

两种抗体的检测,第 4 代试剂同时针对 P24 抗原、IgM 和 IgG 抗体,窗口期已经缩短至 21 d^[3-4]。该血液中心检验科目前检测血液 HIV 这一项即是采用两种不同厂家的第 4 代试剂进行的两次检验,然而通过本组核酸筛查实验,将 ELISA 法两次检测呈阴性的标本进行核酸检测再次筛查,仍会检测到 HIV 阳性标本,说明目前现行开展的检测技术仍有安全隐患,为保证临床用血的进一步安全,开展核酸检测具有重要意义^[5-6]。

感染者体内最早被检测到的是病毒核酸,且病毒核酸呈一过性高水平,此后水平有所下降^[7-8]。在本实验中,通过 CH1 (HIV)探针在第 19 个循环就检测出靶标核酸片段远远提前于内置控在 38.9 个循环才扩增出的结果,因此推断相较于内置控的病毒载量水平,其是相当高的。而此时酶免技术既没有检测出 P24 抗原,也没有检测出 IgM、IgG 类抗体,说明此样本极有可能在最早期的感染阶段,此时病毒核酸呈一过性高水平而 P24 没出现或刚好在 P24 抗原水平下降而抗体还未升高时造成漏检。核酸技术相对于第 4 代酶免试剂缩短了 5 d 的窗口期,该筛查结果极有力地说明了缩短窗口期对血液安全起到了重要的作用。

参考文献

[1] Tani Y, Aso H, Matsukura H, et al. Significant background rates of HBV and HCV infections in patients and risks of blood transfusion from donors with low anti-HBc titres or high anti-HBc titres

with high anti-HBs titres in Japan: a prospective, individual NAT study of transfusion-transmitted HBV, HCV and HIV infections [J/OL]. Vox Sang, 2011-11-14[2012-03-25], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22082342>.

[2] 任芙蓉. 血液核酸检测技术[J]. 北京医学, 2008, 30(10): 624-627.
[3] Shihai H, Brian E, Wai BM, et al. A novel real time HIV-1 qualitative assay for the detection of HIV-1 nucleic acids in dried blood spots and plasma[J]. J Virol Methods, 2011, 178(1/2): 216-224.
[4] Speers D, Phillips P, Dyer J. Combination assay detecting both human immunodeficiency virus(HIV)p24 antigen and anti HIV antibodies opens a second diagnostic window[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(10): 5397-5399.
[5] Jos JA, Weusten M, Harry AJ, et al. Mathematic modeling of the risk of HBV, HCV and HIV transmission by window phase donations not detected by NAT[J]. Transfusion, 2002, 42(3): 537-548.
[6] 吴玉清, 杨忠思, 赵林, 等. 青岛地区无偿献血者血液病毒核酸检测的研究[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(11): 834-836.
[7] 王良华, 叶贤林, 尚桂芳, 等. 免疫筛查隐性献血者血样病毒核酸检测的研究[J]. 中国输血杂志, 2005, 18(4): 286-289.
[8] 任芙蓉, 刘长利, 吕秋霜, 等. 病毒核酸检测在献血者血液筛查中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 596-599.

(收稿日期: 2012-01-17)

• 检验技术与方法 •

FQ-PCR 法与培养鉴定法检测解脲支原体结果比对分析

梁勇彪, 屈雅川, 黄丽英, 肖词英, 黎冬梅
(广西壮族自治区南宁市第二人民医院检验科 530031)

摘要:目的 了解 FQ-PCR 法与培养鉴定法检测解脲支原体(UU)检出率的差异性,并探讨导致差异的原因。方法 用 PCR 法和培养鉴定法分别检测不孕患者和泌尿疾病患者的 UU,并回顾性分析两种方法的检测结果。结果 不孕不育标本中 PCR 法和培养鉴定法比较,两者阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.56, P>0.05$);进一步研究发现在男性泌尿疾病患者即用棉拭子取样所检测的结果显示,两种方法的阳性率差异有统计学意义($\chi^2=28.5, P<0.05$),女性泌尿疾病患者则差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 用培养鉴定法检测男性泌尿疾病患者的 UU 时,男性患者宜以前列腺液代替尿道口棉拭子取样,以确保检测结果的可靠性。

