

doi:10.11816/cn.ni.2019-181516



• 论 著 •

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

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 750004)

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 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪, 按 CNAS-CL02-A009 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 $3/5TEa$, 低浓度和高浓度样本的中间精密度标准差值均小于 $4/5TEa$; 正确度: 2017 年卫计委 10 份室间质评样本的检测结果均在靶值允许的上下限范围之内, 且与靶值的偏倚均 $\leq \pm 7.5\%$, 正确率高达 100%; 线性及可报告范围: 新型试剂在 $50 \text{ IU/ml} \sim 1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$ 范围内具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $y=0.988x+0.1891$, $R^2=0.9996 > 0.95$; 抗干扰能力: 2 g/dl 的血红蛋白、 28 mg/dl 的总胆红素、 3000 mg/dl 的甘油三酯、 40 g/L 的总 IgG 对检测结果没有影响。结论 新型试剂具有重复性好、稳定性高、结果准确可靠、线性范围宽、抗干扰能力强等优势, 其检测性能满足 ISO15189 要求, 可有效用于临床样本检测并适合于在各医学实验室推广使用。

关键词: 新型试剂; 丙型肝炎病毒; 核酸定量; 性能验证

中图分类号: R512.6 文献标识码: A 文章编号: 1005-4529(2019)06-0821-06

Verification of detection performance of novel hepatitis C virus nucleic acid quantitative reagent

HE Xue-hu, GUO Ya-qi, DONG Jie, LIANG Xiao-yan, ZHAO Qian-ying,

SHI Zhi-yun, ZHANG Yu-ying, ZHAO Yue, ZHAO Zhi-jun

(General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To verify the detection performance of novel hepatitis C virus nucleic acid quantitative reagent. **METHODS** The ABI 7500 fluorescence quantitative PCR instrument was used to verify the precision, accuracy, linear and reportable range as well as anti-interference ability according to the requirements of CNAS-CL02-A009. **RESULTS** As for the precision, the reproducibility precision of both low and high concentration samples were less than $3/5 TEa$, and the intermediate precision of both low and high concentration samples were less than $4/5 TEa$. For the accuracy, the results of 10 external quality assessment (EQA) samples were all within the range of the upper and lower limits of the target value, and its biases from target value were less than or equal to $\pm 7.5\%$, confirmed that the accuracy was up to 100%. For the linear and reportable range, the novel reagent had a good linear relationship within the range between 50 IU/ml and $1 \times 10^8 \text{ IU/ml}$, and the linear regression equation was $y=0.988x+0.1891$, $R^2=0.9996 > 0.95$. For anti-interference ability, 2 g/dl hemoglobin (HB), 28 mg/dl total bilirubin (TBIL), 3000 mg/dl triglycerides (TG) and 40 g/L total IgG had no effects on testing results. **CONCLUSION** With the tremendous advantages of repeatability, high stability, accurate and reliable testing results, wide linear range and strong anti-interference capability, the novel reagent's detection performance has met the demand of ISO15189, which could be effectively used in clinical sample testing and worthy to be promoted in medical laboratories.

Key words: Novel reagent; Hepatitis C virus; Nucleic acid quantification; Performance verification

丙型肝炎病毒(Hepatitis C Virus, HCV)基因

组为单正链 RNA, 感染人体后可引起丙型肝炎。不同种族、年龄、性别人群对 HCV 普遍易感。据 WHO 统计, 全球 HCV 感染率约为 3%, 估计 1.8

收稿日期: 2018-10-23; 修回日期: 2018-12-25

通信作者: 赵志军, E-mail: z15815z@163.com

亿人感染了 HCV, 每年新发 HCV 感染病例约 3.5 万例, 每年死于与 HCV 感染有关的病例约 35 万例^[1]。HCV 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^[2]。此外, 丙型肝炎慢性化率高, 一旦感染 HCV, 约 75%~85% 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^[3]。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-HCV 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-HCV 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]。HCV-RNA 是判断 HCV 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, HCV-RNA 定量检测也被誉为早期诊断丙型肝炎的金标准^[5]。基于此, HCV-RNA 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 HCV-RNA 定量试剂成为主流。根据 ISO15189 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, 以证实它具有预期水平。为了解新型试剂的实际检测性能, 本文依据 CNAS-CL02-A009 文件要求对其进行性能验证, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样本来源 宁夏医科大学总医院医学实验中心 PCR 实验室日常检测的 HCV-RNA 临床血浆样本, 实验室自制的 HCV-RNA 定量检测室内质控品和 2017 年全年卫计委室间质评样本。

