

上海地区临床实验室 HCV RNA 检测正确度验证结果分析*

蒋玲丽, 杨依娟, 黄中强, 王雪亮, 鲍 芸, 肖艳群 (上海市临床检验中心, 上海 200126)

摘要:目的 分析上海地区临床实验室 2018 年丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV RNA)正确度验证结果, 了解上海地区 HCV RNA 检测质量。方法 收集临床实验室检验剩余样本, 制备低、高 2 个浓度样本。要求临床实验室在 3 个不同工作日对样本分别重复检测 3 次, 通过网络回报结果。采用国家二级标准物质对样本进行赋值, 分析不同试剂组的组内变异系数(CV)和偏移以及各临床实验室的室内 CV 和偏移。结果 通过赋值 2 个正确度样本的定值分别为 3.02×10^4 和 3.39×10^5 IU/ml。此次调查共有 16 家实验室上报结果, 低、高 2 个浓度样本不同试剂组组内 CV 为 0.78%~8.53% 和 0.94%~6.21%, 检测结果与靶值的偏移为 -4.69%~13.17% 和 -3.44%~6.51%。2 个样本实验室室内 CV 为 0.47%~8.53% 和 0.58%~6.21%; 偏移为 -0.89%~13.17% 和 -4.88%~6.51%。2 个样本的符合率分别为 87.50% (14/16) 和 100% (16/16)。结论 上海地区大部分临床实验室 HCV RNA 检测重复性较好, 正确度水平符合要求。

关键词: 丙型肝炎病毒; 标准物质; 正确度验证

中图分类号: R512.63; R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2019)05-156-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.040

Analysis on the Results of HCV RNA Determination Trueness Verification of Clinical Laboratories in Shanghai

JIANG Ling-li, YANG Yi-xiao, HUANG Zhong-qiang, WANG Xue-liang, BAO Yun, XIAO Yan-qun

(Shanghai Center for Clinical Laboratory, Shanghai, 200126, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the determination quality of HCV RNA in clinical laboratories in Shanghai through analyzing the results of HCV RNA determination trueness verification. **Methods** Remaining samples from clinical laboratories were collected, and high-level and low-level samples were prepared. These samples were determined repeatedly in three different working days, and the results were returned through network. The quantity of prepared samples was traced to a national secondary reference material. Coefficients of variation (CV) and bias were obtained and analyzed according to different reagent systems. The CV and bias of each laboratory was analyzed. **Results** By traceability, the concentrations of the two accuracy samples were 3.02×10^4 and 3.39×10^5 IU/ml, respectively. There were 16 laboratories returned the results. According to the different reagents, the CV of the two level samples were 0.78%~8.53% and 0.94%~6.21%, and the bias between determination results and target value were -4.69%~13.17% and -3.44%~6.51%, respectively. The indoor CV of each laboratory was 0.47%~8.53% and 0.58%~6.21%, and the bias was -0.89%~13.17% and -4.88%~6.51% respectively. The coincidences of the two level samples were 87.50% (14/16) and 100% (16/16) respectively. **Conclusion** The reproducibility and accuracy of the determination of HCV RNA were good in most clinical laboratories of Shanghai area.

Keywords: hepatitis C virus; standards; trueness verification

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 引起的 HCV 是最常见的传染性肝病之一, 治疗前的 HCV 核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 载量检测对治疗诊断起着重要作用^[1]。根据上海市临床检验中心 (以下简称“中心”) 近几年 HCV RNA 室间质量评价 (external quality assessment, EQA) 反馈数据统计的结果, 发现各实验室检测结果和各试剂组检测值之间存在一定的差异。为使不同实验室间测定结果具有可比性, 可通过相应的参考方法或标准物质进行量值溯源^[2], 因此 2015 年中心制备

了 HCV RNA 国家二级标准物质 [编号: GBW(E) 090628]^[3]。2018 年中心利用制备的二级标准物质在上海地区开展了 HCV RNA 正确度验证计划, 用以评价上海地区临床实验室 HCV RNA 检测结果的正确度。

