

• 临床研究 •

两种 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测试剂的比较与评价

陈亘志,杨联云[△],杨海燕
(重庆市合川区人民医院 401520)

摘要:目的 探讨 A、B 两种乙型肝炎病毒(HBV)DNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒检测结果之间的差异及各自临床应用的优缺点。**方法** 分别用两种试剂检测 100 例覆盖 HBV DNA 浓度测量区间的 5 组标本,每组 20 例,比较各组结果之间的差异;分别用黄疸、脂血、溶血标本做两种试剂的干扰试验,比较两者的抗干扰能力。**结果** 两种试剂检测高、中、低、临界值标本的结果符合率(偏倚在±7.5%以内)分别为 95%、80%、55%、30%。20 例 A 试剂检测为阴性的标本中有 6 例 B 试剂检测为临界值或低浓度阳性值。B 试剂检测结果受高黄疸标本影响较大,A 试剂检测结果未受明显干扰。**结论** 采用“一步法”的 B 试剂检测灵敏度较高,范围宽,操作简便,易标准化,省时省力,临床应用价值高;而 A 试剂抗干扰性相对较好。

关键词:乙型肝炎病毒; 荧光定量; 试剂; 偏倚
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.10.049 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)10-1417-02

乙型肝炎病毒(HBV)DNA 的定量检测是反映乙肝病毒在肝脏的复制程度的重要指标,也是评价临床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^[3],对预测慢性乙肝患者肝组织病理状态和病理学分级的效能最大^[4]。目前 HBV DNA 的试剂厂家很多,方法各不相同,在检测灵敏度、特异性、定量准确性、检测范围和低病毒载量标本的检测精密度等方面存在差异^[5-6]。本研究将科室常用的两种 HBV DNA 检测试剂盒,分别对其测量浓度区间的一致性、灵敏度、抗干扰性进行了比较,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 仪器为达安 DA7600 型核酸扩增实时荧光检测系统。A 试剂(批号 1650111,有效期至 2017 年 5 月 2 日)为上海某生物工程股份有限公司提供的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(煮沸法提取 DNA),B 试剂(批号 2016021,有效期至 2017 年 8 月 28 日)为湖南某生物科技有限公司提供的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(一步法,常温裂解直接释放核酸)。

1.2 材料 实验标本经 A 试剂检测 HBV DNA 浓度的标本 100 例,按照阴性(浓度值为 0,且扩增曲线为直线)、临界值(0~10² U/mL)、低值(>10²~10³ U/mL)、中值(>10³~10⁶ U/mL)、高值(>10⁶~10⁹ U/mL)分 5 组,每组 20 例。选取 HBV DNA 阴性的高浓度黄疸、脂血、溶血标本。质控品为中检所提供的 H0(1×10⁸ U/mL),L0(1×10⁴ U/mL),批号为 160211。

1.3 方法 A 试剂采用煮沸法处理标本,加样 100 μL,经煮沸裂解,高速离心富集 DNA,扩增条件为 50 ℃ 反应 2 min,94 ℃ 保温 5 min,再按 94 ℃ 10 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。B 试剂采用一步法,加样量 5 μL,加入核酸释放剂后扩增,扩增条件为 50 ℃ 反应 2 min,94 ℃ 保温 5 min,再按 94 ℃ 15 s,57 ℃ 30 s,45 个循环。两种试剂均采用 PCR 荧光探针法,由同一操作人员严格按照试剂说明书操作。

1.4 统计学处理 血清 HBV DNA 检测结果浓度值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 SPSS11.5 统计软件进行分析,*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种试剂检测 HBV DNA 结果比较 以 A 试剂为比较方法,B 试剂为实验方法。A、B 试剂分别检测 5 组浓度区间(每组 20 例标本,每个标本测 2 次取均值)的结果并取对数值,计算 A、B 试剂测定结果的偏倚。参照分子诊断项目分析性能评价标准两种方法的偏倚在±7.5%以内为结果一致。A、B 两种试剂在检测 HBV DNA 高、中值浓度标本的相关性较好,符合率大于 80%,低值和临界值的结果可比性差,符合率小于 55%,见表 1。

