

A large, stylized graphic of a DNA double helix runs vertically along the left side of the page. It is rendered in a dark blue color against a light yellow background.

基因诊断 —— 荧光PCR检测试剂及其临床应用

深圳市匹基生物工程股份有限公司
SHENZHEN PG BIOTECH CO.,LTD.

公司简介

深圳市匹基生物工程股份有限公司是一家主要从事研发、生产和销售体外基因检测用荧光 PCR 试剂盒的分子生物高科技企业。

公司于一九九八年经深圳市政府批准建于深圳市高新技术产业园区。园区濒临深圳湾，毗邻港澳，环境优美，是国家重点支持的六大科技园区之一，被国家认定为“高新技术产品出口基地”和“亚太经合组织(APEC)科技工业园区”，国内各院校、科研院所及大批国内外著名企业竞相入驻，已形成学、研、产体系，具有美好的发展前景。

公司总投资已达9000万元，是我国首家通过药品生产质量管理规范(GMP)认证的体外基因诊断试剂产业化基地。按照GMP要求建立了全封闭式的自动化生产流程和严格的质量监控管理体系，形成了目前年产3000万人份荧光PCR检测试剂的生产能力。公司配备了目前国际上最新型的荧光PCR检测仪以及用于试剂盒生产的自动化系统和用于新产品开发的先进仪器设备，如ROCHE公司的LightCycler荧光PCR检测仪、PE公司的PE7700、BIO-RAD公司的iCycler, Beckman公司Biomek2000自动分装系统以及Beckman公司最新型的CEQ2000 DNA序列分析系统、DNA合成仪、Beckman公司的System Gold 126/166高效液相色谱仪等各类纯化分析系统等。

公司一直十分注意人才的选拔和培养。公司技术总裁兼总工程师朱文斯博士毕业于美国Rochester大学，并在NIH(美国国立卫生研究院)工作多年，在基因分子生物学领域具有极深的造诣，曾在中国、新加坡获得多项技术专利。公司拥有一支以多名博士、硕士为骨干的优秀专业人员组成的新产品研发队伍和按照GMP要求严格培训的生产及质量检验人员队伍。其中50%具有生物工程或生物化学专业硕士学位、20%具有博士学位和教授、副教授高级职称。

公司在继续研发用于临床的荧光PCR检测试剂盒的同时，正在致力于用于血液筛查、

国家检验检疫等领域优质荧光PCR检测试剂盒的研发。迄今为止开发研制并生产了二十余种荧光PCR检测试剂盒,其中有十余种已经获得或即将获得国家药品监督管理局颁发的国家二类新药的新药证书和生产文号。匹基公司全体员工将一如既往为人民大众的健康和国家利益不断作出我们的贡献。

公司是由深圳华育昌国际科教开发有限公司与三九集团深圳市三九医药股份有限公司为主体投资的高科技企业。华育昌是由全国十三所大学为主体投资的公司,汇集了大批科技人才,技术力量雄厚,市场经验丰富,经济实力雄厚。三九在医药市场具有优良的品牌效应、先进的管理经验和遍布全国各地的庞大销售网络。以上强强联合,必将为匹基快速发展,成为国内同行业中最优秀的生物工程基地,起到巨大的推动作用。

二〇〇一年八月二十三日与国际著名医药企业 ROCHE 公司的罗氏诊断(上海)公司签订了《市场合作框架协议》。匹基与罗氏的合作,是中国一家发展迅速的新兴生物企业与国际一家著名而强大的百年老字号的合作。匹基虽然年轻但也具有自己的一些优势,正如出席签字仪式的罗氏诊断亚太区总裁Walt先生所说:“在罗氏诊断看来,匹基是一个十分理想的合作伙伴,因为其拥有技术上的优势以及出类拔萃的质量水准。匹基与罗氏一样对质量与革新有着很强的承诺。”在中国加入WTO后,匹基也将在购用罗氏公司的原辅材料、检测仪器诸多方面享受优惠的待遇。同时匹基公司将从研发、生产、质量控制、市场服务、经营理念、企业管理等多层面获得向世界著名的医药企业学习和借鉴的机会,为匹基健康快速发展并走向世界打下良好的基础。

匹基生物向广大用户郑重承诺: 优质产品、优质服务。

目 录

荧光 PCR 原理.....	1
PCR 防污染措施.....	3
荧光 PCR 在临床诊断上的应用.....	4
乙型肝炎病毒(HBV) 核酸扩增(PCR)	
荧光检测试剂盒.....	6
丙型肝炎病毒(HCV) 核酸扩增(PCR)	
荧光检测试剂盒.....	10
人免疫缺陷病毒(HIV) 核酸扩增(PCR)	
荧光定量检测试剂盒.....	12
人巨细胞病毒(HCMV) 核酸扩增(PCR)	
荧光定量检测试剂盒.....	16
结核分支杆菌(TB)核酸扩增(PCR)	
荧光检测试剂盒.....	19
沙眼衣原体和淋球菌(CT&NG)核酸扩增(PCR)	
荧光双检试剂盒.....	21
HBV YMDD 突变核酸扩增(PCR)	
荧光检测试剂盒.....	25

荧光PCR原理

1. 荧光染料

荧光基团通常各自拥有单一的光吸收峰。在光的刺激下,荧光基团吸收光的能量后通常以三种方式释放出能量:

