

• 论 著 •

## 解脲支原体 DNA 检测室内质控物的制备及质控方案的设计

葛燕梅, 张 娣, 樊苏逸, 袁 杭, 毛 源<sup>△</sup>

(南京金域医学检验所, 江苏南京 210042)

**摘要:**目的 制备解脲支原体(UU)DNA 荧光定量 PCR 室内质控物, 建立室内质量控制体系, 对其临床应用进行初步评价。方法 分别留取 Ct 值为 24~25(阳性)和 32~33(弱阳性)标本和检测结果为阴性的标本, 待留取到 15 mL 时充分混匀, 按每管 150  $\mu$ L 分装作为室内质控物。前 20 次检测采用“即刻法”判断检测结果是否在质控范围内, 20 次以后绘制 Levey-Jennings 图, 确定靶值、标准差(*s*)和变异系数(CV), 采用 Westdard 多规则质控方法对自制室内质控物检测结果进行判断。在 Unity Real Time(URT)系统中使用质控规则配置操作导出 UU-DNA 的功效函数图(OPSPecs 图), 根据 OPSPecs 图设置质控规则。结果 131 次实验中, 前 20 次采用“即刻法”判断室内质控物; 20 次以后采用 Levey-Jennings 图判断, 质控品稳定, 质控规则合理。结论 用临床分泌物混合液制备 UU-DNA 检测项目的室内质控物品, 制备方法简单, 测定结果稳定, 可作为实验室检测 UU-DNA 项目的质控品; 依据 OPSPecs 图设置分子生物学检测项目的室内质控规则简便、实用。

**关键词:**解脲支原体; 室内质控; 质控图; 功效函数图; 质控规则

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.08.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)08-1070-03

## Preparation of internal quality control substance of real-time PCR to analyze UU-DNA and the design quality control programs

Ge Yanmei, Zhang Di, Fan Suyi, Yuan Hang, Mao Yuan<sup>△</sup>

(Medical Laboratory of Nanjing Kingmed, Nanjing, Jiangsu 210042, China)

**Abstract: Objective** Developing an internal quality control substance of *Ureaplasma urealyticum*(UU)-DNA for real-time PCR to establish an internal quality control system and preliminary evaluation its clinical value. **Methods** Internal quality control substance was prepared by mixing samples which Ct value were 24—25(positive sample) and 32—33(weak positive sample), respectively. At the same time, selecting samples that test results were negative as negative control. The target value, standard deviation (*s*) and coefficient of variation(CV) of internal quality control substance were defined by “instant method” for the first 20 runs and Levey-Jennings quality control(QC) chart after the first 20 runs. Using the “Westdard” multi-rule quality control methods to analyze the detection results. Exporting OPSPecs chart by quality control rules in Unity Real Time (URT) system and setting up new quality control rules according with OPSPecs chart. **Results** 131 times of the detection of quality control substance were performed totally. The first 20 runs were defined by “instant method” and later 111 runs were defined by Levey-Jennings QC chart, the results were stable of quality control substance and reasonable quality control rules. **Conclusion** Preparing of internal quality control substance of UU-DNA used in real-time PCR might be easy and stable. So, the internal quality control substance of UU-DNA could be worthy for practical application in this PCR laboratory. Design internal quality control rules based OPSPecs chart in molecular detection is very simple and practical.

**Key words:** *Ureaplasma urealyticum*; internal quality control; quality-control chart; OPSPecs chart; quality-control rules

与常规 PCR 技术相比, 实时荧光定量 PCR 具有高度的敏感性与特异性, 这项检测技术的出现使临床对抗病毒治疗疗效判断达到了核酸定量水平。尽管实时荧光定量 PCR 技术具有特异性强, 能有效解决 PCR 产物污染和自动化程度高等特点, 但严格的室内质量控制体系仍是临床 PCR 实验室不可忽视的问题<sup>[1-3]</sup>。由于目前尚无统一有效的室内质控品, 因此临床 PCR 实验室需要建立符合本单位的室内质量控制体系。在总结多年 PCR 实验室工作经验的基础上, 笔者结合 PCR 实验室工作的实际情况, 自制了解脲支原体(UU)DNA 室内质控物, 绘制 Levey-Jennings 图, 采用 Westdard 多规则质控方法评价 UU-DNA 的室内质控动态<sup>[4-6]</sup>。而且在 Unity Real Time (URT)系统中利用功效函数图(OPSPecs 图)工具软件进行质控规则的设计, 选择使用更加符合的分子项目的质控规则。

