

for the early detection of nasopharyngeal carcinoma-a new frontier[J]. Am J Epidemiol, 2013, 177(3): 251-253.

[4] Kawa K. Epstein-Barr virus associated disease[J]. Minophagen Med Rev, 1999, 44: 1-13.

[5] Hisashi I, Asuka N, Jun N, et al. Epstein-Barr virus(EBV) associated gastric carcinoma[J]. Viruses, 2012, 4(12): 3420-3439.

[6] 陆晓茜, 高举. 慢性活动性 EBV 感染诊治进展[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2013, 18(5): 198-213.

[7] 刘倩, 朱平. EB 病毒相关淋巴细胞增殖病与细胞因子风暴[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(2): 498-502.

[8] Huang Y, Wei C, Zheng K, et al. The impact of serological features in Chinese children with primary or past Epstein-Barr virus infections[J]. Virol J, 2013, 10(1): 55-57.

[9] 周志平, 陈威巍, 汤勃. EB 病毒感染及其相关性疾病[J]. 传染病信息, 2013, 26(1): 57-60.

[10] Kimura H, Hoshino Y, Kanegane H, et al. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection[J]. Blood, 2001, 98(2): 280-286.

[11] Kimura H, Morishima T, Kanegane H, et al. Prognostic factors for chronic active Epstein-Barr virus infection[J]. J Infect Dis, 2003, 187(5): 527-533.

[12] Kimura H, Hoshino Y, Hara S, et al. Differences between T cell-

• 临床研究 •

type and natural killer cell-type chronic active Epstein-Barr virus infection[J]. J Infect Dis, 2005, 191(4): 531-539.

[13] Jonatan S, Hans S, Peter S. The interaction between smoking and Epstein-Barr virus as multiple sclerosis risk factors may depend on age[J]. Multiple Sclerosis, 2014, 20(6): 747-750.

[14] Toshihisa H, Shigeo N, Young-Hyeh K, et al. Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphomas in the elderly: the first consensus meeting in Kofu 2013[J]. J Dermat, 2014, 41(1): 40-42.

[15] Kim H, Lee H, Kim WS, et al. Systemic Epstein-Barr virus-negative mature natural killer-cell lymphoma with cutaneous and visceral involvement[J]. Apmis, 2015, 123(11): 990-992.

[16] Toshihisa H, Shigeo N, Young-Hyeh K, et al. Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphomas in the elderly: the first consensus meeting in Kofu 2013[J]. J Dermat, 2014, 41(1): 40-42.

[17] Emiko S, Shouichi O, Hiroshi K, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disease in Japan[J]. American J Hema, 2008, 83(9): 721-727.

(收稿日期: 2015-12-25)

SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪性能评价及其应用

邱顺华, 金李芬

(自贡市第三人民医院, 四川自贡 643020)

摘要:目的 评价 SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪(SLAN-96P)的主要性能指标及其应用价值。方法 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)文件制定的评价标准,对 40 份临床血清标本、质控品和标准品进行乙型肝炎病毒 DNA (HBV-DNA)定量检测,评价该仪器的准确性、重复性、线性、灵敏度、A 模块与 B 模块的可比性等指标。结果 准确度的相对偏倚为 0.2%~5.2%;重复性:批内变异系数($CV_{批内}$)为 1.37%~2.75%,批间变异系数($CV_{批间}$)为 1.52%~2.51%;灵敏度:SLAN-96P 能检测的最低 HBV-DNA 浓度为 10^2 IU/mL;线性:直线回归方程是 $Y=0.982X+0.0948$,相关系数(r)=0.999;A 模块与 B 模块的可比性:A 模块与 B 模块的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$),直线回归方程为 $Y=1.0007X+0.0124$, $r=0.994$ 。结论 SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪各项性能指标良好,SLAN-96P 在病原微生物核酸检测方面具有高效、灵敏、快捷、定量的特点,具有很好的临床应用价值。

