

· 临床论著 ·

实时定量 PCR 与 COBAS Amplicor 定量检测血清 HBV DNA 的方法比较

石铭 石龙 赵丽英 祝英华

【摘要】 目的 比较实时定量 PCR 法与 COBAS Amplicor 法定量检测血清 HBV DNA。**方法** 自国家药品生物制品鉴定所与国家临检中心随机选取 158 例临床血清标本,比较了两种检测方法的线性范围、准确度、重复性、实验时间及成本。**结果** 实时定量 PCR 的批内差和批间差分别为 0.3% ~ 3.8% 和 1.4% ~ 8.1%。实时定量 PCR 法与 COBAS AMPLICOR 法具有良好的相关性($r = 0.948$),实时定量 PCR 法成本低且检测范围更宽。**结论** 实时定量 PCR 是监测慢性乙型肝炎患者 HBV DNA 水平的有效方法。

【关键词】 COBAS Amplicor; 乙型肝炎病毒; 实时定量 PCR

Comparison of real-time polymerase chain reaction with the COBAS Amplicor test for quantitation of hepatitis B virus DNA in serum samples SHI Ming, SHI Long, ZHAO Li-ying, ZHU Ying-hua. No 6 Hospital of Dalian, Dalian 116001, China

Corresponding author: SHI Ming, Email: zhsh6655@sohu.com

【Abstract】 Objective To compare the clinical feature of real-time PCR assay with COBAS Amplicor HBV Monitor test for quantitation of HBV DNA in serum samples. **Methods** One hundred and fifty-eight serum samples were chosen from the Chinese National Institute for the control of pharmaceutical and biological products and the National Center for clinical laboratories of China. The linearity, accuracy, reproducibility, assay time and costs of real-time PCR were evaluated and compared with those of the Cobas Amplicor test. **Results** The intra-assay and inter-assay variations of real-time PCR ranged from 0.3% to 3.8% and 1.4% to 8.1%, respectively. The HBV DNA levels measured by real-time PCR correlated very well with those obtained with COBAS Amplicor test ($r = 0.948$). Real-time PCR HBV DNA kit was much cheaper and had a wider examination area. **Conclusions** Real-time PCR assay is an excellent tool for monitoring HBV DNA levels in patients with chronic hepatitis B.

【Key words】 COBAS Amplicor test; Hepatitis B virus; Real-time PCR

基金项目:国家自然科学基金(30371053);国家杰出青年基金(30125034)

作者单位:116001 大连市,大连市第六人民医院

通讯作者:石铭 Email: zhsh6655@sohu.com

据统计,全世界约有3.5亿人感染慢性乙型肝炎病毒,其中三分之一在中国^[1]。HBV的感染可以导致慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌^[2,4]。定量检测患者血清或血浆HBV DNA病毒已成为监测抗病毒治疗的有效性及预测治疗成功与否的重要手段^[5-9]。

已有几种分子生物学技术用于血清或血浆HBV DNA定量,COBAS Amplicor法为其中的一种,它建立在引物特异的初始靶DNA复制的基础之上,而其他几种方法,如VERSANT乙型肝炎病毒DNA3.0检测体系,是以分支DNA信号扩大为基础,第二代杂交捕获法是以化学发光的探针杂交为基础,这些都是常规用于实验室诊断的方法^[10,11]。但这些方法对于乙型肝炎患者来说成本太高,不适于临床大规模检测。近年来,实时定量PCR已用于定量检测血清中HBV DNA水平,其灵敏度更高,检测范围更宽,定量值更准确^[12-15]。

本研究采用复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒检测血清标本中的HBV DNA,仪器采用ABI 7500 PCR分析仪,与COBAS Amplicor系统检测结果比较。

