

• 论 著 •

分子诊断定量项目分析性能验证程序探讨

罗卉丽¹,袁 杭²,毛 源^{2△},张厚智²

(1. 十堰市妇幼保健院检验科,湖北十堰 442000;2. 南京金域医学检验所,江苏南京 210042)

摘 要:目的 探讨分子诊断定量项目的分析性能验证程序。方法 依据《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》和美国国家临床实验室标准化协会(CLSI)颁布的相关文件对实验室开展 PCR 检测乙型肝炎病毒核酸进行方法学性能验证。结果 本实验室乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)检测的重复不精密度(SD)分别为 0.109 和 0.105;日间不精密度(SD)为 0.157 和 0.137;与参比实验室结果比较回归方程为 $Y=0.947X+0.343$,线性相关系数为 0.990;线性范围为 5.00~1.10;定量检出限为 500 IU/mL;溶血对标本检测没有影响。结论 实验室开展分子诊断项目应当进行分析性能验证,选择合适的方法可以进行明确的性能验证,明确检测项目性能指标对项目的临床使用有非常积极的作用。

关键词:性能验证; 正确度; 精密度; 线性验证; 干扰实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2360-03

Exploration of the verification process for the analytic performance of the quantitative project of molecular diagnosis

Luo Huili¹,Yuan Hang²,Mao Yuan^{2△},Zhang Houzhi²

(1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health-Care Hospital of Shiyan, Shiyan, Hubei 442000, China;

2. Nanjing kingmed Clinical Laboratory Co., Ltd. Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: **Objective** To explore the verification process for the analytic performance of the quantitative project of molecular diagnosis. **Methods** Based on "Medical laboratory accreditation criteria for quality and competence in the field of molecular diagnostics application note" (CL-36)(2014) and the relevant documents published by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the performance verification methodology of PCR detection for hepatitis b virus nucleic acid was achieved. **Results** The within-run precision of DNA detection for the hepatitis b virus was 0.109 and 0.105; and the between-run precision was 0.157 and 0.137. Compared with the reference laboratory, the regression equation was $Y=0.947+0.343X$, and the linear correlation coefficient was 0.990. The linear range was 5.00~1.10 and the quantitative detection limit was 500 IU/mL. Hemolysis had no effect on the detection of samples. **Conclusion** The laboratory with molecular diagnostic program should conduct analytic performance verification, and the appropriate method should be chosen to clear performance verification. **Conclusion** Clearing the performance indicators of detection projects has a very positive role in the clinical use of detection projects.

Key words: performance verification; accuracy; precision; linear validation; interference test

检测系统或方法学的分析性能评价是临床检验质量管理的重要内容,但很多资料对如何进行分析性能验证没有明确的规定和指导,同时分子项目方法的特殊性,其分析性能验证的方式和判断依据也存在很多争议和不统一。实时荧光定量 PCR 方法是分子实验室开展检测人体内 HBV-DNA 水平最常见的一种项目。笔者以实验室 HBV-DNA 定量检测为例,探讨如何进行分子诊断定量项目的分析性能验证。

1 材料与方法

1.1 标本来源 标本来源于南京金域医学检验所。重复性精密度验证及线性验证采用 2014 年上半年间来自江苏省各地的临床样本进行测定。中间精密度验证采用北京康斯坦彻提供的高低值室内质控品进行测定,批号:201305001。分析灵敏度验证采用 2014 年卫生部 HBV-DNA 室间质评样本进行测定和试剂厂家的标准物质。临床样本在实验室接收后第一时间分离血清,所有标本当天收集并置于-20℃保存备用。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、恒温金属浴、5145R 高速冷冻离心机。上海科华生物技术有限公司生产的 HBV-DNA 定量荧光检测试剂盒,批准文号:国食药监械(准)字 2012 第 3400803 号。

1.3 方法

1.3.1 正确度验证 参考 EP9-A2 文件^[1],与已通过临床基

因扩增检验实验室技术验收并有连续参加过 20 个测试 HBV-DNA 定量项目的 PT 或室间质评全部合格的实验室进行 40 例临床样本比对,与广州金域基因实验室进行临床标本的比对。计算二者线性相关系数(R),并进一步计算回归曲线。利用回归方程,分别计算该实验室当检测值 lg 为 3、4、5、6、7 时的理论检测值,然后计算出每个浓度的偏倚百分比,偏倚百分比=(测量值-理论值)/理论值×100%。每个浓度的偏倚百分比与偏倚 7.5%比较,偏倚百分比小于±7.5%表示可接受。

