

## • 经验交流 •

## 不同核酸提取方法用于 HBV DNA 定量检测的比较

胡建勇<sup>1</sup>, 吴 放<sup>1</sup>, 李 鑫<sup>2</sup>

(1. 甘肃省定西市人民医院检验科, 甘肃定西 743000; 2. 甘肃省庄浪县中医医院检验科, 甘肃庄浪 744699)

**摘要:**目的 探讨两种国产乙型肝炎病毒(HBV)DNA 荧光定量检测试剂的临床应用价值。方法 选取于该院就诊的慢性乙型肝炎患者共 176 例, 分别用两种国产 HBV 核酸定量检测试剂测定其 HBV DNA 水平。比较分析“煮沸法”的 A 试剂与“一步法”的 B 试剂的线性范围及其灵敏度。结果 176 例慢性乙型肝炎患者血清标本用两种试剂检测, A 试剂检测为阳性的样本有 71 例, 阳性率为 40.3% (71/176); B 试剂检测为阳性的样本有 120 例, 阳性率为 68.2% (120/176)。阳性率的一致性为 100%, 阴性率的一致性为 53.3%, 总的一致性为 72.2%。结论 两种国产 HBV DNA 检测试剂盒对于 HBV 载量在低复制水平的血清标本具有很好的可比性, B 试剂的扩增效率高、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。

**关键词:**乙型肝炎病毒; 国产试剂盒; 低病毒载量; 煮沸法; 一步法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.054

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)17-2387-02

肝脏是人体最大的腺体, 是新陈代谢的关键器官, 乙型肝炎病毒(HBV)等嗜肝类病毒会引起肝细胞损伤以及肝脏炎症, 影响肝脏功能的正常发挥。最近, 基因检测技术不断飞速发展, 分子诊断在肝病的诊疗和监测中发挥着非常重要的作用, HBV DNA 定量检测现已成为 HBV 复制监测最常用的手段, 可以直接检测 HBV 核酸水平, 从而观察抗病毒药物疗效和预后, 进而指导抗病毒药物应用, 对乙型肝炎临床诊断及治疗有较大的指导意义。近年来, 随着核酸及核酸类似物、聚乙二醇干扰素  $\alpha$  等抗病毒药物的问世, 使得慢性乙型肝炎临床抗病毒治疗取得了较大进步, 同时对乙型病毒肝炎的实验室检测的灵敏度和精确度也提出了新的要求<sup>[1]</sup>。本研究结合了 176 例乙肝患者的血清学指标和转氨酶水平, 比较用了用于 HBV DNA 水平检测的两种不同的核酸提取方法, 旨在为临床诊疗提供帮助。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 8 月至 12 月于本院进行治疗的 176 例慢性乙型肝炎患者, 男性 128 例、女性 48 例, 年龄  $(39.9 \pm 13.4)$  岁。纳入研究对象时排除药物性肝炎、酒精性肝炎及其他病毒性肝炎。诊断依据为中华医学会肝病学分会与中华医学会感染病学分会在 2010 年修订的《慢性乙型肝炎防治指南》中的标准<sup>[2]</sup>。所有待检标本均为空腹抽血, 3 000 r/min 离心后, 低温保存待检。

**1.2 仪器与试剂** 乙型肝炎核酸定量检测 A 试剂由国内某厂家提供, 最低检测限为 500 IU/mL, 试剂批号 20120911, A 试剂采用“煮沸法”提取核酸; HBV 核酸定量检测 B 试剂由湖南圣湘生物公司提供, 批号为 2012009, 最低检测限为 100 IU/mL, B 试剂采用“一步法”提取核酸。仪器为美国应用生物系统公司生产的 ABI7300 荧光定量 PCR 分析仪。乙型肝炎五项(ELISA 法)检测试剂由厦门新创公司提供, 检测项目包括乙型肝炎表面抗原、表面抗体、e 抗原、e 抗体、核心抗体。使用的仪器包括湖南凯达有限公司生产的 TGL-16A 型低温高速冷冻离心机, 中科美菱生产的低温冰箱, 转氨酶(ALT, AST)检测仪为美国贝克曼 AU680 全自动生化分析仪, 结果大于 50 U/L 判断为阳性。

**1.3 方法** “煮沸法”的 A 试剂操作: 加入 100  $\mu$ L 样品处理液 A 和 100  $\mu$ L 待测样本、标准品于 0.5 mL 离心管中, 振荡混匀后, 13 000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清; 再加入 25  $\mu$ L 的样本处理液 B, 振荡混匀后, 20 000 r/min 离心数秒, 100  $^{\circ}$ C 干浴