1.2 仪器与试剂 医用冷藏箱(中科美菱, YC-300L), 医用低温箱(日本 Panasonic, MDF-U548D-C), 生物安全柜(新加坡艺思高科技有限公司, AS2-4S1), 微量移液器(德国 eppendorf), 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, VORTEX-5), 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司, MK200-4), 高速冷冻离心机(力康生物医疗科技控股有限公司, Neofuge1600R), 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI, ABI 7500)。丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂(PCR-荧光探针法)(湖南圣湘生物科技有限公司,

国械注准 20153400085)。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 从冰箱中取出试剂, 室温自然解冻, 充分混匀, 向 RNA 提取液 1 中加入 10 μ l HCV 内标, 充分混匀备用; 依次向 1.5 ml 无菌离心管中加入 600 μ l RNA 提取液 1 混合物、200 μ l 待测血浆和 100 μ l RNA 提取液 2, 涡旋震荡充分混匀, 室温静置裂解 30 min, 瞬时离心; 磁性分离 3 min, 缓慢吸弃溶液; 依次加入 600 μ l RNA 提取液 3 和 200 μ l RNA 提取液 4, 涡旋震荡充分混匀, 瞬时离心, 磁性分离 3 min, 从底部缓慢吸弃溶液; 瞬时离心, 磁性分离 3 min, 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。

1.3.2 试剂准备及加样 在试剂准备区按比例配置相应数量的 PCR-mix(每人份 49 μ l PCR 反应液和 1 μ l RT-PCR 增强剂), 转入标本制备区, 每管加入 50 μ l PCR-mix, 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 0.2 ml PCR 反应管中, 盖紧管盖。

1.3.3 RT-PCR 扩增 转移 PCR 反应管至扩增区 PCR 扩增仪上, 记录样本摆放顺序, 进行 RT-PCR 扩增。RT-PCR 扩增选 FAM 通道检测 HCV-RNA, VIC 通道检测 HCV 内标, 参比荧光选择 ROX, 设置 Sample Volume 为 50; 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 60 $^{\circ}$ C 30 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s(45 个循环, 60 $^{\circ}$ C 收集荧光); 25 $^{\circ}$ C 10 s。

1.3.4 结果判读 RT-PCR 反应结束后, 对 HCV 曲线和相应的 HCV 内标曲线分别进行分析。所有结果均在质控在控的情况下方可判读, 即阴性质控检测结果为阴性(FAM 通道无 Ct 值, VIC 通道检测为阳性且 Ct 值 \leq 38); 弱阳性和强阳性质控检测结果分别为弱阳性和强阳性, 且检测值的对数转换值均在各自靶值允许的范围之内; 四个标准品检测结果全为阳性, 且标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。若 50 IU/ml \leq 测定值 $\leq 1.0 \times 10^8$ IU/ml, 且扩增曲线呈 S 型, 则直接记录测定结果; 若测定值 $> 1.0 \times 10^8$ IU/ml, 则判读为 $> 1.0 \times 10^8$ IU/ml; 若 25 IU/ml \leq 测定值 < 50 IU/ml, 扩增曲线呈 S 型, 内标为阳性且 Ct < 38 , 可直接记录测定结果, 但说明病毒载量低; 若测定值 < 25 IU/ml, 内标为阳性且 Ct < 38 , 则判为 < 25 IU/ml, 若内标 Ct 值 > 38 或无数值, 则测定结果无效, 需重复检测。

1.3.5 精密度验证 同时检测 10^3 IU/ml 和 10^6 IU/ml 两个浓度水平的临床混合血浆, 每批每天重复测定 3 次, 连续测定 5 天^[6], 分别计算重复精密

度和中间精密度值,以能力验证/室间质评评价界限(靶值 ± 0.4 对数值)作为允许总误差(TEa),以重复精密度 $< 3/5$ TEa(TEa=0.4Log),中间精密度 $< 4/5$ TEa为判断标准^[7]。

1.3.6 正确度验证 检测 2017 年全年卫计委 10 份 HCV-RNA 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 $\pm 7.5\%$ ^[7]。

1.3.7 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 1×10^8 IU/ml,再用混合阴性血浆依次做 10 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 3 次取其均值,将实测值与理论值比较,偏倚应 $< 20\%$,以实测值为 x,理论值为 y 进行回归统计,计算 $y = ax + b$,斜率 a 值在 1 ± 0.5 范围内,相关系数 $R^2 \geq 0.95$ ^[8]。

