

# 不同商品化试剂对临床血清样本 HBV DNA 定量检测结果的影响

耿帆<sup>1</sup> 肖圣达<sup>1</sup> 徐远东<sup>1</sup> 陈凤花<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:评价不同商品化试剂定量检测临床血清样本乙型肝炎病毒 DNA(HBV DNA)性能的差异。方法:①应用 5 种商品化 HBV DNA 定量试剂(2 种进口试剂 A 和 B,3 种国产试剂 C、D 和 E)分别对 6 例混合血清样本进行检测,并对结果进行比较;3 种国产试剂对 6 例混合血清样本以及  $10^3$  和  $10^6$  两个水平的 HBV DNA 国家标准物质 GBW(E)090137 和 GBW(E)090139 分 3 个批次检测,分析其精密度和正确度。②采用 3 种国产试剂定量检测 43 例慢性乙型肝炎患者血清样本 HBV DNA,并分析其相关性和一致性。结果:①定量检测 6 例混合血清样本中 HBV DNA,试剂 B、C 与 A 的检测结果差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),而试剂 D、E 的检测结果均显著低于试剂 A( $P<0.05$ )。②定量检测 6 例混合血清样本以及  $10^3$  和  $10^6$  两个水平的 HBV DNA 国家标准物质,3 种国产试剂的 CV 均小于 5%,国家标准物质的实际检测值与靶值的差值绝对值均小于  $0.4 \log_{10}$  IU/mL,精密度和正确度满足行业标准。③对于 43 例临床血清样本,试剂 C、D 和 E 的阳性检出率分别为 95.35%(41/43)、95.35%(41/43)、86.05%(37/43);对于检测结果均在 3 种试剂定量范围内的 24 例临床血清样本,HBV DNA 定量检测结果为  $C>D>E$ ( $P<0.05$ ),3 种试剂的检测结果两两间均呈线性相关( $C$  vs  $D$ : $R^2=0.93$ , $Y=0.973X-0.164$ ;  $C$  vs  $E$ : $R^2=0.61$ , $Y=0.770X+0.210$ ;  $D$  vs  $E$ : $R^2=0.69$ , $Y=0.809X+0.270$ ),试剂 C 和 D、C 和 E、D 和 E 的 Bland-Altman 分析发现其检测结果差值平均值分别为 0.28、0.80 和 0.51  $\log_{10}$  IU/mL,相应的 95%一致性界限分别为(-0.30,0.86)、(-0.62,2.21)、(-0.74,1.77),相应的 95%一致性界限以内的点分别占 95.83%(23/24)、95.83%(23/24)和 91.67%(22/24),其一致性界限范围内检测值的最大差异分别为 0.85、1.96 和 1.25  $\log_{10}$  IU/mL。试剂 C 和 D、C 和 E、D 和 E 的检测结果差值  $>1.0 \log_{10}$  IU/mL 的血清样本分别占 0(0/24)、33.33%(8/24)和 25.00%(6/24)。结论:满足行业标准的不同商品化国产试剂定量检测临床血清样本 HBV DNA 的性能存在显著差异,在常规临床实践中互换用于临床决策时务必慎重。

**[关键词]** 乙型肝炎病毒 DNA 定量;试剂比对;检测性能;临床性能;血清

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.06.001

[中图分类号] R512.6 [文献标志码] A

## Effect of different commercial kits on quantitative detection of HBV DNA in clinical serum samples

GENG Zhi XIAO Shengda XU Yuandong CHEN Fenghua

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science Technology, Wuhan, 430022, China)

Corresponding author: CHEN Fenghua, E-mail: chfh100@126.com

**Abstract Objective:** To evaluate the difference in the clinical performance of quantitating HBV DNA in the serum samples from the patients with chronic hepatitis B measured by the different commercial certified HBV DNA quantification kits. **Methods:** ①The six mixed serum samples with HBV viral load were measured by five commercial certified kits(A, B, C, D and E), to compare the results. The six mixed serum samples and the two national HBV DNA serum standard materials(GBW-E-090137 and GBW-E-090139) were measured in three batches using the three domestic certified kits C, D and E, to verify the precision and accuracy of these three kits. ②The serum samples from 43 patients with chronic hepatitis B were measured by the kits C, D and E, to compare the correlation and concordance of the results from these three different HBV DNA assays. **Results:** ①Compared with A, there was no significant difference in the HBV DNA values of the six mixed serum samples measured by B or C( $P>0.05$ ). However, HBV DNA levels measured by D or E were significantly lower than the results by the kit A( $P<0.05$ ). ②Results of the precision and accuracy tests showed that the coefficient of variation(CV) of the six mixed serum samples and the two national standard materials measured by the kits C, D, and E was less than 5%, and the differences between the expected and tested concentrations of these two national standard mate-

