

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.16.022

荧光定量 PCR 检测巨细胞病毒 DNA 试剂盒的性能验证及评价^{*}

朱舜华¹, 李世宝^{1,2△}

1. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏徐州 221000; 2. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221000

摘要:目的 对实验室新开展项目巨细胞病毒核酸(CMV-DNA)进行性能验证。方法 采用荧光定量 PCR 仪检测 CMV-DNA 含量,对精密度、检出限、正确度、线性范围进行验证及评价。结果 CMV 的高浓度和低浓度样本批内与批间精密度的变异系数(CV)平均值均<5%,符合规定标准。检出限验证时,重复检测浓度为(1.00E+03)copy/mL,检出率为 100%,符合要求。正确度线性 R^2 为 0.998 7,在(2.40E+03)~(2.26E+07) copy/mL 范围内,线性关系良好,符合要求。结论 CMV-DNA 试剂盒的主要性能指标已达到相关标准的要求,可在临床上应用。

关键词:巨细胞病毒 DNA; 精密度; 检出限; 正确度; 线性范围

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)16-2385-04

Performance verification and evaluation of fluorescence quantitative PCR kit for detection of cytomegalovirus DNA^{*}

ZHU Shunhua¹, LI Shibao^{1,2△}

1. Medical Technology Institute, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221000, China

Abstract: **Objective** To verify the performance of cytomegalovirus nucleic acid (CMV-DNA), a new project of the laboratory. **Methods** The CMV-DNA content was detected by fluorescence quantitative PCR, and the precision, detection limit, accuracy and linear range were verified and evaluated. **Results** The average coefficient of variation (CV) of intra-batch and inter-batch precision of high-concentration and low-concentration CMV samples was less than 5%, which met the prescribed standards. When the detection limit was verified, the repeated detection concentration was (1.00E+03)copy/mL, and the detection rate was 100%, meeting the requirements. Accuracy linear correlation coefficient $R^2=0.998\ 7$, The linear relationship between (2.40E+03)~(2.26E+07) copy/mL was good, meeting the requirements. **Conclusion** The main performance indexes of the CMV-DNA kit have reached the requirements of relevant standards, and can be applied in clinical practice.

Key words: cytomegalovirus DNA; precision; detection limit; accuracy; linear range

巨细胞病毒(CMV)属于疱疹病毒亚科,在宿主体内具有很强的潜伏能力^[1]。根据宿主感染的时间可以分为先天性感染和获得性感染^[2]。先天性感染主要是孕妇通过垂直途径感染新生儿^[3],会引起新生儿小头畸形,脑室肿大,肝脾肿大等疾病^[4]。成人感染 CMV 一般无症状,当机体免疫力低下时可导致肺孢子菌肺炎等并发症^[5]。目前临床检测抗体的灵敏度与特异度低,实时荧光定量 PCR 因其在检测中快速、高效特点在临床被广泛应用^[6]。根据 CNAS-

CL36 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,实验室开展新项目前需对所采用的商业检测试剂进行方法学性能验证,主要包括精密度、检出限、正确度、线性范围等^[7]。因此,本研究对上海之江生物的 CMV 核酸(CMV-DNA)试剂盒进行性能验证,以期达到临床检测的要求。

1 材料与方法

1.1 标本来源 CMV-DNA 标本来自 2020 年 6 月 1 日徐州医科大学附属医院感染科。

^{*} 基金项目:中国博士后科学基金项目(2020M670076ZX)。

作者简介:朱舜华,女,本科在读,主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者,E-mail:sdjnshlb@126.com。

本文引用格式:朱舜华,李世宝. 荧光定量 PCR 检测巨细胞病毒 DNA 试剂盒的性能验证及评价[J]. 检验医学与临床,2021,18(16):2385-

1.2 仪器与试剂 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪。CMV-DNA 测定试剂盒(批号 P20191201)、CMV-DNA 阴性血清对照品和 CMV-DNA 临界阳性对照品均购自上海之江生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取与 PCR 反应 严格按照 CMV-DNA 测定试剂盒的要求进行。37 ℃ 2 min, 94 ℃ 2 min 循环一次;然后 93 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 循环 40 次,单点荧光检测在 60 ℃。PCR 结果判读:仪器生成准曲线后,会自动显示定量值。当检测样本的检测值在[(1.00E+03)~(1.00E+07)]copy/mL 范围时,测定结果有效。如果超过该范围可将其稀释后再进行测量。

