

• 临床研究 •

核酸检测方法在血液 HBV-DNA 检测中的应用

曾雪珍, 叶贤林, 曾劲峰

(广东省深圳市血液中心 518035)

摘要:目的 研究核酸检测方法在血液 HBV-DNA 检测中的应用价值。方法 选取 2006 年 6 月至 2012 年 6 月深圳市 347 160 例血清学检测阴性的献血者血液标本为研究对象,对其实施罗氏 COBAS AMPLICOR 血液核酸筛查、PCR-微流芯片法、实时荧光 PCR 法及 NOVARTIS TMA 进行核酸筛查以统计携带有 HBV 的血液标本数量,同时,所有献血者追踪检测丙氨酸氨基转移酶和乙型肝炎两对半标志物。结果 347 160 例血清学检测阴性的献血者通过实施核酸检测,共检测出乙型肝炎表面抗原阴性及 HBV-DNA 阳性 129 例,占 0.37%。其中,窗口期 19 例,占检出总例数 14.7%;隐匿性感染 110 例,占 84.3%。结论 NAT 灵敏度高,能够有效筛选出献血者血液标本中携带的 HBV,对保障血液安全具有重要意义,值得在今后临床检测工作中积极推广使用。

关键词:核酸扩增技术; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎表面抗原; 脱氧核糖核酸

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)12-1695-03

输血是将献血者的血液通过静脉输注的方式传输至患者体内,以起到良好的辅助治疗作用的一种治疗方法,在当前医疗机构中得到了广泛的应用。然而,在献血者中,乙型肝炎病毒感染组不可避免地夹杂其中,对献血者的身体健康带来了极大的隐患。根据当前医学临床研究可知,乙型肝炎病毒(HBV)是一种脱氧核糖核酸病毒,属于嗜肝 DNA 病毒科^[1]。目前在我国境内 HBV 感染率约为 65%,而乙型肝炎表面抗原携带率约占到了总人口数的 7%,乙型肝炎病毒(HBsAg)属于传染性疾病,已经被世界卫生组织列为严重的全球性卫生问题。如何有效降低由血液输注造成的 HBV 感染率已经成为各国医学界专家学者研究的重要课题。在血液标本检测工作中,核酸扩增技术(NAT)可缩短检测“窗口期”,降低漏检感染病毒率等优点日渐凸显,并且此种方法已经成为西方发达国家病毒筛查工作的重要手段之一^[2]。为此,本研究针对核酸检测方法在血液 HBV-DNA 检测的应用价值展开深入分析,以为该种检测技术的推广使用提供科学依据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取深圳市血液中心 2006 年 6 月至 2012 年 6 月 347 160 例血清学检测为阴性的献血者为研究对象,其中男 185 470 例,占 53.4%,女 161 690 例,占 46.6%,献血者年龄 18~45 岁,平均(31.5±2.5)岁。所有无偿献血者均检测 HIV、梅毒阴性;ABO 血型根据红细胞表面有无特异性抗原(凝集原)A 和 B 来划分血液类型系统;血液检测标本均是在全密闭状态下采集的。排除非研究区间段提供的血液标本,以及含有乙醇成分的血液标本。

1.2 检测方法 347 160 例献血者血液标本进行 HBsAg 金标试纸法,丙氨酸氨基转移酶(ALT)采用干化学法测试,合格后将采集到的血液标本置于 NAT 试管中,以 3 000 r/min 离心 15 min,并放置在 4℃环境中保存^[3]。选定后实施罗氏 COBAS AMPLICOR 血液核酸筛查方法、PCR-微流芯片法、实时荧光聚合酶链反应(PCR)法及 NOVARTIS TMA 进行 HBV-DNA 检测。(1)罗氏 COBAS AMPLICOR 血液核酸筛查方法。首先对检测血液标本进行核酸全自动提取工作,将所使用的纯化试剂洗涤缓冲液、蛋白裂解液、磁珠等放置在瑞士罗氏 COBAS AMPLICOR NAT 检测仪上,于汇集池将标本均匀混合后取样 500 μL,并且经过阴阳对照之后放入到仪器,等待 1 h 后提取自动完成的核酸^[4]。其次,向标本加入 Mn²⁺ 溶液和纯

