

HBV-DNA 定量检测试剂盒性能验证

庞志宇, 谢在春, 刘 玥, 郭卫真, 张战锋(广州中医药大学第一附属医院检验科, 广州 510405)

【摘要】 目的 验证和评价一种新采购的 HBV-DNA 定量检测试剂盒的分析性能。**方法** 依据美国临床和实验室标准化协会颁布的 EP 系列文件和《医学实验室质量和能力认可准则》相关文件对试剂盒的精密度、正确度、线性范围、检测下限和不同检测试剂的一致性进行性能评价。**结果** 试剂盒的低值和中值的批内精密度 CV 为 3.2%、3.4%, 总精密度 CV 为 4.6%、3.7%; 正确度符合要求; 线性回归方程为 $Y=0.958X+0.355$, $r^2=0.999$, $P<0.001$, 线性范围为 $(1.48 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^8)$ U/mL; 检测下限为 500 U/mL; 与原有检测试剂之间结果无差异。**结论** 新试剂盒的性能符合厂家声明, 能够应用于临床工作。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 荧光定量 PCR; 性能验证

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.17.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)17-2530-03

Performance verification of a hepatitis B virus DNA quantitative detection kit PANG Zhi-yu, XIE Zai-chun, LIU Yue, GUO Wei-zhen, ZHANG Zhan-feng (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510405, China)

【Abstract】 Objective To verify and evaluate the performance characteristics of a newly purchased HBV-DNA quantitative detection reagent kit. **Methods** According to the EP series of document issued by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and the Accreditation Criteria for the Quality and Competence of Medical Laboratories, the precision, correctness, linear range and lower detection limit of the reagent kit and its consistency with different detection reagents were performed. **Results** The low value and middle value intra-assay precision CV were 3.2% and 3.4% respectively, total precision CV were 4.6% and 3.7% respectively; the correctness was within acceptable range; the linear regression equation was $Y=0.958X+0.355$, $r^2=0.999$, the linearity range was $(1.48 \times 10^3 - 1.48 \times 10^8)$ U/mL; the low limit of detection was 500 U/mL; compared with original detection reagent kit, the detection results had no difference. **Conclusion** The new reagent kit has the performance according with the statement of manufacturer and can be used in clinical work.

【Key words】 hepatitis B virus; real-time PCR; performance verification

根据《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189:2012, IDT)5.3.2.3 每当试剂盒的试剂组分或试验过程改变, 或使用新批号或新货运号的试剂盒之前, 应进行性能验证^[1]。美国临床和实验室标准化协会 (CLSI) EP 系列文件中列出了性能验证的内容和方法^[2-4]。广州中医药大学第一附属医院检验科新采购一种 HBV-DNA 荧光定量检测试剂盒, 为确认试剂盒的性能参数符合要求, 以上述文件为依据, 对新采购的试剂盒进行性能验证, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 HBV-DNA 低值 GBW(E)090137(批号: 201403, 浓度水平 S5)和中值 GBW(E)090138(批号: 201403, 浓度水平 S4)质控品购自北京康彻思坦公司; 2014 年国家卫计委临床检验中心室间质评样本, 代码为 1411、1414、1421、1423、1425, 一系列本科室收集的临床标本, 所有标本均 -20℃ 保存。

1.2 仪器 ABI7500 荧光定量 PCR 仪、Sigma3-15K 高速冷冻离心机、杭州奥盛干式恒温器。

1.3 试剂 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒 (careHBV PCR ASSAY) 和乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒 (careHBV PCR ASSAY V2) 均购自凯杰生物工程 (深圳) 有限公司, Gibco 小牛血清。

1.4 方 法

1.4.1 精密度评估 参照 EP15-A 文件^[2]。取 HBV-DNA 低值和中值两个水平质控品, 每天分析一个批次, 每个水平重复测定 5 次, 连续测定 4 d, 每个水平累计得到 20 个数据。参考文献^[5], 计算批内精密度 ($CV_{批内}$) 和总精密度 ($CV_{总}$)。

1.4.2 正确度评估 检测国家卫计委临床检验中心 2014 年全国室间质评活动阳性标本 5 个, 按照国家卫计委临床检验中心的判断标准, 结果落在靶值 ± 0.4 Log 值为通过, 5 个标本至少有 4 个通过为符合要求。