1.3.8 抗干扰能力验证 将 HCV-RNA 浓度为

10^3 IU/ml 的临床阳性血浆样本混合后分成 5 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 2 g/dl 的血红蛋白、28 mg/dl 的总胆红素、3 000 mg/dl 的甘油三酯、40 g/L 的总 IgG 作为干扰组,各组重复检测 3 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 $\pm 0.4 \log$ 范围内。

2 结果

2.1 精密度 低浓度和高浓度两浓度水平的临床样本每天检测 3 次,连续检测 5 天的扩增曲线均呈典型、光滑的“S”型曲线,扩增效率高且重复性好,见图 1。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 0.0758 和 0.0383,均小于 $3/5$ TEa;同样,低浓度和高浓度样本连续检测 5 天的中间精密度标准差值分别为 0.0688 和 0.0647,也均小于 $4/5$ TEa,见表 1。

2.2 正确度 检测 2017 年卫计委 10 份室间质评

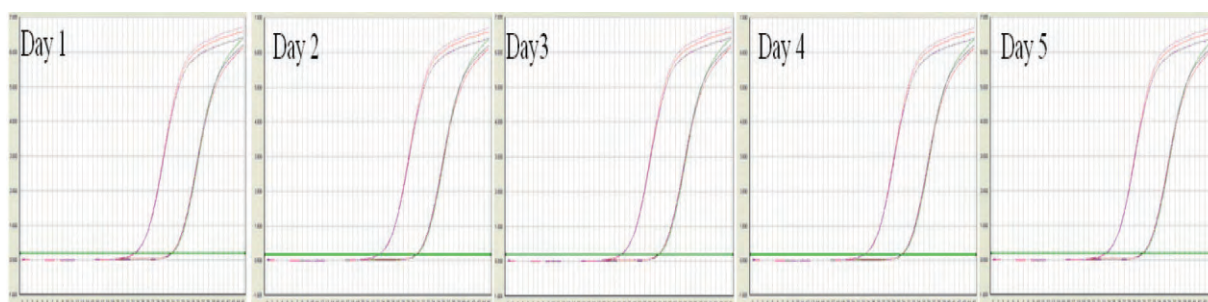


图 1 两个浓度水平精密度连续五天扩增曲线

Figure 1 Amplification curve of two levels of precision for five consecutive days

表 1 精密度验证结果

Table 1 Results of precision verification

精密度	样本	均值(\bar{x})	标准差(SD)	变异系数(CV,%)	判断指标
重复精密度	低浓度样本	3.71	0.0758	2.04	SD $< 0.24(3/5$ TEa)
	高浓度样本	5.86	0.0383	0.65	SD $< 0.24(3/5$ TEa)
中间精密度	低浓度样本	3.71	0.0688	1.85	SD $< 0.32(4/5$ TEa)
	高浓度样本	5.86	0.0647	1.10	SD $< 0.32(4/5$ TEa)

样本结果显示,各样本的检测结果均在靶值允许的上下限范围之内,且均接近于靶值,10 份样本的正确率达 100%,见表 2。

2.3 线性及可报告范围 将 1×10^8 IU/ml 的高浓度临床样本依次用阴性混合血浆做 10 梯度稀释后重复检测 3 次,扩增结果显示,各浓度稀释样本的扩增曲线呈典型的“S”且间隔均匀。将均值与理论值进行比较,并根据定量结果绘制线性回归方程为 $y = 0.988x + 0.1891$, $R^2 = 0.9996 > 0.95$,证实该试剂在 50 IU/ml $\sim 1 \times 10^8$ IU/ml 范围内具有良好的线性关系。由于验证的线性范围满足厂家提供的可报告范

围,所以无需进行扩展可报告范围验证,因此,验证的线性范围即可作为该试剂的可报告范围(50 IU/ml $\sim 1 \times 10^8$ IU/ml),见图 2、表 3、图 3。

2.4 抗干扰能力 正常组检测结果的对数转换值为 3.82,血红蛋白干扰组、总胆红素干扰组、甘油三酯干扰组、总 IgG 干扰组检测结果的对数转换值分别为 3.84、3.91、3.90、3.89,各干扰组的检测结果均在正常组 $\pm 0.40 \log$ 范围内。证实该新型试剂在 2 g/dl 的血红蛋白、28 mg/dl 的总胆红素、3 000 mg/dl 的甘油三酯、40 g/L 的总 IgG 干扰物质存在下对检测结果没有影响,见图 4 和表 4。

