

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.01.001

人 CYP2C19 基因分型检测试剂性能验证*

吕 园¹, 朱莉颖², 张 健¹, 李 萍¹, 邬 兰¹, 张秀梅¹, 王海鹏¹, 俞 杨^{1△}

1. 江苏省南京市第一医院/南京医科大学附属南京医院核医学科实验诊断部, 江苏南京 210006;

2. 江苏省人民医院/南京医科大学第一附属医院血液科, 江苏南京 210000

摘要:目的 通过设计合理的实验对人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒[荧光聚合酶链反应(PCR)法]进行性能验证, 证实其检测结果的可靠性。**方法** 参照 CNAS-GL039:2019《分子诊断检验程序性能验证指南》要求, 选择符合实验条件的样本, 严格按照 CYP2C19 基因分型检测试剂盒标准操作流程进行基因型别的检测。通过数据分析和统计, 对试剂盒性能进行多方面评估, 包括方法符合率、检出限、交叉反应以及抗干扰能力。**结果** 15 例临床样本(10 例突变型+5 例野生型)试剂盒检测结果与金标准测序结果完全一致, 方法符合率为 100%; 经梯度稀释验证, 试剂盒最低检出限为 10 ng/ μ L; CYP2C19 1*/1* 型(c. 681G 和 c. 636G)临床样本中, 加入 CYP2C19 *17 等位基因(c. -806C>T)和同源基因 CYP2C9(c. 1075A>C)突变型质粒, 检测结果仍为 1*/1* 型, 满足交叉反应验证要求; 干扰物质(血红蛋白 20.0 g/L, 甘油三酯 11.0 mmol/L, 总胆红素 60.0 μ mol/L)对试剂盒检测结果无影响, 抗干扰能力合格。**结论** 人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)性能评估合格。

关键词: CYP2C19 基因; 基因分型; 性能验证; 指南

中图法分类号: R446

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)01-0001-04

Performance verification of human CYP2C19 genotyping test reagent*

LYU Yuan¹, ZHU Liying², ZHANG Jian¹, LI Ping¹, WU Lan¹,
ZHANG Xiumei¹, WANG Haipeng¹, YU Yang^{1△}

1. Section of Laboratory Diagnosis, Department of Nuclear Medicine, Nanjing Municipal First Hospital/ Affiliated Nanjing Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210006, China; 2. Department of Hematology, Jiangsu Provincial People's Hospital/ First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210000, China

Abstract: Objective To verify the performance of human CYP2C19 genotyping test reagent kit (fluorescence PCR method) by reasonably designed the experiments to confirm the reliability of the detection results. **Methods** Referring to the requirement of 2019 version of Guideline for Performance Verification of Molecular Diagnostic Test Procedures in CNAS-GL039, the samples meeting the experimental conditions were selected to conduct the genotype detection strictly according to the operation process of CYP2C19 genotyping test reagent kit. The performance of the detection kit conducted a multi-faceted assessment, including the coincidence rate, detection limit, cross reaction and anti-interference ability by data analysis and statistics. **Results** The kit test results of 15 clinical samples (10 cases of mutant type and 5 cases of wild type) were consistent with the gold standard sequencing results. The method coincidence rate was 100%. The minimum detection limit of the kit verified by gradient dilution was 10 ng/ μ L. In 1*/1* (c. 681G and c. 636G) clinical samples of CYP2C19, adding the mutant plasmids of CYP2C19 *17 allele (c. -806C>T) and homologous gene CYP2C9 (c. 1075A>C). The results of CYP2C19 genotyping were still 1*/1*, which met the requirement of the cross reaction verification. Three interfering substances (heme 20.0 g/L, triglyceride 11.0 mmol/L, total bilirubin 60.0 μ mol/L) had no influence on the test results. The anti-interference ability was qualified. **Conclusion** The performance of human CYP2C19 genotyping test reagent kit (fluorescence PCR method) is verified to be qualified.

