

自制 HBV DNA 质控血清的临床应用与评估

鲁荣九¹

【摘要】 目的:探讨自制质控血清用于 HBV DNA 定量检测室内质量控制的可行性。**方法:**收集正常血清和 HBV DNA 高水平的异常血清,充分混匀配成 HBV DNA 质控血清,该血清灭活后分装并置于 -20°C 保存,每支质控血清室温融化半小时后与患者标本在相同条件下进行检测,剩余血清置于 4°C 保存,并在 2 周内用完。**结果:**质控血清的管间差为 1.23%,12 个月测定的月均值差异无统计学意义($F=1.48, P=0.14$),而且质控血清开盖后于 4°C 密封保存 2 周,其测定结果差异无统计学意义(4.83 ± 0.20 VS $4.83\pm 0.23, P=0.91$)。结合“Levery-Jennings”质控规则能有效地识别包括标本降解、扩增效率异常或者标准品降解引起的失控。**结论:**自制 HBV DNA 质控血清均一稳定, -20°C 至少可稳定保存 1 年, 4°C 至少可稳定保存 2 周,能满足室内质量控制的要求。

【关键词】 质控;血清;HBV;DNA

【中图分类号】 R457.1 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1004-2806(2012)06-0353-03

Clinical application and evaluation of self-made HBV DNA quality control serum

LU Rongjiu

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Abstract Objective: To investigate feasibility of the self-made quality control serum as an internal quality control for quantitating HBV DNA. **Method:** Normal serum and abnormally high levels HBV DNA serum were collected and mixed thoroughly to make HBV DNA quality control serum, then the serum were disinfected and transferred into EP tubes. All the control serum were kept at -20°C until analyzed. Every one tube of control serum was thawed at room temperature for half hour, then treated and detected like daily clinical samples. The remaining serum were stored at 4°C and detected within two weeks. **Result:** The tube-to-tube variation was 1.23%. There was no significant difference among 12 monthly means of control serum ($F=1.48, P=0.14$). If the re-capped control serum was used and stored at 4°C for two weeks, no significant difference in measurement results was found (4.83 ± 0.20 VS $4.83\pm 0.23, P=0.91$). In addition, combining with Levery-Jennings control rules, the self-made control serum could discriminate the events out of control resulted from sample degradation, standard degradation and abnormal amplification efficiency. **Conclusion:** The self-made HBV DNA control serum was homogeneous and stable, which was stable for 1 year and two weeks at least at -20°C and 4°C , respectively, therefore, the self-made serum conformed to the requirement as an internal quality control.

Key words quality control; serum; HBV ; DNA

近年来,随着实时 PCR 技术的广泛使用,血清 HBV DNA 水平的定量检测越来越受到重视。研究表明,血清 HBV DNA 水平的高低不仅是判断患者体内病毒是否复制、患者传染性高低的重要参数^[1],同时也是制订治疗方案和监测治疗疗效不可或缺的实验室依据^[2],更有研究认为其是预测原发性肝癌与肝硬化发生的重要独立因子^[3],因此确保 HBV DNA 定量检测结果的准确性与重复性就显得相当重要。实验室室内质量控制是确保检测结果准确性高与重复性好的重要环节,而质控物是实验室室内质量控制的关键因素之一。ISO15189 在其认可准则中明确指出实验室可以使用商品化

或自制的质控物进行质量控制,而中国实验室国家认可委员会更是要求商品化的质控物必须获得中国食品与药品监督管理委员会(sFDA)的批准,遗憾的是目前尚无一种商品化的 HBV DNA 质控血清获得 sFDA 的批准,因此我们尝试利用患者血清样本制备 HBV DNA 质控血清,并从均一性,稳定性以及识别失控的能力等几个方面对其进行评价。

1 资料与方法

1.1 仪器

MXP3000[®] 实时荧光 PCR 仪由美国 Strata-gene 公司生产;HB-100 恒温金属浴由杭州博日科技有限公司生产。

1.2 试剂

HBV DNA 定量检测采用荧光 PCR 法,试剂由上海克隆股份有限公司提供。

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉, 430022)

1.3 质控血清的制备

1.3.1 血清标本的选择 分别收集 HBV DNA 高水平的异常混合血清 (3 个标本, 浓度约为 106 IU/ml) 3 ml 和正常混合血清 35 ml (乙肝三系全阴性而且 HBV DNA 低于最低检出限), 要求所有血清标本无明显溶血与黄疸, 且 HCV-Ab 和 HIV-Ab 均阴性。2 组血清标本分别混匀。

1.3.2 病原体灭活 混合血清分别 56℃ 水浴 10 h。

1.3.3 纤维蛋白原的去除 灭活后的血清 3 000 r/min 离心 10 min, 并将离心后的异常与正常血清充分混匀。

1.3.4 分装 每个 EP 管分装混匀血清 1.2 ml, -20℃ 冻存备用。

1.4 质控血清的使用与稳定性的评估

检测前半小时从 -20℃ 冰箱中取出 1 支 HBV DNA 质控血清, 室温融化并混匀。混匀后的质控血清取 100 μl 与患者标本在相同条件下进行处理, 剩余质控血清密封置于 4℃ 保存, 随后每天取 100 μl 进行质量控制, 通常 2 周用完, 检测结果用于评估质控血清 -20℃ 保存以及开盖后的 4℃ 保存的稳定性。

