

• 经验交流 •

# 科华核酸检测系统的性能验证方法探讨与应用\*

## Discussion and application of performance verification methods for Kehua nucleic acid testing systems

汪海宁<sup>1</sup> 黄敏<sup>1</sup> 马成平<sup>1</sup> 李燕<sup>1</sup> 柯苑<sup>1</sup> 庞蓉蓉<sup>1</sup> 张立波<sup>1</sup>

[关键词] 核酸;性能验证;最低检出限;特异性;准确度

Key words nucleic acid; performance verification; limits of detection; specificity; accuracy

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.02.014

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] B

设备系统性能验证是证实检测系统的基本分析性能符合临床要求,或者与厂商或文献提供的资料一致,才可以将检测系统用于常规检测工作。《血站技术操作规程》《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》都对系统的性能验证做出了规定和要求,目前核酸系统的性能验证没有统一的标准方法<sup>[1]</sup>。我实验室对检测系统的测定下限、特异性、准确度、抗干扰能力,利用几种方法进行验证、比较并全面的评估,寻找最适宜的验证方法,也为其他实验室核酸系统性能验证提供参考<sup>[2]</sup>。

### 1 材料与方法

#### 1.1 血浆样本

使用含抗凝剂的分离胶真空采血管,采集我中

心无偿献血者静脉血 4~5 mL,1500×g 离心 20 min,经核酸系统检测 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 均为阴性的血浆。

#### 1.2 标准物质和血清盘

标准物质 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA,浓度分别为 200 IU/mL、1000 IU/mL、1000 IU/mL,由康彻斯坦生物提供。特异性、准确度性能验证学清盘由 216 支样本组成(表 1);最低检出限(分析灵敏度)验证学清盘为 180 只样本,由 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 50%、95%、100%检出限的样本各 20 支组成(表 2)。

#### 1.3 仪器、试剂

科华全自动核酸检测分析系统(V2.2),科华核酸检测试剂(20200403)。

表 1 特异性、准确度性能验证血清盘组成

编号	项目	含量	编号	项目	含量
P01B	HBV DNA	120 IU/mL	P19C	HCV RNA	20 000 IU/mL
P02B	HBV DNA	120 IU/mL	P20N	NHP	N/A
P03I	HIV-1 RNA	20 000 IU/mL	P21I	HIV-1 RNA	20 000 IU/mL
P04N	NHP	N/A	P22I	HIV-1 RNA	2000 IU/mL
P05C	HCV RNA	20 000 IU/mL	P23N	NHP	N/A
P06B	HBV DNA	2000 IU/mL	P24C	HCV RNA	20 000 IU/mL
P07I	HIV-1 RNA	2000 IU/mL	P25N	NHP	N/A
P08B	HBV DNA	2000 IU/mL	P26B	HBV RNA	20 000 IU/mL
P09C	HCV RNA	200 000 IU/mL	P27B	HBV RNA	20 000 IU/mL
P10N	NHP	N/A	P28N	NHP	N/A
P11B	HBV RNA	20000 IU/mL	P29B	HBV RNA	120 IU/mL
P12C	HCV RNA	1200 IU/mL	P30C	HCV RNA	20 000 IU/mL
P13I	HIV-1 RNA	20 000 IU/mL	P31I	HIV-1 RNA	20 000 IU/mL
P14B	HBV RNA	200 000 IU/mL	P32C	HCV RNA	1200 IU/mL
P15N	NHP	N/A	P33C	HCV RNA	20 000 IU/mL
P16B	HBV RNA	2000 IU/mL	P34N	NHP	N/A
P17C	HCV RNA	1200 IU/mL	P35C	HCV RNA	20 000 IU/mL
P18B	HBV RNA	2000 IU/mL	P36I	HIV-1 RNA	2000 IU/mL

注:另外含 180 支 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 阴性样本。

\*基金项目:江苏省输血协会英科新创科研基金(No:JS2019007)

<sup>1</sup>南京红十字血液中心(南京,210003)

通信作者:张立波,E-mail:37280240@qq.com

表 2 最低检出限验证血清盘组成

项目	HBV DNA	HCV RNA	HIV-1 RNA
50%检出限	2.5 IU/mL (20 支)	25 IU/mL (20 支)	25 IU/mL (20 支)
95%检出限	5.0 IU/mL (20 支)	50 IU/mL (20 支)	50 IU/mL (20 支)
100%检出限	7.5 IU/mL (20 支)	75 IU/mL (20 支)	75IU/mL (20 支)
合计	180 支标本		

