

· 检验仪器与试剂评价 ·

两种 HBV DNA 荧光定量试剂盒检测结果比较

叶剑荣¹, 袁利群¹, 范旭², 蔡俊²

(1. 湖南省人民医院检验科, 长沙 410005; 2. 湖南圣湘生物科技有限公司, 长沙 410205)

摘要:目的 比较两种乙型肝炎病毒(HBV)荧光定量 PCR 检测试剂盒的临床性能。方法 采用两种 HBV 荧光定量 PCR 检测试剂盒对 526 例临床样本进行检测, 比较两种试剂的灵敏度、检测结果的一致性及相关性。结果 两种试剂阳性一致性为 97.44%, 阴性一致性为 95.77%, 总一致性为 96.77%, 两种试剂具有较好的相关性, 相关系数 $r=0.965$ 。结论 HBV 一步法试剂具有操作简便、定量准确、灵敏度较高等优点, 是一种较好的临床 HBV 快速定量检测试剂。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; HBV DNA; 聚合酶链反应; 试剂盒, 诊断; 一步法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.12.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1480-02

乙型肝炎是一种由乙型肝炎病毒(HBV)引起的, 以肝脏病变为主并可引起多种器官损害的传染性肝病。中国是病毒性肝炎的高发地区, HBV 携带率为总人数的 10% 左右。因此, 快速、特异、灵敏的诊断技术对乙型肝炎患者的临床诊断及治疗是非常重要的。目前, 临床上主要检测 HBV 的方法有基于血清免疫学指标检测的 ELISA 法和时间分辨荧光分析法^[1], 以及基于 HBV DNA 水平检测的 PCR 法。荧光定量 PCR 法能够准确反映患者体内 HBV 复制水平, 为临床医生选择治疗方案及预后判定提供了重要依据^[2-3]。本研究选取国内两家 PCR 试剂厂家的 HBV DNA 定量检测试剂盒, 对 526 例临床样本进行研究, 比较两种试剂检测性能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 526 例临床血清样本均来自于湖南省人民医院门诊及住院患者, 血清样本保存于 -20 °C 冰箱。

1.2 仪器与试剂 HBV 一步法试剂和磁珠法试剂(湖南圣湘生物科技有限公司); HBV 煮沸法试剂(广州达安基因股份有限公司); TDZ4-WS 高速离心机(湘麓离心机仪器有限公司); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清样本采集 用无菌注射器抽取受检者静脉血 2 mL, 注入无菌收集管, 室温不超过 4 h, 待样本自行析出血清, 或直接室温 1 600 r/min 离心 5 min 分离血清, 转移到 1.5 mL 灭菌离心管中备用。

1.3.2 HBV DNA 检测 HBV DNA 一步法与煮沸法提取都严格按照各自说明书进行操作。将煮沸法试剂作为本次研究的对照试剂, 其线性范围为 100 IU/mL ~ 1.00×10^8 IU/mL, 一步法试剂的线性范围为 500 IU/mL ~ 5.00×10^9 IU/mL, 两种试剂的检测下限都为 100 IU/mL, 如果检测结果大于检测下限则为阳性, 反之则为阴性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS15.0 统计学软件对两种试剂的检测结果进行统计学分析, 对两种试剂定量结果的对数值进行 F 检验。

2 结果

2.1 两种试剂检测结果比较 采用一步法试剂检测 HBV DNA, 结果 HBV DNA 定量大于或等于 500 IU/mL 的样本有 285 例, 100~500 IU/mL 的样本 29 例, 1~100 IU/mL 的样本有 50 例, HBV DNA 为 0 IU/mL 的样本 162 例。采用煮沸法试剂进行检测, 结果 HBV DNA 定量大于或等于 500 IU/mL 的样本有 276 例, 100~500 IU/mL 的样本 37 例, 1~100 IU/mL 的样本有 10 例, HBV DNA 为 0 IU/mL 的样本 203 例。