<sup>1</sup>华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)  
通信作者:陈凤花,E-mail:chfh100@126.com

rials detected by the kits C, D, and E were all within  $0.4 \log_{10}$  IU/mL, which showed high precision and accuracy. ③The detection rates of the serum samples from 43 patients with chronic hepatitis B as determined by the kits C, D, and E were 95.35%(41/43), 95.35%(41/43), and 86.05%(37/43), respectively. Among the 43 clinical serum samples, 24 were quantifiable by three assays. For the 24 clinical serum samples, the quantitative results of the three assays were  $C > D > E (P < 0.05)$ ; the correlation analysis indicated significant correlations between the three assays (C vs D:  $R^2 = 0.93$ ,  $Y = 0.973X - 0.164$ ; C vs E:  $R^2 = 0.61$ ,  $Y = 0.770X + 0.210$ ; D vs E:  $R^2 = 0.69$ ,  $Y = 0.809X + 0.270$ ); Bland-Altman plot analysis found mean differences of  $(C-D) = 0.28 \log_{10}$  IU/mL (95% confidence interval,  $-0.30$  to  $0.86$ ),  $(C-E) = 0.80 \log_{10}$  IU/mL (95% CI,  $-0.62$  to  $2.21$ ),  $(D-E) = 0.51 \log_{10}$  IU/mL (95% CI,  $-0.74$  to  $1.77$ ), respectively; the proportions of the specimens within the 95% limit of agreement were 95.83%(23/24) between C and D, 95.83%(23/24) between C and E, and 91.67%(22/24) between D and E, respectively. And the maximum differences within the 95% acceptable range were  $0.85 \log_{10}$  IU/mL between C and D,  $1.96 \log_{10}$  IU/mL between C and E, and  $1.25 \log_{10}$  IU/mL between D and E, respectively. The proportions of the specimens with  $>1 \log_{10}$  IU/mL difference of HBV DNA levels were 0(0/24) between C and D, 33.33%(8/24) between C and E, and 25.00%(6/24) between D and E, respectively. **Conclusion:** There is a significant difference in the clinical performance of quantitating serum HBV DNA by the different commercial kits. All three HBV domestic certified assays have low commutability and may be not used interchangeably in routine clinical practice.

**Key words** hepatitis B virus DNA quantification; reagent comparison; analytical performance; clinical performance; serum

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个严重的全球公共卫生问题, 据估计全球有 2.92 亿 HBV 感染者 (HBsAg 阳性), 其中我国约有 8600 万<sup>[1]</sup>。HBV 可造成慢性感染, 进而发展为肝硬化和肝细胞癌, 危及患者生命。血清中高水平 HBV DNA 已被确定为肝硬化和肝细胞癌的主要危险因素<sup>[2]</sup>。通过抗病毒治疗抑制 HBV DNA 复制, 是预防和延缓慢性乙肝患者进展为肝硬化、终末期肝病和肝细胞癌的重要措施<sup>[3-4]</sup>。敏感、准确定量 HBV DNA 在确定 HBV 感染阶段、治疗指征、治疗终点、监测治疗反应以及早期识别耐药中起着至关重要的作用<sup>[3]</sup>。国际肝病协会对于 HBV DNA 超敏定量检测的试剂要求包括高灵敏度  $10 \sim 15$  IU/ml、宽线性范围  $1 \sim 9 \log_{10}$  IU/mL、特异性强和重复性好<sup>[5]</sup>。对于大多数患者 HBV 管理需要长期监测 HBV DNA, 同一患者可能在不同的医院监测其体内病毒载量, 而不同的医院实验室可能应用不同的检测试剂。目前我国市场上有多种进口和国产的商品化 HBV DNA 超敏定量试剂, 并且均已获国家药品监督管理局 (NMPA) 批准, 其中罗氏的 AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HBV 诊断试剂和雅培的 RealTime HBV 诊断试剂是目前国际上通用的 HBV DNA 检测试剂<sup>[5-7]</sup>, 前者在国际上应用更广泛。由于不同商品化试剂的检测性能可能存在差异, 而临床上不同的实验室采用不同的商品化试剂定量检测特定患者血清中 HBV DNA, 可能导致其检测结果不同。因此, 本研究主要拟对 3 种不同商品化国产试剂定量检测临床血清样本中 HBV DNA 的结果进行比对, 以评价不同试剂的临床性能以及在常规临床实践中互换使用的可接受性。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

