

会资源提高教师的业务水平。

3.3 加强学生团队意识 团队协作精神是未来医学工作者必备的素质,而自信张扬、追求独立的新一代大学生团队合作意愿不强。混合式实验让不同专业学生组成小组,分工合作,共同完成实验,是对学生的团队合作与组织沟通能力的全面挑战^[12]。敬岗爱业、凝聚力强的教学团队则能够在培养学生的团队意识中达到潜移默化、事半功倍的效果。

4 小 结

通过混合式实验的开展,临床医学学生对病理检验的认知明显提高,检验专业学生对临床基础理论的理解更深刻,不同专业的同学取长补短,相互交流,合作中不乏竞争,收获成功的经验也积累失败的教训,既激发学生学习动力也拓展学生视野、锻炼学生意志。同时,改革后的教学模式也促进了教师的主动学习及自我提升,真正达到教学相长、师生共进,避免了教学改革最终止于喧嚣、流于形式的结局。总之,将病理检验技术与医学机能实验技术相关项目整合的混合式教学目前还需要师生不懈努力,共同探究,未来还需继续秉承职业教育特点,坚持“必需、实用、顶用”为度、“贴合行情、对接岗位”为原则,适度拓展、合理选取教学内容,进一步加强学生的实践创新能力、自主学习能力和团队合作能力的培养。

参考文献

[1] 石海峰,王博,朱骏.浅谈中日职业院校医学病理检验技术教学比较研究[J].卫生职业教育,2018,36(4):67-68.

管理·教学

- [2] 陈军芳.病理技术人才的培养前景分析[J].中国医药指南,2018,16(29):286-287.
- [3] 张喆,李良同,刘春颖,等.综合性实验项目开设与本科生能力培养[J].教育教学论坛,2019,11(16):270-271.
- [4] 黄丽,葛荣靖,倪虹,等.“翻转课堂”在医学机能实验教学中的应用与评价[J].齐齐哈尔医学院学报,2016,37(13):4209-4210.
- [5] 凡翠华,贺宁,武凌慧.肺栓塞患者疾病相关知识认知情况的危险因素分析[J].护理实践与研究,2019,16(11):24-26.
- [6] 刘洪利,王军利,郜乐乐.高职病理检验技术教学中存在的问题与对策[J].临床合理用药杂志,2014,7(23):166-167.
- [7] 齐妍,庞丽娟,王宁,等.新型翻转课堂-混合式教学模式在诊断病理学教学中的应用初探[J].现代医药卫生,2018,34(13):2082-2085.
- [8] 任艳丽,张秀瑜.科研与临床结合指导医学检验实习带教新策略探讨[J].国际检验医学杂志,2019,40(4):505-507.
- [9] 唐琼兰,王淑珍,许冰,等.临床医学本科实习生病理学教学平台的建设及评价[J].中国高等医学教育,2018,31(5):54-55.
- [10] 曾勇智,张弛,易光辉.开放式医学机能学实验教学模式探索[J].吉林医学,2018,39(3):597-599.
- [11] 陈立松,盖晓东,历春.从综合性实验看医学机能学教学改革[J].吉林医药学院学报,2016,37(2):151-152.
- [12] 张苏丽,商建宇,蒋东乔,等.团队意识在医学机能实验教学中的意义[J].西北医学教育,2014,22(2):286-289.

(收稿日期:2019-10-24 修回日期:2020-02-28)

肿瘤个体化诊断 PCR 类检测试剂体系探讨

李耀华,李 思,塔 娜[△]

(国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心质量管理部,北京 100000)

摘 要:随着肿瘤靶向治疗的不断发展,以荧光定量 PCR 技术为代表的恶性肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂在临床中的地位越来越重要。由于肿瘤细胞具有异质性,临床对 PCR 原理检测试剂的准确度、特异性、精密度、检测限等提出较高要求,相关生产企业应对该类检测试剂有严格的质量控制体系。尽管国家药品监督管理局已经出台相应指南,对标本处理、实验设计、体系设置和质量控制等提出了明确的要求,但仍有很多实验设计的细节内容尚需明确。该文针对肿瘤个体化 PCR 扩增检测试剂在研发和临床使用中的规范要求,依次对肿瘤核酸提取和纯化的方法学、PCR 体系设置、质控体系建立等进行了归纳和探讨,有望指导相关生产企业对该类试剂的产品设计、研发和注册申报。