资料和方法

一、研究对象

共选取158例患者血清标本,其中包括118名慢性乙型肝炎患者(46例基因型B,65例基因型C,7例B与C混合基因型)和40例献血者。这些标本分别采用复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒(中国上海,复星诊断)和COBAS Amplicor系统(罗氏诊断)平行检测分析。所有患者标本乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)均至少持续6个月阳性,甲、丙、丁和戊型肝炎病毒抗体均为阴性。所有患者在标本采集期间未接受任何抗病毒治疗。

本研究采用中国临床检验中心提供的血清参考品检测实时PCR的线性及检测下限,其DNA水平为 7.5×10^8 拷贝/ml,将此参考品做十倍梯度稀释,其HBV DNA水平从 $7.5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^2$ 拷贝/ml变化。同时采用NICBPB建立的血清C基因型参考品作为标准,其HBV DNA水平从1000~ 6.17×10^8 拷贝/ml变化。

二、方法

1. 实时定量PCR检测HBV DNA:按照试剂说明书,使用试剂盒提供的提取液,从100 μ l血清中提取出DNA,然后在ABI 7500 PCR仪上进行产物扩增,扩增体系50 μ l,扩增程序:50℃,2 min,94℃ 5 min,93℃ 30 s,60℃ 90 s,循环40次。Ct值定义为反应体系检测得到的荧光值超过预设阈值时的反应循环数,此时标志荧光信号进入指数增长阶段。结果通过ABI分析软件进行分析,用4个标准点进行校准。复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒的检测范围为 $4.2 \times 10^2 \sim 7.5 \times 10^8$ 拷贝/ml,这与厂家标明的检测范围一致。

2. COBAS Amplicor法:按照产品说明,在COBAS Amplicor系统上进行Amplicor HBV定量实验,HBV核心抗原区与内对照DNA在同一反应孔进行扩增,但在

不同的检测孔进行杂交。用待测孔与标准孔的比率计算得出 HBV DNA 量,用标准曲线计算出每毫升拷贝数。Amplicor 实验的动态检测范围为 $3 \times 10^2 \sim 2 \times 10^5$ 拷贝/ml。

三、统计分析

统计软件使用 SPSS 13.0。检测数据进行对数转换后,采用散点图及斯皮尔曼系数评价两种方法相关性。采用 Bland-Altman 法评估两种方法检测结果的一致性^[16]。

结 果

一、线性和检测下限

实时定量 PCR 法能够检测 87.5% 的稀释参考品,其测定值与标准值有良好的符合性, ($r = 0.999$, $P < 0.001$)。转换公式为: $\text{Log}(\text{HBV DNA 测定值}) = 1.098[\text{Log}(\text{参考品 HBV DNA 值})] - 0.735$ 。实时定量 PCR 检测下限可至 750 拷贝/ml,这与厂家标明的检测下限基本一致。

二、批间差及精密度

为了确定复星实时定量 PCR 试剂盒的检测范围和准确性,分别用不同批号试剂盒连续 3 次检测 NICBPB 血清参考品,检测出所有 7 个稀释梯度的参考品,检测结果均在检测范围之内,批间差 0.3% ~ 3.8%,检测下限为 442 拷贝/ml (表 1)。

表 1 复星 HBV 实时定量 PCR 法灵敏度及各批次实验结果

	NICBPB 参考品范围 (拷贝/ml)	结果(拷贝/ml)			平均值(\log_{10} 拷贝/ml)	标准偏差 (\log_{10} 拷贝/ml)	变异系数 (%)
		1	2	3			
L0	$7.7 \times 10^7 \sim 6.17 \times 10^8$	1.65×10^8	1.84×10^8	1.52×10^8	8.22	0.04	0.50
L1	$1.48 \times 10^7 \sim 1.18 \times 10^8$	9.21×10^7	1.01×10^8	9.23×10^7	7.98	0.02	0.30
L2	$1.59 \times 10^6 \sim 1.26 \times 10^7$	8.54×10^6	9.00×10^6	9.20×10^6	6.95	0.02	0.30
L3	$1.66 \times 10^5 \sim 1.32 \times 10^6$	7.06×10^5	6.13×10^5	9.55×10^5	5.87	0.10	1.70
L4	$1.82 \times 10^4 \sim 1.48 \times 10^5$	8.60×10^4	3.84×10^4	6.30×10^4	4.77	0.18	3.80
L5	$1.51 \times 10^3 \sim 1.23 \times 10^4$	1.07×10^4	6.20×10^3	8.82×10^3	3.92	0.12	3.10
L6	<1000	524	442	581	2.71	0.06	2.20

