

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, Tris-HCl (pH9.0) 10 mmol/L, NP40 0.5%, BSA 0.02% (wt/vol), Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20 μL (其中模板液 5 μL)。PCR 扩增产物大于 500 bp 热循环参数均为: 93 °C 预变性 2 min, 然后 93 °C 60 s → 55 °C 60 s → 72 °C 60 s, 循环 35 周期, 最后一个 72 °C 延长至 5 min, 其余均为: 93 °C 预变性 2 min, 然后 93 °C 30 s → 55 °C 30 s → 72 °C 60 s, 循环 35 周期, 最后一个 72 °C 延长至 5 min。产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 出现与阳性对照分子相当的目的条带为阳性。基因检测试剂盒、靶基因 PCR 引物序列和阳性对照 DNA 由无锡市克隆遗传技术研究所提供。

**1.5 菌株亲缘性分析** 为多基因聚类分析法(邻接法)。以耐药基因以及质粒、转座子、I 类整合子遗传标记为分子标记作检测结果的样本聚类分析。

## 2 结果

20 株 MDR-ABA 菌中 TEM 阳性 5 株 (25%), OXA-23 群阳性 10 株 (50%); aac(3)-I 阳性 4 株 (20%), aac(3)-II 阳性 8 株 (40%), aac(6')-I b 阳性 4 株 (20%), ant(3'')-I 阳性 4 株 (20%), ant(2'')-I 阳性 1 株 (20%); tnpU 阳性 5 株 (25%), int I 1 阳性 4 株 (20%), qacEΔ1-sul1 基因阳性 7 株 (35%)。其余基因均阴性。以耐药基因以及质粒、转座子、I 类整合子遗传标记为分子标记作检测结果的样本聚类分析, 见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

## 3 讨论

不动杆菌为条件致病菌, 可以引起医内感染, 在重症监护病房中分离率最高, 主要与患者接受各种侵袭性操作有关。由于不动杆菌在环境中极强的生存能力为多药耐药鲍曼不动杆菌在院内的克隆传播造就了良好的生物学基础。在欧洲已经发现同一克隆株突破国界在不同国家流行传播<sup>[3-8]</sup>。本院近 4 个月临床分离的医院感染鲍曼不动杆菌主要来自 ICU, 怀疑存在医院感染的院内流行, 故分析其耐药机制和同源性。本研究以 36 种基因以及质粒、转座子、I 类整合子遗传标记为分子标记作检测结果的样本聚类分析, 结果显示 20 株 MDR-ABA 菌

可分二群。并存在多个克隆传播, 其中 1-3-6-14 克隆(A 克隆)携带 TEM、aac(3)-I、aac(6')-I b、ant(3'')-I、tnpU、int I 1、qacEΔ1-sul1 基因; 2-12-15-16-17-18-19-20 克隆(B 克隆)携带 OXA-23、aac(3)-II 基因; 8-13 克隆(C 克隆)携带 OXA-23 基因。A、B 克隆已为院内感染流行株存在, 是本院医院感染鲍曼不动杆菌多药耐药迅速发生的一个重要原因。在此次多重耐药鲍曼不动杆菌流行的控制中, 用分子标记作检测结果的样本聚类分析, 可判断医院感染较方便简单的方法同时可明确耐药株传播来源, 而且对研究者有针对性采取控制措施有重大意义。

## 参考文献

- [1] 俞云松. 多药耐药鲍曼不动杆菌——21 世纪革兰阴性菌的“MR-SA”[J]. 中华临床感染病杂志, 2009, 2(2): 65-68.
- [2] 戴春梅, 郑兰香, 陈辉. 129 株鲍曼不动杆菌所致医院感染的耐药性分析[J]. 实用预防医学, 2006, 13(1): 62-63.
- [3] 冯旻珠, 张扬, 姚堃, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药性与整合子、转座子遗传标记研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2008, 28(7): 876-880.
- [4] 王春新, 金辉, 糜祖煌, 等. 铜绿假单胞菌医院感染株二种亲缘性分析方法比较[J]. 世界感染杂志, 2007, 7(4): 281-284.
- [5] 王伟, 金辉, 糜祖煌. 多重耐药绿脓假单胞菌耐药基因及菌株亲缘性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(9): 843.
- [6] 王继东, 金辉, 糜祖煌, 等. 医院感染铜绿假单胞菌菌株亲缘性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(12): 1137-1139.
- [7] 金辉, 糜祖煌, 钱小毛, 等. 铜绿假单胞菌耐药基因的分子流行病学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(2): 134-136.
- [8] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, et al. Global challenge of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(10): 3471-3484.

