

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.10.015

新型乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒的临床评价

刘立明¹,赵晓茹²,夏利芳²,王 童²,刘亚楠²,任 君^{3△},郭桐生^{2▲}

(1. 北京小汤山医院检验科,北京 102212;2. 中国人民解放军第三〇二医院,北京 100039;
3. 中国人民解放军第三二四医院,重庆 400020)

摘 要:**目的** 评价一种新型乙型肝炎病毒基因分型检测(免疫荧光法)试剂的临床性能。**方法** 收集中国人民解放军三〇二医院研究对象的血清 383 例,与血清对应的血浆 50 例。乙型肝炎病毒 A 基因型评价采用北京万泰生物药业股份有限公司试剂盒(荧光免疫层析法),基因序列测定为对照方法;乙型肝炎病毒 B、C、D 基因型评价使用北京万泰生物药业股份有限公司试剂盒(荧光免疫层析法),上海之江生物科技试剂盒(荧光定量 PCR 法)为对照试剂。验证试剂和对照试剂同时检测同一例标本,若结果不一致,2 种方法分别进行复测,结果以复测为准,如仍不一致进行基因测序,以测序结果为准,对结果进行 Kappa 一致性检验,计算 2 种方法的检测一致率。另通过验证试剂检测对应的血浆标本,评价验证试剂对血清、血浆标本检测能力的一致性。**结果** A 基因型验证试剂检出 15 例,对照方法检出 12 例,2 种方法的符合率为 12/15。B 基因型验证试剂相对对照试剂的阳性符合率为 98.00%(49/50),阴性符合率为 99.06%(315/318),总符合率为 98.91%(364/368),Kappa 值为 0.954。C 基因型验证试剂相对对照试剂的阳性符合率为 98.78%(242/245),阴性符合率为 86.99%(107/123),总符合率为 94.84%(349/368),Kappa 值为 0.881。D 基因型验证试剂相对对照试剂的阳性符合率为 87.50%(7/8),阴性符合率为 100.00%(360/360),总符合率为 99.73%(367/368),Kappa 值为 0.932。验证试剂对 50 例对应的血清/血浆标本检测,结果均为 5 例乙型肝炎病毒 B 基因型,44 例 C 基因型,1 例未分型。**结论** 该新型试剂盒对乙型肝炎病毒的 A、B、C、D 型分型效果较好,可用于感染病毒分型的临床检测。

关键词:乙型肝炎基因分型; 试剂盒; 试剂验证

中图法分类号:R445

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)10-1421-04

The evaluation of one new hepatitis B virus genotypes detecting kit

LIU Liming¹, ZHAO Xiaoru², XIA Lifang², WANG Tong², LIU Yanan²,
REN Jun^{3△}, GUO Tongsheng^{2▲}

(1. Beijing Xiaotangshan Hospital, Beijing 102212 China; 2. 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China; 3. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract:**Objective** To evaluate a new reagent called reverse dot blot assay kit for hepatitis B virus genotypes (immunofluorescence method). **Methods** Three hundred and eighty-three serum samples were collected. Another 50 cases of corresponding plasma were needed. Hepatitis B virus genotype A to D was detected by the diagnostic kit for hepatitis B virus genotypes (fluorescence immunochromatography assay). The gene sequencing technique was regarded as a control method for genotype A, and other genotypes were determined by real-time quantitative PCR. The same sample was detected by using the experimental reagent and control reagent at the same time. If the results were inconsistent, another two previous detections were needed as the final results. If the results of one more time detecting were still inconsistent, then the samples would be sequenced and the results were analyzed by kappa-test for symmetric measures. In addition, the results of the corresponding serum and plasma samples were analyzed to check the consistency. **Results** Fifteen genotype A samples were detected out by diagnostic kit, and 12 samples were detected out by the control reagent. For genotype B, C, D, the positive coincidence rates were of 98.00%, 98.78%, 87.50%, respectively; the negative coincidence rates were 99.06%, 86.99%, 100.00%, respectively; the total coincidence rates were 94.84%, 94.84%, 99.73%, respectively; the value of kappa were 0.881, 0.881, 0.932, respectively. And the detecting results of plasma samples were same as that of the corresponding serum samples. **Conclusion** The experimental reagent was able to meet the requirements to the clinical diagnosis.

