

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.07.013

血清胆红素水平对 HBV DNA 检测的影响及其去除胆红素影响的方法

余 清,滕凤猛[△],杨学文

(南京中医药大学附属医院/江苏省中医院检验科,南京 210029)

摘 要:**目的** 探讨血清胆红素水平对乙肝病毒脱氧核糖核酸(HBV DNA)定量检测的影响及其去除胆红素影响的方法。**方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应检测含不同水平胆红素标本中 HBV DNA 病毒载量,再采用倍比稀释法比较用生理盐水和正常血清作为稀释介质对 HBV DNA 定量检测的影响。**结果** 血清胆红素水平对 HBV DNA 定量检测结果有明显影响,但其影响与血清胆红素水平及 HBV DNA 载量有关。当 HBV DNA 载量 $\geq 1 \times 10^6$ U/mL 时,血清胆红素对 HBV DNA 定量检测结果无影响;当 HBV DNA 载量 $< 1 \times 10^6$ U/mL 时,其检测结果与胆红素水平相关。当胆红素水平 $\geq 250 \mu\text{mol/L}$ 时,对 HBV DNA 定量检测结果有影响;当胆红素水平 $< 250 \mu\text{mol/L}$ 时,对 HBV DNA 检测结果无影响。采用倍比稀释法可去除胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响,且生理盐水介质明显优于正常血清介质。**结论** 血清胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响与胆红素水平和 HBV DNA 载量相关,采用倍比稀释法可去除胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响。

关键词:胆红素; 乙肝病毒脱氧核糖核酸; 荧光定量聚合酶链反应; 影响因素

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)07-0909-03

Study on the influence of serum bilirubin level on HBV DNA detection and the method of removing bilirubin

YU Qing, TENG Fengmeng[△], YANG Xuewen

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of NanJing University of TCM/Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of serum bilirubin on quantitative detection of hepatitis B virus (HBV) DNA and the method of removing bilirubin. **Methods** The viral load of HBV DNA in different concentrations of bilirubin samples was detected by real-time quantitative PCR. The effect of using normal saline and normal serum as dilution medium on the quantification of HBV DNA was compared by the method of dilution. **Results** Serum bilirubin levels had a significant effect on HBV DNA quantification, but their effects were related to serum bilirubin concentration and HBV DNA load. When the HBV DNA load was greater than 1×10^6 , serum bilirubin had no effect on the quantitative detection of HBV DNA, but when the HBV DNA load was lower than this concentration, the detection result was related to the concentration of bilirubin. The study found that when the concentration of bilirubin was higher than $250 \mu\text{mol/L}$, the results of HBV DNA quantitative detection were affected. When the concentration of bilirubin was less than $250 \mu\text{mol/L}$, the test results had no effect. The effect of bilirubin on the quantitative detection of HBV DNA could be removed by the method of double dilution, and the saline medium was obviously superior to the normal serum medium. **Conclusion** The effect of serum bilirubin on HBV DNA detection results is related to bilirubin concentration and HBV DNA load. The effect of bilirubin on HBV DNA quantitative detection can be removed by double dilution method.

Key words: bilirubin; hepatitis B virus DNA; real-time fluorescent quantitative PCR; influencing factors

临床工作中发现,高胆红素血症可导致 HBV 扩增曲线异常,异常的扩增曲线将导致 HBV DNA 定量结果不准确,从而不能给 HBV 感染者的治疗和疗效观察提供准确结果。而胆红素如何影响 HBV DNA 定量检测结果,怎样去除胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响? 这些问题值得探讨。为此,本文深入研究胆红素水平对 HBV DNA 定量检测结果的影响,试图寻找合适的去除胆红素影响的方法,以便给临床

提供准确的治疗依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集在本院治疗的 15 例患者血清标本,其血清 HBV DNA 载量在 $1 \sim 10^6$ U/mL,所有标本保存在 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中备用,均排除 HBV、梅毒和人类免疫缺陷病毒感染。

