

· 临床论著 ·

自制室内质控血浆在罗氏 COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 检测系统的应用

蔡瑜 戎国栋 徐婷 刘婷 潘世扬 黄珮珺 陈丹

【摘要】目的 制备含有不同浓度的乙型肝炎病毒 (HBV) DNA 或丙型肝炎病毒 (HCV) RNA 的血浆标本, 用于罗氏 COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 检测系统定量测定 HBV DNA 及 HCV RNA 的室内质控品, 评价其临床可行性。**方法** 将含有高浓度 HBV DNA (10^7 数量级) 或 HCV RNA (10^5 数量级) 的临床血浆标本用健康志愿者血的临床血浆标本稀释至 10^5 和 10^2 数量级, 均分装数管, 以罗氏 COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 检测系统分别对质控血浆中 HBV DNA 和 HCV RNA 定量测定 20 次, 采用“即刻法”质控方法, 计算每批次的离散指数 (SI) 上限和下限值, 进行室内质控动态监测。**结果** HBV DNA 及 HCV RNA 室内质控血浆每批次检测 SI 上限和下限值均在控, HBV DNA 低浓度和高浓度 20 次检测结果的均值 (对数值) 分别为 2.24 和 5.72, 标准差均为 0.12, 批间 CV 值分别为 5.41% 和 2.17%; HCV RNA 室内质控血浆检测结果的均值 (对数值) 分别为 2.26, 标准差为 0.13, 批间 CV 值为 5.80%。**结论** 含 HBV DNA、HCV RNA 血浆标本制备简单, 单次制备量大、稳定性好, 可用于罗氏 COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 检测系统的“即刻法”室内质控。

【关键词】 乙型肝炎病毒 DNA; 丙型肝炎病毒 RNA; 荧光定量 PCR; 质量控制

Preparation and application of internal quality control plasma for the COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 detection system CAI Yu*, RONG Guodong, XU Ting, LIU Ting, PAN Shiyang, HUANG Peijun, CHEN Dan.

*Department of Laboratory Medicine, the First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061, China

Corresponding author: HUANG Peijun, Email: hpj63@163.com; CHEN Dan, Email: lab.med@163.com

【Abstract】Objective To prepare and evaluate internal quality control (IQC) plasma for the quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA and hepatitis C virus (HCV) RNA by the COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 detection system. **Methods** The plasma samples with high HBV DNA level (10^7 magnitude) or HCV RNA level (10^5 magnitude) were diluted by the HBV and HCV-free plasma from a healthy volunteer and subpackaged into several tubes as internal quality controls (IQC). The HBV DNA or HCV RNA concentrations of IQCs were quantified 20 times by the COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 detection system. After each quantitative detection, the separation index (SI) values were calculated for the IQC analysis by the instant method. **Results** The SI values of IQCs were all under control. The mean values (log) of IQCs with low and high HBV DNA levels (10^5 and 10^2 magnitude) were 2.24 and 5.72, respectively. The standard deviations (SD) were both 0.12. The coefficients of variation (CVs) were 5.41% and 2.17%, respectively. The mean value (log), SD and CV values of HCV IQCs (10^2 magnitude) were 2.26, 0.13 and 5.80%, respectively. **Conclusions** The self-prepared internal quality control plasma is suitable and applicable for the quantification of HBV DNA and HCV RNA by the COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 detection system.

【Key words】 Hepatitis B virus DNA; Hepatitis C virus RNA; Fluorescent quantitative polymerase chain reaction; Quality control

COBAS AmpliPrep/TaqMan 48超敏PCR核酸定量检测系统是罗氏诊断公司最近开发的用于感染性疾病病原体核酸定量检测仪器^[1]。目前主要在血

液中心开展用于对血液制品的病原体筛查, 以及对临床乙型和丙型肝炎患者抗病毒疗效监测^[2-4]。

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) DNA及丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) RNA的定量测定是罗氏COBAS AmpliPrep/TaqMan 48超敏PCR核酸定量检测系统的主要检测项目, 其配套试剂为 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test (72 tests/盒) 和 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.05.005

