

• 论 著 •

基于交叉引物恒温扩增技术的 EasyNAT 甲型、乙型流感病毒及肺炎支原体核酸检测试剂的性能评价及临床应用^{*}

杨邵岚, 李 惺, 先 陶, 李亚菲, 蒋 黎, 华 诗[△]

电子科技大学附属医院·四川省人民医院临床医学检验中心, 四川成都 610072

摘 要:目的 评价基于交叉引物恒温扩增(CPA)技术的 EasyNAT 甲型流感病毒(Flu A)、乙型流感病毒(Flu B)和肺炎支原体(MP)核酸检测试剂的性能及临床应用价值。方法 根据相关标准,使用流感病毒(Flu)和 MP 参考品,依次对 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂的检出限、交叉反应和抗干扰能力进行验证及评价;同时将 2024 年 1 月 1 日至 2024 年 7 月 5 日于该院就诊的疑似 Flu 或 MP 感染患者 811 例纳入研究,并收集其咽部拭子,以逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测结果为标准,分别验证 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂的符合率及一致性,以评价其临床应用价值。结果 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂在其厂家声明的检出限浓度的参考品中,8 次重复检测结果均为阳性;在添加临床常见交叉反应病原体的情况下,Flu 和 MP 阴性标本中均未检测出病原体特征峰;加入干扰物质后,Flu 或 MP 阳性标本的检测结果未受影响;811 例临床标本中,EasyNAT Flu A 核酸检测试剂的灵敏度为 97.33%,Flu B 核酸检测试剂的灵敏度为 98.47%,二者特异度均为 98.04%;EasyNAT MP 核酸检测试剂的灵敏度为 97.95%,特异度为 99.03%,该方法与 RT-qPCR 检测结果高度一致($Kappa$ 值均大于 0.900);在不同循环阈值范围的阳性标本检测中,EasyNAT Flu 核酸检测试剂检出率比较,差异无统计学意义(Flu A: $\chi^2=4.20, P=0.08$;Flu B: $\chi^2=2.22, P=0.31$),EasyNAT MP 核酸检测试剂检出率比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.84, P<0.01$)。结论 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂具有良好的检测性能,灵敏度和特异度高。此外,该产品应用操作简便、检测快速、结果准确,适合基层医院开展,具有广泛的临床应用前景。

关键词:交叉引物恒温扩增; 流感病毒; 肺炎支原体; 逆转录实时荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2025.17.017

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2025)17-2142-06

文献标志码:A

Evaluation of the performance and application value of EasyNAT nucleic acid test kits for influenza A/B viruses and Mycoplasma pneumoniae based on cross-primed amplification technology^{*}

YANG Shaolan, LI Xing, XIAN Tao, LI Yafei, JIANG Li, HUA Shi[△]

Department of Laboratory Medicine and Sichuan Provincial Key Laboratory for Human Disease Gene Study, Sichuan Provincial People's Hospital, School of Medicine, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610072, China

Abstract: **Objective** To evaluate the performance and clinical application value of EasyNAT nucleic acid test kits for influenza A virus (Flu A), influenza B virus (Flu B), and Mycoplasma pneumoniae (MP) based on cross-primed amplification (CPA) technology. **Methods** In compliance with relevant standards, the detection limits, cross-reactivity, and anti-interference abilities of the EasyNAT Flu and MP nucleic acid test kits were validated using influenza (Flu) and MP reference materials. Additionally, a total of 811 suspected Flu or MP infection patients who visited the hospital from January 1 to July 5, 2024 were enrolled in this study. Their oropharyngeal swabs were collected and tested using reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) as the gold standard to evaluate the concordance and compliance of the EasyNAT Flu and MP nucleic acid test kits, thus assessing their clinical application value. **Results** The EasyNAT Flu and MP nucleic acid test kits yielded positive results in 8 repeated tests at the detection limit concentrations of the reference materials. No pathogen-specific peaks were detected in Flu and MP negative samples that had been spiked with common cross-reacting pathogens. Furthermore, the detection results of Flu or MP positive samples were unaffected by the presence of interfering substances. Among the 811 clinical samples, the sensitivity

