

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.20.010

## 实时荧光定量 PCR 仪检测 HBV DNA 的性能验证及评价\*

李彩东, 陈俏丽<sup>△</sup>, 田鹏飞

甘肃省兰州市第二人民医院肝病研究所, 甘肃兰州 730046

**摘要:**目的 验证 ABI step one plus 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪乙型肝炎病毒(HBV) DNA 检测系统的性能。方法 参考 ISO15189《医学实验室质量和能力认可准则(2012 年)》以及美国临床实验室标准化协会(CLSI)文件,对临床检验使用的实时荧光定量 PCR 检验系统的精密度、准确度、可报告范围、定量检测限等进行验证与评价。结果 精密度:高、低两个水平的血清标本批内变异系数(批内 CV)分别为 3.83%、4.25%,批间变异系数(批间 CV)分别为 2.63%、3.46%。准确度:2019 年室间质评得分 100 分,准确度良好。可报告范围:检测试剂在  $2.51 \times 10^2 \sim 3.11 \times 10^8$  IU/mL 线性良好,线性回归方程为  $Y = 1.013 2X + 0.019 2$ ,  $R^2 = 0.997$ 。系统定量检测限为 200 IU/mL。该室 2019 年 10—12 月测定的室内质控品结果的累积均值为 4.16 IU/mL(log 值), $\bar{x} \pm 2s$  范围为 3.91~4.40 IU/mL(log 值),符合参考范围。结论 该实验室 HBV DNA 检测系统性能良好,适用于临床常规检测。

**关键词:**实时荧光定量聚合酶链反应仪; 性能验证; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)20-2948-03

Performance verification and evaluation of real-time quantitative fluorescent  
PCR instrument for detecting HBV DNA \*

LI Caidong, CHEN Qiaoli<sup>△</sup>, TIAN Pengfei

Institute of Liver Diseases, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China

**Abstract: Objective** To verify the performance of HBV DNA detection system in ABI step one plus real-time fluorescent quantitative PCR instrument. **Methods** Referring to ISO15189 Accreditation Criteria for the Quality and Competence of Medical Laboratories (2012) and the documents of the United States of America Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the precision, accuracy, reportable range, limit of quantitation, etc. of the fluorescence quantitative PCR detection system used by clinic conducted the verification and evaluation. **Results** The precision: the intra-batch coefficients of variation (CV) in low and high levels were 3.83% and 4.25%, respectively, while the inter-batch CV were 2.63% and 3.46% respectively. The accuracy: the external quality assessment score was 100 point, the accuracy was good. The reportable range: the detection reagent had good linearity in  $2.51 \times 10^2 - 3.11 \times 10^8$  IU/mL, the linear regression equation was  $Y = 1.013 2X + 0.019 2$ ,  $R^2 = 0.997$ . The system quantitation detection limit was 200 IU/mL. The cumulative mean of logarithm of internal quality control results from October to December 2019 was 4.16 IU/mL (log value) and the range of  $\bar{x} \pm 2s$  was 3.91-4.40 IU/mL (log value), meeting the reference range. **Conclusion** The performance of HBV DNA detection system in this laboratory is good and suitable for clinical routine detection.

**Key words:** real-time fluorescent quantitative PCR; performance evaluation; HBV; DNA

乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球性公共卫生问题,我国是 HBV 感染高发国家,有 2 000 万~3 000 万人是携带 HBV 的慢性乙型肝炎患者<sup>[1]</sup>。HBV DNA 定量反映了病毒复制水平,是抗病毒治疗适应证选择和疗效判断的重要指标<sup>[2]</sup>。目前,常采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)法进行 HBV DNA 定量检测,该法对试剂、标本和操作的要求较高。因此,本实验室从精密度、准确度、可报告范围、定量检测限、质控方面对现使用的 ABI step one plus 实时荧

光定量 PCR 仪进行了全面评估,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本实验室高水平 HBV DNA 标本( $3.11 \times 10^8$  IU/mL, 阳性标本)用于可报告范围与定量检测限验证;高水平( $10^6$  IU/mL)和低水平( $10^3$  IU/mL)血清标本用于精密度验证。乙型肝炎表面抗体为阳性,其余指标为阴性的混合血清作为阴性血清标本。所有血清标本在当天分离后-20℃保存备用。

