

血站核酸检测系统的性能验证方法探讨

陈凯¹ 王英辉² 袁志凤¹

[摘要] 目的:探讨中小血站核酸检测系统的性能验证方法,验证其检测和操作性能能否满足日常检测要求。方法:通过通量测试、压力测试、分析灵敏度验证、不同系统间平行试验、抗交叉污染试验、室内质量评价正确率等方面评估检测系统的性能。结果:浩源核酸检测系统 6 h 完成一批满负荷 384 份标本的 8 混样检测,压力测试试验过程设备软硬件均未发生故障。分析灵敏度验证中 0.5 检出限(LOD)的质控品标本 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 阳性检出率分别为 100%、75%、60%,1.0 LOD 和 2.0 LOD 的质控品标本 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 检出率均为 100%,反应性标本的 Ct 值变异系数均小于 5%。平行试验、抗交叉污染试验结果均与预期结果一致。EQA 正确率为 100%。结论:浩源核酸检测系统的操作性能、分析灵敏度、抗交叉污染能力、检测能力均能满足预期要求,该确认方法可作为中小血站核酸检测系统性能验证的参考。

[关键词] 性能验证;分析灵敏度;定值质控品;核酸检测系统

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.08.011

[中图分类号] R457.1 [文献标志码] A

Discussion on performance validation of nucleic acid test system in blood station

CHEN Kai¹ WANG Yinghui² YUAN Zhifeng¹

(¹Rizhao Blood Station, Rizhao, 276800, China; ²Rizhao Mental Health Center)

Abstract Objective: To explore the performance confirmation method of in-use nucleic acid test system in small and medium-sized blood stations, and verify its performance and operability. **Methods:** The performance of the system was evaluated by throughput test, stress test, sensitivity verification, parallel test, anti-cross-contamination test and accuracy of external quality assessment. **Results:** Haoyuan nucleic acid test system completed a batch of full load of 384 samples of 8 mixed sample detection, stress test equipment software and hardware testing process without failure. The positive rates of HBV DNA, HCV RNA and HIV1 RNA in the 0.5LOD range were 100%, 75% and 60%, respectively, 1.0 LOD and 2.0 LOD HBV DNA, HCV RNA, HIV1 RNA detection rates were 100%, and the statistical coefficient of variation of CT value of positive samples was less than 5%. The results of parallel test and anti-cross-contamination test were consistent with the expected results. The accuracy rate of EQA was 100%. **Conclusion:** The operation performance, analysis sensitivity, anti-cross-contamination ability and detection ability of Haoyuan nucleic acid test system could meet the expected requirements.

Key words performance validation; analysis sensitivity; quality control; nucleic acid test system

血液核酸检测(NAT)技术在血站的全面推行,核酸检测系统的确认工作逐渐成为实验室质量管理的重要组成部分^[1]。《血站实验室质量管理规范》6.3 条要求必须建立和实施仪器、设备的评估、确认、维护、校准和持续监控等管理制度,以保证仪器、设备符合预期使用要求。《血站技术操作规程(2019 版)》4.3.1 要求,检测设备在正式投入使用前应经过确认,核酸检测系统还应进行分析灵敏度验证。然而,标准和规范中并无明确规定核酸检测系统性能验证的标准流程,特别是中小血站由于资源和人员等因素的制约,采用血清盘等进行分析灵敏度验证的方法不切实际,需建立一套适合中小血

站实际的 NAT 性能验证方法。浩源核酸检测系统从通量测试、压力试验、分析灵敏度验证、抗污染能力及平行试验等几个方面探索性的开展性能验证,选择不同检出限(limit of detection, LOD)的质控品标本进行灵敏度试验,验证在一定的概率条件下能测得的最低值,评价核酸系统对低浓度标本的检出能力,以期为其他中小血站进行核酸检测系统性能验证提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源

通量测试、压力测试标本均用纯化水模拟献血者血液标本。

平行试验选取 2020 年 10 月我站采集的无偿献血者标本,献血者的筛选符合《献血者健康检查

¹日照市中心血站(山东日照,276800)

²日照市精神卫生中心

要求》。每位献血者留取血清学检测标本和核酸检测标本,其中核酸标本在采集后 4 h 内 $1800\times g$ 离心 20 min,置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

分析灵敏度验证标本,将商品化的核酸标准物质按照 2.0 LOD(HBV DNA 20 IU/mL、HCV RNA 50 IU/mL、HIV1 RNA 100 IU/mL),1.0 LOD(HBV DNA 10 IU/mL、HCV RNA 25 IU/mL、HIV1 RNA 50 IU/mL),0.5 LOD(HBV DNA 5.0 IU/mL、HCV RNA 12.5 IU/mL、HIV1 RNA 25.0 IU/mL) 稀释成高、中、低 3 种浓度备用。

