

· 监管技术 ·

白喉棒杆菌核酸检测试剂用国家参考品的研制

赵丹, 陈琼, 李亚南, 徐潇, 刘茹凤, 徐颖华, 王春娥, 叶强* (中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

摘要 目的: 研制白喉棒杆菌核酸检测试剂用国家参考品。方法: 将6株白喉棒杆菌和10株非白喉棒杆菌代表性菌株在各自适宜的环境下培养, 经菌株鉴定后, 制备灭活菌液, 对候选参考品进行均匀性和稳定性的评估以及准确性、特异性、重复性和最低检出限的验证研究, 并组织3家实验室进行协作标定。结果: 研制出白喉棒杆菌核酸检测试剂用候选参考品, 由6个阳性参考品、10个阴性参考品、最低检出限参考品和重复性参考品组成。证实该候选参考品均匀性及稳定性良好, 准确性、特异性及重复性好, 最低检出限可达 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 个菌 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。协作标定结果也进一步表明阳性、阴性、重复性和最低检出限候选参考品均符合国家参考品的各项要求。结论: 研制出的白喉棒杆菌核酸检测试剂参考品, 可用于相关试剂盒的质量控制和评价。

关键词: 白喉棒杆菌; 核酸检测试剂; 国家参考品; 均匀性; 稳定性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)12-1438-007

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.12.014

Development of National Reference for *Corynebacterium Diphtheriae* Nucleic Acid Test Kit

Zhao Dan, Chen Qiong, Li Yanan, Xu Xiao, Liu Rufeng, Xu Yinghua, Wang Chun'e, Ye Qiang* (National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To develop national reference for *Corynebacterium diphtheriae* Nucleic Acid Test Kit. **Methods:** Six strains of *C. diphtheriae* and 10 strains of non-*C. diphtheriae* were cultured in the suitable environment. After identification, the inactivated bacterial solution was prepared. The reference samples were evaluated for uniformity and stability. The accuracy, specificity, repeatability and minimum detection limit of the reference were verified. Three laboratories were organized to carry out collaborative calibration. **Results:** A national reference for *Corynebacterium diphtheriae* Nucleic Acid Test Kit was developed, which included 6 positive references, 10 negative references, minimum detection limit references and repetitive references. The national reference showed good uniformity and stability. The minimum detection limit is $1.0 \times 10^3 - 1.0 \times 10^4$ bacteria $\cdot \text{mL}^{-1}$. The results of collaborative calibration also showed that the candidate reference materials of positive, negative, repeatability and minimum detection limit met the requirements of national reference materials.

基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治科技重大专项”(编号 2018ZX10102-001、2018ZX10734404); 国家科技基础条件平台——国家菌种资源库(国家菌种资源库-NMRC-2021-2)

作者简介: 赵丹 Tel: (010) 53852153; E-mail: zhaodan0709@nifdc.org.cn

通信作者: 叶强 Tel: (010) 53852686; E-mail: qiangyee@nifdc.org.cn

Conclusion: A national reference was successfully developed, which can be used for the quality evaluation of *Corynebacterium diphtheriae* nucleic acid detection reagent.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*; Nucleic Acid Test Kit; national reference materials; uniformity; stability

白喉 (*Diphtheriae*) 是一种由白喉杆菌引起的急性呼吸道传染病, 其临床表现为咽喉部灰白色假膜和全身毒血症状^[1-2]。人类是白喉棒状杆菌的唯一宿主, 携带毒力菌株的患者是唯一的传染源, 主要通过密切的身体接触和呼吸飞沫传播发生人际传播^[3-5]。对该菌进行准确、快速鉴定可以有效提高其临床救治的针对性和有效性。近年来, 聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术广泛应用于基因检测、环境科学以及医学等领域^[6], 其不仅有着较强的针对性, 而且灵敏度也相对较高^[7]。利用PCR技术可以更快速地发现突发的感染^[8], 很多企业也研发了相关的试剂盒产品, 其中以荧光定量PCR方法为主^[9-10]。但目前尚无相关的国家参考品对该类试剂进行质量控制和评价, 因此, 为了加强白喉棒杆菌核酸检测试剂的质量控制, 本研究选取6株白喉棒杆菌菌株和10株非白喉棒杆菌菌株研制了白喉棒杆菌核酸检测试剂用国家参考品, 旨在为PCR法测定白喉棒杆菌检测试剂的质量评价提供参考。

