

中国医学装备协会 第二十五届学术年会论文汇编



《中国医学装备》杂志社

地址：北京市西城区南纬路27号
邮编：100050
电话：010-63029869 63028803
传真：010-63023003
E-mail: zgyxzbzz@sina.com
网址: www.zgyxzbzz.org.cn

中国医学装备协会
《中国医学装备》杂志社

2016·贵阳

目 录

「医学装备技术创新」

1. 基于支持向量机失血性休克严重程度多参数预测方法研究.....潘文才 赵鹏 宋修瀛 等 1
2. 基于移液器枪头的集样品预处理扩增于一体的核酸分析系统.....逯文晶 孙佳妹 蒋兴宇 5
3. 减肥类保健食品中添加化学成分酚酞检测卡的研制.....姚世平 刘光中 姚洪涛 等 11
4. 基于胎儿心电技术的胎心率参数提取及研究.....李广飞 张松 杨琳 等 19
5. 动物气溶胶吸入暴露装置的研制.....李劲松 杨文慧 何春雷 等 23
6. 应用于生化分析仪的辅助诊断专家系统.....甘宜梧 王波 谢清华 等 25
7. 用于全自动酶免的超声法液面探测系统.....甘宜梧 郭宣成 谢清华 28
8. 基于光激化学发光技术开发的多表位检测 cTnI 的方法.....程敏卓 张向辉 赵卫国 等 30
9. 基于模糊自适应 PID 的全自动酶免温度控制系统.....甘宜梧 郭宣成 谢清华 34
10. 胶乳增强免疫比浊法检测尿液中 $\alpha 1$ -微球蛋白的含量.....蒋泽军 蒋庆姣 冼庆勇 等 38
11. 一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法检测致病菌的研究.....尹彬洋 陈翊平 蒋兴宇 42
12. 基于硫磺素 T 和自组装多肽纳米材料的肺炎支原体抗体 IgM 双信号检测.....刘野 孙红岩 王云云 等 48
13. 扫描式质子束成像仪研制及其光学特性研究.....杨锋 张湘 Wen Chien Hsi 等 53

「医学装备技术评估」

14. 基于动态心脏体模的冠脉 CTA 成像后处理软件质量评估.....赵鹏 郎朗 潘文才 等 58
15. 艰难梭菌感染体外诊断及设备系统评价.....孙鹏飞 谢乐 许雨乔 等 62
16. 比浊法测定结合珠蛋白试剂盒的性能评价.....韩成莲 刘瑶 69
17. 尿质控品对尿液分析灵敏度的提示及临床相关性研究.....刘云鹏 冼庆勇 蒋泽军 等 72
18. 幽门螺杆菌抗体胶乳免疫比浊检测试剂盒的研制及性能评价.....高爱民 78
19. 基于基因组学对肺炎克雷伯噬菌体安全性的评估.....崔泽林 郭晓奎 汤荣 等 81
20. 基于全自动化学发光检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立及方法学评价.....杨柳 周冬 87
21. 酶法检测游离脂肪酸试剂盒的稳定性研究.....景晟 91
22. 克隆酶供体免疫测定法检测 25-羟基维生素 D 试剂盒的检测意义与性能评价.....翁颖 周冬 94
23. 两台不同型号化学发光仪对于肿瘤标志物项目检测结果可比性探讨.....华长龙 贾磊 王立庄 等 100
24. 参照 CLSI EP 方案评价同型半胱氨酸试剂性能.....李祥胜 103
25. 全自动血型及配血分析系统应用评价.....何哲文 李翠莹 106
26. MG12 型全自动血型分析仪常规检测效果评价.....林婧 苏莉 杨家焕 等 109

「质量管理与计量测试」

27. MRI 远程质量控制检测方案的建立与实施.....李梦 杜娟 赵鹏 等 112
28. 颅颌面内固定系统验收质量管理中 PDCA 的应用与效果检验.....范宝林 赵莹颖 高燕华 115

29. 医用多参数监护仪在临床中应用与质量控制.....	徐子琴	120
30. 手术带电器械的检测与管理探研.....	袁林	122
31. 医疗设备质量控制工作面临的新问题及其改进思路.....	郑小溪 李怡勇 刘倪	125
32. 浅析 PDCA 循环法在病理技术质量管理中的应用.....	陈双乐	128
33. 医院医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系建立的探讨.....	郑龙	130
34. PET/CT 全身成像中 CT 图像质量与辐射剂量关系的研究.....	梁子威 耿建华 王奕斌 等	133
35. 单光子发射计算机断层性能测试系统的设计与开发.....	姚树林 陈英茂 耿建华 等	139

「医用辐射装备防护与检测」

36. 常用辐射剂量仪防护检测中的误区.....	欧向明	144
37. LUNA 全身伽马刀输出因子的蒙卡模拟研究.....	袁继龙 程金生	148
38. 2013 年广西医用诊断 X 射线摄影机质量控制检测结果及分析.....	梁桂强 覃志英 谢萍 等	152
39. 2015 年广西放射诊断设备与放射防护用品的分布调查.....	梁挺 陈发想 董颖 等	156
40. 2014~2015 年浙江省基层放疗机构医用直线加速器应用现状分析.....	曹艺耀 俞顺飞 宣志强 等	159
41. 热释光探测器监测患者全身照射剂量结果与分析.....	唐孟俭 韦宏旷 覃志英	162
42. 介入放射手术中术者和受检者受照剂量研究.....	韦宏旷 唐孟俭 覃志英 等	164

「医学影像」

43. 国产彩色超声诊断仪的临床应用评价研究.....	崔立刚 唐杰 姜玉新 等	168
44. 国产与进口彩超在产前检查中的临床对比研究.....	赵华巍 崔立刚 张明博 等	169
45. 国产与进口彩色超声诊断仪在乳腺超声检查中的临床对比研究.....	郭丽娟 崔立刚 王金锐 等	170
46. 用手机看 B 超, 索诺星无线探头式 B 超带来行业大变革.....	蔡伟忠	171
47. B 超在儿科心脏诊断的应用.....	侯金睿 李振彪 段新安	173
48. 超声弹性成像与 MR 动态增强显像在乳腺肿瘤良恶性鉴别诊断中的价值对比.....	吕书革 王倩云 温雪娟	175
49. 低剂量 CT 脑灌注与 SPECT 在颈动脉狭窄性 TIA 诊疗中的应用进展.....	郑义 芦钺 程瑞年	179
50. 脑干听觉诱发电位联合多普勒超声对高龄眩晕患者诊断价值.....	王淑芳	183
51. SPECT 与 SPECT/CT 设备配置要求与选型方案.....	耿建华 陈英茂 陈盛祖 等	187
52. 不同型号 PET/CT 中受检者的有效剂量及其影响因素的研究.....	梁子威 耿建华 王奕斌 等	193
53. 扫描式质子束剂量成像仪的剂量响应特性研究.....	张湘 杨锋 Wen Chien Hsi 等	199

「临床检验与输血」

54. 4 种电泳组合项目联合检测在多发性骨髓瘤诊断中的应用.....	王家健 莫南勋 陶然 等	203
55. 临床检验实验室自动化流水线的建立及应用.....	徐东江 张会英 吴俊	210
56. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统与血糖、血脂及尿酸的相关性研究.....	刘振杰 张丹丹 李涛 等	213
57. 云南宣威肺癌组织中 LncRNAs 的初步筛选和表达验证.....	李庆 张爱兴 王玉明	216

58. 量子点在高敏 cTnI 检测中的初步应用.....	江华 刘文卫 刘永胜	222
59. 117 例线粒体基因 A3243G 点突变导致的线粒体病患者的临床特征与分子特点研究.....	夏昌宇 刘誉 刘辉	225
60. LC-MS/MS 法检测血浆中的肾上腺素(E),去甲肾上腺素(NE),多巴胺(DA)含量...	杜克贺 王国才 邵立军 等	229
61. 新产业 MAGLUMI 检测肝纤指标的方法学性能验证.....	韦荣国 黄永攀 李灵	233
62. 25-OH 维生素 D 与高血压病危险分期相关性研究.....	殷光荣 赖秀林 自福蓉 等	237
63. 重庆万州地区妊娠期妇女血清甲状腺激素参考区间研究.....	万涛 胡世玲 尹明华 等	240
64. 血清 BGP、ALP 检测联合 SPECT 在前列腺癌骨转移的诊断价值.....	王永斌 邓智勇 洪涛	243
65. 血清 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、胃蛋白酶原联合检测对早期胃癌诊断的意义.....	蓝成娟	247
66. 人中粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的基因克隆、原核表达.....	滕昆 阳艳华 沈超 等	250
67. 幽门螺杆菌的检出率、携带率及其毒力基因与临床特征相关性的研究.....	张艳梅 胡玘婕 赵付菊 等	254
68. 氨甲喋呤对映体对急性淋巴细胞白血病细胞株的体外诱导蛋白表达差异的研究.....	沈佐君 陈洋 何晓东	261
69. 2014-2015 年石家庄市呼吸道感染八项病原体谱分析.....	安翠平 梁芸 李兆锋 等	265
70. 全自动化学发光法测定 TRAb 在自身免疫性甲状腺疾病中的应用以及干扰因素分析.....	张蓉	269
71. 肝炎肝硬化病态造血与脾功能相关性研究.....	陆光生 景晔 徐和福 等	271
72. rs9277341 SNP 与新疆维吾尔族及汉族乙型肝炎病毒感染的相关性研究.....	郭宇璇 杨丽 徐菲莉	275
73. The STAT3-regulated long non-coding RNA Lethe promote the HCV replication...Yu lin-Xiong Hai bin-Wang		278
74. 2 种 HBsAg 定量检测系统对 HBV 不同感染阶段及不同基因型样本检测的一致性评价	刘杨 彭道荣 马越云 等	287
75. 540 名铝业工人尿氟测定结果分析.....	袁秀梅 魏莲花 杨森 等	292
76. 判断血尿来源的方法学研究.....	杨麦贵 杨铮 杨阳 等	295
77. 大肠癌上调蛋白 POSTN 的蛋白组学研究及大肠癌病人血清中 POSTN 的测定.....	鄢超 李威 李丽红 等	298
78. 焦磷酸测序对结核分枝杆菌耐药基因突变的检测.....	冯琳涵 刘家云 黄芳 等	302
79. 脊柱退行性疾病需手术治疗患者骨代谢指标与骨密度关系的研究.....	王旭 张会英 娄路馨 等	306
80. 2015 年全国 Vitek 2 细菌药敏检测系统药敏试验结果准确性调查研究.....	孙宏莉 胡继红 罗燕萍 等	311
81. 基于刚果红与短肽结合的 P-选择素定量检测.....	王云云 刘野 丛玉隆 等	321
82. 血浆 ST2 在 II 型糖尿病进展过程中的分布和临床关联性.....	蔺亚晖 张荣成 王恺隽 等	326
83. 肿瘤标志物在结直肠癌中的临床应用.....	张明建	332
84. 抗 Eppin 抗体对成熟精子的损伤及其凋亡.....	刘萍 向代军 陈运霞 等	335
85. 维生素 D 对 T2DM 患者血糖控制及炎症因子的影响.....	李晋	338
86. 联合骨髓细胞形态、细胞化学染色及骨髓活检切片在低原始细胞骨髓增生异常综合征与溶血性贫血鉴别诊断中的意义.....	顾李霖 康慧媛 潘玉玲 等	343
87. 自身免疫性胰腺炎患者血清 IgG 亚型特征及鉴别诊断.....	邸平 孙京花 朱剑 等	348
88. 循环 microRNA 对非小细胞肺癌诊断和化疗效果评价的研究.....	刘牟林 李士军	352
89. 腹水直接检测降钙素原和白介素 6 用于自发性腹膜炎诊断作用的探讨.....	刘亚楠 苑文雯 蔡硕 等	357
90. 质谱技术在区分大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的临床应用.....	鲍春梅 崔恩博 张鞠玲 等	363

91. 百色地区乙肝两对半定量检测结果分析.....	杨国奎 369
92. 高原地区新生儿缺氧缺血性脑病中血清 NSE 和 S-100 蛋白水平变化与病情关系的探讨.....	包文芳 371
93. 广州地区发热呼吸道症候群成年患者临床特征及非典型病原体与病毒病原学调查分析	秦笙 练立婷 王维亮 等 373
94. 血常规检查指标的新应用:RDW 与 MPV 联合预测心衰患者死亡率.....	张洋 于金星 许强 等 378
95. 应用 PCR-LDR 法两地区慢性乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型比较的研究.....	徐栋 382
96. 人心肌红蛋白多肽的基因克隆、原核表达及抗体制备.....	齐文闯 申魁魁 付新中 等 387
97. 脑梗死患者同型半胱氨酸及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性研究.....	李慧 惠玉芬 白利芬 等 392
98. 直接免疫荧光法在多种呼吸道病毒抗原检测中的应用.....	季玲玲 395
99. 血清中抗磷脂酶 A 受体特异性抗体的两种检测方法比较.....	程桂雪 刘建华 刘勇 等 399
100. Serum long non-coding RNA uc022bqs.1 is a potential biomarker for early diagnosis of human coronary heart disease.....	张明娇 李珉珉 404
101. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测药物代谢酶基因多态性.....	叶阿里 孔令君 张海燕 等 412
102. 一种脆性 X 综合征及相关疾病 FMR1 基因检测方法在临床诊断中的应用.....	徐晔 王丽丽 杨冬梅 等 418
103. 抗酸染色可弥补细针吸取细胞学在诊断淋巴结结核性脓肿的缺陷.....	江涛 朱立强 赵利 423
104. 女性冠心病患病风险数学评价模型的建立与验证.....	冯磊 年士艳 徐文波 等 427
105. 妊娠糖尿病患者血清超氧化物歧化酶、C 反应蛋白、同型半胱氨酸、胱抑素 C 检测的意义	陈兴明 高娇 刘春雷 等 433
106. 5 种抗菌药物与舒巴坦对临床分离 44 株鲍曼不动杆菌体外联合药敏试验.....	周梦兰 王瑶 程敬伟 等 436
107. 依据 CLSI C28-A2 建立广州地区精液分析主要指标的生物参考区间.....	石汉振 杨佩桦 440
108. Agilent 表达谱芯片筛查 RA 患者成纤维样滑膜细胞差异表达基因.....	张宇 王海永 管晓龙 等 445
109. 靶序列富集多重 PCR-液相芯片联合检测 4 种常见呼吸道病毒.....	王洁 王卫萍 孙宁 等 453
110. I 类整合子对铜绿假单胞菌亚胺培南耐药诊断价值的 meta 分析.....	黄秋兰 范德平 高守霞 等 458
111. 中国光滑念珠菌药物敏感性及其基因分型.....	侯欣 范欣 肖盟 等 464
112. 基于 MALDI-TOF 质谱技术无创产前检测胎儿 RhD 血型.....	李芮冰 翟艳红 段晋燕 等 470
113. 实时荧光定量 PCR 技术在男性不育患者 Y 染色体微缺失检查中的应用.....	段晋燕 侯迪 薛丹丹 等 477
114. 中期孕妇凝血纤溶常规检测结果分析.....	周湘红 蒋义 安凌悦 等 484
115. 血液分离机制制备小量红细胞方法的探讨.....	张雪松 刘微 486
116. 对无偿献血者流失相关因素分析及预防对策.....	戚均超 陈惠鸿 488
「数字医学与信息技术」	
117. 医学临床电子病历数据挖掘及其模拟系统设计与应用.....	王清河 谢云鹏 谢利德 等 491
118. 互联网技术在医院设备管理与维修中的应用.....	谢玉丹 494
119. 北京市红十字血液中心信息化建设应用效果.....	李颖 戴云 孟雅娟 等 498
120. 基于 Node.JS 的远程实时虚拟康复训练系统研究.....	王清波 虞成 朱隽典 等 500
121. 3D 打印技术在经皮冠状动脉介入治疗的应用.....	王庆涛 王玉璟 504
122. 医疗设备综合管理系统的自主开发及全流程管控实施.....	李涛 张天锋 杨旭冉 等 508

123. 基于视图技术的电子病历的实现和应用.....	沈瑛瑛	511
-----------------------------	-----	-----

「管理科学与技术保障」

124. 国外国家救援队组成及其装备要览.....	许建阳	515
125. 医用耗材费用管理利益相关者博弈分析.....	林洁 张尉	519
126. 药品库存管理利用数据分析的探究.....	冯琼 李源 刘丽	522
127. 医疗器械全生命周期的设备管理.....	房爱玲	524
128. 我院急救设备保障中心医疗设备租赁式使用集中管理模式的实践研究.....	王晴 吴志坚 初继庆 等	526
129. 临床工程师规范化培训的组织实施策略的探索.....	马结实 赵安 赵鹏 等	529
130. 基于运维系统质控模块医疗设备 PM 计划的实施.....	田君鹏 王加主 李玉琼	532
131. 基于应用风险分析的医院医疗设备维护管理策略探讨.....	徐恒 许锋	534
132. 中心供氧系统供应意外中断应急演练.....	黄龙忠	538
133. 近几年我国放射性同位素进出口情况分析.....	李雪琴 唐楨 邹冰 等	540
134. GE ECM 2.3 层流风机变频控制器维修.....	赵安 种银保 朱彬 等	545
135. 常见透析机的消毒程序解读.....	张帆	550
136. 医用回旋加速器常见故障维修.....	盖立俊	555
137. 浅谈口腔医疗设备维修管理的数据资源利用.....	王鹏 孙蕾	556

「医学装备技术创新」

基于支持向量机失血性休克严重程度多参数预测方法研究*

潘文才^① 赵鹏^{①*} 宋修瀛^① 张险^① 种银保^① 郎朗^① 马结实^① 王晴^① 胥川^① 李梦^①

①第三军医大学新桥医院医学工程科 重庆 400037

[摘要] 目的: 失血性休克严重程度的院前快速诊断, 帮助医护人员及时对患者制定有效的救治措施, 对提高失血性休克病人的救治成功率和预后康复具有重要意义。但目前用于检测院前失血性休克严重程度的方法存在一定局限性。为实现失血性休克严重程度的院前快速诊断, 本文选取了适用于院前条件的多个生理指标, 基于支持向量机(SVM)建立失血性休克严重程度预测模型, 并探究该方法的可行性。**方法:** 以 Wistar 大鼠失血性休克模型为研究对象, 该模型包括 1 组对照组(假手术组)和 3 组不同休克程度实验组(失血量分别为总血量的 25%、35% 和 45%), 选取平均动脉血压、心率、休克指数和口腔黏膜二氧化碳分压四个生理指标为特征数据, 基于 SVM 分类预测器对特征数据进行学习和训练, 建立失血性休克严重程度多参数预测模型, 验证该预测模型, 计算预测准确率。**结果:** 实验结果显示, 基于 SVM 失血性休克严重程度多参数预测模型的预测准确率达 98% 以上。**结论:** 基于 SVM 失血性休克严重程度多参数预测方法能够准确地识别失血性休克严重程度, 说明了该预测方法的可行性。本研究以期为实现院前的失血性休克严重程度诊断提供理论基础和技术支撑。

[关键词] 失血性休克; 严重程度; 预测; 支持向量机

The prediction of hemorrhagic shock severity based on multi-parameters with support vector machine

PAN Wen-cai, ZHAO Peng, SONG Xiu-ying, ZHANG Xian, CHONG Yin-bao, LANG Lang, ZHAN An, MA Jie-shi,

WANG Qing, LI Meng

[Abstract] Objective: The rapidity diagnosis and prediction of the severity of hemorrhagic shock in pre-hospital to help medical staff timely make effective treatment measures for hemorrhagic shock patients, which is important to improve the success rate of treatment and prognosis of rehabilitation. The prediction method of hemorrhagic shock severity in pre-hospital has certain limitations at the moment. In order to solve these current limitations, this study selected multiple physiological parameters applicable to the conditions of pre-hospital, and established the severity of hemorrhagic shock prediction model base on multi-parameters with support vector machine (SVM), and explored its feasibility. **Methods:** Take hemorrhagic shock model of the rats as our research target, which the model includes one control group and three experimental groups varying degrees of shock (Blood loss was 25% of total blood volume, 35% and 45%, respectively). The mean arterial blood pressure, heart rate, shock index and buccal partial pressure of carbon dioxide are characterized by four physiological indexes data. Based on the SVM classification predictor to study and train the characteristic data and establishing the hemorrhagic shock severity of multi-parameter prediction model, and then validate the predictive model and calculate the prediction accuracy. **Results:** Experimental results show that the multi-parameters prediction model based on SVM hemorrhagic shock severity prediction accuracy rate is up to 98%. **Conclusion:** The multi-parameters hemorrhagic shock prediction method based on the SVM can accurately recognize the severity of hemorrhagic shock, indicating the feasibility of the prediction method. The study expects to provide a theoretical basis and technical support for the severity of hemorrhagic shock diagnosis in pre-hospital emergency.

[Key words] Hemorrhagic shock; Severity; Prediction; Support vector machine

[First-author's address] Department of Medical Equipment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China.

失血性休克是指因血管损伤破裂而导致的有效循环血容量与心排血量急剧减少、总血液携氧能力迅速下降, 组织器官灌注严重不足, 细胞代谢紊乱和功能受损, 严重障碍生命重要组织器官机能、代谢的全身危重病理生理过程。其主要多发于战场、自然灾害和重大事故等的救援现场, 如不及时有效地治疗, 将可能导致急性呼吸窘迫综合征、多器官功能障碍综合征等, 早期死亡率高^[1]。据临床资料分析重大交通事故中因挤压伤、贯穿伤等创伤引起的失血性休克所造成的伤员死亡率为 40-50%^[2]。

在救治失血性休克患者过程中, 若能在院前快速诊断出休克的严重程度, 及时帮助医护人员制定有效的救治措

施,对提高失血性休克病人的救治成功率和预后康复具有重要意义。根据中华医学会重症医学分会制定的《低血容量休克复苏指南(2007版)》的标准,目前临床上对失血性休克严重程度的诊断主要依据心率(heart rate, HR)、平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、尿量、皮温色泽和精神状态等指标^[1]。然而有研究表明,HR和MAP在休克初期由于代偿性血管收缩并不能真实地反映休克程度,皮温下降、皮肤苍白、精神状态的变化也不是失血性休克的特异性指标,更不能用于失血程度的定量分析^[3]。

近年来,人们已经认识到传统诊断方法具有局限性,并大量研究其他血流动力学以及重要组织、器官氧代谢指标与失血性休克严重程度的关系。基于血流动力学指标包括脉搏波变异率、R波振幅、心脏周期变化性、休克指数(shock index, SI)和心排血量(cardiac output, CO)等指标;基于氧代谢指标包括有胃黏膜二氧化碳分压(P_{GCO_2})、食道黏膜二氧化碳分压(P_{ECO_2})、口腔黏膜二氧化碳分压(P_{BUCO_2})、经皮氧分压和血气分析等指标^[4]。以上任何单一检测指标均可在不同程度上评估失血性休克的严重程度,但采用单一指标的检测方法或多或少存在不足。例如SI能够估计创伤患者的失血量,但其敏感度和准确性不能有效指导早期诊断和液体复苏^[5];CO是反映失血性休克程度最为敏感的指标之一,但CO的准确测量主要依赖于有创监测,严重影响了这一方法在院前的应用;动脉血乳酸(arterial blood lactate, ABL)对休克有很高的敏感性,虽然ABL作为失血性休克诊断的“金指标”已被国内外专家广泛认可^[6],但ABL不能连续无创监测,且具有延时性,不适用于院前急救和后送转运途中指导复苏; P_{GCO_2} 、 P_{ECO_2} 等指标监测操作复杂且属于有创检测,也不适用于院前急救等复杂环境下休克程度的检测。而且血流动力学指标和氧代谢指标经常受到多因素的影响,单一指标的数值有时并不能正确反映失血性休克严重程度的真实情况,因此需建立一种能应用于院前早期评估休克严重程度的多参数指标检测方法。

本文在课题组前期大鼠失血性休克实验的基础上,选取HR、MAP、 $P_{BU}CO_2$ 和SI 4个适于院前条件的生理指标,建立基于支持向量机(SVM)失血性休克严重程度四参数预测模型,研究该模型的预测准确率、稳定性,探究基于SVM的失血性休克严重程度预测方法的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验数据

本课题所采用的生理指标数据是课题组前期基于Wistar大鼠(310 ± 20 g)建立的失血性休克模型所获得的实验数据。失血性休克模型分为四组,分别为对照组、轻度休克组、中度休克组和重度休克组,每组5个样本,共20个样本量。对照组为假手术组,休克组在30min均匀失血至25%、35%和45%(按失血量/总血容量*100%计算)来分别模拟人体轻度、中度和重度休克。每个样本数据总时间均为90min, -30min-0min为失血前期,0min-30min为失血期,30min-60min失血后期(失血后,不做其他处理),其中0min为失血基线,实验数据如图1所示。为贴切院前急救环境的实际情况,选取30min-60min期间数据作为失血性休克严重程度的训练集数据。

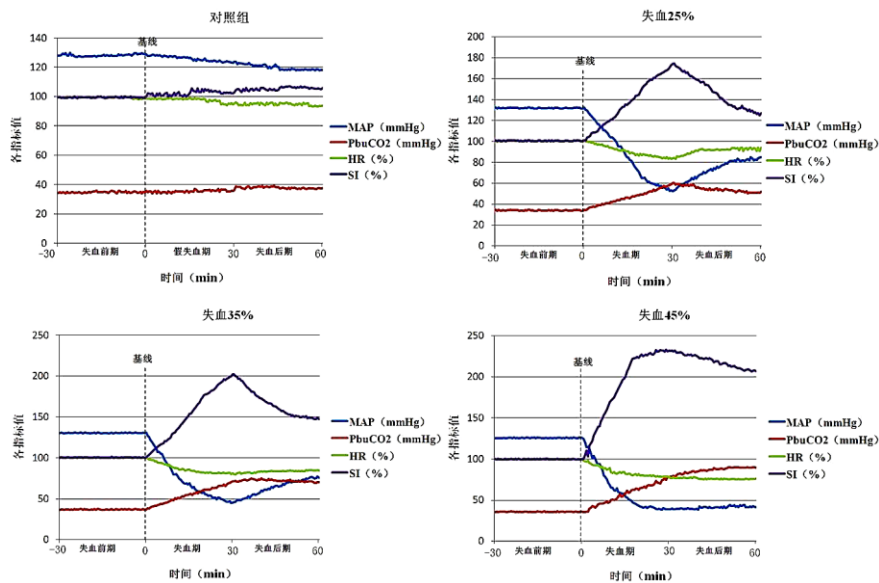


图1 对照样本和三组休克样本的实验数据

1.2 基于 SVM 失血性休克严重程度预测模型的建立

1.2.1 数据准备

在建立基于 SVM 失血性休克严重程度预测模型之前,先将对照组和三组休克组所有样本的实验数据进行程序化处理,包括建立类别标签(本文用对照组样本数据标记为 0,轻度、中度和重度休克组样本数据分别标记为 1、2、3)以及实验数据的归一化处理等。

1.2.2 SVM 核函数和最佳参数 C 和 g 选取

SVM 分类模型的好坏,主要看其的推广性和学习机器的复杂性,即对未知数据测试时的准确性。而影响其好坏的因素主要有两点:一,误差惩罚参数 C ,对算法复杂度和错分样本比例折衷,即在确定好的特征空间中调节学习机器置信范围和经验风险比例,让学习机器的推广能力达到最好。当 C 的值小时,表示对经验误差的惩罚小,学习机器的复杂度小而经验风险值大;当 C 的值大时,则反之。因此,需要选定一个适合的 C 平衡复杂度和风险值,取得最好的 SVM 推广能力;二,核函数形式及核参数 (g),不仅核函数的类型会影响最终 SVM 分类的准确性,而且在同一核函数下核参数不同其分类的准确率也不同^[6]。因此,确定核函数以及最佳参数 C 和 g 的最优值在 SVM 分类模型中非常重要。

本研究所使用的核函数为径向基 (RBF) 核函数,其表示形式为:
$$K(x_i, x) = \exp(-\gamma * \|x - x_i\|^2)$$

其中 γ 为核函数的宽度。在 libsvm 工具箱中, g 代表 RBF 核函数的核参数,表示核函数半径。本文最佳参数 C 和 g 的最优值求解采用两次 k 折交叉验证与网格法的组合方法^[7],即先初步设定 C 和 g 的变化范围划分网格并遍历网格中所有的点进行取值,再运用 k 折交叉验证法对取定的 C 和 g 验证分类正确率,然后根据前面粗略设定的结果进行精确设定,并再一次重复工作,最终选取验证分类正确率最高的 C 和 g 作为最优值。

1.2.3 SVM 预测模型的训练和测试

确定误差惩罚参数 C 和核参数 g 后,将训练集数据在训练函数 (svmtrain) 上进行学习和训练,建立 SVM 失血性休克严重程度分类预测模型。最后,选取测试集数据在预测函数 (svmpredict) 上进行测试,并输出相应的预测结果。

2 结果

本研究中选取了对照组和休克组所有样本休克后期的实验数据(30 min 数据段,每 5 min 为一个测试样本数据,共计 120 个测试样本数据)进行 SVM 预测模型测试,其预测结果如图 2 所示。

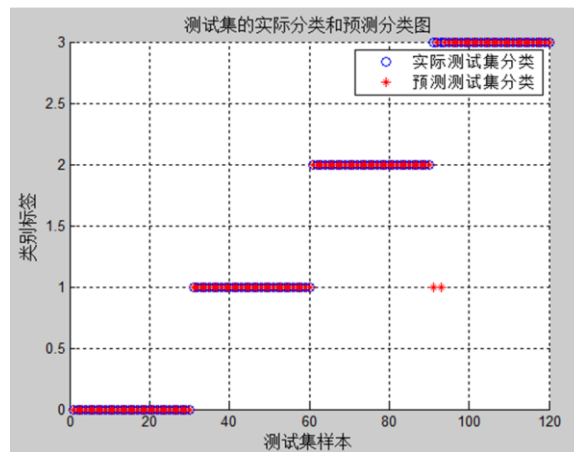


图 2 SVM 预测模型的测试结果图

其中 0 表示对照组数据样本, 1 表示轻度休克组数据样本, 2 表示中度休克组数据样本, 3 表示重度休克组数据样本。

预测准确率是评价该分类预测模型性能的最主要指标,预测准确率表示为:测试集预测正确样本数/测试集总样本数 $\times 100\%$ 。由图 2 可知,测试集预测正确样本数为 118 个,测试集总样本数为 120 个,则预测准确率为 98.33%,测试结果如图 3 所示。

```

optimization finished, #iter = 60
nu = 1.000000
obj = -0.443769, rho = -0.022550
nSV = 120, nBSV = 120
Total nSV = 240
Elapsed time is 0.007618 seconds.
Accuracy = 98.3333% (118/120) (classification)
Elapsed time is 0.010470 seconds.

```

图 3 SVM 预测模型的测试结果输出

为进一步验证该预测模型的扩展性,重新选取了失血后期的实验数据进行测试。以 30 min - 60 min 区间 (30min) 的数据作为一个数据测试样本,共计 20 个测试数据样本。预测结果如图 4 所示,可以看出,20 个样本数据全部分类正确,预测准确率为 100%,该预测模型表现出了良好的扩展性。

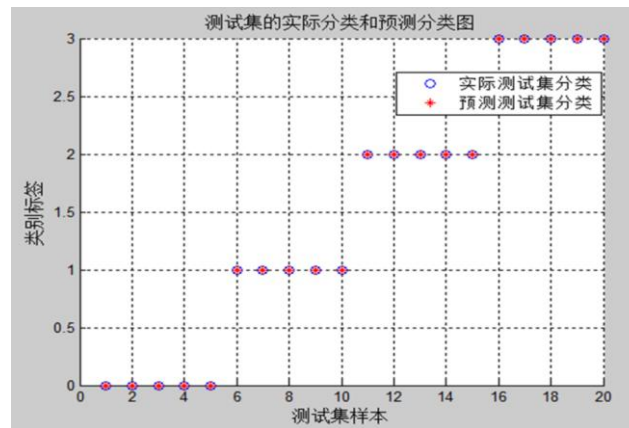


图 4 分类预测模型稳定性分析图

由以上结果可知,基于 SVM 失血性休克严重程度预测模型能够准确地识别失血性休克严重程度,其预测准确率达到了 98% 以上,验证了我们所建立的基于 SVM 失血性休克严重程度多参数预测方法的可行性。

3 分析与讨论

本研究基于 SVM 建立的失血性休克严重程度预测模型,所选取的平均动脉压 (MAP)、心率 (HR)、休克指数 (SI) 和口腔黏膜二氧化碳分压 ($P_{BU}CO_2$) 4 个生理指标均适用于院前急救环境的特殊条件。其中,MAP 主要反映了血容量、心排血量和周围血管阻力等因素。在失血性休克发生后,MAP 会明显下降,MAP 下降的量与失血量成正比;正常成年人的 HR 约为 60-80 次/min,而在发生失血性休克时,血压尚未明显变化,心率及脉搏就明显加快。在传统的失血性休克诊断中,HR 大于 100 次/min 是判断失血性休克发生的依据之一;SI 表示为脉率/收缩压 (mmHg),反映血容量的正常情况。SI=0.5 为正常,SI=1 为休克的临界值,SI>1 为休克; $P_{BU}CO_2$ 能够间接反映组织氧代谢情况。课题组前期研究已经证明:一, $P_{BU}CO_2$ 能够有效检测失血后组织灌注的变化,可用于评价失血性休克严重程度^[9]。二, $P_{BU}CO_2$ 不仅与碱缺失 (BD)、心排血指数 (CI) 等参数具有很高的相关性,而且当快速失血后, $P_{BU}CO_2$ 比 LAC、ABP 和 BD 等指标更具有预测能力^[10,11]。正是由于以上的四个生理指标均能在不同程度上反映了失血性休克发生的状况,这是基于 SVM 建立的失血性休克严重程度多参数预测模型具有很高预测准确率的基础。本研究采用能适用于院前环境的四个生理指标来建立基于 SVM 失血性休克严重程度多参数预测方法,可为院前失血性休克严重程度快速准确诊断提供了思路,有望解决单一参数指标诊断准确率不高的难题。

在 SVM 研究中核函数是核心问题,不同的核函数产生不同的算法模型,直接影响到最终分类的准确率,在实际应用中要选择与自己情况相适宜的核函数。常用的核函数有 4 种,分别是线性 (Linear) 核函数、多项式 (Polynomial) 核函数、径向基 (RBF) 核函数和二层神经网络 (Sigmoid) 核函数。由于径向基核函数,应用最广泛,无论小样本还是大样本,高维还是低维均能适用^[7],所以在本研究中采用了径向基 (RBF) 核函数来建立 SVM 分类预测模型。虽然实验的预测准确率较高,可行性得到了验证,但没有在相同条件下比较 RBF 核函数与其他三种核函数 SVM 预

测模型的预测准确率, 在后续的研究中需逐一比较它们优劣, 最终选择预测准确率最优的核函数。此外, 本研究用于建立 SVM 预测模型的训练集样本数据比较有限, 需加大实验样本数据, 以保证预测模型具有更好的扩展性。

从本研究的结果可以看出, 基于 SVM 失血性休克严重程度预测模型具有很高的预测准确率, 证明了该方法的可行性, 为后续的研究提供理论基础和技术支撑。本研究用于建立基于 SVM 失血性休克严重程度预测方法的实验数据来源是基于动物实验, 与真实失血性休克患者存在一定差别, 要面向临床应用还需开展更深入的动物实验研究和临床研究, 以提高该方法的真实有效性。

参考文献

- [1] 中华医学会重症医学分会. 低血容量休克复苏指南(2007)[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20:129-134.
- [2] 方惠霞, 朱宁, 潘燕珍. 656 例交通事故伤的特点与急救护理[J]. 南方护理学报, 2004, 11(8): 35-37.
- [3] Feihl F, Waeber B, Liaudet L. The hemodynamics of septic shock: a historical perspective[J]. Curr Vasc Pharmacol. 2013, 11(2): 133-138.
- [4] 王文涛, 冯自立, 赵鹏, 等. 无创技术检测失血性休克严重程度的现状与进展[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(11): 938-941.
- [5] Olausson A, Blackburn T, Mitra B, et al. Review article: shock index for prediction of critical bleeding post-trauma: a systematic review[J]. Emerg Med Australas, 2014, 26(3):223-228.
- [6] Vohra T, Paxton J. Abnormal arterial blood gas and serum lactate levels do not alter disposition in adult blunt trauma patients after early computed tomography[J]. West J Emerg Med, 2013, 14(3):212-217.
- [7] 奉国和. SVM 分类核函数及参数选择比较[J]. 计算机工程与应用, 2011, 47(3):123-124.
- [8] 王健峰, 张磊, 陈国兴, 等. 基于改进的网格搜索法的 SVM 参数优化[J]. 应用科技, 2012(3):28-31.
- [9] 赵鹏, 吴太虎, 郑捷文, 等. 口腔黏膜二氧化碳分压与大鼠失血性休克程度的相关性研究[J]. 中国科学: 生命科学, 2011(10):992-999.
- [10] 卢恒志, 吴太虎, 赵鹏, 等. 组织二氧化碳分压在失血性休克监测中的应用[J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(1):59-62.
- [11] Hengzhi Lu, Jiewen Zheng, Peng Zhao, et al. Buccal partial pressure of carbon dioxide outweighs traditional vital signs in predicting the severity of hemorrhagic shock in a rat model[J]. Journal of Surgical Research, 2014, 187:262-269.

***基金项目:** 国家自然科学基金青年基金(81401487)“基于模糊逻辑的失血性休克闭环复苏决策优化算法研究”; 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2016shmszx1143)“院前失血性休克严重程度无创检测装置研制”。

第一作者简介: 潘文才, 男(1987-), 硕士研究生, 助理工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科。研究方向: 失血性休克院前检测和脑灌注磁感应相移检测等; 联系电话: 18716468268; E-mail: panwencai2010@foxmail.com

通讯作者简介: 赵鹏, 男(1984-), 博士研究生, 高级工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科, 主要从事战创伤院前急救智能装备研制。

***通讯作者:** zhaop9@gmail.com

(急救医学装备专委会供稿)

基于移液器枪头的集样品预处理扩增于一体的核酸分析系统

逯文晶 孙佳妹* 蒋兴宇*

国家纳米科学中心 100190

[摘要] 目的: 本研究制备了一种基于移液器枪头的集成样品预处理、等温扩增及检测于一体的核酸检测分析系统。**方法:** 利用集成在移液器枪头上核酸固相提取卡进行核酸的提取, 并在移液器枪头内进行核酸的等温扩增, 利用手持式的紫外灯对检测结果进行判断。**结果:** 本装置可以直接对于液体样本中的核酸进行直接现场快速实时检测分析。可以对人的药物代谢基因进行现场快速检测分析。**结论:** 基于移液器枪头的集样品预处理扩增于一体的核酸分析系统具有价格低廉, 易于操作, 无需专业人员及可以实现液体精确操控等优点, 特别适用于现场及基层检验检疫单位。

[关键词] 移液器枪头; 核酸分析; 集成样品前处理; 等温扩增

Lab in a Micro-pipette Tip with Effectively Integrated Sample Pretreatment, Amplification and Nucleic Acid Detection

Lu Wenjing, Sun Jiashu*, Jiang Xingyu*/Beijing Engineering Research Center for BioNanotechnology & CAS Key,

Laboratory for Biological Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for Nanoscience and Technology,

Beijing 100190, China

[Abstract] Objective: To develop a micro-pipette tip-based nucleic acid test (MTNT) for high-throughput sample-to-answer detection of both DNA from crude samples, without the need of sample pretreatment and complex operation. **Methods:** MTNT consists of micro-pipette tips and embedded solid phase nucleic acid extraction membranes, and fully integrates the functions of nucleic acid extraction from crude samples, loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of nucleic acids, and visual readout of assays. **Results:** The all-in-one MTNT enables DNA detection in diverse crude samples with minimal instrument and operation. MTNT can also enable single nucleotide polymorphism (SNP) of CYP2C19 gene detection directly from whole blood. **Conclusions:** The advantages of MTNT, including affordable, sensitive, specific, and high throughput, suggest a considerable promise for low-cost and point-of-care nucleic acid testing for both DNA. This type of miniaturized analytical system will dramatically broaden the uses of nucleic acid detection, which is now mainly limited by the complex instrumentation and extensive laboratory required for such assays.

[Key Words] Micro-pipette Tip; Nucleic Acid Detection; Integrated Sample Pretreatment; Isothermal amplification

近年来随着经济的快速发展,人口流动的迅速增加,流行疾病的发生频率和概率逐年增加。有效的对病原体进行快速有效的检出是有效的控制疾病传播的先决条件,对于有效的防控传染疾病的传播和爆发具有重要的意义^[1-3]。因此,开发研制针对病原体有效检测的新方法及配套设备不仅具有非常重要的科学意义,也是现实的迫切需要。

核酸是基本的遗传物质,携带者各种信息,作为遗传物质的核酸直接依赖于病原体而存在,相较于抗体检测而言,不需要经历一定的时间段,在感染的初期即可进行检测分析的特点,可以有效的缩短检测的窗口期。现阶段基于核酸检测分析的分子诊断技术已经被广泛的应用于临床分析检测,为疾病诊断、预防及预后的评价等提供了技术上的有力支撑。

基于核酸的病原体的检测方法需要前期的样品预处理,核酸的扩增及后期的结果读出等步骤,因此研发集成的全自动核酸检测分析检测系统具有重要的意义。自1995年欧洲生产厂商首次引入核酸检测技术后,核酸检测技术已经逐步在病原体的检测筛查领域推展开来。现阶段主要的全自动核酸分析系统主要包括罗氏公司的 COBAS Ampli Screen HBV/HCV/HIV 和 HIV-1/HCV 检测系统^[4-5], 诺华公司的 Procleix TIGRIS 系统^[6], Cepheid 公司的 GeneXpert^[7-8], IQum 公司的 Liat Analyzer^[9-10], 以及基于等温扩增反应的 Eiken 公司的 LA-200, 上海科华的 ABI 7300, 上海和 TwistDX 的 Twista 等自动核酸分析仪。然而现有的检测分析仪器,需要诸多配套的试剂,专业技术人员的操作,存在操作复杂、仪器运作环境要求高、价格昂贵等缺点,不能适用于基层检验检疫单位的现场快速检测分析的需求。

近年来对于适用于基层单位的集成样品前处理于一体的快速、现场的核酸诊断技术已经引起了科研工作者的广泛兴趣。近年来的微流控芯片及微纳加工技术的发展为核酸检测分析的微型化发展提供的可能。我们课题组研发了基于微流控芯片及毛细管的集成样品预处理检测分析于一体的核酸检测分析^[11-15]。最近的研究还将核酸的检测集成在光盘上,利用离心力的作用对芯片中的液体进行有效的操纵,实现了核酸检测分析的全自动化^[16]。然而现阶段的研究方法均还存在需要一定的流体控制设备或操作相对复杂价格昂贵等问题。因此急需操作简单、价格低廉、集成样品前处理于一体的集成性高的核酸检测分析的系统,解决现有方法存在的样品预处理复杂、扩增所需的仪器设备昂贵需要专业人员操作等缺点,使其能够更好地适用于基层检验检疫单位及床边诊断。

综上,针对现有的核酸检测分析存在的问题,本工作报导了一种针对核酸快速检测的需求,开发了一种集成在样品预处理及核酸等温扩增、检测分析于一体的核酸检测分析系统。该系统结合了移液器枪头,集成在线核酸提取卡进行在线核酸提取,利用环介导等温扩增技术 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 对核酸进行扩增,并且通过预先在反应液中加入反应指示试剂来指示扩增反应的发生,并借助手持式紫外灯对结果进行可视化的读出。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器和试剂

移液器枪头购置于伯乐公司 (上海, 货号: 2239915)。用于移液器枪头密封的硅油购自于西格玛公司。所用的环介导等温扩增试剂均采购于蓝谱公司 (北京, 货号: SLP204)。用于反应的所有的引物均由上海生工合成。用于核

酸在线提取的 FTA(Flinders Technology Associates)卡购买于 whatman 公司。手持式紫外灯具有特定的 365nm 的波长的发射光。移液器采用大龙移液枪。

1.2 引物序列

Primer name	Sequence(5' to 3')
H1NA-BIP	ATCTAGTGGTACCGAGATATGCAGTGGACTGGTGTATCTGAA
H1N1-FIP	AATGTTATTTGTCTCCCGGCTGATCAAGAAGGGAGAATGAAC
H1N1-B3	TGTCTGACAAGTTGTATTGC
H1N1-F3	CAATAAGACCCAAAGTGAGG
H1N1-LF	CTAGTGTCAGTAATA
H1N1-LB	GGAAAGAAATGCTGGATC
CMS -FIP	TCACATTTGCAATAGGCGCGCTAACACAGGCTAGGAGAACGA
CMS -BIP	GCGCGACTTCGACACCTTTTGGCCATGATGCATCACCAGG
CMS-F3	TCCTCGAGTGACGCTTGA
CMS -B3	GTGATGCCTTTGCCAACATG
CYP2C19*2-WT-FIP	CCGGGAAATAATCTTTTAATTTAATAAATTATTGTTTTCTCTTAG
CYP2C19*2-WT-BIP	CGGGAACCCGTGTTCTTTTACTTTCTCC
CYP2C19*2-MUT-FIP	CTGGGAAATAATCTTTTAATTTAATAAATTATTGTTTTCTCTTAG
CYP2C19*2-MUT-BIP	CAGGAACCCGTGTTCTTTTACTTTCTCC
CYP2C19*2-F3	CCAGAGCTTGGCATATTGTATC
CYP2C19*2-B3	AGGGTTGTTGATGTCCAT
CYP2C19*2-LF	GATAGTGGGAAAATTATTGC
CYP2C19*2-LB	CAAATTACTTAAAAACCTTGCTT
CYP2C19*3-WT-FIP	TCCAGGGGTCTTAACTTGATGGAAAAAT
CYP2C19*3-WT-BIP	GGATCCAGGCCAGAAAAAAGACTGT
CYP2C19*3-MUT-FIP	TTCAGGGGTCTTAACTTGATGGAAAAAT
CYP2C19*3-MUT-BIP	GAATCCAGGCCAGAAAAAAGACTGT
CYP2C19*3-F3	TCCAGAAACGTTTCG
CYP2C19*3-B3	AGGGCTTGGTCAATAT
CYP2C19*3-LF	GCTTACAATCCTGATGTT
CYP2C19*3-LB	GTAAGGCCAAGTTTTTTG

1.3 样品及样品预处理

含有 H1N1 靶标序列质粒提取于的含有该质粒的大肠杆菌细菌。质粒等提取的核酸样品直接用于检测分析。试验中所用的全血样品由在获得知情同意的情况下由志愿者提供。

1.4 实验结果判定

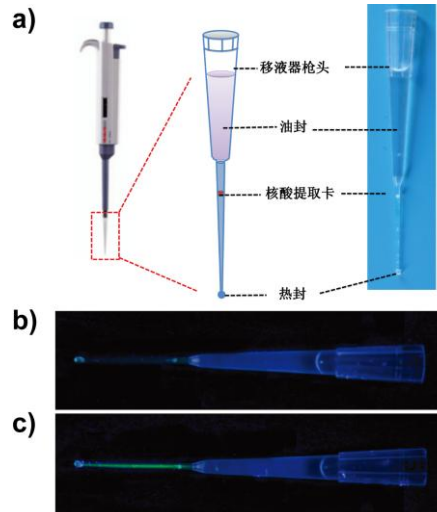
完成扩增反应后的移液器枪头无需任何处理，可直接拿到手持式的紫外灯下进行结果的观察，并且用数码相机记录结果。

2 结果

2.1 检测分析的原理

FTA 是 whatman 公司研发的用于核酸提取的专用卡片。其卡片通过专利配方的强力变性剂和螯合剂的浸泡，纤维基质上留有了特殊的化学物质，当捕捉到细胞后自动将其裂解，并与核酸结合，维持样品中 DNA 的完整性，保护核酸免于降解，免受核酸酶、氧化剂和紫外线损坏，还能够阻止细菌和其他微生物的生长。

我们通过预装的方法将 FTA 预装到移液器的枪头上，当移液器吸取液体的同时，液体接触到核酸提取卡，进行核酸的在线提取。提取的核酸经过简单的几次吸取清洗液即可对提取的核酸进行纯化处理。如图 1a 为移液器的示意图及实物图，然后吸入的 LAMP 反应液使得纯化后的核酸在 65 度恒温 1 小时的条件下进行等温扩增反应。并且在扩增反应之前需通过热封和加入硅油对反应液进行密封，防止扩增反应中气溶胶的污染。由于 LAMP 反应液中预先加入了反应的指示剂，该指示剂可以使得反应的结果借助手持式的紫外灯进行可视化的读出，如图 1b, c 所示为在紫外灯下观察到的阳性结果和阴性结果。



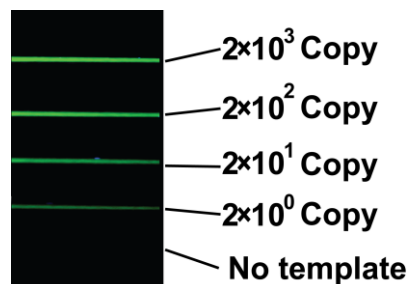
注：a 移液器的示意图及实物图；b 紫外灯下观察到的阳性结果，c 紫外灯下观察到的阴性结果

图1 移液器的示意图及结果的判读

2.2 检测分析的灵敏度

检测分析的灵敏度直接影响该方法的实际应用，对于基于移液器的核酸检测分析系统而言，其灵敏度取决于核酸提取及核酸扩增信号读出的全过程。因此本实验利用提取好的质粒对该方法的灵敏度进行了验证。试验中采用 5 个独立的枪头分别移取 2 微升含有不同浓度的表达 H1N1 流感病毒基因重组质粒，使得液体通过 FTA 核酸提取卡进行核酸的在线提取，然后吹打出废液，吸取核酸纯化液使其通过核酸提取卡纯化提取的核酸。然后吸取 4 微升的核酸 LAMP 反应液，移液器的下端由热封，上端通过加入 100 微升的硅油进行密封，以保证反应的过程中无气溶胶的污染。密封好的移液器枪头直接在 65 度的恒温下进行加热 1 小时，核酸扩增反应因此发生。反应后的枪头无需任何处理即可拿到手持式紫外灯下进行结果的读出，利用有无绿色的光来判断是否有待测的靶标序列。

从图 2 可以看出，所测试的 4 个不同浓度 (2×10^3 , 2×10^2 , 2×10^1 , 2×10^0 拷贝) 的样品均出现了绿色荧光的阳性结果，表明了该方法具有较高的灵敏度，可以检测 2 拷贝的核酸。而阴性对照样品没有绿色荧光，从侧面验证了阳性样品均由特异性扩增产生的。综上该体系的灵敏度可以检测到 2 拷贝的核酸样品，具有较高的灵敏度，可以满足基层单位的检验检疫的需求。



注：图中所示均为在紫外灯下由数码相机拍摄到的结果

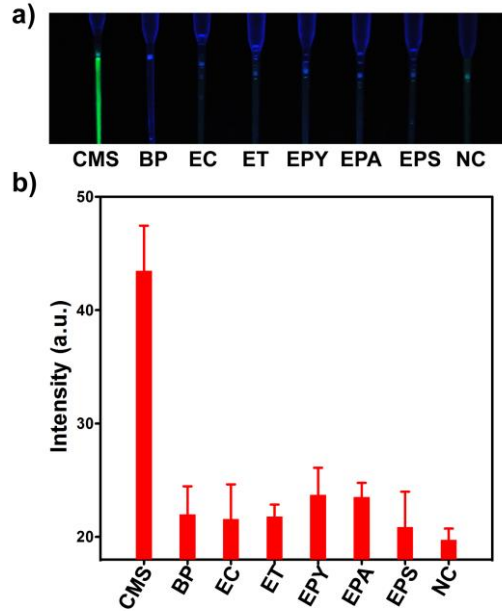
图2 基于移液器枪头的检测分析的灵敏度验证

2.3 选择性的验证

基于移液器枪头的集成样品预处理于一体的核酸检测分析系统的选择性不仅取决于核酸反应液中加入的引物的设计及优化，而且取决于在检测分析中不同的枪头之间是否存在交叉污染的问题。因此我们通过利用排枪对 7 中不同的细菌进行了检测分析，以期验证检测分析的选择性。

本实验采用中国出入境检验检疫局提供的 7 种植物易感染的菌种（马铃薯环腐病菌，*C.michiganensis* subsp.*Sepedonicus*, CMS; 短小芽孢杆菌，*B.pumilus*, BP; 大仙人掌欧文菌，*E.carnegieana*, EC; *E.tasmaniensis*, ET; 亚洲梨火疫病菌 *E.pyrifoliae*, EPY; 桃色欧文氏菌 *E.persicina*, EPA; 番石榴欧文氏菌 *E.psidii*, EPS），采用 8 联排的移液器分

别移取该 7 种菌液及阴性对照样品 (negative control,NC) 进行核酸的在线提取。8 个均移取含有马铃薯环腐病菌的特异性引物的反应液进行扩增反应,以检验该方法的特异性。在紫外灯下所示的结果如图 3a 所示,并且我们利用统计软件统计了绿色荧光的亮度(如图 3b)。结果显示只有含有马铃薯环腐病菌的样品出现了阳性结果,其他 6 种菌株及阴性对照样品均为出现阳性结果。阴性对照结果的出现表明该反应未出现非特异性的扩增,其他几种菌株的阴性结果也验证了该方法的高效的选择性,验证了利用 8 联排的移液器也未造成样品之间的交叉污染。



注: a 图利用 8 联排移液枪测定的 7 种不同菌株及阴性对照的结果图。b 利用统计软件统计的绿色荧光的强度相对值。

图 3 选择性实验验证

2.4 耐药基因单碱基突变位点的检测分析

药物代谢酶在人群中广泛存在着遗传多态性,即一个或多个等位基因发生突变而产生遗传变异,导致其代谢药物的能力明显不同,可分为快代谢型和慢代谢型,通常来说慢代谢型的药物不良反应通常较高。细胞色素氧化酶 CYP2C19 是一种重要的肝微粒体酶。该酶的表型和基因型的遗传多态性决定了不同个体对致癌物代谢的差异性和肿瘤的化学致癌易感性,并且近年来的研究表明 CYP2C19 的基因型对氯吡格雷抗血小板的作用具有一定的影响。2010 年 3 月 12 日美国食品药品监督管理局 (FDA) 发出警示, CYP2C19*2、*3 基因携带者不能有效将氯吡格雷转化为活性产物,故不能象 CYP2C19*1 基因携带者一样从氯吡格雷抗血小板的作用中获益。因此对要服用氯吡格雷的患者需先测定 CYP2C19 的基因型。

本实验测定了三份血液样品,采取的血液样品无需任何预处理。每例血液样本分为 4 份,利用移液器分别吸取样本进行核酸提取过程,分别吸取含有针对 CYP2C19*2、*3 基因突变位点的特异性引物(野生型 Wild type,WT 和突变型 Mutant type, MUT)的核酸扩增液,然后将枪头封装,将枪头放到加热台上进行加热扩增 1 小时,利用紫外灯对结果进行判读,判别药物基因的突变位点及突变类型。结果如图 4 所示,1 号样品 CYP2C19*2 的突变型和野生型均为阳性,则该样品为 CYP2C19*2 杂合子突变; CYP2C19*3 的突变型和野生型也均为阳性,则该样品为 CYP2C19*3 杂合子突变,因此该样品整体基因型为 CYP2C19*2/*3。对于 2 号样品而言, CYP2C19*2 的野生型为阳性突变型为阴性,则该样品为 CYP2C19*2 野生型; CYP2C19*3 的突变型和野生型也均为阳性,则该样品为 CYP2C19*3 杂合子突变,因此该样品整体基因型为 CYP2C19*1/*3。对于 3 号样品而言, CYP2C19*2 的突变型为阳性野生型为阴性,则该样品为 CYP2C19*2 纯合子突变型; CYP2C19*3 的突变型和野生型也均为阳性,则该样品为 CYP2C19*3 杂合子突变,因此该样品整体基因型为 CYP2C19*2/*3。该方法可以直接对全血其 CYP2C19 的基因形态进行检测分析,整个检测过程只需简单的 3 次抽取液体的过程,整个检测分析时间从样品到结果仅需 90 分钟。

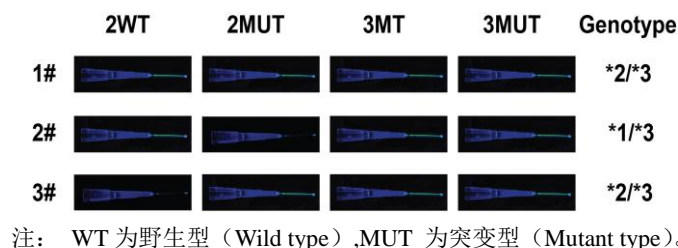


图 4 CYP2C19 的基因多形态检测分析

3 讨论

本研究研制了一种集成在移液器枪头上的于样品前处理、扩增检测于一体的核酸分析检测系统。可以实现对于原始样本实时、现场快速检测分析。该集成核酸提取卡的移液器枪头具有价格低廉,易于操作无需专业人员及可以实现液体精确操控等优点。在此枪头上可以实现快速、操作方便的核酸提取,结合小型的手持式加热及检测装置,可以实现现场检测,特别适用于现场及基层单位应用。

参考文献

- [1] Dou M, Dominguez DC, Li X, Sanchez J, Scott G. A versatile PDMS/paper hybrid microfluidic platform for sensitive infectious disease diagnosis. *Anal Chem*. 2014;86:7978-86.
- [2] Liu D, Liang G, Zhang Q, Chen B. Detection of mycobacterium tuberculosis using a capillary-array microsystem with integrated DNA Extraction, loop-mediated isothermal amplification, and fluorescence detection. *Anal Chem*. 2013;85:4698-704.
- [3] Sun J, Xianyu Y, Jiang X. Point-of-care biochemical assays using gold nanoparticle-implemented microfluidics. *Chem Soc Rev*. 2014;43:6239-53.
- [4] Okonji JA, Basavaraju SV, Mwangi J, Shiraishi RW, Odera M, Ouma K, et al. Comparison of HIV-1 detection in plasma specimens and dried blood spots using the Roche COBAS Ampliscreen HIV-1 test in Kisumu, Kenya. *Journal of virological methods*. 2012;179:21-5.
- [5] Kiely P, Margaritis AR, Seed CR, Yang H. Hepatitis B virus nucleic acid amplification testing of Australian blood donors highlights the complexity of confirming occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2014;54:2084-91.
- [6] Xiao X, Zhai J, Zeng J, Tian C, Wu H, Yu Y. Comparative evaluation of a triplex nucleic acid test for detection of HBV DNA, HCV RNA, and HIV-1 RNA, with the Procleix Tigris System. *Journal of virological methods*. 2013;187:357-61.
- [7] Shenai S, Amisano D, Ronacher K, Kriel M, Banada PP, Song T, et al. Exploring alternative biomaterials for diagnosis of pulmonary tuberculosis in HIV-negative patients by use of the GeneXpert MTB/RIF assay. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51:4161-6.
- [8] Feasey NA, Banada PP, Howson W, Sloan DJ, Mdolo A, Boehme C, et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF for detection of tuberculosis from blood samples of HIV-infected adults confirms Mycobacterium tuberculosis bacteremia as an indicator of poor prognosis. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51:2311-6.
- [9] Mlisana K, Sobieszczyk M, Werner L, Feinstein A, van Loggerenberg F, Naicker N, et al. Challenges of diagnosing acute HIV-1 subtype C infection in African women: performance of a clinical algorithm and the need for point-of-care nucleic-acid based testing. *PLoS one*. 2013;8:e62928.
- [10] Niemz A, Ferguson TM, Boyle DS. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in biotechnology*. 2011;29:240-50.
- [11] Zhang L, Zhang Y, Wang C, Feng Q, Fan F, Zhang G, et al. Integrated microcapillary for sample-to-answer nucleic acid pretreatment, amplification, and detection. *Anal Chem*. 2014;86:10461-6.
- [12] Zhang Y, Zhang L, Sun J, Liu Y, Ma X, Cui S, et al. Point-of-care multiplexed assays of nucleic acids using microcapillary-based loop-mediated isothermal amplification. *Anal Chem*. 2014;86:7057-62.
- [13] Fang X, Chen H, Jiang X, Kong J. Microfluidic devices constructed by a marker pen on a silica gel plate for multiplex assays. *Anal Chem*. 2011;83:3596-9.
- [14] Fang X, Chen H, Xu L, Jiang X, Wu W, Kong J. A portable and integrated nucleic acid amplification microfluidic chip for identifying bacteria. *Lab on a Chip*. 2012;12:1495-9.
- [15] Fang X, Chen H, Yu S, Jiang X, Kong J. Predicting viruses accurately by a multiplex microfluidic loop-mediated isothermal amplification chip. *Anal Chem*. 2010;83:690-5.
- [16] Lutz S, Weber P, Focke M, Faltin B, Hoffmann J, Müller C, et al. Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). *Lab on a Chip*. 2010;10:887-93.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

减肥类保健食品中添加化学成分酚酞检测卡的研制

姚世平 刘光中 姚洪涛 周轶 李心乐* 刘春秀 关苗

北京倍肯恒业科技发展股份有限公司, 北京 100020

[摘要] **目的:**研制一种适合现场快速鉴定减肥类保健食品中酚酞的检测试纸。**方法:**依据酚酞在碱性体系中反应形成粉红色络合物原理,通过物理吸附将碱性体系中的有效组分附着到中性滤纸的材质上制备酚酞检测卡。酚酞检测卡与标准色阶图谱对比进行定性分析,与食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪配合,根据反射光谱法原理,将0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g酚酞标准品与碱性体系反应生成络合物浓度值内部拟合形成标准曲线,可定量分析确定待检品中酚酞的浓度。**结果:**采用酚酞检测卡与食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪检测结果,同药典液相检测方法进行对比实验,检测结果符合率90~98%之间,证实酚酞试纸检测卡具备较高的灵敏度。**结论:**研制的酚酞检测卡即可定性检测又可定量检测分析,适合各种快速检测减肥类保健食品酚酞含量的要求。

[关键词] 检测卡; 酚酞; 保健食品; 试纸; 快速; 减肥类

The development of rapid detection card of Phenolphthalein illegal add chemicals In the health food reducing weight

Shiping Yao, Guangzhong Liu, Hongtao Yao, Yi Zhou, Xinle Li, Chunxiu Liu, Miao Guan .

Beijing times Ken Hengye Technology Development co., LTD, Beijing, 100020

[Abstract] **Objective:** To develop a rapid detection card of Phenolphthalein illegal add chemicals In the health food reducing weight suitable for rapid identification on site. **Methods:** On the basis of phenolphthalein pink complex principle in alkaline system reaction,by physical adsorption,the effective components of alkaline system attached to the neutral filter material on the preparation of phenolphthalein test card. Phenolphthalein test card compared with standard color order spectrum for qualitative analysis. And harmful factors in food asultnd illegal add drugs intelligent integrated detector to cooperate, according to the principle of reflection spectroscopy, will 0.5mg/g,1.00mg/g,2.00mg/g,3.00mg/g,6.00mg/g phenolphthalein standard reaction with alkaline system generated inside the complex density form standard curve fitting,the concentration of the quantitative analysis to determine the quarantine of phenolphthalein. **Result:** Using phenolphthalein test card and harmful factors in food drugs and illegal add intelligent integrated detector test results, comparative experiments with pharmacopoeia liquid phase detection method, test results coincidence rate between 90 ~ 98%,confirm phenolphthalein dipstick test card has a higher sensitivity. **Conclusion:** Development of phenolphthalein inspection card can be used qualitative test and quantitative analysis, suitable for all kinds of rapid detection of the requirements of the content of phenolphthalein health food reducing weight.

[Keyword] Phenolphthalein; Health food; Test paper; Rapid; Slim chemical composition;

酚酞商品名为果导片,是一种弱的有机酸,医用为接触性泻药,其刺激结肠粘膜增强并阻止肠内液体吸收,将水和电解质在结肠蓄积产生缓泻作用而促进排便,因此,临床上作为习惯性顽固便秘的处方药,但不宜长期使用。若长期服用,可导致营养物质的丢失,会引起贫血、水电解质失衡体重过低、抵抗力下降、营养不良等并发症。酚酞化学名为 3,3-双(4-羟基苯基)-1(3H)-异苯并呋喃酮,其分子式为 $C_{20}H_{14}O_4$,属于晶体粉末状,几乎不溶于水,易溶于乙醇。目前减肥类保健食品中酚酞基本采用高效液相色谱、液-质谱串联、分光光度计等方法检测,这些检测方法均有检测成本高、耗时较长、检测人员专业素质要求高等缺点。因酚酞常用做酸碱指示剂,其在酸性和中性溶液中为无色,在 $\text{PH}>10$ 碱性环境中呈紫红色醌式结构物,利用该显色原理制备酚酞检测卡。制备酚酞检测试纸与标准色阶图谱与目测进行定性分析,配合手持金标检测仪可以进行定量分析,由于其便携、操作简单、降低漏检、错检率等特点,更适合现场快速对减肥类保健食品非法掺入的化学药物进行鉴别检测。

1 仪器与材料

1.1 仪器

分光光度计(UV2600,岛津企业管理有限公司),真空干燥箱(DZF6053,上海一恒科技有限公司),精密电子天平(AT261,METTLER TOLEDO),酸度计(UB-7,德国赛多利斯股份有限公司),微电脑自动斩切机(ZQ2000,

上海金标生物科技有限公司), 涡旋混匀器 (XH-C, 金坛市自塔新宝仪器厂)

1.2 材料

酚酞 (规格: 100mg, 中国食品药品检定研究所)、氢氧化钠、碳酸氢钠、氢氧化钾、烷基糖苷、SDS、无水乙醇、活性炭均属国药集团化学试剂有限公司, 分析纯。水为超纯水。材质: 定量滤纸

2 实验方法:

2.1 分光光度计法

2.1.1 根据2015版药典进行酚酞成分的鉴定实验

(1)取本品数毫克, 加氢氧化钠试液或热的碳酸钠试液2ml, 即溶解成红色的溶液; 再加过量的酸, 红色即消失。

(2)取含量测定项下溶液, 照紫外-可见分光光度法 (通则0401)测定{取酚酞标准品约38mg, 精密称定, 置100ml量瓶中, 加乙醇约60ml, 振摇使溶解, 加0.01mol/L盐酸溶液10ml, 混匀, 用乙醇稀释至刻度, 摇匀。精密量取10ml, 置100ml量瓶中, 加乙醇10ml, 混匀, 用0.01mol/L盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 照紫外-可见分光光度法 (通则0401), 在275nm的波长处测定吸光度, 按C₂₀H₁₄O₄ 的吸收系数为134计算, 即得}, 在275nm的波长处有最大吸收, 在259nm的波长处有最小吸收。

2.1.2 初步确定酚酞醌式结构物检测实验范围

分别取0mg/g、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g、8mg/g稀释6倍后进行标准曲线的绘制, 通过对比其OD值的变化区间, 初步确定酚酞碱性体系显色后的检测范围。

2.2 酚酞检测卡

2.2.1 酚酞检测卡的制备

准确裁取中性滤纸长8cm, 宽8cm充分浸泡到试纸显色液[试剂显色液由氢氧化钠 (0.001mol/L)、氢氧化钾 (0.02mol/L)、碳酸氢钠 (0.05mol/L)、烷基糖苷 (APG0810) (5%)、十二烷基硫酸钠 (SDS) (2%); 各组分的体积配比是10:5:4:1:2], 5min后取出37摄氏度烘干二小时备用。将处理好的试纸按照2cm×0.4cm裁剪成小条贴在塑料片上, 制备成酚酞检测卡, 铝箔袋密封保存。

2.2.2 酚酞标准色阶的制备

配置0mg/g、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g酚酞标准系列溶液, 按照试纸检测方法分别鉴定, 将显色后的试纸条用数码相机拍摄后制成标准色阶图谱。

2.2.3 酚酞检测卡与食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪标准曲线的绘制

量取0mg/g、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g酚酞标准系列溶液, 按照试纸检测方法, 将显色后的检测卡放入食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪进行检测, 依据发射光谱原理读取对应灰阶色度值绘制标准曲线进行定量检测分析。

2.2.4 样品

(1) 三种保健类食品样品前处理

①针对减肥咖啡类保健食品的前处理方法是。称取 0.5 克样品, 放入 10 毫升离心管内, 加入 3 毫升提取液, 0.1g 提取物, 振荡 2 分钟, 静置 15 分钟后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取滤液并加入等体积的纯净水, 为减肥咖啡类 1 到减肥咖啡类 5;

②针对减肥茶保健食品的前处理方法是。取约 0.5 克样品碾碎, 放入 10 毫升离心管内, 加入 3 毫升提取液, 0.25g 提取物, 振荡 2 分钟, 静置 15 分钟后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取滤液并加入等体积的纯净水, 为减肥茶类 1 到减肥茶类 5;

③针对左旋肉碱片剂减肥保健食品的前处理方法是。取约 0.5g 样品碾碎, 放入 10 毫升离心管内, 加入 3 毫升提取液, 0.1g 提取剂, 0.1g 提取物, 先振荡 2 分钟, 每隔 10 分钟, 振荡 1 分钟, 重复 3 次, 最后静置 10 分钟后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤, 取滤液并加入等体积的纯净水, 为减肥片剂 1 到减肥片剂 5;

(2) 三种保健类食品加标实验

①针对减肥咖啡类、减肥茶类保健食品的加标方法。取约 0.5g 样品碾碎, 加入 2.00mg/g 酚酞标准溶液 1.0ml, 加入放入 10 毫升离心管内, 加入 3 毫升提取液, 0.25g 提取物, 振荡 2 分钟, 静置 15 分钟后, 用 0.45 μ m 微孔滤膜

过滤,取滤液并加入等体积的纯净水,分别记为减肥咖啡加标液 1 到减肥咖啡加标液 5、减肥茶加标液 1 到减肥茶加标液 5;

②针对左旋肉碱片剂减肥保健食品的加标实验。取约 0.5 克样品碾碎放入 10 毫升离心管内,加入 2.00mg/g 酚酞标准溶液 1.0ml 后混匀,加入 3 毫升提取液,0.1g 提取剂,0.1g 提取物,先振荡 2 分钟,每隔 10 分钟,振荡 1 分钟,重复 3 次,最后静置 10 分钟后,用 0.45um 微孔滤膜过滤,取滤液并加入等体积的纯净水,为减肥片剂加标液 1 到减肥片剂加标液 5。

2.3 高效液相色谱方法

2.3.1 酚酞标准品及样品色谱检测条件

通过文献分析,确定液相检测条件:

色谱柱: ZORBAX SB-C18 柱 (4.6*150mm, 5 μ m, Agilent); 流动相: 水—乙腈 (70:30, v/v); 检测波长: 230nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 10 μ L; 流速: 1.0ml/min; 检测时间: 30min。

2.3.2 酚酞液相标准曲线的绘制

分别精确量取 0mg/g、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g 稀释至检测范围,依据上述色谱条件检测出峰时间及峰面积。

2.3.3 酚酞样品处理

(1)供试品溶液制备

将待检减肥类保健食品胶囊其 1 颗内容物约 0.045g,置于 100ml 棕色容量瓶中,量取 100ml 甲醇溶解,超声处理 10min 后定容摇匀,取续滤液,即为供试品溶液。

(2)对照品溶液制备:

精密称定 105 $^{\circ}$ C 干燥至恒重的酚酞对照品 10mg,置 100ml 棕色容量瓶中,加入甲醇超声溶解,制备成 100 μ g/ml。精确量取 10ml 的 100 μ g/ml 的酚酞标准溶液用无水甲醇定容到 100ml 容量瓶中制备成 10 μ g/ml。加甲醇适量,超声溶解,加甲醇至刻度,摇匀,即为对照品溶液。

(3)液相加标实验:

取 0.5g 碾碎样品于检测管中,加入 2.0mg/g 酚酞标准溶液 0.5ml,置于 200ml 棕色容量瓶中,取 200ml 色谱甲醇溶解,超声处理 10min 后定容摇匀,取得滤液,即为待检样品加标液 1、待检样品加标液 2、待检样品加标液 3。

3 实验结果

3.1 分光光度法

3.1.1 根据 2015 版药典进行酚酞成分的鉴定实验

(1)将酚酞原溶液与 pH 为 12 的碱性体系混合反应生成的醌式结构物显粉红色,再次滴加碱液变为无色。在分光光度计上 200-900nm 进行光谱扫描,其分别有两个吸收峰,有两个吸收峰 $\lambda=553$ nm, OD=0.214ABS; $\lambda=312$ nm, OD=3.117ABS; 通过与酚酞原溶液出峰条件对比,发现 λ 为 553nm 为酚酞络合物的最大吸收峰,可以通过对比 553 处 OD 的变化值作为判定依据。

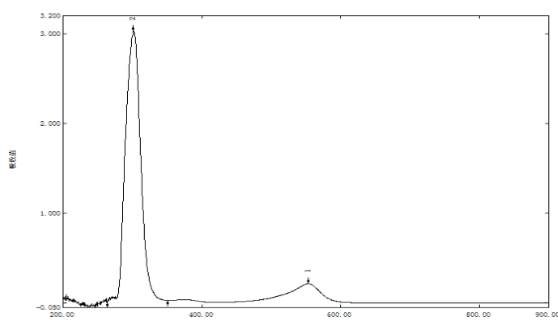


图1 酚酞显色后醌式结构物UV图谱

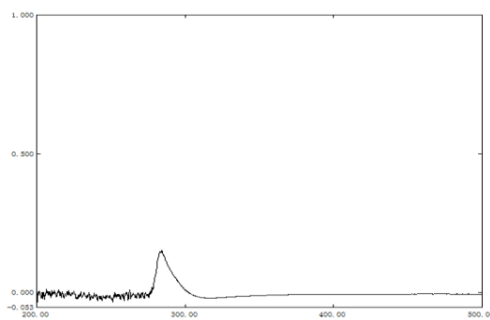


图2 酚酞原溶液UV图谱

(2)取酚酞标准品 38 μ g/ml 的乙醇 (0.01mol/L 的盐酸溶液) 200-500nm 下的光谱扫描, $\lambda=283.6$ nm, OD 为 0.144ABS, 证实酚酞紫外吸收峰为 283.60nm。

3.1.2初步确定酚酞醌式结构物检测实验范围

分别取0mg/g、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g、8.00mg/g稀释6倍后进行标准曲线的绘制,通过对比其OD值的变化区间,初步确定酚酞碱性体系显色后的检测范围。

表1 酚酞浓度与显色醌式结构物OD数据

编号/名称	1	2	3	4	5	6	7
酚酞浓度 mg/g	0	0.5	1	2	3	6	8
醌式结构物 OD	0	0.35	0.604	1.222	1.89	3.62	4.22

通过实验对比,发现酚酞与其在碱性条件下生成的粉红色醌式结构物成正比,以酚酞标准品浓度做横坐标,粉红色醌式结构物 OD 为纵坐标,得到的回归方程为:

$Y=0.603X+0.024$,相关系数为0.999,表明在0-6.0mg/g的酚酞与其粉红色醌式结构物成一元关系,因浓度为6.00mg/g与8.00mg/g显色后OD区分度不大,所以酚酞检测反应的显色反应初步的检测范围为0-6.00mg/g。

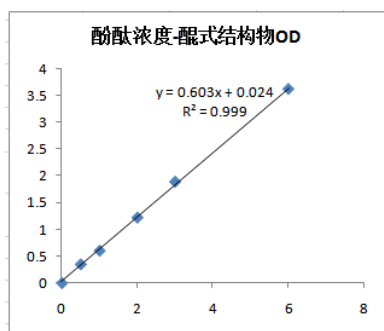


图3酚酞浓度和显色醌式结构物线性关系

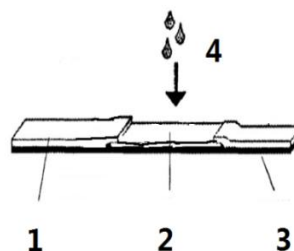


图4 酚酞检测卡示意图

3.2 酚酞检测卡

3.2.1 酚酞检测卡

酚酞检测卡由底板、手柄、酚酞试纸构成。

3.2.2标准色阶图谱的构成

通过将酚酞标准溶液与碱反应生成的络合物变色情况用数码相机拍摄后制备。

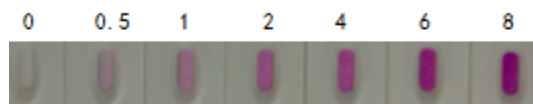


图5 标准色阶图谱

3.2.3酚酞标准曲线的制备

表2 酚酞检测卡显色后在食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪上灰阶色度值

编号/名称	1	2	3	4	5	6
酚酞浓度 mg/g	0.00	0.50	1.00	2.00	3.00	6.00
醌式结构物在检测仪上数值	275.45	359.97	455.18	578.61	692.55	762.83

取酚酞标准溶液0、0.5mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g酚酞各70微升分别滴加到酚酞检测卡上反应15分钟,放置于食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪进行检测:

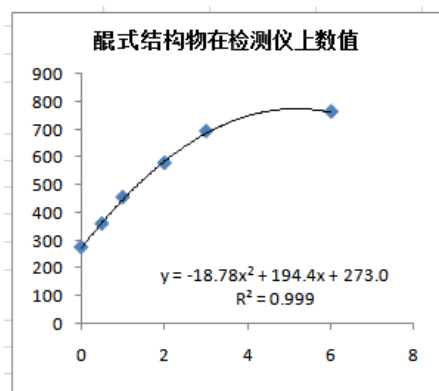


图6 酚酞标液与灰阶色度值线性关系



图7 酚酞检测卡梯度显色情况

在食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪读取灰阶色度值。

通过图6、图7可知，酚酞检测卡检测范围为0-6.00mg/g，检测结果经过目测对比标准色阶图谱可定性，与食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪可进行定量分析。

3.2.4 样品

3.2.4.1 酚酞检测卡样品检测

酚酞检测卡样品检测结果，见表3。

表3 酚酞检测卡检测样品加标情况

编号/名称	含量 mg/g	检测每种类各5组降压胶囊的平均含量 mg/g	CV%
减肥咖啡类 1	1.10	1.15	4.00%
减肥咖啡类 2	1.13		
减肥咖啡类 3	1.20		
减肥咖啡类 4	1.18		
减肥咖啡类 5	1.14		
减肥茶类 1	0.53	0.53	4.39%
减肥茶类 2	0.60		
减肥茶类 3	0.63		
减肥茶类 4	0.58		
减肥茶类 5	0.64		
减肥药片剂 1	1.71	1.69	3.49%
减肥药片剂 2	1.69		
减肥药片剂 3	1.65		
减肥药片剂 4	1.74		
减肥药片剂 5	1.67		

将减肥咖啡、减肥茶、减肥片剂三类的减肥保健食品每种各5个样品用酚酞检测卡进行平行实验，取检测结果平均值，故减肥咖啡类保健食品中含酚酞成分为1.15mg/g,其CV为4.00%；减肥茶保健食品中酚酞成分为0.53mg/g,其CV为4.39%；减肥片剂中酚酞含量为1.69mg/g，其CV为3.49%。

3.2.4.2 三种保健类食品加标实验

酚酞检测卡样品加标检测结果，见表4。

表 4 酚酞检测卡样品加标检测结果

编号/名称	酚酞检测平均含量 (mg/g)	加标值 (mg/g)	加标后测定值 mg/g	去除本底测定值 mg/g	加标回收率%	平均CV%
减肥咖啡	减肥咖啡 1	1.15	2.00	3.15	1.15	3.42%
	减肥咖啡 2			3.22	1.22	106%
	减肥咖啡 3			3.19	1.19	103%
	减肥咖啡 4			3.24	1.24	108%
	减肥咖啡 5			3.19	1.19	103%
减肥茶	减肥茶 1	0.53		2.51	0.51	2.70%
	减肥茶 2			2.57	0.57	108%
	减肥茶 3			2.56	0.56	106%
	减肥茶 4			2.58	0.58	109%
	减肥茶 5			2.55	0.55	104%
减肥药片剂	减肥片剂 1	1.69		3.66	1.66	3.51%
	减肥片剂 2			3.70	1.70	101%
	减肥片剂 3			3.75	1.75	104%
	减肥片剂 4			3.73	1.73	102%
	减肥片剂 5			3.69	1.69	100%

3.3 高效液相色谱方法

3.3.1 酚酞标准品及样品色谱检测条件

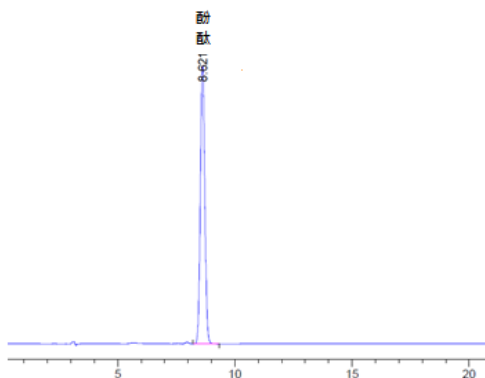


图8 酚酞标液在2.3.3条件下出峰图谱

经实验证实,如图8所示酚酞在高效液相色谱中共检测30分钟,后运行20min,其出峰时间为8.621min,峰面积为243.16,对称因子为0.90。

3.3.2 酚酞液相标准曲线的绘制

分别精确量取0mg/g、0.50mg/g、1.00mg/g、2.00mg/g、3.00mg/g、6.00mg/g稀释至检测范围,依据上述色谱条件检测出峰时间及峰面积。

表 5 酚酞液相标准曲线

酚酞浓度 mg/g	0	0.5	1	2	3	6
液相峰面积	40.22	243.16	450.3	899.22	1320.67	2706.16

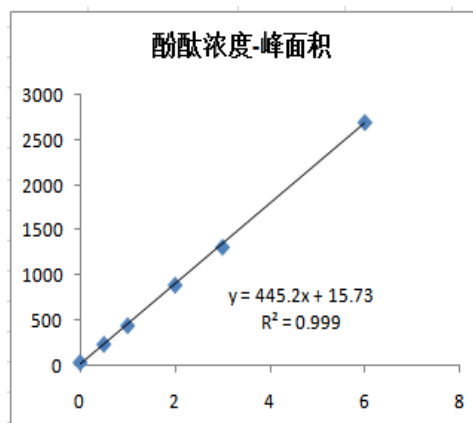


图9酚酞浓度—液相峰面积的线性关系图

以酚酞溶液浓度为横坐标，酚酞在8.63min出峰时间为纵坐标，从图9中可以看出，其呈正比关系建立标准曲线方程，其一元线性方程为 $Y=445.2X+15.73$ ， $R^2=0.999$ 。

3.3.3样品

3.3.1样品测定结果

表6 酚酞液相检测结果

编号/名称	含量 mg/g	检测每种类各 5 组降	
		压胶囊的平均含量 mg/g	cv%
减肥咖啡类 1	1.05	1.11	4.64%
减肥咖啡类 2	1.09		
减肥咖啡类 3	1.14		
减肥咖啡类 4	1.10		
减肥咖啡类 5	1.17		
减肥茶类 1	0.45	0.45	3.00%
减肥茶类 2	0.46		
减肥茶类 3	0.48		
减肥茶类 4	0.40		
减肥茶类 5	0.46		
减肥药片剂 1	1.65	1.67	1.87%
减肥药片剂 2	1.67		
减肥药片剂 3	1.70		
减肥药片剂 4	1.66		
减肥药片剂 5	1.67		

将减肥咖啡类、减肥茶类、减肥片剂类保健食品进行5个样品用酚酞高效液相色谱方法进行平行实验，取检测结果平均值，故减肥咖啡中1.11mg/g，CV为4.64%；减肥茶中0.45mg/g，CV为3.00%；减肥片剂中1.67mg/g，CV为1.87%。

3.3.2加标实验方法

表 7 酚酞液相加标检测结果

编号/名称	酚酞检测平均含量 mg/g	加标值 mg/g	加标后测定值 mg/g	去除本底测定值 mg/g	加标回收率%	平均 CV%
减肥咖啡	1.11	2.00	3.11	1.11	100%	4.12%
			3.09	1.09	98%	
			3.14	1.14	103%	
			3.19	1.19	107%	
			3.17	1.17	105%	
减肥茶	0.45		2.46	0.46	102%	2.55%
			2.49	0.49	109%	
			2.43	0.43	96%	
			2.44	0.44	98%	
			2.48	0.48	107%	
减肥药片剂	1.67		3.60	1.60	96%	3.36%
			3.66	1.66	99%	
			3.69	1.69	101%	
			3.64	1.64	98%	
			3.63	1.63	98%	

如表6所示, 高效液相色谱检测减肥咖啡中酚酞的含量为1.11mg/g, 其加标回收率在98-110%之间, 其平均的CV为4.12%; 减肥茶中酚酞的含量为0.45mg/g, 其加标回收率为95-110%之间, CV为2.55%; 减肥药片剂中酚酞含量为1.67mg/g, 其加标回收率为95-110%之间, CV为3.35%。

4 讨论

如表8所示, 通过采用高效液相色谱方法与酚酞检测卡共同检测降压类保健食品对比发现, 高效液相色谱方法的样品中加标2.00mg/g时, 加标回收率均在95-110%之间, 其CV为2.00-4.00%之间; 硝苯地平检测卡检测加标酚酞2.00mg/g时加标回收率为95-110%之间, 其检测CV为2.50-4.50%之间。

表 8 减肥类保健食品检测结果对比

名称	减肥咖啡	减肥茶	减肥药片剂	加标值为 2.00mg/g 时加标回收率%	三次加标加标值 平均 CV%
检测卡测定浓度 mg/g	1.15	0.53	1.69	95-110%	2.00-4.00%
液相检测浓度 mg/g	1.11	0.45	1.67	95-110%	2.50-4.50%

5 结论

本研究参照 2015 药典方法经过工艺改良制备的酚酞检测卡, 检测卡法鉴定减肥保健食品中的非法添加化学物质酚酞, 是开创了减肥类保健食品快速检测的先河。酚酞检测试纸灵敏度较高可达到 0.5mg/g, 酚酞试纸检测范围为 0-6.00mg/g, 检测时间为 15min, 样品前处理时间与样品检测总时间不超过 30min, 即可与标准色阶图谱比较可定性分析, 又可与食品中危害因子及非法添加药物智能化综合检测仪配合定量的检测。酚酞检测卡可现场直接检测, 针对不同组分的样品, 采用针对性的前处理方法, 避免了快检中容易出现的误检、漏检问题。酚酞检测卡拥有快速、准确、操作简单等特点; 适用于卫生执法现场对保健食品及时检测, 为一线执法提供科学依据。

参考文献

- [1] 甘盛, 韩婷, 李志成, 施晓光, 吴超权. 减肥中成药中非法添加酚酞的拉曼光谱快速检测. 中国实验方剂学杂志, 2014, 11 (1): 20-21.
- [2] 黄诺嘉, 杨文红, 黄奕滨. 减肥产品中非法添加酚酞的检测方法研究. 今日药学, 2012, 15 (12): 1673-1675.
- [3] 胡青, 崔益冷, 王珂, 季申. 减肥类保健食品中非法添加酚酞定性定量检测方法的研究. 中国药理学杂志, 2007, 12 (4): 11-13.

- [4] 袁春晖, 冯家力, 潘振球, 李帮锐. 保健减肥食品中酚酞的测定方法研究. 中华预防医学杂志, 2006, 40 (5) :16-18.
- [5] 马微, 王海波, 马强, 付丽, 李立, 唐英章. 减肥保健食品中非法添加酚酞和西布曲明的同时检测. 食品科学, 2010, 31 (4) :23-24.
- [6] 黄诺嘉, 杨文红, 黄奕滨. 减肥类中成药、保健食品、食品中非法添加酚酞、西布曲明等化学成分的快筛检测方法研究. 食品与药品, 2011, 13 (2) :114-117.
- [7] 姚莉, 陈景国, 陈冬. 减肥类保健品中非法添加化学药品的快速筛查. 淮海医药, 2012, 30 (6) :110-111.
- [8] 黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 邓欣, 罗辉泰, 朱志鑫, 林晓珊. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定保健品中非法添加的六种减肥化学品. 分析测试学报, 2013, 32 (6) :12-15.
- [9] 毛庆, 张小松. 中成药和保健品中非法添加减肥类化学物质的快检. 中国药业, 2010, 19 (18) :41-42.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部). 北京: 北京医药科技出版社, 2015 版: 附录 XC

作者简介: 姚世平, 硕士, 高级工程师; 北京倍肯恒业科技发展股份有限公司, E-mail: wilsonyao@biochemgroup.net

***通讯作者:** lixinle@biochemgroup.net

基于胎儿心电技术的胎心率参数提取及研究*

李广飞^① 张松^① 杨琳^{①*} 王妍^② 李淑芳² 杨益民^① 李旭雯^① 郝冬梅^① 张蕾^③ 徐明洲^④

*基金项目: PXM_2016_014204_500079 中小学生体育运动负荷监测与评价(省部级/教育)

*通讯作者: yanglin@bjut.edu.cn

①北京工业大学生命科学与生物工程学院(李广飞、张松、杨琳、闫亭亭、杨益民、李旭雯、郝冬梅) 北京 100124

②首都医科大学附属北京妇产医院产科(陈奕、田宁、马莹) 北京 100026

③北京易思医疗器械有限责任公司(张蕾) 北京 100152

④北京航天长峰股份有限公司(徐明洲) 北京 100071

[摘要]目的: 研究基于胎儿心电(fetal electrocardiogram, FECG)提取技术的便携式胎儿/母体心率记录仪 Monica AN24 进行连续监护获得的胎儿心率数据, 提取并分析胎儿微小胎心变异占比与基线均值。**方法:** 将 42 例孕 36-40 周的单胎孕妇纳入本研究, 使用胎儿/母体心率记录仪连续记录 4 小时胎儿心率数据, 应用 MATLAB 提取出胎心率(Fetal heart rate, FHR) 参数, 对无应激试验(non-stress test, NST) 分组不同胎儿的胎心率参数进行组间比较并研究其与孕周的关系。**结果:** NST 反应型胎儿的微小变异占整体变异的 28.3%, NST 可疑型胎儿则为 41.9%; NST 反应型胎儿的心率基线为 130.1 次/min, NST 可疑型胎儿为 135.1 次/min。且微小变异占比与心率基线两个参数在两组之间具有统计学差异($p < 0.05$)。两组胎儿的微小变异占比随孕周增大而有升高趋势。**结论:** NST 可疑型胎儿微小变异占比与基线高于 NST 反应型胎儿, 提高实验数据量, 准确找到区分两组胎儿的阈值可降低假阳性率, 减少不必要的临床干预。

[关键词] 胎儿心电技术; 无应激实验; 微小变异占比; 基线

Analysis of fetal quiet sleep cycle and extracting features based on fetal electrocardiogram

Guangfei Li, Song Zhang, Lin Yang, Yan Wang, Shufang Li, Yimin Yang, Xuwen Li,

Dongmei Hao, Lei Zhang, Mingzhou Xu

[Abstract]Objective This study aimed to analyze minimal variability ratio (MVR) and baseline based on fetal electrocardiogram (FECG). **Methods** According to the inclusion criteria (singleton, 36-40⁺⁶ weeks), 42 cases were enrolled in this study. Monica AN24 was used to record continuous 4 hours fetal heart rate data, extracting FHR features to compare different non-stress test (NST) types and analyzing the relationship between FHR features and gestational age (GA). **Results** NST reaction type fetuses' MVR was 28.3% and NST suspicious type fetuses' MVR was 41.9%. NST reaction type fetuses' baseline was 135.1 beats per minute (bpm) and NST suspicious type fetuses' baseline was 130.1. At the same time, MVR and baseline had significant difference between two types. All fetuses' MVR had an increasing trend with GA rising. **Conclusion** NST suspicious type fetuses' features were higher than NST reaction type and increasing the number of subjects, finding suitable threshold value would help lower false positive rate and reducing unnecessary clinical intervention.

[Keywords] Fetal electrocardiogram; NST; MVR; baseline

0 背景

现阶段产前胎心监护的手段主要有超声多普勒监护法、胎儿心电信号监护法和由胎儿心脏活动引起的磁场成分变化的胎心磁图法。其中胎心磁图法需要特殊的防护环境以防止其他磁场（如地球自有磁场）干扰^[1]，目前仍处在科研阶段。多普勒电子胎心监护（Electronic Fetal Monitoring, EFM）在临床广泛应用，基于EFM的无应激试验（non-stress test, NST）是一种普遍的评估胎儿宫内状态的手段。NST的方法：孕妇取坐位或侧卧位，一般20min。由于胎儿存在睡眠周期，NST可能需要监护40min或更长时间^[2]。然而，长时连续的胎心监护能够更好的发现胎儿在子宫内的早期缺氧情况^[3]。除此之外，临床上长时间使用超声多普勒技术的安全性仍然存在疑问^[4]。

近年来，基于胎儿心电（Fetal Electrocardiogram, FECG）信号提取技术的胎儿/母体心率记录仪Monica AN24可连续24小时对母胎进行监护^[5, 6]。经实验，母亲腹部胎儿心电的提取技术比超声多普勒技术具有更高的准确率^[7]，由于该技术并不严格要求孕妇固定体位，使得使用舒适度得到提高。

胎儿心率变异是交感神经与迷走神经相互作用的结果，交感神经兴奋使心率加速，迷走神经兴奋使心率减慢，两者不断协调产生不同的瞬时胎心率，反映在监护图上即为胎儿心率变异^[8]。胎儿心率变异减少被认为是胎儿宫内血管储备能力下降，存在酸中毒状态的重要指标^[9]。

1 研究方法

1.1 胎心率参数

本研究纳入了两个参数，分别是微小胎心变异在整体变异中所占比例（minimal variability ratio, MVR）和胎心率基线均值。

电子胎心监护过程中，良好的数据记录质量（Recording Quality, RQ，定义记录质量 $RQ=100\% - \text{数据损失}$ ）对临床医生识别监护图以及系统对胎儿心率原始数据的后续处理具有十分重要的意义。根据 Dawes 等人的研究^[10]，当胎心监护数据记录质量 $RQ \geq 60\%$ 时表明数据记录成功，低于这一指标时，过多的胎儿心率信息损失易导致医生对监护图的误判。故在提取胎心率参数之前需要预处理，首先将监护仪器导出的.csv 文件中数据拆分成定长为 1 分钟的片段，再利用 MATLAB 软件选出数据记录质量 $RQ \geq 60\%$ 的部分。

微小变异是指振幅波动 ≤ 5 次/min，是可直观定量的^[11]。James 等人将一分钟的心率信号分成了 16 段，即每段 3.75 秒，然后求每段信号的心率变异^[11]。本研究中也采用这种方法，在 3.75 秒数据内的心率值有 15 个（1 秒钟内 4 个胎儿心率值），每段的胎心变异（Fetal Heart Rate Variability, FHRV）为该段中胎儿心率最大值与最小值的差。胎心变异值在 $0 \leq \text{FHRV} \leq 5$ 范围内时，则属于微小变异（minimal variability, MV）。则微小胎心变异在整体变异中所占比例 MVR 定义如下：

$$\text{MVR} = \frac{\text{num}(\text{MV})}{\text{num}(\text{FHRV})} \quad (1)$$

$\text{num}(\text{MV})$ 为微小变异个数， $\text{num}(\text{FHRV})$ 为所有胎心变异个数。

胎心率基线是在 10min 内胎心波动范围在 5 次/min 的平均胎心率，并除外加速、减速和显著变异的部分。正常胎心基线范围是 110-160 次/min^[11]。通过将原始心率信号折叠成第 1 分钟到第 10 分钟、第 2 分钟到第 11 分钟、第 3 分钟到第 12 分钟等多个 10 分钟长度的心率信号片段，并计算出每个 10 分钟长度信号的对应基线值，则第 1 分钟、第 2 分钟、第 3 分钟等每分钟都会计算出一个基线值。

基线均值为选取监护时间内信号质量最好的时间段的基线平均值，选取时间为 2:00。

1.2 样本选择及数据采集

随机选取 2014 年 7 月至 2015 年 7 月在北京大学第三医院入院孕妇 42 例，均为 36-40⁺6 孕周，单胎，胎儿无染色体异常或畸形，其中 NST 正常型 20 例，NST 可疑型 22 例。使用胎儿/母体心率记录仪 Monica AN24（Monica Health care Ltd, Nottingham, UK）进行胎儿心率信号记录，监护时间从 22:00 至次日 2:00，监护期间不限制孕妇活动。粘贴在孕妇腹部的五枚一次性电极传感器可收集到孕妇心电信号和胎儿心电信号，经处理后分别得到孕妇与胎儿心率^[12]。使用砂纸处理皮肤，使皮肤阻抗降至 5K Ω 以下。电极片放置方式如图 1 所示。



图 1.电极片放置

Figure 1.Placement of electrode sheet

纳入本研究的 42 例孕妇，基本信息见表 1。统计软件使用 SPSS 20.0，组间差异分析采用独立样本 t 检验，结果显示 NST 正常组与 NST 可疑组的孕妇年龄与孕周并无显著性差异 ($p>0.05$)。

表 1 42 例孕妇基本信息

Table 1. The basic information of pregnant women

	NST正常型	NST可疑型	P值
年龄	30.53±2.98	31.15±3.98	0.600
孕周	38.50±1.67	37.68±1.46	0.101

2 结果

如表 2 所示，微小变异占比 MVR 单位为 1%，胎心率基线均值单位为 bpm (beats per minute)。NST 可疑组的两个参数均大于 NST 正常组，且两组之间具有统计学差异 ($p<0.05$)。由计算机提取的参数相比临床医生的主观判读更加具有客观性。NST 可疑组的 MVR 比正常组多 13%，基线均值比正常组高 5bpm。

正常组与可疑组的 MVR 在随孕周增大过程中有升高趋势，36 周到 40 周正常组的 MVR 都明显低于可疑组，结果如图 2 (微小变异比例 MVR 与孕周关系)。基线均值随孕周变化没有明显趋势，正常组的基线均值低于可疑组，结果如图 3 (基线均值与孕周关系)。

表 2 胎儿安静睡眠参数组间对比 (正常 20 例，可疑 22 例)

Table 2.Fetal quiet sleep cycle features in different groups

	NST正常型	NST可疑型	P值
微小变异占比	28.3±10.3	41.9±10.6	0.001
基线均值	130.1±6.0	135.1±8.5	0.035

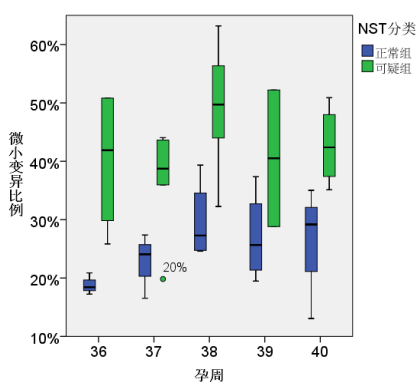


图 2 微小变异比例随孕周变化

Figure 2.Trend of MVR in GA

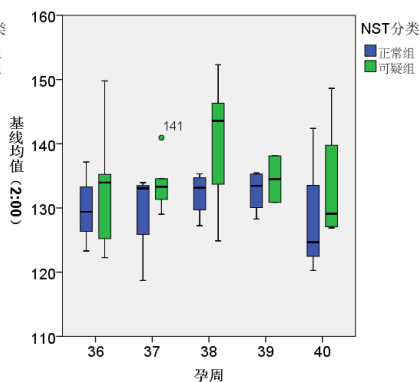


图 3 基线均值随孕周变化

Figure 3.Trend of baseline mean in GA

3 讨论

本研究利用 MATLAB 软件提取计算了胎儿心率微小变异比例及胎心率基线两个参数,分析了 NST 正常组与 NST 可疑组的 MVR 与胎心率基线的组间差异及其与孕周的关系。研究发现, NST 可疑组的 MVR 和胎心率基线均大于 NST 正常组,并且两组之间具有显著性差异。通过 SPSS20.0 统计软件绘制箱式图发现,在孕周 36 周-40 周, MVR 随孕周增大有一定上升趋势。

Peter 等人研究表明,随着孕周的增大,胎儿心率逐渐下降,胎儿心率变异逐渐增多,这种现象与胎儿的心血管系统与神经系统逐渐发育成熟相关^[13]。Nikhil 等人研究心率变异的频域及熵参数,发现相同经后孕龄(Post-Menstrual)的健康胎儿和早产儿相比,健康胎儿频域心率参数及熵参数高于早产儿;并且两者的频域心率变异参数都随着孕周有上升趋势,反映了交感神经与副交感神经的平衡能力提高^[14]。

两组胎儿的 MVR 随孕周增大而增大,说明胎儿发育逐渐成熟;NST 可疑组胎儿的 MVR 高于正常组,反映了可疑组胎儿的心血管发育状况及交感神经与副交感神经的平衡能力劣于正常组胎儿。

目前应用于临床的超声多普勒监护技术具有一定的局限性。孕妇、胎儿活动影响超声多普勒技术获取的胎儿心率质量,长期监护需要频繁的更换探头位置,孕妇需长时间保持同一体位,而基于 FECG 技术的胎儿/母体心率记录仪在一次佩戴后可连续 24 小时对胎儿心率进行实时监护,在减少医护人员的工作量,提高了孕妇舒适度的同时,便于研究人员计算机化的对长时数据进行分析。

4 结论

本研究利用 FECG 技术的胎儿/母体心率记录仪 Monica AN24 获得胎儿心率信号,并借助 MATLAB 软件提取分析胎儿心率微小变异比例和基线均值两个参数,两个参数在 NST 正常组与可疑组之间有显著性差异。胎儿 MVR 随着孕周增大而有一定程度升高,且 NST 可疑组高于正常组。

参考文献

- [1] Lange DS, Leeuwen PV, Geue D. Influence of gestational age, heart rate, gender and time of day on fetal heart rate variability [J]. Medical & Biological Engineering & Computing, 2005, 43(3): 481-486.
- [2] 杨慧霞,李笑天,贺晶.电子胎心监护应用专家共识[J].中华围产科学,2015,18(7):486-490.
Yang Huixia, Li Xiaotian, He Jing. Electronic fetal monitoring applications and experts consensus [J]. Chin J Perinat Med, 2015, 18(7):486-490.
- [3] Kuehnert M, Hellmeyer L, Stein W, et al. Twenty-four-hour CTG monitoring: comparison of normal pregnancies of 25-30 weeks of gestation versus 36-42 weeks of gestation[J]. Archives of Gynecology and Obstetrics, 2007, 275(6): 451-460.
- [4] de Vries J I, Visser G H, Prechtl H F. The emergence of fetal behaviour. I. Qualitative aspects[J]. Early human development, 1982, 7(4): 301-322.
- [5] Sato N, Hoshiai T, Ito T, et al. Successful detection of the fetal electrocardiogram waveform changes during various states of singletons[J]. Tohoku J Exp Med, 2011, 225(2): 89-94.
- [6] Wheeler T, Murrills A, Shelley T. Measurement of the fetal heart rate during pregnancy by a new electrocardiographic technique[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1978, 85(1): 12-17.
- [7] Cohen W R, Ommani S, Hassan S, et al. Accuracy and reliability of fetal heart rate monitoring using maternal abdominal surface electrodes[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2012, 91(11): 1306-1313.
- [8] 刘立卫,张爱群,谢佳.胎心基线变异的意义[J].临床合理用药,2014,7(9):31.
Liu Liwei, Zhang Aiqun, Xie Jia. The significance of fetal baseline variation.
- [9] 蒋宇林,边旭明,高劲松.电子胎心监护解读新进展[J].实用妇产科杂志,2012,28(3):163-166.
Jiang Yulin, Bian Xuming, Gao Jinsong. The new progress of electronic fetal monitoring.
- [10] Dawes G S, Houghton C R, Redman C W, et al. Pattern of the normal human fetal heart rate[J]. Br J Obstet Gynaecol, 1982, 89(4): 276-284.
- [11] James P, Mary M, Redman CWG. A computer system for the numerical analysis of nons-tress tests[J]. American Journal

of Obstetrics & Gynecology, 2002, 186(5):1095-1103.

[12] Pieri J F, Crowe J A, Hayes-Gill B R, et al. Compact long-term recorder for the transabdominal foetal and maternal electrocardiogram[J]. Med Biol Eng Comput, 2001, 39(1): 118-125.

[13] Van LP, Cysarz D, Edelhauser F, Gronemeyer D. Heart rate variability in the individual fetus [J].Autonomic Neuroscience Basic & Clinical, 2013, 178(1):24-28.

[14] Padhye NS, Verklan MT, Brazdeikis A, Williams AL, Khattak AZ. A comparison of fetal and neonatal heart rate variability at similar post-menstrual ages [J]. International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society, 2008, 30:2801-2804.

(医学装备与技术教育培训分会供稿)

动物气溶胶吸入暴露装置的研制

李劲松^{①*} 杨文慧^① 何春雷^② 王洁^① 李金忠^② 胡凌飞^① 李娜^①

①军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室 北京 100071

②青岛众瑞智能仪器有限公司 青岛 266101

【摘要】目的：根据吸入药物治疗、疫苗气溶胶免疫和吸入毒理等研究和评价的需要，研制出一种可进行包括药物、疫苗、微生物气溶胶、PM_{2.5}粒子、纳米粒子等气溶胶动物吸入暴露的新装置，该装置具有动物吸入暴露、防护功能，以及对实验过程暴露装置的压力、温湿度、含氧量实时监测的功能。**方法：**根据实验动物（包括小鼠、大鼠和豚鼠等）的大小、呼吸量和一次实验的动物数量，以及气溶胶均匀性等要求，设计出了动物气溶胶吸入暴露系统；根据实验室生物安全和防护的要求，设计出了暴露装置的负压隔离防护系统；该装置进行性能测试验证。**结果：**经实验测试，该装置性能达到了相关标准的要求。

【关键词】气溶胶；实验动物；吸入暴露设备；设计原理

Development of an animal exposure apparatus to aerosol inhalation

LI JIN-SONG, YANG Wen-hui, HE Chun-lei, et al

【Abstract】 Objective: A new animal aerosol exposure apparatus meeting the requirements of inhalation toxicology investigation for drug aerosol, vaccine aerosol, microbiology aerosol, PM_{2.5} particles and nanoparticles has been developed. The apparatus has high qualified insulation blocking system, aerosol exposure system and realtime monitoring system for pressure, temperature, humidity, oxygen concentration. **Methods:** According to the size, respiratory volume, quantity of the experiment animal (including mice, rats and guinea pigs etc) and aerosol homogeneity, the animal aerosol exposure system has been designed. According to the requirement of laboratory biosafety and protection, the negative pressure protection system has been designed. The performance of the apparatus have been tested and validated. **Conclusion:** The performance of the apparatus is according to relative standards by comparing with the testing results.

【Keywords】 Aerosol; Animal exposure; Inhaled exposure apparatus; Design principle

药物气溶胶吸入治疗、疫苗吸入免疫及各种吸入毒理学研究都需要一个能够进行定量和定性研究的动物气溶胶吸入暴露技术平台，该平台的核心技术和设备就是实验动物气溶胶吸入暴露设备。目前，大多数实验室的气溶胶吸入暴露均采用实验动物全身气溶胶暴露技术和设备，由于全身暴露存在消化道、破损皮肤暴露等多途径暴露的缺陷，研究人员越来越希望使用动物呼吸道吸入暴露系统。动物气溶胶吸入暴露装置的技术复杂，难以统一技术标准，国外高级研究机构均自行设计试制动物气溶胶吸入暴露系统。本项目建立了动物气溶胶吸入暴露技术，研制了气溶胶暴露设备，满足动物气溶胶吸入暴露研究的需要。

动物气溶胶吸入暴露装置由气溶胶动物吸入暴露系统和负压隔离防护系统两部分构成。

1.1 气溶胶动物吸入暴露系统的设计原理

实验动物气溶胶吸入暴露是将动物的口鼻暴露在特定粒径范围内气溶胶环境下，通过动物自主呼吸吸入气溶胶完成吸入途径暴露的实验过程。气溶胶吸入暴露系统根据功能划分为五个子系统设计：动物暴露腔、气溶胶发生与传输、暴露腔环境参数监控、空气净化系统和系统控制等五个子系统。

1.1.1 动物暴露腔子系统设计

该子系统是气溶胶动物吸入暴露系统的核心，由实验动物固定舱、气溶胶管道、气溶胶室三部分构成，动物在吸入暴露时被固定于该系统中，经口鼻主动吸入气溶胶。

动物暴露腔可以容纳 18~30 个动物同时吸入暴露，分为上中下三层。每一层及整个暴露腔可以旋转，便于操作。

动物固定舱采用透明医用钢化玻璃材质，方便观察，可高压灭菌。设计了橡胶塞密封结构，将固定舱插入暴露装置前，固定舱与暴露装置需同时打开橡胶塞，然后插入鼠仓，实现固定舱与暴露装置间的气体交换。

1.1.2 气溶胶发生与传输子系统设计

设计新型气溶胶发生器。在喷气口高速气流的作用下，菌液喷出形成负压，把发生器里的菌液吸至喷嘴处，又被喷气口高速气流碎裂或分散成无数的气溶胶粒子，经喷雾口喷出。新型气溶胶发生器有两个外接口，一个是连接气源的供气接口，另一个是注液和喷雾两用接口。

1.1.3 暴露腔环境参数监控

暴露腔中的温度、湿度、压力、氧气、二氧化碳稳定和变化，直接影响受试动物的生理状态，进而影响实验结果。为了保障动物实验过程中温度、湿度、压力、氧气、二氧化碳的稳定，我们引入了各种因素监测传感器，传感器的设计和规格均适用于动物暴露系统，通过自动传输和储存测量值的专用接口进行电子数据的采集。

1.1.4 空气净化系统子系统

暴露腔中排出的空气含有高浓度的实验气溶胶（如生物气溶胶、药物气溶胶、其他成分气溶胶等），负压隔离防护舱排除的空气含有低浓度的实验气溶胶，这些气溶胶对实验人员和实验室环境都是有害的，必须要严格控制 and 无害化处置的。因此，在这两个空气排出口后、排风风机之前设置一道高效粒子过滤器，必要时可以设置两道高效粒子过滤器，使排除的空气得到净化处置，实现无害化。

1.1.5 系统控制子系统

气溶胶动物吸入暴露系统是由五个子系统构成的，每一个子系统之间的相互协调、平衡，才能保障整个系统的可靠运行，完成动物的吸入暴露实验。因此，系统控制子系统的设计充分考虑了动物暴露腔的温度、湿度、氧含量、压力等因素，气溶胶发生与传输的喷雾流量、喷雾压力、等因素，空气净化系统启动时间、净化时间等因素。

1.2 负压隔离防护系统的设计原理

负压隔离防护系统是为了操作人员及其周围环境的安全，具有负压、气密隔离、空气自循环消毒净化的一种生物安全防护系统。

负压隔离防护系统主体样机的设计充分考虑了使用者操作的便捷性和安全性。

外壳采用双层结构，内胆为 316 不锈钢一体成型结构，全部采用优质不锈钢拉丝板材焊接完成，设计大直径折弯圆角，方便清洗消毒，同时避免气流死角，保障负压隔离防护系统内部无菌环境，防止实验过程中交叉污染的可能。外部采用冷轧钢板喷塑。

采用负压双层箱体保护结构，且整个回风通道相对于外界始终处于负压状态，这样能有效地将污染气溶胶密封在负压隔离防护系统内，使负压隔离防护系统进一步对操作人员和环境的保护构成了有效的安全保障系统。采用鸥翼式双开门设计，设计了上开门结构，磁吸式密封胶条密封，设计失压报警功能保证密封安全。方便用户操作。

负压隔离防护系统设计有高效过滤排风系统和光氢离子消毒系统。高效过滤排风系统可将操作区域内的污染空气经高效过滤器过滤净化达到无害处置后排放，光氢离子净化器不仅能够分解有机物为二氧化碳与水；还具有较高的杀灭微生物的功能。

2 动物气溶胶吸入暴露装置的技术特点

(1) 提供最多 18 只大鼠、小鼠或豚鼠的单一浓度吸入式暴露。

- (2) 气溶胶发生器喷雾流量大小可设定, 气溶胶分布均匀, 浓度稳定。
- (3) 前后鸥翼式双开门结构, 可两位实验人员面对面同时操作。
- (4) 暴露装置可旋转设计, 暴露装置结构设计合理、可靠、拆装方便。
- (5) 管路、气路设计合理、无外漏, 外排气体 2 次过滤, 外排气体达到标准排放级别。
- (6) 防火、防腐材料, 光滑平整、无死角, 容易清洗。
- (7) 内置 LED 照明系统。
- (8) 嵌入式高速工业微电脑控制, 10 寸工业级高亮度彩色触摸显示屏。
- (9) 配置负压隔离防护系统安装支架, 配备可锁止脚轮。方便挪动。
- (10) 用户密码保护, 故障检测自动保护。USB 接口, 支持 U 盘数据转存。
- (11) 内置风压控制, 带有失压报警功能。负压稳定, 噪音小。
- (12) 预留多种接口, 适合外接多种设备如 (消毒设备)。

3 结论

本项目研发出一款功能完善的动物气溶胶吸入暴露装置, 该装置具有负压隔离防护系统, 以及压力、温湿度、含氧量实时监测功能, 创新性地引入了可传递式鼠仓和暴露装置主体旋转平台, 达到行业领先水平。

动物气溶胶吸入暴露装置对微生物气溶胶的平均过滤效率 $\geq 99.99\%$, 对模式微生物气溶胶的消毒效果均为 100%。表明该装置对实验人员和实验室环境安全防护性能优越。

动物气溶胶吸入暴露装置气溶胶分布均匀, 粘质沙雷氏菌气溶胶浓度在上、中、下三层之间无明显差异, 总粒子数的采样结果为三层之间有轻微差异, 表明该装置气溶胶分布均匀, 满足单一浓度的实验需要。

综上所述, 动物气溶胶吸入暴露装置可广泛应用于呼吸道传染病的吸入治疗、吸入免疫、气溶胶吸入毒理等领域的研究和实验评价。

项目来源:“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”国家科技重大专项(2012ZX10003009/05)“气溶胶暴露装置的研制及在结核病治疗中的应用”

通讯作者: lij-s@163.com

(实验室装备与技术分会供稿)

应用于生化分析仪的辅助诊断专家系统

甘宜梧 王波 谢清华

山东博科生物产业有限公司

[摘要] 文章将生化分析仪与专家系统结合, 他能够对仪器检测出来的各种数据自动进行综合分析, 得出理论上最为合适的结论以及各种提示, 家系统知识库部分与数据库相结合, 而解释机制采用的是神经网络算法。

[关键词] 生化分析仪; 专家系统; 知识库; 解释机制; 神经网络

0 引言

当前我国医疗资源区域不平衡, 医疗资源在城乡差距比较大, 加上医生工作量大, 水平参差不齐, 误诊错诊并不罕见, 有时候会严重的耽误治疗时机。本文旨在从算法上设计一种用生化分析仪分析出来的数据进行辅助诊断的专家系统, 既传承和积累了专家长期实践的丰硕成果, 有可缩小地区间医疗卫生水平差距。

目前在全球一体化的背景下, 检验仪器设备的发展趋势也是达到同类型仪器检测的标准化, 我国临床检验的准确性溯源长期以来一直未能得到解决, 使用同类试剂经常出现不同的检验结果, 除了对操作人员素质、试剂质量等进行控制外, 对于各种不同厂家、不同型号的同类型仪器, 采用相同的技术标准非常重要, 这使得各个实验室的数据具

有可比性,目前已有不同等级的质控质控和部门来统一各实验室结果[2]。这使得专家系统应用于体外诊断设备成为一种可能性和以后发展趋势。

生化分析仪是临床检验中经常使用的重要分析仪器之一,它通过对血液或者其他体液的分析来测定各种生化指标:如转氨酶,血红蛋白,白蛋白,总蛋白,胆固醇,葡萄糖,无机磷,钙等。结合其他临床资料,进行综合分析,可以帮助诊断疾病,对器官功能做出评价,鉴别病发因子以及决定今后的治疗基准等。

计算机的迅速发展极大的促进了人工智能的进步,其中最活跃分支就是专家系统。专家系统在医学领域应用的最为广泛。医学专家系统是一个智能计算机程序系统,其内部含有大量的医学专家水平的知识与经验,能够利用人类专家的知识解决问题的方法来处理该领域问题。其性能体现在两个方面,一是拥有大量的专业知识,二是运用专业知识进行推理的能力,因此知识库和推理机制是专家系统的根本。

1 设计系统概要

专家系统主要包括人机接口,推理机,解释程序,知识获取程序,综合数据库和知识库模块,各模块之间的关系如图1所示。

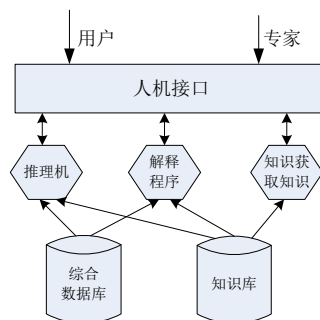


图1 专家诊断系统系统结构

人机接口: 数据库中知识的管理,专家系统的使用以及解释的获得都通过人机接口。

推理机: 对用户提出的问题按某种策略从知识库中选择合适的知识进行推理,给出专家级的答复。

解释程序: 用于人们易于理解的方式解释自身的推理过程。

知识获取程序: 负责知识库的添加,修改,删除和查询;以及对知识库中的知识进行一致性和完整性的检查。

综合数据库: 包含推理的原始事实和推理的中间过程。

知识库: 存储大量的领域专家的知识在数据库中,作为推理的依据,是专家系统进行问题求解的基础。

2 主要部分设计

2.1 知识库的表示与设计

知识表示采用产生式作为知识的表示形式,利用关系数据库描述知识可充分的利用数据库便于查询、编辑及快速处理海量资料的优点。一般将人类专家的知识表示成“如果条件,则结论”的形式,其一般表示形式如下:

IF <条件 1> AND/OR <条件 2> AND/OR AND/OR <条件 n>
THEN <结论>

这种表示方法的含义是如果<条件 1><条件 2>.....<条件 n>满足语句的布尔表达式,则有结论。人们解决实际问题的经验和方法有相当大的一部分可以用这种方式表示。

基于数据库的知识表示采用关系模式来描述知识,为了使知识的表达规范化,约定知识的条件和结论中所包含的断言用合取连接,而对于析取的断言可用两条规则表示。例如:

IF A \vee B THEN C \longrightarrow IF A \wedge \neg B THEN C ,
IF B \wedge \neg A THEN C

IF A THEN C \vee D \longrightarrow IF A THEN C \wedge \neg D, IF A THEN D \wedge \neg C

通过这种方式的转换,实现了把网状的知识表示成线性的表示形式,以适应关系数据库的表示与存储。

知识库是在数据库中创建和存储的,知识库包含事实库和规则库,事实库用来存放事实性数据如症状,结论等,规则库也就是专家系统的知识,用来求解问题的各种规则的集合。在建立事实库时,将所有的条件症状和结论疾病名称存储在事

实库中,并用一个编号唯一标志。这样做的优点是,当规则库具有庞大的数据量时,可以建立有效的索引加速查询和推理过程。我们以生化分析仪比较经常检查的肝功为例说明,如表 1 所示

表 1 ALP 事实库描述

名称	数据类型	说明
S_NO	数字	2
S_Name	文本	碱性磷酸酶(ALP)
Feature	文本	碱性磷酸酶几乎存在于人体的各个组织中,以骨骼、肾脏和肝脏中含量较多。其病理性变化表现在:升高:阻塞性黄疸、急慢性黄疸性肝炎、肝癌、纤维性骨炎、佝偻病、骨转移癌等。降低:呆小症、维生素 C 缺乏症等。
Upper	数字	135U/L
Lower	数字	45U/L

规则表中,一条规则对应多个事实号,从疾病诊断的角度看,即一种疾病对应多种症状,如表 2 所示。在规则表中 Rule_No,Fact_No,Type,共同组成主键,唯一标志一条规则。CF 为可信度值,由于在推理中反复使用,其值对于相同的病历有一定的指导意义,在系统分析改进的过程中,通过分析值来提高推理的准确性。后面再加个规则转化表把规则库中所有的规则进行转化,使每条规则成为一条便于理解的知识自然语言描述形式。“规则前提”即该规则所有前件事实的自然语言描述的组合。规则结论即该规则的结论的自然语言描述。

表 2 规则表描述

名称	数据类型	说明
Rule_No	文本	编码(1 为血脂类检查项目,2 为肝功类检查项目,3 为心肌酶谱检查项目,4 为肾功检查项目)
Fact_No	数字	事实数字(比如 ALP 对应阻塞性黄疸,肝癌等的)
Type	文本	0 为规则前提 1 为规则结论
CF	文本	规则可信度(用户回答或者推理得到 0 为否 1 为是)

2.2 推理机制

不管是传统的靠符号推理的专家系统,还是神经网络都有其局限性。专家系统的特色在于知识的逻辑推理,神经网络的长处在于知识获取,专家系统和神经网络在很多方面具有互补性。一般说,专家系统在宏观上模拟人的知识推理能力,而神经网络则是在微观上模拟人的认知能力,因此研究利用神经网络改造传统的专家系统,并在此基础上进行改进,将神经网络和专家系统技术有机结合,对集成系统的研究进行尝试具有重要意义。

我们采用误差反向传播训练算法(简称 BP 算法)如图 2 所示。误差反传算法的主要思想是把学习过程分为两个阶段:第一阶段(正向传播过程),给出输入信息通过输入层经隐含层逐层处理并计算每个单元的实际输出值;第二阶段(反向过程),若在输出层未能得到期望的输出值,则逐层递归地计算实际输出与期望输出之差值(即误差),以便根据此差值调节权值。

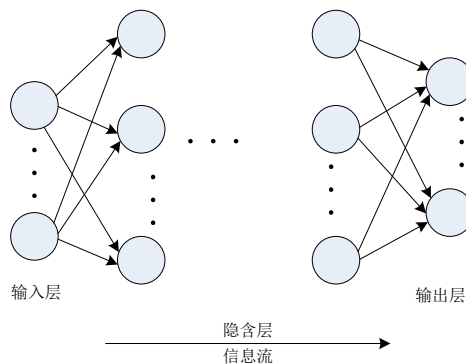


图 2 BP 算法

我们简单的以肝功为例做下说明,选取 ALP,GGT,ALT 等 3 项指标数据作为神经网络的输入单口。ALP,GGT,ALT

相对于正常人的上升或者下降是有不同的疾病引起的,比如 ALP 的病理表现为:升高阻塞性黄疸,急慢性黄疸性肝炎,肝癌等。降低:呆小症,维生素 C 缺乏症等,这些病症都是隐含层。阻塞性黄疸会造成 ALP 的升高同时会使 GGT 的活性显著增高,ALT 的活性也会增高输入。但是如果有某种癌症也是这三种指标同时上升,我们就可以反向推理根据误差判断是那种疾病。数据由开关量“0”和“1”表示,有症状为 1,无症状为“0”。这样我们通过对隐含层的匹配情况得出结论。

系统对于专家建造的网络的隐层数及隐层节点数的默认值,为了提高网络的性能,系统提供专家手动修改隐层数及其节点数的机会,专家可以根据系统提示的默认值,在隐层节点数的基础上加减其数量,以此得到最好的检测效果。

3 总结和展望

本文旨在设计生化分析仪检测出结果后的辅助诊断系统,给医生一些建设性的建议,希望能够提醒启发医生,尽量减小主观原因产生的错误。医学专家系统的建造为医学专家知识和经验的长期保存和运用提供了强有力的手段,借助系统提供的病理存储管理功能,可为医学专家知识和经验的发展鉴定可靠的基础。本文只是将专家系统与生化分析仪结合,相信以后会有更多医疗设备与专家系统结合,为医生提供更加专业的建议,将专家的经验提供更多的病人,帮助他们得到更好的治疗。

参考文献

- [1] 董德威,赫博.基于 SQL Server 数据库和 C++实现专家系统外壳[J].开发应用,2008,24-2.
 - [2] 刘杰,徐英,井雨.医疗器械发展的新方略第 60 届国际医疗器械博览会见闻.2008.
 - [3] 俞思伟.医学专家系统的设计原理与实现方法[J].医学信息,2002.6 15-6.
 - [4] 魏世成,王翰章.医学专家思维的计算机模拟[J].计算机应用,1990,4.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

用于全自动酶免的超声法液面探测系统

甘宜梧 郭宣成 谢清华

山东博科生物产业有限公司

[摘要] 全自动酶免工作站进行工作时,要求对液体的液面情况进行精确探测,由于当前存在加样针必须向下移动一次方可得知液面情况,对导电性能差的液体无效等几大缺陷,本文提出了超声法液面探测系统,能够在克服上述缺点的基础上,提高移液精度,同时更大程度的避免交叉污染,从而更好的满足全自动酶免工作站的检验要求。

[关键词] 全自动酶免;液面探测;超声波;LM1812

0 引言

全自动酶免工作站,可以全自动完成 ELISA 试验,提供高效、快速、准确的自动化免疫学实验解决方案[1]。在 ELISA 实验中,加样加试剂是其中一个非常重要的环节,因而液面探测系统是其不可或缺的一项功能组件,是其中一项非常重要的环节。移液过程中,我们既需要提高移液精度,又需要最大程度的避免交叉污染。二者均直接影响到全自动酶免工作站的检验结果,并且备受人们关注。

当前的全自动酶免工作站中,多采用接触式 LLD 技术,即只有当移液针接触到被移液液体时,才能探知液体的存在、进而探知液面高度的方式,其中电容法使用最为广泛[2]。接触式 LLD 技术存在以下三个缺点:一、移液针必须要向下运动完成一次探测动作后才能得知样本是否缺失或耗尽;二、对缺失和耗尽的样本,该探测动作成为无效动作,降低了仪器运行速度;三、当瓶盖忘记取下时移液针会损坏。且电容法 LLD 技术存在原理性缺陷,即对导电性能差的液体无效。超声波探测方法作为一种非接触式 LLD 技术,其测量精度最高可达 0.005 mm,甚至可以测量口径仅为 3.2 mm 的微小试管内的液面,因而该方法能够在克服上述缺点的基础上,提高移液精度,同时更大程度的避免交叉污染,从而更好的满足全自动酶免工作站的检验要求。

2 系统框架设计

本文提出一种超声法液面探测系统。由微处理器发出控制信号，控制超声波信号发生器芯片发出超声波信号，在遇到试管或微孔板反应孔中的液面时发生反射，通过接收反射的回波信号，送往微处理器进行信号处理，从而达到液面探测的目的。

本超声法探测液面系统由超声波信号发射部分，回波信号接收部分，信号放大部分，以及信号控制处理部分组成，如图 1 所示。

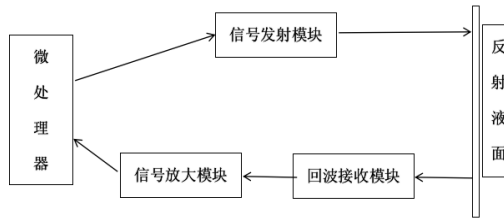


图 1 超声法液面探测系统框图

3 系统部件选取

3.1 信号发射与接收部分

信号收发部分，为使电路更简洁，选用可同时实现超声波信号收发的通用型超声波集成器件 LM1812 芯片。通过 8051 微处理器控制 LM1812 芯片实现超声波信号的发射与回波信号的接收。并将接收后的回波信号接入二级放大电路进行信号放大，而后送入微控制器进行数据分析处理。

LM1812 超声波专用器件外形为 18 脚双列直插塑料封装形式，相应引脚 1 脚第二增益级输出 / 振荡器端，6 脚发射器输出端，7 脚发射驱动器 13 脚外接电源退耦电容端，14 脚检出器输出端，16 脚输出驱动器端，17 脚噪声控制端，18 脚积分器复位时间常数控制端[3]。超声波信号由为控制器控制 LM1812 芯片发出后，在遇到试管或微孔板反应孔中的液面时发生反射，通过微控制器控制 LM1812 芯片转变为接收模式，接收反射后的回波信号。

3.2 信号放大与处理部分

信号放大部分，该部分采用两级放大的方式进行信号放大，将接收到的超声波回波信号接入运放器，进行信号放大，方便更准确的进行信号分析与处理。

信号处理部分，采用 8051 微控制器，它是混合信号系统级芯片，具有 48 个数字输入输出引脚，具有 5 个通用的 16 位定时器，具有 5 个捕捉比较模块的可编程计数器阵列[4]。采用流水线结构，指令执行速度大幅度提高，70% 的指令执行时间为 1 个或 2 个系统时钟周期，只有 4 条指令的执行时间大于 4 个系统时钟周期。来自窗口比较器的 INT 中断信号由微控制器的内部定时器捕捉，这样可最大限度地减少软件延迟。

超声法探测液面系统的具体电路图如图 2 所示。图中，U1 为通用型超声波集成器件 LM1812，U2 为微处理器 8051，T14 为变压器，Q1、Q2 为两级放大电路的核心,其他为特定的电阻电容元器件等。

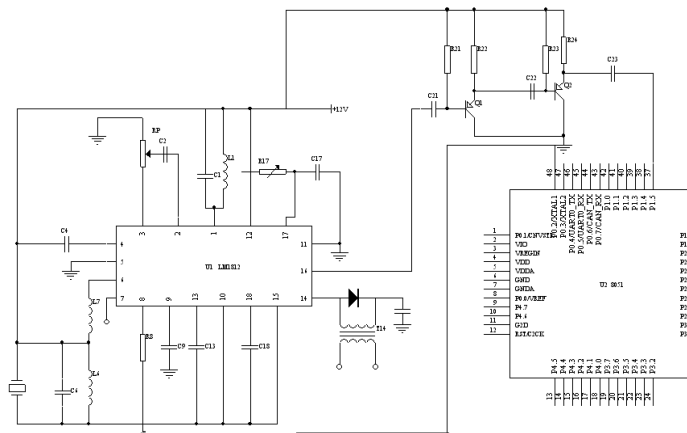


图 2 超声法探测液面系统电路图

4 系统具体实现

首先将 LM1812 芯片的第 1 脚外接 L1、C1，由此决定电路发送的工作频率，其工作频率 $f_0 = 1/(2\pi)$ 。由微控制器发送中断控制 LM1812 芯片各引脚的状态，使第 8 脚为高电平，将 L1、C1 振荡槽路切换为振荡模式，振荡信号经驱动放大后，由 13 脚及 6 脚输出，并在 6、13 脚之间接变压器，以便与超声波发送器阻抗匹配。此时，LM1812 芯片在微控制器的控制信号下向外发射超声波。

超声波信号到达液体液面处，发生反射，通过将 LM1812 的 8 脚设置为低电平，使芯片处于接收模式，接收反射后的回波信号。此时，超声波接收器接收到的超声波信号经电容耦合由 4 脚输入，再经内部两级放大后同由 1 脚的谐振回路取出的信号一起送到检测器。但由于此时噪声脉冲也同样被检测，所以要通过 17 脚外接 R17、C17 进行滤波。电阻 R17 和电容 C17 的时间常数一般为发送时间的 10%~50%。再经过积分延时，16 脚和 14 脚变成低电平。又当 1 脚上的电压变的小到不能触发检测器时，积分器经延时后复位。

当 LM1812 处于发送模式时，第二级放大器自动断开；当切换回接收模式时，第二级放大器并不马上接通，而是在由 9 脚外接电容引起一段延时后再接通。这个延时使接收器暂时封闭（检测器也同时封闭），这样就为超声波发生器停止振荡提供了时间。9 脚外接电容 C9 的大小与延时有关，第 16 脚提供与 COMS 兼容的逻辑输出，14 脚为集电极开路输出，14 脚的吸收电流超过 1A 时，在多重回波接收情况下就可能使芯片损坏。11 脚被设计成保护 14 脚功率输出端，其外接电容 C11 在 14 脚为低电平时（吸收电流）对内部电流进行积分。

通过微控制器，发送中断控制 LM1812 芯片各引脚的状态，从而进行超声波信号的发射与接收。并利用对计数器的数据进行处理，本系统采用了 CPLD 脉冲计数的方法[5]，间接测量时间，也就是把超声波往返时间转化为对单片机内部计数脉冲的测量，即 $L = NS/2 = Nv/(2f)$ ，式中 $S = v/f$ ， f 为单片机机器频率。计算可得当前液面情况，达到液面探测的目的。将接收到的回波信号通过二级放大模块进行信号放大后，送往微控制器进行数据处理，获得当前液面情况，达到液面探测的目的。

5 结语

本文研究了超声法在全自动酶免工作站中的液面探测系统中的应用。这种液面探测方法针对当前全自动酶免工作站的现状，克服了其加样针必须向下移动一次方可得知液面情况，对导电性能差的液体无效等几大缺陷，提出了超声法液面探测系统，能够在克服上述缺点的基础上，提高移液精度，同时更大程度的避免交叉污染，从而更好的满足全自动酶免工作站的检验要求。

参考文献

- [1] 李文胜,周伟,柳晓琴,等.全自动酶免仪与半自动酶标仪比对研究[J].中外医疗,2011,30(24):19-19.
- [2] 徐建超,李冰丽.超声波液位检测仪[J].中小企业管理与科技,2012(11):305-306.
- [3] 侯建军.基于 LM1812 的超声波测距系统设计[C]//四川省电子学会传感技术第十届学术年会.2007.
- [4] Mazidi M A. The 8051 Microcontroller and Embedded Systems[J]. The AVR Microcontroller and C Compiler Co-Design. ATMEEL Development, 1994:5/1 - 5/7.
- [5] 李彩虹,杨志伟.基于 CPLD 和单片机的高速数据采集系统设计[J].仪表技术,2013(07):35-37.
(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于光激化学发光技术开发的多表位检测 cTnI 的方法

程敏卓, 张向辉, 赵卫国*, 张敬

[摘要] 目的:建立一种多表位识别检测人血清心肌肌钙蛋白(cTnI)的光激化学发光免疫检测分析方法。方法:采用夹心法,通过多表位识别建立检测cTnI水平的方法,评估其分析灵敏度、回收率和批内精密密度,并与Siemens(化学发光法)进行方法学比较。结果:分析灵敏度为0.062 ng/ml,回收率为94.25%,批内精密密度(CV)为1.13%,与化学发光法的符合率好($r=0.99$)。结论:光激化学发光免疫分析方法多表位测定cTnI具有超高灵敏度、精密度和准确性,与化学发光法的符合率较好,适用于临床。

[关键词] 心肌肌钙蛋白I; 光激化学发光免疫分析方法; 微粒; 多表位检测

Development of a light initiated chemiluminescent immunoassay for multi-epitope cTnI determination

CHENG Minzhuo¹,ZHANG Xianghui²,ZHAO Weiguo²,*,ZHANG Jin¹

1.School of Life Sciences and Technology,Tongji University,Shanghai 200092,China;2.Beyond Diagnostic Inc,Shanghai 201210,China

*Corresponding Author: ZHAO Weiguo,E-mail: zhaowg@beyondbiotech.cn

[Abstract] This study performed to establish a light initiated chemiluminescent immunoassay(LICA)for human serum cardiac Troponin I(cTnI)detection with multi-epitope recognition technique.Based on double antibody sandwich immunoassay and multi-epitope recognition technique,the LICA for detecting human serum cTnI concentration was established,whose analytical sensitivity,coefficient of recovery,and within-run precision were evaluated and compared with those of Siemens(CLIA).Data showed that the analytical sensitivity of LICA was 0.06ng/ml,coefficient of recovery was 93.43%,and within-run precision(CV)was 0.62%-1.55%,which were highly coincided with those of CLIA($r=0.99$).In conclusion,the constructed LICA possesses advantages of good sensitivity,precision,accuracy and coincidence in determining multi-epitope cTnI,thus could be applied for clinical practice.

[Keywords] Cardiac troponin I ;Light initiated chemiluminescent immunoassay;Microsphere;Multi-epitope determination

急性心肌梗死(AMI)是由冠状动脉急性或持续性缺血缺氧所引起,是目前威胁人类健康及生命的主要疾病之一。肌酸激酶(CK-MB)曾作为AMI诊断的“金标准”,但在多肌炎、皮炎、营养不良和肾功能不全等引起的相关疾病中也会出现血清CK-MB酶的非特异性升高。因此,传统的血清酶学标志物在敏感性和特异性方面已越来越不能满足临床要求。

心肌肌钙蛋白I(cTnI)是心肌肌钙蛋白(cTn)的一个重要亚单位,具有心肌特异性,正常血清中含量甚微^[1]。由于cTnI具有出现时间早、持续时间长、初始灵敏度低、特异性强等特点,已日渐代替CK-MB,而成为诊断AMI的“金标准”。

目前已报道的酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法、电化学发光免疫分析法等对cTnI的检测多为双抗体夹心法^[2-5],这些检测方法不仅耗时,而且需要反复清洗与分离。研究发现,心肌受损后释放的cTnI,多以cTnI-cTnC、cTnI-cTnT等复合物的形式存在于血液中,同时,位于cTnI蛋白2端的表位容易水解^[6],而处于蛋白中间的表位容易受到自身抗体的干扰。因此,简单的双抗体夹心法检测会出现不同程度的漏检。目前,建立一种快速、免洗的cTnI测定方法已成为临床研究人员关注的焦点。本文尝试建立一种多表位cTnI光激化学发光免疫分析方法(light initiated chemiluminescent assay, LiCA)来对人血中cTnI进行定量检测,并对检测性能进行初步评价^[7-9]。

1 材料与方法

1.1 实验材料。96孔板来自博阳生物科技(上海)有限公司;抗人cTnI单克隆抗体(克隆号:19C7、MF4、560、820)购自HyTest Ltd.公司; Troponin I cardiac diversity kit 购自HyTest Ltd.公司;去cTnI人血清购自HyTest Ltd.公司;发光微粒由博阳生物科技(上海)有限公司提供;LICA通用液系LICA HT光激化学发光检测仪的配套试剂由博阳生物科技(上海)有限公司提供;Biotin 购自Sigma公司;Avidin 购自PIERCE公司;牛血清购自上海普龙生物技术研发有限公司;人cTnI-T-C复合物抗原购自HyTest Ltd.公司;BCATM Protein Assay Kit 购自Thermo Fisher Scientific公司。

1.2 主要仪器。高速冷冻离心机购自日立公司;光激化学发光检测仪由博阳生物科技(上海)有限公司提供;粒径仪购自美国PSS公司;电子天平及pH酸度计均购自METTLER TOLEDO公司;电热恒温培养箱购自黄石恒丰医疗器械有限公司;超低温冰箱购自日本三洋公司;多管可调式旋转混合器购自上海强运科技有限公司;酶标仪购自Thermo Fisher Scientific;层析冷柜购自上海芙蓉实业有限公司;JY98-III超声波细胞粉碎机购自上海新芝生物技术研究所。

1.3 免疫发光试剂的制备。取200 nm左右表面为醛基的发光微粒,离心清洗(12 000 r/min, 30 min)后,超声分散至0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,以10:2(W/W)的比例分别加入2个单克隆抗体(19C7、MF4),并加入三氢硼氰化钠(NaCNBH₃)催化,37℃旋转混合反应48 h后,加入适量的BSA 37℃旋转混合过夜,离心清洗,再分别定容至10 mg/ml,4℃保存备用。

1.4 抗体的生物素标记。取另一对单克隆抗体(560、820),调整pH至8.5,以1:30(W/W)的比例加入生物素(Biotin),4℃混合反应过夜后,透析,再定容至1 mg/ml,4℃保存备用。

1.5 定标品和质控品的制备。使用HyTest公司的去cTnI 人血清与人cTnI-C-T 复合物抗原,配制成预浓度为0、2.5、5、15、50、100 ng/ml 的标准品以及预浓度为20 ng/ml、2 ng/ml 的高低值质控品,然后再使用Siemens 系统对其分别进行标定,标定合格后,分装成每管1 ml,并将其保存于-20℃备用;

1.6 检测方法。将免疫发光试剂稀释至50 μg/ml(试剂I),生物素标记试剂稀释至3 μg/ml(试剂II),微孔板中,每孔依次加入标准品或者待测样本25 μl、试剂I 25 μl、试剂II 25 μl,将微孔板置于光激化学发光检测仪内,设定程序为37℃温育900 s,然后加入LiCA 通用液175 μl,37℃孵育600 s后,读取RLU值。

1.7 检测方法性能评价

1.7.1 分析灵敏度。参考EP17-A^[5]程序:将定标品0 ng/ml 重复测定20 孔,计算这20孔的RLU均值(AVE)和标准偏差(SD),以AVE+2SD 反代入标准曲线,所得的浓度值即为分析灵敏度。采用不同的批次的试剂和标准品进行3次以上操作,所得的平均值即为本试剂盒的灵敏度。

1.7.2 回收率。取一例已知浓度的血清样本,进行5次倍比稀释,对稀释后的样品进行检测,所得浓度与其理论浓度进行比较,计算稀释回收率(回收率=实测值/理论值×100%)。

1.7.3 精密性。参考EP5-A2^[6]程序:采用同批试剂、校准品,以各自配套的质控品作为测试标本,对本标本重复测定至少20次。计算均值、SD 及CV。

1.7.4 稳定性。将整套试剂置于4℃存放6个月,置于37℃存放7 d后,分别进行物理检查,并考察其线性、灵敏度、精密性和回收率等方面的稳定性。

1.7.5 方法学相关性分析。取90例心肌梗死病人血清样本,分别用本文建立的cTnI检测试剂(光激化学发光法)和Siemens试剂(化学发光法)进行检测,并对两种方法的测值进行比较,获得相关性曲线。

2 结果

2.1 分析灵敏度

用3个批次的试剂和标准品进行试验,得到的灵敏度分别为0.062、0.059、0.065 ng/ml,平均值为0.062 ng/ml。

2.2 批内精密性 该试剂盒高低质控血清的批内变异系数为1.26%至2.58%,平均值为1.72%,小于5%。批间变异系数分别为:1.03%、1.39%和0.98%,平均值为1.13%,小于5%,因此,本文所建立的检测方法的重复性好。

2.3 回收率

取一例浓度为77.28 ng/ml 的病人血清,将其进行5次倍比稀释,测定稀释后的样品值,测定结果如表1。由上表可以看出,得到的回收率分别为97.20%、93.43%、91.61%、90.27%和92.98%,结果均分布在90%~110%之间,平均值为94.25%。

表1 77.28 ng/ml 的病人血清5 次倍比稀释后的测定值

Tab 1 Coefficient of recovery of LiCA in detecting 77.28 ng/ml serum after 5-fold dilution

Theoretical concentration/(ng/ml)	Fitting concentration/(ng/ml-)	Recovery/%
77.28	77.28	100.00
38.64	37.56	97.20
19.32	18.05	93.43
9.66	8.85	91.61
4.83	4.36	90.27
2.42	2.25	92.98

2.4 稳定性。取出4℃存放6个月,37℃存放7天的试剂,进行物理检查,并考察线性、灵敏度、精密性和回收率方面的稳定性,检测结果如表2。从表2 稳定性研究结果可以看出,在4℃存放6个月,37℃存放7天的试剂目测外观无可见变化,在线性、灵敏度、精密性和回收率方面均和新制试剂无明显差别,所以该试剂盒稳定性好。

表2 稳定性研究结果

Tab 2 The stability of LiCA

Test items	0 day	4 °C,6 month	37 °C,7 days
Physical examination	Reagent uniform Non sediment	Reagent uniform Non sediment	Reagent uniform Non sediment
Correlation coefficient	r=0.999	r=0.997	r=0.995
Sensitivity	0.062	0.069	0.065
QC	QL	QL	QL
	4.18	4.09	4.10
Serum	QM (ng/ml)	19.94	20.08
	QH (ng/ml)	61.38	59.88
Recovery	99.16%	97.76%	103.29%
Conclusion	Qualified	Qualified	Qualified

2.5 与Siemens 化学发光法检测结果的相关性

取90份心肌梗死病人血清样本，分别用LiCA分析方法和Siemens 试剂进行检测，并对检测结果进行数据分析，结论为两种检测方法具有较好的相关性。相关性曲线见图1，相关性方程为 $y=1.0052x+0.1191$ ， $r=0.996$ ，斜率在0.9~1.1 之间，截距小于1.0， $r>0.99$ ，同Siemens 的相关性优异。

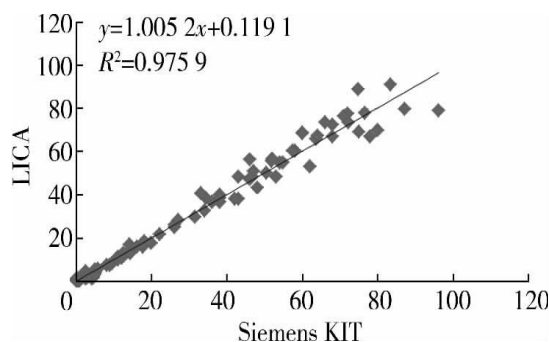


图1 LiCA 与Siemens KIT 的相关性分析

Fig 1 Correlation analysis between LiCA and Siemens KIT

3 讨论

光激化学发光法是继LOCI (luminescent oxygen channeling immunoassay) 技术后，在国内建立并逐步应用于临床检测的一种检测技术。其检测原理是以填充了感光 and 发光材料的两种纳米微球为载体，由抗原-抗体免疫反应拉近感光 and 发光微球的距离。当用680 nm激发光照射时，感光微粒被激活并释放出高能态的单线态氧，之后发光微粒发出520-620nm 的光，并通过光信号来推算待测物的浓度。此法均相、免洗^[12]、发光效率高、灵敏度高和特异性好，既加快了反应速度，又避免了反复分离与清洗，同时由于微粒比表面积的增加，提高了检测的灵敏度。

在cTnI 检测的发展中，起初检测cTnI 所使用的单抗主要是针对血液中游离的cTnI。随着cTnI 研究的深入，发现cTnI 主要以cTnI-cTnC 复合物的形式释放到血液中，而游离的cTnI、cTnI-cTnT复合物和cTnI-cTnT-cTnC 复合物均较少^[10]，并存在多种翻译后修饰的类型^[11]；此外，cTnI 释放到血液中后，N 端与C 端迅速被水解，而其中一段序列则相对稳定，所以cTnI 进入血液循环后，其中的cTnI是由降解物组成的一系列混合物^[12]。在cTnI 的检测中不同方法所用抗体的抗原决定簇特异性不同常会导致检测结果的差异，已知的影响cTnI 的检测值的相关因素，包括翻译后修饰（蛋白水解降解、磷酸化）、与体内物质（肌钙蛋白C、肝素）形成的复合物及患者血液中cTnI自身抗体^[13]。本研究采用2+2 的抗体夹心法，通过对cTnI进行多表位识别，形成一种多表位cTnI 的分析方法^[14]，即采用19C7、MF4、560、820单抗，分别针对的是cTnI的26~35、41~49、83~93、190~196 位点进行特异性结合。这些抗体的选择主要考虑以下因素：抗体不受磷酸化、肝素及cTnI-C复合物的影响；抗体识别表位的互补作用，即19C7（41~49 a.a.r.）与560（83~93 a.a.r.）所识别的区域不易受cTnI 水解作用的影响，但会受自身抗体的干扰，而820（16~35a.a.r.）

与MF4 (190~196 a.a.r.) 所识别的区域不易被自身抗体干扰, 但易受水解作用的影响。通过多位点识别的方法, 弥补了cTnI 蛋白局部受到水解、磷酸化、cTnI-C 复合物、自身抗体干扰等的影响, 可以减少cTnI 在检测中的漏检情况。

对此方法试剂的多项指标进行考核发现: 分析灵敏度 $< 0.1 \text{ ng/ml}$, 稀释回收率90%~110%, 质控血清的批内和批间CV均小于5%, 与Siemens试剂进行相关性比较, r 为0.99。这种灵敏度高, 特异性强, 准确性和重复性好且分析时间短 (30 min) 的检测方法可满足市场需求, 也为cTnI的快速诊断提供参考意义。

参考文献

- [1] Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury[J]. *CMAT*, 2005, 173(10): 1191-1202.
 - [2] Al Hillawi E, Minchin SD, Trayer IP. Overexpression of human cardiac troponin I and troponin C in *E. coli* and their purification and characterization [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 225(3): 1195-1201.
 - [3] Bodor GS, Porterfield D, Voss EM, et al. Cardiac troponin I is not expressed in fetal and healthy or diseased adult human skeletal muscle tissue[J]. *Clin Chem*, 1995, 41(12): 1701.
 - [4] Ronald RB, Renee AL, Patricia BA, et al. Sensitive RIA for the specific determination of insulin lispro[J]. *Clin Chem*, 1999, 45(1): 104-110.
 - [5] Elliott K, Watkins H, Redwood CS. Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(29): 22069.
 - [6] 王德芝, 周则卫, 刘鑫峰, 等. 心肌肌钙蛋白I (cTnI) 合成肽制备、鉴定及抗体研究[J]. *免疫学杂志*, 2013, 29(9): 796-799.
 - [7] Uettwiller Geiger D, Wu AH, Apple FS, et al. Multicenter evaluation of an automated assay for troponin I [J]. *Clin Chem*, 2002, 48(6 pt 1): 869-876.
 - [8] Kutrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex[J]. *Clin Chem*, 1997, 43(8 pt 1): 1379-1385.
 - [9] Bunk DM, Dalluge JJ, Welch MJ. Heterogeneity in human cardiac Troponin I standards [J]. *Anal Biochem*, 2000, 284(2): 191-200.
 - [10] Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, et al. Degradation of cardiac troponin I: implication for reliable immunodetection[J]. *Clin Chem*, 1998, 44(12): 2433-2440.
 - [11] Ronald RB, Renee AL, Patricia BA, et al. Sensitive RIA for the specific determination of insulin lispro [J]. *Clin Chem*, 1999, 45(1): 104-110.
 - [12] Katrukha AG, Bereznikova AV, Filatov VL, et al. Biochemical factors influencing measurement of cardiac troponin I in serum[J]. *Clin Chem Lab Med*, 1999, 37(11/12): 1091-1095.
 - [13] Katrukha AG, Bereznikova AV, Esakova TV, et al. Troponin I is released in bloodstream of patients with acute myocardial infarction not in free form but as complex [J]. *Clin Chem*, 1997, 43(8): 1379-1385.
 - [14] 陈钰, 王捷, 刘仲明. 基于纳米材料的电化学发光免疫传感器[J]. *免疫学杂志*, 2011, 27(1): 81-85.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于模糊自适应 PID 的全自动酶免温度控制系统

甘宜梧 郭宣成 谢清华

山东博科生物产业有限公司

[摘要] 全自动酶免工作站进行温育步骤时, 要求对微孔板的温度进行精确控制, 由于温育处于半开放环境中, 因而系统惯性大, 滞后现象严重。通过系统仿真, 可以验证, 利用模糊自适应 PID 控制温度变化, 可以同时兼顾系统稳定性和精度, 达到系统要求, 并确保实验的精度和准确度。

[关键词] 全自动酶免; 模糊自适应 PID; 温育; 温度控制

0 引言

全自动酶免工作站,可以全自动完成 ELISA 试验,提供高效、快速、准确的自动化免疫学实验解决方案^[1]。温育是其中一个非常重要的环节,因此对微孔板的温度进行精确控制颇为重要,直接影响到实验的精度和准确度^[2]。当前的全自动酶免工作站中,多采用传统 PID 控制技术,它具有结构简单,稳定性好,工作可靠,调整方便等优点,但是由于全自动酶免工作站的温控模块处于半开放环境中,参数变化大,并且温控面积大,导致系统惯性大,滞后现象严重,难以建立精确的数学模型。传统 PID 控制以不能完全满足实验要求。模糊自适应 PID 控制运用模糊数学的基本理论和方法,把规则的条件,操作用模糊集表示,并把这些信息作为知识输入到系统中,然后根据控制系统的实际相应情况,运用模糊推理,自动实现 PID 参数的最佳调整,避免了传统 PID 参数固定的缺点^[3]。本文设计的温度控制模块,利用模糊自适应算法对系统进行 PID 控制,既可缩短调节时间,控制超调现象,又可以兼顾系统稳定性和精度。

1 温控系统设计

全自动酶免工作站温育时要求温度变化为室温到 45℃可调,且温度变化精度为±0.2℃。根据要求设计了温育模块,其系统框图如图 1 所示,由上位机发送温度控制命令,通过串口通信,将命令送达微处理器,PWM 波经过电路放大后,控制加热板给微孔板加热,从而完成温育功能。

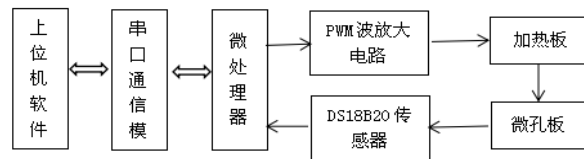


图 1 全自动酶免工作站温育模块系统框图

2 模糊自适应 PID 设计

模糊自适应 PID 控制的任务是找出 PID 的三个参数与偏差 e 和偏差变化率 ec 之间的模糊关系,在运行中不断检测 e 和 ec ,根据确定的模糊控制规则来对三个参数进行在线调整,满足不同 e 和 ec 时对三个参数的不同要求。模糊自适应 PID 控制器的结构如图 2 所示。

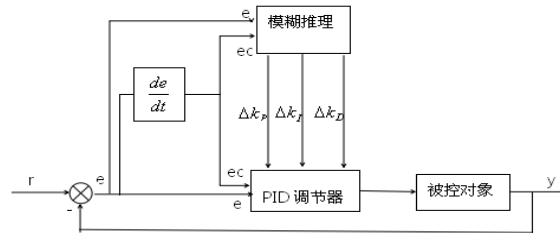


图 2 模糊自适应 PID 控制器结构图

根据结构图,下面进行模糊自适应 PID 算法设计,主要包括以下 4 个步骤。

(1) 选择语言变量

输入语言变量选择偏差 e 和偏差变化 ec ,输出语言选择积分、比例、微分系数 k_I, k_P, k_D 的修正量

$\Delta k_I, \Delta k_P, \Delta k_D$ 。

(2) 定义输入输出模糊集

因为全自动酶免分析仪的温育系统要求温度可从室温到 45℃可调,即加热板的温度变化范围为 15℃到 45℃。而实验中常用微孔板温育温度为 37℃。因此偏差 e 的变化范围为 -22℃到 8℃,且 $E_{\max} = 22$ 。微孔板温度仅受加热板加热功率和自然温度传导两个因素影响,即温度变化率较小,因而可假设 ec 的变化范围为 -5 到 5,且 $EC_{\max} = 5$ 。e,

ec, k_I , k_P , k_D 的控制规则如表所示。语言变量均选取 7 个语言值：负大，负中，负小，零，正小，正中，正大，在表中分别用 NB,NM,NS,ZO,PS,PM,PB 表示^[4]。

(3)定义输入输出隶属函数：

由上述内容可选定语言变量的论域，e 和 ec 的论域均为 $\{-3, -2, -1,0,1,2,3\}$ ， $k_I = \{-0.06, -0.04, -0.02, 0, 0.02, 0.04, 0.06\}$ ， $k_P = \{-0.3, -0.2, -0.1, 0, 0.1, 0.2, 0.3\}$ ， $k_D = \{-0.3, -0.2, -0.1, 0, 0.1, 0.2, 0.3\}$ 。取其隶属函数均为三角形，

$$f(x, a, b, c) = \begin{cases} 0, & x \leq a \\ \frac{x-a}{b-a}, & a \leq x \leq b \\ \frac{c-x}{c-b}, & b \leq x \leq c \\ 0, & x \geq c \end{cases}$$

即满足

，则其隶属函数如图 3 所示。

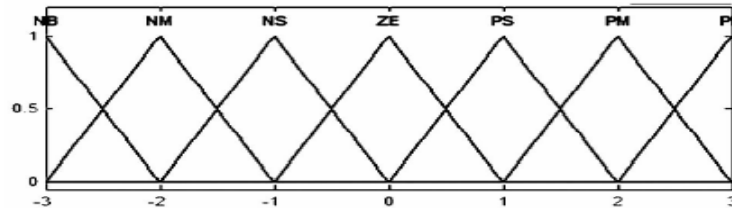


图 3 采用的三角形隶属函数

(4)输出变量模糊控制规则：

综合考虑参数的作用如下： k_I 可以消除系统的稳态误差， k_P 可以加快系统的响应速度， k_D 可以抑制偏差的变化。因而根据实际控制经验，为确保系统具有良好的稳态性能，并且避免出现较大的超调量，模糊自适应 PID 的三个参数 k_I , k_P , k_D 在不同偏差 e 和偏差变化 ec 下的自动调整时，应满足如下 3 条规律：当 e 的绝对值较小时， k_I , k_P 应较大， k_D 应适中；当 e 的绝对值适中时， k_P 应较小， k_I , k_D 应适中；当 e 的绝对值较大时， k_P 应较大， k_I 为 0， k_D 应较小^[5]。因此，可运用 MIN-MAX-重心法进行反模糊化模糊判决，根据上述规律与实际经验列出

$\Delta k_I, \Delta k_P, \Delta k_D$ 控制规则表（表 1，表 2，表 3）。

表 1 Δk_I 控制规则表

		E						
		NB	NM	NS	ZO	PS	PM	PB
EC	NB	PS	NS	NE	NE	NE	NM	ZO
	NM	PS	NS	NE	NM	NM	NS	ZO
	NS	ZO	NS	NM	NM	NS	NS	ZO
	ZO	ZO	NS	NS	NS	NS	NS	ZO
	PS	ZO	ZO	ZO	ZO	ZO	ZO	ZO
	PM	PB	NS	PS	PS	PS	PS	PB
	PB	PB	PM	PM	PM	PS	PS	PB

表 2 Δk_p 控制规则表

		E						
		NB	NM	NS	ZO	PS	PM	PB
EC	NB	PB	PB	PM	PM	PS	ZO	ZO
	NM	PB	PB	PM	PS	PS	ZO	NS
	NS	PM	PM	PM	PS	PS	ZO	NS
	ZO	PM	PM	PS	PS	ZO	NS	NM
	PS	PS	PS	ZO	NS	NS	NM	NM
	PM	PS	ZO	NS	NM	NM	NM	NE
	NE	ZO	ZO	NM	NM	NM	NE	NE

表 3 Δk_D 控制规则表

		E						
		NB	NM	NS	ZO	PS	PM	PB
EC	NB	NB	NE	NM	NM	NS	ZO	ZO
	NM	NE	NE	NM	NS	NS	ZO	ZO
	NS	NE	NM	NS	NS	ZO	PS	PS
	ZO	NM	NM	NS	ZO	PS	PM	PM
	PS	NM	NS	ZO	PS	PS	PM	PB
	PM	ZO	ZO	PS	PS	PM	PB	PB
	PB	ZO	ZO	PS	PM	PM	PB	PB

3 系统仿真

在 matlab 中的 simulink 环境下创建如图 4 所示的仿真模型^[6]。通过仿真模型来验证基于模糊自适应算法的温度控制效果，验证结果如图 5 所示。由图 5 可看出，与传统 PID 控制相比，基于模糊自适应算法的 PID 控制方法系统稳定性更好，且在加入干扰后，系统稳定性更好，几乎没有超调现象，抗干扰能力更强。由此可以验证，基于模糊自适应算法的 PID 温度控制，可以同时兼顾系统稳定性和精度，满足酶免系统的温育要求，并确保实验的精度和准确度。

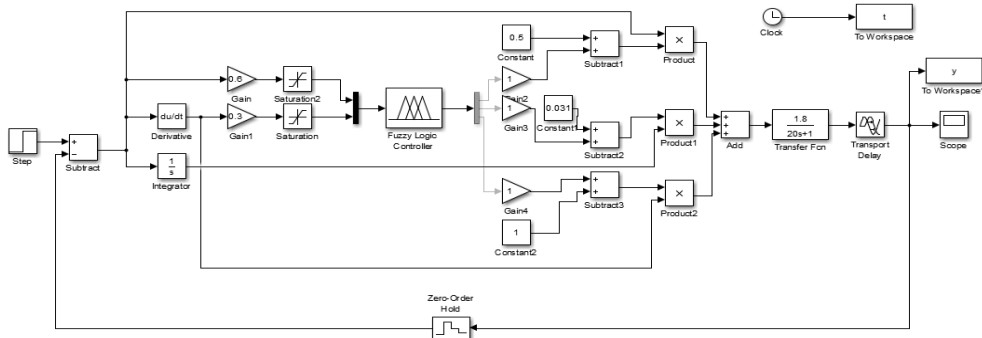


图 4 simulink 仿真模型

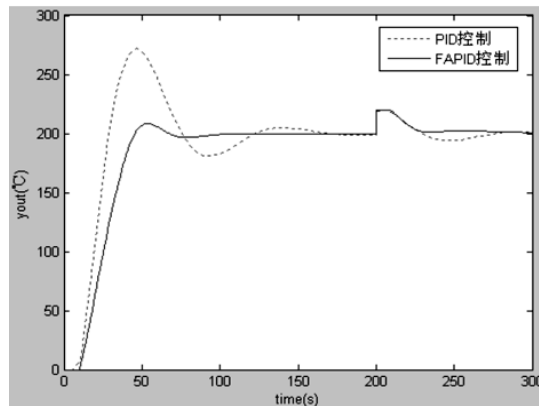


图 5 simulink 仿真结果图

5 结语

本文研究了模糊自适应 PID 控制算法在全自动酶免工作站中的温育控制系统中的应用。这种控制方法针对全自动酶免工作站的温控模块处于半开放环境中的现状,克服了其参数变化大,温控面积大,系统惯性大,滞后现象严重的问题,对传统 PID 控制方法进行了改进,既可缩短调节时间,控制超调现象,又可以兼顾系统稳定性和精度。通过系统仿真验证,该方法得到了比较理想的控制结果。

参考文献

- [1] 李文胜,周伟,柳晓琴,等.全自动酶免仪与半自动酶标仪比对研究[J].中外医疗,2011,30(24):19-19.
- [2] 朱阳泉,徐长根,戴瑞娣,等.影响 FAME 全自动酶免分析系统检测因素探讨[J].临床输血与检验,2004,04 期:254-256.
- [3] Landry M,Leonard F,Landry C,et al.An Improved Vibration Analysis Algorithm as a Diagnostic Tool for Detecting Mechanical Anomalies on Power Circuit Breakers[J].Power Delivery IEEE Transactions on,2008,23(4):1986 - 1994.
- [4] 李国勇.一种改进的自适应 PID 控制器[J].太原理工大学学报,2015,34(1):51-52.
- [5] 红.模糊自适应 PID 参数自整定控制器的研究[J].工业控制计算机,2012,第 8 期(8):58-59.
- [6] 张国良.模糊控制及其 MATLAB 应用[M]// 西安交通大学出版社,2002.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

胶乳增强免疫比浊法检测尿液中 $\alpha 1$ -微球蛋白的含量

蒋泽军 蒋庆姣 冼庆勇* 刘云鹏 何金洋 韦秋云
桂林优利特医疗电子有限公司

[摘要] 目的:研制检测尿液中微量 $\alpha 1$ -微球蛋白 ($\alpha 1$ -MG) 检测试剂盒及评价其性能指标。方法:把 $\alpha 1$ -MG 的多克隆抗体包被在胶乳微粒上,通过抗原抗体结合的免疫比浊反应测试,检测尿液中微量 $\alpha 1$ -MG 的含量。结果:试剂盒的测量范围为 2.0~160 mg/L,回收率为 94.0%~106.0%,对不同浓度的临床样本测试 (n=20),变异系数<5.0%,与日本进口试剂对比测试 101 例临床标本,其相关系数为 0.9854。结论:该试剂盒有良好的准确性和重复性,线性范围宽,符合临床检测需要。

[关键词] 免疫;比浊; $\alpha 1$ -微球蛋白;尿液;胶乳

Latex particle-enhanced turbidimetric immunoassay method for the determination of $\alpha 1$ - microglobulin in urine

Zejun Jiang,Qingjiao Jiang,Qingyong Xian,Yuneng Liu,Jinyang He,Qiuyun Wei

[Abstract] **Objective:** Developed a test kit for detecting trace $\alpha 1$ -microglobulin ($\alpha 1$ - MG) in urine and evaluated its performance.**Methods:** The method is detecting the content of trace $\alpha 1$ -MG in urine through testing the turbidimetric immunoassay reaction of antigen and antibody, which is the polyclonal antibody of $\alpha 1$ -MG packaged on the latex particles.**Results:** The measurement range of the test kit is 2.0 ~ 160 mg/L,the recovery is 94.0%~106.0%.Testing the different concentrations of clinical samples(n=20),the coefficient of variation is<5.0%.Compared with the imported reagent from Japan,the correlation coefficient of 101 clinical samples is 0.9854.**Conclusions:** The test kit of fine repetition,veracity and wide measurement range can be used for clinical detection .

[Keywords] Immunoassay;Turbidimetric; $\alpha 1$ -microglobulin;Urine;Latex

尿液检验对于泌尿系统感染性和非感染疾病的筛查、辅助诊断、病程和疗效监测,以及对其他系统疾病(如糖尿病、高血压、遗传性疾病、药物不良反应等)的筛查、疗效或并发症监测都有重要意义^[1-4]。

尿液蛋白的检测多是采用化学比色法,随着科技的进步,蛋白种类得以分类,并具有相应的临床意义^[5-7]。特种蛋白的免疫测定得到快速发展,是利用抗原-抗体的特异反应检测临床样本中微量蛋白的分析方法^[8]。这种方法的最

大特点是特异性强,灵敏度高,使用简便、快速。

尿液 $\alpha 1$ -MG 的相对分子量为 27000,是一种相对较小的糖蛋白,PI 为 4.5-5.5^[9]。该蛋白产生恒定,在机体内广泛分布,易通过肾小球滤过膜,绝大部分被肾小管重新吸收。不受 pH 变化的影响,尿液 $\alpha 1$ -MG 的升高,常常提示肾小管与间质损害,近年来已有多次报道^[10,11]。尿液 $\alpha 1$ -MG 测定有利于鉴别上、下尿路感染,肾性与肾后性、蛋白尿、血尿。因此,尿液 $\alpha 1$ -MG 的检测试剂盒的研制,将为临床疾病的诊断具有重要的意义。

1 材料及方法

1.1 仪器

7180 型日立全自动生化分析仪、高速离心机、细胞粉碎机

1.2 试剂

$\alpha 1$ -MG 多克隆抗体(进口)、聚苯乙烯胶乳、缓冲盐、表面活性剂、稳定剂、日本进口 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒

1.3 样本

收集 101 例尿液样本,男 57 例,女 44 例,年龄 23~74 岁。

1.4 试剂盒的制备

按照化学结合法将多克隆抗体包被到胶乳微球上,用阻断剂封闭胶乳,阻断剂为自配,高速离心分离后加入分散缓冲液,超声悬浮后即为 R2 试剂;R1 试剂自配:在缓冲体系中加入表面活性剂、增强剂、稳定剂等。

1.5 试剂盒参数

R1 试剂:200 微升,R2 试剂:50 微升,样本/标准/水:12 微升,检测主波长:600nm,副波长:700nm

2 结果与分析

2.1 检测性能

使用自制的 R1、R2 试剂及外购的 $\alpha 1$ -MG 校准品,用 7180 型日立全自动生化分析仪定标测试,定标曲线如图 1 所示,由曲线可见自制试剂盒在对 $\alpha 1$ -MG 的反应良好,并呈现较好的线性关系, $R^2=0.998$ 。

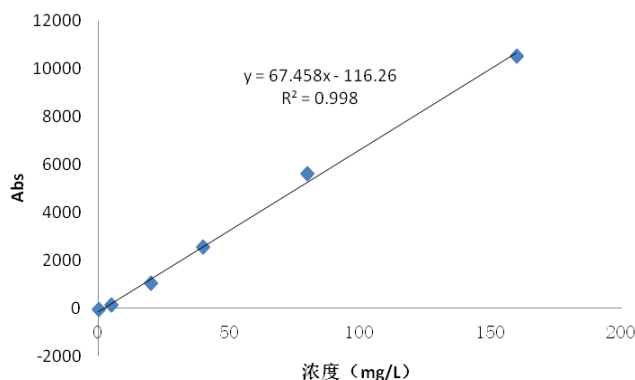
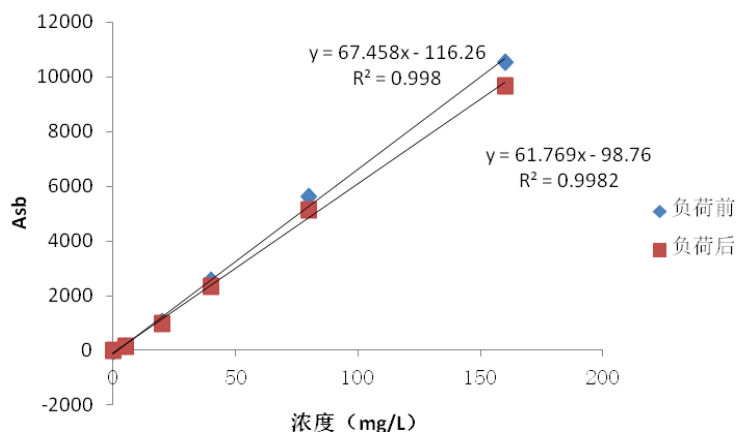


图 1 $\alpha 1$ -微球蛋白的定标曲线

2.2 稳定性分析

将自制试剂盒的 R1、R2 密封放置于温度为 40℃,湿度为 80%的恒温恒湿箱中,负荷 7 天后测试,对比测试负荷前后试剂盒的检测性能。对比结果如图 2 所示,由图可见,负荷后试剂盒的吸光度值略有降低,但 $\alpha 1$ -MG 校准品的浓度在 0-160mg/L 的范围时,降低的吸光度值<10%,且仍呈现良好的线性关系, $R^2=0.998$ 。

图2 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒负荷前后的定标曲线对比

2.3 精密度分析

分别选取三个不同水平（低、中、高）的尿液样本，分别连续测试 20 次，计算测量值、标准偏差和相对标准偏差，测试结果如表 1 所示。测试结果的 CV 值都在 5% 以内。

表 1 精密度分析测试结果

样本编号	测试数 (n)	平均值 (mg/L)	标准偏差	CV
1	20	8.32	0.21	2.52%
2	20	18.34	0.59	3.23%
3	20	43.2	1.76	4.08%

2.4 干扰测试

分别选用两个不同水平（高、低）的混合尿液样本，加入不同浓度的干扰物，以等体积的生理盐水作为无干扰样本，同时测定这些标本的浓度，结果以干扰程度 10% 作为该系统对干扰物的最高限。结果显示：在血红蛋白 $\leq 10\text{g/L}$ 、胆红素 $\leq 0.6\text{g/L}$ 、维生素 C $\leq 0.6\text{g/L}$ 、肌酐 $\leq 10\text{g/L}$ 时，对于测定尿液中 $\alpha 1$ -MG 没有影响。

2.5 加标回收率

把已知 $\alpha 1$ -MG 浓度的混合尿液样本分成 3 等份，分别添加一定量的 $\alpha 1$ -MG 校准品，分别进行测试 (n=3)，平均回收率在 94.0%-106.0% 范围内，相对标准偏差 $< 5\%$ ，符合实验要求，具体结果见表 2。

表 2 加标回收率测试结果

样本编号	含量 (mg/L)	添加量 (mg/L)	测得量 (mg/L)	回收率 (mg/L)	相对标准偏差
1	18.5	10	27.9	94.0%	2.31%
2	18.5	20	39.7	106.0%	1.75%
3	18.5	35	54.6	103.1%	3.46%

2.6 临床对比测试

收集临床尿液样本 101 例，分别用自制 $\alpha 1$ -MG 试剂及日本进口试剂进行临床对比测试，测试结果如图 3 所示，呈现较好的相关性， $R^2 = 0.9854$ 。

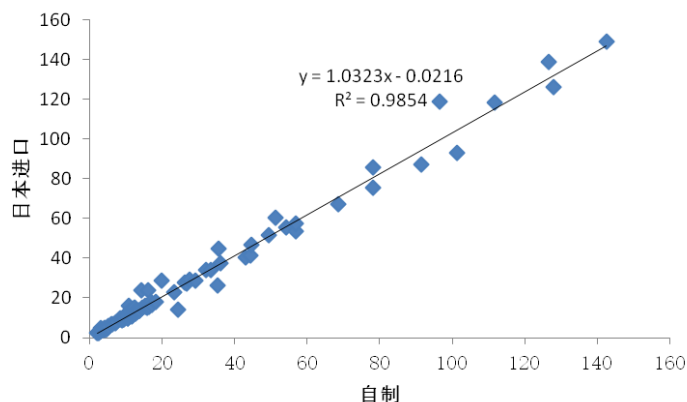


图3 自制 $\alpha 1$ -MG 试剂与日本进口试剂临床测试对比

3 结果与讨论

尿液特种蛋白的检测被认为是反映早期肾损伤的较灵敏指标。人体内 $\alpha 1$ -MG 的产生恒定，尿液中 $\alpha 1$ -MG 的排出量较少受肾外因素的影响，尿液 $\alpha 1$ -MG 检测的可以帮助诊断肾小管受到的损伤程度诊断提供参考依据，被认为是较特异的肾功能损伤诊断实验^[12,13]。因此， $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒的综合性能在临床测试中尤为重要，在本研究中，由图 1、图 2 可见，由本方法制备的尿液 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒在 2-160mg/L 范围内， $\alpha 1$ -MG 的浓度与吸光度值呈良好的线性关系， $R \approx 0.998$ 。另外，试剂盒密封放置于温度为 40℃，湿度为 80% 的恒温恒湿箱中负荷 7 天，试剂盒与尿液中 $\alpha 1$ -MG 的反应仍具有较高的吸光度，且呈现良好的线性关系， $R^2 = 0.9982$ 。由此可见，本研究中的 $\alpha 1$ -MG 试剂盒具备较好的稳定性。

由表 2 可见，我们对该方法的检测试剂盒进行了加标回收率实验，在已知 $\alpha 1$ -MG 浓度（18.5mg/L）的尿液样本中添加不定量的 $\alpha 1$ -MG 校准物，分别添加 10mg/L、20mg/L 及 35mg/L，重复 3 次测试，计算回收率及相对标准偏差，回收率在 94.0%-106.0% 范围内，相对标准偏差 < 5%。另外，我们对尿液中较常见的干扰物质做了干扰试验，包括：10g/L 血红蛋白、0.6g/L 胆红素、0.6g/L 维生素 C、10g/L 肌酐，均对本测试方法无影响。这两个实验表明：本研究中的 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒在尿液中的检测应用具有较好的可行性。

最后，我们使用自制的和日本进口的 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒分别对医院收集的 101 例临床样本进行平行测试，测试结果如图 3 所示，由图可见，临床样本的 $\alpha 1$ -MG 含量都在试剂盒的检测范围内，两种方法的测试结果对比，呈现良好的相关性， $R \approx 0.9854$ 。我们还对本研究中的 $\alpha 1$ -MG 试剂盒做了精密度实验，分别对 3 个不同水平的尿液样本进行重复测试（n=20），其标准偏差控制在 0.21-1.76 范围内，其 CV 值 < 5%。表明本研究的试剂盒能够满足临床测试的需要。

综上所述，本研究利用胶乳增强免疫比浊法研制了检测尿液中 $\alpha 1$ -MG 的试剂盒，并对试剂盒的检测性能、精密度、稳定性、干扰试验、回收率、临床对比等作了分析测试。实验结果表明：本方法研制的尿液 $\alpha 1$ -MG 检测试剂盒，测试性能良好，能够满足临床检测的需要，可为肾脏疾病的临床诊断和治疗提供更多的参考依据。

参考文献

- [1] 彭明婷,周文宾.尿液分析规范化的相关问题[J].中华医学检验杂志,2013,36(12)
- [2] Urine protein profiling identified alpha-1-microglobulin and haptoglobin as biomarkers for early diagnosis of acute allograft rejection following kidney transplantation[J].European Urology Supplements,2014,13(1),e910
- [3] Mark A.Perazella,The Urine Sediment as a Biomarker of Kidney Disease[J].American Journal of Kidney Diseases,2015,66(5),748-755
- [4] Arzu Çağdaş,Kiliç Aydinli,Tülay Irez,Kamil Temizyürek,Memnune Y.Apak.Evaluation of the fetal kidney maturation by assessment of amniotic fluid alpha-1 microglobulin levels[J].European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology,2000,90(1),55-61

- [5] Chiz-Tzung Chang, Hsin-Yi Liao, Wen-Hsin Huang, et al. Early prediction of severe acute pancreatitis by urinary β -2-microglobulin /saposin B peak ratios on MALDI-TOF[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 44(2), 115-122
- [6] Sigurd E. Delanghe, Marijn M. Speeckaert, et al. Soluble transferrin receptor in urine, a new biomarker for IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis[J]. *Clinical Biochemistry*, 2013, 46(7-8), 591-597
- [7] Anthony G.W. Norden, Marta Lapsley, Robert J. Unwin. Chapter Three - Urine Retinol-Binding Protein 4: A Functional Biomarker of the Proximal Renal Tubule[J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2014, 3, 85-122
- [8] Bert E.J. Maddens, Sylvie Daminet, Kristel Demeyere, Dieter Demon, Pascale Smets, Evelyne Meyer. Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010, 134(3-4), 259-264
- [9] 丛玉隆等. 现代尿液分析技术与临床[M]. 第1版, 北京: 人民军医出版社. 2007: 233
- [10] Jing Kang, Jing Liu, Hong Shang, et al. Urine alpha1-microglobulin is a better marker for early tubular dysfunction than beta2-microglobulin among tenofovir-exposed human immunodeficiency virus-infected men who have sex with men[J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015, 19(4), 410-416
- [11] Misao Takano, Junko Tanuma, et al. Urinary beta-2 microglobulin and alpha-1 microglobulin are useful screening markers for tenofovir-induced kidney tubulopathy in patients with HIV-1 infection: a diagnostic accuracy study[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013, 19(5), 850-857
- [12] M. Del Palacio, S. Romero, J.L. Casado. Proximal tubular renal dysfunction or damage in HIV-infected patients[J]. *AIDS Rev*, 14 (2012), pp. 179-187
- [13] Jonas Nordberg, Maria Allhorn, Ingemar Winqvist, et al. Quantitative and qualitative evaluation of plasma and urine α 1-microglobulin in healthy donors and patients with different haemolytic disorders and haemochromatosis[J]. *Clinica Chimica Acta*. 2007, 386(1-2), 31-37
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法检测致病菌的研究

尹彬洋 陈翊平 蒋兴宇

国家纳米科学中心

通讯作者: 陈翊平, Email: chenyp@nanoctr.cn; 蒋兴宇, E-mail: xingyujiang@nanoctr.cn

[摘要] **目的:**本研究构建了一种基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法用于环境、临床和食品样品中细菌, 病毒检测。**方法:**利用大粒径超顺纳米磁珠作为磁分离载体, 从样品中捕获和富集目标物, 同时将小磁颗粒作为磁信号探针, 根据大小不同的磁颗粒在同一磁场中的分离速度不同, 通过免疫反应, 溶液中没有被分离的小磁颗粒的浓度和样品中目标物的致病菌成反比, 同时, 小磁颗粒的浓度和溶液中水分子的质子的横向弛豫时间成正相关。从而实现测量溶液中横向弛豫时间的改变可间接得到食源性致病菌的含量。**结果:**该传感器是一种均相的免疫反应模式, 检测结果比传统的磁弛豫时间传感的分析方法提高了 2 个数量级, 比经典的酶联免疫的分析方法提高了 2 个数量级。**结论:**基于磁分离的弛豫时间免疫传感分析方法灵敏度高、特异性强、稳定性好, 因此该方法在致病菌、病毒、蛋白质等生物标志物临床检测方面有很大的应用前景。

[关键词] 致病菌; 磁弛豫时间; 免疫传感器; 免疫磁珠磁分离

Magnetic Relaxation Switching based on magnetic separation for the detection of pathogen

Yin Binfeng¹, Chen Yiping^{1*}, Jiang Xingyu^{1*}

¹Beijing Engineering Research Center for BioNanotechnology and CAS Key Lab for Biological Effects of Nanomaterials and Nanosafety, National Center for NanoScience and Technology, Beijing 100190, China.

Corresponding author: Chen Yiping, Jiang Xingyu

[Abstract] Objective:We report a sensing methodology that combines magnetic separation (MS) and magnetic relaxation switch (MS-MRS) for one-step detection of bacteria with high sensitivity and reproducibility. **Methods:**We first employ a magnetic field of 0.01 T to separate the magnetic beads of large size (250 nm in diameter) from small size (30 nm in diameter), and use the transverse relaxation time (T_2) of the water molecules around the 30 nm magnetic beads (MB_{30}) as the signal readout of the immunoassay. MS-MRS sensor integrates target enrichment, extraction and detection into one step and the entire immunoassay can be completed within 30 min. **Results:**Compared with traditional MRS sensor, MS-MRS sensor shows enhanced sensitivity, better reproducibility and convenient operation. **Conclusions:**This method provides a promising platform for point-of-care testing.

[Key Word] Pathogens; Magnetic relaxation time; Immunosensor; Magnetic separation

0 前言

传染性的致病菌是出入境检验检疫工作和公共卫生安全的重点监控对象,对这些传染性的有害物进行及时、准确、便捷的检测,对保护人类健康及生命安全、保障国门安全、维护社会稳定具有重要的意义^[1-3]。

目前检测该致病菌的检测方法主要包括分离培养检测^[4]、免疫检测^[5]、分子生物学等方法^[6]。分离培养方法简单、易行,但由于其检测灵敏度低、耗时长,需要占用大量的实验空间,无法达到检验检疫快速、现场检测的要求。免疫分析法主要包括酶联免疫和胶体金免疫层析试纸条的方法,酶联免疫具有灵敏度高,检测成本低等优点,但其检测时间比较长,难以实现现场快速检测。胶体金免疫层析试纸条的方法具有简单、快速、成本低等优点,适合于大规模样品现场筛查,但其灵敏度比较低,是一种半定量的方法,因此其在需要高灵敏度检测领域方面受到一定的限制。分子生物学方法检测灵敏度较高,特异性较好,但需要昂贵的仪器和较高的专业技术,因此其应用受到一定限制。因此,口岸检验检疫急需建立一种快速、灵敏的检测致病菌的方法。

超顺纳米磁珠 (Superparamagnetic beads, SMBs)^[7]是一种新型纳米磁性纳米材料,因其比表面积大以及在外界磁场下可定向运动,在免疫分离分析、核酸分离与杂交、靶向给药、核磁共振成像等领域到了广泛应用。一般大粒径的超顺纳米磁珠 (200 nm-2 μ m) 作为磁免疫分离的载体^[8],可以从复杂的生物或者环境样品中提取和富集待测目标物。由于其独特的磁分离优势,在免疫亲和富集领域已得到广泛应用。小粒径的纳米磁珠 (10-50 nm) 由于磁饱和和强度小,不容易被磁分离,但其悬浮稳定性和生物相容性很好,一般作为一种磁信号探针,用于生物传感和体内成像等方面的研究。

小粒径的 SMBs 在水溶液中当其状态 (分散或者聚集) 变化时会引起磁场均匀性发生改变,进而显著引起周围水分子质子的横向弛豫时间 T_2 发生改变。SMBs 经表面修饰,偶联上相关抗体、抗原或配体、受体后即可制备成特异性的磁弛豫时间传感探针 (Magnetic relaxation switches, MRS)^[9-11],通过特异性亲和反应,使体系中免疫磁珠的状态发生改变,由于状态改变的程度与目标分子含量相关,通过弛豫时间的改变可间接得到目标分子的含量^[12]。目前,基于 SMB 的 MRS 传感技术具有处理简单、快速、灵敏、无损、适于现场检测等优点^[13-14],在生物分子间相互作用研究、大小分子目标物分析等方面得到了应用。但该方法是基于免疫磁珠状态的变化,而免疫磁珠状态的变化受到多方面因素的影响,例如纳米磁珠的大小和浓度,被分析物表面的结合位点数量、免疫反应时间等条件都会影响弛豫时间的改变,导致该方法的稳定性和可操作性比较差,限制了该方法的进一步应用。

克服传统的磁弛豫时间免疫传感分析方法灵敏度偏低、稳定性和可操作性差等缺点,本工作构建一种灵敏度高,稳定和可操作性好的磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法,用于环境、临床和食品样品中细菌,病毒、蛋白的快速、灵敏地检测,达到适合现场、大规模样品筛查的目的,也可以大大提高磁弛豫时间传感分析方法的分析性能,拓宽磁弛豫时间传感分析方法的应用范围。

1 材料与方方法

1.1 仪器和试剂

小型核磁共振仪 (1.5T) 由上海寰彤科技设备有限公司提供。磁分离器由美国 Ocean NanoTech 公司提供。大粒径的超顺纳米磁珠购自德国 Merck 公司,小粒径的超顺纳米磁珠购自美国 Ocean NanoTech 公司。沙门氏菌及相关的

细菌购于美国国家菌种储存公司。

1.2 大粒径磁珠-抗体偶联物 (SMB_大-Ab1) 的制备

(1) 粒径的超顺纳米磁珠 (SMB_大) 活化: 取 200-500 μL 颗粒直径为 200-1000 nm 的超顺纳米微球放到 EP 管中, 磁分离, 然后加入 1000 μL 的去离子水, 放入涡旋振荡器中振荡 2 min; 再加入 5-20 μL 质量浓度为 50 mg/mL 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS) 和 5-20 μL 质量浓度为 25 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基二亚胺盐酸盐 (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC), 摇振 20 min 进行活化; 过量的 EDC, NHS 和副产物通过磁分离, 再溶于 50-300 μL 摩尔浓度为 0.01M、pH=7.4 的 PBS 溶液中, 得到活化超顺纳米微球液。

(2) 包被抗体 (Ab1) 和大粒径的超顺纳米磁珠的偶联: 取上述活化微球液 80-100 μL , 加入到离心管中, 再加入 0.1-0.3 mg 抗生物大分子的抗体 (Ab), 避光摇振 0.5-2 小时, 经磁分离架分离去除没有反应完全的抗体, 倒掉废液; 然后用 1000-2000 μL 的 PBS 溶液重悬, 然后再用普通的磁分离架进行磁分离, 该步骤重复三次, 最后用 PBS (0.1% BSA) 复溶该复合物, 得到已固定化生物大分子抗体的超顺纳米磁珠, 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 小粒径的超顺纳米磁珠-检测抗体偶联物 (SMB_小-Ab2) 的制备

(1) 小粒径的超顺纳米磁珠活化: 取 200-500 μL 颗粒直径为 10-50 nm 的超顺纳米磁珠 (SMB), 然后放入涡旋振荡器中振荡 2 min; 再加入 5-20 μL 质量浓度为 50 mg/mL 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (N-Hydroxysulfosuccinimide sodium salt, NHS) 和 5-20 μL 质量浓度为 25 mg/mL 的 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基二亚胺盐酸盐 [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC], 避光摇振 20 min (即用锡箔包裹离心管在涡旋振荡器中低速振荡, 以下避光摇振过程皆按此操作) 进行活化。然后再加入 1000 μL 摩尔浓度为 0.01M、pH=7.4 的 PBS 溶液中, 得到活化超顺纳米磁珠溶液。

(2) 检测抗体 (Ab2) 和小粒径超顺纳米磁珠的偶联: 往上述的活化好的超顺纳米磁珠加入 0.1-0.3 mg 抗生物大分子的抗体 (Ab), 避光摇振 0.5-2 小时, 经梯度磁场分离柱分离去除没有反应完全的抗体, 倒掉废液; 用 PBS (0.1% BSA) 复溶抗体, 得到已固定化生物大分子抗体的超顺纳米磁珠溶液, 保存在 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 磁富集和免疫反应

100 μL SMB_大-Ab1, 100 μL SMB_小-Ab2 和 800 μL 不同浓度梯度的 ($10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10$ and 0 cfu/mL) 生物大分子分别混合在 1.5 mL 的离心管中。该混合体系在室温下, 涡流震荡免疫反应 30 min, 随后, 在磁分离架进行磁分离, 将没有被磁体吸附的上清液 (SMB-Ab2 溶液) 转移到另外一个 EP 管中, 用 PBS 缓冲溶液重悬磁珠, 然后将上清液转移到原来装有上清液的那个 EP 管中。

1.5 弛豫时间的测量

将上述最终的上清液转移到 7.5-mm 核磁共振试管中分别测量横向弛豫时间 T₂。每个浓度重复测三次, 通过计算弛豫时间改变的改变量, 从而得出样品中生物大分子的含量。

$$\Delta T_2 = T_{2\text{sample}} - T_{2\text{blank}}$$

T_{2sample}: 经过三次测量取平均值的样品弛豫时间

T_{2blank}: 经过三次测量取平均值的阴性对照组的弛豫时间

1.6 研究方法

不同的粒径的纳米磁珠具有不同的磁饱和和强度, 通常情况下, 磁饱和和强度和磁珠的粒径成三次方关系, 磁珠的粒径越大, 磁饱和和强度越大, 因此在同样的磁场条件下, 大粒径的磁珠越容易分离, 而小粒径的磁珠由于磁饱和和强度小, 不容易被磁分离。我们发现, 粒径在 200 nm 以上的纳米磁珠在 0.04 T 的磁场中 30 s 就完全可以分离, 而粒径在 30 nm 及以下的超顺纳米磁珠则很难在 0.04 T 的磁场中得到分离, 至于需要分离 12 h。基于该原理, 本方法将大粒径的磁珠 (200 nm-2 μm) 作为磁分离的载体, 从样品中捕获和富集目标物, 同时因为溶液中的磁弛豫时间和溶液中的小磁珠的含量成负相关, 小磁珠的浓度越高, 磁弛豫时间的值越小。并且小粒径的磁珠的总量是一定的, 通过免疫学反应, “大粒径的纳米磁珠-目标物-小粒径的纳米磁珠”偶联物被磁分离, 而没有反应的这部分小粒径的磁珠则不能被磁场分离, 可以作为磁弛豫时间传感的信号探针。在磁分离-弛豫时间传感分析中, 磁弛豫时间的改变量仅仅与样品中目标物的含量相关, 因此, 该方法的新方法可以解决传统的磁弛豫时间传感方法灵敏度偏低, 稳定性和

可操作性差等问题，达到提高检测灵敏度的目的。

2 结果和讨论

2.1 磁分离-弛豫时间免疫传感方法的原理

基于粒径大小不同的磁珠在同一磁场中的分离速度不一样，将免疫磁分离和磁信号检测整合在一起，整个分析方法可以一步完成。如图 1 所示，首先制备出两种粒径大小不同的免疫磁珠，在此基础上用大粒径的超顺纳米磁珠(SMB_大)作为免疫亲和载体(粒径在 200 nm-1000 nm 之间)，即在样品前处理中实现生物大分子致病菌和病毒快速捕获和富集。而小粒径的超顺纳米磁珠(SMB_小)作为弛豫时间传感的探针。如果样品中有目标物，通过免疫反应形成“大磁珠-目标物-小磁珠”的复合物，该复合物会在 30 s 被磁分离，没有反应的小粒径磁珠不会被磁分离，进而作为一种磁信号的探针。小磁珠的量和样品中目标物的含量成一一对应的关系，因此该方法中，弛豫时间的改变量只和样品中目标物的含量相关，可以大大提高磁弛豫时间免疫传感分析方法的灵敏度，同时与其它方法相比该方法的可操作性得到进一步的提高。

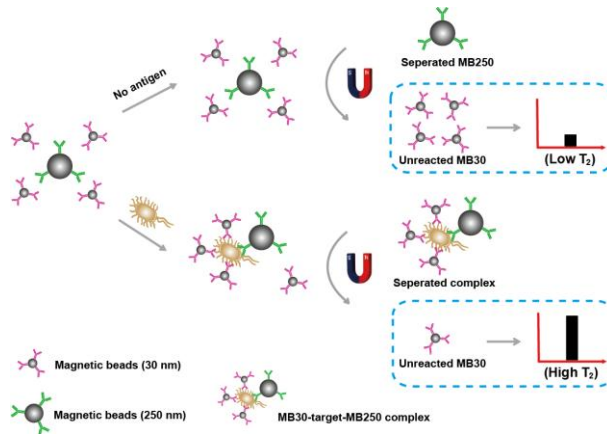


图 1 磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法的示意图

粒径为 250nm 的大磁珠被用于分离和富集样品中的目标物，而粒径为 30nm 的小磁珠用于作为信号系统。

Figure 1. The schematic illustration of MS-MRS sensor. MB₂₅₀ and MB₃₀ can selectively capture and enrich the target to form the sandwich “MB₂₅₀-target- MB₃₀” conjugate. After the magnetic separation, the T₂ signal of water molecules around the unreacted MB₃₀ can be employed as the readout.

2.2 不同粒径的大小磁珠在同一磁场中分离速度的差异

粒径为 250 nm 的大磁珠很容易被普通的磁场分离，可以作为免疫磁分离的载体。粒径为 30 nm 的小磁珠由于饱和磁强度比较小，不容易被普通的磁场分离，因此其可以作为弛豫时间传感探针。通过免疫反应，没有被分离的小磁珠的浓度和样品中目标物的含量成反比，而小磁珠的浓度和横向弛豫时间的值成反比，因此样品中致病菌的含量和弛豫时间的值成正相关，这是定量的基础。在同一个磁场条件下(0.01T)，250 nm 的大磁珠很容易被磁场分离到玻璃瓶的底部(30 s 完成)，而 30 nm 的小磁珠则不容易被磁场分离(12 h)，因此其在玻璃瓶中呈悬浮状，说明没有被磁场分离(图 2)。



图 2 粒径大小不同的磁珠在同一磁场中分离速度的差异

玻璃瓶中下沉状为分离后的 250nm 的大磁珠，悬浮状为 30nm 的小磁珠。

Figure 2. The different magnetic separation speeds between MB₂₅₀ and MB₃₀ under the same magnetic field (0.01T). The MB₃₀ is well dispersed in the magnetic field (after 12 h), and the MB₂₅₀ is precipitated to the bottom of the vial (after 1 min) in the same magnetic field.

2.3 小磁珠的浓度和横向弛豫时间值 (T_2) 之间的关系

从图 3 可以得到，弛豫时间值和小磁珠的浓度成良好的线性关系，小磁珠的浓度越大，其弛豫时间值越小，这也是本研究中，能够利用小磁珠作为弛豫时间信号探针的基础（图 3）。

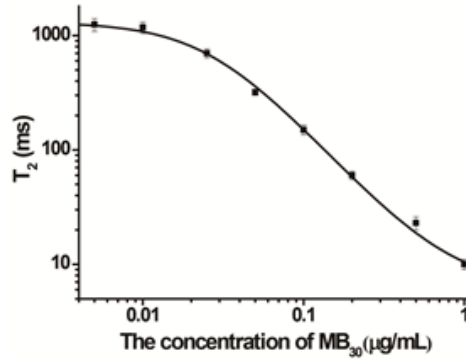


图 3 小磁珠的浓度和横向弛豫时间值 (T_2) 之间的关系

Figure 3. The relationship between T_2 value and the concentration of MB₃₀. The concentration of MB₃₀ is 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01 and 0.005 µg/mL.

2.4 牛奶中沙门氏菌的检测

在条件优化的基础上，我们研究了磁分离-磁弛豫时间传感方法和传统的磁弛豫时间传感方法的灵敏度和线性范围。从图 4 (a) 和 (b) 中，我们可以看到，磁分离-磁弛豫时间传感方法可以检测到 10^2 cfu/mL 沙门氏菌，而传统的磁弛豫时间传感方法可以检测到 10^4 cfu/mL 沙门氏菌。从图 4 (c) 和 (d) 中，我们可以看到，磁分离-磁弛豫时间传感方法的线性范围比传统的磁弛豫时间传感方法宽，定量检测到的浓度更低，有利于在实际样品中对沙门氏菌的检测。

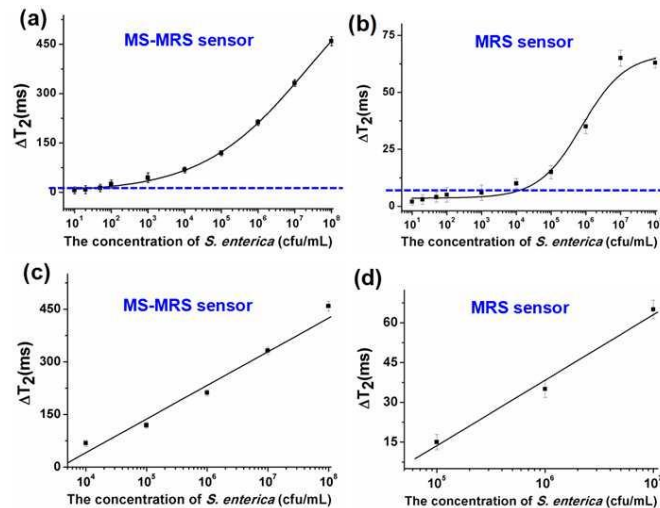


图 4 磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法和传统的弛豫时间免疫传感分析方法检测沙门氏菌的灵敏度和线性范围。(a) 和 (c) 分别表示磁分离-弛豫时间免疫传感分析方法检测沙门氏菌的灵敏度和线性范围；(b) 和 (d) 分别表示传统的磁弛豫时间免疫传感分析方法检测沙门氏菌的灵敏度和线性范围。

Figure 4. (a) and (c) The sensitivity and dynamic ranges of MS-MRS sensor for detection of *S. enterica* in PBS solution. (b) and (d) The sensitivity and dynamic ranges of conventional MRS sensor for detection of *S. enterica* in PBS solution. The dashed lines in (a) and (b) show the cut off values of MS-MRS sensor and MRS sensor.

为了验证所构建方法的准确性和可行性，我们将该磁分离-磁弛豫时间传感方法和传统的磁弛豫时间传感方法分

别用于阳性和阴性牛奶实际样品的检测中。这些实际牛奶样品由 RT-PCR 方法进行验证。图 5 结果表明,采用磁分离-磁弛豫时间传感方法对阳性样品的检出率比磁弛豫时间传感方法的检出率高,因此说明我们所构建的方法在实际样品的检测中具有很好的应用前景。

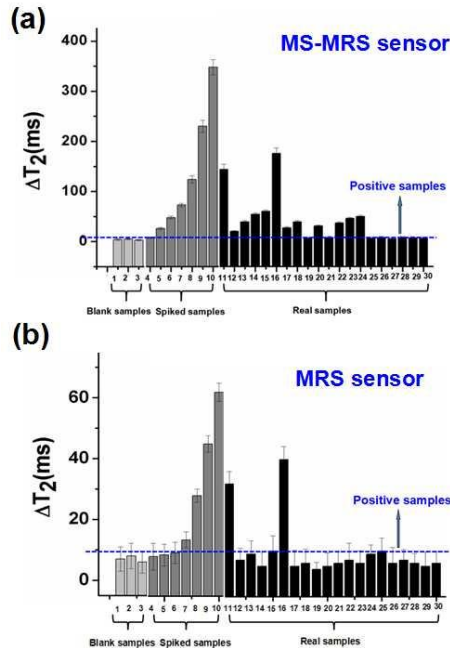


图 5.两种方法检测实际的牛奶样品中沙门氏菌的结果。(a) 表示磁分离-磁弛豫时间传感方法检测实际牛奶样品的结果;(b) 表示传统的磁弛豫时间传感方法检测实际牛奶样品的结果。

Figure 5.The results of MS-MRS for detection of blank samples, spiked samples and real samples. (a) shows that the result of MS-MRS sensor for detection of *S. enterica*. (b) shows that the result of MRS sensor for detection of *S. enterica*.

2.5 传统方法的比较:

酶联免疫法检测需要多次清洗过程,反应时间长,劳动强度大。传统的磁弛豫时间传感的分析方法的灵敏度相对较低。本研究方法无需复杂的样品前处理过程,一步法即完成整个免疫反应,稳定性好,检测灵敏度得到了进一步提高,最低检测线在 10^2 cfu/mL,30 分钟完成。三种分析方法的优缺点比较见表 1。

表 1 检测致病菌的三种分析方法优劣的比较

方法	灵敏度	检测时间	操作性
酶联免疫法	10^4 cfu/mL	6 h	复杂
传统的磁弛豫时间传感的方法	10^4 cfu/mL	0.5 h	方便
基于磁分离的弛豫时间免疫传感	10^2 cfu/mL	0.5 h	方便

3 结论

本研究所提的磁免疫分离-磁弛豫时间传感的分析方法,将免疫磁分离的优势和传统的磁弛豫时间传感方法的优点结合起来,构建一种灵敏度高,操作方便,稳定性好的免疫传感分析方法。该方法比传统的磁弛豫时间传感的分析方法提高了两个数量级,比经典的酶联免疫的分析方法提高了 2 个数量级,同时该传感器是一种均相的免疫反应模式,可以将磁分离、检测和磁信号检测结合在一起,一步完成,整个方法操作简单,反应时间短(30 min),因此该方法在致病菌、病毒、蛋白质等生物标志物检测方面有很大的应用前景。

参考文献

- [1] Mandal PK,Biswas AK,Choi K,et al.Methods for rapid detection of foodborne pathogens: An overview. Am.J.Food Technol,2011,6(2):87-102.
- [2] Chen WW,Li QZ,Zheng WS,et al. Identification of Bacteria in Water by a Fluorescent Array.Angew.Chem.Int.

- Edit,2014,53:13734-13739.
- [3] Irwansyah I,Li YQ,Shi WX,et al.Gram-Positive Antimicrobial Activity of Amino Acid-based Hydrogels.Adv. Mater, 2015,27:648-654.
- [4] Victor LY,Joseph FP, Maddalena CP,et al. Distribution of Legionella Species and Serogroups Isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. J Infect Dis,2002,186(1): 127-128.
- [5] Xie CH,Chen FJ,Yang TB.A high-affinity anti-salbutamol monoclonal antibody:key to a robust lateral-flow immunochromatographic assay. Anal. Biochem,2012,426:118-125.
- [6] Rosemary G,McKaig MPH,Ralph S,et al.Human Papillomavirus and head and neck cancer:Epidemiology and molecular biology.Head & Neck,1998,20(3):250-265.
- [7] Shevkoplyas SS,Siegel AC,Westervelt RM,et al.The force acting on a superparamagnetic bead due to an applied magnetic field.Lab chip,2007,7:1294-1302.
- [8] Olsvik O,Popovic T,Skjerve E,et al. Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology.Clin Microbiol Rev, 1994,7(1):43-54.
- [9] Cai SY,Liang GH,Zhang P,et al. Rational strategy of magnetic relaxation switches for glycoprotein sensing. Analyst, 2011,136:201-204.
- [10] Liang GH,Chen H,Zhang S,et al.Magnetic nanosensors for highly sensitive and selective detection of bacillus Calmette-Guérin. Analyst,2012,137:675-679.
- [11] Tsourkas A,Hofstetter O,Hofstetter H,et al.Magnetic Relaxation Switch Immunosensors Detect Enantiomeric Impurities. Angew.Chem. Int.Ed.2004, 43:2395-2399.
- [12] Perez JM, Josephson L, Loughlin TO,et al. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. Nat Biotechnol,2002,20: 816-820.
- [13] Peterson,VM,Castro CM, Lee H, et al.Orthogonal Amplification of Nanoparticles for Improved Diagnostic Sensing. ACS Nano,2012,6:3506-3513.
- [14] Tassa C,Shaw SY,Weissleder R.Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles:A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging,Molecular Diagnostics,and Therapy.Accounts.Chem.Res,2011,44:842-852.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于硫磺素 T 和自组装多肽纳米材料的肺炎支原体抗体 IgM 双信号检测

刘野^① 孙红岩^① 王云云^② 丛玉隆^{②**} 蒋兴宇^{①**}

①国家纳米科学中心, 北京 100190; ②解放军总医院南楼检验科, 北京 100853)

**通讯作者 E-mail: xingyujiang@nanoctr.cn; yulongc@263.net

[摘要] 本研究建立了一种紫外吸收和荧光双信号读出的肺炎支原体 IgM 型抗体检测方法。原理是多肽纳米材料在碱性磷酸酶催化下, 自发形成 β 折叠, 组成高度有序的分子纳米纤维结构, 随后加入的硫磺素 T 分子能够与 β 折叠结构结合, 引起硫磺素 T 紫外和荧光信号的改变, 在一定范围内信号强度与碱性磷酸酶的浓度呈正比。这种级联作用在传统 ELISA 基础上可以将信号放大, 提高检测灵敏度。利用该方法检测肺炎支原体感染者血清中的 IgM 抗体, 显示较好的灵敏度, 与常规检测用的被动凝集法比较, 相关性较好。该方法采用了一种新的 ELISA 信号读出模式, 为体外检测提供了新选择。

[关键词] 自组装多肽; 硫磺素 T; 肺炎支原体抗体; 双信号检测

Dual Readout Assay of Mycoplasma Pneumoniae Antibody IgM Based on Thioflavine T and Self-Assembly Polypeptic Nanomaterials

Liu Ye¹, Sun Hongyan¹, Wang Yunyun², Cong Yulong^{1**}, Jing Xingyu^{2**}

¹ National Center for NanoScience and Technology and The University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China.

²Clinical Laboratory of South Building, Chinese P. L. A. General Hospital, Beijing 100853, China.

**Corresponding authors: Xingyu Jiang, Email: xingyujiang@nanocr.cn,

Yulong Cong, Email: yulongc@263.net

[Abstract] We established a dual signal readout assay by the ultraviolet absorption and fluorescence intensity on the detection of mycoplasma pneumoniae IgM antibody. The mechanism of the assay was based on a kind of polypeptide nanomaterials that forming into beta fold structure spontaneously when catalyted by alkaline phosphatase. Then the polypeptides formed into a highly ordered molecular nano fiber structure. The thioflavine T molecules can combine with beta folding structure, which caused the ultraviolet and fluorescence signal changes. Within a certain range, the change in ultraviolet and fluorescence signal were associated with the concentration of alkaline phosphatase. This cascade effect was based on the traditional ELISA could amplify signals, improve the sensitivity. We have applied this method to detect mycoplasma pneumoniae infection IgM antibody in the positive serum, which showed better sensitivity than traditional ELISA and better correlation compared with commercial ELISA kits. This new readout model provides a new choice for in vitro detection.

[Key Words] Self-assembled Polypeptide;Thioflavine T;Mycoplasma pneumoniae antibody;Dual Readout.

有些小分子多肽在水介质中可自发或触发形成超分子结构材料，组装形成形态结构和功能特异的自组装体^{1,2}。通过设计不同的氨基酸序列可得到多种具有特殊功能的多肽纳米材料³。另外，由于自组装多肽具有生物相容性良好、在体内易降解、产物无毒等优点，近些年来，在生物传感器、材料科学、生物医药及临床医学等领域都有广阔的应用前景⁴⁻¹⁰。

本研究设计了一种对碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）响应的小分子多肽，ALP刺激下以 β -折叠结构的方式自组装形成规则的纳米纤维，进而形成稳定状态的水凝胶。硫磺素 T（Thioflavine T, ThT）是一种荧光染料，通常作为检测 β -淀粉样蛋白聚集体的探针¹¹⁻¹³，当它结合富含 β -折叠结构时，荧光强度会增强¹⁴。根据这一特性，我们首先尝试在形成 β -折叠结构的多肽组装体中加入 ThT，结果显示 ThT 的紫外吸收和荧光强度均增加， β -折叠结构越多，增加越显著，而一定范围内 β -折叠结构形成的数量与刺激物 ALP 浓度呈正相关，呈现信号的级联放大。因此，本研究在以 ALP 为检测体系的传统 ELISA 基础上，引入自组装多肽和 ThT，旨在通过多级信号放大提高检测灵敏度。

本实验选择肺炎支原体（mycoplasma pneumoniae, MP）作为检测物。MP 是引起人体呼吸道感染的重要病原体，感染人群以儿童和青少年居多^{15,16}。Mp-IgM 出现在疾病早期，Mp-IgM 阳性常被作为急性期感染的诊断指标¹⁷。ELISA 法是用于检测 Mp-IgM 经典方法，但传统的显色方法很大程度上限制了 ELISA 的应用，新的 ELISA 读出模式有望开启体外诊断新篇章。

1 材料和方法

1.1 试剂和样本来源

Tris-HCl 缓冲液本实验室配置，浓度为 0.05 M，pH 7.4。鼠源 MP 菌体抗原、ALP 标记的鼠抗人 IgM 抗体购自北京市沫之东生物技术有限公司。MP-IgM 酶联免疫试剂盒购自德国欧盟公司。硫磺素 T 购自 Sigma-Aldrich 公司。MP-IgM 阳性血清样本由解放军总医院检验科提供。

1.2 自组装多肽前体制备

多肽前体（浓度为 0.2 mg/ml）用双蒸水溶解，NaOH 溶液调节 pH 至 8.5~9.5。多肽前体溶液中加入碱性磷酸酶标记抗体（酶活性约为 60 U/ml），室温作用 30 min 后，通过圆二色光谱仪（JASCO j-810）对 β 折叠结构进行鉴定。

1.3 圆二色光谱鉴定

蛋白质或多肽的远紫外 CD 谱，能反映出蛋白质或多肽链二级结构的信息。样品浓度稀释 100 倍，将样品置于体积为 200 μ l、厚度为 0.5 mm 的石英样品池中，用 Jasco J-810 型圆二色谱仪分析自组装后小分子肽的链段空间构象。设置波长范围为 190~260 nm，扫描速度为 20 nm/min，最终的圆二色谱图谱为 3 次扫描的叠加。对照组为不加 ALP 催化的多肽溶液。

1.4 ELISA 试剂盒检测 MP-IgM

按商家提供的试剂盒说明书操作。

1.5 自组装多肽和硫磺素 T 检测 MP-IgM

包被 MP 菌体抗原 (0.05M Tris-HCl 缓冲液, pH 值 7.4), 4℃ 过夜。洗板三次。加入 10 倍稀释的健康血清, 37℃ 孵育 1 h, 洗板三次。加入 ALP 标记的鼠抗人 P-选择素检测抗体, 37℃ 孵育 1 h, 洗板五次。加入多肽前体和硫磺素 T (1:50 稀释), 同时设置 PNPP 对照孔, 避光孵育 15 min。使用 EnSpire multilabel 荧光分析仪检测荧光强度, 岛津 UV2450 紫外分光光度计检测紫外吸收光度值。

2 结果

2.1 实验原理

应用自组装多肽和 ThT 结合的方法提高 MP-IgM 检测灵敏度主要体现在三级放大的效应 (图 1)。首先 ALP 能够催化自组装多肽形成 β -折叠结构, 这种结构的数量在一定范围内与 ALP 的浓度成正比, ELISA 反应体系中, ALP 浓度与被检测物的含量有关; 同时, ThT 分子与富含 β -折叠结构结合, 造成 ThT 在紫外区域光吸收增强, 荧光强度也增加。因此通过 ALP 与自组装多肽、 β -折叠结构与 ThT 的作用, 导致 ThT 在紫外吸收和荧光强度的增加, 形成检测信号的连续放大。

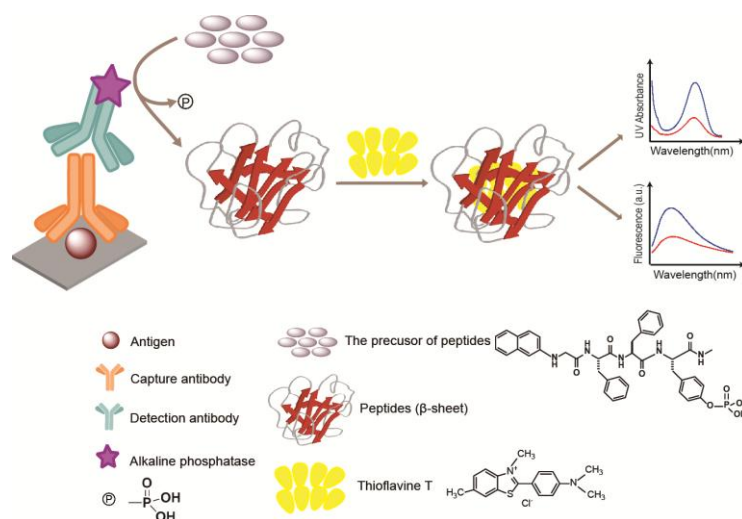


图 1 Peptide-ThT 读出方法的原理图。硫磺素 T 分子能够与 β 折叠结构结合, 引起硫磺素 T 紫外和荧光信号的改变, 在一定范围内信号强度与碱性磷酸酶的浓度呈正比。

Fig.1. The scheme of Peptide-ThT method. ALP catalyzes peptide precursors to form lots of β -sheet structures. The thioflavine T molecules can combine with beta folding structure, which caused the ultraviolet and fluorescence signal changes. Within a certain range, the change in ultraviolet and fluorescence signal were associated with the concentration of alkaline phosphatase.

2.2 圆二色谱 (circular dichroism, CD) 鉴定多肽 β 折叠结构形成

利用 CD 谱探讨小分子多肽在其自组装纳米纤维结构中的空间排列。图 2 实线所示 216 nm 处的负 CD 信号峰说明多肽骨架在自组装纳米纤维结构中以 β -折叠方式进行排列。图 2 实线是多肽前体溶液加入 ALP 后检测的 CD 谱, 呈现典型的 β -折叠 (在 216-218nm 有一负峰, 在 185-200nm 有一强的正峰)。未加 ALP 的对照组未见典型 CD 谱 (见图 2 虚线部分)。

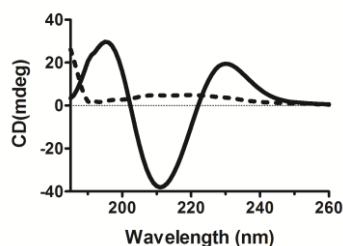


图2 CD谱鉴定鉴定多肽 β 折叠结构形成（实线为多肽前体自组装检测的CD谱，虚线为不加ALP催化的对照组）

Fig. 2. ALP-labeled antibody catalyzes peptides precursors to form peptidic β -sheet structures.

(The black line displays CD spectra of peptide precursor after self-assembly, the dotted lines indicates control group without ALP catalytic)

2.3 自组装多肽对硫磺素 T 紫外吸收和荧光强度的影响

利用紫外光谱和荧光吸收光谱探讨小分子多肽自组装形成纳米结构对 ThT 的影响。图 3 显示多肽自组装纳米纤维结构对硫磺素 T 紫外吸收和荧光光谱有显著增强的作用（蓝线为 ALP 刺激多肽自组装，并与 ThT 结合后对其紫外吸收和荧光光谱有增强作用；红线为不加 ALP 的对照组。）

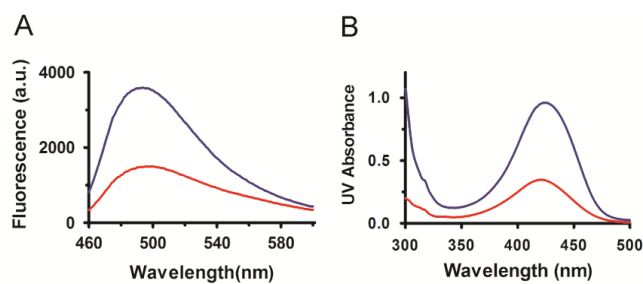


图3 自组装多肽对硫磺素T紫外吸收和荧光强度的影响

(A图为自组装多肽对硫磺素T荧光强度的变化；B图为自组装多肽对硫磺素T紫外吸收增强的变化)

Fig.3. The influence of self-assembling peptides to ultraviolet absorption and fluorescence intensity of ThT (figure A displays the fluorescence intensity enhancement induced by self-assembling peptides; figure B displays the ultraviolet absorption enhancement induced by self-assembling peptides .

2.4 自组装多肽和硫磺素T检测MP-IgM紫外吸光度值和荧光强度的变化

首先用商品化的 ELISA MP-IgM 检测试剂盒鉴定 MP 阳性血清，筛选抗体滴度为 1:1280 的样本倍比稀释后用自组装多肽和硫磺素 T 检测 MP-IgM 紫外吸光度值和荧光强度的变化，如图 4 所示。图 4A 由上至下依次为抗体稀释 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 的荧光强度，荧光强度伴随抗体浓度的升高逐渐增加；图 4B 由上至下依次为抗体稀释 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280 的紫外吸光度的变化，吸光度值伴随抗体浓度的升高逐渐增加。

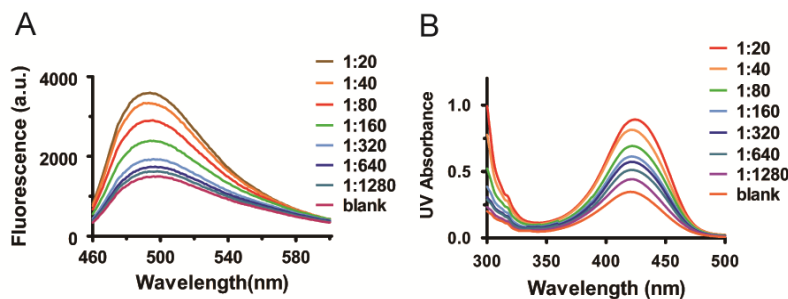


图4 自组装多肽和硫磺素T检测MP-IgM紫外吸光度值和荧光强度的变化

Fig.4. The change of ultraviolet absorption and fluorescence intensity of ThT

with increasing concentrations of MP-IgM. From up to down: 1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280, respectively.

2.5 自组装多肽和硫磺素 T 检测 MP-IgM 双信号读出线性相关曲线

根据图 4, 以 $\log[\text{MP-IgM 稀释倍数}]$ 为横坐标, 分别以紫外吸光度值和最大荧光强度作为纵坐标绘制线性回归曲线, $\log[\text{MP-IgM 稀释倍数}]$ 与紫外吸光度值和荧光强度均显示较好的相关性, R 值分别为 0.9889、0.9933。

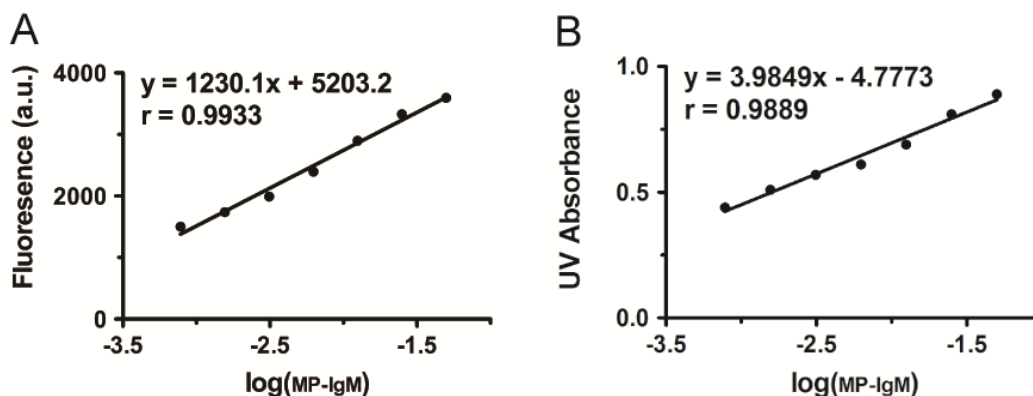


图 5 自组装多肽和硫磺素 T 检测 MP-IgM 双信号读出

Fig.5. Assay of LOD of both NMe-Congo Red method and commercial ELISA.

3 讨论

自组装多肽是近年来材料学和生物医学等领域的研究热点^{18, 19}。多肽自组装形成的二级结构是其发挥特定功能的重要基础。本实验采用的小分子多肽对 ALP 有响应性, ALP 作用下, 溶液于水中的多肽分子自组装形成 β 折叠构象。在一定范围内, ALP 浓度越大, 自组装速度越快, 形成的 β 折叠结构也越多。荧光染料 ThT 与较多的 β 折叠结构结合表现出紫外吸收和荧光强度的显著改变。我们应用这一原理改进了 ELISA 读出模式, 初步验证了通过检测 ThT 紫外和荧光双信号进行结果判读的可行性。

MP-IgM 是检测肺炎支原体早期感染的重要指标, 尽管 ELISA 是 MP-IgM 检测的经典方法, 但由于其灵敏度差, 临床上常采用被动凝集法测定²⁰。被动凝集法是将肺炎支原体细胞膜成分致敏人工明胶颗粒, 致敏粒子在与入血清中存在的肺炎支原体抗体发生凝集反应。这种方法通过肉眼对抗体滴度进行判读, 容易造成较大误差, 影响结果的准确性。因此提高传统 ELISA 灵敏度, 通过多种方式获取可靠结果具有重要意义。

本实验中, 首先利用商品化的 MP-IgM 抗体定量试剂盒筛选出高滴度的阳性血清, 再采用改进的 ELISA 进行双信号检测, 结果显示改进的 ELISA 方法检测灵敏度显著提高。通过线性回归分析发现, ThT 紫外吸光度值与待测 MP-IgM 抗体滴度呈正相关, R 值为 0.9889; ThT 荧光强度与待测 MP-IgM 抗体滴度也呈正相关, R 值为 0.9933。两种信号的检测均获得较理想的结果。这种双信号读出的方式也将为临床检测工作者带来更多选择。

参考文献

- [1] Fichman, G.; Gazit, E., Self-assembly of short peptides to form hydrogels: design of building blocks, physical properties and technological applications. *Acta biomaterialia* **2014**, *10*, 1671-82.
- [2] Saboktakin, M. R.; Tabatabaei, R. M., Supramolecular hydrogels as drug delivery systems. *International journal of biological macromolecules* **2015**, *75*, 426-36.
- [3] Chen, H.; Ma, X.; Wu, S.; Tian, H., A rapidly self-healing supramolecular polymer hydrogel with photostimulated room-temperature phosphorescence responsiveness. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53*, 14149-52.
- [4] Knipe, J. M.; Peppas, N. A., Multi-responsive hydrogels for drug delivery and tissue engineering applications. *Regenerative biomaterials* **2014**, *1*, 57-65.
- [5] Yin, C.; Wang, M.; Lei, C.; Wang, Z.; Li, P.; Li, Y.; Li, W.; Huang, Y.; Nie, Z.; Yao, S., Phosphorylation-Mediated Assembly of a Semisynthetic Fluorescent Protein for Label-Free Detection of Protein Kinase Activity. *Analytical chemistry* **2015**, *87*, 6311-8.
- [6] Dou, Q.Q.; Liow, S.S.; Ye, E.; Lakshminarayanan, R.; Loh, X. J., Biodegradable thermogelling polymers: working towards clinical applications. *Advanced healthcare materials* **2014**, *3*, 977-88.
- [7] McKenzie, M.; Betts, D.; Suh, A.; Bui, K.; Kim, L. D.; Cho, H., Hydrogel-Based Drug Delivery Systems for Poorly

- Water-Soluble Drugs. *Molecules* (Basel, Switzerland) 2015, 20, 20397-408.
- [8] Schneider, H. J.; Strongin, R. M., Supramolecular interactions in chemomechanical polymers. *Accounts of chemical research* 2009, 42, 1489-500.
- [9] 9Hacker,M.C.;Nawaz,H.A.,Multi-Functional Macromers for Hydrogel Design in Biomedical Engineering and Regenerative Medicine. *International journal of molecular sciences* 2015, 16, 27677-706.
- [10] Pachioni-Vasconcelos Jde, A.; Lopes, A. M.; Apolinario, A. C.; Valenzuela-Oses, J. K.; Costa, J. S.; Nascimento Lde, O.; Pessoa, A.; Barbosa, L. R.; Rangel-Yagui Cde, O., Nanostructures for protein drug delivery. *Biomaterials science* 2016, 4, 205-18.
- [11] Wang, P.; Liao,W.; Fang, J.;Liu, Q.; Yao, J.; Hu, M.; Ding, K.,A glucan isolated from flowers of *Lonicera japonica* Thunb. inhibits aggregation and neurotoxicity of Abeta42. *Carbohydrate polymers* 2014, 110, 142-147.
- [12] Carrotta, R.; Canale, C.; Diaspro, A.; Trapani, A.; Biagio, P. L.; Bulone, D., Inhibiting effect of alpha(s1)-casein on Abeta(1-40) fibrillogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 2012, 1820, 124-132.
- [13] Silva,B.A.;Einarsdottir,O.;Fink,A.L.;Uversky,V.N.,Biophysical Characterization of alpha-Synuclein and Rotenone Interaction.*Biomolecules* 2013, 3, 703-732.
- [14] Kawasaki,T.;Kamijo,S., Inhibition of aggregation of amyloid beta42 by arginine-containing small compounds. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2012, 76, 762-766.
- [15] Liu,H.M.;Lu,Q.; Hong, J.G.; Liu,E.M.,[A systematic review of the therapy for *Mycoplasma pneumoniae* infections in children]. *Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics* 2016, 54, 111-118.
- [16] Singh, P.; Seth, A., *Mycoplasma pneumoniae*, A Tale of 50 Years. *Indian pediatrics* 2016, 53, 147-8.
- [17] Zhao, D. Y.; Chen, H.Z.; Zheng, Y. J.,[The diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections]. *Zhonghua er ke za zhi. Chinese journal of pediatrics* 2016, 54, 98-100.
- [18] Sun, Y.; Li, W.; Wu, X.; Zhang, N.; Zhang, Y.; Ouyang, S.;Song, X.; Fang, X.; Seeram, R.; Xue, W.; He, L.; Wu, W., Functional Self-Assembling Peptide Nanofiber Hydrogels Designed for Nerve Degeneration. *ACS applied materials & interfaces* 2016, 8, 2348-2359.
- [19] Chassenieux, C.;Tsitsilianis,C.,Recent trends in pH/thermo-responsive self-assembling hydrogels:from polyions to peptide-based polymeric gelators. *Soft matter* 2016, 12, 1344-1359.
- [20] Daxboeck, F.; Krause, R.; Wensch, C.,Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2003, 9, 263-273.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

扫描式质子束成像仪研制及其光学特性研究

杨锋^① 张湘^① Wen Chien Hsi^{②*} 周荣^{①*}

①四川大学物理学院 四川 成都 610064

②复旦大学附属肿瘤医院 上海 201315

[摘要] 目前实践中所采用的检测重离子束在横截面上剂量分布情况的方式各有优劣。我们对于该问题进行了研究,设计了基于闪烁体,镜面反射板与相机三个重要部分的测量仪器,对束流的剂量分布的状况予以考察。同时,通过精密的电动位移平台对于上述三部分的相对位置进行遥控校准。设备在最后成文时间所能达到的能量分辨率小于 $8.1 \times 10^{-4} \text{g/cm}^2$,空间分辨率为 0.35mm,成像均匀性在 $\pm 3.5\%$,并且可以通过算法进行数值的修正,各项指标均已能够达到临床医学上要求的精度。

[关键词] 重离子治癌; 剂量验证; 校准方式

The development of the scanning proton beam imager and their optical properties

YANG Feng , ZHANG Xiang, Wen Chien Hsi, ZHOU Rong

[Abstract] The current practice in the detection of heavy ion beam in the cross section of the dose distribution of each has its advantages and disadvantages. We have carried out research on this problem, and designed a measuring instrument based on three important parts of the scintillation, the mirror reflector and the camera, and the dose distribution of the beam is investigated. At the same time, the relative position of the three parts is calibrated by the precision of the electric displacement platform. In the last written time equipment can achieve the energy resolution is less than the $8.1 \times 10^{-4} \text{g/cm}^2$, the spatial resolution of 0.35 mm, the imaging uniformity of $\pm 3.5\%$, and can be through the algorithm of numerical correction, the indicators have been able to achieve the accuracy of clinical medicine

1 引言

在物质文明与精神文明都日益丰富的今天,人们有了享受更加美好生活的机会和权利。但是,却也有越来越多的人正在受困于癌症给他们带来的痛苦之中。因此对于现代医学而言,彻底消灭癌症,是整个医学界都在致力于要攻克的难题。

传统治疗癌症的医疗方式主要有放疗,化疗,手术切除,中药调理等等,上述的目的的各种治疗方法都有一些无法避免的缺点,新型的重离子照射癌症治疗法已经进入医学界的视线并逐步开始得到临床应用。

在临床实践上,多使用质子或者 ^{12}C 离子,用医用的加速器将质子或者 ^{12}C 离子加速到一定的能量,对癌变的人体组织进行照射,以杀死或者抑制癌变细胞的活性,这一治疗方法称为癌症的重离子治疗。

与传统的 γ 射线或者X射线的放射性治疗相比较,重离子治疗在物理学与生物学上都有着一定的优点,这些优点是值得我们进行研究与利用的。

在物理学上,由于重离子能量损失存在着Bragg效应,所以在正常的人体组织中,射线的能量释放并不多,而到达病灶处,才释放出大量能量,而Bragg峰后延快速下降,剂量率很小,所以重离子所携带的大部分能量都沉积于Bragg峰位处,也即病灶处。通过上述的物理过程,做到保护正常的人体组织的同时,也能有效的杀灭病变的肿瘤细胞。在生物学上,重离子与临床上的常规治疗中使用的 γ 射线相比,有着相对较高的生物学效应RBE,即细胞对于重离子的敏感度高于 γ 射线,减少了达到相同治疗效果时,人体需要接受的辐射剂量。同时,细胞的各个时期对于重离子的敏感程度也不同,处于有丝分裂的M期的细胞重离子敏感度最强,此特性对于重离子杀灭迅速增殖的肿瘤细胞更为有利。

综上所述,重离子照射治疗方法对于癌症的治疗效果是目前最为有效,也是副作用最小的。世界范围内的癌症病情严峻的现状,带动了重离子癌症治疗的热度上升,促成了重离子束流QA技术的发展。

对于重离子束流在横截面上剂量分布的考察,则是重离子束流用以治疗癌症是否准确有效的关键一步。目前的重离子束流加速的技术中,采用了多叶准直器调节射野的强度,以及计划系统在设计计划使用的算法不同等,均可在计划过程、治疗过程中产生不确定因素,因此在上机治疗前,对于患者的治疗计划进行剂量学的验证,以确保患者所接受的剂量与计划的剂量一致,保证治疗的安全和治疗效果的合格,防止患者接受到错误的照射剂量,造成严重的医疗事故。

2 重离子束流截面剂量分布检测技术发展现状

2.1 胶片成像法

胶片成像法是目前实践中运用最为广泛的方法,其成本低廉,空间分辨率高,组织等效性好。胶片成像法操作过程复杂,对胶片进行装片,配制显影定影液,暗室冲洗胶片等过程都很繁杂冗长,所以不能够在实验的现场及时地反应出成像结果,使用上不够方便。

2.2 二维探测器阵列

二维探测器阵列又包括半导体探测器阵列和空气电离室阵列两种。由加速器射出的重离子束,打在探测器阵列所在的平面上,被探测器阵列探测到,最终通过数据的处理获得探测图像。该技术的空间分辨率有限,设备成本高。

2.3 CCD 二维探测

CCD 能够把光学影像转换为数字信号读出，可以在真空中使用，实现数据的实时在线获取。CCD 虽然可以满足实时测量要求，但是记录面积有限，约为 $26.8\text{mm} \times 26.8\text{mm}$ ，而且其价格昂贵，并且在强烈的辐照环境下损伤严重，需要时常进行 CCD 芯片的更换。

除这些方法本身所具有的问题以外，上述三种方式还拥有同样的缺陷，即实验时的对准方式。为了保证设备成像的准确性和良好的均匀性，束流的方向与探测器阵列（或者胶片）处在平面必须做到尽可能的垂直，而不是倾斜的入射到相机的感光元件上。这样的要求会直接影响探测系统的性能。所以上述的对准方式只适用于粗调，对于想达到更加高的精度，则需要新的对准方式。

3 主动扫描式质子束剂量成像仪技术简介

3.1 主动扫描式质子束剂量成像仪原理

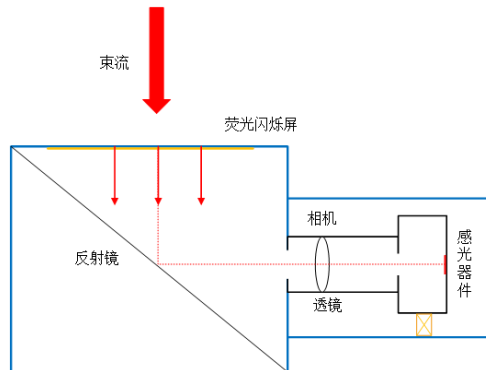


图1 主动扫描式离子束的光学成像仪的原理图

主动扫描式离子束的光学成像仪的原理如图 1 所示。其硬件主要是由荧光闪烁屏，反射镜和单反相机三部分组成，这些组件都安装于光密封的黑箱中。

为了测量粒子束流的断面分布，重离子束流需垂直入射到闪烁屏上。闪烁屏遭受到重离子的照射后，会发出绿色荧光，其每一时刻的光强与入射粒子的辐射剂量率成正的线性相关。因此，相机记录下来的光斑图像记录了粒子束流剂量在其横截面内的分布信息。即利用闪烁体的特性将重离子束流可见光化，相机放置在远离辐射场的远端，以提高相机的寿命，通过反射镜改变光的光路，使之能被相机拍摄。

3.2 仪器介绍

3.2.1 主动扫描式质子剂量成像仪结构

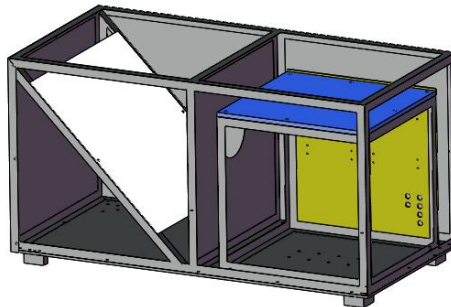


图2 主动扫描式离子束的光学成像仪结构示意图

图 2 中白色部分为成与水平方向呈 45° 角放置的镜面不锈钢板，黄色部分为电动精密位移平台的驱动器，控制电路板等电路元件的安装放置板，其上留有的开孔是与箱体中的位移平台驱动信号相连的九针信号接口；蓝色部分是薄铅板和塑料板组成的次级辐射屏蔽层。

① 闪烁体

医用硫酸钆闪烁体，闪烁荧光为绿色。

②镜面不锈钢板

为了防止在使用环境中存在的粒子辐射直接打到相机上，对相机的图像传感器造成严重的损坏，使用反射镜反射闪烁屏上产生的光线，而不是将相机直接置于重离子束流的通路上，以便相机可安装位置远离粒子束流，只有初级粒子产生的次级中子或 γ/X 射线可以到达。

③精密电动位移平台及驱动器

电机的转矩波动小，低速运行平稳，振动和噪音低。高速时可输出相对较高的力矩，定位精度高。本设备中，相机安装在可控电动位移和旋转平台上，可以通过遥控改变其视野范围与大小，达到测量不同位置与大小的重离子束的目的，适用性强。电动位移平台组合有前后平移，前后俯仰，左右旋转以及光轴方向旋转四个维度。

④遥控单片机

自主设计开发的电路板，采用 W5300 网络通信芯片和两片 STC 单片机芯片，PCB 板上设有网络 RJ54 接口，电脑通过网线与电路板相连通信。

⑤塑料与铅的屏蔽材料

薄铅板与塑料块的组合件，用以保护相机的感光器件，减小相机感光器件所受的辐射与次级辐射，以进一步减弱辐射损坏，延长感光元件的使用寿命。

3.3 主动扫描式离子束的光学剂量成像仪技术指标

3.3.1 空间分辨率

由于光的高斯分布，当两条亮纹的中心距小于其半高宽的时候，会使得这两条光纹变得不能再分辨开了，这决定了仪器成像的空间分辨率。经过实验测试，我们发现设备空间分辨率很好，分辨能力最高可分辨单条条纹宽度 0.35mm，证明该设备的空间分辨率极好，远超过医学上需要的 3mm 的要求。

3.3.2 能量分辨率

在箱体上束流入射点处放置一特制的铝合金模型，该铝合金模型上有深度不一，大小各异的坑洞。当能量相同的入射粒子打入该金属模型，由于深度不一，导致出射的粒子能量的不一样，不同能量的粒子在闪烁屏上产生可以区分的荧光。

将重离子的布拉格峰位厚度调整至闪烁屏附近，在布拉格峰的后沿，比能损失急剧下降，很薄的质量厚度差便会使得重离子在闪烁屏位置的比能损失相差很大。由此造成闪烁屏上的荧光光强也相差很大，以此来检验出微小的质量厚度差。经试验，测试数据如下图

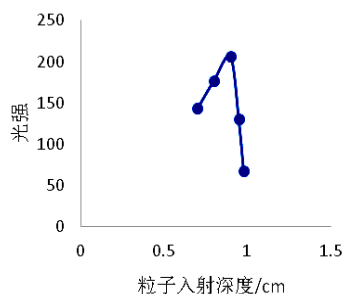


图 3 能量分辨率实验结果

上图的形态与 Bragg 峰位处的形状相似，说明本仪器的能量分辨性能优秀，在 Bragg 峰位处能够有效地分辨不

同能量的重离子，能量分辨率小于 $8.1 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^2$

3.3.3 成像均匀性

将仪器的均匀光场的空间响应的数据做三维的曲面高斯拟合

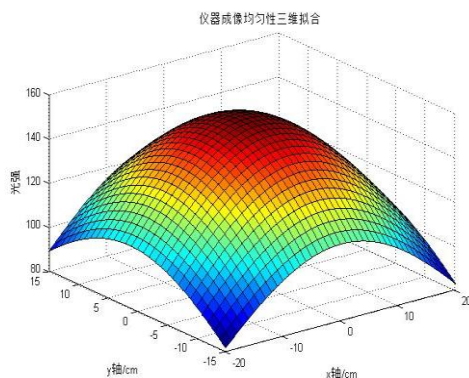


图 4 成像均匀性三维拟合图

并且由于本仪器成像的不均匀性是有规律的，我们可以利用上述的光强分布式，对其进行数学计算上的校准工作。

光强的分布是一个标准的高斯分布。而在图像的中心约 20cm x20cm 的区域里，图像的成像均匀度显得较好一些，光强的偏差范围约为 3.5%。

根据有关资料，目前使用最为广泛的胶片成像法，测量到胶片的像素值的不均匀性大于 $\pm 3.7\%$ 。所以本仪器在成像均匀性上是略优于目前最广泛使用的胶片成像法的。

4 总结

重离子治疗肿瘤的临床研究工作在我国已经开展，在这样的背景下，临床 QA(Quality Assurance, 质量保证)工作十分的重要。

本文设计了一种新型的重离子 QA 的装置，利用闪烁体，镜面板和相机对于重离子束的剂量分布做出检测，同时设计了一种新型的对准方式，经过试验，证明本仪器的能量分辨率，空间分辨率和成像的均匀性均可以达到使用的指标。

参考文献

- [1] 王伟珍. 集装箱检测系统中射线束流中心测量方法的研究 [J].
- [2] 佟永骏,李荐民,林津,罗平安. 核电子学与探测技术. 2007 年 3 月, 第 27 卷第 2 期, 293-297.
- [3] 陈明. 重离子治疗癌症的原理和现状 [J]. 王谨. 中华放射肿瘤学杂志. 2011 年 9 月, 第 20 卷第 5 期, 447-450.
- [4] Sony_CameraRemoteAPIbeta_API-Reference_v2.10[Z]
- [5] 刘志强. 使用辐射自显影胶片对重离子治癌的剂量学验证研究 [D]. 2013 年.

第一作者简介: 杨锋, 大学本科, 四川大学物理学院硕士研究生在读, 18708115927, scuyangfeng@163.com

通信地址: 四川省成都市望江路 29 号四川大学物理学院 610064

通讯作者简介:

Wen Chien Hsi, 博士, 复旦大学附属肿瘤医院 研究员, 上海市质子重离子医院 首席物理师; 185 2137 6100, wenchien.hsi@outlook.com, 海市康新公路 4365 号上海市质子重离子医院放射物理科。

周荣, 博士, 四川大学物理学院副教授, 核工程与核技术实验室主任, 18980910371, zhourong@scu.edu.cn.

通信地址: 四川省成都市望江路 29 号四川大学物理学院, 610064

(核医学装备与技术专委会供稿)

「医学装备技术评估」

基于动态心脏体模的冠脉 CTA 成像后处理软件质量评估*

赵鹏^① 郎朗^① 潘文才^① 官小红^① 马思颖^① 李梦^① 王晴^① 胥川^① 种银保^{①*}

①第三军医大学新桥医院医学工程科 重庆 400037

[摘要] 目的: 采用一种新型动态心脏体模评价双源 CT 和宽体探测器 CT 冠状动脉血管造影 (computed tomography angiography, CTA) 成像后处理软件显示冠状动脉图像的成功率及冠状动脉狭窄的准确性。 **方法:** 利用 Siemens Somatom Definition Flash CT 和 Toshiba Aquilion One CT, 使用心脏扫描模式对不同心率下的动态心脏体模进行扫描。心脏动态体模表面悬挂支架模拟冠状动脉, 其模拟冠状动脉管径分别为 3mm、4mm、5mm, 且设置 25%、50%、75% 的狭窄。心率设置为 60、70、80、90、100 次/min, X 线管转速分别设置为 0.35s、0.28s。重组数据传至 AW4.2 工作站后处理成像。后处理方法采用 2D 重组、VRT、MIP、CPR、心电编辑模式, 再分别对不同图像进行评分, 最后对成像后处理软件进行质量评估。 **结果:** 经配对样本 t 检验分析显示, 两种设备间冠状动脉血管狭窄程度测量存在统计学差异, 且两种设备间冠状动脉图像质量评分以及心电编辑前后两种设备间冠状动脉图像质量评分也存在统计学差异。 **结论:** 采用新型动态心脏体模能够评价两种高端 CT 在冠状动脉血管成像显示冠状动脉狭窄的准确性及冠状动脉图像的成功率。

[关键词] 心律失常; 冠状动脉; CT 血管造影成像; 后处理软件; 质量控制

Evaluation of the quality of coronary CT angiography imaging post-processing software used a dynamic heart phantom/ZHAO Peng, LANG Lang, PAN Wen-cai, GUAN Xiao-hong, MA Siyin, LI Meng, WANG Qing, XU Chuan, CHONG Yin-bao

[Abstract] Objective: Using the new Dynamic cardiac phantom, evaluate the two kinds of high-end CT in coronary artery angiography (computed tomography angiography, CTA) shows that the accuracy of the coronary artery stenosis and coronary artery image of success rate. **Materials and methods:** Using Siemens Somatom Definition Flash CT and Toshiba Aquilion One CT, using a heart scan mode for dynamic cardiac model under different heart rate scan. Dynamic cardiac phantom surface suspension bracket of coronary artery, the simulation of coronary artery diameter is 3 mm, 4 mm, 5 mm respectively, set up by 25%, 50% and 75% of the narrow. Heart rate is set to 60,70,80,90,100 times / min, X-ray tube speed are set to 0.35s, 0.28s. Transmit the restructuring data to AW4.2 workstation post-processing imaging. Post-processing method using 2D restructuring, VRT, MIP, CPR, ECG edit mode, and then, to score different image respectively, finally the image post-processing software quality evaluation. **Results:** By paired samples t-test analysis showed that there was significant difference between the two measuring devices coronary artery stenosis, and both before and after coronary artery between the devices and the image quality score ECG edit image quality of coronary score statistics also exist between the two devices differences between. **Conclusion:** Using the new Dynamic cardiac phantom can evaluate the two kinds of high-end CT in coronary artery angiography shows that the accuracy of the coronary artery stenosis and coronary artery image of success rate.

[Key words] Arrhythmia; coronary artery; CTA; post-processing software; quality control

[First-author's address] Department of Medical Equipment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China.

冠状动脉 CT 造影成像 (Computed Tomography Angiography, CTA) 是冠心病的重要影筛查手段, 但心律失常和心动过速通常会造成冠脉 CTA 成像失败或图像质量失真。近年来随着 CT 成像技术的飞速发展, 各生产厂家不断推出了系列高端 CT, 如双源 CT、宽体探测器 CT 等, 不仅提升了 CT 对动态脏器的成像质量, 还逐渐改善了扫描所需的辐射剂量。然而, 国内外现行的 CT 质量控制标准普遍以 IEC 1223-2-6 作为通用准则, 该标准所规定的 CT 剂量指标和性能测试指标, 仅能检测普通和螺旋 CT 的硬件物理性能, 无法对利用各种算法模型对原始图像进行后处理重建的大量辅助诊疗临床应用程序的符合性进行评价。尤其是对动态器官的解剖结构、功能成像和 3D 后处理重建软件的质控, 至今仍未见报道。因此, 本文拟利用一种新型动态心脏体模, 通过双源 CT 和宽体探测器 CT 的冠脉 CTA 成像及后处理, 运用盲法的主客观评价, 探索建立冠脉 CTA 成像软件质量评价的方法, 以期补充完善现有 CT 质控中

的不足,提升我国重大数字诊疗装备质量控制和安全保障能力。

1 材料与方法

1.1 动态心脏体模

采用一种新型的动态心脏体模,主要由动力部分、解剖结构模拟部分和控制部分组成,如图1所示。其中动力部分可模拟不同的心率及在扫描过程中的心率波动;解剖结构模拟部分由模拟左心室和系列模拟冠状动脉组成,模拟左心室是由密度等同于心肌组织的橡胶制成的弹性球囊,内部可填充造影剂浓度以CT值为300HU;系列模拟冠状动脉是由管壁密度等同于天然血管的合成材料制采用高精度3D打印制成,内径分别为3mm、4mm和5mm,长度为50mm,内有不同狭窄程度分为25%、50%和75%(长度均为10mm),可在空腔中放置软斑块、钙化斑块、支架以及模拟支架内的再狭窄等,冠脉内造影剂浓度以CT值为600HU左右,并通过皮筋固定于模拟左心室周围;控制部分采用模拟心脏-流体泵(美国Shelley公司,CardioFlow 5000),可以通过编程来设定不同的心率运动模式,并产生心电门控信号和电机控制信号,通过控制外部电机的有规律的收缩-舒张-扭转运动,实现模拟左心室的三个期相:快速泵血期、快速充盈期、慢速充盈期。

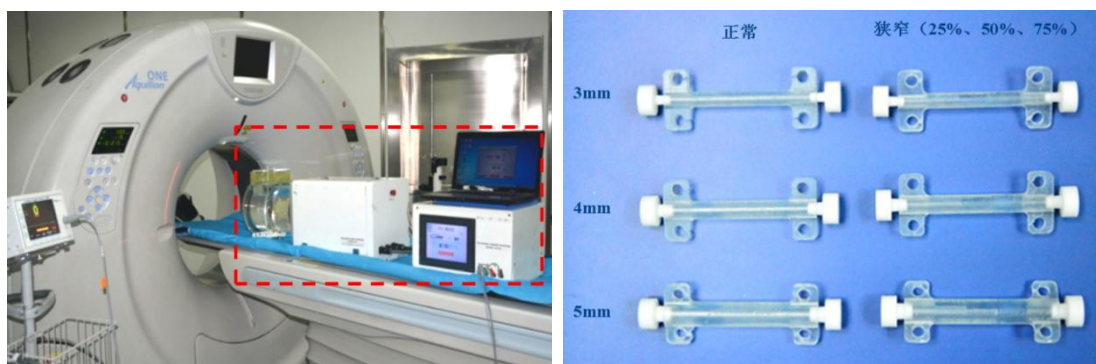


图1 动态心脏体模(左)与冠状动脉体模(右)

1.2 建立标准化的验证模型

选择2012~2015年第三军医大学新桥医院心内科心律不齐患者的心电资料,全部病例的诊断均经临床表现、实验室和基本影像学检查证实。基于上述动态心脏体模,利用上述数据建立标准化的验证模型包括:正常组、早搏组和房颤组,正常组心率分别为60、70、80、90、100bpm,早搏组基准心率分别为60、70、80、90、100bpm,房颤组基准心率分别为60、70、80bpm(心率80bpm以上患者临床不建议作冠脉CTA);冠脉管内径分别为3mm、4mm和5mm,每种管径的冠脉分为空白和狭窄,狭窄程度分别为25%、50%和75%

1.3 仪器与扫描方法

扫描仪器:西门子双源CT-Somatom Definition Flash和东芝320排动态容积CT-Aquilion One;扫描条件:管电压为120KV、管电流240mA、ST为0.5mm,FOV为24cm,其他扫描参数均按照各厂家推荐的最佳方案,详见表1。扫描过程中,每组数据重复扫描三次。

表1. 扫描条件与方式

分组	型号	生产厂家	扫描条件	应用软件
A	Somatom Definition Flash	Siemens	管电压:120KV、管电流:240mA ST:0.5mm FOV:24cm 重建算法:空间迭代(Safire) 扫描方式:前瞻性心电门控全时相扫描	VA44A Syngo Via
B	Aquilion One	Toshiba	管电压:120KV、管电流:240mA ST:0.5mm FOV:24cm 重建算法:空间迭代(AIDR3D) 扫描方式:回顾性心电门控Volume扫描	VITER Vitrea Cardio ImageXact

1.4 数据处理

1.4.1 图像处理

扫描完毕,利用心电编辑软件、后处理软件等对冠脉 CTA 原始图像进行后处理重建,并获得 2D/3D 图像,包括最大密度投影(maximum intensity projection, MIP)、多平面重组(multiplanar reformation, MPR)和容积再现(volumerendering, VR),及心电编辑前后的 2D 图像。西门子双源 CT 图像重建步骤:扫描完成后,为确定血管最清晰的心动周期时相需要采用冠脉预览模式,将该时相作为常规横断面影像的重建时相。然后将该时相的数据进行 MIP、CPR、VR 后处理重建,并且以 5% 的间隔重建 0%~95% 的数据。东芝 320 排动态容积 CT 图像重建步骤:按照 Auto Best Phase、多期相选择和心电编辑三个步骤完成图像重建,其他上同。

1.4.2 图像质量评分

采用盲法主观评价和客观评价相结合的评估方法。主观评价是由两位从事影像诊断的高年资医师分别对受影响的 5mm、4mm 和 3mm 冠状动脉进行评估,记录心电编辑前、后图像的质量。评估判断标准: I 级,冠状动脉血管连续性好,图像显示清晰,无错层或阶梯状伪影,轮廓清晰; II 级,冠状动脉血管连续性好,图像质量满意,轻度伪影,轮廓模糊,但不影响冠脉病变评估; III 级,冠状动脉血管连续性差,图像质量基本满意,伪影明显,轮廓有伪影,影响冠脉病变评估; IV 级,冠状动脉血管中断,明显伪影,轮廓不清,无法评估冠脉病变。将冠状动脉影像质量为 I~III 级者定义为评估血管,如果成像质量介于两个标准之间,则以低标准列入统计。记录心电编辑前后对于血管的评估且计算各血管分支可评估率。而客观评价则是由两位医师分别对受影响的 5mm、4mm 和 3mm 冠状动脉狭窄度进行测量,分别测量 0%、25%、75% 狭窄区域的管径值。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件(V19.0)对所有数据进行分析。两位医师对图像质量判断的一致性采用 K 值表示。组间 CT 辐射剂量 CTDI、DLP 使用配对样本 t 检验,每组血管狭窄程度测量值使用配对样本 t 检验,各节段冠脉的图像质量的主观评分进行 χ^2 检验,结果以统计学描述为 $\bar{x} \pm s$,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 CTDI 和 DLP

两组设备的 CT 辐射剂量指数 CTDI 和 DLP 如表 2 所示。从表 2 中可以看出早搏、房颤模型所用剂量明显高于正常组的剂量。经配对样本 t 检验分析显示,两组设备间 CTDI 除基准心率 60bpm、90bpm 的早搏模型和基准心率 70bpm 的房颤模型外,其他组之间均存在显著性差异($p < 0.05$)。仅基准心率 80bpm 的早搏模型和房颤模型, B 组的剂量略高于 A 组,其他情况下 A 组剂量高于 B 组。两组间的 DLP 在早搏模型中无统计学意义,而在正常和房颤模型中存在显著差异($P < 0.05$)。

表 2 CIDI 和 DLP 平均值

基准心率 (bpm)	CTDI(mGy)			DLP(mGy)			
	A	B	P	A	B	P	
正常	60	52.03±0.06	23.1±0.10	P<0.05	717.67±0.58	277.07±1.22	P<0.05
	70	44.62±0.03	37.4±0.10	P<0.05	615.67±0.58	448.5±1.11	P<0.05
	80	39.2±0.03	47.87±0.06	P<0.05	541±1.00	574.47±0.61	P<0.05
	90	34.9±0.05	43.2±0.17	P<0.05	481.33±0.58	518.43±1.85	P<0.05
	100	31.56±0.06	39±0.10	P<0.05	435.67±0.58	682.9±1.12	P<0.05
早搏	60	73.62±7.02	83.2±0.10	P>0.05	1015.67±97.09	998.5±1.47	P>0.05
	70	63.00±2.73	73.23±4.57	P<0.05	869.67±37.80	878.67±54.90	P>0.05
	80	48.63±3.23	57.97±0.49	P<0.05	671±45.00	695.4±5.90	P>0.05
	90	48.02±4.49	48.57±9.38	P>0.05	662.67±62.07	582.8±12.67	P>0.05
	100	32.69±0.03	50.2±8.60	P<0.05	451.33±0.58	602.47±102.98	P>0.05
房颤	60	51.75±0.06	39.67±6.96	P<0.05	714±1.00	476.07±83.34	P<0.05
	70	44.38±0.90	39.43.72	P>0.05	612.33±12.40	472.93±44.72	P<0.05
	80	41.44±2.10	75.27±8.81	P<0.05	572±27.73	903.23±106.29	P<0.05

2.2 主观评价

对 VR 图像（如图 2）质量进行评分数据采用卡方检验， $P<0.05$ 在统计学上存在显著性差异。

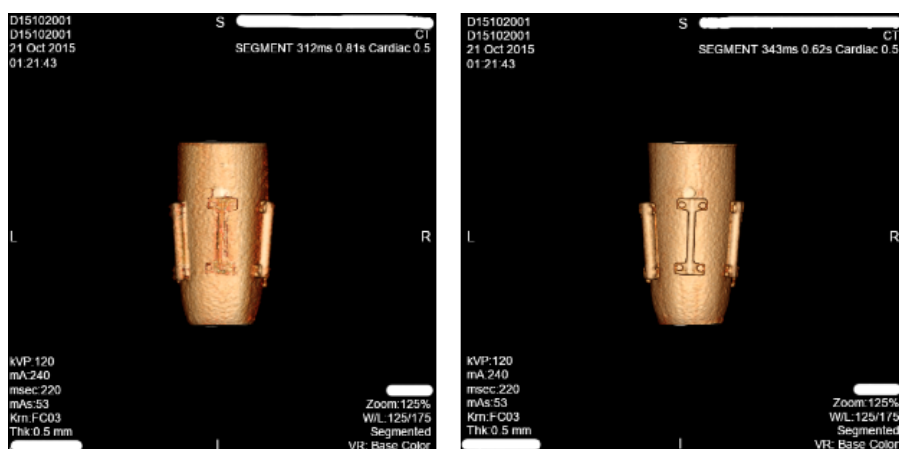


图 2 心电编辑前（左）后（右）VR 图

由表 7 知，A 组和 B 组的图像通过 CTA 后处理及心电编辑后其图像质量都能够进行评估，成功率分别为：95.15%，96.36%，B 组的成功率略高于 A 组。同时由表得出 A 组的图像质量为 5 分的数量为 103，而 B 组图像质量为评分为 5 分的有 58，则 A 组图像质量明显高于 B 组图像。

表 3 图像质量评分

分组	不同分数所占百分比			P
	3 分	4 分	5 分	
A	4.85	32.73	62.42	P<0.001
B	3.64	61.21	35.15	

说明：3 分，4 分，5 分表示图像质量评分。

2.3 客观评价

两组设备所获得的 CPR 图像进行血管狭窄程度测量（如图 3），对其采用配对样本 t 检验分析，结果如表 4 所示， $P<0.05$ 时在统计学上存在显著性差异。由表 4 知，A 组在房颤 3mm 正常血管测量值比 B 组测量值更接近准确值，而在其他情况下 B 组的测量值更加接近于准确值。两设备间心电编辑前后血管狭窄测量配对样本 t 检验分析由表 6 所示，以 P 小于 0.05 有统计学意义。可见，心电编辑后血管测量更加接近于准确值。

表 4 血管狭窄测量平均值 Mean±SD

狭窄程度	血管	正常	P	早搏	P	房颤	P
25%	A3	0.57±0.09	P<0.05				
	B3	0.69±0.10					
	A4					1.17±0.12	P<0.05
	B4					1.30±0.11	
50%	A3	1.19±0.11	P<0.05			1.21±0.11	P<0.05
	B3	1.34±0.29				1.38±0.12	
	A4			1.70±0.07	P<0.05	1.72±0.08	P<0.05
	B4			1.80±0.09		1.91±0.23	
75%	A4	2.61±0.18	P<0.05				
	B4	2.21±0.23					
	A5			3.55±0.21	P<0.05		
	B5			3.73±0.24			

3 分析与讨论

冠脉成像的临床实际应用中，影响冠脉成像质量的因素有很多，除心率、扫描速度和重组算法等，还有其他因素都可能会导致冠脉成像质量的不理想和心脏检查的失败，如心率不齐、房颤及呼吸运动伪影等。而且由于模拟材

料和人体实际心脏有些差别,心脏体模产生的伪影与实际冠脉产生的伪影也有所区别,不可能完全真实模拟心脏的泵血活动。模拟材料的体模不能够模拟真实患者的呼吸运动,所以模拟试验中不能够考虑患者的呼吸运动带来的影响。现有 CT 和 MRI 的心脏、血管动态体模,仅模拟了心脏的搏动和血管脉动,未能实现心脏 3 个运动时相和血流的模拟,在组织等效材料、仿真结构和运动特性等动态仿生方面无法满足临床应用软件功能符合性评价的需求。因此,进一步系统研究系列适用于数字诊疗装备质量控制的高仿真动态体模,并利用其开展相关数字诊疗装备临床应用软件的符合性评价研究,对于提升我国数字诊疗设备医疗质量安全的整体水平,增强数字诊疗设备的技术竞争力意义重大。

参考文献

- [1] 梁开运. 风湿性心脏病 64 层 CT 冠状动脉成像质量控制研究[D]. 第三军医大学: 第三军医大学,2012.
- [2] 李毅,李超,刘卓., CT 质量管理及质量控制测试[J]. 中国医疗设备,2015,(3): 118-120
- [3] 祁吉,沈云,吴胜勇,葛夕洪,姜滨., 新型心脏动态体模及其在多层螺旋 CT 心脏扫描中的应用[J]. 中华放射学杂志,2006,(9): 988-990
- [4] 夏灵,叶学松,霍梅梅,刘锋., 基于动态心脏模型的体表心电图仿真研究[J]. 中国生物医学工程学报,2006,(3):257-262
- [5] 葛夕洪,廖静敏,吴胜勇,姜滨,温连庆,沈云,祁吉., 心率不稳定时 3 种不同重建算法对影像质量的影响:MSCT 动态心脏体模研究[J]. 实用放射学杂志,2007,(6): 831-834
- [6] Jun Horiguchi,Chikako Fujioka,Masao Kiguchi,Hideya Yamamoto. Prospective ECG-triggered axial CT at 140-kV tube voltage improves coronary in-stent restenosis visibility at a lower radiation dose compared with conventional retrospective ECG-gated helical CT[J]. Eur Radiol (2009) 19: 2363-2372.
- [7] Jun Horiguchi, Yun Shen, Yuji Akiyama, Nobuhiko Hirai. Electron Beam CT Versus 16-MDCT on the Variability of Repeated Coronary Artery Calcium Measurements in a Variable Heart Rate Phantom[J]. Cardiac Imaging• Original Research, AJR 2005;185:995-1000.

***基金项目:** 国家重点研发计划(2016YFC0103100)“数字诊疗装备质控仿生动态体模及其临床应用软件符合性评价研究”; 军队“十二五”重点项目(BWS12J036)“高风险卫生装备质量控制检测装置及技术规范的研究”

第一作者简介: 赵鹏,男(1984-),博士研究生,高级工程师,第三军医大学第二附属医院医学工程科,研究方向:主要从事医学装备技术保障、教学与科研,联系电话:13677662230; E-mail: zhaop9@gmail.com

通讯作者简介: 种银保,男(1963-),硕士生导师,高级工程师,第三军医大学新桥医院医学工程科主任,担任全军医学工程学专委会主委、中国医学装备协会常务理事、重庆市医疗器械学会理事长等。

*通讯作者: chongyinbao@163.net

(急救医学装备专委会供稿)

艰难梭菌感染体外诊断方法及设备系统评价

孙鹏飞 谢乐 许雨乔 刘成成 金菲 刘根焰

南京医科大学第一附属医院检验学部

[摘要] 艰难梭菌(*Clostridium difficile*, CDF)是一种专性厌氧的革兰阳性粗大芽孢杆菌,艰难梭菌自身没有侵袭性,致病作用与其基因组中的致病决定区(pathogenicity locus, PaLoc)有关,该片段只存在于产毒素艰难梭菌。PaLoc 上含有五个基因(图 1),分别是 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdD* 和 *tcdE*。*TcdA* 为肠毒素,能破坏肠壁,趋化中性粒细胞浸润且释放细胞因子,导致液体大量分泌入肠腔。*TcdB* 为细胞毒素,能解聚肌动蛋白,损坏细胞骨架,使细胞皱缩坏死。艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)轻者呈自限性腹泻,重者可引起爆发性肠炎。艰难梭菌的诊断也是当前体外诊断的热点,新出现的诊断设备众多,本文将从微生物学、免疫学和分子生物学三个方面系统阐述艰难梭菌的诊断设备及诊断方法的进展。

[关键词] 艰难梭菌;体外诊断;显色培养基;*tcdA*;*tcdB*。

艰难梭菌 (*Clostridium difficile*, CDF) 是一种专性厌氧的革兰阳性粗大芽孢杆菌, 能在土壤及水等环境中以芽孢的形式长期存活^[5], 主要传播途径是粪-口传播, 不能被胃酸、乙醇等杀死, 因此, 可通过污染的食物或水源进入肠道系统并定殖。当患者长期使用广谱抗生素、化疗药或免疫抑制剂后, 肠道正常菌群生长受抑制, 艰难梭菌等抵抗能力较强的细菌乘机大量繁殖^[6]。艰难梭菌自身没有侵袭性, 致病作用与它基因组中的致病决定区^[7] (pathogenicity locus, PaLoc) 有关, 该片段只存在于产毒素艰难梭菌。PaLoc 上含有五个基因 (图 1), 分别是 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdD* 和 *tcdE*。*tcdA*、*tcdB* 分别编码 A 毒素 (TcdA, 308kDa) 和 B 毒素 (TcdB, 270kDa)。TcdA 为肠毒素, 能破坏肠壁, 趋化中性粒细胞浸润且释放细胞因子, 导致液体大量分泌入肠腔。TcdB 为细胞毒素, 能解聚肌动蛋白, 损坏细胞骨架, 使细胞皱缩坏死^[9, 10]。大部分的临床菌株都是同时产 TcdA 和 TcdB 的, 但是也有部分菌株由于 *tcdA* 基因部分片段缺失而只产 TcdB^[11-13]。*tcdE* 基因编码的蛋白质对 TcdA、TcdB 的释放起重要作用^[14]。*tcdC* 和 *tcdR* 基因是一种调控基因, 分别对毒素表达起负向和正向调控作用^[8, 15]。有研究发现部分菌株中还存在另一种毒素即二元毒素 (CDT), 该毒素的具体作用仍尚未阐明^[16]。

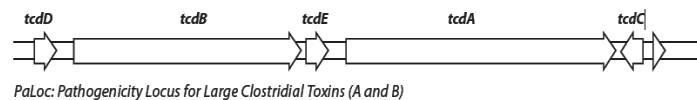


图 1 PaLoc 结构示意图

艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI) 轻者呈自限性腹泻, 重者可引起爆发性肠炎。在美国, 每年大约有 25 万患者因艰难梭菌感染而住院治疗, 且相关死亡人数高达 1.4 万, 造成至少 10 亿美元的额外医疗费用。2000-2007 年期间, 随着一些高致病性菌株对氟喹诺酮类抗生素耐药性增加, 艰难梭菌感染的病死率提高了将近 400%^[2]。2015 年 3 月 27 日, 美国政府发布了一份针对细菌耐药问题的为期 5 年的国家行动计划, 将艰难梭菌列为紧急威胁等级的首位病原菌, 并提出到 2020 年美国艰难梭菌感染的发病率较 2011 年下降 50% 的控制目标。有关 CDF 感染性疾病, 中国目前还缺少系统性流行病学数据, 来自上海华山医院的一项调查显示, 排除复发感染, 艰难梭菌在住院患者粪便中的检出率为 1.6% (69/42936), 发病率是 1.3% (56/42936)^[3]; 中南大学湘雅医院的李文丽等通过艰难梭菌毒素 A、B 的测定, 发现 47 例住院的腹泻患者中有 7 例艰难梭菌毒素检测阳性, 阳性率达 14.89%^[4], 可见国内艰难梭菌感染形势也不容乐观, 只是当前国内常规开展艰难梭菌相关检测的临床实验室仍寥寥无几, 为此, 本文就艰难梭菌的实验诊断方法进行综述, 以促进国内艰难梭菌感染诊断项目的广泛开展。

1 微生物学方法

1.1 厌氧培养

培养的目的是从粪便标本中分离出艰难梭菌。临床最常用的培养基是 CCFA^[17] (环丝氨酸-头孢西丁-果糖琼脂) 平板, 其次是 CCEY^[18] (环丝氨酸-头孢西丁-蛋黄琼脂平板)、TSA^[19] (胰蛋白胨-大豆琼脂平板) 和 CDBA^[20] (艰难梭菌布氏平板)。部分实验室还会在这些平板中添加 5% 马血、牛磺胆酸盐、溶菌酶等来增强艰难梭菌芽孢的复苏能力^[21]。有研究认为热休克或者酒精休克后加入 CCFB (环丝氨酸-头孢西丁-果糖肉汤) 或 CCMB-TAL (环丝氨酸-头孢西丁-甘露糖-牛磺胆酸盐-溶菌酶肉汤) 中增殖有利于减少标本里的杂菌干扰并且能增强细菌复苏能力^[22, 23]。在上述培养基中 35℃ 孵育 48h 后, 典型艰难梭菌菌落的外观呈黄色、扁平、边缘呈不规则状, 在 360nm 紫外灯照射下菌落发黄绿色荧光, 并且有典型的马粪气味, 经验丰富的实验人员可借此判断是否有艰难梭菌菌落。对于那些生长不典型的菌落, 可用进一步用 API 20A、Remal ANA 或 Vitek ANC 板条鉴定。

传统的分离培养耗时长, 而且专业技术要求高, 为此, 市场上出现了一种显色培养平板: ChromID CD agar (IDC; bioMerieux SA, France), 在培养基中添加了牛磺胆酸盐和一些其他成分, 提高了生长速率, 使得大部分的检测能在 24h 内完成。该培养基的另一个突出特征就是能产色素, 白色的平板背景衬托黑色的菌落使结果解释起来更加简便, Yang 等用 ChromID CD agar 检测 190 份新鲜粪便标本, 24h 和 48h 的检测敏感性可达 91.9%、97.3%^[24]。

培养法鉴定敏感性高, 但是特异性相对低, 不能用来区分产毒素菌株与非产毒素菌株。有些因感染其他细菌引起的腹泻, 会因大便标本中存在少量艰难梭菌而培养阳性, 导致误诊。Charles Darkoh 等^[25]利用 TcdA、TcdB 具有葡萄糖基转移酶功能这一特点, 在培养基中添加了 X-Gal 作为显色底物发明了一种新的显色平板 CDPA (The Cdifftox

plate assay), 只有产毒型的艰难梭菌才能在这个平板上显蓝色, 而非产毒素艰难梭菌则呈白色。培养法能进行艰难梭菌分型并且对院内或区域性感染暴发进行流行病学调查的方法。培养的纯菌落还可用于药敏实验, 随着耐甲硝唑和万古霉素菌株的出现^[26-28], 艰难梭菌药敏试验将来在实验室中不可或缺。

1.2 产毒素培养

产毒素培养是在培养的基础上进行毒素检测, 敏感性和特异性高, SHEA/IDSA 指南提议将 TC 方法作为 CDI 检测的金标准^[29]。毒素检测可使用 CCNA、EIA 或针对 tcdA、tcdB 基因的 PCR 方法。但是 TC 也有缺点: ①检测时间长。②检测的是体外产生的毒素, 并不能表示体内或粪便标本中也有毒素存在, Leekha 等^[30]在 9.7% 的无症状住院患者粪便标本中培养到产毒素艰难梭菌, 假阳性高。③对实验人员的技术要求高, 在一般的实验室难以开展。

1.3 细胞毒素中和试验

细胞毒素中和试验 (CCNA) 曾经被大部分实验室作为 CDI 诊断的金标准^[31,32], 它是利用稀释了的粪便过滤液与培养细胞共孵育 24-48h, 若观察到 $\geq 50\%$ 的细胞有病理 (细胞变圆缩小) 改变, 则在反应池中加入毒素的特异性抗体共孵育, 细胞病理改变消失表示毒素阳性, 主要用来检测 TcdB。CCNA 最低可以检测到 1pg 的毒素量^[33], 并且单克隆抗体也提高了检测特异性, 但是与 TC 相比, CCNA 的检测敏感性较低, 只有 75%-85%^[34]。CCNA 的检测结果受多种因素影响。标本运送时间是其中之一, 随着时间延长毒素会在粪便中降解, 造成假阴性; 试验中使用的细胞株不同也会造成差异, 大部分实验室认为使用 Vero cell 时敏感性最高; 并且 CCNA 的结果判读较主观, 不易标准化。除此之外, 细胞培养对实验室的人员设备及环境要求高, 在一般的医院不易作为常规项目开展。

2 免疫学方法

免疫学方法是通过特异性抗体与粪便标本中的谷氨酸脱氢酶 (GDH)、TcdA 或 TcdB 反应来检测艰难梭菌, 包括乳胶凝集实验、酶免疫分析技术 (EIA)。

2.1 毒素 A/B

市场上有许多商品化试剂盒来检测 TcdA、TcdB, 大都使用的 EIA 方法。早期毒素检测都只是用来检测 TcdA, 现在大部分试剂盒都同时检测 TcdA、TcdB。该方法操作简单, 价格相对低, 只需 0.5-1h 即可判断结果, 适合大部分实验室。由于是直接检测的标本中的毒素, 所以特异性高^[35,36], 但是敏感性低且不同研究之间差异大 (56%-80%)^[37-39], 可能与这些因素有关: (1) 流行菌株: Tenover 等^[40]发现不同核糖体型菌株的 EIA 检测敏感性之间存在差异, 可能会造成 EIA 对某些流行菌株的检测敏感性降低; (2) 金标准方法: Rene 等^[41]分别将 CCNA 和 TC 作为金标准来评价八种 EIA 方法的敏感性, 得出的结论是将 CCNA 作为金标准, 敏感性会高出 8%-15%; (3) 标本检测时间: 毒素在标本中降解会降低检测敏感性。

2.2 GDH

由于毒素 EIA 方法检测缺乏敏感性, 所以需要一种更加准确的方法。GDH (谷氨酸脱氢酶) 是一种代谢酶, 作为一种抗原普遍存在于艰难梭菌表面^[42] (包括产毒和非产毒素菌株), 由 gluD 基因编码合成, 在粪便标本中的量较多并且稳定, 方便检测。GDH 方法具有敏感性高 (80%-100%)^[43-45]、阴性预测值 (98.1%-100%)^[44,46]高这一特点, 但是由于 GDH 不能区分产毒和非产毒菌株, 所以阳性预测值相对较低, 有报道只有 53%^[44]。SHEA-IDSA 指南推荐将检测 GDH 作为 CDI 的监测方法^[47], 对于 GDH 阳性结果可进一步验证毒素, 而阴性结果则可基本排除 CDI, 降低了阴性标本的检测周期和费用。

虽然免疫学方法有省时省力、操作人员专业要求不高、结果易判读等优点, 但是由于缺乏面敏感性或特异性, 一般都不建议将 GDH、EIA 这两种方法单独用于诊断 CDI。如今有些试剂生产厂商结合了 GDH 检测敏感性高和毒素 EIA 特异性高的特点将这两种方法整合在一个产品试剂条中完成, 例如 C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE® (Techlab, USA), Chapin 等^[48]研究表明 C.DIFF QUIK CHEK COMPLETE 的敏感性为 61.5%, 特异性为 100%, 对于两者结果不一致的标本用 CCNA 方法或 PCR 方法加以验证可提高检测效率。

3 分子生物学方法

上世纪 90 年代开始用普通 PCR 方法直接检测粪便标本中的艰难梭菌毒素基因。随后一些针对 tcdA、tcdB、tcdC 或者 tpi（一种管家基因）的方法也逐步出现。检测敏感性高、时间短（3-5h），但是操作繁琐，扩增的产物需要用琼脂糖凝胶电泳方法分析，会造成污染。如今应用的方法学包括 FQ-PCR（荧光定量 PCR）、纳米金探针检测终点 PCR、LAMP（环介导等温扩增）、HDA（解旋酶依赖等温扩增）。2009 年，FDA 通过了第一个用于艰难梭菌检测的 NAATs 诊断产品，到现在已经有 12 种（产品介绍和性能总结见表 1）。

3.1 FQ-PCR 方法

大部分产品都是检测艰难梭菌的 tcdB 基因，也有部分是同时检测 tcdA 和 tcdB 两个基因。其中，Xpert C.difficile/Epi 不仅能检测产毒素艰难梭菌的 tcdB 基因，还能通过检测 cdt 和 tcdC 基因上第 117 对碱基缺失判断是否是高产毒性菌株 NAP1/BI/027 型^[49,50]。Cho S Y 等^[51]用 Xpert C.difficile/Epi 来检测 200 份标本中的 027 型菌株，与 PGFE 相比，100% 符合。也有研究发现该产品检测存在假阳性，可能与 027 型菌株在该地区的流行率较低有关。标本的处理、基因扩增及结果分析过程都是全自动化的，对实验室操作人员的专业要求不高。检测需要在分子学方法中是最短的，只需 45min，甚至短于 EIA 方法的时间。

3.2 LAMP 方法

2005 年，Haru Kato 等开始使用 LAMP 方法检测艰难梭菌中的 tcdB 基因。Illumigene C. difficile Assay 是唯一一个获批使用 LAMP 方法检测艰难梭菌的产品。该产品检测的基因是 tcdA 基因的一个片段，存在于所有产毒素菌株中，包括 TcdA (+) TcdB (+) 和 TcdA (-) TcdB (+) 的艰难梭菌。当特异性扩增产物形成时，释放的 PO_4^- 与反应液中 Mg^{2+} 结合形成肉眼可见的絮状沉淀，也可通过检测反应管的透光率实时监测。该方法无需昂贵的热循环仪器，可以在等温条件下持续扩增；产物量多并且时间短，1h 即可完成检测；特异性高，要求 4 条特异性的引物与靶基因的 6 个不同位点完全匹配；对人员设备要求不高，大部分实验室都能满足这个条件。

3.3 HDA 方法

该技术是模拟自然界生物体内 DNA 复制的自然过程，在恒温条件下利用解旋酶解开 DNA 双链，然后由 DNA 聚合酶催化合成互补链，实现靶序列的指数式增长。获得 FDA 批准的产品有两种，分别是 AmpliVue C. difficile Assay 和 Portrait Toxigenic C. difficile Assay。

AmpliVue C. difficile Assay 检测的也是 tcdA 基因上的一段保守序列，存在于所有的 tcdA (+) tcdB (+) 和 tcdA (-) tcdB (+) 艰难梭菌中。反应液中包括生物素标记引物、捕获探针和内部质控，由于 HDA 扩增的不均一性，反应池会形成过量的生物素标记的单链 DNA，与不完全抗体标记的探针杂交形成双标记扩增子。产物检测是在一个装有检测试纸条的小盒中完成，原理免疫层析发相同。试纸条上含有与色彩颗粒共价结合的链酶亲和素，质控区与检测区分别包裹相应的二抗，目标产物在检测区形成肉眼可见的颜色变化。当质控区和检测区都显示红色或仅有检测区显示红色时，结果阳性；当只有质控区显示红色时，结果阴性；质控区和检测区都阴性时，提示检测失败。

Portrait Toxigenic C. difficile Assay 检测的是产毒素 C.difficile 中的 tcdB 基因上的一段保守序列。与 AmpliVue C. difficile Assay 不同，生物素标记引物的 3' 端还连接一段阻塞基团，当温度升高到达最佳反应条件时，RNase H2 才能恢复活性切断 3' 端的阻塞基团启动扩增反应，减少了非特异性产物。特异性探针固定在硅胶板捕获生物素标记的单链产物，与辣根过氧化物酶（HRP）标记的链酶亲和素结合，催化四甲基联苯胺（TMB）显色。

HDA 方法与 LAMP 方法相同不需要昂贵的热循环仪器，且检测装置设计简单，节约了成本；商品试剂盒只需 2-8℃ 冷藏，无需冷冻装置，并且操作简单，结果易判断，适合在小医院开展。

3.4 纳米金探针检测终点 PCR

Verigene C. Difficile Nucleic acid Test 同时检测 tcdA、tcdB 基因，也能通过检测二元毒素基因和 tcdC 基因上第 117 对核苷酸缺失检测高产毒菌株 027 型。捕获探针的一端共价结合固定在微阵列芯片上，另一端可与目标扩增产物结合。产物的检测是通过另一个与胶体金连接的寡核苷酸介导的，该寡核苷酸的一端与目标产物特异结合。反应结束后加入银染增强液，杂交信号随之放大，产物的扩增量与信号强度相关。该产品是全自动的，包括样本处理和结果判读。

利用分子学方法直接扩增粪便标本中 C.difficile 的毒素基因敏感性和特异性较 EIA 方法高，且耗时短，Xpert

C.difficile/Epi 方法只需 45min 即可出结果, 美国胃肠学会推荐将 NAATs 方法作为诊断 CDI 的金标准。但是该方法存在假阳性, 有的患者体内虽然有产毒素的 C.difficile 存在, 但是并没有出现腹泻等临床症状。而且部分阳性患者经过治疗痊愈后, 利用分子学方法仍可检测到标本中的艰难梭菌, 不利于评价临床疗效。

表 1 FDA 批准 NAATs 产品的性能

产品	厂商	检测对象	金标准	标本量	敏感性	特异性	阳性预测值	阴性预测值	数据来源
ICEPlex C. difficile Kit	PrimeraDx	tcdB	TC	952	90	97.4	88.4	96.6	FDA
IMDx C. difficile for Abbott m2000	Intelligent Medical Devices	tcdB、tcdA	TC	1186	86.1	92.5	59.5	98.1	FDA
BD MAX Cdiff Assay	GeneOhm Sciences Canada	tcdB	TC	406	95.5%	99.0%	87.50%	99.70%	[52]
Quidel Molecular Direct C. difficile Assay	Quidel Corporation	tcdA	TC	308	91.7%	100%	100%	98.90%	[53]
Verigene C. Difficile Nucleic acid Test	Nanosphere.	tcdB、tcdA、cdt、tcdC 第 117 位缺失	TC+N AAT	400	96.7%	97.40%			[54]
Portrait Toxigenic C. difficile Assay	Great Basin Scientific	tcdB	TC	549	98.2	92.8			[55]
Simplexa C. difficile Universal Direct Assay	Focus Diagnostics	tcdB	TC+N AAT	190	87	100			[56]
Xpert C. difficile/Epi	Cepheid	tcdB、cdt、tcdC 第 117 位缺失	TC+N AAT	973	91.9	95.3			[57]
Ilumigene C. difficile Assay	Meridian Bioscience	tcdA	TC	302	88.1	96.7	86.7	97.1	[58]
Xpert C. difficile	Cepheid	tcdB	TC	549	93.3	95.1			[55]
ProGastro Cd Assay	Prodesse	tcdB	TC+N AAT	89	88.5%	100%	100	94.8	[48]
BD GeneOhm C. diff Assay	BD Diagnostics/ GeneOhm Sciences	tcdB	TC	243	95.7%	96.5%	91.8%	98.2%	[59]

上面几种方法中, 关于哪一种能单独用于诊断 CDI 还存在争议。因此, 有些实验室开始借鉴 HIV 和梅毒的检测方法使用两步法或三步法来弥补单一方法的缺陷^[60]。SHEA/IDSA 协会推荐 GDH 联合 CCNA 或 TC 方法^[29], 但是后两种方法耗时间且在一般实验室不易开展。英国国民保健服务实验室在 2012 年 4 月宣布将 GDH 或 NAATs 联合 EIA 方法作为 CDI 诊断金标准, 有研究表明两步法可使检测特异性和阳性预测值达到 90%^[43, 61]。Culbreath K 等^[43]将 GDH 联合 EIA 作为初筛实验, 能将 36% 的阳性患者和 97% 的阴性患者在 30min 内检出, 当两者结果不一致时再用 NAATs 方法来验证, CDI 的检出率较 GDH 联合 CCNA 的方法提高, 且时间缩短为 8 小时左右, 相比单独的 NAATs 方法每年能为实验室节约 5.8 万美元, 但是 NAATs 相对 CCNA 方法假阳性率会高一点。

虽然自 1978^[62]年人们开始认知艰难梭菌以来, 市场上已经出现了许多针对 CDI 的商品试剂, 但是关于如何快速且正确的诊断 CDI 对实验室工作人员来说仍然是一大挑战。由于肠道的致病菌群较多且有一小部分患者为产毒素艰难梭菌阳性的无症状携带者, 实验室还需加强与床位医师的交流, 结合实验结果与患者的病史、影像学检查、药物使用情况等综合判断, 提高检测准确性, 减轻患者医疗负担。

参考文献

- [1] Khanna S, Pardi D S. The growing incidence and severity of Clostridium difficile infection in inpatient and outpatient settings[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol. 2010, 4(4): 409-416.
- [2] Wendt J M, Cohen J A, Mu Y, et al. Clostridium difficile infection among children across diverse US geographic locations[J]. Pediatrics. 2014, 133(4): 651-658.
- [3] Huang H, Wu S, Wang M, et al. Molecular and clinical characteristics of Clostridium difficile infection in a University Hospital in Shanghai, China[J]. Clin Infect Dis. 2008, 47(12): 1606-1608.
- [4] 李文丽, 简子娟, 刘文恩, 等. 艰难梭菌毒素 A&B 测定在医院腹泻患者中的应用[J]. 中国感染控制杂志. 2010(04): 261-263.
- [5] Al S N, Brazier J S. The distribution of Clostridium difficile in the environment of South Wales[J]. J Med Microbiol. 1996, 45(2): 133-137.
- [6] Mcfarland L V. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea[J]. Dig Dis. 1998, 16(5): 292-307.

- [7] Voth D E, Ballard J D. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease[J]. Clin Microbiol Rev. 2005, 18(2): 247-263.
- [8] Voth D E, Ballard J D. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease[J]. Clin Microbiol Rev. 2005, 18(2): 247-263.
- [9] Triadafilopoulos G, Pothoulakis C, O'Brien M J, et al. Differential effects of Clostridium difficile toxins A and B on rabbit ileum[J]. Gastroenterology. 1987, 93(2): 273-279.
- [10] Wu D, Joyee A G, Nandagopal S, et al. Effects of Clostridium difficile toxin A and B on human T lymphocyte migration[J]. Toxins (Basel). 2013, 5(5): 926-938.
- [11] Alfa M J, Kabani A, Lyster D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile responsible for a nosocomial outbreak of Clostridium difficile-associated diarrhea[J]. J Clin Microbiol. 2000, 38(7): 2706-2714.
- [12] Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of Clostridium difficile toxinotypes[J]. FEMS Microbiol Rev. 2008, 32(3): 541-555.
- [13] Elliott B, Squire M M, Thean S, et al. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among clinical isolates of Clostridium difficile in Australia[J]. J Med Microbiol. 2011, 60(Pt 8): 1108-1111.
- [14] Deneve C, Janoir C, Poilane I, et al. New trends in Clostridium difficile virulence and pathogenesis[J]. Int J Antimicrob Agents. 2009, 33 Suppl 1: S24-S28.
- [15] Matamouros S, England P, Dupuy B. Clostridium difficile toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC[J]. Mol Microbiol. 2007, 64(5): 1274-1288.
- [16] Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, et al. Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by Clostridium difficile CD196[J]. Infect Immun. 1997, 65(4): 1402-1407.
- [17] Clabots C R, Bettin K M, Peterson L R, et al. Evaluation of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and cycloserine-cefoxitin-fructose broth for recovery of Clostridium difficile from environmental sites[J]. J Clin Microbiol. 1991, 29(11): 2633-2635.
- [18] Brazier J S. Role of the laboratory in investigations of Clostridium difficile diarrhea[J]. Clin Infect Dis. 1993, 16 Suppl 4: S228-S233.
- [19] Thitaram S N, Frank J F, Lyon S A, et al. Clostridium difficile from healthy food animals: optimized isolation and prevalence[J]. J Food Prot. 2011, 74(1): 130-133.
- [20] Nerandzic M M, Donskey C J. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of Clostridium difficile[J]. J Clin Microbiol. 2009, 47(2): 397-400.
- [21] Tyrrell K L, Citron D M, Leoncio E S, et al. Evaluation of cycloserine-cefoxitin fructose agar (CCFA), CCFA with horse blood and taurocholate, and cycloserine-cefoxitin mannitol broth with taurocholate and lysozyme for recovery of Clostridium difficile isolates from fecal samples[J]. J Clin Microbiol. 2013, 51(9): 3094-3096.
- [22] Hink T, Burnham C A, Dubberke E R. A systematic evaluation of methods to optimize culture-based recovery of Clostridium difficile from stool specimens[J]. Anaerobe. 2013, 19: 39-43.
- [23] Chai C, Lee K S, Lee D, et al. Non-selective and selective enrichment media for the recovery of Clostridium difficile from chopped beef[J]. J Microbiol Methods. 2015, 109: 20-24.
- [24] Yang J J, Nam Y S, Kim M J, et al. Evaluation of a Chromogenic Culture Medium for the Detection of Clostridium difficile[J]. Yonsei Medical Journal. 2014, 55(4): 994.
- [25] Darkoh C, Dupont H L, Kaplan H B. Novel One-Step Method for Detection and Isolation of Active-Toxin-Producing Clostridium difficile Strains Directly from Stool Samples[J]. Journal of Clinical Microbiology. 2011, 49(12): 4219-4224.
- [26] Hung Y P, Lin H J, Wu C J, et al. Vancomycin-resistant Clostridium innocuum bacteremia following oral vancomycin for Clostridium difficile infection[J]. Anaerobe. 2014, 30: 24-26.
- [27] Leeds J A, Sachdeva M, Mullin S, et al. In vitro selection, via serial passage, of Clostridium difficile mutants with reduced susceptibility to fidaxomicin or vancomycin[J]. J Antimicrob Chemother. 2014, 69(1): 41-44.
- [28] Tart S B. The role of vancomycin and metronidazole for the treatment of Clostridium difficile-associated diarrhea[J]. J Pharm Pract. 2013, 26(5): 488-490.
- [29] Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA)[J]. Infect Control Hosp Epidemiol. 2010, 31(5): 431-455.
- [30] Leekha S, Aronhalt K C, Sloan L M, et al. Asymptomatic Clostridium difficile colonization in a tertiary care hospital: admission prevalence and risk factors[J]. Am J Infect Control. 2013, 41(5): 390-393.

