

• 论 著 •

# 基于 ddPCR 技术分析 EB 病毒载量特征及与 qPCR 技术的比较研究

王心仪, 周娟, 刘颖, 应斌武<sup>△</sup>

(四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041)

**摘要:**目的 解决临床工作中应用实时荧光定量 PCR(qPCR)方法检测 EB 病毒(EBV)载量与临床诊断不符的问题,探讨微滴式数字 PCR(ddPCR)和 qPCR 方法检测 EBV 载量的能力并为临床提供可能的解决方案。**方法** 收集 510 例疑似 EBV 感染相关疾病患者血浆标本,采用 ddPCR 和 qPCR 两种方法测定同一血浆标本的 EBV-DNA 载量。**结果** EBV 感染人群中,EBV-DNA 载量较其他地区低,载量中位数仅 360 copies/mL,其中初诊未治鼻咽癌患者中位病毒载量为 4 590 copies/mL,治疗后鼻咽癌患者中位病毒载量下降为 430 copies/mL,免疫力低下者中位病毒载量为 130 copies/mL,而淋巴瘤患者中位病毒载量为 840 copies/mL;qPCR 检测 EBV 感染以 400 copies/mL 为界值,高于 400 copies/mL 时,ddPCR 与 qPCR 的 EBV-DNA 测定水平值呈中度相关( $r=0.533, P<0.05$ ),低于 400 copies/mL 时,ddPCR 与 qPCR 的 EBV-DNA 测定水平值呈弱相关( $r=0.2995, P<0.05$ );以 ddPCR 为标准,qPCR 检测 EBV-DNA 的灵敏度仅为 0.317,以 ddPCR 检测结果为标准,构建 qPCR 的受试者工作特征曲线下面积为 0.871,此时临界值(qPCR)为 10 copies/mL,灵敏度为 0.824,特异度为 0.780。**结论** 采用 ddPCR 方法或优化 qPCR 的临界值去检测 EBV-DNA 载量更能为临床诊断 EBV 感染提供有利支持。

**关键词:** EB 病毒载量特征; 实时荧光定量 PCR; 微滴式数字 PCR

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.04.012 **中图法分类号:**R-33

**文章编号:**1673-4130(2020)04-0431-05

**文献标识码:**A

## Analysis of Epstein-Barr virus load characteristic based on ddPCR technology and comparison with qPCR technology

WANG Xinyi, ZHOU Juan, LIU Ying, YING Binwu<sup>△</sup>

(Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract: Objective** To solve the problem that the real-time fluorescent quantitative PCR(qPCR) is not suitable for the clinical diagnosis of EBV in clinical work, and to explore the ability of droplet digital PCR(ddPCR) and qPCR to detect EBV load and provide a possible solution for the clinical work. **Methods** The plasma samples of 510 patients suspected of Epstein-Barr virus(EBV) infection were collected and the EBV-DNA load of the same plasma sample was measured by ddPCR and qPCR. **Results** Among EBV-infected populations, the EBV-DNA load was lower than in other regions, and the median load was only 360 copies/mL. The median viral load of patients with newly diagnosed nasopharyngeal carcinoma was 4 590 copies/mL. After treatment, the median viral load in patients with pharyngeal cancer was 430 copies/mL. The median viral load in patients with low immunity was 130 copies/mL, and the median viral load in patients with lymphoma was 840 copies/mL. The limit value of EBV infection detected by qPCR was 400 copies/mL. Above 400 copies/mL, ddPCR and qPCR EBV-DNA levels were moderately correlated( $r=0.533, P<0.05$ ), which was lower than 400 copies/mL, the correlation between ddPCR and qPCR EBV-DNA levels were weakly correlated( $r=0.2995, P<0.05$ ); The results were based on ddPCR, and the sensitivity of qPCR to detect EBV-DNA was only 0.317. Based on the results of ddPCR, the receiver operating characteristic curve for qPCR was constructed and the area under the curve was 0.871, the cut-off value(qPCR) was 10 copies/mL, the sensitivity was 0.824, and the specificity was 0.780. **Conclusion** Detecting EBV-DNA load using ddPCR method or optimizing the cut-off value of qPCR can provide favorable support for clinical diagnosis of EBV infection.

