

- 孕妇妊娠结局的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 18(18):85-87.
- [6] 孙宇, 赵红. 生活方式干预预防妊娠期糖尿病的研究现状[J]. 中华护理杂志, 2013, 48(8):753-756.
- [7] 于江荣, 许现娣, 孙伟宏, 等. 医学营养指导依从性对妊娠期糖尿病患者母婴体质量的影响[J]. 护理学报, 2014, 10(10):58-59.
- [8] 张远萍. 全子宫切除术后强化心理干预对缓解负性情绪及改善生活质量的临床研究[J]. 医学临床研究, 2014, 31(4):662-664.
- [9] Harrison CL, Lombard CB, Strauss BJ, et al. Optimizing healthy gestational weight gain in women at high risk of gestational diabetes: a randomized controlled trial[J]. Obesity (Silver Spring), 2013, 21(5):904-909.
- [10] 周丽莉, 王霞, 穆玉明. 经会阴超声评估女性产后前盆腔脏器脱垂的临床研究[J]. 医学临床研究, 2015, 32(8):1584-1586.

(收稿日期:2016-03-08 修回日期:2016-05-17)

• 临床探讨 •

免疫性不孕症患者血清 GAPDHS 抗体水平及其临床意义

何 睢¹, 王莉莉²

(1. 湖南省妇幼保健院检验科, 长沙 410008; 2. 上海长征医院检验科 200003)

摘要:目的 检测分析免疫性不孕症患者血清中 S-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDHS)抗体的水平并探讨其潜在的临床意义。方法 2014年4月至2015年11月就诊于湖南省妇幼保健院生殖中心128例免疫性不孕症患者与110例健康对照者,通过酶联免疫法(ELISA)检测血清中的GAPDHS抗体水平,并分析其水平与患者性别、TAT滴度以及免疫性不孕症种类间相关性。结果 免疫性不孕症患者血清中抗GAPDHS抗体水平(86.4±22.7)μg/mL显著高于健康对照组(32.1±4.86)μg/mL,差异具有统计学意义(P<0.05);且其在男性患者、TAT>8以及原发性不孕症患者中的水平显著高于女性患者、TAT≤8及继发性不孕症患者。采用受试者工作特征曲线(ROC曲线)分析显示,GAPDHS抗体在所有不孕症患者中ROC曲线下面积达0.75(敏感度0.66,特异度0.78);在男性不孕症患者中,曲线下面积为0.85(敏感度0.85,特异度0.75);在原发性不孕症患者中,曲线下面积为0.82(敏感度0.78,特异度为0.83)。结论 本研究发现免疫性不孕症患者血清中显著升高的GAPDHS抗体水平可作为临床诊断不孕症的重要指标之一。

关键词:免疫性不孕症; GAPDHS; 原发性不孕症; 继发性不孕症; TAT 试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.15.040 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)15-2176-03

S-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDHS)是精子产生的特异性酶,附着在精子尾部鞭毛主段的筒状纤维鞘上,在精子的能量产生过程中扮演着开关调控的作用,与正常的GAPDHS相比,GAPDHS在结构上有一特殊N端结构域,该结构域能与精子鞭毛中纤维鞘结合促进精子运动,对精子的活力与生育能力至关重要;作为精子相关抗原,GAPDHS自身抗体能够引起正常精子发生凝集,导致小鼠低生育力与不孕^[1];从而认为GAPDHS自身抗体与免疫性不孕症的发生密切相关;但当前对于免疫性不孕症患者中抗GAPDHS自身抗体的水平还不是十分清楚;本研究拟通过酶联免疫法(ELISA)检测128例免疫性不孕症患者血清中GAPDHS自身抗体的水平并探讨其潜在临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2014年4月至2015年11月就诊于湖南省妇幼保健院生殖中心的128例免疫性不孕症患者,其中男24例,女104例,年龄(30.2±6.2)岁;另纳入110例健康对照者,平均年龄为(34.1±5.8)岁;所有患者均依据WHO相关指南进行浅盘精子凝集试验检测,且满足免疫性不孕症的诊断标准^[2]。临床及各项检查均排除其他因素导致的不孕:(1)妇科检查无异常;(2)B超检查盆腔无异常;(3)内分泌学无异常;(4)双侧输卵管通畅;(4)血清抗精子抗体为阳性。所有纳入研究的免疫性不孕症患者均无肝肾疾病、肿瘤、免疫相关疾病以及其他系统性疾病病史。此外,本研究纳入110例健康对照组,所有健康对照组个体无任何临床症状或实验室检查异常,

