

DA3200-ABI7500 全自动核酸提取平台高敏 HCV RNA 定量检测性能验证

冯飞雪¹, 王大望², 肇玉博¹, 王凯¹, 周嘉迪¹, 王战争¹, 王丽¹, 马艳侠¹, 史小武³

(1. 陕西中医药大学附属第一医院检验科, 陕西咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西咸阳 712000; 3. 咸阳市中心血站检验科, 陕西咸阳 712000)

摘要:目的 验证 DA3200-ABI7500 全自动核酸提取高敏检测 HCV RNA 方法性能。方法 参考美国临床实验室标准化协会批准指南 (CLSI-EP), 采用 DA3200 全自动核酸提取平台及荧光定量 PCR 检测 HCV RNA, 评价检测方法的核酸提取纯度、精密度、正确度、线性范围、分析灵敏度、特异度和抗污染能力等性能指标。结果 核酸提取后 A_{260nm}/A_{280nm} 比值为 2.02。高、低两个浓度样本的批间精密度和批内精密度 CV 值均 $\leq 5\%$ 。正确度与抗干扰能力方面, 标本实测值与靶值之间的偏离度 $\leq \pm 0.4lg$ 。在 $13 \sim 1.3 \times 10^6$ IU/ml 范围内, 检测结果与靶值有良好的线性关系 ($Y=0.984X-0.186$, $r^2=0.998$)。最低检出限为 20 IU/ml 的检出率为 100%, 且系统具有较强的特异度和抗污染能力。结论 基于 DA3200-ABI7500 全自动核酸提取高敏检测 HCV RNA 各项分析性能指标均较好, 高敏检测对治疗过程的监测及治疗终点判定具有重要意义。

关键词: 丙型肝炎病毒; HCV RNA; 高敏检测; 性能验证

中图分类号: R446 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 01-108-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.01.027

Performance Verification of DA3200-ABI7500 Automatic Nucleic Acid Extraction Platform for High Sensitive HCV RNA Quantitative Detection

FENG Fei-xue¹, WANG Da-wang², ZHAO Yu-bo¹, WANG Kai¹, ZHOU Jia-di¹, WANG Zhan-zheng¹, WANG Li¹, MA Yan-xia¹, SHI Xiao-wu³

(1. Department Clinical Laboratory, the First Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 2. Academy of Medical Technology of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China; 3. Department Clinical Laboratory, Xianyang Central Blood Station, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To evaluate the DA3200-ABI7500 automatic nucleic acid testing platform for highly sensitive HCV RNA quantitative detection. **Methods** Based on American standard CLSI-EP, the DA3200 automatic nucleic acid extraction platform and PCR analysis system was applied to high sensitivity detect HCV RNA, the precision, accuracy, linear range, detection ability and anti-pollution ability of this method was analyzed. **Results** In terms of nucleic acid extraction, the ratio of A_{260nm}/A_{280nm} was 2.02, and the intra-assay and inter-assay precision CV values of high and low concentration samples were both $\leq 5\%$. In accuracy and anti-interference ability, the deviation between the measured value of the specimen and the target value was $\leq \pm 0.4lg$, and there was a good linear relationship between the test results and the target value in the range of $13 \sim 1.3 \times 10^6$ IU/ml ($Y=0.984X-0.186$, $r^2=0.998$). The detection rate of 20 IU/ml was 100%. **Conclusion** Based on the DA3200-ABI7500 automatic nucleic acid extraction platform, the high sensitivity HCV-RNA quantitative detection performance indicators were all good, and its high-sensitivity detection is of great significance for the monitoring of the treatment process and the determination of treatment endpoints.

