

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.004>

## 实时荧光定量 PCR 检测 EB 病毒 DNA 试剂盒的性能验证及评价

孟斌<sup>1</sup>, 张好良<sup>1</sup>, 李世宝<sup>1,2</sup>, 赵耀<sup>2</sup>, 马萍<sup>1,2</sup>

(徐州医科大学 1. 附属医院检验科; 2. 医学技术学院, 江苏 徐州 221002)

**[摘要]** 目的: 对新建的EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)DNA定量检测体系进行性能验证。方法: 采用实时荧光定量PCR法检测EBV-DNA含量, 并依次对精密性、准确度、人员、仪器、线性范围等性能参数进行验证及评价。结果: EBV临界质控品和强阳性质控品批内精密性分别为1.79%, 0.85%, 批间精密性为2.10%, 1.38%, 均<10%, 符合行业标准。准确度绝对偏差<0.5个对数数量级。人员比对符合率为90%, 仪器符合率100%。在(2.79E+02)~(4.36E+07) IU/mL范围内线性关系良好。结论: 本研究新建的EBV-DNA检测体系的主要性能指标已达到相关标准的要求, 可常规应用于临床。

**[关键词]** EB病毒DNA; 精密性; 准确度; 线性范围; 性能验证

## Performance verification and evaluation of Epstein-Barr virus DNA by real-time PCR

MENG Bin<sup>1</sup>, ZHANG Haoliang<sup>1</sup>, LI Shibao<sup>1,2</sup>, ZHAO Yao<sup>2</sup>, MA Ping<sup>1,2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital; 2. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221002, China)

**Abstract** **Objective:** To verify the performance of Epstein-Barr virus (EBV) DNA quantitative detection system. **Methods:** The DNA content of EBV was detected using real-time PCR. Then, the performance parameters of the detecting system such as precision, accuracy, personnel, equipment, linear range were validated and evaluated. **Results:** The intra-assay precision of EBV critical control products and strong positive control were 1.79% and 0.85% respectively. The inter-batch precision was 2.10% and 1.38%, both less than 10%, which met the industry standard. Accuracy absolute deviation is less than 0.5 logarithmic order of magnitude. The operators' coincidence ratio were 90% and instrument was 100%. It exhibited a benign linear relation from (2.79E+02)–(4.36E+07) IU/mL. **Conclusion:** The main performance indexes of the self-built EBV-DNA detection system in this laboratory meet the requirements of relevant standards and can be carried out in clinical practice.

**Keywords** Epstein-Barr virus DNA; precision; accuracy; linear range; performance verification

收稿日期 (Date of reception): 2018-03-01

通信作者 (Corresponding author): 马萍, Email: pingm62@aliyun.com

EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV)又称人类疱疹病毒4型(human herpesvirus 4, HHV-4), 人群中约95%感染过, 但通常不会造成临床后果<sup>[1]</sup>。然而, EBV会引起传染性的单核病和其他疾病, 并在各种自身免疫性疾病和某些类型的癌症中发挥作用<sup>[2]</sup>。在感染EBV后, 病毒会在患者体内潜伏, 在某些情况下(例如免疫系统减弱), 病毒可能会被重新激活。EBV感染后会产生多种症状, 与其他疾病鉴别困难, 给临床诊疗带来极大困扰。目前临床常规开展的EBV的血清学抗体无法反映病毒的复制状态, 因此急需开展血浆EBV-DNA载量来判断疾病感染、疗效观察和预后评估情况。依据CNAS-CL36医学实验室质量和能力认可准则和《医疗机构实验室管理办法》在基因扩增检验领域的应用说明<sup>[3]</sup>, 开展新项目之前必须进行性能验证。新购试剂盒的性能验证是做好质量控制的重要环节。本研究将对新建EBV-DNA检测系统进行性能验证, 以期满足临床检测需求。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

