

基于 PCR-化学发光的 HBV/HCV/HIV 并行核酸检测试剂盒的评价

张若洋¹, 范恩勇², 王明元³, Zeeshan Ali⁴, 汪久海⁴, 冯晨晨¹, 吴敏慧¹, 史丽莉¹, 李智洋^{4*}, 梁文彪^{1*}

(¹江苏省血液中心, 江苏 南京 210042; ²扬州市中心血站, 江苏 扬州 225000; ³苏州市中心血站, 江苏 苏州 215006; ⁴东南大学生物电子学国家重点实验室, 江苏 南京 210096)

[摘要] **目的:**评价一种基于 PCR 与化学发光技术并行检测血液中 HBV/HCV/HIV 的试剂盒。**方法:**使用自制的磁珠及试剂提取病毒核酸, 利用多重 PCR、特异性探针及化学发光法检测目标病毒核酸的信息, 评价试剂盒的灵敏度、特异性及稳定性等。**结果:**本试剂盒灵敏度高, 特异性和稳定性好, 能够同时检测出 HBV、HCV 和 HIV 的极限值分别为 2.0、3.7 和 166.6 U/mL, 对于可能产生干扰的 10 种病毒和 2 种细菌的病原体无交叉反应, 有效期约 12 个月。在健康献血者 10 422 例酶免疫分析法合格标本中, 筛查出 HBV DNA 核酸阳性标本 12 例和 HCV RNA 核酸阳性标本 2 例, 与国家批准的血液筛查核酸试剂平行检测结果一致。**结论:**该试剂盒快速、准确、高灵敏、低成本, 适用于基因诊断及流行病学调查。

[关键词] PCR; 化学发光; 乙肝; 丙肝; 艾滋病; 基因诊断

[中图分类号] R446.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)03-0335-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170316

Evaluation of a parallel assay kit for detecting HBV/HCV/HIV based on PCR-chemiluminescence

Zhang Ruoyang¹, Fan Enyong², Wang Mingyuan³, Zeeshan Ali⁴, Wang Jiuhai⁴, Feng Chenchen¹, Wu Minhui¹, Shi Lili¹, Li Zhiyang^{4*}, Liang Wenbiao^{1*}

(¹Jiangsu Province Blood Center, Nanjing 210042; ²Yangzhou Blood Center, Yangzhou 225000; ³Suzhou Blood Center, Suzhou 215006; ⁴State Key Laboratory of Bioelectronics, Southeast University, Nanjing 210096, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate a HBV/HCV/HIV nucleic acids parallel assay kit via PCR and chemiluminescence. **Methods:** The viral nucleic acids of HBV, HCV and HIV were simultaneously extracted with the homemade magnetic nanoparticles and reagents. The information on the target viral nucleic acids was checked by multiple PCR, electrophoresis, and chemiluminescence. The sensitivity, specificity and stability of the kit were also evaluated. **Results:** The kit was highly sensitive, specific and stable. The detection limits of the kit were 2.0, 3.7 and 166.6 U/mL for HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA, respectively. There was no cross-reactivity with the 10 kinds of viruses, and 2 kinds of bacteria, which might cause interference potentially. The expiry date was about 1 year. Among the 10 422 EIA negative samples of blood donors, 12 were HBV positive and 2 were HCV positive. These results completely coincided with those of other current diagnostic methods of commercial kit applied in blood screening. **Conclusion:** The kit is fast, accurate, highly sensitive and cost-effective. It can be applicable to the genetic diagnosis and epidemiological survey.

[Key words] PCR; chemiluminescence; HBV; HCV; HIV; genetic diagnosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(03):335-339]

近年来随着生物医学和检验技术的进展, 特别是随着以核酸检测(nucleic acid test, NAT)为代表的

分子生物学技术在血液筛查方面的应用, 输血及血液制品安全性有了很大改善, 但经血源性传播的病毒性疾病残余风险度依然很高。输血性病毒感染的主要原因, 除极个别由于病毒滴度、病毒变异、准种形成和人工操作错误等因素造成乙肝和艾滋病的漏检外, 绝大多数输血传染病是由病毒感染者“窗口期”献血造成。为了进一步降低输血“窗口期”感

[基金项目] 江苏省科技厅 2012 年第一批省级科技创新与成果转化(生命健康科技)专项(BL2012067); 江苏省卫生与计划生育委员会科技项目(H201514)

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: lizhiyangcn@qq.com; thibaut@126.com

