

显带分析中期分裂相 25 个,嵌合型加倍分析,染色体异常者 113 例(10.52%),其中性染色体异常 98 例(9.12%),以克氏征(Klinefelter's 综合征)最多(82 例),常染色体异常 16 例(1.49%),单纯 47,XY74 例,嵌合型 46,XY/47,XY5 例,47,XY/48,XY1 例,47,XY/46,XY15P2 例,46,X 男性综合征 4 例。在 536 例原发不育男性中查出染色体异常 102 例(19.03%),其中 47XXY 有 92 例,46,XX 男性 5 例,无精症染色体异常率为 18.68%。在 73 例中发现 23 例染色体核型异常(31.50%),其中性染色体异常 19 例(82.66%),无精子、少精子者染色体异常 20 例(87%)。男性不育染色体异常,涉及性染色体和常染色体,在无(少)精子者中应进行染色体检查。YRRM 基因的表达在男性不育者精子生成中起重要作用。

7 分子生物学检测

细胞内 DNA 结构和功能的改变如雄性激素受体基因、CyclinA 基因的变化等都会对配子的形成、精子的活力产生影响。夏薇等[11]用 PCR 法对 340 例男性不育者进行 YRRM 缺损情况筛查,有 7 例该基因缺损(2%),均表现出无精或少精。孙圆景等[12]对 30 例少精不育者精液的雄性激素受体(AR)基因 8 个外显子(A、B、C、D、E、F、G、H)分别进行扩增分析,外显子 A 即基因转录激活区发生点突变 3 例,插入突变 4 例,突变率为 23.3%,外显子 H 发生缺失突变 1 例(3.3%)。外显子 G 发生点突变 1 例(3.3%),总突变率为 30.3%,说明雄性激素受体基因外显子 A 即基因转录激活区的突变是造成少精不育的重要原因。对 45 例少精不育症用印迹分析(RFLP)筛选与少精不育相关的新分子标记,用 PAPD(DNA)技术收集其 DNA 指纹片段,发现其含“AAT”和“GCG”密码子重复的中度重复顺序,说明具有 RFLP 现象的中度重复顺序是与精子发生相关的某一基因的表达调控部分,因其易在基因组中发生变异从而影响到精子的发生。

综上所述,精液检验项目是检查男性不育症原因及疗效观察的主要手段,也用于辅助诊断男性一些生殖系统疾病。

参考文献

[1] Serebrovska ZA, Serebrovska TV, Pyle RL, et al. Transmission of male infertility and intracytoplasmic sperm in-

jection [J]. Fiziol Zh, 2006, 52(3): 110-118.

[2] Sakamoto H, Saito K, Schichizyo T. Color doppler ultrasonography as a routine clinical examination in male infertility [J]. Int J Urol, 2006, 13(8): 1073-1078.

[3] Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis [J]. Reprod Biomed Online, 2006, 12(5): 630-633.

[4] Mostafa T, Anis TH, Ghazi S, et al. Reactive oxygen species and antioxidant relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele [J]. Asian J Androl, 2006, 8(4): 451-454.

[5] Ku JH, Shim HB, Kim SW, et al. The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele [J]. BJU Int, 2005, 96(7): 1092-1096.

[6] 张洁, 谢群, 邱曙东. 男性不育相关基因的研究进展 [J]. 国外医学: 计划生育/生殖健康分册, 2006, 25(4): 221-224.

[7] 霍山, 谢群, 方小武, 等. 男性不育患者精液中白细胞与精子形态学参数变化 [J]. 中国综合临床, 2008, 20(6): 538-539.

[8] 宋影, 刘雨生, 周桂香, 等. 精液常规联合改良巴氏染色检查在辅助生殖技术中的应用 [J]. 临床输血与检验, 2006, 8(3): 181-187.

[9] 刘睿智, 辛暨丽, 沙艳伟, 等. 解脲支原体感染对精液黏度和液化时间的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2003, 7(6): 499-500.

[10] 岳林. 精液中白细胞含量与男性不育的相关性研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(1): 102-103.

[11] 夏薇, 苏宁, 王维. 精液黏度与精液分析参数及男性不育的关系 [J]. 中国当代医药, 2009, 16(15): 46-47.

[12] 孙圆景, 孟昭和. 116 例男性不育患者精液一般检验结果分析 [J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(1): 51-52.

