

2020年第03期 [季刊]总第35期

检验通讯

MEDICAL LABORATORY BULLETIN

科室动态

- 一、热烈欢迎检验科赴京增援核酸检测的“英雄”回家
- 二、检验科荣获全国抗疫微视频大赛金奖

检验与临床

- 一、检验科临床联系问题与回复
- 二、检验科走进临床科室--产科（二十四）

检验动态

检验动态

- 一、检验科抗凝蛋白项目（蛋白S/蛋白C/抗凝血酶）的相关说明
- 二、宏基因组测序技术在新生儿感染性疾病病原体检测中的应用



四川大学华西第二医院
West China Second University Hospital, Sichuan University
临床检验科 主办

一、热烈欢迎检验科赴京增援核酸检测的“英雄”回家

7月13日下午4点，一架银色飞机飞抵成都。我院紧急派往北京增援核酸检测工作的刘芳、常莉、车光璐三位老师顺利完成国家交付的检测任务，在一片热烈的欢迎声中回到了成都。医院牛晓宇副院长、院长助理谭欣老师、检验科主任江咏梅老师、副主任刘小娟老师亲自前往机场迎接了他们。

牛晓宇副院长代表医院对三位老师的回归表示欢迎，对他们在京努力工作，发挥华西二院人“守初心、担使命、敢拼搏”的精神表示肯定。江咏梅主任代表科室欢迎“战友们”的回归。三位老师见到了“家里的亲人”，激动得留下了热泪，和江老师紧紧地拥抱在了一起。

7月27日，经过为期14天的隔离，三位老师平安回到了医院的家庭当中。医院院长刘瀚旻，党委副书记/纪委书记王红静，副院长王晓东、牛晓宇、张伶俐携各行政职能部门员工代表为他们举行了隆重的欢迎仪式。因公无法亲临现场的党委书记王素霞也通过多种方式向凯旋的英雄表示欢迎。检验科各专业组员工代表及三位老师的亲友共计40余人参与了本次活动。

为了迎接“英雄们”的凯旋，医院和科室做了充分的准备。大家制作了精美的标语和横幅，早早地等待在“英雄”回归的路上。本次活动还特别邀请了刘芳的丈夫及一双儿女，常莉的丈夫及2岁的女儿以及车光璐的男朋友参加。多日未见自己的同事和家属，刘芳等三位老师激动不已，和大家紧紧相拥，场面十分感人。

刘瀚旻院长代表医院欢迎检验科三位同志的回归，作为第二批外派抗疫的华西二院员工，他对同志们无畏逆行、不辱使命的精神表示充分肯定。由于多日未见自己的同事和家属，刘芳等三位老师激动不已，和大家紧紧相拥。许多同志流下了感动的泪水。

随后，检验科在研究院三楼学习区开展了简短的欢迎座谈。江咏梅主任对“英雄”和家属进行了逐一的亲切慰问，并以此鼓励全科员工，要一如既往英勇抗疫，为广大人民群众健康保驾护航。

新型冠状病毒肺炎抗疫工作仍在继续，检验科将一如既往奋勇当先、众志成城，骤然成炬，点亮黑暗，为广大患者的平安喜乐、健康幸福不懈奋斗！我们以图片记录战友们的北京增援核酸检测工作。



图 1. 科室召开紧急会议并做好出发前的万全准备



图 2. 出发前科室代表集体送行



图 3. 机场合影

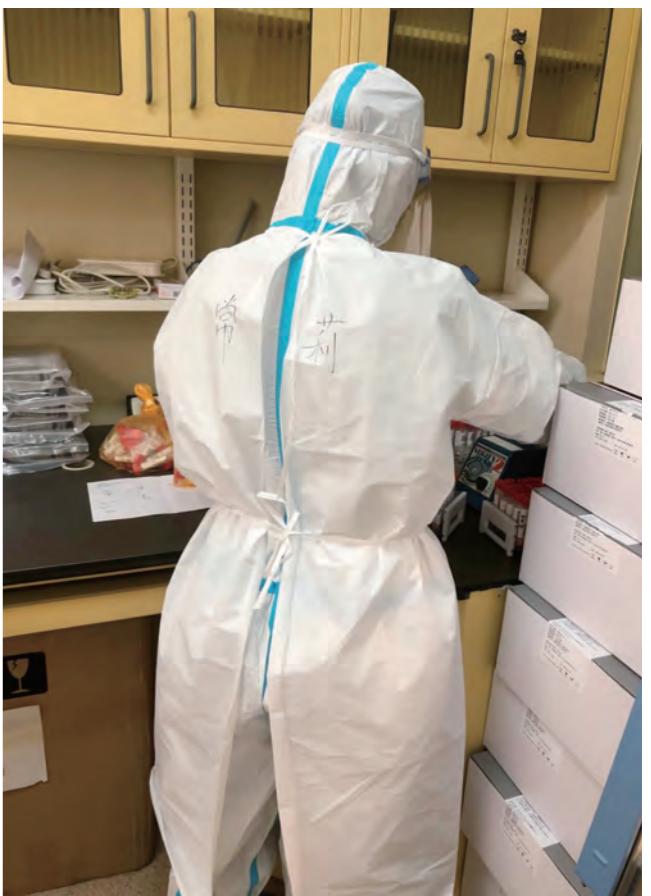
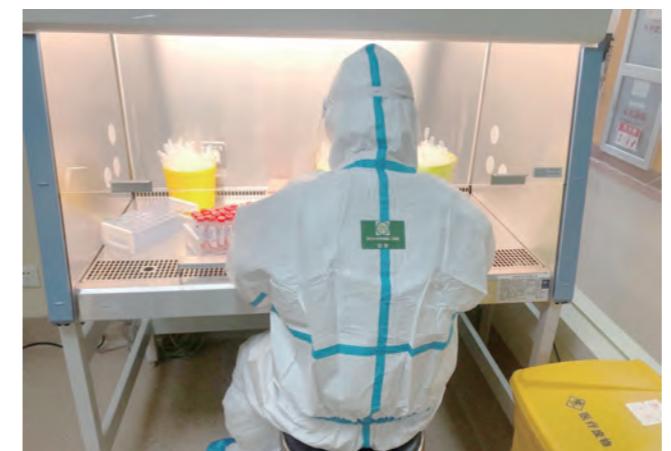


图 4. 刘芳、常莉、车光璐三位老师在北京安贞医院的工作情景



图 6. 三位老师和北京安贞医院同仁们的工作合影



图 5. 三位老师时刻牢记自己作为华西二院检验人的责任和担当



图 8. 欢迎“英雄们”凯旋

图 7. 牛晓宇副院长（左一）代表医院欢迎三位抗疫英雄凯旋归来



图 9. 欢迎仪式

图 10. 我院检验科援京核酸检测队员和其他援京四川队员合影
(第一排左起: 车光路, 常莉, 刘芳)

图 11. 刘瀚曼院长致辞并欢迎援京英雄凯旋



图 12. 医院领导迎接援京核酸检测队员



图 13. 援京核酸检测队员与自己家属久违重逢

二、检验科荣获全国抗疫微视频大赛金奖



图 14. 江咏梅主任携主演——李丰益副主任和分子检测组杨秋霞老师出席颁奖典礼

7月24日,由检验医学传媒面向全国举办的“抗疫微光处·最美检验人”原创短视频大赛顺利闭幕。我院检验科制作的短片《一粒微光 一世安康》经过层层筛选,荣获了大赛唯一的金奖。检验科主任江咏梅老师携主要演员——副

主任李丰益老师、分子检测组的杨秋霞老师出席了颁奖典礼。

《一粒微光一世安康》取材于检验科真实的人物和故事,分别从科室管理层、核酸检测和样本采集三个角度展示了科室老师凝心聚气、全力以赴抗击冠状病毒肺炎疫情的故事。故事真实、感人,体现了检验科“守初心、担使命、敢拼搏”的医学精神。

该视频获得了评委专家和全国观众的一致好评,摘得了金奖桂冠。



图 15. 奖状及奖杯



图 16. 微视频剧照 (一)



过普通的生活，逝普通的芳



医者仁心，小爱却不容易



过普通的生活，流普通的眼泪



图 17. 微视频剧照 (二)



图 17. 微视频剧照 (二)

三、检验科 2020 年首次业务学习盛大开启

每年的 7 月都是新员工、规培生、实习生入职的时候，今年由于疫情的原因，检验科将本年度首次业务学习暨新员工见面会定在了 7 月召开。7 月 23 日晚上，检验科在研究院二楼开展了 2020 年第一次业务学习。为了迎接本次盛会，老师们做了充分准备。本次活动也是科室业务学习有史以来规模最大、内容最丰富、时间最长的一次会议。检验科全体老师参加了培训。

首先，科室邀请新员工作了自我介绍。6 位新员工着正装和全科老师见面，并详细介绍了自己各方面的情况。大家用热烈的掌声欢迎了新员工的到来；接着邀请了档案科主任陈帆老师为大家开展专题讲座——《如何向上级汇报工作》；随后，各组代表以新冠专题各抒己见，发表了思考；根据检验科管理需要，科室通过员工自荐的方式进行了血液组、样本采集组组长及消防管理员岗位的竞聘；检验科党支部书记、副主任刘小娟老师为大家梳理了科室 1-6 月的 KPI 质量指标。

最后，江咏梅主任对此次会议进行总结。她对讲课的每一位老师表示充分肯定，鼓励大家用行动肩负应有的责任，用过硬的本领回应时代的挑战。



图 18. 陈帆主任专题讲座《如何向上级汇报工作》



图 20. 检验科同事积极参与讲座的互动讨论



图 19.2020 年检验科首次业务学习现场



图 21. 王月芳 (左上)、代庆凯 (右上)、柳雪怡 (左中)、徐婷 (右中)、蒋函 (左下) 和刘海 (右下) 六位老师岗位竞聘演讲





图 22. 刘小娟副主任为大家梳理了科室 1-6 月的 KPI 质量指标



图 23. 江咏梅主任对此次会议进行总结

四、迎党的生日 讲战疫故事 悟初心使命 — 检验科召开别开生面的组织生活会

7月9日，检验科党支部创新性召开了远程在线组织生活会，主题是“迎党的生日，讲战疫故事，悟初心使命”。

会议首先由支部书记刘小娟同志讲授微党课“学做共享——坚决打赢防控新冠阻击战：四川大学华西第二医院医学检验科党员同志在行动”。她紧紧围绕“让党旗在防控疫情斗争第一线高高飘扬”的主题，详细地讲述了检验科党员同志在这次疫情爆发伊始到现在进入常态防控阶段中，所发挥的共产党人先锋模范带头作用。特别是分子组和采血组的同志们，承担了全院的核酸检测和标本采集工作。他们冲在第一线，毫无畏惧，不计得失，加班加点，争取医患能第一时间拿到新冠病毒核酸检测报告。

然后，现场连线了我支部正在援京的分子组三位党员同志。四川援京1队临时党支部书记刘芳同志讲述了题为“悟初心、守初心、践初心，在抗疫前线做一个合格的共产党员”的微党课。大家通过她的讲述，了解了援京前线的艰苦环境，繁忙的工作状态，还有他们高昂的斗志，真正体会到共产党员的先锋模范带头作用和坚定的



图 24 微党课现场连线刘芳、常莉和车光璐（从右至左）三位援京党员同志



图 25 柳雪怡同志带来微党课《做最好的自己》



图 26. 华西院区、锦江院区与会党员集体重温入党誓词



图 27. 段义飞同志带来微党课《新冠抗体检测 on the way》

五、检验科团队荣获四川大学“经典诵读者”中华经典美文诵读大赛教师组一等奖

7月1日，第三届四川大学“经典诵读者”中华经典美文诵读大赛结果揭晓。本次活动旨在弘扬中华经典，凝心聚力、共克时艰，鼓动全校师生全力抗击新型冠状肺炎疫情。我院检验科刘兴欣、陈宇心、张梦兰三位老师报送的参赛作品《相信》，荣获了大赛教师组的一等奖。

疫情当前，在科室党团支部老师精心的筹备和指导下，三位老师结合医务人员抗疫的感受，经过充分的准备，认真的排练，运用娴熟的朗诵技能和过人胆识，最终为医院摘得了荣誉。

图 28 获奖名单



图 29. 张梦兰、刘兴欣、陈宇心（从左至右）三位老师倾情演绎

六、检验科团支部荣获四川大学团委多项荣誉

近日，我院在研究院二楼举行了七一表彰大会。检验科团支部在医院党委、团委以及科室和党支部的领导下，荣获 2019 年度四川大学“五四红旗团支部”，并获得医院的“青年之家活动专项奖”；同时检验科团支部书记刘兴欣和宣传委员周岩分别获得 2019 年度四川大学优秀共青团干部和团员。

今后，检验科团支部将继续勠力同心，贡献青年力量。



图 30. 检验科荣获四川大学“五四红旗团支部”称号及医院“青年之家活动专项奖”



图 31. 刘兴欣老师荣获 2019 年度“四川大学优秀共青团干部”



图 32. 周岩老师荣获 2019 年度“四川大学优秀共青团员”

七、全院输血管理委员会 2020年上半年工作总结会顺利召开

7月16日下午，我院输血管理委员会2020年上半年工作总结会在西部妇幼研究院五楼三会议室顺利召开。会议由牛晓宇副院长主持，全体输血管理委员会委员参加了本次会议。

会上，检验科血库组组长陈剑老师对我院今年上半年的输血工作进行了详细的汇报。麻醉科马玉姗副主任就今年上半年我院术中用血及自体输血的情况进行了总结。各位委员就进一步保障我院安全输血工作顺利开展进行了热烈讨论，并达成了可行的共识。

最后牛晓宇副院长充分肯定了全院的输血工作，希望全院相关科室再接再厉，使我院临床输血工作更上一层楼。



图 33. 我院输血管理委员会 2020 年上半年工作总结会现场

八、我院检验科优秀诗歌作品 入选《白衣执甲 - 四川抗疫诗歌精选》

近日，由四川省卫建委主办的“白衣天使——人间有爱”疫情防控主题诗评展活动顺利落幕。检验科竺婷婷、陈宇心、张梦兰等3位老师报送的诗歌作品有幸参评，并入选为优秀作品，收录到了由成都音像出版社出版的诗集《白衣执甲——四川抗疫诗歌精选》当中。

本次活动旨在讴歌广大医疗工作者“敬佑生命、救死扶伤、甘于奉献、大爱无疆”的崇高职业精神，营造全社会尊医爱医的社会氛围。竺婷婷老师的作品《把我的妈妈借给她》，陈宇心老师的作品《战瘟疫》，张梦兰老师的作品《破风》体现了共产党人“守初心，担使命”的理想与信念，同时也展现了医务工作者不畏艰难，甘赴国难，置生死于度外的大医精神，彰显了医院检验人多才多艺的良好风貌！



图 34. 检验科入选优秀作品及作者

	诗歌	作者
186	把我的妈妈借给她	竺婷婷
270	战瘟疫	陈宇心
271	破风	张梦兰

九、重视科研发展，搭建学术平台 —— 检验科新员工开展科研讨论会

重视科研发展，努力为年轻队伍搭建优质学术平台是检验科长期以来坚持的管理理念之一。7月21日，检验科在锦江院区学习区进行了新员工研讨讨论会，科室主任江咏梅老师、支部书记/副主任刘小娟老师、检验科客座教授李明远老师、科研助理石华老师和刘婷老师、研究生及科室近3年入职的员工均参加了此次讨论会。

首先，今年新入职的6名老师们分享了他们在研究生阶段的科研方向，以及入职后科研方面的规划。李明远教授认真聆听了大家的科研汇报，并逐一做了点评和指导，让老师们深有启发、获益良多，也对未来的科研探索之路有了更为深刻的认知。

最后科室主任江老师对此次讨论会进行总结，希望检验科所有员工在做好本职临床工作的同时，加强自己的科研训练，争取取得佳绩，更好地服务临床。



图 35. 检验科新员工科研讨论会现场

十、四川大学华西第二医院输血管理工作顺利通过2020年度四川省输血质控检查

8月19日，经过四川省卫健委、四川省临床输血质控中心、四川省卫生执法大队耐心而细致的检查，四川大学华西第二医院输血管理工作顺利通过了年度四川省输血质控检查，获评为优秀。护理部副主任赵秀芳老师、医务部陶铁军老师、检验科血库组组长陈剑老师以及各相关临床用血科室参与了本次活动。

检查组通过现场督查、考核询问、查阅文件等方式，从医院临床用血组织机构管理、临床用血应急保障、血库建设与发展、血库职责与技术能力、血库质量安全管理、临床科室输血相关技术能力等方面进行了全面而细致的核查。检查结束后，专家组对医院的血液安全工作给予了充分的肯定及表扬，也对临床输血工作中值得改进的地方提出了很好的建议。

在今后的工作中，检验科、临床用血科室将在医院的统一领导下，继续认真贯彻血液安全技术核查专家组的要求，做好安全合理用血工作，履行好救治患者、服务社会的责任。



图36. 检查组查阅血库相关文件



图37. 检查组在血库现场督察及考核提问

十一、弘扬爱国热情 致敬烈士先贤

8月27日，检验科党支部组织全体党员观看了爱国主义教育电影《八佰》。

《八佰》取材1937年淞沪会战期间，讲述了史称“八百壮士”的中国国民革命军第三战区88师524团的一个加强营，固守苏州河畔的四行仓库、阻击日军的故事。

老师们在观看中激动万分，许多老师都留下了感动的泪水。观影后大家纷纷发言，表示要向先辈先烈们致敬，要立足本职工作，为人民健康保驾护航。



图38. 检验科党支部组织全体党员观看爱国主义教育电影《八佰》



图39. 于凡同志分享观影感想

十二、检验科党支部积极组织全体党员观看高校党组织战“疫”示范微党课

7月8日上午9点，检验科党支部组织全体党员收看了高校党组织战“疫”示范微党课第4讲。

党员同志们分别在两个院区同时准时观看。此次微党课由北京航空航天大学党委书记曹淑敏、贵州大学党委副书记令狐彩桃、东北大学扶贫驻村第一书记高大鲲、四川大学华西临床医学院党委书记张伟、重庆大学附属肿瘤医院党委书记吴永忠主讲。每位主讲人从本单位战“疫”实际情况出发，娓娓道来，讲述了身边的抗“疫”故事。