1) 光能

许多荧光基团吸收光能后仍旧以光能形式释放能量,并且发射光的峰值大于吸收峰。比如荧光染料Fam的光吸收峰为490nm,而发射峰为530nm。

2) 热能

某些荧光基团吸收光能后,能量转换为热量扩散到环境中,如Dabcyl。

3) 转移给临近的分子

当临近的分子满足发生能量转移的要求时,能量从荧光基团传递到临近的分子。

2. 荧光共振能量转移 (Fluorescence resonance energy transfer, FRET)

当某个荧光基团的发射光谱与另一荧光基团的吸收光谱发生重叠,且两个基团距离足够近时,能量可以从短波长(高能量)的荧光基团传递到长波长(低能量)的荧光基团,这个过程称为荧光共振能量转移(FRET),实际相当于将短波长荧光基团释放的荧光屏蔽。

3. 荧光PCR

荧光PCR不同于其他PCR的地方在于PCR过程中利用荧光染料在光刺激下释放的荧光能量的变化直接反映出PCR扩增产物量的变化,荧光信号变量与扩增产物变量成正比,并通过足够灵敏的自动化仪器实现对荧光的采集和分析以达到对原始模板量定量的目的。主要有以下几类:

1) 荧光染料直接结合扩增产物

如SYBB Green I,类似于EB,能特异性地区分单双链DNA,只与双链DNA结合。

2) 荧光标记引物

对引物进行荧光标记从而使荧光标记基团直接掺入PCR扩增产物。

3) 荧光标记探针

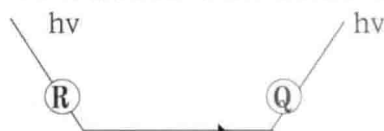
常规引物以外,引入荧光基团标记的特异性探针,探针可与模板发生一对一结合关系。

a) Taqman双标记探针 (TaqmanTM 5'-nuclease assay)

b) 分子信标探针 (Molecular beaconTM)

c) LightCyclerTM 杂交双探针

荧光标记探针的最大优点在于其特异性非常强,避免了非特异性扩增造成的假阳性信号。

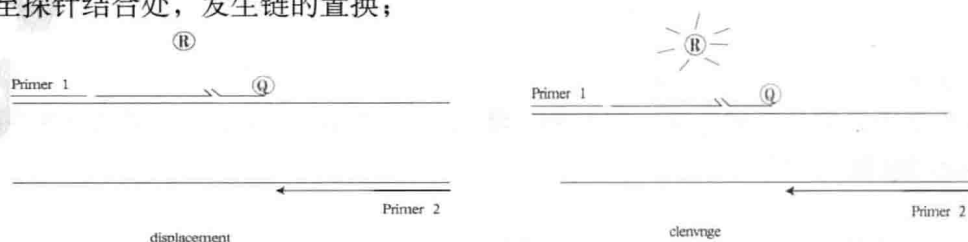


Taqman probe

匹基生物开发的荧光PCR检测试剂盒主要基于Taqman技术 (TaqmanTM 5'-nuclease assay)。

除常规的一对引物以外,PCR反应体系中另外有一个能与PCR产物杂交的荧光双标记探针。该探针的5'端标记一个荧光基团,3'端标记另一个荧光基团。此时5'端荧光基团吸收能量后将能量转移给临近的3'端荧光淬灭基团(发生FRET),因此正常情况下检测不到该探针5'端荧光基团发出的荧光信号。

但当溶液中有模板时，模板变性后低温退火时，引物与探针同时与模板结合。在引物的介导下，沿模板向前延伸至探针结合处，发生链的置换；



Taq酶的5'—3'外切酶活性将探针5'端连接的荧光基团从探针上切割下来，游离于反应体系中，从而脱离3'端荧光淬灭基团的屏蔽，接受光刺激发出荧光，切割的荧光基团数与PCR产物的数量成比例。因此根据PCR反应液的荧光强度即可计算出初始模板的数量。

4. 荧光定量PCR (Fluorescent Quantitative PCR, FQ-PCR)

1) Threshold: PCR扩增信号进入相对稳定对数增长的最下限，通常设定在S型扩增曲线的增长拐点处附近。

2) Threshold Cycle (TC or CT) OR Cross Point(CP): PCR增长信号与Threshold发生交汇的循环数，也是FQ-PCR判断阴阳性和进行定量分析的依据。

3) Standard Curve(标准曲线): CT/TC/CP与起始模板量的对数呈反比关系: $Y = -aX + b$ 其中 $X = \log \text{Concentration}$ $Y = CT/TC/CP$

PCR扩增过程中，引入一系列已知起始浓度的模板与未知样品同时进行扩增，利用该系列模板的CT/TC/CP值与已知浓度对数做直线回归得到标准曲线，从而计算出未知样品的起始模板浓度。

5. 荧光PCR的优点

荧光PCR区别于其他PCR方法主要有以下优点：

- 1) 全封闭反应，无需PCR后处理
- 2) 特异性强，灵敏度高
- 3) 采用对数期分析，摒弃终点数据，定量准确
- 4) 定量范围宽，可达到10个数量级
- 5) 仪器在线式实时监测，结果直观，避免人为判断
- 6) 可实现一管双检或多检
- 7) 操作安全，缩短时间，提高效率
- 8) 利于自动化和联网管理

