

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.20.011

## 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 的线性评价和临床可报告范围\*

李育敏, 阚丽娟, 张水兰, 汤花梅, 熊 丹, 张秀明<sup>△</sup>

广东省深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广州深圳 518001

**摘要:**目的 探讨荧光定量 PCR 测定乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)检测系统的线性评价和临床可报告范围(CRR)。方法 选取接近线性范围上限的患者标本(8.81E+08)IU/mL,用阴性标本进行系列稀释至比厂商声明的线性范围下限低一个数量级(8.81E+01)IU/mL,共制备 8 种浓度梯度的标本,每个标本重复测量 3 次,在一个分析批内完成,采用平均斜率法、美国临床和实验室标准化委员会 EP 06-A 指南方法和线性稀释回收法进行线性评价。在线性范围内选取 3 份高浓度患者标本,采用最大稀释度试验确定 CRR。结果 采用平均斜率法,相关系数( $r$ )=0.999,斜率( $b$ )=1.004( $t=93.326$ , $P=0.000$ ),符合线性要求;按 EP 06-A 指南,经多项式回归分析,最适多项式为二次,二次多项式中每种浓度的线性偏差均小于允许误差 0.4(log 值);采用线性稀释回收法, $r=0.999$ , $b=0.993$ ( $t=75.82$ , $P=0.000$ ),符合线性要求,各浓度梯度的稀释回收量均 $\leq\pm 0.4$ (log 值)。采用最大稀释度试验确定最大稀释倍数为 1:100 000。结论 HBV DNA 在(8.81 E+01)~(8.81 E+08)IU/mL 为临床可接受线性关系,CRR 为(8.81E+01)~(8.81E+13)IU/mL。

关键词:乙型肝炎病毒核酸; 线性评价; 临床可报告范围; 平均斜率法

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)20-2952-04

## Linearity evaluation and clinical reportable range of HBV DNA determination by fluorescence quantitative PCR\*

LI Yumin, KAN Lijuan, ZHANG Shuilan, TANG Huamei, XIONG Dan, ZHANG Xiuming<sup>△</sup>

Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Luohu District, Shenzhen, Guangdong 518001, China

**Abstract: Objective** To explore the linearity evaluation and clinical reportable range (CRR) in HBV DNA determination by fluorescence quantitative PCR. **Methods** A patient's specimen with an analytic concentration at (8.81E+08)IU/mL which was near the expected upper linear range limit was diluted to a concentration at the expected lower limit (8.81E+01)IU/mL with a negative specimen. A series of samples with 8 equally spaced concentrations were provided and each sample was tested 3 times at each level within one run. Average slope method, the method recommended by CLSI EP 06-A and linear dilution recovery method were used for the linearity evaluation. Three higher specimens were selected for CRR determination by the maximum valid dilution method. **Results** The results analyzed by average slope method indicated that the correlation coefficient ( $r$ ) was 0.999, the slope ( $b$ ) was 1.004 ( $t=93.326$ ,  $P=0.000$ ), and which met the linear standard. The results analyzed by EP 06-A indicated that second-order model had the best fit in the models by polynomial regression analysis. None of the deviation from linearity at each concentration in second-order model exceeded the allowable error (log 0.4). The results analyzed by linear dilution recovery method indicated that  $r$  was 0.999,  $b$  was 0.993 ( $t=75.82$ ,  $P=0.000$ ), and which met the linear standard. The amount of recovery at each level was  $\leq\pm \log 0.4$ . The results analyzed by the maximum valid dilution method indicated that the maximum dilution ratio was 1:100 000. **Conclusion** The HBV DNA concentration which ranges from (8.81 E+01) IU/mL to (8.81 E+08)IU/mL is a accepted linear range in clinic. CRR ranges from (8.81E+01)IU/mL to (8.81E+13)IU/mL.

