

流感病毒在 MDCK 细胞上连续培养,前 3~4 代流感病毒的 HA 滴度逐渐提高,之后随着传代次数的增加,流感病毒 HA 滴度逐渐下降并最终消失。其原因可能是流感病毒经过多次传代后,细胞的产物积累在生长液中,不利于细胞生长,从而减少子代病毒的含量^[5]。因此,在病毒培养过程中应尽量减少细胞的传代次数。同时,病毒接种量也要适中,接种量太少,流感病毒对 MDCK 细胞的侵袭力不够,得不到滴度高的病毒;接种量太高,会产生大量不具有感染性的不完全病毒颗粒^[6]。

使用 MDCK 细胞培养流感病毒过程中,加入一定量的胰酶可将没有感染性的非裂解型血凝素变成有感染性的血凝素^[7],少量的胰酶有助于流感病毒的增殖^[8]。同时郭元吉等^[6]也指出,胰蛋白酶类物质能提高细胞病变程度,增加空斑数,加大空斑的直径和提高清晰度,提高病毒收获量。然而,在 MDCK 细胞中不存在该酶类,因此在病毒繁殖时,加入适量的胰酶,能补充该细胞蛋白酶的不足,提高病毒 HA 的裂解。实验表明,胰酶浓度过高,细胞过早脱落,浓度过低又无相应作用,病毒生长液中胰酶终浓度为 2.5~5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,可以明显提高流感病毒的 HA 滴度,提高细胞病变程度。在不影响流感病毒的分离培养又能节约成本的原则下,建议本实验室使用 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 的胰酶。

因胎牛血清中含有某些抗胰酶物质,可减弱甚至丧失胰酶分解蛋白的作用,此外血清中还含有一些物质,能覆盖在细胞膜的病毒受体上,降低或影响病毒对细胞的感染^[9]。本实验表明,随着病毒生长液中胎牛血清浓度的增大,细胞病变速度减慢,病毒的 HA 滴度下降明显。因此,在病毒的生长液中不能含有胎牛血清,在接种病毒前细胞也应充分冲洗干净,尽量去除细胞中残留的胎牛血清。

总之,通过以上实验分析,发现流感病毒在 MDCK 细胞中

最佳培养条件是直接接种流感病毒于病毒生长液,放置 35.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 96 h。其中病毒生长液中无胎牛血清、胰酶终浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。含有流感病毒的细胞传代次数应控制在 4 代以内。收获流感病毒前,将细胞反复冻融 1~2 次,可提高病毒的 HA 滴度,收获的病毒应放置于一 80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。

参考文献

- [1] Palese P. Influenza: old and new threats[J]. Nat Med, 2004, 10 (12): 82-87.
- [2] 刘鹏,李佳林,马超,等. 流感病毒在 Vero 细胞系与 MDCK 细胞系增殖条件的比较[J]. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(1): 24-27.
- [3] Schotaser M, De Filette M, Fiers W, et al. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments[J]. Expert Rev Vaccines, 2009, 8(4): 499-508.
- [4] 中国疾病预防控制中心, 病毒病预防控制所. 国家流感中心标准操作规程(修订版)[S]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2007: 37-39.
- [5] Youil R, Su Q, Toner TJ, et al. Comparative study of influenza virus replication in Vero and MDCK cell lines[J]. J Virol Methods, 2004, 120(1): 23-31.
- [6] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 北京: 中国三峡出版社, 1997: 100-106.
- [7] Boot HJCL, Ogrady J, Neuberger J. Clinical guideline on the management of hepatitis C[J]. Gul, 2001, 49(1): 19-21.
- [8] 陈敬贤. 诊断病毒学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 116.
- [9] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1995: 215.

(收稿日期: 2013-07-05)

• 经验交流 •

血清超氧化物歧化酶检测方法评价及其在临床诊断中的应用价值探讨*

施一帆, 齐发梅[△], 韩平治, 司玉春, 贾彦娟, 王爱霞, 袁秀梅

(甘肃省人民医院 兰州 730000)

