

血液感染性病毒核酸检测室内质量控制方法的研究

高智俊, 周国平, 郑岚, 肇翊同, 王迅, 何智纯 (上海市血液中心, 上海 200051)

摘要: **目的** 探讨合适血液感染性病毒核酸检测 (nucleic acid testing, NAT) 的室内质量控制 (internal quality control, IQC) 方法。**方法** 使用北京康彻斯坦质控品 (常规质控品) 和澳大利亚国立血清学参比实验室 (National Serological Reference Laboratory, NRL) QConnect 质控品 (评估质控品) 进行血液感染性病毒核酸平行检测。收集 2 种质控品的检测结果, 在常规质控方法判断为在控的检测批次中, 再分别采用 Westgard 多规则质控方法和 NRL 质控限质控方法进行判断, 观察 2 种质控方法假失控的次数和比例。**结果** 在常规质控方法判断在控的实验批次中, 再次使用 Westgard 多规则质控方法分析, HBV DNA, HCV RNA 和 HIV RNA 三项仍各有 0 ~ 2.46% (罗氏核酸混样检测) 和 0.73% ~ 2.55% (盖立复核酸单人份检测) 比例的假失控。使用 NRL QConnect 质控品在常规质控方法判断在控的盖立复检测批次中, 使用 NRL 质控限进行室内质控, 未发现失控情况。使用 NRL QConnect 质控品, 在常规质控方法判断在控的罗氏检测批次中, 使用 NRL 质控限的计算方法, 计算该实验室的质控限, 发现在 HBV DNA 和 HIV RNA 检测中各有 1 次失控 (0.30%)。**结论** Westgard 多规则质控方法不适合用于目前血站血液感染性病毒核酸检测的室内质控。该文浓度的 NRL QConnect 质控品和 NRL 质控限适合用于国内盖立复核酸单人份检测方法的室内质控, 但该浓度不适合用于国内罗氏核酸混样检测。该实验室在用的室内质控方法与 NRL 质控限的室内质控方法, 均适用于国内罗氏核酸混样检测和盖立复核酸单人份检测的室内质控。

关键词: 室内质控; 核酸检测; 国立血清学参比实验室质控限; Westgard 多规则

中图分类号: R446 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2022) 04-193-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2022.04.038

Study on Internal Quality Control Method for Nucleic Acid Detection of Blood Infectious Virus

GAO Zhi-jun, ZHOU Guo-ping, ZHENG Lan, ZHAO Yi-tong, WANG Xun, HE Zhi-chun

(Shanghai Blood Center, Shanghai 200051, China)

Abstract: **Objective** To identify suitable internal quality control (IQC) method of blood infectious virus nucleic acid testing (NAT). **Methods** Quality control materials from Beijing Kangchesitan Biotechnology Company (routine quality control) and Australia National serological Reference Laboratory (NRL) QConnect (evaluation quality control) were used to conduct parallel detection of blood nucleic acid. Test results from the two quality control were collected. Westgard rules and NRL QC Limits were applied to in-control test batches judged by routine method and the number and proportion of false rejection rate were identified. **Results** The Westgard rule quality control method was used to analyze in-control of tested batches judged by routine method in Beijing Kangchesitan quality control materials. The false control rates of HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA were still 0 to 2.46% (Roche) and 0.73% to 2.55% (Grifols) respectively. NRL QConnect quality control material was used for nucleic acid testing of single sample(Grifols). NRL quality control limit was directly used for in-control batches judged by routine method, and no out of control situation was found. NRL QConnect quality control material was used for nucleic acid testing of mixed sample(Roche). Using NRL quality control limit calculation method, calculate the quality control limit of the laboratory with in-control of tested batches judged by routine method, only one false rejection rate (0.30%) was identified from each of the HBV DNA and HIV RNA. **Conclusion** Westgard rule quality control method is not suitable for internal quality control for nucleic acid testing in blood establishment. The concentration of NRL QConnect quality control material and NRL quality control limit in this paper are suitable for the internal quality control of Grifols nucleic acid single test method, but not for the mixed test of Roche nucleic acid. The internal quality control methods of nucleic acid detection in the laboratory and NRL quality control limit can be used for the internal quality control of Roche nucleic acid mixed test and Grifols nucleic acid single test.

