

示,HP 对克拉霉素的耐药率为 23%^[7-8],这与所选治疗药物的使用方法和时间,及宿主有一定关系。

抗菌药物不能有效治疗细菌性疾病的原因之一就是细菌生物膜的存在,因其独特的多细胞结构,自分泌的胞外多糖的屏障作用,以及缓慢生长作用机制,使生物膜成为了引起临床各类持续性慢性感染的主要原因。而本研究中《抗幽汤》组方含有具有清热解毒、解痉、抑菌、改善微循环及免疫调节等作用的中草药,且对 HP 生物膜的形成过程及成熟的生物膜都可造成影响,可协同三联西药中的抗菌药物对 HP 起到抑菌或协同杀菌作用。观察组与对照组在治疗模式上有明显差异。在中医辨证施疗中,中药各药物性能发挥了其特性,使组方整体在疗效上起到增强机体免疫力、扶正祛邪、缓解症状、杀菌的作用,其总体疗效比单用西药好。

综上所述,根据患者的不同症状,制订中西医结合的治疗方案,对减轻 HP 感染所致胃炎,缩短病程,减少不良转归具有一定的临床指导意义,是一种可提高疗效的新治疗途径。

参考文献

- [1] 刘文忠,谢勇,成虹,等. 第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告[J]. 胃肠病学,2012,51(10):618-625.
- [2] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告[J]. 胃肠病

学,2008,13(1):43-44.

- [3] 胡伏莲. 幽门螺杆菌感染治疗的新路径[J]. 中华医学杂志,2012,92(10):649-651.
- [4] 温胃舒或养胃舒治疗幽门螺杆菌相关慢性胃炎和消化性溃疡全国多中心临床研究协作组. 温胃舒或养胃舒治疗幽门螺杆菌相关慢性胃炎和消化性溃疡的全国多中心临床研究[J]. 中华医学杂志,2010,90(2):75-78.
- [5] 杨琦,赵靖松,杨凯. 三联疗法联合温胃舒或养胃舒根除幽门螺杆菌治疗胃溃疡疗效观察[J]. 临床医学,2012,32(1):55-56.
- [6] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌科研协作组. 中国幽门螺杆菌耐药状况以及耐药对治疗的影响—全国多中心临床研究[J]. 胃肠病学,2007,12(9):525-530.
- [7] 胡伏莲,成虹,张学智,等. 多中心临床观察荆花胃康联合三联疗法治疗幽门螺杆菌相关性十二指肠溃疡和胃炎疗效及耐药分析[J]. 中华医学杂志,2012,92(10):679-684.
- [8] 成虹,胡伏莲,李江. 幽门螺杆菌耐药性对其根除治疗影响的研究[J]. 中华医学杂志,2006,86(38):2679-2682.

(收稿日期:2015-06-28)



• 临床研究 •

两种核酸提取方法对 HBV DNA 定量检测结果的影响^{*}

孙嘉峰¹,王建伟¹,黄毅^{2△}

(1. 福建省立金山医院检验科,福建福州 350008;2. 福建省立医院检验科,福建福州 350001)

摘要:目的 研究磁珠法和煮沸法两种核酸提取方法对血浆乙型肝炎病毒(HBV)DNA 定量检测结果的影响。方法 采用磁珠法和煮沸法同步处理 106 例“小三阳”或“大三阳”乙型肝炎患者血浆,通过荧光定量聚合酶链反应(PCR)定量检测,比较两种方法的阳性率、定量检测结果并分析两者的关系。结果 106 例乙型肝炎患者血浆经磁珠法和煮沸法处理后的 HBV DNA 阳性率分别为 81.1%和 71.7%,其中“小三阳”患者的 HBV DNA 阳性率分别为 76.9%、66.7%，“大三阳”患者的阳性率分别为 92.8%、85.7%;磁珠法中 HBV DNA 荧光定量 PCR 测得其载量为(3.93±2.43)log₁₀ copies/mL,而煮沸法为(3.35±2.76)log₁₀ copies/mL,且“小三阳”和“大三阳”患者标本经磁珠法提取均明显高于煮沸法提取的 PCR 检测结果;上述结果经统计学分析差异均有意义($P < 0.05$);此外,两种核酸提取方法处理条件下的 HBV DNA 载量呈较好的线性关系($R^2 = 0.8693$, $P < 0.05$)。结论 磁珠法提取核酸阳性率高,检测灵敏度高,值得实验室推广,可用于临床诊断。

