

• 论 著 •

3 种不同方法检测乙型肝炎病毒的诊断性能比较

陈建霞, 许瑞环, 黄衍锋, 张 旭

(深圳市龙岗中心医院检验科, 广东深圳 518116)

摘 要:目的 比较酶联免疫法(ELISA)、电化学发光法(ECLIA)及聚合酶链式反应法(PCR)检测乙型肝炎病毒(HBV)对临床诊断的对比分析。方法 应用 ELISA、ECLIA 及 PCR 法同时检测 200 例 HBV 患者或 HBV 携带者血清标本的 HBV 病毒, 比较不同方法 HBV 病毒检出率差异。结果 ELISA 对 HBV 病毒有 5 份漏检, 而 PCR、ECLIA 没有。PCR、ECLIA 和 ELISA 方法对 HBV 的检测方法与临床符合率分别为 99.5%、100.0% 及 93.5%。HBV-DNA 的检测方法与 ECLIA 法检测 HBV 病毒一致性较好。结论 ELISA 分别与 ECLIA 及 PCR 检测 HBV 病毒的检出率有显著性差异, ELISA 比较适合初筛, ECLIA 相对准确性更好一些, 而 PCR 检测 HBV-DNA 用于判断体内 HBV 病毒复制与否。

关键词:乙型肝炎病毒; 酶联免疫法; 电化学发光法; 聚合酶链式反应法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.10.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)10-1360-02

The comparison of there different methods to detect HBV virus of diagnostic performance

Chen Jianxia, Xu Ruihuan, Huang Yanfeng, Zhang Xu

(Department of Clinical Laboratory, Longgang Central Hospital of Shenzhen, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

Abstract: Objective To compare of ELISA, ECLIA and PCR in the detection of HBV virus for clinic diagnosis of HBV patients. **Methods** The serum sample of 200 HBV patients or HBV carriers were tested with ELISA, ECLIA and PCR. The different HBV detection rate between the three methods were compared. **Results** Five of 200 samples were lost with ELISA method, but in ECLIA and PCR there were no lost samples. Coincidence rate of HBV detection of ELISA, ECLIA and PCR were 99.5%, 100.0% and 93.5% respectively. The results of HBV with ECLIA were consistent with HBV-DNA with PCR method. **Conclusion** There is obvious difference between ELISA, ECLIA and PCR in relevance rate of HBV detection, ELISA is suitable to preliminary screening, and ECLIA has better accuracy and PCR is suitable to decide whether HBV virus replication happened in the body.

Key words: hepatitis B virus; ELISA; ECLIA; PCR

随着免疫学和分子生物技术的迅速发展,检测乙型肝炎病毒(HBV)标志物的方法不断更新^[1]。目前常用的免疫学方法主要有酶联免疫吸附法(ELISA),固相放射免疫法、胶体金免疫层析法、时间分辨免疫荧光法、微粒子酶免疫分析法、化学发光法及电化学发光法(ECLIA)等^[2],分子生物学方法有聚合酶链式反应法(PCR)。放射免疫分析虽然具有高灵敏度的优点,但其不可避免的放射性对操作者的身体是有害的。胶体金法是一种优化的方法,其优点是速度快,10 min 即可判读结果,但其同样只能做定性检测,且准确率低于 ELISA,对于弱阳性的表现度较差,容易造成弱阳性标本的漏读和误读,性价比与准确度方面都略逊于传统的 ELISA^[3]。时间分辨免疫荧光法、微粒子酶免疫分析法、化学发光法及 ECLIA 是目前定量检测 HBV 标记物的较好方法^[4]。这些方法具有很多优越性,如灵敏度和特异性都比定性方法学高,标本可以独立检测,大大缩短了等候报告的时间等;另外定量方法可以克服 ELISA 定性对含量太高造成假阴性的误判,也避免了 ELISA 定性分析时弱阳性标本的漏检^[5]。HBV 病毒核酸(HBV-DNA)水平是直接反映 HBV 患者病毒复制水平,病毒血症程度,传染性强的最佳指标,目前临床上常采用荧光定量 PCR 可直接检测血清中 HBV-DNA 的载量。由于 ELISA、ECLIA 及 PCR 方法在临床检测中应用的比较多,本文旨在研究三者之间的关系,为对乙型肝炎的诊断与治疗提供更准确、更有价值的信息。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机留取本院 HBV 患者或 HBV 携带者血清样本 200 例,其中男 135 例,女 65 例,平均年龄 47 岁。入选

