

用“扫雷游戏”原理标识新型冠状病毒核酸检测中的可能交叉污染孔<sup>\*</sup>张海龙, 牟小会, 王 萍, 滕 敏<sup>△</sup>

贵州省安顺市人民医院医学检验科, 贵州安顺 561000

**摘要:**目的 应用“扫雷游戏”原理分析新型冠状病毒核酸检测板中各孔与周边孔存在交叉污染的可能性, 标识可能存在孔间交叉污染的孔位。方法 利用 Excel 2021 模拟设计 2 块聚合酶链反应(PCR)反应板, 其中 1 块用于显示反应孔所检测的 ORF1ab 和 N 基因的循环数(Ct)值, 另一块板则根据“被污染孔 Ct 值减去污染源孔 Ct 值 $\geq 5$ ”的标准, 计算显示可能被周边孔污染的孔位, 并在实际新型冠状病毒核酸检测工作中, 测试该表格的适用性。结果 Excel 模拟表格可准确反映 PCR 反应孔的基因检测值, 同时显示可能存在污染的孔位。实际检测工作中, 该表格成功预测了可能存在污染的孔位, 该污染孔位对应的标本经双试剂 2 次复核均呈阴性。结论 应用“扫雷游戏”原理评估新型冠状病毒核酸检测中的孔间污染, 可准确、快速预测可能存在污染的孔位, 避免多次复检。

**关键词:**扫雷游戏; 新型冠状病毒; 核酸检测; 循环数值; 孔间交叉污染

**中图分类号:**R446.9

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2023)13-1954-04

新型冠状病毒核酸检测既是确诊新型冠状病毒感染病例和无症状感染者实验室依据, 也是疫情处置措施判定的重要标准<sup>[1-2]</sup>。有研究在各机构实验室开展新型冠状病毒核酸检测过程中发现, 由阳性标本、质控品及扩增产物造成的实验室环境污染、标本污染易导致假阳性的检测结果, 从而造成防控措施过度、人员恐慌及对核酸检测结果不可信等问题<sup>[3-5]</sup>。

针对因人员操作不当、质控品管理不到位等原因造成的阳性标本、质控品及扩增产物污染可通过加强操作人员培训、规范质控品管理、实施实验室风险评估及管理等方式来避免假阳性结果的出现<sup>[6-7]</sup>。而在加样和核酸提取过程中, 因移液吸头外壁携带污染以及核酸提取仪高速震荡形成的气溶胶污染引起的假阳性则很难避免<sup>[6,8-9]</sup>。这种情况通常发生在相邻孔为强阳性标本或质控品时, 会造成初筛结果为阳性而复检结果为阴性, 从而需要进行复检或重新采样检测<sup>[10]</sup>, 很大程度上增加了检测工作量。

为快速、直观地显示初筛结果中可能为孔间交叉污染的孔位, 便于及时复检, 同时减少不必要的第 2 次复检。本研究基于“扫雷游戏”模式, 根据聚合酶链反应(PCR)扩增原理设置判断规则, 用 Excel 表格模拟设计 PCR 反应板, 直观显示实时检测结果及可能存在污染的孔位, 以方便后续复检及结果判断。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 从上海宏石实时荧光定量 PCR 仪中导出 2022 年 11 月 29 日隔离点送检的、检测编号为 027B 检测板的新型冠状病毒核酸检测原始数据,

共计 90 例标本、3 个阴性对照、2 个空白对照及 1 个弱阳性对照的检测结果。

### 1.2 方法

**1.2.1 检测规则** 新型冠状病毒核酸检测的初筛试剂选用上海思路迪生物医学科技有限公司试剂; 第 1 次和(或)第 2 次复检则采用“初筛试剂+湖南圣湘生物科技有限公司试剂”的双试剂复检模式。

**1.2.2 基于“扫雷游戏”的评估规则**  $12 \times 8$  的核酸提取深孔板, 除周边及四角孔位的相邻孔位较少(3~5 个)外, 其余孔位均可能受到周边 8 个孔位的加样携带污染和提取仪震荡带来的气溶胶污染。因此, 如果该孔位检测结果为阳性, 则可能是源于周边 8 个孔位中强阳性标本的污染。

