

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.11.10

基于大规模人群新型冠状病毒核酸检测的经验介绍

江苏省援疆核酸检测医疗队

摘要:根据国家新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情防治工作需要,为全力支持新疆新型冠状病毒(2019-nCoV)核酸检测工作,2020年7月17日江苏省紧急组建了第一批省核酸检测医疗队驰援新疆。该文总结第一批核酸检测队在新疆2019-nCoV核酸检测工作的经验,为未来可能出现的 COVID-19 或其他突发公共卫生事件的大规模人群筛查工作提供参考。

关键词:新型冠状病毒;核酸检测;大规模筛查

中图分类号:R446 **文献标志码:**A

根据新型冠状病毒肺炎(COVID-19)疫情防治工作需要,为全力支持新疆新型冠状病毒(2019-nCoV)筛查工作,2020年7月17日江苏省卫生健康委员会迅速响应国务院应对 COVID-19 联防联控机制统一部署,紧急抽调 21 名分子检验领域的精英人员组建江苏省检验医疗队驰援新疆。7月18日第一批检测队随行携带全套仪器设备及耗材(8台核酸提取仪和6台荧光PCR仪等72件)、检测试剂(2.4万人份)和各类防护物资,奔赴新疆。该文以实时荧光 RT-PCR 法为技术平台,总结在新疆 2019-nCoV 筛查核酸检测工作中的经验,为未来可能出现的 COVID-19 或其他突发公共卫生事件的大规模人群筛查核酸检测提供参考。

1 实验室建设

由于新疆当地医院不能提供标准化 PCR 实验室,根据工作流程和生物安全要求,首先对院方提供的场地进行改造。以实时荧光 RT-PCR 法为技术平台,实验室需单一走向

的专用走廊,并划分3个操作区:试剂准备区(I区)、样本制备区(II区)、扩增检测区(III区),每个区均设置缓冲间(图1)。缓冲间进深至少1.5m,可用于检测人员脱防护用品等。标本先送至II区缓冲间,再进入II区。在常规3个操作区的基础上增设1个实验前区(准备区),用于耗材防护物资存放及工作人员穿戴三级防护用品、提取试剂及耗材带入II区前的拆包等。I区、II区、III区房间的面积分别至少为10m²、40m²、40m²。各区常压,每区之间通过传递窗传递物品。II区和III区外墙装1~2个强力换气扇。各区移动紫外线车1~3台。每个分区都有明确的标识,并且每个分区内的区域、仪器设备等标识清晰。

在实验室的改造过程中,有几点值得注意,因各区常压,尽量选择通风良好的房间,根据单一流向的要求开门关门、安装传递窗,根据各区面积配备移动紫外线车。三区根据扩增仪的数量安装相应制冷设备,如空调或冷气扇。

