

[3] 陆小军,何福生,彭黎明. 血浆 D-Dimer 两种检测方法的比较[J]. 中国实验诊断学,2001,10(5):239-240.

[4] 邢晓光,杨晨. 胶体金免疫渗透试验定量检测 D-dimer 评价[J]. 天津医科大学学报,2004(3):436-438.

[5] 刘汉,景本年,李卓江. 健康人不同年龄组血浆 F1+2 及 D-Dimer 检测的意义[J]. 临床检验杂志,2001,19(2):120-121.

[6] Wolfgang K, Walter R. Latex-enhanced immunoturbidimetry allows D-Dimer determination in plasma and serum samples[J]. Clin Chem,2000,46(6):871-872.

[7] Brown M, Lau J, Nelson RD, et al. Turbidimetric D-dimer test in the diagnosis of pulmonary embolism: a metaanalysis [J]. Clin Chem,2003,49(4):1846-1853.

[8] Di Nisio M,Squizzato A,Rutjes AW,et al. Diagnostic accuracy of D-Dimer test for exclusion of venous thromboembolism:a systematic review[J]. J Thromb Haemost,2007,5(2):296-304.

[9] Gosselin RC,Owings JT,Jacoby RC,et al. Evaluation of a new automated quantitative D-Dimer, Advanced D-Dimer, in patients suspected of venous thromboembolism [J]. Blood Coagu Fibrinol, 2002,113(4):323-333.

(收稿日期:2013-01-02)

• 检验仪器与试剂评价 •

两种国产乙型肝炎病毒核酸定量试剂盒检测结果分析

吴 斌,李彩东,李惠军,田鹏飞,段正军,杨小铤,胡 鹏
(甘肃兰州市第二人民医院肝病研究所,甘肃兰州 730046)

摘 要:**目的** 探讨两种国产乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)荧光定量试剂(PCR-荧光探针法)的临床应用价值。**方法** 收集 411 例慢性乙型肝炎病毒感染者(CHB)血清标本,分别用两种国产乙型肝炎病毒 PCR 试剂检测其 HBV DNA 载量。比较分析 A 试剂(煮沸法)和 B 试剂(免核酸提取的“一步法”)的线性范围、准确性和灵敏度。**结果** 411 例 CHB 血清标本用两种试剂检测,结果均大于 5.00×10^2 IU/mL 的标本 155 例,阳性率一致性为 100%,阴性率一致性为 73.8%,总一致性为 83.7%。对两种试剂检测均阳性($>5.00\times 10^2$ IU/mL)的标本取对数值后,均值差异有统计学意义($P<0.05$)。但在低病毒载量组中结果相差较大,67 例经 A 试剂检测结果为阴性($<5.00\times 10^2$ IU/mL)的标本经 B 试剂检测结果为阳性($>5.00\times 10^2$ IU/mL),B 试剂检测的阳性率高于 A 试剂。A 试剂的最低检测限为 5.00×10^2 IU/mL,而 B 试剂的最低检测限为 1.00×10^2 IU/mL,B 试剂的灵敏度高于 A 试剂。**结论** 两种国产的核酸定量 PCR 试剂盒对于检测 HBV DNA 载量在低复制水平的血清标本具有很好的可比性。免核酸提取的“一步法”B 试剂扩增效率高、操作简便、定量结果准确、线性范围广等优点,具有较好的临床应用价值及发展前景。

关键词:肝炎病毒,乙型; 病毒载量; 聚合酶链反应; 试剂盒,诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.050 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)14-1880-02

乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)是反映 HBV 复制活跃程度及传染性的最直接指标,也是观察抗病毒药物疗效、预后和指导抗病毒药物应用的重要指标之一,HBV DNA 定量检测从根本上突破了免疫学方法等间接方法的局限性,通过直接检测病毒核酸水平,可真实地反映患者体内病毒的水平。HBV DNA 定量检测的方法主要有两类,一类是以聚合酶链反应(PCR)为基础如实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)等;另一类是以核酸杂交为基础如斑点杂交和液相杂交等,荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 现已成为监测乙肝病毒复制最常用的检测手段。目前,国内生产的乙型肝炎病毒 DNA 定量 PCR 试剂有多种,但这些试剂在检测的灵敏度、特异性、定量准确性和低病毒载量检测的精密度等方面存在差异^[1]。近年来,随着基因检测技术的不断完善和规范化,基因诊断在疾病的诊断和监测中发挥着日益重要的作用。核酸的质量是分析成功的先决条件,因而核酸提取是基因诊断实验成败至为关键的步骤^[2]。提高 HBV DNA 定量试剂盒检测的灵敏度对乙型肝炎的早期诊断具有重要意义^[3-5]。HBV DNA 实验室定量检测有助于确定感染者的状态,对确定是否开展抗病毒治疗及适宜抗病毒治疗的方案至关重要^[6]。为此,本研究选用国内两家生物技术公司生产的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒对 411 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 进行定量检测,比较两种试剂检测的阳性率、线性范围、灵敏度以及试剂提取方法的特点和临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取 2012 年 8~12 月期间来本院就诊的慢性乙型肝炎患者 411 例,门诊 314 例,住院 97 例。男 292

