

· 基础论著 ·

四种 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂比较及其结果分析

李美忠 王敏 乐晓华 王火生 陈心春 徐六妹 周伯平

【摘要】 目的 评价3种国产HBV DNA荧光定量PCR试剂的特异性和灵敏度。**方法** 采用德国QIAGEN公司的Artus HBV DNA荧光定量PCR试剂(A)和国内生产的3种HBV DNA荧光定量PCR试剂(B、C、D)对203例HBV感染者血清标本进行平行检测,分析3种国产试剂与Artus试剂检测结果的差别及其相关性。**结果** 4种试剂检测203例血清标本HBV DNA的结果分别是A(5.78 ± 1.78)、B(5.70 ± 1.34)、C(5.51 ± 1.96)、D(5.60 ± 1.52),3种试剂与Artus试剂的相关系数分别为B:0.860、C:0.954、D:0.922。对于HBV DNA载量高于 10^6 拷贝/ml的标本,3种国产试剂检测结果的均值与Artus无明显差异,但试剂B与Artus相关性明显不如试剂C和试剂D;对于HBV DNA载量在 $10^3 \sim 10^6$ 拷贝/ml的标本,试剂B和试剂C的均值水平与Artus试剂存在明显差别,试剂C和D与Artus试剂的相关性要优于试剂B;而对于 $30 \sim 10^3$ 拷贝/ml的标本,试剂B和试剂D的均值与Artus结果存在显著差异,且3种国产试剂与Artus试剂相关性很差。在26例 $30 \sim 10^3$ 拷贝/ml样本中,3种国产试剂分别漏检8例(30.8%)、8例(30.8%)和11例(42.3%),7例 <30 拷贝/ml样本中3种国产试剂无一检出。**结论** 3种国产试剂的敏感性均较Artus试剂差,尤其是病毒载量低于 10^3 拷贝/ml的标本。在3种国产试剂中,试剂C与Artus试剂检测的结果相关性最好。

【关键词】 乙型肝炎病毒 DNA;荧光定量 PCR;敏感性

Assesement of three domestic commercial real-time polymerase chain reaction kits for detection of hepatitis B virus DNA using Qiagen Artus HBV TM PCR kit as reference LI Mei-zhong, WANG Min, LE Xiao-hua, WANG Huo-sheng, CHEN Xin-chun, XU Liu-mei, ZHOU Bo-ping. Shenzhen Institute of Hepatology, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: ZHOU Bo-ping, Email: zhoubp@hotmail.com

【Abstract】 Objective To assess the specificity, sensitivity, accuracy of three domestic commercial real-time polymerase chain reaction kits for detection of hepatitis B virus DNA (HBV DNA real-time PCR kit) in comparison to Qiagen Artus HBV TM PCR kit as reference. **Methods** HBV DNA in 203 sera samples were

作者单位:518020 深圳市,深圳市第三人民医院肝病研究所

通讯作者:周伯平 Email: zhoubp@hotmail.com

detected by Artus HBV TM PCR kit of QIAGEN (A) and three domestic HBV DNA real-time PCR kit (B, C, D) in parallel, the sensitivity, specificity and accuracy of kits were determined by using the results of Qiagen Artus HBV TM PCR kit as reference. **Results** HBV DNA was detectable in 185 of 203 samples by all four kits and the HBV DNA level measured by A, B, C, D are (5.78 ± 1.78) , (5.70 ± 1.34) , (5.51 ± 1.96) , (5.60 ± 1.52) copies/ml, respectively. The correlation coefficient between HBV DNA level determined by Artus reagent (A) and the HBV DNA level of 185 samples measured by domestic kits B, C, D are 0.860, 0.954, 0.922, respectively. While the correlation coefficient remains high in samples with HBV DNA higher than 10^6 copies/ml, it drops significantly in samples with HBV DNA level lower and poor correlation was observed in samples with HBV DNA level lower than 10^3 copies/ml. Out of 26 samples with HBV DNA $30-10^3$ copies/mL, the number of undetectable samples is 8 (30.8%), 8 (30.8%) and 11 (42.3%) by B, C, D kit, respectively. Among the 7 samples with lower level of than 30 copies/ml, all three domestic kits showed negative results. **Conclusions** The sensitivity and accuracy of three domestic kits is comparable with the Artus kit when samples with high HBV DNA level. However, all three kits need to be improved, especially to detect the HBV DNA lower than 10^3 copies/ml.

