

2.2 改良安瓿 O-F 糖醇管贮存期观察 将以上各种安瓿 O-F 糖醇管贮存于室温环境下,分别在 0.5、1、1.5、2 年观察,O-F 糖醇管无干燥、变色、细菌污染等现象。接种相应质控菌株,试验结果与初始配制时结果相同。

3 讨论

近年来,随着各种先进的诊疗技术及抗生素的应用,非发酵革兰阴性杆菌感染发生率明显增加,其耐药问题引起广泛关注^[7-8]。从临床标本中分离这些细菌并无困难,但对它们的准确鉴定远比肠杆菌科细菌难度大的多。对各种 O-F 糖醇的利用试验仍是手工法鉴定非发酵菌的主要鉴定方法之一。传统法用溴麝香草酚蓝作指示剂,双管试验,其中一管要加液体石蜡,方法繁琐,阳性结果有时呈黄绿色,与本色绿色不易区别,难以判断,同时还需冰箱保存,占位大且保存期短,试剂成本高。改用安德烈作指示剂,单支高管,不加液体石蜡,方法简单,颜色反应明显稳定,结果容易判定,但常量试管法仍然存在成本高、冰箱保存,不仅占位大而且保存期短的问题。将常量试管法研制成改良安瓿法,不仅体积小,试剂用量少,节约成本,而且安瓿管完全密封,可长期室温保存。通过对 387 株非发酵菌进行对比试验,两法颜色反应一致,结果完全相同,而且改良法比另两种方法都具有优越性,适合于采用手工法鉴定非

• 检验技术与方法 •

发酵菌的各级医疗机构、科研院所使用。

参考文献

[1] MacFaddin JF. 医学细菌生化试验鉴定手册[M]. 林万明,译. 北京:人民卫生出版社,1985.

[2] 张卓然. 临床微生物学和微生物学检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003.

[3] 刘锡光. 现代诊断微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.

[4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程/中华人民共和国卫生部医政司[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.

[5] 李仲兴,郑家齐,李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港:黄河文化出版社,1992.

[6] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2007.

[7] 周卫东,陈月洁. 非发酵革兰阴性杆菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(6):612-613.

[8] 朱永华,史伟峰. 三种常见非发酵菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(12):1083-1084.

(收稿日期:2010-03-09)

不同溶血方法对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性影响的研究

袁璋林¹,杨发达¹,谢煜楠¹,孙威¹,梁睿熙²

(1. 广州中医药大学附属南海妇女儿童医院检验科,广东佛山 528200;2. 海南医学院检验系,海口 571101)

摘要:目的 探讨溶血方式对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)活性的影响。方法 采用不同溶血方式处理标本后立即上机测定 G6PD 活性,并每隔 10 min 测定 1 次,共测定 5 次,计算在放置过程中 G6PD 活性的下降率,并进行统计分析。结果 G6PD 活性下降率与皂素、十六烷基三甲基溴化铵的浓度呈正相关,皂素的最低溶血浓度为 0.02%,十六烷基三甲基溴化铵为 0.006%;0.03%皂素-CPDA,0.02%皂素-CPDA,0.03%皂素-生理盐水、纯净水、0.006%十六烷基三甲基溴化铵-CPDA,0.006%十六烷基三甲基溴化铵-生理盐水、冻溶-CPDA、试剂盒配套溶血剂共 8 种溶血方式 G6PD 活性下降率分别为 6.2%、2.9%、8.68%、9.94%、5.9%、8.93%、3.76%、10.58。结论 0.02%皂素-CPDA、冻溶-CPDA 2 种溶血方式能较好地维持 G6PD 活性,建议测定 G6PD 活性时采用这 2 种溶血方式

关键词:溶血; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性; 放置时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0372-03

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症是人类最常见的伴性遗传疾病^[1]。目前用于 G6PD 活性检测的方法主要包括:高铁血红蛋白还原法、亚硝基四氮唑蓝法、荧光斑点法、G6PD/6PGD 比值法、酶动力学法^[2]。后 3 种方法均需制备溶血液才能进行测定。但是在标本制成溶血液后,G6PD 活性随时间的延长而呈明显的下降趋势,从而可能导致假阳性结果的出现。因而探索溶血液中 G6PD 活性不稳定的原因,改良溶血剂的配方及溶血方法,提高酶在溶血液中的稳定性,是 G6PD 测定方法学改进中值得研究的问题。

1 资料与方法

1.1 标本来源 本院门诊及住院受检验者的 ACD 抗凝血标本。

1.2 仪器及试剂 日立 7060 生化分析仪,漩涡混合器,离心机、冰箱、分析天平。ACD 血液保存液:葡萄糖 14.7 g/L,柠檬酸钠 13.2 g/L,柠檬酸 4.4 g/L, pH5.03;CPDA 血液保养液:

葡萄糖 25.5 g/L,柠檬酸钠 26.3 g/L,柠檬酸 3.27 g/L,磷酸氢二钠 2.22 g/L 腺嘌呤 173 mg/L, pH5.63;柠檬酸钠溶液 (31.3 g/L);皂素-生理盐水溶液 (1 g/100 mL);十六烷基三甲基溴化铵-生理盐水溶液 (1 g/100 mL);G6PD 测定试剂盒由广州科方生产。

1.3 方法 (1)冰冻溶血试验:随机抽取 10 份 ACD 抗凝标本,3 000 r/min 离心 5 min,吸取管底的压积红细胞 10 μL 进行试验,每个标本取样 3 次,分别加在 A、B、C 3 个样品杯中,分成 A、B、C 3 组进行试验,分别放入-12℃、-15℃、-25℃冰箱中,每隔 5 min 迅速从每组的冻室中取出 1 个样品,加入生理盐水 500 μL,混匀后观察溶血情况,以外观液体清亮,无任何混浊,显微镜下无红细胞或红细胞影为完全溶血。冰冻溶血试验每天 1 次,重复 3 d。(2)溶血剂最低溶血浓度试验:取小细胞低色素红细胞标本 10 份,随机分成 A、B 2 组,每组 5 份,经 3 000 r/min 离心 5 min,吸取管底的压积红细胞 10 μL 进行试验,每个标本取样 8 次,分别加入 8 个样品管中,A 组 1~8 号

管中分别加入 8 个不同浓度的皂素-生理盐水溶液, B 组 1~8 号管中分别加入 8 个不同浓度的十六烷基三甲基溴化胺-生理盐水溶液, 混匀, 观察各管的溶血情况; 用皂素-CPDA 血液保存液、十六烷基三甲基溴化胺-CPDA 血液保存液按上面的方法进行溶血试验; (3) G6PD 活性及活性浓度测定: 严格按试剂盒说明书进行测定。(4) 溶血剂浓度对 G6PD 活性影响的试验: 将样品管分为 A、B 2 组, 每组 8 个, 取同一标本分别吸取 RBC 10 μ L, 加入 A、B 2 组的样品管中, 用不同浓度的皂素-CPDA、十六烷基三甲基溴化胺-CPDA 制备溶血液, 立即测定 G6PD 活性。同法测定 30 份标本。(5) 标本稀释液对冰冻溶血标本酶活性的影响试验: 分别取 RBC 10 μ L, 加入 7 个样品管中, -25 $^{\circ}$ C 冰箱放置 20 min, 取出后分别加入不同的稀释液, 混匀, 制备成溶血液, 立即上机测定, 每间隔 10 min 测定 1 次, 共测定 5 次; 用不同的标本、同样的方法重复进行 3 次试验。(6) 不同溶血剂对 G6PD 活性影响的试验: 分别用试剂盒内的溶解液、纯化水、皂素-生理盐水、皂素-CPDA、十六烷基三甲基溴化胺-CPDA、十六烷基三甲基溴化胺-生理盐水溶解标本, 立即上机测定, 每间隔 10 min 测定 1 次, 共测定 5 次, 记录结果。用不同的标本、同样的方法重复进行 3 次试验。

1.5 统计学处理 试验数据采用 SPSS 统计学软件处理, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结 果

2.1 冰冻溶血试验结果 在 -25 $^{\circ}$ C 条件下, 15 min 可完全溶血, 另外 2 种温度下的溶血时间不具有实用性。

2.2 溶血剂最低溶血浓度试验结果 皂素的最低溶血浓度为 0.02%, 十六烷基三甲基溴化胺为 0.006%。

2.3 溶血剂浓度对酶活性的影响试验结果 0.05%~1% 的皂素制备的溶血液在放置 10 min 后对酶活性均有显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。0.03% 皂素浓度在 20 min 内测定没有显著下降 ($P > 0.05$), 放置 30 min 产生显著影响, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。0.02% 皂素浓度在 30 min 内测定, 酶活性无明显下降, 在 40 min 测定差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。十六烷基三甲基胺的浓度对酶活性及放置过程中酶的稳定性在测试的 5 个浓度之间比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 不同浓度皂素-CPDA 对 G6PD 活性的影响 (U/L)

时间(min)	皂素-CPDA 浓度(%)						下降率 (%)
	1.00	0.50	0.10	0.05	0.03	0.02	
0	1 559	2 234	1 996	1 972	2 028	1 857	16.0
10	712	1 563	1 987	1 882	1 996	1 844	60.1
20	322	1 196	1 918	1 815	1 971	1 837	82.5
30	122	934	1 820	1 782	1 921	1 815	93.3
40	-34	743	1 763	1 739	1 903	1 803	101.9
下降率 (%)	102.2	66.7	11.7	11.8	6.2	2.9	-

