

• 论 著 •

ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 检测系统性能验证

赵 芹, 辛青松, 李峥嵘, 冯志刚, 李忠信
(东莞康华医院检验科, 广东东莞 523080)

摘 要:目的 验证 ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 检测系统性能, 确定该系统是否稳定、准确、可靠。方法 参考美国临床实验室标准化协会(CLSI)颁布的相关文件, 从精密度、准确度、线性、可比性等方面对 ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 检测系统进行性能评价; 通过稀释标本直至低于检测下限进行定量检出限验证实验; 并与质量目标要求和厂商声明的分析性能进行比较。结果 ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 分析系统的批内精密度(CV 批内)分别为 1.485%、1.990% 和 0.932%; 总精密度(CV 总)分别为 1.876%、3.361% 和 1.891%; 准确度最大偏移为 -6.8%; r^2 为 0.998 3, 回归方程为 $Y=0.974\ 8X+0.050\ 7$, 线性范围为 $1.00E2\sim2.00E8$; 定量检出限为 100 IU/mL; ABIViiA7 与 ABI7500 两台 PCR 仪的可比性: $P=0.115$, $r^2=0.994$, 线性比对直线回归方程为 $Y=0.987\ 2X+0.051\ 7$ 。结论 ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 检测系统具有优良的精密度、准确度、灵敏度、线性, 与 ABI7500 检测系统有良好的相关性, 可用于临床标本检测。

关键词:精密度; 仪器比对; 性能验证

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)05-0669-03

Performance validation of ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA detecting system

Zhao Qin, Xin Qingsong, Li Zhengrong, Feng Zhigang, Li Zhongxin

(Department of Clinical Laboratory, Dongguan Kanghua Hospital, Dongguan, Guangdong 523080, China)

Abstract:Objective To verify the performance of the ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA detecting system for confirming its stability, accuracy and reliability. **Methods** According to the evaluation protocols of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the performance of ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA detecting system was assessed in the aspects of precision, accuracy, linearity and comparability; the quantitative detection limit validation experiments was performed by diluting specimen until quantitative detection limit is lower than the lower limit of detection, and the detection results were compared with the quality target requirements and the analysis capability declared by manufacturers. **Results** The CV in within-run precision of this detection system was 1.485%, 1.990% and 0.932% respectively; the total CV was 1.876%, 3.361% and 1.891%, respectively; the maximum deviation of accuracy was -6.8%; the linear correlation coefficient was 0.998 3; the regression equation was $Y=0.974\ 8X+0.050\ 7$. The linear range was $1.00E2\sim2.00E8$; the quantitative detection limit was 100 IU/mL; the comparability of ABIViiA7 and ABI7500: $P=0.115$, $r^2=0.994$, the linear regression equation was $Y=0.987\ 2X+0.051\ 7$. **Conclusion** The ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA detection system has excellent precision, accuracy, sensitivity and linearity and has a good correlation with ABI7500, which can be used for the detection of clinical specimens.

Key words: precision; instrument comparison; performance qualification

ISO 15189:2012^[1] 5.5.1 指出实验室只能使用已确认的适用于预期用途的检验程序, 确认程序应尽可能充分, 以满足给定用途或某特定领域的应用要求。特别列出了“检验程序的选择、验证和确认”, 包括检验程序的验证、检验程序的确认及测量量值的测量不确定度。GB/T 22576-2008^[2] 明确指出, 临床实验室使用厂家已严格评估的检验方法或试剂盒之前, 应验证相关分析性能以证实在本实验室能达到厂家声明的性能指标。卫生行业标准 WS/T 420-2013^[3] 指出临床实验室应对所用的检验方法或商品试剂盒进行验证。CNAS-CL36^[4] 要求性能验证内容至少应包括正确度、精密度、线性、可报告范围等。笔者依据最新相关文件, 结合 HBV-DNA 试剂盒产品性能要求, 对本室新购进的 ABI ViiA 7 荧光定量 PCR 仪定量测定 HBV-DNA, 验证检测系统性能。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 ABI ViiA 7 实时定量 PCR 仪(ABI 公司)、ABI 7500 实时定量 PCR 仪(ABI 公司)、生物安全柜、恒温金属浴、低温高速离心机等; 中山大学达安股份有限公司生产的乙

型肝炎 DNA 定量检测试剂盒, 批号为 2014011。

1.2 标本来源 标准品为试剂盒配套标准品, 质控品由北京康彻斯坦生物技术有限公司提供, 标本分别为卫生部临检中心室间评价样本和本院门诊及住院患者、体检中心的样本。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证 参照 EP15-A 文件^[5]。每天分析 1 个批次, 选用高中低 3 个浓度质控品, 每个浓度重复测定 4 次, 连续检测 5 d。参照文献^[6]计算批内精密度(CV 批内)和总精密度(CV 总), 同厂家声明的批内精密度(CV 批内)和总精密度(CV 总)进行比较, 判断是否存在差异; 同时, 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), 要求重复性精密度小于 $3/5TEa$; 中间精密度小于 $4/5TEa$ ^[4]。