收集 2019 年 4 月我院收治的慢性 HBV 感染患者血清若干份, 制备成 6 个浓度的混合血清, 用于检测。收集 2019 年 7 月我院收治的 43 例慢性 HBV 感染患者血清样本, 其中男 25 例, 女 18 例, 年龄 20~70 岁。

### 1.2 仪器与试剂

AmpliPrep/COBAS TaqMan (CAP/CTM) HBV 诊断试剂 (试剂 A, 罗氏); RealTime HBV 诊断试剂 (试剂 B, 雅培); 3 种国产 HBV 核酸定量检测试剂 (分别为试剂 C、D 和 E); 乙型肝炎病毒核酸 (HBV DNA) 血清标准物质 GBW(E)090137 和 GBW(E)090139 (北京康彻斯坦生物技术有限公司)。COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 病毒载量检测系统 (罗氏); M2000 病毒载量检测系统 (雅培); 三家国产试剂相配套的半自动磁珠式核酸提取仪; COBAS® Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪 (罗氏)。

### 1.3 方法

分别用 6 种试剂对 6 例混合血清样本进行平行检测 (表 1), 试剂 A 和 B 分别检测一次, 试剂 C、D 和 E 各分 3 批进行 3 次检测。试剂 A 和 B 分别采用各自配套的封闭系统进行核酸提取和扩增; 试剂 C、D 和 E 分别采用各自配套的半自动磁珠式核酸提取仪进行核酸提取, 扩增均在 COBAS® Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪上进行。具体操作步骤严格按照试剂说明书进行。

分别用 3 种国产试剂 C、D、E 对 43 例慢性 HBV 感染患者血清样本进行平行检测。核酸提取分别采用各自配套的半自动磁珠式核酸提取仪进

行,扩增均在 COBAS® Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪上进行。具体操作步骤严格按照试剂说明书进行。

各试剂每批次均做阴性对照和北京康彻思坦生物技术有限公司生产的 GBW(E)090137(靶值  $1.41 \times 10^3$  IU/mL)、GBW(E)090139(靶值  $4.6 \times 10^6$  IU/mL)两个水平的 HBV DNA 血清标准物

质。结果判读严格按照试剂说明书进行。确保质控在控后再进行结果分析。

定性检测结果以检出或未检出表示,低于相应试剂厂家声称的检出限判定为未检出。只有超过该试剂声称的定量下限且在其定量线性范围的定量检测结果用于进一步分析。

表 1 5 种商品化 HBV DNA 定量试剂的特点

	试剂 A	试剂 B	试剂 C	试剂 D	试剂 E
核酸提取原理	全自动磁珠	全自动磁珠	半自动磁珠	半自动磁珠	半自动磁珠
上样样本体积/ $\mu$ L	650	500	200	200	600
洗脱体积/ $\mu$ L	65	70	100	50	100
PCR 反应体系中加入的模板体积/ $\mu$ L	50	50	20	20	20
厂家声称的检测亚型	A,B,C,D, E,F,G,H	A,B,C,D, E,F,G,H	A,B,C,D	B,C,D	A,B,C,D
厂家声称的检出限/(IU $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	20	10	10	20	15
厂家声称的定量线性范围/(IU $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	20~ $1.7 \times 10^8$	10~ $1.0 \times 10^9$	30~ $1.0 \times 10^8$	100~ $1.0 \times 10^8$	100~ $1.0 \times 10^9$

1.4 统计学分析

所有检测结果均以 log<sub>10</sub> IU/mL 表示,采用 SPSS 17.0 和 Medcalc 15.2.2 软件进行统计学分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对样本 *t* 检验;非正态分布的计量资料,采用 Wilcoxon 符号秩和检验;计数资料采用配对  $\chi^2$  检验;两种检测方法的相关性分析采用 Pearson 相关性以及线性回归分析;采用 Bland-Altman 图分析两种检测方法的一致性。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5 种试剂定量检测混合血清中 HBV DNA 结果的比较

5 种试剂检测 6 例混合血清样本中 HBV DNA 的定量结果见表 2,以国际上广泛应用的试剂 A 检测结果为参比值,其他 4 种试剂的检测结果分别与其进行比较。经配对样本 *t* 检验,试剂 B、C 与 A 的检测结果间均差异无统计学意义(B vs A:*P* > 0.05;C vs A:*P* > 0.05),试剂 B、C 与 A 的均值差异分别为 -0.09、-0.01 log<sub>10</sub> IU/mL;试剂 D、E 的检测结果均显著低于试剂 A(D vs A:*P* < 0.05;E vs A:*P* < 0.05),试剂 D、E 与 A 的均值差异分别为 -0.34、-0.58 log<sub>10</sub> IU/mL。

