

一种新型乙型肝炎病毒 RNA 定量检测方法的临床检测性能评估

张缈曲 张琪然 张寒悦 喻一奇 仇超 张文宏

复旦大学附属华山医院感染科, 上海 200040

通信作者: 张文宏, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn, 电话: 021-52887976

【摘要】 目的 评估一种新型乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) RNA 定量检测方法——HBV 实时荧光核酸恒温扩增检测 (simultaneous amplification and testing, SAT) (RNA 捕获探针法) 的临床检测性能。**方法** 采用简单随机抽样法收集 2017 年 6 月至 2018 年 6 月上海复旦大学附属华山医院收治的 170 例慢性乙型肝炎患者和 30 例非 HBV 感染者的血清标本 HBV RNA, 使用 HBV SAT 与常规反转录聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 进行检测, 对两种方法检测的灵敏度、特异度、 κ 值及定量值相关性进行比较, 并对两种方法检测的不同 HBV DNA 浓度样本的检出率进行分析比较。统计学分析采用 χ^2 检验。**结果** 以临床诊断为标准, HBV SAT 检测灵敏度为 97.06% (165/170), 特异度为 100.00% (30/30), κ 值为 0.908; 反转录 PCR 检测灵敏度为 92.94% (158/170), 特异度为 100.00% (30/30), κ 值为 0.798。在 HBV DNA 低浓度样本 (HBV DNA < 100 IU/mL) 中, HBV SAT 检出率为 77.27% (17/22), 反转录 PCR 检出率为 59.09% (13/22)。两种方法定量结果线性相关系数 $r = 0.9878$ 。**结论** 全自动 HBV SAT 与反转录 PCR 定量结果一致, 在 HBV DNA 低浓度样本中的检测灵敏度比反转录 PCR 方法略高, 是一种快速、准确的 HBV RNA 定量检测方法。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; RNA; 定量检测

基金项目: 十三五“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (2017ZX10302201-006-003)

DOI: 10.3760/cma.j.cn311365-20191225-00427 中图分类号: R512.6+2

Evaluation of clinical utility of a novel method for quantitative detection of hepatitis B virus RNA

Zhang Miaoqu, Zhang Qiran, Zhang Hanyue, Yu Yiqi, Qiu Chao, Zhang Wenhong

Department of Infections Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Corresponding author: Zhang Wenhong, Email: zhangwenhong@fudan.edu.cn, Tel: 0086-21-52887976

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical utility of a novel quantitative assay named hepatitis B virus (HBV) simultaneous amplification and testing (SAT) using a kit for HBV RNA detection (RNA probes).

Methods HBV RNA was detected in 170 serum samples of chronic hepatitis B patients and 30 serum samples of patients without HBV infection collected by simple random sampling method from June 2017 to June 2018 in Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai using HBV SAT and reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) method. The sensitivity, specificity, kappa value and quantitative correlation of the two methods were analyzed and compared. The detection rates of HBV RNA from samples with different HBV DNA concentrations of the two methods were analyzed and compared. Statistical analysis was performed by chi-square test. **Results** Based on the clinical diagnosis, the detection sensitivity, specificity, kappa value of HBV SAT were 97.06% (165/170), 100.00% (30/30) and 0.908, respectively, while the reverse transcription PCR were 92.94% (158/170), 100.00% (30/30) and 0.798, respectively. Among samples with lower concentration of HBV DNA (HBV DNA < 100 IU/mL), the detection rates of HBV SAT and reverse transcription PCR were 77.27% (17/22) and 59.09% (13/22), respectively. The linear correlation coefficient of the two methods was $r = 0.9878$. **Conclusions** Quantitation results of HBV RNA by HBV SAT and reverse transcription PCR method are consistent. HBV SAT is a rapid and accurate method for HBV RNA quantitative detection, which has a slightly higher detection rate than reverse transcription PCR in samples with low concentration of HBV DNA.

【Key words】 Hepatitis B virus; RNA; Quantitative detection

Fund program: The 13th Five-Year “Prevention and Treatment of Major Infectious Diseases such as AIDS and Viral Hepatitis” Science and Technology Major Project(2017ZX10302201-006-003)

DOI:10.3760/cma.j.cn311365-20191225-00427

大部分 HBV 感染者经 NAs 治疗后,其血清 HBV DNA 低于检测下限,但这仅表示病毒的反转录过程被有效抑制,不能反映肝细胞内 cccDNA 的转录活性状态。研究显示,外周血中的 HBV RNA 来自肝脏的 HBV 前基因组 RNA (pregenomic RNA),其在血清中的含量能够反映肝组织内的 cccDNA 是否有转录活性且与多项乙型肝炎疗效指标相关,因此研究者们提出血清 HBV RNA 有望成为监测乙型肝炎治疗效果的新指标^[1-3]。目前,尚无经过国家药品监督管理局批准的商品化 HBV RNA 检测试剂,已有的研究中的定量检测 HBV RNA 方法主要有两种:反转录 PCR 和实时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT)^[4-5]。SAT 技术是建立在 RNA 转录介导扩增技术基础上的新型 HBV RNA 定量检测方法,本研究对该技术定量检测 CHB 患者血清中的 HBV RNA 进行了性能评估,为其进一步的临床研究和应用提供借鉴。