(收稿日期: 2013-04-08)

# 全自动毛细管电泳技术在多发性骨髓瘤诊断及分型中的应用

朱红艳, 欧阳红梅<sup>△</sup>, 张芹, 甸自金, 宋建新, 杨曦, 蒋雅先

(云南省第一人民医院/昆明理工大学附属昆华医院检验科, 云南昆明 650032)

**摘要:**目的 探讨全自动毛细管电泳技术在多发性骨髓瘤(MM)诊断及分型中的应用。方法 利用全自动毛细管电泳仪对 61 例 MM 患者进行血清蛋白电泳及免疫分型电泳; 同时利用免疫散射比浊法进行免疫球蛋白含量测定。结果 69 例 MM 患者中有 65 例在血清蛋白电泳中检出 M 蛋白峰, 血清蛋白电泳检出率为 94.2%。69 例 MM 患者中 IgG 型 29 例 (42.0%), IgA 型 23 例 (33.3%), 轻链型 17 例 (24.6%), 不分型 1 例 (1.45%)。血清蛋白免疫分型电泳检出率为 95.7%。M 蛋白所属免疫球蛋白显著增高, 非 M 蛋白所属免疫球蛋白下降或正常, 轻链型免疫球蛋白均减低。血清免疫球蛋白定量检出率为 84.1%。结论 血清蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量可对 MM 进行初步筛查, 血清蛋白免疫分型电泳则是 MM 的诊断及分型的重要手段, 而全自动毛细管电泳技术是一种简便的技术, 能为临床快速提供可靠的结果。

**关键词:** 多发性骨髓瘤; M 蛋白; 血清蛋白电泳; 血清蛋白免疫分型电泳; 毛细管电泳技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.044

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2445-03

多发性骨髓瘤(MM)是一种骨髓浆细胞恶性增殖性疾病, 发病以中老年人为主。由于该病起病隐匿, 临床表现复杂多样, 极易漏诊或误诊。因此, 对 MM 的早期诊断和鉴别显得极其重要。本文通过对 69 例 MM 患者进行血清蛋白电泳及血

清蛋白免疫分型电泳、血清免疫球蛋白及尿本周蛋白定量检测分析, 旨在探讨毛细管电泳技术在 MM 诊断及分型中的应用。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 全部病例来自 2010 年 7 月至 2012 年 6 月本

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: ouyhmei@163.com.

院住院或门诊患者 69 例,男 42 例,女 27 例,年龄 31~82 岁,平均 62.8 岁。全部患者临床表现及实验室检查均符合 MM 诊断标准<sup>[1]</sup>。

**1.2 方法** (1)血清蛋白电泳及血清蛋白免疫分型电泳:利用法国 Sebia Capillarys 全自动电泳分析系统及原装配套试剂盒进行测定。(2)免疫球蛋白含量测定:采用美国德灵公司生产的 BNPII 型特种蛋白分析仪及原装配套试剂盒,利用免疫散射比浊法进行测定。

**1.3 统计学处理** 计量资料以例数表示,计数资料以中位数表示。运用 SPSS13.0 进行统计。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 血清蛋白电泳结果** 在 69 例 MM 患者中,有 65 例血清蛋白电泳谱中出现 M 蛋白峰,其中 IgG 型多位于  $\gamma$  区,IgA 型多位于  $\beta$  区,轻链型也多位于  $\gamma$ 。另 4 例未见 M 蛋白峰,结合骨髓穿刺涂片、血清蛋白免疫分型电泳及尿轻链测定 3 例考虑为轻链型,1 例为未分泌型。见表 1。

**2.2 血清蛋白免疫分型电泳结果** 69 例 MM 患者中 IgG 型 29 例(42.0%),IgA 型 23 例(33.3%),轻链型 17 例(24.6%),不分泌型 1 例(1.45%)。血清蛋白免疫分型电泳检出率为 95.7%(66/69)。见表 2。

