

高脂血、溶血标本对荧光定量聚合酶链反应测定低水平 HBV-DNA 的影响

刘小敏¹, 唐恒锋¹, 李文郎¹, 杨美玲² (1. 广东省深圳市龙华新区中心医院检验科 518110; 2. 广东省深圳市龙华新区人民医院 518109)

【摘要】 目的 探讨高脂血、溶血标本对荧光定量聚合酶链反应(PCR)测定低水平 HBV-DNA 检测结果的影响。方法 对收治的 100 例三酰甘油(TG)正常($TG \leq 1.46$ mmol/L)、实时荧光定量 PCR 测定为 $(4.0 \sim 9.0) \times 10^3$ IU/mL 的乙型肝炎患者采集血清标本,进行即刻检测,另外选择 100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的高 TG 标本和 100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的全血标本分别制备成高脂血、溶血血清标本,同时进行高脂血和非高脂血、溶血血清和非溶血血清的 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测,并进行配对 *t* 检验。结果 高脂血和非高脂血、溶血血清和非溶血血清的 HBV-DNA 水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 高脂血、溶血标本低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 定量检测结果较空腹采集即刻检测的结果降低。

【关键词】 标本; 溶血; 高脂血; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.21.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)21-3217-02

Influence of hyperlipemia and hemolysis specimens on fluorescence quantitative PCR determination of low level HBV-DNA LIU Xiao-min¹, TANG Heng-feng¹, LI Wen-lang¹, YANG Mei-ling² (1. Department of Clinical Laboratory, Longhua New District Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518110, China; 2. Longhua New District People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518109, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of hyperlipemia and hemolysis specimens on the fluorescence quantitative PCR determination results of low level HBV-DNA. Methods The serum samples were collected from 100 hepatitis B patients with normal triacylglycerol(TG) (≤ 1.46 mmol/L and $(4.0 \sim 9.0) \times 10^3$ IU/mL by real time fluorescence quantitative PCR) in our hospital and performed the instant detection. In addition, 100 high TG samples of hepatitis B 5-item negative and HBV-DNA non-detection and 100 whole blood samples of hepatitis B 5-item negative and HBV-DNA non-detection were collected and performed the simultaneous HBV-DNA detection of fluorescence quantitative PCR on the hyperlipemia and non-hyperlipemia specimens, hemolysis specimen and non-hemolytic serum. And the paired *t* test was conducted. Results The HBV-DNA detection levels had statistically significant differences between hyperlipemia and non-hyperlipemia specimens and between hemolytic serum and non-hemolytic serum ($P < 0.05$). Conclusion The fluorescence quantitative PCR detection results of hyperlipemia and hemolysis specimens of low HBV-DNA level are reduced compared with those of instant detection for fasting collection specimens.

【Key words】 specimen; hemolysis; hyperlipemia; fluorescence quantitative PCR

乙型肝炎(乙肝)是由乙肝病毒(HBV)引起的以肝损害为主的传染性疾病,流行广、发病率高。HBV-DNA 的定量能客观反映 HBV 感染复制情况,为临床用药、治疗监测及预后判断方面提供有价值的参考依据^[1]。目前用于 HBV-DNA 定量测定的基本方法是荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术,特异性和敏感性高,可实时检测,操作方便,定量范围宽,重复性好,不易引起污染等^[2]。干扰 PCR 扩增的因素很多,除反应体系外,标本因素的影响不可忽视。作者就高脂血、溶血标本对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的影响作一些探讨,制订出适合本实验室的标本采集、储存、重留标准,以使实验结果更为可靠。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 3 月至 2013 年 3 月本院肝病门诊三酰甘油(TG)正常($TG \leq 1.46$ mmol/L)、实时荧光定量 PCR 测定为 $(4.0 \sim 9.0) \times 10^3$ IU/mL 的乙肝患者共 100 例。另外选择 100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的高 TG

标本和 100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的全血标本,均来自于 2012 年 3 月至 2013 年 3 月本院肝病门诊。

1.2 仪器与试剂 日本 Sysmex K6000 血液分析仪, AU5821 生化分析仪, ABI-7500 PCR 仪(美国)以及乙肝病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)。

1.3 方法 血红蛋白、总胆红素和 TG 的测定:100 例乙肝患者分别空腹抽取静脉血 3 mL,离心后将血清混匀,备用。采用日本的 Sysmex K6000 血液分析仪测定血红蛋白, AU5821 生化分析仪测定总胆红素和 TG。

