

国产和进口荧光定量 PCR 试剂检测 HBV-DNA 的比对分析*

张 玥, 田文君, 刘义庆, 张炳昌, 张 庆, 渠 滕, 刘春梅[△](山东大学附属省立医院检验科, 济南 250021)

【摘要】 目的 分析国产和进口实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂检测乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 的相关性,探讨国产和进口试剂在临床应用中的差异。**方法** 使用国产和进口试剂平行检测 262 例乙型肝炎(乙肝)患者血浆当中的 HBV-DNA 水平,国产试剂采用手工提取标本,罗氏 LightCycler480 II (LC480 II)进行核酸扩增;进口试剂则采用罗氏 COBAS AmpliPrep(CAP)和 COBAS Taqman48(CTM)进行标本提取和扩增;对 HBV-DNA 病毒载量数据进行对数转换(log10),并将两组数据进行相关分析。**结果** 国产和进口试剂检测结果,经线性拟合, $R^2=0.814\ 3$ 。HBV-DNA 浓度在 $10\sim10^3$ IU/mL 的标本, $R^2=0.300\ 6$;浓度在 $10^4\sim10^5$ IU/mL 的标本, $R^2=0.411\ 8$;浓度在 $10^6\sim10^8$ IU/mL 的标本, $R^2=0.801\ 7$ 。进口试剂阳性检出率为 75.57%(198/262),明显高于国产试剂阳性检出率[65.65%(172/262)]。**结论** 国产试剂和进口试剂相比,相关性良好。HBV-DNA 浓度在 $10^6\sim10^8$ IU/mL 时,相关性最高;浓度在 $10^4\sim10^5$ IU/mL 时,相关性一般;浓度在 $10\sim10^3$ IU/mL 时相关性较差,国产试剂与进口试剂有明显差异,灵敏度有待进一步提高。

【关键词】 乙型肝炎病毒 DNA; 实时荧光定量 PCR; 试剂比对; 血浆

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.002 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)02-0147-02

Comparative analysis on domestic and imported fluorescent quantitative PCR reagents for detecting HBV-DNA*

ZHANG Yue, TIAN Wen-jun, LIU Yi-qing, ZHANG Bing-chang, ZHANG Qing, QU Teng, LIU Chun-mei[△] (Department of Clinical Laboratory, Affiliated Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China)

【Abstract】 Objective To analyze the correlation between the domestic and imported real-time fluorescent quantitative PCR reagents for detecting HBV-DNA and to explore their difference in clinical application. **Methods** The domestic and imported reagents were used to parallelly detect the plasma HBV-DNA content in 262 cases of hepatitis B. The domestic reagent adopted the sample extracting by adopting the manual method and the amplification for nucleic acid was performed by the Roche LightCycler480 II (LC480 II); the imported reagent used the Roche COBAS AmpliPrep (CAP) and COBAS Taqman48(CTM) for conducting the sample extracting and amplification; the HBV DNA viral load data (log10) was performed the logarithmic transformation and the 2 sets of data were conducted the correlation analysis. **Results** The detection results of the domestic and imported reagents were performed the linear fitting, $R^2=0.814\ 3$. The sample with the concentration range of $10-10^3$ IU/mL, $R^2=0.300\ 6$; the sample with the concentration range of 10^4-10^5 IU/mL, $R^2=0.411\ 8$; the sample with the concentration range of 10^6-10^8 IU/mL, $R^2=0.801\ 7$. The positive detection rate of the imported reagent was 75.57% (198/262), which was significantly higher than 65.65% (172/262) of the domestic reagent. **Conclusion** There is a good correlation between the domestic reagent and imported reagent. The correlation is the highest when the HBV-DNA concentration in the range of 10^6-10^8 IU/mL; the correlation is general when the concentration in the range of 10^4-10^5 IU/mL; the correlation is lowest when the concentration in the range of $10-10^3$ IU/mL, there is a significant difference between the domestic reagent and imported reagent and the sensitivity of the domestic reagent remains to be further improved.

