

基于危害分析及关键控制点体系的核酸检测 实验室质量控制研究

杨树龙*, 刘彦余, 张培婷, 王伟蓉, 张轩玮

(甘肃省红十字血液中心, 兰州 730046)

摘要: 目的 通过危害分析及关键控制点(hazard analysis and critical control point, HACCP)体系系统化控制核酸检测实验室质量, 以期能够实现核酸检测实验室质量的提升, 为有效制定核酸检测质量控制对策提供借鉴。**方法** 根据 HACCP 体系初步探究核酸检测实验室质量控制, 重点分析 HACCP 体系在核酸标本接收、准备试剂、提取标本核酸、核酸扩增、结果判读、核酸检测结果报告环节制定的监控程序、验证措施以及纠偏措施等重要控制点。**结果** 通过分析 2021 年 12 月-2022 年 12 月的检测数据, 结果显示, 各批次核酸检测阳性质控品均满足判定规则, 每一批次的实验均处于在控状态。对 HACCP 体系下实验室数据进行统计, 计算其标准差、均值以及变异系数, 对箱型图绘制后, 展开离群值检验, 结果发现, 均值没有产生离群值。**结论** 核酸检测实验室中应用 HACCP 体系, 能够有效控制核酸检测实验室质量, 全面掌控核酸检测实验室重要控制点, 实现实验室生物安全水平与质量的提升, 保证核酸检测实验室质控的有效性与科学性, 继而有效控制核酸检测实验室质量。

关键词: 核酸检测; HACCP 体系; 实验室; 质量控制

Research on quality control of nucleic acid testing laboratory based on HACCP system

YANG Shu-Long*, LIU Yan-Yu, ZHANG Pei-Ting, WANG Wei-Rong, ZHANG Xuan-Wei

(Gansu Red Cross Blood Center, Lanzhou 730046, China)

ABSTRACT: Objective To systematically control the quality of nucleic acid testing laboratories through the HACCP system, in order to improve the quality of nucleic acid testing laboratories and provide reference for effectively formulating quality control strategies for nucleic acid testing. **Methods** Preliminary exploration of quality control in nucleic acid testing laboratories based on the HACCP system, with a focus on analyzing the monitoring procedures, validation measures, and corrective measures developed by the HACCP system in the stages of nucleic acid sample reception, preparation of reagents, sample nucleic acid extraction, nucleic acid amplification, result interpretation, and nucleic acid testing result reporting. **Results** By analyzing the testing data December 2021 to December 2022, the results showed that all batches of nucleic acid positive quality control products met the judgment rules, and each batch of experiments was in a controlled state. Statistical analysis was conducted on laboratory data under the HACCP system, calculating their standard deviation, mean, and coefficient of variation. After plotting the box plot, outlier tests were conducted, and it was found that the mean did not produce outliers. **Conclusion** The application of HACCP system in nucleic acid testing laboratories can effectively control the quality of nucleic acid testing laboratories, comprehensively control important control points of nucleic acid testing laboratories, improve the level and quality of laboratory biosafety,

*通信作者: 杨树龙, 临床医学检验主管技师, 研究方向: 核酸检测, 质量控制。E-mail: song9915@163.com

*Corresponding author: YANG Shu-Long, Clinical Laboratory Technician in Charge, Gansu Red Cross Blood Center, Lanzhou 730046, China. E-mail: song9915@163.com

ensure the effectiveness and scientificity of quality control in nucleic acid testing laboratories, and then effectively control the quality of nucleic acid testing laboratories.

KEY WORDS: nucleic acid testing; HACCP system; laboratory; quality control

0 引言

危害分析和关键控制点(Hazard Analysis and Critical Control Point, HACCP)最早在航空食品领域应用,属于食品安全管理体系, HACCP 可为太空食品杜绝微生物病原菌提供保障^[1]。二十世纪后期,该体系向我国境内传入,且在实践中取得非常明显的成效。现如今, HACCP 体系被广泛用于畜牧养殖、教学质量、人才培养及实验室安全管理等诸多领域,成为行业质量管理的保障机制。分子生物学实验室质量管控目标,是不断提升监测结果的精准性与可靠性,有效防止交叉污染事件发生^[2]。核酸检测实验室应用 HACCP 体系的情况较少,基于此,该研究探讨核酸检测实验室对 HACCP 体系进行应用的价值,以期能够为加强核酸检测质量控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 研究材料

随机抽选甘肃省 14 家采供血机构,其中,8 家原有实验室,6 家新搬实验室。

1.2 研究方法

本文以《HACCP 体系和应用指南》中有关 HACCP 系统的规定为参照,并根据目前我国的实际情况,对其进行了分析与初步的探讨。图 1 为质控思路图:

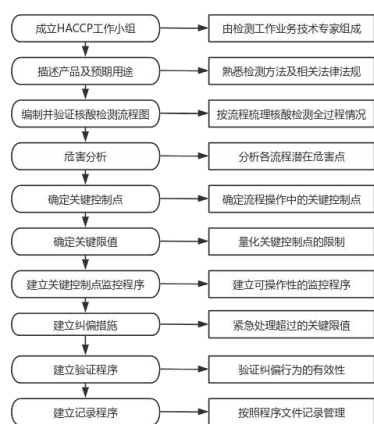


图 1 HACCP 体系引导下核酸检测实验室质控思路

Fig.1 Quality control ideas for nucleic acid testing laboratories guided by the HACCP system

1.2.1 制定 HACCP 计划

第一,建立 HACCP 工作小组;对 HACCP 体系的运作原理,质量控制措施,核酸检测法规,实践工作程序等都要有一定的认识和理解。监督和实施 HACCP 项目,确保 HACCP 项目的顺利实施。第二部分是对商品的说明^[3]。核酸检测的工作内容包括:采集标本,检测试剂准备,核酸提取和扩增;其实,核酸检测主要就是检查病人的血中有没有外来病毒,用实验室试剂提取检测法,判断有没有被病毒感染。第三,预定的使用情况。向核酸化验所提交相关资料。第四个方面是作业的过程。一共分为三个部分,每个部分都是相对独立的,而且是封闭的,不允许通风^[4]。核酸测试的工作人员分为三个区域,一个是核酸样品前处理区域,一个是核酸提取提纯区域,一个是核酸扩增与产品的分析区域。各实验室内的器材和物料应分开存放,不准混放,在各作业区使用不同的颜色标识。第五步是确认过程。按照国家和相关的实验规程,对整个过程进行了严格的检验,确保了整个过程的准确性。

1.2.2 HACCP 计划的制定与实施

(1) 潜在危害点。对核酸检测的精准性产生影响的潜在危害点主要有: a. 收样过程。如标本漏液、人员培训防护以及消杀问题; b. 试剂准备。如个人防护、检测结果阴阳性对照等; c. 核酸扩增(如扩增后禁止开盖、反应板密封性); d. 核酸提取。如核酸加样、标本运转载架开启、废弃物的处理; e. 仪器设备消杀维护; f. 异常处置; g. 结果报告。(2) 明确关键限值和关键点。对监控程序进行创建,同时有效梳理核酸检测潜在危害点,明确潜在危险点的管控和可接受情况,与核酸检测实验室实际相结合,根据《HACCP 体系》明确重要控制点限值,同时创建重要控制点监控程序。其一,标本接收及离心。以标本质量及状态、标本信息完整及收样者防护为关键控制点,以各批次标本信息完整、无漏液情况,收样者根据生物安全准则加强防护为关键限值,以收样负责人监督各批次标本信息、人员交叉互验为监控程序,离心需要根据《血站技术操作规程(2019 版)》要求,主要是转速控制,温度控制,时间控制以及采样后需 4 小时内完成离心^[5]。具体纠偏措施为:若标本漏液,需要对同批次送检样、收样环境进行消杀,同时还要重新送样,如果标本信息有漏项或不完整的问题,必须选择拒收,而且还要重

新送样,如果有工作人员没有落实防护信息,必须在其培训考核通过后,再次上岗。核酸检测验证措施有:实验室劣质标本拒收记录;标本接收记录以及防护用品领取记录及各项消杀记录,其二,核酸提取。标本数量核对及标本质量的控制、处置废弃物为关键控制点。关键限值:根据BSL-2级实验室防护要求,耗材废弃物需做好安全消杀工作。监控程序:严格查验不同批次核酸检测试剂的耗材废弃物、标本载架和密封袋等^[6]。纠偏措施:彻底消毒后,带出垃圾袋至医疗废物暂存点,通过75%酒精擦拭生物安全柜台面和喷洒,将生物安全柜关闭,紫外照射时间为30 min,实验台面紫外灯照射为1 h,实验室空气紫外消毒时间为1-2 h;核酸提取时,定期开展实验室监督检查提取过程是否正常。其三,结果接收及分析。主要的控制点是解释结果、报告和处理异常曲线。临界限制:按照《质量手册》的规定,上报的错误率和正确的资料的正确率必须达到。现场监测流程:每批试验的运行情况及汇报均有两位工作人员进行,检验过程中出现的不正常检验情况,并做好检验报告。纠正错误,上报不正常的,要再检查。第四,实验室信息化建设。重点分析了LIMS的主要内容,指出了如何保证实验的安全性和无泄漏的必要性。监管流程:由主管对实验室的数据安全性执行进行定期检查,对实验室进行内部检查,对数据的保密性和完整性进行全方位的监管,并对其进行对信息的处理;对资讯保安人员进行周期性的培训和评估^[7]。其检验方法包括:对实验资料进行保存,并对其进行管理。(3)文件记录。基于HACCP体系的记录程序主要有标本接收离心记录、核酸检测过程控制记录、核酸实验室设施维护记录、实验室环境及设施消毒维护记录、质控记录和人员培训记录等,统一归档所有记录,负责人审核,保存5-7年以上,便于随时追溯样本记录信息。

