

遗传代谢病筛查中干尿滤纸片制作及洗脱方法探讨^{*}

杨江涛, 林珊珊[△], 戴子鹏, 赵 明, 李 强, 钟沛强, 钱 俊(深圳爱湾医学检验所有限公司, 广东深圳 518055)

【摘要】 目的 探讨遗传代谢病检测中干尿滤纸片的制作及洗脱方法。**方法** 收集正常儿童的尿液样品, 采用新华 3 号滤纸片对尿液进行处理, 制作成干尿滤纸片。用去离子水对干尿滤纸片进行洗脱, 然后采用紫外可见分光光度计来测定洗脱液中肌酐的浓度, 并与传统的制作干尿滤纸片法的标本检测结果进行对比。**结果** 优化后的干尿滤纸片制作与洗脱的最佳条件如下: 浸泡单片滤纸片的尿液体积应大于 1 mL, 尿滤纸片浸泡时间为 15 min, 采用离心洗脱方法及洗脱干尿滤纸片的去离子水用量为 2.5 mL。**结论** 与传统干尿滤纸片制作及洗脱方法相比, 优化后的干尿滤纸片处理方法具有更高的稳定性, 能有效地提高检测的准确性, 有利于阳性和疑似结果的诊断。

【关键词】 遗传代谢病; 干尿滤纸片; 洗脱; 紫外可见分光光度计

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.031 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0942-03

遗传代谢病是指一类有生理代谢功能缺陷的遗传病。氨基酸、有机酸、脂肪酸、线粒体及溶酶体贮积病等都属于遗传代谢病, 其病种繁多, 就目前已经发现的遗传代谢病已超 500 种, 这类疾病普遍表现为单一病种的发病率低, 但作为一类疾病的总体来看, 其发病率却是很高^[1-3]。

目前利用气-质联用技术从尿液中能检测出 132 种有机酸, 是有机酸遗传代谢病最有效的检测方法^[4]。尿液有机酸检测是根据被测尿液的肌酐浓度, 取 0.2 mg 当量肌酐的尿液进行检测, 常用的肌酐检测方法主要有 Jaffe(苦味酸)法、酶法、干化学法、动力学法、毛细管电泳法等^[5-7]。我国幅员辽阔, 地区发展极不平衡, 一般以干尿滤纸片标本的方式送到筛查中心进行检测与诊断工作^[1]。然而要获得一个客观、准确的结果, 其中的影响因素甚多, 而干尿滤纸片的制作及洗脱是有机酸遗传代谢病检测技术流程中最重要的基础环节之一, 也是筛查工作进行的第一步, 是保证检测工作顺利进行和保障检测质量最基础的工作前提^[8-9]。干尿滤纸片制作和洗脱的不规范往往是造成检测结果有误的原因, 干尿滤纸片的质量是否合格将直接影响着疾病检测结果的准确性, 由此可见干尿滤纸片制作及洗脱的规范化是确保检验结果准确的关键因素。然而传统的干尿滤纸片制作及洗脱方法没有一个规范流程^[1-4]。因此, 本文通过对干尿滤纸片制作及洗脱方法的探究, 使干尿滤纸片前处理过程在传统的基础上得以优化, 以提高检测的准确性。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂 紫外可见分光光度计 UV2600 及石英吸收池(日本 SHIMADZU 公司); AUX320 电子天平(日本 SHIMADZU 公司); RL-821 型漩涡振荡混合器(北京八方世纪科技有限公司); Dragonlab 移液器(可调范围: 20~200 μ L、100~1 000 μ L、1 000~5 000 μ L)购自大龙兴创实验仪器(北京)有限公司; 1730QT 型超声波清洗器(北京科玺世纪科技有限公司); 新华 3 号滤纸片(广州诺标化玻有限公司); 聚乙烯塑料瓶。苦味酸(分析纯, 西亚试剂公司); 氢氧化钠(分析纯, DAMAO 公司); 实验用水均为 Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司)制得的超纯水。

1.2 方法

1.2.1 干尿滤纸片的制作和洗脱 收集儿童的随机尿液, 无

防腐剂, -20 $^{\circ}$ C 保存。把实验用的新华 3 号滤纸片剪裁成 5 cm $\times$ 5 cm 大小的正方形。吸取一定量的尿液于培养皿中, 并将滤纸片置于其中浸泡 15 min, 然后取出尿滤纸片在自然条件下晾干。选用 10 mL 塑料离心管, 将 2.5 mL 的针筒放入离心管内, 然后将干尿滤纸片卷曲后放入针筒内, 用 2.5 mL 去离子水进行洗脱, 待充分湿润滤纸后, 用 Parafilm 封口膜进行密封, 室温下静置 5 min, 3 000 r/min 高速离心 5 min, 得到干尿滤纸片洗脱液。

