

• 检验试剂评价 •

两种国产 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒检测结果比较

孙 鹭, 张桂前, 高玉红, 牛 华[△]
(云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨两种国产乙型肝炎病毒(HBV)DNA 荧光定量试剂的临床检测结果相互之间是否存在差异。方法 80 例慢性乙型肝炎患者标本分别用两种国产 HBV DNA 荧光定量试剂检测, 然后对检测结果进行比较, 分析相互之间是否存在差异。结果 A、B 两种国产荧光定量试剂的 HBV DNA 定量检测结果相互之间相差小于一个数量级的占 95%, 大于一个数量级小于两个数量级的占 5%。经统计学分析, 差异无统计学意义($P=0.883$)。40 例 A 试剂检测完全阴性的标本有 6 例经 B 试剂检测为阳性, B 试剂检测的阳性率高于 A 试剂($P=0.034$)。结论 两种国产试剂对于定量结果大于 3 次方的标本具有很好的可比性。

关键词:试剂盒, 诊断; 聚合酶链反应; 比较

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)20-2392-02

乙型肝炎病毒核酸 (HBV DNA) 的定量测定在乙型肝炎患者的临床治疗监测中有重要参考价值, 准确定量检测血清中 HBV DNA 能反映 HBV 在肝脏复制的程度, 对乙型肝炎治疗监测具有极其重要意义, 同时也是考查抗病毒药物治疗效果的重要依据^[1-2]。荧光定量 PCR 法检测 HBV DNA 现已成为监测乙肝病毒复制最常用的检测手段。国内生产 HBV DNA 的试剂厂家很多, 方法各有不同, 在检测灵敏度、特异性、定量准确性、检测范围和低病毒载量样本的检测精密密度等方面存在一定差异^[3], 因此导致不同医院之间的检测结果难以进行比较。本研究选用国内试剂厂家中的两种 HBV DNA 试剂盒, 对 80 例慢性乙型肝炎患者血清进行 HBV DNA 定量检测, 比较两种试剂检测结果之间是否存在差异, 探讨两种试剂结果的可比性以及对本实验室的适用性, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2010 年 6~9 月期间来本院检测的慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 样本 80 例, 其中 40 例经 A 试剂检测阳性 (大于 1 000 IU/mL), 40 例经 A 试剂检测完全阴性 (小于 1 000 IU/mL, 且扩增曲线呈直线); 质控品 B01 为中检所 HBV 定量标准品 L0 用阴性血清稀释至靶值为 (1.5×10^6) IU/mL 的质控样本, 批号 0711。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 fast 荧光定量 PCR 仪、上海宏石 Slan 荧光定量 PCR 仪。PCR 实验室为卫生部验收合格的 PCR 实验室。荧光定量 PCR 试剂盒分别由国内两家基因技术诊断公司提供, 在有效期内使用。A 试剂为上海复星诊断公司提供的 HBV 荧光定量试剂盒, B 试剂为湖南圣湘生物科技有限公司提供的 HBV DNA 荧光定量试剂 (PCR-荧光探针法)。

1.3 方法 采用荧光定量 PCR 方法, 严格按照说明书进行操作, 由同一操作人员进行操作。根据试剂来源及操作条件不同, 分为两种方法。A 方法为 A 试剂检测方法, 采用煮沸法处理样本, 需要煮沸裂解、高速离心富集 DNA, 其扩增条件为 50 °C 反应 2 min, 94 °C 保温 5 min, 再按 93 °C 30 s, 60 °C 90 s, 40 个循环。B 方法为 B 试剂对应检测方法, 采用一步法在血清中加入核酸释放剂后全部转入扩增, 其扩增条件为 50 °C 反应 2 min, 94 °C 保温 5 min, 再按 94 °C 15 s, 57 °C 30 s, 45 个循环。

1.4 统计学处理 血清 HBV DNA 检测结果经对数转换后呈正态分布, 各组检测结果对数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对 *t* 检验, 所有分析使用 SPSS 11.5 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 两种试剂检测 HBV DNA 定量结果的比较 A 试剂检

测结果为 5.08 ± 1.66 , B 试剂检测结果为 5.29 ± 1.64 , 差异无统计学意义 ($P=0.833$)。因此, 对于定量结果大于 1 000 IU/mL 的样本, A 试剂与 B 试剂的相关性较好, 两者具有可比性。结果见图 1。