这是一场特殊的组织生活会，党员同志们感触良多，深受鼓舞，纷纷表示，将坚守医务人员的初心，勇担使命、抗疫在前，为广大人民群众健康保驾护航。



图40. 检验科新老院区、“两岸三地”全体党员集体观看战“疫”示范微党课



十三、检验科唐袁婷老师应邀赴华西成华妇女儿童医院开展培训

7月14日，我院临床检验科唐袁婷主管技师应邀到华西成华妇女儿童医院进行为期2个半小时的培训。

唐袁婷老师以“宫颈阴道形态学”为培训主题，讲解了阴道分泌物的涂片及染色方法要点，宫颈阴道常见形态学的识别和质量控制等相关内容。本次培训还进行了摸底考核和培训后现场考核。培训反响热烈，现场学习气氛好，圆满达到了培训的效果。



图42. 唐袁婷老师赴成华妇女儿童医院讲课现场



图41. 成都市成华区妇幼保健院邀请我院检验科唐袁婷老师培训授课邀请函



图43. 唐袁婷老师赴成华妇女儿童医院技能培训及现场考核

十四、我院锦江区检验科样本处理组喜获锦旗一面

6月25日，我院锦江区检验科又收到一面锦旗，这是6月份收到的第二面锦旗。这面锦旗是由一位患儿的父亲所送，是为了向检验科梅兰老师表示感谢。

6月底，一位焦急的父亲抱着他的孩子来到我院锦江区采集血液。由于患者年龄较小，患儿家属十分担心和焦虑。在整个血液采取过程中，梅兰老师不断安抚患儿，并和病人家属沟通交流。采血结束后，梅兰老师又详细交代了注意事项，让患儿家属感到了无微不至的关怀和温暖。



图44. 患儿父亲向梅兰老师赠送锦旗表示感谢

一、检验科临床联系问题与回复

临床联系是检验科一项重要的常规工作，目的是通过听取临床医生的意见建议，加强科室间的协作和理解，优化检验流程，提高检验服务水平，协助临床科室更好地为患者服务。检验科每月都会在科主任的带领下，与各专业组长一起来到各临床科室，及时听取临床医生的意见和建议，并对临床医生所提问题予以及时反馈。现将检验科与临床沟通收集问题汇总解答于下：

2020年8月3日

小儿感染科提问：

多种代谢疾病的报告解读，取样的注意事项及报告时间，串联质谱的特异性和准确性怎么样，当出现结果与临床不吻合时该如何解释？

回复：

(1) 标本采集：血液标本，随时采集末梢血，浸透专用滤纸片，晾干，详细要求等同新生儿筛查，此项标本采集由检验科有新筛采集资格证的老师进行。尿液标本，清洁中段尿4ml（新生儿不能低于2ml）收集于清洁带盖的尿杯中，1小时内送至检验科标本接收处。

(2) 报告解读、报告时间：检验科负责的血和尿代谢指标质谱分析多年以来，都参加了卫健委临检中心主持的室间质量评价，结果良好。目前检验科已与遗传代谢内分泌科达成共识，检验科负责检验，有遗传代谢内分泌科医生负责报告审核及结果解读，取报告时间为10个工作日。

2020年8月6日

小儿感染科提问：

标本类型如脑脊液查免疫分型、甲胎蛋白等需备注或更改标本类型如何操作？

回复：

目前HIS已具备检验医嘱选择标本类型的功能，如不能应用，可以直接在条码上注明标本类型，检验科收到标本后会进行标本类型更改或备注。

2020年8月11日

小儿感染科提问：生化组新项目的介绍见下页。

如有其他新项目需求或疑问，详询88570874

项目	HIS代码	包含项目	采样要求	出报告时间
肾素/醛固酮(卧位)	SSQGT、QGT	肾素、醛固酮	卧位为清晨起床前采血；立位为至少站立2小时；空腹	11点前采集当日16点后出报告；
肾素/醛固酮(立位)	SSQGT、QGT	肾素、醛固酮	立位为至少站立2小时；空腹	11点后采集，次日16点后出报告。
甲状腺蛋白检测	JZXDBJC	甲状腺球蛋白、甲状腺结合球蛋白	无	
促红细胞生成素	CHXBSCS、EPO	促红细胞生成素 EPO	7:00-12:00间采集	
贫血筛查	PXSC、EPOo	缺铁全套、叶酸、VitB12、EPO	7:00-12:00间采集	
降钙素检测	JGS	降钙素 CAL	空腹	
钙磷代谢相关激素	GLDXXGJS、PTH	降钙素 CAL、甲状旁腺激素	空腹	

项目	HIS 代码	包含项目	采样要求	出报告时间
胆汁酸测定	DZSCD、TBA、ZDZS	总胆汁酸、甘胆酸	空腹 14点前采，4小时后； 14点后采，次日11点	
免疫球蛋白 G 亚类	MYQDBGYL、IGGYL	IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4	无 次日11点出。	
游离脂肪酸测定	YLZFS	游离脂肪酸 NEFA	空腹 IgG 亚类周末节假日顺延	
细胞因子检测	XBYZJC	白介素 1 β 、2 受体、 6、8、10，肿瘤坏死因子 α	采集后立即冰浴送检	周二 / 周五 16 点
糖脂代谢指标检测	TZDXZBJC	丙酮酸、 β 羟丁酸 游离脂肪酸、血乳酸测定	空腹 1个工作日	
感染四项	GRSX	C 反应蛋白、淀粉样蛋白 降钙素原、白介素 6	无 4 小时	
维生素 A/E 检测	WSSAEJC	维生素 A、E	无 每周四 16 点	
多种维生素检测	DZWSSJC	维生素 A、B12、D、E、叶酸	无 维 A/E 每周四 16 点 其余 11 点前采血当日下午 16 点	
骨代谢指标检测	GDXZBJC	钙、磷、碱性磷酸酶、维生素 D 降钙素、甲状旁腺激素	无 11 点前采血当日 下午 16 点	

二、检验科走进临床科室 — 产科（二十四）

7月29日，检验科走进锦江院区产科开展临床联系工作。本次活动由血液组组长张鸽老师、急诊组组长于凡老师带队。产科副主任胡雅毅教授、游泳教授、彭冰教授及其他医护人员参加了活动。

在本次联系沟通中，张鸽老师以“血栓指标的临床应用”为题，介绍了血栓的临床特征、主要检测指标、诊断以及治疗监测等相关内容，得到了产科老师的一致好评。

检验科将持续和临床医护人员进行交流和沟通，满足临床需求，从而为广大患者提供优质高效的服务。



图 45. 张鸽老师以“血栓指标的临床应用”为题进行沟通和交流

一、检验科抗凝蛋白项目（蛋白 S/ 蛋白 C/ 抗凝血酶）的相关说明

供稿 血液组 张鸽

蛋白 S

1. 蛋白 S：一种维生素 K 依赖性糖蛋白，是蛋白 C 系统的一种辅因子，在循环中有两种形式：40%~50% 为游离形式，其余与补体成分 C4b 结合蛋白 (C4b-binding protein, C4b-BP) 结合，只有游离形式具有活化蛋白 C (activated protein C, APC) 辅因子活性，在 PS 的存在下，APC 能够以增加的速率灭活因子 V a 和 VII a，从而减少凝血酶生成，也作为蛋白 C 的辅因子增强纤溶作用，并通过与其他凝血因子的相互作用直接抑制凝血酶原活化。

2. 为保证所有类型的遗传性蛋白 S 缺陷症均能被检出，检验科选使用凝固法检测蛋白 S 的活性而非抗原。

3. 目前提供的参考范围仅针对非孕健康成人，鉴于在妊娠中晚孕阶段蛋白 S 水平以及活性将明显下降，目前提供的参考范围不适合于产科人群。

4. 目前尚无公认的产科人群蛋白 S 缺陷症的诊断阈值，部分研究中产科人群的蛋白 S 孕期相关参考范围如下，鉴于蛋白 S/C 的高值无特殊的临床意义，重点关注参考范围的低值：

早孕：51.93~82.91

中孕：42.79~72.31

晚孕：35.68~59.30

李玲玲，王媛媛，秦燕飞，等. 不同孕期健康妊娠妇女血浆蛋白 S 水平及凝血指标的变化 [J]. 新医学，2014, 000(007):440~443.

13~20 weeks: 34~93

21~28 weeks: 35~81

29~34 weeks: 25~85

35~42 weeks: 25~86

Szecsi PB, Jørgensen M, Klajnbard A, Andersen MR, Colov NP, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy.

Thromb Haemost. 2010;103(4):718~727. doi:10.1160/TH09-10-0704

早孕：57~95

中孕：42~68

晚孕：16~42

Lefkowitz JB, Clarke SH, Barbour LA. Comparison of protein S functional and antigenic assays in normal pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 1996;175(3 Pt 1):657~660. doi:10.1053/ob.1996.v175.a73866

中孕：28.6~49.2

晚孕：23.8~38.6

Paidas MJ, Ku DH, Lee MJ, et al. Protein Z, protein S levels are lower in patients with thrombophilia and subsequent pregnancy complications. J Thromb Haemost. 2005;3(3):497~501. doi:10.1111/j.1538~7836.2005.01158.x

鉴于上述研究中的参考范围界定均非严格遵循 NCCLS-C28A 的要求，且蛋白 S 测定在人群以及检测系统间存在差异，难以进行验证，同时有文献提及蛋白 S 活力越低，不良妊娠结局的可能性越大。因此，个人建议目前中孕使用 42%，晚孕使用 25% 作为遗传性蛋白 S 缺陷症的筛查限。待我科进一步收集数据后进行相应调整。同时，为了筛查遗传性易栓症，评估血栓风险，建议尽量在孕前或者孕早期进行蛋白 S 的活性检测，以规避妊娠期蛋白 S 活力检测参考范围的不确定性。

5. 检测的影响因素：

狼疮抗凝物将会影响蛋白 S 的水平，可升高也可降低。

华法林—导致蛋白 S 降低，建议在疑似蛋白 C (或蛋白 S) 缺乏患者已经停用口服抗凝治疗后至少 2 周进行检测。

肝素—常规剂量的肝素（包括低分子肝素）不影响蛋白 C 以及 S 的检测结果。

活化蛋白 C 抵抗：可导致假性蛋白 S 活性下降，但鉴于中国人群特征，基本无 V 因子 Leiden 突变，无需进行活化蛋白 C 抵抗的相关检测。

6. 获得性蛋白 S 下降

急性血栓性疾病：如 DIC

HIV 感染

肾病综合征

肝脏疾病

使用门冬酰胺酶或激素治疗，包括避孕药物。

蛋白 C

1. 蛋白 C：

一种在肝脏合成的维生素 K 依赖性蛋白质。以酶原形式循环，在活化为丝氨酸蛋白酶—活化蛋白 C (activated protein C, aPC) 后发挥其抗凝功能，主要作用是灭活凝血因子 V a 和 VII a，这两种因子对高效的凝血酶生成和凝血因子 X 激活是必需的。

2. 为保证所有类型的遗传性蛋白 C 和抗凝血酶缺陷症均能被检出，检验科选使用发色底物法检测蛋白 C 和抗凝血酶的活性而非抗原。

3. 鉴于在妊娠阶段蛋白 C 及抗凝血酶水平以及活性无明显下降

，且遗传性蛋白 C 及抗凝血酶缺陷的患者的活性往往低于 50%–60%，因此目前提供的参考范围可用于产科人群筛查遗传性易栓症。

4. 检测的影响因素：

甘油三酯的水平将会影响蛋白 C 的水平（升高或）。

华法林—导致蛋白 C 降低，建议在疑似蛋白 C (或蛋白 S) 缺乏患者已经停用口服抗凝治疗后至少 2 周进行检测。

肝素—常规剂量的肝素（包括低分子肝素）不影响蛋白 C 以及 S 的检测结果。但是会降低抗凝血酶的水平。

使用直接凝血酶抑制剂，如：阿加曲班、达比加群的患者的凝血酶水平可假性增高。

5. 获得性蛋白 C 及抗凝血酶下降

急性血栓性疾病：如 DIC

特殊感染：如疟疾及脑膜炎球菌血症可导致蛋白 C 活性显著下降

肾病综合征或尿毒症

肝脏疾病

维生素 K 缺乏：可导致蛋白 C 活性下降

使用门冬酰胺酶：可导致抗凝血酶活性下降

are more diverse. Early, rapid and comprehensive detection of infectious pathogens is of great significance for timely clinical treatment, and therefore can reduce mortality and complications. Traditional pathogen diagnosis methods are limited in small detection flux, long detection time and low screening efficiency. With the development of high-throughput sequencing technology, metagenomic next-generation sequencing (mNGS) is gradually widely applied in NIDs diagnosis. Not only can acquire the genetic information of pathogens in the samples, but also can be used to excavate the relationship between pathogens and host flora. In particular, mNGS has important reference value for the diagnosis of rare infectious diseases. In this study, the latest research progress and application of mNGS in detecting the pathogens of NIDs have been reviewed.

【Key words】 Metagenomic next-generation sequencing; Neonatal infectious diseases; Pathogen; Laboratory diagnosis

新生儿感染性疾病 (Neonatal infectious diseases, NIDs) 是新生儿死亡的主要原因，占全球每年死亡新生儿的约 29%^[1]。细菌、病毒、真菌、支原体、衣原体和寄生虫等病原体感染新生儿可导致局部或全身性的炎症，重度感染可导致新生儿肺炎、化脓性脑膜炎和新生儿败血症等。该病临床表现多样，早期没有特异性，且进展迅速，致死率高，严重危害新生儿的生命健康。早期、快速、准确的诊断出感染病原体，有助于临床医生选择合理的抗生素进行有针对性的治疗，进而有效提高危重患儿的生存率和改善预后。

目前新生儿感染病原体的实验室诊断主要面临四大挑战：

(1) 新生儿作为一个特殊的群体，免疫系统发育尚未完全，机体防御能力低下，因此导致其感染的致病因素较成人更为复杂，且容易合并特殊病原体的感染。Carl 等^[2]认为新生儿体内细菌的总体组成在很大程度上聚集于 3 个纲，它们的分布与年龄较大的儿童或成人的细菌组成具有显著差异，例如在新生儿所有肠道细菌中，杆菌纲、丙型变形菌纲、梭菌纲分别占 1%–5%、<1% 和 45%–80%。

(2) 全球病原微生物感染呈现多样化和复杂化的趋势，2019 新型冠状病毒、H5N1 禽流感和严重急性呼吸综合征等新发感染性疾病的不断出现给临床实验室病原体的筛查诊断带来了巨大的挑战，常规的诊断试剂盒并不包含这些新出现的病原体^[3]。

(3) 针对新生儿感染病原体的传统实验室诊断主要以涂片染色形态学鉴定、微生物培养和抗原抗体检测为主，存在敏感度低、检测时间长和筛查目标单一的缺点。比如，脑脊液和血液培养，由于这类样本中存在的病原体丰度普遍较低，其培养阳性检出率也极低，易漏诊，甚至是误诊。部分实验室可开展实时荧光定量 PCR 等分子生物学检测方法，但受限于可用于临床的试剂盒种类，总体阳性率仍然偏低，超过半数的感染病例最终无法找到明确的感染病原体^[4–7]。(4) 针对新生儿临床样本的采集也往往较为困难，受限于 1 次采集能够获取的样本量，实验室检验人员几乎不可能通过 1 份标本进行所有可能致病微生物的筛查。因此，传统的病原

微生物检测手段已经很难满足当今新生儿感染性疾病的诊治需求。

本文将对宏基因组测序技术在新生儿感染性病原体检测中的应用进行阐述，旨在进一步揭示宏基因组测序在新生儿感染性疾病诊治中的重要作用和应用价值。

一、宏基因组测序技术

宏基因组测序 (Metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 是基于高通量测序技术以及生物信息学分析对病原体进行基因测序的临床实验室诊断技术^[8–9]。截至目前，该技术是临床应用最广泛的病原体高通量测序技术，对临床患者感染病原体的早发现和精准治疗有着极其重要的作用。相较于全基因组测序技术，其成本更低，耗时更短^[10]。相较于 16S rRNA 基因测序技术，其检测范围更广，不仅可以针对细菌进行鉴别和分类，还可以检测病毒、真菌和寄生虫等其他病原体^[11]。

宏基因组测序技术应用于新生儿感染性病原体的实验室诊断主要具有五大优势：

(1) 新生儿感染性疾病进展迅速，宏基因组测序技术能够同时检测几百万甚至上亿条 DNA 或 RNA 序列，精准高效地获得样品中全部病原微生物的序列信息，克服了传统病原体检测方法耗时长、检测通量小的缺点^[12]。

(2) 新生儿感染性疾病致病因素复杂，宏基因组测序技术克服了传统微生物检测分析中绝大多数微生物难以培养的障碍，极大的拓宽了微生物检测的范围。

(3) 新生儿临床样本采集相对困难，而宏基因组检测所需样本量小，一次采集的样本可满足所有感染病原体的快速诊断需求。

(4) 新生儿感染早期病原体丰度相对较低，而宏基因组测序技术敏感度高，能够检测到样本中丰度较低的微生物。

(5) 新生儿感染易受机体自身免疫力和环境因素的影响，基于宏基因组测序可以分析病原微生物群体的多样性、丰度、分布、功能结构和进化关系，解读病原体与环境、宿主之间的相互关系。

可以肯定的是，对于任何一种感染性疾病，早期诊断和及时有针对性的治疗都具有十分重要的意义。通过宏基因组测序，临床医生能够快捷、高效、全面的了解新生儿感染病原体的种类和丰度，并对患儿进行及时、积极、有效且有针对性的抗生素治疗，这不仅可以减少抗生素的滥用，还能有效提高临床新生儿感染患者的转归。

二、宏基因组测序技术在新生儿感染性疾病中的应用

1. 细菌性感染：

细菌性感染是新生儿感染性疾病中最常见的一种，如大肠埃希菌、无乳链球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和淋球菌等。随着抗生素的广泛使用，甚至滥用，新生儿细菌性感染的病原体构成越来越复杂。不同细菌的生长条件不尽相同，有的差异极大，

二、宏基因组测序技术在新生儿感染性疾病病原体检测中的应用

供稿 PCR 组 刘婷

Application of metagenomic next-generation sequencing in detection of the pathogens in neonatal infectious diseases

Liu Ting, Shi Hua, Liu Fang, Jiang Yongmei

Department of Laboratory Medicine, West China Second University Hospital, Sichuan University, Key Laboratory of Obstetric & Gynecologic and Pediatric Diseases and Birth Defects of Ministry of Education, Chengdu 610041, China

Corresponding author: Jiang Yongmei, Email: jiangym_SCU@163.com

【Abstract】 Neonatal infectious diseases (NIDs) are the main cause of neonatal death worldwide. Since the neonatal immune system is not fully developed, its pathogenic factors are more complex than adults and the clinical manifestations

