

• 短篇论著 •

# ISO15189:2012 与临床实验室定量检测程序分析性能评价\*

任亚萍, 胡 敏<sup>△</sup>

(中南大学湘雅二医院检验科, 长沙 410011)

**摘 要:**目的 根据国际标准化组织(ISO)15189:2012 要求,建立适用于临床实验室定量检测程序分析性能评价的实验方案,对 Beckman Coulter IMMAGE 800 检测系统进行性能评价。方法 参照美国临床和实验室标准化委员会(CLSI)的有关文件及相关文献,结合工作实际,设计验证方案,对 Beckman Coulter IMMAGE 800 检测系统 6 个常规检测项目的正确度、精密度、分析测量范围(AMR)、临床可报告范围(CRR)和生物参考区间 5 个性能指标进行评价,并与厂家提供的分析性能或公认的质量指标进行比较。结果 IMMAGE 800 特定蛋白分析仪各项目的相对偏倚在 0.88%~3.25%,均小于规定的允许偏倚;各项目批内精密度在 1.07%~4.00% 范围内,均小于原卫生部临检中心能力验证(PT)/室间质量评价(EQA)的 1/4TEa 质量要求,各项目批间精密度在 1.39%~6.17% 范围内均小于 PT/EQA 的 1/3TEa 质量要求;各项目的回归方程斜率均在 0.97~1.03 范围内, $r^2 > 0.995$ ,线性良好;各项目临床可报告范围能够满足临床检测需求;各项目引用的参考区间合适。结论 Beckman Coulter IMMAGE 800 特定蛋白分析仪在正确度、精密度、分析测量范围、临床可报告范围和生物参考区间 5 个方面验证合格,能满足实验室需求。该研究验证方案和实验方法简便易行,对规范实验室建设和实验室认可具有重要意义。

**关键词:**特定蛋白分析仪; 性能评价; ISO 15189:2012

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.027

**中图法分类号:**R446

**文章编号:**1673-4130(2018)02-0209-05

**文献标识码:**B

国际标准化组织(ISO)15189:2012<sup>[1]</sup>(以下简称新版准则)是目前国际最权威、全球通行的医学实验室认可规范。检验程序性能验证是新版准则的核心技术要素,也是临床实验室管理的重要技术要素。新版准则技术要素 5.5.1.2 条款对检验程序的性能验证做出明确规定,要求申请认可的实验室应对检测程序的主要分析性能进行验证,证实其能够达到所要求的性能标准。对于定量检验程序来说,中国合格评定国家认可委员会(CNAS)应用说明<sup>[2]</sup>要求性能验证内容至少应包括正确度、精密度和可报告范围,某些项目比如肿瘤标志物还应包括分析灵敏度。

特定蛋白分析仪是临床检验工作中常用的仪器设备,设备的性能是否合格对检验结果准确性至关重要。目前国内已有许多实验室使用 Beckman Coulter IMMAGE 800 特定蛋白分析仪,但尚未见国内外对该仪器进行系统的性能评价报道。本实验室于 2015 年 12 月 25 日以优异成绩顺利通过了 CNAS 认可,本文以新版准则及应用说明为依据,主要参照美国临床和实验室标准化委员会(CLSI)的有关文件,结合自身实践,以 Beckman Coulter IMMAGE 800 特定蛋白分析仪为例,对以下检测项目,包括免疫球蛋白 G(IgG)、免疫球蛋白 A(IgA)、免疫球蛋白 M(IgM)、补体 C3、补体 C4、C 反应蛋白(CRP)、类风湿因子

(RF)、抗链球菌溶血素 O(ASO),从正确度、精密度、分析测量范围、临床可报告范围和生物参考区间方面进行性能验证,同时总结在验证过程中的经验,建立简便易行的定量检测程序的性能验证方案和实验方法,希望对其他临床实验室定量检验性能验证时提供帮助和参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本研究的全部实验对象均来自于中南大学湘雅二医院的患者和健康体检者,留取随机新鲜血清标本,标本无溶血、黄疸、脂血等。

