

• 检验试剂评价 •

## 4 种丙型肝炎病毒荧光定量试剂可比性分析

陈子祥, 邱方<sup>△</sup>, 易妮, 杨清玉, 朱红甜, 倪小利, 吴晓琪

(南京迪安医学检验所分子生物学实验室 210001)

**摘要:**目的 了解不同厂家 HCV-RNA 定量检测试剂盒测定结果的可比性。方法 采用 RT-PCR 技术对 4 种 HCV-RNA 试剂精密度(批内、批间)、线性、阳性检出率、试剂间可比性进行评价。结果 本方法评价表明各厂家试剂盒批内变异系数(CV)均小于 10%、批间变异系数(CV)均小于 12%、线性  $r > 0.97$ 、阳性检出率均大于 81%、试剂间结果相关性均  $r < 0.60$ 。结论 不同试剂盒检测结果稳定,但不同厂家试剂盒间可比性差,不利于丙型肝炎患者在不同医院诊治,各试剂厂家需建立溯源体系,统一标准。

**关键词:**肝炎病毒; 乙型; 聚合酶链反应; 对比研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.050

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-2019-01

在核酸定量技术的发展中,荧光定量 PCR (fluorescence quantitative, PCR) 是发展最快和最有应用价值的新技术,在感染性疾病、分子遗传疾病、肿瘤诊断等方面的作用越来越大。目前,用于诊断丙型肝炎病毒(HCV)感染的主要实验室指标为抗-HCV 和丙型肝炎病毒核酸荧光定量(HCV-RNA),因 HCV 感染到血清中出现抗-HCV 的窗口期一般在 2 个月左右,甚至有些抗-HCV 持续阴性,不能准确反映患者血清中 HCV 实时水平,临床更侧重 HCV-RNA 检测,陈开慧<sup>[1]</sup>、王玉辉<sup>[2]</sup>、何长辉<sup>[3]</sup>的研究表明,HCV-RNA 检测较抗-HCV 更能准确反映病情。现在有很多用于检测 HCV-RNA 的商品试剂盒,很多分子生物学实验室也在开展该项检测,但各试剂检测结果是否稳定<sup>[4]</sup>,各试剂间检测结果是否有差异、是否有可比性、是否适合患者在不同医院间诊治,值得商榷,现将研究结果报道如下。

### 1 材料与与方法

**1.1 材料** 收集本所 PCR 室 2011 年 3~6 月 165 例阳性、30 例阴性样本,临床诊断符合《病毒性肝炎防治方案》诊断标准。标本严格按试剂盒要求进行保存。

**1.2 仪器与试剂** 实时荧光定量扩增仪器(Light Cycler480)、高速低温离心机(Micro fuge22R),仪器均在一个校准周期内;HCV 检测试剂盒分别由上海科华(批号:20110126)、上海之江(批号:20101201)、杭州艾康(批号:20101101)、广州达安(批号:2011001)提供,4 种试剂分别以 A、B、C、D 代表。

### 1.3 方法

**1.3.1 精密度评价** 按照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)评价标准,收集高值、低值混合血清各 50 mL,混匀,各分装至 25 支 1.5 mL EP 管,每管 1 mL, -70 °C 保存,各试剂高、低值血清每天各检测一支,累积 20 组数据,用于批间精密度评价。剩余血清用于批内精密度评价,每种试剂高、低值各做 20 个数据,计算各组数据均值  $\bar{x}$ 、标准差  $s$ ,变异系数计算公式为  $CV = s/\bar{x}$ 。实验操作严格按各试剂盒说明书进行。

**1.3.2 线性评价** 将高值( $2.0 \times 10^7$ )血清用 HCV-RNA 阴性血清 10 倍梯度稀释至临界( $2.0 \times 10^2$ ),共 6 个水平,每个水平每种试剂检测 5 次,取均值,计算理论值与均值结果间相关性。

**1.3.3 试剂间可比性评价** 收集 16 例阳性标本、4 例阴性标本,浓度覆盖各试剂盒线性范围,各试剂平行检测,计算组间相关性,同时计算试剂间检测结果阴阳性符合率。

**1.3.4 统计学处理** 按美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP9-A 文件进行方法间离群值检验,以精密度相对较好及参加卫生部年度室间质评结果合格 A 组为基准组(或参照

系统),其他组(或系统)检测结果与之进行相关性和回归分析,采用相关系数( $r$ )估计,以  $r > 0.975$  为判断标准。采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析。所有浓度(copy/mL)均转换为对数值后,进行分析。

