

TRFIA、FQ-PCR 方法联合检测乙肝标志物的应用探讨

赵东岩, 陈 弟, 刘春林

(云南省第二人民医院检验科, 云南 昆明 650000)

[摘要] **目的** 探讨检测乙肝标志物联合使用时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 和荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 方法的应用价值. **方法** 2008 年 1 月至 2014 年 5 月云南省第二人民医院检验科对门诊疑似乙肝患者 2 476 例, 分别行 TRFIA 检测其血清学标志物 HBV (HBV-M) 和行 FQ-PCR 方法检测其 HBV-DNA 含量, 并对 2 种方法的阳性检出率进行比较. **结果** 2 476 例受检者中, FQ-PCR 检测其 HBV-DNA 阳性 1 656 份, 总阳性率为 66.9%, 其中 TRFIA 法 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性 861 份, 使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 816 份, 占 94.8%; TRFIA 法 HBsAg、HBeAb、HBcAb 均阳性 1 023 例, 使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 674 份, 占 65.9%; HBsAg、HBeAg 均阳性 27 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 26 份, 占 96.3%; HBsAg、HBcAb 均阳性 148 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 117 份, 占 79.1%; HBsAb、HBeAb 均阳性 55 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 3.64%; HBsAb、HBeAb、HBcAb 均阳性 123 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 11 份, 占 8.94%; HBeAb 阳性 22 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 9.09%; HBeAb、HBcAb 均阳性 43 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 3 份, 占 6.98%; HBcAb 阳性 37 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 5.41%; HBsAb 阳性 89 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 2.22%; 均阴性 48 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1 份, 占 2.08%. **结论** TRFIA 法用来排查机体有无感染乙肝病毒, 对于乙肝传染性强弱仅能做一个初步的估计指标, 不能准确检测出血清 HBV-DNA 低滴度者, 故靠 TRFIA 法诊断和判断病情是不够的; FQ-PCR 法检查乙肝患者体内的乙肝病毒数量、复制指标, 能够能为精确的判断出乙肝病毒在体内的复制、传染强弱情况, 是对 TRFIA 法不足的补充. 而 FQ-PCR 法在检测时也容易受到一些人为或非人为因素的影响. 二者联合检测可提高其准确性, 有利于病情的判断和诊治.

[关键词] TRFIA 法; FQ-PCR 法; 乙肝标志物

[中图分类号] R512.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0057-04

Application of Combination of TRFIA and FQ - PCR in Detection of HBV Markers

ZHAO Dong - yan, CHEN Di, LIU Chun - lin

(Dept. of Clinical Laboratory, The Second People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the application of combination of time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) and fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ - PCR) method in detection of HBV markers. **Methods** From January 2008 to May 2014 in Yunnan province, 2476 cases of patients with suspected chronic hepatitis B in the Second People's Hospital of Yunnan Province were selected in this study. TRFIA was used to determine the HBV serological markers (HBV -m) and line FQ - PCR method was used to detect the HBV-DNA content, then the positive detection rates of the two methods were compared. **Results** In 2476 cases, positive HBV

[基金项目] 云南省基础研究计划重点资助项目 (2008CC002)

[作者简介] 赵东岩 (1971~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 主管检验师, 主要从事检验临床工作.

[通讯作者] 陈弟. E-mail:13987186869@139.com

DNA detected with FQ - PcR was found in 1656, the total positive rate was 66.9%, positive HBsAg, HBeAg and HBcAb detected with TRFIA was found in 861, positive HBV DNA detected with FQ - PcR was found in 816, accounting for 94.8%; Positive HBsAg, HBeAb HBcAb detected with TRFIA was found in 1023 cases, positive HBV DNA detected with FQ - PcR was found in 674, accounting for 65.9%; Positive both HBsAg and HBeAg was found in 27, positive HBV DNA detected with FQ - PcR was found in 26 (96.3%) . Positive HBsAg and HBcAb was found in 148, positive HBV DNA detected with FQ - PcR was found in 117, accounting for 79.1%. Positive both HBsAb and HBeAb was found in 55, positive HBV DNA detected with FQ - PcR was found in 2 (3.64%) . HBsAb, HBeAb HBcAb were positive in 123, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 11, 8.94%; HBeAb was positive 22, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 2, 9.09%; HBeAb HBcAb were positive in 43, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 3, accounting for 6.98%; HBcAb was positive in 37, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 2 (5.41%); HBsAb was positive in 89, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 2 (2.22%); All negative was found in 48, HBV - DNA was positive by FQ - PcR in 1, accounting for 2.08%. **Conclusions** TRFIA method can only give a preliminary estimation in screening hepatitis B virus (HBV) infection, cannot accurately detect the low serum HBV - DNA titer, so TRFIA is not enough for diagnosis of HBV infection. FQ - PCR method can accurately judge the replication of the hepatitis b virus in the body, infectious strength, is a complement to TRFIA method. While FQ - PPCR method in detection is easily affected by some artificial or non-artificial factors. Therefore, combining the two detection methods can improve the accuracy, is advantageous to diagnosis and judgment of HBV infection.

