

· 临床检验研究论著 ·

血清 γ -谷氨酰基转肽酶 ELISA 检测方法的建立及其在原发性肝癌诊断中的临床应用研究

刘 峰, 左 媛, 许文雅

(内蒙古医学院第二附属医院检验科, 内蒙古呼和浩特 010030)

摘要:目的 建立可用于血清莨菪罗凝集素(DSA)- γ -谷氨酰基转肽酶(GGT)检测的酶联免疫吸附法(ELISA),并探讨其原发性肝癌(PHC)诊断中应用价值。方法 制备抗 DSA-GGT 单克隆抗体(McAb),经蛋白 G 亲和层析柱色谱纯化后进行生物素标记,构建血清 DSA-GGT 生物素-链霉亲和素 ELISA 检测方法。用建立的方法对健康者、PHC 患者和非 PHC 患者进行 DSA-GGT 检测,并进行方法学评价;采用受试者工作曲线(ROC 曲线)确定 DSA-GGT 诊断 PHC 的临界值。结果 所构建 ELISA 检测方法的最低检测限为 $2 \mu\text{g/L}$,平均批内、批间变异分别为 8.9% 和 11.5%。健康者血清 DSA-GGT 水平呈正态分布,参考范围为 $(1.50 \pm 0.51) \mu\text{g/L}$;经 ROC 曲线分析,确定其诊断 PHC 的临界值为 $3.25 \mu\text{g/L}$;其诊断 PHC 灵敏度为 66.7%(28/40)、特异度为 91.8%(112/122)。结论 所建立的血清 DSA-GGT 生物素-链霉亲和素 ELISA 检测方法具有良好方法学性能,其诊断 PHC 的灵敏度、特异度良好,为 PHC 实验室诊断提供了新的方法。

关键词: 肝肿瘤; γ -谷氨酰转移酶; 抗体,单克隆; 酶联免疫吸附测定; 抗生物素蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)22-2714-03

Establishment and clinical application of ELISA method for the detection of serum γ -glutamyltransferase

Liu Feng, Zuo Yuan, Xu Wenya

(Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical Laboratory, Hohhot, Neimenggu 010030, China)

Abstract: Objective To establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of datura stramonium (DSA)- γ -glutamyltransferase (GGT) and investigate its clinical significance for the diagnosis of primary hepatic carcinoma (PHC). **Methods** Anti-DNA-GGT monoclonal antibodies (McAb) was prepared and labeled with biotin, after being purified by protein G-sepharose affinity chromatography. And avidin-biotin ELISA for measurement of serum DSA-GGT was established and evaluated by detecting serum DSA-GGT in healthy subjects, patients with or without PHC. Cut-off value of DSA-GGT for the diagnosis of PHC was determined by receiver operating characteristic curve (ROC curve). **Results** The minimum detection limit of serum DSA-GGT by avidin-biotin ELISA was $2 \mu\text{g/L}$. Intra- and inter-assay coefficients of variation were 8.9% and 11.5% respectively. The distribution of DSA-GGT values showed Gaussian distribution and the reference range was $(1.50 \pm 0.51) \mu\text{g/L}$. Optimal cut-off value was $3.25 \mu\text{g/L}$ for the diagnosis of PHC, determined by ROC curve, with diagnostic sensitivity and specificity of 66.7% (28/40) and 91.8% (112/122), respectively. **Conclusion** The convenient avidin-biotin ELISA method was successfully established, with fine reproducibility and reliability. It might be a potential tool for the diagnosis of PHC to achieve higher sensitivity and specificity.

