是防止污染的有效手段。将

取出的八连管放入一次性密封袋中,再放入医废袋中妥善处置,也是降低实验风险的一环。异常曲线的另一个表现形式是离散型,即曲线相对离散不集中。可能是因为标本固有的采样误差、操作误差、提取仪器故障等因素造成。

### 5.3 学习方向

在核酸检测领域,不断的学习和进步是保持专业竞争力的重要途径。学习最新的检测技术、设备和方法,了解其原理和应用场景,可以帮助检验人员更好地适应不同的实验需求,提高实验的灵活性和适用性。核酸检测的基本原理是整个工作的基石,深刻理解核酸的提取、扩增、检测等各个环节的原理,有助于在实际操作中更加得心应手,提高实验的效率和准确性。不同的实验环节有各自的操作技巧,例如样本的采集、试剂的配制、仪器的使用等。通过学习和实践,积累实用的技巧和经验,能够更加熟练地进行实验操作,提高工作效率。关注最新的科研文献、学术研究,了解前沿技术和发展趋势,可以帮助检验人员保持对整个领域的全局认知,不断完善自己的专业知识体系。

### 5.4 实验质量的不断提升

通过对异常曲线的深入分析以及学习方向的不断拓展,我们能够在实验操作中发现、解决问题,从而提高实验的准确性和稳定性。实验质量的不断提升要求我们对每一个环节都有着高度的责任心和敬业精神。在接样、试剂准备、标本制备等关键环节,我们要时刻保持高度的警觉性,确保每一步都符合操作规程,杜绝任何可能导致实验失误的因素。实验质量的提升也需要不断改进和更新实验流程。及时采纳新的技术、方法,引入先进的仪器设备,都有助于提高实验效率和准确性。定期进行实验室内部的质量控制和评估,及时总结和反馈实验中出现的,形成经验积累,为今后的实验提供更为可靠的基础。

## 6 感染性医疗废物处理

感染性医疗废物处理是核酸检测工作中至关重要的一环,需要经过严格的培训和按照规程执行,以确保废物的安全处理和环境的卫生。参与废物处理的人员必须具备压力锅使用上岗证,且需佩戴二级个人防护装备。

在处理废物时,首先进行压力蒸汽灭菌处理,这是保

障医疗废物彻底灭活的有效手段。处理后的医疗废物必须装入双层防渗漏的专用黄色包装袋中,并采用鹅颈式捆扎,以确保包装的牢固性和密封性。在包装过程中,还需贴好专用标识,明确标示废物的性质和处理方式,以便后续的分类处置。整理好的医疗废物应当装入周转箱中,经过合理的布局和包装,便于安全、高效地运送至废物的暂存间。在运输过程中,操作人员需时刻保持警惕,确保医疗废物不会发生泄漏或外界污染。为了监督废物处理工作的合规性和安全性,需要做好各种记录。记录的内容应包括废物的种类、数量、处理时间等关键信息,以备查验和核实。

## 7 结果报告

结果回报时常有发生接收实际管数与采样单位发来电子版信息或采集平台信息对不上,原因多为采样人员、录信息人员、整理电子版信息人员、送样人员、没有很好对接造成,有条件上扫码系统杜绝此问题发生。二区人员出舱后将各单位送样实际管数与发来的电子版信息及兵团核酸采集平台上信息核对,无误后,等待扩增结果,结果有问题按复检规则及时复检。并及时上报疫情防控指挥部。将电子版结果发送回送样单位,在核酸采集平台赋值。最后将各单位数据结果汇总并将发现的一些问题一起反馈采样单位,以便问题单位整改。

### [参考文献]

- [1]李淑芳,陈玉梅,区智凤,等.清单式管理在大规模核酸检测外出采样中的应用[J].当代护士(下旬刊),2023,30(10):160-165.
- [2]万广财,李铤,孙唯秀,等.新型冠状病毒快速检测标本前处理方法改良及其效果评价[J].吉林大学学报(医学版),2024(1):1-6.
- [3]张玉霞,魏克敏,张璟,等.新型冠状病毒核酸检测实验室生物安全风险评估与防控[J].医学动物防制,2024,40(3):271-274.

作者简介:朱友全(1972.2—)毕业院校:石河子大学,所学专业:临床医学,当前就职单位:新疆哈密第十三师红星一场医院,现职称:副主任检验技师。