**1.2 仪器与试剂** Beckman Coulter IMMAGE 800 特定蛋白分析仪;Beckman Coulter 原装配套试剂 IgG、IgA、IgM、C3、C4、ASO、RF、CRP(批号依次为: M501049、M505541、M502437、M503778、M409210、M410141、M501021、M410280)、校准品(CAL1 批号: M408041;CAL5 Plus 批号: M310188)、中值质控品(Liquichek<sup>TM</sup> Immunology Control 2 批号: 66302)、高值质控品(Liquichek<sup>TM</sup> Immunology Control 3 批号: 66303)、稀释液 1(Dil1 批号: T501040)、缓冲液 1(Buffer1 批号: Z504303)。检测前须对仪器进行校准,同时进行室内质控,只有当室内质控在控后,实验数据才可以用于分析。

## 1.3 方法

\* 基金项目:湖南省科技计划项目(2014FJ3096)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: huminjk@csu.edu.cn。

本文引用格式:任亚萍,胡敏. ISO15189:2012 与临床实验室定量检测程序分析性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 209-213.

**1.3.1 正确度** Beckman Coulter IMMAGE 800 检测系统使用的是配套试剂,以参加卫生部临检中心的室间质评的检测系统作为参比方法,最近 1 年参加卫生部临检中心的室间质评结果全部合格,用待验证的系统作为实验方法<sup>[3]</sup>。实验方法和参比方法分别检测最少 20 份患者血清标本,标本浓度在测量范围内均匀分布,包含高、中、低浓度以及医学决定水平附近浓度。3~4 d 完成测定,每天测定 5~7 个标本,每个标本测定 5 次,1 d 4 h 内完成,计算相对偏倚(%),以不超过卫生部临检中心能力验证(PT)/室间质量评价(EQA)各项项目的允许总误差(TEa%)的 1/2 为判断依据。

**1.3.2 精密度** 根据 CLSI EP15-A3<sup>[4]</sup> 文件,采用 2 个浓度的质控物,每天分析一个批次,每个浓度重复检测 5 次,连续测定 5 d。收集实验数据,计算均值、标准差、变异系数,计算批内精密度与实验室内精密度,并与允许范围进行比较,判断结果是否接受。评价标准:批内精密度<1/4TEa%;实验室内精密度<1/3TEa%。

**1.3.3 分析测量范围** 分析测量范围(AMR)是指患者标本未经任何处理(稀释、浓缩或其他处理),由检测系统直接得到的可靠检测范围。以试剂厂家提供的理论线性范围收集分析测量范围上限的临床标本,低值标本可使用稀释液稀释后得到,按照一定比例混合(5H、4H+L、3H+2L、2H+3L、H+4L、5L),每个稀释度重复测定 3 次,计算均值,记录结果。以 X 表示各样本的理论预期值,以 Y 表示各样本的实测值,计算  $Y=aX+b$  和相关系数  $r^2$ 。线性范围判断标准: $r^2>0.995$ ,回归方程斜率在 0.97~1.03 范围内。

**1.3.4 临床可报告范围** 临床可报告范围(CRR)为患者标本经稀释、浓缩或其他处理后,向临床所能报告的结果范围。在 AMR 范围内选择一例高浓度标本,按照厂商推荐的最大稀释度进行稀释,得出该稀释样本的预期值;在检测系统上进行测定得出实测值。实测值/预测值×100%即为稀释回收率。通常

稀释回收率在 90%~110% 范围内为临床可接受,最大稀释倍数得到验证。最大稀释倍数确定后可结合临床决定水平可确定 CRR,  $CRR=线性范围\times最大稀释倍数$ 。

**1.3.5 生物参考区间** 生物参考区间是取自生物参考人群的值分布的规定区间<sup>[1]</sup>。参考 CLSI C28-A2<sup>[5]</sup> 文件,选择 20 份体检合格的健康人标本,在 IMMAGE 800 检测系统上进行测定,对结果进行统计分析,参照厂商提供的参考区间进行比较。如果 20 例参考个体中不超过 2 例(或 10%的结果)的检测值在参考区间之外,厂商提供的参考区间可以接受,验证通过。否则进行参考区间确认实验。