Key words: liver neoplasms; gamma-glutamyltransferase; antibodies; monoclonal; enzyme-linked immunosorbent assay; avidin

原发性肝癌(PHC)是常见恶性肿瘤之一,患者死亡率较高,早期诊断和早期治疗有利于提高患者生存率。目前 PHC 实验室诊断方法敏感度和特异度均较低。表面增强激光解吸电离飞行时间质谱技术提高了 PHC 诊断灵敏度和特异度,但对设备和专业人员的要求很高^[1]。于嘉屏等^[2]以免疫沉淀法测定血清中与低密度脂蛋白(LDL)结合的 γ -谷氨酰基转肽酶(GGT)活性,其 PHC 诊断灵敏度达 86.2%,但特异度仍较低。PHC 患者因肝癌细胞返祖现象而产生与生理性 GGT 糖链结构存在差异的“胚胎性”GGT,导致外周血 GGT 水平显著升高^[2-8]。本研究改进了参考文献^[9]的方法,先从肝癌组织中分离纯化 GGT^[10],再用莨菪罗凝集素(DSA)-Sephrose 4B 进行亲和色谱分离纯化,获得强结合的 DSA-GGT,并制备其单克隆抗体(McAb)^[11],经生物素标记后,建立了血清 DSA-GGT 生物素-链霉亲和素酶联免疫吸附法(ELISA)检测系统,并进行了临床应用研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 8 月于本院体检健康者 120 例纳入对照组,男 68 例,女 52 例;年龄 25~59 岁,中位年龄 42 岁。

2006 年 1 月至 2009 年 8 月于本院确诊的肝病及其他肿瘤患者 161 例,进行 ELISA 方法的建立研究,其中 PHC 39 例,男 24 例、女 15 例,年龄 33~67 岁;急性肝炎 31 例,男 19 例、女 12 例,年龄 29~64 岁;慢性肝炎 41 例,男 25 例、女 16 例,年龄 31~65 岁;肝炎后肝硬化 29 例,男 18 例、女 11 例,年龄 36~67 岁;其他肿瘤 21 例(胰腺癌 6 例、肺癌 5 例、肠癌肝转移 4 例、胃癌 3 例、食道癌 3 例),男 13 例、女 8 例,年龄 41~68 岁。继续收集病例至 2010 年 8 月,共有 261 例患者进行 DSA-GGT 与甲胎蛋白(AFP)联合检测;其中 PHC 58 例,男 36 例、女 22 例,年龄 33~68 岁;急性肝炎 47 例,男 28 例、女 19 例,年龄 23~64 岁;慢性肝炎 69 例,男 50 例、女 19 例,年龄 23~65 岁;肝炎后肝硬化 51 例,男 36 例、女 15 例,年龄 31~67 岁;其他肿瘤 36 例(胰腺癌 9 例、肺癌 8 例、肠癌肝转移 7 例、胃癌 8 例、食道癌 4 例),男 21 例、女 15 例,年龄 41~69 岁。疾病诊断符合《病毒性肝炎防治方案》和《原发性肝癌的临床诊断与分期标准》提出的相关标准^[12-13]。10 只 6~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自北京军事医学科学院试验动物中心。

