

• 论 著 •

ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪的性能评估

巢 薇

(广西医科大学第四附属医院, 广西柳州 545005)

摘 要:**目的** 为参加医学实验室认可和评价仪器性能,对 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪的性能进行评估。**方法** 参照美国临床实验室标准化委员会(CLSI)文件对 ABI 7300 荧光定量 PCR 仪检测 HBV-DNA 定量结果的精密度、正确度、灵敏度及线性进行评价。**结果** 精密度:批内变异系数($CV_{批内}$)为 2.38%~4.61%,批间变异系数($CV_{批间}$)为 3.87%~5.33%,达到《医学实验室质量和能力认可准则》中基因扩增检验项目分析性能标准($CV_{批内} < 4.8\%$, $CV_{批间} < 6.4\%$)。正确度:参加 2011 年卫生部室间质评结果总体平均偏倚为 2.14%,符合卫生部质评要求(偏倚不超过 8%);功能灵敏度:100 IU/mL 检测限浓度的 CV 值最接近于 20%,与试剂盒检出下限相符;线性:相关系数(r^2)为 1.0,线性关系符合要求。**结论** ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪各项性能指标精确,可以为临床提供快速、准确的报告。

关键词:实时荧光定量 PCR 仪; 性能评估; HBV-DNA
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.026 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)04-0494-02

Performance evaluation of ABI 7300 real-time fluorescent quantitative PCR

Chao Wei

(The Fourth Hospital Affiliated of Guangxi Medical University, Liuzhou 545005, China)

Abstract:**Objective** To participate in the recognition of medical laboratory and to evaluate the performance of the instruction, we assess the performance of ABI 7300 real-time fluorescent quantitative PCR instrument. **Methods** According to United States of America Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI), assess the precision, accuracy, sensitivity and linearity of HBV-DNA detection result in ABI 7300 fluorescence quantitative PCR instrument. **Results** The Intraassay coefficient of variation is 2.38%—4.61%, and interassay coefficient of variation was 3.87%—5.33%, both achieve the performance analysis standard of gene amplification test project regulated by Medical Laboratory Quality and Competence Accreditation Criteria. Accuracy: the overall mean bias in 2011 Ministry of Health EQA results was 2.14%, which met the quality assessment requirements of the ministry of health. Functional sensitivity: the CV of 100 IU/mL detection limit concentration was close to 20%, which accords with the The limit of detection of the kit; Linear: the correlation coefficient r^2 is 1.0, linear relationship met the requirements. **Conclusion** The performance index of ABI 7300 real-time fluorescent quantitative PCR instrument is accuracy, and it can provide fast, accurate reports for clinical department.

Key words:real-time fluorescent quantitative PCR analyzer; performance evaluation; HBV-DNA

医学实验室认可是目前检验医学界讨论和关注的热点^[1-2]。《医学实验室质量和能力的专用要求》(ISO 15189)和美国病理家学会(CAP)要求参加其认可的实验室,在开展某一检测项目前,需提供并保留相关的方法学验证实验数据^[3]。本科室自 2010 年申报 ISO15189 实验室认可以来,为了验证仪器性能,按照《医学实验室质量和能力认可准则》要求对现行使用的 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪的性能从精密度、正确度、功能灵敏度及线性等方面,进行了全面评估。

1 材料与方法

1.1 一般资料 收集广西医科大学第四附属医院 HBV-DNA 阳性标本,浓度为 $10^2 \sim 10^8$ IU/mL(排除溶血、脂血、黄疸等标本)。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2.2 试剂 HBV 核酸荧光定量检测试剂及 HBV-DNA 标准品(批号:2012006)由中山大学达安基因诊断公司提供。

1.3 方法

1.3.1 精密度实验 按照 CLSI EP15-A 文件,将浓度为 10^8 IU/mL 的阳性标本用不含 HBV-DNA 的血清梯度稀释到 10^7 IU/mL 和 10^3 IU/mL,以 10^7 IU/mL(高值血清)及 10^3 IU/mL(低值血清)作为检测样本。每天对两种浓度标本分别平行检测 4 次,且均使用上述批号试剂检测。每批实验均带质控及标准品,批间间隔不少于 2 h,连续检测 5 天,记录原始数据,统计分析批内及批间的标准差(SD)和变异系数(CV)。

1.3.2 正确度 采用参加室间质评比对的方法,对 2011 年参加卫生部室间质评的 HBV-DNA 结果进行总体评估,计算平均偏倚。

1.3.3 功能灵敏度 按照 CLSI EP17-A 文件,将浓度为 10^8 IU/mL 的标本用不含 HBV-DNA 的血清梯度稀释到 200 IU/mL、100 IU/mL、50 IU/mL,作为检测标本。对上述 3 种浓度的标本每天检测 1 次,每次做 6 个平行实验,连续检测 3 d。计算 3 个检测限浓度标本检测的精密度(CV 值),从中选择最接近于 20%CV 的对应浓度,即为可定量报告的最低浓度。

1.3.4 线性验证 按照 CLSI EP6-A 文件,将浓度为 10^8 IU/mL 标本用不含 HBV-DNA 的血清梯度稀释到 10^3 IU/mL、

10⁴ IU/mL、10⁵ IU/mL、10⁶ IU/mL、10⁷ IU/mL 作为检测样本。每份标本做双份平行检测且均使用上述批号试剂检测,每批实验均带质控及标准品。以标本浓度的预期对数值为横坐标,实测对数值为纵坐标,做相关性回归分析。以样本浓度的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标,做相关性回归分析。

