

表 2 以显微镜红细胞计数法作为标准的检测情况 (n)

显微镜红细胞 检测结果	分析仪结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	9	1	10
阴性	4	26	30
合计	12	28	40

### 3 讨 论

本文研究结果可以看出,尿液显微镜计数法虽然准确性高,但是从尿液显微镜计数法的操作方法看出,工作人员的工作量确实很大;而尿液分析仪检测法虽然方便、快捷、经济,但是准确率略低于显微镜计数法。从这个方面看尿液检测仪适用于初诊患者或者适用于各单位及机关的正常体检,体现尿液检测仪的优越性,但是,若患者要复诊,和确诊的情况下,建议使用两种方法联合起来,通过两种办法的联合检验才能有效的确保检查中不会出现漏检的状况,这是对前来诊治患者的负责,也是对医疗工作者自身的负责,若出现两种检验方法不能够确诊的情况下,可采用颗粒自动计数、化学、尿理学等方面的临床实际,通过全面的彻底的分析进行诊断鉴别。

在临床检验中发现,尿液分析仪会出现试条因素,尿标本因素等一些外在因素的影响,特别是操作过程中一出现的操作问题、环境问题,这些问题的出现会影响检测结果。因此在尿液潜血检验中要以尿液显微镜红细胞计数法为标准。该标准为尿液潜血检验中的最有效的标准,其检测结果的准确性是尿液分析仪无法做到的<sup>[7-9]</sup>。从本文中可以看出在以尿液显微镜红细胞计数法为标准的情况下,尿液分析仪的检测结果出现了 10.0% 的假阳性率,13.3% 的假阴性率。同时通过表 1 结果观察显微镜红细胞计数的阳性率要低于尿液分析仪,通过表 2 发现尿液分析仪的假阳性率较高,这种结果的出现通过分析是由以下原因导致的:(1)尿液分析仪的原理是通过血红蛋白中亚铁血红素中的过氧化物发生反应从而判断的阳性,而患者尿

• 检验技术与方法 •

样本中很有可能出现红细胞数量较少,或者红细胞被破坏使得尿液分析仪检测出阳性。(2)尿液分析仪通过化学变化使得其检测更加细微,患者由于自身的一些其他疾病导致分析仪检查出阳性。(3)尿液分析仪对于那些尿路感染并伴有其他微生物的患者尿液样本检测出阳性造成结果误差<sup>[10]</sup>。

总而言之,尿液分析仪和显微镜红细胞计数法各有其特点,临床中根据不同的情况酌情的使用检测方法,必要时可以二者联合检测,这对提高临床的确诊率具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 翁玉玲,李哲. 尿液潜血试验与镜检红细胞结果的对比观察[J]. 中国医药指南,2012,10(29):52-53.
- [2] 刘承秀,余光华,张迎,等. 尿液潜血检验的比较分析[J]. 西南民族大学学报:自然科学版,2010,(6):1007-1009.
- [3] 赵恒丽. 尿液潜血的临床检验结果分析[J]. 中国保健营养:下旬刊,2012,22(6):58-59.
- [4] 黄文娟. 尿液潜血的临床检验结果分析[J]. 中国保健营养:下旬刊,2012,22(10):83-84.
- [5] 周媛. 尿液分析仪与显微镜检验尿液潜血的比较分析[J]. 中国中医药咨讯,2012,4(3):18-19.
- [6] 赵小琳. 尿液潜血两种检验方法的比较[J]. 中国实用医药,2010,(17):66-67.
- [7] 如先古力卡德,阿里同彩次克. 尿液分析仪潜血检验与显微镜红细胞计数检验方法在尿液潜血检验中的效果[J]. 中外医学研究,2012,12(33):4352-4353.
- [8] 翁玉玲,李哲. 尿液潜血试验与镜检红细胞结果的对比观察[J]. 中国医药指南,2012,10(29):52-53.
- [9] 张虹霞. 尿潜血阳性镜检红细胞情况分析[J]. 甘肃医药,2012,31(4):294-295.
- [10] 苏聆华. 尿分析仪检测潜血与镜检结果对比分析[J]. 当代医学,2011,17(11):102.

