·实验研究·

人类细小病毒 B19 的 3 种基因型核酸检测系统的建立及验证

王　月,龚　钦,郑宵蓓,童剑啸,熊　玲,罗　艳,张　雪,程郁菁,王兰欣,刘　晓*
(国药集团武汉生物制药有限公司,武汉 430207)

[摘要]　**目的:**建立人类细小病毒 B19 实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法,并对该方法进行系统性的方法学验证。**方法:**针对 B19 病毒 3 种基因型的高度保守区设计特异性引物和探针,构建重组载体制备参考品质粒,建立 B19 定量扩增标准曲线。对建立的 B19 核酸检测系统的线性范围、准确度、精密度(重复性和中间精密度)、检测限、基因分型以及特异性抗干扰能力进行验证。**结果:**当 B19 病毒定量参考品范围为 $1\times10^4\sim1\times10^8$ IU·mL^{-1}时,实测值与理论值进行双对数回归分析,回归方程 $R^2\geqslant0.980\,0$,线性关系良好。B19 阳性样本 1 和阳性样本 2 浓度水平标准物质检测值与靶值的偏差均≤ ±0.5 lg 值。B19 阳性标本 1 和阳性标本 2 批内、批间精密度确认和连续重复检测精密度确认的 CV 值均≤5%。*NS1* 和 *VP1* 基因的检出限分别为 57.8 和 5.78 IU·mL^{-1},检出率≥95%。针对 B19 病毒 3 种基因型标本均能有效检出。针对甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、人巨细胞病毒、戊型肝炎病毒、梅毒螺旋体等 7 种非 B19 病原体血浆均为非反应性,种属特异性良好。在其他 7 种病原体同时存在时,B19 阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰。本方法针对常见血浆干扰物质,如血红蛋白、三酰甘油及结合性胆红素均为非反应性,同时在以上 3 种常见血浆干扰物质存在时,B19 阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰。**结论:**本方法特异性强、灵敏度高、线性范围广、稳定可靠、准确度高,可用于原料血浆中人类细小病毒 B19 核酸检测。

[关键词]　人类细小病毒 B19;实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法;血液制品;血浆;核酸检测
[中图分类号]　R917　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1003－3734(2026)16－1751－12

Establishment and verification of a nucleic acid detection system for three genotypes of human parvovirus B19

WANG Yue, GONG Qin, ZHENG Xiao-bei, TONG Jian-xiao, XIONG Ling, LUO Yan, ZHANG Xue, CHENG Yu-jing, WANG Lan-xin, LIU Xiao*
(*Sinopharm Wuhan Biopharmaceuticals Co., Ltd.*, *Wuhan* 430207, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To establish a real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) nucleic acid detection method of human parvovirus B19 and validate the method systematically. **Methods**: Specific primers and probes for the highly conserved regions of the three genotypes of B19 virus were designed, recombinant vectors were constructed to prepare reference-grade plasmids, and B19 quantitative amplification standard curves were established. The linear range, accuracy, precision (repeatability and intermediate precision), detection limit, specificity, genotyping and anti-interference ability of this method were verified. **Results**: When the quantitative reference range for B19 virus was $1\times10^4\sim1\times10^8$ IU·mL^{-1}, a double logarithmic regression analysis was performed between the measured values and the theoretical values, and the regression equation $R^2\geqslant0.980\,0$ showed good linear correlation. The deviation between the detection values of B19 standard substances at two concentration levels of sample 1 and sample 2 and the target values was≤ ±0.5 lg value. The CV values of B19 positive sample 1 and sample 2 for intra-batch, inter-batch precision confirmation and continuous repeated detection

[基金项目]　湖北省药品监督检验研究院 2022 年度重点实验室开放课题(2022HBKFX002)
[作者简介]　王月,女,医学博士,主要从事血液制品管理及质量控制研究。E-mail:cmu89kwy@163.com。
[通讯作者]　*刘晓,男,硕士,主要从事血液制品研究。E-mail:liuxiao1@sinopharm.com。
[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.16.010

precision confirmation were both ≤5%. The detection limits of *NS1* and *VP1* genes were 57.8 and 5.78 IU·mL^{-1}, respectively, with a detection rate ≥95%. Three genotypes of B19 virus samples can be effectively detected. The plasma of seven non B19 pathogens, including hepatitis A virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, human immunodeficiency virus, human cytomegalovirus, hepatitis E virus and *Treponema pallidum*, was non-reactive and had good species specificity. At the same time, in the presence of seven other concurrent pathogens, the positive samples were stably detected, and the B19 nucleic acid testing method was not interfered with. This method was non-reactive to common plasma interfering substances, including hemoglobin, triglycerides and conjugated bilirubin. Meanwhile, in the presence of the above three common plasma interfering substances, B19-positive specimens were stably detected, and the B19 nucleic acid detection method was not affected. **Conclusion**: This method has strong specificity, high sensitivity, wide linear range, good stability and reliability, and high accuracy, and can be used for the detection of human parvovirus B19 nucleic acid in plasma.

[**Key words**] human parvovirus B19; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; blood products; plasma; nucleic acid testing

人类细小病毒 B19 是一种对人类致病的细小病毒[1],为单链 DNA 无包膜病毒,全长约 5.5 kb,共 3 种基因型,可通过呼吸道飞沫、胎盘以及血液传播,人群中广泛流行,孕妇和儿童尤其容易罹患感染,引起孕妇流产、胎儿水肿畸形甚至宫内死胎以及面部皮疹、传染性红斑、贫血、慢性溶血患者再障危象[2-4]。

B19 病毒体积微小(18 ~ 26 nm),为非脂包膜病毒,对热不敏感,具有良好的理化耐受性,可以耐受绝大部分病毒灭活/去除方法。美国 FDA[5]、国际血浆蛋白治疗协会[6]、欧洲药典[7]、欧洲 EMA 和 WHO[8]明确指出混合血浆中 B19 病毒核酸载量不得超过 1×10^4 IU·mL^{-1},B19 被列为可通过血液传播的病毒,纳入原料血浆的常规检测,检测方法主要有抗原检测和核酸检测。2022 年 5 月 25 日,国家药品监督管理局药品审评中心颁布《特异性人免疫球蛋白药学研究与评价技术指导原则》,要求用于生产抗 D 免疫球蛋白的混浆中 B19 病毒核酸载量不得高于 1×10^4 IU·mL^{-1}[9]。《中华人民共和国药典》2025 年版关于人类细小病毒 B19 未收载相关检测方法以及标准限度要求,因此需要开展必要的研究,尽快与国际接轨,开展人类细小病毒 B19 检测相关工作。本研究建立了一种人类细小病毒 B19 核酸定量检测试剂盒及检测方法,可实现 3 种基因型定性、定量检测,有效避免病毒载量低及毒株序列基因突变导致的漏检,可用于生产用原料血浆及血液制品中人类细小病毒 B19 核酸检测。

