·临床探讨·

荧光定量 PCR 仪检测 HBV DNA 结果比对分析*

刘祥琴,刘小琦△(四川省人民医院检验科,成都　610072)

【摘要】 目的　对 Roche Light Cycler 480Ⅱ型荧光定量 PCR 仪(Roche 480)和 ABI 7500 检测乙型肝炎病毒 DNA(HBV DNA)结果进行比对和偏倚评估,探讨不同检测系统间检测结果的可比性和偏倚的可接受性。**方法**　按照美国临床实验室标准化委员会 EP9-A2 标准要求,以 Roche 480 为参比仪器,ABI 7500 为实验仪器,对患者 HBV DNA 项目进行检测,通过比较这两种荧光定量 PCR 仪器间的系统误差,判断检测结果的可比性。**结果**　Roche 480 及 ABI 7500 检测 HBV DNA 具有良好的相关性(r=0.993 1),偏差在可接受范围内,系统误差临床可接受。**结论**　Roche 480 及 ABI 7500 检测结果具有较好的一致性,可同时用于肝炎病毒 DNA 的检测。

【关键词】　荧光定量 PCR;　乙型肝炎病毒;　DNA 检测

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.06.026　**文献标志码:**A　**文章编号:**1672-9455(2016)06-0791-02

采用荧光定量 PCR 仪检测乙型肝炎病毒 DNA(HBV DNA)水平,能衡量 HBV 在病患体内的复制能力和进行疗效的监测[1]。目前,本实验室有多种品牌和型号荧光定量 PCR 仪应用于 HBV DNA 定量检测,由于仪器的光路系统或者温度模块的差异,HBV DNA 浓度测量结果就存在差异,故仪器间的可比性评估非常重要[2]。按照 ISO15189《医学实验室质量和能力认可准则》要求,同一临床基因扩增实验室采用不同的仪器进行同一项目的检测,应通过比对实验检验结果的一致性[3]。本研究拟按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP9-A2 的文件要求,对本实验室内现行使用的 Roche Light Cycler 480Ⅱ型荧光定量 PCR 仪(Roche 公司生产,简称 Roche 408)和美国 ABI 公司生产的 ABI 7500 测定 HBV DNA 结果进行比对和偏差评估分析,评价其检测结果的一致性,以保障本实验室该项目检测的准确性,从而准确地为患者体内 HBV 的复制能力进行疗效的监测[4-5]。

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂　以本实验室近两年参加并通过卫计委临检中心室间质评的 Roche 480 型荧光定量 PCR 仪为参比仪器,该仪器检测结果作为参比值。以 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪为实验仪器,该仪器检测结果作为实验值。两台荧光定量 PCR 仪均按照仪器说明书进行操作和维护保养,以保证所有实验结果准确可靠。HBV DNA 检测试剂盒采用达安公司生产的"HBV 核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)"试剂盒,按试剂盒说明书进行操作。

1.2　样本收集及测定　按 NCCLS EP9-A2 建议,每天从本院门诊及住院患者中分别随机选取 8 份 HBV DNA 阳性,其浓度在线性范围为 $5.0\times10^2\sim1.0\times10^8$ U/mL 新鲜血清样本,排除溶血及脂血样本[6]。严格按照试剂说明书进行 HBV DNA 的核酸提取及定量检测,分别在两台荧光定量 PCR 仪上进行双孔平行测定,按样本 1～8 的次序进行第 1 次测量,样本 8～1 次序进行第 2 次测量,两次测量间隔大于 2 h,连续测量 5 d,将测量的平均值作为比对结果进行统计分析,排除明确人为误差的结果。另外,在整个比对过程中同时测定室内质量控制品,若有失控则需重做[7]。

1.3　统计学处理　采用 SPSS13.0 软件对数据进行处理及统计学分析,设定参比仪器 Roche Light Cycler 480 测定 HBV DNA 结果为 X 值,实验仪器 ABI 7500 测定结果为 Y 值,计算线性回归方程:$Y_{\text{ABI 7500}}=aX_{\text{Roche480}}+b$。采用配对 t 检验比较检测结果均数的差异。