1.3.2 精密度验证

1.3.2.1 重复性精密度 选择高低值标本,按规定的操作方法,在短时间内及稳定的条件下各作 10 次重复测定。计算其均数($\bar{x}$)、标准差(s)与变异系数(CV)。以能力验证/室间质评评价界限(靶值±0.4 对数值)作为允许总误差(TEa),重复性不精密度小于厂家技术指标; $SD < 3/5 TEa (TEa = 0.4 Lg)$,即通过。

1.3.2.2 中间精密度 选择室内质控作为衡量期间精密度的依据。选择具有医学决定水平的正常或异常质控品,按照常规标本的方法测定,测定结果在不出控的前提下利用前 3 个月测定的数据逐步累积最终得出最适 $\bar{x}$ 、s。以此作为判断今后该批号质控数据是否在控的依据。期间不精密度小于厂家技术指标; $SD < 4/5 TEa (TEa = 0.4 Lg)$,即通过。

1.3.3 线性验证 取 HBV-DN 最高浓度标本 D020,检测值为 1.10×10^8 IU/mL,用 HBV 阴性血清做 10 倍梯度稀释,一直稀释到 400 000 倍至 2.75×10^2 IU/mL。由于 HBV-DNA 定量项目每批实验均使用 4 个浓度的标准物质进行定量分析标准曲线的制作,实验质控要求标准曲线的相关性 $r^2\geqslant0.98$,方可报告检测结果。其每次的四个标准物质的浓度为 4.00×10^7 、 4.00×10^6 、 4.00×10^5 、 4.00×10^4 IU/mL,所以明确的线性范围为 $4.00\times10^4\sim4.00\times10^7$ IU/mL。而厂家给出的线性范围为 $5.00\times10^2\sim1.00\times10^8$ IU/mL。需验证线性范围是否下限可以到达 5.00×10^2 IU/mL,上限是否可以达到 1.00×10^8 IU/mL。

1.3.4 分析灵敏度验证 取 2014 年卫生部 HBV-DNA 室间质评样本 1411,靶值为 2.51×10^5 IU/mL,进行 10 倍、100 倍、200 倍、1 000 倍稀释检测。同时取试剂厂家标准物质稀释到 500 IU/mL 检测 20 次,95%结果符合预期要求(2.70 ± 0.4)。检验实际操作中所检出的标本下限值是否与厂商提供的检出下限值相符。

1.3.5 干扰实验 选取 5 个 HBV-DNA 阳性且无溶血、外观正常的全血临床样本,经全血冻融使之溶血。分别检测溶血前、后的 HBV-DNA 定量值,每个样本重复测试 4 次。检验血红蛋白(HGB)对 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测的影响。

1.3.6 质控 每次实验时均做阴性、低值与高值室内质控。低值与高值质控结果在实验结束时均进行对数转换并录入 URT 系统。当质控结果在控时,实验数据才能采用,否则重新进行检测。本实验室的购买的质控品均为北京康彻斯坦公司生产。

1.4 统计学处理 所有统计均将样本测定浓度值(IU/mL)进行对数转化后计算。使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。

2 结 果

2.1 正确度验证结果 浓度值的对数分别为 3、4、5、6、7 时,其偏倚百分比均小于 $\pm7.5\%$ 。准确度符合要求。见表 1。

表 1 HBV-DNA 正确度验证结果(%)

浓度(Lg)	测定值	理论值	偏倚	允许偏倚
2	2.77	2.90	+4.68	$<\pm7.5$
3	3.68	3.76	+2.71	$<\pm7.5$
4	4.73	4.46	-5.70	$<\pm7.5$
5	5.80	6.04	+4.10	$<\pm7.5$
6	6.75	6.92	+2.50	$<\pm7.5$
7	7.65	7.59	-0.78	$<\pm7.5$

2.2 精密度验证结果

2.2.1 重复性精密度 重复性精密度测定低、高值 S 值分别为 0.109、0.105,均小于《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》规定的重复不精密度技术指标[小于 $0.24(3/5\text{ Tea})$],与重复不精密度技术指标[小于 $0.24(3/5\text{ Tea})$]比较,95%的置信区间 $2SD<0.24$ 为可接受。见表 2。

表 2 HBV-DNA 重复性精密度验证结果(IU/mL)

组别	$\bar{x}$	s	重复不精密度指标
低值样本	4.395	0.109	$<0.24(3/5\text{ Tea})$
高值样本	6.439	0.105	$<0.24(3/5\text{ Tea})$

2.2.2 中间精密度 中间精密度统计 3 个月累积的 S 低值为 0.157,高值为 0.137,均小于《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》规定的中间不精密度技术指标