材料与方法

1 试剂

人类细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品(批号:370005-201601,见表 1)及人类细小病毒 B19 核酸检测试剂国家标准品(批号:370023-201601)均购自中国药品检定研究院;人类细小病毒 B19 病毒分型盘(英国国家生物标准与对照品研究所,批号:09/110,见表 2);限制性内切酶 KpnI(批号:EG15544S)和 XbaI(批号:EG15581S)均购自江苏愚公生物科技有限公司;Hieff Unicon® qPCR Taq-Man Probe Master Mix(翌圣生物科技有限公司,批号:11205ES03);凝胶回收试剂盒(批号:AP-GX-250)及 PCR 产物纯化试剂盒(批号:AP-GX-250)均购自美国 Axygen 公司;核酸提取试剂盒(艾德莱生物科技有限公司,批号:DN40);血红蛋白、三酰甘油及非结核性胆红素标准物质(希森美康生物科技有限公司,批号:ZR1504);B19 阴性血浆(批号:F001230401)及甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、人巨细胞病毒、戊型肝炎病毒、梅毒螺旋体均由北京万泰生物药业股份有限公司提供;pUC57 载体由武汉伯远生物科技有限公司提供。

表 1 人类细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品组成和规格

参考品类型	编号	规格/mL·支$^{-1}$	支数/支
阴性参考品	NC01 ~ NC10	1	10
阳性参考品	PC01 ~ PC08	1	8
精密度参考品	CV1、CV2	1	2
精密度稀释液	CV0	1	4
最低检出限参考品	L1、L2	1	2

表 2 人类细小病毒 B19 病毒分型盘组成信息

参考品类型	B19 基因型别	B19 浓度水平对数值	规格 /mL·支$^{-1}$
阳性参考品 1	1 型	5.98(5.61 ~ 6.32)	1.1
阳性参考品 1	2 型	5.94(5.43 ~ 6.52)	1.1
阳性参考品 1	3 型	5.97(5.21 ~ 6.54)	1.1

2 仪器

7500 型实时荧光定量聚合酶链式反应仪(美国应用生物系统公司);BHC － 1300 Ⅱ A2 型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

3 引物、探针设计

根据 GenBank 数据库 B19 病毒 3 种基因型的代表株全基因组序列(1 型:M13178;2 型:AY044266;3 型:NC-004295),用 Snapgene 软件比对 3 种亚型,找到 3 种亚型位于非结构蛋白 1(*NS1*)基因及病毒蛋白 1(*VP1*)基因上相对保守区域,设计引物和探针,5' 端标记 FAM 的荧光报告基团,3' 端标记 TAMRA 的荧光淬灭基团,选择 P53 作为内标,具体序列见表 3。

表 3 *NS1* 基因及 *VP1* 基因引物探针设计

名称	序列(5'-3')	产物大小
NS1-F	GCGCTCTAGTACGCCCATC	63 bp
NS1-R	GAAACTGGGCTTCCGACAAA	
NS1-TaqMan Probe	5'FAM-CCCGGGACCAGTTCAGGAGAATCA-TAMRA'3	
VP1-F	GTGAAGACTTACACAAGCCTGGG	87 bp
VP1-R	GCCCAGCTTGTAGCTCATTGC	
VP1-TaqMan Probe	5'FAM-ACCCGGTACTAACTATGTTGGGCCTG-TAMRA'3	
P53-F	CATCAGCATGAGGGAAGTGC	90 bp
P53-R	GAATGTGTCACGCAGGTTCA	
P53-TaqMan Probe	5'FAM-ACCCAGGTGCCGCTTCCTGG-TAMRA'3	

4 构建重组载体

将人类细小病毒 B19 的 *NS1*、*VP1*、*P53* 基因连接到 pUC57 克隆载体上,构建重组载体。扩增出目的基因序列,1% 琼脂糖凝胶电泳 20 min,电压 5 V·cm^{-1},然后切胶回收试剂盒(购自 Axygen 公司)回收目的序列。用 KpnI 和 XbaI 双酶切 pUC57 载体,酶切载体使用聚合酶链式反应检测(PCR)纯化试剂盒进行纯化,目的基因及 pUC57 载体进行重组反应。将 5 ~ 10 μL 连接产物转化大肠埃希菌感受态细胞,37 ℃ 培养 12 h,转化涂 Amp 抗性平皿。挑取 10 个菌斑同时进行 1.5 mL EP 管接菌和 PCR 鉴定,阳性条带对应的菌液送测序,基因测序确认重组载体是否构建成功。

5 标准曲线建立与国际单位换算

将 pUC57-*NS1*、pUC57-*VP1*、pUC57-*P53* 这 3 个质粒作为标准品使用,用微量分光光度计测量浓度,然后换算成基因拷贝数。拷贝数浓度计算公式:拷贝数浓度(copies·mL^{-1}) = 6.02 × 10^{23}(copies·mol^{-1}) × 标准品浓度(g·mL^{-1})/MW(g·mol^{-1}),MW = 片段大小 × 660 g·mol^{-1}·bp^{-1}。将标准品质粒进行 10 倍梯度稀释,提取核酸作为模板使用,待测样本同法处理。用设计的引物和探针对其进行实时荧光定量 PCR(qPCR),以拷贝数对数值和循环阈值(Ct)进行回归分析,要求拟合回归线决定系数 R^2 应≥0.980 0。同时将检测结果(copies·mL^{-1})换算为国际单位(IU·mL^{-1})。

6 qPCR 反应体系与条件

反应体系总体积为 10 μL,包含 Hieff Unicon® qPCR TaqMan Probe Master Mix 5 μL、上下游引物(10 μmol·L^{-1})各 0.2 μL、TapMan Probe(10 μmol·L^{-1})探针 0.1 μL、模板 DNA 1 μL,用无核酸酶水补足至 10 μL。反应条件为:95 ℃ 30 s,然后 95 ℃ 5 s、60 ℃ 30 s,40 个循环进行扩增,同时进行荧光信号的采集。

7 方法学验证

7.1 线性验证

将已知浓度人类细小病毒 B19 国家参考品使用系列稀释制成不同浓度梯度的标准品溶液,L1 ~ L8 系列浓度分别为 1 × 10^9、1 × 10^8、1 × 10^7、1 × 10^6、1 × 10^5、1 × 10^4 IU·mL^{-1}等,采用 *NS1* 和 *VP1* 引物和探针进行 qPCR 检测,以各浓度参考品的实测值与理论值双对数进行回归分析,要求拟合回归曲线的决定系数 R^2 应≥0.980 0。

