

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[△]
广东省深圳市罗湖区人民医院医学检验科, 广州深圳 518046

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。方法 选取接近线性范围上限的患者标本,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,共制备 3 种浓度梯度的标本,每个标本重复测量 5 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(CLSI)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 5 份高浓度患者标本,采用最大稀释度试验确定。结果 采用平均斜率法,相关系数(r) >0.999 ,斜率(Q) 6.1×10^6 ,符合线性要求;按 CLSI 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($\pm 5\%$);采用线性稀释回收法, $r > 0.999$,符合线性要求,各浓度梯度的稀释回收量均 $\leq 100\%$ 。采用最大稀释度试验确定最大稀释倍数为 $1:10000$ 。结论 HBV DNA 在 $10^4 \sim 10^9$ IU/mL 为临床可接受线性关系,检测范围为 $10^4 \sim 10^9$ 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

中图分类号:R575.2 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2019)20-011-06

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[△]
Department of Medical Laboratory, Luohu District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518046
Abstract: Objective To evaluate the linearity and clinical reportable range of HBV DNA detection system. Methods Patient samples near the upper limit of the linear range were selected, and negative samples were serially diluted to one order of magnitude lower than the lower limit of the linear range declared by the manufacturer. Three concentration gradients of samples were prepared, and each sample was measured 5 times within one analytical batch. Linearity was evaluated by average slope method, CLSI guideline method and linear dilution recovery method. Five high concentration patient samples were selected within the linear range to determine the maximum dilution. Results The average slope method showed a correlation coefficient (r) > 0.999 and a slope (Q) 6.1×10^6 , meeting the linearity requirements. According to the CLSI guideline, polynomial regression analysis showed that the most suitable polynomial was quadratic, and the linear deviation of each concentration was less than the allowable error ($\pm 5\%$). The linear dilution recovery method showed $r > 0.999$, meeting the linearity requirements, and the dilution recovery of each concentration gradient was $\leq 100\%$. The maximum dilution determined by the maximum dilution test was $1:10000$. Conclusion HBV DNA is in a clinically acceptable linear relationship in the range of $10^4 \sim 10^9$ IU/mL.

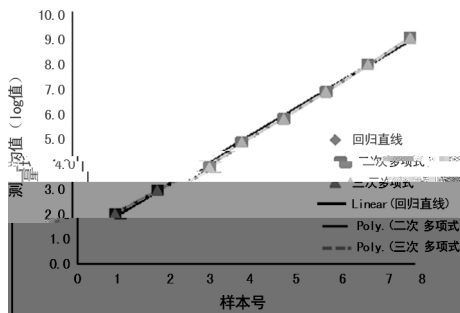
Abstract: Objective To evaluate the linearity and clinical reportable range of HBV DNA detection system. Methods Patient samples near the upper limit of the linear range were selected, and negative samples were serially diluted to one order of magnitude lower than the lower limit of the linear range declared by the manufacturer. Three concentration gradients of samples were prepared, and each sample was measured 5 times within one analytical batch. Linearity was evaluated by average slope method, CLSI guideline method and linear dilution recovery method. Five high concentration patient samples were selected within the linear range to determine the maximum dilution. Results The average slope method showed a correlation coefficient (r) > 0.999 and a slope (Q) 6.1×10^6 , meeting the linearity requirements. According to the CLSI guideline, polynomial regression analysis showed that the most suitable polynomial was quadratic, and the linear deviation of each concentration was less than the allowable error ($\pm 5\%$). The linear dilution recovery method showed $r > 0.999$, meeting the linearity requirements, and the dilution recovery of each concentration gradient was $\leq 100\%$. The maximum dilution determined by the maximum dilution test was $1:10000$. Conclusion HBV DNA is in a clinically acceptable linear relationship in the range of $10^4 \sim 10^9$ IU/mL.

线性范围是指覆盖检测系统可接受线性关系的范围!

表! 荧光定量 Z(? 测定 3+T ZU. 平均斜率法 统计结果 (V</=>)

标本号	加入相对量 *	测量均值	斜率	预期值
!	%	/ #/Oe%	@	/ #/Oe%
"	!	& \$* Oe%	& \$* %	4#& Oe%
\$!%	, #4Oe%\$, , 4\$	4#& Oe%\$
-	!%%	, #* Oe%	, , * %	4#& Oe%
*	!%%%	* #/Oe%&	** / %	4#& Oe%&
,	!%%%	, #* Oe%	, - * %	4#& Oe%
4	!%%%	4#* Oe%4	44 #	4#& Oe%4
&	!%%%	& \$ Oe%&	& \$ %	4#& Oe%&

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 3+T ZU. 加入的相对量; 平均斜率为 4 &#- V</=>; @表示无数据



