

· 论 著 ·

## 不同稀释液在乙型肝炎病毒 DNA 稀释检测中的应用研究\*

汪东剑, 彭慧琼, 彭国林, 林 萍, 徐 波, 刘 仙  
(中国人民解放军第一八四医院, 江西鹰潭 335000)

**摘要:**目的 分析和评价使用不同稀释液对高载量标本进行乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 稀释检测的结果, 评估临床常用稀释液在高载量标本 HBV-DNA 稀释检测中的应用价值。方法 收集初次检测 HBV-DNA 载量超出线性范围的标本 30 份, 比较使用阴性质控品、阴性血清、生理盐水、蒸馏水作为稀释液进行稀释检测结果的差异。结果 高载量标本进行稀释检测时, 使用阴性血清、生理盐水、蒸馏水进行稀释, 其检测结果与使用阴性质控品作为稀释液时的结果比较, 差异无统计学意义( $F=1.198, P=0.314$ ); 偏差均在允许总误差范围内, 但偏差之间的差异有统计学意义( $F=16.945, P<0.05$ )。使用蒸馏水作为稀释液时偏差最小, 且该结果与使用阴性质控品进行稀释检测的结果呈良好的线性关系, 回归方程为  $Y=0.970X+0.255$  ( $Y$ =阴性质控品稀释检测结果,  $X$ =蒸馏水稀释检测结果),  $R^2=0.959$ 。结论 当试剂盒自带阴性质控品不能满足高载量标本 HBV-DNA 稀释检测需要时, 使用蒸馏水作为稀释液进行稀释检测能取得较满意的结果。

**关键词:** 稀释液; 乙型肝炎病毒; 脱氧核糖核酸

**DOI:** 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.13.007 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2017)13-1864-03

## The application of evaluation of the different diluents used in the HBV-DNA diluted detection\*

WANG Dongjian, PENG Huiqiong, PENG Guolin, LIN Ping, XU Bo, LIU Xian  
(No. 184 Hospital of People's Liberation Army, Yingtan, Jiangxi 335000, China)

**Abstract:** Objective Analysis and evaluation the results of HBV-DNA diluted detection using different diluents, to evaluation the application value of those diluents in diluted detection of high loads sample. **Methods** 30 samples which the first detection of HBV-DNA loads exceed the linear scope were collected, compared the difference between results when use negative quality product, negative serum, physiological saline, distilled water as diluents. **Results** In time of diluted detection of those high loads sample, there was no significant difference between the results ( $F=1.198, P=0.314$ ) when use negative quality product, negative serum, physiological saline, distilled water as diluents; the TEa were within the allowed range, but the difference between bias was statistically significant ( $F=16.945, P<0.05$ ); the bias was minimum in time of use distilled water as diluents, and the results of distilled water diluted detection had good linear relationship between that of negative quality product diluted detection, the fitting equation was  $Y=0.970X+0.255$  ( $Y$ =results of negative quality product diluted detection,  $X$ =results of distilled water diluted detection),  $R^2=0.959$ . **Conclusion** In time of negative quality product could not meet the need of diluted detection, using distilled water as diluents could achieve satisfactory results.

**Key words:** diluents; Hepatitis B; DNA

乙型肝炎病毒(HBV)感染是我国面临的严重健康问题, HBV-DNA 定量检测在分析 HBV 感染的进展, 评估抗病毒治疗效果, 研究 HBV 造成肝细胞损伤机制等方面起着重要的作用<sup>[1-4]</sup>。众多研究报道, 高 HBV-DNA 载量患者免疫功能、肝脏损伤、治疗方案、预后转归等区别于其他患者, 从而对高载量标本 HBV-DNA 检测的准确性提出了更高要求<sup>[5-7]</sup>。虽然部分厂家对超过线性范围的标本建议使用试剂盒阴性质控品对标本进行稀释检测, 但由于试剂盒自带阴性质控品仅为 250  $\mu$ L, 难以满足稀释检测的需要, 所以迫切需要适合的替代稀释液用于临床。然而目前国内指导高载量标本 HBV-DNA 稀释检测时稀释液选择的研究较少, 为此使用试剂盒阴性质控品、HBV 阴性血清(以下简称阴性血清)、生理盐水、蒸馏水等 4 种稀释液用于稀释检测, 对稀释检测的结果进行分析和评价, 为临床合理选用稀释液提供依据。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2015 年 6—12 月在该院进行 HBV-