摘要:目的 对比色法测定超氧化物歧化酶(SOD)的方法学进行评价,探讨血清 SOD 活性在消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病、2 型糖尿病患者的血清水平变化及其临床应用价值。方法 用 Olympus 5400 全自动生化分析仪,对比色法测定血清 SOD 活性试剂盒从精密度、准确度、线性、参考范围等方面进行评价。选择 2012 年 1~8 月期间来该院就诊的已确诊住院患者 238 例作为病例组,健康体检人群 80 例作为健康对照组,测定血清 SOD 活性,数据用 SPSS 统计软件进行分析。结果 测试数据表明,比色法测定血清超氧化物歧化酶活性的精密度、准确性、线性、回收率等主要性能指标良好。消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病患者的血清 SOD 活性水平低于健康对照组,差异具有统计学意义($P < 0.01$),2 型糖尿病患者血清 SOD 活性水平与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 比色法测定超氧化物歧化酶试剂精密度、准确性、线性、回收率等结果符合要求,说明试剂盒测定结果稳定,实测浓度和预测浓度一致,具有良好线性关系,完全满足临床需求,血清 SOD 活性在心、脑血管疾病、肾病、肝脏疾病检测中具有良好辅助诊断价值。

关键词: SOD; 方法学; 评价; 临床意义

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.039

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)01-0094-04

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是以铜、锌、锰或镍为辅因子,催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的一种酶,一种重要的抗氧化剂,与体内自由基含量成

负相关^[1]。许多物理、化学、生物因素都可诱发产生大量的自由基,自由基以各种方式造成组织急性或慢性损伤^[2]。所以,了解自由基的平衡状态,对于预防疾病,治疗疾病都有非常重

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWST2012-18)。 [△] 通讯作者, E-mail: qfm3836@sina.com。

要的价值。长期以来,由于方法学的限制,血清 SOD 活性检测未能在临床广泛应用,探寻一种稳定性好、适合全自动生化分析仪的检测血清 SOD 活性方法是本文最终目的。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 1~8 月来本院就诊的已确诊住院患者 238 例作为病例组,健康体检人群 80 例作为健康对照组,病例组中,男 158 例,女 80 例,年龄最大 78 岁,年龄最小 18 岁。

1.2 仪器与试剂 Olympus 5400 全自动生化分析仪,福建福缘生物科技有限公司生产的血清 SOD 活性试剂盒,定标用定标液,质控随试剂盒提供。

1.3 标本采集 研究对象早晨空腹静脉采血 3 mL,用 Olympus 5400 全自动生化分析仪检测血清中 SOD 活性值。

1.4 方法 检测方法用邻苯三酚比色法,参数设置严格按生产厂家提供的参数^[3]。

2 结 果

2.1 方法学评价

2.1.1 精密度测试 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发表的 EP15-A2 文件《用户对精密度和准确度的核实试验批准指南》对邻苯三酚比色法测定 SOD 试剂盒性能进行评价^[4]。选择 2 个水平的样本作为测试对象,标示值为 150 U/mL、200 U/mL,批内检测 20 次,重复 4 次,150 U/mL 浓度样本为中值,200 U/mL 浓度样本为高值,分别计算批内和批间精密度。批内精密度(Sr)为 1.833,批间精密度(Srr)为 2.45,总 CV% 为 1.25%。精密度完全满足临床 CV%≤5%要求。批内精密度的计算^[5],见表 1。批间精密度计算,见表 2。

表 1 精密度实验原始数据计算(U/mL)

日期	批次 1			批次 2			(X1-X2) ²
	结果 1	结果 2	(结果 1-结果 2) ²	结果 1	结果 2	(结果 1-结果 2) ²	
1	148	151	9	201	203	4	25
2	150	151	1	205	203	4	9
3	151	152	1	203	201	4	9
4	152	154	4	206	205	1	9
5	149	148	1	201	203	4	9
7	150	149	1	199	201	4	9
8	148	148	0	202	201	1	1
9	150	150	0	201	201	0	0
10	151	150	1	201	202	1	0
11	151	152	1	202	203	1	0
12	152	149	9	204	206	4	25
13	149	150	1	203	201	4	9
14	150	148	4	205	205	0	16
15	149	150	1	203	202	1	0
16	153	151	4	201	201	0	16
17	151	149	4	203	201	4	0
18	149	150	1	203	202	1	0
19	150	152	4	204	204	0	16
20	152	154	4	201	205	16	144

表 2 批间精密度实验原始数据记录(U/mL)