1.3 统计学处理

通过统计学软件SPSS 26.0展开实验室质量控制结果的统计处理,通过Excel 2007软件进行Levey-Jenning质控图的绘制。

2 结果与分析

2.1 核酸检测实验室在空判定结果

通过分析2021年12月-2022年12月的检测数据,结果显示,各批次核酸检测阳性质控品均满足判定规则,每一批次的实验均处于在控状态。

2.2 Levey-Jenning 质控图

对HACCP体系下实验室数据进行统计,计算其标准差、均值以及变异系数,对箱型图绘制后,展开离群值检验,结

果发现,均值没有产生离群值,由此可以看出,HACCP体系下的核酸检测实验室质量控制效果较好。供血系统核酸检测有三个项目,分别是HBV-DNA, HCV-RNA及HIV-RNA,阳性质控品HBV/HCV/HIV均值分别为29.76, 29.89, 32.06,阳性对照均值分别为24.59, 24.23, 26.11,从该数据可以看出,阳性质控品HIV-RNA数字较高,但差异不明显, $P>0.05$,无统计价值。具体如表1和图2-5所示。

表1 实验均值、变异系数和标准差统计表

Table 1 Experimental mean, coefficient of variation, and standard deviation statistics

| 项目 Ct 值 | 均值 | | | 标准差 | 变异系数 |
|---------|---------|---------|---------|------|-------|
| | HBV-DNA | HCV-RNA | HIV-RNA | | |
| 阳性质控品 | 29.76 | 29.89 | 32.06 | 0.65 | 2.13 |
| 阳性对照 | 24.59 | 24.23 | 26.11 | 0.08 | 0.38 |
| 内标 | 29.88 | 27.29 | 28.65 | 0.20 | 0.66 |
| 内标标准差 | 0.30 | 0.56 | 0.34 | 0.06 | 16.77 |