【Key words】 HBV-DNA; real-time fluorescent quantitation PCR; reagent comparison; plasma

乙型肝炎(简称乙肝)是世界常见的传染病之一^[1],全球感染乙肝的人群约有 3.5 亿^[2],中国大约 1.2 亿人,占三分之一^[3],占我国人口总数的 8%~10%,是感染乙型肝炎病毒(HBV)人数最多的国家。HBV 是属于嗜肝 DNA 病毒科,有较强的抵抗性、传染性和变异性,并且传播途径多样。乙肝极易发展为慢性肝炎和肝硬化,从而引发肝癌^[3],所以预防和治疗乙肝已成为中国乃至全球尤为重要的研究课题之一。现今,在临床众多检测 HBV 感染的方法中,实时荧光定量 PCR 技术检测乙肝病毒核酸(HBV-DNA)是目前特异性较好、灵敏度

较高的方法^[4],HBV-DNA 复制越高,传染性就越强。同时,结合乙肝五项^[5]、肝功能和甲胎蛋白(AFP)等项目的测定,可以更好地反映出乙肝患者的病情和用药治疗情况,从而为临床医生对患者进行诊断和治疗提供可靠的理论依据。本文就收集的 262 例乙肝患者血液标本,采用两种不同的试剂进行检测并统计分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 7 月至 2014 年 1 月的期间在本院就诊做超敏乙肝病毒 DNA(HS-HBV-DNA)检测时的乙二

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81102220);山东省自然科学基金资助项目(ZR2011HM019);

山东省临床重点专科建设项目(鲁卫医字[2013]26 号)。

作者简介:张玥,女,技师,本科,主要从事肝病的分子诊断工作。 [△] 通讯作者, E-mail: lcm831011@163.com。

胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血标本 262 例。将标本按 3 000 r/min 离心 8 min, 留取血浆冷冻于 -80 ℃ 冰箱保存。

1.2 仪器与试剂 试剂 A 由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供; 试剂 B 由罗氏诊断产品有限公司提供。试剂 A、B 分别用罗氏 LC480 II 扩增仪和罗氏 CAPCTM 检测系统, 实验所用试剂在有效期内, 仪器均已进行校准。

1.3 方法 将 262 例血浆标本分别用试剂 A、B 进行平行检测, 试剂 A 采用人工提取核酸和实时荧光定量检测技术, 最低检出限为 5×10^2 IU/mL, 定量检测线性范围为 $(1 \times 10^3) \sim (5 \times 10^7)$ IU/mL; 试剂 B 基于罗氏 CAP 提取仪标本制备过程和同时进行的靶 DNA PCR 扩增与靶序列特异性双标记寡核苷探针检测过程, 最低检出限为 12×10 IU/mL, 定量检测线性范围为 $(5.45 \times 10) \sim (1 \times 10^8)$ IU/mL。

1.3.1 试剂 A 离心管中加入 100 μ L 待测血浆标本和 100 μ L 的 DNA 提取液 1, 充分振荡混匀, 13 000 r/min 离心 10 min; 吸弃上清液; 加入 25 μ L DNA 提取液 2, 振荡混匀, 完全将沉淀溶解, 3 000 r/min 离心 10 s, 然后 100 ℃ 干浴 10 min; 13 000 r/min 离心 10 min, 离心完毕后, 取 2 μ L 上清液加入 PCR 管内的反应液中。

1.3.2 试剂 B 取待测血浆标本 1 030 μ L, 加入带条码夹的样品管中, 与配套专用试剂盒装入罗氏 CAP 提取仪内。

1.3.3 质量控制 试剂 A 每批次做阴性对照、空白对照及高中低三个不同水平的质控品; 试剂 B 每批次均做阴性对照及一个低水平的质控品。

1.4 统计学处理 首先对 HBV-DNA 病毒载量数据进行对数转换(log10), 采用 SPSS21.0 软件进行统计学分析。试剂比对用线性分析和 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种试剂检测结果相关分析 将试剂 A、B 的检测结果取对数值后做相关分析, 通过分析曲线可以看出, 线性良好, 试剂 A、B 契合度一般, $R^2 = 0.814\ 3$, 线性曲线如表 1 所示。