1.5 质控血清的均一性检测

按照 sFDA 制订的《体外诊断试剂校准品、质控品研究技术指导原则》进行均一性检测, 首先随机抽取 5 支分装的冻存质控血清, 每支取 100 μl, 按与患者标本检测相同的条件进行处理, 计算均值 $\bar{x}_1$ 和标准差 S_1 ; 另外从其中一支质控血清中连续取样 5 次, 每次 100 μl, 与前 5 份样本同时同样处理, 计算均值 $\bar{x}_2$ 和标准差 S_2 , 然后计算管间差变异系数 $CV(S_{\text{管间}} = \sqrt{S_1^2 - S_2^2}, CV_{\text{管间}}(\%) = S_{\text{管间}} / \bar{x}_1)$ 。

1.6 质量控制

暂定均值与暂定标准差的确定, 以最初 20 次在控质控结果的均值与标准差为暂定均值与暂定标准差。以暂定均值与暂定标准差绘制“Levery-Jennings”质控框架图对下 1 个月结果进行质量控制, 并将质控结果点在质控框架图, 按“Levery-Jennings”规则判断质控结果的状态。累积均值与累积标准差的确定: 1 个月结束后, 将该月的在控结果与前 20 次质控测定结果汇集在一起, 计算累

积均值与累积标准差, 并以此累积均值与累积标准差绘制下一个月“Levery-Jennings”的质控框架图, 如此累积 5 个月, 累积完成后, 累积均值与累积标准差共使用 7 个月。按“Levery-Jennings”规则判断质控结果的状态 ($\bar{x}$ 平均数; s : 标准差): ① 1_{2s} 为告警规则, 表示一个质控结果超过 $\bar{x} \pm 2s$; ② 1_{3s} 为失控规则, 表示一个质控结果超过 $\bar{x} \pm 3s$; ③ 2_{2s} 为失控规则, 表示 2 个连续质控结果同时超过 $\bar{x} + 2s$ 或 $\bar{x} - 2s$ 。所有质控结果均换算成对数, 并使用 SPSS15.0 软件进行处理, 多组间均值比较采用方差分析, 2 组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 质控血清的瓶间差

同时对来自相同或不同 EP 管内的 10 份质控血清标本进行处理与检测, 结果显示 $s_1 = 0.17$, $s_2 = 0.16$, $\bar{x}_1 = 4.89$, $\bar{x}_2 = 4.88$, $CV_{\text{(管间)}}(\%) = 0.06/4.89 = 1.23\%$ 。

2.2 质控血清的稳定性

从 2009 年 4 月份起对自制 HBV DNA 质控血清进行测定, 在 12 个月内对质控血清检测了 253 次, 方差分析发现, 质控血清的每月测定均值无显著性差异 ($F = 1.48$, $P = 0.14$), 具体见表 1。所有质控血清开盖后第一次测定结果为 $4.83 \pm 0.20 (\bar{x} \pm s)$, 最后 1 次测定结果为 $4.83 \pm 0.23 (\bar{x} \pm s)$, t 检验分析显示 2 组测定结果之间差异无统计学意义 ($t = 0.11$, $P = 0.91$)。

2.3 质控图的均值与标准差

根据“Levery-Jennings”规则对质控数据进行处理取舍后, 确定本研究中暂定均值与暂定标准差分别为 4.91 与 0.24, 5 个月的累积均值与累积标准差分别为 4.86 和 0.18, 具体见表 2。

2.4 质控结果分析

采用“Levery-Jennings”对质控结果分析, 共发现 10 个结果违背 12₁ 规则, 5 个结果违背 13₁ 规则, 2 个结果违背 22₁ 规则, 失控类型、质控血清的 Ct 值及失控可能原因具体见表 3。

3 讨论

质控品是质量控制体系的重要组成部分, 通常要求无基质效应或基质效应低、稳定性高和均一性好。商品化的质控品稳定期长且使用方便, 尽管成本高还是受到众多医学检验者的青睐, 但是对于

表 1 2009-04—2010-03 自制 HBV DNA 质控血清月检测均值与标准差

	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	1 月	2 月	3 月	合计
标本数	22	20	22	23	21	23	18	21	22	21	17	23	253
均值	4.92	4.81	4.88	4.75	4.84	4.89	4.84	4.86	4.96	4.84	4.96	4.86	4.86
标准差	0.24	0.14	0.12	0.25	0.24	0.22	0.21	0.23	0.27	0.19	0.23	0.22	0.22
CV/%	4.87	2.91	2.50	5.26	4.96	4.50	4.34	4.73	5.44	3.93	4.63	4.53	4.52

表 2 质控图的均值与标准差

	暂定	2 个月累积	3 个月累积	4 个月累积	5 个月累积
均值	4.91	4.87	4.87	4.85	4.86
标准差	0.24	0.20	0.18	0.18	0.18
CV(%)	4.89	4.10	3.69	3.71	3.70