Keywords: internal quality control; nucleic acid testing; National Serological Reference Laboratory(NRL) quality control

基金项目: 中国输血协会威高科研基金, 项目编号: CSBT-WG-2017-09。

作者简介: 高智俊 (1988-), 男, 本科, 主管技师, 主要从事供血相关检测工作, E-mail: gaozhijun@sbc.org.cn。

通讯作者: 何智纯 (1973-), 男, 本科, 主管技师, 主要从事供血相关管理工作, E-mail: hezhichun@sbc.org.cn。

limit; Westgard rules

室内质量控制 (internal quality control, IQC) 由实验室工作人员, 采取一定的方法和步骤, 连续评价本实验室工作的可靠性程度, 以监控本实验室常规工作的精密度, 确定实验结果是否可靠, 可否发出报告的一项工作^[1]。血液感染性疾病筛查的对象为健康献血者, 在缺乏病史和体征的情况下, 更多依赖于实验室检测^[2], 根据检测结果从健康献血者中挑出疑似感染者, 因此血液筛查需要实验室的检测结果具有更高的稳定性和可靠性。血液筛查的质量控制是保证检测结果可靠的有效手段^[3]。然而, 病毒标记物检测的血液筛查不同于一般的化学检测, 传统的基于正态分布原理的质控方法可能并不适合非正态分布的病毒标记物检测^[3]。特别是核酸检测的 IQC 具有更多的复杂性, 其 IQC 方法一直是业内讨论的热点。本文对本实验室的质控数据进行了分析, 以当前所使用的室内质控方法作为标准, 在判断在控的检测批次中再用两种不同的 IQC 方法进行了分析, 为探讨合适的血液核酸检测 IQC 方法提供帮助。

1 材料与方法

1.1 质控品 本文使用两种室内质控品。一种为本实验室在用质控品产自北京康彻斯坦公司。用于罗氏核酸混样检测时, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA 浓度分别为 50 IU/ml, 1 000 IU/ml, 1 000 IU/ml; 用于盖立复核酸单人份检测时, HBV DNA, HCV RNA, HIV RNA 浓度分别为 50 IU/ml, 50 IU/ml, 200 IU/ml。另一种为澳大利亚国立血清学参比实验室 (National serological Reference Laboratory, NRL) 提供的 QConnect 质控品 (评估的质控品), 浓度分别为 HBV DNA 50 IU/ml, HCV RNA 50 IU/ml, HIV RNA 250 IU/ml, 罗氏核酸混样检测的质控品为三种标记混合在一起的多标记样品, 本实验室检测时与 5 支阴性血浆混合。盖立复核酸单人份检测的质控品为单一标记样品。

1.2 仪器与试剂 本实验室主要采用 Roche COBAS TaqScreen s201 MPX v2.0 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 方法 (简称: 罗氏) 和 Grifoles procleix™ TIGRIS Ultrio plus 转录介导的扩增 (transcription-mediated amplification, TMA) 方法 (简称: 盖立复) 对血液感染性病毒进行核酸检测, 本文数据均来自这两种检测系统。

1.3 方法 两种质控品与常规血液样品一起进行检测。收集 2019 年 1 月 14 日 ~ 5 月 31 日两种质控品的检测结果, 将北京康彻斯坦质控品的检测结果录入 Excel 表格, 将澳大利亚 QConnect 质控品的检测数据录入 EDCNet 软件。

1.3.1 本实验室常规室内质控方法: 罗氏检测系统每天采用混样模式检测一套室内质控品 (1 支 HBV DNA, 1 支 HCV RNA, 1 支 HIV RNA 阳性室内质控品与 3 支阴性室内质控品的混样样品), 盖立复

检测系统每个工作列表必须包含一套室内质控品, 室内质控品检测模式与检测样本一致。质控品检测结果在控的标准: 阴性室内质控品检测结果应为内标有效的无反应性, 阳性质控品使用罗氏检测系统检测 C_t 值 (cycle threshold value) 须在 $30 \leq C_t$ 值 < 40 范围内, 使用盖立复检测系统检测 S/CO 值 (absorbance signal of sample/cutoff value) 须在 $5 < S/CO$ 值 ≤ 25 范围内。