【Key words】 HBV DNA; Real-time quantitative PCR; Sensitivity

采用荧光定量 PCR 检测患者血清标本中的 HBV DNA 是临床诊断和治疗慢性乙型病毒性肝炎的最重要的依据。患者血清标本中 HBV DNA 拷贝数反应了病毒的复制情况,是判断病情及预后决定是否抗病毒治疗的主要参考指标。在检测 HBV DNA 的定量 PCR 试剂中,国际上具有参比价值的是罗氏公司生产的 Roche COBAS Taqman HBV DNA 定量试剂,但该试剂必须采用 Roche 公司专用的 PCR 仪^[1];另一具有相同品质的试剂就是德国 QIAGEN 公司生产的 Artus 试剂 (Qiagen Artus HBV TM PCR kit, Artus GmbH, Hamburg, Germany),后者可以在其他公司如常用的 ABI 公司生产的 PCR 仪进行^[2]。然而,两者的价格都很昂贵,不可能在中国市场推广使用。适应中国市场的需要,目前已有多家国内公司生产该类试剂,其中临床应用最广的是深圳匹基生物技术公司、上海科华生物技术公司和广州达安公司生产的试剂。由于扩增目的片段的不同及其技术平台不同,不同试剂的敏感性、特异性、准确率等存在一定差异。本文的主要目的是比较国产试剂与进口的 Artus 试剂在敏感性、特异性和准确率方面的差异,通过分析 3 种不同国产试剂与 Artus 试剂对 203 例 HBV 感染者的血清标本 HBV DNA 平行检测结果的吻合程度,对临床常用的 3 家试剂的品质进行比较分析,现将结果报告如下。

材料与方法

一、血清标本

随机收集深圳市东湖医院 2006 年 12 月至 2007 年 3 月收治的 HBV 感染者血清 203 份,分装后 -20°C 冻存储备用。

二、HBV DNA 定量检测

HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂分别购自德国 QIAGEN 公司的 Artus 试剂(A) (Qiagen Artus HBV TM PCR kit, Artus GmbH, Hamburg, Germany)和国内 3 家公司的试剂 B、C、D,所有试剂均有正式批文,批检合格并在有效期内使用。PCR 采用美国 Applied Biosystem 公司生产的 ABI 7500 基因扩增仪。同一份标本采用 4 种试剂进行平行检测,具体操作和结果判定参照试剂盒说明书进行。结果用拷贝/ml 的对数值表示。

三、统计学分析

采用 t 检验、相关性分析和 χ^2 检验。

结 果

一、4 种试剂 HBV DNA 定量结果比较

采用 4 种试剂对 203 例标本进行检测,其中 185 例全部 4 种试剂均有数值报告,其余 18 例则至少有 1 种试剂无数值结果报告。因此,我们选择 185 例的数值结果进行统计分析,结果显示 4 种试剂检测结果(均数 \pm 标准差, \log_{10} 拷贝/ml)分别是 Artus (5.78 ± 1.78)、B(5.70 ± 1.34)、C(5.51 ± 1.96)、D(5.60 ± 1.52),见 **图 1**。