**1.2.3 被污染孔的循环数(Ct)值—污染源孔 Ct 值 $\geq 5$ 的标准设定** 按照 PCR 扩增原理, 当扩增效率为 100% 时, 检测结果间相差  $n$  个 Ct 值即代表标本待测模板间存在  $2^n$  倍差异。为了最大限度地标识出可能被污染的孔位, 假设加样 200  $\mu\text{L}$  的标本可能导致相邻孔位累计最大量 6.25  $\mu\text{L}$  的携带污染或气溶胶污染。此时, 阴性标本可能被污染, 其病毒含量约为污染源孔的  $1/32[6.25/(200.00-6.25)]$ , 则被污染孔的 Ct 值—污染源孔 Ct 值=5。因此, 为找出所有可能被相邻孔污染的孔位, 可设定“被污染孔的 Ct 值—污染源孔 Ct 值 $\geq 5$ ”的条件来识别被污染孔。

**1.2.4 Excel2021 直观标识可能被污染孔位** 用 Excel2021 模拟设计 2 块 PCR 反应板(孔位号按照逐列排序的方式赋号), 其中 1 块从原始数据中提取

<sup>\*</sup> 基金项目:贵州省安顺市科学技术局社会发展类基金项目(安市科社[2021]31 号);贵州医科大学 2021 年本科教学内容和课程体系改革项目(JG2021057)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail:youyifuming@163.com。

ORF1ab 及 N 基因两个靶标的检测值,并按照扩增区 12×8 的模式对应显示反应孔的 Ct 值(2 个靶标均无 Ct 值时不显示)。另一块板的每个单元格输入函数“IF(AND(MIN(OFFSET(Sheet4! B3, -1, -1, 3, 3))<=41, MIN(OFFSET(Sheet4! B14, -1, -1, 3, 3))<=41, Sheet4! B3-MIN(OFFSET(Sheet4! B3, -1, -1, 3, 3))>5, Sheet4! B14-MIN(OFFSET(Sheet4! B14, -1, -1, 3, 3))>5, Sheet4! B3<=41, Sheet4! B14<=41, OR(Sheet4! B3<>41, Sheet4! B14<>41)), (ROW()-2)+(COLUMN()-16)\*8&"号位可能污染", "")”,调用 Sheet4 中各反应孔的 ORF1ab 和 N 基因的检测值进行运算:当该孔位检测为阳性(即 ORF1ab 或 N 基因有 Ct 值)时,分别用该孔的 ORF1ab 和 N 基因的 Ct 值减去周边 8 个相邻孔位中 ORF1ab 和 N 基因最小的 Ct 值,当两个计算结果均≥5 时,标识该孔位可能被污染。为方便计算,无 Ct 值的靶标默认其 Ct 值为最大扩增 Ct (41)。见图 1。

1.2.5 测试表格的适用性 选取强阳性结果多、易出现孔间污染的隔离点标本的核酸检测结果,输入表格,对表格中显示为可能污染的标本进行双试剂复核及 2 次复核,评估表格的适用性。

## 2 结果

2.1 设计表格可直观显示扩增结果及标识可能被污染的孔位 输入隔离点 027B 检测板的新型冠状病毒核酸检测数据,图 2A 在相应孔位显示了阳性孔的 ORF1ab 和 N 基因的 Ct 值,同时图 2B 标识 B11 为“82 号位可能污染”。分析可知, B11 孔可能源于 A12 孔污染, B11 孔与 A12 孔两个靶标的 Ct 值差值为 ORF1ab 基因 7.36(26.14-18.78)、N 基因 7.39(23.22-15.83), Ct 值差值均>5, 因此 B11 孔可能被污染; D2 孔与 E3 孔相邻,但其 ORF1ab 基因的 Ct 值差值为 0.62(30.77-30.15)、N 基因的 Ct 值差值为 2.93(29.15-26.22), 均<5, 因此排除污染的可能。见图 2。

