

血液病毒核酸检测仪器使用前的性能确认

田耘博¹ 李维¹ 秦伟斐¹ 黄霞¹ 段恒英¹ 廖红文¹

[摘要] 目的:确认血液病毒核酸检测(NAT)仪器在使用前,其性能可以满足实际检测工作要求。方法:为确认设备的检测灵敏度、特异性、重复性、可靠性和防止污染等性能,设计4个试验组:联检试验组和鉴别试验组,将生理盐水标本和 NAT 质控品(HBV DNA、HIV-1 RNA、HCV RNA)交叉放置于标本架上,进行 NAT 联检和鉴别检测;仪器比对照组用同一批献血者标本在同类型的2台仪器上进行检测;污染评估试验组用生理盐水作为阴性标本进行 NAT 联检。结果:所有 NAT 检测结果均与预期一致。结论:血液病毒核酸检测设的各项性能满足实际检测工作要求。

[关键词] 核酸检测;仪器;性能确认

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.009

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

A performance qualification method of blood virus nucleic acid testing instrument before using

TIAN Yunbo LI Wei QIN Weifei HUANG Xia DUAN Hengying LIAO Hongwen
(Chongqing Blood Center, Chongqing, 400015, China)

Corresponding author: TIAN Yunbo, E-mail: microtian@126.com

Abstract Objective: To confirm whether the performance of blood virus nucleic acid testing (NAT) instrument before use can satisfy the test requirement. **Method:** For verify the detection sensitivity, specificity, repeatability, reliability, and prevent pollution of blood virus nucleic acid testing instrument, four experimental groups was designed. Multiplex and discriminatory assays groups: specimens of physiological saline and NAT quality control material (HBV DNA, HIV-1 RNA, HCV RNA) cross placed on shelves, perform multiplex and discriminatory assays. Instrument contrast group using the same specimens on the same type instrument for testing, and prevent pollution group: physiological saline as negative samples for multiplex assays testing. **Result:** All NAT test results were in line with expectations. **Conclusion:** Various performance of blood virus nucleic acid testing instrument could satisfy the requirement of actual test work.

Key words nucleic acid testing ; instrument; performance qualification

目前我国正大力加强血站血液安全保障能力建设,国家卫生事业发展“十二五”规划提出积极推进血站核酸检测(Nucleic Acid Testing, NAT)工作,到2015年血液筛查核酸检测将基本覆盖全国。卫生计生委在全面推进血站核酸检测工作实施方案(2013—2015年)中要求建立核酸检测实验室质量体系,确保检测质量和安全。按《血站质量管理规范》、《血站实验室质量管理规范》、《血站技术操作规程(2012版)》的要求,包括核酸检测仪器这样的大型关键性设备,需按照严格质量管理体系要求,在投入正式使用前需进行设备确认。新设备的确认应包括安装确认(Installation Qualification, IQ)、运行确认(Operational Qualification, OQ)和性能确认(Performance Qualification, PQ)。由于全自动核酸检测仪器的推广应用时间相对较短,加上其复杂

性和精密性,因此对此类设备的确认方法,尤其是使用前的PQ方法目前可供参考的较少,本文就1种核酸检测仪器的使用前确认方法进行探讨。确认血液病毒 NAT 仪器在使用前,其性能可以满足实际检测工作要求。

1 材料与方法

1.1 标本来源

1.1.1 阴性试验性标本 将输血用氯化钠注射液(四川南格尔公司,批号:121025),采用负压吸引方式注入核酸标本专用管(奥地利格雷那公司)中,每管约8 ml。然后在开盖机(珠海倍健公司)上进行脱帽开盖。

1.1.2 阳性试验性标本 采用血液病毒核酸检测 HBV DNA 质控品(批号:201211001,浓度水平:30 IU/ml)、HIV-1 RNA 质控品(批号:201211001,浓度水平:200 IU/ml)、HCV RNA 质控品(批号:201211001,浓度水平:30 IU/ml),均为北京康彻思坦公司生产,作为阳性试验标本。

1.1.3 献血者标本 我中心2012年12月21日 NAT 的献血者标本中挑选出100份,其中95份联

* 基金项目:重庆市卫生局科研项目(No:2013-2-158)

¹ 重庆市血液中心(重庆,400015)

通信作者:田耘博, E-mail: microtian@126.com

检阴性和 5 份联检反应性。献血者标本用核酸标本管(含 EDTA-K2 喷雾干粉)采集 6~8 ml 全血,采集后的标本管置于 4℃ 保存,在采集后 4~12 h 内 1 800 g 离心 10 min,检测前置于 4℃ 保存。

1.2 试剂与仪器

Procleix TIGRIS®全自动核酸检测分析仪(美国诺华公司):新安装待确认的(仪器编号 1785)和在用的(仪器编号 1632)各 1 台,相应配套的试剂准备温育器(美国 Chiron 公司),Procleix Ultro® NAT 试剂盒(美国诺华公司,批号:607496),该试剂可同时定性检测人类血浆中的 HIV-1 RNA、HCV RNA 和 HBV DNA,试剂盒含有配套的 Procleix HIV-1/HBV/HCV 鉴别试剂。