Key words:genotypes of HBV; diagnostic kit; experimental reagent

乙型肝炎病毒(HBV)属于嗜肝 DNA 病毒,HBV 复制过程中易发生核苷酸错误配对,导致同一病毒核苷酸序列的差异,表现为 HBV 不同的基因型^[1]。根据 HBV 全基因序列异质性大于或等于 8%或 S 区基因序列异质性大于或等于 4%,可分为 A~I 9 种基因型^[2]。有研究报道 HBV 基因型与乙型肝炎的疾病进程、临床表现、预后与抗病毒治疗应答等密切相关^[3-5]。目前临床基因分型方法有基因测序法、限制性内切酶长度多态分析法、型特异性引物 PCR 法、基因芯片法等^[6-8]。此类方法操作过程均较繁琐,对实验室条件和人员要求较高,临床普及困难。本研究探讨 HBV 基因分型检测试剂盒采用荧光免疫技术,基于双抗加心法,操作简便,同时以实时荧光 PCR 法为对照,对该试剂(以下简称验证试剂)进行临床验证评价,探索一种高效、准确、易于普及的 HBV 基因型分型方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集解放军 302 医院临床检验医学中心分子诊断室研究对象的血清 333 例,50 例配对的血清和血浆,−20℃冻存。

1.2 仪器与试剂 验证试剂为 HBV 基因分型检测试剂盒(荧光免疫层析法)(北京万泰,批号 BGFC20141204),对应仪器采用 RTR-FS100 荧光扫描分析仪;对照试剂为 HBV 基因分型测定试剂盒(荧光 PCR 法),试剂盒内含 HBV B、C 质粒阳性质控(上海之江,H20150701);对应仪器采用 SLAN 荧光定量 PCR 检测系统及相应软件。基因测序法使用第 1 代测序方法,均由上海生工公司完成。

1.3 方法

1.3.1 验证试剂 (1)原理:采用荧光免疫技术和双抗体夹心法,硝酸纤维素膜检测区分别包被抗-HB-sAg 抗体、抗-A 型 HBV 抗体、抗-B 型 HBV 抗体、抗-C 型 HBV 抗体、抗-D 型 HBV 抗体,玻璃纤维垫上包被荧光标记 HBsAb。检测时标本 HBV 与荧光标记抗体结合在毛细作用下沿膜移动,与固定在膜上的包被抗体形成复合物,通过检测仪定性分析基因型。(2)操作:取 80 μL 血清或血浆标本置入试剂加样区,20 min 后荧光扫描分析仪读取分型结果。

1.3.2 对照试剂操作 提取核酸-配制试剂-加样-PCR 扩增;循环参数设置:37℃ 2 min,94℃ 2 min,再按 94℃ 10 s,62℃ 40 s,循环 40 次,单点荧光检测为 62℃,反应体系为 40 μL,荧光通道检测选择 FAM 通道。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计算验证试剂与对照试剂检测结果的符合率及其 95%CI,并计算 Kappa 值分析结果的一致性。

2 结果

2.1 2 种方法检测 A 基因型结果 A 基因型血清标

本验证试剂检出 15 例,对照方法检出 12 例,2 种方法的符合率为 15/12。B 基因型血清标本验证试剂与对照试剂结果的阳性符合率为 98.00%,阴性符合率为 99.06%,总符合率 98.91%。95%CI: 97.24%~99.70%,Kappa 值为 0.954,一致性最强。C 基因型血清标本验证试剂与对照试剂结果的阳性符合率为 98.78%,阴性符合率为 86.99%,总符合率 94.84%。95%CI: 92.05%~96.86%、Kappa 值为 0.881,一致性最强。D 基因型血清标本验证试剂与对照试剂结果的阳性符合率为 87.50%,阴性符合率为 100.00%,总符合率 99.73%。95%CI: 98.50%~99.99%,Kappa 值为 0.932,一致性最强。见表 1~3。

2.2 2 种方法不一致标本的第 3 方检测结果 验证试剂与对照试剂有 28 例血清标本 HBV 基因型检测结果不一致,采用第 3 方基因序列检测方法进行验证,其结果与验证试剂一致标本 17 例,不一致 11 例。见表 4。

2.3 验证试剂对相同血清和血浆标本的检测结果 验证试剂对同一例血清、血浆标本检测 B 基因型结果的阳性符合率为 100.00%,阴性符合率为 100.00%,总符合率 100.00%,95%CI: 92.89%~100.00%,Kappa 值为 1.000,一致性最强。验证试剂对同一例血清、血浆标本检测 C 基因型结果的阳性符合率为 100.00%,阴性符合率为 100.00%,总符合率 100.00%,95%CI: 92.89%~100.00%,Kappa 值为 1.000,一致性最强。见表 5、6。

