

# Present Status of Hepatitis B Virus Nucleic Acid Detection Kit in China

Zhiwei Sui<sup>1\*#</sup>, Linglei Ran<sup>2\*</sup>, Ling Zhang<sup>1</sup>, Wen Chen<sup>2</sup>, Jing Wang<sup>1</sup>, Boqiang Fu<sup>1</sup>, Jiayuan Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Metrology, Beijing

<sup>2</sup>College of Arts and Science of Beijing Union University, Beijing

Email: #[suizhw@nim.ac.cn](mailto:suizhw@nim.ac.cn)

Received: Apr. 27<sup>th</sup>, 2014; revised: May 26<sup>th</sup>, 2014; accepted: Jun. 3<sup>rd</sup>, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

China has a high incidence of hepatitis B virus; nucleic acid amplification (PCR) quantitative detection of HBV nucleic acid biomarkers is one of the important means in diagnosis and treatment monitoring of hepatitis B virus. However, there are many commercial HBV nucleic acid detection kits in the Chinese market, it is necessary to evaluate and analyze the kit for hepatitis B virus nucleic acid production of different manufacturers. This article introduced HBV nucleic acid detection methods, present status and comparative analysis of HBV nucleic acid detection kits to provide the reference for the users and developers.

## Keywords

Hepatitis B Virus, Nucleic Acid, Detection Kit

# 中国乙肝病毒核酸检测试剂盒现状

隋志伟<sup>1\*#</sup>, 冉令磊<sup>2\*</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 陈文<sup>2</sup>, 王晶<sup>1</sup>, 傅博强<sup>1</sup>, 王佳媛<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中国计量科学研究院, 北京

<sup>2</sup>北京联合大学应用文理学院, 北京

Email: #[suizhw@nim.ac.cn](mailto:suizhw@nim.ac.cn)

收稿日期: 2014年4月27日; 修回日期: 2014年5月26日; 录用日期: 2014年6月3日

\*第一作者。

#通讯作者。

## 摘要

我国是乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)的高发区,应用核酸扩增技术对HBV核酸生物标志物进行定量检测是HBV诊断和治疗监测中的重要方法。然而,目前我国市场上的商业化HBV核酸检测的试剂盒很多,有必要对不同厂商生产的乙肝病毒核酸检测试剂盒进行评价和分析。本文对乙肝病毒核酸检测方法、乙肝病毒核酸检测试剂盒现状和比较分析等方面作一介绍,以供试剂盒使用者和研发者参考。

## 关键词

乙型肝炎病毒, 核酸, 检测试剂盒

## 1. 引言

乙型肝炎病毒是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒,简称乙肝病毒(HBV),是最常见的感染性疾病之一[1][2]。人一旦感染 HBV,经过一定的病程发展,可能会成为 HBV 慢性感染患者,最终因肝硬化或肝癌而死亡。近些年来中国是乙型肝炎的高发区,占全球 HBV 表面抗原(Hepatitis B virus surface antigen, HbsAg)总携带率的近 50%,其中 60%的人受过 HBV 的感染,在某些人群中甚至高达 79%[3],所以对 HBV 的防治仍然是我国健康与传染病控制中的首要问题。HBV 传染途径包括由血液传播、性传播、母婴传播等多方面,早期诊断可以提高 HBV 感染者获得治愈的机会、并且减少交叉感染和 HBV 传播,对传染病的预防控制有着重要意义。因此,快速、特异、灵敏的诊断技术对乙型肝炎患者的临床诊断及治疗是非常重要的[4]。

## 2. HBV 检测方法概况

目前 HBV 的检测主要分为基于蛋白质生物标志物的检测和基于 DNA 生物标志物的检测。基于乙肝病毒血清蛋白标志物的检测方法主要原理是采用抗原抗体免疫反应来进行检测,主要应用于确认是否 HBV 感染检测,例如酶联免疫吸附试验(ELISA)、固相放射免疫分析法(SPIA)等。病毒 DNA 检测是通过定量检测体内 HBV-DNA 的来确定病毒载量,是血清中 HBV 存在与复制的直接标志,例如荧光定量 PCR 法。随着大家对 HBV 认识的不断深入和完善,HBV-DNA 的检测已成为乙肝患者临床诊疗的重要依据[5]-[7]。

乙肝病毒核酸标志物主要是指 HBV-DNA,目前普遍将 HBV-DNA 的存在视为乙肝病毒复制的标识,且与肝病活动及传染性有关[8]。因此,它是目前评价 HBV 复制情况的“金标准”,HBV-DNA 检测是可以帮助确诊隐性 HBV 感染和隐性慢性乙型肝炎的实验室检测指标。而 HBV-DNA 定量检测对血清学非典型的慢性 HBV 感染者诊断至关重要,对非活动性 HBsAg 携带状态的判定有重要意义,也是了解 HBeAg 阴性慢性乙型肝炎病毒复制水平主要指标。