- [31] Knetsch C W, Bakker D, de Boer R F, et al. Comparison of real-time PCR techniques to cytotoxic culture methods for diagnosing *Clostridium difficile* infection[J]. *J Clin Microbiol*. 2011, 49(1): 227-231.
- [32] Eastwood K, Else P, Charlett A, et al. Comparison of Nine Commercially Available *Clostridium difficile* Toxin Detection Assays, a Real-Time PCR Assay for *C. difficile* tcdB, and a Glutamate Dehydrogenase Detection Assay to Cytotoxin Testing and Cytotoxic Culture Methods[J]. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, 47(10): 3211-3217.
- [33] Aldeen W E, Bingham M, Aiderzada A, et al. Comparison of the TOX A/B test to a cell culture cytotoxicity assay for the detection of *Clostridium difficile* in stools[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000, 36(4): 211-213.
- [34] Planche T, Wilcox M. Reference assays for *Clostridium difficile* infection: one or two gold standards?[J]. *J Clin Pathol*. 2011, 64(1): 1-5.
- [35] Bruins M J, Verbeek E, Wallinga J A, et al. Evaluation of three enzyme immunoassays and a loop-mediated isothermal amplification test for the laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31(11): 3035-3039.
- [36] Boyanton B J, Sural P, Loomis C R, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic *Clostridium difficile* detection[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(3): 640-645.
- [37] Ylisiurua P, Koskela M, Vainio O, et al. Comparison of antigen and two molecular methods for the detection of *Clostridium difficile* toxins[J]. *Scand J Infect Dis*. 2013, 45(1): 19-25.
- [38] Ota K V, McGowan K L. *Clostridium difficile* testing algorithms using glutamate dehydrogenase antigen and *C. difficile* toxin enzyme immunoassays with *C. difficile* nucleic acid amplification testing increase diagnostic yield in a tertiary pediatric population[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(4): 1185-1188.
- [39] Kawada M, Annaka M, Kato H, et al. Evaluation of a simultaneous detection kit for the glutamate dehydrogenase antigen and toxin A/B in feces for diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. *J Infect Chemother*. 2011, 17(6): 807-811.
- [40] Tenover F C, Novak-Weekley S, Woods C W, et al. Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches[J]. *J Clin Microbiol*. 2010, 48(10): 3719-3724.
- [41] Rene P, Frenette C P, Schiller I, et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* from stool samples and effect of strain type[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012, 73(1): 94-96.
- [42] Carman R J, Wickham K N, Chen L, et al. Glutamate dehydrogenase is highly conserved among *Clostridium difficile* ribotypes[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(4): 1425-1426.
- [43] Culbreath K, Ager E, Nemeyer R J, et al. Evolution of testing algorithms at a university hospital for detection of *Clostridium difficile* infections[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(9): 3073-3076.
- [44] Kim H, Kim W H, Kim M, et al. Evaluation of a rapid membrane enzyme immunoassay for the simultaneous detection of glutamate dehydrogenase and toxin for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. *Ann Lab Med*. 2014, 34(3): 235-239.
- [45] Surawicz C M, Brandt L J, Binion D G, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections[J]. *Am J Gastroenterol*. 2013, 108(4): 478-498, 499.
- [46] Schneider A, Mol A, Lisowska K, et al. Three-step diagnostic algorithm in diagnosing patients suspected of *Clostridium difficile*-associated diarrhea[J]. *Przegl Epidemiol*. 2014, 68(4): 669-674.
- [47] Iv E C O. Clinical update for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection[J]. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2014, 5(1): 1.
- [48] Chapin K C, Dickenson R A, Wu F, et al. Comparison of five assays for detection of *Clostridium difficile* toxin[J]. *J Mol Diagn*. 2011, 13(4): 395-400.
- [49] Castro B, Hernandez-Porto M, Felipe-Diaz V, et al. [Severe colitis due to community-acquired ribotype 027 *Clostridium difficile*][J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014, 32(7): 471-472.
- [50] Sommer T N, Ravn P, Gjørup I. [*Clostridium difficile* ribotype 027 is a challenge.][J]. *Ugeskr Laeger*. 2014, 176(4).
- [51] Cho S Y, Nam Y S, Kim M J, et al. Detection of *Clostridium difficile* as a routine diagnosis: comparison of real-time PCR and enzyme immunoassay[J]. *Am J Clin Pathol*. 2012, 137(3): 494-495, 495.
- [52] Putsathit P, Morgan J, Bradford D, et al. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens[J]. *Pathology*. 2015, 47(2): 165-168.
- [53] Eckert C, Holscher E, Petit A, et al. Molecular Test Based on Isothermal Helicase-Dependent Amplification for Detection of the *Clostridium difficile* Toxin A Gene[J]. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014, 52(7): 2386-2389.
- [54] Tojo M, Nagamatsu M, Hayakawa K, et al. Evaluation of an automated rapid diagnostic test for detection of *Clostridium difficile*[J]. *PloS one*. 2014, 9(8): e106102.
- [55] Buchan B W, Mackey T L, Daly J A, et al. Multicenter clinical evaluation of the portrait toxigenic *C. difficile* assay for

- detection of toxigenic *Clostridium difficile* strains in clinical stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(12): 3932-3936.
- [56] Gilbreath J J, Verma P, Abbott A N, et al. Comparison of the Verigene *Clostridium difficile*, Simplexa C. *difficile* Universal Direct, BD MAX Cdiff, and Xpert C. *difficile* assays for the detection of toxigenic C. *difficile*[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014, 80(1): 13-18.
- [57] Chiang D, Ng S, La MV, et al. Performance assessment of the BD MAX Cdiff assay in comparison to Xpert C. *difficile* assay in a setting with very low prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027[J]. *Anaerobe*. 2014, 30: 156-158.
- [58] Hong G, Park K S, Ki C, et al. Evaluation of the illumigene C. *difficile* assay for toxigenic *Clostridium difficile* detection: a prospective study of 302 consecutive clinical fecal samples[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014, 80(3): 177-180.
- [59] Shin B M, Mun S J, Yoo S J, et al. Comparison of BD GeneOhm Cdiff and Seegene Seeplex ACE PCR assays using toxigenic *Clostridium difficile* culture for direct detection of *tcdB* from stool specimens[J]. *J Clin Microbiol*. 2012, 50(11): 3765-3767.
- [60] Larson A M, Fung A M, Fang F C. Evaluation of *tcdB* real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*. 2010, 48(1): 124-130.
- [61] Wilcox M H. Overcoming barriers to effective recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012, 18: 13-20.
- [62] Bartlett J G, Moon N, Chang T W, et al. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis[J]. *Gastroenterology*. 1978, 75(5): 778-782.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

比浊法测定结合珠蛋白试剂盒的性能评价

韩成莲 刘瑶

[摘要] **目的:**对北京九强免疫比浊法检测结合珠蛋白(HPT)试剂盒进行初步方法学评价,为临床应用提供依据。**方法:**依据美国国家临床实验室标准化协会 CLSI 提供的方法,进行准确度、精密度、线性、相关性和稳定性等性能评价。**结果:**HPT 检测质控的相对偏倚分别为 0.87%、3.09%、2.4%;批内精密度 CV 均小于 2%。线性评价结果显示,线性良好,相关指数 $R^2 > 0.99$ 。相关性评价结果显示,与对比试剂的相关性良好,回归系数 $R^2 > 0.99$ 。加速稳定性试验结果显示 37 度 7 天检测质控偏差均小于 5%。**结论:**比浊法检测结合珠蛋白的方法准确度高,精密度、线性、相关性良好,符合临床检验的要求。

[关键词] 结合珠蛋白;比浊法;性能评价

Performance of Haptoglobin Biochemical Assay Kit (Immunoturbidimetric Method)

Han Chenglian, Liu Yao, Beijing Strong Biotechnologies, Inc, China

Corresponding author: Han Chenglian, E-mail: hanchenglian@bsbe.com.cn

[Abstract] **Objective:**The goal of this study is to evaluate the primarily detection of Haptoglobin (HPT) by Beijing Strong immunoturbidimetry assay, and provide the reference for clinical application. **Methods:**The accuracy, precision, linearity, stability, method comparison was evaluated according to industry standard documents (immunoturbidimetry assay kit). **Results:**The relative biases were 0.87%、3.09% and 2.4% of HPT controls. The intra-assay precision CV was less than 2%. Linear evaluation results showed the correlation index R was higher than 0.99. The regression coefficient index R was greater than 0.99 comparing to other reagent. Under 37 degrees environment for 7 days, the relative deviation was less than 5%. **Conclusions:**The accuracy, precision, linearity and stability performance of Beijing Strong HPT immunoturbidimetry assay was good. Compared with other systems, the clinical concordance was good. The kit is suitable for the clinical application.

[Key Words] Haptoglobin;Immunoturbidimetric;Performance evaluation

结合珠蛋白(haptoglobin,HP)又称触珠蛋白,是血清球蛋白组分中的一种酸性糖蛋白,广泛存在于人类和许多哺

乳动物的血清及其它体液中，主要在肝脏合成和降解，作为急性期蛋白 (acute phase protein, APP) 之一的 HPT，急性反应相时血浆中 HPT 增加，正烧伤和肾病综合征引起的大量白蛋白丢失的情况下也可见增加，且其量与严重程度及预后相关^[1,2]。血管内溶血如溶血性贫血、输血反应、疟疾时 HPT 含量明显下降。此外，在严重肝病患者的 HPT 的合成降低。因此，目前 HPT 检测主要应用于细胞内溶血及肝病的检测，辅助其他急性时相蛋白判断体内炎症反应。

HPT 的分子结构类似免疫球蛋白，即由两条重链(β 链)和两条轻链(α 链)组成四聚体。其中 α 链有两种即 $h p \alpha^1$ 和 $h p \alpha^2$ ，而 $h p \alpha^1$ 又有两种亚型即 $h p \alpha^{1F}$ 和 $h p \alpha^{1S}$ 。因此 HPT 有三种主要表现型，分别称之为 HP1-1、HP2-1 和 HP2-2，这是由于 α 链的类型不同所造成的^[1]。

目前检测结合珠蛋白的方法主要有前期使用的火箭电泳法、放射免疫扩散法及根据 HP-Hb 复合物的类过氧化物酶活性原理检测 HPT 三种方法，及现在广泛开展的免疫比浊法。因前期使用的检测 HPT 的方法在灵敏度、精密度及样本需求、检测时间限制等方面的缺陷现在的应用已非常少。取而代之的免疫比浊法因其灵敏度、精密度高，样本需求量少，检测快速且不受 HPT 不同表现型的影响而在医院获得广泛应用^[8,10,11]。

目前市场上以比浊法检测结合珠蛋白的试剂盒已较多，但大多为国外垄断，检测费用较高。为了丰富市场上结合珠蛋白检测试剂盒种类，降低检测成本，北京九强特推出自己的结合珠蛋白检测试剂盒，为临床应用提供选择。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 全自动生化分析仪（日本日立 7080），常规维护以保证仪器处于良好状态；结合珠蛋白测定试剂盒（北京九强生物技术股份有限公司提供）。

1.2 样本来源 某医院门诊人群血清样本。

1.3 方法

1.3.1 分析方法 采用透射免疫比浊法，样本中的抗原（HPT）和特异性抗体（羊抗人 HPT 抗血清）相结合，形成不溶性免疫复合物，使反应液产生混浊，其浊度高低反映血清样品中 HPT 的浓度，可由校准品所作的剂量-相应曲线算出。

1.3.2 分析参数 样本体积 2ul，R1 试剂体积 180ul，R2 试剂体积 60ul，主波长 340nm，副波长 700nm，方法为终点法。

1.3.3 校准 采用 6 点校准。

1.4 评价指标

1.4.1 准确度试验 使用质控品进行 3 次测定，计算相对偏差

1.4.2 批内精密度试验 使用 3 例样本进行 10 次重复测定，计算 CV。

1.4.3 线性范围试验 将高值样本以去离子水进行稀释，共 12 个梯度，每个浓度检测 3 次。

1.4.4 加速稳定性试验 将试剂放入 37 度，每天对质控品进行测定，连续 7 天，计算相对偏差。

1.4.5 比对试验 将九强试剂与国内某试剂进行样本测定比对，计算线性回归方程。

2 结果

2.1 质控分析 对三个水平质控品进行 3 次连续测定，计算相对偏差结果均 $<5\%$ ，符合靶值要求（见表一），准确度可靠。

表 1 准确度结果

组别 (g/L)	总均数	HPT			接受或拒绝
		赋值	偏倚	允许偏倚	
质控 1	0.683	0.689	0.87%	10%	接受
质控 2	1.318	1.36	3.09%	10%	接受
质控 3	1.952	2.0	2.4%	10%	接受

2.2 精密度试验 选择 3 份高中低值样本进行批内精密度测试，结果 CV 均 $<5\%$ （见表二），可满足临床检验对重复性的要求。

表 2 批内精密度结果

样本	均值 (g/L)	批内精密度	
		SD	CV
低值	0.37	0.002	0.47%
中值	1.08	0.005	0.45%
高值	1.86	0.017	0.89%

2.3 线性试验 线性范围在 0.2~2.7g/L，相关系数 $R \geq 0.99$ （见图一），满足试剂要求。

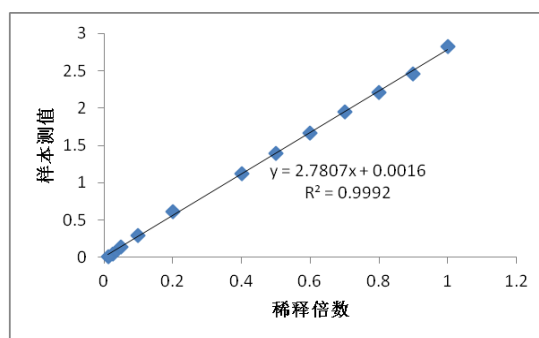


图 1 线性结果

2.4 加速稳定性试验 试剂 37 度恒温放置 7 天，检测质控测定值均在靶值范围内，表示该试剂可在 37 度稳定 7 天（见表五）。

表 3 稳定性

项目 (g/L)	质控水平	相对偏差		
		第 1 天	第 5 天	第 7 天
HPT	低浓度	1.89%	2.03%	4.06%
	中浓度	1.84%	1.4%	3.9%
	高浓度	2.4%	2.9%	3.45%

2.5 比对试验 九强试剂与国内某比法 HPT 试剂盒比对相关性良好，具有可比性（图二）。

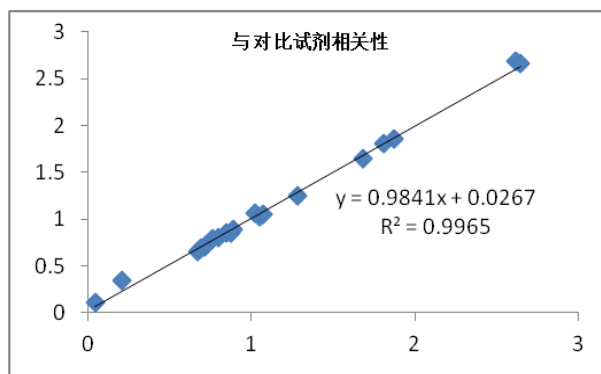


图 2 比对结果

3 讨论

随着对血清中特定蛋白研究的发展，结合珠蛋白除了作为急性时相反应蛋白、血管内溶血检测及肝脏疾病的诊断指标外，更多关于结合珠蛋白的潜在应用价值不断被发现。如部分研究结果显示，冠心病患者血浆 HPT 浓度比正常人血清浓度明显升高，血清 HPT 浓度可以作为冠心病预测及诊断因子^[4]。Haptoglobin 很可能是肝硬化阶段发展到肝癌阶段的一个潜在早期诊断标志物。结合珠蛋白家族在肝癌、肝硬化、慢性迁延性肝炎及正常血清样本中为变化

最显著的一类蛋白。通过对 HPT 的表达验证,推测结合珠蛋白家族可作为肝癌的潜在血清标志物,特别是肝硬化到肝癌阶段,值得进一步研究^[5]。由此可见临床中准确定量血清中的 HPT 具有重要的诊断意义。

通过对九强结合珠蛋白测定试剂盒的性能初步评价,其准确度高,重复性好,线性及相关性稳定性均满足临床实验室的应用要求,检测快速,样本需求量少,可在临床诊断实验室常规自动生化分析仪上使用。

参考文献

- [1] 王凤君,黄文华,黎鳌.触珠蛋白研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1994,21(5):386-472.
- [2] 王璇,高惠敏等.触珠蛋白、 α 1-酸性糖蛋白和 C 反应蛋白对细菌性及病毒性感染患儿的鉴别诊断价值[J].中国小儿急救医学,2011,18(4):338-340.
- [3] Bahera Mali,David Armbruster,Ernie Serediak,et.Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins[J].Clinical Biochemistry,2009,(42): 1568-1571.
- [4] 张宇,邱春光,韩战迎等.血浆结合珠蛋白与冠心病相关性研究[J].中国实用医刊,2011,38(12).
- [5] 舒宏.肝癌发生发展血清蛋白质组的比较研究和结合珠蛋白动态变化及 N-聚糖特征的探索[D].广西医科大学,2008.
- [6] 谭丽娜.结合珠蛋白的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2006,26(1):43-47.
- [7] Frederick Van Lente,Anthony Marchand,and Robert S.Galen.Evaluation of a Nephelometric assay for haptoglobin and Its clinical usefulness[J].Clinical chemistry,1979,25(12):2007-2010.
- [8] Tsai-Mu Cheng,Ju-Pin Pan,Shiau-Ting Lai,et.Immunochemical property of human haptoglobin phenotypes: Determination of plasma haptoglobin using type-matched standards[J].Clinical Biochemistry,2007,40:1045-1056.
- [9] Thomas B. Ledue, Marilyn F.Collins and Robert F.Ritchie.Development of Immunoturbidimetric Assays for Fourteen Human Serum Proteins on the Hitachi 912TM[J].Clin Chem Lab Med,2002, 40(5):520-528.
- [10] Bahera Mali,David Armbruster,Ernie Serediak,et.Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins[J].Clinical Biochemistry,2009,42:1568-1571.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

尿质控品对尿液分析灵敏度的提示及临床相关性研究

刘云鹏 冼庆勇 蒋泽军* 罗克朗 蒋庆姣

桂林优利特医疗电子有限公司

[摘要] 目的:了解质控品质控结果与临床结果的相关性,比较中低值质控和高值质控的相关性优劣,为进行临床检测前提供参考。方法:采用四种尿液分析测试系统,在不同的温度环境里,分别对中低值质控和品牌 A 质控进行 100 例临床样本测试,比较分析结果。同时还对不同灵敏度的试纸条进行中低值质控和高值质控后进行 100 例临床样本测试,比较分析结果。结果:1) 测试环境温度对结果的影响。随着环境温度的升高,临床上蛋白质、尿胆原、白细胞项目阳性率有明显的升高,中低阳性浓度尿质控品质控结果也呈相同的变化趋势,但高值质控质控结果在该些项目上变化不明显,与临床变化程度相关性不高。2) 用质控结果提示有差异的分析系统进行临床对比测试,结果发现质控提示有差异的项目在临床上也有差异。质控结果灵敏度降低的临床结果阳性率也相应有所降低,同时高阳性的样品阳性等级也相应降低。反之也有相同的结果。结论:中低值质控在微小的灵敏度差异上,与临床结果更具有相关性。比较之下,高值质控对提示分析系统的灵敏程度有一定的迟钝和不足之处。

[关键词] 质控品;临床对比;尿液;干化学;尿液分析仪

尿常规检验有助于对疾病进展、治疗效果及并发症的监测,也可用于对给用药物的检测等^[1]。它广泛应用于临床疾病的辅助诊断,是明确患者是否有泌尿系统疾病的常用方法^[2]。在病变之初,尿中与病理相关的各物质的变化是细微的。这一细微的变化,在尿常规检验中体现为各个检出物呈现出由无到有的变化,并以阴性向微弱的阳性显示。然而,当病人处在这一病与不病的临界点上,尿检能检出与否,检出的结果准确与否,直接影响医生对病情认定的准确性。

中低阳性浓度尿质控品在阴性和阳性之间提出了中低阳性浓度质量控制的概念,是在阴性尿质控品和阳性尿质

控品的基础上对质控范围的细化和精确,一方面将质量控制的范围具体化,对尿质控体系进行了有效的补充,另一方面控制弱阳性的检出质量,更加符合和贴近临床结果的情况。

研究通过中低阳性浓度尿质控品的质控结果和阴性尿质控品、阳性尿质控品质控结果与临时结果的比对,研究不同浓度水平的质控与临床相关性的关系。

1 材料与方法

1.1 尿质控品

中低阳性浓度尿质控品(桂林优利特医疗电子有限公司生产),某进口主流品牌A尿质控液。

1.2 主要器材

四种不同的尿液分析系统(含两个批号的配套试纸条)。

1.3 临床样本

取自桂林医学院附属医院检验科的临床样本。取样后2小时内进行测试。

1.4 方法

1.4.1 分析系统测试环境温度对质控结果及临床结果的对应性研究

采用一种尿液分析系统进行测试。首先调节测试环境温度为 $10\pm 2^{\circ}\text{C}$,将仪器、试剂及临床尿样置于调节好温度的环境中稳定30分钟,在测试临床尿样之前用品牌A尿质控液和中低阳性浓度尿质控品进行五次质控测试,记录质控结果后再进行临床尿样的测试;再分别将测试环境温度调节为 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 和 $35\pm 2^{\circ}\text{C}$,在不同的温度下重复进行试验。最后,收集、整理数据,比较质控品测试及临床尿样的结果随温度变化的情况是不是具有相关性。在所有的测试之前,用厂家配套的校准灰条对仪器进行检测通过后再进行质控品和临床样本的测试。

1.4.2 分析系统灵敏度变化的监测及临床对应性研究

在测试环境温度为 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 条件下,将仪器、试剂及临床尿样置于调节好温度的环境中稳定30分钟。在测试临床尿样之前用品牌A尿质控液和中低阳性浓度尿质控品进行三次质控测试,记录质控结果后再进行临床尿样的测试。最后,收集、整理数据,比较质控品测试及临床尿样的结果随温度变化的情况是不是具有相关性。

在所有的测试之前,用厂家配套的校准灰条对仪器进行检测通过后再进行质控液和临床样本的测试。

2 结果

2.1 不同测试环境质控结果与临床结果相关性

2.1.1 品牌A尿质控液测试结果

用品牌A尿质控液在 10°C 、 25°C 、 35°C 三个不同的环境温度下进行质控测试,质控结果都保持一致,反映不出环境温度对分析系统的影响。见表1。

表1 品牌A尿质控液测试结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	PH	PRO	URO	NIT	WBC
10 $^{\circ}\text{C}$	2+ ⁵	3+ ⁵	3+ ⁵	1.015 ¹ 1.020 ⁴	3+ ⁵	7.0 ⁵	3+ ⁵	131 ⁵	P ⁵	2+ ⁵
温度 25 $^{\circ}\text{C}$	2+ ⁴ 1+ ¹	3+ ⁵	3+ ⁵	1.020 ⁵	3+ ⁵	7.0 ⁵	3+ ⁵	131 ⁵	P ⁵	2+ ⁵
35 $^{\circ}\text{C}$	2+ ⁵	3+ ⁵	3+ ⁵	1.020 ⁵	3+ ⁵	7.0 ⁵	3+ ⁵	131 ⁵	P ⁵	2+ ⁵

备注: X^Y: X表示测试的结果, Y表示该结果出现的次数。

2.1.2 中低阳性浓度尿质控品测试结果(以下简称中低)

用中低阳性浓度尿质控品在 10°C 、 25°C 、 35°C 三个不同的环境温度下进行质控测试,质控结果都有所差异。其中胆红素(BIL)、隐血(BLD)、蛋白质(PRO)、尿胆原(URO)、白细胞(WBC)项目结果与温度成线性相关,温度越高,阳性等级越高。见表2。

表 2 中低阳性浓度尿质控品测试结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO	URO	NIT	WBC
10℃	T ⁵	1+ ⁵	1+ ⁵	1.005 ⁵	1+ ⁵	7.0 ⁵	T ³ 1+ ²	3.2 ⁴ 16 ¹	P ⁵	N ⁴ T ¹
温度 25℃	T ⁵	2+ ⁵	1+ ⁵	1.005 ⁵	1+ ⁴ 2+ ¹	7.0 ⁵	T ¹ 1+ ⁴	33 ⁵	P ⁵	1+ ⁵
35℃	T ⁵	2+ ⁵	1+ ⁵	1.005 ⁵	1+ ¹ 2+ ⁴	7.0 ⁵	1+ ⁵	33 ² 66 ³	P ⁵	2+ ⁵

备注：X^Y： X 表示测试的结果， Y 表示该结果出现的次数。

2.1.3 临床结果统计（临床样本为 90 个）

临床样本在 10℃、25℃、35℃ 三个不同的环境温度下进行测试，对各个项目的阳性率进行统计。由图 1 可见 BIL、BLD、PRO、URO、WBC 项目结果与温度成线性相关，其中又以 WBC 最为典型。这些项目的趋势是随着温度的升高，阳性率越高。

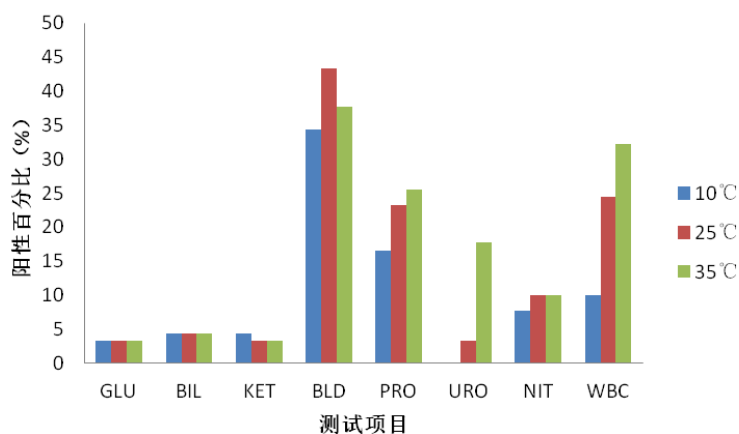


图 1 临床结果统计图

2.2 不同测试系统试纸灵敏度与临床相关性

2.2.1 尿液分析系统 1 质控与临床结果相关性

用尿液分析系统 1 对中低阳性浓度尿质控品和品牌 A 尿质控液进行质控测试。两批不同的试纸（试纸 1 和试纸 2）中，中低阳性浓度尿质控品提示 KET、BLD 和 WBC 项灵敏度有偏低的现象，而品牌 A 质控提示显示正常。结果见表 3。

表 3 尿液分析系统 1 的质控结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO	URO	NIT	WBC
中 试纸 1	1+ ³	2+ ³	1+ ³	1.005 ³	1+ ³	7.0 ³	1+ ³	2+ ³	+ ³	1+ ³
低 试纸 2	1+ ³	2+ ³	T ³	1.005 ³	T ³	7.0 ³	1+ ³	2+ ³	+ ³	2+ ³
品 试纸 1	3+ ³	3+ ³	1+ ³	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	3+ ³	- ³	1+ ³
牌 试纸 2	3+ ³	3+ ³	1+ ³	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	3+ ³	- ³	1+ ³
A										

备注：X^Y： X 表示测试的结果， Y 表示该结果出现的次数。

用同样的临床尿液样本在同样的条件下进行临床测试。通过 100 例结果可以发现，两批不同的试纸与尿仪组成的尿液分析系统也有差异。试纸 1 中 KET、BLD 的阳性率比试纸 2 的分别高 4% 和 9%，而 WBC 项则低 8%。结果见表 4。

表 4 尿液分析系统 1 的临床结果

项目	GLU	BIL	KET	BLD	PRO	URO	NIT	WBC
	T ⁰		T ³	T ⁹	T ¹³			T ⁴
试纸 1	1+ ²	1+ ⁴	1+ ³	1+ ⁷	1+ ⁵	1+ ³	+ ⁹	1+ ³
	2+ ⁵	2+ ⁰	2+ ²	2+ ⁷	2+ ²	2+ ⁰		2+ ¹
	3+ ⁰	3+ ⁰	3+ ²	3+ ¹	3+ ¹	3+ ⁰		3+ ³
阳性率	7.0%	4.0%	10.0%	24.0%	23.33%	3.0%	9.0%	11.0%
	T ⁰		T ¹	T ⁷	T ¹⁴			T ⁶
试纸 2	1+ ²	1+ ⁴	1+ ²	1+ ⁴	1+ ⁵	1+ ³	+ ⁹	1+ ⁵
	2+ ⁵	2+ ⁰	2+ ²	2+ ³	2+ ³	2+ ⁰		2+ ⁴
	3+ ⁰	3+ ⁰	3+ ¹	3+ ¹	3+ ¹	3+ ⁰		3+ ⁴
阳性率	7.0%	4.0%	6.0%	15.0%	25.56%	3.0%	9.0%	19.0%

备注: X^Y: X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。PH、SG 无法按照阳性率统计。

2.2.2 尿液分析系统 2 质控与临床结果相关性

用尿液分析系统 2 对中低阳性浓度尿质控品和品牌 A 尿质控液进行质控测试。两批不同的试纸(试纸 1 和试纸 2)中,中低阳性浓度尿质控品提示 BLD 项灵敏度有偏高的现象,而品牌 A 质控提示显示正常。结果见表 5。

表 5 尿液分析系统 2 的质控结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO	URO	NIT	WBC	
中低	试纸 1	T ³	2+ ³	1+ ³	1.005 ³	1+ ³	7.0 ³	1+ ³	33 ³	P ⁵	1+ ³
	试纸 2	T ³	2+ ³	1+ ⁵	1.005 ³	2+ ³	7.0 ³	1+ ¹ 2+ ²	33 ³	P ⁵	1+ ³
品牌 A	试纸 1	3+ ³	3+ ³	3+ ³	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	131 ³	P ³	2+ ³
	试纸 2	3+ ³	3+ ³	3+ ³	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	131 ³	P ³	2+ ³

备注: X^Y: X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。

通过 100 例结果可以发现,试纸 1 中 BLD 的阳性率比试纸 2 低了近 11%。结果见表 6。

表 6 尿液分析系统 2 的临床结果

项目	GLU	BIL	KET	BLD	PRO	URO	NIT	WBC
试纸 1	T ⁶		T ²	T ⁶	T ⁷	16 ³		T ⁴
	1+ ⁰	1+ ³	1+ ¹	1+ ²	1+ ⁵	33 ⁰	P ¹¹	1+ ⁸
	2+ ³	2+ ⁰	2+ ¹	2+ ³	2+ ²	66 ⁰		2+ ²
	3+ ⁰	3+ ⁰	3+ ²	3+ ⁴	3+ ²	131 ⁰		3+ ³
阳性率	9.0%	3.0%	6.0%	15.0%	16.0%	3.0%		11.0%
试纸二	T ⁶		T ³	T ¹⁰	T ⁶	16 ²		T ³
	1+ ⁰	1+ ³	1+ ⁰	1+ ⁸	1+ ⁶	33 ¹	P ¹¹	1+ ⁹
	2+ ²	2+ ⁰	2+ ¹	2+ ³	2+ ³	66 ⁰		2+ ²
	3+ ¹	3+ ⁰	3+ ²	3+ ⁵	3+ ¹	131 ⁰		3+ ³
阳性率	9.0%	3.0%	6.0%	26.0%	16.0%	3.0%		11.0%

备注: X^Y : X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。PH、SG 无法按照阳性率统计。

2.2.3 尿液分析系统 3 质控与临床结果相关性

用中低阳性浓度尿质控品和品牌 A 尿质控液对尿液分析系统 3 进行质控测试。两批不同的试纸(试纸 1 和试纸 2)中,中低阳性浓度尿质控品提示 GLU 项灵敏度有偏低而 WBC 偏高的现象,而品牌 A 质控提示显示正常。结果见表 7。

表 7 尿液分析系统 3 的质控结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO	URO	NIT	WBC	
中低	试纸 1	1+ ³	1+ ⁵	1+ ³	1.005 ³	1+ ³	7.0 ³	1+ ³	2+ ³	2+ ⁵	1+ ³
	试纸 2	N ¹ 1+ ²	1+ ⁵	1+ ⁵	1.005 ³	1+ ³	7.0 ³	1+ ³	2+ ³	2+ ⁵	2+ ³
品牌 A	试纸 1	3+ ³	3+ ³	2+ ² 3+ ¹	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	4+ ³	2+ ³	2+ ³
	试纸 2	3+ ³	3+ ³	3+ ³	1.020 ³	3+ ³	7.0 ³	3+ ³	4+ ³	2+ ³	2+ ³

备注: X^Y : X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。

100 例临床结果显示,试纸 1 组的 GLU 阳性率比试纸 2 的要高 4%,而 WBC 则低 11%。见表 8。

表 8 尿液分析系统 3 的临床结果

项目	GLU	BIL	KET	BLD	PRO	URO	NIT	WBC
试纸 1	T ⁰		T ²	T ⁸	T ¹³			T ⁶
	1+ ³	1+ ⁴	1+ ⁰	1+ ⁷	1+ ⁵	1+ ³		1+ ¹¹
	2+ ⁵	2+ ⁰	2+ ¹	2+ ³	2+ ²	2+ ²	2+ ⁹	2+ ³
	3+ ¹	3+ ⁰	3+ ¹	3+ ²	3+ ¹	3+ ⁰		3+ ²
阳性率	9.0%	4.0%	4.0%	20.0%	21.0%	5.0%	9.0%	22.0%
试纸二	T ⁰		T ¹	T ⁷	T ¹⁴			T ¹⁵
	1+ ⁴	1+ ⁴	1+ ⁰	1+ ⁹	1+ ⁵	1+ ³		1+ ¹⁰
	2+ ¹	2+ ⁰	2+ ¹	2+ ¹	2+ ³	2+ ³	2+ ⁹	2+ ²
	3+ ⁰	3+ ⁰	3+ ¹	3+ ²	3+ ¹	3+ ⁰		3+ ⁴
阳性率	5.0%	4.0%	4.0%	19.0%	23.0%	6.0%	9.0%	31.0%

备注: X^Y : X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。PH、SG 无法按照阳性率统计。

2.2.4 尿液分析系统 4 质控与临床结果相关性

用中低阳性浓度尿质控品和品牌 A 尿质控液对尿液分析系统 4 进行质控测试。中低阳性浓度尿质控品提示试纸 1 组的 KET 和 PRO 项灵敏度比试纸 2 组的稍高,而品牌 A 质控提示显示正常。结果见表 9。

表 9 尿液分析系统 4 的质控结果

项目	GLU	BIL	KET	SG	BLD	pH	PRO	URO	NIT	WBC	
中低	试纸 1	1+ ³	1+ ³	2+ ³	1.010 ³	2+ ³	7.0 ³	2+ ³	3+ ³	P ⁵	1+ ³
	试纸 2	1+ ³	1+ ³	1+ ³	1.010 ³	2+ ³	7.0 ³	1+ ² 2+ ¹	3+ ³	P ⁵	1+ ³
品牌 A	试纸 1	3+ ³	3+ ³	3+ ³	1.015 ³	4+ ³	7.0 ³	3+ ³	4+ ³	P ³	1+ ³
	试纸 2	3+ ³	3+ ³	3+ ³	1.015 ³	4+ ³	7.0 ³	3+ ³	4+ ³	P ³	1+ ³

备注: X^Y : X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。

100 例临床结果显示,试纸 1 组的 KET 项阳性率比试纸 2 的高 5%,PRO 则低 5%。见表 10。

表 10 尿液分析系统 4 的临床结果

项目	GLU	BIL	KET	BLD	PRO	URO	NIT	WBC
试纸 1	1+ ¹	1+ ⁷	1+ ⁴	1+ ⁶	1+ ⁴	1+ ¹	P ⁶	1+ ⁶
	2+ ⁵	2+ ¹	2+ ²	2+ ⁹	2+ ⁹	2+ ²		2+ ⁵
	3+ ²	3+ ¹	3+ ¹	3+ ¹	3+ ³	3+ ⁰		3+ ³
	4+ ⁰		4+ ³	4+ ¹	4+ ³			4+ ²
阳性率	8.0%	9.0%	10.0%	17.0%	19.0%	3.0%	6.0%	15.0%
试纸二	1+ ²	1+ ⁷	1+ ¹	1+ ⁵	1+ ²	1+ ¹	P ⁶	1+ ⁷
	2+ ⁴	2+ ²	2+ ²	2+ ⁸	2+ ⁷	2+ ²		2+ ⁴
	3+ ²	3+ ⁰	3+ ⁰	3+ ²	3+ ²	3+ ⁰		3+ ⁴
	4+ ¹		4+ ²	4+ ¹	4+ ³			4+ ¹
阳性率	9.0%	9.0%	5.0%	17.0%	14.0%	3.0%	6.0%	16.0%

备注: X^Y: X 表示测试的结果, Y 表示该结果出现的次数。pH、SG 无法按照阳性率统计。

3 讨论

3.1 环境温度对质控、临床结果的影响

(1)品牌 A 尿质控液测试结果几乎不受温度影响。无论是 10℃、25℃或者是 35℃, 质控的结果都保持稳定。这一结果, 对于提示测试系统在相应的测试环境下的状态无较高的指导性意义。

(2)中低阳性浓度尿质控品测质控结果受温度影响比较显著。以常温 25℃为参照, 当温度降低到 10℃时, BIL、BLD、URO、WBC 测试结果有所降低, 尤其以 WBC 最为明显。其中 BIL、BLD、URO 的结果依然在质控范围之内, 而 WBC 则有阴性结果出现, 提示系统存在失控的风险; 当测试温度升高到 35℃时, URO、WBC 测试结果也升高, 同样以 WBC 最为明显, 虽然结果也还在质控范围之内, 但已经处在质控范围的高端, 提示在该测试环境下, 系统的测试结果将偏高。

(3)从临床结果上来看: 以常温 25℃为参照, 当温度降低到 10℃或温度升高到 35℃时, GLU、BIL、KET、NIT 项的阳性率没有显著改变, 说明测试结果比较稳定可靠。这与质控液的质控结果相符。但当测试温度为 10℃时, URO 项提示可疑尿样样本数为 0 个, 25℃为 3 个, 35℃时激增到 16 个; WBC 项在 10℃时, 阳性样本为 9 个, 25℃时为 22 个, 35℃时为 30 个; PRO 项在 10℃时, 阳性样本为 15 个, 25℃时为 21 个, 35℃时为 23 个; BLD 项在 10℃时, 阳性样本为 32 个, 25℃时为 39 个, 35℃时为 34 个。由统计结果可以看出, 从 10℃到 25℃, 随着温度的增加, 阳性率升高; 并且, 这些项目各级阳性样本量呈增加趋势, 这一趋势表明, 随着温度的增加, 原先阳性等级低的往阳性等级高的结果偏移, 同时由于检出灵敏度的提高, 本为阴性的样本也测试出阳性的结果。

(4)综看所有的临床结果, 说明临床的结果受到测试环境温度影响。温度低, 阳性检出率低, 漏检的可能性增大; 温度高, 阳性检出率高, 假阳性的风险相应增加。

(5)就趋势上看, 中低阳性浓度尿质控品的质控结果的趋势与临床结果变化的趋势比较吻合, 即中低阳性浓度尿质控品质控结果与临床结果相关性比以品牌 A 质控为代表的高浓度尿质控品更加接近。所以, 在提示测试系统的风险的敏感度上, 中低阳性浓度尿质控品有着更大的优势。

3.2 分析系统灵敏度变化的分析

从四个分析系统看, 在出现灵敏度变化时, 中低阳性浓度尿质控品的质控结果提示作用都优于高值阳性质控液。尤其是在阳性等级为 1+时尤为明显。从临床结果来看, 临床样本的阳性率增高或降低都和中低阳性浓度尿质控品质控结果相符合, 而高值质控结果无大的变化, 提示作用不显著。综合以上两点, 可以认为中低阳性浓度尿质控品对系统测试风险的提示作用优于高值质控。即与临床的相关性更明显。

参考文献

- [1] 丛玉隆等.现代尿液分析技术与临床[M].第 1 版,北京:人民军医出版社,2007.
- [2] 王海鸥.影响尿液检验分析前质量的主要因素及相应对策研究[J].检验医学与临床,2015(8):1125-1126.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

幽门螺杆菌抗体胶乳免疫比浊检测试剂盒的研制及性能评价

高爱民

北京九强生物技术股份有限公司

[摘要] 目的: 建立胶乳免疫比浊法检测人血清中幽门螺杆菌抗体的分析方法。方法: 采用胶乳免疫比浊法检测人血清中幽门螺杆菌抗体, 并对试剂盒的各项性能指标进行评价。结果: 幽门螺杆菌抗体试剂盒的检测范围为 3-100U/mL; 灵敏度为 3U/mL; 批内、批间精密度的分别为 5.8% (低值)、2.5% (高值) 和 6.9% (低值)、3.8% (高值); 样本中的血红蛋白、胆红素、Intralipid 等干扰物浓度达到 500mg/dL、30mg/dL、250mg/dL 时对检测结果无显著性影响; 84 份常规血清样本用胶乳免疫比浊法与胶乳免疫层析法同时检测, 阳性符合率为 91%, 阴性符合率为 99%。结论: 研制的胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体试剂盒性能优良, 满足临床应用要求。

[关键词] 幽门螺杆菌抗体; 胶乳免疫比浊; 试剂盒

Preparation of latex immunoturbidimetric assay kit for detection of Anti-HP and performance evaluation

Gao Aimin, Beijing Strong Biotechnologies, Inc, China

Corresponding author: Gao Aimin, E-mail: gaoaimin@bsbe.com.cn

[Abstract] **Objective:** To prepare immunoturbidimetric assay kit for detection of human anti-Helicobacter pylori. **Methods:** Immunoturbidimetric assay was adopted to develop kits for detection of human anti-Helicobacter pylori, and the performance of kit was evaluated. **Results:** The linearity range of Anti-HP kit was 3-100U/mL, with sensitivity of 3U/mL, and intra- and inter-assay coefficients of 5.8% (low value), 2.5% (high value) and 6.9% (low value), 3.8% (high value). No significant interference was observed by hemoglobin up to 500mg/dL, bilirubin up to 30mg/dL, and intralipid up to 250mg/dL. The positive correspondence rate between immunoturbidimetric and immunochromatographic was 91%, and negative correspondence rate was 99%, by detecting 84 samples. **Conclusions:** The developed immunoturbidimetric assay kit for detection of anti-HP in this study are valuable for clinical application with high performance.

[Key words] Anti-HP; Latex Immunoturbidimetric; Performance evaluation

幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, H.pylori) 是一种革兰氏阴性菌, 在胃上皮细胞定居繁殖。感染幽门螺旋杆菌后可引起胃炎、消化道溃疡、黏膜相关的淋巴瘤, 甚至导致胃癌^[1]。

幽门螺杆菌能产生多种抗原成分, 诱导体液免疫反应产生 IgG、IgA 和 IgM。IgM 主要出现于急性感染期, IgA 主要以分泌形式进入胃液, 目前血清学检测的主要是可长期存在的 IgG^[2,3]。

检测人血液样本中是否存在胃幽门螺旋杆菌抗体是判断病人是否感染胃幽门螺旋杆菌的重要依据, 可用于临床筛查和辅助诊断^[4]。

现已建立的多种检测幽门螺杆菌抗体的方法, 包括酶联免疫吸附法、免疫层析方法、免疫印迹技术、胶乳凝集试验、化学发光检测等^[5]。我们研制的胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体试剂盒以其简单、快速、易自动化及检测样本通量大等优点更适用于临床检测。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 材料

幽门螺杆菌抗原和抗体为美国 Calbioreagents 公司产品; 聚苯乙烯胶乳购自 Merck 公司。对照胶乳免疫层析法幽门螺杆菌抗体快检卡为 Alere 公司生产, 经销商为杭州艾博。

1.1.2 样本 84 例人血清样本来自北京某医院。

1.1.3 实验仪器 日立 7180 生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 试剂制备

缓冲液中添加适量的和盐离子和高分子聚合物作为提高反应速率的物质, 搅拌均匀为 R1 试剂。

聚苯乙烯胶乳溶液加入幽门螺杆菌抗原后在 37℃ 反应 3 小时, 加入乙醇胺液搅拌 1 小时来终止反应。胶乳离心 3

次去掉上清来清除未反应的抗原，最终交联幽门螺杆菌抗原的胶乳分散悬浮在缓冲液中，为 R2 试剂。

1.2.2 校准品制备

缓冲液中添加适量的幽门螺杆菌抗体，配制浓度分别为 0、10、20、40、70、100U/ml 的幽门螺杆菌抗体多点校准品。

1.2.3 分析操作程序

测定波长 570nm，首先加入 R1 试剂 180uL，37℃ 反应 30 秒后加入幽门螺杆菌抗体校准品 3.5uL，再反应 60 秒后加入 R2 试剂 60uL，测定反应第 10 秒、70 秒的吸光度值 (A1、A2)，计算吸光度差值 $\Delta A = A2 - A1$ ，每管重复测定 2 次，将各校准品管 2 次测得的吸光度差值 ΔA 为纵坐标，对应的浓度为横坐标，制作“浓度-吸光度差值”校准曲线，取得待样本，同法测定样本的吸光度差值，代入校准曲线，即可计算出待测样本中幽门螺杆菌抗体的含量。

1.3 方法学评价

1.3.1 校准曲线

以日立 7180 生化分析仪器系统绘制校准曲线。

1.3.2 分析灵敏度测试

测量水点和至少 5 个低浓度范围的样本，每个样本 20 次，分别计算平均值和 3SD，以低浓度值样本的平均值-3SD 大于水点的平均值+3SD 作为灵敏度值。

1.3.3 线性测试

用高低值样品倍比成至少 5 个稀释浓度，每个浓度测 3 次，计算相关系数。

1.3.4 精密度测试

测量低、高水平质控品上、下午各测 2 次，连续测量 20 天，按照 CLSI EP5-A2 的要求计算批内和批间精密度。

1.3.5 干扰试验

干扰物血红蛋白浓度 (1000-8000mg/dL)、胆红素浓度 (100-500mg/dL)、Intralipid 浓度 (1000-4000mg/dL)，取低值 (10U/mL) 和高值 (40U/mL) 样本各 1 份，分别与干扰物溶液按 9 比 1 体积混合，测定混合液中幽门螺杆菌抗体含量，与对照 (样本与水 9 比 1 混合) 比较计算回收率。

1.3.6 与胶乳免疫层析快检卡检测的相关性

从医院收集的 84 例常规样本，用胶乳免疫比浊法和胶乳免疫层析法同时检测，比较阴、阳性符合率。

2 结果

2.1 校准曲线

校准曲线见图 1

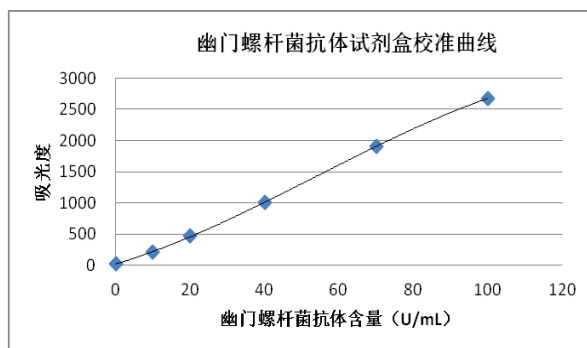


图 1 幽门螺杆菌抗体试剂盒校准曲线

Fig.1 Standard curve of Anti-HP kit

2.2 分析灵敏度

试剂分析灵敏度为 3U/mL (见表 1)。

表 1 幽门螺杆菌抗体试剂盒分析灵敏度结果

Table.1 The results of Anti-HP kit Analytical sensitivity

水	2U/mL	2.5U/mL	3U/mL	3.5U/mL	4U/mL
平均-3SD	-	0.698	1.094	2.394	5.855
平均+3SD	0.706	-	-	-	-

2.3 线性

线性范围在 3~100U/mL，相关系数 $R \geq 0.99$ （见图 2），满足要求。

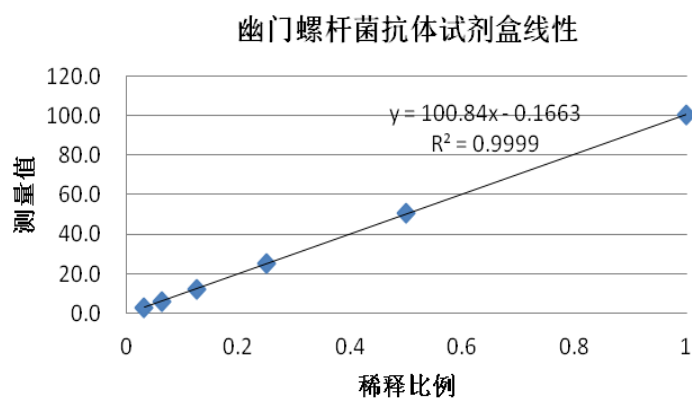


图 2 幽门螺杆菌抗体试剂盒线性结果

Fig.2 The results of Anti-HP kit linearity

2.4 精密度

批内精密度 < 10% 和批间精密度 < 15%（见表 2）。

表 2 批内和批间精密度结果

Table.2 The results of intra-assay and inter-assay precision

样本	批内精密度		批间精密度	
	平均值	CV(%)	平均值	CV(%)
低值	10.2	5.8	10.3	6.9
高值	40.5	2.5	40.8	3.8

2.5 干扰试验

当样本中血红蛋白浓度达到 500mg/dL 时，低值样本回收率为 96%，高值样本回收率为 101%；当样本中胆红素浓度为 30mg/dL 时，低值样本回收率为 94%，高值样本回收率为 95%；当样本中 Intralipid 浓度为 250mg/dL 时，低值样本回收率为 91，高值样本回收率为 92%。可见在上述浓度的干扰物浓度下对测定结果基本无干扰。

2.6 比对试验

本试剂盒与胶乳免疫层析方法的试剂盒检测血清样本比对结果表明拥有较高的特异性和敏感度（见表 3）。

表 3 胶乳免疫比浊法与胶乳免疫层析法检测幽门螺杆菌抗体样本对比结果

Table.3 The results of anti-HP sample comparison between latex immunoturbidimetric and latex immunochromatographic assay

试剂厂家	方法学	阳性符合率	阴性符合率
Alere	胶乳免疫层析	91%	99%

3 讨论

幽门螺杆菌感染普遍存在,世界上 50%的成人都携带,通常是在儿童时期感染的。携带幽门螺杆菌的人群中 10-15%会发生胃溃疡,0.5-5%的人群会发生胃癌[6]。幽门螺杆菌感染数周后才出现特异性抗体,且幽门螺杆菌根除治疗后几个月内甚至几年其抗体都可能持续阳性,故血清幽门螺杆菌抗体阳性不能完全肯定患者有活动性感染,阴性也不能排除初期的感染。因此,血清幽门螺杆菌抗体检测不宜作为现症感染或根除疗效评估的标准,主要用于易感人群的筛查及流行病学调查。

胶乳增强免疫比浊检测技术是在胶乳凝集定性试验基础上发展建立的一种非放射性均相免疫测定法,可以对各种微量的抗原、抗体以及小分子抗原进行精确的定量测定,同时具备生化检测的快速性和免疫分析的特异性,目前越来越多的应用到临床实验室中。

通过对北京九强生物公司研制的胶乳免疫比浊法幽门螺杆菌抗体试剂盒的性能评价,考察其线性、灵敏度、精密度、抗干扰性、准确性,证明该试剂可以满足临床实验室的应用要求,减少了操作时间和降低检查成本,可以作为易感幽门螺杆菌病人的筛查。

参考文献

- [1] 李会强.幽门螺杆菌实验室诊断方法.中国慢性病预防与控制,2007年4月第15卷第2期.
- [2] 李岩.幽门螺杆菌检测方法.中国实用内科杂志,2002,22:15-16.
- [3] 3.D Vaira et al,New immunological assays for the diagnosis of Helicobacter pylori infection,Cut 1999;45(Suppl I):I23-I27.
- [4] Azuma,T et al.Review:Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Journal of Gastroenterology and Hepatology,1996,11(7):662-669.
- [5] 5.D Vaira,et al.New immunological assays for the diagnosis of Helicobacter pylori infection.Gut. 1999 Jul;45 Suppl 1:I23-7
- [6] 6.YELDA LEAL-HERRERA et al.Serologic IgG response to urease in Helicobacter pylori-infected persons from Mexico. Am.J.Trop.Med.Hyg,1999,60(4):587-592.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于基因组学对肺炎克雷伯噬菌体安全性的评估

崔泽林^①, 郭晓奎^②, 汤荣^①, 陈雯静^①, 俞琦^①, 洪庆^②, 李莉^{①*}

①上海交通大学附属上海市第一人民医院检验医学科, 200080;

②上海交通大学医学院基础部免疫学与微生物学系, 200025

[摘要] 多重耐药和泛耐药肺炎克雷伯菌的流行,使得对于该类菌引起的感染的治疗面临无药可用,近年来报道了越来越多的肺炎克雷伯噬菌体,并在动物模型中证明了噬菌体用于防控该类菌感染的有效性。然而,噬菌体作为病毒的一类,不同于传统的抗菌药物,在临床应用之前需要进行更为全面的评估。**方法及目的:**本研究就目前已报道肺炎克雷伯噬菌体从基因组水平对其进行研究,通过生物信息学方法评估其基因组稳定性,是否携带有害基因,是否属于溶原性噬菌体等方面进行分析研究。**结果:**目前已报道 22 株肺炎克雷伯噬菌体的全基因组,7 株属于肌尾科,12 株属于短尾科,3 株属于长尾科;而本研究基于噬菌体全基因组同源性分析结果将肌尾科和长尾科归为一类,定义为 Kp_PhageI;短尾科分为 Kp_phageIIa 和 Kp_PhageIIb 两类。噬菌体基因组上含有肺炎克雷伯菌限制性内切酶不

等数目的识别位点,不携带有毒力基因和耐药基因。5株属于温和噬菌体,15株属于烈性噬菌体。**结论:**研究显示肺炎克雷伯菌噬菌体在基因组水平具有良好的安全性,但是基因组上较多的肺炎克雷伯菌限制性内切酶识别位点,使其用于抗菌治疗应用范围可能较窄。基于基因组同源性分析可将肌尾科和长尾科噬菌体归为一类,而短尾科噬菌体分为两类。在使用噬菌体用于防控细菌感染时部分温和噬菌体需要谨慎排除。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;噬菌体;基因组;安全性

Safety assessment *Klebsiella pneumoniae* phages based on the genomics

Cui Zelin^{1*},Guo Xiaokui²,Tang Rong¹,Chen Wenjing¹,Yu Qi¹,Hong Qing¹,Li Li^{1*}

1 Department of Clinical Laboratory of Shanghai General Hospital affiliated to Shanghai Jiaotong University,200080, 2 Department of Immunology and Microbiology,School of Medicine,Shanghai Jiao Tong University,Shanghai 200025,China)

[Abstract] Background:With dissemination of multi-drug resistant or pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*,there are no drugs available for the treatment of infections,while there are increasing reports of numbers of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages until now,and some of them have been demonstrated can be effectively used for the prevention and control of infections in animal models.However,unlike traditional antibiotics,bacteriophages what are seen as live viruses,should be comprehensive evaluated before clinical applications.**Method:**The purpose of this study is comprehensive analysis the reported *Klebsiella pneumoniae* phages with complete genome using bioinformatics methods,including assessment the stability of its genome,whether they carry undesired genes,whether lysogenic or lytic,etc.**Results:**has reported 22 *Klebsiella pneumoniae* phage genomes,7 belong to Myoviridae,12 belong to Podoviridae,3 belong to Siphoviridae; however,based on the phage genome homology analysis we found Myoviridae and Siphoviridae classified as a group,defined as Kp_PhageI; Podoviridae were divided Kp_phageIIa and Kp_PhageIIb categories.There are varying numbers restriction endonuclease recognition sites of *Klebsiella pneumoniae* on the phage genomes,there are not any virulence genes and resistance genes.5 belong to moderate phage,15 belong to the virulent phage.**Conclusion:**The study shows *Klebsiella pneumoniae* phage genomes are safe,but within a more *Klebsiella pneumoniae* restriction enzyme recognition sites on the genome,so that the scope of application for the antimicrobial treatment may be narrow.Genomic homology analysis can be Myoviridae and Siphoviridae classified as a class,and Podoviridae can be divided into two categories.Some moderate phages should be carefully excluded during the the prevention and control of bacterial infections.

[Keywords] *Klebsiella pneumoniae*,bacteriophage,genome,safety

细菌耐药性的日益严峻,使得临床上用于该类菌的治疗的药物越来越少,面临着进入后抗生素时代,再次无药可用^[1-2]。肺炎克雷伯菌是重要病原菌,其耐药性日益严峻^[3],产碳青霉烯类酶的肺炎克雷伯菌的出现和流行^[4-7],使得应用于该类菌感染的治疗药物越来越少。噬菌体作为细菌的病毒,被发现之初就被尝试用于治疗细菌感染^[8-9]。近年来噬菌体治疗也从新受到广大研究者的关注^[10]。在肺炎克雷伯菌噬菌体方面的研究也取得了进展。

Zuzanna 等报道了一株能针对产广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的短尾科噬菌体 KP34^[11],Eugenijus 等报道了一株基因组达 346Kbp 的肺炎克雷伯菌肌尾科噬菌体 vB_KleM-RaK2^[12]。本文作者报道了一株烈性噬菌体 JD001^[13]。Nikolay 等报道了一株肺炎克雷伯菌短尾科噬菌体 vB_KpnP_KpV289^[14]。Eugenijus 等报道了基因组多达 345,809 bp 肺炎克雷伯菌肌尾科噬菌体 vB_KleM_RaK2^[15]。Shang 等报道了肺炎克雷伯菌短尾科噬菌体 P13^[16]。在对噬菌体特性等研究的基础上,有研究尝试在动物模型中应用噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的效性。

已发现在相关动物感染模型中噬菌体可以用于防控肺炎克雷伯菌引起的感染,而且取得了系列进展:Kumari 等研究发现,在小鼠烧伤感染模型中,噬菌体 Kpn5 治愈肺炎克雷伯菌感染的效果良好^[17];Hung 等研究发现,在小鼠肝脏感染模型中,噬菌体 phiNK5 能控制肺炎克雷伯菌感染^[18];Gu 等的研究显示,在小鼠致死性菌血症模型中,由三株肺炎克雷伯菌噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒制剂能控制肺炎克雷伯菌感染,并且在治疗过程中能有效降低噬菌体抵抗菌株的产生,而且所用噬菌体鸡尾酒制剂的保护剂量远小于给予单株噬菌体的保护剂量^[19];这些研究结果显示,噬菌体具有防控肺炎克雷伯菌感染的潜能。进一步研究发现噬菌体在清除肺炎克雷伯菌形成的生物被膜方面也有良好效果。能对抗菌制剂的细菌形成的生物被膜也有良好效果。肺炎克雷伯菌噬菌体 KPO1K2/NDP 能显著抑制肺炎克雷伯菌生物被膜的形成^[20]。

然而,噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染方面的安全性还需全面了解。噬菌体作为病毒的一类,不同于传统的抗菌药物,其携带有遗传物质,对其安全性的评估也需更为特殊,尤其是噬菌体可以作为基因水平转移的载体,若噬菌

体基因组上携带有一些有害基因, 在应用该类噬菌体治疗细菌感染时, 该类基因整合到宿主菌上, 使得宿主菌毒力更强, 进而可能产生更大危害。本研究就目前已报道肺炎克雷伯菌噬菌体从基因组水平应用生物信息学手段对其安全性进行研究。

1 材料与方法

1.1 噬菌体基因组的整理和功能蛋白的注释

所有肺炎克雷伯菌噬菌体通过病毒基因组数据 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/> 下载并整理, 噬菌体相关信息通过参考文献链接查找整理。噬菌体基因组注释通过 RAST, 并将预测到的 ORFs 通过 InterProScan 软件和 CDD 进行功能解析^[21-22]。系统发育树使用软件 Mega 绘制^[23]。

1.2 基因组稳定性

通过预测噬菌体基因组上有无肺炎克雷伯菌限制性内切酶位点, 来评估噬菌体基因组稳定性。目前已报道并明确识别位点的肺炎克雷伯菌限制性内切酶有 KpnI^[24]和 Kpn2I^[25]。查找噬菌体基因组上是否有该类限制性内切酶位点, 并分析限制性内切酶识别位点数目, 评估噬菌体在侵染宿主菌过程中流产的可能性。

1.3 基于基因组安全性的评估

噬菌体基因组上是否携带有毒力基因和耐药基因分析, 将所用注释的 ORFs 通过和耐药基因库 (ARDB, <http://ardb.cbcb.umd.edu/>)^[26]和毒力基因库比对 (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)^[27]。通过比对, 如果所比对 ORF 与数据库中能比对到基因的覆盖率大于等于 70%, 同时其同源性大于等于 30%, 就认为所比对 ORFs 具有该数据库中基因的功能。

1.4 溶原性/烈性分析

噬菌体的繁殖一般分为 5 个阶段, 即吸附、侵入、增殖(复制与生物合成)、成熟(装配)和裂解(释放)。凡在短时间能连续完成以上 5 个阶段而实现其增殖的噬菌体, 称为烈性噬菌体(virulent phage), 反之则称为温和噬菌体(temperate phage), 基于此, 可以通过噬菌体一步法生长曲线来判断噬菌体是属于烈性噬菌体还是属于温和噬菌体。目前有研究者根据噬菌体基因组上编码的相关功能蛋白通过生物信息学方法来进行预测 (<http://www.phantome.org/PHACTS/index.php>)对噬菌体进行溶原性/烈性分析, 该方法简便可行^[28]。

2 结果与分析

2.1 已报道全基因组的肺炎克雷伯菌噬菌体及其功能蛋白注释

截止 2016 年 1 月, NCBI 数据库目前报道全基因组的肺炎克雷伯菌噬菌体有 22 株, 它们分离自世界各地。表 1 所示, 有 8 株分离自前苏联国家波兰 (4 株) 和俄罗斯 (4 株), 7 株分离自中国, 2 株分离自瑞士, 2 株分离自瑞典, 1 株分离自爱尔兰, 3 株分离自美国。它们基因组从 41kb 到 346kb 不等。12 株属于短尾科噬菌体, 7 株属于肌尾科噬菌体, 3 株属于长尾科噬菌体。GC 含量从 31%到 54%。短尾科噬菌体基因组大小均在 40 kb 左右。长尾科的噬菌体基因组均在 50kb 左右。肌尾科的噬菌体基因组从最小 48kb 到最大 346kb 不等, 其中大多数噬菌体基因组大小集中在 150kb 左右。

表 1 目前已报道全基因组序列的肺炎克雷伯菌噬菌体(截止 2016 年 1 月 18 日)

Table1.The publishedKlebsiella pneumoniaephages with complete genomes (till 18th Jan 2016)

噬菌体	基因组(bp)	GC%	ORFs	科属	限制性内切酶位点		国家/地区	Pub-Date	GI
					KpnI	Kpn2I			
NTUH-K2044-K1-1	43871	54.18	55	Podoviridae	1	12	中国台湾	25-NOV-2014	725949105
F19	43766	53.82	55	Podoviridae	14	11	中国	04-MAR-2014	612508640
KP32	41119	52.37	49	Podoviridae	16	0	波兰	26-JUL-2009	281416278
K11	41181	53.25	46	Podoviridae	19	0	美国	20-MAY-2008	194100415
KP34	43809	54.07	59	Podoviridae	10	8	波兰	28-APR-2011	294661411
vB_Kp1	40114	53.28	47	Podoviridae	19	0	瑞士	05-AUG-2015	940325584
vB_Kp2	43963	53.78	59	Podoviridae	14	17	瑞士	05-AUG-2015	940325956
vB_KpnP_KpV289	41054	52.56	50	Podoviridae	17	0	俄罗斯	29-MAY-2015	906846708
vB_KpnP_KpV41	44203	53.97	55	Podoviridae	17	9	俄罗斯	28-OCT-2015	953700440
vB_KpnP_SU503	43809	53.75	55	Podoviridae	10	14	瑞典	25-JAN-2015	762085962

vB_KpnP_SU552A	43595	54.15	55	Podoviridae	13	10	瑞典	25-JAN-2015	762086021
K5	41698	52.49	47	Podoviridae	18	0	俄罗斯	18-APR-2015	821563186
KP15	174436	41.83	265	Myoviridae	0	106	波兰	09-DEC-2009	294661423
KP27	17441	41.82	267	Myoviridae	0	96	波兰	23-JAN-2011	448260543
K64-1	34660	31.72	513	Myoviridae	43	0	中国台湾	17-DEC-2013	849122338
JD001	48814	48.54	70	Myoviridae	12	15	中国	25-SEP-2012	448245104
0507-KN2-1	15999	46.70	195	Myoviridae	0	52	中国台湾	08-MAR-2013	543171678
vB_KpnM_KB57	14298	44.62	230	Myoviridae	1	0	俄罗斯	16-OCT-2015	945471520
JD18	16631	39.60	280	Myoviridae	15	25	中国	02-JUL-2015	915982012
1513	49462	50.61	75	Siphoviridae	0	18	中国	13-JAN-2015	755259172
KLPN1	49037	50.53	76	Siphoviridae	0	8	爱尔兰	23-APR-2015	902749455
Sushi	48754	50.77	76	Siphoviridae	0	12	美国	27-MAY-2015	877058071

通过对以上噬菌体基因组注释后发现，各噬菌体所预测的 ORFs 因基因组大小差异很大，基因组最小的 ORFs 只有 46，基因组最大的 ORFs 多达 513。将各注释的 ORFs 进行功能解析。注释的 ORFs 表达的相关功能蛋白主要有几大模块，如表 2 所示，比如：参与噬菌体组装、噬菌体裂解、调控、DNA 操作、转座、结构组成和一些其它功能蛋白。然而在噬菌体基因组上普遍存在大量的功能未知蛋白。

表 2 肺炎克雷伯杆菌噬菌体可读框功能模块的预测

Table2 The function modules of ORFs predicted in the genome of Klebsiella pneumoniae phages

噬菌体	0507-KN2-1	1513	F19	JD001	K5	K11	K64-1	KLPN1	KP27	KP15	KP32	KP33	NTUH-K2044-K1-1	Su503	vB_Kp1	vB_Kp2	vB_KpnM_KB57	vB_KpnP_V41	vB_KpnP_V289	JD18	Sushi	KP1	
组装	终止子	+	+	+	+			+	+								+			+	+	+	
	DNA 包装	+		+	+	+				+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+
裂解	裂解酶		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+
	穿孔素		+			+	+	+	+		+					+					+	+	+
调控	DNA 结合蛋白					+					+				+								
	DNA 聚合酶	+		+	+	+			+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DNA 操作相关	DNA 重组/修复蛋白	+					+														+	+	
	DNA 引发酶	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	DNA 连接酶	+				+	+	+	+		+				+		+				+	+	+
	DNA 拓扑酶	+																			+	+	+
	解旋酶	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	+	+		+	+	+	+
结构组成蛋白	底座蛋白	+							+												+	+	
	尾巴组装蛋白		+			+		+							+							+	
	小尾巴蛋白		+					+														+	
	领蛋白			+		+	+				+	+	+	+	+	+		+	+	+			
	尾巴卷尺蛋白		+					+									+					+	
	尾巴鞘蛋白	+							+												+	+	+
	尾巴纤维蛋白	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	大衣壳蛋白										+												+
	衣壳和支架蛋白		+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
内部核心蛋白					+	+					+				+							+	

(“+”表示 噬菌体基因组上有该功能可读框) 基于噬菌体全基因组对肺炎克雷伯菌噬菌体进化关系进行分析发现，该类噬菌体在进化上可以分为 3 大分枝，如图 1 所示，噬菌体 Sushi、JD001、1513、J D 18、K64-1、KP27、KP15、vB_KpnM_KB57、0507-KN2-1 和 KLPN1 属于同一分枝，该分枝定义为，Kp_PhageI，它们中 JD18、JD001、KP27、KP15、K64-1、0507-KN2-1 和 vB_KpnM_KB57 属于肌尾科，Sushi、1513 和 KLPN1 属于长尾科，该分支无短尾科肺炎克雷伯菌噬菌体。而短尾科噬菌体 vB_KpnP、KpV41、NTUH-K2044-K1-1、vB_KpnP_Su552A、F19、vB_KpnP_SU503、KP34 和 vB_KP2 属于一枝，该分枝定义为 Kp_phageIIa；短尾科噬菌体 K5、vB_Kp1、K11、KP32 和 vB_KpnP_KpV289 属于另外一枝，该枝定义为 Kp_PhageIIb。

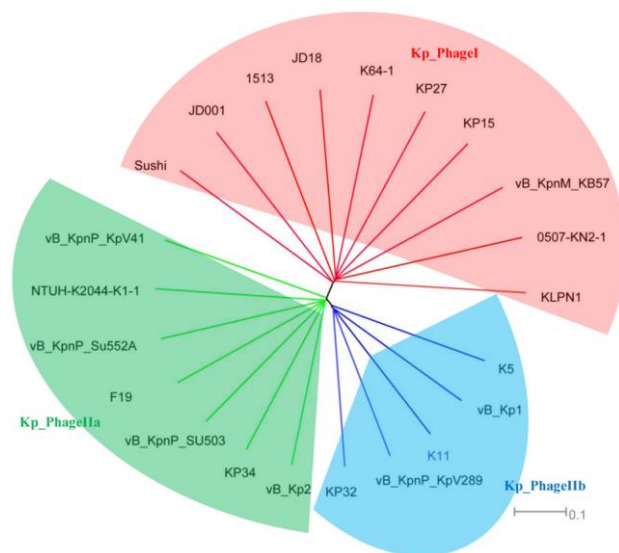


图 1 基于噬菌体全基因组对肺炎克雷伯菌噬菌体同源性分析。基于肺炎克雷伯菌噬菌体全基因组做应用 N-J 方法做进化树，步长是 1000。将目前已报道肺炎克雷伯菌噬菌体分为三大分枝，肌尾科和长尾科归为 Kp_PhageI；短尾科分为 Kp_phageIIa 和 Kp_PhageIIb 两类。

Figure 1 The phylogeny analysis of *Klebsiella pneumoniae* phages based on complete genome sequences. The n-j tree was built basing on the complete genome sequence of phages, the bootstrap is 1000. All of the published phages were clustered into three clades, definitely Clades one Kp_PhageI; Podoviridae were divided Kp_phageIIa and Kp_PhageIIb groups.

2.2 基因组稳定性

基于限制性内切酶分析，通过对已报道肺炎克雷伯菌编码的限制性内切酶分析发现，目前已报道的肺炎克雷伯菌限制性内切酶主要有 KpnI^[24]和 Kpn2I^[25]。通过分析发现，肺炎克雷伯菌长尾科噬菌体 1513、KLPN1 和 Sushi 和肌尾科噬菌体 KP15、KP27 和 0507-KN2-1 不携带有限制性内切酶 KpnI 酶切位点，而其余噬菌体携带从 0 到 43 个限制性内切酶位点不等。

2.3 基于基因组安全性的评估

通过将各噬菌体注释的个 ORFs 在耐药基因库 (ARDB, <http://ardb.cbcb.umd.edu/>) 和毒力基因库比对 (VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) 比对，没有比对到符合要求的噬菌体可读框，噬菌体基因组上不携带有毒力基因和耐药基因。

2.4 溶原性分析

基于噬菌体基因组注释信息，根据 PHACTS 生物信息方法，分析发现 5 株噬菌体属于温和噬菌体，它们分别是 JD001、0507-KN2-1、NTUH-K2044-K1-1、F19 和 vB_KpnM_KB57；15 株属于烈性噬菌体，它们是 KP34、vB_Kp2、K64-1、Sushi、vB_KpnP_Su552A、1513、KLPN1、vB_KpnP_KpV41、KP15、KP27、vB_Kp1、JD18、K5、KP32、vB_KpnP_KpV289 和 K11。

3 结论与讨论

肺炎克雷伯菌耐药性的严峻，噬菌体治疗近年来重新受到重视，目前多种多样的肺炎克雷伯菌噬菌体已经在世界各地报道。而且部分噬菌体的全基因组已经被测定，并在体内外研究发现其能控制肺炎克雷伯菌引起的感染，也能对抗生素或化学消毒剂起抵抗作用的肺炎克雷伯杆菌形成的生物被膜有良好的清除作用。这些都显示了噬菌体用于防控肺炎克雷伯菌感染的潜能。然而噬菌体作为活的微生物，其不同于普通抗菌制剂，对安全性有不同于普通抗菌药物的要求。噬菌体可以作为耐药基因或毒力基因的传递媒介^[29]，使得这些基因在不同菌株之间进行传播，进而导致细菌发生变化，如果噬菌体编码的毒力基因或耐药基因整合到宿主基因组上，可能会是细菌的毒力更强^[30]，耐药性也更强，如果应用该类噬菌体应用于噬菌体治疗，将会带来巨大的危害。所以，基于全基因组学对噬菌体安全性方面的研究。而且基于噬菌体功能基因的研究，有利于新型抗菌制剂的开发。

本研究基于当前测序技术的飞速发展,和近年来对噬菌体治疗的重视,通过生物信息学手段发现,对已报道肺炎克雷伯菌噬菌体基于基因组学研究发现,目前已报道全基因组序列的肺炎克雷伯菌噬菌体有 22 株,它们分离自世界各地,基因组上不携带毒力基因和耐药基因,在基因组水平显示了较为良好的安全性。通过 N-J 系统发育树分析,虽然目前报道肺炎克雷伯菌噬菌体根据形态学可以分为肌尾科、长尾科和短尾科,噬菌体只能分离到科。而随着测序技术的发展,本研究基于全基因组序列同源性分析,将其分为三大类,与基于形态学分类结果有所不同:长尾科和肌尾科归为一类,定义为 Kp_PhageI;短尾科噬菌体分为 Kp_phageIIa 和 Kp_PhageIIb 两类;这提示随着越来越多的噬菌体全基因组序列的报道,将对噬菌体的分类有新的认识。进一步研究显示,噬菌体全基因组上也有相当比例功能未知的可读框,这些可读框在噬菌体感染宿主菌等过程中所扮演的角色还不是很清楚,需要进一步挖掘开发。对噬菌体基因组稳定性分析发现,噬菌体基因组上有肺炎克雷伯菌限制性内切酶数目不等的识别位点,这显示了它们可能导致它们宿主谱的差异,在选着噬菌体用于防控细菌感染时,需要确定所选噬菌体对引起感染的肺炎克雷伯菌是否有杀灭作用。通过溶原性和烈性分析发现,有 5 株属于温和噬菌体,温和噬菌体在侵染噬菌体过程中会将其基因组整合到全基因组上,或者已质粒形式游离于染色体外,随着宿主菌的复制而复制,在选用这类噬菌体用于防控细菌感染时需谨慎。

参考文献

- [1] Cima G.WHO warns of 'post-antibiotic era'.*Journal of the American Veterinary Medical Association*,2014,244(12):1356-1357.
- [2] Rolain JM,Parola P,Cornaglia G.New Delhi metallo-beta-lactamase(NDM-1):towards a new pandemia? *Clin Microbiol Infect*,2010,16(12):1699-1701.
- [3] Pogue JM,Kaye KS,Cohen DA,Marchaim D.Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens.*Clinical microbiology and infection :the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*,2015,21(4):302-312.
- [4] Baraniak A,Izdebski R,Fielt J,Herda M,Derde LP,Bonten MJ,Adler A,Carmeli Y,Goossens H,Hryniewicz W,Brun-Buisson C,Gniadkowski M,Mosar WP,study WPgW.KPC-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonizing patients across Europe and Israel.*Antimicrobial agents and chemotherapy*,2015.
- [5] Jelic M,Butic I,Plecko V,Cipris I,Jajic I,Bejuk D,Koscak I,Marinkovic S,Payerl Pal M,Tambic Andrasevic A.KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Croatia:A Nationwide Survey.*Microbial drug resistance*,2015.
- [6] Xiang DR,Li JJ,Sheng ZK,Yu HY,Deng M,Bi S,Hu FS,Chen W,Xue XW,Zhou ZB,Doi Y,Sheng JF,Li LJ.Complete Sequence of a Novel IncR-F33:A-B- Plasmid pKP1034 Harboring fosA3,blaKPC-2,blaCTX-M-65,blaSHV-12,and rmtB from an Epidemic *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 Strain in China.*Antimicrobial agents and chemotherapy*,2015.
- [7] Zhu J,Ding B,Xu X,Zhu D,Yang F,Zhang H,Hu F.*Klebsiella pneumoniae*:Development of Carbapenem Resistance due to Acquisition of bla NDM-1 During Antimicrobial Therapy in Twin Infants with Pneumonia.*Frontiers in microbiology*,2015,6:1399.
- [8] Summers WC.The strange history of phage therapy.*Bacteriophage*,2012,2(2):130-133.
- [9] Wittebole X,De Roock S,Opal SM.A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens.*Virulence*,2013,4(8).
- [10] Thiel K.Old dogma,new tricks--21st Century phage therapy.*Nature biotechnology*,2004,22(1):31-36.
- [11] Drulis-Kawa Z,Mackiewicz P,Kesik-Szeloch A,Maciaszyk-Dziubinska E,Weber-Dabrowska B,Dorotkiewicz-Jach A,Augustyniak D,Majkowska-Skrobek G,Bocer T,Empel J,Kropinski AM.Isolation and characterisation of KP34--a novel phiKMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*.*Appl Microbiol Biotechnol*,2011,90(4):1333-1345.
- [12] Simoliunas E,Kaliniene L,Truncaite L,Zajanckauskaite A,Staniulis J,Kaupinis A,Ger M,Valius M,Meskys R.*Klebsiella* phage vB_KleM-RaK2 - a giant singleton virus of the family Myoviridae.*PloS one*,2013,8(4):e60717.
- [13] Cui Z,Shen W,Wang Z,Zhang H,Me R,Wang Y,Zeng L,Zhu Y,Qin J,He P,Guo X.Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* phage JD001.*J Virol*,2012,86(24):13843.
- [14] Volozhantsev NV,Myakinina VP,Popova AV,Kislichkina AA,Komisarova EV,Knyazeva AI,Krasilnikova VM,Fursova NK,Svetoch EA.Complete genome sequence of novel T7-like virus vB_KpnP-KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae*.*Archives of virology*,2015.
- [15] Simoliunas E,Kaliniene L,Truncaite L,Klausa V,Zajanckauskaite A,Meskys R.Genome of *Klebsiella* sp.-Infecting Bacteriophage vB_KleM_RaK2.*J Virol*,2012,86(9):5406.
- [16] Shang A,Liu Y,Wang J,Mo Z,Li G,Mou H.Complete nucleotide sequence of *Klebsiella* phage P13 and prediction of an EPS depolymerase gene.*Virus genes*,2015,50(1):118-128.

- [17] Kumari S,Harjai K,Chhibber S.Topical treatment of Klebsiella pneumoniae B5055 induced burn wound infection in mice using natural products.J Infect Dev Ctries,2010,4(6):367-377.
- [18] Hung CH,Kuo CF,Wang CH,Wu CM,Tsao N.Experimental phage therapy in treating Klebsiella pneumoniae-mediated liver abscesses and bacteremia in mice.Antimicrob Agents Chemother,2011,55(4):1358-1365.
- [19] Gu J,Liu X,Li Y,Han W,Lei L,Yang Y,Zhao H,Gao Y,Song J,Lu R,Sun C,Feng X.A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential.PLoS One,2012,7(3):e31698.
- [20] Chhibber S,Nag D,Bansal S.Inhibiting biofilm formation by Klebsiella pneumoniae B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage.BMC microbiology,2013,13:174.
- [21] Marchler-Bauer A,Lu S,Anderson JB,Chitsaz F,Derbyshire MK,DeWeese-Scott C,Fong JH,Geer LY,Geer RC,Gonzales NR,Gwadz M,Hurwitz DI,Jackson JD,Ke Z,Lanczycki CJ,Lu F,Marchler GH,Mullokandov M,Omelchenko MV,Robertson CL,Song JS,Thanki N,Yamashita RA,Zhang D,Zhang N,Zheng C,Bryant SH.CDD:a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.Nucleic Acids Res,2011,39(Database issue):D225-229.
- [22] McDowall J,Hunter S.InterPro protein classification.Methods Mol Biol,2011,694:37-47.
- [23] Tamura K,Peterson D,Peterson N,Stecher G,Nei M,Kumar S.MEGA5:molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood,evolutionary distance,and maximum parsimony methods.Molecular biology and evolution,2011,28(10):2731-2739.
- [24] Chatterjee DK,Hammond AW,Blakesley RW,Adams SM,Gerard GF.Genetic organization of the KpnI restriction--modification system.Nucleic Acids Res,1991,19(23):6505-6509.
- [25] Lubys A,Jurenaite S,Janulaitis A.Structural organization and regulation of the plasmid-borne type II restriction-modification system Kpn2I from Klebsiella pneumoniae RFL2.Nucleic Acids Res,1999,27(21):4228-4234.
- [26] Liu B,Pop M.ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database.Nucleic Acids Res,2009,37(Database issue):D443-447.
- [27] Zhou CE,Smith J,Lam M,Zemla A,Dyer MD,Slezak T.MvirDB--a microbial database of protein toxins,virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications.Nucleic Acids Res,2007,35(Database issue):D391-394.
- [28] McNair K,Bailey BA,Edwards RA.PHACTS,a computational approach to classifying the lifestyle of phages.Bioinformatics,2012,28(5):614-618.
- [29] Colomer-Lluch M,Imamovic L,Jofre J,Muniesa M.Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal wastes from cattle,pigs and poultry.Antimicrob Agents Chemother,2011.
- [30] Matos RC,Lapaque N,Rigottier-Gois L,Debarbieux L,Meylheuc T,Gonzalez-Zorn B,Repoila F,Lopes Mde F,Serror P.Enterococcus faecalis prophage dynamics and contributions to pathogenic traits.PLoS genetics,2013,9(6):e1003539.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于全自动化学发光检测系统的人结核感染 T 细胞检测方法的建立及方法学评价

杨柳 周冬

[摘要] **目的:** 建立基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。**方法:** 本研究是基于夹心法、化学发光免疫分析法与磁性微粒分离技术相结合的一种检测方法。**结果:** 本研究成功建立了基于化学发光平台的人结核感染 T 细胞检测方法。以 T-SPOT TB 试剂的检测结果作为参考,该方法灵敏度为 90.7%,特异性为 92.9%,总体符合率达 91.6%。**结论:** 该方法具有更高的灵敏度、更好的重复性及更易实现高通量检测,且操作简单,适用于基层医院推广使用,具有较大的临床应用价值。

[关键词] 结核感染 T 细胞; γ 干扰素定量检测; 化学发光

Development of detection kit for T cell infected with Mycobacterium tuberculosis based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer Yang Liu,Zhou Dong Shanghai Fosun Long March Medical Science Co.,Ltd

[ABSTRACT] **Objective:** To develop the detection kit for T cell infected with Mycobacterium tuberculosis based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer.**Methods:** The detecting method is based on the technologies of sandwich ELISA,chemiluminescence immune analyzer and magnetic particle separation. **Results:** The research developed the detection kit for T cell infected Mycobacterium tuberculosis based on full-automatic chemiluminescence immune analyzer.Compare with T-SPOT TB testing results of the ELISPOT kit,the sensitivity, specificity and total matching ratio of the CLIA kit was 90.7%,92.9% and 91.6%, respectively.**Conclusion:** The CLIA method has higher sensitivity,better

repeatability and is ease of use. It makes the high-throughput detection available. Therefore, it is suitable for primary hospitals with great clinical value

[Key words] T cell infected with Mycobacterium tuberculosis; IFN- γ quantitative detection; Chemiluminescent detection

结核病是由结核分枝杆菌感染所致的以呼吸系统感染为主的慢性传染病,严重威胁着人类健康。我国结核患者数量居全球第二位,是结核高负担国家之一,全国结核感染率为 44.5%^[1],结核病人 131.1 万人,其中 20.1 万人死于结核病或结核并发症^[2]。传统的结核病诊断方法如结核菌素皮试试验(TST)、结核菌痰培养等,尚存在一定不足和缺陷,突出问题是灵敏度、特异性较低。新型免疫学方法中 γ 干扰素释放实验(interferon-gamma release assay,IGRA) 是现阶段检测结核分枝杆菌感染准确性较高的方法^[3, 4],利用结核分枝杆菌特异性抗原与受试者的新鲜外周全血中的 T 细胞共同孵育刺激培养,感染了结核分枝杆菌的受试者 T 细胞会分泌大量的干扰素,通过干扰素的定量检测可以判断受试者是否存在结核菌感染。该方法采用结核分枝杆菌特异性的 RD (Region of Difference) 区基因编码抗原^[5],因而较好的避免已接种 BCG (卡介苗)的干扰。目前国内现有的商用试剂盒为英国的 T-SPOT.TB 试剂盒、澳大利亚的 QuantiFERON(QFT)-IT 试剂盒及北京万泰的 TB-IGRA 试剂盒,其中 T-SPOT.TB 的敏感性较高而临床使用最为普遍。但是该方法对技术人员操作水平和实验室条件要求较高,在我国应用范围较为局限。TB-IGRA 方法采用全血培养,所需仪器均为实验室常规检测仪器,在有一定条件的医疗单位即可使用。目前采用 TB-IGRA 方法的试剂在 γ 干扰素检测部分均采用传统的酶联免疫法,本研究基于 TB-IGRA 原理与化学发光免疫分析法 (CLIA) 相结合,建立了人结核感染 T 细胞检测方法,在临床检测中与主流试剂进行比对,其灵敏度更高,重复性更好,且操作简单、省时,便于实现高通量检测。为临床诊断结核病提供了更有力的辅助工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器与试剂

结核感染 T 细胞全自动化学发光检测系统,为复星长征公司研制。配套试剂包括链霉亲和素磁珠混悬液,购自罗氏公司; γ 干扰素校准品,购自 Mabtech 公司;阳性刺激物 PHA 购自 Sigma 公司;抗原多肽由吉尔生物合成、AIM-V 培养液购自 Gibco 公司、生物素标记的抗人 γ 干扰素单抗,购自 Pierce 公司;碱性磷酸酶标记的抗人 γ 干扰素单抗,购自 Mabtech 公司;发光底物液 APS 5 购自深圳美凯特生物公司

1.1.2 样本来源:临床样本由上海市肺科医院提供

1.2 方法

1.2.1 分析方法。本品为夹心法、化学发光免疫分析法与磁性微粒分离技术相结合的一种检测方法。分别以生物素标记的单抗和碱性磷酸酶标记的单抗与 γ 干扰素抗原分子的不同表位结合,形成“三明治”结构,再加入亲和素偶联磁珠以分离免疫复合物,最后加入酶促底物发光液检测其发光强度,根据标准曲线即可算出样品中 γ 干扰素的含量。在检测范围内,发光强度与样本中的 γ 干扰素浓度成正比。

1.2.2 试剂制备。链霉亲和素磁珠工作液,25ml/瓶,浓度为 0.2mg/ml;抗体工作液,25ml/瓶,含的生物素标记的抗人 γ 干扰素单抗 (1:4000),碱性磷酸酶标记的抗人 γ 干扰素单抗 (1:400); γ 干扰素校准品:1ug/瓶;阳性刺激物 PHA 工作液,25ml/瓶,浓度为 200ug/ml;抗原多肽工作液,25ml/瓶,浓度为 20ug/ml;以上试剂均 4℃ 保存。

1.2.3 样本采集。无菌注射器抽取外周静脉血 4ml,加至含有肝素类抗凝剂的采血管中;采血量每管不少于 4ml,样本采集后可放置于室温 3-4 小时,请勿置于冷冻或冷藏室。

1.3 仪器工作流程

1.3.1 样本处理。将同一份样本依次加入三个培养孔中,分别为本底对照孔即 N、测试孔即 T、阳性对照孔即 P。每孔分别加入全血 1.0ml。分装前需将全血轻柔混匀。N、T、P 三孔分别加入 AIM-V 培养液、结合特异性抗原混合多肽、阳性刺激物 PHA 各 0.1ml。培养:将各孔混匀后 37℃ 孵育 16-22 小时。

1.3.2 γ 干扰素的测定。采用 6 点定标,浓度依次为 400、100、25、6.25、1.56、0pg/ml。吸取校准品及样本上清液 0.1ml 至反应杯中,加入 0.1ml 酶标抗体液,37℃ 孵育后加入链霉亲和素偶联磁珠 0.1ml,37℃ 孵育并清洗反应混合物;加入底物发光液 0.2ml,混匀后读取发光强度值。

1.3.3 评价指标。(1)线性 以系列浓度的 γ 干扰素校准品为横坐标 (pg/ml),对应的发光强度为纵坐标, 绘制散点图。

(2)灵敏度 重复测定 0 浓度的校准品 20 次, 计算其平均发光值, 标准差 (SD), 将 $M+2SD$ 值带入剂量反应曲线方程中, 得到该方法的灵敏度。(3)精密度 用 3 批试剂对低、中、高三个浓度的样本重复测定 20 次, 计算测定值的平均值和 SD,按照公式 $CV=SD/\text{平均值} \times 100\%$, 计算试剂的批内精密度和批间精密度。(4)抗干扰性 考察溶血、高脂血症、黄疸等干扰因素对试剂检测结果的影响。(5)比对试验 将本试剂与 T-SPOT TB 试剂进行样本测定比对, 计算其阴阳性符合率。

2 结果

2.1 线性

以校准品的抗原含量(mg/ml)及对应的发光强度绘制标准曲线, 得到相关系数 r 大于 0.999, 表明本试剂具有良好的剂量反应关系 (见图 1)。

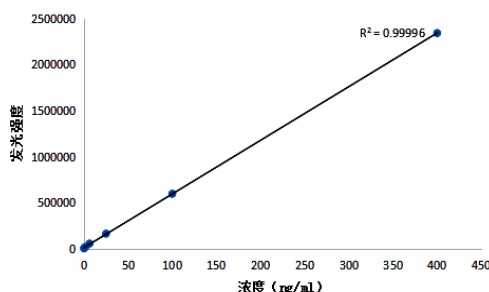


图 1 标准曲线

2.2 灵敏度

以系列浓度的校准品建立标准曲线, 通过重复测定 0 浓度的标准品发光值得出该方法的检测灵敏度为 0.39pg/ml, 而 ELISA 试剂盒的灵敏度为 2pg/ml。

2.3 精密度

本研究进行的精密度评价为批内精密度。将高、中、低浓度的三个水平样本用同一批试剂进行检测, 每浓度点重复测定 20 次, 3 个水平样本的批内变异系数 (CV) 均小于 8%,说明本研究方法重复性良好。(见表 1)

表 1 批内精密度结果

样本	均值	SD	CV
低值	21675	1213	5.60%
中值	165142	6935	4.20%
高值	2341615	91322	3.90%

2.3 抗干扰性

2.3.1 溶血

选取临床确诊结核病标本 5 份 (样本编号 1#~5#), 每份标本分为两组进行试验比对, 一组为正常样本, 另一组为处理后溶血样本, 分别进行刺激培养后, 进行检测。结果表明, 正常培养标本检测结果均为阳性, 溶血后样本其中有 2 份检测结果为阳性, 有 3 份样本阳性对照组无反应性, 检测结果为不确定, 表明溶血对检测结果有影响, 应尽量避免 (见表 2)。

表 2 溶血对检测的影响

样本类型	1#	2#	3#	4#	5#
正常样本	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
溶血样本	不确定	阳性	阳性	不确定	不确定

2.3.2 高脂血症

选取临床确诊为结核病的高脂标本 3 份 (样本编号 6#~8#), 非结核病的高脂标本 3 份 (样本编号 9#~11#) 正常处理培养后, 检测结果显示, 结核病的高脂样本均为阳性, 非结核病的高脂样本为阴性, 表明高脂不会对试剂检

测结果造成影响（见表3）。

表3 高脂对检测的影响

样本编号	6#	7#	8#	9#	10#	11#
检测结果	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

2.3.3 黄疸

选取临床确诊为结核病的黄疸标本3份（样本编号12#~14#），非结核病的黄疸标本3份（样本编号15#~17#），正常处理培养后，检测结果显示，结核病的黄疸样本均为阳性，非结核病的黄疸样本为阴性，表明黄疸对试剂检测结果不会造成影响（见表4）。

表4 黄疸对检测的影响

样本编号	12#	13#	14#	15#	16#	17#
检测结果	阳性	阳性	阳性	阴性	阴性	阴性

2.4 对比试验

用本试剂与主流试剂 T-SPOT TB 进行比对，分别检测 476 份临床标本，以 T-SPOT TB 试剂检测结果为对照，由表5结果可知，本试剂的灵敏度为 90.7%，特异性为 92.9%，总符合率达 91.6%。

表5 试剂对比结果

	T-SPOT 阳性	T-SPOT 阴性	合计	符合率
CLIA 阳性	253	14	269	
CLIA 阴性	26	183	207	91.6%
合计	279	197	476	

3 讨论

结核病是一种经呼吸道传播的慢性传染病,目前已成为严重威胁人民健康的重大公共卫生和社会问题,准确高效的诊断方法是结核病防控的关键。在临床上, TB-IGRA 方法在结核病诊断和防治中越来越被认可并采用^[6,7]。

本研究所建立的人结核感染 T 细胞检测方法基于全自动化学发光免疫检测系统进行 γ 干扰素的定量检测。全自动化学发光检测系统集样本前处理、免疫反应和光检测系统为一体, 24 小时内自动完成孵育、转移、反应、检测及结果分析, 整机最大测试样本量一次可达 64 人份, 大大提高了检测的通量与效率。

化学发光免疫分析技术以磁微粒作为固相载体大大提高了反应的灵敏度, 在标记物中以碱性磷酸酶作为酶促化学发光系统不仅反应速度快而且灵敏度高, 达 0.39 pg/ml, 优于现有的 ELISA 商用试剂盒为 2 pg/ml; 不同于目前使用的 IGRA 产品, 该方法更具有技术和价格优势, 通过网络技术实现检测系统的校准及质量的自动化管理, 提高测试结果的可靠性及准确性, 可为临床检测结核感染提供更强而有力的工具。

参考文献

- [1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组.2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[R].中国防痨杂志,2002, 24(2):65-108.
- [2] WHO.WHO tuberculosis global control[R].2008:18-19.
- [3] Hoffmann H,G.Loytved and T.Bodmer.Interferon-gamma release assays in tuberculosis diagnostics[J].Internist (Berl),2007,48(5):497-498,500-496
- [4] Tsiouris S.J.,D.Coetzee,P.L.Toro,et al.Sensitivity analysis and potential uses of a novel gamma interferon release assay for diagnosis of tuberculosis[J].Journal of clinical microbiology,2006,44(8) :2844-2850.
- [5] Mahairsa,G.G.,P.J.Sabo,M.J.Sabo,M.J.Hickey,et al.Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BGG and virulent M.bovis[J].J.Bacteriol,1996,178(5):1274-1282.
- [6] 蒋英,赵蓉,张胜勇等.干扰素释放酶联免疫法用于检测结核分支杆菌感染的优越性[J].实用预防医学, 2012 ,19(1):024-26.
- [7] Mariette X ,Baron G Tubach F,et al.Influence of replacing tuberculin skin test with ex vivo interferon release assays on decision to administer prophylactic antituberculosis antibiotics before anti-TNF therapy[J].Annals of the Rheumatic Diseases ,2012 71(11):1783-1790.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

酶法检测游离脂肪酸试剂盒的稳定性研究

景晟

上海复星长征医学科学有限公司, 上海 200444

[摘要] 目的:评价自主研发的游离脂肪酸测定试剂盒(酶法)的稳定性应用。**方法:**采用奥林巴斯 AU680 全自动生化分析仪,通过重复性、线性试验、测定试剂盒的稳定性。**结果:**两个水平质控中物质浓度的变异系数(CV)无论在0时间还是各种加速试验开瓶20天后,都小于5%,在0.1~3mmol/L浓度范围内,线性良好,该试剂盒解决了国产同类试剂开瓶不稳定的问题。**结论:**自主研发的游离脂肪酸测定试剂盒稳定、结果准确,操作快速、简便,可满足大批量临床样本的常规和自动化分析。

[关键词] 游离脂肪酸;稳定性研究;诊断试剂盒

The research about stability of non esterified fatty acids reagent/JING Sheng

Shanghai Fosun Long March Medical Science Co. Ltd.,Shanghai 200444,China

[ABSTRACT] Objective:To evaluate the application of the independent innovation reagent determination of non esterified fatty acids (NEFA).**Methods:** The content of NEFA were determined with Olympus AU680 automatic biochemical analyzer by repeatability and linearity tests.**Results:** The coefficients of variation(CV) of the contents at two levels of quality control were less than 5%.The determination of linear samples showed a good linearity over the range of 0.1~3mmol/L.**Conclusion:**The NEFA reagent made by our company can provide a simple,quick,accurate and stable method for the determination of nefa in the clinical serum or plasma samples,can meet the requirement of the conventional and automated analysis of mass clinical samples.This method may be worthy of promotion.

[KEY WORDS] Non esterified fatty acids; stability research; diagnostic reagent

游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)是指非酯化的脂肪酸。血中的FFA主要由皮下和内脏脂肪脂解产生,是脂肪代谢的中间产物,是细胞膜脂质结构和前列腺素合成的供体,也是人体重要能源物质之一^[1]。FFA可提供肝脏、骨骼肌和心肌等所需的基础能量,当机体对能量的需求增加时,可刺激脂肪组织发生脂解反应,增加的FFA可节约葡萄糖,以确保大脑对葡萄糖的需求,并能在长期空腹状态下保护蛋白质不被分解^[2]。肥胖者体内脂肪组织增多,体内脂肪酸和游离脂肪酸释出增加,肝脏脂肪氧化磷酸化和脂肪酸 β 氧化受损使脂肪酸分解下降,合成增多沉积于肝脏而形成脂肪肝^[3]。目前测定游离脂肪酸的方法有很多,主要包括液相色谱法^[4-5]、酶法^[6]。但是液相色谱法操作繁琐、费时,不适宜自动化分析;酶法通常采用昂贵的进口试剂,而大部分国产游离脂肪酸试剂不稳定,运输过程中以及开瓶使用过程中试剂性能会发生变化。本公司研发的测定试剂盒解决了这些问题,本文对本公司测定试剂盒进行了稳定性研究。

1 材料与方 法

1.1 仪器

日本 Olympus AU680 全自动生化分析仪。

1.2 试剂、校准品和质控品

复星长征自主研发游离脂肪酸测定试剂(批号为Z20141203,简称复星长征试剂);校准品(批号为S141110)、配套质控品1(批号为C1141110)和配套质控品2(批号为C2141110)。

1.3 测定方法及条件

按照以下参数来设置奥林巴斯 AU680 全自动生化分析仪:

速率法:温度 37℃,主波长 546nm,副波长 600nm,吸光度范围 0~2A,比色杯光径 1.0cm,反应方向为吸光度上升的反应,样本用 4 μ l,复星长征试剂为液体双试剂,分别由试剂 1(R1)和试剂 2(R2)组成。R1 用量 200 μ l,孵育时间 300s;R2 用量 50 μ l,测定时间 300s,校准模式为两点定标。

1.4 重复性

在重复条件下,测试浓度标示值分别为 0.64mmol/L 和 1.61mmol/L 的控制血清,将这两水平控制血清分别测试 10 次,计算测量值的平均值(\bar{x})、标准差(s)和变异系数(CV)。

1.5 线性试验

用接近线性范围下限的低活性样品与接近线性范围上限的高活性样品混合配制成 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、

3.2mmol/L 的 6 个样品 (xi)，分别用测试试剂 (盒) 对各样品进行测试，每个样品测试 3 次，分别求出每个活性浓度样品检测结果的均值 (yi)。以 6 个浓度 (xi) 为自变量，以检测结果均值 (yi) 为因变量作线性回归。

1.6 新鲜试剂开瓶稳定性试验

试剂 0 时间定标后检测试剂的重复性以及线性，每隔 5 天检测一次重复性，开瓶 20 天后不重新定标再次检测试剂的重复性以及线性。

1.7 37 度 5 天加速试验的试剂的开瓶稳定性试验

加速试验的试剂定标后检测试剂的重复性以及线性，每隔 5 天检测一次重复性，开瓶 20 天后不重新定标再次检测试剂的重复性以及线性。

1.8 模拟运输试验的试剂的开瓶稳定性试验

37 度的恒温摇床震荡试剂 48 小时后定标检测试剂的重复性以及线性，每隔 5 天检测一次重复性，开瓶 20 天后不重新定标再次检测试剂的重复性以及线性。

2 结果

2.1 重复性

新鲜试剂 0 时间的低值质控 CV 为 1.42%，高值质控 CV 为 0.87%；开瓶 20 天后低值质控 CV 为 2.36%，高值质控 CV 为 1.63%。加速试验后的试剂 0 时间的低值质控 CV 为 1.67%，高值质控 CV 为 0.96%；开瓶 20 天后低值质控 CV 为 1.86%，高值质控 CV 为 2.53%。模拟运输的试剂 0 时间的低值质控 CV 为 2.98%，高值质控 CV 为 2.56%；开瓶 20 天后低值质控 CV 为 3.17%，高值质控 CV 为 2.81%。

2.2 新鲜试剂开瓶稳定性试验线性测定结果比较

新鲜试剂刚开瓶以及开瓶 20 天后对 6 个水平样本的检测结果，两者差异无显著意义 ($t=0.26$, $P>0.05$)，结果之间具有良好的相关性 ($r=0.999$, 图 1)。

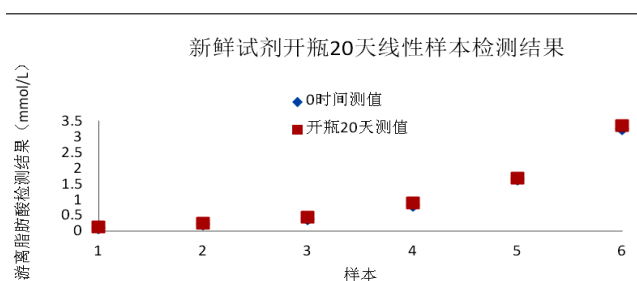


图 1 新鲜试剂开瓶 20 天线性样本检测结果

2.3 37 度 5 天加速试验的试剂的开瓶稳定性试验

加速试剂刚开瓶以及开瓶 20 天后对 6 个水平样本的检测结果，两者差异无显著意义 ($t=0.24$, $P>0.05$)，结果之间具有良好的相关性 ($r=0.999$, 图 2)。

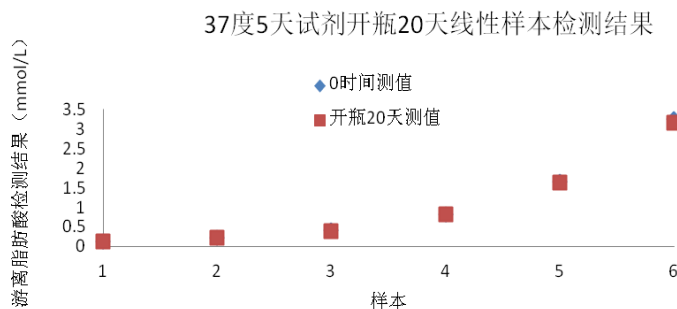


图 2 37 度 5 天加速试验的试剂开瓶 20 天线性样本检测结果

2.4 模拟运输试验的试剂的开瓶稳定性试验测定结果比较

模拟运输试验的试剂刚开瓶以及开瓶 20 天后对 6 个水平样本的检测结果，两者差异无显著意义 ($t=0.18$, $P>0.05$)，

结果之间具有良好的相关性 ($r=0.999$, 图 3)。

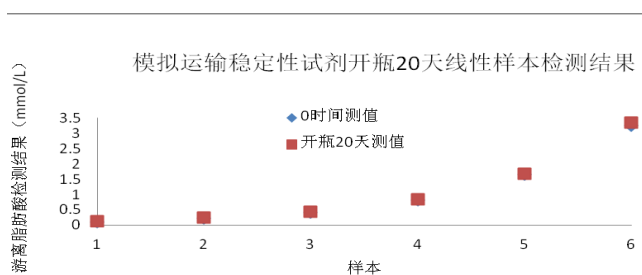


图 3 模拟运输试验的试剂开瓶 20 天线性样本检测结果

3 讨论

本试剂盒采用酶法(ACS-ACOD 法)检测样品中的游离脂肪酸。游离脂肪酸在 ATP、辅酶 A(Coenzyme A, CoA) 的存在下, 经乙酰辅酶 A 合成酶(Acyl CoA Synthetase, ACS)作用, 生成酯酰辅酶 A, 酯酰辅酶 A 被乙酰辅酶 A 氧化酶(Acyl CoA Oxidase, ACOD)氧化, 生成 2,3-trans-烯酰辅酶 A 和过氧化氢, 而生成的过氧化氢在过氧化物酶(peroxidase, POD)存在下, 与 Trinder 色原及 4-氨基安替比林(4-aminoantipyrine, 4-AAP)生成有色物质, 通过测定其吸光度即可得到样品中游离脂肪酸的浓度。

由于试剂 1 中有辅酶 A, 该物质带有巯基具有还原性, 试剂 2 加入后生成的有色物质会被辅酶 A 降解, 因此试剂 2 中加入了抑制辅酶 A 的物质, 一般采用马来酰亚胺来消除辅酶 A, 但是试剂 2 中的色原跟马来酰亚胺共存时不稳定, 特别在开瓶后试剂容易发生变色, 造成样本的检测结果不断降低。本试剂盒通过添加稳定剂保护了试剂 1 中的辅酶 A 以及试剂 2 中的反应色原。试剂 37 度加速试验以及模拟运输稳定性后试剂开瓶 20 天重复性良好, 各个浓度的线性样本开瓶后检测结果也无显著差异。

结果表明我公司研发的游离脂肪酸测定试剂盒测定的方法操作简单、线性范围宽、重复性好、结果准确, 试剂开瓶稳定, 完全可以满足临床检测的需求。

参考文献

- [1] 常燕琴,李伟.影响血浆游离脂肪酸水平的因素.兰州大学学报:医学版,2007,33(2)81-84.
- [2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学会.非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010 年修订版).胃肠病学和肝病杂志,2010,19(6):483—487.赵紫烟.非酒精性脂肪肝的危险因素及脂肪肝诊断的研究进展[J].医学综述,2011,17(10):1522-1524.
- [3] Baur LA, O'Connro J, Pan DA, et al. Relationships between the fatty acid composition of muscle and erythrocyte membrane phospholipid in young children and the effect of type of infant feeding[J]. Lipids, 2000, 35(1): 77-82
- [4] 陈亚飞,程速远,孙宇等,毛细管气相色谱法测定海狗油胶丸中 ω -3 多不饱和脂肪酸的含量[J],药物分析杂质,2004,24(5):499-501
- [5] 王毓三,王继贵.第四篇临床化学检验[M]//叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程.3 版.无锡:东南大学出版社,2006:436-438.

作者简介: 景晟 (198-), 男, 高级工程师, 生化研发经理, 从事于体外诊断试剂生化试剂的研发。E-mail: jingsh@fosunpharma.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

克隆酶供体免疫测定法检测 25-羟基维生素 D 试剂盒的检测意义与性能评价

翁颖 周冬

上海复星长征医学科学有限公司, 上海市宝山区城银路 830 号, 200444

[摘要] 目的:本文介绍了 25-羟基维生素 D 的临床背景,并对本公司研制生产的 25-羟基维生素 D 测定试剂盒(克隆酶供体免疫测定法)进行初步方法学评价,为临床应用提供依据。**方法:**依据 GB/T 26124-2011 《临床化学体外诊断试剂(盒)通用技术要求》对试剂(盒)分析灵敏度、线性范围、精密度、准确度、稳定性等分析性能指标试验方法的要求,对 25-羟基维生素 D 测定试剂盒(克隆酶供体免疫测定法)进行分析性能评估分析与验证。并评价了其与其他厂家试剂的相关性。**结果:**试剂分析灵敏度检测浓度为 35ng/mL 样品时,可达到 0.94;准确度检测两个水平质控的相对偏差分别为-5.08% 和-0.24%;批内精密度 CV 为 1.49%-2.11%,批间精密度相对偏差为 0.97%-2.84%;检测的线性范围为 9-143ng/mL,线性良好,相关系数 $R^2=0.999$;试剂有效期为 12 个月,试剂启用后可稳定 2 周;与英国 Immunodiagnostic Systems Limited(IDS Ltd)公司生产的试剂比对测试结果相关性良好,其相关系数为 0.9680。**结论:**准确检测总 25-OH 维生素 D 水平在临床上是至关重要的。本公司研制生产的用克隆酶供体免疫测定法检测 25-羟基维生素 D 试剂盒可在全自动生化仪上使用,快速、简单,便于在临床上推广。各项分析性能完全能够达到指标要求,并且已达到了目前国内外已批准上市的 25-羟基维生素 D 检测产品的同等水平,其检测结果可为临床诊断提供科学依据。

[关键词] 25-羟基维生素 D; 克隆酶供体免疫测定法; 检测意义; 分析性能

The Performance of 25-Hydroxy Vitamin D (25-OH Vitamin D) Assay Kit (Cloned Enzyme Donor Immunoassay,CEDIA)

WENG Ying ZHOU Dong/Shanghai Fosun Long March Medical Science Co.Ltd.,No.830 Cheng Yin Road,Bao Shan District,Shanghai,P.R.China,200444

[Abstract] Objective:This study introduces the clinical background of 25-OH Vitamin D,and evaluate the primarily detection of independent innovation reagent 25-Hydroxy Vitamin D(25-OH Vitamin D)Assay Kit(Cloned Enzyme Donor Immunoassay,CEDIA)providing the reference for clinical application.**Methods:**The sensitivity,linearity,accuracy,precision,stability,method comparison and concordance were evaluated according to GB/T 26124-2011.**Results:**The sensitivity was 0.94,when detecting 35ng/ml sample.The relative biases were -5.08% and -0.24% of two-level controls.The CV was in a range from 1.49% to 2.11% for within-run precision,and the relative deviation was from 0.97% to 2.84% for between-run precision.The range of linearity was from 9 to 143ng/ml,and the correlation index R^2 was 0.999.The validity of reagent is for 12 months,and it can be stable for 2 weeks after opening the bottles.The consistency of the reagent from our company and Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd) was well with 0.9942 correlation index.**Conclusions:**It is vital to detect 25-OH VD accurately in clinic.The independent innovation reagent 25-Hydroxy Vitamin D(25-OH Vitamin D)Assay Kit(Cloned Enzyme Donor Immunoassay,CEDIA)was fast and simple,can be utilized on auto analyzers.All the analysis performances can meet the demands.Compared to other approved same type products,the clinical concordance of this kit is good and is suitable for the clinical application.

[Key words] 25-OH Vitamin D; CEDIA; clinical significance; analysis performance

1 背景

1.1 维生素 D 及其检测意义

维生素 D 是类固醇衍生物,主要包括维生素 D₂, 又称麦角钙化醇(Ergocalciferol),以及维生素 D₃即胆钙化醇(Cholecalciferol)。维生素 D 能调节体内钙磷代谢,维持血磷和血钙浓度;促进生长和骨骼钙化,促进牙齿健全;促进骨形成,刺激骨吸收,促进钙盐沉着;减少多种骨疾病的发生风险;降低多种慢性疾病患病率,减少多种癌症风险,与骨质疏松症、心血管疾病、肺部疾病、糖尿病等疾病密切相关。

维生素 D 与维生素 D 结合蛋白(Vitamin D binding protein,DBP)结合后被送至肝脏,在肝内经 25 羟化酶催化生成 25-羟基维生素 D₂ 和 25-羟基维生素 D₃, 总称为 25-羟基维生素 D。之后 25-羟基维生素 D 被转运至肾脏,在 1 α -羟化酶作用下生成 1, 25-二羟基维生素 D, 在 24-羟化酶作用下生成 24, 25-二羟基维生素 D, DBP 携带这两种羟基

代谢物及其所有代谢产物，与靶器官的核受体或膜受体结合（VitaminD receptor,VDR），发挥各种生物学作用^[1]。

维生素 D 在人体内主要的储存形式是 25-羟基维生素 D₃，重要的活性形式是 1, 25-二羟基维生素 D₃。1, 25-二羟基维生素 D 是生物活性最强的维生素 D，但体内浓度很低，是 25-羟基维生素 D 的 1/1000，较难检测。维生素 D、25-羟基维生素 D 和 1, 25-二羟基维生素 D 在人体内的半衰期分别为 24h、3 周和 4h^[2]。其中 25-羟基维生素 D 在人体中比较稳定且浓度较高，能反映食物摄入和自身合成的维生素 D 总量，以及维生素 D 的转化能力，因此 25-羟基维生素 D 是反应维生素 D 水平的最佳指标，也被 FDA 认为是衡量营养状态的最佳指标^[3]。由于正常人体内 25-羟基维生素 D₂ 浓度无法检测到，所以对于一般患者和补充维生素 D₃ 的患者而言，检测 25-羟基维生素 D 基本等于检测 25-羟基维生素 D₃，对于补充维生素 D₂ 的患者而言，检测 25-羟基维生素 D 能够更全面反映患者体内的维生素 D 状态。

根据相关文献,25-羟基维生素 D 浓度水平低于 10 ng/mL 被认为是严重的缺乏维生素 D,而 10 ng/mL 至 29 ng/mL 之间的浓度水平被认为是不足的,在 30 ng/mL 至 60 ng/mL 之间的浓度水平被认为是合适的,若 25-羟基维生素 D 浓度超过 100 ng/mL, 则有中毒的危险^[4]。

1.2 临床或实验室诊断方法

目前, 25-羟基维生素 D 的检测方法包括放射免疫分析、液相色谱串联质谱 (LC-MS-MS)、酶联免疫法和电化学发光法等。放射免疫分析因有放射污染且操作复杂, 已经逐渐被其他方法替代; 液相色谱串联质谱法作为 25-羟基维生素 D 测定的金标准, 对操作技术要求较高, 非自动化, 检测效率低, 只有少数的医疗或检验机构使用; 酶联免疫法在医疗或检验机构使用较多, 但是其多为手工操作, 步骤复杂, 检测耗时长, 不利于快速得到检测报告; 电化学发光法灵敏度高, 检测结果准确, 但是需要特定的仪器且试剂盒的价格较为昂贵, 给患者造成较大的经济负担。

1.3 克隆酶供体免疫测定法

25-羟基维生素 D 测定试剂盒采用克隆酶供体免疫测定法。利用重组 DNA 技术制备 β -半糖苷酶的两个片段: 大片段称为酶受体 (enzyme acceptor, EA), 小片段称为酶供体 (enzyme donor, ED)。两个片段本身均不具酶活性, 但在合适的条件下结合在一起就具有酶活性。利用这两相片段的特性建立的均相酶免疫测定称为克隆酶供体免疫测定 (Cloned enzyme donor immune assay, CEDIA)。CEDIA 的反应模式为竞争法, 测定原理为: 标本中的抗原和 ED 标记的抗原与特异性抗体竞争结合, 形成两种抗原抗体复合物。ED 标记的抗原与抗体结合后由于空间位阻, 不再能与 EA 结合。反应平衡后, 剩余的 ED 标记抗原与 EA 结合, 形成具有活性的酶。加入底物测定酶活力, 酶活力的大小与标本中抗原含量成正比。

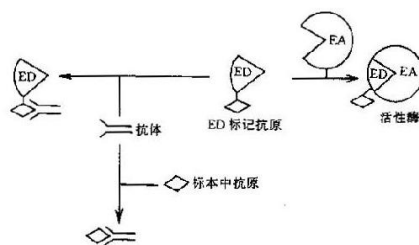


图 1 克隆酶供体免疫测定法原理示意图

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 仪器与试剂

日立 7100 全自动生化分析仪, 岛津 UV-2401 分光光度计; 25-羟基维生素 D 测定试剂盒 (上海复星长征医学科学有限公司提供)。

2.1.2 样本来源

上海某三甲医院提供的血清样本。

2.2 测定技术原理及条件

利用克隆酶供体免疫测定法 (CEDIA), 该测定基于 β -半乳糖苷酶的 α -互补性原理。试剂 (盒) 中酶供体 (ED)

标记的维生素 D 与样本中的 25-羟基维生素 D 竞争结合维生素 D 抗体, 结合了维生素 D 抗体的酶供体 (ED) 由于空间位阻将不能再与酶受体 (EA) 结合形成具有活性的 β -半乳糖苷酶。反应平衡后, 剩余的未结合维生素 D 抗体的酶供体 (ED) 标记的维生素 D 与酶受体 (EA) 结合形成具有活性的 β -半乳糖苷酶。因此, 表现为样本中的 25-OH 维生素 D 浓度与形成的 β -半乳糖苷酶活性成正比。 β -半乳糖苷酶活性的检测是以 2-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷作为底物, 反应生成的产物在 415nm 处有最大吸光度, 通过在 415nm 处测定吸光度的变化值, 即可测得样本中 25-羟基维生素 D 的浓度。

按照表 1 测定条件来设置全自动生化分析仪分析参数:

表 1 测定条件

温度	主波长	副波长	吸光度范围	比色杯光径	分析类型	反应反向	校准模式
37℃	415nm	600nm	0~3A	1.0 cm	终点法	吸光度上升的反应	非线性, 5 点定标

本试剂分别由试剂 1 (R1)、试剂 2 (R2)、试剂 3 (R3) 和稀释液组成。样本用量 20 μ l, 稀释液用量 155 μ l, 稀释后样本用量 20 μ l; R1 用量 75 μ l, 孵育时间 300s; R2 用量 150 μ l, 孵育时间 420s; R3 用量 75 μ l, 测定时间 420s。

2.3 分析性能评价方法

2.3.1 分析灵敏度

按试剂盒反应参数, 在岛津 UV-2401 分光光度计上测试浓度为 35ng/mL 的 25-OH VD 样品, 记录反应吸光度差值。

2.3.2 准确度试验

用质控品水平 1 和水平 2 对试剂盒进行测试, 每个浓度样品重复检测 3 次, 分别取测试结果的均值, 计算相对偏差。

2.3.3 精密度试验

2.3.3.1 批内精密度

在重复性条件下, 用质控品水平 1 和水平 2 测试同一批试剂 (盒), 重复测定 10 次。测定完成后, 分别计算测量值的均值、标准差, 计算变异系数 (CV)。

2.3.3.2 批间精密度

分别用 3 个不同批号的试剂 (盒) 测定质控品水平 1 和水平 2, 每个批号测定 3 次, 分别计算每批 3 次测定结果的均值, 计算相对偏差。

2.3.4 线性试验

用接近线性范围下限的低浓度样品稀释接近线性范围上限的高浓度样品, 混合成至少 5 个稀释浓度 (X_i) 的样品。分别测试试剂 (盒), 每个稀释浓度的样品重复测试 3 次。测试完成后, 分别计算每个稀释浓度样品测试结果的均值 (Y_i)。以稀释浓度 (X_i) 为自变量, 以测试结果均值为 (Y_i) 为应变量求出线性回归方程。计算线性回归的相关系数 (r)。用上述方法中稀释浓度 (X_i) 代入线性回归方程, 计算 Y_i 的估计值及 Y_i 与估计值的相对偏差或绝对偏差。

2.3.5 稳定性试验

2.3.5.1 效期稳定性试验

对在实际储存条件下 (2~8℃避光、密封) 分别保存 3、6、9、12、13 个月的 3 批成品试剂盒, 按试剂分析灵敏度、线性范围、准确度和重复性的试验方法进行检测。

2.3.5.2 开瓶稳定性试验

将 3 批成品试剂盒开瓶后, 分别将试剂 1、试剂 2、试剂 3 及稀释液放置于适用机型的试剂冷藏槽内 (2~10℃) 内, 首日对检测系统定标后, 每隔 2~3 天分别对高、低水平的质控品进行测定。要求测定结果与第一天测定结果的相对偏差不超过 $\pm 10\%$, 且研究期限不小于 14 天。

2.3.6 比对试验

将本公司试剂与英国 Immunodiagnostic Systems Limited (IDS Ltd) 公司生产的 25-羟基维生素 D 检测试剂盒 (酶联免疫法) 进行样本测定比对。采用 Excel 软件对数据进行统计学分析处理。利用线性回归的方式就对比试剂测定结果 (X)

和试剂测定结果 (Y) 的测定结果进行对比评价。

3 结果

3.1 分析灵敏度

试剂检测浓度为 35ng/mL 样品时, 吸光度差值不小于 0.70 (见表 2)。

表 2 分析灵敏度结果

	分析灵敏度	均值	样本浓度
1	0.93		
2	0.94	0.94	35ng/ml
3	0.95		

3.2 准确度

试剂测试两水平质控的相对偏差不得超过 $\pm 15\%$, 符合靶值要求 (见表 3)。

表 3 准确度结果

	均值	靶值	偏差	允许偏差范围
质控水平 1	22.40	23.6ng/ml	-5.08%	17.7-29.5ng/mL
质控水平 2	42.00	41.1ng/ml	-0.24%	30.8-51.4ng/mL

3.3 精密度

试剂批内精密度变异系数 (CV) 不大于 10% (见表 4), 批间精密度相对偏差不大于 10% (见表 5)。

表 4 批内精密度结果

	质控	均值	标准偏差 SD	变异系数 CV
批内精密度	质控水平 1	22.10	0.33	1.49%
	质控水平 2	40.80	0.86	2.11%

表 5 批间精密度结果

	质控	批次	均值	三批均值	靶值	偏差
批间精密度	质控水平 1	1	24.00			
		2	23.90	24.27	23.6ng/ml	2.84%
		3	24.90			
	质控水平 2	1	41.40			
		2	42.20	41.50	41.1ng/ml	0.97%
		3	40.90			

3.4 线性范围

测试血清样本, 试剂线性范围覆盖 9~143ng/mL。线性相关系数 (r) 不小于 0.990 (见图 2); 在 ≤ 40 ng/mL 浓度范围内的线性偏差不超过 ± 6 ng/mL; > 40 ng/mL 浓度范围内的线性偏差不超过 $\pm 15\%$ (见表 7)。

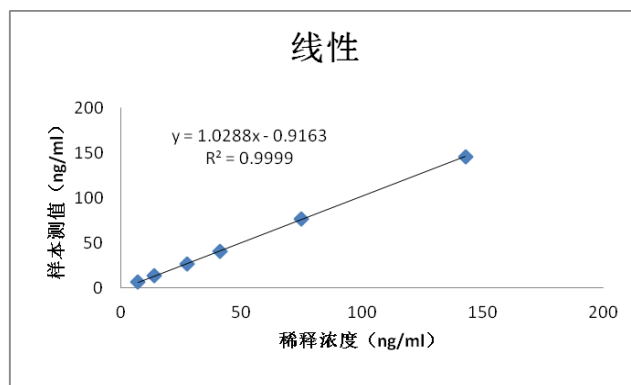


图 2 线性结果

表 7 线性结果-偏差计算

	均值	稀释浓度	估计值	偏差	偏差类型
1	7.00	7.15	6.44	0.56	绝对偏差
2	13.38	13.94	13.43	-0.05	绝对偏差
3	26.99	27.53	27.41	-0.42	绝对偏差
4	40.87	41.11	41.38	-1.23%	相对偏差
5	76.77	75.08	76.33	0.58%	相对偏差
6	146.18	143.00	146.21	-0.02%	相对偏差

3.5 稳定性

3.5.1 效期稳定性

试剂在 2~10℃避光、密封的条件下放置 13 个月后，各项分析性能（包括：试剂空白、准确度、精密度、线性范围、分析灵敏度等）检测结果仍符合上述实验的要求，故试剂的稳定性（或有效期）为 12 个月（见表 8）。

表 8 效期稳定性结果

性能指标	“0”时间	3 个月	6 个月	9 个月	12 个月	13 个月	
分析灵敏度	0.9489	0.9461	0.9412	0.9356	0.931	0.9301	
准确度	质控水平 1	0.42%	2.40%	2.97%	3.67%	-3.25%	0.71%
	质控水平 2	0.57%	1.14%	2.92%	-4.14%	-7.14%	-8.03%
精密度	质控水平 1	3.35%	1.69%	2.58%	3.06%	3.87%	3.56%
	质控水平 2	1.81%	1.66%	2.00%	2.07%	2.83%	2.85%
相关系数	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	
绝对偏差		-1.74	-2.28	-2.38	-2.00	-1.93	-2.20
		-0.24	0.07	-0.06	-0.11	0.31	-0.07
线性范围		1.88	1.63	2.16	1.99	2.47	2.33
		5.17%	6.41%	4.06%	5.30%	3.51%	6.59%
相对偏差		-3.14%	-2.90%	-1.64%	-3.09%	-4.10%	-4.52%
		0.27%	0.13%	-0.08%	0.23%	0.54%	0.47%

3.5.2 开瓶稳定性

试剂在 18 天内高、低值控制血清测定结果与第一天测定结果的相对偏差满足“测定结果与第一天测定结果的相对偏差不超过±10%”的要求。说明试剂盒的开瓶稳定性能够达到 18 天（见表 9）。

表 9 开瓶稳定性结果

质控	相对偏差							
	第 1 天	第 4 天	第 7 天	第 10 天	第 13 天	第 16 天	第 18 天	第 19 天
质控水平 1	0.00%	-0.41%	1.63%	-0.81%	-3.25%	-5.66%	-7.47%	-10.16%
质控水平 2	0.00%	0.98%	2.68%	-0.73%	-2.44%	-4.39%	-6.41%	-10.82%

3.6 比对试验

根据 107 例临床样本的检测结果, 我公司试剂与英国 Immunodiagnostic Systems Limited(IDS Ltd)公司生产的 25-羟基维生素 D 检测试剂盒(酶联免疫法)测试结果相关性良好, 其相关系数为 0.9680 (见图 3)。

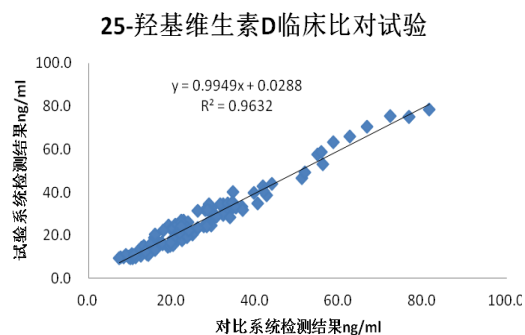


图 3 样本比对试验结果

4 讨论

25-羟基维生素 D 测定试剂盒(克隆酶供体免疫测定法)的性能达到甚至超过市场同类产品的水平。其中试剂盒检测的线性范围为 9-143ng/mL, 涵盖了 25-羟基维生素 D 缺乏、不足、充足、中毒等医学水平的浓度范围, 绝大多数样本的 25-羟基维生素 D 浓度在此范围内, 保证了测定结果的准确、可靠。由于独特的方法学, 本试剂盒被设计为 3 试剂类型, 测定时间为 22 分钟。这就要求所使用的全自动生化仪拥有 3 试剂和大于 15 分钟的测定模式, 如日立 7100、7600 等。

25-羟基维生素 D 的检测对多种疾病的诊断和预防有着不可忽略的意义, 随着医疗水平和人们健康意识的不断增强, 对 25-羟基维生素 D 检测的需求越来越大。维生素 D 对人类的健康至关重要。目前对于维生素 D 检测值的参考区间尚无统一的标准, 而影响维生素 D 含量的因素广泛众多, 因此不同人群的维生素 D 参考值还有待继续探究。如今维生素 D 对人体各方面的作用影响被越来越多的发现, 但维生素 D 缺乏的人数却还在逐年增多。希望在不断加强防治维生素 D 缺乏意识的同时, 可以建立一个稳固准确的维生素 D 参考值系统, 让更多的人群可以通过普遍检测血 25-羟基维生素 D 来提早预防佝偻病等疾病的发生。

由我公司研制生产的 25-羟基维生素 D 测定试剂盒(克隆酶供体免疫测定法)用于检测血清样本中 25-羟基维生素 D 的总含量, 是国内首个可在全自动生化仪上测定 25-羟基维生素 D 的试剂盒, 可在 30 分钟内得到检测结果, 快速、简便、检测结果准确, 与市场上同类产品相比, 能更好地为医疗或检验机构在 25-羟基维生素 D 的检测或研究中提供帮助, 给医疗机构及患者带来益处。

参考文献

- [1]张秀明,黄宪章等. 临床生化检验诊断学[M].北京:人民卫生出版社,2012.
- [2]Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status[J].Am J Clin Nutr,2008,87(4):S1087-S1091.
- [3]Holick MF.Vitamin D status:measurement,interpretation,and clinical application[J].AnnEpidemiol,2009, 19(2):73-78.
- [4] M. Holick.Vitamin D Deficienc[J].NEJM,2007,357(3):266-81.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

两台不同型号化学发光仪对于肿瘤标志物项目检测结果可比性探讨

华长龙 贾磊 王立庄 许斌

深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

[摘要]目的:对 Maglumi 2000P 及 Maglumi 4000 全自动化学发光仪检测 AFP (甲胎蛋白)、CA125(糖类抗原 125)、CA153 (糖类抗原 153) 共三项肿瘤标志物检测的准确度、精密度及结果可比性进行研究。**方法:**根据 NCCLS (美国临床实验室标准化委员会) EP-9A 文件进行验证, 取新产业上述项目质控品分别为高、中、低三个浓度, 每个浓度重复测定三次, 收集 40 例不同患者的血清, 分别在用两台仪器进行检测, 每天测 10 例共测 4 天, 将结果进行对比性评估, 依据准确度及偏倚程度对两台仪器间的可比性进行分析。**结果:**两台不同型号的 Maglumi 机器精密度均小于厂家参考值, 质控品检测及标本检测值均小于允许误差。**结论:**两台仪器对 AFP、CA125、CA153 项目的检测结果的偏差均在临床允许误差范围内, 两台仪器检测结果呈显著相关, 同时结果具有可比性。

[关键词] 化学发光仪; 肿瘤标志物; 准确度; 精密度; 可比性

[Abstract] Objective:Maglumi 2000p and Maglumi 4000 automatic chemical luminescence instrument detection of CEA (carcinoembryonic antigen), alpha fetal protein (AFP), CA125 (carbohydrate antigen 125), CA153 (carbohydrate antigen 153) a total of three tumor mark detection accuracy, precision and the ratio of. **Method:** According to NCCLS (American clinical laboratory standardization committee) EP-9A documents for verification, and take the new industrial the project quality control were high, medium and low concentration, the concentration of each repeated measurement three times and 40 cases of patients with different serum collection, respectively, in the two instruments were detected, measured every day 10 cases were measured 4 days, the results of comparative evaluation, according to the degree of accuracy and bias between the two instruments can be compared analysis. **Result:** Two different models of Maglumi machine precision are less than the reference value of the manufacturers, quality control products and samples are less than the value of the test. **Conclusion:** The results of the two instruments on the CEA, AFP, CA125, CA153 projects are in the range of clinical errors, the results of the two instruments were significantly correlated, and the results were comparable.

[Key words] chemical luminous instrument; tumor marker; accuracy; precision; Comparability

癌症(恶性肿瘤)是致死率极高的一种疾病, 中国的癌症发展形势十分严峻。全世界癌症死亡人数每年约有 700 万人, 而在这庞大的数目中大约有 24% 发生在中国。然而中国患者的生存治愈率仅为 13%。由此可见, 中国癌症防治的任务是非常艰巨。肝癌和结直肠癌分别是发病率排名第三和第四位的恶性肿瘤, 并且近年来由于生活和饮食习惯的变化, 发病率呈现上升的趋势。先进的检测手段对于癌症的预防, 诊断, 治疗及预后都起到重要的指导性参考。^[1,2]在国家科技迅猛发展的今天, 免疫检测方法层出不穷, 化学发光已经逐渐成为新一代免疫检测的手段, 在如今许多医院为保证检测结果的准确性, 以及发送检测报告的及时性, 会同时引进多台不同厂家, 或者不同型号的仪器进行检测试验, 怎样评定两台仪器的可比性, 及保证结果的准确性, 已经显得尤为重要。^[3,4,5]

1 材料与方

1.1 材料

仪器应用新产业 Maglumi 2000P 全自动化学发光仪及 Maglumi 4000 两台。新产业公司相对应项目的检测试剂、校准品、质控品。

1.2 评价方法

(1)精密度性能评价。新产业肿瘤标志物多质控品高、中、低 3 个浓度、每个浓度重复测定 3 次, 连续对三项肿瘤标志物的精密度分别进行分析计算精密度将其结果与厂家声明的批内精密度和批间精密度相比较。

(2)正确度评价。由于使用的校准品均为可溯源的物质, 可保证分析检测结果的准确度具有溯源性^[6,7,8], 故可采用定值校准品与“靶值”相对偏差的评估方式来验证正确度。各项目校准品(批号与校准时所用的批号不相同) 5 个不同浓度, 每个浓度分别平行测定两次, 将检测结果分别与各水平靶值进行比较, 计算相对偏差。两台仪器 2000P 与 4000 各项目进行可比性分析。按 EP-9A 操作规程收集 40 份患者血清, 其浓度分布在各项目线性范围内, 其中 50% 的标本测定结果处于本室生物参考区间外。每天测定 10 份, 分别在 2000P 系统和 4000 系统检测, 连续测定 4 天。分别计算平均偏倚, 用 2000P 与 4000 进行相关回归分析, 计算相关系数 r 或 r^2 , 若 $r \geq 0.975$ 或 $r^2 \geq 0.95$, 则认为 2000P 及 4000 取值范围合适,

两台仪器间检测结果具有可比性。计算偏倚,并绘制相应偏倚图,观察在检测的浓度范围内是否差异一致,认为检测系统间的系统误差或相对偏差属临床可接受范围。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 对数据结果进行相关回归分析, $r^2 > 0.95$, $r > 0.975$ 认为 2 个系统间检测结果在取值范围内相关性良好。

2 结果

2.1 精密度验证结果 两台仪器三个检测项目每 3 个浓度水平的 CV 批内 (<10%)、CV 批间(<15%)均满足要求,与厂家的声明一致可被接受。结果见表 1、表 2。

表 1 M2000P 仪器 3 项肿瘤标志物精密度验证结果

项目	水平值	平均值 (IU/ml)	CV 批内%	CV 批间%	企业制定标准		结果
					批内 %	批间%	
AFP	低	1.832	1.899	4.343	10	15	通过
	中	6.976	2.032	1.787	10	15	通过
	高	10.223	2.478	1.985	10	15	通过
CA125	低	16.642	1.425	1.796	10	15	通过
	中	37.881	1.597	1.853	10	15	通过
	高	101.112	1.603	1.988	10	15	通过
CA153	低	17.089	2.211	2.011	10	15	通过
	中	29.211	2.202	2.353	10	15	通过
	高	56.796	2.202	2.496	10	15	通过

表 2 M4000 仪器 3 项肿瘤标志物精密度验证结果

项目	水平值	平均值 (IU/ML)	CV 批内%	CV 批间%	企业制定标准		结果
					批内%	批间%	
AFP	低	1.711	2.278	4.011	10	15	通过
	中	6.843	2.369	1.799	10	15	通过
	高	10.023	2.792	1.769	10	15	通过
CA125	低	16.421	1.965	2.221	10	15	通过
	中	37.099	2.032	2.232	10	15	通过
	高	101.011	2.056	2.449	10	15	通过
CA153	低	17.009	2.200	3.114	10	15	通过
	中	29.111	2.321	2.987	10	15	通过
	高	56.706	2.479	2.796	10	15	通过

2.2 正确度验证(定值校准品与靶值的相对偏差评估)检测结果与“靶值”的偏差在 0.0%~9.8%,明显小于 15%,5 个水平的检测结果均在可接受的范围内,见表 3。

表 3 两仪器校准品与靶值的测定结果

项目	靶值 (IU/ML)	M2000P		M4000	
		验证 (IU/ML)	相对偏差	验证 (IU/ML)	相对偏差
AFP	5	5.050	1.00	5.103	2.05
	10	10.145	1.45	10.215	2.15
	20	20.410	2.05	20.552	2.76
	100	102.460	2.46	101.900	1.90
	150	155.250	3.50	152.970	1.98
CA125	10	10.205	2.05	10.410	4.10
	20	20.430	2.15	21.030	5.15
	50	51.225	2.45	51.530	3.06
	100	103.550	3.55	102.700	2.70
	200	205.940	2.97	205.160	2.58
CA153	10	10.155	1.55	10.198	1.98
	20	20.300	1.50	20.352	1.76
	50	50.780	1.56	50.75	1.50
	100	102.800	2.80	101.050	1.05
	200	205.700	2.85	202.700	1.35

2.3 两台仪器各项目相关性分析与回归方程

各个项目均 $r > 0.975$, $r^2 > 0.95$ 表明数据分布的范围合适,两台仪器检测结果的相关性良好,各相关系数及回归方程见表 4。

表 4 两仪器的可比性验证结果

项目	回归方程	r^2	可接受标准		评价
			平均偏倚	标准%	
AFP	$Y=1.002X+0.001$	0.999	3.128	15	一致
CA125	$Y=1.031X+0.001$	0.991	2.096	15	一致
CA153	$Y=1.057X+0.025$	0.989	1.010	15	一致

3 讨论

对于整个临床检验过程,质量控制是确保检验结果可靠性的一种保证。能够确保检测结果的一致性(可比性)是所有仪器和试剂必须达到的标准。随着国家经济的发展,医院的规模和层次都在不断的提高,为了保证医院更好的发展,医院的检验科只有保证检验结果的准确才能为患者提供更优质的服务,在这个长期的发展过程中每个医院都会选择多种相同的或者不同的仪器来提高医院的诊断水平。

所有医院的实验室都是在按照 CNAS(国家医学实验室认可委员会)及 ISO151819 的要求及准则进行规范化管理。检验工作者应对检测结果的溯源性及一致性(可比性)以及新引进仪器及所检测项目的性能验证做出相应的鉴定。其中精密度和准确度是最主要的验证评价。本文目的在确定新产业两台不同型号间的性能评估,为医院更好的发展,提供一定的参考。故采用 EP-9A 方案进行简便评价。

精密度试验采用的是新产业肿瘤标志物物质控品进行高中低三水平方法进行试验,四项肿瘤标志物均与厂家生命一致。采用 5 个不同浓度的、可溯源的定值校准品分别在两系统上进行检测,将其检测结果分别与靶值进行比较,计算结果的相对偏差,各项目相对偏差在 0.0%~9.8% 明显小于允许总误差 10%,各项 5 个水平的检测结果均在可接受的范围内。检测结果的不同有时往往源于检测系统的多元化,如果在同一实验室不同仪器进行检测,检测出异样的结果,往往会给临床带来许多难以理解的结果,偶尔会出现误诊的情况。因此评估两台仪器的一致性,必须进行比对试验。本次比对试验主要以 4000 作为参比系统,2000P 仪器作为比较系统,采用 EP-9A 评价方案,试验过程中采用同批号的质控品、校准品及患者标本的选取均按照文件要求,尽量减少相应的差异。各结果的回归方程表明,两系统间 $r > 0.975$, $r^2 > 0.95$ 表明数据分布的范围合适,检测结果对于两台仪器而言具有良好的可比性。

现如今,化学发光检测技术已经逐渐被临床接受及认可,检测结果的准确性及仪器间的可比性将对临床对于患者病情的判断产生极大的影响,所以对于实验室内的相关检测仪器,应定期的进行性能验证,同时应注意日常保养及质量控制,以全面,认真的态度来处理所检测的结果,为临床提供可靠的诊断指标。

参考文献

- [1] Ru L C,Wei M,Hong Y L,et al.Segregation analysis of hepatocellular carcinoma in a moderately high-incidence area of East China[J].World J Gastroenterol,2003,9:2428-2432.
- [2] 张振书,张亚历.中国大肠癌研究进展.世界华人消化杂志,2001(5):489-494.
- [3] 林向阳,王忠永,周武,等.不同检测系统甲胎蛋白测定结果的可比性及偏倚评估研究,中华检验医学杂志,2008,31(8):908-909.
- [4] 杨有业,张秀明.临床检验方法学评价[M].北京:人民卫生出版社,2008:111.
- [5] 王治国.临床检验方法确认与性能验证[M].北京:人民卫生出版社,2009:168.
- [6] 李胜发,徐华建,张莉萍,等.多个血细胞分析系统结果准确性和可比性的方法保证分析[J].重庆医学,2009,38(19):2416-2417.
- [7] 王建兵,韩丽乔,黄宪章. α -淀粉酶参考方法的建立及其性能评价[J].实用医学杂志,2012,28(5):819-821.
- [8] 陈宝荣,孙慧颖,邵燕,等.四种血清 α -淀粉酶厂家系统测量结果的正确性评价[J].中华检验医学杂志,2012,35(4):309-316.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

参照 CLSI EP 方案评价同型半胱氨酸试剂性能

李祥胜*

桂林优利特医疗电子有限公司

[摘要] 目的:参照 CLSI EP 方案对自主研发的同型半胱氨酸(HCY)试剂分析性能进行评价,了解其是否满足临床需求。方法:参照文件测定试剂空白吸光度,检测限,分析灵敏度,精密度,准确度,线性范围,干扰试验和稳定性等技术指标。结果:试剂空白吸光度为1.40,检测限为 $0.2\mu\text{mol/L}$,分析灵敏度为0.018,方法比实验结果 $Y=0.9979x+0.0534$, $r^2=0.9995$;高低值血清批内变异系数分别为0.9%和1.1%,线性范围为 $2.0\sim 50.0\mu\text{mol/L}$, 100mg/dL 维生素 C, 50mg/dL 游离胆红素, 50mg/dL 结合胆红素, 500mg/dL 血红蛋白浓度, 3000 浊度单位乳糜对检测结果无影响,试剂稳定。结论:该试剂分析性能可满足临床实验室的需要。

[关键词] 同型半胱氨酸;性能评价;应用

同型半胱氨酸(HCY)又称高半胱氨酸,是一种含硫氨基酸,是蛋氨酸代谢过程中的重要产物[1]。研究表明,HCY是心脑血管病的独立危险因素。HCY水平与心脑血管疾病密切相关,HCY增高可刺激血管壁引起动脉血管损伤,导致炎症和管壁斑块形成,目前国内外已将HCY作为心脑血管疾病的常规检测指标,用于预知动脉粥样硬化的危险性。HCY升高还可引起神经管畸形及先天性畸形等出生缺陷类疾病[2]。笔者依照临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)制订的评价方案对自主研发的HCY试剂在分析性能方面进行了评价,旨在为临床检测应用提供数据参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

日立 7080 全自动生化分析仪,购于日本日立公司;岛津 2450 分光光度计,购于日本岛津公司;维生素 C,购于广东汕头市西陇化工厂,批号为 0404221;血红蛋白,购于国药集团化学试剂有限公司,批号为 69013631;游离胆红素及结合胆红素,购于百灵威科技有限公司,批号为 20141113;HCY 试剂盒及标准质控,购于湖南永和阳光公司。

1.2 实验方法

1.2.1 检测原理

氧化型 HCY 被转化成游离 HCY,游离 HCY 在 CBS 催化下和丝氨酸反应生成 L-胱硫醚。L-胱硫醚在 CBL 催化下又生成 HCY、丙酮酸和 NH_3 。该循环反应生成的丙酮酸可以用乳酸脱氢酶 LDH 和 NADH 检测到,NADH 转变成 NAD 的速率与样品中 HCY 含量成正比。

1.2.2 试剂配制 试剂 1: 16.92g/L 三乙醇胺, 0.1g/L 丝氨酸, 30KU/L 乳酸脱氢酶, 0.35g/LNADH 。试剂 2: 10g/L 三乙醇胺, 3g/LEDTA , 20KU/LCBS , 10KU/LCBL 。

1.2.3 测试参数

采用速率法,反应温度为 37°C ,光径为 1.0cm ,检测主波长 340nm ,样品(校准管以校准品做样品)加 R1 混匀,孵育 5min 后加入 R2 混匀,反应 2.5min 后,监测 2.5min 吸光度变化,其中样本用量 $13\mu\text{L}$ 。试剂 1 用量 $240\mu\text{L}$,试剂 2 用量 $65\mu\text{L}$ 。根据仪器使用说明及分析参数编制检测程序。

1.2.4 性能评价测定方案

有关试剂空白吸光度、检测限、分析灵敏度、精密度、准确度、线性范围、干扰试验和稳定性等评价指标参照相关 EP 文件及国内外惯用方法进行。

空白吸光度:在波长 340nm (光径 1.0cm)处检测,以蒸馏水为样本,重复测定 2 次。

检测限:以蒸馏水为样本,用试剂重复测定 20 次。

分析灵敏度:以 $10.0\mu\text{mol/L}$ 标本为样品,用试剂测定,记录在试剂规定参数下产生的吸光度改变。换算为吸光度变化率。

精密度按 EP — 5A2 文件评价 [3]:取高值和低值的患者混合血清各 1 份,测定 20 次,计算批内精密度。

准确度试验按 CLSI EP9 — A2 文件评价 [4]:采用 40 例临床样品对试剂进行测试,并将结果与永和阳光试剂进

行数据统计分析。

线性评价按 EP-6A 文件评价 [5]: 取 HCY 高、低值血清标本各一份。将高值和低值血清分别按不同比例混合稀释成不同浓度梯度的样本, 并将这些样本随机排列进行测定, 各个浓度重复测定 3 次, 取其均值为测定值, 与预期值做线性对比。

干扰实验按照 CLSIEP 一 7A2 文件评价 [6]: 测定加入干扰物的混合血清。

试剂热稳定性通过将试剂置于 37℃ 水浴, 分别于水浴前及水浴 1、3、5、7 d 后对高、低浓度的 LAP 标本及试剂线性范围进行测定; 试剂开口稳定性实验通过将试剂定标后, 开瓶放置于生化分析仪的试剂仓, 分别在开瓶 0、3、7、14、21、30 d, 对高、低浓度的 HCY 标本及试剂线性范围进行不定标检测, 比较开瓶前后的检测结果偏差。

1.3 统计学处理

所有数据用 Excel 软件进行统计处理、作图分析。

2 结果

2.1 在 37℃, 340nm 波长, 试剂空白吸光度为 1.40, 大于 0.8, 符合试剂设计要求。

2.2 检测限: 结果显示最低检测限为 0.2μmol/L。

2.3 分析灵敏度: 10μmol/L 样本吸光度变化率为 0.018, 大于 0.01, 符合试剂设计要求。

2.4 精密性: 结果显示, 该试剂高低值血清批内变异系数分别为 0.9% 和 1.1%

2.5 准确度

测定临床标本 40 例, 将测定结果与永和光试剂测定结果进行相关回归分析, 结果见图 1, 计算相关方程和相关系数为 $Y=0.9979X+0.0534$ 和 $r^2=0.9995$ 。

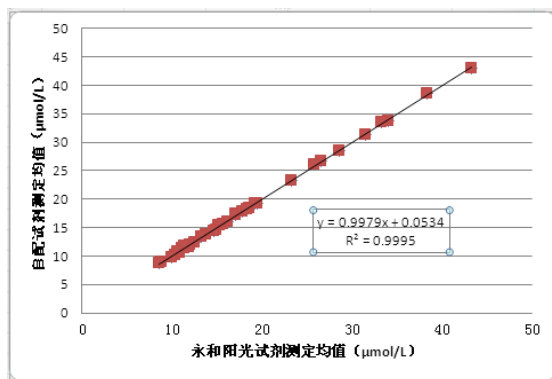


图 1 HCY 重复测定均值的散点图

2.6 线性范围测定

结果如图 2 所示, 相关方程及相关系数分别为 $Y=0.9722X+0.0203$ 和 $r^2=0.9999$ (浓度范围 2.0~50.0μmol/L)。

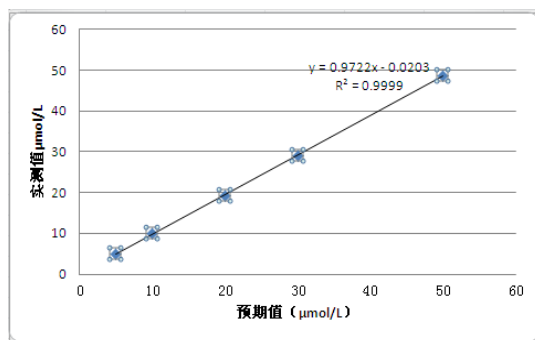
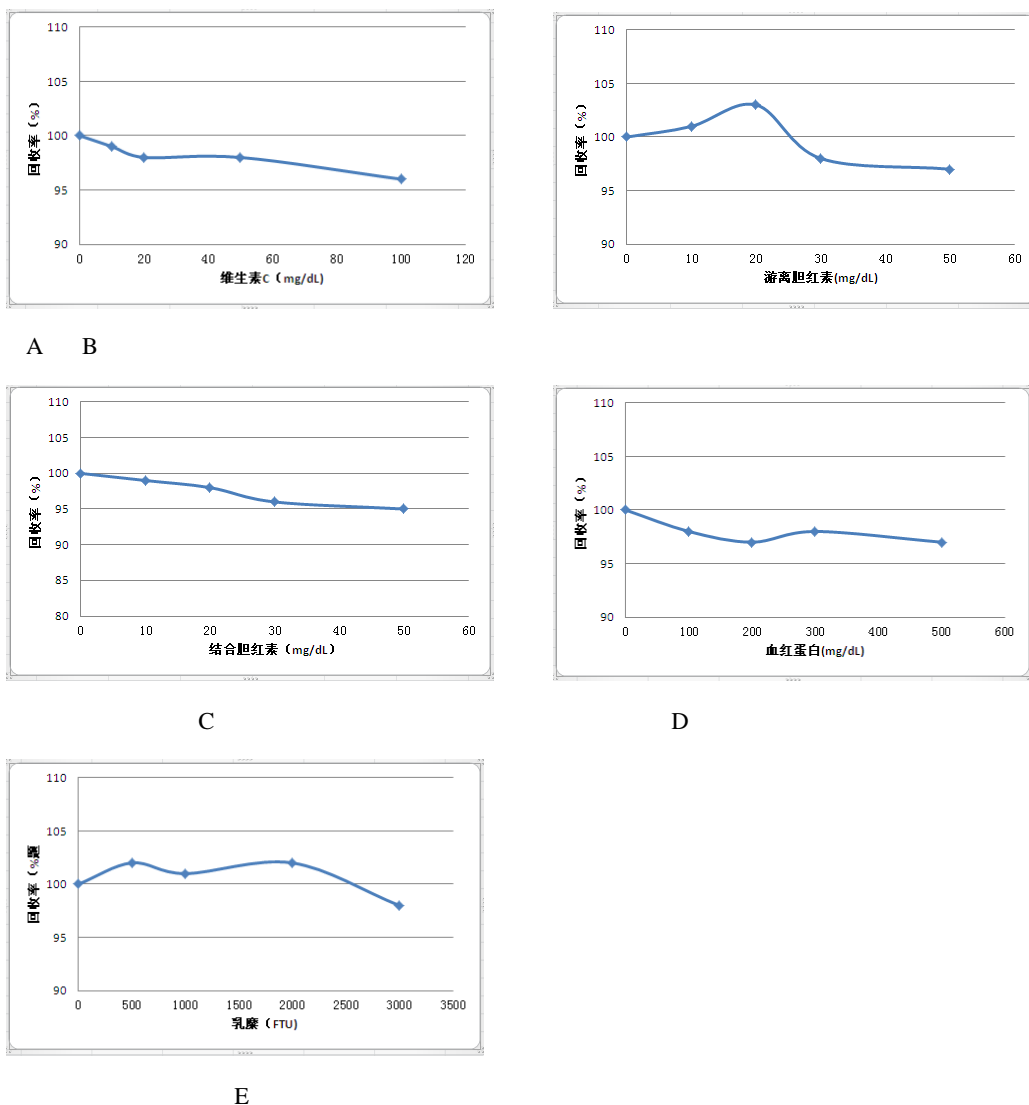


图 2 试剂线性范围实验结果

2.7 干扰试验

以相对偏差大于等于 10% 作为有明显干扰的评判指标, 结果显示, 100mg/dL 维生素 C, 50mg/dL 游离胆红素,

50mg/dL 结合胆红素, 500mg/dL 血红蛋白浓度,3000FTU 乳糜对检测结果无影响, 见图 3。

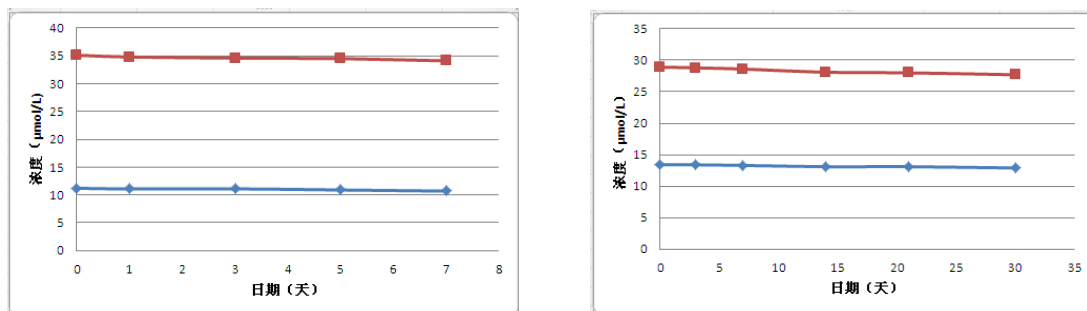


A: 试剂抗维生素 C 干扰结果; B: 试剂抗游离胆红素干扰结果; C 试剂抗结合胆红素干扰结果; D:试剂抗血红蛋白干扰结果; E: 试剂抗乳糜干扰结果。

图 3 试剂抗干扰结果

2.8 稳定性观察

试剂经 7d 热负荷 (37℃) 和试剂仓开瓶 (2~8℃) 30d 后, 高、低值标本和线性实验测定结果与热破坏及开瓶前相比无显著偏差, 结果见图 4。



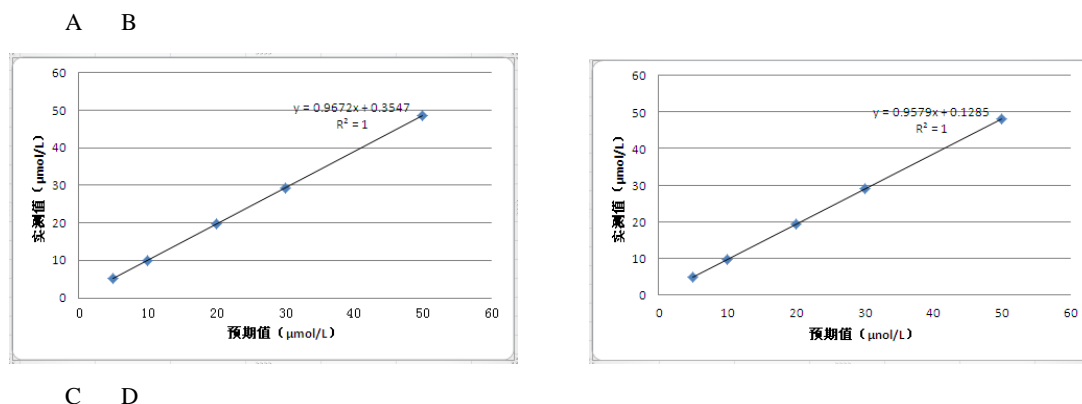


图4 试剂稳定性观察结果

3 讨论

同型半胱氨酸作为独立的心血管风险指标已被广泛接受,是高血脂、吸烟、糖尿病之外的又一危险因素。尽管许多有关高同型半胱氨酸血症的生物化学基础有待明确,其检测与各种疾病的关系和治疗检测将需进一步探讨。目前,血浆同型半胱氨酸的测定主要采用水解酶循环方法,由于时间和价格因素,仅在大医院或检验中心应用。随着临床发展的需要,胱硫醚酶循环法测定同型半胱氨酸将迅速发展起来,为临床的诊断和治疗提供新的方向。本研究参考 CLSI EP 系列文件,对自主研发的 HCY 试剂进行分析性能的系统评价,结果表明自主研发的 HCY 试剂空白吸光度为 1.40,检测限为 $0.2\mu\text{mol/L}$,分析灵敏度为 0.018,高低值血清批内变异系数分别为 0.9%和 1.1%,线性范围为 $2.0\sim 50.0\mu\text{mol/L}$,抗干扰能力较强,试剂稳定。与已上市的永和阳光试剂在分析性能上无显著差异,与其比对实验结果 $r=0.9995$,可应用于临床实验室。

参考文献

- [1] McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature Med*, 1996, 2: 386-389.
 - [2] David A. Homocysteine vs cholesterol competing views, or a unifying explanation of arteriosclerotic cardiovascular disease? *Lab Med*, 1998, 29: 410-417.
 - [3] NCCLS. EP5-A2 Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices: Approved guideline[s]. Wayne, PA: NCCLS, 1999: 41-49.
 - [4] NCCLS. EP6-A Evaluation of the linearity of quantitative analytical methods: A statistical approach; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2003: 41-46.
 - [5] NCCLS. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples: Approved guideline[s]. Wayne, PA: NCCLS, 2002: 49-52.
 - [6] NCCLS. EP9-A2 Interference testing in clinical chemistry; Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002: 10-107.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

全自动血型及配血分析系统应用评价

何哲文² 李翠莹¹△

¹空军总医院输血科, 北京, 100014; ²成都军区总医院输血科, 四川 成都, 610083

[摘要] 目的: 探讨全自动血型分析仪在临床 ABO-CDE 血型鉴定和抗体筛查中的应用。方法: 用全自动血型分析仪对本院 2014 年 7 月-12 月住院及门诊患者的标本进行 ABO-CDE 血型鉴定和抗体筛查, 其中血型正反不一致与抗筛阳性标本送血型参比实验室进行进一步分析。结果: 全自动血型分析仪对 27 385 例 ABO 血型, 19 037 例 CDE 血型鉴定, 25 644 例抗筛检测结果的正确率分别为 99.97%、99.94%、99.99%。结论: 全自动血型分析仪能够快速、准确的检测标本, 满足临床的需求。

[关键词] 血型鉴定; 抗体筛查; 全自动血型分析仪

[Abstract]Objective: To investigate the application of automatic blood analyzer in clinical ABO-CDE blood typing and antibody screening. Methods: ABO-CDE blood typing and antibody screening of specimens of inpatients and outpatients in our hospital from July 2014 - 12 months for full automatic blood analyzer, which positive and negative blood type inconsistent with anti screening positive specimens were sent for blood group reference laboratory for further analysis Results: the automatic blood analyzer in 27 385 cases of type ABO, 19 037 cases of CDE blood group identification, 25 644 cases of anti screening test results the correct rates were 99.97%, 99.94%, 99.99%. Conclusion: automatic blood type analyzer can quickly and accurately detect the samples, meet the needs of clinical.

[Keywords]Blood group identification; antibody screening; automatic blood analyzer

准确的血型鉴定和进行抗体筛查是现代医学临床安全和有效输血的重要保证^[1]。随着检验技术的快速发展,以及对医疗技术要求的不断提高,人工操作已无法满足大批量临床输血前相容性检测的需要,而全自动血型分析仪因检测自动化、标准化高,已在国内大中型医院相继投入使用^[2]。实验室通过仪器的自动化操作系统检测,从而避免了人为因素造成的实验错误,提高实验效率和判读的准确性^[3]。我科已实现了血型鉴定、抗体筛查标准化和自动化检测。现将我科应用全自动分析仪在 ABO-CDE 血型鉴定和抗筛检测的临床应用评价及经验总结如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源

取自本院 2014 年 7 月-12 月住院及门诊患的标本,采用 EDTA-k2 抗凝管留取 4 毫升全血标本,其中 ABO 血型鉴定 27 385 例, Rh CDE 血型鉴定 19 037 例,抗体筛查 25 644 例。

1.2 仪器与试剂

西班牙基立福 Erytra 全自动血型分析仪,日本久保田 KA-2200 型离心机, WADianna GRIFOLS DG SPIN 离心机, WADianna GRIFOLS DG THERM 孵育器。血型鉴定凝胶卡(戴安娜 DG Gel ABO-CDE,批号:14000901.1),抗人球蛋白凝胶卡(戴安娜 DG Gel Coombs,批号:1405301.1),标准 A、B、O 血细胞(上海血液,批号:20145315,浓度为 3%~5%),标准抗体筛查 I、II、III 号细胞(上海血液,批号:20145610,浓度为 3%~5%),然后根据 Erytra 全自动血型分析仪使用说明,将海血液生物医药有限公司提供的血细胞和抗筛细胞稀释至 0.8%~1% 的浓度待用。所有试剂批号均经批批检且在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 前处理。由于在运输过程中,凝胶卡卡内试剂被打散,因此试验前需在 WADianna GRIFOLS DG SPIN 离心机里将凝胶卡离心备用,配制 0.8%~1% 的标准红细胞悬液及筛选细胞悬液,及 A、B 洗液(标准液:蒸馏水=1:2)、BLISS 液。

1.3.2 血型及不规则抗体检测。对入院病人样本进行 ABO 抗原、Rh-CDE 抗原以及抗体筛查检测。应用微柱凝胶试验(MGT),将待检样本放入全自动仪器,然后放入配置好的标准血细胞及标准抗体筛查细胞。根据凝胶卡判读准则设置仪器判读标准,按全自动血型分析仪操作说明书进行检测。ABO 血型系统出现正反不一致和抗体筛查出现阳性的结果送血型参比实验室进行进一步鉴定。

2 结果

2.1 27 385 例 ABO 血型检测 ABO 血型结果正反不一致 652 例,经参比室确认结果与实际情况相符见表 1,7 例因仪器原因未能判读结果,仪器一次性判读准确率为 99.97%。

表 1 652 例 ABO 血型正反不一致结果类型

类型	抗体减弱标本	骨髓移植	冷凝集	亚型	纤维蛋白影响	脂血影响
例数 (n)	623	2	13	2	7	5
百分比 (%)	95.5	0.3	1.9	0.3	1.0	0.7

注:百分比表示不同类型正反不一致结果所占的比例。

2.2 19 037 例 Rh 系统 Rh-CDE 抗原血型检测,其中 362 例结果判读 2+ 以下,需参比室确认结果。Rh 系统 CDE 抗

原检测分布见表 2。经参比室复查后, 362 例结果中, 352 例 (97.20%) 结果确证为阳性, 10 例 (2.76%) 结果确证为阴性, 由此得出仅 10 例结果与经典法不一致, 一次性准确率为 99.94%。

表 2 19 037 例 Rh 系统 CDE 抗原检测分布表

Rh 分型	C 抗原		D 抗原		E 抗原	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
结果						
例数(n)	17350	1776	18934	106	8144	10275
百分比(%)	91.38	9.32	99.46	0.56	42.78	53.97

注: 百分比表示 Rh 系统 CDE 抗原阴阳性结果各自所占其抗原结果的比例。

2.3 25 644 例抗体筛查结果, 阳性 153 例 (0.59%), 其中检测出特异性的 51 例 (0.19%) 见表 3, 未检测出特异性抗体有 75 例 (0.29%), 重新复查后为阴性的 25 例 (0.097%), 由此得出仅 25 例结果与经典法不一致, 一次性判读准确率为 99.99%。

表 3 51 例抗体鉴定结果 (例)

类型	抗 E	抗 c	抗 D	抗 Le ^a	抗 M	抗 S	抗 C 抗 e	抗 E 抗 c	抗 C 抗 D
	联合抗体		联合抗体		联合抗体		联合抗体		
例数(n)	30	3	2	8	2	2	2	1	1
百分比 (%)	58.82	5.88	3.92	15.69	3.92	3.92	3.92	1.96	1.96

注: 百分比表示不同类型抗体鉴定结果的比例。

3 讨论

从表 1 和表 3 实验结果可以看出, 652 例 ABO 血型正反不一致结果和 51 例抗体筛查阳性结果应用试管法及抗人球蛋白试验行进一步分析, 分析结果表明仪器在结果判读上能够更敏感的检测出弱抗原、弱抗体、不规则抗体是保证临床输血安全极其重要的环节^[4]。

全自动分析仪在处理临床大批量标本时有优势, 相比于抗人球蛋白法、手工微板法等自动化程度低, 主观判断性强及可能漏检的方法来说, 能够准确、及时的完成任务, 满足临床对报告时效性的要求, 最大限度的降低了人为操作和主观判断对结果造成的影响, 使仪器更加适用于批量操作。然而仪器设定了严格的结果判读标准, 使仪器判读过于敏感, 易出现假阳性结果。因此在应用全自动血型分析仪出现异常结果时, 需用试管法或抗人球蛋白试管法进行复查^[5], 以提高血型及同种抗体^[6]的检出率。

针对 ABO 血型不一致的结果应考虑 1 岁内新生儿标本、骨髓移植、冷凝集素、A/B 亚型、纤维蛋白、脂血等因素; 针对抗筛阳性的结果, 若常规方法都不能检测出血型正反不一致的原因和怀疑是 ABO 亚型时, 还可通过分子生物学方法来鉴定^[7]。

Rh 血型系统与输血安全紧密相关, 其重要性仅次于 ABO 血型系统, 是输血相容试验必须关注的血型系统^[8]。以 E 抗原为例, 从表 2 结果可以看出, E 抗原阴性患者多于 E 抗原阳性患者, 当 E 抗原阴性受血者输入了 E 抗原阳性的供血者的血液时, 可能会产生 Rh 系统的不规则抗体^[9]即抗 E, 再次输血时, 会造成配血困难。从表 3 得到: 在确诊抗筛阳性结果中, 抗 E 抗体比率高达 58.82%。因此 C、E 抗原阴性人群极可能通过输血治疗或者妊娠产生抗 E 抗体或 C 抗体。

另外有试验证明有多次输血史和妊娠史的患者则会出现 CDE 抗原检测双群现象, 其中 Rh (D) 约为 0.28%, Rh (C) 约为 5.15%, Rh (E) 约为 14.69%^[10]。因此我们将 RhE、RhC 血型鉴定同时纳入常规检查对保障临床安全输血非常重要。

在仪器操作方面, Erytra 全自动血型分析仪优势在于: ①专门设置了急诊按钮, ②实现标本的连续装载和分批装载, ③灵敏度高, ④仪器会根据实际需要进行打孔, ⑤保养和维护更简便, ⑥数据保存功能中新增加了 PDF 存储格式, 解决了原始结果查询和举证问题^[11]; 仪器在运行方面存在以下不足: ①仪器缺少独立的电脑处理系统, ②仪器待机对 A、B 标准清洗液消耗大。

综上所述：全自动血型分析仪能提高特殊血型、血型亚型及不规则抗体的检出率，能够准确、及时的完成每日约 200 人份的 ABO-CDE 血型鉴定和抗体筛查标本，满足临床对报告时效性的要求，而且维护简便，上样方便，查询追溯容易，对于临床医疗纠纷举证有着重要意义。

参考文献

- [1] 甘玮玮, 张添新, 原敏. Erytra 全自动血型分析仪的应用评价. 国际检验医学杂志, 2014, 35(22): 3112-3113.
- [2] 刘玉美, 刘芳庆, 刘肖利. 卡式法血型鉴定, 交叉配血的注意事项. 实用医技杂志, 2006, 13(1): 80.
- [3] 于洋, 冯倩, 林子林, 等. 全自动微柱凝胶技术在 ABO、RHD 血型鉴定中的应用研究. 北京医学, 2008, 30(3): 165-167.
- [4] 宋建, 彭涛, 李翠莹, 等. 全自动血型及配血分析系统的应用. 中国输血杂志, 2011, 24(1): 60-61.
- [5] 蔡红军, 任红红, 张东民, 等. 全自动血型检测系统在无偿献血者血浆检测中的应用. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(12): 926-927.
- [6] 周晔, 蒋天舒, 陈波, 等. 三种全自动血型仪在交叉配血实验中的应用比较. 临床输血与检验, 2013, 15(2): 105-107.
- [7] 李翠莹, 田力, 肖洁, 等. B(A) 血型的血型学及分子遗传学研究-附 2 例报告. 中国输血杂志, 2014, 27(12): 1315-1317.
- [8] Ameen R, Al-Shemmari S, Al-Humood S, Chowdhury R I, Al-eyaadi O, Al-Bashir A. RBC alloimmunization and auroimm-unization among transfusion-dependent Arab thalassemia patients. Transfusion, 2003, 43: 1604-1610.
- [9] 伍伟健, 罗海玲, 黄昌海, 等. 佛山地区无偿献血者 Rh 血型分布情况调查. 中国免疫学杂志, 2010, 26(2): 182-185.
- [10] 夏传友, 刘志泉, 梁丽雯, 等. 顺德地区患者不规则抗体检测情况分析. 中国输血杂志, 2013, 26(8): 749-750.
- [11] 原敏. 卡式血型鉴定出现双群结果临床意义分析. 实用医技杂志, 2007, 14(22): 3009-3010.

联系作者: 何哲文, 13882202652, 523134683@qq.com

四川省成都市五里墩东街 108 号 2 栋 1 单元 52 号, 610031

(输血装备专委会供稿)

MG12 型全自动血型分析仪常规检测效果评价

林婧, 苏莉, 杨家焕, 罗洪, 谭安超, 钟文郁, 王红波, 杨眉, 安邦权
贵州省人民医院输血科 贵州 贵阳 550002

[摘要] 目的 评价上海中山生物 MG12 型全自动血型分析仪 (MG12 血型仪) 在检测 ABO 及 Rh (D) 血型等分析中的应用效果。**方法** 收集本院 2014 年 8 月~9 月患者全血标本共 1162 例, 采用 MG12 血型仪及美国强生 Autivune Innova 血型分析仪 (Innova 血型仪) 同时进行 ABO 血型及 Rh (D) 血型鉴定并比对分析其结果。**结果** 以 Innova 血型仪为参考标准, MG12 血型仪读卡合格率达 100% (1162/1162); 两检测系统不规则抗体阳性标本筛查、Rh (D) 阴性、血液病及肿瘤患者等特殊标本血型鉴定结果一致, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** MG12 血型仪常规鉴定效果能满足实验室要求, 其检测结果可用于临床诊治相关疾病。

[关键词] 全自动血型分析仪; 血型鉴定; 常规检测

血型鉴定在临床输血中的重要性不言而喻, 准确鉴定血型可有效的保证临床输血的安全性。传统手工法检测血型易于受人为因素和方法学等其他因素的干扰, 操作费时, 结果判断主观影响较大, 不利于临床输血安全, 全自动血型分析仪则弥补了其缺陷。但过去由于技术原因, 大多数医院使用的全自动血型分析仪均为国外进口, 导致其成本高, 加重了患者经济负担。近来, 上海中山生物研制成 MG12 型全自动血型分析仪 (MG12 血型仪), 我们将其与

美国强生公司 Autivune Innova 全自动血型分析仪 (Innova 血型仪) 对比检测鉴定 ABO 及 Rh (D) 等常规血型, 现分析结果如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集本院 2014 年 8 月~9 月患者临床标本 (EDTA-K₂ 抗凝血) 共 1162 例。其中特殊血样如 Rh (D) 阴性 [Rh (-)] 标本 27 例、不规则抗体筛查阳性标本 25 例、血液病及肿瘤科病人标本 34 例。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 对照血型检测系统

美国 Innova 血型仪及其配套试剂 (批号 3400789, 有效期内使用), 参加国家卫计委临检中心和贵州省临检中心室内质量评价 (EQA)、室内质量控制 (IQC) 及临床应用合格。

1.2.2 待评血型检测系统

上海 MG12 血型仪 (产品编号 1201001) 及其配套试剂 (批号 201404013, 有效期内使用), 阴阳性 IQC 合格。

1.3 方法

严格按照仪器及试剂使用说明和实验室标准操作程序 (SOP 文件) 进行两个检测系统常规血型等鉴定。

1.3.1 重复实验 选择 5 份经对照血型检测系统和临床应用确认的不同血型的样本, 包括 Rh (+) 的 A 型血、B 型血、O 型血、AB 型血样本各一份、一份 Rh (-) B 型血的样本, 用 MG12 血型仪每天进行四次检测, 连续五天, 以考察工作稳定性及结果重复性。

1.3.2 对比实验

采用盲法检测, 每例标本使用对照系统和待评系统同时进行常规血型鉴定, 试验结束后揭盲。根据对照系统检测结果按血型进行分组和对比统计分析待评系统的符合程度等。

2 结果

2.1 血型重复鉴定实验结果

MG12 血型仪 5 天内 20 次重复鉴定 Rh (+) 的 A 型血、B 型血、O 型血、AB 型血和 Rh (-) B 型血样本 100% 一致。

表 1 MG12 血型仪血型重复鉴定实验结果

项目	A 型 Rh (+)		B 型 Rh (+)		O 型 Rh (+)		AB 型 Rh (+)		B 型 Rh (-)	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
n	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0
符合率	100%		100%		100%		100%		100%	

2.2 两检测系统血型鉴定结果

MG12 血型仪和 Innova 血型仪同时对 1162 例标本进行 ABO 血型及 Rh (+) 血型鉴定, MG12 血型仪检测合格率为 100%, 结果无统计学差异 ($P > 0.05$), 见表 1。其中两个系统同时检测 25 例不规则抗体筛查阳性标本和 34 例血液病及肿瘤患者标本 ABO 及 Rh (D) 等常规血型结果相一致。

表 2 两检测系统常规血型鉴定结果比较

仪器	n	A 型	B 型	O 型	AB 型	Rh (+)	Rh (-)
Innova 血型仪	1162	361	279	410	112	1135	27
MG12 血型仪	1162	361	279	410	112	1135	27

3 讨论

血型系统主要是指红细胞表面抗原所决定的血液抗原类型, 包括 ABO 血型系统、Rh 血型系统、MN 血型系统等^[1], 而在临床工作中非常重要 ABO 血型系统及 Rh 血型系统, 因此, 一般的血型检测主要是针对 ABO 血型系统和 Rh 血型系统。传统经典手工法检测血型为试管法, 其基本原理抗原-抗体反应, 其中正定型是用标准已知单克

隆血型抗体检测未知红细胞膜表面的血型抗原；反定型是用标准已知膜表面血型抗原的红细胞检测血清中的未知血型抗体；根据正、反定型的结果判定该标本的血型。虽然，经典的手工试管法为过去医疗卫生事业作出了巨大贡献，但其操作繁琐费时且不易标准化、难以微量量化，受人为主观影响较大，在大批量样本的检测时易出现差错^[2,3]，因此，目前大批量样本检测已逐步被全自动血型分析仪所取代。

全自动血型分析仪在传统手工法原理的基础上，进一步应用微柱凝胶检测技术，即抗原-抗体在凝胶管内反应，经离心后，红细胞在凝胶管底部为阴性，红细胞凝集后，因抗原-抗体复合物体积大，不能通过凝胶柱而沉积在凝胶柱最上方，为阳性，结果易于观察^[4]。全自动血型分析仪从加样到结果判读严格遵照既定程序，每一个样本对应一张可读条码的试剂卡，对于大批量样本来讲，样本信息和血型信息实现自动一对一，不易出现错配。此外，全自动血型分析仪在判读结果后，将试剂卡拍照，作为数字信息永久保存，这对临床和科研工作非常有利^[5,6]。

我们通过性能评价实验，表1显示MG12血型仪重复鉴定Rh(+)的A型血、B型血、O型血、AB型血和Rh(-)B型血样本结果100%一致，说明该血型鉴定系统性能稳定、重复性好。表2结果显示，MG12血型仪和Innova血型仪对比鉴定1162例ABO及Rh(D)等常规血型无1例差异($P>0.05$)，其中包括27例Rh(D)阴性、25例不规则抗体筛查阳性、34例血液病及肿瘤患者标本的鉴定结果均100%符合。表明MG12血型仪与Innova血型仪常规血型检测性能一致。

综上所述，MG12血型仪ABO及Rh(D)等常规血型重复性好、准确性高、性能稳定，可实现微量量化、标准化快速检测分析。加之该血型鉴定系统价格低廉，与进口配套全自动血型分析系统相比大大降低了成本，有优势用于临床诊治相关疾病。

参考文献

- [1] 田艳侠.全自动血型分析仪与手工试管法检测血型的比较研究[J].中国医药 报道, 2012, 9(30): 99-102.
- [2] 王敏, 王宝龙, 姚萍, 等.全自动血型仪在输血前检查中的应用[J].临床输血与检验, 2011, 18(2): 126-128.
- [3] 甘玮玮, 张添新, 原 敏.Erytra全自动血型分析仪的应用评价[J].国际检验学杂志, 2014, 55(22): 3112-3113.
- [4] 徐兴洋, 黄丽娟, 丁丽, 等.Autovue Innova血型全自动法与盐水手工法鉴定比对分析[J].海南医学, 2014, 25(11): 1679-1680.
- [5] 闫文强, 曹奎杰, 周金安.强生全自动血型配血仪与传统方法的应用比较[J].临床血液学杂志, 2011, 24(10): 577-578.
- [6] 赵艳梅, 强少强, 王照军.1种全自动血型分析仪检测情况分析.中国输血杂志[J].2013, 26(11): 1135-1136.

(输血装备专委会供稿)

「质量管理与计量测试」

MRI 远程质量控制检测方案的建立与实施

李梦^① 杜娟^① 赵鹏^① 种银保^{①*} 潘文才^① 胥川^① 吕思敏^① 周鼎^①

①第三军医大学第二附属医院医学工程科重庆 400037

[摘要]目的: 在军队医院开展 MRI 质量控制推广应用工作, 从而加强全军大型医疗设备质量安全监管工作, 提高大型医疗设备应用质量检测效率和能力, 同时提高医院自身对 MRI 设备的管理控制。**方法:** 总后下发检测通知, 各医院按照《军队医疗设备临床应用质量检测技术规范》采集数据, 通过军卫信息系统上传到卫勤机关, 再汇总到总后药检所检测中心进行数据分析, 并将处理结果反馈给医院。**结果:** 该方案初步探索并建立了 MRI 远程应用质量检测信息通路, 实现了 MRI 检测数据信息和图像信息等远程检测, 且实用有效、可操作性强、成本低。**结论:** 各医疗机构利用 MRI 远程质量控制技术, 可以提高本单位 MRI 的维护管理质量, 从而延长 MRI 寿命发挥其最大作用以及为临床医学诊断提供可靠依据; 同时通过将结果数据上传的方法, 提高了总后药检所对各医疗机构的 MRI 质量管理监管力度及质量, 对总体上把握 MRI 设备质量安全监管有辅助作用。

[关键词] MRI 远程质量控制; Magphan 模体; 检测参数; 设备管理

Establishment and implementation of MRI remote quality control plan tests

LIMeng, DU Jun, ZHAO Peng, CHONG Yin-bao, PAN Wen-cai, XU Chuan, LV Si-ming, ZHOU Ding

[Abstract] Objective: Carrying out MRI quality control work in military hospitals, so as to strengthen the large medical equipment quality and safety supervision, improve the large medical equipment application quality detection efficiency and capacity, and improve the hospital itself on MRI equipment management and control. **Methods:** The General Logistics Department of the PLA issued inspection notice, the hospitals collect data in accordance with the technology specification of military medical equipment quality of clinical, upload the information through the military health information system to the medical authorities, and then aggregated to the drug testing in the General Logistics Department of the testing center for data analysis, and the results will be fed back to the hospital. **Results:** The program initially explored and established the MRI remote application quality inspection information path, and it will be practical and effective, strong operability, low cost. **Conclusion:** The medical institutions using MRI remote quality control technology can improve the MRI unit's maintenance and management quality, which then prolong the life of the MRI unit to play the biggest role and provide a reliable basis for the diagnosis of clinical medicine; at the same time, through uploading the data, the General Logistics Department of the PLA can improve the quality of supervision and control to various medical institution's the MRI unit, grasp the overall quality and safety supervision for MRI equipment device has a supporting role.

[Key words] MRI remote quality control; Magphan module; test parameter; equipment management

[First-author's address] Department of Medical Equipment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China.

自1980年, FONAR推出了世界上第一台商用磁共振系统(0.04T)^[1]以来的二十余年里, 磁共振成像设备的发展十分迅猛。医学技术的进步, 使MRI的应用范围不断扩大, 它在医学诊断中所起的作用也愈加重要。与此同时, 医学应用的深入, 又给MRI技术的发展提出了更高的要求, 从而促使其进一步发展。磁共振设备是一种结构复杂的尖端仪器^[2], 日常工作中必须注意定期维护并进行质量控制和质量保证, 才能保证设备正常工作, 为医疗提供优良的影像, 因此MR的质量控制十分重要。MRI作为当今先进医学影像设备之一, 可实现对多数人体病变的明确诊断, 但其影像质量直接影响临床诊断结果。为了保证临床诊断效果以及设备正常运行, 获得优质影像, 质量控制工作已经成为MRI使用中的重要环节^[3]。MRI远程质量控制工作是一项新的开创性工作, 难度大, 要求高, 是在CT远程质量控制工作

的启示下开展的。作为部队医院，为进一步加强全军大型医疗设备质量安全检测效率和能力，已在全军60所医院开展MRI远程质量控制推广应用工作。

1 远程质控的流程及方法

1.1 MRI 远程质量控制检测流程

MRI 远程质量控制是在 CT 远程质控的启示下探索性的创新工作各医院根据计划按《大型医疗设备远程质量检测标准操作规程》进行环境参数测量、机械参数测量和图像性能检查。其流程如图 1 所示。

1.1.1MRI 远程质控检测具体实施过程及标准依据

①检测实施。各单位人员依据《军队医疗设备临床应用质量技术规范》和《大型医疗设备远程质量控制实施办法》进行检测，图像和数据从 MRI 设备传到医院信息中心；

②数据传输。医院信息中心接收数据，通过军事综合信息网将数据传到各大军区信息中心，各大军区信息中心再汇总到全军信息中心；

③数据分析。全军信息中心从军事综合信息网中抓取图像和数据传入总后药检所检测中心，最后由药检所人员进行分析管理并进行监督网络平台。

④结果反馈。检测中心人员根据《军队医疗设备临床应用质量技术规范》对上传检测数据分析后，出具远程质量检测报告。

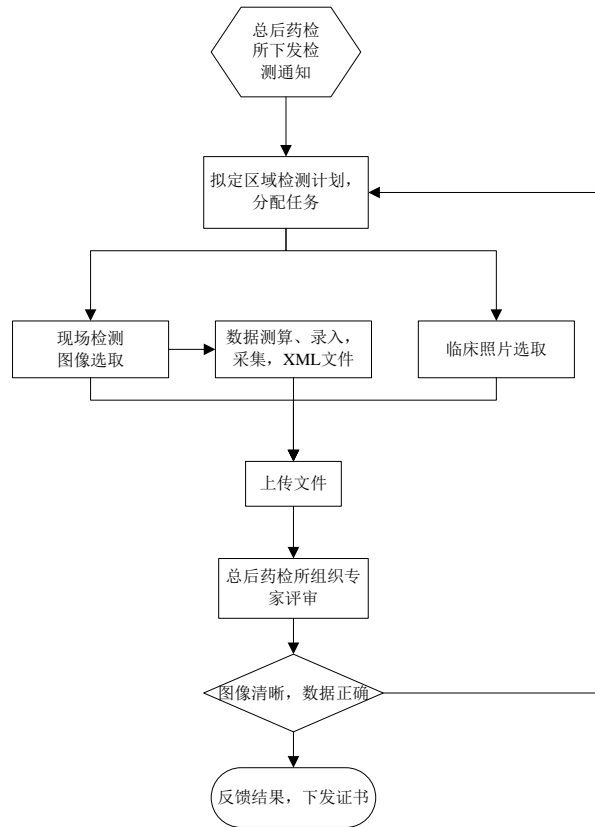


图 1 MRI 远程质控流程图

1.1.2 网络平台

整个流程中的主要传输网络是通过综合信息网和医院 PACS；数据上报传输系统是全军目前大多数医院正在使用军卫信息系统。各单位医院具备了统一数据传输平台，方便上传监督管理。

1.1.3 人员任务分工及检测周期

总后卫生部药品仪器检验所负责技术指导^[4]，研制 MRI 检测数据采集上报分析系统，拟制技术文件和培训教材，并负责检测人员技术培训；各军区药品仪器检验所负责区域内推广应用单位质量控制工作的技术指导；全军卫生信息中心和有关单位卫生信息中心负责提供 MRI 检测数据采集上报分析网络技术支持。MRI 远程质控是在 CT 远程

质控基础上的一项探索性的创新工作，需要医院医工、信息技术人员通力合作才能顺利实施^[5]。医学工程科工程师的主要职责是按照规范要求进行 MRI 质量检测，采集并上报检测数据，并进行持续质量改进工作；信息科工程师主要职责是负责网络通路的维护，将采集上报的数据按照要求传输到总后检测中心，由总后检测中心的工程师对数据进行分析，对图像做出评审并形成报告，做好监管、评判工作。军队医院 MRI 远程质量控制工作每季度组织一次，每年 1 月、4 月、7 月、10 月的第一周为军队卫生机构质量检测、数据上报时间。

1.2 MRI 质量控制检测方法

1.2.1 检测项目

检测方法依据《军队医疗设备临床应用质量检测技术规范》，主要检测项目有（1）环境参数检测：通过温度计、湿度计、大气压计测量环境温度、环境湿度、大气压强。（2）磁体系统：磁场强度；共振频率、射频发射增益。（3）图像性能参数：信噪比，图像均匀性，层厚、空间线性、空间分辨力、低对比度分辨力和纵横比。

1.2.2 检测设备及扫描条件

Magphan SMR170 性能测试体模：信噪比（SNR）、图像均匀性、层厚、空间线性、空间分辨力、低对比度分辨力和纵横比；THM1176 全向霍尔磁场强度计：磁场强度；共振频率、射频发射增益。

扫描条件包括：脉冲序列和扫描时间参数（TE，TI，TR），翻转角度，FOV 和矩阵大小，线圈，模体和模体材料，层数和层厚，层间隔，采集次数，射频功率设置和任何可用的图像处理。一般情况下，采用 T1 SE 序列扫描，具体参数为：TR/TE 为 500ms/30ms，扫描矩阵为 512×512，层厚为 10mm，FOV 为 25cm，接收带宽 RBW=20.48KHz 或 156Hz/pixel，采集次数为一次，不使用并行采集技术及失真校准，强度校正等内部校正技术。

现场扫描流程如图 2 所示。

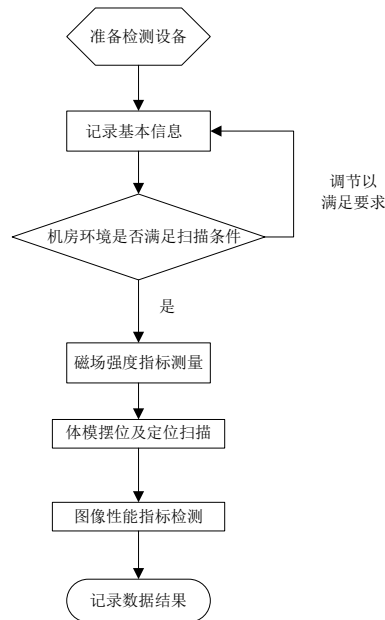


图 2 MRI 质控现场扫描流程

2 MRI 远程质量控制技术的局限及后期改善

MR 图像的质量控制是取得真实图像、优质图像的重要保证，它不仅能够保证设备的正常工作，也是保证医师的诊断准确性的基础。该方案中的数据分析有待实现数据自动采集及智能分析，存在检测人员的能力参差不齐及主观因素差异等问题，目前我科与协作单位正在进一步研发 MRI 成像性能自动测量软件，结合厂家参数和军队检测标准确定一套基准值，最终完成 MRI 质控检测数据采集与自动分析系统的编写，从而实现数据采集客观化，同时也能改善因检测人员不足带来的监管不到位的问题。

参考文献

- [1] 赵喜平. 磁共振成像系统的原理及其应用[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 391 - 403.
- [2] 邹广平, 郭淑宁. 关于 MRI 各项技术参数质量控制的分析研究及发展趋向[M]. 世界最新医学信息文摘, 2015,15(24),29-31.
- [3] 徐桓, 赵庆军, 张秋实. 一种磁共振成像装置质量控制测试体模的研制[M]. 中国医学装备, 2014,11(10),83-85.
- [4] 李怡勇, 米永巍等. 军队医院 CT 远程质量控制方案的研究与实践[M]. 医疗卫生装备, 2014,35 (2) ,12-15.
- [5] [2015]38 号, 中国人民解放军总后勤部卫生部, 《关于开展 MRI 远程质量控制推广应用工作的通知》, 2015.

第一作者简介: 李梦, 女(1988-), 在读硕士研究生, 助理工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科。研究方向: 医学计量与质量控制; 联系电话: 13038309818; E-mail: 466494657@qq.com

通讯作者简介: 种银保, 男(1963-), 硕士生导师, 高级工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科主任, 担任全军医学工程学专委会主委、中国医学装备协会常务理事、重庆市医疗器械学会理事长等。

* chongyinbao@163.net

(核磁共振成像装备技术专委会供稿)

颌颌面内固定系统验收质量管理中 PDCA 的应用与效果检验

范宝林^① 赵莹颖^① 高燕华^①

北京学口腔医学院口腔医院医学装备处 北京 100081

[摘要] 目的: 通过 PDCA 质量管理方法提高颌颌面内固定系统验收质量管理水平, 降低医疗安全风险, 实现高值耗材规范化管理。**方法:** 以某大学附属口腔医院为实施对象, 将 PDCA 用于提高颌颌面内固定系统验收管理水平, 对比 PDCA 实施前后的年度自查评估报告及验收记录。**结果:** 通过 PDCA 对颌颌面内固定系统验收质量管理进行提升后, 职能部门验收率由原来的 31.5% 升高到 98%, 高值耗材的流程得到了有效的控制, 颌颌面内固定系统满足了“双向追溯”的管理要求, 实现了精细化管理, 降低了医疗安全风险。**结论:** 通过科学运用 PDCA 质量管理方法可以辅助规范高值耗材的管理流程, 有效提高高值耗材管理水平, 减少管理粗放、监管薄弱等医疗安全隐患。

[关键词] PDCA; 颌颌面内固定系统; 质量管理

Application and effect evaluation of PDCA in quality management of craniofacial fixation system in acceptance stage

Fan Bao-lin Zhao Ying-ying Gao Yan-hua

[Abstract] Objective: Improving the quality management level of craniofacial fixation system in acceptance stage, and reducing the risk of medical security to achieve the standardized management of high-value consumables. Methods and Materials: The quality management method of PDCA was used by an affiliated stomatological hospital of a university in improving the quality management level of craniofacial fixation system in acceptance stage. The evaluation indicators of self-examination and assessment reports and acceptance records were compare before and after using the management method of PDCA. Results: After using the quality management method of PDCA, the acceptance rate was promoted from 31.5% to 98%, the process of high-value consumables management was effectively controlled, the management requirement of accurate traceability was achieved, fine management was realized, and the risk of medical security was reduced. Conclusion: Application of PDCA can help to standardize the process of high-value consumables, to effectively improve the management level of high-value consumables, and to reduce the medical hidden danger due to extensive management or weak supervision.

[Key words] PDCA; Craniofacial fixation system; Quality management

PDCA 质量管理方法是由美国著名质量管理学家戴明 (W.Edwards Deming) 博士基于沃特·阿曼德·休哈特 (Walter.Shewhart) 的“PDS (计划-执行-检查)”理论发展而来的。主要分为四个步骤, 包括: P (Plan) -计划, D (Do) -执行, C (Check) -检查, A (action) 处理^[1]。PDCA 主要应用于全面质量管理的持续改进, 运用科学的方法, 对现

状进行分析,找出问题,分析主因,制定计划,执行措施,检验措施执行效果,最终进行总结,并持续改进的一套科学、系统的提升管理质量的工具。

随着我国诊疗水平的高速发展,临床、教学、科研以及后勤管理服务部门对于医学装备配备的数量及要求也越来越多,而医学装备的管理水平,直接决定着医院的诊疗、教学以及科研活动能否顺利开展。PDCA作为广泛应用于企业绩效管理、建筑施工管理、信息系统安全管理等多个领域中的科学质量管理方法^[2-4],如今也被医疗卫生事业所青睐,用于提高管理水平,包括医疗质量管理、护理质量管理、药事管理、医用耗材管理等^[5-10]。但是,PDCA质量管理方法却很少应用于高值耗材管理,特别是颅颌面内固定系统管理。所以,本研究针对颅颌面内固定系统验收质量管理,通过PDCA科学质量管理方法,对验收管理制度、流程以及方法进行改良,以期达到规范化高值耗材管理、降低医疗安全风险的目的。

1 材料方法

1.1 一般资料

1.1.1 CQI 质控小组

成立多部门合作的CQI质控小组,设置组长1名,副组长5名,组员5名。医学装备处负责方案制定、颌面内固定系统出入库管理以及跨部门工作协调。颌面外科,作为方案可行性的把控部门。信息中心,负责信息平台技术支持。医务处,负责医政管理。护理部,负责护理质控管理。CQI小组主要负责提高颅颌面内固定系统验收质量管理方案的制定,具体措施的实施以及效果检验等所有与本研究相关的具体工作。

1.1.2 2013 年度评估报告

CQI小组针对2013年度颅颌面固定系统验收质量管理进行自查评估,形成2013年度评估报告,整理报告中发现的问题,作为PDCA实施前的依据及对照。

1.1.3 医学装备管理人员

选择除CQI小组以外,从事医学装备管理相关工作的9名工作人员,与CQI小组成员共同作为咨询对象,进行主因投票,查找造成颅颌面内固定系统验收质量管理不规范的主要原因。

1.1.4 2015 年度评估报告

CQI小组针对2013年度自查评估报告运用PDCA做出2014-2015年度整改计划,措施实施完毕后,对照2013年度报告提出的关于颅颌面内固定系统验收质量管理相关问题,检验效果,最终形成针对相关问题进行逐条回答的2015年度自查评估报告。

1.1.5 验收记录

收集2013年1月1日至2013年12月31日之间的所有颅颌面内固定系统验收记录,选取采购量排名前四位的品牌,每家品牌随机抽取50例验收记录作为对照组,收集2015年1月1日至2015年12月31日之间的所有颅颌面内固定系统验收记录,选取与对照组相同的品牌,并随机抽取相同份数的验收记录作为实验组,统计通过职能部门验收例数占总例数的百分比进行比较分析,作为PDCA效果检验的依据。

1.2 方法

1.2.1 PDCA 质量管理方法

1.2.1.1 P (Plan) 计划: 发现问题, 制定计划

1.2.1.1.1 发现问题

将2013年度自查评估报告中提出的问题进行如下汇总:(1)管理粗放,职能部门验收率低;(2)颅颌面内固定系统出入库流程缺乏监管,没有得到有效控制;(3)未能达到药监局对于植入性产品需实现“双向可追溯”的要求。

1.2.1.1.2 分析现状

收集2013年1月1日至2013年12月31日之间的所有颅颌面内固定系统验收记录,选取采购量排名前四位的品牌,每种品牌随机抽取50例验收记录,统计职能部门验收率,发现平均验收率仅为35.1%,无法满足医疗安全风险控制要求(表1)。

表 1:PDCA 实施前职能部门验收率

颅颌面内固定系统	样本量 (例)	职能部门	验收例数	职能部门	验收比例	平均验收率
品牌 A	50	14		28%		35.1%
品牌 B	50	20		40%		
品牌 C	50	12		12%		
品牌 D	50	17		17%		

1.2.1.1.3 根因分析

通过 CQI 所有成员的头脑风暴法，进行根因分析，绘制鱼骨图，找到导致颅颌面内固定系统验收职能部门收率低，入出库流程缺乏监管以及未能实现“双向追溯”的原因（图 1）。

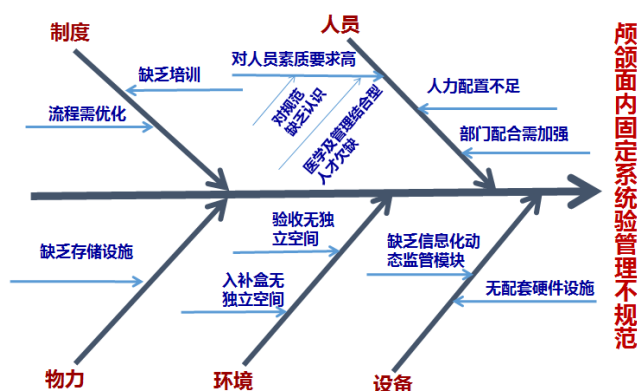


图 1 根因分析

1.2.1.1.4 找到主因，针对主因提出计划，制定措施

向 11 名 CQI 成员及 9 名医学装备管理人员共 20 管理人员进行咨询，并对所有根因进行主因投票，并按照得票顺序进行排序，选出得票累计占比≥80%的主要因素，发现主要因素主要有三个：（1）流程需优化；（2）无信息化管理平台；（3）人力配备不足，它们分别占比 35%、30%以及 20%，累计占比 85%（表 2，图 2）。针对三个主要因素制定实施计划，并绘制甘特图（图 3）。

表 2 主因得票

原因	投票得数	百分比(%)	累计百分比(%)
流程需优化（制度）	7	35	35
无信息化管理平台（设备）	6	30	65
人力配备不足（人员）	4	20	85
无相对独立空间（环境）	1	5	90
部门协同配合不足（其它）	1	5	95
无配套存储设施（物力）	1	5	100

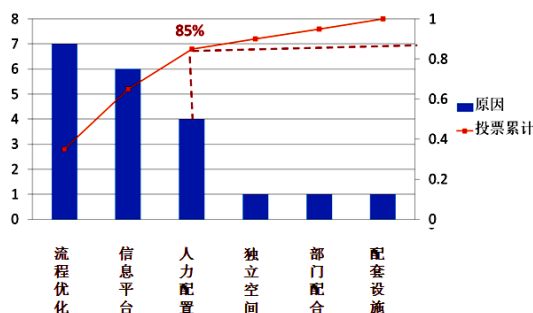


图 2 主因分析

措施	时间 (2014年4月-2015年3月)												责任部门	
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3		
前期调研	→													CQI小组
原因分析	→													CQI小组
流程优化	→													医学装备处
信息平台	→												信息中心	
人员配备									→					颌面外科、 医学装备处
效果确认										→				CQI小组
效果检查											→			医学装备处
总结经验												→		CQI小组
继续追踪												→		医学装备处

图 3 计划实施甘特图

1.2.1.2 D (Do) 执行。根据计划组织实施

1.2.1.2.1 优化流程

制定工作流程，编制岗位职责，包括高值耗材专职人员、手术室专职人员、采购人员、使用记录人员、信息中心以及供应商的高值耗材入出库管理岗位职责。

1.2.1.2.2 搭建信息化平台^[11]

设计信息化动态监管模型，搭建信息化平台，实现从颅颌面内固定系统的验收入库，到出库结算的物流全过程动态监管。

1.2.1.2.3 配备职能部门专职人员^[11]

配备专门人员，进行颅颌面内固定系统的采购申请、入库验收，盘库管理，以及按照出库规律进行入盒补盒管理（仅针对需灭菌的颅颌面内固定系统）。

1.2.1.3 C (Check) 检查

1.2.1.3.1 检验措施执行前后，针对 2013 年度自查评估报告中所提出的关于颅颌面内固定系统验收质量管理存在的问题是否已经得到解决，2015 年度自查评估报告中是否均有体现。

1.2.1.3.2 比较措施执行前后，职能部门验收率之间的差异

1.2.1.4 A (Action) 处理

通过措施执行过程中所遇到的问题，以及措施执行前后结果的分析，总结经验，为持续提升高值耗材管理水平提供依据。

1.2.2 统计学方法

本研究所涉及的数据均应用统计学软件 spss17.0 进行处理、分析，计数资料用 χ^2 检验， $P < 0.001$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运用 PDCA 前后，颅颌面内固定系统验收管理情况对比

2013 年度自查评估报告作为 PDCA 实施前的评估结果，2015 年度自查评估报告作为 PDCA 实施后的评估结果，将两者进行对比，发现 2013 年度报告中提到的关于颅颌面内固定系统验收质量管理过程中存在的问题均得到了解决，问题包括：（1）管理粗放，职能部门验收率低；（2）颅颌面内固定系统入出库流程缺乏监管，没有得到有效控制；

（3）未能达到药监局对于植入性产品需实现“双向可追溯”的要求。经过 PDCA 对管理制度、流程、方法及人员配备的改善。首先，职能部门验收率得到了显著提高，其次，颅颌面内固定系统入出库流程得到了全程动态监管，最后，实现了植入性耗材对病人的“双向可追溯”（表 3）

表 3 运用 PDCA 前后，颅颌面内固定系统验收管理情况对比

	职能部门验收情况	入出库流程监管情况	双向可追溯情况
2013 年度评估报告	缺乏验收	缺乏监管	无法实现
2015 年度评估报告	验收率高	全程监管	可以实现

2.2 运用 PDCA 前后, 颅颌面内固定系统验收记录情况对比

将 2013 年度 200 例颅颌面内固定系统验收记录作为 PDCA 实施前设为对照组, 将 2015 年度 200 例颅颌面内固定系统验收记录作为 PDCA 实施后设为实验组, 将实验组与对照组进行对比, 比较职能部门验收率。2013 年度职能部门验收例数为 63 例, 验收率为 31.5%。2015 年度职能部门验收例数为 196 例, 验收率为 98%。结果表明实施 PDCA 后, 颅颌面内固定系统的职能部门验收率明显高于实施 PDCA 前, 差异具有统计学意义 ($P < 0.001$), 见表 4

表 4 实施 PDCA 前后, 颅颌面内固定系统职能部门验收情况对比

组别	总数 (例)	职能部门验收数	
		例数 (例)	验收率 (%)
对照组	200	63	31.50
观察组	200	196	98.00
χ^2			193.75
P			<0.001

3 结论

近年来, 随着我国综合国力的提升, 对外交流的进一步发展, 我国公立医院的管理水平也逐步接近欧美发达国家, 但与之相比, 国内医院的管理模式还是过于粗放, 制度落实情况也有待加强, 如果在公立医院之间大力推行耗材精细化管理, 可以有效推进医院管理模式由粗放式管理向精细化管理的转变^[12]。由于国家卫计委对于《三甲医院评审标准细则》的评价标准遵循 PDCA 原理, 体现持续改进的原则, 因此 PDCA 质量管理方法已成为医院提高核心竞争力的管理工具和方法^[10]。

本文将口腔医院高值耗材颅颌面内固定系统作为研究对象, 针对其验收质量管理进行分析探讨, 将 PDCA 质量管理方法应用于高值耗材精细化管理中, 对颅颌面内固定系统入库过程进行科学管理, 从而达到持续改进高值耗材规范化管理的目的。事实证明, 通过科学化的管理方法可以有效提高高值耗材的管理水平, 能够在短时期内满足上级单位的管理要求, 达到医疗安全风险防控的目的。

PDCA 实施后的颅颌面内固定系统职能部门验收率虽然已达到了 98%, 较 PDCA 实施前的 31.5% 有了大幅度的提高, 但却仍然没有到达 100%, 证明还有提升空间。分析未能达到 100% 验收率的原因可能与现阶段部分科研用颅颌面内固定系统还无法通过信息化管理平台进行统一管理有关, 它将作为下一次提升验收质量管理中的待解决问题, 使持续改进颅颌面内固定系统验收质量管理落到实处。

参考文献

- [1] 白丽霞,赵东嵩,张小娜,等.PDCA 提升医院质控水平的应用与思考[J].医院管理论坛,2015,32(3):30-32.
- [2] 许婉莹.PDCA 循环在企业绩效管理中的应用[J].企业改革与管理,2016,(4):82.
- [3] 林熙.基于 PDCA 的建筑施工机械设备管理初探[J].企业技术开发,2015,34(29):164-166.
- [4] 常金玲.基于 PDCA 的信息系统全面质量管理模型[J].情报科学,2006,24(4):584-587.
- [5] 范梦澜,王刚.基于 PDCA 循环建设医疗质量管理平台[J].软件产业与工程,2013,(5):27-31.
- [6] 梁屏好,孟萍.FOCUS-PDCA 模式在乳腺微创手术患者护理中的应用[J].临床医学工程,2014,21(5):651-652.
- [7] 钱维强.运用 PDCA 理论加强基层医院药剂科管理探究[J].中医药管理杂志,2014,22(1):70-71,74.
- [8] 杨小燕.PDCA 护理管理对白血病患者 PICC 护理效果影响[J].中国医药导报,2012,9(12):154-155.
- [9] 顾掌生,吴巍.医疗质量管理中 PDCA 循环运用[J].医院管理论坛,2014,31(8):35-38.
- [10] 区凌冰,李雪斌,韦元秀,等.医疗耗材多层次无缝隙 PDCA 循环监管模式设计与实践[J].右江医学,2013,41(5):778-780.
- [11] 高燕华,范宝林,曹战强.物流全程动态监管模式在口腔颌面外科高值耗材管理中的应用探讨[J].中国医学装备,2014,11(7):72-73.
- [12] 陶金枝.精细化管理在医院耗材管理中的应用探讨[J].中国外资,2014,(4):112,114.

作者简介: 范宝林 (1978-), 女, 研究生, 高级工程师, 主要从事医学装备管理工作 E-mail: sbkfb1@163.com
(口腔装备与技术专业委员会)

医用多参数监护仪在临床中应用与质量控制

Medical multi-parameter monitor application and quality control in clinical

徐子琴

福建省立医院 Fujian Provincial Hospital Xu Ziqin

[摘要]本文主要叙述医用多参数监护仪在临床应用及其主要技术性能的质量控制。随着传感器技术,电子技术,计算机技术,数字信号技术的不断发展,医用监护仪的功能也不断增加,它能够进行连续、长时间、自动、实时检测到人体的心电、呼吸、血压、血氧饱和度等生理参数并通过计算机分析处理后,实现多别类信息自动报警、自动记录。

[Abstract] This paper describes the medical multi-parameter monitor quality control in clinical applications and its main technical performance. With the continuous development of sensor technology, electronic technology, computer technology, digital signal technology, medical monitors functions are increasing, it can be continuous, long, automatic, real-time detection of the human body ECG, respiration, blood pressure, blood oxygen saturation and other physiological parameters, and through the computer analysis processing, and other types of information more automatic alarm, automatic record.

[关键词] 临床应用, 心电、呼吸、无创血压、血氧饱和度质量控制

[Key words] Clinical applications, ECG, Respiration, Noninvasive blood pressure, Oxygen saturation quality control.

0 引言

近年来我国医疗卫生事业取得了举世瞩目的伟大成就,医学装备性能精度的提高,促进了医疗卫生事业的发展,今后人们在享有卫生保健的同时,将更加关注医疗装备在临床中应用和质量问题。近期国家卫生和计划生育委员会对医学装备在卫生领域使用中,提出了更高的质量要求,先后发布了:《医疗器械临床使用安全管理规范(试行)》条例;《医疗卫生机构医疗装备管理办法》(2011)24号文件;《关于加强医疗机构医疗设备管理的工作的通知》(2013)391号文件,对医疗卫生领域临床使用医学装备的质量问题提出了新的要求。为了认真贯彻国家卫生和计划生育委员会的文件精神,福建省立医院领导高度重视医学装备的质量控制问题,于2010年成立了医学装备质量控制中心,投资100万元建立医学装备检测实验室并购买了美国福禄克公司制造的高精度的检测设备。对医院在临床使用中的高风险医学装备:多参数监护仪、心脏除颤起搏器、呼吸机、麻醉机、高频电刀、输液泵、注射泵进行了质量控制,取得了明显的成果,降低医疗风险,有效保证了人体健康。下面叙述在临床使用中风险最大使用率最高的多参数监护仪的临床应用和质量控制。

1 多参数监护仪的临床应用

1.1 多参数监护仪的功能

随着传感器技术,电子技术,计算机技术,数字信号技术的不断发展,医用监护仪的功能也不断增加,它能够进行连续、长时间、自动、实时检测到人体的心电、呼吸、血压、血氧饱和度等生理参数并通过计算机分析处理后,实现多别类信息自动报警、自动记录。为临床医生提供更好的患者病情分析情况,从而采取适当的治疗措施,获得最佳的治疗效果,因此多参数监护仪在临床上应用越来越受到临床医务工作者的重视,同时根据临床诊疗的需要,多参数监护仪已经在不同临床治疗场所得到了广泛的应用。

1.2 多参数监护仪在中心监护病房(ICU)、心脏监护病房(CCU)对危重病人的监护

为了提高护理质量,减少并发症,降低危重病人的病情发展,应用多参数监护仪对危重病人进行实时监测:心电(ECG),随时掌握危重病人是否产生心率失常;实时监测:有创血压或无创血压,了解危重病人是否有严重的血压下降或升高;实时监测呼吸,记录每分钟的呼吸数,呼吸压力、呼吸量,了解危重病人呼吸肌和肺的力量与效率,以判断危重病人是否存在呼吸障碍;实时监测血氧饱和度,通过对血氧饱和度的测量,可以及时了解危重病人的血氧含量,为临床提具有十分重要治疗和施药依据;实时监测体温,了解病人是否存在炎症及病情发展的变化;实时监测脉搏,掌握心脏搏动变化的情况。

1.3 多参数监护仪对手术中的病人监护

在手术室病人进行局部麻醉或者全身麻醉后进行外科手术治疗,为了保障手术治疗的效果和患者的生命安全,

多参数监护仪实时对手术患者进行监护，在手术过程中主要对手术患者的循环功能密切相关的血压、体温、心率、血氧饱和度的监护，更有效地为麻醉师提供评价手术患者镇静水平，合理使用麻醉药物的剂量，提高手术患者复苏能力。

1.4 多参数监护仪在普通病房对患者的监护

在手术患者复苏后转移到普通病房时，仍然需要详细观察患者的术后生理变化情况，多参数监护仪主要是检测患者的呼吸系统和心脏循环系统的稳定性，如有突发紧急状态，立即实施治疗或抢救。

2 多参数监护仪的质量控制

多参数监护仪在临床上得到广泛的应用，但由于经常使用造成的多参数监护仪的主要技术监测功能失效，影响了临床治疗效果和治疗安全，为了保障多参数监护仪在临床上的正常使用，确保其主要性能的准确、可靠，每年对多参数监护仪的主要技术性能 - 心电 (ECG)、呼吸 (RESP)、无创血压 (NIBP)、血氧饱和度 (SpO₂) 进行质量控制。

2.1 心电 (ECG) 质量控制

用福禄克 Prosim8 生命体征模拟器对多参数监护仪心电监测性能的：幅值、脉波、方波、三角波、正弦波、R 波、高 T 波抑制、心率精度、幅值精度进行测试。检测结果多参数监护仪心电性能主要质量问题是：产生波形信号失真、变形。产生上述信号失真、变形的原因主要是心电导联线老化，造成对外界干扰屏蔽能力降低，应更换心电导联线。

2.2 呼吸 (RESP) 质量控制

用福禄克 Prosim8 生命体征模拟器对多参数监护仪呼吸监测性能的：速率、波形、比率 (吸气呼气)、电阻变化、精度增量、基线、精度基线、呼吸导联、呼吸暂停选择进行测试，检测结果多参数监护仪呼吸性能的主要质量问题是：呼吸波形太弱，观察不清。由于呼吸信号是由心电电极采集，是经心电导联线传输。因此造成上述质量问题的主要原因是导联线老化，需要更换导联线。

2.3 无创血压 (NIBP) 质量控制

用福禄克 Prosim8 生命体征模拟器对多参数监护仪无创血压性能的：血压计 (压力计)、压力源、无创血压模拟、漏泄、释压进行测试，检测结果多参数监护仪无创血压性能的主要质量问题是：血压袖带气囊老化造成漏气，监护仪内部通气管道与气泵的对接口松动。解决上述质量问题：一是更换血压袖带气囊，二是由工程技术人员对监护仪进行维修调校。

2.4 血氧饱和度 (SpO₂) 质量控制

用福禄克 Prosim8 生命体征模拟器对多参数监护仪血氧饱和度性能的：O₂ 精度、心率、传递、脉冲幅值、干扰进行测试，检测结果多参数监护仪血氧饱和度性能的主要质量问题是：血氧值偏低、不准确。由于血氧饱和度是通过血氧探头一侧的光电二极管发射光信号，穿过患者的手指，被另一侧接收管接收，并转换成电信号，从而检测出患者的血氧饱和度值。所以产生血氧饱和度值偏低、不准确问题，主要原因是：发射管或接收管老化，建议更换血氧探头。

通过对多参数监护仪的质量控制与检测，使我们及时发现多参数监护仪在日常使用中存在着各种质量隐患，及时得到校准和修复。为了保证医疗质量，应加强对在用多参数监护仪进行质量跟踪，使其保持良好的监护性能，更好地为临床治疗服务。

作者简介：徐子琴(1951-), 大学本科，高级工程师，福建省立医院，主要从事医学装备计量管理和医学装备质量质控方面的研究工作。联系电话：13805058997/13314927887, E-mail: 3094880348@qq.com

手术带电器械的检测与管理探研

袁林

扬州市第一人民医院 江苏扬州 225001

[摘要] 手术带电器械在使用存在一定的安全隐患,而在有关规范中只有要求,没有具体的操作方法,为适应临床具体的实际需求对手术带电器械进行规范操作流程进行探讨并研发适应医院具体情况的绝缘检测仪,并可对其进行相应的管理,能符合医院在临床纠纷中进行责任倒置要求的需要。

[关键词] 手术器械; 绝缘性; 检测; 管理; 追诉

Detection and management of surgical instruments

YUANLING, Yangzhou First People's Hospital, JIANGSU YANGZHOU 225001

[Abstract] Surgical electric devices in use has certain security hidden danger, and only in the relevant specification requirements, no specific operation method. In order to adapt to the needs of clinical specific for electric equipment operation standard operation process were discussed and research and development to adapt to the specific situation of the hospital's insulation tester And can carry on the corresponding management, which can conform to the requirements of the hospital in clinical disputes responsibility inversion.

[Key words] Surgical instruments, insulation, detection, management, prosecution

1 引言

在目前手术中使用的设备、器械种类越来越多,其中许多都是通电的,其带电程度有高有低,这给手术者、被手术者都带来一些安全隐患,易出现医疗纠纷,严重者发生医疗事故,而这些有时是非常难说清楚,特别在举证责任倒置时,医院处于的地位非常不利。最近在南京一大型医院(三甲)发生刚经计量部门检测的高频电刀是符合相关规定,但在使用过程中出现患者灼伤的事故。事故发生后,医院认为:该高频电刀是刚经计量部门检测符合规定,在正常使用中不应该出现患者被灼伤的事故,只有可能该高频电刀存在问题,计量部门没有能检测出来,应该是计量部门的问题;省计量部门再次对该高频电刀进行检测,还是符合相关规定,最终也送上海有关部门检测,仍然符合相关规定。现还没有最终的结论。像高频电刀类的设备在手术中使用,必然要用导线连接设备与患者,如连接线或器具等出现缺陷,也必然将造成一些不必要的隐患。

医护人员和患者接触该类器械日益频繁,然而使用手术带电器械的每个环节都包含一定程度的内在不安全性,操作、设备、程序或系统方面的问题都可能造成不良事件。特别是当手术带电器械与人体接触时,由于人体体液是电解质溶液,人体组织是电解质导体能够导电^[1],会有电流流经人体,这种电流被称为漏电流或接触电流^[2]。

1.1 现状

国家规定县级以上人民政府计量行政部门所属或者授权的计量检定机构,在医疗卫生方面,对列入《中华人民共和国强制检定的工作计量器具目录》的计量器具实行定点定期检定。但是,开展检测所需要的条件和能力落后于医疗设备的快速发展,对于强制检定设备进行计量检定的同时,没有对高风险设备进行质量检定^[3],强制检定项目也无法覆盖所有腔镜器械类、电刀类、电源线类等手术带电器械。医院如何检定监测这些手术带电器械的合格率、完好率,如何制定相关制度规范、标准流程以及如何利用监测结果等,在当前医院管理中尚存在盲区。

单纯地对手术带电器械进行性能检测和质量控制,并不能保证最大限度的降低相关不良事件发生的可能性。事实上手术带电器械的检查、检验、校准、使用、保养、维护等管理每个作业环节都可能产生失误或技术上存在“短板”。当失误发生或技术短板暴露又刚好形成串联关系时,医源性损害事件必将发生。为了确保手术带电器械处于良好状态,保障使用质量,需要从系统整体上改进,提前制定好手术带电器械各种安全工作处理方案和相关计划^[4]。然而,国内缺少系统化控制流程与标准,各家医院也缺少分析、评估,难以确保医疗器械始终处于安全良好的工作状态。

医疗器械及其耗材所需花费的金额很大,在保证医疗器械安全性和有效性的前提下,如何有效控制成本,是医

院必须考虑的一个问题^[5]。据测算,外科手术量每年达到2万台的医院,平均每年使用一次医用高频电刀约7200只,患者需要支付约144万元。如果能够重复使用清洗消毒合格的高频电刀,预计每年将节约成本??万元。如何科学地管理该类医用耗材、减少浪费、降低成本、保障临床使用,是现代医院管理者需要考虑的问题。

最高人民法院《关于民事诉讼证据的若干规定》“因医疗行为引起的侵权诉讼,由医疗机构就医疗行为与损害结果之间不存在因果关系及不存在医疗过错承担举证责任”。手术带电器械相关医疗损害事件中,医方一般仅能提供病历资料;医疗器械符合注册、生产、经营许可;医疗器械的合格证明;医疗器械采购、销售符合规定证明等机构和结果类材料。实际上,仅仅这些证据,并不足以证明特定某次医疗活动过程之中,手术带电器械是安全良好的;也不足以证明医疗机构的医疗行为与患者损害结果之间不存在因果关系。

带电器具造成的伤害有:1、电击伤;术中呼吸、心搏骤停;2、电烧伤;3、器官烧伤;4、电伤医务人员,或引起手术室失火

在我国8个省市共20多家医院进行检测,30%~40%的器械处于漏电状态,部分医院检出率更高。腔镜器械及电刀类器械漏电现象较为严重。

1.2 临床需要

在医院护理要求中也有相关的规定,但是只是有规定要作相关的检测或检查,如何检查,标准是什么都没有说明,临床上没有参照,不知如何办。如:中华人民共和国卫生行业标准WS310.2-2009医院消毒供应中心第二部分清洗消毒及灭菌技术操作规范:5.6.3 带电源器械应进行绝缘性能等安全性检查。对于带有绝缘层的器械应当进行绝缘性材料完整性能的检测。——AS、NZZ4187:2003第82页;

(带电源器械)清洗消毒后,应采用技术设备进行电流泄漏检测。——AORN围手术期的标准及推荐实践,2010版,第435页,第XV条。

对在用的设备的计量有相关的规定,也有专门的国家机构来进行法定计量,但对于手术中使用的器具是没有规定要作检查或检测,更没有操作的规范。《手术带电器具检测与管理》是为保证手术的安全,并解决现在临床上所要克服的问题而进行的研究与探讨,同时研制适合医院临床上急需解决的困难——手术带电器具检测仪。

手术带电器具按用途分类:腔镜器械类、电刀类、电源线类。

手术带电器具按结构可分为两大类:1、硬式或棒式;2、软式或线式。在生产厂家都有专门的设备对其进行检测,但在医院是没有专门针对医院使用的专用设备,经查对棒式有手术带电器具可有替代的设备,而对线式目前国内、国外还没有,供医院使用的检测设备。一般来说棒式手术带电器具要检测的长度不超过30CM,并且能用目测进行,但对线式手术带电器具的长度可达200~300CM,甚至更长;同时也不能用目测进行。对线式手术带电器具检测通断用万用表测量就可,但想用万用表测量绝缘性是行不通的,只能进行专门的设计。

2 开展研究

2.1 研究目的

为保障手术带电器具的使用安全,消除安全隐患,保证操作者、患者的安全,规范手术带电器具使用要求(清洗、消毒后,灭菌前检测),制定医用电气设备安全利用制度流程和技术标准等,最大限度地控制医用电气设备潜在的风险,规避可能导致人体伤害的各种有害事件;研发适用于医院的手术带电器械触体绝缘性能检测仪器,防范医疗器械引起的医源性损害及其他意外事件、保障设备安全和管控医疗风险。

2.2 主要研究内容

(1)根据现代医院安全管理的要求,对二、三级医院的医用电气设备,尤其是手术带电器械接触体应用管理现状进行调查,运用管理学方法分析其中存在的问题与不足,并进行分析总结,查找可改进的环节,进行工作流程设计;

(2)以安全、有效、经济为前提,针对带电源器械触体绝缘性能安全检测,研发适合医院并可以重复使用的专用检测工具;

(3)制定手术带电器械触体绝缘性能检定控制标准,和作业制度、流程并加以实施,对照系统化控制措施实施前

后手术带电器械使用情况，验证本项目关于触体绝缘性能检定的系统化控制共性关键性技术。

手术带电器具的管理在相关规范中只有一句话：“带电源器械应进行绝缘性能等安全检查”。这不但在我国是这样，国外也是同样。但在医院内如何进行绝缘性能等安全性检查？检查应包含什么内容？用何种手段？检测的参数（数据）？-----。为规范检查标准、制定检测方法是本课题的主要目的。

对一次性的手术用具，由于是生产厂家供给一般来说，医院不必要再进行使用前的检测。但现在由于我国的国情所限，医院中使用的器具多数是重复使用的，作为一类特殊的器具——手术带电器具具有其非常大的特点，更应特别对待。

手术带电器具由于在使用中必需存在电源供给，形成电流回路，电压供给有高有低，许多电压远超过人体安全电压（36V），能造成人员的伤害。手术带电器具从结构上一般可分为：硬式（棒式）和软式（导线）；从使用方面可分为：腔镜类、电刀类、电源类。手术带电器具具有一个共性：外层设有绝缘层。绝缘层如有损坏或绝缘层绝缘性能下降就可能造成事故。所以手术带电器具安全性检查最生要的核心就是对手术带电器具绝缘性能的检测。对手术带电器具的通断用万用表的电阻档一测量就知，非常的简便。但要想检测手术带电器具的绝缘性能就非常困难，如用兆欧表一点一点的检测是不可行的，手术带电器具只要的一点绝缘性能下降，该手术带电器具就不能使用。除非使用专业的检测仪器，如绝缘检测仪。专业设备使用可靠，但价格贵（15 万元以上）使用不方便，来符合医院使用环境，为适应医院使用及要求要根据医院使用的特点，设计一套医院应用的专用设备，医院对手术带电器具的绝缘性能检测目的是：能否继续使用。绝缘正常——可继续使用；绝缘性能下降或有损坏——停止使用。停止使用的手术带电器具一般作报废或经修理。修理方法正常采用：重新更换绝缘层。如腔镜类。

怎样对手术带电器具进行绝缘性能的检测，按不同的器具性质处理、检测方法也有所区别。硬式（棒式）采用拖拉式连续检测；将手术带电器具与检测仪连接手术带电器具的二极：1、中心金属；2、外表层绝缘层。从头开始检测，拖拉手术带电器具直到末端，不间断检测其绝缘性能。该方法可利用现有的绝缘检测仪为基础。

软式（导线类）：现有的设备不能充分进行检测，主要是不能适合医院的实际状况，检测仪连接手术带电器具中的金属和外表绝缘层，开启检测仪，一次就能检测完成，因该方法是针对医院若具体情况专门设计的，要使用该方法就必须设计对应的装置。

检测仪的组成及功能：

组成：主控板、显示板、功率选择（电压）、检测方法选择（连续或一次性）、记录、报警值设定、报警显示、开启、结束、输入、输出。

当使用“连续”检测方法时，按开启键后，开始检测，在按结束键后，方才停止检测，如若在检测过程中发现某处绝缘值小于设定值时，检测仪发出报警，并停止检测，显示检测值；当使用一次性检测时经一段时间的检测后，自动停止检测，显示检测值，如若在检测过程中发现某处绝缘值小于设定值时，检测仪发出报警。

管理：对每一件要进行检测的器具生成一个唯一的编号，编号可由三端倪组成：1、检测的日期（年月日）；2、检测次序（可是当天的，一般用三位数）；3、器具的英文简写（字母，一般用二个字母）；4、检测人员的编号。从编号中就可识别出该器具何时进行检测的，由于编号是唯一的，如若在使用中出现问题可进行追溯，能方便举证责任倒置。

将每天进行检测的数据均利用计算机进行管理，如选用的检测仪具有能进行检测数据记录管理功能的可和计算机连接，如若无些功能，计算机只能实行人工输入，记录的数据应包括：1、编号；2、检测方法；3、检测电压；4、实际检测值；5、其它。

3 创新之处

(1)角度创新。消除医疗安全管理中各级医院普遍存在的手术带电器械触体绝缘性能监测盲区；

(2)制度创新。建立并完善医用电气设备临床应用安全保障系统化控制流程与标准，通过构建手术带电器械可重复使用触体安全保障体系实现卫生服务资源的最大化利用；

(3)设备创新。针对不同类型手术带电器械，研发适用于医院内可重复使用触体的新型绝缘性能检测器具；

(4)其他。丰富与提升医用电气设备相关医疗损害事件中医方举证的形式与能力。

参考文献

- [1] 陈琨.人体的电流效应[J].卫生职业教育, 2011, 4: 58-159.
- [2] 金玉博, 金鑫, 江南.医用电气设备漏电流测量装置的研究[J].中国医疗器械信息, 2014, 07: 44-46.
- [3] 朱永丽, 王学军, 朱丹丹. 医院获得医学计量专项授权的探索[J]. 医疗卫生装备, 2016年, 37(1): 130-131, 142.
- [4] 潘涛.医院安全管理的综合系统应用探究[J].中国卫生产业, 2015, 10: 79-80.
- [5] 黄莉婷, 董齐, 陆朝甫. 我国医疗器械临床应用监测与评价现状[J].中国医疗设备, 2013, 11: 63-66.

作者简介: 袁林 男 1956年10月 大学 研究员级高级工程师 江苏省扬州市第一人民医院; 主要从事在用医疗设备应用开发与改进工作; 研究医学计量在医疗管理中的计量与医疗质控的关联; 医学计量与医疗纠纷的法律关系。

联系电话: 18205271832, E-mail: 18205271832@126.com

医疗设备质量控制工作面临的新问题及其改进思路

郑小溪, 李怡勇, 刘 倪

广州军区武汉总医院医学工程科, 武汉 430070

[摘要] **目的:** 寻求优化医疗设备质量控制工作的方法, 提高质量控制对于改善医疗设备质量和临床诊疗质量的实施效果。**方法:** 结合质量控制检测数据、医疗设备相关不良事件, 以及临床诊疗工作实际, 分析质量控制工作面临的新问题。**结果:** 医疗设备质量控制工作需要针对性解决存在的具体问题, 并从落实全面质量控制管理体系建设、确立规范的质量控制评价体系、开展质量控制新技术研究等方面加以优化。**结论:** 及时解决面临的新问题, 优化相关工作能够有效提高质量控制实施效果。

[关键词] 医疗设备; 质量控制; 不良事件; 医疗质量。

New Problems and Improvement Ideas of Medical Equipment Quality Control

ZHENG Xiao-xi, LI Yi-yong, LIU Ni

Department of Medical Engineering, Wuhan General Hospital of Guangzhou Command, Wuhan 430070, China

[Abstract] **Objective:** To seek the ways of how to optimize medical equipment quality control, and improve the implementation effect of quality control for improving the quality of the medical equipment and clinical diagnosis and treatment. **Methods:** Analysis the new problems of quality control, combined with quality control testing data, adverse events of medical equipments, and practical work of clinical diagnosis and treatment. **Results:** Medical equipment quality control need to solve specific problems pertinently, and optimized from implementation of comprehensive quality control management system, establish standardized evaluation system and carry out research on new technologies of quality control, and so on. **Conclusion:** Solve the new problems promptly and optimize related work can effectively improve the effect of quality control.

[Keywords] Medical equipment; Quality control; Adverse event; Medical quality.

2006年,按照原总后勤部卫生部的部署安排,军队率先在4家师级医院开展了卫生装备质量控制试点工作,2008年起先后颁布了《军队卫生装备质量控制实施通用要求(试行)》、《军队卫生装备质量控制检测技术规范(试行)》等系列法规和标准,质量控制工作在军队医院全面展开。前期主要开展了监护仪、注射泵、输液泵、除颤起搏器、呼吸机、麻醉机、高频电刀、血液透析机等8类医疗设备的质量控制工作。2012年起,原总后勤部卫生部又专门组织技术力量,研究并分步实施了CT、MRI的远程质量控制检测工作,进一步拓展了质量控制工作的实施手段,实现了上级管理部门对部分大型医疗设备质量控制的实时监管^[1]。十年来,军队卫生装备质量控制工作取得了长足的进步,积累了丰富的经验,有效提升了医疗设备的应用质量,确保了临床诊疗安全。与此同时,地方医疗机构也积极学习、借鉴军队医院的实践成果,广泛开展高风险医疗设备的质量控制工作,军队卫生装备质量控制工作的经济效益和社会效益愈加明显。

随着医疗设备质量控制工作的不断深入,相关检测数据和检测结果不断积累,行业间的交流不断加强,加之相关信息的不断公开,与医疗设备质量控制工作有关的问题也不断出现。质量控制工作在肯定成绩的同时,更需要着手思考和解决遇到的实际问题。

1 存在的问题

1.1 质量控制仍停留在狭义阶段

医疗设备的质量控制从狭义上讲,主要是指为确保医疗设备应用质量和量值准确,应用专业的检测设备和检测模体,检测在用医疗设备的各项性能指标、技术参数是否满足相应技术规范、设计标准等的要求,借以评估医疗设备质量、确保医疗质量及医疗安全^[2]。广义上讲,主要是指通过在医疗设备质量保证方面的指挥、控制、协调、检测等一系列活动,在设备设计、制造、安装、使用等全过程中,排除所有可能影响医疗设备诊断、治疗效果的不良因素,保持设备良好状态,实现最优的质量,有效质量病人,不断追求经济效益和社会效益的最大化^[3]。显而易见,广义的医疗设备质量控制是我们工作的目标和方向,但目前开展的医疗设备质量控制工作,仍停留在狭义阶段。按照上级管理要求,各级医院成立了医院医学计量管理委员会负责质量控制工作,同时也按照有关要求制定了年度实施方案,落实了年终总结,上级主管部门定期落实对各级医院质量控制工作的检查,但是医学工程部门在质量控制方面的工作重点更多的集中在完成检测任务,医疗设备使用部门则更多的是被动的接受任务。管理部门和各级医院难以按照广义定义中的要求,协调生产厂家、采购部门和使用科室,落实全面质量控制。

1.2 合格率的提升没有带来不良事件的下降

随着近年来质量控制工作的不断深入,加之各级管理部门的重视程度不断提升,质量控制工作取得的成效也是显而易见的,各类文献报道中,均显示质量控制范围内医疗设备的整体检测合格率都在逐步提升。但是,从近三年国家食品药品监督管理总局发布的医疗器械不良事件报告中,会发现部分医疗设备质量控制检测合格率的提升,却没有降低不良事件的发生率。

表 1 4 种医学装备的不良事件报告情况

设备名称	不良事件报告数占报告总数的百分比		
	2013 年	2014 年	2015 年
多参数监护仪	1.6%	2.0%	2.13%
输液泵/注射泵	1.1%	1.0%	1.69%
心电图机	0.4%	0.5%	0.51%
呼吸机	0.3%	0.3%	0.38%

从表 1 中可以看出国家食品药品监督管理局收到的有关多参数监护仪、输液泵/注射泵、心电图机、呼吸机的不良事件报告的比例均处于上升态势,但上述几类设备的质量控制检测合格率却不同程度的提升,仅笔者所在医院,2014 年的检测合格率比 2013 年分别提高了 5.8%、24.3%、12.3%和 2.8%。而从其他三甲医院的检测结果来看,开展质量控制工作以来,检测整体合格率提升 20%以上的也比较多,部分医疗设备的检测合格率达到了 98%以上,甚至 100%^{[4]-[6]}。这似乎与质量控制工作控制医疗设备应用风险,降低不良事件的发生率的目标相违背,其中深层次的原因和问题值得我们去思考和解决。

1.3 质量控制检测脱离了临床实际应用

作为致力于不断减少医疗相关不良事件、改进医疗服务、优化临床实践的专业机构,美国紧急医疗研究所(Emergency Care Research Institute, ECRI)在近五年发布的医疗技术十大风险中,先后将输液泵的误操作、呼吸机管路误接和设置不合理、工作人员忽视监护仪等设备的报警等有关人员操作的问题列为危急患者生命安全的关键因素。美国医疗产业促进会的数据也显示,每年 8000 多例的医疗器械不良事件中,有 1/3 属于使用问题^[7]。浙江省卫生厅曾组织一次急诊医务人员的除颤仪操作考核,共有 41 家医疗机构派员参加,结果显示 32%的医务人员操作不正确^[8]。众所周知,医疗设备的质量控制是一项系统工程,医疗设备的使用者对设备应用质量至关重要,医疗设备的质量控制,有着严格的环境要求和操作规范,这与临床医疗工作实际有很大差别,因此质量控制工作必须考虑到临床医疗实际环境和患者的实际状态,脱离了使用者和受试者的理想环境下取得的质量控制检测合格率,对临床医护人员和患者的说服力将大打折扣,也无法保证医疗设备的应用质量。同时由于质量控制工作脱离了应用对象和使用者,其结果对临床医疗质量的参考意义到底有多大,也值得我们深入探讨。

1.4 检测结果对操作规范提出了挑战

近年来,随着各级医院发展建设的加快,加之临床诊疗对医疗设备的依赖程度的不断提升,医院医疗设备的持有量不断增加,质量控制的检测任务相应加重,仅笔者所在医院,目前每年的质量控制检测任务达到 1500 余台次,同时每台次设备的检测参数也比较多,如:监护仪 21 个、麻醉机 42 个、呼吸机 48 个,等等。如此巨大的工作量,已经成为医学工程部门的巨大负担。然而,笔者分析了所在医院 2013-2014 年的检测结果,发现了其中存在值得推敲的地方:首先,输液泵/注射泵的阻塞报警时间、监护仪的单次血压测量时间、麻醉机的强制通气频率和吸入氧浓度、呼吸机的强制通气频率和吸呼比的检测合格率等始终保持在 100%,也有其他医院的检测结果显示呼吸机的呼吸频率、吸气压力水平等指标的检测合格率始终保持在 100%^[9]。其次,在对监护仪血氧饱和度的检测中,能够发现设置值为 85%、88%和 90%时,检测结果之间具有相互预测的特点,即只要其中一项设置值检测合格或不合格时,其他两个设置值的检测结果也会相应为合格或不合格。另外,按照操作规范要求,在监护仪无创血压的测量中,当设定值为最高的 150/95 (114) mmHg 时,不合格率最高,达到了 13.8%,高于该项指标 7.3%的不合格率;当呼吸机的潮气量(VCV 模式)设置在 200ml 的最低值时,不合格率最高,达到了 19.2%,远高于该项指标 9%的不合格率。

上述这些检测结果,给了我们提出了几个值得探讨的问题:首先,既然有些指标始终合格,是否还有必要将其设置必检项;其次,既然不同参数设置值所反映的检测结果是一致的,是否还有必要逐个设定、逐个检测;另外,既然过高或过低的设置值所获得的检测结果已经偏离了设备本身的性能状况,是否有必要将其作为衡量设备质量状况的指标。当然,上述问题的提出还需要临床诊疗实际作为支撑,但无疑已经向质量控制管理者和实施者提出了优化质量控制操作规范的必要性和思路。

1.5 检测合格率对临床诊疗质量的意义难以评估

从实际检测数据来看,质量控制工作确实改善了医疗设备的完好率,确保了医疗设备的应用质量,但是截止至目前,尚没有任何统计数据能够直观反映出其对临床医疗质量的确切影响。比如:目前要求的三个月一次的CT远程质量控制,相比于原总后大型医疗设备应用质量检测中心每两年一次的CT应用质量检测,究竟对CT诊断的阳性率提高了多少;麻醉机、高频电刀检测合格率的提升对于医生手术质量的影响究竟有多大;有关医疗器械不良事件的发生,与设备质量控制的管理究竟有多少相关性;等等。医疗设备质量控制是医疗质量管理体系的重要环节,但是由于缺少评价方法和直观评价指标,使得医疗设备在医疗质量管理中的地位难以确立,其监管成效也难以落实,因而也就无法避免未经检测的设备“带病”工作、检测不合格的设备难以停用、临床科室配合程度和重视程度不高等诸多情况。

1.6 质量控制对采购、生产环节的影响力没有形成

综上所述,质量控制工作的根本出发点是为了确保医疗设备质量,进而提升临床医疗质量。但是,从目前的工作实际来看,医院医疗设备质量控制工作仅仅实现了对设备投入使用后的质量的控制,与质量控制体系要求的对生产、制造、采购环节的影响还没有显现。究其原因,主要是目前缺少质量控制工作配套的评价手段,质量控制工作的合力还难以形成,对生产者的影响力或者威慑力还不够。有关文献曾报道,在除颤监护仪的质量控制检测中,发现某品牌的某一型号除颤监护仪同步模式下的延迟时间合格率整体较低^[10];在高频电刀的质量控制检测中,发现某品牌高频电刀在达到一定使用年限后,其输出功率的误差均超出设定值,而其他指标则相对稳定^[11]。类似这种问题的出现,极有可能与设备部分部件的生产工艺或设计理念有关。但是,一所医院的检测数据说服力毕竟非常有限,难以说明某品牌或某一型号的整体质量情况,对采购管理部门的指导意义还不足,因而也就难以促使生产厂家改进设备生产质量。因此,迫切需要运用大数据理念,汇总、分析质量控制检测结果,把检测中集中出现的某一品牌、某一规格的设备的突出问题突出反映出来,从而给采购管理部门提供决策依据,进而促进生产厂家改善医疗设备生产质量。

2 建议

上述有关医疗设备质量控制工作面临的新问题,并没有否定质量控制工作的重要性。首先,质量控制工作改进了医疗设备应用质量,确保了临床诊疗质量,降低了医疗器械风险;其次,质量控制工作改变了医院管理者、使用者对医疗设备应用质量的认知,拓展了医院医学工程部门的职能,促进了医学工程学科建设。当然我们更应该看到质量控制工作仍然存在诸多需要改进的地方,出了需要解决上述问题的针对性措施外,还应该在以下方面加快改进步伐。

2.1 落实全面质量控制管理体系建设

质量控制管理体系建设是一个老生常谈的问题。随着近年来质量控制工作的深入开展,各级管理部门对质量控制工作的认识程度普遍有所提升,质量控制检测的落实成效也在逐年提高。但是,质量控制仍然没有纳入医院质量管理体系和绩效考核体系,没作为衡量临床科室管理和医疗设备管理水平的考核评价指标,同时医疗设备质量控制在医疗质量管理体系中,也没有达到类似护理质量、病例质量、用药质量的地位^{[12][13]}。质量控制管理体系的建设在医院层面上,不能仅仅只落在管理者身上,更不能只关心质量控制检测任务的完成率和检测合格率,需要改变临床使用者对医疗设备的质量控制理解、认识和重视程度。此外,当前的医疗设备质量控制管理体系,在采购环节和生产者的管理上基本处于空白状态,缺少详细的指导方案和考核标准。构建全面质量控制管理体系对于医院管理者、设备使用者和质量控制工作的操作者都任重道远。

2.2 确立规范的质量控制评价体系

如前所述,笔者结合所在医院质量控制检测结果开展了部分检测数据的分析,说明了一些问题,但仍停留在表面上,尚不能反映出质量控制工作的整体情况,通过数据说明问题的力度还不够。因此,迫切需要研究确立规范的质量控制评价方法和手段,同时建立基于大数据的质量控制评价体系,建立有关检测数据的统一分析和比对方法,及时整合各级医疗机构的检测数据,从而形成行业合力,使得检测中出现的问题能够集中、及时显现,真正让医疗设备质量控制从根本上影响医疗设备全生命周期的质量。与此同时,医疗设备质量控制的重点在临床应用环节,其最终目的也是为了促进临床诊疗质量的提高。因此,不能单纯的站在设备合格率、完好率的角度开展工作,它需要更多直观的数据来支撑其对提高临床诊疗质量的实际意义。因此,必须开展有关质量控制与临床诊疗质量的关系研究,从而有效评价质量控制工作的现实意义。

2.3 加紧开展质量控制新技术的研究

首先,要对现有质量控制操作规范重新进行审视,合理优化质量控制实施步骤。如上所述,质量控制工作从试点运行开始已有十年时间,其有关检测项目、参数设置等是否必要、是否合理,需进一步研究论证。同时由于各类医疗设备新技术的出现,原有操作规范是否与当前新技术的匹配也需要进一步探讨。其次,要充分利用新技术,开发质量控制工作的新手段、新方法;近年来全军推广的CT、MRI远程质量控制工作,依托了当前发达的信息网络技术,实现了检测数据的实时上传和自动分析,确保了CT、MRI定期质量控制检测的落实,以及应用质量的客观性,节约了大量人力、物力和财力^[14]。因此,我们也应当加紧对其他质量控制检测项目的新技术研发工作,进一步减轻工作量,优化检测手段,确保检测结果的客观性。再次,要充分结合当前医疗工作实际中所反应的新问题,拓展质量控制工作实施范围。比如:从国家食品药品监督管理总局发布的近三年医疗器械不良事件报告中,能够明显感觉到电子血压计、血糖仪、婴儿培养箱等医疗设备的不良事件发生率持续居高不下,有些甚至超过了呼吸机相关不良事件的发生比率,对患者安全的影响同样重要。临床诊疗工作是一个整体,临床诊疗工作不能单纯依靠护理质量、用药质量等,也需要医疗设备质量的支撑,而针对医疗设备的质量控制,也要尽可能覆盖更多的影响临床诊疗质量的项目上。

参考文献

- [1] 李怡勇, 李涛, 米永巍. 基于 Matlab CT 空间分辨率自动检测的研究与实践[J]. 医疗卫生装备. 2012, 33(12):14-15.
- [2] 周丹. 医院医疗设备质控体系的建立与实施[J]. 中国数字医学, 2010, 2(8):18-25.
- [3] 周秀华. 关于医疗设备计量工作的探讨[J]. 医疗装备, 2010, 23(10):42-43.
- [4] 王琦, 种银保, 张椿, 等. 加强卫生装备质量控制的做法和体会[J]. 医疗卫生装备, 2012, 33(7): 115-116.
- [5] 张红远, 曲海燕, 张祖进, 等. 军队中心医院医疗设备质量安全监测分析研究[J]. 医疗卫生装备. 2014, 35(1): 114-116.
- [6] 孙国华, 王洪伟, 张弛, 等. 医院医疗设备质量控制管理与实践. 医疗卫生装备. 2013, 34(6): 118-119
- [7] 曹德森. 医疗设备风险认识及控制. 中国医院院长, 2008, 19:60-62.
- [8] 卢爱国. 医疗设备质量管理体系的构建[D]. 重庆. 第三军医大学. 2012.
- [9] 李国栋, 陈基明, 季家红. 探讨医用呼吸机的质量控制[J]. 中国医疗设备, 2012, 27(11): 78-80.
- [10] 钱正瑛. 除颤心电图监护仪质量控制研究[J]. 中国医疗设备. 2012, 27(11): 75-77.
- [11] 彭志方, 杨俊. 高频电刀的质量控制检测结果分析及探讨[J]. 医疗卫生装备. 2012, 8(11): 110-111.
- [12] 王波, 马志军, 万桐林. 将医疗卫生装备纳入医院质量控制体系的实践与思考[J]. 医疗卫生装备. 2011, 32(8):109-110.
- [13] 崔骊, 崔亮, 黄韬. 建立质量控制管理体系 保障医疗设备安全[J]. 中国医学装备. 2011, 8(9):60-61.
- [14] 李怡勇, 米永巍, 李涛, 等. 军队医院 CT 远程质量控制方案的研究与实践[J]. 医疗卫生装备. 2014, 35(2):12-15.

作者简介: 郑小溪 (1983-) 博士在读, 主管技师, 广州军区武汉总医院;

研究方向或从事主要工作: 医疗器械管理, 联系电话: 13397199010, E-mail: wzbme06@126.com

浅析 PDCA 循环法在病理技术质量管理中的应用

陈双乐

解放军一一八医院检验病理科

[摘要] **目的:** 减少病理切片镜下折皱现象, 完善切片质量, 提高科室技术质量。**方法:** 采用 PDCA 循环管理法, 通过将本院 2014 年 5 月至 7 月间以及 2015 年 5 月至 7 月间的病理切片整理, 观察, 分析讨论等步骤进行总结。**结果:** 设立 2014 年 5 月 1 日至 2014 年 7 月 1 日间的病理切片为对照组, 2015 年 5 月 1 日至 2015 年 7 月 1 日间病理切片为研究组, 对照组共切片 445 张, 镜下观察优片数 353 张, 优片率: 79.3%; 研究组共切片 693 张, 镜下观察优片 628 张, 优片率 90.6%, 比较差异有统计学意义。**结论:** 结合了 PDCA 循环法的研究组在统计过程中发现切片的优片率明显高于对照组, 使病理科室技术水平得到提高, 实现了 PDCA 循环法对科室在技术层上的管理应用。

[关键词] 病理科; PDCA; 切片

病理技术是病理诊断不可缺少的前提, 其制片的优劣是影响疾病诊断的关键所在^[1]。根据国家卫生部医疗机构对医院病理科的人员配备设置比例要求, 再对比笔者所处医院的情况, 住院床铺达 500 多张, 病理医师仅 2 人, 技术人员仅 1 人的现象, 保障病理科室从技术到诊断的管理质量十分困难。在这种人员配置不平衡的状态下, 为了每一份病理诊断报告的准确性, 乃至每一张病检切片的质量完善都要求科室人员对日常病理工作需要不断思考和不停的实践。自医院搬迁至新大楼以来, 科室工作环境的改善也促使着科室技术工作要不断提高; 且因为医院等级检查计划的贯彻, 病理科作为能直接关系临床疾病诊断的风向标科室, 更加要从科室技术方面积极改进和提高。为进一步提高科室技术质量工作, 采用 PDCA 循环法进行工作干预, 现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取我院 2014 年 5 月 1 日至 2014 年 7 月 1 日及 2015 年 5 月 1 日至 2015 年 7 月 1 日时间段制作的病理切片作为研究对象。将 2014 年 5 月至 2014 年 7 月病检的切片 445 张切片作为对照组; 自 2014 年 12 月科室开展 PDCA 循环模式后, 再选取 2015 年 5 月至 2015 年 7 月间的病检切片 693 张作为研究组。两组切片标本均含胃镜、肠镜、声带、阑尾、乳腺、宫颈、甲状腺等组织。所有切片在 LEICA DMLS 显微镜下观察统计, 比较两组间的优片率, 观察是否

有统计差异。

1.2 方法

1.2.1 计划阶段 (P)

(1)原因分析。切片是病理疾病诊断的唯一线索。病理切片的完整作为病理报告发放的基础,然而在面对大都是手工操作的病理技术中,在病理诊断镜下时常观察到切片折皱现象,这常常导致病理诊断医师对切片病变部位的不确定性和漏诊。反复观察本院科室制片流程,确定摊片环节出现问题,需要改进。

(2)制定预期目标

对摊片过程中的问题加以改善,减少镜下切片折皱现象,保障切片的质量,持久提升科室技术工作。

(3)统计学分析

对实验中的对照组和研究组两组数据进行率的检验。

1.2.2 对策实施 (D)

(1)规范两组切片的制片环节。

包括取材、脱水、包埋、切片、染色、封固等环节。在每次出片后对切片进行自检,随机抽取同批中的 20%张病理片子镜下观察统计优片率及劣片率。统一晾干管理,后期进行分类归档。

(2)原有对照组摊片方式

将切片展开在冷水上再过渡到热水中,等待组织完全展开,捞取。现结合 PDCA 循环法对研究组的摊片方式进行改善,研究组摊片方式:将原有冷水换成 2%酒精水溶液,再遵循从酒精水溶液上过渡到热水上,等待展开,捞取。

1.2.3 检查阶段 (C)

收集两组标本切片,显微镜下进行观察,同期数据整理,通过有未结合 PDCA 循环法的优劣率比较结果,观察发现,对照组统计优片率为 79.3%,而研究组在改善摊片方式后,其优片率大大提升到 90.6%,根据率的检验, μ 值为 2.23, $P < 0.05$,具有统计学意义。实现了 PDCA 循环法对病理技术的质量管理提升。

1.2.4 行动 (A)

循环管理中发现摊片的酒精水浓度 2%属于估值,还需加强回顾,查找资料,总结最适当的酒精水溶液浓度。也有业内专业人员表明,对于切片的折皱现象,可以通过调节水浴温度进行改善^[2],但是同样的操作在实际工作中对于扁桃体、淋巴结、甲状腺等特殊标本并不能完全杜绝折皱现象。现反思切片折皱现象不仅是只受到酒精水溶液浓度的这一原因影响,摊片时间及石蜡熔点与水温高低、组织本身质地都会加剧片子的折皱现象。

2 结果

质量保障是医院每个科室发展的一项重要内容。利用 PDCA 循环法在病理制片过程中增加酒精水溶液摊片步骤。从研究组数据中可以看出此改善方法对于病理切片质量有显著的提升帮助。考虑到配置酒精水溶液的操作简单,成本不高,成片后镜下观像清晰明了,是值得作为病理科室技术工作中的一项标准推行。

4 讨论

PDCA 管理模式作为管理界的一种盛行方法,被临床护理广泛应用到工作实践中。然而医技科室对此管理法的应用还不普遍。PDCA 法是由美国质量管理专家戴明总结出来并适用于任何一项合乎逻辑的工作程序^[3]。它作为一个持续性、螺旋性的动态平衡质量提升管理方法^[4],只要操作者明确的将工作中所遇见的问题提出,查找产生问题的所有可能性原因,进行准确的原因分析。制定有针对性的改善计划,在持续一段时间内操作执行。即实行改善后的计划后一段时间,回顾性进行检查,便会发现原本工作中的问题在不断被改善和提高。然而对于不同的计划产生的改善结果往往也不一样。有的工作问题在经过一次 PDCA 循环法计划就可以得到完全改进;而另一种结果指进行一次 PDCA 的循环计划还不足以解决提出的问题,抑或经过此次计划后衍生出另一问题,这就要将新问题纳入另一个崭新的 PDCA 循环计划中再进行改进。

结合我国病理行业发展现状分析,不同地区,不同级别的医院存在的病理科室现状都不一样。二级综合及以下有开展病理科的医院普遍发现存在科室人员少,设备条件差,开展项目单一,工作环境污染严重等现象^[5]。病理技术质量很难从中得到保证和达到标准。相比较起三级医院病理科科室人员均衡,且可利用半自动脱水机,自动染色机,自动封片机等高昂医疗设备来实现统一操作,实际情况中很大的避免了工作人员在主观上操作导致的误差。长

期资源不均衡的发展以及不重视是导致病理行业不全面发展的重要因素,这使得不同医院的病理科室总体水平发展缓慢^[6]。笔者所处医院病理科与检验科相属同一科室,部分病检标本前期归检验人员接收,由于专业知识的限制,在接收过程中偶有出现不规范接收标本,这无疑加大了后期病理制片的难度。

纵观病理科工作流程发现,导致最后不完整出片的可能因素很多^[7],而本文结合 PDCA 循环法,从病理科技术工作中的摊片环节进行分析,发现此环节的改善可以进一步提升技术质量,解决制片过程中因摊片产生的折皱现象。从原有设备基础上改变摊片方法而得以质量的改善,提高。此管理法可以着眼于整个操作环节的任一部分,使管理者具体的加以回顾,以小环扣大环,循循渐进的完善管理的每一个细节,从而实现量变带来质变的科室管理理念。

参考文献

- [1] 李玉刚.浅析对病理技术进行质量控制的常见问题及对策[J].当代医药论丛.2015.9-10
- [2] 李文军.基层医院病理科常规制片技术的规范和质量控制[J].中国社区医师:医学专业, 2012.14.251-252
- [3] 黄学忠.PDCA 循环在检验科规范化管理中的应用[J].国际检验医学杂志, 2012,3(16):2044.
- [4] 梁兴梅,戴信秀.PDCA 管理模式在建设优质护理服务示范病房中的运用体会[J].检验医学与临床, 2013.10.2056-2056
- [5] 许宇翔,顾江.病理工作者职业污染危害与防护[J].汕头大学学报, 2012.25.227-229
- [6] 李红芬,范钦和.国内临床病理学的现状与分析[J].江苏医药, 2010,2221-2222.
- [7] 张中海.病理切片制作过程中常见问题及原因探析[J].吉林医学, 2011,32.5761-5761.
(临床检验装备技术专业委员会供稿)

医院医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系建立的探讨

郑龙

解放军第三医院院部 陕西 宝鸡 721004

[摘要]目的:建立完善医院医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系,做到有效监测并及时干预,保证医疗器械在临床使用过程中的安全性。**方法:**医疗器械在使用过程中除了发挥其主要功能外,也可能会引发安全事故。确保医疗器械使用的安全性是医疗器械管理和使用者必须要考虑的因素。为了防止在临床诊疗过程中发生医疗器械不良事件,医疗机构必须重视医疗器械的质量安全控制。**结果:**加强医疗器械质量安全控制和不良事件监测,有效降低了医疗器械临床使用过程中的安全风险。**结论:**医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系的建立完善,可有效保证临床使用中的安全性。

[关键词]医疗器械;质量安全控制;不良事件;监测体系

Hospital medical equipment quality safety control and the discussion of setting up adverse event monitoring system/zheng Long

[Abstract] Objective: To establish and improve the medical equipment quality and safety control and adverse events monitoring system, so that effective monitoring and timely intervention to ensure that the medical device in clinical use in the process of security. **Methods:** The medical equipment in the course of addition to its main function, but also may lead to accidents. Ensure the safety of medical devices are medical devices and consumer factors that must be considered. In order to prevent the medical device adverse events in the clinical diagnosis and treatment process, the medical institutions must pay attention to quality and safety control of medical devices. **Results:** Strengthening the safety of medical devices quality control and monitoring of adverse events, effectively reducing the clinical use of medical devices in the process of security risk. **Conclusion:** The quality and safety of medical device adverse event monitoring and control system perfect, can effectively ensure the safety of clinical use.

[Keyword] Medical Devices; Quality and safety control; Adverse events; Monitoring system.

1 前言

医疗器械是用于临床诊疗工作中进行检查、诊断、护理、治疗或功能替代，并与人体密切相关的特殊产品。因临床条件的限制、产品设计制造工艺、产品说明书存在错误或缺陷等原因，医疗器械在使用过程中可能存在不可预见的安全隐患，医疗机构只有通过建立有效的质量安全控制及不良事件监测体系，才能确保医疗器械安全有效的使用、运行^[1]。

根据 ISO14971《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》标准中对医疗器械安全的定义，安全是指免除于不可接受的损害风险，而风险包含有损害发生的概率和损害的后果，损害又是指身体创伤或对人体健康造成的伤害，或是对财产或环境的损坏。所以医疗器械在使用过程中的安全性是首要考虑因素^{[1][2]}。医疗器械质量安全控制及不良事件监测是指对医疗器械定期进行质量安全控制检测，及时发现处理存在的安全隐患并对已发现的不良事件进行记录、收集、分析、评价和控制、处理的全过程，是医疗器械全程监督管理的重要组成部分。为了防止和减少同类医疗器械不良事件的重复发生，避免给更多的患者带来不必要的痛苦和损害，建立完善医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系是非常必要和紧迫的工作^[3]。

2 建立完善医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系的意义

2.1 有效预防减少医疗事故的发生，保障临床诊疗工作的安全开展

病人是医疗器械直接或间接接触者，一旦出现不良事件就可能危及患者的生命或者需要通过治疗才能避免机体功能的永久性损伤。例如某医疗机构的骨科病人，在治疗骨折过程中使用了某一品牌的可吸收螺钉，事后两年在切口和骨折均已正常愈合的情况下，出现因该可吸收螺钉生物相容性欠佳无法完全吸收导致局部组织呈炎症反应；一些病人在使用呼吸机过程中因设备存在安全隐患，设定的治疗参数与实际参数不符，导致胸闷休克甚至个别患者死亡等情况的发生。通过对医疗器械进行质量安全控制检测并对不良事件及时监测和报告，就可迅速地采取有效措施，尽可能避免或减少类似不良事件的发生和蔓延，最大限度地保障患者、器械使用者及相关人员的人身安全。

2.2 为医疗器械在临床诊疗使用过程中的监督管理和改进提供依据。

医疗机构是医疗器械最直接的使用者，只有医疗机构建立完善的监测体系和管理机制，及时发现医疗器械使用中出现的隐患，才能为在临床诊疗中存在安全隐患的产品采取有效的控制措施及制定或修改相应的监督管理制度提供有效的科学依据，对促进医疗器械产品在临床中的合理使用具有现实意义^{[4][5]}。

3 目前医院医疗器械质量安全控制及不良事件监测管理工作存在的问题。

3.1 医疗机构各部门意识观念不强。

首先是医院管理层对医疗器械质量安全控制及不良事件监测和报告重视程度不高，医院领导更多着眼于医疗业务的开展，对医疗器械质量安全控制及不良事件监测工作的制度制定、资源人员配备等方面不够重视，奖惩力度不足；其次是医院设备管理部门监管不到位，意识不强，只重视设备采购和维护，而疏于对医疗器械质量安全控制及不良事件的信息收集和汇总上报；最后，由于临床医护人员作为直接使用操作者，担心因报告医疗器械使用过程中出现的质量安全问题，使患者产生误解和猜疑，惹来医疗纠纷，招致引火烧身；另外，由于一些患者医疗知识缺乏，也无法辨别不良反应是自身因素导致的还是医疗器械引起的，从而不能如实向医生反映^[6]。这一系列的共同因素阻碍了医疗器械质量安全控制及不良事件监测和报告工作的开展。

3.2 医疗器械专业人员缺乏和相关专业知识欠缺

医疗器械所涉及学科门类较多，产品品种、规格分类较细，医疗器械产品具有数量大，品种广、学科多的特征。按照现有医疗器械分类规则，我国医疗器械共分 43 个大类，259 个亚类，涉及物理（声、光、电...）、化学、材料学等基础学科，更有各学科的交叉和综合应用，技术领域之广、技术水平之高是其他行业所不能比拟的^[7]。而目前很多医疗机构缺乏医疗器械或生物医学工程专业人员，管理人员对医疗器械尤其是高风险的医疗器械有关的管理法规和技术规范了解不够，在整个监管过程中不能有效发挥作用。而临床医护人员对医疗器械质量安全控制及不良事件监测的相关制度、报告机制、上报流程缺乏了解，不清楚医疗器械不良事件的监测重点，遇到疑似病例不知道该不该报、该报什么、怎么报.....如此等等问题都影响了医疗器械质量安全控制及不良事件监测和上报工作的开展^{[8][9]}。

3.3 医院内部监测机构、制度不完善。

目前，大多数医疗机构普遍存在重药轻械、重医疗轻保障的观念，大部分医疗机构未建立规范的医疗器械质量安全控制及不良事件监测制度，也没有专业人员进行这方面的工作。以致于不能对医疗器械进行定期的质量安全控

制检测并及时发现安全隐患采取有效地控制措施,从而导致发生不良安全事件。因此建立有效的监测体系,可最大程度地规避不良事件的发生,并对临床使用医疗器械发挥积极的预警作用^[10]。

4 医院建立完善有效地医疗器械质量安全控制及不良事件监测体系

4.1 制定完善的、具有针对性的制度措施。

为了保证医疗器械质量安全控制工作的定期进行和不良事件监测的有效开展,医院设备器械管理部门应制定相应的质量安全控制检测及不良事件监测的管理制度和操作流程,成立专门的组织机构,根据医院的具体情况进行合理安排,争取将质量安全控制检测工作常态化并形成检测、监测、上报、调查、分析等完整体系,定期总结汇报^[11]。

4.2 加强医疗器械临床使用安全的宣传,定期组织临床科室学习相关的业务知识。

要经常对临床医护人员开展医疗器械质量安全控制及不良事件相关制度和业务知识的培训,提高大家对医疗器械质量安全控制及不良事件监测工作重要性的认识,结合临床科室的实际工作,及时发布近期质量安全控制及不良事件警示信息,在全院营造监测氛围^[12]。

4.3 严格把好医疗器械的采购、验收和使用维护管理关。

对采购进院的每一件医疗器械都能有据可查,保证对医疗器械的来源、去向、使用时间和方式,及使用医生和患者、不良反应发生时间与症状等每个环节的可追溯性,为医疗器械质量安全控制工作及下一步不良事件的评价、控制提供详尽的资料。对临床高风险医疗设备要进行验收前、使用中、维护后的全程质量安全控制检测,将临床使用安全风险降到最低^{[13][14]}。

4.4 对医疗器械进行分类质量安全控制管理和不良事件处置,有效控制使用风险,提高工作效率。

医院应根据医疗器械的种类及临床应用范围划定风险等级,对于风险等级较高的医疗器械应确定为重点检测、监测对象。如临床高风险医疗设备呼吸机、高频电刀、输液泵等;医疗器械耗材内固定植入物、血管支架、介入性治疗导管、一次性使用无菌医疗器械等应列为重点监测对象,在日常临床使用过程中要加强观察和记录,全程进行质量安全控制检测和监测,力争将临床使用安全风险降到最低,一旦发生不良事件也能做到及时发现,迅速上报,有效控制^{[15][16][17]}。

5 小结

医疗器械质量安全控制及不良事件监测是项长期性、系统性的工作,只有医院各部门意识观念一致、高度重视,积极完善监测管理体系,把各项制度措施落到实处,这样才能保证这一工作在医院的有效开展,使医疗器械在临床使用中充分发挥出自己应有的作用,同时可将其使用风险降到最低,从而保障患者及医护人员的安全,创造和谐平安的医院^[18]。

参考文献

- [1]汤黎明,吴敏,沈苏静等.浅谈医院医疗器械不良事件监测与管理体制建立[J].医疗设备信息 2006(2):41-42.
- [2]黎桂清.医院医疗器械不良事件监测影响因素及改进措施浅谈[J].生物医学工程与临床 2014(6):586-587.
- [3]王建波.医院医疗器械不良事件的监测[J].《医疗装备》2015(15):92-93.
- [4]田月洁,李泮海,谢彦军.医疗器械不良事件报告质量控制的实践与探讨[J].《中国药物警戒》2011(11):651-653
- [5]俞侃斌,田复波,罗玉琪.建立医院医疗器械风险管理体系的研究[J].《医疗装备》2015(7):92-95
- [6]朱波.基于麦肯锡7S管理模型的医疗器械不良事件监测管理的研究[J].《中国医学装备》2013(7):34-37.
- [7]徐恒,许锋,田金.医院重点平台医疗设备巡检与质控的信息化探讨[J].《中国医学装备》2011(4):13-16.
- [8]张健,张永寿,曲岳.医疗设备质量控制的探讨[J].《中国医学装备》2009(10):44-45.
- [9]宋晓英,张静,张晨霞.加强医疗设备质量控制 提高医院医疗质量水平[J].《医疗卫生装备》2013(8):108-108
- [10]崔亮,崔骊,苏燕平等.医疗设备质量控制体系的构建研究[J].中国医学装备,2012,7(5):38-40.
- [11]刘建新,苏磊,冯璐琼等.呼吸机质量安全控制探讨[J].中国医学装备,2012,9(3):45-47
- [12]戴捷,苏磊.医疗设备维修管理的研究[J].中国医学装备,2010,7(12):35-38.
- [13]袁卫英,刘建新,苏磊.浅谈医疗设备使用安全[J].中国医学装备,2012,9:112-114
- [14]刘建新,苏磊,邢家伟等.高频手术设备检测仪应用的相关探讨[J].医疗卫生装备,2013,34(7):123-125

- [15]兰建忠,王炜,魏朝兰等. 医院医疗设备的使用管理[J].中国医学装备, 2007, (08):287-288.
- [16]张振梅,张秀英.加强医疗耗材库房管理控制医院感染[J].医疗卫生装备, 2011,32(10):134-135.
- [17]佟欢欢.浅谈医疗卫生机构医疗器械不良事件监测与管理[J].《中国医疗设备》2009(1):47-48
- [18]云庆辉,崔骊,黄殿忠.医疗器械不良事件监测与评价体系的实施方案分析[J].《中国医学装备》2012(8):35-37

PET/CT 全身成像中 CT 图像质量与辐射剂量关系的研究*

梁子威^② 耿建华^{①②} 王奕斌^① 杜召猛^① 毕高畅^① 齐雍鹤^① 郑容^{①②} 吴宁^①

①100021 北京, 国家癌症中心 中国医学科学院 北京协和医学院肿瘤医院 PET-CT 中心, ②100021 北京, 国家癌症中心 中国医学科学院 北京协和医学院肿瘤医院核医学科

通信作者: 耿建华, Email: gengjian@163.com

*基金项目: 国际科技合作项目(2009DFA32960); 中国癌症基金会北京希望马拉松专项基金(LC2013A13)

[摘要] 目的: 以仿真人体模型为实验对象, 研究 PET/CT 中 CT 图像质量与辐射剂量的关系, 为保证图像质量同时降低受检者的辐射剂量提供数据依据。方法: 用 GE Discovery ST 型 PET/CT, 对仿真人体模型 (Model RS-550) 进行扫描。CT 采集条件: 管电压 120 kV, 管电流 30~250 mA 范围内 11 种固定值及自动管电流, 螺距 (pitch) 分别为 0.938、1.375、1.75, 模拟临床 PET-CT 的全身扫描方式对仿真人体模型进行扫描。对图像进行分析, 计算腹部主要器官的噪声、信噪比及质量因数。结果: 噪声随有效剂量的增加而降低, 有效剂量 < 15 mSv 时, 噪声变化幅度较大; > 15 mSv 时, 噪声变化缓慢。信噪比随有效剂量增加而增加。相同的有效剂量时, 质量因数与扫描方案相关。自动管电流模式下的所有指标, 均优于固定管电流采集模式。结论: 在 CT 图像质量达到一定程度后, 进一步增加有效剂量, 图像质量提高有限。根据不同的临床需求在保证一定图像质量的前提下, 选择适当的 CT 扫描方案, 降低受检者的有效剂量。**[关键词]** PET/CT; 图像质量; 有效剂量; 仿真人体模型

Effect on image quality and radiation dose in a phantom study for PET/CT/Liang Ziwei, Geng Jianhua, Wang Yibin, Du Zhaomeng, Bi Gaochang, Qi Yonghe, Zheng Rong, Wu ning/PET/CT Center and Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center/ Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Corresponding author: Geng Jianhua, Email: gengjian@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect on image quality and radiation dose of Anthropomorphic phantom caused by PET/CT to provide data basis for decreasing the radiation dose. **Methods** PET/CT system of GE Discovery ST-16 was used to simulate clinical PET/CT situation for the anthropomorphic phantom. The dose caused by CT was determined by acquisition for the Anthropomorphic phantom (Model RS-550). CT acquisition conditions were as follows: tube voltage 120 kV, tube current 30-250 mA, pitch 0.938, 1.375 and 1.75. Scan range was divided into body scan and head-neck scan to simulate clinical PET/CT. The noise (SD) was recorded and the signal-to-noise ratio and the figure of merit were calculated with different formulas. **Results** The noise decreased with increasing effective dose, when the effective dose was less than 15 mSv, the noise decreased rapidly, however, when the effective dose was more than 15 mSv, the decrease of noise was not significant. The signal-to noise ratio increased with increasing effective dose. However, the figure of merit was fixed, when the radiation dose increased under the different acquisition condition. All indicators of ATCM were superior to the fixed tube current mode. **Conclusions** The image quality of CT in PET/CT could not significantly improve by increasing effective dose, when The image quality reaches to certain level. It shows that the radiation dose caused by CT in PET/CT could be effectively reduced by appropriate choice of acquisition conditions according to different clinical needs. dose. However, the figure of merit was fixed, when the radiation dose increased under the different acquisition condition. All indicators of ATCM were superior to the fixed tube current mode. **Conclusions** The image quality of CT in PET/CT could not significantly improve by increasing effective dose, when the image quality reaches to certain level. The radiation dose caused by CT in PET/CT could be effectively reduced by appropriate choice of acquisition conditions according to different clinical needs.

[Key Words] PET/CT; Image quality; Effective radiation dose; Anthropomorphic phantom

Fund programs: International S&T Cooperation Program of China (2009DFA32960); Beijing Hope Run Special Fund of Cancer Foundation of China (LC2013A13)

PET/CT 已成为临床肿瘤诊疗中不可替代的手段^[1-2]。随着 PET/CT 检查在肿瘤诊疗及肿瘤筛查中检查量的不断增加, 全身 PET/CT 对受检者造成的辐射剂量也已引起广泛关注。前期使用 CT 质量控制模型对不同采集条件下 PET/CT 性能指标及剂量影响进行过研究^[3-6], 结果显示 CT 性能指标随着剂量的降低而降低, 然而 CT 质量控制模型无法模拟

人体内环境中的吸收剂量及具体器官的图像质量。本研究以仿真人体模型作为实验对象，以前期对 PET/CT 有效剂量的研究结果为基础，对 PET/CT 中 CT 的图像质量与有效剂量的关系进行研究，为临床中尽可能降低 CT 辐射剂量提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

PET/CT 机型为美国 GE 公司的 Discovery ST-16 型，CT 部分为 LightSpeed 16 层螺旋 CT，仿真人体模型为 RS-550 模体（美国 Radiology Support Devices 有限公司），由头、颈、躯干、大腿上半部组成，器官及组织包括大脑、口咽、甲状腺、肺、纵膈、肝脏、胰腺、脾脏、双肾、肠管、骨骼、脂肪、肌肉等，各种器官组织的大小及密度与标准成年人一致。

1.2 CT 扫描范围

与临床一致，头颈部 2 床位（头顶至锁骨），87 层，扫描长度 281.22 mm；体部 5 床位（下颚至股骨上端），207 层，扫描长度 673.62 mm。

1.3 CT 扫描参数

扫描分别采用固定管电流模式和自动管电流模式，采集条件如下：①固定管电流模式，管电压固定为 120 kV，螺距（pitch）固定分别为 0.938、1.375、1.75，层厚 3.75 mm，层间距 3.27 mm（PET 层厚），扫描速度 0.8 s/转，管电流（mA）分别为 30、50、70、90、110、130、150、170、190、210、230 和 250 mA。共 36 组扫描条件。②自动管电流模式（automatic tube current mode, ATCM），设置管电压为 120 KV，螺距固定为分别为 0.938、1.375、1.75，管电流区间为 30 至 250 mA，其他扫描参数均选择临床 PET/CT 中所用值。采用上述 39 种采集条件分别对 Model RS-550 仿真人体模型进行扫描。

1.4 CT 图像质量指标

在各种扫描条件下得到仿真体模 CT 的图像，在美国 GE Xeleris 工作站上对腹部主要器官（肝脏、脾脏、胃、左肾）的 CT 图像进行分析，计算各种扫描条件下的图像质量指标：噪声、信噪比及质量因数。

（1）噪声。噪声描述均匀物质图像在给定区域中的 CT 值对其平均值的变异，用感兴趣区（region-of-interest, ROI）内 CT 值的标准偏差（SD）表示^[7-9]。它直接影响 CT 图像低对比分辨率（即密度分辨率），当病变组织与正常组织的衰减系数相差很小时，高噪声 CT 将无法有效分辨较小病灶。在仿真人体模型腹部各主要器官及组织中心层面画定 ROI，记录不同扫描条件下的 SD，如图 1 所示。

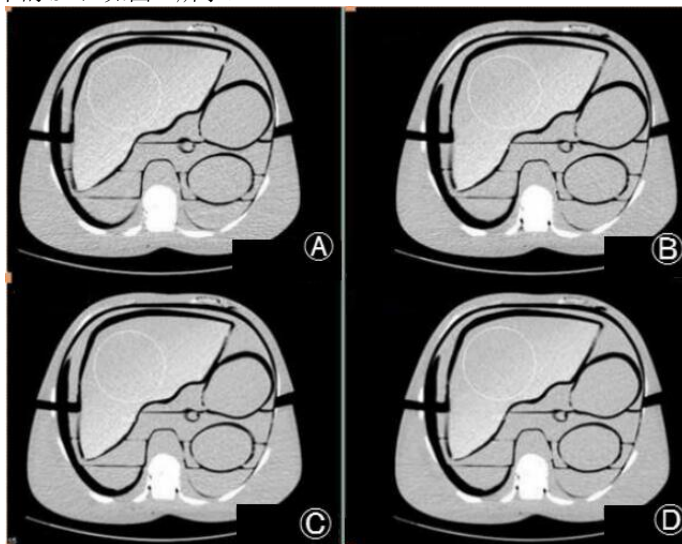


图 1 不同管电流下的同层面图像 A.50 mA；B. 90 mA；C. 130 mA；D. 170 mA

Figure 1 Images on the same level, under the different tube current A.50 mA；B. 90 mA；C. 130 mA；D. 170 mA

（2）信噪比。信噪比(signal-to-noise ratio, SNR)，等于 ROI 中信号强度（感兴趣区内像素的平均值）与噪声水平之比，用公式 1 表示。信噪比与信号强度和噪声直接相关，信号强度越高、噪声越低，信噪比越高，图像清晰度越好。

$$SNR = ROI_{IS} / SD \quad (1)$$

式中， ROI_{IS} 为感兴趣区内平均 CT 值，HU；SD 为噪声值，HU。

（3）质量因数。质量因数(figure of merit, FOM)是同时评价图像质量及辐射剂量的综合指标，等于图像信噪比(SNR)的平方与有效剂量(E)之比，用公式 2 表示。FOM 的意义在于比较不同 CT 扫描方案间图像质量与潜在的辐射损伤

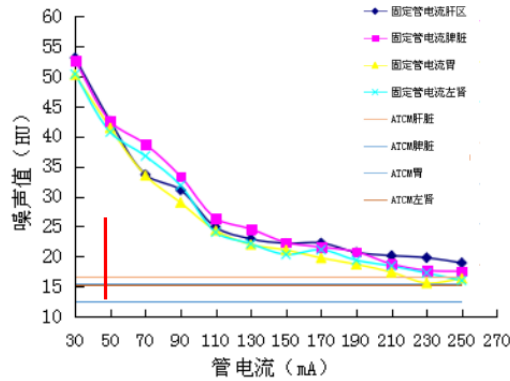
风险的综合“性价比”，FOM 值越大的扫描方案综合性价比越高，相对更为合理。

$$FOM=SNR^2/E \tag{2}$$

2 结果

2.1 不同有效剂量下的图像噪声

固定管电压为 120 kV，各组织器官的噪声随管电流的增加而降低，不同组织器官之间的没有明显的差异。由图 2 可见，噪声的总体趋势是随管电流增加而降低，管电流在 30~110 mA 之间，噪声降低幅度较大；管电流 > 110 mA 时，噪声降低幅度明显减小。ATCM 模式下，噪声值约为 15，显著低于固定管电流下的噪声值。



-
- 图 2 管电压为 120 kV、pitch 为 0.938 时腹部主要器官组织噪声值随管电流的变化
- Figure 2 The noise of major abdominal organ reduced along with the change of the tube current, at 120 kV and pitch = 0.938

按照前期对有效剂量随采集条件变化的研究结果，得出在 39 种采集条件下，不同器官组织图像噪声随有效剂量的变化如图 3 所示。由图 3 可见，在同一管电压下，噪声随有效剂量增加而降低，但降低趋势不呈线性：有效剂量低于 15 mSv 时，噪声变化幅度较大；在有效剂量大于 15 mSv 时，噪声始终维持较低水平，且变化幅度较小。相同 pitch 下，ATCM 模式噪声显著低于固定管电流模式。

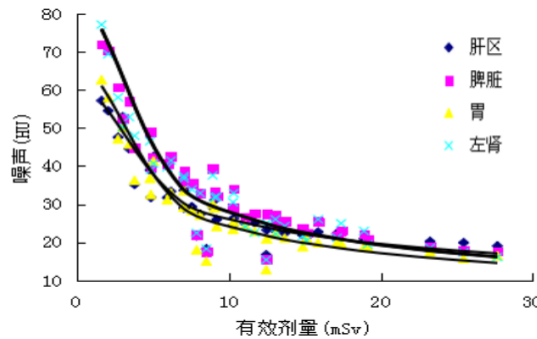


图 3 39 种采集条件下腹部各器官噪声值随全身有效剂量的变化

Figure 3 The noise of major abdominal organ reduced along with the dose, as the 39 kinds of scanning condition

2.2 不同有效剂量下的图像信噪比

在固定管电压为 120 kV，各组织器官的图像信噪比随管电流的增加而增加。ATCM 模式下，信噪比显著高于固定管电流。不同组织器官图像之间有微小的差异，肝区最大，脾脏最小，如图 4 所示。

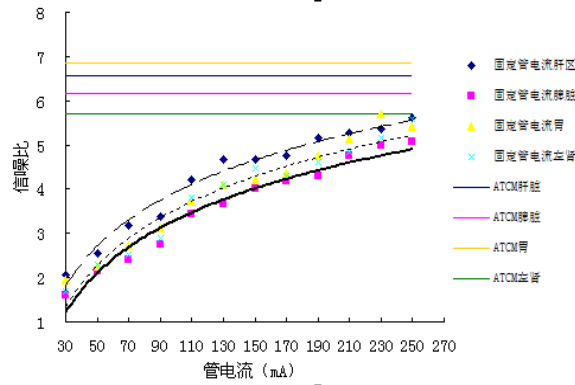


图 4 不同管电流在 pitch0.938 时腹部主要器官信噪比

Figure 4 The SNR of major abdominal organ changed along with the dose, as the 39 kinds of scanning condition

39 种采集条件下, 不同器官组织图像信噪比随有效剂量的变化如图 5 所示。由图 5 可见, 各器官图像信噪比随全身有效剂量增加而增加, 但是在剂量较高时, 增量变缓慢, 不同器官图像信噪比有些差异。

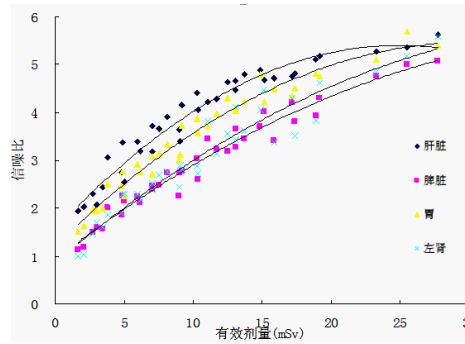


图 5 39 种采集条件下主要腹部器官组织图像信噪比随有效剂量的变化

Figure 5 The SNR of major abdominal organ changed along with the dose, as the 39 kinds of scanning condition

2.3 不同有效剂量下的图像质量因数

如图 6 所示, 固定管电压 120 kV, 腹部器官的质量因数随管电流的增加变化不显著, 质量因数随管电流增加变化不显著, 以肝脏为例, 质量因数平均值: pitch0.938 为 1.48、pitch1.375 为 1.69、当 pitch1.75 为 2.05, 标准差分别为 0.17、0.15 和 0.12。相同 pitch 下, ATCM 模式的质量因数明显高于固定管电流。

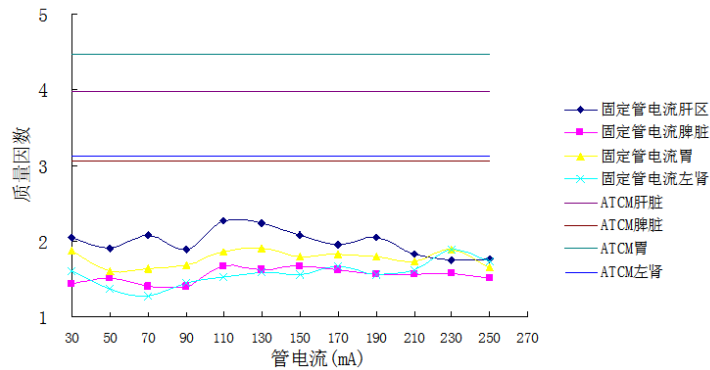


图 6 Pitch 为 0.938 时腹部器官图像质量因数随管电流的变化

Figure 6 The FOM of major abdominal organ changed along with the tube current, at pitch = 0.938

如图 7 所示, 39 种采集条件下质量因数随有效剂量增加变化不显著, 但是, 有效剂量相同时, 不同的采集方式,

其质量因数有明显的差异。以肝脏为例, 3种 pitch 时, 图像的质量因数有明显的差别, pitch=1.75 时, 品质因数最高。

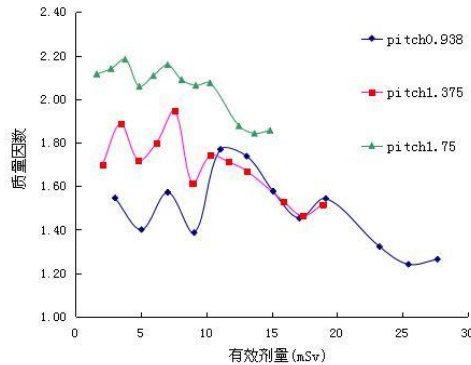


图 7 39 种采集条件下肝脏质量因数随全身有效剂量的变化

Figure 7 The FOM of liver changed along with the does, as the 39 kinds of scanning condition

3 讨论

研究 PET/CT 图像质量与有效剂量的关系需要大量不同参数的 CT 扫描, 用志愿者显然是不可行的, 使用 CT 质量控制模型则无法模拟人体内环境。仿真人体模型是主要用于测量体内辐射吸收剂量的模型, 是按标准人及各器官组织形状大小制作, 用于各器官组织的材料具有与相应人体组织等效的密度及辐射吸收性能, 要研究这类问题使用仿真人体模型是合理的选择。

对腹部 CT 检查, 噪声是影响图像质量的重要因素, 高噪声水平可能掩盖低对比度实质器官的病变, 例如: 肝脏、脾脏、胰腺等^[9-10]。本研究结果显示, 腹部主要实质器官的噪声水平总体上是随管电流增加而降低, 当管电流在低于 110 mA 时, 噪声随管电流增加而明显降低; 当管电流高于 110 mA 时, 噪声随管电流增加而降低的幅度明显变平缓。对于相同管电流下同一器官, 随着 pitch 增大, 噪声随之增加。在同一管电压下, 噪声随有效剂量增加而降低, 但降低趋势不呈线性: 有效剂量 < 15 mSv 时, 噪声变化幅度较大; 在有效剂量 > 15 mSv 时, 噪声始终维持较低水平, 且变化幅度较小。可见, 随着辐射剂量增加噪声的降低幅度并不成比例, 在图像质量已良好, 即噪声较低的情况下, 再增加辐射剂量, 图像噪声改善也不大。

信噪比综合了信号强度与噪声值, 比值越大, 噪声对图像质量的影响越小, 图像质量越好。Waijjer 等^[11]研究信噪比的平方随管电流增加而增加。本研究结果与之相符。结果显示, 信噪比随有效剂量增加而增加, 但并不成线性, 随着有效剂量越来越高, 信噪比增加幅度越来越小。

质量因数是综合考虑图像信噪比与有效剂量的评价指标。根据本研究显示, 质量因数随管电流及有效剂量的增加的变化趋势不显著。根据文献^[7, 12]及前期研究结果^[12], 图像信噪比的平方和有效剂量均随管电流增加而线性增加, 因此理论上, 当以管电流为自变量时, 质量因数不随管电流增加而变化, 本研究结果验证了这一推论。以肝脏为例, 质量因数平均值: pitch 0.938 时为 1.48、pitch 1.375 时为 1.69、pitch 1.75 时为 2.05, 标准差分别为 0.17、0.15 和 0.12。本研究中, pitch 1.75、管电流 90 mA 时和 pitch 0.938、管电流 50 mA 时全身有效剂量同为 5 mSv, 但前者质量因数更高, 因此我们可以根据质量因数选取更合适的扫描方案。可见, 在相同的有效剂量下, 选择高管电流及 pitch 值比低管电流及 pitch 值更为合理。Fletcher 等^[13]研究表明, 常规 CT 质量因数在 0.84~0.91 之间, 由于其所用的常规 CT 管电流较高, 辐射剂量增加所致。可见由于对 CT 图像质量要求相对较低, PET/CT 与常规 CT 比质量因数更高, 但 PET/CT 的全身扫描, 受检者所受的总辐射剂量仍高于常规 CT 的局部扫描。

自动管电流模式相对于固定管电流模式的图像质量有比较显著的提升, 在相同 pitch 和 E 下, 噪声值低、信噪比高、质量因数高。以 pitch 为 0.938 为例, 固定管电流模式下噪声值约为 20~50, ATCM 下噪声明显降低, 约为 10~15; 固定管电流模式下信噪比约为 1~5, ATCM 下信噪比明显提升, 约为 5~7; 固定管电流模式下质量因数约为 1~2, ATCM 下质量因数约为 2.5~4。在相同有效剂量下, 自动管电流模式与固定管电流模式相比测得噪声值较低, 信噪比和质量因数均较高。因此, 临床常用的自动管电流扫描模式更符合图像质量高、辐射剂量低的原则。

根据 CT 在 PET/CT 中的起不同的不同作用, 对 CT 图像质量的要求也不同, 如为 PET 衰减校正、解剖定位及诊断时所需的图像质量由低到高, 差别较大^[11], 其所致受检者的辐射剂量也有较大的差别。因此, 按照临床需求应尽量降低 CT 造成的辐射剂量, 例如, 近期做过高质量常规 CT 病灶部位明确的受检者; PET 延时扫描的受检者, 不需要依赖 PET/CT 提供明确的解剖定位和影像诊断功能, 因此可以在 PET/CT 检查中适当降低管电流, 采取更为低剂量的扫描方案, 从而降低受检人群辐射致癌的风险。数据显示我国 PET/CT 检查中 CT 的管电流设置范围为 90~350 mA, 且大部分>150 mA^[3], 说明我国多采用高剂量方案, 对于受检者承受的辐射风险没有得到普遍重视。目前已有多篇关于低剂量文献报道, 认为在保证图像质量的前提下可以相对降低辐射剂量^[14-17]。

患者体型较大或过于肥胖时, 会增加噪声降低图像质量^[15]。本实验的对象为标准人体仿真体模, 并未考虑到个体大小及体质量指数的差异, 扫描条件采用的是临床扫描条件, 而不是 CT 性能检测使用条件。因此, 本研究中所有数据只用于评估临床情形下的图像质量, 所得数据与真实人体也存在一定差异, 所得规律尚需临床验证。

参考文献

- [1] 中华医学会核医学分会. 2014 年全国核医学现状普查[J]. 中华核医学与分子影像学杂志, 2014, 34(5): 389-389. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2014.05.012.
- [2] Chinese Society of Nuclear Medicine. National nuclear medicine general survey, 2014[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2014, 34(05): 389-389. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2014.05.012.
- [3] 陈英茂, 耿建华, 田嘉禾, 等. PET/CT 中心建设之一—配置条件和设备选型[J]. 中国医学装备, 2013,10(4):1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8270.2013.04.001.
- [4] Chen YM, Geng JH, Tian JH, et al. Establishment of PET/CT center----Requirements and equipment selection[J]. China Med Equip,2013,10(4):1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8270.2013.04.001.
- [5] 张连宇, 耿建华. PET/CT 中的 CT 剂量和质量控制[J]. 中国医学影像技术, 2011,27(11):2365-2367. DOI: 1003-3289(2011)11-2365-03.
- [6] Zhang LY, Geng JH. Quality and dose control of CT component in PET/CT[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2011, 27(11):2365-2367. DOI: 1003-3289(2011)11-2365-03.
- [7] 张连宇, 梁子威, 耿建华, 等. 管电压对 PET/CT 中 CT 剂量及图像质量影响的模体研究[J]. 中国医学装备,2015,12(4):1-5. DOI: 10.3969/ j.issn.1672-8270.2015.04.001.
- [8] Zhang LY, Liang ZW, Geng JH, et al. A phantom study on influence of tube voltage on CT dose and CT image quality in PET/CT[J]. China Med Equip,2015,12(4):1-5. DOI: 10.3969/ j.issn.1672-8270.2015.04.001.
- [9] 张连宇, 梁子威, 耿建华, 等. 不同采集条件对 PET/CT 中 CT 线性影响的研究[J]. 中国医学装备, 2015,12(6):54-57. DOI: 10.3969/J.ISSN.1672-8270.2015.06.017.
- [10] Zhang LY, Liang ZW, Geng JH, et al. Research on influences of different acquisition conditions on CT linearity in PET/CT[J]. China Med Equip, 2015, 12(6):54-57. DOI: 10.3969/ j.issn.1672-8270.2015.06.018.
- [11] 张连宇, 耿建华, 王弈斌, 等. PET/CT 中 CT 的剂量与 CT 图像质量关系的研究[J]. 核电子学与探测技术, 2012,32(3):365-370.
- [12] Zhang LY, Geng JH, Wang YB, et al. A study on influence of CT dose and CT image quality in PET/CT[J]. Nucl Electron Detect Technol, 2012,32(3):365-370.
- [13] Buls N, Van Gompel G, Van Cauteren T, et al. Contrast agent and radiation dose reduction in abdominal CT by a combination of low tube voltage and advanced image reconstruction algorithms[J]. Eur Radiol, 2015, 25(4):1023-1031. DOI: 10.1007/s00330-014-3510-5.
- [14] Schindera ST, Nelson RC, Yoshizumi T, et al. Effect of automatic tube current modulation on radiation dose and image quality for low tube voltage multidetector row CT angiography:Phantom study[J]. Acad Radiol, 2009, 16(8):997-1002. DOI: 10.1016/j.acra.2009.02.021.
- [15] **Schindera ST, Nelson RC, Lee ER, et al.Abdominal Multislice CT for obese patients: effect on image quality and radiation dose in a phantom study[J]. Acad Radiol,2007,14(4): 486-494. DOI: 10.1016/j.acra.2007.01.030.**
- [16] 陈盛祖. PET/CT 技术原理及肿瘤学应用[M]. 北京:人民军医出版社,2007:94.
- [17] Chen SZ. PET/CT Technology principle and oncology application[M], Beijing: People's Military Medical Press 2007:94.
- [18] Waaijer A, Prokop M, Vehhuis BK, et al. Circle of Willis at CT angiography: Dose reduction and image quality-reducing tube voltage and increasing tube current settings[J]. Radiology, 2007, 242(3): 832-839 . DOI :

- 10.1148/radiol.2423051191.
- [19] 梁子威, 耿建华, 王奕斌, 等. PET/CT 受检者的有效剂量及其影响因素的研究[J]. 中国医学装备, 2015, 12(11): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8270.2015.11.001.
- [20] Liang ZW, Geng JH, Wang YB, et al. Research on effective dose and influence factors for PET/CT patients[J]. China Med Equip, 2015, 12(11): 1-5. DOI: 10.3969/j.issn.1672-8270.2015.11.001.
- [21] Fletcher JG, Yu L, Li Z, et al. Observer performance in the detection and classification of malignant hepatic nodules and masses with CT image-space denoising and iterative reconstruction[J]. Radiology, 2015, 276(2):465-478. DOI:10.1148/radiol.2015141991.
- [22] Jackson J, Pan T, Tonkopi E, et al. Implementation of automated tube current modulation in PET/CT: prospective selection of a noise index and retrospective patient analysis to ensure image quality[J]. J Nucl Med Technol, 2011, 39(2):83-90. DOI: 10.2967/jnmt.110.075283.
- [23] 唐坤, 曹国全, 李瑞, 等. 低管电压腹部 CT 扫描对图像质量及辐射剂量影响的体模实验[J]. 中国医学影像技术, 2012, 28(4): 800-804. DOI: 1003-3289 (2012) 04-0800-05.
- [24] Tang K, Cao GQ, Li R, et al. Experiment on the impact of low tube voltage on imaging quality and radiation dose in abdominal multi-detector CT[J]. Chin J Med Imaging Technol, 2012, 28(4):800-804. DOI: 1003-3289 (2012) 04-0800-05.
- [25] Siegel MJ, Ramirez-Giraldo JC, Hildebolt C, et al. Automated low-kilovoltage selection in pediatric computed tomography angiography phantom study evaluating effects on radiation dose and image quality[J]. Invest Radiol, 2013, 48(8): 584-589. DOI: 10.1097/RLI.0b013e318289f918.
- [26] Yang CC, Liu SH, Mok GS, et al. Evaluation of radiation dose and image quality of CT scan for whole-body pediatric PET/CT: A phantom study[J]. Med Phys, 2014, 41(9):092505. DOI: 10.1259/bjr/66327067.
- (核医学装备与技术专委会供稿)

单光子发射计算机断层性能测试系统的设计与开发*

姚树林^① 陈英茂^{①*} 耿建华^② 刘亚强^③

①中国人民解放军总医院核医学科 北京 100853

②中国医学科学院肿瘤医院核医学科 北京 100021

③清华大学工程物理系 北京 100084

*基金项目: 科技部国际科技合作项目 (2009DFA32960) “PET/CT 脑分子影像研究与应用平台及针灸中枢机理探讨”

*通信作者: 陈英茂 chen.ym@263.net

[摘要]目的:研制开发基于新国标的核医学成像设备 SPECT 质量控制测试系统软件, 以满足 SPECT 设备年度状态检测监管需求。**方法:**以新国标为依据, 按照标准中相应的数据处理方法, 建立各指标测试数据的处理分析模型, 采用程序模块化设计、软件跨平台运行设计、检测报告自动生成等技术实现软件系统。**结果:**实现了新国标所要求的固有均匀性、固有空间线性、固有空间分辨率、平面系统灵敏度、平面系统空间分辨率、断层空间分辨率和全身扫描空间分辨率等指标检测数据的处理分析。**结论:**系统具有良好的稳定性、可靠性和输出结果的准确性, 且操作简便易行, 可配套国产通用 SPECT 性能检测模体套装用于不同厂家不同型号的 SPECT 性能测试, 不仅可满足政府监管的年度状态检测需求, 还可用于各医院的常规 SPECT 质量控制检测工作。

[关键词] 单光子发射计算机断层; 质量控制; 性能测试; 数据处理

Design and development of SPECT performance testing program

[Abstract] Objective: To satisfy the supervision demands of SPECT annual inspection, this work developed the quality control and performance test system software for nuclear medicine imaging equipment based on the new equipment inspection standards. **Methods:** According to data processing method in the new standards, the process and analysis model of all the indicator was established. Then this software system was developed with various technologies, including program modularization design, multiplatform software design and automatic generation of testing reports. **Results:** The test data for all the indicators, including intrinsic uniformity, intrinsic spatial linearity, intrinsic spatial resolution, planar system sensitivity, planar system spatial resolution, tomo image spatial resolution and body scanning spatial resolution, were successfully processed and analyzed. **Conclusion:** The system has excellent responsibility and stability, high result veracity and good

user-friendliness. It can be applied to different types of SPECT from different factories when supported by the domestic universal SPECT performance test model package. The system not only fulfilled the annual inspection supervision requirement of the government, but also could be used in the routine SPECT quality control and detection work of hospitals.

[Key words] SPECT; quality control; performance test; data processing

[First-author's address] Department of Nuclear Medicine, Chinese PLA General Hospital ,Beijing 100853, China.