2.2 3 种国产试剂精密度和正确度的比较

统计 3 种国产试剂检测 6 例混合血清样本以及 10<sup>3</sup> 和 10<sup>6</sup> 两个水平国家标准物质的中间精密度,用 CV 值表示,结果见表 3。3 种国产试剂的检测结果 CV 均小于 5%;GBW(E)090137 的靶值为 3.15 log<sub>10</sub> IU/mL,3 种试剂 C、D 和 E 检测所得实际值与靶值的差值分别为 0.29、0.26、0.37 log<sub>10</sub>

IU/mL,均小于  $\pm 0.4 \log_{10}$  IU/mL;GBW(E)090139 的靶值为 6.66 log<sub>10</sub> IU/mL,3 种试剂 C、D 和 E 检测所得实际值与靶值的差值分别为 0.06、-0.09、0.03 log<sub>10</sub> IU/mL,均小于  $\pm 0.4 \log_{10}$  IU/mL。3 种国产试剂 C、D 和 E 精密度和正确度均达到行业标准,符合临床检测应用的基本要求。

表 2 5 种试剂定量检测 6 例混合血清样本 HBV DNA 的结果

标本编号	log <sub>10</sub> IU/mL				
	试剂 A	试剂 B	试剂 C	试剂 D	试剂 E
1	3.60	3.45	3.60	3.24	2.76
2	3.96	3.65	3.69	3.46	3.88
3	5.65	5.51	5.31	5.24	5.01
4	7.21	6.99	7.26	6.86	5.89
5	7.13	7.26	7.47	6.99	6.26
6	7.58	7.64	7.66	7.25	7.74
$\bar{x} \pm s$	5.84 $\pm$ 1.74	5.75 $\pm$ 1.85	5.83 $\pm$ 1.89	5.50 $\pm$ 1.81	5.26 $\pm$ 1.78
		1.532	0.230	7.716	2.677
<i>t</i>		1.532	0.230	7.716	2.677
<i>P</i>		0.186	0.827	0.001	0.044

2.3 3 种国产试剂 C、D 和 E 检测临床血清样本 HBV DNA 结果的比较

2.3.1 临床血清样本中 HBV DNA 检出率的比较 对于 43 例慢性 HBV 感染患者血清样本,试剂 C、D 和 E 的阳性检出率分别为 95.35%(41/43)、95.35%(41/43)、86.05%(37/43)。试剂 E 的检出率低于试剂 C 和 D,但经  $\chi^2$  检验差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

**2.3.2 临床血清样本中 HBV DNA 定量结果的比较** 应用试剂 C、D 和 E 分别检测 43 例慢性 HBV 感染患者血清样本,发现其中 11 例样本的检测结果显示于至少一种试剂的定量下限,8 例样本的检测结果显示于至少一种试剂的定量上限,剩余 24 例样本的检测结果显示均在 3 种试剂的定量线性范围内,因此用这 24 例样本的定量结果进行比较。试剂 C、D 和 E 的 HBV DNA 定量检测均值分别为

4.38±1.11、4.10±1.12、3.58±1.09 log<sub>10</sub> IU/mL,即 3 种试剂的检测结果显示为 C>D>E(C vs D:t=4.656,P<0.001;C vs E:t=5.406,P<0.001;D vs E:t=3.922,P=0.001)。

**2.3.3 3 种检测方法的相关性分析** 对于 24 例慢性 HBV 感染患者血清样本,其检测结果在 3 种试剂定量线性范围内,两两进行 Pearson 相关性以及线性回归分析,结果见图 1~3。

表 3 3 种国产试剂检测血清样本和国家标准物质 HBV DNA 结果的中间精密度比较

标本编号	试剂 C		试剂 D		试剂 E	
	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%
1	3.54±0.12	3.35	3.12±0.13	4.18	2.72±0.09	3.34
2	3.60±0.10	2.90	3.51±0.05	1.49	3.85±0.09	2.28
3	5.24±0.10	1.89	5.21±0.04	0.82	5.06±0.16	3.15
4	7.32±0.10	1.34	7.00±0.13	1.80	5.93±0.21	3.60
5	7.57±0.15	1.94	6.80±0.33	4.91	6.23±0.17	2.66
6	7.72±0.06	0.77	7.19±0.09	1.30	7.73±0.21	2.76
GBW(E)090137	3.44±0.09	2.67	3.41±0.06	1.90	3.52±0.03	0.74
GBW(E)090139	6.72±0.05	0.77	6.57±0.05	0.70	6.69±0.11	1.70