1.3.2 性能验证指标及验证方法

1.3.2.1 精密度 收集高浓度样本和低浓度样本各 1 例,每次实验重复 4 次,分 5 次测定,总计重复 20 次,记录每次检测结果,计算 Ct 值的均值($\bar{x}$)、标准差(SD)、变异系数(CV),此为批间精密度;统计 20 次检测结果,计算其 Ct 值的 $\bar{x}$ 、 SD 、 CV ,此为批内精密度。根据 EP5-A2 要求批内、批间精密度的 CV 与实验室自定标准 5%进行比较。

1.3.2.2 检出限 根据 EP17-A 文件的要求进行检测线验证时,至少测量 20 次。因此将已知结果的 CMV 阳性标本,稀释至试剂检测下限(1.00E+03) copy/mL 附近,对该标本重复测量 20 次,进行结果分析,可接受标准:阳性检出率>95%。

1.3.2.3 正确度 取 20 例已知测定结果的样本,其测定浓度值范围为[0~(1.50E+07)]copy/mL,使其分布于整个线性范围内。测定结果与标准品结果进行比较,绘制曲线。

1.3.2.4 线性范围 将 7 次方高浓度样本进行 10 倍梯度稀释达到或接近试剂盒标明的定量检测限,进行 2 次重复检测。然后以测量值为 X ,理论值为 Y 绘制拟合曲线,计算线性相关系数, $R^2\geq 0.980 0$ 则符合要求。

1.4 统计学处理 将 CMV-DNA 所测值转化为对数值,采用 Microsoft Excel 统计软件,进行 $\bar{x}$ 、 CV 、 SD 、线性范围等相关分析。

2 结 果

2.1 精密度 批内精密度验证结果:高浓度样本与低浓度样本 20 次检测结果其对数值的 CV 分别为 1.64%、1.56%,见表 1。批间精密度验证结果:高浓度与低浓度样本分别测定 5 次,每次重复 4 次其对数值的 CV 分别为 1.64%、1.56%,见表 2。批间与批内精密度 CV 值均小于规定标准 5%,符合要求。

2.2 检出限 已知试剂盒的最低检出限为(1.00E+03)copy/mL,将样本稀释到检出限,重复测定 20 次,

其阳性检出率为 100%,超过行业标准规定的 95%,符合要求,见表 3。

表 1 CMV-DNA 批内精密度评价结果				
样本编号	高浓度样本		低浓度样本	
	浓度值(copy/mL)	对数值	浓度值(copy/mL)	对数值
1	2.95E+06	6.47	1.85E+04	4.27
2	3.03E+06	6.48	2.07E+04	4.32
3	3.23E+06	6.51	2.61E+04	4.42
4	2.28E+06	6.36	2.18E+04	4.34
5	1.97E+06	6.29	2.02E+04	4.30
6	1.87E+06	6.27	2.26E+04	4.35
7	1.66E+06	6.22	1.93E+04	4.29
8	1.62E+06	6.21	2.16E+04	4.34
9	1.50E+06	6.18	1.35E+04	4.13
10	1.70E+06	6.23	1.65E+04	4.22
11	1.62E+06	6.21	1.89E+04	4.28
12	1.52E+06	6.18	2.25E+04	4.35
13	1.90E+06	6.28	1.82E+04	4.26
14	1.53E+06	6.18	1.70E+04	4.23
15	1.63E+06	6.21	1.41E+04	4.15
16	1.52E+06	6.18	2.10E+04	4.32
17	1.76E+06	6.25	1.88E+04	4.27
18	1.72E+06	6.24	1.86E+04	4.27
19	1.60E+06	6.20	2.21E+04	4.34
20	1.51E+06	6.18	1.83E+04	4.26

