

变中的表达特性. 中华检验医学杂志, 2002, 25: 357-359.

[8] Jordanova N, Gyongyosi M, Khorsand A, et al. New cut-off values of cardiac markers for risk stratification of angina pectoris. Int J Cardiol, 2005, 99: 429-435.

[9] Lindahl B, Diderholm E, Lagerqvist B, et al. Mechanisms behind the prognostic value of troponin T in unstable coronary artery disease: A FRISC II Substudy. J Am Coll Cardiol, 2001, 38:

979-986.

[10] Henrikson CA, Howell EE, Bush DE, et al. Prognostic usefulness of marginal troponin T elevation. Am J Cardiol, 2004, 93: 275-279.

(收稿日期:2006-05-31)

(本文编辑:张莉)

患儿粪便中幽门螺杆菌抗原及血清抗体检测

杨瑞生

幽门螺杆菌(Hp)是小儿慢性胃炎、十二指肠炎及消化性溃疡的重要病因之一。临床检测 Hp 的方法较多,传统多采用侵入性内镜检查法,此法准确性、特异性较高,是诊断 Hp 感染的金标准,但儿童、老人及孕妇难以接受。非侵入性方法有¹³C 尿素呼气试验(¹³C-UBT)、粪便中 Hp 抗原(HpSA)检测及血清抗体(Hp-IgG)检查等。本研究通过对 153 例患儿 HpSA、Hp-IgG 的检测,与金标准进行了对比分析,并对 36 例 Hp 阳性患儿根治后进行了¹³C-UBT 检测,复查了 HpSA、Hp-IgG,且进行了对比分析。

一、材料与与方法

1. 病例选择:因消化道疾病而在我院进行胃镜检查的患儿 153 例(男 98 例,女 55 例),年龄 3~14 岁,平均年龄 8.5 岁。已排除 3~4 周内接受抗生素、质子泵抑制剂、铋剂、H₂受体阻滞剂等对 Hp 检测有影响的药物。胃镜诊断为浅表性胃炎 81 例,十二指肠球炎 49 例,十二指肠球部溃疡 15 例,胃溃疡 2 例,其他 6 例。

2. 胃黏膜活检标本 Hp 的检测:患儿胃窦部取黏膜 2 块,分别做快速尿素酶试验(RUT)和组织切片改良 Giemsa 染色查找 Hp。两项均阳性确诊为 Hp 阳性,均阴性为 Hp 阴性,此为 Hp 检测金标准^[1]。对 36 例阳性患儿用洛赛克+两联抗生素(氨苄西林或克拉霉素+替硝唑)治疗 2 周。

3. HpSA 的检测:胃镜检查当天,嘱患儿留取粪便送检。试剂盒由北京协和药业有限公司提供,原理为 ELISA 双抗体夹心法。按说明书进行操作,最后酶标仪比色,波长 452 nm,吸光度(A)值≥0.12 为阳性,否则为阴性。

4. Hp-IgG 检测:患儿胃镜检查后抽静脉血 3 ml,分离血清检测。试剂盒由深圳晶美生物工程有限公司提供,原理为 ELISA 法。按说明书操作,最后酶标仪比色,波长 452 nm,空白管调零,测定管 A 值≥阴性对照 2.1 倍者为阳性。

5. 36 例 Hp 阳性患儿根治后复查:治疗结束,停药 4 周后,再次留取粪便、抽取静脉血,按以上方法进行复检;同时进行¹³C-UBT 检测,作为判断 Hp 是否被根除的标准^[2]。试剂盒由海立克试剂所提供。

6. 统计学分析:根治前 Hp 检测结果以金标准为参照,

用四格表评价 HpSA、Hp-IgG 检测的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确性。Hp 根治复查结果以¹³C-UBT 为参照,计算 HpSA、Hp-IgG 的根除率及诊断符合率。

二、结果

1. 治疗前 Hp 检测结果:金标准检测结果:阳性 85 例,阴性 68 例。其他结果见表 1。

表 1 3 种方法 Hp 检测结果

| 方法 | 85 例阳性病例根治前 | | 68 例阴性病例 | | 36 例阳性病例根治后 | |
|---------------------|-------------|----|----------|----|-------------|----|
| | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| HpSA | 78 | 7 | 4 | 64 | 6 | 30 |
| Hp-IgG | 75 | 10 | 2 | 66 | 31 | 5 |
| ¹³ C-UBT | - | - | - | - | 4 | 32 |

