

[3] 熊正东. 小儿肺炎支原体感染的治疗[J]. 实用儿科杂志, 1993, 8(3): 205.
 [4] 翟燕. 血清特异性抗体检测在肺炎支原体感染早期诊断意义[J]. 中华儿科杂志, 1993, 31(2): 101.

[5] 董绍良, 陈述枚, 何政贤. 小儿内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 276.

(收稿日期: 2011-02-24)

MPT-NAG 测定 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的应用价值

余长福(浙江省温州市瓯海区第三人民医院检验科 325014)

【摘要】 目的 应用新型底物 6-甲基-2-硫代吡啶-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(MPT-NAG)建立检测 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活力的紫外动力学新方法,用于尿液中 NAG 活性测定。方法 基于 NAG 催化水解对硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷生成有色的对硝基酚这一反应,对缓冲液离子强度、pH 值、底物浓度等最佳反应条件及各种实验参数进行研究。用该法测定了多种病尿样中 NAG 活性。结果 该法最低检出限为 1.5 U/L,线性范围可达 250 U/L($r=0.9989$),批内 CV 为 <3%,批间 CV<5%,回收率为 101.3%。结论 本法灵敏度高,线性、精密度好,结果准确,且操作简便快速,适用于全自动生物化学分析仪操作。

【关键词】 甲基-2-硫代吡啶-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷; N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶; 紫外动力学法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.055 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2011)16-2011-02

N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)是一种位于溶酶体内的酸性水解酶,相对分子质量为 140×10^3 ,存在于所有组织中。尿中 NAG 主要来源于肾近曲小管上皮细胞,当近曲小管上皮细胞受损时,尿中 NAG 活性将显著升高且早于其他尿酶,对肾小管损害的早期诊断有较大价值^[1],且 NAG 上升程度与肾小管损伤程度成正比^[2]。可作为早期诊断肾损害的尿标志蛋白^[3]。本文基于 NAG 催化水解 6-甲基-2-硫代吡啶-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(MPT-NAG)生成无色的 6-甲基-2-硫代吡啶(MPT),经反复试验确定了最佳实验条件,建立起简便、灵敏、稳定的检测尿液中 NAG 活力的紫外动力学分析法,该方法不受尿色的影响。用于尿样中 NAG 活力的测定,均获得满意结果。

1 材料与与方法

1.1 试剂和仪器 (1)试剂 1(R1): 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 200 mmol/L(pH 4.6±0.05)、表面活性剂 1 g/L、稳定剂和防腐剂适量。(2)试剂 2(R2): 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 200 mmol/L(pH 4.6±0.05)、MPT-NAG 7 g/L、稳定剂和防腐剂适量。(3)NAG 酶标准酶和质控品,由浙江伊利康生物技术公司提供。所有检测在 AU400 全自动生物化学分析仪上进行。

1.2 样本 随机中段尿样。

1.3 方法

1.3.1 测定原理 样本中的 NAG 催化底物 MPT-NAG 水解,生成产物 MPT。MPT 在 340 nm 处有最大吸收峰,通过测定 340 nm 处每分钟的吸光度变化速率,可计算出 NAG 的活性。即在最佳实验条件下,1 000 mL 样品中 NAG 每分钟水解 1 μmol/L 的 MPT-NAG 发生转变为 1 U 的 NAG 酶量为 1 个单位,简称 U/L。

1.3.2 实验参数反应类型 速率法,波长为 340 nm(主)/405 nm(副);反应温度:37℃;试剂 1 用 240 μL,试剂 2 用 60 μL;标本取 15 μL;读数时间 1~3 min。

1.3.3 统计学处理 实验数据的统计学处理采用 SPSS10.0 统计软件。

2 结果

2.1 吸收光谱 在本实验条件下从 300~450 nm 范围内测定标准溶液的吸光度,得知 6-甲基-2-硫基吡啶最大吸收波长为 340 nm。

2.2 最适缓冲液离子强度的选择 分别配制 50、100、150、200 和 250 mmol/L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液,其他条件不变。分别测试同一份样品(45 U/L)。酶反应速率随缓冲液浓度的增加而增高,但当浓度大于 200 mmol/L 时,酶反应速率反而降低。这是缓冲液浓度太大反而抑制了 NAG 酶的活性,从而导致反应变慢。因此,选择柠檬酸-磷酸氢二钠浓度 200 mmol/L 作为最佳缓冲液和最佳浓度。