EBV-DNA标本来自2016年8至9月徐州医科大学附属医院感染科实验室。EBV临界阳性质控品(批号20160813)与EBV强阳性质控品(批号2016816)购自广州中山大学达安基因有限公司, 参考物质来源于上海市临检中心。

#### 1.1.2 仪器与耗材

ABI 7500实时荧光定量PCR仪、罗氏Light Cycler 480实时荧光定量PCR仪、Eppendorf高速低温离心机、Eppendorf金属浴恒温器、Eppendorf漩涡振荡仪、八联管购自美国Axygen公司。

#### 1.1.3 试剂

EB病毒核酸提取与纯化试剂盒、EB病毒核酸定量检测试剂盒均购自湖南圣湘生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA提取与PCR反应

严格按照EBV-DNA定量检测试剂盒的说明书进行操作。扩增条件: 50 °C 2 min, 94 °C 5 min预变性; 然后94 °C 15 s, 57 °C 31 s(此处收集荧光信

号), 反应45个循环; 25 °C 10 s仪器冷却。PCR结果判读: 反应结束后, 仪器自动保存结果; 所有样本、标准品及阴阳性对照, 内标检测需均为阳性; 根据图像调整基线的开始值(start值)、终止值(end值)及临界值(threshold值), 并满足以下调减: EBV-阴性对照, 无扩增曲线, 无Ct值; EBV-阳性对照应介于(1.35E+05~1.07E+06) IU/mL; 4个EBV定量参考品均为阳性, 且其标准曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.98$ ; 若分析结果不能同时满足上述条件, 表明本次结果无效, 需重新进行。

#### 1.2.2 性能验证指标及验证方法

##### 1.2.2.1 精密度

批内精密度: 将EBV临界阳性质控品与EBV强阳性质控品质随机插入患者样本中进行检测, 一批连续测定10次, 然后对10次检测结果进行统计分析, 评价批内精密度; 批间精密度: 每天将EBV临界阳性质控品与EBV强阳性质控品质随机插入患者样本中检测1次, 20 d后对20次检测结果进行统计分析, 评价批间精密度<sup>[4]</sup>。可接受性能标准: 批内、批间的检测水平对数值的变异系数(CV%)均<10%。

##### 1.2.2.2 准确度

用阴性血清对上海市临检中心室间参考物质(2.13E+05) IU/mL进行10倍稀释至(2.13E+04)和(2.13E+03) IU/mL, 分别对其进行重复测定3次, 并将测定结果转化为10的对数值。绝对偏差不超过±0.5个对数数量级<sup>[5]</sup>。

##### 1.2.2.3 人员比对

选择阴性到 $10^6$ 不同数量级的阳性患者10个外周血标本, 由本室2位检验人员独立进行操作。结果判定标准: 阴性标本必须阴性, 阳性标本必须阳性, 且结果在同一个数量级为符合, 否则为不符合, 符合率达80%以上为通过。

##### 1.2.2.4 仪器比对

选择阴性到 $10^6$ 不同数量级的阳性患者10个外周血标本, 由同一检验人员进行2次操作, 分别置于ABI 7500实时荧光定量PCR仪与罗氏Light Cycler 480实时荧光定量PCR仪进行检测。结果判定标准: 阴性标本必须阴性, 阳性标本必须阳性, 且结果在同一个数量级为符合, 否则为不符合, 符合率达80%以上为通过。

##### 1.2.2.5 线性范围

选择徐州医科大学附属医院检验科检测过的EBV-DNA高值标本(4.36E+07) IU/mL, 用EBV阴性

血清依次进行梯度稀释直至(4.36E+02) IU/mL, 每个浓度标本重复检测2次, 以实测值为Y, 理论值为X, 使用SPSS 17.0拟和方程 $Y=aX+b$ , 并计算线性相关系数和线性范围,  $R^2 \geq 0.98$ 符合要求<sup>[5-7]</sup>。

