维普资讯 http://www.cqvip.com

The value of nitric oxide in ascites and blood in the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis of cirrhosis

Gao Qing, et al
Department of Internal Medicine, College of Clinical Medicine.

In the present study, levels of nitric oxide (NO) in ascites and blood were determined by activated cadminum in 57 patients with ascites. During the treatment, levels of NO in ascites and blood, ratio of NO in ascites and blood (NO_A/NO_B) of 19 cirrhosis patients with spontaneous bacterial peritonitis (SBP) were consecutively determined. The results showed that the levels of NO in ascites and NO_A/NO_B in 19 cirrhosis cases with SBP were significantly higher than those of 38 cases with ascites transudate, and lower significantly after the effective antiinfection treatment. With numerical value≥1.1, as positive discrimination ratio, the sensitivity and specificity of NO/NO in detecting SBP of cirrhosis were 81.5% and 89.5% respectively. It suggested that determining and monitoring the levels of NO in ascites and blood, and ratio of NO_A/NO_B could be used to diagnose SBP of cirrhosis and predicate the prognosis.

KEY WORDS Nitricoxide; Cirrhosis; Spontaneous bacterial peritonitis.

53-55

(18)

PCR热启动及稀释法与常规法检测血清HBV－DNA的结果比较

R512.620.4
R446.9

第二临床学院临床检验中心 李兴禄* 邱君凤 黄坤容 刘祥贵

提 要 采用常规PCR、热启动PCR、稀释后热启动PCR三种方法，对经ELISA检测为HBsAg、抗HBc、HBeAg或抗HBe阳性的血清标本，检测其乙型肝炎病毒DNA(HBV－DNA)。结果显示热启动PCR、稀释后热启动PCR能提高HBV－DNA的阳性检出率。

关键词 多聚酶链反应；HBV－DNA；热启动PCR
中图分类号 R446.1

乙型肝炎病毒，DNA，热启动，聚合酶链反应

血清中HBV－DNA的存在一直被看作是病毒复制的标志物，且与活动性肝病及传染性有关，以前主要用斑点杂交法来检测[1]。随着PCR检测技术的开展和普及，PCR法检测血清中HBV－DNA已广泛应用于临床。热启动PCR是近年来发展起来的，是对常规PCR技术的革新[2]。本文将热启动PCR与稀释DNA模板相结合的方法。检测血清中HBV－DNA，并进行了相关对比实验，以期评估这两种方法在临床诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备:DNA扩增仪 (美国天美公司)

1.1.2 试剂盒:PCR试剂盒由洛阳华美生物工程公司及厦门长城生物工程公司提供;乙肝血清标志物(HBV.M)检测(ELISA法)药盒由上海科华实业技术有限公司提供。

1.1.3 血清标本来源于1996年我院住院及门诊病人，经ELISA法检测HBsAg、抗HBe、抗HBc阳性(小三阳)31例，HBsAg、HBeAg、抗HBc阳性(大三阳)18例，在31例"小三阳"中，13例常规PCR阴性(华美试剂盒)，18例待测。

1.2 方法

* 男，1957－01出生，主管技师

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 ELISA、常规PCR、热启动PCR检测结果

HBV.M					例数	常规PCR阳性	热启动PCR阳性
HBsAg	抗HBs	HBeAg	抗HBe	抗HBc			
+	−	+	−	+	18	17(94.4%)	17(94.4%)
+	−	−	+	+	18	8(44.4%)	10(55.6%)

表2 热启动PCR与稀释后热启动PCR检测结果

HBV.M					常规PCR	例数	热启动PCR阳性	稀释后热启动PCR	
HBsAg	抗HBs	HBeAg	抗HBe	抗HBc				1:5	1:10
+	−	−	+	+	−	23	8(34.8%)	10(43.5%)	3(13.0%)

注:(1)23例标本中10例来自表1,另13例是以往留置经华美试剂盒常规PCR阴性标本。(2)以上结果无交叉现象。

1.2.1 常规PCR:严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.2 热启动PCR:在将DNA模板加入反应管以前约5分钟取出预制好的冰块放入试管盒内,加入适量自来水,制成冰水混合物,其高度以能使反应管内的反应液完全被淹没为佳。将PCR反应体系各成份混匀后,立即置于冰浴中,启动PCR循环仪。待温度上升至70℃以上时,再将反应管置入,其循环参数与常规PCR相同。

1.2.3 稀释法:取提取后的DNA模板上清液1μl加入一个0.5ml试管中,加入4μl超纯水,混匀(稀释度为1:5),再取稀释后的模板2μl加入另一个0.5ml试管内加入超纯2μl,混匀(稀释为1:10),然后再进行热启动PCR.