注:“-”表示无值。

2.4 不同溶血剂对 G5PD 活性影响 取 9 例受试者全血标本采用冰冻溶血方式, 分别加入稀释液 CPDA、ACD、纯化水、31.3 g/L 枸橼酸钠溶液、生理盐水、试剂盒配套溶血液 40 min 后, 其酶活性下降率分别为 37.6%、6.00%、10.20%、5.40%、5.89%、11.16%。纯化水与试剂盒配套溶血剂间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$); ACD、生理盐水、柠檬酸钠溶液三

者的酶活性下降率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 CPDA 比较, 其余 5 种溶血剂的酶活性下降率差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.5 不同溶血方式对 G6PD 活性的影响 取 32 份受试者全血标本分别用 0.03% 皂素-CPDA、0.02% 皂素-CPDA、0.03% 皂素-生理盐水、纯化水、0.006% 十六烷基三甲基胺-CPDA、0.006% 十六烷基三甲基胺-生理盐水、冻溶-CPDA、试剂盒配套溶血剂等方法制备溶血液, 标本溶血后分别在 0、10、20、30、40 min 测定 G6PD 活性, 不同溶血方式制备的溶血液在 0~40 min 内的酶活性下降率分别为 6.2%、2.9%、8.68%、9.94%、5.9%、8.93%、3.76%、10.58%。

表 2 不同浓度十六烷基三甲基溴化胺-CPDA 对 G6PD 活性的影响 (U/L)

时间(min)	季胺-CPDA 浓度(%)					下降率 (%)
	1.00	0.50	0.01	0.008	0.006	
0	283	1 172	2 864	3 252	3 555	92.0
10	203	656	2 719	3 200	3 512	94.2
20	105	353	2 620	3 090	3 452	97.0
30	65	246	2 504	2 995	3 384	98.1
40	38	213	2 376	2 884	3 344	98.9
下降率 (%)	86.6	81.8	17.0	11.3	5.9	-

注:“-”表示无值。

3 讨 论

G6PD 活性测定在中国南方及西南地区是 1 个常见的检验项目, 而溶血方式的选择对酶活性有着显著性的影响^[3], 所以选择适宜的溶血方式对保证结果的准确性有着重要的意义^[4]。

冰冻溶血是一种比较好的溶血方式, 其效果与冻室的温度有关^[5-7], 在 -25 $^{\circ}$ C 条件下, 15 min 可完全溶血, 具有实用价值。红细胞冰冻溶血后必须用一定的稀释液稀释标本才能进行 G6PD 活性的测定, 不同的稀释液对 G6PD 活性影响也不尽相同, 根据试验的结果分析, 用 CPDA 作为标本稀释液在 40 min 内测定 G6PD 活性, 是测试的 6 种稀释液中最理想的一种, 建议采用 CPDA 血液保存液用作标本稀释液。

采用溶血剂制备溶血液是最简单的方式, 但是溶血剂的浓度对 G6PD 活性有着显著性的影响, 根据试验的结果可知, 皂素、十六烷基三甲基溴化胺 2 种溶血剂的浓度与酶活性呈负相关, 与酶活性下降率呈正相关。为保证酶的活性及溶血的效果, 必须选择能完全溶血的溶血剂最低浓度。据试验结果可知, 皂素采用 0.02%、十六烷基三甲基溴化胺采用 0.006% 的浓度最为理想, 放置时间在 30 min 内测定酶活性下降差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

对 8 种常用及试验结果较为理想的溶血方式处理标本所测得的酶活性下降率进行比较, 采用冻溶-CPDA、0.02% 皂素-CPDA 2 种方式能较好地维持 G6PD 活性, 可作为 G6PD 活性测定时的首选溶血方式。

参考文献

[1] Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency[J]. N Engl J Med, 1991, 324:169-174.
 [2] 关广雄, 曹子明, 沈雁. 改良红细胞葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性直接

测定法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(5): 764-766.

[3] 贾璋林, 杨发达, 谢煜楠, 等. 溶血液标本制备后的放置时间对 G6PD 酶活性测定的影响[J]. 医学检验与临床, 2007, 18(03): 69-70.

[4] 贾璋林, 杨发达, 谭桂彩, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性浓度检测法的初步研究[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(2): 65-67.

[5] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006: 175-177.

[6] 黎卓华, 李鄂, 王希平, 等. 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶三种测定方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(7): 663.

[7] 陈运生, 蒋玮莹, 李长钢, 等. G6PD 比值法检测葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因突变女性杂合子影响因素的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(5): 385-390.