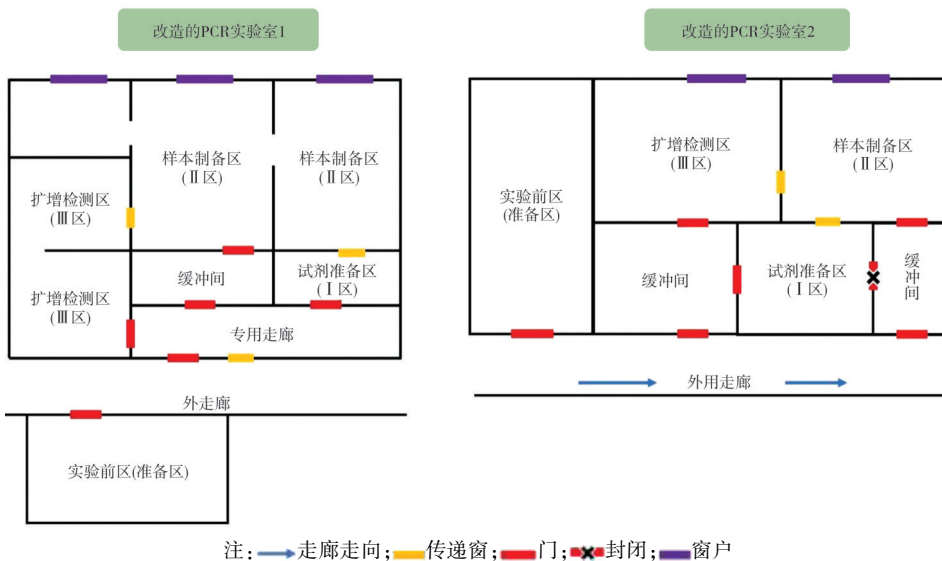


图1 PCR实验室改造示意图

1.1 主要仪器设备 试剂准备区(I区):超净工作台1~2台,5~50 μL可调8通道移液器1把,单通道移液器组合(1~10 μL、5~50 μL、10~200 μL、200~1 000 μL)1套,移液器架、振荡器、掌上离心机各1台,冰柜1~2台(-20℃,存放扩增试剂),可移动紫外线车2台等。样本制备区(II区):生物安全

柜2~3台,96孔全自动核酸提取仪,5~50 μL可调8通道移液器1把,200~1 000 μL单通道移液器4把,移液器架3个,振荡器2个,8联管及96孔板式离心机各1台,台式高速冷冻离心机、恒温设备如金属浴1个或孵箱、展示柜(4~8℃)2台、冰柜(-20℃)1台、可移动紫外线车2台、洗眼器。

扩增检测区(Ⅲ区):实时荧光定量 PCR 仪、电脑、UPS 电源、可移动紫外车 2 台等。

1.2 仪器配置 我队由 21 名队员组成,实际工作中运行 4 台提取仪(96 孔,全自动),8 台实时荧光定量 PCR 仪,即 1 台提取仪配比 2 台 PCR 仪,这个配比可在保证扩增仪轮休的情况下,达到最大检测能力(每台扩增仪日最大检测能力为 1 000 管)。

1.3 试剂及其他设备、耗材

试剂:使用原装配套的提取试剂和扩增试剂,复检试剂为另一品牌扩增试剂。

其他设备:对讲机 4~5 个,75%酒精,大中小黄色医疗垃圾袋(大量),大小黄色医疗垃圾桶各 8~10 个,锐器盒(大量),酒精喷壶 10~20 个,穿衣镜 2 个,洗手衣(手术服)(每人≥2 套),含氯消毒剂,高压蒸汽灭菌器 2 个。

耗材:大量加长型带滤芯无核酸酶枪头(10 μL、50 μL、200 μL、1 000 μL)、配液槽、8 连管、96 孔板及配套封膜,封口袋等。

试剂耗材的补给:由当地医院提供。

2 生物安全防护

新冠病毒核酸检测是一项风险较高的操作,生物安全防护极为重要。根据实验室分区的功能不同及其风险程度,选择合适的个人防护物品保护检测人员安全。Ⅰ区和Ⅲ区的人员采取二级生物安全防护,Ⅱ区人员采取三级生物安全防护。抵达当地医院后,由院方院感科工作人员首先对我队全体队员进行三级生物安全防护的再培训,尤其是防护服的穿脱,并现场进行考核,所有队员均合格。

3 实验流程

3.1 标本交接流程 标本首先送到当地医院的检验科,由检验科核对信息并重新编号,按 1~90、101~190、201~290……的编号规则进行编号。标本的编号以一个自然日为周期,当日标本全部清零,次日再重新开始编号。检验科将已编号样本送至我队实验室,并进行交接登记。Ⅱ区队员收到样本后,首先核对样本编号,确认无误后进入检测流程。

由于大规模筛查样本量非常大,并且一旦发现异常标本,需要迅速且准确无误地在几千标本中找出该样本,进入复检和上报程序,这就需要样本的唯一编号清晰且适合抓取,这种编号方式不但方便流程记录表书写(表 1),而且也便于Ⅱ、Ⅲ区实验人员及时准确地沟通。

3.2 检测流程 每组队员提前到达实验室,进行实验前的准备工作,根据工作量在实验前区拆卸提取试剂及枪头盒外包装,一方面可提高在Ⅱ区的工作效率,为标本检测争取更多的时间;另一方面大量减少需高压灭菌的医疗废物,降低消毒压力。根据分工,穿戴相应防护用品,2 名队员穿戴好二级防护后,1 人迅速进入Ⅲ区判读并发布前一组交班的结果,1 人进入Ⅰ区配试剂。其余队员穿戴好三级防护,携带所需耗材进入Ⅱ区工作。Ⅰ区队员完成本组所需试剂的配制后更换三级防护进入Ⅱ区参与样本提取工作,形成“Ⅱ区 4 人、Ⅲ区 1 人”的工作模式。考虑到不同实验室的人员储备、提取仪数量等,建议每检测组最少 5 人,Ⅰ区、Ⅱ区及Ⅲ区人员配比最好是按 1:4:1 来安排。

