

# 实时荧光定量聚合酶链反应对乙型肝炎病毒 DNA 的检验效果

李书轻 刘丹 王亚 何俊美

作者单位: 274000 山东菏泽, 菏泽市第三人民医院检验科

通信作者: 李书轻, Email: 18353045787@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.02.012

**【摘要】** 目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)对乙型肝炎(乙肝)患者进行乙肝病毒(HBV) DNA 检验的效果。方法 选择 2020 年 9 月—2022 年 10 月在菏泽市第三人民医院进行健康体检的 1 000 名受检者作为研究对象,其中 500 名纳入对照组,依托酶联免疫吸附法(ELISA)法对 HBV-DNA 开展检测操作;其余 500 名纳入观察组,运用实时荧光定量 PCR 法对 HBV-DNA 开展检测操作,比较两组 HBV 标志物〔包括乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝 e 抗原(HBeAg)、乙肝 e 抗体(HBeAb)、乙肝核心抗体(HBcAb)〕的检出率,分析不同阳性组合分布情况。结果 观察组的 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 检出率均明显高于对照组(HBsAg: 1.40% 比 0.20%, HBsAb: 1.80% 比 0.40%, HBeAg: 1.80% 比 0.20%, HBeAb: 1.20% 比 0.00%, HBcAb: 1.40% 比 0.00%, 均  $P < 0.05$ )。观察组的大三阳(HBsAg、HBeAg、HbcAb 均阳性)、小三阳(HBsAg、HbeAb、HbcAb 均阳性)检出率均明显高于对照组(大三阳: 1.60% 比 0.20%, 小三阳 1.40% 比 0.20, 均  $P < 0.05$ )。对照组和观察组 HBsAg 及 HBcAb 均阳性、HBsAg 及 HBeAg 均阳性、五项均阳性的检出率比较差异均无统计学意义(HBsAg 及 HBcAb 均阳性: 0.20% 比 0.20%, HBsAg 及 HBeAg 均阳性: 0.00% 比 0.20%, 五项均阳性: 0.20% 比 0.40%, 均  $P > 0.05$ )。结论 应用实时荧光定量 PCR 法开展对 HBV-DNA 的检测效果较为突出,有较高的准确度,与 ELISA 相比应用价值理想。

**【关键词】** 乙型肝炎; 酶联免疫吸附试验; 实时荧光定量聚合酶链反应; 乙型肝炎表面抗原

## Effect of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction on hepatitis B DNA

Li Shuqing, Liu Dan, Wang Ya, He Junmei. Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of Heze City, Heze 274000, Shandong, China

Corresponding author: Li Shuqing, Email: 18353045787@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) on the detection of hepatitis B virus (HBV) DNA in patients with hepatitis B. **Methods** The 1 000 subjects who underwent physical examination in the Third People's Hospital of Heze City from September 2020 to October 2022 were selected as the research objects. Among them 500 cases were included in the control group, and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect HBV-DNA. The remaining 500 cases were included in the observation group, and real-time fluorescent quantitative PCR was used to detect HBV-DNA. The detectable rates of HBV markers [including hepatitis B surface antigen (HBsAg), hepatitis B surface antibody (HBsAb), hepatitis B e antigen (HBeAg), hepatitis B e antibody (HBeAb) and hepatitis B core antibody (HBcAb)] were compared, and the distribution of different positive combinations was analyzed. **Results** The detectable rates of HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb and HBcAb in the observation group were significantly higher than those in the control group. The detectable rates of large three positive (HBsAg, HbeAg and HbcAb all positive) and small three positive (HBsAg, HbeAb and HbcAb all positive) in the observation group were significantly higher than those in the control group (large three positive: 1.60% vs. 0.20%, small three positive: 1.40% vs. 0.20, both  $P < 0.05$ ). There were no statistically significant differences in the detectable rates of HBsAg and HBcAb both positive, HBsAg and HBeAg both positive and all five items positive (HBsAg and HBcAb both positive: 0.20% vs. 0.20%, HBsAg and HBeAg both positive: 0.00% vs. 0.20%, all five items positive: 0.20% vs. 0.40%, all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** The real-time fluorescence quantitative PCR method for detecting HBV-DNA has good effect, high accuracy, and more practical value compared to ELISA.