1.2 仪器与试剂 小鼠 IgG 亚类鉴定试剂盒(美国 Southern

Biotech), AFP ELISA 测定试剂(郑州博赛), 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(瑞士 Roche), 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色剂(美国 Biotech), 辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗小鼠 IgG、链霉亲和素-HRP(SA-HRP)(美国 Biosource), 生物素(美国 Sigma), 胎牛血清(美国 HyClone), 四甲基联苯胺(TMB, 美国 Amresco, 化学纯), 二甲亚砜(DMSO, 南京化学试剂厂, 分析纯), 蛋白 G 亲和层析柱、葡聚糖凝胶 G-25(分析纯)(美国 Pharmacia)。平衡缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.0)、洗脱缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸, pH2.5)、中和缓冲液(2 mol/L Tris-HCl, pH8.0)、透析缓冲液(0.1 mol/L PBS, pH7.4)、偶联缓冲液(0.1 mol/L NaHCO₃, pH8.4)、保存缓冲液(10 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、0.09% NaNO₃, pH8.2)、标本稀释液[含 2% 牛血清清蛋白(BSA)及 0.5% Tween-20 的 PBS]、洗涤液(0.1 mol/L PBS, 含 0.5% Tween-20)、终止液(2 mol/L H₂SO₄)均为自行配制。酶标板(丹麦 Nunc 产品)、透析袋(截至相对分子质量 12 000~14 000, MD-25, 美国 Sigma)。Model 550 酶标仪、色谱柱(1.5×12.5 cm, 1.0×30 cm)(美国 Bio-Rad)、紫外-可见分光光度计(上海菁华)、RC-5 B 低温高速离心机(美国 Thermo)、可调恒温旋转杂交炉(匈牙利 Shel Lab)、BD40 型记录仪(美国 Kipp&Zonen)、8823B 型紫外检测器(北京宾达英创)、P-1 型蠕动泵(美国 Pharmacia)、IN-Vivo EX 呈像系统(美国 Kodak)、浓缩器(美国 Millipore 公司, 截至相对分子质量 30 000)、37 °C 恒温孵箱(美国 Fisher Scientific 公司)、Opsys MR 酶标仪、洗板机(美国 Dynex Technologies 公司)。

1.3 方法

1.3.1 McAb 制备与鉴定 从 PHC 患者组织标本中提取抗原^[10], 由北京晶美基因谷科技有限公司制备 McAb, 共获得 5 株可特异性识别 DSA-GGT 的 McAb 细胞株, 所分泌 McAb 编号为 NJ1~5, 均为 IgG 1 型^[11]。ELISA 测定 McAb 亲和指数, 免疫印迹法和 ELISA 检测 McAb 特异性^[11-12]。

1.3.2 McAb 纯化 常规方法免疫小鼠并获得腹腔积液, 玻璃棉过滤腹腔积液, 10 400×g 4 °C 离心 20 min, 收集上清液, 0.45 μm 滤器过滤, 加等体积平衡缓冲液稀释; 蛋白 G 亲和层析柱装柱, 室温平衡, 用 5 倍柱床体积平衡缓冲液平衡色谱柱; 预处理腹腔积液上样, 静置 10 min, 用平衡缓冲液洗柱去除杂蛋白至基线(蠕动泵流速: 5 mL/min); 换洗脱缓冲液, 用含中和缓冲液(V 中和缓冲液: V 洗脱液=1:9)的收集管收集洗脱峰; 纯化抗体用 100 倍抗体体积的透析缓冲液透析, 其间更换 3 次缓冲液, 最后 1 次透析过夜; 透析抗体用 Millipore 浓缩器超滤浓缩, 至蛋白浓度大于 1 μg/L, 浓缩抗体 10 400×g 4 °C 离心 10 min, 收集上清液, 用 0.22 μm 滤器过滤除菌, 加入叠氮钠至终浓度 0.09%; 紫外-可见分光光度计测定抗体蛋白浓度[浓度(g/L)=(A280/1.4)×稀释倍数], 4 °C 以下低温保存抗体。

1.3.3 生物素化 McAb 制备 将纯的抗体装入透析袋, 置偶联缓冲液中透析过夜, 测定蛋白浓度, 并用偶联缓冲液调整抗体浓度至 2 μg/L; 称取 1 mg 生物素, 加入 DMSO 至生物素终浓度 10 g/L, 按每毫克抗体加入 8 μL 生物素的比例混匀, 室温旋转反应 4 h; 葡聚糖凝胶 G-25 装柱, 并用保存缓冲液预平衡色谱柱, 将标记抗体上样, 用保存缓冲液洗脱色谱柱(蠕动泵流速: 5 mL/min), 收集第 1 个含生物素化抗体蛋白峰; 紫外-可见分光光度计测定标记物浓度, 4 °C 保存。