2.2 两种试剂定量结果一致性分析 根据对照试剂盒(提取法)检测结果将 526 例样本分为阳性组和阴性组, 比较两种试剂检测结果的一致性, 发现阳性一致性为 97.44%, 阴性一致性为 95.77%, 总一致性为 96.77%, 见表 1。对照试剂检测阳性结果中, 一步法试剂有 8 例样本检测结果为阴性, 这 8 例样本中, 有 6 例样本检测结果具有明显阳性扩增曲线, 但其定量结果低于试剂盒的检测下限。另外 2 例样本检测结果为阴性, 采用磁珠法(检测下限 10 IU/mL)对其进行复检, 结果显示 1 例样本为阴性, 1 例样本为阳性但定量结果仍小于 100 IU/mL。对照试剂检测阴性结果中, 一步法试剂有 9 例样本检测结果为阳性, 其中 4 例样本对照试剂检测结果有明显阳性扩增曲线, 但定量结果低于试剂盒的检测下限。另外 5 例样本对照试剂检测结果为阴性, 磁珠法复检结果表明 5 例样本都为阳性, 且定量结果大于 100 IU/mL。

表 1 一步法试剂与对照试剂检测结果一致性比较(n)

一步法试剂	对照试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	305	9	314
阴性	8	204	212
合计	313	213	526

2.3 两种试剂相关性及回归分析 以对照试剂检测结果作为参考, 对检测结果为阳性的 313 例样本, 分别取对数值后, 对两种试剂检测结果做相关性分析。结果表明一步法试剂与对照试剂的定量检测结果具有线性相关性, 相关系数 $r=0.965$; 两者的回归方程 $Y=1.043X+0.096$ 。对两种试剂检测结果都为阳性的样本做 F 检验, 结果显示两种试剂的定量结果差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

HBV 的免疫学检测是诊断 HBV 感染的传统方法, 但是这种方法并不能准确的诊断对于基因变异、免疫沉默等引起的 HBV 隐性感染^[4-6], 而 HBV DNA 与血清学标志相对独立, HBV DNA 的载量能直接、准确地反映患者体内 HBV 的复制状态, 是患者在治疗过程中对治疗产生应答的最为有用的标志物^[7], 因而基因诊断就成为了确定 HBV 感染状态及患者病情的重要依据。

目前, 临床上主要采用荧光定量 PCR 法进行 HBV DNA 检测, 而国内主要试剂厂家都采用煮沸法来提取 HBV DNA, 进而检测 HBV 载量。本研究的对照试剂即采用煮沸法提取

HBV DNA,该方法操作步骤繁多,需多次高速离心,吸取废液等,HBV 病原体也需要在高温下裂解,整个过程非常容易造成核酸丢失及样本间的交叉污染;而一步法试剂采用核酸释放剂释放核酸,整个实验只有三个操作步骤,并且都在一个 PCR 反应管中进行,整个操作流程简便、省时省力,极大地提高了工作效率。同时,样本释放的核酸全部转入扩增,也提高了检测结果的重复性与准确性,这与之前报道的研究结果一致^[8-9]。

对两种试剂检测结果为阳性的样本进行相关性分析,结果显示二者的相关性很好($r=0.965$), F 检验结果显示两种试剂定量结果差异无统计学意义($P>0.05$),表明两种试剂都可以应用于临床检测。但是对对照试剂检测结果小于 500 IU/mL 的样本进行分析发现,两种试剂定量结果差异较大。对照试剂检测结果为阳性的样本,一步法试剂检测结果与之基本相符;但对对照试剂部分检测结果为阴性的样本,一步法试剂检测结果为阳性,复检结果亦证实这些样本为 HBV 阳性,这表明一步法试剂具有更好的灵敏度。

