

• 临床检验研究 •

# CMV-DNA 荧光定量 PCR 检测室内质控物的制备及初步应用

钟天鹰<sup>1</sup>, 陈倩<sup>2</sup>

(南京医科大学附属南京儿童医院:1. 检验科;2. 儿科研究所 210008)

**摘要:**目的 制备巨细胞病毒 DNA(CMV-DNA)荧光定量 PCR 检测的室内质控物,并对其临床应用进行初步评价。方法 收集一批 CMV-DNA 阳性尿液标本混合后作为室内质控物,前 20 次检测采用“即刻法”判断结果是否在质控范围内,20 次后采用 Levey-Jennings 质控图,确定其靶值、标准差和变异系数,对室内质控结果进行判断。结果 107 次试验中,前 20 次根据“即刻法”,室内质控结果在控;20 次后采用 Levey-Jennings 质控图,结果在控;60 次检测结果的均值为 5.41,标准差为 0.33,变异系数为 6.15%。结论 利用混合尿液标本制备 CMV-DNA 室内质控物,制备方便,测定结果稳定,可以用作本实验室检测 CMV-DNA 的室内质控物。

**关键词:**聚合酶链反应; 巨细胞病毒; 尿液; 室内质控

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1953-03

## Preparation and clinical application of internal quality control substance of CMV-DNA for real time quantitative PCR

Zhong Tianying<sup>1</sup>, Chen Qian<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Institute of Pediatrics, Nanjing Children's Hospital

Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** **Objective** To develop an internal quality control substance of CMV-DNA for real time quantitative PCR and to evaluate its clinical value. **Methods** Internal quality control was prepared by mixing urine samples from children positive with CMV-DNA. The target value, standard deviation and coefficient of variation of internal quality control substance were defined by instant method for the first 20 runs and by Levey-Jennings quality control chart after the first 20 runs. Then the detection results of quality control substance were analyzed. **Results** 107 times of the detection of quality control substance were performed. Of the first 20 runs of instance method, the results were under control. Of the Levey-Jennings quality chart, the results were under control. Of 60 times of detection, the means, standard deviation and coefficient of variation were 5.31, 0.33 and 6.15% respectively. **Conclusion** The preparation of internal quality control of CMV-DNA by mixing urine samples was convenient and the detection results were stable. Internal quality control of CMV-DNA, prepared by this way, could be worthy for practical application in this clinical laboratory.

**Key words:** polymerase chain reaction; cytomegalovirus; urine; internal quality control

与常规 PCR 技术相比,实时荧光定量 PCR 具有特异性强、能有效解决产物污染问题、自动化程度高等特点<sup>[1-3]</sup>。由于荧光定量 PCR 检测较特殊,而且目前尚无统一的室内质控品,临床 PCR 实验室需建立符合本单位情况的室内质控体系<sup>[4-7]</sup>。本院使用达安公司荧光定量 PCR 检测试剂盒,虽然试剂盒本身带有阳性模板,但试剂盒提供的阳性模板是已经提取好的质粒,无需进行核酸提取,用此作为质控品无法监控临床标本核酸提取的整个过程,必须考虑自己制作合适的室内质控物。

本院患者主要为黄疸患儿,主要检测项目是巨细胞病毒(CMV),临床标本为血液、尿液、母乳标本,尿液标本阳性检出率较高,具便于收集。根据达安公司荧光定量 PCR 试剂盒操作说明及结果判断标准,对不同患者的临床尿液标本进行检测后,将多份 CMV-DNA 阳性尿液标本混合后作为室内质控阳性样本,CMV-DNA 阴性混合尿液标本作为室内质控阴性样本。前 20 次采用“即刻法”进行室内质控检测,第 21 次开始采用以前 20 次检测结果计算出的均值和标准差作 Levey-Jennings 质控图,采用 Westgard 多规则方法进行评价<sup>[8-10]</sup>。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 收集本院住院和门诊患者,检测结果为 CMV-DNA 阳性/阴性的尿液标本。

**1.2 仪器与试剂** 采用 ABI 7500 荧光定量 PCR 基因扩增仪,中山大学达安基因股份有限公司的 CMV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒。

**1.3 方法** 尿液室内质控样本的制作具体方法:收集经荧光定量 PCR 检测的患者尿液标本,根据试剂盒说明书中的标准判断结果,将阳性/阴性尿液标本分别轻轻混合均匀,按照每份 1 mL 分装至 1.5 mL 的一次性离心管,标注分装日期、批号,分装,放入 -20 ℃ 冰箱。每次实验时取出阳性/阴性各 1 管复融,与临床标本一起进行 DNA 提取和扩增。每次阳性标本收集量根据临床标本阳性数及家长配合程度不定,收集后的尿液混合阳性质控物一般可维持 30~80 次检测。

