

率较高,但是因为样本数较少,并无指导意义。国外有资料表明:短时间内 CRP 下降,提示预后良好^[5]。所以动态检测 CRP 可预测病情的变化趋势,以便早期给予相应的干预治疗,所以临床工作者在临床诊疗活动中,应引起足够的重视。

参考文献

[1] 舒建. C 反应蛋白检测的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(1): 26-28.
 [2] Dellingerp, Canlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign gudelines managetment of severe sepsis and septic shock[J]. Intensiv Car Med, 2004, 30(6): 536-

555.
 [3] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ES-ISM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definrtions Conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.
 [4] 马丽旭. 血清 C 反应蛋白测定在小儿急性呼吸道感染中的应用[J]. 重庆医学, 2006, 35(13): 1247.
 [5] Lobo SMA, Lobo FRM, Bota DP, et al. C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill perients[J]. Chest, 2003, 123(6): 2043-2049.

(收稿日期: 2011-09-27)

• 临床研究 •

实时荧光定量 PCR 在非典型结核患者纤支液 TB-DNA 检测中的应用

林 虹, 黄好武, 禰彩云(广东省珠海市人民医院检验科 519000)

【摘要】 目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)在非典型结核患者纤支液结核分支杆菌(TB)-DNA 检测中的应用价值。**方法** 收集该院 2009 年 1 月至 2010 年 12 月期间, 526 例临床疑似结核或肺部疾病患者纤维支气管镜检查, 行支气管肺泡灌洗, 取灌洗液进行实时荧光定量 PCR 法检测 TB-DNA, 同时采用常规浓集法涂片查找抗酸杆菌, 比较两种检测方法在结核病患者标本中的阳性检出率。**结果** 526 例肺泡灌洗液中阳性 44 例, TB-DNA 阳性检出率为 8.54%, 常规浓集涂片阳性 12 例, 抗酸杆菌阳性检出率 2.28%, PCR 法检测 TB-DNA 阳性检出率明显高于常规抗酸涂片法($P < 0.05$)。**结论** TB-DNA 定量能显著提高结核杆菌的检出率, 优于传统的涂片、培养等方法, 可作为结核病病原学诊断的首选项目使用。

【关键词】 纤支液; 结核分支杆菌; 荧光探针; 聚合酶链反应

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 05. 033 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0575-02

结核病是一个全球性的问题, 近年来在世界范围内出现流行, 且呈增长的趋势^[1]。近年来由于结核菌耐药菌株的出现, 我国结核病发病又有死灰复燃的趋势, 因此及时准确的诊断和有效规范的治疗是控制结核病流行的有效手段。结核病病原学检查方法主要是涂片和培养, 涂片法尽管在方法学上具有直接、简便的优点, 但敏感性差, 阳性率低。结核分支杆菌(TB)分离培养是结核诊断的金标准, 但 TB 繁殖速度慢, 生长条件要求高, 周期过长。临床上痰菌阴性肺结核病例占肺结核病例比例较大, 我国痰菌阴性肺结核占肺结核总数的 60%~75% 左右。非典型结核患者由于其症状及影像学表现不典型, 容易误诊、漏诊。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测与常规方法比较具有时间短, 敏感度高, 特异性强, 可以少到检出标本中的 10 个结核分支杆菌, 能及早诊断非典型结核患者。本文对本院 2009 年 1 月至 2011 年 6 月临床痰菌阴性的非典型结核患者和其他肺部疾病患者(如肿瘤、肺炎、肺不张等)行纤支镜检查, 人数为 526 例, 取纤支液标本使用荧光定量 PCR 法检测 TB-DNA, 同时用浓集法涂片查找抗酸杆菌的进行分析, 以期临床提供诊断依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 1 月至 2011 年 6 月本院临床痰菌阴性的非典型结核患者或其他肺部疾病患者(如肿瘤、肺炎、肺不张等)纤支镜灌洗液, 人数为 526 例, 其中男 398 例, 女 128 例, 年龄 15~75 岁。

