

糖化血红蛋白临床检测方法进展研究

李 黎 综述, 刘铁牛 审校

(1. 中国人民解放军第一五八医院检验科, 广西柳州 545006; 2. 中国人民解放军第三〇三医院检验科, 南宁 530021)

关键词: 糖尿病; 糖化血红蛋白; 检测方法; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.08.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)08-0954-03

近些年来,随着物质生活水平的逐步提高,糖尿病(DM)的发病率呈不断上升的趋势。有研究显示,中国的 DM 发病率已高达 9.7%^[1]。目前临床上对 DM 诊疗和监测多采用空腹、餐后血糖或是口服葡萄糖耐量试验等,但其只能反映瞬间血糖水平的检验指标,容易受到各种因素影响而失去检测意义。糖化血红蛋白(GHb)是国际上公认的可以反映长期血糖水平的金标准。2010 年,美国糖尿病协会(ADA)在《2010 年糖尿病诊疗指南》中正式推荐以 HbA1c 作为诊断 DM 的优先方法^[2]。在国内,也有不少学者提出类似主张,但对其测定方法意见不一^[3-5]。目前临床实验中检测 GHb 的方法有 30 余种,各有优劣,根据反应原理可以分为两个大类:一类基于 GHb 和非 GHb 所带电荷及等电点不同加以分离检测,如离子交换层析法、电泳法等;一类基于 GHb 分子结构特点,如亲和层析法、免疫法和酶法等^[6]。现就 GHb 的临床检测方法做一综述。

1 GHb 的生化特性

广义的 GHb 是指结合了任何形式碳水化合物血红蛋白(Hb)。典型的成人血红蛋白(Hb)是由 HbA(占 Hb 总量的 97%)、HbA2(2.5%)和 HbF(0.5%)组成^[7]。HbA 中未结合糖类的为 HbA0(90%)、结合糖类的即 GHb 为 HbA1(5%~7%)。HbA1 又可以分为 HbA1a1、HbA1a2、HbA1b 和 HbA1c。临床上所测定的糖化血红蛋白主要指 HbA1c。HbA1c 是 GHb 的一种亚型,约占总 GHb 的 60%~70%,其分子结构稳定,是 GHb 分子中最有特征性的成分。它的 β 链 N 末端有 1 个或 2 个缬氨酸可与组织中葡萄糖的游离醛基进行不可逆的非酶促反应,即糖基化。HbA1c 可以反映过去 6~8 周的血糖水平,它的浓度既不受每天血糖波动的影响,也不受运动和食物的影响,其血中含量的高低主要取决于血糖浓度及血糖与 Hb 接触的时间,因此它是监测长期血糖水平的理想指标^[8-9]。

2 检测方法

2.1 离子交换层析法 其检测原理是基于 GHb 和非 GHb 所带电荷不同进行分离。在偏酸性的阳离子交换树脂中, HbA 和 HbA1 均具有阳离子的特性,但由于 HbA1 的 2 个 β 链 N 末端正电荷被糖基清除,所带正电荷较 HbA 少,因此两者对树脂的附着力不同,用低浓度洗脱液可首先将 HbA1 洗脱下来,而后用高浓度洗脱液洗脱出 HbA,得到相应的 Hb 层析谱,可计算出 HbA1c 所占百分率。

常见的离子交换层析法主要包括高效液相色谱法(HPLC)、低效液相色谱法(LPLC)和手工微柱法。3 种方法中, HPLC 测定结果更精确、准确性及重复性最好,美国临床化学协会(AACC)GHb 标准化分会和国际临床化学联合会(IFCC)HbA1c 标准化工作组建议,以 HPLC 方法作为检测 GHb

的金标准^[10],国内已有厂商推出此类产品,但此方法最大的缺点是实验所用仪器及试剂、耗材昂贵,难以在基层医院推广普及; LPLC 原理与 HPLC 相同,研究证实,两法测定 HbA1c 相关性较好,其成本较 HPLC 低廉,操作简便,可随时插入急诊样本,适合于中小型实验室使用^[11]。手工微柱法操作步骤繁琐,易受以下因素影响:(1)层析时间和微柱质量不易控制,易出现洗脱不全或过度洗脱;(2)外界环境温度对结果影响大;(3)HbF 和变异血红蛋白(HbS、HbC、HbE)易引起结果偏差,因此现在已较少用于临床实验室中。

