的临床诊断缺乏特异性实验室指标，所以国际上通用的美国风湿病学诊断标准中主要以临床症状和 X 线诊断为主，从而导致 RA 漏诊和误诊[1-3]。自从 2000 年抗 CCP 抗体被发现以来，国内、外学者对其检测方法和临床应用进行了多方面的评估，证实其对 RA 的早期诊断具有很好的敏感性和特异性[4-8]。

随着抗 CCP 抗体临床应用价值的日渐清晰，对其检测手段的准确性和高效性提出了新的要求。ECLIA 是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应技术，包括了电化学和化学发光 2 个部分，目前都是采用发光技术与免疫反应和计算机技术相结合的自动化仪器分析，由于其操作的智能化程度高、敏感度高、特异性强，特别是检测灵活性高、快速、检测试剂稳定并易于进行质量控制，已在很多免疫检测项目中逐步取代了 ELISA 法[9]。

本研究以较早上市且已广泛应用于临床的欧蒙 ELISA 检测试剂盒为参比试剂，对 Roche ECLIA 试剂进行了相关性、一致性分析。ECLIA 试剂盒与 ELISA 试剂盒的灵敏度、特异性相近，2 种试剂的总体符合率达 96.74%，且 2 种检测试剂的相关性良好。因此，ECLIA 法可，弥补 ELISA 法的不足，成为新一代抗 CCP 抗体检测方法。

参考文献

[1] 贺联印，粟占国. 类风湿性关节炎的自身免疫异常及研究进展[J]. 复星诊断，2003，1(3)：12-19.

[2] 蔡文虹，孙保东，张宝凤，等. 类风湿性关节炎病因学概述[J]. 中国当代医药，2012，19(5)：11-12.

[3] 古洁若. 类风湿性关节炎研究进展[J]. 实用医学杂志，2005，21(13)：1367.

[4] Schellekens GA，Visser H，de Jong B，et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recogniz acyclic citullinatde peptide[J]. Arthritis Rheum，2000，43(1)：155-163.

[5] Bizzaro N，Mazzanti G，Tonutti E，et al. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis[J]. Clin Chem，2001，47(6)：1089-1093.

[6] 许超尘，饶华春，游玉权，等. 联合检测 AKA、抗 CCP 抗体与 RF 在类风湿性关节炎诊断中的应用[J]. 中国现代医药杂志，2007，9(11)：43-45.

[7] 范列英. 类风湿性关节炎血清早期诊断指标的研究进展[J]. 中华检验医学杂志，2003，26(10)：632-634.

[8] 顾跌丽，吕玲，陈宇明，等. 用受试者工作曲线评价抗环瓜氨酸肽抗体对诊断类风湿关节炎的价值[J]. 中华风湿病学杂志，2005，9(1)：41-45.

[9] 王兰兰，吴健民. 临床免疫学与检验[M]. 4 版. 北京：人民卫生出版社，2007.

（收稿日期：2013-05-28）

·检验技术与方法·

16SrDNA 序列测定在采血耗材污染细菌鉴定中的应用*

肖　洁，宋　建，彭　涛△

（中国人民解放军成都军区总医院输血科，四川成都 610083）

摘　要：目的　探讨 16SrDNA 基因测序方法在鉴定采血耗材中未知细菌污染方面的应用价值。**方法**　对 15 例采血原辅耗材样本进行采样、分离、纯化培养。可疑阳性标本进一步采用 16SrDNA 基因测序检测，同时用表皮葡萄球菌标准菌株作为实验阳性对照。**结果**　15 例样本中有 3 例细菌培养可疑阳性，PCR 扩增其 16SrDNA 片段，测序结果与 GenBank 比对，分别与 *Macrococcus caseolyticus strain*（巨型球菌）、*Klebsiella pneumoniae*（肺炎克雷伯菌）与 *Bacillus thuringiensis*（苏云金芽孢杆菌）的同源性为 99%。表皮葡萄球菌标准菌株 16SrDNA 基因测序结果与来源一致。**结论**　16SrDNA 基因测序方法可用于血制品耗材中未知细菌的污染检测，在菌株鉴定方面有快速、特异的优势。

