

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.14.012

质控工具在荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 室内质控中的应用*

李育敏,徐 怡,阚丽娟,张水兰,汤花梅,熊 丹,许晓清,张秀明[△]

广东省深圳市罗湖医院集团罗湖区人民医院医学检验科,广东深圳 518001

摘要:目的 探讨质控工具在荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 室内质控中的应用价值。方法 以国家卫生健康委员会临检中心室间质量评价计划(EQA)HBV DNA 项目评价界限(0.4 LOG)作为允许总误差(TEa),并与根据文献报道设定的 TEa (0.95 LOG)比较。以该实验室高、低两个水平室内质控品累积变异系数(CV)作为不精密度的估计值,以参加 EQA 的百分差值作为实验室的偏倚($Bias$)估计,应用标准化方法决定图、Westgard 质控选择表格、标准化操作过程规范(OPSpecs)图及标准化 σ 性能验证图的质控工具来评价方法的性能及选择质控规则,并计算质量目标指数(QGI)。结果 TEa 为 0.40 LOG,高水平室内质控评价方法性能为临界水平;低水平为方法不可接受,高、低两个水平在保证 90%分析质量,质控物测定数为 2 时无合适的质控规则,需增加质控物测定数和检测批次。 TEa 为 0.95 LOG,高、低水平评价方法性能均为优秀,高水平可选择质控规则为 1_{3s} ($N=2, R=1$),低水平可选择 $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$ ($N=2, R=1$)。QGI 提示高水平需改进精确度与精密性;低水平需改进精密性。结论 质控工具可评价 HBV DNA 检测系统的性能,结合 QGI 分析方法性能较差的原因,可指导实验室进行持续质量改进。

关键词:方法决定图; Westgard 质控选择表格; 操作过程规范图; σ 性能验证图; HBV DNA 中图法分类号:R446.9;R-331 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2019)14-1993-04

Investigation on application of quality control tools in the internal quality control of HBV DNA determination by fluorescence quantitation PCR*

LI Yumin, XU Yi, KAN Lijuan, ZHANG Shuilan, TANG Huamei, XIONG Dan, XU Xiaoqing, ZHANG Xiuming[△]

Department of Medical Laboratory, Shenzhen Luohu Hospital Group Luohu People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518001, China

Abstract: Objective To explore the application value of quality control tools in the internal quality control (IQC) of HBV DNA determination by real time fluorescence quantitation polymerase chain reaction (PCR). **Methods** The total allow error (TEa , 0.4 LOG) was based on the acceptable range of HBV DNA item which participated in the clinical laboratory external quality assessment (EQA) of the Ministry of Health and 0.95 LOG based on reference. Define the accumulated in coefficient of variability (CV) of the two levels of laboratory internal quality control as the estimation value of imprecision. Use the percentage difference of EQA scheme as the estimation value of $Bias$. Normalized Method Decision Chart, Westgard quality control selection grids, Normalized OPSpecs Chart and Normalized σ performance verification Chart were used to evaluate the performance of HBV DNA testing and select quality control rules in the laboratory. Quality goal index (QGI) was calculated. **Results** A method with marginal performance was surveyed in high level IQC and poor performance in low level IQC, and no quality control procedure could be selected on the Normalized OPSpecs and σ performance verification Chart for 90% AQA for control rules with $N=2$ when TEa was defined as 0.40 LOG. The number of IQC substance and run must increase. A method with excellent performance was surveyed in high and low level IQC, and 1_{3s} ($N=2, R=1$) single-rule quality control method could be selected in high level IQC, and $1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}$ ($N=2, R=1$) multi-rule quality control method could be selected in low level IQC, When TEa was defined as 0.95 LOG. **Conclusion** Quality control tools can be used to evaluate the performance of laboratory HBV DNA testing. The QGI could be used for investigating of the reason for dissatisfied performance of the testing, and guiding the improvement of clinical laboratory quality.

