

1.2 方法 酶联吸附试验方法。

2 结 果

冬季较寒冷的天气时,常常发现每天早上 FAME 的冷维护常常通不过,自检用的微孔板洗板结果本应该三排微孔吸空三排微孔注满水,可是常常结果却不尽如人意,不是吸水不彻底就是注水不满,与同行交流时,发现其他血站实验室也常出现这样的情况,由此本实验室召开了科室质量例会,经过论证,把原因分析如下:天气寒冷,经过一夜后,管道壁内的少量残余水可能结冰或结晶,导致堵塞,管道接口也可能因低温而变硬,导致密封性降低,因而造成洗板注水不满,吸水不彻底^[1]。由此,采取以下应对措施:首先,每天早上提前开空调提高实验室温度,并等室温平衡一定时间后,方可启动 FAME,并用加温(40℃左右,不可超过 50℃)的医用纯水先进行日维护,冲洗管道,一来可以清洁管理内的残余物质,二来可以通过温水冲洗,软化管道。日维护结束后再进行常规的冷维护,经过以上步骤后,自检的微孔板注水和吸水效果良好,能顺利通过自检。

同样在寒冷的天气下,还会出现另一个现象,酶标板有时本底较高,甚至会出现花板现象,质控品吸光度(OD)值也不稳定,相差较大,而且此种现象往往集中在几批次化验中某一厂家试剂的第一批酶标板上,经过分析,这也与室温有一定关系,第一批实验进行时,室温和试剂温度可能相对较低,特别是洗液,因量多,较难平衡至理想温度,而且可能是该厂家的洗液相对其他厂家的而言,溶解度较低一点,有微小结晶因低温而未充分溶解。导致洗板效果不理想。于是采取以下措施,将洗液桶放入温箱孵育升温,使之充分溶解,经过如上处理过程后,酶标板最终结果非常理想,本底清楚,质控品 OD 值也很稳定,不再出现失控现象。

在江苏地区,每年 6~7 月会有梅雨季节,在此期间也会有些异常情况出现,如洗板不理想,洗板针头堵孔现象,实验结果有假阳性,且实验结果重复性不好。在洗板头的维护冲洗中发现,在此期间,洗板头有时会有霉点出现,经分析,可能是洗板针头上有残余血清等蛋白物质,遇到多雨季节,天气闷热,湿度大,洗板针头容易上霉,导致洗板针头被污染,堵塞,从而引起实验结果的假阳性^[2]。由此,采取以下措施,空调设定为除湿状态,降低实验室湿度,洗板头的清洗工作由以前的每月维护

改为每周或不定期(根据具体情况)维护,每天工作结束后,用蛋白清洗液冲洗管道,分解去除管道、洗板针头上的残留物,然后再用医用纯水进行日维护^[3]。通过以上措施,FAME 又能正常工作,得到理想,重复性好的实验数据了。

现将 2008 年与 2009 年 2、6、7 月的抗-HIV 呈反应性标本复查结果重复性做一比较,见表 1。

表 1 2007 年与 2008 年相应月份抗-HIV 呈反应性结果重复性比较

年、月	首次反应性标本数	复查反应性标本数	结果符合率
2007.2	4	2	50%
2008.2	1	1	100%
2007.6	5	3	60%
2008.6	6	6	100%
2007.7	4	2	50%
2008.7	3	3	100%

3 讨 论

全自动的仪器设备固然先进,但它代替不了实验室工作人员的全部工作,只有将工作人员的智慧和全自动设备的机械化工作完美地结合起来,才能获得高效,准确的检测结果,使实验室工作质量更上一个台阶。

参考文献

[1] 李文,丁显平,王乃红,等. FAME24/20 中两步法 ELISA 试剂工作表的优化设计[J]. 现代预防医学, 2007, 34(11):2062-2064.
 [2] 关茵,全兴明,郭美英,等. FAME 全自动酶免分析系统吐板现象分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(10):256-257.
 [3] 张开惠. 确保 ELISA 自动化检验的质量需注意的几个要点[J]. 中国输血杂志, 2008, 21(6):452-454.