【关键词】 宏基因组测序；新生儿感染性疾病；病原体；实验室诊断

甚至不能培养。临幊上通过细菌培养来诊断新生儿细菌性感染存在一定的局限性：

(1) 细菌培养时间普遍较长，且受限于新生儿细菌感染的时间和丰度，培养的阳性检出率普遍较低，特别是血液和脑脊液等样本类型；

(2) 通过培养能够检测到的致病菌种类有限，部分细菌培养所需的条件苛刻，部分细菌在临幊微生物实验室不能培养，容易发生漏检；

(3) 采样人员皮肤和环境中的细菌污染也可能造成细菌培养的假阳性，容易发生误诊^[13]；

(4) 新生儿的多重感染常容易被忽视，对于不明原因发热新生儿的病原体检测更是临幊诊断的难点^[7]。因此，临幊医生对新生儿细菌感染性疾病诊断的准确性和时效性都提出了更高的要求，不依赖于微生物培养的病原体诊断技术宏基因组测序得到了广泛的应用^[12]。

宏基因组测序应用于新生儿细菌性感染诊断的优势在于：

(1) 检测无需预判感染病原菌的范围，一次实验便可以检测目标样本中几乎所有的病原体，且不存在一代测序方法中的偏倚性。Shaw 等^[14]研究了早产儿迟发性血流感染的临幊特征和胃肠道微生物菌群特征，结果表明胃肠道是迟发性血流感染致病菌的寄生部位，病原体通过上皮屏障转移致病，如高丰度的葡萄球菌属和肠杆菌科。Laguna 等^[15]对囊性纤维化患儿肺泡灌洗液菌群进行了测序检测，结果证实链球菌、伯克氏菌、普氏菌、嗜血杆菌、卟啉单胞菌属以及伟荣球菌在囊性纤维化患儿肺泡灌洗液菌群中相对丰度较高。在这些研究中，研究者均未对感染相关的病原菌进行预判，而是经过客观的实验数据分析得出结论。

(2) 宏基因组测序分析有助于提高细菌性感染的阳性检出率，累积的研究数据表明宏基因组测序对病原菌的阳性检出率是传统培养方法的 2.4 倍^[16]。

(3) 新生儿感染的发病机制有别于儿童或者成人，宏基因组测序的检测结果可以为新生儿感染机制的研究提供新的思路。坏死性小肠结肠炎在早产儿中致死率高达 30%~40%。Ward 等^[17]通过宏基因组测序发现大肠埃希菌在早产儿肠道内定植时极易诱发坏死性小肠结肠炎，而在儿童和成人肠道内定植则通常不会引起任何症状。这一研究成果为坏死性小肠结肠炎的早期预防和治疗提供了理论依据。

(4) 某些感染性疾病很容易在医院中引起大规模的流行，在感染性疾病发生院内感染后可采用宏基因组测序对引起感染性的病原体进行检测，以确定病原菌爆发的传播链^[18]。Christine 等^[19]基于测序技术对新生儿重症监护室黏质沙雷氏菌感染的爆发进行了调查研究，研究内容包括样品中细菌微生物群落和沙雷氏菌属相对丰度的评估以及沙雷氏菌株分型，结果证实环境样品中高丰度的粘质沙雷氏菌与新生儿感染密切相关。

2. 病毒性感染：

病毒性感染也是新生儿感染性疾病中常见的一种，其中又以

病毒性呼吸道感染和中枢神经系统感染最为常见^[20]。临幊实验室对于病毒感染的检测，目前主要以抗原抗体和特异性分子 PCR 检测为主，如免疫荧光检测和实时荧光定量 PCR 检测。免疫荧光检测操作简单，价格相对便宜，但结果不能长期保存，且受限于已有的抗体种类，能够检测的病毒种类有限。而大多数的实时荧光定量 PCR 检测只能做单个病原体的检测，即便目前出现了多重 PCR 的病原体检测方案，所涉及的病原体种类也非常有限，因此一些不常见或有突变的病原体常会被漏检。

宏基因组测序应用于新生儿病毒感染诊断的优势在于：

(1) 宏基因组测序不依赖于目的病原体引物序列进行检测，所以该技术不仅可以快速鉴定样本中常见的病原体，还可以高效发现各种罕见及未知的病原体类型^[21-22]。特别对于新生儿多重感染、少见感染和罕见感染的疾病诊断具有重要的意义。据报道刘映乐等^[23]通过宏基因组分析对肺炎患者支气管肺泡灌洗液进行了分析，进而快速鉴定出了新型冠状病毒。Piantadosi 等^[24]对 1 例经常接触蝶、啮齿动物与蝙蝠的严重进行性脑炎患者进行宏基因组测序分析，结果发现导致其致病的主要病原体为罕见的博瓦桑病毒。

(2) 宏基因组测序以特定的微生物群落为研究对象，有利于医生解读特定区域微生物群落的特征及其与疾病发生发展的关系。Perez 等^[25]基于宏基因组测序技术研究了鼻病毒感染过程中早产儿和足月儿的鼻咽微生物菌群差异，结果发现与足月儿相比，早产儿鼻咽微生物菌群具有很高的异质性。这些早产相关的微生物菌群特征在鼻病毒感染过程中持续存在，表明新生儿的鼻咽微生物菌群在调节病毒感染期间气道炎症和呼吸道症状方面起着关键作用。Moran 等^[26]利用宏基因组测序检测了不同年龄阶段的囊性肺纤维化患者的痰液样本，结果证实病毒在该微生态中仅占 1% 左右，又以腺病毒和疱疹病毒为主要病毒类型。

3. 真菌性感染：

由真菌感染引起的孕产妇阴道炎是一种常见的妇科疾病，尤其是妊娠晚期的产妇患病率最高，容易导致新生儿的真菌感染，如念珠菌和曲霉菌等。通过宏基因组测序技术对妊娠晚期产妇的阴道进行微生态检测，能够全面了解孕产妇生殖道的病原体组成和丰度，为围产期抗生素的及时以及合理应用提供科学的参考依据，减少新生儿真菌感染的发病率和死亡率，有效提高社会效益和经济效益。

宏基因组测序应用于新生儿真菌感染诊断中的优势在于：

(1) 新生儿感染的微生物群落环境复杂，多重感染的病原菌之间可能存在拮抗作用，宏基因组测序对于分析感染微生物群落结构有重要的意义。

(2) 临幊上通过普通分子 PCR 的方法鉴定真菌感染十分困难，究其原因主要是真菌核酸分离纯化的产量差异很大。真菌除细胞核 DNA 外还具有线粒体 DNA，部分菌丝可能缺乏细胞核。另外，真菌本身存在肥厚的荚膜，在核酸提取过程中，真菌破壁不充分会直接影响所得真菌核酸含量^[12]。因此，在进行真菌感染普通 PCR 检测时选择合理的核酸提取方法尤为重要。而宏基因组测序技术对于样本上机检测起始核酸含量的要求不高，其检测敏

感度显著提高，能快速、准确地对真菌进行鉴别和分型，甚至还可以获得细胞内多种生物催化剂酶的特征信息。

4. 其他感染：

除了细菌、病毒和真菌之外，感染性疾病常见的病原体还包括支原体、衣原体、立克次体和寄生虫等。Andersson 等^[27]对妇女生殖道分泌物进行了宏基因组测序分析，研究发现了沙眼衣原体的染色体和质粒，可见宏基因组测序技术在新生儿衣原体感染的临幊检测中同样发挥了重要的作用。Lim 等^[28]对美国圣路易斯市大都会区的 8 名健康婴儿的粪便进行了宏基因组测序分析，研究发现比起 RNA 病毒和 DNA 病毒，在科的水平婴儿粪便中存在更多的是噬菌体。当然宏基因组测序技术在寄生虫临幊诊断方面的应用目前还比较少，主要还是因为相较于细菌和病毒感染，寄生虫病的疑难病例较少。未来潜在的研究方向还包括寄生虫基因组的特征及其对新生儿肠道微生态的影响等。

三、宏基因组测序技术应用于新生儿感染性疾病检测中存在的问题及展望

随着高通量测序技术的不断进步，宏基因组测序技术被越来越多的应用于临幊感染性疾病的实验室诊断中，特别是在新生儿感染病原体的诊断方面具有重要的参考价值。在以下几种情况推荐使用宏基因组测序对新生儿感染进行诊断：

(1) 针对疑难重症，在先前感染原因未知和诊断复杂的情况下，利用宏基因组测序可以全面解读新生儿感染的病原体构成，分析主要病因。

(2) 针对多重感染和复杂感染的情况，利用宏基因组测序可以同时检测细菌、病毒和真菌等多种感染病原体。

(3) 多次传统微生物检测分析中感染病原体筛查阴性，但又有明显感染症状的患儿，利用宏基因组测序可以克服绝大多数微生物难以培养的障碍，极大的拓宽了微生物检测的范围，同时还大大提高了实验敏感度以便能够检测到样本中丰度较低的病原体。

(4) 临幊医生想要了解病原微生物群体的多样性、丰度、分布、功能结构和进化关系，解读病原体与环境、宿主的关系。综上，就目前临幊新生儿细菌性感染疾病的实验室检测现状而言，利用测序技术检测病原体宏基因组不失为传统培养及实时荧光定量 PCR 病原体核酸检测外的有意义扩展实验。有助于危重疑难新生儿感染病例的快速诊断，为患者争取治疗时间，降低新生儿死亡率。

尽管目前宏基因组测序技术显现出了诸多的优势，但应用于临幊实际工作中仍然存在一些问题。首先，实验室检测中如何鉴别细菌定植还是感染，需要临幊医生结合临幊进行综合判断^[12]。其次，宏基因组测序无法提供病原菌的耐药信息，需要进一步的药敏培养或者耐药基因检测进行辅助诊断。第三，面对血液、痰液、脑脊液和分泌物等多种多样的标本类型，如何建立统一规范的检测流程使得病原体的检测效能最大化困难重重。第四，样本提取的核酸中人源序列背景太高也是干扰病原体检测的一大因素。第

五，在报告的解读方面，需要实验室结合样本类型、微生物特性、患者临床特征、传统病原检测结果等信息来综合判断，并把最终的结果呈现给临幊医生。整个过程需要实验室检测及审核报告人员具备丰富的分子生物学知识及临幊微生物感染知识。第六，生物信息数据库需要尽可能全的囊括所有病原菌，防止因基因序列未覆盖而导致的漏检。第七，检测过程中准确性和时效性都非常重要，如何权衡测序深度、交付时间以及所需经济成本等诸多因素也是实验室人员必须思考的问题。

综上所述，随着高通量测序技术的发展以及检测成本的下降，宏基因组测序分析在新生儿感染性疾病诊断中的应用已经取得了良好的进展。相信未来宏基因组测序技术将会逐步解决临幊新生儿感染性疾病鉴别诊断困难的问题，进一步推动临幊微生物学的发展，为相关的科学研究提供新方向。

参考文献

- [1] 刘健慧，王丹华. 新生儿重症监护病房早产儿细菌定植的临床研究[J]. 中国实用儿科杂志，2006, 21(1):41-44. DOI: 10.3969/j.issn.1005-2224.2006.01.015.
- [2] La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(34):12522-12527. DOI: 10.1073/pnas.1409497111.
- [3] 陶悦，傅启华，莫茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战 [J]. 中华检验医学杂志，2020,43(3):217-220. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2020.0008.
- [4] Thaver D, Zaidi AK. Burden of neonatal infections in developing countries: a review of evidence from community-based studies[J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(1 Suppl):S3-9. DOI: 10.1097/INF.0b013e3181958755.
- [5] Khatib U, van de Beek D, Lees JA, et al. Adults with suspected central nervous system infection: A prospective study of diagnostic accuracy[J]. J Infect, 2017, 74(1):1-9. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.09.007.
- [6] Ronnestad A, Abrahamsen TG, Medbo S, et al. Septicemia in the first week of life in a Norwegian national cohort of extremely premature infants[J]. Pediatrics, 2005, 115(3):e262-268. DOI: 10.1542/peds.2004-1834.
- [7] Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, et al. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2017, 141(6):776-786. DOI: 10.5858/arpa.2016-0539-RA.
- [8] Mongkolrattanothai K, Naccache SN, Bender JM, et al. Neurobrucellosis: Unexpected Answer From Metagenomic Next-Generation Sequencing[J]. J Pediatric Infect Dis Soc, 2017, 6(4):393-398. DOI: 10.1093/jpids/piw066.
- [9] Somasekar S, Lee D, Rule J, et al. Viral Surveillance in Serum Samples From Patients With Acute Liver Failure By Metagenomic Next-Generation Sequencing[J]. Clin Infect Dis,

2017, 65(9):1477-1485. DOI: 10.1093/cid/cix596.

[10] 周梦兰, 徐英春, 赵玉沛. 全基因组测序在病原微生物学中的应用及研究进展 [J]. 中华检验医学杂志 , 2016, 39(4):319-321. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2016.04.020.

[11] Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(9):814-821. DOI: org/10.1038/nbt.2676.

[12] 张婷, 李颖芝, 高伟. 宏基因组学检测对肺部感染性疾病的诊断价值 [J]. 心电图杂志 , 2019, 8(4):42-43.

[13] Mohseny AB, van Velze V, Steggerda SJ, et al. Late-onset sepsis due to urinary tract infection in very preterm neonates is not uncommon[J]. Eur J Pediatr, 2018, 177(1):33-38. DOI: 10.1007/s00431-017-3030-9.

[14] Shaw AG, Sim K, Randell P, et al. Late-Onset Bloodstream Infection and Perturbed Maturation of the Gastrointestinal Microbiota in Premature Infants[J]. PloS one, 2015, 10(7):e0132923. DOI: 10.1371/journal.pone.0132923.

[15] Laguna TA, Wagner BD, Williams CB, et al. Airway Microbiota in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Clinically Well Infants with Cystic Fibrosis[J]. PloS one, 2016, 11(12):e0167649. DOI: 10.1371/journal.pone.0167649.

[16] Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al. Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients[J]. Arch Med Res, 2016, 47(5):365-371. DOI: 10.1016/j.arcmed.2016.08.004.

[17] Ward D V, Scholz M, Zolfo M, et al. Metagenomic Sequencing with Strain-Level Resolution Implicates Uropathogenic E. coli in Necrotizing Enterocolitis and Mortality in Preterm Infants[J]. Cell Rep, 2016, 14(12):2912-2924. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.03.015.

[18] Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection[J]. Annu Rev Pathol, 2019, 14:319-338. DOI: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751.

[19] Martineau C, Li X, Lalancette C, et al. Serratia marcescens Outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit: New Insights from Next-Generation Sequencing Applications[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9):e00235-18. DOI: 10.1128/JCM.00235-18.

[20] Parker J, Chen J. Application of next generation sequencing for the detection of human viral pathogens in clinical specimens[J]. J Clin Virol, 2017, 86:20-26. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.11.010.

[21] Lefterova MI, Suarez CJ, Banaei N, et al. Next-Generation Sequencing for Infectious Disease Diagnosis and Management: A Report of the Association for Molecular Pathology[J]. J Mol Diagn, 2015, 17(6):623-634. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2015.07.004.

[22] Thorburn F, Bennett S, Modha S, et al. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections[J]. J Clin Virol, 2015, 69:96-100. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.06.082.

[23] Chen Liangjun, Liu Weiyong, Zhang Qi, et al. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1):313-319. DOI: 10.1080/22221751.2020.1725399.

[24] Piantadosi A, Kanjilal S, Ganesh V, et al. Rapid Detection of Powassan Virus in a Patient With Encephalitis by Metagenomic Sequencing[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(5):789-792. DOI: 10.1093/cid/cix792.

[25] Perez GF, Perez-Losada M, Isaza N, et al. Nasopharyngeal microbiome in premature infants and stability during rhinovirus infection[J]. J Investig Med, 2017, 65(6):984-990. DOI: 10.1136/jim-2017-000414.

[26] Moran Losada P, Chouvarine P, Dorda M, et al. The cystic fibrosis lower airways microbial metagenome[J]. ERJ Open Res, 2016, 2(2):e00096-2015. DOI: 10.1183/23120541.00096-2015.

[27] Andersson P, Klein M, Lilliebridge RA, et al. Sequences of multiple bacterial genomes and a Chlamydia trachomatis genotype from direct sequencing of DNA derived from a vaginal swab diagnostic specimen[J]. Clin Microbiol Infect, 2013, 19(9):E405-408. DOI: 10.1111/1469-0691.12237.

