

HBV-DNA 检测试剂的性能评估与室内质控数据评价

邵璇璇^{1,2}, 管世鹤¹, 杨凯¹, 陈治东¹, 程婉秋¹

摘要 参照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) 文件, 对临床检验使用的实时荧光定量 PCR 扩增检测试剂盒定量结果的精密度、正确度、定量限、线性范围及抗污染性进行评价。同时用乙型肝炎病毒核酸 (HBV-DNA) 试剂盒检测 2016 年 3 月~8 月两个批号的质控血清 HBV-DNA, 并计算质控结果、标准曲线斜率、截距和相关系数的均值 (\bar{X})、标准差 (SD) 和变异系数 (CV)。其中批内、批间精密度 CV 分别为 1.08%~4.41%、2.17%~2.74%, 达到核酸检测试剂盒的国家标准及《医学实验室质量和能力认可准则》中基因扩增检验项目分析性能标准 ($CV \leq 5\%$)。参加 2016 年卫生部室内质评结果总体平均偏倚为 2.03%, 准确度符合卫生部质评要求。相关系数 $r = 0.9999$, > 0.98 , 线性关系符合要求。定量限结果符合 ± 0.5 个对数数量级的要求 (评价中至少 22 次为阳性)。本室 2016 年 3 月~8 月测定的室内质控物结果对数的累积均值 ($\bar{X} \pm 2s$) 为 4.34 (4.20~4.44), 符合参考范围要求。经验证, 实时荧光定量 PCR HBV-DNA 检测试剂盒的各项性能指标以及室内质控结果满足《医学实验室质量和能力认可准则》要求, 可以为临床提供快速、准确的报告。

关键词 实时荧光定量 PCR 仪; 性能评估; HBV-DNA; 室内质控

中图分类号 R 197.39; R 512.62; R 446.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)06-0934-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.06.035

实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 凭着其高度的敏感性和特异性现在已经广泛应用于临床检验中^[1], 这一技术的出现使临床对患者抗病毒治疗及其疗效监测达到了核酸分子水平, 有助于监测患者的疗效与预后。该实验室按照《医学实验室质量和能力的专用要求》(ISO15189) 和中国

医药行业标准核酸检测试剂盒要求, 对正在使用的乙型肝炎病毒核酸 (hepatitis b virus nucleic acid, HBV-DNA) 荧光定量 PCR 检测试剂盒进行性能验证, 从精密度、正确度、定量限等方面进行了全面评估^[2]。虽然实时荧光定量 PCR 是目前核酸定量检测较为理想和便捷的方法之一, 但其结果受模板浓度及扩增反应体系的批间差异影响较大^[3]。因此, 良好的质控方法和质控品对结果的稳定性和可靠性起着重要的作用。该研究检测不同批号的 HBV-DNA 检测试剂的质控物, 并对累计质控数据后进行了评价。

1 材料与方法

1.1 一般材料 收集解放军第 105 医院 2016 年 3 月~8 月的 HBV-DNA 阳性标本, HBV-DNA 浓度 $10^2 \sim 10^8$ IU/ml, 排除丙肝病毒、HIV 病毒等其他病毒感染, 并排除溶血、脂血、黄疸标本。

1.2 仪器与试剂 HBV-DNA 定量检测使用厦门安普利生产的 GeneLight9800 实时荧光定量 PCR 仪, 配合同一公司生产的 HBV-DNA 定量检测试剂盒 (批号: 201603007、201606016) 及 HBV-DNA 标准品 (批号: 201603007、201606016) 与质控品 (批号: 201603007、201606016)。

1.3 统计学处理

1.3.1 精密度评估 按照美国临床实验室标准化委员会 (CLSI) EP-45A 文件, 将浓度为 10^8 IU/ml 的阳性标本用不含 HBV-DNA 的阴性血清稀释至 10^7 IU/ml 和 10^3 IU/ml, 以 10^7 IU/ml (高值血清) 和 10^3 IU/ml (低值血清) 作为检测样本, 批内精密度使用 HBV 定量检测试剂盒连续提取 20 次, 加上标准品、室内质控和阴性对照, 计算检测均值 (\bar{X}) 和标准差 (standard deviation, SD), 得出批内变异系数 (coefficient of variation, CV) 值。批间精密度是将高低浓度样本各连续检测 4 d, 每批试验重复检测 5 次, 分别统计两种浓度样本 20 次检测值, 计算 \bar{X} 和 SD 值, 得出批间 CV 值, 统计分析批内和批间的 SD 和 CV 值。