染的风险,本研究利用所建立的基于 PCR-化学发光的新型 NAT 技术^[1-4],对所研制的一种高灵敏度、高特异性、快速、低成本的 HBV/HCV/HIV 体外并行检测试剂盒进行评价。

1 材料和方法

1.1 材料

检测标本来自 2016 年江苏省血液中心、扬州市中心血站和苏州市中心血站知情同意的健康献血者,其中用于试剂盒符合性检测的 10 422 例标本,其酶免疫分析法(enzyme immunoassay, EIA)检测为 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV 均阴性,且梅毒螺旋体阴性、转氨酶正常,检测方案经江苏省血液中心医学伦理委员会批准并在中国临床试验注册中心进行了临床试验的注册(ChiCTR-DDT-14005151)。标本为采集当天 2~8℃ 分离,或转移至新的无菌管-18℃ 以下保存,检测前均室温平衡、混匀备用。

Fe₃O₄@SiO₂ 磁珠(东南大学生物电子学国家重点实验室产品),核酸裂解液(自制,主要成分为盐酸胍、Tris-HCl、EDTA 等),洗涤液(自制,主要成分为盐酸胍、乙醇、水等);PrimeScript One Step RT-PCR Kit (TaKaRa 公司,日本),台式高速低温离心机(Heraeus 公司,德国),PCR 仪(9902, Applied Biosystems 公司,美国),化学发光仪(Enspire 2300 Multilabel Reader, Perkin Elmer 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 试剂盒检测方法

首先将标本加入含有高浓度胍盐的裂解液将血浆标本中的蛋白质充分变性,释放病毒核酸,使用表面经过特殊处理因而具有核酸吸附能力的磁珠捕获病毒核酸,经过磁分离装置进行洗涤、洗脱后,可富集到高纯度的核酸样品。然后将提取的标本加入多重 PCR 体系中,通过掺入 Biotin-11-dUTP 实现 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 病毒核酸的一步法在位扩增,获得带生物素标记的 3 种病毒的 PCR 产物。通过生物信息学分析,设计病毒的特异性探针并修饰固定在核壳结构复合磁性纳米颗粒上,与扩增产物杂交后,在外磁场下分离除去非特异性吸附片段,再与修饰有亲和素的化学发光中心(碱性磷酸酶)结合,洗涤后与发光底物(1,2-二氧环乙烷衍生物)作用后检测发光强度,分析确认标本中病原体的特性。

1.2.2 试剂盒的制备和鉴定

将一定量的盐酸胍、Tris-HCl、EDTA 与 ddH₂O

混匀,配制成核酸裂解液。用 ddH₂O 溶解盐酸胍,然后加入乙醇,配制成洗涤液。将上述自制试剂与其他试剂共同分装,共制备 3 个批次的试剂盒(S20140901、S20140902、S20140903)。通过检测阴性及阳性质控品,并与有国家批准文号的参比试剂进行比较,以鉴定试剂盒是否合格。首先用试剂盒的裂解液裂解病毒并用磁珠富集提取核酸;接着通过 PCR 扩增目的片段,并用电泳检测扩增产物是否理想;将扩增片段与探针在 PCR 仪中杂交;最后加入酶与底物进行化学发光,通过光强检测目的病毒信息。测定结果应符合要求,且与参比试剂一致,则检定合格,否则为不合格。

1.2.3 试剂盒灵敏度检测

用 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 阴性的血样分别稀释 3 种国家标准品。HBV DNA 测定浓度分别为 5、10、50 U/mL;HCV RNA 测定浓度分别为 5、10、50、100 U/mL;HIV RNA 测定浓度分别为 10、50、100、250 U/mL。分别采用 3 个批次的试剂(S20140901、S20140902、S20140903),每批试剂每个稀释度标本平行测定 54 次,因此每个稀释度测定标本总数为 162 次。

1.2.4 试剂盒特异性检测

在 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 阴性的正常人标本中分别加入下列病原体:腺病毒、人巨细胞病毒、EB 病毒、带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒 I 型、单纯疱疹病毒 II 型、白血病病毒 I 型、白血病病毒 II 型、流感病毒、甲肝病毒、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌,另外分别在这 12 组待验证病原体中加入 1×LOD HBV DNA、1×LOD HCV RNA 和 1×LOD HIV RNA 阳性标本,分别用 3 个批次的试剂(S20140901、S20140902、S20140903)进行试剂特异性检测。

