

促凝剂对乙型肝炎病毒实时荧光定量检测影响的评估*

姜立茹, 马 莹(陕西省西安市中心医院检验科 710003)

【摘要】 目的 评估促凝剂对乙型肝炎病毒实时荧光定量检测的影响。**方法** 随机采集 2011 年 10 月至 2012 年 3 月到西安市中心医院门诊的 41 例患者每人 2 管血样, 分别为无添加剂普通管和促凝剂管, 检测分离血清时间及效果。采用实时荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 DNA, 结果对数值采用 SPSS11.5 统计软件进行处理, 并对促凝剂管标本进行精密度和抗干扰性能评价。**结果** 促凝剂管分离血清平均时间为 (4.73 ± 0.86) min, 普通管为 (14.46 ± 2.27) min, 两组数据经配对 t 检验, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 促凝剂管乙型肝炎病毒 DNA 结果对数平均值为 (3.86 ± 2.99) , 普通管组对数平均值为 (3.85 ± 2.96) , 两组经配对 t 检验, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 促凝剂管具有高精密度和抗干扰性能。**结论** 促凝剂对乙型肝炎病毒实时荧光定量检测结果准确性没有影响, 可减少报告周转时间, 值得临床推广和应用。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 实时荧光定量检测; 促凝剂

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.14.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)14-1788-02

Assessment of coagulant on hepatitis B virus by real-time fluorescent quantitative detection* JIANG Li-ru, MA Ying
(Department of Clinical Laboratory, Xi'an City Center Hospital of Shanxi Province, Xi'an, Shanxi 710003, China)

【Abstract】 Objective To evaluate effect of the coagulant on hepatitis B virus by real-time fluorescent quantitative detection. **Methods** From October 2011 to March 2012 were randomly collected in Xi'an city central hospital of 41 patients with each of 2 tubes of blood samples, which were without additives common tube and the coagulant tube. To detected the serum separation time and effect, using real-time fluorescence quantitative PCR for detection of hepatitis B virus DNA, logarithmic mean was performed by SPSS11.5 statistical analysis, and the coagulant tube specimens for precision and anti-jamming performance evaluation. **Results** Coagulant group separation of serum average time was (4.73 ± 0.86) min, common tube group was (14.46 ± 2.27) min, data from the two groups were paired t test, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); Logarithmic mean in coagulant group of hepatitis B virus DNA was (3.85 ± 2.96) , and that was (3.86 ± 2.99) in common tube group, using paired t test, the difference between the two groups was not statistically significant ($P > 0.05$). coagulant tube had the advantages of high precision and anti-jamming performance. **Conclusion** The coagulant on hepatitis B virus by real-time fluorescent quantitative detection accuracy is not affected, can reduce the report turnaround time, is worth the clinical promotion and application.

【Key words】 hepatitis B virus; real-time fluorescence quantitative; coagulant

实时荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒 DNA 是临床上常用的检测方法之一, 该方法具有高特异性、高敏感性等优点, 同时也与溶血、抗凝剂选择不当等标本前处理密切相关。促凝剂因能缩短血液凝固时间, 减少报告周转时间, 在临床为多数生化、免疫检测项目普遍使用^[1-2]。但目前就促凝剂是否能影响实时荧光定量检测乙型肝炎病毒 DNA 的文献报道较少, 本文就此进行相关评估, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本随机采集 2011 年 10 月至 2012 年 3 月本院门诊的 41 例患者每人 2 管血样, 分别为无添加剂普通管和促凝剂管, 其中男 19 例, 女 22 例, 年龄 19~49 岁。无任何添加剂普通管由湖南省安信医用高分子材料有限公司提供, 批号为 110915~111105, 促凝剂管由河北鑫乐科技有限公司提供, 所有试管均在有效期内使用。