7.2 准确度验证

取已知不同浓度水平人类细小病毒 B19 阳性样本 1 和阳性样本 2,每个浓度水平重复检测 3 次,

连续重复检测 5 次以上,实测浓度与理论浓度对数值差值最大值(保留小数点后 1 位有效位数)应≤ ±0.5 × 对数值。

7.3 精密度验证

取不同浓度水平人类细小病毒 B19 阳性样本 1 和阳性样本 2,每个浓度水平重复检测 3 次,连续重复检测 5 次以上,计算重复检测结果 RSD,应≤5%。

7.4 基因分型验证

人类细小病毒 B19 病毒分型盘基因 1 型、2 型、3 型阳性血浆标本(标本 1、标本 2、标本 3)稀释至方法检测范围内某固定浓度,每个样本重复检测 3 次,3 种基因型分型应能够检出,并且重复检测 Ct 值的变异系数(coefficient of variation,CV)应≤5%。

7.5 检测限验证

将已知浓度人类细小病毒 B19 阳性样品进行系列稀释,每个浓度水平重复检测 3 次,以水作为空白对照,B19 阴性血浆作为阴性对照,直到检测到的信号与阴性血浆接近,然后在此浓度水平下重复检测 20 次,要求检出率≥95%。

7.6 特异性及抗干扰能力验证

7.6.1 针对非细小病毒 B19 病原体的特异性研究 验证结果显示本方法针对上述 7 种非 B19 病原体血浆均为非反应性,种属特异性良好。在其他 7 种病原体同时存在时,B19 阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰,且与对照组相比,检测结果偏差应≤ ±0.5 × 对数值。

7.6.2 针对血红蛋白、三酰甘油、非结合性胆红素抗干扰能力的研究 结果显示上述 3 种常见血浆干扰物质均为非反应性。同时,在 3 种常见血浆干扰物质存在时,弱阳性浓度为 1×10^3 IU·mL^{-1}的阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰,且与对照组相比,检测结果偏差应≤ ±0.5 × 对数值。

7.6.3 对照组 B19 阳性标本重复测定 3 次,3 次检测结果 Ct 值的 CV 应≤5%。

结 果

1 标准曲线构建

在每个循环的延伸结束时进行荧光信号检测,以拷贝数的对数值为横坐标,Ct 值为纵坐标作散点图,并绘制标准曲线,可以得到 lg 拷贝数-Ct 值标准曲线和 RT-PCR 标准曲线。*NS1*、*VP1*、*P53* 质粒的标准曲线分别见图 1、图 2 和图 3,决定系数 R^2 分别为 0.993 4、0.992 4、0.999 6,扩增效率分别为 92.7%、91.3%、104.7%,均在 90% ~110% 范围内,证明标准曲线构建成功。

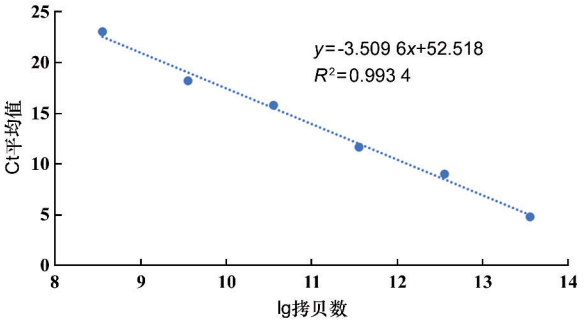


图 1 *NS1* 初始模板标准曲线图

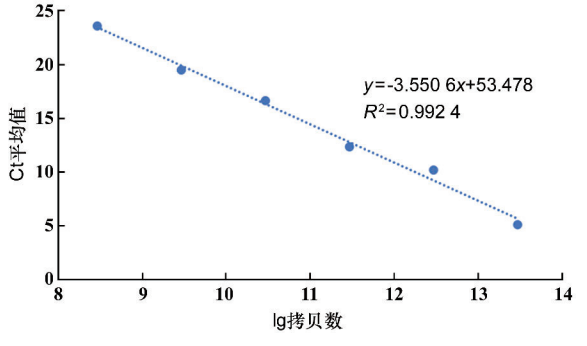


图 2 *VP1* 初始模板标准曲线图

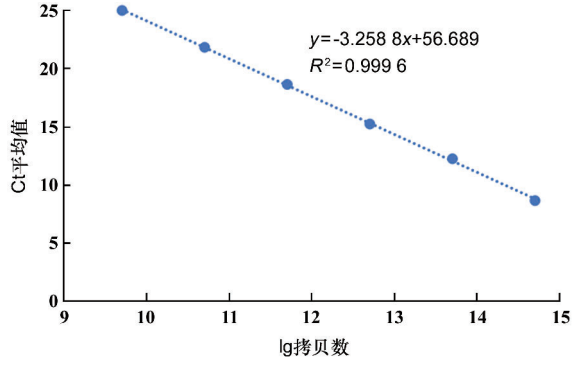


图 3 *P53* 初始模板标准曲线图

2 国际单位换算

将已知浓度人类细小病毒 B19 国家标准品系列稀释制成不同浓度梯度的标准品溶液,L1 ~ L8 系列浓度分别为 1×10^9、1×10^8、1×10^7、1×10^6、1×10^5、1×10^4、1×10^3、1×10^2 IU·mL^{-1}等,采用 *NS1* 引物和探针进行 qPCR 检测,检测结果见表 4,每个浓度水平重复检测 3 次,表中为 3 次检测结果平均值。以不同浓度标准品溶液拷贝数的对数值与其对应的

病毒浓度(国际单位)理论对数值作标准曲线,获得标准曲线线性方程 $y = 1.228\,2x - 7.538\,2$,决定系数 $R^2 = 0.987$,线性关系良好(见图 4)。同理,采用 *VP1* 引物和探针同上操作,获得标准曲线方程 $y = 1.413\,1x - 6.337\,9$,决定系数 $R^2 = 0.995\,2$,线性关系良好(见表 5 和图 5)。*P53* 质粒扩增结果见表 6。

表 4 *NS1* 质粒扩增结果

lg 拷贝数	拷贝数/copies·mL^{-1}	Ct 值	C/ng·μL^{-1}
13.557 020 35	3.61×10^{13}	4.76	797
12.557 020 35	3.61×10^{12}	8.98	79.7
11.557 020 35	3.61×10^{11}	11.63	7.97
10.557 020 35	3.61×10^{10}	15.75	0.797
9.557 020 349	3.61×10^{9}	18.16	0.079 7
8.557 020 349	3.61×10^{8}	23.00	0.007 97