(收稿日期:2013-06-12)

## PCR 反向斑点杂交技术在乙型肝炎病毒基因分型检测中的应用

李 明,刘 琴<sup>△</sup>,王 冠

(新疆医科大学附属中医医院检验科,新疆乌鲁木齐 830000)

**摘 要:**目的 利用反向斑点杂交技术对乌鲁木齐汉族和少数民族人群血清中乙型肝炎病毒的进行快速基因分型,了解和解析该地区人群感染 HBV 的基因型分布特征。**方法** 结合普通 PCR 和反向斑点杂交技术对 732 例临床慢性乙型肝炎患者血清 HBV 基因分型。**结果** 在 732 例临床病例中,HBV 基因型检出率为 100.00%。发现 6 种基因型,其中 C 型为主占 53.83%,其次为 B 型占 25.27%;D 型占 16.12%;CD 混合型占 3.01%;BC 混合型占 0.82%;BD 混合型占 0.96%。其中 35 例少数民族患者血清乙肝 DNA 以 D 型为主,占 82.86%;其余 B 型、C 型和 CD 混合型分别占 8.57%、5.71%和 2.86%。**结论** 新疆乌鲁木齐地区 HBV 基因型以 C 型为主,而少数民族 HBV 基因型以 D 型为主。深入研究不同乙肝 DNA 各种基因型对不同人群侵袭力差异,或许能为对乙肝感染防治提出新的思路。

**关键词:** 肝炎病毒,乙型; 基因型; 反向斑点杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)17-2300-03

乙型肝炎病毒(HBV)为双链 DNA 病毒,是传染性疾病乙

型病毒性肝炎的主要病因,感染 HBV 可引起肝硬化甚至肝细

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:whxw007@126.com.

胞癌变。根据 HBV 全基因序列差异性大于或等于 8% 或 S 区基因序列差异性大于或等于 4%，可将 HBV 分为 9 种基因亚型(A~I)<sup>[1]</sup>，其分布具有典型的地域差异。不同的基因型易发生的突变类型不同，与病情转归也密切相关<sup>[2-3]</sup>。本研究采用 PCR 反向斑点杂交技术对 732 例 HBV 感染者血清 HBVDNA 进行了基因分型研究，以期了解新疆乌鲁木齐地区 HBV 基因型的分布特点，现将研究结果报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 732 例慢性乙型肝炎患者其中 35 例少数民族均来自新疆医科大学附属中医医院，部分服用过或正在服用拉米夫定和/或阿德福韦。其中男性 443 例，女性 289 例。年龄 14~86 岁，平均(40±13)岁。根据不同年龄分为小于 30 岁、30~<40 岁、≥40 岁 3 个年龄组。全部病例均符合中华医学会肝病学会和中华医学会感染病学分会 2010 年修订的《中国慢性乙型肝炎防治指南》中慢性乙型肝炎的诊断标准，收集血清于-20℃保存。

**1.2 仪器与试剂** DA7600 PCR 扩增仪、孵育箱、生物安全柜、离心机、乙型肝炎病毒基因分型试剂盒等均由中山大学达

安基因股份有限公司提供。

**1.3 方法** 待检样本的 DNA 严格按照操作步骤使用乙型肝炎病毒 DNA 试剂盒提取；然后按照乙肝 DNA 扩增操作程序在达安 DA7600 仪上进行扩增；最后使用乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒杂交和显色来判读，膜条上探针排列顺序依次为 C3、C2、C1、D、B、PC、CC，其中 C3、C2、C1 为 C 型，D 为 D 型，B 为 B 型，CC 为显色反应质控点，PC 为 PCR 质控点。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件，计量资料用 *t* 检验或者非参数检验，计数资料用  $\chi^2$  检验，*P*<0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 HBV 基因型在该地区的分布** 见表 1。

**2.2 HBV 基因型在不同年龄组的分布** 通过年龄组分层分析可见，不同基因型在各年龄组中分布基本均衡，差异无统计学意义( $\chi^2=3.690, P=0.719$ )。其中 40 岁以上组在所有基因型中所占的数目都是最高的。见表 2。

**2.3 HBV 基因型在不同民族的分布** 见表 3。

表 1 HBV 基因型在男女之间的分布[n(%)]

