

浊法是测定通过不溶性复合物到达探测器而未被散射或吸收的光线量,光通量与抗原含量成反比。散射比浊法是一定波长的光沿水平轴照射,通过液体时遇到抗原抗体复合物粒子,光线被粒子颗粒折射,发生偏转,光线偏转的角度与发射光的波长和抗原抗体复合物大小和多少密切相关,通过测定散射光的强度来反映被测成分的含量。

长期以来,人们普遍认为免疫透射比浊法的灵敏度不够理想,检测范围不够宽,原因是免疫复合物颗粒太小阻挡不了光线的通过;或是免疫复合物的数量太少,其浊度变化对光通量的透过影响不大,特别是在低浓度时更加明显^[1-2]。而在抗原过量情况下,透射比浊法易出现钩状效应而导致结果偏低。而在速率散射比浊法检测时,仪器设计有抗原过量检测系统,抗原过量时会提示样本稀释,从而达到检测结果的准确性和精密性。由此,在比较实验中,速率散射比浊法在低浓度和高浓度测定中可以得到较为准确的结果^[3-5]。但是,在基层医疗单位,常常没有条件满足使用散射比浊法测定特定蛋白,应用免疫透射比浊法检测就显得更加重要。其次,随着检验医学的日趋发展,检验质量管理已规范化,实验室应重视不同检测方法之间检测结果是否存在一致性的问题^[6-8]。

根据 NCCLS(EP9-A)要求^[6],同一标本在不同系统(仪器、试剂、方法学等)的检测结果显示存在一定的偏差,但通过校正及比对试验后可以取得两者之间结果的一致性,从而满足临床的需要。虽然,透射比浊法和散射比浊法的检测原理不同,但两法均属于免疫比浊测定。本文对这两种方法测定免疫球蛋白的结果进行比对分析,两种方法的测定结果具有较好的相关

性,散射比浊法特定蛋白分析仪对免疫球蛋白检测,能保证检验结果的准确性和可靠性。但在许多没有此条件基层医疗机构,选择透射比浊法检测免疫球蛋白也能在不同检测系统的检测结果间达到可比性和一致性。

参考文献

- [1] 陈世佳. 透射比浊法和散射比浊法检测 RF 的结果比较[J]. 淮海医药, 2009, 27(6): 484-485.
- [2] 段玉东, 桑俊军, 闫海鹏, 等. 散射比浊法和透射比浊法测定血浆免疫蛋白的比较[J]. 中国医药导报, 2008, 5(2): 97.
- [3] 张汉园. 透射比浊法和速率散射比浊法测定 C 反应蛋白的比较[J]. 江苏大学学报, 2004, 14(4): 348-350.
- [4] 但刚, 胡宗海, 李同心. 免疫透射和免疫散射比浊法测定血清免疫球蛋白及补体的比较[J]. 西南国防医药, 2008, 18(5): 659-661.
- [5] 蒋斌华, 苏运钦. 透射比浊法与散射比浊法检测 ApoA1, ApoB 的方法比较[J]. 广州医药, 1999, 30(6): 70-72.
- [6] 赵莹, 张杰, 徐根云. 应用 NCCLS EP9-A 对两种蛋白分析仪的免疫球蛋白测定结果进行比对[J]. 江西医学检验, 2006, 24(4): 315-317.
- [7] 陈华, 王永卿. 免疫透射比浊法测定类风湿因子的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(1): 21-22.
- [8] 张强, 罗寻阳, 胡金曹. 两种免疫比浊法测定血清免疫球蛋白的结果差异探讨及解决方法[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(2): 198-199.

(收稿日期: 2012-04-12)

• 检验技术与方法 •

幽门螺杆菌 IgG 抗体免疫层析分型方法的建立

胡纪文¹, 熊建辉¹, 张永顶²

(1. 深圳市罗湖区中医院检验科, 广东深圳 518000; 2. 深圳市南山区西丽医院, 广东深圳 518000)

