

限,表示有 97.5% 的概率两种系统得出的结果不具一致性,偏倚不可接受。所以 AST、BUN、GLU、CK 的预期偏倚均可接受,测定结果可比性良好,而 Cr 在其医学决定水平处的预期偏倚不可接受,需要调整。

3.3 Cr 在 2 台仪器上测试的相关性虽然好,但由于 BS-380 的定标方式与日立 7180 的不同,而且 BS-380 采用的滤波片的光学系统,而日立 7180 采用的光栅,存在系统误差。为使结果一致,以利于临床观察,根据比对的 a 和 b 对 BS-380 测定的结果添加相应的系数,经系数调整后,再次进行比对结果显示,两种方法具有可比性,允许误差大于 95% 的可信区间上限,符合 1/4CLIA'88 的标准,结果可接受。

当实验室使用不同的检测系统测定相同项目时,应定期对其检测结果进行比对和偏倚评估。如果偏倚不可以接受,根据直线回归方程 $Y=bX+a$ 的 a 和 b,在实验方法上添加相应的系数,可以使不同检测系统结果具有可比性,从而为临床提供稳定而可靠的诊断依据。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3

- 版. 南京:东南大学出版社,2006:59-60.
- [2] 张秀明,庄俊华,徐宁,等. 不同检测系统血清酶测定结果的偏差评估和可比性的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2006,29(4):346-349.
- [3] 邱玲,程歆琦,刘荔,等. 多台生化分析仪多项目同时进行比对的实验研究设计及应用[J]. 中华检验医学杂志, 2007,30(9):1001-1004.
- [4] 王丽,牛璐璐,权翠侠,等. 组合生化检测系统实验结果偏倚评估[J]. 临床检验杂志,2007,25(6):425-426.
- [5] 房玉珠,姚冬明,顾红兵,等. 3 种检测系统测定血清电解质的方法学对比与评估[J]. 江苏大学学报:医学版, 2008,18(1):73-76.
- [6] 张勤寂,刘堂斌,陈丽峰. 室间不同生化检测系统测定结果的比对及偏倚评估[J]. 实验与检验医学,2008,26(2): 151-152.

(收稿日期:2012-06-15)

连接酶检测反应法检测乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药突变的可行性

孙艺艳,吴月平,毛丽萍,陆建荣,陈琳,陆仁飞(江苏省南通市第三人民医院 226006)

【摘要】 目的 探讨依据寡核苷酸等位基因特异性聚合酶链反应(PCR)扩增及连接酶检测反应(LDR)方法检测乙型肝炎病毒(HBV)4 种核苷(酸)类似物耐药突变的可行性。**方法** 以基因库公布的 981 条 HBV 基因序列为基础,针对拉米夫定、替比夫定、阿德福韦和恩替卡韦 8 个耐药位点上的氨基酸替换形式,设计 15 对特异性引物,采用多重 PCR 扩增 HBV P 基因区野生型和突变型目的片段,然后进行多重 LDR,最后在 ABI3130 测序仪上电泳,根据内参标记、LDR 产物的长度进行结果判读。应用此方法对 12 例慢性 HBV 感染患者血清进行检测,同时采用荧光 PCR、焦磷酸测序技术对其验证,判断其特异性和准确性。**结果** LDR 法能有效区分包括 rtL180M、YMDD、YIDD、YVDD、rtA181V/T、rtN236T、rtT184G、rtS202I、rtM250V 野生株和部分突变株;4 例 HBV DNA $>10^6$ copy/mL 患者检测出野生株和突变株,结果与焦磷酸测序一致;LDR 法与荧光 PCR 法检测结果一致率达 83.3% (10/12)。**结论** 血清 HBV DNA $>10^6$ copy/mL 时结合多重 PCR 的复合 LDR 可通过一次扩增检测产物中的多个单突变或野生型位点,有助于核苷(酸)类似物耐药的诊断和治疗。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 连接酶检测反应; 突变

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.043 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2012)21-2737-03

近年来转录依赖的扩增系统(TAS)、自主序列复制(3SR)、Q β 复制酶、链替代扩增反应(SDA)以及连接酶链反应(LCR)、循环探针反应(CPR)等体外核酸扩增技术作为聚合酶链反应(PCR)技术的补充或改进而得以建立和发展。连接酶检测反应(LDR)与 LCR 原理相似,它是通过一对紧邻引物与双链靶 DNA 中的一条单链杂交获得线性扩增结果,LDR 通常与一种一级扩增(PCR、3SR、Q β 复制、RT-PCR)联合应用。结合 PCR 的复合 LDR 可通过一次扩增检测产物中的多个单突变位点。本文利用此技术对乙型肝炎病毒(HBV)4 种核苷(酸)类似物耐药突变位点进行检测,为临床慢性 HBV 感染患者抗病毒治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 对 2010 年 8 月至 2011 年 1 月本院感染科门诊、住院处送检的 12 例慢性 HBV 感染患者血清标本进行 HBV P 基因分析,其中男 8 例,女 4 例。年龄 29~58 岁。患者分别处于接受核苷类药物的治疗前、中、后;住院患者 11 例

