

基于自动化提取HCV RNA荧光定量检测系统的性能验证

邓波¹, 何彪¹, 廖亚龙², 黄革^{2*} (1. 高州市人民医院检验科, 广东高州 525200; 2. 南方医科大学
附属广东省人民医院(广东省医学科学院)检验科, 广东广州 510000)

摘要: **目的** 基于Stream SP96全自动核酸提取仪、ABI7500实时荧光定量PCR仪对丙型肝炎病毒(HCV) RNA定量检测系统的性能指标进行验证。**方法** 依据《临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证》WS/T 420-2013性能验证方案, 采用Stream SP96全自动核酸提取平台及ABI7500荧光定量PCR仪检测HCV RNA, 对其准确度、精密度、线性区间、检测限、定量限和抗干扰能力等进行方法学性能验证。**结果** 低、高浓度标准物质的均值与靶值的误差分别为0.20和0.25, 均小于靶值对数值 $\pm 0.4 \log$; 低浓度样本的批内、批间不精密度变异系数值分别为0.79%、1.01%, 高浓度样本的批内、批间不精密度变异系数值分别为0.52%、1.22%, 均 $<5\%$; 线性相关系数 $r > 0.980$, 线性区间可达 $20 \sim 1.0 \times 10^8$, 呈良好线性($R^2 = 0.9973$); 检出限为20 IU/mL, 最低定量限为50 IU/mL; 含胆红素(300 mg/L)、血红蛋白(300 g/L)、甘油三酯(3 000 mg/L)的干扰物质对样本检测结果无影响。**结论** HCV RNA实时荧光PCR定量法检测系统准确度、精密度、线性范围、检出限、定量限、抗干扰能力均符合厂家声明, 能够满足临床对HCV RNA定量检测的需求。

关键词: HCV RNA; 荧光法; 性能验证

中图分类号: R 440

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 01-0073-05

Validation of the performance of a fluorescence quantitative detection system of HCV RNA based on automated extraction

DENG Bo¹, HE Biao¹, LIAO Ya-long², HUANG Ge^{2*} (1. Laboratory of the Gaozhou People's Hospital, Gaozhou 525200, China; 2. Laboratory of Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: **Objective** To verify the performance indicators of HCV RNA quantitative detection system based on Stream SP96 Automated Nucleic Acid Extractor and ABI 7500 Real-Time PCR System. **Methods** According to the WS/T 420-2013 Performance Verification Scheme in the Verification of Analytical Performance of Commercial Quantitative Kits by Clinical Laboratory, the Stream SP96 Stream SP96 Automated Nucleic Acid Extractor and ABI 7500 Real-Time PCR System were used to test HCV RNA, and methodological performance verification was performed on the accuracy, precision, linear interval, limit of detection, quantitative limit and anti-interference ability. **Results** The errors between the mean and target values of the low and high-concentration reference materials were 0.20 and 0.25, respectively, which were less than the logarithmic value of the target value $\pm 0.4 \log$. The intra-batch and inter-batch precision coefficient of variation (CV) values for low-concentration specimens were 0.79% and 1.01%, respectively, and those for high-concentration specimens were 0.52% and 1.22%, respectively, which were all $<5\%$. The linear correlation coefficient $r > 0.980$, and the linear interval was up to $20 \sim 1.0 \times 10^8$, showing good linearity ($R^2 = 0.9973$). The limit of detection was 20 IU/mL and the lowest limit of quantitation was 50 IU/mL; The interfering substances containing bilirubin (300 mg/L), hemoglobin (300 g/L), and triglyceride (3 000 mg/L) had no effect on the specimen detection results. **Conclusion** The HCV RNA real-time PCR quantitative testing systems have the accuracy, precision, linear range, limit of detection, limit of quantitation and anti-interference ability in line with the manufacturer's statement, and they can fully meet the clinical requirements for HCV RNA quantitative testing.

