

- [13] KHAN F Y, MATAR I. Chylous ascites secondary to hyperlipidemic pancreatitis with normal serum amylase and lipase[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(3): 480-482.
- [14] 唐权. 血清淀粉酶和脂肪酶测定在急性胰腺炎诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(15): 2188-2189.

- [15] 浦清, 龚玲, 居培红, 等. 血清脂肪酶对 60 岁以上高脂血症性急性胰腺炎患者诊断的意义[J]. 江苏医药, 2018, 44(1): 104-105.

(收稿日期: 2018-09-22 修回日期: 2018-12-06)

• 短篇论著 •

EP-15A3 在荧光定量 PCR 测定 HBV-DNA 精密度和正确度验证中的应用*

李育敏, 张水兰, 阚丽娟, 汤花梅, 熊 丹, 许晓清, 李方勇, 张秀明[△]

(深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广州深圳 518001)

摘 要:目的 探讨美国临床和实验室标准化协会(CLSI) EP15-A3 在荧光定量聚合酶链式反应(PCR)法测定乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)精密度和正确度验证中的应用价值。方法 按照 CLSI EP15-A3 方案, 以北京康彻思坦高、低 2 个浓度水平 HBV-DNA 标准物质作为精密度和正确度验证样本, 采用荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA。每个样本重复测定 5 次, 持续 5 d, 得到 25 个数据。Grubbs' 法计算离群值, 单因素方差分析用户重复性(批内不精密度, S_R)、实验室内不精密度(S_{WL})和验证区间(VI), 分别与厂家声明的批内不精密度(σ_R)和实验室内不精密度(σ_{WL})进行比较, 如果 $S_R \leq \sigma_R$ 、 $S_{WL} \leq \sigma_{WL}$, 则精密度验证通过; 如果测量均值($\bar{x}$)在 VI 内, 则正确度验证通过。结果 荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 的结果通过 Grubbs' 法离群值检查, 无离群值。高浓度水平的 S_R (0.87%) $\leq \sigma_R$ (5.00%)、 S_{WL} (1.60%) $\leq \sigma_{WL}$ (5.00%); 低浓度水平的 S_R (3.79%) $\leq \sigma_R$ (5.00%)、 S_{WL} (4.83%) $\leq \sigma_{WL}$ (5.00%); 高、低浓度水平 $\bar{x}$ 分别为 6.54、3.15 Log IU/mL, 均在 VI (6.28~7.04、2.74~3.56 Log IU/mL) 内。结论 运用 CLSI EP15-A3 验证荧光定量 PCR 法测定的 HBV-DNA 的精密度和正确度性能, 高、低 2 个浓度水平的 S_R 与 S_{WL} 符合厂家声明要求, 测量均值在 VI 内, 精密度和正确度验证通过。

关键词: 精密度; 正确度; 性能验证; 乙型肝炎病毒核酸; EP15-A3

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2019.05.033

中图法分类号: R194.2; R446

文章编号: 1673-4130(2019)05-0629-03

文献标识码: B

临床实验室在引进新的测量程序, 检测患者标本及出具患者检测报告之前必须对检测方法的分析性能进行评估。按照 ISO 15189:2012 和 CNAS-CL36:2012《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》^[1], 定量检测方法和程序的分析性能验证应包括精密度和正确度。2014 年 10 月发布的美国临床和实验室标准化协会(CLSI) EP15-A3《用户精密度验证和偏倚评估实验——批准指南》为临床实验室提供了最新的验证厂商声明的测量程序精密度和正确度简便、有效的方法^[2]。目前国内对 CLSI EP15-A3 用于临床分子诊断测量程序的性能验证报道较少, 本研究按照 EP15-A3 方案对荧光定量 PCR 法测定乙型肝炎病毒核酸(HBV-DNA)进行精密度验证和偏倚评估, 为 EP15-A3 在临床分子诊断定量检测

