

阿克苏地区 2017-2021 年 564 例病毒载量检测失败原因分析

许铭玉 李 虎 董 伟 邢雪岩 王小琴 杜小燕 卢 娣 冯疆涛

阿克苏地区疾病预防控制中心 新疆阿克苏 843000

【摘要】目的 分析 Roche Cobas TaqMan 系统检测 HIV-1 血浆病毒载量失败的原因,为基层实验室开展病毒载量检测提供参考。方法 收集本实验室 2017-2021 年期间,温宿县、乌什县、阿瓦提县、柯坪县、拜城县及新和县 6 县的病毒载量结果,根据系统所显示的错误代码进行统计学分析。结果 过去 5 年间,本实验室年检测失败率分别为 1.83%、1.34%、3.72%、6.02%和 7.81%,每一年导致检测失败的原因差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。分析系统所显示的错误代码表明,样本质量与平衡室温是主要影响因素,在全部的失败案例里占比分别为 62.02%、20.38%,阿瓦提县、拜城县和新和县所送样本质量较差。结论 除了仪器定期保养和维护,县级艾滋病实验室一定要严格遵守采样和分离规定,保证样本质量。

【关键词】Roche Cobas Taqman HIV-1 检测系统;病毒载量;检测失败;样本质量

Analysis of the reasons for the failure of viral load detection in 564 cases in Aksu region from 2017 to 2021
XuMingyu, Lihu, Dongwei, XingXueyan, WangXiaoqin, DuXiaoyan, Ludi, FengJiangtao
Aksu Regional Center for Disease Control and Prevention, Aksu Xinjiang 843000

Abstract: Objective To analyze the reasons for the failure of Roche Cobas TaqMan system to detect HIV-1 plasma viral load, and to provide reference for primary laboratories to carry out viral load detection. Methods The viral load results of 6 counties in Wensu County, Wushi County, Avati County, Keping County, Baicheng County and Xinhe County were collected in our laboratory from 2017 to 2021. According to the error code displayed by the system Statistical analysis was performed. Results In the past 5 years, the annual test failure rates of our laboratory were 1.83%, 1.34%, 3.72%, 6.02% and 7.81%, respectively, and the reasons for test failures in each year were significantly different ($P < 0.05$). The error code displayed by the analysis system shows that sample quality and equilibrium room temperature are the main influencing factors, accounting for 62.02% and 20.38% of all failure cases respectively. The samples sent by Awati County, Baicheng County and Xinhe County Poor quality. Conclusion In addition to regular maintenance and maintenance of instruments, county-level AIDS laboratories must strictly abide by the regulations on sampling and separation to ensure the quality of samples.

Key words: Roche Cobas Taqman HIV-1 detection system; viral load; test failure; sample quality

艾滋病防治工作一直是本地区的工作重点与难点,目前防治形势依然严峻,选取简便有效的检测手段来辅助治疗和监测病情十分必要。HIV-1 核酸检测是目前常用方法之一,用聚合酶链式反应 (PCR) 检测系统评价 HIV 在体内生存状态的方法,即病毒载量测定法 (VL)^[1],可用于 HIV 感染诊断、血液筛查、病程评估及抗病毒治疗效果监测^[2-5],是艾滋病防治工作进程中重要的一部分。

在我国 HIV-1 病毒载量的实验室,罗氏或雅培等进口仪器及试剂检测占有一定比例,因 Roche Cobas Taqman HIV-1 检测系统自动化程度高、域值广、稳定性好,被认为是领域内的金标准。本实验室经长期操作,发现该系统检出率达不到 100%,影响了 3 个“90%”的 HIV/AIDS 防治目标的实现进程,同时也存在一定数量的试剂浪费。因此,有必要对 HIV-1 病毒载量检测的影响因素进行分析。

1 材料与方法

1.1 样本来源 自 2017 年至 2021 年五年间,温宿县、乌什县、阿瓦提县、柯坪县、拜城县及新和县 6 个县艾滋病实验室送至本中心确认实验室进行病毒载量检测的 HIV-1 感染者/AIDS 患者血浆样本。

1.2 仪器与试剂 使用 COBAS TaqManHIV-1Test 检测试剂,利用核酸分离纯化仪 (COBAS AmpliPrep) 提取核酸,再用 PCR 分析系统仪 (COBAS TaqMan48) 展开目的核酸扩增检测,以上仪器和试剂均为 Roche 公司提供。