^{*} 基金项目:四川省人民医院横向科研项目(2024HX007)。

作者简介:杨邵岚,女,硕士研究生在读,主要从事临床检验诊断学研究。 [△] 通信作者, E-mail:huashi_525@126.com。

of the EasyNAT Flu A test was 97.33%, and the sensitivity for Flu B was 98.47%, both with a specificity of 98.04%. The EasyNAT MP nucleic acid test showed a sensitivity of 97.95% and specificity of 99.03%. The results demonstrated a high degree of agreement with RT-qPCR ($Kappa$ values were over 0.900). Furthermore, detection rates of the EasyNAT Flu test kits showed no difference in positive samples with different Ct values (Flu A: $\chi^2=4.20, P=0.08$; Flu B: $\chi^2=2.22, P=0.31$) and MP test kits showed significant differences in positive samples with different cycle threshold values ($\chi^2=11.84, P<0.01$). **Conclusion** The EasyNAT Flu and MP nucleic acid test kits exhibit excellent detection performance with high sensitivity and specificity. Moreover, the products are easy to operate, offer rapid detection, and provide accurate results. These features make them suitable for primary healthcare settings, with significant potential for clinical application.

Key words: cross-primed amplification; influenza virus; *Mycoplasma pneumoniae*; reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

流感病毒(Flu)和肺炎支原体(MP)是急性呼吸道感染中常见的病原体,主要通过飞沫传播^[1]。在新型冠状病毒感染后,Flu 和 MP 感染率均呈上升趋势^[2-3]。Flu 和 MP 可感染任何年龄段的人群,是主要表现为轻微呼吸道症状的自限性疾病,有时以呼吸道以外的不典型表现为主要症状^[4-5]。由于 Flu 及 MP 感染时临床表现缺乏特异性,常常难以与其他呼吸道感染性疾病区分,特别是在幼儿、老年人及有严重基础疾病的患者中,这可能导致诊治延误,从而加重疾病甚至造成死亡^[6-8]。因此,早期诊断对于 Flu 和 MP 感染的防治至关重要。

目前,抗原抗体胶体金法和逆转录实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)被广泛应用于 Flu 和 MP 感染的诊断,其中,以 RT-qPCR 为主的核酸扩增技术(NAATs)因其高灵敏度和特异度,已逐渐成为呼吸道病原体 Flu 和 MP 检测的“金标准”^[9]。然而,传统 RT-qPCR 技术存在操作复杂、对实验室条件要求高及扩增时间较长等缺点。因此,迫切需要寻找一种简单、快速、准确且灵敏的检测方法。

交叉引物恒温扩增(CPA)技术通过设计 4 或 5 条特异性引物,同时对目标基因的 4~5 个区域进行扩增,利用具有链置换特性的 Bst DNA 聚合酶和甜菜碱,在约 63 ℃ 的恒温条件下高效、快速且特异性地扩增靶序列^[10]。作为一种新型的核酸恒温扩增技术,CPA 相较于传统 RT-qPCR 技术具有操作简便、准确率高、成本低、检测时间短等优势。研究者利用 CPA 技术成功建立了快速检测结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌的分子检测系统,显示出良好的应用前景^[11]。此外,针对运动巴贝斯虫,研究者开发了基于 CPA 的引物组和试剂盒,提供了有效的检测手段^[12]。尽管 CPA 技术在 Flu 和 MP 检测中的应用尚未得到充分研究,但其在快速病原体检测中的潜力为临床诊断提供了新的方向。因此,本研究旨在对一种基于 CPA 技术的 Flu 和 MP 核酸检测试剂——EasyNAT Flu 和 EasyNAT MP 核酸检测试剂进行性能验证(参照《2019 分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-

GL039》^[13]),评估其在临床诊断中的适用性,并进一步探讨其在实际临床场景中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2024 年 1 月 1 日至 2024 年 7 月 5 日于本院就诊的疑似 Flu 或 MP 感染患者 811 例,按照规定采集咽部拭子后立即保存于细胞液中。所有受试者或其监护人均已签署知情同意书,本研究通过本院医学伦理委员会批准[伦理(研)2024 年第 32 号]。

