

· 检验技术与方法 ·

荧光定量 PCR 法检测乙肝病毒 DNA 和乙肝病毒标志物检测的临床价值分析

陈海雁, 张桂花, 罗锦彬, 黄舒婷

(惠州市惠阳区人民医院检验科, 广东惠州 516211)

摘要:目的 探讨荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)检测乙肝病毒 DNA(HBV-DNA)和乙肝病毒标志物(HBV-M)ELISA 法检测的临床价值。方法 选取 2013 年 4~12 月在该院检测的 653 例乙肝患者,先采用 ELISA 法对其血液标本进行 HBV-M 模式定性检测,检测顺序为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HbsAb)、乙型肝炎 e 抗原(HbeAg)、乙型肝炎 E 抗体(HbeAb)、乙肝表面核心抗体(HbcAb);再采用 FQ-PCR 法进行 HBV-DNA 定量检测,观察不同 HBV-M 模式检测结果。结果 HBsAg、HbeAg、HbcAb 检测同时阳性简称“大三阳”。大三阳[1(+),3(+),5(+)]模式和[1(+),3(+)]模式的 HBV-DNA 阳性率分别为 97.97%、94.74%,显著高于其他模式的 HBV-DNA 阳性率($P < 0.05$)。大三阳的 HBV-DNA 表达水平($5.59 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^5$)copies/mL,明显高于其他模式($P < 0.05$)。结论 联合 HBV-M 定性及 HBV-DNA 定量检测,对临床早期诊断及用药具有重要指导价值。

关键词:酶联免疫吸附试验; 聚合酶链反应; 乙肝病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)16-2216-02

The clinical value of detection of fluorescence quantitative PCR in detection of HBV DNA and HBV markers

Chen Haiyan, Zhang Guihua, Luo Jinbin, Huang Shuting

(Department of Clinical Laboratory, Huiyang District People's Hospital of Huizhou, Huizhou, Guangdong 516211, China)

Abstract:Objective To investigate the clinical value of detection of fluorescence quantitative PCR in detection of HBV DNA and HBV markers. **Methods** 653 hepatitis B patients in our hospital from 2013 April to 2013 December were selected. First ELISA method using HBV-M model for qualitative detection of the blood samples, the detection order: Hepatitis b virus surface antigen (HBsAg), Hepatitis B surface Antibody(HbsAb), Hepatitis B e Antigen(HbeAg), hepatitis B e antibody(HbeAb), hepatitis B core antibody(HbcAb); Then the FQ-PCR method for the quantitative detection of HBV-DNA, different HBV-m model test results were compared. **Results** Big 3 this world[1(+),3(+),5(+)]model and[1(+),3(+)]model of the HBV-DNA positive rate was 97.97%,94.74% was significantly higher than that in other mode($P < 0.05$). Big 3 this world[1(+),3(+),5(+)]model HBV-DNA expression level is the highest($5.59 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^5$) copies/mL was significantly higher than that in other mode($P < 0.05$). **Conclusion** Combined with qualitative and quantitative detection of HBV-DNA HBV-M, which is of great value to clinical early diagnosis and therapy.

Key words:enzyme linked immunosorbent assay; polymerase chain reaction; hepatitis B virus

乙肝病毒标志物(HBV-M)是目前我国临床判断病情及传染性的一项重要参考依据,能够反映患者对 HBV 病毒的免疫应答状态^[1]。随着近年来分子生物学技术的发展,荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)在临床诊断和治疗中发挥着独特的优势,逐渐广泛应用于临床,可直接检测患者的乙肝病毒 DNA(HBV-DNA)病毒水平,反映 HBV 复制及感染活性^[2]。本研究通过 HBV-M 定性及 HBV-DNA 定量检测,探讨两者之间的关系及临床价值,以便指导临床诊断、用药及判断预后,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 抽选 2013 年 4~12 月在本院检测的 653 例乙肝患者,其中男 412 例,女 243 例,年龄 5~66 岁,HBV-DNA 检测试剂主要由凯杰生物工程(深圳)有限公司生产,采用 Roche Light Cycler 480 型号的基因扩增分析仪;ELISA 试剂盒购自上海科华公司。