初筛板号:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O:0 N:0											
B	O:0 N:0											
C	O:0 N:0											
D	O:0 N:0											
E	O:0 N:0											
F	O:0 N:0											
G	O:0 N:0											
H	O:0 N:0											

A

初筛板号:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

B

注:A 用于显示各反应孔 ORF1ab 和 N 基因的 Ct 值;B 用于显示可能污染的孔位基因;O 代表 ORF1ab 基因;N 代表 N 基因;0 表示还未统计 Ct 值。

图 1 模拟 PCR 反应板的表格设计

初筛板号: 027B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												O:18.78 N:15.83
B											O:26.14 N:23.22	
C												
D		O:30.77 N:29.15			O:21.53 N:16.06							
E			O:30.15 N:26.22									O:35.97 N:30.45
F												
G												
H												

A

初筛板号: 027B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												82号位 可能 污染
C												
D												
E												
F												
G												
H												

B

注:A 为检测板中所有阳性孔位的 ORF1ab 和 N 基因的 Ct 值;B 为检测板中被判为可能污染的孔位。

图 2 027B 检测板的扩增结果及可能污染孔位

**2.2 初筛阳性孔 2 次新型冠状病毒核酸复检证实表格的适用性** 对 027B 检测板上所有初筛为阳性的标本进行双试剂第 1 次和第 2 次复检,结果显示,B11 孔位 2 次复检结果均为阴性,D2 孔位 2 次复检均为阳性,证明该表格适用于实际工作中新型冠状病毒核酸检测的结果分析,能快速、直观地显示可能存在的污染孔位。见表 1。

**表 1 隔离点标本 027B 检测板初筛阳性孔 2 次复检结果(Ct 值)**

孔位	孔号	靶标	初筛 思路迪	第 1 次复检		第 2 次复检	
				思路迪	圣湘	思路迪	圣湘
D2	12	O	30.77	31.18	24.51	31.96	24.48
		N	29.15	29.02	26.87	29.49	27.02
E3	21	O	30.15	30.48	24.31	30.78	24.80
		N	26.22	26.72	25.13	27.41	25.83
D5	36	O	21.53	20.44	16.03	21.42	16.43
		N	16.06	15.32	15.23	16.13	13.57
B11	82	O	26.14	NOCT	NOCT	NOCT	NOCT
		N	23.22	NOCT	NOCT	NOCT	NOCT
A12	89	O	18.78	19.05	15.34	19.43	16.45
		N	15.83	15.07	15.18	15.30	16.23
E12*	93	O	35.97	35.32	32.46	35.37	32.01
		N	30.45	29.87	34.19	30.67	34.28

注:O 表示 ORF1ab 基因;N 表示 N 基因;NOCT 表示无 Ct 值;  
\* 表示该孔为弱阳性对照孔。

### 3 讨 论

目前,医疗机构临床实验室开展新型冠状病毒核酸检测所采用的方法以反转录实时荧光定量 PCR 法为主<sup>[11]</sup>,但该方法对加样环境和检验人员要求较高,且容易造成孔间交叉污染,导致假阳性检测结果<sup>[12]</sup>。由于孔间交叉污染多源于加样和核酸提取过程中的携带污染和气溶胶污染<sup>[13-14]</sup>,具有偶发性,很难通过实验室质量控制和风险管理进行规避,只能通过实时分析检测结果和多次复检进行评判。

本研究通过 Excel 软件模拟设计 PCR 反应板的布局,直观地显示各反应孔与其相邻孔位的位置关系,并设置“当阳性孔与其周边最强阳性孔的双靶标 Ct 值相差 $\geq 5$ 时,判定该孔为可能污染”的标准,可准确地标识可能存在污染的孔位。

当下,由于全国各地疫情防控政策的优化,陆续取消了大规模、集中化的社会面核酸筛查,检测机构减少可能引起医疗机构实验室未来一段时间内检出率的增加。结合该表格的使用,检验人员可快速找出可能为交叉污染的标本、及时进行复检。一方面减少了 2 次复检的程序,缩短报告发放时间;另一方面避免了假阳性结果的发出。此外,针对定点治疗医院或方舱医院等阳性标本较集中的机构,当初检、复检结