PCR 防污染措施

PCR在临床诊断的推广面临的最大问题是污染的控制，其中最大的污染源就是PCR扩增产物。对PCR扩增产物扩散的预防和处理显得尤为重要。

1. 实验环境的控制

PCR应实行严格的分区操作：前准备区用于试剂的配制和准备；样本处理区主要进行核酸的分离提取等，其中DNA和RNA的处理也应该分开；扩增区用于PCR扩增操作。各区的操作器械、工作服等应专区使用，并尽量使用一次性消耗品如手套、枪头、离心管等，所有使用过的枪头、离心管等均应立即浸泡于0.1-1N HCl或0.1/%次氯酸钠，并进行集中高压消毒，实验器械和台面均应进行定期消毒等。

2. 避免PCR后处理

荧光PCR不同于其他的PCR方法，无须对PCR扩增产物进行任何的检测，实际就是对PCR污染的有力预防。

3. dUTP 防污染系统

反应体系中常规的dNTPS中的dTTP替换为dUTP，在扩增过程中dU取代dT的位置掺入到PCR产物中，在尿嘧啶糖基酶(UNG)的作用下，发生U的糖苷键的水解，经高温处理后DNA链断裂成碎片，从而无法成为下一轮的PCR的模板。

荧光PCR在临床诊断上的应用

随着现代科学技术的进步与发展,临床医学诊断技术从第一代的细胞形态学技术发展 to 第二代的生化检验技术到第三代的免疫学诊断技术直至第四代的基因诊断技术。其中PCR技术由于其高灵敏度、高特异性、快速简便及直接检测致病病原体或异常基因等特点,成为基因诊断在临床应用最为广泛的技术之一。

在90年代,PCR技术在我国临床诊断曾得到广泛应用,但由于PCR产品厂家的良莠不齐,PCR技术本身的特点对于实验条件提出特殊的要求,而实际中许多用户对其的忽略或无法实现等原因,造成各种假阴性或假阳性结果,反而给临床诊断带来困难和错误。

目前荧光PCR的兴起以及国家职能部门对此的重视和控制为现在的尴尬局面带来良好的转机,并且显示出更为光明的应用前景。

1) 早期诊断

免疫学诊断主要是抗原抗体反应,应用于临床通常在体内产生抗体以后,许多病原体的抗体产生存在较长的“窗口期”,不利于对疾病的早期诊断;而PCR方法直接检测病原体的DNA/RNA,能大大缩短“窗口期”。以HCV为例,免疫学检测的“窗口期”平均长达70天,而荧光PCR可将“窗口期”缩短59天,显然有利于疾病的早期诊断。

2) 药物疗效观察

对病原体的药物治疗中,免疫学指标的变化通常比较滞后出现,且受个体差异影响较大,从而对临床判断难以及时提供直接证据;而荧光定量PCR检测可直接反映病原体滴度是否受药物治疗发生变化,从而为药物疗效观察提供直接依据,以供治疗方案参考;同时药物治疗中可能引起的基因变异等情况更依赖核酸检测提供直接证据。

3) 病情判断和预后评价

评估受侵器官或组织的炎症发生程度以及是否发生病变,长时间机体病毒高水平的患者尤其是慢性病患者往往预后不好。因此对病原体的定量PCR检测对病情和预后评估均有参考意义。

4) 加快疾病的诊断

许多病原体到目前为止仍旧依靠传统的细菌培养作为诊断手段,操作繁琐费时。以结核杆菌为例,传统培养法需要1-2个月,而荧光PCR可将检测时间缩短至半天,能更及时地为临床提供诊断依据。

5) 疾病的发病监控

许多病原体可以感染人体后整合入细胞内成为整合型,而一旦机体免疫力下降等又重新进入活动期并引致发病,临床上希望通过检测病原体基因的数量变化并结合临床表现找出其活动以及是否引起发病的规律,荧光定量PCR可以为此提供直接证据。

6) 遗传疾病的诊断

荧光PCR可实现对点突变、缺失突变、插入突变、多基因突变等的检测。对产前诊断具有其他方法不可比拟的优势,有利于优生优育,提高人口素质。

7) 母婴传播的监控

PCR技术可对病原体的母婴传播进行有效的监控,为病原体的母婴传播阻断等提供参考。

8) 献血员的筛选

PCR的高灵敏度及其对窗口期的缩短使其在提高输血安全方面有重要作为,目前美国、日本以及欧洲均已采用PCR对献血员进行筛选。

9) 肿瘤的诊断

荧光PCR可对原癌基因的突变和易位等作出检测；对原癌基因的mRNA进行定量分析；有利于肿瘤的早期诊断，甚至癌前诊断；探索癌变发生机理的研究提供参考；区别肿瘤的良性和恶性以及炎症反应。

乙型肝炎病毒 (HBV) 核酸扩增 (PCR) 荧光检测试剂盒

1963年Blumberg在两名多次接受输血治疗的病人血清中,发现一种异常的抗体,它能与一名澳大利亚土著人的血清起沉淀反应。直到1967年才明确这种抗原与乙型肝炎(简称乙肝)有关,1970年在电子显微镜下观察到HBV的形态,1986年将其列入嗜肝DNA病毒科。

联合国卫生组织(WHO)估计2000年全球慢性HBV感染达4个亿,全球因乙肝死亡数100万/年。我国在世界上属于乙型肝炎病毒感染的高发区,我国目前乙型肝炎病毒感染率约60-70%,其中有10-15%人血清HBV表面抗原阳性(其中有的地区和特定人群HBV感染率达50-75%)而表现为乙型肝炎病毒感染。其中约10%的HBV感染者临床上有明显症状和体征,肝功能及其他理化检查明显异常,而表现为急性肝炎、慢性肝炎、脂肪肝,有的发展为重症肝炎、肝硬化甚至原发性肝细胞癌等。也就是说,全国12亿人口,约有1.2亿人携带乙肝病毒,而乙肝患者全国约有3千万人。因此乙型肝炎对我国人民健康构成严重的威胁。