化之后的核酸样液,根据 NAT 检测仪检测步骤要求逐次加入变性液、内标、酶和显色剂自动完成扩增和检测工作,之后由操作人员记录标本的阳性检测结果。(2)PCR-微流芯片法。本研究中采用上海浩源生物科技有限公司生产的 PCR 检测试剂盒,扩增引物为 HBV 前 C 及 C 区设计引物,正反向扩增引物的序列如下所示:5'-TTG CCT TCT GAC TTC TTT CC-3', 5'-CGA GGG AGT TCT TCT TCT AG-3'。扩增的具体循环条件为:50℃环境下 120 s;95℃环境下预变性 5 min,94℃ 50 s、50℃ 50 s、72℃ 50 s 2 个循环,90℃ 40 s、50℃ 40 s、72℃ 40 s 共 32 个循环^[5]。使用 DNA500 微流芯片来检测 PCR 扩增物。利用 Caliper L 1000 微流芯片分析仪实施 HBV 定量检测,并利用检测仪携带的计算软件计算最终检测结果^[6]。(3)实时荧光 PCR 法。本研究中所使用的 PCR 混合物包括正向引物(nt1743~1434)5'-ACG TCC TTT GTT TAC GTC GCG T-3'和反向引物(nt1743~1722)5'-CCC AAC TCC TCG CAG TCC TTA A-3'。扩增程序:50℃环境下温育 120 s,94℃ 120 s、60℃ 30 s 1 个循环,94℃ 15 s、60℃ 30 s 共 39 次循环,在 60℃条件下进行荧光 PCR 定量分析^[7]。(4)NOVARTIS TMA。采用 Novartis Procleix Ultrio Discriminatory TMA 对待检测血液标本进行 HBV-DNA 检测,检测样品严格按照世界卫生组织国际标准品 HBV(97/750)进行校准。(5)HBV 阳性结果的追踪研究。进行乙型肝炎两对半,ALT 检测,HBsAg 同时用两种 ELISA 试剂测定,阳性结果用中和实验验证。

1.3 质量控制 每天室内质控物由试剂公司合作配置,按试剂说明书要求判读结果有效性。2007 年开始参加原卫生部和澳大利亚的室内质评(NRL,2011 年后更改为 CITAC)。

1.4 统计学处理 采用 Stata11.0 统计软件进行处理数据及统计学分析,分类变量资料采用 Fisher 法,连续变量资料采用两独立样本 Mann-Whitney U 检验。所有的统计检验均采用双侧检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 核酸检测结果 所有 347 160 例献血者通过实施核酸检测,共检测出 HBsAg 阴性、HBV-DNA 阳性 129 例,占 0.37% [95%置信区间(CI)为 1:3 224~1:2 265,P<0.05]。其中,罗氏 COBAS AMPLICOR 血液核酸筛查方法检出 8 例,95% CI 为 1:9 124~1:1 999;实时荧光 PCR 法检出 11 例,95% CI 为 1:11 779~1:2 831;PCR-微流芯片法检出 3 例,95%

CI 为 1 : 22 831 ~ 1 : 1 611; NOVARTIS TMA 多核酸检测 107 例, 95% CI 为 1 : 2 463 ~ 1 : 1 671。

2.2 HBsAg 阴性及 HBV-DNA 阳性血清学标志物分布情况 本研究共检测出 HBsAg 阴性, HBV-DNA 阳性 129 例。其中, 处于窗口期 19 例, 占检出总例数的 14.7%; 隐性感染 110 例, 占 84.3%。所有 110 例隐性感染中乙型肝炎核心抗体(HBcAb) 阳性及乙型肝炎表面抗体(HBsAb) 50 例, 占 38.8%; HBcAb 阳性及 HBsAb 阳性 45 例, 占 34.9%; 单纯 HBsAb 阳性 15 例, 占 11.6%。

2.3 对核酸阳性结果献血者的追踪结果 129 例 HBV-DNA 阳性献血者进行了追踪, 成功追踪到 42 例献血者, 其中 7 例献血者追踪到 HBsAg 血清转换到阳性的现象, 且 HBcAb 转换为阳性, 呈窗口期特征, 占总例数的 18.0%。

2.4 室间质评结果 2007 年开始每年参加原卫生部临检中心的质评, 结果与预期结果完全一致。澳大利亚的 NRL 共 15 支编号 A~O, 按要求与血液标本同等检测, 2007 年参加 3 次, 其中 HBV-DNA、HCV RNA 与预期结果完全一致。HIV RNA 第 2 次 N 号标本为 B 亚型稀释标本, 首次未检出, 后改进探针后检出。2008 年参加 3 次, 全部符合, 其中第一次 L 号为 HBV 和 HIV 合并感染, HIV 载量低于目前所有的检测方法, 本实验室均检出。2008 年后均为 100.0% 符合。

