

## • 检验技术与方法 •

## 实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 的线性范围与最低检出限的验证

张运洪, 秦维超, 何玲, 黄建军

(重庆市江津区中心医院检验科, 重庆 402260)

**摘要:** 目的 试用实时荧光定量 PCR 定量检测乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA), 求出其线性范围与最低检出限, 从而对本实验室检测 HBV DNA 的主要性能进行验证。方法 参照相关的文件, 通过系列稀释高浓度标本得到超过厂家申明线性范围的系列浓度标本, 进行线性范围的验证; 通过系列稀释低浓度标本得到超过厂家申明最低检出限的系列浓度标本, 进行最低检出限的验证。结果 HBV DNA 检测的线性范围为  $8.58 \times 10^2 \sim 8.41 \times 10^7$  IU/mL, 最低检出限为  $4.07 \times 10^2$  IU/mL。结论 实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 的线性范围与最低检出限达到预期要求, 检测方法和验证方案简便、可行。

**关键词:** 实时荧光定量聚合酶链反应; 乙型肝炎病毒核酸; 线性范围; 最低检出限

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.041

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2362-03

## Verification of the linear range and the minimum detection limit in real-time fluorescence quantitative PCR for HBV DNA

Zhang Yunhong, Qin Weichao, He Ling, Huang Jianjun

(Department of Clinical Laboratory, Jiangjin Center Hospital, Chongqing 402260, China)

**Abstract: Objective** Use real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) to determine HBV DNA, then calculate the linear range and the minimum detection limit, which are the main performance indicators in the laboratory verification.

**Methods** According to the related documents, by serial dilution of high concentration samples, samples of serial concentrations were obtained which were out of the linear range mentioned in the instructions, then verified the new linear range. By serial dilution of low concentration, samples were obtained, the concentrations of which were lower than the minimum detection limit of provide by the manufacturer, then the new minimum detection limit was verified. **Results** The linear range of HBV DNA detection was  $8.58 \times 10^2 \sim 8.41 \times 10^7$  IU/mL, and the minimum detection limit of HBV DNA detection was  $4.07 \times 10^2$  IU/mL. **Conclusion** The linear range and the minimum detection limit of Real-time fluorescence quantitative PCR assessed reaches the expected requirement, and the method and validation scheme are simple and feasible.

**Key words:** real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; DNA, hepatitis B virus; linear range; minimum detection limit

在本科室的实际工作中使用实时荧光定量 PCR 进行乙型肝炎病毒(HBV)DNA 检测的精密度、准确度, 能长期、稳定地控制在理想水平。各水平室内质控和各级室间质评都能很好反应本实验室的精密度和准确度。另外, HBV DNA 检测的线性范围与最低检出限也是重要的性能指标。新型抗 HBV 药物的使用对 HBV DNA 检测的线性范围与最低检出限都提出了更高要求<sup>[1-3]</sup>。现有检测 HBV DNA 的商品化试剂也在不断改进, 以适应临床需求。因此, 实验室现用的 HBV DNA 检测系统的性能指标, 特别是线性范围与最低检出限需要重新进行评估。根据美国病理家协会(CAP)和 ISO15189 对医学实验室的质量和能力的要求<sup>[4]</sup>, 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)相关文件, 笔者对本科室的 HBV DNA 检测系统的线性范围与最低检出限进行了评估。

## 1 材料与方法

## 1.1 标本来源 来源于本院进行治疗的乙型肝炎患者送检的新鲜血清。

1.2 仪器与试剂 罗氏 Light Cycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪、博日 HB-202 型恒温金属浴、飞鸽 TGL-16G 型高速离心机。试剂、标准品均为凯杰生物工程(深圳)有限公司产品, HBV DNA 检测试剂批号为 20131105/1, HBV DNA 标准品批

