

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.041

核酸转录介导的扩增中室内质控方法的探讨

季茂胜, 赵欣, 张蓝江, 王欢, 陈雪, 董玉芳, 魏彩冰

四川省成都市血液中心血液筛查实验室, 四川成都 610041

摘要:目的 比较箱体图法和 Levey-Jennings 质控图法在转录介导的扩增中对室内质控的监测情况。方法 每天使用同一台机器检测同一批号的 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 室内质控品的待测物信号/临界值(S/CO 值)。使用 SPSS17.0 软件绘制箱体图并判断离群值,并用 K-S 检验判断室内质控品 S/CO 值是否服从正态分布;使用 Excel 软件连续测定前 20 次室内质控品的 S/CO 值为参数绘制 Levey-Jennings 质控图。结果 共收集 86 组 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 室内质控品 S/CO 值,箱体图法分别出现 2 次、0 次、1 次离群值;Levey-Jennings 质控图法分别出现 4 次、4 次、6 次失控值;室内质控品 S/CO 值经过 K-S 检验服从正态分布($P > 0.05$),适用于 Levey-Jennings 质控图的绘制。结论 应用外部质控品 S/CO 值绘制的 Levey-Jennings 质控图法相对于箱体图法,更有助于检验核酸检测体系的稳定性。

关键词:核酸检测; 转录介导的扩增; 箱体图; Levey-Jennings 质控图

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2275-04

目前血液核酸检测技术(NAT)已在我国采供血机构全面开展和普及,检测原理主要分为聚合酶链反应(PCR)和转录介导的扩增(TMA),使得其在检测灵敏度和特异度方面表现极佳。通过利用 NAT 检测人类免疫缺陷病毒(HIV)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV),降低了只依赖酶联免疫吸附试验(ELISA)检测献血员标本导致的输血传播性疾病的发生^[1]。《血站核酸检测实验室质量保证指南》中提到血站核酸检测室内质控的基本要求为每一批次检测应至少有一个弱阳性室内质控品。各血站实验室尚未建立较统一的 NAT 质量控制体系^[2-3],然而室内质控是检测和评价本实验室质量管理体系运行情况,确定检测结果是否可靠、稳定的重要因素^[4]。为此本中心实验室结合实际工作中的室内质控检测结果,通过绘制箱体图法和 Levey-Jennings 质控图法回顾性分析实验过程中的检测情况,对两种质控分析方法在转录介导的扩增中对室内质控的监测情况作比较。

1 材料与方法

1.1 室内质控品数据来源 收集 2019 年 3 月 9 日至 7 月 19 日本核酸实验室室内质控品(HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA)检测的待测物信号/临界值(S/CO 值)。

1.2 室内质控品 室内质控品 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 为购于北京康彻思坦公司的标准品,水平分别为 30 IU/mL、30 IU/mL、200 IU/mL,批号为 20190110,有效期至 2021 年 1 月 9 日。

1.3 仪器与试剂 HBV、HCV、HIV1 型(Procleix Ultrio Plus Assay)核酸联检检测试剂盒(主批号为

700354,有效期至 2020 年 5 月 15 日)及 Procleix Tigris 核酸检测系统均购于盖立复生物诊断公司,试剂使用前在试剂孵育器内 32 °C 孵育 1 h。严格按照仪器和试剂说明书及本实验室的标准操作文件进行操作。

1.4 室内质控品检测 从 -30 °C 冰箱取出室内质控品室温解冻后,上下缓慢颠倒使其充分混匀(HIV 室内质控品为干粉状态,使用其相应的溶解液充分溶解后颠倒混匀)瞬间离心。在温度 15 ~ 25 °C、湿度 20% ~ 85% 环境下,室内质控品与常规标本一同检测。机器在使用的情况下,每天做一次 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 3 个项目的室内质控品检测。结果判读:仅当核酸检测试剂盒自带的校准物与对照品同时有效时,室内质控品才能判断为有效,记录 S/CO 值。

1.5 箱体图的绘制 使用统计软件 SPSS17.0 分别计算 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 室内质控品的中位数(M)、下四分位数(Q_L)、上四分位数(Q_U)、四分位数间距(QR) = $Q_U - Q_L$,绘制箱体图判定离群值;也可以通过计算离群值上下限判定离群值,即当 S/CO 值 $> Q_U + 1.5QR$ 或 $< Q_L - 1.5QR$ 时判定为离群值。