近年来,我国核医学设备装机量及使用量快速增长^[1-3],尤其是 SPECT 设备在临床上的应用更为普遍。但核医学设备的质量控制工作还比较落后,这与核医学设备的快速发展很不协调,也使得《放射诊疗管理规定》(2006 卫生部 46 号令)^[4]中规定的要求——对放射诊疗设备的质量控制状态进行年度检测——无法很好的实施。在质量控制标准方面,目前已在我国注册上市的国外 SPECT 生产厂家均认可美国的 NEMA 标准^[5-7],各厂商 SPECT 设备的技术文件中均有按 NEMA 标准方法检测的技术指标数据。2013 年我国已将 NEMA 2007 标准转化为国(GB/T 18989-2013, GB/T18988.1-3-2013)。国家放射卫生标准委员会启动制定在我国切实可行的有关标准“单光子发射断层成像设备(SPECT)质量控制检测规范 WS/T-XXX-XXX”(以下简称为新国标),已上报待批^[8]。标准的制定使得对 SPECT 设备进行强制年检有了评判依据。然而,核医学成像设备的质控检测需要分析处理大量的图像数据,需要专门软件进行,而各 SPECT 设备厂家配套的检测软件不尽相同,图像数据处理的方法也有差异,使检测结果难以统一。为了满足依据新国标对 SPECT 设备进行质控状态年度检测的需要,本文设计了基于新国标的 SPECT 质量控制检测系统,可满足新国标对质控检测数据进行处理和评价的要求,并可配套用于国产的通用 SPECT 性能检测模体套装^[9]。

1 SPECT 质量控制检测系统设计

1.1 总体设计思路

SPECT 质量控制检测系统采用图 1 所示的技术路线,沿依据→方法→模型→技术→系统实现与验证的路线进行设计实现。系统以 NEMA 标准和新国标为依据,确定 SPECT 质量控制所需测定的性能指标;按照标准中给出的指标定义和测量方法进行数据采集,作为软件系统的输入;按照标准中相应的数据处理方法,建立各指标测试数据的处理分析步骤和算法;然后根据处理分析步骤和算法建立系统的程序流程图;根据流程图,并充分考虑到 SPECT 质控测试中各指标的相对独立性以及软件运行平台多样化等特点,采用程序模块化设计、软件跨平台运行设计、检测报告自动生成等技术实现软件系统;最后,利用在多家 SPECT 设备上采集的质控检测数据,对系统进行试验验证。



图 1 技术路线

1.2 系统架构

通过对 SPECT 设备质量控制检测过程的梳理,软件系统可包含在图 2 所示的系统框架中。

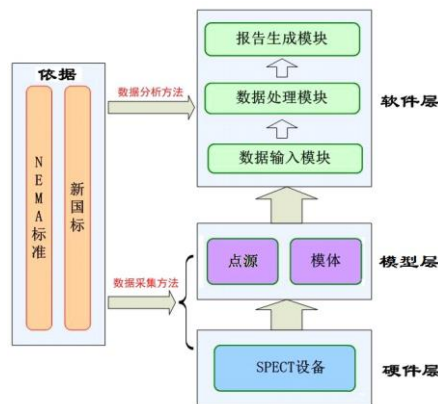


图 2 系统框架

各类型各厂商的 SPECT 设备作为被测对象,处于硬件层中;质量控制检测所需的材料,如 99mTc 点源、Slit 模

体等, 我们将其归属为模型层, 是进行质量控制检测的必备模型; 质量控制检测系统属于软件层, 使进行数据处理分析、生成检测报告的软件; 新国标作为依据, 为硬件层和模型层提供了质量控制检测的数据采集方法, 也为软件层提供了数据处理和分析的方法。质量控制检测系统的数据输入模块将不同指标的检测数据读入软件系统中, 并发送给相应的数据处理模块进行处理、分析, 再由报告生成模块输出检测报告。

1.3 软件组成

依据 SPECT 质量控制检测系统的主要功能, 软件层划分为各功能模块。

系统由数据输入模块、数据处理与分析模块、报告输出模块和系统管理模块四大部分组成。由于不同指标采集的测试数据格式和需要完成的数据分析过程不同, 本系统设计了统一的数据输入模块来识别和区分输入数据文件, 并根据测试目的选择, 将数据送入指定的子模块进行处理。数据输入模块主要完成测试数据的读入与子模块的选择功能。数据处理与分析模块是本系统的主要功能模块。根据不同指标的数据处理过程, 分为固有性能 Slit 模型测试分析子模块、固有均匀性分析子模块、平面系统空间分辨率分析子模块、平面系统灵敏度分析子模块、断层空间分辨率分析子模块和全身扫描空间分辨率分析子模块等六个子模块, 每个模块完成某类指标的检测数据处理。数据处理后, 调用报告生成模块, 将该指标检测结果输出为相应的指标检测报告, 也可在所有指标均完成分析后, 形成完整的质量控制检测报告。系统管理模块主要功能包括用户管理、日志管理以及帮助等系统的管理功能。

2 SPECT 质量控制检测系统功能模块的实现

2.1 系统主要功能

在我国大型诊疗设备管理规章中要求对诊疗设备进行验收测试、状态测试和稳定性测试。测试方法及结果评价依据是国家有关标准。新国标针对我国的现状, 基于 NEMA 标准选取关键指标, 提高了检测的可行性, 并规定了验收检测、状态检测及稳定性检测的指标与频度。本文 SPECT 质量控制状态检测系统基于新国标规定的状态检测指标和方法, 实现了对固有均匀性、固有线性和固有空间分辨率、平面系统灵敏度、平面系统空间分辨率、断层空间分辨率和全身扫描空间分辨率等指标检测数据的处理分析。每个指标检测数据的分析由相应的子模块完成。

(1) 平面系统空间分辨率分析子模块: 对 SPECT 设备的平面系统空间分辨力的测试图像进行分析处理, 获得其平面系统空间分辨力的测试值 (Y 方向 FWTM、Y 方向 FWHM、X 方向 FWTM、X 方向 FWHM)。

(2) 固有性能 Slit 模型测试分析子模块: 对 SPECT 设备的固有性能 Slit 模型测试图像进行分析处理, 包括“原始数据图”、“原始数据立体图”、Slit 模型倾斜度定量分析(狭缝首、尾行的峰值位置差)、高斯函数拟合效果和运行进度时时图、微分线性分布图、空间分辨力分布图, 以及固有空间分辨力指标 (UFOV FWTM、UFOV FWHM、CFOV FWTM、CFOV FWHM) 和固有空间线性指标 (UFOV 微分线性、UFOV 绝对线性、CFOV 微分线性、CFOV 绝对线性)。

(3) 固有均匀性分析子模块: 对 SPECT 设备的固有均匀性测试图像进行分析处理, 输出固有均匀性指标 (UFOV 微分均匀性、UFOV 积分均匀性、CFOV 微分均匀性、CFOV 积分均匀性)。

(4) 平面系统灵敏度分析子模块: 对 SPECT 设备的平面系统灵敏度性能测试结果进行分析处理, 输出平面系统灵敏度。

(5) 断层空间分辨率分析子模块: 对 SPECT 设备的断层空间分辨力的测试图像进行分析处理, 获得其断层空间分辨力的测试值 (横向 FWHM、轴向 FWHM)。

(6) 全身扫描空间分辨率分析子模块: 对 SPECT 设备的全身扫描空间分辨力测试图像进行分析处理, 获得其全身扫描空间分辨力的测试值 (平行方向 FWTM、平行方向 FWHM、垂直方向 FWTM、垂直方向 FWHM)。

2.2 数据分析与处理模块的实现

数据分析与处理模块是系统的主要部分, 实现了系统的主要功能, 分为 6 个子模块。以 SPECT 固有性能 Slit 子模块为例, 介绍该模块的实现过程。

Slit 模型是由不透射线的厚为 3mm 的铅板上雕刻若干条 (x 方向的通用 Slit 模型是 13 条, 缝长 52cm; y 方向是 17 条, 缝长 38cm) 平行的狭缝制成。狭缝宽度为 1 mm, 可透过射线, 模拟线源, 各缝间距 30mm。使用时安装在准直器的位置。

该模块对测试图像进行空间分辨率等指标的分析。

根据标准要求,固有空间分辨力用 Slit 模型的狭缝扩展函数半高宽及十分之一高宽表达,有中心视野和有效视野之分;固有线性用 Slit 模型的狭缝扩展函数峰值位置偏移表达,分绝对线性和微分线性,绝对线性由视野内狭缝峰值位置最大偏移表示,微分线性由视野内所有狭缝峰值位置偏移量的标准差表示,且都有中心视野和有效视野之分。数据分析与处理的算法如下:

第一步:读取测试图像数据;

第二步:目测判断模型放置是否正确:显示“原始数据图”和“原始数据立体图”;

第三步:目测判断通过后,确定各条狭缝线源的坐标;

第四步:进一步对 Slit 模型倾斜度做定量分析:计算狭缝首、尾行的峰值位置差;

第五步:逐条狭缝、沿狭缝逐像素提取垂直线源的剖面图,并进行一维点扩展函数(高斯)拟合。时时显示高斯函数拟合效果和运行进度图;提取拟合曲线的峰值位置、半高宽及十分之一高宽;

第六步:计算所有峰值位置偏移;

第七步:显示“线性偏移分布图”、“空间分辨力分布图”;

第八步:计算有效视野和中心视野区的峰值位置偏移标准差,找出最大偏移;

第九步:计算有效视野和中心视野区的半高宽及十分之一高宽的均值。

在模块运行时,可根据计算过程产生图示化的中间结果图像,能够使用户更直观地查看指标分析情况。

其他子模块的实现与该子模块相似,由于篇幅所限,本文不再赘述。

2.3 输入输出及管理模块的实现

数据输入、数据输出及管理模块是系统必要的组成部分。数据输入模块是系统的入口,数据输出是检测结果的出口。这两个模块均为数据处理与分析模块提供支撑服务的,特别是输出模块,采用基于模板的报告生成技术,能够按照指定的模板格式生成报告,解决了手工填写检测报告效率低、易出错的问题。

用户管理模块提供用户管理、日志管理以及帮助等辅助功能。

2.4 试验验证

为了检验本系统,我们进行了多次对照试验。以设备厂家自带的程序处理结果为对照,分别对两个厂家的 3 台 SPECT 设备的 7 个有关性能指标进行了对照测试实验。结果表明,三台设备的对照实验大部分取得了一致性很好的结果,对个别差异较大的结果进行了原因分析和程序的重新审查。最终得出了结论:本系统所有模块都是可靠的,所得结果是准确的(具体数据结果令文发表)。本系统具有良好的稳定性、可靠性和输出结果的准确性,而且操作简便易行,可通用于不同厂家不同型号的 SPECT 性能测试,不仅可满足政府的年度状态检测监管需求,还可用于各医院的常规 SPECT 质量控制检测工作。

3 结语

SPECT 质量控制检测系统依据新国家标准进行设计实现,是国内首创的通用于各型 SPECT 质量控制的性能测试系统。目前国内北京、山东、江西、吉林、湖北等多省市疾病预防控制中心已经将本系统用于 SPECT 的年度状态检测工作。也有一些医院利用本系统及配套国产模体完成了部分装机验证工作。该系统的实用价值初显,产生了良好的社会效益。

本系统能满足 SPECT 日常性能测试和年度状态检测需求,但因未涵盖 NEMA 标准中的全部测试指标,故不能满足装机验收测试的需求。

参考文献

- [1] 中华医学会核医学分会. 2012 年全国核医学现状普查简报 [J]. 中华核医学与分子影像杂志, 2012, 32(5): 357-357.
- [2] 王嘉兴, 刘丛进, 朱汇庆, 等. SPECT 图像重建方法对 Hoffmann 模型图像质量的影响[J]. 中华核医学杂志, 2010, 30(2): 129-132.
- [3] 中华医学会核医学分会. 2010 年全国核医学现状普查 [J]. 中华核医学杂志, 2010, 30(6): 428-429.
- [4] 卫生部. 放射诊疗规定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.

- [5] National Electrical Manufacturers Association. NEMA NU 1-1994, Performance measurements of Gamma cameras [S] . Washington DC: National Electrical Manufacturers Association, 1994.
- [6] National Electrical Manufacturers Association. NEMA NU 1-2001, Performance measurements of Gamma cameras [S] . Rosslyn, VA: National Electrical Manufacturers Association, 2001.
- [7] National Electrical Manufacturers Association. NEMA NU 1-2007, Performance measurements of Gamma cameras [S] . Rosslyn, VA: National Electrical Manufacturers Association, 2007.
- [8] 耿建华,陈英茂. 核医学成像设备的质量控制现状 中华核医学与分子影像杂志, 2015, 35:(1):75-78.
- [9] 李红磊,刘晓建,李晓鸣,等. 一套 SPECT 性能测试模体的研制[J]. 中国医学装备杂志,2014,11(5):37-39.

(核医学装备与技术专委会供稿)

「医用辐射装备防护与检测」

常用辐射剂量仪防护检测中的误区

欧向明

中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所, 北京 100088

[摘要] 长期以来各省市辐射防护检测机构, 在对医用诊断 X 射线机等放射工作场所及周围环境辐射水平进行监测时, 广泛采用电离室型辐射防护剂量/剂量率仪和巡测仪。但一些工作人员对这种仪器的性能和测量电路原理不熟悉, 而错误地检测医用诊断 X 射线摄影(拍片)时的防护、甚至直接测量拍片时 X 射线管的输出剂量。笔者用仪器时间常数等相关的电路原理, 剖析国内放射诊疗防护监测中常用的几类进口和国产电离室型防护仪探测器及核电子学测量线路的原理与特性, 结合目前广泛使用的 DE-SI-451P 电离室型巡测仪, 分析防护仪在检测医用诊断 X 射线机拍片时的防护及测量拍片时输出剂量所存在的误区, 阐述辐射仪器的基本性能及正确使用电离室型辐射防护仪器开展监测工作的重要性。

[关键词] 辐射防护仪器, 电离室, 核电子学线路, 时间常数, 检测误区

Misleading measurement of radiation protection survey meters/Ou Xiangming

[Abstract] In this paper, the author analyzed ionization chamber and circuits time constant, introduced nuclear-electronics of radiation protection survey meters, emphasized on use them measuring the cumulative dose of the medical X-ray radiograph is incorrect in radiation protection field.

[Key words] Radiation protection survey meters, Ionization chamber, Nuclear-electronics, Circuits time constant, Misleading measurement,

[Author's address] National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China

为了贯彻落实《放射诊疗管理规定》的有关规定^[1], 加强放射诊疗工作的管理保证医疗质量和医疗安全, 保障放射诊疗工作人员、患者和公众的健康权益, 多年来在对医用诊断 X 射线机等放射工作场所及周围环境辐射水平进行监测时^[2], 辐射防护剂量/剂量率仪和巡测仪已被广泛应用在辐射防护的监测工作中^[3], 成为评价电离辐射场所是否安全的定量基础。据统计我国各省市监测机构目前使用的防护仪约有数千台, 其中绝大多数属于电离室型防护仪(以下统称防护仪)。我们发现在辐射防护监测实际工作中, 由于有的监测机构的工作人员对电离室型防护仪的性能和测量电路原理不熟悉, 不了解仪器的电路时间常数, 而错误地使用上述防护仪检测医用诊断 X 射线摄影(拍片)时的防护、甚至直接测量拍片时 X 射线管的输出剂量^[4]。这样, 防护仪的电路响应时间跟不上致使测量值很低, 造成评价结果产生了较大的不确定度, 这种现象应引起相关工作人员的足够重视。

目前, 辐射防护监测机构常用的防护仪主要包括以下几种: ①我国早期研制的以测量照射量率为代表的 XS 及 WF 系列; ②以测量空气吸收剂量率为代表的 FJ-347A; ③以测量剂量当量为代表的 9DP、RTI Survey Meter; ④以美国进口的测量周围剂量当量为代表的 451P-DE-SI。这些防护仪都具有电离室型探测器及高输入阻抗的核电子学前置放大电路^[5], 下面分别分析它们的响应时间。

1 电离室型探测器的响应时间

电离室是辐射防护领域中问世最早、应用最广的一种探测器, 常压由高压电极、收集电极及包含一定气体体积的电离室壁等三部分构成, 按照电离室内是否充有高压气体, 通常被分为常压和加压两类探测器。它们的工作原理是一样的, 当射线入射到电离室的灵敏体积中, 在电极或室壁上打出次级电子(光电子和康普顿电子), 次级电子使气体产生电离, 生成正负离子对^[2]。在加上极化电压的两个电极电场的作用下, 正离子和电子所呈现的正电荷向阴极的漂移和负电荷向阳极方向漂移, 在外电路中收集成微弱的本征电离电流。

在漂移过程中的电子和正离子在两极电场作用下被加速, 使飞行时间较短, 其结果在宏观上表现为防护仪的电

离室响应时间仅在微秒的量级。

2 防护仪的电路的响应时间

2.1 前置放大电路原理

按照电离室探测器的灵敏体积、及辐射防护水平的入射粒子流强度计算，由防护仪探测器所产生的电离电流强度在 10^{-11} 至 10^{-13} 安培之间。一般的电流—电压转换电路无法测量这种很微弱的电流信号，因此防护仪必须使用高输入阻抗的前置放大电路 ($10^{13}\Omega$)，配合高阻值的负反馈电阻 (10^9 至 $10^{12}\Omega$)，才能保证信号不丢失并被有效放大，实现累积剂量或剂量率的测量^[3]。常见防护仪的前置放大电路原理图如图一所示：电离室输出的 u_s 微弱信号经保护电阻 R_a 接入高输入阻抗的前置放大器 PA 进行放大，累积剂量的测量 C_f 为反馈电容、或剂量率的测量 R_f 为高阻值反馈电阻， R_p 为前置放大器的平衡电阻；电离室等效电容为 C_d ，电离室阻抗为 R_d ，放大线路的杂散电容为 C_z ，经电流—电压转换后的信号以 $u_c(t)$ 表示。

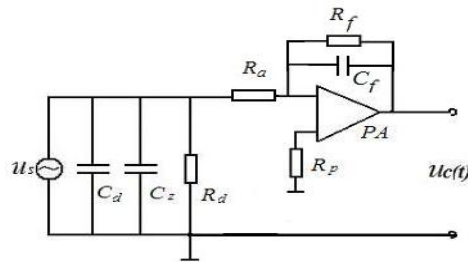


图1 常见防护仪的前置放大电路原理图

2.2 等效电路分析

以防护仪测量累积剂量时为例，经对图一中的电阻、电容进行合成可知，合成后的等效电阻 R 的大小约等于高阻值负反馈电阻 R_f ，等效电容很小（约几十微微法拉）用 C 表示，那么合成后的防护仪前置放大器的等效电路如图二所示^[6]。

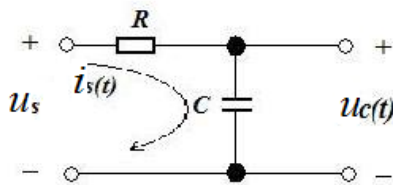


图2 合成后的防护仪等效电路

从等效电路图二可以看出防护仪的前置电路的实质可以等效为积分电路，即电离室探测器接收辐射后产生的电离电流 $i_s(t)$ ，经高输入阻抗 (R) 的前置放大器 PA 进行放大并对电容 C 充电，电容 C 上的电压值 $u_c(t)$ 近似地正比于输入电压 u_s 对时间的积分。电容 C 上的电压值 u_c 为电离电流 $i_s(t)$ 随时间的积分，其函数表达式为：

$$u_c(t) = \frac{1}{C} \int i_s(t) dt \approx \frac{1}{R \times C} \int u_s(t) dt$$

或表示为 e 指数函数为：

$$u_c(t) = u_s - u_s e^{-\frac{t}{RC}} = u_s (1 - e^{-\frac{t}{RC}}) \quad (t > 0)$$

2.3 防护仪的时间常数

按照经典的电子学理论，对于 RC 电路的时间常数为等效电阻 R 与等效电容 C 的乘积，用 τ 表示：

$$\tau = R \times C$$

时间常数在电子线路中是一个很重要的参数，用来表征过渡过程的长短。 τ 越大则过渡过程时间越长，反之就短。若 R 的单位为欧姆， C 的单位为法拉，则 τ 的单位为秒。对于防护仪的等效电路图二，电容 C 上的电压值 u_c 随时间按指数规律上升。一个 τ 的时间截止时，电容 C 上的电压值 u_c 约等于输入信号电压 u_s 的 63.2%，时间常数越大，则防护仪的响应就越慢，反之则越快。防护仪的响应时间与 τ 的对应关系曲线见图三。

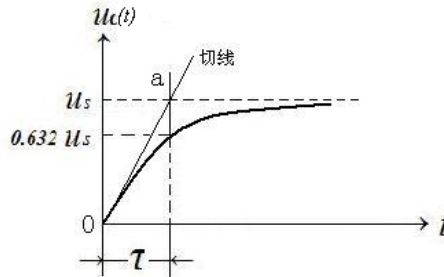


图3 防护仪的响应时间与 τ 的对应关系曲线

τ 可以从 u_c 的变化曲线上求得。从曲线上任选一点起算，每经过 $t = \tau$ 秒的时间，电流或电压就变化了起算值与稳态值之差的 63.2%，即尚余 36.8% 需要在以后过程中完成。或者可在起算点“0”做指数曲线的切线，此切线与稳态值坐标线 u_s 的交点 a 与起算点之间的时间坐标差即为时间常数。相对于常防护仪的时间常数 τ 来说：取测量电路的等效电阻 R 为欧姆、等效电容 C 为法拉，则：

$$\tau = RC = 10^{11} \times 10^{-11} = 1 \text{ (秒)}$$

核电子学理论一般认为，仪器电路从电离室探测器接收到稳定的信号 u_s ，需经过 5 倍的时间常数 (5τ) 的时间，放大电路的过渡过程才能趋于结束。防护仪的读数从检测到信号逐步开始上升，大约需要 5 秒钟时间才能接近 100% 的响应读数值。

2.4 防护仪响应时间的综合分析

对于一台经过充分预热后的防护仪响应时间来说，一方面影响主要来自高输入阻抗的前置放大电路，而电离室探测器的响应时间仅在微秒的量级可忽略不计。另一方面防护仪的量程一般探测下限 $10^{-2} \mu\text{Sv/h}$ 至最大量程 10^2 mSv/h ^[7]，所对应的电路等效高阻值也从高到低、时间常数由大到小，表现为实际监测中，被测量的辐射剂量水平越低、防护仪的量程约低、响应时间越长。以目前辐射防护监测机构常用的 451P 型防护仪为例，笔者查阅了美国 FLUKE 公司生产的 451P-DE-SI 巡测仪相关指标参数。在说明书中的“响应时间”一项，有如下使用注意事项“对于满刻度阶跃上升，从读数 10% 到 90% 的模拟响应时间取决于操作量程”，在不同本底辐射照射量率下的阶跃上升响应时间为表 1。

表 1 不同本底的阶跃上升响应时间

从本底到满刻度值	达到终值 90% 的时间 (秒)
400 $\mu\text{R/h}$	4.8
4 mR/h	3.3
10 mR/h	4.3
40 mR/h	4.5
100 mR/h	2.7
1 R/h	2.0
4 R/h	2.7

表 2 显示在量程不变时，测量照射量率阶跃上升（或下降）从终值的 10% 到 90% 各量程所用的响应时间。

表 2 同一量程时的阶跃上升响应时间

451P-DE-SI 量程	10% - 90%(秒)
0~500 μ R/h (5 μ Sv/h)	5.0
0~5 mR/h (50 μ Sv/h)	2.0
0~50 mR/h (500 μ Sv/h)	1.8
0~500 mR/h (5 mSv/h)	1.8
0~5 R/h (50 mSv/h)	1.8

根据以上的 451P 典型防护仪的指标参数可以看出，它们与本文第 2 部分等效电路的理论计算完全一致。分析可知常用防护仪的时间常数 τ 为 1 秒左右（以秒为量级单位），仪器的剂量读数从辐射信号超过探测下限开始，需要大约 5 秒钟响应才能趋于饱和。

3 医用 X 射线机的曝光时间

在分析了防护仪的时间响应性能以后，我们再了解医用诊断 X 射线机摄影（拍片）时的曝光时间。目前医疗机构对诊断 X 射线受检者进行拍片检查时（包括 CR、DR），放射科医生需根据所检查的部位选择相应曝光条件，曝光时间的选择范围在百分之一秒至数秒之间。为了提高影像清晰度、医生会尽可能采用短的曝光时间，以减少受检者心脏跳动等因素引起的图像模糊现象，提高成像的质量、同时降低射线对医护人员和受检者的辐射伤害^[8]。例如常用胸片摄影的曝光时间范围在 0.1 至 0.5 毫秒之间。一部分医用诊断 X 射线机还具有透视功能，如门诊胸透、心导管介入用 C 型臂等^[9]。它是一种 X 射线管电流低于 5 毫安、小功率、长时间的曝光方式，一般透视档的 X 射线束曝光时间可持续数十秒钟。

4 结论

对于医用诊断 X 射线机透视时的漏射线防护检查，只要能保证加载的 X 射线束持续时间超过 5 秒，防护仪的响应时间是足够的。

由于医用诊断 X 射线机拍片时的曝光时间较短，在分析了电离室型防护仪的时间常数等性能后我们知道，若使用它检测拍片时的防护、或者测量 X 射线管的输出剂量，防护仪的时间响应远远跟不上拍片的曝光时间致使测量值很低，即使进行所谓的“时间修正”也于事无补。造成评价结果低于实际辐射危害，这是违背辐射防护应尽可能“偏安全”原则的。另一方面由于防护仪探测下限灵敏度的限制，实际检测中很难测量出防护条件较好的、环境辐射水平的 X 射线机房漏射线剂量。

笔者建议使用能量响应较好的固态传感器型剂量仪^[10]，来检测医用诊断 X 射线机的漏射线，一方面探测下限可满足环境辐射水平的测量，同时剂量仪的时间常数较小，仪器的响应时间可满足毫秒量级的检测^[11]。对于开展质量控制（QC）和质量保证（QA）时医用诊断 X 射线机输出量的测量，则应该使用专门的诊断 X 射线剂量仪，此类仪器一般选择专用的半导体材料做为探测器^[12]，仪器的能量响应及电路时间常数等指标，完全可以满足质控检测工作的需求。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部令第 46 号，放射诊疗管理规定[M]. 北京：人民卫生出版社，2006：6-9.
- [2] 国家质量监督检验检疫总局.GB18871-2002 电离辐射防护与辐射源安全基本标准[S].北京：中国标准出版社，2002：8-10.
- [3] F.H.阿蒂克斯等.施学勤等译，辐射剂量学（第二卷）[M]. 北京：原子能出版社，1981：45-66.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，GBZ130—2013 医用 X 射线诊断放射防护要求[S]，北京：中国标准出版社，2013：12-13.
- [5] 李星洪. 辐射防护基础[M]. 北京：原子能出版社.1982：17-19.
- [6] 秦世才、贾香鸾，模拟集成电子学[M].天津：天津科学技术出版社.1996：122-130.
- [7] ICRU REPORT No.74, PATIENT DOSIMETRY FOR X RAYS USED IN MEDICAL IMAGING, THE

- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIATION UNITS AND MEASUREMENTS[M], DECEMBER 2005, 65-67.
- [8] 张丹枫.医用 X 射线防护技术与管理[M].山西: 山西科学教育出版社, 1990: 21.
- [9] 国家质量监督检验检疫总局, JJG744-2004 医用诊断 X 射线辐射源计量检定规程 [M].北京: 中国计量出版社, 2004: 7-9.
- [10] 赵士庵等. X 射线照射量标准装置的研究和建立. 中华放射医学与防护杂志[J].1995, 5(2): 30.
- [11] 中华人民共和国国家标准. GB/T 19629-2005 医用电气设备 X 射线诊断影像中使用的电离室和(或)半导体探测器剂量计[S], 北京: 中国标准出版社, 2005: 2-3.
- [12] 赵士庵,欧向明. RD-98智能型诊断X射线剂量计的研制[J]. 《中华放射医学与防护杂志》, 2001, 21(1):50-52.

作者简介: 欧向明 (1964-), 男, 大学本科, 主任技师, 中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所, 主要从事医用诊疗设备辐射防护检测与质量控制的相关研究工作。北京德胜门外新康街 2 号; 100088; 电话: 010-62389946 , 13691363351; E-mail:xiangmingou@hotmail.com

(医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿)

LUNA 全身伽马刀输出因子的蒙卡模拟研究

袁继龙 程金生*

中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所 辐射防护与核应急中国疾病预防控制中心重点实验室

北京 100088

通信作者: 程金生, chengjs3393@163.com

[摘要]目的: 利用蒙卡模拟方法, 对 LUNA 全身伽马刀重要剂量学参数输出因子进行研究。**方法:** 通过厂家提供技术文档建立 LUNA 全身伽马刀蒙卡模型, 模型验证后, 结合厂家测量输出因子所用探测器, 设置蒙卡模型相关参数进行模拟计算, 最后比较分析厂家提供输出因子和蒙卡模拟计算出输出因子的差异。**结果:** 在 3% 偏差范围内, 不同准直器条件下, 厂家提供的输出因子和蒙卡模拟计算得到的输出因子符合很好, 也进一步分析了相关差异的原因。**结论:** LUNA 全身伽马刀输出因子的蒙卡模拟研究为该设备的临床使用和质控提供了参考和依据。

[关键词]LUNA 全身伽马刀; 蒙卡模拟; 输出因子

Monte Carlo Simulation study of LUNA stereotactic body radiotherapy device's output factors Yuan Jilong, Cheng Jinsheng

Chinese Center for Medical Response to Radiation Emergency, National Institute for Radiological Protection, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100088, China

Corresponding author: Cheng Jinsheng, Email: chengjs3393@163.com

[Abstract]Objective: Using Monte Carlo simulation method to study the important dosimetric parameter output factor of the LUNA stereotactic body radiotherapy device. **Methods:** Follow the manufacturer's technical documentation to establish the LUNA stereotactic body radiotherapy device's Monte Carlo model and after model validation, refer to the output factor measurement's detector provided by manufacturer, set the relevant parameters in Monte Carlo model, at last, compare and analysis the difference of output factor which provided between by manufacturer and calculated by Monte Carlo simulation. **Results:** In the 3% deviation range, under the different collimator of condition, Output factors which provided by manufacturers and calculated by Monte Carlo are in good agreement, the reasons for the difference are also analyzed. **Conclusion:** LUNA stereotactic body radiotherapy device's output factors of Monte Carlo simulated research work provides reference and basis for the clinical use of this equipment and for quality control of it.

[Key words] LUNA stereotactic body radiotherapy device; Monte carlo simulation; Output factor

Fund program : International Atomic Energy Agency Technical cooperation programme (CPR6006)

LUNA 全身伽马刀是深圳一体公司生产的 LunaTM-260 型伽马刀, 是一套全身立体定向放射治疗专用设备, 目前全国已经有四十多台 LUNA 全身伽马刀应用于临床治疗, 其有 42 颗 ⁶⁰Co 放射源在源体中沿着临床 XY 平面呈扇形对称分布, 通过准直器聚焦在等中心位置, LUNA 全身伽马刀配备 6 组不同规格(6mm×6mm、8mm×8mm、14mm×14mm、14mm×20mm、14mm×40mm、14mm×60mm 分别对应 1 号、2 号、3 号、4 号、5 号和 6 号准直器)的矩形孔准直器, 临床治疗时, 放射源体连同准直器可以绕着临床 Z 轴进行旋转进行非共面的聚焦照射, 最大旋转角度是以临床 Y 轴为基准的 180°; 上述六个型号准直器以满足头部、体部肿瘤的体积大小的立体定向放疗照射需要进行安装使用, 所有准直器条件下在等中心焦点处形成的聚焦野, 皆非传统放疗 10cm×10cm 的标准照射野, 结合 LUNA 全身伽马刀的临床动态旋转照射治疗特点, 其剂量学研究有着极其重要的临床治疗和质控意义。

目前, LUNA 全身伽马刀主要在国内使用, 相关剂量学研究报道很少^[1-6], 因此结合蒙卡模拟的优势进行建模, 比对厂家测试结果, 对 LUNA 全身伽马刀的输出因子这个重要剂量学参数进行研究很有必要^[7-10], 研究结果为 LUNA 全身伽马刀的放疗质控提供参考和依据。

1 资料和方法

以 LUNA 全身伽马刀为模型, 根据厂家提供的技术文档, 将放射源, 放置放射源的源体, 预准直器、终准直器等剂量学相关部件的几何尺寸、相对空间位置分布、对应材料、动态旋转模式作为模型的输入参数进行蒙卡模拟计算。

蒙卡模拟计算使用加拿大国家研究中心开发的一款通用蒙卡模拟程序工具包-EGSnrc, 上述建模部分的相关部件几何尺寸、相对空间位置分布、对应材料在 BEAMnrc 模块 3 号源项中进行设置, 抽样 γ 粒子数为 2×10^9 , 获得终准直器出口位置的源相空间文件, 其主要包括射线到达设定位置区域的位置、角动量及对应的能量等分布信息。

以此源相空间文件为输入文件在 DOSXYZnrc 模块中进行设置, 该部分设置分两步进行, 第一步为验证蒙卡模型, 对应实际测量情况, 在 8 号源项中设置相关源分布进行静态聚焦照射^[11], 模体体素为 1mm×1mm×1mm, 抽样 γ 粒子数为 2×10^9 , 分析模拟结果 3ddose 文件, 提取临床 X 轴、Y 轴和 Z 轴上的聚焦野剂量分布信息, 计算剂量分布半高宽, 和厂家技术文件提供相关信息进行比对分析、验证模型; 第二步在验证蒙卡模型的基础上, 在 20 号源项中根据源体旋转拉弧的角度、源的活度实际分布进行设置, 等中心处设置 8cm×8cm×8cm 的有机玻璃模体, 等中心位置体素根据不同准直器条件下厂家测量输出因子所用探测器灵敏体积进行设置, 3 号、4 号、5 号、6 号准直器条件下, 使用 0.015cc 电离室进行测量, 其灵敏体积近似为 2mm×2mm×5mm, 1 号、2 号准直器条件下, 使用 Diode 半导体探测器进行测量, 其灵敏体积近似为 1mm×1mm×1mm, 对这些感兴趣区域体素和 0°~180°的旋转聚焦照射进行编程设置, 每个准直器条件下, 抽样 γ 粒子数均为 2×10^9 , 分析模拟结果 3ddose 文件, 获取等中心处剂量值, 相应剂量值(归一到每一个粒子)误差均控制在 $\leq 0.5\%$ 范围内, 以最大尺寸的 6 号准直器为基准, 分别计算其余准直器条件下的输出因子, 并于厂家所提供技术文件中的相应输出因子进行比较分析。

2 结果

基于 EGSnrc 的蒙卡模拟环境在 Ubuntu12.04 32 位系统下搭建, 运行 CPU 为四核 InterCoreTM760 2.8GHz, 有效利用内存大约为 3.0GB, 每个准直器条件下 BEAMnrc 模块运行大概 4.5 小时左右, 每个准直器条件下 DOSXYZnrc 模块运行大概 8 个小时左右。

LUNA 全身伽马刀静态聚焦照射时, 等中心处聚焦野剂量分布半高宽见表 1、表 2 和表 3。

表 1 X 轴上剂量分布半高宽(单位: mm)

准直器	剂量分布半高宽 (厂家)	剂量分布半高宽 (MC 模拟)	偏差
1#	5±1.0	6.68	1.68
2#	8±1.5	9.09	1.09
3#	14±2.0	14.78	0.78
4#	21±2.5	20.33	-0.67
5#	43±3.0	39.65	-3.35
6#	60±3.0	58.61	-1.39

表 2 Y 轴上剂量分布半高宽 (单位: mm)

准直器	厂家	MC 模拟	偏差
1#	5±1.0	6.68	1.68
2#	8±1.5	9.09	1.09
3#	14±2.0	14.78	0.78
4#	20±2.0	20.33	0.33
5#	40±3.0	39.65	-0.35
6#	60±3.0	58.61	-1.39

表 3 Z 轴上剂量分布半高宽 (单位: mm)

准直器	厂家	MC 模拟	偏差
1#	5±1.0	6.92	1.92
2#	10±1.5	9.31	-0.69
3#	15±2.0	15.09	0.09
4#	14±2.0	15.20	1.20
5#	14±2.0	15.23	1.23
6#	14±2.0	15.23	1.23

根据不同准直器条件下, 分别进行对应的焦点处感兴趣区域的体素设置, 模拟计算结果归一到每个抽样模拟计算的粒子上, 见表 4。

表 4 蒙卡模拟等中心处感兴趣区域剂量值 (单位: $\times 10^{-17}$ cGy)

准直器	6#	5#	4#	3#	2#	1#
剂量	9.324	9.274	9.097	8.945	8.486	6.965

由表 4 的剂量值计算 LUNA 全身伽马刀不同准直器条件下的输出因子, 并和厂家提供基于测量计算出的输出因子进行比较, 相应偏差见表 5。

表 5 厂家提供输出因子和蒙卡计算输出因子比较

准直器	厂家	MC 模拟	偏差 (%) *
6#	1	1	0.00
5#	0.996	0.995	-0.10
4#	0.979	0.976	-0.31
3#	0.932	0.959	2.82
2#	0.924	0.910	-1.54
1#	0.754	0.747	-0.94

* (表注): 偏差计算公式: $[(MC \text{ 模拟}-\text{厂家})/MC \text{ 模拟}]*100\%$

3 讨论

本研究目的就是在蒙卡模拟计算辅助下分析 LUNA 全身伽马刀输出因子, 涉及的聚焦野焦点吸收剂量全部为小野模式, 相较于传统的放疗射野剂量分布的测量, 小野模式需要考虑灵敏体积较大的探测器, 如 0.6cc 及 0.125cc 电离室, 在聚焦野内测量时存在侧向电子欠平衡效应及体积效应问题, 这两个效应会影响到测量结果的准确性, 而且 LUNA 全身伽马刀所有准直器条件下的聚焦野都是非标准野, 直接用灵敏体积小电离室如 0.015cc 电离室和其他探测器如 Diode 半导体探测器和 MOSFET 场效应管探测器测量前不但需要在标准辐射场下准确刻度修正, 而且需要预先了解所测聚焦野的剂量分布情况, 以便在不同的聚焦野剂量分布条件下准确使用合适的探测器。

本研究通过厂家技术文档提供的相关参数, 建立 LUNA 全身伽马刀蒙卡模型, 模拟计算得到的等中心焦点处三维剂

量分布,进一步提取出沿着临床 X、Y、Z 轴上剂量分布半高宽和厂家提供的设计尺寸进行对比,从结果的表 1,表 2 和表 3 的对比中,除了最小准直器条件下模拟结果大于设计允许偏差外,原因应该是模体体素设置为 1mm×1mm×1mm,相较于 5mm 的剂量分布半高宽相对较大,而且分析模拟计算结果时,采用线性插值方法获取模拟剂量分布半高宽的方法造成的,此差异在随后研究中将采用更小的体素来分析该准直器条件下聚焦野的剂量分布^[12],其余均在聚焦野设计允许偏差之内,因此本研究建立的 LUNA 全身伽马刀蒙卡模型得到验证。

利用验证过的蒙卡模型,参考蒙卡模拟出剂量分布半高宽,可以选择灵敏体积合适的探测器进行输出因子的测量,本研究首先为了验证厂家给出的输出因子,按照厂家测试所采用探测器的灵敏体积在蒙卡模型的模体中进行焦点处感兴趣区域设置进行模拟计算^[13-15],从表 5 中,可以看到厂家测试得到的输出因子和本研究蒙卡模型模拟计算得到的输出因子的差异,其中 4 号、5 号准直器的输出因子偏差很小,3 号准直器偏差较大,应该是厂家测试所用 0.015cc 电离室在此准直器条件下的聚焦野内出现体积平均效应^[16],造成测量值偏低,测量结果和模拟结果出现如此偏差,1 号、2 号准直器条件下,输出因子偏差相较于 3 号准直器条件,偏差小很多,但相较于 5 号和 6 号准直器条件,偏差要明显大一些,而且此偏差均表现为测试结果大于蒙卡模拟结果,厂家测试 1 号和 2 号准直器用的探测器是 Diode 半导体探测器,其灵敏体积的半导体有效原子序数大于测试及模拟所用有机玻璃模体,在测量过程中会有一定程度的过响应效应造成测量数据偏大,从而导致测试和模拟输出因子的偏差。

通过建立 LUNA 全身伽马刀的蒙卡模拟模型,我们可以更容易的分析 LUNA 全身伽马刀的焦点处三维剂量分布情况,辅助解决现实中不容易实验测量的剂量学参数的问题,辅助实验测量中合适探测器的选择,相应复杂射野情况下修正因子的获取和测试结果的科学合理性分析^[17,18]。本研究将进一步进行 LUNA 全身伽马刀的剂量学研究。

4 结语

本研究介绍了建立 LUNA 全身伽马刀蒙卡模型的方法,在 3% 的偏差范围内,厂家提供的输出因子和蒙卡模拟结果符合的很好,并进一步分析了输出因子的测量和模拟结果在不同准直器条件下偏差的原因。本研究为 LUNA 全身伽马刀设备的临床使用及质控提供了参考和依据。

参考文献

- [1] 张晓峰,乔宝龙.有关伽玛刀的技术问题探讨[J].中国肿瘤,2007,16(7):582-584.
- [2] 黄禹,端正澄,朱国力,等.全身伽玛刀机械结构设计与制造[J].机械制造,2006,44(7):28-30.
- [3] 张重魁,莫军扬.体部伽玛刀临床应用及进展[J].实用癌症进展,2012,27(1):107-110.
- [4] 康静波.体部 γ 刀治疗技术的进展[J].武警医学,2009,20(6):485-488.
- [5] 刘涵,郭吉丰,罗浩,等.伽玛刀剂量场测量分析及验证系统的设计和研究[J].中国医疗器械杂志,2009,29(6):402-405.
- [6] 廖福锡,夏邦传,莫莉,等.SGS- I 立体定向伽玛线全身放疗系统源体定位系统的改进[J].2010,17(5):12-13.
- [7] 彭柳芬,孔令人,范善翔.Monte Carlo 模拟在伽玛刀治疗中的应用[J].医疗设备信息,2006,26(1):9-11.
- [8] Giuseppe Battistoni, Fabrizio Cappucci, Nicola Bertolino, et al. FLUKA Monte Carlo simulation for the Leksell Gamma Knife Perfexion radiosurgery system: Homogeneous media[J].2013,29(6): 656-661.
- [9] H Benmakhlouf, J Johansson, I Paddick, et al. Monte Carlo calculated and experimentally determined output correction factors for small field detectors in Leksell Gamma Knife Perfexion beams[J]. Phys Med Biol, 2015,60(10):3959-3973.
- [10] E. Pappas, A. Moutsatsos, E. Pantelis, et al. AN EGSNRC-BASED MODEL OF THE GAMMA KNIFE PERFEXION UNIT FOR SMALL FIELD DOSIMETRIC CALCULATIONS[J]. Physica Medica 2014,30(e):e108-e109.
- [11] Sangroh Kim, Terry T Yoshizumi, Fang-Fang Yin, et al. Spiral computed tomography phase-space source model in the BEAMnrc/EGSnrc Monte Carlo system: implementation and validation[J]. Phys Med Biol, 2013,58(8): 2609-2624.
- [12] 吴爱东,吴宜灿.CT 图像的体元大小对 EGSnrc 蒙特卡罗剂量计算的影响[J].核技术,2007,30(2):143-146.
- [13] Josef Novotny Jr., Jagdish P. Bhatnagar, Mubina A. Quader, et al. Measurement of relative output factors for the 8 and 4 mm collimators of Leksell Gamma Knife Perfexion by film dosimetry[J]. Medical Physics 2009,36(5):1768-1774.
- [14] Anna Ralston, Paul Liu, Kirbie Warrener, et al. Small field diode correction factors derived using an air core fibre optic scintillation dosimeter and EBT2 film[J]. Phys Med Biol, 2012,57(9):2587-2602.

- [15] Andreas Mack, Stefan G. Scheib, Klinik Im Park, et al. Precision dosimetry for narrow photon beams used in radiosurgery—Determination of Gamma Knife® output factors[J]. Med Phys, 2002, 29(9):2080-2089.
- [16] Jen-San Tsai, Mark J. Rivard, Mark J. Engler, et al. Determination of the 4 mm Gamma Knife helmet relative output factor using a variety of detectors[J]. Med Phys, 2003, 30(5):986-992.
- [17] Otto A Sauer, Jürgen Wilbert. Measurement of output factors for small photon beams[J]. Med Phys, 2007, 34(6):1983-1988.
- [18] Josef Novotny Jr., Jagdish P. Bhatnagar, Ajay Niranjnan, et al. Dosimetric comparison of the Leksell Gamma Knife Perfexion and 4C[J]. J Neurosurg(Suppl), 2008, 109(12):8-14.

基金项目：国际原子能机构 2014-2015 国际合作项目(CPR6006)

第一作者：袁继龙（1982-），博士，助理研究员，中国疾控中心辐射安全所；研究方向：辐射剂量与辐射防护，13264193065 E-mail: 13264193065@163.com

通讯作者：程金生 E-mail: chengjs3393@163.com 职称：研究员，放射诊疗设备质控室主任，中国疾控中心辐射安全所。

（医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿）

2013 年广西医用诊断 X 射线摄影机质量控制检测结果及分析

梁桂强 覃志英* 谢萍 梁挺 陈掌凡 陈发想 董颖

广西壮族自治区疾病预防控制中心，放射卫生防护所，南宁 530028

[摘要] **目的：**了解 2013 年广西医用诊断 X 射线摄影机性能的质量控制状况，分析检测项目不合格的原因，为提高医用诊断 X 射线摄影机性能合格率提供科学依据。**方法：**依据 WS 76-2011《医用常规 X 射线诊断设备影像质量控制检测规范》，采用 Barracuda X 射线输出评估装置对 2013 年广西 171 家医院 282 台医用诊断 X 射线摄影机进行性能及质量控制检测。**结果：**在 282 台 X 射线摄影机中，235 台质量控制检测项目全部合格，合格率为 83.3%。其中，三级医院、二级医院及二级以下医院的合格率分别为 93.7%、97.1%、68.1%，二级以下医院的机器合格率低于其他医院，差异有统计学意义。此外，进口机性能合格率高于国产机。**结论：**广西二级以下医院医用诊断 X 射线摄影机性能及质量检测合格率偏低，需进一步加强医用诊断 X 射线摄影机性能检测及质量控制。

[关键词] X 射线摄影机；质量控制检测；结果分析

The results and analysis of image quality control in Guangxi medical X-ray diagnostic equipment in 2013

Liang Gui-qiang, Qin Zhi-ying, Xie Ping, Liang Ting, Chen Zhang-fan, Chen Fa-xiang, Dong Ying

[Abstract] Objectives To understand image quality control in Guangxi medical X-ray diagnostic equipment in 2013, and analyzing the reason of unqualified, then providing a scientific basis to improve performance qualification rate of medical X-ray diagnostic equipment. **Methods** The image quality control of 282 medical X-ray diagnostic equipment from 171 hospitals in 2013 were conducted through Barracuda x-ray output evaluation device, according to Specifications for testing of image quality control in medical X-ray diagnostic equipment (WS 76-2011). **Results** In 282 medical X-ray diagnostic equipment, 235 are completely qualified and the qualified rate is 83.3%. The qualified rate of tertiary hospitals, second-class hospitals, and below second-class hospitals are 93.7%, 97.1%, 68.1%, respectively. The qualified rate of below second-class hospitals are lower than other hospitals, a statistically significant difference. In addition, the performance qualified rate of import machine is higher than the homebred machine. **Conclusions** The performance and quality test qualified rate of x-ray image medical machine in below second-class hospitals is low. The performance measuring and image quality control of medical X-ray diagnostic equipment need to be improved.

[Keywords] medical X-ray diagnostic equipment, quality control and detection, result analysis

随着我国科技和经济的发展，医用诊断 X 射线影像技术也在不断进步，其在为医学研究及人类健康带来便利的同时，也引出了医学辐射剂量的安全和健康危害问题。医用诊断 X 射线摄影机质量控制检测是减少职业人员和受检者受照剂量的根本保障，同时也是提高影像质量，减少误诊率、漏诊率和重拍率的有效途径。卫生部令第 46 号《放

射诊疗管理规定》^[1]明确规定,从事放射诊疗服务的医疗机构,必需每年定期开展放射诊疗设备质量控制检测,放射诊疗质量控制必须在正常的情况下,方能从事放射诊疗技术工作。为此,2013年广西壮族自治区疾病预防控制中心对广西区内171家医院282台医用诊断X射线摄影机进行设备性能的质量控制检测,对比国产机与进口机的性能,并分析其检测项目不合格的原因,为提高医用诊断X射线摄影机性能合格率提供科学依据。

1 检测对象与检测方法

1.1 检测对象

广西171家医院的282台医用诊断X射线摄影机。

1.2 检测方法

依据WS 76-2011《医用常规X射线诊断影像质量控制检测规范》^[2]的质量控制检测规范要求进行检测,按状态检测标准值对每台设备的检测结果进行评价。设备检定在有效期内,根据现场状况确定每台设备检测项目。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0进行数据分析,医用诊断X射线摄影机质量控制检测合格率比较用卡方检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同等级医院X射线摄影机性能检测合格率分析

不同等级医院X射线摄影机性能检测合格率分析结果见表1。2013年广西X射线摄影机的质量控制检测项目全部合格率高于2011年广西的检测结果^[3],三级医院及二级医院的合格率(分别为93.7%和97.1%)高于二级以下医院的合格率(68.1%),差异有统计学意义。

表1 不同等级医院X射线摄影机性能检测合格率分析

医院等级	医院数量(家)	设备总数(台)	合格数(台)	合格率(%)
二级以下	105	119	81	68.1
二级	24	35	34	97.1 ^a
三级	42	128	122	93.7 ^a
合计	171	282	235	83.3

注: ^a 与二级以下医院相比, $\chi^2=31.267$ 、 $P < 0.001$ 。

2.2 X射线摄影机质量控制检测项目结果分析

由表2可见,有5项检测项目合格率达到100%,有5项检测项目合格率为90%~99%。项目合格率最低的是灯光照射野与X射线照射野四边的偏离(88.2%)。有部分的设备曝光时间指示的偏离超出规定范围7.3倍,灯光照射野与X射线照射野四边的偏离超出规定范围6倍,管电压指示的偏离超出规定范围5.5倍,光野与照射野中心的偏离超出规定范围5倍。

表2 X射线摄影机质量控制检测项目结果分析

检测项目	标准值	测量范围值	检测台数	合格台数	合格率(%)
自动照射量控制响应	$\pm 20\%$	(-15.6~18.4)%	52	52	100
自动照射量控制重复性	$\pm 20\%$	(0.0~8.6)%	52	52	100
输出量重复性	$\pm 10\%$	(0.0~8.67)	282	282	100
SID值的偏离*	$\pm 1.5\%$	(-1.0~1)%	222	222	100
有用线束半值层	$\geq 2.3 \text{ mmAl}$	(2.52~4.85)mmAl	282	282	100
输出量线性	$\pm 10\%$	(-16.8~23.7)%	282	276	97.8
曝光时间指示的偏离	$\pm 10\%$	(-58.2~73.4)%	222	213	95.9
有用线束与影像接收平面的垂直度的偏离	$\leq 3^\circ$	$< 1.5^\circ \sim > 3^\circ$	240	238	95.9
光野与照射野中心的偏离	$\leq 1 \text{ cm}$	(0~5) cm	246	235	95.5
管电压指示的偏离	$\pm 10\%$	(-11.8~14.8)%	282	264	93.6
灯光照射野与X射线照射野四边的偏离	$\pm 5 \text{ kV}$ 任一边 $\pm 1 \text{ cm}$ 内	(-13.6~27.5)kV (0~6) cm	246	217	88.2

*注: SID值指检测焦点与影像接受器之间的距离。

2.3 设备灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离的检测结果

不同等级医院 X 射线摄影机灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离的检测结果见表 3。二级以下医院共有 119 台 X 射线摄影机, 其中有 29 台设备缺灯光照射野, 只有 90 台能开展灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离检测。二级医院 X 射线摄影机 (35 台) 和三级医院 X 射线摄影机 (121 台) 均能开展灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离检测。三级医院的 X 射线摄影设备灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离的合格率高于二级以下医院。

表 3 设备灯光照射野与 X 射线照射野四边的偏离合格率比较

医院等级	灯光野与照射野偏离		
	台数	合格数	合格率 (%)
二级以下	90	70	77.8
二级	35	34	97.1a
三级	121	114	94.2a
合计	246	217	88.2

注: ^a 与二级以下医院相比, $\chi^2=12.496$ 、 $P<0.001$ 。

2.4 不同机型设备的检测结果

不同等级医院 X 射线摄影机机型及检测项目的检测结果见表 4。由表 4 显示, 二级以下医院国产设备占 93.3%, 其设备检测项目全部合格率为 61.3%; 三级医院国产设备占 43.8%, 其设备检测项目全部合格率为 92.8%。三级医院国产设备检测项目合格率高于 ($\chi^2=14.512$ 、 $P=0.000$) 二级以下医院, 说明三级医院对设备进行维护、保养、设备的稳定性检测工作优于二级以下医院。三级医院进口设备检测项目全部合格率与二级及二级以下医院相比较, 差异无统计学意义。经调查, 二级及二级以下医院的进口设备检测项目全部合格, 主要原因这些医院 (如福利院、红十字会医院、总工会医院等) 得到政府大力支持, 医院领导重视, 设备更新快 (大多数设备为近 5 年购置)。

表 4 不同等级医院 x 射线摄影机机型和检测项目结果统计

设备分类	设备总数	国产机型		进口机型		国产机检测项目全部合格		进口机检测项目全部合格	
		台数	合格率 (%)	台数	合格率 (%)	台数	合格率 (%)	台数	合格率 (%)
		二级以下医院	119	111	93.3	8	6.7	73	61.3
二级医院	35	23	65.7	12	34.3	22	95.7 ^a	12	100
三级	128	56	43.8	72	56.2	52	92.8 ^a	69	95.8
合计	282	190	67.4	92	32.6	147	77.3	89	96.4

注: ^a 与二级以下医院国产机子相比, $\chi^2=14.512$ 、 $P<0.001$ 。

2.5 设备质量控制检测项目不合格项结果统计

不同等级医院 X 射线摄影机质量控制检测项目不合格结果统计见表 5。二级以下医院存在 3 项不合格的设备有 6 台 (5.0%), 2 项不合格设备有 12 台 (10.1%), 1 项不合格设备有 20 台 16.8%; 三级医院存在 2 项及 2 项以上不合格设备为 2 台 (1.6%), 1 项不合格设备有 6 台 (4.7%)。说明三级医院和二级医院对设备进行维护、保养工作优于二级以下医院 (卡方值分别为 27.527 和 11.465; 均为 $P<0.001$)。

表 5 不同等级医院设备质量控制检测不合格结果统计

设备分类	检测总数	全部合格		1 项不合格		2 项不合格		3 项不合格	
		台数	合格 (%)	台数	不合格 (%)	台数	不合格 (%)	台数	不合格 (%)
		二级以下医院	119	81	68.1	20	16.8ab	12	10.1
二级医院	35	34	97.1	0	0	1	2.9	0	0
三级	128	120	93.7	6	4.7	2	1.6	0	0
合计	282	235	83.3	26	9.2	15	5.3	6	2.1

注: ^a 与三级医院相比, $\chi^2=27.527$ 、 $P<0.001$; ^b 与二级医院相比, $\chi^2=11.465$ 、 $P<0.001$ 。

3 讨论

本次检测结果表明, 282 台 X 射线摄影机质量控制检测项目全部合格有 235 台 (83.3%), 高于深圳市、江西省、濮阳市和内蒙古中西部地区^[4-7], 还有 47 台 (16.7%) 质量控制检测不合格。特别是二级以下医院, 其 X 射线摄影机检测项目全部合格率低于 70%, 医用诊断 X 射线机质量控制工作还有待提高。

对于 282 台 X 射线机的 9 项质量控制检测单项指标合格率优于深圳市^[4]、吉林省、云南省^[8-9]。9 项检测项目, 合格率最低是光野与照射野偏离 (88.2%), 与文献^[4-9]报道一致。用 SPSS 统计分析软件对表 1、表 3、表 4 和表 5 分析发现, 光野与照射野偏离的合格率、X 射线摄影机 (包括国产设备) 检测项目全部合格率、设备检测项目存在不合格项的项次数还与医院的级别有关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明光野与照射野偏离不仅是 X 射线摄影机最容易发生故障的项目, 而且发生故障的概率还与医院的管理水平有直接关系。三级医院一方面得到政府的大力支持, 同时又具有强大的技术支撑和雄厚的经济基础, 设备更新快, 有专业人员对设备维护、维修和保养, 因此, 三级医院 X 射线机质量控制检测项目相关指标总体上比二级以下医院高。因此, 政府部门除了应加大对二级等以下医院的投入, 及时更新、换代医用诊断 X 射线摄影设备外, 还需加强对医用辐射防护的监督检查, 通过督查来提高放射诊疗设备质量控制检测合格率和诊断率, 减少受检者的受照剂量, 满足开展医用影像诊断的需要。

从 X 射线摄影质量控制检测结果发现, 个别设备光野与照射野中心的偏离、光野与照射野偏离超出规定范围 5 倍、6 倍, 可能的原因是医院对设备的维护保养不够完善。有的设备因多叶遮光器精度不良或安装调整不到位, 出现照射野的灯不亮或照射野不正常等状况, 也未能及时维修; 个别设备的管电压指示值偏离、曝光时间的偏离超出规定范围 5.5 倍、7.3 倍, 说明医院对放射诊断设备定期开展稳定性检测重视不够, 这些势必使受检者接受不必要的剂量。

4 结语

医用 X 射线诊断是应用于面最广、使用频率最高的放射诊疗设备, 为了保证医用 X 射线诊断质量控制在良好的工作状态下运行, 减少受检者的辐射剂量, 开展定期开展对医用诊断 X 射线摄影机质量控制检测非常必要。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部.放射诊疗管理规定.2006 年 1 月 24 日颁布.
- [2] 中华人民共和国卫生部.WS 76-2011 医用常规 X 射线诊断影像质量控制检测规范.北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 覃志英,谢萍,梁挺等.广西部分医用诊断 X 射线摄影机质量控制检测与评价[J].中华放射医学与防护杂志,2013,33(5):529-531.
- [4] 王俊生,张怡,赵坤等.深圳市常规医用 X 射线诊断设备影像质量状况分析[J].职业卫生与应急救援,2013,31(3):129-131.
- [5] 王琦,李南翔,陈以水等.江西省 X 射线诊断设备性能现状分析[J].实用中西医结合临床,2013,13(3):72-73.
- [6] 王全锋,李举跃,陈小霞等.濮阳市医用常规 X 射线诊断设备影像质量控制检测结果及分析[J].中国辐射卫生,2012,21(2):196.
- [7] 格日勒满达呼,哈日巴拉,许潇等.内蒙古中西部地区医用 X 射线诊断机质量控制检测结果分析[J].中国辐射卫生,2011,20(4):443-444.
- [8] 王建超,刘澜涛,岳保荣等.吉林省部分地区的 X 射线诊断设备质控检测结果与分析[J].中国医学装备,2010,07(9):1-4.
- [9] 武国亮,张炳祥,唐红,等.云南省医用诊断 X 射线装置影像质量控制检测结果分析[J].中国辐射卫生,2012,21(4):447-448.

基金项目: 广西自然科学基金 (2014GXNSFAA118223, 2014GXNSFBA118173)

作者简介: 梁桂强 (1988~), 男, 硕士研究生, 医师, 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 放射卫生防护所, 主要从事放射卫生防护检测与评价工作, 电话:0771-2518676, E-mail:lqg26855@163.com

通讯作者: 覃志英 (1964~), 女, 研究生, 主任技师, 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 放射卫生防护所, 主要从事放射卫生防护检测与评价工作, 电话:0771-2518676, E-mail:qzy8883@163.com

(医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿)

2015 年广西放射诊断设备与放射防护用品的分布调查

梁挺 陈发想 董颖 陈掌凡 梁桂强 吴应宇 谢萍*

广西壮族自治区疾病预防控制中心, 放射卫生防护所, 广西 南宁 530028

[摘要] **目的** 了解广西放射诊断设备的数量和放射防护用品的配备情况。**方法** 以广西所有放射诊疗机构为调查对象, 以普查的形式将调查表发放至广西各级卫生行政部门, 分别由其负责辖区内调查表的填报。**结果** 广西的放射诊疗机构平均每家拥有放射诊断设备 1.8 台, 平均每台放射诊断设备配备放射工作人员 3.0 人; 广西放射诊疗机构铅橡胶围裙(方巾)的配备率为 48.7%, 铅橡胶颈套的配备率为 31.2%, 铅橡胶帽子的配备率为 33.1%。**结论** 广西放射诊断设备数量不足, 放射防护用品配备数量不能满足防护要求。

[关键词] 放射诊断设备; 放射工作人员; 防护用品

Investigate about the distribution of radiological diagnostic equipments and protective articles in Guangxi 2015

[Abstract] **Objective:** to acquire the information about quantity of radiological diagnostic equipments and distribution of protective articles in Guangxi. **Methods:** Survey covered all the radiation medical facilities, we distributed questionnaire to the health administrative departments at all levels in Guangxi, by its is responsible for the questionnaire provided within their respective jurisdictions. **Results:** it is shortage of diagnostic radiology equipments and protective articles equipped by radiation medical facilities, radiation workers are also in uneven distribution. **Conclusion:** the quantity of radiological diagnostic equipments is not sufficient, the quantity of radiation protective articles equipped can't meet the requirement of protection .

[Key words] radiological diagnostic equipments; radiation workers; protective articles

放射诊断设备主要用于 X 射线检查, 它产生的 X 射线透过人体组织, 可以清晰的显示人体主要解剖结构。这种方便快捷的影像诊断功能, 让放射诊断设备在 X 线检查中使用的频率不断提高, 但使用放射诊断设备进行 X 射线检查会产生电离辐射, 给机体带来危害。据 UN-SCEAR 评估, X 线检查时所产生的医疗照射是最大的电离辐射照射来源^[1], 所以必须重视受检者的防护。有研究认为, 通常 0.33mm 铅当量的防护用品可减弱 90%左右的辐射剂量^[2], 为此, 配备必要的防护用品, 对减少受检者辐射剂量, 保护受检者健康至关重要。国家出台了相应的法规, 要求各医疗机构根据每台 X 射线设备的工作内容, 现场配备必要的防护用品与辅助防护设施, 其数量应满足开展工作需要, 对陪检者应至少配备铅防护衣^[3]。为更好了解广西各级医疗机构放射诊断设备的数量和放射防护用品的配备数量情况, 促进各个放射诊疗机构合理配备放射防护用品, 开展了本次调查。

1 对象与方法

1.1 调查对象

放射诊疗机构: 广西地区所有开展放射诊疗工作的三级医院、二级医院、一级医院、民营医疗机构(包括民营专科医院、民营综合医院、个人门诊部和牙科诊所)和其他机构(疾病预防控制中心和职业病防治研究院等公益性医疗机构)。

1.2 调查内容

调查内容包括: 放射诊疗机构的放射诊断设备数量与类型; 放射工作人员数量与分布; 放射防护用品的类型与数量等。

1.3 调查方法

依据《中华人民共和国职业病防治法》^[4]、《放射诊疗管理规定》^[5]、《医用 X 射线诊断放射防护要求》等相关法律法规、标准及规范设计统一的调查表, 由广西卫生和计划生育委员会将调查表下发至广西各级卫生行政部门, 当地卫生行政部门指定辖区内的疾病预防控制中心负责开展辖区内调查工作, 广西壮族自治区疾病预防控制中心对调查表进行复核、数据录入与统计分析。

1.4 质量控制

为保证调查的质量, 我们对调查方案进行了严密的设计, 在开展调查前举办调查项目启动会, 对各级调查人员

进行了专业培训,对回收后的调查表格进行严格核对和电话抽查,对每个辖区随机抽取 10%的调查表进行现场核查。数据采用双人录入,交叉核对,确保数据真实可靠。使用 Epi Data3.0 建立数据库,用 SPSS16.0 进行数据分析。

2 结果

2.1 放射诊疗机构概况

截至 2015 年,广西地区放射诊疗机构、放射工作人员和放射诊断设备的数量与构成见表 1。广西地区的放射诊疗机构平均每家拥有放射诊断设备 1.8 台,平均每台放射诊断设备配备放射工作人员 3.0 人。三级医院和二级医院平均每台设备配备的放射工作人员最多,分别为 6.8 人/台和 3.1 人/台,超过了广西的平均水平;一级医院、民营医疗机构和其他公益性单位平均每台设备配备的放射工作人员较少,低于广西的平均水平。结果见表 1。

表 1 2015 年广西放射诊疗机构概况

	医疗机构		放射工作人员		放射诊断设备		平均每家 医院设备 数(台)	平均每台设 备配备放射 工作人员数 (人)
	数量 (家)	比例 (%)	数量 (人)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)		
一级医院	806	63.2	1475	20.8	917	38.9	1.1	1.6
二级医院	304	12.8	2871	40.6	913	38.8	3.0	3.1
三级医院	50	3.9	2537	35.8	374	15.9	7.5	6.8
民营医疗机构	59	4.6	97	1.4	76	3.2	1.3	1.3
其他	56	4.4	97	1.4	79	3.4	1.4	1.2
总计	1275	100	7077	100	2356	100	1.8	3.0

2.2 放射诊疗机构设备情况

本调查中的放射诊断设备全部为隔室操作设备,这其中包括了普通透视设备(不含心血管造影设备),普通 X 射线拍片机(含计算机 X 射线摄影系统、直接数字化摄影系统),乳腺机,牙科机(含口内牙科机和全景牙科机、口腔 CT 机),CT 机和其他设备如骨密度仪等。至 2015 年底,广西共有放射诊断设备 2359 台,其中拍片机最多,为 1624 台,占广西放射诊断设备的 68.8%;其次为 CT 机,为 251 台,占广西放射诊断设备的 10.6%;牙科机和透视机各为 179 和 158 台,分别占广西放射诊断设备的 7.6%和 6.7%;数量最少的是乳腺机及其他设备,为 64 和 83 台,分别占广西放射诊断设备数量的 2.7%和 3.5%。

表 2 2014 年广西医疗机构放射诊断设备分布

	透视机		拍片机		乳腺机		牙科机		CT 机		其他设备	
	数量 (台)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)	数量 (台)	比例 (%)
一级医院	25	15.8	823	50.7	12	18.8	24	13.4	22	8.8	11	13.3
二级医院	79	50	500	30.8	29	45.3	91	50.8	167	66.5	47	56.6
三级医院	28	17.7	206	12.7	22	34.4	39	21.8	56	22.3	23	27.7
民营医疗 机构	6	4.0	37	2.3	1	1.6	25	14.0	6	2.4	1	1.2
其他机构	20	12.7	58	3.6	0	0	0	0	0	0	1	1.2
各类设备 合计数量	158	100	1624	100	64	100	179	100	251	100	83	100

2.3 放射诊疗机构的放射防护用品配备情况

至 2015 年底,广西共有放射诊断设备 2359 台,除去牙片机 179 台,其余放射诊断设备为 2180 台。根据《医用 X 射线诊断放射防护要求》(GBZ130-2013)规定,除牙科机外,其他进行隔室操作的放射诊断设备必须配备的受检者个人防护用品为铅橡胶围裙(方巾)、铅橡胶帽子,铅橡胶颈套;口内牙科机必须配备的受检者个人防护用品为铅橡胶颈套,全景牙科机和口腔 CT 机必须配备的受检者个人防护用品为铅橡胶颈套和铅橡胶帽子。广西全景牙科机和口腔 CT 机的数量较少,为方便计算广西放射防护用品的配备率,本调查将全部牙科设备按口内牙科机的要求来统计放射防护用品。

广西共有铅橡胶围裙(方巾)为 1062 件,配备率为 48.7%;铅橡胶颈套 735 件,配备率为 31.2%;铅橡胶帽子有 781 件,配备率为 33.1%。按医院级别统计,一级医院有铅橡胶围裙(方巾)391 件,配备率为 43.8%,铅橡胶帽子 263 件,配备率为 29.5%,铅橡胶颈套 254 件,配备率为 27.7%;二级医院有铅橡胶围裙(方巾)400 件,配备率为 48.7%,铅橡胶帽子 315 件,配备率为 38.3%,铅橡胶颈套 280 件,配备率为 30.1%;三级医院有铅橡胶围裙(方巾)132 件,配备率为 39.4%,铅橡胶帽子 105 件,配备率为 31.3%,铅橡胶颈套 97 件,配备率为 25.9%;民营医疗

机构有铅橡胶围裙（方巾）75件，配备率为147%，铅橡胶帽子59件，配备率为116%，铅橡胶颈套66件，配备率为86.8%；其他机构有铅橡胶围裙（方巾）64件，配备率为81.0%，铅橡胶帽子39件，配备率为49.4%，铅橡胶颈套38件，配备率为48.1%。广西的放射防护用品中，以铅橡胶围裙（方巾）最多，配备率最高，铅橡胶帽子和铅橡胶颈套的数量缺口较大，配备率也较底。结果见表3。

表3 2015年广西放射诊疗机构放射防护用品配备（件）

	铅橡胶围裙 (方巾)		铅橡胶帽子		铅橡胶颈套	
	数量 (件)	配备率 (%)	数量 (件)	配备率 (%)	数量 (件)	配备率 (%)
一级医院	391	43.8	263	29.5	254	27.7
二级医院	400	48.7	315	38.3	280	30.1
三级医院	132	39.4	105	31.3	97	25.9
民营医疗机构	75	147	59	116	66	86.8
其他机构	64	81.0	39	49.4	38	48.1
合计	1062	48.7	735	31.2	781	33.1

3 讨论

3.1 广西放射诊疗机构的放射诊断设备与放射工作人员分布不均衡。调查中发现，二级、三级医院拥的设备先进，待遇水平高，以27.8%的机构数量，吸引了广西地区76.4%的放射工作人员。一级医院、民营医疗机构和其他公益性医疗机构作为基层医疗机构，数量最多，覆盖面最广，但拥有的放射诊断设备少，性能落后，配备的放射工作人员最少，这些放射诊疗机构平均为每台放射诊断设备配备的放射工作人员数量小于2人，意味着在这些放射诊疗机构中，有较多的影像医师在兼任放射操作技术人员，甚至整个放射科就仅配备一位放射工作人员。放射影像诊断是医疗机构的基础检查项目之一，广西放射诊断设备配置的失衡、放射工作人员的分布不均，增加了群众在基层医疗机构进行影像诊断检查的困难，破坏了医疗的公平获得性。

3.2 广西放射诊疗机构的放射诊断设备数量不足。据国家统计局网站的数据，至2014年底，广西共有人口4754万人，根据本次调查的放射诊断设备数量计算，广西平均拥有放射诊断设备数量为0.50台/万人；按设备类型细分，广西平均拥有透视或拍片机数量为0.37台/万人，牙科机数量为0.04台/万人，乳腺机数量为0.01台/万人，CT机数量为0.05/万人，放射诊断设备的平均数量与2000年的全国平均水平较接近^[6]，但与发达省份相比，差距较大。上海2007年人口共有1858.08万人，拥有放射诊断设备2743台，其中拍片和透视机共1638台，牙科机681台，乳腺机79台，CT机139台^[7]。上海2007年平均拥有放射诊断设备数量1.48台/万人；按设备类型细分，拍片和透视机的平均数量为0.88台/万人，牙科机的平均数量为0.37台/万人，乳腺机的平均数量为0.04台/万人，CT机的平均数量为0.07台/人。广西2015年平均拥有的放射诊断设备数量仅为上海2007年平均放射诊断设备数量的34%，差距很大。这反应了放射卫生资源配备的不均，需要政府高度重视，加以必要的宏观调控，让广西放射诊断设备的数量能逐步赶上发达地区的数量，满足广西人民日益增长的医学诊断需求。

3.3 广西放射诊疗机构放射防护用品配备不足。广西的一、二、三级医院和其他公益性机构的放射防护用品的配备数量较少，各类型防护用品的配备率在30%-50%之间，低于山东的调查结果^[8]，不符合《医用X射线诊断放射防护要求》（GBZ130-2013）的规定。民营医疗机构的放射防护用品配备中，铅橡胶围裙（方巾）和铅橡胶帽子的配备率超过100%，符合国家标准的规定，但铅橡胶颈套的配备率也没有达到100%的要求。《医用X射线诊断放射防护要求》（GBZ130-2013）自2014年5月1日开始实施，至今已有2年的时间，但各放射诊疗机构对此标准了解不深，执行力度不够，必须配备的放射防护用品数量没有及时增加。放射防护用品配备率低，导致每个机房放置的防护用品不足，不能满足受检者进行放射影像检查的防护需求，让受检者的其他非受照部位不能得到恰当有效的防护，这将导致受检者的受照剂量提高，致癌、不育等辐射随机性效应发生概率增加。

4 结论

广西平均拥有的放射诊断设备数量不足且地域分布不均，放射诊断设备和放射技术工作人员主要集中在二级医

院和三级医院,影响了基层医疗机构的有效运行,要解决此问题,需要国家宏观调控予以倾斜,鼓励广西各级医疗机构增加放射诊断设备的配置,提升广西人均拥有放射诊断设备的数量,同时政策引导,让放射工作人员下沉到各级医疗机构,缓解基层医疗结构缺少放射工作人员的难题。广西各放射诊疗机构放射防护用品配备数量不足,需要政府部门加大有关法律法规的宣贯力度,让各级医院了解《放射诊疗管理规定》和《医用 X 射线诊断放射防护要求》等法规和标准的要求,依法做事,做好医院的放射防护管理;卫生行政部门要加大监督执法力度,督促医疗机构加强受检者的医疗照射防护,这既是与国际放射防护领域新进展接轨,更是适应我国医疗卫生事业迅速发展的迫切需求^[9]。

参考文献

- [1]郑钧正,贺青华,李述唐,等.我国电离辐射医学应用中的基本现状[J].中华放射医学与防护杂志,2000,20(增刊):7-14.
- [2]林志凯,葛丽娟,等.我国电离辐射个人防护用品的现状与进展[A].第七届中国核学会“三核”论坛论文集[C],2010.
- [3]中华人民共和国卫生部.GBZ130-2013 医用 X 射线诊断放射防护要求[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [4]中华人民共和国主席令 第 52 号 中华人民共和国职业病防治法 [S]. 2011.
- [5]中华人民共和国卫生部令 第 46 号 放射诊疗管理规定 [S]. 2006.
- [6]郑钧正,贺青华,李述唐,等.我国电离辐射医学应用中的基本现状[J].中华放射医学与防护杂志,2000,20(增刊):7-14.
- [7]高林峰,姚杰,等.上海市2007年X射线诊断的医疗照射频率及其分布[J].环境与职业医学,2009,26(6):532-536.
- [8]刘伟.医疗单位放射防护用品配备、使用情况调查[J].中国辐射卫生,2005,14(4):319.
- [9]郑钧正,卓维海,等.当前放射卫生领域重点研究方向[J].中国公共卫生,2008,24(4):385-387.

基金项目: 广西自然科学基金(2014GXNSFAA118223, 2014GXNSFBA118173);

作者简介: 梁挺(1986—)男,研究生,医师,广西壮族自治区疾病预防控制中心放射卫生防护所,从事放射卫生检测与健康危害评价工作。电话:0771-2518865,邮箱:2534238442@qq.com。

通讯作者: 谢萍(1966—)女,Email: gxcdcxp@126.com,主任医师,广西壮族自治区疾病预防控制中心放射卫生防护所,所长。

(医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿)

2014~2015 年浙江省基层放疗机构医用直线加速器应用现状分析

曹艺耀 俞顺飞* 宣志强 吴寿明 赵尧贤

浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州

[摘要] **目的** 了解 2014~2015 年基层放疗机构医用直线加速器应用现状,为浙江省基层放疗机构配置医用直线加速器提供参考依据。**方法** 对 2014~2015 年浙江省基层放疗机构医用直线加速器的分布与地区情况、收入水平、人口分布进行比较分析,同时与国内外同等级别机构中医用加速器配置情况进行比较。**结果** 浙江省基层放疗机构医用直线加速器人均拥有量与全国平均水平相当,但存在设备少、分布不均衡等情况。**结论** 医用直线加速器的分布与地区的经济、人口关系密切,基层放疗机构在配置医用直线加速器时应充分考虑当地的人均收入水平及人口密度。

[关键词] 基层放疗机构; 医用直线加速器; 应用现状

The analysis of the medical linear accelerator application status in the grass-roots level radiation therapy institutions of Zhejiang Province from 2014 to 2015

Cao Yi-yao, Yu Shun-fei*, Xuan Zhi-qiang, Wu Shou-ming, Zhao Yao-xian

[Abstract] **Objectives** To understand the medical linear accelerator application status at the grass-roots level institutions of Zhejiang Province was slightly equal to the national average, but still insufficient and unevenly distributed. **Conclu** radiation therapy institutions of Zhejiang Province from 2014 to 2015, then provides scientific basis for purchasing linac. **Methods** The relations between distribution of linac and region, income, population distribution of Zhejiang Province were compared

and analyzed, as well as compared with the distribution of linac in China and abroad which were in the same level. **Results** Linac configuration in the grass-roots level radiation therapy sions The distribution of linac was associated with the economic development level and the demographic characteristics, hence the grass-roots level radiation therapy institutions should fully consider the local per income level and population density, before purchasing linac.

[Keywords] Grass-roots level radiation therapy institutions, Medical linear accelerator, Application status

医用直线加速器具有剂量率高、束流稳定, 剂量计算准确, 治疗简便无创, 环境污染小、使用更安全等优点, 成为肿瘤放射治疗中广泛较为应用的设备^[1]。调查表明, 我国每百万人所拥有的医用直线加速器数量与美国、日本等发达国家相比还有很大的差距; 据统计, 2000 年美国每百万人口医用加速器的拥有量为 8.2 台、英国为 3.4 台、法国为 4 台、日本为 4.8 台、韩国为 1.48 台, 而我国仅为 0.38 台^[2]。而在 2006 年统计中, 我国每百万人口医用直线加速器拥有量才达到 0.73 台, 截止目前该数量无明显变化^[3-4]。近年来, 浙江省的肿瘤治疗事业尤其是基层放射诊疗机构发展迅速, 其医用直线加速器数量也在不断增加, 为了掌握浙江省基层放射诊疗机构中医用直线加速器分布情况和现状, 本研究拟对 2014~2015 年浙江省基层放疗机构医用直线加速器的应用现状进行了全面的调查分析, 从而为基层放疗机构配置医用直线加速器提供科学依据。

1 浙江省医用直线加速器的发展和分布

从上世纪 90 年代末到本世纪初, 浙江省医用直线加速器使用数量快速增长, 2006 年至 2010 年保持在一个相对稳定的数量。浙江省放射治疗起步较早, 很多医用直线加速器已经运行多年, 有的甚至超龄使用, 近年来处于更新换代阶段, 增加新设备的同时淘汰旧设备, 数量上基本持平^[5]。按照世界卫生组织(WHO)推荐的平均百万人口拥有量, 我国 13 亿人口应拥有医用直线加速器 3000~3600 台, 而目前我国医用直线加速器拥有量只为该需求的 1/3^[6]。若按此推算, 浙江省近 5000 万人口则需要配备 100~160 台医用直线加速器方可满足肿瘤放疗的需求, 因此, 浙江省对医用直线加速器的需求还远远没有满足。

从浙江省各地区基层放疗机构中医用直线加速器分布情况分析, 目前已经安装运行的医用直线加速器共 8 台。大部分为国外的品牌, 如医科达、瓦里安、西门子等, 西门子约占总量的 2/3。浙江省基层放疗机构中医用直线加速器的拥有总数和百万人口拥有量与全国其他省市相比差异不大。

表 1 2014~2015 年浙江省基层放疗机构中医用加速器分布情况

地区	人口数 (万)	平均人均 GDP(万元)	加速器台数 (台)	人均拥有台数 (台/百万人)
杭州	775.7	6.72	2	0.26
宁波	637.5	5.88	1	0.16
温州	800.1	3.22	1	0.13
绍兴	467.9	5.09	1	0.21
湖州	275.5	3.77	0	0
嘉兴	409.6	4.56	0	0
舟山	122.6	5.11	1	0.82
金华	509.3	3.49	1	0.20
台州	579.2	3.59	1	0.17
衢州	219.1	2.77	0	0
丽水	238.3	2.21	0	0
全省	5034.8	4.21	8	0.17

2 浙江省基层放疗机构中医用直线加速器分布情况

由表 1 可以看出, 浙江省基层放疗机构中医用直线加速器分布极不均衡, 该情况与各地区的人均收入水平呈一定的正比关系。根据地理位置的分析, 医用直线加速器绝大部分都集中经济较发达的基层地区, 这些开展医用直线加速器放射治疗的放疗机构除了政策扶持外, 其自身资金充足, 设施完善, 而且经过技术经验积累, 治疗水平较高。

杭州基层人均拥有量明显高于全省的其他地区,每百万人口拥有 0.26 台。尽管如此仍低于 WHO 建议每百万人口拥有的数量(2~3 台)^[6];在绍兴、舟山、金华、台州地区中,直线加速器的百万人口人均拥有量在全省平均水平线之上,但仍然配备不足;而其他地区则为严重不足,有些地区由于地处山区,经济发展相对落后,而有些地区是人口覆盖数量较大。到目前为止,许多基层放疗机构已经逐步认识到放疗的巨大经济效益和社会效益,纷纷筹建放疗科、肿瘤科,医用直线加速器的配置需求极大,但是受经费、技术储备和专业技术人员配备等问题的限制,很难选择满足需求的设备。

目前,基层放疗机构对医用直线加速器在放疗工作中的重要性已有较深认识,但对于引进何种类型的医用直线加速器,其档次、辅助设备、人员素质等均是必须考虑的因素。需既能充分发挥最大的社会效益和经济效益,又能避免不必要的人力、财力等资源浪费。

3 浙江省基层放疗机构中医用直线加速器的应用方向

从国内外放射肿瘤医学的发展来看,多数国家和地区都经历了原始的镭疗、低能 X 射线治疗机、钴-60 机和医用加速器常规放疗到 SRT、3D-CRT 和单位逆向计划调强治疗等精确放疗过程。结合浙江省医用电子直线加速器配置现状和发展方向,今后浙江省基层放疗机构中在购置设备时应遵循上述发展规律,不同能力的医疗单位应当采用不同的购置策略,注意平衡发展,改善配置不足的状况,同时要努力提高全省整体的放射治疗水平。

基层放疗机构应从本单位的经济状况、专业水平和放疗技术人员配备等客观情况出发,选择最经济实用的途径完成医用直线加速器及其配套设备的购置或更新换代。基层放疗机构肩负着普及放疗技术,满足广大肿瘤患者对放疗需求的重任,应以开展常规放疗,填补空白,提高水平为重点,避免盲目求新、求精。同时在购置设备的时候不能盲目的追求价格低廉的国产设备或二手设备,应注意技术的先进性、性能的稳定性、临床的实用性、技术升级的确定性,特别是售后服务的可靠性等诸多因素^[7]。

4 讨论

基层放疗机构在购置医用直线加速器时必须做好充分细致的考察和论证,结合医院自身的实际情况,合理配置设备才能真正的发挥其自身价值和产出社会效益及经济效益^[8]。若配置不足,将会影响设备正常运转和放疗工作的开展;若过多,又会造成医院的人员设置、机房、配套设施等资源的浪费。因此,配置医用直线加速器必须考虑本地区的人口数量、肿瘤发病率、放疗机构的医疗水平和当地的经济发展情况等诸多因素。

基层放疗机构应结合本地区的经济发展状况、人口分布等因素,购置适宜的医用直线加速器,开展常规放疗,待积累一定的放疗经验后再引进较为先进的放疗技术和装备。若未经充分认证,盲目追求高、新、尖,急于一步到位很可能造成资源浪费、经济效益低下等不良后果。

参考文献

- [1]郑富强,王捷.医用直线加速器概况与进展[J].医疗设备信息,2005,20(4):30-31.
- [2]何文胜.医用电子直线加速器在安徽省的分布及购置策略[J].安徽医学,2003,24(3):77-79.
- [3]殷蔚伯,余耘,陈波,等.2006 年全国放疗人员及设备调查报告[J].中华放射肿瘤学杂志,2007,16(1):1-5.
- [4]中国卫生年鉴编辑委员会.2010 中国卫生年鉴[M].北京:人民卫生出版社,2011:261.
- [5]俞顺飞,吴寿明,赵尧贤,等.浙江省医用直线加速器分布情况及配置策略[J].中国医学装备,2013,10(1):69-71.
- [6]郑钧正,李君利.关注现代医学物理进展,加强医用辐射防护[J].辐射护,2008,28(6):377-384.
- [7] 颜春雨,钱治淮,赵晓春,等.应用性价比分析法购置医疗仪器设备的探索[J].医疗装备,2000,13(12):24-25.1
- [8] 高帆,郭强.医用直线加速器的配置及效益分析方法探讨[J].解放军医院管理杂志,2008,15(5):451-452.

作者简介: 曹艺耀(1986~),男,硕士研究生,医师,浙江省疾病预防控制中心,环境与职业卫生所,主要从事放射卫生防护检测与评价工作,电话:0571-87115089, E-mail:yyc@cdc.zj.cn

通讯作者: 俞顺飞(1982~),男,硕士研究生,主管技师,浙江省疾病预防控制中心,环境与职业卫生所,主要从事放射卫生防护检测与评价工作,电话:0571-87115238, E-mail:sfyu@cdc.zj.cn

(医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿)

热释光探测器监测患者全身照射剂量结果与分析

唐孟俭, 韦宏旷, 覃志英

广西壮族自治区疾病预防控制中心放卫所, 广西 南宁 530028

[摘要] 目的: 患者在行全身照射时进行热释光探测器剂量监测, 确保患者的照射剂量在预定的剂量偏差范围内, 保证照射剂量的准确性。**方法:** 热释光探测器放置于身体的关注部位, 按照预定的剂量率进行 2 次照射, 第 1 次照射结束及时进行测量计算, 并将检测结果告知院方, 物理师根据测量结果调整第 2 次照射时间。**结果:** 患者在行全身照射时分 2 次剂量监测, 能确保照射剂量偏差在 $\pm 5.0\%$ 允许范围内。**结论:** 患者在行全身照射时进行剂量监测且分 2 次照射是有必要的。

[关键词] 热释光探测器; 全身照射; 剂量监测; 结果分析

The monitoring results and analysis of total body irradiation dose using thermoluminescence detector in patient

Tang Meng-jian, Wei Hong-kuang, Qin Zhi-ying

[Abstract] Objective Using the thermoluminescence detector to monitor the total body irradiation dose in patients, to ensure the patients' irradiation dose do not exceed the deviation range of predetermined irradiation dose rate and the accuracy of the irradiation dose. **Method** The thermoluminescence detector was placed on the body position of most concern, then according to the predetermined irradiation dose rate for two-fractional irradiation. To the end of first time, calculating the irradiation dose rate and telling the results to the doctor. According to the measured results, the physicist adjusted the irradiation dose.

Result It could ensure the deviation range of predetermined irradiation dose rate within "plus or minus" 5.0%, while carrying out two-fractional irradiation for patients whole-body irradiation. **Conclusion** It's necessary to carry out personnel external dose monitoring while conducting whole-body irradiation.

[Keywords] thermoluminescence detector; total body irradiation; exposure monitoring; result analysis

全身照射 (Total body irradiation, TBI) 是放射治疗特殊照射方法之一, 已广泛用于白血病、何杰金氏淋巴瘤等的骨髓移植和外周血干细胞移植治疗, 其疗效已得到肯定^[1,2]。但全身照射技术比常规外照射技术复杂的多, 在实施之前要进行大量的剂量测量^[3,4], 如表面剂量、百分深度剂量、射野内均匀度、体内剂量均匀性及肺部所受剂量和剂量率等的测量。其中体内剂量均匀性及肺部所受剂量的测量尤为重要, 也比较繁琐^[5]。TBI 因剂量率低、时间长、患者体位不易固定, 照射时容易出现剂量误差, 为了保证患者的安全, 减少与预定的照射剂量的偏差, 我中心与某院的放射治疗中心合作, 对患者行骨髓移植前进行 TBI 时给予患者热释光探测器剂量监测, 监测结果与分析报告如下。

1 材料与方 法

1.1 照射条件

使用 GWXJ80 型钴-60 远距离治疗机对患者进行全身照射。钴-60 治疗机的机架角为 90° ; 放射源至患者体表的距离 (SSD) 为 450cm, 照射野为 $198\text{cm} \times 60\text{cm}$, 人体中心处的剂量率为 $11.10\text{-}12.70 \text{ cGy/min}$ 。在患者前方放置散射屏, 散射屏为 1cm 厚的有机玻璃板, 患者采用骑跨位, 前后对穿照射。

1.2 测量材料与仪器

热释光探测器为 $\text{LiF}(\text{Mg,Cu,P})$ 粉末剂量计, 热释光探测器测量仪为 RGB-3A 型热释光剂量仪, 参考剂量仪为该机配套的剂量仪。

1.3 测量方法

1.3.1 热释光探测器实际剂量刻度

首先用该机配套的剂量仪的电离室在 $30\text{cm} \times 30\text{cm} \times 30\text{cm}$ 的水箱中测量剂量读数, 再在相同的条件下用热释光探测器监测测量, 得到剂量值与热释光探测器读数的对应关系。

1.3.2 患者照射时的剂量测量

按照预定的患者体中心处 (即肚脐上 2cm 处) 照射剂量为 10Gy, 肺部剂量为 7Gy, 剂量偏差在 $\pm 5\%$ 以内。患者分

2次照射，在2个半天内完成。患者进行第1次照射前在各个关注点上布好热释光探测器，按照拟定的患者体中心处的体表剂量率进行照射，照射结束后及时对热释光探测器进行监测并计算，将结果在进行第2次照射前告知院方，院方根据监测结果来调整照射关注点的照射方案，减少与预定的照射剂量的偏差。

2 热释光探测器剂量监测结果

剂量监测结果分别列于表1和2中。

表1 4例患者照射时体表剂量率及刻度因子

患者序号	剂量 (cGy/min)	仪器测量读数			测量读数重复性	刻度因子
1	11.10	3175	3121	3137	0.8 %	3.53×10^{-5}
2	12.70	2814	2818	2872	1.1 %	4.48×10^{-5}
3	11.24	2434	2532	2511	2.1 %	4.51×10^{-5}
4	11.43	3289	3211	3303	1.5 %	3.50×10^{-5}

表2 4例患者各个关注点的实际照射剂量

患者序号	照射次数	人体关注部位剂量值 (Gy)					
		左肺 (前)	左肺 (后)	右肺 (前)	右肺 (后)	脐	第4腰椎
1	第1次	3.54	3.32	3.59	3.06	4.90	4.79
	第2次	3.73	3.66	3.71	3.91	5.58	5.01
	合计	7.27	6.98	7.30	6.97	10.48	9.80
2	第1次	3.08	3.16	3.16	3.18	4.85	4.79
	第2次	3.72	3.53	3.59	3.54	4.93	4.97
	合计	6.80	6.69	6.75	6.72	9.78	9.76
3	第1次	3.22	3.08	3.24	2.97	4.77	4.50
	第2次	3.67	3.61	3.88	3.68	5.48	5.75
	合计	6.89	6.69	7.12	6.65	10.25	10.25
4	第1次	3.41	3.18	3.16	3.27	4.63	4.74
	第2次	3.73	3.63	3.49	3.45	4.92	4.97
	合计	7.14	6.81	6.65	6.72	9.55	9.71

表3 4例患者实际照射的总剂量监测值与预计值的偏差

序号	人体肺部 ⁽¹⁾						人体中心处 ⁽²⁾					
	左肺 (前)		左肺 (后)		右肺 (前)		右肺 (后)		脐		第4腰椎	
	A(Gy)	B(%)	A(Gy)	B(%)	A(Gy)	B(%)	A(Gy)	B(%)	A(Gy)	B(%)	A(Gy)	B(%)
1	7.27	3.86	6.98	-0.03	7.30	4.29	6.97	-0.04	10.48	4.80	9.8	-2.00
2	6.80	-2.86	6.69	-4.43	6.75	-3.57	6.72	-4.00	9.78	-2.20	9.76	-2.40
3	6.89	-1.57	6.69	-4.43	7.12	1.71	6.65	-5.00	10.25	2.50	10.25	2.50
4	7.14	2.00	6.81	-2.71	6.65	-5.00	6.72	-4.00	9.55	-4.50	9.71	-2.90

注：(1)：人体肺部的预计值为7Gy；(2)：人体中心处的预计值为10Gy；A：监测值；B：偏差值。

3 结果分析

由表1测量结果提示：同一剂量仪存在测量误差，故在TIB前，必须进行刻度因子校正，粉末热释光探测器在测量过程中，稳定性及重复性好，均在3%内。表2说明第1次患者肺的剂量值与预计剂量一半偏差最大处（3号病例右肺后部第1次照射）为-15.1%，第2次与预计值偏差为5.1%，最终与总剂量值的偏差为-5.0%，说明对患者在进行分次剂量监测是有必要的。而且第1次照射剂量都比第2次照射剂量偏小，这样物理师可根据第1次的剂量结果来调整第2次照射剂量时间，保证照射剂量值在正常偏差范围内。

4 讨论

在患者实行TBI治疗时，采用2次照射时既有利于缓解患者在照射过程中的心理压力，也有利于患者在TBI时全程

保持其正确的照射体位,减少对体内均匀照射的影响,同时也有利于在照射过程中及时调整照射方案,确保患者的照射剂量在预定的剂量偏差范围内,保证照射剂量的准确性,减少患者照射后出现的并发症,提高患者的存活率。因此对TBI进行剂量监测且分2次照射是非常重要的。

参考文献

- [1] Chao ul H, La ng e, K. Uber Lympho gr anulom atose and Lhr e Roentg enstr ahlen Munchen Med Wehnschr, 1923. 70: 725.
- [2] 胡逸民. 主编. 肿瘤放射物理学[M]. 北京:原子能出版社, 1999: 217.
- [3] Bro erse J J, Dutr eix A. Phy sical Aspects of Total Body Irradiat ion. J. Euro P. Radiother , 1982. 4: 157.
- [4] Peter L J, Withers H R, et al. Radiobiolo gical Consideration in the Use of Total-bo dy Ir radiat ion. for Bone marrow Transplantaqtio n. Radiolo gy, 1979. 131: 243.
- [5] Roth J. Summar y o f Discussion on Patient Positiona nd Beam Dir ection. J. Eur op. Radiot her, 1982.4: 249.

作者简介: 唐孟俭 (1977~), 女, 壮族, 广西百色人, 副主任医师, 从事放射卫生

防护检测与评价。广西壮族自治区疾病预防控制中心放射卫生所, 南宁市金洲路 18 号, 530028;

电话: 0771-2518865, 邮箱: 21174458@qq.com。

(医用辐射装备防护与检测专业委员会供稿)

介入放射手术中术者和受检者受照剂量研究

韦宏旷, 唐孟俭, 覃志英*, 陈掌凡, 谢萍, 刘丽

广西壮族自治区疾病预防控制中心放射卫生防护所, 南宁 530028

[摘要] 目的: 了解不同介入治疗过程受检者和术者的受照剂量, 探讨影响辐射剂量的因素及其减低剂量的途径和方法, 加强介入治疗中的放射防护。**方法:** 选择广西 4 家三甲医院开展的冠状动脉造影、脑血管造影和肝动脉栓塞术等 3 种共 67 例介入治疗手术, 采用热释光剂量计元件贴敷在受检者和术者体表处, 测量不同部位受照体表剂量进行统计分析。**结果:** 不同手术同一部位表面剂量相差较大, 在同一手术中各部位表面剂量亦差异很大; 冠状动脉造影手术、肝动脉栓塞术和脑血管造影手术中患者最高表面受照剂量分别为 13.35mSv、17.75mSv 和 107.18mSv; 在 3 种介入手术中, 术者眼睛部位、左手和左脚表面受照剂量均较其他部位大, 有防护情况下受照剂量低于无防护条件下受照剂量。**结论:** 加强介入放射手术患者非投照部位尤其是人体敏感部的屏蔽防护工作, 术者也要增强辐射防护意识和操作熟练程度, 减少自身职业照射和患者医疗照射。

[关键词] 介入放射手术; 辐射; 剂量

Research of radiation dose to operators and patients during therapeutic interventional procedure

[Abstract] Objective To investigate the radiation dose of operators and patients during therapeutic interventional procedures, analyze the factors which influence radiation dose as well as the way to decrease dose, and strengthen radiological protection. **Methods** A total of 67 interventional procedures from 4 Third Grade Class A hospitals in Guangxi province were selected, including Coronary angiography surgery, Cerebral angiography and hepatic artery embolization. Thermoluminescence was used to measure the X-ray radiation dose of operators and patients in different position and exposed surface dose of different body parts. **Results** Surface dose was difference at the same body parts in the different interventional procedure as well as the different parts in the same interventional procedure. The maximum surface radiation dose in the patients in Coronary angiography surgery, Cerebral angiography and hepatic artery embolization was respectively 13.35mSv、17.75mSv and 107.18mSv. Surface radiation dose to eye, left hand and left foot was larger than the other parts in the three kinds of interventional procedures. Furthermore, radiation dose under protection was less than which without protection. **Conclusion** We should strengthen the non-surgical interventional radiology projection, especially shielding sensitive body part in patients. In addition operator should enhance the awareness of radiation protection and operational proficiency, to reduce occupational

exposure and medical exposure of patients.

[Key words] Interventional radiology; Operators; Patients; Radiation dosage; Radiation protection

随着临床介入治疗技术的应用与发展,开展介入治疗的医疗机构和开展介入治疗的种类越来越多,目前介入治疗技术被广泛应用于涉及人体多个系统疾病的治疗中^[1-2]。在介入治疗过程中手术者(简称术者)和患者均暴露于X射线线下,由此可能会造成术者和患者受照辐射剂量较大,因此在介入治疗过程中术者和患者的辐射防护已引起广泛关注^[3-4]。本文旨在通过对介入治疗手术中术者和患者的受照剂量水平调查,为有效开展和加强医疗辐射防护,降低术者的职业照射和患者不必要的医疗照射提供依据。

1 材料与方 法

1.1 仪器

LiF (Mg、Cu、P) 剂量计 (TLD), 2000B 型热释光退火炉, Harshaw5500 型热释光剂量仪, 经过中国计量科学研究院检定合格并在检定有效期范围内使用。

1.2 对象

选择广西三甲医院4家,手术类型包括脑血管造影、冠状动脉造影和肝动脉栓塞术,共对67例介入手术开展术者和患者的受照剂量监测,其中脑血管造影12例,冠状动脉造影37例,肝动脉栓塞术18例。

1.3 方法

将 LiF (Mg、Cu、P) 圆片经退火处理后,用黑纸包裹 LiF (Mg、Cu、P) 圆片并折成长条形作为剂量元件,每个剂量元件包含有 3 片 LiF (Mg、Cu、P) 圆片。将剂量元件于术前分别置于术者的左眼左侧(代表眼晶体)、甲状腺(喉结下 1 cm)、左胸、会阴(耻骨联合,代表性腺)、左右手指、左右脚踝(足踝外下),共 8 个部位,其中甲状腺、胸部和会阴部位,在铅衣内、外各放一个剂量元件;患者的眼部、甲状腺、胸部和会阴部位也分别放置剂量元件,放置 2 个剂量元件作为跟随本底,介入手术操作结束收回剂量元件,及时在热释光剂量仪中测读,计算剂量时扣除本底,并取平均值即为各部位所受剂量。

2 结 果

2.1 3 种介入手术中患者各监测部位表面剂量情况

由表 1 可知,不同手术同一监测部位表面剂量相差较大,同一手术各监测部位表面剂量亦差异很大。在冠状动脉造影手术中患者各监测部位表面受照剂量由高到低分别为左胸部、甲状腺、眼睛部位和会阴,其中左胸部最高剂量为 13.35mSv;而在肝动脉栓塞术中患者表面受照剂量较高的部位为左胸部和会阴,其中左胸部最高受照剂量为 17.75mSv;另外在脑血管造影手术中,眼睛部位、甲状腺和左胸部表面受照剂量均较高,甲状腺最高受照剂量甚至达到了 107.18mSv;在这 3 类介入手术中,患者各部位表面受照剂量随着介入手术的不同各监测部位受照剂量存在较大差异。

表 1 3 种介入手术中患者各监测部位表面受照剂量情况

手术名称	例数	监测部位 (μSv)			
		眼睛部位	甲状腺	左胸部	会阴
冠状动脉造影	37	16.6-1763.8	78.2-6170.0	132.4-13351.3	28.6-6611.1
		(123.1)	(950.81)	(1434.1)	(112.9)
肝动脉栓塞术	18	92.5-623.8	659.4-4987.3	1174.0-17747.7	12.15-11785.87
		(247.48)	(1787.8)	(3833.0)	(2700.0)
脑血管造影	12	138.3-51375.3	485.3-107177.8	930.9-5235.7	101.7-1241.6
		(9466.9)	(33446.2)	(2441.5)	(179.2)

注: 括号内为中位数

2.2 术者各监测部位表面受照剂量情况

3 种介入手术中,术者眼睛部位、左手和左脚表面受照剂量均较其他部位大。在肝动脉栓塞术中,左手最高剂量达到了 1936.14 μSv ;甲状腺、左胸部和会阴部在有防护情况下表面受照剂量均比较低,且均低于无防护情况,差异有统计学差异 ($P \leq 0.05$),见表 2。

表 2 3 种介入手术中术者各部位表面受照剂量情况

手术名称	眼睛部位	监测部位 (μSv)								
		甲状腺		左胸部		会阴部		左手	右手	左脚
		围脖内	围脖外	铅衣内	铅衣外	铅衣内	铅衣外			
冠状动脉造影	35-2096 (56.0)	39-2084 (23.5)	134-2980 (58.1)	4.8-1942 (22.3)	5.2-3198 (73.5)	2.2-3450 (22.0)	143-5029 (86.5)	7.8-5997 (77.4)	5.1-3238 (40.3)	166-776.1 (82.8)
肝动脉栓塞术	533-3747 (100.7)	133-2723 (43.1)	35.7-9375 (82.1)	4.7-1525 (42.9)	8.2-9612 (67.0)	5.9-1638 (46.3)	25.5-11146 (69.2)	19.2-19361 (77.6)	6.7-2433 (66.6)	153-1870 (74.2)
脑血管造影	55.7-2074 (86.2)	52.5-933 (59.2)	44.7-855 (67.7)	38.0-181.5 (61.4)	40.0-181.5 (85.9)	38.8-75.3 (54.9)	64.2-181.7 (93.9)	56.8-335.9 (100.9)	53.7-363.0 (77.9)	48.6-297.9 (92.3)

注：括号内为中位数

2.3 3 种介入手术操作时 X 射线机工作条件 由表 3 可知，肝动脉栓塞化疗术中曝光时间和电压均最大，最长的曝光时间达到了 129.02min，脑血管造影的曝光时间和电压较小。

表 3 3 种介入手术中操作时 X 射线机工作条件

手术名称	曝光时间 (min)	电压 (kV)
冠状动脉造影	1.17-61.20(8.23)	75 \pm 8
肝动脉栓塞化疗术	2.75-129.02(21.68)	81 \pm 12
脑血管造影	2.20-33(17)	68 \pm 2

注：括号内为中位数

3 讨论

本次调查结果显示，在介入手术中，术者和患者各监测部位受照的辐射剂量范围均较宽，这与相关调查报告一致^[4-5]。导致上述结果的因素较多，有患者手术复杂性和疾病情况，也有术者的因素，如工作经验、手术操作的熟练程度、站立位置以及屏蔽设备的使用等，此外还有设备的校正和工作时使用的条件等因素^[6-7]，这些因素均可以影响结果的变化。在这 3 种介入手术中，肝动脉栓塞化疗术曝光时间最长曝光条件也是最高，导致术者和患者各监测部位表面受照剂量也较另外两种介入手术高。由于肝动脉栓塞术中患者均为肝癌患者，病情较另外两种介入手术的患者更为复杂，因此 X 射线曝光时间也较长，这一结果也与张翼等^[8]报道一致。

在介入手术中，患者各监测部位所受到辐射剂量的高低与 X 射线的射野范围有直接关系，离照射野越近的器官所受的照射剂量较高，距离越远所受剂量越低^[9]，本调查也得出了类似结果。因此，在介入放射手术中，要尽量缩小 X 射线照射野，控制合适的 X 射线机工作条件，尽量缩短曝光时间，对距离操作部位较近的重要器官采取一定的防护措施是很有必要的，并且要做好对非照射部位尤其是人体对射线敏感部位的屏蔽防护工作，以减少患者不必要的受照剂量。

此外，本调查还发现在介入放射手术过程中，术者的甲状腺、左胸和会阴部在有、无防护条件下剂量水平差别较大。在有防护条件下术者相应部位受照剂量远低于无防护条件下，由此可知在介入放射手术中穿戴防护用具对减少介入放射工作人员受照剂量有重要意义。在无防护条件下，术者的左手和左脚受照剂量也较大。左手由于距离 X 射线射野范围较近，手术过程中完全暴露于 X 射线下，因此剂量较高。而导致术者的左脚受照剂量较高的原因是：X 射线机的球管在诊疗床下面，从球管发出来的 X 射线（主射线）射到诊疗床后直接散射出来，射到术者的脚上，加之床边的防护铅帘一般距地面 20cm 左右，术者的脚部裸露在辐射场内，因术者的左脚距球管距离最近，所以左脚的受照剂量较大。

在介入治疗中，术者和患者均直接暴露于 X 射线下，由于长时间曝光以及防护措施不到位等因素，导致术者和患者受到了较大剂量照射。因此在介入放射手术中应该做好对患者非照射部位尤其是人体敏感部的屏蔽防护工作，对术者也要增强辐射防护意识、提高手术操作熟练程度，缩短透视时间，以减少自身的职业照射和患者的医疗照射。

参考文献

- [1] LaBerge JM, Anderson JC, Radiology Review Committee. A guide to the Interventional Radiology residency program requirements[J]. J Am Coll Radiol. 2015,12(8):848-53.

- [2] Vidal V. Interventional radiology and radiation exposure hazard[J]. Rev Prat. 2015 ,65(1):82.
- [3] 崔燕海,张红丹,郑君惠,等. 冠状动脉造影及介入治疗患者的辐射剂量调查[J]. 中华放医学与防护杂志, 2013,33(5):544-546.
- [4] 刘小莲,麦维基,张素芬,等. 介入放射学工作人员受照剂量调查及调查水平研究[J]. 中国职业医学, 2015 ,42(4):412-416.
- [5] 刘波,南新中,靳志涛,等. 某医院介入放射工作人员大剂量受照情况调查[J]. 中国辐射卫生, 2014(5):417-419.
- [6] von Neubeck C, Shankaran H, Karin NJ, et al. Cell type-dependent gene transcription profile in a three-dimensional human skin tissue model exposed to low doses of ionizing radiation: implications for medical exposures[J]. Environ Mol Mutage, 2012,53(4):247-259.
- [7] Lynskey GE 3rd, Powell DK, Dixon RG, et al. Radiation protection in interventional radiology: survey results of attitudes and use[J]. J Vasc Interv Radiol, , 2013, 24(10):1547-1551.
- [8] 张翼,宋少娟,曲桂莲,等. 10 种介入诊疗程序中患者的辐射剂量调查[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2011,31(4):482-484.
- [9] 陶永军,陈本宝,徐孝波,等. 介入放射手术时被检者和操作者受照射剂量调查[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2005, 25(1):76-77.

基金项目: 广西自然科学基金项目(编号: 2014GXNSFAA118223); 广西自然科学基金项目(编号: 2014GXNSFBA118173); 广西壮族自治区卫生计生委课题资金项目(编号: Z20100041)

作者简介: 韦宏旷(1986~),男,硕士,医师,主要从事放射卫生防护工作。广西壮族自治区疾病预防控制中心, 15078742104, gxcdcwhk@163.com。

通讯作者: 覃志英(1964~),主任技师,广西壮族自治区疾病预防控制中心; Email: qzy8883@163.com。

(医用辐射装备防护与检测专委会供稿)

「医学影像」

国产彩色超声诊断仪的临床应用评价研究

崔立刚^① 唐杰^② 姜玉新^③ 杨敬英^④ 马相国^⑤ 郭亚美^⑥ 宫俊英^⑦

①北京大学第三医院;② 中国人民解放军总医院;③中国医学科学院北京协和医院;④ 鄂尔多斯中心医院;⑤ 呼伦贝尔市中蒙医院;⑥ 子长县人民医院;⑦北京市房山区中医院

【摘要】

目的: 通过对国产高端彩色超声诊断仪(简称彩超)进行一系列体外实验、技术性能测试及临床对比评价研究,以综合评估国产彩超临床应用价值。

方法:

(1)将欲评价彩超首先通过体外仿血流体模进行物理技术评价,随后进行不同级别医院临床基本功能对比评价,将体外实验与临床对比评分结果进行权重,以综合评估。

(2)评价人员及评价对象

人员:选择各级医院高年主治医以上两名医师共同、同时参与评价和评分。

对象:参与实验对比研究的七所医院分别将参与评价的受试者分别在五台彩超(1号机、2号机、3号机、4号机及对比机)上进行五个部位(肝胆、颈动脉与椎动脉、胎儿及胎盘、乳腺、心脏)评价,每部位均需完成30例的对比评分。为使数据具有可比性,每30例一组的评价中,受试者需满足以下条件:

①男女选择应随机均衡分布;

②体重指数均衡分布(体重指数标准:适中:20-25,过重:25-30,肥胖:30-35);

③以44岁为界、年龄均衡分布(年龄≤44岁为青年人)。

(3)评价方法

体外实验:在国家食品药品监督管理局湖北医疗器械质量监督检验中心进行体外实验。体外实验即在同一环境条件下,用相同的检测设备、相同的检测方法和同一组检测人员在规定时间内分别对四台彩超进行检测。内容包括二维图像检测、彩色图像检测和技术性能检测。

临床评价:同一受试者先后在两台彩超进行同一部位、同一器官、同一切面的比较。(要求:扫查条件为仪器内置扫查条件,各项参数设置以厂家确认的最优状态为准,并且采取图像满足聚焦深度相同、单一聚焦点、彩色多普勒取样框面积大致相等。)

结果: 四台国产彩超体外实验权重后评分结果分别为:1号机96.00、2号机98.00、3号机95.00、4号机96.00,(对比机100.00)。临床对比评价结果分别为:1号机347.57、2号机372.24、3号机330.90、4号机348.13,(对比机400.00)。

结论: 对常见四台国产彩超进行物理性能评价包括:二维图像、彩色血流、彩色多普勒血流评价及对彩超的可靠性、稳定性等因素进行综合评价,初步得出所被评价超声品牌的优劣,将结果反馈给厂家,以提升国产彩超的技术性能,促进国产彩超的长足发展。

(超声医学装备专业委员会供稿)

国产与进口彩超在产前检查中的临床对比研究

赵华巍^① 崔立刚^① 张明博^② 王红燕^③ 杨敬英^④ 马相国^⑤ 郭亚美^⑥ 宫俊英^⑦

①北京市海淀区妇幼保健院, 北京大学第三医院; ② 中国人民解放军总医院; ③中国医学科学院北京协和医院; ④鄂尔多斯中心医院; ⑤ 呼伦贝尔市中蒙医院; ⑥ 子长县人民医院; ⑦北京市房山区中医院

【摘要】

目的: 通过在七所各级医院对国产与进口彩色超声诊断仪(简称彩超)在产前超声检查中的临床对比研究, 探讨国产彩超应于各级医院产前超声检查的可行性。

方法:

(1)评价仪器:

选出具有代表性的四种国产彩超各一台及参照评价进口通用型高端彩超, 以下均称为1号机、2号机、3号机、4号机及进口机。(配备探头频率5-1MHz, 产科扫查条件)。

(2)评价对象:

参与实验对比研究的七所医院分别有三级医院北京大学第三医院、中国人民解放军总医院、中国医学科学院北京协和医院、鄂尔多斯市中心医院; 二级医院鄂伦春自治旗中蒙医院、子长县人民医院、北京市房山区中医医院。参与评价的受试对象分别在国产彩超与进口机上进行产前超声检查, 每台完成30例, 共210例, 孕周(21⁺-40⁺周), 平均孕周35.3周。均签署知情同意书。

(3)评价人员与评价方法:

评价人员: 选择各级医院高年主治医师以上两名医师共同、同时参与评价和评分。

评价方法: 根据产前超声检查检查规范采用共同的标准切面, 规范检查并存储图像。选择以下图像: 显示头颅丘脑切面即测量双顶径切面, 显示脐带根部彩色多普勒血流显像(CDFI)及频谱多普勒血流显像(PW), 显示胎盘切面。共5张图片, 存储于设备内。

同一孕妇先后在两台彩超(国产被评价彩超与进口机)进行同一部位、同一切面的留存图像。要求: 扫查条件为仪器内置扫查条件, 各项参数设置以厂家确认的最优状态为准。并且采取图像满足聚焦深度相同、单一聚焦点、彩色多普勒取样框面积大致相等。

(4)评分标准:

从临床图像效果出发, 采用半定量评分法。各项评价指标以进口机为基准, 定义基准分为5分。所评价设备的各项指标参照基准分评分。具体如下: 6分: 如观察胎儿头颅丘脑切面的二维结构时, 结构显示比进口机清, 即评价指标效果优于进口机; 5分: 观察结构清晰度相近, 即评价指标效果与进口机相同; 4分: 观察结构清晰度相似, 即评价指标效果与进口机相似; 3分: 观察结构隐约可见; 2分: 结构不可见, 即评价指标效果显著低于进口机。

结果: 七所医院每所医院完成30例, 共210例。国产彩超评分结果分别为1号机87.75分、2号机96.20分、3号机81.31分、4号机84.90分, 进口机105.0分, 四台国产彩超评分结果与进口机型相比 $P < 0.05$, 均有统计学意义。

结论: 国产彩超可以满足基层医院及二级医院日常工作需要的产前超声检查, 不能满足三级以上产前检查, 仍待提高。

(超声医学装备专业委员会供稿)

国产与进口彩色超声诊断仪在乳腺超声检查中的临床对比研究

郭丽娟^① 崔立刚^① 王金锐¹ 唐杰² 姜玉新³ 杨敬英⁴ 马相国⁵ 郭亚美⁶ 宫俊英⁷

①北京大学第三医院; ②中国人民解放军总医院; ③中国医学科学院北京协和医院; ④ 鄂尔多斯中心医院; ⑤呼伦贝尔市中蒙医院; ⑥子长县人民医院; ⑦北京市房山区中医院)

[摘要]

目的: 通过在七所各级医院对国产与进口彩色超声诊断仪(简称彩超)在乳腺超声检查中的临床对比研究,探讨国产彩超应于各级医院进行乳腺检查的可行性。

方法:

(1)评价仪器

选出可以代表国产彩超先进性水平的彩超四台及参照评价通用型进口高端彩超,以下均称为1号机、2号机、3号机、4号机及对比机。(均配备探头频率12-5MHz,乳腺扫查条件)。

(2)评价对象

参与实验对比研究的七所医院分别有三级医院北京大学第三医院、中国人民解放军总医院、中国医学科学院北京协和医院、鄂尔多斯市中心医院;二级医院鄂伦春自治旗中蒙医院、子长县人民医院、北京市房山区中医院。每所医院完成30例,共210例,其中年龄(22-74)岁,平均年龄40.98岁;身高(150-177)cm,平均身高161.72cm;体重(49-67)KG,平均体重59.03KG;体重指数为18.1-25.5,平均体重指数23.07。

评价人员及评价方法

人员:选择各级医院高年主治医师以上两名医师共同、同时参与评价和评分。

(3)方法

每所医院选取来进行乳腺超声检查的女性30例。采用共同的标准切面:以乳头为中心,左乳2点钟方向,放射状扫查切面(要求包括乳头及乳晕区),对于占位性病变,着重分析病变形态特征。共1张图片,存储于设备内。

同一受试者先后在两台彩超(国产被评价彩超与对比机)进行同一切面的对比研究。要求:扫查条件为仪器内置扫查条件,各项参数设置以厂家确认的最优状态为准。并且采取图像满足聚焦深度相同、单一聚焦点。

(4)分标准

各项评价指标以对比机为基准,定义基准分为5分。所评价设备的各项指标参照基准分评分。具体如下:6分:观察乳腺超声图像的二维结构时,结构显示比对比机清晰,即评价指标效果优于对比机;5分:清晰度相近,即评价指标效果与对比机相同;4分:清晰度相似,即评价指标效果与对比机相似;3分:观察乳腺结构隐约可见;2分:乳腺结构不可见,即评价指标效果显著低于对比机。

结果: 将留存乳腺图像中皮下脂肪层结构归为二维图像显示,将图像中腺体导管壁回声及Cooper's韧带样强回声归为二维精细结构显示,对四台彩超所有评分结果进行统计,七所医院每所医院完成30例,共210例。国产彩超评分结果分别为1号机59.17分、2号机64.60分、3号机59.86分、4号机60.67分,对比机70.0分,四台国产彩超评分结果与对比机进行配对t检验, $P < 0.05$, 均有统计学意义。

结论: 国产彩超基本可以满足基层医院的乳腺癌筛查等日常工作需求。

(超声医学装备专业委员会供稿)

用手机看 B 超，索诺星无线探头式 B 超带来行业大变革

蔡伟忠

广州索诺星信息科技有限公司

【摘要】随着电子集成技术的发展，超声诊断设备的体积越来越浓缩。本文对一款全新的探头式 B 超进行讨论，该产品把主机浓缩至很小的电路板并内嵌于超声探头中，实现了整台 B 超就只是一个探头大小，并开发了基于手机、平板电脑等智能终端的软件，探头式 B 超的图像数据通过内置 wifi 传输给等智能终端，由智能终端实现图像的显示和管理。该产品携带、使用及其方便，并利用智能终端强大的互联网通讯功能非常方便实现远程医疗助诊，适应于移动医疗和互联网医疗的发展趋势，也给临床和基层医护人员带来很大的工作便利，有望成为医护人员人手一套的“视诊器”。

超声成像是医院里最常规的检查之一，在大家印象中，做这个检查要到医院让医生开单然后到 B 超室，用很大的 B 超机器来检查，即使在计生站、体检科有小一点的 B 超，但也最少是手提式或掌上式的。

现在，无线探头式 B 超完全改变了这一切。只需一个“B 超探头”，加上用户自己的安装了专用超声软件的平板电脑或智能手机，就可当作一台 B 超使用。而且这个“B 超探头”不但很小，携带方便，而且没有任何连线的，和手机之间是通过本身内置的微型路由器发出的 Wifi 信号进行信号传输的，没有连线的羁绊，使用非常方便自如。

手机也能用来看 B 超？这听起来有些神奇，到底是什么工作原理呢？研发这个产品的广州索诺星信息科技有限公司的负责人蔡伟忠这样说：“其实这个‘B 超探头’并不单单只是一个探头，而是一台被浓缩成只有探头大小的没有屏幕的‘B 超’，如果给它接上一个显示屏就是一台完整的 B 超了，手机其实只是起到接收图像信号并进行显示和保存的作用”。

该产品相当于改变了原来的主机+探头的产品形式，把主机缩小到只是一块很小的、内置于探头内部的电路板，变成只是一个“探头”就相当于一台 B 超而只需借助随身携带的手机、平板进行显示。

这样的新技术，给医生在临床急诊、病房检查、基层巡诊、户外诊断等带来了极大的方便，只要口袋里揣着这个“B 超探头”(无线探头式 B 超)，加上本身就随身带的手机，随时随地就可给病人检查。

这种检查不但方便医患双方，而且还达到快速、及时的效果，在很多危急的时候，如果还按传统的开单送检的流程和用大仪器来检查，往往需要较长时间而耽误了急救的时机，而用这个“无线探头式 B 超+手机”的操作，是可以做到最快最及时的。

我们相信，未来它将成为跟听诊器一样（可称之为“视诊器”）作为医护人员普及配备的诊断工具。甚至随着产品价格下降或采用租赁模式解决价格障碍，逐步进入家庭，结合远程医疗助诊平台成为患者自助的日常检查工具（其中膀胱尿量检测无线探头已可成为居家老年尿失禁患者日常护理工具）。

另外，这种方式还给超声成像穿刺引导和手术中检查也带来了极大的便利，一方面是没有探头线的羁绊使用更加自如，而更重要的是这个无线探头式 B 超可整个套入一次性防护套，每次使用更换一次防护套即可，很好地解决了手术最注重的消毒问题，避免了因为消毒不彻底而造成的交叉感染的风险，再者探头信号传输给手机、平板电脑等智能终端的传输距离可达到和常规 wifi 一样十米以上，且不受各种障碍物包括墙壁的阻挡，这样便于远距离观看图像减少设备挤占手术台的空间，也便于把图像共享给更多医生甚至患者家属观看。

无线探头式 B 超还有一个好处，就是其是基于手机、平板电脑这些智能终端的，也能利用这些智能终端强大的通讯功能，较好满足远程医疗的需求。在病房检查、临床科室、基层社区医务室或者野外急救，往往没法配备很专业的超声临床诊断医生，打图的医生如果看不明白图像里面的病理特征，可很方便地把图像通过手机的通讯功能如微信、QQ 乃至远程医疗平台等发给专业的超声医生看，让他们帮忙判断病理。



目前，索诺星公司已经开发了扇扫、凸阵、线阵、4D 多个无线探头型号，并且还针对不同临床需求开发膀胱容量检测、穿刺引导、妇科检查等不同专科用的型号，每个型号都根据用户的需求进行设计，让用户获得满意的使用效果，为用户带来极大的便利性。

无线探头式 B 超在多个方面上实现了技术上的极大突破：

- (1)实现产品硬件电路的高度集成、微型化，把主机电路浓缩到探头中。整个探头式 B 超只有 300 克左右。
- (2)实现产品的低功耗设计。低功耗使得探头虽然是全密封但也不发热，且在探头里面只是用一个小小的手机电池就能连续使用 3 个小时。
- (3)实现把超声图像信息通过 Wifi 无线传输，大容量、无损失、高速度、远距离地传输到平板、手机等智能终端。这一点是通过特殊定制的内置 Wifi 实现的。
- (4)开发基于苹果、安卓和 Windows 的超声软件，运行于手机、平板等智能终端，对收到的超声图像信息进行显示、处理、管理和远程网络传输。

这些技术在国内外都是处于领先水平的，可以说它给行业的技术和应用都带来了巨大的变革。

【专家点评】

中山大学附属第三医院泌尿外科 副主任医师 方友强：一直梦想能有一台微型高清而又功能齐全的超声机，手提式，最好发明有探头直接连接随身携带的手机，利用手机 app 屏幕，节省传统超声需要带的较大显示屏。这款无线 B 超探头小巧精致，使用方便可随身携带，电脑、手机或者 ipad 下载了超声软件，就能和探头无线连接，随时随地，拿起探头就能给病人做检查。特别适合当前超声科忙碌、很多病人急需结果而又需排队预约的情况下。作为当前 B 超使用频率最多的泌尿外科医生，使用起来就非常方便，外出会诊或手术中，这款无线探头非常好用，没有探头线的牵拉限制使用更加自如，而且探头可整个套入一次性防护套或者直接用碘伏消毒，使用方便不少，术中可用平板电脑当做显示屏，超声界面也显示得很清晰细腻。近期本人已利用该无线超声探头进行超声引导 PCNL 术，术中与传

统 B 超仪对比, 这款探头基本能达到一般黑白超声引导肾脏穿刺的要求, 使用方便, 左手持超声探头, 右手拿穿刺针, 超声轻巧能很好调整位置, 实时监控穿刺针线, 手术过程顺利, 效果良好, 值得向同行推广使用。

浙江省桐乡市中医院麻醉科主任 副主任医师 郑铁成: 索诺星 UProbe 是一款全新的无线探头式 B 超, 体积小、携带方便、操作简单。我是一名麻醉疼痛科医生, 经常使用 B 超, 通常情况下要在无菌下操作, 目前用的 B 超体积大, 带线探头, 使用起来非常不方便, 如果是去病房操作更加不方便。我们试用了无线探头式 B 超, 发现有以下几个优点: 1、携带特别方便, 尤其是到病房或门诊 B 超引导下操作。2、由于探头没有线, 更便于无菌操作。3、开机操作关机非常简单, 一学就会。4、应用在深静脉穿刺置管、神经阻滞等方面。我认为在不久的将来很有可能取代传统 B 超。

作者简介: 蔡伟忠, 男, 1978 年出生, 2001 年本科毕业于长沙理工大学, 高级工程师职称, 现工作于广州索诺星信息科技有限公司, 从事超声诊断仪器产品策划、开发工作。联系电话: 18922710457 邮箱: sonostar@sonostar.net (超声医学装备专业委员会供稿)

B 超在儿科心脏诊断的应用

侯金睿, 李振彪, 段新安

总后药品与医疗仪器检验所, 北京, 100071

[摘要] 随着 B 超在儿科心脏诊断中诊断的发展, 它在心脏影像学上具有很多优于 CT 成像的特点。比如使患儿不受 CT 大剂量的 X 线辐射, 诊断时对患儿的麻醉状态也具有优势。还可以在半径, 圆周, 纵深三个方向上对包括新生儿在内的儿童心肌应力值 (strain) 和三尖瓣运动状况进行测定。B 超在此方面的诊断可以提供很大的帮助。

[关键词] 二维组织轨迹法; 应力值; 儿科; 心脏诊断

Clinical Application of the B-ultrasonic in Pediatric Patients Cardiac Diagnosis

[Abstract] According to the development of B-ultrasonic in pediatric patients cardiac diagnosis. It excels CT imaging in cardiac field such as the avoidance of high X-dose and low narcotism to pediatric patients. And it can also measure cardiac muscle strain in radius, circle, depth direction to pediatric patients including new born baby.

[Key Words] two-dimension tissue tracking, Strain, Pediatric, Cardiac diagnosis

围产期的缺氧及其并发症是新生儿死亡的重要原因, 对机体的损害是全身性的, 仅窒息后出现心功能损害的发生率就高达 20%~51%, 有的甚至高达 92.8%[1-2]。新生儿因缺氧引起左心室功能减退的临床表现与其他年龄小儿有所不同, 早期临床症状不明显, 发现时已出现左心室功能甚至全心功能衰竭, 救治困难。因此临床上迫切需要一种简便、无创、准确的检测方法了解左心室功能随缺氧变化而变化的情况, 以便及早诊治新生儿心功能损害, 改善预后。有关超声心电图评价不同缺氧程度新生儿左心室功能的作用研究未见相关报道。本研究旨在运用超声心动图了解缺氧新生儿左心室功能损害的相关指标, 为早期实施干预、指导治疗提供依据。

下表是采用日立 EUB8500 彩色超声诊断装置, 对包括新生儿在内的 40 个正常儿童的心肌应力值进行的测定。

表 1 儿童左心室应力正常值 (n=40)

	室间隔	左心室后壁	左心室侧壁	右心室侧壁
圆周方向应力值	-33±11%	-37±11%		
纵深方向应力值 (中央部分)	-28±8%		-31±8%	-46±9%
半径方向应力值	32±10%	49±13%		

采用 2DTT 法 (2-Demensional Tissue Tracking 二维组织轨迹法) 对正常儿童心肌圆周方向的应力值进行测量。在和乳头肌同一水平面左心室短轴断面的心中隔和后壁的内膜面, 分别设置相距 1cm 的两点。采用 2DTT 法可以对一个心动周期中两点间距离的变化率进行自动测算。采用 2DTT 法对右心室心肌异常 2 岁患儿的右心室自由壁纵向应力值进行测量。在右心室自由壁内膜面上设置相距 1cm 的两点。在整个心动周期内对应应力值进行测量。收缩期心脏长轴方向的收缩一般用符号表示, 测量结果为 -6%, 比正常值要明显低。而扩张期出现 10% 的松弛, 呈现出异常的

心肌运动（和表 1 比较）。

采用 2DTT 法对并发完全性房室传导阻滞的心肌扩张症 2 岁患儿左心室半径方向的应力值进行测定。分别在心中隔，左心室后壁，左心室侧壁，左心室下壁的心肌上设置两点，侧壁和下壁部位的应力值比较良好。后壁的应力值比较低。中隔在心室收缩期变薄。各个部位的应力值峰值明显不同步。

采用 2DTT 法对进行性肌营养不良患儿心室中隔和后壁进行半径方向上应力值测定。在心室中隔和后壁中设定两点进行心室壁厚度变化率测量。中隔变化率为 39% 属于正常。而心室后壁在心室收缩期的变化率仅仅为 -6%，属于不正常。

把左心室分为内膜侧和外膜侧，采用 2DTT 法对半径方向上应力值进行分别测量。内膜侧的应力值为 14.5%，在收缩中期出现了峰值。另一方面，在心室收缩期发现外膜侧出现 -14% 的收缩。内膜侧和外膜侧的收缩并不是同时的。

最近，出现了采用三次元回声对房室瓣膜运动的解析报告。而使用 2DTT 法可以在更短的时间内对房室瓣膜运动详细过程进行解析。具体来讲，可以采用 2DTT 法对成人心脏的四腔断面和二尖瓣膜运动进行解析。解析结果是，二尖瓣膜外侧部出现长轴（心尖）方向是 18.1mm，短轴方向 5.2mm 的收缩舒张变化。长轴/短轴方向的收缩舒张比为 4.3 ± 1.9 。另一方面，在扩张型心肌病患者中，这个比值为 1.4 ± 0.9 ，比正常值要低，短轴方向比长轴方向的运动程度增加，这种瓣膜运动的分析对左心室机能的评价可以提供很大程度的帮助。

另一方面，采用三次元回声对三尖瓣解析发现，瓣膜直径在所以方向上收缩期的缩短程度都是 17 ± 2 。对刚出生的新生儿和出生 15 天的婴儿 110 例为对象，采用 2DTT 法对心脏四腔断面和三尖瓣（心中隔一侧和右心室外侧）的运动进行解析。在三尖瓣外侧和心中隔设置两点，对一个心动周期中瓣膜运动进行自动轨迹追踪。从数字化记录找出长轴方向上移动距离，短轴方向上移动距离，最大移动距离，结果发现，新生儿三尖瓣直径在收缩期平均缩短 16.0%，扩张期有 5.8% 的扩大。另外还可以采用组织多普勒方法对三尖瓣外侧部分的右心室收缩期运动速度进行测量，发现随着新生儿出生后天数的增加，右心室收缩能力更加成熟。还有，新生儿的三尖瓣外侧发现有最大 $6.5 \pm 1.4\text{mm}$ ，心中隔一侧有 $3.7 \pm 1.0\text{mm}$ 的移动，外侧瓣膜的移动距离更大。此外，三尖瓣长轴/短轴方向移动距离比，外侧是 4.3 ± 2.3 ，心中隔侧是 4.2 ± 2.5 。长轴（心尖部）比水平方向上的移动更大。

还对一名出生时发现心功能不全的新生儿病例在出生后 20 小时进行心脏运动解析，在三尖瓣外侧和心中隔设置两点，对瓣膜运动进行测量，发现三尖瓣半径在收缩期有 4.2% 的缩小，瓣膜外侧的移动距离是 2.8mm，心中隔侧的移动距离是 2.1mm，都比正常值要低。瓣膜在水平方向上的类似圆周运动比瓣膜两侧向心尖方向的运动幅度要大，发现长轴方向的移动比较低。以上解析表明患儿的右心室机能低下，可能会影响肺动脉供血，进而影响血氧饱和度。正常婴儿随着出生天数的增加，三尖瓣的移动距离会增加，这与右心室收缩的成熟程度有关。期待 2DTT 法对右心室机能指标评价的临床应用有更好的表现。

参考文献

- [1] 《医疗器械维修 300 例》，赵其斌主编，天津科学技术出版社。
- [2] 《现代医用电子仪器原理与维修》，吴建刚主编，电子工业出版社。
- [3] 《B 超、监护仪、心电图机维修 1200 例》，李祖江主编，海潮出版社。
- [4] 森一博、ほか：進行性筋ジストロフィーにおける左室の“ねじれ”の研究。日本小児循環器学会雑誌、22: 351、2006。
- [5] 森一博、ほか：Tissue tracking 法及び新しい解析ソフトを用いて。J Cardiogr、46 suppl I:432,2005

作者简介：侯金睿（1977-），工程师，总后药品与医疗仪器检验所卫生装备技术保障室；

研究方向：电子类仪器的维修计量使用。北京丰台西路 17 号电子室

（医学装备计量测试专委会供稿）

超声弹性成像与 MR 动态增强显像在乳腺肿瘤良恶性鉴别诊断中的价值对比

吕书革^① 王倩云^① 温雪娟^{②*}

①解放军第323医院医务处 陕西西安710054

②解放军第 323 医院超声科 陕西西安 710054

[摘要]目的 探讨超声弹性成像与 MR 动态增强现象在乳腺肿瘤良恶性鉴别诊断中的价值对比。**方法** 本研究选择 2015 年 1 月至 2016 年 1 月于我院就诊的乳腺肿瘤患者共 98 例, 按肿瘤良恶性划分为良性组 45 例, 恶性组 53 例。分别对两组患者进行超声弹性成像 (UE) 检查、MR 动态增强检查及 UE 联合 MR 动态增强检查, 观察两组患者在不同检查下良、恶性检出结果与病理对照, 并对比分析特异率、敏感率及准确率。**结果** UE 检查诊断下良性组诊断结果 1~3 分共 35 例明显高于恶性组 12 例, 4~5 分例数 10 例明显低于恶性组 41 例, 差异具有统计学意义($P<0.05$); MR 增强现象检查下良性组诊断形态为圆形 15 例、片状 21 例明显高于恶性组 5 例、7 例, 而不规则 4 例、边缘毛刺 5 例明显低于恶性组 18 例、23 例, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); UE 联合 MR 动态增强检查下良性组诊断出良性肿瘤例数 41 明显高于恶性组 5 例, 而诊断为恶性肿瘤例数 4 例明显低于恶性组 48 例, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$); UE 联合 MR 动态增强检查下特异率、敏感率、准确率分别为 91.11%、90.57%、90.82% 明显高于 UE 77.78%、77.36%、77.55% 及 MR 动态增强检查 80.00%、77.36%、78.57%, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** UE 联合 MR 动态增强检查下特异率、敏感率及准确率均优于单一 UE 检查或 MR 动态增强检查, 对乳腺肿瘤诊断价值更高, 值得推广应用。

[关键词] 超声弹性成像; MR 动态增强现象; 乳腺肿瘤

Comparison the value of differential Diagnosis of the Breast Tumors with ultrasonic elastography and MR dynamic enhancement phenomenon/LV Shu-ge, WANG Qian-yun, WEN Xue-juan/No. 323 Hospital of PLA, Xi'an 710054 China

[Abstract] Objective To explore the comparison the value of differential Diagnosis of the Breast Tumors with ultrasonic elastography and MR dynamic enhancement phenomenon. **Methods** Chose 98 cases of patients with breast neoplasms during January 2015 to January 2016 in our hospital to have treatment. According to benign and malignant tumors, 45 cases were divided into benign group, and 53 cases in malignant group. The two groups of patients were examined by ultrasonic elastography (UE), MR dynamic contrast enhancement and UE combined with MR dynamic contrast enhancement, two groups of patients were observed in different examination of benign and malignant detection results, pathological comparison, and comparative analysis of specific rate, sensitivity and accuracy rate. **Results** UE diagnosis of benign diagnosis group 1~3 points have 35 cases, were significantly higher than the malignant group of 12 cases, 4~5 points have 10 cases were significantly lower than the malignant group of 41 cases, the difference was statistically significant ($P<0.05$); MR enhancement phenomenon of inspection under the benign group morphological diagnosis for round 15 cases, schistose 21 cases was significantly higher than that in malignant group round 5 cases, schistose in 7 cases, and 4 cases of irregular, burrs on the edges of the 5 cases was significantly lower than that in malignant group irregular 18 cases, burrs on the edges of the 23 cases, the difference is statistically significant ($P < 0.05$); UE combined with MR dynamic enhanced examination under the benign group in the diagnosis of a benign tumor cases, 41 were significantly higher than those in the malignant group 5 cases. And the diagnosis of malignant tumor cases, 4 cases were significantly lower than the malignant group of 48 cases, the difference was statistically significant ($P<0.05$); UE combined with MR dynamic enhanced the specific rate, rate sensitivity and accuracy were 91.11%, 90.57%, 90.82% was significantly higher than that of UE 77.78%, 77.36%, 77.55% and MR dynamic enhanced 80.00% and 77.36% and 78.57%, the difference has statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** The rate of specific, sensitivity and accuracy of UE combined with MR were better than those of the single use of UE or MR. The value of breast tumor diagnosis was higher, and it is worth popularizing.

[Key words] Ultrasonic elastography; MR dynamic enhancement phenomenon; Breast neoplasms

恶性乳腺肿瘤又称乳腺癌, 常发生于女性乳腺上皮组织上, 近年来, 该病发病率呈上升状态, 发病年龄年轻化, 对女性健康造成严重危害^[1]。乳腺癌作为全身性疾病, 癌细胞在早期时便能经血液循环而遍及全身, 因此, 对乳腺癌的预防十分重要, 而做好该病的早期诊断、鉴别是提高治疗效果的关键。在临床诊断中, 通常采用超声弹性成像 (Ultrasound elastography, UE)、CT 及 MR 检测等方法, 其中 UE 检查应用最为广泛^[2]。UE 能反应出检测组织硬度及弹性, 通过检测施加压力所致组织变形及扭曲度, 并根据硬度仪鉴别乳腺肿瘤良恶性, 从较新的角度解释了乳腺肿块的弹性特征^[3]。MR 动态增强检查具有多方位、多参数等特点, 且分辨率较高, 能发现细小病灶, 逐渐应用于乳腺癌诊断中。其在注入对比剂后, 能实现减影技术, 通过病灶形状、血流等进行分析, 提高检查准确率。我院为提高乳腺肿瘤良恶性诊断效果, 通过对两种检查方法、及联合使用进行对比分析, 发现联合检查优于单独检查, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本次研究选择 2015 年 1 月至 2016 年 1 月于我院就诊的乳腺肿瘤患者共 98 例，其中良性患者 45 例，恶性患者 53 例，按良恶性划分为良性组及恶性组。其中良性组患者年龄为 27~59 岁，平均年龄为 41.5 ± 3.3 岁，包括乳腺囊性增生 4 例、纤维腺瘤 22 例、乳腺囊肿 19 例；恶性组年龄为 28~61 岁，平均年龄为 42.1 ± 3.4 岁，包括侵袭性导管癌 35 例，导管原位癌 4 例，侵袭性小叶癌 14 例。入选标准^[4]：确诊为良性或恶性的乳腺肿瘤患者；年龄在 18 岁以上，65 岁以下的患者。排除标准：具有严重心脑血管疾病或先天性心脏病患者；合并肝肾疾病患者；未确诊为乳腺肿瘤患者；接受过对本次检测具有影响性治疗下的患者。研究在所有患者或家属签署知情同意书，并由我院伦理协会监督下进行，患者一般资料的比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

UE 检查：选用荷兰飞利浦电子集团所生产的 IU22 型智能超声设备系统进行检查，探头频率为 6~13Hz。先采用常规超声观测患者乳腺肿块，记录肿块位置、形态、数量及血流分布等基本情况，对各参数进行测量。确定患者病灶部位后，将常规超声观测切换为超声弹性成像，取样框范围大于病灶范围，探头轻度施压，然后缓慢释放压力，系统则实时成像。与此同时，观察二维、弹性图，对病灶及周围组织硬度进行比较分析。MR 动态增强检查：MR 扫描在患者月经后 3 周内进行，采用德国西门子公司生产的 Avanto 型磁共振成像系统进行检查。患者采用俯卧姿，双乳自然悬垂于乳腺相控线圈内，加压固定乳房，使乳头位于最低点。平扫序列脂肪抑制自旋回波 T_2 加权像 (T_2 weighted imaging, T_2 WI)：TR 9960ms，TE 75ms，翻转角 150°，层厚 3.5mm； T_1 加权像 (T_1 weighted imaging, T_1 WI)：TR 25ms，TE 4.5ms，翻转角 30°，层厚 0.8 mm。视域范围 320 mm×320 mm，矩阵 256×256。动态增强扫描横断面 FLASH 3D 脂肪抑制序列：TR 4.45ms，TE 1.46ms，翻转角 12°，层厚 1.25mm，视域范围 320 mm×320 mm，矩阵 512×512。先行平扫，随后静注碘普罗胺注射液（拜耳医药保健有限公司广州分公司，规格 50ml:31.17g，批号 201551021），用量为 0.1 mmol/kg，速率 2ml/s，然后用 15ml 左右生理盐水冲刷导管内残余药剂。在静注药物时，同时启动增强扫描，增强后重复扫描 5~7 次，利用扫描减影进行投影重建不同时间血管造影图像。UE 联合 MR 动态增强检查：对患者先进行 UE 检查，然后进行动态增强检查，步骤与上述相同。

1.3 观察指标

观察观察两组患者在 UE、MR 动态增强检查、UE 联合动态增强检查下良、恶性肿瘤检查结果与病理对照，并进行对比分析特异率、敏感率及准确率。

1.4 疗效评定标准^[5]

UE 检查采用 5 分法进行评分：肿瘤整体变形，病变周围呈现为绿色为 1 分；肿块大规模变形，病变周围蓝绿色混合为 2 分；肿块中央未变形，边缘变形，中央蓝色，周围绿色为 3 分；肿块未变形，整体为蓝色为 4 分；肿块、周围组织均未变形，整体蓝色为 5 分。其中 1~3 分表示良性，4~5 分表示恶性。MR 动态增强检查由专业 MR 医师对所有病例图像进行分析，将病灶 MR 形状表现与动态增强扫描点划分为 1~8 分，最后得出以形状表现为圆形、片状的为良性，不规则和边缘毛刺为恶性。UE 联合 MR 动态增强检查则结合两种检查方法诊断标准进行良恶性鉴别。

1.5 统计学分析

本研究统计软件选择 spss18.0 进行统计，数据用 n 表示计数资料，比较采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 时，表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 UE 检查对乳腺肿瘤诊断结果及病理对照分析：良性组诊断结果 1 至 3 分例数明显高于恶性组，4 至 5 分例数明显低于恶性组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 UE 对乳腺肿瘤诊断结果及病理对照 (n)

组别	例数	1 分	2 分	3 分	4 分	5 分
良性组	45	9	15	11	4	6
恶性组	53	3	6	3	19	22
χ^2		4.6570	7.0040	7.0127	9.8485	9.4672
P		0.0309	0.0081	0.0081	0.0017	0.0021

2.2 MR 动态增强检查对乳腺肿瘤诊断形态及病理对照分析：良性组诊断形态为圆形、片状明显高于恶性组，而不规则、边缘毛刺明显低于恶性组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 MR 动态增强检查对乳腺肿瘤诊断形态及病理对照 (n)

组别	例数	圆形	片状	不规则	边缘毛刺
良性组	45	15	21	4	5
恶性组	53	5	7	18	23
χ^2		8.5578	13.3502	8.7883	12.4298
P		0.0034	0.0003	0.0030	0.0004

2.3 UE 检查联合 MR 动态增强检查对乳腺肿瘤诊断结果及病理对照分析：良性组诊断出良性肿瘤例数明显高于恶性组，而诊断为恶性肿瘤例数低于恶性组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 UE 检查联合 MR 动态增强检查对乳腺肿瘤诊断结果及病理对照 (n)

组别	例数	UE 联合 MR 动态增强对乳腺肿瘤诊断	
		良性	恶性
良性组	45	41	4
恶性组	53	5	48
χ^2		65.1860	
P		0.0000	

2.4 不同方法检查下对乳腺肿瘤诊断结果分析：UE 联合 MR 动态增强检查下特异率、敏感率、准确率明显高于 UE 及 MR 动态增强检查，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同方法检查下对乳腺肿瘤诊断结果比较[n(%)]

检查方法	总例数	特异率	敏感率	准确率
UE	98	35(77.78)	41(77.36)	76(77.55)
MR 动态增强	98	36(80.00)	41(77.36)	77(78.57)
UE 联合 MR 动态增强	98	41(91.11)	48(90.57)	89(90.82)
χ^2		3.2492	4.1332	7.3360
P		0.0170	0.0266	0.0255

3 讨论

超声弹性成像的定量分析在乳腺肿瘤、前列腺等疾病的诊断上具有重要作用^[6]。相关研究显示，乳腺肿瘤患者乳腺组织弹性系数不同，组织硬度也不同，UE 对于乳腺肿瘤的诊断前景良好^[7]。经分析，UE 利用了生物力学成像对病变部位硬度及弹性进行评分，不同组织弹性系数不同，当受外力压迫时，组织内变形程度也出现不同，组织受压前后的回声信号移动幅度变化出现差异，因此，在转化为彩色图像时就存在特异性，能生动显示、定位出疾病病变^[8-9]。在本次研究中，通过 UE 对良恶性乳腺肿瘤的诊断检查，发现其能准确诊断出 76 例患者与病理相符，并能对具体的良恶程度进行评分分析，特异率 77.78%、敏感率 77.36%、准确率为 76%，能发现 UE 具有较好的诊断价值。但是出现 22 例失误，究其原因，可能为以下几点^[10-11]：①当病程较长后，其内部易发生可合并钙化导致硬度上升；②导管内病灶体积大，纤维成分增加以致硬度提高影响评分；③对乳腺病灶进行检查时，压力和压放频率指标具有一定误差；④部分患者乳腺肿块软硬程度不适宜用 5 分法进行判断。

乳腺肿瘤的形态特征及增强现象在一定程度上能反映病理学的改变，如新生血管、纤维反应等^[12]。经病理组织研究表明，硬癌细胞以串状或梁状的形态侵入，伴随着成纤维反应的不同，这就是 MR 强化的表现^[13]。而圆形强化原因是周边组织肿瘤细胞活跃，微血管高密度和良好的通透性，加上病灶中心易坏死和出现纤维化而致。针对导管原位癌的诊断，MR 动态增强检测不具有优势^[14]，这也是我院本次研究中 MR 检查出现失误因素之一。这主要可能是由于导管原位癌基本局限于导管，而并非所有导管原位癌患者都有肿瘤新生毛细血管，所以强化呈现多样性^[15]。在

本次 MR 动态增强检查中, 特异率 80%、敏感率 77.36%、准确率为 77%, 出现失误还可能是 MR 检查不受腺体数量的影响, 虽然分辨率高, 病灶显示清晰, 但对钙化的显示较差。

UE 检查联合 MR 动态增强检查在特异率、敏感率、准确率上均高于单一检查方法, 而出现失误例数仅 9 例, 这可见联合检查对乳腺肿瘤具有更高诊断价值。主要失误在于超声弹性成像 3~4 分区域及 MR 动态增强形态为片状上。因此, 结合两种检查方法, 把符合 UE 检查中 1~2 分和 MR 检查中形状为圆形作为良性诊断标准, 而 UE 检查 5 分和和 MR 检查中不规则和边缘毛刺作为恶性诊断标准, 最终得出较高诊断正确率。综上所述, UE 检查和 MR 动态增强检查对乳腺肿瘤良恶性的鉴别都具有较高价值, 但是与病理结果的比较都存在一定差异, 而 UE 检查联合 MR 动态增强检查能够对两者差异进行矫正, 有效提高诊断率, 减少诊断失误情况, 对临床诊断及治疗方案制定提供准确依据, 值得推广使用。

参考文献

- [1] 王薇,郑春梅,李丹等.乳腺良恶性肿瘤超声弹性成像鉴别诊断的价值研究[J].中国全科医学,2012,15(9): 963-964.
- [2] 温静.超声弹性成像技术结合彩色多普勒超声诊断乳腺肿瘤的研究[J].实用医学杂志,2012,28(10): 1669-1670.
- [3] 郝轶,吕晓玉,郭莉等.乳腺肿瘤超声弹性成像与肌成纤维细胞分布的相关性及临床意义[J].中华超声影像学杂志,2012,21(2):138-141.
- [4] 赵青,翟虹,赵献萍等.超声弹性成像与常规超声诊断乳腺肿瘤良恶性的应用价值[J].重庆医学,2013,42(13):1468-1470.
- [5] 赵巧玲,李芬,张华等.比较超声弹性成像与 CDFI 鉴别诊断良恶性乳腺病变[J].中国医学影像学技术,2013,29(1):75-78.
- [6] 郑春梅,王薇,王繁博等.超声弹性成像对乳腺肿瘤诊断价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2014, 28(3): 259-260.
- [7] 宫霞,王怡,王涌等.超声弹性成像面积比在鉴别诊断乳腺肿块良恶性的价值[J].中国医学计算机成像杂志,2012,18(6):535-537.
- [8] 张伟,朱亚,吴海燕等.超声弹性成像应变率比值法在乳腺良恶性肿块中的诊断价值[J].临床超声医学杂志,2013,15(6):392-394.
- [9] 苏昆仑,徐海滨,涂美琳等.浸润性乳腺癌超声弹性成像与病理的相关性研究[J].中华超声影像学杂志,2014,23(5):419-422.
- [10] 张倩倩,王学梅,李银燕等.剪切波弹性成像在乳腺良恶性病变鉴别诊断中的价值[J].中国临床医学影像杂志,2012,23(6):385-388.
- [11] 杨培胜,程秀富,郝晋阳等.超声弹性成像灰阶图比值法在乳腺肿块鉴别诊断中的临床价值[J].山东医药,2014,54(25):79-81.
- [12] 郭晓霞,王雁,赵红梅等.超声弹性成像与 BI-RADS-US 分级诊断乳腺肿块的价值[J].中华实用诊断与治疗杂志,2012,26(8):783-784.
- [13] 于蕾,李建国,杨力等.超声弹性成像比值法与面积比法在鉴别乳腺良恶性肿块中的应用价值[J].中国全科医学,2014,17(24):2904-2906.
- [14] 金孟英,殷咏梅.乳腺肿瘤超声弹性成像与肌成纤维细胞分布的相关性及临床意义[J].中国医药导报,2013,10(22):97-99.
- [15] 宋媛丽.超声弹性成像在探测乳腺肿瘤上的价值探讨[J].影像技术,2015,27(6):17-18.

作者简介: 吕书革 (1970-), 男, 本科, 主治医师, 专业方向: 超声医学诊断, 电话: 15529686932

E-mail: honglingqianyun@sina.com

***通讯作者:** 温雪娟, 女, 本科, 主任技师, 主要从事超声医学诊断, 电话: 13991834706 E-mail:mq_jay@126.com

低剂量 CT 脑灌注与 SPECT 在颈动脉狭窄性 TIA 诊疗中的应用进展

郑义^① 芦 钺^{②*} 程瑞年^③

承德市中心医院①CT/MRI ②.超声诊断科 ③急诊科, 河北, 承德, 067000

[摘要] CT 脑灌注成像和 SPECT 能够在早期发现颈动脉狭窄性 TIA 的慢性低灌注状态, 及早预测发生风险系数、干预治疗和防止脑梗死的发生, 评价颈动脉内膜剥脱术和颈动脉支架置入手术疗效, 监测脑血流动力学变化情况具有重要价值。本文就 CT 脑灌注成像、SPECT 在颈动脉狭窄性 TIA 技术应用、具备血流灌注情况、优势、疗效评估、发展趋势进行综述。

[关键词] CT; 脑灌注; SPECT; TIA; 颈动脉狭窄

The applicated progress in TIA of carotid diagnosis and treatment by Low dose CT cerebral perfusion and SPECT/Zheng Yi¹ Lu Yue² Cheng Rui Nian³ //Chengde central hospital 1.CT/MRI room; 2.ultrasound room; 3. Department of emergency HE BEI CHENG DE, 067000

[Abstract] CT cerebral perfusion imaging and SPECT could detect earlier the chronic hypoperfusion of carotid stenosis TIA, forecasting risk coefficient, intervention and prevent the occurrence of cerebral infarction, to evaluate effect of carotid intima stripped carotid stenting and carotid artery curative, it is very important to procedure for monitoring cerebral hemodynamic changes. The technology application situation, advantages, perfusion, curative effect evaluation and development trend of in carotid stenosis TIA were reviewed by CT perfusion imaging and SPECT.

[Key words] CT; cerebral perfusion; SPECT; TIA; Carotid stenosis

短暂性脑缺血发作 (transient ischemic attack, TIA) 是以短暂的局灶性神经功能障碍、在 24 小时内症状完全消失、不遗留神经系统阳性体征为特点的脑缺血发作, 在美国, 每年大约近 500 万人有短暂性脑缺血发作病史, 这类人群缺血性脑卒中的发生率远远高于正常人群。近年来, 随着我国人民生活水平提高、餐饮结构的改变, 动脉粥样硬化的发病率呈逐年升高趋势, 导致颈动脉狭窄或闭塞所致的短暂性脑缺血发作比例呈逐年增加趋势, 其脑血流动力学改变与血管狭窄程度及侧枝循环发生有关。TIA 是发生缺血性脑卒中尤其是前循环脑卒中的征兆, 应及时给予诊断、治疗以降低发生风险^[1]。2011 年 TIA 的中国专家共识更新版提出“血管检查、侧支循环代偿及脑血流储备的评估可以判断导致 TIA 的病因和可能的发病原因”^[2]。而在 2013 年, 由美国神经放射学会 (ASNR)、美国放射学会 (ACR)、美国神经介入外科学会 (SNIS) 共同发布的急性脑卒中和短暂性脑缺血发作患者的影像学检查建议中提出, 对于颈动脉狭窄造成的急性脑卒中和短暂性脑缺血发作患者而言, 应用血管成像技术手段可以对卒中发生机制和未来卒中复发几率做出评估^[3]。

CT 灌注成像和 SPECT 是评估责任狭窄动脉供应的脑组织血流动力学变化以及局部脑组织血流灌注状态的两种影像学方法, 能够在一定程度上评估卒中的发生风险系数, 同时给予治疗而减少或避免卒中的发生。现就两者在颈动脉狭窄性 TIA 患者诊疗过程中的应用做一综述。

1 低剂量 CT 脑灌注成像技术原理及参数意义

动态 CT 灌注成像是指在静脉注射对比增强剂的同时对选定的层面进行连续多次扫描, 以获得该层面内每一个像素的时间-密度曲线 (TDC), 根据该曲线利用不同的数学模型计算出脑血容量 (BV)、血流量 (BF)、对比剂平均通过时间 (MTT) 和达峰时间 (TTP) 等血流参数, 以此来评价组织器官的血流灌注状态。灌注是指血液在毛细血管水平上的传输, 因此, CT 灌注成像反映的是局部组织器官生理功能的改变, 是一种功能成像, 进行定量测量时, 灌注通常用“ml/100g·min”单位测量。具体到脑 CT 灌注成像时, 通过肘正中静脉对比剂团注并不是用于观察常规增强扫描时的血管外渗所引起的强化, 而是作为观察脑组织血流灌注的示踪剂。即团注对比剂应以 CT 扫描可观测到的脑组织动态 CT 值变化为标准。既往研究也证实过多的对比剂会导致对比剂的再循环, 干扰血流灌注参数的计算。此外, 对比剂剂量的增加也会导致病人肾脏排泄负荷及相应不良反应风险性的增加。同时, 为了减少病人的辐射风险, 目前多采用低剂量 CT 灌注成像。在控制图像质量的同时, 通过适当地调整管电流、管电压及扫描时间等条件, 进一步降低辐射剂量。目前, 全脑 CTP 检查辐射剂量有 5.1 mSv、6.7~7.5 mSv 及 11.2 mSv 等不同的报道^[4-6]。动态脑组

织灌注 CT 成像能够提供多种功能参数,其中以 CBF、CBV、MTT 及 TTP 较为重要, CBF 及 CBV 图可用于观察脑组织的血流量和血容量,尤其对于 CBV 而言,在缺血的脑组织中,局部脑组织血容量的变化反映了受损脑组织的可恢复程度,当组织发生中等程度的低灌注时,常引起局部脑血容量的增加。而 MTT 及 TTP 等时间曲线可以观察脑组织强化开始和其到达峰值的时间情况。MTT 增加意味着脑循环减慢,大多是脑灌注压下降或者脑血管阻力的增加,如血管狭窄甚至闭塞等原因导致。因此对于组织灌注异常,通常在 MTT 最明显,其次为 TTP 及 CBF。对于脑组织灌注异常 MTT 具有良好预测性,尤其对于局限性地严重缺血,在早期阶段,因为 MTT 反映了对比剂通过组织毛细血管的速度,因此它是一个非常敏感的用以显示血管远端局部灌注压降低的指示剂,因此较之 CBF 图而言,MTT 可以显示灌注成像前后的变化,这点在检测较小缺血灶或无症状性缺血性 TIA 方面作用更大。脑血流量(CBF)是最为重要的脑血流动力学参数,它直接而准确地反映脑组织的灌注状态,对于脑组织灌注异常的检测具有很高的稳定性和敏感性。达峰时间能够部分地描绘脑组织病变区域的位置和范围,有助于在初始及随访研究中异常灌注区的视觉比较,并可用来确定自发的或治疗后的再通,以及再通对脑组织的影响情况。

2 低剂量 CT 脑灌注成像技术评价颈动脉狭窄性 TIA 血流动力学改变

国内、外学者研究认为,颈动脉狭窄所致的 TIA 进展到急性脑卒中中发生,从 CBF 变化过程来看经历了 3 个时期。首先,由于灌注压下降所引起的局部脑血流动力学改变;其次,脑循环储备力(CCR)失代偿性低灌注导致的神经元功能变化;最后,由于 CBF 下降超过脑代谢储备力才发生不可逆转的神经元形态学改变,即脑梗死。通常意义上的脑梗死前期指前 2 个时期。脑血管病常有较长的潜伏期,而 TIA 及临床症状的出现是一个十分明显的预警信号,将脑梗死发生后的超早期影像学提前到脑梗死前期的影像学研究具有更为重要的临床价值。脑梗死前期的局部低灌注可分为 I 和 II 期,其中 I 期指脑血流动力学发生异常变化,脑血流灌注压在一定范围内波动时,机体能够通过小动脉和毛细血管平滑肌的代偿性扩张或收缩来维持脑血流相对动态的稳定。灌注成像见 TTP、MTT 延长,rCBV 及 rCBF 下降^[7-8]。有研究报道,CTP 可敏感地显示颈动脉狭窄引起的血流动力学改变。鉴于不同设备、不同条件下测量的灌注参数的绝对值有差异,通常选择两侧脑灌注参数的相对比值作为评价指标,如此可避免在两侧颈动脉狭窄时,出现两侧脑组织灌注降低程度相同或接近而导致低估灌注异常发生率的情况。Ci H 等^[9]人研究指出,颈动脉狭窄患者 TTP 较对侧延迟 4s 则表明血流动力学已受到影响。郑彩端^[10]等人在应用 CTP 评估颈动脉狭窄性 TIA 患者时发现观察组中灌注异常者占 83.3%,且大多数为 TTP 延迟和 CBV 增加,分析可能是初期灌注压改变引起脑组织代偿性扩张小动脉而维持血流量所致。且在随访观察中发现 CTP 显示脑血管代偿良好的患者即使存在重度颈动脉狭窄,其脑血流动力学改变也未必受到明显的影响,反之在脑血管代偿能力较差的患者,即使颈动脉狭窄程度较轻,脑血流动力学也会受严重影响,从而增加了卒中的发生风险,CTP 所反映的脑血管代偿能力对预测 TIA 患者远期卒中风险方面有一定参考意义,这与文献报道相符^[11]。

颈动脉狭窄程度判定目前主要根据北美症状性颈动脉内膜切除术试验协作组标准和欧洲颈动脉外科试验协作组标准。NASCET 血管狭窄程度 = $(1 - \text{颈内动脉狭窄部血管直径} / \text{狭窄部远心端正常血管直径}) \times 100\%$ ^[12]。ECST 狭窄程度 = $(1 - \text{颈内动脉最窄处血管直径} / \text{颈内动脉膨大处血管直径}) \times 100\%$,上述两种方法都将颈内动脉狭窄程度分为 4 级:①轻度狭窄,动脉内径缩小 <30%;②中度狭窄,动脉内径缩小 30%~69%;③重度狭窄,动脉内径缩小 70%~99%;④100%为完全闭塞^[13]。对不同狭窄程度的 TIA 发作患者,杨玉婵^[14]等人的研究发现,在对各组间额叶、颞叶、基底节、前后分水岭区灰质、白质等解剖部位的 rCBF、rCBV 比较中发现不同狭窄组间差异无统计学意义;rTTP、rMTT 组间差异有统计学意义。此外,动脉狭窄的程度与患、健侧 rTTP、rMTT 比值呈正相关,并且与患、健侧 rTTP 比值的相关性更好,表明 rTTP 是显示脑缺血再灌注损伤的最敏感指标,rMTT 则是显示脑灌注损伤的较敏感指标。TTP、MTT 是能够反映血流动力学异常变化的敏感参数,并评价脑血管侧支循环代偿程度。这与前人的研究成果一致^[15-16]。程晓青等^[17]研究认为通过初级侧支循环代偿的脑血流动力学损伤程度轻,而出现次级侧支代偿则提示血流动力学严重受损,另外 Jongen 等^[18]认为 Willis 环的开放与否对颈动脉狭窄的脑血流动力学改变无影响。在唐健等^[19]的研究中表明,Willis 环通道的开放与否在颈动脉中度狭窄(50%-69%)患者的脑灌注参数之间并无统计学意义。但在重度狭窄或闭塞($\geq 70\%$)患者中 Willis 环通道不开放的脑血流 rTTP 明显延长,与 Willis 环通道开放的脑血流 rTTP 之间具有显著统计学差异,初级侧支通道的建立与否仅在颈动脉血管阻塞 $\geq 70\%$ 时意义重大,颈动脉血管阻塞 $\geq 70\%$ 时脑血管自身调节能力将失代偿,如果此时初级侧支通道又不能建立,则发生缺血性卒中风险非常高。目前在颈内动

脉狭窄或闭塞导致的 TIA 患者脑血流动力学研究中, 灌注成像 (CTP) 所反映的感兴趣区域选择上尚无统一标准, Trojanowska 将感兴趣区锁定在大脑中动脉分布区和分水岭区^[20], 而 Waaijer 将大脑中动脉皮质分布区当作感兴趣区^[21], 国内部分学者^[14]将感兴趣区扩展到 ACA 区(大脑前动脉区)、MCA 区(大脑中动脉区)、基底节区及前后分水岭区, 将涉及面对称扩展, 认为这样可以更全面地评估和分析脑血流动力学的变化情况。

3 SPECT 的基本原理及其在评估颈动脉狭窄性 TIA 中的应用

随着 CT、MRI 等以解剖及形态显示为主的影像学技术的普及, 与疾病相关的各种功能成像成为现代医学影像技术的发展方向, 其中单光子发射体层计算机成像 (SPECT) 是目前最主要的功能显像技术之一, 基本原理是利用同位素 (核素) 示踪原理进行显像, 通过体外采集放射性核素分布信息, 间接显示各种疾病的相关功能、代谢及受体改变情况。对于缺血性脑血管病而言, SPECT 提供了脑血流灌注、脑组织代谢和受体表达等多种功能层面信息, 在早期诊断, 病情监测和治疗评估等多个方面可弥补 CT、MRI 和 DSA 等的不足。他的优势在于两点, 一是主要提供脑血流灌注方面的信息, 二是便于操作, 时间短, 能在完成治疗前评估后及早进入紧急治疗程序。

SPECT 获得的脑组织内放射性分布可以反映局部脑血流量 rCBF, 能较好地反映脑血流量状况, 监测脑血管功能, 对缺血性脑血管病的诊断具有独特的临床意义和价值。颈动脉狭窄引起的 TIA, 因为只是短暂缺血, CT 及 MRI 等可能没有明显异常, 而 24 小时内 rCBF 多显著降低, 部分患者存在较长时间的 rCBF 改变。TIA 发作患者临床症状消失时的 rCBF 研究是预防 TIA 复发或继之形成脑梗死的关键。

既往研究证实, 通过负荷试验可以提高检出率。部分短暂性脑缺血发作或缺血性脑卒中患者, 在给予乙酰唑胺 (ACZ)^[22]、腺苷^[23-24]等之后, 正常脑组织的 rCBF 增加, 病变部位的 rCBF 增加减少, 出现 rCBF“相对”减低病灶, 使可疑病灶更加明显, 提升对疾病诊断的阳性率。检测 rCBF 对于早期发现 TIA 的慢性低灌注状态, 预防不可逆性脑梗死的发生具有重要意义。Imasaka K^[25]等人研究发现, 应用乙酰唑胺脑负荷试验 SPECT 灌注成像, 可以提高颈动脉或颅内动脉狭窄闭塞性病变的低灌注检出率, 有效地降低心脏手术过程中缺血性卒中高风险率。

颈动脉狭窄会导致脑血流动力学发生改变, 进而引起脑血管储备力 (cerebrovascular reserve, CVR) 的下降, CVR 受损是卒中的独立危险因素, 测定 CVR 可以预测卒中的发生^[26]。正常情况下全脑血流量约为 50ml/100g·min; 病理情况时, 当病变区域脑血流量维持在正常的 50% 以上时, 虽然脑组织缺血, 但是没有临床症状; 当 rCBF 低于 23 ml/100g·min 时则可出现临床症状, SPECT 显像可见相应部位的放射性核素降低或缺失, 但 CT 及 MRI 等形态学检查常为阴性; 只有当 rCBF 低于 8 ml/100g·min 时, 局部脑组织才会有明显改变, CT 及 MRI 检查才呈现阳性结果。张翼^[27]等人的研究通过分析颈动脉狭窄 TIA 患者群 SPECT 感兴趣区低灌注程度与半年后是否进展为脑梗死、既往 TIA 发作次数, TIA 发作持续时间等的关系。发现, 随着低灌注程度的增加, 发作次数的越多, 频率增加, TIA 发作的持续时间越长, 进展为脑梗死概率越大。根据 TIA 发作后局部脑血流灌注减低程度来推断患者复发、进展为脑梗死的危险性大小, 对于临床预后的判断, 进一步调整治疗方案具有一定的指导意义。不能因为 TIA 发作后没有无神经系统症状及体征而忽视了治疗的必要性。

4 低剂量 CT 脑灌注与 SPECT 在评估 CEA 及 CAS 术后疗效中的应用

颈动脉狭窄是引起缺血性脑血管病的一个重要原因, 就目前而言, 颈动脉内膜剥脱术 (CEA) 和颈动脉支架置入术 (CAS) 是目前治疗颈动脉狭窄的两种有效方法^[28]。尽管目前 DSA 作为颈动脉狭窄诊断的“金标准”, 能够直接显示颈动脉及其分支狭窄的部位、程度和范围, 但由于颅内血管存在丰富的侧支循环代偿可以改善局部血流, 使得狭窄部位和程度相同的病变所引起的缺血范围和程度可能不同。低剂量脑灌注 CT 成像及 SPECT 脑血流灌注显像对缺血病灶比较敏感, 且由于功能性改变先于器质性病变发生, 两者常可发现 CT、MRI 等常规影像学检查无法发现的缺血区域。目前在行 CEA 或 CAS 的颈动脉狭窄患者中, CTP 及 SPECT 均广泛应用于术前、术中及术后脑血流动力学的监测。赵小妹^[29]等选取了 40 例颈动脉狭窄行支架置入术的患者, 术前及术后 10d 行脑 CT 灌注成像, 观察 rCBF、rCBV、rMTT 等血流动力学参数变化。术后患者颈动脉狭窄症状和神经功能缺损均明显改善。术前患侧 rCBF、rCBV 明显低于对侧, rMTT 较对侧时间长, 术后患侧 rCBF、rCBV 均明显高于术前, rMTT 低于术前。

综上所述, 同其他影像学检查相比较, 低剂量脑 CT 灌注成像与 SPECT 属于无创成像技术, 具有扫描时间短, 操作简单, 分辨率高, 可获得多参数的脑血管的血流动力学信息等优点, 对于早期发现颈动脉狭窄性 TIA 的慢性低灌注状态, 及早干预治疗, 预测和防止脑梗死的发生, 评价颈动脉内膜剥脱术和颈动脉支架置入术手术疗效, 监测

脑血流动力学变化情况，发挥着不可替代的关键作用。

参考文献

- [1] Tae SP, Beom JC, Tae HL, et al. Urgent recanalization with stenting for severe intracranial atherosclerosis after transient ischemic attack or minor stroke [J]. *J Korean Neurosurg Soc*,2011,50(4) :322 – 326.
- [2] 短暂性脑缺血发作中国专家共识组. 短暂性脑缺血发作的中国专家共识更新版(2011 年). *中华危重症医学杂志(电子版)*,2012,5:24-26.
- [3] Max Wintermark, MD, et al. Imaging Recommendations for Acute Stroke and Transient Ischemic Attack Patients: A Joint Statement by the American Society of Neuroradiology, the American College of Radiology and the Society of NeuroInterventional Surgery. *J Am Coll Radiol* 2013;10:828-832.
- [4] Brouwer PA, Bosman T, van Walderveen MA, et al. Dynamic 320-section CT angiography in cranial arteriovenous shunting lesions. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2010, 31:767-770.
- [5] Siebert E, Bohner G, Masuhr F, et al. Neuroimaging by 320-row CT: is there a diagnostic benefit or is it just another scanner? A retrospective evaluation of 60 consecutive acute neurological patients. *Neurol Sci*,2010,31:585-593.
- [6] San Millan Ruiz D, Murphy K, Gailloud P. 320-multidetector row whole-head dynamic subtracted CT angiography and whole-brain CT perfusion before and after carotid artery stenting: technical note. *Eur J Radiol*,2010,74:413-419.
- [7] Orrison WW Jr, Snyder K V, Hopkins L N, et al. Whole-brain dynamic CT angiography and perfusion [J]. *Clin Radiol*, 2011, 66(6):566-574.
- [8] 程晓青, 田建明, 卢光明, 等. CT 灌注成像评价单侧颈动脉闭塞血流动力学与侧支代偿方式[J]. *中国医学影像技术*,2011,27(6):1183-1187.
- [9] Ci H, Ming G, Rui J, et al. Noninvasive assessment of the carotid and cerebrovascular atherosclerotic plaques by multidetector CT in type 2 diabetes mellitus patients with transient ischemic attack or stroke[J]. *Diabetol Metab Syndr*,2013,12(5) :9-13.
- [10] 多层 CT 脑灌注成像联合血管成像评价颈动脉狭窄性短暂性脑缺血发作 中西医结合心脑血管病杂志.2015,13(1),110-112.
- [11] Jongen L M, Hendrikse J, Moll F L, et al. Cerebral perfusion affects the risk of ischemia during carotid artery stenting[J]. *Cerebrovasc Dis*,2010,29(6):538-545.
- [12] Fox A J, Eliasziw M, Rothwell P M, et al. Identification, prognosis, and management of patients with carotid artery near occlusion[J]. *AJNR*,2005,26(8):2086-2094.
- [13] Kumar R, Seemant C. Stroke prevention surgical and interventional approaches to carotid stenosis [J]. *Neurotherapeutics*,2011,8(3):503-514.
- [14] 杨玉婵, 段庆红. 颈动脉狭窄脑血流动力学变化与动脉狭窄程度相关性的 CT 研究. *实用放射学杂志*, 2015,31(5):726-729.
- [15] 何文娟, 沈加林, 李飞平, 等. CT 脑灌注评估颈动脉狭窄的血流动力学改变[J]. *实用放射学杂志*,2011,27(3):334-337.
- [16] Kudo K, Sasaki M, Yamada K, et al. Differences in CT perfusion maps generated by different commercial software: quantitative analysis by using identical source data of acute stroke patients[J]. *Radiology*,2010,254(1):200-209.
- [17] 程晓青, 田建明, 卢光明, 等. CT 灌注成像评价单侧颈动脉闭塞血流动力学与侧支代偿方式 J . *中国医学影像技术*. 2011, 27(6):1183 – 1187.
- [18] Jongen L M, Van der Worp H B, Waaijer A, et al. Interrelation between the degree of carotid stenosis collateral circulation and cerebral perfusion J . *Cerebrovasc Dis* 2010,30(3): 277-284.
- [19] 唐 健, 常 军, 候海燕, 等. 256 层 CT 全脑灌注成像联合 CTA 评估单侧颈动脉狭窄的脑血管储备能力的价值. *实用放射学杂志*,2012, 28(10):1517-1521.
- [20] Trojanowska A, Drop A, Jargiello T, et al. Changes in cerebral hemodynamics after carotid stenting: evaluation with CT perfusion studies[J]. *J Neuroradiol*,2006 ,33(3) :169 -174.
- [21] Waaijer A, van Leeuwen MS, van Osch MJ, et al. Changes in cerebral perfusion after revascularization of symptomatic carotid artery stenosis: CT measurement[J]. *Radiology*, 2007 ,245 (2) :541 -548.
- [22] Smith LM, Elkins JS, Dillon WP, et al. Perfusion CT assessment of the cerebrovascular reserve: a revisit to the acetazolamide challenges[J]. *J Neuroradiol*,2008,35; 157—164.
- [23] Krtagna F, Barozzi(), Puta E, et al. Residual brain viability, evaluated by (99m)Tc ECD SPECT, in patients with suspected brain death and with confounding clinical factors. *Nucl Med Commun*,2009,30:815—821.
- [24] 李慧英, 蒋初明, 高永红, 等. 急性脑梗死早期认知功能与脑血流灌注相关关系的临床分析. *中华老年心脑血管病杂志*[J]. 2015,13 (4) : 385-388.

- [25] Imasaka K, Yasaka M, Tayama E, et al. Obstructive carotid and/or intracranial artery disease rarely affects the incidence of haemodynamic ischaemic stroke during cardiac surgery: a study on brain perfusion single-photon emission computed tomography with acetazolamide. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015, 48(5):739-746.
- [26] Gupta A, Chaze JL, Hartman M, et al. Cerebrovascular reserve and stroke risk in patients with carotid stenosis or occlusion: a systematic review and meta-analysis[J]. *Stroke*, 2012, 43:2884—2891.
- [27] 张翼, 莫颖敏, 韦春英, 等. 短暂性脑缺血发作患者 SPECT 脑显像的研究. *医学影像学杂志*[J]. 2012, 21(5):645-647.
- [28] Brott TG, Hobson RW, Howard G, et al. Stenting versus endarterectomy for treatment of carotid artery stenosis. *N Engl J Med*, 2010, 363:11-23.

基金项目: 承德市科学技术研究与发展计划项目 (项目编号: 20151005)

通讯作者: 芦钺, 联系电话: 18803148788, E-mail: 8260732@sina.com

脑干听觉诱发电位联合多普勒超声对高龄眩晕患者诊断价值

王淑芳

内蒙古医科大学附属医院 神经内科 010050

[摘要]目的: 探讨脑干听觉诱发电位(BAEP)联合颅多普勒超声(TCD)对高龄眩晕患者的诊断价值。**方法:** 选取我院于2013年6月至2015年2月间收治的54例已确诊为眩晕的高龄患者和51例同期就诊无眩晕和神经系统定位体征的高龄患者分别作为试验组和对照组。两组患者均行脑干听觉诱发电位和多普勒超声检查,对两组患者的颈外动脉、颈内动脉、颈总动脉、双侧锁骨下动脉(SUBA)、双侧椎动脉、颅内检测双侧大脑中动脉(MCA)、双侧眼动脉(OA)、大脑后动脉(PCA)、基底动脉、大脑前动脉(ACA)、颈内动脉虹吸段(SCA)等进行多普勒超声检查,并用脑干听觉诱发电位测量两组患者的I~III、III~V、I~V各峰间的潜伏期以及I、III、V各波的波幅和峰间潜伏期,对比观察两组患者的脉动指数和阻力指数等相关指标。**结果:** 试验组患者中出现基底动脉狭窄、一侧椎动脉狭窄和双侧椎动脉狭窄以及一侧椎动脉发育不良等现象的概率分别是11.1%、42.6%、7.4%和12.9%,明显高于对照组患者(3.9%、15.7%、0和1.9%);两组患者出现基底动脉合并椎动脉狭窄以及基底动脉代偿的情况比较和I波和III波峰潜伏期的比较以及I~III波峰间潜伏期的比较均无明显差异(均 $P>0.05$),而两组患者V波的峰潜伏期比较和III~V波的峰间潜伏期比较均具有明显差异(均 $P<0.01$)。试验组患者的总异常率81.5%显著高于对照组患者的总异常率25.5%,两组数据比较具有差异性($\chi^2=9.758$, $P<0.01$)。**结论:** 对高龄眩晕患者进行脑干听觉诱发电位联合多普勒超声检查具有较高的诊断价值,值得在临床上加以广泛推广和使用。

[关键词] 脑干听觉诱发电位; 多普勒超声; 眩晕;

Diagnostic value of brainstem auditory evoked potential combined with Doppler ultrasound in elderly patients with vertigo/WANG Shufang/Department of Internal Medicine-Neurology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, 010050

[Abstract] Objective Explore the brainstem auditory evoked potential (BAEP) transcranial Doppler ultrasonography (TCD) value to the diagnosis of vertigo in aged patients. **Method** Select our hospital from June 2013 to February 2013 were of 54 cases of elderly patients have been diagnosed with vertigo and 51 cases location without vertigo and nervous system symptoms in the same period of age patients as experimental group and control group respectively. Two groups of patients were lines of brainstem auditory evoked potential and Doppler ultrasound examination, on two groups of patients with external carotid artery, internal carotid artery, common carotid artery, subclavian artery (SUBA) on both sides, bilateral vertebral artery, intracranial detect bilateral middle cerebral artery (MCA), double side ophthalmic artery (OA), posterior cerebral artery (PCA), basal artery, before the cerebral artery (ACA) and internal carotid artery siphon segment (SCA) of doppler ultrasound examination, with two group of patients with brainstem auditory evoked potential measuring I~III、III~V、I~V between each peak and I, III, V, wave amplitude and peak latency, observed two groups of patients with pulsation index and resistance index and related indicators. **Result** In the examination in patients with basilar artery stenosis, on one side of the vertebral artery stenosis and bilateral vertebral artery stenosis and the side of the phenomenon such as

vertebral artery hypoplasia probability is 11.1%, 42.6%, 7.4% and 12.9 respectively, significantly higher than the control group patients (3.9%, 15.7%, 0 and 1.9%); Merger of two groups of patients with basilar artery vertebral artery stenosis and the situation of the basal artery compensatory comparison and I wave and the comparison of III wave incubation period and I ~ III peaks between the comparison of the incubation period were no obvious difference ($P > 0.05$), and two groups of patients V wave peak latency period of comparison and III ~ V wave peak to peak of the incubation period of fl has obvious differences (all $P < 0.01$). Group of patients with 81.5% of the total abnormal rate is significantly higher than control group in patients with total abnormal rate of 25.5%, compared two groups of data difference ($\chi^2 = 9.758$, $P < 0.01$).

Conclusion For elderly patients with vertigo brainstem auditory evoked potential in combination with Doppler ultrasound has high diagnostic value, is worth in clinical use and spread.

[Key word] Brainstem auditory evoked potential; Doppler ultrasound; Vertigo

1 引言

多数高龄眩晕患者临床就诊时除眩晕外并无其他明显的后循环缺血体征出现,而且目前临床上对于后循环脑组织缺血也缺乏较好的功能性检查手段,所以出现很多高龄眩晕患者病情无法得到明确的诊断,从而不能及时给予正确的治疗,最终导致病情进一步恶化发展为脑梗死^[1-2]。为此,我院选取 54 例已确诊为眩晕的高龄患者和 51 例同期就诊无眩晕和神经系统定位体征的高龄患者分别作为试验组和对照组,研究探讨脑干听觉诱发电位联合多普勒超声对高龄眩晕患者的诊断价值。

2 资料和方法

2.1 一般资料

选取我院于 2013 年 6 月至 2015 年 2 月间收治的 54 例已确诊为眩晕的高龄患者和 51 例同期就诊无眩晕和神经系统定位体征的高龄患者分别作为试验组和对照组,其中试验组患者中有男性患者 32 例,女性患者 22 例,54 例患者均处于 61 至 82 岁之间,平均年龄为 (68±7) 岁;对照组患者中有男性患者 30 例,女性患者 21 例,51 例患者年龄均处于 58 至 79 岁之间,平均年龄为 (66±5) 岁。两组患者的年龄性别等基础资料对比差异没有统计学意义 ($P > 0.05$),具有可比性。

2.2 纳入标准

所有试验组患者年龄均大于 60 岁,且均确诊为有眩晕发作症状;54 例试验组患者均进行磁共振弥散加权成像 (DWI) 以及磁共振血管造影 (MRA) 联合头颅 MRI 检查后,均不具有后循环急性脑梗死和新发脑梗死以及颅内占位等器质性疾病;所有对照组患者均无眩晕发作史;所有患者均知情同意自愿参与本次研究。

2.3 检查方法

两组患者均行脑干听觉诱发电位和多普勒超声检查,对两组患者的颈外动脉、颈内动脉、颈总动脉、双侧锁骨下动脉 (SUBA)、双侧椎动脉、颅内检测双侧大脑中动脉 (MCA)、双侧眼动脉 (OA)、大脑后动脉 (PCA)、基底动脉、大脑前动脉 (ACA)、颈内动脉虹吸段 (SCA) 等进行多普勒超声检查,并用脑干听觉诱发电位测量两组患者的 I ~ III、III ~ V、I ~ V 各峰间的潜伏期以及 I、III、V 各波的波幅和峰间潜伏期,并记录两组患者的脉动指数和阻力指数等^[3]。

2.4 观察指标

在脑干听觉诱发电位方面,观察记录两组患者的峰潜伏期以及峰间潜伏期,其中峰潜伏期主要包括 I、III、V 波,峰间潜伏期则主要包括 I ~ III 波和 III ~ V 波;多普勒超声检查方面,观察记录两组患者的双侧椎动脉狭窄、基底动脉狭窄、基底动脉代偿、一侧椎动脉狭窄、一侧椎动脉合并基底动脉狭窄以及一侧椎动脉发育不良的例数。

2.5 统计学处理

对我院采集的 280 例患者临床资料用 SPSS19.0 软件进行统计分析,试验所得数据均用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,组间比较采用 t 检验,计数资料之间对比采用 χ^2 检验,以是否 $P < 0.05$ 来比较差异是否具有统计学意义。

3 结果

3.1 比较两组患者椎基底动脉狭窄情况

根据我院对两组患者的临床检查结果进行统计学分析,结果显示试验组患者中出现基底动脉狭窄、一侧椎动脉狭窄和双侧椎动脉狭窄以及一侧椎动脉发育不良等现象的概率分别是 11.1%、42.6%、7.4% 和 12.9,明显高于对照组

患者 (3.9%、15.7%、0 和 1.9%), 两组数据比较差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。两组患者出现基底动脉合并椎动脉狭窄以及基底动脉代偿的情况比较则无明显差异 (均 $P > 0.05$)。试验组患者的总异常率 81.5% 显著高于对照组患者的总异常率 25.5%, 两组数据比较具有差异性 ($\chi^2 = 9.758$, $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 比较两组患者椎基底动脉狭窄情况[例 (%)]

组别	例数	基底动脉狭窄	一侧椎动脉狭窄	双侧椎动脉狭窄	基底动脉合并椎动脉狭窄	基底动脉代偿	一侧椎动脉发育不良	总异常比率
试验组	54	6 (11.1)	23 (42.6)	4(7.4)	2(3.7)	2(3.7)	7(12.9)	44(81.5)
对照组	51	2(3.9)	8(15.7)	0(0.0)	3(5.9)	0(0.0)	1(1.9)	13(25.5)
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01

3.2 两组患者行脑干听觉诱发电位检查后峰潜伏期比较

根据我院对两组患者的脑干听觉诱发电位检查结果进行统计分析, 结果表明两组患者的 I 波和 III 波峰潜伏期并没有明显差异, 而两组患者 V 波的峰潜伏期则有明显差异 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 比较两组患者行脑干听觉诱发电位检查后的峰潜伏期 (ms, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	峰潜伏期		
		I 波	III 波	V 波
试验组	54	1.69 \pm 0.23	3.79 \pm 0.23	5.97 \pm 0.25
对照组	51	1.72 \pm 0.21	3.73 \pm 0.21	5.44 \pm 0.16
P 值		>0.05	>0.05	<0.01

3.3 两组患者行脑干听觉诱发电位检查后峰间潜伏期比较

根据我院对两组患者的脑干听觉诱发电位检查结果进行统计分析, 结果表明两组患者的 I ~ III 波峰间潜伏期并没有明显差异; 而两组患者 III ~ V 波峰间潜伏期则有明显差异, 试验组患者的峰间潜伏期明显长于对照组患者 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 比较两组患者行脑干听觉诱发电位检查后的峰间潜伏期 (ms, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	峰间潜伏期	
		I ~ III 波	III ~ V 波
试验组	54	2.16 \pm 0.17	2.11 \pm 0.19
对照组	51	2.17 \pm 0.23	1.74 \pm 0.13
P 值		>0.05	<0.01

4 讨论

眩晕症 (Vertigo) 是神经内科的常见疾病之一, 临床上任何年龄均可发生, 发作时通常会有天旋地转之感, 甚至发生恶心呕吐和冒冷汗等自律神经失调现象^[4-5]。眩晕仅仅是一种症状而非一个疾病, 患者通常会反复发作性眩晕并且伴有耳鸣、耳闷、耳聋或复听和恶心呕吐、四肢厥冷、面色苍白以及出冷汗等症状^[6-9]。临床上可大致分为真性眩晕和假性眩晕两种, 前者有阵发性的旋转感和坠落感以及倾倒感, 同时伴有明显的恶心呕吐等植物神经症状^[10-11]; 后者则症状较轻, 但持续时间较长, 有摇晃不稳定感, 在注视活体动物时或在嘈杂环境下会导致症状加重^[12-13]。临床上在对于高龄眩晕患者尤其是具有脑血管病等发病基础的患者进行治疗时, 快速简洁地鉴别诊断出由后循环缺血所形成的中枢性眩晕, 对患者个体进行积极而有效的治疗以及避免病情的进一步恶化起到了非常重要的作用^[14-15]。其中后循环缺血是指后循环中的椎基底动脉系统发生短暂性缺血和脑梗死, 由于椎基底动脉系统主要供应人体脑干和小脑等后脑部组织的血流, 所以一旦发生缺血患者就会产生平衡障碍、共济失调和眩晕的现象, 并且发病突然, 容易造成如扑倒、跌落等意外性二次伤害等^[16]。为尽可能明确地检查出患者是否有后循环缺血的情况, 我院选取 54 例已确诊为眩晕的高龄患者和 51 例同期就诊无眩晕和神经系统定位体征的高龄患者进行研究, 探讨脑干听觉诱发电位联合多普勒超声对高龄眩晕患者的诊断价值。

经我院对两组患者进行脑干听觉诱发电位联合多普勒超声检查后发现, 试验组患者中出现基底动脉狭窄、一侧椎动脉狭窄和双侧椎动脉狭窄以及一侧椎动脉发育不良等现象的概率分别是 11.1%、42.6%、7.4% 和 12.9%, 明显高于

对照组患者 (3.9%、15.7%、0 和 1.9%); 两组患者出现基底动脉合并椎动脉狭窄以及基底动脉代偿的情况比较和 I 波和 III 波峰潜伏期的比较以及 I ~ III 波峰间潜伏期的比较均无明显差异 (均 $P > 0.05$), 而两组患者 V 波的峰潜伏期比较和 III ~ V 波的峰间潜伏期比较均具有明显差异 (均 $P < 0.01$)。试验组患者的总异常率 81.5% 显著高于对照组患者的总异常率 25.5%, 两组数据比较具有差异性 ($\chi^2 = 9.758, P < 0.01$)。根据我院对研究结果进行开会讨论后, 一致认为高龄眩晕患者存在后循环脑组织缺血的可能性要远大于无眩晕患者^[17]。但是并不是所有的高龄眩晕患者均意味着伴有后循环脑组织缺血的症状, 临床上要对高龄眩晕患者进行更进一步的诊断以确诊其是否患有后循环缺血的症状, 避免出现漏诊而贻误病情导致最终病情恶化严重危害患者的健康安全^[18]。

多普勒超声检查更是一种无创且易操作而又经济简便的一种临床脑血管检查基本手段, 其检验的可靠性得到了业内广泛的认可^[19]。而脑干听觉诱发电位检查也是一种检查患者脑神经功能的重要手段, 其中 I、III、V 波的检查在临床上更是具有非常重要的诊断意义。脑干听觉诱发电位检查的各波发生源和患者的脑干供血情况相对应, 是对于高龄眩晕患者的后循环系统血流灌注状态很好的判断依据^[20]。

综上所述, 对高龄眩晕患者进行脑干听觉诱发电位联合多普勒超声检查具有较高的诊断价值, 值得在临床上加以广泛推广和使用。

参考文献

- [1] 张淑平, 沙晶莹, 刘水平等. 经颅多普勒联合脑干听觉诱发电位对老年眩晕患者的病因诊断价值[J]. 中国医药, 2014, 9(10): 1471-1474.
- [2] Tian F, Sun Y. Feature Extraction of Brainstem Auditory Evoked Potential Based on Wavelet Multi-resolution Analysis. [J]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 2015 Jun; 32 (3): 514-9.
- [3] 武锋, 曹弘, 张阳普等. 脑干听觉诱发电位联合经颅多普勒超声对无症状锁骨下动脉盗血的临床分析[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2012, 34(8): 607-609.
- [4] He S, Teagle HF, Ewend M, et al. The electrically evoked cortical auditory event-related potential in children with auditory brainstem implants. [J]. Ear Hear 2015 May-Jun (3): 377-9.
- [5] 窦志杰, 李宇彤, 高辉等. 动态脑电图结合脑干听觉诱发电位在昏迷病人预后评估中的价值[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(4): 702-703.
- [6] 谢成金, 周月玲, 陈燕伟等. 脑创伤后长期意识障碍患者脑干听觉诱发电位表现与预后清醒的关系[J]. 中华神经医学杂志, 2011, 10(3): 268-271.
- [7] 张开宇, 梁守礼, 张亚杰等. 脑干听觉诱发电位检查在后循环缺血诊断中的应用[J]. 中国医药导报, 2014, (19): 78-81.
- [8] Sharma K, Kumar N, Behera JK. Brainstem auditory evoked potential in clinical hypothyroidism. [J]. Avicenna J Med 2015 Jul-Sep (3): 79-82.
- [9] 张卫红. 内听动脉闭塞综合征合并高血压病患者脑干听觉诱发电位的变化[J]. 广东医学, 2012, 33(12): 1762-1764.
- [10] 陈晶. 多普勒超声对脑静脉系统血栓形成的诊断价值[J]. 中国卒中杂志, 2013, (12): 965-969.
- [11] 杨继文, 龚树辉, 秦春等. 颈性眩晕患者的 X 线及脑干听觉诱发电位特征[J]. 中国康复, 2015, (1): 37-38.
- [12] 程旭, 王放, 姜健慧等. 脑干听觉诱发电位与脑梗死、短暂性脑缺血发作的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(2): 427-428.
- [13] Garg S, Sharma R, Mittal S, et al. Alterations in brain-stem auditory evoked potentials among drug addicts. A cross-sectional study. [J]. Neurosciences (Riyadh) 2015 Jul; 20 (3): 253-8.
- [14] 赵文雪, 杨兵, 雍永宏等. 多普勒超声和心导管测量阵发性心房颤动患者左心房压力的研究[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2014, (6): 596-598.
- [15] 王彤. 彩色多普勒超声在浅表组织肿块良恶性鉴别诊断中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, (5): 769-771.
- [16] 张文兰, 赵可辉, 李建等. 组织多普勒超声心脏图像的动态三维重建方法[J]. 中国医学装备, 2014, (4): 60-62.
- [17] Abernathy MM, Gauvin DV, Tapp RL, et al. Utility of the auditory brainstem response evaluation in non-clinical drug safety evaluations. [J]. J Pharmacol Toxicol Methods 2015 Sep-Oct 111-7.
- [18] 赵海永, 侯新蕊. 彩色多普勒超声结合同型半胱氨酸及超敏 C 反应蛋白检测对缺血性脑卒中的诊断价值[J]. 中国医学装备, 2015, (8): 4-6, 7.
- [19] He JW, Gong Q, Wang XF, et al. High stimulus rate brainstem auditory evoked potential in benign paroxysmal positional vertigo. [J]. Eur Arch Otorhinolaryngol 2015 Sep; 272 (9): 2095-100.
- [20] 谢成金, 王向宇, 陈燕伟等. 脑干听觉诱发电位分级对脑创伤后长期意识障碍患者清醒预测的价值[J]. 中华神经外科杂志, 2011, 27(11): 1095-1098.

作者简介: 王淑芳, 女, 1968-6、汉、通辽、本科、内蒙古医科大学附属医院神经内科副主任护师;

呼和浩特市民通道北街 1 号, 13031125866 电子邮箱: nmgwangshufang@sina.com

SPECT 与 SPECT/CT 设备配置要求与选型方案

耿建华^① 陈英茂^② 陈盛祖^① 田嘉禾^②

① 中国医学科学院肿瘤医院核医学科、PET/CT 中心 北京 100021

② 中国人民解放军总医院核医学科 北京 100853

[摘要] **目的:** 探讨核医学科建设中 SPECT、SPECT/CT 设备的配置及选型。**方法:** 根据 SPECT、SPECT/CT 的原理、结构和技术特点,分析讨论医疗机构核医学科 SPECT、SPECT/CT 配置与选型规则。**结果:** 1) 核医学科选择 SPECT、SPECT/CT 机型需关注的主要技术规格、性能指标、配套设备及放射防护用品。2) 配置 SPECT、SPECT/CT 可选机型。**结论:** 给出了医疗机构建设核医学中 SPECT、SPECT/CT 的配置与选型的规则,为医疗机构建设核医学科配置 SPECT、SPECT/CT 提供了参考依据。

[关键词] 核医学科; 建设; SPECT; SPECT/CT; 设备选型

Requirements of SPECT and SPECT/CT Equipment Selection

GENG Jian-hua¹ CHEN Ying-mao² CHEN Sheng-zu¹ TIAN Jia-he²

[Abstract] **Objective:** To investigate the equipment selection of SPECT and SPECT/CT for establishment of Department of Nuclear medicine. **Methods:** According to the principles and technical characteristics of SPECT and SPECT/CT equipment, how to select the PET/CT equipment type were analyzed and discussed for a hospital to establish a department of nuclear medicine. **Results:** 1) The requirements for technical parameters and performance indexes of SPECT and SPECT/CT, accessory equipments and radiation protection were presented. 2) SPECT and SPECT/CT equipment types available were showed. **Conclusion:** The information and suggestions about SPECT and SPECT/CT equipment selection for hospitals to establish a department of nuclear medicine are provided.

[Key words] Department of nuclear medicine; Establishment; SPECT; SPECT/CT; Equipment Selection

单光子发射计算机断层扫描系统 (single photon emission computed tomography, SPECT) 是核医学中主要的显像设备。可以进行局部平面显像、全身显像及断层显像。类似 PET/CT 将 CT 加在 SPECT 系统上形成 SPECT/CT 设备,其中 CT 的作用与 PET/CT 中 CT 相同。SPECT 只有进行断层显像才使用 CT, 因此, SPECT/CT 并未像 PET/CT 取代 PET 一样取代 SPECT。与 PET/CT 比, SPECT、SPECT/CT 应用广泛, 价格低廉, 是核医学目前最主要的显像设备。我国 20 世纪 80 年代开始引入 SPECT, 21 世纪初引入 SPECT/CT, 到 2014 年, γ 相机、SPECT (含 SPECT/CT) 已有 659 多台^[1], 其中 SPECT340 台, SPECT/CT 215 台。相对于我国的人口, 与发达国家相比, 仍有较大的发展空间。我国核医学目前正处于蓬勃发展期, 中华医学会核医学分会正在推动核医学“一县一科”, 大量的医疗机构急需对建设核医学科中配置核医学大型设备的指导, 对 PET/CT 及回旋加速器的配置曾有研究报道^[2-8], 本文就 SPECT、SPECT/CT 技术规格、性能指标及选型、配套设备及可选机型等进行探讨, 为医疗机构建设核医学科, 选购 SPECT、SPECT/CT 设备提供参考。

1 SPECT、SPECT/CT 组成与工作原理

技术规格与性能指标是选型采购的主要依据。为了更好的选型, 需要对 SPECT、SPECT/CT 的原理、组成及关键技术性能有深入的了解。

SPECT 系统均由硬件系统及软件系统组成。硬件系统由探头、电子线路部分、机架、扫描床及计算机组成; 软件系统由采集软件、校正软件、图像处理软件及显示软件等组成。SPECT 有通用型与专用型。

1.1 通用型 SPECT、SPECT/CT

1.1.1 通用型 SPECT

目前临床上的 SPECT 绝大部分为通用型 SPECT, 如果没有特殊说明, SPECT 指通用型。通用型 SPECT 为以 γ 相机探头为基础的旋转型设备, 其核心部件为 γ 相机, 因此在一些国外的文献资料中也称 SPECT 为 γ 相机, 而在我国 γ 相机通常特指只能进行局部平面显像的小探头设备。

SPECT 探头与 γ 相机的探头在结构组成及原理方面基本相同。不同之处是 γ 相机的探头尺寸通常较小, 多为圆形 (直径 30cm 左右); 而 SPECT 探头尺寸通常较大, 多为方形 (边长 40cm 左右)。探头是 SPECT 和 γ 相机的核心

部分,其功能为探测从人体发出的 γ 射线。探头性能决定了SPECT和 γ 相机设备的性能及图像质量。探头主要由准直器、NaI晶体、光电倍增管(PMT)组成。 γ 相机通常只有一个探头,而SPECT可以配有一个探头、两个探头或三个探头,临床使用的绝大多数为2个探头。

将某种发射 γ 光子的放射性药物注入患者体内,一定的时间后放射性药物在体内达到一定的分布,开始进行 γ 相机或SPECT显像。从体内发射出的 γ 光子首先到达准直器,准直器限制入射 γ 光子的方向,只允许与准直器孔方向相同的 γ 光子透过,以便于 γ 光子定位。到达晶体的 γ 光子与晶体相互作用,被晶体吸收后产生多个闪烁光子。闪烁光经过光导被多个光电倍增管接收。光电倍增管将闪烁光转变成电脉冲信号。该电脉冲信号经过特殊位置电路定位、能量电路甄别被记录,成为一个计数。记录大量的闪烁光子,经过处理、校正,形成一幅体内放射性浓度分布图像,即为一幅 γ 相机图像或SPECT平面图像。在采集平面图形过程中,从头到脚移动检查床,就形成全身图像。在SPECT断层成像采集时,探头围绕患者旋转。根据需要在预定时间内采集360度或180度范围内不同角度处的平面图像,每个角度处的平面图像称为投影图像(projection image)。利用在不同角度处获得的多幅投影图像,通过数据处理、校正、图像重建获得体内断层图像,即SPECT断层图像。

1.1.2 通用型 SPECT/CT

与SPECT机架并排安装CT机架,二者同轴并共用检查床,通过软件将二者图像融合在一起,形成SPECT/CT。目前临床用的SPECT/CT多为通用型SPECT。其CT的作用有:为SPECT断层图像提供衰减校正及定位,并且提供一定的诊断功能。

1.2 心脏专用 SPECT、SPECT/CT

1.2.1 心脏专用 SPECT

专用型SPECT目前只有心脏显像专用型。心脏专用SPECT从组成与原理上,可分为2类,一类为在通用型SPECT上配置心脏专用准直器并固定成心脏采集专用角度,例如:BHP6603、Ventri型;另一类为专为心脏显像设计,硬件结构不同于通用型SPECT。本节中只讨论后者。目前我国市场上有2种专为心脏显像设计的心脏专用SPECT:D-SPECT和Discovery NM 530c。

D-SPECT和Discovery NM 530c的共同之处为均采用CZT(cadmium-zinc-telluride,碲锌镉)半导体探测器,替代通用型SPECT中的NaI晶体及光电倍增管的功能,并且均由多个CZT探测器阵列组成近似半圆的弧形探头^[9-13]。但是二者探测器的排列方式及采集方式不同。

D-SPECT由9个条状CZT探测器组块组成,探测器组块的尺寸约为4 cm×16 cm。每个条状探测器组块由16×64个2.46 mm×2.46 mm×5 mm(厚度)的CZT探测器单元组成^[10],每个探测器组块上安装广角平行孔准直器。采集时,每个条状探测器组块绕自身的轴旋转,采集心脏不同部位的信号,对每个探测器各方向(120个方向)采集的信号(投影图)进行处理重建,获得心脏的断层图像。

Discovery NM 530c由19个固定的CZT探测器组成,每个探测器由4个模块组成,每个探测器尺寸为8 cm×8 cm,由32×32个2.5 mm×2.5 mm的CZT探测器单元组成^[9]。每个探测器上安装一个有效孔径为5.1 mm的针孔准直器,均面向整个心脏视野。对19个方向的投影数据进行处理重建,获得心脏的断层图像。

CZT半导体探测器取代了通用型SPECT探头中的NaI晶体及光电倍增管的功能,直接完成了将 γ 光子转变成电信号的功能。 γ 光子和CZT半导体作用时, γ 光子被吸收,在CZT内部产生电子空穴对,产生的电子空穴对的数量与 γ 光子的能量成正比,电子与空穴向相反的方向运动,形成电脉冲信号,分析记录该信号即为一个计数,该计数被CZT探测器单元定位。通过对所有探测器单元记录的信息处理重建形成断层图像。

CZT探测器与通用型NaI晶体及光电倍增管探测器相比,具有以下特点:①探头体积及重量显著缩小。没有了通用型SPECT探头中的NaI晶体及光电倍增管,探头体积大幅减小,各种屏蔽、支撑用的材料随之减少,其重量大幅下降,因此对场地的要求显著降低。②直接获得来自体内 γ 光子的位置信号和能量,无需使通用型SPECT中的定位电路及能量电路来确定位置及能量信号。③性能提高,灵敏度、空间分辨率及能量分辨率均有大幅提高。④探头模块式结构,可以组成各种形状及功能的SPECT探头。⑤成本较通用型SPECT探测器高,因此,较低廉的NaI晶体及光电倍增管还将在一定的时间内充当SPEC探测器的主角^[14]。

1.2.2 心脏专用 SPECT/CT

与通用型 SPECT/CT 相同,有心脏专用 SPECT/CT,其中 CT 的作用与通用型 SPECT/CT 中相同。例如,Discovery NM 530c 心脏专用 SPECT 加 64 排 CT 后成为 Discovery NM 570 心脏专用 SPECT/CT^[15]。

2 SPECT、SPECT/CT 技术规格及性能指标

2.1 通用型 SPECT、SPECT/CT 技术规格及性能指标

2.1.1 通用型 SPECT 技术规格及性能指标

SPECT 技术规格指硬件各组成部分的材料、结构、设计参数及软件功能参数,SPECT 性能指标指按特定标准测得的性能指标值^[16]。

SPECT 技术规格及性能指标决定了 SPECT 的档次与价格。表 1 所示为目前市场上通用型 SPECT 常用机型的主要技术规格。表 2 所示为 SPECT (NEMA NU1—2007) 性能指标^[17]。

表 1 SPECT 常用机型的主要技术规格

类别	指标	指标值范围	配置要求	
探头	探头数量	单探头、双探头	单探头设备的价格会大幅低于双探头设备。如果工作量很少,并很少进行全身成像及断层成像,选用单探头即可	
	探头可变角	固定角、可变角	可变角用途范围广	
	视野	480~540mm×380~440 mm	越大,成像视野越大	
	光电倍增管数:	50~100 个	越多,定位精度越高	
	晶体	NaI、或其他	NaI	
	NaI 晶体厚度:	3/8 英寸、5/8~1 英寸	只进行低能(^{99m} Tc 等)到高能(¹³¹ I 等)显像,选 3/8 英寸;还要进行高能或符合显像(¹⁸ F 等)选、5/8~1 英寸	
	能量范围:	低限 40~60 keV; 高限 400~1000 keV	底限越低、高限越高,能显像的核素品种越多。如果只使用特定的显像核素,满足该核素的能量要求即可。	
	PHA 能窗数量	1-16 个	越大,能显像核素越多,可按需选择	
	可同时进行不同采集能量窗的数量	1-16 个	越大,能同时显像核素越多,可按需选择	
	准直器	平行孔准直器	低能高分辨(LEGP)	能量范围: 75~170 keV, 必备
			低能通用(LEHR)	能量范围: 75~170 keV, 按需选配
			中能通用(MEG)	能量范围: 170~300 keV, 按需选配
高能通用(HEGP)			能量范围: 270~370 keV, 按需选配	
超高能高分(UHEHR)辨			能量范围: 511 keV, 按需选配	
针孔准直器		用于甲状腺等小器官显像, 按需选配		
心脏专用准直器	专用于心脏显像, 按需选配			
其他类型	按需选配			
扫描床	床板材料衰减率		≤10%	
	最大前后移动范围			
	最大上下移动范围			
	承重量			
	移动定位精度误差			
	安全保护装置		必备	
软件	数据采集软件	静态采集、门控采集、全身采集、断层采集等	必备	
	图像处理软件		必备	
	图像重建软件		必备	
	定量分析软件		常规定量分析必备, 专用软件按需选配	
	日常质控软件		必备	
	NEMA 测试软件		必备	
辅助设备	心电门控装置	用于心电门控采集	必备	
	活度计	用于活度测量	必备	
	钼铯发生器	指标 ^{99m} Tc 标药物	不易购买 ^{99m} Tc 标药物、或自己标记 ^{99m} Tc 标药物的机构必备	
	心功能运动系统	进行心肌负荷显像	按需选配	
	锝气发生器	进行肺通气显像用	按需选配	
	校正源			
	平板床	图像用于放疗计划	按需选配	
	SPECT 日常质控模体	四象限铅栅、面源、旋转中心测试支架等	必备	
	NEMA NU1-2007 质控模型	用于验收测试及日常质控	按需选配	
放射防护用品	防护注射车		必备	
	注射器防护套		必备	
	铅衣套装		必备	
	表面污染仪		必备	
	剂量率仪		必备	
	防护通风橱		必备	
	防护污物桶		必备	

表 2 SPECT 性能指标^[16,17]

指标类别	指标名称	指标意义
探头固有性能指标：无准直器时，探头的性能指标	1) 固有空间分辨率	反映无准直器时，能分辨两点间最小距离的能力。用线源扩展函数半高宽（FWHM）及十分之一高宽（FWTM）来表示。
	2) 固有空间线性	描述无准直器时成像的位置畸变程度。分绝对线性和微分线性。绝对线性由 X 及 Y 方向的线扩展函数峰值偏离距离表示。微分线性由 X 及 Y 方向的线扩展函数峰值偏离距离的标准差表示。
	3) 固有能量分辨率	描述探头对 γ 射线能量的辨别能力。用无准直器时光电峰的半高宽与峰值处能量的百分比表示
	4) 固有均匀性	无准直器时，探头对一均匀泛源的响应。均匀性积分均匀性和微分均匀性。积分均匀性由均匀入射的 γ 射线在探头视野中产生的最大像素计数与最小像素计数之差与其之和的百分比表示。微分均匀性由视野中 X 方向及 Y 方向相邻 5 个像素中最大像素计数与最小像素计数之差与其之和的百分比表示。
	5) 多窗空间配准	描述无准直器时，不同能窗成像时， γ 相机对不同能量光子的定位能力。用不同能窗时一点源的图像在 X 及 Y 方向上的最大位移表示。
	6) 空气中固有计数率特征	描述在空气中，无准直器时计数率随活度的变化特征
	7) 75000/s 的计数率时固有空间分辨率	75000/s 的计数率时，固有空间分辨率
	8) 75000/s 的计数率时固有均匀性	75000/s 的计数率时，固有均匀性
探头的系统性能指标：有准直器时探头的性能指标	1) 无散射系统空间分辨率	有准直器时，能分辨空气中两点间最小距离的能力。用线源扩展函数半高宽（FWHM）及十分之一高宽（FWTM）表示。
	2) 有散射系统空间分辨率	有准直器时，在有散射物质的空间中，能分辨两点间最小距离的能力。用线源扩展函数半高宽（FWHM）及十分之一高宽（FWTM）来表示。
	3) 系统平面灵敏度和穿透性	灵敏度描述探头对源的响应能力。系统平面灵敏度指某一探头对平行于该探头放置的特定平面源的灵敏度，用单位活度在单位时间内的计数表示。
	4) 探头屏蔽	描述探头对视野之外的源的屏蔽能力
	5) 有散射的系统计数率特性	有准直器时，有散射条件下，探头计数率特性
断层成像性能指标	1) 系统对准(旋转中心偏移、轴偏移)	旋转中心偏移：反映 SPECT 系统的机械转动中心与计算机图像中心的重合程度。轴偏移：反映多探头旋转轴的偏移程度。
	2) 无散射断层空间分辨率	重建的断层图像上能分辨空气中两点间最小距离的能力。用点源扩展函数半高宽（FWHM）表示
	3) 有散射断层空间分辨率	在有散射物质的空间中，重建的断层图像上能分辨两点间最小距离的能力
	4) 系统体积灵敏度	反映 SPECT 断层成像的计数效率
	5) 探头间灵敏度差异	反映多探头 SPECT 探头间灵敏度差异
全身成像性能指标	1) 不含散射全身系统分辨率	反映全身扫描成像时，能分辨空气中两点间最小距离的能力

2.1.2 通用型 SPECT/CT 技术规格及性能指标

SPECT/CT 技术规格及性能指标包含了 SPECT 技术规格及性能指标、CT 技术规格及性能指标及 SPECT/CT 整体的技术规格及性能指标，其中 SPECT 部分技术规格及性能指标同表 1-2。SPECT /CT 中的 CT 技术规格及性能指标决定了 CT 的档次，CT 的档次直接影响 SPECT/CT 的价格。目前在用的 SPECT/CT 中 CT 的档次有三种：诊断级 CT、大致定位级 CT 及介于前二者之间的 CT。医疗机构可根据自己对 CT 使用的需求情况，对 CT 档次、排数、心脏成像技术和 CT 专用高级图像处理软件部分进行针对性的选择。CT 的主要技术规格及性能指标参考参考文献^[2]。表 3 所示为 SPECT/CT 中主要技术规格及代表机型。

表 3 SPECT/CT 的主要技术规格及代表机型

类别	指标	指标值	配置要求
SPECT	见表 1	见表 1	见表 1
CT 档次	诊断级 CT	最大管电流>200 mA	按需配置，代表机型：
	诊断级与大致定位级之间	最大管电流:30 mA	按需配置，代表机型：
	大致定位级	最大管电流:2.5 mA	按需配置，代表机型：
软件	数据采集软件		必备
	图像处理软件		必备
	图像重建软件		必备
	SPECT 和 CT 融合软件		必备
	日常质控软件	CT 日常质控软件、SPECT 和 CT 融合精度测试软件	必备
	性能测试软件		必备
辅助设备	CT 日常质控模体		必备
	CT 性能测试模体		必备
	高压注射器		按需选配（前提：配置诊断级 CT）
	SPECT 和 CT 融合精度测试模体		必备

2.2 心脏专用型 SPECT、SPECT/CT 技术规格及性能指标

专用型 SPECT 技术规格及性能指标。

心脏专用 SPECT 的共同特点为高的灵敏度及高分辨率。表 4 所示为 4 种不同类型的 SPECT 用于心肌显像时的性能及心肌显像特点对比^[9]，可见心脏专用 SPECT 的灵敏度及分辨率明显高于通用型 SPETCT。

表 4 4 种不同型号的 SPECT 性能及心肌显像特点对比

	D-SPECT	NM 530c	通用型 SPECT+心脏 专用准直器及软件	通用型 SPECT
断层灵敏度 $s^{-1}MBq^{-1}$	850	460	390	130
分辨率中心	8.6	6.7	15.0	15.3
模体信噪比	4.1	4.6	3.9	3.5
患者信噪比	3.9	5.2	3.9	3.4

3 SPECT、SPECT/CT 选型

选型是设备购置关键的一步，总的来讲，按需选型，即按照各自医疗机构的具体情况，例如，每日检查的患者数量及科研需求，同时考虑医疗机构自身的价格承受能力。目前我国市场上商用的 SPECT、SPECT/CT 有多个厂家，每个厂家有多种机型，表 5 为目前我国市场上 SPECT、SPECT/CT 的部分机型和关键技术参数。对通用型 SPECT、SPECT/CT，SPECT 硬件部分差异不大，而 CT 部分有较大的差异，并且有些型号的设备配备专用的新软件，带来了价格差异。通常，不带 CT 的 SPECT 价格相对最低，每种机型的价格主要根据配置 CT 的档次及选配的新功能新技术、专业软件等确定。

表 5 目前我国在用及市场上的部分 SPECT、SPECT/CT 机型

制造商	名称	型号	SPECT 类别	CT 排/层数
北京滨松光子技术股份有限公司	SPECT	BHP6601 型	通用机型，双探头	--
北京滨松光子技术股份有限公司	固定角 SPECT	BHP6603 型	心脏专用机型	--
深圳市贝斯达医疗器械有限公司	SPECT	BDH-180	通用机型，双探头	--
GE	SPECT	Discovery NM 530c	心脏专用机型	--
GE	SPECT	Brivo NM 615	通用机型，单探头	--
GE	SPECT	Ventri	心脏专用机型	--
GE	SPECT/CT	Discovery NM/CT 670	通用机型，双探头	16
GE	SPECT	Discovery NM 630	通用机型，双探头	--
GE	SPECT/CT	Optima NM/CT 640	通用机型，双探头	4
GE	SPECT/CT	Infinia VC Hawkeye 4	通用机型，双探头	4
Philips	SPECT	BrightView	通用机型，双探头	--
Philips	SPECT	BrightView X	通用机型，双探头	--
Philips	SPECT/CT	Precedence	通用机型，双探头	16
Philips	SPECT/CT	BrightView XCT	通用机型，双探头	平板 CT
Siemens	SPECT	Symbia E Single	通用机型，单探头	--
Siemens	SPECT	Symbia E	通用机型，双探头	--
Siemens	SPECT	Symbia S	通用机型，双探头	--
Siemens	SPECT/CT	Symbia T	通用机型，双探头	2
Siemens	SPECT/CT	Symbia T2	通用机型，双探头	2
Siemens	SPECT/CT	Symbia T6	通用机型，双探头	6
Siemens	SPECT/CT	Symbia T16	通用机型，双探头	16
Spectrum Dynamics (Israel) Ltd.	D-SPECT	3	心脏专用机型	--

SPECT、SPECT/CT 选型完成后，进入场地的选址、布局设计及放射防护设计阶段，将另文详叙。

参考文献

- [1] 中华医学会核医学分会. 2014年全国核医学现状普查简报. 中华核医学与分子影像杂志, 2014, 34 (5): 389.
- [2] 陈英茂, 耿建华, 田嘉禾, 徐白萱. PET/CT 中心建设之一——配置条件和设备选型[J]. 中国医学装备, 2013, 04: 1-4.
- [3] 陈英茂, 耿建华, 田嘉禾, 徐白萱. PET/CT 中心建设之二——设备关键硬件与技术性能的深度探讨[J]. 中国医学装备, 2013, 05: 1-5.
- [4] 耿建华, 陈英茂, 陈盛祖, 等. PET/CT 中心建设之三——场地选址与布局设计. 中国医学装备, 2013, 10(6): 1-4.
- [5] 耿建华, 陈英茂, 陈盛祖, 等. PET/CT 中心建设之四——放射防护. 中国医学装备, 2013, 10 (7): 1-6.
- [6] 耿建华, 陈英茂, 陈盛祖, 等. PET/CT 正电子药物中心的建设之一——设备的配置和选型, 中国医学装备, 2011, 8(9): 5-10.
- [7] 耿建华, 陈英茂, 陈盛祖, 等. PET/CT 正电子药物中心的建设之二——场地的选址与设计, 中国医学装备, 2011, 8(9): 14-17.
- [8] 耿建华, 陈英茂, 陈盛祖, 等. PET/CT 正电子药物中心的建设之三——放射防护, 中国医学装备, 2011, 8(9): 10-14.
- [9] Imbert L, Poussier S, Franken PR, et al. Compared performance of high-sensitivity cameras dedicated to myocardial perfusion SPECT: A comprehensive analysis of phantom and human images. J Nucl Med 2012; 53:1897-1903.
- [10] Erlandsson K, Kacperski K, Gramberg D. Performance evaluation of D-SPECT: a novel SPECT system for nuclear cardiology. J Phys. Med. Biol. 2009, 54: 2635-2649.
- [11] Takahashi Y, Miyagawa M, Nishiyama Y, et al. Performance of a semiconductor SPECT system: comparison with a conventional Anger-type SPECT instrument. Ann Nucl Med, 2013, 27: 11-16.
- [12] Liu CJ, Cheng JS, Chen YC, et al. A performance comparison of novel cadmium-zinc-telluride camera and conventional SPECT/CT using anthropomorphic torso phantom and water bags to simulate soft tissue and breast attenuation. Ann Nucl Med, 2015, 29: 342-350.
- [13] Tanaka H, Chikamori T, Hida S, et al. Comparison of myocardial perfusion imaging between the new high-speed gamma camera and the standard Anger camera. Circ J, 2013, 77: 1009-1017.
- [14] 郭晋纲, 任媛, 庄坤, 等. 多模态影像设备 (SPECT/CT) 的应用. 生物医学工程学进展, 2014, 35(1): 28-32.
- [15] 郭晋纲, 赵周社, 马兴荣, 等. SPECT/CT 的研究进展. 中国医疗器械杂志, 2014, 38(6): 454-457.
- [16] 耿建华, 陈英茂. 核医学成像设备的质量控制标准及中国质量控制现状, 中华核医学与分子影像杂志, 2015, 35(1): 75-78.
- [17] National Electrical Manufacturers Association. NEMA NU-1 Standards Publication NU-1-2007: Performance measurements of Gamma cameras[S]. Rosslyn, VA: National Electrical Manufacturers Association, 2007.

作者简介: 耿建华, 女, 博士, 研究员, 中国医学科学院肿瘤医院核医学科物理师, 硕士生导师。

主要研究方向: 核医学设备质量控制、放射防护、核医学图像处理及核素内照射剂量。

(核医学装备与技术专委会供稿)

不同型号 PET/CT 中受检者的有效剂量及其影响因素的研究

梁子威^② 耿建华^{①②} 王奕斌^① 杜召猛^① 毕高畅^① 齐雍鹤^① 郑容^{①②} 吴宁^①

①100021 北京, 国家癌症中心 中国医学科学院 北京协和医学院肿瘤医院 PET-CT 中心

②100021 北京, 国家癌症中心 中国医学科学院 北京协和医学院肿瘤医院核医学科

通信作者: 耿建华, Email: gengjean@163.com

*基金项目: 国际科技合作项目 (2009DFA32960); 中国癌症基金会北京希望马拉松专项基金(LC2013A13)

[摘要] 目的: 研究不同型号 PET/CT 中受检者的有效剂量及其影响因素。**资料与方法:** PET/CT 受检者的有效剂量为 PET 放射性药物导致的剂量与 CT 导致的剂量之和。PET 部分由注射的放射性药物活度计算获得。CT 部分采用仿真人体模型 (Model RS-550) 实验获得, 成像设备为 GE Discovery ST 和 Discovery Elite 型 PET/CT。CT 采集条件: 管电压 120kV, 管电流 30-250mA 范围内固定及自动管电流 (ATCM), 螺距 (Pitch) 分别为 0.938、1.375、1.75 以及 0.984、1.375, 模拟临床 PET-CT 的分段扫描方式对仿真人体模型进行扫描。记录各种扫描条件下的剂量长度乘积

(DLP), 计算有效剂量 (ED_{CT})。结果: 1) PET 部分有效剂量与注射剂量及体重成正比, 与 PET 的采集条件无关。2) CT 部分有效剂量: 对固定的螺距, 两机型有效剂量随管电流的增加线性增加, Discovery Elite 型增加幅度低于 Discovery ST 型; 对固定的管电流, 随螺距 (Pitch) 的增加降低。不同的扫描条件下 (30-250mA), 两机型总有效剂量在 1.40-27.68 mSv 范围内。在临床扫描条件下 Discovery Elite 型受检者有效剂量低于 Discovery ST 型。结论: 对确定的受检者, 由 PET 部分导致的有效剂量基本固定, 而由 CT 部分引起的有效剂量随 CT 扫描条件有较大的差异。因此可以根据不同的临床需求, 选择不同的 CT 扫描条件, 可有效降低受检者的有效剂量。

[关键词] PET/CT; 受检者; 有效剂量; 影响因素

Effect on image quality and radiation dose for different PET/CT/Liang Ziwei, Geng Jianhua, Wang Yibin, Du Zhaomeng, Bi Gaochang, Qi Yonghe, Zheng Rong, Wu ning//PET/CT Center and Department of Nuclear Medicine, National Cancer Center/ Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021, China

Corresponding author : Geng Jianhua, Email : gengjean@163.com

[Abstract] Objective:The aim of the study was to investigate the effective dose of patient caused by PET/CT to provide data basis for decreasing the radiation dose. **Materials and Methods:** The effective dose was the sum of the dose caused by CT and PET. The dose caused by PET was calculated by the radioactivity of the radiopharmaceutical injected. The dose caused by CT was determined by acquisition for the anthropomorphic phantom(Model RS-550). PET/CT system of GE Discovery ST-16 and Discovery Elite was used to simulate clinical PET/CT situation for the anthropomorphic phantom. CT acquisition conditions were as follows:tube voltage 120kV, tube current 30-250mA, pitch 0.938, 1.375 and 1.75.Scan range was divided into body scan and head-neck scan to simulate clinical PET/CT. The dose-length product (DLP) was recorded and the effective dose (ED_{CT}) was calculated with $ED_{CT}=k \cdot DLP$. **Results:** 1)The effective dose caused by PET was 3.16-8.96 mSv for a patient with 45-85kg weight with injection dose 3.70-5.55MBq/kg (0.08-0.15mCi/kg) of 18F-FDG, increased linearly with weight and injection dose and independent of the PET acquisition conditions.2) The effective dose caused by CT increases linearly with increasing tube current when the pitch was fixed, Discovery Elite increased larger than Discovery ST. However, when the tube current fixed, the effective dose reduce with increasing pitch. Under the different acquisition condition(30-250mA), total the effective dose of two PET/CT was 1.40-27.68 mSv. The effective dose of Discovery Elite was lower than Discovery ST, upon the condition of clinical scan conditions.

Conclusions:There is no big variation for effective dose by PET for a certain patient, however there is much difference for the effective dose caused by CT under the different acquisition conditions. It shows that the radiation dose caused by CT in PET/CT could be effectively reduced by appropriate choice of acquisition conditions according to different clinical needs.

[Key Words] PET/CT; Patient; Effective radiation dose; Influence factors

PET/CT 具有同时获得功能及解剖影像的优势, 近年来在临床中应用范围也不断扩大, 正常人群的肿瘤筛查、不明原因的肿瘤标志物升高等检查。PET/CT 检查产生的辐射剂量分两部分, 全身 CT 扫描的 CT 部分和放射性药物产生的 PET 部分, 相比 PET 检查放射药物所产生的辐射剂量或常规局部诊断 CT 扫描所产生的辐射剂量, PET/CT 对受检者所产生的辐射剂量会明显加大[1]。前文[2]探讨过在临床条件下, GE Discovery ST-16 型 PET/CT 系统受检者有效剂量及影响因素之间的关系, 本研究探讨 GE Discovery ST-16 型和 GE Discovery Elite 型 PET/CT 系统受检者的有效剂量及其影响因素之间的差异, 进一步探讨有效剂量变化规律, 为临床中尽可能降低 PET/CT 辐射剂量提供参考依据。

1. 资料与方法

1.1 检测设备

1.1.1 PET/CT 设备

GE Discovery ST-16 型 PET/CT 系统; GE Discovery Elite 型 PET/CT 系统。

扫描分别采用固定管电流模式和自动管电流模式, 采集条件如下:

①固定管电流模式:

管电压固定为 120 KV; 管电流 (mA) 分别为 30、50、70、90、110、130、150、170、190、210、230、250mA; 共 36 组扫描条件。

Discovery ST-16 型, 螺距 (Pitch) 可设置为 0.938、1.375、1.75, 层厚 3.75mm, 扫描速度为 0.8s/转。共 36 组扫描条件。

Discovery Elite 型, 螺距 (Pitch) 设置为 0.984、1.375, 层厚 3.75mm, 扫描速度设置为 0.5s/转、0.8s/转。共 48 组扫描条件。

②自动管电流模式 (automatic tube current modulation, ATCM):

设置管电压为 120KV，管电流区间为 30-250mA，采用上述扫描条件分别对 Model RS-550 仿真人体模型进行扫描。

1.2 扫描条件

1.2.1 扫描范围

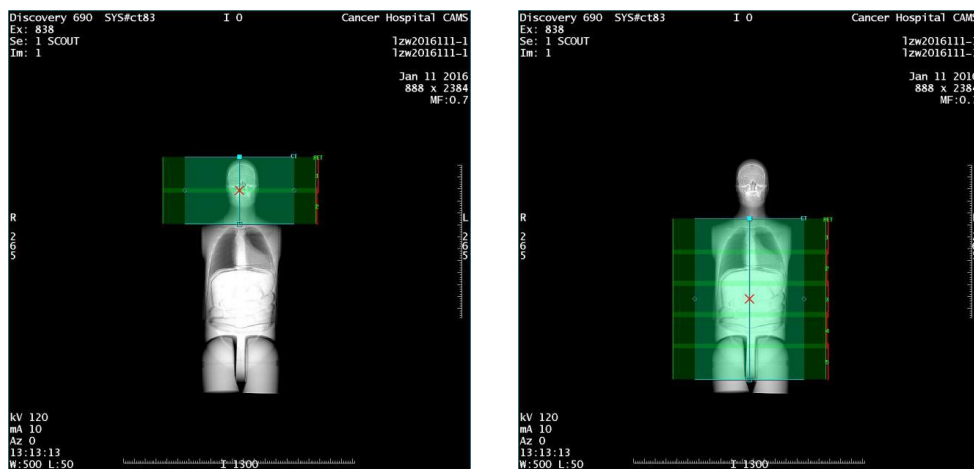


图 1 分体扫描“2+5 模式”

本研究采用“2+5”头颈-体分体扫描方式（如图 1）：

头颈部 2 床位（头顶至锁骨），87 层；

体部 5 床位（下颚至股骨上端），207 层。

1.3 CT 有效剂量

本研究采用与前文相同的剂量长度乘积估算法（dose-length product, DLP）[3]计算 CT 有效剂量（ED）。

1.4 PET 部分有效剂量

PET 部分导致的有效剂量由注射放射性药物的剂量决定，详见前文研究。

2. 结果

2.1 不同扫描条件下的 CT 部分有效剂量

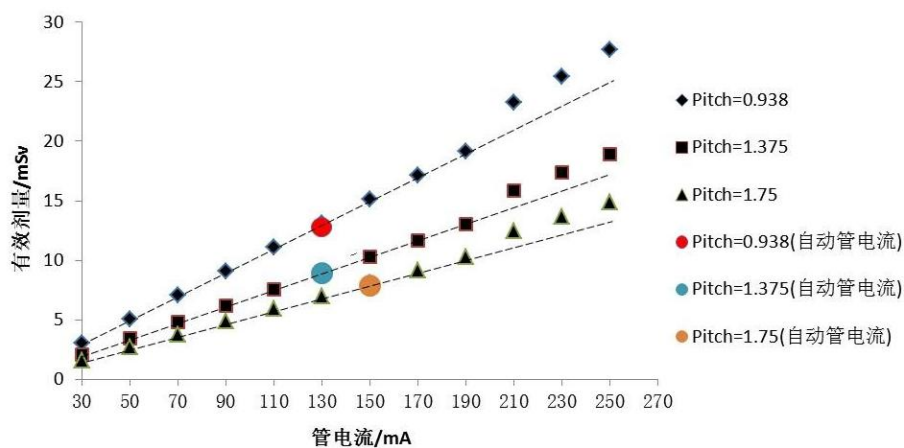


图 2 Discovery ST-16 型 PET/CT 中 CT 部分有效剂量/mSv

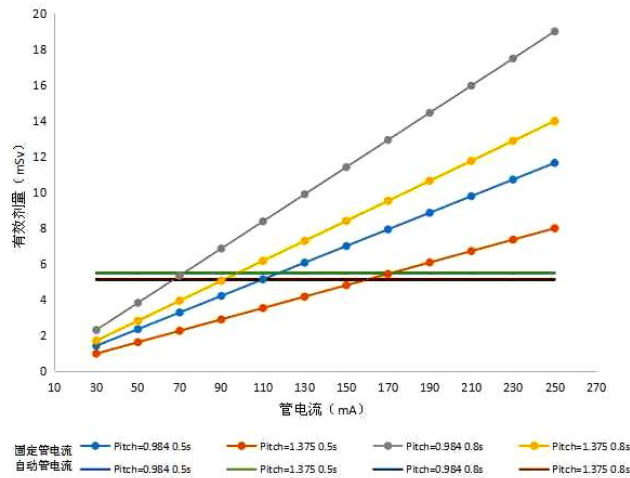


图3 DiscoveryElite 型 PET/CT 中 CT 部分有效剂量/mSv

注：图3内，pitch=0.984 0.5/s 和 pitch=1.375 0.5/s 趋势线基本重合；pitch=0.984 0.8/s 和 pitch=1.375 0.8/s 趋势线基本重合；

Discovery ST-16 型 PET/CT 中 CT 部分有效剂量结果，如图2，详见前文研究。

DiscoveryElite 型 PET/CT 中 CT 部分有效剂量结果，如图3可见，在固定管电流模式，管电流 30-250mA 范围内，在任何螺距下，有效剂量均与管电流成线性关系。自动管电流模式，0.5 转/s 下，pitch=0.984 和 pitch=1.375 下有效剂量分别为 5.45、5.49；0.8 转/s 下，pitch=0.984 和 pitch=1.375 下有效剂量分别为 5.08、5.13。由此可见，自动管电流模式，转速是影响有效剂量的主要因素。

对图3中数据进行分析可见，在本研究的两种 Pitch 和转速下，有效剂量均与管电流成非常显著的线性关系，如下：

转速= 0.5s 时

Pitch=0.984: $ED_{CT}=0.0465 \text{ 管电流} (R^2= 1.0000) \dots\dots\dots 1$
 Pitch=1.375: $ED_{CT}=0.0319 \text{ 管电流} (R^2= 1.0000) \dots\dots\dots 2$

转速= 0.8s 时

Pitch=0.984: $ED_{CT}=0.076 \text{ 管电流} (R^2= 1.0000) \dots\dots\dots 3$
 Pitch=1.375: $ED_{CT}=0.0559 \text{ 管电流} (R^2= 1.0000) \dots\dots\dots 4$

为了临床应用中更直接的估算受检者的辐射剂量，可将上式利用 SPSS17.0 将有效剂量对管电流和螺距进行多元线性拟合，得受检者有效剂量随管电流及螺距的变化关系：

转速= 0.5s 时

$ED_{CT}=0.039 \text{ 管电流}-5.245 \times \text{pitch}+6.189(R^2= 0.97) \dots\dots\dots 5$

转速= 0.8s 时

$ED_{CT}=0.066 \text{ 管电流}-7.182 \times \text{pitch}+8.474(R^2= 0.98) \dots\dots\dots 6$

考虑到采用不同的扫描速度，上述两式可修正为式 1-7：

$ED_{CT}=0.053 \text{ 管电流}-6.214 \times \text{pitch}+12.476 \times \text{转速} (R^2= 0.935) \dots\dots\dots 7$

适用条件：Discovery Elite 型 PET/CT，管电压 120kV，管电流 30-250mA，扫描速度可选的任何速度，扫描范围为 PET/CT 全身扫描。临床利用 1-7 可估计出受检者的辐射剂量。

2.2 两型号 PET/CT 固定管电流下有效剂量比较

考虑到不同机型设置的 pitch 和转速不同，为了有效剂量的结果进行比较，本研究使用有效毫安秒[4]的概念（公式 8），得到相同有效毫安秒下，两种机型的有效剂量，如图 4。

有效毫安秒 = 管电流 (mA) × 旋转速度 (s/转) / pitch 8

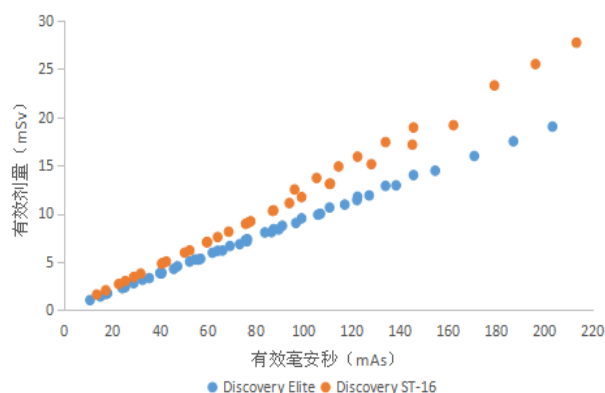


图4 相同有效毫安秒 (mAs) 下, 两种机型的有效剂量 (mSv)

可见, 在相同有效毫安秒下, Discovery Elite 型 PET/CT 有效剂量较 Discovery ST-16 型 PET/CT 更低, 有效毫安秒越大时剂量差异越明显。按照临床患者检查扫描方式, 两机型均使用“2+5”扫描方式, 可见 Discovery Elite 型与 Discovery ST-16 型实际有效剂量分别为 6.98 和 7.45mSv, 单位有效毫安秒下的有效剂量分别为 0.09 和 0.11mSv/mAs, 前者明显较低, 如表 1;

表 1 临床实际扫描条件下, 俩机型 PET/CT 有效剂量比较

管电流 150mA 管电压 120kV	pitch	转速/s	有效毫安秒 mAs	有效剂量 mSv	$\frac{\text{mSv}}{\text{mAs}}$
Discovery Elite	0.984	0.5	76.22	6.98	0.09
Discovery ST-16	1.75	0.8	68.57	7.45	0.11

2.3 自动管电流模式下有效剂量

对比俩型号 PET/CT 在自动管电流模式下有效剂量如表 2, Discovery Elite 型在不同螺距、不同 pitch 和不同转速扫描产生的有效剂量较为接近 (5.13~4.94mSv), 而 Discovery ST-16 型有效剂量波动较大。在相同扫描条件下 (pitch=1.375、转速 0.8/s), Discovery Elite 型有效剂量 (5.13mSv) 小于 Discovery ST-16 型 (8.52mSv)。

表 2 自动管电流模式下, 两种机型的有效剂量 (mSv)

	Discovery Elite				Discovery ST-16		
pitch	0.984	0.984	1.375	1.375	0.938	1.375	1.75
转速/s	0.5	0.8	0.5	0.8	0.8	0.8	0.8
管电流 (30-250mA)	5.45	5.49	5.08	5.13	12.46	8.52	7.88

3. 讨论

PET/CT 系统的图像采集是由两个并列的装置——CT 机和 PET 机, 产生的辐射剂量也分为两部分, 两者产生原理不同。PET/CT 中的 CT 尽管结构原理与专用 CT 机相同但是由于 PET/CT 中 CT 与专用 CT 临床需求侧重点不同, 因此对 CT 的性能要求也有差异, CT 部分的辐射剂量的贡献又占整个检查的大部分 [5], 们可以调节 CT 扫描参数来适当降低 CT 部分辐射剂量。PET 部分由 18F- FDG 注射剂量产生, 与患者体重成正比, 相对固定, 因此我们重点探讨 CT 降低部分辐射剂量的可能性。

3.1 PET/CT 中 CT 有效剂量

3.1.1 固定管电流模式

本实验结果显示当其他条件不变时, 在本研究所测量的管电流范围内 (30-250mA), 两种机型结论抑制: CT 的辐

射剂量随管电流的增加而线性增加,随 Pitch 的减少而增加。本实验中,固定其他条件,当管电流增加时,X 光光子的数量增加,因此导致辐射剂量增加。Discovery ST-16 机型,当管电压固定 120Kv,扫描速度 0.8s/转,管电流 $\leq 190\text{mA}$ 范围内,在任何螺距下,有效剂量均与管电流成线性关系,而在管电流 $>190\text{mA}$ 后,有效剂量随管电流的增幅明显提高。以 5 床位体部有效剂量为例,在管电流在 30-190mA 范围内,Pitch 为 0.938、1.375、1.75 时,管电流每增加 20mA,有效剂量分别增加 1.85mSv、1.26mSv、0.99mSv;然而,管电流 210mA 时有效剂量较 190mA 时分别增加 3.77mSv、2.58mSv、2.03mSv,在管电流 $>210\text{mA}$ 后,管电流每增加 20mA,有效剂量分别增加 2.03mSv、1.39mSv、1.09mSv。而 Discovery Elite 机型管电流在 30-250mA 之间,有效剂量随管电流均成线性关系,并不存在 190-210mA 有效剂量突然增加的特点。转速为 0.8/s, Pitch 为 0.984、1.375 时,管电流每增加 20mA,有效剂量分别增加 1.52mSv、1.12mSv,可见 Discovery Elite 机型辐射剂量增加的趋势要低于 Discovery ST-16 机型。多元拟合公式,ST-16 机型: $ED_{CT} = (0.075 \text{管电流} - 8.096 \times \text{Pitch} + 10.965) \times (\text{扫描速度}/0.8)$, Elite 机型: $ED_{CT} = 0.053 \text{管电流} - 6.214 \times \text{pitch} + 12.476 \times \text{扫描速度}$,也说明 Elite 机型有效剂量随管电流增幅低于 ST-16 机型。

考虑到不同机型设置的 pitch 和扫描速度不同,本实验引入有效毫安秒 (mAs) 概念,在相同有效毫安秒下比较两机型有效剂量。在相同有效毫安秒下,Discovery Elite 型 PET/CT 有效剂量较 Discovery ST-16 型 PET/CT 更低,有效毫安秒越大时剂量差异越明显。按照临床患者检查扫描方式,两机型均使用“2+5”扫描方式,可见 Discovery Elite 型与 Discovery ST-16 型实际有效剂量分别为 6.98 和 7.45mSv,单位有效毫安秒下的有效剂量分别为 0.09 和 0.11mSv/mAs,前者明显较低;同时 Discovery Elite 型使用低 pitch (0.984: 1.75),会提高图像质量如:噪声更低、信噪比和质量因数更高,我们将在后文详细探讨图像质量和有效剂量的关系。

3.1.2 自动管电流模式

在自动管电流采集条件下,设定相同管电流范围 30-250mA,Discovery ST-16 机型使用 Pitch 0.938、1.375、1.75,转速 0.8/s,计算得出 CT 部分有效剂量分别为 12.46mSv、8.52mSv、7.88mSv,有效剂量随螺距的增加而降低。在其他扫描条件不变时,发现自动管电流 CT 有效剂量与对应螺距下固定管电流 130-150mA 时基本相同。Discovery Elite 机型使用 Pitch 0.984、1.375,转速 0.5/s,计算得出 CT 部分有效剂量分别为 5.45mSv、5.59mSv;使用 Pitch 0.984、1.375,转速 0.8/s 计算得出 CT 部分有效剂量分别为 5.08mSv、5.13mSv。可见 Discovery Elite 机型有效剂量随螺距增加变化不明显,且有效剂量值比较接近,但明显低于 Discovery Elite 机型。

既往文献报道 CT 部分造成的剂量为 PET/CT 所致的辐射剂量中的大部分成分。本研究所得 CT 部分有效剂量为 8.12mSv;PET 部分与受检者体重有关,体重 45-85kg 的受检者有效剂量为 3.16-8.96mSv。以体重为 67kg 患者为例,有效剂量为 4.57-7.38mSv 之间。可见,CT 部分为 PET/CT 检查辐射剂量的大部分,与既往文献报道结果基本一致。然而,最高剂量与文献 80mSv[6]相差较多,分析原因如下:①CT 扫描参数,本实验使用管电流最高 250mA,低于诊断 CT 所用管电流值,如果使用诊断 CT 的扫描条件进行 PET/CT 中 CT 扫描,会导致相当高的照射剂量;②体重的影响,PET 部分的有效剂量与体重成正比。另外有些 PET/CT 检查为保证诊断效率常规扫描胸部 CT,其对受检者的有效剂量约为 8 mSv。

PET/CT 机在临床中的应用越来越广泛,PET/CT 中 PET 图像能够对肿瘤进行早期发现、早期诊断及定位,可以鉴别良、恶性肿瘤,进行肿瘤手术前分期、预后评价、监控复发或转移灶、放射治疗计划拟定。CT 在 PET/CT 中的作用可分为 3 种:一是只用作 PET 图像重建时的衰减校正;二是解剖定位兼衰减校正;三是 CT 诊断兼解剖定位和衰减校正,这三种情况所需的 CT 图像质量由低到高,差别较大[7]。一般情况下,较高的辐射剂量获得的图像质量也较好[8],然而造成受检人群辐射致癌的风险也随之增加;当 CT 剂量较低时,往往只能提供衰减校正和定位的作用,不能提供足够的诊断信息。因此,对 PET/CT 中的 CT 应区别于常规的诊断 CT,在满足临床需求的情况下,更需要尽量减少 CT 机产生的这部分辐射剂量。我们对仿真人体模型图像质量与辐射剂量及扫描参数之间的关系进行了一系列研究,探讨如何在满足临床需求的前提下降低辐射剂量,下文详叙。

参考文献

- [1] 张连宇等(2011).PET/CT 中的 CT 剂量和质量控制.中国医学影像技术.27(11):2365-2367.
- [2] 梁子威等(2015a).PET/CT 受检者的有效剂量及其影响因素的研究.中国医学装备.12(11):1-5.
- [3] 岳保蓉等译(2011)国际放射防护委员会(ICRP)第 102 号出版物.多排探测器计算机 X 线体层摄影患者剂量控制.

北京:人民军医出版社.

- [4] 徐晓东等(2006). 西门子多排螺旋 CT 新技术. CT 理论与应用研究. 15 (2): 22-27.
- [5] Brix, et al(2005). Radiation exposure of patients undergoing whole-body dual-modality 18F-FDG PET/CT examinations. J Nucl Med. 46(4):608-613.
- [6] Delbeke, et al(2006). Procedure Guideline for Tumor Imaging with 18F-FDG PET/CT 1.0. J Nucl Med. 47(5):885-893.
- [7] 陈盛祖(2007). PET/CT 技术原理及肿瘤学应用.人民军医出版社.
- [8] 孙立军等(2005). X 线图像质量与造影剂浓度和放射剂量相关性研究. 实用放射学杂志. 21(1): 1-4.

(核医学装备与技术专委会供稿)

扫描式质子束剂量成像仪的剂量响应特性研究

张湘^①,杨锋^①, Wen Chien Hsi^{②*}, 周荣^{①*}

①四川省成都市九眼桥望江路 29 号四川大学物理学院 四川 成都 610064

②上海市浦东新区康新公路 4365 号上海市质子重离子医院 上海 201315

*共同通讯作者: wenchien.hsi@outlook.com

*共同通讯作者: zhourong@scu.edu.c

[摘要] 目的: 现在, 一种在几何光学基础上经过良好设计的光学剂量仪(扫描式质子束成像仪)准备用来测量调制的质子束斑和碳离子束斑的二维剂量分布情况。其剂量响应研究将使仪器适用于多变的质子束和碳离子束流能量和剂量情况, 针对此设计实验探究仪器探测信号随剂量变化的响应特性。**方法:** 使用上海质子重离子中心加速器提供的临床使用精度质子束流, 采用离散点测量法获取不同能量和剂量情况的信号数据, 后拟合响应函数曲线。**结果:** 扫描式质子束剂量成像仪对于能量大于 70MeV, 剂量高于 0.2Gy 的质子束流, 其剂量的响应曲线为很好的对数函数。**结论:** 研究表明, 有着优异空间分辨率和有着对已知能量束流(有良好的能量分辨率)可复写的剂量响应的光学剂量仪, 可用以作为常规检测仪器, 规范地测量质子束和碳离子束的侧面束斑或束流扫描。

[关键词] 光学剂量仪; 剂量响应特性; 质子束斑

Dose response of the scanning proton beam imager

ZHANG Xiang, YANG Feng, Wen Chien Hsi, ZHOU Rong

[Abstract] Objective : An optical dosimeter (scanning proton beam imager) with well-aligned elements in optical path was built to measure a 2D dose distributions of modulated spot-scanning carbon-ion and proton beams. The dose response of phosphor scintillator was investigated for varied energies of carbon-ion and protons. **Methods:** Using the proton beam of Shanghai proton heavy ion center accelerator, the signal data of different energy and dose were obtained by the discrete point method, and then the response function curve was fitted. **Results:** Scanning proton beam dose imaging instrument for energy greater than 70MeV, dose higher than the proton beam 0.2Gy, the dose response curve for a good logarithmic function. **Conclusion:** The result shows that the optical dosimeter with the good spatial resolution and the reproducible dose response for known particle beam energies good spatial resolution can be routinely used to measure the lateral profiles of each spot or scanning field for carbon-ion and proton.

[Key Words] Optical dose meter; dose response characteristics; proton beam spot

1 引言

主动扫描式质子剂量成像仪的核心理念是通过粒子束流轰击荧光闪烁体发出的可见光被感光元件捕获, 从而得到光学信号(像素图像), 依此信号图像中的信息反推束流本身的信息, 从而了解束流情况。

在整个获取信息的通道为: 荧光闪烁屏(荧光闪烁体)——反射镜——感光器件, 将信息沿重离子束流——可见光——经反射的可见光——数字信号的路线传递。反射镜的意义在于防止感光器件被束流直射而产生严重辐照损

害。其角度、平整度、反射率均匀性都会对最终结果产生影响，而这部分在仪器的光学系统测试中已得到一套完备的测试数据档案。因此剩下两个硬件闪烁屏和感光器件成为问题考究的重点。这些硬件的特性会直接影响信号的大小与类型，单独考究硫化钨闪烁体或 CMOS 感光元件是没有必要的，在控制参变量的范围内，我们需要获取的是整体得出的信号其关于剂量变化而出现的变化情况。

2 方法与实验设计

2.1 能量响应的参变量控制

仪器最终的目的是对质子束流的剂量截面情况作出评估。而在此之前，一个重要的参变量是我们需要控制的，即仪器对质子束流的能量响应特性。

一般来说，闪烁体的光产额应与粒子在其中沉积的能量存在着某种稳定的函数关系。不过，在某些情况下，粒子入射能量的大小亦会对光产额造成影响。举例而言，闪烁体的发光特性源自其内部处于激发态的电子。若粒子入射能量过低，低于某一高激发态，那么就绝对不能产生该反应道的激发电子，而影响总的闪烁效率。这是能量极低的情况，当能量过高时，高能带电粒子依旧存在着库伦相互作用，然而其产生的次生高能电子的能量沉积过程方才成为能量沉积的主导，电子的能量沉积过程伴随着辐射损失（韧致辐射），并且高能电子有着更大逃逸出闪烁体的可能性。这些因素可能对同剂量，不同能量情况下的光产额造成影响。从目的上来说，我们需要的是仪器能够准确的反映重离子束流入射某一点处的剂量情况是否与理论计算值相符合，那么，闪烁体对能量的响应就必须是稳定不变的，即对不同能量，同剂量的重离子束流测试结果有着同样的光强，或者其对能量的响应必须存在着某种保持稳定的函数关系，从而可以针对同剂量情况下不同的入射能量束流产生的光强进行剂量修正。

为此我们设计了一组能量跨度从 70MeV 到 200MeV 的质子束流测试实验，在上海质子重离子医院的物理计划设计中，采用与入射深度相关的值（Range）来表示粒子的能量，单位为厘米，其含义为作为能量层标签，数值等于入射重离子在纯水模型中其布拉格效应峰所处的深度位置减去 1.4mm。我们选择 0.200Gy、0.500Gy、1.00Gy 三种剂量情况，每种剂量均匀取 Range 为 5.00m (78MeV)、10.0cm (115MeV)、15.0cm(145MeV)、20.0cm (172MeV)、25.0cm (195MeV)、30.0cm (217MeV) 五个点，共计 15 个测试点进行能量响应测试。

测试中，首先控制仪器光圈以及感光系数不变（光圈值 f/5.6，ISO 速度 250），整个过程中不移动仪器，保持入射位置固定，保证在像素背景亮度不超过 4 的相同全黑背景下，完整收集全部闪烁光，测试完成后选择图像光斑相同点（中心点），取其半径 200 像素点内像素深度（像素点绿色通道位数）平均值为光强测试结果。测试结果如下表所示：

表 1 能量响应像素深度测试数据表

R-cm/ D-Gy	5	10	15	20	25	30
0.2	46.3	48	49.6	50.1	48.9	48.6
0.5	97.6	100	101	102	102	102
1.0	152	153	153	153	154	155

实验结果可见，同剂量情况下，取 70MeV 到 200MeV 范围内不同能量的质子束流，其最终的光产额随能量上升有微弱的增加趋势，但在可接受误差范围内，是可视为保持稳定不变的。其中，0.2Gy 情况下像素深度平均值为 48.6，标准差 1.21，相对偏差最大处达到 4.71%，这是由于低剂量，信号较弱而造成的信噪比不高。在实际定性分析，或将可能进行的定量分析实验中，需调节合适感光系数使得测量信号的像素深度处于 120 到 200 之间，在此范围内，如 1.00Gy 组的测试结果，相对偏差小于百分之一。

2.2 剂量响应特性实验

在得到闪烁体对不同能量，同剂量重离子束流响应特性的特征之后，以此为参考，可以开始研究仪器的剂量响应特性了。由于闪烁体的光产额在可接受的误差范围内（百分之一）不受粒子能量大小的影响，因此我们只需考虑粒子沉积能量即剂量的变化所引起的光产额变化。在设计物理计划的剂量过程中，需考虑闪烁体前的等效水深阻挡效应，以在已有的纯水中离子线性能损数据库中得到该能量粒子束在闪烁体内的 stopping power，并乘以其粒子总数，从而得到束流在闪烁体中沉积的能量即剂量。然而实际情况中存在着这样的问题，闪烁体薄片的厚度不能考虑为理

想情况下的极薄薄片，在其质量厚度内存在着较大的能量梯度，由于对闪烁体的结构和物质组成暂时没能从生产商处获得详细的资料，着致使我们无法知道闪烁体的等效水深究竟是多少。这使得我们暂时不能测量能量较低的束流，因为低能量束流其线性能量损失即 **stopping power** 随其自身能量改变的变化率更大，使得闪烁体本身厚度效应造成的不确定偏差越大。在实际试验后，我们认为现情况下 **Range** 约在 5cm 以上的测试结果，是可以忽视闪烁体的厚度效应的，即我们可以将通过其前端等效水深阻止厚度计算而得到的 **stopping power** 作为离子在整个穿越闪烁体过程中的特征 **stopping power**，以此方式在闪烁体的等效水深阻止厚度未知的情况下，研究仪器的剂量响应特性。

3 结果

实验数据中，首先有 **Range** 为 5cm 的 0.200Gy, 0.500Gy, 1.00Gy, 2.00Gy, 3.00Gy 五个测试点。用与能量响应特性研究中同样的控制变量方式得到测试的图像数据。其数据如下表所示：

表 2 **Range** 为 5cm 剂量响应测试数据

D-Gy/ R-cm	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
5	46.3	97.6	150.1	203.2	227.3

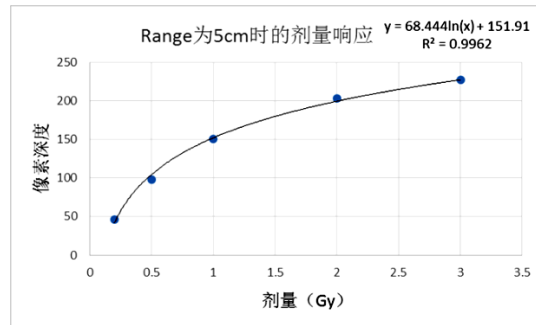


图 1 **Range** 为 5cm (78MeV) 时的剂量响应曲线

可见，仪器关于剂量的响应特性在该范围内是呈对数规律的，当剂量上升时，收集到的光信号强度增加率逐渐降低，并存在着极限值。考虑这一极限值存在的原因，由于我们收集闪烁体产生的可见光的过程，是在全黑环境背景下持续曝光直至束流终止。而剂量的累积实际上是照射时间的累积，即剂量率是保持不变的，这意味出现指数响应特性的可能性存在两种可能，其一是在连续的工作时间里，闪烁体随着高能重离子束流照射时间增长，其闪烁效率呈下降趋势，对剂量响应曲线求导，其函数为 $f=dy/dx=68.4/x$ ($0.2 < x < 3$)，其中 x 为连续照射累积剂量， f 为正比于闪烁效率的单位剂量所生成信号的像素深度；第二种可能是感光元件的信号获取和后端处理系统（此处为索尼 ILCE- $\alpha 7$ 相机）其自身的硬件结构或是算法结果导致的在长时间曝光后的防过曝自修正，使得最终得到图像的亮度与实际光产额不成正比。这仍是悬而未决的问题，不过，仪器本身作为整体对剂量的响应特性成对数关系的。

为研究这一对数关系的稳定性，我们又选择一些能量和剂量点，对其进行测量验证，检验测试结果的数据点能否落入对数曲线之内。测试数据如下表所示：

表 3 剂量响应曲线验证测试数据

D-Gy/ R-cm	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
5	46.3	97.6	150.1	203.2	227.3
10	48.0	100.0	153.0		
15	49.6	100.3	152.7		
20	50.1	102.6	153.4		
25	48.9	102.8	154.2	206.0	
30	48.6	103.1	155.2		

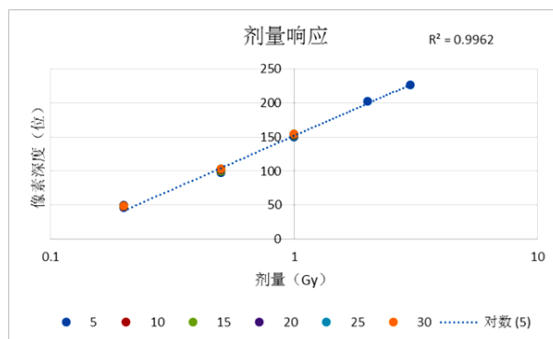


图2 剂量响应曲线验证测试符合图（对数坐标系）

由表中数据可以发现，从 10.0cm 到 30.0cm 的测试结果，其测试结果相差都在一个像素深度以内，而 5.00cm 组的数据普遍偏小一些。由于测试束流的时间有限，除 5cm 组外其他组的数据测试没有能测满，在此取除 5.00cm 以外测试数据最多的一组，25cm 组进行曲线拟合，其对数关系如图中虚线所示。

4 结论

对于能量高于 70MeV 的质子束流，其剂量不变时，信号大小 X 随能量的变化趋势为 $\Delta X/X = (\Delta E/E) \times 3.3\%$ ，在能量跨度小于 120MeV 内可将其近似为忽略 ΔX ，即剂量仪信号大小不随能量的变化而变化。

剂量仪的剂量响应特性，我们通过比较两次拟合结果，其函数 $X = 68.466 \ln(D) + 155.52$ 与之前得到的 5cm 组拟合函数 $X = 68.444 \ln(D) + 151.91$ 。可以得出，从 Range 为 5cm 以上，即能量 70MeV 以上仪器的信号随剂量的变化率是保持不变的，其响应函数曲线为对数函数。 $X = 68.45 \ln(D) + b$ 。仪器有着可复写的剂量响应特性，因此其可以适用于多变的质子束和碳离子束流能量和剂量情况

5 讨论

扫描式质子束剂量成像仪的剂量响应函数 $X = a \ln(D) + b$ ，其中 X 为信号大小， D 为束流剂量， a 和 b 近似为常数。在能量 70MeV 的情况下， b 的值迅速减小 2.3%，由此可以预测在低能端（小于 70MeV），仪器的能量响应会有着较为剧烈的变化，而不可将之视为稳定不变。因此，仪器在低能区的特征尚待进一步实验探索。

参考文献

- [1] Mebrahtu H T, Gao W, Thomas P J, et al. Heavy ion radiation damage simulations for CMOS image sensors[J]. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2004, 5578:323-333.
- [2] Mebrahtu H T, Gao W, Thomas P J, et al. Heavy ion radiation damage simulations for CMOS image sensors[J]. Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering, 2004, 5578:323-333.
- [3] Walter C. Phillips, Alexander Stewart, Martin Stanton, Istvan Naday and Charles Ingersoll. High-sensitivity CCD-based X-ray detector[J]. Journal of Synchrotron Radiation (Impact Factor: 2.74). 01/2002; 9(Pt 1):36-43.
- [4] Lijun Ma, Paul B. Geis, and Arthur L. Boyer. Quality assurance for dynamic multileaf collimator modulated fields using a fast beam imaging system. Medical Physics 24, 1213 (1997); doi: 10.1118/1.598157
- [5] Lei B, Liu Y, Zhang J, et al. Persistent luminescence in rare earth ion-doped gadolinium oxysulfide phosphors[J]. Journal of Alloys & Compounds, 2010, 495(1):247-253.

第一作者简介：张湘，大学本科，四川大学物理学院硕士研究生在读，18328578204，123617188@qq.com

通信地址：四川省成都市望江路 29 号四川大学物理学院，邮编：610064

通讯作者简介：

Wen Chien Hsi, 博士，复旦大学附属肿瘤医院 研究员，上海市质子重离子医院 首席物理师

185 2137 6100, wenchien.hsi@outlook.com; 上海市康新公路 4365 号上海市质子重离子医院放射物理科 201315

周荣，博士，四川大学物理学院副教授，核工程与核技术实验室主任，18980910371, zhourong@scu.edu.cn。

通信地址：四川省成都市望江路 29 号四川大学物理学院，邮编：610064

（核医学装备与技术专委会供稿）

「临床检验与输血」

4 种电泳组合项目联合检测在多发性骨髓瘤诊断中的应用

王家健, 莫南勋*, 陶然, 陈建波, 李连青, 胡朝晖, 李雯雯

广州金域医学检验中心有限公司 广东广州 510515

[摘要] 目的:探讨 4 种电泳组合项目方法联合检测对多发性骨髓瘤(MM)的诊断价值。方法:对 150 例多发性骨髓瘤患者和 45 例健康成人(对照组)的血液和尿液标本,进行血清免疫固定电泳(IFE)、血清蛋白电泳(SPE)、尿本周氏蛋白电泳(B-J)、高分辨尿蛋白电泳(HR)检测、血清总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)、免疫球蛋白(Ig)及轻链定量的检测并计算轻链比值,所有结果使用 SPSS22.0 进行统计分析。结果:在 150 例 MM 患者中, SPE 对 M 蛋白的检出率为 94.7%, IFE 对 M 蛋白的检出率为 100%, B-J 对 M 蛋白检出率为 68%, HR 对 M 蛋白检出率为 59.3%。健康对照组电泳均未检出 M 蛋白。与健康对照组相比较, MM 患者的 TP、ALB、IG、轻链 κ 、 λ 含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:应用免疫固定电泳、本周氏蛋白电泳的检测、血清蛋白电泳、高分辨尿蛋白电泳及轻链定量等方法联合检测,对多发性骨髓瘤患者的早期诊断和预后评估具有重要意义,可以有效避免漏诊、误诊。

[关键词] 多发性骨髓瘤;电泳;联合检测

Application of combined detection in clinical diagnosis of multiple myeloma by four kinds Gel Electrophoresis combinational items

Wang Jiajian, Mo Nan-xun*, Tao Ran, Chen Jian-bo, Li Lian-qing, Hu Chao-hui

Guangzhou Kingmed Center, Guangzhou, 510330, China

[Abstract]Objective:To study the value of diagnosing multiple myeloma (MM) by means of detecting four kinds Gel Electrophoresis combinational items. **Methods:**150 Patients which are diagnostic multiple myeloma and 45 healthy subjects (as control) were detected Immunofixation electrophoresis(IFE), serum protein electrophoresis (SPE), Bence-Jones protein electrophoresis(B-J),High resolution urinary protein electrophoresis(HR),total protein(TP),albumin(ALB),globulin(GLOB),immunoglobulin(Ig) and serum light chain κ 、 λ ,then all data were analyzed by the software of SPSS 20.0.**Result:**In 150 patients, 94.7% cases for serum protein electrophoresis test are M, 100% cases for Immunofixation electrophoresis test are positive. 68% cases for Bence-Jones protein electrophoresis are positive, 59.3% cases for High resolution urinary protein electrophoresis (HR) are positive. M band was not found in 45 healthy subjects. Compare with the control group, the levels of TP、ALB、IG and serum light chain κ 、 λ were significantly higher in the MM patients group ($P < 0.05$).**Conclusion:**The detection of serum protein electrophoresis combined with the detection of Immunofixation electrophoresis,High resolution urinary protein electrophoresis and Bence-Jones protein electrophoresis improved the detection rate and specificities of MM, had the high application value in the early diagnosis of MM. The combined detection of proper combinational items can improve the positive rate of MM detection and effectively avoid the misdiagnosis.

[Key words]multiple myeloma;Electrophoresis;combined detection

多发性骨髓瘤(Multiple Myeloma,MM)是一种起源于浆细胞的造血系统恶性肿瘤,骨髓内单一浆细胞株异常增生,是恶性浆细胞病中最常见的一种类型。其发病率占恶性血液病的 10%~15%,浆细胞病的 45%^[1]。MM 特征是具有合成和分泌免疫球蛋白的浆细胞异常增殖并浸润,单克隆免疫球蛋白(monoclonal immunoglobulin)或其片段,即 M

蛋白 (monoclonal protein) 大量出现, 而正常多克隆浆细胞的增生和多克隆免疫球蛋白分泌受到抑制, 导致相关组织或器官损伤, 常见临床表现为骨痛、反复感染、贫血、肾功能不全、高钙血症和高粘滞血症等。目前, 随着人口老龄化以及检测技术的不断提高, MM 的发病率在不断增加^[2]。

MM 早期可无明显症状。骨髓瘤细胞的浸润、破坏可引起肝脾肿大, 骨痛、骨质疏松和病理性骨折, 肾功能损害等; 破坏骨髓造血组织及肾损害可引起贫血、白细胞减少和血小板减少; 正常免疫球蛋白减少及中性粒细胞减少等常导致感染; 血清中 M 蛋白浓度明显增高易导致高黏滞综合征, 沉积在组织可引起淀粉样变; 血小板减少和高黏滞综合征影响凝血、止血功能可导致出血。MM 起病隐匿, 临床表现多样且首诊科室复杂, 极易漏诊或误诊。据统计, 该病误诊率可达 54%~69.11%^[3]。目前诊断 MM 的方法除了骨髓涂片、组织活检、X 线摄片来确诊外, 血清蛋白电泳及免疫学方法已成为辅助诊断 MM 的重要手段^[4]。而骨髓瘤细胞多呈灶性分布, 应用穿刺涂片等方法单次穿刺不一定能检出, 对患者造成身体与心理上的负担较大, 所以用患者比较能接受的实验室检查方法诊断及鉴别 MM, 降低误诊率, 并且能对患者病情进行评估, 疗效监测, 对患者的治疗和预后有重要意义。现将收集到的 150 例 MM 患者标本与 45 例健康成人标本进行血清蛋白电泳、血清免疫固定电泳、尿本周氏蛋白电泳、尿高分辨率蛋白电泳、血清总蛋白、白蛋白、球蛋白、免疫球蛋白、轻链定量及其比值测定, 旨在探讨多种方法联合检测 M 蛋白在 MM 临床诊断中的意义, 如何应用现有实验室联合筛查对 MM 进行快速的准确诊断及分型, 减小漏诊、误诊率, 为临床多发性骨髓瘤的诊断和治疗提供依据, 便于临床医生对患者进行治疗对策调整。

1 病例和方法

1.1 对象与分组

收集广州金域医学检验中心 2014 年 11 月至 2015 年 6 月送检的 150 例多发性骨髓瘤患者和 45 例健康成人的血液和尿液标本, 所有 MM 患者均符合中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013 年修订)的诊断标准, 150 例 MM 患者中, 男 77 例, 女 73 例, 年龄 39~87 岁, 中位年龄 64 岁。男性 40~59 岁 26 例, 60~79 岁 46 例, ≥80 岁 5 例, 女性 <40 岁 1 例, 40~59 岁 25 例, 60~79 岁 46 例, ≥80 岁 1 例。

1.2 仪器试剂

总蛋白 (批号: 606194)、白蛋白 (批号: 608771)、IgG (批号: 606490)、IgA (批号: 606469)、IgM (批号: 606483) 采用罗氏 COBAS c702 全自动生化分析仪及其配套试剂检测; 血清蛋白电泳 (批号: 090614)、尿本周氏蛋白电泳 (批号: F020714)、高分辨尿蛋白电泳 (批号: 071114) 采用意大利 Interlab G26 全自动琼脂糖凝胶电泳分析系统及其配套试剂; 血清免疫固定电泳 (批号: 552559) 采用美国 Helena SPIFE 4000 全自动电泳分析仪及其配套试剂检测; 血清 κ 轻链 (批号: 346130D)、λ (批号: 342329G) 轻链采用罗氏模块化全自动生化分析仪 Modular P800 及其配套试剂检测。

1.3 统计学处理

全部数据用 SPSS 22.0 统计分析软件分析, 计量资料以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组均数间的比较用 t 检验, 计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为有显著性统计学意义。对 MM 组和对照组的定量检测结果进行 t 检验分析, 对 MM 组的电泳检测结果进行 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 150 例 MM 患者的电泳检测结果分析

如表 1, 图 2 及图 3 所示, SPE、IFE、B-J、HR 四个电泳方法的 M 蛋白检出率, 对表 1 的结果进行 χ^2 检验: SPE 与 IFE 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), SPE 与 B-J 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), SPE 与 HR 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); IFE 与 B-J、HR 分别进行比较, 均有统计学意义 ($P < 0.01$); B-J 与 HR 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。血清免疫固定电泳分型结果 (表 2, 图 4, 图 5): IgG 型 MM 患者 88 例 (IgG-κ 型 54 例, IgG-λ 型 34 例), IgA 型 MM 患者 39 例 (IgA-κ 型 23 例, IgA-λ 型 16 例), IgM 型 MM 患者 6 例 (均为 IgM-κ 型), κ 轻链型 MM 患者 7 例, λ 轻链型 MM 患者 7 例, 双克隆型患者 3 例 (κ 型 2 例, λ 型 1 例)。

表 1 150 例 MM 患者的电泳检测检出 M 蛋白结果

检测项目	阳性	阴性	检出率
SPE	142	8	94.7%
IFE	150	0	100%
B-J	102	48	68%
HR	89	61	59.3%

表 2 IFE 对 150 例 MM 患者分型结果

MM 患者类型	κ 型	λ 型	合计
IgG 型	54	34	88
IgA 型	23	16	39
IgM 型	6	0	6
轻链型	7	7	14
双克隆型	2	1	3
合计	92	58	150

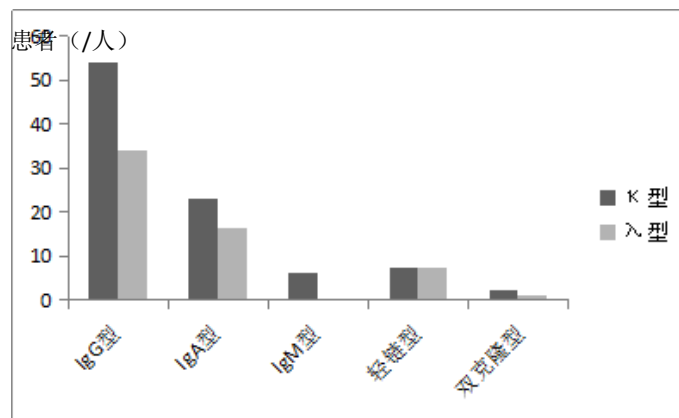


图 1 150 例多发性骨髓瘤患者 MM 分型分布

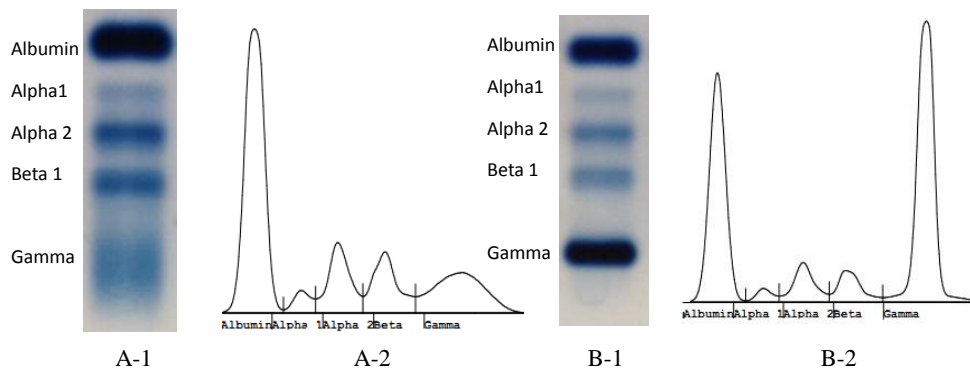


图 2 血清蛋白电泳条带及图谱

注：A-1 为血清蛋白电泳阴性条带，A-2 为血清蛋白电泳图谱；

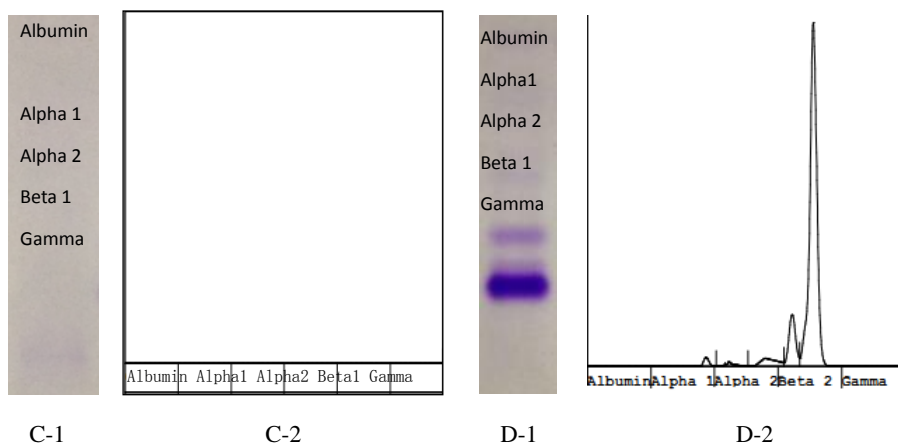


图3 高分辨尿蛋白电泳条带及图谱

注： C-1 为高分辨尿蛋白电泳阴性条带，C-2 为高分辨尿蛋白电泳阳性条带及图谱；

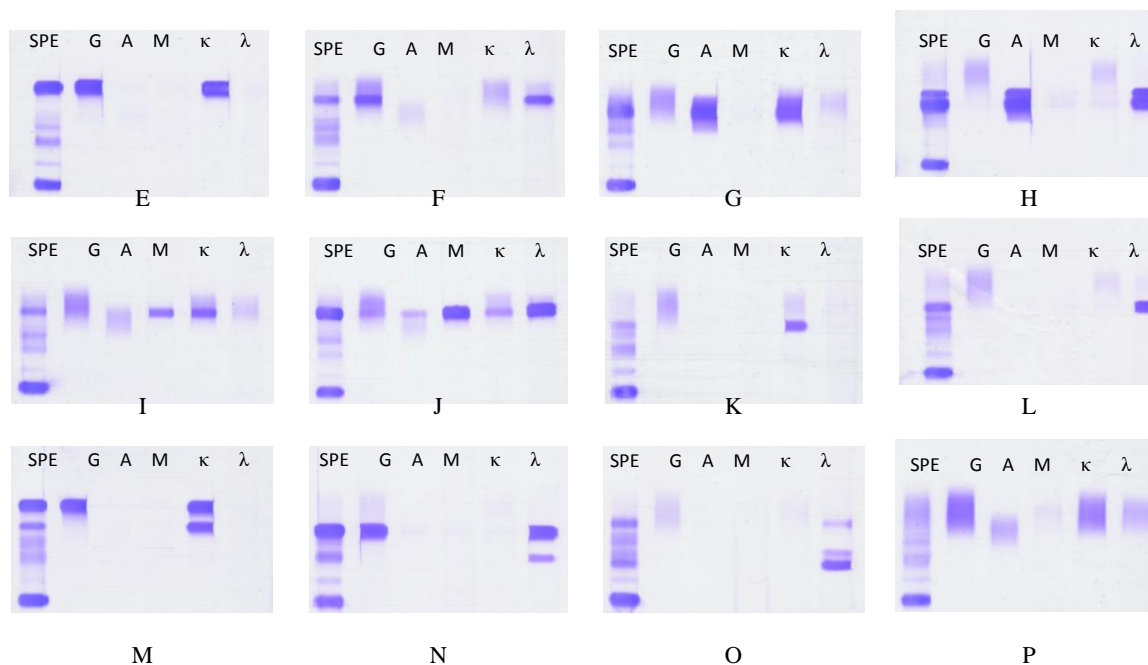


图4 血清免疫固定电泳图

注： E 为免疫固定分型结果 G-κ 型； F 为免疫固定分型结果 G-λ 型； G 为免疫固定分型结果 A-κ 型； H 为免疫固定分型结果 A-λ 型； I 为免疫固定分型结果 M-κ 型； J 为免疫固定分型结果 M-λ 型； K 为免疫固定分型结果 κ 轻链型； L 为免疫固定分型结果 λ 轻链型； M 为免疫固定分型结果 G-κ 伴 κ 型； N 为免疫固定分型结果 G-λ 伴 λ 双克隆型； O 为免疫固定分型结果 λ 双克隆型； P 为免疫固定分型为阴性结果。

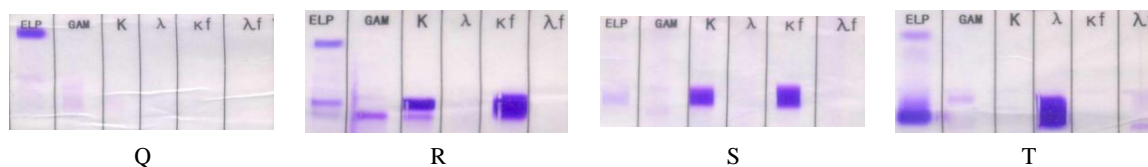


图5 尿本周氏蛋白电泳图

注： Q 为本周氏蛋白阴性结果； R 为本周氏蛋白 κ 游离轻链型； S 为本周氏蛋白 κ 游离轻链型； T 为本周氏蛋白 λ 游

离轻链型；

2.2 150 例 MM 患者与对照组蛋白定量及轻链定量结果分析

与对照组相比，MM 患者的血清总蛋白和球蛋白含量显著升高 ($p < 0.05$)，白蛋白含量减低或正常；IgG 型患者免疫球蛋白 IgG 含量升高 ($p < 0.05$)，而 IgA、IgM 则降低；IgA 型 MM 患者免疫球蛋白 IgA 升高 ($p < 0.05$)，其 IgG、IgM 则降低；6 例 IgM 型 MM 患者的免疫球蛋白 IgM 均升高 ($p < 0.05$)； κ 轻链型 MM 患者的血清 κ 轻链含量升高，而其 λ 轻链含量降低， κ/λ 比值显著增高 ($p < 0.05$)； λ 轻链型 MM 患者血清 λ 轻链含量升高， κ 轻链含量降低， κ/λ 比值显著降低 ($p < 0.05$) (表 3，表 4，表 5)。

表 3 各组血清蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	总蛋白 (g/L)	球蛋白 (g/L)	白蛋白 (g/L)
MM 患者	86.69±24.54*	54.41±29.33*	32.22±7.39
对照组	65.55±8.16	26.18±5.69	38.33±6.27

注：*与对照组相比， $P < 0.05$

表 4 各组免疫球蛋白含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)
IgG 型 MM	43.63±31.24*	0.39±0.49*	0.32±0.24*
IgA 型 MM	3.78±1.92*	13.33±4.81*	0.26±0.32*
IgM 型 MM	0.46±0.36*	6.17±2.81*	11.42±2.69*
对照组	11.06±3.75	2.28±1.61	1.04±1.02

注：*与对照组相比， $P < 0.05$

表 5 各组血清轻链 κ 、 λ 含量及 κ/λ 比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	κ (g/L)	λ (g/L)	κ/λ
κ 型 MM	92	13.75±10.37*	0.60±0.36*	34.65±34.00*
λ 型 MM	48	0.98±0.68 *	5.00±4.56*	0.42±0.41*
对照组	45	2.95±1.06	1.74±0.69	1.73±0.29

注：*与健康对照组相比， $P < 0.05$

3 讨论

多发性骨髓瘤是 B 淋巴细胞克隆性增殖性疾病，骨髓内异常浆细胞增殖、浸润机体软组织及骨骼，引起骨骼破坏，产生大量单克隆免疫球蛋白，正常免疫球蛋白的合成受到抑制，导致正常的免疫功能受抑制。患者临床症状主要为高钙血症、贫血、肾功能异常、高氮血症、骨质疏松和骨质破坏、骨髓内浆细胞增多等^[5]。MM 临床表现多样且首诊科室复杂，易造成漏诊或误诊，因此使用多种方法联合检测对本病的鉴别诊断具有重要的价值^[6]。骨髓穿刺细胞学检查对本病的诊断具有决定性意义，骨髓瘤细胞的出现是诊断 MM 的重要指标^[7]，但是早期患者的瘤细胞可呈局灶性分布，单个部位骨髓穿刺不一定能检出骨髓瘤细胞，有时须做多部位、多次穿刺方可发现瘤细胞。但是，这会增加病人的痛苦，病人较难接受。所以，寻求一个能减轻患者痛苦、让患者更容易接受的联合检测方法对 MM 的临床诊断、分型、疗效监测更具有意义。

正常的免疫球蛋白由多克隆浆细胞所产生，当浆细胞呈异常单克隆增殖时，血清中出现大量单克隆浆细胞分泌的、结构均一的无免疫功能的球蛋白或其肽链亚单位（由单一种类重链或轻链构成），即 M 蛋白，尿中可有大量轻链溢出，而伴随其他正常免疫球蛋白的减少。血和尿中 M 蛋白的检测是 MM 诊断的重要依据^[8]。本文研究结果显示，48% (72/150) 患者的血清总蛋白含量升高，且以球蛋白升高为主，与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，白

蛋白正常或者减少,与文献^[9,10]报道相符。与对照组相比,IgG型MM患者的免疫球蛋白IgG含量明显升高,IgA及IgM的含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);IgA型患者免疫球蛋白IgA含量明显升高,IgG和IgM含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$);IgM型患者的免疫球蛋白IgM含量明显升高,IgG和IgA含量降低,差异有统计学意义($P<0.05$),以上结果与文献^[11,12]报道相符,因此,血清免疫球蛋白定量检测可明确M蛋白所属的免疫球蛋白类型和数量,是辅助诊断MM的一种方法,但是由于MM患者存在免疫功能障碍,免疫球蛋白定量有时可见一种或几种免疫球蛋白含量增高,且IgD和IgE型免疫球蛋白正常含量极少,在MM患者血清中也难以发现明显变化,因此单用免疫球蛋白定量不能很好的提示MM。

MM发生时由于浆细胞分泌的 κ 与 λ 轻链数量失衡,造成血液中出现某一种轻链异常增高。目前,血液轻链检测已被证实为鉴别诊断MM的良好指标^[13]。本文研究结果显示,与对照组比较, κ 型MM患者血清 κ 轻链的含量明显增高, λ 轻链含量明显减低, κ/λ 比值明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$); λ 型MM患者血清 λ 轻链含量明显增高, κ 轻链则明显减低, κ/λ 比值明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),与文献^[14-16]报道结果基本一致。血清中轻链的数量通常是对浆细胞在骨髓内单克隆增殖程度的一种反映,比值差异越大,表明病情越重,比值的失衡是区分MM与其他疾病的重要指标^[14]。因此,测定血清轻链 κ 与 λ 及 κ/λ 比值可以很好的评价多发性骨髓瘤患者的体液免疫状态,并且可以反映肿瘤免疫球蛋白的增殖和受抑制程度,对患者预后进行评估。

随着电泳技术的发展,血清蛋白电泳和免疫方法成为多发性骨髓瘤的诊断的重要方法,血清蛋白电泳精准性高、诊断率高,给多发性骨髓瘤患者的治疗带来很大益处^[17]。血清蛋白电泳后可显示白蛋白、 α_1 球蛋白、 α_2 球蛋白、 β 球蛋白及 γ 球蛋白5个区带,根据不同区带的形态计算不同蛋白的相对含量,并分析各种蛋白是否异常。它可对血清中异常蛋白质进行筛选,在临床实验室得到日益广泛的应用,成为诊断多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症首选试验^[18]。本研究中血清蛋白电泳对MM患者M蛋白的检出率为94.7%,与文献^[8,17]报道基本一致。但是,血清中发现M蛋白不一定是MM,有可能是假性M蛋白血症、良性M蛋白血症、恶性M蛋白血症(即多发性骨髓瘤)其中的一种^[19]。由于单克隆免疫球蛋白类型不同,血清蛋白电泳单克隆成分可出现在 γ 区、 α_1 、 α_2 或 β 区,当单克隆成分不出现在 γ 区或者其他疾病引起 α_2 或 β 区蛋白含量升高时,血清蛋白电泳就较难明确是否存在单克隆成分,这种情况需要用血清免疫固定电泳进行鉴别,免疫固定电泳对单克隆免疫球蛋白的检出敏感性为25 mg/L^[20],能检测出的单克隆成分,用于疾病的早期诊断效果好,也可以对MM进行分型。

免疫固定电泳技术是琼脂糖凝胶电泳结合免疫沉淀反应,免疫固定电泳是发现M蛋白并通过免疫化学鉴别M蛋白种类的金标准^[21]。国外有文献报道,患者血清免疫固定电泳和M蛋白多次检测是否阴性,是判断MM病情是否复发和预后的重要指标^[22]。本文150例MM患者血清免疫固定电泳结果显示,血清免疫固定电泳对M蛋白的检出率为100%,其中IgG型最多(88例),IFE对MM的分型结果与文献^[23,24]报道的结果基本一致。而本研究中未能统计到IgD和IgE型MM病例,可能因为IgD和IgE型MM病例本身很少且收集的病例数量较少而未能发现。本文结果显示,血清免疫固定电泳对M蛋白的检出率明显高于血清蛋白电泳($P<0.05$)、高分辨率尿蛋白电泳($P<0.01$)及尿本周氏免疫固定电泳($P<0.01$),差异有统计学意义,与文献^[11,26]报道一致,说明了该技术对MM诊断的具有高灵敏性。

尿本周蛋白可以识别尿液中的单克隆免疫球蛋白轻链 κ 或 λ ,当血液中产生大量本周氏蛋白,超过肾小管的重吸收阈时,尿中即出现本周氏蛋白,再行检测尿本周蛋白阳性,这提示MM患者同时进行血和尿免疫固定电泳的检测有助于监测患者病程及判断肾功能损害。本文对150例MM患者进行高分辨尿蛋白电泳和尿本周氏蛋白免疫固定电泳,高分辨尿蛋白电泳检测有89例M蛋白阳性,阳性率59.3%;102例尿本周氏蛋白电泳阳性,阳性率68%,高分辨尿蛋白电泳与本周氏尿蛋白电泳对M蛋白检出率比较, $P>0.05$,差异无统计学意义。但本周氏蛋白电泳并不能替代高分辨尿蛋白电泳,高分辨尿蛋白电泳可以对尿液中蛋白成分进行全面分析,为判断蛋白尿的类型提供可靠的依据,并初步判断尿液中是否有异常的单克隆免疫球蛋白产生。尿本周氏蛋白电泳特异性高,但阳性率低,与文献^[24, 25]报道的结果基本一致,在某些情况下血液中轻链发生聚合,聚合轻链不易从肾脏排出,故尿本周蛋白测定表现阴性结果,所以尿本周蛋白电泳检测阴性也不能排除MM。

临床上对于疑为MM的患者,可采用血清蛋白电泳、总蛋白、免疫球蛋白对其进行初步筛查,发现异常单克隆蛋白后,使用血清免疫固定电泳和尿本周氏免疫固定电泳对M蛋白进行确定、分类分型及鉴别诊断,进行免疫球蛋白定量、轻链定量检测可以对患者病情进行评估,对指导临床医生更好的针对患者病情制定治疗方案具有重要意

义。本周氏尿蛋白电泳的敏感性虽然较低,但其在临床中可以帮助判断患者病情是否已发展到肾脏损伤,对判断预后具有重要作用。本文中的4种电泳组合项目联合检测M蛋白的方法,其检测标本易获取且相对穿刺等方法可以一定程度上减轻病人的痛苦及负担,可多次取样,实验便捷快速,在临床工作中较易进行,可操作性强,对多发性骨髓瘤的诊断、分型有重要意义。同时,通过多个方法联合检测可以更为准确地检出M蛋白并进一步分型鉴别,根据免疫球蛋白定量及轻链定量指标为MM的临床诊断与治疗提供重要依据,有效避免漏诊、误诊。

参考文献

- [1] 林凤茹,张静楠.MM的诊断与治疗[J].临床荟萃,2007,22(17):1283-1285.
- [2] 侯建.加强对多发性骨髓瘤的研究[J].中华血液杂志,2000,21(11):567-568.
- [3] International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group [J]. Br J Haematol, 2003, 121(5):749-757.
- [4] 欧阳仁荣,王鸿利,沈志祥.血液病手册[M].上海:上海科学技术出版社,2000,8:246-264.
- [5] The Chinese medical doctor association branch of haematology department physicians, Hematology branch of Chinese Medical Association, Multiple myeloma working group in China. Diagnosis and treatment guideline on Multiple myeloma (revised in 2013)[J]. Chin J Intern Med, 2013, 52(9):791-795. [中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国多发性骨髓瘤工作组.中国多发性骨髓瘤诊治指南(2013年修订)[J].中华内科杂志,2013,52(9):791-795.
- [6] 罗广立.多发性骨髓瘤误诊原因分析[J].当代医学,2011,17(15):77-78[7]张济,刘小军,余海仁.60例多发性骨髓瘤的形态学分析[J].国际检验医学杂志,2008,29(7):671-672.
- [8] 陈石.多发性骨髓瘤的实验室结果分析[J].现代检验医学杂志,2006,21(1):20-22.
- [9] 李淑娥.血清总蛋白增高在多发性骨髓瘤诊断中的影响分析[J].中国现代药物应用,2014,8(20):37-38.
- [10] 杨霞芳,许晓红,朱心智等.多发性骨髓瘤免疫球蛋白及生化相关指标检测结果分析[J].广西中医学院学报,2004,7(4):54-55.
- [11] 刘青.血清免疫固定电泳和免疫球蛋白定量多多发性骨髓瘤的诊断价值分析[J].河南医学研究,2014,23(11):50-52.
- [12] 刘汐盈,孙淑艳,宋媛媛.血清免疫固定电泳、蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量对多发性骨髓瘤临床诊断价值探讨[J].中国实验诊断学,2010,14(5):680-681.
- [13] Singhal S, Vickrey E, Krishnamurthy J, et al. The relationship between the serum free light chain assay and serum immunofixation electrophoresis, and the definition of concordant and discordant free light chain ratios[J].Blood,2009,114(1):38-39.
- [14] 康懿,刘华,王蕾,等.血清 κ/λ 轻链比值及蛋白电泳在诊断MM中的临床应用[J].检验医学,2011,26(10):674-678.
- [15] 张利方,阎有功,石莉萍等.轻链 κ/λ 比值测定对多发性骨髓瘤诊断的临床应用[J].临床血液学杂志,2015,28(1):19-21.
- [16] Wirk, B. Renal failure in multiple myeloma: a medical emergency [J].Bone Marrow Transplantation, 46(6), 771-783.
- [17] 曹淑艳,柴伟,牛广华等.血清蛋白电泳联合免疫球蛋白检测在多发性骨髓瘤诊断中的临床应用[J].辽宁中医杂志,2011,38(6):1162-1163.
- [18] Robert A, Kyle MD. Sequence of testing for monoclonal gam-mopot-hies serum and urine assay[J]. Arch Pathol Lab Med, 1999, 123(2):114-118.
- [19] 邓路德.早期多发性骨髓瘤的敏感方法-M蛋白检查的临床意义[J].空军总医院学报,1995,11(4):243-244.
- [20] 董喜环.免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤诊断中的价值[J].国际检验医学杂志,2007,28(10):902-903.
- [21] KRAJ M. Immunoglobulin heavy chain/light chain pairs (HLC, Heavylite™) assays for diagnosing and monitoring monoclonal gammopathies[J].Adv Clin Exp Med, 2014, 23(1):127-133.
- [22] Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J, Serna J, et al. Remission status defined by immunofixation vs. electrophoresis after autologous transplantation has a major impact on the outcome of multiple myeloma patients[J]. Br J Haematol, 2000,

109(2):438-446.