## 1.4 质控物的定值

**1.4.1** 由经过培训的专业人员连续 20 个 PCR 检测日对自制的质控物检测 20 次,采用“即刻法”判定结果是否在控。

**1.4.2** 第 21 次开始采 Levey-Jennings 质控图方法,以前 20 次检测结果计算出的均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ )作 Levey-Jennings 质控图。满足 40 次测定后重新计算均值和标准差,满足 60 次测定后再重新计算  $\bar{x}$  和  $s$ 。计算出该组数据的  $\bar{x}$ 、 $s$  和变异系数(CV),确定质控物的预期靶值,同时根据 Excel 表格中的数据自动生成 Levey-Jennings 质控图。

1.4.3 荧光定量 PCR 检测 CMV-DNA 阴性尿液标本做阴性对照,制备阴性对照的 Levey-Jennings 质控图。

1.5 尿液阳性室内质控样本的稳定性验证 将 CMV-DNA 检测结果为  $2.36 \times 10^6$  和  $5.78 \times 10^5$  的尿液标本放置室温 10 d 后,再次检测的结果为  $6.92 \times 10^5$  和  $2.21 \times 10^5$ ,结果变化不

大。

2 结 果

2.1 连续 20 个 PCR 检测日对自制的尿液阳性质控物检测 20 次,采用“即刻法”判断质控结果(结果在控),见表 1。

表 1 基因室即刻法室内质控判断(CMV-DNA)

编号	日期	结果	对数	均值	SD	CV%	SI 上限	SI 下限	n3S	n2S	质控判断
1	2009-11-12	$9.57 \times 10^4$	4.98	—	—	—	—	—	—	—	—
2	2009-11-13	$4.16 \times 10^5$	5.62	—	—	—	—	—	—	—	—
3	2009-11-16	$1.46 \times 10^5$	5.16	5.25	0.33	6.25%	1.11	0.83	1.15	1.15	在控
4	2009-11-17	$6.87 \times 10^5$	5.84	5.40	0.40	7.33%	1.10	1.06	1.49	1.46	在控
5	2009-11-18	$3.38 \times 10^4$	4.53	5.23	0.52	9.93%	1.18	1.34	1.75	1.67	在控
6	2009-11-19	$4.61 \times 10^5$	5.66	5.30	0.50	9.39%	1.08	1.55	1.94	1.82	在控
7	2009-11-20	$4.43 \times 10^5$	5.65	5.35	0.47	8.84%	1.03	1.73	2.10	1.94	在控
8	2009-11-23	$4.62 \times 10^5$	5.66	5.39	0.45	8.38%	0.99	1.90	2.22	2.03	在控
9	2009-12-8	$6.77 \times 10^4$	4.83	5.33	0.46	8.67%	1.11	1.73	2.32	2.11	在控
10	2009-12-9	$5.18 \times 10^5$	5.71	5.36	0.45	8.43%	1.04	1.85	2.41	2.18	在控
11	2009-12-10	$4.47 \times 10^5$	5.65	5.39	0.44	8.12%	1.02	1.97	2.48	2.23	在控
12	2009-12-11	$6.22 \times 10^5$	5.79	5.42	0.43	7.98%	0.95	2.07	2.55	2.29	在控
13	2009-12-14	$8.40 \times 10^5$	5.92	5.46	0.44	8.00%	1.06	2.14	2.61	2.33	在控
14	2009-12-15	$5.73 \times 10^5$	5.76	5.48	0.43	7.79%	1.03	2.23	2.66	2.37	在控
15	2009-12-16	$1.56 \times 10^5$	5.19	5.46	0.42	7.66%	1.10	2.24	2.71	2.41	在控
16	2009-12-17	$7.56 \times 10^5$	5.88	5.49	0.42	7.60%	1.04	2.30	2.75	2.44	在控
17	2009-12-18	$1.93 \times 10^5$	5.29	5.48	0.41	7.43%	1.09	2.33	2.79	2.47	在控
18	2009-12-21	$2.98 \times 10^5$	5.47	5.48	0.40	7.21%	1.13	2.40	2.82	2.50	在控
19	2009-12-22	$9.92 \times 10^4$	5.00	5.45	0.40	7.33%	1.18	2.31	2.85	2.53	在控
20	2009-12-24	$1.87 \times 10^5$	5.27	5.44	0.39	7.18%	1.23	2.34	2.88	2.56	在控

