

- 态及其高危基因型的分布情况[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(2): 146-147.
- [10] 龙秀荣, 夏林, 耿建祥, 等. 女性宫颈细胞中 HPV 感染基因型别的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3159-3161.
- [11] 庞艳, 韩卫全. 武汉市某医院筛查女性人乳头瘤病毒感染及基因型分布特点分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(19): 1501-1504.

• 临床研究 •

标本因素对荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的影响

张 蓉¹, 史海霞²

(1. 北京市宣武中医医院检验科, 北京 100050; 2. 中国中医科学院望京医院脾胃病科, 北京 100102)

摘要: 目的 分析荧光定量 PCR 法测定乙型肝炎病毒(HBV)的应用效果及标本因素对 HBV-DNA 的影响。方法 选取 2015 年 1 月至 2016 年 1 月北京市宣武中医医院收治的 10 例乙型肝炎大三阳患者作为观察对象, 所有患者经临床体检、实验室检查、影像学检查确诊为乙型肝炎大三阳, 采集患者的血清标本进行即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测; 高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本进行荧光定量 PCR 法测定, 并采用两两配对 *t* 检验。结果 即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测结果比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本中的 HBV-DNA 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 储存时间、储存温度以及脂血、溶血对荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 无较大影响, 提示荧光定量 PCR 法在测定 HBV-DNA 中具有较高的应用价值。

关键词: 标本因素; 荧光定量 PCR 法; 乙型肝炎病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.047

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)19-2775-03

乙型肝炎具有发病率高、病死率高的特点, 相关统计学研究, 每年约有 100 万人死于乙型肝炎^[1]。慢性乙型肝炎携带者在全球总人口中的比重超过 10%, 且有 20% 的急性乙型肝炎可能转变为慢性乙型肝炎, 并逐渐发展为肝硬化和肝癌^[2]。因此, 尽早、准确地诊断对于乙型肝炎患者的早期治疗具有重要作用。但是, 随着乙型肝炎病毒(HBV)的复杂化, 临床在诊断 HBV 感染中仍存在一些问题, 有时甚至会出现漏诊的现象^[3]。HBV-DNA 是直接确定 HBV 存在的重要指标, 荧光定量 PCR 法在检测 HBV-DNA 的同时, 也能够对其进行相对量化检验, 对于乙型肝炎患者体内病毒复制以及疾病传染性有更加直观的了解, 同时有助于临床诊断乙型肝炎, 选择合适的治疗方案和预后评估^[4-5]。因此, 本研究主要针对荧光定量 PCR 法测定 HBV 的应用效果及标本因素对 HBV-DNA 的影响展开分析, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2016 年 1 月北京市宣武中医医院收治的乙型肝炎大三阳患者 10 例作为研究对象, 其中男 5 例, 女 5 例; 年龄 18~52 岁, 平均 (47.5±12.6) 岁。所有患者经临床体检、实验室检查、影像学检查确诊为乙型肝炎大三阳, 即乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原(HbeAg)以及乙型肝炎表面核心抗原(HbcAb)均为阳性。

1.2 方法 主要仪器: ABI730 荧光定量 MX3000P Quantitative PCR System; 希森美康 4000I 全自动血细胞分析仪; 贝克曼 AU-680 全自动生化分析仪等。主要试剂: HBV 实时荧光定量 PCR 测试试剂盒、常规血液学检测配套试剂等。采取患者的血清标本后进行即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测; 高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本进行荧光定量 PCR 法测定, 并采用两两配对 *t* 检验。(1) 血液标本采集。使用注射器抽取患者外周静脉血 3 mL, 然后置入枸橼酸钠试

- [12] 李永川, 徐含青, 赵娜, 等. 重庆地区 32 882 例女性宫颈人乳头瘤病毒的感染状况调查[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(9): 1031-1034.
- [13] 岑尧, 张翠英, 张雅丽, 等. 中国女性人乳头瘤病毒感染状况及高危型别分布的 Meta 分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 75-81.