摘要:目的 建立 1 种检测血清中抗幽门螺杆菌(Hp)抗体的胶体金免疫层析(GICA)方法。方法 采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记 SPA, 将 Hp 重组抗原 VacA、CagA 和 UreaA、UreaB 抗原包被于硝酸纤维素膜 NC 上, 制成免疫层析检测试纸条, 血清中的抗 Hp 抗体与试纸条上金标记物结合后沿着硝酸纤维素膜移动, 与膜上的固相抗原结合形成肉眼可见的酒红色线条。结果 用 GICA 与免疫印迹试剂盒对比检测了 180 份血清标本中抗 Hp 抗体, 显示本方法检测敏感度、特异度分别为 95.4% 和 96.3%, 两法总符合率为 96.1%。结论 用这种免疫层析 GICA 分型方法检测血清中抗 Hp 抗体, 灵敏度高、特异性强、简便快速, 有着广泛临床应用前景。

关键词: 螺杆菌; 幽门; 免疫层析; 免疫球蛋白

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.043

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)20-2531-03

幽门螺杆菌(Hp)感染在慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌等消化道疾病致病中起重要作用^[1-3]。流行病学调查证明, 我国成人 Hp 感染率在 50% 以上, 相关的临床研究表明 Hp 的致病性主要与菌型特性、感染年龄及机体反应性有关。因为不同的 Hp 菌株生物学特性和致病性有明显差异, 目前通常采用免疫分型, 细胞毒性试验和 PCR 等方法^[4-5]。本研究采用 Hp 主要重组抗原片段、SPA 抗原建立胶体金免疫层析(GICA)方法, 检测血清中抗 Hp IgG, 并对其进行免疫学分型, 包括 I 型(毒力型)和 II 型(非毒力型)。优化胶体金免疫层析快速诊断试纸条研制各关键步骤的实验条件和步骤, 为进一步产业化定实验基础。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 180 份临床血清考核标本由深圳市罗湖区中医院、深圳市南山人民医院、深圳市南山区西丽医院和深圳市

龙华人民医院提供。

1.2 仪器与试剂 氯金酸(HAuCl₃·Cl₃·4H₂O), 上海化学试剂厂; SPA, 卫生部上海生物制品研究所; Hp 的重组蛋白片段 VacA、CagA, 深圳菲鹏公司; Ure A、UreaB, 国外某公司; 硝酸纤维(NC)膜, Millipore 公司; 玻璃纤维膜, S&S 公司; IBT 试剂盒, 深圳伯劳特公司; Z323K 低温高速离心机, 美国; 点膜器, 美国 Bio-Dot 公司。

1.3 方法

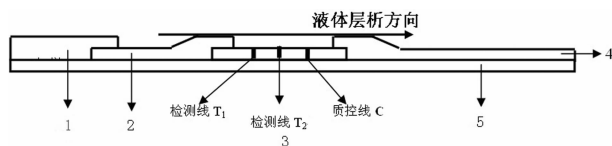
1.3.1 免疫胶体金的制备 15 nm 胶体金的制备, 参照文献[6-8]进行。其步骤为: 去离子水溶解氯金酸使其终浓度为 0.2 g/L, 煮沸后每 100 mL 加入 10 g/L 柠檬酸三钠水溶液 4 mL, 继续煮沸 7 min, 观察胶体金的粒度。取颗粒直径为 15 nm 的胶体金 100 mL, 用 0.1 mol/L K₂CO₃ 调至 pH 6.2, 在搅拌

状态下加入 SPA(1 g/L) 0.6 mL,继续搅拌 10 min;加入 50 g/L BSA 10 mL,继续搅拌 5 min。4 ℃ 下 3 000 r/min 离心 5 min,弃沉淀,上清液以 12 000 r/min 离心 15 min,小心移去上清液,沉淀即为制备的胶体金。用 20 mL 悬浮液悬浮沉淀,以吸水纤维吸附后干燥 4 h,4 ℃ 保存备用。

1.3.2 重组抗原 VacA、CagA 和 UreB+UreA 和人 IgG 在 NC 膜上的包被 将 Hp 重组蛋白片段 VacA、CagA 用 0.2 M 磷酸盐缓冲液(PH7.2)稀释至 1.5 mg/L,人 IgG(1 mg/L)。分别灌入点膜器中,分别在 NC 膜(260 mm×26 mm)上划线 T1,在离 T1 测试带 3 mm 处用 UreaA、B(1.5 mg/L)另划一条线 T2。在离 T2 5 mm 处,用人 IgG(1 mg/L)划线作为质控,将 NC 膜放于密闭的干燥箱中,保存于 4 ℃ 备用。