关键词:肿瘤个体化 PCR 扩增检测试剂; 核酸提取; PCR 体系设置; 质控体系

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.030

文章编号:1673-4130(2020)13-1657-05

中图法分类号:R730.4

文献标识码:B

近年来,癌症发病率持续上升,已经成为威胁人类健康的重要疾病。手术、放疗和化疗是癌症治疗的

主要方法,但手术治疗不适于已经发生转移的癌症晚期患者,放疗和化疗亦因其严重的毒副作用在临床应

[△] 通信作者, E-mail:136033875@qq.com。

本文引用格式:李耀华,李思,塔娜.肿瘤个体化诊断 PCR 类检测试剂体系探讨[J].国际检验医学杂志,2020,41(13):1657-1661.

用中明显受限^[1]。靶向治疗是通过将靶向药物作用于特定的靶分子,特异性地杀死肿瘤细胞,达到肿瘤治疗目的的一种治疗手段。其疗效好,毒副作用小,给药方式便捷,逐渐成为肿瘤治疗的主流趋势之一^[2-4]。靶向药物在使用之前需要对患者特定基因进行检测,以指导药物的使用,因此,肿瘤靶向治疗也被称为个体化治疗,与之相关的基因检测称为肿瘤个体化诊断。从某种意义上说,个体化治疗的成功依赖于精确可靠的基因检测技术,安全和有效的个体化诊断试剂是实施肿瘤个体化治疗的基本条件^[5]。

1 国内、外肿瘤个体化诊断试剂的注册现状

目前,已有多个肿瘤个体化诊断试剂获得国家药品监督管理局(NMPA)的批准,主要集中在肺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤领域。在已上市产品中,以肺癌表皮生长因子受体(EGFR)基因突变检测和乳腺癌人类表皮生长因子受体-2(HER2)基因扩增检测产品占比最大。继 2010 年我国首个非小细胞肺癌 EGFR 基因突变检测试剂上市之后,陆续有 KRAS、BRAF、ALK、ROS1 等单基因突变检测产品获批上市。2018 年用于指导肺癌多种靶向药物治疗的多基因联合检测 PCR 产品和高通量测序产品也获批上市。在美国,也有多个肿瘤个体化诊断试剂盒获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,所涉及的癌种包括肺癌、肠癌、乳腺癌、卵巢癌、尿路上皮癌、黑色素瘤等恶性肿瘤^[6-7],既包括单基因检测产品,如 EGFR、RAS、BRAF、ALK、BCR-ABL 等,也包括可以同时检测多个基因的高通量测序产品,如 FoundationOne CDx、Oncomine Dx Target Test 等。

与肿瘤个体化诊断相关的核酸变异主要包括点突变、插入、缺失、融合、拷贝数变异等类型。在已批准产品中,点突变、插入、缺失等基因变异检测产品大多与 PCR 技术相关。融合基因的检测方法包括 3 种,荧光原位杂交(FISH)、逆转录 PCR 和免疫组化法(IHC),分别在 DNA、RNA 和蛋白水平进行检测,基因拷贝数变异的检测方法主要为 FISH。目前,肿瘤个体化治疗需检测的基因突变靶点相对有限,而 PCR 方法既可以在 DNA 水平检测点突变、插入及缺失,又可以在 RNA 水平上检测基因融合,已成为我国肿瘤个体化诊断使用最广泛的技术^[8]。

