

表皮的最外层为角质层,由多层已经死亡的扁平、无核细胞构成,并以 3~4 周为周期不断脱落和更新,光镜观察为呈嗜酸性的均质状物<sup>[9]</sup>。这些死亡的角质细胞在刮取皮肤时容易脱落,采用刮血法采集末梢血,会产生多少、大小不等的角质细胞碎片,对血细胞分析仪部分项目的检测结果造成干扰。

本研究结果显示,两种采血方法 N、M、L、E、Plt 检测结果比较,差异有统计学意义。BC5300 采用半导体激光散射技术和细胞化学染色技术,配合改良的流式分析装置对 WBC 进行精确分类<sup>[10]</sup>。可能是由于四分类溶血剂 LEO I 的溶血强度较小,并不能完全溶解刮血法标本中的表皮角质碎片,经 LEO II 染色后根据其大小不同而落在 E、L 散点区域,使 E、L 假性升高,N、M 则相对假性减低。采用阻抗法进行 Plt,易将其大小相近的表皮角质碎片误认为血小板,使刮血法 Plt 检查结果假性升高。同时刮血法标本因存在表皮角质碎片污染物,其“WBC 散点图分布异常”和“血小板聚集”的假报警率明显高于吸血法。镜检证实 24 例刮血法标本存在大小、多少不等的表皮角质碎片。吸血法因采用微量吸管直接吸血,避免刮取表皮角质层,60 例标本镜检未见明显表皮角质碎片,仪器假性报警也显著减少。

本研究结果显示,两种采血方法 WBC、B、RBC、Hgb、MCV 检测结果比较,差异无统计学意义。可能是在 WBC/BASO 通道中使用强溶血型试剂(LH 溶血剂),RBC 被溶解,除 B 外的其他 WBC 被裸核化,同时污染的表皮角质碎片也被溶解,因此,对 WBC、B 影响小。由于与 RBC 数量相比,污染的表皮角质碎片数量少得多,所以对 RBC 检测结果影响甚小。

另外,本研究发现 1 例吸血法仪器检测 Plt 结果偏低( $55 \times 10^9/L$ ),WBC 散点图出现明显杂点,E 为 8%,血细胞形态学镜检发现大部分血小板呈聚集状分布,WBC 手工分类 E 仅为 1%,明显低于仪器分类。可能是仪器进行 WBC 分类时部分聚集的血小板的大小和光散射特性与 E 相似而落在该区域,使 E 假性增高。吸血法重新采血后仪器检测 Plt 结果为  $425 \times 10^9/L$ ,WBC 四分类散点图恢复正常,WBC 分类检测结

• 检验技术与方法 •

## 两种前处理流程检测 HBV DNA 的重复性比较

许琳婧,花艳艳,宋 林

(辽宁省大连市第六人民医院中心实验室 116031)

**摘要:**目的 为乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)定量检测提供一种快速、简便、准确的新手段。方法 采用直接煮沸法和浓缩碱裂解法(试剂盒法)提取血清样本核酸模板。收集乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性患者血清 70 份,求出标本的均值、标准差,两种标本处理方法所得测定结果的比较采用配对 *t* 检验。结果 直接煮沸法与试剂盒法检测 HBV DNA 结果比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 采用直接煮沸法从血清中提取 HBV DNA 无需反复开盖操作,避免了交叉污染。该提取方法所获得的核酸能很好地满足荧光定量检测技术对模板的要求,既提高了工作效率,又减少了资源的浪费,省时、省电、省耗材。

**关键词:**聚合酶链反应; 肝炎病毒,乙型; 前处理流程

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1100-03

在核酸定量技术的发展中荧光定量聚合酶链反应(fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)是发展最快和最有应用价值的新技术。在遗传性、感染性疾病<sup>[1-2]</sup>或肿瘤的基因诊断<sup>[3-4]</sup>,以及监控药物和疗效<sup>[5-6]</sup>等方面作用越来越大。特别是在乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)检测方面,因其灵敏度高、检测范围宽、定量值准确、成本低而为临床检测所常用<sup>[7]</sup>。为保证分离核酸的完整性和纯度,本研究采用直接