1.3.4 ELISA 检测方法的建立 采用棋盘法选择包被抗体和检测抗体的配对和浓度, 经筛选配对, 确定 NJ4 和 NJ1

McAb 分别用于包被抗体和生物素化抗体有良好的反应性。将 NJ4 抗体用包被液稀释至 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μg/L, 按每孔 100 μL 加入微孔板, 4 °C 包被过夜, 用洗涤缓冲液洗板 3 次, 1% BSA 封闭后洗板 3 次; 加入 100 μL 不同浓度 DSA-GGT(0、0.78、6.25、50.0 μg/L), 37 °C 水浴 1 h, 洗板 3 次; 加入 100 μL 不同浓度生物素化 NJ1, 37 °C 孵育 1 h, 洗板 3 次; 加入 100 μL 1:200 稀释的 SA-HRP, 37 °C 水浴 30 min, 洗板 3 次; 加 TMB 50 μL, 37 °C 显色 10 min, 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪检测各孔 A450。

1.3.5 DSA-GGT、AFP 联合检测 对确诊的 261 例患者(PHC 58 例、非 PHC 203 例)同时进行 DSA-GGT、AFP 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计学软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以百分率表示; 健康对照组及各疾病组间 DSA-GGT 比较采用 F 检验; GGT 活性以中位数(最小值~最大值)表示, 采用多样本中位数非参数检验; 包被抗体及生物素化抗体工作浓度相关性分析采用 Pearson 相关分析。P-P 概率图检验健康者 DSA-GGT 分布状态。DSA-GGT 诊断 PHC 临界值依据受试者工作特征曲线(ROC 曲线)确定。计算 DSA-GGT 浓度值与相应的 A 值标准曲线的回归方程, 用于计算标本 DSA-GGT 浓度。显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 McAb 鉴定 ELISA 测定 McAb NJ1~5 亲和指数, 均符合试验要求^[14], 其中 NJ1、NJ4 亲和指数较高。免疫印迹法检测 McAb 特异性, 结果显示 McAb 在相对分子质量 57 000 及 23 000 处有阳性条带, 与 GGT 2 个亚单位大小相符, 证实所制备 McAb 为抗 GGT 特异性抗体。ELISA 检测显示, NJ1~5 均与 DSA-GGT 有较强反应性, 但与正常鼠血清可产生弱阳性反应(A₄₅₀: 0.185~0.261), 与健康人血清、人血清清蛋白、木瓜凝乳蛋白酶无反应性。

2.2 McAb 纯化 间接 ELISA 测定免疫小鼠腹腔积液 McAb 效价最小为 1:62 500^[11]。5 株 McAb 纯化结果见表 1。

表 1 5 株 McAb 纯化结果

抗体编号	蛋白浓度(μg/L)	体积(mL)	蛋白总量(mg)
NJ1	2.78	1.8	5.00
NJ2	1.94	2.0	3.88
NJ3	2.35	0.9	2.12
NJ4	2.48	2.7	6.70
NJ5	2.19	1.9	4.16

2.3 McAb 生物素标记 NJ1~5 McAb 纯化后生物素标记结果见表 2, 标记率为 48.6%~72.2%, 其中 NJ1、NJ4 标记率较高(72.2%、61.6%)。见表 2。

表 2 NJ1~NJ5 McAb 纯化后生物素标记结果

抗体编号	蛋白浓度(μg/L)	体积(mL)	蛋白总量(mg)	标记率(%)
NJ1	1.39	2.6	3.61	72.2
NJ2	1.28	1.5	1.92	49.5
NJ3	0.41	2.5	1.03	48.6
NJ4	1.18	3.5	4.13	61.6
NJ5	1.29	1.6	2.06	49.5