Key words: Method Decision Chart; Westgard quality control selection grids; OPSpecs Chart; σ performance verification Chart; HBV DNA

* 基金项目:广东省深圳市政府医疗卫生“三名工程”项目(SZSM201601062)。

作者简介:李育敏,女,主治医师,主要从事分子诊断方向研究。 [△] 通信作者, E-mail: zxm0760@163.com。

室内质控(IQC)是临床实验室保证检验结果质量的重要措施。按照 ISO 15189:2012 和 CNAS-CL36:2012^[1], 定量检测质控计划应规定质量要求、确定方法性能及选择合适的质控规则。不同临床实验室应根据实际条件选择适合自己实验室的质控方法。基于标准化方法决定图、Westgard 质控选择表格、标准化操作过程规范(OPSpecs)图及标准化 σ 性能验证图等质控工具评价方法的性能, 并选择适当质控规则及质控物的测定数在临床生化检验室内质控方面发挥了较大作用。而对于临床 PCR 检验, 统计学质控的应用报道较少, 尚需要更多的研究数据来验证。本研究探讨以上质控工具在评价荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 中的性能及在质控规则选择中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器为罗氏 Cobas® z480 荧光定量 PCR 分析仪。试剂为湖南圣湘生物科技有限公司的 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒(批号:2017012)。室内质控品为北京康彻思坦生物技术有限公司的 HBV DNA 标准质控品, 高水平为 $(4.60 \pm 0.06) \times 10^6$ U/mL, 批号为 201609003, 低水平为 $(1.41 \pm 0.03) \times 10^6$ U/mL, 批号为 201607003。按照厂家说明书进行分装, 保存于 -15°C 温度的冰箱。

1.2 方法

1.2.1 允许总误差(TEa)设定 以国家卫生健康委员会临检中心室间质量评价计划(EQA)评价界限(靶值 ± 0.4 LOG 值)作为 TEa, 并参考文献[2]设定 TEa 为 0.95 LOG, 对设定的两种 TEa 进行比较。由于 TEa 以浓度表示, 需通过计算转化为百分数, 计算公式: $(TEa/\text{靶值}) \times 100\%$ 。HBV DNA 项目采用高、低两个水平质控品, 需分别计算 TEa 的百分数。

1.2.2 不精密度及偏倚估计 以本实验室 2017 年 2 月至 2018 年 4 月的高、低两个水平室内质控品累积变异系数(CV)作为不精密度的估计值。以参加临检中心 HBV DNA 项目 2017 年的两次 EQA 和 2018 年第 1 次 EQA 的百分差值(绝对值)的平均值作为实验室的偏倚估计。由于 EQA 评价界限以浓度表示, 需通过计算转化为百分数, 计算方法同 TEa。

1.2.3 标准化方法决定图 按照 Westgard 方法(www.westgard.com), 以不精密度为横坐标, 偏倚为纵坐标, 绘制标准化方法决定图, 并直接采用网站提供的计算工具计算标准化操作点的横坐标值和纵坐标值, 描操作点于方法决定图上, 根据图中操作点的位置评价方法的性能。并计算分析总误差($TE = Bias + 2s/3s/4s$), 与方法决定图结合, 判断方法性能的可接受性。

1.2.4 Westgard 质控选择表格 表格的行为临界系统误差(ΔSE), 描述过程能力, $\Delta SE = [(TEa - |$

$Bias|) / S] - 1.65$; 列为误差发生率(f), 描述过程的稳定性。通过 ΔSE 和 f 查表得出候选质控规则和质控物测定数。

1.2.5 标准化 OPSpecs 图 标准化操作点计算同标准化方法决定图, 描操作点于 Westgard 网站提供的标准化 OPSpecs 图(90% AQA, N=2)上。90% AQA 代表 90% 分析质量保证, N 代表质控物个数。根据图中操作点的位置选择候选质控规则。

1.2.6 标准化 σ 性能验证图 按照 Westgard 方法计算 σ 值, $\sigma = (TEa - |Bias|) / CV$, 其中各参数以百分数表示。由于高、低两个水平室内质控品的 CV% 存在明显差异, 需分别计算其对应的 σ 值。将 TEa、偏倚和 CV% 导入软件(www.CLInet.com), 绘制标准化 σ 性能验证图。根据图中各水平在不同 TEa 时对应点的位置评价方法的性能, 并选择候选质控规则。计算 σ 值未达到 6σ 水平的质量目标指数(QGI), $QGI = Bias / (1.5 \times CV)$ 。 $QGI < 0.8$, 提示导致方法性能不佳的原因主要为精密度超出允许范围, 需优先改进精密度; $QGI \geq 1.2$ 时, 提示方法正确度较差, 需优先改进正确度; $0.8 \leq QGI < 1.2$, 提示正确度与精密度均需改进^[3]。

2 结果

2.1 TEa、不精密度和偏倚 高、低水平室内质控品的 TEa、不精密度及偏倚评估结果见表 1。

表 1 高、低水平室内质控品的 TEa、不精密度和偏倚

水平	x	s	CV (%)	偏倚		TEa	
				LOG	百分数(%)	EQA	参考文献
高	6.57	0.09	1.44	0.11	6.73	0.4	0.95
低	3.16	0.17	5.34	0.11	3.28	0.4	0.95