1.3.2 Westgard 多规则质控方法: 将日常血液核酸筛查 IQC 结果作 Levey-Jennings 图, 以在用批号的试剂和室内质控品前 20 个点计算均数 (\bar{x}) 和平均差 (s), 并在图上划出 \bar{x} , $\bar{x} \pm 2s$ 和 $\bar{x} \pm 3s$ 质控限, 根据 Westgard 多规则判断当批检测是否在控。

1.3.3 NRL 质控限法: 在使用 NRL 同一浓度新批号 QConnect 室内质控品监控核酸试验的有效性和稳定性之前, 采集来自全球 30 个国家的约 300 个实验室使用该批号 NRL QConnect 质控品的检测结果计算 NRL 质控限^[4], 以此来监控以后的核酸试验的有效性和稳定性。NRL 质控限的计算方法参见文献 [4], 计算时考虑了不同实验室间正常的检测变异, 也考虑了试剂批号之间的变异。鉴于 NRL 质控限计算的数据来自国外核酸单人份检测, 因此, 盖立复核酸单人份检测方法可直接使用根据国外数据计算得出的 NRL 质控限, 而国内罗氏核酸混样检测方法不能直接使用 NRL 质控限, 本文罗氏核酸混样检测方法 NRL 质控限是根据同一研究阶段本实验室、深圳市血液中心、大连市血液中心和山东省血液中心对 QConnect 质控品的检测结果重新计算而得。如果 QConnect 质控品的检测结果在 NRL 质控限范围内, 则当批检测在控, 否则为失控。

2 结果

2.1 本实验室室内质量控制情况 2019 年 1 月 14 日 ~ 5 月 31 日期间应用本实验室核酸室内质量控制方法, 罗氏核酸混样检测康彻斯坦质控品在控批次为 122 批, 失控批次为 2 批, 失控率 1.64%; 盖立复核酸单人份检测康彻斯坦质控品, 在控批次为 275 批, 失控批次为 0 批, 失控率 0。在此期间, 使用罗氏核酸混样方法, 检测 NRL QConnect 质控品 332 次, 使用盖立复核酸单人份检测方法检测 QConnect 质控品 183 次。

2.2 Westgard 多规则质控方法在控和失控情况 见图 1 和图 2。使用罗氏核酸混样方法检测康彻斯坦 HCV RNA 质控品和使用盖立复核酸单人份检测方法检测康彻斯坦 HIV RNA 质控品的质控图。可见在根据日常质控规则判断为在控的检验批次中, 如果采用 Westgard 多规则质控方法判断 HCV RNA 质控情况, 又出现 2 个 1_{3s} 失控和 1 个 10_x 失控, 其中 2 次超出 $+1_{3s}$, 提示弱阳性质控品的检测值偏低; 在盖立复核酸单人份检测 HIV RNA 质控品中, 又出现 6 个 1_{3s} 失控和 1 个 2_{2s} 失控, 其中有 5 个失控