材料与方 法

一、样本来源

根据公式 $n = \frac{[Z_{1-\alpha/2}]^2 P(1-P)}{\Delta^2}$ 和预试验结

果,设定 HBV SAT 和反转录 PCR 阳性符合率达 90%,则需要的阳性样本最少量 $n1 = \frac{1.96^2 \times 0.9 \times (1-0.9)}{0.05^2} =$

138。采用简单随机抽样法收集 2017 年 6 月至 2018 年 6 月上海复旦大学附属华山医院收治的 170 例 CHB 患者(符合《慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版)》^[6]中 CHB 患者的诊断标准)和 30 例非 HBV 感染者(血清经 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 检测均为阴性,临床诊断为非 HBV 感染)的血清标本。170 例 CHB 患者标本中,148 例 HBV DNA > 100 IU/mL,22 例 HBV DNA < 100 IU/mL。本研究通过复旦大学附属华山医院伦理委员会审核批准[(2019)临审批第(414)号]。

二、检测方法

1. 检测试剂:HBV 核酸测定试剂盒(RNA 捕获探针法)购自上海仁度生物科技有限公司,病毒 RNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,DNA 酶和反转录试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,定量 PCR 试剂购自瑞士罗氏公司。

2. HBV SAT:使用 HBV 核酸测定试剂盒检测血

清中的 HBV RNA。该试剂盒包括核酸提取和扩增两部分试剂。核酸提取采用修饰有特异捕获序列的 RNA 探针的磁珠对样本进行 RNA 提取,包括靶标捕获和洗涤两部分,提取获得的 RNA 用于后续检测。根据 HBV RNA 的特异性检测区域,设计带有 T7 启动子的反转录扩增引物和互补链合成序列引物,并在 2 条扩增引物之间的序列中选择保守且特异的区域设计 RNA 探针,该 RNA 探针为茎环结构的分子信标探针,探针 5' 端由羧基荧光素(carboxyfluorescein, FAM)标记,3' 端由 4-(4-二甲基氨基偶氮苯基)苯甲酸(Dabeyl)标记。扩增过程中实时检测荧光信号。提取和检测全程均有设置内标。应用全自动核酸检测分析系统(AutoSAT)进行检测,仪器配套软件根据检测结果自动计算出样本中的 HBV RNA。将待测样本放入仪器内,按照仪器和试剂使用说明书设置程序,提取、扩增、检测及定量结果计算全部由仪器和软件自动完成,软件结果界面自动显示 HBV RNA 定量检测结果。

3. 反转录 PCR:参照文献[7],采用反转录 PCR 检测 HBV RNA。使用 HBV RNA 提取试剂盒提取 HBV RNA,然后用特异的反转录引物进行反转录,最后用 TaqMan 探针对反转录产物进行定量 PCR。使用标准品 RNA 从反转录开始与样品进行同步检测,根据标准品绘制标准曲线,并对临床样本中的 HBV RNA 进行定量。

4. 复测:对于 HBV SAT 和反转录 PCR 定性检测不一致的差异样本进行复测,复测后仍有差异的,将阳性扩增产物送至安徽通用生物系统有限公司进行测序确认。

5. 检出限:采用简单随机抽样法抽取定量范围内 HBV SAT 和反转录 PCR 检测均为阳性的 10 份血清样本,用阴性血清进行 10 倍倍比稀释,每份样本进行 8 个稀释度稀释,采用 HBV SAT 和反转录 PCR 同时对不同稀释度样本进行检测。

三、统计学分析

采用 Med Cad 软件进行统计学分析。以临床诊断为标准计算 HBV SAT 和反转录 PCR 检测临床样本的灵敏度、特异度和 κ 值。对 HBV SAT 和反转录 PCR 检测的不同 HBV DNA 含量样本的 HBV RNA 检出率进行分析,两组间检出率比较采用 χ^2 检验。对 HBV SAT 和反转录 PCR 的定量结果的一致性进行线性回归分析。

结 果

一、定性检测结果

对 170 例 HBV 感染者进行检测,HBV SAT 检测结果为 165 例阳性,5 例阴性;反转录 PCR 检测结果为 158 例阳性,12 例阴性。对 30 例非 HBV 感染者进行检测,HBV SAT 检测结果均为阴性;反转录 PCR 检测结果均为阴性。

