

## • 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<sup>1</sup>,袁利群<sup>1</sup>,范 旭<sup>2</sup>,蔡 俊<sup>2</sup>

(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疾病。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,临幊上主要检测 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<sup>[1]</sup>,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,为临幊医生选择治疗方案及预后判定提供了重要依据<sup>[2-3]</sup>。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 例临幊样本进行研究,比较两种试剂检测性能。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 526 例临幊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 ℃ 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<sup>8</sup> IU/mL,一步法试剂的线性范围为 500 IU/mL ~ 5.00 × 10<sup>9</sup> 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。对照试剂检测阳性的结果中,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。对照试剂检测阴性的结果中,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<sup>[4-6]</sup>,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<sup>[7]</sup>,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,临幊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可重复性与准确性, 这与之前报道的研究结果一致<sup>[8-9]</sup>。

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<sup>[10]</sup>。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团标记, 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病毒的评价.

- 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] Keeffe 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<sup>1</sup>, 马淑丽<sup>2</sup>, 李久民<sup>3</sup>, 宋秀梅<sup>4</sup>

(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 μL, 可节省 500 μL 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<sup>[1-4]</sup>。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 μL 可调移液器一个, 100 μL 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<sup>[5-6]</sup>, 出现报警后, 用可调移液器测量试剂瓶内试剂剩余量, 约 600 μL。由于每瓶血凝试剂的规格为 1 mL 或 2 mL, 而且