Keywords: hepatitis C virus; HCV RNA; high sensitive detection; performance verification

慢性丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染是引起全球慢性肝病的主要原因之一, 可发展为肝硬化和肝癌^[1-2], 构成了世界范围内重要的公共卫生问题。既往研究表明 HCV RNA 在一定程度上反映了 HCV 的复制活性, 定量检测 HCV RNA 对

HCV 感染诊断、疾病进展以及抗病毒治疗方案制定等起着重要作用^[3]。近年来, 慢性 HCV 防治指南中推荐采用最低检出限 ≤ 30 IU/ml 的实时定量聚合酶链反应 (real-time quantitative PCR) 检测 HCV RNA, 而最低检出限为 500~1 000 IU/ml 的传统手

作者简介: 冯飞雪 (1986-), 女, 博士, 讲师, 主要从事临床分子诊断。

通讯作者: 史小武, E-mail: feixue0422@126.com。

工磁珠法和柱提法检测已无法满足临床需求^[4]。目前出现的全自动核酸提取及高敏检测系统,因其自动化程度高和高敏检测受到各大医院的喜爱。本研究拟对 DA3200-ABI7500 全自动核酸提取平台及高敏 HCV RNA 定量检测进行性能验证,包括:提取效率、精密度(批内,批间)、正确度、线性范围、分析灵敏度、特异度和抗污染能力,以确保采用的相关试剂盒分析性能满足临床要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器:实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,ABI7500),DA3200 全自动核酸提取平台(中山大学达安基因股份有限公司),NanoDrop 分光光度计。试剂:丙型肝炎病毒核酸提取试剂盒和 PCR 定量测定试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司),丙型肝炎病毒核糖核酸(HCV RNA)血清液体性能评价参考品(广州邦德盛生物科技有限公司),详细信息见表 1。

表 1 核酸参考盘样品信息

样品编号	HCV RNA 浓度 (IU/ml)	备注
L1	1.3 E+06	GBW(E)090662
L2	1.4 E+05	GBW(E)090661
L3	1.2 E+04	GBW(E)090660
L4	1.4 E+03	GBW(E)090659
L5	1.3 E+02	GBW(E)090979
G1	1.2 E+04	含血红蛋白 (2 g/dl)
G2	1.2 E+04	含总胆红素 (30 mg/dl)
G3	1.2 E+04	含三酰甘油 (3 000 mg/dl)
G4	1.2 E+04	含清蛋白 (6 g/dl)
R1	1.2 E+04	
R2	0.5 E+02	
N1	含乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) DNA 样本	
N2	含人巨细胞病毒 (Human cytomegalovirus, HCMV) DNA 样本	
N3	含单纯疱疹病毒 2 型 (Herpes simplex virus 2, HSV2) DNA 样本	
N4	含淋病奈瑟菌 (<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , NGH) DNA 样本	
N5	含解脲支原体 (<i>Ureaplasma Urealyticum</i> , UU) DNA 样本	
N6	含肺炎支原体 (<i>Mycoplasma Pneumoniae</i> , MP) DNA 样本	
N7	含沙眼支原体 (<i>Chlamydia Trachomatis</i> , CT) DNA 样本	
N8	含艾滋病 1 型病毒 (HIV1) RNA 样本	
RNA 样品 稀释液	不含 HCV RNA 液体	

1.2 方法

1.2.1 高敏 HCV RNA 提取及检测:提取方法为磁珠法,检测方法为实时荧光定量 PCR 法。用

DA3200 全自动核酸提取仪提取血清中的 HCV RNA,并进行 PCR 反应体系的配置,反应体系为 60 μ l[2 μ l 引物 +3 μ l 酶混合液 +15 μ l 反应混合液 +40 μ l 模板,其中模板包括待测样本、阳性质控品、阴性质控品和 4 个定量参考品(浓度为 :1.0 E+06 IU/ml, 1.0 E+05 IU/ml, 1.0 E+04 IU/ml, 1.0 E+03 IU/ml)];将配置好的 PCR 体系放入到 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪中进行 HCV RNA 定量检测;扩增参数 50 $^{\circ}$ C 900s; 95 $^{\circ}$ C 900s; 94 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 45 个循环。结果的处理与计算:质控品满足质控要求方可进行后续结果判定,定性结果根据仪器的 FAM 通道和 VIC 通道及 C_t 值进行判定,定量结果根据 4 个定量参考品得出的标准曲线进行确定。所有操作严格按照实验室标准操作程序以及试剂盒说明书进行。

1.2.2 性能评价:

1.2.2.1 核酸提取纯度验证:使用 DA3200 全自动核酸提取仪提取血清中的 HCV RNA,用 NanoDrop 分光光度计对提取后的 HCV RNA 进行纯度鉴定,吸光度 A_{260nm}/A_{280nm} 应在 1.8~2.2 之间。

1.2.2.2 精密度验证:参考 EP15-A3 文件^[5]。①批内精密度:核酸参考盘 R1 (1.2E+04 IU/ml) 做为高值样本, R2 (0.5E+02 IU/ml) 作为低值样本,两个浓度样本在同一批次内重复测定 20 次。②批间精密度:同上选择高 (R1)、低 (R2) 两种浓度水平作为待测样本,每天检测一个批次,重复测定 4 次,连续测定 5 天。计算均值、标准差和变异系数,精密度 CV 值 $\leq 5\%$ 为合格。

1.2.2.3 正确度验证:参考 EP15-A3 文件^[5]。以 2019 年第二次卫生部室间质评的 5 个 HCV 样本和参考盘中的 L1~L5 标准物质进行正确度验证,样本测定结果的均值对数值与参考值对数值之间的绝对偏倚 $\leq \pm 0.4 \lg$ IU/ml 为合格。

1.2.2.4 线性范围验证:参考 EP6-A 文件^[6]。使用核酸类参考盘中 L1~L5 样本,并将 L5 稀释 10 倍编号为 L6 (浓度为 13 IU/ml, \lg 值为 1.11); 6 个浓度标本重复测定 2 次,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 $r^2 \geq 0.98$ 为合格。

1.2.2.5 分析灵敏度验证:参考 EP6-A 文件^[6]。将核酸类参考盘中的 R2 稀释到试剂盒说明书标示灵敏度浓度 (20 IU/ml),重复检测 20 次,阳性检出率 $\geq 95\%$ 为合格。

1.2.2.6 特异度验证:选取核酸参考盘中 HCV RNA 阴性参考品 N1~N8,所有标本实验结果符合预期为合格。

1.2.2.7 抗干扰能力验证:参考 EP7-A2 文件^[7]。

以核酸参考盘中的G1, G2, G3, G4作为干扰组样本, 测定结果的均值对数值与正常组对数值之间的绝对偏倚 $\leq \pm 0.4 \lg \text{IU/ml}$ 为合格。

1.2.2.8 抗污染能力验证: 在DA3200的样本架上, 将L1高浓度样本($1.3 \text{ E}+06 \text{ IU/ml}$)和N1~N8阴性样本以间隔的方式放置, 验证仪器携带污染的情况和抗污染能力。

1.3 统计学分析 应用SPSS26.0软件进行统计学分析, HCV RNA浓度值转换为浓度对数值 $\lg \text{IU/ml}$ 后再进行统计分析, 计量资料计算均数(\bar{x})、标准差(s)、变异系数(CV), 各组指标相关性采用双变量相关分析, 函数关系采用线性回归分析。

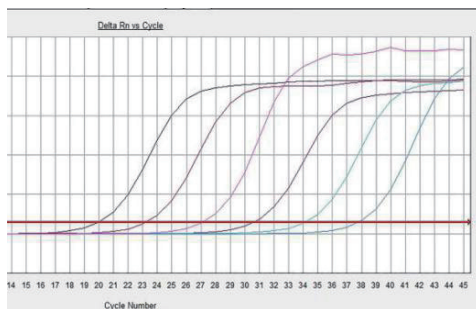
2 结果

2.1 核酸提取纯度结果 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 的值为2.02, 表明DA3200全自动核酸提取仪提取效能符合要求。

2.2 精密度验证结果 见表2。批内精密度实验和批间精密度实验 CV 值均 $\leq 5\%$, 表明批间和批内重复性好。

表2 批内和批间精密度检测结果

检测结果	批内精密度		批间精密度	
	高浓度	低浓度	高浓度	低浓度
Log 均值	4.11	1.87	4.10	1.86
标准差	0.069	0.09	0.062	0.09
CV (%)	1.67	4.85	1.52	4.86