1 材料与仪器

1.1 菌种

菌种均来源于中国食品药品检定研究院 (简称中检院) 中国医学细菌保藏管理中心 (National Center for Medical Culture Collections, CMCC)。阳性参考菌株: 6株白喉棒杆菌[CMCC (B) 38102、CMCC (B) 38103、CMCC (B) 38105、CMCC (B) 38106、CMCC (B) 38108、CMCC (B) 38109]; 阴性参考菌株: 10株非白喉棒杆菌[肺炎链球菌CMCC (B) 31001、脑膜炎奈瑟菌CMCC (B) 29052、流感嗜血杆菌CMCC (B) 58561、

肺炎克雷伯菌CMCC (B) 46117、卡他布朗汉姆氏菌CMCC (B) 29118、嗜肺军团菌CMCC (B) 60001、百日咳博得特菌CMCC (B) 58039、金黄色葡萄球菌CMCC (B) 26001、A群链球菌CMCC (B) 32067、鲍氏不动杆菌CMCC (B) 25019]。

1.2 主要试剂及仪器

哥伦比亚血琼脂培养基 (BD公司); 无菌脱纤维羊血 (北京陆桥技术股份有限公司); 生理盐水 (石家庄四药有限公司); 中国细菌浊度标准国家标准品 (中国食品药品检定研究院); PCR引物由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司制备; 试剂盒01: 白喉杆菌核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 购自江苏硕世生物科技股份有限公司; 试剂盒02: 白喉杆菌核酸测定试剂盒 (荧光PCR法) 购自上海之江生物科技股份有限公司; 试剂盒03: 白喉杆菌核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 购自中山大学达安基因股份有限公司; 二氧化碳培养箱 (STIK IL61CT); 恒温水浴箱 (JulalaTW20); 全自动生化鉴定仪 (梅里埃VITEK); 实时荧光定量PCR仪 (ABI 7500); 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (micro Typer MS); 核酸序列测定由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

2 方法

2.1 候选参考菌株的培养及鉴定

2.1.1 候选参考菌株的培养

将阳性参考菌株接种于含5%羊血的哥伦比亚培养基上, 并于37℃、二氧化碳浓度为5%的条件下培养24小时; 将阴性参考菌株接种于适宜的培养基中, 在适宜环境下传代培养, 阴性参考菌株培养条件见表1。

表1 阴性参考菌株培养基列表

| 菌株名称 | 菌株编号 | 培养基 |
|--------|----------------|---------------|
| 肺炎链球菌 | CMCC (B) 31001 | 含5%羊血的哥伦比亚培养基 |
| 脑膜炎奈瑟菌 | CMCC (B) 29052 | GC培养基 |
| 流感嗜血杆菌 | CMCC (B) 58561 | 巧克力培养基 |

续表 1

| 菌株名称 | 菌株编号 | 培养基 |
|----------|----------------|--------------------------|
| 肺炎克雷伯菌 | CMCC (B) 46117 | 普通营养琼脂培养基 |
| 卡他布朗汉姆氏菌 | CMCC (B) 29118 | 含 5% 羊血的哥伦比亚培养基 |
| 嗜肺军团菌 | CMCC (B) 60001 | BCYE 培养基 |
| 百日咳博得特菌 | CMCC (B) 58039 | Boralet Gengou Agar Base |
| 金黄色葡萄球菌 | CMCC (B) 26001 | 普通营养琼脂培养基 |
| A 群链球菌 | CMCC (B) 32067 | THB 肉汤 |
| 鲍氏不动杆菌 | CMCC (B) 25019 | TSA 培养基 |

2.1.2 候选参考菌株的鉴定

将16株候选参考菌株在相应培养基上培养后,观察菌落形态,并选择单个菌落进行革兰氏染色,同时进行生化鉴定、16S rRNA鉴定及质谱鉴定。生化鉴定用接种环挑取适量新鲜培养物于鉴定用稀释液中,将菌悬液加入到细菌鉴定板上,按照梅里埃(Vitek)细菌鉴定仪标准操作程序(SOP)上机测定;16S rRNA鉴定经PCR扩增后,PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司双向测序,测序引物为通用引物27F和1492R。测序结果使用生物信息分析软件(BioNumerics 7.6版本)进行拼接,并于EZ BioCloud数据库进行比对;质谱鉴定选取平板上培养的第二代单菌落,直接涂到清洗后的靶板上,将靶板放入飞行质谱仪中进行检测。质谱鉴定所用数据库为仪器公司所配备,所采用质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922。菌株鉴定分值在2.00~3.00,结果为高置信度(标识为绿色);分值在1.70~2.00,结果为低置信度(标识为黄色);分值在1.70以下,鉴定不合格(标识为红色),应检查图谱质量、样本制备流程及仪器状态。