关键词：序列分析；　细菌鉴定；　采血耗材；　16SrDNA

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.044　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2013)21-2883-03

血液及血液制品的微生物污染是影响输血安全的重要因素之一。通过输血或注射血制品传播的病原微生物种类繁多，其中细菌污染已经越来越引起人们的重视。血液及血制品细菌污染按来源可分为内源性和外源性两种，外源性细菌污染包括采血耗材质量、献血员皮肤、采血者双手消毒不彻底、空气中细菌超标、血袋破损、血袋被污染等情况。如果采血耗材生产线被细菌污染，将直接给血液质量安全带来严重后果。传统的培养基检测方法由于培养周期长，敏感性不高，检出率较低等缺点，难于对生产线各监控点的微生物情况进行实时检测和控制。16SrDNA 为所有细菌共有，是细菌进化过程中最为保守的基因。基于 16SrDNA 基因分析的聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）技术，可为快速检测采血耗材中未知菌污染提供一种新颖、有效、可行的手段。本研究采用该方法对某采血耗材生产厂家生产线上的可疑细菌污染样本进行检测，结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂　主要仪器：生物安全柜 BBS-1500 Ⅱ AZ-X（BioBase）、Life Express 基因扩增仪（杭州博日科技有限公司）。主要试剂：革兰染液（南京建成生物工程研究所）、细菌基因组 DNA 提取试剂盒（宝生物工程有限公司）、PCR 扩增试剂（宝生物工程有限公司）。

1.2　标准菌株与培养基　*Staphylococcus epidermidis*（表皮葡萄球菌标准菌株：ATCC35984）来源于军事医学科学院输血研究所。TY 液体培养基按《分子克隆实验指南》（第 3 版）由本实验室自行配制。普通琼脂平板、血平板、血培养瓶（厌氧）购自郑州安图绿科生物工程有限公司。

*　基金项目：四川省科技厅 2008 年技术支撑项目（2008SZ0108）。　△　通讯作者，E-mail：tao_1226@126.com。

1.3 实验样本　某厂家采血原辅耗材可疑污染样本，包括红细胞保存液、血液保存液Ⅲ、采血三联塑料袋、采浆耗材管路等 15 例样本。

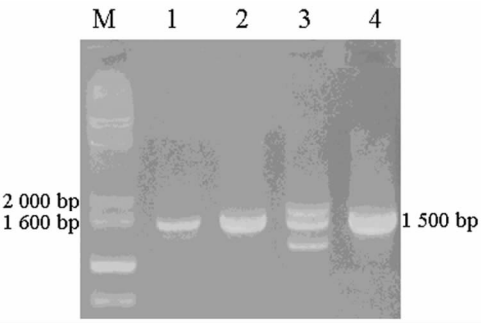
1.4 16SrDNA 引物设计与合成　上游引物(A-17)：5′-GTT TGA TCC TGG CTC AG- 3′；下游引物(3-17)：5′-AAG GAG GTA ATC CAG CC- 3′；目的扩增片段大小约 1 500 bp。委托北京六合华大基因科技股份有限公司合成。

1.5 实验方法　无菌条件下取样后，将样本、表皮葡萄球菌标准株分别接种于 TY(2×)液体培养基和厌氧瓶进行培养。培养 12～24 h 后观察培养基颜色，挑选阳性样本通过平板划线法分别在普通琼脂平板和血平板分离单菌落。将纯培养后分离良好的单个菌落进行革兰染色，显微镜下观察菌体形态及着色情况。细菌基因组 DNA 的小量制备参照细菌 DNA 抽提试剂盒说明。PCR 扩增体系：含 Premix *Taq* 12.5 μL，上下游引物各 0.5 μL，DNA 模板 1 μL，灭菌双蒸水补足体积至 25 μL。扩增参数为：95 ℃预变性 5 min，94 ℃变性 60 s、53 ℃退火 60 s、72 ℃延伸 90 s，30 个循环后，72 ℃延伸 10 min。PCR 产物在 1 %琼脂糖上电泳分析。将 PCR 扩增产物送北京六合华大基因科技股份有限公司进行基因测序。所测序列经 NCBI Blast 搜索引擎在 GenBank 核酸序列数据库中进行比对，获得各菌株鉴定结果。PCR 实验阳性对照为表皮葡萄球菌标准株，实验阴性对照为 TY(2×)液体培养基。