注: x 为均值; s 为标准差

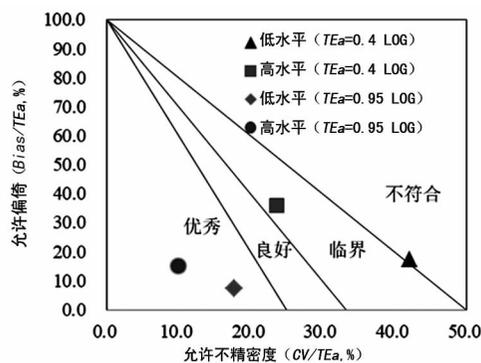


图 1 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 的标准化方法决定图

2.2 标准化方法决定图 如图 1 所示, $TEa = 0.4$ LOG, 高水平室内质控品的标准化操作点的横坐标和纵坐标分别为 23.66% 和 36.08%, 在临界水平; 低水平分别为 42.11% 和 17.32%, 不符合性能要求。 $TEa = 0.95$ LOG, 高水平分别为 9.96% 和 15.19%, 达到优秀水平; 低水平分别为 17.73% 和 7.29%, 达

到优秀水平。TEa=0.4 LOG, 高水平的TE=Bias+3s=0.39<TEa, 方法性能良好; 低水平的TE=Bias+2s=0.30>TEa, 不符合性能要求。TEa=0.95LOG, 高水平的TE=Bias+4s=0.78<TEa, 低

水平的TE=Bias+4s=0.49<TEa, 两个水平均方法性能优秀。

2.3 Westgard 质控选择表格 通过计算ΔSE和f查表得出候选质控规则和质控物测定数, 结果见表2。

表 2 Westgard 质控表格选择荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 的质控规则和质控物测定个数

水平	f(%)	EQA(0.40 LOG)			参考文献(0.95 LOG)		
		ΔSE	单规则	多规则	ΔSE	单规则	多规则
高	4.40	1.05	1 _{3s} , N=2	1 _{3s} /2 _{2s} /R _{4s} /(4 _{1s} W), N=2	6.86	1 _{3s} , N=2	1 _{3s} /2 _{2s} /R _{4s} /(4 _{1s} W), N=2
低	4.40	0.31	1 _{3s} , N=6; 1 _{2s} , N=2	1 _{3s} /2 _{2s} /R _{4s} /4 _{1s} /8 _X , N=2	3.58	1 _{3s} , N=2	1 _{3s} /2 _{2s} /R _{4s} /(4 _{1s} W), N=2

注: f为误差发生率; ΔSE为临界系统误差; N为质控物测定数; W规则用作“警告”规则, 而不是判断失控的规则

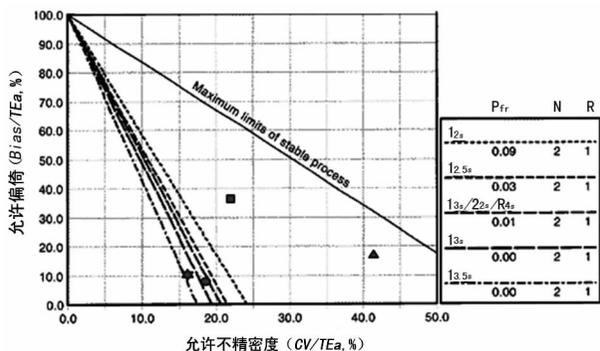
2.4 标准化 OPSpecs 图 高、低水平室内质控品在不同 TEa 的标准化操作点同标准化方法决定图。TEa=0.40 LOG, 高、低水平在标准化 OPSpecs 图(90% AQA, N=2)上均无质控规则可选; TEa=0.95 LOG, 高水平可选择质控规则和质控物测定数为 1_{3s}(N=2, R=1), 低水平可选择 1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}(N=2, R=1), 见图2。

的σ=1.96, 说明方法不可接受, 两个水平均无质控规则可选。TEa=0.95 LOG, 高水平的σ=8.51, 达到6σ水平, 说明方法学性能达到世界一流, 可选择 1_{3s}(N=2, R=1); 低水平的σ=5.23, 说明方法性能优秀, 可选择 1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}(N=2, R=1)。高水平的QGI=1.02, 说明正确度与精密度均需改进; 低水平的QGI=0.27, 说明需优先改进精密度, 见图3。