表 1 2 种方法检测 B 基因型血清标本的结果比较(n)

检测方法	血清	对照试剂		合计
		阳性(+)	阴性(−)	
验证试剂	阳性(+)	49	3	52
	阴性(−)	1	315	316
合计		50	318	368

表 2 2 种方法检测 C 基因型血清标本的结果比较(n)

检测方法	血清	对照试剂		合计
		阳性(+)	阴性(−)	
验证试剂	阳性(+)	242	16	258
	阴性(−)	3	107	110
合计		245	123	368

表 3 2 种方法检测 D 基因型血清标本的结果比较(n)

检测方法	血清	对照试剂		合计
		阳性(+)	阴性(−)	
验证试剂	阳性(+)	7	0	7
	阴性(−)	1	360	361
合计		8	360	368

表 4 2 种方法的不一致标本第 3 方检测结果比较

序号	临床诊断	对照试剂		验证试剂		第 3 方检测	第 3 方与验证试剂的一致性
		初检结果	复检结果	初检结果	复检结果		
105	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
171	HBV(＋)	C	C	未检出	未检出	PCR 扩增(－)	一致
190	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
191	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
196	HBV(＋)	B＋C	B＋C	B	B	B	一致
201	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
210	HBV(＋)	未检出	未检出	B	B	PCR 扩增(－)	不一致
244	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
262	HBV(＋)	C	C	未检出	未检出	C	不一致
269	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	PCR 扩增(－)	不一致
271	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
282	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	PCR 扩增(－)	不一致
295	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
303	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	PCR 扩增(－)	不一致
314	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
315	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
321	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	C	一致
368	HBV(＋)	D	D	C	C	D/C 重组	不一致
376	HBV(＋)	未检出	未检出	B	B	B	一致
385	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	PCR 扩增(－)	不一致
397	HBV(＋)	未检出	未检出	C	C	D/C 重组	不一致
407	HBV(＋)	C	C	未检出	未检出	C	不一致
408	HBV(＋)	C	B	未检出	未检出	PCR 扩增(－)	一致
104	HBV(＋)	未检出	未检出	未检出	未检出	B	不一致
247	HBV(＋)	未检出	未检出	未检出	未检出	C	不一致
353	HBV(＋)	未检出	未检出	未检出	未检出	PCR 扩增(－)	一致
399	HBV(＋)	未检出	未检出	未检出	未检出	PCR 扩增(－)	一致
403	HBV(＋)	未检出	未检出	未检出	未检出	PCR 扩增(－)	一致

表 5 验证试剂检测相同血清、血浆 B 基因型标本的结果比较 (n)

检测类型	血清	对照试剂		合计
		阳性(＋)	阴性(－)	
血浆	阳性(＋)	5	0	5
	阴性(－)	0	45	45
合计		5	45	50

表 6 验证试剂检测相同血清、血浆 C 基因型标本的结果比较 (n)

检测类型	血清	对照试剂		合计
		阳性(＋)	阴性(－)	
血浆	阳性(＋)	44	0	44
	阴性(－)	0	6	6
合计		44	6	50

3 讨 论

目前普遍认为基因型 C 型引起的炎性坏死及纤维化程度比 B 型更严重,HBV e 抗原阳性率更高,平均年龄高于 B 型,且 C 型与肝硬化、肝癌有关;基因型 B 型的累积生存率明显高于 C 型,基因型 D 型易在年轻患者中发生原发性肝细胞癌,F 型比 A、D 型更易引起与肝脏疾病相关的病死率^[9-11]。因此,临床开展 HBV 基因分型检测对患者十分必要,但目前分型方法实验条件较高且难以普及,寻找一种高效、准确、简便的 HBV 基因型分析方法对基层临床实验室至关重要。

国家食品药品监督管理局注册的 HBV 基因分型检测试剂盒共有 7 个生产厂家,主要以 PCR 产品、测序法、反向点杂交为主,且主要检测 B、C 基因型,仅有上

海之江和厦门泰普的产品可以检测 B、C、D 基因型,未有可同时检测 A、B、C、D 基因型的上市批准产品。血清学方法检测基因分型是以抗原抗体反应为基础,具有经济、易操作、高通量等优点。有研究报道,PCR 检测技术分型的阴性患者 35% 可使用血清学分型技术检测,血清学分型要优于 PCR 技术。本研究结果表明,18 例患者使用 PCR 技术无法分型,但采用血清学方法能够分型。也有研究显示,血清学分不出型别的标本比例高达 23.4%。本研究有 9 例患者无法分型,