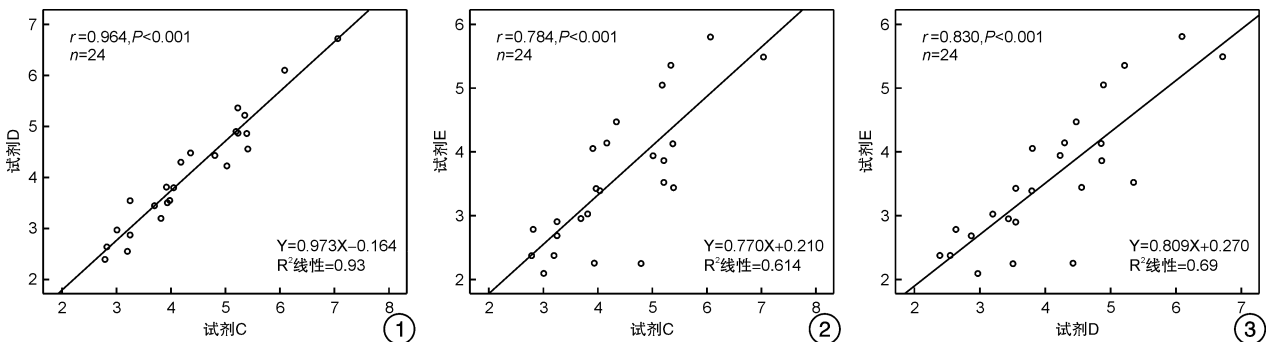


图 1 试剂 C 与 D 检测结果的相关性分析; 图 2 试剂 C 与 E 检测结果的相关性分析; 图 3 试剂 D 与 E 检测结果的相关性分析

**2.3.4 3 种检测方法的一致性分析** 对于 24 例慢性 HBV 感染患者血清样本,3 种试剂 C、D 和 E 的 HBV DNA 定量结果的一致性分析见图 4~6。试剂 C 与 D 检测结果的差值平均值为 0.28 log<sub>10</sub> IU/mL,差值标准差为 0.30 log<sub>10</sub> IU/mL,95% 一致性界限为 0.28±1.96×0.30(-0.30,0.86),95.83%(23/24) 的点在 95% 一致性界限以内,其一致性界限范围内试剂 C 和 D 测定值的最大差异为 0.85 log<sub>10</sub> IU/mL(图 4)。试剂 C 与 E 检测结果的差值平均值为 0.80 log<sub>10</sub> IU/mL,差值标准差为 0.72 log<sub>10</sub> IU/mL,95% 一致性界限为 0.80±1.96×0.72(-0.62,2.21),95.83%(23/24) 的点在 95% 一致性界限以内,其一致性界限范围内试剂 C 和 E 测定值的最大差异为 1.96 log<sub>10</sub> IU/mL(图 5)。试剂 D 与 E 检测结果的差值平均值为 0.51 log<sub>10</sub> IU/mL,差值标准差为 0.64 log<sub>10</sub> IU/

mL,95% 一致性界限为 0.51±1.96×0.64(-0.74,1.77),91.67%(22/24) 的点在 95% 一致性界限以内,其一致性界限范围内试剂 D 和 E 测定值的最大差异为 1.25 log<sub>10</sub> IU/mL(图 6)。3 种试剂检测 24 例临床血清样本的差值分布特点见表 4。**2.3.5 19 例超出定量线性范围的临床血清样本检测结果比较** 对于检测结果低于至少一种试剂定量下限的 11 例样本(表 5):2 例样本,3 种试剂均未检出;2 例样本,试剂 C 和 D 均检出,但均低于其定量线性下限,而试剂 E 未检出;7 例样本,试剂 C 和 D 的检测结果显示在其定量线性范围内,经 Wilcoxon 符号秩和检验,试剂 C 与 D 的检测结果显示间差异无统计学意义(P=0.498),而试剂 E 有 2 例未检出,另外 5 例虽检出,但均低于其定量线性下限。对于检测结果高于至少一种试剂定量上限的 8 例样本(表 5):1 例样本,检测结果均高于 3 种试剂相

应定量上限; 1 例样本, 高于试剂 C 和 D 的线性上限, 试剂 E 检测的结果为  $8.42 \log_{10}$  IU/mL; 2 例样本, 试剂 C 的检测结果高于其线性上限, 试剂 D 的检测结果在其定量线性范围内, 分别为  $7.38$ 、 $7.91 \log_{10}$  IU/mL, 试剂 E 的检测结果在其定量线

性范围内, 分别为  $7.17$ 、 $7.68 \log_{10}$  IU/mL; 4 例样本, 试剂 C 和 D 的检测结果均高于其线性上限, 试剂 E 检测的结果分别为  $7.57$ 、 $6.75$ 、 $7.32$ 、 $6.96 \log_{10}$  IU/mL。

