

却有差异,在几种主要标本中,痰、纤刷物及胸水中的假阳性率较高,而在 27 份血标本中检出阳性 9 例,与临床诊断对比,阳性检出率为 90.00%,而假阳性率为 0。此结果说明不同标本 PCR 检测分枝杆菌假阳性率存在明显差别。另几种标本因数量较少,在此未作统计分析,有待进一步研究。

15 例假阳性痰标本做普通细菌培养,9 例痰菌阳性,其中卡他布兰汉氏菌 4 例,卡他布兰汉氏菌和甲型链球菌混合感染 3 例,卡他布兰汉氏菌和产气肠杆菌混合感染 1 例,摩根氏变形杆菌 1 例。在这 15 例中,病理诊断为支气管鳞癌 1 例,腺癌 6 例,非何金氏淋巴瘤 1 例,其中 2 例合并卡他布兰汉氏菌感染。纤刷物和胸水未作细菌培养,而各例血、尿标本普通细菌培养均为阴性。说明标本中杂菌和癌细胞 DNA 的存在可能是造成 PCR 假阳性扩增或影响结果判断的重要原因。对于皮肤检出物标本的处理,笔者加入 1 mol/L NaOH 后 15 min 均浆标本,其余步骤同一般标本处理,效果较好。

综上所述,在痰涂片阴性患者中能够检测到 TB-DNA,又由于目前没有能快速诊断结核病的检测方法,使用实时荧光定量检测结核患者血清中的 DNA,如果再能与其他方法有机结合,可以提高诊断结核的敏感度^[4]。实验证明,荧光定量 PCR 是一种快速、灵敏、特异的基因诊断技术,此技术在结核分枝杆菌检测方面有许多优势,但由于影响 PCR 检测结果的诸多因素影响如:环境、操作、及标本污染等会造成检测结果的假阳性,因此有待进一步改进。所以分枝杆菌 PCR 检测结果与结

• 检验技术与方法 •

高效液相色谱法测定血液透析液中醋酸根离子含量

王丽兰¹,廖淑君^{2△}

(1. 桂林医学院附属医院检验实验室,广西桂林 541001; 2. 桂林优利特医疗电子有限公司,广西桂林 541001)

摘要:目的 建立一种测定血液透析用浓缩物中醋酸根离子含量的方法。方法 采用高效液相离子排阻色谱法测定血液透析液中醋酸根离子的含量。色谱条件如下,色谱柱:Reae ROA-Organic Acid H⁺ (50×7.8mm);检测波长:220 nm;流速:0.6 mL/min;流动相:0.015 mol/L 硫酸水溶液。结果 醋酸根离子线性范围是 2.4~5.6 mmol/L($r=0.9997, n=5$),平均加样回收率为 100.3%,RSD=0.24%($n=3$)。结论 高效液相色谱法测定血液透析液中醋酸根离子含量操作简单,准确度高,可用于常规试剂分析。

关键词:色谱法,高压液相; 醋酸根离子; 透析液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0589-03

目前,慢性肾衰竭的发病率在世界范围内呈持续增高趋势,且大多数都有高血压或低血压,而且不易控制,甚至引起继发性甲状旁腺功能亢进^[1-3]。世界卫生组织(WHO)发表研究报告指出,血液透析是慢性肾功能衰竭尿毒症患者肾脏替代治疗的重要手段^[4]。研究表明超纯透析液能显著改善慢性肾衰竭患者营养状况及贫血,且与炎症状况改善有关^[5-6]。醋酸在透析液中主要起调节 pH,稳定溶液的酸度的作用。醋酸根离子含量过低,会导致透析液酸度达不到要求,透析液中的 Ca²⁺ 和 HCO₃⁻ 发生反应形成 CaCO₃ 沉淀,损坏透析机^[7]。另外醋酸根离子含量过高,在体内蓄积过多,超过机体代谢能力,在临床上常发生恶心、疲倦、肌肉痛性痉挛等不良反应,所以要对血液透析液中醋酸根离子的含量加以控制。目前对于血液透析液中醋酸根离子含量测定主要有线性滴定法^[8]、Grans 图解法^[9]、紫外分光光度法^[10]、pH 指示剂吸收度比值法^[11]和离子交换