(收稿日期: 2011-08-23)

化学发光免疫分析技术及在临床检验中的应用

施丽娟 综述, 张建明 审校(云南省昆明市金域医学检验所 650214)

【关键词】 化学发光免疫分析技术; 临床检验; 应用

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.04.038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)04-0454-03

化学发光免疫分析技术(CLIA)是 20 世纪 80 年代发展起来的,是继发射免疫、酶免疫、荧光免疫测定以后的新一代标记免疫技术。因其具有简便易行、标记物制备非常容易、稳定性高、标本用量少、便于实现完全自动化和不污染环境等优点,特别是能在较短的时间内得到实验结果,因此深受检验医学工作者和临床医师的好评。

1 CLIA 的原理

1.1 化学发光免疫分析的原理 CLIA 是用化学发光剂直接标记的抗原或抗体与待测标本中相应抗体或抗原、磁颗粒性的抗原或抗体反应,通过磁场把结合状态(B)和游离状态(F)的

化学发光剂标记物分离开来,然后在结合状态(B)部分中加入发光促进剂进行发光反应,通过对结合状态(B)发光强度的检测进行定量或定性检测。

采用化学发光技术和磁性微粒子分离技术相结合,用最新的免疫发光技术可使检测灵敏度达到 10~15 g/mL 的全自动化学发光免疫分析仪,应用最流行的微软视窗编写使用界面,将操作手册浓缩于电脑盘内。分析速率可达每小时 180 个测试,并可同时完成不同的 13 个项目。利用两点定标校对出厂曲线,不需全线定标,可减少试剂消耗,利用条码标签直接读取载物盘内分析内容。该分析系统具有操作简单、快速、结果准

确可靠、试剂储存时间长,自动化程度高等优点。

1.2 器检测原理 在检测化学反应中,某些化学基团被氧化后形成激发态,并在返回基态的同时发射一定波长的光子。其实质是化学反应与免疫反应相结合的一种高灵敏度的分析方法,亦称为微量倍增技术。CLIA 有两种方法,一是小分子抗原物质的测定采用竞争法。二是大分子的抗原物质测定采用夹心法。所用固相磁粉颗粒极微小,其直径仅 1.0 μm。这样大大增加了包被表面积,增加抗原或抗体的吸附量,使反应速度加快,也使清洗和分离更简单。

2 仪器组成

2.1 主机 是仪器的运行反应测定部分。包括原材料配备部分(反应杯、标本盘、试剂盘、纯净水、清洗液、废水在机器上的储存和处理装置等)、液路部分(过滤器、密封圈、真空泵、管道标本及试剂探针等)、机械传动部分(传感器、运输轨道等)、电路部分(光电倍增管和线路控制板)和光路检测部分。

2.2 微机系统 是仪器的核心部分。具有程控操作、自动监测、指示判断、数据处理、故障诊断等功能,并配有光盘。主机还有预留接口,可通过外部储存器自动处理其他数据并遥控操作,用于实验室自动化延伸发展。

2.3 程控操作 全部实验项目的操作程序均存储在微机中,供选择运用。开机后,仪器将按程序指令运行、完成这个实验,也可重新编写建立新实验程序或修改原设定内容。全部操作手册及维修手册均浓缩于光盘内,阅读和保存更方便。

2.4 指示判断 可根据预先设定的各项目界限值范围,指示和判定检验结果是否超出正常值。

2.5 数据处理 可将测定结果进行各种数据处理,求出其导出量。如平均值、标准差、变异系数、相关系数、t 检验等统计学处理。

2.6 故障诊断 能进行自我故障诊断,利用微机逻辑判断能力,由 CPU 发出校核信号讯问仪器的各部分,核对其反应,判断故障的部分及性质,并以代码和文字描述故障原因,能使操作人员很快了解故障的性质,实施排除故障的相应措施。

2.7 自动监视 能监测仪器全过程正常与否,提示所有供应材料剩余量,指示仪器保养清洗管路期限。在执行一种工作程序时与其无关的数字内容将自动关闭,无光度显示,使键盘停止工作,增强了仪器的自我保护功能。

3 仪器使用

3.1 按规定进行标本处理和选择标本用量。

3.2 根据测定项目不同选择试剂用量和进行试剂处理。仪器还配有 18 种复合校正液用于 42 种适宜校正,校正天数分别为 2、7、14、27 d。

3.3 测试运行 (1)将标本按编号排入标本盘;(2)按项目将所用试剂放入试剂盘;(3)自由编排程序按键运行,在微机的控制下,仪器自动放置反应杯,自动加标本与试剂,并根据实验项目不同进行温育、测定;(4)随时加入急诊检查项目;(5)可按三种方式打印报告:按测定混合项目排列、按患者编号排列、按每一种项目排列。

4 CLIA 的技术参数

4.1 不同型号 CLIA 自动化分析系统:近年来,国外许多厂家研制出许多种型号的自动化 CLIA 检测仪,人们将这类仪器称之为自动化分析系统,即检测过程不需要人工操作,均由仪器完成。