1 材料和方法

1.1 参控实验室 上海地区开展 HCV RNA 检测实验室。

1.2 仪器与试剂 瑞士罗氏公司生产的 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 检测系统

* 基金项目: 上海第四轮公共卫生三年行动计划-卫生检验学项目 (15GWZK0301)。

作者简介: 蒋玲丽 (1980—), 女, 硕士, 副主任技师, 主要从事分子检测质量控制, E-mail: jianglingli@sccl.org.cn。

通讯作者: 肖艳群, 女, 本科, 主要从事分子检测质量控制。

及其配套试剂,方法为内标定量法。美国 ABI 公司生产的 ABI7500 全自动扩增仪检测系统,试剂由上海科华生物工程股份有限公司生产,方法为柱提法。

1.3 方法

1.3.1 正确度调查样本收集自上海交通大学医学院附属仁济医院检验科 HCV RNA 检测后的剩余血清样本。混合均匀(剔除溶血和脂血样本),去除沉淀后 700 μ l/支分装,制备成低浓度(约 10^4 IU/ml)和高浓度(10^5 IU/ml)2 个样本,编号为 HCV RNA 1 号和 HCV RNA 2 号。

1.3.2 调查样本评估按照中国合格评定国家认可委员会(China national accreditation service for conformity assessment, CNAS)GL03《能力验证计划样品均匀性和稳定性评价指南》要求评估调查样本的均一性和稳定性。每个浓度抽取 10 支样本,每支检测 2 次,评估样本均匀性;抽取 6 套样本在 2~8℃放置 3 天后检测,评估样本稳定性。

1.3.3 正确度计划实施将 3 套共 6 支样本通过冷链系统运输到各临床实验室。要求临床实验室收到样本后立即将其存放在 -20℃ 以下冰箱中。实验室将样本分 3 批次检测(注:3 批次为不同检测日期),每批次分别取 1 套样本,平衡至室温后混匀,瞬时离心后检测。要求实验室每支样本重复测定 3 次(共 18 个测试数据),在 2 周内将所有检测结果上传至中心数据库,超过规定时间系统不再接收数据。检测后剩余样本按照生物安全要求进行处理。

1.3.4 定值^[3-4]采用 Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 48 检测系统,将正确度验证样本溯源至 HCV RNA 国家二级标准物质[GBW(E) 090628]。将国家二级标准物质稀释成 7 个浓度,每个浓度重复检测 3 次,求回归方程。要求二级标物每次定值实验检测均值在靶值 \pm 不确定度范围内为数据有效。正确度调查样本每个浓度重复检测 10 次,计算均值代入回归方程求出正确度验证样本的含量。分 3 个批次定值,计算 3 次定值均值作为最终定值结果。

1.3.5 结果分析使用上海市临床检验中心的室间质评管理平台进行数据的统计处理,以每个样本的对数值为统计值,计算按不同试剂分组后各试剂组的变异系数(coefficients of variation, CV)、偏移及所有回报结果的单个临床实验室室内 CV,偏移。根据卫生部临床检验中心室间质量评价靶值 ± 0.4 logIU/ml 的评价标准对实验室检测结果进行评价。

1.4 统计学分析 所有数据采用 log 值转换后进

行统计。均匀性评估采用方差齐性检验,稳定性评估采用 t 检验。

2 结果

2.1 均匀性和稳定性评估 计算高低 2 个浓度样本均匀性检测结果,作方差齐性检验, F 分别为 2.253 9 和 1.117 8, $F_{0.05(9,10)} = 3.02$, $F < F_{0.05(9,10)}$, $P > 0.05$,检测结果差异无统计学意义,表明正确度样本符合均匀性要求。统计正确度样本在 2~8℃放置 3 天的稳定性评估检测数据,通过检验,计算 t 值分别为 -0.73 和 0.03, $t_{0.05(10)} = 2.228$, $t < t_{0.05(10)}$, $P > 0.05$,检测结果差异无统计学意义,表明正确度样本是稳定的。

2.2 赋值结果 以国家二级标准物质[GBW(E) 090628]为溯源进行赋值,分 3 批进行。每批分析过程中二级标物均重复检测 3 次,取 3 次赋值的均值作为正确度样本赋值结果,分别为 3.02×10^4 和 3.39×10^5 IU/ml。