抗精子抗体均为阴性;本研究经医院伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 仪器与试剂 促凝管(BD公司,美国);1.5 mL EP管(Eppendorf公司,美国);高速离心机(Bechman公司,美国);酶标仪(科华公司,中国);移液器(1 000、200、20、2.5 μL;Eppendorf公司,美国);37℃恒温水浴箱(上海天呈科技公司,中国);GAPDHS纯化蛋白(上海瑶韵生物科技公司,中国);96孔板(Corning公司,美国);辣根过氧化物酶标记抗体(碧云天公司,中国)。

1.3 方法 所有免疫性不孕症患者与健康对照者于清晨空腹抽取外周静脉血5 mL至促凝管中,3 000 r/m离心10 min后,收集上层血清至EP管中,并于-80℃保存,待所有血清收集完毕后统一进行后续ELISA检测。将200 ng GAPDHS纯化蛋白稀释于100 μL碳酸氢盐缓冲液中,并加入96孔微量滴定板中,4℃孵育过夜;后使用苯二甲酸丁二醇酯(PBST)冲洗96孔板3次,随后每孔加入含1%牛血清白蛋白(BSA)的对PBST 100 μL,封闭1 h后加入PBST冲洗3次,即为抗GAPDHS ELISA试剂盒;免疫性不孕患者、健康对照者的待测血清以及抗GAPDHS抗体标准品与样本稀释液按1:1 000的比例进行稀释后,每孔加入100 μL稀释后样本液及标准品,37℃下孵育2 h,后加入清洗液洗涤3次,每次5 min,随后加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体(抗人IgG抗体),37℃下孵育2 h,同样冲洗3次,洗去多余未结合的检测抗体后加入底物溶液,反应5~10 min后,加入2 M硫酸终止液,随后于酶标

仪中检测每个孔 490 nm 的 OD 值;随后取 3 个复孔平均值得到每个样本 OD₄₉₀ 值,依据标准品的水平与 OD 值绘制出标准曲线后,根据每个待测样本的 OD₄₉₀ 值得到抗 GAPDH 的水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对于抗 GAPDH 抗体水平的正态性分布采用 K-S 正态检验;非配对性 *t* 检验用于评估两组间抗 GAPDH 抗体水平的差异,采用受试者工作特征曲线 (ROC 曲线) 分析免疫性不孕症患者血清中抗 GAPDH 抗体的临床诊断意义。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

