

• 医学检验 •

PCR 荧光探针技术在乙肝患者 HBV-DNA 中的应用

周珍香 陈丽娟

龙岩市新罗区龙岩人民医院检验科 福建龙岩 3640000

【摘要】目的 探究 PCR 荧光探针技术在检测乙肝患者 HBV-DNA 中的临床应用。**方法** 运用 PCR 荧光探针技术定量检测 HBV-DNA。**结果** 289 例疑似乙型肝炎样本中有 103 例 HBsAg、HBeAg 和抗-HBc 样本中, FQ-PCR 检测发现均为 HBV-DNA 阳性, 100% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $2.9 \times 10^6 \text{ copy/mL}$; 在 46 例 HBsAg、抗-HBe 和抗-HBc 阳性样本中, FQ-PCR 检测发现有 35 例 HBV-DNA 阳性, 76.1% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $1.7 \times 10^5 \text{ copy/mL}$; 在 37 例 HBsAg 和抗-HBe 阳性样本中, FQ-PCR 检测出 35 例 HBV-DNA 阳性, 94.6% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $4.4 \times 10^5 \text{ copy/mL}$; 在 15 例 HBsAg 和 HBeAg 阳性标本中, FQ-PCR 检测出 15 例 HBV-DNA 阳性, 阳性率为 100%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $6.2 \times 10^7 \text{ copy/mL}$; 在 36 例抗-HBs 阳性样本中, FQ-PCR 检测出 2 例 HBV-DNA 阳性样本, 阳性率为 5.6%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.2 \times 10^3 \text{ copy/mL}$; 在 52 例乙肝两对半全阴的样本中, FQ-PCR 检测出 HBV-DNA 阳性 1 例样本, 阳性率为 1.9%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.3 \times 10^2 \text{ copy/mL}$ 。**结论** PCR 荧光探针技术能及时的检测出乙肝病毒在人体内感染复制情况, 是诊断乙肝病毒感染情况的有利手段。

【关键词】 乙型肝炎; PCR 荧光探针; 病毒**【中图分类号】** R512.62**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1009-3179 (2019) 01-154-02

乙型肝炎是一类常见的感染性疾病, 主要由乙肝病毒感染所致, 也是转化为肝硬化及肝癌的主要病因, 当前我国乙肝病毒的携带率约为 7.2%^[1]。HBV-DNA 是反映人体对乙肝病毒免疫反应状态的最主要指标, 但是准确掌握的难度比较大, 故需要进行专业的检测^[2]。PCR 已广泛应用于临床上检测 HBV-DNA, 其检测结果也已成为医护人员治疗乙型肝炎的重要参考指标^[3]。

1 材料与方法**1.1 材料来源**

实时荧光定量 PCR 仪来源于上海科华实验系统有限公司产品。HBV-DNA 荧光定量试剂盒为 35 人 / 份, 装有样本处理液 A 和 B, PCR 反应液 A、B 和 C, 标准品 $5 \times 10^7 \text{ copy/mL}$ 、 $5 \times 10^6 \text{ copy/mL}$ 和 $5 \times 10^5 \text{ copy/mL}$ 。

1.2 质量控制

每次实验均设有阳性、阴性、室内质控及标准梯度作为对照试验, 所有的操作均严格按照无污染措施实施。

1.3 方法

荧光探针实时检测定量 PCR 方法。从血清中提取 HBV-DNA 将其加入反应管, 放入扩增仪进行扩增, 反应结束后由电脑自动分析结果^[4]。

1.4 酶联免疫吸附试验法

对同一份血清的 HBV 血清标志物检测用 ELISA 法。

2 结果

2017 年 1 月至 2019 年 2 月我院收治的 289 例疑似乙型肝炎样本中有 103 例 HBsAg、HBeAg 和抗-HBc 样本中, FQ-PCR 检测发现均为 HBV-DNA 阳性, 100% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $2.9 \times 10^6 \text{ copy/mL}$; 在 46 例 HBsAg、抗-HBe 和抗-HBc 阳性样本中, FQ-PCR 检测发现有 35 例 HBV-DNA 阳性, 76.1% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $1.7 \times 10^5 \text{ copy/mL}$; 在 37 例 HBsAg 和抗-HBe 阳性样本中, FQ-PCR 检测出 35 例 HBV-DNA 阳性, 94.6% 的阳性率, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $4.4 \times 10^5 \text{ copy/mL}$; 在 15 例 HBsAg 和 HBeAg 阳性标本中, FQ-PCR 检测出 15 例 HBV-DNA 阳性, 阳性率为 100%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $6.2 \times 10^7 \text{ copy/mL}$; 在 36 例抗-HBs 阳性样本中, FQ-PCR 检测出 2 例 HBV-DNA 阳性样本, 阳性率为 5.6%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.2 \times 10^3 \text{ copy/mL}$; 在 52 例乙肝两对半全阴的样本中, FQ-PCR 检测出 HBV-DNA 阳性 1 例样本, 阳性率为 1.9%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.3 \times 10^2 \text{ copy/mL}$, 详见表 1。