—:无数据。

2.2 本批阳性质控物,总共进行 107 次室内质控,根据质控规则,结果都在控。107 次 CMV 阳性室内质控 Levey-Jennings 质控图,见图 1。

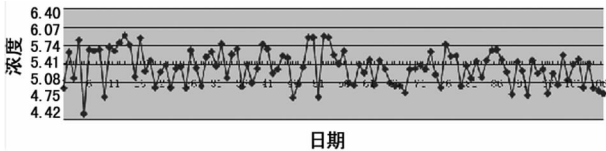


图 1 CMV-DNA 室内阳性质控图

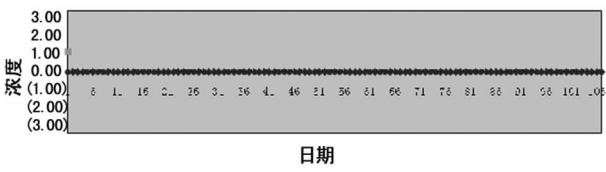


图 2 CMV-DNA 室内阴性质控图

第 21 次开始以前 20 次检测结果计算出的均值和标准差作 Levey-Jennings 质控图。40 次测定后重新计算。60 次后重新计算  $\bar{x}$  为 5.41,  $s$  为 0.33, CV 为 6.15%, 确定质控品的预期

靶值,同时根据 Excel 表格中的数据自动生成 Levey-Jennings 质控图。根据质控规则,结果在控。

2.3 CMV-DNA 阴性的尿液标本做阴性对照,生成阴性对照的 Levey-Jennings 质控图,见图 2。

3 讨 论

实验室要获得可靠的测定结果,需要建立有效的质量管理体系,其中实验室室内质量控制是保证检验质量一个重要环节<sup>[9]</sup>。影响临床基因扩增实验室室内质量控制的因素很多,包括人员、管理、仪器、试剂、技术、环境等诸多因素<sup>[11-12]</sup>。每次对临床标本进行检测,同时需要进行室内质控来保证临床检验报告的准确,确认本次 PCR 检测是否符合要求,报告单是否可以发放,由于没有商品化的质控品,各个单位须根据实验室的情况自己制作<sup>[13-14]</sup>。

质控样本的基质首先须与待测标本一致,且单批可大量获得;其次要有很好的稳定性。PCR 实验室通常采用混合血清自制室内质控物进行室内质控。儿童血液标本难以采集,但尿液标本易于采集,家长易于接受,阳性检出率较高,阳性标本方便收集。基于以上情况,考虑将日常工作中检测到的 CMV-DNA 阳性尿液标本作为室内质控阳性样本,CMV-DNA 阴性

尿液标本作为室内质控阴性样本。

笔者收集患儿 MCV-DNA 阳性尿液标本并混合后,用离心管分装,保存在-20℃冰箱,连续检测 20 次,将结果录入“即刻法室内质控软件”,只需检测 3 次,即可进入质控状态,便于实验室开展室内质控<sup>[15]</sup>,判定结果是否失控。第 21 次开始采用“Levey-Jennings 质控图方法”,以前 20 次检测结果计算出的 $\bar{x}$ 和 $s$ 作 Levey-Jennings 质控图,判断结果是否在控。满足 40 次测定后重新计算 $\bar{x}$ 和 $s$ ,满足 60 次测定后再重新计算 $\bar{x}$ 和 $s$ 。采用 Westgard 多规则方法进行执行过程评价。12s 警告规则:质控值超过 $\pm 2s$ 限时时,为警告;13s 失控规则:当质控值超过 $\pm 3s$ 限时时,为失控;22s:同一水平质控品连续 2 次控制值同方向超过 $\pm 2s$ ,为失控;41s 失控规则:连续 4 次控制值超过 $\pm 1s$ ,为失控;10X 失控规则:连续 10 次控制值在同一侧,为失控。

107 次阳性室内质控,前 20 次根据“即刻法”规则,20 次以后作 Levey-Jennings 质控图,采用 Westgard 多规则方法进行评价。根据质控规则,107 次质控结果均在控,质控结果满意,可以发放临床检验报告。从试验结果看,尿液阴性室内质控检测结果稳定。