表 3 2009-04—2010-03 质控结果失控及失控原因分析一览表

序号	时间	违背规则	标准曲线	Ct 值	可能失控原因
1	2009-07-29	1 _{3s} 规则 (< -3s)	Ct=43.58~3.58lg[C]	31.00	扩增效率为 0.90, 过低
2	2009-08-06	1 _{3s} 规则 (< -3s)	Ct=42.95~3.21lg[C]	29.30	质控血清中 DNA 降解或存在抑制剂
3	2009-10-23	1 _{3s} 规则 (< -3s)	Ct=44.48~3.20lg[C]	30.83	质控血清中 DNA 降解或存在抑制剂
4	2009-11-05	1 _{3s} 规则 (< -3s)	Ct=44.24~3.49lg[C]	29.48	扩增效率为 0.93, 过低
5	2009-12-02	2 _{2s} 规则 (> +2s)	Ct=46.31~3.23lg[C]	28.37	标准品降解
6	2009-12-17	1 _{3s} 规则 (> +3s)	Ct=44.43~3.15lg[C]	27.41	扩增效率为 1.08, 过高
7	2010-02-20	2 _{2s} 规则 (> +2s)	Ct=44.08~3.19lg[C]	27.27	扩增效率为 1.06, 过高

通过或准备通过 ISO15189 实验室认可的单位来说,所使用的商品化质控品必须获得 sFDA 的批准,因此为了保证顺利通过 ISO15189 实验室认可,当商品化质控品不能满足上述要求时,许多实验室均考虑使用自制的质控血清进行质量控制。

本研究收集患者血清制备 HBV DNA 质控血清,收集时要求所有血清无明显溶血、黄疸与脂血, HCV-Ab 和 HIV-Ab 均阴性,而且在制备过程中将混合血清水浴 10 h(56℃)灭活病原体,尽可能降低质控血清的感染性。另外在质控血清制备过程中没有添加任何血清外的物质,即使是 NaN3 等防腐剂也没有添加,有效地避免了基质效应的发生。除了基质效应外,稳定性是质控血清最重要的性能之一,通常应至少包括一批质控血清在特定储存条件下的稳定性和开盖(瓶)后稳定性 2 个方面,高扬等^[4]自制了一系列肿瘤标志物和激素的质控血清,结果发现在-80℃条件下至少可稳定保存 1 年,但开盖后即要使用,开盖后稳定性较差。由于检验科通常无-80℃的低温冰箱,而且 DNA 分子的稳定性可能不同于蛋白质与激素类,基于检验科工作的实际情况,本研究中我们探讨未开盖-20℃保存和开盖后 4℃保存自制 HBV DNA 质控血清的稳定性,-20℃保存条件下 12 个月的均值差异无统计学意义,而且血清解冻后 4℃保存 2 周内的测定结果差异无统计学意义。上述研究结果证实自制 HBVDNA 质控血清在无防腐剂存在的条件下-20℃保存至少能稳定 1 年,4℃保存至少能稳定 2 周,具有较高的稳定性。除了稳定性外,我们还对质控血清的均一性进行评估,结果发现其管间差仅为 1.23%,提示经过充分混匀的质控血清分装后具有较好的均一性。

本研究还采用“Leverly-Jennings”规则对 1 年

的自制质控血清的测定结果进行分明,共发现 10 个结果违背 1_{2s} 规则,5 个结果违背 1_{3s} 规则,2 个结果违背 2_{2s} 规则。对 7 个失控批次的标准曲线进行分析,可将其分为 4 种类型:①标准曲线截距与斜率均基本正常 2 例,可能原因是提取的 DNA 标本存在抑制剂或 DNA 降解;②标准曲线截距正常,而斜率增加(扩增效率下降)2 例,可能是由于相邻标准品的稀释度大于 10 所致;③标准曲线截距增加,而斜率正常(扩增效率正常)1 例,可能是标准品降解所致;④标准曲线截距正常,而斜率下降(扩增效率增加)2 例,可能是由于相邻标准品的稀释度小于 10 所致。因此采用自制 HBV DNA 质控血清与“Leverly-Jennings”规则能有效地监控包括样本 DNA 降解或存在抑制剂,扩增效率异常以及标准品降解等引起的失控,能满足室内质量控制的要求。

参考文献

[1] HATZAKIS A, MAGIORKINIS E, HAIDA C. HBV virological assessment[J]. J Hepatol, 2006, 44: S71-76.

[2] MOMMEJA-MARIN H, MONDOU E, BLUM MR, et al. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: analysis and review of the literature [J]. Hepatology, 2003, 37: 1309-1319.

[3] MENDY M E, WELZEL T, LESI O A, et al. Hepatitis B viral load and risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in the Gambia[J]. West Africa J Viral Hepat, 2010, 17: 115-122.

[4] 高扬, 单宁宁, 李心河, 等. 自制质控血清的临床应用评估[J]. 山东大学学报(医学版), 2009, 47(4): 72-74.

(收稿日期: 2011-12-04)