**1.2 仪器与试剂** ABI step one plus 实时荧光定量

\* 基金项目:甘肃省兰州市卫生健康科技发展项目(2019-014)。

作者简介:李彩东,女,主任药师,主要从事肝病分子诊断相关研究。△ 通信作者,E-mail:405895928@qq.com。

PCR 仪,离心机,生物安全柜,湖南圣湘 HBV DNA 定量检测试剂盒(一步法,批号 2019022、2019023),质控品(批号 20181009)。

**1.3 方法** 在 PCR 反应管中加入 5  $\mu$ L 核酸释放剂,然后加入 5  $\mu$ L 标本,用移液枪反复吹打混匀后,静置 10 min。加入 40  $\mu$ L 配制好的反应液,混匀后瞬时离心,放置于实时荧光定量 PCR 仪上进行检测。热循环条件:50  $^{\circ}$ C 2 min;94  $^{\circ}$ C 5 min;94  $^{\circ}$ C 15 s,57  $^{\circ}$ C 30 s 进行 45 个循环,并在 57  $^{\circ}$ C 30 s 采集荧光基团 FAM、荧光分子 VIC 通道的荧光信号。

**1.3.1 精密度** 按照 ISO15189《医学实验室质量和能力认可准则(2012 年)》和美国临床实验室标准化协会(CLSI) EP05-A2 文件<sup>[3]</sup> 要求,选取高水平( $10^6$  IU/mL)、低水平( $10^3$  IU/mL)血清标本,每份标本重复做 20 次,进行批内精密度试验;将高、低水平标本分别连续检测 4 d,每份标本重复做 3 次,进行批间精密度试验。分别统计批内和批间试验的均值( $\bar{x}$ )、标准差( $s$ )以及变异系数(CV),验证  $s$  及 CV 是否在范围内。

**1.3.2 准确度** 取参加 2019 年全国临床检验实验室室间质评的 HBV DNA 定量检测血清标本,共 5 个水平,每个水平重复检测 3 次,记录结果。采用室间比对的方式对结果进行评估,计算偏倚。

**1.3.3 可报告范围** 按照 CLSI EP06-A 文件<sup>[4]</sup> 相关要求,试剂盒说明书提供的可报告范围为  $1.00 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^9$  IU/mL,选取实验室高水平血清标本( $3.11 \times 10^8$  IU/mL),用阴性混合血清梯度稀释至  $10^2$  IU/mL,每个稀释水平做两个复孔。

**1.3.4 定量检测限** 取高水平血清标本( $3.11 \times 10^8$  IU/mL)分别稀释至 200、100 IU/mL,分装冻存于  $-20^{\circ}$ C 冰箱。每天检测 1 次,每次重复做 3 次,连续检测 5 d。分别计算 2 个标本检测的精密度(CV 值),从中选择最接近于 20%CV 的对应水平,即为可定量报告的最低水平。

**1.3.5 室内质控** 质控品保存于  $-20^{\circ}$ C,使用前充分复融并离心。所有试验均做阴性对照、阳性对照以及阳性质控,质控在控制结果有效,否则需要重新检测。

**1.4 统计学处理** 所有检测结果均进行以 10 为底数的对数转换,结果用  $\bar{x}$ 、 $s$ 、CV 等表示,采用 SPSS19.0 软件进行统计分析和线性回归。

## 2 结果

**2.1 精密度验证** 利用 HBV DNA 检测试剂盒检测高水平( $10^6$  IU/mL)和低水平( $10^3$  IU/mL)标本,结果显示二者批内 CV 和批间 CV 均小于 5.0%,符合厂家声明。见表 1。

**2.2 准确度验证** 对 2019 年参加全国临床检验实验室室间质评的 HBV DNA 定量检测结果进行统计分析。5 份血清标本共 15 个检测结果,其中 1 份标本检测结果为阴性(结果为 0),4 份标本检测结果为阳性,最大偏倚为  $-1.8\%$ ,符合国家卫生健康委员会临