1.2.2 肌酐浓度的测定 取 0.1 mL 尿样洗脱液于 20 mL 玻璃试管中, 加去离子水定容至 3.0 mL。向各试管中加入 2.0 mL 碱性苦味酸溶液, 摇匀后置室温下反应 25 min。再往试管中加入 5.0 mL 去离子水, 摇匀。以试剂空白作为对比, 在波长 490 nm 下测定其吸光度值。每个样品测定 3 次, 取平均值作为该样品的吸光度值。

2 结果

2.1 尿滤纸片完全浸透所需的时间 实验考察了浸泡时间分别为 5、10、15、20、25 min 时尿滤纸片的质量变化, 并根据滤纸片的质量变化, 初步推断滤纸片完全浸透所需的时间。结果如图 1 所示, 尿滤纸片的质量随着浸泡时间的增加而增加。当浸泡时间大于 10 min 后, 尿滤纸片的质量增加不明显, 质量趋于稳定。因此, 综合考虑实验操作时间, 初步选择尿滤纸片充分浸透所需的最佳时间为 10 min。

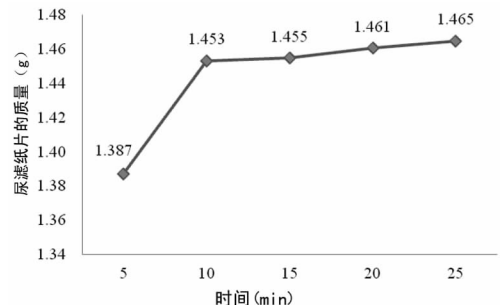


图 1 尿滤纸片完全浸透所需的时间

^{*} 基金项目: 广东省深圳市未来产业专项资金项目(CYZZ20150810111659622)。

[△] 通讯作者, E-mail: linshanshan@aonelab.com.cn。

2.2 尿滤纸片的吸尿体积 尿滤纸片吸尿是否充分对检测结果的准确性有一定的影响。所以尿滤纸片的吸尿体积必须准确把握。吸取 1 mL 尿液,在电子天平上精确称重后,根据密度公式得出尿液密度 $\rho=1.01\text{ g/cm}^3$ 。用电子天平精确称量干滤纸片的质量,然后把滤纸片置于含尿液的培养皿中,待滤纸片充分吸收尿液后,再转移到电子天平上进行精确称重。称量得出干滤纸片净质量 $m=0.47\text{ g}$,干滤纸片吸尿后质量 $m=1.45\text{ g}$,利用差重法,计算出滤纸片的吸尿体积 $v=0.97\text{ mL}$ 。考虑到浸泡滤纸片的尿液体积应大于滤纸片的吸尿体积,因此浸泡单片滤纸片的尿液体积应大于 1 mL。

2.3 尿液浸泡滤纸片时间对尿液肌酐浓度测定的影响 尿液浸泡滤纸片的时间不同可能会对其中的待测化合物浓度有影响,进而影响检测结果的准确性,因此实验考察了浸泡时间分别为 5、10、15、30、60、90、120、180 min 时滤纸片中肌酐的浓度。结果如图 2 所示,5~15 min 随着尿液浸泡滤纸片时间的增加,洗脱液中的肌酐浓度增加,15~90 min 洗脱液中肌酐浓度先稍下降后上升,90 min 后洗脱液中肌酐浓度趋于平稳。从结果上看浸泡时间为 90 min 时肌酐浓度最高,但 15 min 的肌酐浓度和 90 min 的结果相差不大($<3\%$),同时从日常工作中的实际情况考虑,尿液浸泡滤纸片的最佳时间为 15 min。

2.4 干尿滤纸片洗脱方法对尿液肌酐浓度测定的影响

2.4.1 挤压法与离心法对尿液肌酐浓度测定的影响 干尿滤纸片洗脱方法一般为挤压法或离心法^[10-12],实验比较了这两种方法洗脱干尿滤纸片的效果,分别从样品肌酐浓度稳定性及去离子水用量进行比较分析,结果如表 1 所示。由表 1 中可以看出,去离子水用量相同的情况下,用离心法洗脱得到的洗脱液肌酐浓度相对较高,且相对标准偏差(RSD)更小,说明离心法洗脱样品的稳定性更强、重现性好。挤压法是通过人工挤压,由于受挤压的力度、时间等各种因素的影响,洗脱液体积有一定的差距,导致洗脱液肌酐浓度不稳定。而离心法是通过离心机的高速离心,将尿滤纸中的液体充分洗脱出来,洗脱液体积基本一致,洗脱液肌酐浓度比较稳定。因此,采用离心法洗脱干尿滤纸。