1.2 仪器与试剂 参考品甲型流感病毒(Flu A)、乙型流感病毒(Flu B)(20 000 copies/mL)、MP(浓度 500 000 copies/mL)购自广州邦德盛生物科技有限公司(批号:202311011/202308011、202310011),Flu A/B、MP 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法,批号:20231218、20231206,有效期:20241217、20241205),EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂盒(CPA-实时荧光恒温扩增法,批号:231223、240102,有效期:20241123、20250102)。AutoMolec3000 购自郑州安图生物工程股份有限公司,UC0108 核酸扩增检测分析仪购自优思达生物技术有限公司。交叉反应病原体(四川省人民医院临床医学检验中心,微生物实验室及分子生物学实验室)浓度如下,解脲支原体(UU) 1.50×10^8 CFU/mL,金黄色葡萄球菌(SA) 1.50×10^8 CFU/mL,表皮葡萄球菌(SE) 1.50×10^8 CFU/mL,肺炎链球菌(SP) 1.50×10^8 CFU/mL,大肠埃希菌(E. coli) 1.50×10^8 CFU/mL,肺炎克雷伯菌(KP) 1.50×10^8 CFU/mL,MP 2.50×10^6 copies/mL,Flu A 5.46×10^6 copies/mL,Flu B 4.32×10^6 copies/mL,腺病毒(ADV) 7.50×10^7 copies/mL,呼吸道合胞病毒(RSV) 6.24×10^6 copies/mL。干扰物质购自杭州优思达生物技术股份有限公司,干扰物质成分及浓度如下,薄荷脑(DL-M) 1.70 mg/mL,盐酸组胺(HD) 15.00% (v/v),莫匹罗星(M) 10 mg/mL,妥布霉素(T) 4 μ g/mL,硫磺鼻用凝胶(Sng) 15.00% (v/v),布地奈德(B) 0.2 mg/mL,0.05% 盐酸羟甲唑啉溶液(OH) 15.00% (v/v),异丙托溴铵(IB) 0.2

mg/mL,奥司他韦(O)456 μg/L,EDTA 抗凝全血(EAWB)。

1.3 方法 (1) RT-qPCR 检测:按照 Auto-Molec3000 仪器操作说明书及 Flu A/B、MP 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书进行核酸提取,并进行 RT-qPCR 测定。(2) EasyNAT 检测:根据 UC0108 核酸扩增检测分析仪及 EasyNAT Flu、MP 核酸检测试剂盒(CPA-实时荧光恒温扩增法)说明书进行自动检测和结果判读。内标系统采用人内源 mRNA 系统,用以监控采样、提取、纯化和扩增反应的有效性。

1.4 性能验证方法

1.4.1 检出限 待验证试剂盒说明书中声明的 Flu A/B 和 MP 的检出限分别为 500 copies/mL 和 1 000 copies/mL,使用 Flu A/B 和 MP 参考品加入保存液稀释至目标浓度,每份标本重复测定 8 次,100%检出靶核酸,则检出限验证合格。

1.4.2 交叉反应 验证是否存在靶核酸以外病原体的交叉反应,使用 1.2 中 11 种临床常见的其他病原体,按照 500 μL 靶病原体阴性标本+250 μL 病原体 1+250 μL 病原体 2 的体系配制待检标本进行检测,要求检测结果都为阴性。

1.4.3 抗干扰能力 验证可能存在的全血及呼吸道感染治疗药物对靶病原体检测的干扰,使用 1.2 中 10 种干扰物质,按照 500 μL 标本+250 μL 干扰物 1+250 μL 干扰物 2 的体系,将上述干扰物加入 Flu A/B 或 MP 弱阳性临床标本中进行检测,要求各干扰物质不得对检测结果产生影响,以验证抗干扰能力。

1.5 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计学软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,配对资料则采用配对 χ^2 检验(McNemar 检验), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。通过 Kappa 值评估两种方法检测结果的一致性:Kappa ≥ 0.75 表示一致性好,0.04 $\leq$ Kappa <0.75 表示一致性一般,Kappa <0.04 表示一致性差。

2 结果

2.1 EasyNAT Flu、MP 核酸检测试剂性能验证

2.1.1 检出限 Flu A/B、MP 参考品稀释后浓度分别为 500 copies/mL 和 1 000 copies/mL,进行 8 次重复试验。Flu A/B(F1~F8)和 MP(M1~M8)检测结果分别显示出 2 个特征峰和 1 个特征峰,阳性率均为 100%。结果表明,该试剂能够达到厂家声明的检出限。见表 1。