日期	批次 1				批次 2			
	结果 1	(均值-结果 1) ²	结果 2	(均值-结果 2) ²	结果 1	(均值-结果 1) ²	结果 2	(均值-结果 2) ²
1	148	6.30	151	0.24	201	2.56	205	-1.44
2	150	0.26	151	0.24	205	-1.44	203	0.56
3	151	0.24	152	2.22	203	0.56	201	2.56
4	152	2.22	154	12.18	206	-2.44	205	-1.44
5	149	2.28	148	6.30	201	2.56	203	0.56
7	150	0.26	149	2.28	199	4.56	206	-2.44
8	148	6.30	148	6.30	202	1.56	201	2.56
9	150	0.26	150	0.26	201	2.56	201	2.56
10	151	0.24	150	0.26	201	2.56	205	-1.44
11	151	0.24	152	2.22	202	1.56	203	0.56
12	152	2.22	149	2.28	204	-0.44	206	-2.44
13	149	2.28	150	0.26	209	-5.44	201	2.56
14	150	0.26	148	6.30	205	-1.44	199	4.56
15	149	2.28	150	0.26	203	0.56	202	1.56
16	153	6.20	151	0.24	201	2.56	201	2.56
17	151	0.24	149	2.28	205	-1.44	201	2.56

续表 2 批间精密度的实验原始数据记录

日期	批次 1				批次 2			
	结果 1	(均值-结果 1) ²	结果 2	(均值-结果 2) ²	结果 1	(均值-结果 1) ²	结果 2	(均值-结果 2) ²
18	149	2.28	150	0.26	203	0.56	202	1.56
19	150	0.26	152	2.22	206	-2.44	204	-0.44
20	152	2.22	154	12.18	201	2.56	209	-5.44
		36.84		58.78		9.64		9.64

2.1.2 准确度测试 选取定值质控进行测定,标示值为 150 U/mL,200 U/mL,每个水平重复测定 10 次,计算测定结果与标示值的相对偏差。由以上实验结果可知,测定结果与标示值的相对偏差均小于 3%,该血清 SOD 活性试剂的准确度符合相关技术要求和临床实际使用要求。

2.2 线性评价 根据 CLSI EP6-A2 方法^[6]对 SOD 测定试剂盒进行评价,以 SOD 高值水平为原液,用蒸馏水稀释配制出从低到高 4 个浓度样本,加一个空白,按照浓度由高到低的顺序,选择 5 个浓度水平,对每一稀释浓度样本重复测定 3 次取均值。以理论值为 X 轴,以测定均值为 Y 轴,求出线性相关系数 r。以上实验结果可知,线性相关系数 r=0.999 98,r>0.990,该试剂盒提供的线性范围为 15~250 U/mL,该试剂的线性范围与试剂盒提供的相符。

2.3 参考范围验证 随即抽取 80 例健康查体样本为测试样本,选用查体后排除肿瘤、心脑血管疾病、肝脏疾病、肾脏疾病、自身免疫疾病等样本。根据实测的结果来对照参考值范围(129~216 U/mL),观察该试剂的参考范围是否适用。实验结果表明,参考范围为:130.5~207.3 U/mL。由以上实验结果可知,本批健康查体人群的血清 SOD 活性检测结果均落在试剂盒提供的参考区间内,计算以上检测数据的均值及标准差:均值=168.9 U/mL,标准差 SD=19.61 U/mL;可计算得 95%置信区间为:130.5~207.3 U/mL; $\bar{x} \pm 2SD=129.7 \sim 208.1$ U/mL。试剂盒标示参考范围(129~216 U/mL)很接近。因此,该试剂的参考范围是适用的,符合临床使用要求。

2.4 回收试验测定 将 2 份混合血清的血清 SOD 活性值,分别为 99.0 U/mL(溶剂 1)和 126.0 U/mL(溶剂 2),各 200 μL 作为溶剂,将质控品 1(150 U/mL)和质控品 2(200 U/mL)各 20 μL 作为溶质分别加入溶剂 1 和溶剂 2,每份样本测 3 次取均值,测定结果见表 3,相关系数 r=0.999 9。

表 3 SOD 线性测试数据(U/mL)

理论值	250	200	125	63	0
SOD 测定值	256.6	209.0	130.2	65.2	0.0
	258.0	209.0	130.0	64.2	0.0
	260.8	208.0	124.0	64.0	0.0
均值	258.5	208.7	128.1	64.5	0.0

