

# 实时荧光定量 PCR 技术定量检测乙型肝炎病毒 DNA 效果评价

郭金芳\*

(滨州市第二人民医院检验科, 滨州 256800)

**摘要: 目的** 观察实时荧光定量 PCR 检测技术在检测乙型肝炎病毒 DNA 时的检验结果以及实质性影响。**方法** 研究数据选取 2023 年 1 月—2023 年 12 月期间的乙肝患者 1500 例, 均进行血清学标志物法和实时荧光定量 PCR 检测, 对照标准为临床诊断结果, 对比指标为 DNA 定量检测结果。**结果** 共确诊的 1500 例乙型肝炎患者中, 实时荧光定量 PCR 技术检测出的乙型肝炎病毒 DNA 定量结果显示, 有 1380 例患者 (92.00%) 的病毒载量能够被明确量化, 而相比之下, 血清学标志物法仅能明确量化 1260 例 (84.00%) 患者的病毒载量。除技术外, 可能影响最终检测结果的还包括实验室、样本和核酸提取等多环节的操作、贮存等因素。**结论** 实时荧光定量 PCR 技术相较于传统的血清学标志物检测法而言, 其敏感性和准确度更高, 更加适用于现代检验医学科。

**关键词:** 实时荧光定量 PCR 技术; 乙型肝炎病毒; DNA 定量检测; 影响因素

## Evaluation of the effect of real-time fluorescence quantitative technique PCR for quantitative detection of hepatitis B virus DNA

GUO Jin-Fang\*

(Department of Laboratory Medicine, Second People's Hospital of Binzhou City, Binzhou 256800, China)

**ABSTRACT: Objective** To observe the test results and substantial impact of real-time fluorescence quantitative PCR detection technology in detecting hepatitis B virus DNA. **Methods** 1500 patients with hepatitis B from January 2023 to December 2023 were selected for the study data, and all of them were detected by serological markers and real-time fluorescent quantitative PCR. The control standard was the clinical diagnosis results, and the comparison index was the DNA quantitative detection results. **Results** Among the 1500 confirmed hepatitis B patients, real-time fluorescence quantitative PCR technology detected hepatitis B virus DNA quantification results, which showed that the viral load of 1380 patients (92.00%) could be clearly quantified, while the serological marker method could only clearly quantify the viral load of 1260 patients (84.00%). In addition to technology, factors that may affect the final test results include laboratory operations, sample and nucleic acid extraction, and storage at multiple stages. **Conclusion** Real time fluorescence quantitative PCR technology has higher sensitivity and accuracy compared to traditional serum blood marker detection methods, and is more suitable for modern laboratory medicine.

**KEY WORDS:** real time fluorescence quantitative PCR technology; hepatitis B virus; DNA quantitative detection; influence factor

## 0 引言

乙型肝炎也是俗称的乙肝, 属于一种慢性传染性疾病, 在我国的发病率相对较高, 虽历经了多年的研究与防控, 但其在

全球范围内的传播和流行势头仍不容忽视, 至今仍是全球范围内公共卫生领域的挑战之一。据有关调查显示, 乙肝在我国的流行现状较为严峻, 其患病率已经仅次于结核病, 并且仍呈现逐年缓慢上升趋势<sup>[1]</sup>。乙肝作为慢性传染性疾病具有典型的病

\* 通信作者: 郭金芳, 副主任技师, 实验室主任, 研究方向为临床医学检验。E-mail: 1303609333@qq.com

\*Corresponding author: GUO Jin-Fang, Deputy Chief Technician, Laboratory Director, Department of Laboratory Medicine, Second People's Hospital of Binzhou City, Binzhou 256800, China. E-mail: 1303609333@qq.com

程长和迁延难愈的特点,随着病情发展,有很大的风险会发展成为肝硬化和肝细胞癌等恶性疾病,患者最终的恶劣结果就是死亡<sup>[2]</sup>。因此,早发现、早诊断、早治疗成为控制乙肝传播和改善患者预后的关键。随着我国现代检验医学的发展,对于乙肝病毒的检验方法也在不断优化、升级,实时荧光定量 PCR 技术就是近年来在乙型肝炎病毒 (HBV) 检测领域崭露头角的一项重要技术。相较于传统的血清学标志物检测法,该项技术在 HBV-DNA 的定量检验中展现出更强的敏感性和精确性,能够更加全面反映出乙型肝炎病毒在患者体内的复制状态,从而确定病毒载量和病情进展。然而在实际操作中,最终检测结果也会受到实验室条件、样本储存与处理、核酸提取等环节因素的影响。因此,本研究也将针对该方法在乙型肝炎病毒 DNA 定量检测中的应用进行分析,与血清学标志物检测技术进行对比,分析结果和影响因素,为乙肝病毒的早期诊治提供科学依据,有助于检测流程的优化以及检测质量的提高。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