#### 1.4 方法

**1.4.1 使用血清盘的最低检出限验证** 将血清盘中所有标本,按照单检方法检测,同时包含阴阳对

表 3 标准物质及样本稀释量

项目	单检模式			混检模式		
	HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA	HBV DNA	HCV RNA	HIV RNA
标准物质原浓度/(IU·mL <sup>-1</sup> )	200	1000	1000	200	1000	1000
说明书声称的下限/(IU·mL <sup>-1</sup> )	5	50	50	30	300	300
1次检测需要样本量/mL	1.8	1.8	1.8	0.4	0.4	0.4
20次检测需要样本量估算/mL	40	40	40	9	9	9
标准物质体积/mL	1	2	2	1.35	2.7	2.7
阴性血浆体积/mL	39	38	38	7.65	6.3	6.3
稀释后终浓度/(IU·mL <sup>-1</sup> )	5	50	50	30	300	300

**1.4.3 使用特异性、准确度的系统验证血清盘验证** 将血清盘中 216 份检测系列标本,依次按照表 1 中顺序排序;使用前 36 份样本,分别与 5 个阴性样形成个 pool 进行检测,不做拆分获得检测结果。与表 1 中的结果进行对照,结果输入表 4 中通过公式计算各项性能指标。准确度为  $a+d/(a+b+c+d)$ ,特异性为  $d/(b+d)$ 。

表 4 特异性和准确性计算

项目	预期阳性	预期阴性	合计
检测阳性	a	b	a+b
检测阴性	c	d	c+d
合计	a+c	b+d	

**1.4.4 利用室间质量评价验证准确度、特异性** 使用临检中心室间质量评价来验证准确度、特异性,样本量>30;根据检测结果与回报结果进行对照计算准确度、特异性。

**1.4.5 脂肪血、溶血抗干扰能力验证** 选择北京康彻思坦生物技术有限公司生产的核酸标准物质 HBV DNA(200 IU/mL)、HCV RNA(1000 IU/mL)、HIV RNA(1000 IU/mL),根据试剂说明书中声称的 3 倍 LOD 脂血、溶血标准,分别用 HBV、HCV、HIV 全阴性的重度脂血(甘油三酯 33 g/L)、重度溶血(血红蛋白浓度 5 g/L)新鲜血浆梯度

照和质控品;3 项目各浓度 20 支标本的检测率应严格符合其对应的置信区间,即有反应性概率 $\geq 95\%$ ,可确定为试剂的分析灵敏度。

**1.4.2 使用标准物质稀释法的最低检出限验证** 选取北京康彻思坦生物技术有限公司生产的核酸标准物质 HBV DNA(200 IU/mL)、HCV RNA(1000 IU/mL)、HIV RNA(1000 IU/mL),分别用正常人新鲜血浆(HBV DNA、HCV RNA 与 HIV RNA 全阴)作为稀释基质,将标准物质稀释为说明书声明检出限的样本,对每个样本重复 20 次分别进行单检和汇集检测,见表 3。在 20 次重复检测中, $\geq 95\%$ 的结果(即至少 19 次)能检出则为通过。

稀释基质,制成脂血、溶血标本及对照。溶血标本采用将新鲜血液放入冰箱冷冻,溶解制成溶血标本。分别重复检测 3 次。从而考核标本脂血、溶血时对核酸检测结果的影响。

## 2 结果

使用血清盘的最低检出限验证结果,见表 5。

表 5 血清盘验证最低检出限验证结果 %

检测项目	50%检出限	95%检出限	100%检出限
	水平	水平	水平
HBV DNA	80	100	100
HCV RNA	60	95	100
HIV RNA	80	100	100