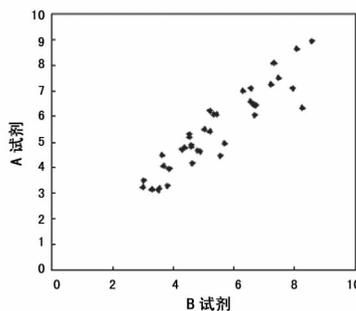


图 1 两试剂 HBV DNA 检测结果的散点图

2.2 HBV DNA 定量检测灵敏度的比较 为了比较两种试剂的灵敏度, 用 B 试剂对 40 个经过 A 试剂检测完全阴性的样本进行检测 (图 2), 其中有多数样本扩增曲线出现抬头, 表明样本为弱阳性, 其中有 6 个样本的定量结果大于 100 IU/mL, 两组检出率差异有统计学意义 ($P=0.034$)。结果见表 1。

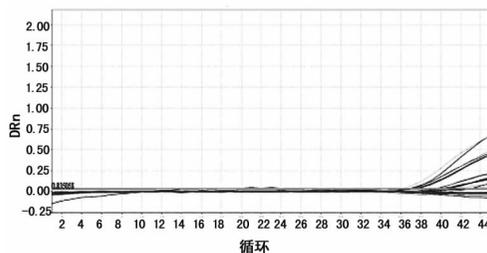


图 2 对 A 试剂检测完全阴性的标本经 B 试剂检测后的样本扩增曲线

表 1 两组试剂 HBV DNA 检测结果灵敏度的比较 (IU/mL)

| 试剂 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| A 试剂 | <1 000 | <1 000 | <1 000 | <1 000 | <1 000 | <1 000 |
| B 试剂 | 193 | 216 | 218 | 272 | 297 | 496 |

2.3 HBV DNA 定量检测重复性的比较 为了比较两种试剂的重复性, 采用经中检所 HBV 定量标准品 L0 用阴性血清稀

[△] 通讯作者, E-mail: ynccl_nh@126.com.

释至靶值为 (1.5×10^6) IU/mL 的质控样本 B01, 经梯度稀释后, 进行重复性实验, B01 及其梯度稀释的样本重复性很好。CV 值经配对 *t* 检验分析, 差异无统计学意义 ($P=0.609$)。结果见表 2。

表 2 B01 及其梯度稀释样本定量分析结果

| 靶值 | A 试剂 | | | B 试剂 | | |
|--------------------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|--------------------|-------|
| | \bar{x} (IU/mL) | <i>s</i> (IU/mL) | CV | \bar{x} (IU/mL) | <i>s</i> (IU/mL) | CV |
| 1.50×10^6 | 8.95×10^5 | 8.77×10^4 | 0.098 | 1.05×10^6 | 8.49×10^4 | 0.081 |
| 1.50×10^5 | 1.08×10^5 | 2.30×10^4 | 0.051 | 1.10×10^5 | 7.22×10^3 | 0.065 |
| 1.50×10^4 | 1.20×10^4 | 3.89×10^2 | 0.042 | 1.17×10^4 | 3.27×10^2 | 0.028 |
| 1.50×10^3 | 1.43×10^3 | 6.94×10^2 | 0.047 | 1.09×10^3 | 2.61×10^2 | 0.025 |
| 1.50×10^2 | — | — | — | 1.12×10^2 | 5.03×10^1 | 0.405 |
| 合计 | 2.54×10^5 | 2.40×10^4 | 0.056 | 2.93×10^5 | 2.31×10^4 | 0.047 |

—: 低于检测下限。

3 讨论

两种试剂对于 40 例已知的慢性乙型肝炎患者血清的检测结果相互之间差异小于一个数量级占 95% (38/40), 其中在同一数量级的占 92.5% (37/40), 不在一个数量级但相差不到一个数量级的占 2.5% (1/40), 相差大于一个数量级小于二个数量级的占 5% (2/40), 两种试剂检测结果的差异都在一个数量级之内。根据中国现行的标准^[4], 这两种试剂的检测结果相互之间具有较好的可比性, 经统计分析亦显示差异无统计学意义 ($P=0.833$)。但是 A 方法采用煮沸法处理样本, 需要煮沸、裂解、高速离心富集 DNA、反复吸取溶液等多个步骤, 在这些过程中, 容易损失样本中的 DNA、裂解不充分、富集不完全, 会造成 DNA 丢失, 从而可能导致样本定量结果偏低。B 方法无需对样本进行多次处理, 免去了一系列的加热、离心等操作, 样本 DNA 没有损失, 全部被转入扩增。其灵敏度可达 100 IU/mL, 准确定量范围 [$(5.0 \times 10^2) \sim (5.0 \times 10^9)$ IU/mL], 通过 A 方法与 B 方法的比较, 结果表明对于浓度大于 1 000 IU/mL 的样品, 两种试剂的检测结果没有统计学差异, 但 B 方法免去了加热、高速离心富集病毒等过程, 能够避免病毒核酸的损失, 具有方法学上的改进, 使得定量更准确。