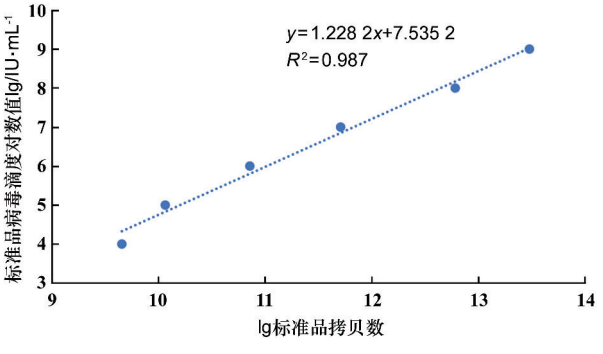


图 4 *NS1* lg 拷贝数-国际单位标准曲线图

表 5 *VP1* 质粒扩增结果

lg 拷贝数	拷贝数/copies·mL^{-1}	Ct 值	C/ng·μL^{-1}
13.470 538 14	2.95×10^{14}	5.10	760
12.470 538 14	2.95×10^{13}	10.17	76
11.470 538 14	2.95×10^{12}	12.32	7.6
10.470 538 14	2.95×10^{11}	16.60	0.76
9.470 538 14	2.95×10^{10}	19.45	0.076
8.470 538 14	2.95×10^{9}	23.53	0.007 6

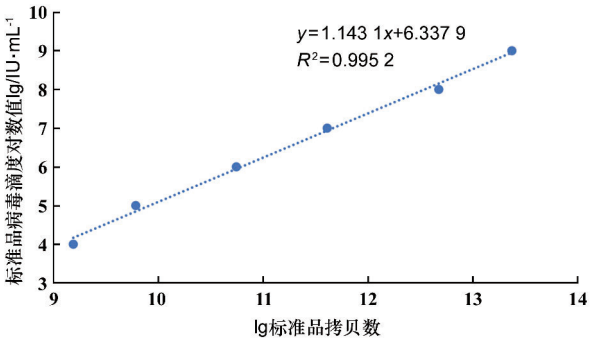


图 5 *VP1* lg 拷贝数-国际单位标准曲线图

表 6 *P53* 质粒扩增结果

lg 拷贝数	拷贝数/copies·mL^{-1}	Ct 值	C/ng·μL^{-1}
14.710 798 08	5.14×10^{14}	8.601	1 090
13.710 798 08	5.14×10^{13}	12.205	109
12.710 798 08	5.14×10^{12}	15.196	10.9
11.710 798 08	5.14×10^{11}	18.607	1.09
10.710 798 08	5.14×10^{10}	21.799	0.109
9.710 798 084	5.14×10^{9}	24.974	0.010 9

根据“**1**”项下方法构建标准曲线得到 Ct 值-拷贝数标准曲线 $y1 = ax + b$,现得到拷贝数-国际单位滴度标准曲线 $y2 = cx + d$,最终得到 Ct 值-国际单位(IU·mL^{-1})的换算公式为:$10^{\log10(10^{((Ct-b)/a)})\times c+d}$。

3 线性验证

参考“**2**”项下方法进行国际单位换算,采用 *NS1* 引物和探针进行 qPCR 检测,将标准品 1×10^9、1×10^8、1×10^7、1×10^6、1×10^5、1×10^4 IU·mL^{-1} 的理论浓度值与其对应实际检测值取双对数进行拟合分析,获得拟合回归曲线 $y = 0.914\,4x + 0.653$,决定系数 $R^2 = 0.987 \geqslant 0.980\,0$(见表 7、图 6 和图 7)。同理,采用 *VP1* 引物和探针同上操作,获得拟合回归曲线 $y = 0.932x + 0.191\,2$,决定系数 $R^2 = 0.995\,2 \geqslant 0.980\,0$(见表 8、图 8 和图 9),均符合要求。

表 7 *NS1* 线性验证结果

编号	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数 /copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数 对数值	理论病毒滴度 /IU·mL^{-1}	理论病毒滴度 对数值	实际检测病毒滴度 /IU·mL^{-1}	实际检测病毒 滴度对数值
L1	14.712 073 96	3.04×10^{13}	13.482 586 78	1.00×10^{9}	9	8.60×10^{8}	8.934 261 13
L2	17.609 156 29	6.12×10^{12}	12.786 749 63	1.00×10^{8}	8	1.38×10^{8}	8.141 429 727
L3	22.073 329 93	5.15×10^{11}	11.711 689 69	1.00×10^{7}	7	8.31×10^{6}	6.919 739 543
L4	25.613 411 59	7.25×10^{10}	10.860 127 47	1.00×10^{6}	6	8.93×10^{5}	5.950 941 425

续表 7

编号	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数 /copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	理论病毒滴度 /IU·mL^{-1}	理论病毒滴度对数值	实际检测病毒滴度 /IU·mL^{-1}	实际检测病毒滴度对数值
L5	28.912 817	1.17×10^{10}	10.066 621 79	1.00×10^{5}	5	1.12×10^{5}	5.048 008 085
L6	30.610 015 23	4.57×10^{9}	9.659 709 717	1.00×10^{4}	4	3.83×10^{4}	4.583 543 53
L7	30.918 677 01	3.84×10^{9}	9.584 837 466	1.00×10^{3}	3	3.16×10^{4}	4.499 073 459
L8	30.591 527 3	4.61×10^{9}	9.664 100 216	1.00×10^{2}	2	3.84×10^{2}	4.588 603 038