3 讨 论

HBV 是一种经血传播, 且危害极大的一种病毒性传染病, 而引起 HBV 传播的途径主要有以下几种: 血源性传播、医源性传播、母婴传播、生殖细胞传播、密切接触传播(性接触为主)、吸血昆虫(蚊子、臭虫等)传播等^[8]。随着病毒防治及健康宣教工作的广泛开展, 生殖细胞传播、密切接触传播、吸血昆虫传播等途径所导致的 HBV 传播率得到了有效控制。因而, 血源性传播已经成为乙型肝炎的主要传播途径。特别是当前输血治疗在医疗机构的各个科室中已经得到了广泛的使用, 更是进一步加剧了 HBV 防治工作的压力。

当前我国范围内的大部分血站一直在单纯使用 ELISA, 并将 HBsAg 作为 HBV 感染的献血者筛查手段与指标。但是, 血液标本检测过程中由于窗口期、低水平乙型肝炎感染、基因变异等客观因素的存在, 使献血者筛查工作并没有取得理想效果, 现代输血安全的需要得不到有效满足^[9]。所以, 如何降低血站血液标本中 HBV“窗口期”感染风险已经成为血液检测领域亟待解决的问题。

经过不断开展的临床研究证实, 人体一旦遭受到外界病毒感染, 通常情况下最先被检测出来的就是病毒核酸。HBV-DNA 为乙型肝炎的脱氧核糖核酸, 即 HBV 基因, 是当前临床判定乙型病毒性肝炎感染的最直接、特异性较强及反应灵敏度较高的指标。如果献血者血液标本经过检测后发现 HBV-DNA 结果呈阳性, 则提示该献血者体内存在着 HBV 复制和潜在传染性。而 HBV-DNA 越高则表示病毒基因复制越严重, 传染性随之提升^[10]。因此, 通过检测 HBV-DNA 已经成为筛选血站血液标本 HBV 感染, 以及提高输血安全性的关键手段。随着医学技术的快速发展, 国外医学界已经广泛采用 NAT 来缩短病毒基因检测的“窗口期”, 实现及时筛查出 HBV 感染的血液标本的目的。相较于 ELISA 等血清学检测方法, 核酸检测将 HBV 检测的“窗口期”由原来的 50 d 缩短至 25 d, 血液安全由此可得到更好保障。国外将其应用在临床血液检测工作中的报道已经屡见不鲜。

本研究对 347 160 例阴性血样献血者在不同时间段分别

采用罗氏 PCR 法, PCR-微流芯片法和实时荧光 PCR 法及 NOVARTIS TMA 进行血液核酸常规筛查。共检出 129 例 HBV-DNA 阳性标本, 阳性总比率为 1 : 2 691, 占 0.37%, 明显高于西方发达国家, 主要原因是我国为肝炎的高发区, 人群中 HBsAg 携带率为 7.18%, HBV 流行率高达 60% 以上。本次检出 129 例 HBV-DNA 阳性, 其中罗氏 COBAS AMPLICOR 血液核酸筛查方法检出 8 例, 实时荧光 PCR 法检出 11 例, PCR-微流芯片法检出 3 例, NOVARTIS TMA 多核酸检测 107 例。科华半自动方法由于前期采用离心富集病毒方法, 该方法富集病毒效果差, 检出比率相应比其他方法低。而 NOVARTIS TMA 方法由于采用单人份检测, 上样量为 500 μ L, 检出的阳性比率较其他方法高。其余方法由于标本采集时间、取样量、提取和扩增方法不同, 检出比率稍有不同。尽管各种检测方法检出例数存在着一定程度的差异, 但是不可否认的是相较于临床常用的 ELISA, 其诊断结果的准确性更高, 对于临床广泛使用的输血治疗起到了有效的保障。进一步研究发现, 检测出的 129 例 HBsAg 阴性、HBV-DNA 阳性献血者, 其中, 窗口期患者 19 例, 占检出总例数的 14.7%; 隐性感染 110 例, 占 84.3%。所有 110 例隐性感染献血者中 HBcAb 阳性及 HBsAb 阴性 50 例, 占 38.8%; HBcAb 阳性及 HBsAb 阳性 45 例, 占 34.9%; 单纯 HBsAb 阳性 15 例, 占 11.6%, 进一步证实了现有检测方法存在的弊端与不足。