(收稿日期:2010-06-24)

血浆同型半胱氨酸临床常用检测方法及其影响因素

王 宇(北京市丰台医院 100071)

【关键词】 血浆同型半胱氨酸; 检测方法; 影响因素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.24.083

中图分类号:R446.1

文献标志码:B

文章编号:1672-9455(2010)24-2808-03

血浆同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)即 2-氨基-4 巯基丁酸,为一种含硫氨基酸,众多的临床研究已经证实高同型半胱氨酸血症是多种血管相关性疾病的危险因素。因此,血浆总同型半胱氨酸的检测也在临床广泛开展并用于指导临床工作。目前相关的检测方法众多,并存在着多种影响因素,造成检测结果存在差异。本文通过介绍临床常用的几种检测方法和影响检测的众多因素来着重指出临床在检测血浆同型半胱氨酸过程中应如何避免检测结果的不准确。

1 HCY 的特征及致病机理

HCY 是蛋氨酸循环中 S-腺苷基高半胱氨酸水解酶,水解反应的产物,细胞内的 HCY 有三条去路即被甲基化生成蛋氨酸,与丝氨酸缩合生成胱硫醚以及直接排出细胞 HCY 是蛋氨酸新陈代谢过程中的重要中间产物,是一种有毒性作用的含硫氨基酸。血浆中 HCY 存在游离态与结合态两种形式。在生理条件下,人体血浆中只有极少量 HCY(<0.3 μmol/L)以游离状态存在,绝大部分以 HCY-二硫化物结合态存在,而结

合态 HCY 中约 70% 与血浆蛋白结合,其余 30% 与其他硫醇结合。

2 HCY 的临床常用检测方法

2.1 高效液相(HPLC)方法 HPLC 法多采用柱前衍生化荧光检测技术。Pastore 等提出的衍生化法较为简单该法的衍生化过程全部在高效液相自动加样器内进行。首先将含有硼氢化钠,二甲基亚砷和氢氧化钠的溶液,含有乙二胺四乙酸(EDTA)和二巯基苏糖醇的溶液,以及 1-辛醇,盐酸溶液共同加入标本中,室温下混匀 1 min 后,加入含有衍生化剂 bromobimane 的缓冲液,混匀 1 min 后进样。色谱柱采用 150 mm×4.6 mm 的反向 C18 柱,进样前用 pH3.6 的硝酸铵和甲酸铵缓冲液平衡,然后用乙腈进行梯度洗脱。半胱氨酸和同型半胱氨酸保留时间分别为 3.76 min 和 4.14 min。此方法灵敏度高,最低检测可达 50 nmol/L,在其线性范围内相关系数 $r > 0.99$; 批内精密密度为 3.3%,批间不精密密度为 4.9%($n=10$);分离效果好,不仅能分离出血中多种含硫氨基酸,还能对尿液标本进行测定。

2.2 酶免疫测定法 其原理为:标本中的与蛋白结合的同型半胱氨酸、与半胱氨酸等结合形成混合同型半胱氨酸二硫化物,与同型半胱氨酸自身结合,再加入二巯基苏糖醇后还原为游离的同型半胱氨酸再经 SAH 水化酶及过量的腺苷氨酸作用,转化为 S-腺苷-L-同型半胱氨酸(SAH),加入 SAHase 酶抑制剂;用腺苷酶(Adoase)降解残余腺苷除去干扰;由抗 SAH 单克隆抗体组成的竞争性酶联免疫检测系统定量测定 SAH。

2.3 荧光偏振免疫检测(FPIA)法 FPIA 法灵敏度高,检测速度快,操作简单。该法用特异性的抗-S-腺苷同型半胱氨酸单克隆技术,采用荧光偏振法测定 HCY。美国雅培公司采用全自动荧光偏振技术,用 AXSYM 仪器检测 HCY,反应原理为:健康人血浆中也需要将同型半胱氨酸转化为先 S-腺苷同型半胱氨酸,与作为示踪物的荧光素标记 S-腺苷同型半胱氨酸类似物,对特异性单克隆抗体进行竞争性结合,引起示踪物偏振光的改变,从而检测出同型半胱氨酸的浓度。

2.4 荧光定量法 首先在微孔板中将患者血浆中的氧化态高半胱氨酸用还原剂还原,再用基因重组的甲硫氨酸裂解酶(γ HCYase)将还原后的同型半胱氨酸分解,形成的产物再与适当成色剂反应形成可测量的荧光化合物。检测其荧光强度,以此测得血浆中同型半胱氨酸的浓度。此方法操作简便,成本低,可以作为一个筛检的方法应用于临床诊断。

3 同型半胱氨酸检测的临床意义

HCY 致病机理表现在当体内的同型半胱氨酸水平代谢紊乱,浓度升高,就会形成同型半胱氨酸巯基内酯,可与低密度脂蛋白形成复合物,随后被巨噬细胞吞噬,形成堆积动脉粥样硬化斑块上的泡沫细胞。而且,同型半胱氨酸还可自发氧化,形成超氧化物和过氧化氢,这些产物会导致内皮细胞的损伤和低密度脂蛋白的氧化,并可造成血管平滑肌持续性的收缩,引起缺氧,从而加速动脉粥样硬化的过程。因而认为,由同型半胱氨酸的代谢异常导致的高同型半胱氨酸血症已被许多研究证实是心脑血管病发病的独立危险因素。近年来,同型半胱氨酸的检测在临床上的应用主要心血管疾病,尤其是冠状动脉粥样硬化和心肌梗死的危险指标。有研究表明,血浆 HCY 每增高