2　结　　果

2.1 菌落形态　15 例样本中有 3 例增菌后细菌培养阳性，转种到普通琼脂平板和血平板均可分离到单菌落。其中，3 号样本为革兰阳性球菌，形态较大；4 号样本在血琼脂平板上菌落颇大，呈灰白色，黏液状，革兰染色显示为阴性杆菌，单独、成双或短链状排列；7 号样本为革兰阳性杆菌，菌体较粗壮，以成簇、分散形式排列，或以 2～4 个菌体组成短链，偶有连成长链。

2.2 16SrDNA PCR 扩增及测序结果　将可疑阳性菌株的 16SrDNA 经 PCR 扩增，均能获得约 1 500 bp 左右的目的片段，见图 1。测序结果经 GenBank 比对分析显示，其与 *Macrococcus caseolyticus strain*(巨型球菌)、*Klebsiella pneumoniae*(肺炎克雷伯菌)与 *Bacillus thuringiensis*(苏云金芽孢杆菌)的同源性为 99%。作为实验对照的表皮葡萄球菌标准菌株 16S rDNA 基因测序结果与来源一致。



M：标记物；1：3 号阳性样本；2：4 号阳性样本；3：7 号阳性样本；4：表皮葡萄球菌标准菌株。

图 1　16SrDNA PCR 扩增片段

3　讨　　论

输血是临床治疗的重要组成部分，是抢救和防治疾病的主要手段之一，但输血在救治患者的同时也有风险。其中最引人关注的是输血传播性细菌感染(transfusion-transmitted bacterial infection，TTBI)。据报道，血液制品的污染比例为 41.9/100 000[1]，细菌污染导致约 17%的输血相关性死亡，引起的发病率和致死率为病毒类感染的 200～400 倍[2-3]，TTBI 已成为影响输血安全的的主要因素。

确保采血原辅耗材的质量是制备血液制品关键环节。如果采血器具和血制品保存袋在制作、灭菌、运输或存储过程中被细菌污染将会给输血安全带来巨大隐患。据报道，丹麦因生产卫生条件不足导致血制品保存袋的污染率在 0.73%[4]。因此，生产厂家必须多时段、多点位、多手段的对产品的灭菌过程进行定期验证和重点控制。检测细菌污染的方法虽然众多，但大多存在敏感性低、特异性差等问题[5]。为了更好地保证采血耗材质量，生产厂家非常需要一种快速微生物检测技术，以解决传统方法检测周期长、结果滞后于生产等问题。随着核酸技术的发展，核酸序列分析已经用于细菌鉴定、种系发生及分类[6]。其中，广谱 PCR 技术 16SrDNA 常被用于细菌鉴定[7]。本实验采用高度保守区的细菌通用引物，实现了细菌的快速分类和鉴定。

目前，无菌医疗器械生产的常用灭菌方法有环氧乙烷、辐照灭菌、高压蒸汽灭菌和甲醛蒸汽灭菌等，不同灭菌方法对不同材质、不同细菌污染的产品有各自适用范围。在本次实验中，3 号样本鉴定为巨型球菌，为目前啤酒生产线上常见的污染菌和破坏菌；4 号样本鉴定为肺炎克雷伯菌，广泛存在于人呼吸道；7 号样本鉴定为苏云金芽孢杆菌为革兰阳性土壤杆菌，广泛分布于昆虫、土壤、仓贮尘埃、污水之中。以上 3 种细菌都可能是采血耗材生产线上的污染菌群。本研究的细菌鉴定结果及时为生产线质量控制提供了指导性信息，也为安全输血提供了有力保障。

