

HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评估及分析*

刘伟平, 杨新春, 殷明刚[△]

(自贡市第一人民医院检验科, 四川自贡 643000)

摘要:目的 根据国际标准化组织(ISO)15189 实验室认可要求,评估乙型肝炎病毒(HBV)DNA 定量检测程序的测量不确定度。**方法** 采用室内质控获得的中间精密度计算 HBV-DNA 测量重复性引入的测量不确定度,采用卫生部室间质量评价结果计算 HBV-DNA 偏倚引入的测量不确定度,将二者合成计算出合成标准不确定度和扩展不确定度。**结果** HBV-DNA 在室内质控水平为 4.03(对数的倒数)时实验室内测量重复性引入的相对测量不确定度为 3.45%,HBV-DNA 偏倚引入的相对测量不确定度为 5.27%。相对合成标准不确定度为 6.30%;相对扩展不确定度为 12.60%;而 HBV-DNA 在该水平的相对测量不确定度可表示为(4.03±12.60)%。**结论** HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度可作为检验结果质量持续改进的依据,并用于解释临床结果。

关键词: 肝炎病毒,乙型; DNA,病毒; 聚合酶链反应; 荧光

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.01.016

中图法分类号:R446;R373.2

文章编号:1673-4130(2019)01-0059-03

文献标识码:A

Evaluation and analysis of measurement uncertainty on real-time fluorescence quantitative detection of hepatitis B virus DNA*

LIU Weiping, YANG Xinchun, YIN Minggang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Zigong First People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: Objective To evaluate the uncertainty of measurement of HBV-DNA quantitative test procedure according to laboratory accreditation requirements of ISO 15189. **Methods** The uncertainty of measuring repeatability of HBV-DNA was obtained from intermediate precision by testing the indoor quality control. The bias uncertainty of HBV-DNA was obtained from testing results of external quality assessment of National Center for Clinical laboratories. And then the synthesis calculated the combined standard uncertainty and expanded uncertainty were calculated. **Results** The quality control level of HBV-DNA was 4.03 (Log), and the relative uncertainty of measurement repeatability introduced in the laboratory was 3.45%. The relative uncertainty of measurement introduced by bias of HBV-DNA was 5.27%. The relative standard uncertainty was 6.30%, and relative expanded uncertainty was 12.60%. So the relative uncertainty of HBV-DNA at this level could be expressed as 12.60%. **Conclusion** The measurement uncertainty evaluation of hepatitis B virus DNA can be used as the basis for the continuous improvement of the quality and to explain the clinical results.

Key words: hepatitis B virus; DNA, viral; polymerase chain reaction; fluorescence

测量不确定度是一个与测量结果相联系的参数,其表征合理地赋予被测量之值的分散性^[1-2]。国际标准化组织(ISO)15189:2012《医学实验室质量和能力的专用要求》明确指出,实验室应为检验过程中用于报告患者样品被测量值的每个测量程序确定测量不确定度。实验室应规定每个测量程序的测量不确定度性能要求,并定期评审测量不确定度的评估结果^[3]。因此,进行测量不确定度评估对实验室具有重

要意义。检验项目的不确定评定可通过实验室的室内质量控制和室间质量评价数据计算出来^[4-7]。本研究采用实验室室内质量控制的中间精密度和卫生部室间质量评价结果,计算了乙型肝炎病毒(HBV)DNA 定量项目的测量不确定度。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 StrataGene Mx3005P 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Agilent 公司,HBV-DNA 荧光

* 基金项目:四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ526);自贡市重点科技计划项目(2017SF09)。

作者简介:刘伟平,男,副主任技师,主要从事临床免疫和分子生物学检验的研究。△ 通信作者,E-mail:yimg1973@163.com。

本文引用格式:刘伟平,杨新春,殷明刚. HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评估及分析[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(1):59-61.