表 1 两种试剂 HBV DNA 检测结果比对			
浓度区间	符合例数(<i>n</i>)	总标本数(<i>n</i>)	符合率(%)
高值	19	20	95
中值	16	20	80
低值	11	20	55
临界值	6	20	30

2.2 HBV DNA 定量检测灵敏度的比较 20 例 A 试剂检测阴性(浓度值为 0,且扩增曲线为直线)的标本中,有 6 例 B 试剂检测结果为低浓度或临界值(浓度值 0~10³ U/mL),扩增曲线出现抬头。B 试剂检测为阴性的标本,A 试剂均未检出。说明 B 试剂检测的灵敏度高于 A 试剂。

2.3 两种试剂抗干扰能力比较 选取 HBV DNA 定量检测阴性的黄疸、脂血、溶血标本各 4 份,按生化检测其黄疸、脂血、溶血指数依次为+、++、+++、++++,干扰物最高浓度分别为:总胆红素(TBIL) 672 μmol/L,三酰甘油(TG) 28 mmol/L,血红蛋白(Hb) 12 g/L。分别用以上血清按 1:4 的比例稀释高浓度质控标本 H0(靶值为 1×10⁸ U/mL)得到 3 组有干扰物的高浓度标本(H1、H2、H3、H4,理论浓度值为 2×10⁷ U/mL),低浓度标本(L1、L2、L3、L4,理论浓度值为 2×10³ U/mL)。用 A、B 试剂分别检测各个标本 3 次,取均值记录结果。以理论浓度值对数为靶值,计算检测结果的偏倚,根据判断标准,偏倚在±7.5%以内判定检测结果未受干扰。实验证明 A 试剂抗干扰性较好;B 试剂对脂血、溶血、低黄疸(黄疸指数+~++)抗干扰能力可接受,但对高黄疸标本(黄疸指数+++~++++,TBIL>360 μmol/L)检测结果影响很大,可

[△] 通信作者,E-mail:yangly3@163.com。

假性增高或假性减低;其扩增曲线出现不规则的波浪状起伏,见表 2。

表 2 两种试剂抗干扰性比较(%)

标本	A 试剂结果偏倚			B 试剂结果偏倚		
	黄疸	脂血	溶血	黄疸	脂血	溶血
H1	3.4	-2.5	-6.3	5.8	3.6	-1.9
H2	-4.5	0.96	-4.9	6.9	-4.0	-3.8
H3	3.9	4.3	5.6	-35.6	-5.6	4.3
H4	5.6	-4.7	-5.7	47.5	-7.3	7.2
L1	-2.9	-5.2	4.7	-7.3	5.2	2.1
L2	4.3	4.6	2.8	-6.4	-6.2	4.8
L3	-3.8	-6.1	-3.7	-10.7	4.9	-5.4
L4	6.2	-4.9	5.1	-15.8	6.4	7.1

3 讨 论

本实验对两种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂的检测结果和抗干扰能力进行了比对分析,根据相对偏倚=(实验值-参比值)/参比值×100%,参照 ISO15189 中对临床基因扩增检验的内检测系统的比对要求时系统误差的绝对值<7.5%。实验发现,在覆盖 5 个浓度区间的 100 例标本中,两种试剂对高、中值标本检测结果的符合率高,分别达 95%、80%;对低值、临界值标本检测结果的可比性差。同时,20 例 A 试剂检测阴性(浓度值为 0,且扩增曲线为直线)标本中有 6 例 B 试剂检测为临界或低浓度阳性值,扩增曲线尾部出现抬头,说明 B 试剂检测灵敏度较高(排除实验中标本污染因素)。临床治疗中,HBV DNA 浓度的精确定量对乙肝患者的抗病毒治疗效果及预后判断很重要^[7]。因此,该类标本建议采用 B 试剂检测以满足临床要求。在临界值区间的标本建议进一步用磁珠法做高敏 HBV DNA 定量。