[28] Lim ES, Zhou Yanjiao, Zhao Guoyan, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants[J]. Nat Med, 2015, 21(10):1228-1234. DOI:

三、如何面对临床对检验结果准确性的质疑

供稿 急诊组 林小能

首先要明白临床对检验结果“不符”并非一个客观的评价，而是一种主观个人的经验判断。因此并不一定就是结果有误，可能有其它方面的原因。对此，我们需要与临床进行良好的沟通和全面客观的分析，才能得出合理的结论。但我们常见的问题在于单纯从实验室角度去分析，比如质控、仪器状态和人员操作等。之所以会这样，主要是由于对“不符”的来源认识不够全面，不知道除了熟悉的实验室环节以外，还有那些方面要去分析。只有对造成不符的原因有一个比较全面的认识，才能做到有的放矢。

下面就来简单介绍下可能的原因：

1、检查因素

(1) 检查方法和指标的敏感性、特异性 任何实验方法都有一定的假阳性和假阴性概率，即使同一方法在不同试剂的敏感性和特异性也不尽相同。如某儿童被临床诊断为“传染性单核细胞增多症”，但EB病毒血清学检查有可能却是阴性的。
 (2) 标本的留取、保存和送检存在的问题 检验误差绝大多数来源于分析前阶段，标本质量决定结果是否可靠。比如输液同侧或静脉留置管处的不规范抽血都是日常工作中经常遇到的问题。
 (3) 测定过程的影响 如标本没有混匀，标本中有小凝块，试剂中有气泡或过期，溶血或脂血等等。有时这些问题比较隐匿，很难在检测前发现，而需要在审核过程中通过一些工作经验来察觉。
 (4) 测定后影响 比如审核或复检不严格，导致异常错误的结果发出。像血小板低时，没有执行复检程序导致血小板假性降低的结果报告给临床等。

2、疾病本身因素

(1) 时间因素 疾病往往都有一个发生发展的过程，如果检查时正好处于“窗口期”，就有可能出现漏检的情况。“窗口期”并不是固定的，会随着检测方法敏感性的提高而缩短，但始终会存在。
 (2) 空间因素 这一点在微生物检查中非常重要，取材部位是否合格决定了结果的可靠性。不当的取样可以导致结果假阴性以及被正常菌群干扰的情况发生。如开放病灶和脓肿：尽量去除表面菌落，用拭子在病灶活动区域或基底部采取标本。
 (3) 特殊因素（疾病的不典型表现等） 正如前所说，“不符”是一种经验上的主观判断。比如理论上肝酶的升高程度应跟肝脏损伤程度一致，但在重症肝损伤时却恰有可能出现肝酶升高不显著的情况。这就是生化中的“胆酶分离”现象。

3、药物因素

对于发生在治疗过程中的结果突然变化尤其需要关注药物影响，药

物对检验结果的影响是非常普遍的现象。如抗生素引起的药物性血小板减少或凝血功能异常，肝素导致的凝血异常或肝素诱导的血小板减少症，蛇毒血凝酶导致的纤维蛋白原降低等等。除了药物，一些治疗方式也会影响检验结果。比如透析治疗中使用的肝素会影响凝血检查以及输注脂肪乳会干扰比色法检验项目结果等。

4、病人自身因素

包括患者的生理状态、饮食习惯、运动情况及药物史等等。比如一些特殊食物或药物会引起尿液变红，误认为是血尿，而且尿液颜色变化可能引起干化学比色结果异常。如果不加以甄别的话，就有可能发出一张隐血假阳性的结果。

5、临床因素

对病情的准确判断有赖于完整的病史信息、体格检查和辅助检查资料，只有这样才能全面系统的把握病情，做出诊断和鉴别诊断。因此当临床信息的收集不全，分析和处理不当或临床经验不足时就可能无法做出正确的判断。综上种种因素，除了我们检验人员需要转变观念，我们不能够只以标本为中心，需要转变为以疾病或者病人为中心对检验结果进行全面分析外，也应该和临床建立良好的沟通机制和反馈制度。相同的问题可能很多不同的人遇到，科内的反馈机制同样也是案例的积累。长期、有效的沟通机制有利于方便及时解决各种问题，也能够得到临床对检验工作的理解和肯定。

四、抗角蛋白抗体的临床意义

供稿 免疫组 李文胜

1、临床意义

类风湿性关节炎 (RA) 是一种常见的自身免疫性疾病，也是最常见的慢性炎症性关节疾病，主要表现为对称性、慢性、进行性多关节炎。RA 具有高致畸性，而 RA 的早期诊断对于控制病情发展、避免不可逆的关节损坏十分重要。

在 RA 病人血清中可检测到多种抗体。抗角蛋白抗体和 RA 的相关性现已明确。生物化学和分子生物学的研究表明这些“RA 角蛋白”特异性抗体的靶抗原是人皮肤的丝集蛋白 (filaggrin)。在颗粒层角质细胞中由至少 10 个串联的丝集蛋白单位合成磷酸化前丝集蛋白，并保存在透明角蛋白颗粒中。在颗粒细胞分化为角质细胞的过程中，前丝集蛋白转变成丝集蛋白分子。丝集蛋白参与细胞角蛋白纤维的聚集以形成巨纤维。

约在 50% 类风湿性关节炎病人中可检测到抗丝集蛋白抗体（灵敏度 36-69%）。已能在疾病早期检测到这些抗体。约 30% 类风湿因子阴性的病人表现为抗丝集蛋白抗体阳性。IgG 类抗体（主要是 IgG1 和 IgG4）具有诊断价值。

多项研究表明在 RA 早期检测到的抗丝集蛋白抗体是临床症状发展的标志。抗体滴度和疾病活动性相关，高滴度抗体对 RA 的有确诊意义。检测丝集蛋白抗体提高了血清学检测 RA 疑似患者的灵敏度，并在疾病早期有预后价值。

RA 患者中，也可发现抗核抗体（组蛋白，U1-nRNP, ssDNA）和抗平滑肌抗体。偶尔也可在其它风湿性疾病（如系统性红斑狼疮、系统性硬化症和强直性脊柱炎）中检测到抗丝集蛋白抗体。

2、检测方法

间接免疫荧光法

3、与其他抗体的对比

类风湿因子 RF 在诊断类风湿关节炎中，较为常见的临床指标是类风湿因子 RF，RF 有着较高的敏感性，但由于在狼疮性肾炎、皮肌炎、干燥综合征、系统性红斑狼疮等患者中均可能检测到 RF 的存在，甚至在某些正常人群中也呈现出阳性率，因此 RF 特异性欠佳，尤其对于早期类风湿关节炎的诊断。

抗 CCP 抗体是环状聚丝蛋白的多肽片段，可用于 RA 的早期诊断，抗体浓度水平可以用来动态的判断 RA 的进展情况和病情严重程度，可作为 RA 的临床监测的指标；同时研究表明，抗 CCP 抗体阳性的患者的骨破坏程度较阴性者严重，且滴度与 RA 患者骨侵蚀的危险程度均有显著的关系。有学者认为，抗 CCP 抗体与抗 AKA 抗体针对的是统一抗原分子上的不同抗原位点，故两者可从不同途径反应自身免疫性疾病的病情发展，可以互补。多项指标联合检测可提高灵敏性和特异性，可以提高 RA 的诊断价值。

4、备注

采样时间：周一至周日；

报告时间：周二 / 五 16:30；

采集管：红头管；

医嘱：在检验医嘱中录入“kjdbkt”或“aka”均可；

联系电话：检验科免疫组 85501277。

五、Impact of Vitamin D and Vitamin D receptor on the risk of cardiovascular diseases in children and adolescents with obesity in Sichuan, China: A cross-sectional study

供稿 生化组 谢洪建

KEY WORD: obesity; Vitamin D; Vitamin D receptor; risk of Cardiovascular diseases; children and adolescents: Fokl

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have demonstrated a close relationship between Vitamin D, Vitamin D receptor

(HDL-C) [8]. Moreover, hyperlipidemia increases the risk of cardiovascular diseases (CVDs) [9]. Therefore, children with obesity often have a high risk of CVDs, threatening their health further.

CVDs include heart and circulatory system disorders, and are the world's leading causes of death. Some researchers have predicted that there will be 23.6 million people who

(VDR), and obesity. Nevertheless, few studies have reported that the relationship among them is associated with the risk of cardiovascular diseases (CVDs) in Chinese children and adolescents.

OBJECTIVE: This study aimed to reveal the effects of obesity, serum Vitamin D levels, and VDR Fokl genotype regarding the risk of CVDs in children and adolescents in Sichuan, China.

METHODS: Children and adolescents were recruited in the cross-sectional study. Serum Vitamin D levels, serum lipid levels, and VDR Fokl gene polymorphism were detected in the laboratory. Some lipid factors were used to predict the risk of CVDs. The impact of obesity, Vitamin D levels and VDR Fokl genotype on the risk of CVDs were investigated.

RESULTS: High lipid levels were observed in children and adolescents of the obese group in comparison to the non-obese group. In the obese group, the C allele carriers had much lower concentrations of lipids than TT genotype. C allele carriers who were Vitamin D deficient had low levels of total cholesterol (TC), triglycerides (TG), apolipoprotein B (Apo-B), total cholesterol / high-density lipoprotein cholesterol (TC/HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol / high-density lipoprotein cholesterol (LDL-C/HDL-C) and triglycerides / high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) than those with the TT genotype in children and adolescents with obesity. In Vitamin D insufficient children and adolescents of obese group, the TC, Apo-B, TC/HDL-C in the C allele carriers were significantly lower when compared to these in the TT genotype in children and adolescents with obesity.

CONCLUSION: Obese children with low Vitamin D levels within the C allele of Fokl have lower levels of CVDs risk factors than TT allele of Fokl carriers. TT genotype in children and adolescents with obesity and supplementation of Vitamin D to normal levels might reduce the risk of CVDs.

Introduction

In the past 30 years, obesity has become an important health problem worldwide. According to the data collected about Chinese children and adolescents aged 7-18 years in 2010, more than one-fourth were classified as overweight or obese [1]. The prevalence of obesity was 18.5%, affecting about 13.7 million children and adolescents in America [2]. Obesity is a prevalent health condition, posing a serious threat to the health of children globally. Children with obesity are at increased risk of diseases, such as hypertension, dyslipidemia, diabetes, coronary heart disease, and so on [3-7].

Obesity in children could lead to dyslipidemia, with high triglycerides (TG) and low high-density lipoprotein cholesterol

will die of CVDs by the year 2030 [10]. Factors that contribute to the development of CVDs are considered as risk factors of CVDs, which included age, sex, family history, inadequate physical activity, smoking, blood pressure, obesity, blood lipid (cholesterol, triglyceride), and diabetes mellitus (DM) [11]. According to some researchers, Vitamin D deficiency may be a new risk factor of CVDs [12].

Vitamin D is a fat-soluble steroid derivative, that produces effects through binding the vitamin D receptor (VDR). The VDR is expressed in adipocytes, so there is a close relationship between Vitamin D and obesity [8, 13]. VDR is a receptor member of thyroxine and steroid hormone superfamily. VDR gene polymorphisms might be associated with multiple biological effects. Previous studies have shown that Vitamin D and VDR are related to cardiovascular risk factors, such as obesity, lipid metabolism disorder, hyperglycemia and hypertension [12, 14].

Vitamin D binds to VDR and acts on specific DNA sequences of the target gene, thereby modulating the expression of the gene. The human VDR gene is located on the long arm of the chromosome 12q13-14 region and it contains 11 exons. Fokl site is the polymorphic site that is associated with the most important functions of VDR. The polymorphic point of Fokl (rs2228570) in exon 2 is located at the transcription initiation site. There are two initiation codons of VDR [15]. VDR conformation is changed after combining with active Vitamin D, which in turn activates the transcription of the target gene. Through genomic and non-genomic mechanisms, Vitamin D induces a series of biological effects [16], except for its traditional influence on calcium homeostasis and bone metabolism, it is also associated with obesity and metabolic syndrome (MS) in children as well as adolescents [17]. Some researchers have found that the polymorphic site of VDR, in particularly Fokl, has an impact on the levels of Vitamin D and the severity of MS [18].

Many researchers have investigated the relationship between Vitamin D, VDR, and obesity. But few researchers have examined the relationship of VDR, Vitamin D, and the risk of CVDs in children and adolescents with obesity. Our study aimed to explore the effect of Vitamin D levels and VDR single nucleotide polymorphism on the risk of CVDs in children and adolescents in Sichuan, China.

Methods

Study population and study design

Children and adolescents of 3-18 years old from West China Second University Hospital were recruited in our study from April 2017 to April 2018. Participants were from the West China Second University Hospital, who participated in the physical examination of the Department of Child Health. All participants

were in good health, had no history of hypertension, metabolic diseases, and other chronic diseases. Participants with liver, kidney, endocrine, or cardiovascular diseases were excluded. Participants who used or were using any drugs or hormones that affected lipid metabolism within 30 days were excluded.

All participants were divided into two groups, the obese group and the non-obese group based on body mass index (BMI) according to the WHO criteria^[19, 20].

Next, based on the levels of serum Vitamin D, all subjects were divided into 3 groups, the Vitamin D normal group, the Vitamin D insufficiency group, and the Vitamin D deficiency group. Based on the criteria recommended by most of the experts, participants with serum concentrations of Vitamin D $\geq 30\text{ng/ml}$ were included in the Vitamin D normal group, participants with serum concentrations of Vitamin D ranging between 10 ng/ml and 30 ng/ml were included in the Vitamin D insufficiency group, and participants with serum concentration of Vitamin D of $\leq 10\text{ng/ml}$ were included in the Vitamin D deficiency group^[21, 22].

Based on different expressions of the VDR Fokl gene, the subjects were grouped into the TT genotype group and the C allele carrier group. TC and CC genotypes were defined as the C allele carrier group.

All participants and their parents took part in this research voluntarily and signed the informed consent before study initiation. The study was approved by the ethics committee of West China Second University Hospital. We did not have access to information that could identify individual participants during or after data collection.

Laboratory tests

All tests were measured in the department of laboratory medicine, which has been accredited by the College of American Pathologists (CAP) and also passed the standard of ISO15189. Vitamin D was analyzed by the ARCHITECT i2000SR Immunoassay system (Abbott Healthcare Diagnostics, 1 Kallang Place, Singapore). TG, total cholesterol (TC), HDL-C, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), apolipoprotein A1 (Apo-A1), and apolipoprotein B (Apo-B) were measured by the ADVIA 2400 Chemistry system (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, New York, USA). The commercial quality Control materials were used daily to guarantee the precision and accuracy of all tests. For better evaluation of cardiovascular risk, the three ratio values of blood lipid indexes (TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C, TG/HDL-C) were calculated as our analysis indicator.

Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to analyze VDR Fokl gene polymorphism (Sangon Biotech (Shanghai) Co, Ltd.). The

commercial kit (TinZyme, Ltd.) was used to extract DNA template from the blood sample, the Fokl site fragment contains VDR gene that was extracted with deoxyribonucleoside triphosphate (dNTP) as the substrate. The PCR primers were designed based on the previous literature^[23], and were as follows:

The Forward Primer

5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3'

The Reverse Primer: 5'-ATGGAAACACCTGCTTCTTCTCCC
TC-3'

DNA sequencing was used to validate DNA amplification fragments by Ion S5 (Life Technologies Corporation.) .

Statistical analysis

Results were analyzed by SPSS statistical software package version 16.0. All data were evaluated their normality by Kolmogorov-Smirnov test and Shapiro-Wilk test. All data were expressed as mean \pm SD. Independent-sample t-test was used to determine the lipid profile in two different groups. One-way ANOVA was used to compare the lipid profile in participants with different Vitamin D levels, with adjustment for participant age by Covariance test. Multiple comparisons were performed by the least-significant difference (LSD) between different groups. Hardy-Weinberg equilibrium was evaluated by the χ^2 goodness of fit test. A chi-square test was performed to evaluate categorical variables with different allele frequencies in the obese group and the non-obese group. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Concentrations of serum lipids

A total of 452 children and adolescents participated in our study. They were divided into two groups -- the obese group and the non-obese group, with 225 and 227 participants, respectively (Table 1). The serum lipid levels and the serum Vitamin D levels were then analyzed in the two groups.

The concentration of serum Vitamin D in obese group was significantly lower than that in the non-obese group ($P < 0.01$). The levels of serum TC, TG, HDL-C, LDL-C, Apo-A1, Apo-B, and LDL-C/HDL-C, in the obese group were significantly higher when compared with these in the non-obese group ($P < 0.005$), while TC/HDL-C and TG/HDL-C showed no significant differences between the two groups ($P = 0.650$, $P = 0.810$), (Table 1).

Genotype distribution and allele

frequency of VDR Fokl site

As shown in Fig 1, the distribution of alleles, including TT genotype in 85 (18.81%) cases, TC genotype in 226 (50.00%) cases, and CC genotype in 141 (31.19%) cases demonstrated the percentage of T allele frequency to be 43.81% and C allele frequency to be 56.19%.

In the obese group, there were 46 cases with TT genotype (20.44%), 101 cases with TC genotype (44.89%), and 78 cases with CC genotype (34.67%). Meanwhile the percentage of T allele frequency was 42.89% and C allele frequency was 57.11%.

In the non-obese group, there were 39 cases with TT genotype (17.18%), 125 cases with TC genotype (55.07%), and 63 cases with CC genotype (27.75%). Meanwhile demonstrated the percentage of T allele frequency to be was 44.71% and C allele frequency to be was 55.29%. The genotype distribution and allele frequency of VDR Fokl site showed no significant differences between the obese and the non-obese group.

The genotype distribution of VDR Fokl site in all participants was fulfilled Hardy-Weinberg equilibrium, indicating that all subjects are from the same Mendelian population and represented the population.

Effect of VDR Fokl gene polymorphism on the levels of serum lipid profiles.

As shown in Fig 2, participants with who were C allele carriers had lower concentrations of TC, TG, Apo-B, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, and TG/HDL-C than these of TT genotype in the obese group ($P < 0.01$, $P = 0.017$, $P < 0.01$, $P = 0.033$, $P = 0.020$).

The levels of serum Vitamin D and lipid profiles showed no differences between the C allele carriers and the TT genotype in the non-obese group.

Effect of serum Vitamin D levels and VDR Fokl gene polymorphism on serum lipid profiles

In the obese group: As shown in Table 2 C allele carriers have significantly lower levels of TC, TG, Apo-B, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, and TG/HDL-C in Vitamin D deficiency group than TT genotype ($P < 0.01$, $P = 0.011$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$). There were no significant differences for HDL-C, LDL-C and Apo-A1 levels between C allele carriers and TT genotype ($P = 0.50$, $P = 0.10$, $P = 0.77$) in the Vitamin D deficiency group. In the Vitamin D insufficiency group, the TC, APO-B, TC/HDL-C in participants with C allele carriers were significantly lower when compared with these with TT genotype ($P = 0.020$,

$P = 0.031$, $P = 0.046$). There were no differences in TG, HDL-C, LDL-C, Apo-A1, LDL-C/HDL-C, and TG/HDL-C between the C allele and the TT genotypes in the Vitamin D insufficiency group ($P = 0.39$, $P = 0.90$, $P = 0.91$, $P = 0.78$, $P = 0.65$, $P = 0.40$, respectively). Also, there was no difference in lipid profiles in each genotype in the Vitamin D normal group. All these results were adjusted by age in participants with different levels of Vitamin D.

In non-obese group: C allele carriers had significantly higher TC, HDL-C, and Apo-A1 levels in the Vitamin D deficiency group when compared with these with TT genotype ($P = 0.039$, $P = 0.025$, $P < 0.01$), (Table 3). There were no differences in TG, LDL-C, Apo-B, TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, and TG/HDL-C between the C allele and TT genotypes in the Vitamin D insufficiency group ($P = 0.053$, $P = 0.89$, $P = 0.52$, $P = 0.28$, $P = 0.88$, $P = 0.80$, respectively). At the same time, there was no difference for all lipid profiles between the C allele and the TT genotypes for either the Vitamin D insufficiency and the Vitamin D normal group (all P values > 0.05).

Discussion

Previous many researchers investigated the relationship between Vitamin D, VDR, and obesity, but few researchers have examined the relationship between VDR, Vitamin D, and the risk of CVDs in children and adolescents with obesity. The effect of Vitamin D, VDR, and obesity on risk of CVDs was evaluated in our study. The results revealed that when obese children who had low Vitamin D levels within the C allele of Fokl had lower levels of several biomarkers of CVDs risk than the TT allele of Fokl carriers. And may therefore obese children with C allele of Fokl have a lower risk of CVDs than TT allele of Fokl carriers within the low Vitamin D levels. The obese children with TT allele may require more attention to the risk of CVDs. If the levels of Vitamin D are lower, the children need to take a vitamin D supplement to reach the normal levels, may decrease the risk of CVDs.