关键词: SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪; 性能评价; 乙型肝炎病毒 DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)06-0801-03

PCR 技术作为一项“革命性的技术”,不仅推动了遗传学与分子生物学的发展,而且在其他生命科学领域也得到广泛应用。荧光定量 PCR 技术是应用最为广泛的技术,具有灵敏度高、特异性强、快速、简便的优点,在临床病毒诊断中具有巨大的应用价值。乙型肝炎病毒 DNA (HBV-DNA)的检测有助于诊断病毒的感染情况,动态监测肝炎病毒的复制情况,动态观察用药后抗病毒的效果。特别是那些慢性乙型肝炎患者乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)阴性,但仍然伴有高水平的 HBV 复制,检测 HBV-DNA 可以判定病毒复制情况^[1-2]。临床治疗过程中,患者血清中 HBV-DNA 载量下降 2 个 Log 值,说明治疗有效,而患者用药 3 个月后病毒载量没有下降,表示治疗无效^[3-4]。因此,测定结果的准确对临床诊断、治疗及疗效观察尤为重要。荧光定量 PCR 仪是美国 ABI 公司于 1996 年首次开发出来。目前我国也开发出许多品牌的荧光定量 PCR 仪,SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪是由上海宏石有限公司开发出

来。为了验证其 PCR 检测结果准确性,笔者对自贡市第三人民医院引进的 SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪进行主要性能指标的评价试验,分析仪器的性能特性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料 临床标本来源于自贡市第三人民医院门诊和住院患者,收集 40 例符合要求且经本院 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪检测 HBV-DNA 的不溶血、不脂血患者血清标本,分装于 1.5 mL 离心管内,置于-20℃保存备用。

1.2 仪器与试剂 主要仪器:SLAN-96P 型实时荧光定量 PCR 仪(上海宏石有限公司)、生物安全柜、离心机等。试剂:HBV-DNA 定量检测试剂盒及 HBV-DNA 标准品均由湖南圣湘生物科技有限公司提供。质控品血清:由卫生部临检中心提供的 HBV-DNA 质控品。

1.3 方法

1.3.1 准确度验证试验 以卫生部室间评价结果靶值为真

值,靶值±0.4Log 为允许范围,计算测定结果与真值之间的偏倚。偏倚=(测定值-真值)/真值×100%。

1.3.2 重复性试验 按照美国临床实验室标准化协会(CLSI)评价标准,在 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪器上检测 10⁶、10⁵、10⁴ IU/mL 3 个浓度的 HBV-DNA。批内重复性试验在相同条件下对同一标本在一天内测定 20 次;批间重复性试验每天各测定 1 次,连续测定 20 d,分别计算出批内和批间的平均值、标准差和变异系数。

1.3.3 灵敏度试验 用质控血清稀释至 10³、10²、10 IU/mL 3 个水平浓度,在 SLAN-P6P 荧光定量 PCR 仪重复测定 10 次,根据其阳性检出率判断其灵敏度。

1.3.4 线性测定 分别取 4×10⁷、4×10⁶、4×10⁵、4×10⁴ IU/mL 的标准品,在 SLAN-P6P 荧光定量 PCR 仪测定 1 次,将检测值和预测值做直线相关分析。

1.3.5 A 模块与 B 模块比对试验 选取 40 份 HBV-DNA 阳性的临床血清标本,浓度为 10³~10⁸ IU/mL。在 SLAN-P6P 荧光定量 PCR 仪的 A 模块和 B 模块平行测定 HBV-DNA,每天检测 8 个标本,连续检测 5 d,计算 A 模块与 B 模块结果的相关性。

1.4 统计学处理 所有统计数据都对数转换后采用 EX-CEL2003 进行统计分析。SPSS17.0 统计软件进行直线相关分析及配对 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SLAN-96P 准确度 通过表 1 可知,1411、1412、1414 标本为阳性,测定结果的偏倚分别为 5.2%、0.2%、3.2%,3 个阳性标本准确度评价良好,均符合卫生部要求。1413 和 1415 为阴性,测定结果也为阴性。