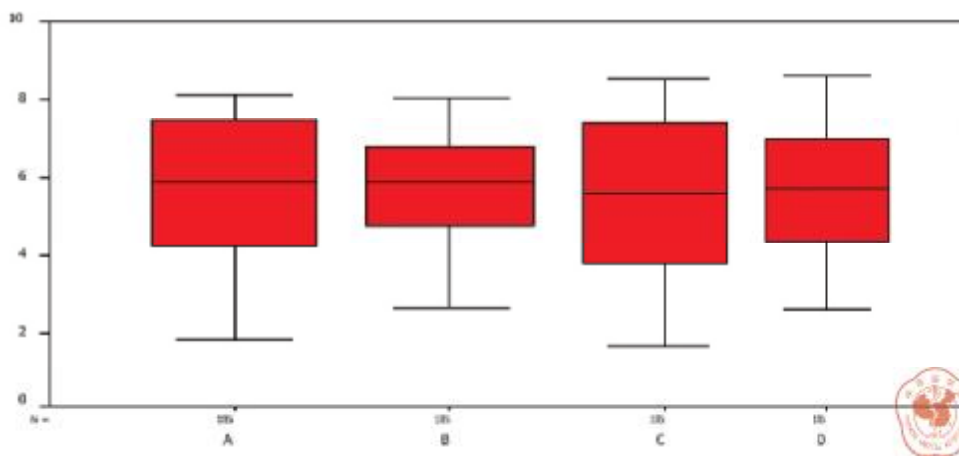


图 1 4 种试剂检测 185 例标本的结果

二、相关性分析

将 B、C、D 3 组结果分别与 Artus 试剂结果进行相关性分析,3 种试剂与 Artus 试剂的相关系数分别为 B:0.860、C:0.954、D:0.922。

三、不同 HBV 载量对试剂检测结果的影响

根据 Artus 试剂的检测下限 30 拷贝/ml, 以 Artus 试剂检测结果为标准, 将所有标本分成 4 组, 分别是: $>10^6$ 拷贝/ml 组、 $10^3 \sim 10^6$ 拷贝/ml 组、 $30 \sim 10^3$ 拷贝/ml 组和 <30 拷贝/ml 组。比较不同 HBV 载量对试剂检测结果的影响, 结果显示在高 HBV 病毒载量组, 不同试剂结果差别小, 而在低 HBV DNA 拷贝组, 不同试剂检测结果相差较大(图 2)。3 种国产试剂检测不同组标本的结果与 Artus 试剂检测结果的相关性见表 1。

表 1 各组标本 3 种国产试剂与 Artus 检测结果的相关性分析

组别	例数	B	C	D
$>10^6$	90	0.437	0.725	0.731
$10^3 \sim 10^6$	80	0.615	0.864	0.726
$30 \sim 10^3$	15	0.385 *	0.467 *	0.168 *
合计	185	0.860	0.954	0.922

注: * 与 Artus 试剂检测结果的相关性 $P > 0.05$, 其余 $P < 0.01$

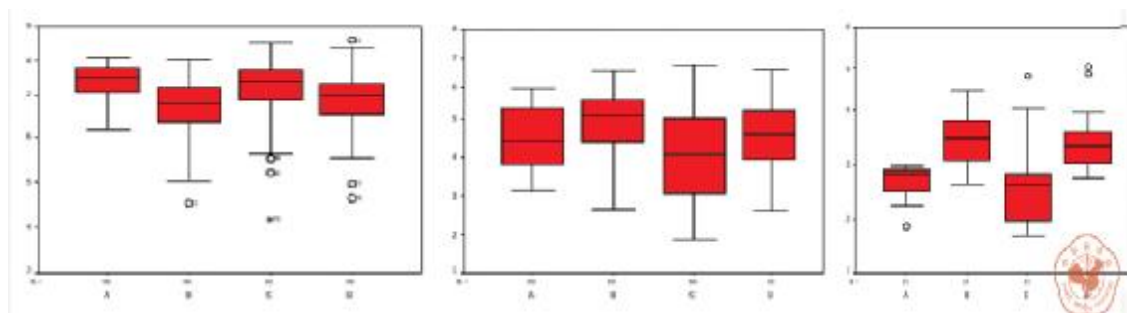


图 2 不同分组标本 3 种国产试剂与 Artus 试剂检测结果的比较

四、3 种国产试剂的漏检情况和特异性

对 26 例 Artus 试剂检测为 $30 \sim 10^3$ 拷贝/ml 的标本, 试剂 B、C 和 D 的漏检情况见表 2。而在 7 例 Artus 检测结果低于 30 拷贝/ml 的标本, 3 种试剂均阴性, 表明 3 种试剂的敏感性与 Artus 试剂一致。

表 2 Artus 试剂检测出的 HBV DNA 低拷贝标本 3 种国产试剂的检测结果

组别	例数	B		C		D	
		漏检数	漏检率%	漏检数	漏检率%	漏检数	漏检率%
$30 \sim 10^3$	26	8 *	30.8	8 *	30.8	11 *	42.3
<30	7	7	100	7	100	7	100

注: * 与 A 配对卡方检验, $P < 0.05$; # 与 A 配对卡方检验, $P < 0.01$ 。

讨 论

HBV DNA 定量检测已广泛应用于临床, 为慢性乙型肝炎患者的诊断、治疗、疗效及预后判定提供十分重要的依据^[3-5], 与传统的 HBV 血清标志物比较, HBV