- [23] 刘玉梅,黄琳琳,赵有利,等.296例血清免疫固定电泳检测结果分析[J].微循环学杂志,2011,22(2):45-46.
- [24] 卢兆新,吴定昌,黄晓华.免疫固定电泳及分型对多发性骨髓瘤诊断的临床价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(12):290-291.
- [25] 韩青,孙国华.免疫固定电泳技术在多发性骨髓瘤诊断及分型中的应用[J].大连医科大学学报,2011,33(2):175-177.
- [26] 姚红,吴亚楠.免疫固定电泳对多发性骨髓瘤的临床应用价值[J].实用癌症杂志,2014,29(1):91-92.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

临床检验实验室自动化流水线的建立及应用

徐东江 张会英 吴俊
北京积水潭医院 北京

[摘要] 目的:通过本院临床检验实验室自动化流水线的实际建立和应用,提出思考和总结,为其他临床检验实验室提供参考。方法:我院通过两年的时间从无流水线工作模式发展为两条流水线工作模式,本文跟踪记录近两年来流水线工作的经验总结,按照实验室自动化分区模块分别总结并改进,观察改革后效果。结果:全实验室自动化流水线随着工作流程和管理模式的改进,显著提高工作效率。结论:随着科技进步,临床检验科一定会走向全实验室自动化的趋势。

[关键词] 全实验室自动化;流水线

随着科技的不断进步,临床检验实验室和临床检验仪器从过去半自动化分析到全自动化分析仪器逐步普及,信息化程度也日益提高。检验科工作模式从过去单台仪器的自动工作发展到目前流水线作业的全实验室自动化(total laboratory automation, TLA)¹或称为全程自动化(front to end automation, FEA)。实验室自动化基本组成主要有样品分选系统、标本处理系统、各类自动分析仪、标本传递系统和网络工作站等。自动化流水线与检验信息系统(laboratory information system, LIS)结合有助于简化工作流程,改善系统质量及安全性,提高效率,减少劳动力成本,并能够准确及时地测定和报告,实现数据化管理,为临床工作和患者提供更好地服务²。本院目前已经引进两条全自动化免疫流水线工作系统,现在将我们的流水线建立及应用经验总结如下。

1 实验室自动化的基本组成

实验室自动化系统由临床实验室信息系统(LIS)、前处理系统(sample pre-analytical module system, PAM)、分析系统和分析后处理系统组成³。目前我科自动化流水线系统连接生化、免疫、离线样本三条主线,后处理系统与流水线系统、离线系统通过LIS和PAM关联。

1.1 实验室信息系统(LIS)

LIS是临床检验实验室的主要工作平台,负责日常数据处理工作,包括标本采集,标本数据接收,数据处理,报告审核,报告发布,报告查询等日常功能,从医院信息系统(hospital information system, HIS)下载患者资料、试验请求信息、生成条形码并通过条形码分配给门诊及临床各科室护士站,指定LIS系统中的条形码贴管设备打印条形码并贴在标本容器上。检验分析仪器可以通过LIS条形码信息识别检测项目、分送标本、传送信息、分析仪双向通讯、查询结果、打印报告、保存标本等实验室的常规操作,PAM系统则在LIS信息系统内完成对各样本分析前、分析中、分析后所处各节点的记录,从而自动化管理检验全过程。

1.2 前处理系统(PAM)

前处理系统又有4个模块组成。(1)投入部(input buffer module, IBM):分急诊进样区和普通进样区,两区并无完全意义的区别,可以互认投入样本。基本作用是读取并确认识别码(identification, ID)并把有效标本传送到下一流程,投入部条形码阅读器对每个投入条码垂直迅速阅读20遍,完全确认后方能确认为有效标本,不符合检测要求及难以辨认条形码的标本则立即报警并转入缓冲区等待进一步处理。有效标本在进入下一部前会在等待缓冲区等

待 8 分钟或积攒满 8 个样本架后进入下一部,一方面保证了血液凝固时间,一方面避免分析区样本过多拥堵。(2)自动离心模块(automatic centrifuge unit, ACU):为内置低温水平离心机,转速设定为 3000rpm,温度设定 2-5 度,离心时间设定 5 分钟。一次离心容量为 40 个标本,当标本量不足时,系统自动按进样顺序和实际标本量自动平衡后进行离心。若首次离心不当可以在程序中重新设定再离心程序(Re-centrifuge)。(3)去盖模块(destopper module, DSP):包括去盖单元和条形码阅读器,具有识别已经开盖的标本,完成去除试管盖的功能。当发生开盖错误时,此模块会及时报警。若开盖超过 72 毫秒,即使最终开盖, PAM 也会报警,样本架从待处理样本区退出。(4)在线分杯模块(online aliquoter module, AQN):包括血清分离效果检测模块、标本分杯和离线条形码粘贴单元。首先进行液面检测、纤维蛋白原检测和血清水平检测功能,根据设定预留出死腔量,为分析仪器提供充足血清量,防止分析仪吸样针堵塞和误撞。对血清总量达不到试验要求、离心后血清中仍有凝块的不合格标本直接输送到待处理标本区,将合格的原始标本根据不同测试项目从原试管中取出,并加入子标本管中,分配到相应分析仪检测或传输至离线样本区待处理。

1.3 分析模块

本系统为样本检测区,按照检测专业分临床生化和临床免疫系统,按照与 PAM 系统关联情况分在线分析系统和离线分析系统。所有在线分析仪器均可离线单独运行,当 PAM 系统出现故障时也不影响实验室工作。我院目前连线系统有全自动生化分析仪和全自动电化学发光分析仪,离线系统有全自动化学发光分析仪、全自动比浊仪。

1.4 分析后系统

分析后系统包括 PAM 输出缓冲模块(output buffer module, OBM)和分析后样本回收区。OBM 系统包括待处理样本区和输出接收区,用于存贮开盖或分杯错误的标本、复位样品架(8 架 40 个样本)、离线样本、已经完成分杯的样本。分析后样本回收区是我院独立设置区,用于回收当日已完成分杯和检测到原始样本。当检验人员审核报告时,确认某一项目复查后,可以通过条形码识别储存位置,分拣出待复检样本并送至分析系统执行复查功能。当日工作完成后所有标本根据分析后系统标识,入库冷藏,待下一个工作周期结束前焚毁。

2 实验室自动化的应用体会

2.1 实验室自动化要求各个基本组成模块配合流畅。①实验室 LIS 系统需要全时自动下载 HIS 系统信息,第一时间连接临床与检验信息互动,若 LIS 或 HIS 瘫痪,自动化无从实现。②投入部最大的障碍是条形码阅读失败,其可能的原因包括 LIS 未接收 HIS 样本、临床医师在样本进入检验科前取消医嘱、条形码模糊或污染破损、条形码粘贴不齐、同一医嘱条形码在同一个样本架上重复两次及以上,针对这些可能原因,我院检验科与 LIS 系统工作人员共同设定条形码位置居中,并与护理部共同培训护士站贴条形码规则,在样本进入检验科工作站前对样本做第二次认证,通过这样的措施由最初 30%的退出比降低到 5%以下。③我院目前只有一个自动离心单元,有时候会出现拥堵等待情况,根据分析仪测定速度、样本流转时间、生化免疫样本分配(我院为骨科为主的综合医院,免疫类样本数与生化类样本数比例约为 2:1)和报告审核规则,一个自动离心单元尚不构成对每天 1200 份生化免疫样本的速度限制,若每日流水线样本数量超过 1200 份,且生化样本翻倍增加,则需要增加自动离心单元。④去盖模块最多的错误来源于样本架倾斜、样本管位置不当。因此需要按时对样本架底部擦拭清洁,认真分拣高度不同的样本管。⑤在线分杯模块需要工作人员提前根据本科室工作需要,设定分杯量、分杯样本架、离线样本架,观察模块内耗材情况,及时补充耗材保证工作顺利进行。⑥PAM 缓冲区目前属于流水线工作的一个较大软肋,每个分区最多可以留存 150 个样本,在样本架占满通道后会导致流水线工作暂停,

需要工作人员实时关注出样区样本架情况,实时清理并更新样本出样区缓存架,对于每个通道工作量高达 1000 份样本以上的实验室,每日工作就需要清空样本缓存区 7 次及以上,这点还需要流水线设计方面进一步更新提高。

表 1 流水线前后工作流程比

模式	项目分类	样本量/日	仪器运行时间(h)	人员	单位时间处理样本数	样本等待时间*(h)	审核复检率%#	审核错误百分比%&	结果审核时间(h)
流水线	生免	1200	6-7	4	160	0.5-1.5	0.3	0	3-4.5
	生化	400	7-8	3	53	1-2	4	0.25	4-5
单模块	免疫	800	7-9	2	100	1-2	0.9	0.1	4-5

表 2 流水线各分部工作速度

分部	投入部	离心机	开栓	分注	条码	分类	回收部	传送轨道	备注
样本量/时	800	250	400	400	450	400	800	800	离心机可增加模块

注*: 为样本在 LIS 系统核收后进入分析仪器时间。

#: 为当日初审结果复审时需要复检的样本率。

&: 为审核发出报告后反馈为错误结果的百分比。

流水线工作模式与单机工作模式相比较,降低样本检索难度,提高样本运转速度,人员减少 20%,单位时间处理样本总数变化不多,但样本等待时间缩短 0.5-1 小时,由于流水线样本离心后分杯检测,有效的保护好各分析仪样本探针,并减少因吸样不当引起的检测错误,审核复检率减少 93%,审核错误百分比下降 0.35%,流水线工作模式可以实现所有样本共同双复审,提高样本分析后审核质量,大大减少了审核复检率和审核出错率,且结果审核时间缩短 0.5-2 小时。流水线各分部工作速度比较,限速在离心机模块,由于单位时间处理样本速度在 160 以内,故目前 250/时代离心机速度并未对自动化工作造成影响。

2.2 实验室自动化不是检验科一个科室的自动化,而是医院各个科室工作合作的自动化。从 HIS 到 LIS,从条码到信息中心,从样本到分析后报告,任何一个环节都需要多方面的配合。任何一个环节的纰漏都会导致自动化的中断。因此实验室自动化加强了临床、护理、网络中心和检验的联系,多方受益。实验室的自动化也带动了全院信息交流更加频繁和方便,利于临床科室第一时间捕捉到危急值,为临床和患者节约了更多的抢救时间。

2.3 实验室自动化流水线可以规范工作流程,将患者信息、样本信息、项目归类、样本检测、报告反馈、样本复检、后处理保存统一信息化管理,极大的提高工作效率,减少人力投入,避免了传统工作模式中的人为差错,保证了标本检测到质量,给临床和患者提供了更具有代表性的检测结果。标本的自动化离心、开盖、分杯,减少了工作人员直接接触标本的机会,改善了工作环境,强化了实验室生物安全。危急值报警和及时反馈、标本检测时间控制、后处理样本保存与复检、病毒阳性样本保存和登记,这些临床和检验都迫切需要解决的问题得益于实验室自动化,在管理上得到了极大的改善。

2.4 实验室自动化流水线将各学科统一整合,对人员的要求也发生了变化。我院目前采用的是生化免疫流水线,将生化、免疫专业合并为一个整体化的临床常规实验室,工作流程发生根本的改变,同时也要求实验室工作者进行专业上的角色转换。实验室工作者最少需要具备两个专业的专业知识,并对人工智能具有更深的理解。同时各个专业在一个整合后的工作站中,相互独立又相互支持,各有分工又各有协作,只有充分整合并融合在一起才能发挥实验室自动化的最大作用。

2.5 实验室自动化也对实验室本身提出更多的要求。流水线工作环境、分离胶离心管质量、样本架准备、流水线耗材准备、分杯管的质量保证和清洁、低温离心机保养、后处理样本架及时更新、实验室报告区与试验区的划分都是实验室自动化的正常运行的必备条件。

2.6 实验室自动化对标本分析前的控制还存在欠缺。住院患者与门诊患者样本采集缺乏相应的预警信息,如患者采血时候的身体状态、采集时间、条形码信息与采集管的匹配与否都直接决定了最终检测报告,目前自动化流水线系统只能依据标本检测参数处理样本,对投入部样本进样前的分析尚无法实现。

临床实验室自动化流水线的建立与应用,实现了一种新的管理模式和工作模式。全自动流水线系统详细记录样本从临床申请、采集、签发、接收、检测、审核、报告等各个过程,规范各样本检测流程,实现了检验标本自动处理和分析,避免了以往过多的人为差错和分析仪加样针拥堵情况,明显提高了检验工作效率。

参考文献

- [1] 李建宏,苏依灿,徐苗桑,等.实验室全自动化系统应用的设计要点[J].中国数字医学,2008,3(7):32-34.
- [2] 赵勇,宋世英,韩志勇.临床实验室信息系统(LIS)的应用研究[J].医学信息学杂志,2010,31(8):25-28.
- [3] 牛爱军,王开森,张玮玮,等.医学检验自动化流水线信息化管理系统的构建及应用[J].国际检验医学杂志,2012,33(14):1784-1786.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

肾素-血管紧张素-醛固酮系统与血糖、血脂及尿酸的相关性研究

刘振杰¹ 张丹丹¹ 李涛¹ 吴子安¹ 司徒俊杰² 徐宁¹

1广东省中医院检验医学部, 510370; 2.南方医科大学检验系 2011级实习生

[摘要] 目的: 通过分析血管紧张素 II、肾素和醛固酮与血糖、血脂和尿酸之间的相关性, 探讨它们与高血压之间的关系。**方法:** 收集广东省中医院 2014 年住院期间进行高血压 3 项(血管紧张素 II、肾素和醛固酮)检测, 而且诊断为高血压的患者 619 例。收集高血压 3 项异常的患者信息(年龄、性别)和患者高血压 3 项、血糖、血脂(胆固醇, 甘油三酯)和尿酸检测的结果。对收集到的数据按照年龄性别进行整理分组, SPSS19.0 软件进行高血压 3 项与血糖、血脂和尿酸之间的相关性分析。**结果:** 在患有高血压的男性患者中, 血管紧张素 II 与尿酸呈正相关 ($r>0.100$), 而在其它分组中不存在相关性。女性患者中, 仅在 40 岁以下及 60 岁以上的年龄段发现血管紧张素 II 与尿酸呈正相关。**结论:** 男性高血压患者的血管紧张素 II 随尿酸的升高呈上升趋势。

[关键词] 高血压; 肾素-血管紧张素-醛固酮; 血糖; 血脂; 尿酸

Relationship between Renin- Angiotensin- Aldosterone and GLU,TC,TG and UA

LIU Zhen-Jie¹, ZHANG Dan-Dan¹, LI Tao¹, Wu zi-an¹, Si-Tu Jun-Jie², XU Ning^{1*}

(1.Department of Clinical Laboratory, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou,510370, PR China;2. Southern Medical University ,2011 intern of Medical Laboratory,510515, PR China.)

[Abstract] Objective:To investigate the relationship between serum UA,Glu,TC,TG level and Angiotensin II ,Renin,Aldosterone,analyzing the consistency,pertinence and possible consequence of changes in UA,Glu,TC,TG level and hypertension. **Methods:**A hypertension sample of 619 subjects aged 0-90 years was selected from in-patients of Guangdong Provincial Hospital of TCM in 2014. Age, height,weight and data of UA,Glu,TC,TG,Angiotensin II ,Renin, and Aldosterone level were collected. The relationship among UA,Glu,TC,TG level and Angiotensin II ,Renin,Aldosterone was analysed with SPSS19.0. **Results:**Serum UA level was correlated with Angiotensin II in male ($r>0.100$), which was founded only below 40 years old and above 60 years old in female. **Conclusion:**Serum UA level was found to be associated with prevalence rate of Angiotensin II in male which was founded only below 40 years old and above 60 years old in female.. It was increased with the increase of serum UA level.

[Key words] hypertension, Renin -Angiotensin II -Aldosterone system, UA,Glu,Lipid

国内外有大量的临床、流行病学研究及动物实验表明,原发性高血压与糖耐量异常、血脂异常和高尿酸血症之间都存在相关性。其中高血压引起糖尿病的机制现在主要集中在胰岛素抵抗的研究, Motoshima 等报道^[1]血管紧张素 II 和醛固酮可能在胰岛素抵抗的发展中起到一定的作用。也有研究发现,血脂异常是影响血压调节的一种重要因素^[2-4]。目前的研究发现高尿酸血症可以激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,引起肾素的分泌增多,这些都与肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)有关。

RAAS 是一类存在于多种组织的生物活性物质,是心血管系统的重要调节系统,其与常规生化指标的相关性,可以为高血压监测和积极治疗提供更好的帮助。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 病例来源

在广东省中医院 2014 年住院期间进行高血压 3 项检测而且诊断为高血压的患者 619 例。

1.1.2 试剂盒

高血压 3 项,包括血管紧张素 II (A II)、肾素(REN)和醛固酮 (ALD) 定量检测的试剂盒均为郑州安图生物工程股份有限公司产品。生化项目检测所使用的试剂盒均为罗氏公司提供。

1.1.3 仪器

郑州安图全自动化学发光酶免仪和罗氏 cobas 8000 全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

血管紧张素 II、肾素和醛固酮的定量检测采用酶联免疫吸附试验 (化学发光法), 严格按照试剂盒说明书的操作步骤执行, 并且对异常结果进行复查核对。

血糖: 葡萄糖氧化酶法; 胆固醇: 胆固醇酯酶 (CHOD-PAP) 法; 甘油三酯: 甘油-3-磷酸氧化酶 (GPO-PAP) 法; 尿酸: 尿酸酶-过氧化物酶耦联法。

1.2.2 数据收集

筛选 2014 年间在广东省中医院进行高血压 3 项检测并存在异常的患者数据。收集这些高血压患者在进行高血压 3 项当天或次日未使用降压药的情况下检测的相关生化指标数据, 包括空腹血糖 (Glu)、总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 和尿酸 (UA)。

1.2.3 统计分析

建立 Excel 数据库, 按照性别与立位和卧位检测高血压 3 项的不同分成 4 个大组 (即男性立位、男性卧位、女性立位和女性卧位), 再从 4 个大组按照年龄的不同分为 5 个小组。采用 SPSS19.0 软件, 做 Pearson 直线相关分析 ($-1.00 < r \leq -0.100$ 为负相关; $-0.100 < r < 0.100$ 为不相关; $0.100 \leq r < 1.00$ 为正相关)。

2 结果

2.1 2014 年高血压 3 项异常的高血压病例年龄分布

共调查 2014 年 619 例高血压 3 项异常的高血压病例, 其中男性 291 例, 女性 328 例; 年龄在 15-90 岁之间, 平均 56 岁 (表 1)。

表 1 2014 年高血压 3 项异常的高血压病例年龄分布构成比

年龄	男性病例数量	构成比%	女性病例数量	构成比%
<40 岁	51	17.53	35	10.67
41-50 岁	67	23.02	48	14.63
51-60 岁	78	26.80	102	31.10
61-70 岁	59	20.27	71	21.65
>70 岁	36	12.37	72	21.95

2.2 高血压 3 项分别与血糖、血脂和尿酸的相关性分析

对上述高血压人群的高血压 3 项分别与空腹血糖、血脂 (胆固醇和甘油三酯) 和尿酸作 Pearson 直线相关分析 (见表 2 和表 3)。男性高血压患者的血管紧张素 II (A II) 与尿酸 (UA) 存在相关性, 呈正相关 ($r > 0.100$), 女性则只在 40 岁以下及 60 岁以上的年龄段呈正相关。

表 2 男性高血压患者的高血压 3 项与空腹血糖、胆固醇、甘油三酯和尿酸的 Pearson 相关系数

相关因子	年龄									
	40 以下		41-50		51-60		61-70		71 以上	
	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位
A II *UA	0.589	0.477	0.368	0.261	0.183	0.308	0.217	0.146	0.184	0.244
A II *Glu	0.031	0.208	-0.139	0.405	0.129	0.210	0.201	0.187	-0.126	0.419
A II *TC	0.188	0.181	0.055	0.207	0.203	0.052	0.122	0.210	0.172	-0.043
A II *TG	0.252	0.577	0.073	0.171	0.326	0.140	0.187	0.336	0.145	0.363
ALD *UA	0.040	0.004	0.132	0.220	-0.157	-0.288	0.160	0.169	-0.186	-0.344
ALD *Glu	0.615	0.704	0.401	0.030	0.081	0.077	0.124	-0.147	0.083	0.517
ALD *TC	-0.279	-0.405	-0.316	-0.073	0.034	-0.096	0.162	0.077	0.300	0.015
ALD *TG	0.028	-0.013	-0.068	0.039	-0.036	-0.037	-0.032	-0.117	-0.201	0.067
REN *UA	0.416	0.482	0.457	0.451	0.037	0.191	-0.214	0.169	0.414	0.297
REN *Glu	-0.103	-0.022	-0.098	-0.088	-0.247	0.025	0.319	-0.147	0.022	0.345
REN *TC	0.215	0.424	0.293	-0.120	0.055	-0.058	-0.184	0.077	0.101	0.148
REN *TG	-0.014	0.112	0.010	0.158	0.164	0.036	0.417	-0.117	0.450	0.240

表3 女性高血压患者的高血压3项与空腹血糖、胆固醇、甘油三酯和尿酸的 Pearson 相关系数

相关因子	年龄									
	40 以下		41-50		51-60		61-70		71 以上	
	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位	卧位	立位
A II *UA	0.353	0.503	0.022	0.336	0.084	-0.107	0.110	0.127	0.117	0.367
A II *Glu	0.185	0.004	0.264	0.380	0.015	0.265	0.093	-0.178	0.022	-0.016
A II *TC	0.246	0.306	0.228	0.345	-0.015	-0.078	-0.096	-0.180	0.143	-0.133
A II *TG	0.182	0.116	0.333	0.171	-0.203	-0.032	0.089	-0.066	0.203	0.281
ALD*UA	-0.535	-0.033	0.045	0.267	0.042	0.112	-0.101	-0.222	-0.092	-0.086
ALD*Glu	0.134	-0.087	0.092	0.199	-0.062	-0.071	0.011	-0.132	-0.149	-0.185
ALD*TC	0.061	0.064	0.064	0.080	-0.041	-0.138	0.077	0.072	-0.187	-0.253
ALD*TG	-0.400	-0.160	-0.093	0.065	0.104	0.017	0.065	0.026	-0.145	-0.196
REN*UA	-0.050	0.188	0.026	0.038	0.238	0.036	-0.003	0.047	0.076	0.218
REN*Glu	0.066	-0.033	0.414	0.407	0.480	0.740	0.341	0.256	0.013	0.038
REN*TC	-0.067	0.081	0.427	0.363	0.021	-0.046	-0.009	-0.065	0.150	-0.167
REN*TG	-0.285	-0.263	0.270	0.430	-0.017	0.044	0.081	0.029	-0.021	-0.069

3 讨论

高血压作为多种心、脑血管疾病的重要病因和危险因素,严重影响着人们的健康。高血压3项筛查所需成本较高且检测费时,患者经济负担重,严重的情况下可能使病情的处理有一定的延误。本次研究就高血压3项与血糖、血脂和尿酸的相关性进行分析,希望通过一些常规生化项目的检测来辅助监测高血压的疗效,帮助病人节省开支,更积极地合理用药。

本文收集2014年间在广东省中医院进行高血压3项检测并存在异常的高血压病人共619例,其中男性291例,占47.01%,女性328例,占52.99%。在对这些病人的高血压3项分别与空腹血糖、总胆固醇、甘油三酯和尿酸的相关性分析中发现,男性高血压患者的血管紧张素II与尿酸存在相关性,呈正相关,而这种相关性在女性中并不明显,只在40岁以下及60岁以上的年龄段呈正相关。其它的项目之间不存在相关性。

尿酸作为体内嘌呤代谢的终产物,约75%经肾脏排泄,其在血液中的溶解饱和度有限,生成过多或排泄减少均可引起尿酸增高,形成高尿酸血症。有研究提示,高尿酸血症可导致高血压的发生和肾脏的损害,可能与同时伴随的肾素-血管紧张素-醛固酮系统兴奋有关,由此引起的血压升高,可通过降低尿酸水平来逆转^[5]。而且高尿酸血症通常伴有胰岛素抵抗,胰岛素抵抗时肾素-血管紧张素-醛固酮系统活性亢进,导致交感神经系统亢进,钠潴留,血容量扩大,血压升高^[1-2]。这些研究都表明了血管紧张素II与尿酸之间存在相关性的可能。Conway等^[3]的研究发现,男性与女性在血管紧张素II引起的血压变化上存在差异,这提示在血管紧张素II的代谢上存在性别差异。这就为为什么仅在男性高血压患者中存在血管紧张素II与尿酸的相关性的原因提供了合理的解释。

在本次的研究中发现,某些相关项目仅在某些年龄段中才存在相关性,如血管紧张素II与甘油三酯、肾素与空腹血糖等,造成这种情况的原因可能是由于:(1)饮食:有研究表明,盐的摄入量对于血管紧张素II的代谢有一定的影响^[6-7],可能是通过血压血管紧张素II1型受体的信使RNA进行调控^[9-10]。(2)药物:病人入院前是否服用药物,如降血脂药物、降血糖的药物等未进行排除,会对之后检测的结果造成影响。(3)标本留取:对于高血压3项(卧位或立位)标本的留取都有明确的要求,病人是否严格按照要求留取标本,没有很好的控制,可能导致结果的误差。

(4)样本量不足:某些项目间的相关性没有体现出来。本研究还需继续改进,通过与医生,护士及病人的进一步沟通,更详细地了解病人的情况,重申标本留取的要求,增加样本量,才能使研究更具说服力。

总之,在男性高血压患者中血管紧张素II与尿酸呈正相关,说明降低血清尿酸水平可能对减少高血压患者心血管事件发生的危险具有重要意义。尿酸检测方便快捷、成本低,可以尽早对高血压的潜在高危患者采取积极有效的干预措施,更好地控制高血压的发展。

参考文献

- [1] Motoshima H, Araki E. RAAS and insulin resistance[J]. *Nihon Rinsho*, 2012, 70(9): 1542-1549.
- [2] 鄞国书, 徐冬川, 孙如琼, et al. 尿酸与胰岛素抵抗的关系及影响因素筛查[J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(3): 415-418.
Ying GS, Xu DC, Sun RQ, et al. Relationship between serum uric acid levels and insulin resistance and risk factors screening for high serum[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2014, 30(3): 415-418.
- [3] Conway V, Couture P, Gauthier S, et al. Effect of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women[J]. *Nutrition*, 2014; 30 (1): 116-119.
- [4] Arslan Z, Ay SA, Karaman M, et al. An additional LDL-lowering effect of amlodipine; not only an antihypertensive[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2013; 35(6): 449-453.
- [5] 赵义发, 徐中林. 降尿酸治疗对伴发无症状高尿酸血症的高血压患者血压的影响[J]. *重庆医学*, 2014, 43(32): 4326-4328.
Zhao YF, Xu ZG. Effect of uric acid reduction on blood pressure in hypertensive patients with asymptomatic hyperuricemia[J]. *Chongqing Medicine*, 2014, 43(32): 4326-4328.
- [6] Beyer AM, Fredrich K, Lombard JH, et al. AT1 receptors prevent salt-induced vascular dysfunction in isolated middle cerebral arteries of 2 kidney-1 clip hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*. 2013, 26(12): 1398-1404
- [7] Jablonski KL, Racine ML, Geolfos CJ, et al. Dietary sodium restriction reverses vascular endothelial dysfunction in middle-aged/older adults with moderately elevated systolic blood pressure[J]. *J Am Coll Cardiol*. 2013, 26(3): 335-343.
- [8] Zeniya M, Sohara E, Kita S, et al. Dietary salt intake regulates WNK3-SPAK-NKCC1 phosphorylation cascade in mouse aorta through angiotensin II[J]. *Hypertension*. 2013, 62(5): 872-878.
- [9] Beyer AM, Fredrich K, Lombard JH, et al. AT1 receptors prevent salt-induced vascular dysfunction in isolated middle cerebral arteries of 2 kidney-1 clip hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*. 2013, 26(12): 1398-1404.
- [10] Braga VA. Could AT1 receptor activation increase antioxidant defense to prevent salt-induced vascular dysfunction of 2 kidney-1 clip hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*. 2014, 27(4): 638-639.

第一作者: 刘振杰, 1981年, 男, 硕士研究生, 主管技师, 主要研究方向: 临床免疫检验学

通讯作者: 徐宁, E-mail: xu_ning21@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

云南宣威肺癌组织中LncRNAs的初步筛选和表达验证

李庆¹, 张爱兴¹, 王玉明²

1 昆明医科大学第一附属医院; 2 昆明医科大学第二附属医院

[摘要] 目的: 筛选云南宣威肺癌组织中表达差异的长链非编码RNA (LncRNAs), 并对筛选出来的LncRNAs进行表达验证, 为进一步研究宣威肺癌的发生机制提供实验基础和理论依据。**方法:** 利用高通量LncRNAs芯片筛选5对宣威肺癌组织中差异表达的LncRNAs和mRNA, 得到关键LncRNAs, 应用RT-PCR对筛选出的LncRNAs进行表达验证, 进一步检测基因芯片的准确性。**结果:** 以LncRNAs芯片结果为基础, 根据差异倍数 ≥ 2 和原始信号值 ≥ 50 , 初步筛选出367个异常表达的LncRNAs和1038个异常表达的mRNA。通过LncRNAs和mRNA共表达分析后筛选出6个具有研究价值的LncRNAs分子, 其中表达上调的有3个 (SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1), 表达下调的有3个 (FENDRR、H19、PWRN1), 应用RT-PCR技术检测33对宣威肺癌患者组织中6个LncRNAs的表达水平, 结果与芯片结果一致, 表明芯片结果可靠。并对33个患者的临床病例资料进行统计分析, 研究其与LncRNAs的相关性。结果显示6个LncRNAs分子的表达差异水平与患者的性别、年龄、吸烟史、淋巴结转移情况、临床分期和组织学类型无明显相关性。而PWRN1的表达差异水平与患者肿块大小有关 ($P=0.016$)。**结论:** 云南宣威肺癌组织和癌旁组织相比, 确实存在大量差异表达的LncRNAs, SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1在宣威肺癌组织中高表达, 而FENDRR、H19、PWRN1在宣威肺癌组织中低表达, 提示这些差异表达的LncRNAs可能与云南宣威肺癌的发生发展有关。6个LncRNAs与患者临床指标无明显

相关性,而PWRN1的表达差异水平与患者肿块大小有关,提示肿块大小可能与引起PWRN1表达呈负相关关系。本研究为进一步研究云南宣威肺癌发生发展机制提供一定的实验基础和理论依据。

[关键词] 云南宣威肺癌;长链非编码RNA;实时荧光定量PCR

肺癌是世界上对人类健康和生命构成严重威胁的重大疾病之一,也是全球癌症死亡的首要原因^[1]。在我国,云南宣威是肺癌的高发区,以非小细胞肺癌为主。有资料显示:在云南宣威,男性肺癌的平均死亡率为98.10/10万,女性肺癌的平均死亡率为83.28/10万^[2]。肺癌的发生一般是城市高于农村,而在云南宣威,不吸烟的女性肺癌死亡率也很高,能达到120/10万,且最高的能达到400/10万,是中国其它地区的20倍,居世界之首^[3]。肺癌患者之所以死亡率高,很大程度上与其早期发现困难,确诊时能够接受手术治疗的患者少相关。

既往对肿瘤的研究主要聚焦于编码蛋白转录本上,而忽略了占人类基因转录本达98%的非编码RNA在肿瘤发生发展中的作用。其中最引人瞩目的是一类大分子非编码RNA,即长链非编码RNA(Long non-coding RNAs,LncRNAs),其在肿瘤发生发展中的作用及机制成为近年来研究的热点。大量研究表明,LncRNAs与很多疾病的发生都有关,如LncRNAs所调控的基因异常表达会使机体产生严重的病理变化,包括肿瘤在内的很多疾病都存在着LncRNAs的异常表达。尽管目前对LncRNAs的致病机理了解甚少,但根据大量临床观察和实验数据显示,LncRNAs的异常表达是疾病发生的重要原因。目前有关LncRNAs在云南宣威肺癌中的作用尚未见报道,因此本研究以此为切入点,应用LncRNAs芯片技术检测云南宣威肺癌组织和癌旁组织中LncRNAs的表达谱,研究LncRNAs在云南宣威肺癌的作用机制,为云南宣威肺癌的分子诊断、靶向治疗和预后判断提供新思路和新方法。

1 材料与方法

2.1 材料

提取RNA的AllPrep[®] DNA/RNA/Protein Mini Kit、反转录试剂盒和SYBR[®] Premix Ex Taq[™] I 试剂盒购自TaRaKa公司;real-time PCR引物由生工生物工程有限公司设计并合成;Human LncRNAs expression arrays的芯片选择、探针设计、图像采集、数据分析等由北京博奥生物有限公司提供。

2.2 方法

2.2.1 新鲜组织收集

收集来自于云南宣威地区肺癌患者(出生、工作均在宣威市及其周边地区)经手术及术后病理证实为肺癌的肿瘤组织以及与其配对的癌旁形态学正常组织(距离癌灶5cm以上),用无菌生理盐水冲洗至无血细胞后冻存于-80℃。取材前向患者告知试验用途,签署知情同意书。患者除患肺癌外,无其他重大疾病史。

2.2.1 芯片实验

(1)芯片选择

采用北京博奥生物有限公司AGI_LncRNAs+mRNA_4*180k芯片筛选5对云南宣威肺癌组织及癌旁组织中差异表达的LncRNAs。该芯片同时针对LncRNAs和mRNA进行检测,包括约3.7万条LncRNAs和约3.4万条mRNA检测的探针,并且覆盖目前所有权威数据库:NCBI Refseq、UCSC Known Gene、NRED、RNAdb等多个数据库的LncRNAs。

(2)组织样本总RNA的提取和质检

用Trizol提取组织块中的总RNA,并进一步采用NucleoSpin[®] RNA clean-up试剂盒对总RNA进行过柱纯化。然后用分光光度计定量,用琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

(3)cDNA合成、标记、杂交:

以总RNA起始,含有T7启动子序列的T7 Oligo(dT)Primer和T7-随机引物,使用First Strand Enzyme Mix合成1st-Strand cDNA。用Second Strand Enzyme Mix将DNA-RNA杂合体中的RNA链转化为2st-Strand cDNA,合成双链DNA。以2st-Strand cDNA为模板,利用T7 Enzyme Mix合成cRNA。使用RNA纯化柱纯化cRNA,除去反应中的盐、酶等,并对cRNA进行定量、质检。以cRNA为模板,Random Primer为引物,CbcScript II酶进行反转录。纯化回收反转录得到的cDNA并定量。以反转录的cDNA产物为模板,Random Primer为引物,用Klenow Fragment酶合成cDNA互补链并掺入带有荧光基团的dNTP(Cy3-dCTP、Cy5-dCTP),纯化并定量标记产物。带有荧光基团DNA即可用于芯片杂交。标记的DNA溶于杂交液中,于45℃杂交过夜,杂交结束后,先在42℃左右含0.2% SDS、2×SSC的液体中洗5min,而后在42℃左右含0.2% SDS、2×SSC的液体中洗3次。清洗程序完成后,离心甩干,待扫描。

(4)芯片扫描和数据分析

使用Agilent芯片扫描仪(G2565CA)对清洗后的芯片进行扫描,得到tiff格式杂交图片。杂交扫描后的图片数据采用Feature Extraction提数软件进行预处理分析,然后采用GeneSpring GX软件计算基因表达差异和统计学显著性 p 值。

2.3 实时荧光定量PCR

利用AllPrep® DNA/RNA/Protein Mini Kit试剂盒提取33对宣威肺癌组织及其癌旁组织中的总RNA,进行电泳检测RNA完整性,分光光度计检测OD260/280以鉴定总RNA的质量。使用随机引物反转录,操作按试剂盒说明书进行,cDNA于-20℃保存。根据试剂盒说明书进行qPCR操作,反应体系为20 μ L,反应程序为:1.预变性:95℃预变性30秒;

2.4 PCR反应

95℃变性5秒,61℃退火31秒,共40次循环;3.生成溶解曲线:95℃变性15秒,60℃退火1小时,95℃加热15秒。内参为GAPDH。引物如表1。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

基因	引物序列	片段大小
SGOL1-AS1	上游 5'-GCAAGTGGGCAAATAGAGGT-3'	211bp
	下游 5'-CAATGGAGCAAGGACCAAG-3'	
SNHG4	上游 5'-GGAGGAAATAGTGGCAGGTG-3'	142bp
	下游 5'-TGGTATCTTCAACGGGATCG-3'	
PVT1	上游 5'-TTGCTTCTCCTGTTGCTGCT-3'	154bp
	下游 5'-GCTGGGTCTTCATCCTGAGT-3'	
FENRR	上游 5'-CCGGACTGCGAATATCTGTT-3'	125bp
	下游 5'-TCAAATCATGCCTCTCCACA-3'	
H19	上游 5'-AGATTCAAAGCCTCCACGAC-3'	124bp
	下游 5'-CACACTCACGCACACTCGTA-3'	
PWRN1	上游 5'-CACCACCTGTATGGATCTCGT-3'	139bp
	下游 5'-TTCCAAGCTCACATGACTGC-3'	
GAPDH	上游 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'	185bp
	下游 5'-GACAAGCTTCCCCTTCTCAG-3'	

2.5 收集患者临床病例资料

收集33对宣威肺癌患者的临床病例资料,包括患者性别、年龄、吸烟史、肿块大小、淋巴结转移、临床分期以及组织学类型等。对其进行统计分析,研究其与LncRNAs是否相关。

2.6 统计分析

用SPSS 17.0统计软件包对目的基因相对表达量以及芯片结果和实时荧光定量PCR结果进行正态性检验和方差齐性检验,若符合正态分布,则选用配对 t 检验;若不符合正态分布,则用非参数检验中的2相关样本 t 检验, $P \leq 0.05$,差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芯片筛选结果

以LncRNAs芯片结果为基础,在云南宣威肺癌中获得了1544个异常表达的LncRNAs,根据差异倍数 ≥ 2 和原始信号值 ≥ 50 ,初步筛选出367个异常表达的LncRNAs,其中表达上调的有133个,表达下调的有234个。结合相关文献,筛选出6个具有研究价值的LncRNAs分子,其中表达上调的有3个,表达下调的有3个。分别是SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1、FENRR、H19、PWRN1,见表2。

表2 初步筛选出的宣威肺癌中表达异常的LncRNAs分子

known LncRNAs name	ProbeName	p	regulation	FC (abs)	Strand	class
SGOL1-AS1	p11750	0.041106	up	3	+	Antisense
SNHG4	p25370	0.007915	up	5	+	Antisense
PVT1	p16373	0.049275	up	8	+	Intergenic
FENRR	p6185	0.024422	down	16	-	Intergenic
H19	p2150	0.018876	down	11	-	Intergenic
PWRN1	p5431	0.025424	down	15	+	Intergenic

3.2 实时荧光定量PCR结果

将实时荧光定量的结果进行正态性检验，其中SGOL1-AS1、SNHG4、FENDRR、H19、PWRN1的 $2^{-\Delta Ct}$ 结果符合正态分布，而PVT1的结果不符合正态分布，经检验其 $2^{-\Delta Ct}$ 值符合指数正态分布，故将其结果进行Lg转换，六个LncRNAs分子的实时荧光定量PCR结果用配对t检验进行统计分析故结果分别见表3。

表3 6个LncRNAs的RT-PCR值

	癌组织 $\bar{X} \pm s$	癌旁组织 $\bar{X} \pm s$	t 值	p
SGOL1-AS1	10.32±2.91	12.23±2.70	-2.982	0.005
SNHG4	10.36±2.31	11.75±2.36	-2.499	0.018
PVT1	1.57±0.38	1.78±0.37	-2.642	0.013
FENDRR	10.24±3.26	5.00±1.87	9.085	0.000
H19	5.41±2.08	3.57±1.64	5.487	0.000
PWRN1	14.40±3.64	12.10±4.33	2.715	0.011

结果显示 SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1 在癌组织中的表达水平高于癌旁组织， $P < 0.05$ ，差异有统计学意义。FENDRR、H19、PWRN1 在癌组织中的表达水平低于癌旁组织， $P < 0.05$ ，差异有统计学意义。

3.3 实时荧光定量PCR结果与芯片结果比较

结果见图1。结果显示实时荧光定量PCR结果与芯片结果一致，表明芯片结果可靠。

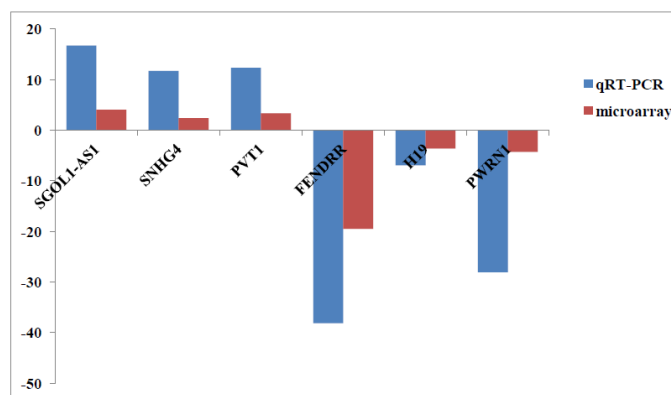


图1 RT-PCR 与芯片结果比较

3.4 实时荧光定量结果与患者临床指标的关系

采用非参数检验中的 2 独立样本 t 检验分析实时荧光定量结果与患者临床指标的关系，结果显示 6 个 LncRNAs 分子的表达差异水平与患者的性别、年龄、吸烟史、淋巴结转移情况、临床分期和组织学类型无明显相关性。而 PWRN1 的表达差异水平与患者肿块大小有关 ($P=0.016$)。见表 4。

表4 实时荧光定量结果与患者临床指标的关系

临床病理特征	样本数	百分比	P					
			SOGL1-AS1	SHNG4	PVT1	FENDRR	H19	PWRN1
性别								
男	19	57.58%						
女	14	42.42%	0.466	0.884	0.229	0.512	0.956	0.662
年龄								
≥50	17	51.52%						
<50	16	48.48%	0.957	0.177	0.857	0.829	0.885	0.227
吸烟史								
吸烟	12	36.36%						
非吸烟	21	63.64%	0.134	0.97	0.112	0.765	0.525	0.41
肿块大小								
≤3cm	18	54.55%						
>3cm	15	45.45%	0.416	0.745	0.678	0.942	0.588	0.007

淋巴结转移								
转移	17	48.48%						
非转移	16	51.52%	0.528	0.577	0.264	0.249	0.221	0.528
临床分期								
I	19	57.58%						
II	9	27.27%	0.468	0.859	0.437	0.525	0.656	0.979
III	5	15.15%						
组织学类型								
腺癌	28	84.85%						
鳞癌	2	6.06%	0.735	0.067	0.907	0.076	0.705	0.136
其它	3	9.09%						

4 讨论

长链非编码 RNA 是近年来逐渐兴起的一个新兴研究领域,其在肿瘤中的生物学作用和机制尚不清楚。起初认为 LncRNAs 是基因组转录的“噪音”,是 RNA 聚合酶 II 转录的副产物,并不具有任何生物学功能^[4]。但近年的研究表明,LncRNAs 参与了 X 染色体沉默、基因组印记以及染色质修饰、转录激活、转录干扰、核内运输等多种重要的调控过程^[5]。越来越多的研究表明 LncRNAs 是有功能的。LncRNAs 可以作为一种基因表达的调节因子通过各种途径对基因表达进行转录前或转录后调控,此调控机制非常复杂,往往是由多种 LncRNAs 与多种蛋白相互作用形成调控网络以完成对蛋白表达的准确调节。

通过基因芯片技术,越来越的人研究发现 LncRNAs 表达异常与人类肿瘤关系密切。目前为止,研究较清楚且与肿瘤密切相关的 LncRNAs 有: MALAT-1、H19、HOTAIR、MEG3 与 ANRIL。而在本研究中,选取了 5 对宣威肺癌组织标本和癌旁组织标本进行了 LncRNAs 芯片检测,得到了在宣威肺癌组织中差异表达的 lncRNA 基因表达谱。为了避免芯片筛选出现假阳性,提高芯片结果的可信度,通过实时荧光定量 PCR 方法对筛选出的 6 个 LncRNAs: SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1、FENDRR、H19、PWRN1 等进行表达验证,分析结果显示 6 个 LncRNAs 分子在癌组织和癌旁组织中的表达差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 并且 SGOL1-AS1、SNHG4、PVT1 在癌组织中的表达高于癌旁组织, FENDRR、H19、PWRN1 在癌组织中的表达低于癌旁组织,这与芯片结果一致。在这些显著差异表达的 LncRNAs 中,有一些 LncRNAs 像 H19、FENDRR、PVT1 等已经在其他肿瘤中被研究发现^[6-9];而大部分的像 SGOL1-AS1、SNHG4、PWRN1 等这样的 LncRNAs 还未被人研究过。

PVT1 是一个大于 300Kb 的 LncRNAs,位于 8q24 区,在 MYC 基因的下游,经研究发现人类染色体的 8q24 区是与肿瘤高度相关的一个区,在乳腺癌及转移性前列腺癌中经常发生拷贝数变异,8q24 区含有的多个 SNP (single nucleotide polymorphism) 位点与结肠癌、前列腺癌等相关^[10]。有学者对人类肿瘤中的全基因组拷贝数变异和基因表达差异进行研究,结果显示 PVT1 可作为一个候选癌基因,在乳腺癌、卵巢癌、小儿恶性星型细胞瘤、急性髓系白血病、霍奇金淋巴瘤中 PVT1 拷贝数增加或者过表达^[11-16],而 PVT1 在正常组织中低表达而在转化细胞株中高度表达^[17]。这与芯片结果及实时荧光定量结果一致。在 2008 年, Huppi 等^[18]人研究发现在 PVT1 位点处编码了 7 个 microRNAs,其中有 6 个已经在 microRNA 数据库中被注释了,分别是 miR-1204, miR-1205, miR-1206, miR-1207-5p, miR-1207-3p 和 miR-1208^[19]。但是 PVT1 编码 microRNAs 的机制仍然是未知的。

FENDRR 是长度为 3099nt 的长链非编码 RNA,位于染色体 3q13.31,由 4 个外显子组。Khalil 等^[20]人首次鉴定出 LncRNAs FENDRR 并且证实了它能与 PRC2 和 TrxG/MLL 蛋白复合物结合在一起,在染色体重塑和基因激活过程中发挥重要作用^[21]。Tong-peng Xu 等^[22]人利用 RT-PCR 方法研究了 158 对胃癌组织和癌旁组织、5 株胃癌细胞 (MGC803, BGC823, MKN28, MKN45 and SGC7901) 和 1 株胃正常上皮细胞株 (GES1) 中 FENDRR 的表达水平,研究发现 FENDRR 在胃癌组织及胃癌细胞株中表达显著下降,并且 FENDRR 低表达与胃癌患者临床病理特征和预后差有关。FENDRR 在胃癌细胞株中异位表达能显著抑制细胞迁移和侵袭。

H19 定位于小鼠 7 号染色体的远端、定位人染色体 11p15.5,系一单拷贝基因,人类 H19 基因全长为 3kb,共含有 5 个外显子及 4 个内含子。近年来,有研究表明 H19 在胃癌中表达上调,其过表达对胃癌细胞有增殖作用^[23]。有学者研究发现 H19 与乳腺癌、膀胱癌、和肝细胞癌有关^[24-26]。H19 并不是在所有的肿瘤细胞中都高表达的,H19 在肝癌、肺癌和前列腺癌细胞中低表达。这一结果证实了 H19 不仅扮演着癌基因的角色还扮演着抑癌基因的角色,这

与一些研究报道不谋而合^[27-30], 也与本研究发现 H19 在宣威肺癌中表达下调相符。

在本研究中, 采用独立样本 t 检验分析 6 个 LncRNAs 与患者性别、年龄、吸烟史、肿块大小、淋巴结转移、组织学类型等的相关性, 结果显示 SOGL1-AS1、SNHG4、PVT1、FENDRR、H19 等与患者临床病理特征无明显相关性 ($P>0.05$), 而 PWRN1 与患者肿块大小有关, 差异具有统计学意义 ($P=0.016$)。

目前有关 LncRNAs 在云南宣威肺癌中的作用尚未见报道, 因此本研究以此为切入点, 应用 LncRNAs 芯片技术检测云南宣威肺癌组织和癌旁组织中 LncRNAs 的表达谱, 结果表明在宣威肺癌中确实存在大量差异表达的 LncRNAs, 并且这些差异表达的 LncRNAs 可能参与宣威肺癌的发生发展过程, 因此本实验为进一步研究 LncRNAs 在云南宣威肺癌的作用机制, 为云南宣威肺癌的分子诊断、靶向治疗和预后判断提供新思路和新方法。

参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60: 277-300.
- [2] 陈竺主编. 全国第三次死因回顾抽样调查报告[M]. 第 1 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2008.
- [3] 董志伟, 乔友林, 李连弟, 等. 中国癌症高发发现场报告[J]. *中国肿瘤*, 2009, (1): 4-5.
- [4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W, et al. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4): 629-641.
- [5] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS, et al. Long non-coding RNAs: Insight into functions[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(3): 155-159.
- [6] DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, et al. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects[J]. *Am J Hum Genet*, 2002, 70: 604-611.
- [7] Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, et al. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth[J]. *PLoS One*, 2007, 2: e845.
- [8] Lu Y, Lu P, Zhu Z, et al. Loss of imprinting of insulin-like growth factor 2 is associated with increased risk of lymph node metastasis and gastric corpus cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2009, 28: 125.
- [9] Yang F, Bi J, Xue X, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells[J]. *FEBS J*, 2012, 279: 3159-3165.
- [10] Meyer KB, Maia AT, O'Reilly M, et al. A functional variant at a prostate cancer predisposition Locus at 8q24 is associated with PVT1 expression[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7: e1002165.
- [11] Haverly P M, Hon L S, Kaminker J S, et al. High-resolution analysis of copy number alterations and associated expression changes in ovarian tumors[J]. *BMC Med Genomics*, 2009, 2: 21.
- [12] Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P, et al. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers[J]. *BMC Cancer*. 2010, 10: 539.
- [13] Schiffman J D, Hodgson J G, Vandenberg S R, et al. Oncogenic BRAF mutation with CDKN2A inactivation is characteristic of a subset of pediatric malignant astrocytomas[J]. *Cancer Res*, 2010, 70: 512-519.
- [14] Kamath A, Tara H, Xiang B, et al. Double-minute MYC amplification and deletion of MTAP, CDKN2A, CDKN2B, and ELAVL2 in an acute myeloid leukemia characterized by oligonucleotide-array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet*[J]. *Cytogenet*, 2008, 183: 117-120.
- [15] Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y, et al. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3)[J]. *Nat Genet*, 2010, 42: 1126-1130.
- [16] Guan Y, Kuo W L, Stilwell J L, et al. Amplification of PVT1 contributes to the pathophysiology of ovarian and breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 5745-5755.
- [17] Carramusa L, Contino F, Ferro A, et al. The PVT-1 oncogene is a Myc protein target that is overexpressed in transformed cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213: 511-518.
- [18] Huppi K, Volfovsky N, Runfola T, et al. The identification of microRNAs in a genomically unstable region of human

- chromosome 8q24[J].Mol Cancer Res,2008,6: 212–221.
- [19] Beck-Engeser G B,Lum A M, Huppi K,et al.Pvt1-encoded microRNAs in oncogenesis[J].Retrovirology, 2008, 5:4.doi:10.1186/1742-4690-5-4.
- [20] Khalil AM,Guttman M, Huarte M,et al.Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression[J].Proc Natl Acad Sci USA,2009, 106:11667–11672.
- [21] Schuettengruber B,Chourrout D,Vervoort M,et al.Genome regulation by polycomb and trithorax proteins[J].Cell,2007,128:735–745.
- [22] Tong-peng Xu,Ming-de Huang,Rui Xia.Decreased expression of the long non-coding RNA FENDRR is associated with poor prognosis in gastric cancer and FENDRR regulates gastric cancer cell metastasis by affecting fibronectin expression[J].Journal of Hematology & Oncology,2014,7:63.
- [23] Yang F, Bi J, Xue X, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells[J]. FEBS J, 2012;279:3159–3165.
- [24] Matouk IJ,Mezan S,Mizrahi A,et al.The oncofetal H19 RNA connection:hypoxia, p53 and cancer[J].Biochim Biophys Acta,2010,1803:443-451.
- [25] Verhaegh GW,Verkley L,Vermeulen SH,et al.Polymorphisms in the H19 gene and the risk of bladder cancer[J].Eur Urol,2008,54:1118-1126.
- [26] Iizuka N,Oka M,Yamada-Okabe H,et al.Comparison of gene expression profiles between hepatitis B virus and hepatitis C virus-infected hepatocellular carcinoma by oligonucleotide microarray data on the basis of a supervised learning method[J].Cancer Res,2002,62:3939-3944.
- [27] Matouk IJ, DeGroot N,Mezan S, et al.The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth[J]. PLoS One,2007,2:e845.
- [28] Yang F,Bi J,Xue X,et al.Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells[J].FEBS J,2012,279:3159-3165.
- [29] Yoshimizu T,Miroglio A,Ripoche MA,et al.The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor[J].Proc Natl Acad Sci USA,2008,105:12417-12422.
- [30] Luo M,Li Z,Wang W,et al.Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression[J].FEBS J,2013,280:1709-1716.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

量子点在高敏 cTnI 检测中的初步应用

江华 刘文卫 刘永胜

襄阳市中心医院医学检验部

[摘要] 目的:建立一种基于量子点、磁微粒技术检测高敏 cTnI 方法,并在临床初步应用。**方法:**采用碳二亚胺交联法,将 cTnI 单克隆抗体包被在纳米磁性微球表面作为固相载体,偶联生物素单克隆抗体作为检测抗体,通过夹心法免疫反应形成抗原抗体复合物,然后加入量子点共轭链霉亲和素作为荧光标记探针,使用发光光谱仪记录信号来检测待检血清中的高敏 cTnI。**结果:**本方法的最低检测灵敏度为 0.047ng/ml,有效测量范围是 0-40ng/ml,批内重复性变异系数分别为 8.92%, 7.66%, 8.76%;平均回收率为 99.53%。使用本方法与化学发光检测系统进行比对,相关系数为 0.995。基于量子点荧光标记技术检测高敏 cTnI 的方法灵敏度高、结果可靠,具有较高的临床应用价值。

2012 年中华医学会心血管分会组织心内科和检验科权威专家,制定并颁布了关于 hs-cTn 在 ACS 中应用的共识,共识指出高敏肌钙蛋白对轻微心肌损伤的诊断成为现实,轻微心肌损伤可能造成肌钙蛋白的轻微升高,现有高敏肌

钙蛋白可以检测出普通肌钙蛋白试剂无法检测出的肌钙蛋白的轻微改变。本研究利用量子点、磁微粒技术检测高敏 cTnI 方法,并在临床中初步应用,现在报道如下。

1 材料与方法

1.1 对象

自 2015 年 3 月-5 月湖北省襄阳市中心医院心内科住院的已确诊为心肌梗死患者。清晨空腹采血,分离血清。

1.2 试剂和仪器

鼠抗 cTnI 单克隆抗体(克隆 M18, 560, 19C7 和 MF4), 人肌钙蛋白 I 标准品(EuroCity、芬兰), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC)与牛血清白蛋白(BSA)购自 Sigma-Aldrich 公司, 磁基化微粒(COOH-MPs, 50 毫克/毫升)和 EZ-Link®Sulfo-NHS-LC-Biotin 购自赛默飞 Scientific 公司, 链亲和素结合的量子点-605(QSA-605)由武汉嘉源量子点有限公司提供。使用的量子点的最大发射波长约为 605 纳米,为橙光。所有储备液由美国 MilliporeSynergy®纯水系统生产的超纯水制备。所有其他化学品(分析纯)由上海国药集团化学试剂有限公司购买。MagneSphere®技术磁性分离架购自美国 ProgeMa 公司, 透射电子显微镜(TEM)为日本日立 H-7000FA, 日本岛津公司紫外可见吸收光谱 uv - 2550 分光光度计。英国 PerkinElmer LS55 发光光谱仪, 西门子公司公司的 ADVIA Centaur 化学发光检测仪与其配套的试剂。

1.3 方法

1.3.1 抗 cTnI 免疫微粒子的制备

四个不同的抗 cTnI 单克隆抗体与磁基化微粒表面共价结合。5 毫克 COOH-MPS 分别用 1ml 10 毫米 pH 值 7.2 PBS 清洗两次磁选立场和分散在 600 μ L 10 毫米 pH 值 7.2 PBS。这种清洗可以去除各种离子的副产物, 包括洗涤剂, 水溶性聚合物, 和缓冲盐, 这可能会影响耦合化学。然后立即加入新鲜制备的 400 μ L 的 10mg / mL 的 EDAC (10 毫 pH 为 7.2 的 PBS), 并为 2mg / mL 的抗体溶液 100 μ L 到预清洗过的 CM-MPS。在室温下将反应物搅拌混合 2 小时。未结合的抗体和其它副产物通过在磁选支架进行洗涤三次用 10mM pH 为 7.2 的 PBS 中除去。最终抗 cTnI 微粒再悬浮在 PBS 中的 200 μ L 含 0.05%NaN₃ 的和 10 毫克/毫升 BSA, 然后储存于 4 $^{\circ}$ C 用于进一步使用。

1.3.2 生物素单克隆抗体的制备

100 μ L 2 毫克/毫升抗 cTnI 单克隆抗体与新鲜 2.7 μ L 磺基-NHS-LC-生物素溶液(10mM 的在 PBS, pH7.2)在室温下通过混合孵育获得生物素抗 cTnI 单克隆抗体。一小时后, 过量的未反应的和水解的生物素试剂除去, 并通过 7500g 离心过滤 15min, 浓缩三轮稀释和再浓缩的。最后得到生物素抗 cTnI 单克隆抗体使用 100 μ L 的 10mM 的 pH7.2PBS (含 0.05%NaN₃ 与 10mg/ mL BSA) 并储存在 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.3hs-cTnI 荧光的三明治检测程序

首先, 10 μ L 单一免疫微粒或两个免疫微粒组合物加入到 100 微升样品(标准样品或临床血清)作为捕获抗体。在 37 $^{\circ}$ C 进行 20 分钟孵育后, 将混合物用 PBS-T (PBS 和 0.05%吐温-20)的磁分离支架洗涤两次。然后加入 100 μ L 一个或两个生物素化单克隆抗体进行 12 分钟温育形成混合物, 并用 PBS-T 洗涤两次。接着磁微粒与抗 cTnI 生物素化单克隆抗体的抗原抗体复合物在 100 微升 10⁻⁹mol/ L QSA-605 溶液中在 37 $^{\circ}$ C 孵化 12 分钟。用 PBS-T 洗涤两次后, 将样品悬浮在 150 微升 PBS 中, 荧光光谱由 PerkinElmer LS55 发光光谱仪进行分析。

1.3.4 方法学评价

对灵敏度、线性范围、精密度、回收实验、干扰试验等指标的评价[4],并与 ADVIA Centaur 化学发光析仪进行方法比对。

1.4 统计分析方法

采用 SPSS13.0 统计软件进行正交表的设计和方差分析,以及对检测结果进行相关分析,两组数据之间的比较用 t 检验(检验标准 P<0.05)。

2 结果

2.1 线性范围

对cTnI标准品稀释系列进行检测,结果显示, cTnI在浓度0 - 40ng/ml,其线性良好,统计分析显示,直线相关系数为 0.99941,直线方程为:Y=0.1241+0.9597 X。

2.2 灵敏度试验

对空白样本和含量为 1ng/ml 低浓度的样本检测 10 次, FL 强度 (0ng/ml) 2 SD 的平均值被用于校准曲线, 观察 0.047ng/ml 的浓度为最低检测限。

2.3 方法精密度试验

分别按本试验条件建立的方法对三个 cTnT 浓度的样本进行 20 次检测, 当均值为 0.2 ng/ml 时, 其变异系数为 8.92%; 当均值为 4 ng/ml 时, 其变异系数为 7.66%; 当均值为 20ng/ml 时, 其变异系数为 8.76%。

2.4 回收实验

取一份病人血浆, 按本试验建立的方法测定 cTnI 浓度。按照加入 cTnI 量约为原血浆 cTnI 量的 50%、100%、150% 的原则, 制备 3 个回收试验样品。所有的回收率均为 98.11%~101.89% 的范围内, 平均回收率为 99.53%。

2.5 比对试验

对 104 份病人标本分别用本试验方法和化学发光分析仪及配套试剂盒进行 hs-cTnI 检测, 对检测数据采用配对 t 检验进行统计分析, $t=1.646, P>0.05$, 两种检测方法无显著性差异。

2.6 干扰试验

取 1ng / ml 人标准的 cTnI 溶液, 再加高浓度的甘油三酯、胆固醇和胆红素进行干扰实验, 计算干扰率。35mmol/L 的甘油三酯、12 mmol/L 的胆固醇和 0.34 mmol/L 的胆红素对 cTnI 的干扰率分别为 16.2%、17.5% 和 13.2%, 对 cTnI 的检测有一定的干扰; 较低浓度的甘油三酯(17.5 mmol/L)、胆固醇(6.3mmol/L)和胆红素(0.17mmol/L)对 cTnI 的干扰率分别为 7.1%、9.5% 和 5.4%, 对 cTnI 检测的干扰很小。

3 讨论

该方法的原理是基于夹心法抗原抗体反应由磁性微粒在磁场的帮助下分离进行检测。首先将一定量的标准样品或临床血清用高灵敏度的磁性体微粒单克隆抗体标记捕获, 然后生物素化 mAb 充当检测抗体被加入到溶液中, 并结合到已捕获到磁性体微粒单克隆抗体表面, 最后链霉亲和素量子点生物素识别并发出明亮的荧光刺激, 记录的发光光谱的荧光信号强度具有对应的 cTnI 在血清中的浓度, 这可用于样品中 hs-cTnI 水平的定量分析。

磁性微球是一种新型的功能材料, 它通常由具有磁性的内核及核外包裹的高分子外壳两部分组成。磁性微球可与抗体、抗原、核酸等偶联, 在反应体系中识别相应的抗原、抗体和核酸, 从而达到分离或检测的目的。免疫磁性分离技术是以抗体包被的磁珠为载体, 通过抗体与反应介质中特异性抗原结合形成抗原-抗体复合物, 此复合物在磁场的作用下定向移动, 从而分离抗原。免疫磁性分离技术已在医学和生物学的许多方面发挥了重要作用, 尤其是在分离及鉴定病原体方面应用广泛。随着研究的日益深入, 免疫磁性分离技术还与 PCR、荧光定量 PCR、ELISA、流式细胞术、免疫荧光显微术等技术相结合, 显示了其巨大的应用潜力。量子点(QDs)又称半导体纳米微晶体, 是一种由 II~VI 族或 III-V 族元素组成的约 2~20 nm 的纳米晶粒, 具有可调节和对称的发射光谱、光化学稳定性好、激发光谱宽且连续、粒度的不同发射光的颜色也不同等特点, 可用于多种标记物的同时检测, 极大地促进了荧光标记在生物医学中的应用。通过本研究显示免疫磁珠富集与量子点荧光检测的优势体系应用于 hs-cTnI 的检测系统, 具有高灵敏度和特异性, 最低检测限为 0.047ng/ml, 有效检测范围为 0 - 40ng/ml, 这表明该测定可用于治疗急性心肌梗死 (AMI), 术后心肌风险评估创伤, 化疗心脏毒性, 以及相关的心肌损伤的一些其它疾病。

因此这种方法具有完美的应用前景, 免疫微粒和量子点为基础的检测是用于检测心肌损伤的一个普遍的, 快速, 特异性和灵敏的方法。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

117 例线粒体基因 A3243G 点突变导致的线粒体病患者的临床特征与分子特点研究

夏昌宇 刘誉 刘辉 张彦春 马祎楠 戚豫

北京大学第一医院检验科

[摘要] 目的:分析线粒体基因 A3243G 点突变导致的线粒体病患者的临床特征与分子特点,以提高对本病的认识。方法:回顾性分析了 117 例 A3243G 点突变所致的线粒体脑肌病患者的病例资料和分子检测结果,其中儿童 100 例,成人 17 例;男性 47 例,女性 70 例。患者的 A3243G 突变率与年龄进行相关性分析。根据是否存在某一临床症状将患者分为有症状组和无症状组,分析不同的临床症状与突变率的关系。结果:66%的儿童患者诊断延迟,平均延迟 2 年。成人患者均有诊断延迟,延迟时间为 1~12 年。儿童首发症状主要为癫痫、肌无力、头痛伴呕吐、视力下降。成人主要为头痛伴呕吐、听力下降和言语不清患者。患者最常见的症状为癫痫、身材矮小、乳酸升高、MRI/CT 异常改变和头痛伴呕吐。患者 A3243G 突变率与发病年龄呈负相关,pearson 相关系数 $r = -0.455$ ($P < 0.001$)。有 MRI/CT 异常、中风样发作和肌病的患者的突变率显著高于无该症状组的患者。结论:对于不明原因出现上述常见症状的患者,应当考虑存在线粒体疾病的可能,建议对其进行 A3243G 突变筛查。

线粒体病是一组累及多系统的能量代谢障碍疾病,核基因(nuclear gene, nDNA)或线粒体基因(mitochondrial DNA, mtDNA)突变都可以引起本病。由 nDNA 和 mtDNA 突变所致的线粒体病的总发病率 $\geq 1/5000$ ^[1]。人类的 mtDNA 突变率远大于 nDNA,主要是由于 mtDNA 在位置上更接近于线粒体内源性氧自由基 ROS 产生的部位,以及缺乏保护性的组蛋白。1990 年发现 MT-TL1 基因编码的 tRNA^{Leu}(UUR)核苷酸 3243 位点腺嘌呤部分突变为鸟嘌呤(A3243G)是 MELAS 的分子基础^[2]。流行病学研究显示 A3243G 突变是人类最常见的致病 mtDNA 点突变。在英格兰东北部成年人中检出率为 3.5/10 万,而在芬兰人群中 A3243G 突变约为 1/6000^[3,4]。和其他线粒体病相似,A3243G 突变常以需氧量较高的脑、肌肉和心肌组织受累为主,临床表现复杂多样。目前我国开设线粒体病专业门诊的医院较少,相关儿科和神经科医生对 A3243G 突变缺乏足够的了解和认识,容易造成误诊和漏诊。本文回顾性总结了 117 例 A3243G 突变患者的临床特点,总结了该突变所致线粒体病患者的临床表型,为临床诊断提供帮助。

1 资料和方法

1.1 研究对象

收集 2007-2013 年就诊于北京大学第一医院和北京儿童医院的 117 例线粒体 A3243G 突变患者,患者为散发病例,相互之间没有血缘关系。患者的年龄为 2 月~53 岁,中位数为 10 岁(QR: 6~14 岁)。其中儿童 100 例,成人 17 例;男性 47 例,女性 70 例,男女比例为(1: 1.49)。所有血液标本检测均先获得患者或其家属的知情同意,研究方案经北京大学第一医院医学伦理委员会审批[批准文号: 2009(23)]。

1.2 基因检测

从患者采集外周静脉血 2ml 保存于 EDTA 抗凝管中。采用 Miller 改良式盐析法提取白细胞 DNA,采用限制性片段长度多态性(RFLP)检测 DNA 样本中的线粒体基因 A3243G 突变。

1.3 统计方法

用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。对定量数据进行正态性检验,如果数据不符合高斯分布,则采用非参数检验。患者的 A3243G 突变率与年龄进行 pearson 相关性分析。按单个症状/系统将患者分为有症状组和无症状组,用 Mann-Whitney U 检验比较两组患者的突变率是否有显著差异。

2 结果

2.1 临床特征

2.1.1 首发症状

儿童的首发症状主要为癫痫(54%),肌无力(29%),头痛伴呕吐(25%),视力下降(18%)。成人主要为头痛伴呕吐(41%),听力下降(24%),言语不清(18%)。66%的儿童患者诊断延迟,平均延迟 2 年。成人患者均有诊断延迟,延迟时间为 1~12 年。

2.1.2 常见症状

4 例患者表现为单一症状或单一系统受累,7 例累及两个系统,其余 106 例累及多系统。患者每种症状的发生率

见表1。儿童最常见的症状为癫痫(76%),身材矮小(73%),乳酸升高(70%),MRI/CT异常改变(68%),呕吐(55%),头痛(50%)和视力下降(50%)和肌无力(50%)。成人最常见的是体重下降(94%),癫痫(88%),听力下降(71%)。

癫痫的形式主要为部分性发作和全身强直性肌阵挛。大部分癫痫患者表现为部分性发作,其次为全身性发作,少数表现为局部性发作。其中16例患者在癫痫时伴有意识障碍。60例(51%)患者反复出现头痛,大部分伴有呕吐或视力下降。79例(67.5%)患者有MRI/CT的异常改变,大部分患者表现为枕叶(75.3%)、颞叶(30%)、顶叶(29%)和额叶(20%)不对称异常信号和双侧基底节钙化(24%)。73/100例(73%)儿童患者有身材矮小或消瘦,而成人患者普遍表现为体重减轻(16/17,94%)。患者血清乳酸水平为1.4~19 mmol/L,76例(65%)患者的乳酸水平升高(正常范围为0.5~2 mmol/L),其中68例(90%)患者的血清乳酸水平>5 mmol/L。13例(11%)患者的血糖水平升高(>6.1 mmol/L)。57例(49%)患者有四肢肌肉无力,主要表现为持物不稳,上下楼困难,其中2例儿童患者不能站立。43例(37%)患者表现为运动不耐受,不能完成年龄相适的体力活动。35/100例(35%)儿童患者有心脏系统的损伤,异常的心电图或超声心动图主要表现ST-T段改变和心律不齐(48%),少数患者有心室肥厚(22%),2例儿童患者曾患心肌炎,3例有预激综合征。3/17例(18%)成人患者有心律不齐和心室肥厚。

表1 线粒体基因 A3243G 突变患者的临床特征

临床特征	儿童例数 (%)	成人例数 (%)	
脑病	癫痫	76 (76%)	15 (88%)
	MRI/CT 异常	68 (68%)	11 (65%)
	头痛	50 (50%)	10 (58%)
	中风样发作	22 (22%)	2 (12%)
	言语不清	21 (21%)	6 (35%)
外观	偏瘫	7 (7%)	2 (12%)
	身材矮小或消瘦	73 (73%)	16 (94%)
内分泌功能受损	乳酸升高	70 (70%)	6 (35%)
	血糖升高	10 (10%)	3 (18%)
胃肠功能紊乱	呕吐	55 (55%)	10 (58%)
	腹泻或便秘	38 (38%)	6 (35%)
视力受损	视物不清	50 (50%)	7 (41%)
	肌无力	50 (50%)	7 (41%)
肌病	运动不耐受	37 (37%)	6 (35%)
	步态不稳	35 (35%)	6 (35%)
	眼睑下垂	18 (18%)	3 (18%)
心脏受损	心电图或超声异常, 心肌炎 ECG	35 (35%)	3 (18%)
听力受损	听力下降	21 (21%)	12 (71%)

2.2 患者 A3243G 突变率分析

所有患者外周血白细胞都进行线粒体基因A3243G突变率检测。患者突变率为5~93%,中位数为40.5%(QR:32~51.2%),其分布无性别差异。32/100例(32%)儿童患者突变率超过50%,而2/17例(12%)成人患者的突变率超过50%。患者的突变率与发病年龄呈负相关(见图1),pearson相关系数 $r = -0.455$ ($P < 0.001$)。有症状组和无症状组患者突变率的差异比较详见表2。有MRI/CT异常、中风样发作和肌病的患者的突变率显著高于无该症状组的患者。

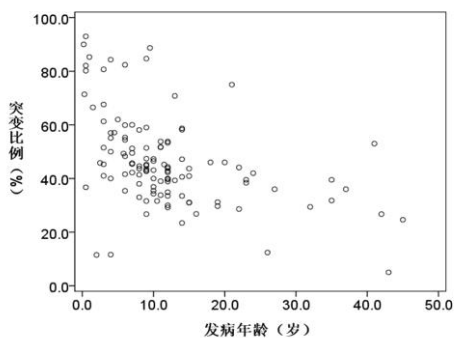


图1 患者 A3243G 突变比例与发病年龄的相关性

表 2 有症状组和无症状组患者线粒体 A3243G 突变率的比较

临床症状	突变率 [#]		P 值
	有症状组	无症状组	
癫痫	46.1(39.2, 63.8)	43.1(35.4, 53)	0.203
头痛	45.1(36.3, 64.2)	43(35.4, 49.2)	0.110
MRI/CT 异常	47.8(38.9, 59.9)	42.3(35.4, 51.4)	0.054
中风样发作	44.5(37.7, 55.7)	42.3(28.6, 46)	0.050*
发育不良/体重减轻	43.8(36.4, 54.1)	42.8(32.7, 51)	0.781
胃肠功能紊乱	43.8(35.4, 70.8)	43.6(37.7, 52)	0.559
视力下降	44.3(36.5, 51.3)	43.6(35, 59.5)	0.756
肌病	46.2(31.2, 58.6)	41.6(35.1, 45.9)	0.015*
心脏疾病	45.2(38, 53.8)	52.5(33.4, 52.2)	0.231
听力下降	44.3(38.2, 57)	42(31.4, 47.8)	0.046*
乳酸升高	43(36.4, 53.3)	40.6(33,53.4)	0.415

注：[#]以中位数（QR）表示；* Mann-Whitney U 检验结果有显著性差异

3 讨论

A3243G 突变导致的线粒体脑肌病表现复杂多样，可以表现为 MELAS、MERRF、CPEO、MIDD、KSS 和 LS 综合征^[5-7]，也有半数患者表现为非综合征类临床亚型。线粒体病属于罕见病，发病率低，在医务工作者中的知晓率较低。加之疾病临床表现多样、检查手段有限、缺乏公认的诊断标准等原因使得临床对于该类疾病的诊断非常困难，容易造成漏诊误诊。本研究显示绝大部分患者都有诊断延迟，儿童平均延迟诊断 2 年，成人延迟诊断时间可达 12 年。这些就诊的患者来自于全国各地，多由于疑难杂症难以确诊而来京就医。因此，加强临床医生对线粒体脑肌病常见临床症状的认识显得尤为重要。

本研究中绝大多数患者为多系统受累，但其症状并非同时出现，患者就诊时的首发症状尤其需要关注，有助于疾病的早期诊断。在儿童患者中我们发现 A3243G 突变者常见的首发症状是癫痫、肌无力、头痛呕吐和视力下降。癫痫作为首发症状的比例高达 54%，有些患儿癫痫发作还伴有头痛、呕吐，症状与脑炎或脑膜脑炎相似。张金花等^[8]对 6 例 MELAS 综合征患者进行的误诊分析中，有 3 例患儿被误诊为病毒性脑炎，占有误诊的一半。另外我们的结果显示有 29% 的患儿首先出现肌无力，提示 A3243G 突变所致的线粒体功能异常很早累及肌肉。视力下降在患儿首发症状中也占有很高比例，但这些患儿多首诊于眼科或小儿眼科，往往需要联合儿科或神经科进行诊断。通过分析儿童 A3243G 患者突变首发症状，提示我们对于首发为伴或不伴头痛呕吐的癫痫、肌力下降、疑诊为脑炎但无相应脑脊液变化、且治疗效果不佳的患儿应考虑到线粒体病的可能。成年患者最早出现头痛呕吐者最多，除脑炎外还易误诊为脑梗塞、脱髓鞘、脑膜瘤等疾病^[9]。与儿童患者不同的是，成人中首先出现听力下降和言语不清者较多。这并不能说明儿童患者首先累及听觉系统者少见，可能是由于儿童语言功能尚未完善，不易发现听力障碍以及由其导致的语言功能障碍。

大脑由于高能量需求是线粒体病最常累及的器官。本研究显示癫痫不仅是 A3243G 突变最早出现的症状，也是最常见的症状，其发生率（78%）与国内多个报道结果相似^[10,11]。线粒体病癫痫治疗药物首选卡马西平类，应避免使用干扰呼吸链药物如丙戊酸钠、巴比妥类、四环素、氯霉素等^[12]。研究发现 67.5% 的患者有 CT 及 MRI 异常表现，病灶主要累及脑叶的脑回处，特别是多位于颞、顶、枕部，但不符合解剖血管分布。这些病变特点也在其他研究中得到共识^[13,14]。另外，半数以上的患者均有头痛伴呕吐、肌无力、身材矮小或消瘦等症状。儿童和成人的常见症状基本一致，只是儿童心脏功能受损比成人患者常见，而成人患者更常见的是体重减轻和听力下降。

基因检测是诊断线粒体病的金标准^[15]。外周血 DNA 检测线粒体基因突变，是一种无创性的检测手段，便于常规开展。发生 A3243G 突变的人群可以是无症状的携带者，也可以在任何年龄发病。本次研究针对的是有线粒体脑肌病症状的 A3243G 突变患者，发现患者首次发病年龄与 A3243G 突变异质性水平呈负相关，这与文献报道相符^[16,17]。患者血细胞线粒体 DNA 突变异质性水平每年递减 0.534%，而携带者递减 0.215%^[18]。此外，我们发现高突变率的患者

更易发生 MRI/CT 异常变化、中风样发作和肌病,提示外周血 A3243 突变率与此类症状有一定的相关性。A3243G 突变在细胞、组织和器官水平具有组织异质性,有研究报道肌肉组织和尿液细胞的突变率或拷贝数与疾病严重程度的相关性更好^[19,20]。外周血白细胞突变率检测虽然不是一项反映疾病进展的理想指标,但由于其无创性和便捷性,仍是线粒体病诊断的重要手段。

综上所述,由于线粒体病往往多系统发病,因此详细的问诊和体格检查尤为重要,加强与神经内科、眼科、耳鼻喉科等其他相关科室的合作,并结合影像学、组织病理学和基因学检测,可以大大降低误诊的可能。临床中如遇到困难解释的难治性癫痫,以及肌无力、发育不良或体重减轻、头痛伴呕吐、出现不明原因的听力和/或视力下降的患者,应当考虑存在线粒体疾病的可能,建议对其外周血 DNA 进行 A3243G 突变筛查,以期及早诊断和治疗。

参考文献

- [1] Smeitink JA, Zeviani M, Turnbull DM, et al. Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders[J]. *Cell Metab*, 2006, 3(1): 9-13.
- [2] Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies[J]. *Nature*, 1990, 348(6302): 651-653.
- [3] Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, et al. Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease[J]. *Ann Neurol*, 2015, 77(5): 753-759.
- [4] Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, et al. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population[J]. *Am J Hum Genet*, 1998, 63(2): 447-454.
- [5] van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, et al. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness[J]. *Nat Genet*, 1992, 1(5): 368-371.
- [6] Bosbach S, Kornblum C, Schroder R, et al. Executive and visuospatial deficits in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome[J]. *Brain*, 2003, 126(pt 5): 1231-1240.
- [7] Koga Y, Akita Y, Takane N, et al. Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene[J]. *Arch Dis Child*, 2000, 82(5): 407-411.
- [8] 张金花,尹飞. 6 例儿童 MELAS 综合征临床特点及误诊分析[J]. *中国医师杂志*, 2014, 16(9): 1224-1226.
- [9] 赵玉英,焉传祝,刘淑萍,等. 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 31 例临床、神经影像及肌肉病理分析[J]. *中华神经科杂志*, 2007, 40(11): 723-727.
- [10] 陈健,邹丽萍. 儿童线粒体脑病的临床和分子遗传学特点及其预后[J]. *临床儿科杂志*, 2014, 32(11): 1020-1023.
- [11] Chi CS, Lee HF, Tsai CR, et al. Clinical manifestations in children with mitochondrial diseases[J]. *Pediatr Neurol*, 2010, 43(3): 183-189.
- [12] 吴洵昶,朱国行,王晋扬,等. 以癫持续状态起病的线粒体脑肌病合并乳酸血症与脑卒中样发作的临床特征分析[J]. *中国临床神经科学*, 2012, 20(1): 37-42.
- [13] 常荣,马晓文,李海燕,等. 线粒体脑肌病的 CT 及 MRI 表现[J]. *现代医用影像学*, 2011, 20(1): 49.
- [14] 周君霞,马祎楠,黄邓高,等. 儿童 MELAS 综合征临床误诊分析[J]. *中国热带医学*, 2014, 14(8): 997-999.
- [15] Goldstein A, Bhatia P, Vento JM. Update on nuclear mitochondrial genes and neurologic disorders[J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2012, 19(4): 181-193.
- [16] Ma Y, Fang F, Cao Y, et al. Clinical features of mitochondrial DNA m.3243A>G mutation in 47 Chinese families[J]. *J Neurol Sci*, 2010, 291(1-2): 17-21.
- [17] 何振巍,张朝东. 线粒体脑肌病伴高乳酸血症和脑卒中样发作综合征一家系临床特征及线粒体基因 A3243G 位点突变异质性水平[J]. *中华神经科杂志*, 2010, 4(5): 322-327.
- [18] Mehrzin M, Shanske S, Kaufmann P, et al. Longitudinal Changes of mtDNA A3243G Mutation Load and Level of Functioning in MELAS[J]. *Am J Med Genet*, 2009, 149A(4): 584-587.
- [19] Jeppesen TD, Schwartz M, Frederiksen AL, et al. Muscle phenotype and mutation load in 51 persons with the 3243A>G mtDNA mutation[J]. *Arch Neurol*, 2006, 63(12): 1701-1706.
- [20] Liu H, Ma Y, Fang F, et al. Wild-type mitochondrial DNA copy number in urinary cells as a useful marker for diagnosing severity of the mitochondrial diseases[J]. *Plos one*, 2013, 8(6): e67146.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

LC-MS/MS 法检测血浆中的肾上腺素 (E), 去甲肾上腺素(NE), 多巴胺(DA)含量

杜克贺¹, 王国才¹, 邵立军¹, 李亚妮¹, 李玉虎¹, 刘鸿君^{1*}

北京汇智泰康医药技术有限公司

[摘要] 目的: 建立 LC-MS/MS 法检测血浆中的肾上腺素, 去甲肾上腺素, 多巴胺的含量。方法: 人血浆样本用 TOAB 提取后, 经衍生剂衍生, 选用 Agela Venusil ASB C₁₈ 色谱柱(50 mm ×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-10mmol L⁻¹ 乙酸铵(pH=4) 为流动相进行分离; 选用 API5000 型三重四极杆串联质谱仪的多重反应监测 (MRM) 扫描方式进行监测, 电喷雾离子化源, 正离子方式, 选择监测离子反应分别 m/z 478.3→ m/z 105.1 (肾上腺素), m/z 484.3→ m/z 105.1 (肾上腺素同位素-d₆), m/z 464.3→ m/z 105.1 (去甲肾上腺素), m/z 470.3→ m/z 105.1 (去甲肾上腺素-d₆), m/z 466.3→ m/z 105.1 (多巴胺), m/z 470.3→ m/z 105.1 (多巴胺-d₄)。结果: 肾上腺素, 去甲肾上腺素, 多巴胺的保留时间分别为 4.85 min, 4.50 min 和 5.86 min; 血浆中 E, NE, DA 的线性范围分别为 10.0~2000 pg mL⁻¹, 10.0~2000 pg mL⁻¹, 10.0~2000 pg mL⁻¹, 定量下限: 三种待测物均为 10.0 pg mL⁻¹。结论: 该方法快速、灵敏度高、专属性强、重现性好, 适用于临床人血浆中 E, NE, DA 的快速检测。

[关键词] 肾上腺素; 去甲肾上腺素; 多巴胺; 液相色谱-串联质谱联用仪

LC-MS/MS determination of Epinephrine, Norepinephrine and Dopamine in human plasma

Du Ke-he¹, Wang Guo-cai, Shao Li-jun, Li Ya-ni, Li Yu-hu, Liu Hong-jun^{*}

(iPhase Pharma Services, Beijing 101111)

[ABSTRACT] **OBJECTIVE:** A LC-MS/MS method for determination of Epinephrine(E), Norepinephrine(NE) and Dopamine(DA) in human serum was developed. **METHOD:** The compounds were extracted with TOAB, derivatized with a reagent, the analytes were separated on a Agela Venusil ASB C₁₈ column using the mobile phase of acetonitrile and 10mmol L⁻¹ Ammonium acetate (pH=4). Detection was carried out by electrospray positive ionization mass spectrometry in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The MRM transitions of m/z 478.3→ m/z 105.1 (E), m/z 484.3→ m/z 105.1 (E-d₆), m/z 464.3→ m/z 105.1 (NE), m/z 470.3→ m/z 105.1 (NE-d₆), m/z 466.3→ m/z 105.1 (DA), m/z 470.3→ m/z 105.1 (DA-d₄) were used to quantify E, NE and DA, respectively. **RESULT:** E, NE and DA. were eluted at 4.85 min, 4.50 min and 5.86 min, respectively. The calibration curves were linear and ranges for E, NE and DA were respectively 10.0~2000 pg mL⁻¹, 10.0~2000 pg mL⁻¹ and 10.0~2000 pg mL⁻¹. The lower limit of quantitation (LLOQ) was 10.0 pg mL⁻¹ for all compounds. **CONCLUSION:** It is a rapid, sensitive, selective and reliable method for the determination of E, NE and DA. The method was successfully applied to detect human serum levels of Catecholamines.

[KEY WORDS] Epinephrine; Norepinephrine; Dopamine; LC-MS/MS.

儿茶酚胺, 包括肾上腺素, 去甲肾上腺素, 多巴胺。肾上腺素, 既是肾上腺髓质, 肾上腺神经元及肾上腺嗜铬体分泌的激素, 又是交感神经和中枢神经系统中的神经递质。由于儿茶酚胺介入多重调控系统和代谢过程并发挥作用, 因而在对一些神经内分泌和心血管疾病的临床诊断与治疗中被视为重要的生物标志物。

正常情况下, 人体血浆中的儿茶酚胺含量极低且不稳定, 易于氧化和分解。因此需要极灵敏和特异的生物分析方法进行定量。现行常用的分析方法是高效液相色谱联用电化学检测器 (HPLC-ECD), 此法存在样品处理耗时, 色谱分离时间长, 分析灵敏度较低等缺点, 限制了其在临床实验室的应用。

我们开发了一个基于液质联用技术结合柱前衍生的方法, 能够快速而又灵敏的检测血浆中三种儿茶酚胺, 以满足临床实验室常规检测的要求。

1 仪器与材料

1.1 仪器

API5000 型三重四极杆串联质谱仪: 美国 Applied Biosystems 公司产品, 配有电喷雾离子化源 (ESI) 以及 Analyst 1.5 数据处理软件; Nexera XR 液相色谱仪: 日本 Shimadzu 公司产品, 包括 LC-20AD_{XR} 型二元泵, DGU-20A_{3R} 型脱

气机, SIL-20AC_{XR} 型自动进样器, CBM-20A 系统控制器; VX-2400 Multi-tube Vortexer 高速振荡混合器: VWR Scientific; Beckman GPR Centrifuge 高速离心机: Beckman。

1.2 材料

肾上腺素(纯度为 100.0%), 北京北化恒信生物技术有限公司, 批号: 100154-200503; 去甲肾上腺素(纯度 95.0%), 北京北化恒信生物技术有限公司, 批号: M24L; 多巴胺盐酸盐(纯度:98.0%), 上海嘉根生物科技有限公司, 批号: 14102317; Epinephrine-d₆(纯度为 100.0%), Cerilant, 批号: FN01121502; Norepinephrine-d₆(纯度为 100.0%), Cerilant, 批号: FN071211-01, DOPAMINE-D₄(纯度为 97.0%), Cambridge Isotope Laboratories, 批号: PR-21736, 甲醇, 乙腈, 甲酸为色谱纯, Burdick&Jackson; 水为超纯水(Milli-Q 纯水系统制备), 其它试剂均为分析纯。牛血清白蛋白, 国药集团化学试剂北京有限公司, 批号: 20131219。

TOAB 提取溶剂: 将 6g TOAB (tetraoctyl-ammonium bromide, 四辛基溴化铵) 溶于 1L 的正庚烷 (11mM), 再加入 12.15ml 的正辛醇 (77mM), 充分混合。室温保存 3 月。

PBA 缓冲盐溶液: 将 10.7g 氯化铵溶解于 100ml 去离子水 (2M), 加入 0.5g 的 EDTA 钠盐 (13.4mM) 溶解, 加入 0.05g 的 PBA(2-aminoethyldiphenyl-boronate 二苯基硼酸-2-氨基乙酯, 2.2mM) 混合, 缓慢加入氨水 (大约 2.1ml) 调节 pH 至 8.95 ± 0.1, 在 50°C 水浴中混合充分。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及质谱条件

色谱柱: Agela Venusil ASB C₁₈ 柱 (50 mm×4.6 mm, 5 μm, 天津博纳艾杰尔科技有限公司); 流动相: 10mmol L⁻¹ 乙酸铵水溶液 (pH=4) (A); 乙腈 (B); 流速: 0.80 mL min⁻¹; 洗脱方式: 梯度洗脱; 梯度设置: 0.0-0.40 min, 37% B; 0.40-2.70 min, 67% B; 2.40-4.00 min, 78% B; 4.00-4.10 min, 67% B; 4.10-6.00 min, 37% B; 柱温: 室温; 进样量: 80 μL。

离子源: 电喷雾离子化源; 离子喷射电压: 5500 V; 温度: 550°C; 源内气体 1 (GS1, N₂) 压力: 65 psi; 气体 2 (GS2, N₂) 压力: 65 psi; 气帘气体 (高纯 N₂) 压力: 20 psi; 正离子方式检测; 扫描方式为多重反应监测 (MRM); 用于定量分析的离子对分别为 m/z 478.3 → m/z 105.1 (E), m/z 484.3 → m/z 105.1 (E-d₆), m/z 464.3 → m/z 105.1 (NE), m/z 470.3 → m/z 105.1 (NE-d₆), m/z 466.3 → m/z 105.1 (DA), m/z 470.3 → m/z 105.1 (DA-d₄), 解簇电压 (DP) 均为: 150V, 碰撞能量 (CE) 分别为: 35 eV, 30 eV, 36 eV, 35 eV, 28 eV, 30 eV; 碰撞气 (CAD, N₂) 压力: 5 psi; Q1 和 Q3 分辨率均为 UNIT。

2.2 标准溶液, 标准曲线, 质控样本的制备

标准储备液的配制:

E: 精密称取 10.32 mg E 标准品于容量瓶中, 加入 0.1% 乙酸水溶液, 配制成 E 浓度为 1.032mg mL⁻¹ 的一级标准储备液, 冷冻于 -80°C 冰箱备用。

NE: 精密称取 11.52 mg NE 标准品于容量瓶中, 加入 0.1% 乙酸水溶液, 配制成 NE 浓度为 1.094mg mL⁻¹ 的一级标准储备液, 冷冻于 -80°C 冰箱备用。

DA: 精密称取 13.65 mg DA 标准品于容量瓶中, 加入 0.1% 乙酸水溶液, 配制成 DA 浓度为 1.338 mg mL⁻¹ 的一级标准储备液, 冷冻于 -80°C 冰箱备用。

质控溶液的配制: 分别取适量 E, NE, DA 一级标准储备液, 用 0.1% 乙酸水溶液将 E, NE 和 DA 稀释成浓度分别为 2, 10, 80 ng mL⁻¹ 的质控溶液, 用于配制血浆基质质控样品。

内标溶液的配制: 精确称 (量) 取各内标标准品, 用 0.15 乙酸水溶液配制成浓度为 10 ng mL⁻¹ 的内标工作溶液, 于 4°C 冰箱中保存备用。

标准曲线工作液的配制: 分别取适量 E, NE, DA 一级储备液, 用 0.1% 乙酸水配制三种化合物的混合标液, 并使其浓度分别为 10、50、100、500、1000 和 2000 pg mL⁻¹ 的标准曲线工作溶液。

质控样本的配制: 分别取适量 E, NE, DA 质控溶液, 用 4% 牛血清生理盐水溶液配制成含 E, NE, DA 浓度分别为 20, 100, 800 pg mL⁻¹ 的质控样本。

2.3 血浆样本处理

取血浆 200 μL, 分别加入内标溶液 20 μL, 300 μL PBA(二苯基硼酸-2-氨基乙酯), 混合均匀后加入 500 μL TOAB, 涡旋提取 10 min, 13000 rpm 离心 5 min, 取 450 μL 上清转移至 1.5 mL 塑料离心管中, 先后加入 250 μL 的正辛醇和 125 μL 0.02N 的盐酸水溶液, 涡旋 3 min, 13000 rpm 离心 5 min。取离心下层溶液 100 μL, 加入 50 μL 100mmol 的四硼酸钠缓冲盐及 100 μL 1% 的苯甲酰氯, 涡旋 30s, 取 80 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2.4 标准曲线和定量下限

取空白血浆 200 μL, 分别加入儿茶酚胺混合标准系列溶液 20 μL, 内标溶液 20 μL, 其余步骤按 2.3 项下“血浆样

本的处理”步骤操作，以血浆中待测物浓度为横坐标，待测物与内标物的峰面积比值为纵坐标，用加权 ($W=1/x^2$) 最小二乘法进行回归运算，求得直线回归方程，即为标准工作曲线。试验表明标准曲线线性良好，相关系数 $R=0.9981$ ，典型工作曲线见图 1，测定血浆中 3 种儿茶酚胺的线性范围均为 $10.0 \sim 2000 \text{ pg mL}^{-1}$ 。

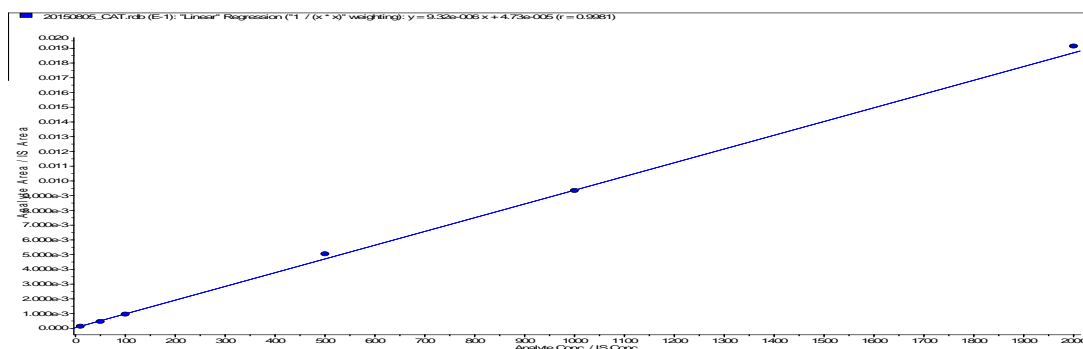


图 1-1 人血浆肾上腺素标准曲线

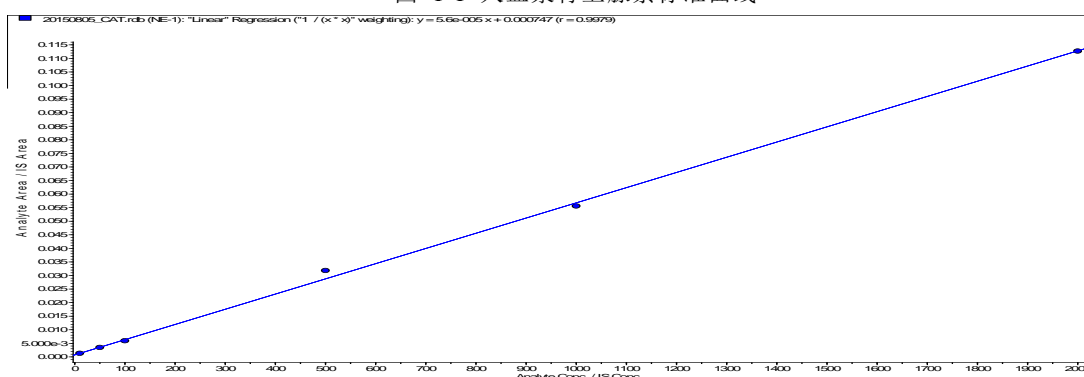


图 1-2 人血浆去甲肾上腺素标准曲线

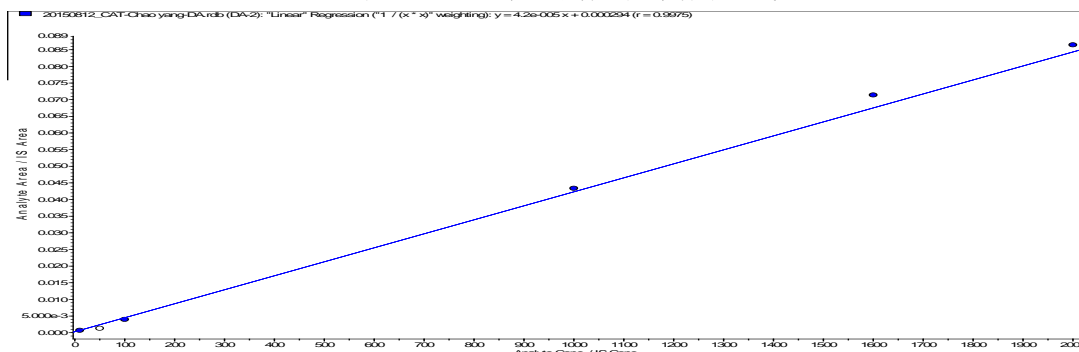


图 1-3 人血浆多巴胺标准曲线

按“血浆样本的处理”项操作，处理 E，NE，DA 浓度为 10 pg mL^{-1} 的 LLOQ 样本，以同一分析批的工作曲线计算 LLOQ 样本的浓度，根据测定结果计算 LLOQ 样本的相对误差 (RE)。RE 在 $\pm 20\%$ 以内，且响应噪音比: $S/N > 10$ ，因此三种化合物定量下限均为 10 pg mL^{-1} 。

2.5 准确度与精密度

按“血浆样本的处理”项操作，处理 E，NE，DA 低、中、高 3 个浓度的 QC 样本，以同一分析批的工作曲线计算 QC 样本的浓度，根据 QC 样本的测定结果计算方法的准确度与精密度。结果见表 2，RE 均在 $\pm 15\%$ 以内，批内 RSD、批间 RSD 均小于 15%。

表 1 人血浆中肾上腺素 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度结果

理论浓度/ (pg mL ⁻¹)	测定浓度/ (pg mL ⁻¹)	RE/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
20.0	19.98±1.27	-0.12	5.02	6.34
100.0	97.20 ±5.25	2.80	6.75	5.40
800.0	793.36±20.73	0.98	3.24	2.61

表 2 人血浆中去甲肾上腺素 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度结果

理论浓度/ (pg mL ⁻¹)	测定浓度/ (pg mL ⁻¹)	RE/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
20.0	21.23±1.15	0.95	6.05	7.85
100.0	95.36 ±6.21	5.66	7.56	10.35
800.0	794.36±22.76	6.31	9.35	9.55

表 3 人血浆中多巴胺 LC-MS/MS 测定方法的准确度与精密度结果

理论浓度/ (pg mL ⁻¹)	测定浓度/ (pg mL ⁻¹)	RE/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
20.0	20.65±3.21	2.13	7.62	9.45
100.0	90.36 ±8.28	8.66	6.19	8.22
800.0	796.48±23.98	4.99	8.52	10.23

2.6 特异性

取空白 4% 牛血清 200 μL，以等体积的 0.1% 乙酸水代替内标溶液，按“血浆样本的处理”项操作，得色谱图 2-A；将儿茶酚胺混合标液及内标加入空白牛血浆样本中，按“血浆样本的处理”项操作，得色谱图 2-B；取实际血浆样本，按“血浆样本的处理”项操作，得色谱图 2-C。结果表明，空白牛血浆中的内源性物质不干扰待测物和内标的测定。方法具有良好的特异性。

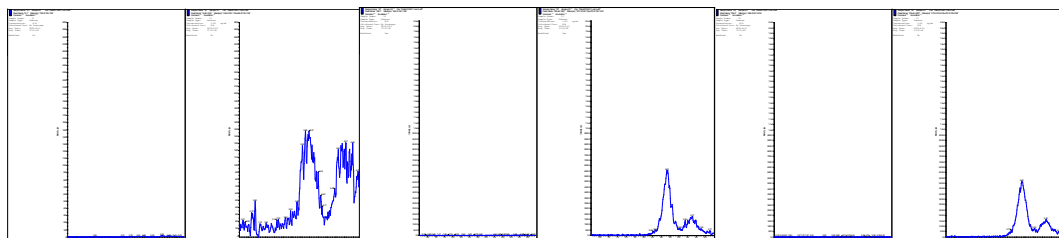


图 2-A 空白血浆 E, NE, DA 色谱图

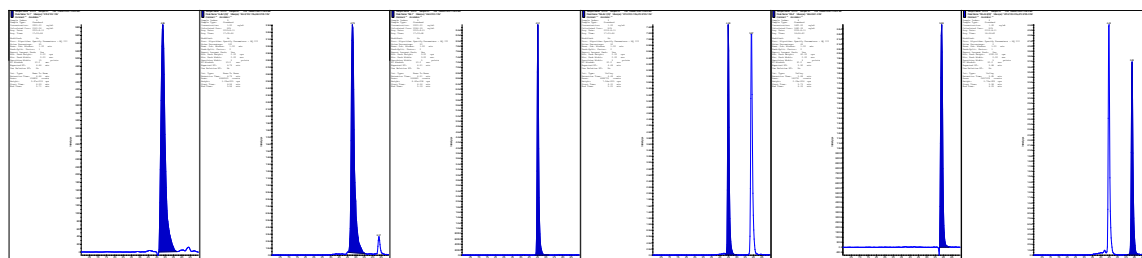


图 2-B 空白血浆加入 E, NE, DA 标准溶液和内标检测色谱质谱图

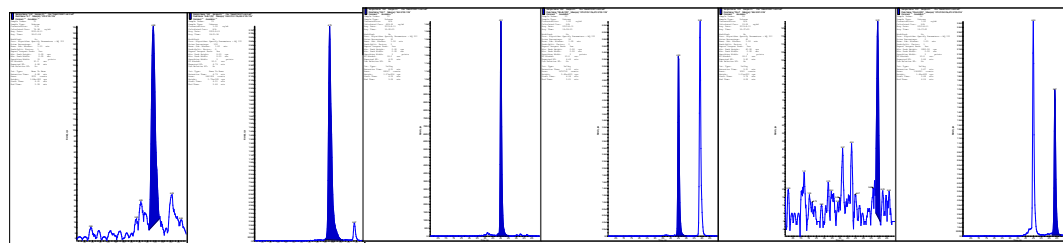


图 2-C 实际血浆样品中 E, NE, DA 检测色谱质谱图

3 讨论与结论

本研究建立了测定人血浆中肾上腺素, 去甲肾上腺素, 多巴胺含量的 LC-MS/MS 分析方法, 该方法具有选择性好, 灵敏度高, 高通量的特点。三种儿茶酚胺的定量下限均为 10 pg mL^{-1} , 加标样品测试结果的准确度大于 89.3%, 变异系数小于 10.43%。三种儿茶酚胺的最高定量限均为 2000 pg mL^{-1} , 加标样品测试结果的准确度大于 91.7%, 变异系数小于 6.72%。三种儿茶酚胺三个水平质控样的日内, 日间变异系数均小于 11%, 方法萃取回收率为 60%, 且未观察到基质效应。

本研究方法的灵敏度高, 样品处理方法操作简单, 可用于血浆儿茶酚胺在临床研究与诊断中的检测。

参考文献

- [1] Guodong Zhang, Yizhong Zhang, Chengjie Ji, et al. Ultra sensitive measurement of endogenous epinephrine and norepinephrine in human plasma by semi-automated SPE-LC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 895-896:186-190.
- [2] Mark M. Kushnir, Francis M. Urry, Elizabeth L, et al. Analysis of Catecholamines in Urine by Positivelon Electrospray Tandem Mass Spectrometry[J]. Clinical Chemistry, 2002, 48:2:323—331.
- [3] Peng Song, Omar S. Mabrouk, Neil D. Hershey, et al. In Vivo Neurochemical Monitoring Using Benzoyl Chloride Derivatization and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry[J]. analytical chemistry, 2012, 84:412-419.
- [4] K. Sadilkova, K. Dugaw, D. Benjamin, et al. Analysis of VMA and HVA by UPLC-MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma[J]. Clin Chim. acta. 2013, 424:253–257.
- [5] Ramakrishna Nirogi, Prashanth Komarneni, Vishwottan Kandikere, et al. A sensitive and selective quantification of catecholamine neurotransmitters in rat microdialysates by pre-column dansyl chloride derivatization using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 913-914:41-47.

作者简介: 杜克贺, 男, 1983年11月, 硕士, 分析化学中级工程师;

从事质谱在临床检测中的应用研究和质量保证工作; kdu@iphasepharma.com;
(临床检验装备技术专业委员会供稿)

新产业 MAGLUMI 检测肝纤指标的方法学性能验证

韦荣国¹ 黄永攀² 李灵²

1 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司; 2 南宁市第一人民医院

[摘要] **目的:** 对新产业 MAGLUMI 全自动化学发光免疫分析仪检测肝纤指标的方法学性能进行验证。**方法:** 按美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐方法测定透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、III型前胶原N端肽(PIII PN-P)、IV型胶原(C IV)的批内和日间精密度、准确度、线性范围、灵敏度以及生物参考区间等指标, 并进行验证。**结果:** MAGLUMI 测定 HA、LN、PIII PN-P、C IV 批内、日间精密度变异系数分别为 3.01~4.82%和 3.77~4.69%; 相对偏倚(%) 在-8.3%~0.2%之间; 测定线性范围与厂商提供的范围相近; HA、LN、PIII PN-P、C IV 的测定数值与仪器厂商提供的参考区间符合率都为 100%; MAGLUMI 检测的分析灵敏度分别为 1.30ng/ml、0.9ng/ml、1.91ng/ml 和 0.54ng/ml。**结论:** MAGLUMI 分析仪可直接用于对人血清中的肝纤指标 HA、LN、PIII PN-P、C IV 的含量进行定量分析, 批内精密度、日间精密度、准确度、线性范围、灵敏度以及参考区间均较好, 报告结果准确可靠。MAGLUMI 分析仪是一种较理想的适用于判断肝纤维化程度的检测仪, 值得推广应用。

[关键词] MAGLUMI; HA; LN; PIII PN-P; C IV; 性能评价

Research on Snibe Maglumi test hepatic fibrosis indicators of performance verification methodology

Rongguo Wei¹ Ling Li²

(1 Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.; 2 The First People's Hospital of Nanning)

[Abstract]Objective:To detect hepatic fibrosis parameter methodology performance for validation of Snibe Maglumi automatic chemiluminescence immunoassay analyzer. **Methods:**Recommended by the American association of clinical laboratory standardization (CLSI) method was developed for the determination of hyaluronic acid (HA), Laminin (LN), III procollagen N-terminal peptide (PIII PN-P), IVcollagen (C IV), and this precision, accuracy, linear range, sensitivity and biological reference range, and validated. **Results:**Maglumi determination of HA, LN, PIII PN-P, C IV and precision, the daytime in this batch variation coefficient were 3.01~4.82% and 3.77~4.69%. Relative bias must lean on (%) between -8.3%~0.2%. The scope of determination of linear range and the manufacturer to provide similar. HA, LN, PIII PN-P, C IV and numerical value with the determination of this instrument manufacturers provide reference interval coincidence rate all were 100%. Maglumi detection sensitivity were 1.30ng/ml, 0.9ng/ml, 1.91ng/ml and 0.54ng/ml. **Conclusion:**MAGLUMI can be used in quantitative analysis of the content HA, LN, PIII PN-P, and C IV directly, which are indicators of liver fibrosis in human serum. Precision, accuracy, linear range, sensitivity and biological reference range show good performance in this methodology. The results of report are accurate and reliable. MAGLUMI should be widely applied, which is an ideal way to determine the degree of liver fibrosis.

[Key words] MAGLUMI; HA; LN; PIII PN-P; C IV; Performance evaluation

肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生, 导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程, 许多慢性肝病疾病均可引起肝纤维化。肝纤维化常见检查方法有组织病理学检查、影像学诊断和血清学诊断。组织病理学检查是判断慢性肝病是否已导致肝纤维化的“金标准”, 但肝活检是一种创伤性检查, 存在较大疼痛和并发症风险, 不方便反复取样检查, 且存在取样误差。影像学评估以超声较普遍, 但目前影像学技术不能评估肝纤维化的早期阶段, 具有一定局限性。血清学诊断具有取样方便, 可随时多次采血、价格低、无创伤等优势, 利于早期发现肝纤, 动态监测肝纤, 是目前应用最广泛的肝纤维化检查方法^[1]。

肝纤维化标志物包括透明质酸、层粘连蛋白、IV型胶原、P III P N-P、甘胆酸 CG 等。通过对肝纤维化标志物进行血清学检测, 能对慢性肝病纤维化病变发展程度进行监测。透明质酸 (hyaluronic acid, HA) 主要由间质细胞合成, 经淋巴循环入血, 由肝脏内皮细胞摄取, 由特异的透明质酸酶水解, 可较准确灵敏地反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损状况, 是肝纤维化和肝硬变的敏感指标。层粘连蛋白 (Laminin, LN) 广泛分布于基底膜的透明层, 紧贴细胞基底部, 与IV型胶原结合形成基底膜骨架, 影响细胞的粘附、运动, 调节细胞生长和分化, 并与肝纤维化发生、肿瘤的浸润转移等有关。III型前胶原 (PC III) 是III型前胶原氨基肽 (P III P N-P) 的前体, PC III分泌到细胞外后, 经内切酶酶切后裂解下来的氨基端多肽形成 P III P N-P, P III P N-P 在肝纤维化早期即可能升高, 血清含量与肝纤程度一致。IV型胶原 (C IV) 为构成基底膜主要成分, 在细胞内合成, 直接以前胶原形式参与细胞外间质的构成。正常肝脏 C IV 含量极微, 肝脏发生纤维化后, 早期即见其增生, 且转换率快, 最后与持续沉积的层粘连蛋白形成完整的基底膜。血清 C IV 水平升高可较灵敏反映出肝纤过程, 在肝纤维化时出现最早, 是肝纤的早期标志之一^[1-3]。

新产业 MAGLUMI 全自动化学发光免疫分析仪应用目前国际上最先进的直接化学发光免疫分析技术, 具有快速、简便及自动化程度高等特点, 可直接对血清中的 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的含量进行快速简便定量检测分析。为了保证检验项目结果质量, 本研究以 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 作为检测项目, 从精密度、准确度、线性范围、灵敏度、参考区间等方面对 MAGLUMI 分析仪各性能进行验证。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集符合肝纤指标标本要求的门诊或住院患者送检的标本, 并按肝纤检测指标的要求及时分析或处理标本。

1.2 仪器和试剂

MAGLUMI 4000 全自动化学发光免疫分析仪, 检测试剂, 校准品, 质控品均由深圳市新产业生物医学工程有限公司提供, 并严格按照仪器及试剂说明书的操作规程进行。

1.3 检测方法

按照仪器的作业指导书对仪器进行系统维护保养, 待常规室内质量控制在完成后按美国临床实验室标准化协会 (clinical and laboratory standards institute, CLSI) 推荐方法测定 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的批内和日间精密度、准确度、线性范围、灵敏度、生物参考区间等指标, 并进行验证, 且于检测过程中不定时地插入室内质控物进行质量监控, 确保整个分析过程中仪器处于在控的良好状态。

1.3.1 精密度

批内精密度: 参照 NCCI SEP5-A^[4] 文件, 随机抽取一盒试剂, 按试剂盒说明书规定检测, 用各自的质控品连续

重复测试 20 次, 分别计算其平均值(\bar{x})、标准偏差(S)和变异系数(CV)。日间精密度: 每日测定 1 次质控品, 连续测定 20 d, 分别计算 \bar{x} 、S 和 CV。

1.3.2 准确度

用校准品校准检测系统后, 对定值质控品进行 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 检测, 检测结果与定值质控品的靶值进行对照, 计算检测值与靶值的相对偏倚(%) (公式 1): 相对偏倚 Bias(%)=(测定值-靶值)÷靶值×100。

1.3.3 线性范围

按照美国临床实验室标准 NCCISEP6-A2^[5]文件评价方案, 选取高值血清样本(H)和低值血清样本(L)各 1 份, 浓度分别接近仪器给定的测量线性范围的两端, 将 H 和 L 按 5H、4H+L、3H+2L、2H+3L、H+4L 及 5L 的比例混合成 6 个样品, 每份样品重复测定 3 次, 计算平均值(\bar{x})。将实测值与理论值相比较验证线性范围。

1.3.4 灵敏度

分别取 10 份 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 空白液连续测定 3 次, 取其平均值(\bar{x})作为相应检测项目的灵敏度。

1.3.5 参考区间

按照 NCCIS C28-A2 文件^[6]要求进行验证。选择健康人群标本 20 份, 在 MAGLUMI4000 分析仪上进行测定, 对结果进行统计并与仪器说明书提供的参考范围比较。测定 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 项目, 要求 20 个检测数据中只允许有 1 个数据在给定的生物参考区间之外, 否则需要进行检测项目参考范围的建立。

2 结果

2.1 精密度

MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 批内精密度分别为 3.01%、3.90%、3.70% 和 1.81%, 日间的精密度分别为 3.86%、4.69%、4.01% 和 3.77%, 均符合要求, 见表 1。

表 1 MAGLUMI 4000 分析仪测定肝纤四项的精密度(%)

项目	样本数	批内精密度		日间精密度	
		$\bar{x} \pm s$	CV	$\bar{x} \pm s$	CV
HA (ng/ml)	20	204.78±6.17	3.01	206.59±7.97	3.86
LN (ng/ml)	20	212.2±8.41	3.90	215.7±10.12	4.69
PIII PN-P (ng/ml)	20	250.9±9.20	3.70	256.4±10.28	4.01
C IV (ng/ml)	20	257.11±12.4	4.82	262.32±9.89	3.77

2.2 准确度

MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的校正品结果与靶值的相对偏倚分别为 0.09%、-4.4%、0.2% 和 -8.3%, 均在 MAGLUMI4000 分析仪允许范围内。

2.3 线性范围

MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的线性范围分别为 12.46~3186.99 ng/ml, 2.00~999.25ng/ml, 0.50~1483.34ng/ml 和 2.00~1490.21ng/ml。都符合要求。与厂商提供的线性范围相近, 表明厂商提供的线性范围可靠, 可直接用于临床。

表 2 MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 线性范围结果

项目	5H		4H+L		3H+2L		2H+3L		H+4L		5L	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
HA (ng/ml)	3186.9 9	3500 0	2816.1 6	2800 0	2129.5 1	2100 0	1494.2 7	1400 0	678.6 9	700 0	12.4 6	0 0
LN (ng/ml)	999.25	1000 0	812.20	800.0	617.24	600.0	406.37	400.0	202.7 1	200 0	2.00 0	0 0
PIII PN-P (ng/ml)	1483.3 4	1500 0	1151.8 8	1200 0	902.42	900.0	602.26	600.0	310.9 5	300 0	0.50 0	0 0
C IV (ng/ml)	1490.2 1	1500 0	1177.1 2	1200 0	901.27	900.0	619.83	600.0	316.8 7	300 0	2.00 0	0 0

注: 表中 H 为高值血清样本; L 为低值血清样本; a 为实测值; b 为理论值。

2.4 灵敏度

MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 灵敏度分别为 1.30ng/ml、0.9ng/ml、1.91ng/ml 和 0.54ng/ml，与厂商提供的灵敏度相一致。

2.5 参考区间

MAGLUMI4000 分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的结果与仪器厂商提供的参考区间符合率都为 100%，仪器厂商提供的参考区间适合本地区人群。

3 讨论

肝脏遭到各种致病原侵袭时，引起肝脏损害与炎症反应，肝组织免疫系统同时被激活，进行组织修复。肝纤维化是指这种组织修复过程过度及失控时，肝组织内细胞外基质过度增生与异常沉积所致肝脏结构和肝功能异常改变的一种病理过程。HA 是基质成分，可较准确灵敏的反映肝内已生成的纤维量及肝细胞受损情况，有资料认为血清 HA 动态检测较之肝活检更能完整反映出肝全貌，是肝纤维化和肝硬变的敏感指标。尤其在肝纤维化时，血清 HA 升高幅度与病变程度相关。LN 为基底膜中特有的非胶原性结构蛋白，与肝纤维化活动程度及门静脉压力呈正相关，另外，LN 水平越高，肝硬变病人的食管静脉曲张越明显。正常肝脏间质含少量 LN，在肝纤维化和肝硬化时，肌成纤维细胞增多，大量合成和分泌胶原、LN 等间质成分，形成完整的基底膜（肝窦毛细血管化）。PIIP N-P 反映肝内 III 型胶原合成，血清含量与肝纤程度一致。持续 PIIP N-P 升高的慢活肝，提示病情可能会恶化并向肝硬化变形发展，而 PIIPN-P 降至正常可预示病情缓解。C IV 为构成基底膜主要成份，反映基底膜胶原更新率，含量增高可较灵敏反映出肝纤过程^[7-9]。

目前，测定肝纤四项血清含量的方法主要有化学发光法和放射免疫分析法，有研究表明，化学发光法是检测血清肝纤四项较为特异和准确的方法，其效果明显优于放射免疫分析法^[2]。新产业 MAGLUMI 化学发光分析仪，运用先进的直接化学发光检测技术，具有准确度高、重复性好、线性范围广、孵育时间短、灵敏度高及检测项目多(如肝纤、肿瘤标志物、甲状腺、性激素、糖代谢、心肌损伤标志物、贫血、骨代谢及传染病等 102 个项目)的特点。但不同实验室之间因条件有很大的差异，如工作人员操作习惯、水质、温度、湿度及电压稳定性等诸多因素存在差异性。因此，每个实验室都有必要按各自的系统建立和验证方法学参数，评价 MAGLUMI 化学发光分析仪各项性能是否符合要求，检测结果是否准确可靠。

精密度是定量测定中最基本的性能指标。本研究结果显示，MAGLUMI 4000 化学发光分析仪测定 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 批内精密度分别为 3.01%、3.9%、3.70%和 1.81%，均小于厂商说明书给定的允许范围(<5%)。说明该仪器在本室的检测环境中系统重复性符合要求，精密度良好，能满足临床检验质量标准。

准确度是通过定值质控品或校准品的测定并计算其偏倚(%)，若测定结果在厂商规定的限值之内，准确度可被确认。按照 NCCLS EP15-A^[10] 文件和 ISO15189 文件中对准确度的评价要求，可通过比对定值质控品或校正品来对系统的准确度进行验证。本研究结果显示，MAGLUMI 4000 化学发光免疫分析仪检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的校正品结果与靶值的相对偏倚分别为 0.09%、-4.4%、0.2%和-8.3%，均在允许范围之内，说明其检测 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 准确度性能符合厂商及实验室要求。

在确保使用原装配套试剂的前提下，本研究验证的 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 线性范围，本研究验证的测定线性范围与厂商提供的线性范围相近，均在厂商提供线性范围之内。按照 NCCLSC28-A2^[6] 文件要求，本研究对 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的正常参考范围进行了验证，结果显示，MAGLUMI 4000 化学发光分析仪测定本区健康人群血清中 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的含量与仪器厂商推荐的参考区间的符合率都为 100%，可直接引用厂商的参考范围。

综上所述，新产业 MAGLUMI 化学发光分析仪检测肝纤维化指标 HA、LN、PIII PN-P 和 C IV 的方法性能良好，可满足要求，能够为临床诊断提供准确可靠的结果。

参考文献

- [1]. 田树华,王守义.肝纤维化指标血清学检测的临床意义[J]. 山西医科大学学报, 2002,33(2):178-179.

- [2]. 周作华, 赵红, 黄萍, 等. 2 种方法检测血清肝纤四项的效果比较[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(25): 2824-2826.
- [3]. 路晓梅, 陈复兴, 杨晓东. 肝病患者层粘蛋白、透明质酸、IV 型胶原测定及其意义[J]. 陕西医学杂志, 1998, 27(05): 302-303.
- [4]. NCCLS. EP5A2: Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. Approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
- [5]. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A statistical approach. Approved guideline NCCLS document EP6-A[S]. Wayne PA: NCCLS 2003: 1-60.
- [6]. NCCLS. C28-A2: how to define and determine reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline-second edition[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- [7]. 沈赟玲, 陆伦根, 曾民德. 肝纤维化血清学诊断研究进展[J]. 胃肠病学, 2007, 129(7): 425-427.
- [8]. 陈杰, 陈新月. 肝纤维化诊断研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2006, 33(6): 413-422.
- [9]. 刘杰, 王吉耀, 陆晔. 血清纤维化指标对肝纤维化诊断价值的研究[J]. 中华内科杂志, 2006, 45(6): 475-477.
- [10]. NCCLS. EP15-A: User demonstration of performance for precision and accuracy. Approved guideline[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2001.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

25-OH 维生素 D 与高血压病危险分期相关性研究

殷光荣^① 赖秀林^① 自福蓉^① 张志辉^① 王丽波^②

①玉溪市第二人民医院检验科 云南 玉溪 653100

②玉溪市第二人民医院科教科 云南 玉溪 653100

[摘要] 目的: 通过测定血清中 25-羟基维生素 D (25-OH-Vit D), 了解维生素 D 在非高血压人群与高血压病患者间的水平变化及不同临床表现组别 (高血压心血管危险分期标准) 维生素 D 的水平变化, 分析维生素 D 缺乏或不足与高血压危险分期的相关性, 并探讨其临床意义。方法: 选取非高血压人群作为对照组 (64 例), 内科门诊及住院部高血压患者作为实验组 (345 例), 实验组分为 I 期 (97 例), II 期 (122 例), III 期 (126 例), 采用直接化学发光法测定每组血清维生素 D 水平, 并分别将对照组与实验组, 实验组 I、II、III 期进行比较。结果: 对照组、实验组 25-OH-Vit D 浓度分别为 (27.53±8.65) ng/mL、(24.00±8.58) ng/mL, 实验组 I 期、II 期、III 期 25-OH-Vit D 浓度分别为 (24.47±9.02) ng/mL、(24.10±9.87) ng/mL、(23.42±6.87) ng/mL。对照组与实验组有统计学差异 (P<0.05), I 期与 II 期, II 期与 III 期的差异无统计学意义 (P>0.05), I 期与 III 期有统计学意义 (P<0.05)。结论: 高血压患者血清维生素 D 浓度下降, 尤其是 III 期高血压患者血清维生素 D 水平降低较明显。

[关键词] 25-OH-Vit D; 高血压分期; 相关性

Correlational research of vitamin D and hypertension different risk stratification

[Abstract] Objective To observe the serum levels of 25-OH-Vit D in normotensive crowds, patients with different risk stratification of hypertension and clinical manifestations of different groups (hypertensive cardiovascular risk staging criteria), and to explore the relationship between vitamin D level and hypertension different risk stratification. **Methods** normotensive crowds as control group (64 cases), internal medicine outpatient and the inpatient hypertension patients as the experimental group (345 cases), the experimental group is divided into phase I (97 cases), phase II (122 cases), phase III (126 cases). Serum vitamin D levels of all the cases were evaluated by chemiluminescence method. The differences of serum vitamin D levels between four groups were analyzed. **Results** Control group, experimental group phase I, phase II, phase III 25-OH Vit D concentration were (27.53±8.65) ng/mL, (24.47±9.02) ng/mL, (24.10±9.87) ng/mL, (23.42±6.87) ng/mL respectively. The

control group compared with experimental group ($P < 0.05$), phase II compared with phase I, phase III ($P > 0.05$), phase I compared with phase III ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypertension patients' serum vitamin D concentrations decreased, especially in patients with stage III hypertension serum vitamin D levels decrease obviously.

[Key words] 25-OH-Vit D;hypertensive stage;Correlation analysis

高血压病是多种复杂和相关因素导致的、逐渐进展的“心血管综合征”，伴随逐年增加的发病率，是影响心脑血管病患者生存的“无声杀手”，多数患者无法科学的评估血压情况，当病情出现进展时往往错过治疗的最佳时期，导致临床预后效果欠佳。而在近年来维生素 D 的多种生物学功能正在逐渐被发现，维生素 D 缺乏所带来的不良影响越来越受到重视^[1]。多项研究表明血清维生素 D 水平与高血压的发生密切相关^[2-6]。大量流行病学和相关荟萃分析也表明维生素 D 缺乏患者发生高血压的危险性增高^[7]，且伴随维生素 D 检测手段和现代实验技术的逐渐成熟，了解 VitD 缺乏或不足与高血压及其高血压危险分层之间的关系，进一步明确 VitD 缺乏或不足在高血压中的作用并采取相应措施，对高血压的防治有重要的临床意义^[8]。

1 方法及对象

1.1 对象：收集非高血压患者作为对照组，内科门诊及住院部高血压患者作为实验组，并排除继发性高血压。2015 年至 2016 年 1 月我院共收集对照组 64 例，实验组 345 例，其中非高血压组男 33 例，女 31 例，年龄 27~70 岁，平均年龄(45.5±2.8) 岁；实验组男 146 例，女 199 例，年龄 34~79 岁，平均年龄(58.1±2.8) 岁。根据 2011 年版《中国高血压病防治指南》按血压水平及存在的危险因素分为 I、II、III 期。

1.2 方法：(1) 临床资料收集所有对象为就诊早晨 8:00 由专人对受试者检测血压。休息 10 min 后坐位测量右肱动脉血压，2 次取平均值，非同日 3 次测量。(2) 所有受试者空腹 10~12 h，晨起抽肘静脉血 5.0 mL，离心后取上清液，标本放在 2-8℃ 保存待测。血清 25-OH-vitD 的测定采用深圳 SNIBE 公司原装试剂盒定量法检测。检测设备采用 Maglumi 4000 系列全自动化学发光免疫分析仪进行检测。严格按标准操作规程操作，在有效期内定量检测 25-OH-vitD 浓度。

1.3 统计学方法：所有数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示，进行正态性检验，两组间数据比较用 t 检验，有关指标用 SPSS 18.0 统计软件包做相关分析， $P < 0.05$ 有显著统计学意义。

2 结果

血清维生素 D 水平与高血压分期的相关性分析：对照组与实验组有统计学意义($P < 0.01$)；I 期与 II 期，II 期与 III 期的差异无统计学意义($P > 0.05$)，I 期与 III 期有统计学意义($P > 0.01$, $P < 0.05$)。按照高血压危险分期比较高血压 I 期、II 期、III 期的血清维生素 D 水平均低于正常对照组 ($P < 0.05$)，且高血压 III 期的血清维生素 D 水平较 I 期、II 期降低更明显 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 血清 25-OH Vit D 水平与高血压分期的相关性

项目	n	男/女(例)	年龄(岁)	25-OH Vit D(ng/mL)
I 期	97	40/57	64.3±11.8	24.47±9.02 ^a
II 期	122	48/74	62.1±11.8	24.10±9.87 ^a
III 期	126	58/68	64.8±8.9	23.42±6.87 ^{ab}
对照组	64	33/31	45.5±12.8	27.53±8.65

注：25-OH-vitD 浓度：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ，与 I 期比较，^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

血清维生素 D 是一种调节体内血钙和血磷代谢平衡的脂溶性维生素和类固醇激素^[9]。其有五种化合物，而与健康关系较密切的是维生素 D₂ 和维生素 D₃，由于其能在血液中被检测到，且检验方法准确可靠，因此目前的研究基本上都是通过检测它来评价机体维生素 D 的水平^[10]。目前对于低 Vit D 状态的界定尚未达成共识，但大部分研究认同以 ≥ 30 ng/ml (75 nmol/L) 为 Vit D 充足 (Vita min D sufficiency)， ≤ 20 ng/ml (50 nmol/L) 为 Vit D 缺乏，21-29 ng/ml(52-72 nmol/L) 为 Vit D 不足 (Vita min D insufficiency)^[11]。本研究以此为依据，对研究组进行维生素 D 划分，结果显示对照组及各实验组均为 (VitD) 缺乏或不足，且 VitD 水平与高血压分期呈现负相关性。

近年来许多除维生素 D 缺乏导致的婴幼儿疾病和骨质疏松等疾病以外的其他心血管疾病，如高血压的相关性认

识被逐渐关注^[12]。本研究结果与国外同类研究结果基本一致,但目前具体机制尚不明确,主要包括:(1)有研究认为维生素 D 影响高血压的可能机制为负性调节肾素-血管紧张素系统^[13]。体外实验表明,在维生素 D 受体基因敲除的小鼠体内肾素和血管紧张素 II 的表达会增加几倍,导致高血压、心脏肥大和水负荷增加^[14]。(2)血管平滑肌细胞和内皮细胞均有维生素 D 受体的表达,维生素 D 通过这些受体从而具有保护血管内皮及改善血管内皮功能的作用,如果维生素 D 不足或缺乏,这种作用就会减弱,从而导致血管顺应性下降,僵硬增加,血压升高。(3)Vaidya 等^[15]研究表明,维生素 D 受体 FokI 型的基因多态性同高血压患者的血浆肾素活性相关,进一步证实了维生素 D 受体基因多态性和高血压的发病相关。在本研究的结果显示,25-OH-Vit D 的水平与高血压分期呈负相关,与以上可能机制相一致。

综上所述,高血压患病率与维生素 D 呈负相关,高血压危险因素越高维生素 D 水平越低,说明维生素 D 可能是心血管保护性激素。补充维生素 D 是否可以降低高血压病发病率,减少维生素 D 水平较低的高血压病患者预后,对预防和治疗高血压病有重要意义。本研究尚未能就维生素 D 影响高血压发病的具体机制进行深入研究,因此仍需继续观察及研究并阐明其可能的原因。

参考文献

- [1] Zittmann A,Gummert J,Sun.vitamin D and cardiovascular disease[J].J Photochem Photobiology B, 2010,101(2):124-129.
- [2] Burgaz A, Byberg L,Rautiainen S,et al.Confirmed hypertension and plasma 25(OH) D concentrations amongst elderly men[J].J Intern Med,2011,269 (2): 211-218.
- [3] Liu YT,Cai YF,Shi JP.Meta -analysis on the relationship between 25-hydroxyvitamin D level and hypertension[J].National Medical Journal of China, 2012,92(18):1268-1271.
- [4] Witham MD,Nadir MA,Struthers AD,et al.Effect of Vitamin on blood pressure:a systematic review and meta-analysis[J].Hypertens, 2009,27(10):1948-1954.
- [5] Zhao G,Ford ES,Li C,et al.Independent associations of serum concentrations of 25 -hydroxyvitamin D[J]. J Hypertens,2010,28(9):1821-1828.
- [6] 王欢,刘海明,胡广梅.原发性高血压病患者血清 25-羟基-维生素 D 水平与血压变异性的相关性研究[J].中国全科医学,2015,18(4):399-403.
- [7] 燕蒲娟,杨五晓.血清维生素 D 与高血压靶器官损害的相关研究[J].中华临床医师杂志,2014,8(18):3274-3278.
- [8] 赵以平,汪应涛,李国洪等.维生素 D 与高血压病及高血压危险分层相关性研究[J].齐齐哈尔医学院学报,2013,34(24):3619-3620.
- [9] Zittermann A.Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence[J].British Journal of Nutrition,2003,89:552-572.
- [10] 吴美华,魏群.维生素 D、维生素 D 受体与高血压[J].中华高血压,2008,16(1):92-94.
- [11] Rosen CJ.Vitamin D Insufficiency[J].N Engl J Med,2011,364(1):248-254.
- [12] 余华,朱再胜,高志立.维生素 D 缺乏与老年高血压的相关性研究[J].Chinese General Practice,2015,15(10B): 3345-3347.
- [13] Vaidya A,Pojoga L,Underwood PC,et al.The association of plasma resistin with dietary sodium manipulation,the renin-angiotensin-aldosterone system,and 25-hydroxyvitamin D3 in human hypertension[J].Clin Endocrinol,2011,74(3):294 -299.
- [14] Li YC,Juan K,Wei M,et al.1,25-d hydroxy vitam in D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin in system[J].J Clin Invest,2002,110(2):229-238.
- [15] Vaidya A,Sun B,Forman JP,et al.The FokI vitamin D receptor gene polymorphism is associated with plasma renin activity in Caucasians[J].British Journal of Nutrition,2011,74(6):783-790.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

重庆万州地区妊娠期妇女血清甲状腺激素参考区间研究

万涛 胡世玲 尹明华 周峻 周茹欣

重庆市万州区妇幼保健院产科

[摘要] 目的:建立重庆万州地区不同孕期妇女甲状腺激素参考区间,为准确筛查及诊断甲状腺疾病提供依据。方法:选取2014年8月-2016年1月于本院就诊的5320例妊娠妇女和426例非孕期健康妇女纳入研究,其中孕早期1632例,孕中期1731例,孕晚期1957例。分析所有入组对象血清促甲状腺激素(TSH)、游离甲状腺素(FT4)水平,并建立各孕期参考区间。结果:早、中、晚孕妇女及非妊娠妇女的甲状腺激素水平均呈偏态分布,故以中位数(M)及双侧限值(P2.5~P97.5)表示其参考范围。TSH在T1[0.81(0.03-3.19)]、T2[1.11(0.04-3.71)]、T3[1.97(0.42-5.41)]期逐渐上升,两两对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。其中T1和T2期、T3期和对照组[1.79(0.59-5.51)]差异无统计学意义($P > 0.05$)。FT4在T1[13.59(10.39-17.61)]、T2[12.56(9.28-16.06)]、T3[11.54(8.37-15.02)]期逐渐降低,均低于对照组[14.01(11.01-18.18)],各期两两比较有统计学意义($P < 0.05$)。结论:建立了重庆万州地区不同孕期妇女甲状腺激素水平的参考区间,有助于正确评价本地区妊娠期妇女的甲状腺功能。

[关键词] 甲状腺激素;参考区间;孕妇;万州

Establishment and clinical significance of the reference range of thyroid hormone in Wanzhou areas of Chongqing

[Abstract] Objectives: To establish and estimate the clinical significance of the reference ranges of thyroid hormone during different normal pregnancy in Wanzhou areas of Chongqing. **Methods:** The thyroid hormone levels were determined from 5320 cases of pregnant women which includes 1632 cases of the early pregnancy, 1731 cases of the second trimester and 1957 cases of the third trimester. 426 cases of non-pregnant women were determined as well. The reference ranges were established by statistical methods. **Results:** The thyroid hormone levels of different normal pregnancy and non-pregnant women all presented obvious skew distribution, so the reference ranges of thyroid hormone were calculated as median (M value) and two-sided limits (the 2.5th and 97.5th percentile values). TSH level was increasing gradually during the normal pregnancy. There were statistically significant differences in TSH level among all groups except T1 and T2, T3 and control groups ($P < 0.05$). TSH level of the third trimester was slightly higher than that of non-pregnant women without statistical difference ($P > 0.05$). FT4 levels were decreasing gradually during the normal pregnancy. There were statistically significant differences in FT4 levels among all trimesters ($P < 0.05$). **Conclusion:** The thyroid hormone levels of normal pregnant women in Wanzhou areas of Chongqing were determined to estimate and evaluate the thyroid function of pregnant women in the area.

[Key words] Thyroid hormones; reference ranges; Pregnant women; Wanzhou

甲状腺疾病好发于女性,尤其是育龄妇女。在妊娠过程中,雌激素的改变、人绒毛膜促性腺激素的作用和碘代谢异常等生理变化会导致甲状腺相关激素指标发生复杂的变化,这些变化有可能导致妊娠有关的甲状腺疾病^[1]。妊娠期合并甲状腺疾病时可导致早产、流产、死胎等风险的增加,妊娠期甲状腺功能不足(甲状腺功能减低症、亚临床甲状腺功能减低症和低T4综合症),甚至单纯的甲状腺过氧化物酶抗体阳性均可对胎儿和母体健康产生不良影响,可严重损害胎儿神经系统发育,导致其出生后的智力下降,因此,对妊娠妇女甲状腺疾病的诊断和治疗显得尤为重要^[2-5]。目前还没有公认的妊娠各期甲状腺激素参考范围可应用于临床,一般实验室多借用非孕期参考值范围,但由于人种、碘摄取水平和试剂厂家等的差异,可能会造成漏诊和误诊。NACB在《实验室诊断与监测甲状腺疾病的应用指南》中也强调,在检验妊娠妇女的甲状腺功能时,应使用不同妊娠期的正常参考值范围对甲状腺疾病进行筛查,并建议各地区建立自己的妊娠甲状腺激素参考范围,对发现的甲状腺疾病及早的进行诊断和治疗^[6]。因此,本研究针对重庆万州地区妊娠标本,建立了当地的妊娠甲状腺激素水平的正常参考区间,以期为孕妇甲状腺功能筛查提供准确可靠的实验依据,降低对妊娠甲状腺疾病的漏诊率和误诊率。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 8 月至 2016 年 1 月于重庆市万州区妇幼保健院就诊的门诊及住院妊娠妇女。健康孕妇参照美国国家临床生化学院 (The National Academy of Clinical Biochemistry, NACB) 标准^[7]制定本研究入选孕妇的排除标准。所有纳入对象按美国甲状腺学会 (ATA) 推荐分期分为 3 组: 妊娠早期组 (T1 组, 孕 1~12 周) 1632 例, 妊娠中期组 (T2 组, 孕 13~27 周) 1731 例, 妊娠晚期组 (T3 组, 孕 28~40 周) 1957 例。另 426 例同期相匹配的非妊娠期健康妇女作为对照组。

所有入选妇女均签署知情同意书。采用化学发光免疫分析法测定 TSH、FT3、FT4、Anti-TPO、TGA 水平。

1.2 仪器与试剂

仪器: Maglumi 2000 全自动化学发光分析仪 (深圳市新产业生物医学工程股份有限公司, 中国)

试剂: TSH、FT3、FT4、Anti-TPO、TGA 试剂盒以及配套的定标品和质控品均由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司 (中国) 提供。血清 TSH 线性范围为 0.01-100 μ IU/ml; 血清 FT3 线性范围为 0.2-50 pg/ml; 血清 FT4 线性范围为 1-120 pg/ml; 血清 Anti-TPO 线性范围为 0.38-1000 IU/ml; 血清 TGA 线性范围为 0.5-2800 IU/ml。

1.3 方法

收集入组妇女适量空腹静脉全血, 静置 30min 后以 3000r/min 离心 10min 分离血清标本后严格按照说明书进行检测。如果出现溶血标本时则重新采集标本进行检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS22.0 进行数据分析, 若为正态分布, 指标采用均数 \pm 标准差表示, 采用 Kolmogorov-Smirnov 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异; 若为偏态分布, 指标使用百分位数法表示, 其结果用中位数及双侧限值表示, 选择 95% 可信区间, 即 P2.5~P97.5 作为参考区间, 两组比较和多组比较分别选用 Mann-Whitney 检验和 Kruskal Wallis 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 实验结果

所有入组妇女年龄呈正态分布, 妊娠早、中、晚期妇女及对照组间年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 入组妇女基本资料 ($\bar{x} \pm s$)

组别	N	年龄 (岁)	孕期 (d)
T1	1632	26.74 \pm 4.69	69.04 \pm 5.15
T2	1731	26.21 \pm 4.58	108.92 \pm 18.19
T3	1957	26.35 \pm 5.26	261.95 \pm 17.77
对照组	426	26.87 \pm 6.03	—

各组年龄对比均无统计学意义, $P > 0.05$

TSH 和 FT4 相关数据均呈偏态分布。TSH 值在孕早期 (T1 期) 最低, 孕中期 (T2 期) 略微升高, 两者并无统计学意义 ($P > 0.05$)。随着孕周的增加, TSH 水平逐渐升高, 在孕晚期达到高峰, 甚至略高于非孕健康妇女对照组, 但两者并无统计学意义 ($P > 0.05$)。T3 期和对照组 TSH 值明显高于 T1 期和 T2 期, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。FT4 值在非孕健康妇女对照组中最高, 妊娠妇女随着孕周的增加 FT4 逐渐降低, 在 T3 期达到最低, 两两统计有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各研究组甲状腺激素参考区间 [M 中位数值 (P2.5~P97.5)]

组别	N	TSH (μ IU/ml)	FT4 (pg/ml)
T1	1632	0.81 (0.03-3.19) ^{1,2,3}	13.59 (10.39-17.61) ^{1,2,3}
T2	1731	1.11 (0.04-3.71) ^{4,5}	12.56 (9.28-16.06) ^{4,5}
T3	1957	1.97 (0.42-5.41) ⁶	11.54 (8.37-15.02) ⁶
对照组	426	1.79 (0.59-5.51)	14.01 (11.01-18.18)

3 讨论

妊娠合并甲状腺疾病对母体和胎儿均有不良的影响,可致妊娠期高血压、贫血、糖代谢异常、胎儿生长受限、新生儿低体重等并发症的产生,甚至会引起早产、流产、胎死腹中等^[8,9]。甲状腺功能亢进症或甲状腺功能减退症的临床表征在妊娠期易被妊娠生理反应所掩盖,如果诊治不及时,不良妊娠结局的发生率将大大提高。部分孕妇早期出现亚临床甲状腺功能减退,随着孕期增长病情可进展为妊娠期甲状腺功能减退,从而导致不良妊娠结局。因此,对于上述疾病的早期诊断尤为重要。

血清甲状腺功能指标的测定是门诊初步评估被检者甲状腺功能的首选检测项目和敏感指标。影响正常人群 TSH 测定值的因素包括所在地区的碘营养状态和测定试剂,大多数研究指出 TSH、FT4 的参考区间的界定因不同地区、人群、种族、碘摄入量、孕期、检测系统等而异。绒毛膜促性腺激素(HCG)因其 α 亚单位与 TSH 相似,对孕妇甲状腺有直接刺激作用,在妊娠 8-10 周逐渐达到高峰并对垂体分泌 TRH 水平产生抑制作用,使血清 TSH 水平降低 20-30%^[10]。本实验室研究数据显示,随着妊娠期的增长,TSH 测定值逐渐升高而 FT4 测定值逐渐下降,这一变化趋势与以往的研究结果相符^[11]。国内外均有报道指出 TSH、FT4 在不同检测系统中不具有可比性,但具有相关性;Maglumi 2000 全自动化学发光分析仪尚未建立妊娠期妇女甲状腺激素参考区间,采用其他仪器参考区间可能发生甲状腺疾病的漏诊和误诊,延误患者诊治。采用非孕期或者同一参考区间评估不同妊娠期妇女甲状腺状态也是不适宜的。

综上所述,本研究建立了本地区正常孕妇不同孕期甲状腺激素水平的参考范围,揭示了不同孕期妊娠期妇女甲状腺激素水平的变化规律,期望能为孕期妇女甲状腺疾病的临床诊断、治疗、监测以及相关研究提供一定的参考意义。

参考文献

- [1] 李晨阳,滕卫平,尚涛.甲状腺激素与妊娠[J].中华内分泌代谢杂志,2004,19(2):158-160.
- [2] Pop VJ, Brouwers EP,Vader HL,et al.Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development:a 3-year follow-up study [J].Clinical endocrinology. 2003,59(3):282-288.
- [3] Kooistra L,Crawford S,van Baar AL,et al.Neonatal effects of maternal hypothyroxinemia during early pregnancy[J]. Pediatrics.2006,117(1):161-167.
- [4] Gyamfi C,Wapner RJ,D'Alton ME.Thyroid dysfunction in pregnancy:the basic science and clinical evidence surrounding the controversy in management [J].Obstetrics & Gynecology.2009,113(6):1372-1373.
- [5] Stagnaro-Green A, Pearce E.Thyroid disorders in pregnancy [J].Nat Rev Endocrinol.2012, 8(11):650-658.
- [6] Demers LM, Spencer CA. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease [J].Clinical endocrinology, 2003. 58(2): 138- 140.
- [7] Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease [J].Thyroid.2003,13(1):123-126.
- [8] De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline [J]. J Clin Endocrinol Metab.2012, 97(8):2543-2565.
- [9] Duan Y, Peng W, Wang X,et al.Communitybased study of the association of subclinical thyroid dysfunction with blood pressure [J]. Endocrine. 2009,35(2):136-142.
- [10] Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology [J]. Endocr Rev.1997,18:404-433.
- [11] Chang DL,Pearce EN.Screening for maternal thyroid dysfunction in pregnancy: a review of the clinical evidence and current guidelines [J].J Thyroid Res.2013,85:1326.

T1: 孕早期; T2: 孕中期; T3: 孕晚期

TSH: ^{1,4}与对照组比较, P<0.05; ⁶与对照组比较 P>0.05; ²与 T2 期比较, P>0.05; ^{3,5}与 T3 期比较, P<0.05; FT4: ^{1,4,6}与对照组比较, P<0.05; ²与 T2 期比较, P<0.05; ^{3,5}与 T3 期比较, P<0.05。

作者简介: 万涛, 男, (1981-), 本科学历, 主管技师, 重庆市万州区妇幼保健院产科, 从事医学检验工作。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

血清 BGP、ALP 检测联合 SPECT 在前列腺癌骨转移的诊断价值

王永斌¹ 邓智勇¹ 洪涛²

1 云南省肿瘤医院核医学科 650118; 2 深圳市新产业生物医学工程股份有限公司 518000

[摘要] 目的:通过测定血清中 BGP、ALP 水平及联合 SPECT 检测,了解 BGP、ALP 在前列腺癌非骨转移与前列腺癌骨转移间的水平变化,探讨血清 BGP、ALP 检测联合 SPECT 在前列腺癌骨转移中的诊断价值。方法:随机抽取我院健康体检者作为对照组(26例),前列腺癌非骨转移组(16例)、骨转移组(24例)作为实验组。对每组血清 BGP、ALP 水平进行检测及通过 SPECT 扫描仪进行骨扫描。分别将对照组与实验组、实验组中前列腺癌组与骨转移组进行比较分析。结果:1、有转移组,无转移组和对照组之间比较, $P < 0.05$, 各组之间差异有统计学意义; 2、利用 ROC 曲线,确定 BGP 的最佳诊断前列腺癌骨转移的诊断值(29 ng/ml); ALP 的最佳诊断值(110 u/l); 3、血清 BGP、ALP 与 SPECT 在前列腺癌骨转移吻合度比较显示 2 种方法的诊断结论吻合度一般。结论:测定血清 BGP 与 ALP 水平及联合 SPECT 检测在前列腺癌骨转移的诊断中,具有一定的临床价值。

[关键词] 骨钙素(BGP); 碱性磷酸酶(ALP); 前列腺癌; 骨转移;

The diagnostic value of combined detection Serum BGP, ALP with SPECT in the bone metastases of prostate cancer

Yongbin Wang¹, Zhiyong Deng¹, Tao Hong²

¹Department of nuclear medicine, the tumor hospital of Yunnan province, 650118, China

²Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd. 518000

[Abstract] **Objective:** To explore the value and clinical significance of the combined detection of serum Bone Gla-containing Protein (BGP), alkaline phosphatase (ALP) and SPECT in the bone metastases of prostate cancer. **Methods:** Randomly selected from health physical examination as a control group (26 cases), 40 cases of prostate cancer patients were divided into bone metastases group (24 cases) and non-metastases group (16 cases) by radionuclide bone imaging. Combined detection Serum levels of BGP, ALP with SPECT in control group and experiment group. The expression levels of BGP, ALP and SPECT were analyzed, so as to compare and evaluate the diagnostic effectiveness of individual and combined detection for this disease. **Results:** (1) The control group compared with experimental group ($P < 0.05$); (2) Using ROC curve, determine the best diagnostic value of BGP of prostate cancer bone metastases (29 ng/ml), the best diagnostic value of ALP (110 u/l); (3) The results that inoculation comparison of serum BGP and ALP and SPECT in prostate cancer bone metastases shows two methods of diagnosis alignment were general. **Conclusion:** Serum BGP and ALP in the diagnosis of prostate cancer bone metastasis has a certain clinical value.

[Key words] BGP; ALP; prostate cancer; bone metastases

前列腺癌是威胁老年男性最常见的恶性肿瘤,随着饮食变化、人口寿命延长,前列腺癌的发病率和死亡率均呈上升趋势^[1]。前列腺癌早期多无症状,发现时多为进展期。有报道^[2],前列腺癌在初诊时有 24%~35%发生转移,其中 70%~80%为骨转移。骨转移不仅影响患者生活质量,还会缩短生存期,因此早期诊断前列腺癌骨转移极为重要。目前,前列腺骨转移诊断主要通过 SPECT 骨扫描、PET、MRI、病理活检确诊。但这些方法存在有辐射、费用高、主观性大、容易漏诊等的局限性。前列腺癌发生骨转移时,骨代谢也发生变化,导致骨代谢标志物血清骨钙素(Bone Gla-containing Protein, BGP)、碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)等水平的明显变化,因此本文旨在通过实验室定量检测 BGP、ALP 水平,分析该两项指标在前列腺癌骨转移中的诊断价值。

1 方法与对象

1.1 实验对象

1.1.1 前列腺癌组

随即抽取 2015 年 4 月到 2015 年 10 月在昆明医科大学第三附属医院泌尿外科收治的前列腺癌 40 例,平均年龄 72.21 岁。确诊标准:病理检查报告诊断为前列腺癌。排除标准:①代谢性内分泌疾病;②外伤性骨折;③近 4 周接受钙剂、二磷酸盐治疗;④严重肾病和肝病。

1.1.2 骨转移组

临床诊断标准为 SPECT^{99m}Tc-MDP 骨显像发现有骨转移。

1.1.3 实验对照组

随即抽取我院健康体检者，排除儿童及青少年骨质发育较快的健康人群。

1.2 方法

1.2.1 标本采集:

患者入院后第二天晨起采集外周静脉血 3ml (用血清管)。避免严重乳糜、溶血等情况。

1.2.2 血清 BGP 检测

采用新产业全自动化学发光仪 Maglumi 4000, 以及配套 BGP 检测试剂。再检测前进行精密度、线性范围、灵敏度、正确度的性能验证, 确保检测患者的 BGP 数据准确可靠。质控品为该公司生产的质控品。血清 BGP 参考范围: 3-48 ng/ml。每次检测严格按照标准操作规程进行, 质控合格。

1.2.3 血清 ALP 检测

采用我院罗氏全自动生化仪器及配套 ALP 试剂, 严格按照 SOP 操作文件执行, 质控为随仪器配套质控, 每天质控合格, 方可检测患者血清。血清 ALP 参考范围: 45-125U/L。

1.2.4 ^{99m}Tc-MDP 骨显像检查

严格按照核医学科放射性核素操作规程进行淋洗、标记、配药, 确保给药的 ^{99m}Tc-MDP 的放射性活度 >20mci; 注射显像剂时, 选择较好的肘部静脉, 确保一次注射成功。待 2 小时代谢后, 进行骨扫描, SPECT 扫描仪器为西门子生产的 e.cam, 采集条件为低能高分辨率准直器, ^{99m}Tc 发生器为中国原子高科提供, MDP 由北京新思科提供, 各显像剂均在有效期内。

2 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理分析。血清 BGP 水平为偏态分布数据, 各组血清 BGP, ALP 值用 M (P5-P95) 表示, 各组间 BGP、ALP 值差异性比较采用 Mann-Whitney U 检验; 各组阳性率比较采用 X² 检验。BGP、ALP 与 SPECT 骨扫描的一致性分析, 采用 Kappa 一致性检验, 以 K>0.7 认为吻合度较强; 0.7>K>0.4 吻合度一般; K<0.4 吻合度较弱。检验水准以 P<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 入选患者各组 BGP、ALP 检测结果

在 40 例前列腺癌中, SPECT 诊断有骨转移 24 例, 无转移 16 例, 实验对照组 26 例。血清 BGP、ALP 检测结果 (见表 1)。

表 1: 血清 BGP、ALP 在前列腺癌和正常健康人群结果

组别	例数	BGP [ng/ml. M(P5-P95)]	ALP [u/l. M(P5-P95)]
前列腺癌无骨转移	16	22.9 (7.24—45.96)	95 (741-115.9)
前列腺癌有骨转移	24	48.27 (26.66—68.38)	237.2 (70.0-404.5)
对照组	26	13.88 (6.69—17.65)	66.5 (50.38-82.16)

有转移组, 无转移组和对对照组之间比较, P<0.05, 各组之间差异有统计学意义。

3.2 BGP、ALP 在前列腺癌骨转移中 ROC 曲线 (见图 1):

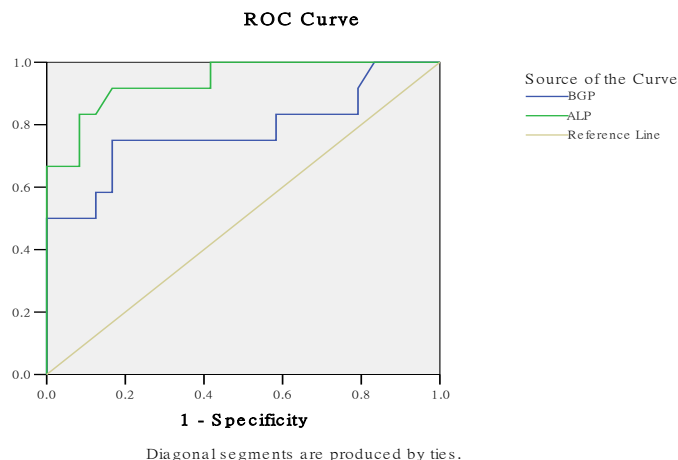


图 1: BGP、ALP 在前列腺癌骨转移中 ROC 曲线截断值

BGP 的 ROC 曲线面积: 0.69; ALP 的曲线面积为: 0.911。利用 ROC 曲线, 确定 BGP 的最佳诊断前列腺癌骨转移的诊断值为: 29 ng/ml; ALP 的最佳诊断值为: 110u/l。

3.3 前列腺癌患者血清 BGP、ALP 与 SPECT 的相关性

通过 ROC 曲线所确定的最佳前列腺癌骨转移诊断值: 即 BGP>29ng/ml 为阳性, ALP>110u/l 为阳性, 比较与 SPECT 的相关性 (见表 2、表 3)。

表 2: 血清 BGP 与 SPECT 在前列腺癌骨转移吻合度比较

BGP	SPECT		合计
	阳性	阴性	
阳性	14	5	19
阴性	4	17	21
合计	18	22	40

通过 kappa 一致性检验, $P=0.132 (>0.05)$, $K=0.548 (>0.4)$ 。提示 2 种方法没有显著性差异, 这 2 种方法的诊断结论吻合度一般。

表 3: 血清 ALP 与 SPECT 在前列腺癌骨转移吻合度比较

ALP	SPECT		合计
	阳性	阴性	
阳性	17	3	20
阴性	2	18	20
合计	19	21	40

通过 kappa 一致性检验, $P=0.302 (>0.05)$, $K=0.648 (>0.4)$ 。提示 2 种方法没有显著性差异, 这 2 种方法的吻合度一般。

4 讨论

前列腺癌是老年男性泌尿系统高发肿瘤, 随着我国老龄化越发突出, 前列腺癌的发病率将会逐步增加。前列腺癌容易发生骨转移, 主要原因是: 在前列腺与低位腰椎之间存在一条静脉系统, 它具有压力低、容积大, 癌细胞

易沿着该静脉血流转移至脊柱,并通过交通静脉转移至其他部位^[3]。而骨转移容易并发骨痛、病理性骨折、脊髓压迫等特点为成骨性病变,临床上可出现疼痛、病理性骨折、脊髓压迫、高血钙,导致患者生活质量严重下降。现行前列腺癌骨转移诊断方法主要是通过影像检查,但存在很多不足:SPECT扫描虽为全身性检查,但其灵敏度差,早期骨转移以及单个浓聚灶诊断准确性差^[4-5]。同时还是一个有辐射的检查,对于造血功能不佳及对放射性核素^{99mTc-MDP}有过敏的患者不能检查。MRI或CT在诊断骨转移时有一定的准确性,但是检查费用昂贵,并且一般不做全身骨扫描,这些也限制了MRI或CT在骨转移方面的使用。病理活检作为诊断骨转移的金指标,但为有创性,且受穿刺部位影响较大,并对操作者要求较高。骨转移发生时,骨代谢生化指标的改变早于影像学所发现的形态学改变,通过准确检测出血清中的骨代谢标志物来弥补影像学在诊断骨转移的不足,有着较高的临床价值^[6]。

骨钙素(Bone Gla-containing Protein, BGP)是成骨细胞合成并分泌,代表成骨细胞活性的标志物,特别是新形成的成骨细胞的活动状态,骨骼中最丰富的非胶原蛋白,是维生素K依赖型,由49aa组成,分子量5800d。骨钙素值随年龄的变化以及骨更新率的变化而不同。完整的骨钙素在外周血中不稳定,血清中BGP在室温放置1小时,会大量分解,羧基端天冬氨酸43-44位(ASP43-ASP44)间的氨基酸易被蛋白酶水解,裂解下来的N端中分子(N-MID)具有良好的稳定性,因此在选择检测BGP时需要能同时检测全段BGP(1-49aa)和N-MID端(1-43aa)^[7]。本研究发现,与健康对照组相比,前列腺癌骨转移组BGP水平明显高于无转移组和对照组各组之间 $P < 0.05$,这与其他研究结论一致^[8-9]。在这36位前列腺癌患者研究过程中,发现有3位骨转移患者其BGP较低 $< 5\text{ng/ml}$,而SPECT骨扫描发现有广泛骨转移,同时血清ALP结果 $> 120\text{u/l}$,分析可能与标本采集到检测时间过长,造成血清中BGP分解,导致结果较低。因此对于BGP检测的分析前质量控制提出较高的时间要求。

碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)是较早用来研究前列腺癌的生化指标之一,有6个同工酶,血清中的ALP分别来自肝脏、骨骼、胎盘和小肠,当骨骼疾病发生时,血清ALP-3既BAP会增高。血清中的碱性磷酸酶被认为是反映成骨的代谢活性^[10]。本次研究发现ALP在前列腺癌发生骨转移前后变化较大, $P < 0.01$,结论与其他研究基本一致^[11],同时通过ALP的ROC骨转移诊断曲线,当ALP $> 110\text{u/ml}$ 时,发生骨转移可能性增高,这与Wymenya^[12]等研究的ALP $> 90\text{u/l}$ 有差别,分析认为:90u/l作为最佳诊断值可提高前列腺癌骨转移的灵敏度,但特异度不佳;同时2种检测ALP的方法学、溯源性可能有差异。同时,ALP与SPECT在前列腺癌骨转移有较好的相关性, $K = 0.648$ 。总之,血清BGP与ALP在前列腺癌骨转移的诊断中,具有一定的临床价值,值得推广。

参考文献

- [1] 王东华,刘竞鹏.前列腺癌流行病学研究[J].中华现代临床医学杂志,2009,37(12):394-396.
- [2] 恶性肿瘤骨转移及骨相关疾病临床诊疗专家共识专家组.前列腺癌骨转移临床诊疗专家共识,2008版.
- [3] Van denouden D, Schroder FH. Management of locally advanced prostate Cancer staging, natural history and results of radical surgery[J].world J urol,2000,18(3):194.
- [4] Palvolgyi R,Daskivich T J,Chamie K, et al. Staging of prostate cancer: an analysis of a veterans affairs cohort[J].Urology, 2011,77(6):1330-1336.
- [5] Briganti A,Passoni N,Ferrari M,et al.When to perform bone scan in patients with newly diagnosed prostate cancer: external validation of the currently available guidelines and proposal of a novel risk stratification tool[J].Eur Urol,2010,57(4): 551-558.
- [6] 钱志平,程容,何玉琪.血清B-CTX和BGP联合应用在乳腺癌骨转移诊断中的意义[J].放射免疫学杂志,2012,25(1): 82-83.
- [7] 江莎,侯加法.骨钙素临床应用研究进展[J].中国骨质疏松杂志, 2010,16(5):360-364.
- [8] 颜宏华,毛达勇,吴立斌.血浆钙调节激素和骨生化标志物与癌症骨转移的关系研究[J].中国骨质疏松杂志,2010, 16(8):550-552.
- [9] 钟敏钰.血清骨钙素检测在女性肿瘤骨转移患者诊治中的临床意义[J].中国卫生检疫杂志,2013,23(5):1225-1227.
- [10] 毛金磊,陈宇琼,何薇.探讨初诊前列腺癌骨转移风险的预测指标[J].标记免疫发现与临床,2014,21(4):390-393.

- [11] 李建,巫骏川,陈爽,等.前列腺癌骨转移患者血清 PSA、ALP 及 ICTP 的表达及临床意义[J].中国实验诊断学杂志, 2012, 16(12):2234-2236.
- [12] Wymenga LF,Boomsma JH,Groenier K,et al.Routine one scans in patients with prostate cancer related to serum prostate-specific antigen and alkaline phosphatase[J].BJU Int,2001,88(3):226-230.

作者简介: 王永斌(36岁)、男(汉族)、硕士研究生、主管检验师、主要从事放射免疫分析(11年)

Email: 13759115035@139.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

血清 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、胃蛋白酶原联合检测对早期胃癌诊断的意义

蓝成娟

合浦县人民医院核医学科

[摘要] 目的: 探讨联合测定血清癌胚抗原(CEA)、糖类抗原(199、242、50、724)及胃蛋白酶原(PG)对早期胃癌诊断的临床意义。**方法:** 采用化学发光法分别对 25 例弥漫型胃癌患者(胃癌组)、60 例慢性萎缩性胃炎(CAG组)、70 例健康体检者(对照组)血清中 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、PG I、PG II 水平进行了检测,并计算 PG I / PG II (PGR 值),观察胃癌组患者各项水平与慢性萎缩性胃炎、健康对照组的差异,通过 ROC 曲线计算各指标的敏感性和特异度。**结果:** 胃癌组与健康体检对照组比较 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、PG I、PG II、PG I / PG II 均有显著差异,而 CAG 组与健康对照比较仅 PG I、PG II、PG I / PG II 有显著差异,七项联合检测时敏感度和特异度分别为 96.0% 和 82.9%。**结论:** CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、胃蛋白酶原的联合检测对胃癌的早期发现具有重要的临床诊断意义。

[关键词] 早期胃癌; 癌胚抗原; 糖类抗原; 胃蛋白酶原

Clinical value of combined detection of serum CEA, CA19-9, CA24-2, CA50, CA72-4 and pepsinogen in diagnosis of early gastric cancer

[Abstract] Objective: To compare the clinical significance of combined detection of serum carcino-embryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens (CA19-9, CA24-2, CA50 and CA72-4) and pepsinogen in the diagnosis of patients with gastric cancer. **Methods:** The levels of serum CEA, CA19-9, CA24-2, CA50, CA72-4 and type I pepsinogen (PG I), type II pepsinogen (PG II), PG I / PG II ratio in patients with gastric cancer (gastric group, n = 25), gastritis (chronic atrophic gastritis group, n = 60) and healthy people (control group, n = 70) were detected respectively. **Results:** In comparison with healthy controls, the serum levels of CEA, CA19-9, CA24-2, CA50, CA72-4 and pepsinogen in gastric cancer were significantly discrepancy, At the same time, In comparison with healthy controls only the type I pepsinogen (PG I), type II pepsinogen (PG II), PG I / PG II ratio in chronic atrophic gastritis group were significantly discrepancy, their difference was statistically significant (P < 0.05). The level of sensitivity of combined detection was 96.0%, the level of specificity of combined detection was 82.9%. **Conclusion:** Combined detection of CEA, CA19-9, CA24-2, CA50, CA72-4 and type I pepsinogen (PG I), type II pepsinogen (PG II), PG I / PG II ratio shows a great clinical significance in the diagnosis and efficacy observation of patients with early gastric cancer.

[Key words] Early gastric cancer; Embryonic antigen; Carbohydrate antigens; Pepsinogen

在世界范围内,胃癌的发病率和死亡率均较高,如果能早期筛查发现,肿瘤能在可治疗阶段进行早期干预,就可以降低肿瘤的死亡率^[1]。胃癌的筛查越来越成为国际消化学界关注的焦点^[2]。目前,胃癌的诊断主要还是依靠胃镜、病理检查^[3],虽然近年来关于的胃癌的血清标志物得到了很大的发展,但还没有得到临床公认的胃癌早期血清学筛查准确有效且便捷的检测组合^[4],为此本文采用化学发光法分别对弥漫型胃癌患者(胃癌组)、慢性萎缩性胃炎(CAG组)、健康体检者(对照组)血清中 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、PG I、PG II 水平进行了检测,探讨联合测定血清癌胚抗原(CEA)、糖类抗原(199、242、50、724)及胃蛋白酶原(PG)对早期胃癌的诊断的临床意义。

1 对象与方法

1.1 对象

随机选取 2013 年 1 月~2015 年 8 月我院经胃镜及病理检查确诊的弥漫型胃癌患者 25 例(男 17 例,女 8 例),平均年龄为(54.6±7.5)岁;慢性萎缩性胃炎 40 例(男 25 例,女 15 例),平均年龄(52.3±6.8)岁、健康体检者 70 例(男 40 例,女 30 例)为经胃镜检查后确认的正常者,平均年龄(35.4±12.2)岁。各组患者在性别、年龄、临床反馈等方面比较差异无统计学意义(P>0.05),具有可比性。

1.2 实验方法

三组研究对象均取清晨空腹静脉血 4 至 5 mL,离心、分离血清,-20℃保存。采用化学发光法(深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供仪器及配套试剂)对血清中 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、PG I、PG II 水平进行了检测。正常值范围:癌胚抗原(CEA)<5.093ng/ml,糖类抗原 199(CA199)<37IU/ml,糖类抗原 50(CA50)<25IU/ml,糖类抗原 242(CA242)<20IU/ml,糖类抗原 724(CA724)<6IU/ml,胃蛋白酶原(以 PG I <70ng/ml,并且 PG I/PG II 比值<3 作为诊断界值^[1])。

1.3 统计学处理应用

SPSS 13.0 统计软件对所得数据进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,通过 Excel 进行数据录入和整理,然后用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料用 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 检测结果

胃癌组患者血清 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 水平平均高于正常对照组及慢性萎缩性胃炎(CAG 组),差异有统计学意义(P<0.05);而慢性萎缩性胃炎(CAG 组)与健康对照组项目 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 水平差异无统计学意义(P>0.05)。如表一所示:

表 1 血清 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 检测结果

组别	n	CEA	CA199	CA242	CA50	CA724
健康对照组	70	2.21±1.65	11.65±7.34	9.33±4.80	9.67±5.89	3.65±2.21
CAG 组	40	2.31±1.43	14.76±6.31	13.41±6.69	15.89±11.32	4.83±2.73
胃癌组	25	9.84±3.47*	32.45±16.87*	28.94±11.05*	34.41±12.48*	11.62±6.34*

与健康对照组项目,*P<0.05。

2.2 三组间 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 表达阳性率比较

胃癌组 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 的表达阳性率分别为 28%、24%、28%、36%、28%,而健康对照组的表达阳性率明显低了很多,差异有统计学意义(P<0.05),并且胃癌组比慢性萎缩性胃炎(CAG 组)的表达率要高。由此可见,就整体而言,由此可见,从总体上而言,胃癌患者以及慢性萎缩性胃炎患者的 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 的血清浓度会有不同程度的升高,这也是其作为肿瘤标志物的基础。如表 2 所示。

表 2 三组 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 的阳性率比较(%)

组别	n	CEA	CA199	CA242	CA50	CA724
健康对照组	70	7.15(5/70)	8.57(6/70)	10.00(7/70)	5.71(4/70)	4.29(3/70)
CAG 组	40	15.00(6/40)	10.00(4/40)	12.5(5/40)	10.00(4/40)	17.50(7/40)
胃癌组	25	32.00(8/25)	44.00(11/25)	40.00(10/25)	48.00(12/25)	52.00(13/25)

2.3 血清 PG I、PG II、PG I/PG II (PGR) 检测结果

慢性萎缩性胃炎(CAG 组)、胃癌组患者血清的 PG I、PG I/PG II (PGR) 水平平均显著低于正常对照组,差异有统计学意义(P<0.05);而慢性萎缩性胃炎(CAG 组)与胃癌组患者血清的 PG I、PG II、PG I/PG II (PGR) 水平差异无统计学意义(P>0.05)。如表 3 所示

表 3 三组血清 PG I、PG II、PG I/PG II (PGR) 检测结果

组别	n	PG I	PG II	PG I /PG II
健康对照组	70	130.45 ±35.75	12.31 ±4.27	10.21 ±2.54
CAG 组	40	65.67 ±17.84	18.32 ±5.36	3.12 ±0.69
胃癌组	25	58.76 ±20.98	18.94 ±4.83	2.89 ±0.77

2.4 胃癌患者血清中 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 及胃蛋白酶原单检与联合检测结果比较。本研究发现单项的 CA724 对胃癌的特异度最高，而 PG I 及 PG I /PG II 对胃癌的灵敏度最高，七项联合检测可以显著提高灵敏度，达到 96.0%，而相应的特异度为 82.9%，如表 4 所示。

表 4 联合检测的特异度与灵敏度

	CEA	CA199	CA242	CA50	CA724	PG I 及 PG I /PG II	七项联合检测
特异度	92.8	91.4	90.0	94.3	95.71	90.1	82.9
灵敏度	32.0	44.0	40.0	48.0	52.0	89.2	96.0

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一，严重影响人类身体健康^[5]。目前已被证实幽门螺旋杆菌感染(H.pylori)、遗传因素、饮食、环境等因素是胃癌发生的主要病因^[6-8]。各种影像学技术已广泛应用于胃癌诊断^[9]。然而，早期胃癌及癌前变化通常在影像学中无特异度表现，确诊率较低，常较易被忽视^[10]。因此需求一种血清学的检测组合尽早及时的发现早期胃癌显得尤为重要。本文对三组人群(弥漫型胃癌患者、慢性萎缩性胃炎、健康体检者)中血清CEA、CA199、CA242、CA50、CA724、胃蛋白酶原进行联合检测，发现相比健康体检人群，胃癌患者以及慢性萎缩性胃炎患者的 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 的血清浓度会有不同程度的升高，特别是结合 PG I 及 PG I /PG II 的检测，发现慢性萎缩性胃炎(CAG组)、胃癌组患者血清的 PG I、PG I /PG II (PGR) 水平均显著低于正常对照组，差异有统计学意义。由于慢性萎缩性胃炎是胃癌发展前的一种病变^[11]，通过对 PG I 及 PG I /PG II (PGR) 的检测，显示慢性萎缩性胃炎患者，血清 PG I 急剧下降，PG II 维持不变，导致 PG I /PG II 比值更大幅度降低，以 PG I <70ng/ml，并且 PG I /PG II 比值 <3 作为临界值可以很好的诊断萎缩性胃炎，因此胃蛋白酶原的检测对胃癌的早期筛查具有重要的临床意义。而 CEA、CA199、CA242、CA50、CA724 及胃蛋白酶原的联合检测可以显著提高胃癌筛查的灵敏度，达到 96.0%，而相应的特异度为 82.9%，因此该组合检测对临床的早期胃癌筛查具有一定指导意义。

参考文献

- [1] 廖专, 孙涛, 吴浩, 等. 中国早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见(2014年4月长沙)[J]. 胃肠病学, 2014(07):408-427.
- [2] Yang Z, Guo X, Li Get al. Long noncoding RNAs as potential biomarkers in gastric cancer: Opportunities and challenges[J]. Cancer Letters, 2016, 371(1):62-70.
- [3] Sollini M, Calabrese L, Zangheri B, et al. 18F-FDG PET/CT versus bone scintigraphy in the follow-up of gastric cancer[J]. Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular, 2016, 35(2):121-123.
- [4] Yang A, Liu J, Lei H, et al. CA72-4 combined with CEA, CA125 and CA19-9 improves the sensitivity for the early diagnosis of gastric cancer[J]. Clinica Chimica Acta, 2014, 437:183-186.
- [5] 早期胃癌筛查及内镜诊治共识意见[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2014(10):1261.
- [6] 陈清波, 王洪波, 徐明焱, 等. 慢性胃病伴肠上皮化生、胃癌与幽门螺旋杆菌感染的关系[J]. 实用癌症杂志, 2010(02):169-171.
- [7] 欧阳红娟, 姜浩, 黄卫国, 等. 幽门螺旋杆菌感染、MMP-1 及 MMP-10 蛋白表达与胃癌侵袭转移关系研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010(01):22-26.
- [8] 刘爱群, 葛莲英. 幽门螺旋杆菌感染与胃癌变相关基因研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010(09):1860-1862.
- [9] 所剑, 王大广, 刘泽锋. 早期胃癌诊断和治疗[J]. 中国实用外科杂志, 2011(08):717-719.
- [10] 杭佑宝. 胃癌相关肿瘤标志物的现状和研究进展[D]. 蚌埠医学院, 2012.
- [11] Gao L, Weck M N, Nieters A, et al. Association between a pro-inflammatory genetic profile and the risk of chronic atrophic gastritis among older adults from Germany[J]. European Journal of Cancer, 2009, 45(3):428-434.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 的基因克隆、原核表达

滕昆* 阳艳华 沈超 肖佳民 齐文闯 周燕娟

桂林优利特医疗电子有限公司

[摘要] 目的: 构建 NGAL 原核表达载体并表达、纯化、鉴定目的蛋白。方法: 根据 GenBank 报道的人 NGAL 基因序列, 采用 RT-PCR 技术从人肝脏组织总 RNA 中获得 cDNA, 经 PCR 获得 NGAL 基因片段。将测序正确的目的基因克隆至 pSE380 载体中, 连接产物转化 E.coliBL21。诱导重组菌表达目的蛋白, 经镍柱亲和层析法纯化并进行 Western blotting 鉴定。结果: 测序结果证实克隆的目的基因序列与 GenBank 中的 NGAL 序列相符。SDS-PAGE 结果显示获得分子量约为 23kDa 的可溶性目的蛋白, Western blotting 结果显示目的蛋白可与 NGAL 抗体发生特异性反应。结论: 在大肠杆菌中获得了人 NGAL 蛋白的可溶性表达。

[关键词] 中性粒细胞; 基因克隆; 原核表达; 诊断标志物

Gene clone and prokaryotic expression of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Teng Kun*; Yang Yanhua; Shen Chao; Xiao Jiamin; Qi Wenchuang; Zhou Yanjuan

[Abstract] Objective: To construct NGAL prokaryotic expression vector and express, purify and identify the target protein.

Method: According human NGAL gene sequence detected from Genbank, this research obtained cDNA from total RNA of human liver tissue by RT-PCR, and obtained target gene by PCR. The target gene sequenced correctly was cloned into expression vector pSE380, ligation production was imported into E.coliBL21. The recombinant strain was induced to express target protein, which was purified by Ni-NTA affinity chromatography and identified by western blotting. **Result:** Sequencing data verified that target gene sequence cloned was conform to NGAL sequence in Genbank. SDS-PAGE showed a relative molecular weight of the soluble target protein was about 23kDa, and Western blotting showed specific reaction of it with NGAL antibody. **Conclusion:** Obtaining human NGAL protein in a soluble form from Escherichia coli.

[Key words] Neutrophil; Gene clone; Prokaryotic expression; Diagnostic marker

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin,NGAL), 是过去几年中对世界医学有很大贡献的 lipocalin 家族的成员之一, 由 Kjeldsen 等在 1993 年研究人类中性粒细胞时发现^[1]。随后, NGAL cDNA 及全基因序列分别于 1994 年和 1997 年被克隆鉴定^[2-3]。多年来, 对 NGAL 的蛋白空间结构研究也进一步明确了其生物学功能, 特别是以此为基础的各种临床研究, 也越发显示出 NGAL 在各种疾病中的价值。NGAL 参与了多种疾病的发生发展, 是肾脏疾病、肿瘤、炎症等多种疾病的一个新型敏感的生物标志物。本研究利用基因工程技术构建稳定、高效表达人 NGAL 的基因工程菌, 获得高纯度的 NGAL, 为进一步开发 NGAL 免疫诊断试剂盒奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒

克隆宿主 E.coliDH5 α 和表达宿主 E.coliBL21 为本实验室保存; 克隆载体 pMD20 为 TaKaRa 公司产品, 表达载体 pSE380 为本实验室保存。

1.1.2 试剂

RNA 提取试剂盒、小量质粒提取试剂盒、逆转录酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 均购自 TaKaRa 公司; IPTG 购自 Sigma, 兔抗人 NGAL 多抗购自诺唯赞生物, HRP 标记羊抗兔 IgG 多抗购自 Sigma, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 目的基因的克隆

提取人肝脏组织总 RNA, 采用随机引物进行逆转录, 合成 cDNA。设计上游引物

CGGGATCCCACCATCATCATCATCAGGACTCCA, 下游引物 CGGAATTCTCAGCCGTCGATA (下划线处为限制性酶切位点, 斜体为 6×His 标签), 以 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 ngal 基因, 扩增条件为 94℃3min, 94℃30s, 57℃30s, 72℃1min; 回收 PCR 产物, 用 T4 连接酶将回收产物并与克隆载体 pMD20 于 16℃连接过夜, 转化克隆宿主 E.coliDH5α, 涂布于含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上, 37℃倒置培养 16-20h。挑取白色单菌落于含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃振荡培养 12h 后提取质粒, 用 EcoRI 和 BamHI 进行双酶切鉴定并将鉴定结果正确的样品送上海生工公司测序。

1.2.2 重组质粒的构建

将测序结果正确的 pMD20-ngal 用 EcoRI 和 BamHI 双酶切, 胶回收纯化目的片段。表达载体 pSE380 经相同酶切处理, 胶回收纯化。用 T4DNA 连接酶将目的片段与表达载体 pSE380 于 16℃连接过夜, 转化表达宿主 E.coliBL21, 涂布于含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上, 37℃倒置培养 16-20h。

1.2.3 重组菌 E.coli BL21/pSE380-ngal 的诱导表达

挑取 E.coliBL21 转化平板上的单菌落接入 5mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃振荡培养过夜。次日将种子液按 2% 转接至 200mL 含 100μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4-0.6 时加终浓度为 0.5mM 的 IPTG, 25℃诱导表达 10h。

1.2.4 表达产物分离和纯化

10000rpm 4℃离心 10min 收集菌体, 洗涤 2 次后用缓冲液 (50mM Na₂HPO₄、500mM NaCl、10mM Imidazole) 重悬。冰上超声破碎菌体, 工作 5s, 间歇 10s, 超声总时间 10min。12000rpm 4℃离心 30min, 上清即为目的蛋白粗提物。通过 SDS-PAGE 对目的蛋白的表达情况和可溶性进行分析。蛋白粗提物经 0.22μm 微孔滤膜过滤后通过镍柱亲和层析纯化。

1.2.5 表达产物 Western blotting 鉴定

将纯化的目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 转至 PVDF 膜, 2% 脱脂奶粉室温封闭 1 小时, 经 PBST 3 次洗涤后加入 1:1000 兔抗人 NGAL 多抗, 室温孵育 1 小时, PBST 洗涤 4 次, 再加入 1:20000 HRP 标记羊抗兔 IgG 多抗, 室温孵育 1 小时, PBST 洗涤 5 次后 ECL 法曝光, 胶片显影。

2. 实验结果

2.1 目的基因的扩增

根据 1.2.1 设计的引物进行目的基因的扩增, 在 1% 琼脂糖凝胶上对扩增产物进行电泳分析 (见图 1), 结果表明扩增的目的片段大小为 550bp 左右, 与预期结果相符合。

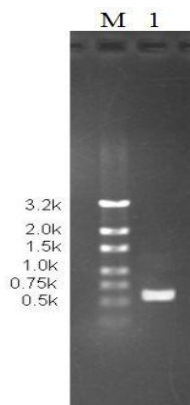


图 1 PCR 扩增产物

Fig.1 The PCR production

Lane M: W2003 Marker Lane 1: PCR products of ngal

2.2 重组质粒 pSE380-ngal 的酶切验证

将重组质粒 pSE380-ngal 用限制性酶 EcoRI 和 BamHI 进行酶切后, 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳验证 (图 2)。结果表明重组质粒 pSE380-ngal 经限制性内切酶 EcoRI 和 BamHI 双切酶后, 呈现出两条不同大小的条带, 大小分别约

为 4400bp 和 550bp，与预期相符，说明目的基因片段已与表达载体连接上。

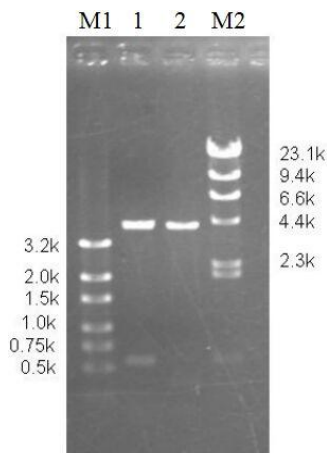


图 2 重组质粒 pSE380-ngal 的酶切验证

Fig2 Recombinant plasmid pSE380-ngal digested with EcoRI and BamHI

Lane M1:W2003 Marker

Lane M2: λ DNA/HindIII Marker

Lane 1: pSE380-ngal digested with EcoRI and BamHI

Lane 2: pSE380 digested with EcoRI and BamHI

2.3 目的基因的表达和纯化

重组菌经 IPTG 诱导后,将目的蛋白粗提物和经过镍柱亲和层析纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析,SDS-PAGE 结果如图 3 所示。从图中可知,目的基因在大肠杆菌中获得可溶性表达,分子量约为 23kDa,与预期结果相符合。经镍柱亲和层析纯化的重组蛋白只有一条明显的蛋白条带,纯度可满足下一步研究分析。

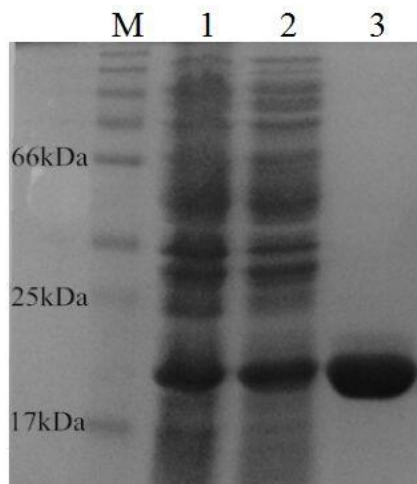


图 3 目的蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.3 Analysis of SDS-PAGE to the target protein

Lane M: Protein Marker

Lane 1: Total protein of recombinant strain E.coli BL21/pSE380-ngal

Lane 2: Soluble protein of recombinant strain E.coli BL21/pSE380-ngal

Lane 3: Target protein purified by nickel column

2.4 表达产物 Western blotting 鉴定

表达产物经 SDS-PAGE,转移至 PVDF 膜,能与相应 NGAL 多抗发生特异性反应形成单一蛋白条带,证明表达纯化的目的蛋白即为 NGAL 蛋白。

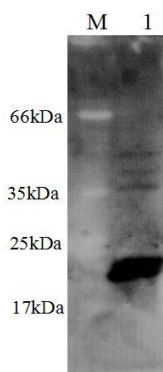


图4 目的蛋白的 Western blotting 分析

Fig.4 Analysis of Western blotting to the target protein

Lane M: Protein Marker

Lane 1: Total protein of recombinant strain E.coli BL21/pSE380-ngal

3 讨论

以往的研究表明, NGAL 与炎症、胚胎发育、免疫应答、趋化作用、信号转导以及多种肿瘤的发生与发展等过程密切相关^[4]。NGAL 在乳腺癌、食管癌、结肠直肠癌、胃癌、慢性粒细胞性白血病等细胞系中均过表达, 并在癌细胞的浸润与不良分化中发挥重要的作用^[5-6]。这些研究结果提示, NGAL 基因可能是人类的一个重要的癌基因。进一步研究证实, NGAL 是多种原因引起的肾损伤的一个保护因素并且由于分子量小, 对蛋白酶有天然的抗性, NGAL 在肾脏损伤后很快聚积, 在尿液中出现早, 可作为急性肾衰的诊断标记物, 是有效评价急性肾衰临床治疗效果及预后的良好指标。

目前, NGAL 作为新型急性肾脏损伤标志物, 在临床应用上: 可作为急性肾损伤早期诊断标志物, 研究表明肾脏急性损伤后约 2 小时就能在尿中检测到 NGAL, 而检测出血肌酐明显改变要等到 3-4 小时后, 同样在肾脏急性缺血再灌注损伤后 3 小时在尿液和血清中也能检测到 NGAL。NGAL 可用于急性肾损伤的分期和疾病的标准化管理, 可用于慢性肾脏疾病损伤严重程度监测及肾脏治疗和间接治疗的疗效指标。本研究在原核重组表达了 NGAL 的基础上, 将进行多克隆、单克隆抗体的制备, 进而开发胶乳增强比浊检测试剂盒及胶体金法检测试剂盒等产品。因此, 本研究为 NGAL 免疫诊断试剂盒的开发奠定了扎实的基础。

参考文献

- [1] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(14):10425-10432.
- [2] Bundgaard JR, Sengelov H, Borregaard N, et al. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding NGAL: a lipocalin expressed in human neutrophils[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 202(3):1468-1475.
- [3] Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans[J]. *Genomics*, 1997, 45(1):17-23.
- [4] 马玉国, 赵红丽, 任秀华, 等. 急性肾损伤的检测指标 NGAL 的研究进展. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(14):1842-1844.
- [5] Shi HY, Gu J, Yang LX, et al. Lipocalin 2 promotes lung metastasis of murine breast cancer cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27:83.
- [6] Cho H, Kim JH. Lipocalin 2 expressions correlate significantly with tumor differentiation in epithelial ovarian cancer[J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57(5):513-521.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

幽门螺杆菌的检出率、携带率及其毒力基因与临床特征相关性的研究

张艳梅¹, 胡玢婕¹, 赵付菊¹, 项平², 杨长青³, 方毅¹, 赵虎¹

1.复旦大学附属华东医院检验科, 2.复旦大学附属华东医院胃镜室, 上海 200040; 3.上海同济大学附属同济医院消化科, 上海 200065

[摘要] 目的: 了解本地区幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 简称 HP)的携带率, 并探究 HP 毒力相关基因与其临床特征的相关性。**方法:** 收集华东医院和上海同济医院胃粘膜活检样本, 分离培养 HP; 设计 HP 种属特异性基因 16Sr RNA 和 ureC 的特异性引物, 直接从胃粘膜活检样本检测 HP; 设计 10 种 HP 毒力基因的引物, 检测临床分离的 HP 菌株中携带的毒力基因, 并分析其与临床特征的相关性。**结果:** 从 514 例胃粘膜活检样本中分离出 129 株 HP, 阳性分离率为 25.1%。其中 31.4% 菌株对所有 4 种抗菌药物均敏感, 而 68.6% 的菌株至少对 1 种抗菌药物耐药。男性分离率较女性高, 壮年组 (30-49 岁) 分离率较其他年龄组高, 但差异不显示; 而溃疡组的分离率则显著高于较其他疾病组; 组织样本直接测序法的阳性检出率高于培养法同时发现 20 株菌株对两种抗菌药物耐药 (23.3%), 6 株对 3 种抗菌药物耐药 (7.0%)。与 CLA、MTZ、AMX 和 LEV 相关的主要耐药基因及其突变位点为 23S rRNA(A2143G), rdxA(C148T), pbp1A (A1777G) 和 gyrA (C261A/G)。**结论:** 上海地区 HP 对常用抗 HP 药物的耐药率高, 建议采用培养方法和体外药敏试验, 根据体外药敏试验结果, 选择敏感的抗菌药物根除 HP; 相关耐药基因的突变与耐药表型相关。

[关键词] 幽门螺杆菌; 耐药性; 基因突变

The study of the resistance of *Helicobacter pylori* and its related gene mutations ZHANG Yanmei¹, HU Binjie¹, ZHAO Fujun¹, XIANG Pin², YANG Changqing³, FANG Yi¹, ZHAO Hu¹. (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Endoscopy, Huadong Hospital affiliated to Fudan University, Shanghai 200040 China; 3. Department of Gastroenterology, Tongji Hospital affiliated to Shanghai Tongji University, Shanghai 200065, China)

[Abstract] Objective: To study the resistance of *Helicobacter pylori* (HP) and explore the association between the resistance and the related gene mutations. **Methods:** Gastric mucosa biopsy samples were collected from Huadong and Tongji Hospital. HP was isolated from the clinical samples, and antibiotic susceptibility tests (AST) to clarithromycin (CLA), metronidazole (MTZ), amoxicillin (AMX) and levofloxacin (LEV) were detected using T-test. Meanwhile, the related gene mutations were detected using gene sequencing, and the association between the resistance and the gene mutations was analyzed. **Results:** 129 HP strains were isolated from 514 cases of gastric mucosa biopsy samples. Among them, 68.6% isolates were resistance to antibiotics, the resistance rate to CLA, MTZ, AMX and LEV was 19.8%, 57.0%, 0.0% and 29.1%, respectively, while double and triple resistance rates were 23.3% and 7.0%. The main resistance gene mutation loci were 23S rRNA/A2143G, rdxA/C148T, pbp1A/A1777G and gyrA/C261A/G. **Conclusion:** The resistance of HP was rather high in Shanghai area, and the drug susceptibility testing should become a standard practice during detection of HP to improve the eradication. Furthermore, Specific gene mutations were associated with antibiotics resistance.

[Key words] *Helicobacter pylori*; Resistance; Gene mutations

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 简称 HP), 是一种微需氧的螺杆菌^[1]。HP 感染与慢性活动性胃炎、消化性溃疡、胃癌和胃黏膜相关淋巴组织 (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT) 淋巴瘤的发生密切相关^[2]。

选用敏感的抗菌药物及时根治 HP 是预防与控制 HP 相关的胃十二指肠疾患的最佳方法^[3]。用于治疗 HP 感染的主要药物主要有克拉霉素 (CLA)、甲硝唑 (MTZ)、阿莫西林 (AMX) 和左氧氟沙星 (LEV) 等抗菌药物, 但是目前 HP 耐药现象日趋严峻, 严重影响其临床疗效和根除率^[4]。

为了解本地区 HP 对常用抗菌药物的耐药性, 并探究相关耐药基因与其耐药性的相关性, 本文采用 E-test 法检测从胃粘膜活检样本中分离培养出的 HP 菌株对常用抗菌药物的最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC), 并采用测序法检测这些临床分离菌株中耐药相关基因突变情况, 分析这些耐药基因突变与耐药的相关性。本研究为上海地区 HP 耐药的流行病学研究和临床治疗提供参考依据; 同时, 为基因突变与临床耐药表型的相关性研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本来源

收集 2014 年 9 月~2015 年 8 月华东医院和上海同济医院胃镜室采集的胃活检样本 514 例,其中男性患者 251 例,年龄 21~88 岁;女性患者 263 例,年龄 19~87 岁。

纳入标准: ①有消化不良等消化道症状者,消化不良的诊断采用 2007 年中华医学会消化分会胃肠动力组的定义^[5]: 临床表现为上腹部疼痛或烧灼感、餐后上腹饱胀和早饱感的症候群,可伴食欲不振、嗝气、恶心或呕吐等症状; ②行胃镜检查及胃黏膜活检; ③年龄不限,性别男女不限。

排除标准^[6]: ①内镜证实有活动性出血者; ②已接受 HP 根除治疗者; ③近 1 个月内曾经服用铋剂、质子泵抑制剂、H₂受体拮抗剂以及抗菌药物者; ④曾对本次治疗所用的药物有过敏史或皮试阳性患者; ⑤孕期及哺乳期患者; ⑥患者同时服用非甾体抗炎药(NSAID)或酗酒,或存在其他影响本研究评价的严重疾病,如严重的肝病、心脏病、呼吸系统疾病等; ⑦患者不能正确表达自己的主诉,如精神病、严重神经官能症及不能合作者。

在内镜直视下用灭菌活检钳取距幽门前 2~3cm 大弯或小弯处约 0.5cm×0.5cm 胃黏膜组织 1 块,置入 0.9% NaCl 溶液的离心管中,于 4h 内转送至实验室。

1.2 材料与试剂

细菌培养及体外药敏试验材料: CM0331 哥伦比亚琼脂干粉、CM1135 脑心浸液琼脂干粉(英国 OXOID 公司); 新鲜无菌脱纤维绵羊血(上海诸翟路耀英羊血供应站); 5%羊血+MH 琼脂培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司); 万古霉素、三甲氧苄啶(TMP)和多黏菌素 B(美国 Sigma 公司); 微需氧产气袋及密封培养盒(日本三菱化学株式会社); CLA、MTZ、AMX 和 LEV 的 E 试验药敏纸条(法国生物梅里埃公司); 全自动组织研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

抗菌药物混合液制备: 精确称量万古霉素 100 mg、三甲氧苄啶 50 mg、多黏菌素 B 3.8mg。依次倒入棕色玻璃试剂瓶中。加入 50 mL 蒸馏水,使抗菌药物混合粉末溶解,保存在-20℃。

细菌目的基因测序材料: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物技术有限公司); Premix Taq-PCR 扩增试剂(TAKARA BIO 生物工程有限公司); 引物委托上海桑尼生物科技有限公司合成。

质控菌株: HP 标准菌株 ACTC43504 和 NCTC11637(上海仁济医院消化研究所惠赠)。

1.3 幽门螺杆菌分离培养和鉴定

胃黏膜组织经全自动组织研磨仪充分研磨,制成组织匀浆后,用无菌滴管将组织混悬液接种于 HP 选择性培养基(哥伦比亚琼脂干粉,8%无菌脱纤维羊血,0.5%选择性抗菌药物混合液),置于 35℃,湿度>95%的微需氧环境下(5% O₂、10% CO₂、85% N₂),培养 5~7 天。

培养 5 天后观察培养基上菌落形态,挑取疑似 HP 菌落(透明细砂样或水滴样,针尖大小,直径 0.1~1mm)进行革兰染色、镜检,显微镜下呈革兰阴性问号状、螺旋状、海鸥状或弯曲短杆状菌,氧化酶、脲酶和触酶试验均为阳性,即鉴定为 HP^[7,8],并分纯进行传代增殖。

1.4 幽门螺杆菌体外药敏试验

用无菌棉签刮取传代纯培养 72h 后、无污染、菌落形态良好、镜下形态典型的 HP 适量菌落于 0.45% NaCl 灭菌溶液中,调节菌悬液浓度为 2.0 麦氏单位(6×10⁸CFU/mL),吸取 100 μL 菌悬液均匀涂布于 MH 血琼脂培养基上,分别贴上 CLA、MTZ、AMX 和 LEV 的 E-test 纸条,置于 35℃,湿度>95%的微需氧环境下培养 72h,读取抑菌圈与 E 试验纸条相交处的数值即为待检 HP 对该药物的最低抑菌浓度(MIC)。

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 2013 年版^[9]及相关文献的判断标准^[10-12]: CLA≥1mg/L; MTZ≥8μg/mL; AMX≥0.5mg/L; LEV≥1mg/L,判定为耐药。

1.5 DNA 抽提

从临床分离的 HP 菌株,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提其 DNA。抽提的 DNA 浓度由核酸浓度测定仪(Thermo Nanodrop 2000, 美国赛默飞公司)测定,保存在-20℃。所有的抽提过程,严格按照试剂盒的说明书进行操作。

1.6 幽门螺杆菌相关耐药基因引物的设计与合成

CLA、MTZ、AMX 和 LEV 相关的耐药基因分别为 23SrRNA、rdxA、pbp1A 和 gyrA 基因。

采用 BLAST 软件(Basic Local Alignment Search Tool)从美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 数据库中进行搜索和评估, 以确保特异性引物的特异性。

目的基因、特异性引物的序列和扩增产物的大小见表 1。

表 1 耐药相关基因扩增和测序引物

抗菌药物	耐药基因	引物(5'-3')	Genebank No.	片段长度
CLA	23S rRNA	F: TCAGTCGCAAGATGAAGCGT R: CCCCAGTCAAACCTACCCACC	U27270	392
MTZ	rdxA	F: TGGTGGTTGTTTCATTAGGGATT R: AAGTTTAAGGAGTGGCATTGTTT	AF316109	770
AMX	pbp1A	F: CACCCATTGAAGCGGCTGAA R: ACGCAATCCTTGGGGACAT	AF479618	415
LEV	gyrA	F: ATGAGCGTGATCATAGGGCG R: GAAGTCGCCATCCCTACAGC	L29481	467

注: CLA: 克拉霉素; MTZ: 甲硝唑; AMX: 阿莫西林; LEV: 左氧氟沙星;

F: Forward; R: Reverse

1.7 幽门螺杆菌相关耐药基因的扩增与测序

基因扩增反应条件为: 94℃ 预变性 3min; 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环; 72℃ 温育 5min, 4℃ 保存。

PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳(Tiangen 生物科技有限公司), 于紫外凝胶成像仪(凝胶 Doc XR + Bio-Rad 有限公司)下观察结果并拍照。PCR 产物纯化和测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。使用 DNASTar 基因分析软件进行序列分析。

1.8 统计学分析

应用 Stata 12.0 统计软件进行数据统计学分析, 选用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 幽门螺杆菌的耐药率

从 514 例胃粘膜活检样本中分离出 129 株 HP, 阳性分离率为 25.1%。对临床分离出的 129 株 HP 临床菌株复苏、传代, 对其中的 86 株采用 E-test 法进行体外药敏试验 (43 株未测定菌株在保存期间死亡, 无法成功复苏)。

86 株临床分离的 HP 菌株, 仅有 27 株 (31.4%) 菌株对所有 4 种抗菌药物均敏感, 而 59 株 (68.6%) 的菌株至少对 1 种抗菌药物耐药。对 CLA、MTZ 和 LEV 的耐药率分别为 19.8%, 57.0% 和 29.1%, 未发现对 AMX 耐药的菌株, 详见表 2。

表 2 幽门螺杆菌对 4 种常用抗菌药物的耐药率

抗生素	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		R	S
	MIC ₅₀	MIC ₉₀		
CLA	2.25	64	17 (19.8%)	69 (80.2%)
MTZ	2	96	49 (57.0%)	37 (43.0%)
AMX	0.032	0.25	0 (0.0%)	86 (100%)
LEV	0.079	12	25 (29.1%)	61 (70.9%)

注: CLA: 克拉霉素; MTZ: 甲硝唑; AMX: 阿莫西林; LEV: 左氧氟沙星;

R: 耐药; S: 敏感

同时, 发现 26 株菌株对两种以上的抗菌药物耐药, 其中, 对 MTZ 和 LEV 同时耐药的菌株最为多见 (12/86, 14.0%), 其次为 CLA+MTZ (5/86, 5.8%) 和 CLA+LEV (3/86, 3.5%)。还有 6 株菌株同时对 CLA、MTZ 和 LEV 耐药 (7.0%), 详见表 3。

表 3 幽门螺杆菌对抗菌药物的多重耐药率

多重耐药类型	菌株数	耐药率
CLA+MTZ	5	5.8%
CLA+LEV	3	3.5%
MTZ+LEV	12	14.0%
CLA+MTZ+LEV	6	7.0%
合计	26	30.2%

注: CLA: 克拉霉素; MTZ: 甲硝唑; AMX: 阿莫西林; LEV: 左氧氟沙星

2.2 幽门螺杆菌相关耐药基因的突变位点及突变率

HP对克拉霉素耐药相关基因为23S rRNA、甲硝唑耐药相关基因rdxA、阿莫西林耐药相关基因pbp1A和左氧氟沙星耐药相关基因gyrA分别经PCR扩增目的片段, PCR产物直接测序。

86株HP中, 4种耐药相关基因发生突变的情况详见表4。

CLA耐药相关基因点突变发生于23S rRNA V区, 突变位点T2182C最为常见, 突变率为34.9%; 其他突变方式为A2143G (20.9%)和A2142G (2.3%)。

MTZ耐药基因rdxA常以多种单核苷酸同时突变的形式存在, 其中T184G发生概率较高, 突变率为73.3%; 其次依次为G616A (46.5%)和C148T (7.0%)。

AMX耐药基因pbp1A突变最常见的方式为A1777G (9.3%), 其次为C1667G (3.5%)和A1684G (1.2%)。

LEV的耐药基因gyrA的突变率依次为C261G (7.0%)、G271A (7.0%)、C261A (5.8%)、A272G (3.5%)和G271T (2.3%)。

表 4 幽门螺杆菌耐药相关基因的突变率

抗菌药物	DNA测序分析		突变率 (N, %)
	耐药基因	突变位点	
CLA	23S rRNA	A2143G	18 (20.9)
		A2142G	2 (2.3)
		T2182C	30 (34.9)
MTZ	rdxA	C148T	6 (7.0)
		T184G	63 (73.3)
		G616A	40 (46.5)
AMX	pbp1A	C1667G	3 (3.5)
		A1684G	1 (1.2)
		A1777G	8 (9.3)
LEV	gyrA	C261A	5 (5.8)
		C261G	6 (7.0)
		G271A	6 (7.0)
		G271T	2 (2.3)
		A272G	3 (3.5)

注: CLA: 克拉霉素; MTZ: 甲硝唑; AMX: 阿莫西林; LEV: 左氧氟沙星

2.3 幽门螺杆菌相关耐药基因与耐药性的相关性

HP相关耐药基因与耐药性相关性的检测结果如下:

对于CLA相关耐药基因, 耐药组与敏感组均存在T2182C突变, 共30例, 两组间差异无统计学意义($P>0.05$); A2143G在耐药组菌株中多见, 两组间差异有统计学意义($P=0.000$); 而A2142G的突变率较低。

对于MTZ相关耐药基因rdxA, C148T为终止密码子突变, 只存在于耐药组菌株, 两组间差异有统计学意义($P=0.027$); 而T184G与G616A突变则同时存在于耐药组与敏感组菌株, 两组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。

对于LEV耐药基因gyrA, 我们检测筛选的所有突变位点均只存在于耐药组菌株中, 且差异均有统计学意义($P<0.05$), 且C261A/G在耐药组中的突变率最高, 为44.0%。

而对于阿莫西林耐药基因, 我们未发现阿莫西林耐药菌株, 所有检测的突变形式均只存在于敏感组菌株中, A1777G的突变率最高, 为9.3%。

综上, 23S rRNA 基因的 A2143G 位点、rdxA 基因的 C148T 和 gyrA 基因的 C261A/G 分别与 CLA、MTZ 和 LEV 的耐药相关, 详见表 5 和图 1。

表 5 幽门螺杆菌的基因突变与耐药性的相关性

抗菌药物	DNA测序分析		耐药组突变数	敏感组突变数	χ^2 值
	耐药基因	突变位点			
CLA	23S rRNA	A2143G	16 (94.1)	2 (2.9)	68.578 ($P=0.000$)
		A2142G	2 (11.8)	0 (0.0)	8.311 ($P=0.004$)
		T2182C	6 (35.3)	24 (34.8)	0.002 ($P=0.968$)
MTZ	rdxA	C148T	6 (12.2)	0 (0.0)	4.870 ($P=0.027$)
		T184G	39 (79.6)	24 (64.9)	2.334 ($P=0.127$)
		G616A	27 (55.1)	14 (37.8)	3.219 ($P=0.073$)
AMX	pbp1A	C1667G	0 (0.0)	3 (3.5)	-
		A1684G	0 (0.0)	1 (1.2)	-
		A1777G	0 (0.0)	8 (9.3)	-
LEV	gyrA	C261A	5 (20.0)	0 (0.0)	12.953 ($P=0.000$)
		C261G	6 (24.0)	0 (0.0)	15.738 ($P=0.000$)
		G271A	6 (24.0)	0 (0.0)	15.738 ($P=0.000$)
		G271T	2 (8.0)	0 (0.0)	4.996 ($P=0.025$)
		A272G	3 (12.0)	0 (0.0)	7.585 ($P=0.006$)

注: CLA: 克拉霉素; MTZ: 甲硝唑; AMX: 阿莫西林; LEV: 左氧氟沙星

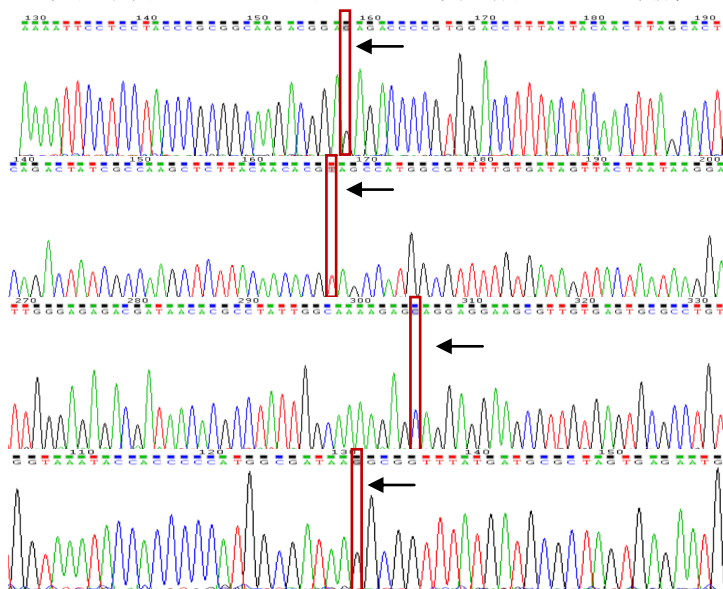


图 1 幽门螺杆菌的 4 种耐药基因突变位点

3 讨论

幽门螺杆菌(HP)是定植于胃粘膜下的一种病原菌, 其感染与慢性活动性胃炎、消化性溃疡和胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤等胃十二指肠疾患发生密切相关, 1994 年世界卫生组织/国际癌症研究机构(WHO/IARC)将 HP 定为 I 类致癌原^[13], 是目前唯一确定为 I 类致癌原的细菌。HP 的感染率很高, 全世界约半数的人口感染 HP^[14, 15], 我国也属 HP 高发地区, 平均感染率高达 40%-80%^[16]。

早期诊断、及时治疗, 可以有效地根除 HP, 并预防 HP 感染相关的胃十二指肠疾患的发生与发展。临床治疗 HP 感染基本采用三联或四联的经验治疗方案。其中最常用的治疗方案为含铋剂的四联疗法^[17, 18], 通常由铋剂加质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)和两种抗菌药物, 最常用的抗菌药物为 CLA 和 MTZ 和/或 AMX。以 LEV 联合治疗为基础的三联疗法亦可以作为二线疗法提高根除率^[19]。遗憾的是, 因为 HP 分离培养困难、阳性检出率低, 临床上一般不将 HP 培养作为常规检验项目, 也不开展常规的 HP 体外药敏试验, 所以目前的治疗方案仍然是经验性治疗, 导致了 HP 耐药率逐渐上升并日趋严峻, 已成为影响 HP 根除治疗效果的主要因素。

Sonia Agudo 等人的研究表明, 西班牙的克拉霉素耐药率在 30% 左右, 与欧洲其他国家如法国、波兰、葡萄牙、

保加利亚、土耳其, 以及日本基本一致^[20]。喹诺酮类药物耐药率在韩国为10%左右, 在日本、朝鲜、香港和意大利等地为15-34%, 在埃及为2%, 而中国高达26.6%。一项涉及包括上海在内的全国16个省市的流行病学调查和耐药原因分析显示, 我国HP对常用抗菌药物的耐药率为: 克拉霉素0-40%, 喹诺酮类0-26.6%, 甲硝唑50%-100%, 阿莫西林0-2.7%, 而且中国地区85.11%的耐药菌株同时对甲硝唑和克拉霉素耐药。本课题组前期开展的多中心流行病学调查表明, 本地区HP感染率为42.3%。使用标准14天三联疗法初治, 根除率为73.58%, 低于要求的75%。之前针对HP根除率低的改进措施主要是改变用药方式和给药时间, 包括从三联疗法到四联疗法和从7天疗程到10-14天疗程等, 但是疗效均不理想。HP对抗菌药物的耐药问题是根除失败的主要原因之一, 对其耐药性的研究将对临床具有重要的参考意义。

为了解本院及上海地区 HP 的耐药率, 我们首先从胃粘膜组织中分离培养 HP。我们采集了华东医院和同济医院 514 例胃粘膜活检组织样本, 从中分离培养出 129 株 HP, 阳性分离率为 25.1%, 与其他地区报道的阳性检出率基本一致^[21, 22]。

临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的 HP 的体外药敏试验的方法为琼脂稀释法^[23], 直接测定 HP 的最小抑菌浓度 (MIC)。因稀释法操作过于繁琐, 本研究采用改良的 MIC 测定方法——E-test 法, 测定临床分离的 HP 菌株对临床治疗 HP 感染的常用抗菌药物——克拉霉素 (CLA)、甲硝唑 (MTZ)、阿莫西林 (AMX) 和左氧氟沙星 (LEV) 的耐药率。实验发现, 除了尚未发现临床分离菌株对 AMX 耐药外, HP 对 CLA、MTZ 和 LEV 的耐药率分别为 19.8%、57.0% 和 29.1%, 其中对 MTZ 的耐药率最高, 对抗 HP 的首选药物——CLA 的耐药率也高达 19.8%。以上结果提示临床治疗 HP 感染时应高度重视抗菌药物的选择, 建议尽量采用 HP 分离培养的方法, 参考体外药敏试验结果, 选用敏感的抗菌药物进行治疗和根除。

值得注意的是, 本实验发现了多个同时对 2 种、甚至 3 种常用抗 HP 药物耐药的菌株, 其中对 2 种抗菌药物耐药的菌株有 20 株, 12 株对 MTZ 和 LEV 同时耐药 (14.0%), 5 株为 CLA 和 MTZ 同时耐药 (5.8%), 3 株对 CLA 和 LEV 同时耐药 (3.5%); 还有 6 株菌株同时对 CLA、MTZ 和 LEV 耐药 (7.0%)。以上结果提示, 临床在选择联合用药时, 要充分考虑到 HP 多重耐药的情况, 尽量选择耐药性较弱的 AMX 作为联合用药的选择之一, 再加上 CLA 或 LEV。MTZ 虽然耐药率较高, 但口服的吸收率高、副作用小, 而且价格低廉, 仍可以考虑联合用药。

之前的研究发现, 与 CLA、MTZ、AMX 和 LEV 相关的耐药基因分别为 23S rRNA、rdxA、pbp1A 和 gyrA 基因^[24, 25]。本文采用基因扩增与测序的方法, 检测了临床分离的 HP 菌株相关耐药基因的突变情况。我们的实验结果表明, 大多数 HP 菌株的 23S rRNA V 区均有基因突变发生, 突变位点 T2182C 最为常见, 突变率为 34.9%; 其他突变方式为 A2143G (20.9%) 和 A2142G (2.3%); rdxA 基因也存在多种突变形式, 其中 T184G 发生概率较高, 突变率为 73.3%; 其次依次为 G616A (46.5%) 和 C148T (7.0%); pbp1A 基因突变最常见的方式为 A1777G (9.3%), 其次为 C1667G (3.5%) 和 A1684G (1.2%); 左氧氟沙星的耐药机制主要为氨基酸的替换^[26], 最常见的氨基酸突变方式为 N87K、D91N、D91Y 与 D91G, 其编码基因 gyrA 相应位点的单核苷酸突变率依次为 C261A/G (12.8%)、G271A (7.0%)、G271T (2.3%)、A272G (3.5%)。

本研究进一步分析了基因突变与其临床耐药表型的相关性。实验结果发现, 23S rRNA 的 A2143G 位点的突变在 CLA 耐药组菌株中多见、且与敏感组显著差异, 提示 23S rRNA 基因的 A2143G 位点的突变与 CLA 耐药相关; rdxA 基因的 C148T 为终止密码子突变, 只存在于耐药组菌株, 而在敏感菌株中没有发生, 提示其与 MTZ 耐药相关; 对于 LEV 耐药基因 gyrA, 我们检测到的所有突变位点均只存在于耐药组菌株中, 其中 C261A/G 在耐药组中的突变率最高, 提示 gyrA 基因的多个位点突变均与 LEV 的耐药相关; 我们检测到阿莫西林耐药基因 pbp1A 的三种突变类型 (A1777G、C1667G 和 A1684G), 但是本研究未分离到阿莫西林耐药菌株, 无从分析基因突变与其耐药的相关性, 还有待于今后分离到耐药菌株后再进一步分析。

综上所述, 上海地区 HP 对常用抗菌药物的耐药率高, 建议采用培养和体外药敏试验, 根据药物试验结果选择敏感的抗菌药物根除 HP。同时, HP 相关耐药基因突变与耐药表型相关, 对其检测将对 HP 的耐药性分析提供重要参考。

参考文献

- [1] Peretz A, On A, Koiefman H, et al. BACTEC™ FX system as a tool for culturing gastric biopsies and *Helicobacter pylori* diagnosis[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2013, 32(12): 1541-1543.
- [2] Blaser M J. *Helicobacter pylori*: its role in disease[J]. *Clin Infect Dis*, 1992, 15(3): 386-391.
- [3] Alahdab Y O, Kalayci C. *Helicobacter pylori*: management in 2013[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(18): 5302-5307.
- [4] Lim S G, Park R W, Shin S J, et al. The relationship between the failure to eradicate *Helicobacter pylori* and previous antibiotics use[J]. *Dig Liver Dis*, 2015.
- [5] 柯美云. 中国消化不良的诊治指南(2007, 大连)[J]. *中华消化杂志*, 2007(12).
- [6] 成虹, 胡伏莲, 谢勇, 等. 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(09): 525-530.
- [7] Whitmire J M, Merrell D S. Successful culture techniques for *Helicobacter* species: general culture techniques for *Helicobacter pylori*[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 921: 17-27.
- [8] Llanes R, Feliciano O, Guzman D, et al. Use of a single biopsy specimen for diagnosing *Helicobacter pylori* infection by culture and two different PCR methods: report from Cuba[J]. *Trop Gastroenterol*, 2010, 31(2): 111-112.
- [9] Clinical and laboratory standards institute. M100-S23 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement[S]. Wayne, PA: CLSI, 2013[J].
- [10] Megraud F, Lehn N, Lind T, et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(11): 2747-2752.
- [11] Yu C, Li L, Chen W, et al. Levofloxacin susceptibility testing for *Helicobacter pylori* in China: comparison of E-test and disk diffusion method[J]. *Helicobacter*, 2011, 16(2): 119-123.
- [12] 高承霞, 严祥, 韩俭, 等. E-test法检测幽门螺杆菌对3种抗生素的耐药性[J]. *国际消化病杂志*, 2013(01): 61-63.
- [13] Wong B C, Lam S K, Wong W M, et al. *Helicobacter pylori* eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2004, 291(2): 187-194.
- [14] Thung I, Aramin H, Vavinskaya V, et al. Review article: the global emergence of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2016, 43(4): 514-533.
- [15] Marshall B J, Windsor H M. The relation of *Helicobacter pylori* to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention[J]. *Med Clin North Am*, 2005, 89(2): 313-344.
- [16] 项利娟, 朱新建, 黄德富, 等. 幽门螺杆菌感染调查与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015(08).
- [17] O'Connor A, Gisbert J P, O'Morain C, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection 2015[J]. *Helicobacter*, 2015, 20 Suppl 1: 54-61.
- [18] Uygun A, Kadayifci A, Safali M, et al. The efficacy of bismuth containing quadruple therapy as a first-line treatment option for *Helicobacter pylori*[J]. *J Dig Dis*, 2007, 8(4): 211-215.
- [19] Liou J M, Bair M J, Chen C C, et al. Levofloxacin Sequential Therapy vs Levofloxacin Triple Therapy in the Second-Line Treatment of *Helicobacter pylori*: A Randomized Trial[J]. *Am J Gastroenterol*, 2016.
- [20] Agudo S, Perez-Perez G, Alarcon T, et al. High prevalence of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(10): 3703-3707.
- [21] Tanih N F, Ndip L M, Ndip R N. Characterisation of the genes encoding resistance to metronidazole [J]. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2011, 105(3): 251-259.
- [22] 张万岱, 胡伏莲, 萧树东, 等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2010(05).
- [23] National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M7-A5. Informational supplement M100-S10. NCCLS, Wayne, PA (2000)[J].
- [24] Gerrits M M, van Vliet A H, Kuipers E J, et al. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(11): 699-709.
- [25] 孔聪聪, 刘改芳. 幽门螺杆菌对抗生素耐药的分子机制研究进展[J]. *临床荟萃*, 2014(04): 478-481.
- [26] Garcia M, Raymond J, Garnier M, et al. Distribution of Spontaneous *gyrA* Mutations in 97 Fluoroquinolone-Resistant *Helicobacter pylori* Isolates Collected in France[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 56(1): 550-551.

基金项目: 上海市科委引导项目 (14411962800); 上海市卫计委重点课题 (20134008); 上海申康医院发展中心“市级医院新兴前沿技术联合攻关项目” (SHDC12013123)

作者简介: 张艳梅, 女, 1976.1-, 博士, 副研究员, 分子生物学和临床微生物学专业

通讯作者: 赵虎, E-mail: hubertzhao@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

氨甲喋呤对映体对急性淋巴细胞白血病细胞株的体外诱导蛋白表达差异的研究

沈佐君 陈洋 何晓东

安徽医科大学附属省立医院 安徽省临床检验中心 安徽 合肥 230001

[摘要] 目的: 探索氨甲喋呤对映体 (D-(-)-MTX 和 L-(+)-MTX) 体外诱导急性淋巴细胞白血病 (ALL) 细胞株 CCRF-CEM 和 BALL-1 蛋白表达的差异, 了解不同氨甲喋呤对映体耐药性差异的机制, 为临床选用合理的甲喋呤对映体提供依据。**方法:** 提取耐药前后的细胞株的总蛋白用双向凝胶 (2-DE) 电泳技术获得亲本细胞和耐药细胞的电泳图, 选择差异倍数在 2 倍以上而且边界比较清晰的蛋白点经胶内原位酶解, 用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 测定肽质量指纹图 (PMF), 将所得的结果进行生物学信息处理。**结果:** MTX 对映体处理的两株白血病前后总蛋白进行双向电泳考染图谱, 经过扫描成像及 PDQuest 软件分析, CCRF-CEM, D-(-)-MTX-CCRF-CEM, L-(+)-MTX-CCRF-CEM, BALL-1, D-(-)-MTX-BALL-1, L-(+)-MTX-BALL-1 平均蛋白点数分别为: 974 ± 12 , 1290 ± 8 , 998 ± 10 , 1060 ± 4 , 1087 ± 9 , 1139 ± 10 。重复实验匹配率为: 82.57%, 85.68%, 84.72%, 88.41%, 86.13%, 89.35%, 其中对于 CCRF-CEM 细胞株, 耐 D-(-)-MTX 差异点数有 28 个, 耐 L-(+)-MTX 差异点数有 80 个, 对于 BALL-1 细胞株, 耐 D-(-)-MTX 差异点数有 44 个, 耐 L-(+)-MTX 差异点数有 38 个。选取差异斑点 17 个进行质谱鉴定, 初步鉴定出 15 种蛋白 HPSA5, HPSA8, EON1, EON2, PCNA, NPM1, CCT6A, CCT6B, DNAJA1, DNAJA4, CORO1A, CALR, VCP, DYNC1I2, HSPD1。这些蛋白点可能和 MTX 治疗 ALL 过程中有着潜在的作用。**结论:** 不同 MTX 对映体在诱导 ALL 过程中导致蛋白表达发生变化, 进行蛋白组差异分析发现显著不同, 提示临床使用 MTX 治疗急性淋巴细胞白血病时应关注耐药性的差异。

[关键词] 氨甲喋呤; 对映体; 急性 T 淋巴细胞白血病; 急性 B 淋巴细胞白血病; 双向电泳

Acute lymphoid leukemia cell lines induced the differences of protein expression using methotrexate enantiomers in vitro

Chen Yang, He Xiaodong, Shen Zuojun

(Centre of Clinical Laboratory, Anhui Provincial Hospital Affiliated of Anhui Medical University, Hefei, 230001)

[Abstract] objective: To explore the acute lymphoid leukemia (ALL) cell lines CCRF-CEM and BALL-1 protein expression using methotrexate enantiomers, D-(-)-MTX and L-(+)-MTX, in vitro. **Methods:** Total protein of culture cells was extracted and separated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). The gels were stained with Coomassie brilliant blue. The protein spots were chosen when the differences of gray value more than twice and the boundary point were clear. The protein spots were digested by enzyme and analyzed by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) to examination the peptide mass fingerprint (PMF). The results will be obtained by biology information processing. **Results:** The PDQuest software was used to analyze the protein spots. The average spots of CCRF-CEM, D-(-)-MTX-CCRF-CEM, L-(+)-MTX-CCRF-CEM, BALL-1, D-(-)-MTX-BALL-1 and L-(+)-MTX-BALL-1 were 974 ± 12 , 1290 ± 8 , 998 ± 10 , 1060 ± 4 , 1087 ± 9 , 1139 ± 10 and the reproducible gels of match rates were 82.57%, 85.68%, 84.72%, 88.41%, 86.13% and 89.35%. Compared to the control group CCRF-CEM cell line, D-(-)-MTX-CCRF-CEM has 28 different protein spots while L-(+)-MTX-CCRF-CEM has 80 different protein spots. Compared to the control group BALL-1, D-(-)-MTX-BALL-1 has 44 different protein spots while L-(+)-MTX-BALL-1 has 38. 15 protein spots were identified including HPSA5, HPSA8, EON1, EON2, PCNA, NPM1, CCT6A, CCT6B, DNAJA1, DNAJA4, CORO1A, CALR, VCP, DYNC1I2 and HSPD1. These proteins might play an important role in the process of MTX treating ALL. **Conclusion:** In the process of MTX enantiomers treated ALL can lead to changes in protein expression. The analysis of protein differences could help us to research the resistance mechanism between MTX and ALL.

[Key words] methotrexate; enantiomers; CCRF-CEM; BALL-1; 2-DE

急性淋巴细胞白血病 (acute lymphoid leukemia, ALL) 是一组起源于无差别的 B 系或者 T 系细胞, 通常称为淋巴瘤细胞恶性增生性的血液肿瘤, 这些细胞在骨髓内聚集并且抑制正常造血功能的。ALL 是儿童常见的白血病之一,

大约占儿童恶性肿瘤的 25%-35%。经过半个多世纪的努力儿童 ALL 的 5 年生存率有了很大的提高,从大约 10%-20% 的生存率提到到现在的 70%-80% 的五年生存率^[1]。抗叶酸药物 MTX 被广泛运用于急性淋巴细胞白血病,非霍奇金淋巴瘤,骨肉瘤,银屑病,类风湿性关节炎等疾病的治疗当中。本文研究 MTX 对映体在诱导人 ALL 过程中所产生的蛋白质的差异表达,进一步在探讨在 ALL 治疗过程中耐药机制中相关肿瘤标记物,为 ALL 的诊断和治疗提供靶点依据。

1 对象和方法

1.1 对象

急性 T 急性淋巴细胞白血病细胞株和急性 B 淋巴细胞白血病细胞株 (CCRF-CEM、BALL-1) 由中国科学技术大学生命科学院赠送。耐受 30 μ mol/L MTX 对映体的两株亲本细胞由本实验室用浓度递增结合低剂量持续诱导获得。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器

D-(-)-MTX、L-(+)-MTX (美国 Acros organics 公司); RPMI-1640 粉末、胎牛血清 (美国 gibco 公司); 二硫苏糖醇 (DTT)、尿素、CHAPS、IPG 胶条 (PH3-10NL, 24cm)、溴酚蓝、十二烷基磺酸钠 (SDS)、碘乙酰胺 (美国 GE Healthcare 公司); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺 (瑞典 fluka chemie 公司), 过硫酸铵、TEMED、甘氨酸、低熔点琼脂糖 (美国 Sigma 公司); Bradford 蛋白浓度定量试剂盒 (上海生工); 考马斯亮蓝 R-350 (上海玉博生物科技公司); CHCA (美国 Sigma 公司); 乙腈、三氟乙酸、TPCK 处理的胰蛋白酶 (德国 Merck 公司)。Etta IPGhor3 等电聚焦仪、DALT-SIX PAGE 电泳仪 (美国 GH Healthcare 公司); ImagescannerIII 图像扫描仪 (日本 Fujitsu 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus IX51 公司); Microfuge 22R 超速离心机 (美国 beckman coulter 公司); 4800 Plus MALDI TOF/TOFTM (美国 ABI 公司)

1.2.2 耐药细胞的诱导

取对数生长期的 CCRF-CEM 和 BALL-1 细胞株加入 5 μ mol MTX 对映体培养基作用 24h 后换液,用无 MTX 的培养基 (含 10% 胎牛血清的 1640 培养基) 继续培养,待细胞恢复到正常状态后再提高 MTX 浓度反复诱导传代,最终获得耐受 30 μ mol/L MTX 对映体的细胞系。为了保持细胞的耐药性,将细胞置于含有 2 μ mol/L 的培养基中继续培养传代以及冻存。后续如有实验需要可以在一周前用无 MTX 的 10% 胎牛血清的 1640 培养基进行培养。

1.2.3 细胞总蛋白的提取

将培养好的细胞用 PBS 洗涤三遍,加入适量的细胞裂解液 (7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 4%CHAPS, 2%IPG buffer, 40mmol/L DTT, 100mmol/L PMSF), 其中 5×10^6 细胞加入大概 1ml 的裂解液。在冰盒上 4 $^{\circ}$ C 裂解 1h, 然后 12000g、4 $^{\circ}$ C 离心 30min; 加入适当预冷丙酮, -20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜; 第二天 12000g, 4 $^{\circ}$ C 离心 30min, 去除上清, 加入适当蛋白裂解液溶解蛋白; 取少量上清液用 Bradford 法测定总蛋白浓度, 其余上清液则标记好放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.4 第一向固相 PH 梯度等电聚焦 (IPG-IEF)

将含有提取好的细胞总蛋白 150 μ g 提取液与水化液 (7mol/L 尿素, 2mol/L 硫脲, 2%CHAPS, 0.5%IPG buffer, 40mmol/L DTT, 微量溴酚蓝) 充分混匀, 然后以总体积 450 μ l 加入到 IPG 胶条槽中, 覆盖一层植物油, 然后将其置于 IPGphor 等电聚焦仪的电极板上。水化和等电聚焦条件设置如下: 面板温度 20 $^{\circ}$ C, 50mA/Strip, 水化 50V 12h, 500V 1h, 1000V 1h, 1000-10000V 1h, 10000V 11h。等电聚焦结束后将 IPG 胶条取出分别放入 15ml 平衡液 A (6mol/L 尿素, 75mmol/L Tris-HCl, 2%SDS, 29.3%甘油, 0.002%溴酚蓝, 0.2%DTT) 和 15ml 平衡液 B (6mol/L 尿素, 75mmol/L Tris-HCl, 2%SDS, 29.3%甘油, 0.002%溴酚蓝, 3%碘乙酰胺) 中各自平衡 15min。

1.2.5 第二向垂直 SDS-PAGE 电泳

将平衡后的胶条放入凝胶板中, 加入低熔点琼脂糖封胶液 (0.5%低熔点琼脂糖+电泳缓冲液), 室温静置 20 min 后开始第二向电泳。第二向 SDS-PAGE 凝胶浓度为 12.5%, 电泳参数设定为: 100V/胶, 电泳 45 min, 200V/胶, 至溴酚蓝离胶下沿 0.5cm 处停止; 冷循环设定温度为 15 $^{\circ}$ C。电泳结束后, 取出凝胶进行染色。

1.2.6 蛋白考染和凝胶图像分析

将胶条固定 (40%乙醇, 10%乙酸) 2h, 考马斯亮蓝染色 12h, 水洗至背景清晰。将经过考染的凝胶通过 Imagescanner III 图像扫描仪扫描成像, 用 PDQuet 软件对图像进行背景消除, 斑点的检测以及匹配等分析。

1.2.7 质谱鉴定

将胶内的蛋白点酶解,用 millipore 进行脱盐,然后在 MALDI-TOF-MS 上采用线性模式、正离子谱测定,对差异的蛋白蛋白点进行鉴定,以多肽质量标准作为外标。将获取的肽质量指纹图通过 Mascot 数据库进行查询分析。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS12.0 统计学分析软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间比较采用 SNK- T 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水平, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 双向凝胶电泳图谱和图像分析

双向电泳图谱检测到 CCRF-CEM, D(-)-MTX-CCRF-CEM, L(+)-MTX-CCRF-CEM, BALL-1, D(-)-MTX-BALL-1, L(+)-MTX-BALL-1 平均蛋白点数分别为: 974 ± 2 , 1290 ± 8 , 998 ± 10 , 1060 ± 4 , 1087 ± 9 , 1139 ± 10 重复实验匹配率为: 82.57%, 85.68%, 84.72%, 88.41%, 86.13%, 89.35% ($n=3$)。经过 ImagescannerIII 图像扫描仪分析和验证,差异倍数在 2 倍以上蛋白点有 122 个,对于 CCRF-CEM 细胞株,耐 D(-)-MTX 差异点数有 28 个,耐 L(+)-MTX 差异点数有 80 个,对于 BALL-1 细胞株,耐 D(-)-MTX 差异点数有 44 个,耐 L(+)-MTX 差异点数有 38 个(见图 1)。

2.2 差异蛋白点的原位酶解和质谱鉴定

本研究选取 17 个表达显著差异、边界清洗的蛋白质斑点进行分析。这 17 个点中,有 5 个点无法匹配成功,这五个点分别是: 118、1025、2824、7824、8131,另外 12 个点鉴定有 15 中可能表达的蛋白。这些表达的点中 1437 和 2835 表达的蛋白是同一个蛋白: HSPA8。222 号的蛋白是: PCNA, NPM1; 616: CALR; 2736: HSPA5; 2742: HSPD1; 2827: VCP; 2831: DYNC1I2; 3321: ENO1、ENO2; 5620: CORO1A; 6521: DNAJA1、DNAJA4; 6620: CCT6A、CCT6B(见表 1)。

相对于对照组细胞 CCRF-CEM 来说, D(-)-MTX-CCRF 表达增多的点有: 222、616、1437、2736、2742、2835、3321、6620,表达减少的点有: 2827、2831、5620; L(+)-MTX-CCRF-CEM 表达增多的点有: 616、1437、2736、3321,表达减少的点有: 2827、2831、5620、6521。而相对于对照组 BALL-1 来说, D(-)-MTX-BALL-1 表达增多的蛋白点有: 222、616、1437、2736、2742、2827、2831,表达减少的点有: 3321、5620、6620; L(+)-MTX-BALL-1 表达增多的点有: 616、1437、2736、2827、2831,表达减少的点有: 3321、5620、6521(具体见表 2)。鉴定的质谱图谱(见图 2)。

3 讨论

本实验选取 ALL 中的两株白血病细胞 CCRF-CEM 和 BALL-1,在加入 MTX 对映体后来提取总蛋白来比较耐药前后蛋白表达差异性,利用双向电泳技术来寻找肿瘤细胞在用药前后蛋白质表达差异可以为疾病治疗、相关毒性机制和耐药机制提供一定依据。

PCNA 是一种增殖细胞核抗原,是 DNA 聚合酶 δ 合成的辅酶^[2]。PCNA 与细胞的增殖的启动上起到很大的作用,可以反应细胞增殖状态和肿瘤细胞生长速度的良好指标。PCNA 在耐 D(-)-MTX 药物的两株急性白血病细胞中都比对对照组有明显的高表达,这个可能提示加入 D(-)-MTX 药物后细胞增长速度会比原来肿瘤细胞增长速度增长快。NPM1(或 NPM)是核仁磷酸蛋白,主要存在于核仁,参与细胞核和细胞质之间物质运输, NPM1 在促进细胞增殖和调控细胞周期的进程方面有着重要作用。PCNA 和 NPM1 都主要存在于细胞核,分子量和等电点都比较接近,但是在做质谱鉴定时候 PCNA 蛋白的得分要高,编号“222”这个点的肽段质谱鉴定 PCNA 的可能性要大一些。

CALR 是钙网蛋白,溶解度高能够与 Ca^{2+} 结合,主要分布于内质网。有研究表明 CALR 可以在肿瘤细胞发生凋亡前从内质网移向细胞膜,从而导致肿瘤细胞的免疫源性死亡,进而增加药物的疗效^[3]。本实验发现 MTX 对映体作用的耐药细胞株 CALR 都有上调表达,在细胞增殖无明显变化情况下, MTX 对映体能够使得 CALR 蛋白表达增加,使得肿瘤的耐药性降低,可能与 ALL 耐药产生有关。

热休克蛋白家族与肿瘤发生、发展、耐药性的产生以及肿瘤预后等方面都有密切关系。本次实验所鉴定的出的 HSPA5 和 HSPA8 都是热休克蛋白 70 家族基因编码表达的产物。HSPA5 能够保护宿主细胞抵抗内质网压力所导致的细胞凋亡。HSPA8 则能够保护细胞免受外界因素损伤,维持细胞内的动态平衡^[4]。本实验中鉴定的两种蛋白在耐药后细胞都是上调表达,则说明这两种细胞可能参与细胞耐药降低细胞对化疗药物的敏感性。HSPD1 是热休克蛋白 60

所编码的蛋白, HPSD1 定位于线粒体基质中, 参与细胞多肽的转运和折叠等, 能够激发固有免疫和获得性免疫。实验中发现 D(-)-MTX 能够上行调控增加其耐药性, 而 L(+)-MTX 与对照组则无明显差异性, 这个使得 D(-)-MTX 疗效没有 L(+)-MTX 好。另外在实验中发现另外一个点也鉴定出 HPSA8, 这个点在双向电泳的位置与理论上的 HPSA8 的 PI 和 Mr 都不符合, 这个可能和蛋白在翻译后的磷酸化、甲基化、糖基化等修饰有关。

VCP 是含缬氨酸蛋白, 与多种细胞活性相关的三磷酸腺苷酶超家族中的一员。VCP 与 DNA 损伤修复、细胞增殖、抗凋亡和应急等有密切联系^[5]。本实验中发现 MTX 对映体作用后的耐药细胞株中, VCP 对 T 系细胞 CCRF-CEM 有下调作用, 而对 B 系细胞 BALL-1 则是上调作用。在 MTX 对映体作用后, VCP 对不同系列的 ALL 细胞株产生的生物作用会有所差别。

DYNC112 是细胞质动力蛋白中间链的一种, 负责运输货物与动力蛋白的连接, 用于锚定货物作用^[6]。本实验中的 DYNC112 对耐 MTX 对映体的 CCRF-CEM 细胞是下调作用, 而对于耐 MTX 对映体的 BALL-1 细胞株是上调作用。

烯醇化酶 ENO1 和 ENO2。ENO1 存在于许多组织中, 能够催化磷酸甘油向磷酸烯醇式丙酮酸转化, 是糖酵解过程中的关键酶之一。ENO1 参与基因转录、细胞分化凋亡等过程, 在肿瘤的发生发展过程中有着重要的作用^[7]。另外一种同工酶 ENO2 则几乎仅肌肉组织中。本实验中发现 ENO1 在对耐 MTX 对映体的 CCRF-CEM 细胞株有上调作用表达, 而对于 BALL-1 细胞株则是下调抑制作用。鉴定出来的 ENO1 得分较 ENO2 高, 则这个肽段是 ENO1 蛋白的可能性要大一些。

CORO1A 是肌动蛋白结合蛋白的一种, 主要存在于造血细胞中。在细胞器的内吞作用中有重要作用, 能够负向调控溶酶体转运, 修改脂蛋白和清除胆固醇在巨噬细胞上的沉积作用^[8]。本实验中 CORO1A 对耐 MTX 对映体的两株细胞都有下调抑制作用。有研究表明正常人群中的 CORO1A 表达蛋白要比肿瘤细胞的高。

DNAJA1 和 DNAJA4 是热休克蛋白 40 (Hsp40) 家族所表达的产物。Hsp40 蛋白通常通过基质捆绑区域与下游蛋白相互作用, 通过其 J 域向 Hsp70 蛋白来提供下游蛋白的后续折叠。实验中鉴定的这中蛋白在耐 L(+)-MTX 药物的细胞株有下行调控作用, 抑制肿瘤细胞的生长^[4]。质谱鉴定的结果现实 DNAJA1 的得分和覆盖率要高于 DNAJA4, 那么这个蛋白是 DNAJA1 的可能性要大些。

CCT6A 和 CCT6B 是分子伴侣蛋白 (CCT) 家族中的成员。CCT 蛋白是由双环 16 个亚基所构成, 是细胞赖以生存的蛋白之一, 具有帮助其他蛋白进行正确折叠的功能^[9]。实验中 CCT6A 或者 CCT6B 对耐 D(-)-MTX 的 CCRF-CEM 细胞株有上调作用, 而对于 D(-)-MTX-BALL-1 细胞株则是下调作用, 同一种药物可能对于不同的类型的 ALL 细胞株会产生不同的作用, 而 MTX 对映体对同种细胞也会表现出不同的耐药性质。通过对这些耐药后上调或者下调蛋白的研究可以为肿瘤耐药机制的研究以及靶向治疗提供一定的依据。

参考文献

- [1] Kodidela S, Chandra P S, Dubashi B. Pharmacogenetics of methotrexate in acute lymphoblastic leukaemia: why still at the bench level?[J]. European journal of clinical pharmacology, 2014, 70(3):253-260.
- [2] Jothilingam P, Basu D, Dutta T K. Angiogenesis and Proliferation Index in Patients with Acute Leukemia: A Prospective Study[J]. Bone marrow research, 2014, 2014.
- [3] Hong S H, Misk D E, Wang H, et al. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer[J]. Cancer research, 2004, 64(15):5504-5510.
- [4] Molvarec A, Rigó J, Nagy B, et al. Serum heat shock protein 70 levels are decreased in normal human pregnancy[J]. Journal of reproductive immunology, 2007, 74(1):163-169.
- [5] Lauten M, Schrauder A, Kardinal C, et al. Unsupervised proteome analysis of human leukaemia cells identifies the Valosin-containing protein as a putative marker for glucocorticoid resistance[J]. Leukemia, 2006, 20(5):820-826.
- [6] Gama J B, Ohlmeier S, Martins T G, et al. Proteomic analysis of the action of the Mycobacterium ulcerans toxin mycolactone: targeting host cells cytoskeleton and collagen[J]. PLoS neglected tropical diseases, 2014, 8(8):e3066.
- [7] Tsai S T, Chien I H, Shen W H, et al. ENO1, a potential prognostic head and neck cancer marker, promotes transformation partly via chemokine CCL20 induction[J]. European Journal of Cancer, 2010, 46(9):1712-1723.

- [8] Federzoni E A,Humbert M,Valk P J M,et al.The actin-binding protein CORO1A is a novel PU.1(SPI1)-and CEBPA-regulated gene with significantly lower expression in APL and CEBPA-mutated AML patients[J].British journal of haematology,2013,160(6):855-859.
- [9] Van Hove I,Verslegers M,Hu T T,et al.A proteomic approach to understand MMP-3-driven developmental processes in the postnatal cerebellum:Chaperonin CCT6A and MAP kinase as contributing factors[J].Developmental neurobiology, 2015.

基金项目: 国家自然科学基金(30672011)

通讯作者: 沈佐君, E-mail: shenzuojun@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

2014-2015年石家庄市呼吸道感染八项病原体谱分析

安翠平 梁芸 李兆锋 杨卫卫 李立新*
石家庄市第一医院检验科

[摘要] **目的:**了解本地区急性呼吸道感染患者8种呼吸道病原体的流行情况。**方法:**对2014年1月1日—2015年12月31日在石家庄市第一人民医院诊治的7545例呼吸道感染患者的血清进行8种常见呼吸道病原体的 IgM抗体检测。**结果:**本地区2014年检出率较高的呼吸道病原体依次是流感病毒B(17.5%)、流感病毒A(12.9%)、肺炎衣原体(11.8%),2015年检出率较高的呼吸道病原体依次是流感病毒B(20.6%)、肺炎支原体(20.0%)、流感病毒A(11.0%)。2015年较2014年流感病毒A、流感病毒B、肺炎衣原体、嗜肺军团菌4种病原体IgM抗体阳性率有所降低,肺炎支原体IgM抗体阳性率有所升高;各年龄组八种病原体抗体阳性率均存在差异,与0-3岁组比较3-15岁组肺炎衣原体、流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、嗜肺军团菌、呼吸道合胞病毒IgM抗体阳性率较高,15岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌、呼吸道合胞病毒IgM抗体阳性率较高;与3-15岁组比较15岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌IgM抗体阳性率较高;且秋冬季与春夏季比较流感病毒A、流感病毒B、副流感病毒IgM抗体阳性率较高,而肺炎支原体IgM抗体阳性率较低。**结论:**本地区呼吸道感染的病原体以流感病毒A(INFA)、流感病毒B、肺炎支原体为主,不同年份、不同季节、不同年龄组病原体的种类和感染率具有一定差异性。

[关键词] 石家庄市; 呼吸道感染; IgM; 抗体; 流行病学

在全球范围内,呼吸道感染是主要感染性疾病,引起呼吸道感染的病原体有很多,除细菌性感染外其他病原体也占有很大的比例。许多呼吸道病原体具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急、病后免疫力不能持久等特点^[1-3]。本院开展了8项呼吸道病原体IgM抗体的检测,通过分析2014—2015年两年间在本院治疗的7545例呼吸道感染患者相关呼吸道病原体IgM抗体检测结果,研究8种常见呼吸道病原体与不同年份、不同季节及不同年龄组人群呼吸道感染的关系,为预防呼吸道感染和临床治疗提供流行病学依据。

1 材料与方法

1.1 样本

血清标本来源于2014年1月1日—2015年12月31日在我院进行诊治的7545例呼吸道感染病例,其中男4440例,女3105例,年龄为0~100岁,按年龄段分为3组,其中0~3岁组1805例,3~14岁组1725例,>15岁组4015例;其中春夏季(3-8月)间送检3501例,秋冬季(9月-次年2月)间送检4044例。

1.2 检验方法

采用德国欧蒙公司生产的呼吸道病原体谱诊断试剂盒,以间接免疫荧光法同时检测8种呼吸道病原体的IgM抗体。8种呼吸道病原体包括呼吸道合胞病毒(RSV),腺病毒(ADV),流感病毒A(INFA),流感病毒B(INFB),副流

感病毒(PIV),肺炎支原体(MP),肺炎衣原体(CP),嗜肺军团菌(LP)。检测严格按照实验操作规程进行实验操作,采用 Olympus BX-51 荧光显微镜进行结果判读。

1.3 统计学处理

计数资料用率(%)进行统计学描述,组间比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义,所有数据采用 SPSS 21.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 2014-2015 各病原体检测结果及两年间阳性率比较

2014 年呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌 IgM 抗体检出阳性率分别为 2.0%、1.6%、2.6%、12.9%、17.5%、11.8%、5.9%、6.3%,2015 年呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌 IgM 抗体检出阳性率分别为 2.1%、1.4%、2.7%、11.0%、20.6%、5.0%、20.0%、2.6%;2014 和 2015 年两年间呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒 3 种病原体 IgM 抗体阳性率基本持平,流感病毒 A、流感病毒 B、肺炎衣原体、嗜肺军团菌 4 种病原体 IgM 抗体阳性率 2015 年较 2014 年有所降低,而肺炎支原体 IgM 抗体阳性率 2015 年较 2014 年有所升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),详见表 1。

表 1 2014 和 2015 年各种病原体 IgM 抗体检出阳性率及两年间比较

病原体	2014		2015		χ^2	P
	阴性, n (%)	阳性, n (%)	阴性, n (%)	阳性, n (%)		
呼吸道合胞病毒	3804 (98.0)	77 (2.0)	3588 (97.9)	76 (2.1)	0.077	0.781
腺病毒	3820 (98.4)	61 (1.6)	3612 (98.6)	52 (1.4)	0.297	0.586
副流感病毒	3779 (97.4)	102 (2.6)	3564 (97.3)	100 (2.7)	0.074	0.786
流感病毒 A	3380 (87.1)	501 (12.9)	3260 (89.0)	404 (11.0)	6.330	0.012
流感病毒 B	3203 (82.5)	678 (17.5)	2909 (79.4)	755 (20.6)	12.048	0.001
肺炎衣原体	3423 (88.2)	458 (11.8)	3482 (95.0)	182 (5.0)	113.382	<0.001
肺炎支原体	3651 (94.1)	230 (5.9)	2932 (80.0)	732 (20.0)	334.524	<0.001
嗜肺军团菌	3636 (93.7)	245 (6.3)	3569 (97.4)	95 (2.6)	60.609	<0.001

2.2 2014-2015 两年间各年龄组婴幼儿(0-3岁)、儿童(3-14岁)和成年人(15岁以上)感染阳性率比较

各年龄组感染率较高的 3 种病原体均为流感病毒 A、流感病毒 B、肺炎支原体,且八种病原体抗体阳性检出率均存在差异($P<0.05$),与 0-3 岁组比较 3-14 岁组肺炎衣原体、流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、嗜肺军团菌、呼吸道合胞病毒 IgM 抗体阳性率较高,15 岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌、呼吸道合胞病毒 IgM 抗体阳性率较高;与 3-14 岁组比较 15 岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌 IgM 抗体阳性率较高,而流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体 IgM 抗体阳性率较低,且结果有统计学意义($P<0.05$),其他病原体 IgM 抗体阳性率组间结果无差异,详见表 2、表 3。

表 2 不同年龄段组呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒 A、流感病毒 B 检测阳性率比较

年龄组	例数	呼吸道合胞病毒	腺病毒	流感病毒 A	流感病毒 B
		阳性, n (%)	阳性, n (%)	阳性, n (%)	阳性, n (%)
0~3 岁	1805	66 (3.7)	16 (0.9)	190 (10.5)	289 (16.0)
3~14 岁	1725	22 (1.3) *	18 (1.0)	272 (15.8) *	419 (24.3) *
15 岁~	4015	65 (1.6) *	79 (2.0) *#	443 (11.0) #	725 (18.1) #
χ^2		32.395	12.994	30.468	44.173
P		<0.001	0.002	<0.001	<0.001

*: 与 0~3 岁比较 $P<0.05$, #: 与 3~15 岁比较 $P<0.05$

表3 不同年龄段组副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌检测阳性率比较

年龄组	总例数, n	副流感病毒	肺炎衣原体	肺炎支原体	嗜肺军团菌
		阳性, n (%)	阳性, n (%)	阳性, n (%)	阳性, n (%)
0~3岁	1805	36 (2.0)	142 (7.9)	230 (12.7)	39 (2.2)
3~14岁	1725	61 (3.5) *	198 (11.5) *	251 (14.6)	61 (3.5) *
15岁~	4015	105 (2.6) #	300 (7.5) #	481 (12.0) #	240 (6.0) *#
χ^2		8.174	26.105	7.168	47.047
P		0.017	<0.001	0.028	<0.001

*与0~3岁比较 $P < 0.05$, #与3~15岁比较 $P < 0.05$

2.3 两年间秋冬(9月-次年2月)和春夏(3月-8月)感染率比较

与春夏季比较秋冬季流感病毒A、流感病毒B、副流感病毒IgM抗体阳性率较高,而肺炎支原体IgM抗体阳性率较低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而呼吸道合胞病、腺病毒、肺炎衣原体、嗜肺军团菌IgM抗体阳性率组间结果无差异,详见表4。

表4 不同季节各病原体IgM抗体检测阳性率比较

病原体	秋冬季		春夏季		χ^2	P
	阴性, n (%)	阳性, n (%)	阴性, n (%)	阳性, n (%)		
呼吸道合胞病毒	3946 (97.6)	98 (2.4)	3446 (98.4)	55 (1.6)	6.862	0.009
腺病毒	3988 (98.6)	56 (1.4)	3444 (98.4)	57 (1.6)	0.753	0.385
副流感病毒	3914 (96.8)	130 (3.2)	3429 (97.9)	72 (2.1)	9.659	0.002
流感病毒A	3478 (86.0)	566 (14.0)	3162 (90.3)	339 (9.7)	33.069	<0.001
流感病毒B	3140 (77.6)	904 (22.4)	2972 (84.9)	529 (15.1)	64.004	<0.001
肺炎衣原体	3722 (92.0)	322 (8.0)	3183 (90.9)	318 (9.1)	3.036	0.081
肺炎支原体	3595 (88.9)	449 (11.1)	2988 (85.3)	513 (14.7)	21.259	<0.001
嗜肺军团菌	3876 (95.8)	168 (4.2)	3329 (95.1)	172 (4.9)	2.509	0.113

3 讨论

呼吸道病原体检测对临床的诊断和治疗至关重要,IgM是近期感染的一个有效指标^[4]。呼吸道合胞病毒、腺病毒、流感病毒A、流感病毒B、副流感病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌均是常见的呼吸道病原体,感染后其IgM抗体均在1周左右出现,但持续存在时间在2-6个月不等。非典型性呼吸道感染的临床表现不明显,极易被误诊或忽视,导致抗生素的滥用和疾病的延误^[5]。我们采用间接免疫荧光法,可同时检测8种呼吸道感染相关病原体的IgM抗体,结果可靠、方便、快速,为及时指导临床正确选择有效药物提供了依据,对避免抗菌药物的滥用有重要意义。

本研究通过对7545例呼吸道感染确诊患者血清中11种常见病原体IgM抗体的检测,本地区2014年检出率较高的呼吸道病原体依次是流感病毒B(17.5%)、流感病毒A(12.9%)、肺炎衣原体(11.8%),2015年检出率较高的呼吸道病原体依次是流感病毒B(20.6%)、肺炎支原体(20.0%)、流感病毒A(11.0%)。这与其他学者的报道不太一致^[6-9],可能与地域差异和研究人群不同造成。通过分析发现本地区2015年与2014年比较流感病毒A、流感病毒B、肺炎衣原体、嗜肺军团菌4种病原体IgM抗体阳性率有所降低,而肺炎支原体IgM抗体阳性率有所升高,提示随着年份不同病原体感染谱可能会发生变化。

通过比较两年中各年龄组八种病原体抗体检出阳性率发现,各年龄组感染率较高的3种病原体均为流感病毒A、流感病毒B和肺炎支原体。这与其他地区的报道不尽相同^[10]。进一步比较分析发现两年中各年龄组八种病原体抗体阳性率均存在差异,与0-3岁组比较3-15岁组肺炎衣原体、流感病毒A、流感病毒B、副流感病毒、嗜肺军团菌、呼吸

道合胞病毒IgM抗体阳性率较高, 15岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌、呼吸道合胞病毒IgM抗体阳性率较高; 与3-15岁组比较15岁以上组腺病毒、嗜肺军团菌IgM抗体阳性率较高, 而流感病毒 A、流感病毒 B、副流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体IgM抗体阳性率较低。这可能与0-3岁组儿童室外活动相对较少有关, 且3-15岁年龄段儿童的免疫力还不完善, 且开始进入幼儿园、学校等公共场所有关, 这和一些国外的文献报导相符合^[11]。此外亦有研究报道IgM是感染早期或潜伏病毒活化时产生的, 1岁以下的婴幼儿在病毒感染后血清内特异性IgM的滴度明显低于1岁以上儿童^[12], 婴幼儿可因免疫反应较弱而出现假阴性^[13], 加之检测时有可能处于IgM产生的窗口期, 均可使血清IgM抗体的阳性检出率偏低^[14], 这些因素的存在可能也对不同年龄组间的差异造成一定影响。

本调查发现两年间秋冬季和春夏季感染率比较发现: 与春夏季比较秋冬季流感病毒A、流感病毒B、副流感病毒IgM抗体阳性率较高, 而肺炎支原体IgM抗体阳性率较低。这与浦春^[9]和陈铮铮^[10]的报道中对呼吸道病原体季节间感染率的差异有相似之处, 而与曹昭^[15]等学者报道不一致。这说明各种病原体感染情况与季节相关, 但由于地域气候等因素不同而略有差异。且有文献指出呼吸道病毒通常遵循季节性活动模式, 并最有可能在感染的高峰时段中引起肺炎^[16]。

本研究为石家庄市呼吸道感染的流行病学研究积累了数据资料, 为在不同年龄、不同季节进行有效的病原体预防控制提供了理论依据。但由于检测试剂限制, 不能涵盖所有可能引起呼吸道感染的病原体, 加上各种病原体IgM在人体中出现和的时间和持续时间长短不一, 给检测结果造成一定的偏差, 因此结果可能会存在一定偏倚, 有待今后进一步的研究。

参考文献

- [1] Quinn SC, Kumar S. Health inequalities and infectious disease epidemics: a challenge for global health security[J]. *Biosecurity Bioterror*, 2014, 12(5): 263-273.
 - [2] Reinton N, Manley L, Tjade T, et al. Respiratory tract infections during the 2011 Mycoplasma pneumoniae epidemic [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013, 32(6): 835-840.
 - [3] Bolton KJ, McCaw JM, Mc Vernon J, et al. The influence of changing host immunity on 1918-19 pandemic dynamics[J]. *Epidemics*, 2014, 8: 18-27.
 - [4] 金伯泉. 各类免疫球蛋白的特性与功能[M]. 5版. 医学免疫学, 2009: 43.
 - [5] 吴茜, 倪林仙, 樊茂, 等. 昆明地区儿童非典型病原体感染病原学回顾性分析[J]. *中国儿童保健杂志*, 2009, 17(6): 708-710.
 - [6] 陈舒, 何蕊, 宋秀军, 等. 九项呼吸道病原体 IgM 检测 500 例分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(12): 1319.
 - [7] 荀春华, 张贤敏, 高志亮, 等. 九江地区 1672 例呼吸道感染患者呼吸道病原体的 IgM 的检测和分析[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2015, 31(3): 391-393.
 - [8] 薛白, 刘洁, 胡志刚, 邹旭美. 呼吸道感染患者病原学调查分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(2): 309-311.
 - [9] 浦春, 方芳, 欧成举, 等. 九项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测对诊断急性呼吸道感染的临床价值[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2015, 3(1): 54-55.
 - [10] 陈铮铮, 吴潇, 朱秋丽. 2009 例儿童 11 种呼吸道病原体 IgM 抗体检测的结果分析[J]. *实用预防医学*, 2015, 22(6): 738-740.
 - [11] Peng D, Zhao DC, Liu JT, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections[J]. *J Virol*, 2009, 29(9): 155-162.
 - [12] Meurman O, Ruuskanen O, Sarkkinen H, et al. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J Med Virol*, 1984, 14: 67-72.
 - [13] 顾伟忠, 曹群. 直接免疫荧光法对呼吸道分泌物多种呼吸道病毒检测的临床意义. *实用儿科临床杂志*, 2004, 19: 857-858.
 - [14] 宋秦伟, 朱汝南, 邓洁, 等. 血清特异性抗体检测在儿童呼吸道病毒感染医院诊断中应用的探讨[J]. *中华儿科杂志*, 2012, 50(6): 440-443.
 - [15] 曹昭, 王建, 易珍, 等. 广西地区肺炎支原体感染的流行病学调查, 2015, 30(9): 3257-3258.
 - [16] Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, et al. Viral pneumonia[J]. *Lancet*, 2011, 377(9773): 1264-1275.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

全自动化学发光法测定 TRAb 在自身免疫性甲状腺疾病中的应用以及干扰因素分析

张蓉

复旦大学附属华东医院 检验科

[摘要] 目的:探讨 TRAb 在自身免疫性甲状腺病中的诊断和鉴别诊断价值和干扰因素。方法:采用全自动化学发光法检测 62 例自身免疫性甲状腺病患者(Graves 病 45 例, 桥本甲状腺炎 17 例)、24 例红斑狼疮患者、12 例风湿性心脏病患者和 153 例正常对照者血清 TRAb、TPOAb、TGA、TSH、FT3 和 FT4。结果: Graves 病患者与正常对照组血清 TRAb、TGA 和 TPO-Ab 的差异有统计学差异($P<0.01$), 桥本甲状腺炎患者与正常对照组血清 TGA 和 TPO-Ab 的差异有统计学差异($P<0.01$), 红斑狼疮患者和风湿性心脏病患者与正常对照组血清 TRAb 的差异有统计学差异($P<0.05$)。结论: TRAb 对鉴别诊断 Graves 病和桥本甲状腺炎具有重要的临床应用价值, 而红斑狼疮和风湿性心脏病患者会出现假阳性。

[关键词] 促甲状腺激素受体抗体; 促甲状腺素; 红斑狼疮; 风湿性心脏; 甲状腺球蛋白抗体; 抗甲状腺过氧化物酶抗体

[Abstract] Objective: To evaluate diagnostic and differential diagnostic values of TRAb in autoimmune thyroid disease and interference factor. Methods: Serum TRAb, TGA, TPO-Ab, TSH, FT3 and FT4 were determined by chemiluminescence immunoassay in 62 patients with autoimmune thyroid disease (45 Graves' Disease and 17 Hashimoto's thyroiditis), 24 patients with Biett's disease, 12 patients with rheumatic heart disease and 153 normal controls respectively. Results: Test values of TRAb, TGA and TPO-Ab showed statistical difference between Graves' Disease and healthy controls ($P<0.01$), Test values of TGA and TPO-Ab showed statistical difference between Hashimoto's thyroiditis and healthy controls ($P<0.01$), Test values of TRAb, showed statistical difference between Biett's disease, rheumatic heart disease and healthy controls ($P<0.05$). Conclusion: TRAb had important clinical application values in differential diagnosis between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis while patients with Biett's disease and rheumatic heart disease had impact on it.

[Key words] TRAb TGA TPO-Ab TSH; Biett's disease rheumatic heart disease

自身免疫性甲状腺疾病(AITD)是一种常见的器官特异性自身免疫病,其中 Graves 病(GD)及桥本甲状腺炎(HT)又是 AITD 中普遍存在的两种甲状腺自身免疫性疾病^[1]。促甲状腺激素受体抗体(TRAb)主要有两类:一类可激活促甲状腺激素(TSH)受体而引起甲状腺功能亢进,一般指甲状腺刺激性抗体(TSAb)或甲状腺刺激性免疫球蛋白(TSI);另一类可以阻断 TSH 和受体的结合及 TSH 功能而引起甲状腺功能减退,一般指甲状腺阻断性抗体(TBAb),其活性的高低是 AITD 的发生、发展或转化的重要原因^[2]。本研究通过分析不同甲状腺疾病血清 TRAb 的水平,探讨采用全自动化学发光法检测的 TRAb 所表现的活性状态,以及其在 AITD 中的诊断价值。

1 资料和方法

1.1 一般资料

1.1.1 正常对照组 153 例(男 99, 女 54), 年龄(26 ~ 78)岁,均为我院门诊的体检者,经确认没有心、脑血管疾病以及其它疾病的健康体检者。

1.1.2 甲亢组 45 例(男 12, 女 33), 年龄(19 ~ 77)岁,临床确诊为甲亢的患者,血清 FT3、FT4 增高, TSH 降低。

1.1.3 甲减组 18 例(男 11, 女 7), 年龄(31 ~ 84)岁,血清 TSH 降低; FT3、FT4 增高。

1.1.4 红斑狼疮 24 例(男 14, 女 10), 年龄(16 ~ 73)岁,确诊为红斑狼疮患者。

1.1.5 风湿性心脏病 12 例(男 8, 女 4), 年龄(49 ~ 83)岁,确诊为风湿性心脏病患者。

1.2 方法

化学发光法检测 TRAb(深圳新产业, Maglumi 2000), TGA、TPO-Ab、TSH、FT3 和 FT4(Abbott, Architect i2000)。

1.3 统计学处理 所有的结果均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 t 检验。

2 结果

2.1 甲亢组、甲减组患者和正常对照组血清 FT3、FT4、TSH、TRAb、TPO 以及 TGA 测定结果如表 1 所示。

表1 各组血清 FT3, FT4, TSH, TRAb, TPO 以及 TGA 测定结果

组别	例数	TSH(mIU/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmo l/L)	TRAb(IU/mL)	TPO(IU/mL)	TGA(IU/mL)
甲亢组	45	0.05±0.05*	16.44±9.29*	30.28±5.70*	92.51±98.18*	395.46±203.13*	279.82±134.53*
甲减组	17	46.88±36.74*	1.85±0.31*	7.12±1.73*	52.87±93.86	543.10±225.22*	465.29±289.64*
正常对照组	153	2.16±1.56	4.31±0.50	12.42±1.49	17.43±6.61	28.87±15.73	18.31±7.82

*表示与正常对照组比, p<0.01

2.2 红斑狼疮组、风湿性心脏病组和正常对照组血清 FT3, FT4, TSH, TRAb 如表 2 所示。

表2 各组血清 FT3, FT4, TSH 和 TRAb 测定结果

组别	例数	TSH(mIU/L)	FT3(pmol/L)	FT4(pmo l/L)	TRAb(IU/mL)
红斑狼疮组	24	2.82±1.40	3.30±0.70*	11.51±1.45	58.76±86.32*
风湿性心脏病	12	2.52±1.79	3.21±0.73*	13.18±2.22*	29.55±16.11*
正常对照组	153	2.16±1.56	4.31±0.50	12.42±1.49	17.43±6.61

*表示与正常对照组比, p<0.05

2.3 甲亢组、甲减组、红斑狼疮组、风湿性心脏病组合正常对照组血清 TRAb 测定值如表 3 所示。

表3 各组血清 TRAb 测定值(x±s, U/L)

组别	n	x±s	阳性率(%)
甲亢组	45	92.51±98.18	88.89
甲减组	17	52.87±93.86	29.41
红斑狼疮组	24	58.76±86.32	29.17
风湿性心脏病	12	29.55±16.11	25.00
正常对照组	153	17.43±6.61	3.27

3 讨论

Graves 病和桥本甲状腺炎是最常见的自身免疫性甲状腺疾病,在这些疾病的患者外周血中可能存在一种或者几种主要针对甲状腺的自身抗体,分析这些自身抗体对自身免疫性甲状腺疾病的诊断有重要意义[3]。促甲状腺激素受体抗体(TRAb)是其中的一种多克隆抗体,主要可分为刺激型(TSAb 等)和阻断型(TSBAb 等)两大类抗体,TSAb 等刺激型抗体是 GD 发生、发展的主要原因,其可与甲状腺滤泡膜上的 TSH 受体结合,活化腺苷环化酶,使 cAMP 增加,从而导致甲状腺激素的合成和分泌增多,血中甲状腺激素水平增高,却又不受甲状腺激素的反馈调节;而 TSBAb 等阻断型抗体在甲状腺功能减退症的发病机理中起重要作用[4]。资料表明,在未治的 Graves' 病中 TRAb 阳性率>95%以上,对 Graves' 病的诊断有较强的特异性。目前,外周血 TGA 和 TPO-Ab 浓度测定也用来辅助诊断自身免疫性甲状腺病[5]。

在 Graves 病中,TRAb、TPO 和 TGA 均与正常对照组存在显著差异(P<0.01),阳性率分别为 88.89%、82.2%和 64.4%,可以看出 TRAb 在 Graves 病的诊断中优于其它两个指标。而在桥本甲状腺炎中,TPO 和 TGA 均与正常对照组存在显著差异(P<0.01),阳性率分别为 88.2%和 76.5%,是辅助诊断桥本甲状腺炎的最佳指标。

本次研究对多种常见疾病的 TRAb 进行了分析,发现红斑狼疮和风湿性心脏病是影响 TRAb 诊断自身免疫性甲状腺疾病的两个因素。经过对 24 例红斑狼疮患者和 12 例风湿性心脏病患者的 TSH、FT3、FT4 和 TRAb 进行分析,可以看出其 TSH、FT3 和 FT4 均处于正常范围,而 TRAb 与正常对照组存在显著差异(P<0.05),并且 TRAb 在红斑狼疮和风湿性心脏病患者中的阳性率分别达到了 29.17%和 25.00%,显著高于正常组的 3.27%。本研究同时对高血压患者、糖尿病患者、肾功能不全者、胃炎和肺炎患者的 TRAb 进行了分析,阳性率和正常值一致。化学发光免疫分析(CLIA)是化学发光与免疫反应相结合以检测抗原或抗体的方法,是继放射免疫、酶联免疫和荧光免疫之后的新一代标记免疫分析技术,灵敏度、精密度和准确度均优于传统的 RRA 和 ELISA。全自动化学发光测定 TRAb 有助于 Graves 病的辅助诊断,红斑狼疮和风湿性心脏病患者 TRAb 也可升高。

参考文献

- [1] Smith, T.J., Pathogenesis of Graves' orbitopathy: a 2010 update. *J Endocrinol Invest*, 2010, **33**(6):p.414-421.
- [2] Matthews, D.C. and A.A. Syed, The role of TSH receptor antibodies in the management of Graves' disease. *Eur J Intern Med*, 2011, **22**(3):p.213-6.
- [3] 杨蓉, 潘秀军等. TGA, TPOAb, TRAb 和 TSH 在自身免疫性甲状腺病中的临床应用. *放射免疫学杂志* 2012, **25**(5).
- [4] 朱利国. 促甲状腺激素, 甲状腺过氧化物酶抗体和促甲状腺激素受体抗体检测在甲状腺疾病中的应用价值. *Labeled Immunoassays & Clin Med*, Aug, 2010, Vol. 17, No. 4.
- [5] 张颖珍. Graves 病早期检测 TSH 受体抗体的临床意义. *标记免疫分析与临床*. 2004, **11**(2).

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

肝炎肝硬化病态造血与脾功能相关性研究

陆光生 景晔 徐和福 杨辉 宋丽萍

北京军区天津疗养院 300381

[摘要] 目的:探讨肝炎肝硬化病态造血与脾功能互相影响及血清乳酸脱氢酶(LDH)检测的临床意义。方法:对 320 例代偿期及代偿性肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组及 40 例健康对照组进行外周血细胞及血清 LDH 活性检测,并随机对 26 例脾肿大组及无脾肿大组进行骨髓祖细胞体外培养与骨髓血细胞形态学观察,并对结果进行统计分析。结果:代偿期脾肿大组与无脾肿大组外周血三系血细胞减少比较,无明显差异, $P > 0.05$,骨髓祖细胞不良生长率及骨髓血细胞病态改变率比较,两组亦无明显差异, $P > 0.05$ 。失代偿期外周血三系血细胞减少率、骨髓祖细胞不良生长率及骨髓血细胞病态改变率,脾肿大组明显高于无脾肿大组, $P < 0.05$,LDH 活性也高于无脾肿大组, $P < 0.05$ 。结论:肝炎肝硬化早期血细胞生成减少、成熟障碍、破坏增多,随病情进展脾肿大、功能增强致三系血细胞进一步减少,形成恶性循环。

[关键词] 肝炎肝硬化;病态造血;脾功能亢进;乳酸脱氢酶

Study on the correlation between pathological hematopoiesis and splenic function in patients with hepatitis cirrhosis

Lu Guangsheng, Xu Hefu, Yang Hui, Ye Jing, Song Liping

(Tianjin military region, Beijing, 300381, yanghui19870202@126.com)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance of serum lactate dehydrogenase (LDH) detection in patients with liver cirrhosis and liver cirrhosis. **Method:** of 320 patients with compensated and decompensated liver cirrhosis splenomegaly group and without splenomegaly group and 40 cases of healthy control group of peripheral blood cells and serum LDH activity was detected, and random of 26 patients with splenomegaly group and without splenomegaly group of bone marrow progenitor cells cultured in vitro and bone marrow blood cell morphology observation and the results for statistical analysis. **Results:** in compensatory stage the splenomegaly group and without splenomegaly group of three systems in peripheral blood blood cells reduced in comparison, no significant difference, $P > 0.05$, bone marrow progenitor cells in poor growth rate and bone marrow blood cell morbid change rate comparison, two groups without significant difference ($P > 0.05$). Loss of compensatory activity in peripheral blood of three blood cell reduction rate, bone marrow progenitor cells in poor growth rate and bone marrow blood cell morbid change rate. The splenomegaly group was significantly higher than that of the group without splenomegaly, $P < 0.05$, LDH activity is higher than that of the group without splenomegaly ($P < 0.05$). **Conclusion:** hepatitis cirrhosis with early blood cell production reduce, mature disorder, damage increased, with progression of splenomegaly, enhanced function caused by blood cells is further reduced, form a vicious circle.

[Keywords] hepatitis; cirrhosis; pathological; hematopoiesis; spleen; function; hyperthyroidism; lactate dehydrogenase

肝炎肝硬化主要为乙型、丙型及丁型肝炎病毒感染, 约占 60%~80%, 通常经过慢性肝炎阶段演变而来。我国肝炎肝硬化 80%以上与慢性乙型肝炎病毒感染有关。有关肝炎肝硬化外周血细胞减少文献报道均认为系脾功能亢进所致^[1~3]。为了探讨肝炎肝硬化病态造血与脾功能相互影响及血清乳酸脱氢酶(LDH)对病态造血的临床意义。本文对 320 例代偿期失代偿期脾肿大与无脾肿大组及 40 例健康对照组进行外周血细胞及血清 LDH 进行检测, 并对 26 例不同病期有无脾肿大组进行骨髓祖细胞体外培养及骨髓血细胞形态学观察, 现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

依据《现代传染病学》肝炎肝硬化诊断标准^[4]确诊的乙型肝炎肝硬化 264 例, 丙型肝炎肝硬化 46 例及丁型肝炎肝硬化 10 例, 共 320 例, 男 279 例, 女 41 例, 年龄为 26~68 岁。代偿期及失代偿期肝炎肝硬化各 160 例。脾肿大组及无脾肿大组肝炎肝硬化各 160 例, 随机抽取各 13 例进行骨髓祖细胞体外培养及骨髓血细胞形态学观察, 健康对照组 40 例, 为健康献血者, 男 26 例, 女 14 例, 年龄为 32~49 岁。全部病例均为我院 2013 年以前住院者。骨髓祖细胞正常值系中国医科院天津血液病研究所提供。

1.2 研究项目

患者入院后即进行外周血常规, 网织红细胞成熟指数(RMI), 血清乳酸脱氢酶活性检测, 并在研究对象髂后上嵴穿刺抽取骨髓液 3ml, 肝素钠抗凝, 稀释后铺在淋巴细胞分离液上[比重(1.075-1.079)/cm]1500r/min 离心 15min, 吸取界面层有核细胞, 用 IMDM 液洗涤 2 次, 在以 1000r/min 离心 10min 后备用。

1.3 体外培养

1.3.1 骨髓晚期红系祖细胞(CFU-E)培养: 经淋巴细胞分离的有核红细胞 2×10^5 /ml, 内含小牛血清 35%, 青、链霉素各 100U, L-谷氨酰胺 15ul, EPO1U, 2-巯基乙醇 10min/L, 0.9%甲基纤维素、IMDM 培养液补足, 置于 30min 小平皿中, 放入 37°C5%CO₂ 饱和温度的孵育箱 5d 后计数。5 个培养皿为 1 个试验点, 取 5 个培养皿计数的平均值。

1.3.2 骨髓粒-单系祖细胞(CFU-GM)培养: 经淋巴细胞分离的有核细胞 2×10^5 /ml, 内含小牛血清 35%, 青、链霉素各 100U, L-谷氨酰胺 15ul, EPO1U, 2-巯基乙醇 10min/L, 肌浸液 10%, 3%琼脂 0.07ml, INDN 培养液补足, 置于 30mm 小培养皿中, 放入 37°C5%CO₂ 饱和湿度的孵育箱 9d 后计数。5 个培养皿为 1 个试验点, 取 5 个培养皿计数的平均值。

1.3.3 骨髓纤维祖细胞(CFU-F)培养: 经淋巴细胞分离的有核红细胞 8×10^6 /ml 细胞悬液 8ml, 内含小牛血清 20%, 青、链霉素各 100U, L-谷氨酰胺 15ul, IMDM 培养液补足, 接种于 50ml 容积的培养瓶中, 放入 37°C5%CO₂ 饱和湿度的孵育箱内, 每半周换液一次, 继续在上述条件下培养 12~14d, 在倒置显微镜下计数 5 个培养皿。

1.3.4 集落计数: CFU-E>8 个细胞为 1 个集落; CFU-GM>40 个细胞为 1 个集落; CFU-F>40 个细胞为一个集落。红系祖细胞集落正常范围(68~93)个, 粒单系祖细胞集落正常范围(14~29)个, 纤维祖细胞集落正常范围(62~16)个。三系祖细胞集落生长减少(CFU-E 集落数<68, CFU-GM 集落数<14, CFU-F 集落数<16)或无集落生长为集落生长不良。集落生长不良率=集落生长减少率+无集落生长率。

1.4 统计学方法 所有数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{X} \pm s$)表示, 组间比较采用两样本 t 检验, $\alpha=0.05$ 为检验水准。

1.5 判断标准 Hb≤120g/L(男性), ≤110g/L(女性)中性粒细胞≤ 2.0×10^9 /L, 血小板≤ 100×10^9 /L, LDH>245u/L, 网织红细胞绝对数> 45×10^9 /L, CFU-E≤50 (2×10^4 有核细胞)个、CFU-GM≤60 (1×10^5 有核细胞)个、CFU-F≤40 (1×10^5 有核细胞)个。红系病态造血: 有类巨幼变或巨大红细胞或双核红细胞三者之一者, 粒细胞病态造血: 核浆发育不平衡或有异常大颗粒二者之一; 巨核细胞病态造血: 巨核细胞减少或有无核巨核细胞二者之一者。无脾肿大: 类下为触及脾或 B 超和 X 线检查, 未见脾肿大。

2 结果

2.1 肝炎肝硬化脾肿大外周血细胞及血清 LDH 测定值比较, 见表 1。可见代偿期肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较, 三系血细胞减少及 LDH 升高, P 均>0.05, 而失代偿期肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较, 三系血细胞减少及 LDH 升高, P 均<0.05。两组与健康对照组比较, P 均<0.05。

2.2 肝炎肝硬化脾肿大外周血细胞减少率及 LDH 活性升高率比较, 见表 2。可见代偿期肝炎肝硬化脾肿大组和无脾

肿大组一系血细胞减少率二系或三系减少率 <0.05 比较, P 均 >0.05 ; 失代偿期肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较, 三系血细胞减少率及 LDH 升高率, P 均 <0.05 。在脾肿大组与无脾肿大组 RMI 降低中比较均无明显差异, P 均 >0.05 。

2.3 肝炎肝硬化脾肿大骨髓祖细胞不良生长率及骨髓血细胞病态造血率比较, 见表 3。可见肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较, 骨髓三系祖细胞不良生长率及骨髓三系血细胞病态造血率, P 均 >0.05 , 两组 LDH 活性比较, $P>0.05$ 。

表 1 肝炎肝硬化脾肿大外周血细胞及血清 LDH 测定值比较 ($\bar{X} \pm s$)

组别	n	Hb (g/L)	中性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	血小板 ($\times 10^9/L$)	LDH ($\times 10^9/L$)
代偿期肝炎肝硬化					
脾肿大组	40	99.32 \pm 12.13	2.42 \pm 0.12	89.39 \pm 51.42	406.46 \pm 19.54
无脾肿大组	120	101.53 \pm 24.33	2.53 \pm 1.01	94.39 \pm 16.41	386.11 \pm 23.16
失代偿期肝硬化					
脾肿大组	120	91.63 \pm 31.96	2.13 \pm 1.06	84.62 \pm 17.36	466.41 \pm 81.32
无脾肿大组	40	99.66 \pm 41.53	2.94 \pm 1.66	95.31 \pm 19.15	398.45 \pm 34.16
健康对照组	40	141.16 \pm 21.12	6.16 \pm 1.54	156.37 \pm 28.64	206.17 \pm 11.85

表 2 肝炎肝硬化脾肿大外周血细胞减少率及 LDH 活性升高率比较[n(%)]

组别	n	Hb ($<110g/L$)	中性粒细 胞 $\leq 110^9/L$	血小板 $\leq 2.0 \times 10^9/L$	二系 减少	三系 减少	RMI 降低	LDH (u/L)
代偿期肝炎肝硬化								
脾肿大组	40	35(89.5)	21(52.5)	24(60.0)	23(57.5)	21(52.5)	34(85.0)	314.12 \pm 72.32
无脾肿大组	120	102(85.0)	62(51.7)	68(56.7)	51(47.5)	32(26.7)	97(80.8)	298.16 \pm 52.39
失代偿期肝硬化								
脾肿大组	120	112(93.3)	108(90.0)	96(80.0)	10(89.2)	96(80.0)	102(85.0)	386.54 \pm 29.32
无脾肿大组	40	32(80.0)	28(70.0)	26(65.0)	25(62.5)	24(60.0)	31(77.5)	345.16 \pm 32.46
健康对照组	40	-	-	-	-	-	-	245.16 \pm 29.32

表 3 脾肿大骨髓祖细胞生长不良及骨髓血细胞病态造血率比较[n(%)]

组别	n	骨髓祖细胞体外培养			骨髓血细胞形态学			LDH (u/L)
		CFU-E 生长不良	CFU-GM 生长不良	CFU-F 生长不良	红系 病态	粒系 病态	巨核系 病态	
脾肿大组	13	8(61.3)	6(46.2)	9(69.7)	9(69.2)	7(53.8)	8(61.3)	264.12 \pm 78.13
无脾肿大组	13	9(69.2)	5(38.5)	8(61.3)	10(76.9)	8(61.3)	9(69.2)	245.31 \pm 52.39

3 讨论

脾脏由 3~7 支脾动脉供血, 静止时的脾脏每 100g 组织的血流 40~100ml/min, 占心脏搏出量的 1%~10%。由脾静脉支引流入门静脉, 脾静脉血液占门静脉血流管的 20%~40%, 肝硬化时门静脉高压, 脾静脉回流阻力升高, 从而发生淤血性脾肿大。而脾功能亢进的定义是: 脾脏肿大, 伴随一系或多系血细胞减少, 而减少的血细胞须伴随相应的骨髓造血的代偿性增强。但血细胞形态学通常是正常的^[6]。脾脏具有重要的免疫和血液过滤作用。因为脾脏肿大, 过滤床也必然增大, 首先是白细胞和血小板在脾脏内阻留, 长期脾窦淤血, 脾内纤维组织和脾髓细胞(主要是单核-巨噬细胞)增生, 使脾脏破坏血细胞的功能增强, 主要表现为白细胞和(或)血小板减少, 有些病例红细胞也减少, 血红蛋白降低^[9]。

多年来,国内外文献一直一致认为肝硬化患者外周血一系或多系血细胞减少,即为脾功能亢进的金标准^[1~4],报道称少数病例虽有脾功能亢进但并无脾肿大,脾肿大与脾亢进时伴有血细胞减少^[6]。本文表 1,可见代偿期肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较,外周血三系血细胞减少程度及 LDH 活性升高程度,两组并无明显差异, P 均>0.05,说明外周血一系或多系血细胞减少并非都是脾功能亢进。本文表 2,提示代偿期肝炎肝硬化脾肿大组与无脾肿大组比较,外周血任何一系血细胞减少率,两组差异非常明显, P 均<0.05。脾功能亢进早期主要是中性粒细胞和血小板减少,本文提示代偿期肝炎肝硬化首先是血红蛋白降低,网织红细胞绝对数大多降低,血清 LDH 升高,说明红细胞系统出现无效造血并非脾功能亢进所致。

本文失代偿期肝炎肝硬化无脾肿大组也表现出外周血一系或多系血细胞减少,可能并非脾功能亢进所致。从本文表 3,可以看出骨髓成纤维祖细胞(CFU-F)、晚期红系祖细胞(CFU-E)及粒-单系祖细胞(CFU-GM)生长不良率,脾肿大组与无脾肿大组比较,无明显差异, P 均>0.05,而骨髓血细胞病态改变率,血清 LDH 活性,也无明显差异, P 均>0.05。CFU-F 被认为代表骨髓造血微环境^[7], CFU-F 生长不良率提示骨髓造血微环境损害,导致造血干细胞在造血微环境中定居、存活、增殖与分化、成熟障碍,本文结果可以看出,骨髓 CFU-E、CFU-GM 体外培养,无集落生长或生长不良,进一步证明骨髓祖细胞生成减少。骨髓三系血细胞也出现病态造血^[8~10],红系出现类巨幼变、巨大红细胞、双核红细胞、粒细胞核浆发育不平衡,有粗大异常颗粒;巨核细胞减少,血小板减少等改变。由于肝功能障碍及(或病毒)内毒素血病使骨髓造血微环境损害→造血干细胞受损→骨髓祖细胞生成减少→骨髓血细胞无效造血(成熟障碍)在骨髓和血管内破坏,大量不成熟、病态、畸形三系血细胞进入脾脏,使脾脏破坏血细胞功能增强。

综上所述,作者认为肝炎肝硬化外周血一系或多系减少的原因是:骨髓造血微环境损害→干细胞受损→祖细胞生成减少→骨髓血细胞破坏→成熟血细胞在脾内破坏→部分成熟血细胞在血循环内破坏。病态造血加速加重脾功能亢进,而脾功能亢进又加重血细胞破坏,形成恶性循环。脾功能亢进使脾静脉超负荷,又加重门脉高压,门脉高压又使脾再增大,功能再增强,形成第二个恶性循环。

外周血细胞减少不仅反映了脾功能亢进、肝功能失代偿,门脉高压,也反映了骨髓病态造血,将导致心、肾、脑并发症及出血、感染及贫血加重。肝炎肝硬化血清 LDH 活性升高,可作为骨髓病态造血,血细胞破坏增加的标志。

参考文献

- [1] 叶任高主编,内科学[M],人民卫生出版社,第五版;662.
- [2] 登家栋主编,临床血液学[M],上海科技出版社,第一版;485.
- [3] 裴法祖主编,外科学[M],人民卫生出版社,第四版;535.
- [4] 陈菊梅主编,现代传染病学[M],人民军医出版社,1999;289.
- [5] 骆抗先,陈全军,李平等.乙型肝炎基础和临床[M],第四版 3,人民卫生出版社,2012:598-589.
- [6] 陈书平主编,肝脏疾病[M],人民卫生出版社,2012;489.
- [7] 陆光生,景晔,徐和福,等.肝炎肝硬化骨髓祖细胞造血功能的改变[J],解放军预防医学杂志,2013,31(5):421-424.
- [8] 景晔,徐和福,陆光生,等.肝炎肝硬化骨髓超微结构改变的临床意义[J],解放军预防医学杂志,2014,32(4): 330-331.
- [9] Iliou MC, Fumeron C, Benoit MO. Prognostic value of cardiac markers in ESRD: Chronic Hemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. Am J Kidney Dis, 2003, 42: 513-523.
- [10] Iliou MC, Fumeron C. Prognostic value of cardiac markers in ESRD: Chronic Hemodialysis and New Cardiac Markers Evaluation (CHANCE) study. Am J Kidney Dis, 2003, 42: 513-523.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

rs9277341 SNP 与新疆维吾尔族及汉族乙型肝炎病毒感染的相关性研究

郭宇璇 杨丽 徐菲莉

新疆医科大学附属中医医院临床检验中心 830000

[摘要] 目的: 通过检测候选基因 rs9277341 位点单核苷酸多态性, 探讨新疆维吾尔族、汉族 rs9277341 SNPs 与慢性乙型肝炎病毒感染的相关性; 探讨 rs9277341 基因单核苷酸多态性是否影响维、汉两民族之间 HBV 感染的个体差异。为临床诊断、治疗及预后提供以分子学水平为指标的遗传学参考依据。**方法:** 收集新疆医科大学附属医院、库尔勒维吾尔医院的住院和门诊患者以及体检人员作为受试者。所收样本分为维族、汉族慢性乙肝患者; 维族、汉族健康者共四组, 每组人数均等。采用 1:1 病例-对照研究, 病例组为慢性乙肝患者, 对照组为体检健康人群。1、使用 DNA 提取试剂盒提取标本基因组 DNA 并进行质检。2、采用 SNaPshot 方法对 rs9277341 基因位点进行检测及分型。3、统计分析采用 SAS9.3。检验水准 $\alpha=0.05$, $1-\beta=0.8$ 。**结果:** 1、在 HBV+ 组和健康对照组比较中 rs9277341 ($\chi^2=11.923$, $P=0.0026$) 这个位点的 P 值小于 0.05, 具有统计学意义, 故其位点多态性与 HBV 感染相关。2、在汉族 HBV+ 与对照组比较时, rs9277341 ($=13.096$, $P=0.0014$) 的 P 值均小于 0.05, 具有统计学意义。3、在汉族健康对照组与维吾尔族健康对照组比较, rs9277341 ($=24.467$, $P<0.0001$) 个位点的单碱基分型具有统计学意义。4、汉族 HBV+ 和维吾尔族 HBV+ 比较, rs9277341 ($=47.344$, $P<0.0001$) 这个位点中单核苷酸多态性分型具有统计学意义。5、在性别与乙型肝炎病毒感染的相关性研究中发现健康对照组 rs9277341 ($=9.271$, $P=0.0097$)、位点的单碱基分型是具有统计学意义的。**结论:** 1、rs9277341 与乙型肝炎病毒感染相关, 其中 rs9277341CC 基因型可能增加乙型肝炎感染的风险。2、汉族健康对照组和维吾尔族健康对照组比较, 发现 rs9277341TT 基因型有可能降低乙型肝炎病毒感染的可能性。3、男女性别差异与乙肝病毒感染的关系, rs9277341 可能与发病人中的那女性别差异相关。rs9277341CC 基因型有可能增加乙型肝炎感染的风险。4、rs9277341 基因的基因频率是存在民族差异的, 位点中不同基因 A、G、C、T 的数目和基因频率在维吾尔族与汉族中存在显著差异。

[关键词] 慢性乙型肝炎病毒; HLA-DP; 维吾尔族; 汉族; 单核苷酸多态性

HBV 感染是最常见的感染之一, 也是导致慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)、肝硬化(cirrhosis liver cirrhosis, LC)、以及肝细胞癌 (Hepatocellular Carcinoma, HCC) 的主要原因。根据世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 统计^[1], 全球约三分之一的人口 (约 22 亿) 曾经感染过乙型肝炎病毒 (HBV), 其中大约 8%-15% 是乙型肝炎病毒 (HBV) 的慢性携带者^[2]。但是, 乙型肝炎病毒的感染在新疆地区呈现多样性, 尤其是在不同的种族之间, 根据流行病学调查研究显示, 新疆地区维吾尔族乙型肝炎的患病率明显低于汉族。樊玉榕^[3]《在新疆阿克苏地区维吾尔族健康人群乙肝两对半结果调查分析》收集了 1448 例样本, 其中汉族 647 例, 维吾尔族 801 例, 检测出汉族的阳性率为 10.2%, 而维吾尔族的阳性率为 1.1%。造成这种差异的主要原因有可能就是宿主的免疫系统和遗传机制的不同。

SNPs 是英文 Single nucleotide polymorphisms 的缩写, 中文译为单核苷酸多态性。通俗地讲, 可以认为是人类 DNA 序列的差异, 指基因组内特定核苷酸位置上存在两种不同的碱基, 其中最少一种在群体中的频率不小于 1%。人类基因组的 30 亿个碱基中, 大约每 300 到 500 个碱基就有一个 SNPs 发生, 整个人类基因组大约有 2000 万 SNPs。科学家认为 SNPs 确实可以使人易患病或影响对药物的敏感性。

本实验所研究探讨的基因位于人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA) 位于人类的第 6 号染色体上体短臂上的长约 3.6Mb 的染色体区段(6p21.31), 是一类具有多基因型与多态性的紧密连锁的基因群。HLA 与疾病的研究至今已有 30 多年的历史, 二者的关联是指携带某些特定 HLA 基因型别的个体易患某一疾病 (阳性关联), 或对该疾病有较强的抵抗力 (阴性关联)。2009 年, 随着第一篇有关慢性乙型肝炎病毒感染的 GWAS 的研究报道^[6], 全世界很多地方的乙肝研究者都将目光聚集到了 HLA-DP 基因座的单核苷酸多态性上。此研究以 786 例日本慢性乙型肝炎患者和 2201 名对照者为研究对象, 通过两步全基因组关联研究显示, 包括 HLA-DPA1 和 HLA-DPB1 基因在内的同一区域有 11 个单核苷酸多态性 (SNP) 与慢性乙型肝炎的发生、发展存在着显著相关性^[7]。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本实验收集 2012 年 5 月~2013 年 7 月共 400 名研究对象, 其中新疆医科大学附属中医医院住院和门诊患者及体检人员共计 375 名, 其中汉族 200 名(男 104 名, 女 96 名), 维吾尔族 175 名(男 93 名, 女 82 名); 库尔勒市维吾尔医院 25 名维吾尔族乙肝病毒感染患者(男 11 名, 女 14 名)。由于一例受试者在测序中未检测出结果, 故在统计分析时将其剔除。采用 1:1 病例-对照研究, 将民族作为病例组和对照组的匹配因素, 病例组为慢性乙肝患者, 对照组为健康体检人群。所收样本分为维族、汉族慢性乙肝患者; 维族、汉族健康者共四组, 每组人数均为 100 例。所有受试者尽量做到年龄、性别均等, 无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理

病例组与对照组按照以上诊断标准从 2012 年 5 月到 2013 年 7 月在新疆维吾尔自治区中医医院及库尔勒市维吾尔医院肝病科门诊、病房、体检中心收集。抽取空腹 8~12 个小时每例受试者 6ml 外周肘静脉血, 分别注入含 EDTA 抗凝管和带分离胶的生化管中。将抗凝血混匀放置于 -80℃ 冰箱保存, 以备提取人基因组 DNA。带分离胶的生化管中的血高速离心 3500 转/秒 5min, 分离血清以备血清学检查使用。以上血液标本均征得受检者知情同意, 并有相应基本资料。存放入新疆维吾尔自治区中医医院临床检验中心乙肝基因研究资料库。

1.2.2 全血基因组 DNA 提取

本实验全血基因组 DNA 提取使用天根生物科技有限公司提供的血液基因组 DNA 提取系统(0.1-20ml) (非离心柱法) 试剂盒提取, 此试剂盒可提取 0.1ml-20ml 加入各种抗凝剂的新鲜血液和冻存血液样品基因组 DNA。严格按照试剂盒的使用说明书进行操作。

1.2.3 DNA 的质检和定量

使用 K5500 核酸蛋白定量仪检测 DNA 的浓度。浓度表中, A260/A280 用于评估样品纯度, 纯净的 DNA 样品比值应大于 1.8, 比值在 1.6-1.8 为可接受范围, 如果比值低于 1.6 说明存在蛋白质或酚类物质的影响。浓度应在 30ng/ul 以上。电泳图中, 电泳条带应明亮且单一, 以背景黑、条带亮为准, 胶孔中应无蛋白残留, DNA 条带无明显拖尾现象。

1.2.4 SNaPshot 技术检测基因位点及其分型

本实验采用 SNaPshot SNP 分型技术对 400 个样本进行 SNP 位点分型。设计了 1 对 PCR 引物(rs9277341F:AACAGGGCAAAGCCACTTCTCTC;rs9277341R:CCTGCACCTGCCACTAATGACTC)用于扩增, 也设计了紧邻 SNP 位点的延伸引物用于单碱基延伸。引物用在线 Primer3 软件设计 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)。PCR 产物用 Qiagen 公司的 HotStarTaq 进行多重 PCR 获得, PCR 产物经过虾碱酶 (SAP) (from Promega) 和外切酶 I (EXO I) (from Epicentre) 纯化后用 ABI 公司的 SNaPshot Multiplex kit 进行延伸反应。延伸产物用虾碱酶 (SAP) (from Promega) 纯化后在 ABI3730xl 上样。SNP 分型用 GeneMapper4.1 (Appliedbiosystems) 来分析。

1.3 统计学处理

数据资料录入 EXCEL 表格, 统计分析采用 SAS9.3。研究中所获得数据, 年龄采用均数和标准差表示, 基因型频率和等位基因频率采用构成比或绝对数描述, 先对维吾尔族与汉族之间进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 乙肝组和非乙肝组之间基因多态性的差异采用 χ^2 检验, 分别以疾病、性别作为分层因素比较汉族和维吾尔族之间、乙肝非乙肝之间基因多态性的差异采用 Cochran-Mantel-Haensel χ^2 检验, 不同基因型和有无乙肝之间的多因素分析采用 Logistic 回归, 检验水准 $\alpha=0.05$, $1-\beta=0.8$ 。

2 结果

2.1 临床病例基本资料分析

维吾尔族人群与汉族人群基本资料见下表, 维吾尔族人群男女比例 103/96, 汉族人群男女比例 104/96; 维吾尔族人群年龄为 37.36 ± 13.47 , 汉族人群为 38.78 ± 11.50 两民族间年龄比例经 t 检验 ($t=-1.06$ $P=0.288$), 两民族间性别构成采用 χ^2 检验 ($\chi^2=0.002$ $P=0.9615$)。可以看出两民族间人口年龄与性别之间差别无统计学意义。

表 1 维吾尔族与汉族性别构成和年龄分布特征

民族/性别	性别 (男/女)	年龄
维吾尔族	103/96	37.36±13.47
汉族	104/96	38.78±1.50
统计量	$\chi^2=0.002$	$t=1.06$
<i>P</i>	0.9615	0.2881

2.2 Hardy-Weinberg 平衡

做此平衡的意义在于, 确定本实验所选实验人群是否符合 Hardy-Weinberg 平衡, 是否可以代表所研究的人群。rs9277341 位点的维吾尔族及汉族三种基因型频率 *P* 值大于 0.05, 均符合 Hardy-Weinberg 平衡。

表 2 维吾尔族与汉族不同位点 Hardy-Weinberg 平衡检验

位点	基因型	民族 n.(%)		χ^2	<i>P</i>	χ^2	<i>P</i>
		汉族 n=200	维吾尔族 n=199				
rs9277341	C/C	123(61.5)	46(23.1)	0.7359	0.3910	0.0078	0.9295
	C/T	65(32.5)	100(50.2)				
	T/T	12(6)	53(26.6)				

2.3 汉族和维吾尔族等位基因分布

rs9277341 位点存在等位基因 C、T, 其中汉族人群中是 T 占比例较高为 52%, 维吾尔族人群中 C 占比例较高为 78%。

表 3 维吾尔族、汉族基因频率

位点	基因	汉族		维族	
		数目	频率	数目	频率
rs9277341	C	311	(0.78)	192	(0.48)
	T	89	(0.22)	206	(0.52)

2.4 HLA-DP SNP 与 HBV 感染的关系

在 rs9277341 位点上, C/C 单体型在健康对照组中所占比例为 34%, 而在 HBV+ 患者中为 51%, C/T 杂合型在健康对照组所占比例为 49%, 而在 HBV+ 组占 34%, 所以相对于可能有保护作用的 C/T 杂合型, 人群中携带 C/C 单体型的人可能感染 HBV 的风险更高。

表 4 HLA-DP 基因多态性与 HBV 感染的关系

基因位点	分型	对照	HBV+	χ^2	<i>P</i>
rs9277341	C/C	68(0.34)	101 (0.51)	11.923	0.0026
	T/T	97(0.49)	68(0.34)		
	C/T	35(0.18)	30(0.15)		

2.5 汉族 HBV+ 和对照组比较、汉族健康对照组和维吾尔族健康对照组比较

在 rs9277341 中 C/C 单体型在 HBV+ 组中所占比例为 73%, 则在健康对照组中占 50%, C/T 基因型在 HBV+ 组占 25%, 在健康对照组占 40%, 故相对于保护性的 C/T 单体型, 携带 C/C 单体型的人乙型肝炎病毒感染的可能性会变大。

表 5 维吾尔族及汉族与 HLA-DP 基因的关系

基因位点	分型	汉族		维吾尔族	
		HBV+	对照	HBV+	对照
rs9277341	C/C	73 (0.73)	50 (0.50)	28 (0.28)	18 (0.18)
	C/T	25 (0.25)	40 (0.40)	43 (0.43)	57 (0.57))
	T/T	2 (0.02)	10 (0.10)	28 (0.28)	25 (0.25)

2.6 HLA-DP 基因单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒感染的关联分析

在 rs9277341 位点上 C/C 比 C/T, 乙型肝炎病毒感染的风险增加了增加了 1.2 倍。

表 6 HLA-DP 单核苷酸多态性与乙型肝炎病毒感染的关系

位点	基因	P	OR	95%CI	
				上限	下限
rs9277341	CCvsCT	0.0472	1.9796	1.01	3.93

3 讨论

本实验的研究结果 rs9277341CC 基因型可能增加乙型肝炎感染的风险。与国内外的文献报道结果有相似之处亦有差异。种族差异性、研究设计和方法学的差异以及复杂的免疫调节机制使得 HLA 等位基因与 HBV 感染及其相关疾病之间关系的研究很难获得一致的结论。宿主遗传因素与病毒的相互作用导致了 HBV 急性或慢性感染, 不同的结局与 HLA 调节的细胞内免疫反应及病毒突变相关。

乙型病毒性肝炎是一种由乙型肝炎病毒 (HBV) 感染机体后引起的疾病。由于宿主的天然免疫在机体抵抗 HBV 感染的过程中起着非常关键的作用, 因而除病毒和环境因素外, 机体遗传因素即宿主对 HBV 的遗传易感性在乙型肝炎发病和预后等方面起着尤为重要的作用。

大量的研究表明 HLA 基因多态性可能是影响 HBV 感染结局, 进一步说明了不同的具有特异性的遗传背景可以改变人群患慢性乙肝的危险性。因此, 非常有必要进行相关的家系研究, 确定不同种族人群中与 HBV 感染或感染后慢性化、肝硬化或肝癌发生相关的 HLA 等位基因及其基因型, 为进一步探讨和揭示慢性乙肝发病机制提供更有价值的科学依据。

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 项目编号: 2013211A117

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

The STAT3-regulated long non-coding RNA Lethe promote the HCV replication

Yulin Xiong.Haibin Wang

Department of Clinical Laboratory, the first affiliated hospital, PLA General Hospital, Beijing, 100048, China

[Abstract]: Long non-coding RNAs (lncRNAs) are a class of RNAs that do not code protein but play important roles in diverse biological processes. In recent years, with the application of high-throughput sequencing, a great deal of lncRNAs associated with virus infections have been discovered and intensively studied, but there are few studies about the relationship between lncRNAs and HCV replication. Previous studies show that signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is activated by HCV and in turn increases the replication of HCV. However, the detailed molecular mechanism is still only partially understood. In the present study, we have established that phosphorylated STAT3 can promote the HCV replication. Furthermore, we identify that several lncRNAs can be up-regulate and down-regulated by phosphorylated STAT3 by using human PCR array method. And among these lncRNAs, lnc-Lethe was involved in the HCV replication. Transfection of siRNA Lethe partially blocked the replication of HCV in Huh7 cells. Data also indicated that when transfected with siRNA Lethe, the expression levels of PKR, OAS and IRF1, which were all ISGs, were all up regulated. Based on our findings from Lethe knockdown, we have identified that Lethe, which was upregulated by activated STAT3, may promoting the replication of HCV through a negative regulatory mechanism of type I IFN response.