果仪器法与手工法接近。

综上所述,刮血法采集末梢血容易混入表皮角质碎片,对 BC5300 WBC 四分类和 Plt 产生干扰,导致仪器假报警升高。由于各种五分类血细胞分析仪检测原理的差异,表皮角质碎片对仪器的干扰可能也有差异。所以,吸血法采集末梢血明显优于刮血法,但采血过程中应避免血液凝固。

参考文献:

- [1] 胡宗海,高建丽,陈蓉,等. 静脉血和末梢血血细胞检测结果分析[J]. 西南军医,2005,7(2):19-20,22.
- [2] 肖秀林,王昌富,汪永红,等. 三种不同采血方式的样本进行血细胞分析的对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(7):585-587,590.
- [3] 王卫金,金玉富,杜万丽. 静脉血与末梢血检测血小板结果的比较与分析[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(9):839.
- [4] 段金霞,冯涛聚,苏文凡. 两种采血方法进行血常规检验在临床应用中的研究[J]. 医学信息,2009,22(1):115-116.
- [5] 何建业. SYSMEX XS-800i 血细胞分析仪检测儿童手指与静脉血标本 IP 信息提示的分析探讨[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1371-1372.
- [6] 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,2006:136-137.
- [7] 丛玉隆. 临床实验室分析前质量管理及对策[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(8):483-487.
- [8] 丛玉隆. 标本质量是保证检验结果准确的根本[J]. 中国全科医学:医生读者版,2009,12(6):32-33.
- [9] 邹仲之. 组织学与胚胎学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2001:116.
- [10] 张时民. 五分类法血细胞分析仪测定原理和散点图特征[J]. 中国医疗器械信息,2008,14(12):1-9,44.

(收稿日期:2012-01-08)

煮沸法提取 HBV DNA,获得较为满意效果,希望能为 HBV DNA 检测提供一种快速、简便、准确的新手段。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

**1.1.1 标本来源** 70 份已知乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)阳性血清和 20 份已知 HBsAg 阴性血清采自 2010 年 6 月至 2011 年 6 月本院门诊及住院的各型乙型肝炎患者。标本采

集与保存按本实验室相应标准操作程序(SOP)进行。系空腹静脉血,分离血清后用 ELISA 法检测 HBsAg 为阳性和阴性者,然后于-20℃冰箱保存备用。每份血清同时用两种提取法提取 HBV DNA 模板后采用 FQ-PCR 进行 HBV DNA 检测。

**1.1.2 仪器与试剂** 仪器为美国 ABI 公司 7500 real-time PCR System 检测仪。运行计算机软件为 Mxpro Application Stratagene(Version4.1.0.0)。血清 HBV DNA 检测试剂盒来自上海克隆生物高技术有限公司[国药药监械(准)字 2009 第 3400437 号],生产批号:20110408,试剂盒检出限为  $5 \times 10^2$  IU/mL。DNA 标准品为试剂盒中所带定量标准品。室内质控血清由卫生部临床检验中心提供,批号:201102S4,靶值: $8.62 \times 10^4$  IU/mL(对数值: $4.94 \pm 0.50$ )。本实验室为卫生部临床检验中心技术认可的临床基因扩增检验实验室。

**1.2 原理与方法**

**1.2.1 试剂盒检验原理** 采用聚乙二醇(PEG)沉淀法浓缩血清样本中 HBV,碱变性法提取 DNA。采用特异引物对 HBV DNA 进行 PCR 扩增,双荧光标记探针与扩增产物进行杂交。与产物杂交的探针被 Taq 酶分解而产生荧光,荧光量与扩增产物量呈正比,并与样本中起始模板数相关,通过荧光信号的变化,定量检测血清或血浆标本中 HBV DNA。使用 dUTP 和 UNG 酶防止扩增产物污染。