脂血标本的制备:100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的高 TG 标本,分别离心后取血清混匀并用生理盐水稀释成 TG 浓度分别为 35、25、15、10、5 mmol/L 的溶液。将上述 HBV-DNA 阳性、实时荧光定量 PCR 测定为 $(4.0 \sim 9.0) \times 10^3$ IU/mL 的乙肝患者混合血清分成 5 组,分别与各浓度 TG 溶液 1:1 混合,制成模拟脂血标本。非脂血血清 $TG \leq 1.46$ mmol/L。

溶血标本的制备:100 份乙肝五项全阴且测不出 HBV-DNA 的全血标本,分别离心弃掉血清后用生理盐水洗 3 遍,反复冻融至溶血;将溶血后的标本混匀并用生理盐水稀释成 Hb 浓度为 30、60、120、240 g/L 的溶液。将上述 HBV 阳性、实时荧光定量 PCR 测定为 $(4.0 \sim 9.0) \times 10^3$ IU/mL 的乙肝患者混合血清分成 5 组,分别与各浓度 Hb 溶液及生理盐水(对照组) 1:1 混合,制成模拟溶血标本。非溶血血清血红蛋白浓度不超过 2 g/L。

标本检测:HBV-DNA 试剂盒采用中山大学达安基因股份有限公司的乙肝病毒核酸扩增荧光定量检测试剂盒,仪器采用美国 ABI-7500 PCR 仪,实验操作、反应体系及扩增条件严格按照试剂说明书进行。

1.4 评价指标 分析不同 TG 水平的脂血标本对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的影响,分析不同血红蛋白水平的溶血血清对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的影响。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件包建立数据库,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,总体差异采用方差分析,组间差异采用 SNK 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乙肝患者高脂血血清与非高脂血血清的 HBV-DNA 定量检测结果 不同浓度的高 TG 血清和同组的非高脂血血清相比,低水平 HBV-DNA 的定量检测结果有所降低,比较差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 乙肝患者高脂血血清与非高脂血血清的 HBV-DNA 定量检测结果($\bar{x} \pm s$)

标本 编号	高脂血血清		非高脂血 HBV-DNA ($\times 10^3$ copy/mL)
	TG 浓度(mmol/L)	HBV-DNA($\times 10^3$ copy/mL)	
1	5	4.37 \pm 0.99	7.23 \pm 1.81*
2	10	4.17 \pm 1.05	7.50 \pm 1.88*
3	15	4.15 \pm 1.04	7.49 \pm 1.87*
4	25	3.76 \pm 0.94	6.87 \pm 1.72*
5	35	3.38 \pm 0.85	6.13 \pm 1.53*

注:和同组高脂血血清比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 乙肝患者不同程度的溶血血清与非溶血血清的 HBV-DNA 定量检测结果 不同血红蛋白含量的溶血血清和同组的非溶血血清相比,低水平 HBV-DNA 的定量检测结果有所降低,差异比较有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 乙肝患者不同程度的溶血血清与非溶血血清的 HBV-DNA 定量检测结果($\bar{x} \pm s$)

标本 编号	溶血血清		非溶血血清 HBV-DNA ($\times 10^3$ copy/mL)
	血红蛋白水平(g/L)	HBV-DNA($\times 10^3$ copy/mL)	
1	15	3.69 \pm 0.87	5.38 \pm 1.35*
2	30	3.71 \pm 0.93	5.53 \pm 1.38*
3	60	3.67 \pm 0.84	5.29 \pm 1.33*
4	120	3.68 \pm 0.92	5.46 \pm 1.37*
5	240	3.42 \pm 0.86	5.32 \pm 1.33*

注:和同组溶血血清比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨 论

定量 HBV-DNA 能客观反映 HBV 感染复制情况,在临床

用药、治疗监测及预后判断方面具有较高的临床参考价值^[3]。目前国内用于 HBV-DNA 定量测定的方法基本上是荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术,这种技术具有实时测定,高特异性,高敏感性,快速方便,定量范围宽,结果重复性好,且不易引起污染等优点^[4]。由于荧光定量 PCR 是监测原始待测核酸模板的扩增过程,任何干扰 PCR 扩增的因素都会影响扩增效率和定量的准确性。