关键词:乙型肝炎病毒; 磁珠法; 煮沸法; 灵敏度

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2720-03

乙型肝炎是一种流行性很广的传染性疾病,其病因主要是乙型肝炎病毒(HBV)感染^[1]。全球约有 20 多亿人既往感染过 HBV^[2],其中约 3.5 亿为慢性 HBV 感染者^[3]。我国是乙型肝炎大国,人群乙型肝炎表面抗原阳性率约 7.18%^[4]。目前临床上对 HBV 的检测主要是依靠血清学方法,但其检出率相对较低,不能有效地反映 HBV 早期感染,而患者 HBV DNA 是了解 HBV 复制状况的可靠指标^[5]。聚合酶链反应(PCR)可以灵敏、快速、特异性地对 HBV DNA 进行检测,特别是实时荧光定量 PCR 能对 HBV DNA 定量测定^[6-7],对乙型肝炎的临床诊断、治疗监测及预后判断有重要的临床意义和参考价值。而标本 HBV DNA 的提取效率是影响 PCR 测定准确性的重要因素。本文对同一份标本分别用磁珠法和煮沸法提取血

浆 HBV DNA,并对两种提取方法的提取效果进行比较,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 106 份乙型肝炎血浆标本来源于福建省立金山医院 2014 年 10 月门诊及住院患者。其中“小三阳”标本 78 份,“大三阳”标本 28 份。

1.2 仪器与试剂 自动核酸提取仪 NP968 购自陕西天龙科技有限公司;ABI 7300 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂、标准品、质控品、阳性对照品、阴性对照品购自广州中山达安公司;煮沸法核酸提取试剂购自广州中山达安公司;自动核酸提取试剂(磁珠法)购自陕西天龙

科技有限公司。

1.3 方法 对同一份标本分别采用煮沸法和磁珠法提取病毒 DNA, 然后用荧光定量 PCR 法测定 HBV DNA 载量。

1.3.1 煮沸法 取得测血浆标本、标准品、质控品、阳性对照品、阴性对照品各 30 μL , 分别加入 70 μL 核酸提取液, 振荡混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 20 μL 上清液加入反应管进行 PCR 扩增。

1.3.2 磁珠法 按照自动核酸提取试剂盒说明书, 取得测血浆标本、标准品、质控品、阳性对照品、阴性对照品各 200 μL , 加入已分装好自动核酸提取液的板孔中, 按设定的提取程序, 自动进行核酸提取, 最终得到 100 μL 核酸洗脱液, 取 20 μL 加入反应管进行 PCR 扩增。

1.3.3 PCR 扩增反应条件及结果判断 反应管在 93 $^{\circ}\text{C}$ 保温 2 min, 先按 93 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s 循环 10 次, 再按 93 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 循环 30 次, 荧光检测在第 2 次循环 55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 时完成。反应结束, 根据同时扩增的标准品自动读取拷贝数。结果判断以临界值 1.00×10^2 IU/mL 为界线, 大于 1.00×10^2 IU/mL 判为阳性, 小于 1.00×10^2 IU/mL 判为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理与统计分析, HBV DNA 载量经对数转换后以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验进行比较; 计数资料以例数或百分率表示, 采用 χ^2 检验进行比较; 采用线性回归分析两种核酸提取方法的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种核酸提取方法检测结果一致性 磁珠法提取 HBV DNA 检测结果中有 86 例阳性, 阳性率为 81.1% (86/106); 煮沸法中有 76 例阳性, 阳性率为 71.7% (76/106); 磁珠法的阳性率高于煮沸法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两种方法检测结果一致性

煮沸法	磁珠法		合计
	+	-	
+	72	4	76
-	14	16	30
合计	86	20	106

+: 阳性; -: 阴性。

2.2 两种核酸提取方法检测“小三阳”患者结果一致性 磁珠法提取“小三阳”患者 HBV DNA 的检测结果中有 60 例阳性, 阳性率为 76.9% (60/78); 煮沸法中有 52 例阳性, 阳性率为 66.7% (52/78); 磁珠法的阳性率高于煮沸法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两种方法检测“小三阳”患者标本结果一致性

煮沸法	磁珠法		合计
	+	-	
+	48	4	52
-	12	14	26
合计	60	18	78

+: 阳性; -: 阴性。

2.3 两种核酸提取方法检测“大三阳”患者结果一致性 磁珠法提取“大三阳”患者 HBV DNA 的检测结果中有 26 例阳性, 阳性率为 92.8% (26/28); 煮沸法中有 24 例阳性, 阳性率为 85.7% (24/28); 磁珠法的阳性率高于煮沸法, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 两种方法检测“大三阳”患者标本结果一致性