4~5 $\mu\text{mol/L}$,血管相关性疾病的发生率相应增高 40%~60%^[2]。普遍接受的诊断标准是空腹血浆 HCY 水平大于 15 $\mu\text{mol/L}$ 。但有学者认为其应在 12~14 $\mu\text{mol/L}$ 以上这可能是由于血浆 HCY 检测中的众多影响因素所致,这些影响因素主要包括以下几个方面。

4 血浆同型半胱氨酸检测结果的影响因素

4.1 受检者遗传缺陷 主要是指与 HCY 代谢相关酶的基因突变或缺陷,如亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR),这些酶是 HCY 体内代谢的关键酶,其缺乏可致 HCY 分解代谢减少而引发血浆 HCY 水平增高^[3]。

4.2 受检者的营养状态 体内同型半胱氨酸水平与饮食有着密切的关系,叶酸、维生素 B₁₂ 和维生素 B₆ 是 HCY 分解代谢中关键酶的辅酶,这些维生素缺乏可导致血浆 HCY 水平升高^[4]。有发现,血浆 HCY 浓度与血浆叶酸、维生素 B₆、B₁₂ 水平呈明显负相关^[5]。

4.3 受检者体质因素影响 肾脏在 HCY 的代谢清除中发挥关键作用,肾脏功能正常时肾小球率过滤与血浆 HCY 水平呈负相关^[6];肝脏是体内叶酸、B₁₂ 和 B₆ 主要储存部位,肝功能受损可使 B 族维生素缺乏致血浆 HCY 水平增高;多种癌症、银屑病、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、甲状腺功能减退症等可致血浆 HCY 水平增高。

4.4 受检者的年龄和性别 血浆 HCY 水平可因性别不同而存在差异,正常女性空腹血浆 HCY 水平较男性低,这可能与女性体内雌激素水平较高及肌肉比重较少有关。妊娠期妇女体内同型半胱氨酸水平较怀孕前低,但由于妊娠期妇女对同型半胱氨酸损坏敏感性增强,所以血浆中同型半胱氨酸水平轻度升高就可能引起一系列的血管损害。男性血浆 HCY 浓度增高的原因可能与雄性激素或肌酐浓度较高及骨骼肌发达有关。有文献显示,老年人的年龄与血浆 HCY 水平相关,年龄每增长 10 岁,HCY 水平升高 10 $\mu\text{mol/L}$ ^[7]。这可能与年龄增长,老年人胃肠功能减低造成维生素 B₆、维生素 B₁₂ 及叶酸缺乏及肝肾功能减退有关。

4.5 生活方式的影响 生活方式亦影响血浆 HCY 水平,饮酒较多影响叶酸和维生素 B₁₂ 的吸收,同型半胱氨酸向蛋氨酸代谢障碍,同型半胱氨酸堆积;吸烟及大量饮用咖啡可致血浆 HCY 水平增高,增加体力活动可降低其水平。

参考文献

- [1] Frank F, Ame LF, Ingrid A, et al. Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum [J]. Clin Chem, 1998, 44(2): 311-316.
- [2] Arnesen E, Reesum H, Bonna KH, et al. Serum total homocysteine and coronary heart disease [J]. Int J Epidemiol, 1995, 24(4): 704-709.
- [3] Dayal S, Lentz SR. ADMA and hyperhomocysteinemia [J]. Vasc Med, 2005, 10(5): 27-33.
- [4] Lenhmann M, Ergland B, Blennow K, et al. Vitamin B12-B6-folate treatment improves blood-brain barrier function in patients hyperhomocysteinemia and mild cognitive impairment [J]. Dement Geriatr Cogn Di, 2003, 16(3): 145-

151.

- [5] Andcrsson A, Isaksson A, Bratstrom L, et al. Homocysteine and other thiols dstermind in plasma by HPLC and thiol-specific postcolumn dervatiztion [J]. Clin Chem, 2001, 39:1590.
- [6] Jakubowski H. Molecular basis of homocystene toxicity in humans[J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(4):470-487.

- [7] Adunsky A, Weitzman A, Fleissig Y, et al. The relation of plasma total homocysteine level to prevalence cardiovascular disease in older patients with ischaemic stroke[J]. Aging Clin Exp Res, 2000, 12(1): 48-55.