Key words: CYP2C19 gene; genotyping; performance verification; guideline

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(11805104)。

作者简介: 吕园, 女, 副主任技师, 主要从事分子诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: bohemia000@163.com。

在临床检验过程中,从质量管理的角度考虑,任何一种全新的用于常规检验的检测系统、试剂或方法学,在其投入临床使用前,均需进行相应的性能验证^[1]。性能验证能够提高实验室对检测系统、试剂和方法学相关性能指标的认识和理解,对实验室技术质量管理和控制水平的提高具有重要作用^[2-3]。本研究参照中国合格评定国家认可委员会(CNAS)2019 年 2 月 15 日发布并实施的 CNAS-GL039:2019《分子诊断检验程序性能验证指南》(以下简称 2019 版指南)^[4],对人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒[荧光聚合酶链反应(PCR)法]进行方法符合率、检出限、交叉反应以及抗干扰能力 4 个方面的性能验证^[5]。

1 材料与方法

1.1 材料 方法符合率:15 例临床样本(10 例突变型+5 例野生型)静脉血;检出限:1 例杂合突变型(*2/*3 型)临床样本基因组 DNA;交叉反应:5 例野生型(*1/*1 型)临床样本静脉血;抗干扰能力:2 例突变型(*2/*3 型和 *1/*2 型)临床样本静脉血。以上基因型均已通过 Sanger 测序证实。

1.2 仪器与试剂 天隆 NP968 自动化核酸提取仪(西安天隆科技有限公司);超微量紫外-可见光分光光度计 NanoDrop One(赛默飞世尔科技中国有限公司);SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪(上海宏石医疗科技有限公司);全自动血液基因组 DNA 提取试剂(西安天隆科技有限公司);人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法,苏州旷远生物分子技术有限公司)。

1.3 静脉血基因组 DNA 提取 采用天隆 NP968 自动化核酸提取仪进行静脉血基因组 DNA 提取。所提取的基因组 DNA 经超微量紫外-可见光分光光度计 NanoDrop One 测定,水平为 10~100 ng/ μ L,纯度 $A_{260/280}$ 值为 1.8~2.0。

1.4 荧光 PCR 检测 按照人 CYP2C19 基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)说明书,进行 CYP2C19 基因分型检测(*2 和 *3 等位基因,c.681G>A 和 c.636G>A),同时检测阴性和阳性对照(试剂盒自带),分为 *2G、*2A、*3G 和 *3A 4 个反应体系。用 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪及相应配套软件进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应条件:37 °C 2 min(去污染);95 °C 3 min(预变性);95 °C 30 s,56 °C 30 s,65 °C 45 s,10 个扩增循环;95 °C 30 s,56 °C 30 s*(信号采集点),65 °C 45 s,30 个扩增循环,设置检测信号 Ct(FAM)/内参信号 Ct(ROX)双通道采集荧光信号;25 °C 1 min,程序结束,机器冷却至室温。

1.5 结果判读 在 Ct(ROX)值 ≤ 20 ,且扩增曲线有明显指数增长期的情况下,分别计算样本 Ct(FAM)值与 Ct(ROX)值的差值,参照说明书判断样本

CYP2C19 基因型。常见 6 种基因型结果:CYP2C19 *1/*1(636 GG;681 GG)、CYP2C19 *1/*2(636 GG;681 GA)、CYP2C19 *1/*3(636 GA;681 GG)、CYP2C19 *2/*2(636 GG;681 AA)、CYP2C19 *2/*3(636 GA;681 GA)、CYP2C19 *3/*3(636 AA;681 GG)^[6]。

1.6 性能验证

1.6.1 方法符合率 按照样本检测程序,采用参比方法(金标准 Sanger 测序法)和候选方法(荧光 PCR 法)平行检测 15 例临床样本(突变型 10 例,野生型 5 例)^[7]静脉血,其中 6 例为正常样本稀释 10 倍获得的弱阳性样本(基因组 DNA 水平约为 20 ng/ μ L)。Sanger 测序工作委托华大基因科技有限公司完成。

1.6.2 检出限 选取 1 例杂合突变型(*2/*3 型)临床样本基因组 DNA。测定其水平为 80 ng/ μ L,纯度 $A_{260/280} = 1.94$,将上述基因组 DNA 梯度稀释 5 个水平范围,分别为 80、40、20、10、5 ng/ μ L。每个水平稀释后的基因组 DNA 重复检测 5 次。

1.6.3 交叉反应 选取 5 例野生型(*1/*1 型)临床样本静脉血,分别加入 CYP2C19 *17 等位基因(c.-806C>T)和同源基因 CYP2C9(c.1075A>C)突变型质粒,分别重复检测 3 次。

