

荧光定量 PCR 与逆转录 PCR 检测 HCV RNA 的比较分析

张英哲, 金仁顺, 朴东明, 沈哲式

张英哲, 金仁顺, 朴东明, 沈哲式, 延边大学医学院附属医院病理科
吉林省延吉市 133000
通讯作者: 朴东明, 133000, 吉林省延吉市局子街 119 号, 延边大学医学院
附属医院病理科. pdm11172000@yahoo.com.cn
电话: 0433-2660121 传真: 0433-2513610
收稿日期: 2005-01-29 接受日期: 2005-03-03

摘要

目的: 用荧光定量 PCR(FQ-PCR)和逆转录 PCR(RT-PCR)法检测抗-HCV 阳性血清中的 HCV RNA, 探讨两种方法检测结果的临床意义。

方法: 抗-HCV 阳性血清样本 1062 份, 其中 481 份用 RT-PCR 法检测, 465 份用 FQ-PCR 法检测, 另有 116 份同时用两种 PCR 法检测。

结果: RT-PCR 法检测 HCV RNA 的阳性率为 49.90%(240/481), FQ-PCR 法的阳性率为 62.58%(291/465), 两种方法的阳性率有显著性差异($P<0.001$)。同时用两种方法检测 116 份, RT-PCR 法阳性率为 49.14%(57/116), FQ-PCR 法阳性率为 65.52%(76/116), 也有显著性差异($P<0.05$)。FQ-PCR 法检测的 40 份阴性中 RT-PCR 法检测出 4 例 HCV RNA 阳性。

结论: FQ-PCR 检测 HCV RNA 比 RT-PCR 特异性高, 但 RT-PCR 的敏感性较 FQ-PCR 高, 部分 FQ-PCR 检测的阴性结果不能排除 HCV RNA 阳性的可能性。

张英哲, 金仁顺, 朴东明, 沈哲式. 荧光定量 PCR 与逆转录 PCR 检测 HCV RNA 的比较分析. 世界华人消化杂志 2005;13(11):1349-1350
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1349.asp>

0 引言

近年来出现的实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术开辟了从定性到定量的新途径, 他以其独特的优点逐渐成为临床和科研中的重要工具, 但仍存在不足之处^[1]。我们采用逆转录 PCR(RT-PCR)和 FQ-PCR 检测了抗-HCV 阳性血清 946 例的 HCV RNA, 同时用两种方法检测了 116 例, 以评价两种 PCR 法检测结果的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-07/2004-12 来我院门诊及住院患者, 利用 ELISA 法检测的抗-HCV 阳性血清标本共 1062 份; RT-PCR 法使用华美生物工程公司提供的 HCV RNA PCR 酶免检测试剂盒, 主要仪器有 PCR 扩增仪(PTC100 型)和酶标仪(Bio Rad 550 型)。FQ-PCR 法使用深圳匹基生物工程公司提供的 HCV RNA 荧光定量检测试剂盒, 主要仪器有

日本大和荧光定量 PCR(FQD-33A)检测系统。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检测 2002-07/2003-04 的 481 份标本利用酶标仪检测结果, 选双波长(450/630)进行比色, 读取 A 值, 结果判定: $\text{Cutoff} = \text{阴性对照 } A \text{ 值} \times 2.1$ (阴性对照 A 值低于 0.05 时按 0.05 计算), 标本 A 值 $\geq \text{Cutoff}$ 值时, 判定为 HCV RNA 阳性, 每次检测均设阴性和阳性对照。

1.2.2 FQ-PCR 法检测 2004-04/09 的 465 份标本样品检测结果低于最低检出限时报告为 $<10^6$ copies/L; 检测结果 $>10^6$ copies/L 时直接报告, 检测的拷贝范围为 10^6 – 10^{11} copies/L。每次试验均设阴性、阳性和峰值对照, 相关系数 $r \leq -0.980$ 。

1.2.3 2004-10/12 的 116 份标本同时用两种 PCR 法检测。两种 PCR 法的实验操作和检测结果, 均严格按试剂盒说明书进行操作和分析。

统计学处理 采用 SPSS10.0 系统分析软件进行数据处理, 两组率比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测的 HCV RNA 阳性率为 49.90% (240/481), FQ-PCR 法的阳性率为 62.58% (291/465), 二者比较有显著性差异 ($\chi^2 = 15.449$, $P<0.001$, 表 1)。

表1 RT-PCR 和 FQ-PCR 法检测 HCV RNA 结果

检测方法	n	阳性份数	阳性率(%)
RT-PCR	481	240	49.90
FQ-PCR	465	291	62.58 ^b

^b $P<0.001$ vs RT-PCR.

2.2 两种 PCR 法同时检测 同时检测的 116 份中 RT-PCR 的阳性率为 49.14%, FQ-PCR 的阳性率为 65.52%, 二者比较也有显著性差异 ($\chi^2 = 6.36$, $P<0.05$, 表 2), FQ-PCR 法检测的 40 例阴性中 RT-PCR 法检测出 4 份阳性。

表2 两种 PCR 法同时检测 HCV RNA 结果

检测方法	n	阳性份数	阳性率(%)
RT-PCR	116	57	49.14
FQ-PCR	116	76	65.52 ^a

^a $P<0.05$ vs RT-PCR.

3 讨论

HCV 感染是世界范围的健康问题^[2]. 在美国, HCV 是慢性肝病、肝硬化和肝细胞性肝癌的最常见的原因^[3], 在亚洲国家其重要性在增加^[4], 我国的HCV 感染率也相当高^[5]. 目前抗-HCV 抗体在筛查慢性HCV 感染者方面发挥了重要的作用, 现行的抗-HCV 诊断试剂的特异性超过99%, 但由于缺少金标准而难以明确其敏感性^[6], 显著一部分阳性结果为假阳性^[7], 邢文革 *et al*^[8] 认为筛查实验的特异性方面, 丙肝抗体酶联免疫检测试剂的特异性并不如想象中的高, 许多筛查试验阳性者并无HCV 感染, 为假阳性结果.