The risk of CVDs was predicted by lipid indexes. Some researchers have found that the ratio of blood lipid indexes such as TC/HDL-C, LDL-C/HDL-C, and TG/HDL-C cloud predict the risk of CVDs better when compared with blood lipid indexes alone [25]. These indexes were used to predict the risk of CVDs between the obese people and the non-obese people. According to large research studies, including the Framingham Study, the LRCP23 and the PROCAM, the levels of TC/HDL-C were considered as impactful risk predictors of CVDs. LDL-C/HDL-C was another predictor of CVDs [25]. The risk of CVDs was mainly detected by TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C, and the risk of CVDs was increased with increasing ratio of these levels.

Children with obesity had lower Vitamin D levels than children without obesity. These results were similar to those of a previous research study^[24]. Vilarrasa N found that the concentration of Vitamin D was decreased with increasing body fat, which might have been due to the following reasons: 1) the synthesis of Vitamin D is low in the obese people^[26], as they undergo less exercise, and are conservative in clothing^[27]; and 2) the retention is stronger on fat-soluble Vitamin D with more adipose cells, leading to the reduction of Vitamin D release in circulation and the bioavailability of Vitamin D, and accordingly the serum concentrations of Vitamin D are lower in obese people^[28].

The serum concentration of Vitamin D can affect the blood lipid levels. In our research, children with obesity have lower Vitamin D and higher blood lipid levels than children without obesity. Tarcin O revealed that the leptin levels were positively correlated with Vitamin D level in the body. A lack of Vitamin D leads to lower concentrations of leptin, increasing the intake of food and decreasing the energy release, synthesizing the promotion of fat cells^[29]. Previous research studies reported that a lack of Vitamin D increases calcium influx, which in turn decreases the activity of lipase and inhibits the lipolysis process^[30]. The concentration of Vitamin D showed a positive correlation with Apo-A1, and the lack of Vitamin D lowered Apo-A1. A lack of Apo-A1 resulted in the decrease of transportation ability to clear cholesterol and increase of cholesterol levels in circulation, leading to abnormal lipid levels^[31]. Some researchers have hypothesized deficiency of Vitamin D as a risk factor of CVDs, and Vitamin D supplementation reduced the risk of CVDs, which was consistent with our study results.

Vitamin D combined with VDR activates the function of Vitamin D circulating forms. The function of VDR is influenced by FokI gene polymorphism. The relationship between FokI polymorphism, obesity, and lipid metabolism was not consistent with that of the previous research studies, and some of them indicated that differences in polymorphisms of VDR gene showed association with obesity, dyslipidemia, and cardiovascular diseases^[32, 33], while few other studies indicated that no relationship between the polymorphisms of VDR, obesity, and dyslipidemia^[33, 34]. In our study, obese children with C allele carriers have lower levels of several biomarkers of CVDs risk than TT genotype carriers.

The FokI site is located in the transcription initiation codon of second exon of VDR gene. When T mutates to C in the first initiation codon of ATG, a FokI polymorphism is formed at the locus. The length of amino acid sequence is changed and the first initiation codon loses its translation function when the mutation occurs. The translation of VDR begins in the second codon, resulting in the lack of three amino acids during the

activation domain of VDR protein positions, and the VDR protein lacking the three amino acids easily activates its effector genes^[35, 36].

Previous research had found that Vitamin D could reduce the risk of CVDs^[37], and this works by combining with VDR. FokI with C carriers could activate its function more efficiently than TT genotype carriers^[35], which was consistent with our study results.

However, similar phenomenon was not observed in the non-obese group. Children with obesity were fatter than normal children, as they had more adipose cells. VDR is located on the adipose cells, and so more VDR existed in children with obesity. The more the mutated VDR was present in children with obesity, the more obvious was the function of mutated VDR.

This research was limited to children and adolescents with obesity in Sichuan. The number of participants in this study was not large enough to represent the results of the whole of China. These results need to be confirmed by a multicenter research in future. More factors of CVDs risk need to be considered in the further research. The mechanism of these phenomena needs to be further studied.

Above all, obese children and adolescents have higher levels of CVDs risk factors than non-obese children and adolescents. Obese children and adolescents with C allele carriers have lower levels of CVDs risk factors than those with TT genotype. When obese participants had normal Vitamin D levels, the lipid levels demonstrated no significant differences between the two genotypes. But when children and adolescents with obesity lacked Vitamin D, the C allele carriers had lower serum lipid levels than TT genotype carriers. This indicated that C allele might protect children and adolescents with obesity lacking Vitamin D from the risk of CVDs. Children with obesity with TT genotype of FokI may require more attention to the risk of CVDs.

Conclusion

VDR gene mutation, levels of Vitamin D and obesity work together with the levels of lipids, which in turn affect the risk of CVDs. Children with obesity have low Vitamin D levels and have high levels of CVDs risk factors. The obese children with C allele carriers have low levels of CVDs risk factors than those with TT genotype. And may therefore the obese children with C allele have low risk of CVDs than TT genotype carriers. With decreased Vitamin D levels, the C allele carriers of obese children decreases the levels of CVDs risk factors. The TT genotype carrier of VDR in children with obesity require more attention to the risk of CVDs when Vitamin D levels are low. TT genotype in children and

adolescents with obesity, and supplementation of Vitamin D to normal levels might reduce the risk of CVDs.

Statements

Acknowledgement

Thanks for all participants in the experiment. Thanks for all helpers in writing article. Thanks for financial supporting from Science & Technology Department of Sichuan Province and Chengdu Science and Technology Bureau.

Statement of Ethics

All participants and their parents took part in this research voluntarily and signed the informed consent before study initiation. The research was conducted ethically in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethics committee of West China Second University Hospital. The reference number obtained from the Ethics Committee was Medical research 2009 (047).

Disclosure Statement

The authors declared that they have no conflicts of interest to this work. We declared that we do not have any commercial or associative interest that represents a conflict of interest in connection with the work submitted

Funding Sources

This work was supported by Chengdu Science and Technology Bureau (2016-HM01-00266-SF), Science & Technology Department of Sichuan Province (2019YFS0394).

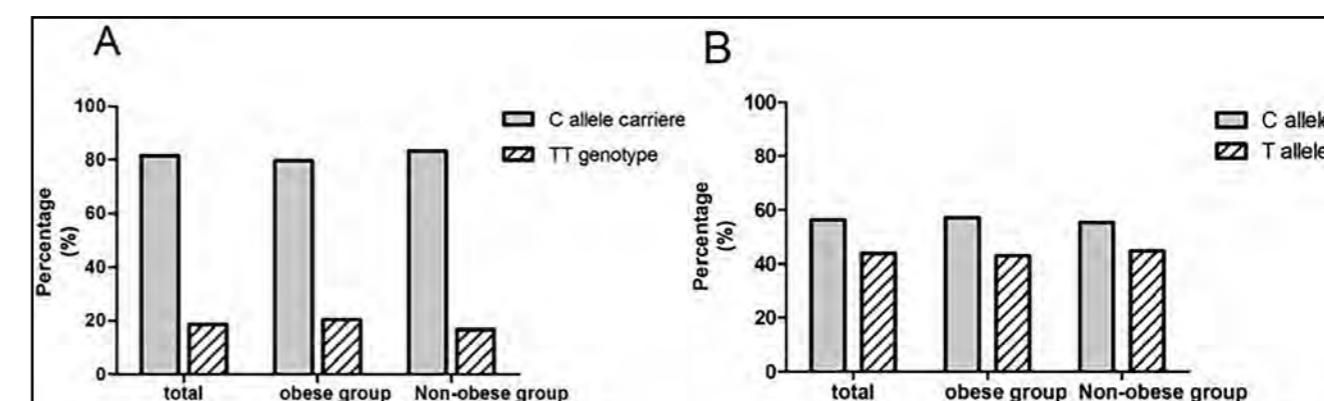
Author Contributions

We confirm that the manuscript has been read and approved by all named authors and that there are no other persons who satisfied the criteria for authorship but are not listed. We further confirm that the order of authors listed in the manuscript has been approved by all of us.

Signed by all authors as follows: Hongjian Xie, Min Min, Yang Xian, Fan Yang, Xia Wang, Yali Cui, Yingying Li, Xiaojuan Liu. Hongjian Xie and Min Min are equal contribution. Xiaojuan Liu is corresponding author.

Xiaojuan Liu designed experiments. Hongjian Xie, Min Min, Xia Wang, Fan Yang, Yali Cui, Yingying Li and Yang Xian carried out experiments and analyzed experimental results. Hongjian Xie and Min Min analyzed data and wrote the manuscript.

Fig 1. The genotype distribution and the allele frequency of VDR FokI site. The genotype distribution of VDR FokI site (A) and the allele frequency of VDR FokI site (B).



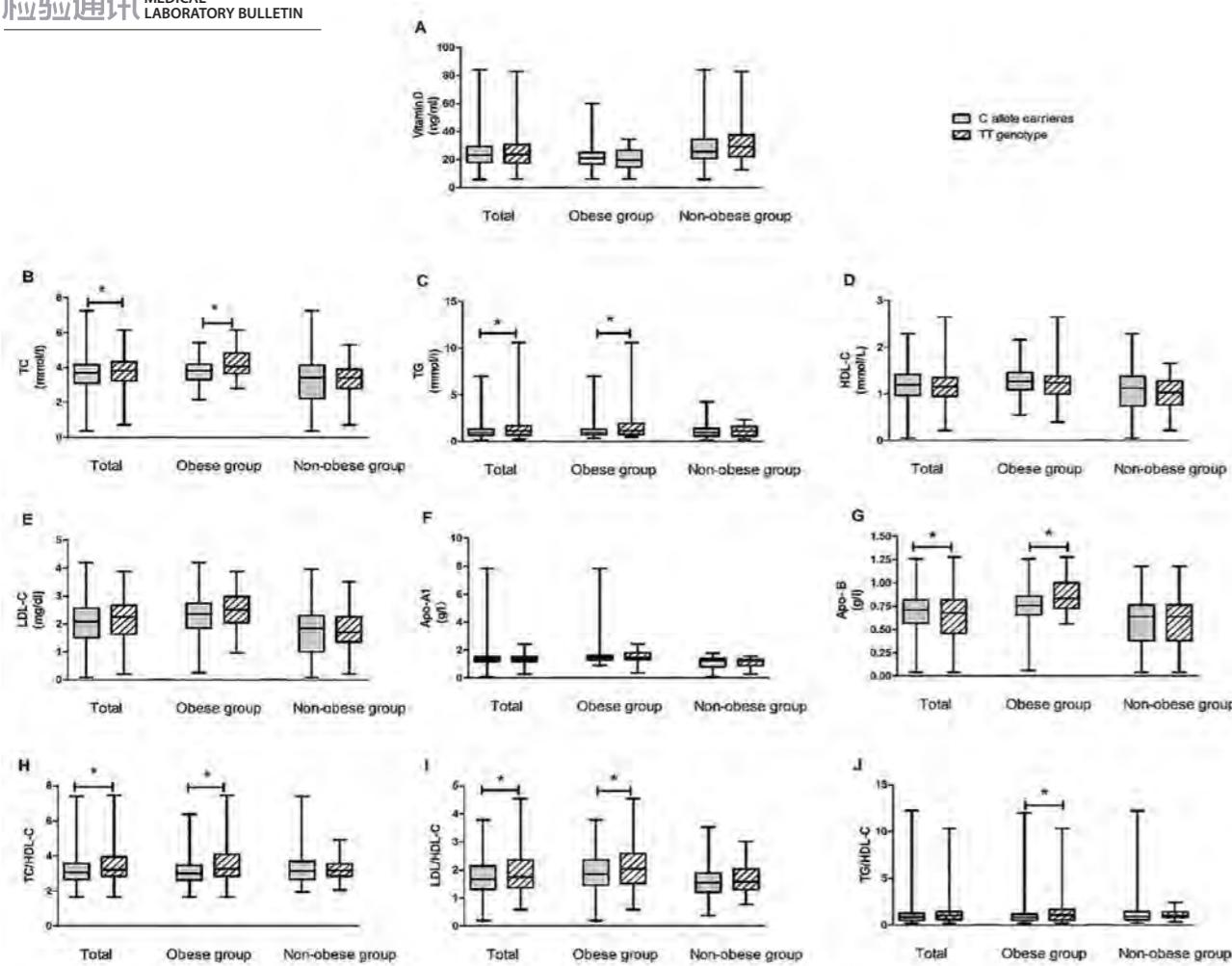


Fig 2. The effect of VDR FokI gene polymorphism on the levels of serum lipid in different groups. The association of VDR FokI gene polymorphism of Vitamin D (A), TC (B), TG (C), HDL-C (D), LDL-C (E), Apo-A1 (F), Apo-B (G), TC/HDL-C (H), LDL-C/HDL-C (I) and TG/HDL-C (J) in all subjects, Obese group and Non-obese group. * indicate statistically significant ($P < 0.05$).

Table 1 The concentration of serum Vitamin D and lipid in the Obese and Non-obese groups
P < 0.05 indicate statistically significant

Obese group(N=225)	Non-obese group(N=227)	P value
Vitamin D(ng/ml)	21.48±11.15	28.42±12.52
TC (mmol/L)	3.89±0.68	3.19±1.32
TG (mmol/L)	1.32±1.14	1.06±0.63
HDL-C (mol/L)	1.27±0.30	1.04±0.47
LDL-C (mol/L)	2.35±0.65	1.68±0.86
Apo-A1(g/L)	1.51±0.49	1.10±0.41
Apo-B(g/L)	0.78±0.16	0.57±0.26
TC/HDL-C	3.21±0.89	3.25±0.76
LDL-C/HDL-C	1.96±0.71	1.60±0.54
TG/HDL-C	1.19±1.40	1.22±1.19

Table 2 The effect of serum Vitamin D levels and VDR FokI gene polymorphism on lipid profiles in Obese group

	Obese group					
	TT genotype (n=46)		C allele carriers(n=179)			
	Vitamin D deficiency group (n=23)	Vitamin D insufficiency group(n=17)	Vitamin D normal group (n=6)	Vitamin D deficiency group(n=77)	Vitamin D insufficiency group(n=84)	Vitamin D normal group(n=18)
Vitamin D (ng/ml)	14.16±3.89	24.42±2.72	32.35±1.52	15.01±3.85	23.93±2.71	40.66±27.87
TC (mmol/l)	4.25±0.80#	4.21±0.83#	4.31±0.67	3.80±0.65	3.81±0.57	3.78±0.59
TG (mmol/l)	1.89±2.09#	1.58±1.30	1.09±0.85	1.14±0.82	1.32±1.07	1.17±0.62
HDL-C (mmol/l)	1.25±0.44	1.24±0.37	1.38±0.40	1.30±0.26	1.25±0.29	1.24±0.21
LDL-C(mmol/l)	2.54±0.64	2.38±0.75	2.69±0.38	2.29±0.64	2.36±0.65	2.24±0.70
Apo-A1(g/l)	1.48±0.43	1.57±0.32	1.58±0.32	1.50±0.22	1.52±0.73	1.47±0.17
Apo-B(g/l)	0.88±0.16#	0.86±0.22#	0.84±0.13	0.75±0.16	0.77±0.14	0.78±0.19
TC/HDL-C	3.71±1.27#	3.66±1.44#	3.26±0.88	2.99±0.62	3.18±0.75	3.18±0.94
LDL-C/HDL-C	2.24±0.87#	2.08±0.97	2.05±0.60	1.81±0.57	1.99±0.69	1.91±0.83
TG/HDL-C	1.90±2.47#	1.51±1.60	0.89±0.78	0.98±0.94	1.19±1.42	1.04±0.79

*p<0.05, the vitamin D normal group compared with the deficiency group;

&p<0.05, the vitamin D insufficiency group compared with the deficiency group.

Table 3 The effect of serum Vitamin D levels and FokI gene polymorphism on lipid profiles in Non-obese group.

	Non-obese group					
	TT genotype(n=39)		C allele carriers(n=188)			
	Vitamin D Deficiency group(n=7)	Vitamin D insufficiency group(n=16)	Vitamin D Normal group(n=16)	Vitamin D Deficiency group(n=49)	Vitamin D Insufficiency group(n=73)	Vitamin D normal group(n=66)
Vitamin D (ng/ml)	16.67±2.83	25.82±3.06	44.71±13.54	14.85±3.64	24.76±2.83	40.86±10.14
TC (mmol/l)	2.29±1.42#	2.98±1.09	3.75±0.61	3.29±1.14	3.13±1.46	3.21±1.39\$
TG (mmol/l)	0.55±0.38	1.07±0.66	1.34±0.45	0.86±0.39	1.11±0.77&	1.12±0.61
HDL-C (mmol/l)	0.78±0.52#	0.99±0.44	1.12±0.23	1.22±0.46	1.00±0.50&	0.99±0.45*
LDL-C(mmol/l)	1.09±0.88	1.52±0.66	2.11±0.55	1.65±0.79	1.62±0.89	1.76±0.96
Apo-A1(g/l)	0.79±0.45#	1.07±0.39	1.28±0.15	1.19±0.34	1.06±0.44	1.10±0.43\$
Apo-B(g/l)	0.37±0.30	0.54±0.23	0.73±0.15	0.57±0.23	0.55±0.28	0.60±0.29
TC/HDL-C	3.08±0.63	3.15±0.47	3.43±0.67	2.82±0.58	3.35±0.84&	3.42±0.76*
LDL-C/HDL-C	1.33±0.59	1.55±0.39	1.95±0.59	1.36±0.50	1.61±0.52	1.73±0.53
TG/HDL-C	0.78±0.28	1.16±0.60	1.21±0.38	0.88±1.03	1.44±1.67	1.28±0.83

*P<0.05, the vitamin D normal group compared with the deficiency group;

&P<0.05, the vitamin D insufficiency group compared with the deficiency group;

\$ P<0.05, the vitamin D normal group compared with the insufficiency group;

#p<0.05, TT genotype compared with C allele carriers.