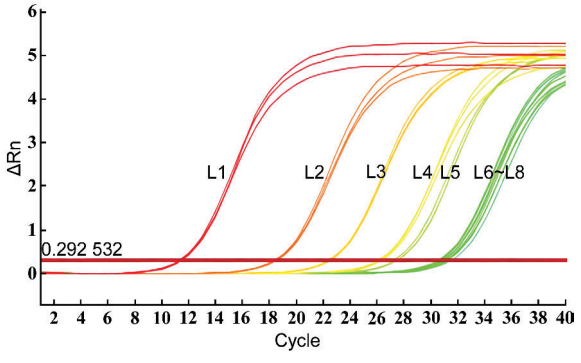


图 6 *NS1* 线性验证扩增曲线图

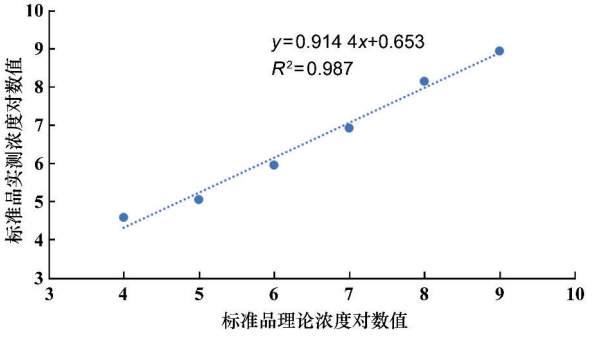


图 7 *NS1* 线性验证标准曲线图

表 8 *VP1* 线性验证结果

编号	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数 /copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	理论病毒滴度 /IU·mL^{-1}	理论病毒滴度对数值	实际检测病毒滴度 /IU·mL^{-1}	实际检测病毒滴度对数值
L1	13.783 768 34	5.08×10^{13}	13.705 792 81	1.00×10^{9}	9	3.51×10^{8}	8.545 203 566
L2	16.757 970 81	9.83×10^{12}	12.992 612 55	1.00×10^{8}	8	6.26×10^{7}	7.796 615 721
L3	21.277 170 18	8.00×10^{11}	11.903 318 57	1.00×10^{7}	7	4.56×10^{6}	6.659 161 984
L4	24.961 857 48	1.04×10^{11}	11.016 778 12	1.00×10^{6}	6	5.39×10^{5}	5.731 749 628
L5	29.062 773 39	1.08×10^{10}	10.035 064 1	1.00×10^{5}	5	5.01×10^{4}	4.699 575 178
L6	31.585 538 86	2.66×10^{9}	9.425 321 549	1.00×10^{4}	4	1.16×10^{4}	4.064 611 153
L7	32.811 284 38	1.45×10^{9}	9.162 642 251	1.00×10^{3}	3	5.70×10^{3}	3.756 098 803
L8	32.074 288 05	2.61×10^{9}	9.121 081 238	1.00×10^{2}	2	8.74×10^{3}	3.941 596 092

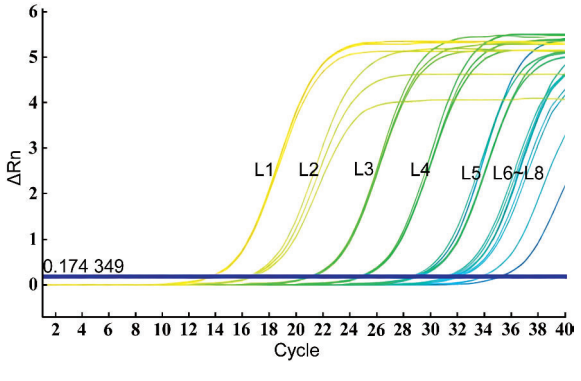


图 8 *VP1* 线性验证扩增曲线图

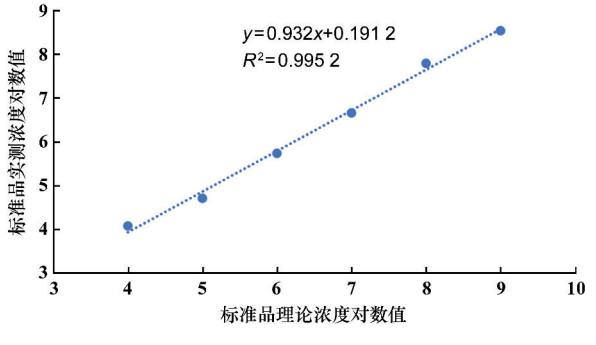


图 9 *VP1* 线性验证标准曲线图

4 准确度验证

人类细小病毒 B19 阳性样本 1 和阳性样本 2 使用 *NS1* 基因引物和探针重复检测，每个浓度水平重复检测 3 次，以平均值表示。重复检测 6 次后，实测浓度与理论浓度对数值差值（保留小数点后 1 位有效位数）最大为 0.374≤0.5，符合要求（见表 9）。使用 *VP1* 基因引物和探针同法操作，重复检测 5 次，实测浓度与理论浓度对数值差值（保留小数点后 1 位有效位数）最大值≤0.5，符合要求（见表 10）。

表 9 *NS1* 准确度验证数据

分组	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数 /copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	病毒滴度对数值	计算病毒滴度 /IU·mL^{-1}	理论病毒滴度对数值	实测浓度与理论浓度对数值差值
PC3-1	21.049 676 26	2.47×10^{8}	8.391 819 237	4.889 380 877	7.75×10^{4}	4.761 927 838	−0.127
PC3-2	21.062 036 51	2.43×10^{8}	8.386 111 695	4.886 604 728	7.70×10^{4}	4.761 927 838	−0.125
PC3-3	21.006 547 93	2.58×10^{8}	8.411 734 426	4.899 067 625	7.93×10^{4}	4.761 927 838	−0.137
PC3-4	20.980 890 91	2.65×10^{8}	8.423 581 959	4.904 830 265	8.03×10^{4}	4.761 927 838	−0.143
PC3-5	21.028 944 02	2.52×10^{8}	8.401 392 678	4.894 037 399	7.83×10^{4}	4.761 927 838	−0.132
PC3-6	22.731 405 89	4.12×10^{7}	7.615 254 02	4.511 659 555	3.25×10^{4}	4.761 927 838	0.250
PC4-1	24.688 816 07	5.15×10^{6}	6.711 388 959	4.072 019 59	1.18×10^{4}	3.761 927 838	−0.310
PC4-2	24.821 120 58	4.47×10^{6}	6.650 295 262	4.042 303 616	1.10×10^{4}	3.761 927 838	−0.280
PC4-3	23.255 099 61	2.36×10^{7}	7.373 430 174	4.394 036 437	2.48×10^{4}	3.761 927 838	−0.374
PC4-4	24.402 278 26	6.98×10^{6}	6.843 702 316	4.136 376 807	1.37×10^{4}	3.761 927 838	0.028
PC4-5	26.192 444 48	1.04×10^{6}	6.017 064 793	3.734 300 316	5.42×10^{3}	3.761 927 838	−0.310
PC4-6	24.689 894 99	5.14×10^{6}	6.710 890 749	4.071 777 26	1.18×10^{4}	4.761 927 838	−0.127

