

两种乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量检测试剂的比较

王希涛

(河北省唐山市第三医院检验科, 河北唐山 063100)

摘要:目的 分析并评价两种国产乙型肝炎病毒基因实时荧光 PCR 试剂盒的相关性。方法 选取 72 例乙型肝炎病毒 DNA 阳性标本和 20 份健康体检者的血清, 采用上海科华生物工程股份有限公司生产的 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂和中山大学达安基因股份有限公司生产的 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂进行平行定量检测。结果 两试剂对 72 例标本的检测结果相关性良好 ($r^2=0.866, P<0.01$), 科华试剂检测标本中 HBV DNA 含量 $[(4.97 \pm 1.68)$ (对数值)], 低于达安试剂检测值 $[(5.62 \pm 1.64)$ (对数值)], 差异有统计学意义 ($t=-2.337, P<0.05$)。结论 两种试剂的相关性好, 乙型肝炎病毒基因定量结果可以比对。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 聚合酶链反应; DNA, 病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.06.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)06-0754-02

Comparison of two kinds of real-time fluorescent quantitative HBV DNA detection reagent

Wang Xitao

(Department of Clinical Laboratory, Tangshan Municipal the Third Hospital of Hebei Province, Tangshan, Hebei 063100, China)

Abstract: Objective To analyze and evaluate the correlation of two kinds of domestic real-time fluorescence PCR kits for detecting hepatitis B virus (HBV) genes. **Methods** 72 cases of HBV DNA positive specimens and 20 serum specimens of healthy check-up were selected and performed the parallel quantitative determination with the HBV DNA fluorescence quantitative PCR reagents produced by the Shanghai KeHua biological engineering Co., Ltd. and DaAn gene Co., Ltd. of Zhongshan University. **Results** The detection results of 72 specimens had good correlation ($r^2=0.866, P<0.01$), the contents of HBV DNA detected with the KeHua reagent was $[(4.97 \pm 1.68), \lg]$, which was lower than $[(5.62 \pm 1.64), \lg]$ with the DaAn reagent, the difference was statistically significant ($t=-2.337, P<0.05$). **Conclusion** Two kinds of reagents have good correlation and the HBV gene quantitative results can be compared.

Key words: hepatitis B virus; polymerase chain reaction; DNA, viral

乙型肝炎在我国是一种流行性很广的传染性疾病, 定量测定 HBV DNA 是乙型肝炎的诊断, 抗病毒治疗药物疗效和用药指导的重要指标^[1]。目前, 我国有很多厂家都在生产实时荧光 PCR 试剂用于定量检测 HBV DNA。本院一直使用上海科华和中山达安两个厂家的 HBV DNA 荧光定量试剂。本文对这两个厂家的试剂的相关性进行比较研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 72 例乙型肝炎病毒 DNA 阳性标本均来自 2012 年 1~5 月本院收治的乙型肝炎患者, 乙型肝炎病毒 DNA 含量在 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$ copies/mL。其中男性 45 人, 女性 27 人, 年龄 20~52 岁。同时收集 20 例健康体检者的血清标本, HbsAg 均为阴性, 其中男性 10 人, 女性 10 人, 年龄 18~50 岁。

1.2 仪器与试剂 上海宏石医疗科技有限公司生产的 SLAN 实时荧光定量 PCR 分析仪。高速离心机、恒温金属浴。上海科华生物工程股份有限公司生产的 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒, 批号: 20111011; 中山大学达安基因股份有限公司生产的 HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒, 批号: 2012011。

1.3 方法 72 份 HBV DNA 阳性标本和 20 份 HBV DNA 阴性标本用科华试剂检测一次, 再用达安试剂检测一次。所有操作都在经过省临检中心认证的 PCR 实验室中进行, 都严格按试剂盒说明书操作, 两种试剂每批检测都设有空白对照、阴性质控、弱阳性质控和强阳性质控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 所有数据换算成对数值, 进行独立样本 t 检验和相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两试剂对 72 例标本的检测结果相关性良好 ($r^2=0.866, P<0.01$), 见图 1。