**Key words:** epstein-barr virus load characteristics; real-time quantitative PCR; droplet digital PCR

作者简介:王心仪,女,技师,主要从事生物化学与分子生物学诊断方面的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: docbwy@126.com。

本文引用格式:王心仪,周娟,刘颖,等.基于 ddPCR 技术分析 EB 病毒载量特征及与 qPCR 技术的比较研究[J].国际检验医学杂志,2020,41(4):431-434.

EB 病毒(EBV)是一种线性双链 DNA 病毒,成人感染率高达 90%,存在于人类 B 淋巴细胞内,通过血液循环造成全身性感染<sup>[1]</sup>,大量病毒通过诱导细胞增殖、抑制细胞分化及凋亡,导致各种增生性疾病<sup>[2]</sup>。病毒感染可累及多个器官,疾病症状的多样化易造成漏诊、误诊,给临床诊断带来一定困难。传统的血清学方法可判断人体是否近期或曾经感染过 EBV,但检测结果不能反映 EBV 的活动状况。目前核酸载量测定是诊断 EBV 感染相关疾病最常用的实验室诊断方法<sup>[3]</sup>,通常使用实时荧光定量 PCR(qPCR)方法检测 EBV-DNA 用于确认 EBV 的感染。而基于 EBV 感染后疾病分布特点,根据各疾病发病率的不同,其 EBV-DNA 载量也不同<sup>[4]</sup>,但在西南地区常出现实验室结果和临床诊断不符的情况,导致 qPCR 检测结果对临床诊断支持能力不足,推测西南地区 EBV-DNA 载量有其自身特征。目前微滴式数字 PCR(ddPCR)方法的灵敏度高和绝对定量的能力在分子诊断方面具有巨大的潜力,作为一种绝对定量的方法<sup>[5]</sup>,可作为检测 EBV-DNA 载量的金标准。

故本研究旨在解决临床工作中用 qPCR 方法检测 EBV 载量与临床诊断不符的问题,一方面可以准确反映西南地区的 EBV 载量特点,另一方面比较 ddPCR 和 qPCR 方法检测 EBV 载量的能力,以 ddPCR 为标准,评价 qPCR 的性能,并为临床提供可能的解决方案。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2017 年 9—12 月四川大学华西医院 510 例疑似 EBV 感染的患者血浆标本。510 例患者中,免疫功能不全者 201 例;淋巴瘤 128 例;未治疗的鼻咽癌 38 例;治疗后的鼻咽癌 143 例。本研究经医院伦理委员会批准。

**1.2 仪器与试剂** qPCR 采用 EBV 载量定量试剂盒,购自中国湖南圣湘生物科技有限公司;ddPCR 使用全自动 PCR 仪,购自美国 Bio-Rad 公司,型号 QX200。

### 1.3 方法

**1.3.1 标本收集** 纳入高度怀疑 EBV 感染的 510 例 1 mL 标本血浆,在 4 °C 低温条件下,12 000 r/min 离心 10 min 后弃沉淀吸取上清液,分装标记保存至 -80 °C 冰箱中备用。

**1.3.2 ddPCR 检测 EBV 核酸载量** 按照 DNA 提取试剂盒具体说明书进行 DNA 的提取,在罗氏 Q480 仪器上进行 PCR 扩增,循环条件包括在 95 °C 10 min; 94 °C 30 s 40 个循环;56 °C 60 s;98 °C 10 min。扩增后,将 PCR 板转移至 Bio-Rad QX200 进行检测,并通过 Quanta-Soft 软件获得数据。

**1.3.3 qPCR 检测 EBV 核酸载量** qPCR 检测扩增

BamHI-W 片段,用已知 EBV-DNA 水平的标准阳性对照品制备标准曲线;提取血浆 EBV-DNA 具体按照说明书进行,将待测标本严格按照说明书进行 PCR 扩增。按照试剂盒说明:EBV-DNA 定量以 400 copies/mL 为界值判断结果。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS25.0 软件进行统计分析,计量资料正态分布以  $\bar{x} \pm s$  表示,非正态分布以中位数(M)表示,计数资料以率(%)表示。采用  $\chi^2$  检验和 Person 相关检验进行比较,设置检验水准  $\alpha=0.05$ ,采用  $\chi^2$  检验进行两组间阳性率的比较, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。计算受试者工作特征曲线(ROC 曲线)下的面积(AUC)来评价 qPCR 的诊断效能。