与肿瘤基因突变检测相关的 PCR 技术分为多种。荧光染料法是成本最低的一种检测方法,但由于染料分子可以与引物二聚体及反应体系中存在的一些双链结构 DNA 非特异性结合,易引起假阳性反应,该方法未得到临床的认可。Taqman 荧光 PCR 方法因其灵敏度特异度较高、操作方便等优点在致病性病原体核酸检测方面得到临床广泛应用,但是对于基因突变而言,其灵敏度稍低。高分辨率溶解曲线法(HRM)依据 DNA 序列的长度、GC 碱基含量的差异对基因突变进行分析,具有较高的灵敏度,但反应体

系中探针引入与否分别存在缺乏扩增的特异性和体系设置较为复杂的缺点,也存在一定的局限性。扩增阻滞突变系统法(ARMS),利用 Taq DNA 聚合酶缺少 3'-5'外切酶活性,PCR 引物的 3'末端位碱基必须与其模板 DNA 互补才能有效扩增的原理,针对不同的已知突变,设计适当的引物以检测出突变基因,具有很高的灵敏度和特异度,目前已经成为临床广泛接受和使用的检测方法^[9]。

2 肿瘤个体化诊断 PCR 检测试剂的注册申报基本要求

肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂是指利用分子生物学对人体来源的各种标本(主要是 35%~40%的甲醛水溶液固定石蜡包埋的病理组织切片标本)的核酸提取液中的特定基因突变进行体外检测的试剂^[10]。在我国,体外诊断试剂(IVD)根据风险程度高低依次分为第三类、第二类和第一类产品,肿瘤个体化治疗基因突变检测相关的体外诊断试剂作为第三类 IVD 产品进行管理。根据国家药品监督管理局颁布的《体外诊断试剂注册管理办法》的有关规定,在国内,首次申请注册的 IVD 产品需完成产品研发、分析性能评估、注册检验及临床试验研究,并在提出注册申请时提交相关的试验验证资料。针对肿瘤个体化治疗基因如突变检测产品,我国近年来相继发布了《肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂技术审查指导原则》《人表皮生长因子受体(EGFR)突变基因检测试剂(PCR 法)注册技术审查指导原则》等指南。由于该类产品生产研发的企业数量较多,方法学差异较大,相关技术更新较快,故医疗器械监管部门有必要根据不同类产品的特征进一步制订个性化的技术要求以指导注册申请人对申报产品进行合理的开发设计、验证与确认。本文将结合肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂的产品特征、临床预期用途、监管部门的法规要求及笔者近年来 IVD 产品技术审评工作的经验总结,对该类产品的标本处理、体系设置、质量控制等重点内容进行探讨并提出指导性建议,供注册申请单位及相关的临床研究单位参考。

3 肿瘤个体化诊断 PCR 试剂体系设置和质控体系设置的基本要求

由于肿瘤个体化诊断涉及的突变位点多且变异类型复杂,而临床对诊断试剂的准确度、特异度、精密度等均有明确的要求,因此,对 PCR 个体化诊断相关的核酸提取、PCR 体系设置和质控体系进行合理要求十分必要。

3.1 核酸提取和纯化

核酸提取和纯化是进行核酸扩增反应的重要步骤,核酸提取和纯化的质量(包括纯度和浓度)与效率是决定 PCR 成败的要素之一。临床上,用于肿瘤个体化诊断的人体标本包括新鲜组织、冰冻组织、经 35%~40%的甲醛水溶液固定的石蜡包埋组织(FFPE)、血液等,其中最常见的标本类型

为 FFPE 标本。组织标本离体后应使用 10% 中性 35%~40% 的甲醛水溶液尽快进行固定,以避免环境中的核酸酶对 DNA,尤其是对 RNA 的降解作用,同时也应考虑标本处理过程中 35%~40% 的甲醛水溶液对核酸分子的影响。活检组织标本一般固定 6~12 h,手术切除标本需 6~48 h 固定。

除了 FFPE 标本,血浆标本也是肿瘤个体化诊断产品的一种标本类型,如人肺癌 EGFR 基因突变检测试剂,在不易获得患者组织标本的前提下,可作为补充检测的一种标本类型组。由于血浆中来源于肿瘤细胞的核酸水平低,突变丰度低,且容易因血浆分离不及时导致血细胞裂解和基因组 DNA 污染,从而影响试验结果的准确性,因此,在该类标本处理过程中应考虑标本保存时间、标本保护剂及抗凝剂对核酸质量的影响。推荐使用含有游离 DNA 保护剂及防细胞裂解保护剂的专用采血管,采集 10 mL 全血并尽快分离血浆。

