

《世界动物卫生组织传染病诊断 PCR 方法验证和质量控制指南》摘译

李宗梦* 译

(天津出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 天津 300461)

摘要: 本文摘译自世界动物卫生组织(OIE)2008年出版的《陆生动物手册》第1.1.5章中关于核酸检测方法验证和质量控制的内容。世界动物卫生组织成立于1924年,主要职能是收集并通报全世界动物疫病的发生发展情况及相应控制措施;促进并协调各成员加强对动物疫病监测和控制的研究;制定动物及动物产品国际贸易中的动物卫生标准和规则。该章节由A-G共7部分组成。A部分是对常规分子诊断技术的介绍;B部分介绍核酸检测方法验证原则;C-G部分是方法验证过程的具体指南。由于篇幅所限,本文对A部分的综述性内容略去,重点围绕方法验证的具体流程进行摘译。目前,我国生物学检测方法(以PCR方法为主)验证的相关研究和标准化程序的制定正处于起步阶段。本文可作为我国食品分析专业人员研发和验证分子生物学检测方法提供借鉴。

关键词: 世界动物卫生组织; PCR; 验证; 指南

Translation from “Validation and Quality Control of Polymerase Chain Reaction Methods used for the Diagnosis of Infectious Disease” issued by OIE

LI Zong-Meng* Translation

(Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China)

ABSTRACT: This paper is partially translated from *Validation and Quality Control of Polymerase Chain Reaction Methods used for the Diagnosis of Infectious Disease* (Chapter 1.1.5., OIE Terrestrial Manual 2008) and is focused on validation and quality control of nucleic acid detection method. World Organization for Animal Health (OIE) was established in 1924 with the main objectives as follows: Collect, analyse and disseminate veterinary scientific information, ensure transparency in the global animal disease situation, encourage international solidarity in the control of animal diseases, safeguard world trade by publishing health standards for international trade in animals and animal products. This chapter consists of 7 parts from A to G. part A is an introduction of molecular diagnostic techniques; part B focuses on principles of assay validation; part C to G provide details in validation process. Due to limited length of this paper, Part A is omitted. Currently, research on assay validation and standardization of molecular method in our country is still in early stages. The objective of this paper is to provide a reference for Chinese food analyst to develop and validate

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2013IK197)、天津检验检疫局科技计划项目(TK086-2013)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK197) and the Scientific and Technological Project of TJCIQ (TK086-2013)

*通讯作者: 李宗梦, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lizm@tjciq.gov.cn

*Corresponding author: LI Zong-Meng, Engineer, Animal, Plant and Foodstuffs Inspection Center, Tianjin Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, No.158 Jingmen Road, Free Trade Zone, Tianjin Port, Tianjin 300461, China. E-mail: lizm@tjciq.gov.cn

molecular methods.

KEY WORDS: OIE; PCR; validation; guideline

1 核酸检测方法验证原则

数据的质量对于临床样本的分析至关重要,因此需满足一些关键标准。应建立一套 QA/QC 体系,包含高质量的实验方案、保证系统运行正常、实验再现性和数据质量的对照样品。全球范围的许多实验室均已建立质保/质控体系,拥有经过培训和具备优秀实验能力的研究人员。除以上方面,分析方法的验证是保证实验结果反映样品真实状态的另一个必要因素。方法验证通过记录方法的性能参数情况对某方法的性能表现进行预测和评估并评判该方法是否适用于某一预期的用途。

2 方法验证

2.1 选择适合预期用途的方法

PCR 方法的适用范围较为广泛。当有直接检测某种致病原的需要时一般可采用 PCR 方法。PCR 方法作为一种诊断手段在发展初期时,由于污染和实验性能表现方面的问题而不被看好。新技术(如实时定量 PCR)的发展有效避免了污染引起的假阳性结果而更易操作。另外,自动化提取技术的应用从根本上降低了成本,提高实验重复性,减少了工作量。许多实验室内 PCR 方法在早期被开发,但缺乏对方法的修正和验证。世界动物卫生组织,国家实验室以及欧共体参考实验室等在推进方法验证和修正工作中扮演了重要角色。如今的 PCR 方法更为安全可靠,假阳性结果发生的可能大大降低并经过了某种形式的验证,符合其预期用途。以下给出了 PCR 重要应用的实例。