干扰 PCR 扩增的因素很多,除反应体系外,标本因素的影响不可忽视。目前临床实验室开展的质量控制大多着重于实验过程中,实验前的质量控制常被忽视。在标本采集中标本溶血、高脂血等因素是常常会遇到,而这些因素对荧光定量 PCR 测定低水平 HBV-DNA 检测结果有一定的影响。在乙肝抗病毒治疗的过程中,临床医生会根据 HBV-DNA 水平的变化对药物剂量进行调整,原则上以病毒含量下降为有效并直至其检测不出^[5]。目前,诸多试剂的检测下限为 1.0×10^3 IU/mL,对于低于下限的以小于方式报告,而此时一般认为检测不出 HBV。因此,当低水平 HBV-DNA 标本检测时受标本的储存、标本溶血、高脂血等因素的影响而使结果偏低甚至为阴性时,无法反映真实情况,如果据此改变治疗方案,将会延误治疗造成病情反复,给患者带来不必要的负担^[6]。目前,国内外在标本的储存、标本溶血、高脂血等因素对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 测定结果的影响方面报道较少,故作者就高脂血标本、溶血标本对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 测定结果的影响作一些探讨,制订出适合本实验室的标本采集、储存、重留标准,以使实验结果更为可靠^[7]。

血清 TG 是组成血清乳糜微粒的主要物质,高脂血血清标本混浊的主要原因是因为血液中的低密度脂肪(乳糜微粒及极低密度脂肪等)增多引起的,高脂血程度可用血清 TG 的水平进行衡量^[8]。因此,本组实验采用不同 TG 水平的高脂血血清标本和正常 TG 水平的血清标本进行对比,测定对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 测定的影响。本组试验结果显示,不同浓度的高 TG 血清和同组的非高脂血血清相比,低水平 HBV-DNA 的定量检测结果有所降低。作者认为高脂血因素造成结果偏低的原因可能有:(1)高脂血因素导致荧光猝灭,使得荧光信号强度降低;(2)高脂血抑制 Taq 酶的活性,使 PCR 的扩增效率降低。

临床研究已报道,血红素可以通过它的卟啉环与 Taq 酶进行不可逆的结合,抑制了 Taq 酶的活性,使 PCR 的扩增效率降低,最终使试验结果检测的 HBV-DNA 水平降低^[9-10]。本组试验中,不同血红蛋白水平的溶血血清和同组的非溶血血清相比,低水平 HBV-DNA 的定量检测结果也有所降低。

总之,高脂血、溶血标本对低水平 HBV-DNA 荧光定量 PCR 测定结果有一定的影响,可根据具体情况制订出适合本实验室的标本采集、储存、重留标准,以使试验检测结果更为可靠。

参考文献

[1] 吴禹湘,吴瑞珊,林晓丹,等.溶血对荧光定量 PCR 检测不同含量 HBV DNA 的影响[J].分子诊断与治疗杂志,2012,4(3):189-192.
 [2] 张翠莉,刘萍,魏文波.脂血和溶血对 HBV DNA 实时荧光定量 PCR 检测的影响[J].武警医学,2012,23(2):150-152.
 [3] 郑有为,梁敏文,钱靖琳,等.荧光探针结(下转第 3220 页)

试验阳性共 59 例,阳性率为 26.5%,抗体游离试验阳性 173 例,阳性率为 77.6%,抗体热放散试验阳性 188 例,阳性率为 84.3%,确诊为 ABO-HDN 共 188 例,研究结果证实三项试验中抗体热放散试验的敏感性最高。确诊为 ABO-HDN 的 A 型患儿 124 例,占 A 型患儿送检例数的 88.6%,确诊为 ABO-HDN 的 B 型患儿 64 例,占 B 型患儿送检例数的 77.1%,O-A 组合阳性率明显高于 O-B 组合。

表 1 223 例 ABO-HDN 检测时间与检测结果的关系

年龄	n	直抗阳性 (n)	游离阳性 (n)	放散阳性 (n)	试验确 诊数(n)	阳性率 (%)
1 d	59	19	50	53	53	89.8
2 d	44	13	40	40	40	90.9
3 d	46	14	36	40	40	87.0
1~3 d 总计	149	46	126	133	133	89.3
>3 d	74	13	47	55	55	74.3
合计	223	59	173	188	188	84.3