定量检测试剂盒购自湖南圣湘生物科技有限公司,室内质控品为自制质控品。

1.2 方法

1.2.1 检测程序 每年定期对 StrataGene Mx3005P 实时荧光定量 PCR 检测系统进行校准,同时,每年对 HBV-DNA 荧光定量检测试剂盒进行性能评价,每批次试剂均进行留样再测比对,确定检测试剂盒的性能达到要求。自制 HBV-DNA 室内质控品,保存于 -70 °C 超低温冰箱,使用前进行全面性能评价,稳定性好。

1.2.2 中间精密度测定 收集 2016 年 10—12 月获得的相同批号室内质控结果,计算批间变异系数(CV%),其数值等于实验室内测量重复性引入的相对测量不确定度 $[u_{rel}(Rw)]$ 。

1.2.3 偏倚(bias) 根据 2014—2016 年本实验室参加卫生部室间质量评价的结果计算偏倚引入的相对不确定度,按以下步骤进行:(1)单次 PT 的偏倚值(bi)和相对偏倚值(bi,rel)。 bi = 单次 PT 测得的 EQA 结果 - 该次 PT 相对应的 EQA 靶值; bi,rel = (单次 PT 测得的 EQA 结果 - 该次 PT 相对应的 EQA 靶值)/该次 PT 相对应的 EQA 靶值 $\times 100$ 。

(2)HBV-DNA 检测方法和实验室的偏倚(RMS_{bias})及相对偏倚 $[RMS_{rel}(bias)]$ 计算公式: $RMS_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_i bi^2}{n}}$; $RMS_{rel}(bias) = \sqrt{\frac{\sum_i bi,rel^2}{n}}$ 。(3)HBV-DNA 单次 PT 公认值的测量重复性引入的不确定度计算公式: $u_{rel}(cons,i) = \frac{RSD_{R,i}}{\sqrt{m}}$; $RSD_{R,i}$ 表示单次 PT 各实验室间的相对重复性, m 表示参加单次 PT 的实验室数量。(4)HBV-DNA 多次 PT 公认值的测量重复性引入的不确定度计算公式: $u_{rel}(Cref) = \frac{\sum_{i=1}^n u_{rel}(cons,i)}{n}$; n 表示 PT 次数。(5)HBV-DNA 偏倚引入的相对测量不确定度计算公式: $u_{rel}(bias) = \sqrt{RMS_{rel}^2(bias) + u_{rel}^2(Cref)}$ 。

(6)相对合成标准不确定度(u_{cref})的计算由中间精密度引入的相对不确定度和偏倚引入的不确定度合成。计算公式: $u_{cref} = \sqrt{u_{rel}^2(Rw) + u_{cref}^2(bias)}$ 。(7)相对扩展不确定度评定。相对扩展不确定度等于相对合成标准不确定度 \times 包含因子(K),计算公式: $U = K \times u_{cref}$ 。若取 95% 置信限,则 $K = 2$ 。

2 结果

2.1 偏倚引入的测量不确定度评估结果 通过 2014—2016 年卫生部室间质量评价结果计算所得 HBV-DNA 偏倚引入的相对测量不确定度为 5.27%。见表 1。

2.2 实验室内测量重复性引入的测量不确定度评估结果 质控数据均值为 4.03,实验室内测量重复性引

入的相对测量不确定度(u_{rel})为 3.45%。见表 2。

表 1 偏倚引入的测量不确定度评估结果

EQA 批号	结果	靶值	bi	bi,rel	$RSD_{R,i}$	$u_{rel}(cons,i)$
201414	3.92	4.10	-0.18	-4.39%	3.25%	0.230%
201425	3.82	3.85	-0.03	-0.78%	3.46%	0.245%
201523	4.37	4.67	-0.30	-6.42%	2.86%	0.202%
201511	4.80	4.54	0.26	5.73%	2.94%	0.208%
201614	4.66	4.99	-0.33	-6.61%	2.86%	0.202%
201624	4.51	4.28	0.23	5.37%	3.12%	0.221%