Key words: HCV RNA; fluorescence method; performance verification

收稿日期: 2023-06-01

作者简介: 邓波(1983-), 男, 学士, 副主任技师, E-mail: 23518981@qq.com

通信作者: 黄革, 主任技师, E-mail: hwangge@163.com

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的以肝损伤为主的传染性疾病,是仅次于乙型肝炎病毒(HBV)导致肝癌的主要危险因素^[1-2]。据WHO统计,全球约有2亿人感染HCV,并面临发生肝硬化和/或肝癌的风险^[3]。目前,丙型肝炎病毒抗体(HCV Ab)及丙型肝炎病毒RNA(HCV RNA)检测均是HCV感染的主要诊断方式。HCV RNA检验可有效反映HCV的复制活跃程度,具有较高的检验准确率,在疾病诊断及疗效监测中具有重要意义^[4]。丙型肝炎防治指南(2022年版)指出:HCV RNA定量检测应当采用基于PCR扩增、灵敏度、特异度和精确度高并且线性广的方法^[5],可于HCV感染1~2周内检出,但RNA易降解,影响因素较多,且技术、条件要求高,不利于基层医疗机构的推广^[6],而及时准确的检测对HCV感染者的诊断和预后具有重要意义^[7]。为保证检测质量,本文拟对Stream SP96全自动核酸提取仪及ABI7500实时荧光定量PCR检测系统进行多方面的性能验证,以确认其性能是否符合临床预期用途。

1 材料和方法

1.1 标本来源

收集南方医科大学附属广东省人民医院检验科不同浓度的临床血清标本,于-20℃冰箱保存;广州邦德盛生物科技有限公司生产HCV RNA标准物质(批号:2021001);2021年卫生部临床检验中心室间质评标本(202111~202115、202121~202125)。

1.2 仪器与试剂

核酸提取仪(达安,Stream SP96),实时荧光定量扩增仪(美国,ABI7500);丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(广州达安,批号:2021003);HCV RNA质控物质(广州邦德盛生物科技有限公司,批号:2021001)。

1.3 性能验证方法

检测时首先采用Stream SP96核酸提取仪提取核酸,然后在ABI7500扩增仪上进行扩增分析,操作均按实验操作规程进行。根据中华人民共和国卫生行业标准(WS/T 420-2013),参照CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》标准,对广州达安丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒进行准确度、精密度、线性、检测限、定量限和抗干扰能力的验证。

1.3.1 准确度 参照WS/T 420-2013文件^[8],采用低值和高值的标准品,每天每个样本使用HCV核酸定量检测试剂盒集中检测重复测量2次,连续5 d重复实验。按照临床样本检测流程进行实验,通过实验结果

与样本信息比较,计算准确度。本室测定结果与参考靶值进行比较,两者结果相差对数值差值小于靶值对数值±0.4 log判断为合格。

1.3.2 精密度 参照WS/T 420-2013文件^[8],选取选择HCV RNA浓度在厂家声明检测范围内的临床送检标本,每天1个分析批次、2个水平浓度,每一水平浓度重复测定3次,连续检测5 d,每个水平浓度累计得到15个结果。记录检测数据,由公式计算批内不精密度和批间不精密度统计进行比较,若小于厂家提供的标准偏差(≤5%)则验证通过,否则需做差异显著性检验。

$$\text{批内不精密度: } S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

$$\text{批间不精密度: } S_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D-1}$$

D : 实验天数; n : 每天重复次数; S_r : 批内不精密度; S_b : 批间不精密度; x_{di} : 第 d 天第 i 次重复结果; $\bar{x}_d$: 天所有结果的均值; $\bar{\bar{x}}$: 所有结果的均值。

1.3.3 线性范围 参照WS/T 420-2013文件^[8],收集临床血清高浓度标本(1.0×10^8 IU/mL)阳性混合血清5 mL,以阴性混合血清进行倍比稀释,梯度浓度分别为 2×10^7 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 IU/mL,每个浓度2个平行样本。对实测值的均值与理论值进行线性回归分析并做线性回归图,判定系数 $r \geq 0.98$ 为合格。

1.3.4 检测限 参照CNAS-GL039:2019文件^[9]。取广州邦德盛生物科技有限公司提供的HCV RNA邦德盛的标准物质,使用邦德盛的标准物质稀释至试剂说明书所示的最低检出限,进行20次重复检测。以至少90%的检出率视为验证通过。

1.3.5 定量限 使用邦德盛的标准物质稀释至试剂说明书所示的定量下限,进行20次重复检测,计算每一次实验结果与示值的差值,结果小于靶值对数值±0.4 log为通过。

1.3.6 抗干扰能力 参照CNAS-GL039:2019文件^[9],使用邦德盛G1、G2和G3的标准品,即血红蛋白(300 g/L)、胆红素(300 mg/L)和甘油三酯($3\ 000$ mg/L),同时设置不含干扰物质的对照组,各自2份平行样本检测。测定结果与之前的定值进行比较,对数值差值小于±0.4 log即为合格。