### 1.3 统计学处理

EBV-DNA检测初始指数值结果均转化为对数值结果, 然后将转化后的数据输入SPSS 17.0统计软件, 分析相关的均数、标准差、变异系数、回归方程和相关系数。

## 2 结果

### 2.1 精密度验证结果

批内精密度验证结果: EBV临界阳性质控品与强阳性质控品10次检测结果CV平均值分别为18.05%, 15.43%, 其对数值的CV分别为1.79%, 0.85%(表1)。批间精密度验证结果: EBV临界阳性质控品与强阳性质控品20次检测结果CV平均值分别为21.29%, 15.59%, 其对数值的CV分别为

2.10%, 1.38%(表2), 均小于试剂盒规定的浓度变异系数50%和行业标准10%。

### 2.2 准确度验证结果

参考物质原液及其各梯度稀释液的检测结果均在允许范围内(表3)。

### 2.3 比对实验结果

经验证, 本研究2位检验人员的检测结果符合率为90%(>80%), 符合要求(表4)。ABI 7500PCR仪与罗氏Light Cycler 480 PCR仪2台仪器检测结果符合率为100%(表5)。唯一不符样本: 检验人员1检测结果为(3.43E+02) IU/mL, 而检验人员2检测结果为(6.67E+02) IU/mL, 两者在同一滴度, 且 $CV < 50\%$ , 虽然符合试剂盒要求, 但结果差异是由于采用(4.0E+02) IU/mL为判断标准造成的。

### 2.4 线性范围验证

一次多项式拟合方程 $Y=0.971X+0.197$ ,  $R^2=0.999$ 符合要求(表6, 图1)。

表 1 EBV-DNA 批内精密度评价结果

Table 1 Intra-batch precision results of EBV-DNA

批内	EBV 临界阳性质控品		EBV 强阳性质控品	
	浓度值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	对数值	浓度值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	对数值
第1次	4.59E+04	4.66	6.38E+07	7.80
第2次	3.56E+04	4.55	5.35E+07	7.73
第3次	3.53E+04	4.55	7.49E+07	7.87
第4次	3.47E+04	4.65	8.21E+07	7.91
第5次	3.37E+04	4.53	6.37E+07	7.80
第6次	2.38E+04	4.38	7.33E+07	7.87
第7次	3.45E+04	4.54	5.14E+07	7.71
第8次	3.41E+04	4.54	5.43E+07	7.81
第9次	3.48E+04	4.53	6.41E+07	7.73
第10次	2.49E+04	4.40	6.47E+07	7.81
$\bar{x}$	3.37E+04	4.53	6.46E+07	7.81
CV/%	18.05	1.79	15.43	0.85

表2 EBV-DNA 批间精密度评价结果

Table 2 Inter-batch precision results of EBV-DNA

批间	EBV临界阳性质控品		EBV强阳性质控品	
	浓度值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	对数值	浓度值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	对数值
第1天	3.59E+04	4.56	6.48E+07	4.816
第2天	5.43E+04	4.73	7.35E+07	4.87
第3天	3.41E+04	4.53	6.49E+07	4.81
第4天	2.51E+04	4.40	5.91E+07	4.77
第5天	3.68E+04	4.57	7.37E+07	4.87
第6天	3.52E+04	4.55	5.45E+07	4.74
第7天	2.91E+04	4.46	7.83E+07	4.89
第8天	3.68E+04	4.57	8.91E+07	4.95
第9天	3.47E+04	4.54	5.43E+07	4.73
第10天	3.43E+04	4.54	5.67E+07	4.75
第11天	3.39E+04	4.53	7.01E+07	4.85
第12天	4.36E+04	4.64	5.78E+07	4.76
第13天	3.63E+04	4.56	6.23E+07	4.79
第14天	2.37E+04	4.38	6.49E+07	4.81
第15天	3.51E+04	4.55	4.94E+07	4.69
第16天	4.42E+04	4.65	6.37E+07	4.80
第17天	3.45E+04	4.54	8.33E+07	4.92
第18天	1.98E+04	4.30	6.09E+07	4.78
第19天	3.41E+04	4.53	7.61E+07	4.88
第20天	3.29E+04	4.52	6.43E+07	4.81
$\bar{x}$	3.47E+04	4.53	6.61E+07	4.82
CV/%	21.29	2.10	15.59	1.38