分离法^[12],这些方法操作复杂,费时,而且容易引起误差。笔者采用高效液相色谱法,使用阴离子排阻色谱柱测定血液透析液中醋酸根离子的含量,并进行了方法学考察。

参考文献

- [1] 方梅,陆巧荣,洪志强. 分子信标荧光定量 PCR 技术检测结核分枝杆菌方法建立及其临床应用[J]. 四川大学学报:医学版,2010,41(1):162-165.
- [2] 金建东. 荧光定量 PCR 检测痰结核杆菌 DNA 及其临床应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(22):3565-3566.
- [3] 魏建华,薛晓红,熊建军,等. 结核分枝杆菌 DNA 分子生物学检测[J]. 预防医学情报杂志,2012,28(1):76-78.
- [4] 陈建文. PCR 荧光定量检测血清结核杆菌 DNA 在临床的应用[J]. 临床肺科杂志,2009,14(7):960.
- [5] 陈红兵,周志红,贺润年,等. 荧光定量 PCR 技术在结核杆菌检测中的应用[J]. 实用医学杂志,2008,24(21):3765-3767.
- [6] 牛宁奎,王自立,施建党,等. 荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA 的流行病学特点[J]. 检验医学与临床,2011,08(17):2049-2050.

(收稿日期:2012-10-01)

△ 通讯作者,E-mail:wanglilan1963@163.com。

1.2.2 溶液制备 (1)醋酸钠标准品储备液的制备:精密称取醋酸钠对照品 0.1650 g,置 50 mL 量瓶中,加水使溶解,并稀释至刻度,此时溶液浓度为 40.24 mmol/L,备用。(2)醋酸钠标准品溶液的制备:精密称取醋酸钠标准品储备液 10 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,此时溶液浓度为 4.02 mmol/L,备用。(3)供试品溶液的制备:精密量取三批血液透析用浓缩液 A、B 各 20 mL,用透析用水按使用说明要求的混合比例配成所标示浓度的透析液,即得。

2 结 果

2.1 空白液和醋酸钠标准品溶液 取空白液(即配制透析液用水)和醋酸钠标准品溶液各 20 μL,注入色谱仪中,收集色谱图,见图 1~2。空白溶液对于醋酸根离子的测定没有影响。

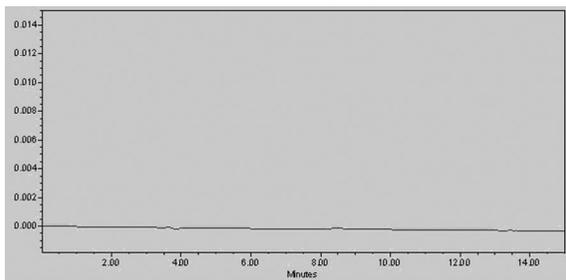


图 1 空白液 HPLC 图

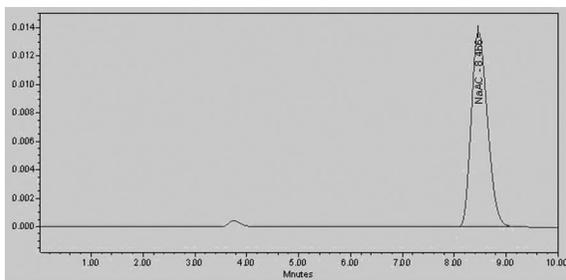


图 2 醋酸钠标准品溶液 HPLC 图

2.2 线性关系考察 分别精密量取醋酸钠标准品贮备液 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 mL,置于 5 个不同的 50 mL 量瓶中,标记序号为 1~5 样品,加水稀释至刻度,摇匀。吸取各溶液 20 μL 注入液相色谱仪中,每份溶液重复测定两次,按上述色谱条件收集色谱图,处理数据。以溶液浓度为 X 轴,醋酸根离子峰面积为 Y 轴进行线性回归,得到线性方程和相关系数:Y=71 005X-1 052.9、r=0.999 7,数据处理见表 1,回归曲线见图 3。醋酸根离子浓度在 2.4~5.6 mmol/L 范围内与峰面积呈良好的线性关系。目前,碳酸氢盐透析液醋酸根离子的最终浓度大都在 3~4 mmol/L 时间,这个线性范围可以满足测定最终透析液中醋酸根离子的要求。