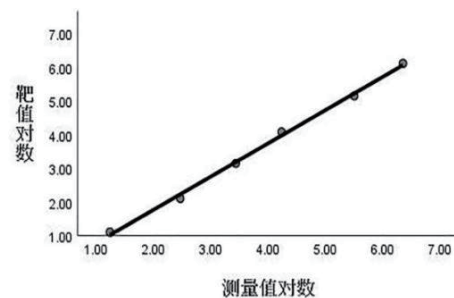
A

2.3 正确度验证结果 见表3。参考物质和室间质控样本共10个标本均检出, 检测结果对数值与靶值对数值之间的绝对偏倚均 $\leq \pm 0.4 \lg$ 值, 表明试剂正确度较好。

表3 正确度检测结果

样品代号	靶值对数结果	测定对数结果	对数值偏差	
参考物质	L1	6.11	6.33	0.22
	L2	5.15	5.53	0.38
	L3	4.08	4.15	0.07
	L4	3.15	3.46	0.31
	L5	2.11	2.46	0.35
室间质控样本	201921	4.95	4.91	0.04
	201922	0	0	0
	201923	5.55	5.58	0.03
	201924	4.92	4.92	0
	201925	4.97	5.00	0.03

2.4 线性范围验证结果 经双变量相关分析和线性回归分析, 6个不同HCV RNA浓度实测值与理论值呈高度正相关性($r=0.999$, $P=0.000$), 线性回归方程: $Y=0.984X - 0.186$, $r^2=0.998 \geq 0.98$, $P=0.000$, 符合线性相关系数要求, 表明在此浓度范围内有很好的线性关系(见图1)。



B

注: A为线性范围验证扩增曲线; B为线性范围验证回归曲线

图1 线性范围实验图

2.5 分析灵敏度验证结果 20 IU/ml 浓度样本的阳性检出率为100%, 但 CV 值为16.17%, 虽检出率好, 但数据间变异程度较大。

2.6 特异度验证结果 所有阴性标本均未检出, 达到试剂特异度要求。

2.7 抗干扰能力验证结果 干扰组样本测定结果的均值对数值与靶值对数值之间的绝对偏倚 $\leq \pm 0.4 \lg \text{IU/ml}$, 试剂抗干扰验证通过。

2.8 抗污染能力验证结果 高浓度阳性样本均检出, 阴性样本均未检出, 表明系统具有很好的抗污染能力。

3 讨论

HCV是一种单正链RNA病毒, 当其侵入肝细胞后, 会造成肝细胞的损伤, 甚至是坏死。随着索非布韦(sofosbuvir, SOF)药物的上市, 丙肝成为一种可以治愈的疾病。但是, 很大一部分丙肝患者可以在20年内没有任何明显的症状, 导致了患者以及医务人员对于丙肝感染的忽视, 当出现临床症状时, 疾病往往到了恶性期。故对丙肝患者的早筛查、早发现对于防止病情的恶化以及降低死亡率具有重要意义, 而HCV RNA的检出是丙肝确诊的标准,

换句话说,就是怎么在这些慢性患者中检出低载量的HCV RNA。其次,治疗后患者血液中HCV RNA的含量对于治疗方案的制定以及治疗终点的判断有着重要的作用^[8],有权威机构指出HCV的治疗终点是在治疗后24周内(或12周内)未检测到HCV RNA(方法检出限<15 IU/ml)^[9]。此外,HCV RNA浓度还对耐药监测有着一定的影响^[10]。如何去检测出患者血液中低载量的HCV RNA,如何保证检测结果的准确性、稳定性已成为当前检测难题之一。

本研究通过使用DA3200全自动核酸提取仪对HCV患者血清的提取,减少了人工操作的污染以及操作过程中的不确定性;使用ABI7500实时荧光定量PCR对提取后的核酸进行扩增、检测,其聚集了PCR的高敏感度、高特异度,光谱系统的准确性,以及检测的实时性^[11],提高了检测的灵敏度,实现了实验过程的全自动化、标准化,很好的保证实验结果的准确性。本研究中的DA3200-ABI7500全自动核酸提取、扩增、检测系统,因检出限低,其他性能良好,可以很好地解决上述所说的难题,实现低量检出HCV RNA,为确诊、治疗提供了强有力的证据,在一定程度上促进了个体化、精准化治疗的进程。