性别	B 基因型	C 基因型	D 基因型	BC 基因型	BD 基因型	CD 基因型	合计
男	116(15.85)	239(32.65)	71(9.70)	3(0.41)	5(0.68)	14(1.91)	443(60.52)
女	69(9.54)*	155(21.17)*	47(6.42)*	3(0.41)*	2(0.27)*	8(1.09)*	284(38.80)*
合计	185(25.27)	394(53.83)	118(16.12)	6(0.82)	7(0.96)	22(3.01)	732(100.00)

\*: *P*>0.05, 与男性比较。

表 2 HBV 基因型在不同年龄组之间的分布(n)

年龄组	B 基因型	C 基因型	D 基因型	BC 基因型	BD 基因型	CD 基因型	合计
<30 组	39	84	25	1	1	5	155
30~<40 岁组	49	132	35	3	2	7	228
≥40 组	97	178	58	2	4	10	349
合计	185	394	118	6	7	22	732

表 3 HBV 基因型在不同民族之间的分布[n(%)]

民族	B 基因型	C 基因型	D 基因型	BC 基因型	BD 基因型	CD 基因型	合计
汉族	182(26.11)	392(56.24)	89(12.77)	6(0.86)	7(1.00)	21(3.01)	697(100.00)
少数民族	3(8.57)*	2(5.71)*	29(82.86)*	0(0.00)*	0(0.00)*	1(2.86)*	35(100.00)*
合计	185(25.27)	394(53.83)	118(16.12)	6(0.82)	7(0.96)	22(3.01)	732(100.00)

\*: *P*<0.05, 与汉族比较。

### 3 讨论

HBV 基因型是根据病毒基因组水平差异进行划分的<sup>[4]</sup>。不同基因型都有其各自明确的特点，更能从本质上反映病毒特点及其异质性。人类感染 HBV 的基因型呈一定典型的地域性分布。在我国目前流行的 HBV 基因型主要为 B 型和 C 型，其中北方以 C 型为主，南方以 B 型为主，在新疆等边远地区可有 D 基因型分布<sup>[5-6]</sup>。目前常用的基因型分析方法主要有：核酸测序，聚合酶链反应-限制性片段长度多态性，单克隆抗体酶联免疫吸附试验，HBV 基因型特异性引物 PCR 分型法等<sup>[7]</sup>。其中以基因序列测序视为“金标准”，但因费用昂贵以及测序耗

时，不适合进行大样本量的检测。

反向杂交(RDB)是 Saiki 等<sup>[8]</sup>提出的一种斑点杂交技术，该技术具有快速、简便、敏感度和特异度高等特点，尤其是在基因分型、基因突变检测、病原体检测等方面具有独特的优势实验采用的 PCR 反向斑点杂交技术试剂盒，选取人乙型肝炎病毒基因组中编码表面抗原的 S 基因的编码区为扩增靶区域，设计特异性引物及 B、C、D 型特异性探针，预先将特异性探针包被在尼龙膜上，再利用生物素标记的引物对靶片段进行 PCR 扩增，PCR 产物和膜条上的特异性探针杂交，靶标中的型特异性片段会和特异性探针结合，未结合的 PCR 产物通过洗膜去

除,最后进行显色和结果分析。检测结果可直接用肉眼分辨,操作变得更为简便节省成本。

在 732 例临床病例中,HBV 基因型检出率为 100%。共发现 6 种基因型,其中 C 型为主占 53.83%,其次为 B 型占 25.27%;D 型占 16.12%与李玉梅等<sup>[9]</sup>报道的阿勒泰地区和王复元等<sup>[10]</sup>报道的克拉玛依地区的 HBV 基因型排序一致;其他为 CD、BC 和 BD 混合型占 4.78%,与阿勒泰地区一致但低于克拉玛依地区。HBV 基因型在不同性别和不同年龄段比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),提示新疆乌鲁木齐地区慢性乙肝病毒基因型在不同性别和年龄分布均一性趋势。而在 35 例少数民族患者中,HBV 基因型以 D 型为主占 82.86%;其余 B 型、C 型和 CD 混合型分别占 8.57%、5.71%和 2.86%。与汉族人群的基因型分布比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。这与其他研究结果相一致<sup>[11-12]</sup>。

综上所述,新疆乌鲁木齐地区 HBV 基因型以 C 型为主,而少数民族 HBV 基因型以 D 型为主。用 PCR 反向斑点杂交技术对乙型肝炎病毒基因分型检测,操作方便、快捷,能够在一次实验中有效区分 HBV 基因型,对于慢性 HBV 感染的临床诊疗非常适用。具有常规检测方法所不具备的突出优势和良好的临床应用前景,适合各级医院大力开展。

参考文献

[1] Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(46):5761-5769.