[Key words] TRFIA method; FQ-PCR method; Hepatitis B markers

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染人体后将引起传染性肝炎 - 病毒性乙型肝炎, 病毒性乙型肝炎是一个全球性的公共卫生问题. 据世界卫生组织 (WHO) 统计, 病毒性乙型肝炎患者逐年增多, 全球已达 20 亿, 其中约 4 亿人为慢性 HBV 携带者^[1]. 我国属于 HBV 感染的高发区, 据统计我国有 1 亿左右病毒乙型肝炎携带者, 其中慢性乙肝病毒携带者约 3 000 万, 导致每年死于病毒性乙型肝炎及其并发症的患者高达数十万人^[2]. 目前, 临床常用时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 定量检测 HBV-M, 光聚合酶链反应 (FQ-PCR) 检测 HBV-DNA 的含量, 2008 年 1 月至 2014 年 5 月, 云南省第二人民医院检验科对 2 476 例疑似乙肝患者同时使用 TRFIA 及 FQ-PcR 方法联合检测乙肝标志物, 探讨使用 TRFIA 及 FQ-PcR 2 种方法联合检测 HBV 的临床意义, 现报告如下.

1 资料与方法

1.1 一般资料

2008 年 1 月至 2014 年 5 月, 云南省第二人民医院门诊和住院的疑似乙肝患者 2 476 例同时使用 TRFIA 及 FQ-PcR 方法联合检测乙肝标志物, 其中男 1 423 例, 女 1 053 例, 年龄 8 ~ 82 岁.

1.2 方法

1.2.1 TRFIA 法 定量检测患者的 HBsAg、抗

-HBs、HBeAg、抗 -HBe、抗 -HBc, 采用 Anytest 2000 时间分辨荧光检测仪及配套试剂. 阳性标准为: (1) HBsAg > 0.2 ng/mL; (2) 抗 -HBs > 10 mIU/mL; (3) HBeAg > 0.5 NCU/mL; (4) 抗 -HBe > 0.2 NCU/mL; (5) 抗 -HBc > 0.9 NCU/mL.

1.2.2 FQ-PCR 法 检测患者的 HBV-DNA 含量, 仪器为 DA7600 荧光 PCR 检测仪, 采用配套试剂, 根据说明书将阳性定量质控标准品进行稀释和处理. 阳性标准为: 大于 1×10^2 IU/mL^[3].

1.3 统计学方法

采取 PEMS 统计学软件处理, 计数资料用百分比表示, 计量资料进行 *t* 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

在 2 476 份血清中使用 TRFIA 法检出 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性 (大三阳) 861 份, 占 34.8%, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 816 份, 占 94.8%; HBsAg、HBeAb、HBcAb 均阳性 (小三阳) 1 023 例, 占 41.3%, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 674 份, 占 65.9%; HBsAg、HBeAg 均阳性 27 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 26 份, 占 96.3%; HBsAg、HBcAb 均阳性 148 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 117

份, 占 79.1%; HBsAb、HBeAb 均阳性 55 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 3.64%; HBsAb、HBeAb、HBcAb 均阳性 123 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 11 份, 占 8.94%; HBeAb 阳性 22 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 9.09%; HBeAb、HBcAb 均阳性 43 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 3 份, 占 6.98%; HBcAb 阳性 37 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 5.41%; HBsAb 阳性 89 份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 2 份, 占 2.22%; 均阴性 48