4.2 3 种 CLIA 比较:根据化学发光信号产生的原理不同,试剂盒的技术参数、信号测量也因之不同,以及影响检测结果的因素也有一定差异。3 种目前常用的 CLIA 比较,见表 1。

表 1 不同化学发光免疫分发方法的比较

	吖啶酯标记 CLIA	酶标记 CLIA	ECLIA
标记物	Apase/HRP	三联吡啶钌	吖啶酯
反应类型	夹心法、竞争法	夹心法、竞争法	夹心法、竞争法
光信号	辉光	电激发	闪光
简便快速	较快速	最快速	快速
影响结果的因素	较多	少	少
可否半自动开放	可以	否	否
检测成本	抵	高	高
发光底物	NaOH-H ₂ O ₂	金刚烷、鲁米诺	电激发

5 CLIA 技术有关问题探讨

不同方法检出值的差异:影响检测结果差异的因素较多,如试剂盒的质量、有效期、储存条件、操作者对仪器的校准、实验室的条件等。不同反应模式对测定值有统计学意义,最常见的是双位点夹心法和竞争法,因前者使用两株单克隆抗体,具有高度特异性,测定值低于竞争法。即使采用完全相同的反应模式,因抗体的特异性和亲和力的不同,对测定值也有一定的影响。另外固相抗体的制备、标记物的比活性、标准品的差异都是影响测定值的因素。

6 CLIA 在临床检验中的应用

6.1 激素分析 激素是由内分泌腺或散在内分泌细胞所分泌的高效能生物活性物质,是细胞与细胞之间信息传递的化学媒介。CLIA 对甲状腺激素、性激素等多种激素进行测定,可给临床诊断、治疗、预后提供可靠的实验室数据,大大提高检测的特异性和灵敏度。Karlsson 等^[1]检测了患者的甲状旁腺。Schmidt-Gayk 等^[2]测量了骨代谢的生化标志物降钙素与以前的放射免疫法比较,有更高的准确度和精密度。Vutyavanich 等^[3]检测了血清中促卵泡生成素、促黄体生成素、催乳素、睾丸素。

6.2 肿瘤标志物的分析 肿瘤标志物是指肿瘤发生和增殖过程中有肿瘤细胞合成、释放或机体对肿瘤细胞反应而产生的一类物质,包括蛋白质、激素、酶(同工酶)及癌基因产物等。肿瘤标志物存在于患者的血液、体液、细胞或组织中。CLIA 对良性及恶性肿瘤患者可进行体外早期辅助诊断和对术后的监测,也可以用于寻找新的肿瘤标志物。Mao 等^[4]检测血清中癌胚抗原、鳞状细胞癌抗原、cyfra21-1 的浓度,达到对食管癌患者的诊断及术后病情监测的目的。Sakaida 等^[5]检测了肝病中细胞色素 C 的含量,比较得出细胞色素 C 可能成为肝衰竭的新标志物。Shabin 和 Raslan^[6]比较了胎膜早破和健康孕妇阴道液中的两种标志物:甲胎蛋白(AFP)、人绒毛膜促线性激素,与健康组相比胎膜早破的孕妇阴道积液中两种物质有显著性增高,其中 AFP 的敏感性和特异性最高。

6.3 传染性疾病的病原诊断 乙型肝炎病毒表面抗原、抗体是乙肝感染后,评价治疗是否有效及机体免疫功能的指标,是重要的血清学标志物。常规酶法有可能使部分低病毒含量携带者漏检。CLIA 具有比酶法更高的灵敏度和线性范围。Bowser 等^[7]测定了感染人类免疫缺陷病毒的围产期儿童体内

的 EB 病毒、单纯疱疹病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒,其检测灵敏度比常规酶法高。

6.4 心脏疾病的特征标记物测定 心肌损伤常用的标记物有肌钙蛋白 T\肌红蛋白和肌酸激酶。临床上常用同工酶定量测定。Dutra 等^[8]运用心肌肌钙蛋白(cTnT)受体分子,制成了免疫传感器,可用于临床上早期检测心肌梗死。有文献报道同时检测了 cTnT、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和肌红蛋白,相关系数分别为 cTnT 0.953~0.982;CK-MB 0.835~0.999;肌红蛋白 0.776~0.992,方法具有很好的相关性,可用于检测临床标本。