**【Key words】** Hepatitis B; Enzyme linked immunosorbent assay; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction; Hepatitis B surface antigen

乙型肝炎(乙肝)属危害严重的感染性疾病,是患者在感染乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)后出现的肝脏炎性病变。随着病情进展,可能会出现肝硬化、肝癌等严重并发症,对患者生命构成威胁<sup>[1-2]</sup>。临床中对乙肝的诊断一般采用血清学标志物法,即对患者的血液样本进行检测,但是结果容易受医护人员操作水平影响,无法确保结果的准确性。实时荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是乙肝诊断的“金标准”,该方法虽然耗时较长,费用较高,但准确率较高<sup>[3-4]</sup>。本研究在 2020 年 9 月—2022 年 10 月时段内,从本院收治的体检者中选择 1 000 例作为研究对象,采用实时荧光定量 PCR 精准检测,考察检验效果,现将结果报告如下。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 选择 2020 年 9 月—2022 年 10 月在本院接受体检的 1 000 例受检者作为研究对象,其中 500 例纳入对照组,依托酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 HBV-DNA。其余 500 例纳入观察组,应用实时荧光定量 PCR 对 HBV-DNA 开展检测工作。

**1.1.1 纳入标准** ① 于本院进行临床体检;② 未接受过相关抗病毒治疗;③ 了解本研究详情且自愿加入;④ 拥有完整的病历资料。

**1.1.2 排除标准** ① 合并其他种类肝炎疾病(如甲型肝炎等)者;② 精神状态出现异常者;③ 患有恶性肿瘤、严重心血管疾病、重大器官类疾病、其余内科疾病者;④ 处于哺乳期、妊娠期阶段的女性受检者;⑤ 存在人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)感染者;⑥ 患有中毒性肝病、酒精性脂肪肝以及肝病并发肝囊肿者;⑦ 中途突然退出研究者。

**1.1.3 伦理学** 本研究与医学伦理学所涉标准符合,并经本院伦理委员会审批(审批号:20230106),知情同意。

**1.2 仪器与试剂** ELISA 试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司,ABI7300 型 PCR 荧光分析仪购自广州达安基因股份有限公司,Thermo Multiskan MK3 酶标仪及相关配套试剂购自美国赛默飞世尔科技公司。

**1.3 研究方法** 两组受检者均在采血前 1 d 晚上开始禁食,并于次日清晨采集空腹状态下的静脉血液标本约 5 mL,经过差速离心,将血清分离后备用。

对照组采用 ELISA 检测 HBV-DNA,观察组采用实时荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA。

**1.3.1 ELISA** 全部操作严格遵守 ELISA 试剂盒(购自上海科华生物工程股份有限公司)说明书中的相关规定,将相关试剂和相应剂量的标准液滴入阳性孔及阴性孔,按要求分别滴加正确剂量的特异酶,融合后进行封膜处理。使用 37 °C 水浴孵育 30 min,洗板、显色,结合酶标仪比色结果,检测所有患者的乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)、乙肝表面抗体(hepatitis B surface antibody, HbsAb)水平值、乙肝 e 抗原(hepatitis B e antigen, HbeAg)水平值、乙肝 e 抗体(hepatitis B e antibody, HbeAb)水平值、乙肝表面核心抗体(hepatitis B core antibody, HbcAb)水平。

**1.3.2 实时荧光定量 PCR** 依托 PCR 荧光分析仪法,对 HBV-DNA 开展精准检测工作。对清晨空腹肘静脉血进行采集,约 5 mL,以 2 500 ~ 3 000 r/min 进行 10 ~ 15 min 离心,使用移液枪将上清液取出处理。将 200  $\mu$ L 血清样本融合 450  $\mu$ L DNA 提取液,在 100 °C 温育器中放置,展开 10 min 的预热处理操作。应用冰冻离心机以 12 000 r/min 进行 5 min 离心,取出 20  $\mu$ L 上清液在 PCE 管中放置,应用分辨荧光免疫分析技术集中开展针对 HBV 血清标志物的检测工作,并依托实时荧光定量 PCR 精准检测 HBV-DNA,均结合说明书实施。

**1.4 观察指标** ① 比较 HBV 标志物检出情况,统计两组 HBV 标志物的检出率,包括 HBsAg、HbsAb、HBeAg、HBeAb、HbcAb。② 比较不同阳性组合的分布,统计两组不同阳性组合的分布,包括大三阳(HBsAg、HBeAg、HbcAb 均阳性)、小三阳(HBsAg、HBeAb、HbcAb 均阳性)、HBsAg 及 HbcAb 均阳性、HBsAg 及 HBeAg 均阳性、五项均阳性。