号为 20130907/6。HBV DNA 室内质控品购自北京康彻思坦公司, 该质控品可溯源至 GBW(E)090137, 具有低水平 HBV DNA 浓度。

## 1.3 方法

1.3.1 线性范围 参照 EP6-A 文件<sup>[5]</sup>, 选取 HBV DNA 浓度大于  $1.00 \times 10^8$  IU/mL 的高浓度的新鲜血清标本, 用 HBV DNA 阴性的标本进行系列稀释, 稀释倍数分别为  $1.00 \times 10^0$ 、 $5.00 \times 10^0$ 、 $1.00 \times 10^2$ 、 $5.00 \times 10^2$ 、 $1.00 \times 10^3$ 、 $5.00 \times 10^3$ 、 $1.00 \times 10^4$ 、 $5.00 \times 10^4$ 、 $1.00 \times 10^5$ 、 $5.00 \times 10^5$ , 包括原倍标本共 11 个样本, 每个样本重复测定 3 次取均值。首先要求试验有效且室内质控结果在控, 然后将实测值与理论值进行比较。以经对数处理的实测值为 Y, 经对数处理的理论值为 X, 计算回归方程:  $Y = aX + b$ , 要求相关系数  $r > 0.975$  或  $r^2 > 0.95$ , 斜率 a 在 0.97~1.03 范围内, 截距 b 与最高浓度比较接近 0。

1.3.2 最低检出限 借鉴 EP17-A 文件<sup>[6]</sup>, 选取 HBV DNA 浓度为  $1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^4$  IU/mL 的低浓度新鲜血清标本, 进行系列稀释, 稀释至低于  $5.00 \times 10^2$  IU/mL。每个稀释样本重复检测 10 次。在最低检出限上的水平, 应每个样本都能检出。反之, 在每个稀释度 10 个重复检测中有任意 1 个或者 1 个以上不能检出, 则说明低于了最低检出限的水平。同时

要求实验有效且室内质控结果在控。

## 2 结 果

**2.1 线性范围** 线性范围评价试验结果见表 1。根据表 1 中数据绘制的线性散点图,见图 1。回归方程各参数( $r^2$ 、a、b)都未超过要求的水平,这表明在以下范围内线性良好:  $8.58 \times 10^2 \sim 8.41 \times 10^7$  IU/mL。这略宽于厂家提供的线性范围( $1.00 \times 10^3 \sim 5.00 \times 10^7$  IU/mL)。该范围也是本实验室的可报告范围,同时该范围能满足临床需要。

表 1 线性范围评价试验结果

理论值	实测值		
浓度(IU/mL)	浓度对数	浓度(IU/mL)	浓度对数
$1.67 \times 10^8$	8.22	$1.60 \times 10^8$	8.20
$8.35 \times 10^7$	7.92	$8.41 \times 10^7$	7.92
$1.67 \times 10^7$	7.22	$1.65 \times 10^7$	7.22
$8.35 \times 10^6$	6.92	$7.91 \times 10^6$	6.90
$1.67 \times 10^6$	6.22	$1.96 \times 10^6$	6.29
$8.35 \times 10^5$	5.92	$6.07 \times 10^5$	5.78
$1.67 \times 10^5$	5.22	$9.99 \times 10^4$	5.00
$8.35 \times 10^4$	4.92	$5.97 \times 10^4$	4.78
$1.67 \times 10^4$	4.22	$1.94 \times 10^4$	4.29
$8.35 \times 10^3$	3.92	$6.91 \times 10^3$	3.84
$1.67 \times 10^3$	3.22	$1.81 \times 10^3$	3.26
$8.35 \times 10^2$	2.92	$8.58 \times 10^2$	2.93