10 min; 之后 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清 2  $\mu$ L 上机检测。“一步法”的 B 试剂操作: 首先将 5  $\mu$ L 的“核酸释放剂”加入八联管中, 然后分别加入 5  $\mu$ L 血清, 阴、阳性对照以标准品, 吸打 3~5 次混匀。每管加入 40  $\mu$ L PCR 反应液, 盖上管盖上机检测。

**1.4 统计学处理** 统计学处理在 SPSS17.0 软件上进行, 阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验; HBV DNA 载量检测结果经对数转换后用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用配对样本  $t$  检验;  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 A、B 两种试剂检测结果一致性分析** 本研究中将 HBV DNA 水平大于 500 IU/mL 作为结果阳性的判断标准, 反之则为阴性。使用 A 试剂的最终检测结果中有 71 例阳性样本, 阳性率为 40.3% (71/176); B 试剂有 120 例阳性样本, 阳性率为 68.2% (120/176)。阳性率的一致性为 100%, 阴性率的一致性为 53.3%, 总的一致性为 72.2%, 见表 1。

表 1 使用“煮沸法”A 试剂与“一步法”B 试剂的检测结果( $n$ )

| A 试剂 | B 试剂 |     | 合计  |
|------|------|-----|-----|
|      | 阳性   | 阴性  |     |
| 阳性   | 71   | 49  | 120 |
| 阴性   | 0    | 56  | 56  |
| 合计   | 71   | 105 | 176 |

**2.2 不同乙型肝炎两对半模式下两种试剂检测结果阳性率比较** 经统计 176 例乙型肝炎患者中 HBV 标志物检测为乙型肝炎表面抗原、e 抗原、核心抗体三项阳性(简称“大三阳”)患者 59 例, A 试剂检测结果呈阳性为 44 例, 阳性率为 74.6% (44/59); B 试剂检测结果呈阳性为 55 例, 阳性率为 93.2% (55/59); 乙型肝炎表面抗原、e 抗体、乙肝核心抗体三项阳性(简称“小三阳”)患者 43 例, A 试剂检测结果呈阳性为 12 例, 阳性率为 27.9% (12/43), B 试剂检测结果呈阳性为 30 例, 阳性率为 69.8% (30/43); 乙型肝炎表面抗原和核心抗体阳性(简称“小二阳”)患者 38 例, A 试剂检测结果呈阳性为 6 例, 阳性率为 15.8% (6/38), B 试剂检测结果呈阳性为 18 例, 阳性率为 47.4% (18/38); 其他共 36 例, 其中 A 试剂检测结果呈阳性为

10例,阳性率为27.8%(10/36),B试剂检测结果呈阳性为17例,阳性率为47.2%(17/36)。见表2。

表2 不同HBV标志物模式下两种试剂检测结果的比较(n)

| HBV标志物模式 | n  | A试剂 | B试剂 | $\chi^2$ | P    |
|----------|----|-----|-----|----------|------|
| “大三阳”    | 59 | 44  | 55  | 1.70     | 0.19 |
| “小三阳”    | 43 | 12  | 30  | 8.76     | 0.00 |
| “小二阳”    | 38 | 6   | 18  | 6.44     | 0.01 |
| 其他       | 36 | 10  | 17  | 1.97     | 0.16 |

2.3 不同ALT、AST水平下两种试剂HBV DNA水平检测结果的比较 176例乙型肝炎患者中同时进行过肝功能检测的患者为151例,其中转氨酶水平正常患者101例。A试剂检测结果呈阳性为30例,阳性率为29.7%(30/101),B试剂检测结果呈阳性为64例,阳性率为63.4%(64/101);转氨酶偏高患者50例,A试剂检测结果呈阳性为26例,阳性率为52.0%(26/50),B试剂检测结果呈阳性为40例,阳性率为80%(40/50)。见表3。

表3 不同转氨酶水平下两种试剂检测结果的比较(n)

| 转氨酶水平 | n   | A试剂(n) | B试剂(n) | $\chi^2$ | P    |
|-------|-----|--------|--------|----------|------|
| 正常    | 105 | 30     | 65     | 17.66    | 0.66 |
| 偏高    | 50  | 25     | 38     | 3.27     | 0.07 |