表3 EBV-DNA准确度评价

Table 3 Accuracy evaluation of EBV-DNA

项目	预期	允许范围	实测结果均值	评价
参考物质原液	5.33	4.83~5.53	5.26	符合要求
参考物质10倍稀释液	4.33	3.83~4.83	4.31	符合要求
参考物质100倍稀释液	3.33	2.83~3.83	3.05	符合要求

表4 EBV-DNA人员比对

Table 4 Staff comparison of EBV-DNA

项目	检验人员1检测结果/(IU·mL <sup>-1</sup> )	检验人员2检测结果/(IU·mL <sup>-1</sup> )	检测结果是否符合
样本1	阴性	阴性	符合
样本2	6.73E+06(+)	7.26E+06(+)	符合
样本3	3.41E+06(+)	4.49E+06(+)	符合
样本4	8.51E+05(+)	6.97E+05(+)	符合
样本5	1.68E+05(+)	3.37E+05(+)	符合
样本6	5.51E+04(+)	6.48E+04(+)	符合
样本7	1.93E+04(+)	3.14E+04(+)	符合
样本8	3.68E+03(+)	6.91E+03(+)	符合
样本9	3.47E+03(+)	6.43E+03(+)	符合
样本10	3.43E+02(-)	6.67E+02(+)	不符合

表5 EBV-DNA仪器比对

Table 5 Instrument comparison of EBV-DNA

项目	ABI 7500/(IU·mL <sup>-1</sup> )	罗氏Light Cycler 480/(IU·mL <sup>-1</sup> )	检测结果是否符合
样本1	阴性	阴性	符合
样本2	8.78E+06(+)	7.35E+06(+)	符合
样本3	5.41E+06(+)	4.31E+06(+)	符合
样本4	9.57E+05(+)	7.38E+05(+)	符合
样本5	4.83E+05(+)	3.94E+05(+)	符合
样本6	7.51E+04(+)	5.72E+04(+)	符合
样本7	2.12E+04(+)	1.35E+04(+)	符合
样本8	8.27E+03(+)	6.54E+03(+)	符合
样本9	3.19E+03(+)	2.51E+03(+)	符合
样本10	7.43E+02(+)	5.83E+02(+)	符合

表6 高浓度EBV-DNA样本梯度稀释检测

Table 6 Gradient dilution test of high concentration sample of EBV-DNA

序号	第1次/(IU·mL <sup>-1</sup> )	第2次/(IU·mL <sup>-1</sup> )	平均测定值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	平均测定值对数	理论值/(IU·mL <sup>-1</sup> )	理论值对数
原始样本	4.36E+07	4.36E+07	4.36E+07	7.64	4.36E+07	7.64
稀释10倍	4.89E+06	5.05E+06	4.97E+06	6.70	4.36E+06	6.64
稀释10 <sup>2</sup> 倍	4.39E+05	2.37E+05	3.38E+05	5.53	4.36E+05	5.64
稀释10 <sup>3</sup> 倍	6.07E+04	2.11E+04	4.09E+04	4.61	4.36E+04	4.64
稀释10 <sup>4</sup> 倍	5.31E+03	1.37E+03	3.34E+03	3.52	4.36E+03	3.64
稀释10 <sup>5</sup> 倍	4.03E+02	2.79E+02	3.41E+02	2.53	4.36E+02	2.64