2 结果

2.1 准确度

检测结果的对数值与标准品示值对数值之差均小于±0.4 log,符合厂商声明,验证通过,见表1。

2.2 精密度

低浓度批内、批间不精密度变异系数分别为0.79%、1.01%;高浓度批内、批间不精密度变异系数分别为0.52%、1.22%,均符合厂商声明,验证通过,见表2。

2.3 线性范围

以浓度实测值的对数均值为y,理论浓度预测值的对数值为x,进行线性拟合,其线性相关系数 $r>0.980$,线性区间可达 $20\sim1.0\times10^8$,符合厂商声明,验证通过,见图1。

2.4 检出限

当标本浓度为20 IU/mL时,检出率为100.0%,符合厂商声明,验证通过,见表3。

2.5 定量限

当标本浓度为50.0 IU/mL时,检出率为100.0%,且检测值对数值与示值对数值差小于±0.4 log,符合厂商的声明,验证通过,见表4。

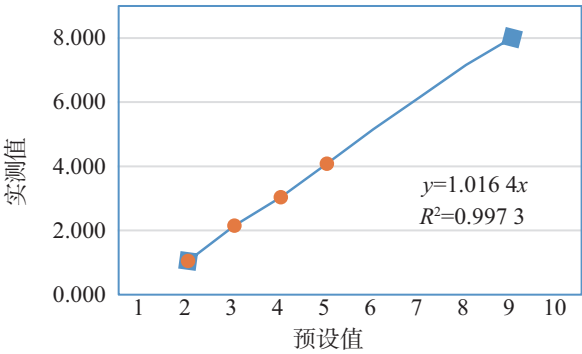


图1 检测的线性相关性

2.6 抗干扰能力

存在干扰物质血红蛋白(300 g/L)、胆红素(300 mg/L)和甘油三酯(3 000 mg/L)时,检测结果与无干扰检测值的对数均值相差均小于±0.4 log,符合厂商声明,验证通过,见表5。

3 讨论

《医疗机构实验室管理办法》的相关规定明确指出: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^[10-11]。实验室首先必须明确所使用的试剂或检测系

表1 准确度验证log值

检测结果	测定值 1	测定值 2	测定值 3	测定值 4	测定值 5	平均值	标准品示值	差值
低浓度	3.31	3.39	3.29	3.22	3.42	3.33	3.13	0.20
高浓度	5.42	5.35	5.34	5.45	5.48	5.41	5.16	0.25

表2 精密度验证结果

检测结果	批内不精密度		批间不精密度	
	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度
对数值	5.95	3.54	5.95	3.54
标准差	0.031	0.028	0.073	0.036
变异系数 /%	0.52	0.79	1.22	1.01

表3 检出限验证结果

样本	检测值/(IU/mL)	对数值	样本	检测值/(IU/mL)	对数值
1	48.2	1.68	11	22.2	1.35
2	39.0	1.59	12	21.3	1.33
3	2.22	0.35	13	27.0	1.43
4	30.6	1.49	14	22.7	1.36
5	23.2	1.37	15	22.0	1.34
6	19.1	1.28	16	12.6	1.10
7	25.5	1.41	17	19.1	1.28
8	28.4	1.45	18	67.0	1.83
9	49.2	1.69	19	55.3	1.74
10	23.6	1.37	20	64.5	1.81

表4 定量限验证结果

样本	检测值	检测 对数值	下限 示值	示值 对数值	对数 差值	样本	检测值	检测 对数值	下限 示值	示值 对数值	对数 差值
1	55.0	1.75	50.0	1.70	0.05	11	40.9	1.61	50.0	1.70	-0.09
2	22.9	1.36	50.0	1.70	-0.34	12	86.5	1.94	50.0	1.70	0.24
3	74.4	1.87	50.0	1.70	0.17	13	19.8	1.30	50.0	1.70	-0.40
4	60.6	1.78	50.0	1.70	0.08	14	24.3	1.39	50.0	1.70	-0.31
5	42.4	1.63	50.0	1.70	-0.07	15	24.3	1.38	50.0	1.70	-0.32
6	23.9	1.38	50.0	1.70	-0.32	16	51.0	1.71	50.0	1.70	0.01
7	67.3	1.83	50.0	1.70	0.13	17	72.5	1.86	50.0	1.70	0.16
8	69.7	1.84	50.0	1.70	0.14	18	39.7	1.60	50.0	1.70	-0.10
9	73.0	1.86	50.0	1.70	0.16	19	73.3	1.87	50.0	1.70	0.17
10	68.2	1.83	50.0	1.70	0.13	20	25.7	1.41	50.0	1.70	-0.29