注:-:未检测

以金标准作为 Hp 感染的诊断标准,HpSA 检测的敏感度 91.8% (78/85), 特异度 94.1% (64/68), 阳性预测值 95.1% (78/82), 阴性预测值 90.1% (64/71), 准确性 92.8% (142/153); Hp-IgG 检测的敏感度 88.2% (75/85), 特异度 97.1% (66/68), 阳性预测值 97.4% (75/77), 阴性预测值 86.8% (66/76), 准确性 92.2% (141/153)。

2. Hp 根治后检查结果:见表 1。¹³C-UBT 检测 Hp 根除率为 88.9%, 以此为标准, HpSA 检测 Hp 根除率为 83.3%, 诊断符合率为 86.1%; Hp-IgG 检测 Hp 根除率 13.9%, 诊断符合率为 51.4%。

三、讨论

1983 年 Hp 被澳大利亚的 Warren 和 Warshail 发现,已确认为最常见的慢性感染性疾病的病原之一^[3]。临床检测 Hp 分侵入性和非侵入性两大类,前者被认为检测 Hp 感染的金标准,但某些患者难以接受。后者的¹³C-UBT 检测虽较为准确,但需要质谱分析仪,难以在基层医院推广。本研究表明,HpSA 检测与金标准比较敏感度、特异度及根治后复查结果与¹³C-UBT 检测诊断符合率均较高。尽管初次检测有 4 例假阳性,这可能与胃内感染灶分布不均、胃黏膜组织取材有限及未能反映全胃情况有关。而定位在胃黏膜上皮细胞表面的 Hp 随着细胞更新脱落由粪便排出,则能反映全胃情况,4 例假阳性,亦不排除真阳性的可能。故 HpSA 的检测

作者单位:475001 开封,河南大学第一附属医院检验科

不仅用于 Hp 感染的检测,还适用于抗 Hp 根治后的疗效评价,这与其他报道一致^[4]。另外此法简便经济、不受患者年龄身体条件的限制、不需特殊仪器,可用于大规模流行病学调查,对特殊人群是较为理想的检查方法,值得在临床推广。

本研究还表明, Hp-IgG 检测法与金标准比较亦具有较高的敏感度、特异度,但在根治后复查时,其阳性率仍维持较高水平,与¹³C-UBT 检测诊断符合率仅为 51.4%,资料显示 Hp 根治后血清中 Hp 抗体滴度可维持阳性超过半年^[5],故 Hp-IgG 检测不能反映现症 Hp 感染,临床应引起注意。

参 考 文 献

[1] 刘凤霖,牛余正,宋华,等. 儿童幽门螺杆菌感染粪便抗原检

测的临床研究. 中华儿科杂志,2002,40:557.

- [2] 陈肖肖,欧弼悠,吴秀英,等. 幽门螺杆菌感染患儿克拉霉素三联疗法的远期疗效失败病例再治疗的探讨. 中华儿科杂志,2004,42:417-420.
- [3] 唐国荣,梅柏如,张健. 无锡地区散居儿童粪便幽门螺杆菌抗原检测结果分析. 临床儿科杂志,2003,21:720-722.
- [4] 林洁,谢鑫友,朱水良,等. 粪便幽门螺杆菌抗原测定的临床价值评价. 中华检验医学杂志,2002,25:111.
- [5] 耿岚岚,丘小汕,区文玑,等. 儿童粪便幽门螺杆菌抗原检测的临床应用. 中国实用儿科杂志,2003,18:687-688.