1.3.1　离群值检验　按 EP9-A2 文件进行离群值检验,并绘制散点图观察离群值及两者的线性关系。计算重复测量每个样本 HBV DNA 定量值的差值、每个样本 HBV DNA 定量测定值均值和在两台不同荧光定量 PCR 仪测定结果均值间的差值,并以差值是否超过 4 倍各荧光定量 PCR 仪测定差值的均值为判断标准检验是否有离群值。

1.3.2　比对系统测定范围的检验　通过相关系数 r 评估系统测定范围 X 是否合适,若 $r>0.975$(即 $r^2>0.950$),则说明 X 范围选择合适,所得到的直线回归方程:$Y_{\text{ABI 7500}}=aX_{\text{Roche480}}+b$ 的斜率 a 和截距 b 可靠。

1.3.3　计算不同荧光定量 PCR 仪之间的系统误差　将不同的 HBV DNA 的医学决定水平浓度 XC 代入回归方程:$Y_{\text{ABI 7500}}=aX_{\text{Roche480}}+b$,计算系统误差 SE。$SE=|Y_{\text{ABI 7500}}-X_{\text{Roche480}}|$;相对偏差 $SE\%=SE/XC\times100\%$。如果 $SE\%<7.5\%$,则说明 Roche 480 与 ABI 7500 检验结果在临床可接受水平范围内,两仪器的可比性好[7]。

2　结　　果

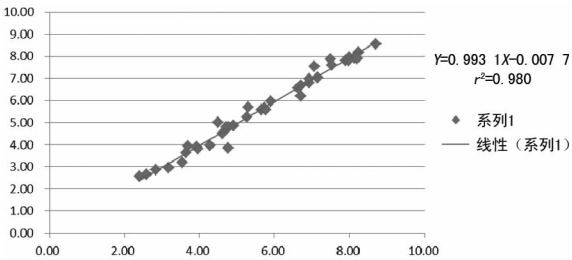
2.1　离群值检验　通过计算 8 份 HBV 阳性标本两次重复测定的 DNA 定量值的差值、每份标本测定值的均值及在两台不同仪器测定结果的平均值间的差值,以 4 倍的参比仪器 Roche 480(X)及实验仪器 ABI 7500(Y)检测 HBV DNA 差值的均值为判断限,差值分别为 X′=0.16 和 Y′=0.11,4 倍差值为可接受限(即 4DX=0.64 和 4DY=0.44)。结果:参比仪器 Roche 480(X)及实验仪器 ABI 7500 仪器在检测 HBV DNA 的测定值时均无离群点出现。

*　**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81271047);四川省卫生厅基金资助项目(130193);四川省人民医院青年基金项目。

△　**通讯作者,**E-mail:liuxiaoqi76@163.com。

2.2 结果显著性差异分析　通过对两种荧光定量 PCR 仪检测 HBV DNA 检测结果进行配对 t 检验比较可知检测结果差异无统计学意义（$P=0.241$）。

2.3 线性相关及回归分析　对两仪器检测 HBV DNA 的结果均值进行相关性分析，$r=0.990$（$r^2=0.980$），大于 0.975，说明比对时参比仪器 Roche 480 的取值范围合适。计算得到的线性回归方程为 $Y_{\text{ABI 7500}}=0.993\ 1X_{\text{Roche480}}-0.007\ 7$，表明两台荧光定量 PCR 仪满足良好的线性要求。



注：横坐标为 Roche 480 检测结果，纵坐标为 ABI 7500 检测结果。

图 1　两台荧光定量 PCR 仪进行 HBV DNA 定量检测结果散点图

2.4 计算相对偏倚　根据 NCCLS EP9-A2 规则，偏倚＝实验值－参比值，偏倚百分比＝（实验值－参比值）/参比值×100%。ABI 7500 与 Roche 480 测定 HBV DNA 定量结果平均偏倚百分比＝3.38%，符合 ISO15189 对临床基因扩增检验实验室内检测系统比对的标准要求（|系统误差|＜7.5%），说明 ABI 7500 与 Roche480 定量检测 HBV DNA 的结果一致性良好，系统误差临床可接受。