2.2 电泳法(以琼脂凝胶电泳为例) 其检测原理是利用酸性缓冲液(pH 6.0)中, GHb 和非 GHb 各组分等电点及泳动速度不同进行分离检测。电泳完成后,距离负极端最近的是含糖基最少的 HbA1a 和 HbA1b,处于中间部分的是 HbA1c,距离正极端最近的是 Hb 的主要成分 HbA0,通过光密度仪扫描计算,最终得出 HbA1c 的百分含量。该方法样本用量少,分辨率高,重复性较好,缺点是每次测定需成批进行样本分析,速度较慢,无法插入急诊样本,自动化程度差,目前尚无商品化、具有批量样本通过能力的仪器面世,因此该法现已少用于临床^[12]。

2.3 等电点聚焦法 原理同电泳法。在聚丙烯酰胺凝胶薄板中加入载体两性介质(如 ampholin),形成从阳极到阴极递增的 pH 梯度,当样本通过薄板时,全血中各组分移动到各自等电点的 pH 位置上,与电泳法相比,该法得到的色带更为精细和集中,通过高分辨率微量光密度仪扫描,可以精确地测出各组分的含量。因为血液中各类 Hb 一级结构及等电点不同,理论上该法可以完全避免交叉干扰,是一种理想的检测方法,但实验设备非常昂贵,无法用于常规检验。

2.4 亲和层析法 硼酸可与结合在 Hb 分子上葡萄糖的顺位二醇基反应,形成可逆的五环化合物,使样本中的 GHb 选择性地结合于微柱上,而未糖化的 Hb 则被洗脱,之后用山梨醇分离五环化合物,并洗脱 GHb,在 415 nm 波长分别测定洗脱液的吸光度,计算出 GHb 的百分含量。临床实验室中最常用的凝胶柱是交联间氨基苯硼酸的琼脂糖珠^[13]。

亲和层析法的优点是不受异常 Hb 的干扰,对经翻译后修饰的 Hb 和病理 Hb 相对不敏感,对全血样本储存时间的要求也不像离子交换层析法那样严格。但由于血液中的所有糖类均可与 Hb 结合,因此检测结果实际是 GHb 总量,而不是 HbA1c。不过大量实验证明,该法所测结果与 HPLC 等方法所测 HbA1c 百分含量、平均血糖值均呈高度相关,表明其在病情监测中仍是一种较理想的方法^[14]。

2.5 免疫法

2.5.1 离子捕获法 其原理是 GHb 与相应抗体结合后,联结荧光标记物,形成反应复合物,再联结带负电荷的多聚阴离子复合物,然后吸附到带正电荷的纤维表面,经过一系列清洗后

测定其荧光强度,从而得到 GHb 的浓度。该法灵敏度和特异性高,重复性好,自动化程度高,回收率可达 98.85%,交叉污染率低于 0.01%,适用于成批 GHb 样本的检测^[15-16]。

2.5.2 胶乳凝集法 是利用抗原抗体发生的凝集反应直接测定总 Hb 中 HbA1c 百分含量的方法。该法快速、准确、特异性强、重复性好,最大的优点是可以在全自动生化仪上测定,不用另外购置专门的仪器,较好地节约了实验室成本,适合于成批的样本检测,不足之处在于易受高浓度葡萄糖、胆红素、三酰甘油等物质干扰。

2.5.3 免疫比浊法 在样本中加入特制的抗 HbA1c 抗体缓冲液,使 HbA1c 与抗 HbA1c 抗体结合形成可溶性的抗原抗体复合物,再加入多聚半抗原缓冲液,与反应液中多余的抗 HbA1c 抗体反应,形成不溶性的抗原抗体复合物,用比浊法测定 HbA1c 含量,同时在另一通道中测定 Hb,计算求得 HbA1c 百分含量。免疫比浊法操作简便,检测周期短,成本低廉,准确性高,重复性较好,实验证实,该法回收率可达 97.9%,CV<2%^[17]。其缺点是:(1)抗交叉污染能力差,易受脂浊、黄疸样本影响;(2)该法线性范围小,一旦样本浓度超过标准品最高值,就需稀释样本重检;(3)受 HbF 及异常 Hb 影响大,结果不稳定^[18]。因此,国外有学者建议此法只能作为判断糖尿病患者血糖水平的指标,而不能用于变异 Hb 的研究^[19-20]。