1.3.2 正确度验证 对卫生部临检中心和广东省临检中心提供的室间质评样本进行检测, 检测结果与已知的靶值和可接受限进行比对。要求样本数 $n\geq 20$, 浓度应覆盖测量范围, 系统误差应小于 $\pm 7.5\%$ ^[4]。

1.3.3 最低定量检出限验证 参照 EP6-A 文件^[7], 将试剂盒

提供的 HBV-DNA 定量 S3 浓度标准品作为基础样本,用阴性血清进行梯度稀释,稀释后的样本浓度分别为 1 000、500、250、100、50 IU/mL,每份样本重复测定 10 次,计算各浓度 CV%,以检出率为 100%,精密度小于 3/5TEa 的浓度定为最低检出限^[4]。

1.3.4 线性范围验证 参照 EP6-A 文件^[7],用阴性血清将 10⁸ 浓度线性参考品梯度稀释成 8 份样本,浓度分别为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ IU/mL,最后浓度为 50 IU/mL (比厂方声明的线性范围低一个数量级),全部实验和数据采集应在同一工作日内完成。分析序列应为随机排列。有显著携带污染时,应用空白隔开样本。每个浓度样本重复测定 3 次。记录测定结果,计算线性相关系数和线性范围。

1.3.5 特异性验证 搜集高载量 HCV、CMV、EBV、HSV2 的阳性标本各 3 份(乙肝表面抗原为阴性),分别检测乙肝表面抗原及乙肝核酸量。要求核酸检测结果全部为阴性^[8]。

1.3.6 参考范围确认 取 15 个年龄、性别均匀分布的健康人血清标本,−80 ℃冻存,每天做 3 个,连续做 5 d^[9]。

1.3.7 比对试验 将 ABI ViiA 7 定量 PCR 仪与已通过卫生部室间质评的 ABI 7500 定量 PCR 仪进行比对,ABI 7500 定量 PCR 仪作为参比系统。参考 EP9-A2 文件^[10],选取本院就诊的 40 例无脂血、无溶血、无黄疸的临床患者血清标本,浓度均匀覆盖测量范围,在两台仪器上进行平行测试,每天监测 10 份标本,标本随机排列,连续监测 4 d,每个样本重复测定 3 次,取 3 次测定的平均值作为比对结果,计算相关系数 r^2 和回归方程,要求相对偏移小于±7.5%^[4]。

1.3.8 室内质控 每次实验室内质控结果在控时,实验数据可采用;否则,应重新进行检测。

1.4 统计学处理 所有统计均将初始浓度值 QDNA 进行对数转化为 LGQ 后计算。使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 精密度验证结果 见表 1。为 CNAS-CL36 医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明附件 A. 2 说明,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),重复性精密度小于 3/5TEa;中间精密度小于 4/5TEa;而计算得出的允许 CV%。验证通过。

表 1 HBV-DNA 精密度验证结果

项目	HBV-DNA S ³	HBV-DNA S ⁴	HBV-DNA S ⁶
$\bar{x}$	3.330	4.950	6.310
s 批内	0.049	0.098	0.059
CV 批内(%)	1.485	1.990	0.932
s 总	0.063	0.166	0.119
CV 总(%)	1.876	3.361	1.891
厂家声明 CV (%)	5.000	5.000	5.000
允许 CV 批内(%)	7.210	4.850	3.800
允许 CV 总(%)	9.610	6.460	5.070

2.2 准确度验证结果 检测 2013 年和 2014 年卫生部和广东省室间质评样本 20 例,结果偏移最大为−6.8%,系统误差均小于±7.5%。不同试剂批号准确度验证,高中低共 5 个浓度样本,结果两批号的平均偏移最大为 0.16%,均小于 EQA 所要求的允许偏移±0.4%。参加 2014 年卫生部室间质评 PT

成绩 100 分。验证通过。

2.3 最低定量检出限 HBV-DNA 浓度大于或等于 100 IU/mL 的稀释样本检出率为 100%,50 IU/mL 和 25 IU/mL 浓度的样本检出率为 50%和 30%,通过计算各浓度样本的总 CV%进行评价,检出率 100%浓度样本的 CV%均小于 5%,在试剂厂家所要求的范围内。因此,该系统能检测到的 HBV-DNA 的最低定量浓度为 100 IU/mL。见表 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.4 线性范围结果验证 见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.5 参考范围确认 15 个数据均低于检测限,因此 95%可信区间即参考范围可确认为小于 100 IU/mL。

