开放科学 "资源服务 #标识码 "/012 #$

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 3B%%%4 #

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 D?1!3B%% 荧光定量 N9C 仪 %按 9L D0-9@%+-D%%, 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 .(B67<%低浓度和高浓度样本的中间精密度标准差值均小于 4(B

(C)1994-2019 China Academic Journal lectronic Publishing House. All ghts eserved. http://ww . k .n t

亿人感染了 K95 !每年新发 K95 感染病例约 .& 万例 !每年死于与 K95 感染有关的病例约 .B 万例"$#$ K95 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"+#$ 此外 !丙型肝炎慢性化率高 !一旦感染 K95 !约 3BA !'BA 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"-#$ 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-K95 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-K95 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#$ K95-CLD 是判断 K95 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 !K95-CLD 定量检测也被誉为早期诊断丙型肝炎的金标准"B#$ 基于此 !K95-CLD 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 K95-CLD 定量试剂成为主流 $ 根据 10/B', 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 9LD0-9@%+-D%%, 文件要求对其进行性能验证 !现报道如下 $

5 ! 材料与方法

5&! 样本来源 ! 宁夏医科大学总医院医学实验中心 N9C 实验室日常检测的 K95-CLD 临床血浆样本 !实验室自制的 K95-CLD 定量检测室内质控品和 +%$3 年全年卫计委室间质评样本 $

5&! 仪器与试剂 ! 医用冷藏箱 &中科美菱 !_9-.%%@' !医用低温箱 &日本 N<*<V"*#) !> 2b-QB4'2-9' !生物安全柜 &新加坡艺思高科技有限公司 !D0+-40$' !微量移液器 &德国 I;;I*!"UG' !涡旋振荡器 &海门市其林贝尔仪器制造有限公司 !5/C67S-B' !干式恒温器 &杭州奥盛仪器有限公司 !> 8+%%-4' !高速冷冻离心机 &力康生物医疗科技控股有限公司 ! LI"GHOI$(%%C' !荧光定量 N9C 扩增仪 &美国 D?1 ! D?1!3B%%'$ 丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂 &N9C-荧光探针法'&湖南圣湘生物科技有限公司 ! 国械注准 +%$B.4%%%'B'$

5&! 方法

5&&! 核酸提取 ! 从冰箱中取出试剂 !室温自然解冻 !充分混匀 !向 CLD 提取液 $ 中加入 $% #E!K95 内标 !充分混匀备用 (依次向 $&& :E无菌离心管中加入 (%% #E!CLD 提取液 $ 混合物 %+%% #E 待测血浆和 $%% #E!CLD 提取液 + !涡旋震荡充分混匀 !室温静置裂解 .% :#* !瞬时离心 (磁性分离 . :#* !缓慢吸弃溶液 (依次加入 (%% #E!CLD 提取液 . 和 +%% #E!CLD 提取液 4 !涡旋震荡充分混匀 !瞬时离心 !磁性分离 . :#* !从底部缓慢吸弃溶液 (瞬时离心 !磁性分离 . :#* !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 $

5&&! 试剂准备及加样 ! 在试剂准备区按比例配置相应数量的 N9C-:#F &每人份 4, #E!N9C 反应液和 $ #E!C6-N9C 增强剂 ' 转入标本制备区 !每管加入 B% #E!N9C-:#F !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 %& :E!N9C 反应管中 !盖紧管盖 $

5&&! C6-N9C 扩增 ! 转移 N9C 反应管至扩增区 N9C 扩增仪上 !记录样本摆放顺序 !进行 C6-N9C 扩增 $ C6-N9C 扩增选 bD> 通道检测 K95-CLD !519 通道检测 K95 内标 !参比荧光选择 C/S !设置 0<:;EI !5"EH:I 为 B% (扩增程序),B f $:#* ((% f .% :#* (,B f $:#* (,B f $BV%(% f .$V&4B 个循环 !(% f 收集荧光 '(+B f $%V$

5&&! 结果判读 ! C6-N9C 反应结束后 !对 K95 曲线和相应的 K95 内标曲线分别进行分析

(C)1994-2019 China Academic Journal lectronic Publishing House. All ghts eserved. http://ww . k .n t

度和中间精密度值，以能力验证/室间质评评价界限（靶值 h%& 对数值）作为允许总误差（67<），以重复精密度 ".B67<（67<‘%&@"0），中间精密度 "4/B67< 为判断标准[3]。

5&&!正确度验证！检测 +%$3 年全年卫计委 $% 份 K95-CLD 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 h3&A[3]。

5&&!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 g%'1Q/:E，再用混合阴性血浆依次做 $% 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．次取其均值，将实测值与理论值比较，偏倚应 "+%A，以实测值为 F，理论值为 \ 进行回归统计，计算 \‘<FeW，斜率 < 值在 $h%& 范围内，相关系数 C+ $%&B[']。