1.2 仪器与试剂

乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒(1 型)核酸检测试剂盒(PCR-荧光法)(上海浩源生物科技有限公司,批号:BB20200402;中山达安科技股份公司,批号:202009002);核酸标准物质(北京康彻斯坦生物技术公司,批号:201909003),试剂均在有效期内。实时荧光分析仪 ABI7500(美国 ABI 公司),ChiTasBSS1200 核酸提取仪(苏州新波),Hamilton Star 核酸提取仪(瑞士 Hamilton 公司),所有仪器均定期校准。

1.3 方法

1.3.1 通量测试 使用纯化水作为测试样本,进行一个批次的 8 混样模式检测,验证浩源检测系统满负荷运行的检测通量和时间。

1.3.2 压力测试 使用纯化水测试样本每天进行一批次 384 份标本 8 混样检测,连续运行 3 d,观察设备软件和硬件的故障情况。

1.3.3 分析灵敏度验证 用上述稀释的 3 种浓度的标准物汇集后进行单检模式检测,每份标本检测至少 20 次,混样阴性判定为无反应性,混样阳性判

定为反应性,统计反应性孔的 Ct 值。

1.3.4 平行试验 使用浩源核酸检测系统对 2020 年 10 月 8—12 日我站采集的献血者标本进行核酸检测,检测结果与达安核酸检测系统进行比较,评估一致性。

1.3.5 抗交叉污染试验 使用 10 个阴性血浆标本和 33 个阳性质控品标本(包含 HBV、HCV、HIV1 强阳性和弱阳性标本)交替放置进行混样模式检测,混检阴性判定为非反应性,混检阳性判定为反应性。

1.3.6 室间质评正确率 统计 2019—2020 年血液核酸检测室间质评标本的结果,与临检中心的反馈结果进行比较。

2 结果

2.1 通量测试

浩源公司核酸检测系统在 6 h 内可以完成 384 份标本的混样检测,运行过程稳定。

2.2 压力测试

每天进行 384 份标本的 8 混样检测,连续运行 3 d,核酸检测设备和程序均未发生故障。

2.3 分析灵敏度验证

0.5LOD 浓度的质控品标本 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 阳性检出率分别为 100%、75%、60%,1.0 LOD 和 2.0 LOD 浓度的质控品标本 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 检出率均为 100%,符合核酸试剂检测要求,见表 1。

2.4 平行试验

浩源公司核酸检测系统共检测标本 765 份,检出 764 份阴性标本和 1 份 HBVDNA 反应性标本,与达安公司核酸检测系统结果一致,见表 2。

表 1 3 种不同浓度定值质控品进行分析灵敏度验证结果

浓度(IU/mL)	项目	份数	Ct	CV/%	反应性数	检出率/%
0.5 LOD						
5.0	HBV DNA	20	34.02 ± 0.41	1.21	20	100
12.5	HCV RNA	20	37.83 ± 0.57	1.51	15	75
25.0	HIV1 RNA	20	39.59 ± 0.98	2.48	12	60
1.0 LOD						
10.0	HBV DNA	20	32.91 ± 0.60	1.83	20	100
25.0	HCV RNA	20	36.22 ± 0.42	1.17	20	100
50.0	HIV1 RNA	20	38.97 ± 0.76	1.96	20	100
2.0 LOD						
20.0	HBV DNA	20	31.16 ± 0.49	1.57	20	100
50.0	HCV RNA	20	33.93 ± 0.85	2.51	20	100
100.0	HIV1RNA	20	36.43 ± 0.63	1.73	20	100
说明书要求						
LOD		20		≤ 5	20	100

表 2 2 种核酸检测系统检测献血者标本和室间质评标本结果比较

检测项目	室间质评标本 40 份						献血者标本 765 份					
	浩源			达安			浩源			达安		
	反应性	无反应性	正确率 /%	反应性	无反应性	正确率 /%	反应性	无反应性	正确率 /%	反应性	无反应性	正确率 /%
HBV DNA	14	26	100	14	26	100	1	764	100	1	764	100
HCV RNA	10	30	100	10	30	100	0	765	100	0	765	100
HIV1 RNA	9	31	100	9	31	100	0	765	100	0	765	100