1.2 仪器与试剂 美国应用生物公司 ABI7300 基因扩增检测仪, 乙型肝炎病毒 DNA 荧光定量试剂盒购自中山大学达安

基因股份有限公司, 以上所用试剂均在有效期内, 操作及判定结果严格按标准操作程序执行。

1.3 乙型肝炎病毒 DNA 模板制备 取无任何添加剂普通管和促凝剂管待测样本各 100 μ L, 分别加入到 0.5 mL 的 Eppendorf 管中, 再分别加入 100 μ L DNA 浓缩液, 振荡器振荡混匀 5 s, 12 000 r/min 离心 10 min; 吸弃上清液, 沉淀中加入 20 μ L DNA 提取液, 振荡器剧烈振荡混匀至沉淀完全散开, 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液备用。

1.4 聚合酶链反应扩增 取聚合酶链反应管若干, 分别加入处理后的样品(包括标本、阴性质控品、临界阳性质控品和强阳性质控品)上清液 2 μ L, 或直接加入阳性定量参考品 2 μ L, 8 000 r/min 离心数秒, 放入仪器样品槽, 4 管乙型肝炎病毒阳性标准品分别为 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 、 1.0×10^7 U/mL。

1.5 聚合酶链反应条件 93 $^{\circ}$ C 2 min; 93 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 10 个循环; 93 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 再进入

* 基金项目: 陕西省社会发展攻关计划项目(2011K12-01-05)。

30 个循环。

1.6 质量控制 阴性质控品:增长的曲线不呈 S 型曲线或 Ct 值为 30;阳性质控品:增长曲线呈 S 型曲线,且强阳性质控品定量参考值($1.0\times10^6\sim2.0\times10^7$)U/mL,临界阳性质控品定量参考值($2.0\times10^2\sim2.0\times10^4$)U/mL;阳性定量参考品:全部阳性,且线性相关系数 $0.97\leq|r|\leq1$;以上要求需在同一次实验中同时满足,否则,本次实验无效,需重新进行。该试剂对乙型肝炎病毒的检出限度为 1.0×10^2 U/mL,线性范围为($1.0\times10^2\sim1.0\times10^8$)U/mL。

1.7 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件对试验数据进行均数配对 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清分离效果分析 促凝剂管室温放置 5 min 后,3 000 r/min 离心 3 min,血清分离效果良好,血清层清亮、无溶血、无蛋白凝块。而无添加剂普通管经 37 ℃水浴 10 min 后离心,大部分标本血清与血细胞不能分离或分离不良,均有血细胞、纤维蛋白挂壁现象,需二次离心才能彻底分离血清。普通管分离血清时间为(14.46 ± 2.27)min,而促凝剂管分离血清时间为(4.73 ± 0.86)min,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),且促凝剂管分离的血清明显好于普通管。

2.2 乙型肝炎病毒 DNA 结果对数值比较 促凝剂管乙型肝炎病毒 DNA 结果对数平均值为(3.86 ± 2.99),普通管的对数平均值为(3.85 ± 2.96),经配对 t 检验,两组差异无统计学意义($P>0.05$)

2.3 促凝剂管标本精密度性能评价 对促凝剂管同一标本、同一批次试剂、同一条件下重复 20 次, Ct 值重复性良好,差异较小,表明促凝剂管标本精密度较高。

2.4 促凝剂管抗干扰性能评价 选择高、中、低 3 种浓度的促凝剂管标本分别添加乙型肝炎病毒标志物阴性红细胞、胆红素进行抗溶血、抗黄疸性能评价,其结果与普通管对比干扰物质对荧光值有一定影响,但不影响 Ct 值,对定量结果没有影响。

3 讨 论

随着医疗机构临床实验室管理办法等一系列法律、法规的出台和实施,医疗机构各项检查项目采血技术也逐步走向规范化,尤其是各种真空采血管技术的推广应用为检验质量控制和快速分离血清提供了重要手段,对规范各级医院采血技术,减少交叉感染提供了有效保障。乙型肝炎病毒实时荧光定量检测项目为一般临床分子生物学实验室常规检测项目之一。《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》(卫医发[2002]10)中只