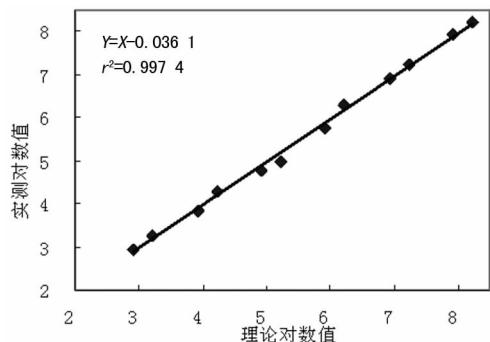


图 1 线性散点图

**2.2 最低检出限** 以原倍血清(HBV DNA 浓度为  $2.04 \times 10^3$  IU/mL)稀释后进行试验的结果见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。按 1.3.2 的方法确定最低检出限为  $4.07 \times 10^2$  IU/mL, 略低于厂家提供的  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 的水平。

## 3 讨 论

PCR 检测 HBV DNA 的试剂或仪器不一样, 性能指标也会不同<sup>[7-8]</sup>。某检测系统临床应用前, 需要掌握该检测系统的性能指标。这些性能指标通常生产厂商已提供, 但是在临床应用前, 实验室仍需对生产厂商提供的方法学主要性能予以验证并确认。临床实验室要结合实际, 合理选择方法学验证试验, 系统设计方法学验证方案<sup>[9]</sup>。

PCR 检测项目较为特殊, 相比于其他专业检测项目, 其检测原理特别, 检测过程繁琐, 有大量的手工操作, 某些项目阳性标本稀缺, 标准物质来源困难, 检测成本高等, 并且在多年前有较多实验室未经过验收就在开展临床检测。若按常规项目进

行方法学验证要花费更大的人力物力。但是, 仍需对 PCR 检测项目的方法学性能指标进行评价。评价的方法要结合本实验室的情况进行, 要实际有效。

临床基因扩增检测实验室通过多年的运行, 分析某个 PCR 检测项目的室内质控和室间质评数据, 可以了解该项目精密度和准确度。本实验室每年都进行了 HBV DNA 室内质控和室间质评数据分析, 都能达到预期要求, 并且持续改进, 不断提高。

线性范围与最低检出限是目前 PCR 检测 HBV DNA 最重要的性能指标, 特别是在患者应用长效干扰素和新型核苷(酸)类似物后, HBV DNA 检测的线性范围越宽、最低检出限越低, 就越利于其疗效监测<sup>[3]</sup>。

对于多点校准的项目, 一般不需要对线性范围进行验证。但是, 本科室常使用的 HBV DNA 检测的校准品一般都在  $1.00 \times 10^4 \sim 1.00 \times 10^7$  IU/mL 的范围。在使用这些标准品绘制的标准曲线时, 为了达到更宽的可报告范围, 标准都进行了两端的延伸, 达到  $1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^8$  IU/mL。因此, 有必要对线性范围进行验证。本课题组使用了经多次稀释定值的大于  $1.00 \times 10^8$  IU/mL 患者标本进行系列稀释后检测, 得出 HBV DNA 检测线性范围略宽于厂家提供的线性范围, 证明厂家提供的这一个性能指标在本室的检测系统上可用。取整后, 仍采用厂家提供的  $1.00 \times 10^3 \sim 5.00 \times 10^7$  IU/mL 作为本室的 HBV DNA 检测线性范围。最低检出限是指能可靠检出分析物的最低实际浓度。EP17-A 文件指出<sup>[6]</sup>, 验证常规项目的定量检出限要检测某一水平至少 25 次重复检测, 每次重复检测的结果与该水平的参考值比较, 计算超出目标误差的度量。结合本室实际情况, 选取了 HBV DNA 浓度在  $1.00 \times 10^3 \sim 1.00 \times 10^4$  IU/mL 的患者标本, 进行系列稀释, 稀释至低于厂家提供的最低检测限水平。每个稀释样本重复检测 10 次。在理论值为  $4.07 \times 10^2$  IU/mL 的稀释标本 10 次重复检测中, 每次都能顺利检出, 且 10 次检出值的 CV 较低( $CV=3.31\%$ ), 与本室低水平(约  $5 \times 10^3$  IU/mL)室内质控的年变异系数相当。在理论值为  $8.14 \times 10^1$  IU/mL 的稀释标本 10 次重复检测中, 有 3 个未能检出, 且 7 次检出值的 CV 较高( $CV=11.12\%$ )。在某个浓度水平的 10 个重复检测中有任意 1 个或者 1 个以上不能检出, 就说明该水平低于了最低检出限。很明显,  $4.07 \times 10^2$  IU/mL 就是本研究中求出的最低检出限, 且略低厂家提供的  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 的水平。取整后, 本科室仍采用厂家提供的  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 作为 HBV DNA 检测的最低检出限。

