行了该检查,结果发现临床诊断为非活动性HBsAg携带者、慢性HBV携带者的人群中,肝纤维化检出率达47.9%,METAVIR分期F2以上达18.9%,这一结果低于既往对非活动性HBsAg携带者、慢性HBV携带者肝活检的研究报道,其原因可能与Fibroscan的检查阈值目前是参照国外对慢性丙肝患者的研究而制定的有关。随着大量相关临床资料的总结,可进一步制定适合我国使用的检测阈值,以提高诊断乙肝肝纤维化的特异性及灵敏度。尽管如此,相对肝活检而言,我们认为Fibro-scan仍不失于1项可以用于非活动性HBsAg携带者、慢性HBV携带者中筛查慢性乙肝患者的有效检查。同时我们的研究发现谷丙转氨酶水平可影响肝硬度值,随转氨酶水平升高,肝硬度值升高($P<0.01$),与文献[4]研究结果一致,提示HBV感染者肝功能波动、肝脏组织内炎症活动是影响肝硬度检测结果的主要原因。同时研究发现肝硬度检测预测肝纤维化程度对于肝功能正常患者意义大于肝功能轻度异常患者,根据肝功能情况不同找出不同的判断肝纤维化程度的检测阈值有助于解决这一问题[5]。因此,鉴于肝硬度瞬时弹性检测受到组织炎症坏死等因素影响,有学者提出肝组织活检可用于检测患者过程中的质控[6]。研究中我们还发现HBeAg(+)感染者肝硬度检测值显著大于HBeAg(-)感染者($P<0.01$),是否由于HBeAg(+)感染血清及肝脏组织内的HBV-DNA含量较高有关有待进一步研究确定。综上所述,Fibroscan是一项很有临床运用前景的无创性肝纤维化检测手段,通过该检查有助于早期筛查临床诊断为携带者的慢性乙肝患者,尤其是对于有慢性乙肝家族史及有肝纤维化家族史的高危人群,定期进行本检查有助于早期发现肝纤维化、早期干预以改善疾病预后。

参考文献:

[1] de-Ledinghen V, Vergniol J. Transient elastography for the diagnosis of liver fibrosis[J]. Expert Rev Med Devices, 2010, 7(6): 811-823.
[2] Sporea I, Sirli R, Deleanu A, *et al*. Liver stiffness measurements in patients with HBV *vs* HCV chronic hepatitis: a comparative study[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(38): 4832-4837.
[3] Bonnard P, Sombie R, Lescure F X, *et al*. Comparison of elastography, serum marker scores, and histology for the assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus (HBV)-infected patients in Burkina Faso[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(3): 454-458.
[4] Chan H L, Wong G L, Choi P C, *et al*. Alanine aminotransferase-based algorithms of liver stiffness measurement by transient elastography (Fibroscan) for liver fibrosis in chronic hepatitis B[J]. J Viral Hepat, 2009, 16(1): 36-44.
[5] Kim S U, Kim do Y, Park J Y, *et al*. How can we enhance the performance of liver stiffness measurement using FibroScan in diagnosing liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B?[J]. J Clin Gastroenterol, 2010, 44(1): 66-71.
[6] Fraquelli M, Rigamonti C, Casazza G, *et al*. Etiology-related determinants of liver stiffness values in chronic viral hepatitis B or C[J]. J Hepatol, 2011, 54(4): 621-628.

(**收稿**:2010-12-03;**修回**:2011-03-15)
(编辑 栾 嘉)

文章编号:1000-5404(2011)14-1547-03

经验交流

荧光定量PCR法和ELISA检测儿童呼吸道感染病原体的意义

刘来成,张鹏辉 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院临床检验中心,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室,重庆市(儿童发育重大疾病诊治与预防)国际科技合作基地)

[**关键词**] 肺炎支原体;肺炎衣原体;荧光定量PCR;酶联免疫法;诊断
[**中图法分类号**] R725.104 [**文献标志码**] B

儿童呼吸道感染是儿童秋冬季节常见的疾病,临床症状以发热、咳嗽、流涕等为主,近年来除了常见的细菌与病毒感染以外,肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae,MP)和肺炎衣原体(chlamydiapliel pneumoniae,CP)也逐渐成为急性呼吸道感染的主要病原体。由于该两类病原体的分离培养方法复杂,所需时间长,不便于临床快速诊断[1],早期检测出病原体而成为临床诊断棘手的问题。目前大多数医院对该两类病原体的检测仍以血清学方法(如ELISA)为主。但近年来随着分子生物学技术的发展,聚合酶链(PCR)反应,尤其是荧光定量PCR技术的广泛使用[2],为病原体的检测提供了新的技术与手段。本研究拟同时采用ELISA和荧光定量PCR技术对儿童呼吸道感染病原体进行检测,比较2种方法对病原体检出的阳性率、一致性和优越性。

