

## 两种方法检测乙型肝炎患者血清HBV-DNA的应用价值

叶儒军, 郑培锐, 区宇洁, 魏威

叶儒军, 梁平县人民医院检验科 重庆市梁平县 405211  
郑培锐, 区宇洁, 中山大学达安基因股份有限公司 广东省广州市 510000  
魏威, 南方医科大学生物技术学院 广东省广州市 510515  
叶儒军, 主管检验师, 主要从事临床检验方面的研究。  
作者贡献分布: 此课题由魏威设计; 研究过程由叶儒军实施完成; 数据分析及病理支持由区宇洁与郑培锐完成; 本论文写作由叶儒军、魏威及区宇洁共同完成。  
通讯作者: 魏威, 讲师, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学生物技术学院. www.wei20052005@163.com  
收稿日期: 2013-06-09 修回日期: 2013-07-04  
接受日期: 2013-07-15 在线出版日期: 2013-07-28

### PCR-EB qualitative analysis versus amp-lisensor quantitative assay for detection of HBV-DNA in serum in patients with hepatitis B

Ru-Jun Ye, Pei-Rui Zheng, Yu-Jie Ou, Wei Wei

Ru-Jun Ye, People's Hospital of Liangping County, Chongqing 405211, China  
Pei-Rui Zheng, Yu-Jie Ou, Ann Gene Co., LTD, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510000, Guangdong Province, China  
Wei Wei, College of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Wei Wei, College of Biotechnology, Southern Medical University, 1838 Guangzhou Road, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. www.wei20052005@163.com  
Received: 2013-06-09 Revised: 2013-07-04  
Accepted: 2013-07-15 Published online: 2013-07-28

### Abstract

**AIM:** To compare the application value of PCR-EB qualitative analysis versus amp-lisensor quantitative assay in the detection of HBV-DNA in serum in patients with hepatitis B.

**METHODS:** PCR-EB qualitative analysis or amp-lisensor quantitative assay was used to detect serum HBV-DNA levels in patients with hepatitis B who were positive for both HBsAg and anti-HBs (group A), those positive for HBsAg alone (group B), those positive for anti-HBs alone (group C), or those negative for both HBsAg and anti-HBs (group D). The detection rate of serum HBV-DNA was compared between the two groups.

**RESULTS:** HBsAg (S/N) value was significantly higher in group than in group A ( $P < 0.05$ ), and anti-HBs value was significantly higher in group C than in group A ( $P < 0.05$ ). The detection rate of serum HBV-DNA by Amp-lisensor quantitative assay was significantly higher than that by PCR-EB qualitative analysis ( $P < 0.05$ ). For amp-lisensor quantitative assay, the positive rate of serum HBV-DNA was lowest in patients of group C ( $P < 0.05$ ). Serum HBV-DNA rose significantly in patients with hepatitis B. HBV-DNA levels were significantly higher in groups A and B than in groups C and D (all  $P < 0.05$ ), but showed no significant differences between groups A and B ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Amp-lisensor quantitative assay has a high sensitivity in the detection of serum HBV-DNA and is even able to detect HBV-DNA in patients who are positive for anti-HBs.

© 2013 Baishideng. All rights reserved.

**Key Words:** PCR-EB; Amp-lisensor; Hepatitis B virus; HBV-DNA

Ye RJ, Zheng PR, Ou YJ, Wei W. PCR-EB qualitative analysis versus amp-lisensor quantitative assay for detection of HBV-DNA in serum in patients with hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2013; 21(21): 2109-2112 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2109.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v21.i21.2109>

### 摘要

**目的:** 观察两种不同方法检测乙型肝炎患者血清中的乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)-DNA的应用价值比较。

**方法:** 分别使用PCR-EB定性及Amp-lisensor定量法对HBV患者, 乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)与抗-HBs同时阳性、HBsAg阳性、抗-HBs阳性、HBsAg与抗-HBs同时阴性进行血清HBV-DNA检查, 观察2组患者阳性检测率。