1.6 室内质控品 S/CO 值分布情况及 Levey-Jennings 质控图的绘制 使用 SPSS17.0 统计软件 K-S 检验判断室内质控品 S/CO 值是否服从正态分布分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;连续测定前 20 次室内质控品的 S/CO 值,使用 Excel 软件分别计算室内质控品的 \bar{x} 、 s 、变异系数(CV),以 $\bar{x} \pm 2s$ 为警戒

限、 $\bar{x} \pm 3s$ 为失控限绘制 Levey-Jennings 质控图,将同一台机器同批号的室内质控品 S/CO 值以散点折线图的方式描绘在 Levey-Jennings 质控图中。

2 结 果

2.1 箱体图结果 实验期间在一台 Procleix Tigris 机器上共检测了 86 组 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 室内质控品数据。3 个项目的 M 、 Q_L 、 Q_U 、 Q_R 及离群值上、下限如表 1 所示。当 HBV-DNA 室内质控品检测的 S/CO 值 < 12.86 或 > 15.36 时判断为离

群值;HCV-RNA 室内质控品检测的 S/CO 值 < 8.44 或 > 11.13 时判断为离群值;HIV-RNA 室内质控品检测的 S/CO 值 < 9.84 或 > 14.51 时判断为离群值。在检测的 86 组数据中 HBV-DNA 的第 32 次(S/CO 值为 16.03)、38 次(S/CO 值为 16.04)为离群值;HCV-RNA 室内质控品无离群值;HIV-RNA 室内质控品的第 32 次(S/CO 值为 14.59)为离群值,与通过 SPSS17.0 统计软件绘制的箱体图所显示的离群值结果一致,见图 1。

表 1 室内质控品百分位数及离群值上、下限

质控品	M	Q_L	Q_U	Q_R	$Q_L - 1.5Q_R$	$Q_U + 1.5Q_R$
HBV-DNA	14.13	13.80	14.42	0.62	12.86	15.36
HCV-RNA	9.77	9.45	10.12	0.67	8.44	11.13
HIV-RNA	12.09	11.59	12.75	1.16	9.84	14.51

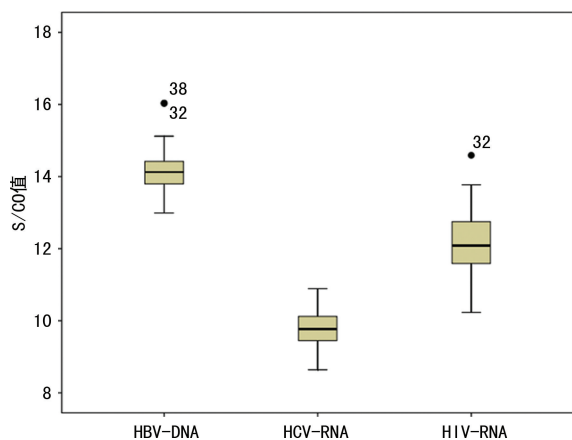


图 1 室内质控品 S/CO 值箱体图

2.2 室内质控品 S/CO 值分布情况及 Levey-Jennings 质控图结果 通过 SPSS17.0 软件正态分布 K-S 检验室内质控品 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 的 S/CO 值的 P 值分别为 0.790、0.982、0.955,均 > 0.05 ,遵从原假设即室内质控品 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 的分布服从正态分布。同批号的 HBV-DNA 室内质控品连续测定前 20 次的 S/CO 值的 \bar{x} 为 14.14, s 为 0.35, CV 为 2.48%, 以此为参数使用 Excel 绘制 Levey-Jennings 质控图并将 86 组数据描绘其中,结果见图 2,其中第 32、38、50、62 次 HBV-DNA 室内质控品 S/CO 值超出 $\bar{x} \pm 3s$ 的失控限。HCV-RNA 室内质控品前 20 次 S/CO 值的 \bar{x} 为 9.62, s 为 0.34, CV 为 3.53%,绘制的 Levey-Jennings 质控图中第 69、75、78、86 次检测值超出失控限,结果见图 3。HIV-RNA 室内质控品前 20 次 S/CO 值的 $\bar{x} \pm 3s$ 为 12.74, s 为 0.66, CV 为 5.18%,绘制的 Levey-Jennings 质控图中第 56、62、63、64、73、75 次检测值超出质控限,结果见图 4。