2.4 临床意义探讨 对已确诊患者 238 例样本进行了血清 SOD 活性检测,结果见表 4。由以上实验结果可知,消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病患者的血清 SOD 活性水平低于健康对照组,差异有统计学意义(P<0.01),2 型糖尿病患者血清 SOD 活性水平与健康对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。

表 4 不同疾病血清 SOD 活性与健康对照组结果比较

疾病种类	n	$\bar{x} \pm 2SD$ (U/mL)	P
健康对照组	80	162.3±38.2	—
2 型糖尿病	22	166.1±83.3	P1>0.05
消化系统疾病	17	133.5±90.5	P2<0.05
肾脏疾病	30	104.7±74.4	P3<0.01
呼吸系统疾病	35	118.1±80.1	P4<0.01
烧伤整形	32	138.0±65.8	P5<0.01
脑血管疾病	54	116.7±45.2	P6<0.01
心血管疾病	48	132.1±58.8	P7<0.01

—:无数据。P1~P7:为健康对照组与各病例组 SOD 活性水平比较。

3 讨 论

随着科学技术的发展和高新技术的应用,试剂性能与检验质量密切相关,性质稳定、敏感性和特异性好的试剂是保障检验结果准确的前提。精密度的衡量体外诊断试剂批内和批间变异的种要指标,也是评价试剂有效性的的重要依据。本文根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)发表的 EP15-A2 文件对 SOD 测定试剂盒进行评价,实验结果表明批内精密度(Sr)为 1.833,批间精密度(Srr)为 2.45,总 CV% 为 1.25%。精密度完全满足临床 CV%≤5%的要求。线性评价根据 CLSI EP6-A2 方法,测定结果表明该试剂盒的线性外围与试剂盒提供的 15~250 U/mL 相符,相关性系数 r 为 0.999 9,完全满足临床需要。参考范围验证:随即抽取 80 例健康查体样本为测试对象,实际测得参考范围为:130.5~207.3 U/mL,与试剂盒标的参考范围(129~216 U/mL)很接近。因此,该试剂的参考范围是适用的,符合临床使用要求。回收试验测定表明,回收率符合试验要求。临床标本验证结果表明,消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整形、脑血管疾病、心血管疾病患者的血清 SOD 活性水平低于健康对照组,差异有统计学意义(P<0.01),2 型糖尿病患者血清 SOD 活性水平与健康对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)。与有关报道相符。血清 SOD 是氧自由基清除酶,反应机体内自由基总量,自由基应激状况是否失衡,与自由基代谢状态呈负相关^[7]。因此,在治疗上述疾病时动态检测血清 SOD 活性对机体内维持一定水平的血清 SOD 活性是相当重要的^[8],糖尿病患者血清 SOD 活性水平与健康对照组比较差异无统计学意义(P>0.05),但糖尿病组病例较少,有待进一步研究。因为,氧自由基的寿命极短,给血清 SOD 活性检测带来很大困难^[9],邻苯三酚比色法,具有试剂稳定、标本用量少的优点,适用于全自动生化分析仪,适合各级医院推广。在消化系统疾病、肾脏疾病、呼吸系统疾病、烧伤整

形、脑血管疾病、心血管疾病预后判断、疗效评估、药效监测等方面具有广阔的前景。试验结果表明邻苯三酚比色法精密度、准确性、线性、回收率参考范围等主要性能指标,完全满足临床实验室及临床需求。

参考文献

[1] 戴国奎,关若萍,梁炳富,等. 广州地区健康成年人血清超氧化物歧化酶(血清 SOD 活性)水平调查[J]. 国际医药卫生导报, 2011, 17(23):2952-2955.

[2] 施益军,陈亦江,吴延虎,等. 依达拉奉对心肌缺血再灌注损伤保护作用临床研究[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(1):50-52.

[3] 福建福缘生物科技有限公司生产的《超氧化物歧化酶(血清 SOD 活性)检测试剂盒》说明书

[4] 欧阳能良,王伟佳. 应用 CLSI EP15-A2 评价 BNP 和 Pro-BNP 测

定的精密度[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5):538.

[5] 体外诊断试剂分析性能评估指导原则—精密度,附件 7.

[6] 吕赛平,刘琴,邹学森. 应用 EP6-A2 方法验证血糖试剂盒的线性范围[J]. 实验与检验医学, 2011, 29(1):45-46.

[7] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社, 2006:33.

[8] 张忠,高静. 比色法测定超氧化物歧化酶的临床评价及应用研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, 18(2):105-107.