尽管市场上有多种针对 FFPE 和血浆游离核酸提取试剂盒,但质量良莠不齐,DNA 和 RNA 提取质量难以保障,为保证 PCR 和逆转录-PCR 检测效果,核酸提取试剂必须采用药监部门批准的核酸提取试剂,严格按照说明书要求进行操作,并对核酸提取和纯化的环节进行验证,同时在产品说明中对产品配套的核酸提取试剂予以明确。

3.2 PCR 试剂体系的设置

3.2.1 引物和探针 引物探针的设计、合成与纯化是荧光 PCR 重要的环节。由于肿瘤个体化核酸试剂检测目标常为多个基因位点,在产品说明时多采用多重 PCR 技术,一管中扩增多个突变位点以满足临床的需求。在引物和探针设计时,有以下几点需要注意:(1)应尽量降低检测体系的复杂度,在同一反应体系内,如 EGFR 外显子 19 缺失检测,除针对缺失设计的特异性引物外,各种缺失类型检测应尽量共用另一条引物和探针;(2)分析目标检测基因是否存在假基因,若存在,引物探针应在目的基因与假基因有区别的位点处设计引物探针,以避免体系的非特异扩增;(3)同一反应管的多条引物自身和彼此之间不应存在互补序列,尤其应避免不同引物 3' 端的互补而形成引物二聚体;(4)如果检测需要多个反应管,除了保证单个目的片段扩增所需上下游引物的 T_m 值的一致性外,各管间引物 T_m 值、探针 T_m 应尽量保持一致,以保证各反应管扩增效率一致性;(5)探针在设计时 T_m 值应高于引物 T_m 值 7~10 °C,以提高探针的杂交效率;(6)为保证有效扩增 FFPE 标本核酸,PCR 扩增片段的长度建议小于 200 bp,若标本类型为血浆游离 DNA,PCR 扩增片段长度建议小于 160 bp^[11-12]。

引物和探针合成质量的优劣也直接影响 PCR 反应的性能。由于合成的引物和探针中可能含有相当数量的“错误序列”,其中包括不完整序列和脱嘌呤产

物,这些序列可以导致非特异扩增和荧光信号强度的降低。因此,肿瘤个体化诊断核酸产品所用的引物和探针必须经过纯化。引物、探针合成时宜选择以下方式保证引物和探针的质量:(1)选择产品质量好且稳定的引物或探针合成机构;(2)选用合适的纯化方法(PAGE、HPLC 或其余合适的方法);(3)生产且针对用于生产的引物和探针设定质量控制标准,如分子量、水平、纯度等要求,针对探针还应明确荧光标志物要求。

3.2.2 PCR 所需酶的要求

3.2.2.1 逆转录酶 对于融合基因检测而言,需要将 RNA 逆转录成 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,因此,高效的 RNA 逆转录对于后续 PCR 检测至关重要。针对逆转录 PCR 反应体系中,逆转录过程受多个因素影响,如反应模式(一步法或两步法),模版 RNA 的水平、质量、二级结构,目标序列的长度等。申请人应综合考虑上述因素,选择合适的逆转录酶。由于不同逆转录酶所需的反应条件和反应环境不同,企业应当对逆转录酶的效率及特异性进行验证。

3.2.2.2 DNA 聚合酶 PCR 反应中 DNA 聚合酶的选择,对于实验的准确度、特异性、灵敏度和稳定性等性能至关重要。PCR 聚合酶选择根据实验者的需求主要从扩增的效率和保真性这两个方面来考虑。尽管在市场上有多种耐热 DNA 聚合酶,但这些酶在热稳定性、扩增效率、移除错配核苷酸的能力上是有差别的,合理选择耐热 DNA 聚合酶是 PCR 成败与否的一个关键因素^[13]。