本研究试剂盒以抗原抗体反应为基础,采用荧光免疫技术和双抗体夹心法,在硝酸纤维素膜检测区分别包被抗-HBV 表面抗原抗体、抗-A 型 HBV 抗体、抗-B 型 HBV 抗体、抗-C 型 HBV 抗体、抗-D 型 HBV 抗体,玻璃纤维垫上包被荧光标记的 HBV 表面抗体。检测时标本置入试剂加样区,标本中的 HBV 与荧光标记抗体结合,在毛细作用力下沿膜移动,与固定在膜上的包被抗体形成复合物,通过荧光扫描分析仪定性分析 HBV 基因型。

本研究以测序法作为参比方法,验证万泰新试剂对 A 基因型的检出性能,且验证试剂和对照试剂(B、C、D 基因型)对血清标本中 HBV 基因分型的试验结果之间具有较好的符合程度,临床应用中两者具有等效性。383 例标本中,有 28 例检测结果不一致,但以参比方法为准,28 例标本有 17 例与参比方法一致,另外 11 例标本有 2 例是混合感染导致结果不一致。相对于对照方法所需的较高试验条件、熟练操作人员、复杂操作步骤等,验证试剂方法具有操作简便、检测时间短、灵敏度高等优点,且验证试剂对血清与血浆的检测能力具有一致性。

综上所述,HBV 基因分型检测(免疫荧光法)试剂盒能满足国内医疗机构临床 HBV 基因分型的检测需求,便于及时报告结果,辅助临床诊断,尤其可在基层医疗卫生机构普及使用。

参考文献

[1] 苏荣,罗娜,杨彦斌,等. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎患者

(上接第 1420 页)

房呼吸机相关性肺炎的危险因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(1):7-10.

[9] XU W, LU Y, YAO J, et al. Novel role of resveratrol: suppression of high-mobility group protein box 1 nucleocytoplasmic translocation by the upregulation of sirtuin 1 in sepsis-induced liver injury[J]. Shock, 2014, 42(5): 440-447.

[10] KARLSSON I, WERNERSSON S, AMBRODRN A, et al. Increased concentrations of C-reactive protein but not

乙型肝炎基因变异和分型研究[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(12): 1804-1807.

[2] 彭瑛,邓正华,黄远帅,等. 慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒基因分型的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 3025-3029.

[3] SCHAEFER S. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 14-21.

[4] 杨娜,胡雪梅. HBeAg 阳性慢性乙肝患者 HBsAg 定量与 HBeAg、HBV DNA、基因型的相关性[J]. 临床输血与检验, 2016, 18(1): 43-46.

[5] 陈燕敏,袁武锋,庞珍珍. 杭州地区乙型肝炎病毒基因分型与临床指标关系研究[J]. 中国现代医生, 2015, 53(21): 97-100.

[6] SHI W, ZHANG Z, LING C, et al. Hepatitis B virus sub-genotyping: history, effects of recombination, misclassifications, and corrections[J]. Infect Genet Evol, 2013, 16(5): 355-361.

[7] TONG Y, LIU B, LIU H, et al. New universal primers for genotyping and resistance detection of low HBV DNA levels[J]. Medicine(Baltimore), 2016, 95(33): e4618.

[8] IRSHAD M, GUPTA P, MANKOTIA D S, et al. Multiplex qPCR for serodetection and serotyping of hepatitis viruses: A brief review[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(20): 4824-4834.

[9] 樊笑霞,陈军,徐丽萍. 上海地区不同类型乙肝患者 HBV 基因分型与 DNA 水平[J]. 山东医药, 2009, 49(21): 18-19.

[10] 王拱辰,施广霞. 肝细胞癌患者血清 HBV 基因分型的相关研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(8): 752-756.

[11] GUNARDI H, ISKANDAR M Y, TURAYAD I, et al. Hepatitis B virus infection in children of HBV-related chronic liver disease patients: a study of intra-familial HBV transmission[J]. Hepatol Int, 2017, 11(1): 96-104.

(收稿日期:2017-11-10 修回日期:2018-01-12)

high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2013, 156(1-2): 64-72.

[11] HIGA F, FURUGEN M, KOIDE M, et al. Clinical evaluation of high mobility group box 1 protein in Legionella pneumophila pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2014, 20(5): 289-292.

(收稿日期:2017-11-26 修回日期:2018-01-18)