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81201359); 江苏省实验诊断学重点实验室基金 (No. XK201114); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (No. CXLX12_0564)

作者单位: 230061 合肥市, 安徽省合肥市第一人民医院检验科 (蔡瑜); 南京医科大学第一附属医院检验学部·国家临床检验重点专科 (戎国栋、徐婷、刘婷、潘世扬、黄珮珺、陈丹)

通讯作者: 黄珮珺, Email: hpj63@163.com; 陈丹, Email: lab.med@163.com

Test (48 tests/盒), 该试剂盒提供低值和高值质控品各4管。但是, 由于传统荧光定量PCR检测价格优势的竞争, 该检测系统尚未在临床检验科室得到广泛开展应用。在实际临床工作中由于检测标本数较少, 经常存在1个检测试剂盒需要经过多批次检测(> 4次)才能用完的情况, 易造成质控品不足的问题。本研究通过自制含有不同浓度HBV DNA血浆标本及HCV RNA血浆标本, 用于罗氏COBAS AmpliPrep/TaqMan 48超敏PCR HBV DNA及HCV RNA定量检测系统的室内质量控制, 探讨其临床应用的可行性, 以解决上述问题。

资料与方法

一、一般资料

1. 血浆标本: 选取南京医科大学第一附属医院感染病科收治的慢性乙型肝炎和丙型肝炎住院患者各1例, 慢性乙型肝炎患者血浆HBV DNA含量为 1×10^7 IU/ml (上海科华HBV定量试剂盒), 慢性丙型肝炎患者HCV RNA含量为 1×10^5 IU/ml (上海科华HCV定量试剂盒), 分别收集其EDTA-K₂抗凝静脉血, 分离获得血浆1 ml; 选择健康志愿献血者1例, HBV表面标志物检测均为阴性, 血浆HBV DNA和HCV RNA检测均为阴性, 收集其血浆共200 ml。

2. 试剂和仪器: 罗氏诊断公司COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test试剂盒及COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test试剂盒; 罗氏COBAS AmpliPrep核酸自动提取仪; 罗氏COBAS TaqMan 48荧光定量PCR仪。

二、方法

1. 室内质控血浆的制备: 将HBV DNA含量为 1×10^7 IU/ml的血浆标本用健康志愿者血浆稀释至 1×10^5 IU/ml和 1×10^2 IU/ml, 分别为“高值质控血浆”和“低值质控血浆”, 各50 ml。将HBV DNA高值和低值质控血浆分别充分混匀, 按照每管1 ml将其分别分装至高压灭菌的1.5 ml塑料离心管。同时将HCV RNA含量为 1×10^5 IU/ml的血浆标本用健康志愿者血浆稀释至 1×10^2 IU/ml, 共100 ml。HCV RNA质控血浆充分混匀后分装至0.1% DEPC水溶液过夜浸泡并高压灭菌的1.5 ml塑料离心管, 每管各1 ml^[5]。将所有质控血浆瞬时离心数秒, 用封口膜封口后置-70℃冷冻保存。

2. 室内质控血浆的检测: 每2周进行1批次检测, 共检测18批次, 即整个实验历时34周。第一批次同时检测HBV DNA低值、高值质控血浆

及HCV RNA质控血浆各3份, 其余每批次同时检测以上3种质控血浆各1份。质控血浆使用前在室温复融, 振荡混匀, 瞬时离心后进行检测, 每批次实验均严格按仪器操作规程, HBV DNA或HCV RNA定量结果由仪器配套软件自动计算得到。

3. “即刻法”质控分析^[6]: 每批次室内质控血浆检测后, 将之前所有批次的检测结果汇总, 计算均值(\bar{x})和标准差(s), 并按照下述公式计算SI_{上限}和SI_{下限}。

$$SI_{\text{上限}} = \frac{x_{\text{最大值}} - \bar{x}}{s}; SI_{\text{下限}} = \frac{\bar{x} - x_{\text{最小值}}}{s}$$