本研究中的 HBV DNA 检验结果报告单格式按上述评价验证进行设计:(1)当检测浓度结果大于  $5.00 \times 10^7$  IU/mL 时, 出具报告为“ $>5.00 \times 10^7$  IU/mL”。若要得到进一步结果, 要稀释后重测。稀释后的检测浓度结果要在标准品浓度最高值与最低值之间。(2)当检测浓度结果小于  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 时, 仅报告“ $<5.00 \times 10^2$  IU/mL”, 不报告具体的浓度数值, 这个浓度数值仅供参考。(3)当检测浓度结果介于  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 与  $5.00 \times 10^7$  IU/mL 之间时(包括  $5.00 \times 10^2$  IU/mL 与  $5.00 \times 10^7$  IU/mL), 检测浓度结果数值直接报告。并且在报告单上标注了“最低检出限:  $5.00 \times 10^2$  IU/mL”, 以免误认为“ $<5.00 \times 10^2$  IU/mL”是 HBV DNA 检测的临床参考值。

通过上述研究, 证明了现行 PCR 系统检测 HBV DNA 的线性范围与最低检出限达到预期要求, 检测方法和验证方案简便、可行。

(下转第 2366 页)

病,其余 24 例未确诊),此 97 例患者 HBV-DNA 阳性率仅为 17.5%。本次试验 71 样本 HBV-DNA 阳性率为 16.9% 与相关文献报道一致,肝功能阳性率为 35.2%,但样本缺乏明确诊断资料,低水平 HBsAg 的临床价值尚有待进一步探讨。

## 参考文献

- [1] 方筠,张久春,陈健,等.乙型肝炎病毒表面抗原确认试验方法的建立[J].检验医学,2006,21(5):478-480.
- [2] 黄伟,杨培华,陈健,等.乙型肝炎病毒表面抗原确认试验的临床应用[J].检验医学,2008,23(2):176-178.
- [3] 岳希全,石宏,李迎.ELISA 法检测 HBsAg 影响结果的重要因素的分析[J].中国实验诊断学,2007,11(2):213-215.
- [4] 车文英,谭延国.不同检测系统测定乙肝病毒表面抗原检测灵敏度的探讨[J].中外医学研究,2009,7(8):20-21.
- [5] 李宁宁,杨继红.乙肝表面抗原 ELISA 试剂灵敏度变化的动态研究[J].湖北预防医学杂志,2001,12(5):21.
- [6] 王岚,沈立松.不同方法检测乙型肝炎血清学标志物的结果比较

(上接第 2363 页)

志谢:本研究得到了重庆医科大学附一院检验科张莉萍教授、重庆医科大学附二院检验科陈维贤副教授、重庆市长寿区人民医院检验科李泉主任技师的悉心指导。

## 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- [2] 罗杰,赖菁,谢俊强,等.肝移植术后 6 年乙型肝炎复发的临床分析[J].中华临床感染病杂志,2012,5(1):37-38.
- [3] 罗杰,李向永,吴元凯,等.国产试剂 HBV DNA 检测下限与核苷(酸)类似物停药后乙肝复发的分析[J].广东医学,2013,34(4):544-546.
- [4] 中国合格评定国家认可委员会. ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则[S].北京:中国合格评定国家认可委员会,2008.