(收稿日期:2010-06-08)

UF-500 尿液流式细胞分析仪在管形检测中的应用

李 冬(云南省腾冲县人民医院 679100)

【关键词】 UF-500 尿液流式细胞分析仪; 管型; 显微镜检查

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.24.084

中图分类号:R446.12

文献标志码:B

文章编号:1672-9455(2010)24-2810-02

自 1995 年,日本希森美康研制出 Sysmex UF-100 Full autbmated urine cell analyzrt, 1998 年 Sysmex UF-50 推向市场, 2009 年 Sysmex UF-500 推向市场。UF-500 流式细胞法尿分析仪是目前自动化程度较高、分析速度较快的尿沉渣仪。然而,它也存在着不足之处:只能检测出透明管型和标出有病理管型的存在可能,只有通过离心镜检,才能确认是那一类管型;不能提供尿沉渣的真实形态图,而是散射图和直方图。流式细胞法尿分析仪作为尿沉渣筛选检查设备,对有疑问的标本进一步进行显微镜检查是不可避免的。

1 流式技术优点

快速,最高每秒可检测数万个细胞,并在短时间内得到大量数据;多参数,能进行多参数相关数量,以获得参数间大量相关信息;分选,即根据测量信息对细胞群体的各种亚群进行分类收集。

2 检测原理

UF-500 尿液流式细胞分析仪应用了流式细胞和电阻抗原理:当尿标本被稀释,用 9 氮杂菲和羧花氰对尿中的细胞、管型、细菌等有形成分进行染色后,靠液压作用通过鞘液流动池,它被无粒子颗粒的鞘液包围,在鞘液的约束下,使每个细胞以单个纵列的形式通过流动池的中心轴线,并被氩激光束照射,形成的细胞柱与氩激光束垂直相交,使细胞产生荧光和光散射。光散射强度主要取决于细胞颗粒的大小,荧光强度与物质颗粒吸附的荧光染料量有关。不同的染色颗粒物质可产生不同的光散射强度和荧光强度,当染色的颗粒散射光和荧光越强,前向光脉冲信号越强,这是定性和定量分析的基础。分析仪还配备了电阻抗变化检测系统,在流动池的前、后方各装有二个电极并维持恒定的电流,当尿液样品通过仪器的流动池小孔时,随着样品电阻抗的变化,二个电极之间的电压起相应的变化。仪器将每个细胞发出的荧光、散射光和电阻抗信号转变成电信号^[1]。根据每个尿液标本的直方图和散射图来区分细胞及其形态。光源:氩离子激光,发射波长为 488 nm。染色:荧光膜染色+荧光核染色。应用荧光染色剂对不同物质的细胞核或细胞膜进行分别染色,并依据染色后荧光强度的不同及细胞大小的不同来区分不同沉渣物质。染色液中使用了具有选择性、能使细胞膜、细胞核分别染色的两种染料。染色所需

时间为 10 s,染色过程是仪器自动进行。

3 样本采集

要注意用新鲜尿液做分析检测,尿液 2 h 内很少出现大的变化,如果时间过于延长,细菌增殖尿呈碱性,管型溶解;这一尿的变化事实,无论采取什么样的方法也难以避免。UF-500 的测定结果可以敏锐反映尿标本的实际状态^[2]。

4 手工显微镜与流式分析仪两者的关系

4.1 目前人工镜检存在缺陷 (1)重复性差,检验人员之间的个体差异大(误差 CV:30%)。各检验机构之间的差异大(误差 CV:30%)。(2)检查所需的时间长:如离心、涂片、镜检。(3)检测方法等的标准化尚未确立,无统一质控标准。

4.2 定量与非定量 定量报告方式能让临床及时了解药物疗效,进行疗效的动态观察和比较。非定量结果是一个模糊的概念,特别当结果处于临界状态时,容易引起误诊误判。

5 UF-500 对管形分类

5.1 在 UF-500 中的 FIw-Fscw 图中可直接分出病理管型和非病理管型。一般认为透明管型是非病理性的,颗粒管型、蜡样管型等其他几种管型是病理性的;同时透明管型中没有 DNA 物质的,病理管型中有 DNA 物质。

5.2 在管型中透明管型可以进行分类,病理管型则不能分类,但是能将其以病理管型(path. CAS)形式打出标记,供将其选出镜检。根据管型和黏液丝在散射图上的出现的位置等的详细就计算程序将其区别。因为透明管型内容物中无 DNA 物质,所以透明管型在仪器上只有前向散射光强度(FSC)、无荧光强度(FI)。UF-500 尿沉渣分析仪是根据管型中的内容物染色后产生的荧光强弱来区分病理性管型和非病理性管型的,但不能将病理性管型进一步的分类。

5.3 病理管型包括上皮细胞、白细胞、微粒体等,它们的荧光强度很强。病理管型在散射图上显示为一个大的红点,在尿沉渣结晶中,夹杂有磷酸盐及尿酸盐,很难区分开。它是利用荧光波宽(FLW)/前向散射光波宽(FSCW)和 DNA 物质来区分上皮细胞、病理管形和非病理管型的。

6 临床实验应用

6.1 交叉污染 含有高浓度粒子的标本测定后,UF500 装置