表 1: 检测结果

组号	ELISA 检测阳性模式	n	FQ-PCR[n(%)]	定量平均 (copy/mL)	定量范围 (copy/mL)
1	HBsAg、HBeAg、抗-HBc	103	103(100)	2.9×10^6	$1.1 \times 10^4 - 2.0 \times 10^7$
2	HBsAg、抗-HBe、抗-HBc	46	35(76.1)	1.7×10^5	$(0-1.9) \times 10^5$
3	HBsAg 和抗-HBe	37	35(94.6)	4.4×10^5	$(0-5.8) \times 10^7$
4	HBsAg 和 HBeAg	15	15(100)	6.2×10^7	$3.1 \times 10^4 - 7.1 \times 10^7$
5	抗-HBs	36	2(5.6)	3.2×10^3	2.6×10^3
6	全阴	52	1(1.9)	3.3×10^2	5.9×10^2

3 讨论

PCR 荧光探针技术是当前临床上诊断乙肝的有效手段, 可为医护人员提供准确的诊断依据, 使医生更能准确的掌握患者的病情发展。PCR 荧光探针技术一般采用闭管方式进行扩增和检测, 克服了污染对实验结果的影响, 并且荧光探针一方面使得检测更具有特异性, 另一方面也对检测进行了定量,

而且本研究设计了阳性梯度, 使得定量范围极广^[5]。

本研究中检测结果显示, 在对 103 例大三阳患者中, 检测出 HBV-DNA 阳性 103 例, 检出率高达 100%, 而且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $2.9 \times 10^6 \text{ copy/mL}$, 表明此 103 例患者的乙肝病毒具有较高的复制水平, 为高传染性患者。

对 46 例小三阳患者进行 PCR 荧光探针检测发现, 有 35

例 HBV-DNA 阳性, 阳性检测率为 76.1%, 小于大三阳检测了, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $1.7 \times 10^5 \text{copy/mL}$, 实验结果表明, 小三阳患者的拷贝数已小于大三阳患者, 但拷贝数仍较高, 表明小三阳患者亦有较高的传染性, 而抗-HBe 存在于患者体内, 但病毒并未复制。

在对 37 例 HBsAg 和抗-HBe 阳性样本进行检测时发现, PCR 检测出 35 例阳性样本, 检出率高达 94.6%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $4.4 \times 10^5 \text{copy/mL}$, 该结果显示此组患者仍具有较强的病毒复制能力, 具有较强的传染性。在 15 例 HBsAg 和 HBeAg 阳性标本中, FQ-PCR 检测出 15 例 HBV-DNA 阳性, 阳性率为 100%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $6.2 \times 10^7 \text{copy/mL}$, 实验结果表明, 该 15 例患者样本具有最高的拷贝数, 传染性亦较大三阳高。

在 36 例抗-HBs 阳性样本中, FQ-PCR 检测出 2 例 HBV-DNA 阳性样本, 阳性率为 5.6%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.2 \times 10^3 \text{copy/mL}$ 。该研究表明了, 抗-HBs 阳性患者其体内的乙肝病毒并未完全停止复制, 有研究提出^[6-7], 可能是由于 HBV-DNA 在前 C 区进行突变, 出现了免疫逃逸, 也有可能是由于乙肝病毒的不同亚型出现重叠感染导致的。

在 52 例乙肝两对半全阴的样本中, FQ-PCR 检测出 HBV-DNA 阳性 1 例样本, 阳性率为 1.9%, 且 HBV-DNA 的平均拷贝数为 $3.3 \times 10^2 \text{copy/mL}$, 国内外亦有研究报道^[8], HBV-DNA 的出现较其他血清标志物早, 故本实验检测出的 1 例阳性样本可能是处于早期感染。乙肝两对半标志物全阴性的患者不能排除 HBV 感染。因此 PCR 的高灵敏度可作为早期诊断 HBV 感染提供依据。