References

- 1.Gui ZH, Zhu YN, Cai L, Sun FH, Ma YH, Jing J, et al. Sugar-Sweetened Beverage Consumption and Risks of Obesity and Hypertension in Chinese Children and Adolescents: A National Cross-Sectional Analysis. Nutrients. 2017;9(12). Epub 2017/12/01. doi: 10.3390/nu9121302. PubMed PMID: 29189729; PubMed Central PMCID: PMC5748752.
- 2.Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, Ogden CL. Prevalence of Obesity Among Adults and Youth: United States, 2015-

2016. NCHS Data Brief. 2017;(288):1-8. Epub 2017/11/21. PubMed PMID: 29155689.
- 3.Lloyd LJ, Langley-Evans SC, McMullen S. Childhood obesity and risk of the adult metabolic syndrome: a systematic review. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(1):1-11. Epub 2011/11/02. doi: 10.1038/ijo.2011.186. PubMed PMID: 22041985; PubMed Central PMCID: PMCPMC3255098.
 - 4.Mohanan S, Tapp H, McWilliams A, Dulin M. Obesity and asthma: pathophysiology and implications for diagnosis and management in primary care. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(11):1531-40. Epub 2014/04/11. doi: 10.1177/1535370214525302. PubMed PMID: 24719380; PubMed Central PMCID: PMCPMC4230977.
 - 5.Bacha F, Gidding SS. Cardiac Abnormalities in Youth with Obesity and Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2016;16(7):62. Epub 2016/05/12. doi: 10.1007/s11892-016-0750-6. PubMed PMID: 27168062.
 - 6.Cote AT, Harris KC, Panagiotopoulos C, Sandor GG, Devlin AM. Childhood obesity and cardiovascular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(15):1309-19. Epub 2013/08/21. doi: 10.1016/j.jacc.2013.07.042. PubMed PMID: 23954339.
 - 7.Freemark M. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in childhood obesity. *J Pediatr (Rio J)*. 2018. Epub 2018/08/05. doi: 10.1016/j.jped.2018.07.004. PubMed PMID: 30076788.
 - 8.Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;289(1):F8-28. doi: 10.1152/ajprenal.00336.2004. PubMed PMID: 15951480.
 - 9.Holven KB, Ulven SM, Bogsrød MP. Hyperlipidemia and cardiovascular disease with focus on familial hypercholesterolemia. *Curr Opin Lipidol*. 2017;28(5):445-7. Epub 2017/09/01. doi: 10.1097/MOL.0000000000000449. PubMed PMID: 28857860.
 - 10.Sun W, Liu C, Chen Q, Liu N, Yan Y, Liu B. SIRT3: A New Regulator of Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:7293861. Epub 2018/04/13. doi: 10.1155/2018/7293861. PubMed PMID: 29643974; PubMed Central PMCID: PMCPMC5831850.
 - 11.Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Curr Cardiol Rev*. 2018;14(3):153-63. Epub 2018/02/24. doi: 10.2174/1573403X14666180222102312. PubMed PMID: 29473518; PubMed Central PMCID: PMCPMC6131408.
 - 12.Saponaro F, Marcocci C, Zucchi R. Vitamin D status and cardiovascular outcome. *J Endocrinol Invest*. 2019. Epub 2019/06/07. doi: 10.1007/s40618-019-01057-y. PubMed PMID: 31172459.
 - 13.Mizwicki MT, Menegaz D, Yaghmaei S, Henry HL, Norman AW. A molecular description of ligand binding to the two overlapping binding pockets of the nuclear vitamin D receptor (VDR): structure-function implications. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2010;121(1-2):98-105. Epub 2010/04/20. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.04.005. PubMed PMID: 20398762; PubMed Central PMCID: PMCPmc2921884.
 - 14.Kheiri B, Abdalla A, Osman M, Ahmed S, Hassan M, Bachuwa G. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular diseases: a narrative review. *Clin Hypertens*. 2018;24(9). Epub 2018/07/07. doi: 10.1186/s40885-018-0094-4. PubMed PMID: 29977597; PubMed Central PMCID: PMCPMC6013996.
 - 15.Sangkaew B, Nuinoon M, Jeenduang N. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with serum 25(OH)D levels and metabolic syndrome in Thai population. *Gene*. 2018;659:59-66. Epub 2018/03/21. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.047. PubMed PMID: 29555202.
 - 16.Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang YM, Beswick S, Kukalizch K, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2009;45(18):3271-81. Epub 2009/07/21. doi: 10.1016/j.ejca.2009.06.011. PubMed PMID: 19615888; PubMed Central PMCID: PMCPmc2786912.
 - 17.Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism: clinical and experimental*. 2008;57(2):183-91. Epub 2008/01/15. doi: 10.1016/j.metabol.2007.08.023. PubMed PMID: 18191047.
 - 18.Laczmanski L, Lwow F, Osina A, Kepska M, Laczmanska I, Witkiewicz W. Association of the vitamin D receptor FokI gene polymorphism with sex- and non-sex-associated cancers: A meta-analysis. *Tumour Biol*. 2017;39(10):1010428317727164. Epub 2017/10/17. doi: 10.1177/1010428317727164. PubMed PMID: 29034815.
 - 19.Group WMGRS. WHO Child Growth Standards based on length/height, weight and age. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992) Supplement*. 2006;450:76-85. Epub 2006/07/05. PubMed PMID: 16817681.
 - 20.WHO. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organization technical report series*. 1995;854:1-452. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 8594834.
 - 21.Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;84(1):18-28. Epub 2006/07/11. PubMed PMID: 16825677.
 - 22.Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology*. 2009;19(2):73-8. Epub 2008/03/11. doi: 10.1016/j.annepidem.2007.12.001. PubMed PMID: 18329892; PubMed Central PMCID: PMCPmc2665033.
 - 23.Inoue N, Watanabe M, Ishido N, Katsumata Y, Kagawa T, Hidaka Y, et al. The functional polymorphisms of VDR, GC and CYP2R1 are involved in the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clinical and experimental immunology*. 2014;178(2):262-9. Epub 2014/07/22. doi: 10.1111/cei.12420. PubMed PMID: 25046415; PubMed Central PMCID: PMCPmc4233376.
 - 24.Tchernof A, Despres JP. Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*. 2013;93(1):359-404. Epub 2013/01/11. doi: 10.1152/physrev.00033.2011. PubMed PMID: 23303913.
 - 25.Millan J, Pinto X, Munoz A, Zuniga M, Rubies-Prat J, Pallardo LF, et al. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5:757-65. Epub 2009/09/24. PubMed PMID: 19774217; PubMed Central PMCID: PMCPMC2747394.
 - 26.Kamycheva E, Sundsfjord J, Jorde R. Serum parathyroid hormone level is associated with body mass index. The 5th Tromso study. *European journal of endocrinology*. 2004;151(2):167-72. Epub 2004/08/07. PubMed PMID: 15296470.
 - 27.Kull M, Kallikorm R, Lember M. Body mass index determines sunbathing habits: implications on vitamin D levels. *Internal medicine journal*. 2009;39(4):256-8. Epub 2009/05/01. doi: 10.1111/j.1445-5994.2009.01900.x. PubMed PMID: 19402866.
 - 28.Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;72(3):690-3. Epub 2000/09/01. PubMed PMID: 10966885.
 - 29.Tarcin O, Yavuz DG, Ozben B, Telli A, Ogunc AV, Yuksel M, et al. Effect of vitamin D deficiency and replacement on endothelial function in asymptomatic subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(10):4023-30. Epub 2009/07/09. doi: 10.1210/jc.2008-1212. PubMed PMID: 19584181.
 - 30.Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(13):2527-9. Epub 2001/10/20. doi: 10.1096/fj.01-0278fje. PubMed PMID: 11641262.
 - 31.John WG, Noonan K, Mannan N, Boucher BJ. Hypovitaminosis D is associated with reductions in serum apolipoprotein A-I but not with fasting lipids in British Bangladeshis. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(3):517-22. Epub 2005/09/13. PubMed PMID: 16155262.
 - 32.Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alkhafry KM, Khan N, Mohammed AK, Vinodson B, et al. Association of VDR-gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency. *Gene*. 2014;542(2):129-33. Epub 2014/04/01. doi: 10.1016/j.gene.2014.03.044. PubMed PMID: 24680778.
 - 33.Ochs-Balcom HM, Chennamaneni R, Millen AE, Shields PG, Marian C, Trevisan M, et al. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;93(1):5-10. Epub 2010/11/05. doi: 10.3945/ajcn.2010.29986. PubMed PMID: 21048058; PubMed Central PMCID: PMCPmc3001595.
 - 34.Malecki MT, Frey J, Moczulski D, Klupa T, Kozek E, Sieradzki J. Vitamin D receptor gene polymorphisms and association with type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2003;111(8):505-9. Epub 2004/01/10. doi: 10.1055/s-2003-44711. PubMed PMID: 14714273.
 - 35.Dong X, Yang D, Han R, Yang W, Pang W, Song D, et al. Study on the association between vitamin D receptor gene FokI (T/C) polymorphisms and the susceptibility to type 2 diabetic kidney disease of Han nationality in south of China. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2018;9(5):55-63. Epub 2018/12/06. PubMed PMID: 30515259; PubMed Central PMCID: PMCPMC6261924.
 - 36.Bouksila M, Kaabachi W, Mrad M, Smaoui W, El Kateb EC, Zouagli MK, et al. FGF 23, PTH and vitamin D status in end stage renal disease patients affected by VDR FokI and Bsml variants. *Clin Biochem*. 2018;54:42-50. Epub 2018/02/20. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.02.009. PubMed PMID: 29458003.
 - 37.Liu M, Li X, Sun R, Zeng YI, Chen S, Zhang P. Vitamin D nutritional status and the risk for cardiovascular disease. *Exp Ther Med*. 2016;11(4):1189-93. Epub 2016/04/14. doi: 10.3892/etm.2016.3047. PubMed PMID: 27073421; PubMed Central PMCID: PMCPMC4812533.



外周血淋巴细胞亚群及细胞因子与自身免疫性肝病及幽门螺旋杆菌感染的相关研究

山东省滨州市滨城区市立医院 吕金明（摘自定向点金 临床实验室 2020 年第八期）

【摘要】目的 研究外周血 T 淋巴细胞及细胞因子与幽门螺旋杆菌 (HP) 感染和自身免疫性肝病 (AILD) 的相关性。方法 连续选择入我院首次诊断为 AILD 患者共 60 例，采用 ¹³C 尿素呼气试验 (¹³C-UBT) 检测 HP 感染；流式细胞术法检测外周血中 T 淋巴细胞亚群百分含量；全自动生化分析仪检测肝功能指标，包括谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和谷氨酰转肽酶 (GGT) 水平；ELISA 法检测血清细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平。结果 共检出 HP 阳性 37 例 (61.67%)，HP 阳性感染患者外周血中 CD3+、CD3+CD8+ 淋巴细胞百分含量明显低于 HP 阴性者，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。HP 阳性感染患者的 ALT、AST、ALP 和 GGT 水平与 HP 阴性者比较无差异 ($P > 0.05$)。HP 阳性感染患者的 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平明显高于 HP 阴性者，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 自身免疫性肝病患者幽门螺旋杆菌感染阳性率较高，与其 T 淋巴细胞亚群百分含量降低和细胞因子水平升高密切相关。

【关键词】门螺旋杆菌；自身免疫性肝病；肝功能；细胞因子

一、对象与方

1. 研究对象：

连续选择 2018 年 01 月至 2018 年 12 月入我院首次诊断为 AILD 患者共 60 例，其中 PBC 诊断参考 2009 年美国肝病学会

自身免疫性肝病 (AILD) 主要由于机体免疫系统过度激活，导致肝脏炎症反应、肝细胞、胆管坏死等一系列慢性、进展性肝脏疾病^[1]。分为原发性胆汁性肝硬化 (PBC)、自身免疫性肝炎 (AIH) 和原发性硬化性胆管炎 (PSC) 三种，与微生物感染、生物异源性物质、营养不良、疫苗接种、紫外线照射以及环境因素等密切相关^[2]。随着生物化学、免疫学及组织病理学等检测技术的进步，AILD 的检出和诊断率逐渐提高。幽门螺杆菌 (Hp) 是定植于胃和十二指肠的革兰阴性杆菌，Hp 感染是导致消化性溃疡的主要因素^[3]。此外，Hp 也可以在肝脏、肾脏等部位存在，可能与 AILD 的发生有关^[4]。T 细胞在维持体内免疫环境稳定与阻止自身免疫性反应中发挥重要的作用^[5]。本研究旨在分析外周血中 T 淋巴细胞亚群及细胞因子含量在 Hp 感染和 AILD 的相关性，为 AILD 的临床诊疗提供新思路。

(AASLD) 标准，AIH 诊断参考 2010 年 AASLD 标准，PSC 诊断参考 Mayer 标准。排除自身免疫性疾病、肝癌、病毒性肝炎、酒精性肝炎、萎缩性胃炎、胃溃疡、妊娠及哺乳期妇女。其中男性 39 例，女性 21 例，年龄 45~78 岁，平均 (58.7 ± 13.6) 岁。

2. 研究方法：

采用 ¹³C 尿素呼气试验 (¹³C-UBT) 检测 HP 感染，流式细胞术法检测外周血中 T 淋巴细胞百分含量；全自动生化分析仪检测肝功能指标，包括谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP) 和谷氨酰转肽酶 (GGT) 水平；ELISA 法检测血清细胞因子 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平。

(1) ¹³C-UBT 方法：受试者清晨空腹 (禁食 8h，禁饮 4h)，正常呼吸，防倒流的气体导管插入 CO₂ 集气瓶中，缓慢呼气 4~5s (严禁倒吸，避免液体溅出)，拔出导管，加入稀释闪烁液，迅速拧紧，为 0min 呼气。用少量凉水 (20ml) 送服 1 粒 ¹³C 颗粒，静坐 30min 后，按上述方法收集呼吸气。采用北京华恒安邦科技有限公司提供的 HG-IRIS200 型 ¹³C 红外光谱仪和北京勃然制药有限公司提供的 ¹³CO₂ 试剂盒进行检测，以 ¹³C 计数 (30min/0min) ≥ 4 为阳性，< 4 为阴性。

(2) 流式细胞术：流式细胞术 (FCM) 检测淋巴细胞亚群数量：空腹抽取受试者 2ml 外周血，EDTA-Na₂ 作为抗凝剂。加淋巴细胞分离液用密度梯度离心法分离单个核细胞层。用适当的 RPMI 1640 培养基将单个核细胞再悬浮并计数。调节培养基用量，使细胞浓度约为 2 × 10⁶/ml。于在流式细胞术专用 EP 管中加 100μl 细胞悬液，加 20μl 对应的一组荧光标记单克隆抗体，吸吹混匀，室温避光反应 30min，加 1ml Hanks 液 500/min 离心 8min 后洗涤一次，再加 1ml Hanks 液充分混匀，应用 FCM 上机检测 10000 个细胞，应用 bd diva 软件分析淋巴细胞的百分含量。

(3) ELISA 法：根据试剂盒说明书进行标本稀释及加样：将试剂盒恢复到室温，空腹抽取受试者 2ml 外周血进行血清分离，血清稀释后加到反应区孔内，同时加到反应区孔内不同浓度的细胞因子，制定标准曲线；温育及洗板：加样板的凹槽里，盖上生物薄片，室温 (20°C) 孵育 30min 后，用缓冲液冲洗，加入 100 μl 的细胞因子酶标抗体，室温 (20°C) 温育 30min，冲洗；显色与终止反应：在反应室内加入显色剂，室温反应 15 min 后加终止液终止反应；用酶标仪进行浓度检测后换算出相应细胞因子的浓度。试剂盒购自 sigma 公司，St. Louis, MO, USA。

3. 统计学方法：

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差表示，组间比较采用独立样本 t 检验，计数资料以例数或 % 表示，组间比较用 χ^2 检验； $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

二、研究结果

1. HP 阳性率分析：共检出 HP 阳性 37 例 (61.67%)，阳性感染者的 HP 比值为 4.1~7.6，平均 (5.8 ± 1.3)。

2. 受试者 T 淋巴细胞亚群分化抗原的比较：HP

阴性感染患者的 CD3+、CD3+CD8+ 细胞明显高于 HP 阳性者，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。CD3+CD4+ 细胞、CD4+/CD8+ 细胞比值，HP 阳性感染患者与 HP 阴性者差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。(见表 1)

表1. 受试者T淋巴细胞亚群分化抗原的比较 (x±s)

组别	样本数	分化抗原			
		CD ₃ ⁺ (%)	CD ₃ ⁺ CD ₄ ⁺ (%)	CD ₃ ⁺ CD ₈ ⁺ (%)	
HP阳性感染	37	55.75 ± 8.03	38.54 ± 9.24	22.70 ± 6.60	1.79 ± 0.96
HP阴性感染	23	68.70 ± 5.95	39.68 ± 4.12	27.12 ± 2.64	1.47 ± 0.21
<i>t</i> 值		6.0776	0.5228	3.1361	1.5274
<i>p</i> 值		<0.001	>0.05	<0.01	>0.05

3. 肝功能指标水平比较：HP 阳性感染患者的 ALT、AST、ALP 和 GGT 水平与 HP 阴性者比较无差异 ($P > 0.05$)。(见表 2)

表2. 肝功能指标水平比较 (UL)

组别	ALT	AST	ALP	GGT
HP阳性感染	58.73 ± 9.62	53.84 ± 14.52	123.62 ± 25.47	49.68 ± 15.05
HP阴性感染	54.62 ± 12.33	51.22 ± 13.65	118.47 ± 28.63	47.52 ± 14.66
<i>t</i> 值	0.162	0.184	0.231	0.206
<i>p</i> 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

注：ALT，谷丙转氨酶；AST，谷草转氨酶；ALP，碱性磷酸酶；GGT，谷氨酰转肽酶

4. IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平比较：HP 阳性感染患者的 IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平明显高于 HP 阴性者，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。(见表 3)

表3. IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平比较 (μmol/L)

组别	IFN- γ	IL-6	IL-10	TNF- α
HP阳性感染	17.83 ± 5.46	45.62 ± 12.23	35.92 ± 7.62	13.68 ± 4.25
HP阴性感染	8.25 ± 2.26	24.35 ± 10.24	17.52 ± 8.34	6.56 ± 2.73
<i>t</i> 值	8.624	7.965	9.234	9.625
<i>p</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

三、讨论

AILD 可通过肝功能检查进行初步诊断，ALT 和 AST 大幅升高，提示肝细胞受损较重，但是常规指标很难把 AILD 与病毒性肝炎鉴别出来，误诊或漏诊率较高，导致 AILD 患者长期无法治愈，严重影响预后^[6]。AILD 患者免疫耐受机制丧失，诱导 T 淋巴细胞介导的肝脏靶抗原损伤等^[7]。HP 含有一些细胞毒素相关蛋白，最重要的一种毒力蛋白因子就是 -cagA^[8]。当观察到疾病患者的 HP 呈阳性时，其浓度可能会增加，大量的 cagA 可能会相应地转移到胃粘膜上皮细胞。细胞下游的信号通路因此被激活，导致感染症状加重，从而诱导细胞免疫反应^[9]。当病人处于一定的免疫耐受状态时，其防御能力会降低。因此，很容易导致内毒素血症，导致肝脏炎症损伤^[10]。