Key words: HBV DNA; linearity; clinical reportable range; average slope method

2012 年《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)要求定量检测方法和程序的分析性能验证应包括线性、测量和/或

可报告范围(CRR)<sup>[1]</sup>。美国临床和实验室标准化委员会(NCCLS)EP 06-A 指出,线性是在检测标本时,可直接按比例得出分析物浓度(一定范围内)的能力;

\* 基金项目:广东省深圳市医疗卫生三名工程(SZSM201601062)。

作者简介:李育敏,女,主治医师,主要从事分子诊断方面的研究。△ 通信作者,E-mail:zxm0760@163.com。

线性范围是指覆盖检测系统可接受线性关系的范围,非线性误差小于设定标准<sup>[2]</sup>。CRR 是美国临床实验室改进修正案(CLIA)法规中的定义,指实验室可建立或验证仪器或检测系统测量在准确度范围内得到检验结果的量值范围。NCCLS EP 06-A 用测量范围代替 CRR。CRR 在美国病理学家学会(CAP)的定义中指定量检测项目向临床报告的检测范围。目前,国内对临床分子诊断定量检测系统的线性、测量和/或 CRR 验证方法报道不一,较少对 CRR 进行确定。本研究以荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 检测系统为例,采用平均斜率法、EP 06-A 指南方法和线性稀释回收法进行线性评价,比较 3 种方法的有效性和优势;采用最大稀释度试验确定 CRR,为临床分子诊断定量检测方法和程序的线性评价及 CRR 确定提供参考,现报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 标本来源** 线性评价标本选取接近线性范围上限的患者标本,重复测量 3 次,取均值作为预期值,用阴性标本进行系列稀释(1:10、1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000、1:10 000 000)至比厂商声明的线性范围下限低一个数量级,共制备 8 种浓度梯度的标本。CRR 确定标本为在线性范围内选取的 3 种高浓度患者标本,重复测量 3 次,取均值作为预期值,稀释方法同线性评价,稀释最低浓度不超过线性范围下限,共制备 7 种浓度梯度的标本。

**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 仪。

### 1.3 方 法

**1.3.1 测定流程** 标本检测前校准仪器每天进行室内质控,质控在控时数据可接受。线性评价的每份标本重复测量 3 次,在一个分析批内完成检测。通过线性验证后进行 CRR 确定试验,测定流程同线性评价。

**1.3.2 平均斜率法评价线性<sup>[3]</sup>** 计算每种浓度的均值、斜率、平均斜率和预期值,以预期值为 X,测量均值为 Y,绘制散点图,做线性回归分析(回归方程  $Y = bX + a$ )。如果  $r \geq 0.95$  ( $r^2 \geq 0.975$ ),b 与 1 无明显差异(通常在 0.97~1.03),则符合线性要求,试验所选择的浓度范围为临床可接受线性范围;如果不符合线性要求,则去掉最高点重新进行试验。

**1.3.3 EP 06-A 评价线性** 根据原卫生和计划生育委员会临床检验中心室间质评评价界限设定允许误差为 0.4

$$(\log \text{ 值})。计算重复性(Sr), Sr = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^R (r_{ij} - r_i)^2}{L \times (R-1)}}, L$$

为样本数,R 为重复测量次数( $j = 1, 2, 3 \dots R$ ), $r_i$  为样本 i 处的平均值。如果  $Sr \leq 0.4$ ,不精密度符合要求。以样本号为 X,测量均值为 Y,绘制散点图,做多

项式回归分析,回归方程为一次  $Y = b_0 + b_1 X$  (直线)、二次多项式  $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2$  和三次多项式  $Y = b_0 + b_1 X + b_2 X^2 + b_3 X^3$ 。判断二次多项式中非线性系数  $b_2$  和三次多项式中  $b_2$  和  $b_3$  是否有统计学意义(与 0 之间有无差异),如果二者非线性系数均无明显差异,认为存在线性关系;有明显差异,该组数据存在非线性,则根据非线性系数和回归标准误( $S_{y,x}$ )确定最适多项式模型。 $S_{y,x}$  越小,该模型越适合数据组。计算最适多项式模型各种浓度点测量均值和预期值差值(线性偏差,DL), $DL \leq \pm 0.4$ ,非线性为临床可接受,说明该方法呈线性,试验所选择的浓度范围为临床可接受线性范围。如果任一个点  $DL > 0.4$ ,则舍去 DL 最大值的浓度点,重新统计分析。

**1.3.4 线性稀释回收法评价线性<sup>[4]</sup>** 计算各种浓度水平的均值,以预期值为 X,测量均值为 Y,进行线性回归分析,回归方程和线性判断同平均斜率法。计算各种浓度点测量均值和预期值差值(稀释回收量) $\leq \pm 0.4$ ,则试验所选择的浓度范围为临床可接受线性范围。如果不满足上述条件,则去掉最高点重新试验。