2.2 候选参考品的制备及验证

将16株候选参考菌株培养后用生理盐水混匀制成菌悬液,菌悬液灭活后稀释至 1.0×10^7 个菌 \cdot mL $^{-1}$ 【阴性候选参考菌株脑膜炎奈瑟菌CMCC(B)29052稀释至 1.0×10^6 个菌 \cdot mL $^{-1}$ 】,定量分装,0.5 mL/管,阳性候选参考品记为P1~P6,阴性候选参考品记为N1~N10。同时将白喉棒杆菌CMCC(B)38105菌悬液稀释至 1.0×10^7 个菌 \cdot mL $^{-1}$

作为重复性和最低检出限参考品,0.8 mL/管分装,均在-20℃以下保存。并用试剂盒1、2、3对候选参考品的准确性、特异性、重复性及最低检出限进行验证。试剂盒01 Ct值 ≤ 35 ,且曲线呈S型,则判为阳性,Ct值 > 38 或未检出,则判为阴性,35~38则结果存疑,需复检1次;试剂盒02 Ct值 ≤ 38 ,判为阳性,结果为UNDET或40,则判为阴性,若为38~40需复检1次,若仍为38~40,即判为阴性。试剂盒03 Ct值 ≤ 38 ,判为阳性,Ct值 > 38 或未检出,则判为阴性。

2.3 候选参考品的分装均匀性评估

随机抽取阳性参考品(P1~P6)、最低检出限参考品各10支,重复性参考品15支,使用白喉棒杆菌核酸检测试剂盒01进行检测,计算Ct值的重复性变异系数(CV值)。

2.4 候选参考品的稳定性评估

将阳性参考品(P1~P6)、最低检出限参考品分别于2~8℃冰箱、25℃培养箱、37℃培养箱中,放置3天、7天和14天,同时另外取一组参考品反复冻融3次和5次,均以-20℃超低温冰箱中保存的参考品作为对照,用白喉棒杆菌核酸检测试剂盒01进行检测,考察参考品加速稳定性及冻融稳定性。

2.5 候选参考品的协作标定

对候选参考品进行盲样编号,分发给包括中检院在内的3家实验室进行检测,2家生产企业使用各自生产的试剂盒(试剂盒02和试剂盒03)对编盲的参考品进行检测,中检院检测人员(未参与编盲人员)使用试剂盒01进行检测,所有检测数据返回

中检院组织者进行统一汇总分析。

2.6 统计学分析

采用SPSS 22.0 统计软件对检测结果进行统计学分析, 统计学方法为Kruskal-Wallis非参数检验, $P < 0.05$ 时表示差异显著。

3 结果

3.1 候选参考菌株的鉴定

16株候选参考菌株菌落形态、革兰氏染色及生化鉴定结果均符合相应菌株的特征。16S rRNA 基因测序结果与EZ BioCloud数据库中收录的数据进行比对, 相似度均在99%以上。基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱仪(MOLDI-TOF MS)鉴定均为相应菌株, 质谱鉴定分值在2.03~2.48之间。鉴定结果见表2。

表2 候选参考菌株 16S rRNA 鉴定及质谱鉴定结果

| 菌株编号 | 质谱鉴定分值 | 16S rRNA 基因鉴定结果 | |
|----------------|--------|-----------------|--------|
| | | 模式株 | 相似度 /% |
| CMCC (B) 38102 | 2.17 | NCTC 11397 | 99.83 |
| CMCC (B) 38103 | 2.13 | NCTC 11397 | 100 |
| CMCC (B) 38105 | 2.03 | NCTC 11397 | 100 |
| CMCC (B) 38106 | 2.14 | NCTC 11397 | 98.95 |
| CMCC (B) 38108 | 2.29 | NCTC 11397 | 99.02 |
| CMCC (B) 38109 | 2.06 | NCTC 11397 | 99.44 |
| CMCC (B) 31001 | 2.15 | ATCC 33400 | 100 |
| CMCC (B) 29052 | 2.36 | MC58 | 99.28 |
| CMCC (B) 58561 | 2.33 | ATCC 33391 | 99.5 |
| CMCC (B) 46117 | 2.48 | DSM30104 | 99.93 |
| CMCC (B) 29118 | 2.33 | DSM25388 | 100 |
| CMCC (B) 60001 | 2.18 | ATCC33152 | 100 |
| CMCC (B) 58039 | 2.32 | ATCC9797 | 99.71 |
| CMCC (B) 26001 | 2.34 | DSM20231 | 99.79 |
| CMCC (B) 32067 | 2.38 | JCM 5674 | 100 |
| CMCC (B) 25019 | 2.43 | ATCC19606 | 99.64 |