2.1.2 交叉反应 在已知靶病原体阴性的 10 个临床标本(N1~N10)中分别加入 11 种临床常见交叉反应病原体,结果仅显示内标峰,无病原体特征峰,与参考结果一致,表明该试剂与其他常见病原体无交叉反应。见表 2。

2.1.3 抗干扰能力 在 FluA/B 或 MP 的阳性临床标本(P1~P15)中,加入 10 种干扰物质,检测结果均为阳性,阳性符合率达到 100%,因此,该试剂的抗干扰能力符合要求。见表 3。

2.2 EasyNAT Flu、MP 核酸检测试剂临床应用

表 1 检出限验证结果		
标本编号	浓度(copies/mL)	检测结果
F1	500	Flu A(+)Flu B(+)
F2	500	Flu A(+)Flu B(+)
F3	500	Flu A(+)Flu B(+)
F4	500	Flu A(+)Flu B(+)
F5	500	Flu A(+)Flu B(+)
F6	500	Flu A(+)Flu B(+)
F7	500	Flu A(+)Flu B(+)
F8	500	Flu A(+)Flu B(+)
M1	1 000	MP(+)
M2	1 000	MP(+)
M3	1 000	MP(+)
M4	1 000	MP(+)
M5	1 000	MP(+)
M6	1 000	MP(+)
M7	1 000	MP(+)
M8	1 000	MP(+)

注:F1~F8 为 Flu 最低检出限参考品;M1~M8 为 MP 最低检出限参考品;+为阳性,-为阴性。

表 2 交叉反应检测结果				
标本编号	靶病原体	已知结果	病原体	检测结果
N1	Flu	—	UU+SA	—
N2	Flu	—	SE+SP	—
N3	Flu	—	E. coli+KP	—
N4	Flu	—	ADV+RSV	—
N5	Flu	—	MP	—
N6	MP	—	UU+SA	—
N7	MP	—	SE+SP	—
N8	MP	—	E. coli+KP	—
N9	MP	—	ADV+RSV	—
N10	MP	—	Flu A+Flu B	—

注:—为阴性。

2.2.1 符合率及一致性分析 所有标本均同步进行 RT-qPCR 和 EasyNAT Flu、MP 核酸检测。RT-qPCR 检测结果显示,Flu A 阳性 75 例,Flu B 阳性 131 例,Flu 阴性 204 例;MP 阳性 195 例,阴性 206 例。EasyNAT 检测结果显示,Flu A 阳性 75 例,Flu B 阳性 131 例,Flu 阴性 204 例;MP 阳性 193 例,阴性 208 例。以 RT-qPCR 检测结果作为“金标准”,EasyNAT 检测 Flu A 的灵敏度、特异度、阳性预测值

和阴性预测值分别为 97.33%、98.04%、97.33% 和 98.04%，与 RT-qPCR 检测结果总符合率为 97.74%；检测 Flu B 的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 98.47%、98.04%、98.47% 和 98.04%，总符合率为 98.28%；检测 MP 的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为 97.95%、99.03%、98.96% 和 98.08%，总符合率为 98.50%。两种检测方法的检出率差异无统计学意义 ($P>0.05$)； $Kappa$ 值均大于 0.900，提示一致性良好。见表 4。

2.2.2 EasyNAT Flu、MP 核酸检测试剂灵敏度分析 使用 RT-qPCR 检测到的 Flu A 阳性 75 例，Flu B 阳性 131 例，MP 阳性 193 例。根据核酸检测试剂

说明书，将 RT-qPCR 阳性标本按循环阈值(Ct 值)分为 3 组：Ct 值 ≤ 25 、 $25<Ct$ 值 ≤ 30 、 $30<Ct$ 值 <36 。结果显示，各组对应的 EasyNAT Flu 核酸检测试剂检出率比较差异无统计学意义 (Flu A： $\chi^2=4.20$ ， $P=0.08$ ；Flu B： $\chi^2=2.22$ ， $P=0.31$)，各组对应的 EasyNAT MP 核酸检测试剂检出率比较，差异有统计学意义 ($\chi^2=11.84$ ， $P<0.01$)。当 Ct 值 ≤ 25 时，EasyNAT Flu、MP 核酸检测试剂的灵敏度均为 100.00%。随着 Ct 值的上升，在 $25<Ct$ 值 ≤ 30 和 $30<Ct$ 值 <36 时，EasyNAT FluA 的灵敏度分别为 95.55% 和 85.71%，EasyNAT Flu B 的灵敏度分别为 97.78% 和 96.42%；在 $30<Ct$ 值 <36 时，MP 的灵敏度为 92.00%。见表 5~7。