**1.3.5 最大稀释度试验确定 CRR<sup>[5]</sup>** 计算各种浓度的均值,以变异系数(CV) $\leq 5\%$ ,测量均值和预期值差值 $\leq \pm 0.4$ 的稀释倍数为临床可接受,CRR 上限为线性范围上限乘以最大稀释倍数,下限为线性范围下限。

## 2 结 果

**2.1 平均斜率法评价线性** 患者标本预期值为  $(8.81E+08)$  IU/mL,统计结果见表 1,将原始数据转换为 log 值后进行线性回归分析(图 1), $r = 0.999$ , $b = 1.004$  ( $t = 93.326$ ,  $P = 0.000$ ),与 1 无明显差异,表明 HBV DNA 在  $(8.81E+01)$  IU/mL (log 值 8.94)~ $(8.81E+08)$  IU/mL (log 值 1.94) 为临床可接受线性关系。

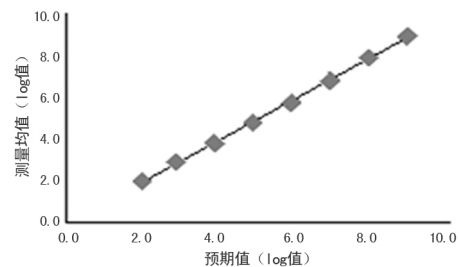


图 1 平均斜率法线性回归分析图

**2.2 EP 06-A 评价线性**  $Sr = 0.27 \leq 0.4$ ,不精密度符合要求。经多项式回归分析,二次多项式中的非线性系数  $b_2$  有统计学意义( $t = 7.336$ ,  $P = 0.001$ ),三次多项式中的  $b_2$  和  $b_3$  无统计学意义,二次多项式有最小的  $S_{y,x}$ ,判断最适多项式为二次(图 2、表 2)。二次多项式中 8 种不同浓度的 DL 均  $< 0.4$  (表 3),表明 HBV DNA 在  $(8.81E+01) \sim (8.81E+08)$  IU/mL 为临床可接受线性关系。

表 1 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 平均斜率法统计结果(IU/mL)

标本号	加入相对量*	测量均值	斜率	预期值
1	0	9.69E+01	—	9.69E+01
2	1	8.35E+02	835.0	7.18E+02
3	10	6.67E+03	667.3	7.18E+03
4	100	6.65E+04	665.0	7.18E+04
5	1 000	5.59E+05	559.0	7.18E+05
6	10 000	6.45E+06	645.0	7.18E+06
7	100 000	7.75E+07	774.7	7.18E+07
8	1 000 000	8.81E+08	881.0	7.18E+08

注：\* 由于低值标本为阴性标本，只需考虑高值标本的加入浓度，在计算预期值时，将平均斜率乘以 HBV DNA 加入的相对量；平均斜率为 718.14 IU/mL；— 表示无数据

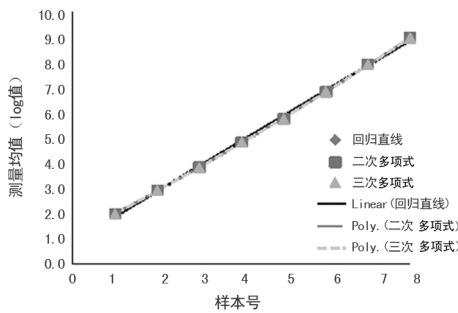


图 2 多项式回归分析图

表 2 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 多项式回归分析结果

阶别	系数	系数值	SE	t	P	自由度	S <sub>y, x</sub>
1	b <sub>0</sub>	0.899	0.066	13.591	0.000	14	0.085
1	b <sub>1</sub>	0.993	0.013	75.822	0.000		
2	b <sub>0</sub>	1.129	0.038	29.853	0.000	13	0.027
2	b <sub>1</sub>	0.855	0.019	44.340	0.000		
2	b <sub>2</sub>	0.015	0.002	7.336	0.001		
3	b <sub>0</sub>	1.104	0.073	15.102	0.000	12	0.030
3	b <sub>1</sub>	0.881	0.066	13.325	0.000		
3	b <sub>2</sub>	0.008	0.017	0.510	0.637		
3	b <sub>3</sub>	0.001	0.001	0.419	0.697		