## 1 材料与与方法

1.1 质控品来源 收集实验室标本中 UU-DNA Ct 值为 24~

25(阳性)和 32~33(弱阳性)的阳性标本和检测结果为阴性的标本。

1.2 仪器与试剂 试剂使用上海科华生物公司 UU-DNA 检测试剂盒, 仪器使用 ABI 公司的 7300 实时荧光定量仪。

## 1.3 方法

1.3.1 质控品的制备 收集每天 Ct 值为 24~25 和 32~33 的阳性标本分别作为高值标本和低值标本, 收集每天检测结果为阴性的标本作为阴性质控标本, 待留到 15 mL 时充分混匀, 然后将标本进行每管 150  $\mu$ L 分装-20  $^{\circ}$ C 保存, 每次实验前将冷冻保存的标本各自取一管室温复融 20 min 并充分混匀后与正常标本同样进行检测, 记录 Ct 值。

1.3.2 PCR 扩增 按照试剂盒上的操作说明对标本进行 DNA 模板提取, 反应体系为 28  $\mu$ L 的扩增反应液和 2  $\mu$ L 提取的 DNA 模板上清液。扩增结束后, 按照仪器操作获得质控结果和标准曲线, 分别记录高值质控品和低值质控品的 Ct 值。

**1.3.3 质控物的定值** 对自制的质控品连续检测 20 次,用“即刻法”判断检测结果是否在控。第 20 次以后采用 Levey-Jennings 质控图方法,以前 20 次检测结果计算出的均值( $\bar{x}$ )和标准差( $s$ )绘制 Levey-Jennings 图。

**1.3.4 质控规则** 采用的是 Westgard 多规则质控方法;如果阴性质控标本的检测结果为阳性,判断为失控,所有阳性标本均进行重新检测,并增加一定数量的阴性质控标本。如阴性质控标本检测结果为阴性,阳性质控检测结果为阳性,并且测得的高值质控品和低值质控品的要满足笔者利用 OPSPeacs 图工具软件设计的质控规则。

**2 结果**

**2.1 采用“即刻法”判断质控结果** 用 PCR 连续对自制的阳性和弱阳性质控标本检测 20 次,采用“即刻法”判断质控结果,结果在控,见表 1、2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.2 根据 OPSPeacs 图得出建议质控规则** 连续检测 100 次后,在 URT 系统中使用质控规则配置操作导出 UU-DNA 的 OPSPeacs 图,见图 1、2,根据 OPSPeacs 图可得出建议的质控规则。得出的质控规则与项目的总允许误差(TEa)、偏倚(%)和变异系数(CV)等有关。UU-DNA 阳性质控的 TEa 为 12.8,偏倚(%)为 0,CV 为 4.26%。UU-DNA 弱阳性质控的 TEa 为 8.96,偏倚(%)为 0,CV 为 2.96。建议规则均为:1-3s|2-2s|R-4s|4-1s|10-X。