5&&T！抗干扰能力验证！将 K95-CLD 浓度为 $%'1Q/:E 的临床阳性血浆样本混合后分成 B 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 +0/!E 的血红蛋白、+‘:0/!E 的总胆红素、.!%% :0/!E 的甘油三酯、4%0/@ 的总 10M 作为干扰组，各组重复检测．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 h%&E"0 范围内。

1！结！果

1&！精密度B 低浓度和高浓度两浓度水平的临床样本每天检测．次，连续检测 B 天的扩增曲线均呈典型、光滑的“0”型曲线，扩增效率高且重复性好，见图 $。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 %&3B‘和 %&.‘.，均小于 .B67<；同样！

(C)1994-2019 China Academic Journal lectronic Publishing House. All ghts eserved. http://ww . k.n t

表 1！正确度验证结果

！！！！！！！！！！！！！！！！！>)8.%! 1！CIVHE=V!"G!<))HU<)\!XIU#G#)<=#'*

样本编号	本室结果	结果对数	靶值	上下限	偏倚	结论
$3$$!	+&B7e%4!	4&$!	4&%!	.&%！4&%!	+&+A	符合
3+!	+&+7e%.!	.&$!	.&,!	+&,！.&,	-+&(A	符合
3.!	’&B7e%.!	.&+!	.&4!	.&4！4&4!	+&’A	符合
$3$4!	%!	%!	%	-$&%！$&%!	%	符合
3B!	%!	%!	%	-$&%！$&%!	%	符合
$3+$!	%!	%!	%	-$&%！$&%!	%	符合
$3++!	%!	%!	%	-$&%！$&%!	%	符合
$3+.!	%!	%!	%	-$&%！$&%!	%	符合
$3+4!	$&,7e%4!	4&$$!	4&$.!	.&.！4&.	-%&’A	符合
$3+B!	4&’7e%4!	4&’!	4&4!	4&4！B&4!	%&(A	符合

图 1！线性范围验证扩增曲线

！！！！！！！！！Q’$#'%! 1！D：;E&G#)<=#'*!)HUXI!"G!E&#*I<U!<*!!UI;"U=<WEI!U<*OI

表 K！线性评价表

！！！！！>)8.%! K！6<WEI!"G!E&#*I<U!IX<EH<=#'*

样本浓度	实测值对数				理论值	偏倚
(1Q/:E)	第 $ 次	第 + 次	第 . 次	均值		(A)
$&%7e%’!	3&’!	’&+!	3&’!	3&,!	’&%	-%$.
$&%7e%3!	(&B!	(&’!	(&B!	(&(!	3&%	-+&%
$&%7e%(!	B&B!	B&$!	B&4!	B&.!	(&%	-+&’
$&%7e%B!	4&’!	4&(!	4&4!	4&.!	B&%	-.&%
$&%7e%4!	.&+!	.&%!	.&%!	.&4!	4&%	-4&%
$&%7e%.!	+&B!	+&B!	+&.!	+&4!	.&%	-B&.
$&%7e%+!	$&,!	$&3!	$&4!	$&3!	+&%	-(&%
B&%7e%$!	$&+!	$&4!	$&,!	$&B!	$&%	-’&+

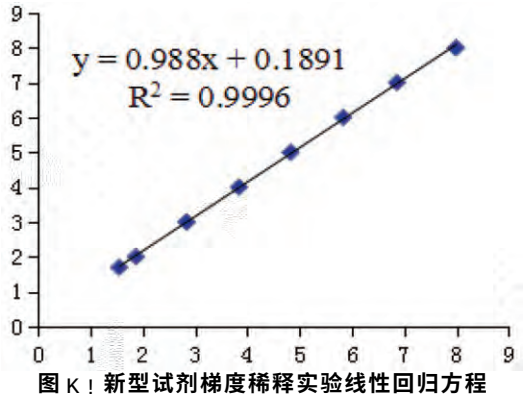


图 K！新型试剂梯度稀释实验线性回归方程

Q’$#'%! K！@#*I<U!UIOUIVW#'*!I^H<=#'*!"G!*IZ!UI<OI*=!OU<!#I*=!!#EH=#'*!IF;IU#:I*=

图 L！新型试剂抗干扰能力验证扩增曲线

！！！！！！！！！Q’$#'%! L！D：;E&G#)<=#'*!)HUXI!"G!<*=##*=IUGIUI*)I!<WE=\!"G!=RI!*"XIE!UI<OI*=

(C)1994-2019 China Academic Journal　lectronic Publishing House. All　ghts　eserved.　http://ww　.　k .n t