3.2 候选参考品的验证

采用“1.2”项中3种试剂盒对候选参考品的准确性、特异性、重复性及最低检出限进行验证, 验证结果表明, 阳性参考品符合率试剂盒01为6/6, 试剂盒02和试剂盒03为6/5; 阴性参考品符合率均为10/10; 重复性变异系数(CV)均 $< 5.0\%$; 试剂盒01和试剂盒02最低检出限为 1.0×10^4 个菌 $\cdot \text{mL}^{-1}$,

试剂盒03为 1.0×10^3 个菌 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 候选参考品的分装均匀性评估

试验结果显示, 阳性参考品(P1~P6)、最低检出限参考品、重复性参考品Ci值的CV均在5%以内, 说明候选参考品的分装均匀度良好。结果见表3。

表3 分装均匀性结果

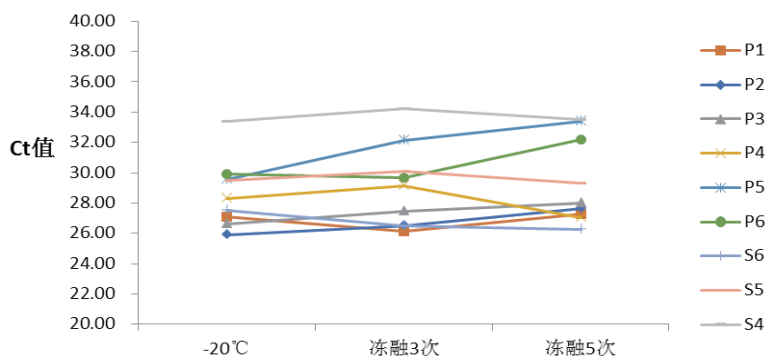
| 检验项目 | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | 最低检出限 | 重复性 | |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ct 值 | 27.06 | 27.01 | 25.51 | 28.16 | 33.85 | 29.61 | 25.72 | 25.96 | |
| | 26.86 | 27.08 | 25.89 | 28.34 | 32.13 | 29.42 | 25.92 | 25.96 | |
| | 25.81 | 27.06 | 25.42 | 27.95 | 30.47 | 29.56 | 26.07 | 25.69 | |
| | 26.89 | 27.22 | 26.19 | 28.52 | 30.24 | 30.03 | 24.81 | 25.91 | |
| | 26.66 | 25.75 | 26.54 | 28.56 | 30.69 | 29.26 | 26.45 | 25.63 | |
| | 26.75 | 26.89 | 27.1 | 28.45 | 30.35 | 28.9 | 26.28 | 26.11 | |
| | 27.03 | 27.04 | 26.25 | 28.11 | 30.7 | 29.01 | 25.24 | 26.07 | |
| | 26.08 | 26.67 | 26.67 | 27.86 | 30.62 | 30.24 | 26.42 | 26.22 | |
| | 26.31 | 28.12 | 26.36 | 27.96 | 30.74 | 29.36 | 25.73 | 25.62 | |
| | 26.82 | 27.69 | 26.1 | 28.51 | 30.63 | 28.59 | 25.56 | 26.27 | |
| | / | / | / | / | / | / | / | / | 25.79 |
| | / | / | / | / | / | / | / | / | 25.73 |
| | / | / | / | / | / | / | / | / | 25.80 |
| | / | / | / | / | / | / | / | / | 25.71 |
| / | / | / | / | / | / | / | / | 25.22 | |
| 均值 | 26.63 | 27.05 | 26.2 | 28.24 | 31.04 | 29.4 | 25.82 | 25.85 | |
| 标准差 (SD) | 0.42 | 0.62 | 0.51 | 0.27 | 1.12 | 0.5 | 0.53 | 0.27 | |
| CV/% | 1.58 | 2.29 | 1.96 | 0.94 | 3.59 | 1.7 | 2.03 | 1.04 | |

