

HBV-DNA 定量检测误差来源分析及处理

李俊立, 彭长华, 李承彬, 欧阳耀灵, 李琳芸, 唐 全

(华中科技大学同济医学院附属荆州医院检验医学部, 湖北荆州 434020)

摘要:目的 找到误差来源并实施相应处理措施, 提高 HBV-DNA 定量检测质量。方法 通过室内质控发现较大误差源的存在后, 对实验全过程定义误差源 15 项, 通过理论分析、比对实验排除非目标误差源。结果 误差源 10、15 导致了较大负误差, 对其进行处理后的室内质控 CV 由平均 9.3% 下降为 3.3%。结论 证实了本文误差源查找方式的正确性与纠正措施的合理性。

关键词: DNA, 病毒; 肝炎病毒, 乙型; 误差源; 处理措施; 室内质控

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0462-02

持续改进是 ISO 15189 对医学实验室质量和能力认可的重要准则之一, 也是临床检验工作者们的永恒课题。本文欲通过发现、分析、解决我科实验室 HBV-DNA 定量检测工作中的问题的实际案例来解析如何进行质量改进, 以求同仁们交流探讨。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本科室 2006~2008 年定量检测 HBV-DNA 室内质控数据。

1.2 仪器与试剂 仪器: Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System。试剂: 乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒, 中山大学达安基因股份公司生产。

1.3 方法

1.3.1 前期室内质控数据回顾性分析

1.3.2 定义误差源 对实验全过程按步骤进行分解, 定义了 15 个可能的误差源: 质控血清混合不匀(误差源 1)及分装量不一致(误差源 2), DNA 浓缩液在加入前是否充分混匀(误差源 3), 加入离心管后与血清混合不均匀(误差源 4), 离心后上清液吸弃是否彻底(误差源 5), 吸管管尖是否接触沉淀, 带出待测物质(误差源 6), DNA 提取液吸出前是否混匀(误差源 7), 加入离心管后与沉淀是否充分混匀(误差源 8), 100℃水浴 10 min 是否一致(误差源 9), 热裂解后上清液中 DNA 是否均匀(误差源 10), 加入 2 微升模板时是否够量(误差源 11), 各反应管内反应物是否一致(误差源 12), 阳性参考模板瞬时离心后是否导致分层不均匀(误差源 13), 扩增时反应孔间热循环是否一致(误差源 14), 取基线起始循环数及阈值后进行线性回归分析是否有统计误差(误差源 15)。

1.3.3 寻找目标误差源 从理论上分析各误差源可能引起的大小、引起的是正还是负误差、哪些是本室能控制的误差源, 进行评估分类, 并提出改进措施。再结合比对实验分别以多误差源联合方式、逐一方式排除非目标误差源。

1.3.4 处理措施及比对实验 对误差源采取相应措施进行控制, 对各处理措施前后进行比对实验; 在对误差源不进行控制状态下进行平行比对实验。

1.3.5 观察实施处理措施后的室内质控数据。

2 结 果

2.1 数据回顾性分析 2006 年 1 月至 2007 年 2 月室内质控的平均标准差为 0.45(log10), 变异系数(CV)为 9.3%, 虽然低于卫生部临床检验中心室间质评可接受的标准差, 但不能达到其他同级医院及试剂厂家所建议的标准差 0.2 (log10), 并发现阳性参考较大负误差(偏低 1 个数量级)出现率 3.7%, 室内

质控较大负误差出现率是 31.3%, 说明本实验室 HBV-DNA 定量检测的精密度需要提高。

2.2 误差源可能性分析 通过控制或替换的方式逐步排除了质控品因素(误差源 1、2)、试剂因素(误差源 12)和能引起较大负误差的常见因素 3、6、11, 除仪器因素(误差源 13、14)外对剩余因素(均为本室可控误差源)进行联合控制, 最后重点怀疑误差源 8、10、15。