2.5 抗交叉污染

43 份测试标本中,33 份阳性标本均为反应性,10 份阴性标本均为无反应性,阳性标本临近的孔位未出现交叉污染的情况。

2.6 室间质量评价正确率

选取 40 份室间质量评价标本,使用浩源公司核酸检测系统按照日常标本相同的方式进行 8 混样检测,与已知结果的符合率为 100%,见表 2。

3 讨论

核酸检测技术通过直接检测病原体的核酸,具有进一步缩短检测的窗口期,识别免疫静默感染导致的漏检等优点,广泛应用于血站实验室的血液常规检测,有效降低了输血残余风险^[2-3]。随着血液核酸检测技术的常规开展,核酸检测的质量控制成为实验室管理的一向重要工作^[4]。国际输血协会和国内的标准、规程中都对设备的确认进行了规定,然而由于核酸检测设备确认未形成一个标准化的方法,缺少可供参考的模式,文献中报道一些大的血液中心或中心血站通过购置商品化的血清盘进行核酸检测系统的分析灵敏度和检测性能的验证,验证结果能达到预期要求^[5-7]。我站在浩源核酸检测系统正式运行后,结合工作实际和血站的特点,从多个方面探索浩源核酸检测系统性能验证方法。

通过通量测试和压力测试试验发现,浩源核酸检测系统能够满负荷运行而不发生设备和程序的故障,可满足日常检测要求。在团体采血期间标本量较大,实验室工作人员应根据系统操作性能结果合理安排前处理过程和人员班次,降低人为因素导致的差错事件。

表 1 结果显示,使用 3 种不同浓度的质控品检出反应性标本的 Ct 值变异系数介于 1.17%~2.51%,符合标准规定的≤5%。其中 1.0 LOD 标本 HBV DNA、HCV RNA、HIV1 RNA 的检出率均为 100%,满足说明书规定的 100%要求。随着这 3 种浓度梯度的标本病毒含量的下降,反应性标本的 Ct 值不断升高,符合核酸检测的检出规律,病毒载量低,提取到的核酸片段少,扩增时的循环数相对增加。试验过程中对每一个浓度梯度的标本进行 20 次的检测,反应性标本的 Ct 值变异系数波

动范围较小(≤5%),说明核酸检测系统的批内精密度较好、可重复性好,能够满足批量样本的检测要求。

核酸检测设备的平行试验主要验证设备性能的一致性^[8],进行常规献血者血液标本的检测时,2 套核酸检测系统的检测结果一致,都能检出 1 份 HBV DNA 反应性的标本,表明 2 台设备对相同标本的检测性能一致。在实验室日常管理中,通过定期开展设备间的数据比对,常规进行设备的维护校准,保证设备的最优检测性能,确保试验结果的可靠性和准确性。

抗交叉污染试验中,汇集后的阳性 pool 和阴性 pool 交叉排布,结果表明阳性标本临近的阴性标本未出现异常扩增,阳性标本之间未发生检测项目的交叉污染,浩源检测系统抗交叉污染性能较好。在日常工作中,应注重加强核酸实验室的环境监测和清洁消毒,防止实验室污染的发生,并做好污染发生后的应急预案。

表 2 显示,使用浩源核酸检测系统检测 40 份已知结果的室间质评标本,正确率均为 100%。作为间接评价检测系统性能的一种方式,据此可推算出浩源检测系统的灵敏度和特异度均为 100%。

通过性能验证,对浩源核酸检测系统的设备操作能力和检测性能、分析灵敏度以及抗交叉污染进行了综合评估,该系统能满足实验室日常工作要求。其中分析灵敏度验证中,采用不同浓度的定值质控品进行测试,实验结果符合预期,具有经济节约、可重复性强等优点,为其他中小血站开展核酸检测系统分析灵敏度验证提供了理论依据。在今后的工作中将进一步强化核酸检测关键控制点的管理,优化核酸检测系统确认方案,持续提升实验室检测能力和质量管理水平。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 陈善华,朱丽莉,吕素梅,等. 洛阳地区无偿献血人群中核酸检测及分析[J]. 临床血液学杂志,2019,32(4):301-303.
 [2] 宋飞峰,吴安明,潘代丽,等. 核酸检测在筛查献血者乙型肝炎病毒感染中的应用价值[J]. 临床医学,2020,40(3):66-67.