3　讨　论

据 2008 年我国原卫生部公布数据显示，HBV 病毒携带者占全国总人口的 7.18%，我国人口基数大，表明目前国内有约 1 亿人是 HBV 携带者，若未经正规治疗易发展为肝硬化和肝癌。对 HBV 病毒携带者进行 HBV DNA 定量检测是进行病情诊断、评估及疗效观察、用药调整的关键依据[8]。

目前由于荧光定量 PCR 仪制造技术越来越成熟，许多厂家开发出各种的仪器用于临床。为了满足临床样本量的需要或实验室购置设备更新换代的原因，不同的荧光定量 PCR 仪用于测定同一项目，本实验室目前就采用 ABI 7500 和 Roche Light Cycler 480Ⅱ进行 HBV DNA 定量检测。为了保证检验结果的一致，满足临床的需求，这两台仪器进行比对工作就显得非常重要[2-4]。为此，本研究按照美国 NCCLS EP9-A2 文件要求，对本室的两台荧光定量 PCR 仪，以 Roche Light Cycler 480Ⅱ作为参比仪器，ABI 7500 作为实验仪器，进行 HBV DNA 的结果进行比对分析。Roche Light Cycler 480Ⅱ的光路系统采用 Therma-Base™热循环专利技术和先进的光学检测系统，彻底消除边缘效应，所以作为本实验室参加卫计委临床检验中心室间质评的仪器[9]。比对试验结果显示，$r=0.990>0.950$，说明两台仪器测定结果相关性较好，配对 t 检验得 $P=0.397$，提示这两台荧光定量 PCR 仪在进行 HBV DNA 定量检测结果一致性好，差异无统计学意义（$P>0.05$）。本研究结果也显示，两台荧光定量 PCR 仪的结果的偏倚百分比＝3.38%是满足 ISO15189 的系统误差绝对值应小于 7.5%的要求，两台仪器检测结果在应于临床诊断和评估乙型肝炎患者临床治疗方面具有可比性。两台不同的荧光定量 PCR 仪进行 HBV DNA 检测的预期偏差有正有负，分析可能是由随机误差导致[10]。

综上所述，本研究以误差为判断标准，以能力验证/室间质评评价界限，来判断 HBV DNA 含量偏差的可接受性，以期对不同型号荧光定量 PCR 分析仪进行比对，为实验室临床结果的一致性和可靠性提供了保障。

参考文献

[1] Portilho MM，Baptista ML，Silva MD，et al. Usefulness of in-house PCR methods for hepatitis B virus DNA detection[J]. J Virol Methods，2015，223：40-44.

[2] 王治国，李小鹏，武平原. 临床检验室内质量控制数据实验室间比对[J]. 中华检验医学杂志，2004，27(10)：701-702.

[3] 中国合格评审国家认可委员会. ISO15189：2012 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京：中国合格评审国家认可委员会，2013.

[4] Magari RT，Elena IM. Estimation of bias between 2 analytical methods at clinically important ranges[J]. Lab Hematol，2006，12(1)：55-59.

[5] NCCLS. EP9-A2 Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples，approved guideline-second edition[S]. Wayne，PA，USA：NCCLS，2002.

[6] 张翠莉，刘萍，魏文波. 脂血和溶血对 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测的影响[J]. 武警医学，2012，23(2)：150-152.

[7] 中国合格评审国家认可委员会. 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：中国合格评审国家认可委员会，2012.

[8] Wang L，Yang P，Zhang K，et al. A 10-year human hepatitis B virus nucleic test external quality assessment in China：continual improvement[J]. Clin Chim Acta，2013，425：139-147.

[9] Decat E，Cosyn J，Bruyn HD，et al. Optimization of quantitative polymerase chain reactions for detection and quantification of eight periodontal bacterial pathogens[J]. Bmc Res Notes，2012，5(1)：1-9.

[10] 冯仁丰. 临床检验质量管理技术基础[M]. 上海：上海科学技术出版社，2003：125-128.

（收稿日期：2015-10-31　修回日期：2016-01-12）