

实时荧光 PCR 和 ELISA 在乙型肝炎病毒检测中的应用

张满娥, 张洪彬, 明燕 (福建省龙岩市第二医院 364000)

【摘要】 目的 比较实时荧光聚合酶链反应(PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)在乙型肝炎病毒(HBV)检测中的结果差异。**方法** 对 182 份血清同时进行 HBV DNA 定量检测和 ELISA 法测定。**结果** 182 份血清标本经两种方法测定, HBV DNA 阳性率与 ELISA 检测 HBV-M 在 HBV-M 在 HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性组(“大三阳”组)和 HBsAg、HBeAb、HBcAb 阳性组(“小三阳”组)之间差异有统计学意义($P < 0.05$); HBV DNA 阳性拷贝数与 ELISA 检测“大三阳”组和“小三阳”组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** HBV DNA 定量检测方法灵敏度更高, 对临床治疗具有较强的指导意义。

【关键词】 荧光 PCR 法; 酶联免疫吸附试验; 乙肝病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.031 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)02-0190-02

乙型肝炎是目前世界上最常见、最广泛、危害最严重的病毒性肝炎之一, 据世界卫生组织估计, 此病已造成世界上大约每年总共 100 万多人死亡^[1]。长期以来, 我国人群一直呈乙型肝炎病毒(HBV)高感染率, 约有 1.3 亿人感染^[2]。HBV DNA 定量检测对乙型肝炎的诊断、抗病毒疗效观察及预后判断均具有重要意义。随着荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术的进展, 由于其灵敏、快速, 假阴、假阳性率极低, 该技术在临床上已被广泛应用于检测 HBV DNA, 而酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 HBV 免疫标志物(HBV-M)仍旧是诊断乙型肝炎的常用方法。本研究采用 FQ-PCR 法对 182 例临床血清标本同时进行 HBV DNA 定量检测和 ELISA 法测定血清中 HBV-M, 并对结果进行对比分析。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2011 年 1 月在本院同时进行 HBV DNA 定

量检测和 ELISA 测定血清中 HBV-M 的血清标本共 182 例。

1.2 试剂与仪器 HBV-M 的 ELISA 检测试剂[英科新创(厦门)科技有限公司]; HBV DNA 的 FQ-PCR 试剂(中山大学达安基因股份有限公司)。BIO680 酶标仪(美国伯乐公司); ABI7300 实时荧光定量 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法 HBV-M 的检测: 采用 ELISA 法, 操作及结果判读按试剂说明书。HBV DNA 的 FQ-PCR 检测: 采用核酸扩增实时荧光检测, 完全按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理 结果采用 χ^2 检验进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

182 份血清标本 ELISA 法检测 HBV-M 和 FQ-PCR 法检测 HBV DNA 检测结果见表 1。

表 1 ELISA 法检测 HBV-M 和 FQ-PCR 法检测 HBV DNA 检测结果

HBV-M 组合	n	HBV DNA 阴性 ($< 10^3$ copy/mL)	HBV DNA 阳性例数		
			$10^3 \sim 10^5$ copy/mL	$> 10^5$ copy/mL	合计阳性率[% (n/n)]
HBsAg、HBeAg、HBcAb 阳性组(“大三阳”组)	63	7	21	35	88.9(56/63)
HBsAg、HBeAb、HBcAb 阳性组(“小三阳”组)	82	49	19**	14**	40.2*(33/82)
HBsAg HBcAb 阳性组	25	13	3	9	48.0(12/25)
HBsAb 阳性组	7	7	0	0	0.0(0/7)
HBsAb HBeAb HBcAb 阳性组	3	2	1	0	33.3(1/3)
HBcAb 阳性组	2	2	0	0	0.0(0/2)