表 4 3 种试剂检测 24 例临床血清样本的差值分布特点

差值	C-D	C-E	D-E
$\leq 0.5 \log_{10}$ IU/mL	79.17% (19/24)	37.50% (9/24)	62.50% (15/24)
$0.5 \sim 1.0 \log_{10}$ IU/mL	20.83% (5/24)	29.17% (7/24)	12.50% (3/24)
$1.0 \sim 2.0 \log_{10}$ IU/mL		29.17% (7/24)	20.83% (5/24)
$\geq 2.0 \log_{10}$ IU/mL		4.17% (1/24)	4.17% (1/24)

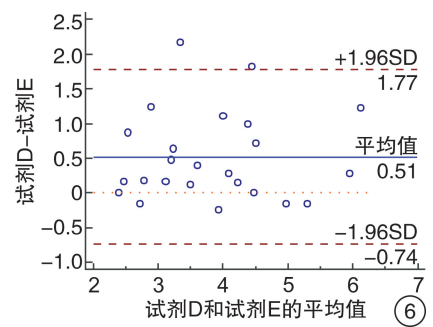
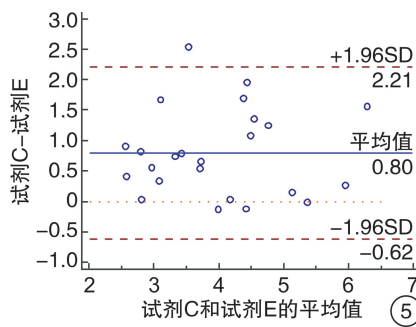
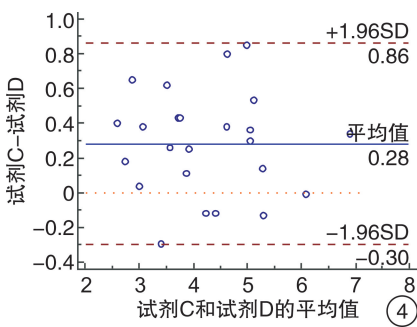


图 4 试剂 C 和 D 检测结果的 Bland-Altman 图; 图 5 试剂 C 和 E 检测结果的 Bland-Altman 图; 图 6 试剂 D 和 E 检测结果的 Bland-Altman 图

表 5 19 例超出 3 种试剂的定量线性范围的临床血清样本检测结果

例数	检测结果			一致性
	试剂 C	试剂 D	试剂 E	
低于至少一种试剂 定量线性下界的 11 例血清样本	2 未检出	2 未检出	2 未检出	相符
	2 10~30	2 20~100	2 未检出	不符
	2 $8.62 \times 10^1 \sim 9.75 \times 10^1$	2 $1.39 \times 10^2 \sim 1.45 \times 10^2$	2 未检出	不符
	5 $1.17 \times 10^2 \sim 1.65 \times 10^3$	5 $1.51 \times 10^2 \sim 2.64 \times 10^3$	5 15~100	不符
超过至少一种试剂 的定量线性上限的 8 例血清样本	1 $> 1.0 \times 10^8$	1 $> 1.0 \times 10^8$	1 $> 1.0 \times 10^9$	相符
	1 $> 1.0 \times 10^8$	1 $> 1.0 \times 10^8$	1 $2.61 \times 10^8$	相符
	2 $> 1.0 \times 10^8$	2 $2.38 \times 10^7 \sim 8.12 \times 10^7$	2 $1.47 \times 10^7 \sim 4.80 \times 10^7$	不相符
	4 $> 1.0 \times 10^8$	4 $> 1.0 \times 10^8$	4 $5.60 \times 10^6 \sim 3.74 \times 10^7$	不相符

**2.3.6 试剂 C 和 D 检测临床血清样本的相关性分析** 对于 43 例慢性 HBV 感染患者血清样本, 其中有 31 例血清样本的检测结果均在试剂 C 和 D 的定量范围内, 相关性分析发现相关系数  $r = 0.966 (P < 0.001)$ , 回归方程  $Y = 0.903X + 0.036$ 。将试剂 C 检测这 31 例血清样本所得的结果以 2000 IU/mL 为截断, 分为两组:  $\geq 2000$  IU/mL 组有 18 个标本, 试剂 C 与 D 检测结果的相关系数  $r = 0.950 (P < 0.001)$ , 回归方程  $Y = 0.986X - 0.235$ ;  $< 2000$  IU/mL 组有 13 个标本, 试剂 C 与 D 检测结果的相关系数  $r = 0.710 (P = 0.007)$ , 回归方程  $Y = 0.672X + 0.757$ , 提示低病毒血症时 2 种试剂的检测结果相关性较差。