表 1 HBV-DNA 卫生部评价标本测定结果及偏倚

编号	测定结果	结果对数	卫生部要求	偏倚
1411	4.75E+05	5.68	5.4±0.4	5.20%
1412	5.75E+04	4.76	4.72±0.4	0.20%
1413	0	0.00	0	
1414	1.69E+04	4.23	4.1±0.4	3.20%
1415	0	0.00	0	

2.2 重复性结果 批内变异系数(CV_{批内})为 1.37%~2.75%,批间变异系数(CV_{批间})为 1.52%~2.51%。3 种浓度的 HBV-DNA 在 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪上检测的 CV_{批内}和 CV_{批间}均符合卫生部标准,见表 2。

表 2 SLAN-96P 重复性试验结果

HBV-DNA 浓度(IU/mL)	批内		批间	
	$\bar{x}\pm s$	CV _{批内} (%)	$\bar{x}\pm s$	CV _{批间} (%)
10 ⁶	6.57±0.09	1.37	6.59±0.10	1.52
10 ⁵	5.32±0.11	2.07	5.28±0.11	2.08
10 ⁴	4.73±0.13	2.75	4.79±0.12	2.51

2.3 灵敏度分析 10³ IU/mL 浓度的 HBV-DNA 病毒血清在 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪上扩增分析,具有明显的扩增曲线,检出率为 100%;10² IU/mL 浓度的血清检出率降至 100%;10 IU/mL 浓度血清检测时无明显的扩增曲线,检出率

仅为 30%。因此,SLAN-96P 荧光 PCR 仪能检测的最低 HBV-DNA 浓度水平为 10² IU/mL。

2.4 线性测定结果 将 4 个浓度梯度的 HBV-DNA 标准品在 SLAN-96P 上检测分析得到:直线回归方程 *Y*=0.982*X*+0.094 8,相关系数(*r*)=0.999。

2.5 A 模块与 B 模块比对试验结果 A 模块与 B 模块的两组检测结果进行配对 *t* 检验,*P*=0.515,提示 A 模块与 B 模块的检测结果差异无统计学意义(*P*>0.05);A 模块与 B 模块的直线回归方程及相关系数:*Y*=1.000 7*X*+0.012 4,*r*=0.994。

3 讨 论

目前,荧光定量 PCR 技术广泛应用于临床,可以检测多种病原微生物。荧光定量 PCR 技术融汇了 PCR 技术的核酸高效扩增,光谱技术的高敏感性,探针技术的高特异性和高精确定量的优点,直接监测 PCR 过程中荧光信号的变化以获得准确的结果,可以弥补定性 PCR 的不足^[5]。SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪使用 LED 灯作为光源,实现永久的光源寿命^[6-8];采用了半导体导热系统,每个反应孔均有独立的温控监测点和高效的散热系统,确保均一的反应孔温度,无边效应^[9-10];设立了两个独立的反应模块 A/B,一台荧光 PCR 仪可以作为两台普通的荧光 PCR 仪来用。

HBV-DNA 定量检测可以定量反映乙肝患者体内病毒复制情况,是检测乙肝病毒的最可靠方法,对临床抗病毒治疗的疗效观察及指导临床用药具有重要价值。目前,荧光定量 PCR 技术检测 HBV-DNA 是 HBV 检测的“金标准”,已广泛应用于临床,为急、慢性乙型肝炎患者的诊治、疗效的观察及预后的判定提供了可靠依据^[11-13]。