然而, 结合国内外既有研究成果及本科室工作经验, 提示 NAT 推广使用需要解决以下两个问题: 首先是持续维持核酸检测运行经费问题。NOVARTIS TMA 核酸检测系统检测结果是上述检测方法中最佳的, 但是该系统与国内目前血站实验室检测系统存在着明显的数据信息对接问题, 缺乏足够的配套资金开展相应的研究。其次, 需要明确一个符合标准的实验室规范化检测流程并做好核酸检测实验室质量控制和人员的技术培训工作。由于 NAT 在国内尚未得到广泛应用, 各地区医疗从业人员对其认知与操作步骤存在一定的不足, 需要在此方面花费较大精力予以妥善解决。

综上所述, NAT 灵敏度高, 能够有效筛选出献血者血液标本中携带的 HBV, 对血液安全起到了重要的保障作用, 值得在今后临床检测工作中积极推广使用。

参考文献

- [1] 何紫琪, 李从荣, 李艳. 乙型肝炎病毒耐药突变检测方法应用研究进展[J]. 中华临床实验室管理电子杂志, 2014, 10(2):101-105.
- [2] 蔡明翠, 吉克春农, 郭豫川, 等. 核酸检测在血液筛查中的重要作用[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2015, 15(2):339-341.
- [3] 张立波, 夏欣一, 马贵明, 等. 以转录介导扩增技术大规模筛查无偿献血者的应用研究[J]. 东南国防医药, 2014, 25(1):6-9.
- [4] 王宏, 张宁, 王芳, 等. 对献血者血液进行 HIV、HBV 和 HCV 病毒核酸检测质量管理的初探[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 16(8):1204-1205.
- [5] 程玉根, 梁启忠, 掌友湖. 献血者血液筛查中 ALT 与 HBV、HCV 的相关性研究[J]. 临床输血与检验, 2014, 35(1):64-65.
- [6] 陈泽惠, 陈嘉昌, 丁渭, 等. 血源性乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和艾滋病毒核酸筛查系统的建立与应用[J]. 现

代生物医学进展, 2014, 24(2): 347-352.

- [7] 王甜, 秦波. HBV ccc DNA 的检测方法及研究进展[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2014, 1(1): 124-126.
- [8] 王卓妍, 陈立, 任芙蓉, 等. 实施核酸检测后献血者乙型肝炎病毒筛查策略的探讨[J]. 中国输血杂志, 2014, 24(2): 131-135.

- [9] 胡建勇, 吴枚, 李鑫. 不同核酸提取方法用于 HBV DNA 定量检测的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 11(17): 2387-2388.
- [10] 张永昌, 欧山海, 谢金镇, 等. 核酸检测技术在血液检测中的应用[J]. 临床输血与检验, 2014, 27(4): 399-400.

(收稿日期: 2016-01-28 修回日期: 2016-03-18)

• 临床研究 •

前列腺癌患者血清胱抑素 C 水平的实验室评价

王 晶, 王欢欢, 张绍城[△]

(四川省绵阳市中心医院检验科 621000)

摘要:目的 评价前列腺癌患者血清 CysC 水平。方法 选择前列腺癌患者 32 例前列腺良性疾病患者 62 例, 以及健康男性体检者 50 例作为对照研究对象, 检测受试者胱抑素 C(CysC)、前列腺特异性抗原(PSA)水平。结果 前列腺癌组血清 CysC 水平明显高于前列腺良性疾病组及对照组, 差异有统计学意义($t=4.322, P=0.0001; t=5.098, P=0.0001$); 而前列腺良性疾病组与对照组血清 CysC 水平比较, 差异无统计学意义($t=1.877, P=0.0632$)。不同年龄前列腺癌患者血清 CysC 水平间差异无统计学意义($P>0.05$)。前列腺癌患者血清 CysC 阳性率明显高于血清 PSA 阳性率, 差异有统计学意义($\chi^2=3.91, P<0.05$)。结论 血清 CysC 在前列腺癌患者中的检出阳性率明显高于血清 PSA 检出阳性率, 有望取代血清 PSA 作为临床灵敏度和特异度更高的前列腺癌早期筛查和诊治新标志物。