**1.5 统计学方法** 所有数据均录入 SPSS 22.0 统计软件进行处理。其中计量资料符合正态分布,通过均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,经 *t* 检验获取结果;计数资料在展开表述时,通过百分比(%)进行,经  $\chi^2$  检验获取结果。 $P < 0.05$  提示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般资料** 对照组和观察组的性别、年龄等一般资料比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),有可比性,见表 1。

**2.2 两组 HBV 标志物检出率比较** 对观察组和对照组患者的 HBV 标志物检出情况进行评估,结

果显示,观察组的 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 检出率均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 对照组和观察组的一般资料比较

组别	例数 (例)	性别(例)		年龄(岁)	
		男性	女性	范围	均数( $\bar{x} \pm s$ )
对照组	500	350	150	25 ~ 60	37.88 ± 3.20
观察组	500	340	160	24 ~ 60	37.43 ± 3.71

表 2 对照组和观察组的 HBV 标志物检出率比较

组别	例数 (例)	检出率[% (例)]		
		HBsAg	HBsAb	HBeAg
观察组	500	1.40 (7)	1.80 (9)	1.80 (9)
对照组	500	0.20 (1)	0.40 (2)	0.20 (1)
$\chi^2$ 值		4.536	4.504	6.465
P 值		0.033	0.034	0.011

  

组别	例数(例)	检出率[% (例)]	
		HBeAb	HBcAb
观察组	500	1.20 (6)	1.40 (7)
对照组	500	0.00 (0)	0.00 (0)
$\chi^2$ 值		6.036	7.049
P 值		0.014	0.008

注: HBV 为乙型肝炎病毒, HBsAg 为乙肝表面抗原, HBsAb 为乙肝表面抗体, HBeAg 为乙肝 e 抗原, HBeAb 为乙肝 e 抗体, HBcAb 为乙肝核心抗体

**2.3 两组不同 HBV-DNA 阳性组合的分布比较** 对观察组和对照组患者的不同 HBV-DNA 阳性组合分布进行评估,观察组的大三阳、小三阳检出率均明显高于对照组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ); 两组 HBsAg 及 HBcAb 均阳性、HBsAg 及 HBeAg 均阳性、五项均阳性的检出率比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。见表 3。

表 3 对照组和观察组的不同阳性组合分布比较

组别	例数(例)	检出率[% (例)]		
		大三阳	小三阳	五项均阳性
观察组	500	1.60 (8)	1.40 (7)	0.40 (2)
对照组	500	0.20 (1)	0.20 (1)	0.20 (1)
$\chi^2$ 值		5.494	4.536	0.334
P 值		0.019	0.033	0.563

  

组别	例数(例)	检出率[% (例)]	
		HBsAg 及 HBcAb 均阳性	HBsAg 及 HBeAg 均阳性
观察组	500	0.20 (1)	0.20 (1)
对照组	500	0.20 (1)	0.00 (0)
$\chi^2$ 值		0.000	1.001
P 值		1.000	0.317

注: HBV 为乙型肝炎病毒, HBsAg 为乙肝表面抗原, HBsAb 为乙肝表面抗体, HBeAg 为乙肝 e 抗原, HBeAb 为乙肝 e 抗体, HBcAb 为乙肝核心抗体,大三阳为 HBsAg、HBeAg、HbcAb 均阳性,小三阳为 HBsAg、HbeAb、HbcAb 均阳性

### 3 讨论

体检是指受检者进行常规体格检查、生殖器检查等,检查项目包括乙肝、梅毒、先天性遗传疾病等,能发现受检者是否患疾病,方便及时治疗<sup>[5-6]</sup>。乙肝因 HBV 感染导致,在我国发病率较高,是一种比较危险的慢性传染性疾病。乙肝的传播途径十分繁多,主要有生活接触传播、血液传播、母婴传播等形式。有部分患者无症状,也有部分患者的主要症状为恶心、呕吐、食欲低下、黄疸、发热等<sup>[7-8]</sup>。