注: 与“大三阳”组比较, * $P < 0.05$, ** $P > 0.05$ 。

3 讨论

本研究结果显示, 63 例“大三阳”中, 7 例检出 HBV DNA 阴性, 与文献报道“大三阳”患者 HBV DNA 阳性率为 100% 不符^[3], 提示并不是所有“大三阳”患者均具有传染性, 可能是 HBV 的全基因整合或表达各抗原的基因在肝细胞的基因组 DNA 中整合, 在肝细胞内仅有抗原的表达而无病毒颗粒的复制, 因此血清中可检测到各种 HBV 抗原, 却不存在 HBV 颗粒。这也是部分“小三阳”组患者 HBV DNA 检测阴性即无传染性的原因, 只不过“大三阳”组此种情况的发生率 11.1%(7/63)要比“小三阳”组的发生率 59.8%(49/82)要小得多。虽然

该类患者无传染性, 但不代表其完全痊愈, 在机体免疫力下降时可能会重新合成 HBV 颗粒, 变为有传染性的患者, 因此应定期复查 HBV DNA。

63 例“大三阳”中, 56 例检出 HBV DNA 阳性, 阳性率为 88.9%, 与陈俊和王晓昌^[4]报道的 88.59% 阳性率相符, 其中 35 例(55.6%) HBV DNA $> 10^5$ copy/mL, 说明患者存在较高的拷贝量, 经 χ^2 检验, “大三阳”组的 HBV DNA 阳性率比“小三阳”组高 ($P < 0.05$), 说明患者具有较高的复制水平, 传染性强。

82 例“小三阳”组中, 33 例检出 HBV DNA 阳性, 阳性率

为 40.2%，与陈俊和王晓昌^[4]报道的阳性率 49.45% 相近。与“大三阳”组比较 HBV DNA 阳性拷贝数差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。阳性率虽然小于“大三阳”组，但该组患者 14 例 (17.0%) HBV DNA $> 10^5$ copy/mL，病毒复制活跃，传染性强，其转化为肝硬化、肝癌的概率更高；19 例 (23.2%) HBV DNA 在 $10^3 \sim 10^5$ copy/mL，属低水平复制，此类患者不容忽视，如果不积极抗病毒治疗，任其发展可导致肝硬化、肝癌。

25 例 HBsAg、HBcAb 阳性组中检出 HBV DNA 阳性 12 例，阳性率为 48%，其中 9 例 (36%) HBV DNA $> 10^5$ copy/mL，提示该组患者仍具有很强的病毒复制，传染性强，此情况可能为血清转换期或前 C 区突变。

3 例 HBsAb、HBeAb、HBcAb 阳性组中检出 1 例 HBV DNA 阳性，说明患者体内虽然出现 HBeAb (+)，但体内仍有病毒在复制，HBsAb (+) 和 HBeAg 转阴并不意味着病毒的复制停止或减弱。此现象可能与 HBV DNA 的 S 区基因突变有关，需要引起临床的足够重视。同时也提示，对于 HBsAg 阴性血清，在绝大多数情况下不存在感染 HBV 危险，但一些特殊情况则除外，如输血、器官移植等要求严格排除血液传染性时，HBV 血清学检测是片面的，必须进行 HBV DNA 定量检测，以排除感染性病例。

由以上分析比较可见，HBV DNA 阳性是表示 HBV 复制最可靠的指标。HBV DNA 定量检测有助于判断 HBV 感染

者病毒复制程度及传染性大小，较灵敏评价抗病毒药物的疗效，适时调整治疗方案，还可以决定乙型肝炎治疗的终点，同时在判断血液或器官是否具有传染性方面更有优越性。而 ELISA 法检测血清 HBV 标志物是临床诊断 HBV 感染的传统手段，该法简单易行，它检测的是人体对 HBV 的免疫反应状态，只能定性，而不能定量判断病毒的载量情况。由此可见，PCR 定量检测乙型肝炎病毒有更大的优势，值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 张蓓, 杨晓云, 刘蕊, 等. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 与乙肝两对半检测结果的相关性讨论[J]. 河北医学, 2006, 12(9): 835-838.
- [2] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2009: 190.
- [3] 赖宏芳, 付晓野, 董玉琳, 等. 荧光探针定量 PCR 测 HBV DNA[J]. 上海医学检验杂志, 2000, 15(1): 18.
- [4] 陈俊, 王晓昌. 1 006 例甘肃省陇东地区 HBV 患者血清标志物与 HBV DNA 的对比分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(1): 36-37.