2.4 包被抗体及生物素化抗体工作浓度的选择 经棋盘法选择 NJ1、NJ4 抗体对,与不同浓度 DSA-GGT 抗原标准品反应后 A 值梯度关系较好,但空白 A 值偏高(0.162)。经优化包被抗体和生物素化抗体浓度,重复检测后最终确认包被抗体为 1 : 100,生物素化抗体为 1 : 300,SA- HRP 为 1 : 200,标准品各孔的 A 值和浓度间线性关系良好,且空白 A 值较低(0.061)。3.90、7.80、15.60、31.30、62.50、125.00 $\mu\text{g/L}$ 纯化 DSA-GGT 抗原对相应 A 值分别为 0.05、0.10、0.19、0.36、0.65、1.13,标准曲线方程为 $\text{YDSA-GGT} = 110.0\text{XA} - 3.82$,相关系数 $r^2 = 0.996 (P < 0.05)$ 。按中国药品生物制品检定所颁布的方法计算,DSA-GGT 检测灵敏度为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2.5 DSA-GGT 参考范围确定及临床患者检测 119 份健康者血清 DSA-GGT 水平经 P-P 概率图检验呈 t1 正态分布, $\bar{x} \pm s$ 为 (1.50 \pm 0.51) $\mu\text{g/L}$ 。将 PHC 患者与非 PHC 患者检测结果进行 ROC 曲线分析,曲线下的面积(AUC)为 0.863(95%置信区间:0.790~0.936, $P < 0.05$),表明具有良好诊断准确性。按文献[15]的方法确定 ROC 曲线上最佳工作点(OOP)为 3.25 $\mu\text{g/L}$ 。用建立的方法对 161 例确诊患者进行血清 DSA-GGT 检测,39 例 PHC 患者 26 例阳性,其诊断 PHL 灵敏度为 66.67%,112 例非 PHC 患者 10 例阳性,特异度为 91.8%,结果见表 3。用 2 份阳性样品(5.2、8.1 $\mu\text{g/L}$)进行精密度试验($n = 20$),批内变异为 8.7%和 9.1%,批间变异为 11.2%和 11.8%,平均为 8.9%和 11.5%。见表 3。

表 3 临床血清标本 DSA-GGT 检测结果

组别	n	DSA-GGT($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)	阳性(n)	阳性率(%)
健康对照组	119	1.50 \pm 0.51	1	0.1
急性肝炎组	31	1.68 \pm 0.57	1	3.2
慢性肝炎组	41	1.73 \pm 0.80	3	7.3
肝炎后肝硬化组	29	1.79 \pm 0.99	3	10.3
其他肿瘤组	21	2.38 \pm 1.51	3	14.3
PHC 组	39	11.90 \pm 12.80*	26	66.7#

*:与其他各组比较, $F = 29.5, P < 0.05$; #:与其他各组比较, χ^2 值分别为 89.8、29.3、30.5、21.6 和 15.0, $P < 0.05$ 。

2.6 GGT 活性测定 对 161 例患者同时进行 DSA-GGT 和 GGT 检测,不同疾病组 GGT 活性异常率为 35.5%~79.5%,诊断 PHC 敏感度为 79.5%,特异度仅为 49.2%,AUC 为 0.793(95%置信区间:0.711~0.874, $P < 0.05$),表明具有一定诊断价值,见表 4。DSA-GGT 与 GGT 活性相关系数为 0.604($P < 0.05$)。

表 4 患者血清标本 GGT 活性测定结果

组别	n	GGT[U/L,中位数 (最小值~最大值)]*	异常(n)	异常率 (%)
急性肝炎组	31	37(18~318)	11	35.5
慢性肝炎组	41	59(20~314)	22	53.7
肝炎后肝硬化组	29	75(21~356)	18	62.1
其他肿瘤组	21	57(13~401)	11	52.4
PHC 组	39	195(32~918)	31	79.5#

*:GGT > 50 U/L 为异常,各组间中位数比较, $P < 0.05$; #:与其他各组比较, χ^2 值分别为:13.9、5.96、2.51 和 4.78,除与肝硬化组比较 $P > 0.05$,与肝炎后其余各组比较 $P < 0.05$ 。