[小于 $0.32(4/5\text{ Tea})$]。与中间不精密度技术指标[小于 $0.32(4/5\text{ Tea})$]比较,95%的置信区间 $2SD<0.32$ 为可接受。见表 3。

表 3 HBV-DNA 中间性精密度验证结果

月份	组别	$\bar{x}$ (IU/mL)	s (IU/mL)	CV (%)	数据点 个数
2014 年 2 月	低值样本	4.34	0.15	3.46	35
	高值样本	6.50	0.12	1.85	35
2014 年 3 月	低值样本	4.39	0.16	3.64	36
	高值样本	6.59	0.15	2.28	36
2014 年 4 月	低值样本	4.35	0.16	3.68	37
	高值样本	6.56	0.14	2.13	37

2.3 线性验证结果 1.10×10^8 IU/mL 浓度的标本一直稀释到 2.75×10^2 IU/m,测定结果见表 4;将所有的 8 个点做回归分析,直线方程 $Y=-3.286X+44.229$,相关性 $r^2=0.998$ 。见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

表 4 HBV-DNA 线性验证结果

编号	稀释倍数	理论结果(IU/mL)	检测结果(IU/mL)
X1	1	1.10×10^8	1.10×10^8
X2	10	1.10×10^7	2.94×10^7
X3	100	1.10×10^6	1.10×10^6
X4	1 000	1.10×10^5	1.16×10^5
X5	10 000	1.10×10^4	1.48×10^4
X6	100 000	1.10×10^3	9.82×10^2
X7	200 000	5.50×10^2	5.04×10^2
X8	400 000	2.75×10^2	1.98×10^2

2.4 分析灵敏度验证结果 室间质评样本稀释后检测结果显示可以检测到 2.51×10^2 浓度,具体见表 5。

表 5 HBV-DNA 分析灵敏度验证结果

编号	稀释倍数	理论结果(IU/mL)	检测结果(IU/mL)	差异(IU/mL)
1	1:10	2.51×10^4	1.30×10^4	0.29
2	1:100	2.51×10^3	1.55×10^3	0.21
3	1:200	1.26×10^3	6.96×10^2	0.26
4	1:1 000	2.51×10^2	1.07×10^2	0.27

取试剂厂家标准物质稀释到 500 IU/mL 检测 20 次,19 例标本结果在(2.70 ± 0.4)IU/mL 以内。

2.5 溶血对检验结果的影响 每个样本溶血前后的平均 HBV-DNA 水平偏倚数均未超过 7.5% ,显示血红蛋白水平小于 41 g/L 时对 HBV-DNA 荧光定量检测的结果无影响。见表 6。

表 6 溶血对检验结果的影响

编号	溶血前 HBV-DNA 水平均值(IU/mL)	溶血后 HBV-DNA 水平均值(IU/mL)	HGB 水平 (g/L)	偏倚 (%)
1	7.00	6.86	28	2
2	8.21	7.99	16	2.7
3	5.48	5.21	11	4.9
4	7.92	7.65	39	3.4
5	5.97	5.94	41	0.5

3 讨 论

PCR 方法在临床分子诊断中展现出巨大的应用价值,但临床实验室必须充分了解其方法性能及采取相应质控措施,才

能确保实验结果的准确。临床基因扩增检验是中国临床检验技术中目前唯一需要审核准入的技术。ISO15189 和 CAP 认可要求中规定在开展某一检测项目前需进行方法学验证。由此可见,方法学性能验证是临床实验室开展 PCR 项目前必须进行的工作。许多学者对检测系统的性能评价做过研究,大多集中在精密度、准确度、灵敏度、特异度和多系统比较等性能参数^[2-4]。基本没有进行干扰实验和线性的验证。同时,也有文献指出,对于多点校准的检测项目,一般不需要进行分析测量范围来评价实验^[5]。但笔者认为,多点校准的检测项目,在多个校准点之间的测量范围是不需要进行评价实验,但一般试剂厂家给出的测量范围超过多个校准点的上限和下限,对于超出上限的测量范围和低于校准下限的测量范围是需要进行实验确认的。

2014 年修订的《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》中规定定量检测方法和程序的分析性能验证中增加了干扰实验,说明干扰物质在分子诊断项目中越来越被重视,但分子诊断所涉及的方法也很多,随着生物技术和个体化医学的发展,分子诊断使用的方法和标本种类也明显增多,而每种方法可能被影响的干扰物质也不尽相同,而哪些干扰物质会对所开展的检测项目产生影响也并不明确,需要实验进行确认。HBV-DNA 定量项目所使用的血清标本,实验证实血红蛋白浓度 41 g/L 时对血清标本没有影响,而一般血液标准溶血++++时,血红蛋白的浓度都小于 15 g/L,所以笔者认为溶血对 HBV-DNA 检测没有影响。至于脂血是否有影响,需收集到合适的标本来进一步确认。