## 2 结果

**2.1 疑似 EB 感染患者的 EBV 载量特征分析** 510 例疑似 EBV 感染病例中,男性 302 例,女性 208 例。基于 ddPCR 检测结果,男性阳性率为 68.5%,女性阳性率为 61.5%,差异无统计学意义( $\chi^2=2.681, P>0.05$ )。患者平均年龄( $45 \pm 16$ )岁,随着年龄上升,阳性率升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。初诊未治鼻咽癌患者中,阳性率最高为(81.6%),其次依序为治疗后鼻咽癌(73.4%),免疫功能不全者(72.6%),淋巴瘤患者(68.0%),各病例组之间感染率比较,差异有统计学意义( $\chi^2=11.236, P<0.05$ )。对 EBV 病毒载量进行分析,发现 EBV 总的感染者病毒载量中位数为 360 copies/mL,其中初诊未治鼻咽癌患者中位病毒载量最高,为 4 590 copies/mL,治疗后鼻咽癌患者中位病毒载量下降为 430 copies/mL,免疫力低下者中位病毒载量为 130 copies/mL,而淋巴瘤患者中位病毒载量 840 copies/mL。见表 1。

表 1 510 例疑似感染者 EBV 分布情况

项目	n	M (copies/mL)	阳性率 [n(%)]	$\chi^2$	P
性别				2.681	>0.05
男	302	288	207(68.5)		
女	208	192	128(61.5)		
年龄				3.291	<0.05
年龄≤46岁	249	206	171(68.7)		
年龄>46岁	261	244	198(75.9)		
疾病组				11.236	<0.05
免疫功能不全	201	130	146(72.6)		
淋巴瘤	128	840	87(68.0)		
初诊未治鼻咽癌	38	4 590	31(81.6)		
治疗后鼻咽癌	143	430	105(73.4)		

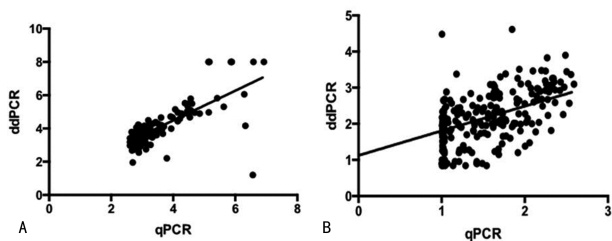
**2.2 两种检测方法定性结果比较** qPCR 和 ddPCR 分别检测同一血浆标本,以 400 copies/mL 作为 qPCR 的临界值时,与 ddPCR 结果做比较,结果显示用 qPCR 检测的大多数 EBV 阳性患者(252/369)被漏检。通过回顾 qPCR 反应曲线,发现 252 个漏检标

本中,有 231 个有典型的 S 型扩增曲线。见表 2。

表 2 两种检测方法定性结果比较(n)

项目	ddPCR		合计
	阴性	阳性	
qPCR			
阴性	137	252	389
阳性	4	117	121
总计	141	369	510

**2.3 qPCR 和 ddPCR 阳性检测结果相关性分析** 按照试剂盒 qPCR 的临界值,分析 qPCR 结果  $\geq 400$  copies/mL 时,与 ddPCR 结果相关性呈中度相关( $r = 0.533, P < 0.05$ )。qPCR 结果  $< 400$  copies/mL 时,与 ddPCR 结果相关性呈弱相关( $r = 0.2995, P < 0.05$ )。见图 1。



注:A 表示 qPCR 结果  $\geq 400$  copies/mL 时,与 ddPCR 的相关性;B 表示 qPCR 结果  $< 400$  copies/mL,与 ddPCR 的相关性。