例,女 119 例,年龄(39.5±13.4)岁,平均年龄 39.5 岁。无合并其他肝炎病毒感染,同时排除药物性、酒精性、其他病毒性肝炎。诊断符合 2010 年 12 月 10 日中华医学会肝病学分会与中华医学会感染病学分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的诊断标准^[7]。所有标本清晨空腹抽取静脉血 5 mL,室温静置,离心后立即分离血清-80℃低温保存待检。

1.2 试剂与试剂 乙型肝炎病毒核酸定量 PCR 试剂 A 由国内某主流的 PCR 试剂厂家提供,最低检测限为 5.00×10^2 IU/mL,线性范围为 $5.00\times 10^2\sim 1.00\times 10^8$ IU/mL,试剂批号 20120611,采用传统的“煮沸法”提取核酸;试剂 B 由湖南圣湘生物科技有限公司提供,批号 2012008,内标批号为 20120705,最低检测限为 $1.00\text{E}+02$ IU/mL,线性范围为 $1.00\times 10^2\sim 1.00\times 10^9$ IU/mL,B 试剂采用一种新的免核酸提取方法(简称“一步法”)。荧光定量 PCR 仪由美国 Applied Biosystem 公司生产的 7300 荧光定量分析仪。乙型肝炎病毒免疫学标志物(HBV-M)检测试剂由厦门英科新创有限公司提供,采用 ELISA 法,ST-360 酶标仪,K30C 型干式恒温器,TGL-16A 低温高速冷冻离心机由湖南凯达有限公司提供,中科美菱 DW-HL668 超低温冷冻储存箱。

1.3 方法 试剂 A 采用传统的“煮沸法”,操作如下:加入样品处理液 A 和待测样本、工作标准品、阴性对照、质控品各 100 μL 于 0.5 mL 离心管中,振荡摇匀,置于低温高速冷冻离心机中 $17\,800\times g$ 离心 10 min,吸弃上清液;再加入 25 μL 的样本处理液 B,振荡摇匀, $1\,680\times g$ 离心数秒, $100\text{ }^\circ\text{C}$ 干浴 10 min;之后于冷冻离心机中 $17\,800\times g$ 离心 10 min,弃上清液 2 μL 点样至 PCR-mix 28 μL PCR 反应管中,上 PCR 仪进行扩增。

循环参数:50℃×2 min 一个循环;预变性:94℃×2 min 一个循环;变性:94℃×10 s;退火和延伸:60℃×30 s,共 40 个循环。

试剂 B 采用免核酸提取的“一步法”,具体操作如下:在 PCR 反应管中加入 5 μL 的“核酸释放剂”,然后分别加入 5 μL 待测样品、阴性对照、阳性对照以及定量参考品,吸打 3~5 次混匀(轻轻吸打,避免出现气泡),每管加入 40 μL PCR-mix,吸打混匀 2~3 次盖上管盖,上机检测即可。循环参数:50℃×2 min 一个循环,Taq 酶活化:94℃×5 min 一个循环;变性:94℃×15 s;退火和延伸:57℃×30 s,共 45 个循环。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行 χ^2 检验和 *F* 检验。血清 HBV DNA 检测结果经对数转换后呈正态分布各组检测结果对数值($\bar{x} \pm s$ 表示,lg IU/mL)表示组间比较用配对样本 *t* 检验。