DNA 定量可较准确地反映 HBV 复制状况,对临床判定患者的传染性和指导治疗具有重要参考价值^[6]。目前国内生产的乙型肝炎病毒 DNA 定量 PCR 试剂有很多种,但这些试剂在检测灵敏度、检测范围和低拷贝样本的检测精密度等方面参差不齐。对于试剂使用者来说,选择一种灵敏度高,检测范围宽、精密度高以及费用低廉的试剂至关重要。我们采用具有国际参比品质的 QIAGEN 公司的 Artus 试剂作为对照试剂和 3 种国产试剂进行同步检测,通过比较 3 种国产试剂与 Artus 在不同载量水平上的相关性以及试剂价格等因素,希望能找到一种高性价比的试剂。

我们的结果显示,如果对全部标本的检测结果进行比较,3 种试剂与 Artus 试剂的结果比较没有显著性差异,相关性也都非常好($r > 0.85$),似乎不同试剂没有显著的差别。但是如果将结果按不同 HBV DNA 拷贝水平进行分组分析,发现不同试剂对高病毒载量标本的检测结果无显著差别,而病毒载量低的标本则存在显著差别,表明国产试剂检测 HBV DNA 线性范围较窄,对低拷贝的 HBV DNA 的定量结果可靠性较差。不过对 7 例 < 30 拷贝/ml 样本中 3 种国产试剂无一检出。表明 3 种国产试剂尽管在低拷贝样本中存在较大的漏检率,但均未出现假阳性结果。

HBV DNA 定量检测作为一项乙型肝炎的诊断、治疗监测和判断预后的重要指标,我们希望检测试剂具有较好的灵敏度和精密度。我们选取的 4 种试剂中,Artus 的检测下限是 30 拷贝/ml,而 3 种国产试剂中检测下限最低为 500 拷贝/ml,但我们的结果也证明,在低拷贝样本中,国产试剂与 Artus 试剂的检测结果相关性极差,且出现明显的漏检率。这说明国产试剂的灵敏度与 Artus 还存在不小的差距,还需进一步优化。而在高拷贝标本($> 10^3$ 拷贝/ml)中,虽然 3 种试剂与 Artus 试剂均值有些差异,但与 Artus 有较好的相关性,其中试剂 C、D 与 Artus 的相关性明显好于试剂 B。

综上所述,国产试剂检测 HBV DNA 拷贝数高的标本,与 Artus 比较没有显著差别。但检测低拷贝数的标本,稳定性和灵敏度均存在很大的差距。在 3 种国产试剂中,如果综合价格及操作的简便等其它因素,我们认为试剂 C 是 1 种比较满意的试剂。它具有较好的灵敏度和稳定性、较低廉的价格和简便的操作。一般临床实验室不大可能采用进口试剂进行 HBV DNA 检测,在临床药物治疗的疗效判定或随访过程中,应选择同一实验室同一试剂测定的结果为依据。而对低拷贝标本则应结合血清标志物检测和其它检查结果以及临床症状综合判断以排除假阴性的可能。

参 考 文 献

- 1 Sum SS, Wong DK, Yuen JC, et al. Comparison of the COBAS TaqMan HBV test with the COBAS Amplicor monitor test for measurement of hepatitis B virus DNA in serum. J Med Virol, 2005, 77: 486-490.
- 2 Hui CK, Bowden S, Zhang HY, et al. Comparison of real-time PCR assays for monitoring serum hepatitis B virus DNA levels during antiviral therapy. J Clin Microbiol, 2006, 44: 2983-2987.

- 3 程钢, 何蕴韶, 周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒. 中华检验医学杂志, 1999, 22: 135-138.
- 4 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性. 中华检验医学杂志, 2005, 28: 225-226.
- 5 王豪, 陶其教, 吴娟, 等. 两种乙型肝炎病毒 DNA 定量检测方法的比较与评价. 中华检验医学杂志, 2002, 25: 318-320.
- 6 王平忠, 张中伟, 周永兴, 等. 定量 PCR 检测慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 及其意义. 世界华人消化杂志, 2000, 8: 755-758.

(收稿日期: 2007-10-06)

(本文编辑: 王丹静)

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/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 7-12.