2.3 正确度调查分析

2.3.1 不同试剂组组内 CV 及偏移分析:见表 1。2 个样本不同试剂组组内 CV 分别为 0.78%~8.53%和 0.94%~6.21%,检测结果与靶值的偏移分别为 -4.69%~13.17%和 -3.44%~6.51%,不同试剂组间检测均值最大差值分别为 0.65 和 0.55 logIU/ml。

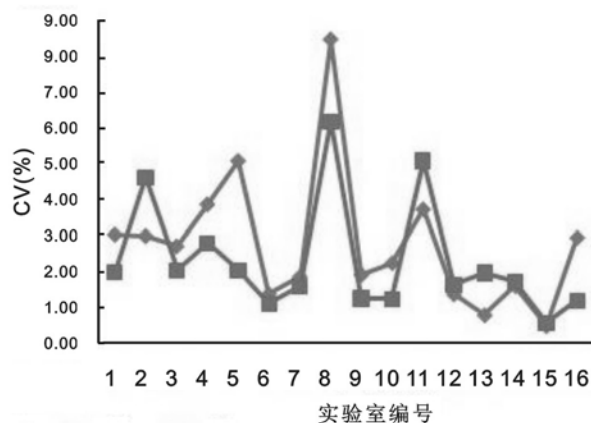
表 1 不同试剂组检测均值、组内 CV 和偏移

试剂组	1 号样本			2 号样本		
	均值(logIU/ml)	CV(%)	偏移(%)	均值(logIU/ml)	CV(%)	偏移(%)
1	4.58	3.83	2.20	5.53	3.53	-0.01
2	4.27	8.53	-4.69	5.57	6.21	0.72
3	4.92	1.91	9.82	5.89	1.27	6.51
4	4.82	1.37	7.59	5.69	1.11	2.89
5	5.07	0.78	13.17	5.79	1.98	4.70
6	4.42	2.10	-1.31	5.34	0.94	-3.44

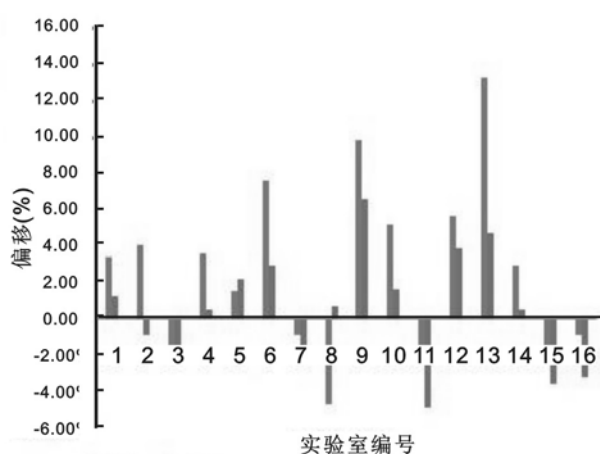
2.3.2 单个实验室室内 CV 及偏移分析:回报结果的 16 家实验室中 2 个样本单个实验室室内 CV 分别为 0.47%~8.53%和 0.58%~6.21%;检测均值与靶值的偏移分别为 -0.89%~13.17%和 -4.88%~6.51%。不同实验室间检测均值最大差值分别为 0.80 和 0.63 logIU/ml,详见图 1,图 2。实验室符合率结果见表 2。

表 2 实验室符合率

样本号	靶值(logIU/ml)	允许范围(logIU/ml)	符合实验室[家(%)]
1 号	4.48	4.08~4.88	14(87.50)
2 号	5.53	5.13~5.93	16(100)



注: ◆ 1号 ■ 2号
图1 实验室室内 CV



注: ■ 1号 ■ 2号
图2 实验室偏移

3 讨论 EQA 是评价临床实验室检测质量、促进实验室提高检测结果可靠性与准确性的有效手段,但 EQA 得到的偏移是单次检测结果与公议值的差值,中心组织的 HCV RNA 室间质量评价也一直采用试剂组组内公议值进行评价,其结果只能用于评价组内不同实验室间结果的一致性。不同组别之间的结果缺乏可比性,得出具有互换性和准确性的患者检验结果是临床实验室的重要目标^[5]。正确度验证计划是 EQA 的一种特殊方式,是评价实验室多次重复检测结果的平均值与参考量值间的一致程度^[6],“正确度”只能通过“溯源”来确定,所得偏移较室间质评更可靠和准确。