对于不精密度的评价,以往没有明确的判断标准,大多数实验室使用 CV 来判断,而 CV 的标准没有明确的要求。2014 年新修订的应用说明给出的检测系统不精密度要求判断指标是:重复性精密度小于 3/5 TEa,中间精密度小于 4/5 TEa。这就意味着新的标准使用 SD 来判断不精密度,重复性精密度小于 0.24 对数值,中间精密度小于 0.32 对数值,但这个标准准确性有待验证。本次实验室用来判断的标准是依据 95% 的置信区间重复性精密度小于 3/5 TEa,中间精密度小于 4/5 TEa。笔者觉得这样的标准更加合理。

对于本分子诊断项目方法学性能验证的方法其设计均按照最新版《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189:2012)文件和《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》的要求进行,参考了生化定量学科的方法,具有很强的实用性,但其设计也存在一些缺陷:(1)在线性验证中,

由于没有 1.00×10^8 IU/mL 的标准物质,故采用临床标本来验证,而笔者使用的 1.10×10^8 IU/mL 的临床标本是通过稀释样本检测乘以稀释倍数计算出来的浓度,由于样本的稀释和检测都可能存在误差,所以 1.10×10^8 IU/mL 为可接受的检测结果而非真值,故其实验只能证明线性范围上限能达到厂家描述的 1.00×10^8 IU/mL,但并没有得到具体的本实验室上限的值。(2)在干扰实验验证中仅仅完成了溶血实验,其他的感染因素因标本原因未能完成。

综上所述,分子诊断项目的方法学性能验证是 ISO15189 认可要求要完成的内容,也是实验室开展分子项目的工作,目的是让实验室清楚所开展检测项目的性能情况,以更好的服务临床工作。以前性能验证的具体内容没有明确规定,随着新版《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189:2012)文件和《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》的出台,实验室工作者清楚了要验证的具体内容,但仍然对如何进行这些指标的验证不是很明确和统一,笔者实验室提出了一套验证的方法可有效的明确性能的具体情况,能够很好地用于项目的方法学评价。

参考文献

- [1] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Ep9-A2 N Method comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- [2] Zacher BJ, Moriconi F, Bowden S, et al. Multicenter evaluation of the elecsys hepatitis B surface antigen quantitative assay[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(11): 1943-1950.
- [3] 蒋玲丽,王雪亮,王华梁,等. 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸方法学性能验证程序的探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(5): 28-32.
- [4] 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.
- [5] 杨有业,张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 168.

(收稿日期:2015-03-02)



(上接第 2359 页)

理癌前病变有重要意义。

参考文献

- [1] Jin-liang Wang, Yi-zhuo Yang, Wei-Wei Dong, et al. Application of Human Papillomavirus in Screening for Cervical Cancer and Precancerous Lesions[J]. Asian Pacific J Cancer Preven, 2013, 14(5), 2979-2982.
- [2] Cuzick J, Szarewski A, Mesher, et al. Long-term follow-up of cervical abnormalities among screened by HPV testing and cytology: result from the Hammersmith study[J]. Int J Cancer, 2008, 122(5), 2294-2300.
- [3] 郑文华,李可瑜,唐璇霓. 薄层液基细胞学联合 HPV 检测在宫颈癌筛查中的应用[J]. 广东医学, 2013, 34(14): 2189-2190.
- [4] 王金华,宋光耀,刘英霞. TCT 联合 HC2 在宫颈癌筛查中的临床

应用[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(17): 2119-2121.

- [5] Balbi G, Napolitano A, Giordano F, et al. Role of the association of high-risk HPV identified by real-time PCR in cervical preneoplastic lesions. Eur J Gynaecol Oncol, 2012, 33(6): 467-471.
- [6] 孙笑非,顾依群,王爱春,等. 高危型人乳头瘤病毒检测结合薄层细胞学检查在宫颈癌筛查中的价值评估[J]. 中华实验和病毒学杂志, 2013, 27(4): 273-276.
- [7] 佟锐,王纯雁. HPV、TCT 联合检测在宫颈癌中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4): 580-581.
- [8] 朱军,林颖,阮海波,等. 浙江沿海地区宫颈病变患者中高危型 HPV 检测及其临床价值[J]. 中华实验和病毒学杂志, 2014, 27(3): 212-214.

(收稿日期:2015-05-22)