表 1 线性试验数据处理

序号	1	2	3	4	5
浓度(mmol/L)	2.4	3.2	4.0	4.8	5.6
峰面积	169 142	225 967	285 682	336 496.5	397 984.5

2.3 精密度试验 取 2.2 项下 3 号溶液,重复进样 5 次(标记序号为 1~5),收集色谱图并进行处理数据,得到峰面积分别为 285 885、285 479、284 390、284 262、285 521,5 次峰面积 RSD 值为 0.23%。由数据可知,在上述色谱条件下,精密度较高。

2.4 加样回收率试验 精密量取供试品溶液 20 mL,平行取 3 份,置于 3 个不同的 50 mL 量瓶中,再分别精密加入醋酸钠

标准品储备液 2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL,加水稀释至刻度,摇匀。吸取上述 3 种溶液各 20 μL 注入液相色谱仪中,按上述色谱条件收集色谱图,处理数据。加入样品的理论浓度分别为 3.2、4.0、4.8 mmol/L,对应的回收率分别为 100.2%、100.1%、100.6%,平均加样回收率为 100.3%,RSD 值为 0.24%。

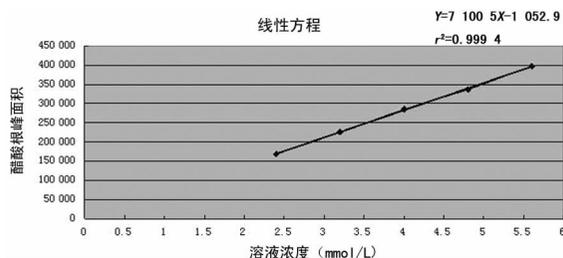


图 3 线性回归曲线

2.5 样品测定 取 3 批供试品溶液各 20 μL 注入液相色谱仪中,按上述色谱条件收集色谱图,处理数据,见表 2。

表 2 醋酸根离子样品测定结果

批号	标示量(mmol/L)	测定值(mmol/L)
201009010	4.0	4.0
201011005	4.0	4.1
201008008	4.0	4.0

3 讨 论

现行的行业标准 YY0598-2006《血液透析及相关治疗用浓缩物》^[14]中要求首次检验应进行方法学验证。本研究表明,高效液相色谱法测定血液透析液中醋酸根离子含量呈良好线性,精密度高,加样回收率结果理想,浓缩物中其他离子对测定结果基本无影响。经过对各机型样品的检测,结果均在标示量上下 10% 的范围内,即 3.6~4.4 mmol/L,符合行业标准 YY0598-2006 对醋酸根离子检测结果的要求。且该法操作简单,可用于常规试剂分析。

参考文献

- [1] Takeda A, Toda T, Fujii T, et al. Discordance of influence of hypertension on mortality and cardiovascular risk in hemodialysis patients[J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(1): 112-118.
- [2] 李旭东, 储虹, 徐向君. 高钙透析用于透析相关性低血压的防治[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(10): 85.
- [3] 马红霞, 周运恒. 尿毒症患者维持性血液透析前后甲状旁腺素急剧变化 1 例[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 1049-1050.
- [4] 曹艳飞, 麦建玲. 不同钙离子浓度透析液对血液透析患者的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(17): 2130-2131.
- [5] 赵明, 李向东. 超纯透析液对维持性血液透析患者微炎症反应状态及肾性贫血的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2007, 23(7): 447.
- [6] 闭闭, 李家燕, 肖华秀, 等. 超纯水对维持性血液透析患者营养不良及贫血的影响[J]. 广西医学, 2004, 26(9): 1267-1269.
- [7] 柯林楠, 母瑞红, 冯晓明, 等. 高效液相离子排斥色谱法测定血液透析液中醋酸根含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(10): 1696-1698.
- [8] 张建民. 线性滴定法测定人工肾透析液中醋酸钠含量[J]. 首都医药, 1999, 6(6): 30-31.
- [9] 郑荣庆, 李光秀, 贾德武, 等. Gran 图解法测定人工肾透析液和复方注射液中醋酸钠含量[J]. 药物分析杂志, 1991, 11(1): 52-53.
- [10] 徐必佳. 差示紫外分光光度法测定醋酸透析液中醋酸钠的含量[J]. 湛江医学院学报, 1999, 17(3): 239.