图 1 qPCR 和 ddPCR 阳性检测结果相关性分析

**2.4 基于 ddPCR 结果尝试优化 qPCR 的临界值** 以 ddPCR 检测结果为基准,根据 ROC 曲线每一点对应的灵敏度和特异度,选择适合的灵敏度和特异度,绘制 ROC 曲线,  $AUC = 0.871$ 。此时,得到在 qPCR 方法中 EBV-DNA 对应的临界值(qPCR) = 10 copies/mL,灵敏度为 0.824,特异度为 0.780。利用优化后的临界值,重新判定 EB 阴性、阳性,在 510 例标本中,qPCR 方法的灵敏度由 0.317 提高至 0.943,且假阴性得到大幅度降低,从 0.683 降为 0.057。见图 2、表 3。

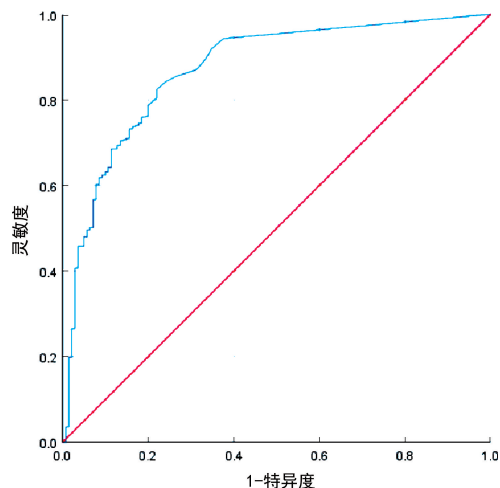


图 2 qPCR 的 ROC 曲线

表 3 两种检测方法定性结果比较(n)

项目	ddPCR		合计
	阴性	阳性	
qPCR			
阴性	88	21	109
阳性	53	348	401
总计	141	369	510

### 3 讨论

EBV 感染对人体免疫功能影响甚大,与机体许多疾病发生机制相关,且 EBV 是第 1 个被证实与癌症发生相关的病毒,由 EBV 感染导致的胃癌、鼻咽癌等癌症患者死亡逐年增加<sup>[6-7]</sup>。而 EBV-DNA 载量检测不仅是 EBV 感染存在的直接证据,也可评估服用免疫抑制剂治疗自身免疫性疾病或监测移植后患者的治疗效果,或辅助诊断淋巴瘤和鼻咽癌及判断预后,因此早期发现 EBV 感染对阻止恶性疾病进程有至关重要的意义。但实际工作中,成人 EBV 感染的病理表现复杂,早期诊断较为困难。且临床实践中 EBV-DNA 载量大多非常低,qPCR 方法灵敏度难以满足临床需求,作为 EBV 筛检指标漏检率高,可能为临床诊断带来困扰。故本研究采用了 ddPCR 和 qPCR 两种方法同时检测 510 例血浆标本病毒 DNA 载量,探讨不同地区各疾病组之间病毒载量间差异性,最终为西南地区 EB 感染临床诊断与实验室结果不符的问题提供解决思路。

本研究基于 EBV 的上述特点用 ddPCR 方法检测了 EBV 感染相关疾病免疫功能不全者、淋巴瘤患者、初诊未治鼻咽癌患者及治疗后鼻咽癌患者血浆中 EBV-DNA 水平。510 例疑似 EBV 感染者的 EBV 中位数载量为 360 copies/mL,与其他低发区相比,宁夏地区 EBV 感染者 EBV-DNA 载量为  $5.01 \times 10^3$  copies/mL<sup>[8]</sup>,山西地区 EBV 感染的病毒中位数载量为 3 356 copies/mL<sup>[9]</sup>,西南地区 EBV 感染者 EBV-DNA 载量远远低于其他低发区,结果显示 EBV-DNA 载量高低与低发区无关。其中初诊未治鼻咽癌患者中位病毒载量为 4 590 copies/mL,治疗后鼻咽癌患者中位病毒载量下降为 430 copies/mL,免疫力低下者中位病毒载量为 130 copies/mL,而淋巴瘤患者中位病毒载量为 840 copies/mL,杨雀飞等<sup>[10]</sup>研究得出鼻咽癌患者 EBV-DNA 载量为 4 250 copies/mL;喻晶等<sup>[11]</sup>研究得出,鼻咽癌患者 EBV-DNA 载量为  $1.1 \times 10^6$  copies/mL,淋巴瘤患者 EBV-DNA 数值为  $6.9 \times 10^3$  copies/mL,自身免疫性疾病患者 EBV-DNA 数值为 630 copies/mL,将西南地区各疾病组与高发区 EBV-DNA 载量相比,显示西南地区 EBV 感染各疾病组的 EBV-DNA 载量均低,且疾病组载量规律相同。国内外文献对于 EBV 阳性检测率报道在 70%~90%,中