表 10 *VP1* 准确度验证数据

分组	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数 /copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	病毒滴度对数值	计算病毒滴度 /IU·mL^{-1}	理论病毒滴度对数值	实测浓度与理论浓度对数值差值
PC3-1	20.131 392 16	5.02×10^{10}	10.701 132 97	4.978 974 116	9.53×10^{4}	4.761 927 838	−0.217
PC3-2	20.286 828 36	4.45×10^{10}	10.648 372 98	4.947 581 924	8.86×10^{4}	4.761 927 838	−0.186
PC3-3	20.031 112 04	5.43×10^{10}	10.735 171 23	4.999 226 883	9.98×10^{4}	4.761 927 838	−0.237
PC3-4	20.105 386 73	5.13×10^{10}	10.709 960 04	4.984 226 222	9.64×10^{4}	4.761 927 838	−0.222
PC3-5	20.247 932 43	4.59×10^{10}	10.661 575 5	4.955 437 42	9.02×10^{4}	4.761 927 838	−0.194
PC3-6	21.562 917 07	1.64×10^{10}	10.215 227 9	4.689 860 603	4.90×10^{4}	4.761 927 838	0.072
PC4-1	23.782 943 73	2.90×10^{9}	9.461 680 281	4.241 499 767	1.74×10^{4}	3.761 927 838	−0.480
PC4-2	23.859 225 59	2.73×10^{9}	9.435 787 79	4.226 093 735	1.68×10^{4}	3.761 927 838	−0.464
PC4-3	23.451 447 17	3.75×10^{9}	9.574 200 75	4.308 449 447	2.03×10^{4}	3.761 927 838	−0.547
PC4-4	25.534 872 69	7.36×10^{8}	8.867 019 894	3.887 676 837	7.72×10^{3}	3.761 927 838	−0.126
PC4-5	23.746 981 3	2.98×10^{9}	9.473 887 07	4.248 762 807	1.77×10^{4}	3.761 927 838	−0.487

5 精密度验证

人类细小病毒 B19 阳性标准物质阳性样本 1 和阳性样本 2 使用 *NS1* 基因引物和探针重复检测 6 次，批内 CV 最大值为 2.597%，批间 CV 最大值分别为 3.221% 和 3.586%，均≤5%，符合要求（见表 11）。使用 *VP1* 基因引物和探针重复检测 5 次，批内 CV 最大值为 0.723%，批间 CV 最大值分别为 2.704% 和 3.550%，均≤5%，符合要求（见表 12），说明检测方法重复性好，精密度高。

表 11 *NS1* 精密度验证数据

样品编号	实验批次	检测 Ct 值			结果统计					
		第 1 批	第 2 批	第 3 批	批内均值	批内 SD	批内 RSD/%	批间均值	批间 SD	批间 RSD/%
阳性样本 1	第 1 次	21.076	21.087	20.986	21.050	0.055	0.262	21.310	0.686	3.221
	第 2 次	21.115	21.084	20.987	21.062	0.067	0.318			
	第 3 次	21.014	20.993	21.012	21.007	0.012	0.055			
	第 4 次	21.025	20.999	20.919	20.981	0.055	0.264			
	第 5 次	21.083	21.025	20.979	21.029	0.052	0.246			
	第 6 次	22.050	23.072	23.072	22.731	0.590	2.597			
阳性样本 2	第 1 次	24.629	24.651	24.786	24.689	0.085	0.345	24.675	0.885	3.586
	第 2 次	24.806	24.955	24.702	24.821	0.127	0.512			
	第 3 次	23.228	23.301	23.236	23.255	0.040	0.172			
	第 4 次	24.356	24.485	24.366	24.402	0.072	0.294			
	第 5 次	26.194	26.225	26.158	26.192	0.033	0.127			
	第 6 次	24.706	24.701	24.663	24.690	0.023	0.094			

表 12 *VP1* 精密度验证数据

样品编号	实验批次	检测 Ct 值			结果统计					
		第 1 批	第 2 批	第 3 批	批内均值	批内 SD	批内 RSD/%	批间均值	批间 SD	批间 RSD/%
阳性样本 1	第 1 次	20.084	20.258	20.052	20.131	0.111	0.551	20.394	0.552	2.704
	第 2 次	20.452	20.240	20.169	20.287	0.147	0.725			
	第 3 次	20.072	20.041	19.980	20.031	0.047	0.236			
	第 4 次	20.140	20.131	20.045	20.105	0.053	0.263			
	第 5 次	20.411	20.205	20.128	20.248	0.146	0.723			
	第 6 次	21.541	21.566	21.582	21.563	0.021	0.096			
阳性样本 2	第 1 次	23.922	23.695	23.732	23.783	0.121	0.511	24.075	0.831	3.550
	第 2 次	23.952	23.818	23.808	23.859	0.080	0.337			
	第 3 次	23.486	23.477	23.391	23.451	0.052	0.223			
	第 4 次	25.555	25.610	25.439	25.535	0.087	0.340			
	第 5 次	23.673	23.850	23.718	23.747	0.092	0.387			

6 基因分型验证

人类细小病毒 B19 病毒分型盘基因 1 型、2 型、3 型阳性血浆标本(标本 1、样本 2、样本 3)稀释至方法检测范围内某固定浓度,每个标本重复检测 3 次。基因 1 型、2 型、3 型阳性血浆标本检测结果均为反应性,使用 *NS1* 引物和探针检测,3 种基因型重复检测 Ct 值的 CV 分别为 1.926%、2.232%、1.820%,均≤5%(见表 13);使用 *VP1* 引物和探针检测,3 种基因型重复检测 Ct 值的 CV 分别为 0.816%、0.504%、0.871%,均≤5%(见表 14),说明本检测方法可以正确检测出人类细小病毒 B19 的 3 种基因型。

表 13 *NS1* 基因分型验证结果

标本编号	Ct 值			平均 Ct 值	CV/%
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
基因 1 型	25.931	26.946	26.520	26.466	1.926
基因 2 型	28.139	26.990	27.195	27.441	2.232
基因 3 型	27.958	27.409	26.961	27.442	1.820

表 14 *VP1* 基因分型验证结果

标本编号	Ct 值			平均 Ct 值	CV/%
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
基因 1 型	27.743	27.295	27.549	27.529	0.816
基因 2 型	27.683	27.836	27.557	27.692	0.504
基因 3 型	28.193	28.262	27.808	28.088	0.871

7 检测限验证

将已知浓度人类细小病毒 B19 阳性标准物质进行系列稀释(即 PC1 ~ PC8),每个浓度水平重复检测 3 次,以水作为空白对照,B19 阴性血浆作为阴性对照,直至检测信号与阴性血浆接近,然后在此浓度水平分别使用 *NS1*、*VP1* 引物和探针重复检测 20 次,*NS1* 基因检出率为 95%(19/20),检测限为 5.78×10^{1} IU·mL^{-1}(见表 15 和表 16);*VP1* 基因检出率为 95%(19/20),检测限为 5.78×10^{0} IU·mL^{-1}(见表 17 和表 18)。