份, 其中使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1 份, 占 2.08%。2476 份血清中, 使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1656 份, 占 66.9%; TRFIA 法检测 HBV-M 阳性者 (1~4 组) 2 059 份, 使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1 633 份, 占 79.3%; TRFIA 法检测 HBV-M 阴性者 (5~11 组) 417 份, 使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 23 份, 占 5.5%, 其中 I 组 HBV-DNA 阳性率与 II 组进行比较, I 组 HBV-DNA 阳性率高于 II 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 TRFIA 法与 FQ-PCR 法检验结果对比

Tab. 1 Test results comparison of TRFIA method and FQ-PCR method

TRFIA 法阳性组合分类	<i>n</i>	FQ-PCR 法阴性例数	FQ-PCR 法阳性例数	阳性率 (%)	95% CI
1、3、5	861	45	816	94.8	94.79 ~ 94.81
1、4、5	1 023	349	674	65.9	65.86 ~ 65.94
1、3	27	1	26	96.3	96.04 ~ 96.56
1、5	148	31	117	79.1	78.88 ~ 79.32
2	89	87	2	2.22	2.17 ~ 2.27
2、4	55	53	2	3.64	3.52 ~ 3.76
2、4、5	123	112	11	8.94	8.81 ~ 9.07
4	22	20	2	9.09	8.35 ~ 9.83
4、5	43	40	3	6.98	6.68 ~ 7.28
5	37	35	2	5.41	5.14 ~ 5.68
全阴	48	47	1	2.08	2.00 ~ 2.16
	2 476	820	1 656	66.9	66.88 ~ 66.92

注: 1 为 HBsAg, 2 为 HBsAb, 3 为 HBeAg, 4 为 HBeAb, 5 为 HBcAb。

3 讨论

乙肝病毒因具有嗜肝性、抵抗力强、致癌性、变异性等特征, 人体感染 HBV 后将患者的身体健康造成极大的危害, 同时也对患者的心里造成极大的伤害, 临床常用时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA) 定量检测 HBV-M, 光聚合酶链反应 (FQ-PCR) 检测 HBV-DNA 的含量, 根据其结果来判断患者是否有 HBV 感染、感染程度及治疗效果^[4]。

时间分辨荧光技术 (TRFIA 法) 是以稀土离子螯合物 (镧系元素铕 (Eu) 螯合物) 作为荧光标记物, 因其荧光寿命长, 可采用振荡反应并适当延长反应时间, 有利于消除非特异荧光的干扰, 增强荧光信号测量的特异性, 同时标记物 Eu³⁺ 有非常优良的可检测性, 使其测量的灵敏度和准确性大大提高^[5]。TRFIA 法反应出体内抗原、抗体的携带

模式, 检测机体在一定条件下的免疫情况, 同时可为乙肝病毒感染提供间接证据, 用来排查机体有无感染乙肝病毒, 对于乙肝传染性强弱仅能做一个初步的估计指标, 同时可以了解药物疗效大小, 为医生选药提供依据。TRFIA 法能检测出低水平复制的乙型肝炎病毒, 避免漏检, 可反映病情变化和治疗效果, 是一种理想的乙肝两对半定量检测方法, 同时对环境无污染, 方法较简便, 出报告时间较快, 值得临床推广应用。

光聚合酶链反应 (FQ-PCR 法) 是检测核酸水平的有效办法, 其原理在 PCR 基础上, 添加一条荧光探针, 且标记在荧光淬灭基团 (Q) 及荧光报告基团 (R) 两个基团。在聚合酶链反应中, 对检测所需的核苷酸片段进行扩增, Taq 酶切断探针, R 基团释放出荧光信号, 检测其荧光信号强弱, 以得到受检者体内的 HBV-DNA 含量^[6]。此法具有灵

敏度高、操作简便等优点,可对乙肝患者体内的 HBV-DNA 含量进行准确判断,并且该技术整个实验过程均在完全闭管的状态下进行,能准确定量及扩增,避免了污染,无假阳性,避免了强烈致癌物溴化乙锭对操作人员的危害,减少了污染环境,已经成为常规 PCR 的更新换代技术. HBV-DNA 检查,是用来检查乙肝患者体内的乙肝病毒数量、复制指标,能够能为精确的判断出乙肝病毒在体内的复制、传染强弱情况. HBV-DNA 检查,才是证实乙肝病毒存在的直接证据,是诊断的有力依据. HBV-DNA 检查是对乙肝两对半检查不足的补充.