关键词:不育; 解脲支原体; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)08-0965-03

解脲支原体(Ureaplasma urealyticum, UU)引起的泌尿生殖道感染又称非淋菌尿道炎,是性传播疾病的病原体之一,与不孕不育症以及泌尿生殖道疾病有着密切的关系^[1-2]。现通过对 UU 主要检测方法(PCR 法和培养鉴定法)相关性进行分析比对,提示影响检测 UU 的重要因素,并探讨两种检测方法影响其阳性率的干扰因素,确保检测 UU 的准确性,以供临床参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009~2011 年该院生殖中心的 5 360 对不育夫妻(即 10 726 例)和 4 318 例泌尿疾病患者。其中男性年龄 23~50 岁,平均年龄 35 岁;女性年龄 22~44 岁,平均年龄 30 岁。5 360 对夫妻都是 3 年以上未避孕而不能生育者,符合不孕不育标准。泌尿疾病患者也为 3 年来泌尿科和妇科门诊的泌尿病患者,其中男性 2 512 例,年龄 19~60 岁,平均年龄 32 岁;女性 1 806 例,年龄 16~53 岁,平均年龄 27 岁。

1.2 方法 (1)标本采集,生殖中心男性取前列腺液或精液送检,泌尿疾病患者男性用无菌棉拭子在尿道口沾取,置无菌 0.9%氯化钠溶液离心管内送检或取中段尿送检。女性标本采集用窥阴器扩展阴道,用无菌棉拭子内旋 180 度沾取分泌物,置无菌 0.9%氯化钠溶液离心管内,洗出分泌物送检。(2)PCR 法标本处理,在振荡器上充分振荡标本,使分泌物游离,经高速离心后制成沉淀物,裂解制成反应液模板,最后置入反应管,操作过程严格按试剂说明书进行实验。培养鉴定法把标本直接接种在基础液中,并严格按说明书进行操作。

1.3 仪器与试剂 美国生产的 ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪。试剂盒由广州中山医科大学达安基因诊断中心提供的 PCR UU 试剂盒。培养鉴定法支原体培养鉴定药敏试剂盒由郑州安图绿科生物工程有限公司提供。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 计算机统计软件进行数据分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 法检测 10 726 例不孕不育患者 UU, 检出阳性者 2 200 例, PCR 法检测 4 318 例泌尿疾病患者 UU, 检出阳性者

356 例。培养鉴定法检测 2 335 例不孕不育患者, 检出阳性者 436 例, 培养法检测 1 718 例泌尿疾病患者, 检出阳性者 72 例。见表 1。

表 1 两种方法检测结果比较

组别	PCR 法检测 例数(<i>n</i>)	PCR 法		培养法检测 例数(<i>n</i>)	培养法	
		阳性[<i>n</i> (%)]	阴性[<i>n</i> (%)]		阳性[<i>n</i> (%)]	阴性[<i>n</i> (%)]
不孕不育患者组	10 726	2 200(20.51)	8 526(79.49)	2 335	436(18.67)	1 899(81.33)
泌尿疾病患者组	4 318	356(8.24)	3 960(91.76)	1 718	72(4.19)	1 646(95.81)
合计	15 044	2 556(17.00)	12 486(83.00)	4 053	508(12.53)	3 545(87.67)

2.2 3 年来不孕不育患者 PCR 法检测阳性 2 200 例(20.51%)与培养鉴定法检测阳性 436 例(18.67%)比较, 两者差异无统计学意义($\chi^2=1.56, P>0.05$)。3 年泌尿疾病患者 PCR 法检测阳性 356 例(8.24%)与培养鉴定法检测阳性 72 例(4.19%)比较, 两者差异有统计学意义($\chi^2=28.5, P<0.05$)。见表 1。