乙肝病程较长,常难以完全治愈,且有概率进展为肝硬化、肝细胞癌等严重并发症。而且受检者如果出现 HBsAg 阳性,其配偶、子女均有较高概率感染 HBV。如果孕产妇感染 HBV,甚至会影响母婴结局,升高产妇、新生儿的死亡概率。因此,对乙肝需要及早发现和给予治疗,对病毒的传播扩散和病情发展进行良好控制,才能降低病情严重程度,延长患者生存时间,提高生活质量。

在临床诊断中,由于乙肝的主要症状和表现种类较多,且常存在不典型表现,因此易导致漏诊、误诊,无法进行准确的判断,还需要开展 HBV-DNA 的相关检测才能最终确诊<sup>[9-10]</sup>。HBV-DNA 的检测具体标志物为 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 等,常用的检测方法主要有 ELISA、化学发光法、实时荧光定量 PCR 等。化学发光法的敏感度较高,自动化程度较强,常用于 HBV 标志物的定量检测。ELISA 是一种常用于大量血清样品中的检测方法,操作比较简单,检测速度较快,但是敏感度和准确度均不够高,局限性较强<sup>[11-12]</sup>。实时荧光定量 PCR 是近年来顺应医学和生物学技术飞速发展下新出现的一种病原学检测方法,敏感度、特异度、准确度均较高,且可重复操作,能够自动检出并根据累积的荧光信号,实时监测 PCR 进程,帮助临床医师更好地对病毒复制情况、传染性强弱程度进行动态分析,针对 HBV-DNA 微量的患者,也能准确检出。

本研究对两组 HBV 标志物的检出情况进行评估,结果显示,观察组的 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb 检出率均明显高于对照组。对两组不同阳性组合分布进行评估,结果显示观察组的大三阳、小三阳检出率均明显高于对照组; 两组 HBsAg 及 HBcAb 均阳性、HBsAg 及 HBeAg 均阳性、五项均阳性的检出率比较差异均无统计学意义。

ELISA 法虽然比较简单、成本较低,但样本容易受到污染,从而出现假阴性或假阳性结果,敏感

度和准确度均较低。此外,国内使用的大部分乙肝 ELISA 试剂没有灰色区域,不同厂家生产的试剂盒计算方法也有一定差异,很难完全满足临床实验要求<sup>[13]</sup>。实时荧光定量 PCR 所用材料与试剂包括普通 PCR 引物、荧光基团、荧光染料等,能够作为荧光探针,对荧光信号进行积累,还能够作为荧光阈值的坐标对 PCR 进行监测。准确检测出微量 HBV-DNA。其检测效果较好,且可重复性高,能够观察到抗病毒药物的治疗效果,精确测定出 HBV-DNA。在大三阳和小三阳两种模式之下,患者的免疫功能低下,既不出现抗体应答,也不表达抗原,乙肝的传染性较低,ELISA 很难将其检出,而实时荧光定量 PCR 却能精确检出<sup>[14]</sup>。

在 HBV-DNA 定量检测中,首先需提取样本中的 DNA。可以通过将血液、组织或其他样本中的细胞进行裂解,并使用 DNA 提取试剂盒来纯化 DNA。在 qPCR 实验中需要设计一对针对 HBV-DNA 靶标序列的引物 (primers),并合成带有特殊荧光标记的探针。引物的选择应确保其能高效且特异性地结合到 HBV-DNA 的目标序列上。然后,将提取得到的 HBV-DNA 与引物和探针一起加入 PCR 反应体系中,并在 PCR 仪中进行温度循环反应。在每个温度循环的延伸步骤中, DNA 数量会随着复制过程而呈指数增加。实时荧光定量 PCR 的一个重要优势是可以实时监测 PCR 产品的积累情况。因为在 PCR 过程中,每一个温度循环结束后,PCR 仪会测量 PCR 产物中的荧光信号强度。根据荧光信号的强弱,可以判断出 HBV-DNA 的初始数量。