### 2 结果

**2.1 精密度评价** 4 种试剂检测结果显示,批内精密度高、低水平 CV 值均小于 10%,批间精密度高、低水平 CV 值均小于 12%,见表 1、2。

表 1 4 种试剂检测批内精密度结果

| 试剂厂家 | $\bar{x}$ (低/高) | $s$ (低/高) | CV(低/高)     |
|------|-----------------|-----------|-------------|
| A    | 3.22/7.12       | 0.19/0.38 | 0.060/0.053 |
| B    | 3.62/7.53       | 0.21/0.40 | 0.058/0.053 |
| C    | 2.97/7.20       | 0.22/0.41 | 0.074/0.057 |
| D    | 2.95/7.01       | 0.25/0.42 | 0.085/0.060 |

表 2 4 种试剂检测批间精密度结果

| 试剂厂家 | $\bar{x}$ (低/高) | $s$ (低/高) | CV(低/高)     |
|------|-----------------|-----------|-------------|
| A    | 3.12/7.12       | 0.23/0.41 | 0.074/0.058 |
| B    | 3.42/7.33       | 0.22/0.45 | 0.064/0.062 |
| C    | 3.17/7.40       | 0.32/0.47 | 0.104/0.064 |
| D    | 3.25/7.11       | 0.35/0.44 | 0.107/0.062 |

表 3 4 种试剂线性结果

| 理论值  | A 实际均值 | B 实际均值 | C 实际均值 | D 实际均值 |
|------|--------|--------|--------|--------|
| 2.30 | 3.31   | 2.10   | 2.00   | 2.10   |
| 3.30 | 3.80   | 2.70   | 2.61   | 3.40   |
| 4.30 | 4.60   | 3.10   | 3.20   | 4.61   |
| 5.30 | 5.40   | 4.10   | 5.13   | 5.40   |
| 6.30 | 6.00   | 5.21   | 6.21   | 6.11   |
| 7.30 | 7.41   | 5.20   | 6.39   | 6.39   |

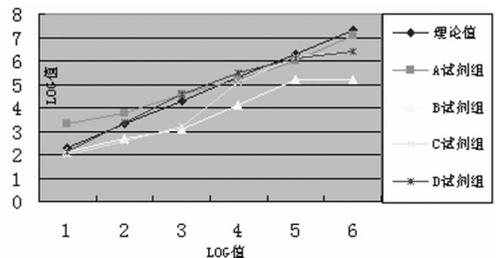


图 1 线性拟合曲线

**2.2 线性评价** 4 种试剂检测经梯度稀释(下转第 2037 页)

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: chenxz@dagene.net.

染机会。因此,ICU、老年病房更要认真做好消毒工作,严格执行无菌操作,采取相应隔离治疗措施,医护人员勤洗手也是防止病菌院内感染的关键。

金黄色葡萄球菌在本院感染革兰阳性球菌中占首位,MRSA 检出率高,耐药性强,MRSA 感染已成为临床治疗的一大难题。MRSA 是由于获得 *mecA* 基因,编码产生 PBP2a 蛋白(一种青霉素结合蛋白),PBP2a 能执行 PBPs(其他青霉素结合蛋白)的生理功能,但与  $\beta$ -内酰胺类抗菌剂亲和力低,造成对  $\beta$ -内酰胺类抗菌剂的普遍耐药。另有研究表明 MRSA 除了携带 *macA* 基因造成  $\beta$ -内酰胺类抗菌剂耐药外,同时还会携带其他耐药基因,对其他非  $\beta$ -内酰胺类抗菌剂,如大环内酯类、四环素和喹诺酮类抗菌剂交叉耐药<sup>[6]</sup>。本组资料分离的 123 株金黄色葡萄球菌中青霉素耐药率接近 100%(99.2%),检测出 79 株 MRSA 所占比例为 64.2%。79 株 MRSA 中环丙、左氧氟沙星、红霉素、克林霉素、四环素耐药率达 85%以上,耐药性明显高于甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA),差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。123 株金黄色葡萄球菌中对万古霉素、利奈唑胺未检出耐药,其次抗菌剂耐药率较低的为辛内吉、氯霉素、复方新诺明、利福平。与其他医院比较本院复方新诺明耐药率非常低仅为 12.2%<sup>[2,7-8]</sup>。分析原因可能为:(1)其仅为口服药,起效较慢;(2)不良反应大,易引起过敏反应,可发生肝、肾损伤及血液系统的病变等;(3)新药的不断推出,宣传过多等多种因素导致医生很少使用复方新诺明,再加上价格低没有利润,本院已有多年未进购复方新诺明。临床使用率低等多种因素导致细菌对复方新诺明的敏感性上升。利奈唑胺为恶唑烷酮类合成抗菌剂,2000 年被美国政府批准用于临床。有研究表明治疗 MRSA 所致的感染<sup>[9]</sup>,利奈唑胺优于万古霉素,尤其是治疗肺部感染,但其价格昂贵,在国内使用时间不长耐药性还有待进一步观察。目前临床治疗 MRSA 全身感染的首选药物是万古霉素,本院虽未检出耐万古霉素金黄色葡萄球菌,但国外已有耐万古霉素菌株的报道<sup>[10]</sup>,中国也有较多异质性耐万古霉素的金黄色葡萄球菌的报道<sup>[2]</sup>。因此临床应慎用万古霉素,以