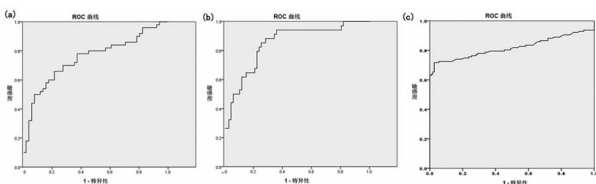
2 结 果

2.1 两组血清中抗 GAPDH 抗体水平比较 所有免疫性不孕症患者中,80 例为原发性不孕,48 例为继发性不孕,依据浅盘精子凝集试验的滴度结果将所有 128 例患者分为 TAT \leq 8 ($n=46$) 与 TAT $>$ 8 组 ($n=82$);与健康对照组相比,免疫性不孕症患者血清中抗 GAPDH 抗体水平 (86.4 ± 22.7) $\mu\text{g/mL}$ 显著高于健康对照组 (32.1 ± 4.86) $\mu\text{g/mL}$,且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 GAPDH 抗体水平水平与免疫性不孕患者临床特征的相关性 TAT \leq 8 组与 TAT $>$ 8 组 GAPDH 抗体水平均显著高于健康对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);TAT $>$ 8 组的抗 GAPDH 抗体水平同样显著高于 TAT \leq 8 组患者,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);男性不孕症血清中 GAPDH 自身抗体水平要显著高于女性不孕症患者,原发性不孕症血清中 GAPDH 抗体水平显著高于继发性不孕症患者,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 GAPDH 自身抗体水平与不孕症患者的临床特征相关性

分组	<i>n</i>	GAPDH 抗体水平 ($\mu\text{g/mL}$)	<i>t</i>	<i>P</i>
性别				
男	24	117.3 \pm 23.2	10.25	<0.001
女	104	79.3 \pm 14.4		
TAT 滴度				
TAT \leq 8	46	61.8 \pm 8.41	15.85	<0.001
TAT $>$ 8	82	100.3 \pm 15.2		
种类				
原发性不孕症	80	99.8 \pm 15.4	14.69	<0.001
继发性不孕症	48	62.3 \pm 11.2		



注:a 为所有免疫性不孕症患者;b 为男性不孕症患者;c 为原发性不孕症患者。

图 1 血清 GAPDH 自身抗体在免疫性不孕症患者的 ROC 曲线

2.3 血清 GAPDH 自身抗体在免疫性不孕症患者的 ROC 曲线分析 对 GAPDH 自身抗体在免疫性不孕患者诊断中的意义进行 ROC 分析;在所有不孕症患者中,GAPDH 自身抗体的 ROC 曲线下面积为 0.75 (95%CI:0.72~0.79),敏感

度为 0.66,特异度为 0.78;男性不孕症患者中,ROC 曲线下面积为 0.85,敏感度为 0.85,特异度为 0.75;在原发性不孕症患者中,ROC 曲线下面积为 0.82,敏感度为 0.78,特异度为 0.83,说明 GAPDH 自身抗体在男性不孕症以及原发性不孕症患者中具有较高的诊断效能。见图 1、表 2。

表 2 血清 GAPDH 自身抗体在免疫性不孕症患者的 ROC 曲线分析结果

组别	曲线下面积	敏感度 (%)	特异度 (%)	95%CI
免疫性不孕症 vs. 健康对照者	0.75	0.66	0.78	0.72~0.79
男性不孕症 vs. 健康对照者	0.85	0.85	0.75	0.81~0.87
原发性不孕症 vs. 健康对照者	0.82	0.78	0.83	0.78~0.85

3 讨 论

免疫性不孕症是女性不孕当中的常见类型之一,随着免疫性不孕症患者的发病率增加^[3-4];越来越多的研究开始集中于抗精子抗体的检验,该抗体被认为与免疫性不孕密切相关,在不孕夫妇中有高达 30% 的检出率^[5];抗精子抗体的靶抗原为精子细胞相关抗原,抗精子抗体可以通过影响精子运动、精子获能、顶体反应、穿透透明带或干扰受精等机制抑制受孕;当前,临床上常规使用浅盘精子凝集试验检测免疫性不孕患者体内是否存在抗精子抗体^[6]。本研究发现与免疫性不孕相关的新抗体即 GAPDH,结果显示该抗体在免疫性不孕症患者尤其是男性、TAT $>$ 8 及原发性不孕症患者中的水平显著升高,在免疫性不孕患者中具有重要的诊断意义。