**1.2.2 试剂盒法样本处理方法** HBV DNA 定量检测严格按试剂盒说明书和本室 HBV DNA 定量检测 SOP 进行。取 50  $\mu$ L 待检血清置 0.5 mL 离心管中,分别加入 50  $\mu$ L 核酸提取液 A,振荡混匀 10 s,12 000 r/min(离心半径 4.9 cm)离心 10 min,弃上清液;沉淀中加入 50  $\mu$ L 核酸提取液 B,振荡混匀 10 s,98~100℃水浴箱中保温 10 min,12 000 r/min(离心半径 4.9 cm)离心 2 min。取 7  $\mu$ L 上清液加入 0.2 mL 反应管中,使用美国 ABI 公司 7500 real-time PCR System 检测仪检测。

**1.2.3 直接煮沸法样本处理方法** 取 50  $\mu$ L 待检血清样本置 0.5 mL 离心管中,直接放入 98~100℃水浴箱中保温 10 min,12 000 r/min(离心半径 4.9 cm)离心 3~5 min。取 7  $\mu$ L 上清液分别加入 0.2 mL 反应管中,使用美国 ABI 公司 7500 real-time PCR System 检测仪检测。

**1.2.4 扩增** 扩增反应条件为 50℃反应 2 min,然后 94℃保温 5 min,再按 93℃ 30 s,60℃ 90 s(40 个循环)。60℃采集 6-羧基荧光素(FAM)荧光通道信号。

**1.2.5 检测结果解释** 扩增运行程序完成后按仪器及软件要求进行结果保存和分析。除检测标本外,本实验设阳性血清对照、弱阳性血清对照、阴性对照、室内质控品以及 4 个定量校准品。定量检测线性范围为  $10^3 \sim 7$  IU/mL,如增长曲线不呈 S 型或每个 PCR 反应管内荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数 Cycle threshold(Ct)=40,则判定样品 HBV DNA 含量小于检测极限。

**1.3 统计学处理** HBV DNA 阳性定量结果(IU/mL)取对数值,两种标本处理方法所得测定结果比较采用配对 *t* 检验。采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。检验水准: $\alpha = 0.05$ 。

**2 结 果**

**2.1 两种不同提取方法检测 HBV DNA 结果比较** 见表 1。

**2.2 阴性率比较** 用两种不同提取方法对 20 例 HBsAg 阴性血清同时进行 HBV DNA 定量检测,结果均为阴性( $< 500$  IU/mL)。

**2.3 重复性比较** 见表 2。

**表 1 两种标本处理方法检测 HBV DNA 结果比较**

方法	n	阳性[n(%)]
试剂盒法	70	52(74.29)
直接煮沸法	70	52(74.29)*

\* : $t = 0.315, P > 0.05$ ,与试剂盒法比较。

**表 2 两种提取方法重复性比较**

方法	重复次数(次)	$\bar{x} \pm s$	变异系数[CV(%)]
试剂盒法	10	4.93 $\pm$ 0.37	7.50
直接煮沸法	10	4.93 $\pm$ 0.32	6.49