表 2 HBV-DNA 的中间精密度测定结果($n=40$)

批次	质控值 (Log)	批次	质控值 (Log)	批次	质控值 (Log)	批次	质控值 (Log)
1	4.16	11	3.8	21	4.32	31	3.94
2	3.68	12	3.88	22	4.19	32	4.05
3	3.98	13	4.13	23	3.73	33	4.15
4	3.95	14	3.96	24	4.09	34	4.16
5	3.96	15	4.09	25	4.23	35	3.93
6	3.99	16	4.12	26	4.18	36	4.11
7	3.89	17	3.96	27	4.00	37	3.96
8	4.22	18	3.98	28	4.25	38	3.93
9	4.11	19	3.95	29	4.14	39	3.95
10	4.03	20	3.94	30	4.12	40	4.02

2.3 HBV-DNA 的相对扩展不确定度 由表 1、表 2 计算得到相对合成标准不确定度(u_{cref})为 6.3%;相对扩展不确定度为 12.6%($K=2$)。

3 讨论

医学实验室认可已成为我国三级甲等医院检验科提升检验质量和能力的重要途径。ISO15189 实验室认可明确要求实验室要评估定量项目的测量不确定度。测量不确定度与检验总误差概念和意义有一定区别^[7]。

评定测量不确定度评定的意义主要体现在以下 2 个方面:(1)确认患者结果是否符合实验室设定的质量目标,确定将患者结果与之前相同类型的结果或临床决定值进行比对时其变化或波动值在多大范围内有意义。(2)实验室在解释测量结果量值时应考虑测量不确定度。通过对不确定度的评价,可提高实验室的检测水平,有助于临床医生更好地理解、使用检验结果^[8]。HBV-DNA 定量已广泛用于乙型肝炎患者临床疗效判断和预后评估,测量不确定度结果可作为检验结果质量的参考依据^[9-10]。

测量不确定度可在中间精密度条件下通过测量质控物获得的量值进行计算,这些条件包括测量程序标准操作中尽可能多而合理的常规变化。评定偏倚的测量不确定度主要通过测量有证参考物质、利用室内质评等获得^[11-12]。

本研究采用弱阳性水平 HBV-DNA 质控品获得的中间精密度和室间质量评价结果评定了 HBV-

DNA 在该水平上的不确定度。实际测量过程相关联的不确定度分量应从接收样品启动测量程序开始,至输出测量结果终止。按本方法计算所得测量不确定度不确定来源上主要包含了分析测量阶段中各种影响组分(如操作人员、仪器、试剂、校准品、质控品、环境条件等)的变异。但未包括与分析前和分析后阶段相关的测量不确定度分量,也未包括由于人群生物学变异而产生的测量不确定度。

每个实验室应建立自己的目标不确定度,以评价各检验指标是否满足临床要求^[13-14]。目前,尚未有检验程序的测量不确定度的国家标准或性能规范,据文献报道,扩展不确定度若大于 10%,需改善检测系统性能及稳定性,提高检测的准确度和精密度^[15]。本实验室根据实验室自身的条件,制定 HBV-DNA 的目标不确定度为 10%。而本研究评定得到的相对不确定度(12.6%)略高于实验室设定的目标不确定度,提示应从检测人员、检测仪器、检测试剂和方法、所使用的校准品和质控品、环境温湿度条件等方面入手,采取加强人员培训、提高试剂质量、变更方法、加强仪器检定和校准、严格控制环境温湿度,逐步改进检验质量,以缩小测量不确定度,为临床疾病的诊治提供更有价值的参考依据。

4 结 论

HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评定具有重要意义,可作为临床实验室检验结果质量持续改进的依据,并用于解释临床检验结果。

参考文献

[1] 肖倩,张轩,李有强,等.化学发光分析仪检测激素类项目的测量不确定度评估[J].实用医学杂志,2015,31(9):1532-1535.