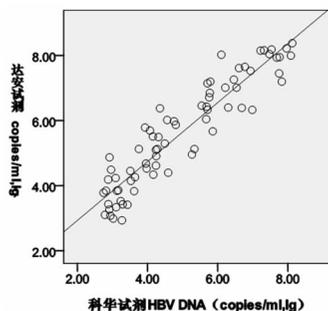


图 1 科华试剂与达安试剂检测 HBV DNA 结果比较

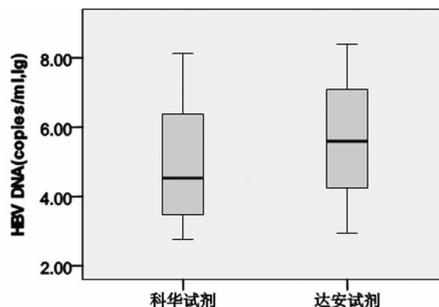


图 2 科华试剂与达安试剂检测 HBV DNA 结果比较

2.2 两种试剂对不同病毒载量的分析, 科华(下转第 787 页)

子 IL-6 和 IL-8,是局部和系统免疫反应的重要因子。新生儿败血症患儿体内的细菌感染产生炎症,刺激机体的 T、B 细胞、单核细胞和内皮细胞分泌大量的 IL-6。有研究表明,在临床症状出现前 2 d,血中 IL-6 已明显升高,因此新生儿败血症患儿血清 IL-6 水平明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),早期阳性率较高,故可以作为早期诊断指标之一。

PCT 是一种没有激素活性的糖蛋白,由 116 个氨基酸组成,分子量为 13×10^3 。PCT 不受母体 PCT 水平高低和窒息缺氧损伤引起的急性炎症反应的影响,仅与新生儿自身细菌感染严重程度有关。PCT 作为监测细菌感染的一项早期特异性诊断指标,在内毒素和细胞因子的刺激下产生,在全身感染 3~4 h 即可检测到,14 h 到达峰值,并在 24 h 内持续升高。革兰阴性细菌感染的患儿 PCT 水平在 24~48 h 显著升高,而病毒感染或非感染性炎症患儿的 PCT 水平不升高或仅轻度升高^[10-11]。新生儿败血症患儿体内存在细菌感染,恢复期 PCT 浓度逐渐下降。PCT 浓度的升高可能与细菌内毒素脂多糖、细胞因子诱导体内甲状腺组织产生大量 PCT 有关。PCT 动力学出现更快,更早,但比 IL-6 出现晚,峰值更宽,消退更慢,72 h 左右基本回落到正常值水平^[12]。本试验显示新生儿败血症组血清 PCT 含量明显高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。病程早,中期阳性率高,持续时间较长,提示 PCT 是检测新生儿败血症的可靠指标之一。从表 3 可见,必要时可以将上述 3 项指标联合检测,显示在新生儿败血症诊断中的阳性率可高达 91%,因此能更及时更准确的反映感染的存在。

综上所述,血清 CRP、IL-6、PCT 检测在新生儿败血症的早期诊断中有重要意义,不同时期检测不同项目能更准确的知晓病情的发展及预后,可提高对鉴别新生儿细菌性感染和病毒性感染疾病诊断与分类的可靠性,弥补单项检测的不足,指导临床及时、合理应用抗菌药物,以免造成严重后果,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 金汉珍,黄德珉,官希吉.实用新生儿学[M].3版.北京:人民卫