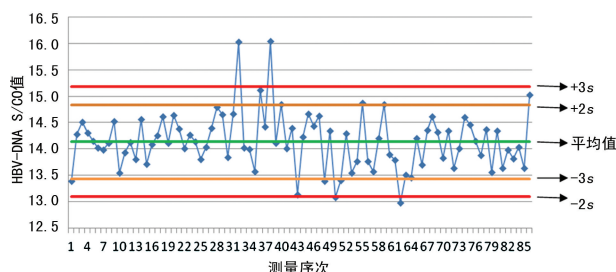


图 2 HBV-DNA 室内质控品 Levey-Jennings 质控图

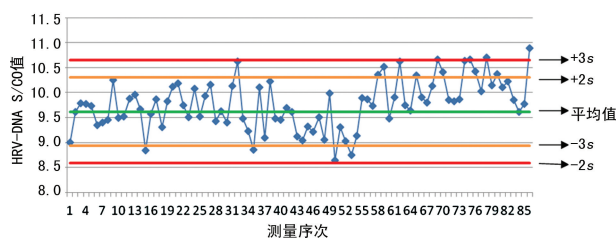


图 3 HCV-RNA 室内质控品 Levey-Jennings 质控图

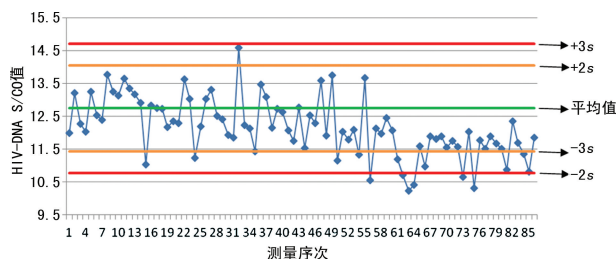


图 4 HIV-RNA 室内质控品 Levey-Jennings 质控图

3 讨 论

箱体图是利用数据中的 5 个统计量即最小值、 Q_L 、 M 、 Q_U 与最大值来描述数据的一种方法(箱体图的最下、上线段为最小、大值;中间箱体的下、上沿为 Q_L 和 Q_U),它可以看出数据是否具有对称性、分布的离散程度等信息^[5],离群值以星号或圆点在箱体图的上方或下方显示,箱体图的绘制依靠实际数据,不需要事先假定数据服从特定的分布形式,不对数据作任

何限制^[6]。图 1 中可以看出 HIV-RNA 的箱体上下高度范围(即 QR)比 HBV-DNA、HCV-RNA 箱体高度范围大,表明 HIV-RNA 的离散程度大于 HBV-DNA、HCV-RNA 的离散程度,这与它们之间 s 、CV 的差别一致^[7]。

在转录介导的扩增中,与扩增产物互补结合的单链核酸探针所产生的化学发光信号以相对光值(RLU)形式报告。但每次实验中室内质控品的相对光值波动较大,采用相对光值的比值 S/CO 值可以相对消除每次实验本身的干扰因素。Levey-Jennings 质控图中的数据应呈正态分布或接近正态分布,非正态分布的测定应转换后方可用这一方法作为质控手段^[8-10]。实验中所用到的室内质控品来自于康彻思坦生物公司的定值标准品,当重复检测时测定的数值应围绕平均值上下波动,经过 SPSS17.0 软件正态分布 K-S 检验各室内质控品 S/CO 值均服从正态分布,可以用于 Levey-Jennings 质控图的绘制。Levey-Jennings 质控图中失控值多于箱体图的原因是前者的 $\bar{x} \pm 3s$ 决定的质控限范围小于后者 $Q_L - 1.5QR$ 和 $Q_U + 1.5QR$ 组成的质控限范围导致的;而当箱体图和 Levey-Jennings 质控图出现失控的情况下,试剂本身的内标和对照品并未出现无效的情况可能是由于室内质控品浓度较低,导致扩增检测值 CV 较大造成的^[11]。

目前国内采供血机构核酸实验室普遍的做法是采用定性的方法进行质量控制^[12],即外部质控品 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 检测结果为反应性的情况下,本批次实验结果有效。虽然结果中 HBV-DNA、HCV-RNA、HIV-RNA 室内质控品分别 4 次、4 次、6 次超出失控限,但 S/CO 值定性结果为反应性,实际工作中笔者依然判断当批次检测有效,当室内质控品 S/CO 值超出失控限时,如果内标、对照有效依然可以判断实验有效。这是因为在每一次实验运行过程中,Procleix Ultrio Plus Assay 的内部质控体系通过以下 3 个方面达到自身实验监控的目的:(1)内标。通过包含内标的目标捕获试剂将内标添加到每个检测标本、对照或校准物管中,使试剂的内标在标本处理、扩增和检测步骤中均可作为质控品来监测实验过程,每个测试管的有效性需要内标的相对光值大于或等于内标临界值^[13]。(2)对照。阴性对照呈无反应性并且阳性对照呈反应性时本批次实验有效。(3)校准物质。虽然它的检测是为了计算待测物和内标的临界值,但它的有效或无效也能在一定程度上起到监测实验的作用。内部质控体系可以全面覆盖检测的整个过程,但是仅可以作为当批次实验有效性的验证,并不能监测仪器整个使用周期中 NAT 体系(包括仪器、试剂、质控品)的稳定性情况^[14],而 Levey-