表 3 抗干扰检测结果

标本编号	靶病原体	已知结果	干扰物质	检测结果
P1	Flu	Flu A(+)	DL-M+HD	Flu A(+)
P2	Flu	Flu A(+)	M+T	Flu A(+)
P3	Flu	Flu A(+)	Sng+B	Flu A(+)
P4	Flu	Flu A(+)	OH+IB	Flu A(+)
P5	Flu	Flu A(+)	O+EAWB	Flu A(+)
P6	Flu	Flu B(+)	DL-M+HD	Flu B(+)
P7	Flu	Flu B(+)	M+T	Flu B(+)
P8	Flu	Flu B(+)	Sng+B	Flu B(+)
P9	Flu	Flu B(+)	OH+IB	Flu B(+)
P10	Flu	Flu B(+)	O+EAWB	Flu B(+)
P11	MP	MP(+)	DL-M+HD	MP(+)
P12	MP	MP(+)	M+T	MP(+)
P13	MP	MP(+)	Sng+B	MP(+)
P14	MP	MP(+)	OH+IB	MP(+)
P15	MP	MP(+)	O+EAWB	MP(+)

注：P1~P5 为 Flu A 阳性标本；P6~P10 为 Flu B 阳性标本；P11~P15 为 MP 阳性标本；+ 为阳性，- 为阴性。

表 4 RT-qPCR 与 EasyNAT 检测结果的一致性分析(n)

EasyNAT		RT-qPCR			P	$Kappa$
		+	-	合计		
Flu A	+	73	2	75	>0.05	0.954
	-	2	100	102		
Flu B	+	129	2	131	>0.05	0.965
	-	2	100	102		
MP	+	191	2	193	>0.05	0.970
	-	4	204	208		

注：+ 为阳性，- 为阴性。

表 5 EasyNAT Flu A 试剂检测各组 Ct 值范围的 Flu A 标本符合率比较(n)

EasyNAT	RT-qPCR(+)			合计	χ^2	P
	Ct 值 ≤ 25	$25<Ct$ 值 ≤ 30	$30<Ct$ 值 <36			
+	39	28	6	73	4.20	0.08
-	0	1	1	2		
合计	39	29	7	75		

注：+为阳性；-为阴性。

表 6 EasyNAT Flu B 试剂检测各组 Ct 值范围的 Flu B 标本符合率比较 (n)

EasyNAT	RT-qPCR(+)			合计	χ^2	P
	Ct 值≤25	25<Ct 值≤30	30<Ct 值<36			
+	58	44	27	129	2.22	0.31
-	0	1	1	2		
合计	58	45	28	131		

注：+为阳性；-为阴性。

表 7 EasyNAT MP 试剂检测各组 Ct 值范围的 MP 标本符合率比较 (n)

EasyNAT	RT-qPCR(+)			合计	χ^2	P
	Ct 值≤25	25<Ct 值≤30	30<Ct 值<36			
+	76	69	46	191	11.84	<0.01
-	0	0	4	4		
合计	76	69	50	195		

注：+为阳性；-为阴性。

2.3 检测结果不一致标本情况 本研究中 EasyN-AT Flu 和 MP 核酸检测试剂结果和 RT-qPCR 结果不一致标本共 14 例,其中假阴性 6 例,假阳性 8 例。假阴性标本中,2 例 RT-qPCR Ct 值<30,而其余假阴性标本 Ct 值均>30。进一步将 6 例不一致标本的剩余标本进行靶向高通量测序(tNGS)检测,其中 2 例 tNGS 结果与 RT-qPCR 结果不一致,其余 4 例结果一致。

3 讨 论

本研究根据《2019 分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS-GL039》^[13]对 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂进行临床性能评价,包括检出限、交叉反应和抗干扰能力等方法学性能验证,该试剂性能均达到相应要求,能够满足临床需求。

EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂使用的 CPA 技术具有检测速度快(1 h 内完成指数扩增),操作简单,无需额外设备等优点。与传统的 PCR 不同,CPA 技术无需依赖热循环仪,使其在基层医疗机构和床旁检测中具有独特优势。此外,CPA 采用独特的引物设计,通过在靶序列两端引入多对交叉引物识别位点,形成分枝状的扩增结构,有效避免了非靶标序列的非特异性扩增,具有较强的抗干扰能力,因此基于 CPA 技术的 EasyNAT Flu 和 MP 核酸检测试剂具有良好的检测性能^[12,14]。

与传统 RT-qPCR 核酸检测试剂相比,EasyNAT Flu A、Flu B 和 MP 核酸检测试剂的总符合率分别为 97.74%、98.28%和 98.50%,Kappa 值均大于 0.900,一致性良好。DENG 等^[15]对 EasyNAT Flu 试剂和 RT-qPCR 的检测结果进行比较,结果显示高度一致性(Kappa 值为 0.963,P<0.001);CHEN 等^[16]的研究结果与本研究一致,显示 EasyNAT MP 核酸检测试剂结果与 RT-qPCR 检测结果的总符合率为

98.77%,一致性良好。DENG 等^[15]的研究结果显示,两种方法检测不一致的标本均具有较高的 Ct 值(均超过 30)。本研究中检测不一致标本共 14 例,在 6 例假阴性标本中,2 例 RT-qPCR Ct 值<30,考虑患者服用青霉素/头孢类抗菌药物可能对检测结果产生干扰,而其余假阴性标本 Ct 值均>30,提示标本中存在极低水平的目标病原体,这可能是因为 EasyNAT (CPA 技术)和 RT-qPCR 在灵敏度上存在差异。RT-qPCR 作为“金标准”,通常具有较高的灵敏度,能够检测到较低水平的病毒^[17]。然而,EasyNAT (CPA 技术)核酸检测试剂可能在检测低病毒载量标本时的灵敏度较低,但其符合率基本能够满足临床需求。

据报道,Flu 的 RNA 载量在患者症状出现后随时间呈非线性下降^[18],MP 的 DNA 载量与病情的严重程度呈正相关^[19]。在 RT-qPCR 检测中,Ct 值作为病毒载量的指标,其值越低表示病毒水平越高。有不少研究表明,新型冠状病毒(SARS-CoV-2)高病毒载量与 SARS-CoV-2 感染的严重症状和高病死率相关^[20-23]。因此,不一致结果的 Ct 值可能反映出检测目标载量接近检出限,从而导致低水平病原体的假阴性结果。同时,本研究进行 tNGS 检测的 6 例结果不一致的标本中,2 例 tNGS 结果与 RT-qPCR 结果不一致,其余 4 例结果一致。tNGS(检出限 100 copies/mL)灵敏度介于 RT-qPCR 与 EasyNAT 之间,tNGS 结果亦证实低水平病原体导致 EasyNAT 检测出现假阴性。此外,8 例 EasyNAT 假阳性标本可能是由于 RT-qPCR 检测时的交叉污染或在进行 EasyNAT 检测时加样过程中的污染所致;同时,EasyNAT 所采用的 CPA 技术反应体系及引物的设计较为复杂,某些标本中可能存在一些能够与荧光染料或引物非特异性结合的物质,从而引起检测结果假阳性。

EasyNAT 核酸检测极大地缩短了检测时间,提

高了检测效率,且降低了对实验室条件的要求,减少了交叉污染风险,具有较高的灵敏度、特异度,同时也具备简便性和独立性等特点。BRACHMANN 等^[24]研究表明,快速核酸检测可有效缩短急诊患者的等待时间,减少不必要的后续检测和治疗,减少急诊患者流量从而降低医院内感染传播风险。此外,EasyNAT 核酸检测仪小巧便携,适用于基层及病房,可有效提高患者核酸检测效率,减少标本运输时间成本,满足当前分子即时检测要求。