**结果:** B组(HBsAg阳性)患者HBsAg(S/N)

### ■背景资料

目前, 临床上用于HBV-DNA检测的方式方法较多, 从曾经的HBV-DNA的定性检测, 发展为目前HBV-DNA的定量检测。曾经常用的HBV-DNA检测方式有夹心斑点杂交法、PCR-EB定性检查等。但是临床资料表明, 上述2种检查方法存在阳性检测率低的缺陷。当前, 对于HBV-DNA检测灵敏度的要求越来越高, 正因如此, Amp-lisensor定量法检测HBV-DNA得到了较大的发展。与传统的定性检查不同, 其能直接反应病毒复制的程度, 指导临床治疗。

### ■同行评议者

林潮双, 副教授, 中山大学附属第三医院感染科

### ■ 研发前沿

目前,临床上用于检测血清HBV DNA的方法较多,随着研究的进一步深入以及检验技术的迅速发展,新的HBV DNA检查手段不断出现。

值高于A组( $P < 0.05$ ), C组抗-HBs值高于A组(HBsAg与抗-HBs同时阳性)( $P < 0.05$ ), Amp-lisensor定量检测下,患者HBV-DNA阳性率明显高于PCR-EB定性组( $P < 0.05$ )。Amp-lisensor定量检测中, C组(抗-HBs阳性)患者的阳性检测率最低( $P < 0.05$ ), 乙型肝炎患者血清中HBV-DNA对数值均有明显的上升, 与E组(乙型肝炎两对半全阴性)比较均有统计学意义( $P < 0.05$ )。A组与B组HBV-DNA对数值明显高于C组与D组(HBsAg与抗-HBs同时阴性)( $P < 0.05$ ), A组与B组HBV-DNA对数值比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**结论:** Amp-lisensor定量法检测血清HBV-DNA的灵敏度较高, 在抗-HBs阳性患者中仍可以检测到HBV-DNA。

© 2013年版权归Baishideng所有。

**关键词:** PCR-EB; Amp-lisensor; 乙型肝炎病毒; 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸

**核心提示:** 通过对比PCR-EB定性及Amp-lisensor定量法检查HBV患者血清中HBV-DNA的阳性率以及含量, 阐述两种方法在临床中的应用价值。Amp-lisensor定量法检测血清HBV-DNA的灵敏度较高, 而在抗-HBs阳性患者中仍可以检测到HBV-DNA, 为HBV患者的治疗与预后提供了直接的证据。

叶儒军, 郑培锐, 区宇洁, 魏威. 两种方法检测乙型肝炎患者血清HBV-DNA的应用价值. 世界华人消化杂志 2013; 21(21): 2109-2112 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/21/2109.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v21.i21.2109>

## 0 引言

乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸(hepatitis B virus, HBV-DNA)是反映乙型肝炎患者是否存在HBV复制的一个经典指标, 具有较高的准确性<sup>[1]</sup>。目前,临床上用于HBV-DNA检测的方式方法较多,从曾经的HBV-DNA的定性检测,发展为目前HBV-DNA的定量检测<sup>[2]</sup>。曾经常用的HBV-DNA检测方式有夹心斑点杂交法、PCR-EB定性检查等<sup>[3,4]</sup>。但是临床资料表明,上述两种检查方法存在阳性检测率低的缺陷。当前,对于HBV-DNA检测灵敏度的要求越来越高,正因如此, Amp-lisensor定量法检测HBV-DNA得到了较大的发展。与传统的定性检查不同,其能直接反应病毒复制的程度,指导临床治疗。笔者通过对比PCR-EB定性及Amp-lisensor定量法检查HBV患者血

清中HBV-DNA的阳性率及含量, 阐述两种方法在临床中的应用价值, 现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究共纳入研究对象125例, 均为我院2012-01/2012-12门诊或住院治疗的HBV患者或寄往曾明确诊断为HBV的患者。根据患者检测指标进行临床分组。其中A组患者为乙型肝炎表面抗原(hepatitis B virus surface antigen, HBsAg)与抗-HBs同时阳性; B组为HBsAg阳性; C组为抗-HBs阳性; D组为HBsAg与抗-HBs同时阴性; E组为乙型肝炎两对半全阴性, 肝功能正常的健康体检者。各组病例均为25例。HBV临床诊断标准参考2000-2001年《病毒性肝炎防治方案》, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、中华医学会肝病学分会联合修订。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本采集:** 清晨空腹采取肘静脉血10 mL, 经4 °C离心机5000 r/min离心15 min分理出血清, -20 °C冰箱中保存。