表 15 *NS1* 检测限验证结果

样品分组	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数/copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	病毒滴度对数值	病毒滴度/IU·mL^{-1}
PC1	16.324 578 6	6.38×10^{11}	11.804 633 89	6.761 927 838	5.78×10^{6}
PC2	18.990 847 91	8.63×10^{10}	10.935 859 27	5.761 927 838	5.78×10^{5}
PC3	20.233 669 28	3.40×10^{10}	10.530 899 55	4.761 927 838	5.78×10^{4}
PC4	21.736 396 79	1.10×10^{10}	10.041 252 27	3.761 927 838	5.78×10^{3}
PC5	23.876 764 3	2.21×10^{9}	9.343 836 984	2.761 927 838	5.78×10^{2}
PC6	29.183 668 77	4.12×10^{7}	7.614 640 348	1.761 927 838	5.78×10^{1}
PC7	30.630 723 95	1.39×10^{7}	7.143 133 283	0.761 927 838	5.78×10^{0}
PC8	28.992 684 05	4.75×10^{7}	7.676 870 627	−0.238 072 162	5.78×10^{-1}
水 1	—				
水 2	—				
阴性血浆 1	30.369 720 46				
阴性血浆 2	29.275 857 93				

—:未检出阳性扩增反应

表 16 *NS1* 检测限复核验证结果

项目	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	第 7 次
检测结果	+	+	+	+	+	+	+
次数/次	8	9	10	11	12	13	14
检测结果	+	+	+	+	+	+	+
次数/次	15	16	17	18	19	20	
检测结果	+	+	+	+	+	—	

+:可以检出阳性扩增反应;—:未检出阳性扩增反应

表 17 *VP1* 检测限验证结果

样品分组	目的基因 Ct 值	目的基因拷贝数/copies·mL^{-1}	目的基因拷贝数对数值	病毒滴度对数值	病毒滴度
PC1	16.200 642 9	3.09×10^{13}	13.489 367 78	6.761 927 838	5.78×10^{6}
PC2	18.850 355 15	3.33×10^{12}	12.522 672 33	5.761 927 838	5.78×10^{5}
PC3	19.996 558 51	1.27×10^{12}	12.104 502 55	4.761 927 838	5.78×10^{4}
PC4	21.498 957 95	3.60×10^{11}	11.556 381 63	3.761 927 838	5.78×10^{3}
PC5	23.570 610 68	6.32×10^{10}	10.800 579 83	2.761 927 838	5.78×10^{2}
PC6	28.268 590 29	1.22×10^{9}	9.086 614 268	1.761 927 838	5.78×10^{1}
PC7	37.723 958 33	4.34×10^{5}	5.637 008 999	0.761 927 838	5.78×10^{0}
PC8	35.161 117 55	3.73×10^{6}	6.572 011 108	−0.238 072 162	5.78×10^{-1}
水 1	—				
水 2	—				
阴性血浆 1	36.174 336 75				
阴性血浆 2	38.626 015 98				

—:未检出阳性扩增反应

表 18 *VP1* 检测限复核验证结果

项目	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 6 次	第 7 次
检测结果	+	+	+	+	+	+	+
次数/次	8	9	10	11	12	13	14
检测结果	+	+	+	+	+	+	+
次数/次	15	16	17	18	19	20	
检测结果	+	+	+	+	+	—	

+:可以检出阳性扩增反应;—:未检出阳性扩增反应

8 特异性和抗干扰能力验证

8.1 针对非人类细小病毒 B19 病原体的特异性研究

验证结果显示本方法针对上述 7 种非 B19 病原体血浆均为非反应性,种属特异性良好。在其他 7 种病原体同时存在时,使用 *NS1* 和 *VP1* 引物探针检测,B19 阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰,且与对照组相比,检测结果偏差分别为 0.005 和 0.043,均≤ ±0.5 × 对数值,符合要求。

8.2 针对血红蛋白、三酰甘油、非结合性胆红素抗干扰能力的研究

结果显示上述 3 种常见血浆干扰物质均为非反应性。同时在 3 种常见血浆干扰物质存在时,使用 *NS1* 和 *VP1* 引物探针检测,弱 B19 阳性标本能够稳定检出,B19 核酸检测方法不受干扰,与对照组相比,检测结果偏差分别为 0.115 和 0.032,均≤ ±0.5 × 对数值,符合要求。

8.3 对照组

B19 阳性标本 3 次重复检测结果 Ct 值的 CV 分别为 1.535% 和 1.546%,均≤5%,符合要求,结果见表 19 和表 20。

表 19 *NS1* 特异性和抗干扰能力验证结果

组别	检测 Ct 值				检测结果				对数差值
	第 1 批	第 2 批	第 3 批	CV/%	第 1 批	第 2 批	第 3 批	均值	
对照组	18.313	18.858	18.444	1.535	3.52×10^5	2.95×10^5	3.38×10^5	3.28×10^5	
病毒组	—				0				
实验组 1	18.567				3.25×10^5				0.005
干扰物质组	—				0				
实验组 2	19.346				2.52×10^5				0.115

—:未检出阳性扩增反应

表 20 *VP1* 特异性和抗干扰能力验证结果

组别	检测 Ct 值				检测结果				对数差值
	第 1 批	第 2 批	第 3 批	CV/%	第 1 批	第 2 批	第 3 批	均值	
对照组	19.135	19.717	19.304	1.546	2.31×10^4	1.82×10^4	2.16×10^4	2.10×10^4	
病毒组	—				0				
实验组 1	19.130				2.31×10^4				0.043
干扰物质组	—				0				
实验组 2	19.552				1.95×10^4				0.032

—:未检出阳性扩增反应

讨 论

本研究针对 GenBank 数据库 B19 病毒 3 种基因型的高度保守区设计特异性引物和荧光探针,构建重组载体制备参考品质粒,通过重组质粒构建、标准曲线建立及国际单位(IU)溯源,成功搭建了一套完整的 B19 病毒核酸检测体系。同时对建立的 B19 核酸检测系统的线性范围、准确度、精密度(重复性

和中间精密度)、检测限、特异性、抗干扰能力以及基因分型进行系统性验证,验证结果均符合要求。证明本研究建立的人类细小病毒 B19 核酸检测系统特异性强、灵敏度高、线性范围广、稳定可靠、准确度高,可用于原料血浆中人类细小病毒 B19 核酸检测。与本课题组前期基于商品化试剂盒的研究相比[10],本研究采用双靶标扩增策略,有效规避了单一靶标易因病毒载量偏低及毒株序列基因突变导致漏检的行业痛点,可满足原料血浆中人类细小病毒 B19 核酸的检测需求,同时为原料血浆中 B19 病毒筛查提供了一套自主化、标准化、可参考的技术思路。