临床 PCR 检验相对于其他临床检验技术而言,虽然具有极高的检测灵敏度,但影响其检测结果的因素也很多。在临床样本核酸提取过程中,靶核酸的丢失、残留的提取试剂、抑制物去除不彻底、扩增仪孔间温度差异等均可能造成检测结果呈假阴性,而避免假阴性结果最有效的措施是设置内标^[10]。一步法试剂中设置有内标,内标的探针与 HBV 目标基因的探针采用不同的荧光报告基因标记,通过检测内标是否正常扩增来监控阴性实验结果是否有效,从而避免检测结果产生假阴性的现象,从而确保定量结果更加可靠、准确。

综上所述,HBV 一步法试剂具有操作简便、定量准确、灵敏度较高等优点,是一种比较理想的临床 HBV 快速定量检测试剂。

参考文献

[1] 李艳霞. 时间分辨荧光免疫分析和酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎
• 检验仪器与试剂评价 •

炎病毒血清标志物结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11):1218-1219.

[2] Pan XB, Wei L, Han JC, et al. Cellular chromosome DNA interferes with fluorescence quantitative real-time PCR detection of HBV DNA in culture medium[J]. J Med Virol, 2008, 80(1): 47-52.

[3] 周丹. 乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 检测在临床诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2010, 20(7): 2271-2272.

[4] Levicnik-Stezinar S. Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay[J]. Clin Lab, 2004, 50(1/2): 49-50.

[5] 侯远沛, 刘成永, 高玉金. 乙型肝炎病毒前 C 区和 BCP 区突变及基因型对 HBeAg 表达的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2007, 23(4): 251-253.

[6] Allain JP. Occult hepatitis B virus infection: implication in transfusion[J]. Vox Sang, 2004, 86(2): 83-91.

[7] Keefe EB, Zeuzem S, Koff RS, et al. Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5(8): 890-897.

[8] 李兵, 王敏, 徐六妹, 等. 三种 HBV 荧光定量 PCR 检测试剂的比较及结果分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2010, 24(4): 301-304.

[9] 龙幼敏, 明凯华, 陈英姿, 等. 一种免核酸提取 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒临床应用价值的评估[J]. 临床医学工程, 2011, 18(5): 652-653.

[10] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3): 225-226.

(收稿日期: 2011-11-15)

CA-530 全自动血凝分析仪降低测定成本的方法

孙志强¹, 马淑丽², 李久民³, 宋秀梅⁴

(1. 河北省承德县中医院检验科 067400; 2. 河北省承德县医院 067400; 河北省承德县中医院; 3. 内科; 4. 财务科 067400)

摘要:目的 探索一种降低 CA-530 全自动血凝分析仪测定成本的方法。方法 把 Z 轴的微型步进电机的 Offset 值由原来的 -60 增加到 -19, 以减少试剂瓶的死体积。结果 把试剂瓶的死体积减少至 100 μ L, 可节省 500 μ L 试剂。结论 此方法能减少试剂浪费, 有效降低测定成本, 对于基层的中小型医院尤为适用。

关键词:血凝仪; 步进电机; 死体积

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 12. 036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)12-1481-02

CA-530 全自动血凝分析仪具有测定速度快、结果准确、重复性好等特点, 该设备作为小型全自动血凝仪的代表, 在国内有相当大的市场占有率^[1-4]。笔者在应用该仪器的过程中, 探索出一种降低测定成本的方法, 本文就此方法作一介绍, 供同行参考。

1 仪器与试剂

CA-530 全自动血凝分析仪及原装配套试剂、质控品(日本 SYSMEX 公司提供), 每日开机后先做质控, 结果在控后再进行标本测试。1 000 μ L 可调移液器一个, 100 μ L 可调移液器

一个。仪器主要参数设置: 试剂容器名称为出厂设置“CUP”, 血凝测试项目包括凝血酶原时间(PT)、凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(Fbg)的参数设置按说明书进行操作。

2 问题

笔者在使用该仪器的过程中发现, 当试剂瓶内还剩很多试剂时, 仪器就发出“Insufficient Reagent (Holder No.)”的报警^[5-6], 出现报警后, 用可调移液器测量试剂瓶内试剂剩余量, 约 600 μ L。由于每瓶血凝试剂的规格为 1 mL 或 2 mL, 而且