3 讨论

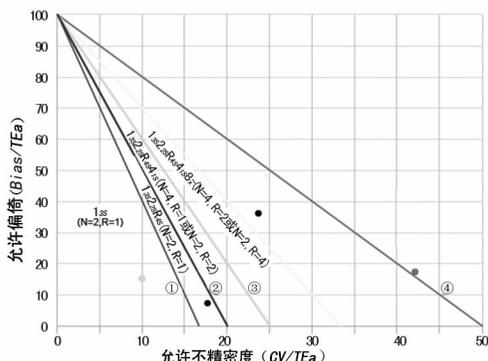
总误差是偏倚和不精密度的代数和, 是能影响分析结果准确度的确定误差的组合, 包括随机误差和系统误差[4]。临床关心检验结果的准确度和实验室判断检测系统分析性能的可接受性是看总误差的大小。本研究首先采用标准化方法决定图、标准化σ性能验证图及计算总误差的大小与 TEa 进行比较3种方式来评价方法性能。根据 EQA 评价界限设定 TEa 为 0.4 LOG 和参考文献[2]设定 TEa 为 0.95 LOG, 将两者比较使用来评估检测系统性能的可接受性。结果表明设定 TEa 为 0.4 LOG 时, 高水平室内质控品评价为方法性能欠佳; 低水平评价为方法不可接受。设定 TEa 为 0.95 LOG 时, 高、低水平评价均为方法性能优秀。由于设定 TEa 为 0.95 LOG 时, 通过计算转换为靶值的百分数过大, 高水平为 30.11%, 低水平为 14.45%, 因此, 该 TEa 对方法性能的判断有待评估。虽然设定 TEa 为 0.4 LOG 时, 高、低水平评价方法性能均较差, 但是本研究结果与文献[2]报道基本一致, 而且累积 CV 为 1.44% (高值) 和 5.34% (低值), 均在 10% 以下, 符合文献[5-7]报道。

本研究以 HBV DNA 检测为例, 采用 Westgard 质控选择表格、标准化 OPSpecs 规范图及标准化σ性能验证图来探讨临床 PCR 检验项目质控规则的选择。质控方法的性能特征包括误差检出概率(Ped)和假失控概率(Pfr), 临床实验室通常要求 Ped 在 90% 以上, Pfr 在 5% 以下。当 ΔSE 高时, 选择低 Ped 的质控规则来降低 Pfr; 当 ΔSE 低时, 需要增加更多质控规则及质控物个数和检测批次来提高 Ped[8-10]。本研究表明设定 TEa 为 0.40 LOG 时, 高、低两个水平在保证 90% 分析质量(90% AQA, N=2)时无合适的质



注: ▲为低水平(TEa=0.40 LOG); ■为高水平(TEa=0.40 LOG); ★为高水平(TEa=0.95 LOG); ●为低水平(TEa=0.95 LOG); Pfr为假失控概率; N为质控物测定数; R为批次

图 2 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 的标准化 OPSpecs 图(90% AQA, TEa100, 0%)



注: ①为高水平(TEa=0.95 LOG); ②为低水平(TEa=0.95 LOG); ③为高水平(TEa=0.40 LOG); ④为低水平(TEa=0.40 LOG); N为质控物测定数; R为批次

图 3 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 的标准化σ性能验证图

2.5 标准化σ性能验证图 TEa=0.40 LOG, 高水平室内质控品的σ=2.7, 说明方法性能欠佳; 低水平

控规则,根据 Westgard 方法,需降低 QA 层次以 50% Ped 作 OPSpecs 规范图,但是 50% Ped 不能满足临床质量要求,因此,本实验室还需增加质控物测定个数和检测批次;设定 TEa 为 0.95 LOG 时,高水平可选择质控规则和质控物测定数为 1_{3s} ($N=2, R=1$),低水平可选择 $1_{3s}/2_{2s}/R_{1s}$ ($N=2, R=1$),与文献[2]报道一致,但由于设定 TEa 为 0.95 LOG 的百分数过大,对质控规则的选择尚待评估。