1.2 检测方法

1.2.1 HBV 免疫学检测 采用 ELISA 法进行 HBV-M 模式

的定性检测。检测顺序为乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HbsAb)、乙型肝炎 e 抗原(HbeAg)、乙型肝炎 E 抗体(HbeAb)、乙肝表面核心抗体(HbcAb);根据 Thermo Multiskan MK3 酶标仪比色进行结果评定,严格按照试剂说明书进行检验操作及评定结果。

1.2.2 HBV-DNA 定量测定 采用 FQ-PCR 法对 HBV-DNA 病毒水平进行测定。仪器型号为 Roche LightCycler 480 型号(购自德国罗氏公司),FQ-PCR 试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司,定量测定范围大于 $10^3 \sim 10^7$ copies/mL,严格按照操作说明进行操作,结果真实可信。

1.3 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用 $n(\%)$ 表示,采用 SPSS17.0 软件分别进行 t 值和 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ELISA 检测 HBV-M 模式结果 本研究 653 例乙肝患者的血液标本中,HBV-M 模式定性检测有以下 8 种模式。HB-

sAg、HbeAg、HbcAb 检测同时阳性简称“大三阳”。大三阳[1(+),3(+),5(+)]模式 197 例;HBsAg、HBeAb、HbcAb 检测同时阳性简称“小三阳”。小三阳[1(+),4(+),5(+)]模式]252 例,[1(+),4(+)]模式]95 例,[1(+),3(+)]模式]19 例,[2(+),4(+),5(+)]模式]25 例,[2(+),4(+)]模式]13 例,[4(+),5(+)]模式]19 例,[5(+)]模式]33 例。

2.2 HBV-DNA 定量检测结果 以 HBV-DNA 表达水平高于 1×10^3 copies/mL 为阳性。本研究 653 例血清样本中,HBV-DNA 检测阳性率为 54.82%(358/653)。

2.3 不同 HBV-M 模式下检测结果比较 大三阳[1(+),3(+),5(+)]模式和 1(+),3(+)]模式的 HBV-DNA 阳性率分别为 97.97%、94.74%,显著高于其他模式($P < 0.05$)。大三阳[1(+),3(+),5(+)]模式的 HBV-DNA 表达水平($5.59 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^5$),明显高于其他模式的 HBV-DNA 表达水平($P < 0.05$),见表 1。

表 1 不同 HBV-M 模式下检测结果比较

项目	n	阳性率(%)	HBV-DNA 水平 (copies/mL)
1(+),3(+),5(+)]模式	197	97.97	$5.59 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^5$
1(+),4(+),5(+)]模式	252	34.92	$4.18 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^4$
1(+),4(+)]模式	95	60.0	$3.33 \times 10^4 \pm 1.75 \times 10^3$
1(+),3(+)]模式	19	94.74	$3.72 \times 10^6 \pm 1.58 \times 10^5$
2(+),4(+),5(+)]模式	25	8.0	$4.75 \times 10^3 \pm 1.39 \times 10^2$
2(+),4(+)]模式	13	0.0	—
4(+),5(+)]模式	19	0.0	—
5(+)]模式	33	0.0	—

—:无数据。

3 讨论

HBV 感染由于具有极强的传染性,临床发病率较高,且部分患者易转变为慢性肝炎,在疾病进展过程中易继发肝硬化、肝癌等疾病,已成为世界性的一个严重公共卫生问题^[3]。因此,采取一种有效的检测方法对于 HBV 感染的早期诊断、切断传播及予以及早治疗具有重要意义。目前临床主要的检测方法有 ELISA 法、放射免疫法、FQ-PCR 法以及化学发光法等^[4]。ELISA 检测方法由于操作简单、灵敏度及特异性高、检测快速、价格低廉等特点在临床上应用广泛,是 HBV 感染的一种常规检测手段。但 ELISA 法检测只能反映患者对 HBV 病毒的免疫应答状态,是 HBV 病毒感染的间接参考依据,对机体 HBV 感染复制情况及传染危险性反映不准确^[5]。而 FQ-PCR 法对 HBV-DNA 表达水平的检测是 HBV 感染情况的最直接参考指标,其检测灵敏度、特异性较高,且能直接、动态地反映 HBV 病毒的复制状态及传染危险性^[6]。但 FQ-PCR 法 HBV-DNA 定量检测对非复制状态下的感染情况反映不明确,故临床上常联合检测。