1.3 检测原理 实时荧光定量聚合酶链式反应 (RT-PCR)

1.4 检测失败判定标准 当样本的检测结果显示为 Failed 或 Invalid,则判定为检测失败。按照系统的显示代码对检测失败情况进一步细分,Failed 主要包括以下五种情况,即 SAMPLECLOT, NOSAMPLE, A/D_ABORT, PREP_ABORT 和 REAG_ERROR; Invalid 则包括 QS_INVALID, DATA_ERROR, SYS_ERROR, PRECHECK, A NO_DATA 和 DISP_ERROR 六种情况。进一步查找代码原因, SAMPLECLOT 和

NO_SAMPLE 为 RNA 提取过程的报错,且前者是由样本质量问题所导致,后者则是因为人员操作不当导致, QS_INVALID 是扩增过程中的报错,表示扩增过程受到了抑制,可能与样本有关,也可能是受到试剂或耗材影响。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,使用 Fisher's 精确检验对各组间差异性进行分析 (存在理论数频数 < 5), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测失败率 2017-2021 年,本实验室采用 COBAS TaqMan48 系统进行 HIV-1 型病毒载量检测,检测样本量总计为 11061 份,其中检测失败为 564 份 (5.10%),其构成比可见图 1。按年度进行区分,5 年间每年样本的检测量分别是 872 例、1265 例、2718 例、3055 例、3151 例,失败率则分别为 1.83% (16 例)、1.34% (17 例)、3.72% (101 例)、6.02% (184 例)、7.81% (246 例),且 2021 年最高,2018 年最低,总体波动不明显,每年均未达到 100%成功检出的目标。

2.2 失败信号分布 对不同年份失败原因进行 Fisher's 精确检验,发现导致检测失败的原因各年间差异有统计学意义 ($P < 0.001$),主要以样本质量为主,具体见表 1。

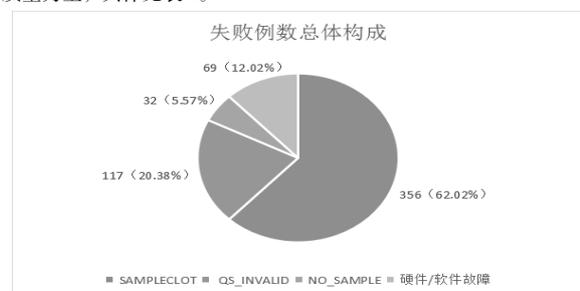


图 1 失败例数总体构成

表 1 不同年份检测失败原因差异性分析 (n, %)

年份	SAMPLECLOT		QS_INVALID		NO_SAMPLE		硬件/软件故障	
	例数	百分比 (%)	例数	百分比 (%)	例数	百分比 (%)	例数	百分比 (%)
2017	7	43.75	2	12.5	4	25	3	18.75
2018	6	35.30	4	23.53	2	11.76	5	29.41
2019	66	65.35	9	8.91	8	7.92	18	17.82
2020	142	77.17	8	4.35	11	5.98	23	12.5
2021	125	50.81	94	38.21	7	2.85	20	8.13
合计	346	61.35	117	20.75	32	5.67	69	12.23

2.3 样本质量地区分布 本实验室接收的血浆样本均由 6 个县市艾滋病实验室工作人员进行抽血、分离、保存和运送。根据近年来各县样本检测失败数与该县送检样本总数之比进行分析, 结果发现阿瓦提县、拜城县和新和县这三个县出现 SAMPLECLOT 报错率排在前三, 具体见表 2。

表 2 全省样本质量导致的检测失败占比 (%)

县市名称	SAMPLECLOT		QS_INVALID	
	失败数	失败率 (%)	失败数	失败率 (%)
温宿县	17	0.76	3	0.14
乌什县	41	2.80	2	0.14
柯坪县	3	0.95	0	0
阿瓦提县	146	5.65	59	2.28
新和县	85	3.19	7	0.26
拜城县	64	3.54	46	2.54
合计	356	3.22	117	1.06