2.5.4 化学发光法 采用离子捕捉免疫分析法,应用抗原抗体反应原理,联结荧光标记物,通过连接带负电的多阴离子复合物,吸附到带正电的纤维表面,经过一系列彻底清洗等步骤后,测定荧光强度变化,计算 HbA1c 浓度^[21]。该法检测系统易于规范和重复,可减少操作技术误差,检测的灵敏度和特异度高,批内、批间变异系数小,回收率和准确度高,交叉污染率小,影响因素少,但由于需采购专用试剂包和免疫发光分析仪,成本昂贵,因此仅适用于大批量样本检查。

2.5.5 放射免疫法 放射免疫法测定 GHb 不受各种干扰因素的影响,特异性强、精密度高、成本较低、可批量测试,但由于高效价抗体制备困难,目前未能有商品化试剂盒面世。

2.5.6 金标免疫渗滤法 该法操作简便,但特异度和精密度相对较差,适用于床旁检测,能为临床医师提供快速的化验数据参考^[22]。

2.6 酶法 第一反应中,全血经溶血处理后,在特异蛋白酶的作用下,切断源于 HbA1c 的 β 链 N 末端的糖化甘氨酸谷氨酰胺,另一边通过测定 600 nm 与 800 nm 处的吸光度差,求出 Hb 浓度;第二反应中,糖化甘氨酸谷氨酰胺在果糖基氨基酸氧化酶和过氧化氢酶的先后作用下,与相应的显色剂耦联显色,通过测定吸光度可求得 HbA1c 浓度。

此技术的应用对 GHb 的测定是个突破,表现在 3 个方面:(1)特异蛋白内切酶特异酶解血液中的 Hb 产生果糖基氨基酸,血浆中的其他蛋白,如清蛋白、球蛋白等对结果不能产生干扰;(2)果糖基氨基酸氧化酶,只在特定的蛋白酶体系与果糖基氨基酸反应;(3)在溶血液体系中应用了 H_2O_2 测定的敏感度,由于过氧化氢酶可以分解色素原引起负反应,所以用过氧化物酶代替,此法提供了一个像临床生化反应一样快速均一的反应系统,有很高的精密度,可同时检测 GHb 和 Hb,且与常规 HPLC 法和免疫测定法有很好的相关性,不需要昂贵、专用的仪器^[23]。有实验报道,该法批内 CV<1.50%,批间 CV<2.50%,平均回收率可达 101.37%^[24]。

3 结 语

近几年,随着新技术、新方法的不断应用,一些新的校准参

考方法的不断引入推动了 HbA1c 检测标准化的进程^[25-27],近期 IFCC 也推荐了一些新的参考物质。在这些方面,国内 GHb 研究与国外相比落后不少,这也使得 GHb 检测的推广普及受到极大限制。对于准备开展 GHb 检测的临床实验室,如果仅从方法的精密度、准确性与重复性上评价,HPLC 无疑是最理想的方法,但由于其成本昂贵,仅仅适合三甲以上的大型医院使用;其他各种方法均有其优缺点,但检测结果也可基本满足临床需求,适合于中小型医院开展。各临床实验室应根据自身实际情况,选择适用于本实验室的最优方案,在降低成本的同时,又可保证为临床提供准确、可靠的实验数据。