SLAN-96P 准确度试验表明:5 个卫生部质控标本均符合卫生部要求,其中 1411、1412、1414 这 3 个阳性标本测定结果的偏差分别为 5.2%、0.2%、3.2%,均小于 ISO15189 要求的 7.5%。重复性试验结果表明:10⁴、10⁵、10⁶ IU/mL 3 个数量级水平浓度的 CV_{批内}和 CV_{批间}值均小于 5%,具有良好的重复性。灵敏度试验表明:SLAN-96P 在 HBV-DNA 浓度为 10³ 和 10² IU/mL 时检出率均高达 100%,具有较高的灵敏度,提示在一定程度上可以降低假阴性率,提高检出率;10 IU/mL 时检出率较低,可能原因是吸样随机误差造成的检出率低。线性试验表明:4 个梯度浓度的标准品,检测得到的 *r* 为 0.999,大于厂家要求的 0.98,为 HBV-DNA 定量提供参照标准,保证定量结果准确。SLAN-96P 仪器的 A 模块与 B 模块比对试验表明:A 模块与 B 模块的检测结果 *r* 为 0.994,相关性很好;配对 *t* 检验结果为 *P*=0.515>0.05,提示 SLAN-96P 仪器的 A 模块与 B 模块的检测结果差异无统计学意义,均能检测临床标本^[9-13]。

综上所述,SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪的准确度、重复性及灵敏度均达到卫生部的要求,线性范围较宽,为临床病原微生物的检测提供一个良好的检测系统,可满足临床检测的需要。

参考文献

[1] Bruss V. Envelopment of the hepatitis B vires nucleocapsid[J]. Virus Res,2004,106(2):199-209.
[2] 龚杰,刘柏林,方艳秋孙,等. 乙型肝炎外膜大蛋白、前 S1 抗原、HBV-DNA 与血清标志物之间相关性分析[J]. 中国实验诊断学, 2013,17(9):1634-1637.
[3] 曾争,刘丹,公维波,等. 三种 PCR 仪的特异性及灵敏度评价[J].

医疗卫生装备, 2006, 27(10): 61-63.

[4] 方莉, 汤洪波, 许媛, 等. LightCycler 480 II 型实时荧光定量 PCR 仪性能评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 207-209.

[5] 丁晓东, 马国文. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 内蒙古民族大学学报, 2006, 21(6): 665-668.

[6] Chow CK, Qin K, Lau LT, et al. Significance of a single-nucleotide primer mismatch in hepatitis B virus real-time PCR diagnostic assays[J]. J Clin Microb, 2011, 49(12): 80-81.

[7] Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments[J]. Clin Chem, 2009, 55(4): 611-622.

[8] Peng J, Xie Z, Cheng L, et al. Paired design study by real-time PCR: miR-378 * and miR-145 are potent early diagnostic biomarkers of human colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2015, 15(1): 1-7.

[9] Yong FL, Law CW, Wang CW, et al. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193a-3p, miR-23a and miR-338-5p for ear-

ly detection of colorectal cancer[J]. BMC Cancer, 2013, 13(1): 1-10.

[10] Sophie S, Penny LG, Simon H, et al. Highly sensitive quantitative real-time PCR for the detection of plasmodium liver-stage parasite burden following low-dose sporozoite challenge[J]. PloS One, 2013, 8(10): e77811.

[11] 郭田华. 乙型肝炎血清标志物和乙型肝炎病毒 DNA 检测的临床意义[J]. 实用医技杂志, 2005, 12(12): 3423-3424.

[12] 王凤岚, 黄朝芳, 冯万周. 乙肝血清免疫标志物及 HBV-DNA 检测结果相关性分析及临床应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(3): 203-204.

[13] Cui Z, Wang SM. Real-time fluorescence quantitative PCR in determination of hepatitis B virus DNA[J]. J Bengbu Med Coll, 2004, 29(1): 67-68.