三、批内差及重复性

分别测定高、中、低浓度样本,每个样本重复测定 12 次,结果平均值、标准偏差、CV 值如表 2 所示,复星试剂盒测定值重复性较好,特别是高、中浓度标本,其 CV 分别为 1.4% 和 2% (表 2)。

四、实时定量 PCR 法与 COBAS Amplicor 法的比较分析

158 例标本分别用复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒与 COBAS 系统平行检测,标本分为 3 组: A 组为健康的献血者标本,共 40 例; B 组为病毒含量在检测范围内的乙型肝炎患者标本,共 43 例; C 组为病毒含量高于检测范围的乙型肝炎

炎患者标本,共75例,这些标本稀释后用 Amplicor 实验重新测定。检测结果进行对数转换。A组标本两种方法检测结果均为阴性。相关系数表明这两种方法具有良好的相关性($r=0.948$, $P<0.0001$)(图1)。

表2 复星 HBV 实时定量 PCR 法的批内差异

标本编号	检测次数	HBV DNA 平均值(\log_{10} 拷贝/ml)	标准偏差	CV(%)
3768	12	3.97	0.32	8.10
3785	12	6.00	0.12	2.00
3770	12	7.84	0.11	1.40

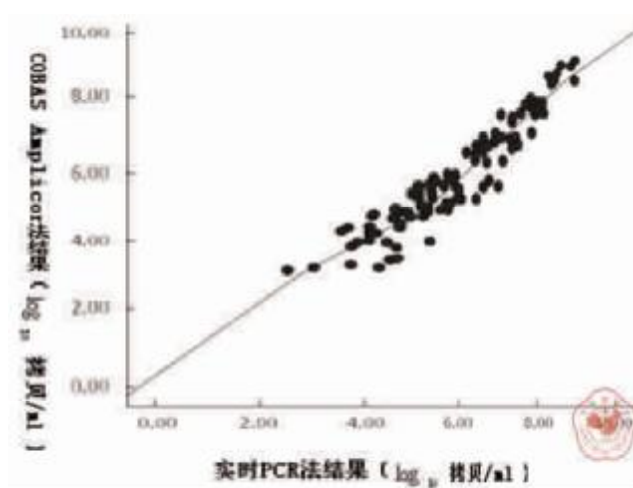


图1 HBV DNA 法与复星实时 PCR 法 HBV DNA 测定结果相关性

用两种方法测定得出的病毒载量与每个标本平均值之间的差异用 Bland-Altman 方法进行分析。158 例标本中,有 2 例(1.3%)病毒含量略高于检测上限,1 例(0.6%)低于复星试剂盒检测下限,而 75 例(47.5%)标本病毒含量位于 Amplicor 实验检测范围以上,病毒基因型对两种方法的测定值都没有影响(图2)。