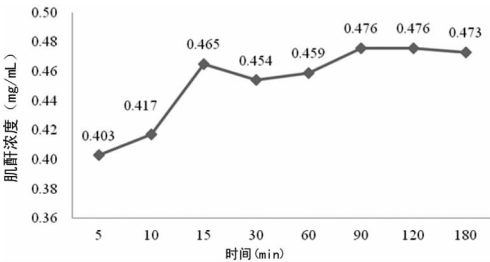


图 2 尿液浸泡滤纸片时间对尿液肌酐浓度测定的影响

表 1 挤压法与离心法对尿液肌酐浓度的影响

项目	去离子水用量 1.2 mL		去离子水用量 2.0 mL		去离子水用量 2.5 mL		去离子水用量 3.0 mL	
	挤压法	离心法	挤压法	离心法	挤压法	离心法	挤压法	离心法
肌酐测定浓度(mg/mL)								
第 1 次	0.398	0.457	0.215	0.291	0.250	0.231	0.263	0.217
第 2 次	0.462	0.421	0.263	0.281	0.216	0.243	0.218	0.235
第 3 次	0.389	0.469	0.306	0.288	0.252	0.255	0.221	0.214
单位体积肌酐浓度(mg/mL)	0.499	0.539	0.522	0.574	0.598	0.608	0.702	0.666
RSD(%)	9.6	5.6	17.4	1.8	8.5	4.9	10.8	5.1

2.4.2 去离子水用量对尿液肌酐浓度测定的影响 洗脱尿滤纸片时去离子水的用量过多可能会稀释样品,过少则无法将干尿滤纸片上的目标化合物充分洗脱下来且洗脱液体积可能未能达到检测所需的取样体积。因此,实验分别考察了离心法洗脱尿滤纸片去离子水用量分别为 1.2、2.0、2.5、3.0 mL 时,洗脱液中的单位体积肌酐浓度。结果见表 1 所示,由表 1 中可见离心法洗脱尿滤纸片去离子水的用量越多,洗脱液中的单位体积肌酐浓度越高,证明洗脱得更充分,但考虑到新生儿尿液中的肌酐浓度较低且新生儿尿液有机酸检测中尿样需取到最大取样体积(即 1.94 mL),且洗脱尿滤纸片时有部分去离子水会残留在滤纸片里(约 400 μL),所以从日常工作中的实际情况及洗脱样品的充分性与洗脱液的肌酐浓度稳定性等因素综合考虑,选用 2.5 mL 去离子水作为洗脱干尿滤纸片的最佳用量。

3 讨 论

由于传统干尿滤纸片的制备和洗脱并没有形成规范,导致各个地方所采用的制备和洗脱方法各不相同,从而使检测结果的准确性和可比性进一步降低。本文探讨了遗传代谢病筛查中尿滤纸片制作及洗脱的方法,其中包括尿滤纸完全浸透所需时间、尿滤纸片的吸尿体积、尿液浸泡滤纸片时间对尿液肌酐

浓度测定的影响及去离子水用量对干尿滤纸片的洗脱影响等。通过该优化方法对干尿滤纸片进行制作和洗脱,能提高检测的准确性,有利于疑似结果的判定。希望通过此次干尿滤纸片制作及洗脱方法的探讨,能为今后干尿滤纸片操作规范的形成作出贡献。

参考文献

[1] 彭薇,张万巧,封志纯.气相色谱-质谱法检测遗传代谢性疾病高危患儿[J].临床儿科杂志,2014,32(9):888-891.
[2] 杨楠,韩连书,叶军,等.新生儿期氨基酸、有机酸及脂肪酸氧化代谢病疾病谱分析[J].临床儿科杂志,2012,30(9):805-808.
[3] 肖昕,郝虎.质谱技术在小儿遗传性代谢病筛查中的应用[J].中国新生儿科杂志,2013,28(1):3-5.
[4] 韩凤,韩连书,叶军,等.气相色谱-质谱检测的 564 例遗传代谢病疾病谱分析[J].中华内分泌代谢杂志,2013,29(8):693-695.
[5] 陈筱菲,倪甘甜.酶法与碱性苦味酸法测定肌酐清除值的差异情况研究[J].检验医学,2010,25(4):272-274.
[6] 张健,张智慧,李玮,等.酶法和碱性苦味酸法测定肌酐的

方法学分析[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(6): 864-865.

[7] 吴汉项. 血清中肌酐的检测方法及其进展[J]. 医药前沿, 2014, 16(31): 92.

[8] 黄玉春, 张春花, 李茹琴, 等. 先天性遗传代谢病的早期诊断[J]. 新生儿杂志, 2005, 20(3): 101-103.

[9] 宋金青, 杨艳玲, 孙芳, 等. 气相色谱-质谱联用分析在有机酸尿症筛查与诊断中的应用[J]. 中国医刊, 2006, 41(2): 38-39.

[10] 许克铭, 王立文, 蔡虹, 等. 气相色谱-质谱法对高危婴幼儿遗传性代谢疾病筛查的研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(9): 515-517.