表 2 正确度验证结果

Table 2 Results of accuracy verification

样本编号	本室结果	结果对数	靶值	上下限	偏倚	结论
1711	2.05E+04	4.31	4.20	3.80~4.60	2.62%	符合
1712	2.02E+03	3.31	3.39	2.99~3.79	-2.36%	符合
1713	8.25E+03	3.92	3.84	3.44~4.24	2.08%	符合
1714	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1715	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1721	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1722	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1723	0	0	0	-1.00~1.00	0	符合
1724	1.29E+04	4.11	4.13	3.73~4.53	-0.48%	符合
1725	4.78E+04	4.68	4.64	4.24~5.04	0.86%	符合

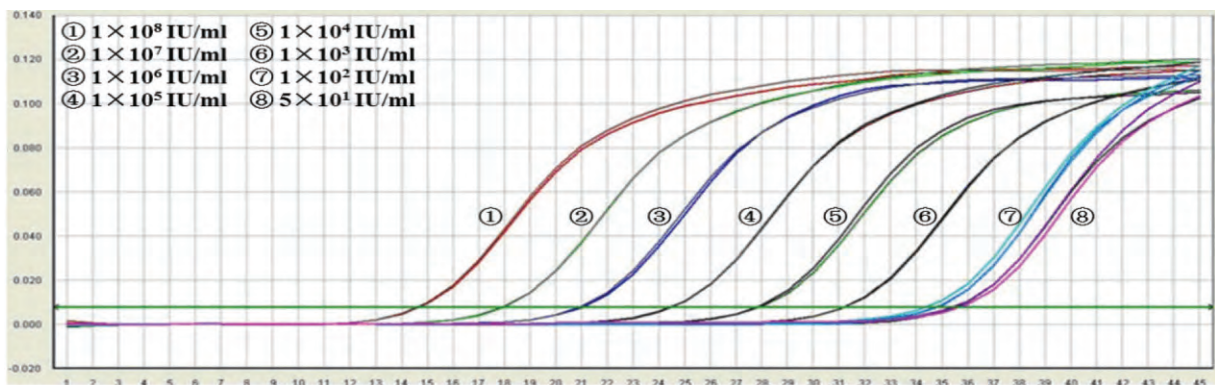


图 2 线性范围验证扩增曲线

Figure 2 Amplification curve of linear and reportable range

表 3 线性评价表

Table 3 Table of linear evaluation

样本浓度 (IU/ml)	实测值对数				理论值	偏倚 (%)
	第 1 次	第 2 次	第 3 次	均值		
1.00E+08	7.98	8.02	7.98	7.99	8.00	-0.13
1.00E+07	6.95	6.78	6.85	6.86	7.00	-2.00
1.00E+06	5.85	5.81	5.84	5.83	6.00	-2.78
1.00E+05	4.88	4.76	4.84	4.83	5.00	-3.40
1.00E+04	3.82	3.80	3.90	3.84	4.00	-4.00
1.00E+03	2.75	2.95	2.83	2.84	3.00	-5.33
1.00E+02	1.89	1.77	1.94	1.87	2.00	-6.50
5.00E+01	1.62	1.54	1.49	1.55	1.70	-8.82