**2.3 血清免疫球蛋白、轻链及尿本周蛋白定量测定结果** 见表 3。

表 1 血清蛋白电泳 M 蛋白位置(n)

| 免疫分型 | n  | M 蛋白位置  |          |                    | 未见 M 蛋白 |
|------|----|---------|----------|--------------------|---------|
|      |    | $\beta$ | $\gamma$ | $\beta$ 及 $\gamma$ |         |
| IgG  | 29 | 1       | 28       | 0                  | —       |
| IgA  | 22 | 14      | 5        | 3                  | —       |
| IgM  | 0  | 0       | 0        | 0                  | —       |
| 轻链型  | 17 | 4       | 9        | 1                  | 3       |
| 不分泌型 | 1  | 0       | 0        | 0                  | 1       |
| 合计   | 69 | 19      | 42       | 4                  | 4       |

—:未检出。

表 2 MM 患者血清蛋白免疫分型电泳结果

| 免疫分型 | $\kappa$ 型(n) | $\lambda$ 型(n) | 合计[n(%)]   |
|------|---------------|----------------|------------|
| IgG  | 9             | 20             | 29(42.00)  |
| IgA  | 12            | 11             | 23(33.30)  |
| IgM  | 0             | 0              | 0(0.00)    |
| 轻链型  | 3 $\Delta$    | 14*            | 17(24.60)  |
| 不分泌型 | —             | —              | 1(1.45)    |
| 合计   | 24            | 45             | 69(100.00) |

$\Delta$ :其中 1 例血清蛋白免疫分型电泳未检出 M 蛋白;\*:其中 1 例血清蛋白免疫分型未检出 M 蛋白。—:未检出。

表 3 各型 MM 患者血清免疫球蛋白、轻链及尿轻链定量测定结果中位数\*

| 免疫分型 |             | IgG(g/L) | IgA(g/L) | IgM(g/L) | Kap(g/L) | Lam(g/L) | K/L   | 尿 Kap(mg/L) | 尿 Lam(mg/L) |
|------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------------|-------------|
| IgG  | $\kappa$ 型  | 61.50    | 0.29     | 0.26     | 49.0     | 1.60     | 38.7  | 180         | <50         |
|      | $\lambda$ 型 | 70.70    | 0.25     | 0.23     | 1.44     | 63.7     | 0.02  | <18.5       | 1 820       |
| IgA  | $\kappa$ 型  | 3.95     | 32.30    | 0.18     | 25.40    | 1.29     | 14.31 | 717         | <50         |
|      | $\lambda$ 型 | 3.32     | 47.40    | 0.18     | 2.67     | 10.9     | 0.24  | <18.5       | 782         |
| 轻链型  | $\kappa$ 型  | 4.62     | 0.34     | 0.22     | 5.48     | 1.52     | 6.84  | 17 600      | 73.5        |
|      | $\lambda$ 型 | 3.51     | 0.18     | 0.15     | 3.04     | 9.40     | 0.42  | <18.5       | 4 960       |
| 不分泌型 |             | 5.68     | 0.21     | 0.32     | 4.34     | 2.91     | 1.49  | <18.5       | <50         |

\*:正常参考值 IgG(7.51~15.6)g/L;IgA(0.82~4.53)g/L;IgM(0.46~3.04)g/L;Kap(6.29~13.5)g/L;Lam(3.13~7.23)g/L;K/L(1.53~3.29);尿 KAP 轻链(0~18.5)mg/L;尿 LAM 轻链(0~50)mg/L。

**3 讨 论**

多发性骨髓瘤血清中常出现大量单克隆免疫球蛋白(M 蛋白),尿中可有大量轻链溢出。血和(或)尿中 M 蛋白的检测是 MM 的诊断的重要依据<sup>[2]</sup>。

在本实验中血清蛋白电泳及免疫分型都是采用 SEBIA 的 CAPILLARYS 毛细管电泳系统,该系统的检测原理与自由溶液毛细管电泳的检测原理相同。CAPILLARYS 毛细管电泳系统已经能够对异常蛋白(如 Hb F)<sup>[3]</sup>进行全自动分析检测,分离速度快,分辨率高。

血清蛋白电泳是分离蛋白质最简单的方法之一,可以获得有关血浆蛋白质全貌的图谱,并对血清中异常蛋白质进行筛选。本文研究结果显示,69 例 MM 患者中有 65 例在血清蛋白电泳中检出 M 蛋白峰,血清蛋白电泳检出率为 94.2%(65/69)。69 例 MM 患者其中 M 蛋白出现的位置频率,与有关实验室统计基本一致<sup>[4]</sup>。由此可知血清蛋白电泳中 M 蛋白的检查是早期筛查多发性骨髓瘤的较敏感方法。本实验发现血清蛋白电泳阴性的 MM 患者多为轻链型,与有关报道一致<sup>[5]</sup>,因

