

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.05.023

CNAS-GL039 验证 HCV-RNA 定量检测系统*

黄 静, 李俊如, 张 帅

四川省西昌市凉山彝族自治州第一人民医院检验科, 四川西昌 615000

摘要:目的 参照中国合格评定国家认可委员会(CNAS)-GL039 对 HCV-RNA 定量检测系统进行性能验证。方法 依据 CNAS-GL039 对 HCV-RNA 定量检测系统的准确度、精密度(重复性和中间精密度)、线性区间进行分析验证。结果 HCV-RNA 定量检测系统的重复性、中间精密度均在允许范围内;检测系统的线性回归方程为 $Y = -0.9957X + 8.3767$, $R^2 = 0.9996$, 线性范围符合要求;将所检测的室间质评标本的实测值与原卫生部临床检验中心的 PT 项目结果(HCV-RNA)对比, 准确度达到预期要求。结论 HCV-RNA 定量检测系统性能良好, 适用于临床实验室。

关键词:中国合格评定国家认可委员会-GL039; HCV-RNA; 定量检测系统

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)05-0650-03

丙型肝炎病毒(HCV)的全球感染率达 3%, 其感染后引起的丙型病毒性肝炎为常见的感染性疾病, 控制不佳还可发展为肝衰竭, 严重影响患者健康。HCV 感染 1 周内人体内就可检测出 HCV-RNA, 应用分子生物学技术定性检测 HCV-RNA 可用于 HCV 感染的早期诊断, 解决了免疫学检测的“窗口期”问题。此外, 定量检测 HCV-RNA 的拷贝数, 对动态监测 HCV 的传染性、病毒复制情况、抗病毒药物疗效及判断患者预后等有着重要的临床意义^[1]。因此, HCV-RNA 检测结果的准确性显得尤为重要。临床 PCR 实验操作烦琐, 影响检测结果的因素较多, 为评估检测系统性能, 保证检测结果准确, 进一步完善实验室质量控制体系, 本研究参照中国合格评定国家认可委员会(CNAS)-GL039^[2]对 HCV-RNA 定量检测系统的准确度、精密度(重复性和中间精密度)和线性区间进行了分析验证, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机收集 HCV 感染者 HCV-RNA 水平为 10^7 、 10^2 IU/mL 的血清标本(无溶血、脂血、黄疸)各 15 mL, 充分混匀后各取 300 μ L 分装至灭菌 EP 管内, 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂 湖南圣湘生物科技有限公司生产的稀释用小牛血清; 原卫生部临床检验中心第二次室间质评标本: 1721、1722、1723、1724、1725; 北京康彻思坦公司提供的 HCV-RNA 标准物质: 10^3 、 10^4 IU/mL 的血清标本(批号: 201708003、201706001); 核酸提取仪(湖南圣湘, 型号: S11A); ABI 公司生产的实时荧光定量 PCR 扩增仪(ABI75000, 批号: 275051447); 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR 荧光探针法)(湖南圣湘, 批号: 2017031)。

1.3 方法

1.3.1 精密度验证 (1)重复性验证: 使用同批号试剂及校准品每天检测 1 个分析批, 每批检测 10^7 、 10^2 IU/mL 两种水平的标本, 每份标本重复检测 3 次, 连续检测 5 d; 在每一批次检测中, 同时检测质控品; 检测结果均用对数形式表示; 按 CNAS-GL037 要求计算出批内标准差(s)、批间 s 、批间方差、批内方差、总方差、均数($\bar{x}$)、总 $\bar{x}$ 、实验室内 s 、实验室内变异系数(CV)^[2-3]。(2)中间精密度验证: 统计本院 2018 年 1—6 月同批号康彻思坦公司生产的 10^3 、 10^4 IU/mL 标准血清室内质控结果(如出现室内质控失控、其他操作问题或单次检测数据超出总 $\bar{x} \pm 4s$, 则将此批次数据弃去, 需在找出原因并纠正后, 另加一个批次进行检测, 数据剔除量应该小于总检测数据量的 5%^[4]), 结果均用对数形式表示, 计算 $\bar{x}$ 、 s 及 CV。(3)判断标准: 以能力验证/室间质评评价界限(靶值 $\pm 2/5$ 对数值)作为允许总误差(TEa), 重复性 $< 3/5 TEa$ (0.24), 中间精密度 $< 4/5 TEa$ (0.32)^[5]。

1.3.2 线性验证 将 HCV-RNA 水平为 10^7 IU/mL 的血清标本作为初始标本, 用小牛血清依次以 10 倍水平梯度稀释至 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 IU/mL, 稀释当天每份标本检测 2 次, 计算每一水平实测值(为测量均值), 排除离群值。以稀释倍数为横轴, 每个稀释倍数所对应的实测值为纵轴进行线性回归分析, 求出回归方程 $Y = aX + b$ 和相关系数的平方(R^2), 如果 $R^2 > 0.95$, 则可以初步判断厂家提供的线性范围符合要求。根据线性回归方程求出每一稀释倍数符合线性方程的理论值, 计算每一稀释倍数实测值和理论值间的差异^[4], 实测值与理论值均用对数形式表示。以能力验证/室间质评评价界限(靶值 $\pm 2/5$ 对数值)作

* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(普及应用项目)(16PJ166)。

为 TEa [6]。

1.3.3 准确度验证 检测室间质评标本 1721、1722、1723、1724、1725,并将实测值与 CANS 认可的原卫生部临床检验中心提供的 PT 项目结果(HCV-RNA)进行对比,使用 PT 项目时应不少于 5 份[3]。以能力验证/室间质评评价界限(靶值 $\pm 2/5$ 对数值)作为 TEa [5]。实测值与靶值均用对数形式表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据

分析,建立线性回归方程判断线性范围是否符合要求。

2 结 果

2.1 精密度验证 HCV-RNA 10^7 、 10^2 IU/mL 两水平标本的实验室内 s 分别为 0.047 9、0.033 5,满足重复性 $<3/5TEa$ (0.24)的要求,见表 1。HCV-RNA 10^3 、 10^4 IU/mL 两水平室内质控品 2018 年 1—6 月的 s 分别为 0.09、0.09,满足中间精密度 $<4/5TEa$ (0.32)的要求,见表 2。

表 1 HCV-RNA 重复性验证结果

HCV-RNA 水平(IU/mL)	检测次数 (n)	总 $\bar{x}$	总方差	批内方差	批间方差	批内 s	批间 s	实验室内 s	实验室内 CV(%)
10^7	15	7.351 3	0.002 3	0.002 3	0.000 7	0.048 3	0.027 1	0.047 9	0.651 3
10^2	15	2.793 3	0.001 1	0.001 1	0.000 4	0.032 9	0.020 1	0.033 5	1.200 3

2.2 线性验证 线性回归方程为 $Y=-0.995\ 7X+8.376\ 7$, $R^2=0.999\ 6$,初步判断线性范围符合要求。每一稀释倍数实测值和理论值的差异均满足 TEa 要求,见表 3。

表 2 HCV-RNA 中间精密度验证结果

HCV-RNA 水平(IU/mL)	检测次数 (n)	$\bar{x}$	s	CV(%)
10^3	37	5.62	0.09	1.62
10^4	37	4.53	0.09	2.13

表 3 HCV-RNA 线性验证结果

稀释倍数	实测值	理论值	差异
原水平	7.35	7.35	0.00
10	6.43	6.35	-0.08
10^2	5.42	5.35	-0.07
10^3	4.34	4.35	0.01
10^4	3.39	3.35	-0.04
10^5	2.42	2.35	-0.07

2.3 准确度验证 将实测值与 PT 项目(HCV-RNA)结果进行对比,均满足 TEa 要求,见表 4。

表 4 准确度验证结果

标本编号	实测值	靶值	TEa
1721	0.00	0.00	-1.00~1.00
1722	0.00	0.00	-1.00~1.00
1723	0.00	0.00	-1.00~1.00
1724	4.13	4.13	3.73~4.53
1725	4.60	4.64	4.24~5.04

3 讨 论

实时荧光定量 PCR 检测技术以其高灵敏度、高特异性、全封闭单管扩增等优势逐渐在各临床实验室中被广泛使用。目前尚无权威机构发布分子诊断相

关的检验程序性能验证的具体解释和指导意见,为保证检测结果的准确、可靠,有大量文献进行了自建性能验证方法探讨[6-9]。2019 年 2 月 15 日 CNAS 首次发布 CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》[2],本实验室依据 CNAS-GL039 标准对 HCV-RNA 定量检测系统的性能进行了分析验证。

CNAS-GL039 建议分子诊断定量检测项目的性能验证参见 CNAS-GL037[2]。在对 HCV-RNA 定量检测系统检测精密度、线性区间、准确度的验证过程中,为排除基质效应,精密度及线性区间验证标本均来自临床患者。CNAS-GL039 中建议精密度验证包括重复性和中间精密度,按照 WS/T 492-2016 中精密度验证方案处理实验数据得到 10^7 、 10^2 IU/mL 两水平的实验室内 s 及 CV。依据 CNAS-CL09[10]中对重复性、中间精密度的定义,笔者认为 CNAS-GL037 中的验证方法仅仅反映了重复性水平,即实验室最佳条件下变异。实际工作中操作者、操作系统(如试剂批号)、操作条件都有可能改变,重复性不能完全反映临床常规工作,故使用较长时间内对同一或相似受测对象的重复检测结果来反映常规条件下的变异,因此统计实验室 10^3 、 10^4 IU/mL 两水平标准血清 2018 年 1—6 月的室内质控结果,并计算出 $\bar{x}$ 、 s 及 CV 作为中间精密度验证数据,验证结果以 CNAS-CL02-A009 作为判断标准,以此反映实验室常规条件下的真实情况[5]。