有完整的核苷类治疗病史记录,单用恩替卡韦(ETV)2 例、替比夫定(L-dT)3 例,7 例序贯治疗或联合治疗均在临床治疗欠佳或出现病毒学、甚至生物化学突破时使用。

1.2 方法

1.2.1 血清中 HBV DNA 含量检测 采用荧光 PCR 法(上海科华试剂),血清阿德福韦酯变异株 HBV RT-A181V/T 变异株、HBV RT-N236T 变异株检测采用荧光 PCR 法(上海之江生物科技有限公司试剂),血清拉米夫定变异株 L180M 变异株、M204V/I 变异株检测采用荧光 PCR(浙江夸克生物科技有限公司)。

1.2.2 血清 HBV DNA 的抽提 血清标本复融后,取 50 μ L,加入 50 μ L 浓缩液,13 000 r/min 离心 10 min;弃去上清液,往沉淀中加入 50 μ L 裂解液,煮沸 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,上清液作为 PCR 模板用于检测。

1.2.3 结果判读 HBV 4 种核苷(酸)类似物耐药突变检测采用 LDR 法进行结果判读:根据测序仪控制软件提示进行数

据收集,见表 1。

1.3 仪器及设备 定性 PCR 扩增仪:PE9700;焦磷酸测序仪:Qiagen 公司 PyroMarkTM ID 遗传分析系统;ABI7500 荧光 PCR 仪;ABI3130 测序仪;WD-9413A 凝胶成像仪凝胶成像仪。

1.4 检测方法 引物设计和合成、PCR 产物检查、PCR 产物的焦磷酸测序委托南京迪安医学检验所完成。

2 结 果

12 例慢性 HBV 感染患者抗病毒治疗时间 0~64 个月不等;4 例患者基线时进行变异株检测结果呈阴性;4 例 HBV DNA>10⁶ copy/mL 患者检测出野生株和突变株,结果与焦磷酸测序一致;12 例慢性 HBV 感染患者中 10 例检测结果与荧光 PCR 法一致,2、11 号患者荧光 PCR 法检出 L180M 突变、M204V/I 突变,而 LDR 法、焦磷酸测序为低于检测限;12 例慢性 HBV 感染患者均未检出 rtA181V/T、rtN236T、rtT184G、rtS202I、rtM250V 突变株,具体信息见表 2。

表 2 LDR 法检测乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药突变位点结果

治疗药物	诊断	患者 编号	抗病毒 时间(个月)	LDR 结果	荧光 PCR 法结果△	HBV DNA (copy/mL)
LAM→LAM+ADV	CHB	5	38	低于检测限	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	1.26×10 ³
LAM→LAM+ADV	CHB	2	36	低于检测限	L180M+、M204V/I+、A181V/T—、N236T—	<10 ³
LAM→ADV	CHB	3	36	全部为野生型	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	4.90×10 ⁷
ADV→LAM→ETV	LC	8	63	低于检测限	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	9.31×10 ⁵
L-dT	CHB	11	12	低于检测限	L180M+、M204V/I+、A181V/T—、N236T—	2.00×10 ⁴
L-dT	CSH	9	0	低于检测限	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	<10 ³
L-dT	CHB	4	0	全部为野生型	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	1.60×10 ⁷
L-dT→ETV	LC	7	22	L180M+、YIDD+	L180M+、M204V/I+、A181V/T—、N236T—	2.00×10 ⁷
ETV	CHB	10	0	低于检测限	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	<10 ³
ETV	CHB	6	0	低于检测限	L180M—、M204V/I—、A181V/T—、N236T—	8.70×10 ⁵
IFN→LAM→LAM+ADV	CHB	1	33	低于检测限	L180M+、M204V/I+、A181V/T—、N236T—	2.34×10 ⁴
IFN→LAM→LAM+ADV →IFN+LAM	CHB	12	64	L180M+、YIDD+	L180M+、M204V/I+、A181V/T—、N236T—	4.31×10 ⁶

注:LAM为拉米夫啉,ADV为阿德福韦酯,L-dT为替比夫啉,ETV为恩替卡韦;CHB为慢性乙型肝炎,CSH为慢性肝功能衰竭,LC为肝硬化;+、—分别表示突变株阳性、阴性。

