

不同实时荧光定量 PCR 仪对外周血中 EB 病毒 DNA 检测结果的影响

徐远东¹ 耿帆¹ 周志明¹ 包一熙¹ 陈凤花¹

[摘要] 目的:应用同一种商品化 EB 病毒核酸定量检测试剂盒在 2 款实时荧光定量 PCR 仪同时检测外周血标本中 EB 病毒载量,探讨不同类型的实时荧光 PCR 仪对 EBV DNA 定性和定量检测结果的影响。方法:提取 179 例外周血标本(包括 102 例全血和 77 例血浆)的 DNA 后,应用 EB 病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)分别在 2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上同时检测 EBV DNA,定性结果采用配对 χ^2 检验和 Kappa 一致性检验,定量结果采用配对 t 检验、Spearman 相关分析和线性回归分析以及 Bland-Altman 图分析。结果:①应用 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 检测 179 例血标本中 EBV DNA 的阳性检出率分别为 49.72%(89/179)、48.60%(87/179),Kappa 值为 0.955 3,一致性较好;两者的阳性符合率为 98.85%、阴性符合率为 96.74%,总符合率为 97.77%。②在定量范围内的 56 例 EBV 阳性血样本,Cobas z480 和 LightCycler 480 II 的检测值分别为 3.943 ± 0.913 、 $3.726 \pm 0.980 \log_{10}$ copies/mL,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步进行 Spearman 相关性以及线性回归分析,相关系数 $r = 0.962 6$,回归方程为 $Y = 1.065 6X - 0.475 4$ ($r^2 = 0.985 3$);2 款实时荧光 PCR 仪检测的差值平均值为 $0.216 \log_{10}$ copies/mL,差值标准差为 $0.133 \log_{10}$ copies/mL,95% 一致性界限为 $(-0.045, 0.478) \log_{10}$ copies/mL,96.43% (54/56) 的点在 95% 一致性界限以内,界外点数为 2(3.57%)。结论:2 款实时荧光定量 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 检测外周血标本中 EBV DNA,结果具有可比性,但 Cobas z480 上的检测结果平均比 LightCycler 480 II 上的高,可能是由于 2 款 PCR 仪所使用的光源和滤光片组合不同所致。

[关键词] EB 病毒;定量;实时荧光定量 PCR 仪

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2022.02.001

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Effect of different real-time fluorescent quantitative PCR instruments on Epstein-Barr virus DNA detection in peripheral blood

XU Yuandong GENG Zhi ZHOU Zhiming BAO Yixi CHEN Fenghua

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

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

Abstract Objective: To compare the results of peripheral blood clinical specimens obtained with a commercial Epstein-Barr virus(EBV) DNA quantitative fluorescence diagnostic kit(PCR-fluorescence probing) using two platforms: Cobas z480 real-time PCR and LightCycler 480 II real-time PCR detection systems, and determine the concordance on qualitative and quantitative results of EBV DNA obtained by these two different real-time PCR instruments. **Methods:** Nucleic acid was extracted from 102 whole blood(WB) and 77 plasma clinical specimens using Sansure commercial extraction kit. Real-time PCR was performed on both Cobas z480 and LightCycler 480 II real-time PCR platforms, using Sansure EBV DNA quantitative fluorescence diagnostic kit. Comparison of the results obtained with two types of thermocyclers included Cohen's kappa, linear regression analysis, paired t test, Spearman correlation, and Bland-Altman analysis. **Results:** ①The detection rates of 179 peripheral blood clinical samples obtained by Cobas z480 and LightCycler 480 II platforms were 49.72%(89/179) and 48.60%(87/179) respectively. The excellent agreement was observed between both platforms($\kappa = 0.955 3$). The positive coincidence rate, negative coincidence rate and overall coincidence rate were 98.85%, 96.74% and 97.77%, respectively. ②A total of 56 clinical specimens with EBV DNA load above the limit of quantification on both PCR platforms were analyzed. The detection values of EBV DNA load obtained by Cobas z480 and LightCycler 480 II platforms were 3.943 ± 0.913 and $3.726 \pm 0.980 \log_{10}$ copies/mL, respectively($P < 0.05$). Correlation coefficient of the results obtained with both analyzers was 0.962 6. Bland-Altman plot analysis found the difference of mean values