3.4 候选参考品的稳定性评估

3.4.1 冻融稳定性评估

参考品经反复冻融3次、5次处理后，与-20℃存放的参考品同步检测，检测结果经SPSS 22.0统

计学软件计算，结果无显著性差异（冻融3次 P 值为0.825，冻融5次 P 值为0.691，均大于0.05），表明本参考品冻融条件下稳定性良好，结果见图1。



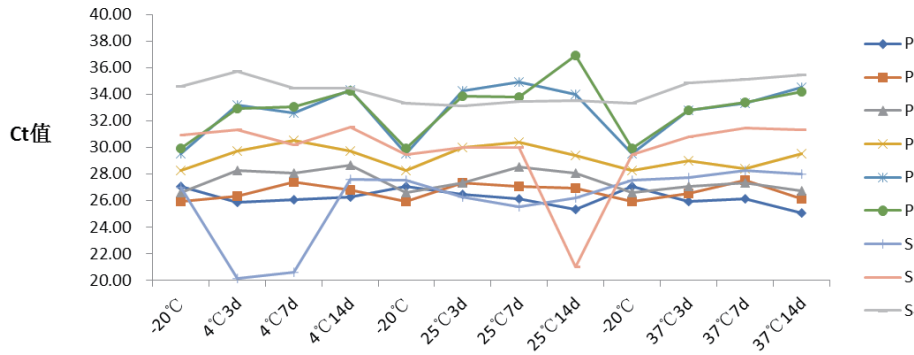
注：S6、S5、S4 分别表示最低检出限参考品浓度为 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 个菌 \cdot mL $^{-1}$ 。

图1 冻融稳定性评估结果

3.4.2 加速稳定性评估

将参考品分别在2~8℃冰箱、25℃培养箱、37℃培养箱中，放置时间为3天、7天和14天后，与-20℃存放的参考品同步检测，检测结果经SPSS 22.0统计学软件计算，结果均无显著

性差异（2~8℃放置后P值分别为0.757，0.566，0.402，25℃放置后P值分别为0.402，0.354，0.895，37℃放置后P值分别为0.627，0.354，0.508），表明本参考品具有较好的加速稳定性，见图2。



注：S6、S5、S4 分别表示最低检出限参考品浓度为 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 个菌 · mL⁻¹。

图2 加速稳定性评估结果

3.5 候选参考品的协作标定

3家实验室参加协作标定，其中中检院使用试剂盒01检测P5结果为阳性，另外2家检测结果均为阴性，3家实验室检测其他阳性候选参考品结果均

为阳性，所有实验室阴性候选参考品检测结果均为阴性。重复性参考品检测Ct值的CV值均在5.0%以内，最低检出限为 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 个菌 · mL⁻¹，结果见表4。

表4 协作标定结果

| 编号 | P1 ~ P6 | | N1 ~ N10 | | 重复性参考品 (CV/%) | | Co-18-1 | Co-18-2 | Co-18-3 | Co-18-4 |
|----|---------|-------|----------|---------|---------------|------|---------|---------|---------|---------|
| | +/+ | (6/6) | -/- | (10/10) | R1 | R2 | | | | |
| 1 | +/+ | (6/6) | -/- | (10/10) | 1.41 | 0.78 | + | + | + | - |
| 2 | +/+ | (6/5) | -/- | (10/10) | 0.92 | 1.11 | + | + | - | - |
| 3 | +/+ | (6/5) | -/- | (10/10) | 0.24 | 0.59 | + | + | - | - |

注：+ 表示检出；- 表示未检出；Co-18-1、Co-18-2、Co-18-3、Co-18-4 表示最低检出限参考品浓度为 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 个菌 · mL⁻¹。

4 讨论

目前PCR技术广泛应用于各个领域，可以快速、准确地进行定量检测^[11]。参考品在产品标准制定验证与实施方面发挥着重要的作用^[12]。核酸检测试剂国家参考品对于相关试剂盒的质量控制和评价至关重要，是相关产品注册检验、上市审批的重要物质基础^[13-14]。本研究从中国医学细菌保藏管理中心选择了6株白喉棒杆菌菌株和10株非白喉棒杆菌菌株作为备用菌株，所选菌株的原始来源均为

临床收集，制备了由6个阳性参考品、10个阴性参考品、重复性参考品和最低检出限参考品组成的白喉棒杆菌核酸检测试剂用候选国家参考品，并对参考菌株进行了菌落形态、革兰氏染色、生化鉴定、16S rRNA基因鉴定和质谱鉴定，鉴定结果均符合相应菌株的特性。