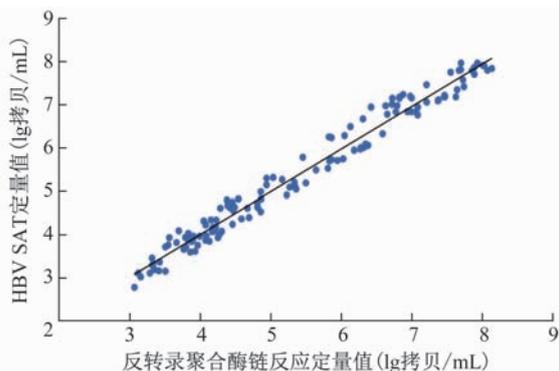
以临床诊断为标准,HBV SAT 检测灵敏度为 97.06% (165/170),特异度为 100.00% (30/30), κ 值为 0.908;反转录 PCR 检测灵敏度为 92.94% (158/170),特异度为 100.00% (30/30), κ 值为 0.798。

148 份 HBV DNA > 100 IU/mL 的样本中,HBV SAT 检出率为 100.00% (148/148),反转录 PCR 检出率为 97.97% (145/148),差异无统计学意义 ($\chi^2 = 3.031, P > 0.05$)。22 份 HBV DNA < 100 IU/mL 的样本中,HBV SAT 检出率为 77.27% (17/22),反转录 PCR 检出率为 59.09% (13/22),差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.676, P > 0.05$)。

4 份反转录 PCR 检测阴性、HBV SAT 检测阳性的 HBV 患者标本,经 HBV SAT 复测后仍为阳性,HBV SAT 扩增产物序列经局部序列排比检索基本工具(basic local alignment search tool, BLAST)在线比对为 HBV。

二、定量检测结果

170 例 HBV 感染者的血清样本中,HBV SAT 和反转录 PCR 均为阳性的标本共 158 份,其中 133 份定量结果位于 HBV SAT 和反转录 PCR 的定量范围内,将其检测结果进行线性相关性分析,线性相关系数 $r = 0.9878 (P < 0.01)$ 。线性回归方程 $y = 0.09482 + 0.9905x$,其中截距的 95%CI 为 $-0.0552 \sim 0.2448$,斜率的 95%CI 为 $0.9635 \sim 1.0175$ (图 1)。



注:HBV SAT 为乙型肝炎病毒实时荧光核酸恒温扩增检测

图 1 HBV SAT 和反转录聚合酶链反应检测 133 份血清乙型肝炎病毒样本结果的相关性

三、检测限检测结果

10 份倍比稀释样本中,9 份样本稀释后 HBV SAT 的检出限比反转录 PCR 多一个稀释梯度。

讨 论

长期以来,乙型肝炎的分子检测都是采用血清 HBV DNA 对 HBV 感染进行确诊及疗效监测。Liao 等^[8]和 Huang 等^[9]的研究显示,HBV RNA 可以作为一种新的 HBV 疗效监测的分子标识。Wang 等^[7]的研究显示,HBV 在感染宿主后,由 cccDNA 转录出的前基因组 RNA 可以被病毒衣壳包被成类似病毒样颗粒进入外周血中,外周血中的 HBV RNA 就是前基因组 RNA,因此检测外周血中的 HBV RNA 可以反映肝脏内的 HBV cccDNA 转录活性。Wang 等^[10]的研究显示在接受 NAs 治疗的患者中,血清 HBV RNA 浓度可反映肝内病毒复制活性,且与肝组织病理学相关。van Campenhout 等^[11]的研究显示血清中 HBV RNA 水平与血清 ALT 水平相关,HBV 前基因组 RNA 可以作为使用聚乙二醇干扰素 α -2a 治疗患者 HBeAg 发生血清学转换的早期预测因子。这些研究均提示血清 HBV RNA 在乙型肝炎疗效监测中具有重要的临床意义。

由于目前尚无 HBV RNA 检测的金标准,HBV DNA 来自前基因组 RNA,本研究中所有样本均来自 HBV DNA 阳性患者,所以暂用 CHB 的临床诊断作为标准,对两种方法检测 HBV RNA 的灵敏度和特异度进行初步评价。结果显示两种方法对 CHB 患者血清中 HBV RNA 的检测特异度均较好,HBV SAT 的灵敏度略高于反转录 PCR,特别是在 HBV DNA < 100 IU/mL 的样本中,HBV SAT 的检出率高于反转录 PCR。4 例 CHB 患者血清标本反转录 PCR 检测为阴性,而 HBV SAT 检测为阳性。反转录 PCR 阴性的原因可能是样本中的 RNA 浓度较低,根据理论推算该方法的检测下限为 250 拷贝/mL,高于 HBV SAT 的 50 拷贝/mL 检测下限,加之提取过程和 DNA 酶处理可能导致模板浓度低于方法学检测下限。对同一样本倍比稀释后,两种方法检测结果显示,HBV SAT 较反转录 PCR 灵敏度更高,有利于检测 HBV RNA 低浓度的样本,但本研究样本量较少,还需要进一步扩大样本量进行研究。通过对两种方法定量结果的线性回归分析显示,两者定量值具有较好的一致性。本研究后续还会进一步扩大样本量对 HBV SAT 进行评估。