[**通信作者**] 张鹏辉,E-mail:zhangph7203@sina.com

1 材料与方法

1.1 患者资料

收集2009年1月至2010年12月在重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心就诊住院患儿3 200例,其中男性1 750例,女性1 450例;年龄为0~12岁。采用的标本为患儿入院时采集深部痰液或肺部灌洗液进行分子检测,同时采集血清进行ELISA检测。

1.2 试剂与仪器

MP和CP荧光定量PCR检测试剂盒、DNA提取试剂盒购自中山大学达安基因公司,MP-IgM检测试剂盒(被动凝集法)Serodia-MycoⅡ购自日本瑞必欧株式会社,CP-IgM检测试剂盒购自芬兰ANI Labsystems OY公司,荧光定量PCR分析仪采用澳大利亚Corbett公司生产的6000型和中山大学达安基因生产的DA7600型,酶标仪采用北京天石生产的SM-3型。

1.3 荧光定量PCR

1.3.1 DNA提取 按照试剂盒说明书进行。阳性与阴性质

控品的处理:向阴性质控品管中加入等量DNA提取液充分混匀,100 ℃煮沸(10±1)min;12 000 r/min离心5 min,备用。

1.3.2 标本处理 ①痰液或灌洗液中加入4倍体积的4% NaOH,置常温下30 min,使痰液充分液化;②用吸管混匀后吸取1.5 ml离心管中,12 000 r/min离心5 min;③去上清,重复步骤②;④彻底去上清,沉淀中加入50 μl DNA提取液充分混匀,100 ℃煮沸10 min;⑤12 000 r/min离心5 min,备用。

1.3.3 荧光定量PCR扩增 严格按试剂盒说明书进行。①试剂准备:MP或CP反应液每人40 μl + *Taq* 酶3 μl,分装至0.2 ml PCR管中,备用。②加样:向准备好试剂的0.2 ml离心管中,分别加入处理后的样品(标本、阴性、阳性质控品)2 μl,瞬时离心数秒,放入仪器样品槽。③PCR反应条件为93 ℃ 2 min,93 ℃ 45 s,55 ℃ 60 s,10次循环;93 ℃ 30 s,55 ℃ 45 s,30次循环。

1.4 血清学检测

取患儿静脉血2.0 ml,取血清作为待检样本,MP-IgM和CP-IgM检测的操作严格按各自的试剂盒说明书进行,结果以≥1∶40判断为阳性。每次试验均设未致敏明胶颗粒、致敏明胶颗粒和阳性、阴性血清进行测定。

2 结果

2.1 呼吸道感染患儿MP与CP的感染情况

所收集到的3 200例呼吸道感染患儿标本中,共检测出MP-DNA阳性标本330例,占10.31%;检测出CP-DNA阳性22例,占0.69%;检测出MP-IgM阳性152例,占4.75%;检测出CP-IgM阳性12例,占0.38%。其中,同时检测出MP的DNA和IgM阳性标本共140例,占4.38%,2种方法检出阳性一致性92.1%;同时检测出CP的DNA和IgM阳性标本共10例,占0.31%,2种方法检出阳性一致性为83.3%。

2.2 MP阳性患儿的临床诊断

由于MP检出的阳性率较CP的检出率高,我们就MP阳性的呼吸道感染患儿的临床诊断进行了统计,发现位居前5位儿童呼吸道感染且MP为阳性检出的疾病依次为支气管肺炎、肺炎、间质性肺炎、支气管哮喘和支原体肺炎。见表1。

表1 呼吸道感染患儿MP阳性的疾病情况 [例数(%)]

临床诊断	DNA检出阳性数	IgM检出阳性数
支气管肺炎	94(2.94)	51 (1.59)
肺炎	78(2.44)	40 (1.25)
间质性肺炎	58(1.81)	27 (0.84)
支气管哮喘	42(1.31)	20 (0.63)
支原体性肺炎	26(0.81)	8 (0.25)
毛支气管性肺炎	12(0.38)	3 (0.09)
重症肺炎	8(0.25)	0 (0.00)
迁延性肺炎	3(0.09)	1 (0.03)
上呼吸道感染	3(0.09)	1 (0.03)
传染性单核细胞增多症	2(0.06)	0 (0.00)
支气管炎	1(0.03)	1 (0.03)
结核性胸膜炎	1(0.03)	0 (0.00)
多发浆膜腔积液	1(0.03)	0 (0.00)
变异性哮喘	1(0.03)	0 (0.00)
合计	330(10.31)	152(4.75)