点低于 -1_{3s} , 表明弱阳性质控品的检测值偏低。其他检测项目的质控图基本与图1和图2类似。统计

所有检测项目的失控情况汇总见表1。

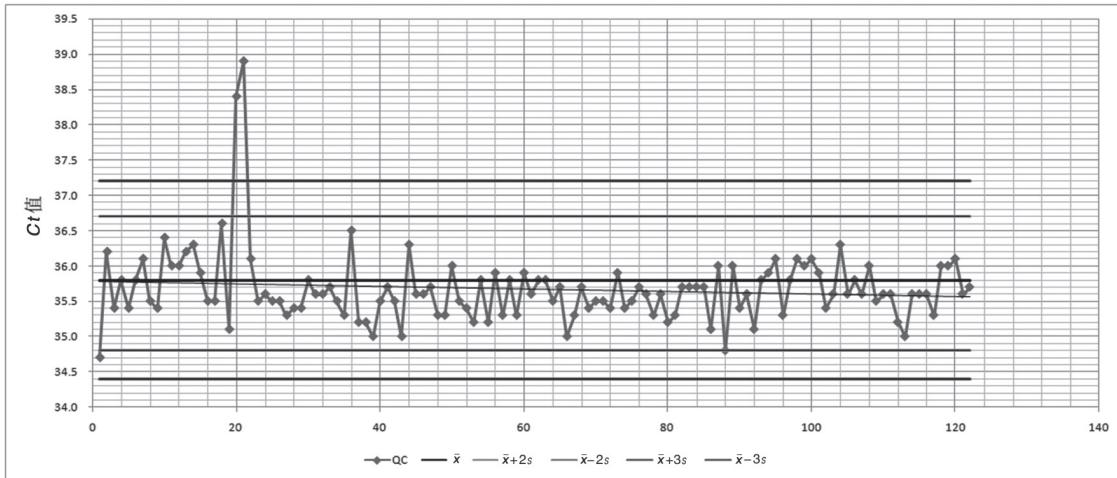


图1 罗氏 HCV RNA 检测质控图

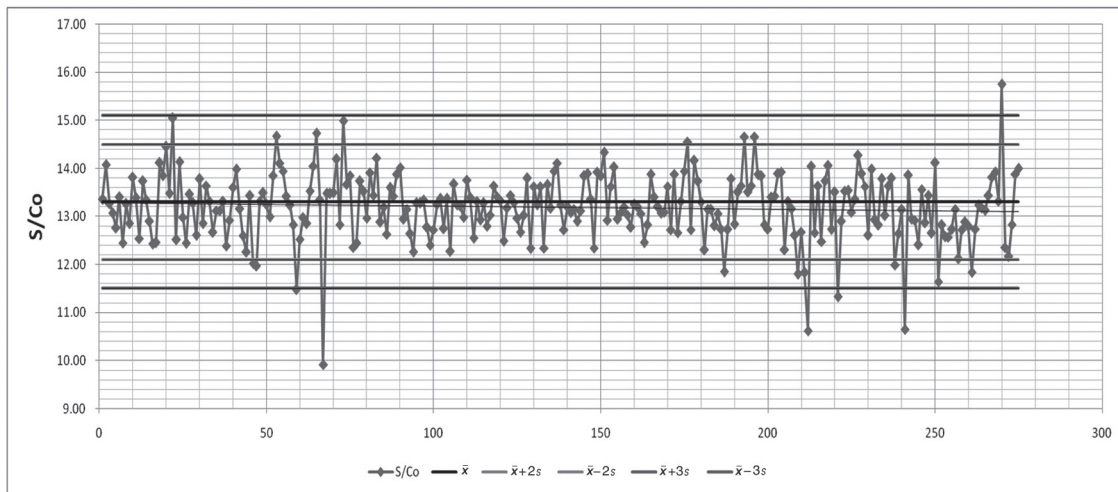


图2 盖立复 HIV RNA 检测质控图

表1 使用 Westgard 多规则质控方法判断失控情况汇总

质控规则	HBV		HCV		HIV	
	失控次数	%	失控次数	%	失控次数	%
罗氏方法	1_{3s}	0	0	2	1.64	0
	2_{2s}	1	0.82	0	0	0
	10_x	0	0	1	0.82	0
小计	1	0.82	3	2.46	0	0
盖立复方法	1_{3s}	5	1.82	2	0.73	6
	2_{2s}	2	0.73	0	0	0.36
	10_x	0	0	0	0	0
小计	7	2.55	2	0.73	7	2.55

2.3 NRL 质控限法在控和失控情况 使用 NRL QConnect 质控品, 盖立复核酸单人份检测, 在本实验室核酸质控方法判断在控的检测批次中, 使用

NRL 质控限进行室内质量 IQC, 结果未发现失控情况; 罗氏核酸混样检测, 在本实验室核酸质控方法判断在控的检测批次中, 使用 NRL 质控限的计算方法, 计算本实验室的质控限, 结果发现在 HBV DNA 核酸检测和 HIV RNA 核酸检测中各有 1 个失控结果 (0.30%) 见表 2。图 3 和图 4 分别为罗氏核酸混样检测 HIV RNA 质控品和盖立复核酸单人份检测 HCV RNA 质控品的质控结果, 其他检测项目与该结果相似。

3 讨论

血液筛查感染性病毒核酸检测作为一种定性检测, 其室内质量控制方法一直是业内讨论的热点。目前各血站常用的室内质量控制技术有: ①选择 2 ~ 5 倍检测限浓度的质控品作定性监测; ②以质控品的 Ct 值作质控图, 并以 Westgard 多规则质控方法判断是否在控; ③在定性监测基础上, 设定一系列判定指标, 综合分析核酸检测的室内质控。