3 讨 论

HBV 突变是引起肝病活动和导致核苷类抗病毒药物治疗失败的主要原因。临床上缺乏有效检测多位点、高通量和自动化程度好且适于临床批量检测的方法。多重 PCR 技术是在同一 PCR 反应体系里加上 2 对以上引物,同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应,其反应原理、反应试剂和操作过程与一般 PCR 相同,特点高效、经济、简便;多重 LDR 技术:高温 LDR 是一种新兴的 SNP 分型检测方法,其原理是高温连接酶检测到模板 DNA 与 2 条探针 DNA 的接头处存在着碱基错配,则连接反应不能进行,即如果探针与模板有一个碱基不配对,连接反应不能进行,如果探针与模板完全互补,连接反应完成。本文利用稳定优化后的多重 PCR、多重 LDR,实现快速多位点单核苷酸多态性 SNP 检测,利用测序仪的高分辨率和多重荧光,实现高通量的 SNP 检测,每个泳道可同时进行 15 个位点分析,实现信号同步稳定的放大,结果稳定可靠,重复性高。

本文资料显示,4 例抗病毒治疗基线时未检出变异株;

表 1 4 种核苷(酸)类似物结果判读

药物名称	P 基因 特定位点	位置(ABI3130 测序仪)	
		突变型(三联密码子)	野生型(三联密码子)
拉米夫啉	rtL180M	66*(CTG)	68(ATG)
替比夫啉	YMDD	—	69(ATG)
	YIDD	72(ATT/ATC)	—
	YVDD	75(GTG/GTC)	—
阿德福韦	rtA181V/T	81(GTT/ACT)	83(GCT)
	rtN236T	86(ACC/ACT)	88(AAC)
恩替卡韦	rtT184G	90(GGT)	92(ACT)
	rtS202I	96(AGT)	98(ATT)
	rtM250V	100(GTG)	102(ATG)

注:*判读依据的数字表示的是 LDR 产物的长度,即碱基数。例如 rtL180M 位点的 66 和 68 分别表示 180 突变株的检测长度是 66 bp,180 野生株的检测长度是 68 bp。—表示无数据。

Wang 等^[1]发现 HBV 准种组成与核苷类药物敏感性密切相关,患者在拉米夫啉治疗前,准种中即存在拉米夫啉变异株(4.4%,2/45),且在拉米夫啉治疗 18 周时成为优势株(79.5%,35/44)。以往研究亦发现治疗前血清中有拉米夫啉变异株的存在^[2-4],这可能与实验方法不同、选择病例有关。由 12 例住院患者临床用药种类与变异模式的关系发现,L180M、M204V/I 变异与拉米夫啉、替比夫啉和恩替卡韦耐药相关,未检出 rtA181V/T、rtN236T、rtT184G、rtS202I、rtM250V 突变株;而 N236T、A181V/T 变异与阿德福韦耐药相关^[5];M250V+I169T+M204V+L180M、T184G+S202I+M204V+L180M 等变异与恩替卡韦耐药相关^[6],这与治疗时间长短、多种药物序贯联合治疗有关,作者准备扩大临床样本、随访时间做进一步研究。由本文荧光 PCR 法结果显示,HBV P 基因区变异株可以在 HBV DNA 发生突破前、中、后(<10³~10⁷ copy/mL)检出,结合本文 4 例 HBV DNA>10⁶ copy/mL 患者 LDR 才检测出野生株和突变株,尽管结果与焦磷酸测序一致,

12 例慢性 HBV 感染患者中 10 例检测结果与荧光 PCR 法一致,2、11 号患者荧光 PCR 检出 L180M 突变、M204V/I 突变,而 LDR、焦磷酸测序为低于检测限。由此认为使用的 LDR 有助于核苷(酸)类似物耐药的诊断和治疗,但还需要对多重 PCR、多重 LDR 进一步优化,才能在临床更好地推广。

参考文献

[1] Wang F, Wang H, Shen H, et al. Evolution of hepatitis B virus polymerase mutations in a patient with HBeAg-positive chronic hepatitis B virus treated with sequential monotherapy and add-on nucleoside/nucleotide analogues [J]. Clin Ther, 2009, 31(2): 360-366.
[2] 王陆军. 拉米夫定治疗过程中乙型肝炎病毒变异的分析 [J]. 交通医学, 2001, 15(5): 503.
[3] 刘传苗, 张欣欣, 陆志檬. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒

YMDD 野毒株和变异株的变化[J]. 肝脏, 2004, 9(2): 73-76.
[4] Zhang X, Liu C, Gong Q, et al. Evolution of wild type and mutants of the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during lamivudine therapy[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18: 1353-1357.
[5] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure [J]. J Hepatol, 2008, 48: 747-755.
[6] Tenney DJ, Levine SM, Rose RE, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48: 3498-3507.