16SrDNA 序列分析虽然较传统细菌检测方法速度更快，检出率更高，但仍有局限性，如可能存在实验室污染，出现假阳性结果；当同种细菌 16SrDNA 序列几乎完全相同时，其鉴定能力就受到限制等。因此，必须严格执行 PCR 实验室操作规定，尽量避免污染源，如果存在多个十分接近的种，直接采用生化辅助最后解释。在此次试验中，本研究仅对 16SrDNA 基因测序方法在快速鉴定采血耗材污染细菌领域中的应用进行了初步验证，今后，将选择更多常见血液污染菌，如铜绿假单胞菌、表皮葡萄球菌等，模拟不同菌种，不同污染浓度的血样本，扩大样本量，进一步对该实验技术的特异性、灵敏度、重复性及局限性进行验证，以深入探讨其在保障血液安全性方面的应用价值。

参考文献

[1] Liumbruno GM, Catalano L, Piccinini V, et al. Reduction of the risk of bacterial contamination of blood components through diversion of the first part of the donation of blood and blood components[J]. Blood Transfus, 2009, 7(2): 86-93.

[2] 钟国萍，张晓卿. 输血传播性细菌感染[J]. 北京医学，2010，32(5)：404-405.

[3] Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components[J]. Clin Chem Lab Med, 2008, 46(7): 919-925.

[4] Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions[J]. Vox Sang, 2004, 86(3): 157-163.

[5] Mastronardi C, Martincic I, Ramírez-Arcos S. Implementation of a proficiency testing programme for bacterial screening in platelet preparations in Canada[J]. Vox Sang, 2007, 93(2): 131-138.

[6] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for i-

dentification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 840-862.
[7] Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens[J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2(3): 299-305.

(收稿日期:2013-05-19)

·检验技术与方法·

非霍奇金淋巴瘤患者血清蛋白电泳结果的变化及临床意义探讨

温冠辉, 王　森, 金　欣, 池　罗, 曹新贞, 郑纳新, 宋世平△
(中国人民解放军军事医学科学院附属医院检验科, 北京 100071)

摘　要:目的　探讨非霍奇金淋巴瘤患者血清蛋白各组份的异常变化及其意义。**方法**　选择 137 例非霍奇金淋巴瘤患者作为 NHL 组, 另选择 30 例健康体检者作为正常对照组, 采用法国 Sebia 全自动毛细管电泳仪及其配套试剂对血清样品进行蛋白电泳, 确定蛋白电泳各组份比例。**结果**　非霍奇金淋巴瘤患者各区带蛋白结果与正常对照组相比较, α1 区结果显著升高, α2 区结果明显升高, β1 区结果显著降低。**结论**　通过对血清蛋白电泳 α1 区带、α2 区带、β1 区带结果变化的观察可能会对 NHL 的诊断提供一定参考。

关键词:淋巴瘤, 非霍奇金;　蛋白电泳;　血清
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.045　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1673-4130(2013)21-2885-02

非霍奇金淋巴瘤(non-hodgkin's lymphoma, NHL)是一组常见的血液系统恶性肿瘤, 大部分为 B 细胞性, 病变的淋巴结切面外观呈鱼肉样。镜下正常淋巴结结构被破坏, 淋巴滤泡和淋巴窦可消失。增生或浸润的淋巴瘤细胞成分单一、排列紧密。NHL 易发生早期远处扩散。有的病例在临床确诊时已播散至全身。侵袭性 NHL 常原发累及结外淋巴组织, 发展迅速。往往跳跃性播散, 越过临近淋巴结向远处淋巴结转移[1]。本文通过分析 NHL 患者血清蛋白电泳各组份的变化, 为疾病的临床诊断提供参考。