**1.2.2 HBV 5M检测:** 使用1 Mx自动免疫分析仪进行, 采用微粒子酶免分析法HBV 5M试剂盒, 仪器与试剂盒均购自Abbott公司, 实验操作按说明书进行。

**1.2.3 PCR-EB定性检测:** (1)实验步骤: 将5 μL 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>加入50 μL血清中, 98 °C变性15 min, 然后进行离心, 变性裂解液5 μL加入标准反应液15 μL中, 密封94 °C变性5 min, 进行45个循环。所有反应在ABI Prism 7300型荧光定量PCR仪(Applied Biosystems, 美国)上进行。

**1.2.4 Amp-lisensor定量法检测:** 使用AG-9600荧光检测仪进行检测, 并采用HBV-DNA定量试剂盒以及ASAP软件, 实验操作根据试剂盒说明书进行。实验设立阴性及阳性对照组以及最大信号对照组, 同时严格参考Kwork等提出的预防污染措施, 阳性截止值 $\geq 2 \times 10^3$  copy/mL。

**统计学处理** 采用SPSS13.0统计软件进行统计分析, 计量资料用mean ± SD表示, 计数资料用百分率表示, 组间计量资料比较采用两样本t检验, 组间计数资料的比较采用 $\chi^2$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组患者HBV 5M检测结果比较** B组患者HBsAg(S/N)值高于A组( $P < 0.05$ ), C组抗-HBs值高于A组( $P < 0.05$ )(表1)。

**2.2 2种方法检测血清HBV-DNA阳性率比较**

表 1 各组患者HBV 5M检测结果比较 ( $n = 25$ , mean  $\pm$  SD)

分组	HBsAg(S/N)值	抗-HBs值(IU/L)	HBeAg	抗-HBe	抗-HBc
A组: HBsAg与抗-HBs同时阳性	98.3 $\pm$ 69.0	92.9 $\pm$ 202.4	11	8	25
B组: HBsAg阳性	104.2 $\pm$ 73.9 <sup>a</sup>		10	8	25
C组: 抗-HBs阳性		115.2 $\pm$ 187.1 <sup>a</sup>	4	11	25
D组: HBsAg与抗-HBs同时阴性			5	13	25

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs A组. HBsAg: 乙型肝炎表面抗原; HBV: 乙型肝炎病毒.

表 2 2种方法检测血清HBV-DNA阳性率比较 ( $n = 25$ )

分组	PCR-EB定性		Amp-lisensor定量	
	阳性数( $n$ )	阳性率(%)	阳性数( $n$ )	阳性率(%)
A组: HBsAg与抗-HBs同时阳性	17	68.0	23	92.0 <sup>ac</sup>
B组: HBsAg阳性	14	56.0	19	76.0 <sup>ac</sup>
C组: 抗-HBs阳性	6	24.0	13	52.0 <sup>a</sup>
D组: HBsAg与抗-HBs同时阴性	10	40.0	20	80.0 <sup>ac</sup>
总计	47	47.0	75	75.0 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs PCR-EB组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs C组. HBsAg: 乙型肝炎表面抗原; HBV: 乙型肝炎病毒.

表 3 Amp-lisensor定量检测各组血清HBV-DNA含量比较 ( $n = 25$ , mean  $\pm$  SD)

分组	HBV-DNA(对数值)	P值			
		与对照组比较	与A组比较	与B组比较	与C组比较
A组: HBsAg与抗-HBs同时阳性	6.13 $\pm$ 1.88	< 0.05			
B组: HBsAg阳性	6.09 $\pm$ 1.79	< 0.05	> 0.05		
C组: 抗-HBs阳性	4.09 $\pm$ 1.38	< 0.05	< 0.05	< 0.05	
D组: HBsAg与抗-HBs同时阴性	5.08 $\pm$ 1.19	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
E组: 乙型肝炎两对半全阴性	1.99 $\pm$ 0.55				

HBsAg: 乙型肝炎表面抗原; HBV: 乙型肝炎病毒; HBV-DNA: 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸.