2.7 DSA-GGT 与 AFP 联合检测诊断 PHC 58 例 PHC 患者 DSA-GGT、AFP 阳性例数分别为 38、40 例,诊断灵敏度分别为 65.5%、69.0% ($\chi^2 = 0.157, P > 0.05$),诊断特异度分别为 91.1%和 90.6% ($\chi^2 = 0.030, P > 0.05$)。在 18 例 AFP 阴性 PHC 患者中,14 例为 DSA-GGT 阳性,显示联合检测有良好互补性,可使 PHC 诊断灵敏度提高至 93.1%。DSA-GGT 与 AFP 无相关性($r = 0.046, P > 0.05$)。见表 5。

表 5 患者血清标本 DSA-GGT、AFP 检测阳性结果[n(%)]

组别	n	DSA-GGT	AFP	DSA-GGT+AFP
急性肝炎组	47	2(4.3)	2(4.3)	3(6.4)
慢性肝炎组	69	5(7.3)	6(8.7)	9(13.0)
肝炎后肝硬化组	51	5(9.8)	6(11.8)	9(17.7)
其他肿瘤组	36	6(16.7)	5(13.9)	8(22.2)
PHC 组	58	38(65.5)*	40(69.0)*	54(93.1)*

*:与其他各组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肝细胞恶性变可导致蛋白质(如 GGT、AFP 等)出现异常的糖链结构[2],典型表现为出现与 DSA 强结合的 2,2,6-或 2,4,2,6-N 糖链[5-6]。PHC 患者肝癌组织细胞合成的糖链结构异常、与 DSA 强结合的 GGT,被认为具有 PHC 特异性[7-8,17-18]。因此,笔者设计了 DSA 凝集素亲和色谱,从 PHC 组织中成功分离获得 DSA-GGT 并制备相应 McAb^[10-11],从而建立了可用于血清 DSA-GGT 定量检测的生物素-链霉亲和素 ELISA。

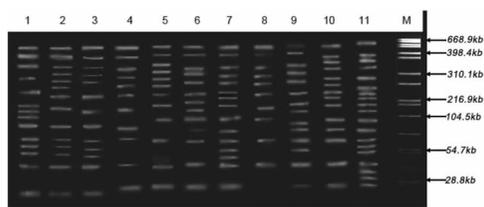
本研究建立了 5 株可稳定分泌抗人 DSA-GGT McAb 的杂交瘤细胞,并证明 McAb 的亲合力、特异性均良好。McAb 纯化采用了蛋白 G 亲和层析柱色谱法,由于洗脱与蛋白 G 结合的抗体需低 pH 缓冲液,但在酸性条件下抗体不稳定,故采用预加缓冲能力强的碱性缓冲液(2 mol/L Tris-HCl)收集洗脱液,使目的抗体洗脱后很快进入中性环境,从而避免抗体失活。采用棋盘法确定包被抗体和生物素化抗体浓度时,应中挑选 A 值接近 1^[19],而阴性 A 值最低的最高稀释倍数为最适稀释倍数,故最终确定包被单抗、生物素化抗体的最适工作浓度分别为 1 : 100、1 : 300。以上述条件确定的配对抗体所建立的生物素-链霉亲和素 ELISA,空白 A 值较低,DSA-GGT 最低检测限达 2 $\mu\text{g/L}$,批内、批间平均变异分别为 8.9%和 11.5%,符合 ELISA 试验批内、批间变异分别不超过 10%和 15%的要求^[16]。

临床标本检测结果表明,本研究建立的方法具有良好的 PHC 诊断灵敏度和特异度,分别达 66.67%和 91.8%。虽然传统 GGT 活性测定对 PHC 的诊断灵敏度为 79.5%,但由于 GGT 在肝胆疾病时有较高异常率,故诊断特异度较差(仅为 49.2%)。DSA-GGT、AFP 检测结果相关性分析显示二者无相关性。DSA-GGT、AFP 对 PHC 的诊断灵敏度、特异度无统计学差异(χ^2 值分别为 0.157 和 0.030, $P > 0.05$),表明 DSA-GGT、AFP 均为诊断 PHC 的较敏感指标,但二者联合检测可将 PHC 诊断灵敏度提高至 93.1%。