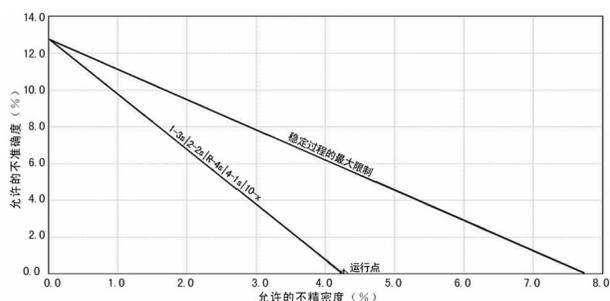


图 1 UU-DNA 阳性质控 OPSPeacs 图

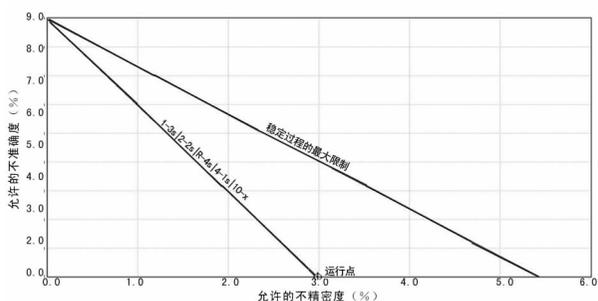


图 2 UU-DNA 弱阳性质控 OPSPeacs 图

**2.3 质控品的 Levey-Jennings 图** 本批自制的阳性和弱阳性质控品,总共进行 131 次室内质控检测,根据质控规则,结果都在控。131 次室内质控阳性和弱阳性质控品 Levey-Jennings 图,见图 3、4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

**2.4 阴性质控品的检测** 自制的阴性质控品,总共进行 131 次室内质控检测,Ct 值均显示为“未检出”,根据质控规则,阴性质控品结果都在控。

**3 讨论**

近年来,临床实验室的管理越来越规范,尤其是临床基因扩增实验室的质量管理日益受到关注。而实验室要获得可靠

的检测结果,必须要建立有效的质量管理体系,其中实验室室内质量控制是保证检验质量的一个重要环节<sup>[5]</sup>。在对临床标本进行检测的同时,需要进行室内质量控制来确保检测结果的准确性。

用于临床基因扩增实验室室内质控的理想质控品应具备以下几个条件:(1)基质与待测标本一致;(2)所含待测物浓度应接近试验的决定性水平;(3)有很好的稳定性;(4)靶值或预期结果已定;(5)无已知的生物传染危险性;(6)单批可大量获得<sup>[7]</sup>。由于现在商品化的质控品尚不齐全,各实验室须根据自己实验室的实际情况自行制备质控品。

UU 支原体感染是近年来国内外最常见的性传播疾病之一<sup>[8]</sup>,临床多用荧光定量 PCR 方法检测 UU-DNA。本实验室在检测过程中发现 UU-DNA 阳性检出率较高,阳性标本易于收集,而且 UU-DNA 送检标本多为用无菌拭子取的临床分泌物混合液,易于采集。基于此种情况,建议将日常收集的 UU-DNA 阳性标本(Ct 值为 24~25)作为室内质控阳性标本,UU-DNA 阴性标本作为室内质控阴性标本,而且考虑到检测的临界值,笔者也收集了 UU-DNA 弱阳性标本(Ct 值为 32~33)作为室内质控弱阳性标本。

笔者将收集的 UU-DNA 不同结果的标本分别充分混匀后,按每管 150  $\mu$ L 用离心管分装好,-20  $^{\circ}$ C 保存。连续检测 20 次,用“即刻法”判断结果是否在控,第 21 次开始采用“Levey-Jennings 图质控法”,用前 20 次检测结果计算得出的和  $s$  绘制 Levey-Jennings 图,判断结果是否在控,采用的是 Westgard 多规则质控方法进行评价。在设计质控方法时,首先要确定质量目标。质量目标可以用 TEa 的形式表示,目前中国尚未确立各项目的 TEa<sup>[9]</sup>。本实验室设置的 TEa 来源为 3s。在检测次数达到 100 次以后,笔者使用 URT 系统中,质控规则配置操作导出 UU-DNA 的 OPSPeacs 图,根据 OPSPeacs 图评价误差检出概率和假失控概率,确定新的质控方法。本研究中根据 OPSPeacs 图得出建议的质控规则 1-3s|2-2s|R-4s|4-1s|10-X;n=2,然后将此规则应用到 UU-DNA 质控品的结果判断,切合实际且能达到临床工作发现误差的要求,同时假失控率也控制在合适的水平。