表 1 上机检测样本编号记录表

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	09	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	02	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	03	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	
D	04	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	阴性
E	05	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	环评 1
F	06	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	环评 2
G	07	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	
H	08	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	阳性

注:从第 1 列开始编号,A~H 行分别为 01~08 号样本,第 2 列 A~H 行分别为 09~16 号样本,后面依次类推;第 12 列空着的 2 个孔位,为异常结果标本复检孔;阴性,阴性对照;阳性,阳性对照;环评 1,环境评价 1;环评 2,环境评价 2。

Ⅱ区队员在提取时,标本号及提取板的编号要一一对应,每次提取结束后用 75%酒精擦拭提取仪内部,并至少 10 min 的紫外灯照射。每板结果判读后,Ⅲ区通过对讲机及时将异常结果标本信息反馈至Ⅱ区,以便异常结果标本第一时间复查,并及时清理阴性标本,当班未能复查的异常结果样本及其提取液暂存于Ⅱ区冷藏柜,并标注日期等信息,同时做好交接班记录。Ⅱ区人员结束工作后,用 75%酒精擦拭生物安全柜、台面及提取仪的内外表面,打包带走所有医疗垃圾,开启紫外灯消毒并开窗通风。Ⅲ区人员在每板扩增结束后,关闭 PCR 仪电源,上报结果并用 75%酒精擦拭 PCR 仪内部,空置 30 min 后再使用,以保证 PCR 仪的可持续运行。

为保证标本的可溯源性,每个分区都有对应的流程图,并要求填写完整,不能有空项。要有风险意识,随手关门。

3.3 结果上报及复检原则 每板结果出来后,Ⅲ区队员首先参考扩增试剂说明书判断阴性对照、环境评价和阳性对照是否在控,若失控需立即查找原因,并整改。在阴性对照、环境评价和阳性对照均在控的情况下进行结果分析,若有内参未检出的标本,立即原管复检;若出现 ORF1ab 或 N 基因单靶位点阳性则不上报,立即使用双试剂复检;若 ORF1ab 及 N 基因双靶位点阳性第一时间上报,同时立即双试剂复检。在记录流程图时,填写复检标本的孔位,初始 Ct 值及复检 Ct 值,并做好交接班记录。

3.4 意外事件/事故处理流程

3.4.1 标本溢洒的处理流程 当出现标本溢洒时,首先在溢洒区域铺上纱布(完全覆盖),而后用 5 000 mg/L 的含氯消毒液喷洒在纱布上,作用 30 min 以上,再将纱布小心移除。清理过程中避免接触污染物,清理的污染物按感染性废物处置。清除污染物后,用 1 000 mg/L 的含氯消毒液喷洒物体表面,最后开紫外灯进行消毒。

3.4.2 实验室环境的消毒流程 当进行实验室环境消毒时,首先用 1 000 mg/L 含氯消毒液擦拭物体表面、地面以及提取仪、PCR 仪、生物安全柜、超净台等的内部,之后用 75%乙醇进行重复擦拭消毒,最后开紫外灯进行消毒。

4 人员

领队 1 人、队长 1 人、秘书 1 人,检测人员最少需 18~20 人,每名队员均具备 PCR 资质并熟练掌握核酸提取、核酸扩增技术和生物安全防护技能,每队至少 1 人具有特种设备从业人员资质。检测队员分组,若分 3 组,每组 6 人,每班工作

6 h;若分 4 组,每组 5 人,每班工作 5 h。同时,根据工作量及标本送达时间,随时调整班次,尽可能保证队员休息,保证持续战斗能力。

注意队员健康监测,每天 2 次体温测量,每周做 1 次核酸检测。加强队员心理疏导,通过开展党组织生活会及小组交流、谈心等多种方式,舒缓队员压力,使队员保持积极乐观的心态,避免出现焦虑情绪和抑郁状态,并时刻保持良好的自我防护意识。