关键词:前列腺癌; 前列腺特异性抗原; 胱抑素 C

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.12.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)12-1697-02

前列腺癌是男性常见肿瘤之一, 占全球新发男性肿瘤的 14%, 其发病率和病死率分别位列男性肿瘤的第二位和第六位^[1-2]。中国前列腺癌高发于 60 岁以上男性, 且发病率和病死率逐年升高, 全球死于前列腺癌的患者有 5% 居住在中国^[3-4]。提高前列腺癌患者生存率的关键在于早期诊断, 因此, 研究特异度、灵敏度均较高的前列腺癌早期筛查标志物和治疗靶标已成为该领域的热点^[1]。胱抑素 C(CysC) 是一种由有核细胞生成的非糖基化低相对分子质量(13×10^3)碱性蛋白质^[5-6], 分泌及排泄不受性别、年龄、饮食和肌肉多少的限制^[7]。相关研究显示 CysC 在肿瘤中表达异常^[5, 8], 但其机制尚不完全清楚。本研究主要探讨了血清 CysC 水平与前列腺癌的关系, 以期为前列腺癌筛查及防治工作提供新的理论基础和研究方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 7 月至 2015 年 6 月本院就诊并最终确诊为前列腺癌患者 32 例纳入前列腺癌组, 年龄 (74.78 ± 1.26) 岁, 根据前列腺癌患者年龄, 将其分为 3 个不同年龄组: A 组 6 例, 小于或等于 70 岁; B 组 16 例, 70 ~ < 80 岁; C 组 10 例, 大于或等于 80 岁。前列腺良性疾病组 62 例, 年龄 (74.29 ± 0.83) 岁。健康男性体检者 50 例纳入对照组, 年龄 (73.82 ± 0.71) 岁。前列腺癌组、前列腺良性疾病组、对照组年龄比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 具有可比性。

1.2 标本来源 采用 VACUTEINER 真空采血管(黄色管, 肝素抗凝, 不含防腐剂, 美国 BD 公司)抽取受试者静脉血液标本 3.0 mL, 颠倒混匀(往返 5 次), 稍作静置(20 min 内), 以 4 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 2 h 内完成检测。

1.3 仪器与试剂 血清 CysC 水平用 HITACHI LST-008 全自动生化分析仪(HITACHI, 日本)测定, 血清前列腺特异性抗原(PSA)水平用 ARCHITECT-i2000SR 全自动化学发光免疫分析仪测定(Abbott, 美国), 试剂分别为两种仪器配套试剂。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism5 及 SPSS19.0 统计软件, 所有数据统计分析前均进行正态性检验, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验, 计数资料以例数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 受检者血清 CysC 水平 前列腺癌组、前列腺良性疾病组、对照组血清 CysC 水平分别为 (1.432 0 ± 0.137 40)、(0.947 7 ± 0.038 49)、(0.862 0 ± 0.017 54) mg/L。前列腺癌组血清 CysC 水平明显高于前列腺良性疾病组及对照组, 差异有统计学意义 ($t=4.322, P=0.0001; t=5.098, P=0.0001$); 而前列腺良性疾病组与对照组血清 CysC 水平比较, 差异无统计学意义 ($t=1.877, P=0.0632$)。

2.2 不同年龄前列腺癌患者血清 CysC 水平 A、B、C 3 个不同年龄组前列腺癌患者血清 CysC 水平分别为: (1.602 ± 0.317 6)、(1.403 ± 0.219 0)、(1.375 ± 0.210 1) mg/L。A 组前列腺癌患者血清 CysC 水平分别与 B、C 组比较, 差异无统计学意义 ($t=0.486 5, P=0.631 9; t=0.620 8, P=0.544 7$); 且 B、C 组前列腺癌患者血清 CysC 水平比较, 差异无统计学意义 ($t=0.086 86, P=0.931 5$)。见表 1。

表 1 不同年龄前列腺癌患者血清 CysC 水平 (mg/L)

组别	n	CysC
A 组	6	1.602 ± 0.317 6
B 组	16	1.403 ± 0.219 0
C 组	10	1.375 ± 0.210 1

2.3 前列腺癌患者血清 CysC 与 PSA 水平 32 例前列腺癌患者有 26 例在同一时间段检查过血清 CysC 水平和血清 PSA

[△] 通讯作者, E-mail: zinssercheung@163.com.