6.5 其他物质的检测 CLIA 技术还可以对其他一些微量物质进行测定,如细菌、细胞因子、基因、维生素、叶酸、免疫球蛋白及酶等。Quan 等^[9]检测食物中的盐曲霉毒素 B₁。Li 等^[10]检测了 SARA 病中的核抗蛋白。Dasgupta 等^[11]检测血清中地高辛的含量。此方法很好的排除了检测过程中丹参的影响,体现了方法的特异性。

7 结 论

现已有全自动化学发光免疫分析仪应用于临床疾病的诊断和治疗中,不但对检测者无害,而且试剂稳定全自动分析,20 min 内就可以得出精确的结果。CLIA 将会成为常规实验诊断的重要手段,为临床提供重要的诊断依据。

进口 CLIA 自动化系统各型号已占领国内部分市场,主要用于大量常规标本的检测,全封闭式仪器需与其匹配的试剂盒使用。近年来,国外仪器商热点已转向开发型自动发光测量仪器的研制。国内在仪器制造和试剂盒的生产,和国外相比有一定的差异。自动化系统的研制为国外专利,现阶段国内厂家重点应放在现有自动测量仪器质量的提高上,完善数据处理功能,研制出高质量的试剂盒。这方面的工作目前国内已取得初步成果。展望未来,小型智能化 CLIA 仪器随着我国高新精密仪器制造业技术的进步,微型自动化 CLIA 系统的研制将取得进展,CLIA 检测技术的应用必将迎来新的曙光。

参考文献

[1] Karlsson SL, Indridason OS, Franzson L, et al. Algengiorgsaker afleidds kalkvakaohofs medal fullordinna a hofudborgars vaedinu Prevalence of secondary hyperparathyroidism(SHPT) and causal factors in adult population in Reykjavik area[J]. Laeknabladid,2005,91(2):161-169.

[2] Schmidt-Gayk H, Spanuth E, Kotting J, et al. Performance evaluation of automated assays for beta-CrossLaps, N-

MID-Osteocalcin and intact parathyroid hormone (BIO-ROSE Multicenter Study)[J]. Clin Chem Lab Med,2004,42(1):90-95.

[3] Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Sirirungsi W, et al. Frequency of Y chromosome and chromosomal abnormalities in infertile Thai men with oligozoospermia and azoospermia[J]. Asian J Androl,2007,(9):68-75.

[4] Mao YS,Zhang DC,Zhao XH,et al. Significance of CEA, SCC and Cyfra21-1 serum test in esophageal cancer [J]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi,2003,25(5):457-460.

[5] Sakaida I,Kimura T,Yamasaki T,et al. Cytochrome c is a possible new marker for fulminant hepatitis in humans [J]. J Gastroenterol,2005,40(2):179-185.

[6] Shahin M,Raslan H. Comparative study of three amniotic fluid markers in premature rupture of membranes: prolactin,beta subunit of human chorionic gonadotropin, and alpha-fetoprotein [J]. Gynecol Obstet Invest, 2007, 63(4):195-199.

[7] Bowser CS, Kaye J, Leier TU, et al. Prevalence of viral and mycobacterial co-infections in perinatally HIV-infected children [J]. Fetal Pediatr Pathol,2006,25(6):321-331.

[8] Dutra RF, Mendes RK, Lins-da-Silva V, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer[J]. J Pharm Biomed Anal,2007,43(5):1744-1750.

[9] Quan Y, Zhang Y, Wang S, et al. A rapid and sensitive chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of fumonisin B1 in food samples [J]. Anal Chim Acta,2006,580(1):1-8.

[10] Li YH,Li J, Liu XE, et al. Detection of the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus in serum: comparison with results of other viral markers [J]. J Virol Methods,2005,130(1-2):45-50.

[11] Dasgupta A, Kang E, Olsen M, et al. New enzyme-linked chemiluminescent immunosorbent digoxin assay is free from interference of Chinese medicine DanShen [J]. Ther Drug Monit,2006,28(6):775-778.

(收稿日期:2011-11-22)

革兰阴性杆菌 16S rRNA 甲基化酶耐药研究进展

何 龙¹综述,杨启文²审校(1. 浙江省温州医学院附属温岭医院微生物实验室,浙江温岭 317500; 2. 北京协和医院微生物实验室,北京 1007300)

【关键词】氨基糖苷类; 革兰阴性杆菌; 16S rRNA; 耐药
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.04.039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)04-0456-04

氨基糖苷类抗生素通过作用于细菌核糖体 30S 亚基的 16S rRNA 高度保守的 A 位点,干扰细菌蛋白质的合成,从而

引起细菌死亡。氨基糖苷类抗生素具有杀菌作用,抗菌谱广,较长抗生素后效应等特点,而且还与其他抗菌药物有协同作

△ 通讯作者,E-mail:yangqiwen81@yahoo.com.cn。