本研究 2 476 份血清中,使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1 656 份,占 66.9%; TRFIA 法检测 HBV-M 阳性者(1~4 组) 2059 份,使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1633 份,占 79.3%,表明 HBV-DNA 与 HBeAg 呈正相关、病毒复制活跃、传染性强^[7,8]. 临床上常将 HBsAg、HBeAg、HBeAb 阳性称为“大三阳”,而将 HBsAg、HBeAb、HBeAb 阳性称为“小三阳”,HBsAg、HBeAg 阳性称为大二阳. 结果显示,大三阳组、大二阳组与小三阳组间差异有统计学意义,大三阳组 HBV-DNA 阳性率(94.8)、大二阳组 HBV-DNA 阳性率(96.3)显著高于“小三阳”HBV-DNA 阳性率(65.9). TRFIA 法检测 HBV-M 阴性者(5~11 组) 417 份,使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 23 份,占 5.5%,HBsAb 阳性是一种保护性抗体,提示患者感染过乙肝病毒,病程进入恢复期,无传染性,但本研究中 5、6、7 组 267 份,使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 15 份,平均阳性率 5.6%,说明化验 HBsAb 阳性,可能仍有部分患者存在 HBV-DNA 复制,其原因可能是患者自然感染 HBV 后,产生了免疫反应,但机体尚未能完全消除病毒,处于感染恢复早期,或可能是患者受到 HBV 亚型的双重感染. 乙肝两对半全阴性,既没有感染过乙肝病毒,体内又没有保护性抗体,属易感人群,易感染乙肝病毒,本实验 48 例,使用 FQ-PCR 法检测 HBV-DNA 的含量阳性 1 份,占 2.08%,其原因可能是患者感染了 HBV 后,处于

感染早期, TRFIA 方法还不能准确检测出血清 HBV-DNA 低滴度者,采用 FQ-PCR 方法可在一定程度上对其进行补充^[7].

综上所述,乙型肝炎病毒标志物含量受人体免疫功能以及变异等多因素的影响, TRFIA 法用来排查机体有无感染乙肝病毒,对于乙肝传染性强弱仅能做一个初步的估计指标,可反映病情变化和治疗效果,不能准确检测出血清 HBV-DNA 低滴度者,故靠 TRFIA 法诊断和判断病情是不够的; FQ-PCR 法检查乙肝患者体内的乙肝病毒数量、复制指标,能够能为精确的判断出乙肝病毒在体内的复制、传染强弱情况,是对对 TRFIA 法不足的补充. 而 FQ-PCR 法在检测时也容易受到一些人为或非人为因素的影响. 二者联合检测可提高其准确性,有利于病情的判断和诊治^[8].

[参考文献]

- [1] ZHOU L. SenIn1 metabolic profiling study of hepatocellular carcinoma infected with hepatitis B or hepatitis C virus by using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2012, 2(11): 5 433 - 5 442.
- [2] 梁晓峰,陈园生,王晓军,等. 中国 3 岁以上乙型肝炎血清流行病学研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(9): 655 - 658.
- [3] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性 [J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(3): 225 - 227.
- [4] 黄玉梅. 酶联免疫法检测乙肝二对半与 PCR 法检测 HBV DNA 的关系 [J]. *中国实验诊断学*, 2011, 15(6): 1 090.
- [5] 张菊萍,王珍柴. FQ-PCR、TRFIA 方法检测乙肝标志物的临床价值 [J]. *山东医药*, 2014, 54(5): 45 - 46.
- [6] 马洪熹,周淑贤,黄晓. FQ-PCR 和 TRFIA 联合检测乙肝标志物的应用探讨 [J]. *中外医学研究*, 2013, 11(24): 68 - 69.
- [7] 刘禄,杨娜,罗启翘,等. 296 例慢性乙型病毒性肝炎患者 HBV 标志物模式与 HBV-DNA 载量相关性研究 [J]. *中国医学创新*, 2012, 9(35): 116 - 117.
- [8] 郭楠,李宝萍,李慧萍,等. 反应体系对荧光定量 PCR 检测乙肝核酸结果影响的分析 [J]. *中国实验诊断学*, 2013, 17(5): 877 - 879.

(2014-06-29 收稿)