HBV的传染性很强,输血或注射是重要的传染途径,也可口感染。外科和口腔手术、针刺、使用公用剃刀、牙刷等物品,皮肤微小操作污染含少量病毒的血液,均可成为传染源。孕妇在妊娠后期患急性乙型肝炎,其新生儿容易感染此病。由于乙型肝炎患者和HBsAg携带者的精液、阴道分泌物均可检出HBsAg,因此两性接触传播乙型肝炎的可能性是存在的。

乙型肝炎病毒具有明显的种属及嗜肝特性,可致持续性病毒感染。人类感染乙肝病毒后,尤其是成年人,大部分在6个月内病毒被清除痊愈,但有5-10%成为持续感染和成为慢性肝炎。慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染能导致严重的肝脏疾病,最终可发展为肝炎后肝硬化、肝细胞性肝癌。

乙肝病毒检测中,目前较为广泛采用的是以酶联免疫吸附(ELISA)法,检测乙肝病毒表面、E和核心抗原抗体系统中乙肝病毒表面抗原(HBsAg,又称澳大利亚抗原或澳抗HAA)、乙肝病毒表面抗体(HBsAb,抗HBs)、乙肝病毒e抗原(HBeAg)、乙肝病毒e抗体(HBeAb,抗HBe)、乙肝病毒核心抗体(HBcAb,抗HBc)五个指标,即俗称的“二对半”。

乙型肝炎表面抗原(HBsAg)

HBsAg阳性为HBV感染的指标,但不反映病毒有无复制、复制程度、传染性强弱及预后。HBsAg本身不具感染性,阳性常见于急性乙型肝炎潜伏期、急性期、慢性迁延性肝炎、慢性活动性肝炎、肝硬化;还见于HBsAg携带者。但HBsAg阴性不能完全排除HBV感染。

乙型肝炎表面抗体(抗HBs)

为HBV的中和抗体,通常意味机体已经产生免疫力。阳性表示曾经感染过HBV,现在体内已有保护性抗体,具一定免疫力,对机体有保护作用;乙肝疫苗注射后或注射抗HBs免疫球蛋白者可呈阳性反应。但S基因突变等可造成抗HBs和HBV DNA同时阳性的结果。

乙型肝炎表面抗原(HBsAg)和乙型肝炎表面抗体(抗HBs)均为阳性可能由于S亚型的存在造成。

乙型肝炎e抗原(HBeAg)

阳性通常表示正患有乙型肝炎,是乙型肝炎病毒复制活跃的标志,具高度传染性。HBeAg阳性与HBV DNA有显著相关,但不能为一一对应关系。

乙型肝炎e抗体(抗HBe)

抗HBe是感染性抗体,不是保护性抗体。抗HBe出现快慢与肝炎转归有关。乙肝急性期出现者易进展为慢性肝炎;慢性活动性肝炎抗HBe阳性者可进展为肝硬化,如HBsAg,抗HBe阳性,

且ALT升高者,要注意考虑有无原发性肝癌的可能。抗HBe阳性检出率肝癌>肝硬化>慢性乙型肝炎。抗HBe阳性孕妇所娩婴儿中有20%感染HBV。

乙型肝炎核心抗体(抗HBc)

抗HBc总抗体包括抗HBc(IgG、IgM、IgA),主要为IgG阳性表明曾有过乙型肝炎病毒感染或疾病处于恢复期。抗-HBc阳性可持续数十年甚至终身。

HBV DNA与血清免疫学的关系

1. HBV DNA与HBsAg/HBsAb的关系

HBsAg阳性代表机体感染乙肝病毒,但不代表其复制情况。HBsAg阳性而HBV DNA阴性的原因有以下几点:乙肝病毒DNA发生与宿主细胞基因组的整合,此时只能表达HBsAg,而没有DNA的复制;PCR试剂的灵敏度不够。

HBsAg阴性而HBV DNA阳性的原因有以下几点:(1)机体急性感染乙肝病毒期,HBsAg检测呈阳性通常需要经历所谓“窗口期”而HBV DNA的检出可提前6-15天;(2)HBsAg的水平过低造成无法检出,或者HBsAg确已消失但病毒仍处于低水平复制状态;(3)暴发性乙型肝炎时肝细胞中以合成HBcAg为主,很少或不合成HBsAg;(4)S区基因发生逃避免疫变异造成HBsAg阴性而HBV DNA阳性;(5)血清亚型的漏检:HBsAg具有几种特异性抗原组分,包括各亚型共同抗原特异决定簇a,和二组互相排斥的亚型决定簇d/y和w/r。HBsAg的主要亚型有adr、adw、ayr及ayw4种。欧美各国以adr为主,我国汉族以adr居多,中部地区及我国少数民族地区以ayw为主(西藏、新疆、内蒙等)。以Abbott的试剂为例,其主要针对adr、adw。(5)老年人HBsAg检出率低于5%,处于HBV的低感染和高免疫状态,老年中HBV感染引起的慢性肝病,血清学表现不典型,病毒较多已发生变异,病毒免疫逃逸而感染持久。