参考文献

[1] 郑燕华,邹德威,冯凯,等.蛋白芯片技术筛选肝癌由清标志蛋白的初步研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(7):628-629.
[2] 于嘉屏,王爱华,顾鹏飞,等.免疫沉淀法测定(下转第 2718 页)

2.2 PFGE 分型结果 4、5、6、8 号菌株为全敏感株,电泳条带有 10~13 条;11 号菌株为全耐药株,条带有 19 条;其余 6 个菌株,即 1、2、3、7、9、10 号菌株介于全敏感和全耐药之间,条带数介于前二者之间,见图 1。



M:DNA 分子标记物;1~11:菌株。

图 1 11 株鲍曼不动杆菌 PFGE 分型结果

3 讨 论

鲍曼不动杆菌可通过多种机制对抗菌药物产生耐药性,尤其是对碳青霉烯类的耐药,已成为院内感染尤其是重症监护病房内感染的主要病原^[5-6]。尽管抗菌药物分型可以提示临床上出现的耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌,但无法通过比较抗菌谱之间的细小差异来区分它们。因此,基因分型在鲍曼不动杆菌研究中有重要地位^[7]。常见的基因分型有质粒分型、核糖分型、PFGE、PCR 指纹图谱等。PFGE 被证明与 PCR 指纹图谱在院内感染暴发流行的鉴定上同样有效,并且优于其他基因分型方法^[8]。本研究中,11 株鲍曼不动杆菌中有 4 株为全敏感菌株,1 株为全耐药菌株,6 株的药敏实验结果介于前二者之间,PFGE 分型结果显示这 3 种不同耐药类型的菌株的条带数分别为 10~13 条、19 条带和介于二者之间。可见,菌株的药敏实验结果和 PFGE 分型的条带数具有相关性。

不动杆菌属条件致病菌,是惟一能在人类皮肤表面生存的革兰阴性杆菌,可广泛存在自然环境及医院环境中。医务人员手部、患者使用的枕头、床垫、桌子,病床围栏或围帘、门把手、呼吸机管道及湿化瓶都发现有不动杆菌的存在。环境的污染在不动杆菌暴发流行中有重要意义。随着广谱抗菌药物的广

泛使用,鲍曼不动杆菌的检出率及耐药率呈现上升的趋势^[9]。研究表明,合理的使用抗菌药物可以有效地降低鲍曼不动杆菌的传播流行^[10]。而分子生物学分型与药敏试验结果之间相关性的研究为该菌的分子流行病学调查提供了一定的依据^[7]。

参考文献

[1] Wang H, Guo P, Sun H, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Chinese hospitals[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(11): 4022-4028.

[2] Mak JK, Kim MJ, Pham J, et al. White PA. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63(1): 47-54.

[3] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections; a review for healthcare epidemiologists[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 1997, 18(6): 426-439.

[4] Seifert H, Schulze A, Baginski R, et al. Comparison of four different methods for epidemiologic typing of *Acinetobacter baumannii* [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32(7): 1816-1819.

[5] 孙丽. 鲍曼不动杆菌感染分布及对常用 β-内酰胺类抗菌药物的耐药性分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(4): 451-452.

[6] 张晓梅, 王苏建, 宋静玉, 等. 多药耐药鲍曼不动杆菌抗菌剂外排泵基因研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2011, 32(16): 1811-1813.

[7] 朱冰泉, 沈萍, 俞云松, 等. 对亚胺培南耐药的鲍曼不动杆菌同源性及碳青霉烯酶基因型研究[J]. *浙江医学*, 2008, 30(5): 459-462.

[8] 金辉, 徐小敏, 糜祖煌, 等. 鲍曼不动杆菌的耐药基因分型与脉冲场凝胶电泳分型的比较[J]. *劳动医学*, 2010, 27(4): 219-221.