1.3.3 SPA 胶体金标记物在玻璃纤维膜上的包被 将已制备好的 SPA 胶体金标记物灌入点膜器中,在玻璃纤维膜(260 mm×5 mm)上划线,最后将玻璃纤维膜放于密闭的干燥箱中,保存于 4 ℃ 备用。

1.3.4 试纸条组装和切割 根据功能不同可将试纸条分为 4 个部分^[9-10],见图 1。吸收垫,吸收检测样品中多余液体。中间为反应区(NC 膜;包括判读结果的检测带 T1 和 T2 和指示试纸条质量的质控带 C)。下段为样品垫(玻璃纤维膜;接触待检测样品)。在中下段之间放置浸有胶体金标记 SPA 复合物的金标垫。而整个试纸条贴附于双面胶白色塑料背板,用切割机将组装好的反应板切成 5 mm 宽的试纸条。



1: 样品垫;2: 金标反应膜;3: NC 反应膜;4: 吸收垫;5: 塑料板。

图 1 试纸条组装和切割示意图

1.3.5 试纸条的结果判定与质量考核 检测抗 Hp IgG,加样端加入 0.1 mL 血清。检测线 T1 和 T2 同时阴性,质控线 C 阳性,结果判为抗 Hp 抗体阴性;检测线 T1 和 T2 同时阳性,质控线 C 阳性,结果判为抗 Hp 抗体 I 型(毒力型)阳性;检测线 T1 阴性,T2 阳性,质控线 C 阳性,结果判为抗 Hp 抗体 II 型(非毒力型)阳性。如果无红色条带质控线出现则视为试剂失效。结果确定时间:强阳性标本在 5 min 内即可在检测线处见到红色胶体金颗粒聚集;弱阳性标本约需要 10 min 确定结果。

1.3.6 临床应用考核 采用本研究建立的抗 Hp 抗体分型检测试剂盒,检测 180 例临床血清的抗 Hp IgG。采用深圳伯劳特公司生产的 Hp IBT 血清抗体试剂盒的检测结果作为金标准:对同一份血清样本,通过免疫印迹方法,检测患者血清的 Hp 抗体,包括判断 Hp 感染的 UreA、UreB 抗体及 CagA、VacA 等毒力标志抗体,并遵循双盲原则。

1.4 统计学处理 比较两种血清学检测方法的敏感度、特异度、阳性预期值和阴性预期值。同时计算两种试剂盒检测结果的符合率。

2 结 果

2.1 试纸条的质量考核

2.1.1 精密度试验 分别将 1 份抗 HpI 型抗体血清和 1 份抗 HpII 型抗体血清用所制试纸各同步检测 10 次,结果反应线均在 5 min 左右出线,且条带颜色完全一致均为酒红色。

2.1.2 保存温度和保存时间的确定 将切割好的检测试纸条分别存放于 37 ℃ 和 4 ℃,观察不同温度对试纸条的影响。分

别在第 3、6、12 天,检测质控品 2 份,测得质控线的颜色深浅均在正常范围内,故该检测试纸条在室温至少可保存 1 年。

2.2 临床应用考核 见表 1。通过计算,本研究建立的 GICA 试剂盒检测敏感度、特异度分别为 95.4% 和 96.3%,阳性及阴性预测值分别为 99.3% 和 78.1%。2 者的总体符合率为 96.1%。产毒株 Hp(I 型)符合率:95.3%;不产毒株 Hp(II 型)符合率为 95.6%。

表 1 两种试剂盒检测的结果(n)

