

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

新型丙型肝炎病毒核酸定量试剂检测性能验证

何学虎, 郭雅琪, 董洁, 梁小燕, 赵倩颖, 师志云, 张玉英, 赵玥, 赵志军

(宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏 银川 750004)

摘要: 目的: 验证新型丙型肝炎病毒核酸定量试剂的检测性能。方法: 运用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪, 按 CNAS-CL02-A009 文件要求, 分别验证其精密度、正确度、线性及可报告范围和抗干扰能力等指标。结果: 精密度: 低浓度和高浓度样本的重复精密度标准差值均小于 $3/5TEa$, 低浓度和高浓度样本的中间精密度标准差值均小于 $4/5$

亿人感染了 HCV! 每年新发 HCV 感染病例约 3.5 万例! 每年死于与 HCV 感染有关的病例约 35 万例^[1]。HCV 感染具有隐匿性! 多数感染者因早期没有典型症状而错过最佳治疗时机^[2]。此外! 丙型肝炎慢性化率高! 一旦感染 HCV! 约 75%~85% 的感染者将会发展为慢性持续性感染! 部分患者病情进展可转化为肝纤维化甚至肝癌! 严重危及患者生命^[3]。因此! 丙型肝炎的早发现、早诊断和早治疗对改善患者预后极为重要。目前! 临床上主要通过检测抗-HCV 抗体、胆红素和转氨酶等免疫和生化指标来辅助诊断丙型肝炎! 但因抗-HCV 窗口期较长、生化指标缺乏特异性! 无法进行准确及时的诊断^[4]。HCV-RNA 是判断 HCV 感染和复制的直接证据! 近年来! 分子生物学技术的飞速发展! 使得核酸定量检测得以实现! HCV-RNA 定量检测也被誉为早期诊断丙型肝炎的金标准^[5]。基于此! HCV-RNA 定量检测在临床上的应用也越来越普及! 但是! 国内用于丙型肝炎核酸定量的传统试剂存在操作繁琐、费时费力、易造成交叉污染和气溶胶污染、核酸易丢失、灵敏度不高等问题。与国外优质试剂相比! 国产传统试剂在灵敏度、准确性、重复性、线性及可报告范围、抗干扰能力等方面均存在一定差距。为此! 在国家传染病防治重大专项支持下! 基于磁珠法提取核酸的新型国产 HCV-RNA 定量试剂成为主流。根据 ISO15189 实验室质量管理体系要求! 新试剂在用于检测临床样本前! 应先验证其主要性能! 以证实其具有预期水平。为了解新型试剂的实际检测性能! 本文依据 CNAS-CL02-A009 文件要求对其进行性能验证! 现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 样本来源! 宁夏医科大学总医院医学实验中心 PCR 实验室日常检测的 HCV-RNA 临床血浆样本! 实验室自制的 HCV-RNA 定量检测室内质控品和 2017 年全年卫计委室间质评样本。

1.2 仪器与试剂! 医用冷藏箱 & 中科美菱! YC-300L! 医用低温箱 & 日本 Panasonic! MDF-U548D-C! 生物安全柜 & 新加坡艺思高科技有限公司! AS2-4S1! 微量移液器 & 德国 eppendorf! 涡旋振荡器 & 海口市其林贝尔仪器制造有限公司! VORTEX-5! 干式恒温器 & 杭州奥盛仪器有限公司! MK200-4! 高速冷冻离心机 & 力康生物医疗科技控股有限公司! Neofuge1600R! 荧光定量 PCR 扩增仪 & 美国 ABI! ABI 7500! 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂 & PCR-荧光探针法! & 湖南圣湘生物科技有限公司!

国械注准 20153400085'。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取! 从冰箱中取出试剂! 室温自然解冻! 充分混匀! 向 RNA 提取液 1 中加入 10 μ l HCV 内标! 充分混匀备用(依次向 1.5 ml 无菌离心管中加入 600 μ l RNA 提取液 1 混合物、200 μ l 待测血浆和 100 μ l RNA 提取液 2! 涡旋震荡充分混匀! 室温静置裂解 30 min! 瞬时离心(磁性分离 3 min! 缓慢吸弃溶液(依次加入 600 μ l RNA 提取液 3 和 200 μ l RNA 提取液 4! 涡旋震荡充分混匀! 瞬时离心! 磁性分离 3 min! 从底部缓慢吸弃溶液(瞬时离心! 磁性分离 3 min! 吸弃残余液体。质控品和标准品的核酸提取过程同待测样本。

1.3.2 试剂准备及加样! 在试剂准备区按比例配置相应数量的 PCR-mix 每人份 49 μ l PCR 反应液和 1 μ l RT-PCR 增强剂! 转入标本制备区! 每管加入 50 μ l PCR-mix! 洗脱吸附于离心管壁的磁珠-核酸! 反复吹吸混匀后全部转入 0.2 ml PCR 反应管中! 盖紧管盖。