本研究以桂林市健康体检人群为研究对象开展贫血流行病学调查,目标人群总体生活水平相对良好,调查研究结果不能完全代表地方整体人群的贫血水平,但大致能体现本地区当下贫血患病人群总体态势,即桂林市居民贫血状况相较早期全国统计调查结果已有显著改善,当前桂林市贫血人群大多数以原因不明轻度贫血为主,且贫血对男性、老年人群健康构成潜在威胁较大,贫血人群随着年纪增长患慢性肾病风险增高,但多数慢性病与贫血患病相关性不大。本文研究仍有一定局限性,后续有必要结合地方实际,以社区为单位进行大规模调查研究,明确桂林市各类人群贫血患病率以及影响因素,为新一轮全国居民营养普查提供参考支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈京蓉,熊鹰,杨静,等.重庆部分营养改善计划实施地区学生贫血状况[J].中国学校卫生,2019,40(5):753-755.
- [2] Palmer K,Vetrano DL,Marengoni A,et al. The Relationship between Anaemia and Frailty: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies [J]. J Nutr Health Aging,2018,22(8):965-974.
- [3] Xu F,Roberts L,Binns C,et al. Anaemia and depression before and after birth: a cohort study based on linked population data[J]. BMC Psychiatry,2018,18(1):224.
- [4] 宋丹靓敏,雷虹.加强营养防治缺铁性贫血[J].中国食品,2019(7):143-143.
- [5] 向阳,宋伟娜,马莱娇,等.舟山地区部队官兵贫血的流行病学调查[J].临床血液学杂志,2012,25(5):622-623.
- [6] 中国居民营养与慢性病状况报告(2020年)[J].营养学报,2020,42(6):521-521.
- [7] 李立明,饶克勤,孔灵芝,等.中国居民2002年营养与健康状况调查[J].中华流行病学杂志,2005,26(7):478-484.
- [8] Organization WH. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity [J]. World Health Organization,2011.
- [9] 付蓉,江汇涓.常见贫血临床诊断流程[J].中国实用内科杂志,2015,35(8):691-695.
- [10] 中国营养学会临床营养分会,中华医学会糖尿病学分会,中华医学会肠外肠内营养学分会,中国医师协会营养医师专业委员会.中国超重/肥胖医学营养治疗指南(2021)[J].中国医学前沿杂志(电子版),2021,13(11):1-55.
- [11] 《中国高血压防治指南》修订委员会.中国高血压防治指南2018年修订版[J].心脑血管病防治,2019,19(1):1-44.
- [12] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J].中华糖尿病杂志,2018,10(1):4-67.
- [13] 赵旺,叶平,胡大一,等.根据《中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)》再分析 DYSIS-China 横断面调查[J].中国心血管杂志,2020,25(1):55-61.
- [14] 王菱,彭艾.中国高尿酸血症及痛风诊疗指南(2019)解读[J].西部医学,2021,33(9):1254-1257.
- [15] 余学清,陈崴.中国慢性肾脏病患者合并高尿酸血症诊治专家共识[J].中华肾脏病杂志,2017,33(6):463-469.
- [16] 中国医师协会肾脏内科医师分会肾性贫血指南工作组.中国肾性贫血诊治临床实践指南[J].中华医学杂志,2021,101(20):1463-1502.
- [17] 胡貽椿,陈竞,李敏,等.2010—2012年中国城市居民贫血状况研究[J].中华预防医学杂志,2016,50(3):213-216.
- [18] 李君,李志芳,侯金友,等.开滦健康体检人群贫血患病率调查及影响因素分析[J].中华内科杂志,2018,57(5):335-339.
- [19] Li M,Hu Y,Mao D,et al. Prevalence of Anemia among Chinese Rural Residents [J]. Nutrients,2017,9(3):192.
- [20] 张尧,田亚平,何玺玉,等.遗传代谢病所致贫血的诊疗专家共识[J].标记免疫分析与临床,2021,28(10):1626-1634.
- [21] 刘林辉,赵松颖,王志红,等.保定市农村地区老年患者的贫血现状及危险因素[J].中国老年学杂志,2019,39(24):6113-6116.
- [22] 刘艳丽,陈硕,孙晨,等.北京市健康体检人群贫血患病情况及影响因素研究[J].中华全科医学,2020,18(9):1585-1587,1614.

(收稿日期:2022-01-06 修回日期:2022-02-08)

(上接第 586 页)

- [3] 宋晓艳,汪鹏,张瑞萍,等.核酸检测在筛查献血者乙型肝炎病毒中的应用[J].中国输血杂志,2019,32(12):1273-1275.
- [4] 刘春兰,姜敏娜,宋雷.血站核酸检测实验室质量监测指标分析[J].国际检验医学杂志,2021,42(15):1902-1905.
- [5] 苏武锦,罗必泰,邱昌文,等.基于 Probit 回归的核酸检测系统分析灵敏度验证[J].临床血液学杂志,2019,32(2):147-149.
- [6] 范文成,王棚,冯霞,等.血站血液检测设备性能对比方法的探讨[J].中国医学装备,2018,15(9):36-40.
- [7] 许守广,孙海英,高晶晶,等.定值核酸质控品用于血液核酸筛查分析灵敏度验证结果分析[J].临床血液学杂志,2017,30(4):276-278.
- [8] 于磊,陈瑜,贾俊杰,等.血站血液检测实验室设备性能比对方法探讨[J].中国输血杂志,2014,27(4):349-353.

(收稿日期:2022-02-16 修回日期:2022-05-09)