2.3 最适 pH 值的选择 分别配制 pH4.0、4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2 和 5.4 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 200 mmol/L,其他条件不变。对 45 U/L NAG 标准酶进行测定,在 pH 4.6 时酶促反应速率最大。

2.4 底物浓度选择 在其他条件不变的情况下,将试剂 2 中 MPT-NAG 浓度分别调整至 5、7、9 g/L,分别测定高、中、低 3 种浓度的质控品。结果显示试剂 2 中 MPT-NAG 浓度为 7 g/L 时底物浓度与酶反应速度的反应曲线尾部已趋于平坦,说明反应速度已到最大值,测定此处的反应速度,最能准确反映酶量的多少。所以试剂 2 中 MPT-NAG 的浓度确定为 7 g/L。

2.5 反应时间的选择 在其他条件不变的情况下,用样本按反应条件进行操作,观察 60~300 s 内各时间的吸光度变化,可见到时间变化与吸光率变化为线性关系。

2.6 精密度的试验 根据 NCCLS(EP-5)的评估方案,取 1 份尿液作批内和批间试验,测定次数 20 次,结果批内 CV 为 2.6%,批间 CV 为 4.2%。

2.7 回收试验 在 1 份样品中分别加入低、中、高 3 个浓度的 NAG 质控品,同时样品中加入相同体积的蒸馏水做基础样本,每份样品重复测定 3 次,取均值,所得回收率分别为 103.2%、101.5%、99.2%,平均回收率 101.3%。

2.8 线性试验 根据 NCCLS(EP6.P)的评估方案,取浓度分别为 5 U/L 和 250 U/L 标本各 1 份。然后将两份标本按 1:0.4:1、3:1、2:1、1:1、1:2、1:3、1:4、0:1 的比例混合,产生 9 个不同浓度的样品,用本法从高到低和从低到高两个浓度顺序测定,将测定值(Y)与理论值(X)作线性回归分析,回归方程为 $Y=1.005X-0.281$, $r=0.9989$,表明线性可达 250 U/L。

2.9 最低检测限 取浓度为 5 U/L 的质控品作为样品,重复测定 10 次,求出标准差 s,以 3s 为最低检测限,结果为

1.5 U/L。

2.10 参考范围 测定100名体检健康者尿液样本,男60名,女40名,年龄20~60岁,均无肾脏疾患、高血压、糖尿病史,未曾服用肾毒性等药物。常规尿蛋白定性和尿沉淀镜检验均呈阴性,正常值尿NAG活性以U/L为计量单位, NAG($\bar{x} \pm s$)男性为(8.83±2.12)U/L,女性为(9.16±2.03)U/L,男女间差异无统计学意义($P > 0.05$),取总体 $\bar{x} \pm 1.96s$ 作为参考值,结果为(9.07±3.89)U/L。随机测定52例各种肾病患者和60名健康组尿NAG活性,肾病患者组尿NAG活性均明显高于健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 各种肾病患者NAG活性($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NAG(U/L)
健康对照组	60	9.16±2.13
糖尿病肾病	13	20.37±4.28*
肾盂肾炎	16	15.64±3.19*
痛风肾病	23	18.32±2.67*

注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

NAG目前应用最多的肾单位活动性损伤检查指标^[4]。随着对NAG的研究不断深入,其检测方法也在不断发展中,主要有荧光分光光度法和可见分光光度法。前者因所需仪器价格昂贵,且对底物溶液配制的要求较高,而不宜用作一般医院的常规检验;后者试剂稳定性欠佳,难以满足临床检验要求。目前大部分采用硝基苯-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(PNP-NAG)、2-氯-4-硝基苯基-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(CNP-NAG)、2-甲氧基-4-(2-硝基乙基)酚-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷(MNP-NAG)作底物建立终点比色法和速率法^[5-8]。这些方法中PNP-NAG和CNP-NAG底物中的色原最大吸收峰在405 nm,而MNP-NAG在500 nm。但尿液的颜色呈微黄色,很容易干扰这些方法的测定,而且PNP-NAG和CNP-NAG在液体状态下不稳定,冰箱保存只能稳定1周,造成试剂浪费严重,临床使用上难于推广。以MPT-NAG底物建立的NAG测定试剂优点在于,NAG分解底物生成的MPT在340 nm处有