[Keywords] Long non-coding RNAs STAT3 HCV replication Lethe

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) is a hepatotropic RNA virus of the genus Hepacivirus in the Flaviviridae family. Since first discovered in 1989, HCV has become a globally spread virus, leading to a global health problem which requires significant resources for its prevention and control. HCV can cause acute and chronic hepatitis in humans and chimpanzees, if untreated it may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma^[1]. HCV is a positive-sense, single-stranded enveloped RNA virus approximately 9600 nucleotides in length^[2]. Signal transducer and activator of transcription factors (STATs) are a family of transcription factors that plays essential roles in cell growth, development, proliferation, immune defense and differentiation. Seven members of the STAT family have been identified and characterized, including STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b and STAT6^[3]. Among the STAT family, STAT3 has been identified as a critical regulator in tumor cells^[4]. The activation of STAT3 might be one of the mechanisms by which Human papilloma virus (HPV) achieve oncogenic transformation. E2 as an early protein of HPV16, potentiates TNF- α -mediated NF- κ B activation through activation of STAT3 in the presence of TNF- α . And this resulted in the reversal of E2-induced apoptosis, which leading to cell survival^[5]. Robert S. Tacke et al found that extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes, macrophages and dendritic cells through an IL-6 autocrine pathway^[6]. Previous studies pointed that STAT3 act as a negative regulator of type I IFN-mediated response^[7].

Non-coding RNAs (ncRNAs) are transcribed RNA molecules with little or non-protein coding capacity. Among all types of ncRNAs, long non-coding RNAs (lncRNAs), a regulatory ncRNAs, play critical roles in almost every aspect of cellular processes^[8]. Quan Zhang et al found that NEAT1 to be one of several lncRNAs whose expression is changed by HIV-1 infection, and the knockdown of NEAT1 enhanced HIV-1 production through increased nucleus-to-cytoplasm export of Rev-dependent instability element (INS)-containing HIV-1 mRNAs^[9]. Apart from HIV, according to a large number of recent studies, lncRNAs are related to the development and progress of HCV which caused hepatocellular carcinoma (HCC)^[10]. Emerging evidences point to the involvement of lncRNAs in many aspects of the immune response, including several pathways related to innate immunity^[11-13]. Most recently, Hiroto Kambara et al reported that IFN-induced lncRNA-CAPK2 has an inhibitory effort on transcription of IFN-stimulated antiviral genes, which suggest that CMPK2 acts as a negative regulator of IFN response^[8]. Despite these discoveries, the role of lncRNAs in key aspects of the immune response including the nearly ubiquitous and functionally crucial interferon (IFN) response remains to further investigation.

In this study we investigated the role of activated STAT3 in HCV replication. We present evidence that STAT3 may enhance HCV replication by way of up regulating lnc-Lethe which inhibits the expression levels of PKR, OAS and IRF1. We need further studies for the exact relationship between Lethe and type I IFN Response.

Materials and methods

Cell culture and virus

Human hepatoma cells (Huh7) are a cell line highly permissive for HCV replication^[14]. Cells were cultured in DMEM medium (HyClone) with 10% FBS and cell culture plates were all placed in a humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C. The genotype 2a HCV strain JFH-1 was produced and propagated as described in Wakita et al^[15].

Abs and drugs

The sources of Abs are as follows: anti-GAPDH (Sigma-Aldrich), anti-phospho-STAT3 (Y705), anti-STAT3 (Cell Signaling Technology), anti-NS5A, anti-NS3 (Abcam), anti-PKR, anti-OAS and anti-IRF1 (Abcam); LIF and AG490 (Abcam)

Total RNA extraction

Total RNA from the cells was extracted by using trizol. 1 mL of trizol reagent was added to the 6-well plates and then incubated the homogenized samples for 10 minutes at room temperature. 0.2 mL of chloroform was added to the samples and was shook vigorously for 15 seconds. The samples were incubated for 5 minutes at room temperature and then centrifuged at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C. Transfer the upper aqueous phase to new tubes, and add 0.5 mL of isopropyl alcohol. Incubate samples for 10 minutes at room temperature, then centrifuge at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C. Carefully remove the supernatant liquid without disturbing the pellet containing the RNA. Wash the RNA pellet with 1 mL of 75% ethanol for three times, then centrifuge at 12,000 x g for 10 minutes at 4 °C. Carefully remove the supernatant and dry the RNA pellet for 10-15 minutes. Re-dissolve the RNA pellet in nuclease-free water according to pellet size. Measure the concentration of RNA using the NanoDrop 1000 spectrophotometer (measure absorbance at 260 nm and 280 nm).

LncRNAs PCR array

The Human LncRNA PCR Array Kit, named Human LncRNA Profiler, which includes 90 lncRNAs associating with many

human diseases, was designed and produced by the Shanghai Funeng biological technology Co., Ltd (Shanghai, China). The sample preparation and Human LncRNA PCR Array Kit were prepared based on the manufacturer's protocols. Purified RNA was reversed transcribed into cDNA with Human LncRNA Profiler cDNA synthesis Buffer. Real-time PCR and PCR array amplification was conducted by IQ5 machine (Bio-Rad) and the conditions were set as follows: 15 seconds at 95 °C, followed by 40 cycles of: 15 seconds at 95 °C, 30 seconds at 65 °C and 30 seconds at 72 °C. Subsequently a melt curve analysis was performed to determine the specificity of the PCR reaction. The relative gene expression was calculated by using $\Delta\Delta C_t$ method^[16]. The primer sequence of lnc-Lethe was: forward 5'-ACAATGAAGCCAAACTGCCG-3'; reverse 5'-AGTTTGTCCAAGGGACCCCA-3'.

Real-time PCR

Reverse transcription of RNA was performed according to Reverse Transcription System of Promage. The primers were designed using the NCBI primer blast tool. The PCR system contained 2 μ L of diluted cDNA, 12.5 μ L of Fast SYBR Green Master Mix (Invitrogen), and 10 μ M of each gene specific primer in a total volume of 25 μ L. Real-time PCR reactions were performed in triplicates in 96-well plates under the following conditions: 15 seconds at 95 °C, followed by 40 cycles of: 15 seconds at 95 °C, 30 seconds at 65 °C and 30 seconds at 72 °C.

siRNA Transfection

Monolayers of Huh7 cells with 70% confluence in 6 well plates were transfected with siRNA Lethe or with siRNA negative control. Transfection was performed using Lipofectamine™ 2000 according to the manufacturer's instructions. In brief, Huh7 cells (in serum free DMEM) were transfected using different amount of Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) according to siRNA quantity. Eight hours postinfection, the cells were harvested to measure the viral gene mRNA level by real-time PCR. The siRNA sequence were designed and synthesized by Shanghai GenePharma Co., Ltd. Negative control sequence was a missense sequence. The sequence of Lethe siRNAs are as follow: si-Lethe-1, 5'-GAGGACATCAGAAAGAACTCAGAAT-3'; si-Lethe-2, 5'-CATCAGAAAGAACTCAGAATCCGCA-3'; si-Lethe-3, 5'-AAAGAACTCAG AATCCGCACTCTTT-3'; si-Scramble, 5'-GAGCTACAAGAAAGAACT CGAGAAT-3'.

Western blot

Cells were collected by trypsinization. Total protein was extracted by using the RIPA plus PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) according to the manufacturer's instructions. The protein samples were diluted in 5 \times loading buffer, boiled for 10 minutes, subjected to a 10% polyacrylamide gel and underwent electrophoresis. The proteins were transferred to Polyvinylidene Fluoride membranes. After transfer, the membranes were blocked with 5% (w/v) nonfat dry milk in TBS-T (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl containing 0.1% v/v Tween 20) for at least 1 h and then the membranes were incubated overnight at 4 °C with monoclonal antibodies in blocking buffer. After being washed three times with TBST, the membranes were incubated with secondary antibodies for 30 min and were revealed using an ECL PLUS detection kit.

Results

1. Activation of STAT3 Increases HCV Replication

STAT3 activation requires posttranslational modifications through phosphorylation at tyrosine 705 (Y705) to be functionally active^[17]. To investigate if STAT3 activation affects the HCV life cycle, we activated STAT3 by way of exogenous cytokine treatment with LIF, a known activator of STAT3. As expected, the levels of STAT3-Y705 were significantly increased with the treatment of LIF in a time dependent manner and dose dependent manner, while the total STAT3 levels were not changed with the treatment of LIF (Fig 1A, 1C). When Huh7 cells pretreated with LIF for a time course of 0-60 minutes before infection of HCV, the mRNA levels of HCV increased in a time dependent manner (Fig 1B). And when treated Huh 7 cells with different doses of LIF prior to infection of HCV, the mRNA levels of HCV increased in a dose dependent manner (Fig 1D). Consistent with this increase in HCV mRNA levels, we observed a marked increase in NS5A and NS3 protein levels with LIF treatment prior to infection of HCV JFH-1 strain (Fig 1E, 1F). These results indicate that activated STAT3 plays an important role in HCV replication or potentially induce the expression of specific genes that are in turn able to create an environment that is favorable for HCV replication.

2. Chemical Inhibition and siRNA Knockdown of STAT3 Inhibits HCV Replication

As we have known that activation of STAT3 results in enhanced HCV replication, we performed the converse sets of experiments by using both siRNA knockdown approach and a chemical inhibitor that block STAT3 activation. Three pairs of STAT3 siRNA and a control siRNA were transfected into Huh-7 cells and total STAT3 determined by western blot and

real-time PCR. The si-STAT3-2 can almost reduce STAT3 expression by 75% (Fig 2A). To investigate the effect of STAT3 siRNA knockdown on HCV replication, Huh7 cells were transfected with si-STAT3-2 or a control scrambled siRNA, and infected with HCV JFH-1. The knockdown of STAT3 with siRNA decreased HCV mRNA levels by 50% (Fig 2B). Then we used AG490, a JAK-2 protein tyrosine kinase (PTK) indirectly inhibits Y705 phosphorylation of STAT3. AG490 treatment had no significant impact on Huh7 cell cycle progression or cell growth and was not toxic (data not shown). The levels of STAT3-Y705 were significantly decreased with the treatment of AG490 in a dose-dependent manner, while the total STAT3 levels were not changed with the treatment of AG490 (Fig 2C). When Huh7 cells were pretreated with the AG490 followed by JFH-1 infection, we observed a significant decrease in HCV mRNA levels, almost by 70% at 20 $\mu\text{mol/L}$ of AG490 (Fig 2D). Then we validated this effect by performing western blotting approach. As expected, we observed a marked decrease in NS5A and NS3 protein levels with AG490 treatment (Fig 2E).

3. Activation of STAT3 regulate lncRNAs

The lncRNA PCR array method was used to detect the different expression levels of lncRNAs in STAT3 activated and control cells. As shown in Fig 3A, several lncRNAs that were reproducibly up- or downregulated in STAT3 activated cells. These identifications were based on the criterion that all changes were at least 2-fold or more compared to control cells. As shown in Fig 3A, 10 lncRNAs were upregulated and 6 lncRNAs were downregulated in STAT3 activated Huh7 cells. Among all these upregulated or downregulated lncRNAs, we then further studied the characterization of Lethe as it was upregulated highest level in all the lncRNAs that were upregulated by STAT3 activation.

To confirm and extend this observation we compared the mRNA levels of Lethe in Huh7 cells treated with LIF or AG490 with control cells and verified that expression level of Lethe in the LIF treated cells was indeed upregulated by approximately 5 fold and in the AG490 treated cells was decreased (Fig 3B). Then we wondered if just HCV infections can upregulate the expression level of Lethe. The mRNA levels of Lethe in the HCV infected cells was upregulated by almost 4 fold Compared with control cells, which has similar effect as pretreatment with LIF prior to infection of HCV (Fig 3C).

4. Depletion of Lethe inhibit HCV replication

The above data show that HCV infection increases the expression level of Lethe, but we wondered how Lethe expression might reciprocally influence HCV replication. Then we employed small interfering RNA (siRNA) knockdown of Lethe. Three pairs of Lethe siRNA and a control siRNA were transfected into Huh-7 cells, and si- Lethe -3 can reduce the RNA levels approximately 80% compared to control siRNA (Fig 4A). Then Huh7 cells were transfected with si- Lethe -3 or a control siRNA, and infected with HCV JFH-1. The knockdown of Lethe decreased HCV mRNA levels more than 50% (Fig 4B). The western blot assay showed that NS5A and NS3 protein levels were both decreased more than 50% with the knockdown of Lethe (Fig 4C). As we have known LIF could activate STAT3 and then promote the HCV replication, we wondered if decreasing the Lethe could block the effect of LIF on HCV replication. As Fig 4D shown that the HCV mRNA levels would not increase in Huh7 cells transfected with Lethe siRNA after the treatment of LIF compared with control cells. These results indicate that Lethe promotes HCV replication.

5. Lethe may promote HCV replication by regulating type I IFN Response

As previous study shows that STAT3 is a negative regulator of type I IFN response, we wondered whether the Lethe, upregulated by activated STAT3, would affect type I IFN response^[7]. Then the effects of decreasing Lethe expression on the expression of ISGs, including PKR, OAS and IRF1 were investigated. It is shown that the expression levels of PKR, OAS and IRF1 were all upregulated by transfected with Lethe siRNA (Fig 5A, 5B, 5C). Then the real-time PCR assay also confirmed that Lethe siRNA would upregulate the mRNA levels of PKR, OAS and IRF1 (Fig 5D). To confirm and extend this observation we investigated the mRNA levels of PKR, OAS and IRF1 when Huh7 cells treated with LIF and then transfected with Lethe siRNA. And as expected the mRNA levels of all three ISGs were much higher than those in Huh7 cells treated with LIF and control siRNA or LIF only (Fig 5E). Together, these results suggest that Lethe may promote HCV replication by regulating type I IFN Response.

Discussion

In this study, we report two novel findings: i) activation of STAT3 up regulated lnc-Lethe which promoted HCV replication in Huh7 cells. ii) lnc-Lethe may promote HCV replication by regulating type I IFN response. A previous study showed that genetic or pharmacologic activation of STAT3 in glioma cells enhanced oHSV replication and cytotoxicity^[18]. And

McCartney et al also proved that HCV replication increase STAT3 activation, in turn activation of STAT3 increases HCV replication by modulating microtubule dynamics^[17]. Activation or overexpression of STAT3 is relevant to many human cancers including Epstein–Barr virus (EBV)-related cancers. The expression of STAT3 would rapidly increase upon the EBV infection, which mediates relaxation of the intra-S phase cell-cycle checkpoint; this facilitates viral oncogene-driven cell proliferation^[19]. HCV Core had been found capable of up-regulating the expression of NANOG which is a member of the homeobox family of DNA binding transcription factors and was identified as pluripotency promoting genes. And this core-induced NANOG expression enhanced cell growth and cell cycle progression through increased expression of phosphorylated STAT3 protein^[20].

The long non-coding RNAs are RNAs with size > 200 bp. Recent findings have revealed that lncRNAs are involved in serial steps of cancer development. These lncRNAs interact with DNA, RNA and proteins, acting as an essential regulator in cell differentiation and organogenesis. Their misexpression implies the cancer cell capacities for the tumor produce, growth, and metastasis^[21, 22]. Lnc-DC which was exclusively expressed in human conventional dendritic cells (DCs) was involved in the DC differentiation and stimulated T-cell activation through interacting with STAT3^[23]. The long non-coding RNA---HULC, highly up-regulated in liver cancer, is dramatically up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC), which functioned through suppressing a tumor suppressor gene p18^[24]. Lnc RNA-CMPK2 was induced by IFN and also acted as a negative regulator of IFN response, at least partially through suppression of transcription of a subset of antiviral ISGs. Previous studies have shown that Lethe was actively regulated and constitute functional regulator of inflammatory signaling^[25].

In this study, we have demonstrated that STAT3 plays a role in HCV replication. We used LIF as an activator of STAT3 to prove that the increase of STAT3 phosphorylation at Y705 would promote HCV replication, and as inhibition of STAT3 with the specific inhibitor AG490 or siRNA mediated knockdown of STAT3 significantly reduced HCV replication. Then, we used human LncRNA PCR array kit, to compare the LncRNA expression profile difference between STAT3 activated Huh7 cells and control cells. We found several lncRNAs regulated by activated STAT3. Among all these regulated lncRNAs, Lethe may promote the replication of HCV by down-regulating the expression levels of PKR, OAS and IRF1.

In summary, these findings would be helpful to further understand the molecular mechanism of HCV replication and the influence of STAT3 on HCV replication. Also we have done a preliminary study about the mechanism of how Lethe works. Our future analysis will focus on whether Lethe would be potential diagnostic even therapeutic targets for HCV infection.

References

- [1] Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 107-115.
- [2] Kim CW and Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol* 2013; 19: 17-25.
- [3] Qi QR and Yang ZM. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. *World J Biol Chem* 2014; 5: 231-239.
- [4] Nguyen AV, Wu YY and Lin EY. STAT3 and sphingosine-1-phosphate in inflammation-associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20: 10279-10287.
- [5] Prabhavathy D, Prabhakar BN and Karunakaran D. HPV16 E2-mediated potentiation of NF-kappaB activation induced by TNF-alpha involves parallel activation of STAT3 with a reduction in E2-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 2014; 394: 77-90.
- [6] Tacke RS, Tosello-Tramont A, Nguyen V, Mullins DW and Hahn YS. Extracellular hepatitis C virus core protein activates STAT3 in human monocytes/macrophages/dendritic cells via an IL-6 autocrine pathway. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 10847-10855.
- [7] Wang WB, Levy DE and Lee CK. STAT3 negatively regulates type I IFN-mediated antiviral response. *J. Immunol.* 2011; 187: 2578-2585.
- [8] Kambara H, Niazi F, Kostadinova L, Moonka DK, Siegel CT, Post AB, Carnero E, Barriocanal M, Fortes P, Anthony DD and Valadkhan S. Negative regulation of the interferon response by an interferon-induced long non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42: 10668-10680.
- [9] Zhang Q, Chen CY, Yedavalli VS and Jeang KT. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. *MBio* 2013; 4: e00596-00512.
- [10] Hou W and Bonkovsky HL. Non-coding RNAs in hepatitis C-induced hepatocellular carcinoma: dysregulation and

- implications for early detection, diagnosis and therapy. *World J. Gastroenterol.* 2013; 19: 7836-7845.
- [11] Fitzgerald KA and Caffrey DR. Long noncoding RNAs in innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2014; 26: 140-146.
- [12] Pang KC, Dinger ME, Mercer TR, Malquori L, Grimmond SM, Chen W and Mattick JS. Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CD8+ T cells. *J. Immunol.* 2009; 182: 7738-7748.
- [13] Gomez JA, Wapinski OL, Yang YW, Bureau JF, Gopinath S, Monack DM, Chang HY, Brahic M and Kirkegaard K. The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon-gamma locus. *Cell* 2013; 152: 743-754.
- [14] Blight KJ, McKeating JA and Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 2002; 76: 13001-13014.
- [15] Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Krausslich HG, Mizokami M, Bartenschlager R and Liang TJ. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* 2005; 11: 791-796.
- [16] Liu T, Zhang S, Chen J, Jiang K, Zhang Q, Guo K and Liu Y. The transcriptional profiling of glycogenes associated with hepatocellular carcinoma metastasis. *PLoS ONE* 2014; 9: e107941.
- [17] McCartney EM, Helbig KJ, Narayana SK, Eyre NS, Aloia AL and Beard MR. Signal transducer and activator of transcription 3 is a proviral host factor for hepatitis C virus. *Hepatology* 2013; 58: 1558-1568.
- [18] Okemoto K, Wagner B, Meisen H, Haseley A, Kaur B and Chiocca EA. STAT3 activation promotes oncolytic HSV1 replication in glioma cells. *PLoS ONE* 2013; 8: e71932.
- [19] Koganti S, Hui-Yuen J, McAllister S, Gardner B, Grasser F, Palendira U, Tangye SG, Freeman AF and Bhaduri-McIntosh S. STAT3 interrupts ATR-Chk1 signaling to allow oncovirus-mediated cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2014; 111: 4946-4951.
- [20] Zhou JJ, Chen RF, Deng XG, Zhou Y, Ye X, Yu M, Tang J, He XY, Cheng D, Zeng B, Zhou QB and Li ZH. Hepatitis C virus core protein regulates NANOG expression via the stat3 pathway. *FEBS Lett.* 2014; 588: 566-573.
- [21] Yang G, Lu X and Yuan L. LncRNA: a link between RNA and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2014; 1839: 1097-1109.
- [22] Fatica A and Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* 2014; 15: 7-21.
- [23] Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, Xu S, Jiang Z, Xu J, Liu Q and Cao X. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science* (80-) 2014; 344: 310-313.
- [24] Du Y, Kong G, You X, Zhang S, Zhang T, Gao Y, Ye L and Zhang X. Elevation of highly up-regulated in liver cancer (HULC) by hepatitis B virus X protein promotes hepatoma cell proliferation via down-regulating p18. *J. Biol. Chem.* 2012; 287: 26302-26311.
- [25] Raponavoli NA, Qu K, Zhang J, Mikhail M, Laberge RM and Chang HY. A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics. *elife* 2013; 2: e00762.

Figure legends:

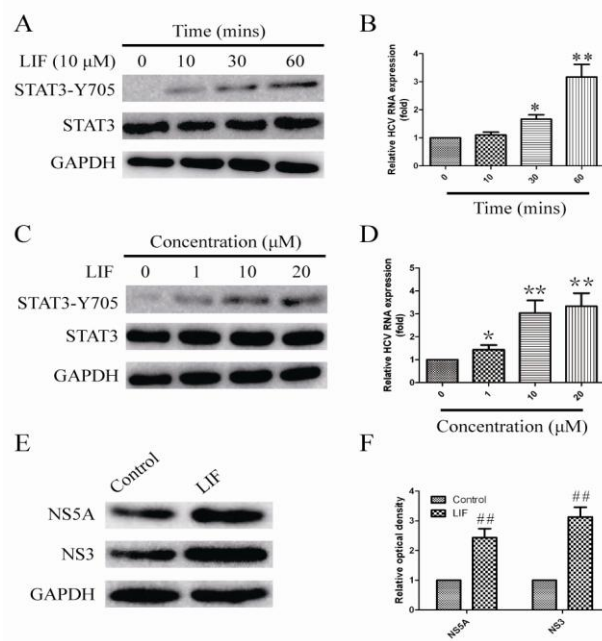


Fig 1. Activation of STAT3 Increases HCV Replication

(A) Huh7 cells were treated with LIF (10 μ M) for a time course of 0-60 minutes. Immunoblots were probed with antibodies for STAT3-Y705, STAT3 and GAPDH. (B) Pretreated Huh7 cells with LIF for a time course of 0-60 minutes before infection of JFH-1(0.01MOI) for 24h and total RNA extracted for real-time PCR of HCV mRNA levels. Results are mean \pm SD from three independent experiments performed in triplicate. Relative expression is expressed in arbitrary units. *, P<0.05; **, P<0.005 (C) Huh7 cells were treated with different dose of LIF (0,1,10,20 μ M). Immunoblots were probed with antibodies for STAT3-Y705, STAT3 and GAPDH.(D) Pretreated Huh7 cells with different dose of LIF before infection JFH-1(0.01MOI) for 24 h and total RNA extracted for real-time PCR of HCV mRNA levels. Results are mean \pm SD from three independent experiments performed in triplicate. Relative expression is expressed in arbitrary units. (E,F)Huh7 cells were pretreated with LIF(10 μ M) and DMSO control for 1 h prior to infection with JFH-1(0.01MOI). Total cell lysates were harvested at 24 h and immunoblots probed with antibodies for NS5A, NS3 and GAPDH. Densitometry analysis confirmed the results (data are represented as mean \pm SD *,P<0.05; **, P<0.005).

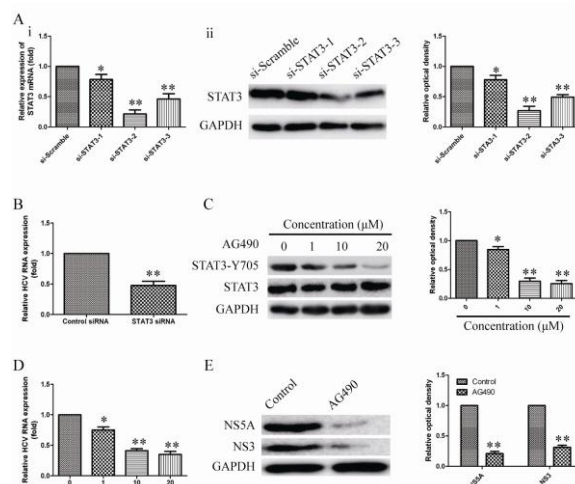


Fig 2. Chemical Inhibition and siRNA Knockdown of STAT3 Inhibits HCV Replication

(A) Huh7 cells were transfected with three pairs of STAT3 siRNA or scrambled control. Total RNA and protein was harvested for RT-qPCR of mRNA levels(Ai) and western blot analysis(Aii) (data are represented as mean \pm SD *,P<0.05; **, P<0.005)

P<0.005). (B)Huh7 cells were transfected with STAT3 siRNA or control siRNA and at 48h posttransfection, cells were infected with JFH-1(0.01MOI). At 24 hours postinfection total RNA was harvested for RT-qPCR of HCV mRNA levels(data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005). (C) Huh7 cells were pretreated with AG490(1-20 μM) and DMSO control. Total protein was harvested for western blot analysis (densitometry analysis data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005). (D) Huh7 cells were pretreated with AG490(1-20μM) and DMSO control for 1 hour prior to infection with JFH-1 (0.01MOI). RT-qPCR analysis were performed to detect the HCV mRNA levels(analysis data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005). (E)Huh7 cells were pretreated with AG490 or DMSO control for 1 hour prior to infection with JFH-1 (0.01MOI). Total protein was harvested for western blot analysis (densitometry analysis data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005).

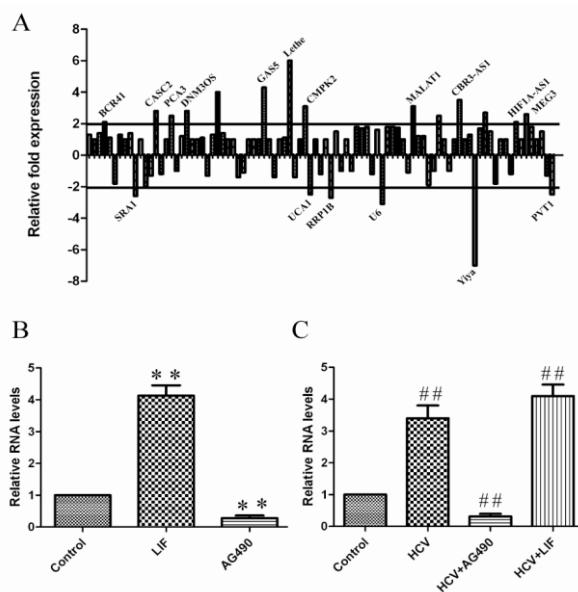


Fig 3. A summary of differentially expressed lncRNAs in LIF treated Huh7 cells

(A)Huh7 cells were treated with LIF(10μM) or DMSO control. The cells were collected to extract total RNA. The same amounts of RNA were converted into cDNA. Disease-related Human LncRNA Profiler was used to analyze the expression levels of lncRNAs in the samples. Each vertical line represents a single lncRNA value of relative expression in LIF treated Huh7 cells compared to that in DMSO treated cells.(B)Huh7 cells were treated with LIF(10 μM), AG490(10 μM) or DMSO control. Total RNA was harvested for RT-qPCR of Lethe mRNA levels(data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005). (C, B)Huh7 cells were pretreated with LIF(10 μM), AG490(10 μM) or DMSO control for 1 h prior to infection with JFH-1(0.01MOI).Total RNA was harvested for RT-qPCR of Lethe mRNA levels(data are represented as mean±SD *,P<0.05; **, P<0.005).

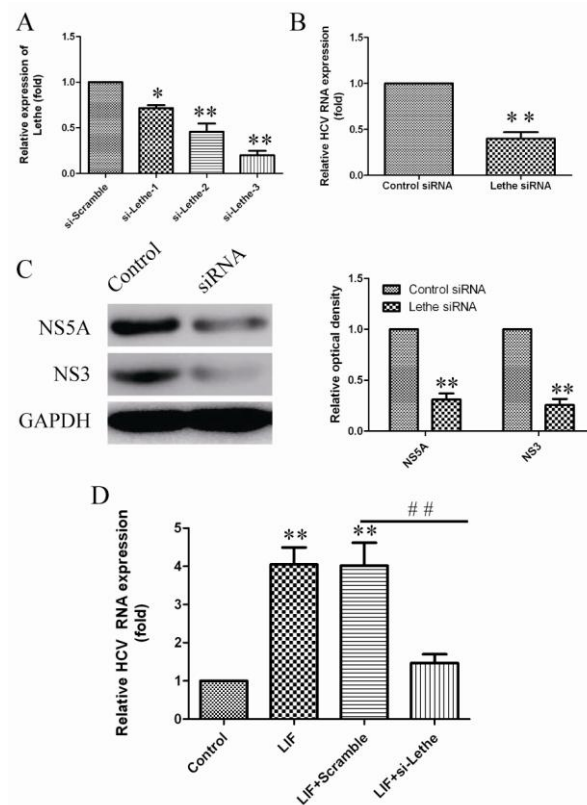


Fig 4. Depletion of Lethe inhibit HCV replication

(A) Huh7 cells were transfected with three pairs of Lethe siRNA. Total RNA was harvested for RT-qPCR of Lethe mRNA levels (data are represented as mean \pm SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$). (B) Huh7 cells were transfected with Lethe siRNA or control siRNA and at 48h posttransfection, cells were infected with JFH-1 (0.01 MOI). At 24 hours postinfection total RNA was harvested for RT-qPCR of HCV mRNA levels (data are represented as mean \pm SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$). (C) Huh7 cells were transfected with Lethe siRNA or control siRNA and at 48h posttransfection, cells were infected with JFH-1 (0.01 MOI). Total cell lysates were harvested at 24 hours postinfection and immunoblots probed with antibodies for NS5A, NS3 and GAPDH. Densitometry analysis confirmed the results (data are represented as mean \pm SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$). (D) Huh7 cells were pretreated with LIF for 1h and then transfected with Lethe siRNA or scramble control and at 48h posttransfection, cells were infected with JFH-1 (0.01 MOI). At 24 hours postinfection total RNA was harvested for RT-qPCR of HCV mRNA levels (data are represented as mean \pm SD, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$).

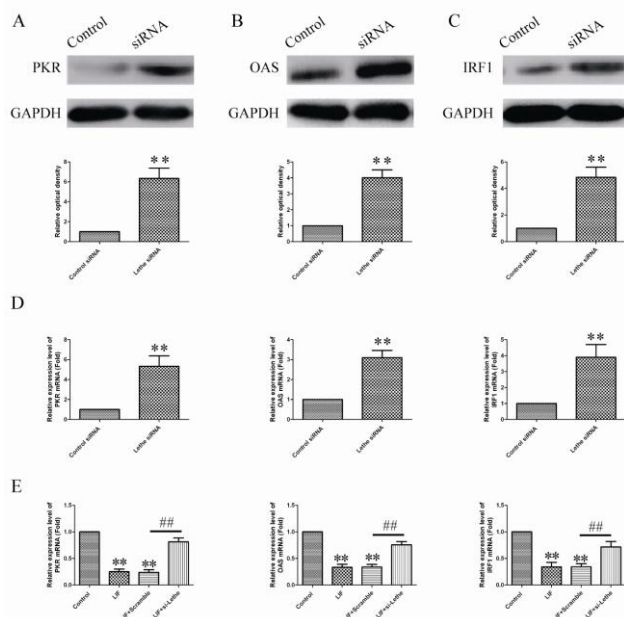


Fig 5. Lethe siRNA upregulated the expression of PKR, OAS and IRF1

(A, B, C) Huh7 cells were transfected with Lethe siRNA. Total cell lysates were harvested at 48h posttransfection and immunoblots probed with antibodies for PKR, OAS, IRF1 and GAPDH. Densitometry analysis confirmed the results (data are represented as mean \pm SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$). (D) Huh7 cells were transfected with Lethe siRNA. Total RNA was harvested at 48h posttransfection for RT-qPCR of PKR, OAS and IRF1 mRNA levels (data are represented as mean \pm SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$). (E) Huh7 cells were pretreated with LIF or DMSO control for 1h and then transfected with Lethe siRNA or scramble control. Total RNA was harvested 48h posttransfection for RT-qPCR of PKR, OAS and IRF1 mRNA levels (data are represented as mean \pm SD *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$).

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

2种HBsAg定量检测系统对HBV不同感染阶段及不同基因型样本检测的一致性评价

刘杨 彭道荣 马越云 程晓东 张涛 王菁 郝晓柯
第四军医大学西京医院检验科, 陕西 西安 710032

[摘要] 目的:分析罗氏 MODULAR E170 电化学发光免疫分析系统(罗氏 E170)和雅培 i2000 化学发光微粒子免疫分析系统(雅培 i2000)对慢性乙型肝炎不同感染阶段、不同基因型患者的乙型肝炎表面抗原(HBsAg)定量检测结果的一致性。方法:收集临床上未经抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者血清样本共 125 例,根据《慢性乙型肝炎防治指南》中的标准,将样本分为免疫耐受期、免疫清除期、低复制期和再活动期 4 组,同时根据基因型(B/C)及 HBsAg 水平($\text{HBsAg} < 1\ 000\ \text{IU/mL}$ / $\text{HBsAg} > 1\ 000\ \text{IU/mL}$)分组。用上述 2 种检测系统平行检测 HBsAg,分析各组间两种系统检测结果的一致性。结果:2 种检测系统总体相关性、一致性好($r=0.989$, $P < 0.001$);4 个不同感染阶段相关系数 r 为 $0.977 \sim 0.993$ (P 均 < 0.001);Bland-Altman 一致性分析中,免疫清除期、低复制期和再活动期一致性较好,但在免疫耐受期罗氏 E170 检测结果较雅培 i2000 高,偏差为 $0.114\log_{10}\text{IU/mL}$;B、C 基因型组 2 种检测系统相关性、一致性均好(r 均 > 0.95 , $P < 0.001$);高水平组 2 种检测系统相关性较差($r=0.959$),但在专业可接受范围内;且高水平组 2 种检测系统的偏差较大,罗氏 E170 比雅培 i2000 平均高 $0.076\log_{10}\text{IU/mL}$ 。结论:2 种系统检测不同感染阶段及不同基因型的样本相关性和一致性较好,但在检测免疫耐受期及高值样本时罗氏 E170 较雅培 i2000 结果偏高,临床上用 HBsAg

预测抗病毒疗效时, 治疗前后尽量选择同一系统的结果, 以避免由于两系统间的差异造成对治疗疗效的错误评估。

[关键词] 乙型肝炎表面抗原; 相关性; 一致性; 评价

Evaluation of the consistency of two HBsAg quantitative detection systems in different HBV infection phases and different genotypes. Liu Y¹, Peng DR, Cheng XD, Ma YY, Zhang T, Wang J, Hao XK* (Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032)

[Abstract]Objective: To analyze the consistency of the Roche E170 electrochemiluminescence immunoassay system (Roche E170) and the Abbott i2000 chemiluminescent microparticle immunoassay system (Abbott i2000) in HBsAg quantitative detection between the different HBV infection phases, different genotypes and different HBsAg levels. **Methods:** Collected 125 serum samples of chronic hepatitis B patients without antiviral treatment, then divided these samples into four different phases according to "The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B", including the immune tolerant phase, the immune clearance phase, the low replicative phase and the HBeAg-negative hepatitis phase. At the same time, divided them into different genotypes groups (B /C) and different HBsAg levels groups (HBsAg < 1000 IU/ml and HBsAg > 1000 IU/ml). All the samples were detected by the two systems and analyzed the consistency of the results. **Results:** The overall correlation and consistency of the two system were well, $r=0.989$, $p<0.001$; The correlation coefficients of the four different phases were from 0.977 to 0.993, $p<0.001$; The results of Bland-Altman analysis showed that the consistencies of the two system during the immune clearance phase, the low replicative phase and the HBeAg-negative hepatitis phase were well, but during the immune tolerant phase, the results measured by Roche E170 were higher than Abbott i2000, bias = 0.114 \log_{10} IU/ml; For B and C genotypes, the correlation and consistency were well, $r>0.95$, $p<0.001$; The correlation coefficients of the higher HBsAg level group was 0.959 and the bias of the Roche E170-Abbott i2000 was 0.076 \log_{10} IU/ml. even though the correlation was poorer than the lower HBsAg level group's, it was falling in professional acceptable range. **Conclusion:** The overall consistencies of the two systems for different phases and different genotypes are well, but for the immune tolerance phase and the high level samples, HBsAg levels tested by Roche E170 are higher than Abbott i2000, so in order to avoid the differences between systems, the same system should be used to evaluate the efficacy of antiviral therapy.

[Key words] Hepatitis B virus surface antigen; Correlation; Consistency; Evaluation

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种嗜肝性 DNA 病毒, 感染人体后可经历免疫耐受期、免疫清除期、低复制期和再活动期 4 个不同的自然免疫阶段, 不同阶段及不同基因型的慢性乙型肝炎患者乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 水平不同^[1]。临床上用 HBsAg 水平对患者抗病毒治疗疗效进行监测时, 其在治疗前的基线水平及治疗过程中的下降幅度都是预测其疗效的重要依据^[2-3]。有研究显示, 由于 HBsAg 在不同基因型间慢性乙型肝炎患者体内的动力学不同, 故其在治疗过程中的下降幅度不同, 在预测抗病毒应答时, 应根据不同基因型设定各自特有的阈值^[4]。罗氏 E170 电化学发光免疫检测系统和雅培 i2000 微粒子免疫检测系统是两种临床上应用最广泛的 HBsAg 定量检测方法, 较多研究都显示了二者具有较高的符合率和相关性^[5], 但缺乏对不同自然免疫状态及不同基因型样本的一致性评价。只有 2 种检测系统对治疗前不同自然免疫阶段的 HBsAg 基线水平检测一致, 以及不同基因型别样本检测一致, 临床才不会因检测系统的不同对患者的疗效做出错误的评估。因此, 本研究的目的是评估罗氏 E170 和雅培 i2000 2 种检测系统在不同自然免疫阶段及不同基因型间 HBsAg 检测的一致性。

1 材料和方法

1.1 研究对象

样本均来自 2015 年 6 至 9 月第四军医大学一附院 (西京医院) 就诊患者, 共 125 例, 无抗病毒治疗史, 且排除其他肝炎病毒感染及其他因素导致的肝脏疾病。

1.2 仪器和试剂

罗氏电化学发光免疫分析仪 MODULAR E170 及罗氏乙肝表面抗原检测试剂盒 (电化学发光法) (德国罗氏诊断有限公司); 雅培化学发光微粒子免疫分析仪 ARCHITECT i2000 及雅培乙肝表面抗原定量检测试剂盒 (化学发光法) (美国雅培有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 检测方法

所有样本均用 2 种仪器及配套试剂平行检测, 检测流程均按说明书进行。雅培试剂原倍检测浓度范围为 0.05~250 IU/mL, 大于上限可 500 倍稀释再检; 罗氏试剂首次检测需强行上机 400 稀释, 检测范围为 20~52 000 IU/mL, 小

于 20 IU/mL 的原倍再检，大于 52 000 IU/mL 的可进一步手工稀释再检。

1.3.2 样本分组

根据 2010 年中华医学肝病学会和中华医学会感染病学分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》^[6] 中的诊断标准，将所收集的 125 例慢性乙型肝炎患者分为不同感染阶段，即免疫耐受期（慢性 HBV 携带者）、免疫清除期（HBeAg 阳性慢性乙型肝炎）、低复制期（非活动性 HBsAg 携带者）和再活动期（HBeAg 阴性慢性乙型肝炎）；各期临床特征、基因分型及 HBsAg 定量水平均见表 1。

表 1 125 例慢性乙型肝炎患者的临床特征

临床分期	年龄 均值（范围）	性别 （男/ 女）	HBsAg log ₁₀ (IU/mL) 均值（范围）	基因分型(B/C)	HBsAg (小于/大 于 1 000 IU/mL)
免疫耐受(n=26)	23(7-37)	9/17	4.23 (2.00~5.38)	6/20	0/26
免疫清除期 (n=31)	37 (16-61)	26/5	3.51 (-0.92~5.39)	5/26	1/30
低复制期(n=45)	39 (9-74)	27/18	2.98 (-0.88~4.73)	10/33	20/25
再活动期(n=23)	43 (20-68)	15/8	2.97 (-1.22~4.61)	5/18	10/13
合计	36 (7-74)	77/48	3.37(-1.22~5.38)	26/97	31/94

注：由于 2 例患者基因分型为 D 型，样本量少，无统计意义，故不列入本研究分析中。

1.3.3 统计方法

采用 Graphpad Prism 5 软件进行数据处理，定量检测结果均转换成 log₁₀ IU/mL，用 Pearson 相关分析及 Bland-Altman 图方法分别进行相关性和一致性检验。

2 结果

2.1 2 种检测系统的相关性分析

将 2 系统检测的定量结果做相关性分析，结果显示，总体相关性强($r=0.989$, $P<0.001$)，见图 1。回归方程为： $Y=0.927X+0.207$ ，其中 X 代表罗氏 E170 检测系统，Y 代表雅培 i2000 检测系统；免疫耐受期、免疫清除期、低复制期及再活动期的相关系数 r 值分别为：0.977、0.993、0.979 和 0.987 (P 均 <0.001)。

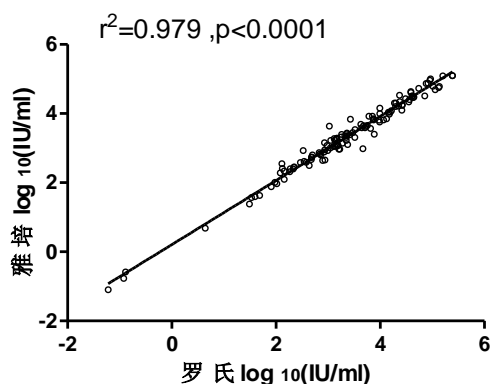


图 1 2 种系统检测结果的相关性分析

2.2 2 种检测系统在不同感染阶段的一致性分析

用 Bland-Altman 方法分析不同感染阶段 2 种系统检测结果的一致性。图中，X 轴： $(\text{HBsAg}_{\text{罗氏}} + \text{HBsAg}_{\text{雅培}}) / 2$ (\log_{10} IU/mL)，Y 轴： $\text{HBsAg}_{\text{罗氏}} - \text{HBsAg}_{\text{雅培}}$ (\log_{10} IU/mL)，上下两条虚线分别代表 95% 一致性界限 (LoA) 的上限和下限。结果显示，2 种系统检测结果整体一致性好，平均偏差为 0.036 \log_{10} IU/mL，125 例样本的检测结果显示，6 个点落在一致性界限外，为可接受范围。慢性乙型肝炎不同感染阶段的结果显示，免疫耐受期、免疫清除期、低复

制期及再活动期偏差分别为 0.114、0.029、-0.013 及 0.054log₁₀ IU/mL，免疫耐受期 2 系统结果偏差大，罗氏 E170 检测结果高于雅培 i2000，见图 2。

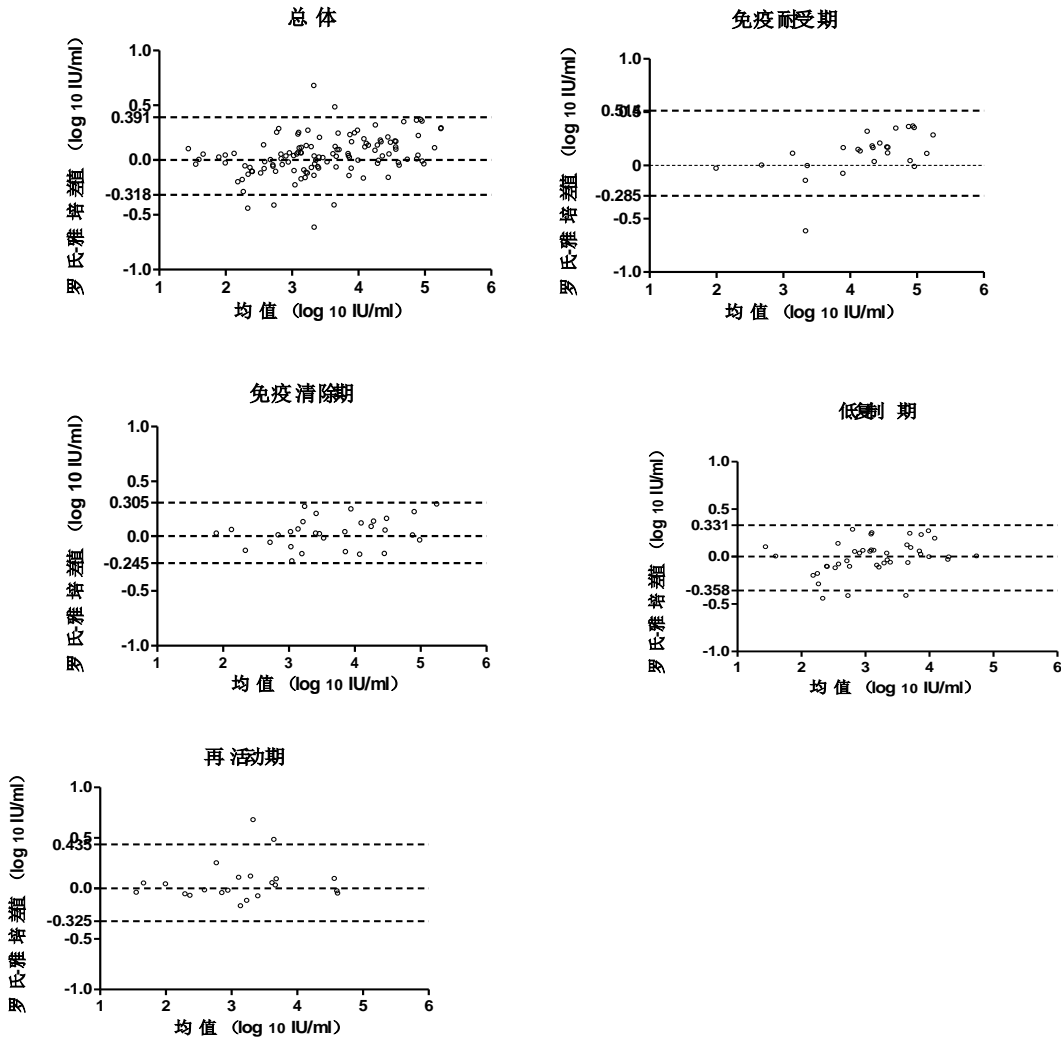


图 2 2 种系统检测结果的 Bland-Altman 一致性分析

2.3 不同基因型及不同 HBsAg 水平 2 种系统检测的一致性

所收集的 125 例样本基因分型后，B 基因型为 26 例，C 基因型为 97 例，D 基因型 2 例，以 B、C 组比较；同时以罗氏 E170 HBsAg 检测结果为依据将样本分为高、低水平 2 组，>1 000 IU/mL 的样本 94 例，<1 000 IU/mL 的样本 31 例，比较各组 2 种系统一致性。结果显示 B、C 两基因型 2 种系统检测结果一致性好；不同水平间 2 种系统检测结果比较，高水平组偏差较大，且相关性较差 ($r=0.959$, $P<0.001$)，但根据《体外诊断试剂分析性能评估（准确度-方法学比对）指导原则》^[7]，2 种免疫方法间 $r^2>0.90$ 为判断 2 种方法一致的标准，在专业可接受范围内，见表 2。

表 2 2 种系统检测不同基因型患者样本的相关性

基因型	r 值	偏差	标准差	95%一致性界限	
				-1.96SD	+1.96SD
B 基因型	0.980	0.005	0.144	-0.278	0.289
C 基因型	0.987	0.042	0.188	-0.327	0.413
<1 000 IU/mL	0.986	-0.055	0.149	-0.348	0.237
>1 000 IU/mL	0.959	0.076	0.179	-0.283	0.434

3 讨论

HBsAg 是 HBV 的一种外膜蛋白, 在 1965 年由 Blumberg 首次提出^[8], 它是临床上应用最多的判断 HBV 感染的指标, 定性检测已被大量应用在血液筛查中。随着研究的深入, 发现 HBsAg 的定量检测对抗病毒治疗疗效的预测有重大意义。在学者陈力元^[9]的研究中, 血清 HBsAg 比 HBV-DNA 更能反映肝内病毒的复制模板 cccDNA 及肝内病毒载量的水平, 它对抗病毒治疗疗效的预测价值更大。研究显示, 在聚乙二醇治疗第 12 周时, HBsAg 定量水平下降至 <1 500 IU/mL 的患者, 治疗结束 1 年 HBeAg 的血清学转换率为 51%; HBsAg 定量下降至 1500~20 000 IU/mL 的患者, HBeAg 的血清学转换率为 32%; 而 HBsAg 定量下降至 >20 000 IU/mL 的患者, 该血清学转换率仅为 19%^[10]。因此, HBsAg 的定量检测在慢性乙型肝炎临床管理和用药中意义重大。

罗氏 E170 和雅培 i2000 是临床实验室检测 HBsAg 应用较广泛的 2 种检测系统。临床医生预测和监测患者抗病毒治疗疗效时, 常用治疗前处于自然感染状态下的 HBsAg 水平为参考, 用治疗过程中患者 HBsAg 下降幅度判断是否对抗病毒治疗有所应答。因此了解治疗前患者的感染阶段和 HBsAg 的基线水平非常重要。本研究中, 2 种系统对自然免疫状态样本的 HBsAg 定量检测一致性整体较好 ($r=0.989$, $P<0.001$), 但不同感染阶段 2 系统检测的一致性稍有差别, 低复制期罗氏比雅培检测结果稍小 (偏差=-0.013log₁₀ IU/mL), 其他 3 期与之相反 (0.029~0.114log₁₀ IU/mL), 其中免疫耐受期, 罗氏比雅培检测结果有普遍偏高的趋势, 这可能由于免疫耐受期患者的 HBsAg 水平高 (3.03~5.38log₁₀ IU/mL), 所有样本均需要不同程度的稀释后再检, 加大了方法间的变异程度, 而且该阶段样本 HBsAg 水平跨度范围小, 均对一致性分析有影响。

随着研究的不断深入, 有学者发现, 在抗病毒治疗过程中, 血清 HBsAg 的动力学在不同基因型的慢性肝炎患者中表现不同, 临床用血清 HBsAg 预测病毒持续应答概率时, 应根据不同基因型制定各自特有的 HBsAg 的监测时间及停药阈值^[4, 11]。在临床应用中, 血清 HBsAg 定量检测方法较多, 只有不同方法对同一基因型别样本检测结果一致, 临床上在判断抗病毒疗效时才不会因为方法间的差异而做出错误判断。本研究中, B、C2 种基因型间罗氏和雅培的相关性和一致性均好, 无明显差异, 2 种系统对 B、C2 种基因型样本检测结果均无差异。但在高、低水平组间的分析结果来看, 高水平组 2 种系统的相关性较低水平组差 ($r=0.959$), 但两者相关系数依然在专业可接受范围内 ($r^2>0.90$)。此外, 2 个水平组间, 罗氏 E170 与雅培 i2000 检测结果的偏差不同, 高水平组为 0.076log₁₀ IU/mL, 低水平组为 -0.055log₁₀ IU/mL。整体来看, 无论是不同的感染阶段、基因分型还是 HBsAg 水平, 罗氏和雅培检测结果相关性都非常好, 但在 Blant-Altman 一致性分析的结果来看, 2 种系统还略有差异, 在免疫耐受期和 HBsAg 高水平组, 罗氏 E170 的结果常常高于雅培 i2000, 这可能由于 2 种检测系统间的系统误差造成, 也可能由于 2 种系统所用试剂包被的抗体活性不同, 使得检测结果有偏差。

综上所述, 虽然罗氏 E170 和雅培 i2000 对 HBsAg 定量检测相关性很好, 不同感染阶段和不同基因型二者检测结果都有较好的一致性, 但在免疫耐受期等高值样本中, 2 种系统还存在偏差。因此, 临床上用 HBsAg 作为抗病毒治疗监测的时候, 治疗前后最好选择同一检测系统, 避免由于系统间的差异对患者的抗病毒应答做出错误的判断。

参考文献

- [1] Nguyen T, Thompson AJ, Bowden S, et al. Hepatitis B surface antigen levels during the natural history of chronic hepatitis B: A perspective on Asia [J]. *Hepatology*, 2010, 52(4): 508-513.
- [2] Chan HL, Wong VW, Chim AM, et al. Serum HBsAg quantification to predict response to peginterferon therapy of e antigen positive chronic hepatitis B [J]. *Aliment Pharmacol Ther* 2010, 32(11-12): 1323-1325.
- [3] Chan HL, Thompson A. Hepatitis B surface antigen quantification: why and how to use it in 2011-A core group report [J]. *Journal of Hepatology*, 2011, 55(5): 1121-1131.
- [4] Brunetto MR, Marcellin P. Response to peginterferon alfa-2a(40KD) in HBeAg-negative CHB: on-treatment kinetics of HBsAg serum levels vary by HBV genotype. [J]. *Journal of Hepatology*, 2013, 59(6): 1153-1159.
- [5] 盛欢, 胡晓波, 许杰. 两种方法检测 HBsAg 定量结果的临床互认研究 [J]. *检验医学*, 2013, 28(9): 828-834.
- [6] 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》 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2011, 19(1): 13-24.
- [7] 国家食品药品监督管理局医疗器械审评中心. 体外诊断试剂分析性能评估(准确度-方法学比较)技术审查指导原则. [EB/OL] [2011-04-12] (2015-5-23). <http://www.cmde.org.cn/CL0057/1393.html>.
- [8] Blumberg BS, Sutnick AI, London WT. Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen [J]. *Bull. N. Y. Acad. Med.* 1968, 44(12): 1566-1586.

- [9] Chan HL,Wong VW,Tse AM, et al. Serum hepatitis B surface antigen quantitation can reflect hepatitis B virus in the liver and predict treatment response[J].Clin Gastroenterol Hepatol 2007, 5(12):1462-1468.
- [10] Lau GK,Marcellin P,Brunetto M, et al. On-treatment monitoring of HBsAg levels to predict response to peginterferon alfa-2a in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B[J].Hepatology 2009, 50(Suppl.1):S333.
- [11] Snooeveld MJ ,Hansen BE,et al.Response-guided peginterferon therapy in hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B using serum hepatitis B surface antigen levels[J].Hepatology.2013, 58(3)872-880.

刘杨, 女, 1988年生, 硕士, 技师, 主要从事临床免疫工作。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

540 名铝业工人尿氟测定结果分析

袁秀梅 魏莲花* 杨森 常若云 韩平治 司玉春 李德红 齐发梅 王爱霞 周爱花 王彩虹 贾彦娟
甘肃省人民医院检验中心

[摘要] 目的: 了解铝业工人受氟污染情况, 为铝业工人预防职业性氟中毒提供依据。方法: 用一次性带盖聚乙烯试管收集工人尿样标本, 并按不同工种分为六组, 采用氟离子选择电极法测定尿氟含量。同时留取无氟污染的 120 名正常人群尿液做对照组, 数据资料采用 SPSS17.0 进行统计学分析。结果: 铝厂工人尿氟浓度平均含量 1.322mg/L, 明显高于对照组($P < 0.01$); 电解工异常百分率最高, 达 73.0%, 尿氟浓度检测均值为 2.059 mg/L, 高于其他工种($P < 0.05$)。结论: 铝业工人尿氟浓度明显增高, 不同工种受氟污染情况不同, 电解铝车间工人氟污染情况最为严重。工厂需加强车间空气氟污染治理, 改善作业环境, 加强对工人的健康体检和劳动保护。作业工人要提高自我防护意识, 好好利用工厂提供的各种防护器具, 做好个人防护。

[关键词] 铝业工人; 尿氟测定; 结果分析

540 aluminum workers urinary fluoride measurement results analysis

[Abstract] Objective: Analysis of aluminum manufacturing workers by fluorine contamination, aluminum manufacturing workers prevention of occupational fluorosis provide evidence. Methods Capped polyethylene tube with a disposable urine specimens collected workers, divided into six groups according to different types of work, urine fluoride content by ion selective electrode method. 120 specimens fluoride pollution normal people do urine control group, data were statistically analyzed using SPSS17.0. Results Aluminum Manufacturing workers average urinary fluoride concentration 1.322mg / L, compared with the control group was significantly higher($P < 0.01$); Manufacturing aluminum electrolytic proportion of abnormal urinary fluoride group accounted for 73.0% of workers, Urine fluoride content average of 2.059 mg / L, higher than other types ($P < 0.05$). Conclusion Urine fluoride concentration of aluminum manufacturing workers increased significantly, by different types of fluoride contamination, electrolytic aluminum plant workers fluoride pollution most serious. Factory workshop called on to strengthen air pollution control fluoride, improve the working environment, to strengthen workers' health examination and labor protection. Workers exposed to enhance self-protection awareness, proper personal protection.

[Keywords] Urine fluoride, Aluminium workers, Ion selective electrode method.

氟是人体内重要的微量元素之一, 广泛分布于自然界水体。含适量氟的饮用水对人体有益, 它是牙齿及骨骼不可缺少的成分, 可以促进牙齿珐琅质对细菌酸性腐蚀的抵抗力, 防止龋齿。但是氟含量过高会危害健康, 引起氟中毒。铝电解以冰晶石-氧化铝氟化铝的熔体为电解质, 电解时散发出氟化物烟气。人体吸入过量的氟, 常常会引起各种刺激症状、氟骨病、直至氟中毒。氟离子主要由肾脏代谢, 因而尿氟含量可以反映体内氟的负荷情况。本文对铝业工人尿氟检测结果作一统计分析, 为预防职业性氟中毒提供数字依据。

1 材料和方法

1.1 对象

观察组为甘肃某铝厂职工 540 人, 其中男性 524 人, 女性 16 人, 年龄 21~55 岁, 平均 41.3 岁, 接氟工龄 0.5~36 年。工种有电解工、出铝工、天车工、铸造工、净化工和技术管理人员。对照组选择年龄及男女比例与观察组相

匹配的健康体检人员 120 人, 年龄 20~56 岁, 平均 40.5 岁, 无氟接触史。

1.2 仪器和试剂

所用仪器为 HC-800 氟离子选择电极。试剂为该仪器专用试剂, 有标准液 A: 氟离子浓度 1.9mg/L, 批号 20151028; 标准液 B: 氟离子浓度 19mg/L, 批号 20151028; 清洗液: 批号 20151028; 氟电极内充液: 批号 20151020; 参比电极内充液: 批号 20151020; 氟离子强度调节液: 批号 20151020; 校正液: 氟离子靶值 9.9-10.9mg/L, 批号 20151021。

1.3 方法

用一次性带盖聚乙烯试管收集观察组和对照组尿样标本, 并将观察组按不同工种分为六组, 按照《工业性氟病诊断标准》(GBZ 5-2002) 附录 B 要求采用离子选择电极法测定尿中氟离子含量^[1]。统计每组人员尿氟均值和尿氟结果超出正常范围的例数及百分率。分析各组之间有无统计学差异。

1.4 统计学方法

所测数据以均数、标准差及百分率表示, 两组间均值比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 率的比较采用卡方检验。显著性水准为 $P < 0.05$ 。统计分析在 SPSS17.0 统计软件包上完成。

2 结果

2.1 540 例铝厂职工(观察组)尿氟含量与正常对照组比较, 两组均值存在显著的统计学差异 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 将 540 例职工根据不同工种分为六组, 进行组间均值比较, 经统计, 电解工尿氟含量最高, 均值为 2.095mg/L,

表 1 观察组与对照组尿氟含量比较

组别	例数	尿氟范围 (mg/l)	均值(mg/l)	标准差	t 值	P 值
观察组	540	0.136-16.598	1.322	1.659	11.58	0.00
对照组	83	0.148-1.363	0.457	0.198		

与其余各组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$); 其次依次为天车工、出铝工、铸造工、勤务工和管理人员。天车工和出铝工比较差异无显著性 ($P > 0.05$), 与其余三组有显著性差异 ($P < 0.05$); 出铝工和铸造工比较无差异 ($P > 0.05$), 与勤务及管理人员有统计学差异 ($P < 0.05$); 铸造工和勤务工比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 与管理人员有显著性差异 ($P < 0.05$); 勤务工和管理组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。具体统计结果见表 2-3。

表 2 不同工种尿氟含量比较

分组	工种	例数	尿氟范围 (mg/l)	均值(mg/l)	标准差
1	电解工	241	0.167-16.598	2.095	2.161
2	出铝工	27	0.184-5.346	0.959	0.956
3	天车工	47	0.366-4.664	1.011	0.744
4	铸造工	48	0.201-4.153	0.707	0.564
5	勤务工	124	0.136-2.593	0.593	0.374
6	管理人员	53	0.174-3.639	0.528	0.482
	合计	540	0.136-16.598	1.322	1.659

注: 组间比较 $F = 23.7$, $P = 0.000 < 0.05$, 说明组间有显著性差异, 需进行各组间多重比较。

表 3 各组间多重比较结果

组间比较	P 值	组间比较	P 值	组间比较	P 值
1-2	0.000	2-3	0.356	3-5	0.000
1-3	0.000	2-4	0.180	3-6	0.000
1-4	0.000	2-5	0.003	4-5	0.077
1-5	0.000	2-6	0.000	4-6	0.010
1-6	0.000	3-4	0.008	5-6	0.189

2.3 不同工种尿氟含量超过正常参考范围上线的例数统计结果,电解工最高,达73%,其余依次为天车工、出铝工、铸造工、勤务工,管理人员最低。具体统计结果见表4。

表4 不同工种尿氟含量异常百分率比较

工种	正常例数	异常例数	合计	异常百分率(%)
电解工	65	176	241	73.0
出铝工	16	11	27	40.7
天车工	24	23	47	48.9
铸造工	40	8	48	16.7
勤务工	105	19	124	15.3
管理人员	49	4	53	7.5
合计	299	241	540	44.6

注: $\chi^2=166.954$, $P=0.000<0.05$, 表示不同工种尿氟异常百分率存在统计学差异。

3 讨论

在铝的生产、冶炼和加工过程中,常常会引起环境污染,带来有关劳动卫生和环境保护方面的问题。临床实验证明,经常接触氟化物的制铝工人出现神经衰弱、咳嗽、胸闷、四肢疼痛、关节痛及四肢麻木的几率比正常人要高。氟对铝作业工人健康的严重影响,已经引起了有关部门的重视,但制铝工人自己也应该注意在工作中保护自己。铝的主要生产过程实际上包括氧化铝生产、冰晶石生产、电极的生产和铝金属四个部分。铝电解以冰晶石-氧化铝氟化铝的熔体为电解质,以炭素材料为电极进行电解。电解时在阴极上析出液态的金属铝,在阳极上产生气体。同时还散发出氟化物、粉尘等污染物为主的电解烟气。在 $400^{\circ}\text{C}\sim 600^{\circ}\text{C}$ 温度下,氧化铝中仍可含有 $0.2\%\sim 0.5\%$ 的水分。原料中的水分与固态氟化盐在高温条件下可发生化学反应,同时进入熔融态电解质中的水分也可与液态的氟化盐发生化学反应,生成有害的氟化氢^[2]。人体吸入过量的氟,常常会引起骨硬化、骨质增生、斑状齿等氟骨病,严重者使人丧失劳动能力。氟化物还对呼吸道粘膜及皮肤有强烈的刺激和腐蚀作用^[3-4]。我国卫生标准规定,车间空气中氟化物(以氟计)的最高容许浓度为 $1.0\text{mg}/\text{m}^3$ ^[5],按照现行国家标准《职业性接触毒物危害程度分级》^[6]中对毒物毒性分级的原则,氟化物为II级,属于高度危害。吸入体内的氟主要通过肾脏排泄,吸收进入体内的氟越多,尿氟的排出量越高^[7-8]。故尿氟测定一般可反映氟的摄入情况。本文测定铝厂职工尿氟均值高达正常对照组的3倍左右,与对照组存在显著性差异。不同工种之间尿氟含量存在差异,其中电解工最高,约为其他工种的2-5倍。从不同工种尿氟含量异常百分率比较结果看,电解工异常率也是最高,其次为天车工。统计数据充分说明电解车间氟污染最严重,长期置于高氟环境,将会使氟不断在体内蓄积,引起工业性氟中毒。污染原因与以上所述铝的生产加工工艺流程有直接的关系。因此为了保证工人的健康,减少氟对工人身体的伤害,铝厂要制定一系列的防护措施。首先要定期进行车间粉尘、氟化氢浓度及外环境氟化物浓度的监测,对长期严重超标的监测点,要查明原因并及时加以治理,进一步改进铝的生产流程,加强对新型电解工艺、电解槽的技术研发,提高电解槽的密闭性;改进净化回收设施,采用密闭集气的抽风排毒设施使含氟烟气进一步高效率的净化回收,从而减少空气中氟污染,实现电解铝行业的清洁生产工艺。其次要本着预防为主方针,加强作业工人的个人防护教育,使其提高防护意识,做好自我保护,并有计划有目的地对接氟作业工人进行预防性服药及治疗。严格按照规定定期进行工业性氟病的体检,以便及早发现氟病并积极给予治疗,使工业氟病的危害不断下降,保障接氟作业工人的身体健康。

参考文献

- [1] 徐伯洪,闫慧芳.工作场所有害物质监测方法[M].北京:中国人民公安出版社,2003:354-356.
- [2] 方剑平,冯晓燕,索小绪等.氟化物对作业工人健康危害的研究.[J].中国职业医学,2004,31(1):32-34.
- [3] 张生军.电解铝作业工人工业性氟病患病情况的调查[J].中华劳动卫生职业病杂志,2007,25:107-108.
- [4] 胡建军.大型电解铝车间的消防设计探析,2010年中国消防协会科学技术年会论文集.
- [5] GB 16228-1996,车间空气中氟化物卫生标准[S].
- [6] 国家标准.职业性接触毒物危害程度分级(GB5004-85),国家标准局.

- [7] 刘素香,刘俊玲.氟对铝作业工人的健康影响[J].中国职业医学,2004,31(6):29-30.
[8] 苗贞军,王空军.电解铝生产工人的尿氟调查[J].职业与健康,2001,17(10):23-24.

通讯作者邮箱 107306723@qq.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

判断血尿来源的方法学研究

杨麦贵^{1*} 杨铮^{2Δ} 杨阳³ 岳波⁴ 郑善奎¹ 饶国洲⁵ 何娟¹ 樊爱琳¹ 郝晓柯^{1*}

(第四军医大学: 1.西京医院全军临床检验医学研究所; 2.学员旅; 3.西京医院全军整形外科研究所; 4.西京医院耳鼻喉头颈外科 陕西 西安 710032; 西安交通大学口腔医院口腔医学研究中心 西安 710004)

Δ并列第一作者: 杨铮

*通信作者: yangmg@fmmu.edu.cn; 电话: 18991959015

[摘要] 目的:探讨三种检测方法判断血尿来源的比较研究。方法:采用显微镜检查红细胞形态变异率、免疫荧光染色和红细胞电泳,分别对318例经临床及病理确诊的血尿来源患者,进行检测比较。结果:确诊的208例肾源性血尿红细胞形态学检查总符合率为69.2%(208/144); Ig免疫荧光符合率为98.1%(208/204); 红细胞电泳时间符合率为97.6%(208/203),免疫荧光和电泳法符合率明显高于红细胞形态学有显著性差异($P<0.01$),免疫荧光与电泳法无明显差异($P>0.05$)。三种方法对110例非肾源性血尿检测符合率分别为97.3%(110/107); 1.8%(110/2); 2.7%(110/3),红细胞形态学法明显高于免疫荧光和电泳法具有显著性差异($P<0.01$)。结论:肾源性血尿红细胞被免疫球蛋白(Ig)包裹,表面电荷降低,使Ig免疫荧光和红细胞电泳法对诊断肾源性血尿较特异准确,红细胞形态学虽较差,但易开展适于各级医疗单位,对非肾源性血尿诊断率优于免疫荧光和电泳法。

[关键词] 血尿-来源; 红细胞; 形态学; 免疫荧光; 电泳-时间

Analyzing hematuria methodological research/YANG Mai-gui, YANG Zheng, YANG Yang, YUE Bo, ZHENG Shan-luan, RAO Guo-zhou, HE Juan, FAN Ai-lin, HAO Xiao-ke

(Fourth Military Medical University: 1.Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Institute of Medicine;2.Participants brigade;3.Institute of Plastic Surgery of PLA Xijing Hospital; 4. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Xijing Hospital, Shanxi Xi'an 710032;5.Research Center of Stomatological Hospital of xi'an Jiaotong University, xi'an 710004, China)

[Abstract] **Objective:** Discussion comparative study to determine the source of the three detection methods hematuria. **Methods:** Microscopic examination of the use of red blood cell morphology mutation rate, immunofluorescence staining and erythrocyte electrophoresis, respectively, 318 cases diagnosed by clinical and pathological origin of hematuria patients were detected compare. **Results:** Confirmed 208 cases of renal hematuria RBC morphology total coincidence rate 69.2% (208/144); Ig immunofluorescence coincidence was 98.1%(208/204); erythrocyte electrophoresis time the rate was 97.6%(208/203), immunofluorescence and electrophoresis was significantly higher red blood cell morphology consistent with a significant difference ($P<0.01$), no significant difference immunofluorescence and electrophoresis ($P>0.05$). Three methods of 110 cases of non-compliance with renal hematuria detection rates were 97.3%(110/107); 1.8%(110/2); 2.7%(110/3), significantly higher red blood cell morphology law immunofluorescence and electrophoresis was a significant difference ($P<0.01$). **Conclusions:** RBC renal hematuria is an immunoglobulin (Ig) parcels, the surface charge reduced, so Ig immunofluorescence and erythrocyte electrophoresis method for the diagnosis of renal hematuria more specific and accurate, though less red blood cell morphology, but easy to carry suitable for all levels medical units, for non-renal hematuria

diagnostic yield than immunofluorescence and electrophoresis.

[Key words] Hematuria-Source; Red blood cell; Morphology ; Immunofluorescence;Electrophoresis-Time

血尿是泌尿系统疾病的主要临床表现之一，鉴别血尿的来源为肾源性血尿还是非肾源性血尿对临床诊断和治疗有着非常重要的价值。检测尿中红细胞形态已成为鉴别肾源性血尿与非肾源性血尿的一种常规诊断方法^[1]。但这种方法因尿液红细胞形态可受尿液渗透压、pH 值、离子比等而影响效果^[2,3]。我们对泌尿系统疾病引起的血尿进行显微镜尿中红细胞形态、免疫荧光染色分析及尿红细胞电泳时间测定，研究探讨在血尿的来源鉴别诊断肾源性血尿与非肾源性血尿的优劣价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本

来自第四军医大学西京医院住院及门诊就诊患者，其主要特征是血尿(肉眼或镜下血尿)，共 318 例，其中经临床及病理确诊肾源性血尿 208 例，男性 112 例，女性 96 例，年龄 58~65(平均 61±2)岁。非肾源性血尿患者 110 例，男性 60 例，女性 50 例，年龄 56~65(平均 60±2)岁。

1.1.2 试剂及仪器

荧光标记兔抗人 IgA、IgG、IgE、IgM 抗体，丹麦 DAKO 公司产，使用前按说明书作 1:10 倍稀释。丙酮(分析纯)，西安化学试剂公司产。BX51 显微镜影像系统，日本奥林巴斯公司产。WJY-IV 型红细胞电泳仪，江苏无锡微机检测仪器有限公司产。TDL-40C 型离心机，上海安亭科学仪器公司产。尿沉渣专用塑料管，江苏康捷医疗器械有限公司产。

1.2 方法

1.2.1 红细胞形态显微镜异常率的分析

属患者留取新鲜中段晨尿 10ml 于有刻度的专用塑料管中，置离心机 1500r/min，离心 5min，弃上清 9.0ml，余底层 1.0ml，分别检查红细胞异常率，红细胞免疫荧光及电泳时间。红细胞形态学检查参照文献^[4]，按全国统一标准将红细胞分为正常形态和异常形态。正常红细胞为双凹圆盘状的红细胞，异形为影形、皱缩形、棘形和小球形等红细胞，每份标本计数 200 个细胞，异形红细胞>80%为肾源性血尿，<50%为非肾源性血尿。

1.2.2 红细胞免疫荧光检查

参照文献^[1]取上述尿液 200μL 生理盐水洗涤离心后取尿沉渣涂片 4 张，自然晾干丙酮固定 10 min 后染色，先用 pH6.0 磷酸盐缓冲液洗涤 1 次，在分别滴加荧光抗体 IgA、IgG、IgE、IgM 于 4 张尿沉渣涂片的薄膜上，放入湿盒 37℃ 孵育 40min，然后用 pH6.0 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次滴加甘油缓冲液，荧光显微镜下检测。结果判定，根据红细胞 Ig 着色的百分率，>90%强阳性，为肾小球性肾炎；60%~80%阳性，为肾性血尿；30%~60%弱阳性，为混合性血尿。只要标本中任何一种抗体显色即为荧光染色阳性。每份标本计数 200 个细胞，异形红细胞>80%为肾源性血尿，<50%为非肾源性血尿。

1.2.3 尿红细胞电泳时间检测

将尿液红细胞制成 4 000~30 000 个/ml 浓度，然后装入特制的圆形细管中，再把此管放入红细胞电泳槽内，并用琼脂管作架桥与电极相连接，调节工作电压为 40 伏特，温度为 25℃，观察每一标本中的 10 个红细胞往返 165 μm 距离所需时间[移动时间：秒(S)]每份标本重复两次取平均值。红细胞形态异常率>80%，电泳时间平均值为 9.0±0.4S，正常均一性红细胞电泳时间平均值为 14.0±0.4S。

2 结果

2.1 肾源性血尿红细胞形态学、免疫荧光抗体染色及尿红细胞电泳时间检查结果比较

208 例肾源性血尿，Ig 免疫荧光红细胞染色，显微镜红细胞形态及电泳时间分析与临床及穿刺病例确诊符合率分别为 98.1%(208/204)、69.2%(208/144)和红细胞电泳时间 97.6%(208/203)(见表 1)。

表1 肾源性血尿红细胞形态学、免疫荧光染色及电泳时间结果比较

肾源性红细胞疾病	N	红细胞形态异常率(%)		免疫荧光染色(%)			红细胞电泳时间(S)			
		>80	<50	阳性	阴性		<9	>9	(%)	
肾小球肾炎	103	76	27	103	0	100	103	0	100	
隐匿性肾炎	6	1	5	6	0	100	6	1	83.3	
IgA 肾小球肾炎	50	43	7	50	0	100	50	0	100	
狼疮性肾炎	14	11	3	14	0	100	14	1	92.9	
肾病综合征	6	2	4	6	0	100	6	0	100	
紫癜性肾炎	25	11	14	21	4	84	21	5	76.2	
急性肾衰	4	0	4	4	0	100	4	0	100	
总 数	208	144	64	69.2%	204	4	98.1	203	7	97.6

注：异常红细胞>80%为肾性血尿；<50%为非肾性血尿

2.2 非肾源性血尿红细胞形态学、免疫荧光抗体染色及尿红细胞电泳时间检查结果比较

110例非肾源性血尿，Ig 免疫荧光红细胞染色，显微镜红细胞形态及电泳时间分析与临床及穿刺病例确诊符合率分别为1.8%(110/2)、97.3%(110/107)和红细胞电泳时间2.7%(110/3)(见表2)。

表2 非肾源性血尿红细胞形态学、免疫荧光染色及电泳时间结果比较

非肾源性红细胞疾病	N	红细胞形态异常率(%)		免疫荧光染色(%)			红细胞电泳时间(S)			
		>80	<50	阳性	阴性		<14	>14	(%)	
泌尿系感染	14	0	14	0	14		0	14		
膀胱肿瘤	26	1	25	1	25		1	25		
肾盂癌	10	1	9	1	9		0	10		
肾结石	32	0	32	0	32		1	31		
输尿管结石	5	0	5	0	5		0	5		
膀胱结石	13	0	13	0	13		0	13		
膀胱炎	6	1	5	0	6		1	5		
输尿管畸形	4	0	4	0	4		0	4		
总 数	110	3	107	97.3%	2	108	1.8%	3	107	2.7%

注：异常红细胞>80%为肾性血尿；<50%为非肾性血尿

3 统计学分析

以上数据经卡方检验，尿红细胞 Ig 免疫荧光染色、红细胞电泳时间与显微镜红细胞形态分析异形率鉴别肾源性血尿有显著性差异($P<0.01$)，红细胞免疫荧光染色与电泳时间差异不明显($P>0.05$)。红细胞形态分析鉴别非肾源性血尿优于免疫荧光染色和电泳。

4 讨论

血尿是泌尿系统疾病病理改变的临床常见反应的一种重要表现，其病因可分为肾内或肾外因素，引起的病因很多，常见急、慢性肾小球肾炎、IgA 肾炎、肾肿瘤、泌尿系统感染、肾结石、膀胱肿瘤、膀胱结石等。目前诊断血尿的来源多用于光学显微镜检查尿沉渣红细胞形态，根据尿中红细胞大小、棘形、皱缩锯齿、影形、半月形、颗粒形红细胞等变形红细胞异常率及类型在两种以上 $\geq 80\%$ 诊断为肾源性血尿， $< 50\%$ 为非肾源性血尿。方法简单方便，经济省时，易普及适宜各级医疗单位开展，但影响因素较多，主要是尿液 pH、渗透压、介质张力、代谢产物的脂肪酸、溶血磷脂酰胆碱、胆酸、细菌及白带污染等的作用影响^[4]，所以要求受检者留取清晨中段的新鲜尿液。

免疫复合物是引起肾脏损害的常见原因,尿液红细胞表面包裹 Ig 分子的机理还尚不清楚。Abrass 等^[5]报道,肾源性血尿中红细胞表面包有 Tamm-Horsfall 蛋白,主要于 Henle 襻升支形成。Ig 分子在此附于红细胞表面的可能性较大,因血液在此流动较慢,是 Ig 有足够时间与红细胞接触黏附于红细胞膜上。用 Ig 免疫荧光抗体尿红细胞染色,对肾源性血尿定位诊断具有重要价值,不受尿内物质的影响,较特异。

红细胞表面带有负电荷,Feehally^[6]发现肾源性血尿红细胞表面的电荷降低,在直流电场中作定向泳动,在固定的距离内以泳动时间的长短表示红细胞表面电荷的多少诊断肾性和非肾性血尿的来源。肾源性血尿红细胞电泳时间缩短,表明其红细胞表面的电荷量减少,可能原因是红细胞通过肾小球基底膜时受挤压及膜表面电荷的影响导致红细胞表面电荷的丢失,其二是由于肾小管内连续性的渗透压改变,在红细胞通过时导致细胞内离子的迁移,红细胞缩小及介质张力等而改变了细胞表面的电荷量^[7,8],非肾源性血尿红细胞没有受到上述因素的作用,均为正常红细胞表面电荷量较多,所以电泳时间就较长。

综上所述三种检测血尿红细胞来源的方法,与临床及病理诊断确诊的血尿病例符合率显微镜红细胞形态学为 69.2%,Ig 免疫荧光染色为 98.1%,红细胞电泳时间为 97.6%,红细胞形态学虽差于免疫荧光和电泳时间法,但此方法简便快速,经济省时,易于开展适用于各级医疗单位,虽然后两种方法较特异、科学准确性较高,但需要特异的免疫抗体试剂,专用仪器设备,尿样要前处理,繁琐耗时,不宜普遍开展,形态学还是目前诊断血尿来源的首选方法,在难以确定血尿来源时可采用免疫荧光或电泳检测诊断,这样较为科学而理想的为临床提供可靠的诊断依据。

参考文献

- [1]丁振若,苏明权,樊爱琳,等.尿液红细胞免疫荧光染色鉴别血尿性质的研究分析[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,2002;23(1):10-11.
- [2]Schramek P,Schuster FX,Georgopoulos M,et al.Value of urinary erythrocyte morphology in assessment of symptomless microhaematuria[J].Lancet,1989;2(8675):1316-1319.
- [3]Metz MD Schiphorst PP,Go RI. The analysis of erythrocyte morphologic Characteristics in urine using a hematologic flow cytometer and microscopic methods[J].Am J Clin Path,1991;95(2):257-261.
- [4]刘成玉,罗春丽.临床检验基础[M].人民卫生出版社.北京,第五版,2012;165-171.
- [5]Abrass CK,Laird CW.Tamm-Horsfall Protein Coating of free cells in urine[J].Am J Kidney Dis,1987;9(1):44-50.
- [6]Feehally J.Measure electric charge of RBC in urine[J].Lancet,1986;2 (8507):635-637.
- [7]葛光午.尿红细胞分类的临床应用及机理探讨[J].中华医学检验杂志,1987;10(2):85-87.
- [8]林拔.电镜法观察尿红细胞[J].中华肾脏病杂志,1986;2(3):246-248.

作者简介:杨麦贵,男,主任技师,主要从事检验医学研究。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

大肠癌上调蛋白 POSTN 的蛋白组学研究及大肠癌病人血清中 POSTN 的测定

鄢超 李威 李丽红 谢风*

吉林大学中日联谊医院检验科 吉林 长春 130000

15943096395 email:yanchao8413@163.com

[摘要] 目的 通过蛋白质组学研究及血清学检测分离鉴定大肠癌中的差异表达蛋白及 POSTN 蛋白与大肠癌之间的关系。**方法:** 使用新鲜的大肠癌组织标本,标本均来源于初次发现、未接受过相关临床治疗的大肠癌患者,且经病理检查分期在 Dukes B 期的腺癌。本实验是通过质谱和二维色谱技术,分析蛋白表达。研究中所用的血液标本均来自于佳木斯大学附属第一医院,经系统编号后存放备用。ELISA 法血浆测定 POSTN,研究 POSTN 与大肠癌之间关系。

结果: 通过质谱分析、二维色谱技术, 在分化大肠癌和癌旁组织的蛋白质表达谱分析, 鉴定结果表明, 分离出 20 个差异蛋白。在 20 个差异蛋白质中, 表达上调的有 13 个, 表达下调的有 7 个。**结论:** 大肠癌血浆中 POSTN 水平与肿瘤的分期、淋巴结是否存在转移、远处是否存在转移及分化程度有关; 病人年龄、性别与其无关。

[关键词] 结直肠癌; 蛋白组; POSTN 蛋白; 质谱分析; 临床验证

[Abstract] Objective: To study the difference of protein separation and identification and serological detection of the expression of the relationship between protein and POSTN protein in colorectal cancer. **Method:** Using fresh specimens of colorectal carcinoma, preoperative patients did not receive any treatment, pathological fruit for Dukes stage B adenocarcinoma. for this test, by mass spectrometry and two-dimensional chromatography, protein expression analysis. Blood specimens from patients with colorectal cancer, blood samples were from First Affiliated Hospital of Jiamusi University, ELISA method of determination of plasma POSTN, to study the relationship between POSTN and colorectal cancer. **Results:** By mass spectrometry and two-dimensional hyphenated chromatographic technology application, analysis of tissue differentiation in colorectal carcinoma and adjacent protein expression profiling, identification results showed that 20 differential protein. In the 20 proteins identified, differences in protein up-expression were 13, differences in protein down-expression were 7. **Conclusion:** The level of POSTN in plasma and tumor of colorectal cancer staging, lymph node metastasis and distant metastasis; and patient gender, age has nothing to do.

大肠癌, 包括结肠癌及直肠癌, 结直肠癌(Colorectal cancer, CRC)全球每年新增病例近600,000例, 对人类健康和生命构成极大威胁。是临床上常见恶性肿瘤之一。无淋巴结转移的大肠癌术后五年期生存率达90%^[1], 有淋巴结转移的患者, 生存率仅为65%^[2,3]。因此改善结直肠癌的疗效和预后的关键就是早发现、早诊断及早治疗。利用差异蛋白质组学分析, 可以发现发病早期高敏感性及特异性强的肿瘤标志物, 对于肿瘤的早期诊断、早期治疗和预后的预测方面具有现实意义。我们前期的试验结果^[4]发现一些差异蛋白。这些差异蛋白可能成为诊断大肠癌的标志物。POSTN 又称为成骨细胞特异性因子2, 研究表明 POSTN 可以促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移^[5, 6], 提示 POSTN 与肿瘤的恶性程度、转移及预后密切相关。本实验应用质谱分析, 二维色谱技术, 分析鉴定大肠癌组织和癌旁组织的差异表达蛋白谱, 有20个差异蛋白, 上调13个, 下调7个。这些差异蛋白可能成为结直肠癌肿瘤诊断需要的高度敏感的、高特异的标志物, 需经进一步临床验证。本研究对Periostin(POSTN)蛋白进一步进行临床验证。

1. 材料与方法

1.1 标本取材

我们共收集大肠癌患者组织标本 24 例, 所有标本取自术前未接受过化疗及放疗的 Dukes B 期腺癌患者。癌旁正常组织标本选择在癌边缘距离大于 10cm 左右癌组织上方的新鲜组织标本。标本留取后, 冲洗, 经液氮速冻, 在-80℃冰箱保存。血液标本来源与 65 例原发性结直肠癌及 65 例健康正常人血液标本取自佳木斯大学附属第一医院。原发性结直肠癌病例均术后经常规病理确诊。取材前知情同意书征得病人同意。

1.2 试剂和方法

POSTN 蛋白是用 CWBio 公司的蛋白抽提试剂盒和美国 Bio-Rad 公司蛋白质定量试剂盒应用质谱分析, 二维色谱技术, 分析鉴定大肠癌组织和癌旁组织的差异表达蛋白谱, 质谱数据采用 Thermo Fisher 公司的 Bioworks 3.3.1 SP1 软件分析, 应用 SEQUEST 进行数据库检索, 以鉴定出相关多肽和蛋白质。结直肠癌病人血浆 POSTN 的表达研究是用 Periostin(POSTN)酶联免疫分析(ELISA)试剂盒(RD)ELISA 法血浆测定 POSTN。

1.3 统计学分析

采用 SPSS17.0 进行统计学处理, 以 $\bar{X} \pm SD$ 表示测定结果, 通过单因素方差分析进行统计处理, $p < 0.05$ 确定为差异具有显著意义。

2 结果

2.1 POSTN 蛋白组学研究结果

将肿瘤组织与癌旁组织的蛋白分析数据依据标准进行比对, 得到有显著差异蛋白 20 个, 13 个上调表达。

表 1 POSTN (Isoform 1 of Periostin) 蛋白质谱鉴定结果

Scan(s)	Peptide	MH+	DeltaM	z	XC	DeltaCn
10671	R.IMGDKVASEALMK.Y	1393.69873	0.87505	2	3.79	0.52
10687	R.IMGDKVASEALMK.Y	1393.69873	0.33550	2	3.90	0.59
12032	K.TTVLYECCPGYMR.M	1650.86487	1.10393	2	2.69	0.51
12139	K.TTVLYECCPGYMR.M	1650.86487	0.69402	2	2.92	0.50
20847	K.GCPAVLPIDHVVYGLGIVGATTQR.Y	2597.94482	1.15378	3	3.00	0.26
21679	K.VGLNELYNGQILETIGGK.Q	1919.16809	0.82561	2	4.26	0.51
21853	K.VGLNELYNGQILETIGGK.Q	1919.16809	1.34514	2	2.75	0.50
31032	R.AAAITSDILEALGRDGHFTLFAPTNEAFEKLPR.G	3573.99854	0.39450	3	5.83	0.67
31181	R.AAAITSDILEALGRDGHFTLFAPTNEAFEKLPR.G	3573.99854	0.20957	3	5.68	0.66
31313	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	1.49639	2	3.74	0.35
31323	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	0.48833	2	4.00	0.44
31327	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	-0.36421	2	3.60	0.48
31488	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	1.10088	2	4.49	0.42
31496	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	1.04106	2	3.91	0.34
31538	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	-0.65278	2	4.20	0.47
31550	K.DIVTNGVIHLIDQVLIPDSAK.Q	2375.70654	0.02544	2	4.52	0.52
33829	R.VLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFR.A	2585.80469	-0.62129	2	4.59	0.64
33863	R.VLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFR.A	2585.80469	0.66802	2	5.34	0.64
33891	R.VLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFR.A	2585.80469	-0.62544	2	4.97	0.65
33899	R.VLTQIGTSIQDFIEAEDDLSSFR.A	2585.80469	-0.40401	2	5.14	0.65
33874	K.SKESDIMITTNGVIHVVDKLLYPADTPVGNDQLLE ILNK.L	4182.74512	0.89182	3	3.62	0.65

2.2 结直肠癌病人血浆 Periostin 的表达研究结果

2.2.1 结直肠癌病人血浆中 Periostin 水平

比较 65 例结直肠癌病人与 65 例正常人血浆中 Periostin 水平, 结直肠癌血浆中 Periostin 水平显著升高($p < 0.001$), 见表。

表2 结直肠癌血浆中Periostin水平

	样本数 (n)	Periostin (ng/mL)	p 值
正常对照	65	20.4±11.1	
结直肠癌	65	32.6±10.8	<0.001***

2.2.2 血浆 Periostin 水平与结直肠癌临床病理学特征的关系

血浆水平和结直肠癌临床病理参数之间的关系见表。结果显示: ①在结直肠癌 DukesC 期、DukesD 期的血浆中 POSTN 水平明显高于 A 期和 B 期 ($p < 0.001$); ②TNM 分期III期和IV期的明显高于临床 I 期和临床 II 期 ($p < 0.001$); ③存在淋巴结转移的结直肠癌血浆中 POSTN 水平显著高于无淋巴结转移的结直肠癌 ($p < 0.001$); ④伴远处转移的结直肠癌血浆中 POSTN 水平显著高于显著高于无远处转移的结直肠癌 ($p = 0.003$); ⑤ 高分化型结直肠癌血浆中 POSTN 水平显著高于中分化、低分化结直肠癌 ($p = 0.003$)。

结直肠癌血浆中 POSTN 水平与肿瘤的分期、淋巴结是否存在转移, 远处器官是否存在转移和肿瘤的分化程度有关; 病人性别、年龄与其无关($p > 0.05$)

表3 结直肠癌病人血浆中POSTN水平与临床参数的关系

参数	样本数 (n)	血浆中 Periostin 水平	P 值
性别	男	41	32.7±1.3
	女	24	32.4±0.1
年龄 (岁)	<55	13	35.1±0.1
	≥55	52	32.0±1.8
分化水平	高-中分化	48	31.2±1.6
	低分化	17	36.7±9.5
TNM 分期	I + II	36	27.0±10.9
	III+IV	29	36.4±9.3
淋巴结转移	N0	29	28.0±10.7
	N1	27	36.1±9.2
	N2	9	37.2±9.5
远处转移	M0	50	31.1±10.8
	M1	15	37.8±9.1

3 讨论

大肠癌早期的症状不是十分明显,而且对大肠癌早起诊断缺乏诊断指标,一般能够确诊大肠癌时,已经到了晚期。往往丧失了治疗的最佳时期。医生的努力目标是探寻早期诊断恶性肿瘤的有效的方法。学术界的重视是分子标记,因为它在诊断,治疗和恶性肿瘤的预后非常重要的作用。肿瘤标记物是肿瘤组织和肿瘤细胞,由于癌基因或抗癌基因和其他肿瘤相关基因及其产物异常表达所产生的抗原和生物活性物质。对肿瘤的诊断及预后的判断有提示作用。其检测方便,是临床上结肠癌诊断的主要辅助检查之一^[7]。由于癌基因的复杂性,肿瘤并不是一个单一的类型,所以到目前为止,没有任何一种灵敏度高、特异性强的肿瘤标志物发现。单一肿瘤标志物检测诊断精密度低,两个或两个以上的联合检测肿瘤标志物的使用可能会增加结肠癌的检出率,提高诊断准确性。医学研究人员正在努力寻找一个高度敏感的肿瘤标志物并具有较高的特异性,以协助结肠癌的诊断。

应用生理和分子生物学等传统筛选方法效率低,耗费时间;高度自动化的蛋白质组学技术,高效益,高吞吐量的优点,可同时检测所有组织蛋白,利用差异蛋白质组学分析可以在高灵敏度和特异性的肿瘤标志物的早期发现。

我们通过质谱分析、二维色谱技术,在分化大肠癌及癌旁组织的蛋白质表达谱分析,鉴定结果发现有 20 个差异蛋白。有 13 个上调, 7 个下调。这些差异蛋白的鉴定对于大肠癌的进一步研究,提供了新的蛋白研究目标,同时这些蛋白有望能对以后通过蛋白质组学研究能对大肠癌的诊断及分期、治疗等有帮助。

POSTN 蛋白在骨外膜、软骨膜及关节韧带中均有高表达^[8]。POSTN 是近年发现^[9]的一个新的间质特异基因,在许多正常组织中均有表达。研究证实^[10]了 POSTN 表达与心脏的发育和心脏疾病密切相关,最近有许多研究报道了 POSTN 在多种人类恶性肿瘤的细胞系以及肿瘤实体中表达增高。一些观点不一致的研究也有^[11,12]。

大量研究表明,POSTN 促进了肿瘤细胞迁移和侵袭能力。POSTN 高表达的更容易发生肺转移和淋巴结转移^[13]。POSTN 上调在胃癌、胰腺癌中同样对肿瘤细胞侵袭和转移有促进作用^[14,15]。POSTN 高表达在口腔癌中导致肿瘤侵袭能力增强。这些研究表明,在许多肿瘤中,POSTN 具有促进肿瘤侵袭和转移的作用。然而,也有报道指出,在人膀胱癌中,POSTN 表达下降,恢复其表达可以抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。

本研究将通过酶联免疫吸附法检测 POSTN 蛋白含量来评估其在结肠癌的临床检验是否具有参考价值。大肠癌血浆中 POSTN 水平与肿瘤分期、淋巴结是否存在转移和远处是否存在转移、肿瘤的分化程度密切相关;病人性别、年龄与其无关。

近 10 年来,随着科研工作者在 POSTN 与肿瘤的发生发展研究领域取得的进展,已经挖掘出肿瘤研究的又一新的方向,为肿瘤的早期诊断和治疗以及预后提供了一个新的靶点。

我们应用二维色谱和质谱联用技术, 鉴定大肠癌组织及癌旁组织的差异表达蛋白谱时, 发现共有 20 种差异蛋白表达。其中有 13 种上调表达, 7 种下调表达。在 13 种上调表达蛋白中就有 POSTN 蛋白, 提示我们 POSTN 可能作为大肠癌病人血清中的标志物。大肠癌血浆中 POSTN 水平与肿瘤分期、淋巴结是否存在转移和远处是否存在转移、肿瘤的分化程度密切相关; 病人性别、年龄与其无关

参考文献

- [1]Cancer Facts & Figures 2011[R].the American Cancer Society.2011.
- [2]Hawk ET,Levin B.Colorectal cancer prevention[J].J Clin Oncol,2005,23(2):378-91.
- [3]Ruo L,Gougoutas C,Paty PB,et al.Elective bowel resection for incurable stage IV colorectal cancer:prognostic variables for asymptomatic patients.[J]J Am Coll Surg.2003,196(5):722-8.
- [4]赵海丰.Dukes B 期大肠癌蛋白质组学研究[D].长春:吉林大学中日联谊医院,2010.
- [5]Zhu M,Fejzo MS,Anderson L,Dering J,Ginther C,Ramos L,et al.Periostin promotes ovarian cancer angiogenesis and metastasis[J].Gynecol ncol,2010,119:337-344.
- [6]Ben QW,Jin XL,Liu J,Cai X,Yuan F,Yuan YZ.Periostin,a matrix specific protein,is associated with proliferation and invasion of pancreatic cancer[J].Oncol Rep,2011,25:709-716.
- [7]杨雪琴,仲召阳,王东等.C-12 多肿瘤标志物蛋白芯片监测胃肠道肿瘤复发转移的临床评价.[J]重庆医学,2010,39(4):427-9.
- [8]赵晓君,孙传玉.periostin 在恶性肿瘤发生发展过程中的作用中华临床医师杂志(电子版) [J],2013,7(13):5741-5742.
- [9]贲其稳,袁耀宗.Periostin 在恶性肿瘤中的作用研究进展肿瘤防治研究[J],2009,36(5):440-442.
- [10]王洋,朱明华第二军医大学长海医院病理科 periostin 与上皮源性恶性肿瘤侵袭转移的关系第二军医大学学报 [J],2012,33(6):1110-1112.
- [11]Yang Lv ,Wei Wang ,Wei-Dong Jia ,et al.High-level expression of periostin is closely related to metastatic potential and poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J].Med Oncol,2013,30:385
- [12]Verena Tischler,Florian R Fritzsche1,Peter J Wild,et al.Periostin is up-regulated in high grade and high stage prostate cancer [J].BMC Cancer 2010,10:273
- [13]Xu D,Xu H,Ren Y,et al.Cancer stem cell-related gene periostin:a novel prognostic marker for breast cancer.[J]PLoS One,2012,7:e46670.
- [14]Katayama M,Nakano H,Ishiuchi A,Protein pattern difference in the colon cancer cell lines examined by two-dimensional differential in-gel electrophoresis and mass spectrometry.[J]Surg Today.2006,36(12):1085-93.
- [15]Pei H,Zhu H,Zeng S,et al.Proteome analysis and tissue microarray for profiling protein markers associated with lymph node metastasis in colorectal cancer.[J] J Proteome Res 2007;6(7):2495-2501.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

焦磷酸测序对结核分枝杆菌耐药基因突变的检测

冯琳涵 刘家云 黄芳 徐修礼 马越云 苏明权 郝晓柯
第四军医大学西京医院全军检验医学中心 陕西 西安 710032

[摘要] 目的: 建立结核分枝杆菌耐药基因 rpoB 突变的焦磷酸测序(pyrosequencing)检测方法, 评估其临床应用价值。
方法: 利用焦磷酸测序技术, 分析 110 株结核分枝杆菌 rpoB 基因突变特点, 并与 BACTEC MGIT 960 药敏结果进行比较。
结果: 110 株结核分枝杆菌中检出 rpoB 基因突变 57 株, 最常见突变形式为 531 位 TCG 突变为 TTG, 占 66.8%,

焦磷酸测序的敏感性是 96%。**结论:** 焦磷酸测序检测技术是一种快速, 准确, 高通量检测结核分枝杆菌耐药性研究的有用工具。

[关键词] 结核分枝杆菌; 耐药; rpoB 基因; 焦磷酸测序

Pyrosequencing of Mycobacterium tuberculosis drug-resistance gene mutations of detection

FENG Lin-han, LIU Jia-yun, HUANG Fang, MA Yue-yun, SU Ming-quan, HAO Xiao-ke

[ABSTRACT] Objective: Application of pyrosequencing technology (pyrosequencing) detection of resistance genes of Mycobacterium tuberculosis (rpoB and gyrA) mutation characteristics, evaluation of its clinical application, created by pyrosequencing method on drug-resistance gene mutations of Mycobacterium tuberculosis detection method. **Methods** Through the BACTEC-960 rapid culture and using the pyrosequencing technology, about 110 cases of tuberculosis drug resistance, analyzes the characteristics of gene mutation, and the results were compared with conventional susceptibility. pyrosequencing sensitivity is 96%. **Results:** 110 strains of Mycobacterium tuberculosis resistance in the rpoB gene of 57 strains of drug-resistant strains, the most common mutation and mutant forms of respectively 531 TCG mutation for TTG. **Conclusion:** pyrosequencing technology is a high throughput and high performance method in detecting mutation resistance in Mycobacterium tuberculosis.

[Key words] Mycobacterium; Tuberculosis; Drug resistance rpoB gene; Pyrosequencing

2011 年卫生部召开全国第五次结核病流行病学抽样调查新闻发布会, 公布了全国肺结核疫情现状。耐药结核病尤其是耐多药结核药结核病流行情况也较为严重, 我国肺结核患者耐多药率为 6.8%^[1], 对于 MDR-TB 病目前大多数采用二线抗结核药物进行治疗。因此如何快速、准确检测结核分枝杆菌耐药性成为有效防治结核病的首要问题之一。本研究通过利用焦磷酸测序技术检测 110 株结核分枝杆菌 rpoB 耐药基因片段, 分析其突变位点, 并与 DNA 测序法和常规药敏相比较, 探讨该技术在结核分枝杆菌利福平耐药基因检测中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源: MTB 标准株 (H37Rv ATCC27294) 本室保存, 110 株 MTB 临床分离株均来自陕西省西安市结核病医院及第四军医大学西京医院检验科临床分离株。

1.1.2 主要仪器和试剂。(1) 主要仪器: BACTEC960 结核培养及药敏分析系统、基因扩增仪 (ABI 2720)、PSQ96 焦磷酸测序仪 (瑞典 Biotage 公司)。(2) 主要试剂焦磷酸测序试剂盒 (PSQ96MA SQA Upgrade Kit)、链亲和素包被磁珠均为瑞典 Biotage 公司, Taq 酶等 PCR 产物扩增体系试剂均为大连 TAKARA 公司产品, 生物梅里埃提取基因组 DNA 试剂盒等等。

1.1.3 引物设计。rpoB 基因特异性引物根据 GenbankL27989 的序列设计^[2], 引物序列为: 上游 5'-GGACGGATGACCACCCAG-3',

下游 5' Biotin-CGGTACGGCGTTTCGATGAAC -3', PCR 扩增片段为 349bp。

Sequencing S504 5'GGTGGTCGCCGCGATCAA-3'

S541 5'-CGGCGGICTGTACG-3'。

以上引物均由大连 TAKARA 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养。所有菌株根据结核病诊断实验室检验规程^[3]进行分枝杆菌培养菌种培养、菌种鉴定。

1.2.2 BACTEC MGIT 960 快速培养药敏检测仪器: 利福平 (Rifampicin, RFP) 药敏试验根据 BACTEC MGIT 960 的操作说明。BACTEC MGIT 960 快速、全自动分枝杆菌培养、药敏检测系统。通过连续检测标本培养管所显示的荧光强度变化, 判断是否有分枝杆菌生长。MGIT 培养管底部包埋有荧光物质, 荧光物质将随着管内氧含量的变化而发生反应。若分枝杆菌在 MGIT 培养管内生长消耗氧, 管内荧光物质被激活, 在特定光源的激发下释放荧光, BACTEC MGIT 960 系统将每隔 60 分钟连续检测 MGIT 培养管内荧光强度, 从而判断 MGIT 管内分枝杆菌生长情况。

1.2.3 基因组 DNA 制备 结核分枝杆菌临床分离株 DNA 严格按 Uitraleari Microbial DNA isolation 试剂盒提取方法提取, 测定浓度后于 -20℃ 冻存储备用。

1.2.4 PCR 扩增

在 50 μ l 反应体系中, 4 种脱氧核苷酸 (dNTP) 的终浓度各为 0.4 μ mol/L, DNA 模版为 50ng, Taq9DNA 聚合酶 1U, PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30s, 65 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 30s 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。取 PCR 产物 1 μ l 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后在紫外灯下检查扩增效果。

1.2.5 PCR 产物的焦磷酸测序

(1)PCR 产物固定: 取 PCR 扩增产物 40 μ l 于 96 孔板中, 分别加入 47 μ l 的结合缓冲液和 3 μ l 亲和素包被磁珠, 于涡旋震荡仪上震荡 10min, 使 PCR 产物完全固定在磁珠上。(2)单链模版的纯化: 将真空泵打开, 转移器转到 PCR 板中, 抓取结合了 PCR 产物的磁珠, 检查大部分磁珠都吸附于真空样品转移器上后, 再将真空样品转移器放入 70% 乙醇中轻微震荡 5s, 然后移到变性缓冲液中抽吸 5s, 使 DNA 变性后得到纯化的单链 DNA 模版, 最后移到洗脱缓冲液 (washing buffer) 中清洗 10s, 得到作为测序的单链 DNA。(3)引物杂交: 先在焦磷酸测序微孔板中各孔加入退火缓冲液 40 μ l 和测序引物 3 μ l 至终浓度为 0.2mmol/L, 再将真空样品转移器从 PCR 板移入焦磷酸测序微孔板, 关闭真空泵, 将已纯化好的单链模板与测序引物混合后, 80 $^{\circ}$ C 变性 2min, 然后自然冷却至室温, 使引物与模版退火杂交。(4)焦磷酸测序: 运用 biotage AB 公司生产的 PSQ96ID 测序仪和试剂盒, 依次加入酶、底物和 4 种 dNTPs, 设定碱基加入顺序进行测序反应, 随着引物引导特异性的合成, 同时伴有酶促反应并诱发发光信号, 通过检测发光信号转化为 A、G、C、T 的碱基信息, 最终确定菌株的核苷酸序列。(5)基因突变位点的确定: 运用 bioedit 分析软件, 将所有测序所得到的序列与 H37Rv 标准株所测序列相比对, 确定结核分枝杆菌临床分离株的突变类型和突变位点。(6)PCR 直接测序分析: 同时将所有检测菌株按以上条件进行 PCR 扩增, 扩增产物送往上海生工生物工程有限公司进行测序, 对比其结果。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS16.0 软件经卡方检验分析结果。

2 结果

2.1 药物敏感试验结果

110 株 MTB 临床分离株经 BACTEC 960 快速药敏法检测药敏测定, 利福平敏感 51 株, 耐药 59 株。

2.2 PCR 基因扩增结果

rpoB 基因扩增 110 株结核分枝杆菌临床分离株 rpoB 基因片段扩增产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 均可见单一清晰的条带(349bp), 部分菌株扩增结果见图 1

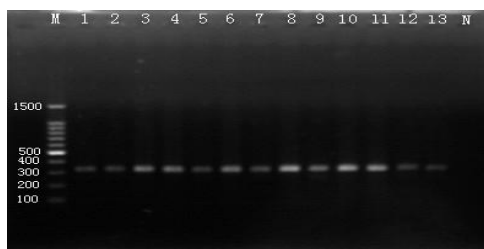


图 1 为部分 MTBrpoB 基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图: 1 为阳性对照 2-13: 为部分样本, N 为阴性对照 M 为 DNA Marker (100bp-1500bp)

2.3 焦磷酸测序检测结果

耐药表型	耐药菌株	耐药基因	主要突变位点	主要耐药基因模式	突变例数
			1349TCG—TGG	450Ser—Trp	35
利福平	57	rpoB	1334CAC—AGC	445 His—Arg	11
			1289CTG—CCG	430 Leu—Pro	9

注: 以上突变位点及突变形式为主要突变位点及突变形式(以上突变均有文献报道, 未发现新的突变)Ser: 丝氨酸 Trp: 色氨酸 His: 组氨酸 Arg: 精氨酸 Leu: 亮氨酸 Pro: 脯氨酸 Asp: 天冬氨酸 Gly: 甘氨酸; Ala: 丙氨酸; Val: 缬氨酸

2.4 焦磷酸测序结果验证

同时采用 DNA 直接测序法对 110 株焦磷酸测序检测耐药性测定结果进行验证对比,结果显示与焦磷酸测序检测结果完全一致。

2.5 焦磷酸测序和 BACTEC960 药敏结果比较

焦磷酸测序技术分别检测 110 株 MTB 临床分离株 *rpoB* 耐药性与 BACTEC960 药敏结果比较分别见表 2。

表 2 *rpoB* 基因焦磷酸测序结果和 BACTEC960 药敏结果比较

	焦磷酸测序	BACTEC960 结果
利福平敏感株	53	51
利福平耐药株	57	59
合计	110	110

2.6 统计学分析结果

两种方法经过卡方检验 $P>0.05$, 显示两种方法无显著性差异, 有较好的一致性。

3 讨论

结核病是严重危害人类的慢性传染病。我国结核病疫情较严重是全球结核病高负担国家之一, 加之耐药结核分枝杆菌引发耐药结核病的危情日益加重, 由于结核分枝杆菌生长缓慢, 经培养需 4-6 周才能出结果难以及时为临床提供有效指导, 迫切需要快速因此创建一种快速、准确的耐药性检测方法显得尤为迫切。目前已有大量基因突变检测方法, 如 NDA 测序法、PCR 单链构成多态性分析法 (PCR-SSCP)、基因芯片检测法、线性探针检测法等^[4-5]。1-2 天即可报告结果, 比传统药敏试验方法快速灵敏, 但也有各自的局限性, 焦磷酸测序技术是 1998 年发明的一种靠生物发光进行实时 DNA 测序技术^[6-7]。焦磷酸测序技术是由 4 种酶催化的同一反应有反应底物体系中的酶级联发光反应。反应体系尤反应底物、待测单链、测序引物和 4 种酶构成。反应底物为 5'-磷酸硫酸 (adenosine 5'-phosphosulfat, APS)、荧光素 (luciferin)。在每一轮测序反应中, 反应体系中只加入一种脱氧核苷酸 (dNTP)。如果它刚好能和 DNA 模板的下一个碱基配对, 则会在 DNA 聚合酶的作用下, 添加到测序引物的 3' 末端, 同时释放出一分子的焦磷酸 (ppi)。在 ATP 硫酸化酶的作用下, 生成的 ppi 可以和 APS 结合形成 ATP, 在荧光素酶的催化下, 生成的 ATP 又可以和荧光素结合形成氧化荧光素, 同时产生可见光。通过 CCD 光学系统即可得到一个特异的检测峰, 峰值的高低则和相匹配的碱基数目成正比。反应体系中多余的 dNTP 残留的少量 ATP 在 Apyrase 的作用下发生降解。目前该技术已被广泛应用于诸多领域, 如遗传学分析、SNP 分析^[8-9]、分子诊断、病原微生物快速鉴定、病毒与细菌分析型、突变检测^[10]、甲基化分析、法医鉴定及药物基因组学等^[11-12]。

本实验将焦磷酸测序技术用于检测结核分枝杆菌耐药性检测, 通过对利福平耐药 *rpoB* 基因高突变序列的测定来确定耐药基因型。110 株 MTB 临床分离株和 H37Rv 标准株均获得焦磷酸检测结果, *rpoB* 基因突变位点主要为 531 位和 526 位, 与其他文献相符。我们在 1-2h 内完成了所有样品的检测, 此方法具有快速、高通量、高自动化、结果判读客观准确的特点。针对临床的需要, 利用焦磷酸测序技术, 建立结核分枝杆菌耐药基因快速检测方法, 可批量检测, 为临床医生及时提供实验结果能够尽快诊治疾病, 减少耐药菌株的产生也有着重大意义。

参考文献

- [1]中华人民共和国卫生部介绍全国第五次结核病流行病学抽样调查结果公布。
- [2]刘家云.耐药结核分枝杆菌基因突变分析[J].中华检验医学杂志 2010,(7):594-598.
- [3]中国防痨协会基础委员会.结核病诊断实验室检验规程[M].北京:中国教育文化出版社,2006.
- [4]HopkinsKL,ArnoldC,ThrelfallEJ.Rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations in quinolone-resistant *Salmonella enterica* using Pyrosequencing technology.J Microbiol Methods,2007,68:163—171.
- [5] Haanper-iM,HuovinenP,JalavaJ.Detection of mutations at positions 2058 and 2059 of the 23S rRNA gene by pyrosequencing. Antimicrob Agents Chemother,2005,49:457-460.
- [6]RonaghiM,KaramohamedS.PetterssonB. et al. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. Anal

Biochem.1996,242 :84-89.

[7]RonaghiM,Uhl6nM,Nyr~nP.A seuqencingmehtodbasedon real-timepyrophosphate.Science,1998,281(5375):363,365.

[8]SureshN,Singh UB,Aroar J,etIa.rpoB genesequencingand spoligotyping of muhidrug—resistan t Mycobacterium tueb rcluosisisolatesfrom I ia.InfectGenetEvol,2006,6:474483.

[9]HuitrieE,WengrenJ,Jur6enP,etIa.ResistancelevelsandrpoB gene mutations among in vitro selected irfma pin—ersistant Mycobaeiteirum tuberculosis mutants. Antimicmb Agenst Chemother,2006,50:2860-2862.

[10]乐军,曾而良,谢建平,等.中国耐多药结核分枝杆菌临床分离株 rpoB 基因突变特点.遗传学报,2004,31:1332—1336

[11]HillemannD,WeizeneggerM,KubicaT,etIa.Useofhtegenotype MTBDR assay ofr arpid detection of rifma pin nad isoniazid ersistancein Mycobacterium tuberculosiscomplexisolates.JClin Miemblo1.20o5.43:3699-3703.

[12] MakinenJ,Marttila}IJ,Maljma akiM,etIa.Comparisonoftwo commercially available DNA line porbe assays for detection of muhidrug—ersistantMycobaeterium tuberculosis.JClinMiembiol, 2005,44:350-352.

作者简介: 冯琳涵,女,(1985-),在读硕士。E-mail: linhan1202@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

脊柱退行性疾病需手术治疗患者骨代谢指标与骨密度关系的研究

王旭¹ 张会英^{1*} 娄路馨² 吕艳伟³ 吴昕峰⁴ 吴俊¹

1 北京积水潭医院检验科 北京 100035

2 北京积水潭医院放射科 北京 100035

3 北京积水潭医院临床流行病学研究室 北京 100035

4 北京积水潭医院脊柱外科 北京 100035

*通信作者: zhy_0825@hotmail.com

[摘要] 目的: 探讨脊柱退行性疾病需手术治疗患者骨质疏松的发生情况,并分析其骨代谢指标与骨密度(BMD)之间的关系以及合并2型糖尿病对骨代谢和BMD的影响。**方法:** 回顾性研究。选取2013年10月至2014年10月期间北京积水潭医院脊柱外科收治的脊柱退行性疾病需手术治疗患者139例。患者术前进行腰椎定量CT(QCT)骨密度测量,同时测定其血清中I型前胶原氨基端延长肽(PINP)、I型胶原羧基端肽 β 特殊序列(β -CTX)、N-端骨钙素(OC)、25-羟维生素D[25(OH)D]、甲状旁腺激素(PTH)和血清钙、磷的水平。采用偏相关分析腰椎QCT骨密度与骨代谢指标的关系,方差、协方差分析BMD水平不同的3组间骨代谢指标的差异,多因素线性回归分析腰椎QCT骨密度的影响因素。t检验比较BMD与骨代谢指标在2型糖尿病有无的两组间的差异。**结果:** 研究对象平均年龄 62.74 ± 6.83 岁,腰椎BMD结果显示骨质疏松的发生率为40.2% (56/139),骨量减少的发生率为43.8%(61/139),骨量正常的比例仅有16.0%(22/139)。25(OH)D < 30 nmol/L的比例为47%(66/139),30~50 nmol/L的比例为40% (55/139),50~125 nmol/L的比例仅为13% (18/139)。偏相关分析提示在控制性别、糖尿病的作用后,腰椎QCT骨密度与PINP、 β -CTX、OC呈负相关($r = -0.352, P < 0.01; r = -0.356, P < 0.01; r = -0.276, P = 0.001$)。并且随着患者年龄的增大、BMD的下降,PINP、 β -CTX、OC水平逐渐升高,差异有统计学意义($F = 11.575, P < 0.01; F = 11.550, P < 0.01; F = 9.738, P < 0.01$)。多因素线性回归分析结果提示年龄、PINP是决定脊柱退行性疾病需手术患者BMD变化的主要影响因素($\beta = -1.863, t = -5.425, P < 0.01; \beta = -0.393, t = -2.061, P = 0.041$)。根据有无血糖异常及2型糖尿病的诊断,将研究对象分为糖尿病组和无糖尿病组,两组间的PINP (36.56 ± 14.56 vs 49.51 ± 16.68 $\mu\text{g/L}$)、 β -CTX (0.39 ± 0.20 vs 0.52 ± 0.21 $\mu\text{g/L}$)、OC (14.21 ± 5.13 vs 20.74 ± 6.84 $\mu\text{g/L}$)水平差异均有统计学意义($t = 3.648, P < 0.01; t = 2.754, P < 0.01; t = 4.573, P < 0.01$)。**结论:** 脊柱退行性疾病需手术治疗患者普遍存在骨质疏松、骨量减少和维生素D缺乏的状况。伴有PINP水平升高的老年患者,更容易发生BMD的降低,增加骨质疏松症的发病风险。合并2型糖尿病的患者处于一种低骨转换状态,这可能

是不依赖于 BMD、增加骨折风险的独立危险因素。

[关键词] 脊柱退行性疾病；骨质疏松；骨代谢指标；骨标志物；骨密度；糖尿病，2 型

The relationship between bone mineral density and bone metabolic markers in patients with spine degeneration diseases needing surgery Wang Xu, Zhang Hui-ying, Lou Lu-xin, Lv Yan-wei, Wu Xin-feng, Wu Jun.

Department of Clinical Laboratory, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing100035, China.

[Abstract] Objective: The aims of this study were to evaluate the morbidity of osteoporosis and the relationship between bone mineral density (BMD) with bone metabolic markers in patients with spine degeneration disease needing surgery, at the same time to observe the influence of type 2 diabetes mellitus on bone metabolism and BMD. **Methods:** This retrospective analysis included 139 patients suffered by spine degeneration disease needing surgery from 2013 October to 2014 October in Beijing Jishuitan Hospital. Lumbar BMD was measured by quantitative computed tomography (QCT) before surgery. Serum N-terminal propeptide of type I procollagen (PINP), β C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (β -CTX), osteocalcin (OC), 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], parathyroid hormone (PTH), calcium and phosphorus were quantified simultaneously. The relationship between lumbar BMD measured by QCT and bone metabolic markers was analyzed by partial correlation. The differences of bone metabolic markers among three groups classified according to BMD were performed by one-way ANOVA and analysis of covariance. The influence factors of lumbar BMD measured by QCT were analyzed by multifactor linear regression. T test was used to analyze the differences of BMD and bone metabolic markers between two groups with and without type 2 diabetes mellitus. **Results:** The average age of 139 patients was 62.74 ± 6.83 years. Lumbar BMD revealed that the percentage of osteoporosis, osteopenia and normal BMD were 40.2% (56/139), 43.8% (61/139) and 16% (22/139) separately. The percentage was 47% (66/139) in subjects with 25(OH)D below 30 nmol/L. The percentage of subjects with the concentrations of 25(OH)D between 30-50 nmol/L was 40% (55/139), while the percentage of subjects with the concentrations of 25(OH)D between 50-125 nmol/L was only 13% (18/139). Partial correlation analysis revealed that lumbar BMD measured by QCT was negatively correlated with PINP ($r=-0.352, P<0.01$), β -CTX ($r=-0.356, P<0.01$) and OC ($r=-0.276, P=0.001$) with gender and type 2 diabetes mellitus as covariates. Along with the age of patients increasing and BMD reducing, the levels of PINP, β -CTX and OC increased gradually and the differences were statistically significant ($F=11.575, P<0.01$; $F=11.550, P<0.01$; $F=9.738, P<0.01$). Multiple linear regressions analysis revealed that age and PINP were the main factors that influenced the change of BMD in patients with spine degeneration disease needing surgery ($\beta=-1.863, t=-5.425, P<0.01$; $\beta=-0.393, t=-2.061, P=0.041$). Subjects were divided into diabetes group and non-diabetes group according to the diagnosis and whether having abnormal serum glucose. The levels of PINP (36.56 ± 14.56 versus $49.51 \pm 16.68 \mu\text{g/L}$), β -CTX (0.39 ± 0.20 versus $0.52 \pm 0.21 \mu\text{g/L}$) and OC (14.21 ± 5.13 versus $20.74 \pm 6.84 \mu\text{g/L}$) in serum between two groups had significant differences ($t=3.648, P<0.01$; $t=2.754, P<0.01$; $t=4.573, P<0.01$). **Conclusions:** There was prevalence of osteoporosis, osteopenia and vitamin D deficiency in patients with spine degeneration disease needing surgery. The patients with higher level of PINP and age were more prone to appear lower BMD which increasing the risk of osteoporosis. The patients combined with type 2 diabetes mellitus had suppressed bone markers which maybe the risk factor, independent of BMD, increasing fracture risk.

[Key words] Spine degeneration disease; Osteoporosis; Bone metabolic markers; Bone markers; Bone mineral density; Diabetes mellitus, type 2

脊柱退行性疾病是中老年人群的常见病、多发病。对脊柱退行性疾病治疗的目的是消除或减轻临床症状，提高患者的生活质量。非手术治疗是该病的主要治疗手段之一，对于保守治疗无效的患者，借助手术治疗来改善症状的手段是脊柱退行性疾病的重要治疗方法^[1]。鉴于该病发病的年龄特点，患者常常伴发骨质疏松、糖尿病等多种疾病。脊柱退行性疾病与骨质疏松的叠加，使患者疼痛症状加重的同时，也增加了手术治疗的难度。术后制动或活动减少，必然进一步加剧患者的骨质流失，增加骨质疏松的发病风险或加重骨质疏松的程度。因此研究这部分人群骨质疏松

的发病情况, 对其进行多指标的综合评估和监测, 及早进行抗骨质疏松的干预治疗, 将是非常必要的。但是目前对于这部分人群骨质疏松的发生情况、骨代谢指标对其应用价值以及与骨密度 (bone mineral density, BMD) 的关系研究尚未见报道。因此, 本研究旨在对以上问题进行探讨, 同时对合并2型糖尿病对骨代谢、BMD的影响进行初步研究。

1 对象与方法

1.1 对象

收集2013年10月至2014年10月在北京积水潭医院脊柱外科手术治疗脊柱退行性疾病患者139例, 患者均于术前同一时间段进行了腰椎定量CT(quantitative computed tomography, QCT)骨密度测量和骨代谢指标的检测。排除标准: 近1年内服用过影响骨代谢的药物 (如双膦酸盐、糖皮质激素等); 合并肝脏、肾脏疾病, 伴有肝肾功异常; 甲状腺、甲状旁腺疾病; 结缔组织病; 肿瘤史; 慢性阻塞性肺疾病; 骨折史、骨科手术史等。根据有无血糖异常及2型糖尿病的诊断, 将研究对象分为无糖尿病组和糖尿病组, 诊断均符合1999年WHO的2型糖尿病诊断标准。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器:

I型前胶原氨基端延长肽 (N-terminal propeptide of type I procollagen, PINP)、I型胶原羧基端肽 β 特殊序列 (β C-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen, β -CTX)、N-端骨钙素 (osteocalcin, OC)、25-羟基维生素 D[25-hydroxyvitamin D, 25(OH)D]、甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 试剂盒购自德国罗氏诊断公司; 钙离子测定试剂购自柏定生物工程 (北京) 有限公司; 磷离子测定试剂购自北京利德曼生化股份有限公司。Cobas E601 电化学发光免疫分析仪为德国罗氏诊断公司生产, 7600全自动生化分析仪为日立公司生产。

1.2.2 每位患者的实验结果均出自同一天采集的血液标本。清晨空腹采集静脉血, 分离血清当日完成检测。

1.2.3 腰椎QCT骨密度测量:

采用Toshiba Aquilion 64排CT扫描机, Mindways公司的QCT骨密度测量分析软件(QCT PRO)工作站。测量L2-4椎体中部层面松质骨的BMD, 取3个椎体BMD平均值。测量层面避免骨皮质、骨赘, 如果有压缩骨折、血管瘤等则放弃该椎体测量。诊断标准: 采用ISCD2007年推荐的QCT诊断标准, $BMD \geq 120 \text{ mg/cm}^3$ 为骨量正常; $80 \sim 120 \text{ mg/cm}^3$ 为骨量减少; $BMD \leq 80 \text{ mg/cm}^3$ 为骨质疏松症。

1.3 统计学分析

采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理。正态分布计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 分类资料采用相对数进行描述。采用独立样本 t 检验进行两组间正态分布计量资料的比较, 采用 χ^2 检验分析不同构成比的差别。采用偏相关分析控制性别、糖尿病的作用, 分析腰椎 QCT 骨密度与骨代谢指标的关系。采用简单相关分析不同计量资料的相关性, 采用多因素线性回归分析腰椎 QCT 骨密度的影响因素, 采用逐步法进行变量筛选。3 组数值变量的比较采用单因素方差分析; 控制年龄的影响, 采用协方差分析 3 组间 PINP、 β -CTX、OC 的差别。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象骨质疏松的发病情况

骨量正常的比例仅为 16% (22/139), 见表 1。

表1 研究对象骨质疏松症的发病率[例(%)]

组别	例数	腰椎QCT骨密度 (mg/cm^3)		
		≤ 80	$80 \sim 120$	≥ 120
女性	82	39(28.0)	32(23.0)	11(7.9)
男性	57	17(12.2)	29(21.0)	11(7.9)
合计	139	56(40.2)	61(43.8)	22(16.0)

2.2 研究对象维生素 D (vitamin D, VD) 的营养状态

美国国家科学院医学研究所 (Institute of Medicine, IOM) 在 2011 年提出了一个比较保守的分类标准, 即 25(OH)D $< 30 \text{ nmol/L}$ 被定义为 VD 缺乏, $30 \sim 50 \text{ nmol/L}$ 为 VD 不足, $50 \sim 125 \text{ nmol/L}$ 为 VD 充足^[2]。按照这个分类标准, 139

例研究对象能达到 VD 充足标准的比例仅有 13% (18/139), 有 47%(66/139)的患者其 25(OH)D<30 nmol/L。

2.3 骨代谢指标与腰椎 QCT 骨密度的相关性

采用偏相关分析控制性别、糖尿病的作用, 统计结果显示 PINP、 β -CTX、OC 与腰椎 QCT 骨密度存在负相关 ($r=-0.352, P<0.01$; $r=-0.356, P<0.01$; $r=-0.276, P=0.001$), 而 25(OH)D、PTH、血清钙、磷水平与腰椎 QCT 骨密度不存在相关性($r=-0.077, P=0.369$; $r=-0.058, P=0.497$; $r=0.002, P=0.982$; $r=-0.019, P=0.826$)。

2.4 不同 BMD 水平患者骨代谢指标的变化情况

对 113 例无糖尿病的脊柱退行性疾病需手术治疗患者, 按照腰椎 QCT 骨密度水平的不同分成 3 组, 对 3 组骨代谢指标进行统计学分析, 见表 2。

表 2 不同骨密度水平下骨代谢指标的变化情况

项目	骨量正常组 (16例)	骨量减少组 (51例)	骨质疏松组 (46例)	统计值	P 值
年龄 (岁)	59.94 \pm 7.04	60.88 \pm 5.65	65.70 \pm 6.74	$F=8.825$	<0.01
性别(男/女)	7/9	23/28	13/33	$\chi^2=3.165$	0.205
PINP (μ g/L)	42.23 \pm 19.22 ^a	45.19 \pm 13.73 ^a	56.83 \pm 16.28 ^{bc}	$F=11.575$	<0.01
β -CTX (μ g/L)	0.37 \pm 0.18 ^{ab}	0.48 \pm 0.18 ^{ac}	0.61 \pm 0.21 ^{bc}	$F=11.550$	<0.01
OC (μ g/L)	15.97 \pm 4.86 ^{ab}	20.57 \pm 6.34 ^{ac}	22.60 \pm 7.24 ^{bc}	$F=9.738$	<0.01
25(OH)D (nmol/L)	33.18 \pm 14.65	37.58 \pm 20.17	33.20 \pm 16.70	$F=0.814$	0.446
PTH (pmol/L)	3.98 \pm 0.90	5.41 \pm 2.32	5.25 \pm 1.92	$F=2.899$	0.059
钙 (mmol/L)	2.28 \pm 0.10 ^b	2.35 \pm 0.10 ^c	2.31 \pm 0.07	$F=3.815$	0.025
磷 (mmol/L)	1.13 \pm 0.18	1.07 \pm 0.14	1.12 \pm 0.17	$F=2.018$	0.138

注: PINP 为 I 型前胶原氨基端延长肽, β -CTX 为 I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列, OC 为 N-端骨钙素, 25(OH)D 为 25-羟基维生素 D, PTH 为甲状旁腺激素。^a与“骨质疏松组”比较, $P<0.05$; ^b与“骨量减少组”比较, $P<0.05$; ^c与“骨量正常组”比较, $P<0.05$

2.5 研究对象腰椎 QCT 骨密度的多因素线性回归分析

以腰椎 QCT 骨密度作为因变量, 以年龄、性别、PINP、 β -CTX、OC、2 型糖尿病有无作为自变量进行多因素线性回归分析。结果提示年龄、PINP 是影响脊柱退行性疾病需手术治疗患者 BMD 变化的主要影响因素 ($\beta=-1.863, t=-5.425, P<0.01$; $\beta=-0.393, t=-2.061, P=0.041$)。

2.6 无糖尿病组与糖尿病组患者各项指标的比较

两组患者的年龄、性别无显著性差异, 糖尿病组患者的 PINP、 β -CTX、OC 均显著低于无糖尿病组, 差异具有统计学意义。而 25(OH)D、PTH、血清钙、磷水平及腰椎 QCT 骨密度值在两组间的差异无统计学意义, 见表 3。

表 3 无糖尿病组与糖尿病组的一般情况、骨代谢指标及腰椎 QCT 骨密度的比较

	无 T2DM 组 (n=113)	T2DM 组 (n=26)	统计值	P 值
年龄 (岁)	62.71 \pm 6.74	62.88 \pm 7.35	$t=-0.118$	0.906
性别(男/女)	43/70	14/12	$\chi^2=2.179$	0.140
PINP (μ g/L)	49.51 \pm 16.68	36.56 \pm 14.56	$t=3.648$	<0.01
β -CTX(μ g/L)	0.52 \pm 0.21	0.39 \pm 0.20	$t=2.754$	0.007
OC(μ g/L)	20.74 \pm 6.84	14.21 \pm 5.13	$t=4.573$	<0.01
25(OH)D (nmol/L)	35.18 \pm 18.07	30.33 \pm 9.30	$t=1.936$	0.057
PTH (pmol/L)	5.14 \pm 2.05	4.49 \pm 1.63	$t=1.512$	0.133
Ca (mmol/L)	2.32 \pm 0.09	2.35 \pm 0.12	$t=-1.187$	0.237
P (mmol/L)	1.10 \pm 0.15	1.12 \pm 0.17	$t=-0.421$	0.674
QCT(mg/cm ³)	90.13 \pm 34.05	92.89 \pm 32.60	$t=-0.377$	0.707

3 讨论

QCT是近年发展起来的一种较先进的BMD测量技术^[3],相较于双能X线吸收测定法,能有效避免各种脊柱退变因素导致的BMD测量假性增高或降低,提高骨质疏松症诊断和预测骨质疏松性骨折风险的可靠性^[4]。本研究对象平均年龄 62.74 ± 6.83 岁,术前BMD结果显示有84%的患者存在骨质疏松或骨量减少。而术后活动的受限必然会进一步加剧骨质的流失,增加骨质疏松和骨质疏松性骨折的风险。

目前VD缺乏成为全球性的普遍问题^[5]。即使按照保守的分类标准,本研究对象的VD营养状况也是令人堪忧的。研究发现维持体内适宜的VD水平可有效抑制PTH的增加,避免因继发性甲旁亢导致的血液生化和骨形态学变化以及骨矿化障碍;增加肠钙吸收;提高BMD等^[6]。因此开展25(OH)D的检测,对缺乏、不足的患者进行及时补充,对维持骨健康将是非常必要的。

偏相关分析结果显示PINP、 β -CTX、OC与腰椎QCT骨密度存在负相关($r=-0.352, P<0.01; r=-0.356, P<0.01; r=-0.276, P=0.001$)。同时随着年龄的增大,BMD的下降,3个骨标志物的水平逐渐增加。多因素线性回归分析进一步提示年龄、PINP是影响BMD变化的主要影响因素。因此推断脊柱退行性疾病需手术治疗患者无论男性或女性,伴有高水平PINP的老龄患者,更容易发生BMD的降低,增加骨质疏松的风险。而且PINP是目前被国际骨质疏松基金会推荐的一种骨形成标志物,用于药物疗效监测及骨折风险评估^[7]。它的浓度受饮食影响小,代谢不受肾功能影响,昼夜差异和个体内变异小,室温中放置稳定期长,在评估骨代谢方面性能优越。Gielen等^[8]对487名40~79岁男性进行的为期平均4.3年的前瞻性研究发现高基线水平的PINP和 β -CTX,与髌部面积BMD下降显著相关。Seguro等^[9]研究发现,低基线水平的PINP可以预测1年后绝经前系统性红斑狼疮患者的BMD下降,主要是糖皮质激素抑制了骨形成。我们看到不管是高水平还是低水平的PINP,其在预测BMD改变方面存在一定的潜力。

骨质疏松症的最大危害就是骨折,是导致患者病残、死亡的主要原因。BMD检查除了用于骨质疏松症诊断、疗效监测,目前也被认为是预测骨折的主要方法^[10]。研究发现^[11]2型糖尿病骨折风险明显高于非糖尿病人群,然而其BMD并非下降甚至是增加,这给临床带来很大困惑。既然BMD并不适于评估2型糖尿病患者的骨量丢失、预测骨折风险,那什么可以用于评估预测呢?近年来研究发现^[12-13]2型糖尿病患者血循环中骨形成标志物如PINP、OC、骨特异性碱性磷酸酶水平显著低于无糖尿病人群,骨吸收标志物CTX水平的下降也被陆续报道^[14]。这些研究结论有些是骨形成标志物下降,有些是骨吸收标志物下降,还有的是骨形成与骨吸收标志物都处于低水平,结论的不同可能与研究对象的地域种族差异相关。尽管尚无统一论,但推断这些标志物的改变可能是独立于BMD之外的导致2型糖尿病骨折风险增加的危险因素。2014年Jiajue等^[13]报道了中国人2型糖尿病与BMD、骨标志物、骨折的关系。研究发现2型糖尿病患者PINP和 β -CTX的水平显著低于对照组。虽然低骨转换预示着骨丢失速率减慢,却由于无法及时修复累积微损伤而使骨质量下降,骨骼脆性增加,骨折风险增大。本研究显示无论是否合并2型糖尿病,其BMD并未见显著性差异。糖尿病有无在多因素线性回归分析中作为自变量在变量筛选中被剔除掉,说明糖尿病不是影响BMD变异的因素,也从另一方面进一步印证了BMD不适宜评估2型糖尿病的骨折风险。而合并2型糖尿病患者其PINP、OC以及 β -CTX均显著低于无糖尿病组,这与上述研究结论是一致的。

综上所述,脊柱退行性疾病需手术治疗患者,其骨质疏松、骨量减少的发生率较高,且VD缺乏情况较普遍。这提示临床,在通过手术方式缓解患者病痛的同时,需关注其骨健康问题,联合QCT骨密度检查和骨代谢指标的检测,特别是PINP和25(OH)D的检测,对骨质疏松发生情况,骨转换的动态过程进行监测、评估,识别高风险人群。同时对合并2型糖尿病患者,进行骨标志物的检测,将有助于对糖代谢对骨代谢的影响以及糖尿病增加骨折风险的机制进行初步探讨。

参考文献

- [1] 徐宏光.脊柱退行性疾病的治疗.解剖与临床,2012,17(3):179-180.
- [2] Institute of Medicine of the National Academies. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011: 75-124.
- [3] 程晓光,李勉文,李娜,等.定量CT骨密度测量(QCT)在骨质疏松症诊治中的临床应用2007国际临床骨密度学会(ISCD)共识摘录.中国骨质疏松杂志,2012,18(11):969-974.

- [4] 臧渊,雷伟,吴子祥.脊柱退行性疾病对腰椎前后位骨密度的影响因素.中国骨质疏松杂志,2012,18(2):179-181.
- [5] Oberg J, Jorde R, Almås B, et al. Vitamin D deficiency and lifestyle risk factors in a Norwegian adolescent population. *Scand J Public Health*, 2014, 42(7):593-602.
- [6] 朱汉民,程群,甘洁民,等.上海地区人群维生素D状态研究.中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2010,3(3):157-163.
- [7] Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int*, 2011, 22(2):391-420.
- [8] Gielen E, O'Neill T, Pye S, et al. Bone turnover markers predict hip bone loss in elderly European men: results of the European Male Ageing Study (EMAS). *Osteoporos Int*, 2015, 26(2):617-627.
- [9] Seguro LP, Casella CB, Caparbo VF, et al. Lower P1NP serum levels: a predictive marker of bone loss after 1 year follow-up in premenopausal systemic lupus erythematosus patients. *Osteoporos Int*, 2015, 26(2):459-467.
- [10] 王琳,沈芸.骨质疏松性骨折预测方法的研究进展.中国骨质疏松杂志,2015,21(5):638-642.
- [11] Shu A, Yin MT, Stein E, et al. Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 2012, 23(2):635-641.
- [12] Rubin MR. Bone cells and bone turnover in diabetes mellitus. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(3):186-191.
- [13] Jiajue R, Jiang Y, Wang O, et al. Suppressed bone turnover was associated with increased osteoporotic fracture risks in non-obese postmenopausal Chinese women with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*, 2014, 25(8):1999-2005.
- [14] Reyes-García R, Rozas-Moreno P, López-Gallardo G, et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*, 2013, 50(1):47-52.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

2015年全国 Vitek 2 细菌药敏检测系统药敏试验结果准确性调查研究

孙宏莉¹ 胡继红² 罗燕萍³ 杨启文¹ 徐英春^{1*}

1 中国医学科学院北京协和医院检验科国家卫生计生委合理用药专家委员会全国细菌耐药监测网质量管理中心 北京 100730; 2 国家卫生计生委临床检验中心 北京 100730; 3 中国人民解放军总医院 301 医院微生物科 北京 100039

*通讯作者: xycpumch@139.com

[摘要] 目的: 调查全国细菌耐药监测网中使用 VITEK 2 药敏检测系统的医院微生物实验室药敏检测结果准确性情况。**方法:** 向参加本次调研的 425 家医院的微生物实验室同时发放二株编号分别为 Carss-14-QC001(产 ESBLs 的大肠杆菌)和 Carss-14-QC002(产 KPC 的肺炎克雷伯菌)的质控测试菌株,以微量肉汤稀释法作为参考方法,通过计算各实验室上报药敏结果基本一致性(EA)、分类一致性(CA)、非常重大误差(VME)、重大误差(ME)和小误差(mE)分析评估参评实验室药敏结果测定的准确性。**结果:** Carss-14-QC001 的药敏测试结果:氨苄西林/舒巴坦和头孢曲松的 EA(24.7%, 51.6%)和 CA(21.9%, 79.2%)较低,其它抗菌药物的 EA 和 CA 值均>90%;氨苄西林/舒巴坦的 mE 百分率(77.8%)最高,哌拉西林、左氧氟沙星和头孢曲松的 mE 百分率(7.1%、3.4%和 2.7%)较高,其余抗菌药物药敏结果 mE 百分率较低(0-1.1%);氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢曲松、头孢替坦和复方磺胺各出现一个 VME 结果;仅一个参评实验室(0.3%)的 ESBL 检测结果错误。Carss-14-QC002 药敏结果:头孢替坦的 EA(24.6%)和 CA(21.2%)最低,美罗培南和头孢吡肟的 EA(81%和 82.1%)和 CA(41%和 76.9%)较低,其它抗菌药物的 EA 和 CA 均>90%;头孢替坦、美罗培南和头孢吡肟的 mE 百分率较高,分别为 78.8%、21.1%和 16.1%;其余抗菌药物药敏结果 mE 百分率较低(0-2.0%);美罗培南 VME 百分率为 6.2%,其余抗菌药物 VME 百分率较低(0-1.2%)。抗菌药物对二株测试菌株药敏结果的 ME 均较低(0-0.7%)。**结论:** 全国 VITEK 2 细菌药敏检测系统中氨苄西林/舒巴坦、头孢曲松、头孢替坦、美罗培南和头孢吡肟的药敏检测结果一致性和准确性较低,其它抗菌药物的药敏结果均具有很好的一致性和较高的准确性。

[关键词] Vitek 2; 药敏试验; 抗菌药物; 质量控制

Study on accuracies of the Vitek 2 automated susceptibility test systems in China 2015/SUN Hong-li, HU Ji-hong, LUO Yang-ping, YANG Qi-wen, XU Ying-chun

(Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College Hospital, Department of Clinical Medicine, Beijing 100730, China)

[Abstract] OBJECTIVE: To evaluate the accuracies of the Vitek 2 automated susceptibility test systems used in China Antimicrobial Resistance Surveillance System hospitals. **METHODS:** Two isolates named Carss-14-QC001 (ESBL-producing *E.coli*) and Carss-14-QC002 (KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*) were sent to 425 hospitals in China at the same time. The essential agreement (EA), categorical agreement (CA), very major error (VME), major error (ME) and minor error(mE)were calculated to evaluate the accuracies of the antimicrobial susceptibility test results reported from every hospitals. **RESULTS:** In total, 23 antimicrobial agents were examined. The antimicrobial susceptibility test results of the isolate Carss-14-QC001: There were low EA (24.7%, 51.6%)and CA (21.9%, 79.2%)observed in ampicillin/sulbactam and ceftriaxone. The EA and CA were above 90% observed in the other antibiotics. Ampicillin/sulbactam showed the highest mE(77.8%)than the other antibiotics. Piperacillin, levofloxacin and ceftriaxone were observed high mE(7.1%,3.4% and 2.7%). The other antibiotics showed low mE(0-1.1%). There was 5 VME observed in the 23 antibiotics (1 each for ampicillin, ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, cefotetan and trimethoprim/sulfamethoxazole). There was only one(0.3%)error ESBL result. The antimicrobial susceptibility test results of the isolate Carss-14-QC002: There were lower EA (24.6%)and CA (21.2%)observed in cefotetan than the other antibiotics. Meropenem and cefepime showed low EA(81% and 82.1%)and CA(41% and 76.9%)too. The EA and CA were above 90% observed in the other antibiotics. cefotetan, meropenem and cefepime were observed high mE(78.8%, 21.1% and 16.1%). The other antibiotics showed low mE(0-2.0%).There was 5 VME observed in the all antibiotics (1 each for ampicillin, ampicillin/sulbactam,ceftriaxone, cefotetan and trimethoprim/sulfamethoxazole). The VME of meropenem is 6.2%. The VME of the other antibiotics is from 0 to 1.2%. The ME is from 0 to 0.7% in the 23 antibiotics to the isolates Carss-14-QC001 and Carss-14-QC002. **CONCLUSIONS:** Low agreements and accuracies antimicrobial susceptibility test results were noted in ampicillin/sulbactam, ceftriaxone, cefotetan, meropenem and cefepime tested by the Vitek 2 performance. The other antibiotics showed good agreements and accuracies.

[Key words] Vitek 2; Antimicrobial susceptibility test; Antibacterial agents; Quality control

近些年,我国开展了多项针对临床常用抗菌药物耐药性的全国范围监测研究^[1-3]。2012年,原卫生部印发了《关于加强抗菌药物临床应用和细菌耐药监测工作的通知》(卫办医政发[2012]72号),全面加强了全国细菌耐药监测网管理工作,监测网成员单位已达1427所,其质量控制问题已成为监测工作十分重要的一个组成部分。由于各单位上报的监测数据绝大部分来源于各医院微生物实验室的常规药敏数据,其药敏方法、所使用的商品化药敏检测系统或药敏纸片各异,从而影响了上报监测网药敏数据的准确性和可比性。本项目由全国细菌耐药监测网质量管理中心从全国细菌耐药监测网成员单位中抽取以VITEK 2药敏检测系统作为常规药敏试验方法的425家医院,调研其药敏检测结果准确性情况,比较分析各参加单位药敏检测结果,以帮助各实验室提高药敏试验检测结果的准确性,为临床用药提供准确的实验室药敏结果,提高上报监测网药敏数据的准确性和可比性。

1 材料与方法

1.1 测试菌株的制备和发放

由中心实验室(北京协和医院检验科)选取2株革兰阴性杆菌质控测试菌株(CARSS-14-QC001, CARSS-14-QC002),和另外两家中心实验室(国家卫生计生委临床检验中心、中国人民解放军总医院301医院微生物科)同时对质控测试菌株和ATCC质控菌株ATCC25922、ATCC27853、ATCC35218和ATCC700603进行微量肉汤稀释法^[4]、Etest法和中国常用VITEK 2药敏卡板型进行药敏测试,测试菌株和质控菌株的菌种类型和耐药基因见表1。若质控菌株药敏测试值在M100-S25 CLSI^[5]规定的质控范围内,则认为测试株药敏结果准确。将该2株测试菌株分别复制和制备冻干菌株425份,同时分别发放给425家参评实验室。

表 1 测试菌株和质控菌株的菌种类型和耐药基因

菌株编号	菌种	耐药机制		
		ESBL 耐药基因	CRE 耐药基因	
质控菌株	ATCC 25922	大肠埃希菌	阴性	阴性
	ATCC 27853	铜绿假单胞菌	阴性	阴性
	ATCC 35218	大肠埃希菌	产广谱 β 内酰胺酶	阴性
	ATCC 700603	肺炎克雷伯菌	阳性	阴性
测试菌株	Carss-14-QC001	大肠埃希菌	CTX-M-14	阴性
	Carss-14-QC002	肺炎克雷伯菌	SHV-11	KPC-2 和 OmpK35 缺失

1.2 参评实验室测试菌株及

ATCC 质控菌株的药敏测试 各参评实验室选择其常规使用的 VITEK 2 药敏卡板型对上述测试菌株及 ATCC 质控菌株进行药敏测试; 并将检测结果通过“全国细菌耐药监测信息系统”于规定时间内上报。

1.3 统计分析

由中心实验室(北京协和医院检验科)对上报结果汇总分析, 以微量肉汤稀释法为参考方法, 通过计算下列参数, 评估参评医院的 VITEK 2 药敏检测系统药敏结果测定准确率[6]: 基本一致性(essential agreement, EA 指被评估仪器检测 MIC 值与参考方法相差不超过 1 个稀释倍数); 分类一致性(categorical agreement, CA 指被评估方法与参考方法药敏结果判断为耐药、中介和敏感一致); 非常重大误差(very major error, VME 指将耐药误判为敏感, 即不能检测出耐药); 重大误差(major error, ME 指将敏感误判为耐药, 即假耐药); 小误差(minor error, mE 指将中介报告为敏感或耐药, 将敏感或耐药报告为中介)。按照美国 FDA 标准, CA \geq 90%、EA \geq 90%、VME \leq 1.5%、ME \leq 3%为可接受范围。

2 结果

2.1 中心实验室药敏结果

以微量肉汤稀释法、Etest 法和 VITEK 2 药敏卡 GN13、GN09、GN16 和 GN67 测试质控菌株 ATCC25922、ATCC27853、ATCC35218 和 ATCC700603 药敏, 检测结果全部在 M100-S25 CLSI 规定的质控范围内。三家中心实验室对二株测试菌株的测试方法及药敏结果见表 2 和表 3, 不同药敏方法和不同中心实验室的测试结果基本一致。

表 2 中心实验室测试菌株 Carss-14-QC001 的 MIC 测试结果(μ g/ml)

抗菌药物	肉汤稀释法 (协和)	Etest (协和/临检中心)	VITEK 2 药敏卡			
			GN13 (协和/301 医院)	GN09 (协和/临检中心)	GN16 (协和)	GN67 (协和)
氨苄西林	>256	>256/256	\geq 32	\geq 32	\geq 32	\geq 32
哌拉西林	>256	>256	无	\geq 128	无	无
阿莫西林/克拉维酸	8/4	(12/6)/无	无	无	4/2	无
氨苄西林/舒巴坦	16/8	16/8	(\geq 32/16)/(16/8)	\geq 32/16	无	\geq 32/16
哌拉西林/他唑巴坦	2/4	(1.5/4)/(1/4)	\leq 4/4	\leq 4/4	\leq 4/4	\leq 4/4
头孢呋辛	>256	>256/64	无	\geq 64	无	无
头孢唑啉	>256	>256/无	\geq 64	\geq 64	\geq 64	\geq 64
头孢他啶	1	0.5/1	\leq 1	\leq 1	无	\leq 1
头孢曲松	>256	>256/32	\geq 64/16	32/ \geq 64	\geq 64	\geq 64
头孢吡肟	2	3/8	2	2	2	2
氨曲南	2	2	2/ \leq 1	\leq 1	\leq 1	无
头孢替坦	0.25	0.25/无	\leq 4	\leq 4	无	无
头孢西丁	4	4/无	无	无	\leq 4	无

厄它培南	0.03	0.023/无	<=0.5	无	<=0.5	<=0.5
亚胺培南	0.25	0.19/0.25	<=1	<=1	<=1	<=0.25
美洛培南	0.125	0.047/0.125	无	<=0.25	无	无
庆大霉素	1	1	<=1	<=1	<=1	<=1
阿米卡星	4	4/2	<=2	<=2	<=2	<=2
妥布霉素	1	1/1	<=1	<=1	<=1	<=1
左旋氧氟沙星	8	8	>=8	>=8	>=8	>=8
环丙沙星	8	8	>=4	>=4	>=4	>=4
复方新诺明	>256	>256/32	>=320	>=320	>=320	>=320
呋喃妥因	16	16	<=16	<=16	<=16	<=16
ESBL 确认	+	+	+	无	+	+

表3 中心实验室测试菌株 Carss-14-QC002 的 MIC 测试结果($\mu\text{g/ml}$)

抗菌药物	肉汤稀释法 (协和)	VITEK 2 药敏卡				
		Etest (协和/临检中心)	GN13 (协和/301 医院)	GN09 (协和/临检中心)	GN16 (协和)	GN67 (协和)
氨苄西林	>256	>256/256	>=32	>=32	>=32	>=32
哌拉西林	>256	>256/256	无	>=128	无	无
阿莫西林/克拉维酸	>256/128	(>256/128)/无	无	无	>=32/16	无
氨苄西林/舒巴坦	>256/128	(>256/128)/(256/128)	>=32/16	>=32/16	无	>=32/16
哌拉西林/他唑巴坦	>256/4	(>256/4)/(256/4)	>=128/4	>=128/4	>=128/4	>=128/4
头孢呋辛	>256	>256/64	无	>=64	无	无
头孢唑啉	>256	>256/无	>=64	>=64	>=64	>=64
头孢他啶	16	24/32	16	16	无	16
头孢曲松	>256	>256/32	>=64	>=64	>=64	>=64
头孢吡肟	8	12/256	8	8/>=64	8	8
氨基南	>256	>256/256	>=64	>=64	>=64	无
头孢替坦	32	32/无	16/32	16	无	无
头孢西丁	32	24/无	无	无	32	无
厄它培南	32	>32/无	>=8	无	>=8	>=8
亚胺培南	16	>32/32	>=16	>=16	>=16	>=16
美洛培南	8	8/4	无	8/4	无	无
庆大霉素	>256	>256/256	>=16	>=16	>=16	>=16
阿米卡星	>256	>256/256	>=64	>=64	>=64	>=64
妥布霉素	>256	>256/256	>=16	>=16	>=16	>=16
左旋氧氟沙星	16	12/8	>=8	>=8	>=8	>=8
环丙沙星	16	32/16	>=4	>=4	>=4	>=4
复方新诺明	>256	>32/32	>=320	>=320	>=320	>=320
呋喃妥因	>256	>=512/512	>=512	>=512	>=512	>=512
ESBL 确认	+	+/无	+	无	+	+

2.2 参评实验室及其 VITEK 2 仪器使用情况统计

网上报名参加单位共 425 家实验室, 最终上报药敏结果共 30 个省的 394 个实验室。未上报结果主要原因为未在规定时间内及时上报(上报系统关闭)。

参评医院使用的 VITEK 2 仪器软件版本包括 4.01、5.01、5.04、6.01、和 7.01; 专家系统所使用的 CLSI 折点包括 2008 年-2015 年共 8 个版本, 其中以 2014 年、2013 年和 2012 年版本使用较多, 分别占 33.4%、31.4%和 25.1%, 2015 年版本仅占 0.5%。

参评医院使用的 VITEK 革兰阴性菌药敏板卡类型包括 GN13、GN09、GN16、GN14、GN04 和 GN67, 其中 GN13、GN09 和 GN16 使用较多, 分别占 47.5%、30.1% 和 12.2%, 上述药敏板卡所含抗菌药物种类不尽相同, 共包括 23 种抗菌药物: 其中包括近 8 年 CLSI 折点无变化的抗菌药物氨苄西林、哌拉西林、阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢呋辛、头孢替坦、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、左氧氟沙星、环丙沙星、复方新诺明和呋喃妥因; 近 8 年 CLSI 折点变化的抗菌药物头孢唑啉、头孢曲松、头孢他啶、氨基曲南、头孢吡肟、头孢西丁、厄它培南、亚胺培南和美罗培南。

2.3 参评实验室质控菌株

ATCC25922 和 ATCC27853 药敏结果 参评实验室中有 15.2%(60/394)的实验室两种质控菌株均未报告药敏结果, 19.0%(75/394)的实验室仅报一种质控菌株药敏结果。共 14 个省 25 家医院出现 ATCC 质控菌株药敏结果失控情况, 占参评医院总数的 6.3%(25/394), 其中出现失控结果医院比率较高的省份为陕西、贵州和福建; 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、头孢呋辛、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、氨基曲南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、呋喃妥因、环丙沙星和妥布霉素出现失控结果, 占所测抗菌药物的 56.5%(13/23), 失控百分率为 0.2%-1.5%。

2.4 参评实验室 Carss-14-QC001 药敏结果

以 M100 -S25(2015 年 CLSI 文件)折点为判断标准, 参评实验室 Carss-14-QC001 药敏结果(见表 4)与中心实验室肉汤稀释法药敏结果相比较: 检测结果分类完全一致(CA=100%)的抗生素包括 β -内酰胺类抗生素中的头孢唑啉、头孢呋辛、厄它培南、亚胺培南、美洛培南、阿莫西林/克拉维酸和哌拉西林/他唑巴坦, 氨基糖苷类抗生素阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素, 环丙沙星和呋喃妥因; 结果分类基本一致(CA \geq 90%)的抗生素包括 β -内酰胺类抗生素中的氨苄西林、哌拉西林、头孢他啶、头孢曲松、头孢吡肟、头孢替坦和氨基曲南, 左旋氧氟沙星和复方新诺明; 99.7%的参评实验室 ESBL 结果上报阳性; 只有氨苄西林/舒巴坦检测结果差别较大(CA=77.8%)。

表 4 参评实验室菌株 Carss-14-QC001 药敏结果的耐药率、中介率和敏感率

抗菌药物	药敏结果个数	R(%)	I(%)	S(%)
氨苄西林	442	99.8	0	0.2
哌拉西林	28	92.9	7.1	0
阿莫西林/克拉维酸	28	0	0	100
氨苄西林/舒巴坦	360	77.8	21.9	0.3
哌拉西林/他唑巴坦	414	0	0	100
头孢唑啉	442	100	0	0
头孢呋辛	143	100	0	0
头孢他啶	388	0.5	0.3	99.2
头孢曲松	442	99.8	0.2	0
头孢吡肟	442	0.7	1.8	97.5
头孢替坦	353	0.3	0	99.7
氨基曲南	435	0.5	0	99.5
厄它培南	299	0	0	100
亚胺培南	442	0	0	100
美洛培南	161	0	0	100
阿米卡星	442	0	0	100
庆大霉素	442	0	0	100
妥布霉素	414	0	0	100
环丙沙星	442	100	0	0
左旋氧氟沙星	442	92.8	7.2	0
复方新诺明	442	99.8	0	0.2
呋喃妥因	442	0	0	100
ESBL	299	99.7(+)		0.3(-)

注: 药敏结果判读标准根据 M100-S25 CLSI。

参评实验室测试菌株 Carss-14-QC001 的药敏结果误差分析见表 5 和表 6: 在折点无变化抗菌药物中, 氨苄西林/舒巴坦的 mE 百分率较高(77.8%), 出现 mE 结果的医院氨苄西林/舒巴坦药敏结果均为 MIC \geq 32 μ g/ml, 哌拉西林和左氧氟沙星的 mE 百分率分别为 7.1% 和 7.2%, 其余抗菌药物药敏结果无 mE。在折点变化的抗菌药物中, 使用 2009 年

CLSI^[7]折点的实验室头孢曲松药敏结果的EA和CA较低(58.6%),mE百分率(37.9%)较高,出现一个VME结果(3.4%);而使用更新后折点(2010-2015年CLSI)的实验室头孢曲松药敏结果的EA和CA分别为44.6%和99.8%,mE百分率仅为0.2%。其余抗菌药物的EA和CA均>90%,VEM、ME和mE百分率均≤0.3%。仅一个参评实验室(0.3%)的ESBL检测结果错误。

表5 CLSI折点无变化抗生素 Vitek 2 药敏结果准确性分析(Carss-14-QC001)

抗菌药物	药敏结果个数	EA(%)	CA(%)	菌株数(%)		
				VME	ME	mE
氨苄西林	442	99.8	99.8	1(0.2)	0(0)	0(0)
哌拉西林	28	92.9	92.3	0(0)	0(0)	2(7.1)
阿莫西林/克拉维酸	28	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
氨苄西林/舒巴坦	360	24.7	21.9	1(2.8)	0(0)	280(77.8)
哌拉西林/他唑巴坦	414	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
头孢呋辛	143	97.2	100	0(0)	0(0)	0(0)
头孢替坦	353	96.3	99.7	1(0.3)	0(0)	0(0)
庆大霉素	442	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
阿米卡星	442	99.5	100	0(0)	0(0)	0(0)
妥布霉素	414	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
左旋氧氟沙星	442	92.8	92.8	0(0)	0(0)	15(3.4)
环丙沙星	442	96.6	100	0(0)	0(0)	0(0)
复方新诺明	442	99.5	99.8	1(0.2)	0(0)	0(0)
呋喃妥因	442	99.5	100	0(0)	0(0)	0(0)
ESBL	299		99.7	1(0.3)		

注: EA, 基本一致性.CA, 分类一致性.VME, 非常重大误差. ME, 重大误差. mE, 小误差。

表6 CLSI折点变化抗菌药物药敏结果准确性分析(Carss-14-QC001)

抗菌药物	CLSI版本	折点				药敏结果个数	EA(%)	CA(%)	菌株数(%)		
		S	SDD	I	R				VME	ME	mE
头孢唑啉	2008-2009	≤8		16	≥32	29	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010	≤1		2	≥4	2	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2011-2015	≤2		4	≥8	411	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						100	100	0(0)	0(0)	0(0)	
头孢曲松	2008-2009	≤8		16-32	≥64	29	58.6	58.6	1(3.4)	0(0)	11(37.9)
	2010-2015	≤1		2	≥4	413	44.6	99.8	0(0)	0(0)	1(0.2)
	小计						51.6	79.2	1(0.2)	0(0)	12(2.7)
头孢他啶	2008-2009	≤8		16	≥32	25	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2015	≤4		8	≥16	363	99.2	99.2	0(0)	2(0.5)	1(0.3)
	小计						99.6	99.6	0(0)	2(0.5)	1(0.3)
氨曲南	2008-2009	≤8		16	≥32	29	96.6	96.6	0(0)	1(3.4)	0(0)
	2010-2015	≤4		8	≥16	406	99.8	99.8	0(0)	1(0.2)	0(0)
	小计						98.2	98.2	0(0)	2(0.5)	0(0)
头孢吡肟	2008-2013	≤8		16	≥32	289	99.3	99.7	0(0)	1(0.3)	2(0.7)
	2014-2015	≤2	4-8		≥16	153	98.7	96.7	0(0)	2(1.3)	3(2.0)
	小计						99.0	98.2	0(0)	3(0.7)	5(1.1)

厄它培南	2008-2009	≤2	4	≥8	6	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2011	≤0.25	0.5	≥1	4	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2012-2015	≤0.5	1	≥2	289	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						100	100	0(0)	0(0)	0(0)
亚胺培南	2008-2009	≤4	8	≥16	30	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2015	≤1	2	≥4	412	96.4	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						98.2	100	0(0)	0(0)	0(0)
美洛培南	2008-2009	≤4	8	≥16	24	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2015	≤1	2	≥4	137	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						100	100	0(0)	0(0)	0(0)

注：SDD, 剂量依赖性敏感.EA, 基本一致性.CA, 分类一致性.VME, 非常重大误差. ME, 重大误差. mE, 小误差。

与肉汤稀释法结果相比较, 参评实验室测试株 Carss-14-QC001 出现错误结果(肉汤稀释法结果为敏感/耐药, VITEK 2 药敏卡检测结果为耐药/敏感)的医院数占全部参评医院的 16.0%(63/394), 其中出现错误结果医院比率较多的省份为广西, 其次为吉林、新疆和广东。

2.5 参评实验室测试菌株 Carss-14-QC002 药敏结果

以 M100 -S25(2015 年 CLSI 文件)折点为判断标准, 参评实验室 Carss-14-QC002 药敏结果(见表 7)与中心实验室肉汤稀释法药敏结果相比较: 检测结果分类完全一致(CA=100%)的抗生素包括 β-内酰胺类抗生素中的氨苄西林、哌拉西林、头孢唑啉、头孢呋辛、头孢他啶、头孢曲松、氨曲南、阿莫西林/克拉维酸和氨苄西林/舒巴坦, 呋喃妥因; 结果分类基本一致(CA≥90%)的抗生素包括 β-内酰胺类抗生素中的厄它培南、亚胺培南和哌拉西林/他唑巴坦, 氨基糖苷类抗生素阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素, 喹诺酮类抗生素环丙沙星和左旋氧氟沙星及复方新诺明; ESBL 检测结果差别较大, 23.7%的参评实验室上报阳性(与肉汤稀释法结果相同); 各实验室间头孢吡肟和头孢替坦检测结果差别较大, 头孢吡肟结果为 12.9%耐药(与肉汤稀释法结果相同)、76.9%中介及 10.2%敏感, 头孢替坦结果为 3.1%耐药(与肉汤稀释法结果相同)、21.2%中介及 75.7%敏感。

表 7 参评实验室菌株 Carss-14-QC002 药敏结果的耐药率、中介率和敏感率

抗菌药物	药敏结果个数	R(%)	I(%)	S(%)
氨苄西林	442	100	0	0
哌拉西林	28	100	0	0
阿莫西林/克拉维酸	28	100	0	0
氨苄西林/舒巴坦	360	100	0	0
哌拉西林/他唑巴坦	414	99.2	0.8	0
头孢唑啉	442	100	0	0
头孢呋辛	143	100	0	0
头孢他啶	388	100	0	0
头孢曲松	442	100	0	0
头孢吡肟	442	12.9	76.9	10.2
头孢替坦	353	3.1	21.2	75.7
氨曲南	435	100	0	0
厄它培南	299	99.7	0	0.3
亚胺培南	442	98.3	1.7	0
美洛培南	161	83.9	9.9	6.2
阿米卡星	442	98.9	0	1.1
庆大霉素	442	98.9	0	1.1
妥布霉素	414	98.8	0	1.2
环丙沙星	442	99.8	0.2	0
左旋氧氟沙星	442	99.5	0.5	0
复方新诺明	442	99.3	0	0.7
呋喃妥因	442	100	0	0

注：药敏结果判读标准根据 M100-S25 CLSI。

参评实验室测试菌株 Carss-14-QC002 的药敏结果误差分析见表 8 和表 9: 在折点无变化抗菌药物中, 除头孢替

坦(EA=24.6%, CA=21.2%)的EA和CA值较低、mE百分率(78.8%)较高外,其它抗菌药物均有较高的EA和CA(>90%)、较低的VME、ME和mE百分率(≤1.2%)。在折点变化的抗菌药物中,头孢吡肟的EA(82.1%)和CA(76.9%)较低,使用2011年-2015年CLSI折点的实验室亚胺培南药敏结果EA为89.3%、美罗培南药敏结果EA和CA均为81%,其它抗菌药物的EA和CA均>90%。使用2011年-2015年^[8]CLSI折点的实验室美罗培南VME百分率为7.3%,而使用2008年-2010^[9]年CLSI折点的实验室美罗培南无VME;头孢吡肟和美罗培南的mE百分率(16.1%和21.1%)较高,亚胺培南和头孢他啶的mE百分率分别为2.0%和0.3%,其余抗生素药敏结果无mE。

与肉汤稀释法结果相比较,参评实验室测试株Carss-14-QC002出现错误结果(肉汤稀释法结果为敏感/耐药,而VITEK 2药敏卡检测结果为耐药/敏感)的医院数占全部参评医院的3.8%(15/394),其中出现错误结果医院比率较多的省份为广西,其次为安徽、内蒙和云南。

表8 CLSI折点无变化抗生素药敏结果准确性分析(Carss-14-QC002)

抗菌药物	药敏结果个数	EA(%)	CA(%)	菌株数(%)		
				VME	ME	mE
氨苄西林	442	96.6	100	0(0)	0(0)	0(0)
哌拉西林	28	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
阿莫西林/克拉维酸	28	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
氨苄西林/舒巴坦	360	96.7	100	0(0)	0(0)	0(0)
哌拉西林/他唑巴坦	414	99.2	100	0(0)	0(0)	0(0)
头孢呋辛	143	97.2	100	0(0)	0(0)	0(0)
头孢替坦	353	24.6	21.2	0(0)	0(0)	278(78.8)
庆大霉素	442	92.5	98.9	5(1.1)	0(0)	0(0)
阿米卡星	442	95.4	98.9	5(1.1)	0(0)	0(0)
妥布霉素	414	95.2	98.8	5(1.2)	0(0)	0(0)
左旋氧氟沙星	442	99.5	99.5	0(0)	0(0)	2(0.4)
环丙沙星	442	96.2	99.8	0(0)	0(0)	1(0.2)
复方新诺明	442	98.6	100	0(0)	0(0)	0(0)
呋喃妥因	442	100	100	0(0)	0(0)	0(0)

注: EA, 基本一致性. CA, 分类一致性. VME, 非常重大误差. ME, 重大误差. mE, 小误差。

表9 CLSI折点变化抗菌药物药敏结果准确性分析(Carss-14-QC002)

抗菌药物	CLSI版本	折点				药敏结果个数	EA(%)	CA(%)	菌株数(%)		
		S	SDD	I	R				VME	ME	mE
头孢唑啉	2008-2009	≤8		16	≥32	29	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010	≤1		2	≥4	2	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2011-2015	≤2		4	≥8	411	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						100	100	0(0)	0(0)	0(0)	
头孢曲松	2008-2009	≤8		16-32	≥64	29	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2015	≤1		2	≥4	413	96.1	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						98.1	100	0(0)	0(0)	0(0)	
头孢	2008-2009	≤8		16	≥32	25	96	96	0(0)	0(0)	1(4.0)

他啶										
	2010-2015	≤4	8	≥16	363	97.2	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						96.6	96	0(0)	0(0)	1(0.3)
氨曲南										
	2008-2009	≤8	16	≥32	29	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2010-2015	≤4	8	≥16	406	96.1	100	0(0)	0(0)	0(0)
小计						98.1	100	0(0)	0(0)	0(0)
头孢吡肟										
	2008-2013	≤8	16	≥32	289	82.0	86.9	0(0)	21(7.3)	38(13.1)
	2014-2015	≤2	4-8	≥16	153	81.7	78.4	0(0)	0(0)	33(21.6)
小计						82.1	76.9	0(0)	0(0)	71(16.1)
厄它培南										
	2008-2010	≤2	4	≥8	6	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2011	≤0.25	0.5	≥1	4	100	100	0(0)	0(0)	0(0)
	2012-2015	≤0.5	1	≥2	289	93.1	99.7	1(0.3)	0(0)	0(0)
小计						97.7	99.9	1(0.3)	0(0)	0(0)
亚胺培南										
	2008-2010	≤4	8	≥16	30	100	93.3	0(0)	0(0)	2(6.7)
	2011-2015	≤1	2	≥4	412	89.3	98.3	0(0)	0(0)	7(1.7)
小计						94.7	95.8	0(0)	0(0)	9(2.0)
美洛培南										
	2008-2010	≤4	8	≥16	24	100	25	0(0)	0(0)	18(75)
	2011-2015	≤1	2	≥4	137	81	81	10(7.3)	0(0)	16(11.7)
小计						90.5	41	10(6.2)	0(0)	34(21.1)

注: SDD, 剂量依赖性敏感.EA, 基本一致性.CA, 分类一致性.VME, 非常重大误差. ME, 重大误差. mE, 小误差。

3 讨论

本次研究共 30 个省市的 394 家二级及三级医院的实验室参评, 约占全国细菌耐药监测网医院总数的 27.6%(394/1427), 占 VITEK 2 药敏检测系统使用用户的 91.2%(394/432), 调查结果有一定的代表性, 能够在一定程度上反映我国 VITEK 2 药敏检测系统使用用户对阴性杆菌药敏测试准确性情况。

本次调研院所使用的不同类型和批号的革兰阴性菌 VITEK 2 药敏板卡的药敏质控结果无统计学差异, 但实验室更换板卡类型或批号时, 也应按不同板卡说明书要求, 进行 ATCC 质控菌株药敏测试, 质控合格后方可进一步完成临床菌株的药敏试验和报告。质控菌株 ATCC25922 和 ATCC27853 是微生物实验室必备的药敏质控株, 用以监测临床菌株药敏结果的准确性。但本次调研结果显示, 34.3%的参评实验室没有或仅有一株 ATCC 质控菌株药敏结果, 上述实验室将无法完成药敏试验的室内质控, 进而无法判断和保证临床测试菌株药敏结果的准确性。

由于 VITEK 2 革兰阴性菌药敏板卡的不同板型所涵盖抗菌药物种类有差异, 本次上报数据中某些抗菌药物的测试数量参差不齐; 但不同的药敏卡板型的同一种抗菌药物的质控菌株和测试菌株药敏结果无统计学差异。本次调研参评医院 VITEK 2 专家系统所使用的 CLSI 折点包括 2008-2015 年共 8 个版本, 其中以 2014、2013 和 2012 年版本使

用较多,共占 89.9%;2015 年版本仅占 0.5%。除头孢吡肟、亚胺培南和美罗培南外,其它抗菌药物根据新及旧 CLSI 折点的药敏结果无统计学差异。头孢曲松 2009 年药敏折点为 $MIC \leq 8\mu\text{g/ml}$ 敏感、 $MIC = 16-32\mu\text{g/ml}$ 中介及 $MIC \geq 64\mu\text{g/ml}$ 耐药,2010-2015 年药敏折点为 $MIC \leq 1\mu\text{g/ml}$ 敏感、 $MIC = 2\mu\text{g/ml}$ 中介及 $MIC \geq 4\mu\text{g/ml}$ 耐药。在 Carss-14-QC001 药敏结果中,中心实验室头孢曲松肉汤稀释法药敏结果为耐药($MIC > 256\mu\text{g/ml}$),使用 2009 年 CLSI 折点出现 mE 结果的医院头孢曲松药敏结果为敏感或中介($8-32\mu\text{g/ml}$),若使用 2010-2015 年 CLSI 标准判断上述 mE 药敏结果,则均为耐药,即无 mE 结果出现,即头孢曲松药敏结果以新折点判断的结果错误率低于旧折点。在 Carss-14-QC002 药敏结果中,头孢吡肟药敏结果也存在和上述头孢曲松类似现象,即以新折点判断的结果错误率低于旧折点。新版 CLSI 的相关更新是建立在大量临床和实验室数据基础上修订的,所以建议用户跟进国际标准,应用最新版的 CLSI 折点判断标准。

另外,由于某些抗菌药物存在接种效应,接种菌液浓度是否准确将直接影响药敏结果的准确性。有文献报道,头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟和头孢替坦对产 ESBLs 的大肠杆菌和肺炎克雷伯菌存在接种效应,哌拉西林/他唑巴坦对部分基因型 ESBLs 菌株存在接种效应^[10, 11, 12, 13, 14]。在本次调研结果中,中心实验室氨苄西林/舒巴坦肉汤稀释法药敏结果为中介($MIC = 16\mu\text{g/ml}$),出现 mE 结果的医院氨苄西林/舒巴坦药敏结果均耐药($MIC \geq 32\mu\text{g/ml}$),而氨苄西林/舒巴坦的药敏折点为 $MIC \leq 8/4\mu\text{g/ml}$ 敏感、 $MIC = 16/8\mu\text{g/ml}$ 中介及 $MIC \geq 32/16\mu\text{g/ml}$ 耐药,因此高于中介值一个稀释浓度即为 mE 结果;2.9%(234/442)的实验室头孢曲松药敏结果为 $8-32\mu\text{g/ml}$,和中心实验室的参考方法药敏结果相差 3-5 个稀释倍数;中心实验室头孢替坦肉汤稀释法药敏结果为中介($MIC = 32\mu\text{g/ml}$),在参评医院上报结果中,75.6%(267/353)的实验室头孢替坦药敏结果为敏感($MIC = 4-16\mu\text{g/ml}$),3.1%(11/353)的实验室药敏结果为耐药($MIC \geq 64\mu\text{g/ml}$),和中心实验室的参考方法药敏结果相差 1-3 个稀释倍数;头孢吡肟也存在同样上述现象;上述不准确的结果可能与药敏试验操作时菌液浓度不准确而导致接种效应有关。

另外,实验室工作人员在发出药敏报告前,应严格审核药敏结果,对罕见或矛盾耐药表型应进一步确证。例如,在本次调研结果中,美罗培南为 VME 结果(敏感)的实验室所测亚胺培南和厄他培南药敏结果均为耐药,即所测碳青霉烯类抗菌药物的药敏结果分类不一致,出现矛盾的错误结果,实验室操作人员应该分析并复查上述药敏结果,否则应向临床医生发出错误的药敏报告,误导临床用药。

由于本研究是国内首次大规模的药敏试验结果准确性调查,是相关研究的初探,所以存在一定的局限性:菌种类型仅选取阴性杆菌中的大肠杆菌和肺炎克雷伯菌,不包括其它临床常见革兰阴性菌和革兰阳性菌;耐药表型仅选取产 ESBL 和 CRE 的耐药菌株,不包括其它常见耐药表型菌株和敏感株;药敏检测系统仅评估 VITEK 2 药敏检测系统,不包括其它常用商品化药敏检测系统和抗生素药敏纸片法。

总之,微生物实验室人员在日常工作中应按规定进行 ATCC 质控菌株的药敏测试、确保标准接种菌液浓度及无菌操作、提高对药敏结果的综合分析能力,严格审核药敏结果,保证临床药敏报告和上报耐药监测系统结果的准确性。在以后的调查研究中应进一步扩大菌种类型和药敏表型菌株种类的测试,并对我国常用的其它药敏检测系统和方法进行评估,全面提高我国微生物实验室药敏检测结果的准确性。

参考文献

- [1] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2015;15(5):401-410.
- [2] Wang H, Chen M, Ni Y, et al. Antimicrobial resistance among clinical isolates from the Chinese Meropenem Surveillance Study (CMSS), 2003-2008[J]. Int J Antimicrob Agents, 2010; 35(3):227-234.
- [3] Zhao C, Sun H, Wang H, et al. Antimicrobial resistance trends among 5608 clinical Gram-positive isolates in China: results from the Gram-Positive Cocci Resistance Surveillance program (2005-2010) [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012; 73(2):174-181.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically document M07-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth

- Informational Supplement.M100 -S25.Wayne,PA: CLSI,2015.
- [6]Clinical and Laboratory Standards Institute. Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document M23–A3.Wayne,PA: CLSI,2009.
- [7]Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement.M100 –S19.Wayne,PA: CLSI,2009.
- [8]Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.M100 -S23.Wayne,PA: CLSI,2013.
- [9]Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement (June 2010 Update).M100 -S20-U.Wayne,PA: CLSI,2010.
- [10]吴娜,褚云卓,陈佰义,等. 抗菌药物对产超广谱 β 内酰胺酶大肠杆菌和肺炎克雷伯菌接种效应的研究[J].中国感染与化疗杂志,2011;11(1)31-35.
- [11]Na Wu¹,Bai Yi Chen¹,Su Fei Tian,et al. The inoculum effect of antibiotics against CTX-M-extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,2014; 13:45.
- [12]Kenneths,Thomson,Ellen Smith Moland. Cefepime,Piperacillin-Tazobactam,and the Inoculum Effect in Tests with Extended-Spectrum β - Lactamase-Producing Enterobacteriaceae[J]. Antimicrob Agents Chemother,2001; 45(12): 3548-3554.
- [13]Amos Adler,Ma'ayan Ben-Dalak,Ina Chmelnitsky,et al. Effect of Resistance Mechanisms on the Inoculum Effect of Carbapenem in Klebsiella pneumoniae Isolates with Borderline Carbapenem Resistance[J]. Antimicrob Agents Chemother,2015; 59(8):5014-5017.
- [14] Goldstein EJ,Citron DM,Cherubin CE. Comparison of the inoculum effects of members of the family Enterobacteriaceae on cefoxitin and other cephalosporins,beta-lactamase inhibitor combinations,and the penicillin-derived components of these combinations[J]. Antimicrob Agents Chemother,1991; 35(3): 560-566.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于刚果红与短肽结合的 P-选择素定量检测

王云云¹ 刘野² 丛玉隆^{1*} 蒋兴宇^{2*}

1.解放军总医院南楼检验科 北京 100853 2.国家纳米科学中心 北京 100190

*通讯作者: yulongc@263.net; xingyujiang@nanoctr.cn

[摘要] 传统的酶联免疫吸附试验分析技术已经广泛应用于疾病的诊断,但由于受方法学及技术条件的局限,在实际操作中仍不可避免的会出现一定的非特异性,从而无法获得准确、可靠的实验结果。本研究在传统 ELISA 基础上,利用一种自主合成的短肽与刚果红结合,通过检测荧光强度的变化进行信号读出。检测原理是在碱性磷酸酶催化下,短肽形成 β 折叠结构,与刚果红结合后引起刚果红本身荧光强度的变化,荧光强度的变化间接反映碱性磷酸酶的浓度。与 ELISA 相比,该方法具有检出限更低和稳定性更好的优势。利用该法检测血小板活化标志物 P-选择素,最低检出限由 1.1 ng/ml 提高到 9.7 ng/ml。

[关键词] β 折叠短肽; 刚果红; P-选择素; 免疫检测

The quantitative detection of P -selectin based on the combination of Congo red and short peptide/Wang Yunyun, Liu Ye, Cong Yulong, Jing Xingyu

¹ Clinical Laboratory of South Building, Chinese P. L. A. General Hospital, Beijing 100853, China.

National Center for NanoScience and Technology and The University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China.

[Abstract] Although traditional enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and related assays have been widely applied for the diagnosis of diseases, many of them suffer from large error variance for monitoring the concentration of targets, and insufficient limit of detection (LOD) for assaying dilute targets. This report shows a readout mode of ELISA, based on alkaline phosphatase (ALP)-triggered binding between peptidic β -sheet structure and Congo Red that can decrease both the error variance and the LOD of detection compared with ELISA. For the detection of P-selectin (a crucial indicator for evaluating thrombus diseases) in clinical samples, such ' β -sheet and Congo Red' mode can significantly decrease both the error variance for monitoring the concentration of P-selectin ([P-Selectin]), and the LOD of [P-selectin] (from 9.7 ng/ml to 1.1 ng/ml), compared with conventional ELISA (an existing gold-standard method for detecting the [P-selectin] in clinic). Considering the wide range of ALP-based antibodies for immunoassays, such novel readout mode could be applicable to the analysis of many types of targets.

[Key Words] Peptidic β -sheet, Congo Red, P-Selectin, Readout mode, Immunoassays.

传统的酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 已经广泛应用于疾病的诊断^[1], 具有操作简单、安全、经济以及较好的灵敏度和特异性等优点^[2]。抗原抗体结合和酶信号读出是 ELISA 中不可或缺的步骤, 其中碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 因容易标记和检测, 被广泛用于 ELISA 反应体系中^[3]。然而, 传统 ELISA 的信号读出模式仍有许多缺点。ALP 以对硝基苯磷酸 (para-nitrophenol, PNPP) 为反应底物, 反应产生黄色的末端产物, 在波长 405 nm 可以读取 OD 值。该黄色产物在溶液中很不稳定, 容易水解, 必须在有限时间内完成检测^[4]。因此这种检测方式不适用于需要在不同时间点进行动态检测的实验^[5,6,7]。另外, 检测临床血清样本时进行适当的稀释可以减少非目的检出物的干扰, 有效地降低背景噪音。但在某些情况下, 样本被稀释后待测物浓度降低, 超出常规 ELISA 的检出限 (limit of detection, LOD) 而无法检测^[8]。通过增强信号可以提高检测灵敏度, 但同时背景噪音也增强, 容易造成较大误差^[9,10]。因此, 有必要开发一种同时实现减少检测误差和降低 LOD 的检测方法。

P-选择素是血小板活化的重要标志物, 可溶性的 P-选择素分布在血浆中, 其作用是介导白细胞与活化血小板和内皮细胞的粘附, 促使炎性物质的释放, 造成血小板活化, 诱发血栓性疾病^[11], 如冠心病、深静脉血栓和动脉粥样硬化等^[12-14]。P-选择素检测有利于评价血小板活化状态, 对服用抗凝药物的血栓患者, 实施 P-选择素的动态监测将有助于评估治疗效果^[15-18]。

本研究在传统 ELISA 基础上, 利用一种具有 β 折叠结构的短肽 (命名为 NMe) 与刚果红 (Congo Red) 结合^[19,20], 通过检测荧光强度的变化进行信号读出。检测原理 (图 1) 是在 ALP 催化下, 短肽自组装形成 β 折叠结构^[21-23], 刚果红可以与 β 折叠结构结合, 引起荧光强度的变化, 在一定范围内刚果红的荧光强度与 ALP 的浓度成正比, 在 ELISA 体系中, ALP 标记的检测抗体的浓度反映被测物浓度, 因此通过测定刚果红荧光强度即可实现定量检测。此外, 这种与 β 折叠结构结合的刚果红荧光信号较稳定^{24,26}, 在动态检测的实验中, 多个时间点留取的标本可以集中在一起进行信号测定, 降低仪器检测误差。

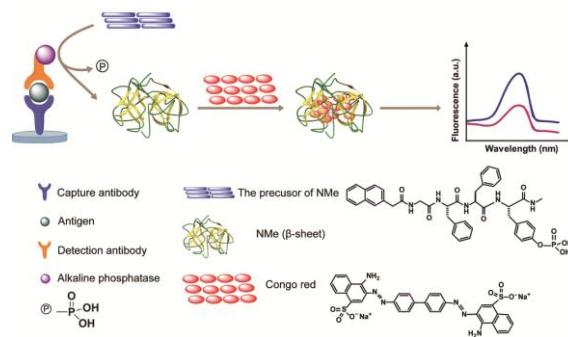


图 1 NMe-Congo Red 读出方法的原理图。ALP 催化短肽 NMe 前体形成 β 折叠结构, 与刚果红结合后引起刚果红本身荧光强度的变化, 荧光强度的变化间接反映碱性磷酸酶的浓度。

1 材料和方法

1.1 试剂和样本来源

抗 P-selectin 单克隆抗体购自江苏血液研究所。P-selectin 纯化抗原购自 Pierce 公司。人可溶性 P-selectin 酶联免疫试剂盒购自 BMASAY 公司。刚果红购自 Sigma-Aldrich 公司。健康人血清样本由解放军总医院健康体检中心提供。

1.2 NMe 前体制备和圆二色光谱鉴定

NMe 前体 (浓度为 1 mg/ml) 用双蒸水溶解, NaOH 溶液调节 pH 至 8.5~9.5。NMe 前体溶液中加入碱性磷酸酶标记抗体(酶活性约为 60 U/ml), 室温作用 30 min 后, 通过圆二色光谱仪(JASCO j-810)对 β 折叠结构进行鉴定。

1.3 检测 P-选择素重组抗原

在 96 孔板中包被 P-选择素单克隆抗体 (0.05M Tris-HCl 缓冲液, pH 值 7.4), 4℃ 过夜。洗板三次。加入倍比稀释的鼠源 P-选择素重组抗原 (0 ng/ml、15.6 ng/ml、31.3 ng/ml、62.5 ng/ml、125 ng/ml、250 ng/ml、500 ng/ml), 37℃ 孵育 1 h, 洗板三次。加入 ALP 标记的羊抗鼠 P-选择素检测抗体, 37℃ 孵育 1 h, 洗板五次。加入 NMe 前体和刚果红 (1:1000 稀释), 同时设置 PNPP 对照孔, 避光孵育 15 min。使用 EnSpire multilabel 荧光分析仪检测荧光强度。

1.4 NMe 检测健康人血清中 P-选择素

在 96 孔板中包被 P-选择素单克隆抗体 (0.05M Tris-HCl 缓冲液, pH 值 7.4), 4℃ 过夜。洗板三次。加入 10 倍稀释的健康血清, 37℃ 孵育 1 h, 洗板三次。加入 ALP 标记的鼠抗人 P-选择素检测抗体, 37℃ 孵育 1 h, 洗板五次。加入 NMe 前体和刚果红 (1:1000 稀释), 同时设置 PNPP 对照孔, 避光孵育 15 min。使用 EnSpire multilabel 荧光分析仪检测荧光强度。

2 结果

2.1 圆二色谱(circular dichroism, CD)鉴定短肽 β 折叠结构形成

蛋白质或多肽的远紫外 CD 谱, 能反映出蛋白质或多肽链二级结构的信息。通过 CD 谱, 可以鉴定 NMe 能否形成与刚果红结合的短肽 β 折叠结构。图 2A 是 NMe 前体溶液加入 ALP 后检测的 CD 谱, 可见典型的 β -折叠(在 216-218nm 有一负峰, 在 185-200nm 有一强的正峰)。未加 ALP 的对照组未见典型 CD 谱 (见图 2B)。

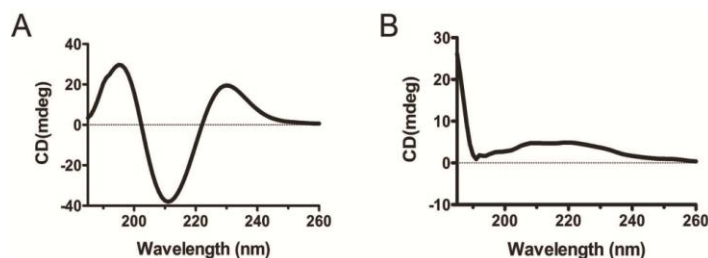


图2 短肽 β 折叠结构的CD谱鉴定 (A为NMe前体溶液加入ALP的CD谱, B为对照组)

2.2 检测 P-选择素重组抗原

为了验证 NMe-Congo Red 法的可行性, 我们首先检测了 P-选择素重组抗原。图 3A 显示, 随着 P-选择素重组抗原浓度的升高, 刚果红荧光强度也随之增加。P-选择素重组抗原浓度在 0~250 ng/ml 范围内与荧光强度之间有良好的线性相关 (图 3B, R 值为 0.990), 初步验证了该方法的可行性。

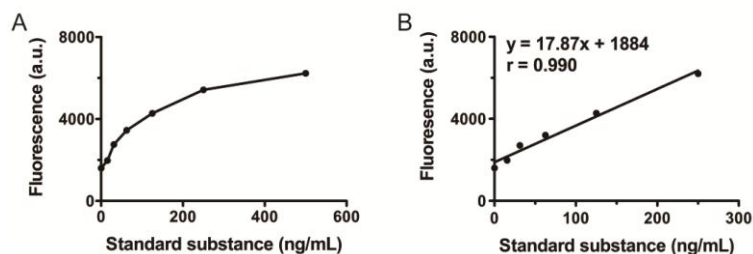


图3 NMe-Congo Red法检测P-选择素重组抗原 (A图为检测荧光强度随倍比稀释的P-选择素重组抗原浓度增加而增强, B图为P-选择素重组抗原浓度与荧光强度之间良好的线性相关)

2.3 NMe-Congo Red 和 PNPP 检测的稳定性对比

同时使用 NMe-Congo Red 和 PNPP 两种方法测试了 20 份血清样本。NMe-Congo Red 法检测信号在 24 小时内维持稳定（图 4 红色部分），传统 ELISA 的读出信号在完成检测的 20 min 后逐渐减弱（图 4 蓝色部分）。结果表明，NMe-Congo Red 读出信号的方法更稳定。

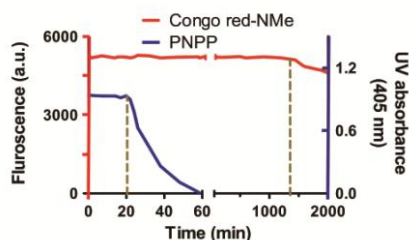


图4 NMe-Congo荧光信号和PNPP吸光度的稳定性检测

2.4 NMe-Congo Red 法检测健康血清样本中的 P-选择素

为减少非特异性蛋白的影响，将血清样本稀释 10 倍，通过 NMe-Congo Red 法检测健康人血清中的 P-选择素(图 5A)。刚果红的荧光强度与 P-选择素浓度呈良好的正相关，LOD 为 1.1 ng/ml(图 5B, R 值=0.988)。传统的 ELISA 方法检测 P-selectin 的 LOD 是 9.7 ng/ml(图 5C、图 5D)。

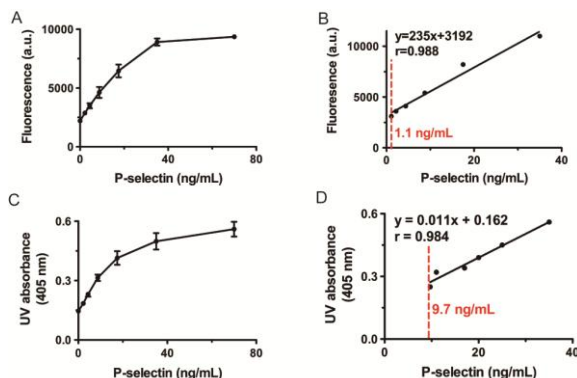


图 5 NMe-Congo Red 与 PNPP 两种读出方法检测范围和 LOD 对比

2.5 NMe-Congo Red 法与商品化 ELISA 试剂盒检测对比

使用 NMe-Congo Red 法与商品化 ELISA 试剂盒检测 16 血清的 P-选择素，两种方法的检测显示良好的相关性(图 6, R 值=0.987)。

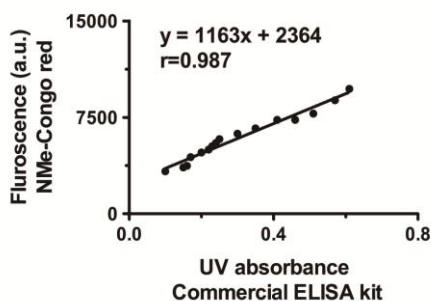


图 6 NMe-Congo Red 法与商品化 ELISA 试剂盒检测对比

3 讨论

ELISA 被广泛应用于临床疾病的诊断，但其传统的读出模式仍有许多缺点，显色底物不稳定会造成较大的检测误差，影响结果的可靠性，因此优化 ELISA 的读出模式有利于其更好地应用于临床诊断。

本项研究中，我们采用一种基于短肽 NMe 和刚果红结合的创新性读出模式。这种优化读出的方法，有效地提高了血小板活化标志物 P-选择素的检测。P-选择素作为预测血栓疾病的重要指标，其动态变化的检测对正在接受药物

治疗的血栓患者有重要意义²⁷。然而,目前最常用的P-选择素检测方法ELISA,由于读出信号不稳定,实施动态变化的检测时必须每次独立检测信号,造成分批次检测误差大的缺点^{5,6}。本研究使用的NMe和刚果红结合的读出信号在24h保持稳定,可以保证所有样本同批次检测,有效减少系统误差的影响,确保检测结果的稳定性,从而优化对P-选择素相关疾病的检测。

P-选择素是血清中评估血栓疾病风险的重要指标,如心血管疾病和静脉血栓栓塞^{28,29}。更低水平的LOD有利于P-选择素的检测,本研究利用短肽NMe和刚果红结合的创新性读出模式检测P-选择素LOD为1.1ng/ml,比传统ELISA检测P-选择素LOD9.7ng/ml提高了近10倍,这种优势有助于对低水平P-选择素的检测。此外,NMe-Congo Red法与商品化的ELISA试剂盒相比显示良好的相关性,在反应体系上只改变了信号读出底物,因此无需增加额外的研发投入,有望成为新的ELISA检测体系。

参考文献

- [1]Cao,T.H.Quinn,P.A.Sandhu,J.K.Voors,A.A.Lang,C.C.Parry,H.M.;Mohan,M.Jones,D.J.L.Ng,L.L.Lancet **2015**,385,S26.
- [2]Sun, J. S.Xianyu, Y. L.Jiang, X. Y. Chem. Soc. Rev. **2014**, 43, 6239-6253.
- [3]Zhang, Y.Guo, Y. M.Xianyu, Y. L.Chen, W. W.Zhao, Y. Y.Jiang, X. Y. Adv. Mater. **2013**, 25, 3802-3819.
- [4]Ceyhan, G.Kose, M.Tumer, M.Dal, H. Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc. **2015**, 142, 8-14.
- [5]Hang,N.T.Ishizuka,N.Keicho,N.Hong,L.T.Tam,D. B.Thu,V.T.Matsushita,I.Harada,N.Higuchi,K.Sakurada,S.BMC.Infect. Dis.**2009**,9.66.
- [6]Clement,F.Dewar,V.Braeckel, E.V.Desombere, I.Dewerchin, M.Swysen,C.Demoiti éM.A.Jongert,E.Cohen,J.Roels,G.L. Malar.J.**2012**,11.384.
- [7]Telles,S.Sharma,S. K.Balkrishna,A. Med. Sci. Monit.Basic.Res.**2014**,20,184-193.
- [8]Ghosh, M.Nandi S.Dutta, S.Saha, M. K. World. J. Hepatol. **2015**, 7, 2482-2491.
- [9]Yin, C.Wang, M.Lei, C. Y.Wang, Z.Li, P.Li, Y.Li, W.Huang, Y.Nie, Z.Yao, S. Z. Anal. Chem. **2015**, 87, 6311-6318.
- [10]Xianyu, Y. L.Chen, Y. P.Jiang, X. Y. Anal. Chem. **2015**, 87, 10688-10692.
- [11]Thomas, M. R.Storey, R. F. Thromb. Haemost. **2015**, 114, 449-458.
- [12]Malik, I.Danesh, J.Whincup, P.Bhatia, V.Papacosta, O.Walker, M.Lennon, L.Thomson, A.Haskard, D. Lancet **2001**, 358, 971-975.
- [13]Bielinski, S. J.Berardi, C.Decker, P. A.Kirsch, P. S.Larson, N. B.Pankow, J. S.Sale, M.Andrade, M. D.Sicotte, H.Tang, W. Atherosclerosis **2015**, 240, 3-9.
- [14]Blann, A. D.Lip, G. Y. H. Lancet **2002**, 359, 525-526.
- [15]Tardif, J. C.Tanguay, J. F.Wright, S. S.Duchatelle, V.Petroni, T.Gr égoire, J. C.Ibrahim, R.Heinonen, T. M.Robb, S.Bertrand, O. F. J. Am. Coll. Cardiol. **2013**, 61, 2048-2055.
- [16]Krishnamurthy, V. R.Sardar, M. Y.Ying, Y.Song, X.Haller, C.Dai, E.Wang, X.Putra, D. H.Sun, L.Morikis, V.Simon, S. I.Woods, R. J.Cummings, R. D.Chaikof, E. L. Nat. Commun. **2015**, 6, 6387.
- [17]Vianelli, N.Catani, L.Gugliotta, L.Nocentini, F.Baravelli, S.Lancellotti, G.Tura, S. Haematologica **1996**, 81, 3-7.
- [18]McEver, R. P. Cardiovasc. Res. **2015**, 107, 331-339.
- [19]Peverill, R. E.Smolich, J. J.Malan, E.Goldstat, R.Davis, S. R. Maturitas **2006**, 53, 158-165.
- [20]Onore, C. E.Nordahl, C. W.Young, G. S.Water, J. A. V.Rogers, S. J.Ashwood, P. Biol. Psychiatry. **2012**, 72, 1020-1025.
- [21]Huang, Z. H.Shi, L.Ma, J. W.Sun, Z. Y.Cai, H.Chen, Y. X.Zhao, Y. F.Li, Y. M. J. Am. Chem. Soc. **2012**, 134, 8730-8733.
- [22]Tian, Y.Wang H. M.Liu, Y.Mao, L.Chen, W. W.Zhu, Z.Liu, W. W.Zheng, W. f.Zhao, Y. Y.Kong, D. L.Yang, Z. M.Jiang, X. Y. Nano. Lett. **2014**, 14, 1439-1445.
- [23]Gao, Y.Shi, J.Yuan, D.Xu, B. Nat. Commun. **2012**, 3, 1033.
- [24]Michels, J.B üntzow, M. J. Microsc. **2010**, 238, 95-101.

- [25]Hill, J. M.Lukiw, W. J. Front. Aging. Neurosci. **2015**, 7, 9.
- [26]Clement, C. G.Truong, L. D. Hum. Pathol. **2014**, 45, 1766-1772.
- [27]Valdes, V.Nardi, M. A.Elbaum, L.Berger, J. S. J. Thromb. Thrombolysis. **2015**, 40, 83-87.
- [28]Ho, J. A.Jou, A. F.Wu, L. C.Hsu, S. L. Methods **2012**, 56, 223-229.
- [29]Tawfik, N. M.Deeb, M. E.Nasr, A. S. Blood. Coagul. Fibrinolysis. **2012**, 23, 537-542.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

血浆 ST2 在 II 型糖尿病进展过程中的分布和临床关联性*

蒯亚晖¹ 张荣成² 王恺隽¹ 叶中倪¹ 黄涛¹ 张健² 陈曦¹ 康金锁^{1*}

*基金项目: 首都临床特色应用研究, 项目编号 Z121107005112014。

¹ 中国医学科学院国家心脏病中心阜外医院临床检验中心 100037

² 中国医学科学院国家心脏病中心阜外医院心衰中心 100037

*通讯作者: kangjinsuofuwai@sina.com

[摘要] 目标: ST2 在糖尿病和心血管疾病中起重要作用。但是血浆中可溶性 ST2 在 II 型糖尿病进展过程中的浓度分布未有报道。方法: 本研究选取血糖正常的个体、糖尿病前期个体和糖尿病患者共 525 例, 采用酶联免疫分析方法, 检测受试者血浆中 ST2 水平。结果: 糖尿病患者外周血血浆中 ST2 水平为 29.4 ng/ml, 显著高于正常人(21.2 ng/ml, $P<0.001$)和糖尿病前期个体(22.3 ng/ml, $P<0.001$)的水平。四百分位数分析显示, 50th 和 75th 百分位的 ST2 水平使糖尿病的风险分别增加 3.85 和 6.84 倍($P<0.001$)。如果以糖尿病前期受试者为参照, sST2 的 50th 和 75th 百分位水平亦可使糖尿病风险显著增加 2.81 和 4.09 倍($P<0.001$)。进一步用 logistics 回归模型校正年龄、性别以及常见心血管病危险因素后, 血浆 ST2 水平每增加 1 SD, 糖尿病患者合并发生动脉粥样硬化的风险增加 1.43 倍。结论: 血浆 ST2 水平是一个预测糖尿病前期向糖尿病转化的潜在生物标志物, 甚至糖尿病患者 ST2 水平的升高与发生动脉粥样硬化并发症的风险正相关。

[关键词] 可溶性 ST2; II 型糖尿病; 糖尿病前期; 动脉粥样硬化

0 前言

致癌抑制因子 (suppression of tumorigenicity 2, ST2) 是白介素 1 受体样分子 1。膜结合型 ST2 与坏死细胞释放的白介素 33 相互作用组成 IL-33/ST2L 信号, 能够激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路, 最终诱导 Th2 型免疫应答并释放炎症因子^[1-2]。外周血中还有一种可溶性 ST2, 其仅包含膜结合型 ST2 分子的胞外区, 可与 IL-33 竞争性结合, 调节 IL-33/ST2L 信号通路的活性。有报道显示, 可溶性 ST2 水平与心血管疾病、肿瘤、免疫疾病和糖尿病有关^[3]。

II 型糖尿病是重要的慢性代谢疾病, 严重威胁人类健康^[4]。包括遗传和环境因素在内的多种致病因素均在糖尿病发生发展中起重要作用^[5]。在肥胖型糖尿病的小鼠模型中, IL-33 能够降低空腹血糖水平并增加胰岛素抵抗^[6]。临床研究显示, 可溶性 ST2 在 II 型糖尿病患者血浆中的水平升高^[7-11]。但是, II 型糖尿病发病过程中, 血浆 ST2 水平的变化和分布状况仍未有报道。糖尿病前期个体中预测转化为糖尿病的风险, 以及在糖尿病患者中预测并发症的发生风险具有重要的临床意义。

本研究分析和比较了正常人, 糖尿病前期个体和 II 型糖尿病患者外周血 ST2 水平。进一步分析血浆 ST2 水平与 II 型糖尿病并发症的关联性。

1 方法

1.1 研究人群

525 例于 2014 年 5 月至 7 月间到阜外医院就诊患者被纳入本研究。入选者年龄在 35-75 岁之间, 无心力衰竭、严重心律失常、心脏瓣膜病、恶性肿瘤和自身免疫性疾病, 并且入选前至少 1 个月无外科手术史。根据 AHA 糖尿病

治疗指南^[14], 餐后血糖(FPG) ≥ 7.0 mmol/L, 2小时糖耐量(GTT) ≥ 11.0 mmol/L, 糖化血红蛋白(HbA1c) $\geq 6.5\%$, 或者近期规律服用治疗糖尿病药物的个体为糖尿病患者; FPG 5.5-6.9 mmol/L, 2-hour GTT 7.7-10.9 mmol/L, HbA1c test 5.7-6.4% 且未服用任意糖尿病治疗药物的为糖尿病前期个体; FPG < 5.5 mmol/L, 2-hour GTT < 7.7 mmol/L, HbA1c test $< 5.7\%$, 且未服用任意糖尿病治疗药物的为正常人。

1.2 数据收集

临床医生负责诊断受试者, 同时通过问卷记录受试者疾病史、用药史、吸烟史和饮酒史等相关生活习惯。所有受试者均经过心脏及颈动脉超声检查和 12 导联心电图检查。受试者血样生化指标和血常规检查分别采用奥林巴斯 AU5400 和希斯美康 XN-20 检测。

1.3 检测血浆 ST2 水平

采集受试者空腹血样后, 1 小时内分离血浆并储存在 -80°C , 直至检测。采用 Presage® ST2 assay (Critical Diagnostics 生产) 试剂盒, 严格按照产品说明检测血浆 ST2 浓度。

1.4 数据分析

连续性变量由均值 \pm SD, 中位数和四百分位数描述, 分类变量由百分比描述。采用线性拟合模型分析 ST2 与连续型变量的关系, logistic 回归模型分析 ST2 与疾病状态的关系。多变量回归分析中, 年龄、性别及其相互作用被添加到回归模型中。P 值 < 0.05 表示统计学显著性。

2 结果

2.1 受试者临床特征

525 例受试者根据 AHA 糖尿病治疗指南分为正常人, 糖尿病前期个体和 II 型糖尿病三组。表 1 描述三组受试者的基本临床特征, 三组受试者的年龄性别无显著差异。空腹血糖水平在三组受试者中依次升高。正常组和糖尿病前期组之间, 除空腹血糖水平和体重指数 (BMI) 外具有相似的临床特征。糖尿病组的血脂水平, 肝肾功能指标与其他两组具有显著差异。

表 1 基本临床资料

	正常组	糖尿病前期组	II 型糖尿病组
Number	192	154	179
Age(years)	59.1 \pm 9.9	60.4 \pm 8.5	60.5 \pm 8.9
Male/Female	105/87	90/64	106/73
BMI	23.73 \pm 2.97	24.97 \pm 3.05*	25.78 \pm 3.56*
Current Smoker,%	21.1	20.8	48.1**
Alcohol, %	23.8	24.5	21.5*
CHD, n	36	41	206
Stroke, n	8	6	32
AS, n(%)	35(6.7)	28(5.3)	124(23.6)
HbA1c, %	5.35 \pm 0.30	5.93 \pm 0.30*	8.15 \pm 1.37**
Glucose, mmol/l	5.09 \pm 0.38	5.88 \pm 0.51**	8.61 \pm 2.80**
Total Cholesterol, mmol/l	4.92 \pm 0.95	4.93 \pm 1.02	4.21 \pm 1.25**
Triglycerides, mmol/l	1.55 \pm 0.97	1.57 \pm 1.07	1.93 \pm 2.01**
HDL-C, mmol/l	1.46 \pm 0.39	1.39 \pm 0.36	1.11 \pm 0.32**
LDL-C, mmol/l	2.95 \pm 1.06	2.97 \pm 0.88	2.48 \pm 0.92**
ALP	63.3 \pm 16.8	62.6 \pm 17.1	68.0 \pm 28.2*
ALT, U/l	24.1 \pm 28.1	23.2 \pm 9.9	29.3 \pm 28.1*
AST, U/l	23.1 \pm 19.1	21.1 \pm 6.0	21.3 \pm 16.0
GGT, U/l	25.7 \pm 24.2	32.2 \pm 36.8	36.7 \pm 45.8*
BUN, mmol/l	5.46 \pm 1.82	5.41 \pm 1.34	6.11 \pm 2.36**
Creatinine, umol/l	68.15 \pm 24.42	68.86 \pm 18.60	74.44 \pm 23.26*
eGFR, ml/min/1.73m ²	98.5 \pm 23.6	97.0 \pm 27.0	88.1 \pm 22.8**
Uric acid, μ mol/L	333.9 \pm 107.5	342.2 \pm 98.7	308.6 \pm 95.4*
WBCs	6.22 \pm 1.76	6.49 \pm 1.54	6.27 \pm 1.52
RBCs	4.70 \pm 0.62	4.86 \pm 0.45	4.79 \pm 0.45
Hemoglobin	140.6 \pm 8.5	144.0 \pm 13.8	138.1 \pm 15.0
Platelet	208.5 \pm 55.9	214.7 \pm 57.2	207.2 \pm 55.7
Neutrophil, %	56.0 \pm 13.3	58.8 \pm 13.6	61.0 \pm 12.6*

Data are showed mean (sd) for continuous variables and absolute number (percent, %) given for categorical variable. BMI, Body mass index; CHD, Coronary heart disease; AS, atherosclerosis; HbA1c, Hemoglobin A1c; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; GGT, Gamma-glutamyl transpeptidase; BUN, blood urea nitrogen; eGFR, estimated glomerular filtration rate; WBCs, White blood cells; RBCs, red blood cells. P values indicat the differences from normal group using ANOVA or *chi*-test. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$;

2.2 II型糖尿病患者血浆ST2水平显著升高

II 糖尿病患者具有 75th 百分位以上 ST2 浓度 (>29.1 ng/ml) 的比例为 37.9%，明显高于正常组和前期组。II 型糖尿病组的平均 ST2 水平为 29.4 ng/ml，与正常组 (21.2 ng/ml) 和前期组 (22.3 ng/ml) 相比较显著升高，并具有统计学意义 (all $P < 0.001$)。糖尿病前期组和正常组的 ST2 水平是相似的($P > 0.05$)。(表 2 和图 1A) 已有的研究显示男性和女性体内的 ST2 水平是不同的[8]，因此，每组受试者按照性别分成亚组，比较血浆 ST2 水平的差异。结果显示，与之前的报道一致，每组中男性 ST2 水平均显著高于女性。男性 II 糖尿病患者血浆 ST2 水平高达 31.9 ng/ml，明显高于正常组和前期组男性血浆 ST2 水平(24.5 ng/ml and 24.4 ng/ml， $P < 0.001$)。在女性亚组中，ST2 血浆水平具有同样的特征，见表 2 和图 1B。

表 2: 血浆 sST2 水平

		Normal	Prediabetes	Diabetes
	N	192	154	179
ALL	Mean(SD)	21.2 (15.8)	22.3 (11.5)	29.4 (17.8)**
	Median(25 th , 75 th)	19.3 (13.1, 25.5)	20.3 (14.5, 27.7)	26.1(19.0, 35.9)
	N	105	90	106
Male	Mean(SD)	24.5 (19.8)	24.4 (9.6)	31.9 (15.0)**
	Median(25 th , 75 th)	21.4 (14.5, 29.3)	22.8 (17.5, 29.2)	28.8 (21.3, 40.4)
	N	87	64	73
Female	Mean(SD)	17.1 (7.6)	19.3 (13.2)	25.6 (20.7)**
	Median(25 th , 75 th)	16.2 (11.9, 21.2)	16.1 (11.6, 23.3)	22.2 (15.8, 28.2)

** : $P < 0.001$;

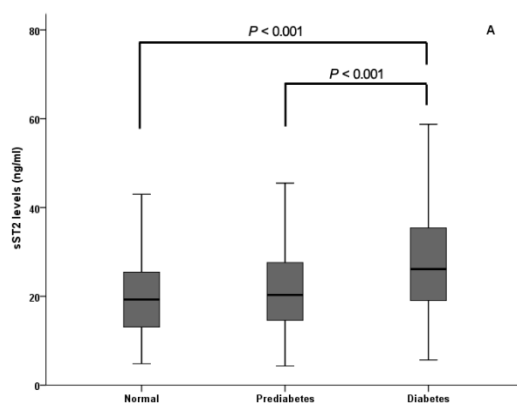


图 1A: 不同组间血浆 sST2 水平(ng/ml)

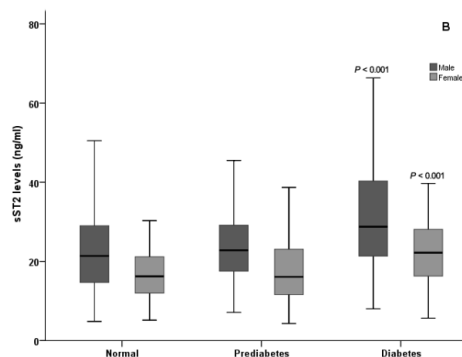


图 1B: 每组不同性别间血浆 sST2 水平(ng/ml)

2.3 血浆 ST2 水平与年龄、性别和生活方式相关

单变量回归分析显示，血浆 ST2 水平与年龄、性别、BMI、吸烟和饮酒均显著相关 ($P < 0.05$ ，见表 3)。校正年龄、性别后，除 BMI 和饮酒外吸烟仍然与 ST2 水平显著相关(0.141，95% CI, 0.098-0.184, $P < 0.001$)。

2.4 血浆 ST2 水平与代谢特性相关

有报道显示,空腹血糖水平与血浆 ST2 水平相关,因此本研究在 525 例中国受试者中分析了二者相关性。结果显示,经 Log 转换的 ST2 血浆浓度与空腹血糖水平显著相关, $R=0.175, P<0.001$ 。校正年龄和性别后, ST2 血浆浓度每升高一个标准差,血糖水平将上升 $0.367 \text{ mmol/l}(95\% \text{ CI}, 0.178-0.556; P<0.001)$ 。

目前研究认为,糖尿病属于全身系统的代谢障碍,包括血脂水平,因此,本研究分析了 ST2 水平与血脂代谢相关标志物的关联性。结果显示, ST2 血浆浓度每升高一个标准差,总胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)浓度分别下降 0.160 mmol/L 和 $0.086 \text{ mmol/L}(P<0.05)$ 。但是,甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)与 ST2 水平不相关。在肝功能相关的标志物中,丙氨酸转氨酶 (ALT),天冬氨酸转氨酶 (AST) 和 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)与 ST2 的水平也显著相关 (all $P<0.001$, 见表 3)。

众所周知,糖尿病患者的肾脏功能经常受到累及,因此,与肾脏功能相关的标志物与 ST2 血浆水平的关系也在本研究中分析,结果显示, ST2 血浆水平每增加一个标准差,外周血中尿酸和肌酐水平分别增加 $10.014 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.015 \mu\text{mol/L}$,肾小球率过滤(MDRD 公式计算)降低 2.894% (all $P<0.05$)。

表 3 单变量分析血浆 sST2 水平与年龄、性别和生活方式的关系

Predictor Variable	Univariate		Adjusted*	
	Effect Estimate (95% CI)	p-value	Effect Estimate (95% CI)	p-value
Demographic variables				
Age (per 10 year increase)	0.024(0.002, 0.046)	0.034		
Sex (Male vs. Female)	0.134(0.095, 0.173)	<0.001		
Lifestyle variables				
BMI	0.030(0.005, 0.054)	0.017	0.013(-0.011, 0.037)	0.274
Smoking (vs. Non Smokers)	0.141(0.098, 0.184)	<0.001	0.091(0.042, 0.140)	<0.001
Alcohol Consumption	0.052(0.018, 0.086)	0.003	0.001(-0.037, 0.037)	0.996

Regression models were fitted with Log sST2 as the outcome. Effect estimates are the relative change in Log sST2 for a specified increase in continuous predictor variables, or compared to the stated reference group for categorical predictors.

*adjusted by sex and age;

表 4 多因素分析血浆 sST2 与糖尿病风险因素的关系

Predictor Variable	Univariate		Adjusted*	
	Effect Estimate (95% CI)	p-value	Effect Estimate (95% CI)	p-value
Glucose (mmol/l)	0.419(0.237, 0.601)	<0.001	0.367(0.178, 0.556)	<0.001
Associations between sST2 and lipid metabolism				
Total Cholesterol (mmol/l)	-0.160(-0.254, -0.0672)	0.001	-0.116(-0.212, -0.021)	0.017
LDL-Cholesterol (mmol/l)	-0.013(-0.026, 0.001)	0.048	-0.011(-0.025, 0.002)	0.094
HDL-Cholesterol (mmol/l)	-0.086(-0.118, -0.054)	<0.001	-0.059(-0.091, -0.026)	<0.001
Triglycerides (mmol/l)	0.009(-0.011, 0.028)	0.041	0.008(-0.013, 0.029)	0.446
Associations between sST2 and markers of hepatic function				
ALT, U/l	5.507(3.536, 7.479)	<0.001	4.733(2.724, 6.742)	<0.001
AST, U/l	2.265(1.027, 3.503)	<0.001	2.402(1.117, 3.686)	<0.001
GGT, U/l	8.667(5.744, 11.591)	<0.001	7.580(4.559, 10.602)	<0.001
Associations between sST2 and markers of renal function				
UA	20.075(11.654, 28.496)	$P<0.001$	10.014(1.879, 18.149)	$P=0.016$
BUN	0.012(0.001, 0.022)	$P=0.032$	0.007(-0.003, 0.018)	$P=0.176$
CREA	0.029(0.019, 0.039)	$P<0.001$	0.015(0.006, 0.024)	$P=0.001$
eGFR, ml/min/1.73m ²	-2.873(-4.953, -0.793)	$P=0.007$	-2.894(-4.978, -0.810)	$P=0.007$

*adjusted by sex and age;

2.5 血浆 ST2 与 II 型糖尿病并发症

长期高水平的血糖水平是血管损伤的重要因素,研究发现动脉粥样硬化是糖尿病的重要并发症。^[16]因此,本研

究将每组受试者再分成两个亚组,分别为合并动脉粥样硬化和未合并动脉粥样硬化的受试者。Logistic 拟合分析显示,每组中出现动脉粥样硬化和未出现动脉粥样硬化受试者的平均血浆 ST2 水平并无显著性差异 ($P>0.05$, 见表 5)。但是,当根据是否出现动脉粥样硬化将所有受试者分成两组后,我们发现 ST2 血浆水平每增加一个标准差,动脉粥样硬化发生的风险增加 1.43 倍。在 ST2 水平达到 25th 百分位水平(14.9 ng/ml)时,出现动脉粥样硬化的风险会轻度增加 1.79 倍 ($P<0.044$)。当 ST2 水平达到 50th 和 75th 百分位水平 (21.3 and 29.1 ng/ml) 时,发生动脉粥样硬化的风险将显著增加 2.34 倍 ($P=0.003$) 和 2.80 倍 ($P<0.001$)。

表 5 血浆 sST2 与糖尿病合并动脉粥样硬化的关联性

Outcome	Univariate		Adjusted*	
	Effect Estimate (95% CI)	p-value	Effect Estimate (95% CI)	p-value
Total (with AS Venus without AS)				
Log sST2(per 1 SD)	1.470(1.227, 1.761)	<0.001	1.429(1.180, 1.729)	<0.001
ST2 25 th	1.824, 1.051, 3.165)	0.033	1.790 (1.013, 3.165)	0.045
ST2 50 th	2.535, 1.464, 4.387)	0.001	2.341 (1.324, 4.140)	0.003
ST2 75 th	3.048, 1.773, 5.239)	<0.001	2.804 (1.574, 4.996)	<0.001
Diabetes (with AS Venus without AS)				
Log sST2(per 1 SD)	1.269(0.932, 1.729)	0.130	1.136(0.813, 1.588)	0.455
ST2 25 th	1.846 (0.631, 5.405)	0.263	1.624 (0.506, 5.211)	0.415
ST2 50 th	2.473 (0.891, 6.862)	0.082	2.134 (0.698, 6.525)	0.184
ST2 75 th	2.138 (0.816, 5.598)	0.122	1.262 (0.419, 3.800)	0.679
Prediabetes (with AS Venus without AS)				
Log sST2(per 1 SD)	1.466(.951, 2.262)	0.083	1.455(0.900, 2.351)	0.126
ST2 25 th	2.571 (0.737, 8.970)	0.138	2.130 (0.569, 7.972)	0.262
ST2 50 th	1.862 (0.480, 7.229)	0.369	1.547 (0.374, 6.406)	0.547
ST2 75 th	2.520 (0.666, 9.530)	0.173	2.316 (0.559, 9.602)	0.247
Normal (with AS Venus without AS)				
Log sST2(per 1 SD)	0.994(0.689, 1.434)	0.975	0.988(0.679, 1.438)	0.951
ST2 25 th	1.256 (0.497, 3.173)	0.630	1.467 (0.560, 3.841)	0.436
ST2 50 th	1.227 (0.447, 3.370)	0.691	1.161 (0.404, 3.341)	0.781
ST2 75 th	0.909 (0.287, 2.882)	0.871	.862 (0.256, 2.905)	0.811

*adjusted by sex and age;

3 讨论

本研究在血糖正常受试者,糖尿病前期受试者和 II 型糖尿病患者中血浆 ST2 水平的分布特征。结果显示外周血血浆中 ST2 浓度在 II 型糖尿病患者中显著升高,并且 ST2 水平的升高能显著增加动脉粥样硬化的风险。

本研究在中国人群中首次确认血浆 ST2 水平与 II 型糖尿病显著相关。Dhillon 等报道,根据血浆 ST2 四百分位点水平将非 ST 段抬高型心肌梗死分成四组,每组患者发生糖尿病的比例依次升高,分别为 17%, 30%, 28% 和 40%。^[17] 在 Kohli 研究的非 ST 段抬高型急性冠脉综合征队列中,血浆 ST2 浓度高于 35ng/ml 的患者合并糖尿病的比例高达 37%。^[18] Sabatine 也发现,ST 抬高型心肌梗死人群的 ST2 血浆水平与糖尿病和肌酐清除率显著相关。^[19] 在社区人群中,ST2 血浆水平也是与糖尿病显著相关,ST2 每升高一个标准差,血糖增加 0.104mmol/L。血浆 C 反应蛋白水平和代谢综合征与 ST2 水平也显著相关。^[7] 另外一个社区队列也显示,除确认 ST2 与糖尿病的相关性外,还发现外周血甘油三酯水平、空腹血糖、ALT 和 GGT 是与 ST2 水平相关的。Fousteris 报道,与正常人群相比较,糖尿病患者外周血 ST2 水平虽轻度升高,但仍具有统计学显著性。^[11] 本研究中,血糖水平正常受试者与糖尿病前期受试者的 ST2 血浆水平、血脂水平以及肝肾功能相关标志物没有差异。提示在糖尿病前期状态下,机体的炎症应答和靶器官

损伤非常轻微。

本研究结果显示, 血浆 ST2 水平不仅与空腹血糖水平相关联, 而且与糖尿病相关的肝肾功能评价指标也显著相关。众所周知, 肝脏在血糖代谢中起重要作用, 80%的糖尿病患者均出现糖原的肝脏储集。^[20] II型糖尿病患者亦常常发生血清转氨酶的慢性轻度升高。^[21-23] 因此, 我们推断糖尿病患者长期的高血糖水平很可能与异常的炎症免疫应答相关 ST2/IL-33 信号通路参与调节, 这与 ST2/IL-33 信号通路在炎症中起重要作用是相符的。^[24,25]

血浆 ST2 是否参与动脉粥样硬化仍是不十分清楚。可溶性 ST2 和 IL-33 联合处理 APO-E 缺陷小鼠不能降低 Th1 免疫应答和动脉粥样硬化斑块的大小。这个结果提示可溶性 ST2 可能参与了斑块形成过程。^[26] 但是, 在风湿性关节炎的队列研究显示, 可溶性 ST2 水平与斑块的发展进程无显著关联性。本研究结果显示, 高水平的 ST2 浓度显著增加动脉粥样硬化的风险, 提示血浆 ST2 是一个潜在心血管事件生物标志物。

参考文献

- [1]Schmitz J,Owyang A,Oldham E,Song Y,Murphy E,McClanahan TK,Zurawski G,Moshrefi M,Qin J,Li X,Gorman DM,Bazan JF,Kastelein RA.(2005) IL-33,an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines.Immunity;23(5),479-90.
- [2]Kakkar R,Lee RT.(2008) The IL-33/ST2 pathway:therapeutic target and novel biomarker.Nature reviews.Drug discovery;7(10),827-40.
- [3]Mueller T,Jaffe AS.(2015) Soluble ST2--analytical considerations.The American journal of cardiology;115(7 Suppl),8B-21B.
- [4]Chen L,Magliano DJ,Zimmet PZ.(2012) The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives.Nature reviews.Endocrinology;8(4),228-36.
- [5]Unger J,Parkin CG.(2010) Type 2 diabetes:an expanded view of pathophysiology and therapy.Postgraduate medicine;122(3),145-57.
- [6]Miller AM,Asquith DL,Hueber AJ,Anderson LA,Holmes WM,McKenzie AN,Xu D,Sattar N,McInnes IB,Liew FY.(2010) Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice.Circulation research;107(5),650-8.
- [7]Coglianese EE,Larson MG,Vasan RS,Ho JE,Ghorbani A,McCabe EL,Cheng S,Fradley MG,Kretschman D,Gao W,O'Connor G,Wang TJ,Januzzi JL.(2012) Distribution and clinical correlates of the interleukin receptor family member soluble ST2 in the Framingham Heart Study.Clinical chemistry;58(12),1673-81.
- [8]Miller AM,Purves D,McConnachie A,Asquith DL,Batty GD,Burns H,Cavanagh J,Ford I,McLean JS,Packard CJ,Shiels PG,Turner H,Velupillai YN,Deans KA,Welsh P,McInnes IB,Sattar N.(2012) Soluble ST2 associates with diabetes but not established cardiovascular risk factors:a new inflammatory pathway of relevance to diabetes? PloS one;7(10),e47830
- [9]Caporali A,Meloni M,Miller AM,Vierlinger K,Cardinali A,Spinetti G,Nailor A,Faglia E,Losa S,Gotti A,Fortunato O,Mitic T,Hofner M,Noehammer C,Madeddu P,Emanuelli C.(2012) Soluble ST2 is regulated by p75 neurotrophin receptor and predicts mortality in diabetic patients with critical limb ischemia.Arteriosclerosis,thrombosis,and vascular biology;32(12),e149-60.
- [10]Fousteris E,Theodosis-Georgilas A,Chantanis S,Spiropoulou P,Mavrogeni S,Economopoulos T,Boutati E,Dimitriadis G,Foussas S,Melidonis A.(2014) Head-to-head comparison of 2 inflammatory biomarkers for the long-term prediction of left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes patients:soluble ST2 versus hs-CRP.International journal of cardiology;174(3),811-2.
- [11]Fousteris E,Melidonis A,Panoutsopoulos G,Tzirogiannis K,Foussas S,Theodosis-Georgilas A,Tzerefos S,Matsagos S,Boutati E,Economopoulos T,Dimitriadis G,Raptis S.(2011) Toll/interleukin-1 receptor member ST2 exhibits higher soluble levels in type 2 diabetes,especially when accompanied with left ventricular diastolic dysfunction.Cardiovascular diabetology;10,101.
- [12]Titov VN,Shiriaeva Iu K.(2011) [Arteriolosclerosis and atherosclerosis.Pathology of the distal and proximal arterial bed.Pathogenesis of diabetic microangiopathy].Klinicheskaja laboratornaia diagnostika (4),3-14.
- [13] Gao Y,Lu B,Sun ML,Hou ZH,Yu FF,Cao HL,Chen Y,Yang YJ,Jiang SL,Budoff MJ.(2011) Comparison of atherosclerotic plaque by computed tomography angiography in patients with and without diabetes mellitus and with known or suspected coronary artery disease.The American journal of cardiology;108(6),809-13.
- [14]American Diabetes A.(2015) Standards of medical care in diabetes-2015 abridged for primary care providers.Clinical diabetes :a publication of the American Diabetes Association;33(2),97-111.
- [15]Dieplinger B,Januzzi JL,Jr.,Steinmair M,Gabriel C,Poelz W,Haltmayer M,Mueller T.(2009) Analytical and clinical evaluation of a novel high-sensitivity assay for measurement of soluble ST2 in human plasma--the Presage ST2 assay.Clinica

- chimica acta; international journal of clinical chemistry;409(1-2),33-40.
- [16]Mihic M,Modi P.(2008) Metabolic syndrome--risk factors for atherosclerosis and diabetes.Current diabetes reviews;4(2),122-8
- [17]Dhillon OS,Narayan HK,Quinn PA,Squire IB,Davies JE,Ng LL.(2011) Interleukin 33 and ST2 in non-ST-elevation myocardial infarction:comparison with Global Registry of Acute Coronary Events Risk Scoring and NT-proBNP.American heart journal;161(6),1163-70.
- [18]Kohli P,Bonaca MP,Kakkar R,Kudinova AY,Scirica BM,Sabatine MS,Murphy SA,Braunwald E,Lee RT,Morrow DA.(2012) Role of ST2 in non-ST-elevation acute coronary syndrome in the MERLIN-TIMI 36 trial.Clinical chemistry;58(1),257-66.
- [19]Sabatine MS,Morrow DA,Higgins LJ,MacGillivray C,Guo W,Bode C,Rifai N,Cannon CP,Gerszten RE,Lee RT.(2008) Complementary roles for biomarkers of biomechanical strain ST2 and N-terminal prohormone B-type natriuretic peptide in patients with ST-elevation myocardial infarction.Circulation;117(15),1936-44.
- [20]Fejfar T,Safka V,Jirkovsky V,Stefankova J,Hulek P.(2011) [Diabetes mellitus and the liver cirrhosis].Vnitni lekarstvi;57(4),368-71.
- [21] Sattar N,Scherbakova O,Ford I,O'Reilly DS,Stanley A,Forrest E,Macfarlane PW,Packard CJ,Cobbe SM,Shepherd J,west of Scotland coronary prevention s.(2004) Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors,metabolic syndrome,and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study.Diabetes;53(11),2855-60.
- [22]Wannamethee SG,Shaper AG,Lennon L,Whincup PH.(2005) Hepatic enzymes,the metabolic syndrome,and the risk of type 2 diabetes in older men.Diabetes care;28(12),2913-8.
- [23]Abbasi A,Bakker SJ,Corpeleijn E,van der AD,Gansevoort RT,Gans RO,Peelen LM,van der Schouw YT,Stolk RP,Navis G,Spijkerman AM,Beulens JW.(2012) Liver function tests and risk prediction of incident type 2 diabetes:evaluation in two independent cohorts.PloS one;7(12),e51496.
- [24]Trajkovic V,Sweet MJ,Xu D.(2004) T1/ST2--an IL-1 receptor-like modulator of immune responses.Cytokine & growth factor reviews;15(2-3),87-95.
- [25]Stampalija T,Romero R,Korzeniewski SJ,Chaemsaitong P,Miranda J,Yeo L,Dong Z,Hassan SS,Chaiworapongsa T.(2013) Soluble ST2 in the fetal inflammatory response syndrome:in vivo evidence of activation of the anti-inflammatory limb of the immune response.The journal of maternal-fetal & neonatal medicine :the official journal of the European Association of Perinatal Medicine,the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies,the International Society of Perinatal Obstet;26(14),1384-93.
- [26]Miller AM,Xu D,Asquith DL,Denby L,Li Y,Sattar N,Baker AH,McInnes IB,Liew FY.(2008) IL-33 reduces the development of atherosclerosis.The Journal of experimental medicine;205(2),339-46.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

肿瘤标志物在结直肠癌中的临床应用

张明建

深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

[摘要] 目的: 探讨测定血清中 CEA, CA199, CA242, CA125 四种肿瘤标志物在结直肠癌诊断中的应用价值。**方法:** 采用全自动化学发光法和酶联免疫法检测 62 例结直肠癌患者, 59 例结直肠良性病变患者和 55 例正常健康体检者血清中 CEA, CA199, CA242, CA125 的含量。**结果:** 结直肠癌患者中血清 CEA, CA199, CA242, CA125 四种肿瘤标志物的含量水平和阳性率明显高于良性病变患者和正常健康体检者, 四项肿瘤标志物联合检测的敏感性高于单项检测。**结论:** 在结直肠癌诊断中, 单项检测 CEA, CA199, CA242, CA125 都具有一定的临床价值, 而将四项指标进行联合检测, 更有临床价值。

[关键词] 结直肠癌; 肿瘤标志物; 联合检测

The Clinical Application of Tumor Markers in Colorectal Cancer
Shenzhen New Industries Biomedical Engineering Co., Ltd.

[Abstract] objective: To evaluate the clinical value of the detection of serum CEA,CA199,CA242,CA125 in the diagnosis of colorectal cancer. **Methods:** The serum level of CEA,CA199,CA242,CA125 of 62 patients with colorectal cancer, 59 patients with benign colorectal disease and 55 normal people were detected by using the automatic chemiluminescence immunoassay

and ELISA. **Result:** The levels and positive rates of CEA, CA199, CA242, and CA125 in patients with colorectal cancer were significantly higher than those in the benign colorectal disease group and healthy controls. The sensitivity of combined detection of the four markers higher than that of single tumor marker. **Conclusion:** In the diagnosis of colorectal cancer, the single detection of CEA, CA199, CA242, and CA125 has certain diagnostic value and can be improved by combined detection of the four makers.

[Key words] colorectal cancer; tumor markers; combined detection

结直肠癌是胃肠道消化系统中常见的恶性肿瘤,在我国发病率居胃肠道肿瘤的第二位^[1]。目前结直肠癌的诊断主要通过肠镜和病理检查,常规的体格检查难以发现结直肠早期的疾患,确诊时病情往往已经发展到中晚期^[2]。结直肠癌平均5年生存率在50%左右^[1,3],早期诊断是提高病人生存率的关键。近年来,肿瘤标志物广泛用于肿瘤的筛查,对于肿瘤的早期诊断,监测,及预后判断有重要意义,将其应用到结直肠癌检查中可以避免肠镜等诊断对患者的侵入性伤害,同时便于早期发现结直肠癌病患。血清CEA目前已经广泛应用于结直肠癌的早期诊断和预后判断^[4,5,6],但仅靠单项肿瘤标志物检查存在灵敏度低,容易出现漏检的情况,在实际临床中为了提高检测敏感性和准确性,往往采用联合检测肿瘤标志物。本文通过使用化学发光方法和酶联免疫法检测血清中CEA, CA199, CA242, CA125的含量,探讨其对结直肠癌的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

结直肠癌62例,年龄38-71岁,平均年龄为61.2岁,结直肠癌均经手术或肠镜,病理检查确诊。良性病变组59例,年龄31-75岁,平均年龄为59岁,对照组55例,均系健康体检者,年龄33-72岁,平均56.2岁。

1.2 研究方法

清晨空腹静脉采血2ml,离心后分离血清当日检测或置于-20℃冰箱保存,次日检测。CEA, CA199, CA125含量均采用化学发光法检测,仪器为罗氏全自动化学发光测定仪,试剂为原装专用配套试剂,操作严格按照说明书进行。CA242含量采用瑞典CanAg公司生产的CA242酶联免疫诊断试剂盒测定。四项肿瘤标志物的阳性界定值:CEA >5.0ng/mL, CA199 >37U/mL, CA242 >20U/mL, CA125 >35U/mL。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学处理,实验计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差分析后,采用两样本t检验比较;计量资料采用方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 四项肿瘤标志物血清CEA, CA199, CA242, CA125在各组中的含量的比较结直肠癌组血清CEA, CA199, CA242, CA125水平明显高于良性病变组及健康对照组($P < 0.05$),差异有统计学意义;良性病变组与健康对照组之间差异也有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 3组血清CEA、CA199、CA242和CA125水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	CEA (ng/mL)	CA199(U/mL)	CA242 (U/mL)	CA125 (U/mL)
结直肠癌组	62	45.58 ± 11.23 [△]	174.53 ± 161.01 [△]	98.53 ± 33.04 [△]	69.57 ± 69.01 [△]
良性病变组	59	9.42 ± 4.25 [*]	30.88 ± 14.76 [*]	14.34 ± 6.89 [*]	23.36 ± 21.98 [*]
正常对照组	55	3.49 ± 1.95	12.19 ± 7.99	3.63 ± 1.99	8.59 ± 6.03

注:结直肠癌与其他两组比较 $\Delta P < 0.05$,良性病变组和正常对照组比较 $*P < 0.05$

2.2 四种肿瘤标志物单独及联合检测阳性率比较

结直肠癌组四种肿瘤标志物联合检测比单项检测敏感性有所提高,达80.65%,差异有统计学意义。结果见表2。

表2 4种肿瘤标志物单独及联合检测阳性率[n(%)]

组别	n	CEA	CA199	CA242	CA125	四项联检
结直肠癌组	62	37(59.68)	28(45.16)	28(45.16)	21(33.87)	50(80.65) [△]
良性病变组	59	9(15.25)	8(13.56)	8(13.56)	5(8.47)	13(22.03)
正常对照组	55	2(3.63)	1(1.82)	0(0)	0(0)	3(5.45)

注：与单项检测组相比较， ΔP 值小于0.05。

3 讨论

近年来，我国结直肠癌发病率呈逐年上升趋势^[7]，结直肠癌早期的临床症状无特异性，发现时多为中晚期，结直肠癌的早期诊断主要依赖于肿瘤标志物，肿瘤标志物主要指那些在血液、体液及组织中可检测到的与肿瘤相关的物质，这些物质达到一定的水平时能揭示某些肿瘤的存在并能反映其一定的生物特性^[8]。通常，一种肿瘤可分泌多种肿瘤标志物，而不同的肿瘤亦有可能分泌同种肿瘤标志物，理想的肿瘤标志物应该特异性好，灵敏度高，既能做早期筛查又能够评价肿瘤的治疗效果和预后情况^[8,9]。单独检测一种肿瘤标志物，可能会因为测定方法的灵敏度不够而出现假阴性，目前大部分单一肿瘤标志物的检测，不能满足临床需要，为弥补单一肿瘤标志物可能出现的敏感性不足，在临床中主要通过肿瘤标志物的联合检测提高阳性率，避免临床上的漏诊。因此，本文选用 CEA，CA199，CA242，CA125 四项肿瘤标志物对结直肠癌进行联合检测，探讨该检测模式在结直肠癌早期筛查中的诊断价值。

目前，CEA 是结直肠癌临床应用中最广泛的肿瘤标志物，血清 CEA 浓度增高程度同 Dukes 分期正相关，CEA 在结直肠癌中的敏感性约为 31.3%-77.0%。^[1,10]本文中 CEA 在 62 例结直肠癌中阳性率为 59.68%，59 例良性病变组中 CEA 阳性率为 15.25%，55 例正常对照组中 CEA 阳性率为 3.63%，结直肠癌和良性病变、正常对照组有显著性差异，表明 CEA 对结直肠癌有诊断价值。

糖类抗原是临床中常用的肿瘤标志物，细胞癌变时，会导致细胞表面的糖类的变化，而在正常组织中糖类抗原含量极微。CA199 是一种类黏蛋白的糖蛋白成分，在消化道肿瘤患者中血清 CA199 可明显升高，目前多用于胰腺癌的诊断。在本文中结直肠癌组中 CA199 水平含量和阳性率明显高于良性病变组合正常对照组，且阳性率将近 50%，这与赵明^[11]等报道的文献一致。CA242 是一种唾液酸化的糖类抗原是结直肠癌和胰腺癌中常用的肿瘤标志物，有报道血清 CA242 结直肠癌诊断具有更好的特异性和敏感性^[12]，在本文中 CA242 的阳性率为 45.16%，表面血清 CA242 对结直肠癌的诊断有参考价值，同时刘文芳^[13]报道在胰腺癌，胆系癌病人中 CA242 也表现为较高的阳性率，但可以通过三维螺旋，CT 胆胰成像等手段，排除胰腺，胆系肿瘤，因此，CA242 的应用需要结合影像学等手段综合判断。CA125 是在卵巢癌临床应用中最为广泛的肿瘤标志物，用于卵巢癌的早期筛查，鉴别诊断和疗效观察等方面。但亦有文献报道 CA125 在消化道肿瘤中也会出现升高^[14,15]，在本文中 CA125 在结直肠癌中的阳性率为 33.87%，跟良性病变和正常对照组有显著性差异，表明 CA125 也可作为结直肠癌诊断的辅助指标。

本研究结果显示：结直肠癌中 CEA，CA199，CA242，CA125 的含量水平和阳性率都明显高于良性病变组和正常对照组，其差异有统计学意义($P < 0.05$)，说明该四项肿瘤标志物在结直肠癌的临床诊断中都有一定的诊断价值，使用四项肿瘤标志物进行联合检测后，联合检测的阳性率为 80.65%，能提高对结直肠癌患者的检出率，弥补了单项肿瘤标志物检测敏感性差的缺点。但目前联合诊断在提高灵敏度的同时会出现一定程度的特异性下降，为提高诊断的准确性，避免假阳性结果干扰临床判断，在联合检测的同时应该密切联系临床表现，结合影像学 and 病理组织学予以综合判断。

综上所述，CEA，CA199，CA242，CA125 四项肿瘤标志物在结直肠癌的临床诊断中都有一定的临床参考价值，其中单项检测肿瘤标志物时，CEA 在结直肠癌诊断中阳性率最高为 59.68%，将四项肿瘤标志物进行联合检测后，能提高检出率达到 80.65%，可以弥补单项检测敏感性的不足，提高结直肠癌的早期诊断率。

参考文献

- [1]李岩.合理应用结直肠癌血清肿瘤标志物的临床检测[J].中华医学杂志,2008,88(29):2023-2024.
- [2]李明,顾晋.中国结直肠癌 20 年来发病模式的变化趋势[J].中华胃肠外科杂志,2004,7(3):214.
- [3]郭琳,陈建青,李洁星.结直肠癌患者 CEA、CA199、CA242 的检测及临床意义[J].医学临床研究,2010,27(6):1119-1120.
- [4]杨雪梅,左向华,孙士欣.等.3 项血清肿瘤标志物检测在结直肠癌诊断中的意义[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2107.
- [5] Carpelan Holmstrom M,Louhimo J,Stenman UH,et al.Estimating the probability of cancer weith several tumor markers in patients with colorectal diseas[J].Oncology,2004,66(4):296-302.

- [6]赵先文,江波,韩存芝,等.大肠癌患者血清肿瘤标志物含量测定与临床研究[J].中华肿瘤杂志,2005,27(5):286-288.
- [7] 叶任高,陆再英.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2005:418.
- [8]Mohamed A, Virji Donald W, Mercer Ronald B. Herberman Tumor markers in cancer diagnosis and prognosis[J]. CA CANCER J CLIN, 1988, 38(2): 104-126.
- [9]Visintin I, Feng Z, Longton G, et al. Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. [J]. Clin Cancer Res. 2008, 15; 14(4): 1065-72.
- [10]建平,杨祖立,王磊,等.结直肠癌临床病理特征与预后的多因素回归分析[J].中华肿瘤杂志,2003,25(1):59-61.
- [11]赵明,季晓鹏,于璟,等.血清 CA199, CA242 和 CEA 检测结直肠癌的临床评价[J].放射免疫性杂志,2006,19(2):130.
- [12]Kuusela P, Hagland C, Roberts PJ. Comparison of a new tumor marker CA242 with CA199, CA50 and CEA in digestive tract disease[J]. Dis Colon Rectum, 1996, 39(7): 799-805.
- [13]刘文芳,范跃祖,邹松海.血清 CA242 检测在结直肠癌中的临床价值[J].中国癌症杂志,2001,11(6):519-521.
- [14]郭巍,赵春明,赵岩峰.七种肿瘤标志物联检在结直肠癌诊断中的应用体会[J].标记免疫分析与临床,2013,20(6):473-474.
- [15]仲召阳,王东,李增鹏,等.多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统对结直肠癌诊断的临床意义[J].重庆医学,2007,36(23):2406-2408.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

抗 Eppin 抗体对成熟精子的损伤及其凋亡

刘萍^{1,2} 向代军¹ 陈运霞^{1,2} 薛丹丹¹ 张帆¹ 孙崇云^{1,3} 王策^{1,3} 梁臻龙^{1,3} 刘晓婷¹ 王成彬¹

1 中国人民解放军总医院临床检验科 北京 100853 2 河北北方学院研究生部 河北 张家口 075000 3 温州医科大学检验医学院、生命科学院 浙江 温州 325035

*通讯作者: wangcb301@126.com

[摘要] **目的:** 研究抗附睾蛋白酶抑制剂 (Eppin) 抗体对人成熟精子常规指标及其凋亡情况的影响, 从而探讨 Eppin 抗体对精子的损伤机制。 **方法:** 将正常男性精液标本经过精子培养液 BWB 稀释为 $20 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ 后分为 7 组: 空白对照组、兔 IgG 抗体组和不同浓度抗 Eppin 抗体组 (浓度分别为 2.5、5、10、20 和 40 ug ml^{-1}) 共同孵育 4h 后, 检测精子活力、精子凋亡率以及精子线粒体膜电位的改变。 **结果:** 当抗 Eppin 抗体浓度达到 5 ug ml^{-1} 后, 精子发生明显的凋亡, 浓度达到 20 ug ml^{-1} 后, 精子的动力降低, 同时在随着抗 Eppin 抗体浓度的增高, 会发现线粒体膜电位的降低。 **结论:** 抗 Eppin 抗体作为抗精子抗体的一种, 当其浓度比较低时, 不会对精子的动力造成明显影响。但当到达某一浓度时, 会对精子产生损伤作用。

[关键词] 抗 Eppin 抗体; 精子活性运动; 精子凋亡; 线粒体膜电位

[Abstract] objective: To research the effect of anti-Eppin antibody on the mature sperm motility and sperm apoptosis, and explore the mechanism of anti-Eppin antibody damage the mature sperm. **Methods:** we collected normal semen and adjusted the concentration of $20 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ using sperm culture solution BWB. We set seven groups: blank control group, rabbit IgG antibody group and different concentration of anti-Eppin antibody group (the concentration are 2.5、5、10、20 and 40 ug ml^{-1}), and incubated for 4 h at 37°C , then detected the sperm motility, sperm apoptosis and mitochondrial membrane potential. **Resultes:** Sperm have a significant apoptosis when the concentration of anti-Eppin antibody reach 5 ug ml^{-1} . Sperm motility will decline when the concentration of anti-Eppin antibody reach 20 ug ml^{-1} . Also we can observe the reduction of mitochondrial membrane potential. **Conduction:** anti-Eppin antibody as an anti-sperm antibody, will not damage the sperm motility in the low concentration, but will injure the sperm when the anti-Eppin antibody reach an certain concentration.

[Key word] anti-Eppin antibody, sperm motility, sperm apoptosis, mitochondrial membrane potential

WHO 将不孕不育定义为育龄夫妇有正常性生活、不采取任何避孕手段 1 年而未能受孕或生育^[1]。而我国将时间界限规定为两年, 据统计, 在我国已婚夫妇中不孕不育约占 10%-15%, 其中不孕不育症中男方原因约占 35%-40%^[2]。引起不孕不育的原因很多^[3], 主要有生殖器官畸形等器质性病变、微生物感染和免疫因素等三大方面。近年来, 免疫性不孕不育逐渐受到重视, 其中抗精子抗体 (AsAb) 导致的不孕不育是免疫性不孕不育的一个重要因素。AsAb 会造成男子受精能力的下降, 在男性不育患者中, 大约有 5%-15% 的人检测出有抗精子抗体的存在^[4], 且不育男性血清和精浆中都存在 AsAb, 但精浆中 AsAb 比血清中 AsAb 对生育力的影响更为重要^[5]。AsAb 引起男性不育的机制是多方面的, 由于 AsAb 成分及其复杂, 其对不同生育环节的作用机制和特异抗原仍然不能确定, 因此进一步研究特定的精子抗原以及它所对应的抗体的特性和对生育的作用机制, 将对免疫性不育的研究具有重要意义。抗附睾蛋白酶抑制剂 (Eppin) 抗体是 AsAb 的一种。有研究发现抗 Eppin 抗体阳性的精液中精子的活性运动明显受到抑制。精子受到抗 Eppin 抗体损伤后导致精子活性运动下降, 从而影响男性生育力^[6]。细胞凋亡是由基因调控的主动的细胞死亡过程, 是一种重要的生理现象, 正常精子的发生过程中同样也存在生精细胞的凋亡^[7]。细胞凋亡失调可导致多种疾病的发生, 并且某些因素会影响精子凋亡, 如 NO^[8]。本文将研究精子在抗 Eppin 抗体作用下精子活动性的改变及其对精子凋亡的影响。

1 材料和方法

精液标本: 收集有生育力、常规检测后各项指标均符合 WHO 正常精液标准且抗精子抗体阴性的男性精液用于本实验研究。用 BWW 将精液标本稀释为 20×10^6 后分为 7 组: 空白对照组、兔 IgG 抗体组和不同浓度 Eppin 抗体组 (浓度分别为 2.5、5、10、20 和 40 ug ml^{-1}) 置于 37°C 生化培养箱中共同孵育 4h。

试剂: anti-Eppin antibody (Santacruz)、兔 IgG 抗体 (索莱宝)、精子培养液 BWW (GENMED)、Annexin V 凋亡检测试剂盒 (BD 公司)、JC-1 线粒体检测试剂盒。

1.1 方法:

1.1.1 精液计算机辅助分析检测常规指标

将孵育后的精液进行常规指标检测, 观察精子运动能力的变化情况。

1.1.2 Annexin V 试剂盒检测精子凋亡

按照试剂盒说明书的操作步骤进行检测。简单来说, 将精子用 PBS 洗涤两次后用孵育缓冲液重悬为 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 的精子重选液, 取 100ul 加入 5ml 的培养管中, 加入 FITC-Annexin V $5 \mu\text{l}$ 和 PI $5 \mu\text{l}$ 染色, 室温下 (25°C) 避光静置 15 min 后加 400 μl 孵育缓冲液, 1 h 内流式细胞仪测定结果。通过 Annexin V-FITC /PI 染色, 精子群体可被分为 4 个亚群: 左下象限显示的是 Annexin V-/PI-精子, 即无磷脂酰丝氨酸 (PS) 外显的活精子; 右下象限显示的是 Annexin V+/PI-精子, 即有 PS 外显的早期凋亡的活精子; 右上象限显示的是 Annexin V+/PI+精子, 即有 PS 外显的晚期凋亡精子; 左上象限显示的是 Annexin V-/PI+精子, 即无 PS 外显的死精子。

1.1.3 JC-1 试剂盒检测精子线粒体膜电位

按照试剂盒说明书的操作步骤进行检测。简单来说, 在精子孵育 4h 后, 取 100ul 精液标本用 BWW 稀释为 1ml, 常温下 400g 离心 5 分钟, 小心弃去上清液, 加入 0.5ml 新鲜配置的 JC-1 工作液进行重悬, 然后再 37°C 恒温箱中孵育 10-15 分钟, 加入 2ml 的 $1 \times$ 分析缓冲液并混匀, 400g 离心 5 分钟, 小心弃去上清液。再加入 1ml 的 $1 \times$ 分析缓冲液并混匀, 400g 离心 5 分钟, 小心弃去上清液。最后加入 0.5ml 的 $1 \times$ 分析缓冲液混匀后, 上流式细胞仪进行检测。

1.2 统计分析

采用 EXCEL 软件进行数据录入及统计分析, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

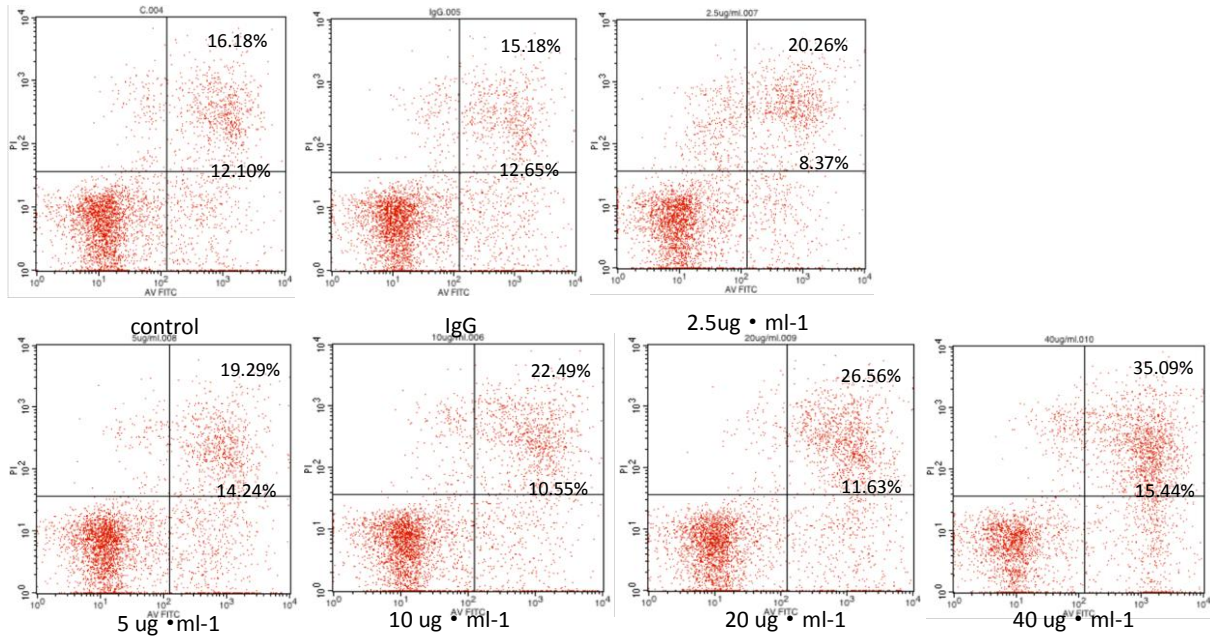
2.1 20 和 40 ug ml^{-1} 抗 Eppin 抗体能降低精子的运动能力

将 2.5、5、10、20 和 40 ug ml^{-1} 抗 Eppin 抗体与精子共同孵育 4 h 后, 测定精子动力, 结果发现抗 Eppin 抗体浓度为 2.5、5、 10 ug ml^{-1} 时, 精子的存活率和前向性运动精子所占比率的改变均无统计学意义; 当抗 Eppin 抗体浓度为 20 和 40 ug ml^{-1} 时, 精子存活率和前向性运动精子所占比率明显降低, 具有统计学意义。

2.2 5、10、20 和 40 ug ml^{-1} 抗 Eppin 抗体能够促使精子发生凋亡

精子凋亡检测结果发现, 抗 Eppin 抗体浓度为 5、10、20 和 40 ug ml^{-1} 时, 精子凋亡的改变具有统计学差异 (图一),

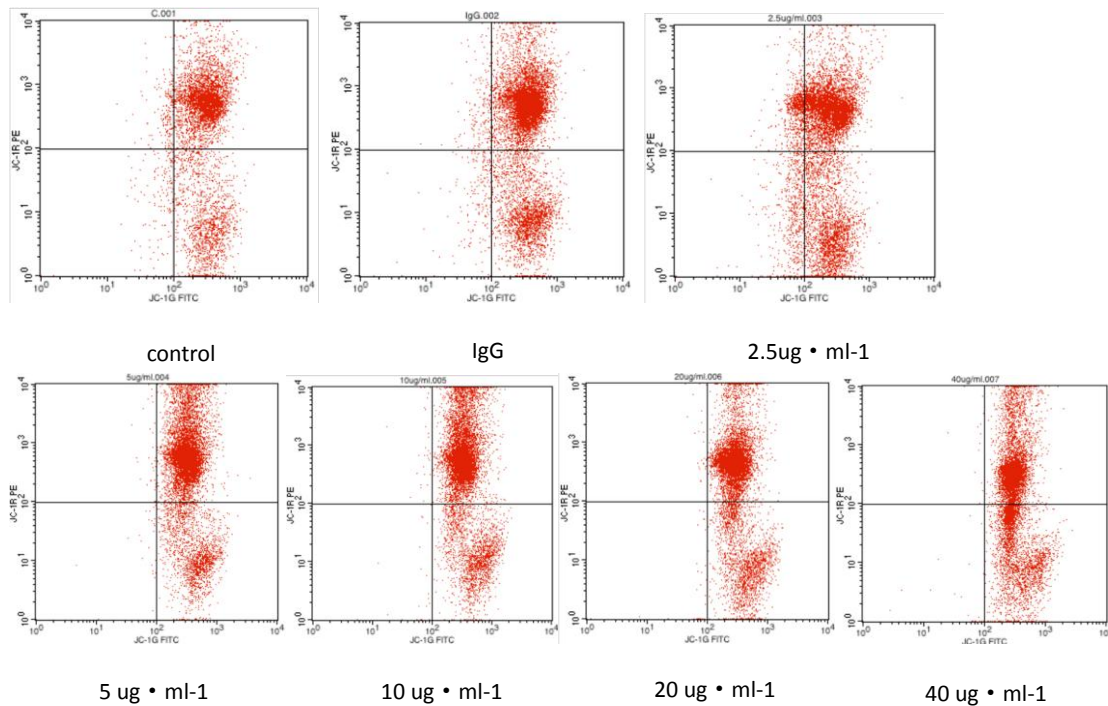
精子凋亡加重, 表明抗 Eppin 抗体能够促进精子发生凋亡。



图一 不同浓度抗 Eppin 抗体对成熟精子凋亡的影响

2.3 抗 Eppin 抗体能够导致线粒体膜电位降低

抗 Eppin 抗体浓度为 2.5、5、10、20 和 40ug ml⁻¹ 时, 均能观察到流式图细胞团的下移 (图二), 即精子线粒体膜电位的降低。



图二 不同浓度抗 Eppin 抗体对成熟精子线粒体膜电位的影响

3 讨论

AsAb 是由精子和精子膜抗原诱发集体产生的特异性抗体, 其主要成分为 IgM、IgA 和 IgG, 分存在于血液中的 IgM 和 IgG 循环精子抗体和存在于生殖道和新鲜精子表面附着的 IgA 和 IgG 的局部精子抗体^[9-10]。研究发现血清中出

现 AsAb 并不意味着在精液中也出现 AsAb, 所以精浆的 AsAb 检测比单纯血清中的 AsAb 检测更有临床价值。精液中 AsAb 与男性生育力降低的密切关系已经得到了公认, 但损伤精子的抗体浓度仍需进一步研究。

在本研究中我们在精液标本中加入不同浓度梯度的抗 Eppin 抗体, 共同孵育 4h 后对精子常规指标进行检测发现, 当抗 Eppin 抗体为 20 和 40ug ml⁻¹ 时, 精子存活率和前向性运动精子所占比率明显降低, 说明低浓度的抗 Eppin 抗体不会使精子的常规指标发生显著性的改变。因此抗精子抗体是需要达到一定浓度才会使精子的运动活性发生改变。精子凋亡检测发现抗 Eppin 抗体浓度为 5、10、20 和 40ug ml⁻¹ 时精子的凋亡和精子线粒体膜电位发生显著性改变。因此与常规检测结果对比发现, 当抗 Eppin 抗体浓度为 5ug ml⁻¹ 时, 导致精子发生了凋亡, 但是精子的常规检测指标并没有发生显著性改变, 表明常规检测对精液质量评估具有重要意义, 但同时存在一定的局限性。

低浓度抗 Eppin 抗体(如 2.5ug ml⁻¹)对精子的常规指标和精子凋亡都没有产生显著性的影响。在一定程度上也说明了精子存在自我保护机制^[11]。对于轻微的损伤, 精子能够通过保护机制从而维持精子正常。随着自噬在许多疾病中研究的深入, 发现自噬是一个降解坏死细胞器和变性蛋白质的过程, 是细胞通过双层膜包裹待降解物形成自噬体, 然后运送到溶酶体形成自噬溶酶体, 从而降解其所包裹的内容物, 实现细胞本身的代谢需要和细胞器的更新。因此我们猜想在抗 Eppin 抗体损伤精子的过程中, 精子内是否也发生了自噬或是通过加强精子自噬, 从而对精子起到保护作用。这将是下一步的研究方向, 通过损伤精子研究精子内自噬的发生以及其发生自噬与精子凋亡之间的关系。通过进一步研究, 从而更好地解释和了解精子在 AsAb 损伤时的相关机制。

参考文献

- [1] 丰有吉, 沈铿. 妇产科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 394.
- [2] 金明兰, 王伟杰. 中医防治亚健康状态的思路和方[J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1301-1302.
- [3] 张丽珠. 临床生殖内分泌与不育症[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [4] Bohring C, Krause W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto) immunity. The value of proteomic analysis[J]. Hum Reprod, 2003, 18(5): 915-924.
- [5] 李宏君, 郭应禄, 王彦, 等. 精浆及血清抗精子抗体的比较研究[J]. 生殖与避孕, 1997, 17(5): 308.
- [6] 王增军, 张炜, 等. 附睾蛋白酶抑制剂 Eppin 的研究进展[J]. 中华男科学杂志, 2007, 02: 017.
- [7] Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, et al. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. Exp Cell Res 1993; 09(2): 238-247.
- [8] 张玮, 张辉, 边淑玲, 等. NO 对抗精子抗体阳性大鼠精子凋亡的影响. 中国男科学杂志 2003, 17(6): 384-386.
- [9] 施云飞, 茅拥军. 不育症患者抗精子抗体检测及其临床评价[J]. 中国男科学杂志, 1995, 9(2): 117-119.
- [10] 楚稚玲, 岳林. 精子表面抗精子抗体与不育男性精液参数的临床分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2004, 12: 162-164.
- [11] Moore, M.N., Allen, J.I., Somerfield, P.J., 2006. Autophagy: role in surviving environmental stress. Mar. Environ. Res. 62(Suppl), S420-S425.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

维生素 D 对 T2MD 患者血糖控制及炎性因子的影响

李晋

[摘要] **目的:** 探讨给予 2 型糖尿病(Type II Diabetes Mellitus, T2MD)患者额外补充维生素 D(Vitamin D, VD), 对 T2MD 患者的血糖控制以及炎性因子表达的影响。**方法:** 按照纳入标准, 选择本院 T2MD 患者 106 例, 按照随机数字表法分为实验组 55 例, 对照组 51 例。两组患者均经常规糖尿病基础治疗, 实验组在基础治疗的同时, 给予额外补充 VD, 对照组给予相同计量的安慰剂。观察治疗 3、6 个月后两组患者的血糖控制情况以及炎性因子的变化。**结果:** 补充 VD 治疗 3、6 个月后, 实验组患者体内 VD 代谢产物 25(OH)VD 水平上升, 与对照组相比, 差异具有统计学意义

($P=0.000$)。此外, 治疗 3 个月后, 实验组和对照组 FBG、餐后 2h 血糖以及糖化血红蛋白(HbA1c)均有一定程度的下降, 而实验组下降程度大于对照组, 同时实验组空腹胰岛素水平高于对照组, 治疗 6 个月之后, 实验组 FBG、餐后 2h 血糖、空腹胰岛素水平以及 HbA1c 与对照组比较, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。实验组与对照组治疗后 Ca^{2+} 水平有所提高, 但差异无统计学意义($P=0.082$)。进一步对两组的炎症因子检测结果显示, 治疗 6 个月后两组 CRP、IL-6 以及 TNF- α 均有所下降, 而实验组 CRP、IL-6 低于对照组, 差异具有统计学意义, $P<0.05$ 。**结论:** 额外补充 VD, 提高了患者体内 VD 水平, 改善了 T2MD 患者的血糖控制, 并有效降低了患者的炎症因子水平。

[关键词] VD; T2MD; 血糖控制; 炎症反应

Effect of Vitamin D on glyceimic control and inflammatory level of type 2 diabetes mellitus

[Abstract] Objective: To explore the Effect of Vitamin D on glyceimic control and inflammatory reaction of type 2 diabetes mellitus (T2MD) by extra supplementation. **Methods:** 106 cases of T2MD meeting the criterion were chosen and randomly divided into treatment group (55cases) and control group (51 cases). Treatment group was given extra vitamin D supplements; the control group was given corresponding placebo. After three/six months treatment, the glyceimic control and inflammatory reaction were analyzed. **Results:** After three/six months treatment, the level of 25(OH)VD of treatment group were significantly higher than control ($P<0.05$). Besides, three months treatment decreased FBG, 2h postprandial blood glucose (PBG), and HBA1C, and increased the insulin level, the degrees of treatment group were greater than control; after six months treatment, meanwhile the differences between treatment group and control were statistically significant($P<0.05$). Moreover, Ca^{2+} level was increased, there was no statistical difference between two groups ($P=0.082$). Inflammatory factors of CRP, IL-6 and TNF- α were decreased after treatment, the differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusions:** Vitamin D supplementation improves the glyceimic control and inflammatory reaction of type 2 diabetes mellitus.

[Key words] Vitamin D; type 2 diabetes mellitus; glyceimic control; inflammatory reaction

目前糖尿病在全球范围内严重威胁着人类健康, 我国糖尿病患者约达 1.14 亿, 约占我国成年人口的 11% 左右, 预计在 2030 年可达 4.39 亿^[1, 2], 因此对于糖尿病治疗的探讨意义重大。而 T2MD 约占糖尿病总人数的近 90%, 主要是因胰岛素抵抗导致糖耐量受损而引起。胰岛素抵抗是指机体对胰岛素敏感性减低, 导致脂肪组织以及骨骼肌对葡萄糖摄取的速度下降, 并进一步加速了肝脏对葡萄糖的释放, 以及脂肪组织对游离脂肪酸的释放, 导致体内游离脂肪酸以及血糖含量上升。高血糖症是糖尿病患者最直接的症状, 对其中有 50% 左右的 T2MD 患者血糖控制不满意, 而血糖控制的不佳可增加机体发生微血管和动脉血管并发症的风险, 因此如何促进血糖控制在稳定范围一直是 T2MD 治疗和研究的重点^[3, 4]。另一方面, Joachim Spranger 等学者研究发现, 炎症反应在 T2MD 发病与发展过程中都具有重要作用, 尤其是白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子, 不仅是 1 型糖尿病发病的原因, 还与心血管疾病、动脉粥样硬化、冠心病等并发症的发生均具有相关性^[5], 此外, Vinagre 等人研究发现, T2MD 患者, 尤其是患有高低密度脂蛋白血症以及肥胖症的 T2DM 患者, 均具有较高的炎症因子水平, 而血糖控制的改善能够降低血清转化生长因子(TGF- β 1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等炎症因子的水平, 进一步改善 T2DM 患者的预后, 降低并发症发生的概率^[6]。

VD (Vitamin D, VD)为一类人体必须的固醇类衍生物, 能够促进机体对钙磷的吸收。有学者研究发现, T2DM 患者体内存在 VD 水平降低的现象, 提出 VD 体内稳态的失衡可能促进 T2DM 的进一步发展^[7, 8]。Anastassios G. Pittas 通过进一步对 T2DM 患者体内 VD 水平与 T2DM 相关性分析发现, VD 水平不足可能对血糖代谢具有不良的影响^[7]。然而, 额外补充 VD 能够改善 T2DM 患者的血糖控制以及体内炎症反应目前尚不清楚, 因此本文以本院 T2DM 患者为研究对象, 给予观察组补充 VD, 对照组给予同等计量的安慰剂, 分析 VD 对 T2DM 血糖控制以及炎症反应的影响。

1 资料与方法

1.1 一般临床资料

本实验为随机双盲实验。首先患者知情同意, 自愿参与, 签署书面知情同意书。选择 22-70 岁 T2DM 患者, 诊断标准: 1, 具有典型糖尿病的症状, 且任何时间, 静脉血浆葡萄糖(GLU) ≥ 11.1 mmol/L; 2, 空腹血糖(Fasting Plasma Glucose, FPG) ≥ 7.0 mmol/L; 3, 糖耐量实验(OGTT), 口服葡萄糖(75 g 无水葡萄糖) 2h 静脉血糖 ≥ 11.1 mmol/L; 空腹

指至少 8 h 未摄入热量。当患者符合以上标准的任意一项,且需 2 次检验结果符合以上条件,则确诊为糖尿病。纳入标准: T2DM 患者; 肾功能正常; 糖化血红蛋白(glycated hemoglobin, HbA1c) $\geq 6\%$ (42 mmol/mol); 伴 VD 缺乏症(血清 25(OH)VD < 20 ng/mL); 胰岛素抵抗, 胰岛素抵抗指数(HOMA-IR) ≥ 2 ; 口服降糖药物至少 30 天。排除标准: 排除已知患有心、脑血管等严重疾病、慢性肝病、尿蛋白(> 3.5 g/24 hours)的患者; 患有自身免疫疾病或炎症性疾病患者、6 个月内患有心肌梗死患者; 患有充血性心力衰竭的患者; 现有消化系统疾病患者; 高血钙症(血清 $Ca^{2+} > 10.2$ mg/dL)患者; 患有原发性甲状旁腺疾病或使用 VD 活性类似物、糖皮质激素、抗癫痫、卡马西平、地高辛、消胆胺或奥利司他的患者; 排除使用胰岛素的患者以及不愿参与本次研究的患者。

最终纳入 T2DM 患者 106 例, 其中男 58 例, 女 48 例。按照随机原则, 分为观察组 55 例, 对照组 51 例。

1.2 方法

将所有入选患者, 按照随机原则分为对照组和观察组, 观察组。在饮食调理、运动调理, 非胰岛素类药物治疗以纠正代谢紊乱, 消除症状等的基础上, 观察组给予口服 VD3(5000 IU/d), 对照组给予相同剂量的安慰剂(主要成分为蒸馏水、淀粉等, 无 VD 成分, 外形与 VD 相同), 各治疗 6 个月。VD 与安慰剂外表相同, 研究对象对于服用的是安慰剂还是 VD 并不知情。两组的运动、饮食调理等状况相近, 因此观察组额外的 VD 补充后, 与对照组进行数据差异的比较, 能够反映 VD 对 T2DM 患者的影响状况。

1.3 观察指标的测定

采用化学发光免疫法进行血清 25(OH)VD、胰岛素和 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的检测, 方法按照深圳市新产业生物医学工程股份有限公司试剂盒说明书操作方式进行操作, 试剂盒为化学发光免疫法试剂盒, 仪器为化学发光免疫测定仪, 型号为 MAGLUMI4000, 均由深圳新产业生物医学工程股份有限公司提供。

采用全自动生化分析仪进行静脉空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG)、 Ca^{2+} 水平的检测。采用全自动高效液相方法进行糖化血红蛋白(HbA1c)测定。应用酶标仪以及酶联免疫试剂盒进行血清 IL-6、TNF- α 的测定。各项指标均于患者治疗前, 以及治疗 3 个月、6 个月后进行检测。

1.4 统计学分析

所有数据采用统计学软件 SPSS16.0 进行分析, CRP、IL-6、TGF- $\beta 1$ 等计量数据采用平均值 \pm 标准差的方式表示, 对各观察值之间进行 t 检验法比较, $P < 0.05$ 时, 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者治疗前、治疗后 3、6 个月 VD 含量

治疗前, 两组患者 25(OH)VD 及之间均无统计学差异。治疗 3、6 个月后, 观察组患者 25(OH)VD 升高, 与对照组相比, 差异具有统计学意义, $P < 0.05$ (见表 1)。

表 1 两组患者治疗前、治疗后 3、6 个月 VD 含量测定

	25(OH)VD (nmol/L)		
	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月
观察组	26.73 \pm 4.12	90.75 \pm 2.26	93.08 \pm 2.61
对照组	30.15 \pm 4.68	29.88 \pm 6.14	29.12 \pm 6.25
P 值	0.773	0.000	0.000

2.2 两组患者治疗前、治疗后 3、6 个月血糖控制

治疗前, 两组之间 FBG、餐后 2h 血糖、空腹胰岛素水平以及 HbA1c 相比, 均无统计学差异, $P > 0.05$ 。治疗 3 个月后, 对照组 FBG、餐后 2h 血糖以及 HbA1c 均有一定程度的下降, 可见饮食调理、运动调理等在一定程度上改善了患者的临床表现, 此外实验组血糖控制各指标的下降程度大于对照组, 提示 VD 的额外补充, 改善了患者的血糖控制情况。治疗后 3 个月, 两组患者空腹胰岛素水平均有所升高且观察组高于对照组, 然而组间比较, 差异均无统计学意义, $P > 0.05$, 提示治疗后 3 个月, VD 的额外补充, 对空腹胰岛素水平的影响不大。

治疗 6 个月之后, 观察组 FBG、空腹胰岛素水平、餐后 2h 血糖以及 HbA1c 组间比较差异具有统计学意义, $P < 0.05$, 提示与常规饮食、运动以及调理控制相比, VD 的额外补充能够进一步促进 FBG, 空腹胰岛素水平以及 HbA1c 的改善, 提高对 T2DM 患者的血糖控制(见表 2)。

表 2 治疗前、治疗后 3、6 个月血糖控制情况

		观察组	对照组	P 值
空腹胰岛素, uIU /mL	治疗前	8.71 ±3.13	8.62 ±4.18	0.856
	治疗 3 个月	12.33 ±3.65	10.58 ±3.12	0.136
	治疗 6 个月	14.58 ±4.02	10.16 ±3.31	0.035
FBG, mmol/L	治疗前	9.4 ±1.2	9.5 ±1.6	0.923
	治疗 3 个月	8.3 ±2.1	8.9 ±1.8	0.082
	治疗 6 个月	7.4 ±1.5	8.7 ±1.8	0.026
餐后 2h 血 糖, mmol/L	治疗前	13.45 ±4.28	13.62 ±4.76	0.791
	治疗 3 个月	11.24 ±4.17	11.82 ±4.86	0.524
	治疗 6 个月	8.33 ±3.25	9.86 ±4.12	0.037
HbA1c, %	治疗前	8.58 ±1.45	8.64 ±1.77	0.852
	治疗 3 个月	7.13 ±1.12	7.54 ±1.02	0.463
	治疗 6 个月	6.21 ±0.65	7.32 ±1.21	0.034

2.3 治疗前、治疗后 3、6 个月 Ca^{2+} 水平

治疗 3 个月后 Ca^{2+} 水平有所提高, 并在治疗 6 个月显著提高, 但与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P=0.082$)

2.4 两组之间补充 VD 对其炎性因子的影响

检测炎性因子的情况显示, 治疗前 CRP、IL-6 以及 TNF- α 两组间比较差异无统计学意义, 治疗后 3 个月 CRP、IL-6 以及 TNF- α 均有所下降, 但是组间比较差异无统计学意义, $P>0.05$; 治疗 6 个月后, CRP、IL-6 以及 TNF- α 均下降, CRP、IL-6 组间比较差异具有统计学意义, $P<0.05$, 但是 TNF- α 差异无统计学意义 $P>0.05$ (见表 3)。

表 3 治疗前、治疗后 3、6 个月 Ca^{2+} 水平的改变

	Ca^{2+} (mmol/L)		
	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月
观察组	7.85 ±1.43	8.76 ±1.58	9.42 ±2.13*
对照组	8.16 ±2.41	8.77 ±1.55	8.96 ±2.28
P 值	0.754	0.315	0.082

注: 与治疗前相比, * $P=0.003$ 。

表 4 两组之间 VD 对其炎性因子的影响分析

	CRP, ng/mL			IL-6, ng/L			TNF- α , pg/mL		
	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月	治疗前	治疗 3 个月	治疗 6 个月
观察组	9.6 ±2.1	7.6 ±1.8	5.4 ±1.5	15.2 ±5.4	11.1 ±4.4	7.3 ±4.7	54.8 ±6.7	50.4 ±6.8	48.6 ±4.8
对照组	9.2 ±1.5	8.3 ±2.2	7.3 ±1.8	16.3 ±4.2	12.3 ±5.3	10.4 ±5.5	55.9 ±5.2	51.8 ±8.2	50.5 ±7.5
P 值	0.557	0.428	0.026	0.842	0.214	0.023	0.643	0.753	0.076

3 讨论

VD 的缺乏在糖尿病疾病中受到了越来越多的关注, Zeitz 等通过小鼠实验证实, 当小鼠缺失 VD 受体后, 表现出胰岛素分泌功能以及敏感性的降低, 证实小鼠体内 VD 确实与胰岛素功能具有密切联系^[9]。并且, 在人类胰岛素受体基因中已经发现了 VD 的效应元件^[10], 那么, 是否体外补充 VD, 对于改善糖尿病患者胰岛素水平以及对血糖的控制有效果目前尚不清楚。

本文通过给予 VD 缺乏的 T2MD 患者补充 VD 或安慰剂, 结果显示, 观察组患者体内 25(OH)VD 水平得到了显著的提高。证实额外补充 VD 能够有效提高机体 VD 的水平。

而前期研究发现, 25(OH)VD 在肾线粒体单氧化酶作用下, 可经羧基化作用, 转变为 1,

25-(OH)₂-VD₃(1,25-dihydroxy vitamin d)。1,25 (OH)₂VD₃ 可剂量依赖的促进人类 U-937 细胞胰岛素受体表达,并进一步提高胰岛素对葡萄糖转运的能力^[11]。因此本文进一步对患者的胰岛素、FBG、餐后 2h 血糖以及 HbA_{1c} 进行检测分析,发现 25(OH)VD 水平的提高,可进一步影响患者体内空腹胰岛素的水平,在 6 个月检测时与对照组相比有显著的提高,并且 FBG、及 HbA_{1c}、餐后 2h 血糖也有了显著的改善。研究证实,胰岛素原可通过内切酶的内切转化为胰岛素,而 VD 具有调节胰岛素原内切酶活性的功能,可 Ca²⁺ 依赖的激活肽链内切酶的活性。因此进一步检测了 Ca²⁺ 的水平,结果显示,补充 VD 后患者体内 Ca²⁺ 的水平有了一定的提高,且与治疗前相比,差异显著,提示 VD 有可能通过 Ca²⁺ 依赖的激活肽链内切酶的活性,提高了血液胰岛素水平,进而改善了患者对血糖的控制,这一点尚待进一步证实。此外, Ca²⁺ 水平与对照组相比差异无统计学意义(P=0.082),可能与样本量、每次检测时间以及患者的其他因素相关,在今后研究中,可通过加大样本量、进一步控制测定时间、改变统计学方法等进行改善。

CRP、IL-6 以及 TNF- α 等炎症反应因子与 T2DM 的发生和发展均具有重要相关性。研究显示,CRP、TNF- α 与早期糖尿病以及妊娠期糖尿病患者的胰岛素抵抗相关^[12, 13]。血糖控制的改善,能够进一步改善 T2DM 患者体内的炎症因子水平,并进一步改善患者预后^[6]。本文通过进一步研究发现,在六个月后,VD 缺乏的 T2DM 患者炎症因子分析显示,对照组各炎症因子水平有所改善,提示常规运动、饮食等调理有益于改善患者体内炎症因子水平,而观察组补充 VD 后,CRP、IL-6、TNF- α 在 3 个月、6 个月均有了一定的改善,且 CRP、IL-6 在 6 个月时检测与对照组相比差异显著,提示 VD 可能通过控制血糖,进而改善了患者体内的炎症反应。

综上所述,通过给予 VD 缺乏的 T2DM 患者补充 VD 可通过提高患者体内 25(OH)VD 水平,促进 1,25 (OH)₂VD₃ 的水平上升,可能通过 Ca²⁺ 依赖的激活肽链内切酶的活性促进胰岛素水平上升,进而改善 FBG、餐后 2h 血糖以及 HbA_{1c},改善血糖的控制,并改善患者体内炎症反应。

参考文献

- [1]Li L,Chen J,Wang J,et al.Prevalence and risk factors of diabetic peripheral neuropathy in Type 2 diabetes mellitus patients with overweight/obese in Guangdong province,China.Primary care diabetes,2014.
- [2]Jiao FF,Lam CLK,Fung C,et al.Comparison of four cardiovascular risk prediction functions among Chinese patients with diabetes mellitus in the primary care setting.Journal of diabetes investigation,2014.5(5):606-614.
- [3]Group TS.A clinical trial to maintain glycemic control in youth with type 2 diabetes.The New England journal of medicine,2012.366(24):2247.
- [4]Holman RR,Paul SK,Bethel MA,et al.10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes.New England Journal of Medicine,2008.359(15):1577-1589.
- [5]Spranger J,Kroke A,Möhlhig M,et al.Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.Diabetes,2003.52(3):812-817.
- [6]Vinagre I,Sánchez-Quesada JL,Sánchez-Hernández J,et al.Inflammatory biomarkers in type 2 diabetic patients:effect of glycemic control and impact of ldl subfraction phenotype.Cardiovascular diabetology,2014.13(1):34.
- [7]Pittas AG,Lau J,Hu FB,et al.The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes.A systematic review and meta-analysis.The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,2007.92(6):2017-2029.
- [8]Mitri J,Muraru M,Pittas A.Vitamin D and type 2 diabetes:a systematic review.European journal of clinical nutrition,2011.65(9):1005-1015.
- [9]Zeitl U,Weber K,Soegiarto DW,et al.Impaired insulin secretory capacity in mice lacking a functional vitamin D receptor.The FASEB journal,2003.17(3):509-511.
- [10]Maestro B,Dávila N,Carranza MC,et al.Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter.The Journal of steroid biochemistry and molecular biology,2003.84(2):223-230.
- [11]Maestro B,Campion J,Davila N,et al.Stimulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D-3 of Insulin Receptor Expression and

Insulin Responsiveness for Glucose Transport in U-937 Human Promonocytic Cells. ENDOCRINE JOURNAL-TOKYO-,2000.47(4):383-392.

[12] Festa A, Hanley AJ, Tracy RP, et al. Inflammation in the prediabetic state is related to increased insulin resistance rather than decreased insulin secretion. *Circulation*, 2003.108(15):1822-1830.

[13] McLachlan KA, O'Neal D, Jenkins A, et al. Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2006.22(2):131-138.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

联合骨髓细胞形态、细胞化学染色及骨髓活检切片在低原始细胞骨髓增生异常综合征与溶血性贫血鉴别诊断中的意义

顾李霖 康慧媛 潘玉玲 刘改霞 葛素君 李绵洋* 王成彬*

解放军总医院临床检验科 北京 100853

*通讯作者: limianyang301@163.com; wangcb301@126.com

[摘要] 目的: 探讨骨髓细胞形态、细胞化学染色及骨髓活检切片联合检测在低原始细胞骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)与溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)鉴别诊断中的临床意义。**方法:** 回顾解放军总医院 2009 年 9 月到 2015 年 3 月确诊的低原始细胞(<5%)MDS 患者 85 例, HA 患者 61 例, 分析比较两组一般临床特征、细胞遗传学和分子遗传学参数、骨髓细胞计数及形态特征、细胞化学染色参数及骨髓活检特征的差异。**结果:** MDS 组与 HA 组患者的一般临床特征比较, 差异无统计学意义($P>0.05$); 而 MDS 组巨核病态造血发生率、环核铁粒幼红细胞阳性率和阳性水平、幼红细胞糖原阳性率和阳性水平、骨髓活检中 MDS 幼稚前体细胞异常定位及巨核病态造血发生率均明显高于 HA 组, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。联合检测可识别 90.6% 的低原始细胞 MDS。**结论:** 联合骨髓细胞形态、细胞化学染色及骨髓活检切片可以及时、准确的鉴别诊断低原始细胞 MDS 与 HA。

[关键词] 骨髓增生异常综合征; 溶血性贫血; 细胞形态; 细胞化学染色; 骨髓活检切片

The Significance of Combining Morphology, Cytochemistry Staining with Bone Marrow Biopsy in Differential Diagnosis of Myelodysplastic Syndrome with Low Blasts and Hemolytic Anemia/GU Li-Lin, KANG Hui-Yuan, PAN Yu-Ling, et al

[Abstract] Objective: To explore the clinical significance of combining morphology, cytochemistry staining with bone marrow biopsy in differential diagnosis of myelodysplastic syndrome (MDS) with low blasts and hemolytic anemia (HA). **Methods:** The differences of clinical data, cytogenetic and molecular features, bone marrow cell count and morphology features, cytochemistry staining data and bone marrow biopsy features were analyzed between 85 MDS with low blasts patients and 61 HA patients, from September in 2009 to March in 2015 in Chinese PLA general hospital. **Results:** There was no significant difference ($P>0.05$) in clinical data between MDS group and HA group. Megakaryocytic dysplasia positive detection rate, ring sideroblasts positive rate and positive level, PAS positive rate and positive level were significantly higher in MDS group than in HA group ($P<0.05$). Abnormal localization of immature precursors (ALIP) and megakaryocytic dysplasia positive detection rate in bone marrow biopsy were significantly higher in MDS group than in HA group ($P<0.05$). 90.6% of MDS with low blasts patients were identifiable by combined detections. **Conclusion:** Combining morphology, cytochemistry staining with bone marrow biopsy was more useful for making differential diagnosis between MDS with low blasts and HA.

[Key word] Myelodysplastic syndrome; Hemolytic anemia; Morphology; Cytochemistry staining; Bone marrow biopsy
Department of Clinical Laboratory, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

骨髓增生异常综合征(Myelodysplastic syndrome, MDS)是一类造血干细胞恶性克隆性疾病,以骨髓细胞无效性克隆造血为特征,常表现为难治性全血细胞减少及易向急性白血病转化^[1]。MDS 诊断主要依靠骨髓细胞形态学及核型

检测等,然而低原始细胞(<5%)MDS核型异常发生率较低^[2],且形态学方面与溶血性贫血(hemolytic anemia, HA)均可表现为红系增生伴有明显病态造血,有时难以鉴别,造成诊断困难。为此,本研究根据2008年WHO分类标准^[3],对85例低原始细胞MDS和61例HA的骨髓细胞形态特征(包括髓系原始细胞计数及粒、红、巨核3系病态造血)、细胞化学染色(包括内铁、糖原染色)及骨髓活检切片(包括粒、红、巨核3系病态造血)进行分析比较,探讨联合检测在MDS鉴别诊断中的意义。

材料和方法

研究对象

收集本院2009年9月至2015年3月明确诊断的骨髓髓系原始细胞<5%的MDS患者85例(包括MDS-RA、RN、RT、RCUD、RCMD等,MDS-RARS因高环核铁粒幼红细胞排除在外),HA患者61例,诊断标准为2008年WHO分类标准^[3]。其中男性78例,女性68例,中位年龄48(10-85)岁。

细胞遗传学及分子生物学检测

细胞遗传学分析:取患者肝素抗凝的骨髓液3-5 ml,经过24-48 h短期培养,收获中期分裂的细胞,采用R显带技术进行核型分析,每例至少分析20个分裂相。染色体核型描述参照《人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2009)》标准描述。分子生物学检测:取患者EDTA抗凝的骨髓液2-3 ml,按照TriPure Isolation Reagent(瑞士Roche公司)操作步骤提取骨髓标本中RNA。采用反转录试剂盒(Reverse Transcription System,美国Promega公司)反转录合成cDNA,应用相关基因特异引物进行实时定量PCR扩增,进行分子生物学分析。

骨髓形态学检查

油镜下计数每个标本的骨髓涂片细胞250个,髓系原始细胞比例为骨髓中髓系原始细胞在250个有核细胞中的比例,红系比例为骨髓中有核红细胞在250个有核细胞中的比例,病态造血评价根据WHO标准^[3],为油镜下计数粒系、红系及巨核系各系细胞中≥10%细胞存在病态。各系病态表现如下:①粒系:分叶过多(≥5叶)、中幼粒细胞核仁出现、颗粒减少或缺如、巨幼样变、双核型粒细胞、环形杆状核粒细胞、假Pelger畸形、假Chediak-Higashi颗粒等;②红系:巨幼红样变、空泡变形、幼红细胞核分叶、核破碎、核出芽、奇数核等;③巨核系:小巨核细胞、微巨核细胞、单圆核、多圆核巨核细胞、多分裂核巨核细胞等。对于形态学病态细胞辨认,由3位不同观察者独立观察,至少2位对某一细胞达到一致视为认同。

细胞化学染色

选择合格涂片进行骨髓内铁染色及糖原染色(periodic acid-Schiff, PAS),参考《血液病实验诊断》及《全国临床检验操作规程》^[4-5],骨髓内铁染色:骨髓片置甲醛蒸气中固定3 min,将等量40 g/L亚铁氰化钾和4%盐酸溶液混合,新鲜配制加热至约56℃;将骨髓片放入其中30 min后取出用流水冲洗,置碱性复红应用液中复染5 min;依次用蒸馏水、无水乙醇、蒸馏水冲洗,在空气中干燥后用显微镜检查;结果判断:铁可染色成蓝色颗粒,小珠及小块状。PAS染色:将骨髓片用95%乙醇固定10 min,10 g/L过碘酸液作用20 min,蒸馏水洗涤;晾干后Schiff染液作用60 min,用自来水洗涤15 min;苏木素染液作用10 min,自来水冲洗15 min,待干;结果判读: PAS阳性反应时胞浆呈红色,阴性反应胞浆呈无色。计算细胞内铁阳性水平(%):计算每个患者100个中、晚幼红细胞中铁粒幼红细胞所占百分比;内铁颗粒数:计算每个患者100个中、晚幼红细胞中铁颗粒总数;环核铁粒幼红细胞阳性率(%):计算环核铁粒幼红细胞阳性患者占内铁染色患者的百分比;环核铁粒幼红细胞阳性水平(%):计算每个患者100个中、晚幼红细胞中环核铁粒幼红细胞所占百分比;PAS阳性率(%):计算幼红细胞PAS阳性患者占PAS染色患者的百分比;PAS阳性水平(%):计算每个患者100个中、晚幼红细胞中PAS阳性幼红细胞所占的百分比。

骨髓活检切片检查

患者以B65-01骨髓活检针于髂后或髂前上棘局麻后行一步法活检取材。活组织块约2 mm×15 mm。经Bouin氏液固定1 h,酒精梯度脱水,Hemapun865包埋剂包埋,切片3 μm厚,采用苏木素-姬姆萨-酸性品红染色(haematoxylin giemsa acid fuchsin,HGF)染色。油镜下观测有无幼红细胞簇异常分布、幼稚前体细胞异常定位(abnormal localization of immature precursors, ALIP)、单圆核及多圆核病态巨核细胞情况等^[6]。

统计学分析

采用SPSS19.0统计学软件进行数据处理:计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或者连续校正卡方检验;

计量资料以 $\bar{x} \pm SD$ 或中位数表示, 组间比较采用 t 检验或 Wilcoxon 秩和检验; 以 $P=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

一般资料的比较

MDS 组与 HA 组在性别、年龄上差异不明显, 两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); 两组初诊时血红蛋白、白细胞计数水平比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); MDS 组的小血小板计数较 HA 组更低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (表 1)。

Table 1. Comparisons of the clinical data between the patients with MDS and HA.