线性是反映实验室方法性能的重要指标之一,可反映分析物水平或活性与分析检测系统之间相应的比例关系,在临床医生认为有价值的分析检测范围内实验方法呈线性,了解分析结果与真值之间的偏差,才能保证检测结果准确可靠。本研究 HCV-RNA 稀释倍数与实测值的线性回归方程为 $Y=-0.995\ 7X+8.376\ 7$, $R^2>0.95$,每一稀释倍数对应的实测值和计

算理论值的差异均满足 TEa 要求,可以初步判断厂家提供的线性范围符合要求,满足临床需要。

基因扩增检测已被广泛应用于临床、科研工作,基因扩增检测受基质效应、基因变异等多种因素影响,各试剂厂家实验方法不同,因此检测灵敏度、特异度差异较大。分子诊断中很多实验缺乏参考方法,难于校准,因此实验室将室间质评作为室内质控的有效补充,目前是分子诊断质量保证中不可或缺的部分。本研究将此次验证检测的室间质评标本的结果与原卫生部临床检验中心的 PT 项目(HCV-RAN)结果对比,准确度满足能力验证要求。

综上所述,CNAS-GL039 为分子实验室完善质量控制体系提供了切实可行的依据。根据 CNAS-GL039 对实验室 HCV-RNA 定量检测系统进行性能验证结果显示,该检测系统在一定范围内进行 HCV-RNA 检测的结果准确、重复性好,适用于临床实验室。

参考文献

[1] 吕建新,樊绮诗. 临床分子生物学检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2015:145-149.
[2] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南:CNAS GL039-2019[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2019.

[3] 中国合格评定国家认可委员会. 临床化学定量检验程序性能验证指南:CNAS GL037-2019[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2019.
[4] 尚红,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2015:145-149.
[5] 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 CL02 A009-2018[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2018.
[6] 仲崇明,曾健,刘婷婷,等. HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测系统性能验证[J]. 中国卫生检验杂志,2015, 25 (14):2362-2363.
[7] 辛娜,杨超,白跳艳,等. 自建 HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测系统性能验证方法及结果分析[J]. 山西医科大学学报,2016,47(4):365-369.
[8] 庞志宇,谢在春,刘玥,等. HBV-DNA 定量检测试剂盒性能验证[J]. 检验医学与临床,2015,12(17):2530-2532.
[9] 崔燕红,赵一琳,宛传丹,等. 丙型肝炎病毒核酸荧光定量检测法的性能验证[J]. 实用检验医师杂志,2018,10(3):168-172.
[10] 中国合格评定国家认可委员会. 科研实验室认可准则:CNAS CL09-2019[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2019.

(收稿日期:2019-06-10 修回日期:2019-09-28)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2020. 05. 024

黏液型铜绿假单胞菌的临床分布及药敏分析*

王巧媚¹,陆丹倩¹,赖贵龙²,彭 明¹

广东省中山市中医院:1. 检验科;2. 综合二区,广东中山 528400

摘要:目的 了解黏液型铜绿假单胞菌(PA)的临床分布及药敏特点,为临床合理用药提供依据。
方法 分析该院 2015 年 1 月至 2018 年 12 月分离到的 82 株黏液型 PA 的临床资料及药敏试验结果。
结果 82 株黏液型 PA 中,有 63 株来自 50~80 岁人群,占 76.8%,9 株来自<50 岁人群,占 11.0%,10 株来自>80 岁人群,占 12.2%;82 株黏液型 PA 主要分离自痰液标本(75 株,91.5%),其中分离自支气管扩张合并肺部感染患者 31 株(41.3%),慢性阻塞性肺疾病患者 18 株(24.0%);12 种抗菌药物中,黏液型 PA 对阿米卡星的耐药率最低,为 2.4%,对左氧氟沙星和哌拉西林的耐药率最高,为 35.4%,其中耐碳青霉烯类黏液型 PA 有 21 株,占 25.6%。
结论 黏液型 PA 体外耐药率总体不高,其易感人群主要为患有慢性呼吸道疾病的中老年人群;临床在诊疗时应重视黏液型 PA 生物被膜的形成诱因,注意加以预防;明确黏液型 PA 感染时建议使用敏感抗菌药物联合大环内酯类、鱼腥草等可抑制生物被膜的药物治疗。

关键词:黏液型铜绿假单胞菌; 生物被膜; 临床分布; 药敏试验

中图分类号:R446.5

文章编号:1672-9455(2020)05-0652-04

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID): 

铜绿假单胞菌(PA)是引起院内感染的主要条件致病菌之一。PA 根据菌落形态可分为黏液型和非黏

* 基金项目:广东省中山市医学科研项目(2018A020114)。