**1.4 统计学处理** 检测所得的数据均采用 Microsoft Office Excel 2007 软件进行数据统计,作散点图进行线性回归分析,计算回归方程及相关系数。

2 结 果

**2.1 正确度验证结果** 实验方法的检测结果与参比方法的相对偏倚见表 1。6 个检测项目的相对偏倚均小于 PT/EQA 各项项目的 1/2TEa(12.5%),正确度验证通过。

表 1 正确度验证结果

验证项目	绝对偏倚	相对偏倚(%)	偏倚标准差	相对偏倚标准差(%)
IgG	1.39	5.79	1.269	0.98
IgA	0.52	4.16	0.374	1.17
IgM	0.59	3.98	0.223	1.20
C3	0.06	3.54	0.1	1.12
C4	0.01	2.15	0	0.57
ASO	4.51	2.84	4.29	0.40
RF	19.94	5.78	6.61	0.48
CRP	5.82	4.54	4.41	0.91

**2.2 精密度验证结果** 两个水平原装配套质控品,每天分析 1 个批次,每个浓度重复检测 5 次,连续 5 d,每个检测项目均获得 25 个数据。各项项目的批内精密度和实验室内精密度均满足要求,见表 2。

表 2 精密度验证结果

验证项目	批内精密度验证结果			实验室内精密度验证结果		
	水平 1 CV(%)	水平 2 CV(%)	1/4TEa(%)	水平 1 CV(%)	水平 2 CV(%)	1/4TEa(%)
IgA	1.07	1.30	6.25	1.41	1.39	8.33
IgG	2.04	1.37	6.25	2.24	1.98	8.33
IgM	1.49	3.13	6.25	2.56	3.39	8.33
C3	1.12	2.07	6.25	2.68	2.49	8.33
C4	4.00	3.76	6.25	6.17	5.08	8.33
ASO	1.92	2.22	6.25	2.80	3.64	8.33
RF	2.49	1.85	6.25	4.49	5.66	8.33
CRP	1.69	3.49	6.25	4.24	3.26	8.33

**2.3 AMR 验证结果** AMR 的评价结果见表 3,结果显示各项目回归方程斜率在 0.97~1.03 范围内,

$r^2>0.995$ ,在厂家声明的检测范围内线性良好。

表 3 分析测量范围验证结果

验证项目	试验验证范围	回归方程	$r^2$	厂家提供范围
IgG	3.3~35.2 g/L	$Y=1.010X-0.383$	0.998	2.0~36.0 g/L
IgA	0.45~6.81 g/L	$Y=0.995X-0.073$	0.997	0.4~7.0 g/L
IgM	0.27~3.62g/L	$Y=1.024X+0.038$	0.995	0.25~4.0 g/L
C3	0.36~2.62g/L	$Y=1.005X-0.042$	0.998	0.35~3.5 g/L
C4	0.15~0.60 g/L	$Y=1.016X+0.002$	0.997	0.10~1.3 g/L
ASO	31~737 IU/mL	$Y=1.029X-1.199$	0.992	25~800 IU/mL
RF	25~774 IU/mL	$Y=1.001X-2.254$	0.997	20~800 IU/mL
CRP	1.5~80.0 mg/L	$Y=0.999X+1.687$	0.999	1~80.0 mg/L

**2.4 CRR 验证结果** 以检测项目 CRP 为例进行不同稀释倍数测定,最大稀释度测定结果见表 4,结合线性范围上限、最大稀释度和医学决定水平,本检测系统测定 CRP 的 CRR 为 1.0~982.6 mg/L ,CRR 可满足临床检测要求。其他各项目依次进行不同倍数稀释测定,计算回收率,与预期回收率 90%~110% 进行比较,确定最大稀释倍数结合临床决定水平可确定 CRR,见表 5。