1.3 方法

用新安装的血液病毒 NAT 仪器在设备允许的实验室环境中,由经过诺华公司培训并获得操作授权的实验室人员,按照仪器的操作说明书进行性能确认测试实验。分成 4 个试验组依次进行 NAT:①联检试验组:NAT 质控品 20 套,HBV DNA、HIV-1 RNA、HCV RNA 各 1 支组合为 1 套阳性标本,和生理盐水标本 20 支交替置于仪器专用标本架上,即 1 支生理盐水管后放 1 套阳性标本,然后再放 1 支生理盐水管,以此顺序将 80 个试验标

本放入 TIGRIS NAT 仪器中,进行 NAT 联检。②鉴别试验组:在联检加样完成后,进行鉴别检测加样。将 10 支生理盐水标本和 10 套 NAT 质控品交替放置于仪器专用标本架上,一共 40 个标本进行 NAT 鉴别检测。分别针对 HBV DNA、HIV-1 RNA、HCV RNA 共进行 3 次鉴别检测。每次检测的试验性阳性标本有 10 个,而阴性试验标本理论上除了 10 个生理盐水标本外,还有未针对所在鉴别检测项目的其他标本 20 个,因此每次鉴别检测中的阴性标本共有 30 个。每个鉴别项目都用新准备的阴性和阳性试验标本。③仪器比对组:将 100 份经在用核酸检测仪器(Procleix TIGRIS,美国诺华,仪器编号 1632)进行联检后的献血者标本,在待确认的核酸检测仪器上进行联检测试。④污染评估试验组:在试验性标本联检和鉴别检测,献血者标本联检完成后,再进行污染评估检测。用生理盐水标本 40 支,在仪器标本架上连续放置,进行 NAT 联检。

2 结果

检测过程顺利,仪器运行完全正常。所有试验性阴性和阳性标本的检测结果见表 1。仪器比对组和污染评估组的检测结果见表 2。

表 1 试验性标本核酸联检和鉴别检测结果

	联检试验组		鉴别试验组					
			HCV RNA		HBV DNA		HIV-1 RNA	
	阳性标本	阴性标本	阳性标本	阴性标本	阳性标本	阴性标本	阳性标本	阴性标本
总例数	60	20	10	30	10	30	10	30
反应性数	60	0	10	0	10	0	10	0
非反应性数	0	20	0	30	0	30	0	30
可疑或无效数	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 仪器比对组和污染评估组检测结果

	仪器比对组		污染评估组
	仪器 1632	仪器 1785	
总例数	100	100	40
反应性数	5	5	0
非反应性数	95	95	40
可疑或无效数	0	0	0

3 讨论

NAT 相对酶联免疫检测(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA),可以大幅度缩短检测窗口期,明显降低输血传播病毒的残余风险,提高血液安全性^[1]。随着血液病毒核酸检测的推广和普及,全自动化的 NAT 仪器也在采供血机构中大量运用^[2]。其检测性能,直接关系到整个血液筛查结果的准确性可靠性,使用前应进行确认^[3]。且设备确认也是采供血机构质量体系进行监控和持续

改进的重要手段^[4]。因此对全自动 NAT 仪器的确认,得到国外同行的日益重视,国际输血协会(International Society Blood Transfusion ,ISBT)指出 IQ、OQ、PQ 是设备确认的 3 个连续阶段,并对具体操作进行了说明^[5]。IQ 是检查设备的安装是否正确;OQ 是检查设备的各种参数设置和空载运行的可靠性和稳定性,确保设备可在要求的范围内正确运行,达到规定的一系列技术性指标;PQ 是通过模拟检测实验的方式,进行设备的试运行,确认设备是否符合实验要求。目前诸如全自动 NAT 仪器这样的大型仪器,IQ 和 OQ 通常由厂商的工程技术人员进行,而 PQ 则需要设备的使用人员来完成。

本方法采用仪器完成 IQ、OQ 后建立的各项参数和程序,确认整个仪器检测过程的可接受性,由多次检测证实了仪器的检测重复性和运行可靠性。本单位所用全自动化 NAT 仪器,先进行 HBV