GICA	深圳伯劳特		
	阳性数	阴性数	合计
阳性数	146	1	147
阴性数	7	26	33
合计	153	27	180

3 讨 论

本研究首次在国内建立免疫层析分型方法,将抗 Hp IgG 分为 I 型(毒力型)和 II 型(非毒力型)。通过与免疫印迹试剂盒比较,总符合率达 95%,表明该方法的建立有较好的临床应用价值。本研究所建立的胶体金免疫层析快速检测抗-Hp 抗体的方法具有下述特点:(1)灵敏度高:与 IBT 方法比较敏感度达 95.8%;(2)特异性强:本试剂盒采用高活性的重组 VacA+CagA、UreA+UreB 抗原,极大地提高了检测的特异性。比其他抗 Hp 胶体金试剂盒仅仅检测尿素酶抗体,具有更高的特异性;(3)能将抗 Hp IgG 分成 Hp I 型和 Hp II 型,以往抗 Hp IgG 不能分型,这将为临床提供极大的方便,具有非常重要的临床意义;(4)操作简便:本试剂盒的核心部分仅为 1 个试条,构造十分简单,结果显示为酒红色的条带,判断非常容易;操作简便,不需任何设备,适应于各类医院和社康中心及体检中心,诊所和急诊检验,具有广阔的临床应用前景。

参考文献

- [1] 中华医学会消化病学分会,幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告(2007 年 8 月庐山)[J]. 中华医学杂志,2008,88(10):652-656.
- [2] 张万岱,胡伏莲,萧树东,等. 中国自然人群幽门螺杆菌感染的流行病学调查[J]. 现代消化及介入诊疗,2010,15(5):265-270.
- [3] Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection; the Maastricht III Consensus Report[J]. Gut, 2007, 56(6): 772-781.
- [4] 王强,谢跃文,辛焰. 211 例上消化道症状儿童幽门螺旋杆菌抗体检测分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(2):268.
- [5] 王瑞锋. 儿童幽门螺杆菌感染检测方法评估[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(5):564-266.
- [6] De Roe C, Courtoy PJ, Baudhuin P. A model of protein-colloidal gold interactions[J]. J Histochem Cytochem, 1987, 35(11): 1191-1198.
- [7] Wang BL, Scopsi L, Martvig M, et al. Simplified purification and testing of colloidal gold probes[J]. Histochemistry, 1985, 83(2): 109-115.
- [8] Seno S, Akita M, Hsueh CL. A new method of the immunohistochemical detection of cellular antigens for light and electron microscopy[J]. Histochemistry, 1989, 91(6): 449-454.
- [9] Osikowicz G, Beggs M, Brookhart P, et al. One-step chromatographic immunoassay for qualitative determination of choriogon-

nadotropin in urine[J]. Clin Chem. 1990, 36(9):1084-1085.

[10] 皮国华, 何红英. 胶体金联免疫吸附试验检测丙型肝炎病毒抗体

[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1995, 9(4): 371-374.

(收稿日期: 2012-04-16)

• 检验技术与方法 •

高脂血对临床生化测定影响及处理方法的临床研究

朱 征^{1,2}, 丁显平^{1△}, 杨 敏², 舒丽虹²

(1. 四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川成都 610064;

2. 成都市第七人民医院检验科, 四川成都 610041)

摘要:目的 分析高脂血对临床生化测定的影响, 探讨利用聚乙二醇-4000(PEG-4000)法消除高脂血对常见 8 项临床生化指标测定的影响。方法 分别对不同浓度的高脂血标本(11 例); 用 PEG 处理前后的正常澄清标本(各 30 例)、中度脂血标本(各 30 例)、重度脂血标本(各 30 例)进行常见 8 项临床生化指标测定; 将测定结果进行统计学分析。结果 当脂血样本 410 nm 吸光度值大于 0.8 时, ALT、AST 无法检测; PEG 浓度为 6.67 g/dL 时, 对常见 8 项临床生化指标测定无影响; 中度脂血标本、重度脂血标本经 PEG 处理后可消除脂血对测定指标结果的影响。结论 高脂血影响临床生化测定的准确性, 利用 6.67 g/dL 的 PEG 处理高脂血标本可以消除高脂血对常见 8 项临床生化检测指标测定结果的影响。