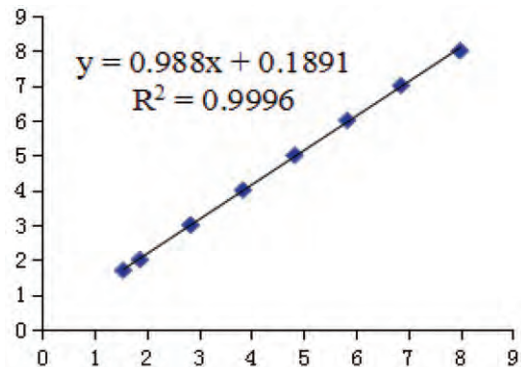


图 3 新型试剂梯度稀释实验线性回归方程

Figure 3 Linear regression equation of new reagent gradient dilution experiment

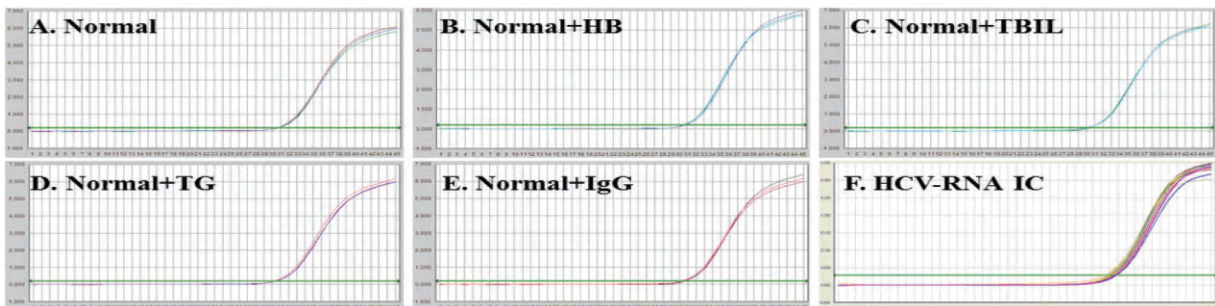


图 4 新型试剂抗干扰能力验证扩增曲线

Figure 4 Amplification curve of anti-interference ability of the novel reagent

表 4 抗干扰能力验证结果

Table 4 Results of verification of the anti-interference capability

样 本	干扰物浓度	实测值对数				判断标准	结论
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	均值		
Normal(N)	/	3.84	3.83	3.80	3.82	/	/
N+HB	2g/dl	3.80	3.86	3.87	3.84	3.82±0.40 (3.42~4.22)	符合
N+TBIL	28mg/dl	3.98	3.86	3.88	3.91		符合
N+TG	3000mg/dl	3.93	3.87	3.91	3.90		符合
N+IgG	40g/L	3.82	3.90	3.95	3.89		符合

3 讨 论

近年来,尽管荧光定量 PCR 技术检测 HCV-RNA 在临床上的应用越来越普及^[9],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 HCV-RNA 低病毒载量的漏检,不利于 HCV 感染者的早期诊断和治疗。为此,《2018 年欧洲肝病学会丙型肝炎治疗推荐意见》^[10]指出,HCV-RNA 定量检测需采用基于 PCR 扩增、灵敏度高、精确度高、线性范围广的分子诊断方法,结果用 IU/ml 表示,以适于了解 HCV 复制水平、HCV 现症感染的确认、抗病毒治疗前基线病毒载量分析、抗病毒治疗中及治疗后的应答评估、疗效监测和用药指导。核酸提取作为扩增模板是荧光定量 PCR 的重要前提,核酸提取方法不同会导致核酸提取效率不同,因此,不同的核酸提取方法会直接影响 PCR 的测定结果^[11]。研究证实,基于磁珠法提取核酸的新型试剂在核酸提取效率、重复性和稳定性等方面显著优于基于煮沸法提取核酸的传统试剂^[12]。湖南圣湘丙肝病毒核酸定量试剂是采用超顺纳米磁珠富集样本中的微量病毒核酸的新型试剂,能常温裂解释放核酸,无需加热煮沸等过程,能最大限度地避免操作过程中核酸的丢失;内标参与核酸提取、RT-PCR 扩增和荧光检测全过程,能实时监控假阴性风险,提高检测可靠性;60℃ 高温逆转录,更有利于变性 RNA 的二级结构,提高逆转录效率;此外,新型试剂针对 HCV1-6 型保守区同源序列设计特定引物,可检测 HCV1-6 六个基因型。

经验证,低浓度样本重复精密度和中间精密度 SD、CV 分别为 0.0758(<3/5TEa)、2.04% 和 0.0688 (<4/5TEa)、1.85%,高浓度样本重复精密度和中间精密度 SD、CV 分别为 0.0383(<3/5TEa)、0.65% 和 0.0647(<4/5TEa)、1.10%,远低于精密度判断标准,证实其具有良好的可重复性;整体上,高浓度样本的精密度好于低浓度样本,重复精密度好于中间精密度,但低浓度样本的重复精密度不如中间精密