表 1 两种试剂检测结果相关分析

检测浓度(IU/mL)	线性方程	R^2
$10^1 \sim 10^3$	$Y = 0.413\ 0X + 1.746\ 3$	0.300 6
$10^4 \sim 10^5$	$Y = 0.840\ 3X + 0.906\ 3$	0.411 8
$10^6 \sim 10^8$	$Y = 0.907\ 0X + 0.611\ 4$	0.801 7
合计	$Y = 0.773\ 2X + 1.064\ 1$	0.814 3

2.2 两种试剂检测率比较 试剂 B 阳性检出率为 75.57% (198/262), 试剂 A 阳性检出率为 65.65% (172/262), 经检验, 进口试剂阳性检出率明显高于国产试剂 ($\chi^2 = 20.833, P < 0.01$), 结果详见表 2。

表 2 两种试剂检测率比较(n)

进口试剂	国产试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	170	28	198
阴性	2	62	64
合计	172	90	262

3 讨 论

HBV-DNA 定量可以精准地反映患者体内的病毒复制情况, 目前检测 HBV-DNA 定量的方法和试剂种类繁多, 国际公认进口罗氏试剂为检测 HBV-DNA 定量的参比试剂^[6]。进口

试剂灵敏度高、精密度高, 但试剂成本较高, 仪器价格昂贵, 检测时间长, 需要患者血浆量大, 在大部分医院难以广泛使用。国产试剂基本为开放试剂, 价格适中, 检测快速, 重复性较好, 医院因为科室发展和经济水平等原因, 使用国产试剂的单位比较普遍^[7]。试剂 A 为煮沸法, 手工提取核酸繁琐复杂, 极易造成核酸的丢失, 容易将检出限附近的低浓度标本漏检^[8]; 试剂 B 采用磁珠分离技术, 标本处理在罗氏 CPA 提取仪内进行, 降低了因操作不当等原因产生的假阳性, 且每个标本中加入内标来防止假阴性, 监测整个提取和扩增过程, 试剂前期准备也简单、便捷。

本组结果分析可以看出, 两种试剂线性相关性良好, $R^2 = 0.814\ 3$ 。HBV-DNA 浓度在 $10^6 \sim 10^8$ IU/mL 时, 相关性最高; 浓度在 $10^4 \sim 10^5$ IU/mL 时, 相关性一般; 浓度在 $10 \sim 10^3$ IU/mL 时相关性较差, 较进口试剂差异有统计学意义, 灵敏度有待进一步提高。在 262 例标本检测结果中, 有 28 例经试剂 A 检测阴性而试剂 B 检测阳性, 提示试剂 B 的灵敏度更高; 有 2 例标本, 试剂 A 检测阳性而试剂 B 检测阴性, 说明在用试剂 A 提取过程存在污染的可能。两种试剂提取方法和对标本体积的需求量不同, 所以试剂的灵敏度、精密度和操作过程等也不同。在 262 例标本当中, 其中 4 例标本浓度大于 5×10^7 IU/mL, 用罗氏 CAPCTM 检测系统第一次上机实验未得出数据, 经 10 倍稀释得出结果。用试剂 A 做 4 例标本, 不用稀释便可得出实验结果。使用试剂 B 做浓度大于 5×10^7 IU/mL 的标本时, 必须稀释。所以, 在乙肝活动期或明确高浓度标本时, 可以直接选择试剂 A 来检测 HBV-DNA 水平。

现在临床治疗乙肝以核苷类抗病毒药物为主, 在长期的治疗过程当中, 极易发生 HBV 的变异和耐药^[9]。HBV 变异和耐药的发生, 不仅使患者治疗费用增加, 如不及时发现, 甚至会进一步恶化, 使病情加重, 影响后续治疗药物的选择。实时、准确地监测乙肝患者 HBV-DNA 的水平, 不仅是临床医生用药的关键性指标, 也是患者了解病情的直观数据^[10]。虽然进口试剂价格较贵, 但是灵敏度相比较, 可以在用药治疗后, 进行随访检测, 观察是否到达预期治疗效果。国产试剂在中、高浓度范围内, 相关性良好, 患者在初诊、乙肝活动期或 HBV 反跳时进行检测, 不仅减少了患者看病时间和经济负担, 还可以提高患者和医生对临床实验室的满意度。

综上所述, 2 种实时荧光定量 PCR 检测试剂, 标本 HBV-DNA 浓度在 $10 \sim 10^3$ IU/mL 时, 国产试剂与进口试剂差异有统计学意义。进口试剂灵敏度较高, 适用于乙肝患者耐药后选择新药治疗的疗效评估和患者治疗后期的病情监测。乙肝活动期或做高浓度标本时, 可以直接选择试剂 A。临床医生可根据患者的具体病情, 选择适合的检测试剂。

参考文献

[1] 朱妍. 137 例病毒性肝炎的病原学分析[J]. 中国医药指南, 2013, 11(9): 612-613.