使用标准物质稀释法的最低检出限验证结果,单检所有标本结果都为检出,混检 HIV 7 号 Pool 未检出,结果见表 6。

使用特异性、准确度的系统验证血清盘验证结果 216 支样本汇集检测结果符合率为 100%,因此特异性为 100%,准确度为 100%。

利用室间质量评价验证准确度、特异性结果,3 次室间质评,每次 10 个样本,成绩为 100%,因此特异性为 100%,准确度为 100%。

脂肪血、溶血抗干扰能力验证结果各种类型的样本都可以检出,结果见表 7。

表 6 标准物质稀释验证最低检出结果

项目	单检结果	混检结果	项目	单检结果	混检结果	项目	单检结果	混检结果
HBV DNA01	+	+	HCV RNA01	+	+	HIV RNA01	+	+
HBV DNA02	+	+	HCV RNA02	+	+	HIV RNA02	+	+
HBV DNA03	+	+	HCV RNA03	+	+	HIV RNA03	+	+
HBV DNA04	+	+	HCV RNA04	+	+	HIV RNA04	+	+
HBV DNA05	+	+	HCV RNA05	+	+	HIV RNA05	+	+
HBV DNA06	+	+	HCV RNA06	+	+	HIV RNA06	+	+
HBV DNA07	+	+	HCV RNA07	+	+	HIV RNA07	+	-
HBV DNA08	+	+	HCV RNA08	+	+	HIV RNA08	+	+
HBV DNA09	+	+	HCV RNA09	+	+	HIV RNA09	+	+
HBV DNA10	+	+	HCV RNA10	+	+	HIV RNA10	+	+
HBV DNA11	+	+	HCV RNA11	+	+	HIV RNA11	+	+
HBV DNA12	+	+	HCV RNA12	+	+	HIV RNA12	+	+
HBV DNA13	+	+	HCV RNA13	+	+	HIV RNA13	+	+
HBV DNA14	+	+	HCV RNA14	+	+	HIV RNA14	+	+
HBV DNA15	+	+	HCV RNA15	+	+	HIV RNA15	+	+
HBV DNA16	+	+	HCV RNA16	+	+	HIV RNA16	+	+
HBV DNA17	+	+	HCV RNA17	+	+	HIV RNA17	+	+
HBV DNA18	+	+	HCV RNA18	+	+	HIV RNA18	+	+
HBV DNA19	+	+	HCV RNA19	+	+	HIV RNA19	+	+
HBV DNA20	+	+	HCV RNA20	+	+	HIV RNA20	+	+
检出率	100%	100%	检出率	100%	100%	检出率	100%	95%

注:单检 1~20;混检 1~20 为 Pool。

表 7 干扰物质验证结果

标本类型	HBV DNA(5 IU/mL)			HCV RNA(30 IU/mL)			HIV RNA(30 IU/mL)		
	结果 1	结果 2	结果 3	结果 1	结果 2	结果 3	结果 1	结果 2	结果 3
	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)
用正常血浆稀释至 3 倍 LOD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
用溶血浆稀释至 3 倍 LOD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
用脂血血浆稀释至 3 倍 LOD	+	+	+	+	+	+	+	+	+

### 3 讨论

对于测定下线的验证,可以使用商品化的学清盘进行验证,该方法简便,但成本较高。对于各项目 50%的检出限,已经超出了试剂的检出能力,HCV RNA 项目有 40%的样本没有检出;而在 95%检出限只有 HCV RNA 项目有 1 个没有检出,其他项目都 100%检出,说明系统的最低检出限与试剂说明书所声称的一致。采用标准物质稀释法验证最低检出限,只有 HIV RNA 项目 1 个标本没有检出,其他项目标本 100%检出,证明标准物质浓度准确,稀释浓度也准确,证明系统的最低检出限与声称的一致。虽然稀释法成本较低,但稀释的准确性可能会存在问题,建议稀释后采用可溯源的设备进行定量检测后再根据结果进行稀释检测。

对于准确度和特异性验证,血清盘中有高浓度的标本可以验证汇集提取的抗交叉污染的能力

力<sup>[3-5]</sup>。检测系统对 216 支浓度强弱不等的标本进行汇集,阳性结果 100%的检出,阴性结果没有产生假阳性,说明系统提取时阴性标本与临近的强阳性标本不会产生交叉污染。证明系统提取时不易产生气溶胶,有一定的抗交叉污染能力。同样也可以使用室内质量评回顾性的方法进行评价准确度和特异性,虽然这种方法简便易行,但是因为其中一般不含有过强浓度的阳性样本,因此没有抗交叉污染的证明能力。

对于抗干扰测试,采用自制的脂肪血和溶血样本与标准物质配置成 3 倍 LOD 样本,连续检测 3 次,各项目都可以 100%检出,证明了厂家声称的脂肪血与溶血在相应浓度范围内不会对检测扩增产生影响,但是同样也要关注稀释准确性的问题。

性能验证的目的是为了验证检测设备的各项参数是否符合制造商所能达到的要求,是否能出具

准确的结果,设备是否可靠<sup>[6]</sup>。实验室对所使用的设备经过性能的确证或验证,才能保证设备在该实验室运行正常,出具的结果准确,因此需要新到设备或定期对检测设备进行验证以保证设备运转可靠,进而保证分析测试的质量<sup>[7]</sup>。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 朱姗姗,朱绍汶,蒋呢真,等.科华 V2.2 核酸检测系统灵敏度验证[J].临床检验杂志,2018,36(1):70-72.
- [2] 李育敏,张水兰,阚丽娟,等. EP-15A3 在荧光定量 PCR 测定 HBV-DNA 精密度和正确度验证中的应用[J].国际检验医学杂志,2019,40(5):629-631.
- [3] 郑旭焱.一种国产血液核酸检测系统的性能验证研究

[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(1):44-48.