(收稿日期: 2017-02-22 修回日期: 2017-05-21)

管, 并将试管轻轻摇晃 5~10 次, 充分混匀。(2) 细胞 DNA 提取。取 1 mL 全血标本加入 1 mL 生理盐水中, 轻微晃动使其摇匀; 另取 1 个 5 mL 离心试管, 加入 500 μL 淋巴细胞分离液, 并将稀释过的血液缓慢导入, 以 2 000 r/min 的速率离心 20 min, 离心后将中间白细胞层分离后再用 12 000 r/min 速率离心 5 min, 弃上清后将沉淀物加入 50 μL DNA 提取液后放置于 100℃ 环境中静置 10 min, 然后以 12 000 r/min 速率离心 5 min。(3) PCR 的测定。取处理好的标本使用自动 PCR 检测仪进行检测。脂血标本制作: 采集 1 mL 乳糜状的浑浊血清, 用健康者血清稀释成不同浓度的血清, 分别抽取 150 μL, 并加入 50 μL 大三阳患者血清, 其中每份采集 100 μL 进行荧光定量 PCR 测量, 共备制 10 份。溶血血清及对照血清: 采集大三阳患者血液标本, 每人血液标本分别装在 2 个试管内。一管使用振荡法制备溶血血清, 并使用全血自动分析仪测量血红蛋白水平; 另一管直接分离血清作为对照血清。取大三阳患者的血清标本, 并分装在 3 个试管中, 分别进行即时检测、4℃ 保持 7 d 检测, 以及室温保存 2 d 检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异采用独立样本 *t* 检验进行比较, 多组间比较采用方差分析, 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验进行比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 脂血标本对 HBV-DNA 测定的影响 脂血标本与非脂血标本的 HBV-DNA 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 溶血标本对 HBV-DNA 测定的影响 溶血标本与非溶血标本的 HBV-DNA 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

2.3 不同储存时间和温度对 HBV-DNA 测定的影响 即时

检测、4℃冷藏7 d后检测、室温保存2 d后检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表3。

表1 高脂血与非脂血血清的PCR定量检测结果比较($\bar{x}\pm s$,拷贝/mL)

类型	n	HBV-DNA
高脂血清	10	8.63±1.63
非脂血清	10	7.69±1.05
t		1.235
P		0.105

表2 溶血与非溶血血清的PCR定量检测结果比较($\bar{x}\pm s$,拷贝/mL)

类型	n	HBV-DNA
溶血血清	10	8.15±1.52
非溶血血清	10	6.85±0.96
t		1.865
P		0.176

表3 不同储存时间和温度对HBV-DNA测定的影响($\bar{x}\pm s$,拷贝/mL)

类别	n	HBV-DNA
即时检测	10	4.53±0.65
4℃保持7 d	10	6.75±0.95
室温保存2 d	10	6.16±0.98

注

3 讨 论

HBV是一种常见的病原体,人体在感染HBV后,其能长期潜伏在人的身体中,但是大多数HBV感染者能够通过免疫系统抑制该病毒的增生,使其无法引起疾病的出现,但无法完全消除HBV,HBV能够通过限制自身的DNA表达,从而规避自然杀伤细胞的清除,并长期潜伏在受感染的细胞中^[6-7]。若机体免疫功能衰弱或在一些特定因子的诱导下,病毒被激活并大量繁殖,从而引起了急性乙型肝炎的出现。人体在感染HBV后往往无特异性症状,待乙型肝炎细胞异常增殖时可引起急性症状^[8]。部分患者HBV感染有时无法达到乙型肝炎的诊断标准,但通过血液可观察到HBV-DNA载量有显著升高的趋势^[9-11]。

乙型肝炎患者在经过一段时间的抗病毒治疗后,随着抗病毒药物的作用及免疫机制的作用,患者体内的HBV-DNA载量又会逐渐下降^[12]。相关研究发现,乙型肝炎患者外周血HBV-DNA载量越高,肝功能异常越严重,提示HBV-DNA载量测定不但能够用于诊断HBV感染相关疾病,同时对于患者的临床治疗效果评估也有较好的指导意义^[13]。

随着荧光定量PCR技术的不断发展,越来越多的学者开始研究HBV-DNA检测在HBV感染相关疾病中的作用与价值。HBV-DNA测定具有快捷、高效、特异度强的优势,且荧光定量PCR技术具有较高的灵敏度、特异度和准确性,在临床检测中得到了广泛的应用,能够帮助医生快速鉴定各种标本,从而为临床治疗提供科学依据,对于提高用药的安全性和尽早改善患者的症状具有较好的效果^[14-15]。将荧光定量PCR技术应