1.2.5 试剂盒稳定性检测

考察试剂在储存条件下长期储存(>1 年)的稳定性。采用以上 3 个批次的试剂,测试结果进行统计分析以确立本试剂的储存时间。每批试剂第 0 天性测试以参考品为标准(表 1),按照说明进行操作,检测参考品均符合标准要求时,进行稳定性测试。稳定性测定以参考品为标准,按照说明进行操作。当某个温度下某个时间点的检测结果没有达到参考品的标准要求时,则可以认为此时试剂的检测性能已经不符合要求,此条件下的试剂有效期应定在此时间点之前。

表 1 参考品标准

Table 1 Standards for reference reagents

参考品名称	标准要求
阴性参考品	
N1~N3	HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 检测均阴性
阳性参考品	
P1、P2	HBV DNA 阳性/HCV RNA 阴性/HIV RNA 阴性
P3、P4	HBV DNA 阴性/HCV RNA 阳性/HIV RNA 阴性
P5、P6	HBV DNA 阴性/HCV RNA 阴性/HIV RNA 阳性
灵敏度参考品	
BS ₀	稀释至 BS ₁ 、BS ₂ 、BS ₃ , 至少 BS ₁ 、BS ₂ 为 HBV DNA 阳性
CS ₀	稀释至 CS ₁ 、CS ₂ 、CS ₃ , 至少 CS ₁ 、CS ₂ 为 HCV RNA 阳性
IS ₀	稀释至 IS ₁ 、IS ₂ 、IS ₃ , 至少 IS ₁ 、IS ₂ 为 HIV RNA 阳性

1.2.6 试剂盒临床验证实验

共收集 10 422 例样本,先将 8 个样本进行等量混合后进行检测,若检测结果呈反应性,则将该组各个样本分拆后进行单样本复检。实验结果与使用国家药监

局批准的商业血液筛查试剂的检测结果进行比对。

1.3 统计学方法

统计学分析采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组数据比较采用独立样本 t 检验, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 试剂盒制备结果

共制备了 3 个批次的试剂盒,批号分别为 S20140901、S20140902 和 S20140903,经检定合格,可进行后续实验。

2.2 试剂盒灵敏度检测结果

在高浓度的另外两种病毒存在的情况下,分别评估 HBV、HCV 和 HIV 引物的性能效率和化学发光检测极限。根据结果,3 种病毒在不同标准品浓度下对应阳性率有显著性差异, P 值分别为 0.03、0.01 和 0.01,可推算出 HBV、HCV 和 HIV 的灵敏度可分别达到 2.0、3.7 和 166.6 U/mL(表 2)。

表 2 HBV、HCV 和 HIV 灵敏度检测

Table 2 Sensitivity test of HBV, HCV and HIV

样本	浓度(U/mL)	测定标本数	阳性标本数	阳性率(%)	可信限均值(95%CI)	灵敏度(U/mL)
HBV	50	162	162	100.00		
	10	162	161	99.38	8.7(5.414~10.638)	2.0
	5	162	150	92.59		
HCV	100	162	162	100.00		
	50	162	162	100.00	9.2(8.621~9.907)	3.7
	10	162	161	99.38		
HIV	5	162	112	69.14		
	250	162	162	100.00		
	100	162	162	100.00		
	50	162	161	99.38	42.3(37.542~50.899)	166.6
	10	162	92	56.79		

2.3 试剂盒特异性检测结果

只含有可能产生交叉干扰的 10 种病毒和 2 种细菌病原体的标本,其 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 测定结果均为阴性,3 个批次试剂盒检测结果无明显差异,特异性良好。在测定的 10 种干扰病毒和 2 种干扰细菌标本中分别加入 1×LOD HBV DNA、1×LOD HCV RNA、1×LOD HIV RNA 阳性标本,则相应含 HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 的标本测定结果均为阳性,且 3 个批次试剂盒结果一致。因此表明,本次选择用于测定的病毒和细菌对检测

HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA 无干扰。

2.4 试剂盒稳定性检测结果

成品试剂储存条件下 1~12 个月检测参考品,各项指标均能符合参考品性能指标,其性能稳定。在 14 个月,虽然阴性参考品符合性能指标,但灵敏度检测结果不符合要求,说明此时成品试剂性能已有所下降,因此整套试剂的有效期约为 12 个月(表 3)。

2.5 献血者标本的检测结果

本研究考核试剂检测 EIA 合格的临床用血标本共 10 422 例,筛查出 HBV DNA 核酸阳性标本

表 3 S20140901、S20140902 和 S20140903 在第 0、6、12、14 个月稳定性检测结果

Table 3 Results of stability test for S20140901, S20140902 and S20140903 at the 0th, 6th, 12th and 14th month