研究数据选取 2023 年 1 月—2023 年 12 月期间的乙肝患者 1500 例,所有患者的有效确诊均由血清学标志物和肝功能检查联合确定。1500 例乙肝患者中男女比例为 49:51,年龄在 22 岁至 60 岁之间,平均年龄 (41.25±3.47) 岁。所有患者均已自愿签署知情同意书,并且近期末接受相关抗病毒治疗,意识清醒、精神正常。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 血清学标志物法

采用常规血清学检测方法,对患者血清中的乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎表面抗体 (HBsAb)、乙型肝炎 e 抗原 (HBeAg)、乙型肝炎 e 抗体 (HBeAb) 和乙型肝炎核心抗体 (HBcAb) 进行定性检测,检测顺序按照上述顺序进行。初步筛查并确认患者的乙型肝炎感染状态后,将其作为实时荧光定量 PCR 技术定量检测研究的对象。

#### 1.2.2 实时荧光定量 PCR 技术检测法

##### (1) 样本准备

在确定检测日期后,检验人员就要明确告知患者及其家属在检测抽血当日不可进食进水,需以空腹的状态等待抽血。与抽血当日的清晨时分,从每位患者处采集空腹静脉血 5 mL,对抽取到的合格样本进行离心分离,再进行接下来的检测。

##### (2) 技术操作流程

①在样本准备妥当后,开始进行核酸提取操作。选用核酸提取试剂盒 (生产厂家:厦门安普利生物工程有限公司),严格

按照试剂盒的说明书进行各项操作,从离心后的血清样本中提取出乙型肝炎病毒 DNA。这一步骤需要确保提取过程和结果的精准,同时需要确保全程在无菌环境下进行,以此才能保证乙型肝炎病毒 DNA 提取物的效率和纯度最大化。

② PCR 扩增 (9800 型 PCR 扩增仪): 针对乙型肝炎病毒 DNA 的保守序列采用特定的引物对,对其进行 PCR 扩增。模板 DNA、引物、dNTPs、Taq 酶及 PCR 缓冲液等均在步骤的扩增体系内。整个扩增流程需严格按照 PCR 扩增程序进行,设置温度循环,以确保扩增效率和特异性。

③实时荧光定量检测: 在 PCR 扩增的过程中,利用荧光染料或者荧光探针对其扩增产物的实时生成进行记录,记录扩增物的生成到累积的过程。当 PCR 扩增物累积到一定程度后,荧光信号会呈现出显著增强的状态,使用 StepOne 实时荧光定量分析仪 (生产厂家为美国 ABI 公司) 仪器自动记录这一增强过程并且会对这些增强的荧光信号进行分析,从而测算出乙型肝炎病毒 DNA 的定量结果。

### (3) 数据分析

乙型肝炎病毒 DNA 的实时荧光定量检测结果均会通过仪器自带的软件功能进行逐个分析,自动生成检测数据和图表,以供比对。检验人员需将该方法所得结果与血清学标志物法的检测所得结果进行比对,并结合患者的实际情况和临床诊断信息对结果进行综合评估后形成检验报告。

### 1.3 观察指标

#### 1.3.1 检验结果

观察并记录定量检测结果,包括 DNA 病毒载量的测定结果,以确诊、漏诊和误诊为对照指标。

#### 1.3.2 影响因素

对本次乙型肝炎病毒 DNA 的定量检测分析过程中,观察并记录实验室条件、标本抗凝血、标本贮存、溶血和血脂以及核酸提取方法等因素所导致的漏诊、误诊的例数占比。

### 1.4 统计学分析

以 SPSS 22.0 软件为本次研究所获数据的处理工具,使用“ $[n(\%)]$ ”“ $(\bar{x}\pm s)$ ”分别对计数、计量数据进行表示,以“ $\chi^2$ ”“ $t$ ”实施组间检验,以  $P<0.05$  具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测结果