总之, PCR 荧光探针在对 HBV-DNA 检测中间有灵敏度

高、特异性强等优点, 相对于传统的检测方法而言, PCR 荧光探针能对病毒的感染、复制进行检测, 能较为准确的诊断 HBV, 是诊断乙肝病毒感染情况的有利手段, 并具有快速、灵敏及特异性等优点, 在临床上诊断治疗乙型肝炎具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 李艳梅, 江忠勇, 李志强. 实时荧光定量 PCR/HBV-DNA 检测系统性能验证方法的探讨[J]. 西南国防医药, 2018, 28(12):1177-1179.
- [2] 王雪峰, 周明莉, 杨慧, 等. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 与化学发光酶免疫法检测乙肝五项相关性[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(34):58-60.
- [3] 杨晓艳, 伊心浩. 253 例 HBsAg 阳性患者 HBV-M、HBV-DNA 和肝功能的观察分析[J]. 心理医生, 2019, 25(2):160-161.
- [4] 郭俊勇, 张小莲, 江光荣, 等. 普通 PCR 技术和高灵敏 HBV-DNA 技术检测乙肝病毒 DNA 的研究[J]. 当代医学, 2018, 24(20):53-55.
- [5] 向芳菲. 巢式聚合酶链反应检测血清中 HBV-DNA 对治疗乙肝的临床意义[J]. 心电图杂志(电子版), 2018, 7(4):62-63.
- [6] 李元珍, 吴三明. 乙肝患者 HBV-DNA 结果分析[J]. 中国保健营养, 2018, 28(25):273.
- [7] 王娇, 钱军, 石英, 等. Mx3000pTM 实时荧光定量 PCR 仪 HBV-DNA 检测系统的性能验证[J]. 中国医药导报, 2018, 15(15):65-68.
- [8] 郭燕姝, 许海涛, 吴西丽. HBsAg 与尿液中 HBV-DNA 的相关性及联合检测对 HBV-GN 患者诊断效果的研究[J]. 检验医学与临床, 2018, 15(22):3394-3397, 3400.

(上接第 152 页)

控制考核的同时还应不断加强对检验技术的考核监督, 从而全面实现质量控制的要求。

4 结语

临床医学检验质量控制是检验部门的一项重要工作内容, 质量控制的提升对于提高检验结果的准确性以及后续治疗的针对性意义重大, 为此在日常检验工作中应不断强化医学检验质量控制意识, 加强检验人员和临床医师的沟通、检验质量控制机制的执行力度以及检验质量控制的考核力度。

参考文献:

- [1] 操金全. 试论临床检验质量控制的影响因素及对策[J]. 中国继续医学教育, 2015, 7(19):29-30.
- [2] 李廷廷. 临床医学检验环节的质量控制分析[J]. 深圳

中西医结合杂志, 2015, 25(5):180-181.

- [3] 李悦琳. 药物对临床医学检验结果的影响分析[J]. 现代养生, 2016(2):57-57.
- [4] 王翠兰, 黄玉双. 临床医学检验中质量控制提高的影响因素及措施[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(2):116-116.
- [5] 罗彩燕. 临床医学检验质量控制的影响因素探讨及应对措施[J]. 当代医学, 2016, 22(30):94-94.
- [6] 冯铁成. 临床医学检验质量控制措施的分析[J]. 世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊, 2015, 15(82):122-123.
- [4] 梅雪飞. 临床医护人员微生物标本采集存在问题分析及对策[J]. 护理学报, 2010, 17(8):27-28.
- [5] 龚丽娟. 血糖仪在指血糖检测中存在的问题及相关因素分析[J]. 河北医药, 2012, 32(9):167-168.

(上接第 153 页)

高前列腺癌的检出率^[4]。在本文的研究之中, 三组患者经过检测之后, 前列腺癌组患者的血清 tPSA、cPSA 浓度以及 cPSA/tPSA 值均要高于前列腺正常组患者以及前列腺增生组患者, $P < 0.05$ 。同时, 前列腺增生组患者的血清 tPSA、cPSA 浓度明显要高于前列腺正常组患者, $P < 0.05$ 。

综上所述, 在前列腺腺恶性肿瘤诊断中应用血清前列腺特异性抗原检测, 可准确判断前列腺肿瘤疾病; 而且在检测血清前列腺特异性抗原的同时检测复合前列腺特异性抗原, 对前列腺良性肿瘤的鉴别和诊断有着良好的效果。

参考文献:

- [1] 王伟, 李传刚, 刘辉, 杨玻. 前列腺特异性抗原对前列腺癌诊断价值的探讨[J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(1):61-65, 69.

[2] Xie, S.W., Li, H.L., Du, J. et al. Influence of serum prostate-specific antigen(PSA) level, prostate volume, and PSA density on prostate cancer detection with contrast-enhanced sonography using contrast-tuned imaging technology[J]. Journal of Ultrasound in Medicine: Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine, 2013, 32(5):741-748.

- [3] 叶鹏, 郑莉, 魏东, 等. 血清前列腺特异性抗原在多囊卵巢综合征患者中的水平变化及其诊断价值[J]. 山东医药, 2017, 57(13):52-54.
- [4] Santotoribio, J.D., Canavate-Solano, C., Garcia-DeLaTorre, A. et al. Serum lactate dehydrogenase in combination with free-to-total serum prostate specific antigen ratio for diagnosis of prostate cancer[J]. Clinical laboratory, 2014, 60(6):1055-1058.