1.3.2 准确度评估 对 2016 年上半年参加的卫生

2017-02-13 接收

基金项目: 安徽省卫生和计划生育委员会科研计划项目 (全科医学临床科研课题) (编号: 2016QK014); 安徽医科大学第二附属医院首批“火花计划”科研项目 (编号: 2015hhjh06)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

² 解放军第 105 医院检验科, 合肥 230031

作者简介: 邵璇璇, 女, 硕士研究生;

管世鹤, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shihéguan@126.com

部室间质评检测 2 次,采用室间比对的方法,对结果进行总体评估,计算偏倚。

1.3.3 定量限验证 以试剂盒提供的 HBV 定量 10^3 浓度标准品作为基础样本,使用阴性血清对其进行稀释,至终浓度为 500 IU/ml。连续检测 25 次,共使用二批试剂进行检测。计算每次检测结果的对数数量级是否符合 ± 0.5 。

1.3.4 线性范围验证 将临床高浓度标本 10^8 IU/ml 标本用不含 HBV-DNA 的阴性血清分别稀释到 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 IU/ml。用 HBV-DNA 定量试剂盒对高浓度和稀释后浓度标本同批次检测 2 次,每批实验均带质控品及标准品。以样本浓度的预期对数值为横坐标,实测对数值为纵坐标,做线性回归及相关性分析。同时以标本浓度的对数值为横坐标,CT 值为纵坐标,做线性回归及相关性分析。

1.3.5 抗污染实验 将实验室进行彻底消毒后,用高浓度标本(10^8)与阴性血清交替依次排列布满整板,放入 PCR 扩增仪进行扩增,实验结束后不进行清洁工作,直接开始第二轮实验,第二轮实验阴阳性标本排列顺序与第一轮互换。计算阴性血清的检出率。

1.3.6 室内质控 质控物保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,实验前充分复溶并和待测样本同等条件下处理,进行核酸的提取与扩增。

2 结果

2.1 HBV-DNA 精密度结果 HBV-DNA 检测试剂盒的精密度检测结果见表 1,符合核酸检测试剂盒国家标准及《医学实验室质量和能力认可准则》中基因扩增检验项目分析性能标准。且从结果可知,批内精密度高浓度优于低浓度。

表 1 HBV-DNA 核酸检测试剂盒精密度验证结果

| HBV-DNA 浓度 (IU/ml) | 批内 | | 批间 | |
|-----------------------|------|--------|------|--------|
| | SD | CV (%) | SD | CV (%) |
| 10^3 | 0.15 | 4.41 | 0.09 | 2.74 |
| 10^7 | 0.08 | 1.08 | 0.15 | 2.17 |

2.2 HBV-DNA 准确度结果 2016 年上半年卫生部室间质评 HBV-DNA 定量检测结果见表 2。本次参加 2016 年上半年 HBV-DNA 定量室间质评活动平均偏倚为 2.03%,室间质评得分为 100 分,符合卫生部质评要求(偏倚不超过 8%),验证通过。

2.3 定量限验证 对 HBV-DNA 检测试剂盒的灵敏度验证结果见表 3,符合核酸检测试剂盒国家标

准(25 次检验中至少 22 次检测结果符合 ± 0.5 个对数数量级)。由图 1 可知,两个批号检出的结果偏差均在 ± 0.5 的范围内,符合要求。

表 2 2016 年上半年卫生部室间质评 HBV-DNA 定量统计结果

| 编号 | 本实验结果 | 卫生部靶值 | 偏倚 (%) | 评价结果 |
|------|-------|-------|--------|------|
| 1611 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 通过 |
| 1612 | 5.58 | 5.52 | 1.0 | 通过 |
| 1613 | 4.84 | 4.46 | 8.5 | 通过 |
| 1614 | 5.28 | 4.99 | 5.8 | 通过 |
| 1615 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 通过 |
| 1611 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 通过 |
| 1612 | 5.53 | 5.52 | 0.2 | 通过 |
| 1613 | 4.53 | 4.46 | 1.6 | 通过 |
| 1614 | 4.83 | 4.99 | 3.2 | 通过 |
| 1615 | 0.00 | 0.00 | 0.0 | 通过 |