[2] 田恩冰,李颖,李伟强,等.“自上而下”法评定检验项目的测量不确定度[J].标记免疫分析与临床,2017,24(1):113-117.

[3] SCHNEIDER F, MAURER C, FRIEDBERG R C. Inter-

national organization for standardization(ISO) 15189[J]. Ann Lab Med, 2017, 37(5):365-370.

[4] MAGNUSSON B, OSSOWICKI H, RIENITZ O, et al. Routine internal- and external-quality control data in clinical laboratories for estimating measurement and diagnostic uncertainty using GUM principles[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2012, 72(3):212-220.

[5] 徐润源,张洁.8 项生化指标测量不确定度评估及允许范围的初步研究[J].上海交通大学学报:医学版,2016,36(12):1777-1783.

[6] 童清,周睿,梁玉芳,等.使用室内质控与能力验证数据评估测量不确定度[J].检验医学与临床,2016,13(20):2866-2868.

[7] 张诗诗,王薇,赵海建,等.临床检验总误差与测量不确定度[J].现代检验医学杂志,2016,31(5):153-156.

[8] 卢妙莲,胡珺,高云龙,等.血液常规检验项目测量不确定度评定[J].实用医学杂志,2014,30(11):1817-1819.

[9] 蒋玲丽,王雪亮,肖艳群,等.荧光定量 PCR 测定 HBV-DNA 测量不确定度评定的探讨[J].检验医学,2014,29(3):241-244.

[10] 庄健海,罗娜,黄星华,等.2 项分子生物学诊断指标测量不确定度评定[J].国际医药卫生导报,2013,19(6):756-762.

[11] 吕京.常规临床检验结果不确定度的若干问题[J].临床检验杂志,2011,29(5):322-323.

[12] 包安裕,李艳,陈晨.22 项生化检测项目测量不确定度的评价[J].现代检验医学杂志,2014,29(6):156-158.

[13] 熊大迁,张灵玲,许安春.目标不确定度的确定方式与不确定度的定期评审在质量改进中的价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(17):2369-2371.

[14] 汪旭强,方洁芸. Nordertest 准则评价 13 项生化检测项目的测量不确定度[J].国际检验医学杂志,2017,38(1):109-110.

[15] 尹晶平,董菁,徐杰,等.测量不确定度评估临床干生化检验的初步应用[J].检验医学与临床,2015,12(20):3033-3034.

(收稿日期:2018-08-16 修回日期:2018-10-22)

(上接第 58 页)

Micellization of mixtures of amphiphilic drugs and cationic surfactants: a detailed study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2012, 92(1):16-24.

[4] 钱盈盈,严玉澄,沈玥,等. Klotho 在急性缺血再灌注性肾损伤中的变化及其与凋亡的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2014,34(6):788-793.

[5] HU M C, KURO-O M, MOE O W. Klotho and kidney disease[J]. J Nephrol, 2010, 23 Suppl 16: S136-144.

[6] HU M C, SHI M, ZHANG J, et al. Klotho deficiency is an early biomarker of renal ischemia-reperfusion injury and its replacement is protective[J]. Kidney Int, 2010, 78(12):1240-1251.

[7] PANNU N, KLARENBACH S, WIEBE N, et al. Renal replacement therapy in patients with acute renal failure: a systematic review[J]. JAMA, 2008, 299(7):793-805.

[8] LIU Y J, SUN H D, CHEN J, et al. Klotho: a novel and early biomarker of acute kidney injury after cardiac valve replacement surgery in adults[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(5):7351-7358.

[9] SEO M Y, YANG J, LEE JUN-YONG, et al. Renal klotho expression in patients with acute kidney injury is associated with the severity of the injury[J]. Korean J Intern Med, 2015, 30(4):489-495.

(收稿日期:2018-08-02 修回日期:2018-10-08)