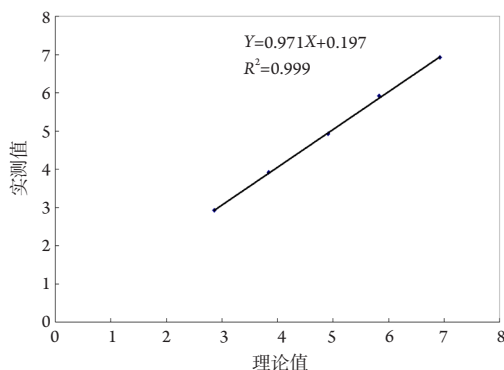


图1 梯度稀释结果线性分析

Figure 1 Linear analysis of gradient dilution results

### 3 讨论

实时荧光定量PCR是实验室最常用的检测方法之一,因其高敏感性和特异性而广泛应用于临床疾病的诊断、疗效评估和预后检测<sup>[8]</sup>。临床基因扩增实验室必须充分了解该方法性能,并采取相应质控措施,才可保证检测结果的准确性。《医学实验室质量和能力认可准则》、CAP和《医疗机构实验室管理办法》的相关规定<sup>[9]</sup>明确指出:在开展临床基因扩增检验项目前必须进行方法学验证。因此试剂盒性能验证是做好质量控制的重要环节。与其他检验项目相比,实时荧光定量PCR的结果均呈偏态分布,需将数值进行转化成正态分布的数据后才能应用正态分布的统计方法。与以往研究<sup>[10-11]</sup>报道一致,本研究也同样对原始数据取对数值进行统计分析。精密度可反映测量结果的再现性,是保证准确度的先决条件<sup>[12]</sup>。本研究结果显示:EBV临界阳性质控品与强阳性质控品的批内精密度的变异系数分别为1.79%, 0.85%,其批间精密度的变异系数分别为2.10%, 1.38%,均小于行业标准10%。因本研究尚未申请室间质评,故未采用重复性精密度<3/5 TEa、中间精密度<4/5 TEa的标准进行评价。

高精密度是保证获得良好准确度的先决条件。准确度是指在一定实验条件下测定结果与真值相符合的程度,也是检验项目性能验证的重要内容。在实际工作中,通常使用标准物质进行验证。但目前国内尚缺乏可溯源至EBV国际标准品的标准品,国内各试剂厂商所用标准品均为自主定值所得,导致不同试剂盒的检测结果间缺乏重复性与可比性。本研究采用上海市临床检验中心新开发的EBV标准品作为标准物质<sup>[12]</sup>,结果发现EBV

标准品及其稀释液均在靶值±0.5对数值内,达到了要求。

线性范围指不需预处理样本就可检出的待测物浓度范围,也是检测系统可接受的线性关系范围。通常使用覆盖整个线性范围的标本进行线性范围验证。本研究所用试剂盒标明的检测范围为(4.0E+02)~(4.0E+09) IU/mL,但是本研究目前所收集到的标本最高浓度为(4.36E+07) IU/mL,故此标本为线性范围的上限,进行梯度稀释至线性下限,结果表明:在(4.36E+02)~(4.36E+07) IU/mL的范围内,线性回归系数 $R^2$ 为0.9995,提示该试剂盒在这个浓度范围内呈线性。但仍需收集更高浓度的标本,重新验证线性范围的上限。

PCR检测方法较其他专业有明显的特殊性,并涉及大量手工操作,检测结果易受实验员主观意识影响。此外,实验设备的差异也会影响实验结果。因此应做好实验人员之间及不同检测仪器间的结果比对。本研究通过让2位实验员分别完成相同实验,发现2位检验人员的检测结果符合率为90%(大于可接受标准80%)。其中有1例不符,其结果差异是由采用(4.0E+02) IU/mL为判断标准造成的。让2位实验员完成2个相同实验,分别置于ABI 7500 PCR仪与罗氏Light Cycler 480 PCR仪上进行检测,结果发现两台仪器符合率为100%。