标准:HBsAg 阳性持续 6 个月以上;ALT<2×ULN 持续 6 个月以上,未使用任何保肝降酶药;HBeAg(+/-),HBV-DNA>10² copies/mL;既往未接受任何抗病毒治疗包括干扰素和核苷(酸)类似物,排除其他类型肝炎的感染。按照 HBV-DNA 含量高低分 3 组。A 组为 HBV-DNA 含量小于 10³ copies/mL;B 组为 HBV-DNA 含量 10³~<10⁵ copies/mL;C 组为 HBV-DNA 含量 10⁵~10⁸ copies/mL;每组份 HBV 血清标志物的测定采用同一份标本。

1.2 主要仪器与试剂 全自动发光仪(美国罗氏公司生产的 E170 型)、实时荧光 PCR 分析仪(美国 ABI 公司生产 7300 型)、酶标仪(上海安图公司生产 PHOM 型)和洗板机(深圳汇松洗板机 PW-960)。PCR 法试剂由深圳市匹基生物科技有限公司提供;HBV 血清学标志物发光试剂是美国罗氏公司配套试剂,ELISA 法试剂由上海科华公司提供。

1.3 检测方法

1.3.1 标本采集 空腹抽取静脉血 3 mL,避免溶血和脂血。静置 30 min,2 000 r/min 离心 5 min,离心后分离血清,-80℃保存直至检测。

1.3.2 HBV 血清标志物检测 分别采用 ECLIA 法和 ELISA 法,ECLIA 法由美国罗氏公司提供全自动免疫分析仪和配套试剂。ELISA 法由上海科华公司提供试剂。每天质量控制均符合要求,操作与判断结果严格按照说明书要求进行。

1.3.3 HBV-DNA 检测 采用实时荧光定量 PCR 仪(循环程序设置:50℃,2 min,1 个循环;94℃,5 min,1 个循环;94℃,15 s,57℃,15 s,45 个循环;25℃,10 s,1 个循环。荧光信号

收集在 57℃。HBV-DNA 定量结果由仪器软件自动分析计算,HBV-DNA>10³ copies/mL 时血清为阳性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件分析,HBV-DNA copies 数采用求对数平均值的方法计算,并运用 χ^2 检验和 Fisher 精确检验比较检测结果, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法检出率的频数分布 研究结果显示,ECLIA 检测的 HBsAg 阳性检出率与 ELISA 检测的阳性率比较差异具有统计学意义($P<0.05$),其他组间 ELISA 组与 PCR 组($\chi^2=2.065, P=0.091$)或 ECLIA 组与 PCR 组($\chi^2=2.008, P=0.157$)其检出率差异没有统计学意义($P>0.05$)。对于阴性检出率 ELISA 组与 ECLIA 或 PCR 比较($\chi^2=6.231, P=0.013$),差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 3 种方法检测 HBV 标志物检出率的频数分布

组别	阳性标本($n=132$)	阴性标本($n=68$)
ELISA	94.7(125/132)	91.2(62/68)
ECLIA	100.0(132/132)	100.0(68/68)
PCR	98.5(130/132)	100.0(68/68)

2.2 3 种方法检测 HBV 标志物定量结果比较总体上组内差异情况 研究结果显示,ECLIA 检测的 HBsAg 或 PCR 法检测的 HBV-DNA 在 A 和 C 组内存在统计学差异($P<0.05$),其他组之间无统计学差异($P>0.05$)。在 ELISA 组的检出率中 C 组与 A 和 B 组差异具有统计学意义($P<0.05$),A 和 B 组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 3 种方法检测 HBV 标志物分组结果定量结果比较

组别	n	PCR(拷贝数 对数平均值 copies)	ECLIA (col)	ELISA 检出率(%)
A	68	<3	289.7±101.6	91.2(62/68)
B	79	4.36±0.97	244.4±83.7	91.1(72/79)
C	53	6.85±0.81	201.5±71.3	100(53/53)

2.3 ELISA,ECLIA 和 PCR 检测 HBV 标志物检出率比较 3 种方法对 HBV 标志物检出率两两之间进行比较,方法采用 Fisher 精确检验,结果显示 ELISA 法检出率(93.5%)与 ECLIA 法(100.0%)和 PCR 法(100.0%)检出率差异具有统计学意义($P<0.05$),ECLIA 法与 PCR 法检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