Group	Number of case	Sex(male/female)	Age [Median (Range)]	$\bar{X} \pm SD$		
				Hb (g/L)	WBC ($\times 10^9/L$)	Plt ($\times 10^9/L$)
MDS	85	45/40	49 (16-85)	74.61 \pm 23.73	4.37 \pm 3.80	88.18 \pm 78.14
HA	61	33/28	43 (10-82)	80.52 \pm 22.35	5.16 \pm 1.99	195.11 \pm 126.39**

** $P<0.01$, compared with MDS group.

细胞遗传学及分子生物学比较

MDS 组 53 例患者, HA 组 20 例患者进行了细胞遗传学及分子生物学检测, 其中 MDS 组有 14 例 (26.4%) 检出核型异常, 包括 -7q, +12q, t(1;7), +8 及复杂核型等, HA 组未检出核型异常 (0%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); MDS 组有 12 例 (22.6%) 检出分子生物学异常, 包括 *MLL* 突变, *c-kit* 突变及 *NRAS* 突变等, HA 组未检出异常 (0%), 差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表 2)。

Table 2. Comparisons of cytogenetic and molecular features between the patients with MDS and HA. No.(%)

Group	Cytogenetic detection case	Abnormal karyotype	Molecular detection case	Abnormal molecular case
MDS	53	14(26.4)	53	12(22.6)
HA	20	0(0.0)*	20	0(0.0)*

* $P<0.05$, compared with MDS group.

骨髓细胞计数比较

MDS 组骨髓原始细胞计数为 (2.74 \pm 1.37)%; HA 组计数为 (0.94 \pm 0.60)%, 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); MDS 组的红系比例为 (40.60 \pm 18.85)%; HA 组计数为 (48.06 \pm 16.17)%, 两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 3)。

骨髓细胞病态造血比较

MDS 组与 HA 组粒、红系病态造血的发生率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$); MDS 组巨核系病态造血的发生率明显高于 HA 组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$) (表 3)。

Table 3. Comparisons of bone marrow cells features between the patients with MDS and HA.

Group	Number of case	BM blasts (%, $\bar{X} \pm SD$)	Erythroid lineage (%, $\bar{X} \pm SD$)	No.(%)		
				Myeloid dysplasia	Erythroid dysplasia	Megakaryocytic dysplasia
MDS	85	2.74 \pm 1.37	40.60 \pm 18.85	36(42.4)	70(82.4)	18(21.2)
HA	61	0.94 \pm 0.60**	48.06 \pm 16.17	23(37.7)	55(90.2)	0(0.0)**

** $P<0.01$, compared with MDS group; BM:bone marrow

细胞化学染色比较

MDS 组 72 例患者, HA 组 54 例患者进行了内铁染色, 结果表明两组在内铁阳性水平和铁颗粒数上差异不明显, 比例无统计学意义 ($P>0.05$); 然而 MDS 组在环核铁粒幼红细胞的阳性率和阳性水平均高于 HA 组, 差异均具有统计学差异 ($P<0.05$); MDS 组 66 例患者, HA 组 36 例患者进行了 PAS 染色, MDS 组在幼红细胞 PAS 阳性率和阳性水平均高于 HA 组, 差异均具有统计学差异 ($P<0.05$) (表 4)。

Table 4. Comparisons of cytochemical staining features between the patients with MDS and HA.

Group	Number of iron staining case	Iron positive level (%, $\bar{X} \pm SD$)	Siderotic granules ($\bar{X} \pm SD$)	Ring		Number of PAS staining case	PAS positive case [No.(%)]	PAS positive level [%Median (Range)]
				Ring sideroblasts positive case [No.(%)]	Ring sideroblasts positive level [%Median (Range)]			
MDS	72	61.56±21.42	308.75±171.40	31(43.1)	3(1-10)	66	35(53.0)	2(0-64)
HA	54	58.41±23.23	253.35±157.78	3(5.6)**	2(1-2)*	36	11(30.6)*	0(0-8)*

* $P<0.05$, compared with MDS group; ** $P<0.01$, compared with MDS group; PAS:periodic acid-Schiff.

骨髓活检切片比较

MDS 组患者 64 例, HA 组 45 例进行骨髓活检分析, 结果表明 MDS 组出现 ALIP 现象 47 例, 占 73.4%; 出现巨核病态造血 37 例, 占 57.8%, 比例均明显高于 HA 组(8.9%,0%), 比较差异均具有统计学意义 ($P<0.01$); 两组间幼红细胞异常分布的发生率比较差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 5)。

Table 5. Comparisons of bone marrow biopsy features between the patients with MDS and HA. No.(%)

Group	Case	Erythroid dysplasia	ALIP	Megakaryocytic dysplasia
MDS	64	34(53.1)	47(73.4)	37(57.8)
HA	45	24(53.3)	4(8.9)**	0(0.0)**

** $P<0.01$, compared with MDS group; ALIP:abnormal localization of immature precursors

联合分析

MDS 组患者中骨髓细胞形态巨核系病态的发生率为 21.2%(18/85); 内铁染色环核铁粒幼红细胞的阳性率为 43.1%(31/72), 幼红细胞 PAS 阳性率为 53.0%(35/66); 骨髓活检切片中 ALIP 现象的发生率为 73.4%(47/64), 巨核病态的发生率为 57.8%(37/64); 联合巨核系病态、内铁染色、PAS 化学染色及骨髓活检 ALIP 和巨核病态任一项阳性的百分比为 90.6%(77/85)。

讨论

MDS 是一类起源于多能干细胞的克隆性疾病, 与 HA 等血液系统良性疾病有时难以鉴别。初诊时 MDS 与 HA 具有相似的表现, 如贫血、乏力等, 血象均会表现为严重贫血或 3 系减低, 骨髓象均可表现为红系明显增生, 特别是低原始细胞 (<5%) MDS, 在骨髓红系比例及染色体核型检测等方面均无特异性特征^[7], 二者鉴别诊断存在一定困难。病态造血、内铁及 PAS 化学染色、骨髓活检在 MDS 的诊断中具有明确特征^[8-13], 本研究拟采用骨髓细胞形态、细胞化学染色及骨髓活检切片联合检测的模式, 分析其在低原始细胞 MDS 与 HA 鉴别诊断中的意义。

本研究显示, MDS 组和 HA 组在性别、年龄、血红蛋白及白细胞计数等一般临床资料中差异均不明显, 仅 MDS 组的小血小板计数较 HA 组更低, 比较差异具有统计学意义 ($P<0.01$)。然而血小板减低并非 MDS 患者的主要特征, 仅凭一般临床特征并不能对 MDS 及 HA 进行明确鉴别诊断。核型分析和基因检测常作为 MDS 诊断的重要方法之一, 研究表明, MDS 组与 HA 组的异常核型检出率、异常基因检出率均高于 HA 组 ($P<0.05$), 然而在低原始细胞 MDS 中分别只有 26.4%、22.6%能检出异常核型和异常基因突变, 大部分低原始细胞 MDS 仍难以鉴别。

骨髓细胞计数中, MDS 组在红系比例与 HA 组差异比较无统计学意义 ($P>0.05$)。通常 HA 患者的骨髓象以代偿

性红系增生为主,然而部分低原始细胞 MDS 患者也会表现反应性红系增生。原始细胞计数 MDS 组较 HA 组更高,比较差异具有统计学意义 ($P<0.01$),部分 MDS 患者原始细胞增高为克隆性特征性改变,此类患者易于鉴别。但对于原始细胞比例较低、并伴有红系增生明显(60%-90%)的 MDS 患者,与 HA 鉴别时仍存在一定困难。

骨髓细胞病态造血在诊断 MDS 中意义重大,无论 FAB 分型还是 WHO 分型均强调了 MDS 细胞形态中病态造血对于诊断的重要性^[14],可作为鉴别 MDS 的重要特征。但其异质性导致了细胞形态改变的多样化^[14-16],并非每例 MDS 患者的病态造血表现都一致,同时 HA 代偿性反应也会出现一定粒、红两系的病态改变。本研究亦表明, MDS 组患者的粒系、红系病态造血的发生率与 HA 组差异均无统计学意义 ($P>0.05$),从粒、红两系病态造血方面不易鉴别。而 MDS 组巨核系病态造血的发生率较 HA 组更高,差异有统计学意义 ($P<0.01$),HA 患者的巨核系病态改变少见,因此巨核系病态中小巨核细胞、单圆核及多圆核巨核细胞的出现往往在 MDS 和 HA 组的鉴别中具有重要意义。但在低原始细胞 MDS 组巨核系病态造血的发生率不高(21.2%),诊断时仍需结合细胞化学染色、骨髓活检等检查以提高检出率。

MDS、HA 患者均会出现铁摄入与代谢紊乱,造成红细胞系统异常或增生过速,幼红细胞中铁颗粒增加^[10]。本研究内铁染色结果表明两组在内铁阳性水平和铁颗粒数上差异不明显 ($P>0.05$);而 MDS 组环核铁粒幼红细胞阳性率和阳性水平均高于 HA 组 ($P<0.05$)。环核铁粒幼红细胞检测可用来辅助鉴别低原始细胞 MDS 与 HA。此外,幼红细胞 PAS 的阳性程度反映了 MDS 患者细胞的恶性增殖^[11],然而部分 HA 患者也会存在微弱 PAS 阳性反应。MDS 组在幼红细胞 PAS 阳性率和阳性水平均高于 HA 组,比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。因此,利用内铁染色和 PAS 染色可明确鉴别出部分 MDS 与 HA 患者。环核铁粒幼红细胞和幼红细胞 PAS 的阳性率分别为 43.1%和 53.0%,仍有一部分 MDS 患者不易鉴别。

骨髓活检切片中病态细胞异常分布及原始细胞在骨髓小梁旁呈现的簇状定位对 MDS 诊断具有重要意义^[12,13]。本研究表明,骨髓活检切片中 MDS 组 ALIP 现象发生率为 73.4%,巨核病态发生率为 57.8%,比例均明显高于 HA 组,比较差异均具有统计学意义 ($P<0.01$);而两组间幼红细胞异常定位的比例差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

本研究进一步表明,骨髓活检对 MDS 粒系、巨核系病态的检出率比骨髓涂片更高,可能与患者因骨髓纤维化或穿刺稀释影响使骨髓涂片不能客观反映 MDS 骨髓病态的实际情况有关,但骨髓活检不能对 MDS 患者原始细胞进行准确计数,因此,需结合骨髓细胞涂片与骨髓活检共同鉴别诊断 MDS。本研究中,骨髓形态检查(巨核病态)可鉴别 21.2%的低原始细胞 MDS 患者,细胞化学染色(内铁染色、PAS 化学染色)可鉴别 53.0%的低原始细胞 MDS 患者,骨髓活检分析(骨髓活检 ALIP 和巨核病态)可鉴别 73.4%的低原始细胞 MDS 患者;联合巨核系病态、内铁染色、PAS 化学染色及骨髓活检 ALIP 和巨核病态任一项阳性的百分比为 90.6%,因此,联合检查可大大提高低原始细胞 MDS 的检出阳性率。

综上所述,骨髓原始细胞计数、病态造血类型、细胞化学染色及骨髓活检的检测均可对部分低原始细胞 MDS 患者的鉴别诊断起重要作用,单一应用检出率相对较低;同时结合骨髓形态学、细胞化学染色和骨髓活检检查可极大的提高 MDS 的准确检测率。联合骨髓形态学改变、细胞化学染色及骨髓活检是 MDS 诊断及与 HA 鉴别诊断重要的临床检测模式。

参考文献

- [1] Mufti G, Bennett JM, Goasguen J, et al. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica*, 2008; 93(11):1712-1717.
- [2] Chen B, Zhao WL, Jin J, et al. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. *Leukemia*, 2005; 19(5):767-775.
- [3] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 2009; 114(5):937-951.
- [4] 邓家栋, 杨崇礼, 杨天楹. 血液病实验诊断. 天津: 天津科学技术出版社, 1985:125-138.

- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程(第3版).南京:东南大学出版社,2006:227-456.
- [6] 陈文杰,陈辉树.造血系统疾病临床病理学.北京:北京医学大学中国协和医科大学联合出版社,1997:147-150.
- [7] Scott BL,Deeg HJ.Myelodysplastic syndromes.*Annu Rev Med*,2010;61(3):345-358.
- [8] Liu D,Chen Z,Xue Y,*et al*.The significance of bone marrow cell morphology and its correlation with cytogenetic features in the diagnosis of MDS-RA patients.*Cancer Treat Rev*,2007;33(Supple 1):31-41.
- [9] Xiong B,Tang ZH,Zou P,*et al*.Dysplasia features of myelodysplastic syndrome in ethnically Chinese people.*Acta Haematol*,2014;131(2):126-132.
- [10] 岳福仁,闫瑞振.细胞化学染色在大细胞性贫血诊断中的价值分析.*国际检验医学杂志*.2012;33(17):2122-2123.
- [11] 刘柳,崔雯,张宏丽等.骨髓增生异常综合征患者有核红细胞糖原染色的意义.*中华血液学杂志*,2011;32(4):263-264.
- [12] 唐笑迪,干惠珠,唐笑言.130例骨髓增生异常综合征的骨髓穿刺涂片和骨髓活检切片结果分析.*临床血液学杂志*.2004;17(03):149-150.
- [13] Das R,Hayer J,Dey P,*et al*.Comparative study of myelodysplastic syndromes and normal bone marrow biopsies with conventional staining and immunocytochemistry.*Anal Quant Cytol Histol*,2005;27(3):152-156.
- [14] 伍俞霓,罗治彬,王琛等.69例骨髓增生异常综合征病态造血特征对预后意义的研究.*中国实验血液学杂志*,2015;23(1):150-154.
- [15] 程虹,江明,杜伟等.难治性贫血与其它贫血性疾病骨髓及血细胞形态学比较分析.*中国实验血液学杂志*.2012;20(6):1423-1426.
- [16] Aul C,Giagounidis A,Germing U.Bone marrow morphology and classification systems in myelodysplastic syndromes.*Cancer Treat Rev*,2007;33(Suppl.1):S2-S5.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

自身免疫性胰腺炎患者血清 IgG 亚型特征及鉴别诊断

邸平^① 孙京花^① 朱剑^② 王珊珊^① 徐茵^① 王成彬^① 李健^{①*}

①解放军总医院临检科 北京 100853 ②解放军总医院风湿免疫科 北京 100853

*通讯作者: jacobsl@126.com

[摘要] 目的: 探讨血清免疫球蛋白G(IgG)亚型分布对罕见自身免疫性胰腺炎鉴别诊断的临床价值。方法: 选择2013年1月至2014年1月解放军总医院自身免疫性胰腺炎患者28例、急慢性胰腺炎患者112例、胰腺癌患者15例、胆管癌患者9例、腹膜后纤维化患者37例及健康对照者52名, 分别检测其IgG亚型、淀粉酶、脂肪酶、血糖、人糖链抗原19-9(CA19-9)水平, 并对难以鉴别的自身免疫性胰腺炎和胰腺癌患者进行腹部CT和病理学组化染色检查, 分别对比分析。结果: 自身免疫性胰腺炎组、腹膜后纤维化组、急慢性胰腺炎组、胰腺癌组、胆管癌组、健康对照组IgG4水平分别为7.58(1.69~13.8)、1.26(0.50~2.61)、0.42(0.16~0.67)、0.69(0.21~0.94)、0.48(0.43~6.50)、0.37(0.19~0.74)g/L, 自身免疫性胰腺炎组及腹膜后纤维化组IgG4水平均显著高于其他组, 且自身免疫性胰腺炎组比腹膜后纤维化组IgG4水平更高, 差异有统计学意义(Z=-3.812, P<0.01), 可用于鉴别诊断。结论: 血清IgG亚型检测对自身免疫性胰腺炎与相似疾病的鉴别诊断具有重要意义, 有助于减少误诊误治。

[关键词] 免疫球蛋白G; 胰腺炎; 诊断; 鉴别

Serum IgG subtypes features and differential diagnosis of autoimmune pancreatitis patients/Di Ping, Sun Jing-hua, Zhu Jian, et al.

Corresponding author: Li Jian, Email:jacobsl@126.com

[Abstract] **Objective:** To investigate clinical value of serum IgG subclass distribution in differential diagnosis of autoimmune pancreatitis. **Methods:** Inpatients were enrolled as follow, autoimmune pancreatitis(AIP, n=28), acute and chronic pancreatitis(ACP, n=112), pancreatic cancer(PC, n=15), cholangiocarcinoma(CC, n=9), retroperitoneal fibrosis(RPF, n=37), together with healthy controls (n=52). IgG subtypes, amylase, lipase, glucose and CA19-9 were tested. For patients with autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer, radiographic CT of abdomen and pathological staining were included for comparison. **Results:** IgG4 subtype distributed in a wide range as 7.58(1.69-13.8)g/L in AIP, 1.26(0.50-2.61)g/L in RPF, 0.42(0.16-0.67)g/L in ACP, 0.69(0.21-0.94)g/L in PC, 0.48(0.43-6.50)g/L in CC and 0.37(0.19-0.74)g/L in control group. IgG4 in AIP and RPC were significantly higher than those in other groups, difference in these two groups even were

found ($Z=-3.812$, $P<0.01$). And it was meaningful in the differential diagnosis. **Conclusion:** Serum IgG4 subtype plays an important role in differentiation of autoimmune pancreatitis from associated diseases.

[Key words] Immunoglobulin G; Pancreatitis; Diagnosis; Differential

Department of Clinical Laboratory, China PLA General Hospital, Beijing 100853, China

自身免疫性胰腺炎(AIP)是一种患病率极低、误诊率极高的自身免疫性疾病,以胰腺弥漫性肿大、胰管广泛狭窄为主要特点,病因与发病机制尚不明确,属于IgG4相关性疾病。此类患者多见于老年男性,早期临床症状轻微且无特异性,由于此病比较罕见,国内有关资料较少,临床认识不够,单纯靠影像学检查的诊断价值有限,病理学检查本应作为金标准用于诊断,但是受限于侵袭性和阳性率,不便提供快捷有效的报告。血清学检测技术的发展为IgG4相关疾病的诊断带来了前所未有的机会,本研究应用免疫散射比浊法对AIP和相关疾病患者的IgG4亚型等重要诊断指标进行了比较研究,以探讨血清学检测在AIP诊断和鉴别诊断中的应用价值。

1 对象与方法

1.1 对象

所有病例均来自解放军总医院2013年1月至2014年1月门诊及住院患者。AIP患者28例,均符合2008年AIP诊断亚洲标准^[1],其中男26例,女2例,年龄32~82岁;急慢性胰腺炎^[2-3]患者112例,男83例,女29例,年龄14~87岁;病理证实胰腺癌^[4]患者15例,男11例,女4例,年龄39~73岁;行穿刺活检病理证实腹膜后纤维化^[5]患者37例,男32例,女5例,年龄39~78岁;病理证实胆管癌患者9例,男5例,女4例,年龄43~76岁。健康对照组52名均为健康体检者。

1.2 检测指标及方法

血清总IgG、血清IgG亚型4项均采用免疫散射比浊法,在西门子BNII免疫特种蛋白分析仪上检测,均使用厂家原装配套试剂。血清淀粉酶、脂肪酶、血糖均采用罗氏Cobas c702全自动生化分析仪进行检测。CA19-9采用罗氏Cobas e602全自动免疫分析仪进行检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析,偏态分布计量资料采用中位数和四分位间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,多组间比较采用秩和检验,两组间比较采用非参数秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自身免疫性胰腺炎的相关标志物分析: AIP组与急慢性胰腺炎组、胰腺癌组、胆管癌组及健康对照组比较,血清IgG4水平差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。急慢性胰腺炎组患者与其他各组患者及健康对照者比较,血清淀粉酶、脂肪酶水平差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。AIP组患者与胰腺癌组患者、胆管癌组患者比较,血清淀粉酶、脂肪酶水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。胆管癌组患者与其他各组患者及健康对照者比较,血清CA19-9水平差异均有统计学意义(均 $P<0.05$), AIP组患者与急慢性胰腺炎组患者、胰腺癌组患者比较,血清CA19-9水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。AIP组患者与急慢性胰腺炎组患者、胰腺癌组患者、胆管癌组患者比较,血糖水平差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),与健康对照组比较差异有统计学意义(表1)。可见,血清IgG4是上述指标中鉴别AIP的良好指标。

表1 不同疾病患者与健康对照者检查结果比较 $[M(P_{25}, P_{75})]$

组别	例数	IgG4(g/L)	脂肪酶(U/L)	淀粉酶(U/L)	CA19-9(U/ml)	血糖(mmol/L)
自身免疫性胰腺炎组	28	7.6(1.7,13.8) ^a	84.8(22.6,179.0) ^a	47.9(24.4,83.5) ^a	19.1(5.9,43.1) ^a	5.7(5.0,7.4) ^a
急慢性胰腺炎组	112	0.4(0.2,0.7) ^b	354.0(151.0,668.0) ^{ab}	87.3(57.5,157.0) ^{ab}	14.2(7.6,27.2) ^a	5.6(4.9,9.6) ^a
胰腺癌组	15	0.7(0.2,0.9) ^b	82.2(30.9,131.0) ^a	45.3(37.5,93.3) ^a	19.3(6.9,37) ^a	7.4(5.1,9.5) ^a
胆管癌组	9	0.5(0.4,6.5) ^b	83.7(62.2,90.5) ^a	62.2(49.4,90.5) ^a	187.0(54.3,383.0) ^{ab}	6.6(5.6,7.5) ^a
健康对照组	52	0.4(0.2,0.7)	39.4(30.4,56.9)	29.4(18.7,36.3)	6.9(4.9,14.8)	4.9(4.1,5.6)
H值		40.5	47.5	48.3	27.9	20.2
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注：与对照组比较，^a $p < 0.05$ ；与AIP组比较，^b $p < 0.05$

2.2 IgG4相关疾病血清IgG亚型的分布特征：AIP组患者与健康对照组血清IgG1和IgG3水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)，IgG2、IgG4水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AIP组患者与腹膜后纤维化组患者仅IgG4水平比较差异有统计学意义，说明IgG1、IgG2、IgG3对于鉴别诊断AIP价值不大。AIP患者与腹膜后纤维化患者虽均属于IgG4相关性疾病，但AIP患者血清IgG4水平较腹膜后纤维化患者升高更为明显 (表2)。

表2 AIP、腹膜后纤维化患者与健康对照组血清IgG亚型结果比较 [$M (P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	IgG1(g/L)	IgG2(g/L)	IgG3(g/L)	IgG4(g/L)	IgG4/总IgG(%)
自身免疫性胰腺炎组	28	8.3(6.6,10.1)	6.0(4.0,7.6) ^a	0.3(0.2,0.9)	7.6(1.7,13.8) ^a	32.2(16.5,42.2) ^a
腹膜后纤维化组	37	7.4(6.4,9.1)	4.9(3.8,7.3)	0.4(0.2,0.6)	1.3(0.5,2.6) ^{ab}	7.4(3.3,18.5) ^{ab}
健康对照组	52	7.8(6.7,8.8)	4.1(3.2,5.4)	0.3(0.2,0.4)	0.4(0.2,0.7)	2.8(1.7, 5.5)
χ^2 值		1.5	8.4	3.1	36.8	35.3
P值		>0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

注：与对照组比较，^a $P < 0.05$ ；与AIP组比较，^b $P < 0.05$

2.3 胰腺疾病鉴别诊断的方法学比较：影像学影像学、血清学、病理组化染色对AIP及胰腺癌鉴别诊断的阳性率见表3。AIP和胰腺癌患者影像学CT检查发现胰腺弥漫性肿大的阳性率分别为70%和18%；AIP和胰腺癌患者血清IgG4水平升高的阳性率分别为82%和6%；AIP患者组仅1例患者进行手术，术后取病变组织组化染色检查IgG4⁺细胞浸润，其他患者经CT检查提示怀疑AIP，血清IgG4水平升高，使用激素冲击治疗病情缓解，均未进行手术。

表3 影像学、血清学、病理组化染色对胰腺疾病鉴别诊断的阳性率比较 [例 (%)]

组别	影像学	血清学	病理组化染色
AIP	20 (70)	23 (82)	N/A
胰腺癌	3(18)	1 (6)	0(0)

注：“N/A”示不适用于统计分析。

3 讨论

AIP是新近被人们认识的与IgG4相关的自身免疫性疾病，40%~90%的AIP患者有胰腺外器官受累症状，其伴发的胰腺外损害主要包括糖尿病、腹膜后纤维化、胆管病变等。此病常发生于中老年男性，60~70岁多见，男女比例约2:1。本研究中28例AIP患者平均年龄56岁，由于发病率低，就诊患者未成平衡分布，男女比为13:1。

血清IgG有4个亚型，分别为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，均由浆细胞分泌，所有亚型都可在病变组织中出现，但以IgG4为主。IgG4主要存在于血液中，其含量为0.07~0.64 g/L，约占血清总IgG的0.8%~11.7%，半衰期为21d。通过研究结果发现血清IgG1、IgG2、IgG3对于诊断AIP价值不大，仅IgG4可以作为AIP和其他胰腺疾病鉴别诊断的良好指标。Hamano等^[6]报道，以1.35 g/L为cut-off值，血清IgG4升高诊断AIP的敏感性为95%、特异性为97%、准确性为97%，高水平的IgG4仅见于AIP患者，不存在于健康人群及患有其他慢性胰腺炎或自身免疫性疾病的患者中，与本研究结果相似。另有研究认为^[7]，AIP患者可进一步发展为胰腺癌，故血清IgG4升高的胰腺癌患者有可能由AIP发展而来。

根据血清IgG4水平可将AIP分为3个类型：IgG4<1.35 g/L为自行缓解型AIP；1.35 g/L< IgG4<10 g/L为激素治疗有效型AIP；IgG4>10 g/L为难治型AIP^[8]。IgG4在AIP的疗效监测中也发挥了重要作用，比如，糖皮质激素治疗AIP效果好，血清IgG4水平下降可作为糖皮质激素治疗有效的评估指标^[6]。Hirano等^[9]还提出可根据血清IgG4变化程度调整激素的治疗剂量。Maire等^[10]发现，血清IgG4高水平的AIP患者的复发率明显高于IgG4水平正常或下降的AIP患者。

AIP尚无国际公认的诊断标准，现主要参考日韩联合标准。(1)影像学：胰腺弥漫性肿大呈腊肠样；(2)血清学：血清IgG4水平升高>1.35 g/L；(3)病理免疫组化：IgG4⁺淋巴细胞浸润胰腺组织 (IgG4⁺/IgG⁺细胞>40%)。其中(1)为必需条件，(2)和(3)只满足1项为疑似该病，同时满足(2)和(3)可诊断该病，但需排除恶性疾病如胰腺癌、胆管癌。由于AIP临

床表现和影像学检查均与胰腺癌相似,故易被误诊为胰腺癌,虽然AIP相对于胰腺癌来说是一种发病率很低的良性疾病,但其误诊率极高,有病例报道称某患者初诊检查CA19-9、淀粉酶均正常,影像学提示胰头癌可能性大,遂诊断为胰头癌,手术切除,术后取组织经病理诊断为AIP。AIP用激素治疗即可,若术前能检查血清IgG亚型4项,IgG4升高提示AIP,患者即可避免手术。故术前的及时准确诊断尤为重要。

目前,在AIP患者的诊断中仅靠影像学和病理学还存在着一定的局限性。影像学诊断AIP特征性表现为胰腺弥漫性肿大,呈腊肠样外观,有时可见胆管狭窄,但只能确定组织影像形态变化,不能确定细胞组分和免疫学变化,AIP这类既有组织形态学变化,又有免疫学变化的疾病,必须进行影像学与血清学的联合互补检测。病理学诊断AIP特征性表现为弥漫性浆细胞浸润胰腺组织,腺泡萎缩,组织间隙纤维化,常累及腹膜后胰腺组织,免疫组化显示浸润的细胞主要包括IgG4⁺浆细胞和CD4⁺或CD8⁺T淋巴细胞,IgG4⁺ / 总IgG 浆细胞比例明显升高,病理学检查作为金标准也存在其局限性,比如术中取材不当、未能准确采集病变组织,或切片时未能有效选择到病变组织;此外,组化染色时找到足够数量的IgG4⁺细胞并不容易。实际上,组织中IgG4⁺细胞早期浸润时,可能已经出现血清学改变,若血清学检查IgG4水平明显升高或已达cut-off值(1.35 g/L)时,即可高度怀疑为AIP,此时再联合影像学检查可避免不必要的手术,提高患者生存质量。因此当尚未确定患者肿块性质时,应优先考虑无侵袭性的血清学方法。

综上所述,在难以应用影像学方法鉴别诊断AIP与其他胰腺疾病或缺乏病理组化染色的情况下,无侵袭性的血清学方法体现出了特有的优势,其特异性结果也为进一步做组化染色提供了重要依据。血清IgG亚型检测同时联合影像学与病理免疫组化染色技术可对AIP的鉴别诊断发挥重要作用。

参考文献

- [1] 《中华胰腺病杂志》编委会.我国自身免疫性胰腺炎诊治指南(草案,2012)[J].中华胰腺病杂志,2013,(1):43-45. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1674-1935.2013.01.015
- [2] 王兴鹏,李兆申,袁耀宗,等.中国急性胰腺炎诊治指南(2013,上海)[J].中国实用内科杂志,2013,(7):530-535. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2013.04.001
- [3] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组.慢性胰腺炎诊治指南(2014)[J].临床肝胆病杂志,2015,31(3): 322-326 DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.04.001
- [4] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组.胰腺癌诊治指南(2014)[J].中国实用外科杂志,2014,34(11):1011-1017. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2015.01.026
- [5] 蔡林,周利群,何志嵩等.腹膜后纤维化26例的诊治分析[J].中华外科杂志,2008,46(10): 749-751.DOI: 10.3321/j.issn:0529-5815.2008.10.008
- [6] Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, et al. High serum IgG4 concentrations in patients with sclerosing pancreatitis[J].N Engl J Med, 2001, 344(10):732-738. DOI: 10.1056/NEJM200103083441005.
- [7] Iida H, Kubota K, Yoneda M, et al. A case of autoimmune pancreatitis developed pancreatic tail cancer[J].Pancreas, 2009, 38(5):483-484. DOI: 10.1097/01.MPA.0000357017.39180.64
- [8] Kubota K, Inamori M, Nakajima A. Three clinicopathological subtypes of autoimmune pancreatitis stratified by the duodenal papillary findings and the serum IgG4[J].Gastrointest Endosc, 2008, 67(5):1608. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gie.2008.03.985>
- [9] Hirano K, Tada M, Isayama H, et al. Significance of measuring IgG and IgG4 during follow-up of autoimmune pancreatitis[J].Pancreas, 2011, 40(5):788-791. DOI: 10.1097/MPA.0b013e3182156e32
- [10] Maire F, Le Baleur Y, Rebours V, et al. Outcome of patients with type 1 or 2 autoimmune pancreatitis[J].Am J Gastroenterol, 2011, 106(1):151-156. DOI: 10.1038/ajg.2010.314.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

循环 microRNA 对非小细胞肺癌诊断和化疗效果评价的研究

刘牟林^① 李士军^②

①大连医科大学检验医学院 大连 116044 ②大连医科大学附属第一医院检验科 大连 116011

邮箱: 18098877199@163.com

[摘要] **目的:** 探讨血清中 miR-19b, miR-125b, miR-34a, miR-200b 的表达与非小细胞肺癌发生发展的相关性, 以及这 4 种 microRNAs 在化疗过程中表达水平的变化和对患者化疗的监测效果。**方法:** 采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 技术检测 43 例健康体检者和非小细胞肺癌患者血清中 miR-19, miR-125b, miR-34a, miR-200b 的表达水平, 以及化疗过程中的表达变化, 比较第二次、第六次化疗后 microRNAs 的表达差异。 **结果:** 与健康对照组相比, 非小细胞肺癌患者血清中 miR-19b, miR-125b 和 miR-200b 表达上调, 与淋巴结转移相关; miR-34a 表达下调, 与淋巴结转移无关。在化疗期间, miR-19b、miR-125b 的表达随着化疗的进行而降低, 第六次化疗后与第二次化疗后相比表达下降 ($P<0.05$)。 **结论:** 血清 miR-19b, miR-125b, miR-34a 和 miR-200b 可作为 NSCLC 的辅助诊断指标; miR-19b, miR-125b 可作为 NSCLC 患者化疗效果评价的潜在标志物。

[关键词] 非小细胞肺癌; miR-19b; miR-125b; 化疗

The Study of circulating microRNA on Diagnosis and Evaluation of Chemotherapy for Non-small Cell Lung Cancer/Liu Mu-lin, Li Shi-jun

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between serum expression of miR-19b, miR-125b, miR-34a, miR-200b with the development of non-small cell lung cancer, the expression changes of these four microRNAs during chemotherapy and the function of chemotherapy monitoring. **Methods:** Real-time PCR was used to detect the expression change of serum miR-19b, miR-125b, miR-34a and miR-200b of 43 cases healthy volunteers and non-small cell lung cancer patients. And also detected the expression changes of these four microRNAs during chemotherapy. To observe the differential expression between the second and sixth chemotherapy. **Results:** Compared with the healthy control group, serum miR-19b, miR-125b, miR-34a and miR-200b expressed differentially in patients of non-small cell lung cancer ($P<0.05$). The expression of miR-19b, miR-125b, miR-200b were up-regulated and related with lymph node metastasis. miR-34a was down-regulated but not related with lymph node metastasis. The expression of miR-19b, miR-125b were decreased when the patients received chemotherapy, and the expression were lower after the sixth cycle of chemotherapy than the second ($P<0.05$). **Conclusion:** The serum expression of miR-19b, miR-125b, miR-34a and miR-200b could be assisted diagnostic markers for NSCLC; miR-19b, miR-125b could act as potential biomarkers of chemotherapy evaluation for NSCLC patients.

[Keywords] Non-small cell lung cancer; MiR-19b; MiR-125b; Chemotherapy
Clinical Laboratory Diagnosis, Dalian Medical University, Dalian, 116044, China;

肺癌是目前世界上最常见的恶性肿瘤之一, 也是肿瘤致死原因中的第一位, 治疗效果欠佳, 预后较差^[1], 寻找与肺癌发生发展相关的标志物, 对于提高肺癌的诊断和治疗效果极其重要。

循环 microRNA 是一类以游离形式存在于血清、血浆等机体体液中的 microRNA^[2], 当机体发生病变时, 可通过某些机制直接或间接地破坏机体内循环 microRNAs 的稳定状态, 出现差异性表达。

当机体发生肿瘤时, 很多循环 microRNA 会发生表达上调或下调, 表现出相应的促癌或抑癌作用^[3]。本研究通过 Real-time PCR 的方法检测健康体检者和非小细胞肺癌患者血清中 miR-19b, miR-125b, miR-34a 和 miR-200b 的表达变化, 以及化疗过程中这 4 种 microRNA 的特征性表达, 探讨血清 miR-19b, miR-125b, miR-34a 和 miR-200b 与非小细胞肺癌发生发展的关系以及对非小细胞肺癌患者化疗的监测效果。

1 材料与方法

1.1 样本获取

选取 2014 年 3 月到 2015 年 1 月期间在大连医科大学附属第一医院入院并确诊的 43 例原发性非小细胞肺癌。平均年龄 64.28 岁, 男性 29 例, 女性 14 例; 腺癌 19 例, 鳞癌 16 例, 大细胞癌 8 例; TNM 分期: IIIA 期 11 例, IIIB 期 7 例, IV 期 25 例。在非小细胞肺癌患者第一次化疗前 1-3 日, 以及第二、四、六次化疗用药结束后 1-3 日采集静脉血, 取血清备用。同时选取健康体检者 43 例作为对照组。本研究涉及的被测试者都已告知了研究目的, 并签署了

知情同意书。

1.2 试剂

血清 RNA 的提取试剂 miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen), 组织 RNA 提取试剂 RNAiso Plus(Takara), 逆转录试剂盒(Takara), SYBR green qRT-PCR assay(Takara)。

1.3 血清 RNA 的提取

将血清样品用 QIAzol Lysis Reagent 裂解, 加入 miRNeasy Serum Spike-In Control, 氯仿等混匀, 离心取上清层, 加入无水乙醇洗涤, 过 RNeasy MinElute spin column 浓集 RNA, 将 RNA 纯化后, -80°C 保存备用。

1.4 Real-time PCR

测定 RNA 的浓度和纯度后, 利用 microRNA reverse transcription kit 反转录试剂盒和 microRNA 的特异性引物将 RNA 反转录生成 cDNA。反应条件为: 25°C , 30min; 42°C , 30min; 85°C , 5min; 4°C 保存。然后在实时荧光定量 PCR 仪上, 按照程序进行 PCR 扩增反应。反应条件为: 95°C , 3min; 95°C , 12s; 62°C , 40s; 40 个循环。PCR 反应以 U6 作为内参, 采用 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 相对定量法测定血清中 microRNA 的表达水平。

1.5 统计学方法

所有数据都采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 以均数 \pm 标准差的形式表示。组间 microRNA 的表达差异采用 Wilcoxon tests 方法检验; 双边 χ^2 test 用来比较 microRNAs 与 NSCLC 患者临床病理因素的相关性; ANOVA test 用于检验 microRNAs 与 TNM 分期的关系, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 的提取

本实验采用 miRNeasy Serum/Plasma Kit 提取血清 RNA, 提取的 RNA 经微量核酸测定仪 NanoDrop 2000 测定浓度及纯度, 其 $\text{OD}_{260/280}$ 在 1.8-2.0 范围内。

2.2 循环 microRNAs 在非小细胞肺癌患者血清中的表达

与健康对照组相比, 血清中 4 种 microRNAs 的表达存在差异, miR-125b 的表达明显高于健康对照组, $P<0.01$; miR-19b 与 miR-200b 也高于健康对照组, $P<0.05$; miR-34a 表达下降, $P<0.05$ (图 1-1)。

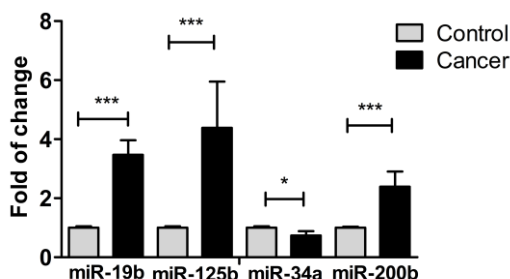


图 1-1 血清中 4 种 microRNAs 的表达

2.3 循环 microRNAs 对非小细胞肺癌诊断的评价

miR-19b、miR-125b、miR-34a 和 miR-200b 的 ROC 曲线下面积分别是 0.873, 0.826, 0.730 和 0.870。根据统计学标准, 当 $\text{AUC}=0.5$ 时, 表示完全无诊断价值; 当 $0.5<\text{AUC}\leq 0.7$ 时, 表示诊断准确性较低; 当 $0.7<\text{AUC}\leq 0.9$ 时, 表示诊断准确性中等; 当 $0.9<\text{AUC}<1$ 时, 表示诊断准确性较高; 因此, miR-19b, miR-125b 和 miR-200b 对非小细胞肺癌的诊断准确性中等; miR-34a 对非小细胞肺癌的诊断准确性不及上述 3 种 microRNAs (图 1-2)。

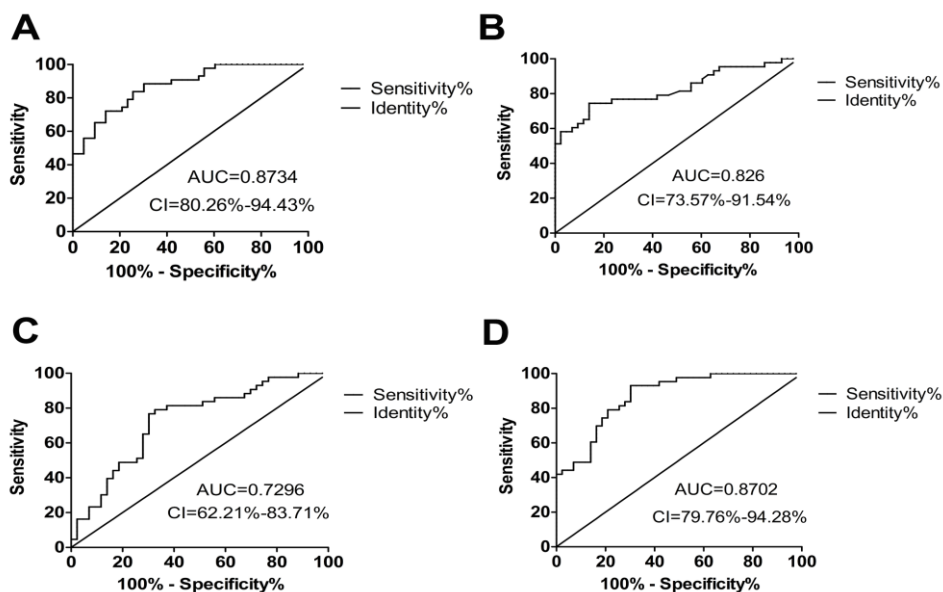


图 1-2 A.miR-19b ROC 曲线 B.miR-125b ROC 曲线
C.miR-34a ROC 曲线 D.miR-200b ROC 曲线

2.4 循环 microRNAs 与非小细胞肺癌患者临床病理特征的相关性

miR-19b、miR-125b、miR-34a 和 miR-200b 在非小细胞肺癌患者血清中的表达与其年龄、性别、吸烟、病理类型等无相关性。但 miR-19b、miR-125b、miR-200b 的表达与淋巴结转移相关 (P<0.05)；miR-34a 的表达与淋巴结转移没有相关性 (P>0.05) (表 1-1)。

表 1-1 血清 microRNAs 与 NSCLC 临床病理特征的相关性

	miR-19b		p	miR-125b		p
	高 23	低 20		高 25	低 18	
年龄 (%)			0.7799			0.655
<60	9 (56.3)	7 (43.8)		10 (62.5)	6 (37.5)	
≥60	14 (51.9)	13 (48.1)		15 (55.6)	12 (44.4)	
性别 (%)			0.1045			0.927
男	18 (62.1)	11 (37.9)		17 (58.6)	12 (41.4)	
女	5 (35.7)	9 (64.3)		8 (57.1)	6 (42.9)	
吸烟 (%)			0.1906			0.014
吸烟	16(61.5)	10(38.5)		19 (73.1)	7 (26.9)	
不吸烟	7(41.2)	10(58.8)		6 (35.3)	11(64.7)	
有无转移 (%)			0.0041*			0.001**
无	5(27.8)	13(72.2)		5(27.8)	13 (72.2)	
有	18(72)	7(28)		20 (80)	5 (20)	
病理 (%)			0.27			0.343
腺癌	12(63.2)	7(63.8)		11(57.9)	8(42.1)	
鳞癌	6(37.5)	10(62.5)		11(68.8)	5(31.3)	
大细胞癌	5(62.5)	3(37.5)		3(37.5)	5(62.5)	

	miR-34a		p	miR-200b		p
	高 21	低 22		高 22	低 21	
年龄 (%)			0.168			0.757
<60	10 (62.5)	6 (37.5)		8 (50)	8 (50)	
≥60	11 (40.7)	16 (59.3)		14 (51.9)	13 (48.1)	
性别 (%)			0.916			0.092
男	14 (48.3)	15 (51.7)		16 (61.5)	10 (38.5)	
女	7 (50)	7 (50)		6 (35.3)	11 (64.7)	
吸烟 (%)			0.416			0.85
吸烟	14(53.8)	12(46.2)		13(50)	13(50)	
不吸烟	7(41.2)	10(58.8)		9(52.9)	8(47.1)	
有无转移 (%)			0.455			0.009**
无	10 (55.6)	8 (44.4)		5(27.8)	13(72.2)	
有	11(44)	14(56)		17(68)	8(32)	
病理 (%)			0.622			0.17
腺癌	8(42.1)	11(57.9)		7(36.8)	12(63.2)	
鳞癌	8(50)	8(50)		9(56.3)	7(43.8)	
大细胞癌	5(62.5)	3(37.5)		6(75)	2(25)	

2.5 循环 microRNAs 对非小细胞肺癌患者化疗效果的监测

根据 RECIST 标准、CT 结果和肿瘤标志物对化疗效果的评价, 将患者分为完全缓解(CR), 部分缓解(PR), 病变稳定期(SD)及病变进展期(PD), 其中化疗有效组(CR+PR)25 例, 化疗无效组(SD+PD)18 例。在化疗有效组 (CR+PR), 患者血清中 miR-19b, miR-125b 的表达逐渐下降, 第六次化疗后与第二次化疗相比表达降低($P<0.05$)。在化疗无效组 (SD+PD) 中结果正好相反, 患者血清中 miR-19b 和 miR-125b 表达持续升高, 在末次化疗和第二次化疗相比存在差异($P<0.05$)。miR-34a 无论是在化疗有效组还是化疗无效组, 各化疗阶段的表达均没有统计学差异($P>0.05$)。在化疗有效组和化疗无效组中, 患者在各化疗阶段血清中 miR-200b 的表达都下降, 且第二次化疗与第六次化疗相比, miR-200b 的表达存在统计学差异($P<0.05$) (图 1-3)。

表 1-2 4 种 microRNAs 在化疗期间的相对表达量

		第二次化疗	第四次化疗	第六次化疗
miR-19b	CR+PR 组	2.98±0.08	2.66±0.21	2.1±0.10
	SD+PD 组	3.123±0.11	3.19±0.13	3.91±0.33
miR-125b	CR+PR 组	3.61±0.53	3.08±0.85	2.19±0.34
	SD+PD 组	3.97±0.59	4.2±0.74	4.63±0.25
miR-34a	CR+PR 组	0.857±0.31	0.849±0.14	0.879±0.27
	SD+PD 组	0.826±0.12	0.887±0.18	0.881±0.16
miR-200b	CR+PR 组	1.975±0.11	1.80±0.19	1.70±0.12
	SD+PD 组	2.08±0.28	1.89±0.31	1.72±0.22

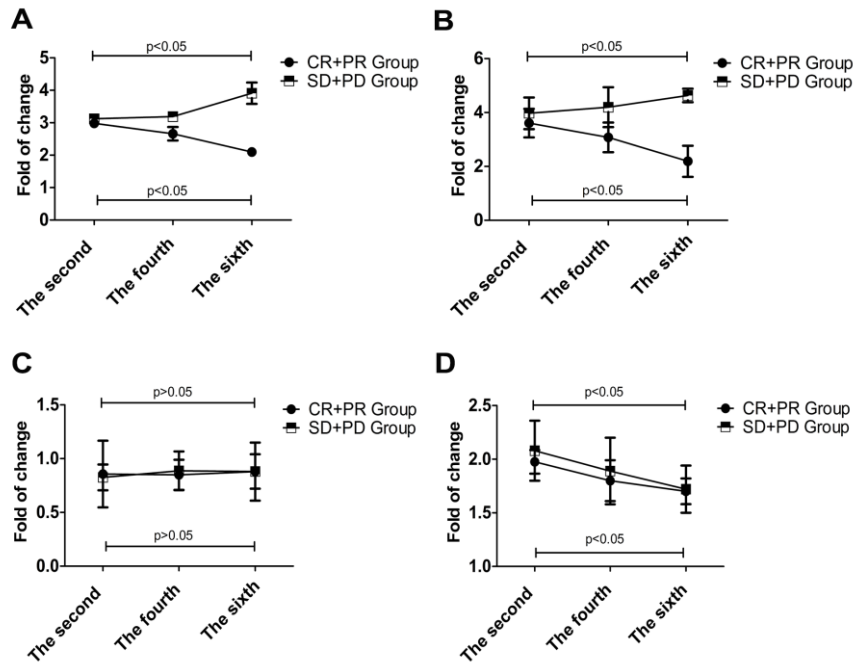


图 1-3 A.miR-19b 的表达变化

B.miR-125b 的表达变化

C.miR-34a 的表达变化

D.miR-200b 的表达变化

3 讨论

肺癌是全世界范围内发病率、死亡率最高的肿瘤之一，2009年，中国肺癌患者的发病率和死亡率居恶性肿瘤首位^[4]。非小细胞肺癌患者的发病率占肺癌发病率的80%，因NSCLC起病隐匿，多数患者发现时已处于晚期阶段，目前对NSCLC的治疗主要是化疗。虽然肺癌的诊断、治疗技术不断提高，患者的5年生存率也有所上升，但肺癌依然是预后最差的恶性肿瘤之一^[5]，虽然对NSCLC的研究和治疗已经有了一定的进展，仍然缺乏对NSCLC诊断、治疗指导、疗效评估的有效生物学指标。

大量研究已表明，microRNAs在肿瘤诊断、疗效判断等方面具有一定的优势：1. microRNAs可参与肿瘤的发生发展过程，在不同的肿瘤组织中，其表达呈现出特征性的改变^[6]；2. microRNAs的表达具有组织特异性，可作为一种新的标志物准确判断肿瘤组织的来源^[7]；3. microRNAs的表达具有阶段特异性，在肿瘤的不同分期，microRNAs呈现出不同的表达谱^[8]；4. microRNAs是一种小分子，比mRNA更为稳定，检测更为准确^[9]；5. 人体体液如血浆或血清中的循环microRNAs与肿瘤密切相关，并能被稳定的检测出来，使循环microRNAs作为一种新的反映肿瘤状态的标志物，拥有良好的临床应用前景^[10]。另外，循环microRNAs在血清中稳定性好，与肿瘤发生发展相关，且血清标本容易获得，可对健康人群进行早期的肿瘤筛查，还可对肿瘤患者的治疗效果和预后进行动态评估，奠定了循环microRNAs成为理想肿瘤标志物的基础。

本研究发现，与健康体检者相比，非小细胞肺癌患者血清中miR-19b，miR-125b，miR-200b表达升高，miR-34a表达降低，说明在非小细胞肺癌的发生发展过程中，这4种microRNAs呈现出特征性的表达，可能参与了NSCLC的发生发展过程，通过ROC曲线分析发现，miR-19b，miR-125b，miR-200b对NSCLC的诊断准确性较好，且与淋巴结转移相关，可作为NSCLC诊断的辅助诊断指标，同时也可作为判断患者是否出现淋巴结转移的辅助标志物。在NSCLC患者接受化疗过程中，miR-19b，miR-125b也呈现出特异性表达。在化疗有效组（完全缓解CR+部分缓解PR）中，miR-19b，miR-125b表达逐渐下降，第六次化疗后与第二次化疗后相比，表达明显降低，在化疗无效组（病情稳定期SD+病变进展期PD）中结果正好相反，说明血清miR-19b，miR-125b的表达水平可以反映患者的化疗效果，可以作为患者化疗效果评价的辅助标志物，当化疗过程中血清miR-19b，miR-125b表达降低时，说明化疗有效，当其表达升高时，说明该化疗方案对患者效果欠佳，应及时改变化疗方案，以确保患者的治疗效果。因此，我们推测

miR-19b, miR-125b 与 NSCLC 的发生发展相关, 在化疗过程中可表现出相应的变化, 可作为 NSCLC 的辅助诊断标志物和化疗效果评价标志物, 为 NSCLC 的诊断和治疗效果的判断提供了新的思路。

参考文献

- [1]Meng J,Xie W,Cao L,et al.shRNA targeting HDGF suppressed cell growth and invasion of squamous cell lung cancer[J].Acta Bioc Biop Sin,2010,42(1): 52-57.
- [2]Wozniak MB,Scelo G,Brennan P,et al.Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Non-Small-Cell Lung Cancer.PLoS One, 2015,10(5): e0125026.
- [3]Lawrie CH,Gal S,Pulford K,et al.Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma.Br J Haematol,2008,141(5): 672-675.
- [4]Chen W,Zheng R,Zhang S,et al.The incidences and mortalities of major cancers in China.Chin J Cancer,2013,32(3): 106.
- [5]Rebecca S,Deepa N,Ahmedin J,et al.Cancer Statistics.CA CANCERJ CLIN,2013,34(4): 24-29.
- [6]Mar-Aguilar F,Mendoza-Ramírez JA,Reséndez-Pérez D,et al.Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers.Dis Markers, 2013,34(3): 163-9.
- [7]Rosenfeld N,Aharonov R,Meiri E,et al.MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin.Nat Biotechnol,2008,26(4): 462-499.
- [8]Malumbres R,Sarosiek KA,Cubedo E,et al.Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas.Blood,2009,113(16): 3754-3764.
- [9]Liu A,Tetzlaff MT,Vanbelle P,et al.MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues.Int J Clin Exp Pathol,2009,2(6): 519-527.
- [10]Brase JC,Wuttig D,Kuner R,et al.Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer.Mol Cancer,2010,9: 306-315.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

腹水直接检测降钙素原和白介素 6 用于自发性腹膜炎诊断作用的探讨

刘亚楠 苑文雯 蔡硕 李沛然 郭桐生*

302 医院临检中心 北京 100039

*通讯作者:gtsheng@sina.com

[摘要] **目的:** 评估肝硬化患者腹水直接检测降钙素原和白介素 6 用来诊断自发性细菌性腹膜炎的价值。**方法:** 按照自发性腹膜炎的诊断标准, 2015 年 1 月至 4 月在解放军第 302 医院连续收集 74 例自发性细菌性腹膜炎 (SBP) 的肝硬化患者的腹水和 75 例无感染的肝硬化患者的腹水, 检测患者的总胆红素、AST、ALT 及凝血酶原活动度, 电化学发光法检测患者腹水的 PCT 和 IL-6, 同时检测 SBP 组患者的血清 PCT。SPSS13.0 进行统计分析。**结果:** 肝硬化腹水患者中男性明显多于女性, SBP 组和对照组两组性别、年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$); SBP 组的腹水分叶核细胞计数显著高于对照组 (2634.3 ± 7198 vs. 32.1 ± 45.6 , $P=0.003$), SBP 组的 AST 要显著高于对照组 (276.5 ± 868.7 vs. 66.1 ± 51.9 , $P=0.044$); 有 19 名肝硬化患者腹水细菌培养阳性共鉴定出 21 株菌; SBP 组腹水 PCT 和 IL-6 结果分别显著高于对照组的相应结果 ($0.94 \pm 1.24 \text{ ng/mL}$ vs. $0.21 \pm 0.27 \text{ ng/mL}$, $P<0.001$; $3386.7 \pm 1551.9 \text{ pg/mL}$ vs. 1775.4 ± 1551.9 , $p<0.001$)。SBP 组血液和腹水 PCT 的具有相关性 ($R=0.771$, 95%CI: 0.234-0.346); 腹水 PCT 受试者工作曲线 (ROC): 曲线下面积为 0.783, 95%CI: 0.707-0.860, $p<0.001$, PCT 折点为 0.4ng/mL, 敏感性为 0.608, 特异性为 0.907。**结论:** 肝硬化患者腹水直接检测 PCT 可以用于肝硬化患者 SBP 的诊断, 但敏感性不太高, 要防止漏检。IL-6 不太适用于肝硬化患者 SBP 的诊断。

[关键词] 肝硬化；自发性细菌性腹膜炎；腹水；降钙素原；白介素 6

自发性细菌性腹膜炎 (spontaneous bacterial peritonitis, SBP) 是肝硬化患者最常见的感染并发症之一, 住院肝硬化患者感染率 30-50%, 死亡率达到 32%。SBP 可以分为(1)腹水中性粒细胞计数 $>250/\text{mm}^3$ 和腹水细菌培养阳性; (2)细菌培养阴性而腹水中性粒细胞计数 $>250/\text{mm}^3$; (3)腹水细菌培养阳性而腹水中性粒细胞计数 $<250/\text{mm}^3$ 。有报道腹水中性粒细胞计数 $<250/\text{mm}^3$ 和细菌培养阴性 SBP 的肝硬化患者发生率为 8-30%, 这部分患者的死亡率高^[1-3]。

SBP 肝硬化患者复发率高, 非住院患者为 1.5-3.5%, 而住院患者的发生率 10%。SBP 一年复发率高达 70%, 住院死亡率 20%-40%, 最高死亡率报道达到 78%^[3-5]。早期诊断和及时的抗生素治疗是提高患者生存率的关键。尽管使用了包括床边接种培养瓶培养腹水的敏感方法, 在有明显腹膜炎临床症状和腹水中性粒细胞计数升高的患者中培养阴性率超过 60%, 基于 SBP 的凶险性和需要及时治疗的原因, 很多指南中选择腹水中性粒细胞计数 $>250/\text{mm}^3$ 作为诊断 SBP 的标准。

但腹水细菌培养需要很长的时间, 而且对设备要求比较高并不是所有医疗单位可以开展。需要简单、快速、可靠的生物标志物用于诊断具有腹水的肝硬化患者。降钙素原(procalcitonin, PCT)和白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)是临床常用的感染诊断标志物, 相对于腹水细胞计数, PCT 和 IL-6 检测可以更客观, 能够在床旁开展。多个研究对 PCT 在 SBP 诊断作用进行了探索, 发现血清中 PCT 可以作为诊断 SBP 感染的标志物, IL-6 在 SBP 的诊断作用未见研究结论。对于腹水直接检测 PCT 对于 SBP 的诊断价值研究探索在 2001 年以前, 得到的结论不确定, 而且这些研究文章的病例也较少(两个研究为 21 和 10 例), 得到的结论难以让人信服^[6-7], 我们在前期的预试验中发现 SBP 患者腹水中 PCT 和 IL-6 是升高的。基于以上理由, 我们对腹水中直接检测 PCT 和 IL-6 进行探索。

1 材料和方法

1.1 一般资料

研究对象为解放军 302 医院 2015 年 1 月~4 月收治的肝硬化患者, 共 149 例, 其中男性 55 例, 女性 37 例, 肝硬化腹水感染或肝硬化腹水无感染的诊断均符合 1998 年全国腹水学术会议制定的肝硬化并发腹水感染的诊断标准。分为肝硬化自发性细菌性腹膜炎患者组(SBP 组)和肝硬化腹水无感染患者组(对照组), SBP 组年龄 55.1 ± 1.8 岁; 对照组年龄为 53.1 ± 1.1 岁。

1.2 检查项目

腹水细菌培养、分叶核细胞计数, 血清、腹水降钙素原和白介素-6 水平, 血清总胆红素、AST、ALT 和凝血酶原活动度。

1.3 实验方法

1.3.1 PCT 和 IL-6 检测仪器

罗氏 E601 电化学检测仪, 试剂盒为罗氏 PCT 和 IL-6 电化学发光试剂盒 (德国罗氏)。

1.3.2 有核细胞计数

希斯美康 XT-4000i 多功能全自动血细胞分析仪在体液细胞模式下检测 (日本希斯美康), 人工复核。

1.3.3 腹水细菌培养

生物梅里埃血培养仪, 生物梅里埃细菌培养瓶 (法国梅里埃)。

1.3.4 凝血酶原活动度

采用希斯美康凝血检测仪 CA-7000 (日本希斯美康), 试剂为仪器配套原装进口试剂。

1.3.5 血清总胆红素、AST 和 ALT 检测

贝克曼 AU5400 检测, 试剂为仪器配套试剂 (美国贝克曼)。

1.3.6 统计学方法

结果采用 SPSS13.0 统计学软件进行处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示, 计数资料先进行 F 检验, 两组服从正态分布进行 t 检验, 否则采用秩和检验; 计数资料采用 χ^2 检验, 检验值 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。ROC 曲线用于确定检测的折点、敏感性和特异性。

2 结果

2.1 两组患者一般资料情况

肝硬化腹水患者中男性明显多于女性，SBP 组和对照组两组患者性别、年龄比较，差异无统计学意义($P>0.05$)，具有可比性，结果见表 1。其他资料见表 2，SBP 组的腹水分叶核细胞计数显著高于对照组，我们病例中 SBP 组的 AST 要显著高于对照组。

表 1 两组肝硬化患者年龄和性别比较

	年龄	性别(男/女)
SBP 组(n=74)	55.1±11.8	56/18
对照组(n=75)	53.1±11.1	56/19
t 值	0.747	
p 值	0.456	0.887

表 2 两组肝硬化患者其他一般资料

	SBP 组 (n=74)	对照组 (n=75)	p 值
原发病			
HBV 感染肝硬化	41	35	
HCV 感染肝硬化	3	9	
酒精性肝硬化	6	11	
其他	24	20	
检测结果			
腹水分叶核细胞数 ($\times 10^6$ cells/L,)	2634.3±7198	32.1±45.6	$P=0.003$
总胆红素($\bar{X} \pm S$, $\mu\text{mol/L}$)	118.1±16.3	94.8±126.2	$P=0.246$
AST($\bar{X} \pm S$, U/L)	276.5±868.7	66.1±51.9	$P=0.044$
ALT($\bar{X} \pm S$, U/L)	119.9±399.2	42.0±40.5	$P=0.109$
PTA($\bar{X} \pm S$, %)	56.6±20.3	61.4±16.4	$P=0.117$

2.2 SBP 组培养

所有的患者均在无菌抽取腹水并在床旁按照无菌操作要求注入血培养瓶，全自动微生物培养仪培养，阳性报警后接种血平板和中国蓝平板，细菌生长后分纯鉴定和做药敏。共有 19 名肝硬化患者腹水培养出阳性，其中有 2 位患者培养出两种菌，共鉴定出细菌 21 株菌（见表 3）。

表 3 腹水细菌培养鉴定细菌结果

	菌名	菌株数
革兰氏阴性菌	大肠埃希菌	2
	鲍曼不动杆菌	2
	产气肠杆菌	1
	产吡啶金黄杆菌	1
	摩根摩根菌摩根亚种	1
	嗜麦芽寡养单胞菌	1
	链球菌属	1
革兰氏阳性菌	屎肠球菌	8
	金葡	3
	粪肠	1
	链球菌属	1

2.3 两个组之间腹水 PCT 和 IL-6 结果

SBP 组 PCT 结果为 (0.94 ± 1.24) ng/mL, 对照组的 PCT 结果为 (0.21 ± 0.27) ng/mL, F 检验 $P < 0.001$, 秩和检验 $P < 0.001$, 两者相差非常显著(见图 1)。SBP 组 IL-6 结果为 (3386.7 ± 1551.9) pg/mL, 对照组的 PCT 结果为 (1775.4 ± 1551.9) pg/mL, F 检验 $P = 0.266$, t 检验 $t = 6.114$, $P < 0.001$, 两者相差非常显著(见图 2), 虽然 SBP 组 IL-6 结果显著高于对照组, 无论对照组和 SBP 组腹水 IL-6 均远高于正常值(0-7)。

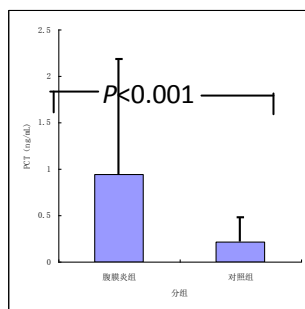


图 1 两组之间腹水 PCT 结果比较

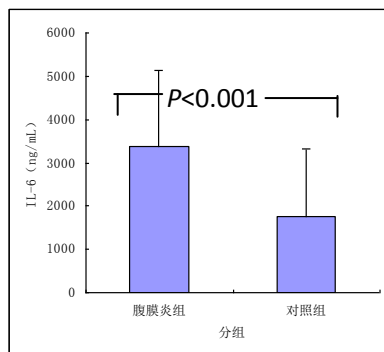


图 2 两组之间腹水 IL-6 结果比较

2.4 SBP 组血液和腹水 PCT 的相关性检测

将 SBP 组血清和腹水的 PCT 进行相关性检测, $R = 0.771$, 95%CI: 0.234-0.346, 两者的回归相关图见图 3。

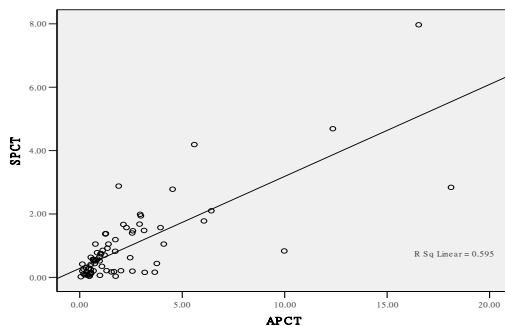


图 3 SBP 组血清和腹水 PCT 相关图 (SPCT:血清 PCT, APCT 腹水 PCT)

2.5 腹水 PCT 受试者工作曲线 (ROC)

曲线下面积为 0.783, 95%CI 为 0.707-0.860, $p < 0.001$, 说明腹水直接检测 PCT 具有诊断意义, 约登指数最大为 0.515 所对应的 PCT 结果为 0.4ng/mL, 以该值作为折点, 敏感性为 0.608, 特异性为 0.907。结果见图 4。

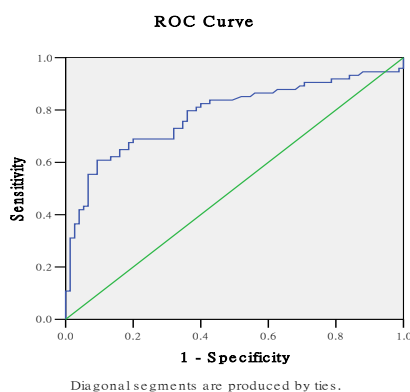


图4 腹水 PCT 受试者工作曲线图

3 讨论

肝硬化是引起腹水增多最常见的原因之一，腹水的出现往往预示着肝硬化患者预后较差，相对于其他并发症，提高了危险性，一年死亡率达到 40%，二年死亡率达到 50%^[8]。

肝硬化患者腹水感染主要原因是肠道细菌的易位，即从肠道进入肠道淋巴小体，然后进入血液、腹水等造成感染。SBP 最常见的病原是以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为代表的肠杆菌属。但是在我们的报道中仅仅有 19 个病例培养分离出病原，其中包括大肠埃希菌、肠球菌、鲍曼不动杆菌和链球菌，培养阳性率不高，而且和我们以往研究不同这次培养的大肠埃希菌等肠杆菌科细菌不多，可能主要原因是这次我们收集的病例有 149 例，不能代表 SBP 样本的全体；有欧洲研究显示 SBP 病原中革兰氏阳性菌的比例在不断上升，革兰氏阴性菌的比例在下降，原因是与患者预使用抗生素有关，有些 SBP 患者治愈后为防止复发，使用氟喹诺酮类抗生素预防，抑制了肠道的肠杆菌科细菌生长，但是一些革兰氏阳性菌却成为 SBP 的重要病原。

有关肝硬化患者 SBP 发生率的报道也不一致，有一项报道是 27.7%，其他的报道从 50-71%。一些包括腹水 pH 值、乳酸、乳酸脱氢酶指标曾经作为诊断 SBP 的备选指标，但是都不能达到满意诊断 SBP 的效果。现在临床上普遍采用腹水多分叶核细胞分类和计数作为诊断标准之一，而且发现多分叶核细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)计数作为诊断标准可以区分 SBP 与其他原因引起的腹水。考虑最佳的敏感性和特异性，PMN 的诊断界值选 >250 个/μL 作为折点，PMN >500 个/μL 作为折点虽能够有更好的特异性，但是敏感性比较低，现在指南普遍接受 PMN >250 个/μL 作为折点，主要考虑这个折点可以减少假阴性^[1-3]。但是 PMN >250 个/μL 折点并不能排除漏掉 SBP 的病例，Campillo 等^[9]根据 SBP 患者感染的细菌种类发现感染葡萄球菌属的 SBP 患者 PMN 计数较低(87 ± 200 个/μL)，其次为链球菌(3275 ± 8342 个/μL)和肠球菌(771 ± 1686 个/μL)等革兰氏阳性菌，远远低于肠杆菌科细菌(650 ± 1359)。Gonzalez-Navajas 等^[10]发现革兰氏阳性菌引起的 SBP 腹水中 PMN 计数要低于革兰氏阴性菌引起的 SBP。我们这次发现有 4 例培养阳性 PMN 计数 < 250 个/μL，最低的一例由屎肠球菌引起的 SBP 患者 PMN 计数仅为 80 个/μL。

降钙素原(procalcitonin, PCT)与降钙素原的前体氨基酸序列相同，研究发现感染后的 3-6 小时 PCT 在血清中可以升高，其半衰期为 25-30 小时，很多研究提示 PCT 可以作为细菌感染的炎症诊断指标，正常人的血清中检测值 < 0.1 ng/mL，PCT 作为细菌感染的诊断指标要优于 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)。而且相对于腹水细胞计数，PCT 检测可以更客观，能够在床旁开展。Su 等^[11]采用 META 分析，将降钙素原单独或与其他标志物联合使用时对 SBP 的诊断价值进行分析。分析显示：血清 PCT(折点在 0.58 和 0.75 ng/mL 之间取舍)诊断 SBP 的准确度高，曲线下面积(AUC)值为 0.95(95%可信区间[95%CI], 0.82-0.99)，敏感性为 0.86(95% CI, 0.73-0.94)，和特异性为 0.80(95% CI, 0.72-0.87)。Cekin 等^[12]纳入了 101 例腹水患者(其中 20% 例为感染性腹膜炎)，检测血清 PCT 和 CRP 水平。受试者工作曲线(ROC)分析：血清 PCT(折点 0.61 ng/mL)诊断 SBP 的 AUC 为 0.98。但是两项研究腹水检测 PCT 诊断 SBP 的文献都很早(2000 年和 2001 年)，而且病例比较少(21 和 10 例)^[6-7]。我们这次研究纳入 74 例 SBP 患者，ROC 曲线下面积为 0.793，95%CI: 0.707-0.860，折点选为 ≥ 0.4 ng/mL 时约登指数最大为 0.515，敏感性为 0.608，特异性为 0.907。特异性高但是敏感性不是太高。

IL-6 直接被肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和白细胞介素 1 诱导产生，特点是分泌快，2 小时内达到高

峰,能在血液中持续一段时间,IL-6用于感染诊断作用还缺少大型的前瞻性研究证据,现有的研究结果存在互相矛盾,在一些创伤研究显示IL-6在感染组高于非感染组,有一个研究发现以 $>500\text{pg/mL}$ 作为折点,IL-6和PCT的诊断价值相当^[13-14]。IL-6用于肝硬化患者感染尤其是SBP患者感染也有文献涉及,同样得到的结果存在矛盾。但是没有肝硬化患者腹水检测IL-6用于SBP诊断的报告,我们在研究中发现患者无论是SBP组还是对照组腹水中IL-6普遍升高,所有患者检测结果高于正常人血液中检测结果,低于100仅仅两名患者,低于500也只有17名患者。虽然SBP组IL-6结果远高于对照组结果($3386.7\pm 1551.9\text{pg/mL}$ vs. 1775.4 ± 1551.9 , $P<0.001$),腹水直接检测IL-6难以用于诊断SBP。

所以肝硬化患者腹水直接检测PCT可以用于肝硬化患者SBP的诊断,只是敏感性不是太高,要防止漏检。IL-6不太适用于肝硬化患者SBP的诊断。

参考文献

- [1]Wiest R,Krag A,Gerbes A.Spontaneous bacterial peritonitis:recent guidelines and beyond.Gut.2012;61:297-310.
- [2]Such J,Frances R,Munoz C,et al.Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative,nonneutrocytic ascites.Hepatology.2002;36:135-141.
- [3]Mostafa MS,El-Seidi EA,Kassem AM,et al.Detection of ascitic fluid infections in patients with liver cirrhosis and ascites.Arab J Gastroenterol.2011;12:20-24.
- [4]Nousbaum JB,Cadranel JF,Nahon P,et al.Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis.Hepatology.2007;45:1275-1281.
- [5]Evans LT,Kim WR,Poterucha JJ,et al.Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites.Hepatology.2003; 37:897-901.
- [6]Spahr L1,Morard I,Hadengue A ,et al.Procalcitonin is not an accurate marker of spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis.Hepatogastroenterology. 2001 Mar-Apr;48(38):502-5.
- [7]Viallon A, Zeni F, Pouzet V, Lambert C,et al.Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis:diagnostic value and relationship to pro-inflammatory cytokines.Intensive Care Med. 2000,26(8):1082-8.
- [8]European Association for the Study of the Liver.EASL clinical practice guidelines on the management of ascites,spontaneous bacterial peritonitis,and hepatorenal syndrome in cirrhosis.J Hepatol.2010,53(3):397-417.
- [9]Campillo B,Richardet JP,Kheo T,et al.Nosocomial spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia in cirrhotic patients:impact of isolate type on prognosis and characteristics of infection.Clin Infect Dis. 2002 Jul 1;35(1):1-10.
- [10]González-Navajas JM,Bellot P,Francés R,et al.Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin.J Hepatol 2008;48:61-7.
- [11]Su DH,Zhuo C,Liao K,Cheng WB,Cheng H,Zhao XF.Value of serum procalcitonin levels in predicting spontaneous bacterial peritonitis.Hepatogastroenterology 2013;60:641-6.
- [12]Cekin Y,Cekin AH,Duman A,Yilmaz U,Yesil B,Yolcular BO.The role of serum procalcitonin levels in predicting ascitic fluid infection in hospitalized cirrhotic and non-cirrhotic patients.Int J Med Sci 2013;10:1367-74.
- [13]Billeter A,Turina M,Seifert B,et al.Early serum procalcitonin,interleukin-6,and 24-hour lactate clearance:useful indicators of septic infections in severely traumatized patients.World J Surg 2009,33:558-66.
- [14]Oberhoffer M,Russwurm S,Bredle D,et al.Discriminative power of inflammatory markers for prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in ICU patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or sepsis at arbitrary time points.Intensive Care Med 2000,26(Suppl 2):S170-4.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

质谱技术在区分大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的临床应用

鲍春梅 崔恩博 张鞠玲 王欢 贾天野 陈素明 庞君丽 曲芬 李伯安

302 医院临检中心 北京 100039

[摘要] **目的:** 使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)鉴定区分宋内志贺菌和大肠埃希氏菌。**方法:** 分别选取宋内志贺菌和大肠埃希氏菌各 20 例, 使用 flexanalysis 软件比对观察两组细菌蛋白峰的差异, 同时使用 ClinProTools 软件将采集的宋内志贺菌和大肠埃希氏菌的谱图数据建立遗传算法(GA)、快速分类法(QC)、监督神经网络算法(SNN)的分类模型, 对未知菌进行鉴定。**结果:** 通过比对发现宋内志贺菌特异峰 2 个, 大小分别为 2775 和 2877Da; 宋内志贺菌特异峰 1 个, 大小约为 2837Da。GA 模型的交叉验证和认证能力最高为 100%, QC 与 SNN 算法交叉验证率分别为 97.62%和 96.43%。**结论:** 使用 ClinProTools 软件实现对大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的区分鉴定, 弥补了质谱技术在鉴定亲缘关系相近菌种能力的不足。

[关键词] MALDI-TOF MS; 宋内志贺菌; 大肠埃希氏菌

宋内志贺菌是引起腹泻的常见病原菌, 属于志贺菌的 D 群, 引起的腹泻常为隐匿性, 多发生于儿童和免疫力低下的老人。近些年, 在发展中国家由它引起的腹泻有逐年上升的趋势^[123]。细菌基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)技术是近年来发展起来的一种新型的软电离技术, 它的出现是微生物实验室诊断技术的一次伟大变革, 它的主要优势为鉴定范围广, 操作简便, 准确快速, 成本低廉等特点。但志贺氏菌因为与大肠埃希氏菌亲缘关系相近的缘故, Bruker 公司的质谱仪中并没有宋内志贺菌的数据库, 我们使用质谱技术的 Flexanalysis 软件和 ClinProTools 生物分析软件将宋内志贺菌和大肠埃希氏菌进行鉴定区分, 现将实验结果分析如下:

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验菌株

20例宋内志贺菌和20例大肠埃希氏菌为生化代谢反应鉴定、血清凝集试验及16SrRNA测序确认的临床分离株。

1.1.2 试剂

哥伦比亚血琼脂购自赛默飞, 货号HA-CMY, 批号7024695; 基质 α -氰基-4-对羟基肉桂酸购HCCA购自sigma, 货号CA70990, 批号732469。质控标准品购自布鲁克公司, 货号: 255343, 批号: 193005。

1.1.3 仪器 MALDI-TOF-MS仪器由德国Bruker公司提供, 型号为microFlex-LT型。

1.2 方 法

1.2.1 宋内志贺菌和大肠埃希氏菌的质谱数据采集

1.2.1.1 细菌培养

将40株待测细菌进行接种传代, 孵育16-18小时。

1.2.1.2 细菌固定灭活

在Eppendorf管中加入300 μ l纯净水, 用牙签挑取1-2个的单克隆菌落加入Eppendorf管中, 仔细混匀后加入900 μ l无水乙醇, 混匀后高速离心3 min, 弃去上清, 尽量使Eppendorf管内保持干燥。

1.2.1.3 细菌蛋白溶出

在Eppendorf管中加入50 μ l 70%甲酸, 混匀后加入50 μ l纯乙腈, 高速离心2 min。

1.2.1.4 点靶

分别吸取细菌1 μ l样本上清和质控标准品点靶, 完全干燥后再点1 μ l基质。干燥后上机。基质和BTS标准品配制在基质和BTS标准品中分别加入200 μ l和100 μ l的标准溶液, 标准溶液为50%乙腈、2.5%三氟乙酸和47.5%超纯水的混合溶液。超声震荡混匀后储存-20℃保存备用。

1.2.1.5 采集数据

放入载有样本和质控品生物靶板, 打开FlexControl, 校准仪器, 选择数据采集方法(AutoXecute Method), 调整仪器参数, 采用氮基光源、线性阳离子检测模式, 激光强度为50%, 延迟时间为130 ns, 质量/电荷比的采集范围为2000~20000 Da。每个光谱收集500个点的激光射击, 用鼠标点击Start按钮, 采集质控品的数据先进行仪器校准, 通过校准成功后采集宋内志贺菌和大肠埃希氏菌的样品数据, 每个菌株采集1张谱图并分别保存。

1.2.2 未知菌株的质谱数据采集

20株肠杆菌科的未知菌重复上述1.2.1.1-1.2.1.5的步骤进行质谱数据采集。

1.2.3 宋内志贺菌和大肠埃希氏菌的鉴定

1.2.3.1 标注蛋白峰

打开Flexanalysis软件, 使用它为质谱图做基线消减和平滑处理后, 选择protenis1-20kDa-fullprocess.FAMS方法分别对宋内志贺菌和大肠埃希氏菌临床野生株标注蛋白峰。

1.2.3.2 建立模型

1.2.3.2.1 峰统计

使用ClinProTools软件分组调入宋内志贺菌和大肠埃希氏菌样品数据对所有的峰进行统计分析。在峰统计表中分别显示每个峰的峰编号、质量数、均值差、p值、各组的均值、标准偏差和变异系数等信息。

1.2.3.2.2 建立模型

采用多种生物统计学方法遗传算法(GA)、快速分类法(QC)、监督神经网络算法(SNN)建立模型。

1.2.3.3 未知菌株的分类鉴定

模型建成后, 调入20株未知菌的数据, 分别使用三种不同的生物统计方法对未知菌株的进行分类鉴定。

2 结果

2.1 特异性蛋白峰的差异

通过对40株宋内志贺菌和大肠埃希氏菌谱图蛋白峰的差异分析发现3个特异性峰, 它们的分子量大小分别为2775 Da, 2837 Da和2877 Da。2775和2877 Da分子大小的蛋白峰为宋内志贺菌特异峰, 而2837 Da为大肠埃希氏菌特异峰。图谱如下:

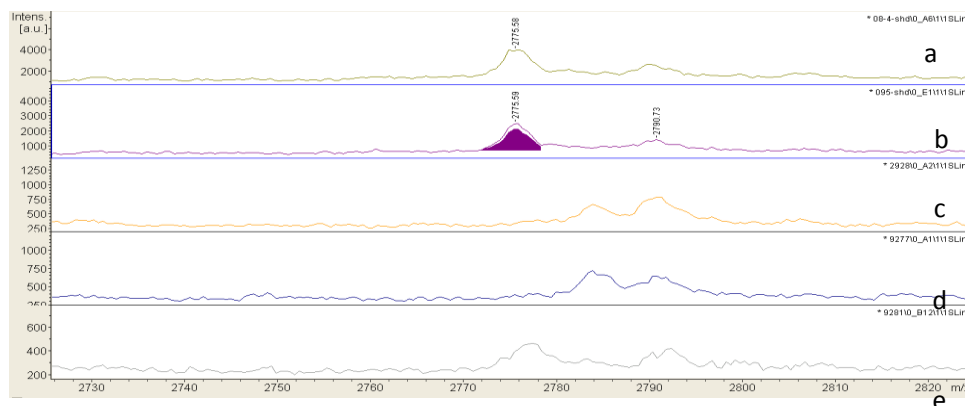


图1 a和b为宋内志贺菌, c, d和e为大肠埃希氏菌, 紫色部分为宋内志贺菌特异峰, 位置大约在2775Da左右。

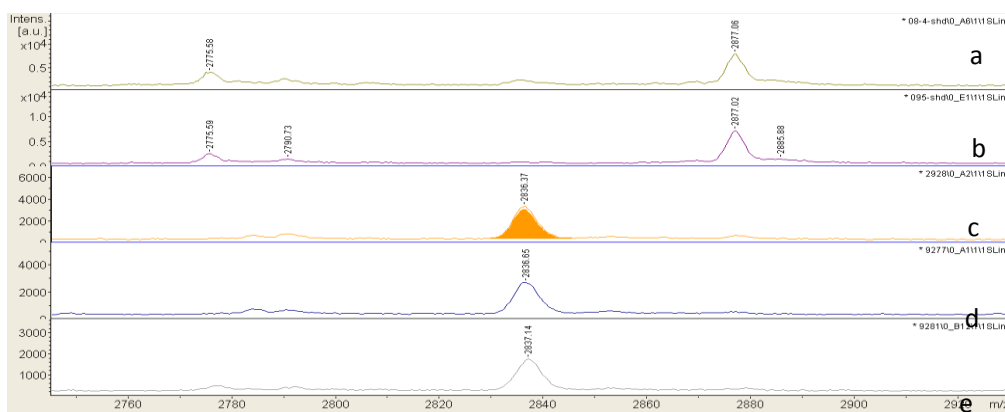


图 2 a 和 b 为宋内志贺菌，c, d 和 e 为大肠埃希氏菌，橙色部分为大肠埃希氏菌特异峰，位置大约在 2837Da 左右。

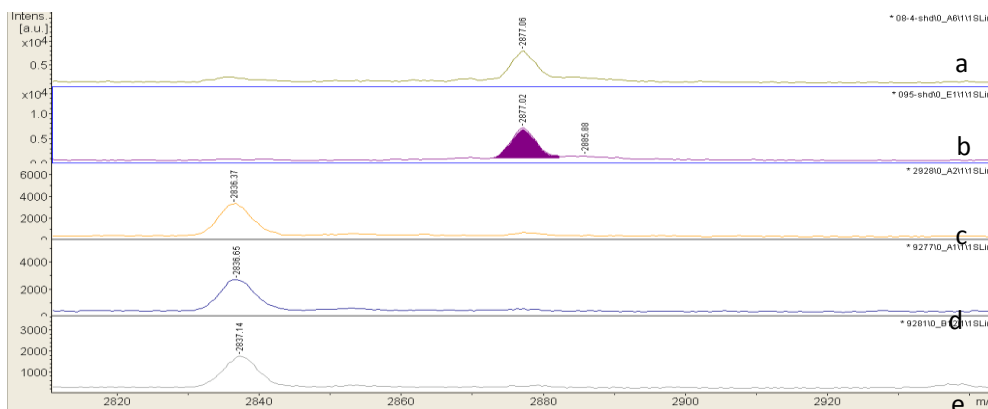


图 3 a 和 b 为宋内志贺菌，c, d 和 e 为大肠埃希氏菌，紫色部分为宋内志贺菌特异峰，位置大约在 2877Da 左右。

2.2 峰统计分析

表 1 宋内志贺菌及大肠埃希氏菌的峰统计分析表

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
1	2084.7	0.53	0.012	0.00988	0.00245	1.24	1.77	0.47	0.69	38.17	38.93
2	2105	0.66	0.00412	0.00312	0.0023	1.11	1.77	0.42	0.78	37.71	44.24
3	2182.52	4.06	0.00000217	< 0.000001	0.0589	3.61	7.67	1.31	2.52	36.16	32.92
4	2384.79	0.87	< 0.000001	0.00000111	0.163	1.64	0.76	0.5	0.33	30.3	43.08
5	2425.11	0.06	0.729	0.825	0.487	1.88	1.82	0.52	0.38	27.89	20.62
6	2549.08	0.1	0.916	0.989	0.335	6.38	6.48	3.21	2.22	50.27	34.3
7	2691.76	5.84	0.000766	0.000157	0.0848	8.38	14.22	3.04	5.77	36.26	40.6
8	2776.24	3.74	< 0.000001	< 0.000001	0.00042	4.72	0.98	1.47	0.37	31.11	37.65
9	2790.91	1.07	0.0000586	0.0000611	0.885	2.49	1.42	0.7	0.69	28.21	48.59
10	2836.63	6.01	< 0.000001	< 0.000001	0.00104	2.08	8.09	0.65	2.33	31.34	28.82
11	2877.53	10.55	0.00000177	< 0.000001	< 0.000001	11.65	1.1	6.36	0.45	54.59	41.49
12	2960.2	0.66	0.00598	0.00312	0.0126	1.86	2.52	0.51	0.79	27.48	31.26
13	2966.87	0.02	0.868	0.753	0.357	1.6	1.63	0.33	0.38	20.69	23.64
14	2999.28	0.61	0.00598	0.00501	0.00417	1.39	2	0.42	0.76	30.44	37.7
15	3022.61	0.42	0.0995	0.137	0.204	2.23	1.81	0.81	0.66	36.45	36.78
16	3076.67	0.64	0.0119	0.00785	0.000581	2.14	2.78	0.59	0.84	27.66	30.02
17	3129.37	9.25	< 0.000001	< 0.000001	0.0287	7.42	16.66	2.22	4.7	29.98	28.23
18	3159.59	7.88	< 0.000001	< 0.000001	0.0275	6.84	14.71	2.03	4.44	29.73	30.15
19	3180.18	0.63	0.147	0.173	0.537	6.23	5.6	1.33	1.2	21.31	21.51
20	3185.67	0.5	0.264	0.226	0.65	4.59	4.09	1.12	1.49	24.42	36.38

红色部分标注的大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的差异峰。1组为大肠埃希氏菌，2组为宋内志贺菌

index 索引号; mass 分子质量大小; Ave 峰面积/峰强度平均值; DAve e 峰面积/峰强度平均值的差异; PTTA 正态分布使用的 t 检验和方差检验的 P 值; PWKW 非正态分布使用的 Wilcoxon 检验和 Kruskal-Wallis 检验的 P 值; StdDev 峰面积/峰强度标准偏差 CV 变异系数

2.3 宋内志贺菌及大肠埃希氏菌聚类分析散点图

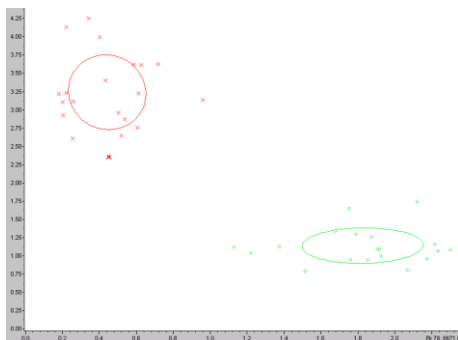


图4 宋内志贺菌和大肠埃希氏菌的聚类分析
红色点区域为大肠埃希氏菌，绿色点区域为宋内志贺菌

2.4 三种不同模型建立的认知能力和交叉认证率计算

模型的 GA 与 QC 算法的交叉验证和认证能力最高，分别为 100%，SNN 算法交叉验证为 96.43%，具体结果见表 2。

表 2 建立模型的认知能力和交叉认证率计算

模型名称	算法	交叉验证	认证能力
遗传算法	GA	100%	100%
监督神经网络算法	SNN	96.43%	100%
快速分类法	QC	97.62%	100%

2.5 未知菌的鉴定

遗传算法 20 株未知菌都可以准确鉴定，快速分类法误把 1 株大肠埃希菌鉴定为宋内志贺菌，监督神经网络算法模型误把 1 株宋内志贺菌鉴定为大肠埃希氏菌。结果见图 5-7。

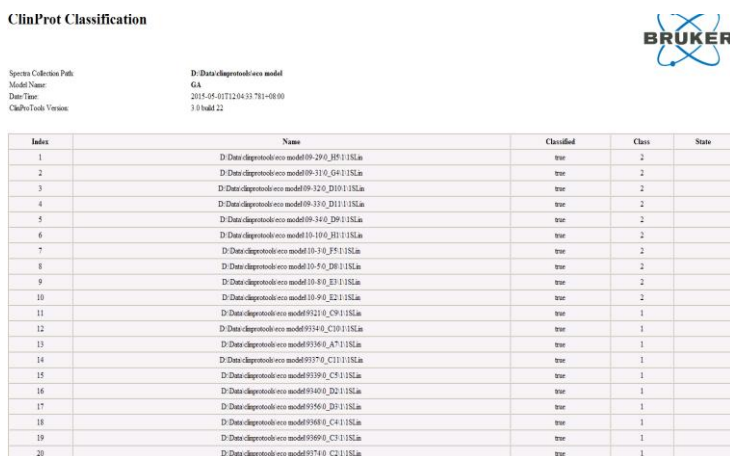


图 5 遗传算法模型的鉴定
1 大肠埃希氏菌 2 宋内志贺菌

ClinProt Classification



Spectra Collection Path: D:\Data\claprotols\model
 Model Name: QC
 Date/Time: 2015-05-01T12:36:18.609-08:00
 ClinProtTools Version: 3.0 build 22

Index	Name	Classified	Class	Class1	Class2	State
1	D:\Data\claprotols\model\09_29\0_H8\1\1SL.in	true	2	0.13	1.87	
2	D:\Data\claprotols\model\09_31\0_G4\1\1SL.in	true	2	0.45	1.55	
3	D:\Data\claprotols\model\09_32\0_D19\1\1SL.in	true	2	0.66	1.34	
4	D:\Data\claprotols\model\09_33\0_D11\1\1SL.in	true	2	0.11	1.89	
5	D:\Data\claprotols\model\09_34\0_D9\1\1SL.in	true	2	0.15	1.85	
6	D:\Data\claprotols\model\10_10\0_H1\1\1SL.in	true	2	0.31	1.69	
7	D:\Data\claprotols\model\10_30\0_F5\1\1SL.in	true	2	0.41	1.59	
8	D:\Data\claprotols\model\10_50\0_D8\1\1SL.in	true	2	0.56	1.44	
9	D:\Data\claprotols\model\10_80\0_E3\1\1SL.in	true	2	0.72	1.28	
10	D:\Data\claprotols\model\10_90\0_R2\1\1SL.in	true	2	0.64	1.36	
11	D:\Data\claprotols\model\9321\0_C9\1\1SL.in	true	1	1.32	0.68	
12	D:\Data\claprotols\model\9340\0_C10\1\1SL.in	true	1	1.15	0.85	
13	D:\Data\claprotols\model\9360\0_A7\1\1SL.in	true	1	1.8	0.2	
14	D:\Data\claprotols\model\9370\0_C11\1\1SL.in	true	1	1.74	0.26	
15	D:\Data\claprotols\model\9390\0_C5\1\1SL.in	true	1	1.12	0.88	
16	D:\Data\claprotols\model\9340\0_D2\1\1SL.in	true	1	1.33	0.67	
17	D:\Data\claprotols\model\9350\0_D3\1\1SL.in	true	1	1.29	0.71	
18	D:\Data\claprotols\model\9360\0_C4\1\1SL.in	true	1	1.8	0.2	
19	D:\Data\claprotols\model\9369\0_C3\1\1SL.in	true	2	0.9	1.1	
20	D:\Data\claprotols\model\9374\0_C2\1\1SL.in	true	1	1.61	0.39	

图6 快速分类法模型的鉴定

1 大肠埃希氏菌 2 宋内志贺菌

ClinProt Classification



Spectra Collection Path: D:\Data\claprotols\eco model
 Model Name: SNN
 Date/Time: 2015-05-01T12:06:16.374-08:00
 ClinProtTools Version: 3.0 build 22

Index	Name	Classified	Class	State
1	D:\Data\claprotols\eco model\09_29\0_H8\1\1SL.in	true	2	
2	D:\Data\claprotols\eco model\09_31\0_G4\1\1SL.in	true	2	
3	D:\Data\claprotols\eco model\09_32\0_D19\1\1SL.in	true	2	
4	D:\Data\claprotols\eco model\09_33\0_D11\1\1SL.in	true	2	
5	D:\Data\claprotols\eco model\09_34\0_D9\1\1SL.in	true	2	
6	D:\Data\claprotols\eco model\10_10\0_H1\1\1SL.in	true	2	
7	D:\Data\claprotols\eco model\10_30\0_F5\1\1SL.in	true	2	
8	D:\Data\claprotols\eco model\10_50\0_D8\1\1SL.in	true	1	
9	D:\Data\claprotols\eco model\10_80\0_E3\1\1SL.in	true	2	
10	D:\Data\claprotols\eco model\10_90\0_R2\1\1SL.in	true	2	
11	D:\Data\claprotols\eco model\9321\0_C9\1\1SL.in	true	1	
12	D:\Data\claprotols\eco model\9340\0_C10\1\1SL.in	true	1	
13	D:\Data\claprotols\eco model\9360\0_A7\1\1SL.in	true	1	
14	D:\Data\claprotols\eco model\9370\0_C11\1\1SL.in	true	1	
15	D:\Data\claprotols\eco model\9390\0_C5\1\1SL.in	true	1	
16	D:\Data\claprotols\eco model\9340\0_D2\1\1SL.in	true	1	
17	D:\Data\claprotols\eco model\9350\0_D3\1\1SL.in	true	1	
18	D:\Data\claprotols\eco model\9360\0_C4\1\1SL.in	true	1	
19	D:\Data\claprotols\eco model\9369\0_C3\1\1SL.in	true	1	
20	D:\Data\claprotols\eco model\9374\0_C2\1\1SL.in	true	1	

图7 神经网络模型的鉴定

1 大肠埃希氏菌 2 宋内志贺菌

3 讨论

多数大肠埃希氏菌为肠道内正常的菌群,而宋内志贺菌则有致病意义。而非活跃性大肠埃希氏菌(无动力、不发酵乳糖、不产气)在生化特性上与志贺菌相似,给临床诊断造成了很大的困难。宋内志贺菌在临床具有高传染性,一般<100个菌体就可以引起致病。目前实验室常用鉴定方法主要依赖生化代谢反应和血清凝集,但它的临床诊断表现欠佳,许多非活跃性大肠常被市场上商业化试剂盒误诊为志贺菌。血清凝集时它们有时会出现交叉凝集的现象。所以用血清凝集的方法作为金标准来鉴定志贺菌目前还存在争议^[4]。

质谱技术因为它的快速、简便,低价、高通量化及鉴定准确的特点被广大的微生物实验室认可,但先进的16SrRNA和质谱技术也无法区分宋内志贺菌和大肠埃希氏菌,质谱技术的缺陷是在鉴定亲缘关系相近菌种及血清分型上有一定的局限性。在Bruker公司提供的细菌鉴定Biotyper数据库中,并没有宋内志贺菌的标准谱图,所以它们通常都会被判断为大肠埃希氏菌。基于DNA杂交及多位点酶电泳的结果显示,这两个菌种是非常相近的种族发育联系谱^[5, 6, 7]。通过flexanalysis软件的比对分析40株宋内志贺菌和大肠埃希氏菌谱图蛋白峰的差异发现在峰统计数据中大部分蛋白峰都为两种菌共有峰。这也是两种菌使用质谱技术不易区分的主要原因,两种菌的核糖体蛋白含有相似的蛋白成分。大约2775和2877Da两个分子量大小的蛋白峰在大多数宋内志贺菌中都存在,而大部分大肠埃希氏菌都没有发现此峰;而2837Da为大肠埃希氏菌的特异峰,通过识别是否存在这三种分子量大小的蛋白峰可以简单地区分两个菌群。据文献报道,He教授等使用布鲁克公司的Biotyper软件未能将宋内志贺菌和出血性大肠埃希氏菌从非致病性大肠埃希氏菌中分离出来。Karger等使用质谱技术无法将产志贺毒素的大肠埃希氏菌区分鉴定,主要原因在优化数

据分析参数上遇到了困难也^[8,9]。由此可见,在质谱仪区分相近菌群的局限性,有很多学者试图寻找其他的途径方法而不是借助于商业化软件。

ClinProTools 软件是一种数据发掘软件程序,可以帮助我们发现复杂光谱中的特有标记峰,它依据生物标记峰进行数学模型计算对未知菌进行分类,可以快速灵活的在大量光谱中建立分类模型实现鉴别细菌的目的。它主要依靠谱图中存在或缺失蛋白峰及所有蛋白峰的质量和强度差别建立模型进行分类。国外有学者报道,使用 ClinProTools 软件成功鉴定了金黄色葡萄球菌的两个种及肺炎链球菌和缓症链球菌的区分^[10,11]。交叉验证是验证模式的可靠性及预测模型的将来表现的。认知能力是利用建立模型测试成功分类光谱的能力,我们使用 ClinProTools 软件的 GA 算法模型区分鉴定大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的交叉验证和认证能力最高,其他文献也有相似报道,并且指出使用 ClinProTools 软件分类模型区分非活跃性大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的能力可以超过血清分型以及微生物自动化鉴定^[12]。也有文献报道,利用自建数据库及更改的分析方法,使用基于 MatLab 算法成功分离宋内志贺菌和大肠埃希氏菌,使用支持向量机 SVM(Support Vector Machine)算法区分肺炎沙门菌和鼠伤寒沙门菌血清型,甚至还能区分出血性大肠埃希氏菌和致病性大肠埃希氏菌和其他非致泻性大肠埃希氏菌^[13]。

综上所述,我们可以使用 ClinProTools 软件成功实现对大肠埃希氏菌和宋内志贺菌的区分鉴定,如果将来能统一操作流程,加大入选模型的样本量,并且通过自建库的方式收集相近亲缘关系菌株的谱图,不断优化软件设定参数,质谱技术在鉴定亲缘关系相近菌株的能力还有更大的发展空间。

参考文献

- [1]钱慧敏,庄菱,董晨,等.江苏省 2008-2009 年志贺菌菌型分布及耐药性分析[J].江苏预防医学,2010,1(4): 15-17.
 - [2]高昆.2002 至 2008 年临床分离志贺菌的血清分型及耐药性监测[J].检验医学,2010,5(3):239-243.
 - [3]Ranjbar R,Soltan Dallal MM,Talebi M,et al.Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran,Iran[J].J Health PopulNutr,2008,26(4):426-30.
 - [4]Khot PD,Couturier MR,Wilson A,Croft A,Fisher MA.2012.Optimization of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis for bacterial identification.[J].J.Clin.Microbiol.50:3845-3852.
 - [5]Lukjancenko O,Wassenaar TM,Ussery DW.2010.Comparison of 61sequenced Escherichia coli genomes[J].Microb.Ecol.60:708-720.
 - [6]Pupo GM,Lan R,Reeves PR.2000.Multiple independent origins of Shigella clones of Escherichia coli and convergent evolution of many of their characteristics[J].Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.97:10567-10572.
 - [7]Pupo GM,Karaolis DK,Lan R,Reeves PR.1997.Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdhsequence studies[J].Infect.Immun.65:2685-2692.
 - [8]He Y,Li H,Lu X,et al.Mass spectrometry biotyper system identifies enteric bacterial pathogens directly from colonies grown on selective stool culture media[J].J Clin Microbiol,2010,48:3888-92.
 - [9]Karger A,Ziller M,Bettin B,et al.Determination of serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli isolates by intact cell matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry[J].Appl Environ Microbiol 2011;77:896-905.
 - [10]Boggs SR,Cazares LH,Drake R..Characterization of a Staphylococcus aureus USA300 protein signature using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry[J].J.Med.Microbiol.2012,61:640-644.
 - [11] Ikryannikova LN,Filimonova AV,Malakhova MV,et al.Discrimination between Streptococcus pneumoniae and Streptococcus mitis based on sorting of their MALDI mass spectra[J].Clin.Microbiol.Infect.2012,[Epub ahead of print.] doi:10.1111/1469-0691.
 - [12]Prasanna D.Khot,Mark A.Fisher.Novel Approach for Differentiating Shigella Species and Escherichia coli by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry[J].Journal of Clinical Microbiology,2013,51 (11):3711-3716.
 - [13]Reiner Schumann,Nicolas Knoop,Gelimer H.Genzel,et al.Discrimination of Enterobacteriaceae and Non-fermenting Gram Negative Bacilli by MALDI-TOF Mass Spectrometry[J].The Open Microbiology Journal,2013,7,118-122.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

百色地区乙肝两对半定量检测结果分析

杨国奎

深圳市新产业生物医学工程股份有限公司

[摘要] 目的: 探讨乙肝两对半定量检测的临床意义。**方法:** 筛选 2015 年 1 月到 2015 年 12 月在百色市那坡县中医院接受检查的 1640 例检测者作为调查对象, 重点分析乙肝两对半的结果。**结果:** 该研究采用 CLIA 法进行乙肝两对半检查, 其中乙肝感染者及携带者为 288 例; 150 例全部血清标志物均为阴性。**结论:** 乙肝两对半的检查是全国目前乙肝诊治的重要参考指标。因此临床应认真规范, 同时定量测定使患者对自己的病情有更清楚的了解。

[关键词] CLIA 法; 乙肝两对半; 分析

Results Analysis of Quantitative Test of HBV in Baise

[Abstract] Objective: To explore the clinical significance of quantitative detection of HBV. **Methods:** Object detection is investigation from January 2015 to December 2015 in Napo Chinese Medicine Hospital of Baise to analyze the results of HBV. **Result:** The study check HBV by CLIA method, with 288 cases of hepatitis b infection and carriers and 150 cases of serum markers were negative. **Conclusion:** The inspection of HBV is important reference index of diagnosis and treatment of hepatitis in our country now. Therefore, clinical should serious and specification and the quantitative determination of patients can more clearly understand their illness.

[Keywords] CLIA; HBV; Analysis

我国是乙型病毒性肝炎(以下简称乙肝)大国^[1], 它是由乙型肝炎病毒引起的传染性疾病, 已经严重影响我国人民身体健康^[2], 乙肝病毒携带者占我国总人口的 10%左右。这些肝炎的共性是可测出 HBV 的血清学标志, 包括 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb, 也就是常说的乙肝两对半, 而乙肝的诊治主要依赖乙肝两对半测定^[3], 化学发光免疫检测是近几年来的一种高灵敏度和高特异性的定量检测方法, 可作为临床乙肝病毒感染的重要诊断指标和免疫检测。

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2015 年 1 月到 2015 年 12 月在百色市那坡县中医院接受检查的 1640 例检测者作为调查对象, 重点分析乙肝两对半的结果。其中, 男性 690 例, 女性 950 例; 年龄在 20-65 岁, 检测者均于清晨空腹静脉采血 3-5ml, 分离血清, 备用。测定时严格按照乙肝两对半定量试剂盒的操作说明进行操作。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 仪器

化学发光免疫法 (CLIA), 直接化学发光免疫分析仪是由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供, 仪器型号是 MAGLUMI1000。

1.2.2 试剂

化学发光免疫分析试剂由深圳市新产业生物医学工程股份有限公司提供, 每天严格进行内部质控并在规定时间内做两点定标, 以确保检验结果的准确性。

1.3 方法

严格按照深圳市新产业生物医学工程股份有限公司乙肝两对半试剂盒说明书进行操作。

1.4 结果

CLIA 法结果由 MAGLUMI1000 测定, HBsAg 值 ≥ 1 index/mL、HBsAb 值 ≥ 30 index/mL、HBeAg 值 ≥ 15 index/mL、HBeAb index/mL 和 HBcAb 值 ≥ 100 index/mL 为阳性, 反之阴性。为了便于表达和书写分别用 1、2、3、4、5 来表示 HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb 和 HBcAb。

1.5 检验常见结果分析

a.1 3 5 阳性者一般处于急、慢性乙肝，病毒复制活跃，传染性强；b.1 4 5 阳性者一般处于急、慢性乙肝，病毒复制减弱，传染性弱；c.2 5 阳性者一般处于乙肝恢复期，有免疫力；d.五项全阴者表示无抗体产生，也没有感染。

1.6 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析，应用 t 检验， χ^2 检验， $P < 0.05$ 代表具有统计学意义。

2 结果

2.1 检测结果

本研究 1640 例检测者中，乙肝感染者及携带者为 288 例，150 例全部血清标志物均为阴性。

2.2 乙肝阳性结果分析

对 HBsAg 阳性的 288 例检测者进行分析发现，大三阳 136 例（8.29%），小三阳 112（6.83%）例，小二阳^[4]40 例（2.43%）。

2.3 性别及年龄的差异

本研究 288 例 HBsAg 检测者中，男性 163 例，女性 125 例。对比不同性别患者的感染概率， $P > 0.05$ ， $\chi^2 = 0.94$ ，差异无统计学意义。

对比不同年龄段的检测者的发病概率， $P > 0.05$ ，差异无统计学意义，见表 1。

表 1 对比不同年龄段患者的发病情况

年龄（岁）	检测人数	发病人数
20-29	246	48
30-39	260	52
40-49	596	88
50-59	382	64
60 以上	156	36

3 讨论

乙肝是医学上常见的传染性疾病，主要的传播途径有血液、体液和母婴传播。乙肝病毒入侵机体肝细胞后，它本身并不致病而是引起机体免疫反应，继而引发免疫清除过程导致肝脏受损，甚至过度清除^[5]，导致肝功能异常。如果不能及时发现及时治疗，就有可能发展成为肝硬化、肝癌等严重的疾病。随着时代的不断地进步，乙肝疫苗及一些其它防护乙肝病毒的方法正在实施，但数据显示，乙肝病毒的感染及携带者仍然十分庞大。

乙肝在我国有着很高的发病率，乙肝携带者达全国总人口的 10% 左右，其起病缓，多不症状，传播途径广，可引起多种肝炎。对乙肝病毒的预治疗和控制很大程度上依赖乙肝两对半检测工作^[6]。本研究采用的 CLIA 定量检测法灵敏度高，可用于急性乙肝“窗口期”的检测，同时还可以动态直观的分析乙肝两对半各个指标的变化，为乙肝的诊治提供可靠的动态数据，并为乙肝疫苗的再次接种提供可靠的依据，同时定量检测能使患者对自己的病情有更清楚的了解，提高治疗信心也加强了对医生的信任度，是比较理想的检测方法。

参考文献

- [1] 尹永贞.1028 例乙肝两对半检测的结果分析[J].当代医学,2011,17(242):73-74.
- [2] 章敏,万唐,彭慧中,等.前 S2、前 S1 抗原与乙肝病毒标志物的相关性探讨[J].实验与检验医学,2009,27(6): 609.
- [3] 彭文伟.传染病学[M].北京人民卫生出版社,1999:19.
- [4] 黄志敬.小二阳自然转阴所引发的思考[J].光明中医,2009,21(5):924.
- [5] 托亚,张爱梅,孙明元.1246 例乙型肝炎血清五项标志物的检测分析[J].中国疗养医学,2006(3):173-174.
- [6] 王晓红.乙肝两对半定性定量检测的意义[J].中国民族民间医药,2009,18:82.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

高原地区新生儿缺氧缺血性脑病中血清NSE和S-100蛋白水平变化与病情关系的探讨

包文芳

青海红十字医院检验科

[摘要] 目的: 观察高原地区(海拔 2300 m~3700 m)新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)中血清 S-100 蛋白、神经元特异性烯醇化酶(NSE)水平变化, 探讨血清 NSE 和 S-100 水平变化与病情的相关性。**方法:** 检测 90 例高原 HIE 患儿(轻、中、重度各 30 例)血清中 S-100 蛋白和 NSE 的值做为实验组,并与 30 例正常新生儿血中 S-100 蛋白和 NSE 的值做为对照组进行比较。**结果:** 按临床分度标准将 HIE 患儿分为轻、中、重 3 组,轻度组 S-100 蛋白平均值为(2.29±0.60)ng/mL、NSE 平均值为(12.80±1.53),与正常对照组 S-100 蛋白平均值(1.85±0.48)ng/mL、NSE 平均值(9.80±1.36)比较,P 值为 1.89 和 2.53, P>0.05, 增高无显著性差异;中度组 S-100 蛋白平均值(6.95±0.79)ng/mL, NSE 平均值为(20.80±2.12)与正常对照组平均值比较,P 值为 0.043 和 0.021, P<0.05, 增高有显著性差异;重度组 S-100 蛋白平均为(26.80±0.79)ng/mL,NSE 平均值为(39.80±3.29)与正常对照组比较,P 值为 0.0036 和 0.0082, P<0.01, 增高有显著性差异, 具有统计学意义, 且轻、中、重度 3 组间差异均有显著性意义(P<0.01),S-100 蛋白和 NSE 值随 HIE 严重程度增加而增高。**结论:** HIE 患儿血清中 S-100 蛋白和 NSE 可作为脑损伤的生化标志物, 能反映疾病的严重程度, 对临床有很好的参考价值。

[关键词] 高原新生儿; S-100 蛋白; 神经元特异性烯醇化酶(NSE); 缺血缺氧性脑病(HIE)

新生儿缺氧缺血性脑病(HIE)是因为在围产期受到各种不同因素的作用而导致的脑缺血、缺氧新生儿脑损伤, 若不及时治疗, 极易造成整个神经系统的伤残。高原HIE病因复杂, 主要与高原缺氧所致围产期窒息率增加有关, 而围产期窒息与孕妇处于高海拔环境及分娩过程有密切关系, 只要有缺氧、缺血因素存在就有可能导致脑损伤^①, 对于该种疾患必须早期做出正确的诊断。为建立一种判别新生儿脑损伤严重程度简易快速的早期指标, 本文对脑损伤的新生儿进行血清S-100蛋白、NSE联合检测, 能够使新生儿脑损伤得到早期诊断治疗, 从而降低其后遗症发生率, 减少病残儿的发生, 值得临床推广应用。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集 2015年1月至2015年8月来我院顺产的、并患有高原HIE的新生儿90例为实验组, 根据脑电图、CT或磁共振及临床症状分为轻度HIE、中度HIE和重度HIE各30例, 其中男新生儿57例、女新生儿33例, 均为刚出生1周之内的新生儿; 再选择同期住院的无窒息史, 无宫内感染、无神经系统疾病的健康新生儿30例为对照组; 其中男新生儿18例, 女新生儿12例, 均为刚出生1周之内的新生儿; 两组年龄、性别、体重相似, 无统计学差异。

1.2 研究方法

实验组与对照组均于出生后48h小时内采取静脉血2ml. 立即分离出血清, S-100蛋白和NSE用Mag2000化学发光仪检测, 试剂及标准品、质控品均购自深圳新产业公司原装试剂。检测方法及评判标准均严格按照SOP实施。

1.3 统计学方法

采用SPSS13.0 统计学软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用t检验, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清S-100蛋白和NSE浓度测定轻度、中度和重度HIE组与对照组结果进行t检验, 差异显著。见表1。

表1: 血清S-100蛋白和NSE浓度在各组间结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	S-100蛋白(ng/ml)	P值	NSE(ng/ml)	P值
轻度HIE	30	2.29±0.60 [▽]	1.89	12.80±1.53 [▽]	2.53
中度HIE	30	6.95±1.83 [★]	0.043	20.80±2.12 [★]	0.021
重度HIE	30	26.8±3.54 ^{▽★}	0.0036	39.8±3.29 ^{▽★}	0.0082
对照组	30	1.85±0.48 ^{▽★}		9.80±1.36 ^{▽★}	

注：“[▽]”表示轻度组与对照组比较P值为1.89和2.53，P>0.05，差异无统计学意义；“[★]”表示中度组与对照组比较P值为0.043和0.021，P<0.05，差异有统计学意义；“^{▽★}”表示重度组与对照组比较P值为0.0036和0.0082，P<0.01，差异显著有统计学意义。

2.2 轻度HIE组30例和中度HIE组30例基本全部治愈,而重度有所好转或基本治愈只有7例,死亡1例。其他未治愈自动出院。可能死亡,也可能转其它医院就诊。可见其病情的严重和预后的不良;而对照组30例全部正常出院。

3 讨论

NSE 主要存在于中枢神经系统的神经元和神经内分泌细胞内,是早期就能特异性反映神经元损伤的物质。当脑组织发生损伤后,NSE 快速地从脑细胞内溢入脑脊液,进入血液循环中,从而引起血清NSE 浓度明显升高^[2]。因此,检测NSE 的血清水平可以反映神经元受损的程度,能早期直接地了解脑损伤程度。S-100 蛋白是神经细胞中的特异性蛋白,有很广泛的生物活性。资料表明^[3,4],S-100蛋白与围产期感染脑受损直接相关。脑部炎症所致脑损害可引起S-100蛋白含量升高,而S-100蛋白升高的程度跟脑细胞坏死范围相关,高S-100蛋白提示预后不良,由此可见S-100蛋白含量不仅可以早期及时准确地反应脑损伤的程度。而且还可以作为预报病情变化的指标。

高原新生儿 HIE 病因复杂,主要与围产期窒息有关,而高原围产期窒息与孕妇处于高海拔环境及分娩过程有密切关系,只要有缺氧、缺血因素存在就有可能导致脑损害;本文用化学发光法检测了三组新生儿 HIE 患儿大多来自高海拔地区(2300~3700 m)的农牧民,主要原因是因海拔高,母体血液含氧量不足易导致胎儿宫内缺氧;高海拔地胎儿易患严重的先天性心血管疾病而导致胎儿宫内缺氧。本文研究中发现中度和重度 HIE 组 S-100 蛋白和 NSE 浓度均高于对照组,差异有统计学意义;进一步发现轻、中、重度三组之间的 S-100 蛋白和 NSE 浓度有差异,且有统计学意义。同时将 S-100 蛋白和 NSE 浓度升高水平与患儿转归结合分析,发现 S-100 蛋白、NSE 浓度水平愈高。患儿预后愈差,如重度组 1 例死亡。12 例自动出院或转院者, S-100 蛋白均高达 26.8ng/ml、NSE 均高于 39.8ng/ml 以上。由此可见 S-100 蛋白、NSE 含量不仅可以早期及时准确地反应脑损伤的程度。而且还可以作为预报病情变化的指标。

高原新生儿 HIE 病因复杂,主要与围产期窒息有关,而高原围产期窒息与孕妇处于高海拔环境及分娩过程有密切关系,只要有缺氧、缺血因素存在就有可能导致脑损害;本文用化学发光法检测了三组新生儿 HIE 患儿大多来自高海拔地区(2300~3700 m)的农牧民,主要原因是因海拔高,母体血液含氧量不足易导致胎儿宫内缺氧;高海拔地胎儿易患严重的先天性心血管疾病而导致胎儿宫内缺氧。本文研究中发现中度和重度 HIE 组 S-100 蛋白和 NSE 浓度均高于对照组,差异有统计学意义;进一步发现轻、中、重度三组之间的 S-100 蛋白和 NSE 浓度有差异,且有统计学意义。同时将 S-100 蛋白和 NSE 浓度升高水平与患儿转归结合分析,发现 S-100 蛋白、NSE 浓度水平愈高。患儿预后愈差,如重度组 1 例死亡。12 例自动出院或转院者, S-100 蛋白均高达 26.8ng/ml、NSE 均高于 39.8ng/ml 以上。由此可见 S-100 蛋白、NSE 含量不仅可以早期及时准确地反应脑损伤的程度。而且还可以作为预报病情变化的指标。

总之,血清 S-100 蛋白、NSE 对新生儿脑损伤具有较高特异性和灵敏性,能较早的反映新生儿脑损伤及其严重程度,在新生儿脑损伤的早期诊断及病情预后评估方面有较高的价值,可作为新生儿脑损伤诊断的生化指标。血清 S-100 蛋白、NSE 联合检测与临床表现、头颅 B 超、MRI 等结合来诊断新生儿脑损伤,可使新生儿脑损伤得到早期诊断和治疗,从而使后遗症发生率明显降低,最大限度的减少病残儿的发生,值得临床推广应用。

参考文献

[1] 牟信兵,李素芝.高原病学.拉萨:西藏人民出版社,2001,40,76-86.

- [2] 王广斌,季泰令.S-100 蛋白、NSE 作为脑损伤标志物的研究进展 J.中国老年学杂志, 2011,31(5):890-892.
- [3] Gazzolo D,Marinoni E.Measurement Of urinary S-100 protein concentrations for the early identification of brain damage in physically full-term infants J.Arch Pediatr Adolesc Med,2005,157:1163—1168.
- [4] 段荣,黄凯.S—100 蛋白与脑损伤的研究田.江西医学检验,2001,19(6):373-374.
(临床检验装备技术专业委员会供稿)

广州地区发热呼吸道症候群成年患者临床特征及非典型病原体与病毒病原学调查分析

秦 笙^{1a} 练立婷² 王维亮^{1b} 张伟铮^{1a} 陈茶^{1a} 郑贵星³

1.广东省中医院 a.检验医学部, b. 呼吸科, 广州 510006; 2.广州市珈源医学试剂有限公司, 广州 510515; 3. 广州医科大学附属第一医院 检验科, 广州 510120

[摘要]目的: 探讨广州地区发热呼吸道症候群成年患者临床特征及非典型病原体与病毒分布。**方法:** 收集 2014 年 9 月-2015 年 8 月 400 份发热呼吸道症候群成年患者血清标本,应用呼吸道病原体九联检试剂盒检测九项病原体 IgM 抗体,并对患者临床特征进行分析。**结果:** (1)病原学分布: 400 例患者中共检测病原体阳性 131 份,总阳性率为 32.75%。检出以肺炎支原体为主,共 54 例(13.5%),其余分别为乙型流感病毒 33 例(8.3%);嗜肺军团菌血清 1 型 14 例(3.5%); Q 热立克次体和甲型流感病毒各 7 例(1.8%)、呼吸道合胞病毒和肺炎衣原体各 6 例(1.5%);副流感病毒 1-3 型 4 例(1.0%);未发现腺病毒。混合感染 17 例(5.8%),其中双重感染 14 例,以肺炎支原体合并乙型流感病毒为多见;三重感染 1 例。(2)临床特征: 广州发热呼吸道症候群成年患者男女比例 1.3:1,平均年龄 68.58 岁,以发热、咳嗽、咳痰、畏寒、气促、头痛及口干为主要临床症状,均见肺部实变体征;实验室血常规检查见发热呼吸道症候群成年患者白细胞计数升高,其中中性粒细胞百分比明显升高,淋巴细胞百分比明显降低。**结论:** (1)广州地区发热呼吸道症候群成年患者的非典型病原体及病毒检测以肺炎支原体及乙型流感病毒为主,其他病原体散发;(2)不同非典型病原体和病毒感染的患者多见发热,伴有明显的全身和呼吸道症状,肺部感染多见。

[关键词]发热呼吸道症候群;非典型病原体与病毒;临床特征

The investigation and analysis of Guangzhou febrile respiratory syndrome adult patients with clinical characteristics and atypical pathogens and virus etiology

Qin Sheng^{1a}, Lian Li-ting², Wang Wei-liang^{1b}, Zhang Wei-zheng^{1a}, Chen Cha^{1a}, Zheng Gui-xing³

1. Guangdong province Traditional Chinese Medical Hospital, a. Department of laboratory medicine, b. Department of respiration, Guang Zhou 510006;
2. GuangZhou JiaYuan Medical Reagents Co.,Ltd, Guang Zhou 510515;
3. The first affiliated hospital of Guangzhou medical university, Department of laboratory medicine, GuangZhou, 510120.

[Abstract] Objective: TO discuss febrile respiratory syndrome in GuangZhou of adult patients with clinical characteristics and atypical pathogens and virus distribution. **Methods:** Collected 400 febrile respiratory syndrome of adult patients with serum from september 2014 to august 2015, Application of respiratory pathogens nine joint inspection kits to detect 9 pathogens IgM antibody, and to analyze the clinical features. **Results:** (1)Etiology distribution: Detecting pathogens of 400 patients were positive for 131, the total positive rate was 32.75%. Detection is given priority to mycoplasma pneumoniae, a total of 54 cases (13.5%), and the rest of Influeza B virus 33 cases (8.3%); Legionella pneumophila serum type 1 respectively 14 cases (3.5%); Q fever rickettsia and Influeza A virus both 7 cases (1.8%); respiratory syncytial virus and Chlamydia pneumonia in 6 patients (1.5%); parainfluenza type 1-3 in 4 patients (1.0%) We found no adenovirus virus infection. Mixed infection of 17 cases (5.8%), including 14 cases of double infection, with mycoplasma pneumoniae merge influenza B virus is seen; Triple infection of 1 cases. (2)Clinical features: Men's and women's infection raio of febrile respiratory syndrome patients in Guangzhou was 1.3:1, the average age was 68.58. With fever, cough, sputum, shortness of breath as the main clinical symptoms, the consolidation of the lung signs was all showed. From laboratory blood routine examination, we saw heating respiratory syndrome in adult patients with elevated WBC count, neutrophil percentage of obvious rise, lymphocyte percentage decreased obviously. **Conclusions:**(1)For febrile respiratory syndrome patients in GuangZhou, infection of atypical pathogens with mycoplasma pneumoniae and influenza B virus was given priority to other pathogens. (2)Different atypical pathogens and virus infection of elderly patients were characterized by fever, accompanied with obvious systemic

and respiratory symptoms, lung infection.

[Keyword] Febrile respiratory syndrome; Atypical pathogens and virus; Clinical features

发热呼吸道症候群 (febrile respiratory syndrome, FRS) 是一组具有相似临床体征的呼吸系统疾病临床症状^[1-3], 可由多种病原体造成^[4,5]。近年来 FRS 患者呈现发病率高, 感染病原体不断变化等特点^[6,7], 而且其临床症状相似, 鉴别诊断困难, 所以快速的病原体检测是指导临床准确诊断和及时治疗的必要依据。为了解广州地区成人发热呼吸道症候群临床特征及其非典型病原体与病毒病原学分布情况, 本文应用呼吸道病原体九联检测试剂对 400 例确诊的 FRS 成人患者血清标本进行检测, 结果报道如下。

1. 材料与方法

1.1 标本

2014 年 9 月~2015 年 8 月期间, 收集广东省中医院住院及门诊病人符合发热呼吸道症候群定义的 18 岁以上成人患者血清标本。所有患者均符合以下诊断标准: 1. 急性感染表现至少符合下列任意 1 项: 发热, 白细胞升高、降低或分布异常, 寒战, 体温降低; 2. 呼吸道临床表现至少符合下列任意 1 项: 咳嗽, 咳痰, 气短, 听诊呼吸音异常 (湿啰音, 干啰音, 哮鸣音, 浊音 呼吸急促, 胸痛); 3. 胸部 X 线片提示肺部炎性改变如片状阴影实变影等。同时记录患者一般信息及临床症状。将采集后的标本常温送至实验室进行检测, 如无法立即检测, 则存放于 4℃, 24 小时内检测。收集以非急性呼吸道症状或发热为主诉的住院或门诊患者血清作为阴性对照。

1.2 试剂

呼吸道病原体九联检测试剂盒 (PNEUMOSLIDE IgM, VIRCELL, Spain) 原装进口, 可同时检测血清 9 种呼吸道感染常见病原体 IgM 抗体, 包括嗜肺军团菌血清 1 型 (LP1)、肺炎支原体 (MP)、Q 热立克次体 (COX)、肺炎衣原体 (CP)、腺病毒 (ADV)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、甲型流感病毒 (INFA)、乙型流感病毒 (INFB) 和副流感病毒 (PIVs)。

1.3 检测方法

检测方法按试剂说明书进行。制备好的玻片尽快用荧光显微镜 400 倍放大率下观察结果。如果不能立即观察, 可避光保存于 2-8℃, 但不超过 12 小时。

1.4 结果判断

阳性结果: 腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒及副流感病毒阳性荧光出现于细胞核、胞浆和/或胞膜, 阳性细胞数达 1% 以上, 阳性细胞外形完整, 荧光清晰可见, 报阳性。其余病原体荧光模式: 嗜肺军团菌血清 1 型为杆状、肺炎支原体为细胞外围显荧光、Q 热立克次体为球杆状、肺炎衣原体为球状。嗜肺军团菌血清 1 型、Q 热立克次体、肺炎衣原体阳性菌形态典型、大小均一、均匀布满视野, 荧光清晰明亮, 报阳性。肺炎支原体阳性细胞数达 10% 以上, 报阳性。

阴性结果: 嗜肺军团菌、肺炎衣原体和 Q 热立克次体视野中无荧光, 支原体菌体呈红色, 感染腺病毒、甲型和乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒的细胞呈红色。

1.5 数据统计

组间病原体检出率用卡方或 Fisher's 检验统计; 临床特征分析用 Odds Ratios (OR) 及 95% 可信区间统计, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。病人年龄、血常规结果、住院时长、住院费用等计量资料用均数 \pm 标准差表示, 用方差检验统计, 以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。病人一般情况用频数及百分比显示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 非典型病原体与病毒检测结果

本研究共收集 400 例 FRS 确诊患者, 57 例非急性呼吸道症状或发热患者作为对照组。400 例 FRS 患者中共检测出病原体 131 份, 总阳性率为 32.75%, 其中多见肺炎支原体 (54 例, 占 13.5%), 乙型流感病毒 (33 例, 占 8.3%) 和嗜肺军团菌血清 1 型 (14 例, 占 3.5%)。通过与对照组比较, 各种病原体的阳性率并无统计学差异。各病原体阳性例数、阳性率见表 1。阳性病例中共有 14 例多重感染, 混合感染率为 3.5%。其中双重感染病例有 13 例, 三重感染 1 例, 各种混合感染模式见表 2。

表 1. 成人发热呼吸症候群患者非典型病原体与病毒检测阳性例数及阳性率

病原体	阳性例数(%)	阴性对照组(%)	OR(95% CI)	P
	n=400	n=57		
嗜肺军团菌血清 1 型	14(3.5%)	0(0.0%)	1.148 (1.107-1.189)	0.151
肺炎支原体	54(13.5%)	5(8.7%)	1.623 (0.621-4.245)	0.319
Q 热立克次体	7(1.8%)	1(1.8%)	0.997 (0.120-8.259)	0.998
肺炎衣原体	6(1.5%)	0(0.0%)	1.145 (1.105-1.186)	0.352
腺病毒	0	0		
呼吸道合胞病毒	6(1.5%)	0(0.0%)	1.145 (1.105-1.186)	0.352
甲型流感病毒	7(1.8%)	1(1.8%)	0.997 (0.120-8.259)	0.998
乙型流感病毒	33(8.3%)	1(1.8%)	5.035 (0.675-37.551)	0.080
副流感病毒	4(1.0%)	0(0.0%)	0.556 (0.062-5.152)	0.608

表 2. 成人发热呼吸症候群患者非典型病原体与病毒检测阳性多重感染模式

多重感染病原体组合	例数
嗜肺军团菌血清 1 型+甲型流感病毒	2
嗜肺军团菌血清 1 型+肺炎支原体	1
嗜肺军团菌血清 1 型+肺炎衣原体	1
肺炎支原体+乙型流感病毒	4
肺炎支原体+副流感病毒	1
肺炎支原体+呼吸道合胞病毒	1
乙型流感病毒+副流感病毒	1
乙型流感病毒+肺炎衣原体	1
乙型流感病毒+ Q 热立克次体	1
肺炎支原体+乙型流感病毒+呼吸道合胞病毒	1

2.2 FRS 患者一般情况

FRS 患者平均年龄为 68.58 岁，高于对照组，有统计学差异。男女比例 1.3:1。FRS 患者肝脏、肾脏心血管、高血压及糖尿病等基础疾病与对照组相比无统计学差异，平均住院时长 9.8 天，与对照组比较无明显延长或缩短。FRS 患者平均中医药费用为 277.94 元，明显少于对照组患者，有统计学差异，平均西医费用为 7025.29 元，与对照组相比无统计学差异。FRS 患者细菌培养鉴定共有 12 人次获得阳性结果，革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌以及真菌的检出比为 1: 5: 4，FRS 患者痰培养结果与对照组比较有统计学差异。FRS 患者经过系统治疗，病情好转或痊愈 386 例，5 例病情加重要求出院未完成治疗，9 例死亡。具体结果见表 3。

表 3. 发热呼吸道症候群成人患者一般情况调查分析表

病人一般情况	发热呼吸道症候群患者 n=400	对照组 n=57	P
平均年龄 (岁)	68.58±18.57	56.75±21.50	<0.01
性别 (例, %)			
男	229	26	0.098
女	171	31	0.098
基础疾病 (例)			
肝脏疾病	26	5	0.523
肾脏疾病	24	7	0.078
心血管疾病	20	5	0.241
高血压	78	9	0.504
糖尿病	28	4	0.996
平均住院时长 (天)	9.88±13.90	13.79±13.58	0.115

平均医药费用 (元)			
中医费用	277.94±302.01	481.98±500.77	<0.01
西医费用	7025.29±12526.28	11587.07±31182.79	0.208
细菌培养阳性 (人次)			
痰培养	12	9	<0.01
革兰氏阳性菌	2	1	
革兰氏阴性菌	7	6	
真菌	5	2	
病人转归 (例)			
好转	386	53	0.201
未完成治疗	5	3	0.031
死亡	9	1	0.811

2.3 临床特征

分析 400 位符合 FRS 的成年患者临床特征,除了发热、咳嗽、咳痰等标志性呼吸道症状外,FRS 成年患者与对照组患者相比,其畏寒、头痛、口干、气促、纳差五种临床症状表现明显,另外多见鼻塞以及流涕。血常规结果与对照组患者相比可见,FRS 患者白细胞计数升高,其中中性粒细胞百分比明显升高,淋巴细胞百分比明显降低;其他各项指标与对照组患者相比无统计学差异。具体结果见表 4。

表 4. 400 例发热呼吸道症候群成年患者临床特征分析表

临床症状	阳性例数(%) n=400	对照组(%) n=57	OR(95% CI)	P
畏寒	95(23.8%)	1(1.8%)	17.443 (2.383-127.698)	<0.01
头晕	53(13.3%)	8(14.0%)	0.936 (0.420-2.085)	0.870
头痛	72(18.0%)	2(3.5%)	6.037 (1.439-25.320)	<0.01
鼻塞	40(10.0%)	1(1.8%)	6.222 (0.839-46.169)	0.042
流涕	44(11.0%)	1(1.8%)	6.921 (0.935-51.247)	0.028
口干	135(33.8%)	9(15.8%)	2.717 (1.294-5.703)	<0.01
咽痛	40(10.0%)	2(3.5%)	3.056 (0.718-13.003)	0.112
胸闷	62(15.5%)	8(14.0%)	1.124 (0.507-2.488)	0.774
胸痛	29(7.3%)	1(1.8%)	4.377 (0.585-32.774)	0.117
气促	170(42.5%)	9(15.8%)	3.942 (1.883-8.254)	<0.01
恶心	9(2.3%)	2(3.5%)	0.633 (0.133-3.006)	0.562
腹痛	10(2.5%)	1(1.8%)	1.436 (0.180-11.432)	0.731
纳差	187(46.8%)	15(26.3%)	2.458 (1.321-4.576)	<0.01
乏力	115(28.8%)	13(22.8%)	1.366 (0.709-2.631)	0.350
肌肉酸痛	45(11.3%)	2(3.5%)	3.486 (0.822-14.780)	0.072
血常规指标:				
白细胞计数 ($\times 10^9/L$)	9.21±6.44	7.36±4.12		0.048
中性粒细胞 (%)	74.75±13.78	68.16±14.46		<0.01
淋巴细胞 (%)	16.25±10.97	32.19±8.16		0.011
单核细胞 (%)	7.72±3.98	13.67±4.219		0.063
血小板计数 ($\times 10^9/L$)	186.78±103.64	214.25±127.24		0.108
血红蛋白浓度 (g/L)	115.09±27.89	115.75±26.82		0.878
红细胞压积 (%)	35.14±8.24	35.36±6.16		0.858

3 讨论

本研究检测 400 份 FRS 病例中,病原体检出总阳性率是 32.75%,虽然通过与对照组比较,各种病原体的阳性率并无统计学差异,但从构成比来看,FRS 成年患者以检出非典型病原体为主,多见肺炎支原体。本研究发现 FRS 成年患者病毒检测检出率不高,可能由于成人血清中抗体总量随着年龄增长而增加,机体具有良好的记忆 T 细胞种群,可以应答以前遇到过的病原体有关。病毒检测中多见乙型流感病毒阳性,基本与我国南方 2014-2015 年流感病毒流行趋势相符^[8]。本次研究中多重感染率为 3.5%,以双重感染为主,其中以肺炎支原体合并病毒感染为多见,同时感染细菌的病例占 44%,以合并革兰氏阴性菌为主。

结合本研究的患者一般信息机临床特征数据,60 岁以上老年患者出现以下症状,需高度警惕患者患有 FRS:发热、咳嗽、咳痰、畏寒、头痛、鼻塞、流涕、口干、气促并结合肺部实变体征改变,实验室检查结果,白细胞计数

升高,其中中性粒细胞百分比升高,淋巴细胞百分比降低。在治疗 FRS 患者过程中,中医费用比非 FRS 的患者少,这可能与中医对 FRS 的治疗比较有效,能用较少的药物就能控制病情。

FRS 成年患者转归为死亡的 9 例病例中,6 例为非典型病原体或病毒抗体阳性,其中肺炎支原体 3 例,乙型流感病毒、Q 热立克次体及嗜肺军团菌各 1 例,但并未发现混合感染,说明其危重病人十分必要进行非典型病原体和病毒检测。

目前国内对发热呼吸道症候群的监测方法基于科研目的或监测目的主要为核酸检测^[9-11],但由于所使用的试剂基本没有国家权威机构的认证,尚属科研性质,需大量的科研经费支持,不能广泛应用于基层医院。本研究所使用的呼九试剂获得国家药监局的认证,可用于日常患者的常规检查,方便基层医院的开展,而且能实时报告结果,为一线临床医生提供及时的检查结果,如果结合国家或各省市定期的监测数据可实时判断病患的发热呼吸道疾病情况。

对于呼吸道病原体九联检试剂盒的敏感性和特异性已有多个报道^[12-13],已证实该试剂的可靠性。在本次研究中,我们从另一角度分析该试剂的实际应用价值。我们对临床医生对呼九检测结果的接受程度也作了回顾性分析,有记录的 102 例患者中,74 例(72.5%)检测结果与临床症状相符,医师的结论是“接受”,并在获得结果后及时调整用药。以上说明呼吸道病原体九联检试剂盒的使用的确为临床的诊断和治疗提供有效的信息,避免抗生素滥用或针对用药,降低病人的医疗费用。

但此呼吸道病原体九联检试剂盒也存在一定的缺点。例如,与核酸检测相比,其检测范围有限,检测病原谱中未包括偏肺病毒和博卡病毒,在细菌谱中主要为非典型病原体,只能解决一部分病原体检测问题。所以增加病原谱是此类检测试剂的发展趋势。

综上所述,广州地区发热呼吸道症候群成年患者的非典型病原体和病毒检测以肺炎支原体和乙型流感病毒阳性为主,其临床特征常见发热、咳嗽、咳痰,伴有明显的全身和呼吸道症状,肺部感染多见。

参考文献

- [1] Sandrock CE. Severe febrile respiratory illnesses as a cause of mass critical care[J]. *Respir Care*, 2008, 53(1): 40-57.
- [2] Srinivasan A, Perl TM. Respiratory protection against influenza[J]. *JAMA*, 2009, 302(17): 1903-1904.
- [3] Vayalunkal JV, Gravel D, Moore D, et al. Surveillance for healthcare-acquired febrile respiratory infection in pediatric hospitals participating in the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2009, 30(7): 652-658.
- [4] Monto AS, Sullivan KM. Acute respiratory illness in the community. Frequency of illness and the agents involved[J]. *Epidemiol Infect* 1993; 110: 145-160.
- [5] Feikin DR, Njenga MK, Bigogo G, et al. Etiology and Incidence of viral and bacterial acute respiratory illness among older children and adults in rural western Kenya, 2007-2010[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e43656.
- [6] Puro V, Fusco FM, Lanini S, et al. Risk management of febrile respiratory illness in emergency departments[J]. *New Microbiol*, 2008, 31(2): 165-173.
- [7] Gaunt ER, Hardie A, Claas EC, et al. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(8): 2940-2947.
- [8] 国家流感中心. 流感周报[EB/OL]. (2015-8-25) <http://www.cnic.org.cn/chn/down>.
- [9] 费怡, 朱渭萍, 孙乔, 等. 上海市浦东新区发热呼吸道症候群与流感样病例的相关性分析[J]. *上海预防医学*, 2014, 26(8): 412-414.
- [10] 庄丽, 付琳, 任丽娟. 贵州省发热呼吸道症候群病毒感染状况调查[J]. *现代预防医学*, 2013, 40(20): 3854-3856.
- [11] 王冬玲, 于爱红. 2013年张掖市发热呼吸道症候群细菌多重PCR检测结果分析. *中国卫生检验杂志* 2014, 24(23): 3407-3411.
- [12] Wu Z, Li Y, Gu J, et al. Detection of viruses and atypical bacteria associated with acute respiratory infection of children in Hubei, China[J]. *Respirology*, 2014, 19(2): 218-224.
- [13] 谢红梅, 胡必杰, 马艳, 等. 1647 例呼吸道感染病原体的 IgM 抗体检测结果分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(5): 1075-1077.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

血常规检查指标的新应用:RDW 与 MPV 联合预测心衰患者死亡率

张洋 于金星 许强 蔡艳 李新强 刘建茹 杨冰花 程高娃 陈曦 康金锁*

国家心血管病中心 中国医学科学院 阜外医院 实验诊断中心

[摘要] **目的:**研究联合红细胞体积分布宽度 (Red Cell Distribution Width, RDW) 和血小板平均体积(Mean platelet volume, MPV)对心衰患者死亡风险的预测作用。**方法:**选择阜外医院心衰住院患者 1021 例,记录他们入院时的 RDW, MPV、左室射血分数 (Left Ventricular Ejection Fraction, LVEF) 以及其他临床和实验室指标。随访患者住院期间和出院后的死亡情况。**结果:**随访 21 \pm 9 个月后, 116 例患者失访, 137 例死亡; 死亡患者 RDW 中位数为 14.8%, 明显高于存活者的 13.3%($P<0.001$), MPV 在死亡组[10.7% (8.0%,13.1%)]和存活组[10.4%(7.7%,13.8%)]中同样存在显著差异 ($P<0.01$); 随着心功能分级的增加, RDW 和 MPV 水平逐渐升高, 差异有统计学意义均 $P < 0.05$; 将 RDW 和 MPV 两两组合进行生存分析, 绘制生存曲线 (图 2), 发现在 RDW \geq 13.4%, MPV \geq 10.5%组的患者中, 患者生存率最低。**结论:**联合 RDW 和 MPV 可以提高单独 RDW 对心衰患者死亡的预测价值。

[关键词] 红细胞体积分布宽度; 血小板平均体积; 心力衰竭; 预后

New Application blood test indicators:To evaluate the effect of Mean Platelet Volume and Red Cell Distribution Width predict mortality in patients with heart failure

[Abstract] **Objective:**To evaluate the effect of Mean Platelet Volume and Red Cell Distribution Width predict mortality in patients with heart failure. **Methods:**We retrospectively investigated 1021 HF patients at Fuwai Hospital. Clinical information on the patients,including RDW,MPV,LVEF and other laboratory tests ,was recorded on admission. During the follow-up period,adverse events after discharge,such as rehospitalization due to HF or all-cause death,were recorded.**Results:**Patients were median followed-up for 693days. During the follow-up period (21 \pm 9 months),116 participants were lost to follow-up,and 137 patients died. RDW median of 14.8% in the death group,significantly higher than 13.3% of survivors ($P < 0.001$),MPV in the death group [10.7 (8.0, 13.1)] and the survival group [10.4 (7.7,13.8)] also exists significant differences ($P < 0.01$);with the increase of NYHA,RDW and MPV levels gradually increased($P < 0.05$);Kaplan–Meier analysis showed that the group of patients with RDW \geq 13.4% and MPV \geq 10.5% had the lowest cumulative survival in patients with HF.**Conclusions:**RDW and MPV combination can improve the predictive value of a single RDW for the prognosis of patients with heart failure .

[Key words] Mean Platelet Volume;N-terminal pro-brain natriuretic peptide;heart failure caused by coronary heart disease;prognostic indicator

心力衰竭是各种心血管疾病的终末阶段,其发病率、死亡率呈增长趋势^[1],因此判定心衰患者的预后,对高危患者长期监测和追踪非常重要。红细胞体积分布宽度 (RDW) 和血小板平均体积(MPV)是全血细胞计数分析时的常规检测项目,以往分别被认为是鉴别诊断不同类型的贫血的指标和血小板活化的指标。最近有研究表明, RDW、MPV 分别与心血管疾病具有相关性^[2-3]。本研究观察心衰患者体内MPV和RDW水平,探讨联合两者预测心衰患者的预后,使得更多的基层、社区医院患者获益。

1 对象与方法

1.1 对象

连续性入因心力衰竭住院的患者 1021 例,年龄 18~90 岁。心衰的诊断由两名有经验的临床医生根据欧洲心脏病学会 (ESC) 的诊断标准纳入。排除合并有恶性肿瘤; 甲状腺疾病, 慢性阻塞性肺病, 终末期肾病等可能影响 RDW 结果的并发症;

1.2 方法

1.2.1 收集患者临床信息、实验室及影像检查结果

根据病例资料,收集患者的一般情况,包括年龄、性别、体重指数(BMI)、合并疾病(高血压、高脂血症、糖尿病)、住院死亡时间及原因等。心功能分级按NYHA标准,取患者入院时结果。取患者入院后最早的血常规、生化等检查结果,LVEF取患者入院后1个星期内的超声心动图检查结果,如患者有多次结果,则取与入院日期最接近的一次结果。

1.2.2 随访

对病情好转出院患者的门诊、急诊和住院病历进行分析整理,电话随访患者本人或家属,记录患者出院后的情况,终点事件为全因死亡。

1.2.3 检验仪器

RDW、红细胞计数(RBC),血红蛋白(Hb)采用Sysmex XE-2100全自动五分类血细胞分析仪及配套试剂检测;谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、直接胆红素(DBiL)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(CREA)、尿酸(URIC)和高敏C反应蛋白(hs-CRP)采用Olmplus AU5100全自动生化分析仪以及中生北控公司生产的试剂盒检测;NT-proBNP采用Biomedica公司生产的酶联免疫(ELISA)试剂盒以及美国Bio-Tek公司生产的ELx800全自动酶标仪检测;超声心动图(LVEF)采用Philips公司生产的iE33全数字心脏彩超诊断仪检测。

1.3 统计学分析

采用SPSS17.0统计软件进行分析。对数据进行正态性检验,正态分布的资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,本组研究人群的大部分数据不为正态分布,用中位数表示。两样本均数比较用t检验或Mann-Whitney U检验,两样本率比较用 χ^2 检验,多组样本比较用Kruskal Wallis H检验,进一步两两比较用Bonferroni法。不同RDW分组患者生存率的估计用Kaplan-Meier法,组间比较用Log-rank检验。RDW对心衰患者死亡是否有预测价值采用ROC曲线分析,曲线下面积比较采用Z检验。心衰患者死亡独立预测因素用Cox比例风险模型进行评估。相关分析用Spearman相关分析,RDW相关影响因素用多重线性逐步回归分析。P<0.05具有统计学意义。

2 结果

2.1 入选患者的一般情况

入院时病历资料完整且有RDW数据的患者1021例。男性占70.5%,平均年龄59.4±13.6岁。中位随访693天后,有116例患者失访。共有效随访905例。随访期间137例患者死亡,死亡率为15.1%。(表1)。

表1.入院时患者的一般情况

	所有病例 (n = 905)	死亡组 (n = 137)	存活组(n = 768)	P 值
年龄,岁	59.4±13.6	60.4±14.4	59.3±13.5	0.390
男性,例 (%)	641(70.5)	93 (67.9)	548 (71.4)	0.410
BMI,kg/m ²	24.5±4.1	22.6±4.4	24.8±3.9	<0.001
收缩压,mmHg	121.8±20.6	113.9±20.5	123.2±20.3	<0.001
舒张压,mmHg	72.8±12.6	69.7±11.6	73.3±12.7	0.002
心率,次/min	78.0±16.7	81.4±17.5	77.3±16.5	0.009
NYHA class II:III:IV,n	18.1:43.9:38.0	11.1:36.8:52.1	25.8:45.5:28.7	<0.001
LVEF,%	47.0±15.2	36.8±13.8	48.7±14.8	<0.001
RDW,% (IQR)	13.4 (12.8,14.5)	14.8 (13.6,16.3)	13.3 (12.8,14.3)	<0.001
MPV,% (IQR)	10.5 (7.7,13.8)	10.7 (8.0,13.1)	10.4(7.7,13.8)	<0.01
NT-proBNP (fmol/mL) (IQR)	1566.0 (766.0,3003.2)	4158.1 (2404.8,6101.8)	1347.8 (718.5,2391.9)	<0.001
Hb,g/L (IQR)	136 (124,148)	132 (119,147)	137 (125,147)	0.01
RBC,10 ¹² /L (IQR)	4.5 (4.1,4.9)	4.4 (3.9,5.0)	4.5 (4.1,4.9)	0.033
TP,g/L(IQR)	70.1 (65.7,74.9)	68.0 (62.8,73.6)	70.4 (66.0,75.5)	0.008
ALB,g/L(IQR)	40.7 (37.7,43.4)	37.7 (33.9,41.1)	41.1 (38.3,43.9)	<0.001
ALT,IU/L (IQR)	24.0 (16.0,39.0)	23 (15.5,44.5)	24.0 (16.0,38.0)	0.916

AST,IU/L (IQR)	26.5 (20.0,37.8)	31 (22,41)	26 (20,37)	0.023
TBIL, $\mu\text{mol/L}$ (IQR)	19.0 (13.5,29.3)	27.3 (17.0,41.4)	18.6 (13.1,27.7)	<0.001
DBIL,mol/L (IQR)	3.2 (2.1,5.3)	5.2 (3.1,10.8)	3.0 (2.0,4.8)	<0.001
BUN,mmol/L (IQR)	7.35 (5.74,9.67)	9.4 (7.6,12.7)	7.3 (5.7,9.3)	<0.001
URIC, $\mu\text{mol/L}$ (IQR)	377.5 (303.0,485.2)	458.9 (354.5,548.6)	368.5 (307.0,467.5)	<0.001
CREA, $\mu\text{mol/L}$ (IQR)	91.4 (76.4,113.5)	103.0 (80.7,129.7)	91.4 (76.9,111.9)	<0.001
hs-CRP,mg/L (IQR)	3.62 (1.64,9.66)	8.51 (3.20,11.2)	3.17 (1.54,9.13)	<0.001

注: M (Q1, Q3): 中位数 (第1四分位数, 第3四分位数); BMI: 身体质量指数; NYHA class :n 纽约心功能分级; LVEF: 左室射血分数; NT-proBNP: 氨基末端B型钠尿肽原; RBC: 红细胞计数; Hb: 血红蛋白; TP: 总蛋白; ALB: 白蛋白; ALT: 丙氨酸氨基转移酶; AST: 天冬氨酸氨基转移酶; TBiL: 总胆红素; BUN: 尿素氮; CREA: 肌酐; hs-CRP: 高敏C反应蛋白。

2.2 RDW、MPV 是心衰患者死亡的影响因素

死亡和存活患者的年龄, 男性比例, 老年人所占比例, 合并高脂血症和糖尿病的比例没有差异。但与存活患者相比, 死亡组患者入院时的体重指数和血压偏低, 心率稍快, 心功能较差, 贫血人数较多, RDW 和 MPV 较高, 肝肾功能指标异常。其中 RDW 在死亡组[14.8 (13.6,16.3)]和存活组[13.3 (12.8,14.3)]中存在显著差异 ($P<0.001$), MPV 在死亡组[10.7 (8.0,13.1)]和存活组[10.4(7.7,13.8)]中同样存在显著差异 ($P<0.01$) (表1, 图1)。

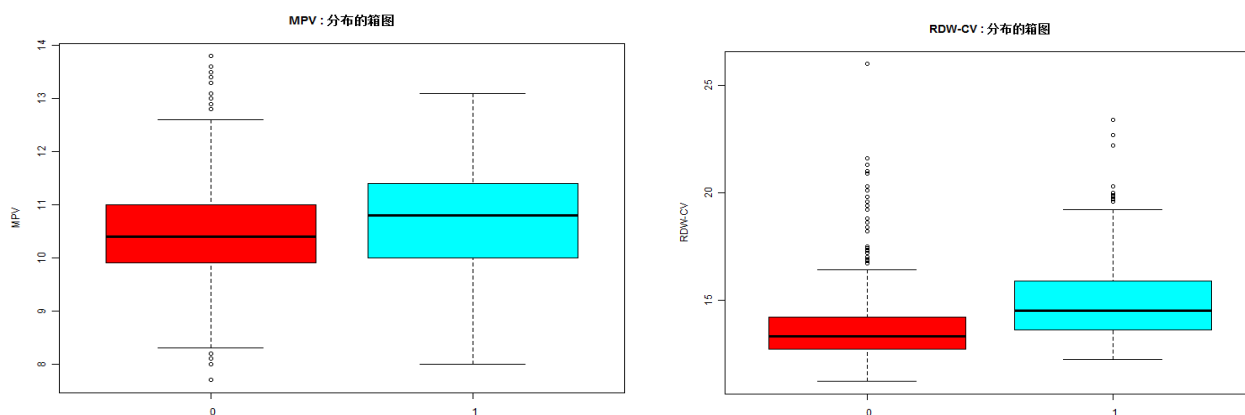


图1 MPV、RDW在死亡组与存活组的分布箱图 (注: 0:存活组; 1: 死亡组)

将心衰患者按NYHA 分级分组, 比较各组的RDW和MPV, 可见随着心功能分级的增加, RDW和MPV水平逐渐升高, 差异有统计学意义均 $P < 0.05$ (表2)。

表2 不同心功能分级患者的 RDW、MPV 比较

	II (n=164)	III (n=397)	IV (n=344)	P值
RDW	13.5 (11.5, 26.0)	14.1(11.2, 23.4)	14.9(12.1-22.7)	<0.05
MPV	10.4(7.7, 13.4)	10.6(8.0, 13.4)	10.8(8.0, 13.8)	<0.05

注: II: NYHA 心功能II 级; III: NYHA 心功能III 级 IV: NYHA 心功能IV 级

2.3 联合 RDW 和 MPV 对患者死亡的预测价值

将 RDW 按中位数进行分组, 中位数为 13.4 (12.8,14.5), $\geq 13.4, < 13.4$ 两组; MPV 按中位数进行分组, 中位数为 10.5 (7.7,13.8), $\geq 10.5, < 10.5$ 两组。然后将 RDW 和 MPV 两两组合进行生存分析, 绘制生存曲线 (图 2), 发现在 RDW ≥ 13.4 , MPV ≥ 10.5 组的患者中, 患者生存率最低, RDW ≥ 13.4 , MPV < 10.5 组的患者中, 患者生存率次之。由此可见, 联合 RDW 和 MPV 可以提高单独 RDW 对心衰患者死亡的预测价值。

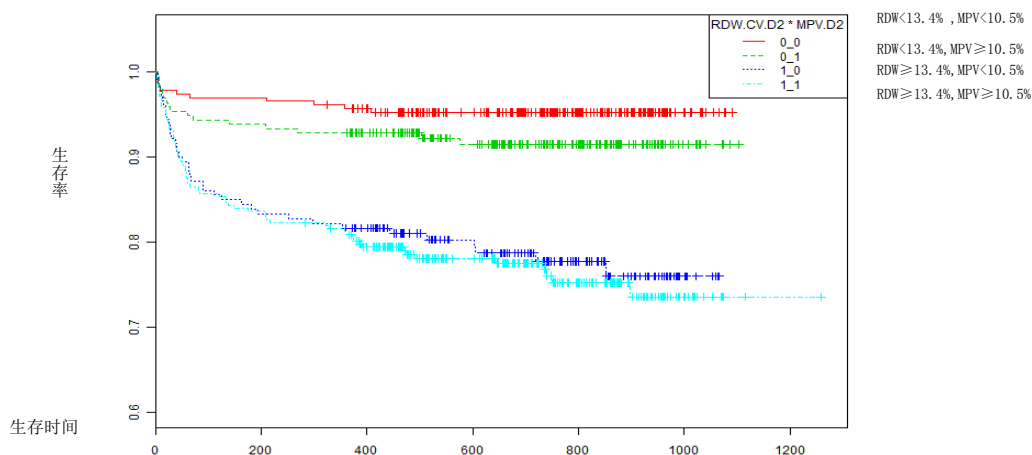


图2 RDW 和 MPV 两两组合的心衰患者生存曲线

3 讨论

心力衰竭是各种心脏疾病终末阶段的表现,其病因和机制复杂,患者预后差。2003年我国心衰流行病学调查显示^[4],我国约有400万心衰患者,患病率为0.9%,60%以上患者在5年内死亡,严重者1年死亡率便高达50%。因此,选择简单而准确的指标,筛选心衰预后不良的高危患者,及早采取积极有效的干预措施,对改善患者预后具有重要的意义。

RDW是血常规中反映外周血红细胞体积改变的参数,临床上多用于贫血的形态学分类和小细胞性贫血的鉴别诊断,2007年研究者发现它是慢性心衰患者死亡的独立危险因素^[5],随后的研究表明,RDW升高不仅与慢性心衰患者死亡率增加有关,而且与急性心衰^[6-8]、急性心梗^[9,10]的预后也有关系。本研究中RDW在死亡组和存活组中存在显著差异,是心衰患者死亡的影响因素,这与我们前期的研究结果一致^[11],且随着心功能的恶化,RDW也在随之增高。

血小板平均体积(mean platelet volume,MPV)是血小板活化的一个重要指标。MPV升高,血小板体积增大,活性增强,MPV作为一种血小板测量参数,是自动化血细胞分析仪的测定值,它一般用于判断出血倾向及骨髓造血功能变化。最近国外有文献报道,MPV水平升高,与心血管疾病患者的死亡率增高和预后不良具有较强的相关性^[12,13],其中2011年Hayati Kandis^[12]等对136例心力衰竭患者随访18±2月研究发现,失代偿期心力衰竭患者MPV水平显著升高,入院时MPV水平是院内死亡及6个月死亡的独立预测因素。本研究中MPV在死亡组和存活组中存在显著差异,是心衰患者死亡的影响因素,结果提示随着心衰程度的加重,血小板活化越来越明显。心衰患者MPV增高可能与心衰发生时血小板活化增加以及出现心源性肝硬化,门静脉压力升高,脾脏对血小板的阻留作用增强有关。心衰患者中血小板活化增加,一方面可促进血栓栓塞事件发生增加,另一方面也可通过免疫和炎症机制促进心衰的发生发展^[14]。

作为血常规的检测项目:RDW和MPV,均是心衰患者死亡的预测指标,将两者联合起来探讨预测心衰患者的预后。本研究中将RDW和MPV分别按照中位数进行两两分组,共四组,发现在RDW≥13.4,MPV≥10.5组的患者中,患者生存率最低,RDW≥13.4,MPV<10.5组的患者中,患者生存率次之。由此可见,联合RDW和MPV可以提高单独RDW对心衰患者死亡的预测价值。在实际工作中,若患者入院时的RDW升高,同时查看同一张血常规化验单,如MPV升高,那该患者发生死亡的风险很大,应对患者及早采取积极的治疗措施,以降低患者的死亡风险。

N末端B型钠尿肽原(N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide,NT-proBNP)在心衰中的应用价值已得到认可。但是NT-proBNP检测费用高,在基层医院不易开展。RDW和MPV是目前临床上常用的血常规检验指标,在一张报告单上即可获得这两个检测结果,且廉价快捷。应用这两项指标对心衰病情严重程度和预后进行评估,不仅简单易行而且可广泛开展,使得更多的基层、社区医院患者获益。

参考文献

- [1] Loehr L R,Rosamond W D,Chang P P,et al.Heart failure incidence and survival(from the Atherosclerosis Risk in Communities study).Am J Cardiol,2008,101:1016-1022.
- [2] Elisa Danese,Giuseppe Lippi,Martina Montagnana.Red blood cell distribution width and cardiovascular

- diseases. *Journal of thoracic disease*, 2015, 7(10):E402-411.
- [3] Samad Ghaffari, Leili Pourafkari, Hassan Javadzadegan. Mean platelet volume is a predictor of ST resolution following thrombolysis in acute ST elevation myocardial infarction. *Thrombosis research*, 2015, 136(1):101-106.
- [4] 中国心血管健康多中心合作研究组. 中国心力衰竭流行病学调查及其患病率. *中华心血管病杂志*, 2003, 31:3-6.
- [5] Felker GM, Allen LA, Pocock SJ, et al. Red cell distribution width as a novel prognostic marker in heart failure: data from the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50:40-47.
- [6] Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Redondo B, et al. Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *Eur J Heart Fail*, 2009, 11:840-846.
- [7] Jaewon Oh, Kang SM, Hong NK, et al. Relation between red cell distribution width with echocardiographic parameters in patients with acute heart failure. *J Cardiac Fail*, 2009, 15:517-522.
- [8] Kimmenade RR, Mohammed AA, Uthamalingam S, et al. Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure. *Eur J Heart Fail*, 2010, 12:129-136.
- [9] Dabbah S, Hammerman H, Markiewicz W, et al. Relation between red cell distribution width and clinical outcomes after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2010, 105:312-317.
- [10] Azab B, Torbey E, Hatoum H, et al. Usefulness of red cell distribution width in predicting all-cause long-term mortality after non-ST-elevation myocardial infarction. *Cardiology*, 2011, 119:72-80.
- [11] Yang ZHANG, Yan WANG, Jin-Suo KANG, et al. Differences in the predictive value of red cell distribution width for the mortality of patients with heart failure due to various heart diseases. *Journal of Geriatric Cardiology*. 2015, 12:647-654.
- [12] K Hayati, O Hakan, O Serkan, et al. The prognostic value of mean platelet volume in decompensated heart failure. *Emergency medicine journal*, 2011, 28(7):575-578.
- [13] YJ Ki, S Park, SI Ha. Usefulness of mean platelet volume as a biomarker for long-term clinical outcomes after percutaneous coronary intervention in Korean cohort: a comparable and additive predictive value to high-sensitivity cardiac troponin T and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide. *Platelets*, 2014, 25(6):427-432.
- [14] 王华, 包承鑫, 杨杰孚. 慢性心力衰竭的血栓栓塞相关因素研究现状. *血栓与止血学*, 2006, 12(4):273-275.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

应用 PCR-LDR 法两地区慢性乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型比较的研究

徐栋

上海星耀医学科技发展有限公司

[摘要] **目的:** 应用 PCR-LDR 法比较上海和兰州 2 个地区的慢性乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型的比较以及关系。**方法:** 取上海和兰州地区慢性乙型肝炎患者血清 194 例和 325 例, 利用 PCR-LDR 法对常见的 7 种耐药突变位点和 B 型和 C 型两种亚型。使用 SPSS 对数据进行分析。**结果:** 1、2 个地区均 C 型为主, 上海、兰州分别为 79.3%、81.4%。2、上海地区突变 (48.9%) 比率高于兰州地区 (35.3%), 存在统计学差异。2 地区耐药突变均以拉米夫定突变为主, 占 75.7%, (153/202, 上海 68/92, 兰州 85/110), 2 地区导致拉米夫定耐药突变位点上存在统计学上差异; 而 2 地区的阿德福韦耐药位点均以 rtA181T/V 为主, 地区间无统计学差异。3、耐药突变与否与基因型无相关性, C 基因中上海地区的突变比率 (49%) 高于兰州地区 (35.4%), 存在统计学差异。4、4 种耐药比率在与基因型无相关性。**结论:** 上海兰州 2 各地区在基因型分布上相似, 上海地区发生耐药比率更高, 2 个地区均显示发生耐药与否以及耐药类型与基因无关。

[关键词] PCR-LDR; 乙型肝炎; 耐药突变; 基因型

[Abstract] Objective: Comparative research on HBV nucleoside drug resistance loci and genotypes of Shanghai and Lanzhou with PCR-LDR method. Method: Seven nucleoside drug resistance loci and genotype of B and C were detected on 194 (Shanghai) and 325 (Lanzhou) patient serum samples of chronic hepatitis B patients. Spss was used for analyzed the data obtained. Results: 1, Genotype C is the main genotype in two area (Shanghai 79.3%, Lanzhou 81.4%). 2, Mutation of Shanghai is higher than Lanzhou, and there are statistical differences ($P < 0.01$) in two areas. Lamivudine resistance is main in all the mutation of two areas, which ratio is 75.7% (153/202; Shanghai 68/92, Lanzhou 85/110). The Lamivudine mutation

loci of two areas difference is significant ($P < 0.01$). However, there aren't difference in adefovir of two areas, which the main mutation loci are rtA181T/V. 3, There are no correlation between whether mutation and Genotype. But we found that there are significant difference on Mutation or not between Shanghai and Lanzhou. 4, There aren't correlation between the ration of four nucleoside drug resistance mutation and Genotype. Conclusion: The Genotype ratio of two areas are similar; Shanghai have a higher mutation ration than Lanzhou; The aren't correlation between whatever whether mutation or drug resistance and genotype.

[Key words] PCR-LDR; HBV; drug resistance; genotype

0 前言

据统计,全球每年大约有3.5亿人感染慢性乙肝,超过100万人死于肝硬化和肝癌^[1]。乙型肝炎病毒(HBV, Hepatitis B Virus)持续感染与肝炎、肝硬化、肝癌的发生密切相关^[1-2]。HBV根据基因组全序列的差异性是否大与8%分为A-H 8种基因型^[3-4]。在中国,较为常见的是B型和C型,其中B型和C型,按照中国南北地域分布存在差,北方以C型为主,南方以B型为主,而A型和D型则较少发现^[5]。一些研究表明不同基因型对抗病毒治疗的药物应答不同,B型要比C型对干扰素的应答好;另外,C型通常与HBV重度感染、肝硬化、肝癌更加高度相关^[6-7]。目前用于乙肝治疗的核苷类似物类药物存在耐药突变,主要的突变位点有7个分别为rtL180M, rtA181T/V, rtT184G, rtS202I, rtM204I/V, rtN236T, M205V^[8]。准确的对HBV进行分型和耐药位点突变检测非常重要,对乙肝患者的用药、预后有很强的指导意义。PCR-LDR法是目前研究较多,灵敏度高、特异性强,且性价比高的检测方法,可以用于临床检测基因分型和多耐药位点检测^[8-10]。

对于HBV的分型和耐药的研究以一个地区较多,而对2个地区比较的研究较少,尤其是对中国东西2个城市比较。本文对地理位置分别在东部和西北部的上海和兰州进行了分型和耐药的比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 血清样本

本次研究所用的血清标本收集于兰州大学第二医院肝病研究所和上海精神卫生中心医院,共计519例,其中上海精神卫生中心医院194例(2013年1月-2015年10月)男性119例,女性75例,年龄26至67岁,平均年龄43.72岁;兰州大学第二医院肝病研究所325例(2013年8月至2015年5月),男性213例,女性112例,年龄24至72岁,平均年龄45.23岁;上述患者血清样本采集均符合2005年《慢性乙型肝炎防治指南》中的有关标准。

1.1.2 仪器

仪器使用美国伯乐公司MJ-90 PCR仪,ABI公司ABI7500实时荧光定量PCR仪和美国ABI公司ABI3130 DNA测序仪。

1.1.3 试剂

乙肝DNA提取试剂为上海星耀医学科技发展公司(下称上海星耀)乙肝DNA磁珠提取试剂盒,乙肝DNA定量检测使用乙型肝炎病毒(HBV)核酸扩增(PCR)荧光定量试剂盒,耐药位点扩增、LDR反应和测序使用上海星耀生产的乙型肝炎病毒多耐药基因位点分型试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 血清乙肝DNA提取 按照上海星耀的DNA提取试剂盒进行

1.2.2 PCR扩增、电泳检测和LDR反应

均按照上海星耀的说明书进行,其中:PCR扩增体系(50ul)如下:加入18ul的P1, 1ul的PE,以及1ul的DNA样本,充分混匀后,短暂离心最后加入10ul的石蜡油。PCR扩增程序:37℃5min, 94℃15min, (94℃30s、54℃2s、72℃20s)45次循环,72℃5min, 4℃保存。

电泳:取PCR扩增后的产物2ul加入8ul的loading buffer内,混匀并离心。跑琼脂糖电泳。观察是否有扩增产物条带,如果有条带表示扩增正常。

LDR反应:在2个200ul的PCR薄壁管中,分别加入8ul的L1、L2后,各加入0.2ul的LE,加入2ul步骤1的扩

增产物。充分混匀后短暂离心，最后加入 10ul 的石蜡油。PCR 扩增程序：94℃ 2min，（94℃ 15s、50℃ 45s）30 次循环，4℃ 保存。

1.2.3 毛细管电泳

在每个上样孔中加入 9.5ul 的 Hidi、0.3ul 的内参标记 Standard ROX，最后加入 L1、L2 的产物各 1ul，混匀后上机，在 ABI3130 DNA 测序仪电泳 30min。

1.2.4 结果分析与数据统计

电泳结束后结果判定通过 GeneMapper4.0 软件进行分析，数据统计使用 SPSS 17.0 进行。

2 结果

2.1 特异性检测、检测下限和重复性

随机挑选经 LDR 法检测突变位点为 rtL180M，rtA181T/V，rtT184G，rtS202I，rtM204I，rtM204V，rtN236T，M205V 以及野生型各 3 例进行测序检测，LDR 法检测结果和测序结果均一致。

按照试剂盒说明书的最低检测下限 103 拷贝/mL，挑选含不同突变位点的 rtL180M，rtA181T/V，rtT184G，rtS202I，rtM204I，rtM204V，rtN236T，M205V 和野生型样本 1-3 例，进行乙肝 DNA 不同病毒载量检测，根据定量结果将这些标本稀释至 103-104 拷贝/mL，每样本重复检测 3 次，均能检测出相应突变。

本实验共测试 529 例样本，其中 19 例样本未检测，其中上海地区 13 例，兰州地区 6 例，对这 19 例样本进行 DNA 定量检测结果低于试剂盒检测下限，符合试剂盒性能。

2.2 HBV 基因型结果

本次 PCR-LDR 法对样本进行了 B 型和 C 型检测，其他型别未进行检测。2 地区的 BC 分型的结果统计见表 1。500 例测试样本中 C 型为主，共 403 例，占总比率的 80.6%，B 型 74 例（14.8%）、非 B 非 C 18 例（3.6%），B/C 混合型 5 例（1%），同样上海地区（79.3%，149/188）和兰州地区（81.4%，254/312）的均以 C 型为主。两地区间的 B、C、非 B 非 C 型、B/C 混合型所占比率无显著性差异（ χ^2 检验，P 值 0.329），刨除非 B 非 C 型和 B/C 混合型不考虑，两地区的 B、C 型分布之间也无显著性差异（ χ^2 检验，P 值 0.215）。

表 1 两地区乙肝基因型及耐药统计表

基因型	上海			兰大一院			合计 3 (%)
	耐药突变* (%)	无耐药突变 (%)	合计 1 (%)	耐药突变* (%)	无耐药突变 (%)	合计 2 (%)	
B	16 (48.5)	17 (51.5)	33(17.6)	13(31.7)	28(68.3)	41(13.1)	74(15.8)
C	73 (49.0)	76 (51.0)	149(79.3)	90(35.4)	164(64.6)	254(81.4)	403(80.6)
非 B 非 C	3 (7.5)	1(2.5)	4(2.1)	5(35.7)	9(64.3)	14(4.5)	18(3.6)
B/C	0 (0)	2 (100)	2(1.1)	2(66.7)	1(33.3)	3(1)	5(1)
合计 4	92(48.9)	96(51.1)	188(37.6)	110(35.3)	202(64.7)	312(62.4)	500

*耐药突变统计按照发生拉米夫定、恩替卡韦、替比夫定、阿德福韦耐药突变计算，若有相关位点突变但未导致耐药突变未列为耐药突变。

2.3 两地区 HBV 耐药突变结果

本次 500 例样本共检测出 32 种突变位点组合。共有 208 例样本发生 rtL180M、rtLA181T/V、rtT184G、rtS202I、rtM204、rtM204V、rtM204I/V、rtN236T、rtM250V 当中的某个位点或多个位点突变，其中 6 例样本未发生耐药突变，耐药突变比率为 41.6%，其中上海地区为 48.9%（92/188），兰州地区 35.3%（110/312），两地区突变比率差异极显著（ χ^2 检验，P 值 0.0025）。202 例耐药突变样本中拉米夫定突变 153 例，占总耐药突变比率的 75.7%，（上海 68，兰州 85）；其他几种耐药突变分别为：替比夫定突变 95 例（上海 34，兰州 61），阿德福韦 61 例（上海 29，兰州 32），恩替卡韦突变 6 例（上海 5，兰州 1），各种耐药突变比率差异极显著。2 个地区拉米夫定突变不同：上海地区 rtM204I、

rtM204V 突变为主, 其他形式突变少数; 而兰州地区以 rtM204V 为主; 对两个地区 rtM204I、rtM204V 进行统计学分析, 存在统计学差异 (χ^2 检验, P 值 0.0075)。对阿德福韦耐药的耐药位点进行类似分析发现, 2 个地区均已 rtA181T/V 为主, 地区间无统计学差异 (χ^2 检验, P 值 0.994)。恩替卡韦的突变例数较少未进行位点统计学分析。所有突变样本中, 发生 2 种或 2 种以上耐药突变共 109 例, 占总耐药突变比率的 54%, 其中上海 46.7% (43/92), 兰州 60% (66/110), 两地区多耐药情况无显著性差异 (χ^2 检验, P 值 0.0597), 发生 3 种药物耐药突变 7 例 (上海 3 例, 兰州 4 例), 无 4 种药物共同耐药突变, 其中 2 种耐药以拉米夫定和替比夫定同时耐药为主, 占 84.4% (92/109, 上海 33/43, 兰州 59/66)。

表 2 两地区突变位点类型及基因型统计

突变位点	上海		兰州		耐药型别
	数量	基因型	数量	基因型	
rtL180M	0	0	1	1C	LAM
rtL180M& rtS250I	1	1C	0	0	LAM
rtL180M& rtS202I	1	1C	0	0	LAM
rtM204I	25	4B20C1 非 B 非 C	49	5B39C1B/C4 非 B 非 C	LAM&LDT
rtM204I&rtM204V	1	1B	1	1C	LAM&LDT
rtM204I&rtM204V& rtS202I	1	1B	0	0	LAM&LDT
rtM204I&rtM204V& rtL180M	0	0	1	1C	LAM&LDT
rtM204I&rtL180M	5	5C	7	7C	LAM&LDT
rtM204I& rtL180M & rtS202I	1	1C	0	0	LAM&LDT&E TV
rtM204I& rtL180M & rtN236T			1	1B	LAM&LDT&E TV
rtM204I & rtS202I	1	1C	0	0	LAM&LDT
rtM204I &rtN236T	2	1B1C	0	0	LAM&LDT & ADV
rtM204I & rtA181T/V	0	0	2	2C	LAM &LDT & ADV
rtM204I & rtT184G	0	0	1	1C	LAM&LDT
rtM204V	18	4B13C1 非 B 非 C	10	5B5C	LAM
rtM204V&rtL180M	3	3C	5	5C	LAM
rtM204V&rtL180M& rtA181T/V	2	2C	1	1C	LAM & ADV
rtM204V & rtL180M&rtS202I	3	3C	0	0	LAM &ETV
rtM204V & rtL180M&rtT184G	1	1C	0	0	LAM &ETV
rtM204V & rtL180M&rtS250I& rtA181T/V	0	0	1	1C	LAM&ETV & ADV
rtM204V& rtA181T/V &rtS202I	1	1C	0	0	LAM&ADV
rtM204V &rtT184G	1	1C	1	1C	LAM
rtM204V &rtS202I	1	1C	1	1C	LAM
rtM204V &rtN236T	0	0	2	2C	LAM&ADV
rtA181T/V	16	3B12C1 非 B 非 C	16	1B13C1B/C1 非 B 非 C	ADV
rtA181T/V& rtT184G	1	1C	0	0	ADV
rtA181T/V& rtN236T& rtS202I	1	1C	0	0	ADV
rtA181T/V& rtN236T	2	2C	7	1B6C	ADV
rtA181T/V& rtS250I			1	1C	ADV
rtN236T	4	2B2C	1	1C	ADV
rtS202I	3	1B1C1B/C	1	1C	/
rtT184G	0	0	2	2C	/

注: “&”表示“同时”的意思, “/”表示未发生耐药突变。该表格中列出了所有突变位点的组合, 所有位点没有重复统计。

2.4 HBV 基因型与耐药突变关系

对 2 地区的 BC 分型及耐药突变的分布统计见表 1。由于 B/C 混合型和非 B 非 C 型在总数中所占比例较小，本小节和下小节的结果分析剔除了这些样本。对所有耐药突变按照 B 型和 C 型的进行分类如下：B 型 39.2% (29/74)，C 型 40.4% (163/403)，B、C 型耐药突变比率无显著性差异 (χ^2 检验, P 值 0.839)。对两地区 B、C 型的突变比例分开进行统计得到类似结果，也无显著性差异，其中上海地区 (χ^2 检验, P 值 0.956)、兰州地区 (χ^2 检验, P 值 0.642)。对 B 或 C 型突变在上海和兰州地区的所占比率分别进行地区间比较：两个地区间 B 型耐药突变情况 (上海 48.5%，兰州 31.7%) 无显著性差异 (χ^2 检验, P 值 0.14)，两地区间 C 型耐药突变 (上海 49%，兰州 35.3%) 差异统计学上极显著 (χ^2 检验, P 值 0.0074)。

2.5 耐药突变与 HBV 基因型比较

对发生耐药突变的样本按耐药的四种药物类型与基因型进行分类，所有 B 和 C 型中四种耐药突比率无统计学差异 (χ^2 检验, P 值 0.68)，对上海地区和兰州地区单独进行分析同样无统计学差异 (χ^2 检验, P 值上海 0.68，兰州 0.90)。对耐药突变位点的基因分析，发现 rtL180M 绝大部分发生在 C 型中 (34, 1B33C)，两个地区间无统计学差异。其他几个位点基因型的分析如下。关于耐药位点的与基因分型关系，我们发现了一些统计学差异，如：rtL180M, rtT184G rtM250V；但同时也有位点没有统计学差异，如：rtLA181T/V rtS202I, rtM204I, rtM204V rtN236T 这。

3 讨论

3.1 PCR-LDR 法性能

对于 PCR-LDR 法检测乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和分型检测的灵敏度、特异性、和重复性等性能以前相关研究已有数据显示，该方法的具有 PCR 高灵敏度、高特异性和测序法的高精度特点，且相对测序法性价比更高 [8-10]。本文没有过多对这些性能进行大数据验证，就实验中涉及到的验证均与先前研究符合，说明该方法的可靠性。

3.2 两地区乙型肝炎型别的关系

由于中国地区主要乙型肝炎型别为 B 型和 C 型，本试剂盒只对 B 型和 C 型进行检测。经统计发现，上海地区和兰州地区的基因型均以 C 型为主，本研究中两地区的各基因分布情况无统计学上差异，兰州地区略高于上海地区，这些结

两地区的突变位点与基因型统计比较

果符合先前研究，北方地区以 C 型为主 [3-5]，上海地区的 C 型比先前的研究要略高 [11]，这可能于样本基数不够大和上海地区流动人口比较多有关系。值得一提的是，本文中检测出的非 B 非 C 型主要集中在兰州地区，可能与该地区的少数民族的比率高于上海地区有关系，对于乙型肝炎病毒的基因分型的研究 [5] 也显示中国地区的 A 型和 D 型主要存在于少数民族。

3.3 耐药位点突变分析

本文耐药位点突变的判读基于先前的已有研究 [8]。本研究发现，在所有 208 例发生位点突变患者中，有 6 例没有产生耐药，这可能在服用核苷类似物之前发生先天性的突变，但具体突变机理需要进一步研究。对 2 个地区耐药突变情况进行比较，2 个地区的发生耐药突变的比率存在显著性差异，这可能与 2 个地区的经济水平有关，上海地区的患者可能接受治疗概率比兰州地区高，由于没有患者的详细诊疗资料，这是推测，具体原因需要进一步探究。研究研发两个地区均以拉米夫定突变为主，这与拉米夫定突变的单位点突变相关，rtM204I/V 或 rtL180M 某一位点发生突变产生耐药。恩替卡韦的耐药突变率最低，这与其耐药为多为点突变有关系，其中恩替卡韦的 6 例突变 5 例存在于上海地区，也侧面说明上海地区患者可能接受治疗的比率更高可能性，且更改过治疗方案。2 个地区的多耐药情况，均以拉米夫定和替比夫定为主，这与替比夫定与拉米夫定的其中一个耐药位点相关。

3.4 耐药突变与否与基因型关系分析

对于 2 个地区的 BC 分型和耐药突变与否分析，未发现耐药突变与否在 2 种基因的存在偏好性。本研究显示与先前部分的研究 [12-13] 结果相似，突变与否与基因型无关，本研究也与部分研究 [14-15] 结果有所出入，这些研究认为 C 型较 B 型更容易发生耐药突变。对 2 个地区的 B 型和 C 型的耐药与否进行比较发现，C 型中上海地区发生耐药比率明显高于兰州地区，差异极显著，就此结果未找到相关文献，是偶然性还是其他因素，无从知晓。

3.5 耐药突变位点及耐药药物种类与 HBV 基因型分析

通过统计发现,结果同 3.4,耐药药物种类与 HBV 基因型无相关性,从统计学上看未发现某种药物耐药突变倾向于某种基因型,这与先前研究基本一致^[12-13]。同样,耐药位点的值得一提是,值得一提是,6 例发生恩替卡韦突变样本均为 C 型,这一现象可以作为进一步研究对象。对于耐药突变位点与基因型的关系本研究发现部分位点与基因型有关,如 rtL180M,rtT184G rtM250V 更偏好 C 型,但由于实验基数不大的原因,这一结论需要进一步研究证实。

参考文献

- [1] World Health Organization.Hepatitis B.Department of Communicable Disease Surveillance and Response,World Health Organization, Geneva,Switzerland.2002.
- [2] 中华医学会肝病学会分会,中华医学会感染病学分会;慢性乙型肝炎防治指南[J](2010 年版).中华传染病杂志,2011,29:65-80.
- [3] Norder H,Courouce AM,Magnius LO.Complete genomes,phylogenetic relatedness,and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus,four of which represent two new genotypes [J].Virology 1994; 198:489-503
- [4] Stuyver L,De Gendt S,Van Geyt C,et al.A new genotype of hepatitis B virus:complete genome and phylogenetic relatedness[J].J Gen Virol 2000; 81:67-74.
- [5] Zeng G,Wang Z,Wen S,et al.Geographic distribution,virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China[J].J Virat Hepat,2005,12(6):609-17.
- [6] Orito E,Mizokami M,Sakugawa H,et al.A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C[J].Japan HBV Genotype Research Group[J].Hepatology 2001; 33(1):218-223.
- [7] Nakayoshi T,Maeshiro T,Nakayoshi T,et al.Difference in prognosis between patients infected with hepatitis B virus with genotype B and those with genotype C in the Okinawa Islands:a prospective study[J].J Med Virol 2003; 70(3):350-354.
- [8] 张时良,裴豪,戴亚新等.应用 PCR-LDR 法检测乙型肝炎病毒核苷类药物耐药多基因突变位点[J].中国实验诊断学 2013;03:471-474
- [9] 杨昊,张帆,张笋华等.寡核苷酸芯片法、实时 PCR 和测序法进行乙型肝炎病毒[J].现代生物医学进展 2012;5 :861-864.
- [10] 孙艺艳,吴月平,毛丽萍等.连接酶检测反应法检测乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药突变的可行性[J].检验医学与临床 2012;21:2737-2739.
- [11] 梁雪松,万谟彬,李成忠等.上海急慢性乙型肝炎患者病毒基因型分布概况比较[J].中华传染病杂志 2009;1:23-26.
- [12] 林莲英,张文,邱峰.慢性乙型肝炎病毒基因型与 YMDD 变异关系[J].现代临床医学生物工程杂志 2006;2:164-166.
- [13] 方芳,冯钢,浦春慢性乙型肝炎患者乙型肝炎 B、C 基因型和阿德福韦酯耐药基因的相关性[J].皖南医学院学报 2012;4:291-294.
- [14] 李红生.慢性乙肝不同基因型与拉米夫定耐药关系的探讨[J].当代医学 2011;36:83-33
- [15] 许建平,钟国权乙型肝炎病毒核苷类药物耐药突变和基因型研究[J].检验医学与临床 2015;9:1240-1242

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

人心肌红蛋白多肽的基因克隆、原核表达及抗体制备

齐文闯 申魁魁 付新中 周燕娟 滕昆 熊露群 肖佳民*

[摘要] 本研究使用基因重组技术通过原核表达获得单表位的人心肌红蛋白肽段,纯化肽段后免疫兔子,以此制备出针对不同表位的多克隆抗体。利用软件分析人心肌红蛋白的抗原表位,得到 4 个肽段(片段 1、2、3、4),PCR 扩增其基因序列,连接到表达载体 pET-GST 中,转化至 E.coli BL21 进行诱导表达。在 A600 至 0.5-0.8 时,加入 IPTG 浓度为 0.1mmol/L,16℃,200r/min 诱导过夜(20h),各个片段均能大量表达。将 MB-GST 融合蛋白通过 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱进行纯化,用 12%SDS-PAGE 检测,得到大小为 28kD 左右的融合蛋白,表达量为 15mg/L。将亲和纯化的肽段与佐剂乳化后免疫新西兰大白兔,多次免疫后检测血清效价,获得效价高的多抗。结果表明 4 个多肽抗体经 Western blot 检测均具有较好的特异性。

[关键词] 肌红蛋白;基因重组;原核表达;融合蛋白

Gene synthesis,Prokaryotic Expression and Antibody Preparation of Human heart Myoglobin Protein Peptides

Wenchuang Qi,Kuikui Shen,Xinzhong Fu,Yanjuan Zhou,Kun Teng,Luqun Xiong,Jiamin Xiao*

[Abstract] In order to acquire single-epitope human heart myoglobin peptides, the study used gene recombination technique and prokaryotic expression. The polyclonal antibodies of different epitopes were obtained by immunized of rabbits with the purified peptides. Four peptides (fragment 1,2,3,4) came from human serum myoglobin by software analysis. Their gene sequences were amplified by PCR, connected to the expression vector pET-GST and expression of protein in *E. coli* BL21. The protein expression level of peptides was 15 mg/L when the growth environment was A600(0.5-0.8), IPTG(0.1mmol/L), 16°C and 200r/min(20h). The MB-GST fusion protein was purified by GST-Sepharose 4B and detected by 12%SDS-PAGE. The fusion protein was about 28 kD. New Zealand white rabbits were immunized with the purified peptides and adjuvant emulsion. To obtain high titer polyclonal antibody was by multiple immunization. The results showed that the 4 peptides antibodies were good specificity by Western blot

[Key words] Myoglobin; Gene Recombination; Prokaryotic Expression; Fusion Protein

肌红蛋白(MB)是横纹肌组织所特有的一种蛋白质,在正常人的血清中含量甚微。当心肌和骨骼肌受损时,可从受损的肌细胞释放出来,所以成为近年来测定急性心肌梗死(AMI)的一项重要指标。心肌梗死患者血清肌红蛋白升高幅度及持续时间与梗死面积和坏死程度呈正相关,所以早期测定肌红蛋白对心肌梗死的及早诊断有一定的参考价值。近几年临床在诊断急性心肌梗死时,主要以病史、临床症状、心电图的变化为主。很多临床医师主要采用乳酸脱氢酶和肌酸激酶作为早期诊断指标,由于操作复杂,利用率低,且不适用于急诊。因此,在进行急性心肌梗死的检测时,采用血清肌红蛋白、肌钙蛋白I与超敏C-反应蛋白结合的方法更加准确快速,MB可作为早期诊断AMI较理想的指标,具有出现时间早、阳性检出率高等特点,对急性心肌梗死的诊断、预测心肌梗塞面积、指导溶栓治疗及其预后具有重要意义^[1-7]。

有关MB临床检测的方法很多,放射免疫法、胶体金法、荧光免疫测定法、化学发光和免疫比浊等。检测方法的发展对科学研究提出了更高的要求,筛选出可用于夹心法的高特异性、高亲和力配对单克隆抗体是应用于化学发光、免疫比浊等的关键^[8-12]。传统的单克隆制备方法筛选到对应不同表位的单克隆抗体有一定的困难,需要耗费较多的物力、人力、财力。本研究旨在通过对MB抗原的分析,预测获得不相近的抗原表位,以此设计出合适的肽段。利用基因重组技术重组分别表达各个单一表位,纯化肽段(免疫纯度级别)。不同表位的多肽免疫兔子,可得到针对不同表位的多抗。成功筛选获得高敏感性及特异性的MB抗体,为建立检测人类心脏疾病,尤其是急性心肌梗塞的临床检测试剂盒的制备奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli BL21由本实验室保存;原核表达质粒pET-GST购自Promega公司;新西兰大白兔,3-4周龄,本公司动物组饲养;弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自Sigma公司;人肌红蛋白天然抗原购自LeeBio公司;DNA回收试剂盒、T₄DNA连接酶和质粒抽提试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司;GST-Sepharose 4B购自GE公司。

1.2、方法

1.2.1 MB肽段确定和基因克隆

参考文献和蛋白质结构预测软件确定MB肽段:片段1-HLKSEDEMKA SEDLKKHGAT;片段2-KKGGHHEAEIKPLAQSHATKH;片段3-VLQSKHPGDFGADAQGAMN;片段4-LELFRKDMASNYKELGFQG。各片段的F引物引入BamHI酶切位点(GGATCC),R引物引入EcoRI酶切位点(GAATTC)。以包含人心肌红蛋白的cDNA库为模版进行PCR扩增,条件:94°C预变性,3min;94°C,30s;64°C,30s;72°C,150s;32个循环;72°C延伸10min;4°C保存。

表 1.1 本研究所用引物名称和序列

Table 1.1: Sequences of primers used in the present study

Gene	Sequences(5'-3')
MB-1-F	CGGGATCCCACCTGAAGTCAGA
MB-1-R	CGGAATTCGGTGGCACCATGC
MB-2-F	CGGGATCCAAGAAGGGGCATCATGA
MB-2-R	CGGAATTCGTGCTTGGTGGCAT
MB-3-F	CGGGATCCGTTCTGCAGAGCAA
MB-3-R	CGGAATTCGTTCATGGCCCCCT
MB-4-F	CGGGATCCCTGGAGCTGTTC
MB-4-R	CGGAATTCGCCCTGGAAGCC

1.2.2 重组表达质粒 pET-MB-GST 构建及鉴定

将 PCR 扩增产物使用试剂盒回收纯化, 经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切, 再经试剂盒回收纯化得到 4 个片段。同样, 将 pET-GST 质粒经双酶切回收纯化, 用 T₄DNA 连接酶与肽段在 16℃ 连接 2h (或 4℃ 过夜)。将连接产物转化到 *E.coli* BL21 上, 涂到含有氨苄青霉素 (AMP) 的平板上 37℃ 过夜。无菌操作下, 用灭菌的牙签挑取平板上的单菌落, 将其点样保存于另一块事先标记好的画格标记平板上, 然后将牙签上的菌落浸入 PCR 反应液中, 将菌落混入反应液中做模板。挑取 PCR 鉴定为阳性克隆的单菌落, 用含有 Amp 的 LB 液体培养基 (0.1%, V/V) 扩大培养, 使用质粒抽提试剂盒提取质粒, 然后进行双酶切鉴定。

1.2.3 pET-MB-GST 原核表达和纯化

将鉴定正确的重组质粒 pET-MB-GST 转化到 *E.coli* BL21 上, 挑取多个单克隆接入 5ml 新鲜的 LB (AMP) 培养基中, 200r/min, 37℃ 震荡过夜。次日以 1:50 接种到 500ml 新鲜 LB (AMP) 培养基中, 200r/min, 37℃ 震荡, 待 A600 达到 0.5-0.8 时, 加入 IPTG (终浓度 0.1mmol/L), 将温度调至 16℃, 200r/min 震荡过夜。4℃, 10000r/min 离心 5min 收集菌体, 经 PBS 洗涤两次, 10000r/min 离心 5min 弃上清。加入 10ml 1×PBS 吹散菌体, 在冰浴条件下超声破碎菌体 (50% 强度, 超声 5s, 停 5s, 15min), 待溶液由粘稠变透亮时, 4℃, 10000r/min 离心 10min, 收集上清储于 4℃。将收集上清过 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱, 用还原性谷胱甘肽+Tris-HCl 缓冲液进行洗脱, 得到目的蛋白, 用 12%SDS-PAGE 验证分析。

1.2.4 肽段多克隆抗体制备

纯化的 4 个肽段免疫 3-4 周龄新西兰大白兔, 每个片段 3 只兔子, 首免量均为 400μg, 与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化后于兔子背部和四肢皮下多点免疫。每隔 2 周加免一次, 免疫量为 200μg, 与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化, 背部和四肢皮下多点免疫, 每次加强免疫 7 天后, 抽血检测抗体效价 (ELISA), 待抗体效价达到 1:640000 后, 进行大量抽血, 纯化抗体。

1.2.5 抗体检测

将纯化的肽段与标准 MB 先进行 SDS-PAGE, 然后转移到硝酸纤维素膜上, Western blot 检测纯化的抗体的特异性。

2 结果

2.1 MB 基因克隆和 pET-MB-GST 构建

利用各个片段特异性引物进行 PCR 扩增, 产物经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳分离后, 在 100bp 下方存在一条明显的条带 (均为 75bp 左右), 大小与理论值相符 (如图 1.A)。pET-MB-GST 经 *Bam*HI/*Eco*RI 双酶切后, 产物经 1.2 % 琼脂糖凝胶电泳分离后, 在 100bp 下方存在一条明显的条带, 与目的基因一致, 表明成功将各个肽段基因克隆到载体 pET-GST 上 (如图 1.B)。

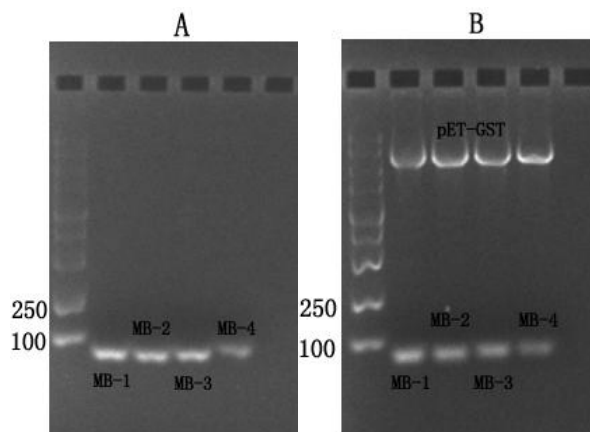


图 1 A:MB 多肽基因 PCR 产物电泳图; B:重组质粒 pET-MB-GST 双酶切鉴定。

Fig.1.A: Electrophoresis of PCR amplification product of Myoglobin Peptides.B: Cleaving of pET-MB-GST with *Bam* HI and *Eco* RI.

2.2 pET-MB-GST 原核表达和纯化

通过对表达条件的摸索,在 A600 为 0.5-0.8 时, IPTG 浓度为 0.1mmol/L, 16℃, 200r/min 诱导过夜 (20h), 各个片段均能大量表达。将 MB-GST 融合蛋白通过 GST-Sepharose 4B 亲和层析柱进行纯化, 用 12%SDS-PAGE 检测, 得到纯化的大小为 28kD 左右的融合蛋白, 表达量为 15mg/L (如图 2)。

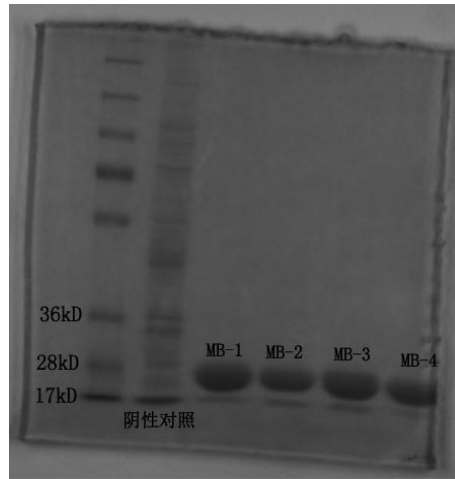


图 2 融合蛋白纯化。阴性对照:pET- GST; MB-1/MB-2/MB-3/MB-4:MB-GST 融合蛋白。

Fig.2.The purified fusion protein.Negative Control: pET- GST; MB-1/MB-2/MB-3/MB-4: MB-GST.

2.3 抗体检测

将纯化的肽段和标准 MB 与纯化的抗体和免疫前兔血清进行 Western blot, 结果显示, 纯化的肽段与抗体在 28kD 附近出现特异性杂交条带 (如图 3.A), 标准 MB 与抗体在 18kD 处出现特异性杂交条带 (如图 3.B), 混合的免疫前兔血清均不与纯化的肽段和标准 MB 反应 (如图 3.C)。因此, 得到的 4 个肽段的抗体均具有较好的特异性。

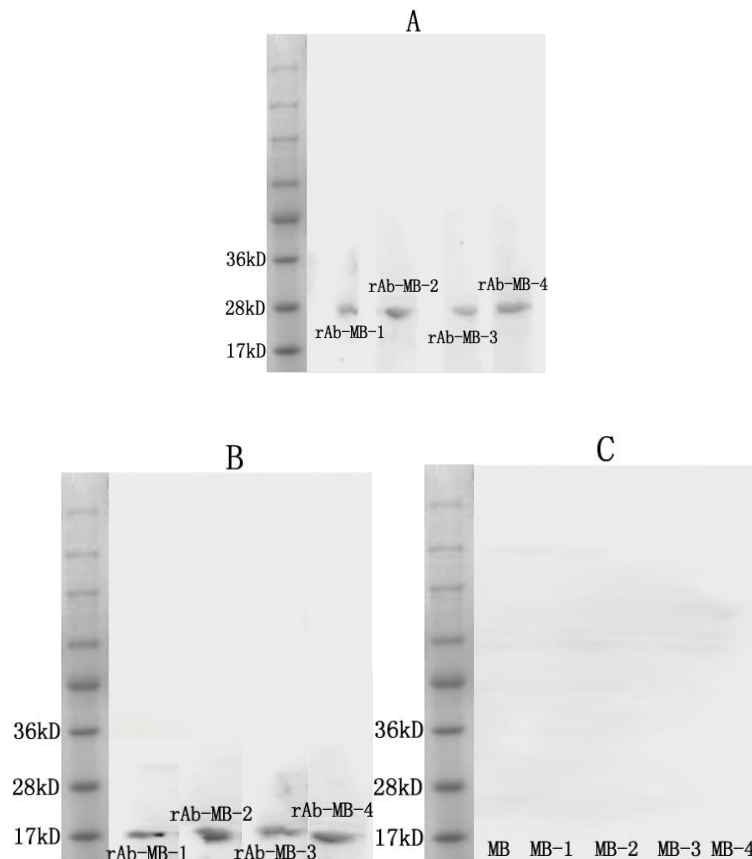


图 3 Western blot 检测。A:MB-1/MB-2/MB-3/MB-4 与各自的兔多抗反应；B:标准 MB 与 rAb-MB1/2/3/4 反应；C:免疫前混合兔血清与标准 MB、MB-1/2/3/4 反应。

Fig.3.Western blot.A: the reaction of MB1,MB2,MB3 and MB4 with their respective rabbit polyclonal antibodies; B: the reaction of MB with rAb-MB1/2/3/4; C: the reaction of MB,MB1,MB2,MB3 and MB4 with mixed rabbit serum before immunization.

3 讨论

1975 年 Kagen 等^[7]首次提出 MB 可作为心肌梗塞 (AMI) 早期的诊断标志物以来, MB 的检测被广泛应用于临床诊断及预后检测。有关 MB 临床检测的方法很多, 放射免疫法、胶体金法、荧光免疫测定法、化学发光和免疫比浊等。检测方法的发展对科学研究提出了更高的要求, 筛选出可用于夹心法的高特异性、高亲和力配对单克隆抗体是应用于化学发光、免疫比浊等的关键。

本研究旨在通过对人心肌红蛋白的分析, 预测获得不相近的抗原表位, 利用基因重组技术重组分别表达各个单一表位。将不同表位的多肽免疫兔子, 可得到针对不同表位的多抗。成功筛选获得高敏感性及特异性的 MB 抗体, 为建立检测人类心脏疾病, 尤其是 AMI 的临床检测试剂盒的制备奠定了基础。利用各个片段特异性引物进行 PCR 扩增, 构建到载体 pET- GST 中, 转化到 E.coli BL21 上, 16℃, 200r/min, 经 IPTG (终浓度为 0.1mmol/L) 诱导过夜 (20h), 各个片段均能大量表达, 表达量达到 150mg/L, 其他温度条件表达量均显著降低。纯化的 4 个肽段免疫 3-4 周龄新西兰大白兔, 多次免疫后获得了效价高的多克隆抗体, ELISA 检测抗血清效价达到 1:64 万, 经 Western blot 检测, 获得的 4 个肽段的抗体与肽段和标准 MB 均有较好的特异性。

参考文献

- [1] 安星兰.人肌红蛋白基因合成、原核表达及单克隆抗体制备:[硕士学位论文].哈尔滨:东北林业大学,2012.
- [2] 崔大伟,王伟,周小林等.人肌红蛋白基因的克隆、表达及其抗体制备[J].中国生物制品学杂志,2007(3),166-169.
- [3] 黄新次,甄燕.肌钙蛋白 I、肌红蛋白及心肌酶的检测在急性心肌梗死中的临成诊断价值[J].第四军医大学学报,2009,30(2),133-134.
- [4] 伍敏仪,曾利剑,陈怡霓.心肌标记物在急性心肌梗塞早期诊断中的应用[J].实用医学杂志,2001,17(1),18-19.
- [5] 郑佐娅,王迪楼,杭勤.磁珠分离酶联免疫测定法在检测人血清肌红蛋白中的应用[J].检验医学,2005,20(1),17-19.
- [6] 王桂珍,杨春祥.人血清肌红蛋白测定及临床意义[J].天津医药,1994(12),758-759.
- [7] Kagen L,Scheidt S,Roberts L,et al.Myoglobinemia following acute myocardial infarction.Am J Med,1975,58:177.
- [8] Montague C,Kirchfr T.Myoglobin in the early evaluation of acute chestpain [J].AmJClinPathol,1995,104:472-476.
- [9] Hasic S,Jadric R,Kiseljakovic E,et al.Comparison of creatine kinase activity and myoglobin blood level in acute myocardial infarction patients [J].Bosn J Basic Med Sci,2006,6(1),19-23.
- [10] Politicelli F,Zobnina V,Ciaccio C,de Sanctis G,Ascenzi P,et al.Enhanced heme accessibility in horse heart mini-myoglobin: Insights from molecular modellColetta M3 [J].Arch Biochem Biophys,2015,11(585),1-9.
- [11] Frauenfelder H,McMahon BH.Relaxations and fluctuations in myoglobin [J].Biosystems 2001,62,3-8.
- [12] Karras DJ ,Kane DL .Serum markers in the emergency department diagnosis of acute myocardial infarction [J].Emerg Med Clin North Am,2001 ,19(2): 321- 337.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

脑梗死患者同型半胱氨酸及亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性研究*

李慧, 惠玉芬, 白利芬, 王诗淼, 雷光星, 王兴宁[△]

延安大学附属医院检验科, 陕西延安 716000

[摘要] 目的:研究甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、脂蛋白 a[LP(a)]、同型半胱氨酸(Hcy)水平及 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR) C677T 基因多态性与脑梗死的相关性。方法:选择 2013 年 1 月至 2013 年 11 月入住延安大学附属医院的脑梗死患者 281 例为脑梗死组,以同期在我院体检正常者 140 例为对照组,分别检测两组血脂四项、Hcy 水平及 MTHFR C677T 基因多态性,采用统计学软件包 SPSS 19.0 进行分析。结果:脑梗死组患者血清 Hcy、TG、TC、LDL、LP(a)水平分别为(19.78±5.21) μmol/L、(1.94±1.23) mmol/L、(5.16±1.31) mmol/L、(3.11±0.89) mmol/L、(373.31±159.88) mg/L,均明显高于对照组(P<0.05); TT、TC、CC 基因型分布频率分别为 33.1%、43.1%、23.8%,等位基因 T、C 频率分别为 54.6%、45.4%,与对照组相比差异均有统计学意义(P<0.001);脑梗死组各基因型 Hcy 水平均高于对照组,差异有统计学意义(P<0.001),其中 TT 型 Hcy 浓度最高,CT 型次之,CC 型最低,差异有统计学意义(P<0.001)。结论:脑梗死患者血脂四项水平均显著增高,MTHFR C677T 多态性 TT 基因型致 Hcy 水平增高,可能是引发脑梗死的重要遗传因素,血脂四项结合 Hcy 及 MTHFR C677T 基因多态性检查可更好的用于脑梗死易感人群筛查。

[关键词] 脑梗死;5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶;基因多态性;同型半胱氨酸

The analysis of homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in patients with cerebral infarction

LI Hui, HUI Yu-fen, BAI Li-fen, WANG Shi-miao, LEI Guang-xing, WANG Xing-ning

(Department of Laboratory, Yan'an University Affiliated Hospital, Shaanxi Yan'an 716000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the relationship of triglyceride(TG), total cholesterol(TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), lipoprotein a[LP(a)], homocysteine(Hcy) levels and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase(MTHFR)C677T gene polymorphism with cerebral infarction. **Methods:** Choose 281 cases who were hospitalized patients with cerebral infarction from January 2013 and November 2013 in Yan'an University Affiliated Hospital as a group, with the same period in our hospital check-up is normal 140 cases as control group, then determine respectively blood lipid, Hcy levels and MTHFR C677T gene polymorphism, using statistical software package SPSS19.0 were analyzed. **Results:** The triglyceride(TG), total cholesterol(TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), lipoprotein a[LP(a)] levels of the hospitalized patients with cerebral infarction were as follows: (19.78±5.21) μmol/L、(1.94±1.23) mmol/L、(5.16±1.31) mmol/L、(3.11±0.89) mmol/L、(373.31±159.88) mg/L, respectively. Which were obviously higher than that in normal controls (P<0.05). The genotype frequencies of TT, CT, CC were 33.1%、43.1%、23.8% respectively; The frequency of T and C alleles were 54.6%、45.4%, respectively. The differences were statistical significant (P<0.001); The homocysteine(Hcy) levels were higher in cerebral infarction patients than that in normal controls. The differences were statistical significant (P<0.001), among these, The TT genotypes had the highest homocysteine(Hcy) levels, the CT genotypes took the second place, and the CC genotypes were the lowest, the differences were statistical significant (P<0.001). **Conclusion:** The level of blood lipid patients with cerebral infarction was significantly higher, MTHFR C677T polymorphism genotype TT increased Hcy levels, may be an important genetic factors caused by cerebral infarction, combining the inspection of blood lipid, Hcy and MTHFR C677T polymorphism can be better used in screening the susceptible population of cerebral infarction.

[Key words] cerebral infarction; 5,10-MTHFR; gene polymorphism; Hcy(homocysteine)

脑梗死(Cerebral infarction, CI)是缺血性脑卒中的总称,是高致死和高致残的常见疾病,严重危害着人类健康,其并机制目前尚未完全明确。目前常规生化指标中,脂代谢异常被公认为脑梗死的一个主要原因。而同型半胱氨酸(Homocysteine, Hcy)是脑血管疾病发生的一个独立的危险因素^[1-2], 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylenetetrahydrofolate, MTHFR)是 Hcy 代谢的关键酶,目前发现 MTHFR C677T 的基因突变会导致酶活性下降,进而导致 Hcy 浓度增高,增加患脑梗死的危险性。突变频率及分布受人种、地域等因素的影响较大,本研究主要分析延安市居民甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、脂蛋白 a[LP(a)]、Hcy 及 MTHFR

多态性, 为以常规角度及基因角度筛选脑梗死易感人群提供依据。

1 材料与方法

1.1 一般材料

选取 2013 年 1 月至 2013 年 11 月入住延安大学附属医院神经内科的脑梗死患者 281 例为脑梗死组, 其中男 191 例, 女 90 例, 年龄 25~85 (62.2±11.6) 岁。纳入标准: 所有脑梗死患者均为急性起病, 有明确的神经系统损害症状/体征, 并经颅脑 CT 和 (或) MRI 确诊, 符合 1995 年全国第四届脑血管病学术会议制定的诊断标准和评定办法^[3], 排除脑出血、心源性脑栓塞、术后脑栓塞及其他少见原因引起的脑梗死。另选择同期在我院体检正常者 140 例作为对照组, 其中男 87 例, 女 53 例, 年龄 22~89 (60.2±16.5) 岁。排除标准: 两组均排除肝肾功能不全、甲状腺疾病、严重感染、肿瘤、胶原病或自身免疫性疾病、代谢性疾病、严重的慢性疾病、妊娠或哺乳期妇女及近 3 个月服用维生素 B12、叶酸等药物者。两组人群均为自延安市城市居民, 年龄、性别、吸烟情况构成上没有显著性差异 ($P>0.05$), 具有可比性。

所有受检者均于清晨空腹采集静脉血, 分别为促凝真空采血管 1 管及 EDTA-K₂ 真空采血管 2 管。促凝管采血后静置半小时离心 (4000r/min, 离心 10min), 用于血脂四项检查; EDTA-K₂ 管其中一管于采血后立刻离心 (4000r/min, 离心 10min)、分离上层血浆并检测 Hcy 水平, 另外一管用于 MTHFR 基因多态性检测。

1.2 方法

1.2.1 血脂四项测定

使用仪器为西门子 ADVIA 2400 全自动生化分析仪 (德国), TG、TC 及 LDL 测定使用试剂由西门子医学诊断产品有限公司提供, LP(a)测定使用试剂由浙江伊利康生物技术有限公司提供, 各项目所用质控品、校准品均由相应厂家配套提供。

1.2.2 Hcy 测定

使用仪器为 HITACHI 7600-020 全自动生化分析仪 (日本), 试剂为北京九强生物技术有限公司生产的 Hcy 检测试剂盒 (循环酶法), 质控品、校准品均由北京九强公司配套提供。

1.2.3 MTHFR 基因多态性检测

使用的 PCR 扩增仪为杭州博日科技有限公司生产 (TC-XP-D), 杂交和芯片识读分别使用上海百傲科技股份有限公司生产的全自动杂交仪 (BR-526-24) 和生物芯片识读仪 (BE2.0), 所用核酸提取试剂盒及 MTHFR(C677T)基因检测试剂盒均为上海百傲公司配套提供, 所有操作均严格按照试剂盒及仪器说明书进行。

1.3 统计学分析

使用统计软件 SPSS 19.0 对所有资料进行统计学分析, 计数资料使用卡方检验, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示, 两组间计量资料比较使用独立样本 t 检验, 多组间计量资料比较使用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑梗死组 Hcy 及血脂四项水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 见表 1。

表 1 脑梗死组与对照组 Hcy 与血脂四项比较

组别	例数	Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	LDL (mmol/L)	LP(a) (mg/L)
脑梗死组	281	19.78±5.21	1.94±1.23	5.16±1.31	3.11±0.89	373.31±159.88
对照组	140	10.24±3.33	1.38±0.59	4.69±0.89	2.87±0.44	209.79±110.61
t		-19.74	-5.104	-3.791	-2.961	-10.871
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001

2.2 脑梗死组与对照组 MTHFR 基因 C677T 位点基因突变纯合型 (TT 型)、杂合型 (CT 型)、野生纯合型 (CC 型) 分布频率差异有统计学意义 ($P<0.001$), 两组 T、C 等位基因频率差异有统计学意义 ($P<0.001$), 见表 2。

表 2 脑梗死组与对照组 MTHFR C677T 基因多态性和等位基因平率分布

组别	例数	基因型频率 (n,%)			等位基因频率 (n,%)	
		TT	CT	CC	T	C
脑梗死组	281	93(33.1)	121(43.1)	67(23.8)	307(54.6)	255(45.4)
对照组	140	24(17.1)	60(42.9)	56(40.0)	108(38.6)	172(61.4)
χ^2		16.907			19.273	
P		<0.001			<0.001	

2.3 脑梗死组与对照组, MTHFR 不同基因型 Hcy 水平比较, 脑梗死组各基因型 Hcy 均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.001$); 两组组内各基因型间 Hcy 均为 TT 型最高, CT 型次之, CC 型最低, 两两比较差异均有统计学意义 ($P<0.001$), 见表 3。

表 3 脑梗死组与对照组 MTHFR 不同基因型 Hcy 水平比较

组别	TT		CT		CC	
	例数	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	例数	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	例数	Hcy($\mu\text{mol/L}$)
脑梗死组	93	22.90 \pm 4.37	121	19.54 \pm 4.62	67	15.86 \pm 4.59
对照组	24	15.48 \pm 1.64	60	10.37 \pm 2.61	56	7.86 \pm 1.36
t		8.149		14.281		12.847
P		<0.001		<0.001		<0.001

注: 脑梗死组三种基因型 Hcy 比较: $F=47.866$, $P<0.001$, 对照组三种基因型 Hcy 比较: $F=118.348$, $P<0.001$ 。

3 讨论

脑血管病是全球威胁中老年的主要疾病之一, 在我国疾病死因调查中, 已成为“第一杀手”, 其中, 以脑梗死最为常见, 约占 80%^[4]。据 WHO 预测, 到 2030 年我国脑卒中死亡人数将达到 390 万人^[5]。因此, 如何能更准确的筛查脑梗死易感人群显得尤为重要。脑梗死发病机制非常复杂, 涉及遗传以及后天获得等多种危险因素。遗传因素主要有性别、年龄、基因等因素; 后天因素主要有脂质代谢紊乱、吸烟、高血压病、糖尿病、饮酒、高凝状态等。多项研究表明, Hcy 水平升高是脑梗死的独立危险因素^[6], 且 Hcy 水平越高, 生存率越低。Hcy 是一种含硫氨基酸, 代谢途径之一为再甲基化, 高水平的 Hcy 可损伤血管内皮细胞、刺激血管内皮炎症反应、激活促凝血因子、加速血小板聚集, 引起血栓形成, 同时可促进动脉粥样硬化的发生发展^[7], 诱发脑梗死。Chao Feng^[8]等研究了 230 例大动脉梗死患者和 180 名腔隙性脑梗死患者发现高同型半胱氨酸 ($OR=1.058, P=0.075$)。本研究中脑梗死组 Hcy 浓度与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.001$), 脑梗死组三种不同基因型 Hcy 水平同样高于对应对照组, 且差异有统计学意义 ($P<0.001$)。

随着现代分子生物学技术的发展, 人们开始致力于探索遗传学在疾病发生发展中的作用。目前确定与脑梗死病因相关的基因还几乎没有发现。在 Hcy 的代谢过程中, MTHFR 是关键酶, MTHFR 是一种黄素蛋白, 可使亚甲基四氢叶酸还原为甲基四氢叶酸, 为 Hcy 的再甲基化过程提供甲基^[9]。其中 C677T 基因突变可产生三种基因型: 突变纯合型 (TT 型)、杂合型 (CT 型) 和野生纯合型 (CC 型)。CC 型的四氢叶酸还原酶活性最高, CT 型次之, TT 型活性最低, 因此, 认为 TT 基因型突变是氧化应激的一种标志以及动脉粥样硬化的原因^[10], TT 型突变导致的酶活性及耐热性降低, 使 Hcy 再甲基化能力下降, Hcy 水平升高, 可能是脑梗死的遗传易感因素^[11]。本研究发现, 脑梗死组 TT、CT、CC 三种基因型所占比例与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.001$), TT 型所占比例显著高于对照组, 同时等位基因 T、C 所占比例与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.001$)。无论脑梗死组还是对照组, Hcy 水平均为 TT 型最高, CT 型次之, CC 型最低, 两两相比差异均有统计学意义 ($P<0.001$), 提示 MTHFR C677T 基因纯合突变对 Hcy 浓度升高有直接影响, 并与脑梗死发生密切相关。

脂代谢紊乱是诱发脑梗死的后天因素, 本研究经过统计学分析发现, 脑梗死患者血清 TG、TC、LDL 及 LP(a) 均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 说明脂代谢紊乱是脑梗死的重要危险因素, 其机制可能与动脉粥样硬化有关。高脂血症可致动脉内膜深层脂肪变性和胆固醇沉积, 导致动脉粥样硬化和斑块形成, 继而导致动脉管腔狭窄甚至闭塞。另外, 血浆 Hcy 水平升高能改变肝脏的脂肪代谢, 增加巨噬细胞对修饰 LDL 的摄取, 从而导致 TG 和

TC 在血管壁的堆积,促进动脉粥样斑块的形成。LP(a)是动脉硬化斑块中重要的脂质成分,具有强烈的致动脉硬化和促血栓形成作用,有研究发现^[12],脑梗死患者的血清 Hcy 和 LP(a) 水平之间呈正相关。

综上所述,脑梗死是一种多病因疾病,具有复杂影响因素,常规的血脂检查 TG、TC、LDL 及 LP(a)均增高即具有患脑梗死的高风险,而 Hcy 浓度升高是脑梗死的独立危险因素,MTHFR C677T 位点基因突变与延安市城市居民脑梗死发病风险密切相关,血脂检查结合 Hcy 以及 MTHFR C677T 基因多态性检查可更有效地筛查延安市城市居民脑梗死的易感人群。

参考文献

- [1]Kostulas K,Crisby M,Huang WX,et al.A methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in ischaemic stroke and in carotid artery stenosis[J].Eur J Clin Invest,1998,28(4):285.
- [2]Khan U,Crossley C,Kalra L,et al.Homocysteine and its relationship to stroke Subtypes in a UK black population:the south London ethnicity and stroke study[J].Stroke,2008,39(11):2943-2949
- [3]全国第四届脑血管病学术会议.各类脑血管疾病诊断要点[J].中华神经科杂志,1996,29(6):379-383.
- [4]中华医学会神经学脑血管病学组缺血性脑卒中二级预防指南撰写组.中国缺血性脑卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南 2010[J].中华神经科杂志,2010,43(2):154-160.
- [5]诸军权,肖于飞,秦光明.健康人群中血压增高伴 Hcy 增高的流行病学调查[J].放射免疫学杂志,2013,26(2):216-217.
- [6]Nahid Ashjzadeh,Morteza Fathi,Abdohamid Shariat.Evaluation of homocysteine levels as a risk factor among patients with ischemic stroke and its subtype[J].Iran J Med Sci,2013,38(3):233-239.
- [7]王兴宁,李慧,米思蓉,等.脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平与颈动脉粥样硬化的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2015,30(3):46-49.
- [8]Chao Feng,Xue Bai,Yu Xu,et al.Hyperhomocysteinemia Associates with Small Vessel Disease More Closely Than Large Vessel Disease[J].International Journal of Medical Sciences.2013,10(4):408-412.
- [9]Nahar A,Sabo C,Chitlur M,et al.Plasma homocysteine levels,methylene tetrahydrofolate reductase polymorphisms,and the risk of thromboembolism in children[J].J Pediatr Hematol Oncol,2011,33(5):330-333
- [10]Moe KT,Woon FP,De Silva DA,et al.Association of acute ischemic stroke with the MTHFR C677T polymorphism but not with NOS3 gene polymorphisms in a Singapore population[J].Eur J Neurol,2008,15(12):1309-1314.
- [11]Najib Fekih-Mrissa,Meriem,Mrad,et al.Methylenetetrahydrofolate Reductase(C677T and A1298C)Polymorphisms,Hyperhomocysteinemia,and Ischemic Stroke in Tunisian Patients[J].Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases,2013,22(4):465-469.
- [12]尤忠孝,时东彦,张静,等.血清同型半胱氨酸和载脂蛋白 a 水平与脑梗死相关性研究[J].脑与神经疾病杂志,2013,21(4):311-312.

*基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)课题资助; 课题编号: 2011AA02A111

作者简介: 李慧(1884-),女,本科,主管检验师;

△通讯作者: 王兴宁. Tel: 13809118809; E-mail: ydfywxn@163.com.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

直接免疫荧光法在多种呼吸道病毒抗原检测中的应用

季玲玲

[摘要] 目的:采用直接免疫荧光法检测呼吸道病毒抗原,为临床早期诊断提供依据,并了解湘潭地区呼吸道病毒流行情况。**方法:**对该院 2524 例儿童呼吸道分泌物中的呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒(ADV)、流感病毒 A 型(IFA)、流感病毒 B 型(IFB)、副流感病毒 1 型(PIV1)、副流感病毒 2 型(PIV2)和副流感病毒 3 型(PIV3)进行抗原检测,并统计学分析。**结果:**在 2524 例呼吸道感染患儿中,检出病毒感染 855 例,检出率为 33.87%。其中,RSV 检出最多,共 544 (63.63%)、IFA 94 例(10.99%)、IFB 20 例(2.34%)、ADV 25 例(2.92%)、PIV1 51 例(5.96%)、PIV2 18 例(2.11%)、PIV3 103 例(12.05%)。随着年龄的增长,呼吸道病毒的感染率逐步下降,1 岁内患儿病毒感染率高达 37.84%,1 岁以上则为 28.13%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论:**直接免疫荧光法能对多种呼吸道病

毒抗原进行快速、高效地检测,适于早期诊断。

[关键词] 呼吸道病毒;直接免疫荧光;儿童

Application of direct immunofluorescence assay for detection of multiple respiratory viral antigens

[Abstract] Objective:To detect respiratory virus antigen by direct immunofluorescence method, provide basis for early diagnosis in clinic and learn the situation of respiratory virus epidemic in Xiangtan, Hunan Province. **Methods:**Utilization of direct immunofluorescence to rapidly detect seven respiratory viruses, including respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus A (IFA) and B (IFB), parainfluenza viruses 1,2 and 3 (PIV1,PIV2 and PIV3) and adenovirus (ADV),from respiratory secretions of 2524 children. Then statistical analysis was performed. **Results:**855 virus infection in 2524 cases of respiratory infected children were found,the detection rate was 33.87%.Among them,RSV was the most common respiratory virus causing infection 544 cases and accounting for 63.63% of the positive cases;94 cases of IFA,accounting for 10.99%;20 cases of IFB,accounting for 2.34%;25 cases of ADV,accounting for 2.92%;51 cases of PIV1,accounting for 5.96%;18 cases of PIV2,accounting for 2.11%;103 cases of PIV3,accounting for 12.05% of the positive cases.With the increase of age,respiratory virus infection rates gradually decreased in children,virus infection rate was 37.84% among the infants within 1 year old,and the number was 28.13% among the children above 1 year old,there was significant difference ($P < 0.05$).**Conclusions:**Direct immunofluorescence can not only quickly and effectively detect multiple kinds of respiratory viral antigens but also has profound significance in early clinic diagnosis.

[Key Words] Respiratory virus;Direct immunofluorescence;Children

急性呼吸道感染 (acute respiratory tract infection,ARI) 是儿童较为常见的感染性疾病,目前已证明细菌以外的病原体是其主要致病因素,其中病毒感染最为普遍^[1-2]。呼吸道病毒病原学因不同国家、不同省市和地区、不同医院、不同年份、季节和年龄等而异,而病原学的检测是临床诊断和制定治疗措施的根本依据^[3-4]。目前,呼吸道病毒检测方法繁多,但都存在不足。病毒分离培养法耗时耗力,假阴性较多;病毒核酸检测灵敏度高,但实验要求高,成本也较高;酶联免疫法检测血清病毒特异性抗体,仅适用于回顾性研究,不能早期诊断,不适用于临床推广^[5]。因此,本研究采用直接免疫荧光法 (direct immunofluorescence assay,DIFA) 对包括呼吸道合胞病毒 (RSV)、流感病毒 A 型、B 型 (IFA、IFB)、副流感病毒 1 型、2 型及 3 型 (PIV1、PIV2、PIV3) 和腺病毒在内的呼吸道分泌物中的 7 种常见的病毒抗原进行检测,为临床病毒病原学诊断提供依据并指导合理用药。

1 材料和方法

1.1 标本

2013 年 5 月-2014 年 4 月在湖南省湘潭市妇幼保健院住院的患儿,经临床确诊为呼吸道感染 2524 例 (男 1547 例,女 977 例)。根据年龄分为 4 组:0 月龄~6 月龄、6 月龄~1 岁、1 岁~3 岁和 3 岁以上。

1.2 试剂和仪器

BX51 型荧光显微镜 (Olympus, 日本);呼吸道病毒抗原检测试剂盒 (D3 Ultra DFA, Diagnostic Hybrids,USA, 批号 UR082013),包括荧光标记的 7 种特异性单克隆抗体 (RSV、IFA、IFB、ADV 以及 PIV1、PIV2、PIV3),浓缩洗涤液磷酸盐缓冲液 (PBS, 40 \times),封固液,抗原对照玻片,另准备冷丙酮。

1.3 方法

1.3.1 标本采集

由专门培训合格的临床医生或者护士将配套的呢绒植绒拭子经鼻腔插入 5 cm~6 cm,到达鼻咽部,旋转 2 次~3 次后,置于装有生理盐水的收集管中,1 h 内送检。

1.3.2 细胞涂片制备

涡旋振荡收集管,使细胞脱落,弃掉拭子。在 2000 r/min 转速下离心 5 min 后弃上清,沉淀用 PBS 洗涤后,用 PBS 重悬,调整至适当浓度,在玻片上点 7 个样 (25 μ l/孔),置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱烘干,冷丙酮固定 8 min~10 min。

1.3.3 直接免疫荧光检测

每份标本分别滴加 FITC 标记的针对 7 种呼吸道病毒抗原的特异性单克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱孵育 20 min,

PBS 浓缩洗液冲洗，风干，滴加封固液封片，并于荧光显微镜下观察。

1.4 统计学处理

用 SPSS19.0 软件对计数资料进行 χ^2 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 呼吸道病毒阳性结果

直接免疫荧光法使用的 FITC 标记的特异性单克隆抗体与病毒抗原形成抗原抗体复合物后，在荧光显微镜下呈现苹果绿色荧光，该细胞为阳性细胞，而不含病毒的阴性细胞则被 Evans 蓝染成红色（图 1）。

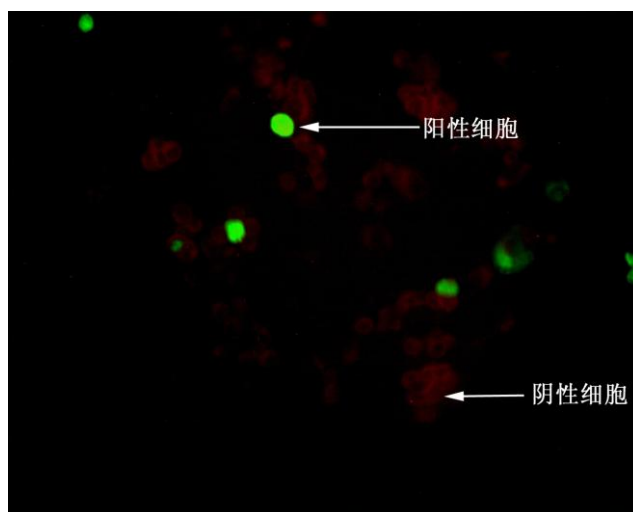


图 1 流感病毒 A 型荧光显微镜下图像（200 倍，直接免疫荧光法）

2.2 病毒感染的总体情况

2524 例呼吸道感染患儿病毒检出呈阳性 855 例，检出率为 33.87%，其中最高为 RSV（544 例，21.55%），其次为 PIV3（103 例，4.08%）和 IFA（94 例，3.72%）（表 1）。

表 1 儿童 7 种呼吸道病毒感染的情况

调查内容	呼吸道病毒							总计
	IFA	IFB	ADV	RSV	PIV1	PIV2	PIV3	
阳性例数 (n)	94	20	25	544	51	18	103	855
阳性率 (%)	3.72	0.79	0.99	21.55	2.02	0.71	4.08	33.87
占阳性标本率 (%)	10.99	2.34	2.92	63.63	5.96	2.11	12.05	100

2.3 不同年龄感染儿童呼吸道病毒检出情况

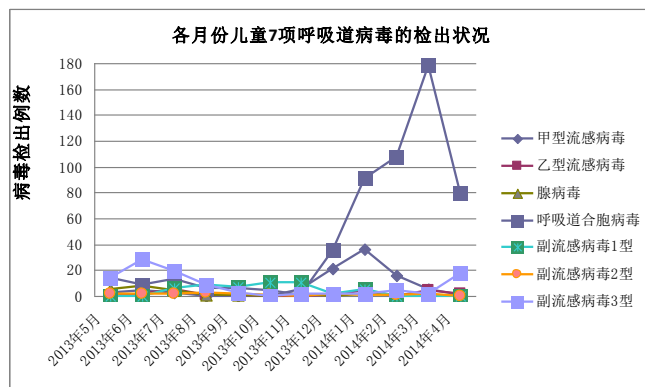
除 6 月~1 岁组与 1 岁~3 岁组间，各年龄段之间感染病毒的总阳性率差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)，0 月龄~6 月龄的婴幼儿病毒阳性率最高 (42.31%)，3 岁以上儿童病毒阳性率最低 (19.25%)，1 岁以下患儿的病毒感染率达 37.84%，1 岁以上患儿病毒感染率为 28.13%，二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)（表 2）。

表 2 不同年龄组病毒检出情况 (%)

年龄	检测例数	总阳性例数 (%)	各病毒阳性数						
			IFA	IFB	ADV	RSV	PIV1	PIV2	PIV3
0 月~	761	322(42.31)	13(4.04)	4(1.24)	5(1.55)	260(80.75)	9(2.8)	2(0.62)	29(9.01)
6 月~	732	243(33.2)	19(7.82)	2(0.82)	2(0.82)	151(62.14)	25(10.29)	8(3.29)	36(14.81)
1 岁~	631	213(33.76)	34(15.96)	4(1.88)	9(4.23)	118(55.4)	14(6.57)	6(2.82)	28(13.15)
≥3 岁	400	77(19.25)	28(36.36)	10(12.99)	9(11.69)	15(19.48)	3(3.9)	2(2.6)	10(12.99)

2.4 各月份儿童 7 项呼吸道病毒的检出情况

2013 年 5 月-2014 年 4 月, 各月 7 项呼吸道病毒的分布情况如图 2。其中, 呼吸道合胞病毒变化较显著, 高发期主要集中在 12 月至次年 4 月, 甲型流感病毒高发于 12 月至次年 2 月, 副流感病毒好发于 4 至 7 月, 其他病毒各月份无显著区别, 呈全年散发。



3 讨论

呼吸道病毒是儿童期急性呼吸道感染最主要的致病原, 其感染力强、传播速度快, 易造成暴发或流行, 因而是国家重点监测对象^[6-7]。IFA、IFB、RSV、ADV 以及 PIV1、PIV2、PIV3 是儿童呼吸道感染常见病原体, 及时准确的诊断能指导临床合理用药, 避免抗生素的滥用, 促进患儿康复^[8]。直接免疫荧光法是一种针对病毒抗原的快速、简便而高效的实验方法, 其高灵敏度和特异度已被许多研究证实, 适于临床大规模推广应用^[9]。由美国 Diagnostic Hybrids 公司研发的 D3 Ultra DFA 7 项呼吸道病毒筛查鉴定试剂盒, 提供了高质量的荧光单克隆抗体, 可以在 1.5 h~2 h 内完成对上述 7 种病毒抗原的检测, 在儿童病毒感染的早期就给出明确诊断。

本研究利用该试剂盒对 2524 例本院的呼吸道感染的患儿进行病原学检测, 结果显示湘潭地区 2013 年 5 月-2014 年 4 月呼吸道感染 7 种病毒的总阳性率为 33.87% (855/2524), 病毒检出率与陆小梅等报道的东莞地区 33.92% 基本相似^[3], 提示快速诊断的必要性。通过分析各病毒感染构成比, 本文发现 RSV 总阳性病例感染率占首位, 与南京、武汉等地基本一致^[10-11]。但是不同年龄组的感染率也存在差异, 3 岁以上儿童 RSV 阳性率是 4 组中最低的, 且 3 岁以上组中 IFA 阳性率最高, 可见 RSV 感染集中于小年龄组, 这也与瑞典的一项研究结果一致^[12]。另外, 本文发现与 1 岁以上患儿病毒感染率比 1 岁以下患儿病毒感染率低, 可能与机体免疫力随着年龄增长不断完善有关, 说明婴幼儿期应该是病毒感染防御的关键时期。

大量研究表明, 患儿在早期检出呼吸道病毒感染后, 立即加用抗病毒药物疗效显著, 病情会有明显好转。运用直接免疫荧光法同时检测 7 种常见的呼吸道病毒, 可以为临床早期诊断提供病原学依据, 指导合理用药, 减少抗生素滥用, 缩短病程, 促进患儿健康。同时, 推广应用直接免疫荧光法, 还可以快速准确掌握各地区儿童呼吸道感染的病原学特征, 对各季节流行的呼吸道病毒进行动态监测。

参考文献

- [1] He Y, Lin GY, Wang Q, et al. A 3-year prospective study of the epidemiology of acute respiratory viral infections in hospitalized children in Shenzhen, China [J]. Influenza and other respiratory viruses 2014, 8(4):443-451.
- [2] She RC, Polage CR, Caram LB, et al. Performance of diagnostic tests to detect respiratory viruses in older adults [J]. Diagnostic microbiology and infectious disease 2010, 67(3):246-250.
- [3] 陆小梅, 黎四平, 何月敬, 等. 呼吸道感染患儿 1256 例多种呼吸道病毒抗原检测结果分析 [J]. 实用儿科临床杂志 2012(22):1733-1735.
- [4] 蒋旻, 赵艳丰, 张益红, 等. 南京地区患儿急性呼吸道感染常见病毒监测 [J]. 中国卫生检验杂志 2013, 23(4):932-934.
- [5] 潘秀军, 吕婕, 沈立松. 直接免疫荧光法同时检测儿童多种呼吸道病毒抗原的临床应用 [J]. 放射免疫学杂志

2009(03):67-270

- [6] Yu X, Lu R, Wang Z, et al. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing [J]. PLoS one 2012, 7(2):e32174.
- [7] 张巧玲, 杨永强, 邓卫武, 等. 直接免疫荧光法在儿童呼吸道感染病毒病原学分析中的应用[J]. 细胞与分子免疫学杂志 2014, 30(08):863-864.
- [8] 陈云菊, 张玉茹, 亚军. 呼吸道病毒抗原检测在小儿呼吸道感染中的应用[J]. 临床肺科杂志 2014, 19(6):1111-1112.
- [9] Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods [J]. Journal of clinical virology 2007, 40 Suppl 1:S11-14.
- [10] 陆红霞, 李红胜, 李胜兵. 儿童急性下呼吸道感染的病毒抗原检测及结果分析[J]. 现代实用医学 2013, 25(6):686-688.
- [11] 刘孙琴, 韩晓峰, 李明. 直接免疫荧光法检测急性呼吸道感染病毒抗原的结果分析[J]. 中国卫生检验杂志 2013(18):3537-3539.
- [12] Ukkonen P, Hovi T, von Bonsdorff CH, et al. Age-specific prevalence of complement-fixing antibodies to sixteen viral antigens: a computer analysis of 58,500 patients covering a period of eight years [J]. Journal of medical virology 1984, 13(2):131-148.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

血清中抗磷脂酶 A 受体特异性抗体的两种检测方法比较

程桂雪 刘建华 刘勇 秦晓松

中国医科大学附属盛京医院

[摘要] **目的:** 探讨两种不同方法检测特发性膜性肾病患者(Idiopathic Membranous Nephropathy, IMN)血清磷脂酶 A2 受体(M-Phospholipase A2 Receptor, PLA2R)抗体检出差异, 评价两种方法检测抗体对疾病的诊断价值。**方法:** 病例来源于 2014 年 4 月至 2015 年 1 月中国医科大学附属盛京医院收治的膜性肾病及其他明确病理诊断的入院患者, 分为特发性膜性肾病组(IMN)、非 IMN 组。采用间接免疫荧光法和酶联免疫吸附试验对患者血清抗 PLA2R 抗体进行检测。**结果:** 敏感度分别为 55.38%、52.31%, 特异性均为 95.83%, AUC_{ROC} 分别为 0.756、0.741, 两种方法的诊断效能无统计学差异($P>0.05$), 但两种方法的一致性稍差($\kappa=0.44$); 抗体阳性检出率与疾病的发病年龄、血白蛋白、24h 蛋白尿以及是否使用免疫抑制剂治疗相关($P<0.05$); 抗体滴度越高患者的低蛋白血症越严重, 患者中发生大量蛋白尿比例大($P<0.05$) **结论:** 两种方法检测血清中 PLA2R 抗体的敏感性和特异性高, 该抗体可作为 IMN 患者良好的诊断指标。

[关键词] 特发性膜性肾病; 磷脂酶 A2 受体; 抗体; 检测方法

膜性肾病按病因分为特发性膜性肾病和继发性膜性肾病(Secondary Membranous Nephropathy, SMN)。IMN 占膜性肾病的 70%-80%, 男女比例约为 1.3-2.2:1, 被认为是一种自身免疫性疾病^[1]。自 2009 年, Beck^[2]等人在 IMN 患者发现足细胞膜表达的 M 型磷脂酶 A2 受体为 IMN 致病靶抗原, 使人们对 IMN 发病机制有了更加深入的研究, 并且使 PLA2R 作为 IMN 诊断及鉴别诊断的指标。近年来, 许多研究者对 PLA2R 的检测方法也多种多样, 如: Western blotting、间接免疫荧光法、可定位激光小球免疫测定法、酶联免疫吸附试验等, 使抗 PLA2R 抗体的检出更加精确, 并逐步应用于临床^[2-9]。本研究对 IIF 法和 ELISA 法检测研究对象血清抗 PLA2R 抗体试验诊断指标的评价与分析, 以及抗体与临床指标的关系, 为临床诊断提供更充分的依据

1 研究对象

1.1 IMN 组

收集 2014 年 4 月至 2015 年 1 月我院肾内科住院患者 65 例, 并行经皮肾活检病理诊断明确为 IMN。所有活检病理诊断符合临床肾病标准, 并且整理临床资料, 并结合实验室检查, 排除感染性疾病、自身免疫性疾病肿瘤及药物引起的 SMN。

1.2 非 IMN 组

随机选取同期诊断为继发膜性肾病和其他肾脏病理类型 24 例, 其中 SMN 10 例(均继发于自身免疫性疾病); 其他肾脏疾病 14 例, 其中 IgA 肾病 7 例, 肾小球微小病变型肾病 3 例、狼疮性肾炎 2 例、新月体性肾小球肾炎 1 例, 膜增殖性肾小球肾炎 1 例, 局灶硬化性肾小球肾炎 1 例, IgM 肾病 1 例。

2 研究方法

2.1 样本收集

收集所有入选清晨空腹采集静脉血，低温高速离心 10min(3000r/min)分离血清，并分装保存于-80℃冰箱待用

2.2 收集临床资料

收集入选患者的基本信息及病史，包括：性别、年龄、入选距活检时间、激素和/或免疫抑制剂使用情况、是否患有高血压、是否患有糖尿病及其他肾脏疾病；同时收集入选时实验室检查信息，包括：肌酐、尿素氮、胱抑素 C、血清白蛋白、24 小时蛋白尿、自身抗体检测、乙型肝炎病毒 DNA、乙肝病毒五项。

2.3 间接免疫荧光法定性测定血清抗 PLA2R 抗体

该方法检测的试剂盒购自德国欧蒙公司，荧光显微镜(Olympus)下观察结果。存放于-80℃冰箱的待测血清样本解冻并混匀，测定时按 1: 10 稀释。待测血清与转染 PLA2R 抗原的细胞孵育，再与 FITC 标记的羊抗人 IgG 孵育，操作后封片保存于-20℃冰箱。结果判定标准：根据试剂盒说明书，滴度<1:10，记录结果为阴性。荧光结果判读经两位医师共同完成，对有异议的结果，讨论后给出最终结果。

2.4 采用 ELISA 方法定量测定血清抗 PLA2R 抗体

该方法检测的试剂盒仍盒购自德国欧蒙公司，酶标仪(Tecan)测量光密度(OD 值)及浓度。存放于-80℃冰箱的待测血清样本解冻并混匀，测定时按 1: 101 稀释，试验操作按照试剂盒内的说明书进行。阳性结果判定标准：根据试剂盒说明书，抗 PLA2R 抗体浓度<14RU/mL，记录结果为阴性。

3 统计分析方法

采用 SPSS19.0 软件进行数据分析处理。计量资料的采用 $\bar{x} \pm s$ 描述，计数资料采用频数或构成比进行描述。正态分布资料的两组间比较采用 t 检验，计数资料组间比较用 χ^2 检验，分级计数资料，若方差齐则采用 F 检验，方差不齐采用 Kruskal-Wallis H 检验。通过两种方法检测抗 PLA2R 抗体与金标准-肾活检病理结果比较，绘制 ROC 曲线，比较两种诊断试验的准确性检验使用 z 检验。两种方法的抗体检出率一致性采用 Kappa 检验，差异性采用 McNemar 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 两组基本信息及实验室检查结果比较

纳入 IMN 组患者 65 例，男 47 例，女 18 例，年龄 50.25 ± 2.1 岁，血清肌酐($76.99 \pm 41.73 \mu\text{mol/L}$)、尿素氮($5.95 \pm 2.76 \text{mmol/L}$)、胱抑素 C($1.29 \pm 0.70 \text{mg/L}$)、白蛋白($24.72 \pm 7.58 \text{g/L}$)、24h 蛋白尿($6.76 \pm 5.86 \text{g/d}$)、eGFR($81.02 \pm 26.26 \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{m}^2$)；非 IMN 组 19 例，男 10 例，女 11 例，年龄 44.08 ± 17.8 岁，血清肌酐($106.93 \pm 86.09 \mu\text{mol/L}$)、尿素氮($8.59 \pm 6.56 \text{mmol/L}$)、胱抑素 C($1.47 \pm 0.81 \text{mg/L}$)、白蛋白($26.08 \pm 7.40 \text{g/L}$)、24h 尿蛋白($7.71 \pm 6.93 \text{g/d}$)、eGFR($71.39 \pm 30.96 \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1.73 \text{m}^2$)。两组患者在性别构成上有差异，而年龄、血清肌酐、尿素氮、胱抑素 C、白蛋白、24h 蛋白尿定量等相关实验室指标无统计学意义(P>0.05)。见表 1

4.2 两种方法对血清抗 PLA2R 抗体检测结果及诊断评价

IIF 法检测结果显示 IMN 组 65 例患者中，抗体阳性者有 36 例；非 IMN 组患者数 24 例，抗体阴性者 23 例。该方法测定抗 PLA2R 抗体的敏感度为 55.38%，特异度为 95.83%，准确率 66.29%。ELISA 法测定抗 PLA2R 抗体结果显示：IMN 组 58 例患者中，抗体阳性者有 34 例；非 IMN 组患者数 24 例，抗体阴性者 23 例，该检测方法的敏感度为 52.31%，特异度为 95.83%，准确率 68.54%。见表 2。两种检测方法诊断试验 AOC 曲线下面积分别为 0.756(95%可信区间为 0.655-0.857)、0.741(95%CI 为 0.637-0.844)，见图 1。两种诊断试验准确性比较差异无统计学意义(P>0.05)。

4.3 IIF 法与 ELISA 法对抗 PLA2R 抗体检出率的一致性和差异性的比较

两种方法对抗体检出率的一致性达 73%，其 Kappa 值为 0.42，P 值为 $0.000 < 0.05$ ，差异有统计学意义，两种检测方法的有一定程度的一致性。对两种方法差异性检验，两种抗体检出率虽有统计学意义，但抗体检测 IIF 法阳性且 ELISA 法阴性的样本与 IIF 法阴性且 ELISA 法阳性的样本数量相差较小，故其差异性较差，即两种检测方法对抗 PLA2R 抗体检出率的差异性无统计学意义。见表

4.4 IMN 组抗 PLA2R 抗体阳性组与阴性组基线资料比较

在 IMN 组患者中对抗 PLA2R 抗体阳性和阴性的患者临床情况的比较，在此仅纳入为 IIF 法和 ELISA 法检测抗

体结果一致的样本,共41例,结果见表。抗PLA2R抗体阳性与阴性两组间,性别、血肌酐、尿素氮及eGFR在两组间无统计学差异;而患者年龄、血清白蛋白、24h蛋白尿、抗体检测前未使用免疫抑制剂治疗的差异有统计学意义($P<0.05$)。

4.5 不同抗PLA2R抗体滴度的IMN患者临床指标的情况

不同水平抗体滴度,患者血肌酐、尿素氮、胱抑素C及eGFR无统计学差异;但患者低蛋白血症及大量蛋白尿的临床症状与该抗体水平有明显相关性,即抗体浓度越高,发生上述两种症状的程度越明显($P<0.05$)。见表讨论:

本试验为回顾性研究,所收集样本为本次入院时肾病理活检确诊为膜性肾病以及既往入院已被确诊为IMN患者,采用间接免疫荧光法和酶联免疫吸附试验对IMN组与非IMN组血清标本进行抗PLA2R抗体检测,结果表明阳性率分别为55.38%、52.3%,近年来文献报道Western blot方法、免疫荧光法及ELISA法等检测不同种族、地区的IMN患者血清抗体的阳性率为(52%-82%)^[10-14],且也有研究表明肾组织沉积物中PLA2R检出率要较血清样本检出率高^[11],本试验的血清样本研究结果的阳性检出率与文献报道相符。既往研究中指出在SMN的患者中,血清中抗PLA2R抗体和肾组织中PLA2R抗原的检出率极低^[2,13-15],在本实验中纳入的10例继发于免疫相关性疾病的膜性肾病患者中,两种方法均未在血清中检测出抗PLA2R抗体。除纳入SMN患者外,还纳入了肾病理活检为其他肾病,采用上述两种方法对该类患者血清测量,两种方法共同显示同一患者抗PLA2R抗体阳性。作为临床诊断指标,抗PLA2R抗体检测具有很高的诊断及鉴别诊断价值。

比较两种方法的诊断效能,其敏感度分别为55.38%、52.31%,特异性均为95.83%, AUC_{ROC} 分别为0.756、0.741,两种方法的诊断效能接近,无差异。该研究中敏感度较文献报道结果稍低,有已下几种解释:(1)纳入研究的IMN组有53.8%患者有不同剂量及疗程的使用过免疫抑制剂,有研究表明治疗一段时间后抗PLA2R抗体水平可下降到正常范围,甚至测不出,从而使抗体测量出现差异^[6,7];(2)引起疾病发生的其他抗原作用,如I型血小板反应蛋白7A域、阳离子化牛血清白蛋白、醛糖还原酶、超氧化物歧化酶等^[16-18];(3)IMN的疾病进程中,发生自发缓解的比率较高,在纳入研究之前已被活检为膜性肾病的患者,可能进入自发缓解状态;(4)在发病过程中由于肾小球损伤引起持续大量的蛋白尿对血液中产生的抗体起到了清除的作用,使留取的血样中抗体含量下降^[19];(5)IMN组患者可能存在临床尚未发现的继发因素。两种方法对抗PLA2R抗体的检出率在一致性达74%($\kappa=0.44$),一致性稍差。而对其差异性的检验中,其结果虽然证明二者之间有差异;但IIF法测定为阳性而ELISA方法测定为阴性者有13例,ELISA法测定为阳性而IIF法测定为阴性者有11例,二者病例数相似,故没有统计学意义,即二者的差异性较小。该研究对两种方法比较一致性的结果与文献报道^[4,20,21]的一致性达94%-97%不相符,其原因可能(1)两种方法判定阴性或阳性结果所设置的临界值设置条件不一致,以致结果判定有差异;(2)患者体内产生的抗PLA2R抗体亚型有差异,两种方法所测的抗体亚型,可能并非患者体内所产生的该抗体的总含量;(3)无论是IIF法所用的生物膜片还是ELISA所用微孔板,均通过处理而包被了PLA2R抗原,在制备过程中可能使所暴露的可识别抗原表位含量或抗原表位与抗体亲和能力存在不同,使得测量抗体的易感性出现差异。

PLA2R参与的自身免疫反应目前被认为是IMN发病的主要机制,患者体内抗体有无与临床症状的轻重以及疾病缓解过程密切相关。将研究中两种检测方法一致的IMN组患者分为抗PLA2R阳性组及阴性组,对其临床资料及实验室检测指标进行分析,两组的年龄比较中阳性组患者均为中老年人,该病发病的年龄范畴。虽然在其他研究中并未发现这两组有差异^[4],但本试验结果显示IMN患者中抗体阳性者出现低蛋白血症、大量蛋白尿的症状较抗体阴性组明显。血清中抗体与肾小球表面PLA2R结合引起肾小球的损伤,使得大量蛋白经尿液流失,使得患者的肾病综合征症状更加明显。对临床症状严重的患者在未经肾活检是使用免疫抑制剂进行治疗;而对于明确肾病理活检的患者在接受免疫抑制剂治疗过程中,由于副作用、药物剂量、治疗效果等原因,患者会多次入院,本次纳入研究患者中阳性组未使用免疫抑制剂治疗患者比例69.56%,而阴性组有83.33%使用了免疫抑制剂治疗,两组抗体检出结果的差异可能源于药物治疗引起的缓解,但该研究未经长期的随访,难以给予肯定结论。ELISA方法对抗体进行定量检测,分析检测结果为阳性患者的抗体滴度越高,低蛋白血症越严重,而大量蛋白尿比例越高,这与文献报道相一致^[20,22],提示抗体的含量与疾病活动性相关,监测抗体水平反应疾病治疗效果,使该抗体广泛的应用于临床。

本研究评价了两种检测方法对于血清中抗PLA2R抗体的诊断价值,其敏感性、特异性及 AUC_{ROC} 相近,且具有

很高的诊断效能，且对于未经治疗过的 IMN 患者的诊断更有意义。但两者在抗体检出率准确性不完全一致，使得检测的方法学还有待进一步定义及研究。同时该研究也分析了抗体阳性检出与临床指标及药物使用的关系，并指出定量检测的抗体滴度与疾病轻重及活动性相关。对于已经商品化的两种检测方法在临床上的应用推广，应进行更进一步研究。

本研究为小样本回顾性研究，尚未进行多中心大样本量的前瞻性研究，对于成品试剂盒应用于临床实验诊断，还有待于进一步研究；患者体内抗体亚型产生的差异是否会影响抗体的检出率尚不知晓；研究中指出相应的药物治疗与抗体的检出相关，但未进行长期的监测，需进行长期随访研究；而对于抗体滴度变化与疾病的缓解是否有关也尚未明确。对于以上问题，将进行深入研究。

表 1 IMN 组与非 IMN 组基本资料

	IMN 组	非 IMN 组	P 值	t 值
性别比(男/女, 例)	2.61(47/18)	1.0(12/12)	0.048	3.903(x2)
年龄(岁)	50.25±12.1	44.08±17.8	0.127	1.568
Cr(umol/L)	76.99±41.73	106.93±86.09	0.114	1.634
尿素氮(mmol/L)	5.95±2.76	8.59±6.56	0.067	1.909
胱抑素 C(mg/L)	1.29±0.70	1.47±0.81	0.3766	0.916
血清白蛋白(g/L)	24.72±7.58	26.08±7.40	0.455	0.75
尿蛋白(g/d)	6.76±5.86	7.71±6.93	0.534	0.625
eGFR(ml ⁻¹ .min ⁻¹ .1.73m ⁻²)	81.02±26.26	71.39±30.96	0.147	1.463

注：eGFR：估计肾小球滤过率

表 2 IIF 法和 ELISA 法检测血清抗 PLA2R 抗体诊断试验评价指标结果

	准确率	Se	Sp	PV+	PV-	LR+	LR-
IIF 法	66.29%	55.38%	95.83%	97.30%	44.23%	13.28	0.466
ELISA 法	64.04%	52.31%	95.83%	97.14%	42.59%	12.54	0.498

注：Se：敏感度； Sp：特异度； PV+：阳性预测值； PV-：阴性预测值； LR+：阳性似然比； LR-：阴性似然比

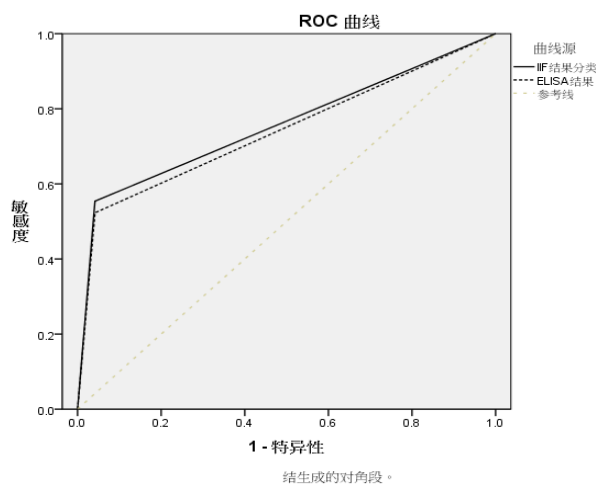


表 3 抗 PLA2R 抗体阳性组和阴性组基本资料

	PLA2R+	PLA2R-	P 值
性别比(男/女, 例)	23(15/8)	17(14/3)	0.194
年龄	54.00±12.98	44.67±10.50	<0.05
Cr(umol/L)	83.07±54.54	66.99±11.53	0.158
尿素氮(mmol/L)	5.61±2.12	6.04±2.81	0.585
胱抑素 C(mg/L)	1.36±0.86	1.12±0.48	0.307
血清白蛋白(g/L)	21.01±5.33	27.39±7.24	<0.05
尿蛋白(g/d)	8.49±6.01	4.82±4.71	<0.05
eGFR(ml-1.min-1.1.73m-2)	77.44±25.82	88.45±28.53	0.203
试验前未使用免疫抑制剂 治疗比例	69.56%(16/23)	16.67%(3/18)	<0.05

表 4 抗 PLA2R 抗体不同滴度的 IMN 患者血清白蛋白、大量蛋白尿情况

抗体滴度(RU/ml)	血清白蛋白(g/L)	蛋白尿(>3.5g/d)比例
<14	28.27±8.11	51.51%(17/33)
14-100	22.52±5.17	70.59%(12/17)
>100	19.87±4.91	73.77(11/15)
P 值	<0.05	<0.05

参考文献

- [1] Mathieson PW:Membranous nephropathy.Clin Med 2012,12(5):461-466.
- [2] Beck LH,Jr.,Bonegio RG,Lambeau G,Beck DM,Powell DW,Cummins TD,Klein JB,Salant DJ:M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy.N Engl J Med 2009,361(1):11-21.
- [3] Behnert A,Fritzler MJ,Teng B,Zhang M,Bollig F,Haller H,Skoberne A,Mahler M,Schiffer M:An anti-phospholipase A2 receptor quantitative immunoassay and epitope analysis in membranous nephropathy reveals different antigenic domains of the receptor.PLoS One 2013,8(4):e61669.
- [4] Hofstra JM,Debiec H,Short CD,Pelle T,Kleta R,Mathieson PW,Ronco P,Brenchley PE,Wetzels JF:Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. J Am Soc Nephrol 2012,23(10):1735-1743.
- [5] Dahnrich C,Komorowski L,Probst C,Seitz-Polski B,Esnault V,Wetzels JF,Hofstra JM,Hoxha E,Stahl RA,Lambeau G et al:Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy.Clin Chim Acta 2013,421:213-218.
- [6] Timmermans SA,Damoiseaux JG,Heerings-Rewinkel PT,Ayalon R,Beck LH,Jr.,Schlumberger W, Salant DJ, van Paassen P,Tervaert JW:Evaluation of anti-PLA2R1 as measured by a novel ELISA in patients with idiopathic membranous nephropathy:a cohort study.Am J Clin Pathol 2014,142(1):29-34.
- [7] Behnert A,Schiffer M,Muller-Deile J,Beck LH,Jr.,Mahler M,Fritzler MJ:Antiphospholipase A(2) receptor autoantibodies:a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy.J Immunol Res 2014,2014:143274.

- [8] 唐小波:M 型磷脂酶 A2 受体抗体检测在老年膜性肾病诊断中的价值.中国老年学杂志 2015,16.
- [9] 牛广华:磷脂酶 A2 受体抗体在特发性膜性肾病中的诊断价值.中华检验医学杂志 2015,09.
- [10] Hoxha E,Harendza S,Zahner G,Panzer U,Steinmetz O,Fechner K,Helmchen U,Stahl RA:An immunofluorescence test for phospholipase-A(2)-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis.Nephrol Dial Transplant 2011,26(8):2526-2532.
- [11] Hayashi N,Akiyama S,Okuyama H,Matsui Y,Adachi H,Yamaya H,Maruyama S,Imai E,Matsuo S,Yokoyama H:Clinicopathological characteristics of M-type phospholipase A2 receptor(PLA2R)-related membranous nephropathy in Japanese.Clin Exp Nephrol 2015,19(5):797-803.
- [12] Hofstra JM,Beck LH,Jr.,Beck DM,Wetzels JF,Salant DJ:Anti-phospholipase A(2) receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy.Clin J Am Soc Nephrol 2011, 6(6):1286-1291.
- [13] Oh YJ,Yang SH,Kim DK,Kang SW,Kim YS:Autoantibodies against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy.PLoS One 2013,8(4):e62151.
- [14] Qin W,Beck LH,Jr.,Zeng C,Chen Z,Li S,Zuo K,Salant DJ,Liu Z:Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy.J Am Soc Nephrol 2011,22(6):1137-1143.
- [15] Hoxha E,Kneissler U,Steg G,Zahner G,Thiele I,Panzer U,Harendza S,Helmchen UM,Stahl RA:Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy.Kidney Int 2012,82(7):797-804.
- [16] Tomas NM,Beck LH,Jr.,Meyer-Schwesinger C,Seitz-Polski B,Ma H,Zahner G,Dolla G,Hoxha E,Helmchen U,Dabert-Gay AS et al:Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy.N Engl J Med 2014,371(24):2277-2287.
- [17] Fresquet M,Jowitt TA,Gummadova J,Collins R, O'Cualain R,McKenzie EA,Lennon R,Brenchley PE:Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy.J Am Soc Nephrol 2015,26(2):302-313.
- [18] Prunotto M,Carnevali ML,Candiano G,Murtas C,Bruschi M,Corradini E,Trivelli A,Magnasco A, Petretto A,Santucci L et al:Autoimmunity in membranous nephropathy targets aldose reductase and SOD2.J Am Soc Nephrol 2010,21(3):507-519.
- [19] Debiec H,Ronco P:PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. N Engl J Med 2011,364(7):689-690.
- [20] 林伟锋:抗磷脂酶 A2 受体抗体与特发性膜性肾病的关系.中华内科杂志,2015,09(54).
- [21] 符克英:IIF 与 ELISA 在抗磷脂酶 A2 受体抗体检测中相关性.中国热带医学,2015,04(15).
- [22] 曹鹏龙:血清抗 M 型磷脂酶 A2 受体抗体与成人特发性膜性肾病的相关性.实用医学杂志,2014,15.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

Serum long non-coding RNA uc022bqs.1 is a potential biomarker for early diagnosis of human coronary heart disease

张明娇 李珉珉*

广州市暨南大学附属第一医院

Serum long non-coding RNA uc022bqs.1 is a potential biomarker for early diagnosis of human coronary heart disease

Ming-jiao Zhang¹,Min-min Li^{1,*}.

¹Clinical Medical Laboratory Center,the First Affiliated Hospital of Jinan University,Guangdong Guangzhou 510630,China

[Running Title]LncRNA uc022bqs.1 as biomarker for coronary heart disease

[Correspondence to]Dr.Min-min Li,Tel and Fax:+86-20-38688431; E-mail:limm269@126.com

[Abstract]Objectives:To determine the lncRNA expression profile in serum of coronary heart disease(CHD)patients and its potential clinical value.**Methods:**The difference of lncRNA expression profile between CHD patients and normal individuals was measured by lncRNA microarray.QRT-PCR was used to confirm the expression of representative lncRNA in 30 cases of normal control(NC),30 cases of stable angina pectoris(SAP),42 cases of unstable angina pectoris(UAP)and 30 cases of acute myocardial infarction(AMI).The relationship between their levels and pathological factors of patients with CHD was explored.A receiver operating characteristic(ROC)curve was adopted to verify the diagnostic efficiency of the selected lncRNAs.**Results:**LncRNA expression profile showed 166 lncRNAs with expression alteration eight fold or above.The up-regulated and down-regulated candidate lncRNAs were 105 and 61($P<0.005$),respectively.The expression of serum uc022bqs.1 verified by qRT-PCR was consistent with the microarray analysis.Using ROC curves analysis,serum uc022bqs.1 could discriminate the SAP,UAP and AMI from NC and the areas under curve(AUC)was 0.796(95%CI:0.681~0.911),0.821(95%CI:0.718~0.924),0.846(95%CI:0.795~0.932),respectively.For discriminating the CHD patients from NC,the AUC was 0.895(95%CI:0.824~0.965),and the sensitivity and specificity were 79.5% and 83.3%,respectively.**Conclusions:**Serum uc022bqs.1 may serve as a potential marker for the early diagnosis of coronary heart diseases.

[Key words]Coronary heart disease; long noncoding RNAs; serum; diagnosis.

Introduction

Coronary heart disease(CHD)continues to be the major cause of death worldwide with high morbidity and mortality.Although both diagnosis methods such as coronary angiography and therapeutic methods(percutaneous coronary intervention,coronary artery bypass surgery and drug treatment,etc.)have improved the prognosis of CHD,the mortality of CHD remains high.Most patients were advanced when they first visited,which made them lose the opportunities of surgery.Therefore,early detection(especially before left ventricular dysfunction),early diagnosis and early treatment are the key to improve the cure rate of CHD and to reduce mortality [1-2].

Long noncoding RNAs(LncRNAs)are RNA molecules longer than 200nt that do not encode proteins,but regulate gene expression and other aspects at the transcriptional and post-transcriptional levels [3-4].The functions of lncRNAs were still poorly understood,but there was a lot of evidence showed that lncRNAs were closely linked with cardiovascular disease [5].In this study,the serum lncRNAs expression profile in patients with CHD was investigated and their clinical significance was explored.

Materials And Methods

Medical records

Serum from 102 CHD patients admitted to the First Affiliated Hospital of Jinan University,China,between August 2014 and June 2015 were obtained.CHD was confirmed by coronary angiography and clinical manifestations,including 30 cases stable angina pectoris(SAP),in which male patients 27 cases,female patients 3 cases,mean age(70.52 ± 11.53); 42 cases unstable angina pectoris(UAP),in which 22 males and 20 females,mean age(68.67 ± 11.25); 30 cases acute myocardial infarction(AMI),in which 29 males and 1 female,mean age(64.53 ± 13.34).In the same period of the study,30 selected healthy people without a history of coronary heart disease were used as normal control(NC)group,including 18 males,12 females,mean age(59.64 ± 13.72).This study was approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Jinan University.Written informed consent was obtained from all patients themselves,in accordance with Declaration of Helsinki.

Serum preparation

Peripheral blood samples were collected into 3 ml drying tubes in the absence of anti-coagulation treatment.Fresh blood samples coagulated 30 min at room temperature were centrifuged at 3500 g for 10 min to separate serum from any residual cells and remaining cellular debris.Supernatant was collected into fresh EP tubes and stored at -80°C until further processing.

RNA isolation

Total RNA was extracted from 200 μ l of CHD patients and NC group frozen serum(after dissolving).When the cells are sufficiently homogenized,800 μ l Trizol reagent(Invitrogen,CA,USA)was added to a total volume of 1 ml and placed in 1.5 ml RNase-free EP tube.After mixed,the sample was incubated for 2 minutes at room temperature.Trizol reagent contains phenol and should only be used under a fume hood.Then 0.2 ml of chloroform was added to the tube and vortexed for 15 seconds to mix.The sample was incubated for 15 minutes at 4 $^{\circ}$ C and then centrifuged at 12,000 g for 15 minutes at 4 $^{\circ}$ C.The mixture will separate into a lower red phenol-chloroform phase,an interphase,and a colorless upper aqueous phase.The upper aqueous phase contains the RNA.The top layer should comprise of about 60% of the initial volume of Trizol(approximately 0.6 ml).Transfer 500 μ l of the top aqueous layer into a new EP tube using a 100 μ l pipette being careful not to transfer any of the interphase layer.To precipitate the RNA,0.5 ml isopropanol was added and allowed to keep at room temperature for 10 minutes,then centrifuged at 12,000 g for 20 minutes at 4 $^{\circ}$ C.RNA will form a gel-like pellet on the bottom of the tube.Without disturbing the pellet,the supernatant was removed and the pellet was washed in 1 ml 75% ethanol(allocated by 1:1000 DEPC water).Mix the sample by gentle inversion and centrifuge at 7,500 g for 10 minutes at 4 $^{\circ}$ C.After centrifugation,removed the ethanol with a pipette and allowed sample to dry while inverted for 15 min,and incubated the sample at 50 $^{\circ}$ C for 10 min.Adding 20 μ l of 1:1000 DEPC water to the dried RNA sample and then stored at -80 $^{\circ}$ C until further processing.

Microarray Analysis

LncRNAs were screened by microarray analysis in the serum from CHD patients(n=3)and control individuals(n=3).RNA was pre-amplified and then analyzed using microarray(Arraystar,Human LncRNA array,version 3.0).This procedure allowed the concurrent detection of 30586 lncRNAs.To find specific lncRNAs as possible CHD biomarker candidates,we used the following criteria for up-regulated lncRNAs:signal intensity >8,fold change >8 and p<0.005 following the protocol provided by the manufacturer.

qRT-PCR

The quantity and quality of total RNA from serum were determined using NanoDrop(ND-1000).Approximately 20-50 ng of RNA was obtained from 1 μ l RNA mix and samples were used only if the ratio of the absorbance at 260 and 280 nm(A260/A280)was between 1.8 and 2.1.No difference in the amount of extracted RNA in a unit of serum was found between NC and CHD samples.Then,3 μ l of purified RNA was used for cDNA synthesis.

According to the manufacturer's recommendations,20 μ l of final reaction mixture containing 10 μ l of SYBR Green PCR Master Mix(Vyazame,China),0.5 μ l of sense primer,0.5 μ l of antisense primer,0.5 μ l ROX Reference Dye(50 \times),6.5 μ l of 1:1000 DEPC water and 2.0 μ l of the synthesized cDNA.Primers were designed by Primer Primer 5.0 and synthesized by Sangon Biotech(Sangon,Shanghai,China).Their sequences were as follows:5'-AACCAGG CGACCCAGACAA-3'(sense)and 5'-TTAGGGACGGATCGGAGAA-3'(antisense)for uc022bqs.1.At the same time,5'-CCT GGATACC GCAGCTAGGA-3'(sense)and 5'-GCGGCGCAATACGAATGCCCC-3'(antisense)for human 18S-rRNA was also synthesized.The relative expression level of lncRNA in serum was normalized to the internal control 18S-rRNA expression and calculated by the comparative $C_T(\Delta\Delta C_T)$ method. C_T was detected by ABI Prism 7000 sequence Detector(Applied Biosystem,

CA,USA).A melt curve analysis was used to confirm the specificity of amplification.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS 13.0 statistical software package.Results are presented as the Mean \pm SD.In all statistical analyses,lncRNA levels were log-transformed by taking the base 10 logarithm to account for the skewness of their distributions.The comparison of the levels of uc022bqs.1 between each group was analyzed by Least-Significant Difference-t test,while the associations between uc022bqs.1 expression and clinical characteristics were evaluated by Pearson analysis.Receiver operating characteristic(ROC)curve was established to evaluate the diagnostic value

for differentiating between CHD and NC. A two-tailed P value of 0.05 or less was considered statistically significant.

Results

LncRNA expression profile in the serum of CHD patients

The serum levels of lncRNAs differed significantly between the two groups (CHD vs NC), as illustrated in the hierarchical clustering analysis (Figure 1). Of the 30586 lncRNAs detected on the microarray, 166 were found to be differentially expressed in CHD patients with a fold change >8 and $P < 0.005$. Among them, 105 lncRNAs were up-regulated whereas 61 were down-regulated. To make potential lncRNA biomarkers easy to be measured in the clinic, we selected possible biomarkers in the 105 up-regulated lncRNAs. The five lncRNAs of the most significantly different expression were ENST00000546135, ENST00000428009, uc022bqs.1, NR_027275, ENST00000430859, respectively (Table 1). Then we verified the expression levels of above lncRNAs through qRT-PCR in CHD patients ($n=8$) and normal individuals ($n=8$). It was found that the serum expression levels of uc022bqs.1 was up-regulated in CHD patients, and was in accordance with the microarray results.

Levels of serum uc022bqs.1 is associated with the severity of CHD

When analyzed by one-way ANOVA, the differences of serum uc022bqs.1's relative levels between each group was statistically significant ($F=22.50$, $p < 0.05$). At the same time, the serum uc022bqs.1 level in AMI (0.42 ± 0.29 , $n=30$) had a higher level than those in UAP (0.26 ± 0.29 , $n=42$), SAP (0.03 ± 0.33 , $n=27$) and NC (-0.29 ± 0.39 , $n=30$), respectively (Figure 2). This proved that the expression level of uc022bqs.1 in serum increased with pathological changes level of CHD with statistical significance ($P < 0.05$), which suggested uc022bqs.1 may serve as a therapeutic target for CHD.

The relationship between uc022bqs.1 level and clinical parameters of CHD

To verify the functions of uc022bqs.1, we tested the correlation of uc022bqs.1 expression in 99 samples with age and blood lipid levels of CHD patients. Statistical analysis indicated that high uc022bqs.1 expression was not associated with age ($P = 0.360$), blood lipid (all $p > 0.05$), Lp-a ($p=0.566$) and BNP ($p=0.185$), as shown in the Table 2.

The potential diagnostic value of serum uc022bqs.1

ROC curve was used to determine the best positive serum uc022bqs.1 reference values to improve its diagnostic value of CHD. The area under the ROC curve (AUC) for serum uc022bqs.1 diagnosing SAP, UAP, AMI was 0.730 (95% CI: 0.603~0.857), 0.782 (95% CI: 0.665~0.898), 0.821 (95% CI: 0.723~0.919), respectively. The AUC for serum uc022bqs.1 diagnosing CHD was 0.895 (95% CI: 0.824~0.965), with the sensitivity and specificity were 89.0% and 76.7%, respectively (Figure 3), suggesting that serum uc022bqs.1 has potential diagnostic value in CHD.

Serum uc022bqs.1 can be a biomarker for diagnosing CHD

For a reliable biomarker, a stable level is a basic requirement. We studied the stability of uc022bqs.1 in serum exposed to various periods at room temperature and different freeze-thaw cycles (Figure 4). Exposure of the plasma to room temperature for 8 h had no effect on uc022bqs.1 expression. Even after 48 h, uc022bqs.1 levels were still at about 80% of the unexposed levels. A freeze-thaw cycle is another major factor affecting RNA levels in serum. We found that two-three freeze-thaw cycles had almost no influence on uc022bqs.1. There were studies showing that the stability of miRNAs in plasma was due to their being packaged in microvesicles or formation of protein complexes with miRNA-binding proteins and lipoproteins [6]. Whether lncRNAs have similar to these descriptions for miRNAs are still unknown. Serum is easy to attain and detect, which will be a suitable sample to test lncRNA.

Discussion

CHD continues to be a leading cause of death worldwide, which is a common complex disorder that can be caused by single gene or multifactorial conditions. The diagnosis of CHD involves non-invasive and invasive methods. Non-invasive methods include the electrocardiogram, Holter monitor, and myocardial nuclide imaging, etc. However, the lower sensitivity and specificity of these tests reduce their diagnostic values. Coronary angiography is a 'gold standard' in the diagnosis of

CHD, and CT angiography has been paid attention to over the last decade, with the rapid development of imaging technology [7]. However, both spiral CT angiography and coronary angiography are expensive and invasive, and are used only in the diagnosis of patients with high-risk factors. Prompt diagnosis of CHD can improve its prognosis with percutaneous coronary intervention, coronary artery bypass surgery and drug treatments. Therefore, there is a clinical demand for specific and reliable non-invasive biomarkers for the early diagnosis of CHD.

High throughput methodologies have revealed the existence of an unexpectedly large number of lncRNAs. Many studies have found that lncRNAs were associated with human disease, most notably cancer. LncRNAs, such as MALAT1, CCAT-1, HOTAIR and H19, participate in the process of the pathogenesis, progression, and metastasis of tumors [8-11]. Several lncRNAs have been characterized as potential biomarkers in human body fluids [12-13]. The most prominent example of such biomarkers is PCA3, a lncRNA highly expressed in prostate cancer. PCA3 in the urine has been demonstrated to be a more specific marker for prostate cancer diagnose than the commonly used prostate-specific antigen (PSA) [14]. We chose serum as sample type, not only for it easy to attain, but also for the stable lncRNA in it, and then we proved that serum uc022bqs.1 was stable, which can be a biomarker for diagnosing CHD.

There are also studies finding that lncRNAs play an important regulatory role in adipogenesis, and participate in the occurrence of atherosclerosis and development [15]. The finding of a long-term prospective cohort study suggested that lncRNA ANRIL-related transcripts EU741058 and NR_003529 were associated with the severity of atherosclerosis ($p=0.02$ and 0.001 , respectively) [16]. Another large scale case-control studies demonstrated a strong association of the ANRIL SNP (rs1333049) with Myocardial Infarction (MI) as well as familial hypercholesterolemia patients in a northern Pakistani population and could be used as a useful genetic marker for the screening of MI in the general Pakistani population. Therefore, lncRNAs are closely associated with atherosclerosis, and have potential to be a great breakthrough of the treatment of cardiovascular diseases.

This study screened lncRNAs expression profile of CHD patients' serum using microarray analysis. We then verified that serum expression level of uc022bqs.1 was in accordance with microarray results through qRT-PCR. We showed for the first time that lncRNA uc022bqs.1 was frequently up-regulated in CHD patients' serum than in normal individuals. An ROC curve was constructed for differentiating CHD patients' serum from normal individuals' serum, and the results demonstrated that the AUC was 0.895. We believed that this correlation would strengthen the clinical value of uc022bqs.1. The expression of serum uc022bqs.1 in CHD patients was up-regulated, and was significantly associated with the severity of CHD. In early 2014, researchers had reported uc022bqs.1 was a novel biomarker of cardiac remodeling and predicts future death in patients with heart failure, and then named it long intergenic noncoding RNA predicting cardiac remodeling (LIPCAR) [17], which strengthen our finding. LncRNA uc022bqs.1 derives from mitochondrial DNA, which suggests that it may regulate mitochondrial pathways, such as oxidative phosphorylation.

Taken together, our results revealed the level of serum uc022bqs.1 in CHD patients was higher than in normal individuals. To make serum uc022bqs.1 as a successful biomarker used in clinic, multi-centers and large number experiments will be needed to proceed, and the mechanism of uc022bqs.1 participate in occurrence and progress of CHD also needs to be further explored.

References

- [1] Daneault B, Greux P, Kirtane AJ, Witzenbichler B, Guagliumi G, Paradis JM, Fahy MP, Mehran R, Stone GW. Comparison of three-year outcomes after primary percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fraction $<40\%$ versus $\geq 40\%$ (from the Horizons-AMI trial). *Am J Cardiol*, 2013, 111(1):12-20.
- [2] Waldo SW, Secemsky EA, O'Brien C, Kennedy KF1, Pomerantsev E1, Sundt TM 3rd1, McNulty EJ1, Scirica BM1, Yeh RW2. Surgical ineligibility and mortality among patients with unprotected left main or multivessel coronary artery disease undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation*, 2014, 130(25):2295-2301.

- [3] Di Gesualdo F,Capaccioli S,and Lulli M.A pathophysiological view of the long non-coding RNA world.Oncotarget,2014,5(22):10976-10996.
- [4] Guo XL,Gao L,Wang Y,Chiu DK,Wang T,Deng Y.Advances in long noncoding RNAs:identification,structure prediction and function annotation.Brief Funct Genomics,2015 :1-9.
- [5] Yang Y,Cai Y,Wu G,Chen X,Liu Y,Wang X,Yu J,Li C,Chen X,Jose PA,Zhou L,Zeng C.Plasma long non-coding RNA,CoroMarker,a novel biomarker for diagnosis of coronary artery disease.Clin Sci,2015,129(8):675-685.
- [6] Vickers KC,Palmisano BT,Shoucri BM,Shamburek RD,Remaley AT.MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins.Nat Cell Biol.2011,13(4):423-433.
- [7] Maurer MH,Zimmermann E,Hamm B,Dewey M.CT coronary angiography versus conventional invasive coronary angiography - the view of the referring physician.Rofo,2014,186(12):1102-1110.
- [8] Hirata H,Hinoda Y,Shahryari V,Deng G,Nakajima K,Tabatabai ZL,Ishii N,Dahiya R.Long noncoding RNA MALAT1 promotes aggressive renal cell carcinoma through Ezh2 and interacts with miR-205.Cancer Res,2015,75(3):1916-1930.
- [9] Ma MZ,Chu BF,Zhang F,Weng MZ,Qin YY,Gong W,Quan ZW.Long non-coding RNA CCAT1 promotes gallbladder cancer development via negative modulation of miRNA-218-5.Cell Death Dis,2015,6:e1583.
- [10] Bayram S,Sumbul AT,Batmaci C Y,Genç A.Effect of HOTAIR rs920778 polymorphism on breast cancer susceptibility and clinicopathologic features in a Turkish population.Tumour Biol,2015,DOI 10.1007/s13277-014-3028-0.
- [11] Li H,Yu BQ,Li JF,Su L,Yan M,Zhu Z,Liu B.Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer.Oncotarget,2014,5(8):2318-2329.
- [12] Hauptman N,Glavac D.Long non - coding RNA in cancer.Int J Mol Sci,2013,14(3):4655-4669.
- [13] EissaS,Matboli M,Essawy NO,Kotb YM.Integrative functional genetic-epigenetic approach for selecting genes as urine biomarkers for bladder cancer diagnosis.Tumour Biol,2015,DOI10.1007/s13277-015-3722-6.
- [14] Stephan C,Jung K,Miller K, Ralla B.New biomarkers in serum and urine for detection of prostate cancer.Aktuelle Urol,2015,46(2):129-143.
- [15] Holdt LM,Beutner F,Scholz M,Gielen S,G äbel G,Bergert H,Schuler G,Thiery J,Teupser D.ANRIL expression is associated with atherosclerosis risk at chromosome 9p21.Arterioscler Thromb Vasc Biol,2010,30(3):620-627.
- [16] Ahmed W,Ali IS,Riaz M,Younas A,Sadeque A,Niazi AK,Niazi SH,Ali SH,Azam M,Qamar R.Association of ANRIL polymorphism(rs1333049:C>G)with myocardial infarction and its pharmacogenomic role in hypercholesterolemia.Gene,2013,515(2):416-420.
- [17] Kumarswamy R,Bauters C,Volkman I,Maury F,Fetisch J,Holzmann A,Lemesle G,de Groote P,Pinet F,Thum T.Circulating long noncoding RNA,LIPCAR,predicts survival in patients with heart failure.Circ Res,2014,114(9):1569-1575.

Table 1.The information of 5 selected lncRNAs

Seqname	P-value	Fold Change	Regulation	Source	RNA length	Chrom
ENST00000546135	4.92E-05	38.70	up	GENCODE	254	chr12
ENST00000428009	6.78E-06	112.26	up	GENCODE	4390	chr20
uc022bqs.1	5.42E-05	90.15	up	UCSC knowngene	781	chrM
NR_027275	2.29E-04	79.60	up	RefSeq	845	chr16
ENST00000430859	1.28E-05	47.81	up	GENCODE	740	chr7

Table 2. The association between uc022bqs.1 level and clinical parameters of CHD(Mean±SD)

Clinical parameters	Data	uc022bqs.1	
		r	p
Age(year)	65.26±3.18	-0.113	0.360
Chol(mmol/L)	4.25±0.98	-0.088	0.487
TG(mmol/L)	1.59±0.77	0.012	0.407
LDL(mmol/L)	2.42±0.13	-0.067	0.547
Lp-a(mmol/L)	321.98±344.41	-0.074	0.566
BNP(ng/L)	661.21±970.89	0.211	0.185

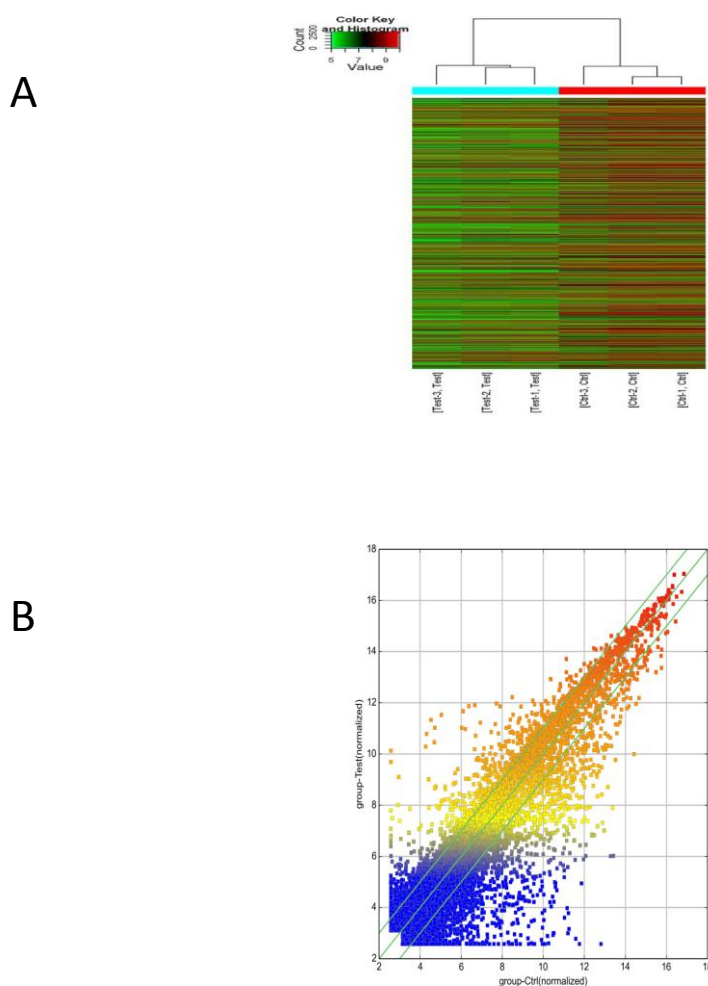
Figure Legends

Figure 1. Differential expression of lncRNAs in CHD patients and control individuals. Hierarchical clustering analysis of all lncRNAs that were differentially expressed in the two groups of participants. (A) Expression values are represented in red and green, indicating expression above and below the median expression value in CHD patients (Test-1, Test-2, Test-3) or control individuals (Ctrl-1, Ctrl-2, Ctrl-3), respectively. (B) Volcano plot of fold change and corresponding P value for each lncRNA.

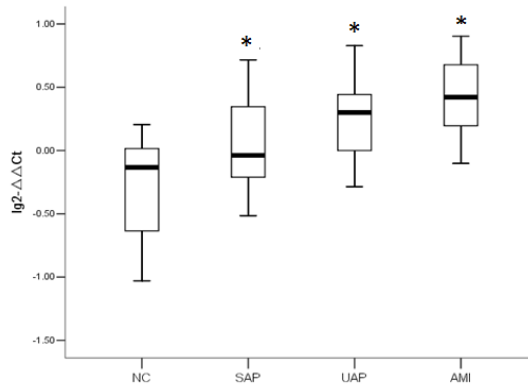


Figure 2.Comparison of serum uc022bps.1 expression between normal controls and CHD patients.SAP patients($0.03 \pm 0.33, n=27$).UAP patients($0.26 \pm 0.29, n=42$).AMI patients($0.42 \pm 0.29, n=30$).NC($-0.29 \pm 0.39, n=30$),* $P < 0.05$,versus control.

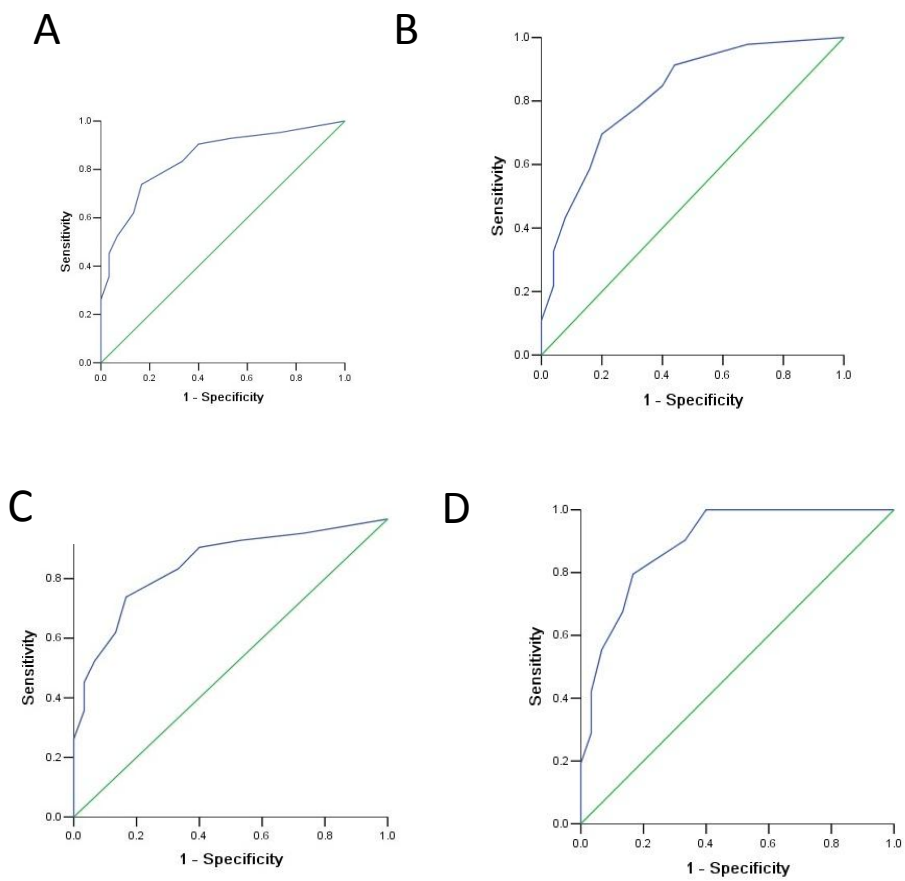


Figure 3.The ROC curves of serum uc022bps.1 in different groups for the diagnosis of CHD.(A)SAP patients($n=27$). (B)UAP patients($n=42$). (C)AMI patients($n=30$). (D)Total CHD patients($n=99$).

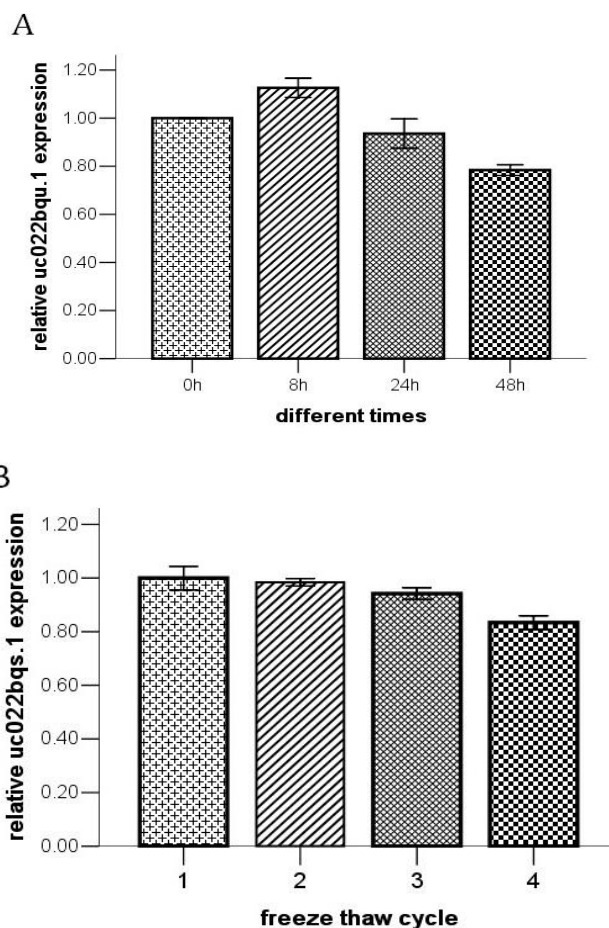


Figure 4. Stability of serum uc022bqs.1. Detection of uc022bqs.1 in serum of five normal individuals. Serum was exposed to various periods(A) at room temperature and (B) with a different number of freeze-thaw cycles.

通讯地址: 广东省广州市天河区暨南大学附属第一医院检验科

邮编: 510630

联系电话: 18819432550

E-mail: jndxzmj@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术检测药物代谢酶基因多态性

叶阿里 孔令君 张海燕 张睿 张晓峰 窦亚玲

中国医学科学院 北京协和医学院 检验科; 北京毅新博创生物科技有限公司

【摘要】目的:建立基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术检测患者体内药物代谢酶基因多态性的方法。**方法:**选取 2013 年 10 月至 2014 年 6 月在北京协和医院门诊就诊患者 53 份 EDTA 抗凝外周血, 提取全血基因组 DNA, 用 MALDI-TOF-MS 技术检测 53 例患者药物代谢酶基因 CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C9*3(rs1057910), CYP2C19*2(rs4244285), CYP2C19*3(rs4986893), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560)的单核苷酸多态性(SNP)位点, 并用 Sanger 测序法进行验证。**结**

果:用 MALDI-TOF-MS 技术可以同时完成 53 份样本 2 个药物代谢酶基因 7 个 SNP 位点的检测。53 名患者中,发现 CYP2C19*2(rs4244285)AG 型 25 例, AA 型 6 例, A 等位基因频率为 35%。CYP2C19*3(rs4986893)AG 型 4 例, A 等位基因频率为 3.8%。CYP2C9*3(rs1057910)CA 型 5 例, C 等位基因频率为 4.7%。未发现 CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560)位点突变。经与 Sanger 测序法比较,两种检测方法结果的符合率为 100%。**结论:**成功建立 MALDI-TOF-MS 技术检测药物代谢酶基因多态性的平台,该法具有高通量,准确的特点,对个性化用药治疗具有重要的临床应用价值。

【关键词】 药物代谢酶基因; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术; 单核苷酸多态性

Identification of Cytochrome P450 polymorphism by MALDI-TOF-MS

Ali Ye¹, Lingjun Kong¹, Haiyang Zhang², Rui Zhang¹, Xiaofeng Zhang², Yaling Dou¹,

¹Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

²Bioyong(Beijing)Technologies Inc.Ltd.Beijing,100200,China.

Correspondence author: Yaling Dou, E-mail: douyaling@163.com

[Abstract] Objective:To establish the MALDI-TOF-MS platform for the identification of the cytochrome P450 enzyme in patient.**Methods:**53 patient samples were collected from May 2013 to 2014 in Peking Union Medical College Hospital. The whole genomic DNA were extracted from the patients peripheral blood. The SNP polymorphism of CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C9*3(rs1057910), CYP2C19*2(rs4244285), CYP2C19*3(rs4986893), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560) were identified by MALDI-TOF-MS. Sanger sequencing were performed for all the samples mentioned above. **Results:**The MALDI-TOF-MS were performed for the 53 samples on two cytochrome gene and 7 SNP loci. In all the 53 patients, 25 AG and 6 AA genotypes were identified in CYP2C19*2(rs4244285), the allele frequency of A genotype is 35%. 4 AG genotype were identified in CYP2C19*3(rs4986893), the allele frequency of A genotype is 3.8%. 5 CA genotype were identified in CYP2C9*3(rs1057910), the allele frequency of C genotype is 4.7%. There is no mutation loci were identified in CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), and CYP2C19*17(rs12248560). All the identification data were confirmed by Sanger sequencing. The coincidence rate is 100%. **Conclusion:**The MALDI-TOF-MS identification platform for the Cytochrome enzyme SNP were established. This platform may provide another alternation for the SNP identification rather than PCR, chips and Sanger sequencing.