表 3 HBV-DNA 核酸检测试剂盒定量限验证检测结果

| 批号 | 检出次数 | 检验总数 | 阳性率 (%) | 评价 |
|-----------|------|------|---------|----|
| 201603007 | 22 | 25 | 88 | 符合 |
| 201606016 | 22 | 25 | 88 | 符合 |

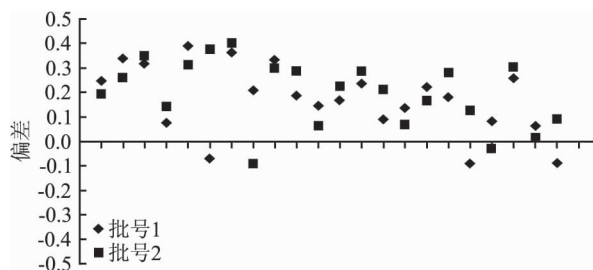


图 1 HBV-DNA 核酸检测试剂盒定量限验证偏差结果

注:以 500 IU/ml 浓度对数值为靶值 22 次检测结果对数值均在 ± 0.5 内,以序列号为 X 轴,偏差为 Y 轴;批号 1:201603007;批号 2:201606016

2.4 线性范围验证 以标本浓度的对数值为横坐标,CT 值为纵坐标,相关系数 $r = 0.999\ 9$, > 0.98 ,符合要求(图 2A)。同时以标本浓度的预期对数值为横坐标,实测对数值为纵坐标,相关系数 $r = 0.995\ 8$,符合线性要求(图 2B)。由于本实验室血清 HBV-DNA 定量测定选取的浓度为 $5.0 \times 10^2 \sim 1.10 \times 10^8$ IU/ml,在验证的范围 $5.0 \times 10^2 \sim 1.10 \times 10^8$ IU/ml 线性较好,线性范围上限较厂家给定的线性范围 $5.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ IU/ml 要窄。

2.5 抗污染实验 将实验室彻底消毒后进行实验,两次实验阴性标本的检出率均为 100%,说明未受到高浓度阳性标本的污染,抗污染能力较好。

2.6 质控数据累积评价 2016 年 3 月~8 月使用了 2 个批号共 80 次的质控检测,80 次的质控累积

结果统计见表4。其中,室内质控参考值如下:室内质控结果对数的靶值为4.35,SD为0.11,CV为2.53%, $\bar{X} \pm 2s$ 范围为4.13~4.57。2016年3月~8月测定的室内质控结果对数累计为4.34, $\bar{X} \pm 2s$ 范围为4.20~4.48,符合参考值范围。且所有质控值均在参考值范围内,没有超出失控限。

将两个批号的质控品结果的常用对数、标准曲线斜率、截距和相关系数相对应的SD和CV进行t检验,结果表明:不同批号质控结果、SD、CV及标准曲线斜率、截距存在显著差异,见表5。