2.3 不同年龄MP感染情况

呼吸道感染MP阳性患儿的发病年龄以7岁及以下儿童为主,经统计发现7岁及以下儿童MP阳性率占88.2%(291例)。见表2。

表2 MP阳性患儿年龄分布统计 [例数(%)]

年龄	DNA	IgM
<1个月(新生儿期)	0(0.0)	0(0.0)
1~12个月(婴儿期)	72(21.8)	31(20.4)
1~3岁(幼儿期)	99(30.0)	40(26.3)
4~7岁(学龄前期)	120(36.4)	63(41.4)
8~12岁(学龄儿童)	35(10.6)	15(9.9)
>12岁(少年)	4(1.2)	3(2.0)
合计	330(100.0)	152(100.0)

3 讨论

呼吸道感染是儿童的常见病与多发病,以秋冬季节常见。MP感染在全球范围内均有发生,是各年龄段儿童急性呼吸道感染的常见病原。由于MP感染的临床表现常无特异性,尤其是肺外并发症使病情复杂化,且一般在给予青霉素或头孢类抗生素治疗一定时间效果不佳时,才考虑是否为MP或CP感染,易导致误诊治[3-4],因此MP和CP的早期诊断具有重要意义。

本研究结果提示,临床诊断为支气管肺炎、肺炎、间质性肺炎时MP的阳性率所占比例最大,分别占2.94%(94例)、2.44%(78例)、1.81%(58例),且MP的阳性感染主要见于7岁及以下儿童,是由婴幼儿呼吸系统生理解剖特点决定的。婴幼儿气管、支气管管腔狭窄、黏液分泌少,纤毛运动差、肺弹力组织发育差、血管丰富、易于充血、间质发育旺盛、肺泡数少、肺含气量少、易为黏液阻塞,易发生肺炎和间质性肺炎等呼吸道疾病[5-6]。因此,早期进行MP或CP病原体检测对患儿及时诊断与防治呼吸道疾病具有重要意义。不同年龄儿童MP、CP感染在临床症状及体征等方面存在一定差异,在进行不同年龄组呼吸道感染诊断时应进行综合考虑。

近年来,中重症肺炎支原体肺炎患儿不断增多,肺外并发症多见,病程长,病情重,引起多器官功能衰竭甚至死亡。仅根据临床表现常难与病毒、细菌和结核感染相鉴别,给临床治疗带来一定的困难。其诊断主要依靠支原体分离培养、血清学检查和PCR等实验室检查手段。培养分离MP和CP是确定病原体最可靠的方法,但临床标本中病原体含量少,呼吸道污染的杂菌较多,且需时长,操作繁琐,阳性率低,检出率较低,在临床上难以推广[1,5]。MP-IgM是机体受MP感染时最早出现的特异性抗体,MP感染临床症状出现3 d后血清中IgM可被检出,10~30 d达高峰,12~26周消失,故发病10 d后检测MP-IgM为最佳时期,但是MP-IgM的阳性率受到年龄、病程、敏感性、免疫状态等因素的影响[5]。目前,荧光定量PCR检测MP-DNA因其高敏感性和特异性可达到早期诊断病原的目的,为临床早期诊断以及治疗提供了有效的帮助。但PCR检测所取标本有严格的限制,如标本应取患儿深部浓痰或肺部灌洗液,否则对检测结果的阳性率有一定的影响,会造成假阴性率的增高[7]。

综上所述,儿童呼吸道感染必须综合判断,虽然目前血清

学方法检测到所产生的抗体才是确定感染的标准,但血清学方法要依赖于患儿的免疫状态,与年龄、病程等密切相关,单从方法学本身来看,荧光定量 PCR 方法是直接检测病原体本身,优于 ELISA 法,但也由于受取材的部位等限制。因此,任何单一种方法都不能完全准确地诊断疾病,而应将 ELISA 与荧光定量 PCR 法联合应用来进行诊断疾病。

参考文献:

[1] 俞树荣. 微生物学和微生物学检验[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 342 - 348.

[2] 黄建宏, 林心, 李文锋, 等. FQ-PCR 技术在儿童支原体肺炎早期诊断中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(1): 18 - 19.

[3] 陈志敏. 儿童肺炎支原体感染诊治研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2008, 28(7): 562 - 565.

[4] Chinnawirotpisan P, Mammen M P Jr, Nisalak A, *et al*. Detection of concurrent infection with multiple dengue virus serotypes in Thai children by ELISA and nested RT-PCR assay [J]. Arch Virol, 2008, 153 (12): 2225 - 2232.