目前,有关 HBV RNA 的研究多数使用基于 RNA 提取、反转录和定量 PCR 作为技术平台的检测方法,手工操作过程难以绝对标准化,因此样本间和同一样本的多次重复性可能存在较大偏差。本研究中使用 HBV 核酸测定试剂盒配套自动化检测仪器通过全自动核酸检测分析系统,实现样本进结果出的全程自动化检测,可以减少操作产生的偏差。

综上所述,全自动化的 HBV SAT 检测试剂盒能够快速准确地完成血清样本中 HBV RNA 的定量检测,全程自动化,检测结果更加客观,减少了检测人员的工作量,降低了生物安全风险,是一种检测 HBV RNA 的有效方法。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 张缈曲、张琪然、张寒悦:标本整理和试验操作、论文撰写;喻一奇:论文撰写;仇超、张文宏:论文审核

参 考 文 献

[1] 鲁凤民,王杰,庄辉. HBV RNA 病毒样颗粒的潜在临床意义 [J]. 中华肝脏病杂志, 2016, 24 (9): 641-642. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1007-3418. 2016. 09. 001.

[2] 鲁凤民,王杰,陈香梅,等. 乙型肝炎病毒 RNA 病毒样颗粒的发现及其对抗病毒治疗临床实践的潜在影响 [J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25 (2): 105-110. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1007-3418. 2017. 02. 005.

[3] 鲁凤民,窦晓光,张文宏,等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV RNA 检测的临床意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34 (5): 934-938. DOI:10. 3969/j. issn. 1001-5256. 2018. 05. 005.

[4] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Natural history of serum HBV-RNA in chronic HBV infection [J]. J Viral Hepat, 2018, 25 (9): 1038-

1047. DOI:10. 1111/jvh. 12908.

[5] Chen EQ, Wang ML, Tao YC, et al. Serum HBerAg is better than HBV RNA and HBsAg in reflecting intrahepatic covalently closed circular DNA [J]. J Viral Hepat, 2019, 26 (5): 586-595. DOI: 10. 1111/jvh. 13061.

[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 (2015 更新版) [J]. 中华传染病杂志, 2015, 33 (11): 641-662. DOI:10. 3760/cma. j. issn. 1000-6680. 2015. 11. 001.

[7] Wang J, Shen T, Huang X, et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound [J]. J Hepatol, 2016, 65 (4): 700-710. DOI:10. 1016/j. jhep. 2016. 05. 029.

[8] Liao H, Liu Y, Li X, et al. Monitoring of serum HBV RNA, HBerAg, HBsAg and anti-HBc levels in patients during long-term nucleoside/nucleotide analogue therapy [J]. Antivir Ther, 2019, 24 (2): 105-115. DOI:10. 3851/IMP3280.

[9] Huang H, Wang J, Li W, et al. Serum HBV DNA plus RNA shows superiority in reflecting the activity of intrahepatic cccDNA in treatment-naïve HBV-infected individuals [J]. J Clin Virol, 2018, 99/100:71-78. DOI:10. 1016/j. jcv. 2017. 12. 016.

[10] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between serum HBV-RNA levels and intrahepatic viral as well as histologic activity markers in entecavir-treated patients [J]. J Hepatol, 2018, 68 (1): 16-24. DOI:10. 1016/j. jhep. 2017. 08. 021.

[11] van Campenhout MJH, van Bömmel F, Pfefferkorn M, et al. Host and viral factors associated with serum hepatitis B virus RNA levels among patients in need for treatment [J]. Hepatology, 2018, 68 (3): 839-847. DOI:10. 1002/hep. 29872.

(收稿日期:2019-12-25)

(本文编辑:蒋蔚娜)

《中华传染病杂志》第九届通讯编委会组成人员名单

以下按姓氏汉语拼音排序

曹红翠	陈立	陈小华	程君	樊蓉	高海兵	侯凤琴	胡付品
李俊峰	李湘燕	李玉香	李元元	李晖	连建奇	梁雪松	刘鸿凌
刘俊平	马世武	马臻	彭明利	钱志平	曲俊彦	饶慧璞	邵凌云
沈军	沈银忠	王亚东	王绮夏	吴涛	吴志远	向天新	徐亮
许烂漫	杨慧	于德敏	曾庆磊	张静萍	张永喜	郑培文	朱传龙
朱跃科							