参考文献

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [2] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes 2010[J]. Diabetes Care, 2010, 33(Suppl 1): 11-61.
- [3] 邓兆享,彭杰雄,钟惠霞.糖化血红蛋白、空腹血糖和 50 g 糖筛查对妊娠期糖尿病诊治的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 153-155.
- [4] 赖基贤,江文庆,赖胜华,等.糖化血红蛋白在糖尿病诊断中的临床意义[J]. 临床医学, 2011, 31(2): 53-54.
- [5] 喻芳菊.三种糖尿病评估方法分析[J]. 实验与检验医学, 2008, 26(5): 575-576.
- [6] Goodall I, Colman PG, Schneider HG, et al. Desirable performance standards for HbA(1c) analysis-precision, accuracy and standardization: consensus statement of the Australasian Association of Clinical Biochemists (AACB), the Australian Diabetes Society (ADS), the Royal College of Australasia(RCPA), Endocrine Society of Australia(ESA) and the Australian Diabetes Educator Association(ADEA)[J]. Clin Chem Lab Med, 2007, 45(8): 1083-1097.
- [7] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社, 2006: 347.
- [8] American Diabetes Association. Implications of the United Kingdom prospective diabetes study[J]. Diabetes Care, 2000, 23(Suppl 1): 27-31.
- [9] King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates and projections[J]. Diabetes Care, 1998, 21(9): 1414-1431.
- [10] 杨利黎,孙静.两种糖化血红蛋白分析仪的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(9): 545-546.
- [11] 冯雪凤,贾支俊,黄群,等.离子交换 HPLC 和 LPLC 测定 HbA1c 的比较[J]. 医学临床研究, 2007, 24(12): 2105-2106.
- [12] 吴宇芳,关晓东.琼脂糖凝胶电泳法测定糖化血红蛋白及其临床应用[J]. 西部医学, 2003, 1(2): 101-102.
- [13] 黄颖,樊希承.糖化血红蛋白几种常见检测方法[J]. 临床与实验医学杂志, 2009, 8(2): 126-127.
- [14] 李顺君,黄文芳,饶绍琴,等.糖化血红蛋白测定方法学评价[J]. 检验医学与临床, 2007, 4(5): 381.
- [15] 胡进访,吴雁.糖化血红蛋白检测方法学的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(13): 2047-2050.
- [16] 张阳.糖化血红蛋白的检测方法及临床应用[J]. 现代医药卫生, 2007, 23(5): 2286-2287.
- [17] 胡应秀,张红梅.免疫透射比浊法测定 HbA1c 的可靠性研究[J]. 吉林医学, 2011, 32(24): 4969-4970.
- [18] 索艳,李强.糖化血红蛋白测定方法及影响因素的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2010, 23(2): 210-213.

[19] Roberts WL,Safar-Pour S,De BK,et al. Effects of hemoglobin C and S traits on glyhemoglobin measurements by eleven methods [J]. Clin Chem,2005,51(4):776-778.

[20] Bry L,Chen PC,Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glyhemoglobin[J]. Clin Chem,2001,47(2):153-163.

[21] 梁劲松,李生. 化学发光法检测糖化血红蛋白的实验评价[J]. 江西医学检验,2003,21(6):503.

[22] 贺岩,罗梅. 金标法测定糖化血红蛋白的方法学比较[J]. 中国医疗前沿,2007,2(13):101-102.

[23] 王冬环,张传宝,陈文祥,等. 应重视糖化血红蛋白测定技术及量值溯源[J]. 中华检验医学杂志,2008,3(9):965-968.

[24] 肖弘,王敏,李小盛. 酶化学法测定糖化血红蛋白性能的验证[J]. 检验医学与临床,2011,8(12):1450-1454.

[25] Panteghini M,John WG. Implementation of haemoglobin A1c results traceable to the IFCC reference system;the way forward[J]. Clin Chem Lab Med,2007,45(8):942-944.

[26] Hoelzel W,Weykamp C,Jeppsson JO,et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden;a method-comparison study[J]. Clin Chem,2004,50(1):166-174.

[27] Weykamp C,John WG,Mosca A,et al. The IFCC reference measurement system for HbA1c: a 6-years progress report [J]. Clin Chem,2008,54(2):240-248.

(收稿日期:2011-12-25)

嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制研究进展^{*}

吴春燕¹综述,赵擎宇²审校

(中山大学:1. 中山医学院;2. 肿瘤防治中心,广州 510060)

关键词:嗜麦芽窄食单胞菌; 耐药机制; 医院感染

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 08. 030 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)08-0956-03

嗜麦芽窄食单胞菌(Sm)广泛存在于自然界,存在于各类液体、塑料物质表面和患者的体表,也是医院中常见的条件致病菌,在侵入操作和患者免疫力下降后极易引起下呼吸道感染、心内膜炎、脑膜炎、皮肤组织感染、尿道感染等,随着抗生素的广泛应用,Sm 成为具有易感因素患者院内感染的重要致病菌之一^[1-2]。Sm 的耐药机制极为复杂,针对 Sm 感染的复杂性,检验工作者应予足够的重视。