用于HBV-DNA的检测,能够确定患者是否为杆状病毒表达载体感染引起的疾病,同时能够根据病毒载量水平观察病毒辅助情况,对于以高热为主的患者是否为HBV感染的临床诊断与治疗都有一定的指导作用^[16]。荧光定量PCR检测HBV-DNA具有时间短、准确率高的优势,在HBV感染的临床诊断与鉴别中具有较好的应用效果。

脂血血清标本呈浑浊状主要是由于乳糜微颗粒水平过多引起的,而这些乳糜微颗粒多为三酰甘油^[17]。虽然有报道指出乳糜微颗粒具有光散射效果,对荧光定量PCR技术的信号强度具有一定的影响,同时对Taq酶活性有一定的抑制作用,对其扩增效率有较大的影响,容易造成假阴性结果^[18]。但是本研究显示,脂血标本对荧光定量PCR检测结果无影响,这可能与大部分乳糜微颗粒在离心处理时被去除以及提取DNA过程中被稀释有关。

溶血标本从理论上来说对荧光定量PCR检测结果有一定影响。有学者认为血红素能够通过卟啉环与Taq酶结合从而抑制其活性,对HBV-DNA测定结果有影响^[19]。但是本研究结果显示,溶血与未溶血标本的荧光定量PCR检测结果差异无统计学意义($P>0.05$),这可能是由于溶血对荧光定量PCR测量无影响。血清标本在DNA提取过程中被破坏,成为沉淀物,并且在多次离心之后被完全排除,只存在血红蛋白衍生物;此外,离心后抛去上清也会降低血红蛋白水平。

此外,由于PCR检测费用较高,每天检测量有限,不可能每天进行PCR检测,许多实验室都是采集标本后放置室温环境或冷藏库保存,每周测量2~3次^[20]。且本研究结果显示,不同保存时间和温度对PCR测量结果无明显影响,说明荧光定量PCR技术具有较好的应用效果。

本研究中,即时检测、4℃冷藏7 d后检测、室温保存2 d后检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$);高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本中的HBV-DNA水平差异均无统计学意义($P>0.05$),说明储存时间、储存温度以及脂血、溶血对荧光定量PCR法测定HBV-DNA无较大影响,提示荧光定量PCR法在测定HBV-DNA中具有较高的应用价值。

参考文献

- [1] 郑建中,王丽萍.标本因素对荧光定量PCR法测定乙型肝炎病毒DNA的影响[J].中国医药指南,2008,6(17):431-433.
- [2] 高峰,高慧华,杨学文.脂血因素对荧光定量PCR检测乙型肝炎病毒DNA的影响及解决措施[J].临床检验杂志,2007,25(5):359-360.
- [3] 郭华国,姚正国.脂质、血红蛋白、胆红素标本对乙型肝炎病毒DNA荧光定量测定的影响[J].微循环学杂志,2006,16(1):32-33.
- [4] 郑专,董学君,汤家良,等.实时荧光聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒YMDD变异标本影响因素的研究[J].浙江实用医学,2006,11(3):148-150.
- [5] 赖新华,吕娜,彭艳辉.实时荧光定量PCR对乙型肝炎DNA检测的影响因素[J].中外医学研究,2014,21(5):63-64.
- [6] 颜敏.血清HBV-DNA荧光定量PCR检测与乙型肝炎病毒标志物模式的相关因素探讨[J].中外医疗,2014,43(26):193-194.
- [7] 肖晓光,王晶,林琳,等.应用实时荧光PCR方法检测乙

- 型肝炎病毒 1896 位点变异及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2014, 23(11): 1829-1832.
- [8] 刘金华, 孙悦, 殷学锋, 等. 流动式微流控 PCR 芯片快速扩增乙型肝炎病毒 DNA[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(z1): 179-180.
- [9] 曹红卫, 卫国, 冯文曦, 等. 乙型肝炎病毒 DNA 荧光定量 PCR 检测及其意义[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 866-868.
- [10] 贾袁媛, 沈钰明, 伍义行, 等. 基于鸭胚原代肝细胞的抗乙型肝炎病毒药物评价模型的建立[J]. 安徽农业科学, 2013, 23(14): 6276-6279.
- [11] 冯波, 邓文斌, 肖文勇, 等. PCR 扩增 HBV X 基因特征序列检测乙型肝炎病毒 DNA[J]. 湘潭大学自然科学学报, 2011, 33(1): 84-88.
- [12] 周翔天, 吕茹, 郑吉顺, 等. 粪便中乙型肝炎病毒的定量检测及其与乙型肝炎病毒标志物的相关性研究[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 23(10): 1510-1513.
- [13] 陈海雁, 张桂花, 罗锦彬, 等. 荧光定量 PCR 法检测乙型肝炎病毒 DNA 和乙型肝炎病毒标志物检测的临床价值分析[J]. 实用临床医药杂志, 2014, 18(19): 108-110.
- [14] Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) test: a novel automated real-time PCR assay for quantification of HBV DNA in plasma[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(3): 828-834.
- [15] Pol J, Le Pendeven C, Beby-Defaux A, et al. Prospective comparison of Abbott RealTime HBV DNA and Versant HBV DNA 3.0 assays for hepatitis B DNA quantitation:

· 临床研究 ·

血液流变学指标在糖尿病病情评估中的诊断价值

张珊珊¹, 杨 磊²

(1. 平顶山学院医学院, 河南平顶山 467000; 2. 平顶山市第一人民医院, 河南平顶山 467000)

摘要: 目的 分析血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标在糖尿病病情评估中的诊断作用。方法 选取平顶山市第一人民医院 2015 年 1 月到 2016 年 12 月收治的 65 例糖尿病患者为试验组, 再选取同期来平顶山市第一人民医院体检的健康者 60 例作为对照组, 检测并对比两组的血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标, 采用 Logistic 回归分析血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标与糖尿病的相关性, 评价以上相关指标在糖尿病病情评估中的诊断价值。结果 试验组患者的血浆黏度、全血高切黏度、全血低切黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率均明显高于对照组, 以上指标比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关分析结果显示, 血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标均与糖尿病呈正相关($P < 0.05$)。结论 血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标可作为糖尿病的诊断指标, 具有一定的临床诊断价值。

关键词: 血浆黏度; 全血黏度; 红细胞比容; 红细胞沉降率

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.048

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)19-2777-03

糖尿病作为临幊上常见疾病受到世界关注, 有关调查研究数据显示, 糖尿病的发病率呈显著上升趋势, 可能与人们生活方式和饮食习惯的改变有关, 使患者的健康和生活质量受到极大威胁^[1]。糖尿病不能被彻底根治, 需要长期依赖药物或者胰岛素进行治疗, 随着病程的延长, 患者容易出现血管性病变、糖尿病肾病以及糖尿病足等并发症, 可能危及患者的生命, 因此, 需要尽早采取措施治疗并发症^[2]。血液流变学指标是研究血液及其有形成分流动性、变形性、聚集性的变化规律及其在医学中应用的科学, 临幊上多种疾病的发生、发展均与血液流变

impact on HBV genotype monitoring[J]. J Virol Methods, 2008, 154(1/2): 1-6.

- [16] Shyamala V, Arcangel P, Cottrell J, et al. Assessment of the target-capture PCR hepatitis B virus (HBV) DNA quantitative assay and comparison with commercial HBV DNA quantitative assays[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(11): 5199-5204.
- [17] Ozdarendeli A, Toroman ZA, Bulut Y, et al. Combined branched-DNA and conventional HBV PCR assays for detection of serum HBV-DNA in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B patients[J]. Hepatogastroenterology, 2006, 53(67): 106-109.
- [18] Portilho MM, Martins PP, Lampe E, et al. A comparison of molecular methods for hepatitis B virus (HBV) DNA detection from oral fluid samples[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(Pt 6): 844-851.
- [19] Nagata I, Colucci G, Gregorio GV, et al. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 1999, 30(6): 965-969.
- [20] Morris CJ, Hill M, De Medina M, et al. Comparison of detection and quantification of HBV DNA in chronic HBeAg negative and positive patients by Abbott Real-Time HBV and Roche Cobas TaqMan HBV assays[J]. J Virol Methods, 2013, 193(2): 391-393.

(收稿日期: 2017-02-16 修回日期: 2017-05-18)

学相关指标具有一定的联系^[3]。血液流变学指标主要包括血浆黏度、全血黏度、红细胞比容、红细胞沉降率、纤维蛋白原、红细胞聚集指数以及红细胞变形指数等指标, 本研究为探索血浆黏度、全血黏度、红细胞比容以及红细胞沉降率等指标与糖尿病的关系, 选取了部分糖尿病患者和健康者, 对两组研究对象上述指标进行比较, 分析这些指标对糖尿病评估的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取平顶山市第一人民医院 2015 年 1 月到 2016 年 12 月收治的 65 例糖尿病患者的临床资料进行研究,