(收稿日期: 2010-07-22)

• 检验技术与方法 •

胞内代谢指纹分析在推断新化合物抗菌作用机制中的应用评价

施锦杰, 范列英, 马红霞

(同济大学附属上海市东方医院检验科, 上海 200120)

摘要:目的 探讨利用胞内代谢指纹分析推断化合物抗菌作用机制的应用价值。方法 4 种胍类化合物和 13 种常用抗生素作用于金黄色葡萄球菌的培养物, 利用气相色谱-质谱对不同刺激下菌体细胞内代谢物进行全面检测即代谢指纹分析, 通过聚类分析推断菌体代谢指纹相似性及化合物可能的作用机制。结果 合成的 4 种化合物与常用的抗生素相比较, 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCoN)具有显著的抗菌活性, 其相应的 MIC 值在 0.125~8.000 μg/mL 之间; 气相色谱-质谱对金黄色葡萄球菌 ATCC25923 在不同化合物存在条件下的代谢指纹分析, 结果显示 4 种化合物具有相似的作用机制($P > 0.05$); 4 种化合物与克林霉素关系最近, 它们之间可能具有相似的作用机制。结论 利用气相色谱-质谱代谢指纹分析, 能够相对容易地推断抗菌药物的作用机制。

关键词:气相色谱-质谱法; 胞内代谢指纹分析; 抗菌作用机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)03-0374-02

细菌耐药性的广泛传播是感染治疗中的 1 个十分棘手的问题^[1]。目前, 新抗生素的开发主要集中在规避已知的耐药机制或者针对新的靶点^[2], 因此确定新药的确切作用机制或靶点在先导化合物筛选和新药研制方面是十分重要的一环。但目前抗生素研发中的瓶颈就是缺乏有效的筛选候选化合物的方法^[3]。随着高通量分析技术的出现, 制药工业也开始发生着变革^[4-6]。本研究中, 利用气相色谱-质谱对 4 种合成的胍类化合物和 13 种常用抗生素刺激下的菌体细胞内代谢物进行全面检测即代谢指纹分析, 通过聚类分析代谢指纹的相似性来推断未知化合物可能的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 菌种来源 金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、2 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)及 1 株耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCoN)均由同济大学附属上海市东方医院微生物实验室提供。

1.2 试剂 13 种抗生素来源于商品化产品, 4 种合成的胍类化合物由上海药物所提供^[7]。M-H 肉汤和琼脂购自法国 BioMerieux 公司。乙腈、乙醇、丙酮和甲醇为 TEDIA (Fairfield, OH) 产品。含 1% 二甲基叔丁基氯硅烷的 N-(叔丁基二甲基硅烷基)甲基三氟乙酰胺(MTBSTFA)、吡啶和四氢吡喃购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养与药敏试验^[8] 微量稀释法和纸片扩散法药敏试验按照 CLSI2005 年标准执行。金黄色葡萄球菌在 35 °C M-H 肉汤中培养 24 h, 新鲜培养物稀释到 1.5×10^8 CFU/mL。每种药物分别与 10 mL M-H 肉汤混匀加菌液到细菌浓度为 5×10^5 CFU/mL。35 °C 需氧培养 10 h 以保证代谢变化为抗生素直接影响所造成^[9]。

1.3.2 气相色谱-质谱分析 气相色谱-质谱条件: Shimadzu QP 2010 GC-MS 系统。毛细管柱为 DB5-MS 固定相的石英柱 (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm)。进样口温度 280 °C, 分流比 10 : 1。35.0 cm/s He 为载气, 采用程序升温, 初始柱温 70 °C 5 min, 然后以 5 °C/min 提高到 280 °C 并维持 5 min, 柱平衡时间 3 min, 质谱扫描范围为 m/z 40~ m/z 600, 检测器电压 0.9 kV, 离子源温度 200 °C, 接口温度 280 °C, 溶剂切割时间 6 min。样品处理: 冻干样品溶解于 50 μL 吡啶溶液内混匀 10 min, 加 BSTFA 60 μL 60 °C 衍生 30 min, 取 1 μL 用于气相色谱-质谱分析。

1.4 统计学处理 气相色谱-质谱数据转换成 NetCDF 格式后 XCMS 处理^[10]。对已知作用机制的抗生素每峰做 *t* 检验, 对未知化合物的作用机制判断采用聚类分析法。

2 结果

2.1 4 种合成的胍类化合物和 13 种常见抗生素的最低抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 见表 1。

表 1 4 种化合物和常见抗生素的 MIC 比较 (μg/mL)

药物	ATCC25923	MRSA-1	MRSA-2	MRSCoN
庆大霉素	0.25	32	32	0.125
阿米卡星	2	128	128	0.125
环丙沙星	0.5	4	8	8
四环素	1	32	16	32
氯霉素	8	8	8	64
青霉素	2	8	8	4
万古霉素	1	2	4	2
红霉素	0.5	16	32	32
苯唑西林	0.25	32	64	8
克林霉素	0.25	8	8	1