

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.10.009
文章编号: 1005-8982 (2018) 10-0051-04

一种 HBV DNA 定量检测试剂的准确性分析

孔祥沙, 杨瑞锋, 季颖, 朱凌, 张海莹, 王震宇, 魏来

[北京大学人民医院(北京大学肝病研究所), 北京 100044]

摘要: 目的 评价一种新型 HBV DNA 定量检测试剂的准确性。**方法** 将第3代 HBV DNA WHO 国际标准品稀释为6种不同梯度浓度样本, 8.5×10^5 、 8.5×10^4 、 8.5×10^3 、 8.5×10^2 、85 及 42.5 IU/ml, 用待评价试剂 careHBV PCR Assay V3.0 检测, 并对实测值和理论值进行相关性分析; 以 Cobas Taqman HBV V2.0 为参比试剂, 用 careHBV PCR Assay V3.0 检测 93 份 HBV 感染者标本和 30 份健康者标本 HBV DNA 含量, 并对 2 种试剂定量检测结果进行相关性和一致性分析; 采用巢式 PCR 扩增漏检标本的 HBV S 区, 直接测序法测定其基因型。**结果** careHBV PCR Assay V3.0 检测 WHO 国际标准品的实测值和理论值具有线性相关; 2 种定量试剂检测 93 份 HBV 感染者标本结果均阳性共 68 份, 检测结果呈线性相关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但 careHBV PCR Assay V3.0 检测值相对偏低; careHBV PCR Assay V3.0 检测有 14 份标本漏检, 其中 13 份标本 Cobas Taqman HBV V2.0 检测结果位于 30 ~ 2 000 IU/ml 间; 对 1 份漏检标本的基因型检测结果为 C 型。**结论** careHBV PCR Assay V3.0 与 Cobas Taqman HBV V2.0 试剂检测结果有较好的相关性, 但对基因型 C 型的标本可能存在漏检现象。

关键词: 乙肝病毒 DNA; 定量检测; 准确性

中图分类号: R512.62

文献标识码: A

Accuracy analysis of a type of HBV DNA quantitative detection reagent

Xiang-sha Kong, Rui-feng Yang, Ying Ji, Ling Zhu, Hai-ying Zhang, Zhen-yu Wang, Lai Wei

[People's Hospital of Peking University (Peking University Hepatology Institute),
Beijing 100044, China]

Abstract: Objective To evaluate and analyze the accuracy of a new type of HBV DNA quantitative detection reagent. **Methods** The 3rd generation HBV DNA WHO international standard was diluted into 6 samples of different concentrations, i.e. 8.5×10^5 , 8.5×10^4 , 8.5×10^3 , 8.5×10^2 , 85 and 42.5 IU/ml. The linear correlations between the theoretical values and the results detected by careHBV PCR Assay V3.0 were analyzed. With Cobas Taqman HBV V2.0 as the reference, HBV DNA content of the specimens from 93 patients infected by HBV and 30 healthy donors were detected by careHBV PCR Assay V3.0 and Cobas Taqman HBV V2.0 simultaneously. And the correlation and consistency of the loads of HBV DNA between the two kinds of results were analyzed. HBV S zone of the samples undetected by careHBV PCR Assay V3.0 was amplified using nested PCR, then the genotypes were determined by direct sequencing. **Results** The results of the WHO international standard detected by careHBV PCR Assay V3.0 were linearly associated with the theoretical values ($R^2 = 0.993$, $P = 0.000$). Among the 93 patients infected by HBV, 68 samples were positive by both kinds of quantitative reagents, and the two results were in linear association ($R^2 = 0.947$, $P = 0.000$); there was no statistical significance between them ($t = 1.204$, $P = 0.231$), but the loads of HBV DNA detected by careHBV PCR Assay V3.0 were relatively lower. There were 14 (15.05%) samples undetected

by careHBV PCR Assay V3.0, including 13 (46.43%) samples with the results between 30 and 2 000 IU/ml detected by Cobas Taqman HBV V2.0, the genotype of 1 undetected sample was determined to be genotype C. **Conclusions** The loads of HBV DNA detected by careHBV PCR Assay V3.0 are correlated well with the results detected by Cobas Taqman V2.0. But there may be missed detection of genotype C samples by careHBV PCR Assay V3.0.