延缓耐万古霉素金黄色葡萄球菌的出现。MRSA 感染的治疗,应根据临床感染情况结合药敏结果合理使用抗菌剂。

医院要高度重视 MRSA 院内感染的监测,特别对于高危病房和高危人群怀疑感染时应立即采集标本送检,及时发现并采取相应措施防止 MRSA 的扩散。加强 MRSA 相关知识的宣传,根据细菌培养和药敏结果合理选择抗菌剂,对临床治疗和细菌耐药性的控制有着重要的意义。

参考文献

[1] 郭素芳,张勇,孟峻. 356 株金黄色葡萄球菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):269.  
 [2] 魏晓宇,贾蓓,常李军,等. 2006~2008 年我院金黄色葡萄球菌耐药监测[J]. 中国抗生素杂志,2010,35(6):472-476.  
 [3] 薛欣盛,康焰,廖燕. 强化手卫生控制 ICU 内 MRSA 感染的效果分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2008,8(1):60-62.  
 [4] 郭美姿,杜昌兰,刘燕王,等. 老年人医院获得性金黄色葡萄球菌肺炎分析[J]. 实用老年医学,2007,21(3):189-191.  
 [5] Hiramatsu K, Cui L, Karoda M, et al. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. Trends Microbiol, 2001,9(10):486-493.  
 [6] 崔巧珍,戎建荣. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性分析和 *mecA* 基因检测[J]. 中国药物与临床,2010,10(11):1248-1249.  
 [7] 朱德妹,胡付品,汪复,等. 2007 年中国 CHINET 葡萄球菌属耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2009,9(3):168-174.  
 [8] 朱德妹,张雯元,汪复,等. 2009 年上海地区细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(6):403-413.  
 [9] 肖玲,朱静. 利奈唑胺和万古霉素对耐甲氧西林金葡萄菌感染治疗效果的 meta 分析[J]. 中国抗生素杂志,2008,33(3):178-181.  
 [10] Sievert DM, Rudrik J, Patel JB, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002~2006[J]. Clin Infect Dis, 2008,46(5):668-674.

(收稿日期:2011-05-20)

(上接第 2019 页)

评价 16 例阳性标本、4 例阴性标本中,A 试剂组结果符合率为 90%(18/20),假阴性 2 例;B、C 试剂组结果符合率为 75%(15/20),假阴性 5 例;D 试剂组结果符合率为 85%(17/20),假阴性 3 例。各试剂组假阴性均出在临界值附件。以 Excel 软件计算,以 A 组为基准组,其他组与之进行比较分析,各组间相关性如下: $Y_{AB} = 0.912X - 0.53, r_{AB} = 0.584, Y_{AC} = 1.10X - 0.11, r_{AC} = 0.532, Y_{AD} = 0.86X + 0.29, r_{AD} = 0.512$ 。由于各组间相关系数均  $r < 0.975$ ,参照 EP9-A 的要求说明 4 种试剂测定 HCV-RNA 的结果相关性和可比性不佳。

2.4 HCV-RNA 结果的阴阳性符合率评价 阴阳性判断参照试剂盒标准及是否出现标准“S”型曲线为准。165 例临床诊断符合《病毒性肝炎防治方案》的丙型肝炎患者血清,A 试剂阳性率 86.7%、B 试剂阳性率 81.2%、C 试剂阳性率 82.4%、D 试剂阳性率 86.1%,结果见表 4。

表 4 4 种试剂结果符合率

| 试剂 | 阳性(n) | 阴性(n) | 检出率(%) |
|----|-------|-------|--------|
| A  | 143   | 22    | 86.7%  |
| B  | 134   | 31    | 81.2%  |
| C  | 136   | 29    | 82.4%  |
| D  | 142   | 23    | 86.1%  |

