

试剂检测结果相当,可以接受。这说明在检测的过程中,残留试剂与原装试剂具有可比性,差异无统计学意义($P>0.05$),不需重新校标,可直接用于患者标本的检测,结果准确可靠。

综上所述,雅培 ARCHITECT I2000SR 化学发光 AFP 残留试剂的回收再利用方法简便,结果的重复性和准确性均较好,与原装试剂的检测结果显示具有可比性,符合临床要求,可以使用。本文仅是以 AFP 为例,后面还将陆续对雅培 ARCHITECT I2000SR 化学发光其他残留试剂的利用进行评估,以期在保证检测结果准确的前提下,创造最大的经济效益。

参考文献

[1] 何惠,刘基铨,廖冰洁,等. 甲胎球蛋白在不同检测系统中的可比性研究[J]. 按摩与康复医学,2011,56(7):12-13.
 [2] 黄妮姣,黄宪章,周强,等. 不同检测系统甲胎蛋白测定结果的可

比性研究[J]. 检验医学,2006,21(4):360-363.
 [3] 陈华,王明达,邹文武,等. 依据 NCCLS EP9-A2 对不同生化仪测定血糖结果的偏倚评估[J]. 医学临床研究,2009,26(6):1009-1011.
 [4] 张凤川,刘松坚. NCCLS 文件 EP9-A 在方法对比及偏差评估中的应用[J]. 解放军检验医学杂志,2002,1(2):174-175.
 [5] 王凤超,朱安友,葛鑫,等. AFP、CEA 在 2 种不同化学发光分析系统间的对比分析和偏倚评估[J]. 实用全科医学,2008,6(2):194-196.
 [6] 吴义芳,张震,周涛,等. 雅培 AXSYM 化学发光残留试剂检测癌胚抗原的初步评估[J]. 安徽医药,2010,14(12):1505-1507.

(收稿日期:2013-09-15)

• 检验仪器与试剂评价 •

基于标准曲线的两台 PCR 仪检测结果的可比性分析

吕晓丽¹,杨文青¹,黄利思²,邹菊贤¹,闫琳¹,李锐成¹,张惠中^{1△}

(1. 第四军医大学唐都医院临床实验与检验科,陕西西安 710038;

2. 中山大学孙逸仙纪念医院检验科,广东广州 510120)

摘要:目的 分析同一实验室 2 台实时荧光定量 PCR 仪标准曲线相关参数的可比性。方法 常规条件下,使用同一批号试剂,将 HBV DNA 检测标准品与待测标本、室内质控在 2 台实时荧光定量 PCR 仪上同时进行扩增,比较标准曲线的斜率、截距及 Ct 值,分析检测结果的一致性。结果 作为单一检测系统,相同批号标准品在同一批号检测试剂的多批次实验中,2 台仪器均有良好重复性,2 台实时荧光定量 PCR 仪之间的测定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 实验室存在多台实时荧光定量 PCR 仪时,可通过分析标准曲线的相关参数来监测不同仪器间检测结果的一致性,保证检测结果的准确可靠。

关键词:聚合酶链反应; 标准曲线; 比对

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.24.066

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)24-3399-02

随着分子生物学技术在检验医学的深入应用,多台 PCR 仪在同一实验室的使用情况越来越多。如何评估以保证 2 台仪器在测定结果上取得一致性是保证检测结果的准确可靠的重要依据,也是实现实验室标准化、规范化亟待解决的问题。为此,在常规条件下,将标准品与待测标本、室内质控在本室两台 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上使用相同的开放试剂同时进行扩增,分析标准曲线的相关参数检测结果,进而监测不同仪器间检测结果的一致性,保证检测结果的准确可靠。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 HBV DNA 荧光定量检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司产品,批号为 2012004;标准品为试剂盒自带,批号为 20120905,含 1.00×10^4 、 1.00×10^5 、 1.00×10^6 、 1.00×10^7 copy/mL 4 个浓度梯度;2 台实时荧光定量 PCR 仪均为美国 ABI 公司产品,型号分别为 ABI7500-7893,ABI7500-4854。

1.2 方法 严格依据试剂说明书提取样本 DNA,吸提取好的样本 DNA 和标准品各 2 μ L 加入 PCR 反应管(反应管内含除模板以外的其他 PCR 反应物),反应条件:93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;93 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C 1 min,10 个循环;93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;55 $^{\circ}$ C 采集荧光。扩增结束后,点击 Amplification 按钮后在 2~7 循环进行基线调整。同一批号标准品用相同批号的试剂按照相同的方法检测,分析 30 次标准曲线相关参数检测结果(每次扩增 r^2 值均应大于 0.98,否则本次视为无效