**2.4 直接煮沸法特异性(阴性参考品符合率)** 直接煮沸法对阴性参考品检测结果全部为阴性,未出现假阳性。

**2.5 直接煮沸法敏感性(阳性参考品符合率)** 直接煮沸法对阳性参考品检测结果全部为阳性,未出现假阴性。

**2.6 直接煮沸法线性和灵敏度(最低检出限)** 直接煮沸法对线性和灵敏度参考品检测定量结果与标示值最大偏差未超过  $\pm 50\%$ ,相关系数不小于 0.99,最低检出量为  $1.1 \times 10^3$  IU/mL。

**2.7 直接煮沸法精密性** 直接煮沸法对精密度参考品重复检测 10 次,  $CV < 35\%$ 。

**3 讨 论**

自 1996 年实时 FQ-PCR 由美国 Applied Biosystems 公司推出以来,该技术以其比常规 PCR 有更强的特异性、实现闭管实时定量检测和高自动化程度等特点而得到广泛应用,尤其是 Roche 公司 Lightcycler PCR 检测体系的出现,不仅实现了闭管实时荧光检测,而且具备稳定、温度绝对均一的特点,从而被广泛地应用于临床<sup>[8]</sup>。实时 FQ-PCR 检测 HBV DNA 给乙型肝炎的诊断、治疗和预后判断带来重大改变,尤其是在抗病毒治疗中的疗效判断方面发挥重要作用,成为临床医师用药、诊治的关键依据<sup>[9-10]</sup>。FQ-PCR 能使原始 DNA 模板复制上百万倍,由于扩增检测过程都是仪器自动化完成,因而对于 FQ-PCR 检测的质控重点应是扩增检测前的试样处理流程。但扩增反应前处理仍是手工操作,已成为影响 FQ-PCR 检测结果重复性的关键因素。另外随着临床检验项目的不断增加,疾病的传染性对工作人员构成的危险因素也加大,同时对工作效率、准确的实验数据要求也越来越高。因此,面对大批量的样本如何提高检测质量、速度及水平以满足临床诊疗的要求,为抗病毒治疗的效果评价标准制定提供客观依据,建立一种简便、快速、准确的检测方法势在必行。

由于检测试剂厂家提供的检测下限为  $5 \times 10^2$  IU/mL,线性范围为  $10^3 \sim 7$  IU/mL,即说明  $10^3$  IU/mL 以下检测不能准确定量。本研究从临床血清标本中选择 5 个浓度梯度的样本制备实验检测标本,检测结果更能准确地反映 HBV DNA 临床实验室常规检测的实际情况。本研究采用煮沸法直接从血清中提取 HBV DNA,无需反复开盖操作,避免了交叉污染,这种核酸的提取方法所获得的 DNA 能很好地满足 PCR 对模板的要求,提取的 HBV DNA 阳、阴性临床样本用克隆商业性试剂盒的核酸提取方法进行质量检验及实际应用,证实了直接煮沸法的可操作性和结果的客观性。直接煮沸法即满足了快速检测质量的要求,又减少了操作程序,即提高了工作效率,又减少了资源的浪费,省时、省电、省耗材。

然而血清中的一些成分如酸性多糖、糖蛋白、血红蛋白、脂类及其代谢产物的存在将会直接影响 FQ-PCR 的测定结果,有研究表明血红蛋白可通过其卟啉环与 Taq 酶的不可逆结合而抑制 Taq 酶活性,从而影响 PCR 测定<sup>[11-12]</sup>,这将使得在监测患者治疗中 HBV DNA 的定量检测失去临床价值,而且在定性测定时也会由于这些抑制物的存在,而使弱阳性标本的 PCR 测定出现假阴性结果。直接煮沸法由于其只是简单地将核酸释放出来,所得 DNA 产物不纯,为消除检测错误而导致误诊,在核酸提取过程中应加注意。对溶血、脂血标本,以及复杂的生物液态物或是难以分解的细胞如乳汁、精液等仍需按商用试剂盒提取核酸的方法提取。

参考文献:

[1] Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR[J]. *Viml Methods*, 2000, 85(12): 55-64.

[2] Hussain Z, Das BC, Husain SA, et al. Biological course of hepatitis A virus as determined by real time RT-PCR: Correlation with biochemical, immunological and genotypic profiles[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(29): 4683-4688.

[3] Gal S, Fidler C, Lo YM, et al. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR[J]. *Br J Cancer*, 2004, 90: 1211-1215.

[4] Nistor A, Watson PH, Pettigrew N, et al. Real-time PCR complements

immunohistochemistry in the determination of HER-2/neu status in breast cancer[J]. *BMC Clin Pathol*, 2006, 6(1): 2-10.

[5] Wang X, Li X, Currie RW, et al. Application of real-time Polymerase chain reaction to quantitate induced Expression of interleukin-beta mRNA in ischemic brain tolerance[J]. *J Neurosci*, 2000, 59(2): 238-246.