- 当抗体水平极低,无法通过抗体检测时的传染病诊断(例如在牛白血病根除计划中酶联免疫吸附分析方法反复出现“灰色地带”时)。
- 区分幼年动物感染以及母源性免疫(例如根除计划中的小牛)。
- 当样本存在毒性不适合进行病毒分离时对病毒或细菌的核酸进行检测(例如精液和木乃伊化的死胎)。
- 在根除计划的最后阶段,需要对个别案例进行深入调查时(例如假性狂犬病根除计划中的疱疹病毒延迟和单反应器动物)。
- 区分疫苗株和野病毒株(DIVA 方法)。
- 确定病毒系统发生关系并应用于分子动物流行病学。
- 在疫病大爆发的情况下进行快速、安全的初步诊断(例如 2006 年爆发的高致病性禽流感)。
- 确定病毒载量(例如猪圆环病毒二型感染)。

- 对出现临床症状的已接种疫苗的动物进行快速检验。
- 检测致病微生物的抗药突变体等。
- 证明活体动物或动物产品未受到感染。值得注意的是某些被感染的动物组织内检测不到核酸。

2.2 方法开发初期应考虑方面

2.2.1 预防措施和控制手段

考虑到常规诊断中 PCR 方法在安全性和可靠性方面的不确定性,任何采用 PCR 方法检测感染源的实验室都应采取特殊预防措施避免假阳性结果和假阴性结果的发生。以上措施与内部对照(例如类似物)可共同确保对结果的安全评估,避免由污染引起的假阳性结果的产生。作为内部对照的看家基因可与目的基因同时扩增,但前提是聚合酶和核苷酸等试剂是过量的。小量竞争意味着目的片段水平是已知的,而此种情况不适用于野生样本。通过在提取步骤中加入携带类似物的盔甲 RNA 来确证提取步骤是否有效。使用看家基因的不足之处在于其存在量大于目的病原体。

2.2.2 防止假阳性结果的预防措施

假阳性结果(阴性结果显示阳性反应)的出现可能与实验室有关,如交叉污染,也可能与实验本身有关,如方法优化不足或方法性能低下。由阳性样本遗留的产物或更为常见,早先实验中 PCR 产物交叉污染都可能导致错误结果的产生。为避免假阳性结果,可采取多种措施和工具。应在分开的层流气流罩中处理样品和试剂,可常规使用紫外光或漂水去除污染。

设置和使用特殊试管架以及开管设备同样有助于避免假阳性结果。此外,应保证良好的实验室操作,例如应在独立分开的实验区域或房间进行以下基本操作(DNA 抽提,引物制备和混合,样本制备,凝胶电泳等)(图 1)。每个步骤应使用不同套的移液器。建议使用阳性置换以及带滤芯的吸头。如果可能,建议每个步骤都由不同的操作者负责,并固定在某一区域活动。应采取措施限制样品、纸张、设备、人员的移动,或其他潜在的污染途径,以避免“洁净”实验室从可能被污染的实验室引入扩增产物。只有在设备和试管等物品以及实验服和手套经过表面污染去除后才能反方向移动。如果样品可能含有高浓度的致病原或其核酸,建议在进入“洁净”实验室之前进行稀释。采用阴性对照也很重要,例如不含目标物的与被测样品尽可能相似的样品。当实验室出现交叉污染问题的时候,建议每检测五个待测样品的同时检测至少一个阴性对照。应常规对混入阳性、阴性对照的待测样品进行分析,对 PCR 方法性能进行评估。