表5 抗干扰能力验证结果

干扰物质	检测值/×10 ³	对数值	对数值均值	与无干扰对数差值
血红蛋白	3.75	3.57	3.58	-0.17
	3.90	3.60		
胆红素	5.39	3.73	3.69	-0.06
	4.49	3.65		
甘油三酯	4.40	3.64	3.71	-0.04
	5.90	3.77		
无干扰	5.71	3.76	3.75	0
	5.60	3.75		

统能够满足其所确定临床预期用途的要求,并以此建立及完善检测系统。实时荧光定量PCR融汇了PCR高敏感性、探针杂交高特异性和光谱检测高精确性等技术优点,被认为是检测HCV RNA定量的标准方法^[12]。HCV RNA作为HCV感染诊断的金标准^[13],可直接反映病毒复制和传染性,其阳性是判断HCV感染的最直接证据,能够确认患者是否为现症感染,并且可以直接反映丙肝病毒的复制情况及患者的病情程度^[14],分析病毒治疗前基线病毒载量,以及治疗结束后的应答评估。PCR分子检测项目不同于其他专业的检测项目,其试剂成本高、检测过程繁琐、涉及多种操作步骤、某些特殊项目的阳性标本稀缺,对实验室来说,方法学验证需要花费更大的人力和财力^[15]。对于厂家能够提供完整产品性能指标的检测系统,可以当做封闭系统来对待,只需要对检测系统做基本的性能验证实验即可,无需进行更加繁琐的性能确认实验^[16]。

CNAS-CLO2-A009指出定量检测方法和程序的分析性能验证内容至少包括精密度、准确度、线性范围、抗干扰能力等^[17]。验证过程证实的检验程序的性能指标应与检验结果的预期用途相关。本文的HCV RNA定量检测系统使用的是广州达安基因的检测试剂盒,厂家说明书中明确提出使用ABI7500荧光定量PCR分析仪进行扩增的程序,并提供了该检测系统对

应的产品性能指标。依据《临床实验室对商品定量试剂盒》WS/T 420-2013的性能验证方案,对该试剂盒的准确度、精密度、线性范围、抗干扰能力进行验证,以证实该试剂盒能否达到厂家声明的分析性能指标。

本次准确度验证以计算实际检测结果的对数值与标准品示值对数值误差 $\leq \pm 0.4 \log$ 为符合要求,低、高两个浓度水平标准物质的均值与靶值的误差分别为0.20和0.25,均 $\leq \pm 0.4 \log$ 。精密度是反映方法学性能的主要指标,确保了样本在实验室检测的稳定性、可靠性。本研究精密度验证结果:低浓度样本的批内、批间不精密度变异系数分别为0.79%、1.01%,高浓度样本的批内、批间不精密度变异系数分别为0.52%、1.22%,均 $< 5\%$,符合要求。线性区间验证是使用高浓度临床样本进行梯度稀释,对实测值的均值与理论值进行线性回归分析并做线性回归图,判定系数 $r \geq 0.98$ 为合格。线性区间验证结果显示, $r > 0.980$,线性区间可达 $20 \sim 1.0 \times 10^8$,呈良好线性($R^2 = 0.9973$)。检出限验证使用标准物质进行稀释到试剂说明书所示的最低检出限,检出率至少95%,检出限20 IU/mL,最低定量限50 IU/mL,与制造商声明一致。胆红素溶血产生的大量血红蛋白会抑制PCR反应,而脂血中的大量乳糜微粒会导致标本中病毒颗粒有效容量减少,病毒浓度降低,同时高血脂可能使荧光信号猝灭,导致其强度降

低,从而影响检测结果准确性^[18]。抗干扰能力验证结果显示,含胆红素(300 mg/L)、血红蛋白(300 g/L)、甘油三酯(3 000 mg/L)干扰物对检测结果无影响,对检测系统进行留样再测,结果全部通过,符合临床应用要求。