DNA 定量检测载量超过试剂盒线性范围的标本 30 份, 分装于 1.5 mL 离心管—20  $^{\circ}$ C 保存备用。超过试剂盒检测线性范围标本同时满足以下入选标准: (1)原倍检测时, 样品浓度大于  $5.0 \times 10^8$  IU/mL, 或扩增完毕后、结果分析前扩增曲线呈典型“S”型曲线, 自动分析或手动分析后曲线呈倒“S”型且分析结果显示为“低于检测下限”。(2)按试剂盒说明书, 使用标准稀释液分别进行 10、100 倍稀释检测时, 其扩增曲线呈典型 S 型曲线, 并且按稀释倍数计算后其结果均大于  $5.0 \times 10^8$  IU/mL。定值血清由中山大学达安基因有限公司提供, 载量为  $2.0 \times 10^9$  IU/mL。稀释液来源: (1)阴性质控品由中山大学达安基因有限公司额外提供。(2)阴性血清为收集 2015 年 10—12 月经 HBV 血清标志物及 HBV-DNA 检测均为阴性的无溶血、黄疸、脂血血清 50 份, 充分混匀紫外线照射 2 h 无害化处理, —20  $^{\circ}$ C 保存备用。(3)生理盐水由晨欣药业股份有限公司生产。(4)无菌蒸馏水由四川科伦药业股份有限公司生产。

## 1.2 检测方法

\* 基金项目: 南京军区医学科技创新课题项目(MS078)。

作者简介: 汪东剑, 男, 副主任技师, 主要从事医学检验及临床输血研究。

**1.2.1 使用阴性质控品进行稀释检测准确性的验证** 试剂生产厂家建议使用试剂盒阴性质控品作为稀释液对高载量标本进行稀释检测,为验证其准确性,使用阴性质控品对厂家提供的  $2.0 \times 10^9$  IU/mL 定值标准血清以 10 倍为梯度进行 10、100、1 000、10 000、100 000 倍的稀释,对每个稀释梯度标本重复检测 5 次,比较稀释检测结果与理论结果间的偏差并进行线性评价,评估其稀释检测的准确性。

**1.2.2 标本稀释** 为确保稀释检测结果均处于试剂盒检测线性范围,取待检高载量血清标本分别使用阴性质控品、阴性血清、生理盐水、蒸馏水进行 100 倍稀释,震荡混匀 15 s 后备用。

**1.2.3 定量检测** 采用实时荧光定量 PCR 法对稀释后标本进行 HBV-DNA 载量检测,试验步骤严格按试剂盒说明书进行。

**1.2.4 质量控制措施** 本实验室经过江西省临床检验中心审核,具备开展临床基因检测技术的能力和资质,实验操作人员均接受省临检中心组织的临床基因检测技术培训并取得上岗资质。实验室成立之后每年参加江西省临床检验中心室间质评活动,在 HBV-DNA 定量检测的项目均取得 100 分的成绩。每批次试验均使用定量参考品建立标准曲线,且标准曲线线性相关系数符合  $0.97 \leq |r| \leq 1.00$  的要求;每批次试验均同时检测阴性对照,临界阳性质控品,强阳性质控品,且结果均在试剂盒规定的参考范围之内。