2.3 处理措施及比对实验

2.3.1 误差源 8 一般使用振荡器振荡混匀 1 min 就开始裂解, 由于树脂沉淀很不容易分散, 振荡混匀 1 min 可能使其混匀不充分而引起较大误差。(1)处理措施: 将 DNA 提取液加在离心管上部后在振荡器上振荡混匀 1 min, 放置 20 min 后(至无肉眼可见的沉淀)再在振荡器上振荡混匀 1 min, 以控制误差源 8。(2)比对数据及结果: 同步进行控制与不控制误差源 8 的室内质控, 连续观察 4 d 室内质控数据, 结果表明控制组与不控制组没有差异($t=1.882, P=0.156>0.05$), 见表 1, 表明误差源 8 并非目标误差源。

表 1 对误差源 8 控制和不控制的室内质控数据比对(log10)

组别	1	2	3	4	t	P
不控制组	5.95	6.13	5.93	5.88	1.882	0.156
控制组	5.99	5.8	5.61	5.79		

2.3.2 误差源 10 100℃水浴裂解后常有微小水滴悬挂于管壁, 离心后滑入上清液内, 导致待测物质分布不均, 直接加入扩增体系易引起负误差。(1)处理措施: 热裂解后将离心管瞬时离心, 在振荡混合器上振荡混合 1 分钟, 再于 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液时先用加样器吸 2 微升后轻轻排出, 共重复 3 次, 以混匀上清液, 最后加入 PCR 反应管内, 以控制误差源 10。(2)比对数据及结果: 在对误差源 10 不进行控制的状态下, 对室内质控血清裂解后上清液做双管平行试验, 共 3 天, 结果见表 2, CV 达到 10.25%, 证实误差源 10 确实能引起较大误差。

2.3.3 误差源 13 阳性参考模板瞬时离心后可能导致分层不均匀, 直接加入扩增体系引起负误差。(1)处理措施: 阳性参考模板瞬时离心后, 在振荡混合器上振荡混合 1 min, 先用加样器吸 2 微升后接着轻轻排出, 共重复 3 次, 以此混匀, 最后吸 2 微升加入 PCR 反应管内, 以控制误差源 13。(2)比对数据及结果: 在对误差源 13 分别在不控制和控制的状态下, 对 105 阳

性参考模板做多管平行试验,各两天,结果如表 3,与控制前相比,控制组的标准差已显著减小($F=7.886, P=0.0154$),证实误差源 13 也能引起一定的误差。

表 2 室内质控血清双管平行试验结果(log10)

时间	A 管	B 管
第 1 天	4.66	5.93
第 2 天	5.20	6.04
第 3 天	6.15	5.65

$s=0.575, CV=10.25\%$ 。

表 3 阳性参考模板做多管平行试验结果(log10)

组别		1 管	2 管	3 管	4 管	s(CV)
不控制组	第 1 天	5.06	4.87	4.71	5.08	0.205(4.15%)
	第 2 天	4.99	4.62	5.17	4.93	
控制组	第 3 天	5.00	5.00	5.15	5.13	0.073(1.45%)
	第 4 天	4.94	5.11	5.08	5.04	

2.4 室内质控 CV 变化趋势 对误差源 10、13 经过纠正措施的实施后的 2008 年,室内质控 CV 由平均 9.3% 下降为 3.3%,标准差稳定在 0.2(log10) 左右,进一步证实误差源 10、13 是导致本实验室前期 HBV-DNA 定量检测的精密度不高的重要因素。

3 讨论

室内质量控制的作用在于监控本实验室常规工作的精密度,为实验结果的准确性提供保障^[1-2]。正是基于对本实验室室内质控数据的回顾性分析,才能发现误差的存在,为误差源的查找提供方向,还能验证纠正措施是否得当。

HBV-DNA 定量检测是一种影响因素较多的实验技术,所以对实验各个环节都要进行控制才能保证高质量检验的完成。作者在查找误差源之前对诸多细节进行了准备,如规范化操作培训、移液器和温度计的校准、环境温湿度的监测、实验器材的