1.2 方法

1.2.1 TB-DNA 检测 采用实时荧光定量 PCR 法 按照试剂

盒的要求对纤支液用生理盐水洗涤沉淀 3 次, 弃上清液。向沉淀加入 DNA 提取液 30 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min。再放入 100 $^{\circ}$ C 干浴器 10 min。冷却后 13 000 r/min 离心 10 min, 取 2 μ L 标本进行 PCR 扩增。反应条件为: 37 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 60 $^{\circ}$ C 30 s 42 个循环, 反应体系为 40 μ L, 扩增完毕直接在电脑上分析产物, 人工观察扩增曲线呈圆滑 S 型且 CT < 38 时, 判为阳性。

1.2.2 浓集法涂片查找抗酸杆菌 取纤支液约 10 mL 加 5 倍量蒸馏水, 经 121 $^{\circ}$ C 高压灭菌 20 min, 冷却后取 10 mL 加蒸馏水至 50 mL 以 3 000 r/min 离心 30 min, 取沉淀物涂片进行抗酸染色, 镜检找抗酸杆菌^[2]。

1.3 仪器与试剂 仪器为 AB7300 荧光 PCR 检测仪, 试剂盒为深圳匹基公司的产品。本试剂盒采用一对 PCR 引物和一个荧光双标记的探针, 该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合, 从而将 PCR 技术和荧光检测技结合起来, 实现了对 TB 核酸的自动化检测。

1.4 统计学方法 对实验数据用 Excel 2003 进行配对检验分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

荧光定量 PCR 法检测 TB-DNA 和浓集法涂片查找抗酸杆菌的结果, PCR 法阳性 45 例 (8.55%), 阴性 482 例 (91.45%); 涂片法阳性 12 例 (2.28%), 阴性 509 例 (97.72%), 两种方法比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

近年来由于结核分支杆菌耐药菌株的出现, 结核病的发病

率又有不断上升的趋势。2000 年我国第四次结核病流行病学抽样调查报告显示,我国现有活动性肺结核病患者 451 万,菌阳肺结核病患者 196 万。临床上非典型结核患者由于其症状及影像学表现不典型,无典型结核胸部 X 线及 CT 表现,病变部位不完全符合结核性改变,尤其无痰或反复痰检阴性容易误诊、漏诊^[3]。目前在我国肺结核的实验室诊断方法有涂片法和分离培养法,涂片抗酸染色是检查结核菌的首选方法,其阳性率与患者排菌量明显相关,排菌量少、易漏检,需要多次送检,直接导致阳性率较低;结核菌分离培养是 TB 诊断的金标准,但 TB 繁殖速度慢,生长条件要求高,周期过长,因此造成全国约有 50% 的肺结核病患者未被发现,给人群造成巨大威胁。纤支镜检查应用于临床以来,应用范围不断扩大,作为呼吸系统的治疗手段,日益广泛,纤支镜对肺结核病,尤其是位于非典型好发部位的肺结核有重要的诊断价值^[4]。支气管镜不但可以直观气管,支气管内病灶,了解病变的程度,而且可以直接从病变部位取样,进行结核菌和病理学检查,显著提高确诊率^[5]。

随着分子生物学技术的发展,特别是核酸扩增技术的发展,把结核病诊断方法推向更高领域。实时荧光定量 PCR 法较常规的培养法,直接涂片法相比具有检测时间短,敏感度高,特异性强的特点。本文采用实时荧光定量 PCR 法检测了 526 例纤支灌洗液,总阳性率为 8.55%,明显高于常规涂片染色法($P < 0.05$),证明 PCR 法优于传统的涂片、培养等方法^[6]。由于本文中的数据仅仅是对所有使用纤支镜检查的患者所留取的纤支液标本,而非严格选择的肺结核患者的标本进行分析的,阳性率较王海宾等^[4]报道的 36.5% 低。