(收稿日期: 2012-06-19)

西门子 ADVIA2400 生化分析仪性能评价

陈 彬, 邓小军, 许永志(解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院检验科, 福建漳州 363000)

【摘要】 目的 对已使用 5 年的西门子 ADVIA2400 全自动生化分析仪的性能再次进行评价。**方法** 根据美国临床实验室标准化协会制订的评价标准, 通过一系列实验设计, 对 ADVIA2400 全自动生化仪的常用项目的正确度、精密度、线性范围、携带污染率等方面进行性能评价。**结果** ADVIA2400 全自动生化分析仪批内精密度(CV)为 0.34%~3.58%, 均能满足小于 1/4CLIA'88 能力验证分析质量要求, 批间 CV 为 1.12%~6.58%, 均能满足小于 1/3CLIA'88 能力验证分析质量要求; 实验室检测结果平均偏倚均小于 1/2CLIA'88 能力验证分析质量要求; 常用检测项目线性范围内斜率为 0.97~1.03, 高低值标本之间携带污染率小于 1%。**结论** 西门子 ADIVA2400 全自动生化分析仪经过 5 年的使用, 在按时按需保养的情况下, 仍能保持精密度高, 正确度好, 并且具有良好线性及低携带污染率等特点。

【关键词】 ADVIA2400 全自动生化分析仪; 性能评价; 精密度; 线性
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.21.044 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2012)21-2739-03

西门子公司生产的 ADVIA2400 全自动大型生化分析仪是目前较为先进的生化分析仪器之一, 有着较快的单机分析速度。其特有的预稀释模式的使用, 使仪器具有精密度高, 标本使用量少等特点, 并且较其他生化仪更为节省试剂, 并且经过长时间的使用仍能保持高稳定性^[1]。本文通过实验对其正确度、精密度、线性范围、携带污染率等方面的测试进行评价, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集健康体检者血清混匀后, -20℃冻存备用; 各项目临床异常高值标本以及常规检测标本。
1.2 仪器 西门子 ADVIA2400 全自动生化分析仪, 在 5 年的使用期内, 按照标准操作程序手册要求, 做好日保养、周保养、月保养、半年保养及年度保养等维护。
1.3 试剂 尿素(Urea)、尿酸(UA)、肌酐(Cr)、葡萄糖(GLU)、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、γ-谷氨酰转移酶(GGT)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、α-羟丁酸脱氢酶(HBDH)均采用上海复兴长征体外诊断试剂盒; 长海复兴长征复合校准品(批号: 586UN); 美国伯乐(BIO-RAD)质控物, 中值(批号: 45582), 高值(批号: 45583)。

1.4 实验方法

1.4.1 仪器校正 采用长征临床复合校准血清(批号 586UN)按 ADVIA2400 生化仪校准程序校正仪器。
1.4.2 实验设计 (1)批内精密度(CV): 集临床样本, 按照各检测项目配置中值及高值混合血清, 充分混匀后上机连续检测 20 次, 对检测结果统计分析。(2)批间 CV: 每日做室内质控品伯乐(BIO-RAD)45582、45583 2 批, 每批做 2 次, 连续检测 20 d, 得到 80 个数据, 检测结果进行统计分析。(3)正确度: 统计实验室参加 2007~2010 年福建省临床检验中心及 2010 年卫生部组织室间质评成绩, 比较回报靶值和实验室检测结果, 计算相对偏倚, 并做统计平均。(4)线性范围: 收集临床高值及低值样本, 配置混合血清(如果低值样本较难取得, 则用纯化水稀释, 高值样本难以取得, 则添加适合高浓度储存液, 如血糖等)。低值样本以 L 表示, 高值以 H 表示, 按照 1L、0.8L+0.2H、0.6L+0.4H、0.4L+0.6H、0.2L+0.8H、1H 制备 6 种等间距不同稀释浓度的样本, 在生化分析仪上进行检测, 每个样本检测 2 次, 在一个批次内完成。当低值样本浓度相对高值可以忽略不计, 计算预期值时无需考虑加入量。以平均斜率计算法算得预期值, 以 2 次测量均值为实测值。将预期值设为 X, 测量均值为 Y, 做散点图, 并做线性回归, 得出 Y=bX+a 回归方程, 若 b 值在 0.97~1.03, 且 a 值相对高值可忽略不计, 则认为线性在所测范围内能够达到要求。(5)携带污染率: 连续检测高值样本 3 次(记为 H1、H2、H3), 然后检测相同项目低值 3