1 Sm 的生物学性状

在自然界中 Sm 生长在土壤、水、植物和动物身上,1958 年首先从口腔肿瘤患者咽拭子中分离发现,被命名为嗜麦芽假单胞菌,1981 年曾被划归属于黄单胞属;但 1993 年有学者将其从黄单胞属划为另一新菌属,被命名为嗜麦芽窄食单胞菌^[2-3]。Sm 是专性需氧的革兰阴性杆菌,有芽孢,有丛鞭毛,血平板培养物有很强的氨味,呈 β 溶血;在琼脂平板上,菌落呈针尖状,无色或灰黄色,中央凸起。该菌能产生硝酸盐还原酶、赖氨酸脱羧酶和降解脂肪的酶类。Sm 营养谱有限,对葡萄糖只能缓慢利用,但能快速分解麦芽糖而产酸。以 16S rRNA 测序可以从自然界和临床分离获得的 Sm 分为 3 个种群,包括以 K279a 为代表的 A 群,以 N531 为代表的 B 群,以 675a 为代表的 C 群^[4]。临床分离株主要是具有高度同源性的 A 群和具有更多异质性的 B 群。

Sm 的毒性不强,有一些菌株甚至被应用于生物技术,如生物去污、生物降解以及生物防治^[5]。而该菌致病性与其产生的酶类和黏附能力有关^[1]。酶类(包括蛋白酶、脂肪酶、弹性蛋白酶等)能引起局部组织损伤以及出血;菌毛使菌体具有强大的黏附能力,能黏附在塑料物质表面以及上皮细胞,增加感染的概率;菌体的生物膜能抵抗吞噬作用和耐受抗生素。这些致病作用与可扩散的信号因子(DSF)有关。

2 嗜麦芽窄食单胞菌的耐药机制

2.1 膜屏障 Sm 具有天然的低渗透性外膜,对很多抗生素有天然耐药性。生物膜使 Sm 拥有动力特征,经过 2 h 的体外孵育,菌落能快速黏附聚苯乙烯。有研究指出,Sm 的膜孔蛋白直径与大肠杆菌的一样,但由于膜孔蛋白拷贝数少,其通透性只有大肠杆菌的 3%~5%;加上受到抗生素的刺激后,菌体还可以通过改变膜孔蛋白的结构或者减少打开的数量使通透性进一步降低,产生获得性耐药^[6]。

生物膜的调节机制具有多样性。氨基糖苷类抗生素温度依赖的耐药性与外膜上面脂多糖的 O 侧链改变或者脂多糖的磷酸含量降低有关;而外膜上的微孔蛋白常有丢失或基因突变造成的缺失与对碳青霉烯类的天然耐药有关^[6]。金属阳离子 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 等对细胞膜有稳定作用而增强其耐药性,而金属螯合剂 EDTA 或者枸橼酸盐等能破坏细菌外膜中的金属阳离子从而扭转耐药性。

2.2 抑制抗生素活性的各种酶类

2.2.1 β-内酰胺酶 Sm 对 β-内酰胺类药物的耐药机制主要是表达 β-内酰胺酶,Sm 至少产生 2 种 β-内酰胺酶,即 L1 和 L2 型金属 β-内酰胺酶(简称 L1 和 L2)。L1 是四聚体,相对分子质量是 118×10³,具有 2 个 Zn²⁺ 活性位点,能水解青霉素类、头孢菌素、β-内酰胺酶抑制剂和大多数碳青霉烯类;L2 是二聚体,相对分子质量是 57×10³,具有丝氨酸的活性位点,主要水解头孢菌素和单环类抗生素^[7]。β-内酰胺酶属于染色体酶,其中 L1 有 5 个基因型,L2 有 4 个基因型,另外有研究者发现了携带编码 L2 基因的质粒^[8]。β-内酰胺酶基础表达量低的菌群对 β-内酰胺类抗生素的敏感性是最高的,而 β-内酰胺类抗生素的选择压力能使 L1 和 L2 基因快速进化^[7-8]。

β-内酰胺酶调控因子 AmpR 的激活对于 L1、L2 的诱导和

^{*} 基金项目:中山大学医教科研基金资助项目(医教 2011-41 号)。