3 讨 论

HCV-RNA 检测结果受很多因素影响,尤其是 PCR 测量 HCV 有个逆转录过程,陈朝霞等<sup>[5]</sup>研究表明 HCV-RNA 极易受内源性及外源性的 RNase 的降解,而 RNA 酶在空气中大量存在。同时又受标本保存方式的影响,从而使得检测结果的阳性率偏低,刘长利等<sup>[6]</sup>研究表明标本保存过程中易受到时间及温度的影响。同时,在试验过程中,检测系统各个环节都影响 PCR 测 HCV 的准确性<sup>[7]</sup>。

本次参加比对的 4 种 HCV-RNA 检测试剂分属国内不同厂家,且试剂生产均取得国家药监局批文。本次试验所用的检测系统除试剂外均相同,其中 A 系统是本实验室常检测系统,日常室内质控及年度室间质评结果理想,实验室设置及试验均严格按照《医学实验室质量和能力认可准则在基因扩增检验领域的指南》执行。4 种试剂组重复性实验显示,各试剂精密密度均处于理想水平<sup>[8]</sup>,保证了实验数据的可靠性。各试剂内线性相关系数良好,斜率、截距均理想,说明在试剂盒线性范围内,定量结果准确。A、D 组阳性检出率高,阳性率是否与各试剂盒检测的病毒片段(基因型)有关,有待证实。李峥等<sup>[9]</sup>研究表明 HCV-RNA 主要基因型为 3b 型,其次是 2a 型。试剂盒间检测结果的可比性差,有的相差两个数量级(下转第 2039 页)

中注意交叉感染,接触任何标本要戴手套(必要时佩戴两副手套),各种实验室用品应按规定放置,保护实验室台面、地面及物品表面不被血液、体液、排泄物直接污染。在实验操作过程中始终贯穿无菌操作理念,例如,静脉采血必须“一人一针一管一带”,微量采血应做到“一人一针一管一片”,酒精棉球必须用镊子取,严格遵守规范的操作程序,减少操作失误造成的危险。任何实验操作后应按 WHO 推荐的“六步洗手法”正确洗手。

**3.2.3 重视实验室设施投入和管理** 对于临床检验实验教学的实验室应当配备相应的生物安全防护器材,如:生物安全柜、防护服、高压灭菌锅、废弃物分类垃圾收集及处理设备。实验室用过的仪器设备要及时消毒,对反复使用的玻璃器皿,如试管、移液管、烧杯等,都要有专人进行统一的清洗干燥灭菌<sup>[6]</sup>。

**3.2.4 建立生物安全意外事故的处理** 实验操作过程中难免会出现实验室意外事故的发生,例如临床阳性标本不慎洒落在台面、地面和其他表面;采血操作中不慎皮肤刺伤;分离标本时离心管发生破裂等。要求学生实验操作过程中,一旦发生以上实验室事故,应及时上报带教老师,在老师指导下进行相应的应急处理。

**3.3 实验后废弃标本的处理** 实验垃圾应与生活垃圾分开存放,由学校统一机构和部门进行处理。例如,进行临床检验实验操作时,在实验室配有“生物危害”标志的黄色垃圾袋和利器盒,让学生将实验过程中的废弃物按类别丢弃,标本、使用的棉签、棉球、一次性手套、防护帽等直接丢入黄色垃圾袋中,采血针等损伤性废物应丢入利器盒中。载玻片、玻璃试管、吸管等实验器材由实验室管理老师统一清洗消毒。实验结束后必须脱下实验服,不得穿着离开实验室,受污染的实验服要先消毒后清洗。

#### 4 实验室生物安全教育的教学效果评价

**4.1 考核要求** 临床检验实验教学中开展生物安全防护教育的具体实践中,以参加临床检验实验学习的医学检验专业学生为调查对象随机进行了问卷调查,针对临床检验实验室生物安全知识和技能的状况,了解他们对实验室生物安全教育和培训的需求。在临床检验实验考核中贯穿生物安全防护教育,将防护意识纳入实验技能考核的标准,例如将是否正确穿戴防护设备、无菌操作观念,实验废弃物的处理等作为考核知识点。