Jennings 质控图法通过室内质控品的监控可以很好地弥补这方面的不足。图 2 中 86 次 HBV-DNA 室内质控品 S/CO 值围绕平均值随机上下波动,其中第 32、38、50、62 次超出失控限,分析原因发现第 32、38、62 次实验当天机器出现“磁清洗工作台液位感测故障”,采取的措施是实验开始前增加一次磁力工作站的高级磁力冲洗以减少其故障的发生,但第 50 次机器运行情况正常,猜测是由机器的偶发故障所造成;图 3 中 HCV-RNA 室内质控品 S/CO 值从第 65 次起出现在平均值一侧,观察发现所用盖立复试剂并未更换批号,排除试剂原因。所用机器在六月中旬曾做过半年维护保养(正好为第 65 次的时间段),由于测量化学发光信号的冷光仪经过校正,导致室内质控品数值不同于校正前的数值,机器的系统误差造成结果漂移,解决办法是在维护保养后应重新绘制质控图,以排除仪器校正对质控结果的影响;而图 4 中 HIV-RNA 室内质控品从第 56 次起后面的检测值都低于平均值,分析原因可能是由于 HIV-RNA 作为核糖核酸易于降解(质控品为干粉)在保存过程中随着时间的延长 RNA 降解导致浓度降低,致使 S/CO 值低于平均值造成的,使用新订购的室内质控品并尽快使用以减少保存时间对浓度的影响。

两种质控方法相比较,箱体图法仅仅可以发现少数离群值,而通过 Levey-Jennings 质控图中超出失控限原因的分析^[15],不仅可以评估仪器的运行状态,还可以监测试剂和质控品的质量状态,监测核酸检测体系的稳定性,从而更好地保证核酸检测的质量控制。

参考文献

- [1] 蒋祺. 酶联免疫吸附试验、核酸扩增技术检测在无偿献血者血液筛查中的应用[J]. 临床医学, 2020, 40(7): 82-84.
- [2] 王露楠. 血站实验室能力建设[J]. 中国输血杂志, 2018, 31(2): 99-100.
- [3] 侯云, 冯秋霞, 张龙穆. Procleix PANTHER 核酸检测系统使用前性能验证[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(71): 22-23.
- [4] 尹丹, 毕蕾静, 黄秀琳, 等. 基于转录介导扩增的单人份核酸检测在血液筛查中的应用分析[J]. 中国输血杂志, 2017, 30(6): 604-607.
- [5] 腾文惠, 葛紫颖, 康亚茹. 基于 SPSS 的箱图在数据描述中的应用研究[J]. 中国管理信息化, 2018, 21(14): 218-220.
- [6] 陈少彬, 何子毅, 余霖, 等. 多标记室内质控品在血液核酸筛查的应用分析[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(4): 423-426.
- [7] 方建华, 王艺芳, 葛文超, 等. 核酸检测实验室质量监控指标的探讨[J]. 中国输血杂志, 2019, 32(4): 399-401.
- [8] 何子毅, 余霖, 王庆, 等. Z-score 分数和泊松分布在血站血液核酸筛查室内质控的应用[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(1): 11-14.

- [9] 张珂,寸伟,何清,等.血液筛查实验室转录介导的扩增法室内质控初探[J].临床输血与检验,2015,17(2):132-135.
- [10] WENG B, XU Y L, YING J, et al. A novel use for Levey-Jennings charts in prenatal molecular diagnosis[J]. BMC Med Genomics, 2020, 13(1): 109-114.
- [11] 贾国荣. 传染病血液筛查核酸检测无效原因分析[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(3): 403-405.
- [12] VOLLMER T, DIEKMANN J, KNABBE C, et al. Hepatitis E virus blood donor NAT screening: as much as possible or as much as needed? [J]. Transfusion, 2019, 59(2): 612-622.
- [13] 陈少彬,何子毅,陈庆恺,等.血液筛查核酸检测内标在系统评价的应用分析[J].中国输血杂志,2016,29(2):201-203.
- [14] 赵倩,谢月娜,姚娜,等. Procleix Panther 核酸检测方法学性能验证评价[J].继续医学教育,2018,32(12):151-153.
- [15] 崔晓蕾. 核酸检测无效结果及无效列表的探讨与分析[J].临床输血与检验,2018,20(6):575-578.