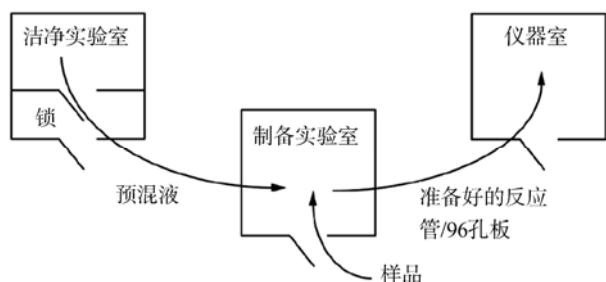


图1 实时定量PCR检测推荐的实验室布局

Fig. 1 The recommended laboratory layout of quantitative real-time PCR

2.2.3 避免假阴性结果的预防措施

事实证明PCR是一种检测临床样本中核酸(如病毒基因组)的极为有效的方法。然而,受到感染的动物在感染过程的晚期,很难在其组织中检测到病毒核酸。因此,遇到该情况时应将阴性PCR结果纳入诊断测试的一部分。假阴性结果(即含有目标物的样品检测结果为阴性)的出现主要是由于抑制效应和/或移液误差以及样本处理过程中的问题。因此,内部对照对PCR方法效率具有指示作用。PCR内部对照可包括加入样品中的外源DNA或普遍存在于样品中的DNA。加入样品中的DNA可包括DNA或RNA类似物。DNA类似物、人工合成的寡核苷酸具有与PCR目标片段相同的引物结合序列,但扩增出的是一段异源DNA片段,具有不同的片段长度。引物结合位点的相同性使目标序列和类似物在同一管内同时扩增而具有最小竞争。片段大小的不同使Southern印迹杂交易于分析。“盔甲”RNA与DNA类似物概念类似,利用对RNA具有保护或稳定作用的噬菌体衣壳蛋白包裹对照RNA片段进而对RT-PCR分析进行质控或标准化。对于实时定量PCR方法来说,也可以使用内部对照,如使用自然存在的看家基因或从宿主基因组中挑选出的一个片段,例如肌动蛋白基因、GAPDH或核糖体RNA。可通过将内部对照基因片段与一种特殊发光的报告荧光基因连接形成复合物,检验样品质量、确定PCR效率。内部对照(如类似物)可增加PCR诊断方法的可信度。应谨慎设计和验证内部对照,进行大量实验保证加入的内部对照在PCR扩增时不与目标物扩增竞争从而降低分析灵敏度。内部对照的浓度稍高于PCR方法的检测限保证检测性能。需注意,内部对照的使用也存在弊端。与添加的样品类似,对目标核酸不具有代表性,可能引起假阴性结果的产生。

2.2.4 标准品制备

参考实验室应提供代表某种致病原的标准样品。此类标准样品可以是致病源或临床样本等的培养物,并在保存完好的前提下分发出去,例如冷冻、保存于有机试剂(如Trizol)或其他合适的方式。标准样品也可以是核酸(冷冻、冻干或乙醇中保存)。参考实验室还应提供合适的类似物。

标准样品对于方法验证的成败具有举足轻重的作用。但往往在制定一个方法验证计划的过程中最容易出问题。

仅仅使用培养物或添加样品是不够的,野生天然样本可能具有与实验室制备样本截然不同的特性。由于PCR方法一般具有比多数“金标准”方法更高的灵敏度,很难通过经典方法确定方法验证中使用的样本状态从而难获得野生的真阴性或真阳性样本。如前所述,参考实验室可能是此类标准样品的潜在来源之一。除此之外,贝叶斯方法为诊断检测方法验证提供了概率分析途径而无需“金标准”。

3 方法验证

3.1 试剂优化和标准化以及关键控制参数的确定

样本采集、制备、运输以及核酸提取方法是检测方法性能的关键参数并应根据疾病诊断对其进行优化。根据样本和生物类型不同,适用的方法也千差万别。总的来说,血浆、机体组织以及棉拭子样本核酸提取较为容易,而粪便、自溶物质以及精液样本提取较难。RNA目标物提取与DNA提取不同, RNA更容易降解。DNA或RNA的提取既可以用商品化试剂盒(自动化、离心柱、磁珠分离等)也可以用经典化学方法进行提取。在进一步对方法进行验证之前,确定重现性最好、效率最高的提取方法非常重要。如果提取方法发生变化,应获得等效性数据或对验证过程进行重复。验证过程中使用的仪器必须经过适当维护。需要校准的设备(如加热块、冰箱、热循环仪、移液器等)应根据实验室质量保证程序进行校准。此外,还应对仪器和方法程序进行适当校准。以近期在常规诊断流程中实施的自动化核酸提取方法为例,仅仅比较该方法与之前使用的核酸提取方法的特征是不够的。自动化设备和操作程序应被验证,确认不存在交叉污染的风险,例如测试一组阳性和阴性样本混合的样本。开发“经典”或实时定量PCR方法时,应对所有参数、程序以及试剂进行优化。一个标准化的方法应做到在多次重复条件下,并且经由不同实验室的不同操作人员操作的条件下始终得出同样的结果。在PCR方法优化期间,可评估方法的主要参数不受细微变动影响的能力。对于PCR方法优化来说,对其关键参数进行评估是必须的。这些参数包括:孵育时间和温度、缓冲液的浓度、引物、氯化镁等,pH值,其他成分的含量(例如dNTP,牛血清白蛋白等)。关键控制参数的特征性分析对于识别方法中必须适当控制的关键点非常重要。参数的人为变化会导致方法稳健性的初步变化。