### 3 讨 论

HBV载量不仅是反映HBV复制程度及传染性强弱的指标,而且也是观察抗病毒药物疗效和预后的重要指标。HBV定量检测突破了免疫学等方法的局限性,可如实地反映患者体内病毒载量。目前,国内生产的乙型肝炎检测PCR试剂有多种,但部分试剂在检测的精密度、最低病毒载量、特异性、灵敏度等方面存在差异<sup>[3]</sup>。随着基因检测技术的不断发展,基因诊断的作用显得尤为重要。HBV载量检测是分析成功的先决条件,好的核酸提取方法是决定实验成败的步骤<sup>[4]</sup>。提高国产乙肝PCR试剂盒的灵敏度对乙型肝炎的早期诊断显得尤为重要<sup>[5-7]</sup>,HBV定量检测对开展抗病毒治疗非常重要。

本研究显示,A试剂检测为阳性的样本71例,阳性率为40.3%(71/176),阴性率为59.7%;B试剂检测为阳性的样本120例,阳性率为68.2%(120/176),阴性率为31.8%。阳性率的一致性为100%,阴性率的一致性为53.3%,总的一致性为72.2%。176例HBV感染者中HBV标志物模式为“大三阳”患者59例,A试剂检测结果呈阳性为44例,阳性率为74.6%(44/59),B试剂检测结果呈阳性为55例,阳性率为93.2%(55/59);“小三阳”患者43例,A试剂检测结果呈阳性为12例,阳性率为27.9%(12/43),B试剂检测结果呈阳性为30例,阳性率为69.8%(30/43);“小二阳”患者38例,A试剂检测结果呈阳性为6例,阳性率为15.8%(6/38),B试剂检测结果呈阳性为18例,阳性率为47.4%(18/38);其他共36例,其中A试剂检测结果呈阳性为10例,阳性率为27.8%(10/36),B试剂检测结果呈阳性为17例,阳性率为47.2%(17/36)。经统计学分析,“一步法”B试剂检测的阳性率明显高于“煮沸法”A试剂,说明B试剂检测的灵敏度高于A试剂。

另外的研究结果显示,在176例乙型肝炎患者中同时进行

过肝功能检测的患者为151例,其中转氨酶正常患者101例,A试剂检测结果呈阳性为30例,阳性率为29.7%(30/101),B试剂检测结果呈阳性为64例,阳性率为63.4%(64/101);转氨酶偏高患者50例,A试剂检测结果呈阳性为26例,阳性率为52.0%(26/50),B试剂检测结果呈阳性为40例,阳性率为80%(40/50)。B试剂检测的阳性率明显高于A试剂,说明B试剂检测的灵敏度高于A试剂。

PCR检测虽具有较高的灵敏度,但是影响因素较多。PCR实验室在提取核酸过程中容易造成核酸的丢失,抑制物去除不完全等均可能使检测结果成为假阴性,避免检测结果假阴性最好方法是在试剂中加入内标<sup>[8]</sup>。本研究结果“一步法”B试剂中设置有内标,以防止检测结果产生假阴性,从而使HBV DNA定量结果更加真实、可信。

一些专家指出,核苷类似物治疗慢乙型肝炎时应根据患者HBV DNA水平,监测和评价病毒学应答情况,调整治疗方案和降低耐药的发生率<sup>[9]</sup>。HBV DNA检测下限的确定,不仅反映了该实验检测系统的精密度,而且对乙型肝炎的诊断、治疗和预后也非常重要<sup>[10]</sup>。本文研究结果显示“一步法”B试剂总体性能较好,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。血清转氨酶的水平与肝细胞受损有直接关系,综合分析乙型肝炎五项检测、HBV DNA及转氨酶水平,才能更加客观和准确地评估病情的变化,从而更好地为临床服务。

### 参考文献

- [1] 蒋素贞,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.
- [2] 中华医学会肝病分会,中华医学会感染病分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].中华肝脏病杂志,2011,19(1):13-24.
- [3] 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.
- [4] Lee JH, Park Y, Choi JR, et al. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory [J]. Yonsei Med J, 2010, 51(1):104-110.
- [5] Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, et al. Assessment of the target-capture PCR hepatitis B virus (HBV) DNA quantitative assay and comparison with commercial HBV DNA quantitative assays [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11):5199-5204.
- [6] 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.
- [7] Sato S, Ohhashi W, Ihara H, et al. Comparison of the sensitivity of NAT using pooled donor samples for HBV and that of a serologic HBsAg assay[J]. Transfusion, 2001, 41(9):1107-1113.
- [8] 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):5-7.
- [9] 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.
- [10] 梁金明,陈亚珍,李艳. HBV-DNA荧光定量PCR检测下限的确立[J].分子诊断与治疗杂志,2010,2(4):257-259.

(收稿日期:2014-04-18)