表 4 CRP 最大稀释度测定结果

稀释倍数	实测值(mg/L)	预期值(mg/L)	回收率(%)
1:36*	81.9	81.9	100
1:216	78.6	81.9	96
1:432	82.4	81.9	101

注:\*表示 IMMAGE 800 检测系统测定 CRP 浓度时设定的原倍模式为 1:36

表 5 临床可报告范围验证结果

验证项目	不同稀释倍数	预期	临床
	回收率范围(%)	回收率(%)	可报告范围
IgG	100~108	90~110	0.55~208.8 g/L
IgA	93~109	90~110	0.083~230.4 g/L
IgM	94~102	90~110	0.06~146.5g/L
C3	92~104	90~110	0.06~91.62 g/L
C4	98~100	90~110	0.03~22.03 g/L
ASO	94~100	90~110	25~27 000 IU/mL
RF	92~100	90~110	20~28 548 IU/mL
CRP	96~101	90~110	1~982.6 mg/L

**2.5 生物参考区间验证结果** 20 份体检合格的健康人标本,男女各 10 例,年龄 18~65 岁,IgG、IgA、IgM、C3、C4、ASO、RF、CRP 检测均不超过 2 例测定值在参考范围外,见表 6,因而引用的参考区间是合适的,能用于本实验室测定人群。

表 6 生物参考区间验证结果(n=20)

验证项目	参考区间	超限个数(n)	有效性
IgG	7.51~15.6 g/L	1	有效
IgA	0.82~4.53 g/L	1	有效
IgM	0.46~3.04 g/L	0	有效
C3	0.79~1.52 g/L	1	有效
C4	0.16~0.38 g/L	0	有效
ASO	<116 IU/mL	0	有效
RF	<20 IU/mL	0	有效
CRP	<8 mg/L	0	有效

3 讨论

正确度用偏倚来度量,首先必须知道靶值,靶值可以是参考方法定值或是有证参考物质的认定值,也可以是 PT/EQA 的统计值。参考方法定值和有证参考物质认定值是确定靶值的最好方法,但由于我国临床检验参考系统不完善,具有互通性的参考物质由于价格高、有效期短且项目不全等因素的影响,对于很多检验项目来说很难实现<sup>[6]</sup>。PT/EQA 统计值是众多的实验室剔除离群值之后的统计值,近年来国际上也强调应通过检测具有互通性的 PT/EQA 样本实现检验结果的一致性<sup>[7]</sup>。正确度验证实验可采用以下方案<sup>[8]</sup>:(1)有条件的实验室可以通过与参考方法比对或检测具有互通性的有证参考物质获得偏倚。赋值参考物质的来源包括,有证参考物质(CRMs):已用参考方法或决定性方法定值,可从美国国家标准局(NIST)或其他国际组织认可的提供者获得;从能力验证试验(PT)中获得的参考物:如 CAP 和卫生部检验中心能力验证试验中提供的调查品;厂商提供的正确度确认物或质控物;室间质量评价计划中使用的质控物;由第三方提供的已用不同方法定值的物质。(2)利用 PT/EQA 样本进行评估。在参考方法、参考物质不易获得的情况下,可用 PT/EQA 的样本代替,但必须保证有足够的 PT/EQA 样本,在检测前将标本分装,保证检测用量,其余冻存;其次要注意待测定物质在一定时间内的稳定性和互通性。在测定 PT/EQA 样本时可采用 CLSI EP-15A2<sup>[9]</sup> 方案(每天分析一个批次,2 个浓度水平,各测定 2 次,连续测定 5 d)或 EP 15-A3<sup>[4]</sup> 方案(每天分析一个批次,2 个浓度水平,各测定 5 次,连续测定 5 d),如果测定的均值在验证区间内则正确度得到验证,如果在验证区间外,则计算均值与靶值的偏倚,若小于规定的允许偏倚则验证通过,否则联系厂家寻求帮助。(3)可以与参加 CNAS 认可的机构或其他有资质机构组织的进行正确度验证或室间比对计划。在实际工作中,有一些实验室通过统计 PT/EQA 回报结果计算项目合格率代替正确度验证是不可取的。对于配套系统,实验室可无需再按照 CLSI EP 9 文件进行正确度确认<sup>[3]</sup>,可以按照 CLSI EP-15A<sup>[10]</sup> 和 WS/T 420-2013<sup>[11]</sup> 文件进行正确度验证<sup>[4]</sup>。本实验室计算的相对偏倚均小于规定的允许偏倚(<1/2TEa),说明该检测系统结果准确,达到质量要求。