将SI_{上限}和SI_{下限}与对应SI界值进行比较。若SI_{上限}和SI_{下限}均 $\leq n2s$ 值, 表明结果在控; 若SI_{上限}或SI_{下限}在 $n2s$ 和 $n3s$ 之间, 表明结果处于“告警”状态; 若SI_{上限}或SI_{下限} $\geq n3s$ 值, 表明结果失控。

4. Levey-Jennings质控图的绘制: 分别计算HBV DNA低值、高值室内质控血浆及HCV RNA质控血浆20个检测结果的均值 \bar{x} 和标准差 s , 以 $\bar{x} \pm 2s$ 为告警限, $\bar{x} \pm 3s$ 为失控限, 在Excel软件中绘制Levey-Jennings室内质控图^[7-9]。

5. 学生化残差(SREi)计算方法^[10]: 连续测定质控品5次, 即可对以后的检验结果是否为离群值进行检验。①求出测定结果(至少5次)的平均值(\bar{x})和标准差(S)。②求出待判定结果(X_i)对应的残差(ei), $ei = X_i - \bar{x}$; ③求出残差(ei)的标准误差(Se): $Se = S\sqrt{1 - \frac{1}{n}}$; ④求出SREi: $|SREi| = \frac{ei}{Se}$; ⑤离群值判定: 当 $|SREi| < 1.96$ 时, 该测定值为群体测定值; 当 $1.96 \leq |SREi| < 2.58$ 时, 该测定值为边缘值; $|SREi| \geq 2.58$ 时, 该测定值为离群值, 在计算该组数据均值和标准差时, 边缘值和离群值均应舍去。

三、统计学处理

不同批次间HBV DNA及HCV RNA定量结果的比较采用配对 t 检验, 统计分析均采用Stata 9.2统计软件进行。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、“即刻法”室内质控评价

HBV DNA低值、高值质控血浆各批次HBV DNA定量检测SI_{上限}及下限值见图1, 图中白色区域为“在控”, 淡灰色区域为“告警”, 深灰色

区域为“失控”。除了高值质控血浆第5和第6批次SI下限值(图1红色标记)在 n_{2s} 和 n_{3s} 之间,处于“告警”状态,各批次SI上限和下限值均在控。

HCV RNA 质控血浆各批次定量检测结果的SI上限及下限值均小于 n_{2s} 对应值,提示此质控测定值的变化在 $2s$ 之内,是可以接受的。

二、Levey-Jennings 质控图

HBV DNA 低值、高值质控血浆20次定量检测结果的均值 \bar{x} 分别为2.24和5.72,标准差 s 均为0.12,批间变异系数值(coefficient of variation, CV)分别为5.41%和2.17%,依据Westgard多规则质控方法,设定低值和高值血浆质控“告警限”分别为 (2.24 ± 0.24) 和 (5.72 ± 0.24) ，“失控限”分别为 (2.24 ± 0.36) 和 (5.72 ± 0.36) ,低值和高值质控20次检测结果均处于在控范围 (2.24 ± 0.24) 。

HCV RNA 质控血浆20次定量检测结果的均值 \bar{x} 为2.26,标准差 s 和批间CV值分别为0.13和5.80%,依据Westgard多规则质控方法,设定血浆质控“告警限”为 (2.26 ± 0.26) ，“失控限”为 (2.26 ± 0.39) ,各检测值均匀的分布在均值两侧。其中,第7批次检测结果介于 $\bar{x} - 3s$ 和 $\bar{x} - 2s$ 之间,属于“告警”状态(图2红色标记)。

三、学生化残差法判定离群值

HCV RNA质控血浆18批次检测结果的 $|SRE_i|$ 均小于1.96,其中第7批次检测值 $|SRE_i|$ 为1.85,属于“群体测定值”,而非“边缘值”或“离群值”,见表1。