Keywords: HBV DNA, quantitative detection, accuracy

HBV DNA 是反映乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 复制比较直接和可靠的指标^[1]。定量检测血清或血浆中 HBV DNA 可作为急性或慢性 HBV 感染的诊断以及初始治疗方案制定的依据,其动态变化又可作为抗病毒疗效监测以及抗药性是否形成的重要指标^[2]。同国际主流试剂相比,国产试剂在检测的敏感性和精密性上尚有较大差距^[3]。罗氏公司生产的“Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HBV Test”(Cobas Taqman HBV V2.0)检测系统采用全自动化操作,由于具有较高的敏感性、精确性、可重复性和较宽的检测范围而获得美国 FDA 批准^[2, 4-5]。而 careHBV PCR Assay 是临床应用较广泛的一种国产 HBV DNA 定量检测试剂,其第 3 代试剂产品 (careHBV PCR Assay V3.0) 相对之前产品改进了纯化技术,增加了检测用量,提高了敏感性和线性范围。本文以罗氏公司的 Cobas Taqman HBV V2.0 为参比试剂,评价 careHBV PCR Assay V3.0 试剂检测的准确性。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2015 年 1 ~ 11 月北京大学人民医院收治的 HBV 感染者的血清标本 93 份。所有患者均符合慢性乙型肝炎防治指南 (2010) 标准^[6]:既往有乙型肝炎病史或 HBsAg 阳性超过 6 个月,现 HBsAg 和 (或) HBV DNA 仍为阳性者,可诊断为慢性 HBV 感染。该部分患者血清 HBV DNA 经 Cobas Taqman HBV V2.0 检测均为阳性,并且涵盖了 HBV DNA 载量的高、中、低值。同期收集健康体检者血清标本 30 份。所有标本 -20℃ 冷冻保存。

1.2 主要试剂及仪器

主要试剂:第 3 代 HBV DNA WHO 国际标准品 (购自英国国家生物制品检定所,编号:10/264,浓度赋值 8.5×10^5 IU/ml), 稀释用阴性血清为 HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 均为阴性的人 AB 型血清 (天津川贝公司), careHBV PCR Assay V3.0 试剂盒 (深圳凯杰公司,检测上下限为 $30 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^8$ IU/ml), Cobas TaqMan

HBV V2.0 试剂盒 (德国罗氏诊断公司,检测上下限为 $20 \times 10^8 \sim 1.7 \times 10^8$ IU/ml), 巢式 PCR 所用的 dNTP、Taq DNA Polymerase、PCR buffer 和引物 (美国赛默飞世尔公司)。主要仪器:LightCycler 480 II 荧光定量 PCR 仪 (德国罗氏诊断公司), Cobas AmploPrep/Cobas TaqMan 96 型自动提取及扩增仪器 (德国罗氏诊断公司), 巢式 PCR 使用 Mastercycler PCR 仪扩增, Bio-Rad 电泳仪以及凝胶成像仪鉴定 PCR 产物。

1.3 WHO 标准品检测

用不含核糖核酸酶的灭菌双蒸水将 HBV DNA WHO 国际标准品配制成 6 份不同梯度浓度的样本,分别为 8.5×10^5 、 8.5×10^4 、 8.5×10^3 、 8.5×10^2 、85 及 42.5 IU/ml。用 careHBV PCR Assay V3.0 定量检测 HBV DNA 载量,每份样本重复检测 3 次,计算均值。