规定了检测标本可为血清或血浆,其中血浆已明确规定了需乙二醇四乙酸或枸橼酸盐抗凝并明确禁止使用肝素抗凝。而对于血清除使用普通管(不含任何添加剂)外却没有明确规定能否使用促凝剂管来获得血清。目前大多数医院生化和免疫标本均使用促凝剂管来促进血液凝集,缩短血清析出时间,大大缩短了报告周转时间。但因促凝剂管含有添加剂,应考虑其添加成分对乙型肝炎病毒实时荧光定量是否产生影响。因此在投入使用前应进行性能验证分析,以确保检验结果的准确性。目前多数文献主要研究各种抗凝剂对乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量检测的影响^[3-5],而对于促凝剂的研究报道较少。

通过对 41 例患者同一时间段分别采集不含任何添加剂普通管和促凝剂管标本进行血清分离效果比较表明,促凝剂管血清分离时间明显较普通管血清分离时间短,差异有统计学意义,且血清分离质量也较好,这为标本的进一步检测减少了大量的时间和提供了质量保障,最终减少了报告周转时间^[3-5],缩短了患者等待时间。同时,41 例普通管和促凝剂管乙型肝炎病毒 DNA 结果对数值比较差异无统计学意义。另对促凝剂管进行的精密度和抗干扰等性能验证表明,促凝剂管检测结果稳定,可替换原普通管进行乙型肝炎病毒实时荧光定量检测。但考虑到不同厂家促凝剂管所含的促凝剂可能存在成分差异,所以在使用其他厂家促凝剂管进行乙型肝炎病毒 DNA 检测时应另进行性能评估。

参考文献

- [1] 刘发全,杨锦平,陈珍女,等.促凝剂使用对临床电解质及肾功能检查的结果影响分析[J].当代医学,2012,18(1):54-55.
- [2] 曾蓉,王薇,王治国.临床实验室报告周转时间的监测[J].临床检验杂志,2012,30(4):301-302.
- [3] 郭华国,桂瑞丰,汪宏,等.高血脂、肝素对乙型肝炎病毒 DNA 实时荧光定量 PCR 测定干扰机制的探讨[J].现代检验医学杂志,2007,22(1):58-60.
- [4] 潘香燕,莫宝妹,刘倩如,等.抗凝剂对定量检测乙型肝炎病毒 DNA 的影响[J].中国热带医学,2008,8(4):650-652.
- [5] 熊朝俊.无促凝剂快速分离血清方法及效果观察[J].国际检验医学杂志,2011,32(1):44.

(收稿日期:2012-12-21 修回日期:2013-03-12)

(上接第 1787 页)

的含量不同作出合理的解释。

综上所述,在 SCLC 患者血清中 NSE 和 CEA 两种物质含量都表现出了不同程度的增加;采用 NSE 及 CEA 检测可用于 SCLC 患者的早期诊断、疗效监测及预后判断。同时,CEA 与 NSE 联合检测对 SCLC 的诊断效果最佳。

参考文献

- [1] 高秀展.CEA、NSE、CA125 和 TPA 检测在小细胞肺癌中的临床表达[J].牡丹江医学院学报,2010,31(4):23-25.
- [2] 康德元,路宝士,赵立明.NSE、CEA 检测联合骨扫描在小细胞肺癌早期骨转移中的诊断[J].青海医药杂志,2007,37(11):7-10.

- [3] 路宝士,康德元,孙宝义.血清 CYFRA21-1、CEA、NSE 联合对肺癌的诊断价值[J].放射免疫学杂志,2007,20(2):182-183.
- [4] 陈名声,于文彬,刘林英,等.血清 NSE、CEA 和 β 2-MG 含量对小细胞肺癌的诊断价值[J].第四军医大学学报,2000,21(4):70-72.
- [5] 杨静.血清 NSE 和 CEA 含量及其比值对小细胞肺癌的诊断价值[J].广东医学,2010,31(14):1834-1835.
- [6] 李学祥,韩彬彬,王慇杰,等.血清 TPS、NSE 和 CEA 水平在小细胞肺癌中的临床意义[J].中国肿瘤,2008,17(4):314-317.

(收稿日期:2012-11-21 修回日期:2013-02-12)