精密度是指在规定条件下获得的独立测量结果之间的一致性程度,验证样品可以是质控品或新鲜冷冻血清,但必须保证至少两个不同浓度,如果有可能尽量选择参考区间两端或临床决定水平处的浓度,以确定对临床有影响的关键浓度点的性能。精密度验证实验可以采用以下方案:(1)CLSI EP15-A2<sup>[9]</sup> 方案:在常规质控在控的条件下,每天分析一个批次,2 个浓度水平,各测定 3 次,连续测定 5 d。计算批内 CV 和批间 CV,并与评价标准比较。评价标准可以为

厂商声明、卫生部临床检验中心室间质评要求(批内不精密度按  $1/4TEa$ 、批间不精密度按  $1/3TEa$ )、CLIA,88 法案、中华人民共和国国家标准或卫生行业标准等。(2)EP15-A3<sup>[4]</sup>方案:在常规质控在控的条件下,每天分析一个批次,2 个浓度水平,各测定 5 次,连续测定 5 d。计算数据处理同 EP15-A2 方案。(3)EP5-A2<sup>[12]</sup>方案:实验室先进行重复性试验,重复性 CV 满足要求后可以按 EP5-A2 简易方案,在常规质控在控的条件下,将试验样本作为患者样本,每批 1 次,连续 20 d,计算均值、标准差、CV。本实验室采用 EP15-A3 方案,结果显示各项的批内精密度在  $1.07\% \sim 4.00\%$  范围内,均小于 PT/EQA 的  $1/4TEa$  质量要求,各项的试验室内精密度在  $1.39\% \sim 6.17\%$  范围内均小于 PT/EQA 的  $1/3TEa$  质量要求。表明 IMMAGE800 检测系统精密度良好,满足性能评价要求。

实验室可采用 CLSI EP6-A<sup>[13]</sup>方案来验证厂家声明的 AMR,但统计学处理稍显复杂,在实际工作中可以参考以下简便方法:选择一浓度接近略高于 AMR 的高值标本和一浓度接近或略低于厂商声明 AMR 的低值标本,或者用配套的稀释液对高值标本进行稀释,制成不低于 5 个线性浓度标本<sup>[14]</sup>。每个浓度重复测定不低于 2 次,以判断方法的精密度是否符合要求。以样本号(或已知值)为横坐标,实测值为纵坐标作图,计算  $Y=aX+b$  和相关系数  $r$ ,若  $r \geq 0.95$ ,回归方程斜率在  $0.97 \sim 1.03$  范围内,实验涉及的浓度即为 AMR。本实验室通过对各项的线性评价,结果显示,各项的回归方程斜率在  $0.97 \sim 1.03$  范围内,  $r^2 > 0.995$ ,IMMAGE800 检测系统在厂家声明的检测范围内线性良好。由于 C3、C4 的临床高值标本较少,使用 C3、C4 高值质控品和校准品也达不到要求,目前也尚无 C3、C4 线性范围试验高值商品购买,本实验室的线性范围验证的范围未能覆盖厂家声明的线性范围。查询本实验室近 3 年的发布的检测报告,发现 C3 和 C4 中、低值标本更为多见更具临床意义,且 C3、C4 的最高报告值也远远小于本实验验证的线性范围上限。所以,在可以满足临床需求的前提下,可采用本实验室的验证的线性范围作为权宜之计,并在今后的临床工作中收集范围更广的临床数据进行进一步的评价,为临床提供有价值的实验室信息。