综上所述,本研究新采购的EBV-DNA检测试剂盒的性能验证结果与厂商提供的数据基本一致,确认新试剂能够满足临床EBV感染和疗效判断,且经济简便,适合在临床推广应用。

### 参考文献

- Cohen JI, Jaffe ES, Dale JK, et al. Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: a 28-year experience in the United States[J]. *Blood*, 2011, 117(22): 5835-5849.
  - Loebel M, Eckey M, Sotzny F, et al. Serological profiling of the EBV immune response in chronic fatigue syndrome using a peptide microarray[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179124.
  - 刘维薇, 关明. 2013版《医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的应用说明》改版解读[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2013, 1(1): 36-40.
- LIU Weiwei, GUAN Ming. Interpretation of the guidance on the application of accreditation criteria for the medical laboratory quality and competence in the field of gene amplification testing (version 2013)[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Management*.

- Electronic Edition, 2013, 1(1): 36-40.
4. EP15-A2, User verification of performance for precision and trueness; approved guideline. 2nd edition[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.
  5. EP6-A2, Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.
  6. 宋丽. 实时荧光定量聚合酶链反应检测在乙型肝炎诊断中的应用[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(3): 289-290.  
SONG Li. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction detection in the diagnosis of hepatitis B[J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2013, 20(3): 289-290.
  7. 翁美华, 李召东, 徐美华, 等. 一种国产HBV-DNA荧光PCR检测试剂盒的性能验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(21): 3124-3126.  
WENG Meihua, LI Zhaodong, XU Meihua, et al. Performance verification of a domestic fluorescence quantitative PCR diagnostic kit for HBV-DNA[J]. Chinses Journal of Health Laboratory Technology, 2014(21): 3124-3126
  8. 蒋玲丽, 王雪亮, 王华梁, 等. 实时荧光定量 PCR 检测病毒核酸方法学性能验证程序的探讨[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(5): 321-325.  
JIANG Lingli, WANG Xueliang, WANG Hualiang, et al. Discussion of the performance verification procedures of the real-time quantitative polymerase chain reaction for determination of virus nucleic acid[J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2012, 4(5): 321-325.
  9. 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02: 2008医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:2007)[S]. 北京: 中国计量出版社, 2008.  
China National Accreditation Service for Conformity Assessment. CNAS-CL02: Accreditation Criteria for Quality and Competence of 2008 Medical Laboratories (ISO15189:2007)[S]. Beijing: China Metrology Publishing House, 2008.
  10. 毕波, 吕元. 定量检测方法学性能验证的系统设计[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(2): 143-145.  
BI Bo, LÜ Yuan. An appropriate design of method performance validation for quantitative tests [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2007, 30(2): 143-145.
  11. 余南, 甘明, 詹希美, 等. 乙型肝炎病毒核酸定量检测中不确定度的研究[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(4): 310-314.  
YU Nan, GAN Ming, ZHAN Ximei, et al. Uncertainties of measurement in HBV-DNA quantification by FQ-PCR[J]. Journal of Tropical Medicine, 2007, 7(4): 310-314.
  12. 王雪亮, 刘芬, 蒋玲丽, 等. EB病毒核酸检测质控品制备及其应用[J]. 检验医学, 2015, 30(11): 1078-1082.  
WANG Xueliang, LIU Fen, JIANG Lingli, et al. Development and application of quality control materials for EBV nucleic acid determination[J]. Laboratory Medicine, 2015, 30(11): 1078-1082.

本文引用: 孟斌, 张好良, 李世宝, 赵耀, 马萍. 实时荧光定量PCR检测EB病毒DNA试剂盒的性能验证及评价[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(5): 929-935. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.004

**Cite this article as:** MENG Bin, ZHANG Haoliang, LI Shibao, ZHAO Yao, MA Ping. Performance verification and evaluation of Epstein-Barr virus DNA by real-time PCR[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2018, 38(5): 929-935. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.05.004