位拷贝数为  $10^3 \sim 10^4$  copies/mL<sup>[12-14]</sup>, 将不同地区结果对比发现, 本院检测出的 EBV-DNA 水平明显较低。

实验室使用试剂盒临界值: 400 copies/mL 定性 EBV 感染。qPCR 检测 EBV 感染以 400 copies/mL 为界值,  $\geq 400$  copies/mL 时, ddPCR 与 qPCR 的 EBV-DNA 测定水平值呈中度相关 ( $r = 0.533, P < 0.05$ ),  $< 400$  copies/mL 时 ddPCR 与 qPCR 的 EBV-DNA 测定水平值度呈弱相关 ( $r = 0.2995, P < 0.05$ )。此结果证明载量在 400 copies/mL 以下不能准确检测, 有漏检情况, 此临界值不能满足 EBV-DNA 低载量水平的检测, 也证明了目前临床 qPCR 检测手段无法准确为临床在 EBV 感染提供有效的证据, 但由于目前国际上还没有采用统一的检测标准, 无法确立统一的临界值作为阳性参考值, 这可能会影响检测中的灵敏度和特异度<sup>[15]</sup>, 所以西南地区低水平的 EBV-DNA 的检测可能需要更为灵敏的方法去检测。

qPCR 方法是目前临床 EBV-DNA 常用的筛检方式, qPCR 要求目的基因拷贝数相对较高, 对目的基因做出相对定量分析<sup>[16]</sup>, 本研究中, ddPCR 和 qPCR 两种方法的定性结果比较后发现, qPCR 漏检率高达 68.3%, 在漏检的 252 例标本中, 231 例标本有明显扩增曲线, 推断患者有 EBV 感染, 说明在西南地区 qPCR 方法筛检低水平载量的 EBV-DNA, 情况不理想, 因而需要寻找更为灵敏的方法去检测。近来, ddPCR 发展迅速, 用 ddPCR 检测血浆能实现对 EBV-DNA 的绝对定量, ddPCR 由 Bio-Rad 公司于 2011 年推出<sup>[17]</sup>, 该技术在传统的 PCR 扩增前对样品进行微滴化处理, 而后进行 PCR 扩增, 根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例, 可得出靶分子的起始拷贝数或水平, 是一种核酸分子绝对定量技术, 其检测敏感性高达 0.001%, 而 ddPCR 不仅兼具 qPCR 优点, 无需建立标准曲线, 更不受扩增效率的影响, 有研究利用逆转录和 ddPCR 技术灵敏度高和精确性强的特点测定甲流病毒中的去离子颗粒<sup>[18-19]</sup>, 而有许多研究证实 ddPCR 可作为 EBV-DNA 检测的金标准, 即可实现对 EBV-DNA 的绝对定量, 尤其是微量标本的绝对定量<sup>[20]</sup>, TAKUYA<sup>[21]</sup> 根据 ddPCR 检测 EBV 的 BamH1-W 片段拷贝数计算 EBV-DNA 载量, 并设定 EBV-DNA 载量的截止值。

根据目前状况, 可针对临床实验室普遍使用的 EBV-DNA 检测的 qPCR 法进行优化, 适当提高 qPCR 方法的灵敏度, 优化其临界值, 降低其漏检率, 高度有效地筛检 EBV 感染, 更好地指导临床诊断。但在此研究中, 尝试对 qPCR 进行优化, 以 ddPCR 结果为金标准, 绘制 qPCR 的 ROC 曲线, AUC 0.871, 找到新的临界值 (qPCR) = 10 copies/mL, 灵敏度 82.4%, 特异度 78.0%。用新的临界值进行验证, 结