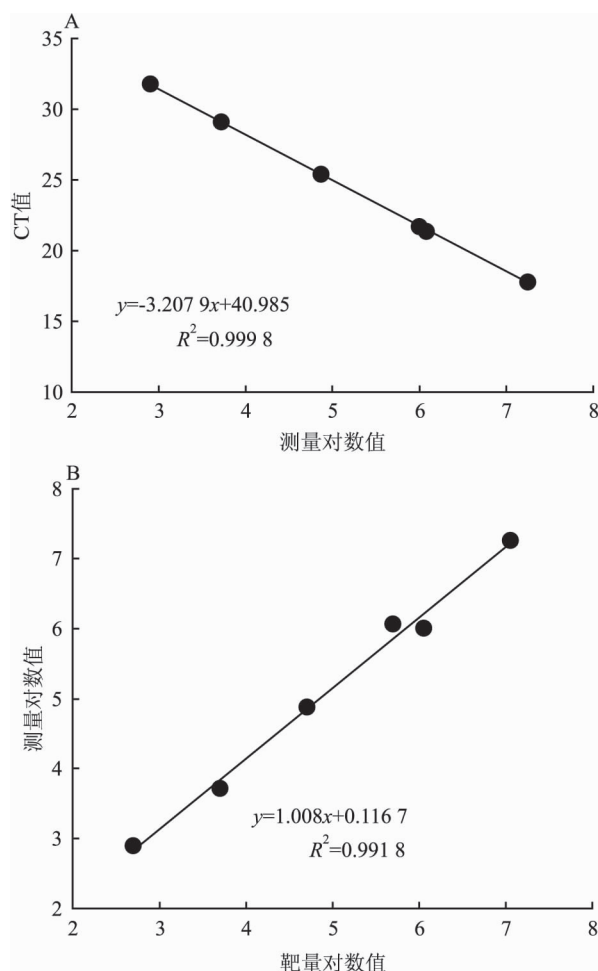


图2 HBV-DNA检测试剂盒检测线性范围验证

A:检测值与检测CT值散点图;B:样本靶值与检测值散点图,样本靶值与检测值均取以10为底对数

表4 HBV-DNA质控的累积结果分析(n=80)

| 项目 | \bar{X} | SD | CV(%) |
|---------|-----------|-------|-------|
| 质控品结果对数 | 4.340 | 0.070 | 2.000 |
| 相关系数 | 0.998 | 0.003 | 0.250 |
| 斜率 | -3.594 | 0.186 | 5.460 |
| 截距 | 41.289 | 1.288 | 3.120 |

表5 两个批号质控品间的分析

| 项目 | 质控结果 | | P值 |
|----------------|--------------|--------------|------|
| | 批号:201603007 | 批号:201606016 | |
| \bar{X} (对数) | 4.350 | 4.330 | 0.01 |
| SD | 0.080 | 0.060 | 0.01 |
| CV(%) | 1.930 | 1.380 | 0.01 |
| 相关系数 | 0.997 | 0.998 | 0.94 |
| 斜率 | 3.400 | 3.980 | 0.01 |
| 截距 | 41.660 | 40.910 | 0.03 |

3 讨论

随着检验医学的发展及医学实验室管理对质量要求的提高,检测系统的性能起着重要的作用。虽然试剂厂家已经提供了检测性能的初步参数,但在检验分析过程中检测患者标本及发送检验报告前仍需对其检测性能进行评估。如此,既可保证检验质量,也是实验室认可的必须要求^[4]。

与其他项目相比,PCR定量试验项目的数据都呈偏态分布,把数值进行转化成正态分布的数据后才能应用正态分布的统计方法,本研究把原始数据进行以10为底的对数转化后进行各种统计分析^[5]。经过对核酸试剂盒的性能进行评估,表明解放军第105医院采用的厦门安普利的HBV-DNA检测试剂盒的各项性能如精密度、准确度、定量限、线性范围等均符合要求,可满足于临床检测要求。虽然定量限验证符合要求,但是其阳性率没有达到100.00%,可能是由于标本稀释过程中未充分混匀或稀释时部分液体残留在管壁,导致个别稀释后样本检测不到,也有可能是由于采用不含HBV-DNA的阴性患者血清存在基质效应,对低浓度影响较大,未来可考虑使用专用血清样本稀释液或小牛血清,以提高低浓度样本检测准确性。另外,由于本实验室血清HBV-DNA定量测定选取的浓度范围是 $5.0 \times 10^2 \sim 1.10 \times 10^8$ IU/ml,在验证的范围 $5.10 \times 10^2 \sim 1.10 \times 10^8$ IU/ml内为线性,上限较厂家给定的线性范围 $5.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ IU/ml窄。由于缺少高值样本,对靠近上限的范围验证不足,故后期会进一步取材验证。

同时,对2016年3月~8月由试剂厂家提供的质控品进行检测,数据累计后进行评价,其所有质控结果均在控,及位于 ± 2 SD范围之内,符合要求。说明该质控品批内性质稳定,而且在整个核酸提取及扩增过程中,质控品标准品与待测样本在相同条件下检测,使得批内重复性和精密度得到了保证,从而确保临床测定过程及结果在偏差和精密度方面达