¹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

measured with both PCR thermocyclers was 0.216 \log_{10} copies/mL (95% confidence interval, -0.045 to 0.478), and the proportions of the specimens within the 95% limit of agreement were 96.43% (54/56) between both platforms. **Conclusion:** The two real-time fluorescent PCR instruments provide reliable and comparable EBV viral load results, but viral load values measured with the Cobas z480 platform are on average higher than those measured with LightCycler 480 II platform. The difference is probably due to different light sources and filters used in both thermocyclers.

Key words Epstein-Barr virus; quantification; real-time fluorescent quantitative PCR thermocycler

实时荧光定量 PCR 已广泛应用于临床实验室中感染性病原体如 EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV)、巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 等相关疾病的诊断、治疗、监测与预防。EBV 是有包膜的双链 DNA 病毒, 与传染性单核细胞增多症、移植后淋巴增殖性疾病 (PTLD) 以及鼻咽癌、淋巴瘤、白血病等恶性肿瘤密切相关。外周血中 EBV 载量的准确定量对于监测移植患者的免疫抑制状态和 PTLD 的发展、早期筛查鼻咽癌患者等具有重要的临床意义^[1-2], 血浆中 EBV DNA 筛查鼻咽癌的敏感性和特异性分别为 97.1% 和 98.6%^[2]。应用实时荧光定量 PCR 检测 EBV DNA, 许多因素包括标本类型 (全血或血浆)、核酸提取方法、靶基因、PCR 扩增试剂以及实时荧光 PCR 仪等都可能影响 EBV DNA 的检测结果^[3]。本研究主要拟对 2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 定量检测外周血样本中 EBV DNA 的结果进行比对, 以评价不同类型的实时荧光 PCR 仪对 EBV DNA 定性和定量检测结果的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

EB 病毒核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法, 国械注准 20173400077) (圣湘生物科技股份有限公司); 两款实时荧光定量 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II (罗氏公司)。

1.2 标本

179 例外周血标本 (包括 102 例全血和 77 例血浆) 来自 2021 年 2 月我院住院患者, 其中男 122 例, 女 57 例; 年龄 2 个月~76 岁, 中位年龄 32 岁; 诊断为鼻咽癌 22 例、淋巴瘤 20 例、白血病 27 例、造血干细胞移植术后 30 例、心脏移植术后 2 例、肾移植术后 1 例、传染性单核细胞增多症 2 例和其他诊断 (含发热待查、肺部感染等) 75 例。

1.3 DNA 的提取

具体操作步骤严格按照试剂说明书进行。

1.3.1 血浆样本中 DNA 提取 取 100 μ L 血浆样本, 加入等体积的浓缩液, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀中加入 50 μ L 核酸释放剂, 充分震荡混匀, 静置 10 min, 作为待测核酸模板备用。

1.3.2 全血样本中 DNA 提取 向 800 μ L 全血中加入 1 mL 红细胞裂解液, 充分震荡混匀至透明清亮; 12 000 r/min 离心 1 min, 去上清; 再加入 1 mL

红细胞裂解液, 震荡混匀至沉淀震散; 12 000 r/min 离心 1 min, 去上清; 接着加入 1 mL 生理盐水, 12 000 r/min 离心 3 min, 去上清; 向沉淀中加入 400 μ L 核酸释放剂, 震荡混匀, 75 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min 后瞬时离心, 作为待测核酸模板备用。