煮沸法	磁珠法		合计
	+	-	
+	24	0	24
-	2	2	4
合计	26	2	28

+: 阳性; -: 阴性。

2.4 两种核酸提取方法 HBV DNA 载量比较 106 份血浆标本分别采用磁珠法和煮沸法提取核酸, 磁珠法测得 HBV DNA 载量为 $(3.93 \pm 2.43) \log_{10}$ copies/mL, 煮沸法测得 HBV DNA 载量为 $(3.35 \pm 2.76) \log_{10}$ copies/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 两种核酸提取方法“小三阳”患者 HBV DNA 载量比较 78 份“小三阳”患者血浆标本分别采用磁珠法和煮沸法提取核酸, 磁珠法测得 HBV DNA 载量为 $(3.21 \pm 1.85) \log_{10}$ copies/mL, 煮沸法测得 HBV DNA 载量为 $(2.61 \pm 2.22) \log_{10}$ copies/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 两种核酸提取方法“大三阳”患者 HBV DNA 载量比较 28 份“大三阳”患者血浆标本分别采用磁珠法和煮沸法提取核酸, 磁珠法测得 HBV DNA 载量为 $(6.12 \pm 2.66) \log_{10}$ copies/mL, 煮沸法测得 HBV DNA 载量为 $(5.42 \pm 3.08) \log_{10}$ copies/mL, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.7 两种核酸提取方法检测结果的关系 在 106 份标本中, 对两种核酸提取方法检测 HBV DNA 载量大于 1.00×10^2 IU/mL 的 72 份标本进行相关性分析, 二者的相关性较好, 决定系数 $R^2 = 0.8693$ ($P < 0.05$)。见图 1。

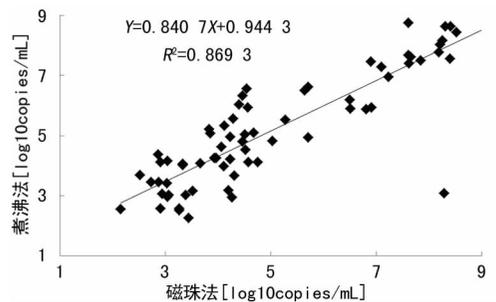


图 1 煮沸法和磁珠法的相关性

3 讨论

随着基因检测技术的不断发展, 分子生物学在肝病的诊断、治疗监测、预后判断中发挥着越来越重要的作用。血浆中 HBV DNA 载量既是反映 HBV 复制程度及传染性的指标, 也是临床上观察抗病毒药物疗效和预后的参考指标。因此, HBV DNA 检测的灵敏度就显得尤为重要。目前对血浆 HBV DNA 提取的多数试剂盒是采用煮沸法, 该方法是经高温煮沸后使病毒 DNA 从病毒颗粒中释放出来, 然后经离心沉淀后 DNA 即在上清液中; 磁珠法是先通过裂解细胞, 使 DNA 充分游离出来, 游离出来的 DNA 分子特异性吸附到磁珠颗粒表面, 蛋白质等杂质留在溶液中, 在磁场的作用下, 磁性颗粒与液体分开, 再经洗脱即得到病毒 DNA。

通过分析煮沸法和磁珠法提取 106 份血浆标本检测结果的一致性, 发现磁珠法提取 HBV DNA 的阳性率高于煮沸法, 同时对 78 份“小三阳”患者和 28 份“大三阳”患者血浆标本的比较发现磁珠法的阳性率仍高于煮沸法, 差异均有统计学意义

($P < 0.05$)；另外，本研究发现无论“大三阳”还是“小三阳”患者血浆标本经磁珠法提取后 HBV DNA 载量均明显高于煮沸法，差异均有统计学意义($P < 0.05$)。因此认为磁珠法较煮沸法的灵敏度高。其原因一方面可能是煮沸法在高温煮沸时，使部分核酸随血浆蛋白凝固而被包裹，离心沉淀时丢失，从而使上清液中核酸量减少；另一方面煮沸法处理血浆标本只是将病毒 DNA 从病毒颗粒中释放出来，经过离心后的上清液中不仅含有病毒的 DNA，也或多或少含有血红蛋白等一些干扰 PCR 反应的杂质，而磁珠法通过磁性将 DNA 吸出，很好地去除了血浆中杂质对 PCR 反应的干扰^[8]。

本文对磁珠法和煮沸法两种核酸提取方法检测 HBV DNA 载量大于 1.00×10^2 IU/mL 的 72 份标本进行相关性分析，结果提示二者具有较好的线性关系($R^2 = 0.8693$, $P < 0.05$)，说明两种核酸提取方法在 HBV DNA 的 PCR 定量上相关性明显。

综上所述，磁珠法是一种较为理想的核酸提取方法，其对 HBV DNA 的检测灵敏度明显高于煮沸法，尤其对低浓度标本的检测较为敏感，值得临床上推广。

参考文献

[1] 金汉珍, 黄德珉, 官希吉. 实用新生儿学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生

出版社, 2003: 342-349.

[2] 潘雪娇, 刘伟, 涂秋凤. 乙型病毒性肝炎免疫预防的现状和问题[J]. 江西医药, 2011, 46(7): 668-670.