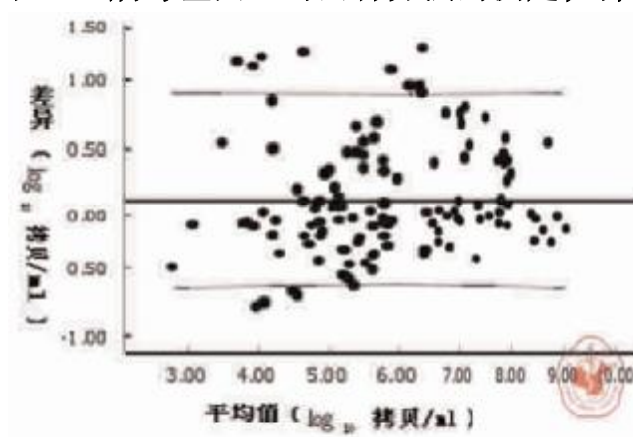


图2 两种方法测定得出的病毒载量与每个标本平均值之间的差异

讨 论

中国 HBV 感染者数量居世界首位,欧美国家所用的 HBV DNA 检测方法对中国乙型肝炎患者来说费用昂贵,我国迫切需要可靠而经济的 HBV DNA 检测方法。复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒由中国复星公司生产并已由中国 SFDA 批准用于体外诊断,与 COBAS Amplicor 检测相比,这种方法不但可靠而且成本较低。

许多研究已证明实时定量 PCR 是一种准确度高、重复性好、灵敏度高而且快速的临床标本 HBV 水平检测方法,在所有商业化检测方法中检测范围最宽^[13,14,17-21]。复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒能够定量检测 NICPBP 的所有稀释参考品,检测范围达 8 个数量级。97.5% 的标本在试剂盒的检测范围之内,对病毒含量较高的患者来说,实时定量 PCR 法优于 COBAS Amplicor 法。

用两种方法检测 158 例临床标本的结果基本一致,HBV DNA 定量值相关性较高($r=0.948$, $P<0.001$),这与评价其他 HBV DNA 实时定量 PCR 方法的研究结果一致^[13,14,22-26]。

与 COBAS Amplicor 法及其他检测方法相比,复星实时定量 PCR 法的成本较低,可用于经济条件相对较差的慢性乙型肝炎患者。美国肝病研究协会和亚太劳动协会建议,乙型肝炎患者应在前 3 个月以及以后每隔 3 至 6 个月检测 HBV DNA^[27,28],这对象中国这样大多数人还没有基本医疗保障的国家来说,是非常巨大的经济负担。可靠而经济的 HBV DNA 方法可有效控制这些国家的 HBV 感染。

复星实时定量 PCR 法和其他 PCR 方法一样,没有设置内参,内参可以弥补标本间 DNA 提取效率的差异及反应体系中可能存在的抑制物质的影响。另外,这种方法要得到更广泛的认可还需要对内参标准进行标准化^[14,29-31]。

总之,复星乙型肝炎病毒实时荧光定量试剂盒成本较低,可提供给临床可靠而快速的 HBV DNA 检测方法,从而有效监测慢性乙型肝炎患者的 HBV DNA 水平。

参 考 文 献

- 1 Lai CL, Ratziu V, Yuen MF. Viral hepatitis B. *Lancet*, 2003, 362: 2089-2094.
- 2 Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 1997, 337: 1733-1745.
- 3 Liaw YF, Tai DI, Chu CM, et al. The development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis: a prospective study. *Hepatology*, 1988, 8: 493-496.
- 4 Beasley RP. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 1988, 61: 1942-1956.
- 5 Yeo W, Mo FK, Chan SL, et al. Hepatitis B viral load predicts survival of HCC patients undergoing systemic chemotherapy. *Hepatology*, 2007, 5: 1382-1389.
- 6 Yim HJ, Byun KS, Chang YJ, et al. Levels of hepatitis B virus (HBV) replication during the nonreplicative phase: HBV quantification by real-time PCR in Korea. *Dig Dis Sci*, 2007, 52: 2403-2409.
- 7 Liu CJ, Chen PJ, Lai MY, et al. Viral factors correlate with hepatitis B e antigen seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Liver Int*, 2006, 26: 949-955.