外周血中检出HCV RNA 是HCV 复制活跃的可靠指标, HCV RNA 检测包括定性和定量两种方法, 定性PCR 检测技术操作繁琐耗时, 易交叉污染而出现假阳性, 检出率较低等, 因此该检测方法的应用受到一定程度限制. 近年来发展的荧光定量PCR 技术因其具有操作简便、减少了污染和准确定量等优点被临床广泛采用. 两种检测方法相比较, 定性PCR 灵敏度高于定量PCR^[9].

近年来国内陆续有应用两种PCR 法检测HCV RNA 的报道, 但选择的样本不同, 使用的仪器、试剂和检测结果的方法不同, 得出的结果有差异^[10-13]. 本组检测二次的定性PCR 阳性率(49.90%、49.14%)和定量PCR 的阳性率(62.58%、65.52%)基本相似, 无明显波动, 表明试剂和仪器性能稳定, 技术操作规范. 我们检测的结果表明, RT-PCR 检测的阳性率为49.90%, FQ-PCR 的阳性率为62.58%, 后者阳性率高于前者, 有显著性差异($P < 0.001$), 与张淑云 *et al*^[11] 报道的阳性率(68.3%)相似(同一厂家试剂), 表明FQ-PCR 的特异性较RT-PCR 高. 本实验采用的试剂检测的定量范围(10^6 – 10^{11} copies/L)较宽, 在抗病毒药物的治疗前和治疗过程中定期检测HCV RNA 含量, 有利于药物疗效的动态观察. 我们还用两种PCR 法同时检测了116 份样品, 同样FQ-PCR 的阳性率高于RT-PCR 法. 二者比较也有显著性差异($P < 0.05$). 在FQ-PCR 检测的40 份阴性样品中用RT-PCR 检测出4 份阳性, 王平忠 *et al*^[13] 报道定量阴性30 例中定性阳性6 例, 表明了定性(RT-PCR)检测的灵敏度高于FQ-PCR 检测, 因此定性PCR 主要用于急性慢性丙型肝炎的诊断, 而定量PCR 则用于疗效检测^[9]. 我们使用的FQ-PCR 检测试剂最低检测限为 10^6 copies/L,

如样本中HCV RNA 的量 $< 10^6$ copies/L 时可能检测不出, 因此FQ-PCR 检测HCV RNA 的结果阴性时不能轻易排除病毒血症水平低于检测极限的可能性, 应重复用定性PCR 检测, 以免漏诊病毒感染处于活跃期的患者. 与HBV DNA 相比, HCV RNA 的检测更为复杂和困难, 且检出率较低, 同一份临床样本不同检测方法所得结果不同, 王宇明^[14] 提出HCV RNA 的PCR 检测应强调规范化, 应采取的措施有: 空腹条件下抽血、及早分离血清和检测、避免标本反复冻融, PCR 的整个过程应避免RNA 酶及DNA 酶对标本的降解和对模板的污染. 定量PCR 技术已被临床广泛采用, 定量结果为临床判定疗效提供了依据, 但不能用定量PCR 代替定性PCR 以诊断丙型肝炎, 可能会造成丙型肝炎的漏诊, 应引起重视.

4 参考文献

- 1 张蓓, 沈立松. 实时荧光定量PCR 的研究进展及其应用. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2003;24:327-329
- 2 Cook L, Ng KW, Bagbag A, Corey L, Jerome KR. Use of the MagNa pure LC automated nucleic acid extraction system followed by real-time reverse transcription-PCR for ultrasensitive quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol* 2004;42:4130-4136
- 3 Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2004;24(Suppl 2):3-8
- 4 Chaudhuri S, Das S, Chowdhury A, Santra A, Bhattacharya SK, Naik TN. Molecular epidemiology of HCV infection among acute and chronic liver disease patients in Kolkata, India. *J Clin Virol* 2005;32:38-46
- 5 王耀宗. 重视我国丙型肝炎的严重性. 中华传染病杂志 2003;21:211-213
- 6 魏来. 丙型肝炎的实验室诊断和临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12:2373-2376
- 7 Booth JCL, Grady JO, Neuberger J. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 2001;49(Suppl):I1-I21
- 8 邢文革, 郑怀竟. 必须提高丙型肝炎病毒实验室检验结果的可信度. 中华肝脏病杂志 2004;12:170-171
- 9 庄辉. 重视丙型肝炎的研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:65-66
- 10 林潮双, 陈文思, 卢建溪, 谢俊强, 柯伟民, 高志良. 荧光定量PCR 与RT-PCR 技术检测HCV-RNA 的比较观察. 中国实验诊断学 2000;4:176-178
- 11 张淑云, 刘伟, 谷鸿喜, 杜博, 常曼丽. 实时荧光定量PCR 检测血清中HCV-RNA. 世界华人消化杂志 2004;12:1464-1465
- 12 李桂珍, 梅秀珍, 刘兴祥, 王兴亮. 丙肝抗HCV 与HCV RNA 定性、荧光定量之间的关系. 江西医学检验 2003;21:580
- 13 王平忠, 聂青和, 张中伟, 白宪光. 丙型肝炎病毒感染的不同人群HCV RNA 定量研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1247-1250
- 14 王宇明. 重视我国丙型肝炎的研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:106-107

编辑 张海宁