表2 使用 QConnect 质控品, 按 NRL 质控限方法进行室内质控的结果

检测方法	HBV		HCV		HIV	
	NRL 质控限	失控次数	NRL 质控限	失控次数	NRL 质控限	失控次数
罗氏	32.5 ~ 36.4	1	18.0 ~ 57.2*	0	33.3 ~ 37.1	1
盖立复	12.4 ~ 17.1	0	7.4 ~ 11.9	0	10.4 ~ 15.9	0

注: 因用于罗氏核酸混样检测的 NRL QConnect 质控品 HCV RNA 浓度较低 (50 IU/ml), 其他合作实验室检测的 C_t 值变异非常大, 导致 NRL 质控限的范围增大, 根据目前检测结果计算出的 NRL 质控限不具有室内质量控制的意义。

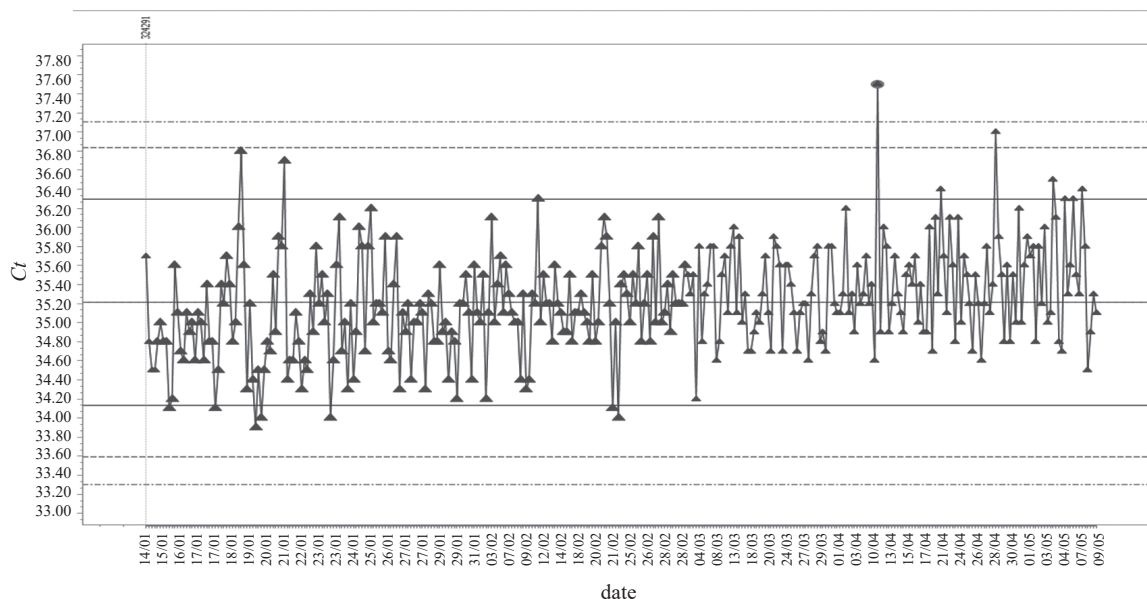


图3 使用 QConnect 质控品按 NRL 质控限法进行罗氏 HIV RNA 室内质量控制

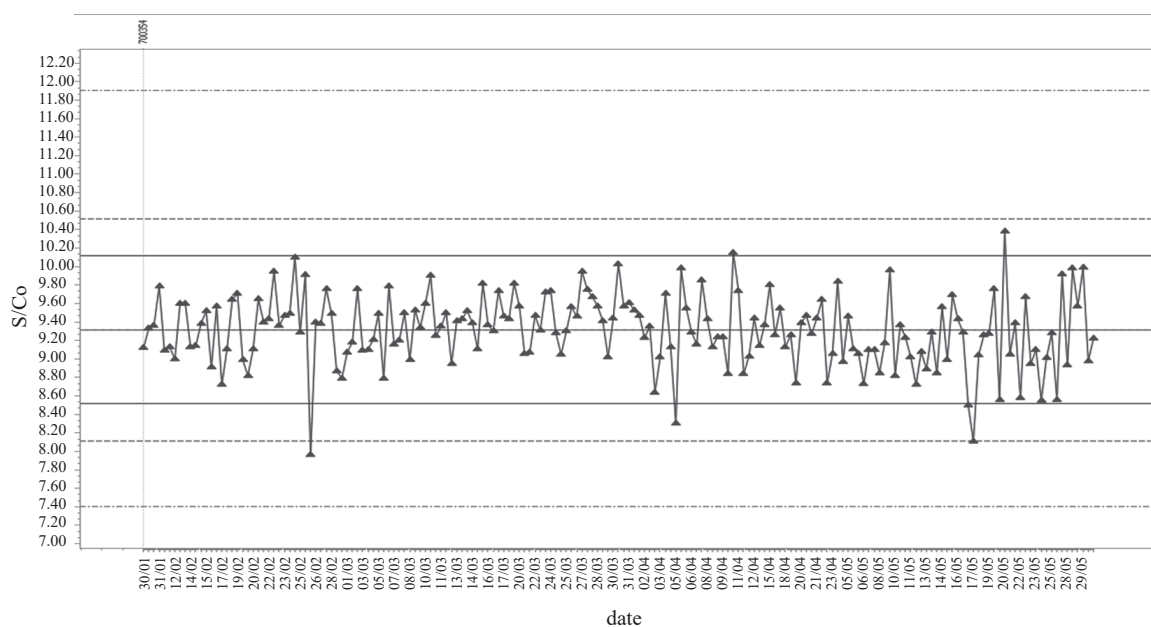


图4 使用 QConnect 质控品按 NRL 质控限法进行盖立复 HCV RNA 室内质量控制

第一种方法单独使用时存在一定的缺陷, 因为核酸检测是单管独立反应, 室内质控品的检测情况并不能完全代表待检样品的真实反应情况, 简单的定性监测不一定能发现实验室的系统偏差和大部分的随机偏差。

第二种是以室内质量控制结果作 Levey-Jen-

nings 图, 加以 Westgard 多规则质控的方法在国内一些血液筛查核酸实验室用以判断检测是否在控^[4-6]。该方法虽然比单纯定性监测能提供更多的稳定性和重复性信息, 但由于样本间的 C_t 值是指数关系, 而不是线性关系, 不能使用 t 检验或方差分析等这些正态分布的方法对 C_t 值进行统计分析^[7-8],