此在血清蛋白电泳图谱中,未出现 M 蛋白峰也不能排除 MM 病,因为单纯轻链型和非分泌型 MM 的血液中可检不出 M 蛋白,这类患者需进行进一步检查。

在 MM 的诊断中,免疫固定电泳也是一种特异、灵敏快速分离及鉴别单克隆蛋白的直观方法。而且免疫固定电泳能对 M 蛋白进行准确分型。实验中 69 例 MM 患者各型所占比例与有关报道<sup>[5-6]</sup>略有差异,IgG 型比例稍低,IgA 型略高,可能是本实验检测 M 蛋白采用的毛细管电泳方法不同于传统的免疫固定电泳,提高了 IgA 的检出率,也可能是因为本实验病例数太少而不具代表性。而轻链型的比例比以往报道的高,可能是因为本实验中免疫固定的试剂中不包括测定 IgD 型的抗体,使得 IgD 型也划入了轻链型。

本研究免疫球蛋白定量测定显示:M 蛋白所属免疫球蛋白显著增高,非 M 蛋白所属免疫球蛋白下降或正常,轻链型免疫球蛋白均减低。研究者还发现 IgA 型中有 2 例血清免疫球蛋白定量结果正常或减低,但血清蛋白电泳及免疫固定电泳显示为单克隆 IgA 型。轻链型中 2 例  $\kappa$  型血清  $\kappa$  定量均减低,而

血清蛋白电泳及免疫固定结果均示为单克隆型,且尿 Kap 明显增高;轻链型中 14 例  $\lambda$  型中有 7 例血清 Lam 定量是增高的,有 7 例是正常的,但血清蛋白电泳及免疫固定结果除 1 例外均示为单克隆型,且尿 Lam 含量显著增高。因此本研究中血清免疫球蛋白检出率为 84.1% (58/69)。实验结果表明免疫球蛋白定量可明确 M 蛋白所属免疫球蛋白类别及数量,也是 MM 诊断较为敏感的方法。但由于 MM 患者存在免疫功能障碍,免疫球蛋白定量检测可见一种或几种增高,而其他几种相应降低。有部分患者免疫球蛋白及轻链在正常范围之内,仅两种轻链比例失调。所以单凭免疫球蛋白定量不能很好地提示 MM,需用免疫分型电泳来鉴定有无单克隆成分的存在<sup>[5]</sup>。

综上所述,采用血清蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量可对 MM 进行初步筛查,而血清蛋白免疫分型电泳则是 MM 的诊断及分型的重要手段,且血清蛋白免疫分型电泳检出率高于前两种方法。而全自动毛细管电泳技术是一种简便的电泳技术,能为临床快速提供可靠的结果。因此,能为临床早期、快速、准确诊断多发性骨髓瘤提供帮助。

#### • 检验技术与方法 •

## GICA 法和 ELISA 法检测抗 EV71-IgM 抗体的比较

贾文魁,包军安,单宏伟,朱自平,徐海敏

(襄阳市传染病医院检验科,湖北襄阳 441003)

**摘要:**目的 对胶体金免疫层析法(GICA)和酶联免疫法(ELISA)检测发病初期手足口病(HFMD)患儿抗 EV71-IgM 抗体的结果进行比较。方法 采取 90 例发病初期临床诊断为 HFMD 的患儿末梢血,采用 GICA 法和 ELISA 法同时检测标本抗 EV71-IgM 抗体,利用统计软件 SPSS13.0 对结果进行分析。结果 当 ELISA 法吸光度(A); $A < 0.050$ 、 $0.050 \leq A < 0.150$  和  $A \geq 0.150$  时,GICA 法阳性率分别为 25.00%、50.00% 和 95.83%;GICA 法和 ELISA 法检测抗 EV71-IgM 抗体的一致性 Kappa 检测,Kappa 值为 0.523, $P < 0.05$ ,一致性一般;两法符合率为 76.7% (69/90);进行两样本配对 McNemar  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$ ,两法检验结果存在显著性差异。结论 对于发病初期的 HFMD 患儿,抗 EV71-IgM 抗体的检出阳性率 GICA 法要明显高于 ELISA 法( $P < 0.05$ ),两法一致性一般(Kappa=0.523);对于两种方法都是阴性标本,应对患者随后再次复查以免漏检。