(收稿日期:2021-01-17 修回日期:2021-06-01)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.042

红细胞体积分布宽度与血小板比值在慢性乙型肝炎患者肝纤维化评估中的临床价值

赵小军

西安医学院第二附属医院检验科,陕西西安 710038

摘要:目的 探讨红细胞体积分布宽度(RDW)与血小板(PLT)比值(RPR)在慢性乙型肝炎(CHB)患者肝纤维化评估中的作用。方法 收集 173 例 CHB 患者作为病例组,评估其肝纤维化、肝硬化程度。收集同期的体检者作为健康对照组,比较两组血常规多项指标和生化指标(清蛋白、血脂、肝肾功能)的差异。比较 CHB 患者不同肝纤维化分期各纤维化指标及 RPR 的水平及诊断价值。结果 随着肝纤维化程度的加重,病例组患者 RPR、Ⅳ型胶原、层粘连蛋白和透明质酸水平逐渐上升,且差异均有统计学意义($P < 0.05$)。RPR 对肝纤维化 F2 期诊断的 AUC 为 0.704;对肝纤维化 F3 期诊断的 AUC 为 0.792;对肝纤维化 F4 期诊断的 AUC 为 0.818。结论 对于 CHB 患者,RPR 对于肝细胞纤维化评估具有较好的诊断价值。RDW 和 PLT 是医院中常见的经济、简单的检查方法,参考两者的比值可减少患者肝活检,可在未普及肝纤维化 4 项检查的情况下应用。

关键词:慢性乙型肝炎; 肝纤维化; 红细胞体积分布宽度; 血小板

中图法分类号:R446.11

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2278-04

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个严重的健康问题,据估计超过 3.5 亿人被确诊为慢性 HBV 感染^[1]。若未对此类患者采取适当的干预措施,慢性乙型肝炎(CHB)可能会发展为肝纤维化,并增加肝硬化、肝失代偿和肝癌的风险。肝活检是目前评估肝纤维化程度的金标准。然而,由于其侵入性操作、可能引起并发症的风险、取样误差、判定者的评估误差等,该检测手段通常被视为“不完美的金标准”^[2]。因此,临床提出了几种有效的侵入性较小的评估方法,如肝纤维化 4 项检查[Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(Ⅳ-C)、层粘连蛋白(LN)、透明质酸酶(HA)]。肝纤维化 4 项的检测因其高准确度和结果可重复性等优点在临床上得到更广泛的应用^[3-5]。然而,由于肝纤维化 4 项检查技术尚未广泛应用于基层医疗机构,大量慢性肝病患者的肝硬化评估手段依然存在问题。有文献报道可采用红细胞体积分布宽度(RDW)与血小板(PLT)比值(RPR)来诊断肝炎患者的肝纤维化和肝硬化^[6]。然而,这种方法在评估肝纤维化程度时的性

能尚未得到外部充分验证。因此,本研究的目的是比较 RPR 与其他监测方法对于 CHB 患者的显著纤维化、晚期纤维化和肝硬化的诊断性能,以期为临床实践提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 10 月至 2020 年 10 月在本院诊断为 CHB 的 173 例患者为病例组。纳入标准:(1)CHB 的诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》诊断标准^[7];(2)在抗病毒治疗前进行肝活检以评估纤维化和炎症的严重程度;(3)年龄 < 80 岁,一般情况良好,且自愿参加配合研究。排除标准:(1)既往有抗病毒治疗史;(2)有其他肝脏疾病史(比如有丙型、丁型肝炎病毒感染等);(3)临床资料不全,检测结果数据不全,未接受肝纤维化 4 项或其他检测;(4)饮酒量 > 40 g/d,持续 5 年以上者;(5)有除肝癌外的其他恶性肿瘤。肝纤维化分期标准如下。(1)F0~1 期:汇管区以及汇管区周围纤维化,以及局限在肝窦周围纤维化或者小叶内纤维瘢痕,这时纤维化