1.4.3 线性范围验证 参照 EP6-A 文件^[3]。取本室收集的 HBV-DNA 高值标本, 用小牛血清进行系列梯度稀释 (1:10、1:100、1:1000...) 至厂家声明的线性范围下限, 每个浓度标本重复检测 1 次, 计算线性相关系数和线性范围, $r^2 > 0.95$ 为符合要求。

1.4.4 定量检测下限验证 取全国室间质评样本 1423, 用小牛血清进行梯度稀释, 稀释至厂家声明的检测下限, 重复检测 10 次, 至少有 9 次检出为符合要求。

1.4.5 与原有检测方法的一致性检验 参照 CNAS-CL36 文件^[4], 选取本室的临床样本 20 份, 样本浓度尽量覆盖线性范围, 再用新试剂检测, 收集后 3 d 内完成检测。参考文献^[5],

对两次检测结果进行相关回归分析,计算 r^2 值,并检测回归方程的系数 a 和截距 b 分别与 1 和 0 之间的差异是否有统计学意义。

1.4.6 质控 每次试验都做室内质控,室内质控在控,结果有效,否则重新检测。

1.5 统计学处理 所有数据先进行以 10 为底的对数转换,然后进行统计学计算。采用 SPSS13.0 软件对数据进行处理及统计学分析。一致性检验参考文献[6]。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV-DNA 精密度评估结果 精密度性能验证结果见表 1。HBV-DNA 低值和中值的批内和 $CV_{总}$ 分别为 3.2%、4.6% 和 3.4%、3.7%,小于厂家声明的 10%, $CV_{批内}$ 和 $CV_{总}$ 均符合厂家声明。

表 1 HBV-DNA 精密度评估结果

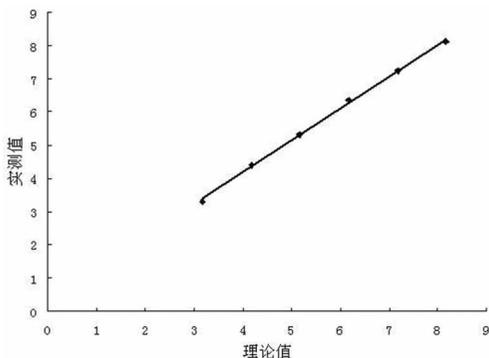
项目	HBV-DNA 低值	HBV-DNA 中值
$\bar{x}_{总}$	3.395	4.744
$S_{批内}$	0.110	0.161
$CV_{批内}(\%)$	3.2	3.4
$S_{总}$	0.157	0.177
$CV_{总}(\%)$	4.6	3.7
厂家声明 $CV(\%)$	10	10

2.2 HBV-DNA 正确度评估结果 正确度评估,结果见表 2。其中 5 个标本有 4 个通过,结果符合要求。

表 2 HBV-DNA 正确度评估结果

样本编号	检测值	靶值	允许范围	结论
1411	4.9	5.4	5.0~5.8	未通过
1414	3.8	4.1	3.7~4.5	通过
1421	4.59	4.88	4.48~5.28	通过
1423	4.19	4.58	4.18~4.98	通过
1425	3.95	3.85	3.45~4.25	通过

2.3 线性范围验证 本研究收集到的最高浓度的标本为 1.48×10^8 ,对其连续 10 倍稀释来进行线性范围的验证,得到的线性范围是 $(1.48 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^8)$ U/mL,在厂家声明的 $(1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9)$ U/mL 范围内。见图 1。

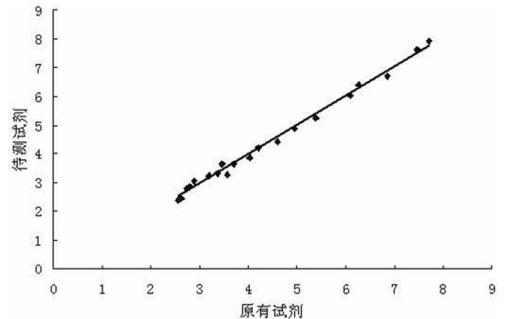


注:HBV-DNA 线性范围验证回归方程: $Y=0.958X+0.355, r^2=0.999$,线性范围 $(1.48 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^8)$ U/mL, $P < 0.05$ 。