检测医疗队返程后,队员采取居家隔离。居家隔离时应选择家庭中通风较好的房间隔离,每天上午和下午各测量 1 次体温,并尽可能减少与其他家庭成员接触等^[1]。

5 混采而不混检

对于口咽拭子的采集,可混采不可混检,以确保结果的准确性和可靠性^[2]。援疆期间,混采标本从 5 合 1 到一家人合 1,最大量到 10 合 1。混检本身是一个稀释的过程,在检测方法的检出限相同的情况下,很容易漏检病毒载量较低的阳性标本,而混采则极大地降低了漏检率。而我队在援疆期间就遇到因标本稀释差点漏检的情况,有 1 例标本 5:1 混采检测出强阳性(双靶点 Ct 值均为 27),但 5 个单采的标本因其他单位检测后稀释 2 倍送至我队实验室,3 种品牌的扩增试剂,3 台不同的 PCR 仪重复做,只有一次实验检测出 N 基因且 Ct 值为 38.3,其余均未检出。

6 小结与展望

在援疆期间,为应对大批量检测需要,缩短报告时间,完成防控指挥部下派的检测任务,我队多次梳理和优化了检测流程以及交接班规定等,强调操作规范化、标准化,高效率、高质量地完成了核酸检测任务。疫情就是命令,防控就是责任,实验室就是战场。战时状态,最讲究时效性,第一时间抓住异常病例,第一时间双试剂复查,第一时间报告,以便做到第一时间隔离。

总结我队本次援疆之行经验,概括为 3 点:(1) 各类标识标志明确,实验室有明确分区,每个分区内也有明确标识;(2) 流程标准规范,完整准确的流程表可保证样本结果的可溯源性,这对于在大规模筛查中准确找到异常样本至关重要;(3) 技术能力过硬,我队队员既是检测人员,也是仪器工程师。援疆期间,在仪器工程师无法到场支援的情况下,能够迅速地发现并自行解决遇到的各种问题,保证仪器高效运

转。同时,自治区政府和当地医院在生活、交通、试剂保障等各方面均给予了大力支持。所有人共同努力,克服各种困难,完成了艰巨的核酸检测任务,甚至创造了单日检测量 8 405 管的纪录。

对于 COVID-19 患者早发现、早报告和早隔离,是控制疫情传播的首要任务。而快速有效的 2019-nCoV 实验室检测则显得非常迫切,这对实验室人员提出了更高的要求,要做好生物安全防护工作,严格按照标准操作规程实施 2019-nCoV 检测工作,做好标本检测的全程质量控制工作,提高病毒检出率,更好地应对未来可能出现的 COVID-19 或其他突发公共卫生事件的大规模人群筛查核酸检测。

执笔:薛娴(南京医科大学第二附属医院),董苏荣(泰州市人民医院),王颖(淮安市第一人民医院)

江苏省援疆核酸检测医疗队名单

许斌(江苏省肿瘤医院、江苏省临床检验中心),董苏荣(泰州市人民医院),裴豪(无锡市第五人民医院),束国防(东南大学附属中大医院),薛娴(南京医科大学第二附属医院),王颖(淮安市第一人民医院),赵鸿(江苏省人民医院),孙靖(常州市第一人民医院),李妍(南京医科大学附属逸夫医院),张哲雄(连云港市第二人民医院),熊御云(江苏大学附属医院),陈相(南通市第一人民医院),孙宝兰(南通大学附属医院),宋妙丽(苏州市立医院),余汉忠(徐州市第一人民医院),李颖(徐州医科大学附属医院),罗富银(高邮市人民医院),刘志明(南京市浦口区中心医院),张发(南京市浦口区中心医院),曹风华(镇江市中西医结合医院),邵可可(盐城市第一人民医院)。

7 参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会办公厅. 新型冠状病毒感染的肺炎防控中居家隔离医学观察感染防控指引(试行)[EB/OL]. (2020-02-04). http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-02/05/content_5474688.htm.
- [2] 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. 关于印发新冠病毒核酸 10 合 1 混采检测技术规范的通知[EB/OL]. (2020-08-17). http://www.gov.cn/xinwen/2020-08/19/content_5535756.htm.

(收稿日期:2020-09-27)

(本文编辑:刘群)