因此,按 Westgard 多规则质控方法以 C_t 值作为指标判断 PCR 检测结果是否在控时,可能会造成许多“假失控”^[9]。本研究结果表明,盖立复核酸单人份检测方法出现假失控的概率会高于罗氏方法,这主要是因为盖立复的转录介导的扩增(transcription-mediated amplification, TMA)技术是一种终点检测方法,其 S/CO 值与样品中的核酸浓度没有相关性,因此 Westgard 多规则质控方法不适宜对 TMA 的结果进行分析。如果日常检测中经常出现“假失控”,实验室可能会投入更多的精力去调查失控原因、复检该批样品、延迟报告发出时间,不仅会造成人、财、物和时间上的浪费,时间久了还可能让实验室的员工对质量控制工作失去信心。因此本文研究结果表明,Westgard 多规则质控方法不适合用于目前国内血筛核酸检测的室内质控。

第三种为在定性监测基础上,设定一系列判定指标,综合分析核酸检测的室内质控。本实验室自 2011 年起即开始采用该方法对血筛核酸检测进行室内质量控制。除了试剂盒自带质控符合系统设定的要求、第三方弱阳性室内质控品的定性结果与预期相符以外,还对室内质控品的检测值建立了在控范围,同时还对日常检测指标进行监测。这样的综合判断指标来源于核酸扩增的基本原理和本实验室核酸检测方法性能验证数据。实验室日常监测核酸混样阳性拆分反应率、单人份反应率、鉴别阳性率、无效批次率及无效结果率等数据也为检测结果的有效性提供必要的支持,也与最近发布的《血站血液检测实验室质量监测指标》(T/CSBT 004-2019)和《可经输血传播感染病原体核酸筛查技术要求》(T/CSBT 008-2019)相符。因此本文以本实验室核酸检测所用质控限的室内质量控制方法是可行的。在符合实验室实际运行状况下,既避免其他质控方法带来的假失控风险,又能及时发现检测中的问题,保证血液筛查质量。