1.3.3 RT-PCR 扩增! 转移 PCR 反应管至扩增区 PCR 扩增仪上! 记录样本摆放顺序! 进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 扩增选 FAM 通道检测 HCV-RNA! VIC 通道检测 HCV 内标! 参比荧光选择 ROX! 设置 Sample Volume 为 50 (扩增程序) 95 $^{\circ}$ C 1 min (60 $^{\circ}$ C 30 min (95 $^{\circ}$ C 1 min (95 $^{\circ}$ C 15 s (60 $^{\circ}$ C 31 s & 5 个循环! 60 $^{\circ}$ C 收集荧光' (25 $^{\circ}$ C 10 s)。

1.3.4 结果判读! RT-PCR 反应结束后! 对 HCV 曲线和相应的 HCV 内标曲线分别进行分析。所有结果均在质控在控的情况下方可判读! 即阴性质控检测结果为阴性 & FAM 通道无 Ct 值! VIC 通道检测为阳性且 Ct 值 \leq 38' (弱阳性和强性质控检测结果分别为弱阳性和强阳性! 且检测值的对数转换值均在各自靶值允许的范围之内(四个标准品检测结果全为阳性! 且标准曲线相关系数 $R^2 \geq$ 0.98。若 50 IU*ml & 测定值 \geq 1.0×10^8 IU*ml! 且扩增曲线呈 S 型! 则直接记录测定结果(若测定值 \neq 1.0×10^8 IU*ml! 则判读为 \neq 1.0×10^8 IU*ml (若 25 IU*ml & 测定值 \geq 50 IU*ml! 扩增曲线呈 S 型! 内标为阳性且 Ct \leq 38! 可直接记录测定结果! 但说明病毒载量低(若测定值 \geq 25 IU*ml! 内标为阳性且 Ct \leq 38! 则判为 \geq 25 IU*ml! 若内标 Ct 值 \neq 38 或无数值! 则测定结果无效! 需重复检测。

1.3.5 精密度验证! 同时检测 10^3 IU*ml 和 10^6 IU*ml 两个浓度水平的临床混合血浆! 每批每天重复测定 3 次! 连续测定 5 天^[6]! 分别计算重复精密

度和中间精密度值,以能力验证/室间质评评价界限(靶值 ± 0.4 对数值)作为允许总误差(TEa),以重复精密度 $\leq 3/5$ TEa(TEa=0.4Log),中间精密度 $\leq 4/5$ TEa为判断标准^[7]。

1.3.6! 正确度验证! 检测 2017 年全年卫计委 10 份 HCV-RNA 室间质评样本,观察结果是否在靶值允许的上下限之间,或检测值与靶值的偏倚是否小于 $\pm 7.5\%$ ^[7]。

1.3.7! 线性及可报告范围验证! 取高浓度临床血浆样本定量并稀释至 1×10^8 IU/ml,再用混合阴性血浆依次做 10 倍梯度稀释,组成不同浓度的系列样品,覆盖说明书声明的线性范围,各浓度样本重复检测 3 次取其均值,将实测值与理论值比较,偏倚应 $\leq 20\%$,以实测值为 x,理论值为 y 进行回归统计,计算 $y = ax + b$,斜率 a 值在 1 ± 0.5 范围内,相关系数 $R^2 \geq 0.95$ ^[8]。

1.3.8! 抗干扰能力验证! 将 HCV-RNA 浓度为

10^3 IU/ml 的临床阳性血浆样本混合后分成 5 份,一份不加任何干扰物质作为正常组,另四份分别加入终浓度为 2 g/dl 的血红蛋白、28 mg/dl 的总胆红素、3 000 mg/dl 的甘油三酯、40 g/L 的总 IgG 作为干扰组,各组重复检测 3 次取均值,观察干扰组检测结果的对数转换值是否在正常组 $\pm 0.4 \log$ 范围内。

2! 结! 果

2.1! 精密度! 低浓度和高浓度两浓度水平的临床样本每天检测 3 次,连续检测 5 天的扩增曲线均呈典型、光滑的“S”型曲线,扩增效率高且重复性好,见图 1。定量结果显示,低浓度和高浓度的重复精密度标准差值分别为 0.0758 和 0.0383,均小于 $3/5$ TEa;同样 Xw 鹩 馐-样B

表 2! 正确度验证结果

!!!!!! Table 2! Results of accuracy verification

样本编号	本室结果	结果对数	靶值	上下限	偏倚	结论
1711	2.05E+04	4.31	4.20	3.80~4.60	2.62%	符合
1712	2.02E+03	3.31	3.39	2.99~3.79	-2.36%	符合
1713	8.25E+03	3.92	3.84	3.44~4.24	2.08%	符合
1714	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1715	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1721	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1722	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1723	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1724	1.29E+04	4.11	4.13	3.73~4.53	-0.48%	符合
1725	4.78E+04	4.68	4.64	4.24~5.04	0.86%	符合