**关键词:**胶体金免疫层析法; 酶联免疫法; 手足口病; 抗 EV71-IgM 抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2447-02

手足口病(HFMD)是一种主要有柯萨奇病毒 A16 型引起,也可由 A5、A10 及肠道病毒 71(EV71)经多种途径传播而引起的以发热和手足口部皮疹为临床特征的急性传染病<sup>[1]</sup>。近年来 HFMD 引起的爆发流行越来越频繁,EV71 为重症和死亡病例绝对优势病原<sup>[2]</sup>,GICA 法和 ELISA 法对抗 EV71-IgM 抗体检测为 EV71 感染的早期诊断,分类收治提供了依据,特别是 GICA 法更为方便、快速。本实验对这两种方法进行比较。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 患者来源于襄阳市传染病医院 2012 年 5~6 月发热门诊,依据卫生部发布的《手足口病诊疗指南(2010 年版)》诊断为 HFMD 的患儿。90 例中,男 56 例,女 34 例,年龄 7 个月至 6 岁,其中 64 例处在发病 24 h 内,26 例处在发病 48 h 内。

**1.2 仪器与试剂** GICA 法采用北京万泰生物药业有限公司生产抗 EV71-IgM 抗体检测板[国食药监械(准)字 2011 第 3401197 号;批号:JEI20120502];ELISA 法采用北京万泰生物药业有限公司生产的抗 EV71-IgM 抗体试剂[国食药监械(准)字 2010 第 3400526 号;批号 EI20120201];采用山东高密彩虹分析仪器公司生产的 GF-W3000 洗板机和 GF-

### 参考文献

- [1] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].3 版.北京:科学出版社,2007:232-233.
- [2] 陈石.多发性骨髓瘤的实验室结果分析[J].现代检验医学杂志,2006,21(1):20.
- [3] 陈星,卢业成,初德强,等.全自动毛细管电泳系统在 Hb-F 检测中的应用[J].实用医学杂志,2009,25(14):2359-2360.
- [4] 万唐,章敏,龚金莲,等.血清蛋白电泳对多发性骨髓瘤诊断的临床应用[J].中国卫生检验杂志,2007,17(10):1825.
- [5] 刘汐盈,孙淑艳,宋媛媛.血清免疫固定电泳、蛋白电泳、免疫球蛋白及轻链定量对多发性骨髓瘤临床诊断价值探讨[J].中国实验诊断,2010,14(5):680.
- [6] 王金行,赵越,刘柏新.血清免疫固定电泳在多发性骨髓瘤诊断中的意义[J].广东医学,2011,32(15):2018.

(收稿日期:2012-11-08)

M3000 酶标仪。

**1.3 样本收集和处理** 采集患者的末梢血于 EDTA-K<sub>2</sub> 喷雾 0.5 mL 离心管中抗凝。标本离心后随即进行 GICA 检测,然后存放于 4 ℃ 冰箱次日进行 ELISA 检测。

**1.4 方法** 标本在检测前分离出血浆。ELISA 法严格按试剂说明书操作,于主波长 450 nm 和次波长 630 nm 测定吸光度(A)值,以  $0.1 + A_{\text{阴性对照}}$  均值为 Cut off 值,A 阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算;GICA 法严格按试剂说明书操作,在规定时间内进行目测判读,不论色带颜色深浅均按阳性记录。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计学分析。利用列联表卡方分割对各组间进行两两比较;利用 Kappa 检测,检测两种方法的一致性,并进行配对设计的 McNemar  $\chi^2$  检验。

### 2 结果

**2.1 90 份血浆抗 EV71-IgM 抗体检测结果** 列表统计见表 1 (ELISA 法  $A_{\text{阴性对照}}$  均小于 0.05)。ELISA 法阳性 24 (26.7%) 份,GICA 法阳性 43 (47.8%),当 ELISA 法  $A \geq 0.150$  时,GICA 法阳性率达到 95.83%,比其他两组(分别为 50.00%,25.00%)有明显的提高( $P < 0.05$ )。但观察发现 GICA 试条显色强度普遍不高。