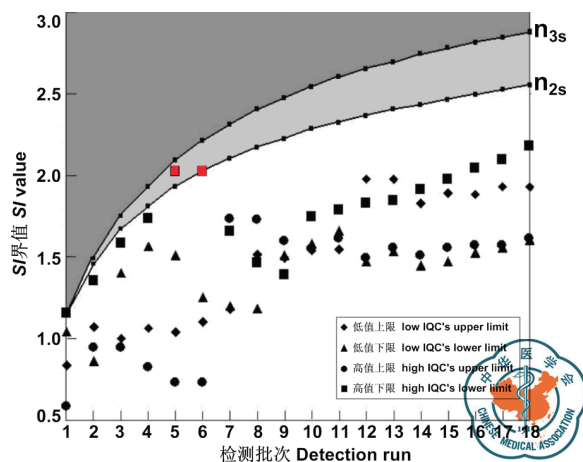


图1 “即刻法”HBV DNA 室内质控SI界值图

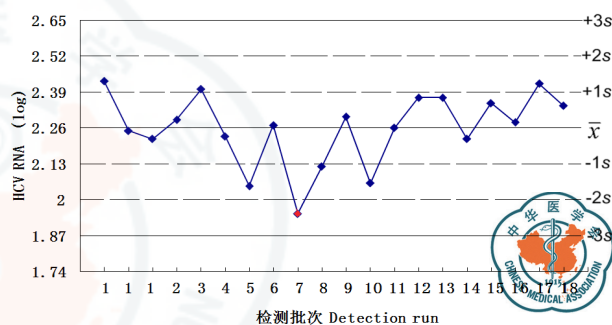


图2 HCV RNA 质控血浆 L-J 室内质控

值”,见表1。

四、保存时间对结果的影响

将HBV DNA 低值、高值和HCV RNA 室内质

表1 “学生化残差”判断离群值的结果(HCV RNA)

批次	浓度(log)	均值	标准差	$ SRE_i $	质控状态
1	2.43				
1	2.25				
1	2.22	2.30	0.12		
2	2.29	2.30	0.10		
3	2.40	2.32	0.09	0.89	在控
4	2.23	2.30	0.09	0.84	在控
5	2.05	2.27	0.13	1.73	在控
6	2.27	2.27	0.12	0.01	在控
7	1.95	2.23	0.15	1.85	在控
8	2.12	2.22	0.15	0.67	在控
9	2.30	2.23	0.14	0.52	在控
10	2.06	2.21	0.15	1.08	在控
11	2.26	2.22	0.14	0.33	在控
12	2.37	2.23	0.14	1.04	在控
13	2.37	2.24	0.14	0.95	在控
14	2.22	2.24	0.14	0.14	在控
15	2.35	2.24	0.13	0.83	在控
16	2.28	2.25	0.13	0.29	在控
17	2.42	2.25	0.13	1.23	在控
18	2.34	2.26	0.13	0.60	在控

注:即刻法质控要有连续3批质控测定值才能对第三次测定结果进行质控。因此“均值”和“标准差”两列到第3批次才有结果。学生化残差(SRE_i)计算方法要求测定质控品5次,才可对以后的检验结果是否为离群值进行检验。因此“ SRE_i ”和“质控状态”两列直到第5批才有相应结果

控血浆标本各 18 批次检测分别分为前 9 批次和后 9 批次, 前 9 批次的 1~9 批次与后 9 批次的 1~9 批次时间间隔均为 18 周, 采用配对 t 检验方法对数据进行统计学分析, 其前 9 批次与后 9 批次定量检测结果之间的差异均无统计学意义, P 值分别为 0.0548、0.9868 和 0.1820。未见定量结果随着批次增加和时间推移而出现逐渐下降的趋势。