**1.3 仪器与试剂** HBV-DNA 核酸定量检测使用中山大学达安基因股份有限公司生产的 DA-7600 核酸扩增仪及其配套 HBV-DNA 核酸定量检测试剂盒。

**1.4 统计学处理** 各检测结果 QDNA 均进行对数转化为 LGQ,采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm$

*s* 表示,组间比较采用方差检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。偏差分析以《CNAS-CL36 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》规定的(靶值  $\pm 0.4$  对数值)为允许总误差 (*TEa*),当偏差小于此 *TEa* 时可接受,否则不可接受。

**2 结 果**

**2.1 阴性质控品稀释检测准确性验证结果** 使用阴性质控品对定值标准血清以 10 倍为梯度进行梯度稀释检测。见表 1。

**表 1 阴性质控品稀释检测准确性验证结果**

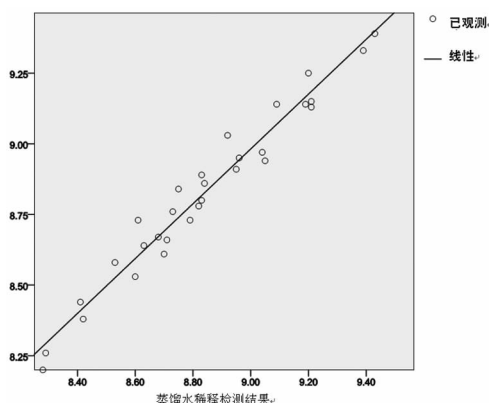
项目	10 倍	100 倍	1 000 倍	10 000 倍	100 000 倍
理论结果	8.30	7.30	6.30	5.30	4.30
检测结果(LGQ)	8.36	7.43	6.34	5.41	4.51
绝对偏差	0.06	0.13	0.04	0.11	0.21
相对偏差(%)	0.70	1.47	0.70	2.08	4.98
线性评价参数	$Y=1.028X - 0.288, R^2=0.999(n=5), P<0.01$				

**2.2 高载量标本稀释检测结果及线性评价** 30 份高载量标本使用不同稀释液稀释 100 倍后 HBV-DNA 检测结果及线性评价参数,见表 2。线性评价以阴性质控品稀释检测结果为 *Y* 值,其他稀释液的检测结果为 *X* 值进行线性回归分析( $Y = aX + b$ ),参照文献[8-9]以 *a* 介于  $1.00 \pm 0.05$ ,  $R^2 \geq 0.95$  为评判标准,判定是否符合线性评价要求。蒸馏水稀释检测结果与阴性质控品稀释检测结果呈良好的线性关系,符合线性评价要求,见图 1。偏差分析以阴性质控品稀释检测结果作为参照,使用 3 种稀释液时偏差均小于 *TEa*,差异有统计学意义( $F = 16.945, P < 0.05$ ),以蒸馏水作为稀释液偏差最小。

**表 2 稀释检测结果**

项目	阴性质控品	阴性血清	生理盐水	蒸馏水
检测结果(LGQ)	$8.82 \pm 0.29$	$8.96 \pm 0.33$	$8.90 \pm 0.34$	$8.84 \pm 0.30$
拟合方程	—	$Y = 0.872X + 1.013$	$Y = 0.862X + 1.149$	$Y = 0.970X + 0.255$
偏差(%)	—	$1.55 \pm 1.12$	$0.87 \pm 0.95$	$0.14 \pm 0.69$
		$F = 16.945$	$P = 0.000$	