DNA\HIV-1 RNA\HCV RNA 的联合检测,对反应性标本通过鉴别检测区分出具体的病毒类型。在设计性能确认方法上根据实际工作流程,对仪器的检测灵敏度、特异性、重复性、可靠性、和防止污染能力等项目按实际工作要求分别进行确认。①检测灵敏度方面,检测仪器对 HBV DNA\HIV-1 RNA\HCV RNA 的 100%检出限分别为 45 IU/ml、60 IU/ml、10 IU/ml,参考目前 ELISA 采用弱阳性质控品来监控检测实验的有效性和稳定性原则^[6],结合 NAT 的自身特点,选择了浓度水平为 1~3 倍检出限的 NAT 质控品作为试验测试的阳性标本,其病毒含量较为明确,一致性较好,相对于常规的血样标本,更有利于进行新仪器的检测灵敏度确认。②检测特异性上,通过阴性标本与阳性标本混合检测的方式,进行确认。尤其是在鉴别检测中,非鉴别目标的阳性试验性标本,也成了该项检测的阴性标本。如在对 HBV DNA 的鉴别检测时,HIV-1 RNA、HCV RNA 试验性标本就成了检验是否存在检测中发生交叉反应的较好参比对象。③在检测重复性的确认设计上,通过同 1 批次的 HBV DNA\HIV-1 RNA\HCV RNA 各自浓度相同的质控品多次检测,可较好检查 NAT 仪器的检测结果一致性。而采用普通血液标本,可能会因其血浆中病毒含量较低导致 NAT 结果的不稳定^[7],从而不适合用于检测仪器的重复性确认。④可靠性确认方面,首先从标本数量安排上,参考血液检测方法确认要求并结合实验室的实际情况,安排在一个时间段内连续测试了联检、鉴别、仪器比对和防污染等项目的标本,加上每次检测所需的校准品和质控品,总的测试量达到了 403 个,是我单位实际工作中每次检测量的 2 倍。可较好确认仪器在常规检测中的运行稳定性。⑤防污染确认方面。NAT 的防污染是必须重视的 1 个问题^[8],本方法通过 2 个步骤完成对仪器防污染性能的确认。首先将阳性和阴性试验标本混合交叉排列,进行交叉污染的评估。然后在含反应性的标本检测完成后,继续进行阴性试验性标本的检测。由于检测仪器内将产生大量的扩增产物,而 NAT 最主要的污染来源就是扩增产物^[9]。因此在进行了多次含有阳性标本检测后,再进行阴性试验标本检测,可以有效的确认仪器防污染性能。

由于生理盐水和质控品与实际的献血标本有差异,基质效应会导致检测结果偏差^[10],还考虑到我单位以后 2 台 NAT 仪器并行检测,仪器间检测结果的一致性和准确性非常重要^[11],因此本方法设计了采用实际献血标本进行仪器比对的测试。但由于实际献血标本中病毒含量可能较低,会导致 NAT 结果的不一致^[7],或许会发生 2 台仪器之间比对结果不一致的情况,这时如果将结果不一致的

标本进行病毒核酸定量检测,对明确具体原因会有很大帮助。

通过对新进全自动 NAT 仪器的性能确认测试,其结果证明了该仪器在检测灵敏度、特异性、重复性、可靠性、和防止污染等多项主要性能上均满足实际检测工作要求。由于对 NAT 仪器的熟悉和对仪器确认的深化认识都还有待提高,因此本文所介绍的设备性能确认方法可能还存在诸多不足,加上设备确认工作不仅限于此,是一项极其重要、繁杂且需不断探索的工作^[12]。因此需要同行们共同努力,找到更优的方法进行 NAT 仪器的设备确认,持续提高 NAT 质量管理体系和管理水平。

参考文献

- [1] Shimian Zou, Kerri A. Dorsey, Edward P. Notari, et al. Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing[J]. Transfusion, 2010,50: 1495-1504.
- [2] Roth W K, Busch M P, Schuller A, et al. International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009[J]. Vox Sang, 2012,102:82-90.
- [3] Böcker W, Clark M, Desaint C, et al. ISBT-Guidelines for validation and maintaining the validation state of automated systems in blood banking [J]. Vox Sanguinis, 2003,85:1-14.
- [4] 罗海玲,田兆嵩,梁佩贤. 确认控制[M]//余晋林,朱业华,田兆嵩. 血站质量管理培训教程. 北京:科学出版社,2009:367-68.
- [5] ISBT. Guidelines for Validation of Automated Systems in Blood Establishments[J]. 2nd ed Vox Sanguinis, 2010,98:1-19.
- [6] 吴亚玲,祝宏,董杰. 血液核酸筛查室内质控品浓度选择的探讨[J]. 中国输血杂志,2013,26(2):170-171.
- [7] Hollinger FB, Sood G. Review Occult hepatitis B virus infection: a covert operation[J]. J Viral Hepat, 2010,17:1-15.
- [8] 颜秀娟,邱昌文,石庆秋,等. 核酸血液筛查污染控制措施[J]. 中国输血杂志,2012,25(8):807-808.
- [9] 冷婵,王中梅,于磊,等. 血站核酸检测实验室风险识别、评估及控制方法探讨[J]. 中国输血杂志,2011,24(7):547-550.
- [10] 邹荣良. 基质效应在临床化学检测中的影响研究[J]. 中国误诊学杂志,2009,34(9):8391-8392.
- [11] 黄宏耀,王长翠,李玲,等. 建立新鲜健康抗凝血多仪器比对室内质量控制措施的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(11):1033-1034.
- [12] 张瑶婵,张泳,郭康社. 设备确认存在的问题及分析[J]. 中国输血杂志,2010,23(11):909-910.

(收稿日期:2014-06-25)