3.2 重复性

在衡量方法重复性时应对方法一次运行和多次运行时的重复进行评估,在进行进一步方法验证之前获得重要信息。如果发现变异度过大,应在继续验证程序前进行校正。PCR方法的重复性要求每一个重复都应被看作是独立样品。根据重复(如三个重复)的变异性,来自初始待测样品的三份独立样品经过提取和扩增,由测得的平均值得到的

变异系数可作为重复性的指标。因此,测试来自于同一份提取物的三个扩增产物是不可接受的。相类似的,多轮反应的重复也应被视为独立样品。通过以上过程,可对一次实验以及多次实验之间的变异性进行评估。在实时定量 PCR 方法中,由重复样本得到的 Ct 值可用于确定组间实验的变异系数。应注意待测样品应具有与该方法预期测试样品同样的基质。例如,某方法目的是说明已知对 PCR 反应具有抑制作用的基质中不含有某种成分,那么全面评估该方法的重复性尤为重要。当方法中引入了来自新生产商的不同批次的寡核苷酸或其他试剂,应重新测试方法的重复性。

3.3 特异性和灵敏度的确定

分析方法的特异性是指某一方法从其他致病原中区分目标物的能力。该能力通过分析遗传关联的致病原和从患病动物获得的临床样本来确定。从患病动物身上获得野生样本最为理想,但不易实现。在这种情况下,可以使用细胞培养的病毒。是否具有可接受的交叉活性主要决定于方法的预期目的并且应根据实际情况确定。电脑模拟研究是实验室检测的有效辅助手段。分析方法的灵敏度(或检出限)是指方法可检测出该物质的最小量,可以基因组拷贝数、感染剂量、菌落形成单位、空斑形成细胞等。灵敏度的确定方法是待测物进行终点稀释,直至大于 5% 的重复样品无法被该方法检测出。PCR 产物的克隆片段可作为标准样品,可以是 DNA 或 RNA。同一方法对不同的样品基质的灵敏度差异较大。在进行梯度稀释时,应注意使用与样品基质类似的稀释液,例如将阳性精液稀释于阴性精液而非缓冲液。

4 方法性能验证

性能特征或分析方法参数可提供方法在特定条件下运行的信息。

4.1 确定方法性能特征——对照动物种群

4.1.1 阴性对照动物

真阴性样本,如未接触致病原的动物样本,往往很难获得。较为常见的是从已经消除某种疫情的国家收集样本。应注意,获得的阴性样本应具有待分析样本的特征,如种类、年龄、性别、品系等。

4.1.2 阳性对照动物

一般来说,获得足够数量的阳性对照动物有一定困难。需要获得自然感染的或通过实验感染的动物并通过分离致病原证明其阳性特征。

4.1.3 其他方法确定对照动物状态

“金标准”一般是指参比标准且仅限于可明确区分被感染或未被感染动物的方法。由于新的 PCR 方法一般被认为应优于现存的“金标准”方法,因此使用此类方法作为参照是不合适的。尤其在证明阴性对照动物为真阴性时,此

问题尤为突出。通过与“金标准”方法比较,分子生物学方法的验证可能由于 PCR 方法的高灵敏度导致特异性的显著下降。这一问题可通过分析样品来源、临床历史以及 PCR 产物测序确认真实性来解决。

4.2 阈值的确定

诊断灵敏度(DSe,已知被感染的对照动物检测为阳性的比例)和特异性(DSp,已知未被感染的对照动物检测为阴性的比例)。可通过计算对 DSe 和 DSp 进行合理预测,获得确定 DSe 和 DSp 估计值和允许误差所需的对照样品数。估计值的置信区间一般设置在 95%。然而,影响检测结果的各种宿主/致病原相关因素无法通过公式计算进行预测。对于非流行或非广泛分布的疫病,开始可能难以获得达到理想置信区间的样品数,但随着后续数据的逐步增加,阈值置信度也随之增加。由于人工添加样本可能无法代表自然感染的样本,因此 PCR 方法中使用此类样本是最后的手段。如果无法获得自然状态下受感染动物的样本,可使用通过模拟自然感染过程得到的样本,如通过暴露于感染性蜱虫诱发的蜱传播感染。有时完全遵照指南进行是不现实的,比如当用于测试的样本数较少或方法无金标准可参照,那么该分子生物学方法可作为“部分验证”方法使用,当检测大量样本时,可追加验证数据。在这种情况下,应采用另外的方法确证阳性样本,例如可以致病原的分离或测序。还应通过对照基因确认阴性样本适用于 PCR 方法(非抑制性)。这种持续进行的验证原则有助于新方法的快速引入,同时降低了验证成本。该程序必须在一定条件下进行,只有在检测了适当范围的已知培养物、人工添加样本(需提供分析数据)以及某些临床样本(说明在某种组织中目标物是存在的)并提供明确证据,该方法方可作为“部分验证”的方法发布。