[9] Reddi AR, Jense LT, Naranuntarat A, et al. The overlapping roles of manganese and Cu/Zn in oxidative stress protection[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(2):154-162.

(收稿日期:2013-06-28)

• 经验交流 •

血浆 C-反应蛋白检测对睡眠呼吸暂停低通气综合征合并高血压患者的临床价值

伍传琦¹, 许文水², 韦宏文¹, 赵 斌¹
(广西崇左市大新县人民医院:1. 检验科;2. 内一科 532300)

摘 要:目的 评估血浆 C-反应蛋白(CRP)检测对睡眠呼吸暂停低通气综合征(SAHS)合并高血压患者的临床价值。方法 收集 102 例 SAHS 合并高血压患者,依据血压水平分为 3 组,检测 3 组患者的血脂谱、糖化血红蛋白以及血浆 C-反应蛋白水平。同时采用 Pearson 相关分析血浆 C-反应蛋白水平与血压的关系。结果 (1)3 组患者血脂、糖化血红蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$),但血浆 C-反应蛋白水平差异存在统计学意义($P<0.05$);(2)Pearson 相关分析提示血浆 C-反应蛋白水平与收缩压呈正相关性($r=0.883, P=0.025$),与 DBP 无明显相关性($r=0.536, P=0.074$)。结论 SAHS 合并高血压患者的血浆 C-反应蛋白水平与收缩压呈正相关,检测 SAHS 患者血浆 C-反应蛋白能够在一定程度上反映患者的血压水平。

关键词:C-反应蛋白; 睡眠呼吸暂停低通气综合征; 高血压
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.01.040 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2014)01-0097-02

睡眠呼吸暂停低通气综合征(sleep apnea hypopnea syndrome, SAHS)是一种严重影响患者身体健康的疾病^[1-2]。研究表明^[3-4], SAHS 与高血压、心肌缺血和脑血管疾病具有一定的相关性,但关于 SAHS 的致病机制目前尚未完全明确。因此,本研究拟初步探讨 SAHS 与高血压间的关系,从而为今后的进一步研究提供基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集从 2010 年 1 月至 2011 年 6 月,在本院就诊、明确诊断为原发性高血压以及合并 SAHS 的患者 102 例,年龄(47.5±5.9)岁,男 60 例,女 42 例。

1.2 研究方法 依据患者的血压水平,将患者分为 3 组(分别为 I 级、II 级和 III 级高血压组),采取患者空腹静脉血,用于血脂谱、血糖以及 C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)的检测。

1.3 统计学处理 定量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,定性资料采用百分率表示,采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用 one-way ANOVA 或 χ^2 检验,采用 Pearson 相关分析血浆 CRP 水平与血压的关系, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组患者入院时一般资料比较 由表 1 可见,高血压 3 组患者的血脂谱以及糖化血红蛋白水平无明显差别,但随着患者血压的升高,3 组间 CRP 呈逐渐升高趋势,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 血浆 CRP 水平与收缩压(SBP)和舒张压(DBP)的相关性

采用 Pearson 相关分析提示,血浆 CRP 水平与 SBP 呈正相关,相关系数 $r=0.883(P=0.025)$,与 DBP 无明显相关,相关系数 $r=0.536(P=0.074)$ 。

表 1 两组患者入院时一般资料比较			
分组	I 级组	II 级组	III 级组
例数(<i>n</i>)	30	40	32
男性(<i>n</i>)	18	22	20
SBP(mm Hg)	148±6	166±7	186±4 *
DBP(mm Hg)	94±3	104±3	115±4 *
TG(mmol/L)	1.6±0.3	1.7±0.3	1.6±0.4
TC(mmol/L)	5.2±0.4	5.1±0.4	5.1±0.3
LDL-C(mmol/L)	4.0±0.3	4.0±0.3	3.9±0.5
HDL-C(mmol/L)	1.2±0.3	1.3±0.3	1.3±0.2
GHbA1c(%)	6.3±0.2	6.4±0.3	6.3±0.3
CRP(g/L)	7.8±0.9	9.4±0.6	12.3±1.1 *

* : $P<0.05$,与其他组比较。

3 讨 论

既往大量文献报道 SAHS 人群高血压以及心脑血管疾病的发生率较无 SHAS 人群明显升高,其机制可能与 SAHS 导致低氧血症后患者交感神经系统和肾素-血管紧张素-醛固酮