2.6 仪器比对 40 份临床样本比对结果,对 3 组平均值进行配对 t 检验,提示 ABI ViiA7 与 ABI 7500 的检测结果差异无统计学意义($P=0.115$);其线性比对回归直线方程: $Y=0.987\ 2X+0.051\ 7(r^2=0.994)$,提示两台仪器具有良好相关性。见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。每份样本的相对偏移均小于±7.5%,符合 CNAS-CL36 医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明中附录 A2 对仪器比对的要求。

3 讨 论

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。ISO15189 是国际医学界普遍承认并遵照执行的关于医学实验室质量和能力方面要求的国际标准,其技术要素 5.3.2 中指出应确定设备(在安装时及常规使用中)能够达到所要求的性能标准。张葵^[11]提出对检测系统性能验证,应多参照 CLSI 相关文件的要求设计实验方案。强调 CLSI 文件的要求通常用于厂商设备、试剂申报及实验室新方法性能参数的建立。而临床实验室引入检测系统或检测方法时,多数厂家均提供了较为完整的性能参数,只需验证其性能。实验室可在符合相关文件要求的前提下,结合自身实际情况设计简单易行的实验方案。因此,笔者通过对 CNAS-CL36 医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明的认真解读,结合达安股份有限公司生产的 HBV-DNA 定量检测试剂盒说明书中“产品性能指标要求”制定和实施如上验证程序,验证仪器性能和评价试剂质量。

ABI ViiA 7 精密度实验表明,在 10³、10⁴、10⁶ IU/mL 数量级上 CV 批内和 CV 批间值均小于 4%,重复性精密度小于 3/5TEa,中间精密度小于 4/5TEa,具有良好的精密度。同时,2014 年参加卫生部室间质评成绩 PT100%;定量检出限方面,ABI ViiA 7 在 HBV-DNA 浓度大于或等于 100 IU/mL 时检出率均为 100%,在浓度为 50 IU/mL 时检出率高达 50%,而造成假阴性的原因可能与操作过程中不可避免的随机误差及标本梯度稀释后的基质效应有关,验证结果符合试剂说明书标识的最低定量浓度 100 IU/mL。线性实验 8 个浓度梯度的质控品,测得 r^2 为 0.998 3,线性方程为 $Y=0.974\ 8X+0.050\ 7$,线性关系良好。按照 CLSI 的 EP9-A2 文件要求,比对试验 $r^2>0.95$ 为相关良好,本实验中,ABI ViiA7 与 ABI 7500 相比,检测结果的 r^2 为 0.995,说明相关性良好;配对 t 检验,提示两台 PCR 仪检测结果差异无统计学意义($P=0.115$),均能用于临床标本的检测。

ABI ViiA 7 是 ABI 公司最新研发的第 7 代荧光定量 PCR 仪,该仪器的 TaqMan 系统使用一组光学滤光片来区分运行期间采集的荧光发射,可校正光路的微小差异;(下转第 712 页)

不强调,往往很多学生,一到下课,直接脱下工作服就放书包了。强调工作服要经常清洗消毒;实验完后消毒洗手;禁止吸烟、吃食物;保持桌面干净整洁,传染性物品放入消毒容器内;如有菌材料溅出,应报告教师及时做出适当处理;在使用实验器材时一定要合理、规范。对在实验中需要的实验物品不准随意抛掷;对潜在的带有生物危害的标本都要进行高压蒸汽灭菌或是其他方法消毒后才能处理。(2)严格遵守实验操作规程。在免疫学实验过程中产生的主要生物危害有:使用离心机离心、操作玻片凝集实验、对动物进行接种、用移液器吹打、去注射器针头等所产生的气溶胶吸入^[2],而这些实验都是免疫学检验实验中的常规实验,每一个学生都必须操作和掌握。除此以外,在实验过程中还可能遇到皮肤黏膜污染、被感染的实验动物咬伤、误食,甚至可能被刺伤割伤等。总之,要求学生在实验过程中必须严格遵守生物安全有关规定,反复强调实验中的安全注意事项,对学生在操作过程中出现的问题及时指导和规范,避免任何意外事件发生的可能。