2.1 相关性分析

2.1.1 两种试剂检测 HBV DNA 载量结果的比较 HBV DNA 载量结果以检测结果大于 5.00×10² IU/mL 为阳性,反之为阴性。A 试剂检测阳性结果经对数转换后用 *t* 检验分析其值为(5.49±1.57)。B 试剂检测阳性结果经对数转换后用 *t* 检验分析其值为(6.22±1.51),*t*=17.192,自由度=154,*P*<0.01,差异具有统计学意义。其中 135 例经两种试剂检测结果均为阴性(Undet 或 No Ct 值)的样本,阴性率为 32.8%(135/411)。对 A、B 试剂检测均大于 5.00×10² IU/mL 的标本分别取对数值,应用 SPSS17.0 统计学软件进行相关性分析,并统计回归方程相关系数为 *r*²=0.888,回归方程为 *Y*=0.906 4*X*+1.242。

2.1.2 A、B 两种试剂阴阳性符合率 由于 A、B 两种试剂检测的灵敏度不同,A 试剂最低检测限为 5.00×10² IU/mL,而 B 试剂的最低检测限为 1.00×10² IU/mL。因此,本实验规定 HBV DNA 载量大于 5.00×10² IU/mL 为检测结果阳性,反之为阴性。A 试剂检测为阳性的样本 155 例,阳性率为 38%(155/411),阴性率为 62%;B 试剂检测为阳性的样本 222 例,阳性率为 54%(222/411),阴性率为 46%。阳性率的一致性为 100%,阴性率的一致性为 73.8%,总的一致性为 83.7%,结果见表 1。

B 试剂	A 试剂		合计
	阳性	阴性	
阳性	155	67	222
阴性	0	189	189
合计	155	256	411

*:A、B 两种试剂阳性率的一致性为 100%,阴性率的一致性为 73.8%,总的一致性为 83.7%。

2.3 A、B 两种试剂定量检测结果比较 411 例血清样本的 HBV DNA 载量进行分组统计结果见表 2 所示,对于 HBV DNA 载量大于 1.00×10⁸ IU/mL 的高病毒载量组:B 试剂阳性率明显高于 A 试剂,B 试剂阳性率为 7%(29/411),A 试剂阳性率为 1%(4/411), $\chi^2=18.939, P<0.01$ 。因为 B 试剂的线性范围较宽(5.00×10²~5.00×10⁹ IU/mL),且试剂盒检测下限灵敏度可达到 1.00×10² IU/mL。另外对于 HBV DNA 载量在 5.00×10²~1.00×10⁴ IU/mL 的低病毒载量组:检测结果 B 试剂阳性率为 26%(107/411),A 试剂阳性率为 14.8%(61/411), $\chi^2=12.595, P<0.01$,B 试剂的阳性率高于

A 试剂。A 试剂检查结果小于 5.00×10² IU/mL 的样本,经 B 试剂检测有 67 例为检查结果大于 5.00×10² IU/mL,且检测值在 5.00×10²~9.99×10³ 之间(取对数值后在 2.79~3.85 之间)。是由 A 试剂检测的灵敏度不够而造成了漏检,使部分患者得不到及时有效的治疗,延误了临床治疗的最佳时机。另外研究发现,对于 1.00×10⁵~1.00×10⁶ IU/mL 的中等病毒载量组的标本,A 试剂检测有 14.1%(58/411),B 试剂检测为 15.6%(64/411), $\chi^2=0.295, P>0.05$ 。A、B 两种国产核酸定量检测试剂 HBV DNA 载量检测结果在同一数量级的有 43 例,占 10.5%(43/411);B 试剂比 A 试剂检查结果大于 2 个数量级的有 21 例,占 5.1%(21/411),B 试剂比 A 试剂大于一个数量级的有 212 例,占 51.6%(212/411)。

表 2 A、B 两种试剂定量检测结果比较				
HBV DNA 载量(IU/mL)	A(<i>n</i>)	B(<i>n</i>)	χ^2	<i>P</i>
>1.00×10 ⁸	4	29	18.939	0.000
1.00×10 ⁷ ~1.00×10 ⁸	33	22	2.200	0.183
1.00×10 ⁵ ~1.00×10 ⁶	58	64	0.295	0.654
5.00×10 ² ~1.00×10 ⁴	61	107	12.595	0.000
1.00×10 ² ~5.00×10 ²	31	48	3.658	0.074
1.00×10 ¹ ~1.00×10 ²	15	6	3.857	0.078
<1.00×10	209	135	15.919	0.000
合计	411	411		