[6] De-Kok JB, Ruers TJ, Van-Muuen GN, et al. Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues[J]. *Clin Chem*, 2000, 46(3): 313-318.

[7] 李成德, 陈享, 梁莉红. 两种 HBV-DNA 定量测定方法的比较[J]. *热带医学杂志*, 2006, 6(1): 36-38.

[8] 杨洁, 关宇, 王燕军, 等. LightCycler 实时监测 PCR 定量分析血清 HBV DNA[J]. *热带医学杂志*, 2002, 2(2): 118-120.

[9] 程钢, 何蕴韶, 周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒[J]. *中华医学检验杂志*, 1999, 22(3): 135-138.

[10] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(3): 225-227.

[11] Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics[J]. *Clin Chem*, 1998, 44: 1-26.

[12] MM3-A. Molecular diagnostic methods for infectious diseases: approved guideline[J]. *NCCLS*, 1995, 15(22): 32-33.

(收稿日期: 2012-01-08)

• 检验技术与方法 •

## 化学发光法测定梅毒抗体的性能验证

马开富

(湖北省襄阳市中心医院 441021)

**摘要:**目的 对美国雅培公司化学发光法测定梅毒螺旋体抗体的临界(Cut-off)值、精密度、灵敏度和特异性等进行验证和评价。方法 分别使用美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发布的 EP5-A2、EP-17A 对其精密度和灵敏度进行评价,使用梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)确认试验对其特异性进行评价。结果 化学发光法的 Cut-off 值以 0.36 最佳,精密度、灵敏度和特异性与厂家数据一致。结论 美国雅培公司化学发光法测定梅毒螺旋体抗体的性能符合要求。

**关键词:**梅毒; 螺旋体属; 化学发光测定法; 性能验证

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)09-1102-03

因原发性病例快速增加和复发率非常高,梅毒已成为世界各国严重的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。血清学诊断是梅毒诊断的重要手段<sup>[2-3]</sup>,正确评估梅毒血清学诊断试验方法,对于指导实际应用具有非常重要的意义。化学发光法(CMIA)是近年来美国雅培等公司推出的全自动梅毒特异性抗体测定方法,特点是简便、准确、经济,以往的性能评价主要集中在敏感性、特异性,以及与其他常用方法结果符合性等方面<sup>[4-6]</sup>。本文主要根据 ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则临床免疫学检验领域指南的要求,对美国雅培公司 CMIA 测定梅毒螺旋体抗体的临界(Cut-off)值、精密度、灵敏度和特异性进行验证和评价。

### 1 资料与方法

**1.1 仪器与试剂** 使用美国雅培 ARCHITECT-i2000 System,试剂为雅培配套试剂 ARCHITECT Syphilis TP。梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)试剂采用日本富士瑞必欧株式会社试剂盒(包含溶解液、血清稀释液、致敏粒子和阳性对照血清等)。

**1.2 检测对象与方法** 验证美国雅培 ARCHITECT-i2000 System 检测系统 Cut-off 值,分别使用美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)有关指南文件 EP5-A2(临床化学设备精密性能的评价)和 EP-17A(极限参数指南)对其方法的精密度和灵敏度进行评价。

**1.2.1 Cut-off 值验证** 血清来源于本院 2009 年 1~12 月住院患者和体检者,包含 6 168 例住院患者、6 237 例体检者梅毒螺旋体抗体为阴性的 OD 值结果。

**1.2.2 精密度评价** 确认仪器运转良好,试剂在效期内且定标通过,室内质控在控。每天测定一个批次实验样本,样本为卫生部临床检验中心室内质评血清(-20℃冷冻保存),每批次重复测定 4 次,连续测定 5 d,按以下公式计算重复性评价

(批内)的标准差(s):  $s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^n (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{I(n-I)}}$ 。其中 I 为总运行天数, n 为每批重复检测次数,  $\bar{x}_{ij}$  为第 i 日第 j 次重复检测结