2.3 3 年间 PCR 法检测差异无统计学意义($\chi^2=4.05, P>0.05$); 3 年间培养法检测差异也无统计学意义($\chi^2=3.88, P>0.05$); 3 年来两方法比较差异也无统计学意义($\chi^2=0.9, P>0.05$)。见表 2。

2.4 不孕不育患者用 PCR 法检测男、女性阳性率差异无统计学意义($\chi^2=1.58, P>0.05$), 培养鉴定法检测男、女性阳性率比较差异也无统计学意义($\chi^2=0.64, P>0.05$)。泌尿疾病患

者中 PCR 法检测男、女性阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=2.45, P>0.05$)。培养鉴定法检测男、女性阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=9.47, P<0.05$)。见表 3。

表 2 3 年之间两种方法检测结果比较

年份	PCR 法检测 总例数(<i>n</i>)	阳性率 [<i>n</i> (%)]	培养鉴定法 检测总例数(<i>n</i>)	阳性率 [<i>n</i> (%)]
2009 年	5 170	857(16.58)	922	109(11.82)
2010 年	5 755	975(16.94)	1 718	218(12.69)
2011 年 1~10 月	4 119	724(17.58)	1 413	181(12.81)
合计	15 044	2 556(16.99)	4 053	508(12.53)

表 3 3 年中两种方法对不孕不育患者和泌尿疾病患者男、女性间检测结果比较

性别	不孕不育患者				泌尿疾病患者			
	PCR 法(<i>n</i>)	培养法(<i>n</i>)	PCR 法阳性率[<i>n</i> (%)]	培养法阳性率[<i>n</i> (%)]	PCR 法(<i>n</i>)	培养法(<i>n</i>)	PCR 法阳性率[<i>n</i> (%)]	培养法阳性率[<i>n</i> (%)]
男性	5 360	1 218	1 119(20.87)	235(19.29)	2 695	1 082	211(7.83)	33(3.05)
女性	5 360	1 117	1 081(20.16)	201(17.99)	1 623	636	145(8.93)	39(6.13)
合计	10 726	2 335	2 200(20.51)	436(18.67)	4 318	1 718	356(8.24)	72(4.19)

3 讨 论

支原体是条件致病菌, 当机体免疫力下降、菌群失调或长期滥用抗生素时能迅速繁殖, 其黏附在泌尿生殖道上皮细胞表面^[3-4]。UU 感染还可以造成不完全梗阻的输卵管炎性黏连, 使管腔狭窄, 不通畅, 是发生输卵管不孕以及宫外孕的重要原因^[5-6]。据文献报道, UU 产生神经氨酸酶样物质干扰精子和卵子的结合, 且与精子膜有共同抗原, 可引起免疫损伤而致不育^[7-8]。女性宫颈部的支原体极易吸附在精子的表面, 随精子到达宫腔和输卵管, 引起宫颈炎和输卵管炎, 导致输卵管阻塞和受精卵着床不良。无论生殖道哪个部位被 UU 感染, 均会引起输卵管通液障碍, 是原发性或继发性不孕症的重要病因^[9]。

本实验结果表明: (1) 在不孕不育患者中, 用 PCR 法和培养鉴定法检测 UU, 两者比较阳性率差异无统计学意义($P>0.05$), 两者在 3 年间差异也无统计学意义($P>0.05$)。 (2) 在泌尿疾病患者中用 PCR 法和培养鉴定法检测, 两者比较阳性率差异有统计学意义($P<0.05$), 3 年间差异无统计学意义($P>0.05$)。在性别分布上, 泌尿疾病患者中 PCR 法的男、女性比较阳性率差异无统计学意义($P>0.05$), 而在培养鉴定法中的男、女性比较阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述, PCR 法和培养鉴定法检测 UU 阳性率有或无