方法和程序分析性能验证的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本测定 样本为北京康彻思坦生物技术有限公司提供的 HBV-DNA 标准物质, 高浓度水平 (4.60E+06 IU/mL) 批号为 201609003, 低浓度水平 (1.41E+03 IU/mL) 批号为 201607003。按照厂家说明书进行分装保存于 -15℃ 以下。

1.2 试剂与仪器 试剂为湖南圣湘生物科技有限公司提供的 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒 (批号 2017012)。仪器为罗氏 cobas® z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪。

1.3 方法

1.3.1 测定流程 样本检测前校准仪器, 每天进行室内质量控制, 质控在控时数据可接受。按照 EP15-A3

* 基金项目: 深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。

[△] 通信作者, E-mail: zxm0760@163.com。

要求,选择高、低 2 个浓度水平样本,每个样本重复测定 5 次,持续 5 d,每个样本得到 25 个数据。

1.3.2 离群值检验 利用 Grubbs'方法,计算所有测定值的均值($\bar{x}$)和标准差(SD)。根据公式(Grubbs'限= $\bar{x} \pm G \times SD$)计算 Grubbs'上、下限值, G 为 Grubbs'因子,当测定值数量 $N=25$ 时, G 为 3.135。判断规则为所有测定结果在 Grubbs'限内,如超出,则判断为离群值。每个样本最多允许 1 个离群值,所有样本不能超过 2 个离群值。

1.3.3 精密度验证 数据分析采用单因素方差分析(ANOVA)计算每个浓度水平的 S_R 和 S_{WL} ,计算公式为:
 $MS1 = \frac{n \sum_{i=1}^k (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(k-1)}$, $MS2 = \frac{n \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{x}_i - x_{ij})^2}{N-k}$,如果 $MS1 \leq MS2$, $S_R = S_{WL} = \sqrt{MS2}$;如果 $MS1 \geq MS2$, $S_R = \sqrt{MS1}$, $S_{WL} = \sqrt{\frac{MS1 + (n_0 - 1)MS2}{n_0}}$ ($MS1$ 为批间均方; $MS2$ 为批内均方; $\bar{x}_i$ 为每批测定结果的均值; $\bar{x}$ 为所有测定结果的均值; x_{ij} 为每一批的每一个测定值; n 为每一批的测定值数量; n_0 为平均每批的测定值数量; k 为全部批次的数量; N 全部测定值的数量)。 $S_R \leq \sigma_R$ 、 $S_{WL} \leq \sigma_{WL}$,则精密度验证通过;否则需计算验证上限(UVL),计算公式为: $df_R = N - k$, $\rho = \sigma_{WL} / \sigma_R$ 或 $\%CV_{WL} / \%CV_R$, df_{WL} 根据 ρ 值查 EP15-A3 附表可得, $UVL_R = F_R \times \sigma_R$ 或 $F_R \times \%CV_R$, $UVL_{WL} = F_{WL} \times \sigma_{WL}$ 或 $F_{WL} \times \%CV_{WL}$ (df 为自由度; ρ 为厂商实验室内不精密度与重复性的比率; CV 为变异系数; F 为验证上限因子,根据 df 和样本数量查 EP15-A3 附表可得), $S_R \leq UVL_R$ 、 $S_{WL} \leq UVL_{WL}$,则精密度验证通过。