- 8 Liu CJ, Chen BF, Chen PJ, et al. Role of hepatitis B viral load and basal core promoter mutation in hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. *J Infect Dis*, 2006,193:1258-1265.
- 9 Chan HL, Tsang SW, Liew CT, et al. Viral genotype and hepatitis B virus DNA levels are correlated with histological liver damage in HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection. *Am J Gastroenterol*, 2002,97:406-412.
- 10 Yao JD, Beld MG, Oon LL, et al. Multicenter evaluation of the VERSANT hepatitis B virus DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol*, 2004,42:800-806.
- 11 Yuan HJ, Yuen MF, Wong DK, et al. Clinical evaluation of the digene hybrid capture II test and the COBAS AMPLICOR monitor test for determination of hepatitis B virus DNA levels. *J Clin Microbiol*, 2004,42:3513-3517.
- 12 Abe A, Inoue K, Tanaka T, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *J Clin Microbiol*, 1999,37:2899-2903.
- 13 Ronsin C, Pillet A, Bali C, et al. Evaluation of the COBAS Ampli Prep-total nucleic acid isolation-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) quantitative test and comparison to the VERSANT HBV DNA 3.0 assay. *J Clin Microbiol*, 2006,44: 1390-1399.
- 14 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.
- 15 Pas SD, Fries E, De Man RA, et al. Development of a quantitative real-time detection assay for hepatitis B virus DNA and comparison with two commercial assays. *J Clin Microbiol*, 2000,38:2897-2901.
- 16 Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet*, 1995,346:1085-1087.
- 17 Chen RW, Piiparinen H, Seppanen M, et al. Real-time PCR for detection and quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Med Virol*, 2001,65:250-256.
- 18 Lindh M, Hannoun C. Dynamic range and reproducibility of hepatitis B virus (HBV) DNA detection and quantification by Cobas Taqman HBV, a real-time semiautomated assay. *J Clin Microbiol*, 2005,43:4251-4254.
- 19 Lu YQ, Han JX, Qi P, et al. Rapid quantification of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using efficient TaqMan probe and extraction of virus DNA. *World J Gastroenterol*, 2006,12:7365-7370.
- 20 Liu Y, Hussain M, Wong S, et al. A genotype-independent real-time PCR assay for quantification of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol*, 2007,45:553-558.
- 21 Oliso D, Boaretti M, Ligozzi M, et al. Detection and quantification of hepatitis B virus DNA by SYBR green real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007,26:43-50.
- 22 Gordillo RM, Gutierrez J, Casal M. Evaluation of the COBAS TaqMan 48 real-time PCR system for quantitation of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol*, 2005,43: 3504-3507.
- 23 Weiss J, Wu H, Farrenkopf B, et al. Real time TaqMan PCR detection and quantitation of HBV genotypes A-G with the use of an internal quantitation standard. *J Clin Virol*, 2004,30:86-93.
- 24 Welzel TM, Miley WJ, Parks TL, et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of hepatitis B virus genotypes A to G. *J Clin Microbiol*, 2006,44: 3325-3333.
- 25 Lole KS, Arankalle VA. Quantitation of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using internal amplification control and dual TaqMan MGB probes. *J Virol Methods*, 2006,135: 83-90.
- 26 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 Clin Virol*, 2006,35:373-380.
- 27 Liaw YF, Leung N, Guan R, et al. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver Int*, 2005,25:472-489.
- 28 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2007,45:507-539.
- 29 Garson JA, Grant PR, Ayliffe U, et al. Realtime PCR quantitation of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. *J Virol Methods*, 2005,126:207-213.
- 30 Stocher M, Leb V, Berg J. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. *J Virol Methods*, 2003,108: 1-8.
- 31 Burggraf S, Olgemoller B. Simple technique for internal control of real-time amplification assays. *Clin Chem*, 2004,50:819-825.

(收稿日期:2008-03-25)

(本文编辑:王丹静)

石铭, 石龙, 赵丽英, 等. 实时定量 PCR 与 COBAS Amplicor 定量检测血清 HBV DNA 的方法比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(4): 294-299.