注：SE 为系数标准误；S<sub>y, x</sub> 为回归标准误

2.3 线性稀释回收法评价线性 经线性回归分析(图 3),  $r=0.999$ ,  $b=0.993$  ( $t=75.82$ ,  $P=0.000$ ), 与 1 无明显差异, 符合线性要求, 稀释回收量均  $< \pm 0.4$  (表 4), 表明 HBV DNA 在  $(8.81E+01) \sim (8.81E+08)$  IU/mL 为临床可接受线性关系。

2.4 最大稀释度试验确定 CRR 患者标本预期值分别为  $(8.81E+08)$ 、 $(3.74E+08)$  和  $(2.28E+08)$  IU/mL。

表 5 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 最大稀释度试验统计差值(log 值)和 CV(%)

标本号	1 : 1 000 000		1 : 100 000		1 : 10 000		1 : 1 000		1 : 100		1 : 10		原倍	
	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)	差值 (log) 值	CV (%)
1	-0.02	2.08	-0.12	2.12	-0.12	1.67	-0.20	1.09	-0.14	1.01	-0.06	0.12	0.00	0.32
2	-0.12	3.19	-0.10	1.50	-0.17	2.07	-0.10	0.57	-0.16	0.39	-0.16	0.76	0.00	0.65
3	0.18	8.56	-0.04	1.65	-0.11	0.56	-0.12	0.56	-0.07	0.14	-0.04	0.53	0.00	0.19

3 份标本各种浓度梯度的测量均值和预期值差值均  $< \pm 0.4$ , 但标本 3 在 1 : 1 000 000 稀释浓度的  $CV > 5\%$  (表 5), 因此确定最大稀释倍数为 1 : 100 000。CRR 上限为线性范围上限  $8.81E+8 \times 100 000 = (8.81E+13)$  IU/mL。结合线性范围下限, CRR 为  $(8.81E+01) \sim (8.81E+13)$  IU/mL。

表 3 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 二次多项式和直线回归的线性偏差(log 值)

标本号	测量均值	直线回归预期值	二次多项式预期值	线性偏差 (DL)
1	1.99	1.89	2.00	0.11
2	2.92	2.89	2.90	0.02
3	3.82	3.88	3.83	-0.05
4	4.82	4.87	4.79	-0.08
5	5.75	5.86	5.79	-0.08
6	6.81	6.86	6.81	-0.05
7	7.89	7.85	7.87	0.02
8	8.94	8.84	8.95	0.11

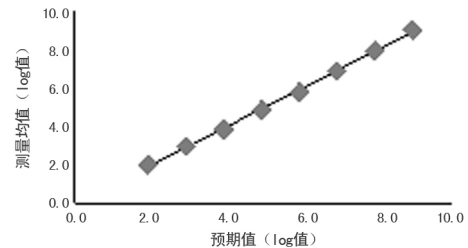


图 3 线性稀释回收法回归分析图

表 4 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 线性稀释回收法统计结果(log 值)

标本号	测量均值	预期值	稀释回收量
1	1.99	1.94	0.05
2	2.92	2.94	-0.02
3	3.82	3.94	-0.12
4	4.82	4.94	-0.12
5	5.75	5.94	-0.21
6	6.81	6.94	-0.13
7	7.89	7.94	-0.05
8	8.94	8.94	0.00

### 3 讨 论

按照 ISO 15189:2012 在分子诊断领域的应用说明,定量检测程序应验证线性、测量和/或 CRR<sup>[1]</sup>,而目前国内厂商关于分子体外诊断定量检测试剂盒的性能指标通常提供的是线性范围。由于自动化仪器通常使用两点校准,在 0 点和设定点之间获得线性校准函数,超出设定点以外结果可靠性的则需通过 CRR 评价试验来确定,为此美国 CLIA 法规使用 CRR 而不是线性范围。而美国 NCCLS EP 06-A 指南则提出线性范围是指覆盖检测系统可接受线性关系的范围,并且用测量范围代替 CRR<sup>[2]</sup>。临床 PCR 实验室应正确理解线性、测量和/或 CRR 的含义。美国 CAP 提出分析测量范围(AMR)和 CRR 的定义,AMR 是指患者标本未经稀释、浓缩等预处理,由检测系统直接测量得出的可靠结果范围;CRR 是指实验室可建立或验证仪器或检测系统测量在准确度范围内得到检验结果的量值范围,如果 CRR 超出 AMR,可采用稀释、浓缩或其他预处理使待测物浓度在 AMR 以内再测量。从以上定义可以看出,线性范围、CRR 和 AMR 是不同组织对检测系统在一定范围内给出可靠检测结果能力的描述,名称虽不同,含义却相同。因此,临床分子诊断定量检测程序应验证线性范围和 CRR。