本试验结果显示 PCR 和 ECLIA 检测的 HBV 结果比 ELISA 对临床诊断的符合率较高,但是每种方法对 HBV 的检测又各有差异。

ELISA 仍是目前大多数临床实验室定性检测 HBV 血清标志物的常规方法。该方法具有灵敏度高、特异度强、重复性好的特点,且操作简单、试剂价廉、无放射性危害等多年来广泛应用于临床^[6-7]。然而,ELISA 不能进行定量分析,在阳性判断值周围一定范围之外的测定结果为测定的灰区,易引起假阴性。本试验结果表明,5 例 ELISA 检测阴性的标本 ECLIA 检测或 PCR 检测为阳性,分析其原因可能为溶血、脂血、黄疸钩状效应引起的^[8]。虽然 ELISA 方法优缺点分明,但从临床角度,尚不可能用 ECLIA 或时间分辨荧光分析法来取代传统的

ELISA,其原因主要在于价格上的巨大差异。而且,绝大多数受试者只需 ELISA 即可,而且 ELISA 中 S/CO 值实际上有一定半定量意义。

ECLIA 是一种高灵敏度的分析技术,是继放射免疫、荧光免疫、酶免疫、化学发光免疫和时间分辨免疫技术测定之后新一代标记技术。近年来,ECLIA 以其自动、快速、特异性强、灵敏度高等优点展现出良好的应用前景^[9]。本试验结果显示 ECLIA 的检测阳性率和符合率均高于 ELISA 检测方法。有研究结果显示 ECLIA 的灵敏度为 0.05 ng/mL,大大高于 ELISA 测定灵敏度的 1.00 ng/mL^[10]。从方法学和自动化程度上来讲,ECLIA 优于 ELISA,但成本高,且未能国产化,从而影响到其推广应用。ECLIA 和 ELISA 不能定量判断病毒载量情况,PCR 方法在此方面要优于以上方法。PCR 技术能够大大增加 HBV-DNA 检测的敏感范围,达到 5~10 pg/mL^[11]。而且 PCR 检测 HBV-DNA 可以判断体内 HBV 是否存在复制、复制程度、HBV 是否被清除等,特别是检测隐性 HBV 方面尤为突出,为临床观察药物疗效、病情转归等提供了有力的证据^[12]。

参考文献

[1] Merrill RM, Hunter BD. Seroprevalence of markers for hepatitis B viral infection[J]. Int J Infect Dis, 2011, 15(2): e78-121.

[2] Rehermann B, Naoumov NV. Immunological techniques in viral hepatitis[J]. J Hepatol, 2007, 46(3): 508-520.

[3] de la Escosura-Muiz A, Maltez-da Costa M, Sánchez-Espinel C, et al. Gold nanoparticle-based electrochemical magnetoimmunosensor for rapid detection of anti-hepatitis B virus antibodies in human serum[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 26(4): 1710-1714.

[4] 冯丽珍, 石安平, 韩宏枫. 三种检测方法对 HBV 血清标志物的检测比较与质控分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1132-1133.

[5] 郭辉. 化学发光免疫分析法与酶联免疫法测定乙肝病毒标志物的相关性分析[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(5): 270-272.

[6] 梁玉全, 周远青, 梁瑞莲, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV M 定性与 HBsAg 及 HBV-DNA 定量检测的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(13): 1944-1945.

[7] Wang NY, Zhang D, Zhao W, et al. Hepatitis B virus large surface protein in serum as a candidate biomarker for evaluating hepatitis B virus infection[J]. Clin Biochem, 2011, 44(14/15): 1199-1204.

[8] 王宇明, 周吉军, 程林. 乙型肝炎病毒血清学标志物定量检测方法比较及其应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(11): 812-814.

[9] Dai X, Hilsen RE, Hu WG, et al. Microbead electrochemiluminescence immunoassay for detection and identification of Venezuelan equine encephalitis virus[J]. J Virol Methods, 2010, 169(2): 274-281.

[10] 赵秀英, 陈俊梅, 王文静, 等. 电化学发光法和 ELISA 法检测 HBV 表面抗体结果的比较与分析[J]. 北京医学, 2011, 33(6): 461-463.

[11] Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH. Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the polymerase chain reaction technique[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(9): 1930-1933.

[12] 叶艳红. 不同检验方法对慢性肝病的检验结果比较[J]. 中国伤残医学, 2013, 21(8): 300-301.