注:—表示无数据。

表 2 CMV-DNA 批间精密度评价结果					
时间	次数	高浓度样本		低浓度样本	
		浓度值 (copy/mL)	对数值	浓度值 (copy/mL)	对数值
第 1 天	1	2.95E+06	6.47	1.85E+04	4.27
	2	3.03E+06	6.48	2.07E+04	4.32
	3	3.23E+06	6.51	2.61E+04	4.42
	4	2.28E+06	6.36	2.18E+04	4.34
第 2 天	1	1.97E+06	6.29	2.02E+04	4.30
	2	1.87E+06	6.27	2.26E+04	4.35
	3	1.66E+06	6.22	1.93E+04	4.29
	4	1.62E+06	6.21	2.16E+04	4.34
第 3 天	1	1.50E+06	6.18	1.35E+04	4.13
	2	1.70E+06	6.23	1.65E+04	4.22
	3	1.62E+06	6.21	1.89E+04	4.28
	4	1.52E+06	6.18	2.25E+04	4.35
第 4 天	1	1.90E+06	6.28	1.82E+04	4.26
	2	1.53E+06	6.18	1.70E+04	4.23
	3	1.63E+06	6.21	1.41E+04	4.15
	4	1.52E+06	6.18	2.10E+04	4.32

续表 2 CMV-DNA 批间精密度评价结果

时间	次数	高浓度样本		低浓度样本	
		浓度值 (copy/mL)	对数值	浓度值 (copy/mL)	对数值
第 5 天	1	1.76E+06	6.25	1.88E+04	4.27
	2	1.72E+06	6.24	1.86E+04	4.27
	3	1.60E+06	6.20	2.21E+04	4.34
	4	1.51E+06	6.18	1.83E+04	4.26

注：—表示无数据。

表 3 CMV-DNA 检出限的评价结果

样本编号	浓度值 (copy/mL)	对数值
1	2.01E+03	3.30
2	2.10E+03	3.32
3	3.54E+03	3.55
4	3.14E+03	3.50
5	1.79E+03	3.25
6	2.73E+03	3.44
7	2.51E+03	3.40
8	2.67E+03	3.43
9	2.09E+03	3.32
10	1.93E+03	3.28
11	2.70E+03	3.43
12	3.20E+03	3.51
13	2.28E+03	3.36
14	2.44E+03	3.39
15	2.79E+03	3.45
16	3.23E+03	3.51
17	1.42E+03	3.15
18	2.69E+03	3.43
19	2.48E+03	3.39
20	2.03E+03	3.31

2.3 正确度 测定值与理论值的线性拟合方程为 $Y=0.984\ 1X+0.058\ 6$, 其 R^2 为 0.998 7 符合要求, 见图 1。

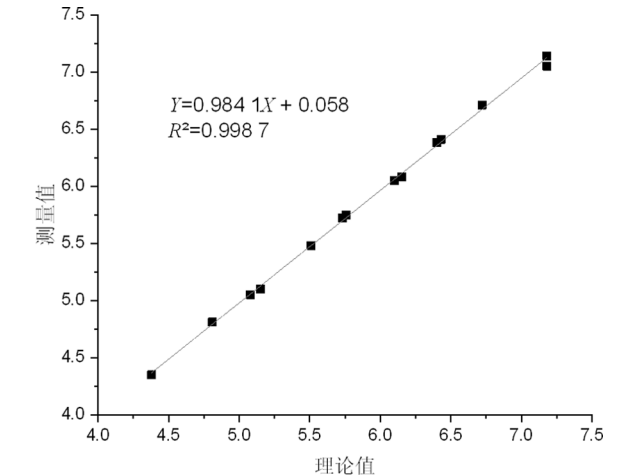


图 1 正确度线性结果

2.4 线性范围 将样品浓度稀释分布在试剂盒的线性范围内, 绘制线性拟合方程为 $Y=1.004\ 9X+0.018\ 2$, $R^2=0.999\ 9$, 见图 2。