[Key words] Cytochrome P450 gene, MALDI-TOF-MS, SNP

细胞色素 P450 酶(cytochrome P450, CYP), 又称为混合功能氧化酶(mixed function oxidase)或单加氧酶(mono-oxygenase), 是人类肝脏中一种重要的药物代谢酶系统, 在脑, 肺, 肾脏, 皮肤, 胎盘, 胃肠道和乳腺等组织中也有发现^[1]。细胞色素 P450 酶能够代谢临床常用药物及一些重要的内源性物质及前致癌物, 它的活性决定药物的代谢速率, 与药物的清除率有着直接关系, 是药物代谢的第一相酶, 因而又称为药物代谢酶^[2]。

目前, 困扰临床医疗和制药行业最常见的问题是不同病人对同一药物的反应不同, 表现为对相同药物的不同疗效和毒副作用^[3]。CYP450 遗传多态性有可能引起 CYP450 酶活性缺失, 表达量降低或增高, 底物特异性改变等, 从而引起药物代谢动力学的改变。CYP450 的遗传多态性是导致不同个体对同一药物产生不同应答的因素之一。目前研究也发现 CYP450 包含许多亚家族, 与药物代谢紧密相关的主要有 CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 和 CYP3A5 等。其中 CYP2C9 和 CYP2C19 为中国人人群中遗传多态性频率较高的两种酶, 与 100 余种药物的代谢有关, 约占临床常用处方药物的 10%~20%^[4], 仅 CYP2C19 就参与了 20 余种临床药物的代谢^[5]。因此, 在用药前就进行相关药物代谢酶的基因多态性检测并结合临床因素, 有助于为患者提供用药指导, 降低药物的不良反应发生率。

以往检测药物代谢酶基因多态性通常采用荧光定量 PCR 法, 基因芯片法, Sanger 测序法等, 上述方法均为化学法检测, 会存在不同程度的化学因素干扰。而本研究采用的是基于核酸序列分子量的物理法方法测定药物基因多态性, 希望能够成为现有化学检测方法的进一步补充。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

MALDI-TOF 飞行时间质谱系统, 全血基因组 DNA 提取试剂盒, $MgCl_2$, dNTP 和 HotStar Taq 酶, 虾碱性磷酸酶和缓冲液, 延伸酶等相关配套试剂与耗材, Typer 4.0 软件分析系统。

1.2 人外周血 DNA 提取

静脉采集外周血 2 mL, EDTA 抗凝, 用全血基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 PCR 扩增反应

扩增引物由 Generay 公司合成。PCR 体系包括 1 μ l 基因组 DNA, 500nM 上下游引物, 50 μ M dNTPs, 0.5 U HotStartTaq DNA 聚合酶, 30nM Mg^{2+} 和 1 \times PCR 缓冲液。扩增条件为 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 2min, 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30s, 56 $^\circ\text{C}$ 退火 30s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1min, 进行 45 个循环, 最后 72 $^\circ\text{C}$ 持续 5min。

1.4 SAP 酶消化反应

反应体系包括 0.5u 虾碱性磷酸酶和 10 \times 的缓冲液, 将反应混合物加入到上一步的 PCR 产物中。反应条件为 37 $^\circ\text{C}$ 保温 40min, 85 $^\circ\text{C}$ 保温 5min。

1.5 单碱基延伸反应

将多重 PCR 反应混合物加到上一步的 SAP 酶消化后的产物中。iPLEX 反应体系为 0.041 μ l iPLEX 酶和 10 \times 的缓冲液, 1 μ l 引物混合液, 0.2 μ l iPLEX 终止混合液, 以水补齐 2 μ l 反应体系, 再次进行 PCR 反应, PCR 反应条件为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 30s; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 5s, 52 $^\circ\text{C}$ 退火 5s, 80 $^\circ\text{C}$ 延伸 5s, 内部 5 个循环, 持续外部 40 个循环。最后 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 3min。

1.6 MALDI-TOF-MS 检测

PCR 反应完成后, 向反应产物的 384 孔板中加入 16 μ l 三蒸水, 2000 rpm 离心 3min; 加入 6mg 树脂, 来回颠倒 35 min 脱盐; 反应完成后再次 2000 rpm 离心 3 min。将脱盐处理后的样品点在样品靶上, 自然结晶; MALDI TOF 质谱检测, 采用 Typer 4.0 软件检测质谱峰, 并根据质谱峰图判读各样本目标位点基因型。

1.7 Sanger 测序分析

为检验 MALDI-TOF-MS 技术的准确性, 用常规 PCR 方法扩增含有 CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3(rs1057910), CYP2C19*2(rs4244285), CYP2C19*3(rs4986893), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560)的片段, 用产物回收试剂盒回收后, 进行 Sanger 测序分析验证。

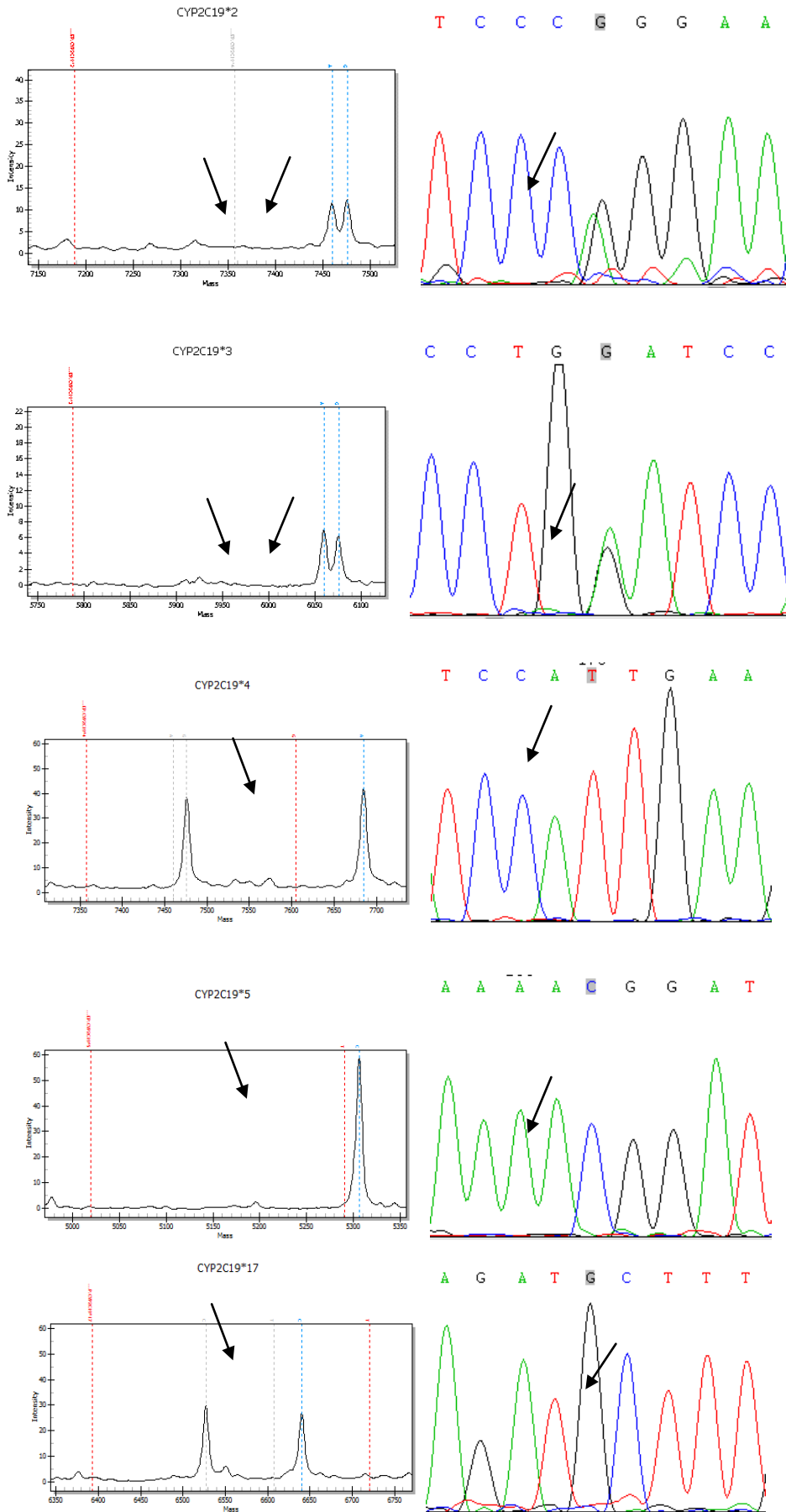
2 结果

2.1 MALDI-TOF-MS 检测

用 MALDI-TOF-MS 技术对药物代谢酶基因的单核苷酸多态性(SNP)位点 CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C9*3(rs1057910), CYP2C19*2(rs4244285), CYP2C19*3(rs4986893), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560)进行检测, 成功检测出以上位点的基因型多态 SNP, 如图 1 所示。53 名患者中, 检出 CYP2C19*2(rs4244285)AG 型 25 例, AA 型 6 例, A 等位基因频率为 35%; 检出 CYP2C19*3(rs4986893)AG 型 4 例, A 等位基因频率为 3.8%; 检出 CYP2C9*3(rs1057910)CA 型 5 例, C 等位基因频率为 4.7%。未发现 CYP2C9*2(rs1799853), CYP2C19*4(rs28399504), CYP2C19*5(rs56337013), CYP2C19*17(rs12248560)位点存在突变。

MALDI-TOF-MS

Sanger 测序



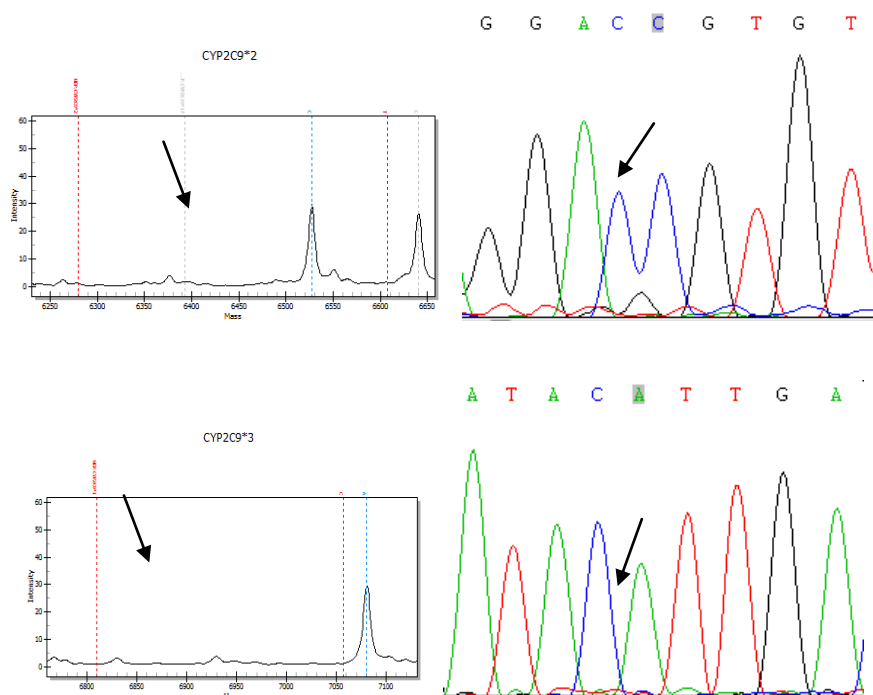


图 1 MALDI-TOF-MS 质谱图与 Sanger 测序图比对

2.2 Sanger 测序验证结果

MALDI-TOF-MS 检测结果经与 Sanger 测序的结果比较,符合率为 100%,见表 1。

表 1 MALDI-TOF-MS 与 Sanger 测序结果比较(n=53)

检测位点	检测方法	野生型	突变杂合子	突变纯合子
CYP2C19*2	MALDI-TOF-MS	22	25	6
	Sanger 测序	22	25	6
CYP2C19*3	MALDI-TOF-MS	49	4	0
	Sanger 测序	49	4	0
CYP2C19*4	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C19*5	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C19*17	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C9*2	MALDI-TOF-MS	53	0	0
	Sanger 测序	53	0	0
CYP2C9*3	MALDI-TOF-MS	48	5	0
	Sanger 测序	48	5	0

3 讨论

CYP450 遗传多态性是产生药物毒副作用,降低或丧失药物疗效的主要原因之一^[4,6]。通过 CYP450 基因型检测可以进行临床用药方案指导和调整,为临床个体化用药提供依据,预防药物不良反应等。

氯吡格雷是一种抗血小板药物,广泛用于急性冠脉综合征,缺血性脑血栓,闭塞性脉管炎和动脉硬化及血栓栓塞引起的并发症。心脏支架手术后的患者需长期服用氯吡格雷以防止支架内再梗。氯吡格雷主要经 CYP2C19 代谢活

化后发挥抗血小板效应。CYP2C19 慢代谢患者应用常规剂量的氯吡格雷后体内活性代谢物生产减少,对血小板的抑制作用下降。美国 FDA 和美国心脏病学会建议,对于 CYP2C19 慢代谢基因型患者需考虑改变治疗方案[5],具体意见为: CYP2C19*1/*1 基因型个体应用氯吡格雷有效,可常规使用; CYP2C19*2 或*3 基因型个体对氯吡格雷疗效降低,建议更换成普拉格雷或替卡格雷; CYP2C19*2 或*3 突变型纯合子个体应用氯吡格雷效果差,建议换用普拉格雷或替卡格雷^[5]。2010 年 3 月,美国 FDA 再次建议,患者在服用氯吡格雷之前,应该接受基因型检测。

奥美拉唑是目前应用最为广泛的质子泵抑制剂之一,主要由 CYP2C19 酶代谢^[7,8]。CYP2C19 快代谢者,会出现疗效不佳; CYP2C19 弱代谢者,会出现严重不良反应。检测 CYP2C19 基因型,可以更精确地调整药物剂量。

现有的荧光定量 PCR 法,基因芯片法和 Sanger 测序法都是基于化学(荧光)方法,依赖于核苷酸的互补性对核酸序列进行分析。因此对于序列的长度,复杂性,反应条件等都具有较高的要求,容易受到多种化学因素的影响,导致检测结果出现偏差。以荧光 PCR 方法为例,一旦基因突变位点出现在引物杂交区域,则有可能导致引物不能与模板正确结合,导致检测结果出现误差。在基因芯片中,也同样存在探针内突变位点导致杂交结果出现假阴性的现象,甚至还会引起二次杂交时候的不正确配对,导致出现废片,影响检测结果。

而 MALDI TOF MS 方法则是根据核酸序列本身的核苷酸组成分子,以及其被电离后在真空管中的飞行时间来确定其分子量大小,最终确定核苷酸序列。其检测结果仅仅依赖于分子量这一物理参数。尤其是在 SNP 位点已经确定的条件下,采用 MALDI TOF MS 的方法还可以将检测大幅度通量提高,可在同一反应体系内对多个 SNP 位点进行多重检测与分析,从而提高检测通量,效率与正确率。这样的检测方法无疑是对现有荧光 PCR,基因芯片和测序等方法的重要补充。如果能够将化学和物理方法结合起来对药物代谢酶基因 SNP 进行检测,将极大的提高检测结果的准确性。

因此, MALDI-TOF-MS 对药物代谢酶基因多态性的检测方法,同样也可以在用药前对药物代谢酶的基因多态性进行检测,结合临床因素,有助于为患者指导用药,降低严重不良反应的发生率,为个体化医疗提供更加多样化的检测手段。

参考文献

- [1] A.M.McDonnell,C.H.Dang,Basic review of the cytochrome p450 system.Journal of the advanced practitioner in oncology,2013,4:263-268.
- [2] U.M.Zanger,M.Schwab,Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism:regulation of gene expression,enzyme activities,and impact of genetic variation.Pharmacology & therapeutics,2013,138:103-141.
- [3] S.C.Preissner,M.F.Hoffmann,R.Preissner,M.Dunkel,A.Gewiess,S.Preissner,Polymorphic cytochrome P450 enzymes(CYPs)and their role in personalized therapy.PloS one,2013,8:e82562.
- [4] U.M.Zanger,K.Klein,M.Thomas,J.K.Rieger,R.Tremmel,B.A.Kandel,M.Klein,T.Magdy,Genetics,epigenetics,and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes.Clinical pharmacology and therapeutics,2014,95:258-261.
- [5] M.Chang,G.Tybring,M.L.Dahl,J.D.Lindh,Impact of cytochrome P450 2C19 polymorphisms on citalopram/escitalopram exposure:a systematic review and meta-analysis.Clinical pharmacokinetics,2014,53:801-811.
- [6] P.Shahabi,G.Siest,U.A.Meyer,S.Visvikis-Siest,Human cytochrome P450 epoxygenases:variability in expression and role in inflammation-related disorders.Pharmacology & therapeutics,2014,144:134-161.
- [7] H.Nakahashi,Y.Yamamura,A.Usami,P.Rangsunvigit,P.Malakul,M.Miyazawa,Metabolism of(-)-cis- and(-)-trans-rose oxide by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes.Biopharmaceutics & drug disposition,2015,36:565-574.
- [8] S.Uehara,T.Inoue,M.Utoh,A.Toda,M.Shimizu,Y.Uno,E.Sasaki,H.Yamazaki,Simultaneous pharmacokinetics evaluation of human cytochrome P450 probes,caffeine,warfarin,omeprazole,metoprolol and midazolam,in common marmosets(Callithrix jacchus).Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.2016,46:163-168.

通信作者: 窦亚玲, 电子邮箱: douyuling@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

一种脆性 X 综合征及相关疾病 FMR1 基因检测方法在临床诊断中的应用

徐晔,王丽丽,杨冬梅,方芳,刘艳辉

珀金埃尔默医学诊断产品(上海)有限公司诊断事业部,苏州珀金埃尔默医学检验所有限公司

[摘要] 目的:建立一种简便、快捷、准确、易操作的检测脆性 X 综合征及相关疾病的方法,评价其在临床检测的可行性。**方法:**用 PCR 法结合微流控毛细管电泳技术对参考样品及 227 例临床样品进行 FMR1 基因检测,并经软件分析,得出 CGG 三核苷酸重复次数。**结果:**参考样品临床分类结果与已知结果 100%吻合;临床样品共检测出 15 例阳性,其中全突变(CGG 重复数大于 200)检测出 9 例,前突变检测出 6 例;对一例临床样品进行家系分析,其母亲为前突变携带者。**结论:**FragilEase™ PCR 试剂是一种准确、简便、可以在临床常规应用的快速筛查、诊断脆性 X 综合征的基因检测方法。

[关键词] 脆性 X 综合征; FMR1 基因; FragilEase™ PCR

脆性 X 染色体是指在 Xq27~Xq28 带之间的染色体呈细丝样,导致其相连的末端呈随体样结构。由于这一细丝样部位易发生断裂,故为脆性 X 染色体,因此所导致的疾病称为脆性 X 染色体综合征(Fragile X syndrome)(OMIM 309550)[1]。脆性 X 综合征与脆性 X 智力低下基因(FMR1) 5' 非翻译区遗传不稳定的(CGG) n 三核苷酸重复序列相关。正常人群 CGG 重复序列小于 55,重复数为 45-54 时为灰区,55-200 个重复序列为前突变,CGG 重复拷贝数大于 200 时为全突变。全突变时位于(CGG) n 上游的 CpG 岛异常甲基化,不能正常生成 FMRP 蛋白,导致脆性 X 综合征[2-3]。脆性 X 综合征男性发病率约为 1/4000[4],女性发病率约 1/6000,几乎所有的脆性 X 染色体综合征中,都伴有智力低下或学习能力障碍、行为情绪问题包括孤僻症等表现,孩子和成人表现程度不一样,男性发病比女性更严重。

女性前突变携带者具有动态遗传的特点,经逐代遗传有可能变成全突变,并且随着突变数的增加转变为全突变的概率逐渐增加[5]。女性前突变携带者常伴有卵巢功能不全(FXPOI)[6],会导致育龄女性不孕和早期雌激素缺乏。前突变携带者男性老年(50 岁以后)罹患共济失调/意向性震颤(FXTAS)的可能性增大[7]。

出生后的脆性 X 患儿一般体格生长发育正常,无外在畸形且缺乏特异性,所以单靠临床症状不能在早期确诊,部分女性携带者也无明显临床症状,需结合分子生物学方法,目前主要有细胞遗传学方法,Southern 印记杂交[8],及基于 PCR 扩增的检测方法[9],各种方法均有各自特点及不足之处,本文对 PerkinElmer 公司 FragilEase™ PCR 试剂(PCR 扩增结合微流控毛细管电泳)及软件分析法应用于临床诊断的可行性、适用性做评价。

1 材料和方法

本研究目的在于证实 PerkinElmer FragilEase™ PCR 试剂及其软件 FraXsoft™ 用于脆性 X 综合征及相关疾病临床诊断及筛查的技术可行性。

1.1 研究对象和 DNA 提取

本研究包含 14 份参考样品和 227 例临床样品。

1.1.1 参考样品

实验选择 14 个 Coriell 和 WHO/NIBSC 研究所细胞株作为参考 DNA,包括了正常、前突变及全突变样品,其 FMR1 基因的 CGG 三联重复序列拷贝数已知。用于技术的有效性验证。

1.1.2 标准样品

在每轮 PCR 反应及电泳时,均加入两例来自于 Coriell 研究所的 DNA 样品作为标准品,标准品编号分别为 NA20239 和 NA20240,其 FMR1 基因的三联重复序列拷贝数已知,分别为 20 和 200(NA20239)及 30 和 80(NA20240),标准品用于构建标准曲线,从而对未知样品进行片段大小的精确计算。

1.1.3 临床样品

227 例临床表现为智力低下、发育迟缓、孤独症、运动行为障碍、认知障碍、卵巢早衰、复发性流产或有相关家庭史的儿童、女性或患儿父母病例,样本来源覆盖中国大陆多个省市,经门诊遗传咨询和本人或监护人知情同意后采集外周静脉血 2ml,送检至苏州珀金埃尔默医学检验所有限公司。227 例送检样本中包含儿童、老年、育龄女性,

疑似患儿的父母，或有脆性 X 综合征家族史。每次实验均有实验室收集的无智力低下的正常样本做对照。

外周血临床样品使用 QIAamp DNA Blood Mini Kit, 51104(50 人份)或 51106(250 人份) (凯杰企业管理(上海)有限公司) 进行 DNA 提取, 利用 NanoDrop ND-200 核酸定量仪 (赛默飞世尔科技(中国)有限公司) 进行 DNA 浓度测定, 25ng/μl 为理想浓度。同时进行 DNA 参考品和标准品浓度配制。

1.2 PCR 扩增及纯化

经提取纯化的样本和标准品 DNA, 及参考品 DNA 采用 PerkinElmer 公司 FragilEase™ PCR 试剂进行扩增。FragilEase™PCR 反应体积为 20μl, 共 25 个循环。PCR 产物经过 PureLink PCR Micro Kit 柱纯化后, (K310250, 美国生命技术公司) 再进行自动微流控毛细管电泳 (PerkinElmer, LabChip® MultiDx™) 确定扩增片段大小。最后利用 FraXsoft™ 分析软件 (PerkinElmer), 根据标准曲线, 计算出待测样品 CGG 三联重复序列的拷贝数。

具体操作流程是: 根据 DNA 的原始浓度, 用 Sample diluent 稀释配制 DNA 为 25ng/μl。将含有配制好的 DNA 的 PCR 反应管放入 BIO-RAD C1000 TOUCH PCR 仪中进行反应, 扩增条件设置如下:

表 1.PCR 扩增条件设置

步骤	温度	时间
Step1	95℃	5min
Step2	98℃	35s
Step3	59℃	35s
Step4	72℃	4min
Step5	重复 Step2-4, 共 25 个循环	
Step6	72℃	10min
Step7	4℃	∞

1.2.1 PCR 扩增产物进行纯化

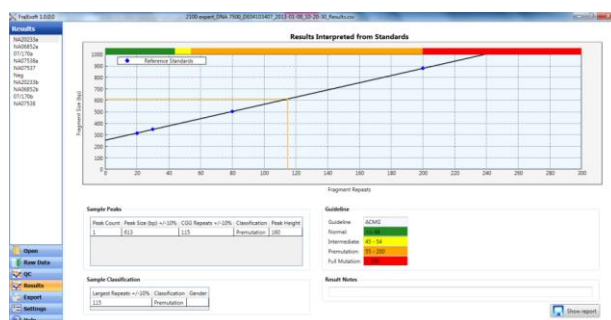
将所有样本从 PCR 反应管中取出放入 DNA 纯化 96 孔板上相应孔中, 封板膜封孔, 将板放入经预热 (65℃) 的 TriNEST 仪器中, 设置工作条件 1200rpm, 10 min, 真空抽滤系统抽滤 (抽滤的压力为 250mbar, 时间为 15 min); 再次设置 TriNEST 仪器至 25℃, 吸取 50μl TE 继续抽滤 10min; 向每个孔中加入 20μl TE, 设置 TriNEST 仪器, 工作条件为 1200rpm, 5min, 运行。纯化好的 PCR 产物可立即用于毛细管电泳分析, 或保存于 -30℃~ -16℃。

1.2.2 PCR 产物微流控毛细管电泳分析

参考品、标准品, 及纯化后临床样品 DNA 经微流控毛细管电泳仪 (PerkinElmer/Caliper LabChip® MultiDx) 进行片段大小分析。电泳仪采用一个单吸管微流体芯片, 对 96 或 384 孔板中的样本进行分析。简要操作流程如: 提前 30 分钟将 MultiDx 5K chip 和 MultiDx 5K reagent kit 从冰箱中取出。先后准备 Gel-Dye Solution, Buffer Tube, Ladder Dilution, Marker Dilution。将事先准备好的电泳芯片取出, 吸去芯片相应孔中的液体, 并洗涤, 加入 Marker Dilution、Gel-Dye Solution 等到芯片相应孔中。设置 Labchip MultiDx 图标软件, 加载 96 孔样品板和芯片等, 选择样品孔位置开始电泳分析。待电泳结束后导出结果。

1.2.3 软件分析

脆性 X 综合征与 (CGG) n 重复数相关, 而基于微流控毛细管电泳技术平台的检测是精确地分辨到扩增片段大小, 还需要进一步将扩增片段信息转化为 (CGG) n 重复数信息。FraXsoft™ 分析软件专门为脆性 X 的相关检测设计。为精确分析 (CGG) n 重复数, 每次实验中都使用已知 CGG 重复数的 Coriell DNA 参考样本, 制作线性标准曲线, 所有样品的每个片段均与线性回归标准曲线进行比对。



FraXsoft™ 分析软件严格设置质控标准和国外指南的判读标准。国外已经有相关检测指南发布,软件目前内置 ACMG 和 ESHG 的判读标准, 并可以根据不同的检测指南修改。

2 结果

本研究参考品临床分类的一致性为 100%; 共检测出 6 例前突变样品和 9 例全突变样品, 阳性率为 6.6% (15/227), 对一例进行家系分析, 其母亲为前突变携带者。正常人群 CGG 三核苷酸重复数平均值为 30, 中位数值为 32。所有 227 例临床样本经 DNA 抽提试剂并经浓度测定, 均符合 PCR 上机要求, 未出现异常。

2.1 标准曲线构建

Coriell 研究所的 DNA 样品作为标准品, 两例女性标准品, 编号分别为 NA20239 和 NA20240, 其 FMR1 基因的三联重复序列拷贝数已知, 分别为 20 和 200 (NA20239) 及 30 和 80 (NA20240), 经 PCR 扩增、产物纯化、微流控毛细管电泳分析, 根据重复数和片段大小生成线性回归方程 $Y=kX+b$, 示例如图, $k=3.2293$, $b=247.58$, $R^2=0.9998$ 。

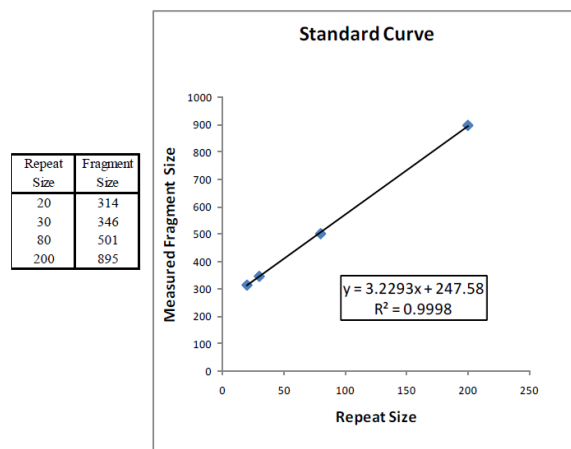


图 2.标准品 NA20240 和 NA20239 检测核酸片段大小标准曲线示例, $R^2>0.98$ 。

2.2 参考品检测结果

所有 14 个参考品都经过一式三份重复测试, 无失败样品, 计算得到的拷贝数临床分类与已知拷贝数分类等级 100% 相符。所有样本的拷贝数数值准确性在微流控毛细管电泳仪 $\pm 10\%$ 误差范围内, 除参考品 07/170 外, FragileEase 测得结果高于微流控毛细管电泳的平均值 (Southern Blot 测得 07/170 号参考品重复数为 353-960。)另一参考品 07/120 Southern Blot 测得双峰, 微流控毛细管电泳仪识别为单峰。

表 2.各参考品 FragilEase 检测结果及参考结果

	Sample	Repeat Size	
		Reference	FragilEase
Coriell	NA07174	30	28
	NA06892	86	89
	NA20233	117	112
	NA06852	342	309
	NA07538	29 29	28
	NA20240	30 80	30 84
	NA20239	20 200	17 199
	NA07537	28 336	29 316
NIBSC	07/174	114	120
	07/170	754	1022
	07/120	22 31	29
	07/122	33 113	35 119
	07/168	38 346	40 353
ATCC	CRL2704D	31 59	30 62

(Coriell Institute for Medical Research(Camden,NJ,USA),National Institute for Biological Standards and Control(NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK), American Tissue Culture Collection(ATCC, Manasas, VA, USA)

2.3 临床样品检测结果及家系分析

所有 227 例临床样品的检测结果见下表。

表 3: 临床样品的诊断分类

正常 Normal	灰区 Intermediate	前突变 Premutation	全突变 Full mutation	总体 Total
212	0	6	9	227
93.4%	0.0%	2.6%	4.0%	100%

正常人群 CGG 重复数平均值为 30, 中位数值为 32。

表 4: 117 例男性样本检测结果

已知结果分类	基于 PCR 和微流控毛细管电泳检测结果				共计
	正常	灰区	前突变	全突变	
正常	109	0	0	0	109
灰区	0	1	0	0	1
前突变	0	0	0	0	0
全突变	0	0	0	7	7
总计	109	1	0	7	117

表 5: 110 例已知结果女性样本检测结果

已知结果分类	基于 PCR 和微流控毛细管电泳检测结果				共计
	正常	灰区	前突变	全突变	
正常	102	0	0	0	102
灰区	0	0	0	0	0
前突变	0	0	6	0	6
全突变	0	0	0	2	2
总计	102	0	6	2	110

因为 247 例病例中, 伴有智力低下发育迟缓的儿童所占比例较大, 所以该统计数据中, 阳性病例比例高于之前报道的数据。我们针对一例儿童阳性样本进行了家系分析, 性别男, 因为存在特殊面容, 伴有智力低下、发育迟缓而进行脆性 X 检测, 检测结果 CGG 重复数为 240, 而后对父母双方外周血进行检测, 发现母亲为脆性 X 前突变携带

者，CGG 三核苷酸重复数为 30/86，父亲正常 CGG 重复数为 30，第二胎时抽取羊水进行检测，胎儿为正常女性。

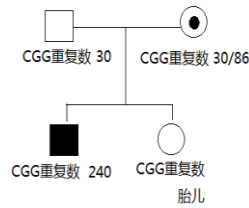


图 3.一例临床样本家系分析

3 讨论

脆性 X 综合征及相关疾病主要是由 X 染色体上 FMR1 基因上游 5'端 (CGG) n 三核苷酸重复序列异常所致，当重复序列大于 200 即全突变时 CpG 岛高度甲基化，失去全部功能，无法制造正常蛋白 FMRP。

早期使用叶酸缺陷型培养基培养疑似患者的外周血淋巴细胞，加入诱导剂，则可在 Xq27.3 处出现裂隙或断裂。但是此方法费事费力，检出率低，只能对男性患者和部分女性患者做出诊断，对前突变者几乎不能检出。目前此法已经很少使用。FraX 患者因为 CGG 的异常扩增，CpG 岛的异常甲基化使其甲基化敏感性酶切位点消失，可以据此特征使用 Southern Blot 方法进行检测。然而，Southern Blot 技术复杂，费时，且需要标记，不适合群体筛查，同时可能存在酶解不完全而导致杂交结果不准确而引起误诊。一般实验室自配的 FMR1 PCR 检测，最多只能对拷贝数在 70-120 的样本进行有效扩增。女性两个 FMR1 基因中一个等位基因通常是正常状态，为 28-30 个拷贝的重复。当两个等位基因的拷贝数相同，或仅相差一个拷贝时，在电泳结果中表现为一个单峰。故对于常规 PCR 扩增法出现单峰时，无法判定样品是纯合子，还是有一个等位基因为全突变（拷贝数>200）的杂合子，此时，需要使用 Southern Blot 作进一步区分，通常情况下，15% - 20% 的样品需要进行这种区分检测。Southern Blot 需要 7 至 10 天时间得到结果，需 1 μg DNA，这些要求在进行高通量筛查时往往无法满足。



PerkinElmer 公司针对 FMR1 基因靶向区域特点开发出 FragilEase™ PCR 试剂及 FraXsoft™ 软件，能够很好地将不同 CGG 重复数的样本进行扩增。使用 FragilEase™ PCR 试剂盒及 PerkinElmer/Caliper® MultiDx 电泳仪能够解决传统 PCR 不能检测较大重复序列的前突变和全突变的瓶颈（可检测 >1400 的 CGG 重复），准确地将单峰样本判为正常样品，基本无需进行 Southern Blot 实验（评估全突变样品的甲基化状态除外）。此法提供必需的通量和数据质量，同时加入已知 CGG 重复数的标准 DNA（Coriell DNA）进行实验，并使用软件进行精确定量计算，该法相对 Southern 印记杂交法简便易操作，并可判断出女性杂合子和纯合子。

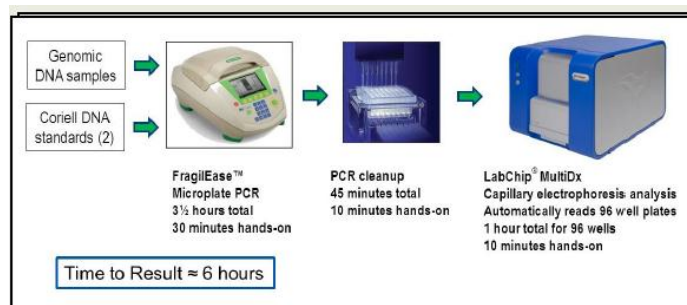


图 4: FragilEase™+FraXsoft™PCR 工作流程。（6 小时可得到结果）

此法针对脆性 X 综合征致病基因 FMR1 能确切检出正常、前突变携带者及全突变患者,适用于儿童智力低下、女性卵巢早衰、产前诊断及有家族史病例的诊断,且使得脆性 X 综合征及 FMR1 基因携带者的广泛筛查成为可能。

参考文献

- [1] Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS et al: Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-914.
- [2] Pieretti M, Zhang FP, Fu YH et al: Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 1991;66:817-822.
- [3] Rousseau F, Heitz D, Tarleton J et al: A multicenter study on genotype-phenotype correlations in the fragile X syndrome, using direct diagnosis with probe StB12.3: the first 2253 cases. *Am J Hum Genet* 1994;55:225-237.
- [4] Hill MK, Archibald AD, Cohen J, Metcalfe SA: A systematic review of population screening for fragile X syndrome. *Genet Med* 2010;12:411-412.
- [5] Eichler EE, Holden JJ, Popovich BW et al: Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nat Genet* 1994;8:88-94.
- [6] Sherman SL: Premature ovarian failure in the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* 2000;97:189-194.
- [7] Berry-Kravis E, Abrams L, Coffey SM et al: Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: clinical features, genetics, and testing guidelines. *Mov Disord* 2007;22:2018-2030, quiz 2140.
- [8] Rousseau F, Heitz D, Biancalana V et al: Direct diagnosis by DNA analysis of the fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J Med* 1991;325:1673-1681.
- [9] Brown WT, Houck Jr GE, Jeziorowska A et al: Rapid fragile X carrier screening and prenatal diagnosis using a nonradioactive PCR test. *JAMA* 1993;270:1569-1575.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

抗酸染色可弥补细针吸取细胞学在诊断淋巴结结核性脓肿的缺陷

江涛¹, 朱立强¹, 赵利^{2*}

1. 徐州医学院附属医院检验科, 徐州, 221002; 2. 徐州市肿瘤医院检验科, 徐州, 221002

[摘要] 目的: 探讨抗酸染色在细针吸取细胞学 (FNAC) 无法明确诊断的淋巴结结核性脓肿中的诊断价值。方法: 收集 58 例 FNAC 诊断为可疑淋巴结结核性脓肿的病例。同时将吸取脓液送微生物室做抗酸染色, 查抗酸杆菌。结果: 58 例可疑病例中, 42 例被临床最终确诊为淋巴结结核, 28 例抗酸染色阳性, 阳性检出率为 61.9%。8 例 2 月-1 岁患儿腋下脓肿涂片中 7 例抗酸染色阳性, 阳性检出率为 87.5%。结论: 抗酸染色与 FNAC 在诊断中有效互补应用, 有利于淋巴结结核性脓肿, 特别是幼儿腋下结核性脓肿的明确诊断。

[关键词] 细胞学; 细针抽吸; 结核; 抗酸染色; 诊断

Ziehl-Neelsen stain can make up for the drawback of fine needle aspiration cytology (FNAC) in diagnosis of tuberculous abscess of lymph nodes

JIANG Tao¹, ZHU Liqiang¹, ZHAO Li^{2*}

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Jiangsu Province Xuzhou, 221006, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Cancer Hospital, Jiangsu Province Xuzhou, 221006, China

[Abstract] Purpose: To investigate the application value of Ziehl-Neelsen stain in diagnosis of tuberculous abscess of lymph nodes which are dilemma for fine needle aspiration cytology (FNAC). **Methods:** 58 cases suspected of tuberculous abscess of

lymph nodes by FNAC were involved in this study. All the cases were aspirated and subjected to microbiological (Ziehl-Neelsen stain). **Results:** In all the 58 cases, 42 cases were confirmed as tuberculosis abscess of lymph nodes, out of which 28 cases were positive by Ziehl-Neelsen stain. The positive detection rate was 61.9%. In 8 cases kids from 2 month to 1 year, 7 cases were positive by Ziehl-Neelsen stain and the positive detection rate was 87.5%. **Conclusion:** Ziehl-Neelsen stain and FNAC are complementary, have flexible application and can meet the diagnosis of tuberculous abscess of lymph nodes, especially those in children's armpit.

[Key words] Cytology; Fine-needle aspiration; tuberculous; Ziehl-Neelsen stain; diagnosis

结核病是全世界面临的健康挑战之一，是人类单一病原体感染性疾病致死的最重要原因。淋巴结核是由结核杆菌感染淋巴结后导致的一种慢性炎性疾病，是最常见的肺外结核。细针吸取细胞学（fine-needle aspiration cytology, FNAC）对诊断增殖型淋巴结核具有重要价值。但对于干酪样坏死型，特别是伴有液化坏死的淋巴结核常缺少典型细胞学表现，难以与其他细菌引起的化脓性炎症区分。而将抽吸的脓液涂片做抗酸染色，能弥补该缺陷，提高淋巴结核的阳性检出率。现将 58 例 FNAC 怀疑为淋巴结核脓肿病例的细胞学及抗酸染色结果进行总结分析，报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取徐州市肿瘤医院、徐州医学院附属医院 2011 年 03 月-2015 年 05 月间就诊的 58 例颈部及腋下可疑结核性脓肿病例进行细针吸取细胞学检查，同时做抗酸染色。其中男性 30 例（其中 1 例临床确诊为 HIV 感染），女性 28 例；年龄 2 个月-70 岁，其中儿童（<18 岁）14 例，2 月-1 岁患儿 8 例，成人 44 例，颈部肿块 37 例，腋下肿块 21 例。

1.2 方法

1.2.1 细针吸取方法

选择肿大明显、可疑性较大的淋巴结作为穿刺目标。肿物局部皮肤常规消毒，采用 10mL 注射器、8 号针头，以左手手指和拇指固定肿大淋巴结，右手持针进针，确定进入淋巴结后抽吸针芯形成负压，进退数次，待充分吸取足够组织物后，放弃负压，退针。局部覆盖无菌纱布，胶布固定。淋巴结穿刺内容物制备涂片 3-5 张，同时作 2 方面的检查：1-2 张涂片常规瑞氏染色，用于 FNAC 诊断；其余涂片送微生物室做抗酸染色。

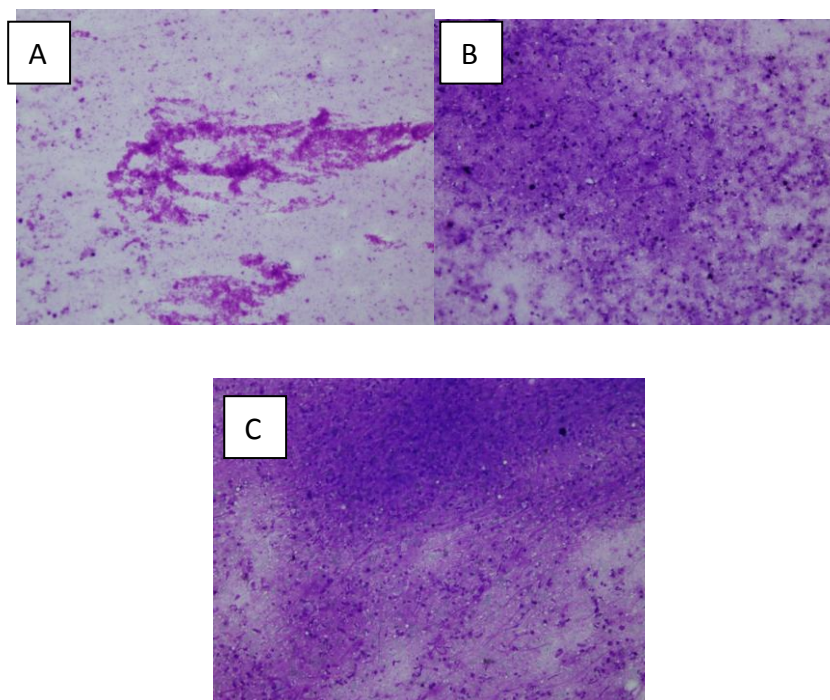
1.2.2 试剂：瑞氏染色及抗酸染色染液购自台湾 Baso 生物技术有限公司。

1.3 淋巴结核诊断依据：全部病例诊断依据有淋巴结肿大或脓肿史，PPD 试验阳性或强阳性，并伴有以下 1 项或 1 项以上者：①病理检查符合结核改变；②脓液培养或涂片结核杆菌检查阳性；③血液结核抗体试验阳性；④合并肺结核及(或)肺外结核^[1]。

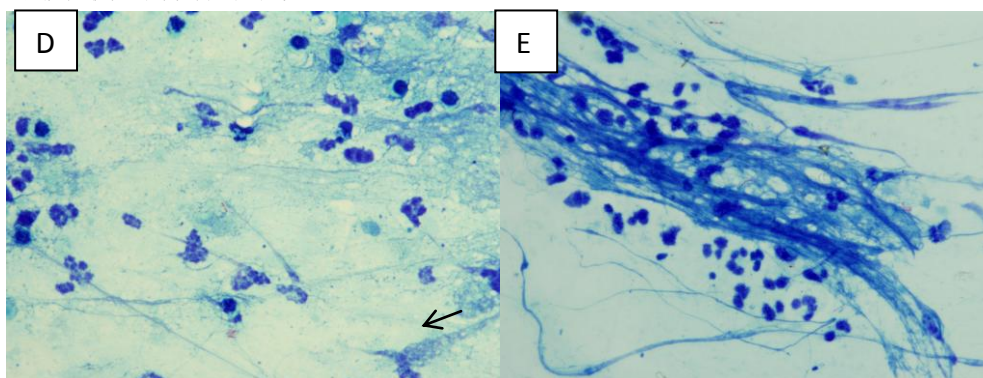
2 结果

选取的 58 例颈部及腋下无痛性可疑结核性脓肿病例，根据淋巴结核诊断依据结合临床资料证实：42 例为结核性脓肿，16 例为其它细菌引起的化脓性炎症。42 例淋巴结核性脓肿中，36 例肿块直径 1.5-5cm，7 例肿块直径 5-10cm，1 例肿块直径达 15cm（该患者伴 HIV 感染）。8 例年龄在 2 月-1 岁之间的患儿，肿块均为发生于腋下。

42 例结核性脓肿针吸细胞学涂片中，5 例脓细胞+++，7 例脓细胞++，11 例脓细胞+，19 例脓细胞少或无；淋巴细胞均少见或无；6 例可见个别退化类上皮细胞；背景均可见大量紫红色细颗粒状坏死性物质，9 例伴有纤维素样坏死物（见图 1-3）。细胞学诊断结果仅作描述性诊断，未做出明确诊断。42 例结核性脓肿涂片抗酸染色结果：查到抗酸杆菌 26 例，阳性检出率为 61.9%。其中，8 例 2 月-1 岁患儿腋下脓肿涂片中 7 例查见抗酸杆菌，阳性检出率为 87.5%。



图A、B、C 瑞氏染色 $\times 200$ 针吸细胞学涂片中，图A 无脓细胞；图B 脓细胞+；图C脓细胞++，背景均可见大量紫红色细颗粒状无结构坏死性物质。

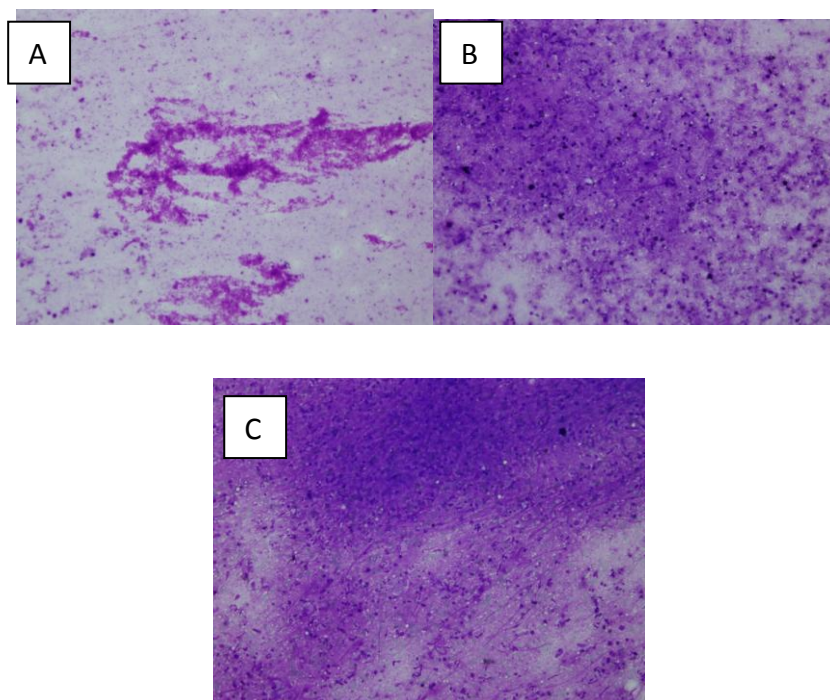


图D、E 抗酸染色 $\times 1000$ 针吸细胞学涂片中查见抗酸杆菌（箭头所示）

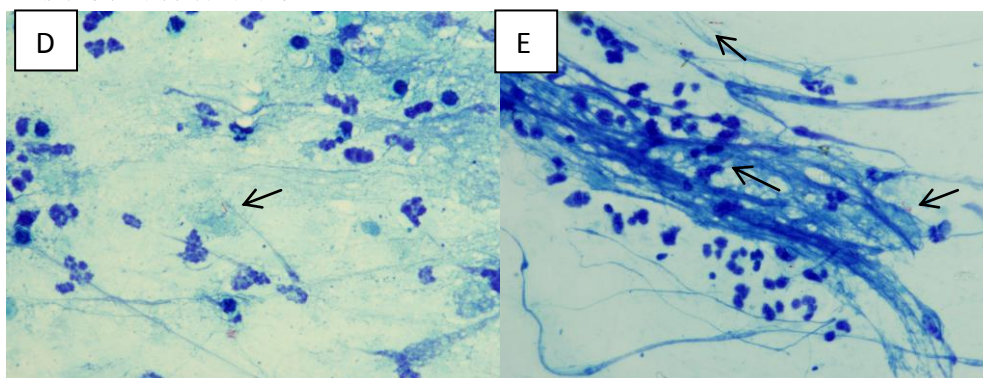
3 讨论

淋巴结结核是一种最常见的肺外结核疾病。对于结核性脓肿，不宜盲目切开引流或做病理切片，对临床怀疑的淋巴结结核提倡做细针穿刺细胞学检查，否则会使创面不愈合而形成瘘管。FNAC 是一种简单、快速、痛苦小的细针吸引活检术，在国外已经作为颈部淋巴结结核病变检验受欢迎的方法，在国内仍未引起应有的重视^[2]。多数研究者根据患者病变淋巴结的细胞病理学特征将其分为增殖型和干酪型^[3-5]。增殖型淋巴结结核常出现典型的郎罕氏巨细胞或类上皮细胞，对于淋巴结结核具有特征性的 FNAC 诊断价值。但干酪型淋巴结结核细胞涂片中仅见到大量紫红色颗粒状坏死物，细胞少见、退变或无细胞成分。尤其伴液化坏死或合并感染时，常出现多少不等的脓细胞及纤维素样坏死物，与其它细菌引起的化脓性炎症难以区别。因此抗酸染色在针吸细胞学难以诊断的结核性脓肿检查中尤为重要。

虽然，仅根据细胞形态学难以对结核性脓肿做出明确诊断，但笔者根据多年细针吸取细胞学经验发现液化坏死期淋巴结结核脓肿具有以下特点，有助于结核性脓肿的筛选及细菌学送检。（1）淋巴结结核多发生于颈部、腋下，幼儿多发生于腋下。本组病例中，8例1岁以下幼儿均发生于腋下，且阳性检出率较高，可能与幼儿接种卡介苗的活力、剂量、注射技术及被接种者的个体因素有关^[6]。（2）淋巴结结核性脓肿常无红、热、肿、痛等表现。通常为单侧的、无痛的、质地中等的、增大或融合淋巴结，脓肿形成后可扪及波动感，少数淋巴结肿块直径可达 10 cm 以上。



图A、B、C 瑞氏染色 $\times 200$ 针吸细胞学涂片中，图A 无脓细胞；图B 脓细胞+；图C脓细胞++，背景均可见大量紫红色细颗粒状无结构坏死性物质。



图D、E 抗酸染色 $\times 1000$ 针吸细胞学涂片中查见抗酸杆菌（箭头所示）

3 讨论

淋巴结结核是一种最常见的肺外结核疾病。对于结核性脓肿，不宜盲目切开引流或做病理切片，对临床怀疑的淋巴结结核提倡做细针穿刺细胞学检查，否则会使创面不愈合而形成瘘管。FNAC 是一种简单、快速、痛苦小的细针吸引活检术，在国外已经作为颈部淋巴结结核病变检验受欢迎的方法，在国内仍未引起应有的重视^[2]。多数研究者根据患者病变淋巴结的细胞病理学特征将其分为增殖型和干酪型^[3-5]。增殖型淋巴结结核常出现典型的郎罕氏巨细胞或类上皮细胞，对于淋巴结结核具有特征性的 FNAC 诊断价值。但干酪型淋巴结结核细胞涂片中仅见到大量紫红色颗粒状坏死物，细胞少见、退变或无细胞成分。尤其伴液化坏死或合并感染时，常出现多少不等的脓细胞及纤维素样坏死物，与其它细菌引起的化脓性炎症难以区别。因此抗酸染色在针吸细胞学难以诊断的结核性脓肿检查中尤为重要。

虽然，仅根据细胞形态学难以对结核性脓肿做出明确诊断，但笔者根据多年细针吸取细胞学经验发现液化坏死期淋巴结结核脓肿具有以下特点，有助于结核性脓肿的筛选及细菌学送检。（1）淋巴结结核多发生于颈部、腋下，幼儿多发生于腋下。本组病例中，8例1岁以下幼儿均发生于腋下，且阳性检出率较高，可能与幼儿接种卡介苗的活力、剂量、注射技术及被接种者的个体因素有关^[6]。（2）淋巴结结核性脓肿常无红、热、肿、痛等表现。通常为单侧的、无痛的、质地中等的、增大或融合淋巴结，脓肿形成后可扪及波动感，少数淋巴结肿块直径可达10 cm以上。

本组病例中, 1 例 HIV 阳性患者肿块直径达 15cm 且有红、热、肿、痛的表现, 这可能与机体免疫状态有关。因此, 不能以肿块的大小、性状、位置作为淋巴结核的诊断依据, 只对诊断有参考作用。(3) 穿刺物常呈乳白色干酪样, 液化坏死时呈淡黄绿色脓样或豆腐渣样。(4) 细胞学涂片上, 可见紫红色细颗粒状无结构物质, 脓细胞较少见。合并其它感染者可见多少不等的脓细胞及纤维素样坏死物。(5) 可见少数退化的类上皮细胞。本组收集的 58 例脓肿病例符合以上 1 个或多个特点, 经临床资料证实, 42 例被确诊为结核性脓肿, 阳性率为 72.4%。因此可根据细针抽取脓液的大体性状、镜下坏死物的特点选取可疑病例进一步做其它相关性检查, 以明确结核的诊断, 将有利于结核的及时诊断及治疗。

FNAC 检查获取标本新鲜, 抽取脓液标本量大, 通常含菌量较多。因此针吸抽取物涂片直接涂片抗酸染色查抗酸杆菌是最简便、快捷、有效确诊淋巴结核的方法之一。Derese 等^[7]报道当针吸抽取物培养阴性时, 亦有 7.8% 的涂片抗酸染色阳性, 因涂片可发现死菌; 但其灵敏度低, 为 22.9%~40.8%^[7-9], 抗酸染色在未经过治疗者及 HIV 阳性者中阳性率较高^[10]。高绪锋等^[5]报道当 FNAC 提示为坏死型时, 与抗酸染色结果符合率达 94.73%。本组抗酸染色的阳性率阳性检出率为 61.9%, 8 例 1 岁以下儿童腋下脓肿针吸物中 7 例查见抗酸杆菌, 阳性检出率为 87.5%。因此, 对针吸细胞学发现的可疑脓肿, 特别是 HIV 阳性患者及幼儿腋下的脓肿, 抗酸染色检查阳性率高, 有助于淋巴结核的明确诊断和及时治疗。故 FNAC 结合抗酸染色对淋巴结核性脓肿诊断优势互补, 有重要的临床应用价值。

总之, FNAC 以其操作简便、使用安全、省时、痛苦小以及标本来源容易等优点著称。FNAC 抽吸到脓性包块, 缺乏诊断结核的特征性细胞时, 不宜简单做出“化脓性炎症”诊断, 应根据临床及细胞学特点筛选可疑病例做抗酸染色, 抗酸杆菌阳性检出率高。两者有效互补运用, 有利于淋巴结核性脓肿, 特别是幼儿腋下结核性脓肿的明确诊断。

参考文献

- [1] 韩水金, 朱苏宝. 细针针吸活检术诊断颈淋巴结核的临床应用价值[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(6): 739-740.
- [2] 宋燕, 范艳, 王乙. 细针穿刺细胞学在体表肿大淋巴结早期诊断中的应用价值[J]. 中国医疗前沿, 2010, 5(10): 56.
- [3] 刘奉春. 淋巴腺结核分期针吸细胞学的检验诊断[J]. 中华医学研究与实践, 2004, 2(8): 43.
- [4] 刘秀娜, 张华芬, 于海涛. 淋巴结核针吸细胞病理学对淋巴结核分型诊断的应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(2): 43-44.
- [5] 高绪锋, 张守永, 张松涛, 等. 细针穿刺细胞学与抗酸染色检验在淋巴结核诊断中的比较[J]. 检验医学, 2010, 25(12): 944-946.
- [6] 郑健. 新生儿接种卡介苗致淋巴结核 15 例分析[J]. 基层医学论坛, 2009, 13(2): 190-191.
- [7] Derese Y, Hailu E, Assefa T, et al. Comparison of PCR with standard culture of fine needle aspiration samples in the diagnosis of tuberculosis lymphadenitis [J]. J Infect Dev Ctries, 2012, 6: 53-57.
- [8] Sharma M, Sethi S, Mishra AK, et al. Efficacy of an in-house polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in patients with tubercular lymphadenitis: comparison with fine needle aspiration cytology and conventional techniques. Indian J Pathol Microbiol [J], 2010, 53: 714-717.
- [9] Iwnetu R, van den Hombergh J, Woldeamanuel Y, et al. Is tuberculous lymphadenitis over-diagnosed in Ethiopia? Comparative performance of diagnostic tests for mycobacterial lymphadenitis in a high-burden country [J]. Scand J Infect Dis, 2009, 41(6-7): 462-468.
- [10] Sinha SK, Chatterjee M, Bhattacharya S, et al. Diagnostic evaluation of extrapulmonary tuberculosis by fine needle aspiration (FNA) supplemented with AFB smear and culture [J]. J Indian Med Assoc, 2003, 101(10): 588, 590-591.

作者简介: 江涛, 女, 主管技师。Tel: 13655209985, E-mail: jiangtao1033@163.com

*赵利, 女, 主管技师, 通讯作者 E-mail: jczl@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

女性冠心病患病风险数学评价模型的建立与验证

冯磊 年士艳 徐文波 张兴锋 叶丹

玉溪市人民医院 检验科, 云南 玉溪 653100

[摘要] 目的: 尝试建立综合多个生理生化指标的数学评价模型, 提高女性 CHD 的诊断效能。**方法:** 通过相关性及 ROC 曲线分析, 明确与女性 CHD 密切关联的指标, 尝试建立数学评价模型, 通过 ROC 曲线确定诊断效能, 并在病人中进行重复性验证。**结果:** (1) 对照组与实验组间除 LDL、APOB 和 Lp(a) 外, 其余各指标均存在显著性差异; (2) 年龄、TG、HCY、GGT、HDL 和 APOA 与 CHD 具有很强的相关性; (3) 年龄、HCY、GGT、HDL、APOA 五个指标 ROC 曲线下面积大于 0.75; (4) 建立了 6 个数学评价模型, 其中模型 6 的 ROC 曲线下面积达到了 0.955; (5) 数学模型能在验证人群中被重复。**结论:** 通过建立包含了多个指标的数学评价模型, 能显著提升女性判断是否患 CHD 的诊断效能。

[关键词] 冠心病; 女性; 数学模型

Building and Confirming the Mathematical Model to Estimate the Occurrence of CHD in Female

Feng Lei, Nian Shi-yan, Xu Wen-bo, Zhang Xin-feng, Yue Dan. (1. Department of Laboratory, People's Hospital of YuXi City 653100, China)

[Abstract] Objective: Try to build mathematical estimation model which include lots of physiological and biochemical factors in order to improve the potency in diagnosing CHD for female. **Method:** Through the correlation analysis and ROC curve to confirm the factors which have signal relationship with CHD. To build mathematical estimation model, to value the effect by ROC curve and confirm the repeatability in patients. **Result:** (1) There are signal differences between test group and control group except LDL, APOB and Lp(a); (2) There is very strong relationship between CHD and age, TG, HCY, GGT, HDL, APOA; (3) ROC curve areas of age, TG, HCY, GGT, HDL, APOA are also larger than 0.75; (4) Having built six model and the area of sixth model has been up to 0.955; (5) The result of mathematical estimation model can be repeated in patients. **Conclusion:** The built mathematical estimation models which included some factors can significantly promote the potency in diagnosing CHD for female.

[Key words] Coronary Heart Disease; female; mathematical model

0 引言

前期大量研究已证实, 除了血脂类指标外, 很多生化指标如尿酸(UA)^[1-4]、同型半胱氨酸(HCY)^[5]、总胆红素(TBIL)^[6]、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)^[7-8]等均可能为冠心病(Coronary Heart Disease, CHD)的独立危险因素或与传统危险因素如年龄、性别、肥胖及体重指数等密切相关。已有研究还显示, 通过对不同指标进行整合, 如: LDL/(HDL+TBIL)或 LDL/HDL 在 CHD 危险因素中的重要性远高于其他单独指标。另外, 综合了 TBIL 结果的 LDL/(HDL+TBIL)比值与单纯血脂指标的 LDL/HDL 比值比较, 可极大提高诊断 CHD 的敏感性, 说明通过整合多项指标可提高对 CHD 的诊断效能, 如再增加一些独立危险因素形成新的数学模型, 是否能进一步提高诊断效能, 值得进一步研究。由于很多指标存在性别差异^[9-12], 故本次研究将从女性入手, 寻找与女性 CHD 发病相关的生化指标, 通过统计学分析, 建立综合多指标的数学评价模式, 提高常用生化指标对 CHD 的诊断效能。同时, 将建立的数学模型应用于临床, 积累一定数据后重新进行统计学分析, 以验证模型的有效性和可重复性。

1 材料与方法

1.1 建立数学模型所用研究对象

选择 2012 年 10 至 2014 年 5 月本院经冠状动脉造影证实的女性 CHD 患者 385 例为实验组, 选择同期健康体检女性 227 例为对照组。

1.2 验证数学模型所用研究对象

选择 2014 年 6 至 2015 年 6 月本院经冠状动脉造影证实的冠心病患者女性 68 例为实验组, 选择同期健康体检女性 128 例为对照组。

所有研究对象应排除各种感染、急慢性肝病、肾脏疾病、慢性消耗性疾病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病。

1.3 方法

所有样本均早晨空腹坐位采静脉血,采血前未作剧烈运动,标本无溶血、脂血、黄疸,当天测定完毕。检测所有样本的甘油三酯(TG)、TBIL、直接胆红素(DBIL)、GGT、胆固醇(CHO)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、UA、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、载脂蛋白 A(APOA)、载脂蛋白 B(APOB)、脂蛋白 a[Lp(a)]、HCY。德国罗氏 Cobas 8000 全自动生化分析仪使用配套试剂进行检测。质量控制使用罗氏公司配套的两个不同水平质控血清,采用多规则质量控制标准,每批次在控,承认检测结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 统计软件包,建立数据库。多样本均数间比较采用方差分析中均数的两两比较;两样本均数间比较采用成组资料 t 检验;各指标与患病与否的相关性采用双变量 Spearman 相关分析,各指标间的相关性采用双变量 Pearson 相关分析;通过 ROC 曲线下面积评价指标在患病与否或严重程度中的诊断效能。

1.5 模型建立的方法

根据各指标与患病与否或疾病严重程度的双变量 Spearman 相关系数结合各指标与患病与否或疾病严重程度的 ROC 曲线下面积选择建模指标,优先选择相关性强或 ROC 曲线下面积大的指标入模。其中与患病与否或疾病严重程度呈正相关的指标放在公式的分子部分,呈负相关的放在分母,方向相同指标间以乘法相连。

2 结果

2.1 指标统计学描述

直方图显示,各指标均为正态分布或近似正态分布,故均采用 $\bar{X} \pm SD$ 来描述。成组 t 检验结果发现,对照组与实验组间除 LDL、APOB 和 Lp(a) 外,其余各指标均存在显著性差异。详见表 1。

表 1 实验组与对照组生化指标统计

指标	实验组(385例)	对照组(227例)	t	P
年龄(岁)	65±9.0	43±10.4	-27.039	0.000
TG(mmol/L)	2.19±1.36	1.49±1.00	-6.736	0.000
CHO(mmol/L)	4.99±1.25	4.50±0.84	-5.229	0.000
HDL(mmol/L)	1.22±0.27	1.55±0.34	13.330	0.000
LDL(mmol/L)	2.80±0.94	2.67±0.72	-1.893	0.059
APOA(mmol/L)	1.31±0.24	1.59±0.24	14.218	0.000
APOB(mmol/L)	0.90±0.29	0.87±0.24	-1.124	0.261
Lp(a)(mg/L)	255±234	295±291	1.877	0.061
UA(umol/L)	326±88	283±61	-6.511	0.000
HCY(umol/L)	16.6±6.10	7.5±4.04	-19.942	0.000
TBIL(umol/L)	10.83±4.8	12.3±4.46	3.620	0.000
DBIL(umol/L)	3.61±1.84	3.2±1.30	-2.878	0.004
GGT(U/L)	47.9±42.8	22±24.6	-8.240	0.000
IBIL(umol/L)	7.22±3.87	9.0±3.35	5.891	0.000

2.2 各指标与是否患病的双变量相关分析

详见表 2。从表中可见,与是否患 CHD 呈正相关的指标有年龄、UA、CHO、TG、LDL、APOB、HCY、DBIL 和 GGT,其中年龄、TG、HCY 和 GGT 与是否患 CHD 具有很强的相关性(相关系数分别为 0.729、0.358、0.629 和 0.490);其余指标与是否患 CHD 呈负相关,其中 HDL、APOA 相关性较强(相关系数分别为-0.473 和-0.500)。而各指标之间,年龄与 HCY 有较强正相关(相关系数为 0.551);UA 与 HCY 存在一定相关性(相关系数为 0.326);CHO 与 LDL 和 APOB 存在明显正相关(相关系数分别为 0.762 和 0.731);TG 与 CHO 存在一定正相关(相关系数为 0.342),与 HDL 存在一定负相关(相关系数为-0.409);HDL 与 APOA 之间存在明显正相关(相关系数为 0.806);LDL 除与 CHO 呈明显正相关外,还与 APOB 存在明显正相关(相关系数为 0.725);APOB 与 CHO 和 LDL 存在明显正相关(相关系数分别为 0.731 和 0.725);Lp(a) 是个相对独立的指标,与其他指标间无明显相关性;TBIL、DBIL 和 IBIL 三项间相关性很强,其中, TBIL 和 IBIL 的相关系数达到 0.946;GGT 也是相对独立的指标,与其他指标间无明显相关性。

表2 各指标与是否患病的双变量相关分析

	诊断	年龄	UA	CHO	TG	HDL	LDL	APOA	APOB	LP	HCY	TBIL	DBIL	IBIL	GGT
诊断	1.000	0.729	0.245	0.218	0.358	-0.473	0.059	-0.500	0.024	-0.077	0.692	-0.178	0.115	-0.275	0.490
年龄	0.729	1.000	0.225	0.205	0.204	-0.368	0.161	-0.363	0.116	-0.052	0.551	-0.098	0.108	-0.170	0.269
UA	0.245	0.225	1.000	0.103	0.198	-0.192	0.056	-0.165	0.101	-0.100	0.326	-0.076	-0.012	-0.090	0.152
CHO	0.218	0.205	0.103	1.000	0.342	0.121	0.762	0.144	0.731	0.127	0.130	0.009	-0.086	0.049	0.097
TG	0.358	0.204	0.198	0.342	1.000	-0.409	-0.024	-0.134	0.321	-0.076	0.244	-0.031	-0.136	0.021	0.148
HDL	-0.473	-0.368	-0.192	0.121	-0.409	1.000	0.100	0.806	-0.060	0.126	-0.286	0.130	-0.036	0.178	-0.229
LDL	0.059	0.161	0.056	0.762	-0.024	0.100	1.000	0.075	0.725	0.155	0.024	0.007	-0.129	0.066	0.075
APOA	-0.500	-0.363	-0.165	0.144	-0.134	0.806	0.075	1.000	0.058	0.068	-0.338	0.100	-0.183	0.206	-0.246
APOB	0.024	0.116	0.101	0.731	0.321	-0.060	0.725	0.058	1.000	0.171	-0.012	0.044	-0.177	0.133	0.082
LP	-0.077	-0.052	-0.100	0.127	-0.076	0.126	0.155	0.068	0.171	1.000	-0.047	0.047	-0.046	0.079	-0.032
HCY	0.692	0.551	0.326	0.130	0.244	-0.286	0.024	-0.338	-0.012	-0.047	1.000	-0.095	0.112	-0.169	0.202
TBIL	-0.178	-0.098	-0.076	0.009	-0.031	0.130	0.007	0.100	0.044	0.047	-0.095	1.000	0.681	0.946	-0.054
DBIL	0.115	0.108	-0.012	-0.086	-0.136	-0.036	-0.129	-0.183	-0.177	-0.046	0.112	0.681	1.000	0.407	0.098
IBIL	-0.275	-0.170	-0.090	0.049	0.021	0.178	0.066	0.206	0.133	0.079	-0.169	0.946	0.407	1.000	-0.110
GGT	0.490	0.269	0.152	0.097	0.148	-0.229	0.075	-0.246	0.082	-0.032	0.202	-0.054	0.098	-0.110	1.000

注：计量资料使用Pearson相关分析，分类资料使用Speaman相关分析。

2.3 各指标与是否患病的ROC曲线及曲线下面积

结果分别见图 1-2 和表 3。可见在以下指标中有年龄(0.935)、HCY(0.914)、GGT(0.793)、HDL(0.783)、APOA(0.799)五个指标曲线下面积大于 0.75。

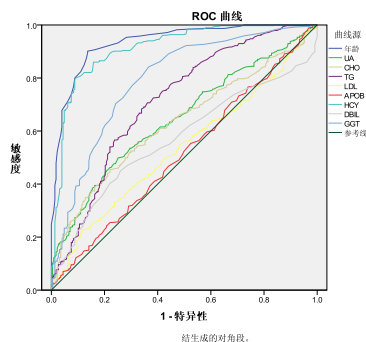


图1与是否患CHD呈正相关指标的ROC曲线

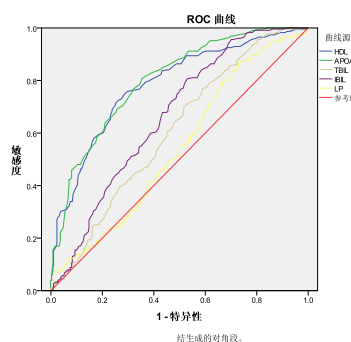


图2与是否患CHD呈负相关指标的ROC曲线

表3 各指标与是否患CHD的ROC曲线下面积

检验结果变量	面积	标准误差	渐进 Sig.b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
年龄	0.935	0.010	0.000	0.916	0.955
UA	0.646	0.022	0.000	0.603	0.690
CHO	0.630	0.022	0.000	0.586	0.674
TG	0.714	0.022	0.000	0.670	0.757
LDL	0.535	0.024	0.147	0.489	0.581
APOB	0.514	0.024	0.556	0.467	0.561
HCY	0.914	0.012	0.000	0.890	0.938
DBIL	0.568	0.023	0.005	0.523	0.614
GGT	0.793	0.019	0.000	0.755	0.831
HDL	0.783	0.019	0.000	0.745	0.821
APOA	0.799	0.018	0.000	0.764	0.834
TBIL	0.606	0.023	0.000	0.561	0.651
IBIL	0.665	0.022	0.000	0.622	0.707
LP	0.544	0.024	0.067	0.498	0.591

2.4 是否患病评估模型建立及性能评价。

共建立了 6 组评估模型,分别为:模型 1--年龄*UA*CHO*TG*LDL*APOB*GGT*HCY/(HDL*APOA*TBIL*IBIL), 模型 2--年龄*CHO*TG*UA* GGT*HCY/(HDL*APOA*TBIL*IBIL), 模型 3--年龄*CHO*TG* GGT*HCY/(HDL*APOA*TBIL*IBIL), 模型 4--年龄*CHO*TG* GGT*HCY/(HDL*APOA* IBIL), 模型 5--年龄 *TG*UA* GGT*HCY/(HDL*APOA* IBIL), 模型 6--年龄*CHO*UA* GGT*HCY/(HDL*APOA* IBIL)。ROC 曲线及曲线下面积见图 3 和表 4。从图表中可见模型 6 曲线下面积最大, 具有最高的诊断效能, 计算得出该模型正确指数最高值为: 0.792, 此时的特异度为: 0.885, 灵敏度为 0.906, CUT OFF 值为: 1263810。

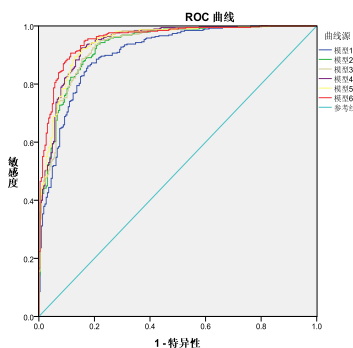


图3 数学评估模型ROC曲线

表4 数学评估模型ROC曲线下面积

检验结果变量	面积	标准误差	渐进 Sig.b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
模型1	0.907	0.012	0.000	0.883	0.932
模型2	0.932	0.011	0.000	0.911	0.952
模型3	0.933	0.010	0.000	0.913	0.954
模型4	0.943	0.010	0.000	0.924	0.962
模型5	0.944	0.010	0.000	0.925	0.962
模型6	0.955	0.008	0.000	0.939	0.971

2.5 数学评估模型结果验证

在模型建立以后,按模型建立的要求,另外随机选择了 128 例对照组人群, 68 例病例组人群, 建立数据库, 用于验证是否患 CHD 评估模型(6 个模型)的可重复性。ROC 曲线及曲线下面积见图 4 和表 5。

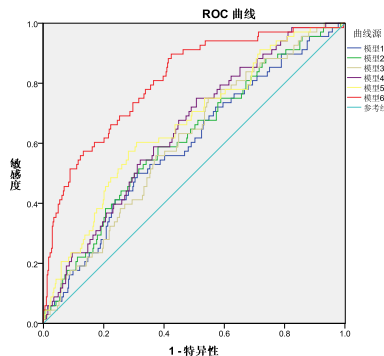


图4 验证数学评估模型的 ROC 曲线

表5 验证数学评估模型的ROC曲线下面积

检验结果变量	面积	标准误差	渐进 Sig.b	渐近 95% 置信区间	
				下限	上限
模型1	0.595	0.037	0.012	0.522	0.668
模型2	0.616	0.036	0.002	0.544	0.687
模型3	0.607	0.035	0.005	0.539	0.676
模型4	0.646	0.034	0.000	0.580	0.712
模型5	0.661	0.035	0.000	0.592	0.731
模型6	0.807	0.029	0.000	0.751	0.863

3 讨论

作为最常见的心血管疾病，CHD最有效的预防策略是“高危策略”(只针对高危的患者)和“人群策略”(针对全人群)同时并举。因此，及时发现并管理高风险人群是该病预防的关键步骤^[13]。研究表明，危险因素常常出现或聚集在同一个人身上，其致病作用协同放大，加速了疾病进程。因此在CHD防治中必须有全局观点，在发现一种危险因素时，要主动寻找有无其他危险因素。对于并存的危险因素必须关注，并予以积极的干预，才能取得最佳的防治效果。同时，CHD是一种复杂的多因素疾病，单个因素的诊断效能有限，故本次研究首先需要通过大样本分析明确各指标与CHD及各指标间的相关性强弱，进而探讨联合多种因子，通过建立数学评价，提高对CHD的诊断效能。

本次研究结果发现，女性人群中传统公认的3个血脂指标LDL、APOB和Lp(a)病例组和对照组间均无显著性差异，其余11个指标病例组和对照组间均存在显著性差异，这11个指标可能均与CHD有一定相关性。在相关的11个指标中，年龄、UA、CHO、TG、LDL、APOB、HCY、DBIL和GGT与CHD呈正相关，其中年龄、TG、HCY和GGT与CHD具有较强正相关性(相关系数分别为0.729、0.358、0.629和0.490)，与已有认知或研究结果一致；其余指标与CHD呈负相关，其中HDL、APOA相关性较强(相关系数分别为-0.473和-0.500)，也与已有认知或研究结果一致。本次研究结果证实GGT、UA升高与胆红素降低在女性人群中均与CHD相关，与已有研究结果^[1-4,14,15]一致。

各指标与CHD相关性结果与ROC曲线下面积的结果非常一致，ROC曲线下面积最大(>0.75)的五个指标年龄(0.935)、HCY(0.914)、APOA(0.799)、GGT(0.793)、HDL(0.783)所对应的Spearman相关系数的绝对值也最大(分别为0.729、0.692、0.500、0.490、0.473)，同时，对应病例组与对照组间均值间比较的t值的绝对值也最大(27.039、19.942、14.218、8.240、13.330)。

以上两部分结果均证实，女性人群中年龄、HCY、APOA、GGT、HDL与CHD的发生关系最为密切，可作为数学评价模型建立的首选指标。

而3个传统血脂指标是否真与CHD无关？初步分析，首先，本次所选病例组不能保证均为初诊病人，故可能部分病人之前已诊断为CHD，并进行过相应治疗。而针对血脂异常的治疗，是《中国心血管病预防指南》^[28]中的核心内容，故部分病例组APOB、LDL和Lp(a)甚至部分UA测定值已为治疗后的，未能反映原始状况，从而影响到整个病例组均值水平；另外，本次所选对照组平均年龄低于病例组，而年龄又是CHD发生的一个重要因素，故对照组中肯定有潜在的CHD患者，由于健康意识、各种社会因素影响，这部分人群可能未进行过相关干预和治疗，能够真实反映患病前的原始状态。在以上两个主要因素的共同影响下，可能就出现了上述与传统结果不一致的情况。具体原因还需进一步研究确认，在对传统指标的运用上，也提出了一些新的思考。

根据以上积结果，依照模型建立方法，共建立了6组模型，其中模型6具有最大的ROC曲线下面积。分析模型6入选的几个指标发现，除CHO外，其余各指标均为相关系数绝对值或ROC曲线下面积排名最靠前的，符合模型建立方法。而从验证结果来看，在验证人群中同样是模型6具有最大的ROC曲线下面积，且6个模型在趋势性方面也非常一致，说明模型建立方法具有高度可重现性，结果真实可靠，具有可推广性。但由于验证人群标本量，特别是病例组偏少，ROC曲线下面积有一定差距，将在今后工作中通过扩大样本以进一步验证和完善。

综上所述，通过本次研究，全面深入探讨了各常用生化指标与CHD相关性，明确了各指标特别是一些非传统项目如：GGT、TBIL、IBIL、UA等在CHD诊疗中的价值。本次研究所确定的数学评估模型，虽来源于最常用的生

理生化指标,但在经过一定组合后,却能大大提升判断是否患 CHD 的诊断效能,而本模型的建立和使用简单,结果较为可靠,可操作性很强,具有一定的临床运用价值。

本研究也存在一些缺陷或不足,如:入选病例数及指标有限,女性入选人群均未考虑更年期前后激素水平等影响,故代表性方面存在欠缺,导致部分研究结果与已有研究存在一定差异,故得出的结论或假设可能会存在偏颇。今后将与临床医生密切配合,在研究对象选择、影响因素排除等方面进一步细化和完善,扩大研究因素。同时,由于本次研究为探索性研究,而研究者为非专业统计人员,在统计方法选择,特别是模型建立及评价方面存在极大欠缺。下一步将与专业医学统计人员合作,使在数学模型建立和验证方法选择和评价方面更专业。另外,CHD 是一种多因素疾病,除与各种生理生化指标有关外,还与遗传背景关系密切^[16-17],故今后的研究中还将纳入一些遗传易感性因子,使结果更加完善。

参考文献

- [1] Kackov S, Simundic' AM, Nikolac N, et al. The association of uric acid with glucose and lipids in general population: Croatian cross-sectional study [J]. *Coll Antropol*, 2011, 35: 1055-1059.
- [2] Loeffler LF, Navas-Acien A, Brady TM, et al. Uric acid level and elevated blood pressure in US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006 [J]. *Hypertension*, 2012, 59: 811-817.
- [3] Turak O, Ozcan F, Tok D, et al. Serum uric acid, inflammation, and nondipping circadian pattern in essential hypertension [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2013, 15: 7-13.
- [4] De Luca G, Secco GG, Santagostino M, et al. Uric acid does not affect the prevalence and extent of coronary artery disease. Results from a prospective study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2012, 22: 426-433.
- [5] Wood D, Joint European Societies Task Force. Established and emerging cardiovascular risk factor [J]. *Am Heart J*, 2001; 141(2): 49-57.
- [6] Bosma PJ, van der Meer IM, Bakker CT. UGT1A1*28 allele and coronary heart disease: the Rotterdam Study [J]. *Clin Chem*, 2003; 49(7): 1180-1.
- [7] Mason JE, Starke RD, Van Kirk JE. Gamma-glutamyltransferase: a novel cardiovascular risk biomarker [J]. *Prev Cardiol*, 2010, 13 (1): 36-41.
- [8] Fraser A, Harris R, Sattar N, et al. Lawlor transferase is associated with incident vascular events independently of alcohol intake: analysis of the British Women's Heart and Health Study and Meta-Analysis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (12): 2729-735.
- [9] 冯磊, 年士艳, 徐文波, 等. 胆红素随年龄及性别变化趋势分析 [J]. *医学信息*, 2011, 24(4): 1980-1981.
- [10] 冯磊, 年士艳, 山德生, 等. 玉溪市红塔区健康人群血清 UA 参考区间确定 [J]. *医学检验与临床*, 2011, 22(2): 86-87.
- [11] 冯磊, 年士艳, 徐文波, 等. 血清尿酸随年龄及性别变化趋势分析 [J]. *现代诊断与治疗*, 2011, 22(2): 65-67.
- [12] 冯磊, 年士艳, 徐文波, 等. γ -谷氨酰转移酶随年龄及性别变化趋势分析 [J]. *临床荟萃*, 2011, 26(7): 615-617.
- [13] Ministry of Health and other 15 ministries. On the issuance of the notice "Chronic diseases prevention and control work plan (2012 - 2015)". *Methodist CDC [2012] 34*. (in Chinese) 卫生部等 15 部委. 关于印发《中国慢性病防治工作规划(2012—2015年)》的通知. *卫疾控发(2012)34号*.
- [14] 李刚, 陆卫华, 方庆, 等. 血清 γ -谷氨酰转移酶水平预测 2 型糖尿病成人冠状动脉钙化进展 [J]. *临床心血管病杂志*, 2014, 30(3): 258-262.
- [15] 史连义, 周志伟, 田雪梅, 等. 冠心病患者血清总胆红素水平的 meta 分析 [J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(4): 1368-1370.
- [16] Lei Feng, Shi-yan Nian, Jihong Zhang. The GG genotype of telomerase reverse transcriptase at genetic locus rs2736100 is associated with human atherosclerosis risk in the Han Chinese population. *PLOS ONE*. 2014, 9(1): e85719.
- [17] Lei Feng, Shi-Yan Nian, Ying-Lu Hao, Wen-Bo Xu, Dan Ye, Xing-Feng Zhang, Dan Li, Lei Zheng. A Single Nucleotide Polymorphism in the Stromal Cell-Derived Factor 1 Gene Is Associated with Coronary Heart Disease in Chinese Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 11054-11063.

[基金项目]: 云南省教育厅一般项目(2011C083)

[作者简介]: 冯磊, 博士, 昆明医科大学硕士研究生导师, 副主任技师, 玉溪市人民医院检验科主任, 研究方向为心血管疾病的实验室诊断。地址: 云南省玉溪市红塔区聂耳路21号玉溪市人民医院检验科, 电话: 13887770272, E-mail: fngj2004@163.com。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

妊娠糖尿病患者血清超氧化物歧化酶、C反应蛋白、同型半胱氨酸、胱抑素 C 检测的意义

陈兴明¹, 高娇¹, 刘春雷, 田路, 李丹, 敬华*, 丁浩, 张侠, 杨晋德

中国人民解放军第306医院检验科, 100101

[摘要]目的: 探讨超氧化物歧化酶(SOD)、C反应蛋白(CRP)、同型半胱氨酸(Hcy)、胱抑素 C(CysC)在妊娠糖尿病(GDM)患者血清中的变化。**方法:** 根据75g葡萄糖筛查试验将妊娠妇女分为正常妊娠组和妊娠糖尿病组, 检测2组受试者血清SOD、CRP、Hcy、CysC水平, 并进行比较。**结果:** 2组受试者血清空腹血糖(FBG)、SOD、CRP、Hcy、CysC水平比较, 差异具有统计学意义($p < 0.05$)。其中GDM组CRP、Hcy、CysC水平均高于正常妊娠组, Hcy与CysC呈正相关($r=0.461, p < 0.05$); 但SOD水平降低, SOD与FBG呈负相关($r=-0.494, p < 0.05$)。**结论:** 血清SOD、CRP、Hcy、CysC水平均与GDM的发生有关, 可以作为GDM的监测指标, 并且Hcy与CysC的共同作用可能与GDM的发生发展密切相关。

[关键词] 妊娠糖尿病; 超氧化物歧化酶; C反应蛋白

The Significance of Superoxide dismutase, C-reactive protein, Homocysteine and Cystatin C in Gestational Diabetes Mellitus Patients Serum

Jiao Gao¹, Xingming Chen¹, Chunlei Liu, Lu Tian, Dan Li, Hua Jing², Hao Ding, Xia Zhang, Jinde Yang

1: These authors contributed equally to this study.

2: Corresponding author. E-mail: jinghua6379@163.com

Clinic Laboratory Department of the 306th Hospital of PLA; 100101

[Abstract]Objective: To explore the changes of Superoxide dismutase(SOD),C-reactive protein (CRP),Homocysteine (Hcy) and Cystatin C (CysC) level in the serum of gestational diabetes mellitus patients (GDM). **Method:** According to oral glucose 50g screen test, pregnant women were divided into normal pregnant group and gestational diabetes group. The levels of Fasting blood glucose (FBG), SOD, CRP, Hcy and CysC in serum were detected. Comparison between the two groups was made. **Results:** Statistically significant difference between the two groups was observed($p < 0.05$). The levels of CRP, Hcy and CysC in gestational diabetes group were significantly higher than normal pregnant group, and there is positive correlation between Hcy and CysC($r=0.461, p < 0.05$). But the level of SOD decreased, and there is negative correlation between SOD and FBG($r=-0.494, p < 0.05$). **Conclusion:** The levels of serum SOD, CRP, Hcy, CysC were associated with the occurrence of GDM, and can be the monitoring indicators of patients with GDM. The joint effects of Hcy and CysC may relate to the development and progression of GDM.

[Key words] gestational diabetes mellitus; Superoxide dismutase; C-reactive protein

妊娠糖尿病(GDM)是指妊娠前糖代谢正常, 妊娠期才出现的糖尿病。目前中国约有1.31-3.75%的妇女在妊娠期发生血糖偏高或糖尿病, 并呈逐年上升趋势^[1]。GDM对妊娠、分娩、及胎儿都有极大的危害, 已广泛引起临床和科研工作者关注, 但其病因及发病机制尚未完全明确。最近研究发现, 糖尿病可能是炎症因子介导的炎症反应性疾病^[2], 可以引起血管病变, 而Hcy和CysC都是与血管病变密切相关的指标^[3-4]。因此, 本研究检测分析在GDM患者血

清中SOD、CRP、Hcy、CysC水平的变化,为临床干预提供参考。

1 资料与方法

1.1 研究对象

正常妊娠组:24人,年龄24-37岁,平均(30.29±3.00)岁;GDM组:20人,年龄23-36岁,平均(31.85±3.65)岁。两组均为我院产科门诊同期病人,GDM经临床确诊。75g OGTT的诊断标准:空腹及服糖后1、2小时的血糖值分别为5.1mmol/L、10.0 mmol/L、8.5 mmol/L。任何一点血糖值达到或者超过上述标准即诊断为GDM,确诊后服用降糖药物使血糖达到控制标准。两组均无心、肝、肺、肾等重要脏器疾病,近期无炎症及自身免疫性疾病。

所有研究对象于晨起空腹采集肘部静脉血液样本,4℃,3000r/min,离心15分钟,分离血清,于-70℃冷冻保存。

1.2 试剂、方法和仪器

采用免疫透射比浊法检测CRP,试剂盒为四川迈克生物科技股份有限公司产品,批号:1113041;采用比色法检测SOD,试剂盒为北京华宇亿康生物工程技术有限公司产品,批号:130618;采用酶循环法检测Hcy,试剂盒均为北京利德曼生化有限公司产品,批号:312051K;免疫比浊法检测CysC,试剂盒均为北京利德曼生化有限公司产品,批号:306283E。

仪器采用日立7600自动生化分析仪,均根据说明书要求进行检测。

1.3 统计学方法

采用SPSS 19.0软件处理数据。所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析,两两比较采用t检验。两个变量间的关系采用Pearson法分析。 $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组SOD、CRP、Hcy、CysC水平比较

两组FBG、SOD、CRP、Hcy、CysC水平比较。发现:GDM组FBG、CRP、Hcy、CysC水平高于正常妊娠组,差异具有统计学意义($p < 0.05$)。而正常妊娠组SOD高于GDM组,差异具有统计学意义($p < 0.01$)。详见表1。

表1 两组FBG、SOD、CRP、HCY、CysC比较

组别	FBG(mmol/L)	SOD(U/ml)	CRP(mg/L)	HCY(umol/L)	CysC(mg/L)
正常妊娠组(n=24)	3.56±0.36	194.58±10.43	11.77±2.02	6.14±0.82	0.89±0.09
妊娠糖尿病组(n=20)	4.19±0.65 ^{**}	180.10±12.19 ^{**}	14.01±1.88 ^{**}	6.67±0.77 [*]	0.99±0.13 ^{**}

^{**}与对照组比较, $p < 0.01$;^{*}与对照组比较, $p < 0.05$

2.2 GDM组各检验指标相关性分析

对GDM组各检验指标进行相关性分析,结果发现,FBG与CysC呈正相关($r=0.461$, $p < 0.05$),与SOD呈负相关($r=-0.494$, $p < 0.05$);HCY与CysC呈正相关($r=0.461$, $p < 0.05$),见表2。CRP与各检测指标间无明显相关性($p > 0.05$)。

表2 GDM组FBG、SOD、CRP、HCY、CysC相关性分析

指标	FBG	SOD	CRP	HCY	CysC
FBG	1	-0.494 [*]	-0.076	0.160	0.461 [*]
SOD	-0.494 [*]	1	0.249	0.173	-0.312
CRP	-0.076	0.249	1	0.154	-0.204
HCY	0.160	0.173	0.154	1	0.461 [*]
CysC	0.461 [*]	-0.312	-0.204	0.461 [*]	1

^{*} $p < 0.05$

3 讨论

SOD是人体内生性氧自由基清除剂,对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用。糖尿病患者因为血糖的持续升高引起蛋白质的糖化,同时葡萄糖的自发氧化也产生氧自由基,使患者体内氧自由基增加^[5-6]。自由基在体内的大量

积累,引起组织细胞的损害和功能缺失,从而导致各类并发症。本研究中GDM组SOD水平明显低于正常妊娠组($p < 0.05$),提示机体自由基的生成超过了SOD的清除能力。这可能与GDM引起的糖尿病并发症密切相关(主要原因是胎盘滋养细胞两种糖载体GLUT-1和SGLT-2的mRNA基因表达下调有关^[7])。虽然本研究中FBG与SOD呈负相关($r=-0.494, p < 0.05$),但对于机体能否存在应激反应或者反弹效应,过多的自由基能否诱导更多的SOD的释放尚不明确。

CRP是一种急性时相反应蛋白,能诱导胰岛素抵抗的发生^[8],而胰岛素抵抗、胰岛素敏感性降低则会抑制胰岛素的生理作用,进一步导致CRP的合成增加,从而加重机体胰岛素抵抗程度。胰岛素抵抗可引起体内对葡萄糖摄取和氧化减少,导致患者出现高血糖等变化,从而促进GDM的发生与发展。本研究中GDM组CRP水平明显高于正常妊娠组($p < 0.05$)。提示CRP可能参与了GDM的发生发展。

Hcy是一种含硫氨基酸,在体内主要通过再甲基化和转硫途径代谢。正常血清中Hcy水平有赖于细胞内Hcy吸收和代谢的动态平衡,其代谢过程依赖于蛋氨酸合成酶、亚甲基四氢叶酸还原酶等酶和叶酸、维生素B6、维生素B12等辅助因子。任何原因引起的血清叶酸、维生素B12和维生素B6水平降低均可通过影响再甲基化过程而影响血清Hcy水平。GDM患者高血糖引起的过度排尿可以叶酸、水溶性B族维生素丢失,是引起高Hcy血症的重要原因之一^[9]。研究中GDM组Hcy水平明显高于正常妊娠组($p < 0.05$)。

CysC作为一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,可抑制Hcy分解过程中的酶,升高Hcy水平。高Hcy能诱导过氧化氢产生,自由基活性增加,具有直接的细胞毒性作用,直接损伤血管内皮功能。CysC与Hcy、组织蛋白酶等相互作用,在血管损伤过程中起重要作用^[10]。本研究结果显示,GDM组CysC水平明显高于正常妊娠组($p < 0.05$),同时CysC与Hcy呈正相关($r=0.461, p < 0.05$)。这提示两者与GDM的发生发展密切相关,并且可能具有协同作用。但CysC和Hcy是否通过特异性的损害GDM患者的微血管促进GDM的发生发展还是未知的,尚需进一步研究。

GDM是严重影响母婴健康的妊娠并发症,寻找早期预警指标并予以合适的干预治疗对于预防GDM发生具有重要意义,本研究发现GDM患者SOD降低、CRP升高、Hcy和CysC均升高,说明GDM患者存在血管或其他部位炎症反应,且超氧化物清除不足,而CysC升高可能是引起血管损伤和氧自由基增加的原因之一,因此SOD、CRP、Hcy和CysC可以作为GDM的预警指标,给予相关药物早期干预治疗有能够预防GDM的发生和发展。

参考文献

1. 王君,李红星,郭淑芹.妊娠糖尿病的研究进展[J].医学综述,2012,18(3):429-431.
2. D'Anna R, Baviera G, De Vivo A, et al. C-reactive protein as an early predictor of gestational diabetes mellitus[J]. J Reprod Med, 2006, 51(1):55-58.
3. Reece EA, Homke C, Wizntzer A. Metabolic changes in diabetic and nondiabetic subjects during pregnancy[J]. Obstet Gynecol Surv, 1994, 49(1):64-71.
4. 孙承军.高同型半胱氨酸血症研究进展[J].实用心脑血管病杂志,2010,18(7):1008.
5. Zeigler D, Sohr CGH, Zadeh JN. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy[J]. Diabetes Care, 2004, 27(6):2178.
6. 金镇,迟鑫洙.血糖控制满意的妊娠期糖尿病孕妇血清性激素结合球蛋白水平与妊娠结局的关系[J].中华妇产科杂志,2011,46(6):422-426.
7. 肖文霞,马秀菊.超氧化物歧化酶与妊娠[J].国外医学妇幼保健分册,2005,16(5):282-285.
8. Li Hong, ZHU Xin, WANG An, et al. Co-effect of insulin resistance and biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction on hypertension[J]. Hypertens Res, 2012, 35(5):513-517.
9. 冯允健,张莹.妊娠糖尿病患者血清同型半胱氨酸、胱抑素C、CRP水平的变化与意义.中外医学研究,2014,12(2):49-50.
10. 陈治奎,葛长江,胡申江.胱抑素C与心血管疾病的联系[J].生理科学进展,2003,34(3):269-271.

通讯作者: 敬华 E-mail: jinghua6379@163.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

5 种抗菌药物与舒巴坦对临床分离 44 株鲍曼不动杆菌体外联合药敏试验

周梦兰^{1,2} 王瑶¹ 程敬伟¹ 侯欣¹ 徐志鹏¹ 徐英春¹ 赵玉沛³

1.中国医学科学院北京协和医院检验科,北京 100730; 2.中国医学科学院北京协和医学院研究生院,北京 100730;
3.中国医学科学院北京协和医院基本外科,北京 100730)

[摘要] 目的:观察头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、粘菌素单药及其与舒巴坦联合用药时对鲍曼不动杆菌的体外抗菌作用。方法:选取 2011 年-2012 年 SMART 监测美罗培南耐药鲍曼不动杆菌 23 株、美罗培南敏感鲍曼不动杆菌 21 株,采取棋盘稀释法进行联合药敏试验,计算部分抑菌浓度(FIC)指数判定联合效应。结果:所有联合用药效应均未出现拮抗作用,头孢哌酮、替加环素与舒巴坦联合应用对鲍曼不动杆菌的抗菌效应以协同作用为主,FIC 指数 ≤ 0.5 的菌株分别达 56.8%及 50.0%;亚胺培南、粘菌素与舒巴坦联合应用对鲍曼不动杆菌的抗菌效应主要表现为协同和部分协同作用,FIC 指数 < 1 的菌株分别占 61.4%和 52.3%;头孢他啶和舒巴坦联合应用则主要表现为无关作用,FIC ≥ 4 的菌株占 63.6%。在对美罗培南耐药的鲍曼不动杆菌中,亚胺培南、替加环素与舒巴坦联合用药协同作用率较高,FIC 指数 ≤ 0.5 的菌株分别达 56.5%及 69.6%。结论:五种联合用药组合中,头孢哌酮与舒巴坦联合用药的体外协同作用效果最好,尤其对碳青霉烯敏感的鲍曼不动杆菌,可增强其体外抗菌活性;亚胺培南、替加环素与舒巴坦联合用药可增加对碳青霉烯耐药的鲍曼不动杆菌的体外抗菌活性。临床对碳青霉烯耐药鲍曼不动杆菌引起的院内感染,可考虑联合应用亚胺培南/舒巴坦、替加环素/舒巴坦进行治疗。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;棋盘稀释法;体外联合药敏试验;舒巴坦

In vitro synergy test of five kinds of antibiotics with sulbactam against 44 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* Menglan Zhou, Yao Wang¹, Jingwei Cheng¹, Xin Hou¹, Zhipeng Xu¹, Yingchun Xu¹, Yu-pei Zhao².

1. Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Corresponding author: Xu Yingchun, Email: xycpumch@139.com

[Abstract] OBJECTIVE: To study the in vitro synergy activity of sulbactam combined with cefoperazone, ceftazidime, imipenem, tigecycline and colistin against clinical isolated *Acinetobacter baumannii*. **METHODS:** The minimal inhibitory concentrations (MICs) and in vitro synergy activities of the study antibiotics against 44 strains of *A. baumannii* (23 carbapenems-resistant strains and 21 carbapenems-sensitive strains) isolated during 2011-2012 was determined through broth microdilution and checkerboard methods. The fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated to determine the combined effect of the antibiotics. **RESULTS:** No antagonism effect was observed in all the combinations. The combinations of cefoperazone/sulbactam and tigecycline/sulbactam showed mainly synergic effects on *A. baumannii* with a percentage of 56.8% and 50.0% respectively; the combination of imipenem/sulbactam and colistin/sulbactam revealed mostly synergic or partial synergic effects with a percentage of 61.4% and 52.3% respectively, while the combination of ceftazidime/sulbactam mainly manifested as irrelevant effect with a percentage of 63.6%. For carbapenems-resistant *A. baumannii*, the

combination of imipenem /sulbactam and tigecycline /sulbactam exhibited an excellent synergic effect with a percentage of 56.5% and 69.6% in total. **CONCLUSIONS:** Cefoperazone/sulbactam is recommended for the treatment of carbapenms-sensitive *A. baumannii*, while imipenem /sulbactam and tigecycline /sulbactam could be suggested for the treatment of infections due to carbapenms-resistant *A. baumannii*.

[Key words] *Acinetobacter baumannii*, checkerboard microdilution method, in vitro combining drug susceptibility test, sulbactam

鲍曼不动杆菌是引起院内感染的重要病原菌, 可以引起呼吸机相关性肺炎、败血症等严重的、甚至致死性的感染。碳青霉烯类抗菌药物是目前所使用的主要抗不动杆菌的抗菌药物, 但随着碳青霉烯类的广泛使用, 鲍曼不动杆菌耐碳青霉烯类抗菌药物的报道日益增多。据中国细菌耐药监测网 (CHINET) 监测结果显示, 2014 年不动杆菌属 (鲍曼不动杆菌占 93.0%) 对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别为 62.4% 和 66.7%, 与 2013 年相比, 鲍曼不动杆菌中广泛耐药株的检出率有所上升 [1-2]。随着鲍曼不动杆菌耐药情况的日益严重, 多重耐药株的感染暴发已屡见不鲜, 单种药物已经很难治疗多重耐药鲍曼不动杆菌引起的感染。临床对于多重耐药鲍曼不动杆菌或者泛耐药鲍曼不动杆菌感染治疗常常需要两药联合方案, 甚至三药联合方案 [3]。但是对两种及以上抗菌药物的联合应用效果如何, 目前尚缺乏足够的药敏实验依据支持, 而且对一些经验联合用药效果, 实际的药敏结果却未必能够支持 [4]。本研究根据临床用药经验及原则, 对 2011 年-2012 年抗菌药物耐药趋势监测研究 (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends, SMART) 的部分菌株进行体外联合药敏实验, 探讨头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、粘菌素与舒巴坦联合用药对鲍曼不动杆菌的抗菌效应, 以期为临床联合用药治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

选取 2011 年-2012 年 SMART 监测美罗培南耐药 (MRA) 鲍曼不动杆菌 23 株、美罗培南敏感鲍曼不动杆菌 (MSA) 21 株, 均来自无菌部位, 其中胆汁来源的 15 株, 中段尿来源的 11 株, 腹水来源的 8 株, 胰腺来源的 6 株, 肝脏来源的 2 株, 脾脏及胸腔来源的各 1 株。SMART 研究入选标准为从中国 21 家医院选取来自无菌部位的连续非重复院内分离株。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922 及铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.1.2 培养基和试剂

细菌培养所用血琼脂平板购自英国 Oxoid 公司, 头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、粘菌素、舒巴坦抗生素标准品, 均购自中国食品药品检定研究院, MH 肉汤干粉购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 单药最低抑菌浓度 (MIC) 测定

依照 CLSI M07-A9 [4] 推荐的方法进行微量肉汤稀释法测定 6 种抗菌药物对 44 株鲍曼不动杆菌的 MIC 值。

1.2.2 棋盘法测定各抗生素组合的联合抑菌效应

所有抗菌药均先配制 5mg/mL 贮备液, 头孢哌酮、头孢他啶抗生素标准粉用 DMSO+水溶解, 亚胺培南、替加环素、粘菌素、舒巴坦均直接加水溶解。将头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、粘菌素、舒巴坦贮备液以灭菌的 MH 肉汤进行倍比稀释, 头孢哌酮、头孢他啶分别形成 512 μ g/mL - 0.5 μ g/mL 的 11 个浓度及 1024 μ g/mL - 0.5 μ g/mL 的 12 个浓度。亚胺培南、替加环素最终形成 512 μ g/mL - 0.25 μ g/mL 的 12 个浓度, 粘菌素和舒巴坦分别形成 256 μ g/mL - 0.125 μ g/mL 的 12 个浓度及 64 μ g/mL - 0.5 μ g/mL 的 8 个浓度。将配好的不同浓度的两种抗菌药物按棋盘法设计两两组合加入 96 孔平板中, 每种药物各 25 μ l, 再加入 50 μ l 接种菌悬液 (1×10^6 CFU/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 读取结果并记录单独用药时的最低抑菌浓度 (MIC 甲药单用和 MIC 乙药单用), 并选择最佳组合效应时两药联用时各自的 MIC 值 (MIC 甲药联用和 MIC 乙药联用), 以计算部分抑菌浓度 (FIC) 指数。

1.2.3 判读结果

MIC 值的判读结果按照 CLSIM100-S24 [5] 执行, 通过计算 FIC 指数判断相互作用。FIC = MIC_{甲药联合} / MIC_{甲药单用} + MIC_{乙药联合} / MIC_{乙药单用}, FIC 指数为 ≤ 0.5 、 $> 0.5 \sim 1$ 、 $= 1$ 、 $> 1 \sim 4$ 、 ≥ 4 时分别表示协同、部分协同、相加、无关、拮抗作用。

2 结果

2.1 44 株鲍曼不动杆菌的联合药敏试验结果

见表 1。

表 1. 鲍曼不动杆菌对粘菌素、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、头孢哌酮与舒巴坦联合作用情况

药物 [□]		协同株数 (FIC≤0.5) [□]	百分 率 [□]	部分协同株数 (0.5<FIC<1) [□]	百分 率 [□]	相加株数 (FIC=1) [□]	百分 率 [□]	无关株数 (1<FIC<4) [□]	百分 率 [□]	拮抗株数 (FIC>=4) [□]	百分 率 [□]
	总数 (44) [□]	7 [□]	15.9% [□]	16 [□]	36.4% [□]	5 [□]	11.4% [□]	16 [□]	36.4% [□]	0 [□]	0 [□]
粘菌素 [□]	碳青霉烯敏感 (21) [□]	3 [□]	14.3% [□]	3 [□]	14.3% [□]	2 [□]	9.5% [□]	13 [□]	61.9% [□]	0 [□]	0 [□]
	碳青霉烯耐药 (23) [□]	4 [□]	17.4% [□]	13 [□]	56.5% [□]	3 [□]	13.0% [□]	3 [□]	13.0% [□]	0 [□]	0 [□]
	总数 (44) [□]	6 [□]	13.6% [□]	2 [□]	4.5% [□]	8 [□]	18.2% [□]	28 [□]	63.6% [□]	0 [□]	0 [□]
头孢他啶 [□]	碳青霉烯敏感 (21) [□]	3 [□]	14.3% [□]	0 [□]	0.0% [□]	2 [□]	9.5% [□]	16 [□]	76.2% [□]	0 [□]	0 [□]
	碳青霉烯耐药 (23) [□]	3 [□]	13.0% [□]	2 [□]	8.7% [□]	6 [□]	26.1% [□]	12 [□]	52.2% [□]	0 [□]	0 [□]
	总数 (44) [□]	15 [□]	34.1% [□]	12 [□]	27.3% [□]	5 [□]	11.4% [□]	12 [□]	27.3% [□]	0 [□]	0 [□]
亚胺培南 [□]	碳青霉烯敏感 (21) [□]	2 [□]	9.5% [□]	7 [□]	33.3% [□]	4 [□]	19.0% [□]	8 [□]	38.1% [□]	0 [□]	0 [□]
	碳青霉烯耐药 (23) [□]	13 [□]	56.5% [□]	5 [□]	21.7% [□]	1 [□]	4.3% [□]	4 [□]	17.4% [□]	0 [□]	0 [□]
	总数 (44) [□]	22 [□]	50.0% [□]	3 [□]	6.8% [□]	11 [□]	25.0% [□]	8 [□]	18.2% [□]	0 [□]	0 [□]
替加环素 [□]	碳青霉烯敏感 (21) [□]	6 [□]	28.6% [□]	0 [□]	0.0% [□]	8 [□]	38.1% [□]	7 [□]	33.3% [□]	0 [□]	0 [□]
	碳青霉烯耐药 (23) [□]	16 [□]	69.6% [□]	3 [□]	13.0% [□]	3 [□]	13.0% [□]	1 [□]	4.3% [□]	0 [□]	0 [□]
	总数 (44) [□]	25 [□]	56.8% [□]	5 [□]	11.4% [□]	11 [□]	25.0% [□]	3 [□]	6.8% [□]	0 [□]	0 [□]
头孢哌酮 [□]	碳青霉烯敏感 (21) [□]	19 [□]	90.5% [□]	1 [□]	4.8% [□]	1 [□]	4.8% [□]	0 [□]	0.0% [□]	0 [□]	0 [□]
	碳青霉烯耐药 (23) [□]	6 [□]	26.1% [□]	4 [□]	17.4% [□]	10 [□]	43.5% [□]	3 [□]	13.0% [□]	0 [□]	0 [□]

2.1 鲍曼不动杆菌对粘菌素与舒巴坦联合药敏试验结果分析:

44 株鲍曼不动杆菌对粘菌素与舒巴坦联合作用的效果中部分协同作用及无关作用的菌株占多数, 均达 36.5%。起协同作用的菌株占 15.9%, 其中 MSA 和 MRA 所占比例基本相同, 协同作用百分率均为 15% 左右; 而在部分协同作用株中, MRA 所占比例远远多于 MSA, 其部分协同作用百分率分别为 56.5% 和 14.3%。

2.2 鲍曼不动杆菌对头孢他啶与舒巴坦联合药敏试验结果分析:

44 株鲍曼不动杆菌对头孢他啶与舒巴坦联合作用的效果中无关作用的菌株占很大比例, 达 63.6%, 而协同作用和部分协同百分率则只占 13.6% 和 4.5%, 并且在这部分菌株中, MRA 与 MSA 所占比例基本相同。

2.3 鲍曼不动杆菌对亚胺培南与舒巴坦联合药敏试验结果分析:

44 株鲍曼不动杆菌对亚胺培南与舒巴坦联合作用的效果中起协同作用的菌株所占百分率最高, 其次为部分协同作用, 分别达 34.1% 和 27.3%。在协同作用菌株中, MRA 所占百分率达 56.5%, 而 MSA 仅为 9.5%。在部分协同作用菌株中, MSA 和 MRA 所占比例基本相同。

2.4 鲍曼不动杆菌对替加环素与舒巴坦联合药敏试验结果分析:

44 株鲍曼不动杆菌对替加环素与舒巴坦联合作用的效果中 50% 的鲍曼不动杆菌对其联合作用均表现为协同作用, MRA 占 69.6%, MSA 占 28.6%。同样, 在部分协同作用株中, MRA 所占比例也超过 MSA, 分别为 13.0% 和 0.0%。

2.5 鲍曼不动杆菌对头孢哌酮与舒巴坦联合药敏试验结果分析:

44 株鲍曼不动杆菌中有 56.8% 对头孢哌酮与舒巴坦的联合作用表现为协同作用, 其中 MSA 占多数, 达 90.5%, 而 MRA 仅占 26.1%。部分协同作用株中以 MRA 占多数, 其百分率达 17.4%, 而 MSA 仅为 4.8%。

3 讨论

在抗菌药物的广泛使用及侵入性治疗大量开展的大背景下, 鲍曼不动杆菌临床分离率逐年增高, 已成为仅次于铜绿假单胞菌的又一重要非发酵菌。由于其强大的获得耐药性和克隆传播的能力, 多重耐药、广泛耐药、全耐药鲍曼不动杆菌已呈世界性流行, 给临床治疗带来极大挑战[6]。导致鲍曼不动杆菌耐药的因素很多, 外部因素主要有患者住院时间长、抗菌药物的长期应用、患者自身患有多种基础疾病、免疫力低及营养状态差以及医院内侵袭性操作等; 鲍曼不动杆菌自身耐药机制主要是产生碳青霉烯酶、青霉素结合蛋白改变、外排泵的表达、膜孔道蛋白的缺失等[7]。抗菌药物的单一使用对严重的耐药菌感染作用有限, 且易诱导耐药性的产生, 因此联合用药是很好的选择。

舒巴坦是一种人工合成的不可逆的竞争性 β -内酰胺酶抑制剂, 对革兰阳性及阴性菌所产生的 β -内酰胺酶、及多数超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 均有抑制作用, 从而发挥其抑菌作用。此外, 舒巴坦还可以与鲍曼不动杆菌的 PBP2a

结合,从而体现其对鲍曼不动杆菌的独特杀菌作用,故含舒巴坦的复合制剂对鲍曼不动杆菌具有良好的抗菌活性[8]。本研究分别测定舒巴坦与头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、粘菌素单药及联合用药的 MIC 值,并根据联合用药最佳组合效应时两药联用时各自的 MIC 值计算 FIC,从而判断两种药物的联合作用效果。

总体来说,五种抗菌药物与舒巴坦联合用药对 44 株鲍曼不动杆菌的联合作用主要表现为协同、部分协同、相加及无关作用,无拮抗作用。粘菌素、头孢他啶、亚胺培南、替加环素、头孢哌酮对 44 株实验菌株的协同、部分协同率之和依次占:52.3%、18.1%、61.4%、56.8%、68.2%,由此可见,头孢哌酮/舒巴坦、替加环素/舒巴坦及亚胺培南/舒巴坦联合应用对鲍曼不动杆菌的抗菌效应主要表现为协同作用,其中头孢哌酮与舒巴坦联合用药对鲍曼不动杆菌的疗效最佳,起协同作用的百分率达 56.8%,这一研究结果与 Erdem I、Choi JY、Bishburg E 等的研究结果不谋而合[9-11],同时本研究结果显示起协同作用的鲍曼不动杆菌以 MSA 为主。然而同为第三代头孢菌素的头孢他啶与舒巴坦的实际协同作用百分率却仅为 13.6%,主要表现为无关作用,无关作用百分率达 76.2%,即是否联合用药对鲍曼不动杆菌的治疗效果无明显作用,这一研究结果与 2009 年黄义山等人的研究结果出现分歧[12]。对此,在对第三代头孢菌素类的使用量与鲍曼不动杆菌对其耐药率的相关性研究中,梁健等提出鲍曼不动杆菌耐药性与第三代头孢菌素类的用药量具有一定的相关性,临床需高度重视第三代头孢菌素类药物的规范使用,以避免或延缓其耐药株的产生[13]。此外替加环素、亚胺培南与舒巴坦联合用药的效果也较佳,协同作用率分别达 50%、34.1%。在 MSA 中,头孢哌酮与舒巴坦的协同作用率最高,达 90.5%;在 MRA 中,替加环素与舒巴坦的协同作用率最高,达 69.6%,其次为亚胺培南,协同作用率达 56.5%;而粘菌素与头孢他啶与舒巴坦的联合用药对 MRA 及 MSA 的联合作用效果基本相同。

综上所述,头孢哌酮与舒巴坦联合用药的协同作用效果最好,但以对 MSA 为主;亚胺培南、替加环素与舒巴坦联合用药可增加对 MRA 的体外抗菌活性。建议对鲍曼不动杆菌引起的院内感染,可根据其耐药谱联合应用头孢哌酮/舒巴坦、亚胺培南/舒巴坦及替加环素/舒巴坦进行治疗。尽管体外实验不能完全说明临床试验效果,但本研究的结果可为临床治疗鲍曼不动杆菌引起的感染提供重要的参考。

参考文献

- [1]胡付品,朱德妹,汪复等.2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2014,(5)
- [2]胡付品,朱德妹,汪复等.2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J].中国感染与化疗杂志,2015,(5):401-410.
- [3]卫生部合理用药专家委员会.耐药革兰阴性菌感染诊疗手册[M].人民卫生出版社,2015.
- [4]陆一丹,张亚莉,周浩等.泛耐药鲍曼不动杆菌的体外联合药敏分析[J].南方医科大学学报,2014,(11):1697-1701.DOI:10.3969/j.issn.1673-4254.2014.11.30.
- [5]M100-S24.Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing;Twenty-Fourth Informational Supplement
- [6]Poirel L,Marqu é S,H éritier C,et al.OXA-58,a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*.Antimicrob Agents Chemother.2005 Jan;49(1):202-8.
- [7]汤凤珍,张伟红,陈惠玲.碳青霉烯类抗生素耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶基因研究[J].中国感染与化疗杂志,2010,10(5):354-356.
- [8]Laishram S,Anandan S,Devi BY,et al.Determination of synergy between sulbactam,meropenem and colistin in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* isolates and correlation with the molecular mechanism of resistance.J Chemother.2015 Oct 2:1973947815Y0000000079.
- [9]Choi JY,Kim CO,Park YS,et al.Comparison of efficacy of ceftazidime/sulbactam and imipenem/cilastatin for treatment of *Acinetobacter bacteremia*[J].Yonsei Med J,2006,47(1):63-69.
- [10]Erdem I,Ozgultekin A,Inan AS,et al.Incidence,etiology,and antibiotic resistance patterns of gram-negative microorganisms isolated from patients with ventilator-associated pneumonia in a medical-surgical intensive care unit of a teaching hospital in Istanbul,Turkey:2004-2006[J].Jpn J Infect Dis,2008,61(5):339-342.
- [11]Bishburg E,Bishburg K.Minocycline:an old drug for a new century:emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)and *Acinetobacter baumannii*[J].Int J Antimicrob Agents,2009,34(5):395-401.

- [12]黄义山,姜瑞,苏忠龙等.鲍曼不动杆菌对多种抗生素与舒巴坦复合制剂的最低抑菌浓度(MIC)比较分析[J].中国实用医药,2009,4(31):34-35.DOI:10.3969/j.issn.1673-7555.2009.31.021.
- [13]梁健,韦伟.第三代头孢菌素类的使用量与鲍曼不动杆菌对其耐药率的相关性研究[J].实用预防医学,2014,21(10):1173-1176.DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2014.10.007.

基金项目: 公益性行业科研专项(201402001)

作者单位: 100730 北京, 中国医学科学院北京协和医院检验科(周梦兰, 王瑶, 程敬伟, 侯欣, 徐志鹏, 徐英春); 中国医学科学院北京协和医学院研究生院(周梦兰, 程敬伟, 侯欣); 中国医学科学院北京协和医院基本外科(赵玉沛)

通信作者: 徐英春, 电子信箱: xycpumch@139.com

通讯地址: 北京市东城区帅府园 1 号北京协和医院检验科, 100730

联系电话: 周梦兰 18811387499

Email: mumuxi529@139.com/18811387499@139.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

依据 CLSI C28-A2 建立广州地区精液分析主要指标的生物参考区间

石汉振¹ 杨佩桦²

1.广东省中医院检验医学部, 2.广州医科大学金域检验学院 广州 510120

[摘要] 目的: 建立广州地区本实验室精液分析主要指标的生物参考区间, 作为临床不育症诊治和判断患者生育力的依据。**方法:** 收集 2014 年 2 月至 2015 年 5 月正常体检男性(2 年内已育、备二胎) 156 例, 使用西班牙 SCA 精子分析仪及改良巴氏染色进行精液分析及精子正常形态率检查, 所得结果按 CLSI(临床实验室标准化委员会)的标准化文件 C28-A2 进行统计处理, 建立起本实验室精液分析主要指标的生物参考区间。**结果:** 本实验室精液精液分析主要指标的生物参考区间分别如下:精液量 $\geq 2.0\text{ml}$; 液化时间 ≤ 45 分钟; PH 值 ≥ 7.0 且 ≤ 8.0 ; 精子浓度为 $\geq 17.9 \times 10^6/\text{ml}$; 前向运动精子总数为 $\geq 24.2 \times 10^6$ /一次射精; 精子总活动率为 $\geq 36.7\%$; 精子前向活动率 $\geq 28.1\%$; 精子正常形态 $\geq 3\%$ 。**结论:** 实验室有必要根据 WHO 相关文件和 CLSI C28-A2 文件定期建立本实验室所在区域的精液分析主要指标的正常生物参考区间, 为临床诊断及辅助生殖技术提供科学的实验室诊断数据。

[关键词] CLSI C28-A2; 精液分析; 生物参考区间

Establish the biological reference intervals of the major indexes of semen analysis according to CLSI C28-A2

Shi Hanzhen¹, Yang Peihua²

1.Clinical Laboratory of GuangDong Provincial Hospital of Traditional Medicine, 2.The JingYue Clinical Laboratory Institute of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510120, China.

[Abstract] Objective: To establish the biological reference intervals of the major indexes of semen analysis in local laboratory of The Guangzhou Area, and it will as a basis for the clinical diagnosis and treatment of Infertility and Fertility evaluation. **Methods:** Collecting 156 cases of normal medical men in February 2014 to May 2015, has given birth in two years and prepare the second baby. Using Spanish SCA sperm analyzer and improved pap staining to analyze sperm and the normal rate of Morphology. Processing the results with statistic according to standardized documents C28-A2 of CLSI (clinical laboratory committee), and standardization establish the biological reference intervals of the major indexes of semen analysis in local laboratory. **Results:** The biological reference intervals of the major indexes of semen analysis in local laboratory are respectively as follows, the lower reference limit of semen volume is 2.0ml, the higher reference limit of liquefaction time is 45 min, the biological reference intervals of semen pH is between 7.0 and 8.0, the lower reference limit for

Sperm concentration is $17.9 \times 10^6/\text{ml}$, the lower reference limit for total number of motility is $24.2 \times 10^6/\text{time}$, the lower reference limit for total motility is 36.7%, the lower reference limit for progressive motility is 28.1%, the lower reference limit for normal rate of Morphology is 3%. **Conclusions:** Laboratory is necessary to establish the normal biological reference intervals of the major indexes of semen analysis in local laboratory on a regular basis, according to the related documents of the WHO and the file, CLSI C28 - A2, in order to provide support for clinical diagnosis and treatment, and provide scientific laboratory diagnostic data for assisted reproductive technology.

[Key words] CLSI C28-A2; Semen analysis; Biological reference interval

精液分析越来越广泛应用于评价男性生育力、诊断男性生殖系统疾病以及在辅助生殖技术中应用。有研究显示, 1995~2008年14年间精子密度和精子总数明显降低^[1]。WHO 2010年第5版人类精液分析实验室技术手册^[3]相对于WHO 2001年第4版人类精液分析实验室技术手册^[2]中部分参考区间也做了相应下调。但有学者指出WHO 2010年第5版中精液分析主要指标的生物参考区间的样本采集人群中并没有涉及来自占世界人口1/5的中国人的任何临床数据和资料^[3]。如果只是对其生搬硬套, 将对部分患者造成误判, 因此有必要建立起本实验室区域性的生物参考区间。本次实验主要根据CLSI(临床实验室标准化委员会)的标准化文件C28-A2, 抽取156例正常体检男性(2年内已育、备二胎)进行精液常规分析, 根据WHO第5版精液常规标准建立本实验室精液分析主要指标的正常生物参考区间。

1 材料和方法

1.1 研究对象

取广东省中医院2014年2月至2015年5月正常体检男性156例, 要求2年内已育, 排除器质性疾病、生殖器炎症、不良生活习惯(如经常抽烟、喝酒、熬夜)、不良环境影响(如从事高温作业、长期接触射线、化学药物、有毒有机物等)以及部分职业(如油漆工人、装修工人、矿工、专职司机等)。研究对象平均年龄为31岁(31 ± 5.3 岁)。

1.2 实验方法

1.2.1 收集标本

要求患者禁欲2~7天, 取精室手淫取精, 收集一次射精的全部精液于清洁、无毒密闭容器内, 置37℃水浴箱中待液化后进行精液分析, 检测时必须要好质量控制^[4]。

1.2.2 实验仪器、试剂、耗材

西班牙SCA精子分析仪、恒温水浴箱、光学显微镜、南京欣迪改良巴氏染液、玻璃染缸、10ml、100ml加样枪各一把、玻片、盖玻片、10ml塑料试管。

1.2.3 精液分析主要指标操作步骤

使用称重法称量精液标本重量, 计算精液体积并记录。将精液倒进10ml塑料试管中, 放置37℃恒温水浴箱中待液化, 记录液化时间, 然后对精液分析主要指标(精液量、PH值、液化时间、精子浓度、前向运动精子总数、总活动率、前向运动活动率、精子正常形态率)进行检测并记录。精液PH值选用6.0到10.0之间的精密PH试纸检测。精子浓度、前向精子总数、活动率、前向活动率使用西班牙SCA精子分析仪检测。精子形态率采用改良巴氏法进行染色, 油镜下计数200个精子, 依据第5版《WHO人类精液检查与处理实验室手册》^[3]判断标准计算其正常形态率。

1.3 统计学方法

使用Grubbs检验公式 $G = \frac{|X_d - \bar{X}|}{s}$, X_d 为离群值, \bar{X} 、s 分别为包括离群值在内的均值、标准差, 分别计

算各个主要指标的G值, 如果计算得到的G值大于Grubbs检验临界值表中相应的临界值时, 则将 X_d 作为异常值舍去。分别去除离群值后, 需保证样本例数大于或等于156例, 然后随机分别抽取156例进行分析。采用SPSS 13.0软件进行统计分析。

2 结果。

2.1 精液分析主要指标统计结果见表1。

表1 精液分析主要指标结果统计

	精液量 (ml)	液化时间 (min)	精子密度 (10 ⁶ /ml)	前向精子总 数(10 ⁶ /一次 射精)	总活动率 (%)	精子前向活 动率(%)	正常形态 精子(%)
总数	156	156	156	156	156	156	156
均数	3.88	28.62	92.23	146.77	52.39	44.00	3.80
标准差	1.362	6.99	55.42	100.19	7.84	8.0	1.45
5%	2.00	15.00	17.95	24.15	36.71	28.10	3.0
50%	3.75	30.00	79.65	116.74	51.95	44.10	4.00
95%	6.36	45.00	209.33	363.90	69.10	65.62	9.0

注：5%标线为参考区间的第5百分位数，50%标线为参考区间的中位数，95%标线为参考区间的第95百分位数。

表1可见本实验室精液分析主要指标的正常生物参考区间分别如下（取第5百分数或第95百分数单侧）：精液量 ≥ 2.0 ml；液化时间 ≤ 45 分钟；精子密度为 $\geq 17.9 \times 10^6$ /ml；前向精子总数为 $\geq 24.2 \times 10^6$ /一次射精；精子总活动率为 $\geq 36.7\%$ ；精子前向活动率 $\geq 28.1\%$ ；精子正常形态 $\geq 3\%$ 。

2.2 精液分析 PH 值统计结果见表 2。

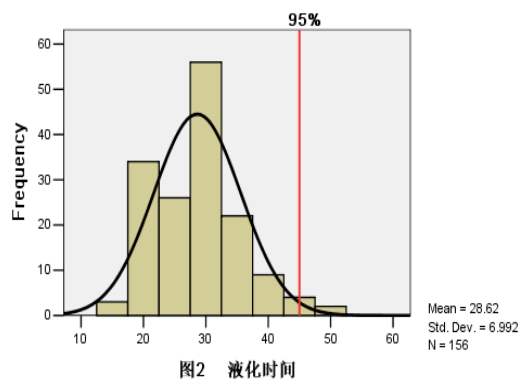
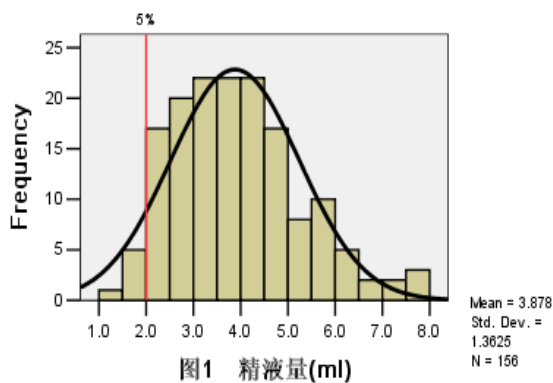
表2 精液 PH 值结果统计

总数	156
均数	7.50
标准差	0.280
2.5	7.00
50	7.50
97.5	8.00

表2可见本实验室精液分析主要指标的正常生物参考区间分别如下（取第2.5，97.5百分位数双侧）： $7.0 \leq \text{PH}$ 值 ≤ 8.0 。

2.3 精液分析各项主要指标数据分布频数图

见图 1-8。



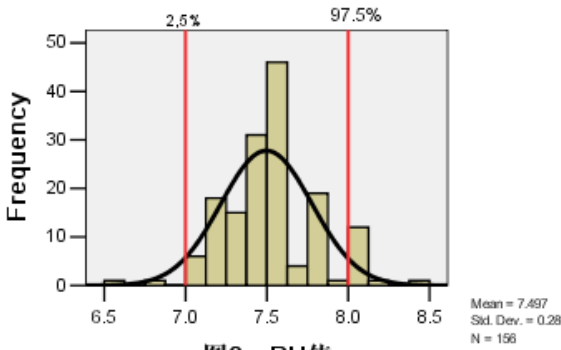


图3 PH值

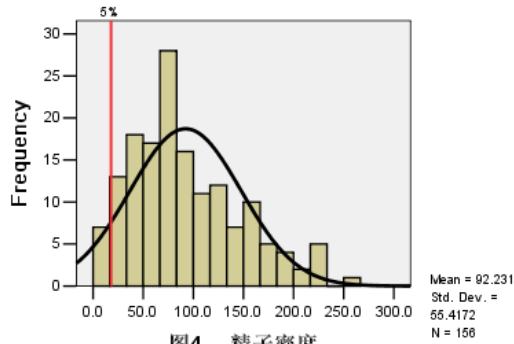


图4 精子密度

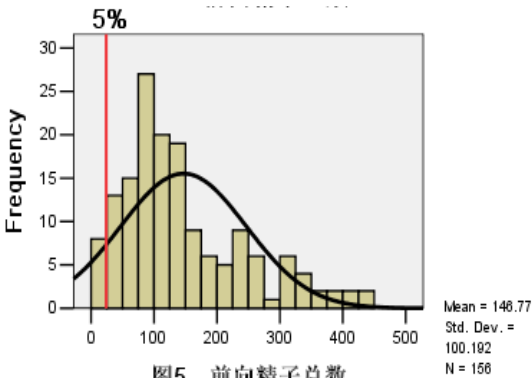


图5 前向精子总数

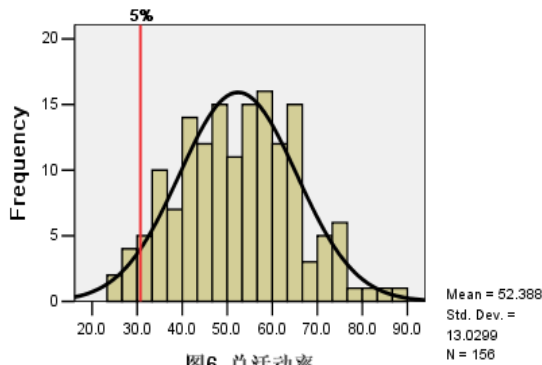


图6 总活动率

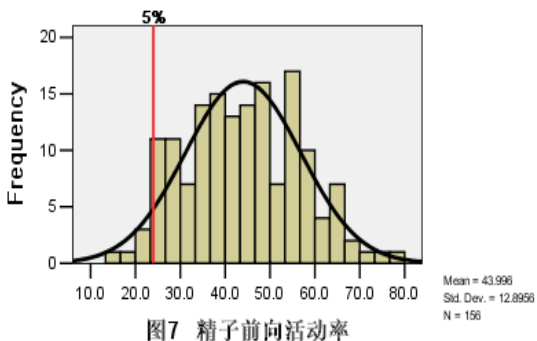


图7 精子前向活动率

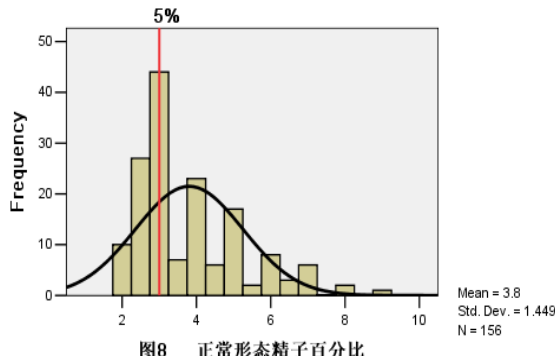


图8 正常形态精子百分比

注：其中图中红线为生物参考区间的关键点

图 1-8 可见精液分析各项主要指标（精液量、PH 值、液化时间、精子密度、前向运动精子总数、总活动率、前向运动活动率、精子正常形态率）均呈正态分布或偏正态分布，因此可以采用百分位数的方法作为其生物参考区间。

3 讨论

精液常规分析是评价男性生育能力，诊断、治疗和研究男性不育的一项基本检查。2010 年出版的第 5 版《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》原始数据为来自 3 大洲的 8 个国家的可生育男性的 400-1900 份精液样本^[3]，但并没有涉及来自占世界人口 1/5 的中国人的任何临床数据和资料^[4]。若直接使用其参考区间对我国男性精液进行分析判断，会对部分患者造成误判。因此有必要建立起本实验室区域性的精液分析主要指标生物参考区间。鉴于精液分析的特殊性，部分指标如精子浓度、精子前向活动力、精子前向活动精子总数、精子正常形态率只有降低才有意义，会影响临床结局，因此本实验按照 WHO 要求也是取第 5 百分位数单侧作为其生物参考区间。

本研究分析了广州地区 2014 年 2 月至 2015 年 5 月本院正常体检男性的精液分析主要指标的检测结果。发现本研究结果中精子活动率、精子前向活动率、精子正常形态均低于 WHO 第 5 版的人类精液分析实验室技术手册中的参考值^[6]。而精液体积和精子浓度及前向精子总数略高于 WHO 第 5 版的人类精液分析实验室技术手册中的参考值。

分析其原因可能为精子质量存在地域性和种族间人群的差异；环境因素如有毒物质、杀虫剂、激素等使用影响；吸烟、饮酒、饮用咖啡、久坐、精神紧张等生活方式的影响；分析样本量不够大等^[7-10]，因此我们可以通过更长时间研究增大样本量及改进统计方法或通过多中心科研协作的方法从而建立起更适合本地人群的实验室（或地区）精液分析主要指标生物参考区间。

由于不同医疗机构医疗资源的差异造成国内精液分析存在着多种不同的检测方法。比如对于精子浓度的检测有牛鲍氏计数板手工法、MALKER 板计数法、计算机自动分析（配相差显微镜）等，因此在将来的研究中有必要建立不同检测系统的精子分析生物参考区间，以满足不同实验室的需求，避免引起临床的误判。

在本实验中我们将影响生物参考区间的因素去除，但部分处于灰区的患者可能也被我们筛除了，但可能他们也是拥有正常生育能力的。因此在以后研究中我们将对这部分患者每年进行一次电话追踪，如果发现患者已生育的将继续纳入研究对象中。

根据地域性特点建立本实验室的精液分析主要指标的生物参考区间，将有利于临床医生根据精液分析结果更准确地评价患者精液质量及生育能力，提高诊断准确性。同时为辅助生殖技术提供更准确的实验室诊断和技术支持，更好的为患者服务。

参考文献

- [1] 黄春妍,姚陈均,王春,等.1985~2008 年间我国正常男性精液质量变化分析[J].中华男科学杂志,2010,16(8):684-688.
- [2] 世界卫生组织.WHO 人类精液及精子-宫颈粘液相互作用试验检验手册[M].第 4 版.北京,人民卫生出版社,2001:51.
- [3] 世界卫生组织.世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M].第 5 版.北京,人民卫生出版社,2011:2
- [4] 潘福达,郑红丽.精液分析的质量控制[J].现代检验医学杂志,2005,20(2):72-73
- [5] 陆金春,黄宇烽,吕年青.《世界卫生组织人类精液分析实验室技术手册》与我国男科实验室现状[J].中华男科杂志,2010,16(10):867-871.
- [6] 黄莉萍,李亚斐,熊鸿燕,等.近 25 年中国正常男性精液质量的变化趋势分析[J].生殖与避孕,2011,31(2):122-128.
- [7] 宋向林.生活习惯对男性精液质量的影响分析[J].中国卫生产业,2014(10):141-142.
- [8] 张树成,贺斌,王弘毅,等.有关环境与男性精液质量变化的几个问题[J].中国计划生育学杂志,2003(3):189-191.
- [9] 武俊青,高尔生,杨秋英,等.中国年轻男性精液质量与吸烟、饮酒等行为因素的关系[J].生殖医学杂志,2004,13(2):87-90.
- [10] 甘燕玲,孙朝晖,全静雯,等.3527 例男性不育患者精液检查分析[J].现代检验医学杂志,2015,30(4):153-154

基金项目：广东省中医院朝阳人才计划（七叶皂苷素对精素静脉曲张雄鼠生精功能及生育结局影响）

作者简介：石汉振，1978 年生，男，副主任技师，医学硕士，主要从事男性学检验技术及辅助生殖实验室技术，电话：020-81887233，Email：石汉振 978@163.com。

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

Agilent 表达谱芯片筛查 RA 患者成纤维样滑膜细胞差异表达基因*

张宇, 王海永, 管晓龙, 李玲慧, 王菲, 赵琴飞, 李晓军

南京军区南京总医院中心实验科, 南京 210002

[摘要] 目的: 用基因表达谱芯片筛选类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 患者关节成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, RA-FLSs) 中差异表达基因, 探索其与 RA 发病机制的关系。方法: 原代培养手术切取的膝关节滑膜组织中 FLSs 至第 3 代, 用 Agilent 人基因表达谱芯片对 3 例 RA 患者和 3 例外伤患者的 FLSs 进行基因初筛, 并对差异表达基因进行基因本体 (gene ontology) 和信号通路 (pathway) 分析。随后用实时定量 PCR 在 15 例 RA-FLSs 和 15 例外伤病人 FLSs (CON-FLSs) 中验证可能与 RA 发病机制有关的差异表达基因。结果: 与 CON-FLSs 相比, RA-FLSs 共检出 103 个差异表达的基因转录本 (差异倍数 > 2, $P < 0.05$), 其中 36 个表达上调, 67 个表达下调。定量 PCR 结果显示, 与 CON-FLSs 相比, RA-FLSs 中速激肽前体 1 α 型 (TAC1)、wnt 诱导分泌蛋白 3 (WISP3)、血管内皮生长因子 (VEGFA) 基因上调, 肿瘤坏死因子超家族成员 15 基因 (TNFSF15) 下调。结论: TAC1、WISP3、VEGFA 和 TNFSF15 基因在 RA-FLSs 中异常表达, 探讨这些基因功能将有助于深入研究 RA 致病机制。

[关键词] 类风湿关节炎; 成纤维样滑膜细胞; 基因芯片

Microarray analysis of synovial fibroblasts in human with rheumatoid arthritis

ZHANG Yu, WANG Hai-yong, GUAN Xiao-long, LI Ling-hui, WANG Fei, ZHAO Qin-fei, LI Xiao-jun (Institute of Clinical Laboratory Medicine, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objectives:** Microarray was used to profile the global gene expression of RA-FLSs to explore the underlying pathogenic mechanism. **Methods:** Whole genome microarrays (human) were conducted in three pairs of specimens (RA, n=3; trauma patients, n=3) using FLSs from passage 3, then the gene ontology and pathway analysis of the differently expressed mRNAs were carried out. The results were verified by real-time PCR in 15 specimens of RA-FLSs and 15 specimens of CON-FLSs. **Results:** Compared to the CON-FLSs, there are 103 gene transcripts differently expressed in RA-FLSs including 36 up-regulated transcripts and 67 down-regulated transcripts. Real-time PCR were confirmed that TAC1, WISP3 and VEGFA were overexpressed and TNFSF15 was underexpressed in RA-FLSs compared with CON-FLSs. **Conclusion:** This study provide details about differently expressed genes of TAC1、WISP3、VEGFA and TNFSF15 in RA-FLSs. And researches of these genes may contribute to clarify the pathogenesis of RA.

[Keywords] Rheumatoid arthritis; Synovial fibroblasts; Microarray

0 引言

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性全身性炎症性疾病, 在全世界范围内发病率为 0.5~1.0%, 主要发生在 40~70 岁成人中, 且女性多于男性^[1]。RA 关节滑膜衬里层细胞从 1~2 层异常增生到 10~20 层, 增厚的滑膜主要包括两种类型的细胞, 即 A 型巨噬细胞样滑膜细胞和 B 型成纤维样滑膜细胞 (FLSs)。作为 RA 重要的效应细胞, FLSs 越来越受到人们的关注^[2-4]。已有相关文献报道用蛋白质质谱和基因表达芯片技术分析 RA 患者中的差异表达基因转录本和蛋白质, 但研究多采用患者的外周血 (细胞)、关节液、滑膜组织作为检测样本^[5-7]。本研究用基因表达芯片筛选 RA-FLSs 差异表达基因, 旨在更深入探讨 FLSs 在 RA 中的作用。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2014 年 10~12 月于南京军区南京总医院行膝关节置换手术的 RA 患者和行膝关节手术的外伤患者滑膜组织。芯片检测标本取自 3 例 RA 患者 (男性 1 例, 女性 2 例) 和 3 例外伤对照 (男性 1 例, 女性 2 例); PCR 验证标本取自 15 例 RA 患者 (男性 5 例, 女性 10 例, 年龄 51.07 ± 11.99 岁) 和 15 例外伤对照 (男性 8 例, 女性 7 例), 年龄 41.43 ± 12.65 岁。研究纳入的 RA 患者均符合 2010 年美国风湿病学学会 (ACR) 和欧洲抗风湿联盟 (EULAR) 提出的 RA 诊断标准。本研究得到南京军区南京总医院伦理委员会批准。

1.2 FLSs 原代培养

RA 和外伤患者滑膜组织经酶消化法和组织块法结合处理获得原代培养的 FLSs^[8]。简述如下：滑膜组织用 PBS 清洗后，用无菌剪刀剪碎，加入含有 2.0g/L II 型胶原酶（invitrogen）的离心管中，II 型胶原酶用 DMEM 高糖培养基（WISENT，加拿大）配制而成，37℃ 消化 1h，消化结束后离心去除上清液，加入 1mL 含有 50% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基，用吸管反复吹打后放入 50mL 培养瓶，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养，次日有细胞逐渐爬出组织块，缓慢加入 2mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。细胞传至第 3 代时进行实验。

1.3 流式细胞实验

取处于对数生长期的第 3 代 FLSs，倒掉残液，用 PBS 洗 2 次，加入 2.5g/L 的胰蛋白酶（Gibco，美国）消化后，加含 10% 血清的培养基终止消化，离心 300g 5min，弃上清。加 PBS 调节细胞浓度至 1×10^7 /mL，分 5 管，分别加入：（1） 1×10^6 细胞（100 μ L 1×10^7 /ml 细胞悬液）；（2） 1×10^6 细胞，加 PE 标记的同型对照（PE 标记的小鼠 IgG1）10 μ L 和 FITC 标记的同型对照（FITC 标记的小鼠 IgG2b）10 μ L；（3） 1×10^6 细胞，加 FITC 标记的同型对照 10 μ L 和 PE 标记的鼠抗人 CD90 抗体 10 μ L；（4） 1×10^6 细胞，加 PE 标记的同型对照 10 μ L 和 FITC 标记的鼠抗人 CD68 抗体 10 μ L；（5） 1×10^6 细胞，加 PE 标记的鼠抗人 CD90 抗体 10 μ L 和 FITC 标记的鼠抗人 CD68 抗体 10 μ L。震荡均匀后避光 30min，每管加入 PBS 2mL，离心 300g 5min，弃上清，加 PBS 至 500 μ L，震荡均匀，上流式细胞仪（Becton-Dickinson 公司，FACScan）检测。CD90 为 FLSs 表面特异性标志物，CD68 为巨噬细胞样滑膜细胞表面特异性标志物^[9]。以上抗体均购自德国 Miltenyi 公司。

1.4 RNA 提取

FLSs 培养至第 3 代，用 trizol/氯仿/异丙醇法裂解细胞并抽提 RNA，每 10cm² 细胞中加 1mL trizol 试剂（TaKaRa，日本），用紫外分光光度计（NanoDrop ND-1000）测定 RNA 260nm、280nm 和 230nm 波长的吸光度值，以计算浓度并评估纯度。用标准变性凝胶电泳评估 RNA 的完整性。

1.5 芯片杂交及数据分析

提取总 RNA 后，使用去除核糖体 RNA 的试剂盒（mRNA-ONLY™ Eukaryotic mRNA Isolation Kit，Epicentre）纯化 mRNA。线性扩增总 RNA，并使用 Cy3-UTP 标记。使用 RNA 纯化试剂盒（RNeasy Mini Kit，Qiagen）纯化标记后的 cRNAs，并用 NanoDrop ND-1000 检测浓度和活性。将 1.65 μ g cRNA、10 \times 封闭试液 11 μ L（Agilent，美国）、25 \times 片段化缓冲液 2.2 μ L（Agilent，美国）加入 1.5mL 无核酸酶的离心管中，加无核酸酶的水至 55 μ L 震荡混匀，再加入 2 \times 杂交液 55 μ L（Agilent，美国）充分混合，取 100 μ L 置于杂交室内，与人 4 \times 44K 基因芯片（Agilent Human 4 \times 44K Gene Expression Microarrays v2）在 65℃ 杂交 17h，洗涤芯片后使用芯片扫描仪（Agilent DNA Microarray Scanner）扫描芯片的荧光强度，用 Agilent Feature Extraction Software 对原始数据进行分析运算。根据扫描的荧光强度得到初始值，用 GeneSpring GX v12.1 软件（Agilent Technologies）对原始数据进行标准化，计算差异表达倍数，进行 t 检验。差异表达的基因转录本筛选标准：与 CON-FLSs 相比，RA-FLSs 中表达上调或下调倍数 > 2 且 P < 0.05 的基因转录本。以上芯片实验由上海康成生物公司提供技术支持。

1.6 基因本体和信号通路分析

基因本体（gene ontology, GO）包括三个部分，分别为：分子功能（molecular function），生物过程（biological process）和细胞组成（cellular component）。信号通路是一系列的蛋白质通过行使不同的功能将细胞外的信号传至细胞内发挥效应的酶促反应通路。在检测出差异表达基因后，使用 Gostat software 软件进行 GO 功能注释和富集分析，使用 KAAS annotation server 软件检测差异表达基因富集的信号通路。

1.7 实时定量 PCR

使用逆转录试剂盒（Promega，美国）将 RNA 逆转录成 cDNA，使用 PCR Master Mix（TaKaRa，日本）进行定量 PCR 反应。PCR 反应体系为 20 μ L，其中 2 \times Master Mix 10 μ L，上游特异引物 1 μ L，下游特异引物 1 μ L，对应的 cDNA 2 μ L，加双蒸水至总体积为 20 μ L。扩增反应条件 95℃，10min；40 个 PCR 循环（95℃ 10 秒；60℃ 60 秒；收集荧光）。结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算。引物由上海康成生物公司合成。

1.8 统计学分析

数据使用 SPSS19.0 软件进行分析，计量资料采用均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，两组数据比较采用 t 检验，P < 0.05 时，认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测 FLSs 纯度

结果显示,第3代 FLSs 纯度>99.0% (见图1)。

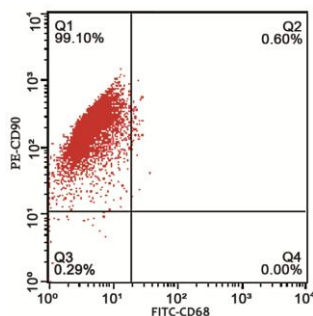


图1 流式细胞仪检测 FLSs 纯度

Figure1 Identification of FLSs by flow cytometry

2.2 RA-FLSs 基因表达谱

与 CON-FLSs 相比, RA-FLSs 共检出 103 个差异表达的基因转录本 (倍数>2, $P < 0.05$), 其中 36 个表达上调, 67 个表达下调。表 1 和表 2 分别展示了 RA 组跟对照组相比, 上调和下调的 20 个转录本。

表 1 RA-FLSs 与 CON-FLSs 相比表达上调的 20 个转录本

Table 1 20 up-regulated expressed transcripts in RA-FLSs compared with CON-FLSs

序列名称	基因	产物	倍数	P 值
ENST00000539839	FZD10	膜卷曲蛋白受体 10	13.61	<0.05
NM_013996	TAC1	速激肽前体 1 α 型	11.30	<0.05
NM_013997	TAC1	速激肽前体 1 γ 型	9.23	<0.05
ENST00000383490	TMEM200C	跨膜蛋白 200C	8.93	<0.05
NM_020142	NDUFA4	NADH 脱氢酶 1 α 复合物 4	7.00	<0.05
NM_198239	WISP3	WNT1 诱导信号通路蛋白 3	5.17	<0.05
ENST00000480798	CST7	半胱氨酸蛋白酶抑制物 F	4.61	<0.05
NM_005950	MT1G	金属硫蛋白 1 G	4.35	<0.05
NM_003182	TAC1	速激肽前体 1 β 型	4.23	<0.05
NM_006399	BATF	基本的亮氨酸拉链转录因子	4.02	<0.05
NM_171998	RAB39B	RAS 致癌基因家族成员	3.89	<0.05
NM_001126133	TNNT1	肌钙蛋白 T 1 型	3.65	<0.05
NM_001130159	STOX1	10 号染色体开放阅读框 24	3.61	<0.05
NM_000921	PDE3A	磷酸二酯酶 3A	3.56	<0.05
NM_001170535	ATAD3A	腺苷三磷酸酶家族蛋白 3A	3.41	<0.05
NM_001033756	VEGFA	血管内皮生长因子	3.12	<0.05
NM_020182	PMEPA1	前列腺跨膜蛋白 1	3.08	<0.05
ENST00000321660	GJD4	缝隙连接蛋白 δ 4	2.93	<0.05
NM_005952	MT1X	金属硫蛋白 1 X	2.58	<0.05
NM_000618	IGF1	胰岛素样生长因子 1	2.38	<0.05

表 2 RA-FLSs 与 CON-FLSs 相比表达下调的 20 个转录本

Table 2 20 down-regulated expressed transcripts in RA-FLSs compared with CON-FLSs

序列名称	基因名称	产物	倍数	P 值
ENST00000443026	ABCB5	磷酸腺苷结合盒 B 亚家族成员 5	10.37	<0.05
NM_004654	USP9Y	泛素特定肽酶 9	10.11	<0.05
NM_001184825	PSG1	妊娠特异性 β 1 糖蛋白 1	9.90	<0.05
ENST00000306511	PSG8	妊娠特异性 β 1 糖蛋白 8	7.84	<0.05
NM_033358	CASP8	半胱天冬酶 8	7.64	<0.05
NM_001145026	PTPRQ	蛋白酪氨酸磷酸酶受体 Q	6.92	<0.05
NM_001955	EDN1	内皮素 1	6.79	<0.05
NM_016179	TRPC4	瞬时受体阳离子通道 4 α 亚型	5.56	<0.01
NM_005044	PRKX	环腺苷酸依赖蛋白激酶	5.22	<0.01
NM_003465	CHIT1	几丁质酶 1	4.88	<0.05
NM_001135956	TRPC4	瞬时受体阳离子通道 4 γ 亚型	4.55	<0.05
NM_001135955	TRPC4	瞬时受体阳离子通道 4 β 亚型	4.53	<0.05
NM_033143	FGF5	纤维母细胞生长因子 5	3.81	<0.05
NM_000933	PLCB4	磷脂酶 C β 4 α 亚型	3.78	<0.05
NM_182797	PLCB4	磷脂酶 C β 4 β 亚型	3.66	<0.05
NM_005118	TNFSF15	肿瘤坏死因子超家族成员 15	3.55	<0.05
NM_004932	CDH6	钙粘蛋白 6	3.53	<0.05
NM_001136000	ABL2	非受体酪氨酸激酶 ABL 2	3.34	<0.05
ENST00000537559	VEPH1	心室区 PH 域 1	3.27	<0.05
NM_001004019	FBLN2	腓骨蛋白 2	3.14	<0.05

差异表达基因信号通路分析

对差异表达基因进行 KEGG 信号通路分析, 结果显示上调基因参与了 9 条信号通路 (见表 3), 下调基因参与了 27 条信号通路, 表 4 列出了 10 条下调基因参与的信号通路。

表 3 RA-FLSs 上调基因信号通路分析

Table 3 Analysis of pathway affected by up-regulated genes in RA-FLSs

ID 号	信号通路名称	P 值	上调基因
hsa04978	矿物质吸收	<0.01	MT1G//MT1X
hsa04150	雷帕霉素靶蛋白信号通路	<0.01	IGF1//VEGFA
hsa05205	肿瘤中蛋白聚糖信号通路	<0.01	FZD10//IGF1//VEGFA
hsa04914	孕激素介导的卵母细胞成熟	<0.01	IGF1//PDE3A
hsa04066	低氧诱导因子信号通路	<0.05	IGF1//VEGFA
hsa05200	肿瘤信号通路	<0.05	FZD10//IGF1//VEGFA
hsa04510	黏着斑信号通路	<0.05	IGF1//VEGFA
hsa04015	Rap1 信号通路	<0.05	IGF1//VEGFA
hsa04014	Ras 信号通路	<0.05	IGF1//VEGFA

表 4 RA-FLSs 下调基因信号通路分析

Table 3 Analysis of pathway affected by down-regulated genes in RA-FLSs

ID 号	信号通路名称	P 值	下调基因
hsa05416	病毒性心肌炎	<0.01	ABL2//CASP8//SGCA
hsa04916	黑色素生成通路	<0.01	EDN1//PLCB4//PRKX
hsa04668	TN 信号通路	<0.01	CASP8//CSF1//EDN1
hsa04014	Ras 信号通路	<0.01	ABL2//CSF1//FGF5//PRKX
hsa04270	血管平滑肌收缩	<0.01	EDN1//PLCB4//PRKX
hsa04961	内分泌和钙重吸收	<0.01	PLCB4//PRKX
hsa04720	长时程增强通路	<0.05	PLCB4//PRKX
hsa04210	凋亡通路	<0.05	CASP8//PRKX
hsa04915	雌激素信号通路	<0.05	PLCB4//PRKX
hsa04060	细胞因子与受体	<0.05	CSF1//TNFRSF11B//TNFSF15

2.3 差异表达基因 GO 分析

对差异表达基因进行 GO 分析, 表 5、表 6、表 7 分别列出了 10 项上调基因参与的生物过程、分子功能和细胞组成分析结果。

表 5 RA-FLSs 上调基因生物学过程分析

Table 5 Analysis of biological process affected by up-regulated genes in RA-FLSs

ID 号	名称	P 值	上调基因
GO:0040007	生长	<0.01	ATAD3A//WISP3//GJD4//IGF1//MT1G//MT1X//VEGFA//PTHLH
GO:0048875	组织内化学动态平衡	<0.01	PTHLH//VEGFA
GO:0071294	细胞对锌离子的反应	<0.01	MT1G//MT1X
GO:0045321	白细胞激活	<0.01	RHOH//IGF1//MT1G//BATF//TAC1
GO:0090036	蛋白激酶 C 信号通路	<0.01	VEGFA//SEZ6L
GO:0021700	发育成熟	<0.01	PDE3A//IGF1//VEGFA//SEZ6L
GO:0043114	血管通透性调控	<0.01	PDE3A//VEGFA
GO:0008015	血液循环	<0.01	NAV2//TAC1//PDE3A//VEGFA
GO:0051346	水解酶活性负调控	<0.01	CSTA//CST7//FZD10//VEGFA
GO:0030335	细胞迁移	<0.01	VEGFA//TAC1//IGF1

表 6 RA-FLSs 上调基因分子功能分析

Table 6 Analysis of molecular function affected by up-regulated genes in RA-FLSs

ID 号	名称	P 值	上调基因
GO:0008083	生长因子活性	<0.01	IGF1//VEGFA//WISP3
GO:0004869	半胱氨酸型肽链内切酶抑制剂活性	<0.01	CSTA//CST7
GO:0004857	酶抑制剂的活性	<0.05	CST7//CSTA//RHOH
GO:0005179	激素活性	<0.05	IGF1//PTHLH
GO:0005172	血管内皮生长因子受体结合	<0.05	VEGFA
GO:0004115	3', 5'环腺苷酸磷酸二酯酶的活性	<0.05	PDE3A
GO:0008201	肝素结合	<0.05	VEGFA//NAV2
GO:0005523	原肌球蛋白结合	<0.05	TNNT1
GO:0005095	鸟苷三磷酸酶抑制剂活性	<0.05	RHOH
GO:0005159	胰岛素样生长因子受体结合	<0.05	IGF1

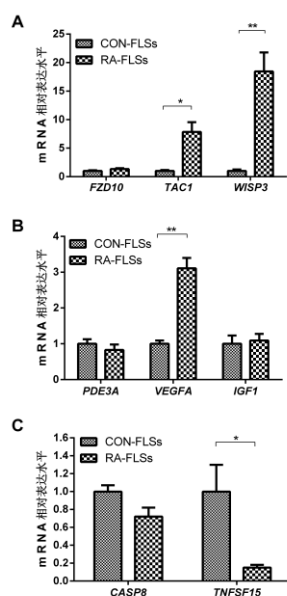
表 7 RA-FLSs 上调基因细胞组成分析

Table 7 Analysis of cellular component affected by up-regulated genes in RA-FLSs

ID 号	名称	P 值	基因
GO:0031983	囊泡	<0.01	IGF1//VEGFA
GO:0005615	细胞外间隙	<0.05	IGF1//CSTA//PTHLH//TAC1//VEGFA//WISP3
GO:0005614	间隙基质	<0.05	NAV2
GO:0005865	横纹肌细肌丝	<0.05	TNNT1
GO:0031012	细胞外基质	<0.05	VEGFA//NAV2//CRIP2
GO:0005737	细胞质	<0.05	PMEPA1//ATAD3A//RHOH//PAFAH1B2 等
GO:0005922	连接子	<0.05	GJD4
GO:0001533	角质化包膜	<0.05	CSTA
GO:0001772	免疫突触	<0.05	RHOH
GO:0005921	缝隙连接	<0.05	GJD4

2.4 定量 PCR 验证

用实时荧光定量 PCR 对 RA-FLSs (n=15) 及 CON-FLSs (n=15) 中 FZD10、TAC1、WISP3、PDE3A、VEGFA、IGF1、CASP8 和 TNFSF15 8 个基因的表达水平进行扩大验证。结果显示, TAC1、WISP、VEGFA 基因在 RA-FLSs 表达上调, TNFSF15 基因在 RA-FLSs 表达下调, 这四个基因表达水平与芯片结果一致 (见图 2)。



与对照组相比, *P<0.05, **P<0.01

图 2 实时定量 PCR 检测 8 个基因表达水平

Figure 2 Expression levels of 8 genes detected by real-time PCR

3 讨论

RA 是一种病因复杂的自身免疫病, 其中 FLSs 的异常增生是造成 RA 关节组织损伤和畸变的主要原因之一。本

文通过基因表达谱芯片技术对 RA-FLSs 与 CON-FLSs 进行基因表达谱的对比分析,发现了 103 个差异表达的基因转录本,参与了雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、低氧诱导因子(HIF-1)、细胞凋亡等信号通路,涉及了细胞生长迁移、白细胞激活分化、血管通透性改变等生物学过程。我们进一步扩大验证出了一些差异表达基因,包括 VEGFA、TAC1、WISP3 和 TNFSF15 基因。

血管内皮生长因子(VEGF)能强有力促进血管上皮细胞增生、迁移,提高血管通透性,介导炎症反应。VEGF 家族包括 VEGF A~E 和胎盘生长因子,其中 VEGFA 研究最多,诱导血管生成作用最强。RA 的发病机制与活跃的组织新血管形成密切相关,在 RA 发病机制的研究中,VEGF 很早就引起了广泛关注^[10]。研究显示 RA 患者滑膜组织、关节滑膜液、血清中 VEGF 表达量均高于骨关节炎(OA)患者及外伤患者;VEGF 在 RA 患者的 FLSs、巨噬细胞样滑膜细胞、中性粒细胞、滑膜液及血清中均呈现高表达状态^[11-13]。

TAC1 位于 7 号染色体,其编码产物 P 物质(substance p, SP)一直被认为是一种神经递质,作用于神经受体和平滑肌细胞,诱导血管舒张和促分泌素反应。近年来,越来越多的研究显示 SP 在多种癌症(如食管癌、胆管癌、胰腺癌、乳腺癌、肺癌等)中起到了促进肿瘤细胞增殖、迁移、转移的作用,抑制 TAC1 表达或使用 SP 受体拮抗剂,均可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、转移^[14-18]。这些研究提示 TAC1 在 RA-FLSs 类肿瘤样的增生过程中是否发挥一定的作用有进一步研究的价值。

WISP3 位于 6 号染色体长臂 2 区 1 带(6q21),属于 CCN 家族,编码富含半胱氨酸的分泌蛋白,与骨形成修复关系密切,基因突变会导致进行性假性类风湿发育不良^[19-21]。研究表明,WISP3 的异常表达与肿瘤相关,WISP3 在胃癌、膀胱癌、非小细胞肺癌中高表达,起到了致癌基因的作用^[21-22]。抑制膀胱癌细胞中 WISP3 表达,细胞增殖、迁移减少,凋亡增加^[22];抑制胃癌细胞中 WISP3 表达,细胞增殖、迁移减少,细胞粘附分子的表达减少,Wnt 信号通路被抑制^[23]。本研究发现 WISP3 在 RA-FLSs 中的表达上调,Nakano 等^[24]在 RA-FLSs 甲基化芯片分析中发现,WISP3 基因甲基化位点呈低甲基化,基因的低甲基化往往会造成表达水平上调,WISP3 是否参与了 RA-FLSs 的异常增生及对 RA 患者骨骼破坏修复产生影响,有待深入研究。

TNFSF15 可编码血管内皮细胞生长抑制因子(VEGI),被确定为一种抗血管生成的细胞因子,属于肿瘤坏死因子超家族。VEGI 通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(如 CDK2、CDK4、CDK6)抑制细胞增殖,通过激活应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinase, SAPK)诱导细胞凋亡,从而抑制血管生成、肿瘤生长等活动。VEGI 在肾透明细胞癌、垂体腺瘤等肿瘤中表达下调,在肿瘤细胞中过表达 VEGI,抑制细胞增殖、粘附、侵袭,促进细胞凋亡^[25-28]。应用基因工程技术制备重组人 VEGI,已经在治疗肿瘤的应用中取得了一定的进展^[29]。TNFSF15 表达下调在类风湿关节炎中可能通过减弱对 RA-FLSs 增殖、血管生成的负调控,减弱诱导 RA-FLSs 凋亡的作用参与到 RA 的发病过程中。

本研究通过芯片和定量 PCR 实验验证出 TAC1、WISP3、VEGFA 和 TNFSF15 基因在 RA-FLSs 中表达异常,通过基因本体分析和信号通路分析阐述了 RA-FLSs 异常的生物学过程、分子功能和信号通路,为进一步探讨 RA 发病机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Gabriel SE,Michaud K.Epidemiological studies in incidence,prevalence,mortality,and comorbidity of the rheumatic diseases[J].Arthritis Res Ther,2009,11(3):229-244.
- [2] Glossop JR,Haworth KE,Emes RD,et al.DNA methylation profiling of synovial fluid FLS in rheumatoid arthritis reveals changes common with tissue-derived FLS[J].Epigenomics,2015,7(4):539-551.
- [3] Lee JW,Ok MR,Lee S,et al.Detecting changes in arthritic fibroblast-like synoviocytes using atomic force microscopy[J].Microsc Res Tech,2015,78(7):982-988.
- [4] Bartok B,Firestein GS.Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J].Immunol Rev,2010,233(1):233-255.
- [5] 岳龙涛,伟 张,郑亚冰,等.表达芯片筛选类风湿关节炎特异表达基因[J].中国生物化学与分子生物学报,2014,30(9):899-904.
- [6] Li X-J,Xu M,Zhao X-Q,et al.Proteomic analysis of synovial fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis[J].Clin Exp Rheumatol,2013,31:552-558.
- [7] Sanayama Y,Ikeda K,Saito Y,et al.Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid

- arthritis: biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray[J].*Arthritis Rheumatol*,2014 ,66(6):1421-1431
- [8] 蔡文虹,孙保东,张宝凤,等.两种方法分离培养类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞的比较[J].*中国当代医药*,2012,19(21):13-14
- [9] Li G,Liu D,Zhang Y,et al.Celastrol inhibits lipopolysaccharide-stimulated rheumatoid fibroblast-Like synoviocyte Invasion through suppression of TLR4/NF-kB-mediated matrix metalloproteinase-9 expression[J].*PLoS One*,2013; 8(7):e68905.
- [10] 韩曼丽,章金春.雷公藤多苷对胶原诱导性关节炎大鼠组织中血管内皮生长因子及血管内皮生长因子受体 2 mRNA 表达水平的影响[J].*医学研究生学报*,2013,26(5):478-480.
- [11] Melinte R,Jung I,Georgescu L,et al.VEGF and CD31 expression in arthritic synovium and cartilage of human knee joints[J].*Rom J Morphol Embryol* ,2012,54(4):911-915.
- [12] Azizi G1,Boghozian R,Mirshafiey A.The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis[J].*Int J Rheum Dis*,2014,17(4):369-383.
- [13] Li BT,Zhang FZ,Xu TS,et al.Increasing production of matrix metalloproteinases,tumor necrosis factor- α ,vascular endothelial growth factor and prostaglandin E2 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by different adiponectin isoforms in a concentration-dependent manner[J].*Cell Mol Biol*,2015,61(7):27-32.
- [14] Dong J,Feng F,Xu GE,et al.levated SP/NK-1R in esophageal carcinoma promotes esophageal carcinoma cell proliferation and migration [J].*Gene*,2015,560(2):205-210.
- [15] Muñoz M,Coveñas R.Involvement of substance P and the NK-1 receptor in pancreatic cancer[J].*World J Gastroenterol*,2014,20(9):2321-2334
- [16] Harford WE,Lewis KM,Vink R,et al.Evaluating the role of substance P in the growth of brain tumors[J].*Neuroscience*,2014,261:85-94.
- [17] Muñoz M,González OA,Rosso M,et al.The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists[J].*Peptides*,2012,38(2):318-325.
- [18] Meng F,DeMorrow S,Venter J,et al.Overexpression of membrane metalloendopeptidase inhibits substance P stimulation of cholangiocarcinoma growth[J].*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2014,306(9):G759-G768.
- [19] Sun J,Xia W,He S,et al.Novel and recurrent mutations of WISP3 in two Chinese families with progressive pseudorheumatoid dysplasia[J].*PLoS ONE*,2012,7(6):e38643
- [20] Dalal A,Bhavani GS,Togarrati PP,et al.Analysis of the WISP3 gene in Indian families with progressive pseudorheumatoid dysplasia[J].*American Journal of Medical Genetics*,2012,158(11):2820-2828.
- [21] Nakamura Y,Weidinger G,Liang JO,et al.The CCN family member Wisp3,mutant in progressive pseudorheumatoid dysplasia,modulates BMP and Wnt signaling[J].*The Journal of Clinical Investigation* ,2007,117(10):3075-3086.
- [22] Zeng J,Liao Y,Zhou J,et al.Role of WISP3 siRNA in proliferation,apoptosis and invasion of bladder cancer cells[J].*Int J Clin Exp Med*,2015,8(8):12792-12800
- [23] Fang F,Kong,Tu L,et al.Silencing of WISP3 suppresses gastric cancer cell proliferation and metastasis and inhibits[J].*Int J Clin Exp Pathol*,2014,7(10):6447-6461.
- [24] Nakano K,Whitaker JW,Boyle DL,et al.DNA methylome signature in rheumatoid arthritis[J].*Ann Rheum Dis*,2013,72(1):110-117.
- [25] Zhang N,Wu P,Wu L,et al.The differential expression of vascular endothelial growth inhibitor isoforms,VEGI251,VEGI174 and VEGI192 in human clear-cell renal cell carcinoma[J].*Cancer Genom Proteom*,2013,10(1):47-53.
- [26] Wu L,Li X,Ye L,et al.Vascular endothelial growth inhibitor 174 is a negative regulator of aggressiveness and microvascular density in human clear cell renal cell carcinoma[J].*Anticancer Res*,2014,34(2):715-722.
- [27] Jia W,Sander AJ,Jia G,et al.Vascular endothelial growth inhibitor (VEGI) is an independent indicator for invasion in human pituitary adenomas[J].*Anticancer Res*,2013,33(9):3815-3822.
- [28] Gao Y,Ge Z,Zhang Z,et al.Vascular endothelial growth inhibitor affects the invasion,apoptosis and vascularisation in breast cancer cell line MDA-MB-231[J].*Chin Med J*,2014,127(10):1947-1953.
- [29] Duan L,Yang G,Zhang R,et al.Advancement in the research on vascular endothelial growth inhibitor (VEGI)[J].*Target Oncol*,2012,7(1):87-90.

基金项目: 国家自然科学基金(81470071)

作者简介: 张宇, 1990年生, 女, 硕士研究生, 从事肿瘤及免疫方面的研究

通讯作者: 李晓军, 主任技师, 教授, 博士, 硕士与博士研究生导师, E-mail: xiaojunli62@126.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

靶序列富集多重 PCR-液相芯片联合检测 4 种常见呼吸道病毒*

王洁, 王卫萍, 孙宁, 李晓军

南京军区南京总医院中心实验科, 南京 210002

[摘要] 目的: 建立一种基于液相芯片系统的 4 种常见呼吸道病毒快速分子检测方法, 为有效防控其发生和流行提供有力手段。**方法:** 针对 A 型流感病毒 (FluA)、B 型流感病毒 (FluB)、呼吸道合胞病毒 A 型 (RSVA) 和 B 型 (RSVB) 的保守区序列分别设计并合成了特异性引物、探针和通用引物, 构建 4 种病原体阳性参比品, 通过对扩增和杂交条件的优化, 建立了靶序列富集多重 PCR (Tem-PCR) 和 Luminex 液相芯片 (xMAP) 技术相结合的检测系统, 并对该检测系统进行了特异性、灵敏度评价。收集以急性上呼吸道感染为主要表现的患儿咽拭子标本, 用上述建立的方法进行检测分析, 分别与单病毒基因荧光定量 PCR 检测方法及 xTAG 液相芯片法进行比对检测。**结果:** 建立了 IFNA、IFNB、RSVA 和 RSVB 四种呼吸道病毒的特异性快速分子检测方法且灵敏度可达 10 拷贝/ μL 。用快速分子检测方法和单病毒基因荧光定量 PCR 法对 120 例疑似患儿咽拭子标本进行检测, 快速法阳性检出率为 31.7% (38/120), 荧光定量法阳性检出率为 29.2% (35/120)。经一致性检验分析提示两种方法一致性较强 ($k>0.7$)。部分标本同时采用 xTAG 液相芯片试剂盒进行检测, 经一致性检验分析提示两种方法一致性较好 ($k>0.6$)。**结论:** 临床的初步应用证实了 4 种常见呼吸道病毒快速分子检测方法具备灵敏、特异、快速等优点, 为临床早期、准确判断呼吸道感染的病原体提供实验依据。

[关键词] 呼吸道病毒; 靶序列富集多重-聚合酶链反应; 液相芯片技术; 荧光定量检测方法

近年来, 新发呼吸道传染病如 SARS、H1N1 的爆发和流行, 对人类的健康带来了巨大冲击, 仅 20 世纪, 全球就有超过 1 亿人因感染流感病毒而死亡^[1]。呼吸道传染病病原复杂, 传播迅速, 对婴幼儿及老年人的生存威胁较大, 由于这些病毒引起的感染症状和流行特点相似, 仅靠临床症状和常规检测方法进行病原的确定很不可靠, 因此迫切需要一种高度灵敏和特异性的方法, 以便为治疗疾病控制疫情等提供可靠依据。

目前, 国内传统的病原学检测方法主要包括病毒分离培养、血清学检测、免疫荧光检测等手段, 病毒分离培养仍是病毒鉴定的“金标准”, 但该方法存在实验条件要求高、检测周期长而灵敏度或特异度不足等问题, 限制了其指导临床诊疗和疫情监控方面的作用。随着微生物基因组计划的进展, 许多病毒的基因组序列已被破解, 已有 RT-PCR、Real-time PCR、Nested-PCR 等 [2-6] 技术对病毒进行快速诊断的相关报道。但由于 PCR 方法本身局限性, 不可能实现对病原体生物高通量检测。

本研究将靶序列富集多重 PCR (target enriched multiplex PCR, Tem-PCR) 扩增技术和液相芯片 (multiple analytes profiling, xMAP) 检测技术有机结合, 建立了呼吸道病原体的快速分子检测方法。该方法克服了病毒分离培养、血清学诊断及单一 PCR 的缺点, 可以在单个反应体系中快速高效地检测出 4 种常见呼吸道病毒。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

临床待检标本取自南京军区南京总医院儿科就诊的疑似患儿咽拭子标本和健康阴性对照咽拭子标本, 甲型通用型 RNA 检测试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司, 呼吸道病毒 RSV A/B 分型检测试剂盒、乙流病毒检测试剂盒、RNA 磁珠柱提取试剂盒均购自上海之江生物科技有限公司, TapDNA 聚合酶购自北京全土金生物技术公司, cDNA 第一链合成试剂盒购自南京天为生物技术有限公司, pCR[®] II 质粒载体等购自上海 Invotrigen 公司。ABI-7500 购自美国 ABI 公司, Luminex liquid-chip200 系统及配套耗材购自上海透景生命科技有限公司。

1.2 引物探针设计与合成

根据 Genbank 已发表的上述四种病毒的基因序列, 选择保守的区域作靶标序列, 利用 Primer 6.0 分析软件设计并制备特异性的引物 (Fo、Ro、Fi、Ri) 通用引物 (FSP、RSP) 及探针 (De), 所有引物和探针均有上海 Invotrigen 公司合成。四种病原体参比品设计: 涉及研究的 4 种呼吸道病毒基因组均为 RNA, 因此根据 RNA 的碱基序列合成 DNA, 并将合成的片段克隆到 pCR[®] II 载体中, 将重组质粒转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 经 PCR、酶切、测序后, 提取质粒, 测定浓度和纯度。

1.3 病原体核酸提取与处理

按 RNA 磁珠柱提取试剂盒说明,对收集到的咽拭子标本进行 RNA 提取。将 RNA 模板进行 RT-PCR,扩增体系为 30 μL : 5 \times qRT SuperMix 6 μL ,模板 RNA 24 μL ,反转录条件: 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.4 Tem-PCR 反应体系

Tem-PCR 反应体系: 10 \times Buffer 2.5 μL , dNTPs(2.5 mM) 2 μL , Transtart TapDNA 聚合酶 (2.5 U/ μL) 1 μL , 上下游特异性外引物 (Fo 和 Ro: 0.1 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL ,上下游特异性内引物 (Fi 和 Ri:0.4 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 上游通用引物 (FSP:0.5 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 下游通用引物 (RSP:2 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , 反转之后的 cDNA 模板 6 μL , 去 RNA 酶水补足至 25 μL 。扩增条件为: 初始 PCR 活化 95 $^{\circ}\text{C}$ 15min; 富集反应 8 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 4min 30s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 25s; 3 步反应 30 个循环: 93 $^{\circ}\text{C}$ 20s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 25s, 71 $^{\circ}\text{C}$ 15s; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 PCR 产物杂交及检测

选定四种不同型号的微球,然后与相对应的病原体探针进行交联。杂交反应实验流程: 1.5 \times 四甲基氯化铵溶液 (tetramethylammonium chloride solution, TMAC) 22 μL , 加上制备好的 4 种探针微球包被液各 0.1 μL 和 Tem-PCR 产物 3 μL 。杂交反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 活化 5min, 48 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 59min, 此时加入预热的藻红素链霉亲和素稀释液 (SA-PE) 75 μL 继续反应 15min。反应结束后在 Luminex Liquidchip 200 仪器上进行检测。用软件进行分析,标本平均荧光强度值 (mean fluorescent intensity, MFI) \geq 阴性对照标本 4 倍判定为阳性。

1.6 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量数据以均值 \pm 标准差 ($\pm s$) 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。不同检测方法之间的比较采用四格表配对计数的 χ^2 检验,并对一致性系数 k 进行评价。

2 结果

2.1 靶标病毒序列的验证

将含靶标病毒序列的重组质粒转化感受态大肠杆菌 DH5a,提取质粒进行测序鉴定,经软件比对插入的靶标病毒序列与设计的序列一致。将四种参比质粒 DNA 作为模板进行 Tem-PCR 反应,优化反应条件,建立了 Tem-PCR 反应体系。将 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,凝胶成像系统下观察并拍照 (图 1)。结果可见,IFNA、IFNB、RSVA、RSVB 依次扩增出的目的片段大小为 160bp、150bp、160bp、160bp,均与目的条带相符。将 PCR 产物送 Invitrogen 公司进行测序,用软件进行比对,证实所得 PCR 产物为设计使用的靶标病毒序列产物。

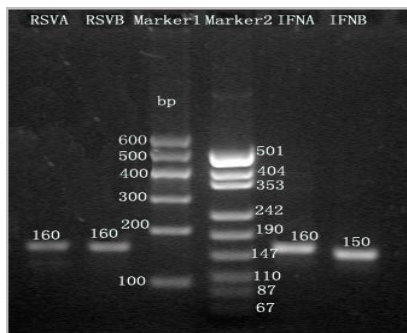


图 1 Tem-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 方法学评价

2.2.1 特异性评估

一种病毒模板,仅与相应目标微球探针产生特异性荧光信号,与其他微球探针及空白对照检测到平均荧光强度值具有显著差异 (图 2)。

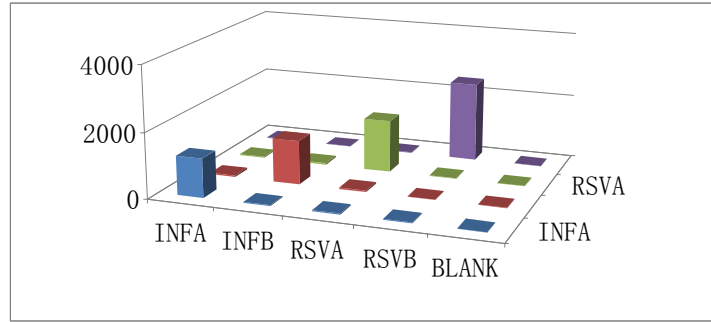


图2 体系特异性评估

2.2.2 灵敏度评估

提取重组质粒 DNA 经分光光度计定量后换算成拷贝数，对其倍比稀释，获 10^0 至 10^5 拷贝/ μL 的 6 个浓度梯度。各取 $1\mu\text{L}$ 做模板，检测灵敏度。试验非同日 3 次平行进行。显示检测下限可达 10 拷贝/ μL (图 3)，具有较高的灵敏度。

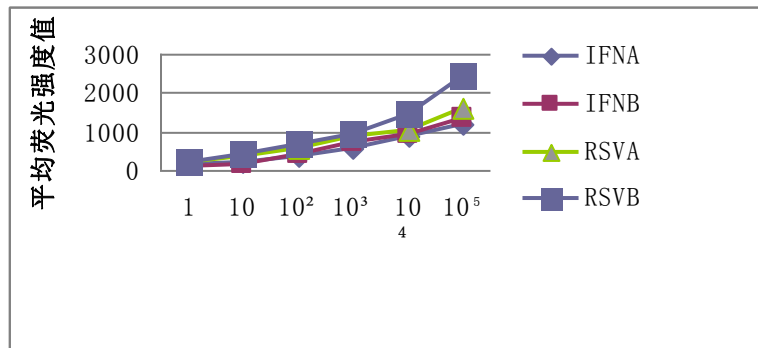


图3 评估检测方法的灵敏度 copies/ μL

2.2.3 重复性评估

选定重组质粒 DNA 10^3 拷贝/ μL 的浓度做模板，进行同批实验及非同批实验重复检测 10 次，比较批内、批间变异系数 (CV%)。(表 2) 结果可见具备良好的重复性。

表 2 批内、批间试验结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

病毒	批内 CV %		批间	
	CV %			
	($\bar{x}\pm s$)	CV(%)	($\bar{x}\pm s$)	CV(%)
IFN A	563.0 \pm 3	6.0	566.0 \pm 4	7.2
IFN B	608.0 \pm 3	5.0	600.0 \pm 4	7.0
RS VA	780.0 \pm 6	8.6	790.0 \pm 7	8.9
RS VB	887.0 \pm 7	8.7	897.0 \pm 8	9.0
BLANK	7.0		1.0	

2.2.4 种常见呼吸道病毒快速分子方法的检测结果

实验分 3 次平行进行。结果以标本 MFI 值 \geq 阴性对照标本 MFI 值 4 倍以上者判定为阳性。数据均以均值 \pm 标准差($\pm s$)表示。150 例标本中 30 例为健康阴性对照。检测结果显示，120 例疑似标本中甲型流感病毒阳性例数 24 例，检出率为 20%；呼吸道合胞病毒 A 阳性例数 1 例，检出率 0.83%；呼吸道合胞病毒 B 阳性例数 13 例，检出率 10.8%。未检测到乙型流感病毒和混合感染 (表 3)。

表3 4种呼吸道病毒快速分子检测结果

分组	例数	IFNA		IFNB		RSVA		RSVB	
		±s	阳性例数(%)	±s	阳性例数(%)	±s	阳性例数(%)	±s	阳性例数(%)
疾病组	120	202.7±51.5	24(20)	15.0±7.6	0(0)	165.0±6.6	1(0.83)	217.0±26.5	13(10.8%)
健康组	30	30.4±11.1	0	17.0±7.5	0	17.3±7.8	0	18.3±9.5	0

2.3 快速分子检测方法与荧光定量 PCR 法的比较

荧光定量 PCR 结果表明, 120 例疑似标本中检测到的阳性标本总数为 35 例, 其中甲型流感病毒阳性例数 22 例, 感染率 18.3%, 乙型流感病毒阳性例数 1 例, 感染率 0.83%, 呼吸道合胞病毒 B 阳性例数 12 例, 感染率 10%, 没有检测到呼吸道合胞病毒 A 及混合感染。使用配对计数的 χ^2 检验进行统计学分析, 其中针对甲型流感病毒两种检测方法的阳性与阴性总符合率 91.7%, $\chi^2=0.1$, $P>0.05$, 一致性系数检验 (Kappa) $k=0.731$, $P=0.000$, 提示两种检测方法一致性较强且有统计学意义; 针对呼吸道合胞病毒 B 两种检测方法的阳性与阴性总符合率 95.8%, $\chi^2=0.2$, $P>0.05$, 表明两种方法没有明显差异, 一致性系数检验 $k=0.777$, $P=0.000$, 提示两种检测方法一致性较强且有统计学意义。用荧光定量方法检测到 1 例乙流病毒阳性标本, 快速分子检测方法则没有检测到阳性结果。针对呼吸道合胞病毒 A 仅快速分子检测方法检测到 1 例阳性标本, 荧光定量方法则没有检测到阳性结果。

2.4 快速分子检测方法与 xTAG 液相芯片法的比较

采用 xTAG 液相芯片试剂盒对快速分子检测方法检测出的阳性标本 (24 例)、阴性标本 (6 例) 及健康对照 (2 例) 进行检测。经配对计数的 χ^2 检验, 结果显示针对甲型流感病毒两种检测方法的阳性与阴性总符合率 83.3%, $\chi^2=0.2$, $P>0.05$, 一致性系数检验 $k=0.667$, $P=0.000$, 提示两种检测方法一致性较好且有统计学意义; 呼吸道合胞病毒 B 两种检测方法的阳性与阴性总符合率 83.3%, $\chi^2=0.25$, $P>0.05$, 一致性系数检验 $k=0.619$, $P=0.000$, 提示两种检测方法一致性较好。用 xTAG 液相芯片法检测到两例 IFNB 阳性标本, 快速分子检测方法则没有检测到阳性结果。

表4 xTAG 液相芯片检测结果

sample	Boca	RSVA	H1	Meta	RSVB	H1N1	229E	OC43	NL63	HKU1	IFNA	IFNB	PIV-1	Aden	H3	PIV-3	PIV-2	Ente
例数	0	0	4	0	7	9	0	0	0	0	15	2	0	0	5	1	0	1

注: Boca: 人博卡病毒; H1: 甲型流感病毒 H1 型; Meta: 偏肺病毒; H1N1: 甲型流感病毒 2009 H1N1; 229E: 冠状病毒 229E; OC43: 冠状病毒 OC43; NL63: 冠状病毒 NL63; HKU1: 冠状病毒 HKU1; PIV-1/2/3: 副流感病毒 1/2/3 型; Aden: 腺病毒; Ente: 鼻病毒; H3: 甲型流感病毒 H3 型

3 讨论

多种病原体的分子检测需要有特异高效的多重扩增技术, 普通多重 PCR 有着不可克服的缺点, 如靶点不兼容、特异性和敏感性差, 扩增不均衡等^[7]。而 Tem-PCR 针对待扩增的每一种靶序列, 设计两对巢式的特异性引物 (Fo, Ro 和 Fi, Ri)。其中 Fi 和 Ri 引物带有一个能被通用引物识别的标签序列。巢式的靶序列特异性引物的浓度极低, 用于在 PCR 的最初几个循环中富集目标序列。只有通用引物的浓度足以进行指数扩增, 而且通用引物进行了生物素的标记。Tem-PCR 技术克服了传统多重 PCR 的障碍, 可在一个反应管内对多个目标基因进行高效特异的扩增, 是目前可靠性最高的多重 PCR^[8]。

液相芯片技术 (又称流式荧光) 是建立在基因芯片技术上的一项在液相体系中完成探针与目的基因杂交新技术, 它有机地整合了编码微球、激光技术、应用流体学、数字信号处理器和计算机运用等技术, 具有高度的检测特异性和灵敏度^[9]。可在一个反应孔内完成 100 种不同的生物学反应, 并将结果转化成数值 (MFI) 输出。目前该芯片技术在临床科研中得到广泛应用^[10-12], 并成为最早通过美国 FDA 认证的可用于临床诊断的生物芯片技术。

我们将 Tem-PCR 和液相芯片检测技术相结合,建立了呼吸道病原体的快速分子检测方法,该检测系统特异性灵敏性均较高,所有非阳性指标的 MFI 值均较低,阳性指标的 MFI 值和其他所有非阳性指标 MFI 值间的差异显著。对临床样本的检测结果进行统计分析,标本 MFI \geq 阴性对照标本 4 倍判定为阳性。阳性标本的 MFI 值大部分在 200 左右,个别阳性标本的 MFI 值略低,可能和病原体在咽拭子中的载量有关。此外,这种检测方法还能检出标本中多种病原体混合感染的现象,这是用常规方法一次实验所不能获得的信息。

采用建立的快速分子检测方法和实时荧光定量 PCR 方法对临床咽拭子标本同时进行了检测,结果显示快速分子检测方法阳性检出率为 31.7% (38/120),而实时荧光定量 PCR 阳性检出率为 29.2% (35/120)。经配对计数的 χ^2 检验,结果显示吻合系数 $k>0.7$, $P=0.000$,提示两种检测方法一致性较强且有统计学意义。

采用 xTAG 液相芯片试剂盒对快速分子检测方法检测出的阳性标本 (24 例)、阴性标本 (6 例)及健康对照进 (2 例)进行检测,经使用配对计数的 χ^2 检验,结果显示吻合系数 $k>0.6$, $P=0.000$,提示两种方法吻合度较好且有统计学意义。

本研究采用快速分子检测方法能在短时间内快速灵敏地检测临床标本中 4 种呼吸道病毒,说明该方法具有良好的临床实用价值,可用于临床快速诊断、预防院内感染,为控制大规模疫情爆发提供实验室方法。但是本检测方法也存在一些缺点:一是与文中提到的两种方法比较,快速分子检测方法敏感性较低,对于一些本身病毒载量就比较少的标本会出现漏检的现象,造成假阴性,比如针对 IFNB 的检测,快速分子检测方法就没有检测到阳性标本,原因可能是针对实际的临床样本检测,快速分子的检测条件还有待改善;二是 xTAG 液相芯片法能检测到更多的病原体感染的现象,快速分子检测方法则存在局限。针对以上问题,我们将在后期研究中加以改进和完善,包括对检测反应体系的进一步优化,和进一步扩大临床标本量,以期获得更加灵敏特异的结果及更广泛的临床应用。

参考文献

- [1] Beck ET, Henrickson KJ. Molecular diagnosis of respiratory viruses[J]. *Futur Microbiol*,2010,5(6):901-916.
- [2] Kehl SC, Kumar S. Utilization of nucleic acid amplification assays for the detection of respiratory viruses [J]. *Clin Lab Med*. 2009,29(4):661-671.
- [3] Huijskens EG, Biesmans RC, Buiting AG, et al. Diagnostic value of respiratory virus detection in symptomatic children using real-time PCR[J]. *Virol J*,2012,9:276-282.
- [4] Hymas WC, Mills A, Ferguson S, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for detection of influenza A, influenza B, RSV and typing of the 2009-H1N1 influenza virus[J]. *J Virol Methods*. 2010,167(2):113-118.
- [5] Benson R, Tondella ML, Bhatnagar J, et al. Development and evaluation of a novel multiplex PCR technology for molecular differential detection of bacterial respiratory disease pathogens[J]. *J Clin Microbiol*. 2008,46(6):2074-2077.
- [6] Wang W, Ren P, Sheng J, et al. Simultaneous detection of respiratory viruses in children with acute respiratory infection using two different multiplex reverse transcription-PCR assays[J]. *J Virol Methods*. 2009,162(1-2):40-45.
- [7] Han J. *Molecular differential diagnoses of infectious diseases: is the future now?*[M]. New York Springer Publishing Company,2006.
- [8] Han J, Swan DC, Smith SJ, et al. Simultaneous amplification and identification of 25 human papilloma virus types with multiplex technology[J]. *J Clin Microbiol*,2006,44(11): 4157-4162.
- [9] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection[J]. *Clin Chim Acta*,2006,363(12):71-82.
- [10] Mandy FF, Nakamura T, Bergeron M, et al. Overview and application of suspension array technology[J]. *Clin Lab Med*,2001,21(4):713-729.
- [11] 罗渊,刘伯华,祝庆余. 悬浮芯片在核酸和蛋白质检测中的应用[J]. *微生物学杂志*,2007,27(2):78-82.
- [12] Xiaoyan L, Jingying C, Mei K, et al. Development of high-throughput liquid chips for respiratory virus detection[J]. *Clin Lab*,2014, 60(3):347-361.

基金项目: 全军医学科技“十二五”科研项目 (CWS129811298); 南京军区医学科技重大专项 (14ZX17)

作者简介: 王洁, 1990 年生, 女, 硕士学位, 从事临床免疫方面的研究

通讯作者: 李晓军, 主任技师, 教授, 博士, 硕士与博士研究生导师, E-mail: xiaojunli62@126.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

I 类整合子对铜绿假单胞菌亚胺培南耐药诊断价值的 meta 分析

黄秋兰, 范德平¹, 高守霞¹, 刘红绸¹, 薛娜丽¹, 倪语星²

1. 上海南翔医院医学检验科, 上海 201802; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院微生物科, 上海 200025

[摘要] 目的:通过 Meta 分析探讨 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药的相关性, 以及 I 类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中的价值。**方法:**通过计算机检索中国生物医学文献数据库 (CBM)、中国知网 (CNKI)、万方数据库、维普数据库 (VIP) 以及英文 PubMed、Embase 等数据库, 检索国内、外关于 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关性的研究, 检索时间均为建库至 2015 年 12 月, 按纳入、排除标准由两人独立进行文献筛选、资料提取和质量评价后, 采用 RevMan 5.2 和 Meta-Disc 1.4 软件进行 Meta 分析。**结果:**共纳入 22 篇文献, 包含 2087 株临床分离的铜绿假单胞菌, 其中 I 类整合子阳性 1036 株 (49.6%), 亚胺培南耐药 842 株 (40.3%)。Meta 分析结果显示, I 类整合子在铜绿假单胞菌亚胺培南耐药株中检出率明显高于敏感株 (OR: 4.82, 95%CI: 2.68~8.66); I 类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中的合并敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比分别为 0.57 (0.54~0.60)、0.76 (0.73~0.79)、2.15 (1.62~2.86)、0.55 (0.43~0.70), SROC 曲线下面积 (AUC) 为 0.7564。**结论:** I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关; I 类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中具有一定特异度和准确度, 但敏感度较低, 建议临床上可联合其它检测方法使用, 提高其检验效能。

[关键词] 铜绿假单胞菌; 亚胺培南耐药; I 类整合子; 诊断价值; Meta 分

The value of class I integron in diagnosing the imipenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis HUANG Qiulan¹, FAN Deping¹, GAO Shouxia¹, LIU Hongchou¹, XUE Nali¹, NI Yuxing².

1. Department of Laboratory, Lanxiang Hospital, Shanghai 201802, China; 2. Department of Clinical Microbiology, Rui jin Hospital of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Objective:To evaluate the relativity between class I integron and imipenem resistance in *pseudomonas aeruginosa*, and assess the value of class I integron in diagnosing the imipenem resistance of *pseudomonas aeruginosa*. **Methods:**Such databases such as CBM, CNKI, WANFANG, VIP, PubMed and Embase were searched from their establishment to December 2015 for integron, imipenem resistance and *pseudomonas aeruginosa*. After study selection, assessment and data extraction conducted by two reviewers independently, meta-analyses were performed by using RevMan 5.2 and Meta-Disc 1.4. **Results:**Twenty-two studies were included with 2087 *pseudomonas aeruginosa* cases isolated from clinical specimens. 1036 cases (49.6%) were diagnosed as imipenem resistance, while 842 cases (40.3%) as positive class I integron. The results of the meta-analyses showed that class I integron was more common in imipenem-resistant *pseudomonas aeruginosa* (IMPRPA) than in imipenem-sensitive *pseudomonas aeruginosa* (IMPSPA) (OR: 4.82, 95%CI: 2.68~8.66). In the detection of class I integron for diagnosing the imipenem resistance in *pseudomonas aeruginosa*, the weighted sensitivity, specificity, positive likelihood ratio and negative likelihood ratio were 0.57 (0.54~0.60), 0.76 (0.73~0.79), 2.15 (1.62~2.86) and 0.55 (0.43~0.70) respectively, and the curve area under SROC curve was 0.7564. **Conclusions:**Class I integron was related with the imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. The detection of class I integron had certain diagnostic specificity and accuracy in diagnosing the imipenem resistance of *pseudomonas aeruginosa*, but with a relatively low sensitivity. It was suggested to be combined with other clinical trials to increase the power of test.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; Imipenem resistance; Integron; Diagnostic value; Meta-analysis

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas Aeruginosa*, PA), 俗称绿脓杆菌, 广泛分布于自然界及人体皮肤、胃肠道和呼吸道等处, 是医院感染最常见的病原菌之一。亚胺培南, 作为碳青霉烯类抗生素的代表药物, 被认为是控制临床上铜绿假单胞菌感染最为有效的抗菌药物之一。近年来, 随着多种抗生素的广泛使用, 铜绿假单胞菌耐药率不断上升, 耐药菌株不断增多, 特别是耐亚胺培南铜绿假单胞菌, 给临床抗感染治疗带来了极大挑战。

铜绿假单胞菌的耐药性主要表现在产生多种 β -内酰胺酶、膜微孔蛋白缺失、细胞主动外排机制, 近年来研究还发现, 整合子与铜绿假单胞菌耐药性的产生和传播相关, 但国内报道存在一定分歧, 特别是 I 类整合子。为此, 我们通过 meta 分析, 评估 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药的相关性, 同时探讨 I 类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中的价值。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 文献检索

在中国生物医学文献数据库 (CBM)、中国知网 (CNKI)、万方数据库、维普数据库 (VIP) 以及英文 PubMed、Embase 数据库中检索国内、外文献, 中文检索词为“铜绿假单胞菌 AND 亚胺培南 OR 整合子”, 英文检索词为“pseudomonas aeruginosa AND imipenem AND integron”, 检索年限从建库至 2015 年 12 月。同时, 手工检索相关会议论文、学位论文以及相关参考文献。

1.1.2 纳入和排除标准

纳入标准: (1) 检测对象为从临床标本分离、鉴定的铜绿假单胞菌。(2) 聚合酶链反应 (PCR) 检测 I 类整合子的遗传标记 *intI1*。(3) 药敏试验检测铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药性, 并以此为金标准。排除标准: (1) 仅检测铜绿假单胞菌中耐药株的 I 类整合子。(2) 未说明 I 类整合子在铜绿假单胞菌亚胺培南耐药株和敏感株中的分布情况。

(3) 重复发表、质量差、样本量太小及数据描述不详的研究。

1.2 方法

1.2.1 文献筛查、数据提取与质量评价

由两名评价者分别独立检索文献, 阅读摘要及全文, 根据纳入、排除标准选择相关文献, 并提取研究的发表信息、标本来源、菌株鉴定、药敏试验、PCR 反应、I 类整合子分布情况等指标。根据诊断性研究的质量评价 (quality assessment of diagnostic accuracy studies, QUADAS) 对纳入的文献进行质量评价。资料提取和质量评价如有争议, 请专家讨论解决。

1.2.2 统计分析

采用 RevMan 5.2 软件对所纳入研究进行 Meta 分析, 评价 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药的相关性。采用 I^2 对异质性进行分析, 若 $I^2 \geq 50\%$, 认为存在异质性, 进行敏感性分析及亚组分析, 寻找异质性来源, 若不能找出异质性原因, 则采用随机效应模型。若 $I^2 < 50\%$, 认为无异质性, 采用固定效应模型。采用漏斗图和 Begg's 检验对纳入的研究进行发表偏倚分析。

采用 Meta-Disc 1.4 软件对纳入研究进行诊断性 Meta 分析。评估研究间有无阈值效应引起的异质性时, 采用以敏感度对数与 (1-特异度) 对数的 Spearman 相关系数进行分析。若研究间存在异质性, 则采用随机效应模型合并敏感度 (Sensitivity)、特异度 (Specificity)、阳性似然比 (Positive LR)、阴性似然比 (Negative LR) 及 95% 可信区间 (95% confidence interval, 95% CI), 拟合综合受试者工作曲线 (summary receive operating characteristic curve, SROC) 曲线, 计算曲线下面积 (area under curve, AUC)。若无异质性, 则采用固定效应模型计算。P < 0.05 时, 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 文献检索结果及质量评价

通过计算机检索到 2888 篇文献, 按照研究制定的纳入、排除标准进行筛选后, 最终纳入 22 篇文献 (图 1), 共涉及 2087 株临床分离的铜绿假单胞菌, 其中 I 类整合子阳性 1036 株 (49.6%), 亚胺培南耐药 842 株 (40.3%)。纳入文献的基本特征, 见表 1。22 篇文献评分均在 18~25 分之间, 质量较高。

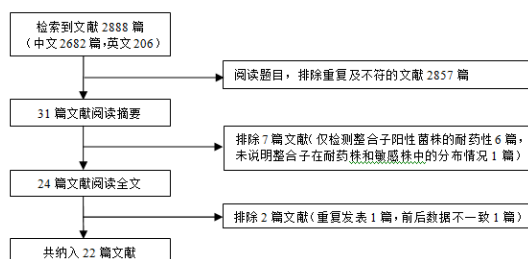


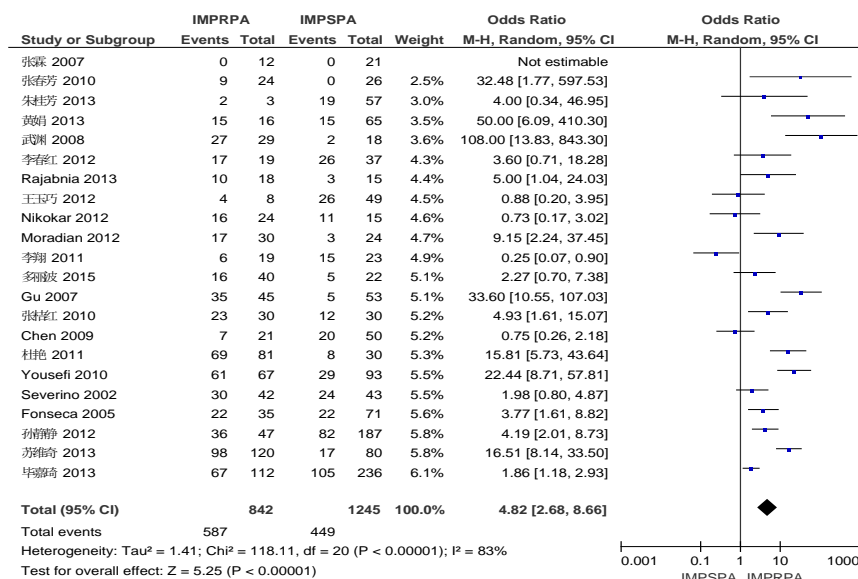
图 1 文献筛选流程图

表 1 纳入文献的基本特征

作者 时间	研究 地区	研究时间	标本 来源	标本种类	菌株鉴定	亚胺培 南 (IMP) 药敏试 验方法	药敏判定 标准	质控菌株	铜绿 菌株数	亚胺培南耐药株(%)			
										整合子+	整合子-	整合子+	整合子-
Severina 2002	巴西	1997-1998	ICU	—	梅里埃鉴定 系统	药敏卡	NCCLS 1998	—	85	30 (35)	12 (14)	24 (28)	19 (22)
Fonseca 2005	巴西	2000-2003	—	—	梅里埃鉴定 系统	—	—	—	106	22 (21)	13 (12)	22 (21)	49 (46)
Gu 2007	中国 江苏	2003-2005	多科室	—	梅里埃鉴定 系统	琼脂平 皿稀释 法	CLSI2006	—	98	35 (36)	10 (10)	5 (5)	48 (49)
张霖 2007	中国 浙江	2005-2006	ICU	痰液	梅里埃鉴定 系统	药敏卡	CLSI2005	ATCC25922ATCC27853	33	0 (0)	12 (36)	0 (0)	21 (64)
武洲 2008	中国 江苏	1997-2003	多科室	痰液、血液、脓液、 尿液、导管、口腔分 泌物、气管套管	梅里埃鉴定 系统	琼脂平 皿稀释 法	—	ATCC27853	47	27 (57)	2 (4)	2 (4)	16 (34)
Chen 2009	中国浙江	2006-2007	—	—	梅里埃鉴定 系统	药敏卡	CLSI2006	—	71	7 (10)	14 (20)	20 (28)	30 (42)
Youssefi 2010	伊朗	2007-2008	多科室	痰液、血液、导管、 脑脊液、胸水、伤口 分泌物	手工鉴定	琼脂平 皿稀释 法	CLSI2006	ATCC27853	160	61 (38)	6 (4)	29 (18)	64 (40)
张春芳 2010	中国江苏	2009	—	—	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	NCCLS	—	50	9 (18)	15 (40)	0 (0)	26 (52)
张桔红 2010	中国广东	2007-2008	多科室	痰液、创面、大便、 咽拭子、眼水	梅里埃鉴定 系统	药敏卡	CLSI2005	ATCC25922ATCC27853	60	23 (38)	7 (12)	12 (20)	18 (30)
李翔 2011	中国湖南	2007	多科室	痰液、分泌物、血液、 胸水	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	CLSI2006	ATCC27853	42	6 (14)	13 (31)	15 (36)	8 (19)
杜艳 2011	中国云南	2011	多科室	—	梅里埃鉴定 系统	药敏卡	CLSI2008	ATCC27853	111	69 (62)	12 (11)	8 (7)	22 (20)
Moradian 2012	伊朗	2011-2012	ICU	仪器设备	手工鉴定	琼脂平 皿稀释 法	CLSI2006	—	54	17 (31)	13 (24)	3 (6)	21 (39)
李春红 2012	中国山东	2008-2010	多科室	痰液、尿液、分泌物、 引流液、肺泡灌洗液	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	CLSI2010	ATCC27853	56	17 (30)	2 (4)	26 (46)	11 (20)
孙静静 2012	中国广东	2010	多科室	痰液、尿液、分泌物、 血液	BD Phoenix 鉴定系统	K-B 法	—	ATCC27853ATCC25922	234	36 (15)	11 (5)	82 (35)	105 (45)
王玉巧 2012	中国宁夏	2009	门诊	—	MicroScan Walkway 鉴 定系统	琼脂对 倍稀释 法	CLSI2005	—	57	4 (7)	4 (7)	26 (46)	23 (40)
Nikokar 2012	伊朗	2010-2011	烧伤科	伤口分泌物	手工鉴定	琼脂平 皿稀释 法	CLSI2008	ATCC27853	39	16 (41)	8 (21)	11 (28)	4 (10)
毕嘉琦 2013	中国广东	2008-2012	多科室	—	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	CLSI2010	ATCC27853	348	67 (19)	45 (13)	105 (30)	131 (38)
Rajabnia 2013	伊朗	2008-2009	ICU	仪器设备	手工鉴定	琼脂平 皿稀释 法	CLSI2011	—	81	15 (19)	1 (1)	15 (19)	50 (62)
黄娟 2013	中国广东	2011-2012	—	—	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	CLSI2011	ATCC27853	81	15 (19)	1 (0)	15 (19)	50 (62)
朱桂芳 2013	中国江苏	2011	—	痰液、尿液、血液	梅里埃鉴定 系统	K-B 法	CLSI2011	ATCC25922ATCC25923	60	2 (3)	1 (2)	19 (32)	38 (63)
苏维奇 2013	中国山东	2009-2011	—	—	MicroScan Walkway 鉴 定系统	NC31 实验板	—	ATCC27853	200	98 (49)	22 (11)	17 (8)	63 (32)
多丽波 2015	中国 黑龙江	2011-2012	—	痰液、尿液、分泌物、 血液	MicroScan Walkway 鉴 定系统	组合纸 片法	—	—	62	16 (26)	24 (39)	5 (8)	17 (27)

2.2 Meta 分析结果

评价 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关性时, 研究间存在较大异质性 ($I^2=83\%$)。采用随机效应模型, Meta 分析结果发现, I 类整合子在铜绿假单胞菌亚胺培南耐药株中检出率明显高于敏感株 (OR: 4.82, 95%CI: 2.68-8.66), 提示 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关 (图 2)。



注: IMPRPA: imipenem-resistant pseudomonas aeruginosa, 亚胺培南耐药铜绿假单胞菌; IMPSPA: imipenem-sensitive pseudomonas aeruginosa, 亚胺培南敏感铜绿假单胞菌

图 2 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关性的 Meta 分析

2.3 异质性分析

上述 Meta 分析纳入的研究间存在较大异质性, 遂进行敏感性分析及亚组分析, 寻找异质性来源。对研究地区、标本采集科室、标本来源、标本量、标本采集时间、细菌鉴定方法、药敏试验方法、质控菌株等因素进行亚组分析, 结果发现, 除了来源 ICU 的 4 个研究间和来源仪器设备的 2 个研究间同质性较好以外 (I²=43%、0%), 其余亚组中研究间的异质性均较大 (I²>70%), 但所有亚组中的合并结果无实质性改变 (表 2)。敏感性分析中, 逐一剔除所纳入的研究后, 结果无实质性改变, 但异质性仍较大 (81%~84%)。综上所述, 研究间异质性可能来源于铜绿假单胞菌自身生物性质的差异, 而非实验相关因素。因此, 本研究采用随机效应模型。

表 2 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关性的亚组分析

分组	研究数	OR 值	95%CI	异质性 (I ²)
研究地区				
国外	6	4.31	1.65~11.24	77%
国内	16	5.13	2.41~10.91	85%
标本采集科室				
ICU	4	3.90	1.48~10.26	43%
其他	18	4.95	2.54~9.64	85%
标本来源				
仪器设备	2	6.99	2.45~19.95	0
人体相关	20	4.67	2.48~8.77	85%
标本量				
大于 100 株	6	7.18	2.92~17.69	89%
小于 100 株	16	4.03	1.76~9.22	80%
标本采集时间				
2005 年前	4	10.74	2.25~51.16	87%
2005 年后	18	4.01	2.09~7.70	83%

细菌鉴定方法				
仪器	18	4.65	2.43~8.89	85%
手工	4	5.5	1.22~24.78	81%
药敏试验方法				
琼脂平皿稀释法	8	5.83	1.61~21.09	87%
纸片法	8	3.06	1.31~7.14	74%
药敏卡	5	7.21	2.52~20.67	81%
质控菌株				
无	9	3.79	1.65~8.72	75%
有	13	5.75	2.49~13.28	87%

2.4 诊断性 Meta 分析

诊断性 Meta 分析中,对纳入文献进行阈值效应分析后,发现 ROC 平面散点图不呈典型的“肩臂状”分布,提示不存在阈值效应, Spearman 相关系数=0.252, P=0.270, 也表明不存在阈值效应。由于研究间的敏感度、特异度、阳性似然比、阴性似然比均存在异质性 ($I^2=92.7\%$, 84.7% , 78.6% , 90.3%), 故采用随机效应模型进行分析。合并结果提示, I 类整合子诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药的敏感度为 0.57 (95%CI: 0.54~0.60), 特异度为 0.76 (95%CI: 0.73~0.79), 阳性似然比为 2.15 (95%CI: 1.62~2.86), 阴性似然比为 0.55 (95%CI: 0.43~0.70) (图 3)。SROC 分析提示, AUC=0.7564, 表明 I 类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中具有—定准确度 (图 3)。

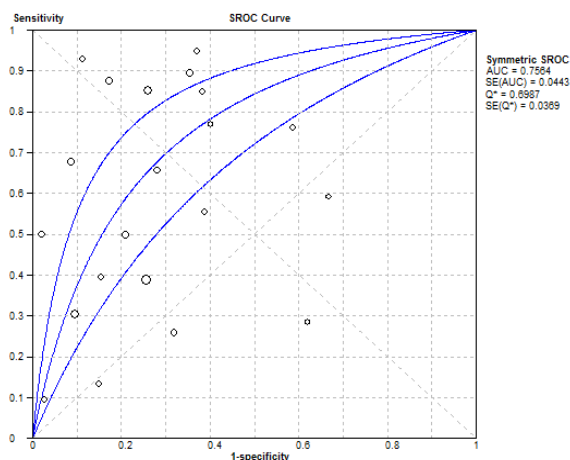


图 3 纳入研究的 SROC 曲线

2.5 发表偏倚评估

对纳入的 22 个研究进行发表偏倚分析, 结果发现, 漏斗图基本对称 (图 4), Begg' 检验结果 P 值为 0.1476, 说明纳入文献无明显发表偏倚。

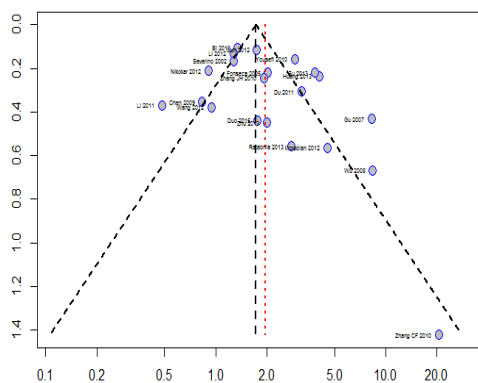


图 4 I 类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关性 Meta 分析的漏斗图

3 讨论

近年来,随着抗菌药物的广泛使用,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药呈上升趋势。铜绿假单胞菌耐药机制复杂,特殊的菌体结构,以及诱导产生 β -内酰胺酶、主动外排系统、耐药基因传播等机制,使其具有天然耐药和获得性耐药的特点。1989年Stokes和Hall^[10]提出了整合子的概念,目前已发现的整合子可分为8类,主要位于质粒及转座子上,可以随质粒和转座子在细菌间广泛传播^[11]。其次,整合子可携带多个耐药基因,特别是I类整合子^[11-12],可使耐药基因在不同种属细菌间水平传播以及在细菌子代垂直传播^[14]。因此,I类整合子被认为与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药密切相关。但国内研究结果存在一定分歧,部分研究发现铜绿假单胞菌亚胺培南耐药株(IMPRPA)与敏感株(IMPSPA)中I类整合子检出率无明显差别。

本研究通过Meta分析发现,I类整合子在IMPRPA中检出率明显高于IMPSPA(OR: 4.82, 95%CI: 2.68~8.66),提示I类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关。IMPRPA感染患者死亡率较高,快速诊断、及时更改治疗方案可以改善患者预后,但常规药敏试验需3~5天,不能及时反映患者病情进展。I类整合子聚合酶链反应(PCR)作为一种相对简单、快捷检测手段,如果能用于铜绿假单胞菌亚胺培南耐药的诊断,将更加迅速地为临床医师提供参考,便于及时调整治疗方案。为此,本研究评价了I类整合子检测在铜绿假单胞菌亚胺培南耐药诊断中的价值。结果显示,I类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中的合并敏感度和特异度分别为57%和76%,表明该诊断方法具有一定特异度,但敏感度较低。SROC曲线下面积(AUC)为0.7564,提示该诊断方法具有一定准确度。因此,我们认为I类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中存在一定价值。

综上所述,本研究分析表明,I类整合子与铜绿假单胞菌亚胺培南耐药相关,其次,I类整合子检测在诊断铜绿假单胞菌亚胺培南耐药中具有一定特异度和准确度,但敏感度较低,建议临床上可联合其它检测方法使用,提高其检验效能。

参考文献

- [1]李玮,王凯亮,熊祝嘉,等.353株铜绿假单胞菌的临床分布与耐药性分析[J].中国实验诊断学,2015,19(7):1107-1109.
- [2]方毅,赵付菊,赵虎.华东医院感染老年患者多重耐药和广泛耐药革兰阴性杆菌的耐药性分析[J].检验医学杂志,2015,30(5):474-477.
- [3]孙建芝,封建凯,李杰,等.医院内感染多重耐药铜绿假单胞菌耐药性[J].中国实验诊断学,2013,17(8):1391-1393.
- [4]郭宇,王辉,赵春江,等.2013年中国革兰阳性球菌多中心耐药检测研究.中华检验医学杂志,2015,38:373-381.
- [5]辜依海,朱啸,崔生辉,等.未经碳青霉烯类抗生素治疗患者检出亚胺培南不敏感铜绿假单胞菌.中华检验医学杂志,2012,35(8):716-721.
- [6]刘洋,邓琼,余阳,等.碳青霉烯类抗生素耐药铜绿假单胞菌的耐药机制及同源性分析[J].中华烧伤杂志,2014,30(1):15-20.
- [7]杨菁菁,艾郊曼,胡云建,等.泛耐药铜绿假单胞菌对 β 内酰胺类抗生素的耐药机制研究[J].中国感染与放化疗杂志,2013,13(1):14-18.
- [8]Pereira SG,Reis T,Mendez IP,et al.Prevalence and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamases from two central hospitals in Portugal.Microb Drug Resist, 2013,19(5):392-6.
- [9]祝亚文,张春霞,彭立.2007-2011年铜绿假单胞菌医院感染分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2013,23(21):5321-5323.
- [10]Stokes HW,Hall RM.A novel of family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions:integrans[J].Mol Microbiol,1989,3(12):1669-1683.
- [11]Hall BM,Brookes DE,Stokes HW.Site-specific insertion of genes into integrans:role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point[J].Mol microbial,1991,5(8):1941-1959.
- [12]Nikokar I,Tishayar A,Flakiyan Z,et al.Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrans among *Pseudomonas aeruginosa*,isolated from burn patients in Guilan,Iran.Iran J Microbiol, 2013,5(1):36-41.
- [13]Pereira SG,Reis T,Mendez IP,et al.Prevalence and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamases from two central hospitals in Portugal.Microb Drug Resist, 2013,19(5):392-6.
- [14]Vo AT,van Duijkeren E,Fluit AC,et al.Class 1 integrans in Dutch *Salmonella* enteric serovar Dublin isolates from clinical cases of bovine salmonellosis[J].Vet Microbiol,2006,117(2-4):192-200.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

中国光滑念珠菌药物敏感性及其基因分型*

侯欣¹ 范欣¹ 肖盟¹ 程敬伟¹ 王贺¹ 徐志鹏¹ 张戈¹ 康梅² 胡志东³ 孙自镛⁴ 万喆⁵ 陈淑兰⁶
廖康⁷ 褚云卓⁸ 胡铁石⁹ 倪语星¹⁰ 邹桂玲¹¹ 徐英春^{1*} 赵玉沛¹²

*基金项目：卫生公益性行业科研专项（项目编号：201402001）

1.中国医学科学院北京协和医院检验科 中国医学科学院北京协和医学院研究生院 北京 100730；2 四川大学华西医院实验医学科 四川 成都 610041；3 天津医科大学总医院医学检验科 天津 300052；4 华中科技大学同济医学院附属同济医院检验部 湖北 武汉 430030；5 北京大学第一医院检验科 北京 100034；6 哈尔滨医科大学附属第一医院检验科 黑龙江 哈尔滨 150007；7 中山大学附属第一医院检验科 广东 广州 510080；8 中国医科大学附属第一医院 辽宁 沈阳 110001；9 辽宁省人民医院检验科 辽宁 沈阳 110016；10 上海交通大学医学院附属瑞金医院临床微生物与感染控制科 上海 200025；11 哈尔滨医科大学附属第四医院检验科 黑龙江 哈尔滨 150001；12 中国医学科学院北京协和医院基本外科 北京 100730

*通讯作者：xycpumch@139.com

[摘要] 目的：了解我国光滑念珠菌药物敏感性及其多位点序列分析(MLST)和微卫星多态性分析的分型特点。**方法：**收集中国医院侵袭性真菌监测网(CHIF-NET) 2011-2012 中 11 家医院光滑念珠菌 177 株，采用显色微量肉汤稀释法检测九种药物（阿尼芬净，米卡芬净，卡泊芬净，氟胞嘧啶，泊沙康唑，伏立康唑，伊曲康唑和氟康唑）的敏感性。对 40 株光滑念珠菌采用 MLST 和微卫星多态性分析技术进行基因分型，并比较两种基因分型方法的结果和分辨力。

结果：177 株光滑念珠菌中，氟康唑耐药菌株 26 株，耐药率为 14.7%；无棘白菌素类药物耐药菌株。选取 40 株菌经 MLST 分型得到 7 个序列型，其中 ST7 型最多，占 80%；经微卫星多态性分析方法分为 11 个型别，其中 A 型最多，占 45%。**结论：**我国光滑念珠菌氟康唑耐药率与其他地区相近，棘白菌素类药物耐药率低于其他地区。微卫星多态性分析方法简便、快速，分辨能力高于 MLST。

[关键词] 光滑念珠菌；抗真菌药物敏感性；基因分型；多位点序列分析；微卫星多态性分析

The antifungal susceptibility and genotyping of *Candida glabrata* in China

Xin Hou¹, Xin Fan¹, Meng Xiao¹, Jingwei Cheng¹, He Wang¹, Zhi-peng Xu¹, Ge Zhang¹, Mei Kang², Zhi-Dong Hu³, Zi-Yong Sun⁴, Zhe Wan⁵, Shu-Lan Chen⁶, Kang Liao⁷, Yun-Zhuo Chu⁸, Tie-Shi Hu⁹, Yu-Xing Ni¹⁰, Gui-Ling Zou¹¹, Ying-chun Xu¹, Yu-pei Zhao¹².

(1.Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Laboratory of Clinical Microbiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China; 4. Department of Clinical Laboratory, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China; 5. Department of Clinical Laboratory, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 6. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150007, China; 7. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 8. Department of Clinical Laboratory, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China; 9. Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Liaoning Province, Shenyang 110016,China; 10. Department of Clinical Microbiology and Infection Control, Ruijin Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China; 11. Department of Clinical Laboratory, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001,China; 12. Department of General Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

[Abstract] OBJECTIVE: To understand the antifungal susceptibility and multilocus sequence and microsatellite

polymorphism typing of *Candida glabrata* in China. **METHODS:** A total of 177 *C. glabrata* from 11 hospitals were collected from China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) between 2011 and 2012. The in vitro susceptibility to nine antifungal drugs—fluconazole, voriconazole, itraconazole, posaconazole, caspofungin, micafungin, anidulafungin, amphotericin B and 5-flucytosine—was determined using chromogenic microbroth dilution methodology following the manufacturer's instructions. 40 isolates were typed by multilocus sequence typing (MLST) and microsatellite polymorphism. The results and discrimination power of the two genotyping methods were compared. **RESULTS:** Among 177 *C. glabrata*, 14.7% (26/177) were resistant to fluconazole. None of the isolates were resistant to echinocandins. By MLST, the 40 isolates belonged to seven clone sequences and 80% were ST-7. By microsatellite polymorphism, the 40 isolates were classified into 11 genotypes, while 45% were type A. **CONCLUSIONS:** The resistant rate of fluconazole in China is close to other regions, while the resistant rate of echinocandins is lower. Microsatellite polymorphism is a simple and rapid method for molecular typing with higher discrimination power than MLST.

[Keywords] *Candida glabrata*; Antifungal susceptibility; Genotype; Multilocus sequence typing; Microsatellite polymorphism

侵袭性念珠菌病是威胁社区和医院患者健康的重要原因，且预后差、病死率高。虽然白念珠菌是最常见的致病菌，但近几年非白念珠菌的比例逐渐增高^[1, 2]。其中光滑念珠菌就是其中备受关注的一种。它是引起粘膜和系统性感染的重要病原体，是导致念珠菌性阴道炎的第二大病原体，仅次于白念珠菌，并能够引起念珠菌血症和其他侵袭性感染^[3]。在美国，它是引起侵袭性念珠菌病的第二大病原体^[1]；在中国，光滑念珠菌在念珠菌中占第四位，仅次于白念珠菌、近平滑念珠菌复合体和热带念珠菌^[2]。光滑念珠菌对唑类药物，特别是对氟康唑敏感性低，临床上棘白菌素常常作为光滑念珠菌侵袭性感染的一线药物，但棘白菌素的耐药率也在增加，而且出现对氟康唑和棘白菌素类均耐药的菌株^[4]。当地光滑念珠菌流行病学和耐药情况将会影响临床决策的制定。但我国尚缺乏多中心、大规模的光滑念珠菌流行病学研究，因此了解我国光滑念珠菌的耐药情况及分子流行病学对指导临床医生用药，院感控制和医院管理十分重要。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定

来自我国多中心侵袭性真菌监测项目——中国医院侵袭性真菌监测网 (CHIF-NET) 2011 年-2012 中 8 省市 11 家医院收集的光滑念珠菌 177 株。所有菌株均在赛保罗培养基上进行复活、传代及分纯。菌株使用核糖体转录间隔区 (ITS) 区 DNA 测序及基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 方法鉴定为光滑念珠菌^[5]。ITS 测序所用引物: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。

1.2 仪器和试剂

Vitek MS (法国 bioMérieux 公司), ABI 3730XL 测序仪 (美国 ABI 公司), 科马嘉念珠菌显色培养基 (赛默飞生物化学制品 (北京) 有限公司), 含氯霉素的沙保弱葡萄糖琼脂培养基 (赛默飞生物化学制品 (北京) 有限公司), CHCA 肉桂酸基质 (法国 bioMérieux 公司), 甲酸 (法国 bioMérieux 公司), Sensititre YeastOne™ YO10 药敏板 (赛默飞生物化学制品 (北京) 有限公司), PCR Mix (其中包括 Tap DNA 聚合酶, Mg²⁺, dNTP。北京全式金生物技术有限公司), 酸化玻璃珠 (美国 sigma 公司) 等。

1.3 药敏试验

采用显色微量肉汤稀释法，按照标准操作说明书使用 Sensititre YeastOne™ YO10 药敏板进行药敏试验，可检测九种药物 (阿尼芬净，米卡芬净，卡泊芬净，氟胞嘧啶，泊沙康唑，伏立康唑，伊曲康唑和氟康唑) 的敏感性。临床判断折点根据 CLSI M27-S4，流行病学折点参照最新文献^[2]。

1.4 DNA 提取

从沙保弱培养基中挑取 3-5 个菌落转入加有 50 μl 酸化玻璃珠的 300 μl 无菌蒸馏水中混匀，震荡 1 min，100℃金属浴 15 min，离心机最大转速 (13300 rpm) 离心 5 min，取上清，4℃暂存或-20℃长期保存。

1.5 多位点序列分析 (MLST)

对 26 株氟康唑耐药和随机挑选的 14 株氟康唑敏感菌株, 共 40 株菌进行 MLST 和微卫星多态性分析分型。采用 Dodgson 等^[6]建立的方法确定光滑念珠菌基因组上的 6 个管家基因 (*FKS*、*LEU2*、*NMT1*、*TRP1*、*UGP1*、*URA3*) 为目的基因片段, 测序结果与 MLST 网站 (<http://cglabrata.mlst.net>) 进行比对, 确定等位基因号和 ST 型别, 并将 6 个基因串联得到 3345bp 长度的序列, 使用 MEGA 6.06 软件非加权配对算术平均法 (UPGMA) 绘制系统树图。

1.6 微卫星多态性分析

采用 Abbes 等^[7]推荐的方法确定光滑念珠菌基因组上的 6 个微卫星多态性分析位点 (*RPM2*、*ERG3*、*MTI*、*GLM4*、*GLM5*、*GLM6*) 作为目的基因片段, 引物序列和荧光标记见表 1, 结果采用 GeneMarker 软件进行分析, 读取片段大小。根据公式:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s x_j (x_j - 1)$$

计算该方法的鉴别力指数 (DP)。其中 N 是菌株总数, s 是所分组数, x_j 是 j 组中的菌株数。

表 1 微卫星多态性分析序列 PCR 荧光引物序列

位点	引物序列 (5'-3')	荧光标记
RPM2	F: ATCTCCCAACTTCTCGTAGCC	5' FAM
	R: ACTTGAACGACTTGAACGCC	-
ERG3	F: AGTGCGAGTGTATGTAAAGAATG	5' HEX
	R: CGTATACCTTATCTCCGTTC	-
MTI	F: CAGCAATAATAGCTTCTGACTATGAC	5' FAM
	R: GACAGGAGCAACCGTTAGGA	-
GLM4	F: AGTGTTTCATTGTCGCCTTC	5' TAMRA
	R: AATGCAGGCTCACCATTTTC	-
GLM5	F: TGGGGATAGTGGGAACCTCAA	5' HEX
	R: CGATGATTCATGTCCGATG	-
GLM6	F: GATGATTCTGCCCGTTAGGA	5' ROX
	R: CCTGAAGTAGGTGCCGAGAG	-

2 结果

2.1 药敏试验

CHIF-NET 2011-2012 年 8 省市 11 家医院共收集光滑念珠菌共 177 株, 药敏结果见表 2。其中氟康唑耐药菌株 26 株, 耐药率为 14.7%; 氟康唑耐药菌株主要分离自 ICU (38.5%, 10/26), 以血液标本为主 (53.8%, 14/26) (图 1); 泊沙康唑和伊曲康唑非野生型均为 19 株, 各占 10.7%; 伏立康唑非野生型 22 株, 占 12.4%; 阿尼芬净, 卡泊芬净和米卡芬净的耐药率为 0; 两性霉素 B 和氟胞嘧啶都是野生型。

表 2 九种抗真菌药物药敏试验结果

抗菌药物	MIC 范围($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₅₀	S/WT(%)	SDD(%)	R/non-WT(%)
氟康唑	0.5->256	16	—	85.3	14.7
伏立康唑	≤ 0.008 -4	0.25	87.6	—	12.4
伊曲康唑	0.06->16	0.5	89.3	—	10.7
泊沙康唑	0.03->8	1	89.3	—	10.7
卡泊芬净	0.03-0.25	0.06	98.9	1.1	0
米卡芬净	≤ 0.008 -0.06	0.015	100	0	0
阿尼芬净	≤ 0.015 -0.25	0.03	99.4	0.6	0
两性霉素 B	≤ 0.12 -1	0.5	100	—	0
5-氟胞嘧啶	≤ 0.06 -0.12	0.12	100	—	0

注: S. 敏感, SDD. 剂量依赖性敏感, R. 耐药, WT. 野生型, non-WT. 非野生型

2.2 MLST 分型

40 株光滑念珠菌均扩增至 6 个管家基因 (*FKS*、*LEU2*、*NMT1*、*TRP1*、*UGP1*、*URA3*)，各基因对应条带片段长度分别为 589 bp、512 bp、607 bp、419 bp、616 bp 及 602 bp。将每株菌 6 个基因测序结果与 MLST 数据库进行比对，结果显示 40 株光滑念珠菌得到了 7 个序列型 (见表 3)。ST7 型 32 株 (80%)，ST3 和 ST26 各 2 株，ST43 和 ST10 各 1 株，另外两株菌是新的等位基因型别，所作系统树图见图 1。其中 N2 型与 ST7 相近，仅 *TRP1* 基因中第 264 位的 C 变为 T，其它 5 个位点的序列与 ST7 完全一致；N1 型存在简并碱基，*TRP1* 基因中第 42 和 148 位为 G+A (R)，87 位为 G+T (K)，与数据库(<http://cglabrta.mlst.net>)中已经报道的 ST 型别也有一定差异。

表 3 MLST 基因分型结果

MLST 型	菌株数(%)	<i>FKS</i>	<i>LEU2</i>	<i>NMT1</i>	<i>TRP1</i>	<i>UGP1</i>	<i>URA3</i>
ST7	32(80)	3	4	4	3	3	4
ST3	2(5)	5	7	8	7	3	6
ST26	2(5)	7	4	3	4	1	8
ST43	1(3)	10	5	19	19	1	17
ST10	1(3)	8	4	3	5	1	2
N1	1(3)	7	5	14	N1	1	4
N2	1(3)	3	4	4	N2	3	4

注：N1 和 N2 是两个新型

图 1: 40 株光滑念珠菌 MLST 系统树图和微卫星多态性分析型别及菌株相关信息

注：HX. 四川大学华西医院，PU. 中国医学科学院北京协和医院，BD. 北京大学第一医院，TZ. 天津医科大学总医院，LR. 辽宁省人民医院，H1. 哈尔滨医科大学附属第一医院，GZ. 中山大学附属第一医院，RJ. 上海交通大学医学院附属瑞金医院，H4. 哈尔滨医科大学附属第四医院。

2.3 微卫星多态性基因分型

40 株光滑念珠菌所测的 6 个位点均只有一个峰值，等位基因分别命名为碱基对的长度。40 株菌分为 11 个型别，结果见表 4，其中 F、G、H、I、J 和 K 型各 1 株，A 型 18 株，B 型 10 株。DP 为 0.742。

表 4 微卫星多态性基因分型结果

基因型	菌株数 (%)	<i>RPM2</i>	<i>ERG3</i>	<i>MTI</i>	<i>GLM4</i>	<i>GLM5</i>	<i>GLM6</i>
A	18(45)	128	197	242	277	301	297
B	10(25)	128	198	242	277	301	297
C	2(5)	134	204	244	268	262	327
D	2(5)	122	181	243	283	265	324
E	2(5)	128	197	242	277	298	297
F	1(3)	122	238	243	301	262	311
G	1(3)	128	181	243	289	262	309
H	1(3)	128	197	242	277	298	300
I	1(3)	140	228	243	241	265	300
J	1(3)	128	198	242	277	304	297
K	1(3)	128	197	242	277	301	300

3 讨论

抗真菌药物敏感性试验在真菌耐药性监测流行病学研究中的作用越来越显著。在念珠菌中，光滑念珠菌由于对氟康唑敏感性低，并且对唑类药物交叉耐药，受到广泛关注。全球真菌检测项目——ARTEMIS 连续 10.5 年研究结果显示，光滑念珠菌的分离率 (11.3%) 仅次于白念珠菌 (65.3%)，且北美洲的分离率高于其他地区。其对氟康唑的耐药率为 15.7%，高于白念珠菌 (1.4%)、热带念珠菌 (4.1%) 和近平滑念珠菌 (3.6%)。对氟康唑耐药的菌株中 59.2%

对伏立康唑也耐药^[8]。在美国,与1992年-2001年相比,2001年-2007年光滑念珠菌血症由18%增至25%,对氟康唑的耐药率从9%增加到14%,可能与氟康唑预防和治疗用药量增加有关。研究发现光滑念珠菌的分离率与耐药率和地域分布有关。器官移植、造血干细胞移植、氟康唑暴露史是光滑念珠菌血流感染的危险因素。随着年龄的增长,血流感染中光滑念珠菌分离率增高,但对氟康唑的耐药率下降^[9]。Alexander等^[4]回顾性研究美国一家医院十年间(2001-2010年)血流感染313株光滑念珠菌,结果表明十年间光滑念珠菌对氟康唑的耐药率从18%增至30%,对棘白菌素的耐药率从4.9%增加到12.3%。全球真菌监测项目SENTRY2010-2012结果显示中国光滑念珠菌对氟康唑的耐药率为9.4%,高于白念珠菌和热带念珠菌,棘白菌素类不耐药^[10]。本研究中,光滑念珠菌氟康唑耐药率为14.3%,与其他地区耐药率相近,且氟康唑耐药菌株中84.6%(22/26)是伏立康唑非野生型。对棘白菌素的耐药率为0,低于其他地区。美国感染性疾病协会(IDAS)指南推荐棘白菌素作为侵袭性光滑念珠菌病的一线用药^[11]。国外已有唑类和棘白菌素药物多重耐药的菌株报道^[4],因此规范的药敏试验和耐药率监测十分重要。

光滑念珠菌是引起院感的常见病原体之一,其感染和定植的流行病学研究需要一种可靠的分型方法判断菌株亲缘性。多种分子生物学分型方法已用于光滑念珠菌中^[12]。脉冲场凝胶电泳(PFGE)能够分离大片段DNA,结果可靠、重复性好。但仪器昂贵,电泳时间较长,一次能够检测的样本数较少;限制性内切酶电泳(REA)是将DNA经一种或多种特定的限制性内切酶消化后剪切成长度不同的片段,通过琼脂糖凝胶电泳,EB染色后观察条带。基因变异导致内切位点改变使得菌株间带型有差异,其敏感性低于PFGE;DNA随机扩增(RAPD)使用大约10bp长度的随机引物进行扩增,PCR产物经凝胶电泳和EB染色后观察带型,依据整个基因组的随机基因标志物进行基因变异分析。该法操作简单、省时、价廉,但结果重复性较差;Southern印迹杂交采用放射性同位素或生物素标记DNA序列检测同源DNA,便于大型流行病学研究的系统性分析。在微进化和院内感染分析中优于RAPD和MLST,其缺点是需要放射性探针和计算机辅助系统自动化鉴定并结合条带的复杂性。本研究采用MLST和微卫星多态性分析方法进行分型。

MLST是目前公认的权威、客观、重复性好的基因分型技术,在院内感染、暴发、病原体监测和抗生素耐药机制研究中发挥重要作用。2003年由Dodgson等^[6]首次将该方法应用于光滑念珠菌分子分型中,分析了菌株的地理分布并检测基因重组。检测欧洲、美国、日本、智利等不同国家和地区的107株临床菌株和2株参考菌株的6个管家基因,共发现81个可变核苷酸位点,109株菌分为30个ST型别,其中ST3最多;应用UPGMA和最大简约法将相近的ST分为5个不同的组(I-V),结果显示菌株ST型别与地理位置有关,而与氟康唑的耐药性无关。Lin等^[13]分析台湾一家教学医院收集的80株光滑念珠菌,其中56株菌分为5个ST型别,24株为10个新型,ST72最多,占31.25%(25/80);而PFGE将80株菌分为54个基因型。研究表明MLST的分辨率低于PFGE,但与PFGE相比,其操作步骤简单,结果判断有标准数据库,可实现不同实验室试验分析结果之间的比较,为全球范围内大规模流行病学调查奠定了基础。Lott等^[14]在美国一项基于人群的大规模监测研究中,采用MLST分析引起念珠菌血症的230株光滑念珠菌,共发现127(3.8%)个可变核苷酸位点,菌株共分为31个ST,以ST16,ST19和ST3为主。研究结果显示ST型别与时间、地理位置有关。光滑念珠菌与白念珠菌相比,其MLST的可变位点百分率较低,因此分辨率也低,可能是其单倍体特征造成的^[6]。在本研究中,40株光滑念珠菌分为7个ST,ST7最多,不同于美国、台湾和世界其他地区的型别分布,再次证明光滑念珠菌ST型别与地域有关。此外,氟康唑敏感和耐药菌株中均以ST7为主,也说明ST型别与氟康唑的耐药情况无关。

微卫星多态性分析是具有高度多态性的2-6bp的短串联重复序列,其分型是采用荧光标记引物进行多重PCR然后通过基于测序的毛细管凝胶电泳读取片段长度。2005年由Foulet等^[15]首次将该分型方法应用于光滑念珠菌,该研究分析三个位点(RPM2、MTI和ERG3),并通过测序进行验证。将8株参考菌株和138株分离自不同医院和病房的临床菌株分为21个型别,DP为0.84。结果显示微卫星多态性分析型别与菌株分离部位无关,并证明该法有较好的稳定性和特异性。本研究中所选择的6个位点是根据Abbes等^[7]2012年进行的研究,该研究对85株不相关和118株相关菌株进行分型,在Foulet等的基础上,又增加了三个位点(GLM4、GLM5、GLM6),DP值增至0.949。本研究所得各片段长度与该文献中略有差异,可能与标记的荧光物质或仪器读取结果及软件分析判断长度大小存在微小差异有关。本研究中DP为0.742,低于其他研究,可能原因是菌株数目较少及菌株地理分布较集中。已有文献报道微卫星多态性分析法的分辨率高于MLST^[7]。本研究结果显示微卫星多态性分析将32株ST7菌株分为A、B、E、H、

J 和 K 型, 再次说明其分辨率高于 MLST。而且与 MLST 相比, 微卫星多态性分析更加简单、快速、价廉。

参考文献

- [1] Pfaller M A, Diekema D J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1): 133-163.
- [2] Xiao M, Fan X, Chen S C A, et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance[J]. J Antimicrobial Chemotherapy, 2015, 70(3): 802-810.
- [3] Glöckner A, Cornely O A. *Candida glabrata*-unique features and challenges in the clinical management of invasive infections[J]. Mycoses, 2015, 58(8): 445-450.
- [4] Alexander B D, Johnson M D, Pfeiffer C D, et al. Increasing Echinocandin Resistance in *Candida glabrata*: Clinical Failure Correlates With Presence of FKS Mutations and Elevated Minimum Inhibitory Concentrations[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 56(12): 1724-1732.
- [5] Zhang L, Xiao M, Wang H, et al. Yeast Identification Algorithm Based on Use of the Vitek MS System Selectively Supplemented with Ribosomal DNA Sequencing: Proposal of a Reference Assay for Invasive Fungal Surveillance Programs in China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(2): 572-577.
- [6] Dodgson A R, Pujol C, Denning D W, et al. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(12): 5709-5717.
- [7] Abbes S, Sellami H, Sellami A, et al. *Candida glabrata* strain relatedness by new microsatellite markers[J]. Europ J Clin Microbiol & Infectious Diseases, 2012, 31(1): 83-91.
- [8] Pfaller M A, Diekema D J, Gibbs D L, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1366-1377.
- [9] Pfaller M A, Messer S A, Hollis R J, et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10): 3185-3190.
- [10] Pfaller M A, Castanheira M, Messer S A, et al. In vitro antifungal susceptibilities of isolates of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. from China to nine systemically active antifungal agents: data from the SENTRY antifungal surveillance program, 2010 through 2012[J]. Mycoses, 2015, 58(4): 209-214.
- [11] Pappas P G, Kauffman C A, Andes D, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5): 503-535.
- [12] Abbes S, Amouri I, Sellami H, et al. A review of molecular techniques to type *Candida glabrata* isolates[J]. Mycoses, 2010, 53(6): 463-467.
- [13] Lin C Y, Chen Y C, Lo H J, et al. Assessment of *Candida glabrata* Strain Relatedness by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing[J]. J Clin Microbiology, 2007, 45(8): 2452-2459.
- [14] Lott T J, Frade J P, Lockhart S R. Multilocus Sequence Type Analysis Reveals both Clonality and Recombination in Populations of *Candida glabrata* Bloodstream Isolates from U.S. Surveillance Studies[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(4): 619-625.
- [15] Foulet F, Nicolas N, Eloy O, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(9): 4574-4579.

作者简介: 侯欣 (1990-), 女, 博士研究生, 主要从事微生物鉴定及耐药机制研究。

邮箱: houxinyffs@163.com 地址: 北京市东城区帅府园 1 号 电话: 010-69159744; 13716797252

*通讯作者: xycpumch@139.com

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

基于 MALDI-TOF 质谱技术无创产前检测胎儿 RhD 血型

李芮冰^① 翟艳红^② 段晋燕^① 刘萍^① 卢彦平^{②*} 王成彬^{①*}

①中国人民解放军总医院临床检验科 北京 100853

②中国人民解放军总医院妇产科 北京 100853

③首都医科大学附属北京妇产医院检验科

*通讯作者: luy301@163.com; wangcb301@126.com

[摘要] 目的: 基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(Matrix-assisted laser ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)分析母血浆游离 DNA 鉴定胎儿 *RHD* 基因型。**方法:** 本实验收集自 2013 年 8 月至 2015 年 3 月来自中国人民解放军总医院和北京妇产医院进行产前检查的孕 20~40 周 RhD 阴性健康单胎孕妇的外周血,其丈夫为 RhD 阳性,利用 MALDI-TOF MS 检测孕妇血浆游离 DNA *RHD* 基因外显子 4、5、7 和 10 以及 *RHD1227* 位点判断胎儿 *RHD* 基因型预测胎儿 RhD 血型,其判断结果与产后新生儿脐血血清学检测结果进行对比分析。**结果:** 收集 40 例 RhD 阴性孕妇的外周血游离 DNA,经过 MALDI-TOF MS 分析胎儿 *RHD* 基因外显子 4、5、7、10 及 *RHD1227A*,共发现 1 例 RhDel 型,1 例 RhD 阴性及 38 例 RhD 阳性。35 例皆得到产后脐带血的血清学验证。结果与产前胎儿 RhD 血型预测结果相符,5 例跟踪失访。**结论:** 利用 MALDI-TOF 质谱分析技术初步建立的无创产前诊断 RhD 阴性孕妇胎儿 RhD 血型的方法,准确性高、可行性好,可用于新生儿溶血病的预防。

[关键词] 胎儿; Rh-Hr 血型系统; 产前诊断

Noninvasive prenatal diagnosis of fetal RHD genotyping using MALDI-TOF mass spectrometry/LI Rui-bing, ZHAI Yan-hong, DUAN Jin-yan, et al

Department of Clinical Laboratory, the General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China

[Abstract] Objective: To establish a method for noninvasive prenatal diagnosis of fetal *RHD* genotyping from RhD-negative women based on matrix-assisted laser ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Methods:** RhD negative pregnant women with single fetus (20~40 gestational weeks) in the General Hospital of People's Liberation Army and Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital were recruited from August 2013 to March 2015. The existence of fetal DNA was confirmed by SNPs. Fetal RhD genotype was detected by MALDI-TOF MS targeting exon 4, 5, 7, 10 and *RHD1227A* to predict the fetal RhD status. A double blind trial was carried out to compare the results of fetal RhD detected by MALDI-TOF MS and serological tests on cord blood. **Results:** A total of 40 plasma samples were collected. Fetal RhD genotype was detected by MALDI-TOF MS targeting *RHD* exon 4, 5, 7, 10 and *RHD1227A*. 38 cases were identified RhD positive when one case was typed RhDel and one was RhD-negative. Five neonatal blood samples could not be obtained due to loss to follow up, and the remaining 35 genotypings were in concordance with newborn D phenotypes at delivery. **Conclusion:** These preliminary results demonstrate the feasibility of noninvasive prenatal diagnosis of fetal RhD status from RhD-negative maternal plasma in Chinese population using MALDI-TOF mass spectrometry.

[Key words] fetus; Rh-Hr blood-group system; prenatal testing

胎儿溶血症是指母体致敏情况下体内出现抗胎儿红细胞抗原抗体,其与胎儿红细胞表面抗原结合发生溶血,导致胎儿出现贫血、水肿等一系列症状的一种被动免疫性疾病。母胎 Rh 血型不合是胎儿发生同种免疫反应的主要原因^[1, 2]。针对 RhD 阴性孕妇,若其胎儿为 RhD 阳性,则需动态监测其抗 D 抗体水平及变化,并在妊娠 28~30 周肌内注射 300 μ g 抗 D 免疫球蛋白,产后 72 小时内追加 300 μ g 抗 D 免疫球蛋白^[1-3];若胎儿为 RhD 阴性则不会引起母体致敏,孕期无需处理。临床上缺乏安全、有效、直接的方法可以在早中孕期鉴定胎儿 RhD 血型,故无论胎儿是否为 RhD 阴性均需要监测抗 D 抗体,肌注抗 D 免疫球蛋白,这无疑造成昂贵血制品的滥用,更为尴尬的是国内尚无公立医院出售抗 D 免疫球蛋白,孕产妇需自行网络购买,存在安全隐患。因此,胎儿 RhD 血型的产前诊断对 RhD 阴性孕妇妊娠期母胎监测以及新生儿溶血病的预防和治疗具有重要意义。

本研究根据已报道的有关中国 RhD 阴性人群 *RHD* 基因型特点设计特异性引物, 并通过联合 Sequenom MassARRAY® SNP 检测、多重 PCR 技术、MassARRAY iPLEX 单碱基延伸技术和 MALDI-TOF MS 进行检测, 与产后脐血血清学鉴定结果比较评价该无创产前检测胎儿 RhD 血型方法的有效性和准确性, 为临床医师指导 RhD 阴性孕妇注射抗 D 免疫球蛋白制品提供科学依据, 避免不必要的医疗资源浪费。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

孕妇外周血标本均取自 2013 年 8 月至 2015 年 3 月中国人民解放军总医院进行产前检查的 RhD 阴性健康孕妇, 孕 20~40 周, 平均 26 周, B 超确定为单胎。经其本人及家人知情同意后, 抽取其 EDTA 抗凝全血 8ml, 在 4h 内于 1600g/min 离心 10min, 小心吸取上层血浆加入另一离心管中, 再次以 16000g/min 离心 10min, 小心吸取上层血浆置于 -20℃ 冻存。另取 1 例无妊娠的 RhD 阳性健康者外周 EDTA 抗凝血 2ml 作为阳性对照, 同时取蒸馏水做阴性对照。胎儿自然分娩后抽取脐带血 2ml 进行 RhD 血型的血清学实验。

1.1.2 标本纳入排除标准

(1) 纳入标准:

- ① 配偶为 RhD 阳性的 RhD 阴性孕妇;
- ② 孕 20~40 周单胎妊娠;
- ③ 接受基因检测, 产后可提供脐血, 依从性好, 能够定期随访的孕妇。

(2) 排除标准:

- ① 高体重孕妇 (体重大于 100 千克)

体重过重的孕妇血浆 cfDNA 含量偏低, 因怀孕血液循环容量增加, 稀释了血浆中的 cfDNA, 血液中相对增多的凋亡脂肪细胞, 提高了血浆中母亲 cfDNA 的含量, 导致 cfDNA 的含量降低, 一旦 cfDNA 含量低于 NIPT 检测的最低要求 4%, 就存在假阴性的风险。

② 通过体外授精-胚胎移植方式受孕的孕妇

通过体外授精-胚胎移植方式受孕的孕妇妊娠情况比较复杂, 易出现双胎/多胎妊娠, “双胎一胎消失综合征”等情况, NIPT 结果可能不准确。

③ 双胎的 RhD 阴性孕妇或双胎之一胎死宫内的 RhD 阴性孕妇

④ 孕妇 1 年内接受过异体输血、移植手术、细胞治疗或接受过免疫治疗等对 NGS 结果将造成干扰者。接受异体输血、移植手术及细胞治疗时, 外来组织和细胞凋亡后基因组 DNA 进入母体外周血浆中, 增加检测假阳性风险。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取

(1) 基因组 DNA 提取

2ml EDTA 抗凝血标本, 按照 Wizard® Genomic DNA Purification Kit 试剂盒(美国 Promega 公司)说明书提取 DNA, -20℃ 存放备用。

(2) 母血游离 DNA 提取

8ml EDTA 抗凝血标本在 2~3h 内处理, 血液样本以 4℃ 1600g 离心 10 min 后收集上层血浆, 再次 16000g 4℃ 离心 10 min, 将上清收集于 0.5 ml EP 管内, 采用 Ex-DNA 血清血浆游离核酸提取试剂盒(西安天隆科技公司)提取血浆游离核酸, 操作按说明书进行, -20℃ 存放备用。

1.2.2 MALDI-TOF MS 检测胎儿 RhD 基因型

1.2.2.1 多重 PCR 扩增

身份鉴别所用的 50 种 SNP 引物由毅新兴业有限公司提供, 因专利因素尚不能公开其全部引物序列, 只列出 6 个 SNP 位点引物探针序列, 见表 1。

鉴定 RhD 血型的引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成, 序列见表 2 和 3。PCR 反应体系如下表 4, 在兼容 384 孔板的 PCR 仪进行 PCR 扩增, 扩增条件为 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min,

进行 45 个循环，最后 72℃持续 5 min。

表 1 SNP 位点引物探针序列

SNP 位点	引物探针序列
rs1829309	F: ACGTTGGATGATCTCTGAGTTGACACCACC R: ACGTTGGATGTTCCCTAATCAGGAGAGACCG P: TTGCTTTGGGGAGCAG
rs7551188	F: ACGTTGGATGATCCCTGGTTCCTTCCTTAG R: ACGTTGGATGGAGCCTCTCAGTGTCTATAC P: GGACAGATTCTGGGAC
rs12125888	F: ACGTTGGATGCAACATCCTGTACATCACTC R: ACGTTGGATGAGACAATTTCTGTCCTCTGG P: TACATGACTATCTCCTCCCTTAGGT
rs4487973	F: ACGTTGGATGTCAGAGAGTGACAAGACCTG R: ACGTTGGATGGAATGCATGCCAACTTAGGG P: CAGGTCACACAGTTAGGATT
rs2050927	F: ACGTTGGATGTTCTAGCTTGCTTCTCCTCC R: ACGTTGGATGTTGGGTGCAGAGTAGTCATC P: TGCTTCTCCTCCATCATCCTTAGC
rs11166512	F: ACGTTGGATGCTTCATCCACTATATCCACC R: ACGTTGGATGTGACCAGATGTTGGATTAG P: CCACTATATCCACCTTTTCT

表 2 RHD 基因引物探针序列

引物名称	引物碱基序列 (5'-3')	产物大小 Da
<i>RHD</i> EXON 4 F	ACGTTGGATGCTGCCAAAGCCTCTACTCG	6808.4
R	ACGTTGGATGTGGCAGACAAACTGGGTCTC	
P	GAACGGAGGATAAAGATCAGA	
<i>RHD</i> EXON 5 F	ACGTTGGATGAATCGAAAGGAAGAATGACG	8168.4
R	ACGTTGGATGCTGAGATGGCTGTCACCTCG	
P	ATGCCGTGTTCAACACCTACTATGCT	
<i>RHD</i> EXON 7 F	ACGTTGGATGAGCTCCATCATGGGCTACAA	8360.3
R	ACGTTGGATGTTGCCGGCTCCGACGGTATC	
P	CTTGCTGGGTCTGCTTGGAGAGATCA	
<i>RHD</i> EXON 10 F	ACGTTGGATGACGCTCATGACAGCAAAGTC	7656.9
R	ACGTTGGATGAACTCCATTTTCTCTGACTC	
P	GGTCTCCAATGTTCCGCGCAGGCAC	

表 3.RhDel 型检测

基因位点	引物探针	探针引物 Da	延伸碱基	延伸产物分子量 Da
<i>RHD</i> 1227	F:ACGTTGGATGAAATCTTAAATATGGAAAAG R:ACGTTGGATGTTTAAAGTTCATGCACTCAA P:CGTTAATAGGTGAAAAATCTTAC	7070.6	G A	7317.8 7397.7

表 4.PCR 反应体系配置表

PCR 反应体系	每个反应(μl)
模板	1
10 \times 缓冲液	0.5
Mg ²⁺ (25mM)	0.4
dNTP(25mM)	0.1
引物混合 (0.5 μM)	1
Hotstar Taq(5U/ μl)	0.2
水	1.8
总量	5

1.2.2.2 虾碱性磷酸酶处理 PCR 反应产物

(1) 虾碱性磷酸酶混合液按下表 5 配制。

表 5. 虾碱性磷酸酶混合液配制

虾碱性磷酸酶混合液	体积(μl)
10 \times 缓冲液	0.17
虾碱性磷酸酶(1.7U/ μl)	0.3
水	1.53
总体积	2

(2) PCR 反应结束后, 将 2 μl 虾碱性磷酸酶混合液加入 384 孔反应板内, 每个孔内反应体系总体积共 7 μl , 其中虾碱性磷酸酶混合液 2 μl , 原 PCR 反应产物 5 μl 。在兼容 384 孔板的 PCR 仪于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 min 后置于 85 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 使虾碱性磷酸酶失活。

1.2.2.3 单碱基延伸

(1) 配制单碱基延伸混合液如下表 6。

表 6 单碱基延伸混合液配制

单碱基延伸混合物	体积(μl)
延伸引物	1
iPLEX 缓冲液	0.2
iPLEX 终止液	0.2
iPLEX 酶	0.041
水	0.559
总体积	2

(2) 在虾碱性磷酸酶处理结束后, 进行单碱基延伸反应, 总体积共 9 μl , 其中上一步反应产物 7 μl , 加入的延伸混合物 2 μl , 在兼容 384 孔板的 PCR 仪上, 进行 PCR 反应, PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30s; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 5s, 80 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5s, 内部 5 个循环, 持续外部 40 个循环。最后 72 延伸 3 min。

1.2.2.4 树脂纯化

PCR 反应完成后将反应产物的 384 孔板中加入 16 μl 三蒸水, 在离心机中离心 2000 转离心 3min。加入 6 mg 树脂导入延伸产物板中, 封膜, 在反转摇匀仪上做树脂纯化反应 35 min, 反应完成后在离心机中离心 2000 转离心 3 min。将脱盐处理后的样品点在样品靶上, 自然结晶; 质谱检测并应用 Typer 4.0 软件检测质谱峰, 并根据质谱峰图判读各样本目标位点基因型。

1.2.2.5 结果判读

若标本外显子 4、5、7、10 都未检测到峰, 则胎儿血型判为 RhD 阴性, 若 4 个外显子皆检测到峰, 且 RHD1227

未检测到 G>A 突变则胎儿血型判为 RhD 阳性, 若 4 个外显子皆检测到峰, 且 *RHD*1227 检测到 G>A 突变则胎儿血型判为 RhDel 型。对于只检测到 1 个或多个外显子信号的判断, 若只检测到 7 和 10 或检测到 10, 则胎儿血型判为 RhD 阴性。其他情况需结合母亲 *RHD* 基因型判读胎儿 RhD 血型。若与母亲的 *RHD* 基因型相同, 则胎儿判为 RhD 阴性; 若与母亲的 *RHD* 基因型不同, 则判为胎儿血型不清, 临床按胎儿血型为 RhD 阳性处理。

1.2.2.6 血清学检查血型

将用于 RhD 血型鉴定的孕妇外周血及胎儿出生后的脐血送至解放军总医院临床检验科进行血型鉴定。RhD 血型的鉴定包括抗人球蛋白实验及吸收放散实验, 保证血型的可靠。

2 结果

2013 年 8 月至 2015 年 3 月共收集 40 例经解放军总医院临床检验科血清学鉴定为 RhD 阴性孕妇的外周血。经 MALDI-TOF MS 分析孕妇血浆游离 DNA 的 *RHD* 外显子 4、5、6、7、10 及 *RHD*1227A 信号, 共发现 38 例 RhD 阳性(发现 *RHD*4、5、7、10 且无 1227G>A 突变信号如图 1), 1 例 RhDel 型(发现 *RHD*4、5、7、10 及 1227G>A 信号如图 2) 及 1 例 RhD 阴性(未检测到 *RHD* 相应信号图 3)。35 例皆得到产后脐带血的血清学验证, 结果与产前胎儿 RhD 血型预测结果完全相符。5 例 RhD 阳性跟踪失访。

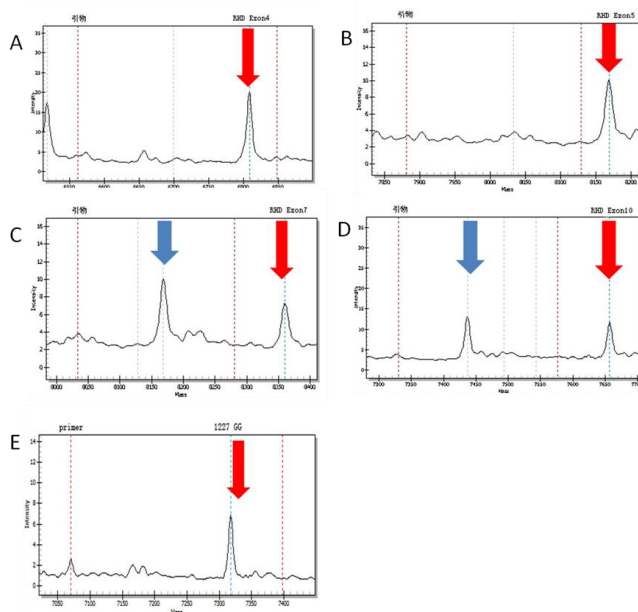


图 1 母血浆游离胎儿 DNA RhD 阳性基因检测结果图

A 为 *RHD* 外显子 4 的检测图, 相应峰出现在 6810 Da 处; B 为 *RHD* 外显子 5 的检测图, 相应峰出现在 8170 Da 处; C 为 *RHD* 外显子 7 的检测图, 相应峰出现在 8360 Da 处; D 为 *RHD* 外显子 10 的检测图, 相应峰出现在 7650 Da 处; E 为 *RHD*1227 位点的检测图, 峰出现在 7320 Da 处, 说明其等位基因为 GG (蓝色箭头指示 SNP 位点, 红色箭头指示所检测到的相应外显子信号)。

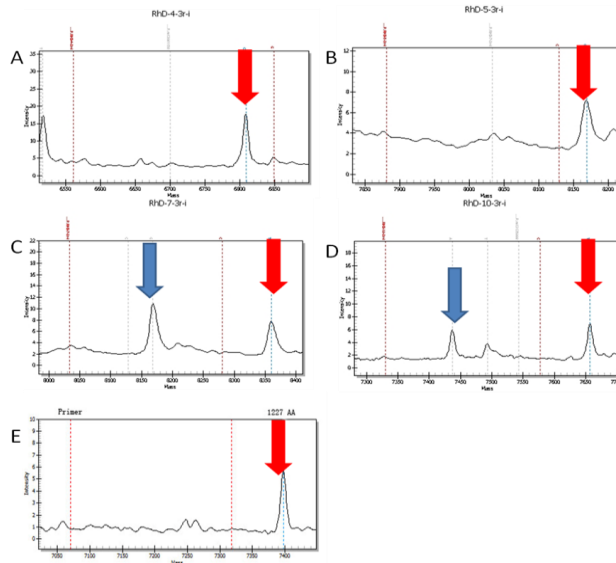


图2 无创产前诊断胎儿为 RhDel 型质谱检测结果图

A 为 *RHD* 外显子 4 的检测图，相应峰出现在 6810 Da 处；B 为 *RHD* 外显子 5 的检测图，相应峰出现在 8170 Da 处；C 为 *RHD* 外显子 7 的检测图，相应峰出现在 8360 Da 处；D 为 *RHD* 外显子 10 的检测图，相应峰出现在 7650 Da 处；E 为 *RHD*1227 位点的检测图，峰出现在 7400 Da 处，说明其等位基因为 AA（蓝色箭头指示 SNP 位点，红色箭头指示所检测到的相应外显子信号）

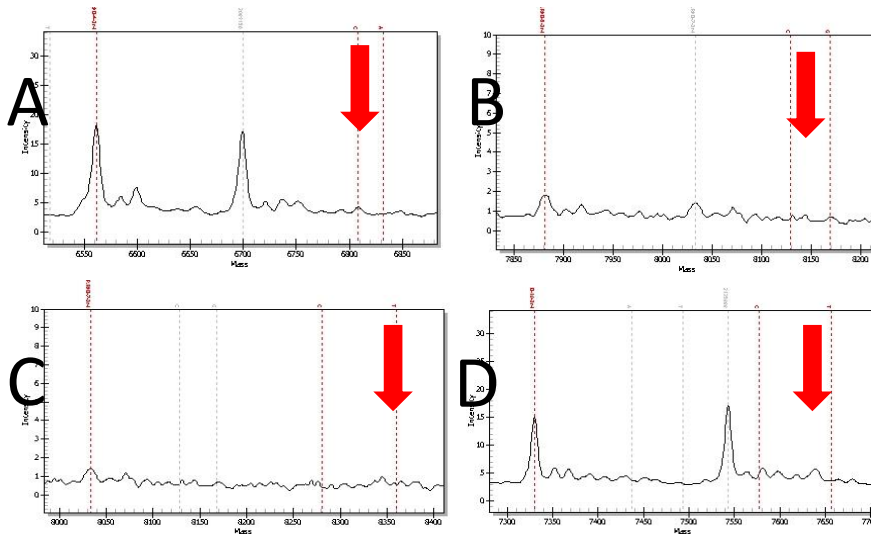


图3 无创产前诊断胎儿为 RhD 阴性质谱检测结果图

A 为 *RHD* 外显子 4 的检测图，在 6810 Da 处无相应峰；B 为 *RHD* 外显子 5 的检测图，在 8170 Da 处无相应峰；C 为 *RHD* 外显子 7 的检测图，在 8360 Da 处无相应峰；D 为 *RHD* 外显子 10 的检测图，在 7650 Da 处无相应峰（红色箭头指示所检测到的相应外显子信号）

3 讨论

胎儿 RhD 血型的无创产前诊断目前主要通过 Realtime PCR 等技术检测母血游离胎儿 DNA，存在一定的假阴性，这主要是由于母血中游离胎儿 DNA 在总的游离 DNA 片段中仅占 6%~10%，很容易受到母血背景中其他游离核酸的混淆，对此解决方法：一是只针对那些胎儿具备而母亲不具备的 DNA 序列进行检测，如男胎 Y 染色体 DNA 片段^[18, 19]等。由于这种方法只能鉴别不多的源于父系的基因，临床应用上较受限制。二是基于母胎 DNA 序列上存在特异性的差异性位点而实现的，如差异性甲基化位点 *RASSF1A*、*Maspin* 基因等^[20, 21]。利用甲基化差异性有效的识别胎儿 DNA，这会降低假阴性率。但是甲基化过程较为复杂，且耗时较长，临床应用也较为受限。本研究利用 MALDI-TOF

MS 一次性可检测大量样本,检测周期短,成本较低,方便快捷等特点应用由毅新兴业有限公司提供的身份识别系统即 50 种不同 SNP 位点鉴别胎儿 DNA 存在,使得无创产前诊断不受胎儿性别限制,拓展了母血游离胎儿 DNA 在胎儿 RhD 血型检测中的应用。

无创性产前诊断 RhD 阴性孕妇胎儿 RhD 血型一直以来都是产前诊断领域的一个重要的研究方向。利用 RhD 阴性母体外周血中游离胎儿 DNA 检测胎儿 RhD 血型对于检测胎儿新生儿溶血病具有重要意义。

国内外学者报道的大多数无创产前诊断胎儿 RhD 血型的研究都是基于荧光定量 PCR 技术,一次性检测标本有限,且对胎儿游离 DNA 的浓度要求较高,低浓度的胎儿游离 DNA 易造成假阴性^[22]。虽然胎儿游离 DNA 的浓度会随着孕周增长而增加,孕晚期胎儿 DNA 检测率高,但为了有效避免胎儿新生儿 RhD 溶血症发生,临床一般建议母胎 RhD 血型不合的孕妇在孕 28 周及产后注射抗 D 免疫球蛋白^[1-3],因此在早中孕期检测胎儿 RHD 基因型预测 RhD 血型,可以避免血制品不必要的浪费和生物制剂。

本研究使用 Sequenom MassARRAY® SNP 检测结合多重 PCR 技术、MassARRAY iPLEX 单碱基延伸技术和 MALDI-TOF MS 通过判断分子量的差异而进行无创胎儿 RHD 基因型检测。在研究中尽量选择于孕 28 周前采样, MALDI-TOS MS 的胎儿游离 DNA 检测率可达 100%,高灵敏性的检测低浓度的胎儿游离 DNA 为无创性产前诊断胎儿 RHD 基因型准确性提供了保障。

Rh 血型基因位于 1 号染色体短臂 1p34.3-1p36.1 上,由两个紧密连锁且高度同源的 RHD 和 RHCE 基因组成,RHD 与 RHCE 基因同源性高达 96%,结构非常相似,都由 10 个外显子和 10 个内含子构成,都编码 417 个氨基酸^[19, 23, 24]。RHD 基因第 1、2、8 外显子的编码区与 RHCE 的相应序列相似,不是 RHD 的特异性序列,其余基因与 RHCE 基因有区别。RHD 外显子 10 其 3'末端非翻译区与 RHCE 有较大差别,检测该区域有利于区分 RHCE 和 RHD。RHCE 虽与 RHD 高度同源且这两者编码的多肽氨基酸顺序高度同源,但 RhCE 蛋白不表达任何 RhD 抗原表位。RHD 基因编码的多肽形成 6 个细胞外环,C 末端和 N 末端位于胞浆内,形成胞外区、跨膜区和胞内区三部分。Rh 抗原位点就位于这 6 个细胞外环上,RHD 外显子 3、6 由于负责编码跨膜区和胞内区部分,对 RhD 引起的免疫反应影响不大,而由外显子 4、5、7 编码的细胞外环在免疫反应中起着重要作用,故检测 RHD 外显子 4、5、7 有助于判断 RhD 抗原性^[24-26]。

在绝大多数高加索人种中,RhD 阴性个体 RHD 基因完全缺失,这是 RhD 阴性存在的普遍机制,但是进一步研究证明 Rh 血型具有复杂且丰富的遗传多态性,存在丰富的种族背景差异,这使得 RHD 基因定型易产生假阳性。中国 RhD 阴性机制与高加索人群相比较为复杂,故无法将国外成熟方案完全引进使用,需结合我国 RhD 阴性机制特点,于不同位点进行多引物设计可防止假阳性产生。RHD 和 RHCE 基因具有高度同源性,在进行 RHD 基因型测定时利用 RHD 和 RHCE 两基因序列差异设计序列特异性引物。上文中提到 RHD 基因第 1、2、8 外显子的编码区与 RHCE 的相应序列相似,不是 RHD 的特异性序列,其余基因与 RHCE 基因有区别。RHD 外显子 10 其 3'末端非翻译区与 RHCE 有较大差别,检测该区域有利于区分 RHCE 检测 RHD。RHD 外显子 4、5、7 编码 RhD 抗原胞外区多肽,故设计引物时我们首先考虑 RHD 基因外显子 4、5、7 和 10。

我国 Rh 阴性者除绝大多数因 RHD 基因完全缺失引起的 RhD 阴性外,还包括弱 D、部分 D 及 RhDel 型等。在基因水平上 RhD 阴性血型机制除 RHD 基因完全缺失外还表现为 RHD 基因完整存在和 RHD 基因部分缺失^[27]。弱 D 普遍被认为虽具有完整 RHD 基因但 D 抗原表达减弱,对于其是否能够产生抗 D 抗体,还没有统一认识,为有效预防胎儿新生儿溶血症,在实验中我们姑且认为此类型血清型表现为 RhD 阳性。部分 D 是指缺乏一个或数个 RhD 抗原表位,临床上最为常见的为 DVI 类,可产生针对自身缺乏表位的抗体,故被当作 RhD 阴性个体,常见的基因型为 RHD-CE(3-6)-D。通过这部分个体常见基因型分析 RHD 基因外显子 7 敏感性最高,若检测到外显子 7 和 10,未检测到外显子 4 和 5 则 RhD 血清型判为 RhD 阴性;若外显子 7 和 10 特异性扩增结果出现差异即检测到外显子 10 未检测到外显子 7,检测另一外显子 4 可帮助做出正确判断即缺失外显子 4 判为 RhD 阴性。另外还有一类存在 RHD 基因的特殊体为 RHD ψ ,其基因外显子 4 有 37bp 的插入片段产生移码突变,不产生 RHD 基因转录本^[19, 28-36]。RHD 基因外显子 5 有助于区分出 RHD ψ 。

若是中国 RhD 阴性人群还需考虑常见的 RhDel 型,我国 Rh 阴性者约占 0.3%~0.5%,RhDel 型约占中国 RhD 阴性人群中 30%,一般携带完整的 RHD 基因,主要表现为 RHD1227G>A 突变,影响 mRNA 正常拼接,是我国 RhDel

型基因诊断的特征性遗传标志物。在对中国人群通过 *RHD* 基因型预测 RhD 血型的设计实验方案中,需对 *RHD1227A* 等位基因进行检测以减少假阳性的干扰,保证结果的准确性^[19,35]。

结合以上分析本研究设计 *RHD* 基因外显子 4、5、7、10 及 *RHD1227A* 引物,有效减少因无效基因或变异体造成的假阳性,但对于个别特殊类型,还需加做母体 *RHD* 基因型,若胎儿与母体基因型相符则判为 RhD 阴性,若不符,则判为不清,建议临床按照胎儿 RhD 阳性处理。

实验方面,联合 Sequenom MassARRAY® SNP 检测、多重 PCR 技术、MassARRAY iPLEX 单碱基延伸技术和 MALDI-TOF MS 进行检测。该方法通过多重 PCR 技术扩增包含检测位点区域的 DNA 模板,使用特异的延伸引物与 PCR 产物进行单碱基延伸反应。由于位点碱基不同,延伸产物不同的末端碱基将导致延伸后的产物分子量的差异,通过判断分子量的差异而进行分析,精确度高,且一次性检测样本量可达 200 个,价格相对较低,可解决临床大样本量的需求。

本研究共收集40例标本,均能够有效鉴别母血中胎儿DNA,检测母血浆游离DNA*RHD*基因外显子4、5、7、10的信号,共发现RhD阳性38例, RhDel型1例及RhD阴性1例。除5例RhD阳性跟踪随访外,余35例皆得到产后脐带血的血清学验证。结果符合率100%,但是纳入的病例数少,尚未检测到RhD阴性变异体。RhD阴性机制的复杂性与种族差异有关,考虑到中国各民族的种族来源不同,需收集各个民族尤其维吾尔族和蒙古族孕妇外周血标本来评价该方法在临床上的可行性。

参考文献

- [1]方群,罗艳敏.Rh同种免疫与宫内输血[J].中华围产医学杂志,2013,16(9):522-526.
- [2]林胜谋,陈敏,陈敦金.母胎Rh血型不合所致同种免疫反应及妊娠相关问题[J].中华围产医学杂志,2012,15(11):651-655.
- [3]丁肖华,郭如华,田兆嵩.Rh免疫球蛋白的临床应用[J].中国输血杂志,2008(06):474-476.
- [4]Brojer E,Zupanska B,Guz K,et al.Noninvasive determination of fetal RHD status by examination of cell-free DNA in maternal plasma[J].Transfusion.2005,45(9):1473-1480.
- [5]Wang XD,Wang BL,Ye SL,et al.Non-invasive foetal RHD genotyping via real-time PCR of foetal DNA from Chinese RhD-negative maternal plasma[J].Eur J Clin Invest.2009,39(7):607-617.
- [6]马玲,刘衍春,郑凌等.基于RASSF1A为标志的无损性孕妇血浆中胎儿RHD-DNA检测方法的建立[J].中国输血杂志,2014(07):696-699.
- [7]Chen X,Xiong L,Zeng T,et al.Hypermethylated ERG as a cell-free fetal DNA biomarker for non-invasive prenatal testing of Down syndrome[J].Clin Chim Acta.2015,444:289-292.
- [8]李芮冰,卢彦平,徐淑敏等.无创产前诊断RhD阴性孕妇胎儿RhD基因型敏感度和特异度的荟萃分析[J].中华医学杂志,2014,94(34):2677-2680.
- [9]陆松松,陈静娴.Rh(D)变异体的研究进展[J].临床输血与检验,2010(04):374-378.
- [10]Mouro I,Colin Y,Cherif-Zahar B,et al.Molecular genetic basis of the human Rhesus blood group system[J].Nat Genet.1993,5(1):62-65.
- [11]邵超鹏.RHD研究进展和中国人RHD研究现状分析[J].中国输血杂志,2003,16(5):354-358.
- [12]周华友,兰炯采.人类Rh血型系统研究进展[J].中国输血杂志,2004,17(3):211-214.
- [13]Ye LY,Guo ZH,Li Q,et al.Molecular and family analyses revealed two novel RHD alleles in a survey of a Chinese RhD-negative population[J].Vox Sang.2007,92(3):242-246.
- [14]林甲进,朱碎永,白植地.Rh弱D、Del的检测及意义[J].温州医学院学报,2008(04):361-362.
- [15]谢俊杰,邵超鹏.Rh血型D放散型(D~(el)) [J].中国输血杂志,2011(01):3-7.
- [16]孙国栋,王晓平.Rh血型系统弱D及部分D研究进展[J].临床输血与检验,2007(02):183-185.
- [17]陈家学,杨仕坤,石思蓉等.常规血清学RhD阴性个体D基因多态性的种族差异[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2011(06):757-760.
- [18]任本春,张爱.弱D和部分D研究进展[J].临床血液学杂志(输血与检验版),2012(04):542-545.
- [19]Westhoff CM.The Rh blood group system in review:a new face for the next decade[J].Transfusion.2004,44(11):1663-1673.
- [20]Avent ND,Reid ME.The Rh blood group system:a review[J].Blood.2000,95(2):375-387.
- [21]Chen JC,Lin TM,Chen YL,et al.RHD 1227A is an important genetic marker for RhD(el) individuals[J].Am J Clin Pathol.2004,122(2):193-198.
- [22]Shao CP,Maas JH,Su YQ,et al.Molecular background of Rh D-positive,D-negative,D(el) and weak D phenotypes in Chinese[J].Vox Sang.2002,83(2):156-161.

(临床检验装备技术专业委员会供稿)

实时荧光定量 PCR 技术在男性不育患者 Y 染色体微缺失检查中的应用

段晋燕 侯迪 薛丹丹 冯晓倩 刘培培 李兴翠 李绵洋 王成彬

中国人民解放军总医院临床检验科 北京 100853

[摘要] 目的: 探索实时荧光定量 PCR 技术在检测男性不育患者 Y 染色体微缺失中应用的可行性, 并进一步分析 Y 染色体微缺失在男性不育患者中的发生率。**方法:** 利用实时荧光定量 PCR 技术对 2015 年 3 月至 10 月于我院就诊的 443 例男性不育患者的 Y 染色体长臂 AZFa、AZFb、AZFc 和 AZFd 四个区域的 8 个位点进行检测, 并用多重 PCR 方法对检测出的存现 Y 染色体微缺失的标本进行验证。**结果:** 共检测出 3 例男性不育患者发生 Y 染色体微缺, 并通过多重 PCR 方法得到验证。3 例 Y 染色体微缺病例均发生于非梗阻性无精症患者, 其中 2 例为 AZFc+d 区缺失, 1 例为 AZFb+c+d 区缺失, 占非梗阻性无精症的 10.3%。**结论:** 实时荧光定量 PCR 技术可用于对 Y 染色体微缺失的检测, 且该检查对筛查不育症患者具临床价值。

[关键词] Y 染色体微缺失; 实时荧光定量 PCR 技术; 男性不孕不育

不孕不育是全球重要的生殖健康问题, 全球大约 15% 的夫妇遭遇生育困难或者无法生育的困境, 其中 30%~50% 是由于男性原因引起^[1]。约 40%~50% 的男性不育患者存在精子数量少、存活率低以及形态异常等问题^[2]。Y 染色体上的基因组是决定男性性别以及生成正常精子的重要因素, 染色体结构上的异常或基因数量上的异常均会引起无精症或少精症^[3]。Y 染色体长臂上的无精子因子区(azoospermia factor, AZF)的微缺失是目前最常见的与 Y 染色体异常相关的不孕不育的原因之一^[4]。AZF 区可分为三个区域, 分别称为 AZFa、AZFb、AZFc 区, 该区域不同程度的缺失会导致精子生成能力的降低^[5]。近年来, 也有专家认为在 AZFb 和 AZFc 之间还存在一个新的区域, 称为 AZFd 区, 可能与精子的生成有关^[6]。在无精症或严重少精症的男性中, AZF 区微缺失所占的比例高于 1%^[7]。本研究采用实时荧光定量 PCR 技术(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR) 对 443 例男性不育患者进行 Y 染色体微缺失检测, 并进一步分析缺失类型在男性不育症中的发生率。

1 对象和方法

1.1 对象 2015 年 3 至 10 月于本院男科就诊的男性不育患者 443 例年龄平均(30.6±5.2)岁。按第五版 WHO 精液常规分析标准, 其中非梗阻性无精症患者 29 例(精液中未发现精子), 严重少精症患者 6 例(精子密度 $<5 \times 10^6/\text{mL}$), 少精症患者 21 例(精子密度 $<15 \times 10^6/\text{mL}$)。

1.2 仪器与试剂 CFX96™ Real-Time PCR 仪(Bio-Rad 公司, 美国), TProfessional Thermocycler PCR 仪(Biometra 公司, 德国), DYY-7C 型电泳仪(六一仪器厂, 中国), ChemiDoc™ XRS+凝胶成像仪(Bio-Rad 公司, 德国)。采用北京爱普益生物科技有限公司的人 Y 染色体 AZF 微缺失核酸检测试剂盒。多重 PCR 方法所使用的引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成, 引物信息见表 1。

表 1 多重 PCR 方法使用的引物信息

Sequence tagged site	Forward and reverse primer	Length(bp)
sY84	F: AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT R: GCCTACTACCTGGAGGCTTC	326
sY86	F: GTGACACACAGACTATGCTTC R: ACACACAGAGGGACAACCCT	318
sY127	F: GGCTCACAACGAAAAGAAA R: CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	274
sY134	F: GTCTGCCTCACCATAAAAACG R: ACCACTGCCAAAACCTTCAA	301
sY145	F: CAACACAAAAACACTCATATACTCG R: TTGAGAATAATGTATGTTACGGG	143
sY152	F: AAGACAGTCTGCCATGTTTCA R: ACAGGAGGGTACTTAGCAGT	125
sY254	F: GGGTGTACCAGAAGGCAAA R: GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	380
sY255	F: GTTACAGGATTCGGCGTGAT R: CTCGTCATGTGCAGCCAC	123

表 2 RT-PCR 扩增循环步骤

Step	Temperature	Time	Cycle number
1	95°C	5min	1
	94°C	20s	
2	57°C	20s	4
	72°C	1min	
3	94°C	15s	33
	56°C	1min	

1.3 人外周血基因组 DNA 的提取 使用 EDTA K₂ 真空采血管采集患者 1~1.5ml 静脉血, 取 200 μ L 置入 1.5mL 灭菌离心管中, 提取 DNA 过程按照试剂盒说明书操作。

1.4 RT-PCR 法检测 Y 染色体微缺失 待测样本 DNA、阴性对照品和阳性对照品均分别与 4 种 PCR 反应液混合。每种 PCR 反应液 22.75 μ l 和 0.25 μ l 的 Taq 酶混合, 加入 2 μ l DNA 溶液。使用正常女性 DNA 和正常男性 DNA 作为对照。加样混匀, 离心, 放入 PCR 仪中, 按表 2 程序循环扩增, 收集

FAM、VIC、Cy5 信号(见表 3)。sY127、sY34、sY152、sY254、sY255 位点缺失的判断值为 Ct 值 >24; sY84、sY86 和 sY145 位点缺失的判断值为 Ct 值 >18。

1.5 多重 PCR 电泳法检测 Y 染色体微缺失 待测样本 DNA、阴性对照品和阳性对照品均分别与 A、B、C 三种 PCR 反应液(见表 4)进行混合, 比例是 2:23, 总体积 25 μ l。阴性对照为正常女性 DNA, 阳性对照为正常男性 DNA。加样混匀, 离心, 放入 PCR 仪中, 按以下表 5 程序循环扩增:

表 4 各反应液检测的目的基因

Tube	Sequence tagged site				
Tube A	sY86	sY127	sY254	ZFY	SRY
Tube B	sY84	sY134	sY255	ZFY	SRY
Tube C	sY145	sY15	/	ZFY	SRY

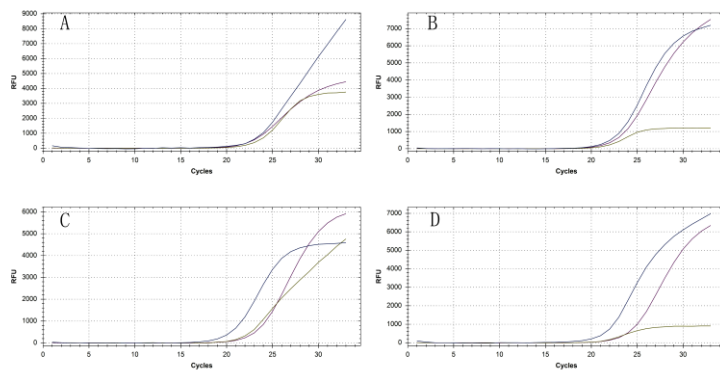
表 5 多重 PCR 扩增循环步骤

Step	Temperature	Time	Cycle number
1	50°C	2min	1
2	95°C	3min	1
	94°C	30s	
3	57°C	30s	35
	72°C	1min	
4	72°C	1min	1

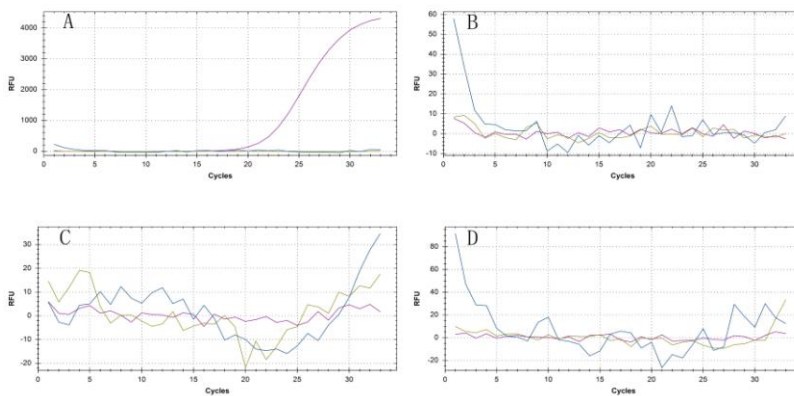
使用 2%的琼脂糖凝胶。将 5ml 扩增产物与 1ml 6 \times Loading buffer 混合上样, 50bp 的 DNA ladder 作为 marker。电压 150v, 时间 40min。使用凝胶成像仪, 分析电泳结果。

2 结果

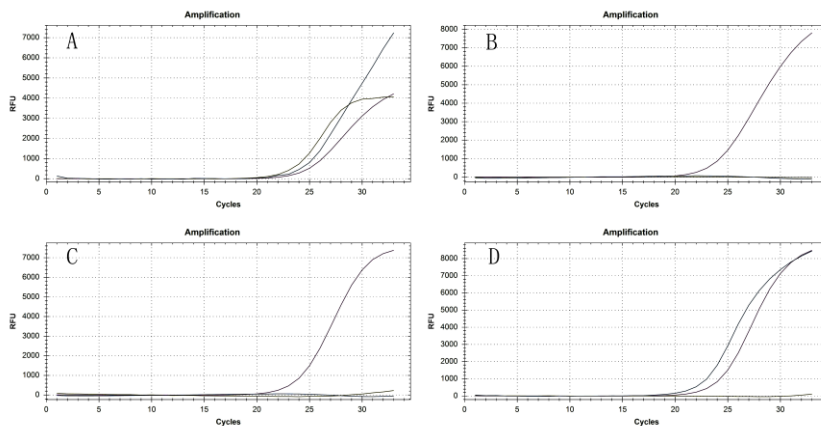
2.1 RT-PCR 法检测 Y 染色体微缺失结果 443 例标本中, 检测出存在 AZF 缺失的标本 3 例, 其中 2 例为 AZFc+d 区缺失(sY152, sY254, sY255 位点缺失), 1 例患者 AZFb+c+d 区缺失(sY127, sY134, sY152, sY254, sY255 位点缺失), 其他样本未检测出 AZF 区域缺失。AZF 缺失标本和正常男性、女性 DNA 的 RT-PCR 扩增曲线见图 1-4。



A. blue curve: sY86; green curve: sY84; purple curve: β -actin
 B. blue curve: sY127; green curve: sY152; purple curve: SRY
 C. blue curve: sY254; green curve: sY134; purple curve: SRY
 D. blue curve: sY145; green curve: sY255; purple curve: SRY
 图 1 RT-PCR 方法检测正常男性 DNA 标本的扩增曲线图



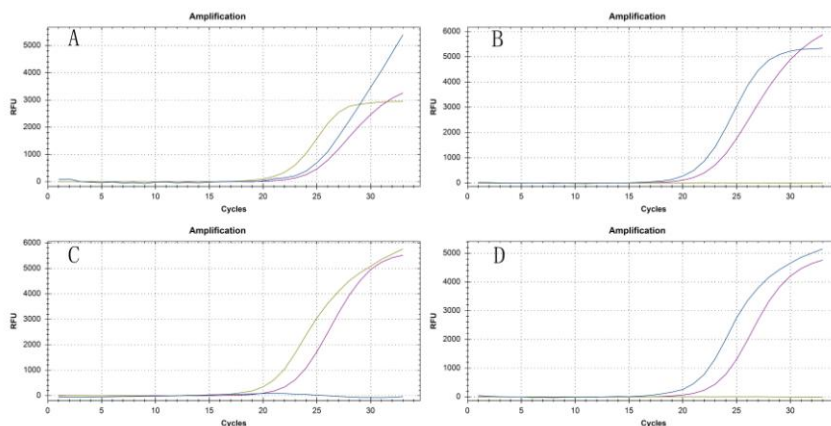
A. blue curve: sY86; green curve: sY84; purple curve: β -actin
 B. blue curve: sY127; green curve: sY152; purple curve: SRY
 C. blue curve: sY254; green curve: sY134; purple curve: SRY
 D. blue curve: sY145; green curve: sY255; purple curve: SRY
 图 2 RT-PCR 方法检测正常女性 DNA 标本的扩增曲线图



A. blue curve: sY86; green curve: sY84; purple curve: β -actin

- B. blue curve: sY127; green curve: sY152; purple curve: SRY
 C. blue curve: sY254; green curve: sY134; purple curve: SRY
 D. blue curve: sY145; green curve: sY255; purple curve: SRY

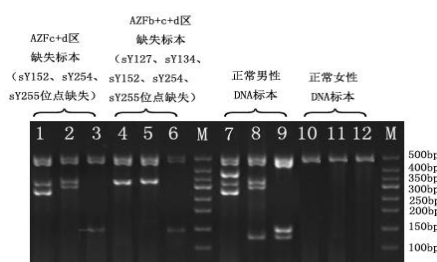
图 3 RT-PCR 方法检测 AZFb+c+d 区缺失(sY127、sY134、sY152、sY254、sY255 位点缺失)样本的扩增曲线图



- A. blue curve: sY86; green curve: sY84; purple curve: β -actin
 B. blue curve: sY127; green curve: sY152; purple curve: SRY
 C. blue curve: sY254; green curve: sY134; purple curve: SRY
 D. blue curve: sY145; green curve: sY255; purple curve: SRY

图 4. RT-PCR 方法检测 AZFc+d 区缺失(sY152, sY254, sY255 位点缺失)样本的扩增曲线图

2.2 多重 PCR 法验证 Y 染色体微缺失标本 使用多重 PCR 法检测上述 3 例 AZF 缺失标本, 缺失位点均与 RT-PCR 法检测结果相一致。AZFb+c+d 区缺失(sY127、sY134、sY152、sY254、sY255 位点缺失)和 AZFc+d 区缺失(sY152, sY254, sY255 位点缺失)标本的多重 PCR 结果如图 5 所示。



1,4,7,10 line: DNA amplification in tube A; 2,5,8,11 line: DNA amplification in tube B;
 3,6,9,12 line: DNA amplification in tube C; M: 50bp DNA ladder

图 5 多重 PCR 法检测 AZF 缺失样本的电泳图

3 讨论

精子的正常生成是由 Y 染色体和常染色上的数个基因共同调控的。相对于正常人群而言, 无精子症或者少精症伴随染色体异常的几率较大。Y 染色体 AZF 区的微缺失已是目前公认的导致男性不育的原因之一。研究显示, Y 染色体 AZF 微缺失与多种男性不育有关, 如精液质量低下、精索静脉曲张和生殖激素异常等男性不育患者中均查出不同程度的微缺失。使用常规的精液分析或者 Y 染色体核型分析都无法对此进行检测。因此, 对于散发性的非梗阻性原因引起的男性不育症, Y 染色体微缺失分析在辅助生殖过程中起着非常重要的作用。

欧洲男科协会(European Academy of Andrology, EAA)和欧洲分子遗传质量协作网(European Molecular Genetics Quality Network, EMQN)发布的 Y 染色体微缺失的检测指南, 推荐了检测分别位于 AZFa、AZFb 和 AZFc

三个区域的 sY84、sY86、sY127、sY134、sY254 和 sY255 等 6 个试序列标签位点(sequence tagged site, STS), 即每个区域 2 个 STS 位点^[8]。但随着研究的深入 AZFd 区也逐渐纳入到了检测范围中^[9, 10]。因此, 本研究上述 6 个 STS 位点的基础上, 增加了 sY152 和 sY145 两个位于 AZFd 区的 STS 位点。本研究检测出的 3 例 Y 染色体微缺失的男性, 均检测出了 AZFd 区的位点缺失, 也证明了检测该区域的重要性。该 3 例样本均为多区域缺失样本, 2 例 AZFc+d 区缺失, 1 例 AZFb+c+d 缺失, 这也与其他实验室统计的多区域缺失概率相吻合^[11]。

本次统计显示 Y 染色体微缺失的比例约占非梗阻性无精症的 10.3%, 占无精症、严重少精症和少精症患者总人数的 5.3%。关于 Y 染色体微缺失的比例, 不同的研究小组研究结论相差很大, 原因可能是由于样本量大小不同, 或者使用的 STS 位点和数量不一致, 但大多数报道还是普遍在 15% 的发生率^[7, 11, 12]。

目前, 国内多数实验室使用的是多重 PCR 方法对目的片段进行扩增, 然后通过琼脂糖电泳或者毛细管电泳对产物进行分离^[13-15]。该方法也是中国人 Y 染色体微缺失分子诊断指南(草案)推荐使用的方法。报道使用 RT-PCR 的方法检测 Y 染色体微缺失的实验室数量有限。虽然多重 PCR 方法对仪器设备要求不高, 仅需普通 PCR 仪和琼脂糖凝胶电泳设备即可实现 STS 位点的检测, 但该方法多为人工操作, 自动化程度低, 无法实现高通量检测。同时, 对产物进行分析时所使用的核酸染料, 也具有潜在的致癌可能, 对实验人员的安全防护以及实验室安全要求较高。

基于 RT-PCR 方法进行 STS 位点检测, 避免了 PCR 扩增后的分离检测的过程, 减少了实验时间和费用。同时, 检测和分析过程自动化程度高, 减少了人工操作产生的误差和交叉污染, 也可实现大规模筛查。目前已有实验室使用 RT-PCR 进行 Y 染色体微缺失的检测, 但相关报道仍十分有限^[16, 17]。

本实验采取 RT-PCR 的方法对 Y 染色体微缺失进行检测。将 8 种基因分为 4 组, 每组 2 个 STS 位点, 分别为 1-4 号管。1 号管使用 β -actin 做内标, 其余 3 管使用性别决定基因(SRY 基因)做内标, 同时, 每批检测均有正常女性基因和正常男性基因作为对照。既保证了每管内检测结果的可靠性, 也确保了每批实验结果的准确性和可信度。在实验过程中, 本实验小组使用多重 PCR 的方法对 Y 染色体微缺失标本、阴性对照和阳性对照进行验证, 两者结果一致。

随着选择性辅助生殖技术的发展, 越来越多不育男性选择卵泡浆内单精子显微注射技术(intra cytoplasmic sperm injection, ICSI)或体外受精联合胚胎移植技术(in vitro fertilization, IVF)等试管婴儿方法来孕育下一代。这也潜在的提高了影响精子生成基因传递到下一代的风险。因此, 在进行辅助生殖之前, 对不育的男性进行充分的基因缺陷相关检测, 对于避免缺陷基因的遗传也具有重要意义。

参考文献

- [1]Naasse Y,Charoute H,El Houate B,et al.Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco.BMC Urol 2015;15:95.
- [2]Ferlin A,Arredi B,Foresta C.Genetic causes of male infertility.Reprod Toxicol 2006;22:133-41.
- [3]Ambulkar P,Chuahary A,Waghmare J,et al.Prevalence of Y Chromosome Microdeletions in Idiopathic Azoospermia Cases in Central Indian Men.J Clin Diagn Res 2015;9:GC01-4.
- [4]Krausz C,Degl'Innocenti S.Y chromosome and male infertility: update,2006.Front Biosci 2006;11:3049-61.
- [5]Rozen S,Skaletsky H,Marszalek JD,et al.Abandant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes.Nature 2003;423:873-6.
- [6] Zaimy MA,Kalantar SM,Sheikhha MH,et al.The frequency of Yq microdeletion in azoospermic and oligospermic Iranian infertile men.Iran J Reprod Med 2013;11:453-8.
- [7]Hadjkacem-Loukil L,AYadi I,Bahloul A,et al.Tag STS in the AZF region associated with azoospermia in a Tunisian population.J Androl 2007;28:652-8.
- [8]Simoni M,Bakker E,Krausz C.EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions.State of the art 2004.Int J Androl 2004;27:240-9.
- [9] Muslumanoglu MH,Turgut M,Cilingir O,et al.Role of the AZFd locus in spermatogenesis.Fertil Steril 2005;84:519-22.
- [10]Kucukaslan AS,Cetintas VB,Altintas R,et al.Identification of Y chromosome microdeletions in infertile Turkish men.Turk J Urol 2013;39:170-4.