**3 讨论**

HBV DNA 是乙型肝炎诊治中最重要的分子标志物, 可用于确定治疗指征和监测治疗等, 例如指南建议尽早识别病毒学突破、调整抗病毒治疗, 而病毒学突破 (viral breakthrough) 是指患者血清 HBV DNA 水平与最低值相比上升超过  $1 \log_{10}$  IU/mL (10 倍)<sup>[8]</sup>。慢性 HBV 感染者的精准管理高度依赖于 HBV DNA 的准确定量, 而影响 HBV DNA 定量准确性的因素很多, 包括核酸提取所用样本量、核酸提取方法、样品中酶抑制剂、荧光定量 PCR 仪、PCR 反应体系中模板浓度、PCR 引物和荧光探针等。HBV DNA 在不同的实验室可能应用不同的试剂检测, 试剂的差异可能改变病毒载量结

果,导致 HBV DNA 定量结果偏高或偏低,特别是在医学决定水平,因而可能影响临床决策。另外实验室在更换检测试剂时,临床一致性是最重要的指标,通过它来判断结果的等效性<sup>[9]</sup>。因此用于患者诊断或治疗管理的决策不仅基于患者的状态,而且可能还依赖于当时所使用的检测方法和试剂。

目前我国市面上有多种国家药品监督管理局(NMPA)批准的基于荧光定量 PCR 技术的 HBV DNA 定量检测商品化试剂盒。本研究选择了 2 种进口试剂和 3 种国产试剂(表 1),2 种进口试剂 A 和 B 是目前国际通用的 HBV DNA 定量试剂,但由于价格高昂、检测成本高而在我国应用有限,更多的实验室用的还是国产试剂。因此选择了 3 种国产试剂 C、D 和 E,为目前国内市场占有率较高的 3 种试剂,均采用各自配套的半自动化磁珠式核酸提取仪进行核酸提取。由于不同型号的荧光定量 PCR 仪可能影响检测结果<sup>[10]</sup>,将 3 种试剂均在 COBAS® Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪上进行扩增。

本研究主要探讨应用不同的试剂检测临床血清标本 HBV DNA 的结果一致性,以评价不同试剂的临床性能以及在日常临床实践中互换使用的可接受性。本研究分为两部分,第一部分探讨不同试剂的差异是否影响 HBV DNA 检测结果,首先应用小样本量的临床混合血清样本对此进行验证,发现两种进口试剂 A 和 B 的检测结果差异无统计学意义,而 C、D 和 E 3 种国产试剂仅有 C 与试剂 A 的检测结果间无统计学差异,试剂 D、E 的检测结果均显著低于试剂 A( $P < 0.05$ ),提示这 3 种国产试剂的检测性能可能与国际公认的进口试剂之间存在差异;进一步验证 3 种国产试剂的检测性能,发现 2 个水平国家标准物质的实际检测值与其靶值的差值均小于  $\pm 0.4 \log_{10}$  IU/mL,符合我国 NCCL 室间质量评价标准 HBV DNA 定量检测的可接受范围  $\leq \pm 0.4 \log_{10}$  IU/ml;3 种国产试剂 C、D、E 的 CV 均小于 5%,符合国际上常用的可接受定量标准  $CV \leq 5\%$ ,因此 3 种试剂的检测性能(正确度和精密度)均满足临床应用要求。

本研究第二部分扩大样本量探讨 3 种国产试剂在检测临床血清样本的定量结果一致性以及临床性能是否存在差异,发现试剂 E 的检出率略低于试剂 C 和 D,可能存在漏检;3 种国产试剂检测 24 例临床血清样本(3 种试剂的检测结果均在其定量范围内)的结果在统计学上差异有统计学意义,并且分析发现:试剂 C 与 D 的相关性和一致性较好、D 与 E 次之、C 与 E 最差;进一步分析试剂 C 和 D 检测 31 例临床血清样本(2 种试剂的检测结果均在其定量范围内)的结果发现,2 种试剂检测低病毒载量的相关性与高病毒载量时相比差。这些均