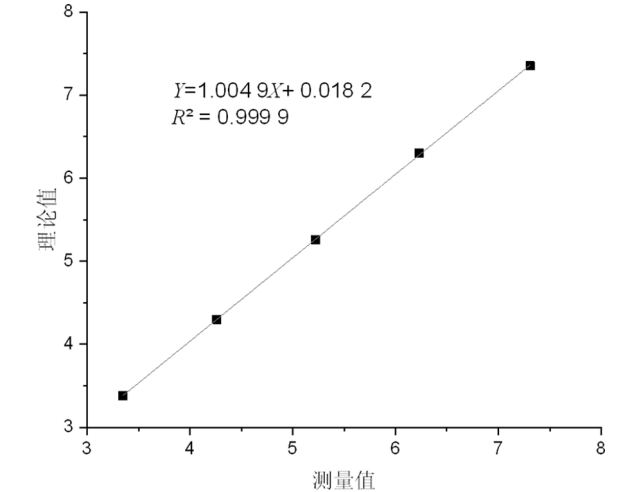


图 2 梯度稀释线性结果

3 讨 论

目前, 我国是 CMV 感染的高发区, 人均感染率为 85% 左右^[8]。在人体免疫功能正常时 CMV 处于潜伏期, 当人体免疫功能缺陷时, 潜伏的病毒会大量增殖, 所以, CMV 感染是艾滋病患者的第二大机会性感染^[9]。CMV 感染也是常见的先天性感染, 新生儿的免疫系统尚未发育完全, 感染 CMV 之后会产生严重的后果, 如听力损伤、神经功能异常等^[10]。因此, 对 CMV 准确、快速地检测显得尤为重要。

实时荧光定量 PCR 对 CMV 检出率高, 克服了传统 PCR 重复性差、易假阳性等缺点, 在临床得到了广泛的应用^[11]。实时荧光定量 PCR 通过检测 CMV-DNA 载量来实现早期检测, 尤其是在 CMV-IgM 阴性时^[12]。在进行实时荧光定量 PCR 结果分析时, 需要将原始数据取对数再进行分析, 因为实时荧光定量 PCR 原始数据成偏态分布, 必须将其转化为正态分布才能进行分析^[13]。实验室需对试剂进行独立验证, 确保试剂盒在本实验符合规定的要求。精密度评价实验应放在其他实验之前, 因为精密度表示测量结果的再现性, 是获得良好准确性的先决条件^[14]。本实验结果显示, 高浓度与低浓度样本批内与批间精密度的 CV 均小于 5%, 符合要求。

正确度为检测结果均值与真值之间的一致程度, $R^2=0.998\ 7$, 说明测量值与理论值之间具有良好的—致程度, 该试剂盒的正确度符合要求。将样本稀释在检出限 $(1.00E+03)$ copy/mL 附近, 重复测量 20 次, 检出率为 100%, 这有利于提高临床诊断的精准。线性范围关系到是否可以为临床提供可靠的信息, 线性范围越宽则就越适用于临床^[15]。本实验所用试剂盒标明的线性范围为 $[(1.00E+03) \sim (1.00E+07)]$ copy/mL, 但是本实验验证所用的线性范围为 $[(2.40E+03) \sim (2.26E+07)]$ copy/mL, 最高浓度已

经超过试剂盒所规定,线性良好 $R^2=0.999\ 9$,证明结果可靠。

综上所述,本实验的 CMV-DNA 试剂盒精密度高,正确度好,检出限可靠,具有良好的线性范围,可以满足临床的需要。

参考文献

[1] PANJIT C, NAYANUNT P, SIRINDA J, et al. Degos-like lesions as a cutaneous manifestation of cytomegalovirus infection; a rare and serious complication in a patient with drug-induced hypersensitivity syndrome[J]. J Dermatol, 2020, 48(1): 46-57.

[2] 刘孟涓, 李秋红, 李春莉. 2451 份不同类型标本中人巨细胞病毒 DNA 的检出情况分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(11): 1563-1566.

[3] 黄玲, 陈燕娥, 吴学明, 等. 孕妇巨细胞病毒感染与 TLR9 基因 2848 位点多态性及血清水平相关性[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(9): 1410-1414.

[4] GALLACH A, ALBERT M A, HERNÁNDEZ A, et al. Secuelas neurológicas en pacientes con infección congénita por citomegalovirus[J]. Anales de Pediatría, 2020, 93(2): 111-117.

[5] 路梦晴, 王博, 马艳萍, 等. 不同年龄段患者中人巨细胞病毒的感染状况[J]. 中国医科大学学报, 2021, 50(4): 322-326.