2.4 加强《免疫学检验》实验室生物安全管理体系的建设 本院在 2008 年成立了生物安全委员会,实验室也专门配备了一名生物安全员,落实到了生物安全管理责任制,教研室主任也定期组织教师学习生物安全的相关标准、政策与法规等,但主要是针对微生物检验实验室,虽然其生物安全管理制度不断得到完善,但是免疫学实验中的一些生物安全问题仍然没有引起足够的重视。所以,加强《免疫学检验》实验室生物安全管理体系的建设十分必要。对免疫学检验实验中的各个技术操作规程也要严格进行规范,每次实验完毕进行相关的记录等。在实验室中,要规范各种标识,使其时效性与警示作用得到保证。在发生紧急情况时的联系电话,事故处理的流程应张贴在明显处等,使工作人员发生问题时,能及时找到处理问题的人。总之,实验室环境的井然有序,管理体系的完善建立,对初入免疫学检验实验室的检验专业学生来说就是最好的示范,并有很强的警示作用^[3]。

2.5 加强《免疫学检验》实验室的清洁与消毒管理 由于免疫

学检验学科的特性,几乎每个实验都要用到仪器设备,所以实验室仪器的保养、清洁与消毒都非常重要,也是学生实验生物安全的重要保障^[4]。在免疫学检验实验中最常用的仪器有:冰箱、高压蒸汽灭菌器、离心机、移液器、恒温干燥箱等常规仪器,由于学生接触的机会非常多,因此消毒和清洁一定要彻底,要充分保证学生的实验安全。其他的有酶标仪、洗板机、水浴箱等仪器设备,虽然使用频率不如常规仪器,但每次使用完毕后也要进行彻底的消毒和清洁。总之,实验室的每台仪器都要由专业人员保管,消毒和清洁工作都要符合生物安全规定,遵守先消毒后清洁的原则^[5]。除此以外,为了保证实验室的生物安全,在实验过程中使用的操作台,其消毒和清洁也要严格按照生物安全进行。另外,免疫学实验室废弃物处理所用的血清标本,抽血的注射器针头等也都要符合生物安全要求,保证无污染为目的。

免疫学检验实验中的生物安全防护知识学习是医学检验专业学生学习生物安全防护知识的重要途径之一,当其具备了相应的生物安全防护知识,不仅能够保证他们在学习期间的生物安全,而且使他们在今后的职业生涯中终生收益。

参考文献

[1] 王保龙,苏虹,伍佳玲.在医学检验专业开展实验室生物安全教学的思考[J].中华疾病控制杂志,2010,20(1):460-462.
[2] 陈宏娟,鞠传余,闫海润,等.医学检验实验室生物安全防护现状与措施[J].中华医院感染学杂志,2012,22(1):139-141.
[3] 刘惠君,刘持,向阳,等.加强医学研究生实验操作中的生物安全防护[J].现代生物医学进展,2009,9(20):3949-3950.
[4] 李红花,李英信,李芳芳,等.加强医学微生物实验室安全管理[J].现代预防医学,2008,35(1):27-28.
[5] 高俊,岩邢,兰云,等.关注学校临床检验实验室的生物安全[J].卫生职业教育,2009,27(3):115-116.

(收稿日期:2014-11-15)

(上接第 670 页)

添加的荧光探针,大大提高了反应的特异性。该系统使用ΔRn 循环曲线可有效识别和检查不规则扩增,进一步确定正确的基线值和阈值。选择适用于 ABI ViiA 7 TaqMan 系统的达安股份有限公司生产的 HBV-DNA 核酸定量检测试剂盒,该试剂盒带有的内标物质参与实验,可有效监控核酸提取过程,减少假阴性结果的出现。

综上所述,ABI ViiA 7 Taqman HBV-DNA 检测系统具有良好的精密度、准确度、灵敏度、可比性,检测范围宽,特异性强,符合标准化实验室的质量管理要求,能用于临床标本检测。

参考文献

[1] International Organization for Standardization. ISO 15189 Medical laboratories-Requirements for quality and competence[S]. Geneva:International Organization for Standardization,2012.
[2] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 22576-2008 医学实验室质量和能力的专用要求[S]. 北京:中国国家标准化管理委员会,2010.
[3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 420-2013 临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证[S]. 北京:中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,2013.
[4] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL36 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[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.
[5] Clinical and laboratory standards institute. EP15-A2 User verification of performance for precision and trueness; approved guideline-second edition[S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2005.
[6] 王薇,王治国,李少男.临床实验室对厂家声明的精密度和真实度的性能验证要求[J].检验医学,2010,25(12):1001-1005.
[7] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach[S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2003.
[8] 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.
[9] 秦绪珍,孙江燕,韩建华,等. COBAS Taqman HBV DNA 的方法学验证[J].现代检验医学杂志,2008,23(1):29-31.
[10] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A User comparison of quantitative clinical laboratory using patient samples[S]. Wayne,PA,USA:NCCLS,2002.
[11] 张葵.定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J].临床检验杂志,2009,27(5):321-323.

(收稿日期:2014-08-18)