生出版社,2003:342-349.
 [2] Volante E,Moretti S,Pisani F,et al. Eady diagnosis of bacterial infection in the neonate[J].J Matern Fetal Neonatal Med,2004,16 (Suupl 2):S13-16.
 [3] Tiskumara R,Fakharee SH,Liu CQ,et al. Neonatal infections in Asia[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed,2009,94(2):144-148.
 [4] 中华医学会儿科分会新生儿组.新生儿败血症诊疗方案[J].中华儿科杂志,2003,41(12):397.
 [5] Backhouse JL,Nesteroff SI. Treponema pallidum western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis,2001,39(1):9-14.
 [6] Kuyumcuoglu U,Kangal K,Guzel AI,et al. Clinical significance of procalcitonin in cervico-vaginal secretions of women with preterm rupture of membranes[J]. Clin Exp Obstet Gynecol,2010,37(4): 319-321.
 [7] Greksova K,Parrak V,Chovancova D,et al. Procalcitonin,neopterin and C-reactive protein in diagnostics of intrauterine infection and preterm delivery[J]. Bratisl Lek Listy,2009,110(10):623-626.
 [8] Ng PC,Lam HS. Diagnostic markers for neonatal sepsis[J]. Curr Opin Pediatr,2006,18(2):125-131.
 [9] 庄晓岚,何丽,朱艳,等.新生儿败血症 C 反应蛋白的检测盒评价[J].临床儿科杂志,2008,26(2):136-138.
 [10] Prat C,Sancho JM,Dominguez J,et al. Evaluation of procalcitonin,neopterin,C-reactive protein,IL-6 and IL-8 as a diagnostic marker of infection in patients with febrile neutropenia[J]. Leuk Lymphoma,2008,49(9):1752-1761.
 [11] 郭安臣,左萍萍.一种新的由感染引起的系统性炎症的标记物—前降钙素[J].中华医院感染学杂志,2003,13(10):993-994.
 [12] Redl H,Schlag G,Tögel E,et al. Procalcitonin release patterns in a baboon model of trauma and sepsis: relationship to cytokines and neopterin[J]. Crit Care Med,2000,28(11):3659-3663.

(收稿日期:2013-11-20)

(上接第 754 页)

试剂检测标本中 HBV DNA 含量 $[(4.97 \pm 1.68)$ (对数值)]低于达安试剂检测值 $[(5.62 \pm 1.64)$ (对数值)],差异有统计学意义($t = -2.337, P < 0.05$)。见图 2。

3 讨论

实时荧光 PCR 均采用荧光共振能量转移原理。也就是说,当一个荧光基团与一个荧光淬灭基团(可以淬灭前者的发射光谱)的距离邻近至一定范围时,就会发生荧光能量转移,淬灭基团会吸收荧光基团在激发光作用下的激发荧光从而使其发不出荧光。目前,国内临床诊断试剂中应用最广的是以 TaqMan 荧光标记探针为基础的实时荧光 PCR 技术^[2]。由以上结果发现,科华试剂比达安试剂检测结果偏低。PCR 用于 HBV DNA 定量检测时,如是使用外部标准进行定量,再加上 HBV DNA 定量数值大,通常不同测定次间差异会较通常检验项目大,一般量值变化在 0.5 个对数数量级内均可视为没有变化^[3]。科华试剂检测标本中 HBV DNA 含量 $[(4.97 \pm 1.68)$ (对数值)],低于达安试剂检测值 $[(5.62 \pm 1.64)$ (对数值)],差异有统计学意义($t = -2.337, P < 0.05$)。原因可能与两试剂的核酸提取液、反应体系和扩增程序不同有关。科华试剂和达

安试剂检测结果虽然有一定差异,但相关性良好($r^2 = 0.866, P < 0.01$),具有可比性。国内有人对达安试剂和罗氏试剂进行过相关性比较,结果显示两试剂相关性良好($r^2 = 0.792$)^[4]。由此可见,科华试剂和达安试剂都能反映患者血清中 HBV DNA 水平,对临床治疗有指导意义。

参考文献

[1] Ciotti M,Marcuccilli F,Guenci T,et al. Evaluation of the Abbott RealTime HBV DNA assay and comparison to the Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 48 assay in monitoring patients with chronic cases of hepatitis B[J]. J Clin Microbiol,2008,46(4):1517-1519.
 [2] 李金明.实时荧光 PCR 技术[M].北京:人民军医出版社,2011:16-17.
 [3] 李金明,乙型肝炎病毒血清标志物测定及结果解释的若干问题[J].中华检验医学杂志,2006,29(5):385-389.
 [4] 肖艳群,陈慧英,张锦锋,等.实时荧光定量 PCR 与 PCR-ELISA 在乙型肝炎病毒 DNA 定量检测中的应用比较[J].检验医学,2005,20(4):319-321.

(收稿日期:2013-12-20)