2.4 A、B 两种试剂经 ABI 7300 荧光定量分析仪扩增后的曲线 A 试剂扩增曲线无明显的平台期,而 B 试剂扩增曲线平台期较明显,说明 B 试剂扩增效率较好。

2.5 B 试剂内标曲线 A 试剂中没有加入内标,而 B 试剂中加入了竞争性内标,避免检测结果产生假阳性的现象,从而保证定量结果更加准确、可靠。

2.6 HBV DNA 载量检测灵敏度比较分析 为了比较两种试剂的灵敏度用 A 试剂检测小于 5.00×10² IU/mL 的标本经 B 试剂检测结果大于 5.00×10² IU/mL。

2.7 A 试剂与 B 试剂对比检测 2012 年上半年卫生部临检中心室内质评结果 见表 3。

表 3 A、B 两种试剂 2012 年上半年室内质评结果					
编号	A 试剂 (IU/mL)	B 试剂 (IU/mL)	A 试剂 对数值	B 试剂 对数值	卫生部定值 血清靶值
1211	8.72×10 ³	1.30×10 ³	3.94	3.11	3.37
1212	1.73×10 ⁷	1.39×10 ⁷	7.24	7.14	7.22
1213	<5.00×10 ²	<1.00×10 ²	0.00	0.00	0.00
1214	4.87×10 ⁵	2.39×10 ⁵	5.69	5.38	5.49
1215	4.07×10 ⁴	2.17×10 ⁴	4.61	4.34	4.32

3 讨 论

近年来,随着 HBV DNA 荧光定量 PCR 技术的发展,国产试剂盒的灵敏度也不断提高,目前国产试剂盒说明书中所示灵敏度为 5.00×10² IU/mL。HBV DNA 检测下限的确定,不但是反映该实验检测系统的精密度,而且对乙型肝炎的诊断、治疗和预后也有意义^[8]。由于临床治疗对患者 HBV DNA 检测的要求很高,实验室尽可能消除检测结果的不准确性,而且提高 HBV DNA 定量试剂盒灵敏度对乙型肝炎早(下转插 I)

(上接第 1881 页)

期诊断具有重要意义^[9]。

本研究中 A 试剂采用传统的“煮沸法”,需经过多次高速离心吸弃废液等,HBV 病原体需要在高温下裂解,整个过程容易造成核酸丢失及样本间的交叉污染,从而可能导致样本定量结果偏低。其检测下限为(5.00E+02) IU/mL;而 B 试剂采用了一种全新的核酸提取和扩增方式,即免核酸提取的“一步法”,其检测下限为(1.00E+02) IU/mL,整个样本处理和检测过程在一个 PCR 反应管中即可完成,且无需离心振荡,更换离心管等一系列繁琐操作,省时省力,极大地提高了工作效率。具有方法学上的改进,使得 HBV DNA 定量结果更准确。B 试剂能够对低病毒载量的样本进行定量检测,这对于临床初筛或药物监控治疗可以起到重要作用。因此,用于检测抗病毒药物疗效时需综合考虑生化学和免疫学指标,尤其当 HBV DNA 载量低时应结合血清标志物检测和其他检查结果,以及临床表现综合判断以排除假阳性与假阴性,必要时需及时检查 HBV DNA。

本研究对 411 例用两种试剂同时检测大于 5.00E+02 的样本进行均值比较和相关性分析,两种试剂有显著性差异 $t=17.192, P<0.01$ 。但是对于 HBV DNA 病毒载量大于 1.00E+08 IU/mL 的高病毒载量组样本。A 试剂的检测阳性率为 1%,B 试剂检测阳性率为 7%, $P<0.01$,差异有统计学意义,B 试剂的检出率明显高于 A 试剂,因为 B 试剂的线性范围较宽(5.00E+02) IU/mL~(5.00E+09) IU/mL;HBVDNA 载量在(1.00E+05)~(1.00E+06)IU/mL 的中等病毒载量组的样本,A 试剂检出率 14.1%,B 试剂检出率为 26%,B 试剂的检出率高于 A 试剂, $\chi^2=0.295, P>0.05$,差异无统计学意义;另外研究发现 A、B 两种国产乙型肝炎病核酸定量检测试剂盒检测 HBV DNA 载量在同一数量级的有 43 例,占 10.5%。B 试剂比 A 试剂检测结果大于 2 个数量级的有 21 例,占 5.1%。B 试剂比 A 试剂大于 1 个数量级的有 212 例,占 51.6%。