HBsAb的出现通常认为表示病毒已清除。但已有报道HBsAb出现后血清内仍有DNA复制,尤其急性乙型肝炎感染窗口期HBsAb与HBV DNA同时阳性,但通常HBV DNA检出率逐步下降。

2. HBV DNA与HBeAg/HBeAb的关系

在HBV感染的自然史中,伴随HBeAg的阴转往往是HBV病毒血症的消失或炎症的静息。所以人们通常认为HBe系统的血清学转变即HBeAg转阴继而出现HBe抗体的转化为乙型慢性肝炎好转稳定的标志。事实上HBV在与宿主相互作用的过程中,形成了持续感染和逃避清除的精确机制。一部分感染者中如慢性肝炎患者,HBeAg阴转并不意味着炎症活动的停止。乙肝病毒基因前C区83位碱基由鸟嘌呤(G)突变为腺嘌呤(A),造成该区28位氨基酸突变为终止密码子而丧失HBeAg的合成与分泌功能,从而HBe抗体阳转。前C区变异株HBV虽呈全世界分布,但以欧洲地中海地区和亚洲多见,其流行率占CHB的40%~80%。前C区变异HBV在慢性HBV携带者中也很常见,通常HBeAg阳性的HBV携带者约75%为单纯的HBV野株感染,而另25%则存在野株与前C区变异株混合感染,当HBeAg血清阴转时,前C区变异株即可转为HBV优势株。HBeAg阴性而存在HBV病毒血症的情形定义为HBeAg阴性的HBV感染;在另一部分感染者中如重型肝炎患者,主要以HBcAg的表达为主,感染起始即为HBeAg阴性。

荧光定量PCR对HBV DNA检出的临床意义

1. 判断疾病的严重程度和传染性

HBV DNA是直接反映HBV复制状态及传染性的最佳指标。

2. PCR结果与血清免疫学结果的综合评价

随着现代医学的检测技术的发展,采用基因扩增技术(PCR)检测对HBV-DNA进行乙肝病毒DNA定性和定量,结合二对半检测结果,对于机体乙肝病毒感染状态尤其变异株发生和病人预后的评估更为科学。

3. 观察抗病毒药物疗效,指导药物用量

直接检测血清中的HBV DNA是监控HBV传染和观察抗病毒药物疗效的最可靠的方法。根据《2000年拉米夫定临床应用指导意见》,中国慢性乙型肝炎病人治疗的目的主要就是降低血清HBV DNA,诱导HBeAg血清转换,使ALT正常化,改善肝脏组织学病变,改善疾病症状、体征,提高生活质量,降低肝硬化和肝癌的发生率。同时血清的HBV DNA滴度的动态变化还可在临床上对用药的剂量、用药时间以及是否需要联合用药等提供参考。

4. 献血员窗口期病毒核酸的筛查及早期诊断

HBsAg在血清中的检出通常在乙肝病毒感染机体后的2-4月出现,平均为56天左右。而HBV DNA的检出可以将该所谓“窗口期”缩短6-15天,对于早期诊断和提高输血安全有着重要的意义。

5. 预测病情、判断预后

HBV DNA的定量检出对于病情的预测和预后的判断有着参考意义。通常HBV DNA持续阳性超过6个月的会转为慢性肝炎。抗-HBe阳性患者血清HBV DNA持续阳性常提示肝损严重。50%以上抗-HBe阳性慢活肝病人,经平均4.5年发展为肝硬化,常与HBV DNA持续阳性有关。

6. 器官移植中的作用

肝脏器官移植是目前肝硬化晚期治疗的唯一方法,但有约86%以上既往HBsAg携带者术后HBsAg重新出现。检测HBV DNA可用于观察免疫受损患者的HBV感染状况。肝移植后乙肝主要是复发,再感染为次要因素。特别是移植前HBV复制水平高者,复发和再感染的机率是要更高的。定量检测HBV DNA为肝移植术后的跟踪观测具有较好的临床价值。

7. 对阻断母婴传播的监测

联合应用高价免疫球蛋白和乙肝疫苗有效地阻断母婴传播,但仍有5-10%婴儿对疫苗呈低反应,荧光PCR可对此进行监测,分析阻断失败的原因。

试剂盒简介:

深圳市匹基生物工程股份有限公司开发的乙型肝炎病毒核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒已于1999年12月获得国家药品监督管理局颁发的二类新药证书。该试剂盒适用于血清标本,其结果可用于乙型肝炎的辅助诊断和抗病毒药物疗效的观察。试剂盒在获得认证的GMP厂房中生产,采用中国药品生物制品检定所标准品系列作为质量标准,生产和质控完全按GMP要求进行。

该试剂盒具有以下特征:

1. 高灵敏度

检测限度可达到500copies/ml。

2. 高特异性

对丙肝病毒、人类免疫缺陷病毒、庚肝病毒、输血传播病毒、戊肝病毒等的检测均保持良好的阴性结果。

3. 防污染

与电泳法等不同,该试剂盒无须PCR后处理,完全闭管扩增和检测,同时采用了dUTP-UNG系统,有效地防范了PCR扩增产物的污染,避免假阳性结果,提高临床诊断依据的可靠性。