本研究中发现,A 试剂的检测浓度下限为 1 000 U/mL,因此对低浓度标本无法检测出来,假阴性率高;而 B 试剂检测下限为 100 U/mL,准确定量下限达 500 U/mL,能较好地对低浓度标本进行定量检测;HBV DNA 检测下限的确定不但是反映实验室检测系统的灵敏度,而且对乙型肝炎的诊断、治疗和预后也有意义^[8]。另有相关报道,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),且病毒载量越低,出现假阴性的比例越高^[9-10]。

实验同时发现,在两种试剂的抗干扰性方面,A 试剂较 B 试剂抗干扰性好,B 试剂检测结果受高黄疸血清影响大。分析原因应是两者在处理标本,提取病毒核酸方法上的不同:A 试剂采用煮沸法提取病毒核酸,加标本量 100 μL,高速离心,弃上清液,再煮沸、裂解、高速离心富集 DNA,取微量的 2 μL 加入反应管中;其间血清中的干扰物已基本被清除,对 DNA 的扩增和荧光检测影响很小。B 试剂采用一步法,直接将标本与核酸释放剂混合加入反应管上机检测,因高黄疸标本对 PCR 扩增仪荧光采集产生干扰,造成检测结果偏离真值。临床工作中,部分乙肝患者有黄疸现象,当其血清生化检测黄疸指数高于+++ ,TBIL >360 μmol/L 时,应作适当稀释,降低血清黄疸指数和总胆红素浓度,再用 B 试剂做 HBV DNA 定量检测。

A、B 两种试剂均为荧光探针法定量检测 HBV DNA,两者区别在于病毒核酸提取方法的不同。A 试剂采用传统煮沸法,据相关报道及本实验证实,其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^[11-12]。由于标本经过高温裂解,高速离心富集等操作,溶血、脂血、黄疸对实验结果的干扰很小^[13]。B 试剂采用提取液常温裂解,“一步法”获取病毒核酸,在避免高黄疸血清标本干扰的情况下,核酸提取效率高,值得推广应用。综上所述,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关重要的^[14]。本实验结果显示,在两种 HBV DNA 检测试剂荧光定量分析中,B 试剂核酸获得率高、操作简便、灵敏度较高,总体性能较好。同时,B 试剂检测范围更宽,检测下限较低,临床应用价值大。总之,为保证检验质量,临床基因扩增实验室应选择符合临床应用,易于标准化操作的试剂;同时,做好试剂的性能验证和试剂间比对及抗干扰因素分析,才能为临床诊治提供准确而有价值的检测报告。

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): 225-227.

[2] 吴洪秋, 张永良, 黄坚尧, 等. 乙肝血清学标志物定量和 HBV DNA 定量联合检测在乙肝病毒感染诊断中的应用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(4): 415-418.

[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] 张占卿, 陆伟, 王平安, 等. QIAGEN 实时 PCR 与 COBAS TaqMan 检测血清 HBV DNA 预测慢性乙型肝炎肝组织病理状态的性能比较[J]. 肝脏, 2016, 21(4): 241-247.

[5] 孙鹭, 牛华. 两种国产 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒检测结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20): 2392-2393.

[6] 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.

[7] 何紫琪, 李从荣, 童永清. 乙型肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4): 464-466.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 叶剑荣, 袁利群, 范旭, 等. 两种 HBV DNA 荧光定量试剂盒检测结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(12): 1480-1481.

[11] 冯玉莉, 孙朝晖. 肝癌患者循环 DNA 不同提取方法的比较[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(13): 2215-2217.

[12] 张玥, 田文君. 国产和进口荧光定量 PCR 试剂检测 HBV DNA 的比对分析[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(2): 147-150.

[13] 林森, 易荣. 实时荧光定量 PCR 对乙肝 DNA 检测的影响因素[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(1): 127-128.

[14] 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.