1.3.4 偏倚评估 数据分析计算每个浓度水平的测定均值($\bar{x}$)、标准误差($se_{\bar{x}}$)、不确定度(se_{RM})和验证区间

(VI)。计算公式: $se_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{1}{nRun} [S_{WL}^2 - \frac{nRep-1}{nRep} S_R^2]}$, $se_{RM} = \frac{Upper-Lower}{2 \times 1.96}$, $se_c = \sqrt{se_{\bar{x}}^2 + se_{RM}^2}$ 。如果 $se_{RM} = 0$, $df_c = nRun - 1$;如果 $se_{RM} > 0$, $df_c = (nRun - 1) \times (se_c / se_{\bar{x}})^4$ 。 $VI = TV \pm (t_{(1-\frac{\alpha}{2 \times nSam, df_c})} \cdot se_c)$ 。 $nRun$ 为批次数; $nRep$ 为每批中重复测定次数; $Upper$ 和 $Lower$ 为标准物质 95% CI 的上下限; se_c 为 $se_{\bar{x}}$ 和 se_{RM} 的组合标准误差; TV 为标准物质定值; df_c 为 $df_{\bar{x}}$ 和 df_{RM} 的组合自由度; $\alpha = 0.05$; $nSam$ 为标准物质的个数。测定均值在 VI 内,则正确度验证通过。

2 结 果

2.1 离群值检验 将 HBV-DNA 检测原始结果转换成对数值后进行数据分析,以便使数据更符合正态分布,消除指标度量单位不同造成的不良影响。用 Grubbs'法计算高、低 2 个浓度水平样本所有测定结果对数值均在 Grubbs'限内,无离群值。2 个水平测定结果对数值的最大值和最小值见表 1。

2.2 精密度验证 高浓度水平的 $S_R (CV, 0.87\%) \leq \sigma_R (CV, 5.00\%)$ 、 $S_{WL} (CV, 1.60\%) \leq \sigma_{WL} (CV, 5.00\%)$;低浓度水平的 $S_R (CV, 3.79\%) \leq \sigma_R (CV, 5.00\%)$ 、 $S_{WL} (CV, 4.83\%) \leq \sigma_{WL} (CV, 5.00\%)$,精密度验证通过,见表 2。

表 1 Grubbs'法计算荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 的离群值结果(Log IU/mL)

浓度水平	$\bar{x}$	SD	最小值	最大值	Grubbs'	Grubbs'	离群值判断
					下限	上限	
高浓度	6.54	0.10	6.40	6.73	6.23	6.87	无
低浓度	3.04	0.14	2.90	3.28	2.60	3.51	无

表 2 荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 的精密度验证结果(Log IU/mL)

浓度水平	重复性(批内不精密度)				实验室内不精密度				
	S_R	$S_R [CV(\%)]$	$\sigma_R [CV(\%)]$	验证判断	S_{WL}	$S_{WL} [CV(\%)]$	$\sigma_{WL} [CV(\%)]$	$UVL_{WL} [CV(\%)]$	验证判断
高浓度	0.06	0.87	5.00	通过	0.10	3.79	5.00	6.40	通过
低浓度	0.12	1.60	5.00	通过	0.15	4.83	5.00	6.40	通过

2.3 偏倚评估 高浓度水平平均值为 6.54 Log IU/mL,在 VI (6.28~7.04 Log IU/mL)内;低浓度水平平均值为 3.04 Log IU/mL,在 VI (2.74~3.56 Log IU/mL)内,正确度验证通过,见表 3。

表 3 荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 的偏倚评估结果(Log IU/mL)

浓度水平	均值	$se_{\bar{x}}$	se_{RM}	TV	VI	偏倚	验证判断
高浓度	6.54	0.04	0.16	6.66	6.28~7.04	-0.12	通过
低浓度	3.04	0.05	0.18	3.15	2.74~3.56	-0.11	通过

3 讨 论

精密度是指在规定条件下,对同一或类似被测对象重复测量所得值或测得值间的一致程度,反映测量结果随机误差的大小,通常用不精密度表示^[3]。精密度是检测系统的基本分析性能之一和其他方法学性能评价的基础,如果精密度差,则无法进行其他方法学性能评价。在 CLSI 的精密度评价指南中,EP10-A3 是用于同时进行线性、偏倚、精密度和样本携带污染的初步评价^[4],EP5-A3 用于测量程序的精密度性