HBV DNA 检测下限的确定, 不但是反映该实验室检测系统的精密度, 而且对乙型肝炎的诊断、治疗和预后也有意义^[5]。由于临床治疗对患者 HBV DNA 检测的要求很高, 实验室应尽可能消除检测结果的不准确性, 而且提高 HBV DNA 定量试剂盒灵敏度对乙型肝炎早期诊断具有重要意义。以往的研究表明, 国产试剂相当一部分标本检测结果出现假阴性 (低于

检测范围), 而且病毒载量越低, 出现假阴性的比例高^[6]。在本研究中发现, 试剂 A 的检测下限为 1 000 IU/mL, 因此对于低浓度样本无法检测出来, 假阴性率较高, 而试剂 B 的检测下限为 100 IU/mL, 准确定量下限达 500 IU/mL, 能够对低浓度样本进行检测定量, 这对于临床初筛或者药物监控治疗, 可以起到很重要的作用。

临床 PCR 检验结果的正确与否是试剂质量、人员素质、仪器设备状态、室内质控措施等的综合反映^[7-9], 其中临床基因扩增实验室所使用的 PCR 试剂盒的质量对测定结果的影响是直接而至至关重要的^[10]。本组结果显示, 试剂 B 总体性能优于试剂 A, 核酸获得率高、操作极其简单、兼具高灵敏度与定量准确性, 同目前国内主流厂家的优质试剂 B 相比, 试剂 B 检测范围更宽、操作更简便, 具有较高的临床价值。由于试剂盒的质量是影响临床 PCR 测定的决定性因素之一, 因此, 为保证检验质量, 临床基因扩增实验室必须选择质量好且符合自己实验室要求、与本实验室仪器相匹配的试剂盒应用于临床检测。

参考文献

- [1] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 225-226.
- [2] 王豪, 陶其敏, 吴娟, 等. 两种乙型肝炎病毒核酸定量检测方法的比较与评价[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(4): 318-320.
- [3] 李兵, 王敏, 徐六妹, 等. 三种 HBV 荧光定量 PCR 检测试剂的比较及结果分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(4): 301-304.
- [4] 李金明. 乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(5): 385-389.
- [5] 梁金明, 陈亚珍, 李艳. HBV-DNA 荧光定量检测下限的确定[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4): 257-279.
- [6] 王召钦, 周伯平, 陈心春, 等. 国产 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂检测准确性的初步分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(6): 479-481.
- [7] 吴泽才, 邓正华, 吴少群. 不同 PCR 仪检测结果对比[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(4): 398-399.
- [8] 雷秀霞, 陈斌, 龙幼敏, 等. 临床实验室 HBV DNA 检测室内质量控制的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 622-623.
- [9] 王家银. 沉淀煮沸提取方法对血清 HBV DNA 荧光定量检测的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1165-1166.
- [10] 申子瑜, 李金明. 临床基因扩增检验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 167-168.

(收稿日期: 2011-08-15)

(上接第 2381 页)

并 HIV 抗体阳性 10 例 (男 7 例, 女 3 例), 合并 HCV 抗体阳性 11 例 (男 6 例, 女 5 例); 在 HCV 抗体阳性标本中, 合并 HIV 抗体阳性 15 例 (男 11 例, 女 4 例), 合并梅毒阳性的 11 例 (男 6 例, 女 5 例); 进一步说明高危人群中存在性乱和共用注射器具的高危行为。从检测样本来源看, 本院的各科室均有 HIV 阳性病例报告。建议青年男女婚前、孕前、孕期、产前进行 HCV、HBV、HIV 和 TPPA 血清学检查, 有利于优生优育^[6]。

参考文献

- [1] 谢志坚. 148 例静脉吸毒者艾滋病病毒、乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒的调查结果分析[J]. 广西医学, 2004, 26(12): 1859-1860.
- [2] 文小青, 蒋基权, 黄运能, 等. 2007 年桂林市艾滋病哨点吸毒人群

监测结果报告[J]. 疾病监测, 2009, 15(1): 42-43.

- [3] 朱莉莉, 施苗盛. 吸毒者 HCV、HBsAg、梅毒感染状况及 ALT 的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1085-1086.
- [4] 钟福华, 唐梦瑾, 刘劲, 等. 2001~2006 年广西玉林市吸毒者行为特征及 HIV 感染状况的研究[J]. 中国艾滋病性病, 2008, 14(1): 71-73.
- [5] 朱秋映, 刘伟, 陈杰, 等. 1989~2006 年广西艾滋病流行情况分析[J]. 应用预防医学, 2008, 14(2): 73-75.
- [6] 林广玲, 黄林锋, 林少晖, 等. 3 649 例孕妇 HBV、HCV、HIV 和 TPPA 感染血清流行病学的分析[J]. 国际检验医学, 2009, 30(3): 232-233.

(收稿日期: 2011-08-12)