图 1 线性范围验证回归曲线

2.4 检测下限验证 检出例数为 10 例,要求检出例数不低于 9 例,厂家声明 HBV-DNA 检测下限为 500 U/mL。10 个标本全部检出,符合厂家声明。

2.5 与原有检测方法的一致性检验 通过计算与原有检出方法的相关回归曲线,检测回归方程的系数 a 和截距 b 分别与 1 和 0 之间的差异是否有统计学意义,结果显示系数 a 95% 的置信区间包括 1,截距 b 95% 的置信区间包括 0,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),待验证的试剂与原有试剂结果一致。见图 2。



注:HBV-DNA 一致性验证回归方程: $Y=1.019X-0.108, r^2=0.990$,系数 a 95% 的置信区间为 $(0.974, 1.064)$,截距 b 95% 的置信区间为 $(-0.323, 0.107)$ 。

图 2 HBV-DNA 一致性验证

3 讨论

我国是 HBV 感染的高发国家,HBsAg 携带率为 7.18%,慢性乙型肝炎患者约 2 000 万例。HBV-DNA 定量检测是慢性 HBV 感染诊断、治疗适应证的选择及抗病毒疗效判断的重要指标。因此 HBV-DNA 定量检测试剂盒性能符合要求对慢性乙肝的诊疗有重要意义。CNAS 文件要求,新试剂和新项目必须进行性能验证,CLSI 的 EP 系列文件对临床化学设备的方法学评价作出了明确的要求,但是对分子生物学领域尚未作出说明,本研究在参考 CNAS-CL36 文件,以上述文件为依据的前提下,制定了新引进的 HBV-DNA 定量检测试剂盒进行了性能验证方案。

与其他检验项目相比,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,这与文献的报道一致[7-8]。

精密度反映检测结果的重复性[9]。本研究检测出的数据显示:HBV-DNA 低值和中值的批内分别为:3.2% 和 3.4%, $CV_{总}$ 分别为 4.6% 和 3.7%,小于厂家声明的 10%。

准确度是检验项目性能验证的重要内容。EP-15-A2 给出了准确度的验证方案。一种方案是用新方法与比对方法同时检测患者标本,第二种是使用参考物质。对于第一种方案,目前 PCR 检测项目大都没有国际公认的试验方法,对于 HBV-DNA 定量,罗氏公司的 Cobas 检测系统是相对认可度比较高的检测系统,但是目前国内应用该检测系统的实验室数量有限,标本不易获得。第二种参考物质,可以是国际或国家标准物质、室内质评物质等具有定值的标准物质。本次试验采用的是国家卫计委临检中心发放的室内质评物作为标准物质,结果在靶值 ± 0.4 Log 内作为正确的标准。作者检测了 2014 年全国室内质评的 5 个阳性标本,结果有 4 个通过,达到了要求。作者发现第一次质评 1 个标本未通过,1 个虽然通过,但是比靶值低,这可能与第一次质评标本放置过久和反复冻融有关。

线性范围指标本不需要任何预处理可以检测出待测物的浓度范围。用于线性范围验证的标本应尽可能覆盖整个线性范围^[10]。厂家声明的线性范围为 $(1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9)$ U/mL,但是本研究收集到的最高浓度的标本为 1.48×10^8 U/mL,本研究就以这个标本为线性范围的上限,然后用小牛血清进行稀释至线性下限,结果表明在 $(1.48 \times 10^3 \sim 1.48 \times 10^8)$ U/mL 的范围,线性回归方程的 r^2 为 0.999, $P < 0.05$,证实检测系统在这个浓度范围呈线性。收集更高浓度的标本,对线性范围进行重新验证,有待进一步验证。

根据 CNAS-CL36 文件,检测下限是 25 个标本能检出 22 个的浓度值。由于参考物质难以获得,选用了 2014 年第二次全国室间质评物质进行梯度浓度稀释。厂家声明的检测下限为 500 U/mL,本研究以 10 个标本检出不小于 9 个为判断标准。检测的结果为 10 个标本全部检出,符合设定的判断标准。认为与厂家声明的检测下限一致。