讨 论

COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 核酸定量检测系统是罗氏诊断公司开发的主要用于感染性疾病病原体核酸定量检测的仪器, 这一系统包括 COBAS AmpliPrep 核酸自动提取仪和 COBAS TaqMan 48 荧光定量 PCR 仪, 目前该系统可对人血浆标本中的 HBV、HCV 和 HIV 等病毒核酸进行定量测定。该项检测系统较传统荧光定量 PCR 外标法最大的优势和特点主要体现在灵敏度和精密度两个方面^[11]。COBAS AmpliPrep 核酸提取仪采用较为先进的磁珠微球特异性吸附法实现了对微量核酸的自动化提取, 极大的提高了核酸提取效率和提取的稳定性、重复性及安全性, 该系统针对 1 ml 血浆标本进行检测, 较传统的微量样本核酸提取检测方法(样本用量通常低于 0.2 ml) 进一步提高检测灵敏度; 罗氏 COBAS 超敏 PCR 技术摒弃传统外部标准品定量方法, 而采用内部标准品, 在核酸提取纯化和 PCR 扩增过程中能够对多种检测影响因素(核酸提取丢失、标准品与待测样品扩增效率的管间差异等) 进行控制, 提高了检测精密度, 保证结果的稳定可靠。目前, COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 核酸定量检测系统主要用于血液制品中低拷贝病原体的筛查, 以及临床感染性疾病患者疗效评价, 指导医生的临床用药^[12]。

室内质控品是临床检验实验室质量控制体系不可缺少的一部分, 是临床检测质量保证的根源。然而, 由于 COBAS 检测系统配套试剂价格昂贵, 临床检测收费较高(约为传统荧光定量 PCR 检测项目价格的 4 倍), 因此临床检测量少(每周 10 个以下), 进而导致试剂盒内自带室内质控品不足, 无法满足临床实验室的检测需要。本文针对上述问题, 在总结多年临床 PCR 工作经验的基础上, 自制了含有 HBV DNA 或 HCV RNA 的血浆标本作为其室内质控品。对于临床检验实验室定量检测项目的常规室内质控方法, 要求质控品在用于室内质量控制之前需至少测定 20 次, 用以确定其靶值和标准

差并建立室内质控限后才能使用。然而, 罗氏诊断公司 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test 及 COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test 为进口试剂, 价格昂贵(约为 450 RMB/test), 如果按照上述方法进行质控分析, 则需要近 2 万元的高昂成本, 因此, 传统室内质控方法并不适用于该检测系统。

本研究采用“即刻法”质控方法对自制室内质控血浆进行检测。该方法通过 Grubbs 异常值取舍法, 先以首批 3 个检测结果确定 SI 上限和下限值, 之后可对每批次结果是否异常进行判断并取舍, 达到 20 次检测结果后, 再按照常规 Levey-Jennings 质控图和 Westgard 多规则法确定质控界限和范围进行常规室内质量控制^[13-14]。结果表明, 各批次 SI_{上限} 和 SI_{下限} 均在控, 除了 HBV DNA 高值质控血浆第 5 和第 6 批次 SI_{下限} 在 n_2s 和 n_3s 之间, 处于“告警”状态, 说明高值质控血浆前 6 批次检测结果中的最小值(即第 6 批次结果)显著偏离测定值群体, 这可能是测定结果随机波动的极值, 也可能是与群体测定值非属同质总体的异常值, 即“离群值”。本研究通过对高值质控血浆前 4 批次的 6 个定量检测结果进行计算分析发现, 由于其检测重复性很好(CV 值为 0.33%), 从而导致对后续质控结果的精密度要求较高, 容易出现失控, 且多为假失控, 是此“告警”状态出现的最可能原因, 这是即刻法的一大不足之处^[15]。最后, 本研究通过对总体结果进行回顾分析显示, 高值质控血浆第 5 和第 6 批次的定量检测结果在 $\bar{x} \pm 2s$ 范围以内, 表明此结果在“即刻法”质量监控过程中属于测定结果随机波动的极值, 而并非“离群值”, 因此结果给予保留, 不需剔除。

HCV RNA 质控血浆各批次 SI 上限和下限值均在控, 然而在对 20 次检测结果进行整体分析发现第 7 批次检测结果超出 $\bar{x} \pm 2s$ 范围, 为“告警”状态。该值(88.7 IU/ml)是用 Grubbs 检验法判断的极值在控, 但随着数据的增加即判断为异常值, 这一现象也被称为“回顾性失控检出”, 是即刻法的另一不足之处^[16]。但是通过“学生化残差”方法作异常点分析, 计算第 7 批次 $|SRE_i| < 1.96$, 表明当日检测结果为“群体测定值”, 因此予以保留。