- [11] 李杰, 严宝霞. pH 指示剂吸收度比值法测定人工肾透析液中的醋酸钠[J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(1): 29-30.
- [12] 中华人民共和国卫生部药政局. 中国医院制剂规范: 西药制剂[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 1995, 1: 232.
- [12] 廖淑君. 一阶导数光谱法测定血液透析用浓缩物中醋酸根含量[J]. 生命科学仪器, 2012, 10(1): 32-34.
- [13] 林燕璇, 叶夏. 明兴纳克中醋酸钠含量测定方法的改进[J]. 国际

医药卫生导报, 2008, 14(1): 70-72.

- [14] 国家食品药品监督管理局. 中华人民共和国医药行业标准: YY0598-2006 血液透析及相关治疗用浓缩物[S]. 北京: 国家食品药品监督管理局, 2006.

(收稿日期: 2012-11-01)

• 检验技术与方法 •

绒毛染色体制备方法及其在产前诊断中的应用

谢志威, 张 晶, 李卫凯

(江门市中心医院检验科细胞遗传室, 广东江门 529023)

摘要:目的 探讨绒毛活检的适宜操作方法及其应用于产前诊断的临床意义。方法 无菌条件, B超引导下经腹取绒毛组织进行培养后, 收获染色体, G 显带, 显微镜下分析核型。结果 2011 年间培养绒毛标本 37 例, 成功率为 97.3% (36/37), 其中异常核型 3 例, 限制性胎盘染色体嵌合(CPM)1 例。结论 绒毛细胞长期培养法和染色体制备方法简单、技术稳定、结果可靠, 可用于胎儿染色体疾病的产前诊断。

关键词:绒毛膜绒毛; 染色体; 核型分析; 产前诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)05-0591-02

目前国内产前细胞遗传学诊断多为中孕期(孕 16~22 周)羊膜腔穿刺术后进行羊水细胞培养和分析染色体核型, 一旦发现胎儿染色体异常, 终止妊娠相对较晚, 引产对孕妇造成损伤较大, 在等待产前诊断的过程中, 孕妇的心理压力大。而绒毛活检由于诊断时机更早, 临床应用的意义更大, 本院产前诊断中心于 2011 年开展绒毛染色体培养, 对符合产前诊断指征的孕妇, 于早孕期(孕 7~13 周)行 B 超引导下经腹取绒毛组织进行培养, 取得良好的效果。现将本院开展的情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年, 来本院产前咨询门诊就诊, 具有明确产前诊断指征的早孕期孕妇 37 例, 妊娠 7~13 周, 均为单胎妊娠。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 临床医生在无菌条件, B 超引导下经腹壁抽取绒毛膜组织置于装有 5 mL 生理盐水的无菌试管中, 立刻送实验室培养。