实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RQ-PCR)技术是由 Mullis 在 1987 年发明的 PCR 技术发展而来,是核酸定量技术的一次重大提高,由于该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,能够对 PCR 反映的全过程进行监控,并且自动化程度高,所以该技术从生产到现在短短十几年的时间,在科研及检验领域获得了广泛的应用,成为分子生物学领域不可或缺的一项重要技术。荧光定量 PCR 是在 PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为一寡核苷酸,两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收,刚开始时,探针结合在 DNA 任意一条单链上,PCR 扩增时,Taq 酶的 5'端-3'端外切酶活性将探针酶切降解,使报告

荧光基团和淬灭荧光基团分离,从而荧光监测系统可接收到荧光信号,即每扩增一条 DNA 链,就有一个荧光分子形成,实现了荧光信号的累积与 PCR 产物形成完全同步,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

荧光定量 PCR 是一种以标准品参考定量的核酸检测技术,在很多领域已得到广泛的应用,如基因表达、基因 SNP 分析、病原微生物等。HBV-DNA 的定量测定是检测病毒复制最直接、最可信赖的方法[9]。在进行 HBV-DNA 检测的同时,可以对其进行相对的量化,这对于乙肝患者体内的 HBV 复制以及传染性有更直接的了解,同时也更有利于临床诊断 HBV 感染、选择治疗方案及判断预后。荧光定量 PCR 法能够准确反映患者体内 HBV 复制水平,为临床医生选择治疗方案及预后判定提供了重要依据[10]-[12]。它具有快速、准确、灵敏度和重复性高,可以减少污染等特点。

### 3. HBV-DNA 检测试剂盒研究进展

利用核酸扩增技术(PCR)定量检测样本中 HBV-DNA 是乙型肝炎治疗过程中疗效监测的重要手段之一。继乙型肝炎病毒核酸扩增定性检测试剂盒批准临床使用之后,定量检测试剂盒也陆续批准临床使用。目前,用于 HBV-DNA 检测的荧光定量 PCR 检测试剂盒很多,为乙肝核酸检测提供了多样选择。然而,不同厂家生产的试剂在定量检测乙肝核酸时,检测结果的一致性和准确性需要进一步的验证和评价。

张丽[13]等人在 2003 年将国产乙肝病毒核酸检测试剂盒与进口乙肝病毒核酸检测试剂盒比较发现,国产试剂盒在产品的整体设计、检测灵敏度(104 拷贝/ml),测定范围(104~108 拷贝/ml)等方面已基本达到国外同类产品水平。但是在常规检验实验室使用过程中,可控性比较差,特别是对 HBV-DNA 低拷贝样本的检测精密度比较差,这成为国产同类产品共同存在的问题。吴星[14]等人在 2009 年再次对国产和进口检测试剂盒进行了比较,结果发现:1) 在检测样本量方面国产试剂盒小于进口试剂盒,这可能影响检测的灵敏度[15];2) 在提取方法方面,国产试剂盒多采用煮沸法提取病毒,进口试剂盒多采用磁珠吸附法提取病毒;3) 在内标方面,国产试剂盒不设内标,试剂盒定量结果可能造成偏低,进口试剂盒通过各管的内标进行单点定量,控制了提取过程的假阴性和病毒损耗。由于国产和进口试剂盒在病毒载量损耗和提取产物纯度方面的不同,均可影响定量检测结果的准确性。因此国产 HBV-DNA 定量 PCR 试剂尚需进行改进及进一步提高检测质量。

为了验证 HBV-DNA 的检测质量,2008 年张宪华[16]采用荧光定量 PCR 法对两种不同的 HBV-DNA 检测试剂盒进行比较和分析。通过选择 10 份正常血清、10 份 HBV 高清晰度血清和梯度稀释的 HBV 克隆质粒标准品来验证两种检测方法的重复性、特异性和灵敏度,结果发现两种试剂盒均有好的特异性和灵敏度,重复性极好。然而刘秀英[17]在比较达安和科华两种不同乙肝病毒核酸定量试剂测定结果时却发现两种试剂的检测结果虽然无明显差异,但在灵敏度和检测下限方面两种试剂盒却差异较大。

此外,龙幼敏[18]在 2011 年研究一种全新的免核酸提取的荧光定量 PCR 试剂检测 HBV-DNA,比较免核酸提取和核酸提取两种试剂扩增结果的一致性、灵敏度和相关性。选用上海某公司核酸提取试剂,使用两步核酸提取法,先在离心管中提取核酸得到核酸模版后再点样至 PCR 反应管中。则另一个是湖南某公司的免核酸提取试剂,整个过程都在 PCR 反应管中进行。结果两种 HBV-DNA 荧光定量试剂阴阳结果符合率为 100%,HBV-DNA 定量结果无显著差异。但发现该免核酸提 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂扩增效率、线性关系和重现性良好,因此具有潜在的临床应用价值和发展前景。