(收稿日期: 2015-12-16)

• 临床研究 •

30 254 例门诊及住院患者术前 4 项检测 results 分析

黎燕琼

(广西壮族自治区梧州市中医医院, 广西梧州 543002)

摘 要:目的 了解梧州市中医医院 4 种病原体的感染情况, 分析进行手术前、产前、输血前检测术前 4 项的重要性。方法 回顾性分析梧州市中医医院 2012 年 7 月至 2015 年 6 月 30 254 例标本丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)、梅毒螺旋体抗体(抗-TP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV1/2)的检测 results, 采用化学发光法检测 HBsAg, 抗-HCV、抗-HIV1/2 用 ELISA 检测, 抗-TP 用梅毒甲苯胺红不加热血清试验法(TRUST)。结果 HBsAg 阳性率为 9.12%, 抗-HCV 为 0.56%, 抗-HIV1/2 为 0.25%, 抗-TP 为 0.5%, 总阳性率为 10.43%。结论 检测术前 4 项, 可以及时了解患者这 4 种病原体的感染情况, 对减少院内感染的发生以及有效地降低医患矛盾的发生具有重要意义。

关键词:乙型肝炎病毒表面抗原; 丙型肝炎病毒抗体; 梅毒螺旋体抗体; 人类免疫缺陷病毒抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)06-0803-03

有些患者感染乙型肝炎或丙型肝炎或梅毒或艾滋病后身体并无明显的临床症状, 检测术前 4 项即丙型肝炎病毒抗体(抗-HCV)、梅毒螺旋体抗体(抗-TP)、乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV1/2)能为医疗单位和患者提供是否为术前、产前、输血前感染的客观依据。这几种病原体是目前临床在检查和创伤治疗过程中极有可能传播的疾病, 为减少医务人员职业暴露风险, 减少医疗纠纷和医院感染的发生, 本院按照卫生部的要求对住院患者都进行术前 4 项检测。笔者统计并分析了梧州市中医医院 2012 年 7 月至 2015 年 6 月 30 254 例标本的术前 4 项检测 results, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2012 年 7 月至 2015 年 6 月门诊及住院患者 30 254 例, 其中男 14 189 例、女 16 065 例; 年龄 1 d 至 94 岁; 2012 年 7 月至 2013 年 6 月 8 971 例, 2013 年 7 月至 2014 年 6 月 10 159 例, 2014 年 7 月至 2015 年 6 月 11 124 例。

1.2 仪器及试剂 HBsAg 检测所用的仪器为北京科美生物技术有限公司生产的 CHEMCLIN 600 全自动发光仪, 试剂及质控物均由该公司生产, 购自广州奥比奥公司。抗-HCV 和抗-HIV1/2 检测的仪器为 MULTISKAN MK3 酶标仪及 WELLWASH 4MK2 洗板仪, 抗-HIV1/2 所用的试剂为英科新创(厦门)科技有限公司生产。抗-TP 检测所用的试剂为上

海荣盛生物药业有限公司生产, 抗-HCV 检测所用的试剂为北京万泰生物药业有限公司生产。TPPA 检测用的是日本富士瑞必欧株式会社试剂。

1.3 方法 HBsAg 检测采用化学发光法, HBsAg > 0.85 ng/mL 为阳性, 抗-HCV 和抗-HIV1/2 用酶标仪读数。抗-HIV1/2 阳性者送梧州市疾控中心做确认。抗-TP 用 TRUST 检测, 阳性者用 TPPA 做确证试验。整个操作严格按照标准操作规程进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行统计学处理。计数资料以率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 30 254 例术前 4 项检测 results HBsAg 阳性 2 760 例, 阳性率为 9.12%; 抗-HCV 阳性 170 例, 阳性率为 0.56%; 抗-HIV1/2 阳性 75 例, 阳性率为 0.25%; 抗-TP 阳性 151 例, 阳性率为 0.50%; 总阳性 3 156 例, 总阳性率为 10.43%; HBsAg 阳性率高于其他 3 项检测指标, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.2 不同性别术前 4 项指标分布 术前抗-HCV、抗-TP、HBsAg、抗-HIV1/2 标志物总阳性率男性患者高于女性, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。