本研究分析了上海地区临床实验室 2018 年 HCV RNA 正确度验证结果。根据 CNAS-CL02-A009《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》中不精密度要求,以 0.4 logIU/ml 为允许总误差,中间精密度 $< 4/5 \text{Tea}$ 计算,2 个样本的 CV 应分别小于 7.14% 和 5.79%,上报结果中实验室 8 的 CV 超过了允许要求,但该实验室 2 个样本的检测均值均在允许范围内,提示实验室检测结果虽符合要求但检测重复性不佳,存在随机误差,建议实验室应加强人员培训,同时建

议实验室应重新进行 HCV RNA 项目检测系统的精密度验证。另外,结果显示实验室 9 和实验室 13 的低浓度样本偏移超过了允许范围,但两个实验室该浓度样本的 CV 分别为 1.91% 和 0.78%,提示两家实验室检测重复性较好,表明实验室存在系统误差。建议实验室可采取以下措施:①统计实验室长期室内质控数据,观察近期是否存在系统偏移趋势;②上海地区室内质控数据要求进行实验室间比对,可通过室内数据室间比对检查实验室检测数据是否存在偏移;③检查实验室检测设备是否满足要求;④从试剂校准品入手查找问题,积极联系试剂厂家分析校准品溯源的正确性。调查数据还显示 2 个样本试剂组间最大差值分别为 0.65 logIU/ml 和 0.55 logIU/ml,实验室间最大差值分别为 0.80 logIU/ml 和 0.63 logIU/ml,表明各试剂组和各实验室间检测结果还是存在一定差异,可能由于国内 HCV RNA 检测主要采用国产试剂,试剂品牌较多,各试剂校准品溯源方式不同,并且核酸提取以手工为主,整个检测过程影响因素较多。

综上所述,上海地区大部分实验室检测重复性较好,正确度符合要求,但各试剂组和各实验室之间结果存在差异。建议各试剂厂商统一试剂校准品的溯源方式和溯源链,并且积极推进全自动核酸提取系统,使各实验室之间的 HCV RNA 检测结果更具可比性。

参考文献:

- [1] 薛丽,黄芳,张彦平,等. 丙肝患者血清 HCV-RNA 含量与肝功能及血常规指标的相关性[J]. 现代检验医学杂志,2017,32(5):110-114.
XUE Li, HUANG Fang, ZHANG Yanping, et al. Relevance of serum HCV-RNA level with routine liver function indices and blood routine parameters in patients with hepatitis C[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(5): 110-114.
- [2] 张瑞,李金明. 如何正确使用临床检验标准物质[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(1):10-14.
ZHANG Rui, LI Jinming. How to use standard materials correctly in clinical laboratory[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2009, 32(1): 10-14.
- [3] 蒋玲丽,王华梁,王雪亮,等. HCV 核糖核酸国家二级标准物质的研制[J]. 临床检验杂志,2016,34(1):60-63.
JIANG Lingli, WANG Hualiang, WANG Xueliang, et al. Preparation for national secondary reference material of HCV RNA[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2016, 34(1): 60-63.
- [4] 王露楠,吴健民,李金明,等. 丙型肝炎病毒核酸检测的国家标准物质的研究[J]. 中华检验医学杂志,