本研究按照文献[6]的报道,对用不同检测试剂检测的 20 个样本进行相关回归分析,然后检测系数 a 和截距 b 与 1 和 0 是否有统计学意义,结果显示 a 和 b 95% 的置信区间分别包括 1 和 0,说明在 $P = 0.05$ 的检验水平下,两者差异无统计学意义,说明两种不同检测试剂的结果一致。也有文献[11]采用 Bland-Altman 法评价不同检测系统的一致性,本研究采用了两种方法进行了比较,发现效果是一致的。

目前在临床上,性能验证主要集中在生化、免疫、临检等领域,在分子生物学领域目前尚未有权威机构发布性能验证的方案。由于 PCR 技术步骤繁琐,手工操作多,并且高浓度标本和标准品难以获得,性能验证方法的程序及方法常常困惑着临床工作人员。本实验室参考其他领域性能验证的方法,对新试剂盒的精密度、正确度、线性范围、检测下限和一致性进行了验证,结果表明,新试剂的性能和厂家声明的一致,检测结果可以接受,可以达到应用于临床,也为分子生物学领域进行性能验证提供了一种思路。

参考文献

[1] CNAS-CL02. 医学实验室质量和能力认可准则

(上接第 2529 页)

- 的国民保健工程[J]. 中国实用内科学, 2010, 30(11): 965-967.
- [2] 张岩, 霍勇. 伴同型半胱氨酸升高的高血压——“H 型”高血压[J]. 心血管病学进展, 2011, 32(1): 32.
- [3] 王玉, 丁一妹, 李小鹰, 等. 降低血浆同型半胱氨酸与脑卒中预防[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(2): 209-210.
- [4] Alsulaimani S, Gardener H, Elkind MS, et al. Elevated homocysteine and carotid plaque area and densitometry in the northern Manhattan study[J]. Stroke, 2013, 44(2): 457-461.
- [5] 何素稳, 侯艺威, 李春华, 等. 脑梗死患者血清同型半胱氨酸的增龄性变化[J]. 四川医学, 2011, 32(1): 114-115.
- [6] 王雪茵, 胡永华. 同型半胱氨酸代谢与脑卒中关系研究进展[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(11): 988-992.

(ISO15189)[S]. 2012.

- [2] CLSI. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline-second edition [S]. EP15-A2, 2005.
- [3] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline NCCLS document EP6-A [S]. Wayne, Pa: NCCLS, 2003.
- [4] CNAS-CL36. 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明[S]. 2012.
- [5] 王薇, 王治国, 李少男. 临床实验室对厂家声明的精密度和真实度的性能验证要求[J]. 检验医学, 2010, 25(12): 1001-1005.
- [6] 胡良平. 检验医学科研设计与统计分析[M]. 北京: 人民军医出版社, 2004: 185
- [7] 蒋玲丽, 王雪亮, 王华梁, 等. 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸方法学性能验证程序的探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(5): 321-325.
- [8] 余男, 甘明, 詹希美, 等. 乙型肝炎病毒核酸定量检测中不确定度的研究[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(4): 310-314.
- [9] 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.
- [10] CLSI. Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods[S]. EP6-A2, 2003.
- [11] 秦绪珍, 孙江燕, 韩建华, 等. COBAS Taqman HBV DNA 的方法学验证[J]. 现代检验医学杂志, 2008, 23(1): 29-31.

(收稿日期: 2015-03-15 修回日期: 2015-03-25)

- [7] Pascoe MC, Grewther SG, Carey LM, et al. Homocysteine as a potential biochemical marker for depression in elderly stroke survivors[J]. Food Nutr Res, 2012, 56(4): 83-89.
- [8] 胡盛寿, 孔灵芝. 中国脑血管病报告[M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2006: 11.
- [9] 张曼, 孙宁玲. 如何认识血浆同型半胱氨酸的正常值[J]. 中国脑卒中防治, 2011, 1(1): 23.
- [10] 马丽, 录海斌. 青年急性脑梗死与高同型半胱氨酸血症的相关性探讨[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2012, 15(1): 36-37.
- [11] Yang Q, Botto LD, Erickson D, et al. Improvement in stroke mortality in Canada and the United States, 1990 to 2002[J]. Circulation, 2006, 113(10): 1335-1343.

(收稿日期: 2015-03-18 修回日期: 2015-04-16)