1.2.2 绒毛培养 (1)以吸管吸弃原混有血液的生理盐水, 注意勿丢失绒毛; 加入备好的生理盐水, 吹打冲洗绒毛, 尽量洗净黏附于绒毛上的血丝。(2)将绒毛移入准备好生理盐水的无菌平皿中, 挑选绒毛。注意绒毛与蜕膜组织相区别, 分辨不清时可置显微镜下观察, 绒毛一般有血管, 而蜕膜组织没有。(3)将挑选好的绒毛移入另一个无菌平皿中, 吸弃液体成分, 取手术刀片将绒毛组织切碎, 大致成糊状即可。(4)取无菌注射器吸取培养基 10 mL, 将培养基部分注入平皿中冲切切碎之绒毛组织, 全部吸入后轻轻晃动针筒将绒毛组织混匀于培养基中。将上述培养基绒毛混合液注入培养瓶中, 每瓶 5 mL, 每份绒毛标本培养两瓶。标记上姓名、编号、日期。置 37 °C 培养箱内静止培养, CO₂ 浓度为 5%。(5)培养 6~7 d 后在倒置显微镜观察绒毛细胞贴壁生长情况, 如细胞贴壁状况好, 于 10 倍物镜下见到占一个以上视野克隆数超过 3~5 个, 则将旧培养液保留约 0.5 mL, 其余弃掉, 再加 5 mL 张氏全培养液, 每天观察细胞生长情况, 如果绒毛细胞达到生长数量, 增长旺盛, 则直接收获。(6)如果绒毛细胞数量未达到收获要求则进行传代: 将培养管

内的培养液弃尽, 用巴氏滴管加胰酶液(GBICO 公司生产)约 0.5 mL, 漱洗培养瓶 2 次并弃去, 再加胰酶液 4 滴, 放入 37 °C 培养箱培养 3~5 min, 见细胞收缩变圆后轻拍培养瓶, 使大部分绒毛细胞由瓶底脱落, 然后加 5 mL 张氏全培养液, 放培养箱中继续培养, 每天观察细胞生长情况, 绒毛细胞达到生长数量, 增长旺盛时进行收获。

1.2.3 细胞收获 培养第 9 天早上 11:00, 于每只培养瓶中加入秋水仙素(25 μg/mL)1 滴, 混匀后放回培养箱, 3 h 后收获: 将绒毛培养液标本倒入离心管, 核对姓名和编号, 在培养瓶中加入生理盐水 1 mL 左右漱洗培养瓶 1 次并弃去, 再加胰蛋白酶液 4 滴和 37 °C 预温的生理盐水约 2 mL, 消化 5 min。显微镜下观察绒毛细胞变圆后, 轻拍使细胞脱落后吸入离心管, 再用生理盐水漱洗培养瓶 2~3 次, 一并吸入离心管中。以 1 200 r/min, 离心 10 min, 吸去上清液, 留下沉淀物。向离心管中加入 2 mL 预温(37 °C)的 0.075 mol/L 氯化钾低渗液并吹匀, 水浴(37 °C)6 min 后加入固定液约 0.5 mL(甲醇: 冰乙酸=3:1, 新鲜配制), 轻轻吹匀, 在室温下放置 7 min, 以 1 200 r/min, 离心 10 min 后吸去上清液, 加入固定液 8 mL, 轻轻混匀, 固定 30 min。再重复以上固定步骤一次, 加盖拧紧后置 4 °C 冰箱贮存。

1.2.4 制片、显带、染色方法 制片: 标本 2 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入新配制的适量固定液(0.5~1 mL), 用吸管轻轻吹打细胞团, 制成细胞悬液, 吸取 2~4 滴细胞悬液滴于预冷的洁净载玻片上, 每人制 2~3 片, 标记姓名及编号立即用口吹散, 将制备的染色体标本片置鼓风干燥箱内 75 °C 3 h, 取出后自然冷却至室温。显带染色同羊水细胞染色体制备^[1]。

1.6 核型分析 核型选择染色体折叠、挤压、团聚、变形总数不超过 5 条, 带纹清楚、深浅带反差明显、染色为桃红色、细胞核膨大、无蓝色背景。计数 20 个核型, 分析 3 个分裂相。异常核型由 2 人以上确定。异常核型, 根据异常种类不同, 计数 50~100 个核型, 分析 10 个分裂相。染色体结构异常病例必须复查一次并争取复查父母核型进行对照染色体检查报告由专人签发, 15 个工作日出结果。