CRR 的上限通过最大稀释度验证试验来确定。通常稀释回收率在  $90\% \sim 110\%$  范围内为临床可接受,若回收率达不到要求,则需降低稀释倍数重新试验,直至得出临床可接受的最大稀释度,确定最大稀释倍数结合临床决定水平可确定 CRR<sup>[15]</sup>。本实验室结合 AMR 上限、最大稀释倍数和临床决定水平确定各项目 CRR,能够满足临床检测需求。参考区间是取自生物参考人群的值的分布的规定区间。按照 CLSI C28-A2<sup>[5]</sup>要求,选择合适的统计学方法进行归纳分析,临床检测结果如果是在确定的参考区间内,临

床上视为“正常”,超出参考区间视为“异常”。在临床工作中应注意有些检测项目,如肌酐、红细胞计数等的参考区间受年龄和性别的影响,应考虑分组验证参考区间。本实验室通过对 20 例健康人标本进行上述项目的测定,各项目均不超过 2 例测定值在参考范围外,满足性能要求。

总之,本研究对 Beckman Coulter IMMAGE 800 特定蛋白分析仪测定 IgG、IgA、IgM、C3、C4、ASO、RF、CRP 的主要分析性能验证结果与厂家声明或预期用途基本一致,能保持精密度高,正确度好,并具有良好的线性,参考区间合适,能达到质量要求,更好地为临床服务。建立的性能验证方案和实验方法简便易行,能为其他临床实验室定量检验方法学性能评价时提供帮助和参考,对提高检验质量和规范实验室认可具有重要意义。

## 参考文献

- [1] International Organization for Standardization. Medical laboratories-requirements for quality and competence: ISO 15189[S]. International Organization for Standardization, 2012.
- [2] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则在临床化学检验领域的应用说明: CNAS-CL38 [S]. 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
- [3] 康凤凤, 王治国. ISO 15189:2012 与临床检验定量检测方法确认和性能验证[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(12): 881-884.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias: EP15-A3 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Defining, establishing and verifying reference intervals in the clinical laboratory: C28-A2 [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.
- [6] 庄俊华, 徐宁, 陈茶, 等. 医学实验室质量体系文件范例 [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 815-912.
- [7] GREG M W, MYERS G L, GANTZER L M, et al. Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures[J]. Clin Chem, 2011, 57(8): 1108-1117.
- [8] 张秀明. 浅析定量检测程序分析性能验证实验方案设计 [J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(6): 428-430.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: EP15-A2 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. User demonstration of performance for precision and accuracy: EP15-A [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2001.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 临床生物化学检验常规项目分析质量指标: WS/T403-2012 [S]. 中华人民共和国卫生部, 2012.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: EP5-A2 [S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2004.
- [13] National Committee for Clinical Laboratory Standards. E-

valuation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach: EP6-A [S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.

[14] 中华人民共和国卫生部. 临床化学设备线性评价指南: WS/T408-2012[S]. 中华人民共和国卫生部, 2012.

[15] ZHANG X M, WANG W J, WEN D M, et al. Analytical performances and heart failure research of the BNP and NT proBNP assays on the cobas e601 and ADVIA centaur[J]. Clin Lab, 2013, 59(7/8): 715-725.

(收稿日期: 2017-08-20 修回日期: 2017-10-28)

• 短篇论著 •

# HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒性能验证\*

杨佳佳, 张彦懿, 刘华伟, 黄江渝<sup>△</sup>  
(成都市第三人民医院检验科, 成都 610031)