度,可能原因除高浓度样本较低浓度样本稳定外,还与操作过程中的随机误差有关。2017 年卫计委临检中心 10 份 EQA 样本留样再测结果均在靶值允许的上下限范围之内,且非常接近靶值,正确度高达 100%,准确性极高。新型试剂在 50 IU/ml~1×10⁸ IU/ml 范围内具有良好的线性关系,目前,国内传统试剂的线性范围大多为 1.0×10³ IU/ml~5.0×10⁷ IU/ml,国外主流产品(Roche)的线性范围为 43 IU/ml~6.9×10⁷ IU/ml,可见新型试剂的线性范围明显优于国内其他产品,也与国外主流产品相当;线性定量范围越宽、灵敏度越高,越适合在不需要稀释的情况下对不同浓度临床样本的快速检测;近年来,直接抗病毒药物的出现(Direct-acting Antiviral Agents, DAAs),使丙型肝炎患者在 3 个月内彻底治愈成为可能^[13],随着治疗的推进,大部分患者的血浆 HCV-RNA 病毒载量被报告为低于试剂盒检测下限,但是,这部分患者并非体内病毒完全被清除,而是由于试剂灵敏度不足,不能及时检测出低病毒载量的核酸所致^[14];新型试剂线性范围宽、灵敏度高,能在一定程度上避免低病毒载量核酸的漏检,有助于患者的精确诊断,指导进一步治疗。临床样本中往往存在 PCR 抑制物影响 PCR 反应,导致结果偏低甚至出现假阴性结果^[15]。抗干扰能力是指临床样本中的溶血、黄疸和脂血等现象对检测结果不产生影响的能力;对核酸定量检测项目来说,抗干扰能力指血红蛋白、总胆红素、三酰甘油和 IgG 等干扰物质对检测结果不产生影响的能力。经在临床样本中证实,血红蛋白组、总胆红素组、甘油三酯组和总 IgG 组的核酸定量结果均在正常组±0.4Log 范围内,符合率达 100%,证实该新型试剂不受常规高浓度干扰物的检测干扰,在 2 g/dl 的血红蛋白、28 mg/dl 的总胆红素、3 000 mg/dl 的甘油三酯、40 g/L 的总 IgG 干扰物质存在下对检测结果没有影响,具有极强的抗干扰能力。综上所述,本研究参照 ISO15189 和 CNAS-CL02-A009 文件要求,经性能验证证实,基于磁珠法提取核酸的新型丙型肝炎核酸定量试剂

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 ISO15189 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

- [1] Holmes JA, Chung RT. Viral hepatitis: HCV compartmentalization in HCC: driver, passenger or both[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13(5):254-256.
- [2] 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[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2018, 28(1):11-13.
- [3] 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[J]. *中华肝脏病杂志*, 2018, 26(3):225-232.
- [4] Sanlidag T, Akcali S, Ecemis T, *et al.* Investigation of the correlation between anti-HCV levels (S/Co) with HCV-RNA in the diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection[J]. *Mikrobiyol Bul*, 2016, 50(3):508-510.
- [5] Kiani IG, Khan AN, Butt B, *et al.* HCV-RNA per positivity in HCV antibody negative patients undergoing haemodialysis[J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2018, 30(3):397-400.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. User verification of performance for precision and trueness: approved guideline-second edition[S]. EP15-A2, CLSI, 2005.
- [7] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02-A009 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[S]. 北京:CNAS, 2018.
- [8] NCCLS. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: a statistical approach. Approved guideline NCCLS document EP6-A[S]. Wayne, Pa: NCCLS, 2003.
- [9] Sarrazin C, Wedemeyer H, Cloherty G, *et al.* Importance of very early HCV RNA kinetics for prediction of treatment outcome of highly effective all oral direct acting antiviral combination therapy[J]. *J Virol Methods*, 2015, 214:29-32.
- [10] 杨甲, 饶慧瑛, 魏来. 《2018 年欧洲肝病学会丙型肝炎治疗推荐意见》介绍及解读[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(8):1622-1631.
- [11] Mikel P, Vasickova P, Kralik P. Methods for preparation of MS2 phage-like particles and their utilization as process control viruses in RT-PCR and qRT-PCR detection of RNA viruses from food matrices and clinical specimens[J]. *Food Environ Virol*, 2015, 7(2):96-111.
- [12] 范公忍, 陈天宝, 李冰, 等. 两种核酸提取方法对丙型肝炎病毒 RNA 检测效果的比较及应用评价[J]. *检验医学与临床*, 2015, (1):48-50.
- [13] WHO. Global hepatitis report 2017[M]. Geneva: World Health Organization, 2017:21-31.
- [14] Cloherty G, Chevaliez S, Sarrazin C, *et al.* Hepatitis C RNA assay differences in results: potential implications for shortened therapy and determination of sustained virologic response[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:35410.
- [15] 李金明. 实时荧光 PCR 技术(第二版)[M]. 北京:科学出版社, 2016:70-72.