本研究结果显示,大三阳(1、3、5 模式)和 1、3 模式的 HBV-DNA 阳性率 97.97%、94.74% 显著高于其他模式($P < 0.05$)。大三阳[1(+),3(+),5(+)]模式的 HBV-DNA 表达水平最高($5.59 \times 10^6 \pm 2.42 \times 10^5$) copies/mL,明显高于其他

模式($P < 0.05$)。与林琳^[7]研究报道一致,说明了当 1、3 同时阳性时,患者体内 HBV-DNA 复制活跃,病毒传染性增加,因此,大三阳患者的病毒传染性强。本研究小三阳患者 HBV-DNA 阳性率为 34.92%,显著低于大三阳的阳性率 97.97% ($P < 0.05$);但是 HBV-DNA 表达水平($4.18 \times 10^5 \pm 1.53 \times 10^4$) copies/mL 仍较高。说明小三阳 HBeAg 已经转阴,HBV-DNA 复制活跃性亦略低于大三阳组,但是机体内病毒复制并未停止,仍有传染性^[8]。1(+),3(+)]模式的 HBV-DNA 阳性率为 60%,介于大、小三阳之间,有研究报道解释其可能是因 HBV 病毒基因第 1896 位核苷酸出现突变,使得前 C 区序列转录以及翻译受阻,因而 HBeAg 分泌减少,但患者 HBV-DNA 复制情况仍存在,临床也应加以重视^[9]。2(+),4(+)]模式,4(+),5(+)]模式,5(+)]模式的阳性率为 0%。HBsAg、HBeAg 转阴,HBsAb 的产生说明了患者体内 HBV 病毒已经清除,HBsAb 在 HBV 病毒清除时作用较大。2(+),4(+),5(+)]模式下,机体已经产生了具有保护性作用的 HBsAb,或宿主免疫力低,既不表达抗原,也不产生抗体应答,因此阳性率亦较低^[10]。以上 4 种模式,乙肝病毒基本不复制,传染性低。

综上所述,不同 HBV-M 模式的 HBV-DNA 表达水平及阳性率存在显著差异性,联合 HBV-M 定性及 HBV-DNA 定量检测,对临床早期诊断及用药具有重要指导价值。

参考文献

- [1] 叶儒军,魏威. 乙肝病毒 DNA 与乙肝病毒标志物的相关研究[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(23):2932-2933.
- [2] 陈凤萍,沈云峰,吴瑶,等. 335 例乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 定量与乙肝病毒标志物的相关性分析[J]. 江汉大学学报:自然科学版,2012,40(5):93-95.
- [3] 舒海英. 两种免疫分析方法检测乙肝病毒血清标志物的差异分析[J]. 陕西医学杂志,2012,41(12):1602-1603.
- [4] 刘玉昆,黄晓霞,吴远萍,等. 乙肝病毒标志物阳性产妇乳汁中乙肝病毒检测结果分析[J]. 中国妇幼保健研究,2011,22(5):581-586.
- [5] Su HL, Huang RD, He SQ, et al. Cloning and sequence analysis of the DHBV genome of the brown ducks in Guilin region and establishment of the quantitative method for detecting DHBV[J]. Reprod Biol Endocrinol. 2013,11(1):56-57.
- [6] 秦望森,沈立萍,张爽,等. 乙肝患者 HBV 感染指标、病毒复制水平与基因分型的关系分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(5):328-330.
- [7] 林琳. 乙肝患者血清标志物和病毒含量的相关性研究[J]. 标记免疫分析与临床,2011,18(2):71-73.
- [8] Chen CH, Lee CM, Wang JH, et al. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2004,16(11):1213-1218.
- [9] 唐芳玫. 乙型肝炎病毒 DNA 与血清标志物的关系[J]. 检验医学与临床,2010,7(1):28-29.
- [10] 周丽敏. 乙肝病毒标志物 2431 例检测模式汇总及分析[J]. 临床和实验医学杂志,2012,11(1):65-67.