床检验中心要求( $<8.0\%$ )。室间质评得分为 100 分,准确度良好,验证通过。见表 2。

表 1 HBV DNA 检测试剂盒精密验证结果

HBV DNA 水平(IU/mL)	批内			批间		
	$\bar{x}$	$s$	CV	$\bar{x}$	$s$	CV
	(IU/mL)	(IU/mL)	(%)	(IU/mL)	(IU/mL)	(%)
$10^6$	6.12	0.23	3.83	5.94	0.16	2.63
$10^3$	3.31	0.14	4.25	3.19	0.11	3.46

注: $\bar{x}$ 、 $s$  均进行了以 10 为底数的对数转换。

表 2 2019 年参加全国临床检验实验室室间质评 HBV DNA 定量结果

标本编号	本实验室结果均值(IU/mL)	靶值(IU/mL)	偏倚(%)	评价结果
201921	4.95	4.95	0.0	通过
201922	0.00	0.00	0.0	通过
201923	5.45	5.55	-1.8	通过
201924	4.90	4.92	-0.4	通过
201925	4.99	5.00	-0.2	通过

注:本实验室结果及靶值进行了以 10 为底数的对数转换。

**2.3 可报告范围验证** 以预测值为横坐标,实测值为纵坐标进行线性回归,并计算决定系数  $R^2$ ,得到直线回归方程  $Y=1.013 2X+0.019 2$ ,  $R^2=0.997 > 0.98$ ,符合线性要求(图 1)。本试验得到的线性范围为  $2.51 \times 10^2 \sim 3.11 \times 10^8$  IU/mL,在厂家声明范围( $1.00 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^9$  IU/mL)内。

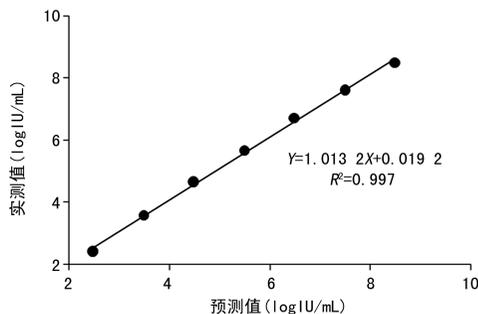


图 1 HBV DNA 检测试剂盒可报告范围验证结果

**2.4 定量检测限验证** 对稀释标本的检测结果进行统计分析,HBV DNA 水平为 200 IU/mL 的标本平均检测值为 218 IU/mL, CV 为 19%,符合要求。因此,本检测方法可定量报告的最低水平为 200 IU/mL。见表 3。

表 3 HBV DNA 检测下限

HBV DNA 水平(IU/mL)	检测次数( $n$ )	$\bar{x}$ (IU/mL)	CV(%)
200	15	218	19
100	15	94	24

注: $\bar{x}$  进行了以 10 为底数的对数转换。

**2.5 质控数据累积评价** 将 2019 年 10—12 月使用的批号为 20170109 的 HBV 质控品共 59 次质控数据进行统计分析,该批号所有质控品测定值均在参考范围内,没有超出失控限。见表 4。

表 4 HBV DNA 质控数据累积结果

项目	$\bar{x}$ (IU/mL)	$s$ (IU/mL)	CV(%)	范围(IU/mL)
质控参考值	4.15	0.13	3.13	3.89~4.41
质控累积值	4.16	0.12	2.97	3.91~4.40

注: $\bar{x}$ 、 $s$  均进行了以 10 为底数的对数转换;范围为  $\bar{x} \pm 2s$ 。

### 3 讨论

实时荧光定量 PCR 作为精准治疗的有效检测手段,具有灵敏度高、特异性强等优点,现已广泛应用于临床检测。与临床检验、生化等项目相比,PCR 定量试验自动化程度相对较低,对操作人员和实验条件的要求较高,因此,结合本实验室实际情况对 PCR 检测系统进行性能验证是十分必要的。本文参照国内外相关标准及方法<sup>[5-8]</sup>,从以下 5 个方面验证了本实验室实时荧光定量 PCR 检测体系的性能。