最大吸收峰,测定样本在340 nm完成,不受尿液颜色干扰。该方法最低检出限为1.5 U/L,线性范围可达250 U/L($r = 0.9989$),批内CV为<3%,批间CV<5%,回收率为101.3%。测定52例各种肾病患者和60名健康人尿NAG活性,结果肾病患者组尿NAG活性均明显高于健康对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,本文用MPT-NAG建立的测定尿NAG活性的方法,灵敏度高、线性范围宽、精密度好、结果准确,且操作简便快速,适用于全自动生物化学分析仪大批量标本操作,有利于临床对肾脏疾病的早发现 and 早治疗。

参考文献

- [1] 丛玉隆,马骏龙.当代尿液分析技术与临床[M].北京:中国科学技术出版社,1998:149-150.
- [2] 朱立华.肾脏疾病的生化、免疫检测技术进展[J].中华检验医学杂志,2002,25(2):307.
- [3] 李晓红,盛光耀.尿p2-MG和尿NAG在儿童过敏性紫癜肾损害早期诊断中的意义[J].山东医药,2010,50(13):87-88.
- [4] 霍日查,刘和,杨志刚.NAG、β2-MG、CysC测定膀胱出口梗阻患者的早期肾损害的临床意义[J].当代医学,2010,16(1):111-112.
- [5] 周永列,等.N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷的基质合成及其动力学法测定[J].临床检验杂志,1993,11(3):114-117.
- [6] 施强华.MNP-NAG底物测定尿NAG方法的建立[J].上海第二医科大学学报,1998,8(3):199-202.
- [7] 周午琼,王向阳.以2-甲氧基-4-(2-硝基乙基)酚-N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷为底物测定尿N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶活性[J].临床检验杂志,2007,25(3):220-221.
- [8] 徐朝阳,王峰,宋克征.尿酶NAG改良速率法测定及其临床应用[J].江西医学检验,2004,22(6):521-523.

(收稿日期:2011-04-06)

血液感染中葡萄球菌的耐药性分析

韦柳华,张文英,蒙雨明(广西医科大学第四附属医院,广西柳州 545005)

【摘要】 目的 了解血液感染患者血液中葡萄球菌的耐药性及耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)检出情况,以更好地指导临床用药。**方法** 应用BacT/Alert 120全自动血培养仪培养血液标本,使用Microscan Autoscan-4微生物分析仪对细菌做鉴定和药物敏感试验。**结果** 耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRCNS)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)检出率分别为79.4%、30.6%;葡萄球菌对万古霉素、利奈唑胺的耐药率为0;MRS对大部分抗菌药物的耐药率显著高于甲氧西林敏感葡萄球菌(MSS)。**结论** MRS与MSS对抗菌药物的耐药程度不一致,临床医师应根据药物敏感试验结果选择敏感性抗菌药物进行治疗。

【关键词】 血液感染; 葡萄球菌; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.056 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)16-2012-02

随着器官移植、介入性治疗技术的发展和广谱抗菌药物及免疫抑制剂的广泛使用,葡萄球菌引起的血液感染有增加趋势,常位居病原菌的首位^[1]。了解血液中葡萄球菌的耐药性,可为临床合理用药提供依据。现对本院血培养分离的葡萄球菌耐药性进行回顾性分析,结果报道如下。

1 材料与方

1.1 菌株来源 2008年1月至2010年12月从本院住院患者

送检血液中分离的病原菌,同一患者多次分离到的菌株不重复计入。

1.2 培养方法 采用BacT/Alert 120全自动血培养仪,严格按照操作规程采集血标本及培养。对仪器指示阳性者,无菌操作抽取培养液,立即转种血平板、麦康凯平板、巧克力平板,分离单个细菌。

1.3 细菌鉴定和药物敏感试验 采用Microscan Autoscan-4