图" 多项式回归分析图

表" 荧光定量 Z(? 测定 3+T ZU. 多项式回归分析结果

阶别	系数	系数值	\$1	D	!	自由度	\$O.G
!	Q.	%&/	%%, ! \$#!	%%%	! -	%%%&	
!	Q	%#/\$	%% \$ 4#&"	%%%			
"	Q.	! #/	%&#& "/ & \$ %	%%%	! \$	%% 4	
"	Q	%&* %	%% / -- \$ %	%%%			
"	Q	%% * %	%% 4#&	%%%			
\$	Q.	! #%	%%& \$! * #%	%%%	!"	%%&%	
\$	Q	%& \$	%%, ! \$&* %	%%%			
\$	Q	%%&&	%% 4 %#! %	%%\$4			
\$	Q.	%%&	%%& %#! / %#!/4				

注: \$1 为系数标准误; \$O.G 为回归标准误

2# 线性稀释回收法评价线性 经线性回归分析(图 \$) B6%#//, Q6%#/\$D6#& ,! 6%%%), 与! 无明显差异, 符合线性要求, 稀释回收量均<\%#(表-), 表明 3+T ZU. 在(& \$ Oe%) ~ (& \$ Oe%& V</=> 为临床可接受线性关系。

2# 最大稀释度试验确定 (?? 患者标本预期值分别为 (& \$ Oe%)、(\$# Oe%) 和 (" #& Oe%& V</=>。

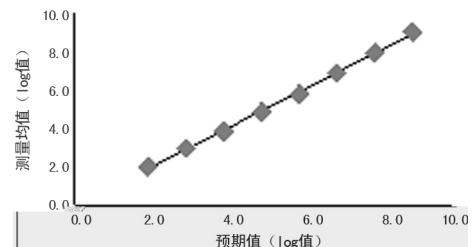
表* 荧光定量 Z(? 测定 3+T ZU. 最大稀释度试验统计差值 (EM值) 和 "P(5)

标本号	!!! %%%		!!! %%%		!!! %%%		!!! %%%		!!! %%%		!!! %%%		原倍	
	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)	差值 (EM) 值	"P (5)
!	@%&	%&	@%&	" #"	@%&	! #4	@%&	! #4	@%&	! #4	@%&	! #4	%%&	%&
"	@%&	\$#/	@%&	! #%	@%&	" #4	@%&	%#4	@%&	%&/	@%&	%&	%%&	%&*
\$	%&&	&#,	@%&	! #*	@%&	%#,	@%&	%#,	@%&	%#4	@%&	%#\$	%%&	%#/

\$ 份标本各种浓度梯度的测量均值和预期值差值均<\%#, 但标本 \$ 在! i ! %%% 稀释浓度的 "P>* 5 (表*), 因此确定最大稀释倍数为 i ! %%%. (?? 上限为线性范围上限& \$ Oe& \$! %%%& (& \$ Oe! \$) V</=>. 结合线性范围下限, (?? 为 (& \$ Oe%) ~ (& \$ Oe! \$) V</=>。

表\$ 荧光定量 Z(? 测定 3+T ZU. 二次多项式和直线回归的线性偏差 (EM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 (EM)
!	! #/	! &/	" %%	%#!
"	" #"	" &/	" #%	%%&
\$	\$ &	\$ &&	\$ &\$	@%&
-	- &	- &4	- #/	@%&&
*	* #&	* &	* #/	@%&&
,	, &	, &	, &	@%&
4	4 &/	4 &	4 &4	%%&
&	& #-	& &	& #*	%#!



图\$ 线性稀释回收法回归分析图

表- 荧光定量 Z(? 测定 3+T ZU. 线性稀释回收法统计结果 (EM值)

标本号	测量均值	预期值	稀释回收量
!	! #/	! #-	%%&
"	" #"	" #-	@%&
\$	\$ &	\$ #-	@%&#'
-	- &	- #-	@%&#'
*	* #&	* #-	@%&#'
,	, &	, #-	@%&#\$
4	4 &/	4 #-	@%&
&	& #-	& #-	%%&

3 讨 论

按照ISO 15189:2013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/或回收率^[1],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,在零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回收率评价试验来确定,为此美国FDA法规使用回收率而不是线性范围。而美国UCLL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回收率^[2]。临床实验室应正确理解线性、测量和/或回收率的含义。美国CLIA提出分析测量范围(AMR)和回收率的定义,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;回收率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,如果回收率超出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、回收率和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回收率。

本研究首先采用平均斜率法、UCLL指南方法和线性稀释回收法对荧光定量PCR测定3+T ZU检测系统进行线性评价^[3-5],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3+T ZU在(0.01~100)μg/L为临床可接受线性关系。采用平均斜率法应注意以下3点:一是进行数据统计时通常将ZU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3+T ZU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。UCLL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ZU,容易导致线性两端的ZU较大,超出允许误差而得出非线性结论^[6]。本研究结果显示,最低和最高浓度点的ZU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回收率确定。目前,国内对3+T ZU检测程序的线性范围验证报道较多,较少确定回收率^[4,5],这可能是因为在临床上3+T ZU几乎很少高于(100~1000)μg/L,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回收率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3+T ZU检测的回收率^[7],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≤10%外,以" $P \leq 0.05$ "的稀释倍数为临床可接受,确定回收率为(0.01~100)μg/L。

0 0 0 9.703505