3 讨 论

ABO-HDN 对新生儿最大的危害是引起新生儿核黄疸,其后果非常严重,因此对 ABO-HDN 的早期诊断和治疗非常重要。作者在 223 例 ABO-HDN 的血清学检测中观察到,出生 1~3 d 共检测 149 例,阳性率为 89.3%,这表明患儿在此期间检出率较高,主要是因为患儿血液中有较多游离的 IgG 血型抗体及致敏红细胞,但随着时间的延长,失去了反应原性,降低了检出率^[5],所以在出生 1~3 d 内尽早检测,尽早诊断,尽早治疗,可减少 ABO-HDN 的后遗症。临床诊断 ABO-HDN 最有力的证据是患儿红细胞被来自母亲的 IgG 血型抗体致敏^[6],而只是游离试验阳性者只能作为参考,不能作为诊断指标^[7]。在 223 例 ABO-HDN 的血清学检测中观察到三项试验中直抗试验阳性率为 26.5%,游离试验阳性率为 77.6%,放散试验阳性率为 84.3%,直抗试验和放散试验同为检测红细胞上致敏的抗体,但由于放散试验所用的红细胞是直抗的几百倍^[8],再经红细胞放散使抗体浓缩,所以抗体热放散试验阳性率最高,直抗试验阳性率最低,放散试验是“三项试验”中敏感度最高的一项试验,也是判定 ABO-HDN 最有力的证据^[9]。在 223 例 ABO-HDN 的血清学检测中观察到不同母婴血型组合的

ABO-HDN 阳性率存在差异,母婴血型组合阳性率 O-A 组(88.6%)明显高于 O-B 组(77.1%),这与文献^[10]报道相符。因此临床医生应高度重视 O 型母亲所生的 A 型婴儿。

ABO-HDN 是儿科最常见的急性溶血性疾病之一,通过血清学“三项试验”可直接确认新生儿患病与否,临床应高度重视母婴的血型组合,并在早期尽快进行血清学三项试验的检测,以提高疗效,减少后遗症。

参考文献

- [1] 李保才,黎海阑.母婴血型不合引起新生儿溶血病的实验室诊断[J]. 检验医学与临床,2012,9(23):2886-2887.
- [2] 孙六娜.108 例新生儿溶血病患儿血清学检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2012,9(21):2718-2719.
- [3] 董予新,贾昭华,刘怀慧,等. ABO 新生儿溶血病与孕妇血型抗体效价的关系[J]. 实用儿科临床杂志,2010,25(6):397,460.
- [4] 温洁新,马西霞,孙稔侠. O 型血孕妇血清中 IgG 抗(A)B 抗体效价与 ABO 新生儿溶血病的相关分析[J]. 广东医学,2010,31(11):1430-1431.
- [5] 陈海儿. 395 例新生儿 ABO 溶血病检测结果分析及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,17(4):92-93.
- [6] 李小红,程磊,黄红莉,等. 430 例新生儿溶血病实验室检测结果分析与报告[J]. 中国输血杂志,2012,25(增刊):114.
- [7] 王杰伟. 310 例新生儿黄疸患儿血清学检测结果的分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(9):1186-1192.
- [8] 谭淑云,刘凤华. 血型血清学检验结果与 ABO 型新生儿溶血病发病率及高胆红素血症的关系[J]. 黑龙江医学,2010,34(2):117-118.
- [9] 戴维,陈剑,朱凯,等. 3 种放散试验在新生儿 ABO 溶血病检测中的的效果比较[J]. 中国输血杂志,2011,24(2):128-129.
- [10] 罗萍,郭刚,刘开云,等.《临床免疫学及免疫检验》实验课教学改革初探[J]. 检验医学与临床,2007,4(11):1109-1110.

(收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-08-24)

(上接第 3218 页)

合区序列突变对 HBV DNA 检测的影响[J]. 热带医学杂志,2012,12(7):837-839.

- [4] 林森,易荣. 实时荧光定量 PCR 对乙肝 DNA 检测的影响因素[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(1):127-128.
- [5] 李军,刘宏利,韩超,等. 病毒接种剂量对 HBV 感染成年树鼯的影响[J]. 免疫学杂志,2012,28(12):1056-1060.
- [6] 杨晓瑞,吴学炜,臧利敏,等. HBV cccDNA SYBR Green I 荧光定量检测方法的建立及初步应用[J]. 现代预防医学,2012,39(16):4200-4204.
- [7] 彭红波,刘亚丽,陈旭姿. 乙型肝炎病毒核酸荧光定量及血清标志物与肝功能检测的临床意义[J]. 检验医学与临

床,2012,9(18):2260-2262.

- [8] 白彦楼,高英堂,李莹,等. HBV cccDNA 的水平及临床因素对肝细胞癌术后预后的判断价值[J]. 世界华人消化杂志,2012,20(9):729-736.
- [9] 边立忠,宋广辉,赵素芝,等. LNA 探针实时荧光定量 PCR 检测 HBV DNA 的研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2013,7(6):2501-2506.
- [10] 蒋玲丽,王雪亮,肖艳群,等. 荧光定量 PCR 测定 HBV DNA 测量不确定度评定的探讨[J]. 检验医学,2014,29(3):241-244.

(收稿日期:2015-02-18 修回日期:2015-06-21)