**4.2 教学反馈** 对试卷和调查问卷进行分析,96%学生认为

在校期间开展生物安全教育是必要的,特别融入到临床检验实验教学中是可行的。结合专业实验教学开展生物安全防护教育,学生在学习临床检验技能的同时能提高安全意识,培养良好的实验室操作行为习惯和操作规范,取得较满意的教学效果。为了取得更大的教学效果,可以开展第二课堂,举办生物危害、生物安全措施、实验废弃物处理等方面的讨论会,让学生查阅资料,教师指导总结进行讨论等各种形式<sup>[7]</sup>,可以使教育内容丰富、生动活泼、富有吸引力。

总之,生物安全防护教育涉及多个方面,是一个艰巨而重要的任务。临床检验实验中开展生物安全防护教育取得预期的效果。应将这种防护教育渗透到其他医学检验课程的实验教学中,按检验工作流程建立包括生物安全防护教育的实验教学体系,这将使高等医学院校医学检验实验室的学生职业暴露的概率降低,防护意识逐渐增加,以更快适应临床检验工作岗位。

#### 参考文献

- [1] Shaniati B, Shahidzadeh-mahani A, Oveysi T, et al. Accidental exposure to blood in medical interns of Tehuan Unibersity of medical sciences[J]. J Occup Health, 2007, 49(4): 317-321.
- [2] Norsayani MY, Noor HI. Study on incidence of needle stick injury and factors associated with this problem among medical students [J]. J Occup Health, 2003, 45(3): 172-178.
- [3] Schmid K, Schwager C, Drexler H. Needlestick injuries and other occupational exposures to body fluids amongst employees and medical students of a German university: incidence and follow-up [J]. J Hosp Infect, 2007, 65(2): 124-130.
- [4] 于伟光. 西医实验室教学课应加强学生生物安全防范观念[J]. 长春中医药大学学报, 2006, 22(1): 95.
- [5] 武小樱, 郭友成. 浅析医学教学实验室生物安全管理[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(2): 192-193.
- [6] 杨佳, 郑磊, 李海侠, 等. 医学检验实验教学中的生物安全管理[J]. 中华医学教育杂志, 2010, 30(5): 765-767.
- [7] 杨文才, 李嘉, 姚毅, 等. 做好医学检验学生实验室生物安全防护教育[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1192-1193.

(收稿日期: 2011-05-09)

(上接第 2037 页)

后的性线, 计算理论值与各组实际均值之间相关性, 相关系数  $r > 0.975, P > 0.05$ , 见表 3、图 1。

**2.3 试剂间检测 HCV-RNA 结果的可比性** 以上, 相关性低, 不利于医院间检测结果的互认, 不利于患者在不同医院间转诊, 增加了丙型肝炎患者的就医成本。

总之, HCV-RNA 检测需严格按照行业标准进行操作, 各检测试剂盒质量可靠, 患者固定在同一医院进行 HCV-RNA 感染、治疗情况监测是可靠的。同时, 亟待各试剂厂家建立溯源体系, 以实现自下而上的量值溯源<sup>[10]</sup>; 急需国家制定 HCV-RNA 标准毒株, 以实现行至上而下的量值传递。最终实现不同检测系统可比性, 实现医院间 HCV-RNA 检测结果的互认。

#### 参考文献

- [1] 陈开慧. 探讨三种检测方法在丙型肝炎诊断中的应用价值[J]. 免疫学杂志, 2011, 26(4): 319-321.
- [2] 王玉辉. 丙型肝炎 HCVRNA 检测的临床意义[J]. 中国社区医师: 医学专业, 2010, 12(12): 142-143.

- [3] 何长辉. 丙型肝炎病毒检测方法的应用评价[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(10): 753.
- [4] 樊飞, 李丽. 基于 PCR 的基因定量方法及方法学评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 23(2): 115-119.
- [5] 陈朝霞, 闽保华, 延平. 影响 HCV-RNA 荧光定量 PCR 检测的因素及其对策[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(2): 175-176.
- [6] 刘长利, 任芙蓉, 吕秋霜, 等. 对丙型肝炎病毒核酸稳定性的研究[J]. 临床输血与检验, 2007, 9(3): 1238-1243.
- [7] 杨振华. 关注测量不确定度在临床检验中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(9): 965-966.
- [8] 陈文祥, 申子瑜, 杨振华. 临床检验分析质量指标的设定[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(4): 298-300.
- [9] 李峥, 高玉红, 张桂前, 等. NS5B 区核酸序列测定的丙型肝炎病毒基因分型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 550-552.
- [10] 陈卫, 周帅, 韩帅, 等. 肌酐检测系统溯源性研究[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(16): 2428-2430.

(收稿日期: 2011-05-20)