**摘要:**目的 基于 ISO15189:2012 要求, 对一种国产 HBV-DNA 实时荧光定量聚合酶链反应检测试剂盒的性能参数进行验证, 以评价其是否可应用于临床检测。方法 依据《医学实验室质量和能力认可准则》相关文件对试剂盒的正确度、精密度、检测下限、线性范围、特异度和抗干扰能力进行性能验证。结果 试剂盒正确度符合要求( $< \text{靶值对数值} \pm 0.4$ )。低值和高值的批内精密度 CV 为 4%、0.65%, 标准差(s) 为 0.19、0.04; 低值和高值的中间精密度 CV 为 4.75%、1.33%, s 为 0.17、0.09。HBV-DNA 定量的检测下限定为 100 IU/mL。线性范围为  $1.00 \times 10^2 \sim 5.00 \times 10^8$  IU/mL。特异度符合要求。血红蛋白浓度不大于 28 g/dL、总胆红素浓度不大于 30 mg/dL、三酰甘油浓度不大于 3 200 mg/dL, 对检测结果没有影响( $< \text{靶值对数值} \pm 0.4$ )。结论 试剂盒的性能参数符合厂家声明, 可以应用于临床检测工作。

**关键词:** 乙型肝炎病毒 DNA; 实时荧光定量聚合酶链反应; 试剂盒; 性能验证

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.028 **中图法分类号:** R440

**文章编号:** 1673-4130(2018)02-0213-05 **文献标识码:** B

我国是乙型肝炎病毒感染的高发国家, 携带率约为 10%, 慢性乙型肝炎患者 2 000 万至 4 000 万例, 乙型肝炎病毒 DNA 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测是诊断慢性 HBV 感染、选择抗病毒治疗及判断抗病毒疗效的重要指标<sup>[1-4]</sup>。故, HBV-DNA 定量检测试剂盒性能符合要求具有重要意义。根据《医学实验室质量和能力认可准则》(ISO15189: 2012, CNAS-CL36)5.5.1.2 定量检测方法和程序的分析性能验证内容至少应包括正确度、精密度、线性、测量和/或报告范围、抗干扰能力等<sup>[5-6]</sup>。本实验室以 CNAS-CL36 为依据, 制定了 HBV-DNA 定量检测试剂盒性能验证方案, 包括正确度、精密度、检测限、线性范围、特异度和抗干扰能力验证。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 用于正确度验证的二级标准物质购自广州邦德盛生物科技有限公司(以下简称 BDS), 其量值可溯源至国家一级标准物质(GBW09150)。用于批内精密度验证的质控物购自达安基因, 用于中间精密度验证的质控物购自康彻思坦。用于检测限(灵敏度)验证, 线性范围验证, 特异度验证, 抗干扰能力验证的二级标准物质和参考品购自 BDS。

**1.2 仪器与试剂** LC COBAS Z480 荧光定量 PCR

仪(瑞士罗氏公司)。试剂购自中山大学达安基因股份有限公司的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法), 批号为 2016001, 按试剂盒说明书进行操作。

## 1.3 方法

**1.3.1 正确度验证** 在测定范围内选择 5 个已知浓度的样本, 其中包括 4 个二级标准物质样本和 1 个阴性样本进行正确度检测。计算测量平均值与靶值偏差, 按照国家卫计委临床检验中心的判断标准, 结果在小于靶值对数值 $\pm 0.4$  为通过。

**1.3.2 精密度验证** 选择达安基因乙型肝炎病毒室内质控物两个浓度( $10^4$ 、 $10^6$ )进行批内精密度检测, 同一天每个样本重复提取 20 次, 检测 20 次。选择康彻思坦室内质控物两个浓度( $10^3$ 、 $10^6$ )进行中间精密度检测, 质控品随样本检测日一起检测, 检测 20 次。计算低、高两浓度样本对数值变异系数(CV)和标准差(s), 应符合检测浓度对数值的  $CV < 5\%$ , 批内精密度  $s \leq 3/5 TEa(0.24)$ , 中间精密度  $s \leq 4/5 TEa(0.32)$ , 反之试剂性能评估不通过。

**1.3.3 检测限(灵敏度)验证** 以 HBV 二级标准物质, 编号: GBW(E)090664 作为基础样本, 用配套的 DNA 样品稀释液进行倍比稀释, 按照试剂说明书要

\* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(16PJ049)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: jiangyuhuang@163.com。

本文引用格式: 杨佳佳, 张彦懿, 刘华伟, 等. HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒性能验证[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 213-217.