

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 ABI7500 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 !以证实它具有预期水平 \$ 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 &新加坡艺思高科技公司 !AS2-4S1 ' !微量移液器 &德国 eppendorf ' !涡旋振荡器 &厦门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 !ABI17500 ' \$ 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 &45 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 通道检测结果为阳性且 Ct 值 ≤ 38 ' (弱阳性和强阳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 $\geq 1.0 \times 10^8$ IU*ml !且扩增曲线呈 S 型 !则直接记录测定结果 (若测定值 $\geq 1.0 \times 10^8$ IU*ml 则判读为 $\geq 1.0 \times 10^8$ IU*ml (若 25 IU*ml &测定值 ≥ 50 IU*ml !扩增曲线呈 S 型 !内标为阳性且 Ct ≤ 38 !可直接记录测定结果 !但说明病毒载量低 (若测定值 ≥ 25 IU*ml !内标为阳性且 Ct ≤ 38 !则判为 ≥ 25 IU*ml !若内标 Ct 值 ≥ 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 $1 \times 10^{8.1}$ 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

$10^{3.1}$ 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、3000 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!

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

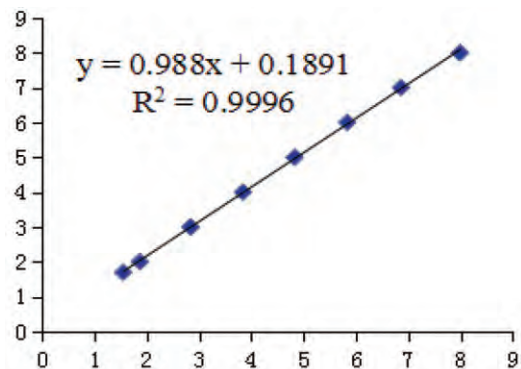


图 3 新型试剂梯度稀释实验线性回归方程

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	3.86	3.87	3.84	3.82 ± 0.40 (3.42~4.22)	符合
N+TBIL	28mg/dl	3.98	3.86	3.88	3.91		符合
N+TG	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 ! J A, Chung ! R T. 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] ! Sanlidag ! 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 ! G, Khan ! A N, Butt ! B, et al. HCV-RNA per 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. User ! 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 ! P. Methods ! for ! preparation ! of MS2 phage-like particles