[2] 宋淑静,何忠平,庄辉,等.中国北方 5 城市慢性乙型肝炎患者的

(上接第 2293 页)

[13] Tokarz P, Blasiak J. The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment [J]. Acta Biochim Pol, 2012, 59(4):467-474.

[14] Moitra, K, Im K, Limpert K, et al. Differential gene and microRNA expression between etoposide resistant and etoposide sensitive MCF7 breast cancer cell lines[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e45268.

[15] Zhu H, Wu H, Liu X, et al. Role of microRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(5):582-588.

[16] Bai Y, Liao H, Liu T, et al. MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-à-go-go(EAG1) [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(3):710-724.

[17] Yao Q, Cao Z, Tu C, et al. MicroRNA-146a acts as a metastasis suppressor in gastric cancer by targeting WASF2 [J]. Cancer Lett, 2013, 335(1):219-224.

[18] Liu K, Qian T, Tang L, et al. Decreased expression of microRNA let-7i and its association with chemotherapeutic response in human gastric cancer[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10(1):225.

[19] Zhao X, Yang L, Hu J. Down-regulation of miR-27a might inhibit proliferation and drug resistance of gastric cancer cells[J]. J Exp

基因分型[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(10):166-167.

[3] 张咸宁,帕孜来提.用 PCR-RFLP 方法研究新疆地区汉族 HLA-DQA1 和-DQB1 基因多态性 [J]. 中国免疫学杂志, 1996, 12(2):89-92.

[4] 杨夏,张跃新,朱滨,等. HBV 基因型芯片检测方法的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(7):603.

[5] 游晶,庄玲,陈红英,等.乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 8(8):125-126.

[6] 吴赞,孙余婕,沈左君.乙型肝炎病毒基因型的国内研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7):703-704.

[7] 翁伟,唐吉斌.乙型肝炎病毒基因分型研究在抗病毒治疗中的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2):126-130.

[8] Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, et al. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(16):6230-6234.

[9] 李玉梅,徐志峰,刘然,等.中国黑龙江大庆与新疆阿勒泰地区乙肝病毒基因型分布规律研究[J], 现代医学检验杂志, 2012, 27(4):41-43.

[10] 王复元,吴秀娟,张大军,等.克拉玛依地区 HBV 基因分型及进化分析[J] 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3):479-480.

[11] 冯琴,朱善军,何江,等.新疆 5 个民族慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布特点 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(14):2015-2017.

[12] 孙晓枫.新疆乙型肝炎病毒的基因亚型、变异的研究[D]. 中国博士学位论文全文数据库, 2009.

(收稿日期:2013-04-14)

Clin Cancer Res, 2011, 30(1):55.

[20] Chen Z, Saad R, Jia P, et al. Gastric adenocarcinoma has a unique microRNA signature not present in esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(11):1985-1993.

[21] Liu D, Sun Q, Liang S, et al. MicroRNA-27a inhibitors alone or in combination with perifosine suppress the growth of gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(2):642-648.

[22] 陈熙,聂玉强,叶敏,等.胃癌组织中 miR-181a 和 miR-27a 高表达及意义[J]. 广州医学院学报, 2011, 39(4):13-16.

[23] Yang SM, Huang C, Li XF, et al. miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating PTEN[J]. Toxicology, 2013, 306(1):162-168.

[24] Kim CH, Kim HK, Rettig RL, et al. miRNA signature associated with outcome of gastric cancer patients following chemotherapy [J]. BMC Med Genomics, 2011, 4(1):79.

[25] Wu XM, Shao XQ, Meng XX, et al. Genome-wide analysis of microRNA and mRNA expression signatures in hydroxycamptothecin-resistant gastric cancer cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(2):259-269.

(收稿日期:2013-04-22)