本研究对收集到的阳性、弱阳性和阴性 3 个不同浓度的标本共进行了 131 次检测,每周进行 3 次检测,连续进行了 10 个月的时间,检测结果仍然比较稳定,因此可以考虑将自制的 UU-DNA 标本混合液作为 PCR 实验室 UU-DNA 检测的室内质控物。

**参考文献**

- [1] Jardi R,Rodriguez F,Buti M,et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in serum by a new rapid real-time fluorescence PCR assay[J]. J Viral Hepat,2001,8(6):465-471.
- [2] Heermann KH,Gerlich WH,Chudy M,et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA in two international reference plasma preparations[J]. J Clin Microbiol,1999,37(1):68-73.
- [3] 申子瑜,李金明. 临床基因扩增检测技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:147-148.
- [4] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,2003:245-258.
- [5] 秦晓光. 室内质控的主要工具——质量控制图[J]. 中华检验医学杂志,2003,26(11):710-713.
- [6] 张正. 分子生物学中 PCR 临床检测的室内质控(IQC)[C]//中华医学会,全国检验医学感染控制和病原检测学(下转第 1074 页)

者又通过热放散和乙醚放散,收集放散液,用谱细胞鉴定,并将 4℃冷吸收后的血清也进行谱细胞鉴定,从而确定抗体的特异性。59 例是自身抗体伴 Rh 系统或 MNs 系统或 Kidd 系统抗体,对于这样的患者,筛选特异性抗原阴性的献血者进行盐水介质、凝聚胺和经典抗人球 3 种方法的交叉配血试验,选取阳性反应强度最弱的供血者。47 例为自身抗体不能排除同种抗体,虽然不能确认抗体的特异性,但据报道同种抗体主要分布在 Rh 系统中<sup>[2-3]</sup>,所以对于这样的患者,筛选 Rh 与受血者同型的献血者血液进行盐水介质、凝聚胺和经典抗人球 3 种方法的交叉配血试验,选取阳性反应强度最弱的供血者。20 例单纯自身抗体阳性的患者的配血方式与自身抗体阳性且不能排除同种抗体的患者相同。在进行交叉配血时,主侧应该使用 4℃冷吸收去除自身抗体的患者血清,而次侧应该使用放散后的患者红细胞,以最大限度地排除自身抗体对于交叉配血的干扰,从而得出最具有临床意义的配血结果,降低输血风险。

自身抗体阳性伴 DAT 阳性的疾病多见于自身免疫性疾病,如系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿关节炎、新生儿溶血病,血液病,如骨髓增生异常综合征,癌症,如淋巴瘤、病毒感染、药物诱导等等。这些患者往往伴有贫血症状而需要输血<sup>[4-5]</sup>。从笔者的实验可以看出,自身抗体和 DAT 的凝集强度与贫血呈正相关,与输血疗效呈负相关。有文献报道,大部分 DAT 阳性的红细胞存活期会缩短<sup>[6]</sup>。结合本研究,可以推断出,自身抗体和 DAT 凝集强度越强,红细胞的存活期越短,从而导致贫血程度越严重。对于这样的患者,输血的危险性较高,输血不当会加重病情,所以除了在交叉配血时要格外严格外,在选择何种血液制品时也需要斟酌。首先,要区分患者是溶血性贫血还是非溶血性贫血。溶血性贫血是由于机体产生了血型抗原特异性的红细胞抗体,形成的抗原抗体复合物,或者细菌代谢产物、β-内酰胺类抗生素等抗原物质黏附于红细胞上,刺激机体产生抗体,激活补体,并通过 ADCC 效应,导致红细胞破坏,从而发生溶血<sup>[7]</sup>。溶血性贫血分为自身溶血性贫血和新生儿溶血病,自身溶血性贫血的患者应选择洗涤红细胞。洗涤红细胞经过生理盐水反复洗涤悬浮红细胞,除去了绝大部分白细胞、血小板、血浆及代谢产物,可避免因血浆蛋白、白细胞、血小板引起的输血反应<sup>[8]</sup>。但有的患者输注洗涤红细胞后导致溶血反应,说明洗涤红细胞在个别自身溶血性贫血患者体内可以被自身抗体或(和)补体所致敏,使得输注的红细胞存活期缩短,输注无效,甚至产生溶血反应。因此,该类患者在治疗过程中必须严格掌握输血指征,应首选药物治疗并查找病因,去除诱因,尽量避免输血。而新生儿溶血病的血液选择则不同,对于 ABO 血型系统所引起的新生儿溶血病应选用 O 型红细胞,而 Rh 血型系统所引起的新生儿溶血病应选用与血清中抗体相对应的 Rh 抗原阴性的 O 型红细胞,血浆均应选择 AB 型血浆,也就是所谓的“重组血”。非溶血性贫血的患者 DAT 阳