1.6.4 抗干扰能力 选取 2 例突变型(*2/*3 型和 *1/*2 型)临床样本静脉血,分别稀释 10 倍获得弱阳性样本(基因组 DNA 水平约为 20 ng/ μ L)。分别加入终水平为血红蛋白 = 20.0 g/L,胆红素 = 60.0 μ mol/L,甘油三酯 = 11.0 mmol/L(厂商声明的最高抗干扰水平)的干扰物质,分别重复检测 3 次。

2 结果

2.1 方法符合率 15 例临床样本检测结果见表 1,参比方法(金标准 Sanger 测序法)和候选方法(荧光 PCR 法)检测的符合率为 100%。

2.2 检出限 杂合突变型(*2/*3 型)临床样本基因组 DNA 经梯度稀释后,其中 80、40、20、10 ng/ μ L 4 个水平 5 次检测结果基因型均为 *2/*3 型,而 5 ng/ μ L 水平 4 次检测结果基因型为 *2/*3 型,1 次检测无结果。根据试剂盒说明书要求,判定检出限为 10 ng/ μ L。

2.3 交叉反应 5 例野生型(*1/*1 型)临床样本静脉血,分别加入 CYP2C19 *17 等位基因(c.-806C>T)和同源基因 CYP2C9(c.1075A>C)突变型质粒,CYP2C19 基因分型检测结果仍为 *1/*1 型,证实交叉反应验证合格。

2.4 抗干扰能力 2 例突变型(*2/*3 型和 *1/*2 型)临床样本静脉血,在 3 种干扰物质(血红蛋白/胆红素/甘油三酯)作用下的基因分型检测结果均与对照一致,故试剂盒抗干扰能力合格。

表 1 方法符合率结果比对

样品编号	Sanger 测序结果	荧光 PCR 结果	结论
1	* 1/ * 2	* 1/ * 2	一致
2	* 1/ * 1	* 1/ * 1	一致
3	* 1/ * 3	* 1/ * 3	一致
4	* 2/ * 2	* 2/ * 2	一致
5	* 3/ * 3	* 3/ * 3	一致
6	* 2/ * 3	* 2/ * 3	一致
7	* 1/ * 1	* 1/ * 1	一致
8	* 2/ * 2	* 2/ * 2	一致
9	* 1/ * 3	* 1/ * 3	一致
10	* 1/ * 1	* 1/ * 1	一致
11	* 1/ * 3	* 1/ * 3	一致
12	* 1/ * 1	* 1/ * 1	一致
13	* 1/ * 1	* 1/ * 1	一致
14	* 1/ * 2	* 1/ * 2	一致
15	* 2/ * 3	* 2/ * 3	一致

注:编号为 1、2、3、4、5、6 号样本为正常样本稀释 10 倍获得的弱阳性样本。

3 讨 论

2019 年 2 月 15 日 CNAS 发布并实施了 2019 版指南^[5],并以此作为分子诊断实验室性能验证的参考文件。此版指南中明确了分子诊断定性检测项目性能验证的指标宜包括“方法符合率、检出限、交叉反应和抗干扰能力”。这对 2018 版指南中“准确度、测定下限、特异性和抗干扰能力”^[8]4 个方面性能验证指标进行了明确定义和指导。

关于性能验证样本容量,一直是实验室工作人员最难把握的问题。样本容量又称“样本数”。样本容量是指一个总体的必要抽样的数目^[9]。在进行抽样调查时,抽样误差的大小直接影响抽取样本对观察总体的代表性和研究结果的可靠性,而足够的样本单位数目是保证抽样误差不会超过某一指定范围的一个重要因素^[10]。2019 版指南对定性项目性能验证明确了样本容量的具体要求,为临床提供了参考标准。例如:方法符合率要求,选取阴性样本至少 5 例、阳性样本(宜包含弱阳性的样本)一般不少于 10 例。在基因突变检测过程中,通常将野生型样本作为阴性样本,突变型样本作为阳性样本^[11],本研究共选取 15 例样本,满足 2019 版指南要求。检出限要求,使用定值标准物质的样本梯度稀释至厂家声明的检出限水平,可重复测定 5 次或不同批次内对该水平样本进行 20 次重复测定(如测定 5 d,每天测定 4 例样本)。本研究选取单日重复测定 5 次的方案,成功验证厂家声明的检出限水平(10 ng/μL)。交叉反应和抗干扰能力均要求至少重复检测 3 次以上。