编号	第 0 个月检测结果			第 6 个月检测结果			第 12 个月检测结果			第 14 个月检测结果		
	HBV	HCV	HIV	HBV	HCV	HIV	HBV	HCV	HIV	HBV	HCV	HIV
N1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
P2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
P3	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
P4	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
P5	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
P6	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
BS ₁	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BS ₂	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
BS ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS ₁	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
CS ₂	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
CS ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IS ₁	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
IS ₂	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
IS ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

N1~N3 为阴性参考品, P1~P6 为阳性参考品, BS₁~IS₃ 为灵敏度参考品。

12 例, HCV RNA 标本 2 例, 未检测出 HIV RNA 阳性标本, 结果与国内外商业血液筛查试剂相符, 与国内外商业血液筛查试剂的检出率相比差异无统计学意义 ($P=0.832$)。

3 讨论

乙肝、丙肝和艾滋已成为严重的公共卫生和社会问题^[5-7]。HBsAg、抗 HCV 和抗 HIV 的 EIA 检测是用于血液筛查的常规方法, 由于受免疫学诊断方法的灵敏度及方法学本身的限制, 造成 EIA 方法存在一个较长的“窗口期”, 如 HBsAg、抗 HCV、抗 HIV 的“窗口期”平均为 56、72、22 d^[8-9], 即使使用灵敏度显著提高的第 4 代 EIA 血液筛查试剂, 依然不能杜绝病毒感染血样的漏检。因此研制灵敏度更高的试剂盒, 及早发现尚处在“窗口期”的感染者, 对于预防和控制病毒性输血传染病的发生以及疾病的救治意义重大。EIA 检测会受到血清学转换因素的制约, 而 NAT 技术是一种直接检测病原体抗原的分子生物学技术, 其灵敏度和特异性均较高, 能够显著缩短病原体检出的窗口期。近 5 年来, 随着 NAT 技术在血液筛查方面的广泛应用, 核酸检测 HBV、HCV、HIV 病毒的窗口期分别提前到 9、25、14 d^[5], 可将献血员传播以上病毒性疾病的概率分别降低 42%、72% 和 50%^[10], 在降低输血传播病毒风险方面取得良好效果。

本研究试剂盒具有以下技术特点: ①磁珠法进行病毒核酸提取: 磁珠法是一种较先进的核酸提取方法, 可对标本中的病毒核酸进行富集, 不仅可获得纯度高的检测标本, 还可以提高检测灵敏度; 本研究所用标本量的下限为 50 μ L, 在检测中选取 100 μ L 体积做为检测样品使用量, 可节约检测标本的用量。②多重 PCR 技术: 可同时对 3 种病毒进行 PCR 扩增, HCV RNA、HIV RNA 先在反转录酶作用下反转录成 cDNA, 然后 HCV cDNA、HIV cDNA 和 HBV DNA 又在 Taq DNA 聚合酶的作用下扩增其核酸保守的区域; 通过掺入 Biotin-11-dUTP, 使扩增产物中带上生物素标记, 用于后续的探针杂交。③化学发光 (chemiluminescence, CL) 技术: 化学发光与 EIA 法相比, 是异相免疫分析, 抗原抗体能够高效结合, 没有传统方法中 HOOK 效应引起的假阴性、非特异反应、交叉污染引起的假阳性等缺点, 同时它结果稳定、精密度高、反应体系可控^[11], 化学发光物质与大分子的结合不会减小所产生的光强度, 从而增加了灵敏度^[12]。本研究中带有生物素标记的多重 PCR 产物与修饰在复合磁性纳米颗粒上的特异性探针杂交后, 在外磁场下分离除去非特异性吸附片段, 再与修饰有亲和素的化学发光中心结合, 洗涤后向微孔内加入发光底物, 化学发光仪通过收集碱性磷酸酶催化发光底物的发光值, 从而判断阴阳性结果。此外, 试剂盒按照美国 NCCL 及国家核酸检测

试剂的要求,使用了 ROCHE 热敏尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UNG),使用量经过测试,它既可以有效去除经放大产生的 U-DNA,又可以经加热灭活;即可有效控制 PCR 后污染,又保证了试剂的特异性及敏感度,具有强大的抗干扰能力。而扩增靶序列选自病毒基因组的高保守区域,也提高了检测的灵敏度及特异性。