- [4] 廖威,方丽娟,邓旭怡,等. HCV RNA 定量检测系统性能验证方案的制定[J].实验与检验医学,2020,38(1):58-61,76.
- [5] 何吕芬,李沙,利振坤,等.新型冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测的性能验证[J].分子诊断与治疗杂志,2020,12(7):848-851.
- [6] 张帅,黄静,李俊如,等. HBV-DNA 全自动检测系统的性能验证[J].当代医学,2020,26(11):13-16.
- [7] 张立波,赵静,马贵明.全自动酶免分析仪不同孵育槽及不同位置检测结果分析[J].中国输血杂志,2012,25(8):786-787.

(收稿日期:2020-09-21 修回日期:2021-05-07)

## 同种异体输血与恶性淋巴瘤患者感染的关系研究 Study on the relationship between allogeneic blood transfusion and infection in patients with malignant lymphoma

李毓龙<sup>1</sup> 贺腊<sup>1</sup> 张正超<sup>1</sup> 余松川<sup>1</sup> 朱紫衣<sup>1</sup>

**[关键词]** 恶性淋巴瘤;同种异体输血;感染;相关性

**Key words** malignant lymphoma; allogeneic blood transfusion; infection; correlation

**DOI:**10.13201/j.issn.1004-2806.2022.02.015

**[中图分类号]** R551 **[文献标志码]** B

恶性淋巴瘤(malignant lymphoma, ML)是起源于淋巴结或结外淋巴组织的免疫细胞肿瘤,是血液科常见的疾病类型之一。ML分为霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma, HL)和非霍奇金淋巴瘤(Non-hodgkin's lymphoma, NHL),其中以 NHL 较为多见,两者均以进行性地无痛性淋巴结肿大的临床表现为主。ML 患者常因大剂量化疗、自身相关性疾病、侵入性操作、输血等各种原因导致患者自身免疫力低下,增加了各种细菌、病毒等入侵的风险,容易导致患者感染。有报道指出,医院感染是 ML 患者死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。有研究指出抗菌药物、住院天数、侵入性治疗、年龄与合并其他疾病为恶性淋巴瘤患者医院感染的独立危险因素,但很少有文献报道输血与 ML 患者感染之间的关系<sup>[2]</sup>。虽有报道同种异体输血(allogeneic blood transfusion, ABT)会增加感染风险<sup>[3-5]</sup>,但还存在争议<sup>[6-7]</sup>,本试验通过对我院近 5 年收治的 ML 患者进行回顾性研究,旨在分析 ABT 与 ML 患者感染之间的关系。

### 1 资料与方法

#### 1.1 资料

选取 2015 年 1 月—2019 年 10 月入住我院血

液内科的 ML 患者 162 例,回顾性分析患者的病历资料,包括性别、年龄、住院天数、临床分期、是否有侵入性治疗、是否使用抗菌药物、是否放疗或化疗、是否输血、是否感染等。

#### 1.2 诊断标准及分类标准

恶性淋巴瘤患者诊断标准参照 2001 年世界卫生组织关于淋巴瘤制定的分类标准<sup>[8]</sup>,所有患者经体格检查、实验室诊断、影像学资料、HE 切片及免疫组织化学染色切片等综合分析确诊为 ML。ML 患者中接受 ABT 后 1 个月内出现感染的患者纳入感染组。

#### 1.3 统计学分析

所有统计分析均使用 SPSS 19.0 软件进行。对患者性别、年龄、住院天数、临床分期、是否有侵入性治疗、是否使用抗菌药物、是否放疗或化疗、是否输血、是否感染进行描述性分析。连续变量以  $\bar{X} \pm S$  表示,采用  $t$  检验;分类变量汇总以例(%)表示,采用 Pearson  $\chi^2$  检验。按性别(男和女)、年龄(<45 岁和  $\geq 45$  岁)、住院天数(<30 d 和  $\geq 30$  d)、临床分期(I~II 期和 III~IV 期)、是否有侵入性治疗、是否使用抗菌药物、是否放疗或化疗对 ML 患者进行分层。采用描述性分析比较输血组与非输血组,感染与非感染组。采用多变量 lo-

<sup>1</sup> 简阳市人民医院实验医学科(四川简阳,641400)