1　资料与方法

1.1　一般资料　选择本院就诊的 137 例 NHL 患者作为 NHL 组, 其中, 男 51 例, 女 86 例; 年龄 8～83 岁, 均为初次入院且未经治疗的患者。另选择 30 例本院健康体检者作为正常对照组, 其中, 男 16 例, 女 14 例。

1.2　检测方法　取受检者空腹静脉血离心后所得的上清液(血清)进行检测。采用法国 Sebia 全自动毛细管电泳仪及配套试剂对血清样品进行蛋白电泳, 确定蛋白电泳各组份比例。

1.3　统计学处理　采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

NHL 组各区带蛋白结果与正常对照组比较, α1 区结果显著升高, α2 区结果明显升高, β1 区结果显著降低, 见表 1。

表 1　NHL 组与正常对照组蛋白电泳各区带结果比较(%)

组别	清蛋白	α1	α2	β1	β2	γ
NHL 组	59.31±6.87	5.42±2.46△	9.91±3.10*	5.50±0.76△	4.69±0.91	15.97±2.17
正常对照组	61.29±2.35	3.66±0.46	8.67±0.98	6.04±0.57	4.36±0.65	15.14±6.00

*: $P<0.05$; △: $P<0.01$, 与正常对照组比较。

3　讨　　论

近年来, 毛细管电泳法的发展极为迅速, 这一技术已广泛运用到社会生活和科学研究中。毛细管电泳是以高压电场为驱动力, 毛细管为分离通道, 以样品的多种特性(电荷、大小、等电点、极性等)为依据, 根据各组分之间在毛细管中的迁移速度和分配行为上的差异, 而进行高效分离的一种液相微分离分析技术。毛细管电泳主要有毛细管区带电泳、毛细管凝胶电泳、毛细管等电聚焦电泳等。本科使用的为法国 Sebiα 全自动毛细管电泳仪, 属于毛细管区带电泳。其分离出的的正常血清蛋白电泳可以分为 6 条区带即: 清蛋白带、α1 区带、α2 区带、β1 区带、β2 区带、γ 区带。它与传统的醋酸纤维素薄膜电泳在电泳分区上有一定差别, 即毛细管电泳是将醋酸纤维薄膜电泳的 β 区带分为 β1 区带和 β2 区带。

137 例 NHL 患者血清蛋白电泳结果显示, α1 区结果显著升高, α2 区结果明显升高, β1 区结果显著降低。究其原因, 可能是由于位于各区带中的蛋白变化所致。其中, α1 区带蛋白结果显著高于正常对照组, 主要是由于 α1 酸性糖蛋白(α1-acid glycoprotein, α1-AGP)升高所致。AAG 主要在肝脏中合成, 是主要的急性时相反应蛋白之一, 恶性肿瘤患者体内 AAG 浓度显著增高[2]。这是因为肿瘤组织自身可以产生并释放 AAG, 同时机体有抑制肿瘤发展的免疫功能, 这一过程可能刺激肝细胞释放 AAG, 是机体免疫功能状态的反应, 导致血液中 AAG 浓度的升高, 使 α1 区带蛋白结果显著高于正常对照组; α2 区带蛋白结果与正常对照组比较, 明显升高, 铜蓝蛋白升高是其主要因素, 铜蓝蛋白是一种急性时相反应蛋白, 由肝脏合成, 具有氧化酶活性。恶性肿瘤细胞增值活跃, 肿瘤细胞表面糖脂脱落增加, 使血液唾液酸活性降低, 唾液酸转移酶活性增高, 使脱去唾液酸处于分解状态的铜蓝蛋白又被唾液重新酸化, 影响铜蓝蛋白的正常降解过程, 从而使铜蓝蛋白活力增高[3], 使 α2 区带蛋白结果明显高于正常对照组; β1 区带蛋白结果显著低于

△　通讯作者, E-mail: songshiping307@163.com。