2019 版指南明确了应验证与检测对象可能存在交叉反应的核酸物质对检测结果的影响^[12]。对于报告具体基因型的方法,应在待测核酸水平验证其他基因型对待测核酸测定的影响。本次性能验证试验选取 5 例 CYP2C19 * 1/ * 1 型临床样本,分别加入 CYP2C19 * 17 等位基因(c. -806C>T)和 CYP2C9 (c. 1075A>C)两种突变型质粒。CYP2C19 * 17 代表 c. -806 位点,其突变型质粒对本试剂盒检测的 c. 636 和 c. 681 位点结果无影响;而 CYP2C9 为 CYP2C19 的同源基因,其 c. 1075 位点突变型质粒对本试剂盒检测结果亦无影响。

在验证试剂盒“检出限”的过程中,本研究将原水平为 80 ng/μL 基因组 DNA 梯度稀释为 5 个水平范围,以求寻找试剂盒最低检测下限^[13]。当梯度稀释至 10 ng/μL(试剂厂家声称的最低测定下限)时,5 次检测结果均与未稀释的样品一致,说明本研究已成功复现了生产厂家所宣称的最低测定下限。当梯度稀释至 5 ng/μL 时,其中只有 4 次结果与未稀释的样品一致,且内参扩增曲线的 Ct(ROX)值明显增加,接近临界 Ct 值(20)。第 5 次结果内参 Ct(ROX)值>20,不符合标准操作流程要求,无法判定结果。可能是由于稀释样本中基因组 DNA 模板水平过低,无法与试剂中引物有效结合^[14]。本试剂盒无法保证在 5 ng/μL 水平 100%检出靶核酸,因此判定试剂盒检出限为 10 ng/μL。

在验证试剂盒“抗干扰能力”的过程中,本研究选取血红素 20.0 g/L,甘油三酯 11.0 mmol/L,总胆红素 60.0 μmol/L 作为 3 种干扰物质,分别验证溶血、脂血和黄疸 3 种静脉血样本状态对试剂盒检测结果的影响,相应水平为试剂厂商声称的最高抗干扰水平。结果证实 3 种干扰物质对检测结果无影响。但在实际临床应用过程中,因大多数患者来自心血管内科,相关药物是否会对检测结果产生影响,值得进一步探讨。

本次性能验证过程严格按照 2019 版指南对分子诊断基因分型检测的具体要求,实验方案简单明了,可供相关实验室参考。

参考文献

[1] HALLING K C, SCHRIJVER I, PERSONS D L[J]. Arch Pathol Lab Med, 2012, 136(1): 11-13.
 [2] 林松峰. ISO 15189 在核酸检测性能验证方法中的应用价值[J]. 中国药物经济学, 2017, 12(2): 122-124.
 [3] NICHOLS J H. Verification of method performance for clinical laboratories[J]. Adv Clin Chem, 2009, 47: 121-137.
 [4] 中国合格评定国家认可委员会. 分子诊断检验程序性能验证指南: CNAS-GL039: 2019[S]. 北京: 中国计量出版社, 2019. (下转第 8 页)

年度仅 3 年,故对该结论不敢断言,需进一步持续监测手足口病病例数据以期得到更准确的结论。

综上所述,手足口病发病病例数多,主要感染年幼儿童,男性感染多于女性,散居和幼托儿童占发病病例的大多数,感染的优势病原体出现转换,故对手足口病的持续监测对防控政策的制订和疾病的防治具有重大意义。

参考文献

- [1] WANG Y, FENG Z, YANG Y, et al. Hand, foot, and mouth disease in China: patterns of spread and transmissibility [J]. *Epidemiology*, 2011, 22(6): 781-792.
- [2] MIRAND A, HENQUELL C, ARCHIMBAUD C, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackie virus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(5): E110-E118.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notes from the field: severe hand, foot, and mouth disease associated with coxsackievirus A6: Alabama, Connecticut, California, and Nevada, November 2011 to February 2012 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2012, 61(12): 213-214.
- [4] 兰莹莹, 邱卫华, 曹新梅, 等. 2015—2018 年上海某综合医院手足口病流行病学特征分析[J]. *实用临床医药杂志*, 2019, 23(11): 116-118.
- [5] 孙立波, 朱友荣, 金丹群, 等. 华东地区严重手足口病临床特点的多中心调查[J]. *中国小儿急救医学*, 2018, 25(4): 282-287.
- [6] 陈霞. 上海地区 2015—2017 年手足口病流行特征分析[J]. *饮食保健*, 2017, 4(28): 345.
- [7] 张英杰, 王超, 曹凯, 等. 中国大陆 2008—2010 年手足口病流行特征聚类分析[J]. *中国公共卫生*, 2015, 31(5):