1.4 实时 PCR 扩增

PCR 反应体系包括 38 μ L PCR 反应液、2 μ L 酶混合液、1 μ L 内标和 10 μ L 核酸模板, 总体积为 51 μ L, 同时在两款实时荧光定量 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上进行扩增, 扩增条件均为: 50 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 5 s; 57 $^{\circ}$ C 30 s, 45 个循环, FAM 和 VIC 通道检测荧光。该试剂盒的定量线性范围为 $4.00 \times 10^2 \sim 4.00 \times 10^9$ copies/mL。

1.5 统计学分析

EBV DNA 在 2 款实时荧光 PCR 仪上的定性结果采用配对 χ^2 检验和 Kappa 一致性检验; 定量结果均以 \log_{10} copies/mL 表示, 结果差异采用配对 t 检验分析, 相关性分析采用 Spearman 相关分析以及线性回归分析, 一致性采用 Bland-Altman 图分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 款实时荧光 PCR 仪检测血标本中 EBV DNA 的定性结果分析

对于 179 例外周血标本中 EBV DNA 的定性检测, 以 FAM 通道具有典型的 S 型扩增曲线和 Ct 值 ≤ 39 作为阳性, 2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上的阳性检出率分别为 49.72% (89/179)、48.60% (87/179), 经配对 χ^2 检验差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 进行 Kappa 一致性检验分析, Kappa 值为 0.9553 ($P < 0.05$), 2 款实时荧光 PCR 仪检测血标本中 EBV DNA 的定性结果一致性较好; 两者的阳性符合率为 98.85%、阴性符合率为 96.74%, 总符合率为 97.77%, 见表 1。

2.2 2 款实时荧光 PCR 仪检测血标本中 EBV DNA 的定量结果分析

应用同一种 EBV DNA 试剂盒同时在 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上进行扩增检测 179 例血标本中 EBV 载量, 发现其中 56 例血标本在 2 款实时荧光 PCR 仪上的定量检测结果均在试剂盒的定量线性范围内, Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上的 EBV DNA 定量检测值分别为 3.943 ± 0.913 、 $3.726 \pm 0.980 \log_{10}$ copies/mL, 差异有统计

学意义($t=12.15, P<0.05$)。

2.3 2 款实时荧光 PCR 仪定量检测 EBV DNA 的相关性分析

对于定量范围内的 56 例血样本,2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 的检测

结果进行 Spearman 相关性以及线性回归分析,相关系数 $r=0.9626 (P<0.01)$ (95%CI, 0.9368~0.9780), 回归方程为 $Y=1.0656X-0.4754$ ($r^2=0.9853$), 结果见图 1。

表 1 2 款实时荧光 PCR 仪定性检测血标本中 EBV DNA 的结果分析

Cobas z480	LightCycler 480 II		Kappa (95%CI)	阳性符合率/% (95%CI)	阴性符合率/% (95%CI)	总符合率/% (95%CI)
	阳性	阴性				
阳性	86	3	0.9553(0.9120~	98.85(93.76~	96.74(90.76~	97.77(94.38
阴性	1	89	0.9986)	99.97)	99.32)	~99.39)