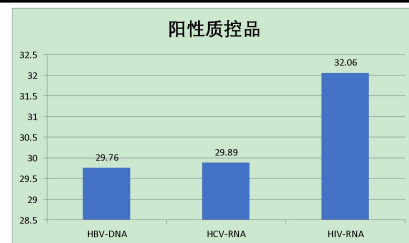


图2 阳性质控品 HBV/HCV/HIV 均值

Fig.2 Mean value of HBV/HCV/HIV positive control samples

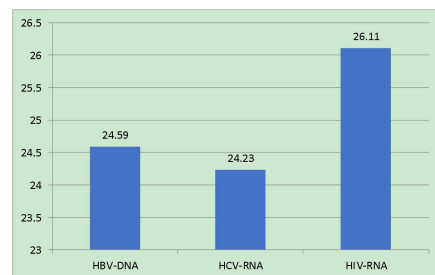


图3 阳性对照均值

Fig.3 Mean value of positive controls

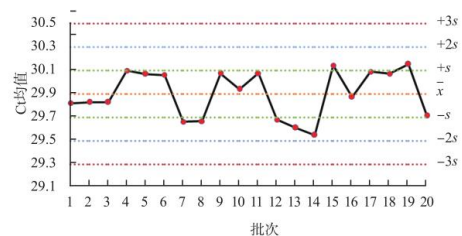


图4 内标 Ct 均值

Fig.4 Mean internal standard Ct

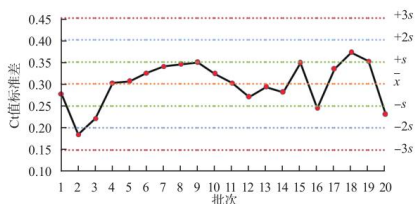


图5 内标 Ct 值标准差

Fig.5 Standard deviation of internal standard Ct value

3 讨论

HACCP 体系主要包含七方面, 即: a. 危害分析; b. 重点控制点; c. 重要控制点限制; d. 建立质量控制系统监控程序; e. 纠正措施; f. 确认程序; g. 建立保存档案并将其归档^[8]。所谓核酸检测实验室质控, 指的是对所有可能会对其质量造成影响的各个步骤进行控制, 对实验工作进行监控, 以改善各批及批间的检测结果的连贯性。保证试验结果准确可靠^[9]。HACCP 体系包含了对实验室的前期品质监控(如: 仪器、耗材、员工资质、实验环境、设施等)^[10]。同时, 对样品进行检测时的质控(包括: 样本采集、核酸放大、数据处理等)、统计学质控(包括差错、差错等)^[11]。全面剖析核酸测试的质控与 HACCP 制度的相关理论, 特别是 HACCP 体系的原理, 可以帮助我们更好地处理核酸检测的实验室质量管理问题, 具体表现为: (1) 技术指导科学性。依照《医疗机构核酸检测工作手册》《血站技术操作规程(2019版)》^[12]中有关实验室质控要求, 通过特定试验方式在室内质评、性能验证以及室内质控等环节实现实验室质控的目标。HACCP 体系工作步骤在于层层梳理中, 符合风险监测和预防机制, 全面规划与合理布局核酸监测质控系统^[13]。(2) 目标导向一致性。所谓核酸检测实验室质控, 其实就是在允许限度内, 为分析核酸检测误差控制制定有效的控制措施, 最终满足实验室质量可控目标, 再对实验检测数据加以验证溯源^[14]。HACCP 体系以识别监测系统风险为宗旨, 为系统稳定运行提供保障, HACCP 体系和核酸检测质控体系具有相似的目标导向^[15]。(3) 检测预防指导性^[16]。通过 HACCP 体系对核酸检测实验室全过程危害进行分析, 明确 CCP, 同时创建监控程序, 达到核酸检测全过程风险防控, 特别是创建重要控制点监控程序, 指导实验室人员有效控制核酸检测质量, 继而实现核酸检测质量控制效能的提升。

参考文献

- [1] 崩文和, 吴忠兰, 韩坤, 等. 新冠病毒核酸检测实验室质量控制措施建立初探[J]. 中国公共卫生管理, 2021, 37(6): 838-841.
- [2] 谢月娜, 李凤园, 赵倩, 等. 血站核酸定性检测实验室统计学质量控制方法的建立[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2022, 43(3): 245-249.
- [3] 文良雪, 张澜艺, 苏丽, 等. 血站核酸检测实验室 HBV DNA 项目室内质量控制方法探讨[J]. 检验医学, 2021, 36(4): 437-440.
- [4] 杨娜娜, 杜江, 蒋斌, 等. 有关核酸检测技术在基层血站应用质量控制的探讨[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2020, 41(8): 988-991.
- [5] 李会杰, 陈桂芳, 高运华, 等. HPV16 与 HPV18 (E6/E7 基因) RNA 假病毒核酸标准物质定值研究[J]. 计量学报, 2023, 44(3): 401-409.
- [6] 郑绮菡, 李爱荣, 刘爱云, 等. 新冠病毒核酸快检实验室 ISO15189 质量管理体系的建立与运行[J]. 医学检验与临床, 2023, 34(6): 72-77.
- [7] 李乐. 致病微生物新型检测方法及预防体系应用研究[D]. 湖南: 中南大学, 2014.
- [8] 孙艳珍, 顾世顺. 食品安全管理体系与 HACCP 体系确认过程要求之异同[J]. 质量与认证, 2023, 12(9): 66-67.
- [9] 陈倩, 单志明, 宋超, 等. 浙江地区新建新型冠状病毒核酸检测实验室质量现状分析[J]. 检验医学, 2022, 37(7): 669-673.
- [10] 袁志凤, 陈凯, 范晓娟. 2016-2020 年日照市中心血站核酸检测实验室质量监控指标及分析[J]. 社区医学杂志, 2022, 20(8): 463-467.
- [11] 王义平, 张红妮, 何军霞, 等. 基于 HACCP 体系的核酸检测实验室质量控制初步探讨[J]. 疾病预防控制通报, 2023, 38(3): 92-94.
- [12] 周晓泉, 钟江, 刘玉娇. 采供血机构核酸检测实验室质量控制体系及监控指标的建立[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(11): 195-197.
- [13] 赵兰青, 刘红, 邓明镜, 等. 创伤弧菌核酸检测试剂国家参考品的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2024, 16(1): 5-9.
- [14] 李育敏, 付晓歌, 郭东月, 等. 新型冠状病毒核酸检测弱阳性质控失控分析及影响因素[J]. 临床检验杂志, 2022, 40(11): 876-878.
- [15] 娄娇, 蒋玲丽, 王寅, 等. 医学检验实验室在区域新型冠状病毒核酸检测中的质量监管[J]. 诊断学理论与实践, 2022, 21(2): 174-177.
- [16] 宋然, 孟芹. 分子生物实验室室内质量控制失控原因分析[J]. 中国卫生产业, 2022, 19(1): 81-84.

作者简介

杨树龙, 临床医学检验主管技师, 研究方向: 核酸检测, 质量控制。