4. 操作简单、耗时短

试剂盒在特定的荧光PCR检测仪上进行扩增和检测,不需要进行电泳或杂交的操作,只需1-1.5小时即可完成PCR过程,有利于提高报告出具的速度。

5. 定量结果准确

定量范围为 $10^3-5 \times 10^7$ copies/ml,无须对样品进行烦琐的稀释。与FDA批准的国外同类试剂相比可达到93%以上的相关性(参见表1、图1)。

6. 结果客观可靠

无需人为判断,仪器自动收集和分析数据。

适用机型: Roche LightCycler ; BIO-RAD icycler; PE7700; PE5700。

表1 PG HBV FQ-PCR与国外同类试剂的灵敏度比较

标本编号	Roche 结果	PG结果	ROCHE结果	
	(copies/ml)	(copies/ml)	(Logcopies/ml)	(Logcopies/ml)
0-1	1.73E+07	2.8E+07	7.24	7.25
0-2	1.36E+06	3.00E+06	6.13	6.48
0-3	2.48E+05	2.80E+05	5.39	5.45
0-4	3.11E+04	7.70E+04	4.49	4.89
0-5	1.14E+04	1.30E+04	4.06	4.11
0-6	2.09E+03	1.70E+03	3.32	3.23
0-7	2.82E+02	3.30E+02	2.45	2.52
0-8	0.00E+00	0.00E+00	0.00	0.00

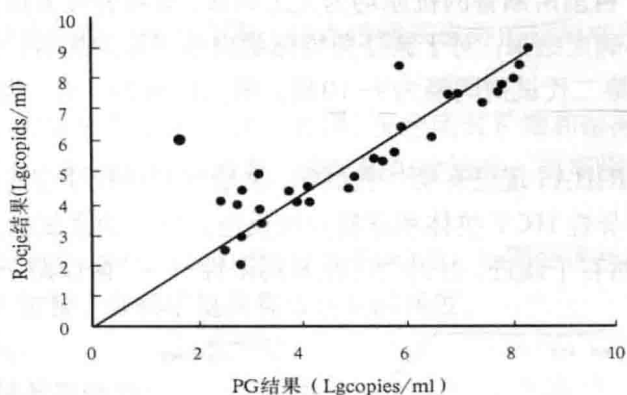


图1 PG HBV FQ_PCR与国外同类试剂相关性比较

丙型肝炎病毒（HCV）核酸扩增（PCR）荧光检测试剂盒

HCV 的病原学

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是最近几年才发现的一种单链正股RNA病毒,1991年,国际病毒分类委员会将HCV归类于黄病毒科(Flaviviridae)。

丙型肝炎病毒在受感染者血清及肝组织内数量较少,用电镜不易看到。经HCV-cDNA分析,HCV基因组全长9419bp,新近核苷酸序列分析研究证明至少存在6种HCV基因型和90种以上的亚型,我国的HCV基因型主要是Ⅱ型和Ⅲ型。

与HBV相比,HCV存在许多生物学特性的差别。RNA病毒不如DNA病毒稳定,更易变异,因而更易慢性化。HCV感染者的病毒血症水平比HBV感染者低得多,因而感染力也弱得多。

HCV 的流行病学

HCV是引起输血后非甲非乙型肝炎的主要病因之一。丙型肝炎呈全球性分布,无明确地理界限。全世界大约有1%的普通人群感染此病,约50%以上慢性肝炎是由HCV感染引起的。在美国,丙型肝炎发病率占急性病毒性肝炎的20-30%;我国由于对献血员筛选方法不够灵敏,输血后乙型肝炎发病率占2/3,其余1/3为丙型肝炎,其中20-30%病人发展为肝硬化。

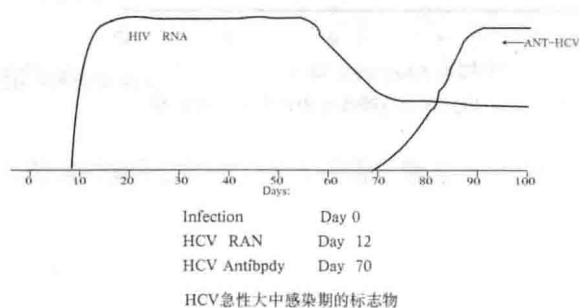
HCV 的常规检测方法

目前临床上常用的HCV检测方法主要有两类:血清学方法(EIA或RIA)测定抗HCV及PCR法检测血清HCV-RNA。

抗HCV酶联免疫(EIA)试剂是目前诊断丙肝的主要手段,普遍应用于检查血源和血液制品。抗HCV出现较慢,一般在发病后2-6月阳转,有的在12个月才出现阳性。自1989年研制了第一代抗HCV EIA试剂,目前已发展到第三代产品。第一代所用抗原为C-1003、第二代抗原包括核心抗原及NS3NS4抗原、第三代在第二代的基础上又加上NS5抗原。此类试剂已被广泛应用,但由于HCV病毒的分离尚不成功,目前所制备的抗原均为人工合成,其特异性方面仍然存在不足,主要是在低危人群中发现大量的不确定结果;对于某些免疫球蛋白水平高的患者,也可能出现假阳性。另外,感染后至抗体出现,在第二代试剂间隔为9-10周,第三代为6-8周,因此对于HCV感染的早期检测还需加强。