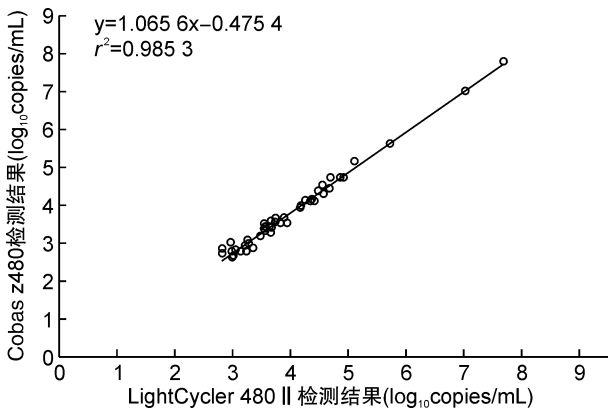


图 1 2 款实时荧光 PCR 仪定量检测 56 例血标本中 EBV DNA 的相关性分析

2.4 2 款实时荧光 PCR 仪定量检测 EBV DNA 的一致性分析

对于定量范围内的 56 例血样本,Cobas z480 和 LightCycler 480 II 上 EBV DNA 定量检测结果的差值平均值为 0.216 log₁₀copies/mL, 差值标准差为 0.133 log₁₀copies/mL, 95% 一致性界限为 0.216 ± 1.96 × 0.133 (-0.045, 0.478), 96.43% (54/56) 的点在 95% 一致性界限以内, 界外点数为 2(3.57%)(图 2)。另外, 其中 5 个(5/56, 8.93%) 血标本两款 PCR 仪定量检测结果的差值 ≥ 0.4 log₁₀copies/mL。

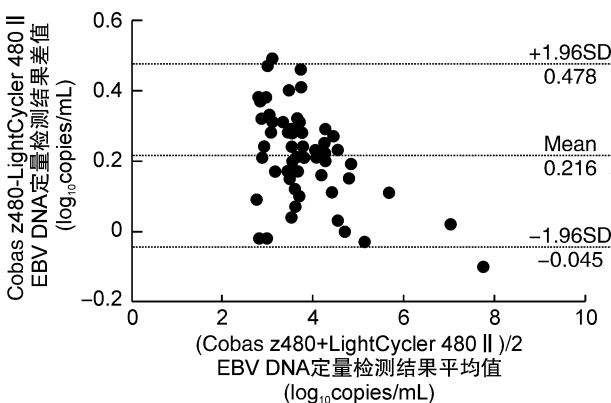


图 2 2 款实时荧光 PCR 仪定量检测血标本中 EBV DNA 的 Bland-Altman 图分析

3 讨论

实时荧光定量 PCR 已成为一种高度灵敏检测临床样本中感染性病原体核酸的主要方法之一, 通过荧光标记的探针在 PCR 过程中产生的荧光信号变化, 从而定量模板 DNA 的量。然而, 检测同一病原体核酸的不同厂家商品化实时定量 PCR 试剂盒所用探针上标记的染料、校准品、仪器等不同, 都可能影响检测结果^[4]。室间质评中不同实验室定量检测同一样本 EBV DNA 的差异可高达 300 倍 (2.5log₁₀)^[3]。另外, 不同的实时荧光 PCR 仪也可能影响检测结果^[5]。研究发现应用同一商品化试剂盒在 2 款实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler 2.0 和 LightCycler 480 上定量检测 97 例血清样本中的 CMV 载量, 发现 2 款 PCR 仪上 CMV DNA 定量结果的差值中位数为 0.137 log₁₀, 差值平均值为 0.215 log₁₀^[6]。

本研究比较了 179 例血样本提取核酸后应用相同的扩增试剂和扩增条件在 2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 同时扩增检测 EBV DNA, 发现两者定量检测结果之间具有可比性, 差值平均值为 0.216 log₁₀copies/mL, Spearman 分析提示两者检测结果之间存在相关性 ($r=0.9626$)。这 2 种检测系统除各自的实时荧光定量 PCR 仪不同外, 其余包括样本、试剂、标准品、操作程序以及具体的操作人员都相同, 外周血标本中 DNA 的提取和 PCR 体系的配制、分装、加入模板都是由同一工作人员同时操作, 提示这种差异可能主要由 2 款实时荧光 PCR 仪的不同所致。

2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 均具有 6 个荧光检测通道, 可进行定量分析; 都包含相同的热循环模块和 CCD 荧光检测系统, 但两者的光源和滤光片组合不同, Cobas z480 的光源为氙灯, LightCycler 480 II 的光源为高强度白光 LED 灯, 两者所检测染料的滤光片组合也稍有不同(见表 2), 这些都可能影响实时荧光定量 PCR 检测结果。对于所有实时荧光 PCR 仪, 荧