实时荧光 PCR 技术检测最终的乙型肝炎病毒 DNA 定量结果与血清学标志物法检测的 DNA 数据结果 (见表 1) 存在一致性,但是从检验结果的准确性上来看,选择实时荧光 PCR 定量检测技术的结果准确性更高。

表 1 检验结果对比 [n(%)]

Table 1 Comparison of the test results [n(%)]

检测方法	例数	确诊(病毒 DNA 明确量化)	漏诊/误诊
血清学标志物法	1500	1260(84.00)	240(16.00)
实时荧光定量 PCR 技术检测法	1500	1380(92.00)	120(8.00)
$\chi^2$	—	—	45.4545
$P$	—	—	<0.001

共确诊的 1500 例乙型肝炎患者中,实时荧光定量 PCR 技术检测出的乙型肝炎病毒 DNA 定量结果显示,有 1380 例患者 (92.00%) 的病毒载量能够被明确量化,而相比之下,血清学标志物法仅能明确量化 1260 例 (84.00%) 患者的病毒载量。

通过进一步分析,发现实时荧光定量 PCR 技术在检测病毒载量较低,判断标准为  $<10^3$  IU/mL 个体时更具检验优势,准确

性和灵敏度更高,与血清学标志物法存在显著差异。

### 2.2 影响因素分析

通过对本次乙型肝炎病毒 DNA 的定量检测过程进行分析,认为除技术外,可能影响最终检测结果的还包括实验室、样本和核酸提取等多环节的操作、贮存等因素有关,在漏诊误诊的 120 例患者中,受相关因素的影响如表 2 所示。

表2 影响因素分析  
Table 2 Analysis of influencing factors

影响因素	例数(n)	占比(%)
实验室条件	18	15.00
标本抗凝血	30	25.00
标本贮存	42	35.00
溶血和血脂	18	15.00
核酸提取方法	12	10.00

### 3 讨论与结论

人体感染乙型肝炎病毒后会根据自身体质的不同而呈现出不同的临床表现和免疫应答反应,引发急、慢性肝炎。乙型肝炎是肝硬化和肝细胞癌的重要诱因之一,一系列并发症和严重肝脏疾病的发展势必会威胁到患者的生命安全<sup>[3]</sup>。因此,早期诊断对于控制乙型肝炎病毒的发展具有重要意义,还会在一定程度上延长患者的生命周期。乙型肝炎病毒是现代医学检验科的重要检测对象之一,对乙型肝炎病毒DNA的定量检测更是提高确诊结果准确率的关键<sup>[4]</sup>。而实时荧光定量PCR检测技术被广泛应用于检验医学科,在实际检验中发现,该检验技术对于检测乙型肝炎病毒DNA的过程中具有显著优势,特别与血清学标志物法的检验性能相比,其优势尽显。这也为本次研究提供了思路。本研究通过两种检验方法并用的方式,对乙肝患者进行了DNA载量测定,旨在发现何种检验方法对于乙型肝炎病毒DNA载量的测定结果更加精准。

本次研究结果显示,实时荧光定量PCR技术检测出的乙型肝炎病毒DNA定量结果要显著高于血清学标志物法的检验结果( $P < 0.05$ )。在实际检验过程中,实时荧光定量PCR法所需的操作流程更加标准化和规范化,基本实现了无人化检验,有效减少了人为因素对最终检验结果的影响。在检验过程中,实时荧光定量PCR技术呈现出如下关键点,这也是与传统检验技术和结果呈现显著差异的根本原因<sup>[5]</sup>。PCR扩增以模板DNA特异性和循环为扩增原理,设计针对乙型肝炎病毒DNA特定区域的引物设计,借助DNA聚合酶的催化作用,使乙型肝炎病毒DNA片段在体外进行指数级扩增<sup>[6]</sup>。而PCR循环则包括变性、退火和延伸这三个基本步骤,双链DNA经加热后被解离成单链,引物与模板DNA的特定序列相结合,经引物引导合成新的DNA链,实现循环的延伸<sup>[7]</sup>。