性,可能是由于如炎症或免疫功能紊乱导致的非红细胞抗原特异性球蛋白吸附在红细胞上所致,这种结合不会激活补体,不会导致溶血<sup>[9-10]</sup>。因此,非溶血性贫血的患者选择同型的悬浮少白红细胞,可减少白细胞引起的不良反应。另外,对于危重、急性、难治性的溶血性贫血患者,血浆置换可迅速清除自身抗体及补体免疫复合物等,经血浆置换治疗后,加用一定量两种球蛋白可更好控制溶血,诱导缓解。

总之,对于自身抗体阳性伴 DAT 阳性的患者需要严格的控制输血指征<sup>[11-12]</sup>。输血的原则是能不输血尽量不输,必须输血时选择反应强度最弱的,慢速输注,注意观察,并且要积极治疗原发病,降低抗体强度,从而减少输血反应,降低输血风险。

## 参考文献

- [1] 兰炯采. 加强对自身免疫性溶血性贫血输血前试验的研究[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(4): 295-296.
- [2] Wheeler CA, Calhoun L, Blackall DP, et al. Warm reactive autoantibodies: clinical and serologic correlations[J]. Am J Clin Pathol, 2004, 122(5): 680-685.
- [3] 向东, 刘曦, 王健莲, 等. 红细胞温自身抗体的血清学特点分析及配血对策[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(12): 924-926.
- [4] 胡进林, 冒镇, 陈焯. 39 例 Coombs 试验阳性自身免疫性溶血性贫血临床分析[J]. 中国交通医学杂志, 2004, 18(3): 253-254.
- [5] 周静, 徐才刚, 刘霆, 等. 72 例自身免疫性溶血性贫血患者抗体分型及临床意义[J]. 四川大学学报: 医学版, 2003, 34(4): 761-762.
- [6] 杨桂斌, 徐杰, 黄传荣, 等. 73 例直接抗人球蛋白试验阳性结果分析[J]. 陕西医学检验, 1998, 13(2): 54.
- [7] 魏晴, 涂同涛, 周金安, 等. 直接抗球蛋白试验在临床中的应用[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(7): 537.
- [8] 汪传喜, 田兆嵩. AIHA 病人的输血前检查和成分输血[J]. 中国输血杂志, 2000, 13(1): 61-65.
- [9] 王照峰, 张虎, 冯载, 等. 直接抗人球蛋白阳性试验 41 例分析[J]. 中国误诊学杂志, 2012, 12(2): 316.
- [10] 杨世明, 王文婷, 张勇萍, 等. 自身温抗体的特异性及其对交叉配血试验的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(2): 222-223.
- [11] 梁金凤. 自身抗体的分析处理及输血策略[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2425-2427.
- [12] 伍伟健. 同种免疫性抗体致血小板输注无效输血策略的国内外研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(3): 426-429.

(收稿日期: 2015-12-18)



(上接第 1071 页)

术研讨会论文集. 北京: 中华医学会, 2004: 6.

- [7] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2014: 148.
- [8] 梁汉锦. 比较两种检测支原体(UU)的方法[J]. 中国医药指南, 2012, 10(20): 420-421.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 临床实验室定量测定室内质量控制指南(GB/T 20468-2006)[M]. 北京: 中国标准出

版社, 2006: 3-7.

(收稿日期: 2015-12-08)