本研究首先采用平均斜率法、EP 06-A 指南方法和线性稀释回收法对荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 检测系统进行线性评价<sup>[2-4]</sup>,并比较和讨论 3 种方法的有效性、优势及注意点。结果表明,3 种方法均可进行有效的线性评价,确定 HBV DNA 在(8.81E+01)~(8.81E+08) IU/mL 为临床可接受线性关系。采用平均斜率法应注意以下 2 点:一是进行数据统计时通常将 DNA 检测原始结果转换成对数值进行分析,以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,但是该方法在计算均值、斜率、平均斜率和预期值时应采用原始数据,因为在计算斜率时 HBV DNA 加入的相对量是按照稀释比例来进行统计;其次是由于低值标本为阴性标本,计算斜率时只需考虑高值标本的加入浓度。EP 06-A 采用多项式回归法,是一种非线性选择的特殊参数模型,可以在每种浓度点进行非线性度判断,并通过检查重复性减少不精密度的影响,但是其采用直线回归和最适多项式的预期值计算 DL,容易导致线性两端的 DL 较大,超出允许误差而得出非线性结论<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,最低和最高浓度点的 DL 较中间浓度点明显增大。平均斜率法和线性稀释回收法采用测量均值和预期值进行线性回归分析,避免了以上问题。线性稀释回收法只需判断线性的可接受性,在可接受情况下

稀释回收量在允许误差内即可确定试验所选浓度范围为线性范围,相对前两种方法,其统计学处理简单,但是前两种方法基于严格的科学原理设计,能可靠地评价线性偏离程度。因此,实验室可根据自身检测系统的情况选择一种或多种方法进行线性评价。

通常情况下,只有经验证的线性范围上限不能满足临床需求时才进行 CRR 确定。目前,国内对 HBV DNA 检测程序的线性范围验证报道较多,较少确定 CRR<sup>[7-10]</sup>,这可能是因为在临床上 HBV DNA 几乎很少高于(5E+09) IU/mL,目前厂商提供的线性范围经验证后已能满足临床需求,而且对于分子诊断定量检测程序 CRR 确定的具体方法也尚无统一方案。本研究参考临床生化检验采用最大稀释度试验来确定 HBV DNA 检测的 CRR<sup>[5]</sup>,考虑到低浓度标本检测数据受不精密度的影响,除判断测量均值和预期值差值 $\leq \pm 0.4$ 外,以  $CV \leq 5\%$  的稀释倍数为临床可接受,确定 CRR 为(8.81E+01)~(8.81E+13) IU/mL,结合临床,该范围能够满足需求。

### 参考文献

- [1] 中国合格评审国家认可委员会.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[S].北京:中国合格评审国家认可委员会,2012.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; EP06-A[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2003.
- [3] 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].2版.上海:上海科学技术文献出版社,2007:138-177.
- [4] 张秀明,范勇利,温冬梅,等.临床化学自建检测系统分析性能确认的分析测量范围和临床可报告范围[J].中华检验医学杂志,2016,39(12):946-951.
- [5] 张秀明.浅析定量检验程序分析性能验证实验方案设计[J].中华检验医学杂志,2015,38(6):428-430.
- [6] 杨有业,张秀明.临床检验方法学评价[M].北京:人民卫生出版社,2008:173-192.
- [7] 王战争,冯飞雪,肇玉博,等.一种乙型肝炎病毒核酸 PCR 定量检测试剂的性能验证[J].国际检验医学杂志,2017,38(15):2098-2101.
- [8] 胥明勇,朱华强.ABI7500 HBV-DNA 检测系统性能评价[J].实验与检验医学,2017,35(4):489-491.
- [9] 邵璇璇,管世鹤,杨凯,等.HBV DNA 检测试剂的性能评估与室内质控数据评价[J].安徽医科大学学报,2017,52(6):934-937.
- [10] 徐江霞,龚淑琪,万振华,等.新型乙肝定量 PCR 试剂检测性能验证[J].实验与检验医学,2016,34(2):149-151.

(收稿日期:2019-02-16 修回日期:2019-05-25)