4.3 方法重现性的建立

方法重现性是通过多个实验室对同一方法(操作程序、试剂以及对照)进行操作来确定的。由至少 3 家实验室对一组相同的样品(至少 20 个样品)进行测试从而对方法的耐用性进行估计。在考虑将一个方法应用于其他实验室之前,必须评估该方法的重现性。目前,在兽医学诊断实验室进行的 PCR 方法很少对其重现性进行全面评估。许多实验室由于某种原因一般采用自制方法。条件允许时,应采用已经发布的标准化、经过验证的方法,尤其是由世界动物卫生组织参考实验室, ECRLs 或国家实验室发布的方法。此外,还应进行方法的室内验证过程,这将有助于方法的标准化,使其在各国之间保持一致性。

5 计划实施

参考实验室在新方法的实施或现存分子生物学方法的验证方面发挥重要作用。OIE 参考实验室 ECRLs 和国家

实验室致力于协助新方法的实施。例如, OIE 和 CDRL 在欧洲推行的禽流感分子诊断方法。

5.1 方法性能有效性监控—检测结果的解读

影响检测结果解读的一个主要因素是目标群体中分析物的分布。即使是具有高精密度和准确度, DSe 和 DSp 值接近 99% 的 PCR 方法仍有可能给出错误推断。对于核酸分析方法来说, 假阳性结果在低分布群体中应引起重点关注。这种情况下可能需要对扩增产物进行测序来确认 PCR 阳性结果, 纠正由引物非特异性结合引起的错误。

5.2 验证标准的维护

维护内部质量控制对于常规使用的方法非常重要。应对方法的重复性和准确度进行持续的监控。OIE 建议一年至少进行 2 次实验室间方法稳健性测试。该测试一般由参考实验室实施, 进行样品分发、结果汇总、数据分析以及结果反馈。如果方法将用于其他地理区域或人群, 那么可能需要在新的环境下对方法进行重新验证或记录其等效性。如果方法将用于不同的基质, 如血液样品经过验证的方法用于其他组织, 或在牛的组织验证的方法用于另一个可能含有不同抑制因子的物种, 那么应重新进行方法验证

或等效性验证。引物或探针可能发生的突变会影响检测效率, 进而会使已经建立的性能标准失效。建议对全国范围或地区的致病原分离物的基因组目的序列进行定期确认, 特别是对引物结合序列进行确认, 保证其稳定性。当方法从开发实验室转移到现场使用时, 由于检测环境较差、操作人员的经验不足等原因, 应对方法的稳健性进行反复评估和验证。

参考文献

- [1] OIE Terrestrial Manual 2008. Chapter 1.1.5: Validation and Quality Control of Polymerase Chain Reaction Methods used for the Diagnosis of Infectious Disease [R].

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



李宗梦, 博士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lizm@tjciq.gov.cn

“碳水化合物的物性学及功能特性研究”专题征稿函

碳水化合物是食品中的六大营养素之一, 是食品的主要成分, 对于食品的“色、香、味、形、质”以及营养功能均具有重要的影响作用。

鉴于此, 本刊特别策划了“碳水化合物的物性学及功能特性研究”专题, 由天津科技大学的张民教授担任专题主编。张教授现任天津科技大学食品工程与生物技术学院院长。本专题主要围绕碳水化合物的物性学特性(包括: 力学特性、流变学特性、质构特性、介电特性、热特性和凝胶性等)、功能特性、应用特性、结构特性展开。探讨碳水化合物的组成、分子结构等对加工特性以及食品质量的影响或者针对您认为在碳水化合物的研究方面有意义的内容进行研讨, 计划在 2015 年 5 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊编辑部及张民教授特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。请在 2015 年 4 月 20 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部