[5] 邵天波, 余丽萍, 朱继蕊. 两种肺炎支原体感染检测方法的临床效果比较[J]. 山东医药, 2008, 48(48): 97 - 98.

[6] 芦爱萍. 儿科呼吸系统疾病的诊断与治疗[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2002: 391.

[7] 赵茹, 黄莉, 季伟. 双份血清 MP 抗体及痰 MP-PCR 检测在儿童肺炎支原体感染诊断中的价值[J]. 江苏医药, 2008, 34(12): 1282 - 1283.

(**收稿**:2011-01-03;**修回**:2011-03-10)

(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2011)14-1549-02

经验交流

内固定在头颈交界区神经鞘瘤切除手术中的应用

杨福兵,杨 俊,钟冬胜,刘 亮,包长顺,王 斌 (646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院神经外科)

[**关键词**] 神经鞘瘤;内固定;头颈交界区

[**中图法分类号**] R651 [**文献标志码**] B

头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤发病率较低,约占脊髓神经鞘瘤的 5%,手术切除该部位神经鞘瘤的难度和技术要求高,且该部位活动度大,术后的不稳定等并发症多[1],因此术中内固定也非常重要。本研究探讨头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤的切除方法及其内固定的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院从 2004 年 1 月至 2010 年 12 月连续收治的 11 例资料完整、头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤患者,男性 7 例,女性 4 例,年龄 28 ~ 70 岁,平均 44 岁。病程 3 个月至 6 年,平均 3.5 年。神经根性疼痛 7 例,表现为颈肩部疼痛。双上肢运动障碍 8 例,双下肢乏力 5 例,神经病变对侧浅感觉减退 3 例。

1.2 术前检查

11 例术前均行头颈部 3D-CTA 及 MRI 检查。MRI 显示起源于 C_1 者 8 例,C_2 者 2 例,枕骨大孔区 1 例;病灶呈近似等 T_1 长 T_2 信号者 9 例,近似等 T_1 等 T_2 信号者 2 例,病灶均有不同程度的强化(图 1、2)。3D-CTA 示 C_1 或 C_2 椎体破坏者 4 例,枕骨大孔与 C_1 间隙扩大者 1 例,C_1 ~ C_2 椎间孔扩大变形者 9 例,椎动脉受压变细者 5 例(图 3)。

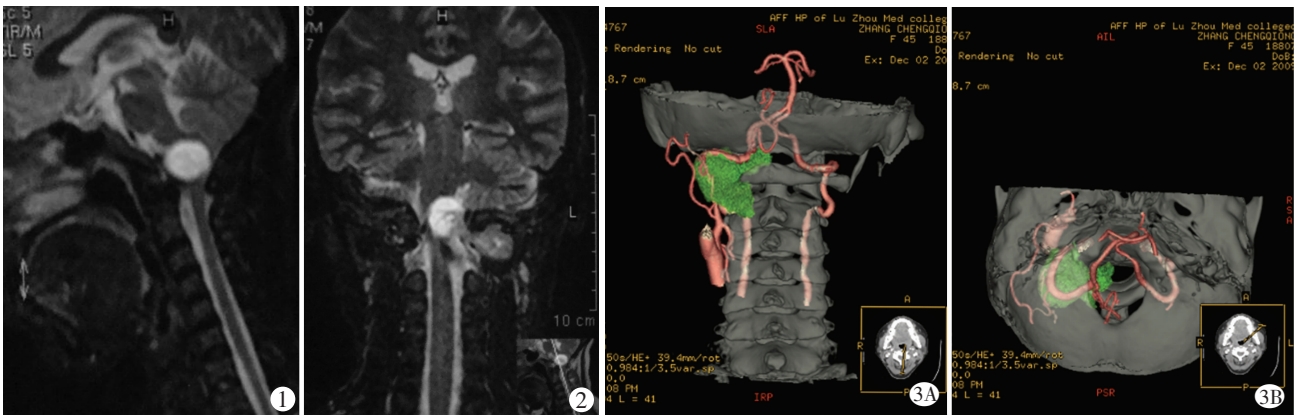


图 1 头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤患者术前 MRI 矢状位示肿瘤位于延髓的腹侧与斜坡之间

图 2 头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤患者术前 MRI 冠状位示肿瘤位于延髓左侧,由颅内通过颈椎管,向椎管外生长

A:冠状成像示肿瘤的供血动脉及肿瘤与颈椎管、椎动脉的关系;B:轴状成像示肿瘤的供血动脉及肿瘤与枕骨、椎动脉的关系

图 3 头颈交界区中枢神经系统神经鞘瘤患者术前头颈 3D-CTA 成像

[**通信作者**] 刘 亮,E-mail:liulst@tom.com