表 L！抗干扰能力验证结果

！！！！！！！！！！！！！！>)8.%! L！CIVHE=V!"G!XIUJG#)<=#'*!"G!=RI!<*=##*=IUGIUI*)I!)<;<WHE=\

样！本	干扰物浓度	实测值对数				判断标准	结论
		第＄次	第＋次	第．次	均值		
L"U:<E(L)	/	.&4!	.&.!	.&%!	.&+	/	/
LeK?!	+0/!E!	.&%!	.&(!	.&3!	.&4!	.&+h%&%	符合
						(.&+！4&+)	
Le6?1@!	+':0/!E!	.&'!	.&(!	.&'!	.&$		符合
Le6M!	.%%%:0/!E!	.&.!	.&3!	.&$!	.&%		符合
Le10M!	4%0/@!	.&+!	.&%!	.&B!	.&,		符合

K！讨！论

！！近年来，尽管荧光定量 N9C 技术检测 K95-CLD 在临床上的应用越来越普及[,]，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 K95-CLD 低病毒载量的漏检，不利于 K95 感染者的早期诊断和治疗。为此，

(C)1994-2019 China Academic Journal lectronic Publishing House. All ghts eserved. http://ww . k .n t

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10/B′，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

[$]！K"E：IV![D，9RH*O!C6&5#U<E!RI;<=##V：K95!)"：;<U=：I*=<E·#]<=#'*!#* !K99：!U#XIU，;<VVI*OIU!"U!W"=R[]&L<=!CIX!M<V·=U"I*=IU"E!KI;<='E，+%$(，$.(B)：+B4·+B(&

[+]！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[]&中西医结合肝病杂志，+%$′，+′($)：$$·$.&

[.]！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[]&中华肝脏病杂志，+%$′，+(()：++B·+.+&

[4]！0<*E#!<O!6，DY)<E#!0，7)I：#V!6，0+¦，-&*XIV=#O<=#'*!"G!=RI!)"U·UIE<=#'*¦WI=ZII*!<*=#-K95!EIXIEV(0/9") Z#=R!K95·CLD!#*=RI!!#<O*"\#V!"G!RI;<=##V!9!X#UHV（K95）#*GI)=#'*[]&>#Y·U"W#A\"E!?HE，+%$(，B%(.)：B%′·B$%&

[B]！8#<*#1M，8R<*!DL，?H==!?，0+¦，-&K95-CLD!;)U!;"V#=#X#=\#*K95!<*=#W"!\!*IO<=#XI!;<=#I*=V!H*!IUO"#*O!R<I："!#<E\V#V[]&[!D\HW!>I!!9"E!DWW"==<W<!，+%$′，.%(.)：.，3·4%%&

[(]！9E#*#)<E!<*!!@<W"U<="U\!0=<*!<U!V!1*V=#+H=I&QVIU!XIU#G)<=#'*"G!;IUG"U：<*)I!G"U!;UI)#V#'*!<*!!=UHI*IVV：<;;U"XI!!OH#!IE#*I·VI)"*!!I!##'*[0]&7N$B-D+，9@01，+%%B&

[3]！中国合格评定国家认可委员会，关于印发《CLD0-9@%+·D%%，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[0]&北京：9LD0，+%$′&

[′]！L99@0&7X<EH<=#'*!"G!=RI!E#*I<U#=\!"G!^H<*=#><=#XI!：I<VHUI·：I*=!;U")I!HUIV：<!V=<=#V=#)<E!<;;U"<)R&D;;U"XI!!OH#!IE#*IL99@0!!")H：I*=!7N(-D[0]&P<*I，N<：L99@0，+%%.&

[,]！0<UU<]#*!9，PI!I：I\IU!K，9E"RIU=\!M，0+¦，-&L：;"U=<*)I!"GXIU\!I<UE\!K95!CLD!Y#*I=#)V!G"U!;UI!#)=#'*!"G!=UI<=：I*=!"H=·)"：I!"G!R#ORE\!IGGI)=#XI!<EE!"U<E!!#UI)=!<)=#*O!<*=#X#U<E!)"：W#·*<=#'*!=RIU<;\[]&[!5#U"E!>I=R"!V，+%$B，+$4：+，·.+&

[$%]！杨甲，饶慧瑛，魏来，关于印发《+%$′年欧洲肝病学会丙型肝炎治疗推荐意见》介绍及解读[]&临床肝胆病杂志，+%$′，.4(′)：$(++·$(.$&

[$$]！>#YIE!N，5<V#)Y"X<!N，8U<E#Y!N&>I=R"!V!G"U!;UI;<U<=#'*!"G>0+;R<OI-E#YI!;<U=#)EIV+ $

(C)1994-2019 China Academic Journal lectronic Publishing House. All ghts eserved. http://ww . k.n t