在实际工作中, 即刻法作为特殊情况的质控方法, 在质控数据较少时合理应用可以达到室内质控的目的, 但是在 20 次测定结果完成后, 应及时制作 L-J 质控图进行回顾性分析, 为以后质控积累经验。本研究自制室内质控血浆基质与临床标本完全

一致,批间CV值均在6%以下,性质均匀,结果稳定。本次试验为每2周检测1批次,共18批次,时间跨度达到半年以上。通过统计分析,前9批次与后9批次定量检测结果之间的差异均无统计学意义。表明HBV DNA、HCV RNA质控血浆在-70℃条件下至少可以保存18周。本次自制的血浆标本有很好的稳定性,方便临床进行室内质量控制;单次制备量大,符合理想质控品的要求。

综上所述,本研究自制的含HBV DNA、HCV RNA 血浆标本适用于罗氏 COBAS AmpliPrep/TaqMan 48 超敏 PCR 定量检测系统的“即刻法”室内质控。

参考文献

- 1 Alice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) test: a novel automated real-time PCR assay for quantification of HBV DNA in plasma[J]. J Clin Microbiol,2007,45(3):828-834.
- 2 Yang Z, Xu L, Liu L, et al. Routine screening of blood donations at Qingdao central blood bank, China, for hepatitis B virus (HBV) DNA with a real-time, multiplex nucleic acid test for HBV, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Types 1 and 2[J]. Transfusion,2013,53(10 Pt 2):2538-2544.
- 3 Pyne MT, Brown KL, Hillyard DR. Evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test and identification of rare polymorphisms potentially affecting assay performance[J]. J Clin Microbiol,2010,48(8):2852-2858.
- 4 Bamaga MS, Azahar EI, Al-Ghamdi AK, et al. Nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus, and its role in blood donation screening in blood banks[J]. Saudi Med J,2009,30(11):1416-1421.
- 5 J. 萨姆布鲁克, DW. 拉塞尔, 黄培堂等译. 分子克隆指南上册[M]. 3版. 北京: 科学出版社,2002:584-585.
- 6 李金明主编. 实时荧光PCR技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:156.
- 7 Levey S, Jennings ER. The use of control charts in the clinical laboratory[J]. Am J Clin Pathol,1950,20(11):1059-1066.
- 8 Sharma D. Use of the microsoft excel for automated plotting of Levey Jennings charts[J]. Indian J Med Microbiol,2011,29(4):448-449.
- 9 Coskun A. Westgard multirule for calculated laboratory tests[J]. Clin Chem Lab Med,2006,44(10):1183-1187.
- 10 骆展鹏, 邹晓萍, 黎美君, 等. “即刻法”室内质量控制方法学的改进[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1234-1235.
- 11 Pyne MT, Hillyard DR. Evaluation of the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV Test[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2013,77(1):25-30.
- 12 徐京杭, 于岩岩, 斯崇文, 等. 马来酸恩替卡韦片治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎的随机, 双盲, 双模拟, 阳性药对照, 多中心临床研究48周结果[J]. 中华肝脏病杂志,2013,21(12):881-885.
- 13 吕虹, 周亚莉, 张国军, 等. HBV-DNA荧光定量PCR检测的室内质控研究. 中国热带医学,2008,8(7):1241-1243.
- 14 Khatri R, Kc S, Shrestha P, et al. Implementing self sustained quality control procedures in a clinical laboratory[J]. JNMA J Nepal Med Assoc,2013,52(189):233-237.
- 15 李承彬, 张国良. 即刻法质控运用错误分析[J]. 检验医学与临床,2007,4(4):250-251.
- 16 丁海明, 潘婉仪. ELISA定性实验“即刻法”室内质控的评价与应用[J]. 现代检验医学杂志,2009,24(3):28-30.

(收稿日期: 2014-01-12)

(本文编辑: 孙荣华)

蔡瑜, 戎国栋, 徐婷, 等. 自制室内质控血浆在罗氏COBAS AmpliPrep/TaqMan 48超敏PCR检测系统的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(5): 618-622.