本研究采用与目前国内外 HBV、HCV、HIV 体外核酸诊断试剂不同的技术路线,将化学发光技术与 PCR 等技术联合使用,使前者的高灵敏度与后者的高特异性相结合,在建立 PCR-化学发光方法的基础上,研发具有自主知识产权的新型 HBV、HCV、HIV 快速血液筛查试剂盒。结果表明能够分别检测出低至 2.0 和 3.7 U/mL 的 HBV 和 HCV 病毒,与目前国外基于免疫荧光扩增的方法相比,其检测精度已经相当于、甚至优于进口试剂的技术指标(罗氏公司 Cobas V2.0 试剂对 HBV、HCV、HIV 检测灵敏度分别为 2.3、6.8 和 50.3 U/mL)。其次通过加入可能产生干扰的 10 种病毒和 2 种细菌评价了试剂盒的特异性。当只有干扰病毒和细菌存在时,测定结果均为阴性;当分别加入 $1\times$ LOD HBV DNA、 $1\times$ LOD HCV RNA 和 $1\times$ LOD HIV RNA 时,则测定结果均为阳性,且 3 个批次试剂盒结果一致。该结果提示,本次选择用于测定的其他病毒和细菌对试剂盒检测无干扰。在进行试剂盒稳定性评价时,以参考品为标准,到第 12 个月时各项指标均能符合参考品性能指标,其性能稳定。然而在第 14 个月,虽然阴性参考品符合性能指标,但灵敏度参考品检测结果不符合要求,说明此时成品试剂盒性能已有所下降,因此整套试剂盒的有效期约为 12 个月。将 10 422 个样本进行混合提取、扩增、电泳及化学发光检测,结果显示无论是 HBV 阳性或 HCV 阳性,其化学发光值都显著高于阴性对照及空白对照,与阳性对照无显著性差异,共发现 HBV 阳性 12 例、HCV 阳性 2 例,与国家批准的血液筛查核酸试剂平行检测结果一致。

目前国内外血液筛查试剂主要有实时荧光 PCR 技术和 TMA 的 NAT 检测试剂,尚没有基于 PCR-化学发光方法用于同时检测 HBV、HCV、HIV 的 NAT 体外诊断试剂盒,本研究对所研制的基于 PCR-化学发光方法的 HBV/HCV/HIV 检测试剂盒进行了初步评价。该试剂盒具有高灵敏度、高特异

性、快速、低成本和便于实现自动化的特点,可用于健康人群和患者 HBV/HCV/HIV 的检测,具有潜在的社会和经济效益。

[参考文献]

- [1] Yang H, Liang W, He N, et al. Chemiluminescent laOction of pathogen infections [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(1):774-781
- [2] Li Z, Yang H, He N, et al. Solid-phase hybridization efficiency improvement on the magnetic nanoparticle surface by using dextran as molecular arms [J]. J Biomed Nanotechnol, 2013, 9(11):1945-1949
- [3] Ali Z, Liang WB, Jin L, et al. Development of magnetic nanoparticles based nucleic acid extraction method and application in hepatitis C virus chemiluminescent detection [J]. Sci Adv Mater, 2015, 7(7):1233-1240
- [4] Liang W, Li Z, Ali Z, et al. Establishment of a new method for parallel detection of HBV-HCV-HIV based on PCR-chemiluminescent analysis [J]. Vox Sang, 2016, 94(1):59
- [5] 李 媛, 梁 祁, 戴启刚, 等. 江苏省乙型肝炎病例实验室诊断符合率调查分析 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(2): 270-274.
- [6] 陈红波, 徐 银, 黄 鹏, 等. 某地既往有偿献血人员 HCV 感染情况及危险因素分析 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(5):751-756
- [7] 徐晓琴, 郭宏雄, 胡海洋, 等. 江苏省连续 3 年 HIV-1 耐药警戒线及流行亚型的调查研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2015, 35(9):1329-1332
- [8] Busch MP. Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? [J]. Transfus Clin Biol, 2004, 11(1):26-32
- [9] Roth WK, Buhr S, Drosten C, et al. NAT and viral safety in blood transfusion [J]. Vox Sang, 2000, 78(Suppl 2): 257-259
- [10] 陈泽惠, 陈嘉昌, 丁 渭, 等. 血源性乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和艾滋病病毒核酸筛查系统的建立与应用 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(2):347-352
- [11] 朱为刚, 曾劲峰, 李 彤, 等. 一种化学发光检测试剂在血液筛查中的应用评估 [J]. 中国输血杂志, 2016, 29(6):581-583
- [12] 李 璐, 邢文革. 化学发光技术在 HCV 和 HIV 检测中的应用 [J]. 中国艾滋病性病, 2011, 17(3):382-385

[收稿日期] 2016-12-27