近年来,核酸检测是临床分子实验室的重要检测项目之一,检测结果对病情的诊断及治疗有着重要意义。之前HCV RNA的提取方式为人工柱抽提法和磁珠法,存在着操作复杂、灵敏度低等问题。最近国内外厂家相继推出全自动核酸提取仪,最大限度减少人为操作的污染,增加结果的准确性。未来HCV RNA的检测将向着提取、扩增、检测一体化,全自动化的方向前进。此外,POCT仪器的出现让HCV RNA检测更加快速、便捷^[12],但其结果的准确性及灵敏度还有待验证。微流体技术^[13](流体处理的小型化)和等温扩增技术^[14]的出现,加速了PCR的发展,虽然其具有速度快、成本低、反应模式微小等特点,但因技术限制,两者还不能广泛的应用于临床。随着技术的发展,PCR将会被更好地应用于疾病的筛查、诊断等方面。

参考文献:

- [1] MAJUMDAR A, KITSON M T, ROBERTS S K. Systematic review: current concepts and challenges for the direct-acting antiviral era in hepatitis C cirrhosis[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 43(12): 1276-1292.
- [2] CHHATWAL J, WANG Xiaojie, AYER T, et al. Hepatitis C disease burden in the United states in the era of oral direct-acting antivirals[J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2016, 64(5): 1442-1450.
- [3] ÇETINER S, ÇETIN D A, KIBAR F, et al. Performance comparison of new Generation HCV core antigen test versus HCV RNA test in management of hepatitis C virus infection[J]. *Transfusion and Apheresis Science*, 2017, 56(3): 362-366.
- [4] 刘萍, 张坚磊, 刘晔华, 等. 磁珠法提取核酸检测丙肝病毒RNA载量及其临床研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2014, 28(6): 482-484.
LIU Ping, ZHANG Jianlei, LIU Yehua, et al. Magnetic beads-based nucleic acid extraction method applied for quantitative detection of hepatitis C virus RNA load and its clinical research[J]. *Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology*, 2014, 81(6):482-484.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP15-A3: User verification of precision and estimation of bias Approved Guideline---Third Edition [S]. Wayne:PA, USA CLSI EP15-A3, 2015.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP6-A2 :Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods: Approved Guide -Second Edition [S]. Wayne:PA, CLSI EP6-A2, 2003.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI EP7-A2: Interference testing in clinical chemistry:Approved Guideline Second Edition [S]. Wayne:PA, CLSI EP7-A2, 2005.
- [8] PEIFFER K H, SARRAZIN C. The importance of HCV RNA measurement for tailoring treatment duration[J]. *Digestive and Liver Disease*, 2013, 45(Suppl 5): S323-S331.
- [9] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: management of hepatitis C virus infection[J]. *Journal of Hepatology*, 2014, 60(2): 392-420.
- [10] CLOHERTY G, COHEN D, SARRAZIN C, et al. HCV RNA assay sensitivity impacts the management of patients treated with direct-acting antivirals[J]. *Antiviral Therapy*, 2015, 20(2): 177-183.
- [11] 刘娜, 李春霞, 东冰, 等. 高敏HCV RNA检测技术的临床应用[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(5): 428-433.
LIU Na, LI Chunxia, DONG Bing, et al. Clinical application of hypersensitivity HCV RNA detection technology[J]. *Journal of Molecular Diagnosis and Therapy*, 2019, 11(5):428-433.
- [12] GREBELY J, APPLGATE T L, CUNNINGHAM P, et al. Hepatitis C point-of-care diagnostics: in search of a single visit diagnosis[M]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2017, 17(12): 1109-1115.
- [13] KANAGAL-SHAMANNA R. Digital PCR: principles and applications[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2016, 1392: 43-50.
- [14] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. DPCR: A technology review[J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2018, 18(4): 1271.

收稿日期: 2020-05-27

修回日期: 2020-10-20