AILD 患者中与 HP 阴性感染患者相比，HP 阳性感染患者外周血中总的 T 淋巴细胞特征性标志的 CD3+ 淋巴细胞、

CD3+CD8+ 淋巴细胞的含量明显减少 ($p < 0.01$)，而 CD3+CD4+ 淋巴细胞的含量和 CD4+/CD8+ 淋巴细胞比值，差异无统计学意义 ($p > 0.05$)，CD4+ 是辅助性 T 淋巴细胞的重要表面标志，通过识别并结合 MHC II 类分子分泌细胞因子，并协助其它细胞参与免疫应答。据报道，HP 感染后，可引起人体免疫功能紊乱，血浆炎性介质被大量释放，加重炎症，导致肝组织损伤，与自身抗体发生反应形成免疫复合物，进而造成免疫性肝病^[11-12]。HP 感染可增加肝细胞坏死或凋亡发生，使淋巴细胞浸润到肝内胆管，加速发生肝硬化^[13-14]。

通过该研究得出 AILD 患者中 HP 阳性率为 61.67%，并且 HP 阳性感染患者血液中的 IFN-γ、IL-6、IL-10 和 TNF-α 含量明显高于 HP 阴性者，差异有统计学意义 ($p < 0.05$)，提示，自身免疫性肝病患者幽门螺旋杆菌感染阳性率较高，与多种免疫性抗体阳性和细胞因子水平升高密切相关。通过对 HP 的早期检测和干预可提高 AILD 的诊断准确率和临床治疗效果。然而，上述结果在大样本临床环境下仍需进一步确认，以获得具体结论。

参考文献

- 1.Montano-Loza AJ, Thandassery RB, Czaja AJ. Targeting Hepatic Fibrosis in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2016 Jul 19(7):156-157.
- 2.Czaja AJ. Nature and Implications of Oxidative and Nitrosative Stresses in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2016 Jul 13(7):122-123.
- 3.Yeo SH, Yang CH. Peptic Ulcer Disease Associated with Helicobacter pylori Infection. *Korean J Gastroenterol.* 2016 Jun 25; 67(6): 289-299.
- 4.El-Matary W, Dalzell AM, Ashworth M. Helicobacter pylori and autoimmune hepatitis. *Eur J Pediatr.* 2005 Jan; 164(1): 54-55.
- 5.Wang P, Zheng SG. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2013 Dec; 6:2688-2674.
- 6.Muratori P, Lalanne C, Bianchi G, Lenzi M, Muratori L. Predictive factors of poor response to therapy in Autoimmune Hepatitis. *Dig Liver Dis.* 2016 Jun 23(6):189-190.
- 7.Utiyama SR, Zenatti KB, Nóbrega HA, Soares JZ, Skare TL, Matsubara C, Muzzillo DA, Nishihara RM. Rheumatic Disease Autoantibodies in Autoimmune Liver Diseases. *Immunol Invest.* 2016 Jul 13(7):1-8.
- 8.龙妮娅、熊林、赵艳等，幽门螺旋杆菌东、西方株 CagA 的序列差异及其对胃癌细胞生长与凋亡的影响 [J]. 微生物学通报 ,2018,45 (4) : 848-855.
- 9.Silva LD, Rocha AM, Rocha GA, de Moura SB, Rocha MM, Dani R, de Melo FF, Guerra JB, de Castro LP, Mendes GS, Ferrari TC, Lima AS, Queiroz DM. The presence of Helicobacter pylori in the liver depends on the Th1, Th17 and Treg cytokine profile of the patient. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011 Sep;106(6):748-754.
- 10.Mackay IR, Leskovsek NV, Rose NR. Cell damage and autoimmunity: a critical appraisal. *J Autoimmun.* 2008 Feb-Mar;30(1-2):5-11.
- 11.Dzierzanowska-Fangrat K, Nilsson I, Woźniak M, Jozwiak P, Rozynek E, Woynarski M, Socha J, Ljungh A, Wadström T. Lack of an association between Helicobacter infection and autoimmune hepatitis in children. *Pol J Microbiol.* 2006;55(2):157-159.
- 12.Vorobjova T, Nilsson I, Terjajev S, Granholm M, Lyyra M, Porkka T, Prükki T, Salupere R, Maaroos HI, Wadström T, Uibo R. Serum antibodies to enterohepatic Helicobacter spp. in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of H. pylori infection. *Dig Liver Dis.* 2006 Mar;38(3):171-176.
- 13.Durazzo M, Pellicano R, Premoli A, Berrutti M, Leone N, Ponsetto A, Rizzetto M. Helicobacter pylori seroprevalence in patients with autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2002 Feb;47(2):380-383.
- 14.Galperin C, Gershwin ME. Immunopathogenesis of gastrointestinal and hepatobiliary diseases. *JAMA.* 1997 Dec 10;278(22):1946-1955.

供稿 样本处理组 于颖

服务之星 —— 刘婷婷

她是一名普普通通的 90 后女孩。2014 年 10 月来到检验科样本处理组从事采血工作，至今已有 6 年工作经验。作为服务之星的她不仅积极乐观向上、热爱生活而且在工作中她自觉遵守医院的各项规章制度，严格履行岗位职责。熟练掌握岗位专业知识。保质保量地完成每一份工作。她总是热情的对待每一位患者，耐心解释，细心体贴。她始终坚信“健康所系，生命相托”，从她选择从医这个专业那一刻起，她就肩负起一个医务工作者的重大责任，一丝不苟地履行着“白衣天使”这一光荣而又神圣的使命。

天使，是美的象征，我们渴望成为真的天使，不仅仅是因为她的美丽。而是因为她能给人们带来美好幸福的生活。护士，这个平凡的职业，之所以被人们称为白衣天使，不仅仅因为她们身着美丽的白衣，还因为她们凭着“燃烧自己，照亮别人的坚定信念”。她无私奉献的精神像春风，拂去病人的痛苦；用热血，温暖寒冷的心腹；用爱的丝线，缝合病人身心的创伤。她精心钻研，业务技术过硬的她在全面提高自己穿刺技术水平的同时，还把她平时工作的经验无私地和同事一起分享。不断提高业务水平。努力解决工作中疑难问题。为广大患者提供了最优质的服务。静脉动穿刺技术是护理工作中最重要也是最基本的技能。能否做到“一针见血”直接影响到患者承受痛苦的多少。加上现在大多都是独生子女，家属特别心疼小孩。尤其是肥胖、循环不良的患儿。血管是既看不清又摸不到。加上患儿哭闹不配合，家属心情急躁。就加重了穿刺的难度。她在工作中做到了细心，耐心，做好家属的解释工作。



图 46. 刘婷婷老师生活及工作照



2020 年第 03 期 39



2020年第二季度（4-6月）华西院区主要分离菌耐药率通报

供稿 微生物组 罗晶晶、周伟

为指导临床合理使用抗生素，现将2020年第二季度（4-6月）医院华西院区主要病原菌分离率和耐药率通报如下：

一、细菌分离情况：

2020年4-6月，华西院区共分离病原菌740株，其中专性厌氧菌124株，占16.8%；需氧革兰阴性杆菌232株，占31.4%；需氧革兰阳性球菌240株，占32.4%；真菌84株，占11.4%；其它菌（解脲脲原体/肺炎支原体/分枝杆菌）60株，占8.0%。与上一季度相比，构成比变化不大。分离率前十位的细菌/真菌分别是：大肠埃希菌91株（12.1%）；疮孢丙酸杆菌54株（7.2%）；金黄色葡萄球菌52株（6.9%）；粪肠球菌48株（6.4%）；白念珠菌37株（4.9%）；肺炎克雷伯菌30株（4.0%）；表皮葡萄球菌30株（4.0%）；屎肠球菌21株（2.8%）；光滑念珠菌20株（2.7%）；铜绿假单胞菌20株（2.7%）；肺炎链球菌20株（2.7%）。

二、主要病区前五位分离菌分布（菌株分离总数小于30株的病区略）：

病区\病原菌	1	2	3	4	5
产科	疮孢丙酸杆菌 (158株)	粪肠球菌 (34株)	大肠埃希菌 (22株)	双歧杆菌属 (8株)	卷曲乳杆菌 (7株)
儿科 ICU	金黄色葡萄球菌 (61株)	肺炎链球菌 (10株)	洋葱伯克霍尔德菌 (8株)	铜绿假单胞菌 (6株)	肺炎克雷伯菌(3株) 卡它莫拉菌(3株) 鲍曼不动杆菌(3株) 表皮葡萄球菌(3株)
妇科	大肠埃希菌 (55株)	粪肠球菌 (24株)	阴道加德纳菌 (6株)	表皮葡萄球菌 (5株)	人型支原体 (3株)
新生儿科	大肠埃希菌 (47株)	解脲脲原体 (12株)	肺炎克雷伯菌(8株) 粪肠球菌(8株)	嗜麦芽窄食单胞菌(2株) 产气肠杆菌(2株)	表皮葡萄球菌 (1株)
急诊儿科	金黄色葡萄球菌 (46株)	流感嗜血杆菌 (10株)	肺炎链球菌 (8株)	大肠埃希菌 (5株)	鼠伤寒沙门菌 (4株)

三、病原菌临床标本来源：

痰及呼吸道标本117株，占15.8%；全血86株，占11.6%；生殖道标本296株，占40%；尿液36株，占4.9%；粪便26株，占3.5%；创面分泌物15株，占3.4%；脑脊液、胸腹水11株，占2.0%；其它种类标本153株，占20.7%。

四、主要分离菌耐药率：

1. 大肠埃希氏菌（68株）：大肠埃希菌产ESBL率58.8%；对碳青酶烯类药物（厄他培南、亚胺培南、美罗培南）耐药率0.0%；阿米卡星2.9%、呋喃妥因1.5%；哌拉西林/他唑巴坦0.0%；头孢哌酮/舒巴坦1.5%；氨苄西林/舒巴坦32.4%；对头孢菌素类抗生素的耐药率分别为：头孢唑林62.7%、头孢呋辛57.4%、头孢曲松58.8%、头孢他啶11.8%、头孢吡肟7.4%；单酰胺类氨基曲南耐药率为27.9%；头霉素类头孢替坦1.5%、头孢西丁2.9%；喹诺酮类环丙沙星及左氧氟沙星耐药率分别为54.4%及41.2%，复方磺胺耐药率为48.5%。

2. 金黄色葡萄球菌（52株）：青霉素耐药率89.6%；苯唑西林耐药率（MRSA）为35.4%；红霉素耐药率62.5%；克林霉素耐药率60.4%；复方磺胺耐药率8.3%；莫西沙星耐药率2.1%；环丙沙星耐药率8.3%；左氧氟沙星耐药率8.3%；利福平耐药率2.1%；对万古霉素、利奈唑胺、替加环素无耐药。

3. 粪肠球菌（48株）：红霉素耐药率61.5%；四环素耐药率78.9%；高浓度庆大霉素耐药率35.9%；高浓度链霉素耐药率7.9%；左氧氟沙星耐药率17.9%；莫西沙星、环丙沙星耐药率均为18.4%；氨苄西林、青霉素、万古霉素、亚胺培南、呋喃妥因、利奈唑胺、替加环素无耐药。

2020年第二季度（4-6月）锦江院区主要分离菌耐药率通报

供稿 微生物组 罗晶晶、周伟

为指导临床合理使用抗生素，现将2020年第二季度（4-6月）医院锦江院区主要病原菌分离率和耐药率通报如下：

一、细菌分离情况：

2020年4-6月，锦江院区共分离病原菌873株，其中专性厌氧菌189株，占21.6%；需氧革兰阴性杆菌217株，占24.9%；需氧革兰阳性球菌261株，占29.9%；真菌122株，占14.0%；其它菌（解脲脲原体/肺炎支原体/分枝杆菌）57株，占6.5%。与上一季度相比，构成比变化不大。分离率前十位的细菌/真菌分别是：疮孢丙酸杆菌85株（9.6%）；金黄色葡萄球菌79株（8.9%）；大肠埃希菌77株（8.7%）；白色念珠菌75株（8.4%）；粪肠球菌41株（4.6%）；光滑念珠菌39株（4.4%）；B群链球菌39株（4.4%）；

肺炎克雷伯菌 36 株 (4.0%)；卷曲乳杆菌 30 株 (3.4%)；詹氏乳杆菌 22 株 (2.5%)。

二、主要病区前五位分离菌：

病区\病原菌	1	2	3	4	5
妇科 / 肿瘤放化疗	大肠埃希菌 (35株)	肺炎克雷伯菌 (4株) (16株)	金黄色葡萄球菌 (4株)	粪肠球菌 (3株)	咽峡炎链球菌 (2株)
产科 (346株)	疮孢丙酸杆菌 (85株)	粪肠球菌 (27株)	大肠埃希菌 (18株)	咽峡炎链球菌 (13株)	B群链球菌 (10株) 光滑念珠菌 (10株)
儿童重症医学科	金黄色葡萄球菌 (39株)	肺炎克雷伯菌 (4株) (5株)	铜绿假单胞菌 (3株) 鲍曼不动杆菌 (4株)	平常假丝酵母菌 (2株) 大肠埃希菌 (2株)	福氏志贺菌 (1株) 解鸟氨酸拉乌尔菌 (1株) 白念珠菌 (2株)
感染儿科 (36株)	金黄色葡萄球菌 (11株)	肺炎链球菌 (6株)	流感嗜血杆菌 (5株)	产酸克雷伯菌 (3株)	肺炎克雷伯菌 (2株) 屎肠球菌 (2株)
小儿呼吸免疫 (84株)	金黄色葡萄球菌 (24株)	白念珠菌 (12株)	肺炎克雷伯菌 (10株)	流感嗜血杆菌 (8株)	肺炎链球菌 (6株)
新生儿科	解脲脲原体 (17株)	金黄色葡萄球菌 (13株)	粪肠球菌 (7株)	肺炎克雷伯菌 表皮葡萄球菌 (5株) 溶血葡萄球菌 (5株)	大肠埃希菌 (5株)
急诊儿科	鼠伤寒沙门菌 (8株)	大肠埃希菌 (6株)	沙门菌属 (其它种共5株)	金黄色葡萄球菌 (4株)	肺炎链球菌 (3株)

三、主要分离菌耐药率：

痰及呼吸道标本 349 株，占 45.4%；全血 47 株，占 6.1%；生殖道标本 226 株，占 29.4%；脓 12 株，占 1.6%；尿液 32 株，占 4.2%；脑脊液、胸腹水 10 株，占 1.3%；创面分泌物 7 株，占 0.9%；大便 1 株，占 0.1%；其它种类标本 85 株，占 11.1%。阿米卡星 0.0%、呋喃妥因 3.2%；哌拉西林 / 他唑巴坦 25.0%；头孢哌酮 / 舒巴坦 31.3%；氨苄西林 / 舒巴坦 74.2%；对头孢菌素类抗生素的耐药率分别为：头孢曲松 53.1%、头孢他啶 43.8%、头孢哌酮 31.3%；单酰胺类氨基曲南耐药率为 37.5%；头霉素类头孢替坦 19.4%、头孢西丁 37.5%；喹诺酮类环丙沙星及左氧氟沙星耐药率均为 0.0%；复方磺胺耐药率为 37.5%。

四、主要分离菌耐药率：

1. 流感嗜血菌 (103株)： 第 1 季度分离的流感嗜血菌 72.3% β 内酰胺酶阳性；氨苄西林耐药率为 76.7%；阿莫西林 / 克拉维酸耐药率为 5.8%；哌拉西林 / 他唑巴坦耐药率为 4.9%；氨苄西林 / 舒巴坦 35.0%；头孢呋辛 29.1%；头孢曲松、头孢他啶、头孢哌酮的耐药率均为 0.0%；环丙沙星、洛美沙星耐药率均为 0.0%；复方磺胺耐药率为 53.4%；氯霉素耐药率为 5.8%；四环素耐药率为 6.8%；美罗培南耐药率 0.0%；阿奇霉素不敏感率 39.8%。

2. 大肠埃希氏菌 (75株)： 大肠埃希菌产 ESBL 率 43.2%；对碳青霉烯类药物 (厄他培南、亚胺培南、美罗培南) 耐药率 0.0%；阿米卡星 0.0%、呋喃妥因 0.0%；哌拉西林 / 他唑巴坦 1.3%；头孢哌酮 / 舒巴坦 5.3%；氨苄西林 / 舒巴坦 40.0%；对头孢菌素类抗生素的耐药率分别为：头孢唑林 53.4%、头孢呋辛 48.0%、头孢曲松 45.3%、头孢他啶 20.0%、头孢哌酮 10.7%；单酰胺类氨基曲南耐药率为 25.3%；头霉素类头孢替坦 0.0%、头孢西丁 9.3%；喹诺酮类环丙沙星及左氧氟沙星耐药率分别为 46.7% 及 37.3%，复方磺胺耐药率为 50.7%。

3. 金黄色葡萄球菌 (57株)： 青霉素耐药率 91.2%；苯唑西林耐药率 (MRSA) 为 35.1%；红霉素耐药率 64.9%；克林霉素耐药率 63.2%；复方磺胺耐药率 15.8%；莫西沙星、左氧氟沙星、环丙沙星耐药率分别为 5.3%、5.3%、8.8%；对万古霉素、利奈唑胺、利福平、替加环素无耐药。

血栓弹力图用于产科围术期出血监测的研究进展

供稿：血库组 作者：易宗平（重庆医科大学附属第一医院）

血栓弹力图 (TEG) 是一种动态分析机体整体凝血功能的监测方法。近年来 TEG 逐渐用于产妇凝血功能的监测及指导产科大出血输血方案制订。产妇常规凝血监测和 TEG 监测的凝血状态均不同于非产妇，但至今未确立明确的参考范围。妊娠合并胎盘异常的产妇易发生产后大出血甚至弥散性血管内凝血 (DIC)，TEG 可协助判断出血原因及出血量、指导合理的输血成分。对于有血栓形成高危因素的产妇，TEG 还可评估其术后血栓形成风险。本文就 TEG 的工作原理及其用于产科围术期出血的监测及指导输血、预测血栓形成风险作一综述。