注:—表示无数据



**图 1 蒸馏水稀释检测与阴性质控品稀释检测结果的曲线拟合**

出检测上限标本进行精确定量的常用方法<sup>[10-11]</sup>。本研究使用中山大学达安基因股份有限公司提供的设备和试剂进行 HBV-DNA 定量检测,主要依靠手工进行核酸提取,整个操作步骤繁多,其中核酸提取、扩增反应体系、仪器设备、数据处理等多个环节均会对检测结果造成影响<sup>[12-13]</sup>,在高载量标本稀释检测时稀释液的选择更应慎重。对于超出检测线性范围的标本,厂家建议采用试剂盒自带阴性质控品作为稀释液进行稀释检测,以获得较为准确的检测结果,但由于每盒试剂自带阴性质控品仅 250  $\mu$ L,甚至无法满足 1 次稀释检测的需要,因此有必要寻找一种适合的替代稀释液用于临床工作。陈小颖等<sup>[14]</sup>和王瑞莲等<sup>[15]</sup>研究采用 HBV 阴性血清作为 HBV-DNA 稀释检测的稀释液。生理盐水和蒸馏水具有易于获取、成分比较单一、性状稳定、对实验室工作人员不会造成额外危害的优点,使其也有可能成为 HBV-DNA 检测中较好的稀释液。

**3 讨 论**

稀释检测是临床检验中为获取更大的线性范围或对于超

本研究首先对使用阴性质控品进行稀释检测时的准确性进行了评估,对载量为  $2.0 \times 10^9$  IU/mL 定值标准血清以 10 倍

为梯度进行 10、100、1 000、10 000、100 000 倍的稀释后,其检测结果与理论结果间的偏差均小于《CNAS-CL36 医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》规定的  $TEa$ (靶值 $\pm 0.4$ 对数值)。各梯度稀释检测结果与理论结果间符合线性评价的要求,  $Y=1.028X-0.288, R^2=0.999(n=5)$ 。

在验证了阴性质控品是 HBV-DNA 检测良好稀释液的基础上,以阴性质控品(厂家额外提供,主要成分为 HBV 阴性血清)作为标准稀释液,以自制阴性血清、生理盐水、蒸馏水作为替代稀释液,对 30 份高载量 HBV-DNA 标本进行 100 倍稀释检测,结果显示使用不同稀释液时,差异无统计学意义( $F=1.198, P=0.314$ )。对使用替代稀释液与使用标准稀释液进行稀释时检测结果之间进行线性评价,发现使用蒸馏水作为稀释液时与使用阴性质控品作为稀释液时的检测结果能满足线性验证试验分析测量范围(AMR)评价要求( $a=1.00\pm 0.05, R^2\geq 0.950, r=0.979, R^2=0.959$ , 回归方程为  $Y=0.970X+0.255$ ( $Y$ =阴性质控品稀释检测结果,  $X$ =蒸馏水稀释检测结果);而使用阴性血清、生理盐水进行稀释时,虽然检测结果与使用阴性质控品进行稀释时的结果均呈正相关,相关系数分别为 0.955、0.969( $P<0.05$ ),但由于其对应回归公式中的  $a$  值及  $R^2$  均超出了线性评价的允许范围,因而不符合线性评价要求。

同样,分析使用阴性血清、生理盐水和蒸馏水作为稀释液时的检测结果与使用阴性质控品作为稀释液时的检测结果间的偏差,发现使用上述 3 种稀释液时,稀释检测结果偏差均在  $TEa$  范围内(靶值 $\pm 0.4$ 对数值);但偏差之间的差异有统计学意义( $F=16.945, P<0.05$ ),使用蒸馏水作为稀释液时偏差最小,使用阴性血清作为稀释液时偏差最大。使用自制阴性血清作为稀释液时,其检测结果偏差最大,这可能是因为 PCR 检测涉及核酸提取、扩增、产物分析等多个步骤,其反应体系的复杂性使得未进行严格筛选和预试验验证的 HBV-DNA 阴性血清难以成为良好的高载量标本 HBV-DNA 检测的稀释液。相反,蒸馏水在高载量标本 HBV-DNA 稀释检测中取得了较为满意的结果,其检测结果不仅与使用阴性质控品时的检测结果呈现良好的线性关系,而且在 3 种替代稀释液中偏差最小。