541-544.

- [8] 孙立波, 朱友荣, 金丹群, 等. 重症手足口病治疗的多中心临床流行病学调查[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2018, 33(6): 447-452.
- [9] 蔡明毅, 赵文良, 沈琦, 等. 上海市某医院 2011—2014 年手足口病病原谱及流行特征分析[J]. *国际病毒学杂志*, 2015, 22(6): 376-379.
- [10] 张晓玲, 俞慧菊, 刘祎, 等. 2011—2016 年上海地区手足口病病原谱及柯萨奇病毒 A 组 6 型不同基因型感染细胞的差异研究[J]. *微生物与感染*, 2018, 13(2): 84-89.
- [11] 黄威, 陈雨, 罗恺铭, 等. 湖南省 2008—2017 年手足口病病原学及流行特征分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2019, 33(1): 16-20.
- [12] 周艳玲, 张月华, 郑云丽, 等. 手足口病和疱疹性咽峡炎流行病学和病原学特征分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19(3): 274-278.
- [13] BLOMQUIST S, KLEMOLA P, KAIJAHINEN S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland [J]. *J Clin Virol*, 2010, 48(1): 49-54.
- [14] WU Y, YEO A, PHOON M C, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains [J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(12): e1076-e1081.
- [15] 葛艳玲, 郑雅旭, 潘浩, 等. 2010 至 2014 年上海地区儿童手足口病的流行病学监测[J]. *中华儿科杂志*, 2015, 53(9): 676-683.
- [16] PODIN Y, GIAS EL, ONG F, et al. Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia: lessons from the first 7 years [J]. *BMC Public Health*, 2006, 6: 180.

(收稿日期: 2022-02-22 修回日期: 2022-09-22)

(上接第 3 页)

- [5] 张云丽, 王鑫, 邵玲, 等. 1 种新型冠状病毒核酸检测试剂的性能验证[J]. *临床检验杂志*, 2020, 38(11): 827-830.
- [6] 吕园, 俞杨, 张秀梅, 等. 南京及周边地区冠心病患者 CYP2C19 基因多态性分析[J]. *标记免疫分析与临床*, 2016, 23(10): 1139-1143.
- [7] 陈非铭, 顾鸣敏, 孙顺昌. 联合应用 PCR 扩增和 Sanger 测序对脊髓小脑型共济失调进行基因诊断的临床意义[J]. *检验医学*, 2019, 34(6): 534-538.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. 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: CNAS-CL02-A009[S]. 北京: 中国计量出版社, 2018.
- [9] SERDAR C C, CIHAN M, YUCEL D, et al. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies [J]. *Biochem Med (Zagreb)*, 2021, 31(1): 010502.

- [10] 时涛. 抽样调查中样本量的科学确定[J]. *泰山医学院学报*, 2010, 31(7): 531-533.
- [11] 鲍芸, 肖艳群, 蒋玲丽, 等. 上海地区遗传性耳聋基因检测室间质量评价[J]. *检验医学*, 2019, 34(3): 267-270.
- [12] 李少波, 汪洪富, 吴云凤, 等. 依据 CNAS-GL039 在 Bio-rad CFX96 荧光定量 PCR 仪进行 SARS-CoV-2 核酸检测的性能验证[J]. *标记免疫分析与临床*, 2021, 28(5): 876-880.
- [13] 董江锴, 黄青红, 范娟, 等. 新型冠状病毒 2019-nCoV 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)最低检测限的确定[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(4): 410-414.
- [14] 王玉倩, 薛秀花. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. *生物学通报*, 2016, 51(2): 1-6.

(收稿日期: 2022-02-20 修回日期: 2022-09-10)