精密度的指同一样品多次测定结果之间的接近程度,包括批内精密度和批间精密度。本研究选用两个水平的血清标本,验证结果表明,高水平( $10^6$  IU/mL)标本和低水平( $10^3$  IU/mL)标本批内 CV 分别为 3.83%、4.25%,批间 CV 分别为 2.63%、3.46%,均小于厂家声明值(5.0%)及 ISO 标准值(7.5%)。

准确度是指测定值与参考值的接近程度,常采用以下两种方法进行验证:一是用检验方法或比对方法对患者标本进行检测、验证;二是检测有确定值的参考物质,进行验证<sup>[9]</sup>。本实验室通过检测能溯源的国家标准物质进行准确度验证,结果表明,检测值最大偏倚为-1.8%,符合国家卫生健康委员会临床检验中心质评要求( $<8.0\%$ )。

可报告范围是指检测方法可报告的最高与最低水平的变化范围,即检测线性范围。厂家声明的线性范围为  $1.00 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^9$  IU/mL,本实验室由于缺少高值标本,测定选取的范围为  $2.51 \times 10^2 \sim 3.11 \times 10^8$  IU/mL,在此范围内线性良好。在后期试验中,还需进一步取材验证上限范围。

定量检测限是检测样品能被定量测定的最低量,该测定结果应该具有一定的准确度<sup>[10]</sup>。本实验室选取两个水平标本进行多次、重复测定,结果显示,本检测系统的定量检测限为 200 IU/mL。该结果高于厂家声明的  $1.0 \times 10^2$  IU/mL,推测原因如下:(1)商品化试剂盒在开发过程中虽进行了完整的方法学验证,但在临床使用过程中,考虑到人员操作、样品及检测系统等差异,其结果会有一定误差。基于本实验室检测仪器确定 HBV DNA 定量检测限为 200 IU/mL,因此对临床低于 200 IU/mL 的检测结果,要结合扩增曲线及 Ct 值,报告相应的测定值。(2)由于标本稀释过程中未充分混匀或者液体残留至管壁上,导致部分 HBV DNA 水平为 100 IU/mL 的血清标本检测结果偏低, CV 大。这提示研究者在检测标本时要充分

混匀和离心。(3)本试验步骤中标本取样量少,仅 5  $\mu$ L,可能造成了低水平标本检测的试验误差。目前,我国已有多家医院检验科使用全自动核酸提取扩增一体仪,避免了人为因素及移液器造成的系统误差,保证了检测结果的准确性。

对本实验室 2019 年 10—12 月质控品检测数据进行分析,所有质控结果均位于  $\bar{x} \pm 2s$  范围内,质控品稳定性良好,确保了临床检测报告的可信度。在未来检测中,还需定期对质控数据进行小结,计算一定期限内的  $\bar{x}$  和  $s$ ,对可能出现的异常及时分析处理,确保每次检测结果的准确性。

综上所述,本实验室基于 ABI step one plus 实时荧光定量 PCR 仪的 HBV DNA 定量检测系统的精密性、准确度、可报告范围等性能良好,定量检测限为 200 IU/mL,高于试剂盒说明书,其余均与试剂盒相符。质控品批内性质稳定,符合《医学实验室质量和能力认可准则(2012 年)》要求,可用于临床常规检测。

### 参考文献

- [1] LIU J, LIANG W, JING W, et al. Countdown to 2030: Eliminating hepatitis B disease, China [J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.
- [2] 中华医学会感染病学分会, 中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2648-2661.
- [3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative methods: EP05-A2 [S]. 2nd Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: EP06-A [S]. 2nd Edition. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
- [5] 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): 494-495.
- [6] 王战争, 冯飞雪, 肇玉博, 等. 一种乙型肝炎病毒核酸 PCR 定量检测试剂的性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(15): 2098-2101.
- [7] 刘维薇, 关明. 2013 版《医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明》改版解读[J/CD]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2013, 1(1): 38-42.
- [8] 邵璇璇, 管世鹤, 杨凯, 等. HBV-DNA 检测试剂的性能评估与室内质控数据评价[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(6): 934-937.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: EP15-A2 [S]. 2nd Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures: EP17-A2 [S]. 2nd Edition. Wayne, PA, USA: CLSI, 2012.