本研究对运用试剂盒自带阴性质控品进行高载量标本 HBV-DNA 稀释检测进行综合评价,对使用不同稀释液进行 HBV-DNA 稀释检测的结果进行比较,证实试剂盒自带阴性质控品符合 HBV-DNA 稀释检测的要求,使用蒸馏水作为稀释液能取得与使用阴性质控品作为稀释液时相一致的结果。因此认为在使用中山达安基因股份有限公司提供的 HBV-DNA 定量检测试剂盒对高载量标本进行 HBV-DNA 稀释检测时,厂家提供的阴性质控品是较为可靠的稀释液;当厂家未能提供足量阴性质控品作为稀释液时,使用蒸馏水作为替代稀释液也能取得较为满意的结果。

由于本研究样本量较小,研究结果还需要大样本量的进一步证实;稀释液的选择仅是影响稀释检测结果准确性的因素之一,稀释倍数的不同是否会对稀释检测结果的准确性具有影响还有待进一步探讨。

## 参考文献

[1] 陈慧,顾兴华,吴敏娟,等. HBV 感染不同病程中病毒载

量与肝功能相关指标及免疫功能的变化分析[J]. 国际免疫学杂志, 2015, 38(2): 138-142.

- [2] 杨龙,杨阳,陈志勇,等. 聚乙二醇干扰素  $\alpha$ -2a 治疗多种核苷(酸)类药物耐药慢性乙型肝炎的疗效[J]. 实用医学杂志, 2014, 13(3): 503-504.
- [3] 姚佳燕,晁康,李敏睿,等. 白细胞介素-21 在慢性乙型肝炎病毒感染自然史不同阶段的表达分析[J]. 实用医学杂志, 2015, 20(7): 1061-1064.
- [4] Huang L, Li J, Lau WY, et al. Perioperative reactivation of hepatitis B virus replication in patients undergoing partial hepatectomy for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(1): 158-164.
- [5] 连佳,韩涛,向慧玲,等. 恩替卡韦与阿德福韦酯单药治疗慢性乙型肝炎相关性肝病患者 240 周的随机对照研究[J]. 中华肝病杂志, 2015, 23(10): 733-737.
- [6] 余雪平,郭如意,柯邵鹏,等. 慢性乙型肝炎及其肝硬化患者 HBsAg 与 HBV DNA 定量变化及其相关性[J]. 南方医科大学学报, 2015, 23(5): 682-686.
- [7] 李冀宏. 病毒高载量的慢性乙型肝炎两种治疗方案的临床疗效及成本-效果分析[J]. 中国全科医学, 2011, 14(7): 743-745.
- [8] Prakash C, Shaffer CL, Nedderman A. Analytical strategies for identifying drug metabolites[J]. Mass Spectrom Rev, 2007, 26(3): 340-369.
- [9] Yang X, Liu L, Wu M, et al. Wet-chemistry-assisted nanotube-synthesis reaction for high-efficiency and bulk-quantity synthesis of boron-and nitrogen-codoped single-walled Carbon nanotubes[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(34): 13216-13219.
- [10] 周洪,陈志菊,周绍英. 2 种检测系统测定血、尿淀粉酶高值标本时稀释液的评价与选择[J]. 重庆医学, 2015, 31(8): 1048-1051.
- [11] 孙彬,白光亮,丁修冬,等. HCG 稀释检测对结果的影响及解决策略探讨[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(6): 726-728.
- [12] 李金明. 我国临床分子诊断试剂发展:问题及思考[J]. 检验医学, 2014, 29(3): 199-201.
- [13] 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.
- [14] 陈小颖,龙璐,李琼,等. 基于 Pre-NAT 全自动核酸提取平台的高敏 HBV DNA 检测性能评价[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 35(10): 696-700.
- [15] 王瑞莲,张婷,龙军,等. 国产磁珠法试剂在荧光定量 PCR 检测乙型肝炎病毒核酸中的应用[J]. 实用医学杂志, 2015, 31(21): 3594-3596.

(收稿日期:2017-01-21 修回日期:2017-03-22)