提示 3 种 HBV DNA 定量试剂的临床性能差异有统计学意义。

本研究中 3 种国产试剂的正确度和精密度均符合国家要求,但对临床血清样本的结果却存在显著差异,其原因可能包括:①核酸提取效率可能存在差异:虽然 3 种国产试剂都是采用敏感的磁珠法提取核酸,但血清上样量不同,例如试剂 E 的血清上样体积是 C 的 3 倍而洗脱体积、加入 PCR 体系的模板体积均相同(表 1),理论上 E 的 PCR 反应体系中 DNA 浓度应高于 C,但 E 的检出率却低于 C,提示核酸提取效率可能存在差异;②PCR 扩增效率可能存在差异:由于临床血清样本中存在 PCR 抑制剂如血红蛋白、肝素等,3 种试剂的抗干扰能力可能不一致,从而导致其扩增效率可能存在差异;③检测不同基因型和突变病毒株的能力可能存在差异:3 种试剂声称的检测亚型稍有差异,但究其各自能力如何未验证;3 种试剂的引物和探针序列可能并不相同,HBV 是一种高度变异的 DNA 病毒,抗病毒治疗中 HBV DNA 序列可能发生耐药性突变,若突变位于引物或探针结合区域,则可能导致样本的病毒载量被低估;Liu 等<sup>[11]</sup>建议准确定量 HBV DNA 可能需要两个靶标,例如基于 S 和 C 区域的双重实时 PCR 检测。

总之,本研究发现 3 种常用国产试剂定量检测临床血清样本 HBV DNA 的性能存在显著差异,在常规临床实践中互换用于临床决策时务必慎重。但由于本研究评估临床性能时所用血清样本量较小,是否影响临床决策有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2018, 3(6): 383-403.
- [2] Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(4): 1240-8, 1248. e1-2.
- [3] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice @ easloffice. eu, European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- [4] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(12): 2648-2669.
- [5] Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, et al. Multi-laboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification[J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(8): 2854-2858.

- (4):312-314.
- [6] Al-Samkari H, Parnes AD, Goodarzi K, et al. A multi-center study of romiplostim for chemotherapy-induced thrombocytopenia in solid tumors and hematologic malignancies[J]. *Haematologica*, 2020.
- [7] Hohaus S, Bartolomei F, Cuccaro A, et al. Venous Thromboembolism in Lymphoma; Risk Stratification and Antithrombotic Prophylaxis[J]. *Cancers(Basel)*, 2020, 12(5):1291.
- [8] Ikezoe T. Advances in the diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation in haematological malignancies[J]. *Int J Hematol*, 2021, 113(1):34-44.
- [9] Colombo R, Gallipoli P, Castelli R. Thrombosis and hemostatic abnormalities in hematological malignancies[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2014, 14(6):441-450.
- [10] Harada-Shirado K, Wang X, Mori H, et al. Circulating intranuclear proteins may play a role in development of disseminated intravascular coagulation in individuals with acute leukemia[J]. *Int J Hematol*, 2020, 111(3):378-387.
- [11] Qdaisat A, Soud RA, Wu CC, et al. Poor performance of D-dimer in excluding venous thromboembolism among patients with lymphoma and leukemia [J]. *Haematologica*, 2019, 104(6):e265-e268.
- [12] Mukai M, Oka T. Mechanism and management of cancer-associated thrombosis[J]. *J Cardiol*, 2018, 72(2):89-93.
- [13] Dharmavaram G, Cao S, Sundaram S, et al. Aggressive lymphoma subtype is a risk factor for venous thrombosis. Development of lymphoma-specific venous thrombosis prediction models [J]. *Am J Hematol*, 2020, 95(8):918-926.
- [14] Santi RM, Ceccarelli M, Bernocco E, et al. Khorana score and histotype predicts incidence of early venous thromboembolism in non-Hodgkin lymphomas. A pooled-data analysis of 12 clinical trials of Fondazione Italiana Linfomi(FIL) [J]. *Thromb Haemost*, 2017, 27.

(收稿日期:2021-01-29)

(上接第 384 页)

- [6] Qiu N, Li R, Yu JG, et al. Comparison of Abbott and Da-an real-time PCR for quantitating serum HBV DNA[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(33):11762-11769.
- [7] Han MS, Park Y, Nah H, et al. Comparison of the QIAGEN artus HBV QS-RGQ Assay With the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Assay for Quantifying Viral DNA in Sera of Chronic Hepatitis B Patients[J]. *Ann Lab Med*, 2017, 37(3):248-253.
- [8] Terrault NA, Lok A, McMahon BJ, et al. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance[J]. *Hepatology*, 2018, 67(4):1560-1599.
- [9] Maasoumy B, Bremer B, Lehmann P, et al. Commutability and concordance of four hepatitis B virus DNA assays in an international multicenter study[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2017, 10(8):609-618.
- [10] 耿帆, 周志明, 肖圣达, 等. 两款荧光定量 PCR 仪检测 HLA-B27 基因结果比对分析[J]. *临床血液学杂志*, 2019, 32(8):593-596.
- [11] Liu C, Chang L, Jia T, et al. Real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA quantification may require two different targets[J]. *Virology*, 2017, 14(1):94.

(收稿日期:2021-01-05)