检测)。

1.3 统计学处理 SPSS16.0 计算标准品不同浓度梯度 Ct 值及标准曲线斜率、截距的全距, \bar{x} , s ,CV,评价单一检测系统的检测效果。对标准曲线相关参数的检测结果进行 t 检验,评价其检测结果的一致性,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 单一检测系统扩增曲线和标准曲线分析 标准品在两台 PCR 扩增仪上的扩增结果(30 次连续检测中其中 1 次)如图 1a 和 b 所示(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。在 Delta-Rn vs Cycle 图中,从右到左 4 条曲线代表浓度分别为 1.00×10^4 、 1.00×10^5 、 1.00×10^6 、 1.00×10^7 copy/mL,可见 2 台仪器曲线均呈标准“S”型扩增,不同浓度 Ct 值分别为 11.45、14.77、18.15、21.54 和 11.36、14.69、18.07、21.56,曲线间间距均一;从 Stangdard Curve 图中可以看出,2 台仪器标准曲线斜率分别为 -3.366、-3.420 均接近理论斜率, r^2 值均大于 0.98,因此此次扩增有效且扩增效率较高。

2.2 2 台仪器标准曲线相关参数的结果分析 标准品不同浓度梯度 Ct 值及标准曲线斜率、截距的全距, \bar{x} , s ,CV 如表 1 所示。从表中可以看出两台仪器的 s ,CV 值均保持在较小范围内,ABI7500-7893 型不同浓度标准品检测结果的 CV 值均比 ABI 7500-4854 小,但不同梯度间的 Δ Ct 值 3.48、3.49、3.56 均一性不如 ABI7500-4854 型 3.38、3.35、3.39。统计学分析发现,浓度为 1.00×10^4 copy/mL 的标准品 Ct 值检测结果在 2

△ 通讯作者,E-mail:zhz328@ffmmu.edu.cn.

台仪器上存在差异;斜率、截距及其他 3 个浓度标准品检测结果统计学分析,差异均无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 2 台仪器标准曲线相关参数的结果分析

项目	ABI7500-4854				ABI7500-7893				
	全距	\bar{x} (copy/mL)	s (copy/mL)	CV(%)	全距	\bar{x} (copy/mL)	s (copy/mL)	CV(%)	
斜率	3.08~4.05	3.58	0.21	5.86	3.07~4.02	3.53	0.22	6.23	
截距	33.92~40.45	36.77	1.49	4.05	33.24~40.50	36.33	1.63	4.48	
Ct	1.00×10^4 copy/mL	23.89~20.21	21.86	0.73	3.33	23.82~20.98	22.15	0.64	2.89
	1.00×10^5 copy/mL	20.49~17.32	18.48	0.64	3.46	20.00~17.63	18.67	0.43	2.30
	1.00×10^6 copy/mL	16.96~13.38	15.13	0.62	4.10	16.31~14.59	15.18	0.59	3.85
	1.00×10^7 copy/mL	13.60~11.02	11.74	0.6	5.11	12.59~10.88	11.62	0.36	3.09

3 讨 论

PCR 技术的问世使病原体检测得以快速简便地进行。目前,实时荧光定量 PCR 技术广泛应用于肝病^[1-4]、性病^[5-6]以及人呼吸道病毒^[7-8]等各种病原体感染的临床诊断,为实现快速准确诊断提供了有效的检测方法。但随着应用的逐步深入,临床基因诊断的工作量逐步加大,多台 PCR 仪在同一实验室使用的情况越来越普遍。需要特别注意的是临床上对抗病毒治疗的疗效评价时不同仪器的检测结果不能相互替代和比较,考虑定量的结果时必须考虑应用仪器的类型^[9],实际工作中发现即使使用同一型号仪器,室内质控在控,同一标本在不同仪器上检测结果会出现差异^[10],为保证检测结果的准确可靠,同室内不同仪器检测结果的一致性是值得讨论的问题。本文采用实时荧光定量的方法检测试剂盒自带的标准品,分析其结果,评价本室两台 PCR 仪检测结果的一致性,同时探讨其在监测仪器可比性中的价值。