综上所述,EasyNAT 核酸检测平台作为一种具有良好检测性能的检测系统,可以快速准确地检测出 Flu 及 MP,极大地提高了实验室诊断效率,在 Flu 及 MP 的快速检测和诊断方面具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] LI Z J, ZHANG H Y, REN L L, et al. Etiological and epidemiological features of acute respiratory infections in China[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5026.
- [2] 陈镇虎. 后新冠时代流感传播趋势的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2024.
- [3] 徐梦华, 柳鹏程, 卢丽娟. COVID-19 流行期间上海单中心儿童肺炎支原体和沙眼衣原体感染流行病学研究[J]. 中国循证儿科杂志, 2022, 17(4): 290-295.
- [4] WALKER T A, WAITE B, THOMPSON M G, et al. Risk of severe influenza among adults with chronic medical conditions[J]. J Infect Dis, 2020, 221(2): 183-190.
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 儿童肺炎支原体肺炎诊疗指南(2023 年版)[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2023, 50(2): 79-85.
- [6] IULIANO A D, ROGUSKI K M, CHANG H H, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study[J]. Lancet, 2018, 391(10127): 1285-1300.
- [7] KUTTY P K, JAIN S, TAYLOR T H, et al. Mycoplasma pneumoniae among children hospitalized with community-acquired pneumonia[J]. Clin Infect Dis, 2019, 68(1): 5-12.
- [8] MEYER SAUTEUR P M, BEETON M L. Mycoplasma pneumoniae: delayed re-emergence after COVID-19 pandemic restrictions[J]. Lancet Microbe, 2024, 5(2): e100-e101.
- [9] 杨琛. 呼吸道病原体的核酸快速检测研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2021.
- [10] 姜苏, 李一荣. 等温扩增技术的原理及应用[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(5): 591-596.
- [11] 吴康, 屈蓉, 王刚, 等. 基于常规引物靶向结核分枝杆菌 II 型分枝杆菌散在重复单位的恒温扩增[J]. 复旦学报医学版, 2020, 47(6): 799-808.
- [12] WANG J, GAO S, ZHANG S, et al. Rapid detection of Babesia motasi responsible for human babesiosis by

cross-priming amplification combined with a vertical flow [J]. Parasit Vectors, 2020, 13(1): 377.

- [13] 中国合格评定国家认可委员会. 2019 分子诊断检验程序性能验证指南: CNAS-GL039[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2019.
- [14] 马艳平, 覃宝田, 梁曦, 等. 花鲈虹彩病毒交叉引物恒温扩增检测方法的建立[J]. 广东农业科学, 2024, 51(3): 148-156.
- [15] DENG J, ZHU H, AN S, et al. Accurate detection of influenza A virus by use of a novel cross-priming isothermal amplification-based point-of-care assay[J]. Microbiol Spectr, 2024, 12(3): e0307423.
- [16] CHEN G, YU J, CHEN H, et al. EasyNAT MP assay: a simple, rapid, and low-cost method to detect Mycoplasma pneumoniae using cross-priming amplification technology [J]. Mol Diagn Ther, 2022, 26(3): 345-352.
- [17] COWLEY J A, RAO M, MOHR P, et al. TaqMan real-time and conventional nested PCR tests specific to yellow head virus genotype 7 (YHV7) identified in giant tiger shrimp in Australia [J]. Virol Methods, 2019, 273: 113689.
- [18] LEE N, CHAN P K, HUI D S, et al. Viral loads and duration of viral shedding in adult patients hospitalized with influenza[J]. J Infect Dis, 2009, 200(4): 492-500.
- [19] WANG W, WANG L, YIN Z, et al. Correlation of DNA load, genotyping, and clinical phenotype of Mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. Front Pediatr, 2024, 12: 1369431.
- [20] ZHENG S, FAN J, YU F, et al. Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study[J]. Bmj, 2020, 369: m1443.
- [21] LIU Y, YAN L M, WAN L, et al. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19 [J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(6): 656-657.
- [22] MAGLEBY R, WESTBLADE L F, TRZEBUCKI A, et al. Impact of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load on risk of intubation and mortality among hospitalized patients with coronavirus disease 2019 [J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(11): e4197-e4205.
- [23] WESTBLADE L F, BRAR G, PINHEIRO L C, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts mortality in patients with and without cancer who are hospitalized with COVID-19 [J]. Cancer Cell, 2020, 38(5): 661-671.
- [24] BRACHMANN M, KIKULL K, KILL C, et al. Economic and operational impact of an improved pathway using rapid molecular diagnostic testing for patients with influenza-like illness in a German emergency department [J]. J Clin Monit Comput, 2019, 33(6): 1129-1138.