1.2 仪器与方法 HBV DNA 检测试剂盒(广州达安基因有限公司),ABI7500 实时荧光定量聚合酶链

反应(FQ-PCR)仪(ABI,美国)。严格按照厂商说明书操作,且在室内质量控制在控的条件下对结果进行分析。

1.3 试验设计 (1)采用 FQ-PCR 检测 15 份标本,然后在不同基线设置下分析结果。(2)用不同水平胆红素血清对 HBV DNA 水平进行倍比稀释,观察胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响。(3)采用生理盐水和正常血清对高胆红素标本进行稀释,观察不同稀释介质对 HBV DNA 定量检测结果的影响。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计分析软件进行数据处理,HBV DNA 数据进行对数转换后统计,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 同批次标本在不同基线设置下 HBV DNA 定量检测结果 见表 1。不同基线设置对血清胆红素正常标本无影响,但对高胆红素的标本,不同基线设置对检测结果影响较大,当基线为 0.1 时,检测结果为 7.20 U/mL;当基线为 0.2 时,检测结果为 5.92 U/mL,当基线为 0.4 时,检测结果为 3.42 U/mL,三者差异有统计学意义($P<0.05$)。提示对于正常标本,不同基线设置对检测结果无影响,但高血清胆红素标本对 HBV DNA 定量检测结果有影响。分析结果发现,高胆红素标本的扩增曲线异常:扩增曲线起跳很早但很快又下降,然后又升高。这种异常的扩增曲线对 HBV DNA 定量检测结果有影响。

表 1 不同基线设置下 HBV DNA 定量检测结果(U/mL)

标本号	基线=0.1	基线=0.2	基线=0.4	最大差值
1	7.20	5.92	3.42	3.78*
2	5.69	5.64	5.57	0.12
3	4.32	4.27	4.19	0.13
4	3.66	3.58	3.54	0.12
5	7.89	7.96	7.91	-0.02
6	2.72	2.67	2.60	0.12
7	2.27	2.15	1.91	0.36
8	8.54	8.73	8.82	-0.28
9	2.54	2.41	2.34	0.02
10	2.69	2.65	2.60	0.09
11	1.81	1.74	1.67	0.14
12	3.39	3.35	3.35	0.04
13	6.39	6.39	6.34	0.05
14	8.63	8.89	8.97	-0.34
15	1.97	1.93	1.90	0.07

注:HBV DNA 检测结果经过对数转换后,不同基线分析结果差值为 0.0~0.5,0.5~1.0 表示结果准确,大于 1.0 表示结果不准确,与其他标本组比较,* $P<0.01$

2.2 血清胆红素水平对 HBV DNA 定量检测结果的影响 选用高值和低值 HBV DNA 标本,分别用高胆红素水平标本(排除乙肝、丙肝、艾滋病、梅毒)进行稀释,使其含胆红素的水平为 7.82、15.63、31.25、62.50、125.00、250.00 $\mu\text{mol/L}$,然后采用 FQ-PCR 检测 HBV DNA 载量。结果显示,HBV DNA 高值标本,即当 HBV DNA $\geq 1 \times 10^6$ U/mL 时,HBV DNA 定量检测结果不受胆红素水平和基线设置的影响。

但是 HBV DNA 低值标本,即 HBV DNA $< 1 \times 10^6$ U/mL 时,其 HBV DNA 定量检测结果与胆红素水平相关。当胆红素水平 $< 250 \mu\text{mol/L}$ 时,HBV DNA 定量检测结果不受影响,当胆红素水平 $\geq 250 \mu\text{mol/L}$ 时,HBV DNA 定量检测结果受影响。提示血清胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响一方面与血清胆红素水平相关,另一方面与血清中 HBV DNA 载量相关。

表 2 不同基线设置下以正常血清倍比稀释后不同胆红素水平中 HBV DNA 定量检测结果(U/mL)

胆红素水平($\mu\text{mol/L}$)	基线=0.1	基线=0.2	基线=0.4	最大差值
250.00	6.53	5.11	4.70	1.83*
125.00	4.43	4.22	4.13	0.30
62.50	3.85	3.77	3.70	0.15
31.25	3.58	3.51	3.45	0.13
15.63	3.23	3.23	3.19	0.04
7.82	2.77	2.69	2.57	0.20

注:与其他胆红素水平组比较,* $P<0.01$

表 3 不同基线设置下以生理盐水倍比稀释后不同胆红素水平中 HBV DNA 定量检测结果(U/mL)