• 检验技术与方法 •

消毒等,然后经过质控品的替换、试剂的替换后还有较大负误差出现,再对常见误差源 3、6、11 进行控制后仍然没有得到改善。可见误差源存在于仪器因素和剩余操作步骤中,仪器因素因为短时不可控而作最后考虑。在剩余误差源中通过多组联合控制而筛选出疑似误差源 8、10、13,再经过对比和平行试验确认导致较大负误差的原因为误差源 10、13。

误差源 10、13 是 HBV-DNA 定量检测过程的两个步骤,按照试剂盒说明书要求操作不能避免出现较大负误差,通过作者提出的两项优化措施对其作相应纠正后的室内质控 CV 从 2006 年的 9.3% 下降到 2008 年的 3.3%,标准差控制在 0.2(log10) 附近,与相关实验室的报道比较一致^[3-5],也证实了本文误差源查找的正确性与纠正措施的合理性,所以本文所运用的误差来源分析方式及处理方法值得从事 DNA 定量检测的临床工作者和研究者们的借鉴,以加强实验室工作的持续改进。

参考文献

- [1] Westgard JO. Internal quality control: planning and implementation strategies[J]. Ann Clin Biochem, 2003, 40(6): 593-611.
- [2] 李承彬, 彭长华, 欧阳耀灵. 定量检测 HBV-DNA 质量的持续改进[J]. 中国医院感染学杂志, 2009, 19(16): 2128-2130.
- [3] Lee C, Lee S, Shin SG, et al. Real-time PCR determination of rRNA gene copy number: absolute and relative quantification assays with Escherichia coli[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 78(2): 371-376.
- [4] Sun S, Meng S, Zhang R, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection[J]. Virol J, 2011, 8(2): 227-230.
- [5] Kim MH, Cha CH, An D, et al. Performance evaluation of Abbott RealTime HBV Quantification Kit for HBV viral load by real-time PCR[J]. Korean J Lab Med, 2008, 28(2): 144-150.

(收稿日期: 2012-10-02)

酶法测定同型半胱氨酸的初步评价

朝浩鹏, 申丽红, 陈永德[△]

(中国中医科学院望京医院检验科, 北京 100102)

摘要:目的 通过观察使用免疫学方法和酶法检测样本同型半胱氨酸(Hcy)结果的相关性;用酶法检测 Hcy 的不精密度、线性范围及抗交叉污染的性能,研究使用酶法代替免疫学方法的可行性。**方法** (1)选取内科患者和体检人群样本共 118 例,对其血浆 Hcy 用两种方法同时分别检测,评价其相关性。(2)选取不同水平样本进行酶法的不精密度、线性范围及抗交叉污染的性能评价。**结果** (1)两种方法的检测结果显示其相关性良好($r=0.985, P<0.01$)。测定结果的相对偏倚在线性范围内能被接受,其结果具有可比性。(2)酶法检测 Hcy 的不精密度、线性范围和抗交叉污染的性能良好。**结论** 用酶法代替免疫学方法测定 Hcy 在结果上具有一致性和可持续性,在临床上是可行的。

关键词: 半胱氨酸; 方法学相关性; 不精密度

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.04.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)04-0463-03

随着人们生活方式和饮食习惯的改变,心脑血管疾病在我国的发生率逐年上升,而 Hcy 的检测对于动脉粥样硬化、2 型糖尿病、慢性肾功能不全、叶酸缺乏等疾病^[1-3] 的诊断价值也更

普遍地为临床所接受和重视。目前医疗保险已将酶法检测 Hcy 列为报销项目,而以前传统应用的免疫学方法^[4] 因其价格等问题并未列入。本院根据医疗需求和医保精神,选取了部分

[△] 通讯作者, E-mail: wjcydy@sina.com。