到预定的标准^[6-7]。但是不同批次试剂及质控品间的部分参数存在一定差异,从表5可以看出,两批质控间质控 \bar{X} 、SD、CV及标准曲线斜率、截距存在显著差异,但因SD非常小,故尽管差异显著,但实际结果差别仍然很小。总的来说,室内质控批内差异很小,而批间差异受模板浓度、PCR反应体系影响较大,重复性相对较差,故需要使用配套的试剂及其质控品。验收试剂时注意试剂与质控品的质量,注意保存,注意日常的操作。

由于PCR极易受人员操作、试剂质量、提取方法等因素影响导致DNA模板发生丢失,扩增效率降低,故受模板浓度、PCR反应体系的批间差异影响较大,重复性较差^[3],所以在检测过程中更要注重试剂验收时试剂与质控品的质量、试剂质控品的配套使用。另外,在80次质控结果中有若干个结果处于警告状态,经排除试剂质量、人员操作提取核酸过程中的可能影响后^[8],确定为仪器的若干孔位清洁度不够要求,经过清洗,重新测试检测后,问题得到解决^[1]。

综上所述,本实验室所使用的HBV-DNA检测

系统精密度、准确度、线性范围等性能良好,质控品批内性质稳定,可满足于临床需求,也符合医学实验室质量和能力认可要求。

参考文献

- [1] 祁金友,樊卫.实时荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA室内质控累积数据的评价[J].检验医学与临床,2011,8(15):1845-6.
- [2] 巢薇.ABI 7300实时荧光定量PCR仪的性能评估[J].国际检验医学杂志,2015,36(4):494-5.
- [3] 苏荣,谢小梅.实时荧光定量聚合酶链式反应室内质控方法的研究[J].南方医科大学学报,2010,30(7):1752-3.
- [4] 陈渊博,郑文婷,尹志军,等.CA7000全自动凝血仪性能验证[J].国际检验医学杂志,2013,34(2):209-11.
- [5] 庞志宇,谢在春,刘玥,等.HBV-DNA定量检测试剂盒性能验证[J].检验医学与临床,2015,12(17):2530-1.
- [6] 李美兰,杨旭,胡莹.HBV-DNA定量检测的室内质控分析[J].海南医学,2010,21(18):107-8.
- [7] 郭向华,黄雁翔,靳海英,等.HBV-DNA荧光定量PCR室内质控分析[J].中国卫生检验杂志,2010,20(2):437-8.
- [8] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006.

Performance verification and evaluation of cumulative internal quality controls data of HBV-DNA reagent kit

Shao Xuanxuan^{1,2}, Guan Shihe¹, Yang Kai¹, et al

(¹Dept of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601;

²Dept of Clinical Laboratory, The 105th Hospital of People's Liberation Army, Hefei 230031)

Abstract HBV-DNA reagent kit was used to assess the precision, accuracy, limit of quantitation and linear range according to the United States of America Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The HBV-DNA internal control sera were collected from March to August in 2016, and the mean value (\bar{X}), standard deviation (SD) and coefficient variability (CV) of internal control results, slope rate, intercept and correlation coefficient of standard curves were calculated. The intra-assay precision coefficient of variation and inter-assay precision coefficient of variation are 1.08% ~ 4.41% and 2.17% ~ 2.74%, respectively. Both of them achieve the performance analysis standard of gene amplification test project regulated by Medical Laboratory Quality and Competence Accreditation Criteria. The overall mean bias in of Ministry of Health External Quality Assessment (EQA) was 2.03% in the first half of 2016, and the accuracy met the requirements of the Ministry of Health. The correlation coefficient is 0.9999, the linear range met the requirement. High concentration serum was diluted to 500 IU/ml with negative serum and 22 of them were detected positive in 25 continuous assays, the limit of quantitation achieved the limit requirement. The cumulative mean ($\bar{X} \pm 2s$) of internal controls' logarithm was 4.34 (4.20 ~ 4.48) falling within the reference range during March to August in 2016. It is verified that the technical performance of HBV-DNA reagent kit and the results of the internal quality control in our hospital fulfilled the requirement of Medical Laboratory Quality and Competence Accreditation Criteria, and established the basement for providing instant and accurate clinic reports.

Key words real time fluorescent quantitative PCR; performance verification; HBV-DNA; internal quality control