显著性差异的结果与两种方法无关, 考虑到泌尿疾病患者和不孕不育患者的女性采样方式一样, 而男性的取样则不同。为了避免取材不当造成假阴性, 因此用培养鉴定法检测男性泌尿疾病患者的 UU 时, 男性患者宜以前列腺液代替尿道口棉拭子取样, 以确保检测结果的可靠性。

FQ-PCR 法是一项具有高度的特异性和灵敏度且快速批量较为成熟稳定的技术, 缺点是缺少药敏报告, 并且对实验条件要求较高^[10]。培养方法提供药敏结果便于临床治疗, 但检测时间周期较长。因此两法现阶段都各有所长无法舍取, 应多加改进完善以防干扰因素影响检测结果。

参考文献

[1] 岑福柱, 杨秀群. 解脲支原体与女性生殖道疾病的关系[J]. 医学综述, 2008, 6(12): 1829-1830.

[2] 杜刚, 杨桂英, 陈利琼. 泌尿道衣原体、支原体感染及药敏分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 402-403.

[3] 杨晓云, 纪凤祥. 支原体鉴定培养及药敏试验分析对临床诊疗的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1443-1444.

[4] 周铁明, 刘佩. 泌尿生殖道分泌物支原体培养及药敏结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 410-411.

[5] 万长春, 汪弘, 商学军, 等. UU 感染对精子运动轨迹影响的实验

研究[J]. 男科学报, 1999, 5(1): 29-31.

[6] 徐宁. 泌尿生殖道分泌物支原体培养及药敏结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 505-506.

[7] 高鹏, 张咏梅, 李顺安, 等. 某地区 2 774 例泌尿生殖道支原体培养及药敏检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 205-206.

[8] 吴蓉, 邱燕, 穆海. 泌尿系感染病原体分布及耐药性监测[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 271-272.

• 检验技术与方法 •

[9] 洪志强, 方梅, 陆巧荣. 实时荧光定量 PCR 技术在结核分枝杆菌研究中的应用[J]. 现代预防医学, 2010, 37(27): 346-347.

[10] 陆静, 梁占光, 韩字研. 荧光定量 PCR 对生殖道沙眼衣原体及解脲支原体检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(10): 1311-1312.

(收稿日期: 2012-01-30)

高效液相色谱法检测全血糖化血红蛋白的稳定性分析及其应用价值

聂庆东¹, 刘君廷², 祁瑞环¹

(1. 清华大学医院检验科, 北京 100084; 2. 北京市丰台医院检验科 100070)

摘要:目的 初步分析高效液相色谱法(HPLC)检测全血糖化血红蛋白的稳定性并讨论其应用价值。方法 临床随机采集 3 个 HbA1c 水平的乙二胺四乙酸(EDTA-K₂)抗凝无变异血红蛋白的全血标本 90 例, 应用 HPLC 对全血标本在不同存放时间(即时、30、50、60、70 d)进行 HbA1c 检测。结果 全血糖化血红蛋白 60 d 内检测的结果均在可接受范围内, 判定为稳定。结论 应用离子交换高效液相色谱法检测在 2~8 ℃条件下保存的 EDTA-K₂ 抗凝全血, 对糖化血红蛋白稳定性研究有着重要的临床应用价值。

关键词:糖尿病; 糖化血红蛋白; 高效液相色谱; 稳定性

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 08. 035 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)08-0967-02