[3] 申焕军, 陈敬银, 张中伟, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 血清标志物与 HBV DNA 的相关性分析[J]. 传染病信息, 2013, 26(2): 111-114.

[4] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 传染病信息, 2011, 24(1): I0001-I0012.

[5] 詹克勤, 吴杰敏, 洪智海. HBV DNA, Pre-S1 和 Pre-S2 抗原检测对诊断乙型肝炎患者的意义[J]. 江西医药, 2006, 41(10): 796-799.

[6] 赵登贤, 杨文东. HBV-DNA 阳性孕妇产后脐带血及乳汁中 HBV-DNA 载量的检测分析[J]. 实验与检验医学, 2013, 31(1): 64-66.

[7] 吕世琪, 张金良, 闫奇. 乙肝五项指标与荧光定量 PCR 检测血清 HBV-DNA 含量联合运用[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(6): 641-642.

[8] Kessler HH, Pierer K, Santner BI, et al. Quantitative detection of hepatitis B virus DNA with a new PCR assay[J]. Clin Chem Lab med, 1998, 36(8): 601-604.

(收稿日期: 2015-06-25)

• 临床研究 •

个性化检验危急值实施后漏报情况的调查研究

张鸿伟, 李海勤, 熊林怡

(昆明市第一人民医院检验科, 云南昆明 650021)

摘要:目的 不断减少危急值漏报, 避免发生因危急值漏报所致临床患者诊疗的延误, 维护患者安全。方法 依照该院不同科室个性化检验危急值报告管理规定, 对照该科室急诊检验组 2013 年危急值报告记录, 对该科室在实施个性化危急值报告后的危急值漏报率、漏报项目及科室进行分析。结果 该科室急诊检验组实施个性化危急值报告的漏报率从前期的 32.17% 下降到 0.26%。该科室改进前后危急值漏报项目从 14 项减少为 10 项。改进后危急值漏报前 3 位的项目为血红蛋白(Hb)、肌钙蛋白 T(cTnT)、血钾(K^+)。漏报科室前 3 位的依次为消化科(49%)、呼吸科一科(9%)、肿瘤科和干部疗养科(均占 8%)。结论 本科室个性化检验危急值报告管理持续改进方法有效, 能不断减少危急值漏报, 维护患者安全; 另外, 漏报率前 3 位的项目及科室也需要提醒工作人员提高警惕, 避免漏报。

关键词:个性化; 检验危急值; 漏报

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2722-03

危急值是危及生命的极度异常的检验结果, 说明患者可能正处于有生命危险的边缘状态, 如果不给予及时有效的治疗, 患者将处于危险状态, 而立即给予治疗可明显改善预后。一旦出现这样的检验结果, 应立即报告给临床医师, 提醒其立刻采取相应的治疗措施, 否则将会因为错过最佳的治疗时机而使患者的生命安全受到威胁^[1-2]。原卫生部出台的三级综合医院评审标准实施细则(2011 版)也对危急值报告提出明确要求, 并把危急值报告管理作为核心条款之一^[3]。在危急值界限的确定上, 不同医疗机构、不同临床专业科室之间对同一检验项目危急值界限的确认不同^[1], 因此针对临床科室的不同需求, 个性化检验危急值就应运而生。本院检验科在危急值的报告管理实践中, 也经历了不同的发展时期, 从 20 世纪 90 年代刚有危急值的概念开始, 到全院科室共用一个危急值的标准, 再到 2013 年根据临床科室的不同需求, 实施个性化检验危急值报告, 危急值报告管理经历了一个循序渐进的持续改进过程。关于危急值管理方面有两个重要的环节, 一是作为危急值的报告

方的检验科是否把确认过的危急值全部报给了临床而无遗漏, 二是作为危急值的接收方的临床是否对报告给的危急值全部得到了响应、处理。本院检验科作为危急值报告方是否把该报的危急值都报给了临床这是需要关注和监控的问题, 本研究调查分析了本科室实施个性化检验危急值后有关危急值漏报情况的数据, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 在医院医务部、质控办、检验科及各临床科室参与下共同制订的本院检验危急值报告项目、范围的通用要求, 包括血钾(K^+)、血钠(Na^+)、血氯(Cl^-)、血糖(Glu)、淀粉酶(AMS)、血钙(Ca^{2+})、肌钙蛋白 T(cTnT)、酸碱度(pH)、二氧化碳分压(PCO_2)、氧分压(PO_2)、白细胞(WBC)计数、血红蛋白(Hb)、血小板(PLT)计数、凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)及纤维蛋白原(FIB), 见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”); 以及 K^+ 、 Na^+ 、Glu、AMS、肌酐(Cre)、pH、 PO_2 、WBC 计数、Hb、PLT 计数及 PT 的