1.4 临床标本检测

用 careHBV PCR Assay V3.0 和 Cobas Taqman HBV V2.0 同时对收集的 93 份 HBV 感染者标本和 30 份健康者标本进行 HBV DNA 定量检测。对于超出试剂盒检测上限的标本,使用 HBV 阴性人血清将原始标本稀释后重复检测,用所得结果乘以稀释倍数进行校正。

1.5 HBV DNA 基因型的测定

采用巢式 PCR 扩增漏检阳性标本中的 HBV S 区^[7],巢式 PCR 外引物正向:5'-AGGACCCCTGCTCGT GTTAC-3',反向:5'-ACATACTTTCCAATCAATAG-3';内引物正向:5'-GATGTGTCTGCGGCGTTTTATCAT-3',反向:5'-ACATATCCCATGAAGTTAAG-3'。两轮 PCR 循环参数相同,94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 45 s,共 35 个循环;72℃ 7 min。制备 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳用于鉴定 PCR 产物。将符合标准的 PCR 产物送往北京诺赛公司测序,并与标准序列比对,从而判断其基因型。

1.6 统计学方法

所有数据采用 SPSS 19.0 软件分析,所有图形采用软件 GraphPad Prism 5 绘制。将 HBV DNA 载量换

算成对数形式 (Log_{10} IU/ml) 进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据进行 Pearson 相关分析, 比较采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 careHBV PCR Assay V3.0 检测 WHO 国际标准品的结果

对用 careHBV PCR Assay V3.0 检测配制的 6 份不同梯度浓度 WHO HBV DNA 国际标准品的结果与标准品理论值进行相关性分析, 两者存在线性相关 ($R^2 = 0.993, P = 0.000$)。见图 1。

2.2 2 种试剂 HBV DNA 检测结果的相关性分析

Cobas Taqman HBV V2.0 检测 HBV DNA 结果阳性的 93 份标本中, careHBV PCR Assay V3.0 检测 68 份阳性, 25 份阴性。将 2 种试剂检测结果均阳性的 68 份标本进行相关性分析, 结果呈线性相关 ($R^2 = 0.947, P = 0.000$)。见图 2。

2.3 2 种试剂 HBV DNA 检测结果的一致性分析

将 2 种试剂 HBV DNA 检测结果均阳性的 68 份标本进行一致性分析。数据显示 95% 一致性界限以外有 2 份标本 (3.22%); 一致性界限范围内, Cobas Taqman HBV V2.0 与 careHBV PCR Assay V3.0 HBV DNA 检测结果的对数均值分别为 (5.09 ± 2.14) Log_{10} IU/ml 和 (4.63 ± 2.32) Log_{10} IU/ml, 经配对 t 检验, 2 种试剂 HBV DNA 检测结果差异无统计学意义 ($t = 1.204, P = 0.231$)。2 种检测试剂对 30 份健康体检者标本的检测结果均为阴性。见图 3。

2.4 漏检标本分析及基因型检测

careHBV PCR Assay V3.0 检测阴性的 25 份标本中, 其中 11 份标本 Cobas Taqman HBV V2.0 检测结果 < 30 IU/ml (careHBV PCR Assay V3.0 检测下限); 而其余 14 份标本则为漏检。漏检标本中 13 份 Cobas Taqman HBV V2.0 检测结果位于 $30 \sim 2\,000$ IU/ml 间; 1 份 $> 2\,000$ IU/ml。采用巢式 PCR 扩增漏检标本

的 HBV S 区, 直接测序法测定基因型, 其中 1 份标本经 Cobas Taqman HBV V2.0 检测 HBV DNA 结果为 (7.79×10^3 IU/ml) 为 C 型基因型, 其测序结果见图 4。其他漏检标本因标本量不足或病毒载量较低等原因未能成功检测其基因型。