Amp-lisensor定量检测下, 患者HBV-DNA无论在A、B、C、D组, 阳性率均明显高于PCR-EB定性组( $P < 0.05$ ). Amp-lisensor定量检测中, C组患者的阳性检测率最低( $P < 0.05$ )(表2).

2.3 Amp-lisensor定量检测各组血清HBV-DNA含量比较 除E组(健康体检者)外, 乙型肝炎患者血清中HBV-DNA对数值均有明显的上升, 与E组比较均有统计学意义( $P < 0.05$ ). A组与B组HBV-DNA对数值明显高于C组与D组( $P < 0.05$ ), A组与B组HBV-DNA对数值比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表3).

### 3 讨论

目前, 临床上用于检测血清HBV-DNA的方法较多, 随着研究的进一步深入以及检验技术的迅速发展, 新的HBV-DNA检查手段不断出现<sup>[5]</sup>. Zaijier

等<sup>[6]</sup>曾经使用斑点杂交法、分支链DNA信号扩增、Abbott液相杂交、PCR、Amp-lisensor定量等对HBV患者进行血清HBV-DNA灵敏度的检测. 结果发现, 各组灵敏度分别为 $2.5 \times 10^7$  copy/mL、 $2.5 \times 10^6$  copy/mL、 $2.5 \times 10^7$  copy/mL、 $2.5 \times 10^2$  copy/mL、50 copy/mL. 提示Amp-lisensor定量对于临床检查HBV患者血清HBV-DNA的灵敏度较高. 本研究对PCR与Amp-lisensor定量两种目前临床虫咬的检验HBV-DNA方法进行了观察, 可以发现, 无论在HBsAg与抗-HBs同时阳性、HBsAg阳性、抗-HBs阳性、HBsAg与抗-HBs同时阴性的患者中, Amp-lisensor检测的阳性检测率均明显高于PCR-EB. 这与Zaijier等<sup>[6]</sup>的研究结果较为相似, 说明Amp-lisensor检测在检测HBV-DNA阳性率方面, 具有较高的检查灵敏度.

### ■ 相关报道

Zaijier等曾经使用斑点杂交法、分支链DNA信号扩增、Abbott液相杂交、PCR、Amp-lisensor定量等对HBV患者进行血清HBV-DNA灵敏度的检测. 结果发现, 各组灵敏度分别为 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^7$ 、 $2.5 \times 10^2$ 、50 copy/mL.

### ■同行评价

本文对比PCR-EB定性及Amplisensor定量法检查乙肝患者血清中HBV-DNA的阳性率及含量,研究两种方法在临床中的应用价值,研究选题具有一定科学和临床意义。

本研究显示, HBsAg与抗-HBs同时阳性的HBV患者,和普通的HBV患者一样,其血清HBV-DNA的含量均较高,且两组之间无统计学差异。但是,在抗-HBs阳性患者以及抗-HBc阳性患者方面,两组血清HBV-DNA含量明显低于A组与B组。然而,进行Amp-lisensor检测可以发现,两组的HBV-DNA阳性率仍达到52.0%(13/20)、80.0%(20/25),并且处于阳性截止值之上。传统的理解认为,如果HBV感染者血液中抗-HBs出现阳性,即表示患者体内的HBV病毒被清除,意味着HBV传染性的消失以及病情好转、康复<sup>[7-9]</sup>。但是,通过本研究的结果,发现即使抗-HBs出现阳性,患者血清HBV-DNA含量仍然处于较高水平。因此,临床对于该类抗-HBs出现阳性的患者,需要进行进一步的研究,重新认识这个问题。随着检测手段的丰富,目前临床研究已经发现<sup>[10,11]</sup>,在一些抗-HBs阳性的HBV患者中,仍可以在血清或肝脏组织中发现较大量的HBV-DNA。有学者对1355例HBV慢性携带者进行了跟踪随访检测,在进行为期23 mo的检查后,发现有55例患者HBsAg发生自然转阴,32例患者出现抗-HBs阳性<sup>[12]</sup>。对抗-HBs阳性的患者进行进一步观察,发现有近20%的患者,血清HBV-DNA检测阳性。而对55例HBsAg自然转阴的患者进行观察,能够发现18例患者出现肝癌、肝硬化以及亚急性重型肝炎。研究认为<sup>[13,14]</sup>,HBsAg自然转阴,甚至抗-HBs出现阳性,并不一定属于病情好转的标志,相反,在一些患者中,甚至出现病情恶化的可能。该情况的发生与体内仍存在一定量的HBV-DNA有关。因此,临床上定性检测HBV 5M,可能存在较大的误差,影响HBV患者的预后判断。而Amp-lisensor定量检测恰恰可以弥补各类定性检测方法可能带来的误差,精准得出患者血清HBV-DNA的含量,判断是否存在传染性或病情恶化<sup>[15]</sup>。该技术与PCR的主要差别在于Amp-lisensor采用的是复合探针。一个探针上标以荧光报告基团,另一个探针上标以荧光淬灭基团,两探针之间能因碱基互补而结合。此时,两基团靠近而形成FRET结构,报告基团的荧光信号被