图 2! 线性范围验证扩增曲线

!!!!!! Figure 2! Amplification curve of linear and reportable range

表 3! 线性评价表

!!!!!! Table 3! Table of linear evaluation

样本浓度 (IU/ml)	实测值对数				理论值	偏倚 (%)
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	均值		
1.00E+08	7.98	8.02	7.98	7.99	8.00	-0.13
1.00E+07	6.95	6.78	6.85	6.86	7.00	-2.00
1.00E+06	5.85	5.81	5.84	5.83	6.00	-2.78
1.00E+05	4.88	4.76	4.84	4.83	5.00	-3.40
1.00E+04	3.82	3.80	3.90	3.84	4.00	-4.00
1.00E+03	2.75	2.95	2.83	2.84	3.00	-5.33
1.00E+02	1.89	1.77	1.94	1.87	2.00	-6.50
5.00E+01	1.62	1.54	1.49	1.55	1.70	-8.82

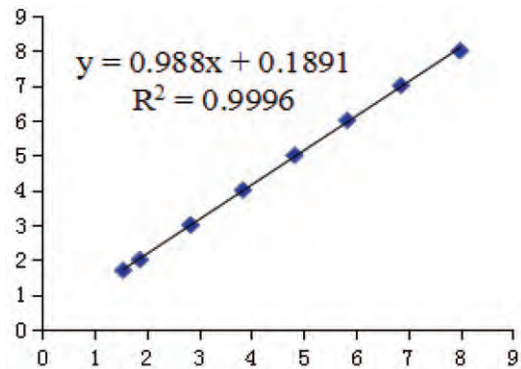


图 3! 新型试剂梯度稀释实验线性回归方程

Figure 3! Linear regression equation of new reagent gradient dilution experiment

图 4! 新型试剂抗干扰能力验证扩增曲线

!!!!!! Figure 4! Amplification curve of anti-interference ability of the novel reagent

表 4 抗干扰能力验证结果

Table 4 Results of verification of the anti-interference capability

样本	干扰物浓度	实测值对数				判断标准	结论
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	均值		
Normal(N)	/	3.84	3.83	3.80	3.82	/	/
N+HB	2g/dl	3.80	3.80	3.87	3.84	3.82±0.40 (3.42~4.22)	符合
N+TBI	28mg/dl	3.98	3.80	3.88	3.91		符合
N+TQ	3000mg/dl	3.93	3.87	3.91	3.90		符合
N+IgG	40g/l	3.82	3.90	3.95	3.89		符合

3 讨论

近年来,尽管荧光定量 PCR 技术检测 HCV-RNA 在临床上的应用越来越普及^[9],但是很多传统国产试剂灵敏度不足、线性范围窄、抗干扰能力弱,很容易出现因试剂灵敏度不足而造成 HCV-RNA 低病毒载量的漏检,不利于 HCV 感染者的早期诊断和治疗。为此,

具有性能可靠、操作简便、重复性好、正确度高、线性范围宽、灵敏度高、抗干扰能力强等优势,满足ISO15189 实验室质量管理体系要求,可用于临床样本检测,适合于在各临床实验室推广使用。

参考文献

[1] Holmes JA, Chung RT. Viral hepatitis: HCV compartmentalization in HCC: driver, passenger or both[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(5):254-256.

[2] 李媛,黄古叶,莫春梅,等.慢性丙型肝炎中医证候分布规律的研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2018, 28(1):11-13.

[3] 王琴,饶慧瑛,于宁,等.成人慢性丙型肝炎合并疾病及用药现状分析[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(3):225-232.

[4] Sanlidagi T, Akcali S, Ecemis T, et al. Investigation of the correlation between anti-HCV levels (S/Co) with HCV-RNA in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2016, 50(3):508-510.

[5] Kiani IG, Khan AN, Butt B, et al. HCV-RNA positivity in HCV antibody negative patients undergoing haemodialysis[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2018, 30(3):397-400.

[6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Use verification of performance for precision and trueness: approved guideline-second edition[S]. EP15-A2, CLSI, 2005.

[7] 中国合格评定国家认可委员会. 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[S]. 北京:CNAS, 2018.

[8] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline NCCLS document EP6-A[S]. Wayne, Pa: NCCLS, 2003.

[9] Sarrazin C, Wedemeyer H, Cloherty G, et al. Importance of very early HCV RNA kinetics for prediction of treatment outcome of highly effective all oral direct acting antiviral combination therapy[J]. *J Virol Methods*, 2015, 214:29-32.

[10] 杨甲,饶慧瑛,魏来.《2018年欧洲肝病学会丙型肝炎治疗推荐意见》介绍及解读[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(8):1622-1631.

[11] Mikel P, Vasickova P, Kralik M, et al. Method for preparation of MS2 phage-like particles