本研究将日常工作中检测到的 CMV-DNA 阳性尿液标本作为室内质控阳性样本,CMV-DNA 阴性尿液标本作为室内质控阴性样本。不足之处是由于阳性患者不是太多,高值标本更是非常少,无法制备 2 个浓度水平的质控品作为室内质控,根据实际情况,每批质控只使用 1 个浓度水平的室内质控物。根据目前实际情况,在现有条件下,笔者认为本实验室使用自制的 CMV-DNA 阳性尿液标本混合液作为室内质控物是可行的。

参考文献

[1] Jardi R,Rodriguez F,Buti M,et al. Quantitative de-tECTION of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay[J]. J Viral Hepat,2001,8(6):465-471.

[2] Heermann KH,Gerlich WH,Chudy M,et al. Quantitative detec-

tion of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations[J]. J Clin Microbiol,1999,37(1):68-73.

[3] 申子瑜,李金明. 临床基因扩增检测技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:147-148.

[4] 张伟民,夏晓华,宋超. PCR 实验室技术复审结果的分析[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(8):943-944.

[5] 黄学忠. 荧光定量 PCR 室内质控体系的概念及方法[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2005,26(7):478.

[6] 李金明,林尊慧,王露楠,等. 基于日常检测结果的核酸扩增检测假阳性统计室内质量控制方法[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(3):275-277.

[7] 姚磊,韩艳辉,罗富康,等. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 室内质控物的制备及初步应用[J]. 中国误诊学杂志,2006,6(5):807-809.

[8] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社出版,2007:245-258.

[9] 秦晓光. 室内质控的主要工具-质量控制图[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(11):710-713.

[10] 张正. 分子生物学中 PCR 临床检测的室内质控(IQC)//中华医学会. 全国检验医学感染控制和病原监测学术研讨会论文集[C]. 北京:中华医学会,2004:6.

[11] 李金明. 临床实验室分子诊断的标准化[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(6):483-486.

[12] 莫培生. 室内质量控制和基本统计学[J]. 中华医学检验杂志,1996,19(1):49-51.

[13] 邹单东,郑楚. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 室内质控物的制备及初步应用[J]. 华夏医学,2009,22(4):617-619.

[14] 吕虹,闫惠平,周亚莉,等. 荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 室内质控物的制备及质控图的应用[J]. 现代检验医学杂志,2008,23(3):122-124.

[15] 郑怀竞. 室内质评与室内质控[M]. 北京:北京医科大学、北京协和医科大学联合出版,1997:41-49.

(收稿日期:2011-05-20)

(上接第 1952 页)

床经验性治疗和制定针对分离菌的治疗方案都有重要的指导意义。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志,2001,81(5):314-320.

[2] 陆屏,蔡叶桦,杨丹蓉. 128 例胆道疾病患者胆汁细菌培养及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(11):1442-1443.

[3] 薛峰,肖永红. 2006~2007 年 Mohnarín 胆汁培养病原菌构成与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(9):1248-1251.

[4] 姚俊,许亚平,孟鑫,等. 114 例胆道感染患者胆汁细菌培养分析[J]. 临床内科杂志,2006,23(10):677-678.

[5] 周淑群,周定球. 235 例胆道感染病原菌组成及其耐药性分析[J]. 中国药房,2010,21(2):141-142.

[6] 项领,陈秀平,任苇,等. 胆汁标本肠球菌的分布及药敏分析[J]. 江西医学检验,2006,24(2):103-104.

[7] 孟泽武,陈燕凌,唐南洪,等. 胆道感染的病原菌组成及药敏变化分析[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(1):117-118.

[8] 毛雁飞,任君,彭燕,等. 结石性胆囊炎胆汁培养菌群构成及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(8):823-824.

[9] 张雪青,余方友,陈增强. 胆道感染的病原学调查[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(3):440-442.

[10] 陈敏,吕婉飞,张媛媛. 胆道感染病原菌谱及药敏分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(5):734-736.

[11] 应建飞,吕火祥. 胆道感染患者胆汁中病原菌分布与药物敏感性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(11):1444-1446.

[12] 吴连根,祝进,陆军. 胆道感染的病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(18):2856-2858.

[13] 郑于剑,周杰,张国伟. 胆道感染常见病原菌及其药物敏感性的变化[J]. 肝胆外科杂志,2009,17(4):277-280.

(收稿日期:2011-05-20)