果不一致时,会启动 2 次复检的流程<sup>[10]</sup>,极大地增加了检测的工作量。此时,将该表格用于分析各阳性孔是否被污染,可以避免非必要的 2 次复检,减少核酸检测工作量。

本研究判定污染的标准为“被污染孔的 Ct 值—污染源孔 Ct 值 $\geq 5$ ”,是基于检测试剂盒扩增效率为 100%、200  $\mu\text{L}$  加样量可能携带或造成相邻孔累计 6.25  $\mu\text{L}$  污染的假设。实际工作中,很多新型冠状病毒核酸检测试剂盒的扩增效率 $\leq 90\%$ <sup>[15]</sup>,吸头携带或气溶胶污染量可能低于 6.25  $\mu\text{L}$ ,因此,Ct 值差值 $\geq 5$ 的标准可根据各实验室检测对象、检出率等因素进行适当调整。

综上所述,基于“扫雷游戏”原理评估新型冠状病毒核酸检测中的孔间污染,可准确、快速预测可能存在污染的孔位,避免多次复检,减少核酸检测工作量。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 新型冠状病毒肺炎防控方案(第九版)[EB/OL]. (2022-06-27)[2022-10-22]. <https://www.gov.cn/xinwen/2022-06/28/5698168/files/9585944023424f45a4b4d522b5f5c034.pdf>.
- [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. 医疗机构新型冠状病毒核酸检测工作手册(试行第二版)[EB/OL]. (2020-12-28)[2022-10-28]. <http://www.nhc.gov.cn/zwygj/s7659/202012/b89bcd0813da41788688eb14787b3c72.shtml>.
- [3] 王爽,潘阳,徐新民,等. 新型冠状病毒核酸 PCR 检测假阳性核酸污染类型的鉴别方法[J]. 首都医科大学学报, 2022,43(3):427-432.
- [4] 梁志超,潘阳,林长缨,等. 新型冠状病毒核酸检测样本 DNA 污染鉴别方法研究[J]. 实用预防医学, 2022, 29(9):1064-1067.
- [5] LIPPI G, SIMUNDIC A M, PLEBANI M. Potential pre-analytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19)[J]. Clin Chem Lab Med, 2020, 58(7):1070-1076.
- [6] 龚文娟,陈宝荣,孙慧颖,等. 新型冠状病毒核酸阳性质控品污染原因分析及解决办法[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2021, 9(4):237-241.
- [7] 王秋,黄韵,姜航,等. CLSI EP23-A 在新型冠状病毒核酸检测实验室风险管理中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 43(21):2680-2684.
- [8] 李俊英,葛文超,王艺芳,等. 浅谈核酸检测关键环节的质量控制[J]. 中国卫生检验杂志, 2020, 30(11):1404-1406.
- [9] 李振昊,高小玲,杨小娟. 新型冠状病毒核酸检测分析[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(10):1313-1315.
- [10] 陈长强,孟俊,金佩佩,等. 定点医院新型冠状病毒肺炎患者核酸检测工作的实践和探索[J]. 诊断学理论与实践, 2022, 21(2):143-149.
- [11] 中国医院协会临床微生物实验室专业委员会. 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.

[12] 汤晓琦. 基于链置换触发 G 四联体/RCA 的外泌体源性 microRNAs 电化学传感技术的构建[D]. 重庆: 中国人民解放军陆军军医大学, 2020.

[13] 赵建华, 何军, 夏欣一, 等. 新型冠状病毒核酸全自动 PCR 检测系统临床应用江苏专家共识[J]. 临床检验杂志, 2022, 40(11): 801-807.

[14] 罗明, 王雪, 罗琴, 等. 核酸检测自动化工作站的污染风险

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2023.13.031

及检测性能评估[J]. 现代预防医学, 2021, 48(15): 2802-2807.