- Northern Han Chinese from Liaoning Province, Northeast China[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2017, 29: e35-e37.
- [22] Thompson R, Zoppis S, McCord B. An overview of DNA typing methods for human identification: past, present, and future[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 830: 3-16.
- [23] Butler JM, Buel E, Crivellente F, et al. Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(10-11): 1397-412.
- [24] Børsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2015, 18: 78-89.
- [25] Aly SM, Sabri DM. Next generation sequencing (NGS): a golden tool in forensic toolkit[J]. *Arch Med Sadowej Kryminol*, 2015, 65(4): 260-271.
- [26] Lo YM, Chiu RW. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis[J]. *Clin Chem*, 2008, 54(3): 461-466.
- [27] Zhang S, Han S, Zhang M, et al. Non-invasive prenatal paternity testing using cell-free fetal DNA from maternal plasma: DNA isolation and genetic marker studies[J]. *Leg Med(Tokyo)*, 2018, 32: 98-103.
- [28] Jiang H, Xie Y, Li X, et al. Noninvasive Prenatal Paternity Testing (NIPAT) through Maternal Plasma DNA Sequencing: A Pilot Study[J]. *PLoS One*, 2016, 11(9): e0159385.
- [29] Morling N, Allen RW, Carracedo A, et al. Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases[J]. *Forensic Sci Int*, 2002, 129(3): 148-157.
- [30] Zhou Z, Shao C, Xie J, et al. Genetic polymorphism and phylogenetic analyses of 21 non-CODIS STR loci in a Chinese Han population from Shanghai[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(2): e1083.
- [31] Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, et al. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing[J]. *Forensic Sci Int Genet*, 2007, 1(3-4): 223-231.
- [32] Morling N, Allen RW, Carracedo A, et al. Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases[J]. *Forensic Sci Int*, 2002, 129(3): 148-157.
- [33] Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution[J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(6): 435-445.
- [34] de Jong A, Dondorp WJ, de Die-Smulders CE, et al. Non-invasive prenatal testing: ethical issues explored[J]. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18(3): 272-277.

(收稿日期: 2021-04-30)

(上接第 89 页)

光强度水平取决于仪器维护、及时更换灯泡(光源)以及仪器镜头的清洁度;定期清洁镜头,并对仪器进行维护,以确保其处于最佳性能,有助于保障实时荧光定量 PCR 检测结果的准确性。

表 2 2 款实时荧光 PCR 仪的常用染料的激发光谱和发射光谱

染料	nm			
	Cobas z480		LightCycler 480 II	
	λ 激发 滤光片	λ 发射 滤光片	λ 激发 滤光片	λ 发射 滤光片
FAM	465	510	440	510
HEX/VIC	540	580	533	580
Red610	498	610	498	610
Cy5	610	670	618	660

总之,2 款实时荧光 PCR 仪 Cobas z480 和 LightCycler 480 II 定量检测外周血样本中 EBV DNA,结果具有可比性,但 Cobas z480 上的检测结果平均比 LightCycler 480 II 上的高,可能是由于两款 PCR 仪所使用的光源和滤光片组合不同所致。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kanakry JA, Hegde AM, Durand CM, et al. The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases[J]. *Blood*, 2016, 127(16): 2007-2017.

- [2] Chan K, Woo J, King A, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(6): 513-522.
- [3] Hayden RT, Yan X, Wick MT, et al. Factors contributing to variability of quantitative viral PCR results in proficiency testing samples: a multivariate analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 337-345.
- [4] Pavšič J, Devonshire AS, Parkes H, et al. Standardization of Nucleic Acid Tests for Clinical Measurements of Bacteria and Viruses[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2008-2014.
- [5] 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.
- [6] Przybylski M, Dzieciatkowski T, Les K, et al. Comparison of real-time PCR quantitative analysis of the cytomegalovirus DNA level using LightCycler 2.0 and LightCycler 480 instruments[J]. *J Clin Virol*, 2012, 55(3): 270-273.

(收稿日期: 2021-06-24 修回日期: 2021-07-29)