2 结 果

2.1 精密度验证 ABI 7300 CV 结果见表 1,结果均达到《医学实验室质量和能力认可准则》中基因扩增检验项目分析性能标准(CV_{批内}<4.8%,CV_{批间}<6.4%)。

表 1 ABI 7300 精密度验证结果

HBV-DNA	批内		批间	
	SD	CV(%)	SD	CV(%)
10 ³	0.15	4.61	0.17	5.33
10 ⁷	0.16	2.38	0.26	3.87

2.2 正确度验证 2011 年 HBV-DNA 定量卫生部临检中心室间质评统计结果见表 2。本仪器参加 2011 年卫生部临检中心 HBV-DNA 定量室间质评活动,获室间质评 100 分,平均偏倚为 3.51%,符合卫生部质评要求(偏倚不超过 8%),验证通过。

表 2 2011 年 HBV-DNA 定量卫生部临检中心室间质评统计结果

标本编号	本实验室结果对数	卫生部靶值	偏倚	评价结果
1111	6.91	6.76	2.2%	通过
1112	0.00	0.00	0.0%	通过
1113	6.54	6.52	0.3%	通过
1114	2.93	3.27	10.0%	通过
1115	2.89	3.27	11.6%	通过
1121	3.66	3.74	2.1%	通过
1122	3.53	3.74	5.6%	通过
1123	6.65	6.76	1.6%	通过
1124	0.00	0.00	0.0%	通过
1125	6.41	6.52	1.7%	通过

2.3 功能灵敏度验证 200 IU/mL 检测限浓度的 CV 值为 13.5%,100 IU/mL 检测限浓度的 CV 值为 17.8%,50 IU/mL 检测限浓度的 CV 值为 22.7%。100 IU/mL 检测限浓度的 CV 值为 17.8%,最接近于 20%,与试剂说明书中给定的最低检测下限(<100 IU/mL)相符,验证通过。

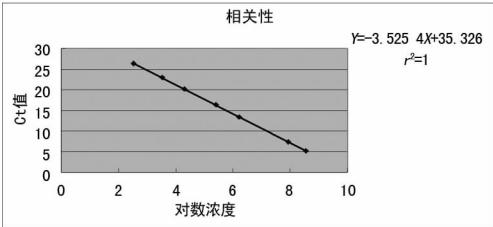


图 1 项目相关性统计散点图、拟合直线回归方程及 r² 值

2.4 线性验证 以标本浓度的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐

标,做相关性回归分析见图 1,其中相关系数(r²)为 1.0,r²>0.99,相关性关系符合要求。以标本浓度的预期对数值为横坐标,实测对数值为纵坐标,做线性回归分析见图 2,Y=1.025 4X-0.162,斜率为 0.97~1.03,线性关系符合要求。

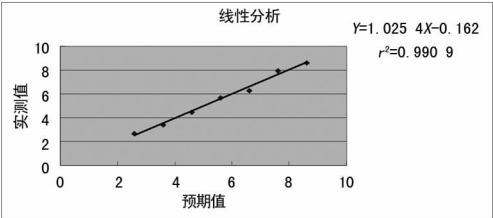


图 2 项目线性统计散点图、拟合直线回归方程及 r² 值

3 讨 论

随着检验医学的发展和对质量要求的提高,人们开始认识 and 关注检测系统的重要性。即使生产厂商已提供了仪器性能的初步参数,仍应在正式用来检测患者标本和发检验报告前,对其的性能进行重新评估。这是保证检验质量的一个重要措施,也是实验室认可的要求[4]。

PCR 作为分子生物学的一种检测技术,凭其高度的敏感性与特异性现已广泛应用于临床[5]。ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪可进行多色荧光检测,结果重复性好,线性范围广,分辨率高,采用卤钨灯作为光源,可发出全光谱的光源,且可对实时数据进行监控,并有熔点曲线实时显示分析[6]。

ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪精密度验证实验表明,其在检测浓度为 10⁷ IU/mL、10³ IU/mL 的标本时,均具有较高的精密度,其结果均达到《医学实验室质量和能力认可准则》中基因扩增检验项目分析性能标准。同时参加 2011 年卫生部临检中心 HBV-DNA 定量室间质评结果均为 100 分,且偏倚达到要求,说明该仪器的测定准确度良好。在功能灵敏度试验中所得到的 CV 最接近 20% 的数值与厂家给定的值相符。在线性方面,ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪也呈现出了良好的线性范围,可以满足临床的检测要求。

综上所述,ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪是一部具有良好精密度、正确度、灵敏度及线性范围较宽的检测系统,既可满足临床的需求,也符合医学实验室质量和能力认可要求。

参考文献

[1] 丛玉隆,邓新立. 实验室 ISO15189 认可对学科建设的几点启示[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):128-131.
[2] 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.
[3] 徐建华,黄宪章,庄俊华,等. 罗氏 Modular 全自动生化分析仪酶学指标检测性能验证[J]. 检验医学,2010,25(2):81-85.
[4] 陈渊博,郑文婷,尹志军,等. CA7000 全自动凝血仪性能验证[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(2):209-211.
[5] 祁金友,樊卫. 实时荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 DNA 室内质控累积数据的评价[J]. 检验医学与临床,2011,8(15):1845-1846.
[6] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:101-102.