淬灭基团吸收。当两探针分开后,其间的FRET关系受到破坏,淬灭基团的抑制作用解除,报告基团的荧光信号得到释放。因此,Amp-lisensor的结果较为可靠,出现假阳性的情况相对较低。

总之,Amp-lisensor定量法检测血清HBV-DNA的灵敏度较高,在抗-HBs阳性患者中仍可以检测到HBV-DNA,为HBV患者的治疗与预后提供了直接的证据。

### 4 参考文献

- 1 马俊骥,冯丽英,冯志杰,姜慧卿,孙泽明,赵丽梅. HBeAg阳性和阴性慢性乙型肝炎患者肝组织病理结果分析158例. 世界华人消化杂志 2013; 21: 1766-1771
- 2 张磊,张淑云. 乙型肝炎病毒的基因变异及其临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20: 1644-1652
- 3 董爱爱,赵洁,贾建伟,袁桂玉. HBsAg定量检测在慢性HBV感染患者肝脏储备功能评价中的作用. 世界华人消化杂志 2012; 20: 3033-3036
- 4 王秋平,陈斌,张琼,雷秀霞,王小棉,匡艳华. 临床研究3种免核酸提取PCR试剂盒检测乙型肝炎患者血清中HBV DNA的比较. 广东医学 2011; 32: 2251-2253
- 5 秦望森,沈立萍,张爽,尹文娇,王锋. 乙肝患者HBV感染指标、病毒复制水平与基因分型的关系分析. 中华实验和临床病毒学杂志 2012; 2: 328-330
- 6 Zaaijer HL, ter Borg F, Cuypers HT, Hermus MC, Lelie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2088-2091 [PMID: 7814529]
- 7 李珉珉,洪丹妮,朱勤爱,朱德兰. PreS1抗原与HBeAg联合检测用于预测HBV-DNA的水平. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2011; 32: 637-640
- 8 黄清衡,陈文思. 乙型肝炎病毒DNA载量与HBeAg及ALT联合检测的意义. 实用医学杂志 2011; 27: 4308-4310
- 9 裴彦祯,韩涛,马晓艳,李莹,邢晶,宋佐莉. HBsAg及HBV DNA定量水平在慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌患者中的变化. 中华肝脏病杂志 2011; 19: 743-746
- 10 王美容,邱宁,卢实春,修典荣,于建国,李彤,刘学恩,庄辉. 肝组织中HBV cccDNA荧光定量聚合酶链反应检测法的建立. 中华流行病学杂志 2011; 32: 504-509
- 11 蒋素贞,鲁凤民,庄辉. 慢性乙型肝炎病毒DNA定量检测的临床意义. 中华检验医学杂志 2012; 35: 117-121
- 12 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. 中国实验诊断学 2011; 15: 1090
- 13 朱锦宏,吴晓蔓. 乙肝患者血清HBV cccDNA的临床意义. 实用医学杂志 2013; 29: 395-397
- 14 刘伟平,殷明刚,阮艳秋. HBV DNA检测在血清HBsAg与HBsAb共存模式中的临床价值. 医学研究杂志 2012; 41: 136-139
- 15 胡惠萍,袁晓华,詹传华. 乙肝患者血清标志物模式与HBV DNA检测结果分析. 国际检验医学杂志 2012; 33: 2269-2270

编辑 田滢 电编 鲁亚静