由于肿瘤个体化诊断常常为多重 PCR 反应,为保证扩增的特异性,建议采用热启动 Taq DNA 聚合酶来降低引物的非特异性扩增,而耐热、高保真及核酸外切酶活性为选择 Taq 的主要原因。由于肿瘤组织中既含有突变 DNA,也含有野生型 DNA,而野生型 DNA 背景常常会影响突变 DNA 检测,因此,肿瘤个体化 PCR 产品宜采用同时兼顾扩增效率和特异性的 DNA 聚合酶,生产企业应针对核酸扩增酶设定相应质量控制标准,对供应商不同批次的酶的性能进行评价,在保证试剂高灵敏度的同时,要防止因 DNA 聚合酶特异性差而造成的假阳性现象。

3.2.2.3 尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG 酶) PCR 在扩增过程中产生大量的 PCR 产物,这些产物是 PCR 反应最常见、最重要的污染物。为了保证 PCR 扩增结果的准确性,企业应当采取措施避免因 PCR 产物污染而产生的假阳性结果。

UNG 酶可以选择性水解断裂含有 dU 的 DNA 双链,在随后的变性条件下,该 DNA 发生断裂,不能够作为 PCR 模板进行扩增,从而防止扩增产品对扩增的影响;同时,在 PCR 变性过程中,高温使 UNG 酶被灭活,不会再降解新扩增的产物 U-DNA^[14]。建议

企业以脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(dUTP)部分或全部替代脱氧胸苷三磷酸(dTTP),且在反应系统中添加 UNG 酶,并对不同供应商来源的 UNG 酶性能进行验证。由于 PCR 扩增时 dUTP 的掺入效率要低于其他脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP),因此,企业应当对各 dNTP 的用量和比例进行优化,以得到最佳的反应效率。

3.2.3 反应体积 PCR 反应体积对肿瘤个体化核酸检测试剂性能也有着明显的影响。反应体积越小,加入反应系统的模板数也随之降低,容易引起假阴性;反应体积越大,允许使用的模板体积也可放大,灵敏度随之提升。理论上讲,大体积的稳定性更好,实验的重现性也更好,但是,反应体系的增大会增加成本。因此,需要重点考虑 PCR 反应体积核酸扩增检测用试剂(盒)-YY/T 1182—2010 行业标准中的要求,体外诊断用人类免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)核酸扩增检测试剂盒产品核酸加样体积不小于 20 μL ;总反应体积不小于 40 μL 。建议肿瘤个体化诊断 PCR 扩增类产品的反应体积为 30~100 μL 。

3.2.4 PCR 添加剂 部分化学因子、DNA 结合蛋白及商业化试剂可以降低引物和模板的二级结构,使 RNA 二级结构打开,双链 DNA 变性完全;同时还可以提高 DNA 复性时的特异性配对,增加或改变 DNA 聚合酶的稳定性等,提高 PCR 的扩增效率。这些物质作为添加剂经常被加入逆转录体系或 PCR 体系中,常见的添加剂有二甲基亚砜、甲酰胺、聚乙二醇 6000、甘油、甜菜碱和牛血清蛋白。但没有一种添加剂可以适用于所有的 PCR 反应体系,需要根据实际情况选择最优的 PCR 添加剂并对其用量进行优化。

3.3 质控体系设置 为有效监控肿瘤个体化诊断试剂的假阴性和假阳性,肿瘤个体化诊断产品应从标本制备、配液及加样、试剂盒仪器性能、扩增反应抑制物、交叉污染、靶核酸降解等方面进行考虑,建立完整的质控体系。完整的质控体系包括外部体系质控及内部质控两个部分。