[11] 耿国兴, 李旺, 范歆, 等. 乙酸乙酯萃取-气相色谱-质谱联用技术对 267 例疑似遗传代谢病筛查的结果[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(20): 3289-3290.

[12] 刘志峰, 郭红梅, 练敏, 等. 应用尿液气相色谱-质谱分析法筛查儿童遗传代谢性肝病的临床意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(8): 575-576.

(收稿日期: 2015-10-11 修回日期: 2015-12-25)

• 临床探讨 •

探讨全自动快速微生物检测系统在鉴定流感嗜血杆菌的应用^{*}

陆伟桃¹, 郭 菁¹, 邓晨晖², 张 文³, 周 强^{3△} (1. 广东省广州市黄埔区红十字会医院检验科 510760; 2. 广东省中医院手术室, 广州 510120; 3. 广东省中医院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 探讨全自动快速微生物检测系统(VITEK MS)在鉴定流感嗜血杆菌的应用价值。**方法** 收集广州市黄埔区红十字会医院与广东省中医院 2014 年 3 月至 2015 年 1 月从痰液或咽拭子标本中分离的流感嗜血杆菌 35 株, 用 16S rDNA 测序确证。并且用 VITEK MS 质谱仪, API NH 常规生化鉴定与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验 3 种方法对上述菌株鉴定分析。**结果** 在 35 株流感嗜血杆菌细菌中, VITEK MS 质谱仪与 API NH 常规生化鉴定差异无统计学意义($P>0.05$), 而 VITEK MS 与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 对于 API NH 常规生化鉴定与 MH 琼脂平板上 V+X 因子需求性试验, VITEK MS 能快速、准确地鉴定流感嗜血杆菌, 对临床诊治提供很大的帮助, 有非常好的应用前景。

【关键词】 流感嗜血杆菌; 全自动快速微生物检测系统; API NH; V+X 因子; 16S rDNA
DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.07.032 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)07-0944-02

流感嗜血杆菌是专性寄生于人类上呼吸道的常居菌群, 属苛养性细菌, 是社区获得性肺炎的重要致病菌之一^[1]。全自动快速微生物检测系统(VITEK MS)利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS), 是近年来出现的一种新的蛋白质组学的检测方法, 在国外广受关注^[2-5]。本研究以 16S rDNA 基因测序作为“金标准”, 对 VITEK MS 质谱仪, API NH 常规生化鉴定与 V+X 因子需求性试验鉴定效能比较分析, 探讨 VITEK MS 质谱仪在鉴定流感嗜血杆菌的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料来源 35 株流感嗜血杆菌分离自广州市黄埔区红十字会医院及广东省中医院 2014 年 3 月至 2015 年 1 月 1 343 例呼吸道感染患者痰液或咽拭子标本, 并且通过 16S rDNA 检测及测序, 结果用 BLAST 与 Gene bank 数据库中的序列进行比对确证。

1.2 试剂与仪器 嗜血巧克力平板(江门凯琳); API NH 细菌鉴定卡; V+X 因子(英国 OXOID 公司产品); Premix Ex Taq Version 2.0, DL2000 DNA marker(TaKaRa); VITEK MS 质谱仪(法国 BioMrieux 公司), ABI 9700 PCR 仪, Bio-Rad 凝胶成像系统。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离培养 所有菌株标本接种在流感嗜血培养基上, 35℃ 孵育箱恒温培养 24~48 h。

1.3.2 细菌的生化鉴定 采用 API NH 细菌鉴定卡, 严格按照说明书操作。

1.3.3 X+V 因子需求试验 质控菌株为流感嗜血杆菌 ATCC49247, 操作按全国临床检验操作规程要求进行。

1.3.4 VITEK MS 质谱仪鉴定 用无菌接种环挑取适量单个菌落涂于质谱仪样品检测板上, 随后再点 1 μL 基质液, 待基质液干燥后放入质谱仪上检测。

1.3.5 16S rDNA 检测及测序 DNA 提取试剂盒提取模板 DNA, 进行 16S rDNA 基因 PCR 扩增, 阳性 PCR 产物送 invitrogen 公司进行 DNA 测序, 测序结果用 BLAST 与 Gene bank 数据库中的序列进行比对, 相似度大于 99% 的细菌判定为同种细菌^[5]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 计数资料以率表示, 比较采用 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 从 1 343 份痰或咽拭子标本中, 共分离出流感嗜血杆菌株 35 株, 检出率为 2.6%。其中儿童(≤14 岁)占 31%(11/35), 成人(15~60 岁)占 17%(6/35), 老年人(≥60 岁)占 52%

^{*} 基金项目: 广东省科技计划项目(2011B031800028); 广东省科技计划项目(粤科函规财字[2014]807 号)。
[△] 通讯作者, E-mail: zq_zhouqiang@163.com。