果显示对于极低 EBV-DNA 载量, qPCR 存在假阳性可能, 且假阳性为 37.5%, 在这个临界值下, 检验效能虽得到大幅度提高, 但特异度降低, 所以还是寻找灵敏度更高的方法更为可靠, 比如 ddPCR。

#### 4 结 论

西南地区临床实践中 EBV 载量大多非常低, 常规 qPCR 方法灵敏度难以满足临床需求, 采用 ddPCR 方法检测 EBV-DNA 载量能为临床诊断 EBV 感染提供更有利的支持。

#### 参考文献

- [1] HATTON O L, HARRIS-ARNOLD A, SCHAFFERT S, et al. The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: implications for infection, immunity, and disease[J]. Immunol Res, 2014, 58(2): 268-276.
- [2] HWANG Y Y, AU-YEUNG R, LAU H P, et al. Complete response of age-related Epstein-Barr virus-associated polymorphic nodal lymphoproliferative disease of plasmacytic type to low-dose lenalidomide[J]. Ann Hematol, 2017, 97(2): 1-4.
- [3] 祁春茹, 周向红, 张振兴, 等. 呼吸道感染性疾病患儿 3192 例 EB 病毒血清学和核酸检测结果分析[J]. 中国药物与临床, 2019, 19(7): 28-30.
- [4] FRYER J F, MINOR P D. Standardisation of nucleic acid amplification assays used in clinical diagnostics: a report of the first meeting of the SoGAT clinical diagnostics working group[J]. J Clin Virol, 44(2): 103-105.
- [5] 张雨. ddPCR 法检测血浆游离 DNA EGFR 基因突变及与 EGFR——TKI 疗效的相关性分析[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [6] FUNG S Y, LAM J W, CHAN K C. Clinical utility of circulating Epstein-Barr virus DNA analysis for the management of nasopharyngeal carcinoma[J]. Chin Oncol, 2016, 5(2): 18.
- [7] NATALIA N, JILL L. Malignancies associated with Epstein-Barr virus: pathobiology, clinical features, and evolving treatments[J]. Clin Adv Hematol Oncol, 2014, 12(6): 358-371.
- [8] 师志云, 赵玥, 张玉英, 等. 宁夏某医院成人 Epstein-Barr 病毒感染情况[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2018, 45(5): 309-312.
- [9] 张丽中, 王瑞雪, 周永年, 等. 山西地区 EB 病毒感染状况分析[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(11): 16-18.
- [10] 杨雀飞, 何彪, 谭贵海. 鼻咽癌患者外周血淋巴细胞中 EB 病毒 DNA 载量与临床分期的关系研究[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(2): 46-48.
- [11] 喻晶, 王琳, 卢丽华, 等. 淋巴细胞及血浆 EB 病毒 DNA 在 EBV 感染相关疾病中表达的研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(6): 15-18.
- [12] BRIGETTE B Y M, ANN K, LO Y M D, et al. Relationship between pretreatment level of plasma Epstein-Barr virus DNA, tumor burden, and metabolic(下转第 439 页)