3.3.1 外部质控设置 外部质控体系主要是指在进行目的基因检测的同时,平行设置已知结果的标本检测,主要监控荧光 PCR 检测的结果是否可靠。外部质控体系包括阳性对照、阴性对照(空白对照)。阳性对照主要作用是判断试剂是否正常扩增及扩增的效率是否有偏差。阳性对照在设置时应考虑以下几点:(1)阳性对照一般选择目的基因为扩增模版,扩增效率应与靶基因的扩增效率一致。(2)模版浓度不宜过高,避免在操作过程中因气溶胶污染而对其他待测标本产生假阳性;也不宜过低,以避免试验间阳性对照 Ct 值偏差过大,甚至出现完全无法检出的现象。(3)建议对于每一管反应,应设置相对应的阳性对照。阴性对照主要是判断试剂是否存在引物二聚体、交叉反

应、强阳性污染等问题。阴性对照的选择可以是无模板的纯水,也可以是确定野生型的核酸,阴性对照每次的检出结果应该为阴性,说明实验结果较为可靠;也有实验者增加一个空白对照,即不加入任何模板或提取产物,仅仅试剂单独扩增,主要目的是监控实验室环境是否存在污染的风险。

3.3.2 内部质控设置 内部质控则是对标本的制备、PCR 反应体系及人员操作进行质控。内标的检测可以发现核酸标本中是否存在 PCR 抑制剂,也可以发现标本有无加入反应孔等操作问题。内标最好与标本中的靶核酸一起经历核酸提取过程,这样也可以作为核酸提取过程的质控。目前国内外传染性荧光 PCR 检测产品大多含有内标,核酸扩增检测用试剂(盒)-YY/T 1182—2010 行业标准也对此作出了明确要求,体外诊断用 HIV、HBV、HCV 核酸扩增检测试剂盒产品必须含有内标。

由于肿瘤个体化核酸诊断产品检测对象为人类核酸,若检测对象为 DNA,建议以非靶基因 DNA 片段作为瘤个体化诊断产品的内标;若检测对象为融合基因,以与目标基因表达量相当的人类管家基因 RNA 作为内标。在设计内标引物和探针时,应避开内含子区,在相邻外显子两侧设计引物探针,因内标扩增与目的基因扩增公用一套酶及缓冲体系,所以应充分考虑内标扩增对靶核酸扩增的影响,并对反应体系进行优化。肿瘤个体化用药相关基因突变检测试剂技术审查指导原则要求企业应对内对照(内标)的引物、探针和模板浓度做精确验证,既要保证内标荧光通道呈明显的阳性曲线,又要尽量降低对靶基因检测造成的抑制而导致假阴性。

4 讨论

肿瘤靶向药物发展迅速,并展示很好的临床治疗效果,而肿瘤靶向治疗的效果与肿瘤个体化诊断产品的质量密切相关,因此,核酸扩增检测试剂也需要在严格的体系设置要求下与药物共同发展形成完备的肿瘤个体化诊疗方案。国家药品监督管理局发布的《体外诊断试剂注册管理办法》《肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂技术审查指导原则》和《人表皮生长因子受体(EGFR)突变基因检测试剂(PCR 法)注册技术审查指导原则》仅对相关内容的要求概述,并未对具体内容展开描述;特撰此文,指导相关生产企业对该类试剂的研发、生产;希望国产试剂提升产品质量,为公众用械安全提供保障。

参考文献

- [1] 李靖. 肺癌靶向治疗的二三事——访江苏省肿瘤医院肿瘤内科主任医师史美祺[J]. 江苏卫生保健, 2019, 20(9): 4-5.
- [2] 路琳, 崔秀洁, 孙淦倪. 靶向联合化疗治疗结肠癌患者的疗效及 TSGF、CEA 的变化研究[J]. 癌症进展, 2019, 17

(18):2158-2161.

[3] 周杰. 放化疗结合靶向治疗非小细胞肺癌脑转移的临床疗效[J]. 医学理论与实践, 2019, 32(18):2922-2923.

[4] 彭博, 李慧玲. 浅析癌症与其靶向药的相关研究进展[J]. 世界最新医学摘, 2019, 19(61):54-57.

[5] JØRGENSEN J T. Companion diagnostics: the key to personalized medicine. Foreword. [J]. Expert Rev Mol Diagn, 2015, 15(2):153-156.