对于不明原因的长期咳嗽、咳痰、喉部水肿、X 线或胸部 CT 提示有结核活动病灶,支气管镜是明确诊断的必要手段,

纤支镜导管对支气管、肺机械性刺激和灌洗可起到疏通引流支气管,促进痰量增加的作用,可提高结核菌的诊断率。实时荧光定量 PCR 是在全封闭状态下实现 PCR 扩增产物的分析,完全杜绝扩增产物的污染而导致的假阳性,结果真实可靠,采用荧光定量 PCR 方法检测冲洗液中 TB-DNA 是快速诊断结核感染的一种方法,其结果可作为结核病的主要诊断依据指标和筛选指标。PCR 技术对于评估临床疗效,疫情的监控,发病的机制和人群的普查都具有重要的意义。

参考文献

[1] 中华医学会结核病分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(2): 70-74.
 [2] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 796.
 [3] 彭勤, 常占平, 汪晓琴, 等. 纤支镜灌洗液的结核分支杆菌快速培养对不典型肺结核的诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2003, 25(3): 143-145.
 [4] 王海宾, 赵磊, 康书慧, 等. 纤维支气管镜检查在肺结核病诊断中的应用[J]. 河北医药, 2010, 33(18): 2533-2534.
 [5] 徐韵. 经纤维支气管镜刷检联合活检对痰菌阴性肺结核患者的诊断价值的初步研究[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(7): 967-968.
 [6] 李素华, 陈莉, 王欢. 荧光定量 PCR 检测 TB-DNA 在各类检样中的阳性率分析[J]. 西南国防医药, 2007, 17(6): 752-753.

(收稿日期: 2011-10-11)

• 临床研究 •

肺性脑病患者血清 S-100β 和神经元特异性烯醇酶的应用研究

程 晖, 汪宏良(湖北省黄石市中心医院医学检验科 435000)

【摘要】 目的 检测肺性脑病患者血清 S-100β 蛋白和神经元特异性烯醇酶(NSE)的浓度, 探讨其临床意义。
方法 29 例健康者为健康对照组, 慢性阻塞性肺疾病患者(COPD)无呼吸衰竭无肺性脑病 26 例, COPD 并发呼吸衰竭 35 例, COPD 并发肺性脑病 38 例。肺性脑病组分为轻型(14 例)、中型(13 例)、重型(11 例)3 组。用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清中 S-100β 蛋白, 用电化学发光法检测血清中 NSE, 并进行比较分析。
结果 COPD 并发肺性脑病组和 COPD 并发呼吸衰竭组血清 S-100β 和 NSE 值明显高于 COPD 组及健康对照组(P 值均小于 0.05), 而 COPD 组与对照组血清 S-100β 和 NSE 值比较差异无统计学意义(P 值均大于 0.05)。肺性脑病重、中型组患者血清 S-100β、NSE 水平显著高于轻型组($P < 0.05$), 重型和中型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。
结论 检测血清 S-100β 蛋白和 NSE 浓度, 对于 COPD 并发肺性脑病及呼吸衰竭的诊断、病情的评估及脑损害的程度具有重要临床意义, 可作为评判颅内损伤的重要指标。

【关键词】 肺性脑病; 脑损伤; S-100β 蛋白; 神经元特异性烯醇酶

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 05. 034 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)05-0576-03

肺性脑病(pulmonary encephalopathy, PE)是慢性阻塞性肺疾病(COPD)最常见且病死率最高的并发症,是因各种慢性肺胸疾病伴发呼吸衰竭、导致低氧血症和高碳酸血症而出现的各种神经精神症状的一种临床综合征。目前主要依靠临床症状和动脉血气分析来诊断,缺乏一个能够诊断脑损害的生化指标。S-100β 蛋白和神经元特异性烯醇酶(neuron specific enolase, NSE)主要分布于中枢神经系统,脑组织损伤后进入脑脊髓液,经血脑屏障进入血液循环。S-100β 蛋白和 NSE 检测已

经被作为脑损伤标记物用于判断疾病是否累及神经系统,神经元损伤的严重程度以及用于评价治疗效果。本研究旨在探讨血清 S-100β 蛋白和 NSE 检测对呼吸衰竭患者肺性脑病的诊断价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 4 月至 2011 年 4 月在黄石市中心医院呼吸内科住院的 68 例 COPD 患者血清,其中男 35 例,女 33 例,年龄 49~89 岁,平均(73.58±9.85)岁。临床诊断及