(收稿日期:2006-06-07)

(本文编辑:毛家都)

下呼吸道人博卡病毒感染患儿的荧光定量 PCR 检测

曾爱平 林峰 郑敏巧 林海燕 郑昌华 李桦
陈弘 吴锋 杨宁敏 杨恩 金大智 文思远

引起小儿下呼吸道感染的病原微生物有相当部分是存在于自然界的病毒,其中包括呼吸道合胞病毒、流感病毒、腺病毒及冠状病毒等。迄今为止,约 10%~39% 的小儿下呼吸道感染的病因未知^[1]。人博卡病毒(human bocavirus)是最近从患儿下呼吸道感染分泌物中发现的一种新人细小病毒(parvovirus),据报道由瑞典斯德哥尔摩卡罗林斯卡学院的 Tobias Allander 儿童医院的医生在对 540 例下呼吸道感染患儿进行治疗时发现的,将之命名为“人博卡病毒”^[2]。新发现的人博卡病毒被认为在引起患儿下呼吸道感染的病因中至少占 5%^[2,4]。在中国,每年不明原因的儿童住院治疗的人数也逐年上升,且病毒感染是小儿下呼吸道感染的主要病原体^[5,6],在临床上,有相当比例的小儿下呼吸道感染病因不明^[7,8]。人博卡病毒的发现无疑对小儿下呼吸道感染的病因研究和下呼吸道感染的诊治提供了新的科学依据。

目前,对于人博卡病毒的检测和鉴定的报道有 Ma 等^[4]运用 PCR 技术检测 318 份临床样本,阳性检出率为 5.7%,还有报道用其他试验方法对人博卡病毒进行鉴定^[9,11]。本研究的目的是针对已报道的人博卡病毒基因序列,选取 NS1 基因中的约 85 bp 的特异性保守片段,建立人博卡病毒的荧光定量 PCR 检测方法。

一、材料与方 法

1. 临床样本:试验共收集因发热、咳嗽等下呼吸道感染住院患儿 240 例,年龄为 50 d 至 9 岁,男 164 例,女 76 例。

作者单位:317500 浙江省温岭市第一人民医院检验科(曾爱平、林峰、郑敏巧、林海燕、郑昌华、李桦、陈弘、吴锋);浙江省杭州致远医学检验所(杨宁敏、杨恩);军事医学科学院放射与辐射医学研究所(金大智、文思远)

通讯作者:林峰,电子信箱:linfengwyy@vip.sina.com

万方数据

采集患儿痰或吸痰样本 176 份。

2. 模板制备:将痰或吸痰的样本用 3 倍体积的 4% NaOH 消化,离心取上清液,-70℃ 保存;咽拭子组的样本用生理盐水洗涤后,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,-70℃ 保存,采用小型全血 DNA 抽提试剂盒(德国 QIAGEN 公司)提取病毒基因组 DNA。

3. 引物和探针的设计:根据 GenBank 上人博卡病毒全基因组序列(NC 007455),选取 NS1 基因设计引物和 Taqman 探针,引物和探针的合成均由军事医学科学院放射与辐射医学研究所生物技术研究室合成,引物和探针的序列见表 1。

表 1 引物和探针的序列

| 名称 | 序列(5'-3') | 位点 |
|------|--|-------------|
| 上游引物 | AGCTTTTGTTCATTCAAGGCTATAATC | 1418 ~ 1444 |
| 下游引物 | TCFTTCCCGAATGTTTGTTC | 1504 ~ 1478 |
| 探针 | FAM-TCTAGCCCTTGCTCACCG CCTGTC-TAMRA | 1446 ~ 1469 |

4. 荧光定量 PCR 扩增:PCR 反应扩增体系:10 × 缓冲液,5.0 μl;镁离子 3.5 mol/L;dNTP200 μmol/L;上下游引物均为 0.2 μmol/L;TaqMan 探针 50 nmol/L;Taq 酶 1.25 U;模板 2.0 μl;加去离子水至 50 μl。PCR 反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 15 s,58℃ 45 s,共 40 循环。

试验所用的酶和其他分子生物学试剂均购自宝生物(大连)有限公司;荧光定量 PCR 仪使用 PE5700 型。

5. 标准曲线的建立:将人博卡病毒基因(nt1-5299, DQ000496)克隆到 pBluescript 载体(由美国密苏里大学哥伦比亚分校 David Pintel 教授惠赠)中,计算出初始拷贝数,进行 10 倍梯度稀释成 5.0 × 10¹ ~ 5.0 × 10⁷ 拷贝。

6. 临床样本检测:将收集到的临床样本进行分组,并按