据统计,国内能够生产 HBV-DNA 检测 PCR 诊断试剂的生产厂商主要有达安基因、复星医药、华美生物、厦门艾普利、杭州艾康、杭州博赛等,但与国际上比较成熟的试剂在检测结果上还是存在不同差异,如此之多的生产厂家生产的试剂盒检测结果是否能达到一致,需要通过统一的标准进行评价和监测,以确保我国乙肝病毒核酸检测结果的准确。

## 4. 小结

随着目前实时荧光定量 PCR 的出现和不断应用,极大地简化了定量检测的过程,而且保证了定量检测准确性。众多厂商生产的商业化检测试剂盒,使实验的选择性更强,这些试剂盒的应用既保持了 PCR 技术灵敏与快速的特点,又克服了以往传统 PCR 的假阳性污染和不能进行准确定量的缺点[19] [20]。实时定量 PCR 是目前临床检测乙肝病毒核酸的分子方法,其特异度与灵敏度是其它方法难以达到的,但灵敏度高是把双刃剑,一方面可以非常灵敏的检测到体内极低浓度的病毒,另一方面,不当操作或者试剂盒设计缺陷可能会导致假阳性结果。为了避免假阳性的发生和保证定量测量结果的准确性,有必要对应用于检测的不同厂商和不同批次乙肝病毒核酸检测试剂盒进行评价和分析。通过荧光定量 PCR 法,建立相关曲线,再通过结果数据,从示值误差、检测下限、线性和重复性等内容进行评价,实现乙肝病毒核酸定量测定结果的一致,保证乙肝患者诊疗方法的准确性。

## 项目基金

科技支撑项目计划(2013BAK12B05), 公益性科研院所基本科研业务费专项(AKY1219)。

## 参考文献 (References)

- [1] 吴簧, 沈佐君 (2010) 乙型肝炎病毒基因型的中国国内研究进展. *国际检验医学杂志*, **7**, 703-704.
- [2] 梅玉峰, 黄敏, 陈丽娟 (2010) HBV-DNA 阳性乙肝感染者血清学标志物临床分析. *国际检验医学杂志*, **9**, 1004-1005.
- [3] 彭文伟 (1997) 病毒性肝炎研究. 广东科技出版社, 广州, 1.
- [4] 叶剑荣, 袁利群, 范旭, 蔡俊 (2012) 两种 HBV-DNA 荧光定量试剂盒检测结果比较. *国际检验医学杂志*, **33**, 1480.
- [5] 陈濒珠 (2005) 实用内科学. 人民卫生出版社, 北京, 21-27.
- [6] 程宏水 (2006) 肝炎的诊断及防治. 金盾出版社, 北京, 79-82.
- [7] 王传新, 王国礼 (2004) 现代检验医学技术及质量控制. 山东科学技术出版社, 济南, 119-122.
- [8] 崔春霞, 解希帝, 郑瑞芬 (2013) 乙型肝炎病毒的研究进展. *疾病监测与控制*, **7**, 228-231.
- [9] Chevaliez, S., Bouvier-Alias, M., Laperche, S., *et al.* (2008) Coba8 TaqMan real-time PCR assay for hepatitis B virus DNA quantitative cation. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**, 1716-1723.
- [10] 李桂民 (2011) HBV、HCV、HIV-1 荧光定量 PCR 检测体系的建立和应用. 东北师范大学, 长春.
- [11] Pan, X.B., Wei, L., Han, J.C., *et al.* (2008) Cellular chromosome DNA interfere with fluorescence quantitative real-time PCR detection of HBV-DNA in culture medium. *Journal of Medical Virology*, **1**, 47-52.
- [12] 周丹 (2010) 乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 检测在临床诊断中的价值. *检验医学与临床*, **7**, 2271-2272.
- [13] 张丽, 高恩明 (2005) 国产乙型肝炎病毒(HBV)核酸扩增(PCR)定量检测试剂盒技术现状介绍. *中国实验诊断学*, **9**, 0159.
- [14] 吴星, 黄维金, 周诚 (2009) 五种乙型肝炎病毒核酸荧光定量检测试剂盒的比较. *中华传染病杂志*, **3**, 142-146.
- [15] Shyamala, V., Arcangel, P., Cottrell, J., *et al.* (2004) Assessment of the Target acquisition PCR hepatitis B virus (HBV) DNA quantitative assay and comparison with commercial HBV-DNA quantitative assays. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 5199-5204.
- [16] 张宪华 (2008) 两种 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测比较. *中国现代医生*, **46**, 78.
- [17] 刘秀英 (2008) 两种不同乙肝病毒核酸定量试剂测定结果比较. *实用医技杂志*, **15**, 4067.
- [18] 龙幼敏, 明凯华, 陈英姿, 雷秀霞 (2011) 一种免核酸提取 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂盒临床应用价值的评估. *临床医学工程*, **18**, 652.
- [19] 陈辉 (2003) 有关乙肝病毒 DNA PCR 检测的问答. *现代实用医学*, **15**, 531.
- [20] 曹红卫, 卫国, 冯文曦 (2001) 乙肝病毒 DNA 荧光定量 PCR 检测及其意义. *第三军医大学学报*, **23**, 866-867.