分析原因,因 qPCR 是一种常用分子生物学技术,可以用于检测和定量 HBV。qPCR 基本原理是利用 DNA 聚合在特定条件下,在反应体系中扩增目标 DNA 片段,并通过荧光染料与扩增产物结合来实现对扩增产物数量的实时监测。操作步骤包括提取样品中的核酸、选择适当的引物和探针、设置 PCR 反应体系、进行扩增和监测。qPCR 的优点在于能够快速、敏感和精确定量地检测 HBV 的核酸含量。相比传统的 PCR 方法,它不需要进行凝胶电泳等后续步骤来确定扩增产物,通过荧光信息即可实现实时监测。此外, qPCR 还具有高度特异性和广泛的线性动态范围。在 HBV 检测中, qPCR 可以用于诊断患者是否感染 HBV、判断病毒是否复制活跃,以及监测抗病治疗的效果。通过检测 HBV 的核酸含量,可以帮助医生评估患者病情,制定合理的治疗方案,

并监测治疗的进程。qPCR 是一种重要的分子诊断技术,可用于 HBV 的定量检测,具有较高的敏感度和特异度,对临床诊断、治疗及预后评估有重要意义。张艳奇<sup>[15]</sup>研究选择 327 例乙肝患者,分别依托 ELISA 和实时荧光定量 PCR 开展针对 HBV-DNA 的检测工作,显示实时荧光定量 PCR 得到的检测结果更加优异,与本研究结果大致类似。

综上所述,与 ELISA 法比较,实时荧光定量 PCR 法检测 HBV-DNA 的效果更好,准确率更高。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- 1 毛旭文,李新霞,刘印天,等. 16S rDNA 实时荧光定量 PCR 检测大蒜提取物对小鼠肠道菌群的调节作用[J]. 中国微生物学杂志, 2022, 34 (7): 751-758. DOI: 10.13381/j.cnki.cjm.202207002.
- 2 李鑫,李志勤,苏彬彬,等. 不同免疫检验方法检测乙肝病毒感染血清标志物的效果分析[J]. 医学食疗与健康, 2022, 20 (17): 59-61.
- 3 赵玲,程晓宏,杨清华. 实时荧光定量 PCR 检测新型冠状病毒的不确定度评定[J]. 疾病预防控制通报, 2022, 37 (3): 24-27.
- 4 刁颖. 乙肝病毒血清学检验采用化学发光法与酶联免疫法的效果比照观察[J]. 中国实用医药, 2021, 16 (1): 67-69. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2021.01.026.
- 5 华雅洁,岳远征,杨秀莲,等. 海州常山叶片实时荧光定量 PCR 的内参基因选择[J]. 林业科学研究, 2022, 35 (2): 194-202.
- 6 左雪灿,丁庆和,李占平. 化学发光免疫分析技术和酶联免疫吸附试验在乙肝病毒血清学检验中的应用效果[J]. 中国民康医学, 2020, 32 (5): 123-125. DOI: CNKI:SUN:ZMYX.0.2020-05-051.
- 7 钱猛,杨娜,朱昌华,等. 绿豆实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与验证[J]. 植物生理学报, 2021, 57 (11): 2203-2212.
- 8 王征帆,朱利塞,王娟,等. PDCoV 与 TGEV 双重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48 (10): 3855-3863.
- 9 朱彤,商瑞,程凯慧,等. H13 亚型禽流感病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 病毒学报, 2022, 38 (1): 1-7.
- 10 关玲. 不同免疫检验法对乙肝病毒感染血清标志物检验的效果分析[J]. 医学食疗与健康, 2021, 19 (15): 192, 194.
- 11 彭萍,何立志,彭鑫,等. 3 个不同国产乙肝病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒检测结果的比较[J]. 质量与安全检验检测, 2020, 30 (6): 54-56, 60.
- 12 赵芯晨,王晶,何婧瑜,等. 致敏性 CD4<sup>+</sup> T 细胞来源的外泌体介导心肌梗死后心肌重构的机制研究[J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (11): 1332-1336. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210709-01038.
- 13 凡俊丽. CLIA 法与实时荧光定量 PCR 技术在乙肝患者中的应用价值[J]. 医药论坛杂志, 2021, 42 (4): 108-111.
- 14 毛彦妮,余永涛,赵清梅,等. 产苦马豆素疯草内生真菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国草地学报, 2021, 43 (1): 8-17. DOI: 10.16742/j.zgcdxb.20200055.
- 15 张艳奇. 实时荧光定量 PCR 法在乙肝病毒 DNA 及血清标志物检测中的应用价值[J]. 黑龙江医药, 2019, 32 (1): 204-205. DOI: 10.14035/j.cnki.hljyy.2019.01.099.

(收稿日期: 2023-02-15)

(本文编辑: 邵文)