以上检测均采用华美试剂盒

1.2.4 试剂盒对比试验:对常规PCR、1:5、1:10稀释后热启动PCR均阴性的标本,再用长城试剂盒重新检测。

2 结果

2.1 ELISA、常规PCR、热启动PCR检测结果如表1

2.2 热启动PCR与稀释后热启动PCR的结果比较如表2

2.3 试剂盒对比试验结果

13例常规PCR、热启动PCR、1:5、1:10稀释后热启动PCR均阴性的标本,有3例因血清量不足而未作进一步检测,另10例用长城试剂盒检测,结果与华美试剂盒检测果一致。

3 讨论

3.1 热启动PCR能提高阳性检出率

众所周知,常规PCR的操作流程是不够完善的,最大的干扰就是非特异性扩增产物的影响,对于高水平感染HBV－DNA的血清标本,非特异性扩增对PCR检测结果的影响较小,而对于低水平感染的标本,非特异性扩增则成了一个决定扩增成败的关键因素。热启动PCR能提高特异性扩增已多有报道[3,4,5],该方法提高阳性检出率的主要原因在于PCR反应一开始就在大于70℃,即高于引物退火温度之上进行,有效地消除了引物错配和二聚体形成的任何机遇。因而非特异性产物减少,显著增加了特异性产物的扩增量,使低拷贝数DNA更易扩增。本方采用热启动PCR对ELISA检测为"小三阳"和"大三阳"的血清标本各18例进行检测。结果如表1所示:18例"大三阳"标本常规PCR及热启动PCR检测阳性均为17例(94.4%),支持传统看法认为HBeAg是病毒复制的指标,说明患者具有传染性的观点[6],另一例未得到阳性结果,其原因有待进一步探讨;18例"小三阳"标本常规PCR阳性8例(44.4%),而热启动PCR阳性10例(55.6%),阳性率提高了11.2%,充提示在这10例患者血清中尽管已产生了抗HBe,但是仍存在HBV－DNA的复制,属活动性肝病,具有一定的传染性。

3.2 适量稀释法能提高阳性检出率

常规PCR提取DNA得到的模板中存在抑制

维普资讯 http://www.cqvip.com

因子(主要是抑制DNATaq酶的活性)。稀释法即是针对稀释抑制因子,降低抑制作用而设计的,但在稀释了抑制因子的同时,靶序列也被稀释了,不利于DNA的检出。由于PCR法极其灵敏,据不同的报道,国内检测灵敏度可达1fg/ml HBV－DNA[7],而国外则更高,达到了0.001fg/ml,远低于HBV最小感染量[8]。适量的稀释对PCR敏感性影响较小而抑制因子的抑制作用被大大降低,使原来被抑制而不能检出的HBV－DNA易于检出。本实验结果如表2所示:作1:5稀释后,阳性数由8例增加为10例,阳性率提高了8.7%,证实该稀释度对检测HBV－DNA是适宜的,能使常规PCR甚至热启动PCR不能检出的HBV－DNA被检出;但若稀释度过大,使标本中的靶序列低于该实验室PCR法的最低检出量,即使抑制因子的抑制作用被大大降低,HBV－DNA也不能被检出,故检出率反而降低,如表2所示:作1:10稀释后,因过分稀释,热启动PCR的8例阳性仅有3例仍为阳性,阳性率降低了21.8%。

本文采用一般物理方法的热启动PCR以及1:5稀释法检测HBV－DNA,操作简便,比常规PCR具有更高的灵敏度,能较大幅度地提高阳性检出率,为临床判断病程,针对性用药及观察疗效提供了更为准确的实验室指标。

参 考 文 献

1. kam W,et al. Hepatitis B viral DNA in liver and serum of asymptomatic carriers.proc Natl Acad SCi USA.1982,79:7522
2. 肖文华,等.《国外医学》临床生物化学与检验分册,1996;17(2):68
3. 刘宝瑞,等.第四军医大学学报 1992;(2):111
4. 陈庆华,等.《国外医学》分子生物学分册 1992;14(4):198
5. 魏 军,等.中华医学检验杂志 1993;16(5):271
6. 张 捷,等.中华医学检验杂志 1995;18(6):373
7. 余竹元,等.上海医科大学学报 1993;20(1)
8. Ulrich PP,et al.J infect Dis 1989:160(1):37

(收稿日期1997－05－15)

The detection for serum HBV－DNA by polymerase chain reaction(PCR), hot start(HS)PCR and HS－PCR after dilution

Li Xinglu, et al
Department of Laboratory Examination, The Second College of Clinical Medicine

Using Polymerase Chain Reaction(PCR), Hot Start(HS) PCR and HS－PCR after dilution, the serum HBV－DNA was detected, which has been proved to be positive for HBsAg, HBcAg, HBeAg or HBeAb in ELLSA. The results indicated that HS－PCR, HS－PCR after dilution could improve the positive detedtion rate of HBV－DNA.

KEY WORDS Polymerase Chain reaction;HBV－DNA;Hot start PCR