1. TEG 的工作原理及各项参数的意义

TEG 的检测原理为将全血样本与高岭土反应，在 37℃ 的恒温环境下将其注入圆柱形反映杯中，反映杯的盖子和悬垂丝耦合为一体，杯子在磁场的作用下以 4°~45° 的角度和每 9 秒匀速转动 1 周，当受检血样开始凝结，血块使杯子和盖耦合在一起；悬垂丝受到样本形成的切应力作用，随之出现左右旋转，在旋转过程中由于切割磁力线而产生电流；在检测开始的瞬间，凝血反映立即开始，血凝块逐渐形成，血凝块强度逐渐增加，当强度增加到最大值时，悬垂丝被固定于其中。系统将检测到的凝血到纤维蛋白溶解过程中的物理信息经电脑软件处理后，便形成 TEG 曲线。TEG 参数图横坐标表示时间，单位为 min；纵坐标表示振幅，单位为 mm。TEG 是定性伴定量的检测，主要参数包括凝血反映时间 (R 值)、血凝块形成时间 (K 值)、凝血固定角 (Angle 角)、最大纤维蛋白凝块强度 (MA)、30min 纤维蛋白溶解率 (LY30)、最终纤溶百分比预测值 (EPL)、综合凝血指数 (CI) 等，各个中心的上述参数参考范围略有不同。

(1) R 值判断血凝块形成的速度，反映凝血因子活性，延长时可补充新鲜冰冻血浆 (FFP)。

(2) K 值和 Angle 角代表血凝块聚合的速率，反映纤维蛋白原 (Fib) 的功能，K 值延长可被冷沉淀或 FFP 纠正，Angle 角 <45° 代表水平低下，可适当补充 Fib。

(3) MA 表示血凝块的强度，反映血小板和 Fib 的功能，主要反映血小板功能，MA ≤ 40mm、40mm < MA < 45mm、45mm ≤ MA < 54mm 分别代表极低、较低、低血小板功能，此时可结合血小板数量、临床出血情况补充血小板；MA ≥ 70 mm 表示血小板功能亢进，对于心肌梗死、脑梗死风险高的患者有必要进行抗血小板治疗。

(4) LY30 和 EPL 均表示血凝块的稳定性，反映纤溶功能；CI 反映总体凝血状态。LY30 ≥ 7.5%、CI < 1.0，代表原发性纤溶亢进；LY30 ≥ 7.5%、CI > 3.0，代表继发性纤溶亢进；LY30 < 7.5%、CI > 3.0，代表血栓前状态，此时需要抗凝治疗。

基于上述意义，TEG 常用于判断凝血状态、指导术中成分输血、抗凝及抗血小板治疗等。

2. 各类产妇的 TEG 表现

2.1 健康产妇的 TEG 表现

妊娠末期产妇血容量增加约 40%~45% (平均 1.5L)，血浆平均增加 1.0L，红细胞平均增加 500mL，血液稀释。血小板随血液稀释及子宫胎盘单位的消耗增加而减少，除 V、VII 因子外几乎所有的凝血因子均升高，Fib 升高最为明显，几乎是妊娠前的 2 倍 (平均 4.5g/L)，并以此高水平维持到产后第 1 天，在维持产妇的高凝状态中起重要作用。D-D 升高，产后第 1 天达高峰，之后逐渐下降，

凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶时间(APTT)、国际标准化比值(INR)不变或轻微改变。故产妇妊娠晚期呈现出稀释性高凝状态。TEG参数表现为K值随孕周增加逐渐降低、Angle角孕周增加逐渐升高,表明Fg的增多引起血液高凝;MA值和CI值明显增大,提示血小板增多引起的高凝及全血的高凝状态,但两者与孕周的增加无明显关系;R值无明显变化。TEG检测能提供妊娠各个时期较为准确的凝血功能和纤溶功能监测,在后续指导分娩方式的选择、产科出血的治疗及产后血栓形成的预防等方面发挥重要作用。

2.2 妊娠合并非胎盘疾病的产妇的TEG表现

TEG监测尚可发现合并有其他非胎盘疾病的产妇凝血功能的异常。对于血小板减少症产妇,血小板计(PLT) $\geq 50 \times 10^9/L$ 时血液呈现高凝状态,PLT $<50 \times 10^9/L$ 时则失去正常孕晚期的高凝状态,TEG表现为R、K值延长,MA降低,CI值下降。另一项研究指出PLT $>56 \times 10^9/L$ 且TEG指标正常时可安全地进行椎管内麻醉。妊娠合并糖尿病产妇其高凝状态较无糖尿病产妇更明显,表现为Angle角增大,MA升高,CI值增大,而R、K值减小。Fib功能异常的产妇,如K $\geq 3.8\text{min}$,MA $\leq 54.2\text{mm}$,CI ≤ -3 时将更容易发生阴道流血、产后出血、胚胎发育异常、先兆早产、胎儿死亡等并发症。但是,TEG检测参数不能区分上述并发症中的出血和非出血症状。子痫产妇多表现为低凝状态,TEG表现为R值、K值延长而Angle角、MA降低,且在PLT $>100 \times 10^9/L$ 时仍可观察到这一现象,因此TEG可准确判断血小板减少及血小板正常的子痫产妇的凝血状态。更早的研究发现健康产妇、轻度子痫、重度子痫产妇除MA以外的所有TEG参数并无明显差异,轻度子痫产妇的MA值明显高于重度子痫产妇,重度子痫合并PLT $<100 \times 10^9/L$ 时TEG参数呈现出明显低凝状态。上述合并不同疾病的产妇凝血功能状态的改变与产后出血有一定关系。产前或者剖宫产术前的TEG监测能提供全面且较为准确的信息,对判断与处理孕妇的凝血功能状态进而采取相应措施有很大帮助。

2.3 产妇合并胎盘异常的TEG表现

胎盘异常(包括胎盘早剥、前置胎盘及胎盘植入)的产妇剖宫产率极高,也极易发生产后大出血。既往有流产史或剖宫产史的前置胎盘产妇多合并胎盘植入,此时子宫动脉血流因胎盘植入从0.1L/min增加0.4L/min,致子宫动脉明显增粗,增粗的动脉分娩时常不能正常痉挛,成为难以控制的出血来源。最新研究发现胎盘植入已替代子宫收缩乏力成为子宫切除的第一位原因,这类产妇剖宫产术中平均失血量达3L,其中40%的产妇术中至少需要10U的红细胞输注。合并胎盘异常的产妇产前TEG指标同健康妊娠产妇无明显差异,可能与胎盘异常仅在发生出血时胎盘及蜕膜释放组织因子导致凝血系统激活而分娩前并不影响母体止血功能有关。TEG可检测75%的与临床相关的严重的凝血异常,协助诊断DIC时的早期征象——高凝状态,帮助早期预测严重的产后出血。

3. TEG在剖宫产术中大出血的应用

3.1 TEG监测产科出血

广义的产科出血包括产前出血、早期产后出血(胎儿娩出后24h内)及晚期产后出血(分娩后1d至6周),其中绝大多数的病

例是早期产后出血。剖宫产术后出血定义为产后出血量 $>1\text{L}$ 。产科出血常发生于术前合并胎盘早剥、前置胎盘、胎盘植入、瘢痕子宫、先兆子痫等疾病的产妇,因隐性子宫出血、出血混合羊水或其他液体及妊娠末期血容量增加等因素,难以准确估计出血量,成为产妇死亡的重要原因之一。发生产后出血的患者约25%的死亡原因为大量出血后治疗不充分,40%的产妇相关死亡是可预防的,尤其是出血所致的死亡。大量出血时产妇TEG表现为血凝块的稳定性及纤溶功能降低,血凝块形成速度加快,即R、K值缩短。但是,关于产妇的TEG值参考范围尚未有明确的规定,TEG估计出血量的作用有限,Butwick等研究得出剖宫产术中平均出血量为0.8L,估计总失血量与TEG表示血凝块强度的参数即MA%、MRTG有弱相关性,呈正相关;产前的高凝状态在产后出血早期轻度降低。产科大出血患者多因难以控制的出血需行子宫切除术,这类患者中一半以上有失血性休克,超过25%有不同程度的凝血功能障碍或DIC。TEG的监测能提高整体止血能力的评估并且为止血治疗提供有价值的信息。为了减少出血后治疗的延迟,术中可常规应用安置床旁凝血监测设备,如TEG或旋转式血栓弹力计。同时TEG能判断出血是因外科原因还是凝血功能障碍所引起,从而决定止血方式的选择及血液成分的补充。

3.2 TEG指导成分输血

3.2.1 TEG指导成分输血可减少血制品输注总量

产科大出血时需紧急输血治疗来保证器官灌注及产妇的氧合,成分血制品如红细胞悬液、Fib、凝血因子、血小板、FFP,冷沉淀的合理使用及止血药物氨甲环酸、缩宫素的合理使用可阻止出血进一步发展并减少血制品的输注。目前少有研究明确指出出血量与TEG指标的变化关系,Karlsson等研究发现产妇失血超过2L时从TEG指标及传统凝血功能检测中可观察到凝血功能受损。大出血时失血量超过1L应复查TEG,此时若TEG指标下降,则需根据以下指标进行成分输血:R $>7\text{ min}$ 时可予以输注FFP,MA $<54\text{mm}$ 时可予以血小板输注, α 角 $<32^\circ$ 时予以Fib或冷沉淀输注,Lys30 $>7.5\%$ 时予以抑肽酶输注。考虑到各个中心设置的TEG正常值参考范围有所差异,实际临床成分输血时需根据术中具体情况而定,术毕还应再次复查TEG以了解机体凝血功能是否纠正。Wikkelsøe等汇总的相关文献分析结果显示,用TEG检测指标指导临床输血后,虽红细胞血小板或FFP单独的输血量未减少,但患者术中、术后总出血量及同时输注FFP与血小板的比例明显减少。Charbit等研究报道TEG指导的红细胞、FFP、血小板的输注有可能减少术前和术后的输血需求,协助指导术中抗纤溶药物及凝血因子替代物的应用,同时降低患者病死率。既往指南建议对于创伤大出血患者可采取“输血打包法”紧急输血,即从复苏开始交替使用血浆、血小板、红细胞,水平配比为5U PRBC+5U FFP+2U血小板,TEG测定凝血功能结果显示打包法可早期维持止血功能。由于剖宫产术中大出血产妇的特殊性,同时又为避免凝血功能障碍的发展和阻止凝血因子活性进一步降低,目前最新产科出血指南建议:

尽量减少使用胶体,优化FFP和血细胞比率即1U血细胞+1UFFP+1U血小板,更高的FFP和血细胞比率能明显降低围产期大规模液体复苏后的凝血异常,1U血细胞、1UFFP和1U血小板混合物含29%的血细胞比容、 $85 \times 10^9/\text{L}$ 血小板和62%的凝

血因子活性。

适当使用冷沉淀和抗纤溶药物,Fib水平 $>2\sim 3\text{g/L}$ 是维持充分止血的条件,同时维持VII因子活性在50%~60%以上,以尽量减少出血。

可以考虑氨甲环酸早期应用于产科大出血患者,但目前研究证据尚不足,应用需谨慎。

VII因子用于产科大出血的患者,被证实可以明显减少出血并且不会增加血栓栓塞事件的发生率。产科大量输血对处理严重产后出血的作用十分重要,但目前并无统一的产科大量输血方案(MTP)。已有关于TEG在剖宫产大出血管理方面的相关研究,但由于各个研究之间存在差异,研究水平及结果一致性较小。

3.2.2 Fib在产科出血中的作用

研究表明Fib是唯一与严重产后出血相关联的实验室参数,能更早预测严重的大出血。每减少1g/L,出血风险增加2.63倍,当Fib $\leq 2\text{g/L}$ 时其预测出血风险的概率甚至可达100%。Rahe-Meyer等进行的关于人Fib浓缩液应用于主动脉弓置换手术的两项前瞻性研究表明,人Fib浓缩液预处理可安全地降低输血需求、恢复机体的凝血能力,保护患者免于发生与输血相关的不良事件。维持稳定的Fib水平可以减少产后出血患者异基因血液制品的输注。但如何精确地补充Fib目前仍不十分明确,指南建议围产期患者Fib水平应达到5~6g/L。TEG可通过血小板活化抑制剂来确定功能性Fib水平,K值、MA值、Angle角与Fib有良好的相关性,K值、Angle角随Fib的增加而缩短,MA值也可部分反映Fib的水平。然而Karlsson等进行的一项前瞻性观察性研究表明Fib水平与产后出血不存在相关性。因此产妇Fib水平可预测产后出血尚需进一步大样本研究支持。

3.2.3 TEG指导成分输血需结合临床

TEG所具有的指导成分输血的优势,使其与其他检测联合应用于大出血的患者时可能最大限度地降低异体血的输注量,极具临床价值。产科大出血严重时可危及产妇生命,需麻醉医生、产科医生、输血科医生的紧密合作,术前动脉球囊阻断、术中外科干预、加强宫缩一定程度上可减少出血量进而降低输血概率,同时TEG指导成分输血需结合术中产妇的生命体征改变、血流动力学变化、血气分析及凝血检测指标从而合理输血。

4. TEG预测产后血栓形成

剖宫产术后早期各凝血因子较术前仅轻度降低,绝大部分产妇在产后3周以内仍处于高凝状态。Rami等发现产后8~12d血小板有明显升高,并可一直持续到产后24d。产妇术后需卧床休息,也增加了产后血栓形成发生率,甚至部分产妇分娩时即发生静脉血栓。Douglas等发现当MA值 $\geq 68\text{mm}$ 时,患者术后发生血栓的风险将明显增加,对此类产妇必要时需积极抗凝治疗。

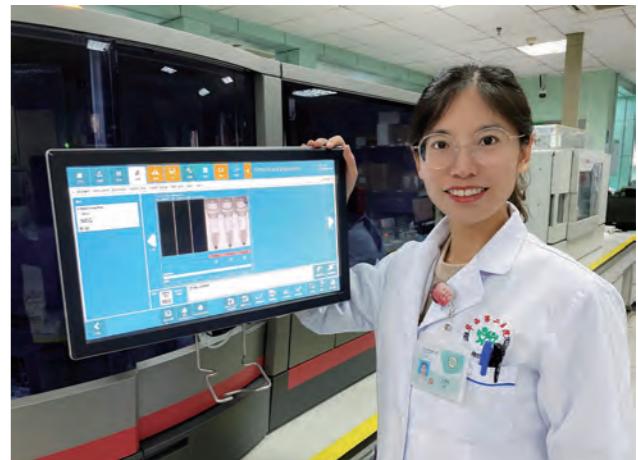
5. 小结

综上所述,合并中央型前置胎盘、凶险性前置胎盘、重度子痫、血小板减少及存在血液系统疾病如血友病的产妇在实施剖宫产手术时,采用TEG监测可指导术中输血,准确判断出血后的凝血功

能,减少异体血输注量,为产妇术后快速康复提供了条件。同时尚可联合腹主动脉球囊阻断及去白细胞血液回输治疗以进一步减少术中出血和异体血的输注,促进产妇快速康复。术后TEG监测还可预测产妇产后血栓形成的风险,指导适时的抗凝治疗,避免静脉血栓形成。但根据TEG参数的具体数值判断出血量、指导更精确的临床成分输血仍需大量大样本研究的支持。

摘自

《检验医学与临床》2017年10月第14卷第20期



封面人物: 王海娟

主管技师,硕士研究生,2012年毕业于四川大学华西临床医学院,此后进入我院检验科工作,主要从事临床输血相关检测、临床合理用血和输血不良反应监督管理、输血信息系统管理等工作。尤其擅长疑难配血、新生儿溶血病孕前监测及产后新生儿溶血病检测等。同时作为检验科样本处理组组长,负责日常管理相关工作。毕业至今,在国内外期刊杂志上发表多篇论文,多次获得医院先进、优秀共产党员等称号。

**有奖翻译**

(奖励规则: 请将本页英文单词或词组翻译成中文, 正确翻译率 $\geq 95\%$ 即可带着杂志或本页复印件到检验科领取奖品。领奖联系人: 李老师, 联系电话: 85502045)

emergency	crystals
fever	cytoplasm
lethargy	neutrophils
poor feeding	rhomboid
yellowish coloration of skin	rectangular
febrile	needlelike
hypotensive	occasional
jaundiced	neonates
bilirubin	hemolytic
blood group incompatibility	specific
admit	vitro
pediatric	elevated level of care
intensive care unit	chickenpox
given IV fluids	chilblain
broad-spectrum antibiotics	chlamydia
double-volume exchange transfusion	chloasma
intensive	chloroma
phototherapy	chlorosis
blood culture	cholangitis
escherichia coli	cholecystitis
hyperbilirubinemia	choledochitis
secondaryto	cholelithiasis
sepsis	azoospermia
peripheral blood smears	balanitis
EDTA-anticoagulated blood	balanoposthitis
refractile	belching

检验通讯读者问卷调查

感谢您对《检验通讯》的关注与支持, 为把通讯的每一个栏目办得有声有色, 我们真诚地希望您在阅读本刊后填写如下问卷。您的宝贵意见和建议将推动我们不断进步, 为您呈现一份更加优秀的通讯期刊, 同时也希望本刊能在您的工作和学习中助您一臂之力。谢谢您的合作!

读者评刊

1 您阅读本期《检验通讯》主要想获得哪个专题的信息?

- 科室动态; 检验与临床; 检验动态; 检验风采; 细菌耐药监测;
输血园地; 医学英语;

2 您最关注本期《检验通讯》的哪些栏目?

- 科室动态; 检验与临床; 检验动态; 检验风采; 细菌耐药监测;
输血园地; 医学英语;

3 您认为《检验通讯》需要改进的地方有哪些?

- 封面; 内容; 版面设置; 排版设计

4 您是否希望继续收到《检验通讯》?

- 是; 否

5 您希望检验通讯增加的其他栏目和内容? 您的其他意见和建议?

阅读习惯调查

1 您获取专业信息的主要方式有?

- 专业杂志 / 报纸; 专业网站; 医学图书馆 / 网页; 学术会议;
其他请注明 _____

2 您经常阅读的专业杂志有:

- 中华儿科杂志; 中华妇产科杂志; 中华检验医学杂志; 临床检验杂志;
中华医院感染杂志; 四川大学学报(医学版); 中国寄生虫学与寄生虫病杂志;
其他请注明 _____

3 您认为哪一级以上的杂志对你的专业最有帮助?

- 省级期刊以上; 统计源期刊以上; 核心期刊以上; MEDLINE、SCI 以上

请将填写完的调查表沿裁剪线扯下, 投至“检验科意见箱”(检验科“血标本接收窗口”旁)

联系电话: 85501543; E-Mail: hxeyjyt@163.com; 新浪微博 @ 四川大学华西第二医院检验科

请沿虚线剪下