[2] Tankivanich P, Sa-Nguanmoo P, Mahachai V, et al. A case-control study on sequence variations in the enhancer II /core promoter /precore and X gens of hepatitis B virus in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Hepatol Int, 2010, 4(3): 577-584.

[3] 吴肖峰. PreS1Ag 与 HBV-DNA、乙肝病毒“两对半”的相关性分析[J]. 中国当代医药, 2011, 18(14): 81-82.

[4] Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, et al. Multi-laboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2854-2858.

(下转第 150 页)

行 100 μL 加样时, 各组均满足实际工作要求。见表 1。

表 1 实验各组加样量计算结果($n=16$)

组别	10 μL			100 μL		
	$\bar{x}\pm s$	$E(\%)$	$CV(\%)$	$\bar{x}\pm s$	$E(\%)$	$CV(\%)$
A 组	9.72 $\pm$ 0.32	-2.8	3.29	100.8 $\pm$ 0.50	0.8	0.50
B 组	8.95 $\pm$ 0.76	-10.5	8.50	98.9 $\pm$ 0.59	-1.1	0.60
C 组	8.76 $\pm$ 0.29	-12.4	3.31	98.8 $\pm$ 0.43	-1.2	0.44
D 组	6.21 $\pm$ 0.90	-37.9	14.49	98.1 $\pm$ 0.93	-1.9	0.95

注: 实际工作 10 μL 加样应满足 E 在 $\pm 10\%$, $CV \leq 3.5\%$; 100 μL 加样应满足 E 在 $\pm 3\%$, $CV \leq 1.0\%$ 。

3 讨 论

实际工作中, 微量加样的准确性直接影响生物、化学等实验结果^[6-9], 而且加样量越小准确性越难以控制。如采用 ELISA 进行丙型肝炎抗体检测时, 微孔先加入 100 μL 稀释液, 再加入 10 μL 标本进行实验, 此时 10 μL 加样准确性比 100 μL 更难控制。本实验在进行 10 μL 加样时, 只有 A 组数据满足实际工作标准要求, 分析其原因, A 和 B 组比较, B 组采用未浸润分样, 由于液体表面张力的存在, 分样时悬空的加样针尖会产生 1 mm 左右的液滴, 即挂滴现象, 由于血浆类标本的黏度存在差异^[10], 表面张力即存在差异, 液滴大小不一, 实验结果显示 E 为 -10.5%, 即平均加样量只有 8.95 μL , 且 CV 为 8.50%, 加样准确性无法达标。A 组采用浸润分样, 加样针尖与稀释液液面接触, 分样时产生的液滴随即溶入稀释液中, 可以有效避免挂滴现象的产生, E 为 -2.8%, CV 为 3.29%, 准确度和精密度均达到标准。由以上两组实验可见, 消除挂滴现象对 10 μL 加样的准确性起着至关重要的作用, 同时也表明浸润加样可以有效消除挂滴现象。本实验在浸润分样时针尖会有极微量稀释液残留(稀释液残留量不会对后续分样产生影响), 实际工作中可以进一步调节和设置分样高度, 使针尖高度距稀释液液面小于产生液滴的直径, 分样时产生的液滴也可以随即溶入稀释液内, 既可以消除挂滴现象, 又可以防止加样针尖稀释液残留。A 和 C 组比较, 将样品吸入加样针后, 加样器活塞与样品之间会有一段空气存在(空腔气体), 当分样时, 活塞并不能直接挤压需要分配的液体, 而是挤压二者之间的空腔气体, 再将压力传导给前部的样品。空腔气体因黏性样品的阻力和活塞向外的压力共同作用产生微小的形变, 即体积缩小, 活塞挤压的进程不能完全传递给样品, 导致分液体积有所下降, 空腔体积越大(大容量加样针)产生形变越大, 对分样准确性影响也越大。如实验结果所示, 10 μL 加样时 C 组加样针容量较大, E 也越大为 -12.4%, 即平均加样量只有 8.76 μL , 已经不能满足准确性要求。D 组作为 B 和 C 组不利条件的叠加, 加样的准确性变得更低, 完全不能满足实际工作要求。在