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是一种常见的内分泌代谢障碍性疾病。人口老龄化和居民生活方式的改变使得我国的糖尿病患病率呈明显的上升趋势^[1]。糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, GHb)是目前国际上公认的检测 DM 患者血糖控制情况的金标准。糖化血红蛋白 A1(HbA1c)是红细胞中血红蛋白与葡萄糖缓慢、持续且不可逆进行非酶促蛋白糖化反应的产物^[2]。国际标准推荐 HbA1c≥6. 5%作为诊断非妊娠相关的 DM^[3-4]。但各地 HbA1c 检测方法标准化的程度及当地对普遍开展 HbA1c 检测的经济承受能力等问题, 使 HbA1c 筛查和诊断 DM 存在许多问题^[5]。实验室由于人员、设备、效益等因素的影响, 有时不能及时检测 HbA1c, 这就涉及样本的保存问题^[6]。国外有文献报道抗凝全血样本在-70 ℃或更低的温度可以稳定 1 年以上, 但对于 2~8 ℃保存标本稳定性的探讨却各不相同^[7-8]。现分析全血标本保存时间对离子交换高效液相色谱法(IE-HPLC)检测 HbA1c 的影响, 从而讨论其在临床实际应用中的价值。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 日本 TOSOH 公司 HLC-723 G7 全自动糖化血红蛋白分析仪。配套试剂由日本 TOSOH 公司提供, 批号: 第 1 液 G7-108P; 第 2 液 G7-206P; 第 3 液 G7-302P; 溶血洗净液 HW-13P。质控品由日本 TOSOH 公司提供, 水平 1、2 批号: 090848。耗材: 真空采血管由健峰生物技术有限公司提供。

1.2 方法 用 IE-HPLC 法检测变异 Hb、HbF 样本中的 HbA1c, 结果可能受干扰^[9]。应从该院当日体检采集的 EDTA-K₂ 抗凝全血标本中选取无变异血红蛋白的标本 90 例, 2 h 内检测 HbA1c 水平为基准值, 相对均匀地选择 HbA1c 浓度为小于 6. 5%、7%~8%和大于 10%样本分别混匀后分装, 将得到的 3 份低、中、高值区间样本保存于 2~8 ℃冰箱, 分别于 30、50、60、70 d 复融、稀释、检测。

1.3 稳定性评价 本实验参考美国糖化血红蛋白标准化计划^[10](National Glycohaemoglobin Standardization Program,

NGSP)并结合实验室自身条件严格进行全血样本的稳定性评价。HLC-723 G7 仪器即时检测 90 例 HbA1c 结果并计算各区间样本的 $\bar{x}$ 、s 和 CV%, 并以此为基准结果, 其他保存时间的结果与 $\bar{x} \pm 3s$ 比较进行稳定性评价, 在 $\bar{x} \pm 3s$ 范围内为可接受结果, 即判为“稳定”, 超出 $\bar{x} \pm 3s$ 范围即判为“不稳定”。判为“不稳定”所对应检测时间的前一时间点为保存时间即是稳定时间。

2 结果

2.1 按照 CLSI 的 EP5-A2 文件的要求^[11], 将 TOSOH 公司水平 1、2 质控品混合均匀分装, 每天做两批实验(上午一批、下午一批, 时间间隔大于 2 h), 实验样本随机插入常规标本中做双份测定, 连续测定 20 个工作日, 结果显示高、低两水平质控品的总精密度均小于 2%, 说明 HLC-723 G7 全自动糖化血红蛋白分析仪重复性良好。

2.2 即时检测 HbA1c 结果, 临床随机采集 3 个 HbA1c 水平的乙二胺四乙酸(EDTA-K₂)抗凝无变异血红蛋白的全血标本 90 例, 测定数据采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析, 可接受范围为 $\bar{x} \pm 3s$ 区间。见表 1。

表 1 即时 HbA1c 检测结果比较分析					
组别	例数(n)	$\bar{x}$ (%)	s(%)	CV(%)	可接受范围(%)
低值组	45	5.26	0.05	0.95	5.11~5.41
中值组	25	7.59	0.06	0.79	7.41~7.77
高值组	20	10.76	0.06	0.56	10.58~10.94

2.3 不同保存时间 HbA1c 结果, 在 4 ℃保存条件下, 90 例 EDTA-K₂ 抗凝全血分别在 30、50、60、70 d 应用 G7 检测 HbA1c(%), 结果 70 d 低、中、高值均超出可接受范围 $\bar{x} \pm 3s$, 因其前一时间点为 60 d, 判定其可稳定 60 d。见表 2。

表 2 不同保存时间 HbA1c 检测结果比较分析($\bar{x} \pm s$, %)