- 2006, 29(4):354-357.
- WANG Lunan, WU Jianmin, LI Jinming, et al. Establishment of the first national standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assay for HCV RNA[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2006, 29(4):354-357.
- [5] 章晓燕, 王薇, 王治国. 临床检验正确度控制品-评估偏移[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5):147-149.
- ZHANG Xiaoyan, WANG Wei, WANG Zhiguo. True-ness controls of clinical laboratory to assess bias[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5):147-149.
- [6] 康凤凤, 王治国. ISO 15189:2012 与临床检验定量检测方法确认和性能验证[J]. 临床检验杂志, 2013, 31(12):881-884.
- KANG Fengfeng, WANG Zhiguo. Performance validation and verification of quantitative detection methods for clinical laboratories in ISO 15189:2012[J]. Chin J Clin Lab Sci, 2013, 31(12):881-884.
- 收稿日期:2019-07-05 修回日期:2019-07-20
-
- (上接 155 页)具有更好的指导意义。
- 本研究中 BUN 的生理水平和 TC 的病理水平的扩展相对不确定度不符合实验室目标不确定度 10.93%(9%)和 10.76%(10%), 高于包安裕等^[5]的研究 9.66%, 4.78%, 这可能与我们的室间质评中参与实验室数量较少有关, 导致偏移的测量不确定度较大, 合成后的扩展不确定度较大。ALT 的生理水平扩展相对不确定度为 17.41%(20%), 虽然符合本室的目标不确定度, 但由于与精密度相关的相对不确定度为 7.94%较大^[5,8-9], 提示应从检测人员、仪器、试剂和方法、所使用的校准品和质控品、环境温湿度条件等方面入手, 加强人员培训, 逐步改进检验质量从而缩小测量不确定度。
- 本方法未包括与分析前和分析后阶段相关的测量不确定度分量, 也未包括由于人群生物学变异而产生的测量不确定度^[6]; 张晓红等^[4]认为在不确定度评定过程中应注意不能忽略校准品不确定度的影响, 故如何量化检验过程中的不确定来源, 以更可靠的计算和表示测量不确定度, 为临床医生提供重要参考, 还需我们不断探索。
- 参考文献:
- [1] JCGM100:2008. Evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement [S]. Geneva: Switzerland, International Organization for Standardization, 2008:2-3.
- [2] FUENTES-ARDERIA X. Uncertainty of measurement in clinical laboratory sciences [J]. Clin Chem, 2000, 46(9):1437-1438.
- [3] 中国合格评定国家认可委员会. 测量不确定度的要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011:5-6.
- China National Accreditation Committee for Conformity Assessment. Requirements for measurement uncertainty[S]. Beijing: China Standard Press, 2011:5-6.
- [4] 张晓红, 刘向玮, 文江平, 等. 利用“室内质控和室间质评”数据评估临床生化检验中的测量不确定度[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(5):457-462.
- ZHANG Xiaohong, LIU Xiangwei, WEN Jiangping, et al. Evaluation of measurement uncertainty in clinical chemistry assays based on the data of internal quality control and external quality assessment[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2012, 35(5):457-462.
- [5] 包安裕, 李艳, 陈晨. 22 项生化检测项目测量不确定度的评价[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(6):156-158.
- BAO Anyu, LI Yan, CHEN Chen. Evaluation of measurement uncertainty of 22 clinical chemistry assays[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(6):156-158.
- [6] 刘伟平, 杨新春, 殷明刚. HBV-DNA 实时荧光定量检测程序的测量不确定度评估及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(1):59-61.
- LIU Weiping, YANG Xinchun, YIN Minggang. Evaluation and analysis of measurement uncertainty on real-time fluorescence quantitative detection of HBV-DNA[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(1):59-61.
- [7] 卢妙莲, 胡珺, 高云龙, 等. 血液常规检验项目测量不确定度评定[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(11):1817-1819.
- LU Miaolian, HU Jun, GAO Yunlong, et al. Uncertainty evaluation of blood routine test items[J]. Journal of Practical Medicine, 2014, 30(11):1817-1819.
- [8] 徐润灏, 张洁. 8 项生化指标测量不确定度评估及允许范围的初步研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2016, 36(12):1777-1783.
- XU Runbao, ZHANG Jie. Preliminary study on the measurement uncertainties and permissible ranges of 8 biochemical indexes[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science), 2016, 36(12):1777-1783.
- [9] 尹晶平, 董菁, 徐杰, 等. 测量不确定度评估临床干生化检验的初步应用[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(20):3033-3034, 3037.
- YIN Jingping, DONG Jing, XU Jie, et al. Preliminary application of measurement uncertainty for assessing clinical dry biochemical tests[J]. Laboratory Medicine and Clinical, 2015, 12(20):3033-3034, 3037.
- 收稿日期:2019-05-13 修回日期:2019-07-08