本研究还发现 A 试剂检测结果小于(5.00E+02)IU/mL 的样本,经 B 试剂检测有 67 例结果大于(5.00E+02) IU/mL,检测结果均在(5.00E+02)~(9.99E+03) IU/mL 之间(取对数值在 2.79~3.85 范围之间)。B 试剂能够对 HBV DNA 低病毒载量的样本进行定量检测,对于临床初筛和药物的监控治疗,起到了主要作用。在这其中 67 例标本中诊断为 HBeAg 阳性或 HBeAg 阴性的慢性乙型肝炎患者,对 HBV 早期调查和评价核苷类似物药物治疗存在局限性。HBV DNA 水平则是对治疗方案和进行优化调整的重要依据^[10]。本研究还发现,两种试剂在对比检测 2012 年上半年卫生部临床检验中心室间质评结果中,B 试剂检测结果均在卫生部定值血清对数值靶值允许范围之内,且更靠近靶值;而 A 试剂检测编号为“1211”的血清偏离靶值,且超出了允许范围。其余 4 份血清均在卫生部血清对数值允许范围之内,说明 B 试剂的准确性更好。

临床 PCR 检测虽然具有较高的灵敏度,但是影响因素较多。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,扩增仪间的温度差异等均可能造成检测结果呈假阳性,而避免假阴性的结果最有效的措施是设置内

标^[11]。本研究结果免核酸提取的“一步法”B 试剂中设置有竞争性内标,通过检测内标是否扩增来监控阴性实验结果是否有效;避免检测结果产生假阴性的现象,从而保证定量结果更加准确、可靠。

一些国外专家提出了核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎路线图,其核心内容是核苷(酸)类似物治疗慢性乙型肝炎时,根据患者血清 HBV DNA 水平,监测和评价治疗的应答情况,调整治疗方案,降低耐药的发生率,提高长期疗效^[12]。核酸的质量是分析成功的先决条件,因而核酸提取是基因诊断实验成败至为关键的步骤^[13]。本研究结果显示,试剂 B 总体性能优于试剂 A,核酸提取效率较高,操作极其简单,兼具高灵敏度与准确性,值得在临床推广。

参考文献

- [1] 李兵,王敏,徐六妹,等. 三种 HBV 荧光定量 PCR 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.
- [2] Lee J, Park Y, Choi JR, et al. Comparisons of three automated system for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory [J]. Yonsei Med, 2010, 51(1):104-110.
- [3] Shyamala V, Arcangel P, cottvell J, et al. Assessment of the target-capture PCR hepatitis B Virus(HBV)DNA quantitative assay and comparison with commercial HBVDNA quantitative assays [J]. Clin Microbiol, 2004, 42:5199-5204.
- [4] Biswas R, Tabor E, Hsia CC, et al. Comparative sensitivity of HBV NATs And HBsAg assays for detection of acute HBV infection[J]. Transfusion, 2003, 43(6):788-798.
- [5] Sato S, Ohhashi W, Ihara H, et al. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of aserologic HBsAg assay[J]. Transfusion, 2001, 41:1107-1113.
- [6] 蔡素贞,鲁凤民,庄辉. 慢性乙型肝炎病毒 DNA 定量检测的临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(2):117-121.
- [7] 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[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1):13-24.
- [8] 梁金明,陈亚珍,李艳. HBV DNA 荧光定量检测下限的确定[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(4):257-279.
- [9] 孙鹭,张桂前,高玉红,等. 两种国产 HBV NNA 荧光定量 PCR 试剂盒检查结果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20):2392-2393.
- [10] Liaw YF. Antiviral therapy of chronic hepatitis:opportunities and chauenges in Asia[J]. J Hepatol, 2009, 51:403-410.
- [11] 李金明. 聚合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.
- [12] Keefe EB, Zeuzem S, Koff RS, et al. Report of an in-ternational workshop: roadmap for management of patients neceiting oral. therapy for chronic hepatitis[J]. CLin. Gastroenterol Heperol: the Official Clinicalpractice Journal of the American Gastroentero Logical Association, 2007, 5(8):890-897.
- [13] Lea JH, Park Y, Choi JR, et al. Comparisons of three automated systems for gsnomil DNA extraction a clinical diagnostic Laboratory[J]. Yonsei Med, 2010, 51(1):104-110.

(收稿日期:2012-11-10)