试纸条免疫印迹试验(RIBA)现已有第二代试剂,灵敏度和特异性有所提高,主要用于ELISA检测可疑者,能帮助区别特异性HCV抗体和非特异性反应,是一确证试验。

HCV抗体检测方法虽然有了改进,但仍然存在其局限性——“窗口期”平均长达70天(如图),



不利于早期诊断；而且只代表既往感染，可在病毒清除后仍长时间存在，有报道说该时间可长达9年，无法准确判别抗-HCV阳性者是否有病毒血症。

荧光PCR检测HCV RNA的临床意义

血清中的HCV RNA是病毒复制和肝炎进程的确切标志。所以，检测血清HCV-RNA已成为诊断HCV病毒血症的“金标准”。HCV感染者血清病毒滴度通常很低，常规分子杂交技术难以检出HCV-RNA。近年发展的逆转录PCR (RT-PCR)，巢式PCR (nested PCR) 技术将HCV-RNA检测的特异性和灵敏度大大提高，而荧光PCR的出现又将此检测技术推向了另一台阶。

通过荧光PCR的方法直接检测HCV-RNA，大大提高HCV感染的检测准确性，有利于疾病的早期诊断，可将“窗口期”缩短平均56-60天，对“窗口期”感染的筛选和提高输血安全也非常有意义。此外，在抗病毒药物治疗中，HCV RNA是对其疗效评价的指标之一。另检测HCV RNA的滴度和基因型可对用药和预后提供参考。以干扰素治疗为例，治疗前血清HCV RNA水平低者通常应答好于血清HCV RNA水平高者；基因1型的病人通常比基因2型(尤其是2a)的应答差。治疗过程中，HCV RNA的动态监测同时还可作为临床上的用药剂量、时间等提供依据。

匹基丙型肝炎病毒(HCV)核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒简介

深圳市匹基生物工程股份有限公司的丙型肝炎病毒(HCV)核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒于2000年1月获得国家药监局颁发的二类新药证书，随之又获得了生产文号。该试剂盒利用一对丙肝病毒的特异引物、一个特异性荧光探针，配以PCR反应底物，采用PCR方法结合荧光探针的扩增检测技术，通过荧光信号的变化检测丙肝病毒RNA。本试剂盒适用的被检样本为血清样本，适用于丙型肝炎患者和携带者、可疑人群的HCV检测以及献血员及血液制品的筛查等。试剂盒采用WHO国际标准品作为质量标准，严格按照GMP管理规范进行质量控制，检测结果可用于丙型肝炎的辅助诊断。

该荧光PCR试剂盒的主要特点有：

1. 高灵敏度

检测限度可达到1000copies/ml。

2. 高特异性

对乙肝病毒、艾滋病病毒、庚肝病毒、输血传播病毒等的检测均保持良好的阴性结果。

3. 防污染

与电泳法等不同，该试剂盒无须PCR后处理，完全闭管扩增和检测，同时采用了dUTP-UNG系统，有效地防范了PCR扩增产物的污染，避免假阳性结果，提高临床诊断依据的可靠性。

4. 操作简单、耗时短

试剂盒在特定的荧光PCR检测仪上进行扩增和检测，不需要进行电泳或杂交的操作，只需1-1.5小时即可完成PCR过程，有利于提高报告出具的速度。

5. 结果客观可靠

无需人为判断，仪器自动收集和分析数据。

6. 结果判断

由于结合了荧光检测技术，本试剂盒结果判断上的主要指标为仪器自动给出的Ct值。若在实验中加入用于定量参考的标准曲线，则在结果判断时可直接取用仪器自动计算好的病毒拷贝数。该数值的大小真实反映了待检者所带有的病毒载量的多少。

适用机型：Roche LightCycler；BIO-RAD icycler；PE7700；PE5700。

人免疫缺陷病毒 (HIV) 核酸扩增 (PCR) 荧光定量检测试剂盒

艾滋病在美国从1978年在纽约发现第1例以后,逐年直线上升,世界卫生组织宣布到1992年7月底统计已达164个国家,约50万人以上患AIDS,病人随着年代的推进,累积数量不断增加,1995年6月30日,世界卫生组织公布,全世界登记在册的艾滋病病例已接近117万。世界卫生组织认为,实际数要比此数高得多,估计全世界AIDS病例总数可能已超过500万,全世界目前HIV感染者的总数已超过2000万人,每天还约增加600人。死亡病人数近100万人,故称之为“世纪绝症”。目前以美洲为最多,其次是亚洲,欧洲名列第三。但亚洲HIV感染人数正飞速上升,本世纪末下世纪初,亚洲处于艾滋病扩散期。在泰国,印度,已从高危人群扩散到一般人群,成人已有20%受感染。产前妇女HIV阳性率高达8%,再过5年,大多数新感染的病例将来自于亚洲。

在我国大陆,自1986年首次发现一美籍阿根廷人在西安发病,经多方检查确诊为AIDS。距世界首例报道AIDS相隔4年。进入90年代我国的HIV病情情况更加不可阻挡地迅猛发展,按国家卫生部公布的数字,1990年HIV带毒者为492人,AIDS仅为5名,其后逐年上升,到2000年年底,大陆31个省、自治区、直辖市累积报告HIV感染者22,517例,其中艾滋病病例880例,死亡病例496例。据官方数据我国大陆HIV感染者达50万,但包括隐瞒病例等,专家估计实际感染者已达500万。艾滋病正以洪水凶猛之势向我们袭来。