DNA模板质量对PCR具有较大影响^[19],PCR反应中提取的核酸模板质量是影响核酸检测的重要因素,目前临床上主要应用的核酸提取方法有磁珠法、离心柱法、煮沸法、快速核酸释放法,而自动化磁珠法核酸提取法是核酸提取技术里的主流技术。磁珠法是一种操作简便、纯化效率高的提取方法,可应用于HCV感染者的临床诊断和疗效监测^[20]。本检测系统使用Stream SP96核酸提取仪(磁珠法),不需要离心、无需加入多种试剂,操作简单快速,具有通量高、耗时短、可实现自动化等优点,能够提高工作效率、降低人工操作成本和试剂检测成本,保证测定结果的准确性和稳定性^[21]。

综上所述,基于Stream SP96核酸提取仪和ABI 7500实时荧光PCR仪组成的自动化检测系统,本实验针对准确度、精密度、线性范围、检出限、定量限和抗干扰性6个方面验证HCV RNA定量检测试剂盒的效果,实验结果均符合要求,其各项性能指标可靠,具备灵敏度高、线性范围广、抗干扰能力强、重复性好等优势,且检测系统提取过程简便,操作简单、快速,具有通量高等优势,能够满足临床检测要求,具有良好的临床应用价值。

参考文献:

- [1]中华预防医学会医院感染控制分会,中华医学会感染病学分会,中华预防医学会感染性疾病防控分会.中国丙型肝炎病毒型肝炎医院感染防控指南(2021年版)[J].中国感染控制杂志,2021,20(6):487-493.
- [2]张如,朱建华,李强.HCV RNA检测在丙型肝炎诊断中的应用价值[J].临床输血与检验,2019,21(2):200-202.
- [3]COBB B,POCKROS P J,VILCHEZ R A, et al. HCV RNA viral load assessments in the era of direct-acting antivirals[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(4):471-475.
- [4]刘轩.丙肝病毒RNA与丙肝抗体在丙肝诊断中的检验效果分析[J].医学信息,2022,35(6):174-176.
- [5]中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会.丙型肝炎防治指南(2022年版)[J].中华传染病杂志,2023,41(1):29-46.
- [6]IZQUIERDO L,PREGERMAIN C,HOTTELET C, et al. Clinical performance of the VERIS HCV assay for hepatitis C virus RNA quantification[J]. J Clin Virol, 2017, 93:1-7.
- [7]郭杰,曲沛,李韦杰,等.丙型肝炎病毒核酸定量检测性能验证及评价[J].传染病信息,2019,32(5):394-398.
- [8]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.临床实验室对商品定量试剂盒分析性能的验证(WS-T 4420-2013)[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [9]中国合格评定认可委员会.CNAS-GL039分子诊断检验程序性能验证指南[S].北京:中国合格评定认可委员会,2019.
- [10]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.
- [11]孟斌,张好良,李世宝,等.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.
- [12]POLJAK M,LEPEJ S Z,RODE O D. Recent developments in serologic and molecular diagnosis of hepatitis B and C[J]. Acta Med Croatica, 2013, 67(4): 281-290.
- [13]杨慧敏,李超,杨国华,等.丙型肝炎患者HCV-RNA载量与抗-HCV检测的临床意义探讨[J].中国优生与遗传杂志,2017,25(12):12-14.
- [14]ZHANG C, YANG X, QI Q, et al. lncRNA-HEIH in serum and exosomes as a potential biomarker in the HCV-related hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Biomarkers, 2018, 21(3):651-659.
- [15]向秀华,李丹,徐文波,等.实时荧光PCR探针法检测丙型肝炎病毒核酸性能验证[J].化学工程与装备,2020,285(10):251-252,163.
- [16]廖威,方丽娟,邓旭怡,等.HCV RNA定量检测系统性能验证方案的制定[J].实验与检验医学,2020,38(1):58-61,76.
- [17]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:中国合格评定国家认可委员会,2018.
- [18]冷婵,刘正敏,王瑞,等.Cobas s201 TaqScreen MPX试剂抗干扰实验的验证研究及应用[J].北京医学,2018,40(9):888-892.
- [19]王辉,郑义,孔繁荣,等.不同DNA提取方法对PCR检测解脲支原体的影响[J].中国麻风皮肤病杂志,2002(2):101-103.
- [20]范公忍,陈天宝,李冰,等.两种核酸提取方法对丙型肝炎病毒RNA检测效果的比较及应用评价[J].检验医学与临床,2015,12(1):48-50.
- [21]潘美晨,郭杰,孟欢,等.基于全自动核酸检测平台高敏HCV RNA定量检测性能评价[J].标记免疫分析与临床,2020,27(10):1801-1805.

(责任编辑:李 晓)