(收稿日期: 2011-07-15)

• 临床研究 •

非淋菌性宫颈炎患者解脲支原体感染耐药性变迁

薛 灵 (江西省赣州市肿瘤医院检验科 341000)

【摘要】 目的 研究医院非淋菌性宫颈炎患者解脲支原体(Uu)感染情况及对 10 种抗生素药物的耐药性变迁,更好地指导临床合理用药、提高治疗效果。**方法** 对 2008~2010 年经数码电子阴道镜检查确诊为非淋菌性宫颈炎的患者取宫颈分泌物进行支原体培养及药敏检测,并对药物的耐药性进行对比分析。**结果** 2008 年 104 例中 Uu 培养阳性 24 例;2009 年 188 例中 Uu 培养阳性 48 例;2010 年 182 例中 Uu 培养阳性 82 例,耐药性分析显示交沙霉素 3 年中耐药性均小于或等于 8%;四环素类药物强力霉素和美满霉素耐药性明显降低;喹诺酮类药物氧氟沙星和司帕沙星耐药性则大幅度升高。**结论** Uu 已成为引起女性非淋菌性宫颈炎的重要病原体,Uu 的药物敏感性随时间变化而变化,重视非淋菌性宫颈炎 Uu 的培养,定期监测 Uu 的耐药性十分必要,对指导临床用药、控制其传播、防止耐药性产生具有重要意义。

【关键词】 非淋菌性宫颈炎; 解脲支原体; 药敏试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.02.032 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)02-0191-03

随着性传播疾病(STD)发病率不断上升,非淋菌性宫颈炎的发病数已超过淋球菌感染,成为最常见的 STD 之一。而解脲支原体(Uu)和人型支原体(Mh)是引起非淋菌性宫颈炎的重要病原体。近年来,由 Uu 感染引起的女性生殖道宫颈炎的发生率呈上升趋势,同时由于广谱抗生素的广泛使用,导致耐药菌株也在不断增加,因而受到临床越来越普遍的关注。为了解本院女性生殖道宫颈炎感染支原体的状况及其药敏情况,科学指导临床治疗支原体感染和合理选择抗生素提供必要的实验室诊断依据,本实验室对本院 2008 年 1 月至 2010 年 12 月 474 例确诊为非淋菌性宫颈炎患者的宫颈分泌物标本进行支原体培养及药敏检测,现将结果分析如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 均来自于本院 2008 年 1 月至 2010 年 12 月妇科门诊经数码电子阴道镜检查确诊为非淋菌性宫颈炎患者

474 例,主要表现:白带增多、有异味、外阴瘙痒、宫颈充血或红肿,有白色或脓性分泌物,年龄 20~55 岁,就诊前 1 周内未使用过任何抗生素。

1.2 标本采集 拭去宫颈口多余黏液,然后用女性拭子在宫颈管内 1~2 cm 处取宫颈分泌物,取材时拭子在宫颈内缓慢捻转并至少停留 30 s,标本采集后立即进行接种培养。

1.3 仪器与试剂 仪器:电热恒温培养箱;试剂:采用珠海市银科医学工程有限公司支原体药敏试剂盒,内含尿素精氨酸肉汤培养基、微量药敏测试板及无菌石蜡油。测试板上共 26 个微孔;鉴定区设有阴、阳性对照孔,Uu 和 Mh 的鉴定、计数孔,药敏区设有:强力霉素(DOX)、美满霉素(MIN)、环丙沙星(CFP)、氧氟沙星(OFL)、司帕沙星(SPA)、罗红霉素(ROX)、阿齐霉素(AZI)、克拉霉素(CLA)、交沙霉素(JOS)、壮观霉素(SPE)。10 种抗生素的药敏测定孔,分高低两个浓度。