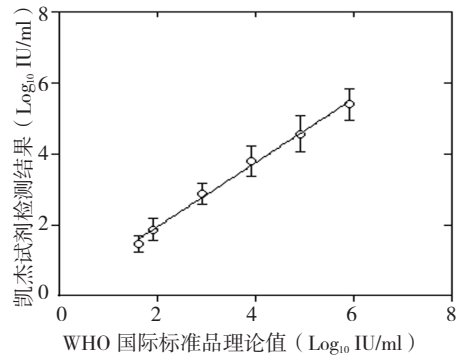


图 1 WHO 国际标准品结果

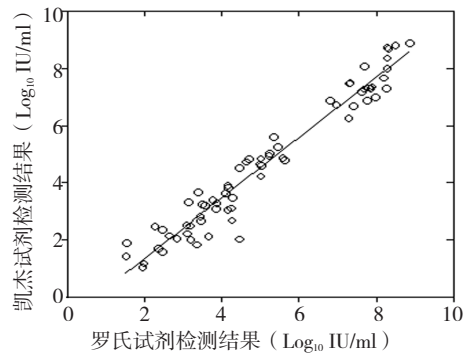


图 2 2 种试剂 HBV DNA 检测结果的相关性分析

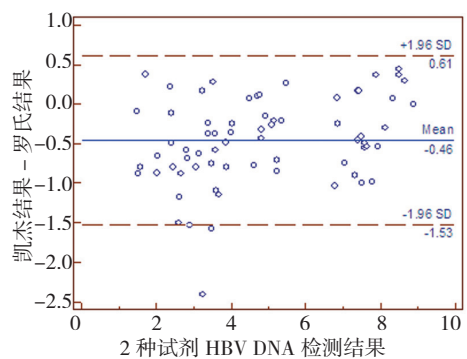


图 3 2 种试剂 HBV DNA 检测结果的一致性分析

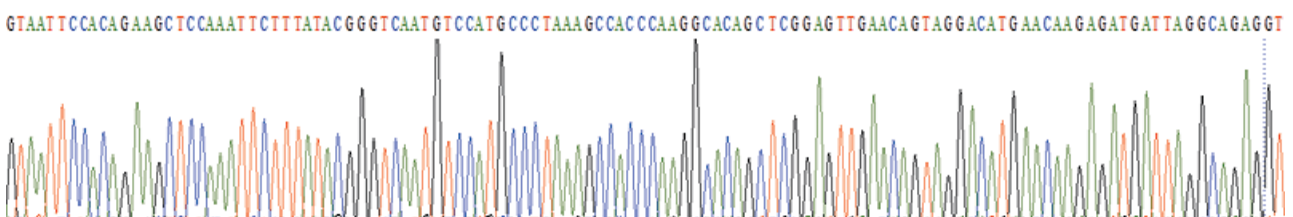


图 4 漏检标本的测序结果

3 讨论

目前定量检测 HBV DNA 的方法很多,文献报道国产试剂与进口试剂有较好的相关性,比如凯杰试剂和美国 Digene 公司生产的 Hybrid Capture- II HBV DNA 试剂^[8]、国产实时荧光定量试剂和 Cobas Taqman HBV V2.0^[9]、以及 careHBV PCR Assay V2.0 和 Cobas Taqman HBV V1.0^[10]等都有良好的相关性。本研究采用改良后的 careHBV PCR Assay V3.0 与 Cobas Taqman HBV V2.0 进行比较,结果显示 careHBV PCR Assay V3.0 与 Cobas Taqman HBV V2.0 具有良好的相关性。careHBV PCR Assay V3.0 检测 HBV DNA WHO 国际标准品的实测值与理论值存在线性相关,且能检测到 WHO 国际标准品浓度为 42.5 IU/mL 的标本。但是,在分析 2 种试剂检测阳性标本的一致性时,尽管两组检测结果差异无统计学意义,但 careHBV PCR Assay V3.0 检测结果稍低于 Cobas Taqman HBV V2.0 检测结果均值,提示 careHBV PCR Assay V3.0 尽管具有较好的线性范围和较高的敏感性,但是其检测的准确性尚与 Cobas Taqman HBV V2.0 存在差距。