在 PCR 的反应体系中加入荧光染料,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过特定的数学原理对未知模板进行定量分析的方法即为实时荧光定量 PCR^[11]。实践证明,只要能保证核酸的抽提质量和实时扩增效率,实现定量结果的准确、可靠和可重复性是完全可以把握的。从实时荧光定量 PCR 的相关理论得知,扩增效率与标准曲线的斜率相关,斜率的绝对值与荧光曲线间距相同,而曲线间距会因每次扩增结束后调整基线水平的不同而变化,进而影响不同浓度标准品 Ct 值的变化。因此,监测标准曲线斜率,截距及标准品 Ct 值的变化,可以有效监测仪器的扩增效率,进而评估定量结果的准确性。图 1 为 30 次连续检测中其中一次标准品的扩增情况,两仪器标准曲线斜率均与理论斜率接近, r^2 值均大于 0.98,显示出较高的扩增效率;从表 1 可以看出,2 台仪器不同浓度标准品检测结果 SD 值和 CV 值都保持在较小范围内,不同梯度间的 ΔCt 值均一性较好,提示作为单一系统,两台仪器扩增效率均较高且检测的重复性较好。统计学分析显示,2 台仪器 1.00×10^4 copy/mL 标准品 Ct 值结果差异显著,其余参数的检测结果均无显著性差异。查看既往检测结果记录发现,在同一次检测中,除 1.00×10^4 copy/mL 检测 Ct 值偏高外,其余 3 个浓度标准品 Ct 值均在适宜状态,且此情况多次出现在同一人员操作时,推测其偶然误差的可能行比较大,剔除异常结果即排除偶然误差后,分析证明 1.00×10^4 copy/mL 标准品在 2 台仪器的检测结果一致。

利用标准曲线进行仪器可比性分析只是一种监测手段,它不能代替方法学上的比对实验。用患者样本进行方法对比及偏差评估即 EP9-A 文件是美国临床实验室标准化委员会 1995

年出台的标准化系列文件之一,适用同一标本在使用不同检测方法、试剂或仪器时其检测结果的对比分析和偏差评估^[12],但对评估时间外的系统误差和由于试剂问题所致的偏差不易发现。HBV DNA 荧光定量检测现已广泛用于临床,产品种类繁多,由于缺乏统一的标准品,各试剂厂家均自带标准品,要求每次检测均要检测标准品。标准品和质控成为每天必测的,且对两台仪器而言因为使用的是同一种质控品,因而具有同源性。因此,可以通过监测标准品检测结果的变化及时发现仪器间可能存在的差异,从而使同一患者样本在同室不同分析仪上的检测结果保持一致,保证检测结果的准确稳定。

参考文献

- [1] 刘昕阳,李锐成,代瑛,等. HCV-RNA 阳性 236 例临床与实验室特征分析[J]. 陕西医学杂志,2013 (3):359-360.
- [2] 郑宏波. 实时荧光定量 PCR 检测丙型肝炎病毒[J]. 实用全科医学,2005,3(5):460-461.
- [3] 陈学民,凡任芝. 荧光定量 PCR 检测乙型肝炎病毒 DNA 的临床意义[J]. 临床医学与护理研究,2004,3(6):24-25.
- [4] Katsoulidou A, Manesis E, Rokka C, et al. Development and assessment of a novel real-time PCR assay for quantitation of hepatitis D virus RNA to study viral kinetics in chronic hepatitis D[J]. J Viral Hepat,2013,20(4):256-262.
- [5] 戴金华,叶玉琼,王邦勇. 荧光定量 PCR 检测沙眼衣原体解脲支原体生殖道感染临床分析[J]. 实用预防医学,2004,11(6):1289-1290.
- [6] 邓君,洪华,饶绍琴,等. 荧光定量 PCR 技术在性病临床标本实验诊断中的应用[J]. 中国皮肤性病学杂志,2003,17(2):120-121.
- [7] 付爱红,向希映,周宜兰. 小儿肺炎支原体血清学与病原学检测的对比分析[J]. 医学临床研究,2008,25(2):369-369.
- [8] 陈传德,黎剑华,林宇静,等. 实时荧光定量 PCR 快速检测人副流感 3 型病毒研究[J]. 实用预防医学,2008,15(2):325-326.
- [9] 曾争,刘丹,公维波,等. 三种 PCR 仪的特异性及灵敏度评价[J]. 医疗卫生装备,2006,27(10):61-62.
- [10] 柳渊洁,陈进凡,黄仕君. ALT,AST,GGT,AKP,CHE 在两生化分析系统间的偏倚评估[J]. 卫生职业教育,2005,23(11):114-115.
- [11] 袁亚男,刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型,特点与应用[J]. 中国畜牧兽医,2008,35(3):27-30.
- [12] CLSI. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples; Approved guideline[J]. 2ed ed. Wayne,PA:CLSI,2002.