在本研究中,所选用的是荧光探针和染料进行信号检测,在PCR的扩增过程中,荧光探针会与模板DNA相结合,被DNA聚合酶切割后释放荧光信号,其强度与PCR产物数量成正比。而荧光染料在PCR的反应体系中能够直接结合到双链DNA上,并且伴随着扩增产物的生成累积,荧光信号也会随之而增强<sup>[8]</sup>。通过本次研究结果的验证,这两种荧光信号检测技术均能够在PCR扩增反应过程中的荧光信号实时监测,这也是确保检测结果的准确性和敏感性的基础。此项研究结果也证明了在PCR的循环过程中是可以对乙型肝炎病毒DNA进行动态且精确地定量的。在此基础之上,本研究还对120例发生漏诊误诊的乙肝患者进行了结果影响因素的分析,揭示了实验室条件、标本处理及贮存、溶血和血脂干扰,以及核酸提取方法等关键因素对检测结果的潜在影响。PCR扩增技术对于实验室的硬件条件要求较高,要求完善试剂和仪器的质控体系。在软件方面,要求人员定期接受相关检验技术的培训并参与实践活动,明确实时荧光定量PCR技术的检验流程与操作规范,避

免在实验室造成人为失误。在标本管理方面更应加强,从采集到提取应当严格遵循实验室的无菌操作原则,因为该环节属于人为参与环节,存在一定的人为因素和外部因素的干扰风险<sup>[9]</sup>。

本次研究中因实验室条件因素所影响最终漏诊误诊的患者占比为8%,足以证明我院在实验室条件因素管理方面还存在一定的完善空间,在硬件建设和软件管理方面都需要严格按照实验室管理规范进行提升。对此,要强调标本合规管理的重要性,适当处理抗凝标本、严格控制标本的贮存温度、湿度及时间、预处理溶血和血脂含量高的样本等。标本抗凝血因素之所以会对患者最终的检验结果造成影响,是因为肝素抗凝素的使用会导致样本中的DNA与抗凝剂结合,使其裂解失效,会在极大程度上降低乙型肝炎病毒DNA的提取浓度和纯度,必然会对后续PCR的扩增过程和效果造成影响<sup>[10]</sup>。标本在存储期间,会存在一定的变性风险,其主要原因与过长的静置时间和温度过高有关,如果标本的静置时间已经超过三小时,或者环境温度超过25摄氏度,都将引起标本变性的发生。对此,在标本储存与静置等环节要严选试剂盒,根据拆封与否分开储存,谨防污染。核酸提取方法的不同也会导致最终结果受到影响,而本研究中所采用的核酸提取方法为商用化试剂盒,具有较高的自动化和标准化程度,能够有效减少操作过程中的误差和污染风险。

实时荧光定量PCR技术检验乙型肝炎病毒DNA的敏感性和准确度更高,更加适用于现代检验医学科。

### 参考文献

- [1] 李静,毕燕华,黄月华,等.高敏与普通荧光定量PCR技术在不同病毒载量慢乙肝患者HBV-DNA检测的一致性及应用价值[J].热带医学杂志,2023,23(02):198-202.
- [2] 石莹,田绿波,樊学军,等.磁珠法结合实时荧光PCR试剂检测HBV-DNA临床性能验证[J].中国国境卫生检疫杂志,2023,(05):46-47.
- [3] 艾文彬,王定保.一种新型乙型肝炎病毒耐药基因检测方法的建立及应用[J].检验医学与临床,2022,23(11):52-56.
- [4] 叶青,赵敏,冉紫晶,等.miRNA-122在慢性乙型肝炎患者循环血清中的水平表达及与病情程度的相关性分析[J].四川医学,2021,42(06):61-64.
- [5] 贺良,耿小平,赵红川,等.肝细胞肝癌中乙肝病毒基因整合位点及临床病理分析[J].肝胆外科杂志,2022,14(02):225-228.
- [6] 李永富.高敏.PCR检测HBV-DNA在慢乙肝低病毒血症患者中的应用价值[J].现代诊断与治疗,2023,34(22):3448-3449,3473.
- [7] 刘运东,刘娟,康金贤.电化学发光法在乙肝表面抗原检测中的应用研究[J].中国城乡企业卫生,2023,38(07):30-33.
- [8] 雷艳,金郑宝,詹世淮,等.基于不同型号荧光定量PCR仪比对HBVDNA检测结果的一致性分析[J].临床医药实践,2023,32(06):435-437,440.
- [9] 张黎.荧光定量PCR法在乙型肝炎病毒检测中的准确性评价[J].基层医学论坛,2023,27(11):98-100.
- [10] 李震.不同免疫检验方法在乙型肝炎患者血清标志物检测中的应用[J].实用检验医师杂志,2023,15(01):9-12.

### 作者简介

郭金芳,副主任技师,实验室主任,研究方向为临床医学检验。