关键词:高脂血症; 聚乙二醇-4000; 模拟脂血

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.044

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)20-2533-02

高脂蛋白血又称高脂血, 是指血浆中乳糜微粒(CM)、极低密度脂蛋白(VLDL)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)等脂蛋白有 1 种或几种浓度过高的现象^[1]。高脂血是临床生化检验工作中经常遇到的棘手问题, 临床常见高脂血标本的来源有(1)高脂血症患者; (2)患者食入高脂食物后, 大量的乳糜微粒进入血液, 可使血浆产生混浊, 称乳糜血^[2]; (3)临床因治疗营养不良或消耗性疾病输入脂肪乳的患者^[3]。高脂血对临床生化指标测定的干扰机制主要有光散射、不可溶物质增多使标本混浊, 增加标本内物质的极性与非极性^[4]。通常低浓度的脂血对临床常见生化检测指标影响不大, 但中、高浓度的脂血对临床生化检测指标影响严重。特别是遇到急诊手术, 某些急诊患者如急性胰腺炎、全静脉营养输注患者时, 常由于标本严重脂血导致临床生化指标无法测定或测定结果不准确, 严重影响临床医生对患者病情的全面掌握及恰当处理, 甚至导致医疗纠纷、医疗事故的发生。本研究通过高脂血对临床生化测定的影响分析及处理方法的临床研究, 力求解决高脂血影响临床生化测定的问题。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 本底血清来自本院当日门诊和住院患者, 共 150 例, 要求血清外观澄清无混浊, 收集上述血清总量至 100 mL, 充分混匀后备用。

1.2 仪器与试剂 OLYMPUS AU-640 全自动生化分析仪; 质控品和定标液由 Beckman coulter Biomedical limited 提供, 质控品中值批号: 0029J, 高值批号: 0030A, 定标液批号: 01141。血淀粉酶(AMY)试剂由 Beckman coulter Biomedical limited 提供, 批号: 2360; ALT、AST、总蛋白(TP)、总胆红素(TB)、GGT、肌酐(Cr)试剂由北京利德曼生化股份有限公司提供, 批号分别为 201102L、111081J、204091C、202101A、203271C、204051A; 肌酸肌酶(CK)试剂由中生北控生物科技股份有限公司提供, 批号: 120441。30%脂肪乳注射液由四川科伦药业股份有限公司生产, 批号: F12030301-2; 聚乙二醇-4000(PEG-4000)由湖南华纳大药厂有限公司提供, 批号: 100504。脂肪

乳、PEG 的配制: 30%脂肪乳注射液 200 μ L 加入到 5.8 L 蒸馏水中充分混匀, 1:30 稀释后备用; 20 g PEG-4000 加入到 100 mL 蒸馏水中充分混匀, 浓度为 20 g/dL(20%)备用。

1.3 方法 150 μ L 血清分别加入配制的脂肪乳 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μ L, 构成 11 个不同浓度梯度的模拟脂血标本。按比例向本底血清中加入配制的 20 g/dL PEG 溶液, 充分混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 使 PEG 浓度呈由低到高的不同浓度梯度。

1.3.1 模拟正常对照组 PEG 处理前(30 例): 150 μ L 本底血清; PEG 处理后(30 例): 150 μ L 本底血清 + 75 μ L 20% PEG, 充分混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 此时 PEG 浓度为 6.67 g/dL, 血清被稀释 1.5 倍。

1.3.2 模拟中度脂血组 PEG 处理前(30 例): 150 μ L 本底血清 + 25 μ L 配制的脂肪乳; PEG 处理后(30 例): 150 μ L 本底血清 + 25 μ L 配制的脂肪乳 + 88 μ L 20% PEG, 充分混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 此时 PEG 浓度为 6.69 g/dL, 血清被稀释 1.75 倍。

1.3.3 模拟重度脂血组 PEG 处理前(30 例): 150 μ L 本底血清 + 45 μ L 配制的脂肪乳; PEG 处理后(30 例): 150 μ L 本底血清 + 45 μ L 配制的脂肪乳 + 98 μ L 20% PEG, 充分混匀, 3 000 r/min 离心 5 min, 此时 PEG 浓度为 6.68 g/dL, 血清被稀释 1.95 倍。

1.4 统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件包进行统计学分析; 组间比较采用 *t* 检验, 统计分析显著性水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 不同浓度模拟脂血标本 ALT、AST 测定结果及 OD 值比较 ALT、AST 测定采用双试剂、双波长连续监测法, 主波长为 340 nm, 副波长为 410 nm。11 个不同浓度梯度的模拟脂血标本的测定结果, 见表 1。副波长 OD 值反映的是样本的颜色和浊度, 随着模拟脂血浓度增加, 样本的浊度不断增加, 410 nm 的 OD 值不断增加, 当 OD 值大于 0.805 以后, ALT、

△ 通讯作者, E-mail: brainding@scu.edu.cn。