为了探讨目前澳大利亚核酸室内质控技术在我国应用的可行性,本文采用 NRL 的 QConnect 质控品,并使用互联网 EDCNet 软件分析其日常质控的结果。在本实验室罗氏核酸常规质控方法判断在控的批次中,利用 QConnect 质控品及 NRL 质控限的方法进行判断,在 HIV RNA 项目中发现 1 个“失控”结果。这个“失控”结果也可能是“假失控”,主要是因为 QConnect 用于罗氏检测方法的质控品 HIV RNA 浓度只有 250 IU/ml,这一浓度在国外均用于单人份检测,结果变异范围较小,而在国内开展的混样检测中,该浓度相对偏低,结果变异范围较大。因此,在研究中所使用 QConnect 质控品的浓度并不适合用于罗氏核酸混样检测。但根据本实验室获得的稳定结果推测,如果提高该质控品浓度,可以达到对其进行室内质控的目的。在盖立复核酸常规质控方法判断在控的批次中使用 NRL 质控限进行判断,未发现失控情况。表明当前 QConnect

质控品浓度配合 NRL 质控限方法,与本实验室现行质控限的方法均适合用于盖立复核酸单人份检测的室内质控。

综上所述,在选择适宜浓度的质控品情况下本实验室在用质控限的方法与 NRL 质控限的方法均可用于罗氏核酸混样检测和盖立复核酸单人份检测的室内质控。

参考文献:

- [1] KINNS H, PITKIN S, HOUSLEY D, et al. Internal quality control: best practice[J]. Journal of Clinical Pathology, 2013, 66(12): 1027-1032.
- [2] SÁEZ-ALQUEZAR A, ALBAJAR-VIÑAS P, GUIMARÃES A V, et al. Quality control in screening for infectious diseases at blood banks. rationale and methodology[J]. EJIFCC, 2015, 26(4): 278-285.
- [3] DIMECH W, VINCINI G, KARAKALTSAS M. Determination of quality control limits for serological infectious disease testing using historical data[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2015, 53(2): 329-336.
- [4] 蒋义,张钢,郭咚,等. 血液病毒核酸筛查系统室内质控方法的建立及评价[J]. 临床检验杂志, 2017, 35(7):542-544.
JIANG Yi, ZHANG Gang, GUO Dong, et al. Establishment and evaluation of internal quality control method for blood virus nucleic acid screening system[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2017, 35(7): 542-544.
- [5] 汤心怡,纪云鹏,冯晨晨. 血站核酸筛查混样和拆分单检室内质控方法的建立和评价[J]. 中国实验血液学杂志, 2016, 24(3):921-924.
TANG Xinyi, JI Yunpeng, FENG Chenchen. Establishment of internal quality control method for mixed and split samples by NAT in blood donor screening[J]. Journal of Experimental Hematology, 2016, 24(3): 921-924.
- [6] 陈雪,李书平,赵欣,等. 血液核酸筛查利用室内质控品 C_t 值建立质控图方法初探[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(11):1154-1155.
CHEN Xue, LI Shuping, ZHAO Xing, et al. Establishment of quality control chart by using C_t value of internal quality control materials in blood nucleic acid screening[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2014, 27(11):1154-1155.
- [7] 纪冬,辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4):598-600.
JI Dong, XIN Shaojie. Development and data analysis of real-time fluorescent quantitative PCR[J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(4): 598-600.
- [8] 易健明,屈武斌,张成岗. 实时荧光定量 PCR 的数据分析方法[J]. 生物技术通讯, 2015, 26(1):140-145.
YI Jianming, QU Wubin, ZHANG Chenggang. Data analysis methods of real-time fluorescent quantitative PCR[J]. Letters in Biotechnology, 2015, 26(1): 140-145.
- [9] DIMECH W, KARAKALTSAS M, VINCINI G A. Comparison of four methods of establishing control limits for monitoring quality controls in infectious disease serology testing[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2018, 56(11): 1970-1978.

收稿日期: 2021-06-21 修回日期: 2022-02-23