胆红素水平($\mu\text{mol/L}$)	基线=0.1	基线=0.2	基线=0.4	最大差值
250.00	6.06	4.83	4.48	1.58*
125.00	4.46	4.22	4.08	0.38
62.50	4.20	4.08	3.99	0.21
31.25	3.71	3.53	3.48	0.23
15.63	3.45	3.31	3.26	0.19
7.82	2.92	2.95	2.94	-0.02

注:与其他胆红素水平组比较,* $P<0.01$

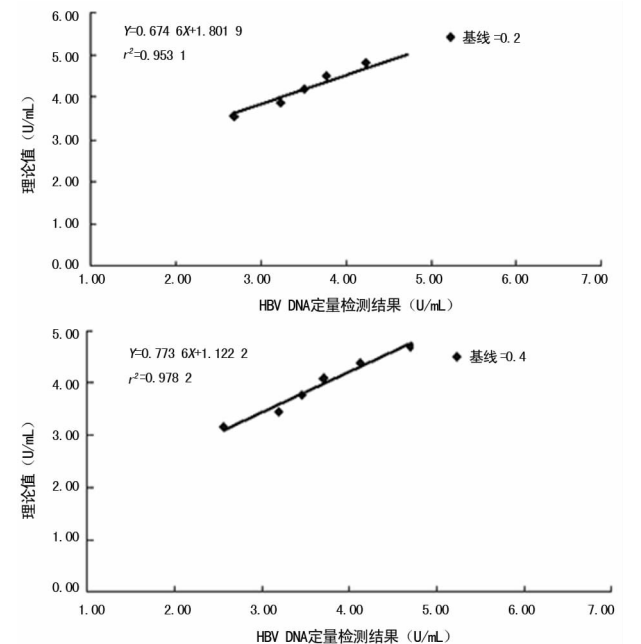


图 1 不同基线设置下正常血清介质中 HBV DNA 定量检测结果与理论值相关性分析

2.3 不同稀释介质对 HBV DNA 定量检测结果的影响 分别用生理盐水和正常血清对胆红素标本进行倍比稀释,然后对 HBV DNA 定量检测结果进行回归分析。结果显示,采用倍比稀释法可去除胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响,而且生理盐水和正