[6] 谭天照, 李学仿, 黄广荣. 实时荧光定量 PCR 检测人巨细胞病毒感染的临床意义分析[J]. 中国实用医药, 2020, 15(7): 35-37.

[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): 36-40.

[8] 刘玲玲, 刘香花, 徐培淇. 实时荧光定量 PCR 检测儿童人巨细胞病毒感染的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(10): 1415-1417.

[9] 孟欢, 郭杰, 迟小伟, 等. 利用实时荧光定量 PCR 系统检测人巨细胞病毒 DNA 性能验证探讨[J]. 标记免疫分析与临床, 2020, 27(10): 1781-1784.

[10] 吴际, 禄梦笛, 郑有为, 等. ELISA 和荧光定量 PCR 诊断婴幼儿巨细胞病毒感染的临床价值[J]. 中国妇幼保健, 2020, 35(2): 338-340.

[11] 李佳凌, 巫岳龙, 邹礼乐, 等. 血液中检测人巨细胞病毒的荧光定量 PCR 方法建立及评估[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(6): 637-641.

[12] 谢利波, 刘敏, 王敏. 荧光定量 PCR 检测在人巨细胞病毒-IgM 阴性婴儿巨细胞病毒感染诊断中的意义[J]. 中国中西医结合儿科学, 2018, 10(2): 129-132.

[13] 孟斌, 张好良, 李世宝, 等. 实时荧光定量 PCR 检测 EB 病毒 DNA 试剂盒的性能验证及评价[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(5): 929-935.

[14] 况凌云, 桂晓美, 徐连强. 国产谷胱甘肽还原酶试剂盒分析性能验证与评价[J]. 实验与检验医学, 2021, 39(1): 65-69.

[15] 卢旭. 贝克曼库尔特 AU5800 全自动生化分析仪性能验证[J]. 医疗卫生装备, 2016, 37(5): 107-110.

(收稿日期: 2020-12-16 修回日期: 2021-04-18)

(上接第 2384 页)

胞相关参数与防城及中山地区的各参数在参考区间范围的宽度上有一定的差异,考虑检测设备不一样,性能不一样,各地区的人口构成比例不一样,所以生物参考区间也不能直接照搬其他地区的生物参考区间来使用。

另有文献报道,新生儿血常规的生物参考区间与分娩的方式有关^[8],提示在设定血常规生物参考区间时应区别设置剖宫产和顺产的范围参数。

综上所述,不同地区新生儿脐带血红细胞相关参数生物参考区间存在差异,有必要建立不同地区的生物参考区间。

参考文献

[1] 沈湘, 罗桂香, 庞江琳, 等. 新生儿脐血红细胞平均体积和红细胞平均血红蛋白对地中海贫血初筛的探讨[J]. 广东医学院学报, 2003, 21(4): 335-336.

[2] 黄盛文, 李贵芳, 周曼, 等. 新生儿 α -地中海贫血筛查及脐血红细胞参数变化分析[J]. 现代预防医学, 2013, 40

(13): 2509-2510.

[3] 中华人民共和国卫生部. 血细胞分析参考区间: WS/T405—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.

[4] 唐金华, 何嘉凝, 李培颜, 等. 防城港地区脐血血细胞参数参考范围的建立及其在珠蛋白生成障碍性贫血早期筛查中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 34-37.

[5] 吴为强, 陈志芬, 吕蓉, 等. 正常新生儿脐带血血细胞参数参考值范围的调查[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(6): 1072-1073.

[6] 刘爱胜, 李远宁, 占松涛. 虎门地区 3 356 名幼儿静脉血细胞参数参考值调查[J]. 上海医学检验杂志, 2001, 16(3): 189-193.

[7] 顾梅青, 钱建青, 周剑峰, 等. 772 例新生儿脐血平均红细胞体积和红细胞体积分布宽度结果分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2013, 5(4): 336-337.

[8] 雷明德, 张术华, 郭清芳, 等. 正常新生儿脐带血血常规参数参考范围调查报告[J]. 当代医学, 2020, 26(1): 12-14.

(收稿日期: 2020-12-12 修回日期: 2021-04-27)