GAPDH,又称为 S-甘油醛-3-磷酸脱氢酶,它是糖酵解反应(糖酵解反应是精子鞭毛运动所需能量 ATP 的主要来源)和糖异生反应中必不可少不少的酶,主要催化甘油醛-3-磷酸氧化磷酸化为甘油酸-1-3-二磷酸,这反应过程合成 ATP,供应精子的能量产生,与精子活力与生育能力密切相关;GAPDH 基因敲除的小鼠产生的精子为非运动型精子进而引起小鼠不孕^[7];研究显示免疫性不孕症患者血清中显著升高的 GAPDH 抗体水平为健康对照组的 2.7 倍;按照患者性别分组,发现男性患者血清中 GAPDH 抗体水平大约为健康对照组的 3.6 倍,女性患者约为健康对照组的 2.5 倍;同样在 TAT $>$ 8 与原发性不孕症患者中 GAPDH 抗体水平是健康对照组 3.1 倍;男性不孕症患者与原发性不孕症患者血清内高水平的 GAPDH 抗体进一步说明了免疫性不孕的常规发病机制,GAPDH 等特异性精子抗原一般表达于睾丸中,由于血流屏障,睾丸被认为是免疫豁免区,正常生理条件下,该类抗原将无法被机体免疫系统所识别,但是如果发生异常,如损伤或男性生殖系统发育障碍时,精子相关抗原如 GAPDH 将被释放入血,打破免疫耐受并刺激免疫系统产生自身抗体,降低精子活力,甚至导致睾丸生殖细胞损伤,最终引起不孕^[8]。

浅盘精子凝集试验是常规检测免疫性不孕的方法之一,但是该方法必须依赖于新鲜、完全活动的精子^[9];但本研究使用 ELISA 法检测 GAPDH 抗体水平,该方法具有操作简单、反应敏感、可重复、相对廉价等优点,通过对特异性精子相关抗原、抗体的检测可以让临床医生更加简单的评估患者的疾病严重程度,更加准确的进行临床诊断,同样用于判断临床治疗的效果等^[10]。当然,本研究只限定于一个小样本中,为了验证研究结果的准确性,将来的研究应当聚焦于大样本人群中,并且纳入分析不同类型的不孕症患者血清中 GAPDH 抗体的水平;此外,在临床应用中应当排除就诊患者是否患有免疫系统

性疾病如自身免疫性疾病,在一些自身免疫性疾病中,患者血清体内可能存在于较高水平的自身抗体,因而应当排除自身免疫性疾病对 GAPDHS 抗体水平的干扰^[11]。

总之,本研究发现了免疫性不孕症患者中显著升高的 GAPDHS 抗体,且这种抗体与男性、TAT 滴度、原发性不孕等密切相关;GAPDHS 抗体可能会用于将来临床诊断不孕症患者的一个重要指标之一。

参考文献

[1] Wang Y, Zhang N, Zhang X, et al. Experimental immunological infertility effect of anti-GAPDH-2 antibodies on the fertility of female mice[J]. Fertil Steril, 2009, 92(6): 2020-2027.

[2] 胡丽梅, 陆国健. 女性不孕症患者的激素指标特征与临床诊断价值分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(15): 2135-2136.

[3] 邹元曦, 吴克明. 免疫性不孕发病机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 2(2): 111-113.

[4] 黄茜, 邹彦. 女性不孕症病因及相关因素的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(3): 332-334.

[5] Vazquez-Levin MH, Marin-Briggiler CI, Veaute C. Antisperm antibodies: invaluable tools toward the identification of sperm proteins involved in fertilization[J]. Am J

Reprod Immunol, 2014, 72(2): 206-218.

[6] Bozhedomov VA, Lipatova NA, Rokhlikov IM, et al. Male fertility and varicocele: role of immune factors[J]. Andrology, 2014, 2(1): 51-58.

[7] Miki K, Qu W, Goulding EH, et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(47): 16501-16506.

[8] Fu J, Wang Y, Fok KL, et al. Anti-ACTL7a antibodies: a cause of infertility[J]. Fertil Steril, 2012, 97(5): 1226-1233.

[9] 纪玉兰, 王晓荣. 不孕夫妇抗精子抗体的浅盘凝集试验检测[J]. 实用医药杂志, 2008, 25(10): 1193-1194.