综上所述,首先,确定合适的 TEa 是 IQC 工作的前提和基础,以临检中心评价界限 0.4 LOG 作为 TEa 无疑是可行的,而本实验室和文献[2]在该界限处的分析性能均未能达到此水平要求。文献[2]以 1.0 LOG 作为 TEa 和本实验室以 0.95 LOG 作为 TEa 评估方法性能均为优秀,并能选出合适的质控规则,但是如果允许检测结果有接近 2 个数量级的误差对于临床是无价值的,因为该检测方法的性能不能满足临床需求。这说明本实验室需要进行质量改进,通过计算 QGI 分析方法性能较差的原因,表明高水平需改进正确度与精密度;而低水平需优先改进精密度。其次,IQC 工作需设定实验室最低的 CV 要求,而如何设置合理的荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 项目的 CV 是临床基因扩增实验室关注的问题。临检中心推荐的 CV 是 5% (大于或等于 10^3 U/mL 的标本)。从本实验室 CV 分析来看,高值在 5.00% 以下,低值为 5.34%,符合文献[5-7]的报道,因此,设定最低 CV 要求为 6%,同时增加质控物测定数,并采用多规则的质控方法。另外,质控工具在临床化学及免疫检验项目的性能评价和室内质控中具有较好的应用价值^[8-10]。而从本研究对方法性能的评价和质控规则选择的数据分析及相关文献来看,统计学质控工具及方法在临床 PCR 检验 TEa 和质量目标的设定、检测系统的性

能评价的应用尚需要更多的研究数据来进行验证。

参考文献

- [1] 中国合格评审国家认可委员会. 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:CNAS-CL36[S]. 北京:中国合格评审国家认可委员会,2012.
- [2] 翁跃颂,裘海文,孙定河,等. 六西格玛质量管理方法在乙肝病毒核酸检测性能评价中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(21):3663-3665.
- [3] KANG F F, ZHANG C B, WANG W, et al. Sigma metric analysis for performance of creatinine with fresh frozen serum[J]. Scand J Clin Lab Inv, 2016, 76(1):40-44.
- [4] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:135-136.
- [5] 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):1845-1846.
- [6] 何晓清. 实时荧光定量 PCR 室内质控方法的探讨[J]. 现代医院,2010,10(7):116-117.
- [7] 蒋玲丽,王雪亮,肖艳群,等. 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 室内质控方法的探讨[J]. 检验医学,2014,29(6):668-671.
- [8] 肖亚玲,王薇,赵海建,等. 西格玛性能验证图在常规化学检测项目性能评价中的应用[J]. 现代检验医学杂志,2016,31(4):159-162.
- [9] 李国柱,张剑宏,关坤萍,等. 内分泌项目性能评价中的标准化西格玛性能验证图应用[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志,2017,5(3):156-159.
- [10] 黄永富,曹兴建. Westgard 网站质控工具在肿瘤标志物室内质控中的应用[J]. 临床检验杂志,2008,26(1):65-68.

(收稿日期:2019-01-14 修回日期:2019-04-06)

(上接第 1992 页)

[M]. 上海:复旦大学出版社,2014:158-162.

- [10] 王晓巍,李迎春,刘铁英. 支气管肺泡灌洗术诊治小儿肺炎 54 例临床分析[J]. 临床军医杂志,2016,44(12):1299-1300.
- [11] 费建荣,朱佳威. 活血祛瘀化痰法对慢性阻塞性肺疾病伴肺心病患者高凝血状态及心肺功能的影响[J]. 中国生化药物杂志,2017,37(6):129-130.
- [12] 赵明丽,王玉忠,张露露,等. COPD 合并肺心病患者血清 hs-CRP、BNP 的含量及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2016,20(10):1670-1672.
- [13] 何六涛,陈华春,余旭舟,等. 米力农注射液治疗肺心病合并呼吸衰竭患者的临床疗效[J]. 中国生化药物杂志,2017,37(2):264-266.
- [14] 游雯,宋阳春,傅锐,等. 丹参川芎嗪注射液联合鼻塞通胶

囊对肺心病患者血液黏稠度的影响[J]. 中国生化药物杂志,2017,37(4):131-133.

- [15] 柴晶晶,朱华栋,于学忠,等. 慢性阻塞性肺疾病评估测试对 COPD 急性加重患者的有效性评估[J]. 中国急救医学,2017,37(2):158-163.
- [16] 陶小华. 有创和无创正压通气对 COPD 急性加重并严重呼吸衰竭患者血浆脑钠肽水平的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(4):973-974.
- [17] 窦培红. 经鼻导管湿化高流量吸氧在呼吸衰竭患者中的应用[J]. 吉林医学,2016,37(9):2371-2372.
- [18] 张敏达,谢林花,朱冬梅,等. 经鼻高流量湿化氧疗在 COPD 患者中的应用效果[J]. 中华现代护理杂志,2018,24(11):1335-1338.

(收稿日期:2019-01-12 修回日期:2019-04-10)