[9] 汪志方, 张益辉, 王泽球. 鲍曼不动杆菌感染的危险因素及耐药性分析[J]. *临床肺科杂志*, 2012, 17(1): 14-16.

[10] 瞿洪平, 杨莉, 王枫, 等. 泛耐药鲍曼不动杆菌 ICU 交叉感染的防控策略[J]. *中国急救医学*, 2007, 27(12): 1057-1059.

(收稿日期:2012-06-02)

(上接第 2716 页)

血清中与两种脂蛋白结合的 γ-谷氨酰基转移酶活性及其诊断肝癌的价值[J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(3): 371-373.

[3] 姚登福, 孟宪镛, 徐克成, 等. 肝癌特异性 GGT 发生本质及部分性质的研究[J]. *交通医学*, 1994, 8(3): 15-17.

[4] Yao DF, Dong ZZ, Yao M. Specific molecular markers in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(3): 241-247.

[5] Tsuchida S, Yamazaki T, Cambal EM, et al. Comparison of the peptide and saccharide moieties of gamma-glutamyltransferase isolated from neoplastic and non-neoplastic human liver tissue[J]. *Clin Chim*, 1985, 152(1/2): 17-26.

[6] Yamashita K, Hitoi A, Taniguchi N, et al. Comparative study of the sugar chains of gamma-glutamyltranspeptidases purified from rat liver and rat AH-66 hepatoma cells[J]. *Cancer Res*, 1983, 43(21): 5059-5065.

[7] 龙宪连, 于嘉屏, 王爱华. 肝癌 γ-谷氨酰转肽酶糖链的凝集素亲和分析[J]. *临床检验杂志*, 2002, 20(4): 337-339.

[8] Wen J, Wang N, Chen ZQ, et al. A simple and specific method for detection of hepatoma specific GGT by affinity chromatography [J]. *Lab Med*, 2007, 38(1): 160-164.

[9] Shaw LM, London JM, Petersen LE. Isolation of gamma-glutamyltransferase from human liver, and comparison with the enzyme from human kidney[J]. *Clin Chem*, 1978, 24(6): 905-915.

[10] 王念跃, 赵伟, 李勇, 等. 用欧曼陀罗凝集素分离纯化人肝癌组织

中强结合的 γ-谷氨酰转氨酶[J]. *临床检验杂志*, 2006, 24(3): 332-334.

[11] 王念跃, 赵伟, 刘晨, 等. 人肝癌组织中 DSA 强结合的 γ-谷氨酰转氨酶 McAb 的制备[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(3): 336-338.

[12] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案[J]. *中华传染病杂志*, 2011, 19(1): 56-62.

[13] 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准[J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9(2): 324-325.

[14] Macdonald RA, Hocking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution[J]. *J Immunol Methods*, 1988, 106(2): 191-194.

[15] 陈卫中, 潘晓平, 宋兴勃, 等. ROC 曲线中最加工作点的选择[J]. *中国卫生统计*, 2006, 23(2): 157-158.

[16] 徐立根. ELISA、MAIA、CLIA 和 TRFIA 试剂盒质量标准探讨[J]. *放射免疫杂志*, 2006, 19(2): 230-233.

[17] 王念跃, 王惠民, 李鹤林, 等. 凝集素亲和层析分析血清 GGT 寡糖链结构[J]. *陕西医学检验杂志*, 2001, 16(3): 1-4.

[18] 司维柯, 李士敏, 罗朝学, 等. 伴刀豆蛋白 A 识别正常与肝癌 γ-谷氨酰转氨酶的实验观察[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(3): 294-296.

[19] 祁小乐, 崔保安. 猪伪狂犬病毒双抗双夹心 ELISA 法的构建[J]. *河南农业大学学报*, 2004, 38(3): 387-393.

(收稿日期:2012-05-25)