[6] BELTRÁN-GARCÍA J, OSCA-VERDEGAL R, MENA-MOLLÁ S, et al. Epigenetic IVD tests for personalized precision medicine in cancer[J]. Front Genet, 2019, 10(2):621.

[7] LEVENT A, DE RICHTER P, ANGEL W H, et al. Changes in the use of commercial and lab-developed IVD assays in the clinical setting for PD-L1 expression testing in NSCLC in the United States[J]. J Clin Oncol, 2018, 36 (suppl 5): S154-S157.

[8] 张杰. 聚合酶链反应技术在非小细胞肺癌 EML4-ALK 融合基因检测中的应用[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(12):856-858.

[9] 国家卫生和计划生育委员会. 肿瘤个体化治疗检测技术指南(试行)[EB/OL]. (2015-07-29)[2019-11-02]. <http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s3593/201507/fca7d0216fed429cac797cdafa2ba466.shtml>.

管理·教学

[10] KERR K M, BUBENDORF L, EDELMAN M J, et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer[J]. Ann Oncol, 2014, 25(9):1681-1690.

[11] VON AHLFEN S, MISSEL A, BENDRAT K, et al. Determinants of RNA quality from FFPE samples, PLoS One[J]. 2007, 2(12):e1261.

[12] NEWMAN A M, BRATMAN S V, TO J, et al. An ultra-sensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage[J]. Nat Med, 2014, 20(5):548-554.

[13] HAGEN R M, RHODES A, OXLEY J, et al. A M-MLV reverse transcriptase with reduced RNaseH activity allows greater sensitivity of gene expression detection in formalin fixed and paraffin embedded prostate cancer samples[J]. Exp Mol Pathol, 2013, 95(1):98-104.

[14] PRUVOST M, GRANGE T, GEIGL E M. Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies [J]. Biotechniques, 2005, 38(4):569-575.

(收稿日期:2019-12-29 修回日期:2020-02-20)

新型冠状病毒核酸检测实验室的生物安全防护探讨*

李渊婷^{1,2}, 高小玲^{1,2}, 李永红^{1,2,△}

(甘肃省人民医院:1. 临床研究与转化医学研究所;2. 国家卫生健康委
胃肠肿瘤诊治重点实验室, 甘肃兰州 730030)

摘要:2019 年 12 月底, 武汉市发现由新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染引起的新型冠状病毒肺炎病例, 随后感染人数不断上升, SARS-CoV-2 核酸检测可及时对急重症及疑似患者的诊断提供直接证据。由于 SARS-CoV-2 可能存在气溶胶传播途径, 检测人员在实验过程中存在较大的感染风险。因此, 加强检测实验室生物防护显得极为重要。该文结合相关文献及在 SARS-CoV-2 核酸检测中的工作经验, 从实验室生物安全防护、个人生物安全防护、核酸检测过程生物安全防护等各个环节进行深入探讨, 为 SARS-CoV-2 检测实验室生物安全防护提出相关措施和参考依据。

关键词:新型冠状病毒; 新型冠状病毒肺炎 实验室生物安全防护

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.13.031

文章编号:1673-4130(2020)13-1661-04

中图法分类号:R817-33

文献标识码:B

自 2019 年 12 月底湖北省武汉市发现新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染患者以来, 院内感染及对病毒传播途径认知不足致使生物安全防护欠缺或不到位是导致医务人员暴露并感染的重要原因^[1]。

SARS-CoV-2 是人类分离的第七类冠状病毒, 属于 β 属的新型冠状病毒, 有包膜的单股正链 RNA 病毒, 直径 60~140 nm, 形态不一, 多为圆形或椭圆形。其基因特征与严重急性呼吸综合征冠状病毒(SARS-

* 基金项目: 甘肃省新型冠状病毒肺炎(NCP)科技重大专项。

△ 通信作者, E-mail: liyonghong-GSPH@hotmail.com。

本文引用格式: 李渊婷, 高小玲, 李永红. 新型冠状病毒核酸检测实验室的生物安全防护探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(13):1661-