本研究检测结果发现,小于 careHBV PCR Assay V3.0 检测下限(30 IU/ml)的 11 份标本未检出。在低病毒载量(30 ~ 2 000 IU/ml)标本中, careHBV PCR Assay V3.0 检测结果的漏检率,提示 careHBV PCR Assay V3.0 检测 HBV DNA 低病毒载量的敏感性比 Cobas Taqman HBV V2.0 低。表明用 careHBV PCR Assay V3.0 检测结果为阴性时,其实很多病例并非真正完全清除病毒,而是由于其检测系统分析敏感性不足,尚不能检出残留的 HBV DNA,还需进一步提高敏感性。在 careHBV PCR Assay V3.0 试剂漏检的样本中有 1 份标本基因型为 C 型,由此可见 careHBV PCR Assay V3.0 对基因型为 C 型的 HBV DNA 检测可能存在漏检。当然,由于样本数量少,尚需进一步增加样本量验证。

国内研究^[11]也证实了国产试剂与进口试剂存在差距,研究采用德国 Qiagen 公司的 Anus HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂和国内生产的 3 种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂,对 HBV 感染者的血清标本进行平行检测,并将结果按不同 HBV DNA 拷贝水平进行分组分析,研究发现不同试剂对高病毒载量标本的检测结果显示差异无统计学意义,而病毒载量低的标本则差异有统计学意义,且在低拷贝样本中,凯杰试剂与 Anus 试剂的检测结果显示相关性极差,且出现明显的漏检率。因此

很多慢性乙型肝炎患者在抗病毒治疗过程中,以及低病毒载量的患者,国产试剂就不能很好地监测病毒载量的变化,也不能很好地指导治疗,以及判断停药的终点。

careHBV PCR Assay V3.0 虽然通过改进纯化技术,加入磁珠,加入内标,增加标本用量,提高了检测的敏感性,增宽了检测线性范围,但是与实现全自动化检测与分析的 Cobas Taqman HBV V2.0 相比,仍有待进一步提高。

参 考 文 献:

- [1] CIOTTI M, MARCUCCILLI F, GUENCI T, et al. Evaluation of the Abbott RealTime HBV DNA assay and comparison to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 assay in monitoring patients with chronic cases of hepatitis B[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(4): 1517-1519.
- [2] CHEVALIEZ S, BOUVIER-ALIAS M, LAPERCHÉ S, et al. Performance of the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantification[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(5): 1716-1723.
- [3] 杨瑞锋, 魏来. 乙型和丙型肝炎病毒核酸检测技术及进展 [J]. *中华检验医学杂志*, 2010, 33(5): 476-480.
- [4] HOCHBERGER S, ALTHOF D, GALLEGOS DE SCHROTT R, et al. Fully automated quantitation of hepatitis B virus (HBV) DNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system[J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(4): 373-380.
- [5] ALLICE T, CERUTTI F, PITTALUGA F, et al. COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) test: a novel automated real-time PCR assay for quantification of HBV DNA in plasma[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 828-834.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版) [J]. *中华肝病杂志*, 2011, 19(1): 13-24.
- [7] YANG R, CONG X, XU Z, et al. INNO-LiPA HBV genotyping is highly consistent with direct sequencing and sensitive in detecting B/C mixed genotype infection in Chinese chronic hepatitis B patients and asymptomatic HBV carriers[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(23-24): 1951-1956.
- [8] 王豪, 陶其敏, 吴娟, 等. 两种乙型肝炎病毒 DNA 定量检测方法的比较与评价 [J]. *中华检验医学杂志*, 2002, 25(5): 318-320.
- [9] SHI M, ZHANG Y, ZHU Y H, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(3): 479-483.
- [10] 张海莹, 季颖, 朱凌, 等. 两种 HBV DNA 检测试剂的比较 [J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(5): 459-464.
- [11] 李美忠, 王敏, 乐晓华, 等. 四种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂比较及其结果分析 [J]. *中华实验和临床感染病杂志*, 2008, 2(1): 7-12.

(张西倩 编辑)