- role of dehydroepiandrosterone on functional innate immune responses to acute stress[J]. *Stress Health*, 2017, 33(5):656-664.
- [5] MOVAHEDI M, TAVAKOL M, RAHMANI F, et al. Single nucleotide polymorphisms of IL-2, but not IL-12 and IFN- $\gamma$ , are associated with increased susceptibility to chronic spontaneous urticaria[J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2017, 45(4):333-338.
- [6] 于波, 张杰. 慢性荨麻疹的诊断流程及鉴别诊断[J]. *皮肤病与性病*, 2015, 37(1):15-16.
- [7] ZUBERBIER T, ABERER W, ASERO R, et al. The EAACI/GA(2) LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis, and management of urticaria; the 2013 revision and update[J]. *Allergy*, 2014, 69(7):868-887.
- [8] 赵文玲, 刘艺迪, 王亚男, 等. 慢性自发性荨麻疹药物治疗进展[J]. *中华临床免疫和变态反应杂志*, 2016, 10(4):407-411.
- [9] 丁黎, 杨景煜, 郝雁杰, 等. 地氯雷他定片与匹多莫德片联合治疗慢性荨麻疹的临床疗效及对血清 IL-2 及 IL-4 水平的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(26):5169-5171.
- [10] 张倩雯, 梁碧华, 李润祥, 等. 慢性自发性荨麻疹发病机制及其治疗的研究进展[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2015, 22(4):332-335.
- [11] 刘丽明, 于波, 张杰. 慢性自发性荨麻疹自身免疫机制研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2015, 29(12):1154-1156.
- [12] 李润祥, 张倩雯, 黄振明, 等. 慢性自发性荨麻疹免疫相关指标与病情的相关性分析[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2015, 22(2):105-108.
- [13] BOONPIYATHAD T, PRADAPPONGSA P, SANGASAPA VIRIYA A. Decreased serum vitamin D level in patients with chronic spontaneous urticaria[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2014, 133(2):120.
- [14] ERTAS R, OZYURT K, ATASOY M, et al. The clinical response to omalizumab in CSU patients is linked to and predicted by IgE levels and their change[J]. *Allergy*, 2018, 73(3):705-712.
- [15] 王莹. 维生素 D 对糖皮质激素免疫抑制模型小鼠的免疫调节作用[D]. 安徽: 安徽医科大学, 2016.
- [16] 李如霞, 侯进飞, 周瑾思, 等. 1,25-二羟基维生素 D<sub>3</sub> 对尘螨引起的 P815 肥大细胞 TLR4 表达和 IL-4 分泌影响的初步研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(3):188-193.
- [17] KOKIC V, KALITERNA D M, RADIC M, et al. Relationship between vitamin D, IFN- $\gamma$ , and E-2 levels in systemic lupus erythematosus[J]. *Lupus*, 2016, 25(3):282-288.
- [18] LIPS P. Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D measurements[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22(11):1668-1671.
- [19] 宁小丽, 臧运书, 潘敏. 血清硫酸去氢表雄酮水平与慢性荨麻疹关系的 Meta 分析[J]. *中国循证医学杂志*, 2016, 16(10):1131-1136.
- [20] 何泽生, 岳良, 安国芝, 等. 女性慢性特发性荨麻疹血清脱氢表雄酮硫酸酯水平检测及意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(5):567-570.
- [21] 胡月, 赵海春, 安国芝, 等. 慢性自发性荨麻疹血清脱氢表雄酮硫酸酯与总 IgE, IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  的相关性[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2016, 30(10):1007-1009.
- [22] 赖秀琴. 血清 IgE, IgG 在不同程度慢性荨麻疹中的表达[J]. *辽宁医学院学报*, 2015, 36(2):51-53.

(收稿日期:2019-05-18 修回日期:2019-09-05)

(上接第 434 页)

- activity in advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 66(3):714-720.
- [13] KANAKRY J A. The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases[J]. *Blood*, 2016, 127(16):2007-2017.
- [14] ZHAO F P, LIU X, CHEN X M, et al. Levels of plasma Epstein-Barr virus DNA prior and subsequent to treatment predicts the prognosis of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(5):2888-2894.
- [15] ZANG J, LI C, ZHAO L N, et al. Prognostic model of death and distant metastasis for nasopharyngeal carcinoma patients receiving 3DCRT/IMRT in nonendemic area of China[J]. *Medicine*, 2016, 95(21):e3794.
- [16] ANN-BRITT N, CLAUS B J, SUSANNAC, et al. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR[J]. *BMC Mol Biol*, 2007, 8(5):67.
- [17] KOCH H, JESCHKE A, BECKS L. Use of ddPCR in experimental evolution studies[J]. *Met Ecol Evolu*, 2016, 7(3):340-351.
- [18] HERRING E, KANAOKA S, TREMBLAY É, et al. Droplet digital PCR for quantification of ITGA6 in a stool m RNA assay for the detection of colorectal cancers[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(16):2891-2898.
- [19] SCHWARTZ S L, LOWEN A C. Droplet digital PCR: a novel method for detection of influenza virus defective interfering particles[J]. *J Virol Met*, 2016, 237:159-165.
- [20] TANJA D. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot[J]. *Ana Bio Chem*, 2014, 406(26):6513-6528.
- [21] TAKUYA S. Establishment of a screening method for Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma by droplet digital PCR[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12):628.

(收稿日期:2019-05-23 修回日期:2019-09-20)