常血清都可作为高胆红素标本的稀释介质,二者对检测结果无影响,见表 2、3 和图 1、2,但生理盐水明显优于正常血清。

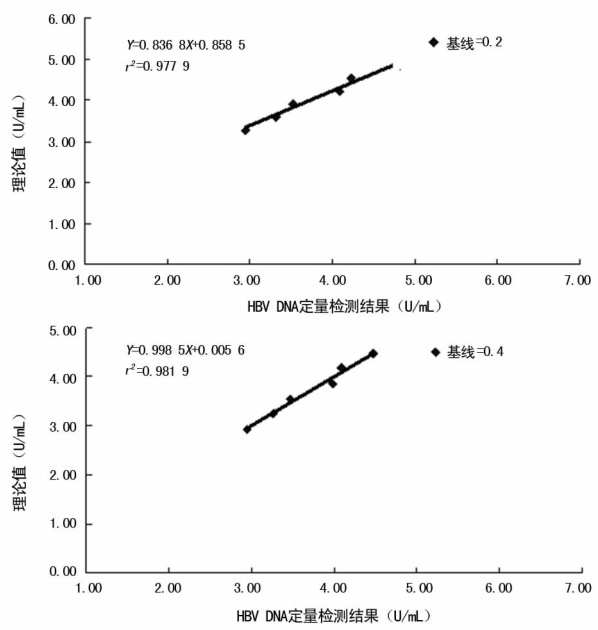


图 2 不同基线设置下生理盐水中 HBV DNA 定量检测结果与理论值相关性分析

3 讨 论

HBV 感染呈世界流行,据世界卫生组织报道,全球约有 20 亿人曾感染 HBV,其中 2.4 亿为慢性感染者^[1]。每年约有 65 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和肝癌^[2]。HBV DNA 定量检测主要用于判断慢性 HBV 感染的病毒复制水平,可用于抗病毒治疗适应证的选择及疗效判断,而准确定量检测需要采用 FQ-PCR。因此,血液中 HBV DNA 定量检测已成为慢性感染评估和管理的重要检测指标。除 HBV 的血清学和血清丙氨酸氨基转移酶测定外,HBV 病毒载量检测用于确定慢性 HBV 感染^[3],特别适合于无 HBeAg 检测的个体活动性与非活动性疾病的鉴别。最近,一些抗病毒药物已用于治疗慢性 HBV 感染,而病毒血症是决定开始治疗和监测治疗反应的重要组成部分^[4]。血清或血浆中 HBV DNA 定量检测是治疗 HBV 感染的重要指标,能预测和监测抗病毒治疗的效果,通过检测 HBV DNA 突变可鉴定耐药性的出现。FQ-PCR 作为 HBV DNA 检测和定量的一种新的分子学方法,已越来越多地被用作传染病的诊断试验^[5]。有研究评估了 FQ-PCR 检测 HBV DNA 的敏感度、线性范围和准确性等性能^[6]。有研究发现,与现有的其他检测方法相比,FQ-PCR 具有更高的敏感度、准确度及更宽的线性范围^[7]。但是所有的研究主要集中在单个检测的性能比较表现上,而对 FQ-PCR 检测的影响因素研究不多^[8-9]。由于 HBV DNA 定量检测对乙肝患者的诊断和疗效监测有极其重要的作用,因此,对 FQ-PCR 干扰因素的研究有重要临床价值。然而,目前关于 FQ-PCR 检测 HBV DNA 影响因素的研究较少,大部分研究只做了某种

物质对 HBV DNA 的定量研究,没有进行深入细致的探究。

本研究发现,血清胆红素对 FQ-PCR 检测 HBV DNA 病毒载量的影响,一方面与 HBV DNA 的病毒载量有关,另一方面与胆红素水平有关。高 HBV DNA 病毒载量的标本不受胆红素水平的影响,但是低 HBV DNA 病毒载量的标本受胆红素水平的影响。高水平胆红素对 HBV DNA 定量检测结果有影响,低水平胆红素对 HBV DNA 定量检测结果无影响。在日常工作中,可通过倍比稀释法去除胆红素对 HBV DNA 定量检测结果的影响。在实际临床工作中,对 PCR 检测结果一方面要看标准曲线做得是否满足要求,另一方面要观察扩增曲线有无异常。

总之,HBV DNA 定量检测是临床诊断、治疗 HBV 感染、判定疗效的重要指标,对阐明 HBV DNA 定量检测的影响因素有重要意义。因此,在日常工作中,应综合分析,给临床提供更有价值的检测结果。

参考文献

- [1] OTT J J, STEVENS G A, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection; new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. Vaccine, 2012, 30(12): 2212-2219.
- [2] LOZANO R, NAGHAVI M, FOREMAN K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010; a systematic analysis for the global burden of disease study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [3] SAGNELLI C, CICCOZZI M, ALESSIO L, et al. HBV molecular epidemiology and clinical condition of immigrants living in Italy [J]. Infection, 2018, 46(4): 523-531.
- [4] LANGE B, ROBERTS T, COHN J, et al. Diagnostic accuracy of detection and quantification of HBV-DNA and HCV-RNA using dried blood spot (DBS) samples - a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 693-696.
- [5] BERGER A, PREISER W, DOERR H W. The role of viral load determination for the management of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus infection [J]. J Clin Virol, 2001, 20(1/2): 23-30.
- [6] 庞志宇, 谢在春, 刘玥, 等. HBV-DNA 定量检测试剂盒性能验证 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12(17): 2530-2532.
- [7] 李文静, 徐红星, 陈昭华, 等. 基于 Pre-NAT 全自动核酸检测系统的 HBV-DNA 超敏检测试剂方法学性能验证 [J]. 临床检验杂志, 2015, 33(7): 532-534.
- [8] 应威, 李万春, 宋涛, 等. HBV DNA 一步法定量检测性能验证及评价 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2017, 31(3): 257-261.
- [9] 杨佳佳, 张彦懿, 刘华伟, 等. HBV-DNA 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒性能验证 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 40(2): 213-217.