[J].检验医学,2004,19(6):535-537.

- [7] 中华人民共和国卫生部医政司编.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:619.
- [8] 骆抗先.乙型肝炎的基础与临床[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2001:221-223.
- [9] 王蕾,刘华,王雯静,等.低水平乙型肝炎表面抗原的检测及其临床价值评估[J].微生物与感染,2009,4(1):9-12.
- [10] 谭玉华,陈鲜关,卢顺舵,等.时间分辨荧光免疫分析法乙型肝炎血清标志物分析灵敏度的建立与分析[J].中国医学检验杂志,2006,7(4):228.
- [11] 杨朝国,张玲英,许建.隐匿性乙型肝炎病毒感染者血清 HBsAg 阴性原因探讨[J].四川省卫生管理干部学院学报,2009,28(2):103-104.
- [12] 林国英,陈国良,周宁.低水平乙肝病毒表面抗原的结果分析[J].临床军医杂志,2003,31(2):116-117.

(收稿日期:2014-05-08)

- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute Standard. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: statistical approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute Standards. EP17-A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: statistical approved guideline[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [7] 吴斌,李彩东,李惠军,等.两种国产乙型肝炎病毒核酸定量试剂盒检测结果分析[J].国际检验医学杂志,2013,34(14):1880-1881.
- [8] 巢薇.比对两台荧光定量 PCR 仪检测 HBV-DNA 结果一致性研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2162-2163.
- [9] 毕波,吕元.定量检测方法学性能验证的系统设计[J].中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

(收稿日期:2014-06-08)

## 生物标志物助力感染性疾病临床诊疗

近日,由中国医师协会急诊医师分会主办,罗氏诊断产品(上海)有限公司协办的“感染诊断新技术临床应用中国行 2014”启动会暨专家研讨会在北京召开,由中国医师协会急诊医师分会会长、北京协和医院急诊科主任于学忠教授担任大会主席。与会国内权威急诊专家重点探讨了感染标志物降钙素原(PCT)与白细胞介素 6(IL-6)的临床应用价值。

作为血清降钙素(CT)的前肽物质, PCT 在感染开始后最初 3 h 即可测得,6~12 h 后可达最高峰值,与传统生物标志物相比,PCT 半衰期接近 24 h,且几乎不受肾功能状态、激素治疗的影响。独特的生物学特点,使 PCT 对机体感染的反映具有快速准确的特征,并被 2008 版《美国重症成人患者新发发热指南》等推荐用于指导临床感染治疗。

动态监测 PCT 水平的变化趋势可以指导抗菌药物的合理应用,减少临床非必需抗菌药物的使用和重症监护室(ICU)的再感染率,减少脓毒症患者的住院时间,且对 ICU 脓毒症患者死亡率与存活率有很好的预测作用。

IL-6 具有调节免疫应答、急性期反应及造血功能的作用,在机体抗感染免疫反应中起重要作用,可作为有效的预测指标,在重症医学、急诊医学、早发型新生儿脓毒症、创伤危险分层和预后、术后风险等领域应用尤为突出。

作为脓毒症预后的生物标志物,若入院时  $IL-6 > 1000 \text{ ng/mL}$ ,预示患者死亡高风险。此外,脓毒症是新生儿发病和死亡的主要原因之一,每 1 000 名新生儿中就可能有 1~10 例发病。创伤患者和术后患者亦有发生脓毒症的风险,应用生物标志物检测有助于其诊断和预后。

在实际操作中, PCT 联合 IL-6 检测可以避免单一指标对感染类别判断的误差,及时帮助临床医师尽快确定患者的治疗方案,进而提高患者治疗成功率,具有重要的临床应用价值。“感染诊断新技术临床应用中国行 2014”将覆盖全国 10 个省市,旨在通过与全国各地区急诊医师的学术研讨和互动交流,推进感染诊断技术在急诊感染领域的应用和发展,造福更多患者。