标准物质的主要特征是特性量值的均匀性、稳定性和准确性^[15]。本研究对候选参考品的分装均匀性进行了评估，结果显示各参考品的分装均匀

性CV值均小于5%，表明分装均匀性良好。同时对参考品的准确性进行了验证，验证结果中试剂盒01结果均符合参考品的研制要求，试剂盒02和试剂盒03对P5的检测结果为阴性，P5检测结果出现假阴性提示试剂盒的检测靶点设计可能不合理，有待与试剂盒研发企业进行进一步沟通确认，建议对试剂盒的靶点进行重新考量，避免出现临床检测时发生漏检。同时采用试剂盒01对参考品的冻融稳定性及不同温度下的加速稳定性进行了验证，并对验证结果进行统计学分析，分析结果无显著性差异，表明该候选参考品具有较好的冻融稳定性及加速稳定性，能够满足运输及试验过程中的冻融要求。

本研究研制的白喉棒杆菌核酸检测试剂盒国家参考品准确性、特异性、重复性，及最低检出限检测指标均符合要求，具有良好的分装均匀性及稳定性。本候选参考品可用于评价不同企业白喉棒杆菌核酸检测试剂的阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性和最低检出限等关键指标，可用于白喉棒杆菌核酸检测试剂盒的质量控制和评价。

参考文献：

- [1] Okamoto K, Hatakeyama S, Sugita C, et al. Nasal Diphtheria (Chronic Carriage) Caused by Nontoxigenic *Corynebacterium Diphtheriae*[J]. *Infect Chemother*, 2018, 24 (9): 759-762.
- [2] 郑恩惠, 谢芳钦, 黄梦颖, 等. 一例患者痰液白喉棒状杆菌伴纹带棒状杆菌分离培养与鉴定分析[J]. *海峡预防医学杂志*, 2021, 27 (6): 8-10.
- [3] 沈丹丹, 刘妍, 胡娟, 等. 一例无毒力白喉棒状杆菌携带者的临床特征和病原学诊断分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36 (4): 132-170.
- [4] Cyril G, Rathish B, Wilson A, et al. A Case of Diphtheria and Infectious Mononucleosis Co-Infection in a Partially Vaccinated Boy[J]. *Cureus*, 2020, 12 (10): 647-651.
- [5] Kannambath R, Sistla S, Jayakar S, et al. Isolation of *Corynebacterium Freneyi* from A Case of Exudative Pharyngitis, a Close Mimicker of *Corynebacterium Diphtheriae*[J]. *Access Microbiology*, 2021, 3 (7): 238-241.
- [6] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量PCR技术及其应用研究进展[J]. *现代农业科技*, 2020 (6): 1-3.
- [7] 黄钜源. PCR技术在食品工程中的应用分析[J]. *食品安全导刊*, 2021 (28): 146-147.
- [8] 徐潇, 石继春, 王春娥, 等. 鲍氏不动杆菌核酸检测试剂盒国家参考品的研制[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (3): 307-312.
- [9] Koo SB, Chi HG, Kim JD, et al. Multiple Compact Camera Fluorescence Detector for Real-Time PCR Devices [J]. *Sensors*, 2021, 21 (21): 561-563.
- [10] Liu Y, Wu H, Zhou Q, et al. Digital Quantification of Gene Methylation in Stool DNA by Emulsion-PCR Coupled with Hydrogel Immobilized Bead-array[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 92: 596-601.
- [11] 张礼堃, 邹秉杰, 宋沁馨, 等. PCR技术在新冠病毒核酸检测中的应用[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34 (5): 539-544.
- [12] 国家标准物质管理委员会. 标准物质的研制、管理与应用[M]. 北京: 中国计量出版社, 2010: 43.
- [13] 黄洋, 李康, 徐潇, 等. 流感嗜血杆菌核酸检测试剂盒国家参考品的建立[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2021, 13 (11): 1740-1743, 1747.
- [14] 刘东来, 周海卫, 石大伟, 等. 细菌感染多重核酸检测试剂参考品的建立[J]. *传染病信息*, 2018, 31 (3): 209-214.
- [15] 丁兆婷. 六种糖标准物质的检测[D]. 北京: 北京化工大学, 2010.

(收稿日期 2022年2月17日 编辑 李亚微)