[15] 于河山, 任峰, 张艺凡, 等. 六种新型冠状病毒核酸检测试剂的性能评价及其与核酸提取试剂匹配性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(9): 841-848.

(收稿日期: 2022-12-16 修回日期: 2023-02-08)

## 432 例妊娠合并心律失常患者临床资料分析\*

张丽敏, 吴秋平, 李 丽<sup>△</sup>

中国人民解放军陆军军医大学第二附属医院心血管内科, 重庆 400037

**摘要:**目的 探讨妊娠合并心律失常对母儿结局的影响。方法 选择 2007 年 2 月至 2021 年 8 月该院收治的 58 728 例孕妇中 432 例妊娠合并心律失常患者(心律失常组)的临床资料, 对心律失常类型、妊娠结局进行分析。根据年龄和妊娠年份 1:1 匹配同期 432 例健康妊娠女性作为对照组。分析两组研究对象的一般资料、孕期并发症、妊娠结局情况。结果 58728 例孕妇妊娠合并心律失常发生率为 0.74%, 其中室性期前收缩(24.31%)及窦性心动过速(24.07%)构成比较高, 88.19% 的患者能顺利通过妊娠期和分娩期。与对照组比较, 心律失常组住院天数更长, 剖宫产率更高, 新生儿体质量更低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。两组流产、早产发生率, 孕周比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。对恶性心律失常患者及时进行介入手术干预后, 患者基本平稳度过围生期。结论 近年来, 妊娠合并心律失常发生率有升高的趋势, 可导致不良妊娠结局, 通过多学科联合管理, 对符合适应证的患者及时采取介入手术干预可改善妊娠结局。

**关键词:**妊娠; 心律失常; 介入治疗; 妊娠结局

**中图分类号:** R714.252

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-9455(2023)13-1957-04

妊娠合并心律失常是导致孕产妇围生期因心血管疾病死亡的重要原因之一, 国外研究证实, 妊娠合并心血管疾病占美国妊娠女性相关死亡的 26.5%<sup>[1]</sup>。心律失常作为妊娠最常见的心血管不良事件, 其发病率已升至妊娠合并心血管疾病的首位<sup>[2]</sup>。因此, 本研究对妊娠合并心律失常患者的基本情况和影响因素进行了分析, 借此寻求降低妊娠合并心律失常不良预后发生率。回顾性分析本院 432 例妊娠合并心律失常患者的临床资料, 现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2007 年 2 月至 2021 年 8 月本院收治的 58 728 例孕妇中合并心律失常患者 432 例, 患者年龄 17~46 岁、平均(28.64±5.19)岁, 平均孕周(37.24±5.12)周。妊娠合并心律失常的诊断标准依据《妇产科学》(第 9 版), 根据患者病史、症状、体征、辅助检查相关结果诊断, 同时按年龄和妊娠年份 1:1 匹配, 纳入健康孕妇(对照组)分析心律失常对孕妇及胎儿的影响。本研究通过医院伦理委员会审查(2021-研第 070-01)。

**1.2 方法** 利用医院病案统计系统收集 2007 年 2

月至 2021 年 8 月妊娠合并心律失常 432 例住院分娩患者病历资料, 登记患者一般情况、心律失常类型、心功能、分娩方式、预后及新生儿情况等。围生儿结局包括早产(分娩孕周 28~<37 周)、小于胎龄儿(新生儿出生体质量<相同孕龄第 10 个百分点孕周体质量)、新生儿窒息(出生后 5 min Apgar 评分<7 分)等。按照纽约心脏病协会分级方案对患者心功能进行分级。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用两独立样本  $t$  检验; 不符合正态分布的计量资料以  $M(P_{25}, P_{75})$  表示, 组间比较采用秩和检验。计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 妊娠合并心律失常患者基本情况** 2007 年 2 月至 2021 年 8 月, 本院收治的 58 728 例孕妇中妊娠合并心律失常 432 例, 发生率为 0.74%。不同年份发生率见表 1。

\* 基金项目: 重庆市科卫联合医学科研项目(2020FYYX085)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: 104802470@qq.com。