[10] Aggarwal A. Role of autoantibody testing[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2014, 28(6): 907-920.

[11] Selmi C, Ceribelli A, Generali E, et al. Serum antinuclear and extractable nuclear antigen antibody prevalence and associated morbidity and mortality in the general population over 15 years[J]. Autoimmun Rev, 2016, 15(2): 162-166.

(收稿日期:2016-03-26 修回日期:2016-06-07)

• 临床探讨 •

不同临床科室间 ESBLs 大肠埃希菌耐药情况分析

白 晓, 许 霞, 曾宪飞

(武警陕西省总队医院检验科, 西安 710054)

摘要:目的 对不同临床科室检出产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌的耐药情况进行分析,为临床科室对 ESBLs 大肠埃希菌的感染进行有效治疗及控制。**方法** 对本院 2014 年 6 月至 2015 年 6 月不同临床科室送检标本,用 DL-96 微生物自动鉴定仪对菌种进行鉴定及药敏分析,并对耐药情况进行统计分析。**结果** 分离出大肠埃希菌 432 株,其中产 ESBLs 大肠埃希菌 262 株,泌尿外科分离率最高占 21.4%,其次为重症监护室(ICU)占 21.0%,神经外科占 17.9%。分离的产 ESBLs 大肠埃希菌中,耐药率较高科室主要是呼吸内科、泌尿外科、ICU,耐药率高的药物主要以复方磺胺甲噁唑、四环素以及喹诺酮类药物为主。不同临床科室抗菌药物中阿莫西林/棒酸、氨苄西林/舒巴坦、环丙沙星、美洛霉素、诺氟沙星、庆大霉素、头孢他啶、左氧氟沙星的耐药率差异具有统计学意义($P < 0.05$);其他抗菌药物耐药率科室间差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 在针对产 ESBLs 大肠埃希菌的治疗中,耐药率较高的呼吸科更应依据药敏试验结果合理选用抗菌药物,各临床科室用药时,应首选用科室间耐药率无显著性差异且敏感性强的抗菌药物进行治疗,对于存在科室间耐药率差异的药物,需对照各科室药敏结果合理选用抗菌药物,以控制或减少院内感染的发生。

关键词:超广谱 β-内酰胺酶; 耐药率; 大肠埃希菌; 临床科室

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.15.041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)15-2178-03

近年来在临床各科室分离的产超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)细菌中以大肠埃希菌最为普遍^[1-2]。ESBLs 细菌,作为医院内常见重要致病菌临床分离率逐年上升,且该类细菌耐药性较强^[3],并同时多种抗菌药物交叉耐药。为更好的了解 ESBLs 大肠埃希菌在本院不同科室间的流行情况以及耐药性差异,控制其传播和流行,减少院内感染的发生,指导临床合理选用抗菌药物,本研究对 2014 年 6 月至 2015 年 6 月临床各科室分离的大肠埃希菌进行 ESBLs 检测,并对不同科室间的耐药情况进行分析。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 6 月至 2015 年 6 月本院不同临

床科室送检的患者标本中分离的大肠埃希菌,菌株皆取自患者首次分离菌株。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922,购至温州市康泰科技有限公司。

1.2 仪器及试剂 DL-96 微生物自动鉴定仪(珠海迪尔公司)及其配套试剂。

1.3 菌种鉴定及药敏试验 送检标本经分离培养获得单个菌落后,用 DL-96 微生物自动鉴定仪对菌落进行鉴定并得到其药敏最小抑菌浓度(MIC)值,按照 CLSI 标准判定结果。

1.4 ESBLs 检测 根据 CLSI 确认 ESBLs 试验要求,选用头孢噻肟单独稀释及头孢噻肟加克拉维酸(4 mg/L);头孢他啶单独稀释及头孢他啶加克拉维酸(4 mg/L),上述 2 种药物必