能确认及验证^[5]。EP15-A3 仅用于验证已经建立的检测方法精密度性能,而不适用于未建立精密度声明的新方法分析性能的确认,主要为临床实验室提供一个简便、有效、可行的方法来验证实验室的不精密度是否与厂家声明的一致,也适用于能力验证失败后或者质量检测未通过,对实验方法改进或校正后再次进行精密度验证。性能指标为 S_R 和 S_{WL} 。 S_R 是指在一系列相同的测定条件下获得的不精密度。测定条件包括相同的测定方法,相同的操作者,相同的测量系统,相同的操作条件,相同的地点,在一段较短的时期中重复测定相同或相似的分析物。 S_{WL} 是指在规定的时间内和相同的操作者使用相同的仪器设备,校准和试剂可以是变化的,得到的不精密度。

正确度是指无限多次重复测量的平均值与真值的一致程度,反映测量结果系统误差的大小,通常用偏倚来度量^[6]。用于正确度评价的 CLSI 指南有 EP9-A3 和 EP15-A3。EP9-A3 采用至少 40 份患者样本进行测量程序比对和偏倚评估,适用于实验室引进新的检测系统或方法,更换新试剂或新仪器,与原有检测系统或参考方法进行比对,评价两个检测系统或方法测定结果的偏倚是否在可接受范围内^[7]。厂商或实验室开发新的测量程序,最好使用 EP9-A3 进行比对及偏倚评估。EP15-A3 采用有值参考物质进行偏倚评价,比对定值和测定结果,其样本数量、重复次数及统计学处理较 EP9-A3 简单,适用于临床实验室进行测量程序的正确度确认和验证。有值参考物质包括有证参考物质、参考方法定值分析物、PT 和 EQA 定值分析物,这些物质也适用于精密度验证。性能指标为相对偏倚,即实验室确定允许偏倚,评价测量偏倚是否在允许偏倚范围内。

与 EP15-A2 相比,EP15-A3 首先在重复测定次数上增加到 5 次,使重复性更可靠,其次,采用 Grubbs'法进行离群值检验,使离群值判断更简单客观。第三,偏倚评估不再采用患者样本进行两种方法的比较,仅利用有值参考物质进行比对,使验证方法更简便。第四,在偏倚评估数据分析中,EP15-A2 判断参考物质靶值是否在测量均值验证区间内,EP15-A3 则判断参考物质测量均值是否在靶值验证区间内,提高统计学效能^[2,8]。

本研究按 CLSI EP15-A3 指南,对荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 进行精密度验证和偏倚评估。

Grubbs'法检验无离群值。高、低浓度水平样本检测均 $S_R \leq \sigma_R$, $S_{WL} \leq \sigma_{WL}$,表明不精密度符合厂家声明要求,精密度验证通过;高、低浓度水平测量均值均在 VI 内,表明测量偏倚与允许偏倚不具有统计学差异,测量偏倚在允许偏倚范围内,正确度验证通过,说明该测量程序能够满足临床需求。目前,国内报道 EP15-A3 多用于临床化学和免疫测量程序的性能验证^[9-10]。本研究以 HBV-DNA 检测为例,将 EP15-A3 应用于临床分子诊断定量检测方法和程序的精密度和正确度验证,供同行参考。

参考文献

- [1] 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分子诊断领域的应用说明:CNAS-CL36:2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of precision and estimation of bias: EP15-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [3] 国家质量监督检验检疫总局. 通用计量术语及定义: JJF 1001-2011[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Preliminary evaluation of quantitative clinical laboratory measurement procedures: EP10-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures: EP5-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [6] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2014:47-52.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples: EP09-A3[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2014.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: EP15-A2[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2005.
- [9] 徐建华,刘冬冬,徐宁,等. CLSI EP15-A3 在临床生化精密度验证中的应用[J]. 临床检验杂志,2016,34(3):215-218.
- [10] 刘海,张伟,王红艳,等. Axceed 260 检测系统精密度和正确度性能验证[J]. 检验医学与临床,2016,13(21):3106-3109.

(收稿日期:2018-10-04 修回日期:2018-12-18)