- [11]Al-Achkar W,Wafa A,Moassass F.Cytogenetic abnormalities and Y-chromosome microdeletions in infertile Syrian males.Biomed Rep 2013;1:275-9.
- [12]Fu L,Xiong DK,Ding XP,et al.Genetic screening for chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in Chinese infertile men.J Assist Reprod Genet 2012;29:521-7.
- [13]李明昭,施文浩,李伟,等.无精子症和重度少精子症不育患者 Y 染色体微缺失率的临床研究.生殖医学杂志 2015;125-8.
- [14]刘春玲,吴晓云,邱惠麒,等.无精子症和严重少精子症患者 Y 染色体微缺失、染色体核型和性激素结果分析.中华男科学杂志 2013;890-5.
- [15]欧妙玲,陈志华,刘丽雅,等.Y 染色体无精子症因子微缺失的筛查与临床探讨.检验医学与临床 2015;365-7.
- [16]崔瑾,程伟,张阳丽,等.Real-timePCR 技术筛查男性不育患者的 Y 染色体微缺失.重庆医科大学学报 2015;819-23.
- [17]Segat L,Padovan L,Doc D,et al.A real-time polymerase chain reaction-based protocol for low/medium-throughput Y-chromosome microdeletions analysis.Genet Test Mol Biomarkers 2012;16:1349-55.
- (临床检验装备技术专业委员会供稿)

中期孕妇凝血纤溶常规检测结果分析

周湘红^①, 蒋义^②, 安凌悦^③, 杜作江^④, 安邦权*^⑤, 童璐^⑥

①贵州省人民医院检验科, 贵州 贵阳 550002

②贵州省人民医院输血科, 贵州 贵阳 550002

③贵州医科大学检验学院贵州, 贵阳 550004

④贵州省龙里县人民医院检验科, 贵州 龙里 551200

[摘要]目的 了解妊娠中期孕妇(中期孕妇)血浆凝血纤溶常规指标变化及临床意义。**方法** 采用 Sysmex CA-7000 全自动凝血仪对 53 例中期孕妇进行血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)、D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原降解产物(FDP)等检测,并分析其结果变化情况。**结果** 中期孕妇组 PT (9.72 ± 1.11)、APTT (27.61 ± 3.57)、D-D (1.64 ± 0.60)、FDP (3.37 ± 1.45)与对照组相应指标(10.29 ± 1.09 、 30.06 ± 3.93 、 1.30 ± 0.74 、 2.38 ± 1.67)比较无统计学差异($P > 0.05$),但有不同程度增减改变;FIB (3.77 ± 0.70)和 TT (19.48 ± 3.58)则明显高于对照组(2.92 ± 0.87 、 17.56 ± 2.89),有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 孕妇妊娠中期开始可能存在早期高凝状态和继发纤溶系统激活,应采取相应措施预防其并发症的发生,进一步说明其凝血纤溶常规监测的重要性。

[关键词] 孕妇;凝血功能;高凝状态;纤溶系统

Result's analysis of coagulation function of middle pregnant women

ZHOU Xiang-hong, JIANG Yi, AN Ling-yue, DU Zuo-jiang, AN Bang-quan*, TONG Lu

*Department of Clinical Laboratory, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China

Corresponding author: AN Bang-quan, E-mail: anhonggao@sina.com

[Abstract] Objective To understand conventional indicators and clinical significance of blood coagulation and fibrinolysis changes for trimester pregnant women (mid-pregnant women). **Methods** Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen (FIB), thrombin time (TT), D - dimer (DD), fibrinogen degradation products (FDP) were detected and analyzed changes in its structure by using Sysmex CA-7000 automatic coagulation analyzer for 53 cases of mid- pregnant women. **Results** Mid-pregnant group of PT (9.72 ± 1.11), APTT (27.61 ± 3.57), DD (1.64 ± 0.60), FDP (3.37 ± 1.45) and control group corresponding indicators (10.29 ± 1.09 , 30.06 ± 3.93 , 1.30 ± 0.74 , 2.38 ± 1.67) showed no significant difference ($P > 0.05$), but there were different degrees in change; FIB (3.77 ± 0.70) and TT (19.48 ± 3.58) were significantly higher than control group (2.92 ± 0.87 , 17.56 ± 2.89), which showed statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Trimester pregnant women may have an early start trimester hypercoagulable state and secondary fibrinolysis system activation, we should take appropriate measures to prevent the occurrence of complications, and further illustrate the importance of its routine monitoring of coagulation and fibrinolysis.

[Key words] Pregnant women; Coagulation function; Hypercoagulable state ; Fibrinolytic system

妊娠是妇女的特殊生理过程,孕妇会发生一系列的生理改变,以适应机体的需要。其中凝血纤溶常规项目血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)、D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原降解产物(FDP)等的变化受到广泛关注,它是目前临床上用于诊断和观察血栓形成、出血情况和抗凝治疗的常用检验项目,更是判断机体止血系统病理变化、术前筛查凝血性疾病的重要指标,对检测妊娠期妇女的凝血状态、预防产后DIC等的发生有重要意义^[1-3]。不少学者^[4-6]曾对临产孕妇凝血功能进行了调查研究,而中期孕妇凝血纤溶指标变化情况的报道少见,我们对53例妊娠中期孕妇PT、APTT、FIB、TT、D-D、FDP等七项常规指标进行检测,并对结果进行了分析。

1 资料与方法

1.1 临床资料

为2014年1月到2015年1月在贵州省人民医院产科妊娠保健的中期孕妇52例,年龄23岁~40岁(平均29.0岁);非妊娠健康体检者(对照组)52例,年龄25岁~41岁(平均29.7岁)。均排除心、肝、肾功能异常及出血、血栓等血液疾病。

1.2 样本采集

清晨空腹抽取静脉血于真空采血管(3.2%枸橼酸钠1:9抗凝)中及时混匀,及时以3000r/s离心15min,分离血

浆待检。

1.3 测定方法

严格按照实验室标准操作程序(SOP),使用日本 Sysmex CA-7000 全自动血凝仪(配套试剂和质控品均在有效期内使用,性能评价^[7]和质控合格)进行检测。

1.4 统计学处理

应用 SPSS17.0for Windows 统计软件采用 *t* 检验进行数据处理, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

中期孕妇组 PT、APTT、D-D、FDP 结果与对照组相差不明显 ($P > 0.05$),但 PT、APTT 呈缩短趋势, D-D、FDP 呈增高趋势。中期孕妇组 FIB、TT 结果明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两组凝血纤溶常规测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	PT (s)	APTT (s)	FIB (g/L)	TT (s)	D-D (mg/L)	FDP (mg/ml)
中期孕妇组	52	9.72±1.11	27.61±3.57	3.77±0.70	19.48±3.58	1.64±0.60	3.37±1.45
对照组	52	10.29±1.09	30.06±3.93	2.92±0.87	17.56±2.89	1.30±0.74	2.38±1.67
<i>P</i>	<i>P</i>	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

正常情况下机体内止凝血系统与抗凝系统是处于相互制约,通过复杂的正、负反馈作用一直维持着动态平衡^[8]。如果在某些内、外因素作用下凝血活性增强或减弱都会引起平衡失调,从而导致高、低凝状态,造成血栓或出血甚至是带来更严重的后果。常规凝血项目是判断出血性疾病的主要诊断指标,在临床疾病诊疗中具有重要的价值^[9-11],其中PT是反映外源性凝血途径中凝血因子II(FII)、FV、FVII、FX情况的指标,PT延长是DIC实验室筛查的诊断标准之一,如DIC、原发性纤溶亢进症;PT缩短则提示DIC早期高凝状态。APTT反映内源性凝血途径中FVIII、FIX、FXI、FXII情况;PT、APTT时间的缩短,表示血液正处于高凝状态并具有血栓形成的倾向。FIB是肝细胞合成的一种糖蛋白,含量与凝血酶活性有关,凝血时在血小板的聚集过程中起着重要作用,通过纤维蛋白原的链接作用形成血小板聚集体,最终形成血栓。TT是反映共同凝血途径的实验,显著延长多见于DIC纤溶亢进期,可作为DIC的一项诊断指标。D-D是机体活动性血栓形成的特异性分子标志物,是继发性纤溶亢进筛查的重要依据(即血栓已经被溶解的直接的证据),是筛查与辅助诊断血栓性疾病最常用的指标,并且D-D的检测对临床上多种并发症的诊断及指导抗凝治疗等有重要价值^[12];有学者发现D-D在先兆子痫、胎儿生长受限、水肿胎时明显升高^[13]。FDP是在纤溶亢进时产生的纤溶酶作用下、纤维蛋白/纤维蛋白原被分解后产生的降解产物的总称,在血液中的浓度增高是体内纤溶亢进的标志。

妊娠期凝血系统的变化主要表现为血浆纤维蛋白原及FVII、FVIII、FIX、FXII等都有不同程度的增高,抗凝血酶活性逐渐下降,导致机体凝血功能增强。孕妇血液的适度高凝状态其实是一种保护机制,不仅可以助于胎儿的生长,并且有利于胎盘剥离而形成血栓,减少产后出血,加速子宫内膜的再生和修复^[1,5]。我们分析中期孕妇的各项凝血纤溶常规指标结果(见表1)发现,FIB、TT明显高于对照组($P < 0.05$),而PT、APTT有所缩短,D-D、FDP有所增高,尽管其差异无统计学意义,但在一定程度上提示机体凝血和纤溶系统的双重激活,即部分孕妇机体已处于高凝状态,并存在一定程度的继发纤溶蛋白降解过程,应引起临床医师和孕妇的高度警惕。进一步证明妊娠期间适时检查凝血纤溶功能的重要性,为积极预防和治疗血栓前的状态和产科意外提供可靠实验依据,便于及时采取干预治疗及预后判断,减少并发症的发生,对保护母婴身体和生命健康安全有着相当重要的意义。

参考文献

- [1] 凌晓午,安邦权,黄盛文. 1154例临产孕妇凝血四项检测调查研究[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(34): 5553-5555.
- [2] 谢军. 凝血与纤溶系统水平对产妇弥漫性血管内凝血的早期诊断分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(15): 2528-2529.
- [3] 陈孝祥,冯维良,姜米佳,等. D-二聚体测定对妊娠子痫前期孕妇产后出血的预测意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(15): 2533-2535.
- [4] 金梅,李小多. 妊娠晚期与非妊娠期女性凝血功能的对比研究[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(11): 1620-1621.
- [5] 郭家权,蔡坤. 临产孕妇抗凝血纤溶指标检测临床意义分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(11): 1445-1446.

- [6] 田 宇, 马梦影, 徐妍妍, 等. 孕妇产前凝血四项、D-一二聚体和血小板的检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35 (16): 2156-2158.
- [7] 杨 眉, 邓 波, 安邦权, 等. Sysmex CA-7000 血凝仪应用评价[J]. 贵州医药, 2012, 36(7): 587-590.
- [8] 安邦权, 王凤学. 血液学检验标准操作程序[M]. 第 1 版. 贵阳: 贵州科技出版社, 2007.4: 180-292.
- [9] Dorn A, Dempfle C, Bertsch T, *et al.* Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000[J]. Thrombosis, 2005, 116(2): 171-179.
- [10] Flanders M, Crist R, Safapour S, *et al.* Evaluation and performance characteristics of the STA-R coagulation analyzer [J]. Clinical Chemistry, 2002, 48(9): 1622-1624.
- [11] 蒋 义, 郁施青, 安邦权, 等. 4 种凝血机制抗凝管抗凝效果对比研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(9): 1150-1151.
- [12] 王鸿利, 王学锋. D-二聚体检测的方法及其临床应用[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(2): 171-173.
- [13] Kucukgoz GU, Tuncay OF, Baris GA, *et al.* An analysis of C-reactive protein, procalcitonin, and D-dimer in pre-eclamptic patients[J]. Am J Reprod Immunol, 2012, 68(4): 331-337.

基金项目: 贵州省科学技术基金项目 (2010 SY 3129)。

作者简介: 周湘红 (1966-), 女, 本科, 副主任技师, 主要从事血液学和临床基础检验工作。

共同第一作者: 蒋义 (1983-), 男, 本科 (在读研究生), 技师, 主要从事医学检验工作。

通讯作者: 安邦权, E-mail: anhonggao@sina.com。

(输血装备专委会供稿)

血液分离机制备小量红细胞方法的探讨

张雪松 刘微

吉林省血液中心, 吉林 长春 043100

[关键词] 儿科输血; 血液分离机; 自动分离; 小量红细胞

由于儿科患者跨越的年龄段 (新生儿至 18 岁以前) 正是人体各种器官和功能逐渐发育成熟阶段, 故导致其在血型鉴定、输血前检测乃至输血治疗手段等方面与成人相比有许多差异^[1]。且儿科输血工作繁琐、工作量大、异形输血常见, 同时儿科患者病情变化快, 对血液制品规格、种类要求复杂, 因此儿科输血需要各级血站的大力支持^[2]。随着输血学科与儿科学的相互融合与渗透日渐加强, 且输血医学新技术、新方法的不断诞生与应用, 我中心利用血液分离机实现了将 1u 去白细胞悬浮红细胞自动分装成 2 个 0.5u 去白细胞悬浮细胞的制备, 现就 30 例制备方法及相关结果汇报如下。

1 材料与方 法

1.1 一次性使用 200ml 三联空袋 (山东威高集团医用高分子制品股份有限公司, 批号: 2015051102), 由 1 个 200ml 空袋和 2 个 50ml 空袋组成。

1.2 仪器与试剂

CompoMatG5 全自动血液成分分离机 (费森尤斯卡比 (中国) 投资有限公司), Compodock 无菌接管机 (费森尤斯卡比 (中国) 投资有限公司), KX-21 血细胞计数仪 (希森美康医用电子有限公司), 稀释液 (希森美康生物科技有限公司 批号: G4062), 溶血剂 (希森美康生物科技有限公司 批号: R4051)、酶清洗液剂 (希森美康生物科技有限公司 批号: A5006)、全血质控物 (希森美康生物科技有限公司 批号: 52060821)。

1.3 方 法

1.3.1 无菌连接

取 1 μ L 去白细胞悬浮红细胞与一次性使用三联空袋通过无菌接管机进行无菌连接。

1.3.2 复制条形码

登录血站管理软件复制 2 个 15 位条形码, 要求前 13 位与原条形码完全一致, 后 2 位校验码不同。将复制后的 2 个条形码分别粘贴到 2 个分装袋上。

1.3.3 上机制备

将去白细胞悬浮红细胞挂在全自动血液成分分离机的上下挤压板上, 将 200ml 空袋放在顶挤压板上, 将 2 个 50ml 空袋放置在血浆套件上, 分别用 2、3 号阀门对 2 个空袋进行控制。选择分装程序, 读取去白细胞悬浮红细胞的条形码以及 2 个分装袋上的条形码以及操作者代码。扫描结束后机器自动启动程序, 上下挤压板向前推进将去白细胞悬浮红细胞挤到顶挤压板的 200ml 空袋内, 当去白细胞悬浮红细胞袋内的血液全部挤净后, 上下挤压板后退至原位, 顶挤压板下行将 200ml 空袋内的去白细胞悬浮红细胞挤回至原去白细胞悬浮红细胞的血袋内。全部挤净后, 顶挤压板上升, 完成一次混匀过程, 如此上下挤压过程共反复三次, 一共完成 3 次混匀过程。混匀结束后, 上下挤压板向前推进, 分别给 2 个空袋挤入 50 克的去白细胞悬浮红细胞, 然后把剩余的去白细胞悬浮红细胞每次以 5 克的重量分别挤入到 2 个空袋中, 直至上下挤压板内的去白细胞悬浮红细胞全部挤压为止。

1.4 血细胞计数仪法

按照厂家说明书的方法对相关实验对象进行检测和结果计算。

1.5 统计学分析

利用 SPSS19.0 统计软件对所得的数据进行统计学分析, 采用配对 t 检验进行分析, 以 P 检验 >0.05 为无统计学意义。

2 结果

30 例去白悬浮红细胞分装后的小量红细胞液的检测结果见表 1。

表 1 1 μ L 去白悬浮红细胞分装成 0.5 μ L \times 2 的质量比较 (n=30, $\bar{x}\pm s$)

项目	分袋 1	分袋 2	P 值
重量 (毫升)	50.77 \pm 7.68	50.30 \pm 6.22	P>0.05
血红蛋白浓度	200.30 \pm 12.58	199.67 \pm 12.69	P>0.05
血红蛋白含量	10.01 \pm 1.82	9.97 \pm 1.60	P>0.05
红细胞	6.45 \pm 0.54	6.46 \pm 0.53	P>0.05
血细胞比容	0.63 \pm 0.04	0.63 \pm 0.04	P>0.05
平均血红蛋白	31.03 \pm 1.89	31.01 \pm 1.91	P>0.05
平均血红蛋白浓度	320.23 \pm 12.99	320.10 \pm 13.35	P>0.05
红细胞平均体积	97.16 \pm 5.18	97.10 \pm 5.17	P>0.05

3 讨论

据巴西新生儿监护中心的曾做过的 1 项调查发现, 在 952 名极低体重早产儿(出生时体重<1500g)中有 532 人接受过输血, 输血率达 55.9%, 调查者据此认为, 虽然都依据同样的红细胞输注指征, 但各新生儿监护中心的输血情况却不同, 可以把输血状况作为评估新生儿监护质量的 1 个指标^[3]。目前我国输血各成分的比例与国外同样存在很大差异, 悬浮红细胞所占输注血液成分的 64.2%, 新鲜冰冻血浆次之(29.7%), 血小板最低, 仅为 6.1%^[4]; 而英国 1 项相应的新生儿流行病学调查资料显示, 红细胞、血小板和血浆的输注比例分别为 4.5%, 15.6%和 3.3%^[5]。这种差异可能源于对血液成分的不同应用, 利与弊值得进一步探讨^[4]。

儿科输血由于其自身特点, 会用到一些小量红细胞, 部分血站采取提供 1u 的红细胞制剂, 多余的红细胞制剂废弃的方法, 这样会造成血液制剂浪费。目前大多数血站是采用手工分装小量红细胞来满足临床需要, 分装小量红细胞的关键控制点: 1. 在分装前要将血液充分混匀; 2. 按照所需要的规格进行分装, 且二袋的重量质量要均等。采用手工分装存在着混匀不到位, 分装重量和质量不均等的问题。同时献血者个体差异, 在浆净出的条件下红细胞重量差异范围大, 无法用全自动血液分离机智能分装。

改进后方法解决了自动混匀和定量分装的问题, 具有分装均匀, 重量差异小, 不受人操作因素的影响等优势。分装后的小量红细胞从检测结果来看重量 (毫升) 为分袋 1 (50.77 \pm 7.68), 分袋 2 (50.30 \pm 6.22); 血红蛋白含量为分袋 1 (10.01 \pm 1.82), 分袋 2 (9.97 \pm 1.60), 两组差别无统计学意义, 说明二袋血液分装的非常均匀。参照去白细胞

悬浮红细胞血红蛋白含量标准：来源于400ml全血：含量 $\geq 36g$ ；来源于200ml全血：含量 $\geq 18g$ ^[6]。那么小量红细胞的血红蛋白含量应该 $\geq 9g$ 。

全自动血液分离机分装小量红细胞不仅可以节约人力，1个人在20分钟内就可以完成14袋红细胞的分装工作，还可以追溯到操作者、程序、设备、重量等信息。同时也可以根据不同单位成分科的实际需要将1.5u分装成1u和0.5u等不相等规格，目前未实现与管理互联网，希望业内人士在以后的工作不断完善。

参考文献

- [1] 马曙轩.儿科输血//刘景汉,汪德清.基础医学.北京:人民卫生出版社,2011:321-341.
- [2] 马曙轩,刘景汉.儿科输血工作的思考与展望.中国输血杂志,2013,26(2):99-100.
- [3] Amelia MS, Ruth G, Renato SP, et al. Variability on red blood cell transfusion practices among Brazilian neonatal intensive care units. *Transfusion*, 2010, 50(2): 150-159.
- [4] 11811名新生儿输血状况调查分析.中国输血杂志,2010,23(7):495-497.
- [5] Cobain TJ, Vamvakas EC, Wells A, et al. A survey of the demographics of blood use. *Transfus Med*, 2007, 17(1): 1-15.
- [6] 中华人民共和国卫生部.中国国家标准委员会,全血及成分血质量要求.中华人民共和国国家标准,GB18469-2012.大多数血站都会根据临床的需要分装出这种小规格的红细胞制剂,而且有的血站还有把2 μL 的红细胞制剂分装成2个1 μL 制剂的需要。

(输血装备专委会供稿)

对无偿献血者流失相关因素分析及预防对策

戚均超 陈惠鸿

诸暨市中心血库 浙江 诸暨 311800

[摘要] **目的** 探讨影响无偿献血者再次献血的相关因素及预防对策。**方法** 随机选择2010年1月-2011年12月参加无偿献血者1500例作为研究对象,不再继续献血者作为流失组,再次参加献血者作为固定组,以12673名2010年-2011年两年献血总人群作为献血总体样本人群;比较各组人群性别、年龄、居住地、文化程度、职业、献血次数、献血知识了解程度、对献血服务质量满意等方面的差异。**结果** 1500例无偿献血者中不再献血(流失组)847例(56.47%),愿意再次献血(固定组)653例(43.53%)。与其他人群相比流失组女性比例高、年龄大、人口流动性大;而固定组中,年龄低、常住人口多、文化层次相对较高,决定该人群更容易接受无偿献血知识并相对容易固定在同一个区域参加献血。**结论** 影响无偿献血者再次献血的相关因素复杂,应针对上述影响因素实施相应干预措施通过提高无偿献血。

[关键词] 无偿献血;再次;影响因素;预防对策

For the loss of voluntary blood donors related factors and preventive measures/QI Junchao, CHEN Huihong Zhuji//
Central Blood Bank, Zhejiang 311800, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of related factors and preventive measures of voluntary blood donors donate blood again. **Method** Randomly select January 2010 -December 2011 1500 cases of blood donors to participate as research subjects, no further loss of blood donors as a group, to participate again as a fixed group of donors to 12,673 in 2010 - 2011 years of blood donation The total population as the overall sample population to donate blood; crowd each group were compared by sex, age, place of residence, education level, occupation, number of blood donation, blood donation knowledge level of understanding of blood donation and other aspects of quality of service satisfaction. **Results** Results 1500 cases of voluntary blood donors are no longer donate blood (loss group) 847 cases (56.47%), are willing to donate blood again (fixed group) 653 cases (43.53%). Loss group high proportion of women, older, population mobility compared with other populations; fixed group, the age is low, the resident population, cultural level is relatively high, the decision of the people more likely to accept voluntary blood donation and relatively easily fixed In the same area to participate in blood donation. **Conclusions** Relevant factors affecting the complexity of free blood donors again, appropriate interventions should be implemented for these factors by increasing blood donation.

[Key words] Unpaid blood donors; again ; influencing factors ; preventive measures

无偿献血是临床用血安全的保证,经过十六年的发展与完善,目前中国无偿献血已初具规模,但近两年受各方面因素影响,无偿献血形势不容乐观,尤其是再次无偿献血情况,已经成为抑压无偿献血发展的瓶颈^[1],本研究通过对我市无偿献血人群的调查,探讨影响者再次无偿献血的相关因素,对制定无偿献血政策提供依据,以提高调动无偿献血的积极性,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

随机选择2010年1月-2011年12月包括中心商业区、居住区和城乡结合区首次无偿献血者1500例作为研究对象,男791名,女709名;年龄20-50岁,平均33.23±7.89岁。同时统计2010年1月-2011年12月两年全部无偿献血者共12673名作为总体样本作为对照,其中男性7688名,女性4985名,年龄18-55岁,平均32.5±10.2岁。

1.2 方法 对1500例献血者进行跟踪调查,继续观察其献血情况,至2014年根据其在近三年内有无再次献血情况进行分组;比较两组人群性别、年龄、居住地、文化程度、职业、献血次数、献血知识了解程度、对献血服务质量满意等方面的差异,并分别与两年全部无偿献血人群进行比较。

1.3 统计学处理

SPSS13.0 统计软件对定性资料采用率比描述,采用 χ^2 检验或精确概率法进行检验;对定量资料数据用 mean±SD 表示采用 t 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

1500例无偿献血者中不再次献血(流失组)847例(56.47%),再次献血(固定组)653例(43.53%)。两组性别、年龄、文化程度等情况比较见表1,从结果中看流失组与固定组在女性比例、年龄、人口流动性、文化程度、户籍等方面比较P<0.05,均有显著差异。两组人群与两年全部献血人群(两年组)进行两两比较,结果见表2,固定组与全部人群在性别、居住地方面无显著差异,年龄、文化程度、职业方面有显著差异,固定组人群的平均年龄小于两年组,文化程度中高中以上比例高于两年组,非农民比例高于两年组;流失组性别、年龄、居住地与两年组有显著差异,年龄高于两年组,女性比例高于两年组,常住人口比例低于两年组。

表1 两组无偿献血人群相关指标比较

观察项目	流失组 (n=847)	固定组 (n=653)	χ^2	t值	P
性别(男/女)	375/472	416/237	64.20		<0.05
年龄(岁)	36.23±8.23	28.45±7.89		4.42	<0.05
居住地(常住/流动)	514/333	534/119	77.91		<0.05
文化(初中以下/高中以上)	363/484	299/354	24.49		<0.05
职业(农民/非农民)	188/659	45/608	65.83		<0.05
献血知识(了解/匮乏)	433/414	95/558	216.23		<0.05

表2 两组献血人群与总献血人群指标比较

观察项目	流失组 (n=847)	两年组 (n=12673)	固定组 (n=653)
性别(男/女)	375/472 $\chi^2=88.61, P<0.01$	7688/4985	416/237 $\chi^2=2.41, P=0.12$
年龄(岁)	36.23±8.23 $t=10.78, P<0.01$	32.5±10.2	28.45±7.89 $t=12.95, P<0.01$
居住地(常住/流动)	514/333 $\chi^2=142.49, P<0.01$	9939/2734	534/119 $\chi^2=4.34, P=0.04$
文化(初中以下/高中以上)	363/484 $\chi^2=5.16, P=0.02$	4542/7131	354/299 $\chi^2=60.47, P<0.01$
职业(农民/非农民)	188/659 $\chi^2=173, P=0.19$	2574/10099	45/608 $\chi^2=70.82, P<0.01$

2.2 对服务满意情况的评价

1500例无偿献血者满意度测评情况见表3,流失组平均满意度为96.71%,固定组平均满意度为96.08%,以95%,90%进行分类,分别对两组人员满意率高中低率进行比较, $X^2=3.991, P=0.136>0.05$,两者无显著差异。

表3 两组无偿献血人群献血服务满意率比较

	流失组	固定组
≥95%	469	328
90%≥, <95%	342	296
<90%	36	29
合计	847	653

3 讨论

充足的血液保障是对临床医疗活动的切实保障,建立一支安全固定的自愿无偿献血者队伍,对确保临床安全用血有着非常重要的作用,近年来虽然公民的无偿献血意识不断加强,但由于多种因素的存在影响了无偿献血者的再次献血^[2],本研究通过对献血者从初次参加献血活动到保留成为固定献血者的一个持续的跟踪调查,结果显示1500个献血者中有高达56.47%的献血者由于各种原因没能再次献血,而成为流失的献血人群,在本市献血人群中,初次献血者在献血以后被保留成为一个忠诚的固定献血者的概率还不是很很高。

调查显示在流失组、固定组和全部献血人群的比较中,流失组人群中女性所占比例较大,在年龄上也显著高于其他组年龄,流动人口、农民这些原因造成献血者会比其他人群更易流失,献血知识匮乏也是流失组是一个情况,笔者认为女性人群的性格和特有的生理因素(月经、妊娠、哺乳)会影响到女性再次献血。年龄、文化程度均会影响到献血者的保留。而人员流动性也是影响献血者保留的一大因素,由于本市外来人口较多,人员流动频繁,因此也会阻碍到献血者再次献血。而在固定组中,年龄低、常住人口、文化层次较高,决定该人群更容易接受无偿献血知识并相对容易固定在同一个区域参加献血。

国内文献在报道中认为服务质量的不满意,包括献血环境、采血用品的安全性、工作人员的态度、受尊敬的程度等是影响再次献血的重要因素^[9],但在本次调查中,服务满意度对献血者保留的情况并不明显,笔者分析这主要是笔者所在单位在献血者服务过程中采用高质量的服务标准,在献血环境、操作规范、人员服务态度各方面已经得到很大的提升,所以献血者不满意情况相对较少,在上述调查人群是该部分因不满意而拒绝献血的情况相对不明显。

综上所述,笔者认为目前在献血者流失情况严重的形势下,注重创造一个温馨、舒适的献血环境已经不能作为献血者保留的唯一促进点,而是应该根据不同人群的需求通过多方面来提高献血者保留成功率,如针对女性性格,要适时的对某些犹豫不决的女性加以鼓励,打消其顾虑,以动员更多的女性加入到无偿献血的行列;在宣传工作中要从多个角度入手,从年轻人入手,通过讲解血液生理知识,讲解献血与健康的关系,来扫盲,消顾虑,最终达到最大程度保留献血者的目的;同时还需要完善献血后服务工作,采血后应及时做好信息反馈工作,参照户籍管理等形成全国性数据网络从而更好调动流动人员献血的积极性,最终带动整个社会朝着正能量发展,鼓励更多的人献血,保留更多的献血者,促进无偿献血良性发展。

参考文献

- [1] 袁介秋.无偿献血中存在的问题与对策[J].职业卫生与病伤,2005,20(2):160.
- [2] 陶红兵.郭石林.无偿献血者献血行为及影响因素分析[J].中国公共卫生,2008,24(1):0-91.
- [3] 叶小凡,唐荣才,陆方,等.南京市街头无偿献血者状况调查分析[J].中国输血杂志,2007,2(6):519-520.
- [4] 朱美玲,黎淦平,王秀兰,等.无偿献血工作中献血者满意度调查[J].临床输血与检验,2006,8(3):208-209.
- [5] 徐健,杨雪梅,章杏英,等.无偿献血教育的形式与内容探讨[J].中国输血杂志,2007,20(3):248-249.
- [6] 庄培芬,金志鑫.在献血服务中实施星级管理的体会[J].中国输血杂志,2008,21(1):57-59.
- [7] 唐光生,明钰,朱儒涵.自愿无偿献血若干问题的探讨[J].临床输血与检验,2008,10(1):84-85.
- [8] 李秀兰,刘仁文,颜建吾,等.无偿献血的影响因素分析[J].实用预防医学,2008,15(1):108-110.
- [9] 刘培兴.无偿献血者再次献血行为的影响因素分析[J].临床输血与检验,2009,11(2):166-167
- [10] 李泉忠,郝丽丽,闫爱美,等.影响成为固定献血者相关因素的探讨[J].临床输血与检验,2008,10(4):372-373.

(输血装备专委会供稿)

医学临床电子病历数据挖掘及其模拟系统设计与应用

王清河^① 谢云鹏^② 谢利德*^① 王晓春^① 李牧乘^①

①承德医学院

②承德医学院附属医院, 河北 承德 067000

[摘要] 医学临床电子病例综合了患者的诊断、治疗、护理的全部资料, 这些资料对于医学求知者自主学习和个性化学习具有相当意义; 但是医院现有的综合信息管理、电子病历管理、影像信息管理、化验信息管理平台是有权限的, 对于医学专业知识点来说, 有些数据是非结构化的; 针对这些现状设计了模拟临床电子病例管理系统, 并根据临床专业知识节点将非结构化数据转化为结构化数据; 构建适应于医学求知者学习的数据资源服务中心及其操作系统软件, 使医学求知者方便的对医学知识进行查询、检索、学习、自测, 提高医学求知者的在线学习效果。

[关键词] 医学求知者; 数据挖掘; 结构化数据

The Designing and Applying of Clinical EPR Data Mining Simulation System

Wang qinghe¹ Xie yunpeng² Xielide*¹ Wang xiaochun¹ Li Mucheng¹

1 Chengde Medical university, 2 Affiliated Hospital of Chengde Medical university, Hebei Chengde 067000

[Abstract] The clinical EPR sums all diagnosis, treatment and nursing data of a patient while the data is very useful for a medical learner to study in his own ways; However, the information management, EPR management, video management and chemical examination management of a hospital are limited by authorization. Some of the data is unstructured for medical professional knowledge; Designing the simulate EPR management system according to the situation and transform the unstructured data into structured data with professional clinical knowledge; Establish the data resource service center and operating system software for medical learners and make their online study much more efficient such as querying, retrieval, learning and self testing.

[Keywords] Medical learner, Data mining, Structured data

1 研究背景与现状

在信息化高速发展的进程中, 网络信息技术的应用对大中型医院来说并非新生事物, 目前, 我国大中型医院都已经建立了适合于本地医院管理的、较为完善的信息资源管理系统, 如医院综合信息管理平台 (Hospital integrated information management platform, HIMP)、电子病历管理平台 (Electronic medical record management platform, EMRP)、影像信息管理平台 (Image information management platform, IMP)、化验信息管理平台 (Laboratory information management platform, LIP) 等, 这些管理平台对医院的管理水平、诊疗水平的提高, 都起着重要的作用; 但是这些分散的、独立的、数据访问级别高的系统对于医学求知者对学习资源共享的需求, 相差甚远。随着网络信息技术的发展, 一个以共享知识为重心的知识经济型态, 将主导 21 世纪人类的文明社会型态, 如何透过信息的搜集、共享和转化, 促成知识的理解与创新, 将是身处知识经济时代人们的竞争力所在; 在这个共享知识的经济时代, 无论 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统多么发达, 就其功能而言, 是替代不了医学求知者 (医学生、医学教师、医务工作者) 的自主学习^[1-4]、个性化学习的共享需求; 在当下知识爆炸阶段, 医学求知者唯有不断的自己主动学习, 建构出属于自己的知识网络架构并共享交流, 才能确保其不致淹没于知识洪流之中。医学求知者在决定获取若干既定的知识或技能之后, 该人就应主动地对自己的学习负责, 制订个人学习计划、使用有效学习策略, 建立起适应于自己的网络学习通道和构架, 并在此网络学习通道和构架下进行交流互动^[5]。由此可见, 为了保障医学求知者的自主学习, 挖掘临床外科专业知识数据资源并结构化其数据, 构建一个模拟临床医学诊治常规操作的网络学习系统软件, 方便医学求知者自主学习和个性化学习的网络支撑环境, 使医学求知者充分利用有效的、个性化适应的数据资源, 进行有效学习是我们研究过程中所关注的热点。

2 需求分析

医学临床专业知识是一门实践与操作性强的学科，临床教学的突出特点是利用大量病例的图片、动画、视频、操作技能录象来解释难于理解的医学理论及操作等；临床电子病例、影像等学习资源丰富，但是医院的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的访问是有权限的，限制了医学求知者的自主性和个性化应用，同时也限制了医学求知者的自主学习和个性化学习^[6]；鉴于这些特点，针对医学求知者层面的需求，挖掘医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的临床医学资源和操作技能视频，将教学设计、数字技术、大数据管理技术深度融合，对临床医学教学环境^[7]及过程进行建模，设计信息系统，提供学习情境，使医学求知者有效利用挖掘的结构化学习资源进行学习。

医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的管理模式主要针对医院病人诊断、治疗、护理方面的管理，而缺乏临床教学资源的管理，检索学习资源的信息只能通过病人的住院号、病房号、科室等才能检索到相关学习资源，没有按外科学专业知识节点与分类建立相应的学习资源，直接给医学求知者对知识的检索带来不便；因此挖掘数据的同时将一些非结构化的数据转化结构化数据也至关重要，只有根据临床外科学专业知识节点将非结构化的数据转化结构化数据，才能方便医学求知者对知识的检索和查找。

3 数据挖掘及安全管理

3.1 构建数据资源服务中心^[8-10]

根据需求分析，构建数据资源服务中心主要依托医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的数据资源和外科手术技能资源，并将这些数据资源的非结构化转化为结构化；首先创建数据库和文件服务结构目录，并提供外部数据资源接口，实现内外部数据资源的转储，具体实现方案如下：

根据系统的要求，把医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统及外科手术操作技能视频的数据与描述学习资源文件的基本相关信息转储到 SQL Server2008 中统一管理。创建数据库，主要涉及到以下几个数据表文件：学习资源索引表，学习资源管理表。其 E_R 关系略图如图 1，其中（1）（2）为实体及其属性图（3）为实体及其关系图。创建 IIS 文件结构目录，将结构化的目标文件转储于此目录。

3.2 构建数据采集系统^[11-12]

数据采集阶段是实现系统目标的关键环节，其主要目的是把零散的、分散的非结构化数据转化结构化数据，系统的开发主要采用了 C/S 结构方式，利用软件开发工具 VISUAL C#做一些动态连接库（.DLL）及一些控件（.ocx），根据软件开发工具 VS.NET 来引用.dll 及.ocx

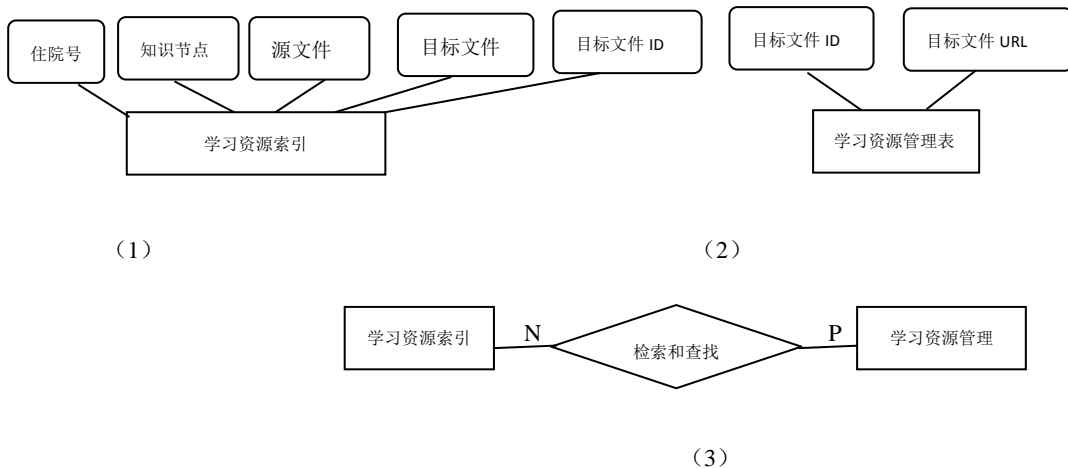


图 1 系统 E_R 关系略图

设计用户界面，实现结构化数据的转储；根据实际需求，系统可以有批量数据转储和单条数据数据存储功能，批量数据转储的主要实施过程为：进入认证模块，接收数据处理命令，对命令进行分析，是否为批量数据转储命令；进入数据中心处理模块；如果接到的是批量数据转储命令，则调用 Data-Transmission System（DTS），选择性的将数据导入数据资源中心；进入数据分析处理模块，对导入的数据进行分析，保留可用字段，对源文件分析处理后，直接更新为目标文件，并对目标文件进行标示备用（具体实现源码略）。如果接到的是单条数据处理命令，将数据比对

后直接存入数据中心。在实际操作中，主要有外科手术相关数据采集和临床电子病历采集

(1)外科手术相关数据采集与管理

目前，国内大中型医院的手术室都安装了实时手术录像录播系统，可以利用现有的录播系统，对手术视频进行录制，并根据需要进行编辑，调用单条数据处理命令，比对住院号后，将数据采集到数据资源中心；对录像文件的导入可按如下录像导入模块导入：

通过自定义窗口类 Class `drlxx` 以及类 Class `NetworkCredential` 及数据库对象 ADO.NET 实现，其所属类图如图 2。

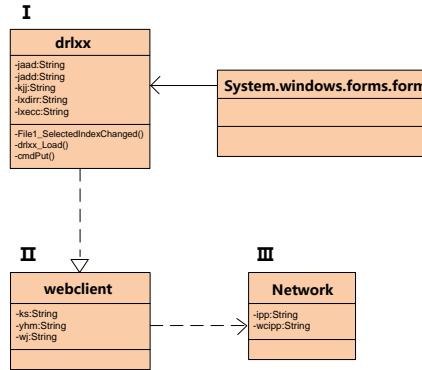


图 2 录像导入模块 uml 类图

(2)临床电子病历采集与管理

主要根据医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的数据资源，根据临床外科学知识节点筛选出典型病例，以患者住院号为关键字段，利用 DBMS 的 DTS 批量的将 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的数据导入到数据资源中心，经过统计、分析、关联、固化后进行标示，最终将生成的数据，推送给学习资源管理列表，方便系统的检索和查询。

4 数据的应用

系统将医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的数据资源和外科手术视频的的采集，并将其数据进行结构化处理，为医学求知者对数据的检索、查询、自测提供了基础数据；医学求知者对基础数据的利用，是通过数据查询浏览系统和典型病例自测系统程序界面实现的，具体实现过程如下：

4.1 构建数据查询浏览系统^[13]

主要利用 C#、Web.UI 及数据库组件对象技术实现，通过 sql、Data 更好的实现数据查询，并把数据集结果，利用数据组件 ADO.NET 的 DataSet 对象同步到 Web.UI，使得 Web.UI 与 DataSet 的数据可以相互贯通，并可以有效地进行索引和搜索，以便在 web 上管理和发布数据，方便用户管理数据和浏览（具体实现源代码略）。

4.2 构建临床外科学典型病例自测系统

临床外科学典型病例自测系统主要用来检测医学求知者对资源中心的专业知识学习和掌握情况，选择的题型主要以客观题为主，程序界面直接给出答题结果，为了提高效率，习题可以直接从数据资源中心中产生，并按题目序号添加问题及答案；由于数据资源中心的目标文件的 URL 可以指向文件的 IIS 虚拟地址，自测题目可以是临床外科手术视频，既丰富了自测试题内容又将形象化试题载入知识检测现场，提高了知识检测效果和学习效果。

5 总结

通过对医学求知者的需求分析和医院现有的 HIMP、EMRP、IMP、LIP 等系统的调研，提出数据挖掘的总体方法和步骤；在系统设计过程中，根据医学临床专业知识节点将非结构化的数据转化结构化数据，方便医学求知者对知识的检索和查找的原则，充分体现了医学求知者的自主学习和个性化学习的模式，为医学求知者的学习创建一个网络共享平台和交流学习环境。

参考文献

- [1] Tough,A. M.. The Association Obtained by Adult Self-Teachers[J].Adult Education(USA), 1966 (17):33-37.
- [2] 庞维国. 自主学习:学与教的原理和策略[M]. 上海 华东师范大学出版社 2003.07.
- [3] 郁晓华. 个人学习环境中的自主学习: 转变与实现[M]. 南开大学出版社.2013.11
- [4] Samy Azer 著 王维民 译. 问题导向学习 (PBL) 指南[M]. 北京大学医学出版社.2012.07
- [5] 黄荣怀.CSCL 的理论与方法[J].电化教育研究, 1999, (6): 25-30.
- [6] 张雅军. 建构主义指导下的自主学习理论与实践[M]. 华中师范大学出版社.2012.06.
- [7] 郑太年 马小强.学习环境的设计 [J].中国电化教育, 2010, (2): 1-6.
- [8] 刘永平.智慧网络学习资源信息系统的研究与实践[J]. 实验技术与管理, 2013, (12): 114-117
- [9] 刘永平. 基于语义网和本体构建适应性学习资源信息系统 [J].实验室研究与探索, 2011 (10): 59-62.
- [10] 王清河.校园网内共建共享适应性学习资源系统的研究与实践[J]. 实验技术与管理, 2013, (4): 185-188 实验室研究与探索
- [11] Evangelos Petroutsos Kevin Hough.Visual Basic 6 Handbook 北京 电子工业出版社 1999.21~836
- [12] 王清河 王阳 谢利德等. 导向型自主学习的医学实验及临床技能教学[J]. 实验室研究与探索, 2014 (3): 269-271
- [13] (美)Lars Powers;Mike Snell . Visual Studio 2005 技术大全. 人民邮电出版社 2008,(1):400-591

基金项目: 河北省教育厅教育科学规划课题“基于学生自主学习需求构建网络在线适应性学习系统研究”(GH132005)

作者简介: 王清河 (1966-), 男, 高级工程师, 学士, 承德医学院多媒体教学管理部, 314-2291268, 15831458620

研究方向: 多媒体软件开发, 网络学习环境设计

***通讯作者:** 谢利德(1965-), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 承德医学院副校长; 研究方向: 医学工程。

(医学实验室装备与技术分会供稿)

互联网技术在医院设备管理与维修中的应用

Application of internet technology in management and maintenance of hospital equipments

谢玉丹

全医佳医疗设备服务平台

[摘要] 随着医疗设备在医院中的广泛应用, 其管理和维修的正常开展也成为医疗工作的前提。如何建立一套更完善和规范的管理体系、如何保全医疗设备报修信息记录问题、如何确保维修记录的及时生成问题、如何获取有关维修工作统计学信息问题、如何实时掌握维修工作动态问题是设备维修面临的主要问题, 而互联网的应用为解决以上问题提供了新思路和方法。本研究主要探讨互联网在医院设备管理和维修中的应用及一站式医疗设备平台的优势, 旨在为医院设备管理和维修提供方法。

[关键词] 互联网; 设备管理; 设备维修; 质控; 一站式医疗设备服务平台

随着高科技的发展及其在医疗设备中的应用, 越来越多的大中型医疗设备已经实现了信息化调控, 计算机及其网络在医疗设备的管理和维修中发挥着越来越重要的作用^[1]。医疗设备的管理和维修, 是医工部门一项重要的日常工作, 而高效、及时的设备维修是正常开展临床医疗工作的前提^[2]。面对复杂的医疗设备管理和维修工作, 如何在符合医院管理要求和国家法规的基础上满足临床需求, 是设备科管理者亟待解决的重要问题。研究^[3]表明, 传统的人工管理模式无法解决以上难题, 必须开发专门的数据库管理系统, 并依靠计算机、信息通讯及相应控制技术, 才能有效促进医疗设备管理和维修的规范化和科学化。本研究主要探讨互联网在医院设备管理和维修中的应用及一站式医疗设备平台的优势, 如下。

1 医疗设备管理和维修现状

1.1 医疗设备管理现状

中华人民共和国卫生部分别于 2010 年 1 月和 2011 年 3 月颁发了《医疗器械临床使用安全管理规范(试行)》和《医疗卫生机构医学装备管理办法》。同时, 2010 年 9 月上海医疗设备质控中心颁发的《质控手册》也对医疗器械的预防性维护 (preventive maintenance, PM) 管理和风险管理给予相应的规定^[4]。然而, 大多数医院每天需要管理和维修的仪器设备都较多, 而医院的设备管理通常无系统、规范的软件系统, 混乱无章, 使资产统计非常困难。医院设备管理现状如图 1 所示。



图 1 医院设备管理现状

面临的问题：PM 是提高设备安全性和使用效率、降低设备故障发生机会的重要措施，但 PM 能否如期进行是主要问题所在，传统的人工管理模式，如资产管理软件、手工表格管理及传统的医院信息管理系统 (HIS) 系统中的资产管理模块等，无法保证每一位工程技术人员都能按照规定如期执行 PM，因此，建立一套更完善、规范的管理体系是亟待解决的问题之一。

1.2 医疗设备维修现状

目前维修方式主要有：

(1) 医院自修。优势：无需费用，响应速度快，设备更新快。缺点：自有人员较少，厂家不提供培训，无备件和维修工具，维修难度高。

(2) 厂家维修。优势：维修力量强，维修人员经验丰富，有充足的备件。缺点：生产厂家垄断维修，价格高，以换代修，只换不修，维修过程不透明，维修服务意识差，效率慢，流程复杂。

(3) 第三方维修。优势：聘请的技术人员维修力强，维修水平高；响应速度快，维修价格便宜；维修方式灵活多样，在维修及备件价格方面比较公道。缺点：备件来源不正规，没有质量保障；维修人员未接受正规、专业培训，对设备维修无全局把握。

面临的主要问题：

- (1) 如何保全医疗设备报修信息记录问题；
- (2) 如何确保维修记录的及时生成问题；
- (3) 如何获取有关维修工作统计学信息问题；
- (4) 如何实时掌握维修工作动态问题。

2 互联网应用的优势

2.1 解决管理问题

医院设备管理三大痛点，如图 2 所示。



图2 医院设备管理三大痛点

根据以上三大痛点，应用互联网的解决方案包括以下方面：

(1) 管理问题的解决。通过资产电子档案的建立，院领导能随时查询和掌控全院的固定资产，还针对需要“强检”的设备进行计量管理功能，可有效的配合计量管理部门工作，并能快速的完成台账处理。具体功能主要包括：资产卡片的建立、资产转移、资产报废、资产外调、资产折旧、资产查询、资产盘点处理等。

(2) 质控管理。分级质量管理方案及流程建立；设备运行状态管理记录；设备预防性保养计划、保养记录；设备维修登记；设备计量管理；保养提醒、计量检测提醒、国家标准质控要求完成提醒，消耗品及易损件更换提醒；安全监测及不良事件处理上报；配合医院评级、评定需要的申报资料和报告生成；设备维修和维护综合统计；提供质控服务一站式解决方案。

(3) 维修管理。①快速报修：一键报修，手机、APP、电话、短信、网络全方位报修，避免遗漏延误；②院内工程师电脑系统智能化派工，最快最优的派工安排；③报修响应、反馈进程实时呈现，全程过程化管理；④通过互联网提供一站式报修解决方案，提供海量优质外修、配件供应商选择；⑤报修审批流程管理；设备故障率分析及故障率排名分析；⑥常见问题处理解决方案。

(4) 数据分析。①设备折旧分析：根据设备特性及使用现状设置折旧曲线，契合医院管理要求；②设备效益分析：定期统计分析设备使用率及当期效益，为医院设备配置计划提供重要参考依据；③设备维护成本分析，对维修及养护记录数据分析，为制定最合理的维护计划提供数据支持，降低设备运营成本；④对设备的使用、质量、服务等方面的指标自动进行量化统计；⑤领导随时可查阅全院、科室、单机的维修费用，以及年度、季度、月度的费用对比。

2.2 解决维修问题

系统、规范化互联网系统可以有效解决各大医院医疗设备的维修问题，如对散乱的第三方维修机构信息进行梳理分类，包括上万家服务商和工程师的信息进行收集整理；对服务商及工程师的服务能力和质量进行评估，建立信用评级评价及担保机制；通过共享配件库解决小服务商配件资金难题；引入第三方质量检测机构，对维修质量进行评估检测，保障服务质量；通过互联网完成全程商务服务，解放设备科生产力。

3 现有信息化系统现状及发展方向

3.1 财务软件或传统 HIS 系统中资产管理模块

财务软件或 HIS 常见系统包括卫宁、金蝶、用友等，但是系统存在严重的缺陷，如单纯资产管理，不适应设备管理的要求，无法追溯医疗设备的相关资料，盘点困难；无质控、维修流程管理功能；无效益分析、数据分析功能。

3.2 单纯设备管理软件

单纯设备管理软件如保利软件、中设等，具有效益分析和数据功能，但无法整合维修和质控服务商，不能解决维修难题。

3.3 基于医院资源计划系统（HRP）的管理模式^[5]

医院资源计划系统（hospital resource planning, HRP）是一套支持医院整体运营管理的管理系统，其根据医院管

理的行业特征，并参照企业资源计划系统（enterprise resource planning, ERP）管理理念和思想而创建。HRP 含有维修和 PM 功能，但其部分功能对医院设备维修并不适用，根据医院医疗设备的维修需要，仅“维修单”、“派工单”和“维修申请”等功能受到采纳。且 HRP 也不能根据要求以曲线图、直方图等方式展示信息数据统计，因此，HRP 虽然为某些医院的医疗设备的维修和 PM 提供了实践机会并解决了部分难题，但还需有相应的制度与机制等配套措施，才能发挥应有的效率。

3.4 一站式医疗设备服务平台

3.4.1 功能

一站式设备服务平台（例：全医佳一站式医疗设备服务平台，其服务架构如图 3）具有以下功能：

（1）资产管理。为每台设备建立电子档案，设备数目、状况一览无余，避免造成资产流失损失；电子码查询、盘点、转移、借用方便快捷，节省人力；设备历史维修记录及相关资料全部在案，随时便捷调阅查询，为保养、维修提供支持。

（2）质控。系统化质控管理解决方案，助力医院评级；确保设备安全合格使用，减少事故隐患和医患风险；预防性维护降低维修费用，延长设备使用寿命。

（3）维修。报修迅速无死角，确保最快响应时间；智能化安排工程师最为科学地安排工作；通过服务平台海量供应商提供选择，确保最优、最快、最经济服务；维修状态及进程及时反馈，平台客服提供全过程支持。

（4）审批。手机、电脑均可审批流程，确保及时有效推进借用、维修等进程，避免纸质流程的拖延、丢失和推诿现象发生；所有审批记录留存，便于管理。

（5）效益分析。为医院内部管理、科室评估、设备添置更换提供决策依据；降低维修养护成本。



图 3 全医佳一站式医疗设备服务平台服务架构

3.4.2 优势

一站式设备服务平台具有诸多优势：

（1）更全面。覆盖最多的设备品类，是最大的医疗设备维修服务平台；提供最多服务商信息，覆盖全国各区域。

（2）更快速。一键报修，随时随地无死角；提供最近、最快响应时间供应商筛选；最全备件库，缩短等待时间。

（3）更经济。集中采购，规模化效益降低成本；多家优质服务商比价确保最优性价比。

（4）更可靠。提供信用评级、行业评价，信用保证金保障、第三方付款保障资金安全；售后维权服务、维修质量评估报告出具；庞大供应商团队确保托底，无后顾之忧。

（5）更专业。平台工程师提供准确信息，减少故障判断时间，避免供应商误报乱修；规范化流程管理，提供标准化服务，合同模板。

（6）更周到。全程客服跟踪，实时信息 APP 反馈；节省人力寻找服务商、询价、比价、招标全套服务；可与设备管理系统联动，分析故障原因，提供完整维修资料记录参考。（7）更贴心：提供常见问题快速解决方案、视频教学等增值服务；业内最专业工程师提供定期网络培训。

4 讨论

作为一种新的生产力,信息技术必将对生产方式、管理模式带来重大而深刻的变革。全球化信息技术的不断发展,必然使信息技术在医院管理中不断深入。传统的管理模式已不能适应时代发展和医院医疗设备管理和维修的要求。因此,在充分认识到信息技术对原有管理模式所产生的深刻影响,探索新型的管理模式。

近几年,通过应用于宽带多媒体信息网络的基于计算机网络的实时视频监控系统进行医院医疗设备维修工程师与生产厂家之间或工程师之间的经验交流已成为可能,更体现出计算机及其网络技术在医院医疗设备维修工作中的支持地位。医疗设备管理和维修系统在医院信息系统中占主要地位,故应当在充分考虑各个医院医疗设备管理的特点的基础上,结合计算机信息技术,建立其高效的管理系统^[6]。

基于互联网的医疗设备维修管理系统,尤其是一站式医疗设备服务平台,作为医院医疗设备维修管理系统和保障平台,可以在信息化过程中落实各项操作标准、执行规范和管理制度;充分利用计算机和网络的快捷性和方便性,标准化和电子化所有的维修作业记录;所有医疗设备实现电子化管理,不仅为数据收集、维护、分析和挖掘提供了有效的信息平台,还有利于对医疗设备的统筹管理,加强掌控信息的能力,进而为研究型保障提供完整模型,值得在各大医院大力推广施行。

参考文献

- [1] 刘胜利,张叙天,等.基于BS模式的医疗设备维护信息平台的开发与应用[J].中国医疗器械杂志,2012,36(2):145-147.
- [2] 蒋友好,彭文,蒋宁峰,等.基于RIA技术的医疗设备维修管理系统[J].中国医疗设备,2013,(12):53-56.
- [3] 吴向阳,张超群,杭建金,等.医疗设备维修的数据库管理系统研究与设计[J].医疗卫生装备,2009,30(7):25-27.
- [4] 蒋友好,彭文,马力.呼吸机的使用现状分析及风险安全管理措施[J].中国医疗设备,2012,27(2):71-73.
- [5] 陈绵康,张进,余世准,等.基于HRP的医疗设备维修管理探索与实践[J].中国医疗器械杂志,2013,(1):68-71.
- [6] 刘元明,刘欢.医疗设备资产信息管理系统平台的构建[J].中国医学装备,2014,(1):54-56

作者简介:谢玉丹,全医佳医疗设备服务平台;13913911000

北京市红十字血液中心信息化建设应用效果

李颖 戴云 孟雅娟 万峻 陈超 袁曜 田甜 王硕

北京市红十字血液中心信息科

[摘要] 2015年是北京市红十字血液中心虚拟化平台、新存储系统、备份系统正式使用的第一年。我们在实践中不断的应用新知识、迎接新挑战。在工作与实践探索中摸索更适合的备份策略、建立新的虚拟机以配合新血液管理信息系统的测试,监控各个虚拟机的状态。我们运用新技术仅仅围绕中心业务工作,有效的保障了血液管理信息系统安全稳定运行。

今年世界互联网大会上,习近平提出“五点主张”中第四点就是“保障网络安全,促进有序发展”。习主席指出,安全和发展是一体之两翼、驱动之双轮。安全是发展的保障,发展是安全的目的。我中心同样在安全和发展两个层面构建中心网络,用安全的标准为中心网络建设建立规则,用发展的眼光为中心网络建设出谋划策,做好中心的信息安全管理工作,解决了各个科室信息化建设上的技术难题。

1 实施虚拟化新技术的应用效果

2016年也是北京市红十字血液中心虚拟化平台、新存储系统、备份系统正式使用的第一年。我们在实践中不断的应用新知识、迎接新挑战。在工作与实践探索中摸索更适合的备份策略、建立新的虚拟机以配合新血液信息系统的测试、监控各个虚拟机的状态。原使用16台物理服务器承担所有业务工作，现使用6台物理服务器运用虚拟化技术手段部署了31个业务和16个测试虚拟机，其所承载的业务总量远远大于过去16台物理服务器所承载的工作量，并节省了机房的空間。由于运用了虚拟化技术，我们灵活实现了物料设备和集中化检测子系统的接口部署工作。今年信息科将原有的2台海深威检验系统和全市联网系统应用服务器从物理服务器迁移到虚拟机环境，同时配合运维公司新建、删除、调整配置和转换虚拟机工作共计21台次，已无需像过去那样单独采购硬件和考虑资源重复配备问题，仅仅用几小时就实现了新系统环境的搭建，当不需要此虚拟机资源时，仅用几分钟就可以释放资源，极大地提高了我们的工作效率，节约了机房资源。

年中，数据库审计虚拟机存储空间不足，我们运用虚拟化技术仅用几分钟就重新划分一块存储空间给数据库审计虚拟机，已经无需费时费力购买数据存储盘阵和调整硬件存储策略，使得业务工作可以安全连续稳定运行。几次业务升级需机房停机也都体会到虚拟机开关机的便捷和高速。今年8月调试数据库审计系统和11月调试数据库防火墙时，我们也是利用虚拟化技术，配合运维工程师完成故障的排查恢复工作，极大地降低了工作时长。

2 按信息安全等级保护要求部署无线网络的应用效果

12月16日，以“互联互通、共享共治——构建网络空间命运共同体”为主题的第二届世界互联网大会在浙江乌镇开幕，国家主席习近平出席大会开幕式并发表讲话。习主席指出，网络安全是一个全球性问题，维护网络的和平与安全原则是治理全球互联网秩序的基本原则。习主席强调各国应该共同努力，防范和反对利用网络空间进行的恐怖、淫秽、贩毒、洗钱、赌博等犯罪活动。不论是商业窃密，还是对政府网络发起黑客攻击，都应该根据相关法律和国际公约予以坚决打击。此段讲话尤其彰显出当今信息安全在互联网中的重要性。

血液中心也将网络信息安全工作做为今年的工作重点。今年在9.3阅兵严峻的信息安全形势下，按照北京市公安局文保大队的要求，在敏感时期关闭中心无线网络，同时，积极调研符合安全信息安全认证要求的无线网络解决方案。最终，选定通过公安认证的、免费布网与运营的、在医疗机构中有广泛实践经验的迈外迪佑康公司作为中心的无线网络解决方案厂商。该Wi-Fi网络可以满足公安部网络审计和审查要求，符合《互联网安全保护技术措施规定》（公安部82号令）中相关规定，可以做到记录并留存中心内用户使用的互联网网络地址和内部网络地址对应关系；记录并留存中心内用户登录和退出时间；记录并留存中心内在公共信息服务中传输的违法消息并及时停止传输。该网络覆盖北京红十字血液中心所有区域，提供20M专线为中心职工、献血者提供两套Wi-Fi网络。为献血者提供献血公益性宣传、查询血液中心科室服务内容等资讯，同时使中心职工通过网上平台充分利用空闲时间了解行业、会议、学术、中心等最新资讯，从而提升医护服务能力。可为中心领导提供行政工作移动互联、信息共享等平台，从而提高管理效率、促进精细化管理。

3 按信息安全等保要求部署新硬件设备的应用效果

习主席指出，安全和发展是一体之两翼、驱动之双轮。安全是发展的保障，发展是安全的目的。我中心同样在安全发展的两个层面构建中心信息化，用安全的标准为中心信息化建设建立规则，用发展的眼光为中心信息化建设出谋划策，做好中心的信息安全管理工作。

今年年中，完成信息系统安全等级保护自查，改进针对信息安全管理中发生变更的制度、内容及表单。根据三级等保要求，及时整改不符合项，增加了一台山石VPN设备，配置其远程管理方式为加密传输，保障中心的网络安全。机房内安装防水检测系统，每月进行一次漏水检测验证其有效性，保障机房物理安全。我们还采购了综合日志审计系统，该系统作为综合性管理平台，对中心的网络设备、安全设备、主机（服务器）和应用系统的日志进行全面处理，及时发现各种安全威胁和异常行为事件，确保中心业务不间断运营。同时该系统提供跨设备、细粒度的关联分析，提供事件追责依据，提供集中化的统一管理平台，将所有的日志信息收集到平台中，实现信息资产的统一管理、监控资产的运行状况，协助我科全面审计信息系统整体安全状况。

在这一年中，无论是软件运维公司远程维护方案、成分分离科离心机远程监控调试，还是公安局献血者数据比对等需求，我们都从信息系统三级等级保护的要求出发，研究可行性方案、甄别风险点，有些需求是有条件的通过，对于不符合安全保护规范的、引入巨大风险的需求，我们直接否定。对于业务实际需要，又经过评估可行的数据访

问,必须提前申请防火墙访问,在评估后有限开放。力争信息安全有效的运行。8月顺利通过北京市公安局文保总队的信息安全检查并获得好评。

4 血液中心仍需改进的措施

习近平在今年世界互联网大会上说,网络空间,不应成为各国角力的战场,更不能成为违法犯罪的温床。各国应该共同努力,防范和反对利用网络空间进行的恐怖、淫秽、贩毒、洗钱、赌博等犯罪活动。不论是商业窃密,还是对政府网络发起黑客攻击,都应该根据相关法律和国际公约予以坚决打击。因此,我们也将 2016 年继续开展等级保护测评工作,完善现有信息安全中不足的地方,随着新技术的发展持续为中心信息安全保驾护航。今后我们中心新开展的业务工作均要在信息安全评估通过后实施,不随意建立不符合信息安全的策略。

未来,我们将根据北京市红十字中心信息化建设的工作特点,持续改进服务质量。在工作中勇于创新,努力做到增强服务意识,规范服务行为。做好科室内、外沟通协调,及时保质保量解决信息技术问题,为加快中心信息化发展、提升中心行业影响力、保障血液安全有效做出贡献。

作者简介: 李颖,男,1979年,硕士,工程师,北京市红十字血液中心信息科,血液管理信息系统维护 13810592489, 34032545@QQ.com 地址:北京市海地区北三环中路 37 号
(医学装备信息交互与集成分会供稿)

基于 Node.JS 的远程实时虚拟康复训练系统研究

王清波 虞成 朱隽典 胡志奇 袁杰 王琳斌
杭州市第一人民医院设备科 浙江 杭州 310006

[摘要] 目的: 建立远程实时虚拟康复训练监控系统,利用虚拟现实的视觉等反馈机制,弥补传统康复训练的不足,帮助患者在反复的尝试-练习-更正过程中,不断提高其参与积极性及康复效果。**方法:** 通过 Node-JS 和 Socket.io 来构建远程实时数据传输系统,服务器端采用弯曲传感器测量手指弯曲程度,利用串口通过蓝牙模块传输数据,从而构建无线数据手套。同时利用 Node-JS 构建服务器,使用 node-serialport 接收串口数据,并使用 Socket.io 建立远程实时连接。客户端采用支持 WebSocket 的 Mozilla Firefox 浏览器,采用网页形式登录服务器,接收远程实时数据。通过 jUART 模块将数据以串口形式发送,虚拟手模型单元接收串口形式数据,数据提取后用于控制虚拟手。**结果:** 弯曲传感器数据采集准确、有效,远程实时数据传输稳定方便,三维虚拟手模型控制连续及有效。**结论:** 构建了一套基于 Node.JS 的远程实时虚拟康复训练监控系统,能够有效的用于患者的手部运动康复。

[关键词] 弯曲传感器;虚拟现实;康复

Research of a remote real-time virtual rehabilitation training system based on Node.JS/WANG Qing-bo, YU Cheng Wang Lin-bin, et al./Equipment Department, Hangzhou First People's Hospital

[Abstract] Objective: To establish a remote real-time virtual rehabilitation training system, in order to make up the lack of traditional rehabilitation by using vision feedback mechanism of virtual reality, and help patients raise participation enthusiasm and rehabilitation effect trough the process of attempt - exercise - correction. **Methods:** A remote real-time virtual rehabilitation training system was established by Node-JS and Socket.io. The part of server collected the bending angle of finger based on bending sensor and used the serial port to transmit data by blue-tooth, and then the wireless data glove was established. The server was established by Node.JS, used the module of node-serialport to receive serial data, and used the module of Socket.io to build remote real-time connection. The part of client used Mozilla Firefox browser with websocket support and used the web for signing in the server to receive the remote data. The glove data was sent by module of jUART and was received by virtual hand module for virtual hand control. **Results:** Hall current sensor was accurate and effective for

data collection. The remote real-time data transmission. The control for 3D virtual hand model were fast and convenient.

Conclusion: A remote real-time virtual rehabilitation training system based on Node.JS which could help the patient hand's rehabilitation was constructed.

[Key words] Flex-sensor; Virtual reality; Rehabilitation

[First-author's address] Equipment Department, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China

0 前言

脑卒中(stroke)又叫中风或脑血管意外 (cerebrovascularaccident, CVA), 属于脑血管类疾病, 是由于脑部供血受阻而迅速发展的脑功能缺失。在美国和欧洲它是导致成人残疾的首因, 在世界范围内脑卒中是第二大死因^[1]。随着世界人口逐步老龄化, 在接下来的 20 年, 脑卒中疾病造成的社会负担将会极大地增加, 这种情况在发展中国家将会变得尤其严重^[2]。迫于国家医疗保险制度的缺陷和家庭经济承担能力的限制, 大多数中风病人在医院里进行初步的康复治疗之后就立即回到家中进行下一步的康复进程。因此有效和低成本的家庭远程康复就变得尤为重要。在家庭康复中, 很重要的一个问题是如何和医生进行有效沟通和交互。虚拟现实的引进一定程度上解决了这个问题, 通过远程医疗, 可以把医师从康复过程中解放出来, 同时符合患者兴趣的虚拟现实还能让患者保持愉悦的心情, 减少康复过程的乏味; 另一重要方面, 医师和患者之间的一对一的康复训练是不够的, 还需要实时获得康复情况、患者病情的客观数据采集及主观体验反馈, 虚拟现实的数据分析和视觉、听觉等多种反馈机制可以实现此功能。建立在线交流和咨询平台, 有助于医生及时了解患者现状并指导下一步康复。

本文研究目标是能够实现远程康复训练的虚拟交互平台。首先是设计能够远程实时传输数据的系统平台, 在测量手指活动角度的数据手套基础上, 将病人端数据远程传输至医生观察端; 然后结合基于网页的 IO 读取技术, 利用现有虚拟手训练, 以有效地跟踪患者手的运动。具体设计如下:

1 基于 Node.JS 的远程实时虚拟康复训练监控系统

远程虚拟康复训练监控系统包括病人端和医生端, 将病人数据手套测量的数据远程传输到医生端。由于在常规情况下, 病人所处的网络多为家用网络, 医生所处多为医院公共网络下的子节点, 网络属于不同的 IP 段下, 无法通过 IP 直接通讯, 故通过花生壳申请域名, 对动态域名进行解析, 保证系统平台的通用性。在系统中数据平台部分主要包括服务器设计、实时数据通讯模块和虚拟手模型三个部分。其中服务器端负责接收数据手套采集的串口数据, 实时数据通讯模块负责服务器端客户端之间的实时数据传输, 并将网络接收的数据以串口形式发送至虚拟手模型单元。如图 1 所示。

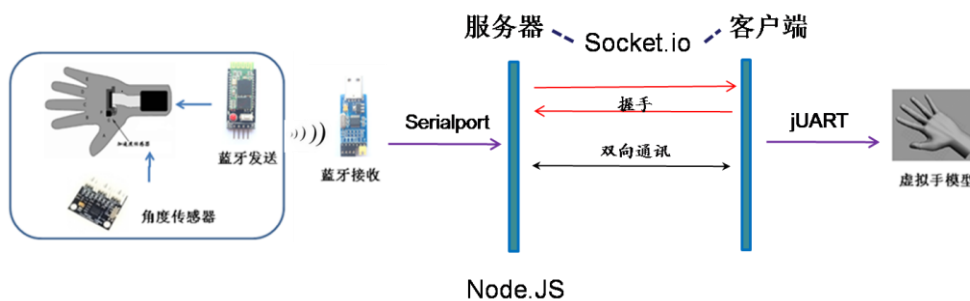


图 1 远程实时虚拟康复训练监控系统设计

1.1 服务器设计

1.1.1 数据手套设计

为检测手指关节弯曲角度, 使用弯曲传感器 (Flex-Sensor), 弯曲传感器的表面是一层特殊的电阻材料, 当弯曲传感器受到应力发生弯曲变形时, 表面的电阻值即发生变化。弯曲程度越高, 电阻值越大^[7]。如图 2 所示

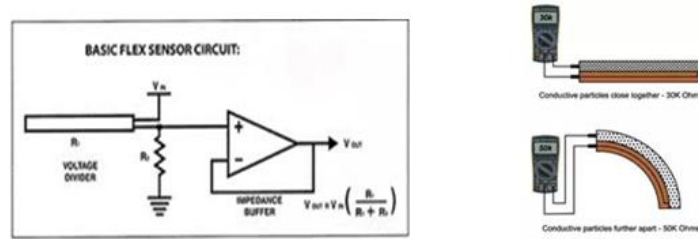


图2 弯曲传感器角度变化检测

通过串接角度传感器电阻，测量角度传感器的电压，将其连接到电压跟随电路。数字控制部分采用 STC12C5A60S2/AD/PWM 系列单片机是宏晶科技生产的单时钟/机器周期(1T)的单片机。手指的角度变化通过弯曲传感器测量后，经过分压电路，跟随电路后，经 STC12C5A60S2 的 P1 口进行 AD 采集。采集后采用蓝牙短距离无线通信技术将数据传输至电脑进行网络传输。蓝牙模块使用 HC-05 蓝牙串口套件，其使用 CSR 主流蓝牙芯片，蓝牙 V2.0 协议标准[8][9]。

1.1.2 基于 Node.JS 的数据采集服务器设计

Node.js 是一个开放源代码、跨平台的、可用于服务器端和网络应用的运行环境。Node.js 应用 JavaScript 语言写成，在 Node.js 运行时运行。Node 带来的高性能 I/O 用于实时应用，Voxer 将 Node 应用在实时语音上，国内腾讯的朋友网将 Node 应用在长连接中，以提供实时功能，花瓣网、蘑菇街等公司通过 socket.io 实现实时通知的功能[10]。

为能实时读取蓝牙模块接收的 USB 转串口数据，需引入 SerialPort 模块，node-serialport 是一个 Node.js 的包，用来对串口数据进行读写操作。如下：

```
var SerialPort = require("serialport").SerialPort
```

1.2 实时数据通讯模块

1.2.1 基于浏览器的实时数据传输

通常，浏览器访问网页时，会向页面所在的服务器发送一个 HTTP 请求。Web 服务器确认请求并向浏览器发回响应。在许多情况下，返回的信息到达浏览器显示页面已经过时。由于远程实时数据传输是本系统设计的核心，采用 WebSocket 规范。传统的 WebSocket 是 HTML5 的一种新通信协议，它实现了浏览器与服务器之间的双向通讯[11]。

而 Socket.IO 是一个完全由 JavaScript 实现、基于 Node.js、支持 WebSocket 的协议用于实时通信、跨平台的开源框架，它包括了客户端的 JavaScript 和服务端端的 Node.js。Socket.IO 设计的目标是构建能够在不同浏览器和移动设备上良好运行的实时应用，如实时分析系统、二进制流数据处理应用、在线聊天室、在线客服系统、评论系统、WebIM 等。目前，Socket.IO 已经支持主流 PC 浏览器(如 IE、Safari、Chrome、Firefox、Opera 等)和移动平台上的浏览器(iOS 平台下的 Safari、Android 平台下的基于 Webkit 的浏览器等)。

在服务器端，经过安装 socket.io 模块后，在 JS 程序中引入该模块

```
io = require('socket.io').listen(server)
```

在客户端连接，身份识别核对后，开始传输串口数据，

```
socket.emit('newMsg', socket.name, SerialData, mycolor);
```

在客户端端，index.html 主页插入 javascript 脚本，引入 socket.io 模块

```
<script src="/socket.io/socket.io.js"></script>
```

同时自行编写脚本引入，<script src="scripts/VirHand.js"></script>

从网页上接收服务器端推送的实时数据，

```
this.socket.on('newMsg', function(user, msg, color)
```

1.2.2 基于 jUART 的数据串口传输

基于浏览器的数据获取后，需以串口形式将数据转发至虚拟手操作单元，但在采用浏览器模式下，对客户端硬件 I/O 的操作比较受限。本系统中采用 jUART 系统平台，可以再浏览器上进行 JavaScript 框架下的串口通讯[12]。直接引用该平台下的相关函数，进行串口通讯，其中 recv 为接收到串口数据时的回调函数。

```
function pluginLoaded()
{
    ser = plugin().Serial;// 获取串口实例
    ser.open("COM2");// 打开串口
    ser.set_option(9600,0,8,0,0);// 串口设置
    ser.recv_callback(recv);// 用于接收数据的回调函授
}

```

1.3 虚拟手模型

OSG 是开源的高性能三维图形开发包,使用 OpenGL 技术开发,是一套基于 C++平台的应用程序接口 (API),它让程序员能够更加快速、便捷地创建高性能、跨平台的交互式图形程序。被广泛的应用在可视化仿真、游戏、虚拟现实、科学计算、三维重建、地理信息、太空探索、石油矿产等领域[13]。

本文沿用原研究的虚拟手 OSG 模型作为展示模型,提供作为患者的手部反馈[14]。该模型仿真手指的关节结构,具备拇指 (2 关节),食指 (3 关节)、中指 (3 关节)、无名指 (3 关节)、小指 (3 关节)、腕关节等控制参数,可通过结构体的参数设置来进行模型控制[15]。如图 5 所示。

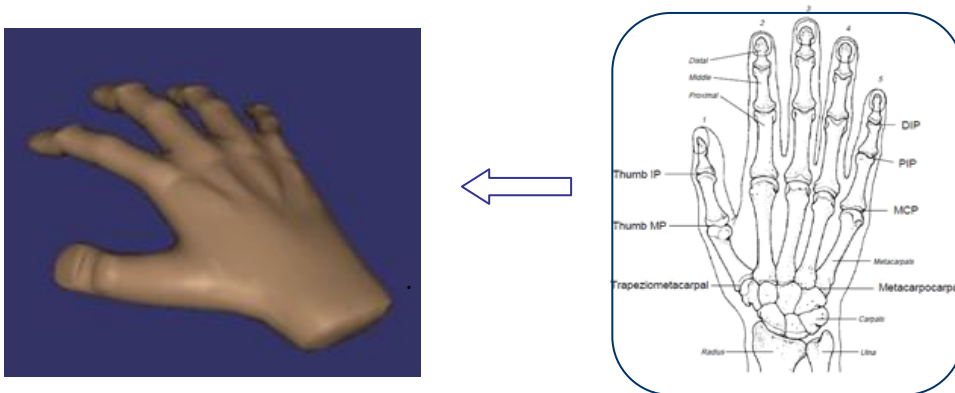


图 5 虚拟手模型骨架

2 结果

2.1 服务器部分

服务器部分包含无线数据手套和远程数据传输部分。无线数据手套,开机上电自动检测弯曲角度,按照 10hz/s 速度传输数据。蓝牙模块上电自动连接,通过串口检测接收,数据有效传输。弯曲传感器采用粘合的方式固定在手套上,数据手套佩戴舒适。

远程数据传输部分,可通过 node-serialport 有效接收串口数据,并检测串口数据格式后,实时发布数据。

2.2 客户端控制

客户端部分采用网页作为数据传输中介,加载 jUART 模块。当通过网页远程登录服务器时,可实时接收服务器推送的数据,并通过串口模块将数据发送到虚拟手模型。虚拟手模型部分采用浙江大学求是高等研究院设计的虚拟手,主要设计接口部分。虚拟手模型可有效接收串口数据,实时显示。

3 结论

本文研究通过 Node-JS 和 Socket.io 来构建远程实时数据传输系统,服务器端完成手指弯曲数据采集和远程实时数据推送,客户端部分完成数据获取和虚拟手模型控制。服务器端采用弯曲传感器测量手指弯曲程度,转换成模拟信号后输入至芯片 (STC12C5A60S2) 的 AD 采集单元,并转换为数字量然后利用串口通过蓝牙模块传输数据,从而构建无线数据手套。同时通过花生壳申请域名,利用 Node-JS 构建服务器,使用 node-serialport 接收串口数据,使用 Socket.io 建立远程实时连接。客户端采用支持 WebSocket 的 Mozilla Firefox,采用网页形式登录服务器,接收远程实时数据。通过 jUART 模块将数据以串口形式发送,虚拟手模型单元接收串口形式数据,数据提取后用于控制虚拟手。

该系统为患者提供了一个带视觉反馈的自主康复训练平台,经健康人试验,该系统达到预期的设计技术要求,系统稳定。

参考文献

- [1] F.ValeryL, Stroke ePIdemiology in the developing world [J]. The Lancet, 2005, 365:2160- 2161.
- [2] G.A.Donnan, et al., Stroke[J], The Lancet, 2008,.371:1612 - 1623.
- [3] 李海丽,谢叻,魏盛凯,等.手功能康复机器人技术[J].机械设计与研究, 2014, 30(1):24-28.
- [4] Lukas Z, Mario J, Lar S, et al . Increasing Patient Engagement During Virtual Reality-Based Motor Rehabilitation [J]. Archives of Physical Medicine Rehabilitation, 2013, 94(6): 1737-1346.
- [5] Ching Y W, Wen J H, Jing J F, et al . Comparison of Virtual Reality Versus Physical Reality on Movement Characteristics of Persons With Parkinson's Disease: Effects of Moving Targets [J]. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 2011,92(8):1238-1245.
- [6] Linda R, Marissa R M. Advanced Upper Limb Prosthetic Devices: Implications for Upper Limb Prosthetic Rehabilitation[J]. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation, 2012, 13(4):710-717.
- [7] Juan M I Z, Alejandro J M T,Angel D G S, et al . Development of a system based on 3D vision, interactive virtual environments, ergonomic signals and a humanoid for stroke rehabilitation. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2013,112(2):239-249.
- [8] 樊锐,李茹,王绩一.蓝牙/ZigBee 无线网络传输系统的设计与实现[J].内蒙古大学计算机学院,2013,23(1):209-213.
- [9] 陈鹏展,祝振敏.基于环境光能量收集的低功耗蓝牙传感器[J].仪表技术与传感器, 2014(2): 4-10.
- [10] 朴灵.深入浅出 Node.js[J].北京: 人民邮电出版社,2013.163-164.
- [11] Vanessa W, Frank S, Peter M. HTML WebSocket 权威指南[M]. 北京: 机械工业出版社, 2014.7-9.
- [12] jUART FrameWork. <https://github.com/billhsu/jUART>.
- [13] 杨晓,廉静静,张新宇.基于 OSG 的虚拟场景中包围盒碰撞检测的研究[J].计算机技术与发展,2011,21(9):32-38.
- [14] 王清波,虞成. 基于无线式数据手套的虚拟手控制系统研究[J].中国医学装备,2015(12):35-37.
- [15] 李懿,陆光明,金帅, 等.手部精细运动获取缺损数据修复方法[J].浙江大学学报,2013, 47(6):925-956.

作者简介: 王清波,男,(1983-), 硕士, 工程师。杭州市第一人民医院设备科,从事医学生物传感器、检测等技术方向的项目研究以及医疗设备的临床验证研究、医疗设备售后的技术支持等工作。

3D 打印技术在经皮冠状动脉介入治疗的应用

王庆涛^① 王玉璟^{②*}

①长江大学附属第一医院

②长江大学附属第一医院心内科; 湖北 荆州 434000

[摘要] 3D 打印技术是在三维图像的指导下,通过逐层增加材料,不间断的叠加,进而生成三维实体模型的技术,是近些年来发展非常迅速的一项新技术。随着影像学三维技术和材料工程学的不断成熟,3D 打印技术正在逐步应用到医疗实践中。笔者从技术教学、医患沟通、手术预演等方面初步探讨 3D 打印技术在经皮冠状动脉介入治疗中的临床应用价值。

[关键词] 3D 打印; 经皮冠状动脉介入; 临床应用

引言

3D 打印技术出现在 20 世纪 90 年代中期,是指在三维图像的指导下,将“打印材料”(塑料、树脂、硅胶、生物材料等)一层层叠加起来,最终将计算机上的三维图像变成实物的一项新技术。伴随着三维成像技术和材料工程学的飞速发展,3D 打印技术表现出无限的潜能。德国 3D 打印联盟率先在国内大力推广这一技术,所以德国在 3D 打印领域一直处于全球领先的地位。之后英国、美国、欧盟以及比利时相继成立相关研究所,投资巨额资金大力推广 3D 技术。2013 年 5 月,我国科技部公布:3D 打印技术入选国家高技术研究发展计划(863 计划)^[1]。此举为 3D 打印在我国的行业发展提供了契机,是迈入“中国制造”最坚实的一步。

1 3D 打印在医疗方面的应用

3D 打印技术的日臻成熟，使其不再局限于“高端科技”的范畴，而是渗入到人们生活的方方面面，例如各种高雅艺术品、食品以及各种生活用品和医疗用品，甚至在医疗应用方面的已经是 3D 打印最重要的发展方向。3D 打印的最大优势就是个性化定制，即通过机器扫描物体获取数字化的模型信息，经过软件处理后建立其三维模型并进行打印，可实现完美复制或重构，由于不同患者的骨骼、牙齿及器官存在着差异性，所以 3D 打印在医疗领域将其个性化定制化的特征可以发挥得淋漓尽致^[2]。

目前 3D 打印在医疗方面的应用包括 3 大类：1、体外医疗器械，主要有各种材料打印的义肢、用于教学和科研的医疗模型、健康辅具、助听器等。2、定制化永久植入物。使用各种材料（钛合金、不锈钢、生物陶瓷等）打印的牙齿、关节、骨骼、软骨等产品，通过外科手术方法植入。3、生物打印。利用生物材料（干细胞、生长因子、各种营养成分等）打印出具有生物活性、生理功能的组织结构，为研制出人体组织替代物奠定了基础。

2 3D 打印在心血管方面的应用

随着影像学检查技术的迅猛发展，尤其是三维重建技术的出现，医生可以更加清晰地观察组织病变的三维立体结构。而且对于许多复杂性先天性心脏病、瓣膜病、大血管类疾病等，其诊断和治疗的关键在于清晰地认识患者病变部位的解剖结构，但是三维重建技术有时也难以清晰、直观地观察病变内部的结构，从而给这类疾病诊断、治疗带来极大挑战。3D 打印技术的医学应用可通过制作病变组织的 3D 模型，使术者更加直观的认识病变处的空间解剖结构，帮助制订外科或介入手术方案，并且在模型上亦可模拟手术过程^[3]。

通过断层扫描，在三维重建的基础上利用适合的材料打印出心脏模型，这就是 CT、MRI 作为建模工具的依据。海伦·德沃斯儿童医院先天性心脏病中心专家发现，用 3DTEE（3D 经食道超声心动图）也可以构建出先天性心脏病患者的心脏 3D 打印模型，并且 CT 结合 3DTEE 可以更准确的打印出心脏模型。CT、MRI 以及 3DTEE 这三种方法构建出的模型各有优缺点，结合起来可以提高打印的精准度^[4]。目前 3D 打印技术在瓣膜置换，先心病修补等方面应用广泛^[5,6]。

3 3D 打印在经皮冠状动脉介入治疗（PCI）的应用

3.1 科研教学（包括医学生的教学、院内青年医生的技术教学）

(1) 医学生教学。由于二维图像的局限性，医学生无法对于接触到的医学知识有深入的了解，所以通过具象化的方式将各个组织器官呈现在学生面前，是 3D 打印应用于教学最好的方式，可激发学生的好奇心和积极性。将抽象的概念转化成具体的、可触及的实物，使学生更加直观、深刻的认识各种组织器官，包括其内部结构、表面血管走形，尤其是心脏、脑组织、血管网络等结构比较复杂的器官。心脏的血供丰富，血管走形复杂，内部解剖结构精细是医学生不易理解的几大难点，而现有的教学模型较粗糙、内部解剖结构无法显现是最大的问题，现通过树脂材料打印透明的心脏模型，可以清楚看到心脏内部结构、表面血管。同时国外科学家发现利用生物细胞材料可打印出具有生物活性的心脏，能够存活几个小时，是医学界另一大突破，为将来研究组织器官替代物奠定了基础。3D 心脏建模示意图，见图 1。

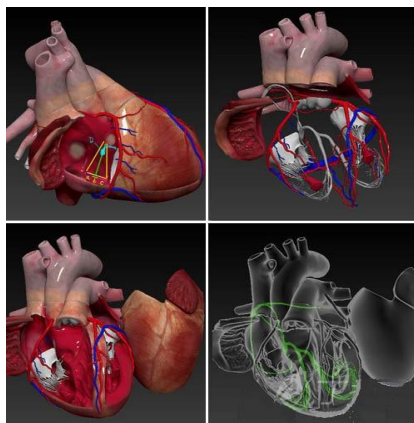


图 1 3D 心脏建模示意图

(2) 技术教学。青年医生是保卫健康的中坚力量，是医学事业的中流砥柱，是与患者零距离接触的临床医生，他

们的专业水平直接影响到患者的生命健康,所以为了更好地培养他们的专业技术,硬件设施非常关键。我们知道 PCI 是一门对心内科医生要求非常之高的技术,一般需要具备高级职称且行 PCI 超过 10 年以上的医生才能单独手术。由于此血管路径本身结构复杂,青年医师对疾病的了解限于对二维图片的解读,即使是 3D 图像的旋转,也是多幅二维图像连续播放而已。由于血管间的重叠,无法分辨其真实的空间结构。3D 打印技术可以让青年医生更快更好地掌握这门技术,3D 打印可以构建从股动脉或者桡动脉达到心脏冠状动脉的完整的路径,青年医生不再是通过屏幕上的二维图像、合成的三维图像来学习,而是通过模型实际操作,真实的感受利用导丝从外周动脉行至冠状动脉的过程。同时也可以利用生物细胞材料打印出仿真血管,让青年医生在模拟 PCI 时感受更加真实。入围 863 计划的四川蓝光英诺生物科技股份有限公司 3D 生物打印血管项目取得了突破性的进展,自主研发了 3D 生物血管打印机,3D 生物血管打印机可以打印血管独有的中空结构和多层不同种类的细胞,这是世界首创^[7]。我们相信 3D 打印技术构建的 PCI 的血管仿真模型作为一种过渡的教学手段是非常重要的,缩短了心血管医生培养的周期,增加了实际操作的机会,丰富了青年医生的经验。如图 2 所示。

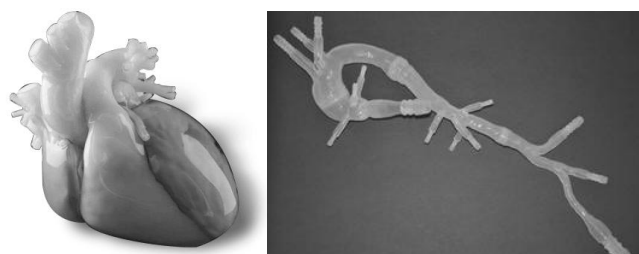


图 2 PCI 血管路径心脏建模

3.2 医患沟通

医疗费用高、医患之间不信任、医生沟通技巧欠佳、医患之间信息不对等是造成医患关系不稳定最主要的原因。医患沟通是稳定医患关系最重要的一环,是减少甚至杜绝医患矛盾纠纷的必由之路,故如何进行医患沟通一直都是是一门学问。3D 打印机打印出 PCI 血管路径,医生利用此血管路径模拟手术中 PCI 过程,将此过程完整的展现在患者的面前,加深患者及家属对 PCI 过程的了解,为患者及其家属提供视觉和触觉上的直观理解,更好地了解手术治疗方案。还可以在模拟 PCI 的同时讲述在此过程中可能发生的并发症及相关风险,例如血管损伤、心律失常、心力衰竭等。在实体模拟操作 PCI 的过程中与患者沟通,让患者理解此操作过程的复杂性、不可控性,希望患者理解、支持医生的工作,达到缓解医患矛盾的作用,减少医疗纠纷的发生。有研究表明 3D 打印模型的使用可以显著提高在医患沟通中患者及家属的满意程度^[8]。因此,3D 打印模型对改善医患关系起到重要的辅助作用。使用 3D 打印模型辅助 PCI 手术教学流程对比,见图 3。

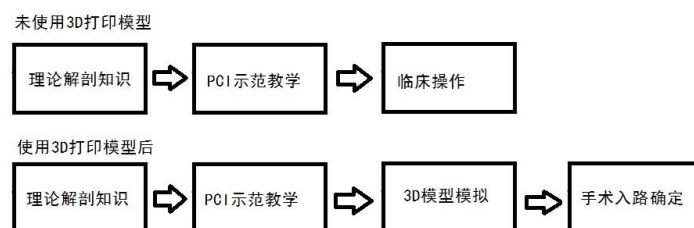


图 3 使用 3D 打印模型辅助 PCI 手术教学流程对比

3.3 手术预演

3D 打印实体模型可以对术前影像进行三维实物重现,仿真性高,可直观观察、分析病变及其与周围组织、结构的关系,让医师真实全面地了解冠状动脉结构,制定各种手术方案。3D 打印技术还可以实现术前个性化设计、进行手术预演、精准手术过程、缩短手术时间、减少医源性损伤、提高手术效率等优点,临床应用价值较高。临床上已有多个科室将 3D 打印应用于手术预演,例如复杂骨折的内固定、骨骼畸形矫正,心脏瓣膜置换、室间隔封堵等等。不像外科医师可以直观的观察病变部位,心内科医师多依靠感觉、经验操作,故 PCI 手术对心血管内科医师要求极高,特别是遇到棘手的患者,比如冠脉多只多病变,冠脉畸形等,常常会让心内科医师底气不足,没有十足的把握。

使用 3D 打印技术可以通过患者冠状动脉 CTA 或 MRA 的扫描数据从而制作患者的 PCI 血管路径 3D 模型,可精确显示患者的心血管解剖结构,更加直观的了解冠状动脉的解剖,狭窄部位、程度。医师还可以利用导丝来进行 PCI 手术预演,该在何处放置支架,如何放置,从而预测手术难度及手术效果,指导术者进行手术方案的制定。几位心血管专家还可以同时进行操作预演,全科室进行病例讨论,制定手术方案,探讨各自的体验,增进交流,提高手术成功率。手术模型效果图,见图 4。



图 4 3D 打印模型对应术中模拟操作效果图

4 技术展望

3D 打印技术不仅可以应用于心脏外科、骨科术前诊断、手术模拟及疾病治疗,还可以应用于教学科研、医患沟通等。依靠 3D 打印技术实现的模拟手术不仅使医生充分了解和评估患者病情,更颠覆了传统的医学教学模式,使得年轻医生的成长不再完全依赖于师徒教学。

3D 打印技术对结构性心脏病,尤其是对复杂性和特殊的先天性心脏病的诊治较其他影像学检查具有独到的优势,但在心血管病内科领域的应用目前尚未深入展开。对冠心病患者而言,最大的价值或许在于 PCI 中的解剖关系显露及模拟手术入路,帮助了解其内部结构及畸形情况,指导治疗策略制定。虽然 3D 打印技术是一项具有工业革命意义的高新制造技术,但作为一项新的技术,3D 打印也存在许多问题和不足,也面临多方面的挑战,如成本、材料、精细程度等在未来的研究中尚需进一步发展完善,以更好地发挥其在医学领域,尤其是心血管病研究中的应用价值。

参考文献

- [1] 魏静. 3D 打印入选 863 计划,秒速 3D 打印 5 月亮相[EB/OL]. [2013-05-01]. <http://news.hexun.com/2013-05-01/153691790.html>
- [2] 余冬梅,张建斌. 3D 打印:定制化医疗修复[J].中国金属, 2016,1:21-28.
- [3] 杨帆,郑宏. 3D 打印技术在心血管病中的应用心血管外科杂志(电子版)[J],2015,4 (2):93-96.
- [4] 常丽君. 多成像技术 3D 打印心脏更精确[N].科技日报,2015,06,30(001).
- [5] 本刊讯. 心脏手术应用 3D 打印技术[J]. 生物医学工程学进展,2015,36(1):37.
- [6] 胡立伟,钟玉敏. 3D 打印技术在儿童先天性心脏病诊断及治疗中的应用进展[J]. 中国医学物理学杂志,2015,32(4):514-519.
- [7] DG3D 打印. 蓝光英诺发布全球首款生物血管 3D 打印机 [EB/OL].[2015-10-29]. http://mp.weixin.qq.com/s?__biz=MzA5MTk5NDYxNA==&mid=400150787&idx=1&sn=bc91aeaf4aa2629b0397e31bf84293b5&scene=4#wechat_redirect.
- [8] 陈光忠,李鉴轶,秦琨,等. 3D 打印技术在颅内动静脉畸形血管内介入治疗中的初步应用[J].中国脑血管病杂志,2016,13(1):25-28.

作者简介:王庆涛(1990-)男本科湖北省荆州市沙市区航空路8号 E-mail: 931436594@qq.com

通讯作者:王玉璟男教授主任医师湖北省荆州市沙市区航空路8号 E-mail: 496666462@qq.com

医疗设备综合管理系统的自主开发及全流程管控实施

李 涛 张天锋 杨旭冉 阎宗海

武警甘肃总队医院医学工程科 甘肃 兰州 730050

[摘要] 目的: 实现我院医疗设备综合管理系统的自主开发以及对医疗设备进行全流程管控。**方法:** 以我院现有的局域网为现实基础, 运用当下较为先进的数据库应用和条形码管理等各种技术, 从而构建出一个模块化和网络化的综合管理系统结构。**结果:** 自主开发出来的综合管理系统能够将我院的设备租赁和设备保养维修方面的管理、信息档案的管理、成本核算方面的管理等各个方面的工作有机地整合在一起, 满足我院综合管理医疗设备的需加大了我院向数字化医院迈进的步伐。**结论:** 医疗设备综合管理系统的开发和全流程管控的应用大大优化了我要, 院的工作效率, 使我院对各方面医疗设备的管理工作变得更加科学合理。

[关键词] 医疗设备综合管理系统; 信息档案; 数字化医院; 自主开发;

随着现代医学的不断创新发展, 我国也随之扩大了对数字化医院的建设, 并且显著提高了大多数医院的信息化程度^[1]。同时由于图片存档及通讯系统(PACS)和医院信息系统(HIS)以及电子病例等方面在临床上的广泛推广运用, 越来越多的高精尖医疗设备被投入到临床医疗实践上, 避免了许多医务人员的事务性工作, 工作效率也随之得到了大大的优化^[2-3]。但是国内大多数医院对那些引进的高精尖医疗设备的管理还是存在很多的不足, 比如依然是沿用了传统的手工操作方式等, 各医院都开始积极解决如何高效管理医疗设备的问题^[4]。为了解决当前医疗设备管理方面的诸多不足和弊端, 我院结合临床实际, 以现有的局域网为现实基础, 运用当下较为先进的数据库应用和条形码管理等各种技术, 从而构建出一个模块化和网络化的综合管理系统结构。

1 综合管理系统结构

我院医疗设备综合管理系统主要由硬件、软件和数据库三方面系统组成, 而其中的硬件系统则主要由终端微机 and 条码枪、条码打印机以及条形码等四部分构成。同时系统以我院现有的局域网为基础, 运用 C/S 架构进行自主开发设计, 将软件系统安装在 PC 客户端上, 而数据库系统则安装在服务器中, 使用目前而言较为先进的数据库应用和条形码管理技术使系统结构模块化和网络化。见图 1。

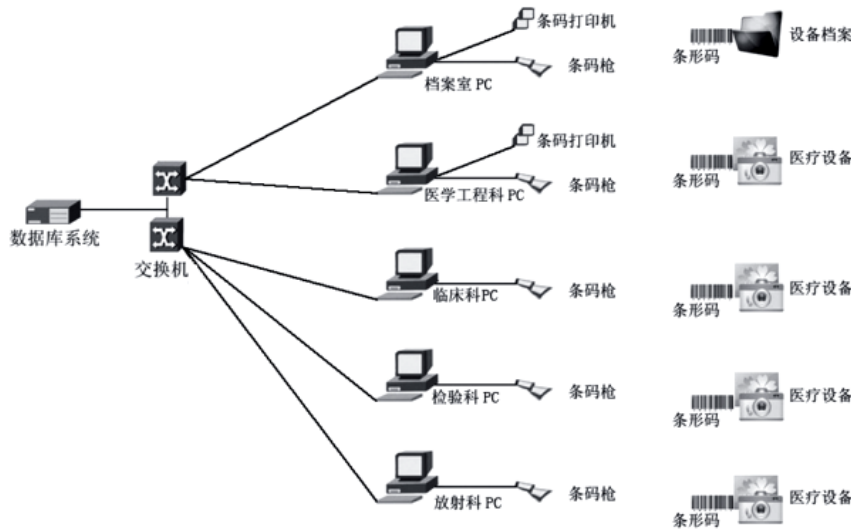


图 1 系统结构示意图

2 系统开发工具和开发环境

在对医疗设备综合管理系统的开发过程中, 我院采用 Windows XP Professional 和 Microsoft Windows 2003 以及 SQL Server 2000 分别作为客户端与服务端的操作系统和数据库系统, 同时运用 Delphi 7.0 作为数据库应用程序的开发工具, 并且利用 Borland Database Engine 方式来作为连接数据库和应用程序的桥梁^[5]。

3 各模块介绍以及说明

3.1 档案信息管理模块

建立档案信息管理模块最主要的就是需要建立一个完善的医疗设备信息资料库，其中囊括了设备的各项基本信息如设备名称和型号、出产商和出产序号、购进日期和购进价格以及各阶段保养情况等，同时还包含了设备的档案资料如设备的用户手册和产品的购销合同、设备的配置清单和安装检收报告以及产品的保修卡等。根据对患者医疗设备使用服务的需要，将设备的综合数据分为十类，并围绕患者的各项基本信息管理有关设备的使用情况。见图 2。

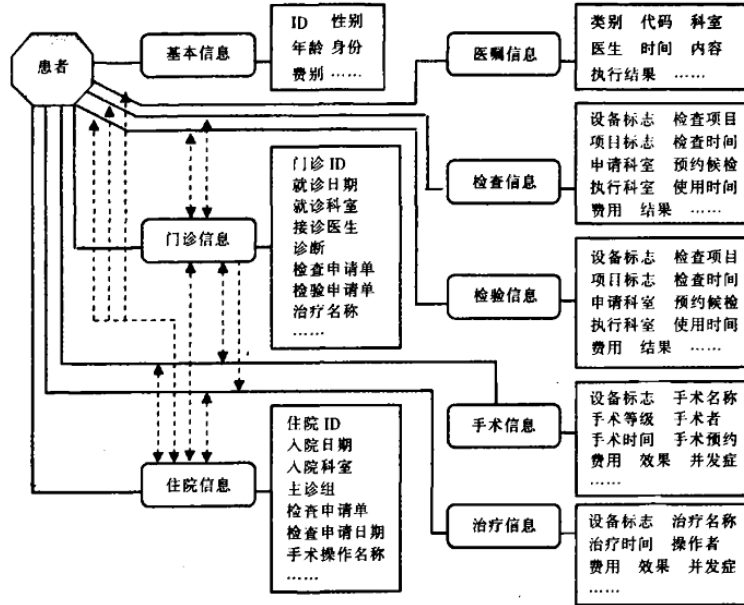


图 2 设备数据组织结构

3.2 设备租赁管理模块

由于各科室不同时间段的病人诊疗量不同，所以对于一些常用的类似于呼吸机、血压仪、心电监护仪等小型医疗设备需求不同，当某些科室诊疗量过多时则会出现相应的医疗设备不足的问题，对此我院医学工程科则会配备一些常用的医疗设备供其他科室不时之需，但是由此引发出设备租赁的管理问题就需要找一个好的方法来解决^[6-7]。我院自主开发出的医疗设备综合管理系统中设备租赁管理模块就是专门负责解决这一问题的，需要租赁设备的科室应当先向医学工程科提出租赁申请，然后扫描被租赁设备上的条形码由系统自动记录并且生成租赁单，在归还设备时则扫描租赁单，由系统自动读取归还日期并计算租赁时间和租赁费用。如此通过租赁单则可以解决各科室繁琐的对账问题，大大降低了设备租赁的管理工作量。

3.3 日常维修保养管理模块

为保障医疗设备的正常工作，对设备进行日常保养及维修非常重要，该模块会由管理员记录每一个设备每一次的保养记录和保养注意事项，系统在到达设备保养期当天会自主提醒管理员进行设备保养。在设备需要进行维修时，可以从系统中调取相应设备的详细资料提供维修技术支持，同时在维修后，管理员应录入相应设备的维修人及故障原因和维修费用及具体维修配件使用情况等信息，以便进行相关设备使用情况进行评估和分析。

3.4 成本核算管理模块

该模块主要对各类医疗设备在购进、使用和保养维护等过程中产生的各种费用结合该设备本身创造的收益进行统计分析，并生成相应报表。其中设备的购买支出和养护维修费用等由前三个模块提供，而设备创造的收益则由管理员从 HIS 和 PACS 等系统查询后手工录入，核算出设备本身的成本及收益，进而生成相应报表作为医院设备引进的参考依据。见图 3。

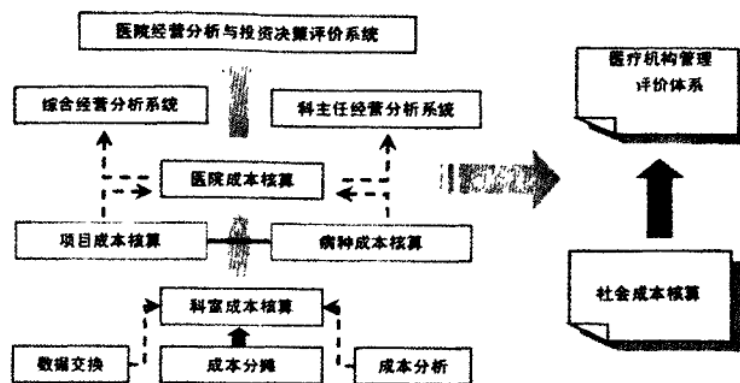


图3 成本核算系统功能结构图

4 小结

随着近年来各种医疗设备的不断升级和更新换代，对各种高精尖设备的购进、租赁和日常保养及维修等工作也随之变得越来越繁琐，不仅工作强度大而且还效率低下，并且由于无法做到全程管控而导致管理方面上存在缺陷和漏洞^[8-11]。目前临床上医疗设备主要有诊断类设备、治疗类设备以及辅助类设备三大类，它们分布在各个部门中种类繁多而且又相互交叉互相联系，但是各部门的医疗设备基本上都是针对各部门的内在需要而设计的，有着各自独特的运行方法和管理模式^[12-14]。由于部门和部门之间的联系较少，所以在医疗设备上所涉及的信息、数据包括设备采购文件、设备工作量、创收与消耗信息、管理文件、贷款偿还信息、检查病人数、维修检测记录、技术档案资料等存在着不小的管理障碍，无法形成一个比较综合的设备信息^[15-16]。科学技术的高速发展带动医学水平的急速上升，医院对医疗设备的要求也越来越高，从而产生的医疗设备管理工作强度也越来越大，纯粹依靠人工来管理与日俱增的医疗设备也变得越来越力不从心^[17]。随着国家医疗改革的进程加快，医疗设备综合管理系统也在各医疗机构开始渐渐推广普及，为了使管理更加信息化，促进我院向数字化医院发展，自主开发一个能够对所有设备进行综合管理并且可以全流程管控的管理系统对于提高医院的管理水平以及综合效益就显得非常重要。

医疗设备综合管理系统是以临床医疗设备为管理对象，在医疗行业中科学规范而又高效地对医院各种设备进行综合性管理^[18]。其中包括医疗设备的招标和采购、日常运营和保养维修等各个环节的管理，尽可能地降低管理人员的工作强度和管理人员的工作效率，降低医院的设备使用成本，减少临床使用中的设备损耗及浪费，尽可能地提升设备的利用率^[19]。对此，我院采用 Windows XP Professional 和 Microsoft Windows 2003 以及 SQL Server 2000 分别作为客户端与服务器的操作系统和数据库系统，同时运用 Delphi 7.0 作为数据库应用程序的开发工具，并且利用 Borland Database Engine 方式来作为连接数据库和应用程序的桥梁，自主开发设计了适合我院使用的医疗设备综合管理系统，并运用其对医疗设备进行全流程管控。经过长达三个月的临床使用测试，我院对实践中出现的漏洞进行了大量的后期修补，在总体运用方面该系统大大减轻了我院工作人员对医疗设备管理的工作量，在提高工作效率方面同样起到了非常好的效果。

在自开发出医疗设备综合管理系统并付诸临床使用配合全流程管控的实施后，有效加强了我院固定资产的管理，建立健全了管理工作程序，使我院对医疗设备的管理变得更加科学化、现代化、规范化和系统化，大大提升了我院医疗设备的档案管理水平，加大了我院向数字化医院的方向发展的步伐，使得我院更接近国际化管理水平。

参考文献

- [1] 秦建明,李盼盼,王国文等.基于 C/S 架构的医疗设备综合管理系统的开发[J].中国医疗设备,2014,(1):45-47.
- [2] Lin C , Lin CM , Yen DC ,et al.The integrated information architecture: a pilot study approach to leveraging logistics management with regard to influenza preparedness.[J].J Med Syst 2012 Feb;36 (1):187-200.
- [3] 曾立.医院综合维修管理系统的设计与应用[J].中国医疗器械杂志, 2011,35 (2): 117-118.
- [4] Messenger RW.Reducing chronic obstructive pulmonary disease readmissions: the role of the durable medical equipment provider.[J].Prof Case Manag 2012 May-Jun (3):109-14; quiz 115-6.

- [5] 夏裕俊,王婷,陈功等.医院综合运营管理系统的现状和应用[J].中国医疗设备, 2012,27(2):99-101,73.
- [6] Hansen N.Palm scanners enhance patient safety. Iowa's Broadlawn Medical Center integrated the biometric system with its registration process.[J].Health Manag Technol 2012 Aug;33(8):12.
- [7] 李卉.浅析医院资产装备信息化管理系统的建设[J].中国现代医学杂志, 2013,23(27):110-112.
- [8] 丁效军,郑理华,陈宇珂等.RFID技术在医疗器械管理中的应用研究[J].医疗卫生装备, 2012, 33(8):38-39.
- [9] Lee J.EMR management system for patient pulse data.[J].J Med Syst 2012 Oct;36(5):3255-60.
- [10] 徐勇,许芮滔,周全洲等.医院设备管理科绩效考核与管理方案的探讨[J].中国医学装备,2015,(4):113-114,115.
- [11] 廖湘庆,杨雪梅,张进等.基于物联网技术的医疗设备管理[J].中国医院管理, 2014,34(9):55-56.
- [12] 王涛,薛霄,朱鹏等.基于本体的出生缺陷相关医学知识管理系统[J].计算机应用研究, 2011,28(3):1007-1011,1030.
- [13] 周军华,任坚,吴文生等.基于自组网和物联网的医疗设备综合管理系统设计与实现[J].中国医学装备,2015,(1):41-44,45.
- [14] 袁军,钟昭林,周海波等.医疗设备档案综合管理系统的开发和应用[J].医疗卫生装备, 2002,23(2):37-39.
- [15] Yamashita Y , Ogaito T , Kasamatsu S .Development of medical equipment alarm monitoring system.[J].Stud Health Technol Inform 2013 ;192 1195.
- [16] 王玉玲,李德炳,张红亮等.数字化医院慢性病管理模式探讨[J].中国数字医学, 2015, (4):49-50,59.
- [17] 鲁长滨,王佩,陈校云等.发达国家数字化医院对我国院外急救的启示[J].中国急救复苏与灾害医学杂志,2014,9(10):961-962.
- [18] Cheung A , van Velden FH , Lagerburg V ,et al.The organizational and clinical impact of integrating bedside equipment to an information system: a systematic literature review of patient data management systems (PDMS).[J].Int J Med Inform 2015 Mar;84(3):155-65.
- [19] 许树强,鲁长滨,陈校云等.美国数字化医院评价体系对我国数字化医院建设的启示[J].中国医院,2014,(5):43-45.

作者简介: 李涛,男,1964-8,甘肃庆阳,武警甘肃总队医院医学工程科,副主任技师,本科,医疗设备管理研究方向,通讯地址:甘肃省兰州市七里河区龚家湾武警医院医学工程科,730050,电话:18911538966,邮箱:gslzlitao@sina.com

基于视图技术的电子病历的实现和应用

沈瑛瑛

湖州市第三人民医院 浙江 湖州 313000

摘要 目的:通过视图和触发器技术,融合医院信息系统(HIS)、临床检验系统(LIS)和医学影像存储传输系统(PACS)等,建立集医嘱、病历、检验和检查于一体的电子病历系统(EMR),并利用电子病历数据服务于社会。**方法:**通过视图和触发器技术,无缝连接各个数据库,完成数据互访与共享。通过程序的改造,集成HIS、LIS和PACS各个业务系统功能。**结果:**建立了一体化的电子病历系统(EMR),融合了HIS、LIS、PACS等,集医嘱、病历、检验和检查于一体,并将检验和检查结果反馈给医生。**结论:**建设数字化医院,提升医院信息化水平,保证完整和准确地采集和上报电子病历数据,提高临床的工作效率,更好的服务患者。

[关键词] 视图技术;EMR;HIS;LIS;PACS

Implementation and application of electronic medical record based on view technology/SHEN Ying-ying

[Abstract]Objective: through the view and trigger technology, integration of hospital information system (HIS), clinical laboratory information system (LIS) and medical image storage and transmission system (PACS), a set of medical advice, medical records, electronic medical records system testing and inspection in one (EMR), and the use of electronic medical records data service to the society. Methods: through view and trigger technology, seamless connection of each database, complete the data exchange and sharing. Through program transformation, integration of HIS, LIS and PACS of each

business system. Results: the establishment of the electronic medical record system integration (EMR), HIS LIS, PACS fusion, etc., in the doctor's advice, medical records, inspection and check in one the inspection and examination results, and give feedback to the doctor. Conclusion: the construction of digital hospital, enhance the level of hospital information, to ensure complete and accurate data collection and reporting of electronic medical records, improve clinical efficiency, to better serve patients.

[Key words] View technology; EMR; HIS; LIS; PACS

First-author's address Information Department, Third Huzhou Municipal People's Hospital, Huzhou Zhejiang

随着计算机技术和网络技术日新月异的发展,信息技术在医疗领域也得到了广泛的应用。为满足数字化医院的建设^[1],在先进的信息技术基础上,通过视图和触发器技术,融合医院信息系统(HIS)、临床检验系统(LIS)和医学影像存储传输系统(PACS)等,建立了电子病历系统(EMR)^[2],集医嘱、病历、检验和检查于一体,该系统实现了以电子病历为核心①湖州市第三人民医院信息科 浙江湖州 313000的医院信息系统的互联互通,提升医院信息化水平,提高临床的工作效率,提高医疗质量和管理水平,更好的服务患者,树立良好的社会形象。

1 电子病历系统概述

电子病历是医疗机构对患者临床诊疗和指导干预的、数字化的医疗服务工作记录。是居民个人在医疗机构历次就诊过程中产生和被记录的完整、详细的临床信息资源,涵盖临床医护人员在医疗过程中所有临床重点数据的记录和医疗质量安全管理,覆盖病人医疗及健康信息的采集、存储、传输、整合和利用等多个方面,为院内、院际间实现联合医疗提供基础数据,并通过信息化手段提高临床工作效率及医疗水平。

2 电子病历系统建设目标

电子病历系统建设以病人为中心,以提高医疗服务质量和管理水平为宗旨,以实用性、先进性和开放性为系统设计原则,采用稳定可靠的 Oracle 数据库管理系统,为医院提供一体化建设解决方案。在医院信息系统中,所有医疗数据都要统一体现到电子病历中,并且电子病历的建设涉及到医院数字化建设基础设置的架构和选型设计,因此电子病历既是核心又是基础。电子病历系统建设的难点是将医院当前正在使用并相对独立的 HIS、LIS 和 PACS 这三大系统无缝集成,同时遵循医院指定的行业标准,以集成平台和应用集成的技术标准制定相应的技术接口,统一管理,通过视图和触发器技术^[3],信息共享,完成数据的有效交换。

3 电子病历的实现

3.1 HIS 视图的创建

我院 HIS 自 1999 年发展至今,在功能和系统稳定性方面都已经比较完善,有非常多有价值的信息可以共享,病人信息是最基本的,其次是医嘱、费用和诊疗等信息都很重要,因此 HIS 扎实的基础数据是电子病历实施的先决条件。

3.1.1 困难分析

我院 HIS 是杭州创业软件股份有限公司开发,EMR 由浙江联众卫生信息科技有限公司集成,系统的开发来自不同公司,在数据存储、整合和流转过程中都有差别。

3.1.2 实现

(1) 获取基本信息:包涵病区,科室,病人类别,职工信息,床位信息,病人信息,病人费用,病人转科转床等公用基础表的表结构、字段类型和长度等信息。

(2) 创建视图、字典表和触发器:新建视图、表和触发器,完成数据同步,HIS 数据一旦执行新增、修改和删除操作,触发执行,EMR 中数据同步更新。

(3) 开发数据同步软件:试运行阶段,问题逐步出现,后台查询即不直观又耗费大量时间,于是开发了数据同步软件。同步软件 24 小时运行,信息科每天定时查看程序运行情况,报错时只需查看日志文件,判断问题,及时又有效,不耽误临床医生书写病历。

(4) 集成医嘱：临床医嘱和计费医嘱是两个概念，但之间又相互联系。EMR 能够让医生录入真正具有临床意义的医嘱，我们根据医嘱和费用的关系，灵活设计接口方式，并调用 HIS 接口，自动计费，从而实施电子医嘱开单。(见图 1)

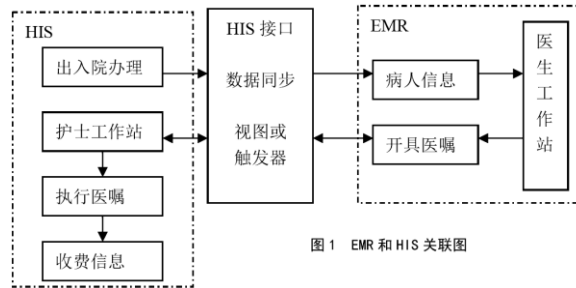


图 1 EMR 和 HIS 关联图

3.2 LIS 视图的创建

我院 LIS 是医院信息系统重要组成部分之一，医生开检验申请时需获取检验项目、临床意义和注意事项等信息；通过就诊号、病案号等调阅病人化验结果；急诊和危险值短信提醒医生；医生病历文书包含大量检验信息，如此频繁的交互数据决定了 LIS 必须与电子病历整合。

3.2.1 困难分析

LIS 以 SQL Server 做为数据库管理，EMR 以 Oracle 作为数据库管理，不同数据库之间没有互访权限，不同开发平台的界面难以集成。

3.2.2 实现

- (1) 创建用户：新建用户名，开通访问权限，授权于 EMR。
- (2) 创建视图：新建视图，存放病人信息和检验报告数据。
- (3) 开发接口程序：修改和调试程序，配置相关参数。
- (4) 推送检验报告：检验报告审核完成，报告结果向临床医生推送，并导入到病程记录中，见图 2。

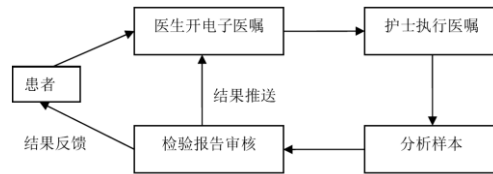


图 2 EMR 与 LIS 关联图

3.3 PACS 视图的创建

我院 PACS^[4] 涵盖了放射、彩超、胃肠镜、病理、心电、脑电和肌电等基础医疗项目，因此 PACS 与电子病历整合是实施检查电子申请单的必要条件，也是实施数字化医院的关键。

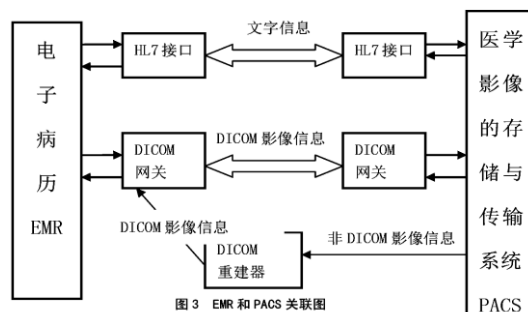
3.3.1 困难分析

目前的 PACS 已有国际组织对其建设的技术及数据标准进行统一管理，PACS 在影像信息方面采用 DICOM 标准^[5]，其他信息采用 HL7 国际标准进行信息交换；数据库问题同 LIS。

3.3.2 实现

我院 EMR 系统支持 HL7 国际标准接口提供的系统连接，将 EMR 中的病人和检查项目信息通过 HL7 传输到 PACS 中。同时支持写报告等功能，报告审核完成后通过 HL7 传输到 EMR 中供临床医生调阅，并导入到病程记录中。

EMR 系统支持基于 DICOM 标准接口提供的系统连接，PACS 中的影像通过 DICOM 协议传输到 EMR。对于非 DICOM 影像信息通过程序转换为 DICOM 图像，或通过虚拟打印程序转换为 DICOM 图像，再发送到 EMR 中供临床医生浏览、查阅。(见图 3)



4 电子病历的应用

我院自 2011 年开展电子病历以来，一直深受临床一线的喜悦，医生不仅从繁琐的手写病历和重复抄写中解脱出来，同时第一时间能看到检验、检查报告的结果。病人办理入院手续，填写基本信息，当病人入住病房时，医生早已看到病人信息，并做好一系列评估。书写病历时检验和检查结果直接导入病程记录中，即准确又快捷。病历书写完成，提交归档，如需再次调阅，只需网络申请借阅即可查阅病历。

我院按照市卫生计生局的要求，完成区域电子病历的数据上传和调阅，并且一直保持良好的排名记录。

我院按照卫生部医管司的要求，完成与医院质量检测系统研究中心（HQMS）数据采集并对接成功，按照要求定时上报，运行良好。

经过 4 年的运行，我院电子病历系统较好的服务了临床^[6]，服务了患者，同时提高了服务质量和医疗质量，为建立和谐社会做出了贡献。

参考文献

- [1] 孙涛,周山,王海威,等.数字化医院建设探讨[J].中国医学装备,2013,10(11):77-80.
- [2] 罗娟,唐晓东,胡倩.新版电子病历系统与临床信息系统融合方法与应用评价[J].中国医疗设备,2013,28(4):57-58.
- [3] 方堃靖,张红,王志奇,等.中医电子病历系统接口的设计与实现[J].中国医疗设备,2014,29(8):46-48.
- [4] 王芬芬,胡占生,丁冰芳,等.基于 Oracle 数据库技术的 PACS 集成设计与应用[J].中国数字医学,2015,10(10):78-80.
- [5] 顾培华,赵一凡.基于健康等级 7 的放射学信息系统与影像归档及传输系统集成方法[J].中国医学装备,2016,13(4):50-53.
- [6] 李晓燕,唐颖.浅谈医院电子病历系统的应用[J].中国医学装备,2013,10(12):76-77.

作者简介: 沈瑛瑛 (1986-), 大学本科, 助理工程师; 湖州市第三人民医院, 从事医院信息系统的管理和维护工作, E-mail: 429184055@qq.com, 0572-2290530, 13868261217

「管理科学与技术保障」

国外国家救援队组成及其装备要览

许建阳

中国武警总医院 北京

[摘要]在人类历史过程中天灾人祸造成成千上万的生命丧生,巨大物质遭受破坏。在面对这些灾害困境,如何快速有效救援,减少生命伤害和财产损失,把损失降到最低,这体现国家的实力和发达程度,更体现医疗救护队的水平。本文简要介绍了美国、俄罗斯、日本、德国、法国和意大利等国的救援队的组成及其装备,以期在今后的救援过程中充分发挥重要作用。

[关键词]国家救援队 组成 装备

Components and Equipment of Rescue Team in Foreign Countries

Jian-yang Xu (The general hospital of armed police)

[Abstract:]In the process of human history of natural and man-made disasters killed tens of thousands of lives, huge damage to matter. Disasters in the face of these difficulties, how to fast and efficient rescue, reduce life injury and property damage, the losses to a minimum, this reflects the strength of the country and the developed degree, more reflect the level of the ambulance service. This paper briefly introduced the United States, Russia, Japan, Germany, France and Italy and other countries of the composition and equipment for the rescue team, in order to give full play to the important role in the rescue process.

[Keywords] National Rescue team Equipment

在人类发展历史过程中,各种自然灾害的袭击,成千上万的生命丧生,物质遭受巨大破坏。在面对这些灾害困境,如何快速有效救援,减少生命伤害和财产损失,把损失降到最低,这往往会体现一个国家的发达程度,体现医疗救护队的水平高低。尤其在近年来,世界范围内地震频发,造成重大的人员伤亡。国际社会纷纷对此高度关注,在第一时间为灾区提供人道主义援助。许多国家将救灾医疗队看作灾害应急卫生救援中的主体力量,成立了国际救援队,救灾医疗队必须先组建、合理组成、装备齐全、机动性强、有足够的自我保护能力,在重大灾害面前,这些具有丰富经验的国际救援队扮演了十分重要的角色。下面为大家介绍几个发达国家的医疗救护队组成及其装备。

1 美国国家救援队

美国国际救援队(American Rescue Team International, ARTI)成立于1985年,队员来自于多个国家的15个救援队。ARTI完全是非牟利的,除了救助生命,没有别的目的和企图,ARTI几乎没有什么预算,一年可能只需要几千美元维持其运作。队员不在ARTI领取薪水,相反,当灾难发生的时候,队员甚至自己掏钱参与救灾行动。ARTI拥有数千名成员,而且还在继续不断地扩充队伍,吸收更多来自全球各地的救援人员。为了保证能在灾情发生的第一时间赶到现场,ARTI将成员划分为若干小组,分别驻在世界各个地方,因此,ARTI总是能够在发生灾难后第一时间赶到现场。

美国应急管理机制实行统一管理、属地为主、分级响应、标准运行的制度。美国的应急管理组织体系形成了联邦、州、县、市、社区5个层次的应急管理与响应机构。美国把应急管理活动贯穿到四个基本领域,即缩减、准备、反应和恢复。缩减和准备是灾难发生之前的行为,反应是灾难发生过程中的行为,而恢复则是灾后的行为。缩减阶段在于预防和减少灾难的损失,如在设计建筑物时要考虑恐怖分子发动袭击等因素;准备阶段在于设计反应阶段如何应急,提升更有效的反应能力,其中包括对应急人员和公众的训练计划,报警系统、通信系统的启用计划;反应阶段是对灾难作出的立即行动,包括群众撤离疏散,构筑沙袋和其他设施,保证应急食品和水源的安全,提供应急医疗服务,搜索救援,灭火,防止产生掠夺现象并维护公共秩序;恢复阶段是善后处理的一部分,包括提供临

时住所,恢复电力供应,小额商业贷款,清理废墟等。美国的联邦、州、县、市、社区都有自己的紧急救援专业队伍,它们是紧急事务处理中心实施灾害救援的主要力量。联邦紧急救援队伍被分成十二个功能组:运输组、联络组、公共实施和公共工程组、消防组、信息计划组、民众管理组、资源人力组、健康医疗组、城市搜索和救援组、危险性物品组、食品组、能源组,每组通常由一个主要机构牵头。各州、县、市、社区救援队也有自己的功能组,负责地区救援工作。美国非常重视救灾医疗队(DMAT)的组建,将救灾医疗队看作灾害应急卫生救援中的主体力量。组建标准要求救灾医疗队必须事先组建、合理组成、装备齐全、机动性强、有足够的自我保障能力。经过科学论证,救灾医疗队的标准编制定为29人,并形成模块组合,由3个救灾医疗队加上适当的指挥与保障人员可以组成伤病员分类——中转救护单元(CSU)。另外,根据卫生救援需求,对救灾医疗队进行合理安排,在全国范围内组建150个CSU建立国家级救灾医疗队,用以满足灾害卫生救援时大批伤病员的救治。

ARTI拥有全世界最精密的装备。其装备要比其他国家救援队领先10年以上。而且ARTI中有许多发明家,自己会研发救援装备。这些先进的装备能够帮助ARTI通过各种方式,如毛发、气味等找到死伤者。美军的远程医疗队分为可空运诊所、预防医疗、应急护理和野战外科分队4个模块,所有装备可装在一个托盘上空运,远程机动性强。卫生装备实现了模块化、小型化、履带化和机动化,展收迅速、转移便捷,具有较强的独立保障和应急机动能力,卫生装备分组合并性能好,是决定其卫勤保障成败的重要环节。美军在科索沃,其医疗保障主要使用了能快速机动、独立保障的医疗队。该医疗中队由一个可空运诊所、一支预防医疗分队、一支应急护理分队和一支野战外科手术分队组成。该中队所有装备,都便于空运,它承担了驻阿尔巴尼亚的美军和其他北约部队的医疗保障。在紧急情况下,该中队还将担负一些难民救援任务。

2 俄罗斯国家救援队

俄罗斯联邦政府根据其在1990年12月27日签署的法令,组成了俄罗斯救援部队,相当于联邦应急委员会。1994年该委员会重新组建为直接对总统负责的“民防、紧急状态和消除自然灾害后果部”,简称紧急状态部。该部成立以来,作为俄罗斯专业化的抗灾救助机构,具有系统的机制、具体的措施和丰富的经验,建立并管理专业化的救援救灾队伍是该部的一项最基本的工作。

俄罗斯的紧急状态部负责整个联邦应急救援的统一指挥和协调,直接对总统负责。内部设有内务部、国土保护司、灾难预防司、部队司、国际合作司、放射物及灾害救助司、科学与技术管理司等部门,同时下设俄罗斯联邦森林灭火机构委员会、俄罗斯联邦抗洪救灾委员会、海洋及河流盆地水下救灾协调委员会、俄罗斯联邦营救执照管理委员会等机构。俄罗斯联邦灾害管理体系由俄罗斯联邦的各界人士和组织、地方行政机构、各类工业和经济实体组织组成这些组织的活动是保护受灾的公众和领土,同样也保护灾害响应所需的部队和设施。该系统包括联邦级、州级、地方政府、社区一级和受灾现场5个等级地方政府一级的灾害预防和响应系统形成于俄罗斯联邦灾害预防和响应统一(就其划定的地区)中,由地方行政管理部门的响应部队组成。该级的次级功能系统由联邦机构组织灾害预防和响应的工业和经济的各个分支机构组成。有三十多个类似的次级系统,如联邦森林服务的森林火灾次级系统,俄罗斯科学院的地震预报次级系统等。

灾害响应、人道主义援助由部队、地方行政机关及俄罗斯联邦机构执行。各自的执行区域受灾害影响面积及各级灾害委员会的直接指令调控。如果受灾范围过大,不足以控制在局部范围之内或不足以抵御,灾害管理委员会可转向更高一级的灾害管理委员会进行求助,其可以协助或指挥灾害响应行动,提供必要的人道主义援助。如可调用的灾害响应部队和设施不足以有效地抵御灾害,联邦机构的部队和资产可追加提供。在俄罗斯全国范围内,以中心城市为依托,下设9个区域性中心(莫斯科、圣彼得堡、顿河罗斯托夫、萨马拉、叶卡塔琳娜堡、诺瓦西比斯克、契塔和卡巴、洛夫斯克等),负责各个州的救灾活动。每个区域和州设有指挥控制中心。司令部往往设在有化学工厂的城镇,下辖中央搜索分队80个,分队约由200名队员组成。联邦紧急事务部及其所属应急指挥机构和救援队伍在应对突发事件、各类灾害和社会危机等方面都发挥了重要作用,成为与国防部、外交部并列的重要国家部门。

俄罗斯国际救援队一个很大的特点就是反应迅速,能在第一时间进入紧急状态待命,医护人员、专业搜救人员和搜救犬能及时做好准备,随时可以奔赴救灾。除了反应迅速,这支队伍也设备精良,配备了先进的“空中救灾医院”,2007年末,俄罗斯完成伊尔-76飞机上的空中医院的建造工作,以便为重大事故、突发性灾难、国际维和与人道主义救援等提供紧急救援服务,该国救援队能够在3个小时内对国内任何地点展开救援工作,而且医院还能实施空投。“空

中医院”拥有高压氧舱、心血管和呼吸等支持系统，还配备医疗救护小组，医生和护士都经过专门的紧急医疗护理、航空医疗、飞机和系统设施安全起降以及飞行护理方面的培训。俄罗斯国际救援队可以充分发挥“空中医院”的作用，在灾难发生后，对灾区实施紧急救援。从而能缩短搜寻、抢救、疏散和提供医疗救助的时间，并且能直接在其中进行医疗救援，然后提供转运服务，把需要急救的病人安排到最近的医院接受治疗，而病人将在“空中医院”里接受抢救，显著提高了病人生还的几率。

4 日本国家救援队

日本灾害救援队是日本政府于1987年6月建立的，任务是快速收集国家和城市重大自然灾害和技术灾害的有用情报，经高技术处理后报给外务省日本国际合作局，并报经济合作局进行选择决策；承担合法渠道的国际灾害救援任务，做到技术装备一流，人员技术能力一流，并具有外语能力。按技术规定和高素质高能力培养的要求，救援队应是人道主义者，同时又是技术上过硬的业务工作队。

日本法规对国家、各级地方政府及军队的救灾职责以及全国防灾救灾的对策与措施进行了明确规定，使全国的防灾救灾工作法制化。日本重视防灾救灾的宣传教育，重视提高全民的防灾意识，并经常举行不同层次的防灾救灾演习，切实做好防灾救灾训练。日本自卫队参加灾害卫生救援已由单一型卫勤支援转为综合性后勤保障，由地面一维支援转为空地立体式支援。紧急医疗救治由空中医疗直升机和地面野战医院同时进行，大批直升机与地面的救护车、工程保障车、通信指挥车等构成立体保障，形成空地一体的保障优势，充分显示陆上自卫队的快速反应能力。广泛使用先进技术，包括现场综合控制系统、医疗状况和伤员状况控制系统、飞行管理系统、运输控制系统等。日本自卫队在实践中不断总结改进灾害卫生救援工作。日本将参与国际灾害卫生救援作为参与国际性事务的一种方式。

国家救援队人员配备，日本灾害救援队从成立初期的400人到2002年已扩大到1540人，这些搜索救援人员分别来自日本警察局、日本海岸警备队和火灾管理机构，其中医护人员注册数为614人，有医生201人，护理人员261人，药剂师21人，医务协调人员31人，100个后勤人员。日本灾害救援队在1999年-2001年期间，每年的财政预算为4850万美元左右(含全体职员年工资的1/2)，其中的300万美元为设备仪器购置费，年培训演练费为500万美元，紧急需求时可动用的援助费约80万美元。

日本灾害救援队按国际救援队标准建设，主要包括：SAR(搜索与救援)队；专业救助队；医疗队；生活自给充足的管理队；高效的联络队；按国际救援培训指导教材进行培训的教育队。该队按照规定配备有一百余吨的设备和工具，包括运输与通讯车辆，船只和小型直升机，各类起重、挖掘和装卸工具，搜救仪器，个人全套用具，生活补给储存设备，发电设备等。

4 德国国家救援队

德国是世界上应急管理体系高度发达的国家之一，应急救援工作严谨而完善德国应急救援体系因其法律制度完善，机制协调有序，救援队伍众多，分工布局合理，装备先进齐全等特点具有明显优势。

德国各级防灾行政当局负责指挥各种专业技术救援活动，包括卫生救援。各级防灾行政当局下设救灾指挥部，由4个指挥组及专家顾问组成。4个指挥组是人事组、情报组、组织组、供给组。同时包括一些有关的专业部门。卫生局作为有关的专业部门，隶属于“防灾行政当局”，受其领导。卫生局设立救援指挥所负责分配医院床位，指挥伤病员后送。在救灾指挥部中设一名顾问医生，负责处理有关医学救援事务。灾害现场的卫勤指挥由救援所所长负责，其任务是评估伤病员救援需求、伤类伤情、救援工作的困难及缺陷；向指挥部报告；出现现场救护、救护所及后送所需的支援力量。德国共设立699个民防医疗队，每队50人，志愿救护人员28500人。全国有35个覆盖半径为35公里的急救基地，发生事故或出现急救患者时可在12分钟内到达现场。急救基地位于医院内，由飞行员、医师、急救队员3人组成，随时待命。民防还包括训练工作，如居民的急救训练、救灾演习、制定法规等等。灾害发生后，邻近灾害地点的卫生部队、部队门诊部等的卫生人员立即投入抢救和急救工作。陆军卫生营在有关领导的指示下迅速投入救援工作。伤病员转运由陆军卫生营的救护车实施。为提高伤病员存活率，直升机转运重伤员较为普遍；如果直升机运力不够，可由陆军飞行团及空军直升机运输联队的力量给予支援。

5 法国国家救援队

法国的灾害卫生救援体制的模式与急救医疗系统的模式一致，在国家发生全国性重大灾害时，由内务部协调指挥，完成灾害卫生救援管理，以急救医疗系统为主体进行灾害卫生救援。

参加救援的机动救灾医疗队（SMUR）由医院负责组建，一名医生负责监督，医院行政部门负责管理。SMUR 设置的范围应在 100 分钟内可开始救援行动，否则必须凭借直升机，以满足全国人群更为广泛的救援需求，开展野外救援行动。SMUR 的装备有应付重大紧急灾害事件所需的所有重型设备，包括运送伤病员的轻型飞机。法国军队在灾害卫生救援行动中按灾害救援需求提供机动性支援。由于国内发生情况比较重大灾害的概率较小，所以法军的军医快速行动队以投入国外的灾害卫生救援行动为主。无论平时还是战时，遇有大量伤病员时，法国三军卫生部（ASHD）都能调动军队卫生资源，提供大规模的救援。ASHD 可以派遣机动救援支队、军医快速行动队、生物危害防疫队以及民间安全救援队。

军医快速行动队（FMMIR）是能够对任何地区任何类型的灾害快速反应的医疗救援队，能在自然或人为灾害时参加各种类型的救援工作，能承担战伤救护、震后救护、大量难民的卫生保健工作、防疫工作等等。FMMIR 高度机动灵活，适应性强。不管山高路远、气候条件如何恶劣，均能快速满足任何救援需求。并且具有快速行动能力和独立工作能力，具有灵活机动的组织结构，可以参加不同类型的救援工作，如卫生保健工作、外科手术工作或复合救援工作等。

6 意大利国家救援队

意大利境内的灾害如地震、火灾、水灾、火山爆发等比较多见，所以意大利对灾害救援工作十分重视，军队担负着主要的救灾任务。

意军指定其陆军司令部统一负责三军协调防灾及采取救援措施，包括灾害救援卫勤保障。当出现灾害时，军区指挥部自动组织起救灾中心，负责检查和协调为救灾而进行的全部军事活动。军区的卫勤部门也立即组织起一个救灾保障中心，昼夜值勤，与陆军司令部和军区司令部里的卫勤部门联系，任务是接受救援保障申请，发出救灾保障专业技术命令。

海军承担意大利境内的海上救援任务，海军卫勤管理部门须紧密配合陆军司令部下设卫勤组织指挥部门的保障工作。海军掌握的海上伤员集中场所是医院船。空军卫勤保证用卫生直升机把伤员运上医院船的平台。空军参加所辖区域内的救援工作，主要是在陆军司令部下设卫勤组织指挥部门的统一指挥和调度下实施空运后送。飞机上的医疗装备都已标准化，避免了伤病员在运送过程中再次受伤的危险。空军搜索救援实施和医疗组织建立 2 个移动医疗单元，分配给第一和第二空军部队卫勤部门。这种移动医疗单元可看作是一个小医院，紧急情况下对伤员急救后可空运送出；也可作为野战医院，不需用帐篷，能迅速到达现场。

参考文献

- [1] Tetsuya Tanimoto, Naoyuki Uchida, Yuko Kodama, et al. Japan: health after the earthquake. *The Lancet*, 2011, 377:968.
- [2] Aoki N, Demsar J, Zupan B, et al. Predictive model for estimating risk of crush syndrome: a data mining approach. *J Trauma*, 2007, 62(4):940-5.
- [3] Bar Dayan Y, Leiba A, Beard P, et al. A multidisciplinary field hospital as a substitute for medical hospital care in the aftermath of an earthquake: the experience of the Israeli Defense Forces Field Hospital in Duzce, Turkey, 1999 [J]. *Prehosp Disaster Med*, 2005, 20(2):103-106.
- [4] Butler D. Radioactivity spreads in Japan. *Nature*, 2011, 471:555-556.
- [5] Ashkenazi I, Isakovich B, Kluger Y, et al. Prehospital management of earthquake casualties buried under rubble. *Prehosp Disaster Med* [J]. 2005, 20(2):122-133.
- [6] 01 MWG_Provision of Medical Care in an Austere Environment Specifically in a Confined Space_ISG Approved Feb 2011.
- [7] 05 MWG_Amputations and Dismemberment_ISG Approved Feb 2011.

作者简介：许建阳（1962.11—），男，医学博士后，主任医师，教授，博士生导师。武警总医院中西医结合康复理疗科主任。研究方向：中西医结合脑病。电话：010-57976721（O），13601315896； E-mail: xujianyang@sina.com

医用耗材费用管理利益相关者博弈分析

林洁 张尉

福建医科大学附属协和医院, 福建福州, 350001

[摘要] 近年来,我国人均医疗费用增幅明显,除医疗技术变革、疾病谱变化等因素外,医用耗材以其独特的临床刚需性,成为了医疗收入的重要来源,其价格的高低也直接影响到了医疗费用的高低。伴随着公立医院改革的持续深入,如何应对医用耗材价格虚高、临床使用不合理等现状,降低医用耗材收入占医疗收入的比重(耗占比),成为了社会各界所关注的热点与难点问题。本文围绕医用耗材的定义与特性,汇总了福建省某三甲医院近三年医用耗材费用管理情况,基于博弈分析理论,从政府、医疗机构、患者、厂商等利益相关者角度入手,分析原因并提出有关管理措施,以期建立起一套完善的医用耗材费用管控体系提供科学的参考依据。

[关键词] 医用耗材; 费用管理; 利益相关者; 博弈分析

The stakeholders' game analysis of medical consumables cost management/LIN Jie ZHANG Wei/Fujian Medical University Union Hospital,Fuzhou,Fujian,P.R.China,350001

[Abstract] In recent years, the per person medical expenses has increased significantly, except the change of medical technological and the disease spectrum, medical consumables for its unique clinical rigid demand, become the important source of medical income, the price directly affected the medical expenses. With the sustained and in-depth reform of public hospitals, how to deal with the medical consumables prices artificially high, the unreasonable clinical use, reduce the medical consumables accounted for the proportion of medical income, has become the focus and the difficult problem. This article around the definition and features of medical consumables, has summarize the administrative situation of Fujian top three hospitals medical consumables cost in three years, based on the Game Analysis Theory, from the government, medical institutions, patients, manufacturers and other stakeholders perspective, analysis the reason and puts forward relevant management measures, to establish a perfect medical consumables cost control system and provide the scientific reference basis.

[Key Words] Medical consumables; Cost management; Stakeholders; Game analysis

伴随着医疗新技术、新项目的层出不穷,高精尖仪器设备以及大量医用耗材应运而生。在给患者带去健康福音的同时,医用耗材收入占医疗收入的比重居高不下,一定程度上加重了患者疾病经济负担。据不完全统计,全国大型综合性医院医用耗材成本占医疗成本的20%左右,医用耗材费用占患者就医总费用的40-50%。由此可见,医用耗材与医疗费用间的带动性增长成为了医药卫生体制改革进程中的阻碍之一^[1]。

1 医用耗材的定义与分类

1.1 定义

医用耗材属医疗器械。医疗器械是指直接或者间接用于人体的仪器、设备、器具、体外诊断试剂及校准物、材料以及其他类似或者相关的物品,包括所需要的计算机软件。其效用主要通过物理等方式获得,不是通过药理学、免疫学或者代谢的方式获得,或者虽然有这些方式参与但是只起辅助作用^[2]。

1.2 分类

从医用耗材的价格上可分为高值与低值医用耗材。高值医用耗材是指直接作用于人体、对安全性有严格要求、临床使用量大、价格相对较高、社会反映强烈的医用耗材。其中,分为血管介入类、非血管介入类、骨科植入类、神经外科类、电生理类、起搏器类、体外循环与血液净化类、眼科材料类、口腔科类与其他^[3]。低值耗材往往是临床各专科普遍应用的材料。

2 医用耗材使用现状与存在问题

2.1 使用现状

以福建省某三甲医院为例,如表1与表2所示,2013-2015年医用耗材收入占医疗收入比重的历年增幅分别为27.29%、2.01%。其次,患者人均医用耗材费用支出的历年增幅分别为31.27%、8.62%。

表 1 福建省某三甲医院 2013-2015 年医用耗材收入情况表 (单位: 亿元)

年份	2013	2014	2015
医疗总收入	20.29	22.25	24.96
医用耗材收入	2.93	4.09	4.68
医用耗材占比	14.44%	18.38%	18.75%

表 2 福建省某三甲医院 2013-2015 年患者人均医用耗材费用支出情况

年份	2013	2014	2015
医用耗材收入 (亿元)	2.93	4.09	4.68
出院人数	82583	87815	92508
人均医用耗材费用支出 (元)	3547.95	4657.52	5059.02

经统计, 医用耗材占比及其增幅较大的科室主要集中在心内科、心脏大血管外科、胸外科、介入科、口腔外科、神经外科、血管外科、眼科与结直肠外科等科室。

2.2 存在问题

医院临床、医技等科室众多, 医用耗材具有使用零散、专业跨度大且分散, 准确溯源、动态追踪、灵活调配的机制难以达成等特点, 也存在着一定资源浪费的问题^[4]。

医用耗材虽经政府统一招标、确标, 医院在限价范围内采购, 却一直无法达到降价预期^[5]。从医用耗材价格形成机制上看, 其包括了产品研发、市场准入、生产流通、集中招标采购、医疗机构准入、临床使用等环节。但是由于医用耗材生产、经营与使用单位间的利益出发与归属点不同, 集中招标并不能产生真正意义上的“价格最低、质量最优”, 也存在着政府招标目录外产品的市场自主定价, 间接导致了医用耗材种类与价格的持续增长。

卫生行政、市场监管、物价等政府部门针对医用耗材生产、经营与使用行为均享有行政管辖权, 也相继出台了一系列管理措施, 但均未能从根本上控制医用耗材费用的不合理增长。例如, 医用耗材的分类与统一编码、命名不完善, 未提供系统化的标准管理模式^[6]。医院只能根据不同部门所需, “各自备料、粗放管理”, 使得采购业务效率低下, 数据统计与分析精准度不足, 综合管理有待规范。

3. 利益相关者博弈分析

本文中的利益相关者是指对医用耗材费用管理起到影响作用的个人或者组织, 包括了政府、医疗机构、患者、厂商等。在现有市场经济与医疗环境的大背景下, 各利益相关者都在追求自身利益的最大化, 希望通过自身手段, 影响决策结果。但由于医疗服务市场的特殊性, 其为非完全市场, 受到了各利益相关者主观因素的制约, 也局限了其部分行为^[7]。

表 3 医用耗材管理利益相关者博弈关系分析表

利益相关者	利益关系	主要资源	对价格影响力	降价意愿
政府	希望降价, 有影响力, 专业性不足	政策、资金	较强	较强
医疗机构	部分耗材特管, 医务人员对降价不敏感, 采购人员有意愿降价	专业技术	强	较弱
患者	有强烈意愿降价	资金	弱	强
厂商	涨价, 提高利润	技术、产品	较强	弱

从表 3 中可以看出, 患者希望医用耗材降价的意愿最强, 但是由于其对价格的影响力较弱, 在博弈中处于弱势地位。厂商对于价格的影响力很强, 他们希望通过涨价, 从而进一步提高利润。医疗机构由于存在医疗保险、第三方支付等因素, 其中的医务人员专业性强, 对于价格不敏感, 采购人员也只能在预估范围内讲价, 无法最终影响到医用耗材的定价, 对于价格影响力所发挥的作用是有限的。政府有较强的降价意愿, 也通过了集中采购等方式进行

了限价,但由于缺乏专业知识与品目更新不及时等原因,其持续性与合理性难以得到保障^[8]。

此外,从博弈关系中也不难得出医用耗材管理存在问题的原因。首先,厂商通过学术公关等手段,促使医务人员、采购更好多了解自身产品,从而进一步扩大市场份额,让医疗机构产生诱导需求。同时,其拥有较强产品和技术优势,医院对于多数新型产品无法在第一时间掌握其使用方法,技术信息不对称,使得厂商在获利或者变相涨价中占有主导地位。其次,医疗机构作为医用耗材采购、使用的决策者,其使用习惯、绩效追求度很大程度上决定了费用的整体情况。再者,患者作为消费者,希望买到价优质好的医用耗材,既能治疗疾病又能较好地降低自身经济负担,但由于自身医学知识的欠缺,医患间的信息不对称,在没有第三方参考的情况下,大多数患者按照医务人员制定的使用方案进行治疗,也进一步弱化了自身在博弈关系中所处的地位。从政府的角度来看,由于疾病的不确定性与伤害风险,且大多数人参与社会统一的医疗保险,医保部门收取民众一定比例保费,其就医时的费用则按比例由医保支付。但政府力求收支平衡,在参保人群不变的情况,控制了医保费用的支出,故对于有效控制医用耗材费用存在局限性,不能真正做到有的放矢^[8]。

4 对策与建议

4.1 政府多渠道推动医用耗材改革补偿机制形成

政府在公立医院改革工作中起主导地位,应不断加大政府投入,落实政府对于医疗机构医用耗材购置、人员费用以及政策性亏损补贴的投入,在取消医用耗材加成后,形成服务收费和财政补助两个渠道,体现人力资源以及医疗技术价值,确保医务人员薪酬,也使得医院由追求经济效益向提高服务质量与患者满意度方向发展,回归医院公立性。

4.2 充分发挥医疗保险在医用耗材费用控制中的作用

在医患双方信息不对称的情况下,医疗保险机构在规范服务行为、控制费用、均衡博弈力量不均衡之间发挥重要作用。首先,建立医保单位与医疗机构间医用耗材谈判机制,经资质认定的耗材方可进入医保目录。其次,基于现有基金管理、费用结算与控制,通过按病种、按人头、按使用医用耗材总额等预付制支付方式,增强医疗保险在医用耗材费用管理过程中的激励与约束作用。

4.3 建立医用耗材信息化管理平台

建立健全医用耗材信息化管理平台,起到实时追踪溯源功能。即在完善厂商、医用耗材数据库的基础上,依权限系统分配临床、医技科室等用户业务功能,通过提交采购申请,由设备管理部门审批、采购,后通过介质储存共享订单信息,进而进行配送、使用。同时,上级卫生行政主管部门应做好“顶层设计”,简化对医疗机构医用耗材管理流程,提高数据的通用性与可及性,实现医用耗材采购数据的实时信息共享与监督,防止“信息孤岛”现象的发生。

4.4 制定医用耗材统一命名与编码规则

当前,医用耗材存在由不同部门制定多种不同分类编码标准,通用性与统一性差,无法满足实际使用与监管的需求。为此,需建立起统一的医用耗材命名与编码规范,使医用耗材按统一标准进行分类编码和使用、监管,做到一物一码,实时溯源,避免厂商以次充好,也有利于各政府部门间沟通信息,为提高医用耗材安全使用与管理水平具有较大意义。

4.5 规范医用耗材各流通环节

医用耗材的层层代理与授权环节,无疑增加了流通成本,使得最终价格虚高,而且也易于发生商业贿赂等违法行为。可在集中招标过程中要求生产企业或者总代理直接参与投标。同时,政府以及医疗机构严把供货商资质关,实时“回头看”,对供货商所售医用耗材以及销售行为进行综合评价,末位淘汰,提高医用耗材购置集中度,减少中间环节,降低采购成本。

综上所述,医用耗材费用管理是一项系统性工程,涉及到的利益相关者众多,需要综合评价予以统筹,以期建立起一套行之有效的运作模式与合理的价格形成机制,借助信息管理手段,进一步规范医用耗材管理行为,实现多方共赢。

参考文献

- [1]蔡泽玲,卢锡芝,尹继明,林署霞. 加强医用耗材管理 降低医院运营成本[J]. 管理观察,2013,17:141-142.
- [2]国务院令 第 650 号,《医疗器械监督管理条例》,2014 年 6 月 1 日实施。
- [3]关于印发《高值医用耗材集中采购工作规范(试行)》的通知(卫规财发[2012]86 号),2012 年 12 月 17 日发布。
- [4]叶政德,陈林. 医院信息系统及办公自动化管理用于试剂供应服务的实效性[J]. 中国药业,2015,24:174-175.
- [5]茹国英. 医疗制度改革中高值医用耗材价格管理的探索[J]. 财经界(学术版),2014,19:72.
- [6]福建省社会医疗保险协会课题组,林瑾文. 医用耗材管理的问题与对策[J]. 中国医疗保险,2012,12:57-58+67.
- [7]张云. 医用耗材价格管制研究[D]. 上海交通大学,2011.
- [8]刘灿. 云南省高值医用耗材价格管理研究[D]. 云南大学,2014.

第一作者简介:

林洁,男,1991 年出生,大学本科,研究实习员(医院管理),现就职于福建医科大学附属协和医院,主要研究方向:医院管理、设备管理。

联系电话:15392490548

E-mail: fjxhyylj@126.com

(医用耗材专委会供稿)

药品库存管理利用数据分析的探究

冯琼 李源 刘丽

北京联合大学 生物化学工程学院,北京 100023

[摘要] ABC 分析法是运用巴雷托曲线分析方法,将药品库存分为 A、B、C 三类,按不同的价值分布区别对待,进行重点和一般管理。ABC 分析法可以对药品库存进行分析控制,从药品库存的数据分析因素中找出主要因素,获取系统数据信息,将库存药品的平均存储量作为原始数据进行系统的 ABC 分析,旨在加强库存药品管理,保证正常药品供应。

[关键词] 数据库 药品管理 巴雷特曲线 ABC 分析法

ABC 分类法是由意大利经济学家维尔弗雷多·巴雷特首创的。1879 年,巴雷特在研究个人收入的分布状态时,发现少数人的收入占全部人收入的大部分,而多数人的收入却只占一小部分,他将这一关系绘制成巴雷特图。该方法旨在判定某一事物众多因素中的主次关系,并判别出对事物起决定作用的关键因素(占少数)及对事物影响较少的次要因素(占多数)。其要点是根据事物在技术方面或经济方面的主要特征,进行分类排队,分清重点和一般,以便分重点和一般确定管理方式。因为该方法把被分析的对象分成 A、B、C 三类,所以又称为 ABC 分析法。

1 药品管理中的 ABC 分类法

按药品品种每年度的销售金额,将库存药品划分为 ABC 三类:

A 类药品为销量较大的常用药,是药房出药的主体。由于现行医药市场的竞争体制,供药渠道多,货源充足,A 类药品所占的库存资金的比例最大,如果要增强资金的流动性,就必须控制此类药品的库存积压。对此类药品在制定采购计划时,应采取缩短采购周期、一次采购少量的原则,压缩该类药品的库存量,降低此类药品的库存成本,保证库存需求,从而减少对流动资金的使用,使药店的资金得到充分利用。

B 类药品所占库存资金比例相对较少,但均为药店不可缺少的药品。此类药品的销量不高,但所需资金较少,可以多备些,以减少采购次数,延长采购周期。

C 类药品占药店库存品种总数的比例最大,但占流动资金的比例却最小。此类药品需求较少,但在供药市场上经常出现缺货的现象,故此类药品的采购应适当多加采购。根据药品的销售金额占整个药店药品销售总金额的比例,对药品进行 ABC 分类,A 类药品库存成本约占库存总成本的 60%,品种约占库存总数的 15%;B 类药品库存

成本约占库存总成本的 20%，品种约占库存总数的 15%；C 类药品所占药店流动资金的比例最低，但该类药品的品种约占库存总数的 50%以上。

2 基于 ABC 的药品库存管理研究

2.1 ABC 药品库存分类系统

ABC 药品库存分类系统对这些药品库存等级进行了如下分类，其中的百分比为估计值，而且会随药房的不同而有所不同：（1）高价值项目：其占有全部项目数量的 10%至 15%与全部药品库存价值的 50%至 70%；（2）中等价值项目：其占有全部项目数量的 20%至 25%与全部药品库存价值的 15%至 20%；（3）低价值项目：其占有全部项目数量的 60%至 70%与全部药品库存价值的 10%至 35%。

2.2 ABC 药品库存分类法的实施方略

2.2.1 药品库存方略

对每件药品进行编号；努力精确地预测药品需求量；少量频繁地采购，减少药品平均库存量；采用定期订货方式，对药品库存必须做定期检查；严格执行盘点，每天或每周定期盘点，以提高库存精确度；对交货期限须加强控制，发货和收货设置严格标准；实施药品上架规范化；药品采购须经高层主管核准。

2.2.2 药品配送方略

使用“定期订购制”，并作短期预测；决定订购周期，根据目前的库存量、订购余额或已订余额决定下一周期的需求量。

2.2.3 库存管理策略

批量采购。以在进货价格上获得优惠；采用定量订货方式，节省手续；简化库存管理手段，以最简单的方式管理；每月盘点一次。

2.3 ABC 药品库存分类法的实施步骤。

药品库存可以采取以下简单的 ABC 库存分类法：

2.3.1 收集数据

先收集各类药品的相关数据，包括药品种类数、单价、库存量和资金占用等。

2.3.2 数据处理

根据收集的数据，对数据进行分析处理。比如时间段可以根据需要，定义在一个学期或一个时间段，计算出库存药品种类的年度库存总金额和相关库存管理参数等。

2.3.3 作 ABC 分析

将库存药品种类占用资金的大小按顺序排列，分别计算出库存金额累积百分比和药品种类数累积百分比。按年库存金额的累计百分比，根据 ABC 库存分类法基本原理，对药品库存进行分类。

3 ABC 分类控制管理应注意的问题

药品库存管理控制方法包括：药品库存经济批量模型、药品库存储存期控制、药品库存 ABC 分类控制等。常用的 ABC 分类控制管理法，就是把品种繁多的药品库存，按其重要程度、消耗数量、价值大小、资金占用等情况进行分类排队，然后采用不同的管理方法，做到抓住重点，照顾一般。

在使用 ABC 分类管理方法时，必须注意两个问题：

（1）占用库存资金问题，由于单价高的药品，其数量的变动对占用药品库存资金的变化影响更大，在 A 类药品中更应引起关注，这类药品的管理应当尽可能地往零库存方向发展。

（2）C 类药品的重要性问题，有些被划为 C 类的药品可能对医院有至关重要的影响，这种药品的重要性并不在资金占用上体现，而是体现在，如果缺货会造成病患治疗中断或严重影响正常治疗；缺货会危及病人的正常用药及病人生命；市场短缺的药品，缺货后不易补充。为了弥补这一不足，发展出重要性分析方法，将药品按重要性进行分类，两者相结合可以更准确地对库存进行分类管理。

4 结语

ABC 分析的结果，只是理顺了复杂事物，搞清了各局部的地位，明确了重点，主要目的在于解决困难，是一种解决困难的技巧。因此，在分析的基础上，必须提出解决的办法，才能真正达到 ABC 分析的目的。按 ABC 分析结

果,再权衡管理力量与经济效果,对三类库存药品进行有区别的管理。通过实施正确的药品库存管理方法,降低药房的平均资金占用水平,提高药品库存的流转速度和总资金周转率,最终提高药房的管理效益。

参考文献

- [1] 周芳艳,李卫平.ABC分类法在中小型药店库存管理中的研究[J].岳阳职业技术学院学报,2012(2).
- [2] 盛勇.ABC分析法在库存管理中的应用[J].财会研究,2009(2).
- [3] 胡从旭.ABC分类法在库存管理中的实施及改进[J].物流技术与应用,2011(4).

基金项目:本文系北京联合大学教育教学研究与改革项目“‘项目导学’教学模式在《Access数据库应用》课程教学中的应用”中子课题“北京联合大学大学生科技创新项目”阶段研究成果。

医疗器械全生命周期的设备管理

房爱玲

天津市肿瘤医院 天津 300060

[摘要] 随着医疗事业的迅速发展,医疗设备已被广泛运用于医疗领域的各个方面,对临床诊断及治疗水平的提高正起着决定性的作用,在医疗体系中占据着越来越重要的地位。医院医疗器械从购置前论证、采购、使用、维护、维修、报废等全生命周期的各项管理,都面临着进一步细化和全面的规范化管理问题。本文从论证、采购、使用效益分析、档案管理等几方面详细阐述了医疗设备全生命周期的各个环节的管理模式,高效的医疗设备管理模式对提高医疗设备的安全性和使用率、提高医院的经济效益、降低医院运行成本、提高医疗设备的整体配置水平有重大意义。

[关键词] 医疗器械;设备管理;效益分析;档案管理

随着医疗事业的迅速发展和日趋完善,医疗设备已被广泛运用于医疗领域的各个方面,对医疗诊断、治疗水平的提高正起着决定性的作用,在医疗体系中占据着越来越重要的地位。医疗设备的管理主要有以下几个方面:

1 购置前的论证管理

医院需要购置何种类型的设备,什么档次的设备都需要经过认真考察与论证。盲目地采购会造成设备的积压浪费反而影响到医院的发展。论证是对设备的技术参数、开展项目及相关事宜进行了解、比较、判断。医疗设备管理部门的作用在于合理、合法的利用所掌握的知识、技术、信息与科室共同对设备性能价格比做出最优化的选择,为设备进入医院后的管理创造有利条件。这种购买前的管理不能用价格来量化评价,它是知识能力和技术水平的综合,并不是购买的价格越低越好。论证过程应由院领导、设备处负责人及相关科室负责人及使用人员等共同完成,充分的论证给领导决策提供有力依据。

2 采购管理

采购是医院经营的重要组成部分,建立良好的供方名录和供应链并不断通过临床验证、工程验收、维修、计量和市场反馈信息对其进行持续地评价,形成良好的制度化管理。采购管理的更高层次应该建立临床医疗器械准入客观标准,建立科学的评价指标体系,用客观数据和指标决策,克服主观因素干扰,从而提高工作效率。具体做好以下几个环节的管理:

(1)医疗仪器设备需求科室提出申请,任何医疗仪器设备购买的原因来源于临床或非临床对于医疗、教学、科研需求,这种需求是实际的、发展的,有的是有前瞻性的,因而医疗器械采购技术规范第一步是科室对医疗仪器设备的需求申请,需认真填写《医疗仪器设备购置申请表》。

(2)设备处应及时将《医疗仪器设备购置申请表》进行汇总,以表格的形式分类列出临床医疗需求、科研需求采购汇总表。由于科室对于医疗仪器设备的申请是随时提出的,所以购买的需求汇总这一流程也应该是按时间段随时进行的。当医院对医疗仪器设备进行审核、讨论时,便随时可将《医疗仪器设备购置需求汇总表》提供给医院领导

进行决策。

(3)以公正、公平、公开的原则,由院领导、使用科室、纪检办及其他有关科室等主任、专家参与监督,召集三家以上的供货商,以同类型、同档次的设备进行公开招标。通过招标来选择技术质量高、性能使用性强、价廉质优的设备;这样不仅增加了工作的透明度,完善了监督机制,杜绝了设备购置中的不良现象,而且保证了进货的质量,为医院节约大量的资金。

3 使用效益分析

医疗设备的经济效益分析在医院经济管理中占着举足轻重的位置,它既能客观分析评价在用医疗设备的工作状况,又能科学的指导医院的医疗设备规划。加强大型医疗设备的科学管理,降低设备运行成本,运用经济手段对大型医疗设备使用的效率进行成本效益分析是十分必要的。

3.1 经济效益包括直接收入效益和间接收入效益

直接收入是按设备的收费码统计直接累计的收入;间接收入是该设备发挥作用后所带来的不归入该设备收入的间接效益。有些医疗设备使用率很高,如各种设备工作站、全自动快速灭菌器等。这些设备虽然无单独收费,无法从直接经济效益上进行分析,但能减轻医务人员的劳动强度,提高医院的声誉。

3.2 设备的全寿命费用是经济管理的一项重要指标

医院医疗设备的全寿命费用 (life cycle cost, LCC)是指设备在生命周期内的设备采购费和设备维修管理费、耗材使用费、维护费的总和。LCC 越低,节省费用越多,设备效益相对提高。实践证明,能否运用 LCC 分析方法指导设备管理是提高设备效益的重要因素。

3.3 设备购置后是否能发挥充分的效能,能否合理利用,可通过评价投资回收期来确定,具体公式如下:

投资回收期(年)=全寿命费用(LCC)/(每年工作日数×每日工作次数×每次收费金额)

由以上公式可以得出回收期越短,投资效果越好。

4 档案管理

医院为了提高医疗质量、医疗水平,投入大量的资金购置国内外先进的仪器设备,要管理好、高效率的使用这些医疗设备,减少设备突发故障和提高设备的使用率,就必须科学的管理好医疗设备仪器的档案。医疗设备档案为各使用设备科室提供凭证,为医疗设备成本核算提供凭证,它同时也为医院再次购置相同设备及领导决策提供历史依据,从而降低购置和维护成本。

4.1 档案的真实性和完整性,档案资料收集的应是原始资料

在医疗设备管理的各个环节中,如因客观原因只能得到复印件时,则必须验证复印件的真实性和注明复印件的提供者并及时加盖公章以备查证。档案目录与实际档案资料内容、数量必须相符,不能缺少。一般情况下原始资料不能外借,而应以复印件方式借出,当原始资料必须借出时,应严格执行和借阅签字手续,防止丢失。

4.2 医疗器械档案采用统一管理、分级负责的原则

根据医疗器械类目实施统一编码管理,对每一案卷实行编码检索,按编制科室类别分类定位集中保存。逐步采用信息化管理技术手段,开发档案信息资源,为医院的科技进步和经济建设服务。

4.3 确定医疗设备档案的归档范围

根据医疗设备档案的管理要求,结合医疗实际,明确了医疗设备档案管理的归档内容。归档内容如下:(a)购置资料:申请表、论证表、批复文件;招标、评标记录或采购谈判记录、标书、产品生产注册证、销售商品的经营许可证、授权书、到货验收报告、安装验收报告、配置清单等。(b)设备技术资料:产品样本、使用和维修手册、线路图、光盘及其他有关资料。(c)管理资料:操作规程、维护保养制度、保修资料、使用维修记录等。

5 报废管理

(1)医疗设备报废原因分为长久使用自然淘汰的、更新换代停止使用的、管理不善使用不当的、维修不力无配件无法修复的等等,以上设备可由科室提出设备申请报废。

(2)报废设备鉴定是报废管理的重要环节,需由专业工程师鉴定并填写鉴定报告,对于大型五万元以上设备要上报卫生局及财政局,等待上级部门的批复。

(3)各种报废手续完成后与财务部门进行报废减账,并将各类鉴定报告及批复订入档案。

医疗设备的现代化程度的重要标志,是医疗、科研、教研、教学工作最基本要素,也是不断提高医学科学技术水平的基本条件,医疗设备管理应该是贯穿于医疗设备整个生命周期的全过程管理,对医疗器械的管理的规范化、实用性、可靠性愈来愈被重视。临床学科的发展在很大程度上取决于医疗器械的发展,甚至医疗器械将会起决定性作用,医院医疗设备管理已成为现代化医院管理的一个重要领域。

参考文献

- [1] 丁忠,邓勇等.医疗设备管理的方法探讨[J].中国医疗设备,2011(12):76-78.
- [2] 中国医院协会,三级综合医院评审标准实施指南[M].北京:人民卫生出版社,2011:197-198.
- [3] 蒋红兵,马俊等.医疗器械采购管理[J].中国医疗设备,2012(10):40-42.
- [4] 周军,唐志前,杨俊峰.医院医疗器械全程管理探讨[J].医疗卫生装备,2009,30(2):88-89.
- [5] 李丽,张艳.我院医疗设备维修管理规范化的探索[J].中国医疗设备,2015,30(1):150-152.
- [6] 刘延祥.现代医疗设备科学管理模式的思考[J].当代医学,2008,18(148):27-29.

作者简介: 房爱玲(1970-)女 大学本科 天津市肿瘤医院 高级工程师 从事医疗设备管理工作。
联系方式 13612001720 天津市河西区体院北环湖西路肿瘤医院 300060

我院急救设备保障中心医疗设备租赁式使用集中管理模式的实践研究

王晴^① 吴志坚^① 初继庆^① 种银保*^①

①第三军医大学新桥医院医学工程科

[摘要] 本文阐述了我院通过建立急救设备保障中心,开展对急救设备的租赁,提高了医疗设备的使用效率,节省了大量的重复购置资金,为医院设备的综合管理、减少医疗资源浪费、实现资源共享提供了切实可行的管理办法。

[关键词] 医疗设备;租赁;管理;效益

Study on the practice of centralized management mode of medical equipment for emergency equipment service center in our hospital

WANG Qing, WU Zhi-jian, CHU Ji-qing, Chong Yin-bao

[Abstract] This paper describes the mode of operation of emergency equipment service center in our hospital. By leasing the emergency equipment, it improves efficiency in the use of medical equipment, saves a lot of repeat purchase funds, reduces the waste of medical resources and provides a practical management approach for integrated management of hospital equipment.

[key words] Medical equipment; lease; management; efficiency and benefits

[First-author's address] Department of Medical Equipment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China.

现代化的医疗仪器设备在医院经营与医疗市场竞争中发挥的作用愈来愈明显。医院不仅要加大仪器设备引进的力度,同时更应该重视医疗设备的科学化管理工作,合理利用现有医疗设备资源,使其发挥最大的经济效益、社会效益和技术效益,是医疗设备管理部门一个值得探讨的问题。设备租赁是近些年出现的医疗设备投资管理的一个重要方式,主要包括社会商业融资渠道和建立医院内部租赁中心两个方面^[1-2]。商业租赁前几年在社会上出现,因安全、法规等多方面因素其可能性受到很大限制,而在医院内部建立通用设备租赁中心,是医疗设备调配管理的一个思路。近几年,国内不少大中型医院建立了设备租赁中心,部分同行在设备租赁中心的建立和运行上都有了成功的经验,也体现了显著的管理效益^[3-6]。

我院于2009年成立了“急救设备保障中心”,对急救设备实行集中管理,全院统一调配使用,经过4年多的运行,效果良好,得到临床医护人员的认同,同时也为医院创造了良好的经济效益。本文就我院对医疗急救设备实行租赁式使用集中管理进行实践探讨和研究。

1 方法

1.1 急救设备保障中心管理范围

根据我院医疗设备装备情况、设备的使用率和需求状况以及现有医学工程人员数量,急救设备保障中心设备租赁的管理范围首先是(除急诊、ICU、手术室外)各临床科室配置的呼吸机、监护仪、输液泵、注射泵等通用性强的医疗设备。进入中心的设备必须是各个临床科室通用的价值较高的设备,并且以小型和可移动为佳。这样既可以发挥设备的最大利用价值也可以方便借还。目前我院急救设备保障中心的设备主要是呼吸机^[7]、多参数心电监护仪、输液泵、注射泵和除颤监护仪。

1.2 急救设备保障中心运行模式

为方便中心工作的开展和协调,中心可由院医教部医疗科领导,由设备科对中心所属设备进行全程管理和技术保障。中心设置在病房大楼,有专门存放设备和用于常规修理、检测和日常事务处理的房间。中心采用租赁制,24小时值班,科室可随时向中心租用机器。中心负责指导科室对机器的正确操作,填写机器使用登记表。科室使用完毕后通知工作人员,点验后收回。每月结算科室消耗报表,上报卫生经济科进行核算。

1.3 急救设备保障中心工作流程

(1) 使用科室向中心预约申请租借机器,中心值班工作人员根据设备在位情况及设备状态,给予答复。在紧急情况下,由医教部业务值班领导直接与中心工作人员联系,对中心设备进行统一调配。

(2) 中心工作人员接到电话后15分钟内将机器送达科室,并与科室人员当面共同试机,双方认可后签字借出。

(3) 科室使用完通知中心人员撤机,中心工作人员对科室已停用设备进行检查,清点设备及附件,填写设备租用交接单,租用结束。

(4) 收回的设备按照要求进行打包消毒、试机检测,维护完毕挂“正常”指示牌,供其他科室下次借用。

1.4 制定规范的中心设备租赁制度

中心自成立之日起,制定了一系列规章制度,以保证工作的正常有序开展和更好的服务于临床。

《医疗急救设备保障中心管理办法》:包括总则、运行管理、收费核算及附则,是科室申请租用“中心”设备的具体范畴和方法以及租借设备过程中的注意事项和要求;

《急救设备保障中心管理规定》是“中心”工作人员的具体工作范畴;

《设备维护制度》是“中心”设备管理人员对设备进行检测检定工作要求;

《设备租用登记表》是记录各科室租用“中心”设备的时间及附件情况;

《保障中心值班人员交接班登记表》是“中心”值班人员日交接工作记录单;

《仪器设备使用管理登记本》是“中心”设备管理人员对机器进行日常维护保养和维修记录本。

2 结果

自2009年开始投入运行以来,4年多的时间里急救设备保障中心不断发展壮大。最初只有6台呼吸机、10台监护仪,到2013年保障中心已有18台呼吸机、30台监护仪、3台输液泵、3台注射泵。设备使用率长期保持在90%以上。个别时期高达100%。2009-2015年设备租赁情况,见下表。

表2 2009-2015年急救设备保障中心设备租赁情况详表

租赁设备	呼吸机			监护仪			输液泵/注射泵		
	租借次数	总使用时间(小时)	台数(台次)	租借次数	总使用时间(小时)	台数(台次)	租借次数	总使用时长(小时)	台数(台次)
2009年	103	5495	6	88	6576	10	—	—	—
2010年	277	21319	11	284	24923	10	—	—	—
2011年	349	24487	15	905	60702	10	—	—	—
2012年	401	21237	18	1708	118419	20	—	—	—
2013年	594	24926	18	1989	118090	20	61	2644	6
2014年	610	33708.7	18	1869	110143.5	50	89	8298	6
2015年	627	40697.5	18	1618	114078	50	59	10348	6

急救设备保障中心自成立至今,呼吸机租借次数从2009年的103台次发展成为2015年的627台次,监护仪从2009年的88台次增长为2016年的1618台次,从临床科室对设备租借次数呈大幅度增长趋势可看出,临床科室由认识急救设备保障中心到对设备租赁工作的认可和依赖程度也不断升温。由下图1可看出。

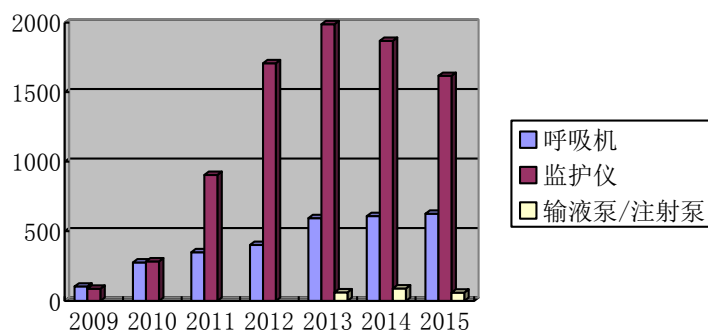


图1 2009-2015年急救设备保障中心呼吸机、监护仪租借次数趋势图

3 讨论

(1) 有效地提高了设备使用率,减少设备的闲置时间,做到了物尽其用。统计数据表明,急救设备保障中心运营以来监护仪每台每天闲置时间平均不超过2h。

(2) 盘活设备存量,优化资源配置。采用设备租赁的方法,可减少医疗设备的重复购置,减轻机关领导和职能科室协调设备使用的精力,使医院的医疗资源重新优化配置,发挥现有资源的效益最大化。

(3) 减少科室支出,增加医院收益。采用设备租赁前,设备无论是否使用,科室都要全部负担设备的折旧费,采用设备租赁后,科室只负担租赁时间内的设备折旧费,成本支出大幅减少,再加上设备使用率的提高,设备使用寿命的延长,增加了医院的收益。

(4) 租赁中心由专职工程师全面负责设备的维护保养,对设备的结构、性能熟悉,设备使用正确、规范,势必会降低机器故障率,减少设备损耗,延长机器使用寿命。

4 结论

医院医疗设备租赁式使用集中管理模式,解决了通用医疗急救设备重复购置、使用率低的问题,在节约医院成本的同时满足了临床科室的工作需要,做到了资源功效,提高了设备的使用率、完好率,强化了医疗设备管理,建立健全了医院医疗急救设备高效规范的保障、使用和管理机制。随着医疗设备的大量投入,不仅仅是综合医院医疗设备的资源共享,基层医院在医疗设备管理上也应考虑采取设备租赁调配集中管理模式,以期最大程度的节约医院成本并获取效益最大化。

参考文献

- [1] 胡月静, 辛显涛.军队中小医院融资租赁医疗设备的实践与体会[J].医疗卫生装备, 2013,34(1):99-100
- [2] 王耀平, 汤黎明, 刘玉亭.医疗设备租赁式使用与集中管理模式的探讨[J].中国医疗器械杂志,24(6):359-360.
- [3] 陈静. 医疗设备的租赁[J].医疗装备, 2012, 25 (9) : 37-39.
- [4] 王拴武, 张长虹, 黄志聪, 赵亚丽, 医院医疗设备租赁中心的建立及其管理规定, 中国医学装备, 2007, 4(2):28-29.
- [5] 韩峰, 万剑锋.我院实行内部医疗设备租赁的探讨.中国医疗设备, 2013,28(1):90-91.
- [6] 牛巧灵, 邵继凤, 张恩科.建立院内通用医疗设备租赁中心的实践探讨[J].中国医学装备,2010, 7(8):32-33
- [7] 张晴.医院内呼吸机租赁式管理[J].中国医学创新, 2012,9(2):137-138.

第一作者简介: 王晴, 女(1983-), 硕士研究生, 工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科。研究方向: 失血性休克院前检测和脑灌注磁感应相移检测等; 联系电话: 13883665908; E-mail: 190322602@qq.com

通讯作者简介: 种银保, 男 (1963-), 硕士生导师, 高级工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科主任, 担任全军医学工程学专委会主委、中国医学装备协会常务理事、重庆市医疗器械学会理事长等。

(医学装备管理专委会供稿)

临床工程师规范化培训的组织实施策略的探索

马结实^① 赵安^① 赵鹏^① 潘文才^① 王晴^① 种银保^{①*}

[摘要] 临床工程师规范化培训是培养胜任临床工程职位的高级技术人才的必经途径。目前我国临床工程师的培训还处于探索阶段。我院在调研了国际和国内关于临床工程师培训现状的基础上, 结合多年来在本科实习生中开展临床工程学规范化培训的实际做法, 总结出了比较适合我国国情的临床工程师规范化培训的组织实施策略。

[关键词] 临床工程师; 规范化培训; 组织实施策略

Research on the strategy of the implementation of the standardized training of clinical engineers

MA Jie-shi, ZHAO An, ZHAO Peng, PAN Wen-cai, WANG Qing, CHONG Yin-bao

[Abstract] Standardized training of clinical engineers is a necessary way to train senior technicians in clinical engineering. At present, the training of clinical engineers in our country is still in the exploratory stage. Based on the investigation of international and domestic status of clinical engineer training and the practices of clinical engineer training to the undergraduates in our hospital, a strategy of the implementation of the standardized training of clinical engineers more suitable for our country was summed up.

[Keywords] Clinical engineer; Standardized training; Strategy of the implementation

[First-author's address] Department of Medical Equipment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China.

临床工程师是将工程和管理技能应用到医疗技术领域以支持和促进患者诊断、治疗的专业人员。临床工程师的培养包括院校本科(或以上)教育、毕业后临床工程教育和继续临床工程教育三个阶段。由于国家还没有开展临床工程师的规范化培训和认证^[1]。为了能使临床工程师能基本胜任医院临床工程岗位的职能, 临床工程师的培养主要依托其所在的医院的医学工程科和单位外的专业培训中心培养^[2]。由于各个医院的医学工程科的工作侧重有所不同以及培训师资的水平不相同, 导致我国临床工程师的水平参差不齐。为了使临床工程师在经过实习后能达到统一的知识能力水平, 有必要对实习学员开展规范化培训, 以巩固他们的理论知识、提高他们实际的技术保障能力。我们以高等院校培养的生物医学工程专业的高年级本科实习生为研究对象, 对实习阶段临床工程师技能培训的组织实施策略进行的长期的研究, 借鉴了美国临床工程学会临床工程师认证体系和日本临床工程师认证部门对临床工程师技能培养的要求^[3-4], 也学习了国内同行对临床工程师培养的经验和思路^[5], 同过整合升华和创新获得了一些好的做法和经验, 现总结如下。

1 培训组织方法

规范化培训的方法是理论学习和实践, 通过专业理论学习和轮转达到培训目标。一般可分为两个阶段, 第一阶段为 3 个月, 主要进行基础培训, 学习临床工程有关的基础理论知识与基本技能训练; 第二阶段为 3 个月, 主要进行专业理论和专业技能训练。

临床工程人员在各个部门轮转过程中, 须有指导老师进行带教。带教流程如下:

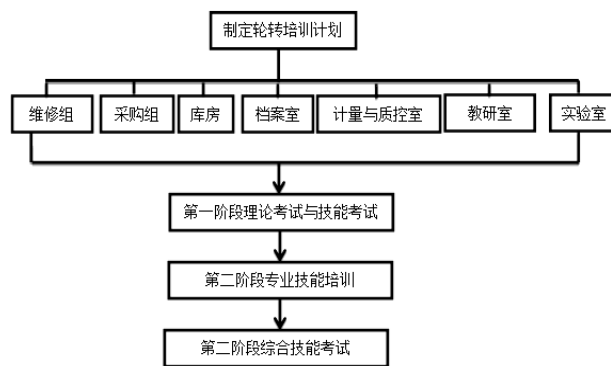


图1 带教流程图

2 培训内容和标准

为保证培训质量，应规定医院临床工程师在各个部门轮转的时间和应完成的最低工作数量，明确每一室组轮转目的（掌握、熟悉与了解的内容）与达到的标准（基本和较高标准）。

针对本科实习学员，临床工程师规范化培训的目标不能太高，因为，目前很多实习学员实践经验缺乏，动手能力较差；也不能太低，否则失去了应有的意义。对这些实习学员，通过规范化的培训，使他们获得独立分析和熟练处理一般条件下本工作岗位事务的能力，熟悉本部门其他岗位工作任务的操作流程，学会处理与临床工作接触时的相关事务。经培训后，其能力水平应介于助理临床工程师和临床工程师之间。

理论培训，不是系统地学习某个专业理论，而是围绕医学工程科的工作任务，系统地学习相关的知识点。如设备耗材采购管理方面，要求熟悉医疗设备购前论证制度、大型医疗设备的需求论证和效益评估分析、进口医疗物资采购流程、招标谈判方式等；设备技术保障方面，应知晓常用医疗设备的基本原理，如呼吸机、高频电刀、B超、磁共振等，知晓医疗设备计量与质量控制法规与技术规范等。

实践培训。在理论培训的基础上，根据医院的每个工作任务和个人将来从事的工作岗位，采用在各个岗位“轮转工作”模式，进一步提高临床工程师的实践能力。实践培训并不是简单的岗位轮转，每个岗位应指定相应的指导老师进行指导，在完成日常工作的同时，还要设计实践考核题目，如设备采购方面可以设计要求其完成几项设备的选型论证报告；耗材发放方面，让其独立完成几类耗材出库操作；设备维修方面，可以人为设置机器几个故障点，要求其在一定期限内独立排除故障等。

培训教材。系统规范的培训教材对达成临床工程师的规范化培训目标是非常重要的。医院医学工程科承担的工作范围宽，任务较多，涉及的知识面广。概括起来主要工作包括设备、器材的招标采购、供应、管理；医疗设备器材的技术保障；医疗设备计量与质控；设备选型与效益评估分析；医务人员设备安全使用培训或技术支持；“三气”供应；结合临床开展科研工作等。因此，理论培训涉及的知识点很多，给培训带来难度。我们编著的《临床工程师规范化培训教程》正是针对培养优秀临床工程师而编著的临床工程师应知应会的知识和技能。

3 培训考核

科学的、标准化的考核方法是指导和评价培训工作的重要依据，考核方案中应突出对培训过程的评估和对学员实践能力的考核。考核方式须笔试与面试相结合、日常考核与结业考核相结合。医院临床工程师在整个培训期间要经历轮转考核、阶段考核和综合考核3个过程。

3.1 轮转考核

考试考核是评价、检验和控制培训质量的重要手段。轮转考核是由轮转科(室)的主任(负责人或上级工程师)主持，按照标准要求，对医院临床工程师在本科(室)轮转期间的学习和工作情况进行考核。不同的部门承担的工作任务不同，因此考核的内容也是不同的。轮转考核采用笔试、实际操作和日常实践相结合的综合考评办法。

考核内容要紧扣培训细则的要求。为了便于指导老师出题和考核内容的全面和完整性，应分别设计每个轮转部门的轮转考核表。

3.2 阶段考核与综合考核

阶段考核和综合考核分别是完成第一阶段和第二阶段培训计划后，培训基地组织的统一考试，包括理论考试和

技能考试。考核合格者由当地卫生局或相关部门授予培训合格证书。医院临床工程师规范化培训是毕业后教育,也是岗位培训,因此它的理论考试命题应牢牢把握医院临床工程师“三基”的内涵,明确医院临床工程师日常工作必须掌握的内容是考试的重点内容。最基本的应知应会内容必须考核,应突出实践应用型内容,区别于普通工程学考试。

我们设计了一系列的实操考核表对被训人员实际技能进行考核,这些技能包括对关键知识点的掌握和对基本技能的掌握等。以维修技术考核为例,实操考核表有三个重要的组成:项目、考评要点和评分标准,这三个部分的内涵是:

(1)项目是培训教程各章书稿中可考核的重要知识点,也就是项目依托于培训教程书稿,并且要在实际中能考,具有可操作性;(2)考评要点就是对于某个项目,要考哪几个方面;(3)评分标准是针对考评要点,被测者在掌握了必要的知识、检修方法、检修步骤,会操作且操作正确的情况下被赋予的分值。每一章的实际技能考核按照百分制计分。我们在维修技术考核部分设计了十张实操考核表,其中彩色多普勒超声诊断仪的维护保养与检修的实操考核表如表1所示。

表1 彩色多普勒超声诊断仪的维护保养与检修的实操考核表

项目	考评要点	分值	评分标准	得分			
机房环境条件	工作环境	20	会用接地电阻测试仪,能区分交流接地、安全接地与防雷接地及其要求:10分				
	仪器接地						
	供电电压						
B型超声诊断仪图像性能测试	探测深度和盲区的测量	20	掌握B超探测深度和盲区测量方法和结果评判:5分				
	横向和轴向分辨力测量						
	横向和纵向位置示值误差测量						
	模拟病灶观察						
	探头的清洁与消毒				30	掌握探头、探头电缆的清洁、消毒保养方法:6分;掌握轨迹球的清洁保养方法(移开固定环、取出轨迹球、清洁内部定位杆灰尘、装回):6分	
	轨迹球的清洁保养						
	空气过滤网的清洗						
	病人数据的导出和备份				10	掌握空气过滤网的拆卸、清洗保养方法与注意事项:6分	
	Error log 错误日志的导出						
	会用U盘或光盘导出和备份病人数据资料:6分						
图像干扰故障	探头	10	能快速查明故障属于探头故障、外环境电磁干扰还是仪器本身故障:5分				
	发射板						
	接收板						
死机故障	过滤网堵塞	10	能快速查明故障属于过热死机故障、系统软件错误死机还是PC机故障死机:6分				
	软件故障						
	PC机故障						
轨迹球故障	清洁轨迹球	10	能快速查明轨迹球故障的原因是因为灰尘过多、轴承失灵还是光耦合器故障:6分				
	机械轴承						
	光耦合器						
合计		100					

考试命题时应设计好或规定好各部分比例,才能不偏科目不偏题。命题时还应注意以下几点:(1)考试内容控制:纯理论的考题宜控制在10%左右,基本知识的考题控制在20%左右,理论应用性考题控制在70%左右为宜;(2)认知层次控制:应用性考题控制在60%以上为宜,理解和记忆性考题控制在40%左右为宜;(3)难易程度控制:中等难度题的比例控制在50%,较难的考题控制在20%以下。另外,考试进行后应做好试卷分析,不断完善考题,充实题库。

4 规范化培训组织实施策略的初步效果

从近两年我们开展规范化实习培训的结果来看,经过规范化培训,学员巩固了临床工程师应该掌握的基础知识、基本技能和基本方法,在遇到具体的设备故障时能按照学习到的检修思路进行科学的分析、测试、故障定位和故障排除,具备了胜任医院临床工程职位的基本能力。因此,我院探索的临床工程师规范化培训的组织实施策略是切实

可行且有效的。

参考文献

- [1] 廖衍忠, 王贤卿, 刘凯.关于临床工程师发展现状的几点建议[J].湖北科技学院学报,2014,34 (2): 202-203.
- [2] 周勇.加强临床工程师的培养与培训[J].基层医学论坛, 2006,10 (5): 1.
- [3] 沈翀.美国临床工程学会临床工程师认证体系概述[J].中国医疗设备, 2010, 25 (11):147-148.
- [4] 桥本胜信, 张学龙.日本临床工程人才培养教育现状及其发展[J].2008,23 (3): 1-5.
- [5] 戚仕涛, 刘铁兵, 汤黎明. 临床工程师规范化培训探讨[J].中国医疗设备, 2012, 27 (11): 121-121.

第一作者简介: 马结实, 男 (1983-), 工学博士, 工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科, 研究方向: 电阻抗测量与成像技术在院前抗休克研究中的应用、脑血流的电阻抗成像评估方法研究。通讯地址: 重庆市沙坪坝区新桥正街 183 号新桥医院医学工程科, 邮编: 400037, 联系电话: 023-68774815, 邮箱: 13636715459@163.com

通讯作者简介: 种银保, 男 (1963-), 硕士生导师, 高级工程师, 第三军医大学新桥医院医学工程科主任, 担任全军医学工程学专委会主委、中国医学装备协会常务理事、重庆市医疗器械学会理事长等。

*通讯作者: chongyinbao@163.net

(医学装备与技术教育培训分会供稿)

基于运维系统质控模块医疗设备 PM 计划的实施

田君鹏, 王加主, 李玉琼

中国人民解放军第 175 医院厦门大学附属东南医院 医学工程科, 福建 漳州 363000

[摘要]随着医院对设备要求越来越高, 医院对先进设备的引进必然也随之增多, 如何降低设备的故障率提高设备的利用率将成为医院工程科难题。我院通过运维系统质控模块制定医疗设备的 PM 计划, 使设备的故障率能长期稳定在较低的水平, 使医院经济效益上升了一个新台阶。本文将对我院医疗设备 PM 计划的实施方案进行阐述。

[关键词]运维系统; 设备管理; PM 计划

Implementation of the medical equipment PM plan based on medical equipment Operation and maintenance management system quality control module/TIAN Jun-peng, WANG Jia-zhu, LI Yu-qiong//The Equipment Department, The No.175 Hospital of P.L.A., Zhangzhou Fujian 363000, China

[Abstract] As hospital to equipment demand is higher and higher, to the introduction of advanced equipment must also increases, how to reduce the failure rate of equipment, improve equipment utilization will become a problem. Our hospital make medical equipment PM plan through medical equipment Operation and maintenance management system quality control module, make the equipment failure rate can Long-term stability at lower levels, make the hospital economic benefits rise a new step. This article will shed light on the implementation plan for medical equipment PM plan.

[Key words] Operation and Maintenance Management System; Equipment Management; PM Plan

1 引言

现代医学在疾病诊断和治疗中已越来越多地依赖于先进的医疗设备, 因此大量先进设备不断地被引进应用于临床诊断、治疗及科研, 使医院的诊断、治疗和科研水平有了很大的提高^[1-3], 如何保证它们这些设备时刻处于良好的工作状态, 最大限度地发挥效益 给医疗设备工程师提出了一个新的难题, 而预防性维护 (preventive maintenance, PM), 将是解决这一难题的有效方法。

PM 是指定期对设备可能发生的故障提前进行检查和维护, 从而提前排除故障隐患^[4], 使设备处于良好的工作状态, 同传统的因故障而维修的方法相比, 大大提高设备的使用率。本文基于我院运维系统质控模块下对 PM 实际操作, 探讨预防性维护的重要性。

2 PM计划生成条件

只有工程师在设备的维修、质量控制中对某一类或者某一台设备长期进行统计，统计其故障时间、故障类型、故障周期等等，才能准确的进行PM计划。现我院设备运维系统质控模块实现了医疗设备周期质控流程的信息化，并提供了丰富的统计查询功能，让我院设备的PM计划能够顺利的展开^[5-7]。

2.1 运维系统 模块介绍

该系统的质控模块包括以下功能：

①质控计划。主要提前当前质控到期的设备系统会提前 7 天在该计划内生成任务，即进入待分配状态。

②启动质控。该步骤为临床科室确认步骤，待临床科室确定该设备为到期设备时，负责器械人员点击启动质控，即进入启动质控状态。

③质控执行。该步骤为设备科工程师执行质控步骤，由组长进行分派到指定的工程师进行质控，质控完成后需要填写质控信息，并提交至主任审批，即进入质控执行状态。

④质控审批。由主任审批，确定该工单质控信息无误，最后审批完成质控过程

⑤报表查询统计。主要是对质控记录和质控部门进行统计对质控过的设备进行数据分析。

质控模块功能界面，见图 1。



图 1 质控模块功能界面

3 PM 计划的实施

基于运维系统质控模块报表查询统计，我们可以准确的查询到设备的维修次数、维修时间、故障原因等，以下我们是以心电监护仪进行 PM 计划的实际例子。

3.1.检测数据统计分析

通过统计其 14 年的数据检测情况，14 年总检测监护仪 338 台，其中故障台件 143 台，故障率为 42%。故障率较高，同时针对故障设备我们做了进一步分析，故障类型分别是血压、心电、血氧、其它这四类，并且故障存在一定的周期性，统计如下表 1 所示。

表 1 14 年心电监护仪的故障类型、次数及周期列表

故障类型	故障次数	平均每台故障周期
无创血压	63	5 个月
血氧饱和度	36	7.5 个月
心率	13	12 个月
电源及其它	31	9 个月

3.2 PM 计划生成

为了降低故障率针对上图 3 的数据分析，从 15 年开始，我们把监护仪设备列入了 PM 计划，针对不同类型故障我们提前进行检查保养等，PM 内容如下表 2。

表 2 15 年心电监护仪的 PM 计划表

故障类型	巡查周期	巡查时间	巡查内容
无创血压	4 个月	3 月份	检测袖带、延长管、气泵
血氧饱和度	7 个月	5 月份	清洁探头及延长线
心率	11 个月	10 月份	清洁导联线及外皮
电源及其它	8 个月	11 月份	检查电源线、整机除尘、电池蓄电情况、外壳等

3.3 PM 计划实施效果

利用运维系统质控模块报表统计功能,经过实施 PM 计划,15 年总检测监护仪 329 台,其中故障台件 89 台,故障率为 27%。通过 14-15 年心电监护仪的故障率统计,见表 3;可看到 14 年较 15 年故障率同比下降 15%,说明基于运维系统下对设备 PM 计划能够有效的降低设备的故障率,进而保证设备的正常运行。

表 3 14-15 年心电监护仪故障次数统计

故障类型	14 年故障次数	15 年故障次数
无创血压	63	39
血氧饱和度	36	25
心率	13	5
电源及其它	31	20

4 小结

医疗设备质控工作对提高医疗器械安全,确保医疗质量,确保患者安全,发挥设备资源效率,不断提高军队卫勤保障水平具有重要意义^[8],而医院设备运维系统的应用,能够更加准确的统计医院各个设备的故障周期,故障率,进而能够有针对性的提前进行 PM 计划,有效的降低医院的设备故障率,较大的降低了设备运营成本,提高设备利用率,让设备的管理更上一个新台阶。

参考文献

- [1] 刘刚,李洋.浅谈医疗设备维护保养的体会[J]医疗装备 2009, 69(11): 69
- [2] 宋孝花.医疗设备科学管理模式分析[J]黑龙江医学.2014, 38(4):483-484
- [3] 陈晓红,任国荃,周丹.医疗设备质量控制体系构建实践与研究[J]解放军医院管理杂志,2008, 15(4):384-385
- [4] 陈曼珊.浅析医疗仪器设备的维护与保养[J]医疗保健器具,2008, 111(5):33-34
- [5] 胡小兰,田君鹏,胡立勇.我院医疗设备“运维”管理系统的应用[J]中国医疗设备, 2012,27(4): 70-71
- [6] 胡立勇,林小灵,李璟.医疗设备质量控制及计量流程化信息系统的应用[J]中国医学装备, 2014, 11(6): 60-61
- [7] 高文娜,胡立勇,黄耀辉.医疗设备开展周期质量控制检测工作方法研究[J]医疗卫生装备, 2015, 36(9): 101-102
- [8] 王文胜,探讨医院医疗设备管理与财务效益分析[J]财务审计, 2014,5(3): 88-89

作者简介: 田君鹏 (1979-), 男, 本科, 工程师, 解放军第 175 医院医学工程科医学工程科, 主要医疗设备管理与维修, 13599660192, E-mail: 13599660192@139.com。
(医学装备计量测试专委会供稿)

基于应用风险分析的医院医疗设备维护管理策略探讨

徐恒 许锋

北京大学第三医院 医学工程处, 北京 100191

[摘要]目的: 现代医学技术飞速发展,相应的医疗设备数量增多,功能增强,设备管理部门应制定合理的医疗设备管理计划,以满足医疗机构对设备使用安全管理的需求;**方法:** 基于应用风险分析制定医疗设备管理计划,并执行预防性维护和安全性能检测;**结果:** 临床医学工程技术人员关注的重点应由被动地接受待维修设备,向设备预防性维护转变,并开展安全性能检测以降低设备故障可能导致的并对患者产生影响的危险;**结论:** 临床医学工程技术人员在提高自身技术水平的同时,也需要关注应用风险并提高其管理策略。

关键词: 应用风险分析; 医疗设备管理计划; 预防性维护; 安全性能检测

Discussion on the strategies for maintenance and management of medical devices of hospital based on the analysis of application risk/XU Heng TIAN Jin XU Feng//Department of Biomedical & Engineering, Peking University Third

Hospital, Beijing 100191, China

[Abstract] Objective: In order to keep up with improvements in equipment technology, as well as with increasing in number of medical equipment, the department of biomedical and engineering should develop a reasonable medical equipment management plan to meet the needs of using safety management of medical institutions; **Methods:** Make up a strategy based on the analysis of application risk and incorporates multiple criteria to formulate appropriate management plan and conduct the preventative maintenance and safety performance inspection; **Results:** The focus of clinical engineering professionals change from passive acceptance to repair equipment to preventive equipment maintenance, and carry out safety performance inspection to reduce the risk caused by the failure of equipment which is harmful to patient; **Conclusion:** The clinical engineering professionals need to pay attention to the application risk and improve the management strategy while they improve the technical level.

[Key Words] Analysis of application risk; Medical equipment management plan; Preventative maintenance; Safety performance inspection

1 引言

现代医学技术飞速发展, 医院医疗设备数量日益增多, 功能不断增强, 现代医院在不断提高临床诊疗水平的同时, 需要更加关注医疗设备在临床诊疗过程中的安全使用问题。设备管理部门和临床医学工程技术人员作为设备管理、维护的主角, 需要关注设备应用风险并改进对医疗设备的管理策略, 集中优势资源改善医疗服务质量, 以保证设备在日常临床诊疗活动中平稳、安全运转。

2 医疗设备维护管理计划

作为医院的职能部门, 医学工程处(科)如何评估设备质量, 如何设置检查和测试周期, 保障设备处于良好的运转及待用状态, 实现医疗资源配置最优化, 既可满足临床需要和病患需求, 又不造成设备空置, 是设备管理方面亟待解决的问题, 也是目前国内医院与国外医院管理水平相比仍存在的差异。

美国医疗机构评审联合委员会(JCAHO, Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations)提出以设备的使用频率和设备故障对病人安全的影响严重程度等因素为纳入标准, 来制定医疗设备管理计划(MEMP, Medical Equipment Management Plan), 并以此为根据定期或不定期对设备进行预防性维护和安全性能检测。

制定医疗设备管理计划是实施有效维护的关键步骤, 这涉及到设备的风险分类、设备的维护要求、设备的功能和故障的发生历史、设备的使用频率和设备故障所导致的风险。在医院内部针对不同医疗设备建立相应的维护及检测程序(时间表), 即医疗设备管理计划, 是提高设备管理水平的基础。

3 应用风险分析

衡量设备风险的标准主要有临床功能、有形风险、故障可避免概率及不良事件记录等四个因素。针对每个因素对设备进行评分, 总分即为该设备的风险得分, 而这正是制定设备维护策略的基础。表 1 给出了呼吸机等设备根据风险衡量标准得到的风险得分情况。

表 1 不同设备风险值分析表

设备类型	临床功能 (0-10)	有形风险 (0-10)	故障发生概率 (0-10)	不良事件记录 (0-10)	管理部门特殊要求 (0-10)	总分
呼吸机	10	8	8	7	7	40
高频电刀	8	8	6	6	7	35
输液泵	8	7	6	6	5	32
血气分析仪	7	6	5	4	3	25
检查台	4	4	3	2	2	15
.....						

从图 1 可以看出, 医疗设备发生故障的概率为一“U”字形: 其中在 $(0-t_1)$ 时间段内发生故障的概率是逐步下降的, 可以归结为设备安装调试到性能稳定的“磨合期”, 时间一般为 $(1-3)$ 个月; 在 (t_1-t_2) 时间段内发生故障的概率是相对稳定的, 且相对较低, 可视为“稳定期”, 时间一般为 $(3-36)$ 个月; 在 (t_2-t) 时间段内发生故障的概率是逐步上升的, 即为“损耗期”。

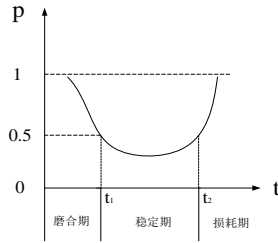


图 1 医疗设备随时间发生故障的概率

为了保证设备有效、安全、可靠运行，医院可以通过分析其现有在用设备的使用状态，以确定最适当的管理维护策略。如何选择医疗设备管理计划的纳入标准，即从哪些方面考虑将设备归入管理计划并有层次、有针对性的开展设备维护工作，是制定医疗设备维护管理计划的前提。表 2 给出了基于病人风险和任务严重程度制定的预防性维护和安全性能检测活动是医疗设备管理计划的例子。

表 2 结合设备故障可能给患者带来的风险和设备担负任务的严重程度制定的预防性维护和安全性能检测活动时医疗

表 2 设备管理计划示例

		设备故障可能给患者带来的风险		
		高	中	低
设备担负任务的重要程度	严重	包括	包括	包括
	重要	包括	可选+	不包括
	必要	包括	不包括	不包括

医疗设备维护管理计划中，开展预防性维护和安全性能检测的设备的纳入标准除了风险因素外还应包括其他标准，如反映了医院的需要和现实情况，以及技术方面的问题。如血气分析仪，其并不直接接触患者，可能不被视为高风险设备，但这台设备所产生的检验结果将直接关系到患者下一步的治疗或护理措施，可靠运行对及时诊断、监测和治疗都是至关重要的，所以也应该纳入医疗设备维护管理计划中，并定期开展预防性维护和安全性能检测。

一般来说，设备的功能及关键程度、物理风险和故障可能导致的危害及维修历史是纳入标准主要考虑的三个方面。纳入标准如图 2 所示。

此外，临床医学工程技术人员也可考虑将他们在日常工作中积累的经验纳入维修计划中。每个医院都可以构建一个独特的适合其性质、任务和需要的纳入标准的模型。

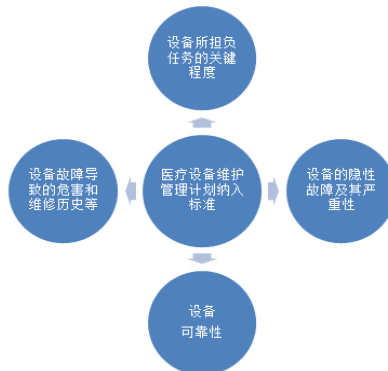


图 2 纳入标准之各要素

4 设备维护策略的确定

在选择了适合医院的纳入模型之后，便可为模型包括的设备确定合适的维修策略。主动型计划维护策略的两种主要形式是预防性维护 (PM, Preventive Maintenance) 和安全性能检测(SPIs, Safety and Performance Inspections)。

临床工程技术人员积累的维修经验表明，在有明确的与使用年限相关的故障模式、以及维护任务在技术上可行

并且其维护成本符合成本效益时优先考虑预防性维护。

在实际工作过程中，安全性能检测主要是检测隐形故障（即故障对于用户来说不是显而易见的）或潜在故障(即一个可识别的状况表明一个功能型故障即将发生或正在发生)，其目的是验证设备是否在合理性能指标范围内运行，及评价由于过度使用或性能退化引起的安全风险。因此，安全性能检测实际上是结合了被动的故障调查任务和积极的预防性维护任务。

预防性维护和安全性性能检测互不重复，相互补充。在每次可能影响安全性能的预防性维护和修理后应进行安全性性能检测。同时，在医疗设备管理计划中没有纳入预防性维护的设备，开展安全性性能检测是保证质量安全的有效补充。

医学工程技术人员需要确定每个设备是否实施 PM 和（或）SPI，以及实施主体、实施频率和实施内容。

通常，医学工程技术人员结合临床的使用模式及的维护经验，并参照设备生产厂家的建议，设定适当的维护程序和频度对达到一定使用年限但尚未出现明显故障的设备实施 PM。而是否需要 SPI 主要取决于设备潜在的故障。在实践中，核实现有医疗设备中每台设备的安全性性能是不切实际的。因此，除大部分设备的 SPI 必须由经过培训的技术人员执行外，部分设备的 SPI 可以由临床使用人员执行。表 2 给出一个使用简化的故障模式和影响分析进行 SPI 决策的例子。

表 2 一个应用简化的故障模式和影响分析安排 SPI 的例子

故障的影响 (对患者或医 疗工作)	故障模式		
	严重 (关键任务或高风险)	用户可检测到的 医学工程技人 员执行 SPI	用户不可检测的 医学工程技术人员执行 SPI
	不严重	临床使用人员执 行 SPI	医学工程技术人员执行 SPI

*用户 SPI 主要包括设备连接到病人后的自检和正常操作的可视化验证，而技术 SPI 将是更详细，更全面的检测。

在实际工作中，考虑到主动性、被动性维护的成本，即平均维护成本，其应为制定、执行 MEMP 的一个参考因素。式（1）所示为参考的平均维护成本的算法。

$$K_C = \frac{1}{T} [P_C * T_P + M_C * T_M] \dots\dots\dots (1)$$

式（1）中 K_C 为平均维护成本，P_C 为单次预防性维护成本，T_P 为预防性维护次数，M_C 为单次维修成本；T_M 为维修次数。

5 小结

通过分析设备的应用风险从而建立一个适合所有医院的 MEMP 是非常困难的。因此，本文讨论的内容更多侧重于方法而不是条文规定。医院的设备管理人员和临床医学工程技术人员必须详细分析设备的风险，并运用自己的专业判断和经验去建立适合自己的维修策略。通过医院 MEMP 的建立，医疗设备管理部门可以激励管理策略的创新发展，为平衡有限的医疗资源和改善患者就医安全和就医质量提供支持与帮助。

参考文献

[1] Wang B. Medical Equipment Management Strategies. Biomedical Instrumentation & Technology, 2006, June: 233-237

[2] Joint Commission on Accreditation of Healthcare Organizations (JCAHO). Sentinel event statistics. Available at: <http://www.jointcommission.org/SentinelEvents/Statistics>. Accessed March 21st, 2006.

[3] 林涛.医疗设备综合管理模式浅析[J].医疗卫生装备, 2004,(3):38-39

[4] 孙小立等.医疗设备的维护管理[J].医疗装备, 2010,(2): 43-44

[5] 尚长浩等.医疗设备动态管理实践与探索[J].中国医疗器械杂志, 2009,33(5):383-385

[6] 张长荣.医疗设备管理中成本控制的要点分析[J].医疗设备, 2011(1):58-59

[7] 田林怀等.医疗设备质量控制刍议[J].中国医学装备, 2011.5,7(5):27-30

[8] 张金葆等.医疗设备质量、安全检测体系的建立[J].中国医疗设备, 2009,24(6):78-80

[9] 李世录, 余巧生.全面质量控制的医疗设备管理探讨[J].医疗装备. 2009(12): 56-57.

[10] 晏妮, 杨东明.医疗设备管理方法浅谈[J].医疗卫生装备, 2009, (270): 86-87.

作者简介：徐恒，男，研究生学历，工程师，就职于北京大学第三医院医工处，从事医疗设备质量控制工作。联系电话 15810534139 / 010-82265923 邮箱 bysy_xuheng@126.com (医学装备计量测试专委会供稿)

中心供氧系统供应意外中断应急演练

黄龙忠

福建医科大学附属三明第一医院 设备科, 福建 三明 365000

[摘要] 通过设置险情模拟中心供氧的供应意外中断, 考查医务人员的应急处置能力以及部门间的协调能力。组织相关人员现场观摩, 提高大家对应急处置的认识, 加大演练的效果。提高医务人员对中心供氧意外中断供应的应急处理的能力, 掌握应急处置流程; 检验本院医用的氧气供应安全, 提升医院的应急响应能力。在演练中发现问题, 为日后的改进提供指导。

[关键词] 中心供氧; 现场观摩; 应急演练; 应急流程图

Emergency drill for emergency disruption of central oxygen supply system

HUANG Long-zhong, The SanMing First Hospital of FuJian Medical University, SanMing, FuJian 365000, China

[Abstract] The emergency response of the supply of the emergency simulation center was interrupted, and the emergency response capability and the coordination ability among the medical staffs were investigated. Organize relevant personnel to observe the scene, improve the awareness of the emergency disposal, increase the exercise effect. Improve medical personnel to central oxygen supply an interruption in the supply of emergency treatment of the ability, grasps the emergency treatment process; the medical oxygen supply security inspection, enhance the hospital's emergency response capability. To find the problem in the exercise, to provide guidance for future improvement.

[Key words] Central oxygen supply; field observation; emergency drill; emergency flow chart

医用氧是医院治疗或抢救病人的常规手段, 在医院治疗过程中起到至关重要的作用, 而中心供氧因经济、使用方便, 更是成为各大医院不可或缺的重要医疗设施。由于本院有一座大楼要拆除, 部分供氧管道需要进行改造, 可能导致大面积停氧。为确保供氧系统正常运行并得到有效监控, 可靠地保障制氧设备及其输送系统的安全性, 防止因天气、自然灾害、设备故障等原因造成氧气中断影响医院业务正常运行, 提高医务人员对中心供氧中断应急处理的认识, 掌握应急流程, 特制定本演练。

涉及部门及人员: 分管院长、医务科、护理部、设备科、信息科、总务科、安全保卫、相关病区主任护士长及值班医护人员。

涉及重点科室: 手术室、ICU、高压氧舱、CCU、急诊科、呼吸内科、神经内科、干部病房、NICU 等科室。

1 成立中心供氧应急领导小组

成员由分管院长、医务科、护理部、设备科、信息科、总务科、安全保卫等部门负责人及技术骨干组成。

工作职责: 对发生供氧事故的现场进行组织协调, 安排救助人员和故障的抢修工作; 考查医务人员对中心供氧中断供应应急处理的认识及应急处理流程的掌握情况; 组织对医院重症患者的急救, 负责向上级领导报告。应急领导小组下设氧气供应保障组、医疗救护保障组、后勤保障组。

(1) 氧气供应保障组: 由医院中心供氧值班人员、设备维修人员及总务科指派人员(应急瓶装氧及吸氧设备运输人员)组成, 由设备科负责协调。

(2) 医疗救护保障组: 由医务科及护理部负责人、各病区主任护长及值班医生、护士组成。

后期保障组: 由分管院长及设备科、总务科、信息科、安全保卫等部门负责人组成。

2 演练实施(总指挥: 分管院长 编排: 设备科)

2.1 情景设定

供氧主管道因工程施工被意外挖断, 造成使用科室供氧压力不足或停气。(以关断科室供氧总阀模拟险情, 由设备科技术人员操作)

时间: 2014年5月31日上午10时;

地点: 呼吸内科;

物资: 备用氧气瓶及吸氧装置1套、便携式氧气袋1个、抢救车;

观摩: 由护理部酌情组织其他科室人员到现场观摩; 由设备科组织所有工程师到现场观摩。

2.2 演练步骤

(1) 护士巡视发现氧流量表浮标指示为零, 立即检查氧气装置是否完好, 检查病人生命体征。(医务科随机提问: 如果此时病人出现气短、呼吸急促、心率加快, 应如何处理?)

(2)护士检查总氧气压力表指示为零或偏低。

(3)护士用备用氧气瓶为患者提供氧气，若吸氧病人较多，氧气瓶不足可用便携式氧气袋应急替代，保证病人生命安全。

(4)护士通知护士长，寻求帮助。

(5)护士长报告供氧中心值班人员、医务科、护理部、设备科。

(6)供氧中心值班人员立即检查设备及管道，发现管道被施工时挖断，马上关闭供氧漏气管道前端最近的阀门，以防发生火灾。同时通知设备科长组织人员抢修，科长通知所有维修工程师到各自责任科室现场巡视、待命。

(7)设备科通知安全保卫部门派安保人员到现场设置隔离带，移除附近易燃物，疏散人员，监控附近不得有吸烟、用火等情况。

(8)设备科组织人员评估抢修所需的时间，上报分管院长，并请信息科在院内信息平台发送停气通知，同时通知医务科、护理部要求各科室医护人员做好氧气瓶的供氧替代，特别是重点科室，供氧设备不足（若吸氧病人较多，氧气瓶不足可用便携式氧气袋应急替代）的马上反馈给供氧中心，由供氧中心调配，总务科协调运送人员负责运送氧气瓶及供氧设备到使用科室。

(9)医务科、护理部同时通知各科室医护人员严密观察患者的生命体征及病情变化，并做好病人及家属的解释工作，并请安全保卫部门派人到重点科室协助维持秩序和防火指导。

(10)若涉及高压氧舱停气时间较长，医务科要上报卫生主管部门备案，以防突发公共卫生事件。

(11)事故管道抢修工作完成，恢复中心供氧，设备科及时通知各部门供氧恢复正常，请各科重新启用中心供氧。设备工程师到各责任区协助完成切换工作，保障设备正常运行。

3 总结与评价

一小时后，中心供氧供应意外中断应急处理演练结束，演练总指挥对演练效果进行总结和评价。参演人员到位及时准确，存在个别人员职责不够明确的情况；演练所需的物资能够保证充足供应，部门间的协调效率不够高，有待进一步改进，本次演练基本达到目的，部分环节有待改进。

通过本预案演练，进一步规范中心供氧的各种管理与应用规则，对设备突发故障，能做到及时应对，不断提高安全意识，确保病人安全。保证医疗设备的安全运行，为医护人员和广大患者提供了安全的工作就医环境。

现场演练记录表设计如下：

表 1 呼吸内科中心供氧系统中断供应应急演练

预案名称	中心供氧中断供应应急处理		演练科室	呼吸内科
演练时间	2014年5月31日上午10时		演练地点	呼吸内科病房
组织人				
演练目的	提高医护人员对中心供氧供应意外中断的应急处理能力			
演练过程	1、责任护士巡视发现氧流量表浮标指示为零，立即检查氧气装置是否完好，检查病人生命体征。 2、值班护士检查总氧气压力表指示为零或偏低。 3、责任护士用备用氧气瓶为患者提供氧气，若吸氧病人较多，氧气瓶不足可用便携式氧气袋应急替代，保证病人生命安全。 4、值班护士通知护士长，寻求帮助。 5、护士长报告供氧中心值班人员，医务科、护理部、设备科，确认中心供氧故障的原因。 6、责任护士严密观察患者的生命体征及病情变化，并做好病人及家属的解释工作。 7、保卫部门隔离事故现场。8、设备科组织抢修，发停气通知，提供备用氧气设备。 9、恢复中心供氧，重新启用中心供氧。			
演练效果评价	人员到位情况	<input type="checkbox"/> 迅速准确 <input type="checkbox"/> 基本按时到位 <input type="checkbox"/> 个别人员不到位 <input type="checkbox"/> 重点岗位人员不到位		
	履职情况	<input type="checkbox"/> 职责明确 <input type="checkbox"/> 职责不明，操作不够熟练 <input type="checkbox"/> 职责不明，操作不熟练		
	物品到位情况	抢救物品： <input type="checkbox"/> 物资充足 全部有效 <input type="checkbox"/> 现场准备不充分 <input type="checkbox"/> 现场物资缺乏		
	协调组织情况	整体组织： <input type="checkbox"/> 准确、高效 <input type="checkbox"/> 协调基本顺利，能满足需求 <input type="checkbox"/> 效率低，有待改进		
	实战效果评价	<input type="checkbox"/> 达到预期目标 <input type="checkbox"/> 基本达到目的，部分环节有待改进 <input type="checkbox"/> 没有达到目标，需重新演练		
	处理结果	<input type="checkbox"/> 处理到位 <input type="checkbox"/> 部分处理不到位 <input type="checkbox"/> 大部分处理不到位		
	急救意识	<input type="checkbox"/> 急救意识强 <input type="checkbox"/> 急救意识薄弱 <input type="checkbox"/> 急救意识差		
演练小结				
存在问题				
整改措施				

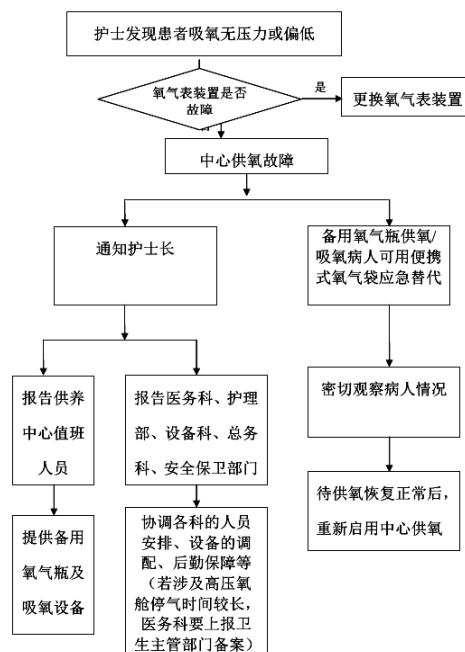


图 1 中心供氧供应中断应急流程图

参考文献

- [1] 王东伟. 医用中心供氧系统及安全管理控制 [J]. 医疗装备, 2012, (1): 50—51.
 [2] 王宁, 戴二黑. 医用供氧系统突发事件应急预案 [J]. 中国医疗设备, 2010, 25 (12): 111—113
 [3] 祁建强. 三甲医院中心供氧系统安装及临床应用 [J]. 中外医疗, 2009, (9): 179

作者简介: 黄龙忠, 男, 1971, 大学本科, 高级工程师, 福建医科大学附属三明第一医院设备科, 从事医疗设备维修、管理、质控工作, 联系电话: 18759721511, E-mail: hlz315@126.com

(医学装备计量测试专业委员会供稿)

近几年我国放射性同位素进出口情况分析

The Situation Analysis of Import and Export of Radioisotope in Recent Years in China

李雪琴¹, 唐桢², 邹冰³, 张婧³, 王刚³, 罗建军³

LI Xue-qin¹, TANG Zhen², ZOU Bing³, ZHANG Jing³, WANG Gang³, LUO Jian-jun³

1 环境保护部核与辐射安全中心, 北京 100035; 2 宁波市环境监测中心, 宁波 315012;

3 环境保护部辐射源安全监管司, 北京 1000342

[摘要] 目的 通过分析放射性同位素的进出口情况, 促进辐射安全监管更加合理、有效、科学。**方法** 利用“国家核技术利用辐射安全管理系统”, 分别对我国近几年放射源和非密封放射性物质的进出口情况进行摸底调查。**结果** 2010年至2014年期间, 我国每年进口的放射源涉及钴-60、铯-137、镅-241等20多种核素; 出口的放射源涉及铯-137、钴-60、镅-241以及氙-85等10多种核素, 类别从I到V类, 尤其是对钴-60辐照装置用源和放射性药品的进出口情况进行分析。**结论** 结合对放射性同位素进出口分析和环保部一系列管理政策和文件的出台, 有效推动了核技术行业的发展, 同时也推动监管部门进一步制定“简政放权”管理制度。

[关键词] 核技术利用; 放射源; 进出口; 辐照装置; 放射性药品

核技术利用在我国经济发展中起到重要作用。在核技术利用事业快速发展的新形势下, 我国核技术利用行业经历了上世纪50年代的开创、60-80年代的开发应用以及90年代后全面发展三大历史阶段, 现已应用于工业、农业、医疗、环保、国家安全等各个领域^[1-8], 并形成具有一定规模、水平及较完整的体系, 也产生了巨大的经济和社会效

益。为实现对核技术利用单位及放射性同位素安全、实时、科学和动态监管, 环保部在国际原子能机构 (International atomic energy agency, IAEA) 放射源监督管理信息系统 (The Regulatory Authority Information System, RAIS)基础上, 结合我国放射源类型多、数量大、情况复杂的特点, 于 2010 年建立了“国家核技术利用辐射安全管理系统” (以下简称“系统”), 对放射性同位素的进出口、转让以及废旧放射源的处理等全过程进行网络化、动态化和科学化监管^[9], 全面提高了监管的效率和信息化水平。为促进我国核技术行业的健康发展, 提高核与辐射安全监管的有效性, 本文通过“国家核技术利用辐射安全管理系统”, 对近 5 年放射性同位素的进出口及发展情况进行分析与探讨。

1 对象和方法

1.1 对象

根据《中华人民共和国放射性污染防治法》(主席令 第六号)^[10]和《放射性同位素与射线装置安全和防护条例》(国务院令 第 449 号, 以下简称“条例”)^[11]的要求, 放射性同位素是指某种发生放射性衰变的元素中具有相同原子序数但质量不同的核素。根据《放射性同位素产品的分类和命名原则》^[12], 放射性同位素是指具有放射性的同位素, 特指半衰期足以供实际使用的放射性核素。本文所指的放射性同位素是狭义的, 只包括放射源和非密封放射性物质。

1.2 法律法规现状

条例规定, 国务院环保部门对放射源的安全和防护实施统一监管。进口列入限制进口目录的放射性同位素, 应当由国务院环保部门审查批准后, 再由国务院对外贸易主管部门依据有关规定签发进口许可证, 并由海关验凭进口许可证办理有关进口手续。出口列入限制进出口目录的放射性同位素, 也应由环保部审查批准后, 再办理有关手续^[11]。2006 年 1 月, 原国家环保总局发布了《放射性同位素与射线装置安全许可管理办法》(国家环保总局令 第 31 号), 规定了核技术利用单位申请进出口放射性同位素的相关要求^[13]。为了更好地指导核技术利用单位进行放射性同位素进出口的申请, 2012 年 6 月中华人民共和国环保部 (以下简称环保部) 公布了《列入限制进出口目录的放射性同位素进出口审查批准》, 详细规定了对放射性同位素进出口审批流程、申请文件、审批时效等相关内容。

1.3 方法

根据《关于发布放射源分类办法的公告》(国家环境保护总局公告 2005 年第 62 号)的有关规定, 按照放射源对人体健康和环境的潜在危害程度, 从高到低将放射源分为 I、II、III、IV、V 类, V 类源的下限活度值为该种核素的豁免活度。在国家核技术利用辐射安全监管系统和全国核技术利用申报系统中, 审批部门可登录系统完成对进出口等审批表的审查和批准; 核技术利用单位申请进出口、转让以及异地使用放射性同位素, 须登录系统并提出申请。通过对 2010-2014 年国家核技术利用辐射安全监管系统中的进出口放射性同位素的情况进行分析, 分析我国和技术利用行业发展状况, 推动辐射安全监管部门采取合理、优化措施进行有效监管。

2 近几年我国放射性同位素的进出口情况

2.1 放射性同位素的进口

2.1.1 放射源的进口总数统计

2010—2014 年, 我国每年进口 20 多种放射源, 主要包括铯-137、铱-192、钴-60、镅-241 等核素, 总数量近 300 00 枚。其中铯-137 源 (7084 枚) 和钴-60 源 (6409 枚) 位居前二, 分别占 24.00%、21.71%, 这两种核素约占进口总数的 50.00%, 2013 年达到最高值, 2014 年有所下降; 其次镅-241 源进口数量为 4630 枚, 铱-192 为 4483 枚, 分别占 15.68%、15.19%; 其它进口核素的情况详见表 1。

表 1 2010-2014 年进口放射源总数及占比

核素	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年	2014 年	总计	占比
Cs-137	437	1056	1597	2482	1512	7084	24.00%
Co-60	426	1399	1303	1717	1564	6409	21.71%
Am-241	677	1546	398	1612	397	4630	15.68%
Ir-192	367	1355	577	1447	737	4483	15.19%
Kr-85	170	365	293	383	590	1801	6.10%
Ni-63	0	378	413	267	523	1581	5.36%
其它	618	645	629	840	643	3533	11.97%

2.1.2 放射源的进口分析

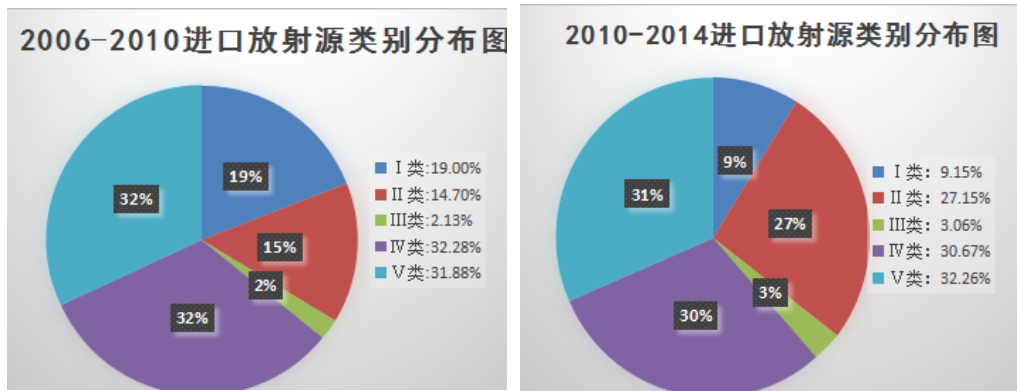


图 1.放射源进口情况

以2010年为分界点(如图1所示),前后两个不同的5年期间, I类放射源进口总数占比从19.00%下降到了9.15%,降了近2/3; II类占比从14.70%上升为27.15%,增长近一倍; III类、IV类以及V类放射源总数占比基本不变。

I类主要为用于辐照加工行业的钴-60放射源,2006—2009年期间,进口总数呈上升趋势,2009年达到峰值(1326枚)^[14];2010-2014年期间,进口总数200~500多枚范围,2014年有下降的趋势。II类放射源主要为医疗伽马刀用钴-60,工业探伤用铀-192,镅-241/铍中子源,以及少量的铯-137^[14]。钴-60源用于医疗伽马刀,少量用于海关港口大型货物安检。通常一套伽玛刀用钴-60源约190-200枚左右,2011-2014年间逐年增加,2014年批准进口了5套伽玛刀,含放射源达1000枚左右;工业探伤用铀-192源进口量在300-1300枚范围内。III类放射源进口相对较少,主要包括医疗后装治疗机用铀-192、钴-60、铯-137以及镅-241/铍等放射源。铀-192源主要用于宫颈癌等恶性肿瘤的治疗,半衰期较短(73.8天),基本每台仪器每年都需要更换一次。IV类、V类源数量较多,核素分布更广,主要为铯-137、钴-60、镅-241及氙-85等20多种核素。IV类源从每年100多枚增加到1000枚左右,V类源从每年200多枚增加到1500枚左右,5年内增加了7-10倍;其次氙-85、锆-68以及氡-3等放射源进口量逐年增加,然而镅-241/铍源有所下降。氡-3和镅-241/铍源主要用于测井行业,考虑到镅-241/铍源等中子源,半衰期长、风险大、废源处置周期更长等因素,测井用氡中子管有很大的发展空间,而且正逐渐取代常用的测井化学源,为测井行业今后的发展方向。

2.1.3 非密封放射性物质进口

2010-2014年期间,我国进口的非密封放射性物质主要有铀-192、钴-60以及硒-75等核素,铀-192核素每年的总活度从 2×10^{15} Bq 逐年增加到 9×10^{15} Bq; 硒-75和钴-60核素也在逐年增加,分别从 $5.4 \times 10^{14} \sim 2.7 \times 10^{15}$ Bq、 $6.4 \times 10^{14} \sim 1.3 \times 10^{16}$ Bq。铀-192、钴-60以及硒-75等核素主要为制作放射源的原料,其次用于各科研院所的科学实验。对于进口的放射性药品及其原料,钼-99(钼-99m)逐年增加,从2010年的每年 5×10^{14} Bq 增加到2014年 1.3×10^{15} Bq; 碘-131核素每年进口的总量在 10^{14} Bq 量级内,2014年有所下降;另外涉及的放射性药品核素还有碘-125、磷-32以及锶-89等。我国每年进口的放射性药品中钼-99(钼-99m)的量是最大的,约占63.02%,碘-131占33.34%、碘-125占3.15%。(如图2所示)。

表 3 2010-2014 年非密封放射性物质进口情况统计

核素	2010年	2011年	2012年	2013年	2014年	总计
Ir-192	2.10E+15	4.54E+15	6.59E+15	8.44E+15	9.13E+15	3.08E+16
Co-60	6.38E+15	1.06E+16	1.31E+16	1.30E+16	4.37E+15	4.75E+16
Se-75	5.27E+14	1.12E+15	1.83E+15	2.67E+15	2.20E+15	8.34E+15
H-3	1.86E+14	2.38E+14	4.26E+14	2.77E+14	1.68E+14	1.29E+15
Am-241	6.38E+12	1.27E+13	7.85E+12	7.13E+12	3.34E+13	6.74E+13
Kr-85	6.74E+12	1.17E+13	7.22E+12	7.26E+12	2.37E+12	3.53E+13
Ni-63	1.85E+11	1.11E+12	1.74E+12	1.26E+12	2.22E+12	6.51E+12
C-14	1.59E+11	6.71E+11	1.01E+12	1.79E+12	2.83E+12	6.47E+12
Cs-137	2.22E+12	2.20E+06	1.85E+11	3.82E+09	3.89E+12	6.29E+12

表 4 2010-2014 年放射性药品及其原料进口情况统计

核素	2010 年	2011 年	2012 年	2013 年	2014 年	总计	占比
Mo-99(Tc-99m)	4.8E+14	7.69E+14	7.53E+14	1.27E+15	1.27E+15	5.18E+15	63.2%
I-131	2.92E+14	3.48E+14	4.05E+14	9.35E+14	7.58E+14	2.74E+15	33.3%
I-125	4.63E+13	2.42E+13	4.14E+13	7.1E+13	7.64E+13	2.59E+14	3.2%
P-32Sr-89,Sm-153	3.99E+12	4.88E+12	4E+12	4.44E+12	4.44E+12	2.18E+13	0.4%

2.2 放射性同位素的出口情况

2010-2014 年期间,我国出口的放射源涉及铯-137、钴-60、镅-241 及氪-85 等 10 多种核素,类别从 I 至 V 类全覆盖;其中铯-137 源的数量达 300 枚左右,其余在 30 至 200 枚左右,出口总数达 800 多枚,出口国家包括德国、加拿大、澳大利亚以及印度等 40 多个国家;我国出口的非密封放射性物质核素种类包括钼-99、碘-131、碘-125 以及铯-137 等 9 种核素,其中涉及的放射性药品有 3 种,出口的国家包括美国、英国、韩国以及蒙古等 10 多个国家,出口钼-99 核素总活度达到 1.6×10^{12} Bq (如图 2 所示)。对于出口到境外的 I、II、III 类放射源,我国始终按照 IAEA《放射源安全和保安行为准则》^[15](Code of Conduct on the Safety and Security of Radioactive Sources)及其补充导则《放射源的进口和出口导则》^[16](Guidance on the Import and Export of Radioactive Sources)的要求,承诺回收出口的放射源。我国设计的钴源辐照装置也已经出口至泰国、越南等国;铯-137/钡发生器已经出口至美国,锶-68/镓-68 发生器已经出口至韩国、马来西亚、印度尼西亚等 7 个国家。

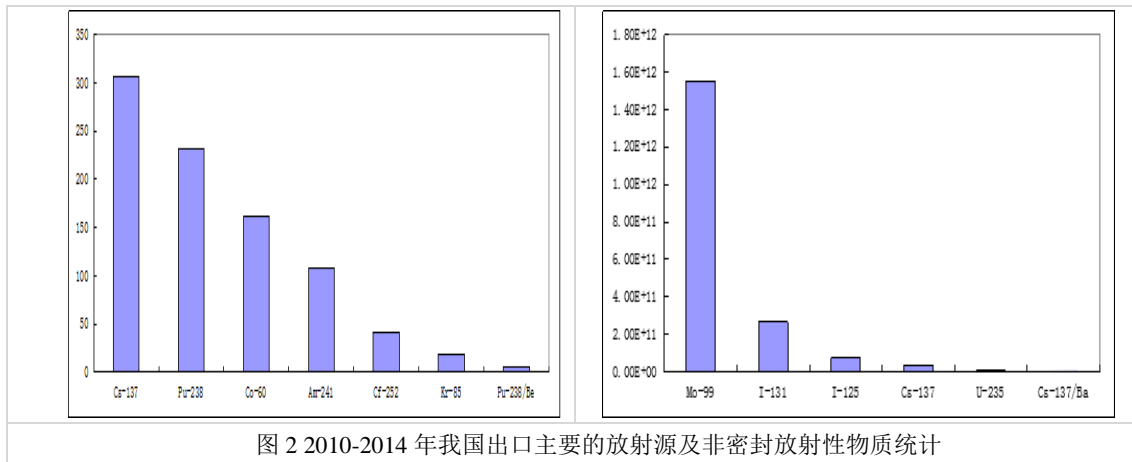


图 2 2010-2014 年我国出口主要的放射源及非密封放射性物质统计

3 讨论

从近五年的放射性同位素进出口情况得出,首先对于辐照加工行业,我国不论技术水平还是管理水平都有了长足的进步。2011 年辐照装置设计装源能力 1.11×10^{16} Bq 以上的钴源辐照装置达到 120 座,实际装源量从 2003 年的 6.66×10^{17} Bq 增长到 2010 年的 1.67×10^{18} Bq 增长了 150.00%,其中设计装源能力 7.4×10^{16} Bq 以上的已达 42 座^[17],辐照装置基本实现设备大型化、产业集团化、装置现代化。在新装置装源和老装置更换旧源导致钴源需求增长的情况下,进口源中 I 类放射源的占比却不断下降。通过分析得出,2010 年之前我国的辐照用源几乎全部依赖进口,2010 年后我国生产高活度钴-60 辐照源能力逐步提升,形成稳定的供应渠道,部分用源单位已转向国内购买,我国辐照用钴源已逐步摆脱完全依赖进口的局面。我国设计的钴源辐照装置也已经出口至泰国、越南等国。

对非密封放射性物质的进口核素分析,20 世纪 90 年代我国先后自主研究生产碘-131 核素,单次生产碘-131 能力均达 10^{16} Bq 水平,实现了稳定生产供应;其次我国已对钼-99/锝-99m、铯-137/钡、锶-68/镓-68 以及锡-113/铟-113m 等多种发生器进行了大量研究,目前已建成完整的钼-99m 药物研究、生产、供应体系,其中以裂变型钼-99/锝-99m 发生器和凝胶型钼-99/锝-99m 发生器的发展和应用最具代表性,这两种制备技术已达到国际先进水平,其中凝胶型

钼-99/锝-99m 发生器实现了稳定批量生产^[18]。另外,一些大型放药生产企业逐步在全国建立多个钼-99m 即时标记药物配送中心,有力地推动了我国现代核医学 SPECT 显像诊断应用的发展。

放射性药品在医学上应用范围很广,可以诊断和治疗多种疾病,其灵敏性、早期性和无创伤性在医学界日益显现出其重要性。我国每年进口的放射性药品中,用于核素显像诊断的钼-99(锝-99m)量最大(63.02%),甲状腺疾病治疗的碘-131 次之,涉及的放射性药品核素还有碘-125、磷-32 以及 Sr-89 等。然而放射性药品的产业规模和发达国家还存在很大差距。以钼-99 为例,全球每周钼-99 的需求量为 4.44×10^{14} Bq^[18],美国占全球钼-99 的消耗量的 55.00%,欧洲 22.00%,日本占 9.00%,韩国占 3%。我国的周消耗量大约 7.4×10^{12} Bq,仅占全球的 1.7%左右。我国 2014 年钼-99 的进口量已达到 1.3×10^{15} Bq,今后将有很大的发展空间。据统计^[19],截止 2013 年年底,国内医院从事核医学专业相关工作的科(室)838 个,PET(CT)检查总数较 2011 年增加 45.30%;开展核素治疗的医疗机构为 610 个,其中甲状腺疾病治疗的占 43.00%,钼-99 亚甲基二膦酸盐占 20.00%,敷贴器(锶-90)治疗 26.00%,磷-32 治疗占 8.00%。另外,国内每年申请生产放射性药品的企业逐年增加,出口的放射性药品涉及钼-99、碘-131 以及碘-125,其制备技术将逐步提高到新的发展水平,应用前景很好。

4 总结

《放射性污染防治法》、《放射性同位素与射线装置安全和防护条例》以及《放射性同位素与射线装置安全许可管理办法》等法规与部门规章的相继颁布实施为辐射安全监管提供法律基础。我国按照“统筹规划、统一标准、分级负责、安全运行、有效监督”原则建立的国家核技术利用辐射安全管理系统,使我国实现对核技术利用单位及放射性同位素安全、实时、科学以及动态的安全管理。

为了对高风险源做到规范、合理的监管,对于进口到国内或出口至境外的 I、II、III 类放射源,我国始终按照 IAEA《放射源安全和保安行为准则》^[16]的要求,承诺返回生产国或承诺回收出口的放射源。为避免出现卡源、运行故障等事件,降低高活度源的风险,环保部出台过一系列管理文件,比如《辐照装置卡源故障专项整治技术要求》、《环保部辐射安全与防护监督检查技术程序》等;而且对于早期使用的废旧源返回生产国,做了很多努力与实践,比如对于从俄罗斯进口的 90 年代的废旧钴-60 源,第一批废源已成功退回俄罗斯,今后将以“进新源同时带旧源”的方式解决我国积压多年的废旧 I 类钴-60 源。这不仅实现高风险源的有效监管,而且也促进了辐照装置行业的健康、可持续发展。为了对放射性药品进行精细化、科学化的辐射安全监管,使其更好地为公众服务,环保部也出台了一系列规范性文件,比如《关于实施碘-125 放射免疫体外诊断试剂使用有条件豁免管理的公告》、《关于放射性药品辐射安全管理有关事项的公告》等,采取了一系列的优化管理措施,同时为了降低医院使用放射性药品以及处理放射性医疗废物的风险,也大力支持大型企业在各地建立药物配送中心,真正做到“服务公众,有效监管”。另外,其中也反映了一些问题,比如对于 V 类源或者豁免源的管理,相关部门正积极进行调研,对相关的法规条例进行全面评估,进一步规范核技术利用项目的管理。在近十年的辐射安全监管中,环保部门积累了大量管理经验,同时也发现了不少问题,需要通过管理的科学化、规范化、精细化使核技术利用事业更上一个台阶。

参考文献

- [1] 唐孝威. 核技术在医学中应用的对话[J].世界科技研究与发展, 2000,22(1):26-29.
- [2] 曲鹏,张琦,杨斌等. 核技术的应用与发展在滨海新区开发开放中的作用[J].中国科技成果,2009,10(12):4-6.
- [3] 郭之虞,王宇钢,包尚联. 核技术及其应用的发展[J].北京大学学报自然科学版,2003,39(z1):82-91.
- [4] 徐步进,核技术与农业[J].中国科学基金,2004,18(3):138-141.
- [5] 吴世旗,金山,郑华. 核技术在大庆油田生产测井中的应用[J].同位素,2003,16(1):10-17.
- [6] 吴志芳,刘锡明,张玉爱. 同位素应用的现状和新进展[J].同位素,2012,25(2):117-123.
- [7] 宋海青,徐旭东,马曦,广东省核技术工业应用状况与许可管理[J].辐射防护通讯,2015,35(5):25-28.
- [8] 袁佐清,核技术在药用植物研究中的应用[J].中草药,2007,38(10):附 5-附 6.
- [9] 周晓剑,彭慧,陈栋梁等,国家核技术利用辐射安全管理系统功能与应用[J],中国科技信息, 2012, 12 (22): 45-45.
- [10] 中华人民共和国主席令. 中华人民共和国放射性污染防治法, 2003.

- [11] 中华人民共和国国务院. 放射性同位素与射线装置安全和防护条例, 2005.
- [12] 国家技术监督局.GB/T 14503-2008 放射性同位素产品的分类和命名原则[S].北京: 中国标准出版社,2009
- [13] 国家技术国家环境保护总局 放射性同位素与射线装置安全许可管理办法[Z].2008-11-21.
- [14] 许忠杨, 邢劲松, 陈栋梁等. 浅谈放射源进口现状及建议[J].中国辐射卫生, 2012, 4 (21) :471-473.
- [15] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Code of Conduct on the Safety and Security of Radioactive Sources[R]. IAEA/CODEOC.Vienna:IAEA,2004
- [16] INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Guidance on the Import and Export of Radioactive Sources[R]. IAEA/CODEOC/IMO-EXP.Vienna:IAEA,2012.
- [17] 张锦荣.中国同位素与辐射技术行业发展现状[Z].2012 中国(成都)核技术应用产业国际论坛。
- [18] 张锦荣, 罗志福.中国放射性同位素技术与应用进展[J].中国工程科学.
- [19] 中华医学会核医学分会. 2014 年全国核医学现状普查简报[J], 中华核医学与分子影像杂志, 2014,34 (5):389-389.

作者简介: 李雪琴(1981-), 女, 博士研究生, 高级工程师; 主要从事核技术利用项目审评;
E-mail: lixueqincdc@163.com

通讯作者: 罗建军, 高级工程师, E-mail: luojianjun@mep.gov.cn.
(核医学装备与技术专委会供稿)

GE ECM 2.3层流风机变频控制器维修

赵安^① 种银保*^① 朱彬^① 种红兵^①

①第三军医大学新桥医院医学工程科
第三军医大学第二附属医院医学工程科 重庆 400037

[摘要] 目的: 以数年未解决的层流室风机变频器维修为例, 探讨以在线测试仪为工具的非图纸芯片级维修的可行性。
方法: 选择在同样条件下(供电冲击)出现故障的血液科层流室风机变频器 8 套, 采用在线测试仪和编程器等工具, 经过手工除胶、在线测试、离线测试和 E²PROM 内容比较等步骤, 确定了 E²PROM 为主要故障点, 继而通过将正确内容写入新的 E²PROM, 实现修复变频器的目的。
结果: 所有 8 套损坏变频器主板中, 有 7 套都有 E²PROM 的故障。其中 4 套为 E²PROM 单一故障, 其他为非单一器件的复杂故障。
结论: 利用在线测试仪可实现好坏芯片的鉴别, 证明了基于在线测试仪进行非图纸维修具有一定的可行性, 但具体应用中应注意甄别处理在线测试隔离不好导致的假阳性。

[关键词] 在线测试仪; 变频器; 芯片级维修; 非图纸维修

Reparation of the wind turbine Variable-frequency Drive of Laminar Flow Room Based upon In-Circuit Tester

ZHAO An, CHONG Yin-bao, ZHU Bin, CHONG Hong-bin

[Abstract] Objective: Taking the maintenance of the wind turbine Variable-frequency Drive (VFD) of Laminar Flow Room as an example, the feasibility of the non-drawing chip level maintenance method by the use of In-Circuit Tester is discussed.
Methods: choose eight sets of fan VFD of Laminar Flow Room as maintenance objects which appeared fault under the same conditions of power shock. After the steps of manual removal glue, online testing, offline test and E²PROM content comparison by using ZD9610 In-Circuit Tester and RF3148 programmer such as, the E²PROM is determined as the main point of failure. By write the right contents to the new E²PROM chips, the purpose of repair inverters is achieved. **Results:** There are 7 have E²PROM fault in all 8 damaged inverter motherboard. One group of the 4 sets is E²PROM single fault. The other group has a complex fault of a single device. **Conclusion:** The identification of chips as good or bad can be achieved by the use of In-Circuit Tester. It is proved that the In-Circuit Tester based non-drawings chip level maintenance has certain feasibility. But specific application should pay attention to false positive identification while online isolation for the testing chip is not good.

[Key words] In-Circuit Tester; Variable-frequency Drive; Chip level maintenance; No drawing maintenance

[First-author's address] Biomedical engineering department of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China, 400037

GE ECM 2.3层流变频控制器是应用变频技术与微电子技术,根据层流室环境的实际需要,靠内部IGBT的通断调整输出电压和频率,来对电机调速,进而达到调控层流病房温湿度的目的^[1]。它主要由整流(交流变直流)、滤波、逆变(直流变交流)、驱动单元、检测单元、微处理单元等组成^[2]。

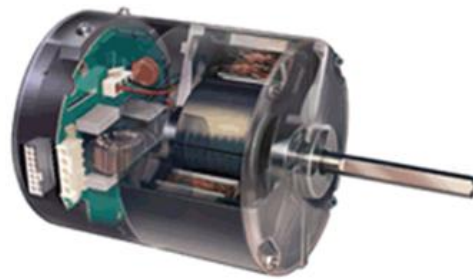
在线测试仪(In-Circuit Tester)是一种重要的电路板芯片级维修工具,它将不同电路板视为各种器件的连接组合,针对具体器件提供快捷有效的测试手段,能够在线检测各种类型的故障,并将定位到集成电路、元件、端口或电路节点上。其关键技术是利用后驱动技术实现在线元器件的隔离^[1]。目前在线测试仪在工业仪器和军事装备的电路测试中应用广泛^[2],在医疗设备维修中较少见。

1 故障现象

我院曾一度因为住院部用电负荷大出现非预期停电,导致层流室风机变频器损坏较多,在给供电线路增加延时启动器之后,变频器故障率大幅降低,提示故障可能是复电之后瞬间冲击电压导致的。由于手上没有该变频器的图纸,变频器主电路板也完全被橡胶塑封,且变频器的安装方式和层流室的各种管道造成维修空间狭小,难以进行现场带电测试,给维修带来了较大的困难。



(a)实物图



(b)内部结构图

图1 层流风机及其变频控制器

2 检修思路

由于手上没有该型变频器任何图纸和资料,仅能在网上找到一些诸如变频器原理的通用资料,采用在线测试仪开展检修成了唯一可行的方法。然而对于不同的器件,应该采用不同的检测方法:

(1) 变频器主板上主要的IC有8794单片机、温控芯片20TWP5、型号为AT93C46B的E²PROM,四电压比较器LM339N。对于LM339N,在线测试仪存有电压比较器测试程序库,可以直接用于测试。对于8794单片机、温控芯片20TWP5、AT93C46B等在测试仪中没有测试库的芯片,只能利用VI曲线比较的方法进行测试:先找到一块好的变频器主板,对这些芯片建立在线VI建库,之后再拿坏板在线测试比较。

(2) E²PROM芯片有其特殊的地方,即使芯片的硬件没有损坏,但其内部程序若被改写,也会造成整机工作不正常。因此,在硬件没有损坏的情况下,还应使用编程器等仪器读出其中的程序,与正常的程序文件进行比较。若二者完全一致,才能说明E²PROM没有问题,否则需要烧写新的E²PROM芯片替换。

(3) 一些主要分立器件,像光耦、IGBT(Insulated Gate Bipolar Transistor,绝缘栅双极型晶体管)、隔离变压器、稳压管等均可以用分立元件的测试方法检测。

(4) 对于贴片的二极管、三极管,分别主要是起保护与开关的作用,由于体积太小(SOT-23封装)、数量又多,主要用万用表检测是否击穿。

3 检修过程

在利用替换法确认了变频器故障之后,断开变频器与系统之间的连接。经测试,220V交流变直流的电源板完好。我们使用万用表和ZD-9610型在线测试仪,首先按照以下步骤对变频器主板进行了故障排查。

(1) 首先是小心拆掉主板的橡胶塑封。由于橡胶层较厚,难以用化学试剂溶解,以手工拆卸为主。注意保护贴片的小三极管和电阻,极易被拆卸工具抠掉。利用万用表对整板贴片二极管、三极管进行了测试,除个别有明显烧糊痕迹的之外,无其他损坏的情况。

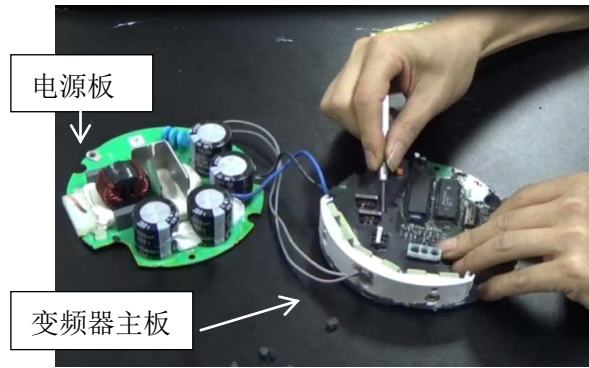


图2 拆卸橡胶塑封

(2) IGBT的测试

IGBT是逆变主回路上的主要器件，通过它的电流较大、开关频繁，因而故障率较高。它是由BJT(双极型三极管)和MOS(绝缘栅型场效应管)组成的复合全控型电压驱动式功率半导体器件，兼有MOSFET的高输入阻抗和BJT的低导通压降两方面的优点。

利用在线测试仪对六个板载IGBT进行了功能测试，其测试方法与场效应管类似，见图3。测试勾VI2对栅极G施加一个可变的电压，以控制流过集电极与发射极之间的电流。选择栅级电压起始值5V，栅级电压终止值10V，递增值0.24V。测试勾VI1施加一个集电极扫描电压 $\pm 15V$ ，集电极串联阻抗选择1K。最后点击“十步循环测试”，得到其正常特性曲线如图4 (a) 所示，显示功能完好。CE击穿的IGBT特性曲线如图4 (b) 所示。

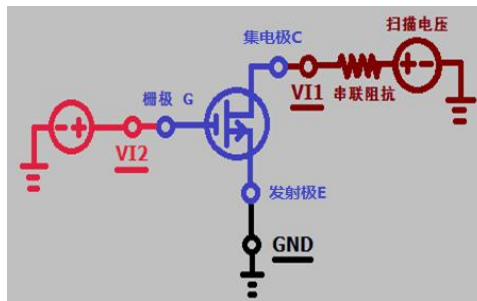
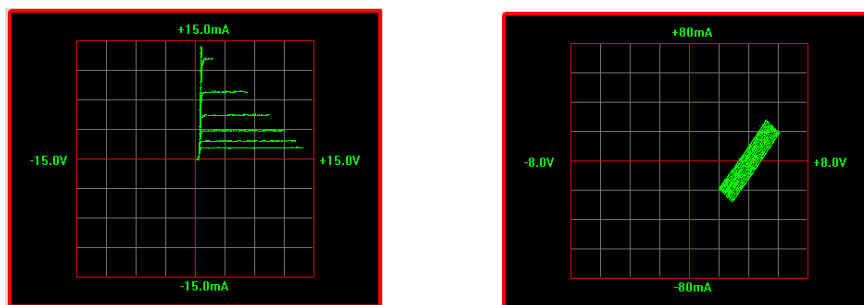


图3 在线测试仪测试IGBT的方法



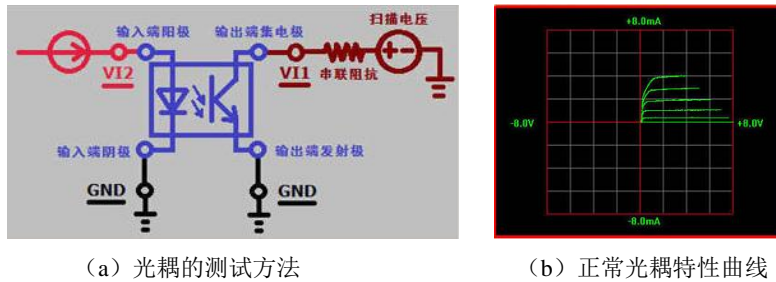
(a)正常

(b)击穿

图4 所测试的IGBT的特性曲线

(3) 光耦的测试

光耦在变频器中主要起到强弱电隔离的作用，从而保护MCU等弱电电路。它的损坏也会导致整机工作不正常。由于光耦在结构上是由一个发光二极管和一个光电三极管所组成，因而正常的光耦也应具有类似三极管的特性曲线。对它的测试方法及其结果见图5，没有发现问题。



(a) 光耦的测试方法 (b) 正常光耦特性曲线

图5 在线测试仪测试光耦的方法及结果

(4) 芯片的测试

剩下的主要就是几块集成芯片，其中包括单片机8794、温控芯片20TWP5、比较器LM339、E²PROM（ATMEL 93C46B）等。

对于 LM339 电压比较器而言，可采用测试夹、测试插座或专用测试钩等，设置好供电电压之后（±12V），测试仪自动在线测试电压比较器的功能，依据其输出峰-峰值电压参数值来判别其好坏。结果如图 6 所示，没有发现问题。

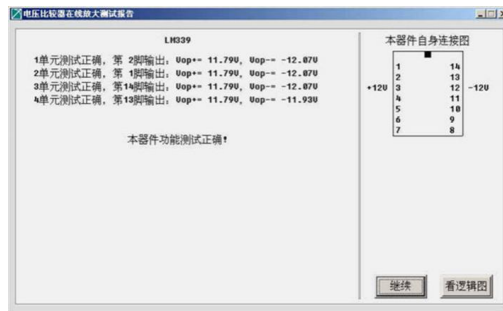


图6 LM339在线测试结果

对单片机、温控芯片、E²PROM这些芯片进行测试，主要采用VI曲线法。即测试仪产生一个变化的电压信号，通过测试夹加在被测对象上，轮流以每一个芯片管脚为电压参考点，同时记录不同管脚不同电压下对参考点的电流，把随电压变化的电流在电压-电流坐标系上表示出来，得到一系列阻抗曲线。在线测试仪会以不同颜色显示好、坏电路板相应芯片VI曲线（蓝色-已学，红色-实测），并自动计算曲线形状差异百分比，使用者根据自身的测试经验进行芯片故障判断。特别需要注意的是，在线测量芯片VI曲线的时候，需要断开板上的晶振。

通过在线测试仪逐一VI测试对比，本文发现一例E²PROM（ATMEL 93C46B）的坏片与新片相比，存在两处差异超过30%。如图7所示，分析6、7脚对参考脚（1脚）的VI曲线，本来应反向导通的（蓝色），变成了反向截止（红色），提示E²PROM可能存在故障。

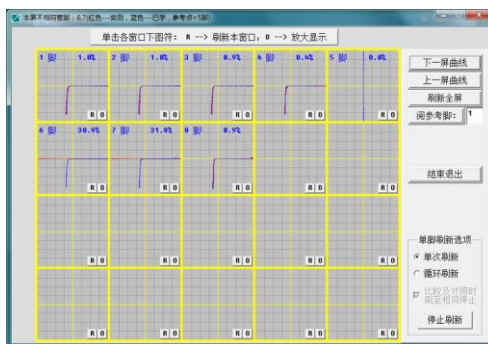


图7 型号为ATMEL 93C46B的E²PROM对比VI测试

本文进一步采用RF3148型编程器来读取E²PROM内的程序和数据，并进行好坏片的内容比较。如图5所示，差异内容以红色高亮字符显示，证实了E²PROM的故障。并且本文进一步发现，少数存在问题的E²PROM，其VI曲线与好片并没有太大差异，只是其中的数据已有所不同。且所有待修的8块电路板中，7块均存在E²PROM的故障。通过将正

确的E²PROM的内容写入新片,本文一举修复了4块变频器主板,节约了可观的维修经费。另外4块主板还有其他器件的故障待排查。

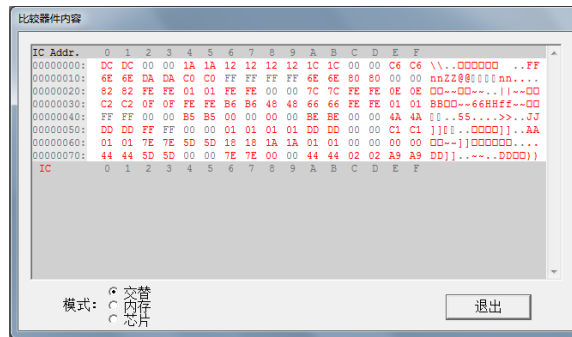


图8 E²PROM内容比较

本文也发现单片机、温度控制芯片等数模混合芯片的好坏片之间也存在多处VI差异,但最终采用替换法证实所测芯片并未损坏,表明在线测试仪具有一定的假阳性率。假阳性产生的原因是复杂的,没有很好的物理隔离导致受其他器件影响可能是主要原因^[1],需要仔细甄别。

4 讨论

板件级维修和芯片级维修是医疗设备常用的两种维修方式。前者是一旦确定故障后整板更换,后者是直接修复故障电路板^[4]。因此,芯片级维修是一种深度维修方式。当前医院拥有的医疗设备品种繁多,芯片级维修所面临的困难越来越大,已经成为医院医学工程科多年来所面临的普遍问题^[5]。究其原因,有以下几点:其一医疗设备原理结构复杂,电路板集成化程度很高,对其进行芯片级维修需要扎实的专业知识和丰富的维修经验;其二,生产厂商出于技术保密和对维修市场的控制,一般不给医院提供电路图、维修手册、维修软件及密码等维修资料。其三,维修工具方法的落后。设备出现故障后,医院工程师一般仅能依靠万用表等简单工具判断故障^[6]。

对于医院自主维修所面临的困境,多年来并未取得突破,导致医院更加依赖厂商的维修力量^[7]。而本文作者所接触的厂商维修工程师,多半只会更换电路板或零配件,很少会开展芯片级维修,从而造成了这样一种现象:本来几十元钱就能解决的元器件故障,却要医院付出上万元的维修费用。而电路板故障往往是因为个别器件功能失效,开展芯片级维修不但可以节约费用和时间,还能锻造出过硬的维修队伍。本文以在线测试仪在层流室风机变频器无图纸维修中的成功运用,抛砖引玉。对于医学工程科来说,任何时候都不应放弃自主维修的尝试和努力,因为这是医学工程科能够存在于医院的根本。

参考文献

- [1] <http://www.gotoevo.com/GEMotors.htm>
- [2] 张作良.基于小波变换和神经网络的电压型变频器故障诊断系统[D].中南大学,控制科学与工程,2008,硕士
- [3] 王侃.用在线测试仪维修医疗设备故障电路板的基本规则.2010年第25卷06期:127-128.
- [4] 高志远,白修宇,潘安宝.军工电子线路板测试技术综述[J].国防技术基础.2007,(2):50-52.
- [5] 陈书林.CT设备电路板芯片级维修[J].医疗装备,2003,16(10):47-48.
- [6] 杜昱铿.大型医疗设备芯片级维修探讨[J].中国医学装备,2011,8(10):89-91.
- [7] 陈书林.用常用仪表维修现代影像设备电路板实践浅谈[J].医疗卫生装备,2008,29(10):362-363.
- [8] 王喜顺.医疗器械电路板的维修浅析[J].医疗装备,2012,25(10):86-87.

第一作者简介: 赵安,男(1979-),博士研究生,工程师,第三军医大学新桥医院医学工程科,从事维修、教学等工作。联系电话:13896131847;邮箱:12923435@qq.com

通讯作者简介: 种银保,男(1963-),硕士生导师,高级工程师,第三军医大学新桥医院医学工程科主任,担任全军医学工程学专委会主委、中国医学装备协会常务理事、重庆市医疗器械学会理事长等。

***通讯作者:** chongyinbao@163.net

(医学装备技术保障专委会供稿)

常见透析机的消毒程序解读

张帆

威高日机装（威海）透析机器有限公司 客户支持部门 山东 威海 264210

[摘要] 目的：对常见品牌透析机的消毒流程进行分析解读，以提高操作者对规范化消毒的认知水平。**方法：**从以下几个方面详细解读和对比三种品牌透析机的消毒程序：消毒液的选择、消毒方式、消毒浓度、消毒液注入量等。**结果：**这三种透析机常用的消毒程序均为热柠檬酸消毒，并且需要定期增加次氯酸钠消毒程序以便去除蛋白质等有机物。**结论：**尽管透析机都有比较完善和有效的消毒程序，但是需要根据实际情况选择合理的消毒程序。如果操作者对消毒程序不了解，重视程度不够，就可能使用不恰当的消毒程序，导致消毒不彻底，影响透析机正常运行、增加感染的风险。

[关键词] 消毒液；消毒浓度；消毒程序

Interpretation of disinfection procedures based on common dialysis machines/ZHANG Fan

[Abstract] Objective: in order to improve operator's cognitive level of standardized disinfection, this paper will focus on analyzing and interpreting the disinfection procedures with some common dialysis machines. **Methods:** this paper will interpret and compare the disinfection procedures using three brands of dialysis machines in the following aspects: the choice of the disinfectant, the disinfection method, the concentration of the disinfectant and the injected volume of the disinfectant, etc. **Results:** the procedures of hot disinfection with citric acid are used completely in those three brands of dialysis machine, and the procedures of sodium hypochlorite are used periodically to remove the proteins and other organic matter. **Conclusion:** although the dialysis machines provide almost complete and efficient disinfection procedures, but the operator should need to select the most suitable procedures according to the situation. If the operators cannot master the disinfection procedures and have not noticed the importance of it, the wrong procedures will cause incomplete disinfection, affect the normal operation of the dialysis machines and risk of cross-infection.

[Key words] Disinfection; Disinfection concentration; Disinfection procedures

[First-author's address] Customer Support Division, Weigao Nikkiso (Weihai) Dialysis Equipment Co., Ltd, Weihai Shandong 264210, China.

理论上细菌、病毒不能穿透完整的透析膜，但透析器存在破膜的风险，且透析膜的孔径能允许部分内毒素及其碎片通过，由此可能引发透析患者一系列急、慢性并发症^[1-2]，另外随着医疗机构内多重耐药菌的不断增多，血液透析中心内多重耐药菌感染的比例也在不断增高，严重威胁着患者的生命^[3]。虽然通过破膜感染的概率很低，但感染风险的仍然存在。加之透析班次间交替的时间紧张，机器消毒程序可能不能很好地完成。治疗时产生的碳酸盐结晶以及蛋白等有机物，在消毒不彻底时会附着在机器内部，并滋生细菌等微生物，影响机器安全运转^[4]。保证机器正常运转、降低感染风险最有效措施就是规范化消毒。透析机厂家通过消毒效果对比，结合了自身设备的特点选择了合适的消毒液和消毒程序。

1 透析机消毒方式的对比

透析机的消毒方式可以通过以下要素进行评价：①有效杀灭细菌、病毒等微生物；②溶解蛋白等有机物；③清除碳酸盐；④对设备零部件的腐蚀、老化等损害较少；⑤化学稳定性好；⑥对人体无害；⑦冲洗后不易残留；⑧消毒时间短；⑨废水造成环境污染小。常用的4种消毒方式比较如表1

表 1 常用的 4 种消毒方式比较： ◎优秀 ○良好 △一般 X 差

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨
次氯酸钠	◎	◎	X	X	△	△	△	△	X
冰醋酸	X	X	◎	○	△	△	△	△	○
过氧乙酸	◎	△	○	X	X	△	◎	△	○
热水柠檬酸	◎	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎

以下重点讲解威高日机装DBB-27C、费森尤斯4008S、百特金宝AK200S三个常见透析机型号的消毒程序。

2 威高日机装 DBB-27C 的消毒程序

2.1 消毒程序

DBB-27C 可根据临床需要自行编制 5 种消毒程序，使用时可自由选择。

DBB-27C 消毒程序主要是以下两种组合：①热水柠檬酸（消毒除菌，除碳酸盐）+ 次氯酸钠（除蛋白有机物）；②次氯酸钠（消毒除菌，除蛋白有机物）+ 冰醋酸（除碳酸盐）。

2.2 消毒浓度

威高日机装推荐使用的消毒液浓度分别是：次氯酸钠有效氯浓度在5%以下；冰醋酸的浓度30%以下；柠檬酸的浓度为50W/V%，其中W/V是质量体积比，50W/V%等于500g/L。

目标消毒浓度是消毒液在机器内部被稀释后具体实施消毒的浓度，稀释后的理想目标浓度分别为：次氯酸钠有效氯为0.1%，冰醋酸为1%，柠檬酸为2W/V%。

2.3 消毒液注入量

消毒液注入量和目标消毒浓度、机器配管容量以及消毒液浓度有关。消毒液注入量的计算方法：

$$\text{消毒液注入量 (ml)} = \frac{\text{配管容量} \times \text{目标消毒浓度}}{\text{消毒液原液浓度}}$$

同一型号机器选配件不同，配管总容量也会有所差异，以DBB-27C机器的标准配置为例，使用微粒子过滤器时，内部配管总容量为1300ml，根据威高日机装推荐使用的消毒液浓度和目标消毒浓度，通过公式可以计算出次氯酸钠吸入量为26ml，冰醋酸吸入量为44ml，柠檬酸吸入量为52ml。

2.4 消毒流程

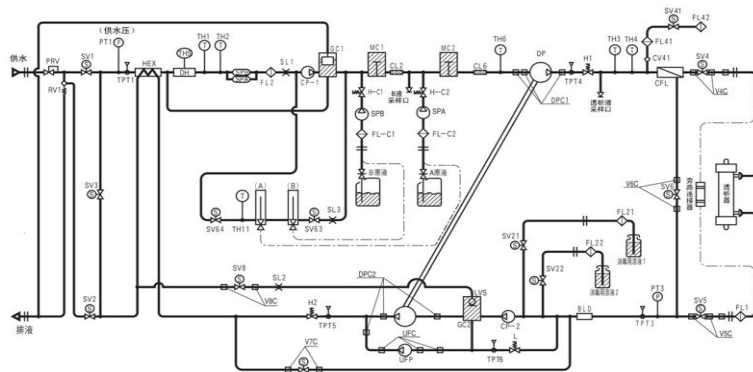


图1 威高日机装DBB-27C配管图

以热水柠檬酸消毒程序为例，包含以下三个步骤：清洗（≥7min）-热水柠檬酸（≥20min）-清洗（≥8min）

根据DBB-27C的流程图（如图1），前清洗阶段，进水电磁阀SV1、排水电磁阀SV2打开，脱气泵、加压泵、脱水泵、A液泵、B液泵按照既定的速度运转，反渗水进入机器对配管进行单向清洗。

热水柠檬酸阶段，依次为：柠檬酸注入→排气→升温→循环→排液滞留→循环。注入阶段，进水电磁阀SV1关闭，排液电磁阀SV2打开，药液消毒电磁阀SV22打开，与此同时，加压泵运转，脱水泵以6L/h的固定泵速将柠檬酸按照已设定的注入量吸入机器，排液管将排出同样容量的液体，如果出现消毒液吸管吸入空气时，被浮子判断出来，机器会立刻提示“消毒桶是否空着？”，提醒操作者添加消毒液或者排除故障。注入完毕后，SV1、SV2、SV22均关闭，循环电磁阀SV3打开，各个泵启动运转，加热器开始工作。当加热器出口温度连续10s ≥80℃时，进入热水柠檬酸循环。在热水柠檬酸循环阶段结束前5分钟进入排液滞留，先排出1L左右的消毒液，在排液管滞留5min，对排液管进行消毒。反渗水补充后，再次进入循环加热阶段^[5]。

后清洗阶段，电磁阀SV1、SV2打开，各个泵运转，反渗水进入机器，冲洗掉机器内部的消毒液。消毒程序结束时机器可以根据设定跳转到待机、自检或者自动关闭电源。

3 费森尤斯4008S的消毒程序

3.1 机器默认了多种消毒程序，根据需要选择消毒/清洗程序。

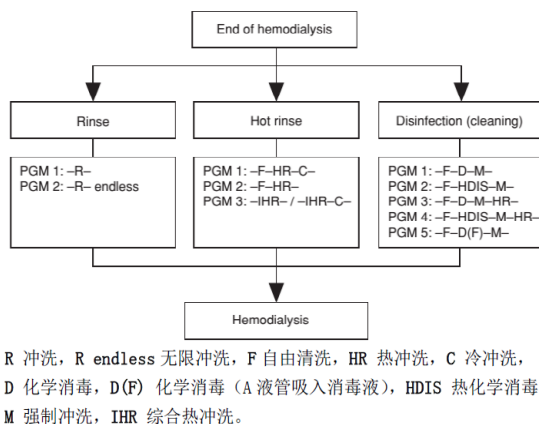


图2 费森尤斯清洗消毒程序

费森常用的消毒是热化学消毒（柠檬酸加热）F-HDIS-M，使用高通量透析器可配合不高于每周一次频率的次氯酸钠消毒程序：A液管前吸F-D(F)-M。

3.2 消毒液浓度

费森尤斯4008S推荐使用消毒液：Citrosteril（C液，活性物质底物为20%柠檬酸）用于热消毒和去钙化，FreseniusPuristeril340（P液，活性物质底物为过氧乙酸）用于消毒和去钙化，可使用Sporotal100（活性物质底物为3.5%次氯酸钠）消毒。

消毒液吸入机器稀释后的目标浓度分别为：柠檬酸约0.8%，次氯酸钠有效氯为0.1%，过氧乙酸的浓度为0.1%。

3.3 消毒液注入量

机器根据所选用的不同机型的配管容量、固定的配比，前吸1:35稀释，后吸1:25稀释，自动默认消毒液注入量，装有透析液过滤器的4008S透析机柠檬酸注入量为66ml，次氯酸钠注入量为50ml。

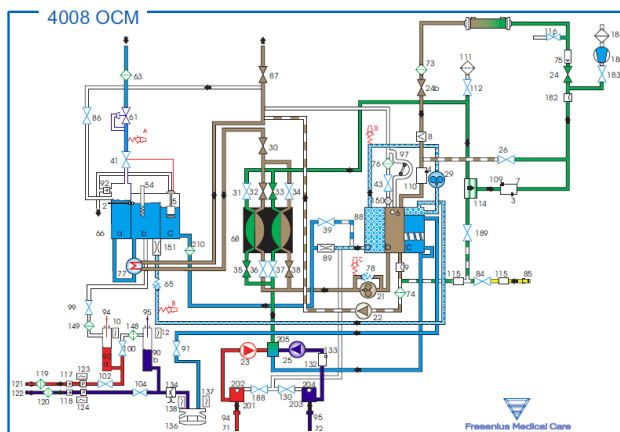


图3 费森尤斯4008S管路图

3.4 消毒流程

根据图3，以热柠檬酸化学消毒程序为例，分为自由清洗约3min，排空、消毒液注入、加热循环升温至80℃需5min，水温在≥80℃以上循环消毒10min，以及排液冲洗10min几个部分。前清洗阶段单向冲洗配管内残留物之后，吸消毒液前有排空，此时，平衡腔关闭，等待浮子开关到达上位。然后V41控制失效，V26、V43、V87及平衡腔新鲜液阀打开，负压泵减速将液体从加热腔抽出，直到浮子开关到达低位。经过一个平衡腔周期后，66c腔中的液位在低位以下约30mL（平衡腔容量）。接着，V43及负压泵关闭，超滤泵（22）经过20次动作，使液位进一步降低，使水箱留出66ml的空间。最后消毒剂阀（V84）打开，经传感器(115)进入循环系统，超滤泵经过66次动作吸取66mL的柠檬酸消毒液，此时水箱浮子开关到达上位。消毒液传感器(115)可检验吸入的是否为导电液体。消毒液吸入量则靠平衡腔、超滤泵和

浮子共同来保证。

吸完消毒液后，排出阀(87) 关闭，再循环阀(86) 打开，形成密闭加热循环，消毒液经稀释后在机器内部管路循环消毒。平衡腔分两个周期：排液周期，V41受浮子开关控制，平衡腔按透析模式运转(V24、V24b、V30、V87打开；V26、V43、V86关闭)将液体排出；在填充周期，平衡腔按照填充程序运转(V26、V43、V86打开；V24、V24b、V30、V41、V87关闭)，同时空气分离泵动作并且超滤泵以最大频率动作。该程序中，V91在每个平衡腔周期开0.5s，以便消毒冲洗腔(90)^[6]。机器保证水路温度≥80℃后消毒循环10min，温度到达80℃时V87打开排出几十毫升的热柠檬酸液体对排液电磁阀附近配管进行消毒，若在一定时间内不能加热到80℃，消毒时间倒计时将倒退重新计时。

循环消毒完毕，V43、V87持续打开，排出液体，水箱水位下降联动进水阀V41打开，超滤泵持续以最大频率动作，进行强制性冲洗。强制性冲洗完成，机器在最后1min对各个阀进行检测，并排空水箱，机器消毒完毕。结束后机器跳转到待机状态，并发出提示音，10分钟后无操作将自动关闭电源。

4 百特金宝AK200S

4.1 消毒程序的选择

AK200S推荐每次治疗后进行热消毒程序+CleanCart-C或液体柠檬酸，至少每隔七个治疗日进行结合CleanCart-A的热消毒程序或结合次氯酸钠的化学消毒程序。

目前临床常用的消毒程序为柠檬酸热消毒和次氯酸钠化学消毒。

4.2 消毒液浓度和消耗量

AK200S（带透析液过滤器）推荐使用的消毒液浓度、稀释浓度、注入量以及时间等消毒参数如下表2所示：

表2 金宝AK200S消毒参数

	热消毒	柠檬酸加热	过氧乙酸	低浓度过氧乙酸	次氯酸盐
浓度		20%	3.5%	0.35%	0.5% 有效氯
机器中浓度		2% 柠檬酸	0.1%	0.01%	0.5%不稀释
注入量		约 230 ml	约 75 ml	约 75 ml	约 2500 ml
清洗灌注阶段	13分钟	15分钟	17分钟	17分钟	25分钟
循环浸泡阶段	15分钟	15分钟	10分钟	10分钟	10 - 20分钟
冲洗排液阶段	4分钟	12分钟	46分钟	31分钟	42分钟
总时间	32分钟	42分钟	73分钟	58分钟	77分钟

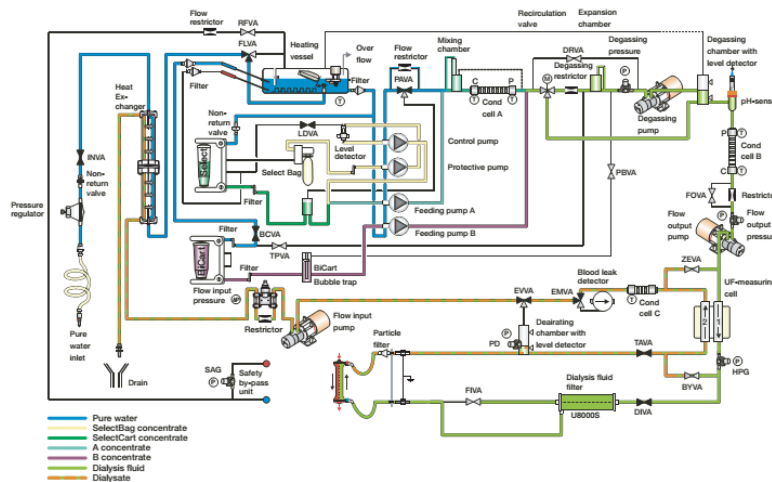


图4 金宝AK200S 配管图

4.3 消毒流程

如上图4，以最常用的热化学消毒程序（柠檬酸加热）为例，消毒程序由连续三个阶段完成：冲洗灌注阶段、循环阶段和清洗排液阶段。此消毒程序的第一步是冲洗灌注，包含清洗、注入消毒液，打开进水阀INVA进水加热后冲洗透析机器内部配管，以便洗掉先前治疗使用的浓缩液残留物。FOVA阀打开，以高流量冲洗，流量输入泵高速运

转,持续排液。

在灌注阶段,首先,流量输入泵运作使加热容器中的水位急剧下降,然后流量输入泵停止工作,通过B液管吸入消毒液,B液泵将柠檬酸消毒液按照已设定的注入量吸入机器水路中。当消毒液吸空或者消毒液浓度不合适时,机器会继续消毒,不能提醒操作者,需要操作者保证消毒液的合格。消毒加热循环阶段,RFVA阀打开,透析器旁路接头通过RFVA阀与水箱连通,负压泵低速持续运转,内部电磁阀交替打开。循环浸泡阶段由一系列配管循环组成,每个循环组成一个消毒序列,热水柠檬酸在配管内循环消毒到每一个部件。在消毒的同时经过输出泵多次输出部分热柠檬酸液体对排液侧配管进行消毒。

清洗排液阶段,先排掉机器内部的消毒液,反渗透水进入机器,水温迅速下降。期间各电磁阀交替打开冲洗,冲洗结束机器对主要腔体进行排空,整个消毒程序结束时机器可以根据设定跳转到待机状态,10分钟后无操作将自动关闭电源。

5 讨论

三个型号机器共同点是均首选热柠檬酸消毒程序,它具有消毒杀菌、除碳酸盐结晶、清除部分蛋白、抑制铁锈附着的作用。但对蛋白清除效果有限,随着高通量透析和血液透析滤过的广泛开展,厂家均建议每周使用一次次氯酸钠除蛋白有机物。他们消毒程序的区别是:DBB-27C在消毒循环阶段通过电导度传感器测量消毒时配管内液体的电导度,并对电导度的数值设定上下限进行报警监视;4008S在消毒液吸入侧装有电导度传感器,判断吸入的液体是否是导电液体;AK200S则需要操作者确认消毒液无误。DBB-27C和4008S均具有标准的循环消毒阶段,循环方式节省能量(加热)和消毒液。AK200S不是严格意义上的循环消毒,消毒循环时,其末端部分管路采用边消毒边排液,这种设计在一定程度上减少了循环的污染,但消耗的消毒液较多,消毒浓度不便于控制。已有透析机厂家设计出供液和排液端进行独立循环消毒的双通道结构,来平衡循环消毒和单方向消毒的优缺点,但目前还未出现成熟的产品。

规范的消毒程序是对消毒液吸入量、消毒温度、有效浓度、有效消毒时间的保证,最终保障消毒质量的可靠性,维持透析设备安全、可持续运行。如果消毒程序不规范,消毒程序就可能成为污染程序,透析机厂家要加强对临床关于透析机消毒方面的指导,使其真正理解规范化消毒的必要性和重要意义。

参考文献

- [1] 刘学军,陆文进,张凌.血液透析机消毒效果的临床观察[J].中华医院感染学杂志,2014,24(1):245-246.
- [2] 田爱辉,曹立云.血液透析设备的消毒[J].中国血液净化,2009,8(1).
- [3] 陶珍晖,曹立云.血液透析感染预防的国内外进展[J].中国护理管理,2013(8).
- [4] 张飞鸿,王聪,周怡.血液透析机消毒作用的探讨[J].中国医学装备,2010,7(3):11-14.
- [5] 董斌,师维超,吴丹.日机装系列血液透析机柠檬酸与热力联合杀菌作用原理[J].中国血液净化,2015,14(10):630-632.
- [6] 庄旭东,叶昌盛,岳小荣,费森尤斯4008S型血液透析机清洗消毒过程及故障分析[J].中国医疗设备,2013,28(06):132-133.

作者简介: 张帆,男,(1986—),本科学历,助理工程师,联系电话:13940249582

E-Mail: zhangfan@wgonikkiso.com

威高日机装(威海)透析机器有限公司 客户支持部门 从事血液净化设备维修工作

医用回旋加速器常见故障维修

盖立俊

赤峰市医院核医学科

[摘要] 目的: 分析回旋加速器报错原因, 及时对故障进行处理。**方法:** 根据回旋加速器操作手册中诊断提示和工作经验积累。**结果:** 能够排除简单的故障, 保证患者的正常影像检查, 降低设备的运行成本。**结论:** 平时使用过程中要做好保养工作。

[关键词] 回旋加速器; 故障诊断; 故障维修

[Abstract] Objective: Analyzing the reason of correct of cyclotron, dealing with fault in time. Methods: According to the cyclotron diagnostic tips in the operating manual and experience accumulated. Results: To rule out simple fault, the patients's normal imaging can be proceeding and reducing the operation cost of equipment. Conclusion: It's important for engineers to do well in maintenance in the daily work.

[Key words] Cyclotron; Fault diagnosis; Fault maintenance

1 回旋加速器概述

PET/CT 作为肿瘤早期诊断的新型医疗设备, 近几年装机的数量不断增多, 而合成 PET/CT 显像剂的正电子核素是由回旋加速器生产的, 因此回旋加速器已成为现代核医学科不可或缺的设备之一。

回旋加速器工作原理是在加速器中心位置的离子源经高压电弧放电使气体电离, 产生粒子束流在半圆型电极盒中运动, 电极盒与高频振荡电源相接为粒子束提供加速电场, 在电场和磁场的作用下, 粒子束在近似螺旋轨道中加速运动, 当粒子束运动轨道半径达到最大且动能最高时被提取系统引出进入靶室轰击靶材料, 从而产生我们所需要的正电子核素^[1-2]。回旋加速器主要由离子源系统、磁场系统、靶系统、射频系统、提取系统、真空系统、水冷系统、屏蔽系统和控制系统组成^[3]。

2 回旋加速器常见故障分析与排除

2.1 故障一

2.1.1 故障现象

在启动磁场的过程中, 磁场电流在 125mA 左右, 突然报错, 错误信息: Fault in RF system, can not set standby mode。射频系统错误, 不能进入待机模式。磁场电流仍然可以升高到 150mA, 但是不在降低, 稳定在 150mA。

2.1.2 故障分析及处理

工程师常规检查发现湿度达到 62%, 由于昨天夜里下雨, 回旋加速器在地下一层, 潮气不易排出, 分析可能是湿度过高导致射频系统不能启动, 因此开启除湿器, 当湿度降到 40% 的时候再次启动磁场, 能够顺利启动, 故障排出。

2.2 故障二

2.2.1 故障现象

早晨启动回旋加速器之前, 日常检查发现 DP 灯处于闪烁状态。

2.2.2 故障分析

检查电源柜, 发现夜间突然停电非正常关机, 间隔几个小时后又非正常启动。一切检查完毕后, 将回旋加速器全部关掉, 按照正常程序重新开机, BP 对真空腔进行抽真空, 期间 DP 灯处于闪烁状态, 表明油扩散泵处于加热, 一般加热 30min^[4], 这个过程是正常现象, 当 BP 将真空腔真空度抽到 7.5×10^{-2} Pa 之后, DP 灯任然处于闪烁状态, 说明温控系统或者加热电路出问题了。用万用表测量电阻显示 31Ω, 加热电路是由两个加热环并联构成, 分别为 31Ω 和 62Ω, 实际并联工作电阻应为 20.7Ω, 因此推断 62Ω 加热环坏了, 更换加热环, 故障排出。

2.3 故障三

2.3.1 故障现象

在加磁场的过程中报错 Fault in RF system. Water flow fault(射频系统水流错误)

2.3.2 故障分析

此类故障可能是 RF 水冷流量偏低，导致二级水冷热交换不完全，达不到抽真空指标，计算机保护性停机。观察 RF1、RF2 二级水流量发现 RF2 的磁悬浮子沉在最低端，加大水流量也不能漂浮，从外观看是水垢积累过多，磁悬浮子卡在了观察窗的外壳上。关闭回旋加速器，取出磁悬浮子，用棉纱布擦拭干净，再超声波清洗仪清洗后重新安装，运行回旋加速器，故障排出。

3 小结

回旋加速器是一种系统繁多、结构复杂的大型医疗设备，各个系统之间联系紧密，任何一个子系统出现故障都会影响回旋加速器的正常运行，因此，工作期间应严格控制其湿度、温度、清洁度及通风性。由专业的质控师进行日常保养和维护是提高回旋加速器使用效率和使用寿命的关键^[5]。

参考文献

- [1] 胡玉民, 梁秀艳, 于丽娟, 等. MINTrace 医用回旋加速器升级后的性能分析[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(8): 126-127.
- [2] 李东, 尚进, 朱洪峰. 回旋加速器射频谐振腔原理分析和故障排除[J]. 医疗卫生装备, 2013, 34(8): 131
- [3] 张虎军, 杨勤, 向艳, 等. 医用回旋加速器的基本原理与组成[J]. 医疗卫生装备, 2007, 28(11): 59-60.
- [4] 陈泽龙. 回旋加速器真空系统原理及故障排除[J]. 医疗卫生装备, 2007, 28(11): 81
- [5] 张虎军, 张超群, 郭正奎, 等. 医用回旋加速器故障维修 2 例[J]. 医疗卫生装备, 2008, 29(1): 118.

作者简介: 盖立俊 男 1988.12.26 硕士研究生 工程师 赤峰市医院 核医学科设备质控与维修

18647650606 gentleglj@sina.com

(核医学装备与技术专业委员会)

浅谈口腔医疗设备维修管理的数据资源利用

Discussion about Data Resource Utilization in Management of Stomatological Medical Equipment Maintenance

王鹏 孙蕾

大连市口腔医院 大连医科大学附属口腔医院 后勤部 辽宁 大连 116021

WANG Peng & SUN Lei/General Affairs Section, Dalian Stomatological Hospital & Stomatological Hospital Dalian Medical University Dalian Liaoning 116021

[摘要]本文介绍了口腔医疗设备的维修管理的特点和方法，并举例说明设备维修数据资源的分析方法和应对措施。通过对故障型维修的数据资源进行有效科学的分析，并根据分析结果对预防性维修措施和计划提出重点和指明方向，可以有效提高预防性维修管理的效率。这将大幅提高口腔设备维修管理的质量，对医院的管理也有着非常现实的意义。

[关键词]预防性维修 故障性维修 数据资源

医疗设备的维修管理是对医疗设备进行维修的系统工程，是医疗设备设计与使用保障之间的纽带，是医疗设备技术管理的主要组成部分；口腔医疗设备因其自身特点，具有故障的频发性和时间的紧迫性，因此，临床对口腔设备的产品质量和维修质量要求较高。在口腔医疗设备的维修管理过程中，如何对日常故障性维修数据资源加以利用和分析，并提出预防性维修计划和措施的方向，对口腔医疗设备的质量控制有着重要的意义。

1 口腔医疗设备维修管理的特点和方法

口腔医学的实践性很强，它不仅依赖于口腔医生的知识、经验、思维判断、技术操作的熟练程度和技巧，很大程度上依赖仪器设备。随着科学技术的发展，电子技术、光学纤维技术、超声技术、激光技术、计算机软硬件技术等口腔医学领域的应用，先进的口腔医疗设备不断投入临床，对口腔设备的维修管理的要求也不断提高。口腔设备的维修管理也成为医院管理的重要组成部分。

维修是指装备在应用和储备过程中，使其保持和恢复有关技术文件所规定和要求的状态，以达到预期工作效能所进行的全部技术活动和管理活动。结合口腔医疗设备的特点，我们将设备维修工作分为预防性维修和故障性维修。

预防性维修是按照一定计划，周期性的对设备进行系统检查、保养、维护工作，以减少或避免偶然故障的发生，延缓必然故障的发生，达到消除隐患，防患于未然的目的，确保设备性能的稳定可靠和有效安全。预防性维修是医疗设备管理质量控制的主要手段。

故障性维修是设备出现故障或预测将出现故障前采取的修复措施；是经过培训的专业人员采用特有的技术手段，检查出设备非正常运行或停止运行的原因，然后以特有的方法和技术将其修复，使设备正常使用的全过程。

通过工作实践我们发现：日常工作中口腔医疗设备的故障性维修十分常见。通过对故障性维修的数据统计和分析，可以指导预防性维修的计划和方案的制定，从而提高预防性维修的效率，达到对医疗设备的质量控制的目的。

2 口腔医疗设备维修的数据统计与分析

2.1 设备维修数据的收集

日常面临的故障性维修频率高，故障种类多，信息量大。为取得真实详尽的第一手资料和数据，必须依靠设备维修人员做日常详细记录。为了鼓励和监督维修人员做好记录应建立以维修记录单为基础的设备维修人员的量化考核机制。同时通过临床使用者的认定和评价，从另一方面印证维修记录的真实性，从而使维修统计数据更加可靠。（见附表 1）

2.2 设备维修数据的分类统计

通常我们将维修数据做如下分类：按照技术种类分电路维修、水路维修、气路维修、计算机软件设置等；按照设备种类和品牌分牙科综合治疗机，预真空灭菌器、牙科手机等；按照临床科室分别统计等多种分类方法。从不同角度分析设备维修数据，可以带来不同角度的管理信息，从而丰富口腔医疗设备管理的层次。

2.3 设备维修数据的分析

通过对维修记录的统计和分析，我们可以从不同角度观察设备运行情况、临床科室使用情况、不同品牌设备的质量等多种信息。我们以某月的统计数据为例，对设备运行等情况做以分析。（见附表 2）

根据以上的数据分析，我们分别采取了及时清理全院水汽分离器，检查所有 E 型牙科综合治疗机的 EPROM 供电电池，通知 D 型设备厂家及时对所有 D 型设备进行检修并更换电路板等预防性维修措施；同时我们通过统计分析对口腔粘膜病科、儿童口腔科等吸唾器使用频繁的科室进行设备保养培训，并定期督查保养情况；对技工室的设备使用进行监管，及时清理喷砂机残渣，并对铸造间的采光窗进行了封闭处理，减少室外灰尘的进入；与医疗管理部门合作对供应室提供的蒸馏水质量进行监测，杜绝不合格蒸馏水的产出与使用。

3 口腔医疗设备维修的数据资源利用的效果

经过一年半的运行管理，2015 年 1 月至 6 月与 2014 年同期比较，全院医疗设备故障次数由 70.7 次/月，下降至 61.2 次/月，同比下降 13.4%；维修费用也相应下降。因此，通过实践我们认为对故障型维修的数据资源进行有效科学的分析，并根据分析结果对预防性维修措施和计划提出重点和指明方向，可以有效提高预防性维修管理的效率。这将大幅提高口腔设备维修管理的质量，对医院的管理也有着非常现实的意义。

表 1 医疗设备维修记录单

设备名称		设备编号	
使用/报修人		使用科室	
故障现象			
报修人:	报修日期:		
故障维修记录			
故障原因:			
处置方式:			
所需配件名称数量:			
维修人:	开始维修时间:	结束维修时间:	
维修结果:			
维修人:	设备科长:	(千元以上维修) 主管院长:	
维修验收意见:			
报修人:	使用科室负责人:		

附表 2 2015 年医疗设备维修统计表 4 月

种类	设备名称	电路维修	水路维修	气路维修	其他维修	统计分析和应对措施
综合治疗机	A 型	3	4	11		气路维修中吸唾器故障为 9 次, 监督临床科室使用后及时清洗
	B 型	1	1	5		气路维修中挂架阀故障 5 次, 疑似压缩机水汽分离器清洗不及时, 造成压缩空气含水量大
	C 型	1	1	1		
	D 型	7	1	3		电路维修中椅位控制电路板故障 6 次, 电磁阀故障 1 次, 应通知厂家对该批次电路板做全面检修, 疑似电路板桥式整流板质量不过关
	E 型	0	1	0	3	停电后, 再次开机原存储信息全部消失需要重新设置, 经查为 EPROM 电池需要更换, 检修同类设备的电池, 统一更换并记录跟换时间
其他设备	F 型铸造机	2	0	0		更换栅极电刷 1 次, 更换主控制交流接触器 1 个, 检修时发现设备内部灰尘过多, 设备间环境需要改造, 更换封闭更好的采光窗
	G 型水式喷砂机	1	3	0		喷砂电机维修 1 次, 水路堵塞 3 次, 检修时发现机器内喷砂室与砂浆过滤网破损, 未及时更换造成喷砂残渣堵塞水路
	H 型牙周治疗仪				6	手柄维修 6 次, 故障原因为手柄堵塞, 检查蒸馏水质量
	K 型预真空灭菌器	2	4			均与蒸馏水质量有关

参考文献

- [1] 张志君. 口腔设备学(第三版). 成都: 四川大学出版社, 2008: 41-54
- [2] 曹荣桂, 赵自林. 医院管理学, 医学装备管理分册. 北京: 人民卫生出版社, 2011:90-98
- [3] 杨海. 医用耗材数据资源利用. 中国医疗设备, 2011(05): 43-46
- [4] 史今驰. 数据挖掘技术在医院信息系统中的应用. 中国医疗设备. 2012(01): 86-88
- [5] 朱晓鸥, 关伟, 黄天明. 标准化医学装备预防性维护模板的建立及评估. 中国医学装备. 2016(4): 109-111

作者简介: 王鹏(1973-), 工程硕士, 高级工程师, 大连市口腔医院后勤部长;

研究方向: 医院后勤保障及医疗设备管理; E-mail: chunyudan@126.com

孙蕾, 本科, 护师, 大连市口腔医院老年病口腔科护士长,

从事本科室内的口腔医疗设备的档案管理和对设备科室报修、监督、评价等管理工作。

(口腔装备与技术专业委员会供稿)