3 讨论

2020 版的《全国艾滋病检测技术规范》中指出, 将核酸检测作为补充实验, 可用于 HIV-1 感染诊断, 包括抗体复检试验有反应和抗体补充试验不确定样本的判定, 急性期和晚期感染者的诊断^[6]。核酸定性试验对实验室条件和操作人员技术水平要求相对较高, 且可能存在假阳性, 故目前优选核酸定量试验, 即血浆 HIV-1 型病毒载量检测。Roche (罗氏) 公司的“Roche AmpliPrep/CobasTaqManHIV-1Test”诊断系统, 由于具备自动化程度高、操作简便、检测下限低 (20copies/ml) 等优势, 被视为病毒载量检测领域内的金标准。TaqMan 系统的样本加样量大 (1ml), 对样本质量要求也较高, 加样样本量不足、样本中凝块以及较高的血脂含量的存在会使检测失败率升高。若无法一次性检出, 则需要重新采样、分离、运送, 若有患者无法及时重新采样, 就会失去每年至少一次免费检测的机会, 不能准确获悉自身病程状况。同时, 配套的试剂成本和耗材价格昂贵, 重复检测也会加大治疗成本的投入。

2017—2021 年, 本实验室每年均有部分样本无法一次性检出, 年检测失败率分别为 1.83%、1.34%、3.72%、6.02%和 7.81%。从仪器报错信号来看, 以 SAMPLECLOT、NO_SAMPLE、QS_INVALID 和仪器故障最为常见, Fisher's 精确检验表明导致检测失败的原因主要以样本质量为主。分析全部的 564 份检测失败样本, 样本质量导致的 SAMPLECLOT 报错率占比达到 63.12%, 追溯其原因, 主要是血浆样本中存在凝块导致机械臂取样时吸头堵塞无法正常取样。采样、分离、运送和保存这些过程都会影响到样本的质量, 即人为因素影响较大, 这也是检测失败率总体呈现

波动的主要原因。分离血浆时离心的转速和离心时长不够、样本的反复冻融以及上机之前未进行样本前处理等都可能致样本中出现凝块。具体比较 6 个县样本的检测结果, 均出现 SAMPLECLOT 报错, 其中以阿瓦提县、拜城县和新和县最为严重, 说明应进一步加强县市级实验室操作人员的业务培训和血浆样本制备的全流程质控管理, 要求严格按照 SOP 进行操作, 尤其是新进人员一定要做好相应的岗前培训。由于仪器的全自动性, 当出现仪器软件或者硬件故障, 检测过程会自动终止, 人工无法干预, 也导致出错点同架后续样本检测失败。这就要求仪器一定要定期维护, 并且按照程序做好日常保养, 使之处于最佳状态。

本实验室检测工作均严格按照标准程序进行操作, 包括仪器的日常维护工作, 定期联系厂家派遣工程师进行仪器的保养, 但仪器老化使得这类偶发性的故障不可避免。NO_SAMPLE 是红外线扫描时在样本液面应有高度处没有扫到, 主要是样本量不足导致, 操作人员应注意加样枪的检定与校准, 以及加样后的检查, 确保样本量达到检测要求。出现 QS_INVALID 报错的原因则比较复杂, 对照 Cobas TaqMan 检测系统操作手册发现, 与患者个体状况, 如高血脂导致血浆中血脂含量过高, 样本分离不规范导致的溶血等有关, 使得扩增反应被抑制。经与厂家工程师沟通探讨, 存放在 4℃冰箱中的检测试剂以及提前制备的样本室温平衡不到位, 也会导致个别样本出现 QS_INVALID 报错。

参考文献:

- [1] 卢志红, 鹿敏红, 刘琪琛, 艾滋病病毒载量检测在疾病诊断和进展评估中的应用[J]. 医学动物防制, 2016, (32) 6: 637-639.
 - [2] Wilson D P, Law M G, Grulich A E, et al. Relation between HIV V viralload and infectiousness: a model-based analysis[J]. Lancet, 2008, 372 (9635): 314-320.
 - [3] Wang S Q, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28 (6): 770-781.
 - [4] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南 (2011 版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4 (6): 321-330.
 - [5] 丁莉莎, 陈曦, 熊晓燕, 等. 一种新型国产试剂检测 HIV-1 病毒载量[J]. 实用预防医学, 2014, 21 (1): 19-21.
 - [6] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范 (2020 年修订版)[S]. 2020.
- 作者简介: 许铭玉 (1991-), 女, 实验师, 硕士研究生, 主要从事 HIV 实验室检测工作。