本课题组前期已完成商品化试剂盒 B19 核酸检测的方法学验证及市售血液制品的 B19 筛查研究[10-11],证实了核酸检测技术(nucleic acid testing, NAT)在 B19 检测中的可靠性,但商品化试剂多采用单一靶标扩增设计,B19 病毒在自然传播和进化过程中可能发生基因序列的微小突变[3,12],单一靶标体系若遭遇突变位点位于扩增区域的情况,可能导致病毒漏检或检测失效的风险,原料血浆筛查的核心要求为“低漏检、高可靠”,漏检将直接导致血液制品的病毒传播风险,这在某种程度上佐证了贾俊婷等[13]报道的 B19 毒株分子特性研究及侯继锋等[14]在凝血因子类制品 B19 检测中发现的核酸反应性存在差异的现象。

双靶标引物探针组的设计是本研究的核心创新点之一。本研究在前期研究基础上,围绕国内血液制品行业的实际筛查需求开展自主检测体系构建,针对性地通过生物信息学分析筛选 B19 基因组 *NS1*、*VP1* 这 2 个独立的高度保守区,设计双靶标扩增体系,实现了对病毒核酸的双重扩增与验证,既进一步提升了检测的灵敏度,又从技术层面有效降低了毒株突变引发的漏检风险,显著提高检测体系的稳定性和可靠性。本检测系统线性范围 1.0×10^4 ~ 1.0×10^8 IU·mL^{-1},*NS1*、*VP1* 基因拟合曲线 R^2 分别达 0.987、0.995 2,均 ≥ 0.980 0;检测限分别为 57.8、5.78 IU·mL^{-1},且检出率均≥95%;准确度偏差≤ ±0.5 × 对数值,批内、批间精密度 CV 值均≤5%,可以满足原料血浆大规模筛查的技术要求。本检测系统的特异性与抗干扰能力高度适配原料血浆成分复杂的实际检测场景,对甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎等 7 种常见经血传播病原体无交叉反应;在与上述病原体及高浓度血红蛋白、三酰甘油、非结合性胆红素等血浆干扰物质共存时,仍能稳定检出 B19 阳性标本,与对照组偏差均≤ ±0.5 × 对数值,可有效避免假阳性、假阴性结果。同时本系统可准确识别 B19 病毒 1、2、3 型,各基因型 Ct 值相对偏差≤5%,能兼顾原料血浆常规筛查与病毒基因型监测的双重需求,为 B19 流行毒株变异追踪提供技术支撑。同时,本研究采用中国药品检定研究院构建的 B19 病毒核酸检测试剂国家参考品与标准品完成方法学验证[15],检测结果可实现国际单位溯源,为检测结果的标准化、实验室间结果的可比性提供了保障,也为我国 B19 病毒检测相关标准的制定积累了重要的实验数据。

本研究仍存在一定局限性。① 验证样本主要为原料血浆,对孕妇、儿童、免疫缺陷人群等临床感染标本的检测适应性仍须进一步验证;② 目前为单一病毒检测,筛查效率仍有提升空间。未来可扩大样本类型与来源开展多中心临床验证,与前期商品化试剂盒检测结果进行大样本比对,进一步完善体系的临床适用性。可基于本研究双靶标设计思路,结合数字 PCR 技术开发绝对定量检测体系,提升低载量样本的检测精度;同时开发多重 qPCR 体系,实现 B19 与乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒等常见经血传播病毒的同步筛查,提升原料血浆筛查的效率与成本效益。此外,可将 B19 核酸检测体系应用于血液制品生产全链条质控,开展献浆人群 B19 病毒大规模筛查与变异监测,为我国 B19 病毒监管法规标准制定及相关诊断试剂、治疗药物研发提供数据支撑。

[参 考 文 献]

[1] COSSART YE, FIELD AM, CANT B, *et al*. Parvovirus-like particles in human sera[J]. *Lancet*, 1975, 1(7898): 72-73.

[2] HEEGAARD ED, BROWN KE. Human parvovirus B19[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15(3): 485-505.

[3] KAUFMANN B, SIMPSON AA, ROSSMANN MG, *et al*. The structure of human parvovirus B19[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11628-11633.

[4] XIONG YQ, TAN J, LIU YM, *et al*. The risk of maternal parvovirus B19 infection during pregnancy on fetal loss and fetal Hydrops: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Virol*, 2019, 114: 12-20.

[5] Food and Drug Administration, HHS. Guidance for industry: nucleic acid testing (nat) to reduce the possible risk of human parvovirus b19 transmission by plasma derived products additional [EB/OL]. (2009-07-28)[2024-06-30]. https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2009-07-28/pdf/E9-17965.pdf.

[6] PPTA. QSEAL NAT Testing Standard (Version 2.0). Annapolis (MD): Plasma Protein Therapeutics Association [EB/OL]. (2013-06-13)[2024-07-01]. https://uploads-ssl.webflow.com/638f893112c6eac0e46ac576/64517906a60bdb04ed8c3b74_

NATTestingV2-3. pdf.
[7] European Directorate for the Quality of Medicines&Healthy Care. European pharmacopoeia[S]. 9.0. Strasbourg: EDQM, 2016.
[8] WHO. Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation[EB/OL]. (2005 - 10 - 08)[2024 - 06 - 30]. https://cdn. who. int/media/docs/default-source/biologicals/blood-products/ecbs-2005-annex-4-human-plasma-fractionation. pdf? sfvrsn = 50177626_2&download = true.
[9] 国家药品监督管理局药品审评中心. 特异性人免疫球蛋白药学研究与评价技术指导原则[EB/OL]. (2022 - 05 - 25)[2024 - 06 - 30]. https://www. cde. org. cn/main/news/viewInfoCommon/405635e0ad527825015870c9ee5dcd47.
[10] 王月, 郑宵蓓, 郑雅婧, 等. 人类细小病毒 B19 核酸检测方法的建立及方法学验证[J]. 中国输血杂志, 2024, 37(11): 161 - 168.
[11] 王月, 郑宵蓓, 龚钦, 等. 血液制品中人类细小病毒 B19 核酸检测分析[J]. 中国输血杂志, 2025, 38(7): 950 - 957.
[12] KAUFMANN B, SIMPSON AA, ROSSMANN MG, *et al*. The structure of human parvovirus B19[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(32): 11628 - 11633.
[13] 贾俊婷. 血源性人细小病毒核酸检测体系建立与人细小病毒 B19 分子特性分析[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
[14] 侯继锋, 王敏, 马秋平. 原料血浆及血液制品中人细小病毒 B19 DNA 的检测[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(8): 1043 - 1044, 1048.
[15] 麻婷婷, 许四宏, 周海卫. 人细小病毒 B19 核酸检测试剂国家参考品的建立[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(12): 1596 - 1599, 1603.

编辑:刘卓越/接受日期:2026 - 04 - 23