人类免疫缺陷病毒是艾滋病(Aids)的病原体,系引起细胞病变的灵长类逆转录病毒之一,属逆转录病毒科(Retroviridae)慢病毒亚科(Lentivirinae)。它于1983年Montagnier等首先从1例淋巴腺病综合征患者分离到,命名为淋巴腺病综合征相关病毒(Lymphadenopathy Associated Virus, LAS)。随后1984年美国Gallo等从艾滋病病人分离到逆转录病毒,命名为嗜人类T淋巴细胞病毒Ⅲ型(Human T Cell Lymphotropic Virus Type Ⅲ, HTLV-Ⅲ),后来证明这二种病毒是一样的。至1986年国际病毒命名委员统一称为人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)。

HIV基因组长约9.2~9.7kb,含gag、Pol、env3个结构基因,及至少6个调控基因(Tat、Rev、Nef、Vif、Vpr、Vpu)并在基因组的5'端和3'端各含长末端序列(图30-2)。HIV LTR含顺式调控序列,它们控制前病毒基因的表达。已证明在LTR有启动子和增强子并含负调控区。HIV主要型别为HIV-1和HIV-2,艾滋病大多由HIV-1引起。其中中国大陆主要以HIV-1中B'、C亚型为主,E亚型近年有明显增长趋势。

HIV的传染源主要是HIV感染者,曾从血液、精液、阴道分泌液、眼泪、乳汁等分离得HIV。其传播途径有:

1. 性传播:通过男性同性恋之间及异性间的性接触感染。
2. 血液传播:通过输血、血液制品或没有消毒好的注射器传播,静脉嗜毒者共用不经消毒的注射器和针头造成严重感染,据我国云南边镜静脉嗜毒者感染率达60%。
3. 母婴传播:包括经胎盘、产道和哺乳方式传播。
4. 医源性传播:医务人员可因针头刺伤或粘膜被污染的血液溅污而接触病毒,已有因被HIV的血液针头刺伤医务工作者而发病的报导,虽然病例不多,但应引起高度重视。

HIV的致病性主要是其选择性地侵犯带有CD4分子的细胞,主要有T4淋巴细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞等。细胞表面CD4分子是HIV受体,通过HIV囊膜蛋白gp120与细胞膜上CD4结合后由gp41介导使毒穿入易感细胞内,造成细胞破坏,进而造成免疫功能的缺损。

艾滋病病人由于免疫功能严重缺损,常合并严重的机会感染,常见的有细胞(鸟分枝杆菌)、原虫(卡氏肺囊虫、弓形体)、真菌(白色念珠菌、新型隐球菌)、病毒(巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、乙型肝炎病毒),最后导致无法控制而死亡,另一些病例可发生Kaposi肉瘤或恶性淋巴瘤。此外,感染单核巨噬细胞中HIV呈低度增殖,不引起病变,但损害其免疫功能,可将病毒传播全身,引起间质肺炎和亚急性脑炎。

HIV感染人体后,往往经历很长潜伏期(3~5年或更长至8年)才发病,表明HIV在感染机体中,以潜伏或低水平的慢性感染方式持续存在。当HIV潜伏细胞受到某些因素刺激,使潜伏的HIV激活大量增殖而致病,多数患者于1~3年内为死亡。

HIV的实验室检查

(一) 抗体检测

初筛试剂主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫荧光试验(IFA)。ELISA用去污剂裂解HIV或感染细胞液提取物作抗原,IFA用感染细胞涂片作抗原进行抗体检测,如果发现阳性标本应重复一次。确认试剂通常采用Western blot(WB,蛋白印迹法)。即用聚丙烯酰胺凝胶电泳将HIV蛋白进行分离,再经转移电泳将不同蛋白条带转移于硝酸纤维膜上,加入病人血清孵育后,用抗人球蛋白酶标抗体染色,就能测出针对不同结构蛋白抗体,如抗gp120、gp41、P24抗体,特异性较高。

(二) 抗原检测

用ELISA检测P24抗原,在HIV感染早期尚未出现抗体时,血中就有该抗原存在。但由于P24量少,阳性率通常较低。现有用解离免疫复合物法或浓缩P24抗原,来提高敏感性。

(三) 病毒分离

常用方法为共培养法,即用正常人外周血液分离单个核细胞,加PHA刺激并培养后,加入病人单个核细胞进行共培养。

(四) 核酸检测

用PCR法检测HIV基因,具有快速、高效、敏感和特异等优点,目前该法已被应用于HIV感染早期诊断及艾滋病的研究中。

荧光PCR技术在HIV检测中的应用

1. 追踪HIV的自然感染史

荧光PCR可在其它血清学和病毒学标志出现前检测病毒RNA,这样可判定无症状而且血清阴性患者潜在的HIV的传播性;同时还可用来监测长潜伏期的HIV携带者,及时为人群的监控和安全提供信息。

2. 观察抗病毒药物疗效,指导药物用量

血液中胞外HIV RNA的量与抗HIV药物治疗的进程及疗效有着十分直接的关系,目前用于治疗艾滋病的药物中主要就是抗病毒药物,HIV RNA滴度的定量测定和动态变化可在临床上对用药的剂量、用药时间以及联合用药等提供指导参考。

3. HIV感染的早期诊断

由于在感染HIV后到出现免疫反应之前有一段“窗口期”,可长达6周至6个月,而且无抗体产生期可能更长些。在此期间受感染者往往检测不到抗体,因此,血清阴性的人也可能已感染HIV。PCR法在高危人群中检测到HIV-1比由血清学转阳确诊的时间可以提前10~15天。对血清学试验结果不能确定者,也可通过PCR作进一步分析和确诊。