进行 100 μL 加样时, 各组加样数据均满足实际工作标准要求。即全自动酶免一体机如果使用以上两种不同容量加样针进行加样, 以及加样时产生的微量挂滴现象对加样准确性的影响均处在允许范围内, 因此进行 100 μL 加样时, 选择实验中的 4 种参数组合均可。

综上所述, 使用全自动加样器进行微量加样时, 应当根据加样量的不同来选择适当的参数和方法。进行 10 μL 加样时, 应设计方法(如采用浸润加样)尽量减少分液时挂滴现象的产生, 同时选用容量小的加样针以减小空腔气体, 确保分样准确; 对于 100 μL 加样, 虽然以上参数对加样准确性有一定影响, 但在允许范围内, 可以根据实际情况选择参数。而对于一份标本需要同时进行多项酶联免疫吸附试验(不同体积)加样时, 可以从加样准确性、实验耗时、耗材使用量等各方面综合考虑, 设计更适合的加样参数和方法, 只有这样才会使加样的准确性得到提高, 从而降低整个酶联免疫吸附试验的系统误差, 为实际工作提供更为准确的实验数据。

参考文献

[1] 徐永良. STAR 全自动加样仪双向通讯功能的应用[J]. 中国输血杂志, 2014, 27(2): 204.

[2] 马秀敏, 杨忠思, 张永征. RSP 全自动加样器维护保养的体会[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(5): 360.

[3] 张辽明, 周海容, 张永昌, 等. 使用一次性加样针控制血液加样中交叉污染的探讨[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(4): 289-290.

[4] 赵飞雪. Microlab FAME 全自动酶免分析仪检测的影响因素及质量控制[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(13): 1090-1091.

[5] 朱美芹, 王莉莉. Tecan Freedom Evolyzer-2200 全自动酶免分析仪应用评价[J]. 实用医技杂志, 2013, 20(10): 1677-1678.

[6] 胡良勇, 汪朝红. 数字微量加样器检测校准方法的研究[J]. 中国医疗设备, 2011, 26(3): 11-12.

[7] 吴军, 常见. 微量加样器的正确使用与校准[J]. 中华医学研究杂志, 2006, 6(10): 1160.

[8] 叶贤林, 杨立新, 周一炎. 应用甲基橙比色法测试加样器的精度[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(6): 406-407.

[9] 费荣, 张立波, 马贵明. 环境温度变化对全自动加样器影响分析[J]. 临床血液学杂志, 2013, 26(6): 410-411.

[10] 席文华, 李泽文, 刘汝胜. 高黏样品影响全自动生化分析仪加样量[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(5): 500-501.

(收稿日期: 2014-05-22 修回日期: 2014-09-30)

(上接第 148 页)

[5] 韩晓蓉. 乙肝五项指标测定结果与 HBV DNA 的关系探讨[J]. 中外医疗, 2012, 32(17): 40-42.

[6] Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. Comparison of the Cobas Ampliprep/Cobas TaqMan HBV Test versus the Cobas Amplicor HBV monitor for HBV-DNA detection and quantification during antiviral therapy[J]. New Microbiol, 2008, 31(1): 27-35.

[7] 荆成宝, 禹梅, 刘婕. 2 种 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测试剂的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 206-207.

[8] 陈小颖, 赵荣平, 应春妹. 实时荧光定量 PCR 检测低含量 HBV-DNA 的分析[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 85-87.

[9] Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy [J]. Hepatology, 2009, 49(5 Suppl): S174-S184.

[10] 蔡惠兴, 吴英, 梁鹏. 乙肝血清标志物与 HBV-DNA 定量检测结果分析 [J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(2): 227-229.

(收稿日期: 2014-05-07 修回日期: 2014-08-28)