

- 东南大学出版社,2006;3-57.
- [2] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patients samples; approved guideline [S]. NCCLS, EP9-A, 1995.
- [3] 张力球. 不同分析仪器及不同性质样本检测电解质浓度结果分析 [J]. 吉林医学, 2012, 33(9): 1915.
- [4] 龙琳娟, 周月平, 徐梅, 等. 血气分析仪、电解质分析仪与全自动生化仪三者所测电解质的比对分析 [J]. 实验与检验医学, 2009, 27(5): 501.
- [5] 孙国华, 韩青, 孙芹敏. 不同检测系统测定血清肌酐、谷丙转氨酶的比对分析和偏倚评估 [J]. 大连医科大学学报, 2011, 33(2): 166-170.
- [6] 齐永志, 马聪, 张雅芳, 等. 全自动生化分析仪与血气分析仪电解质测定结果比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(16): 1828-1829.
- [7] 唐龙泉. 不同仪器检测电解质结果分析 [J]. 医学信息, 2010, 23(4): 1070.
- [8] 王凤平, 吴兴福, 封莉. 便携式血气分析仪电解质结果分析 [J]. 临床合理用药杂志, 2009, 2(24): 60-61.
- [9] 伍亭全. 生化分析仪与血气分析仪检测静脉血电解质结果分析 [J]. 临床合理用药, 2011, 4(9B): 94-95.
- [10] 叶余辉. 血气分析仪与生化仪测钾离子的比较分析 [J]. 中外健康文摘, 2011, 8(40): 237-238.
- [11] 蔡红芳. GEM3000 血气仪测定动脉血钾、钠、葡萄糖的结果分析 [J]. 医学研究杂志, 2008, 37(7): 88-90.
- [12] 饶卫农. 不同分析仪器及不同性质样本检测血钾浓度可比性问题初探 [J]. 国际医药卫生导报, 2003, 9(8): 106-107.

(收稿日期: 2013-02-18)

• 检验技术与方法 •

产 OXA-23 鲍曼不动杆菌的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测研究*

王利君, 范艳艳, 王 政

(首都医科大学附属北京同仁医院检验科, 北京 100730)

摘要: 目的 应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱快速检测产 OXA-23 鲍曼不动杆菌。方法 125 株泛耐药鲍曼不动杆菌及 110 株碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌为研究对象, 用 PCR 和测序方法检测 OXA 基因。美罗培南与鲍曼不动杆菌 37 °C 孵育 2 h 后, 上清液进行基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测, 统计学分析各质谱峰的 ROC 曲线。结果 125 株泛耐药鲍曼不动杆菌均携带 OXA-23 基因。碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌的质谱峰荷比 (m/z) 为 384 m/z, 406 m/z, 428 m/z, 而泛耐药鲍曼不动杆菌的质谱峰为 358 m/z, 380 m/z, 402 m/z, 406 m/z, 424 m/z, 428 m/z, 446 m/z, 468 m/z。质谱峰 358 m/z 与 380 m/z 的 ROC 曲线下面积 (AUC) 均为 0.99。通过质谱峰的变化鉴定产碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌, 灵敏度与特异度均为 100%。结论 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱可以快速、准确检测碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌, 指导临床合理使用抗菌药物。

关键词: 质谱; 鲍曼不动杆菌; 抗药性, 微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)19-2587-03

鲍曼不动杆菌是医院感染的重要病原菌。近年来抗菌药物的滥用, 鲍曼不动杆菌的耐药率在不断上升, 氟喹诺酮类、氨基糖苷类等耐药率甚高, 碳青霉烯类的耐药率也有上升。研究表明碳青霉烯类抗菌药物的长期广泛使用与鲍曼不动杆菌的耐药性相关^[1]。为减少鲍曼不动杆菌在医院感染的发生及多重耐药菌株的出现, 研究者应及时监测其耐药情况, 指导临床抗菌药物应用, 有效预防和控制感染。

鲍曼不动杆菌中最主要的碳青霉烯酶是 D 类苯唑西林酶 (Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases or oxacillinas-es, OXA)。虽然外膜蛋白缺失和主动外排机制也是鲍曼不动杆菌碳青霉烯类耐药的机制, 但是 OXA 的作用仍然是最重要的^[2-4]。产 OXA-23 鲍曼不动杆菌是国内外报道最多的泛耐药鲍曼不动杆菌, 并且常导致爆发流行^[5-6]。

临床实验室碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌的检测主要依靠药敏试验, 但检测时间需要至少 24 h。虽然, PCR 法已经成熟的应用于各种耐药基因的检测, 但是费力以及费用高昂。近几年, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 已经应用于临床实验室微生物鉴定^[7], 本研

究旨在研究快速检测产碳青霉烯酶鲍曼不动杆菌的 MALDI-TOF MS 方法。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 菌株均为北京同仁医院检验科分离的临床菌株。耐药组为 125 株泛耐药鲍曼不动杆菌。敏感组为 110 株碳青霉烯类敏感的鲍曼不动杆菌。参考菌株: 肺炎克雷伯菌 ATCC 700603, 大肠埃希菌 ATCC25922。阳性对照菌株: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705, 嗜麦芽窄食假单胞菌作为产碳青霉烯酶的阳性对照。

1.2 仪器与试剂 三水美罗培南 (西格玛公司, 美国); 药敏纸片 (Oxoid 公司, 英国); 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪 Autoflex (布鲁克公司, 德国)。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 将以上菌株转种 MH 平板, 37 °C 孵育过夜, 采用 MALDI-TOF MS 进行菌种鉴定。药敏试验采用琼脂扩散法。药敏结果解释参照美国临床实验室标准委员会 (CLSI-2012) 标准。

1.3.2 耐药基因检测 OXA-23、OXA-24、OXA-58 及 ISAbeta 引物参照参考文献^[8]。PCR 产物送北京诺赛基因组研究中心

* 基金项目: 首都医科大学附属北京同仁医院科研基金 (2012-YJJ-010)。

心有限公司进行测序,测序结果与 GenBank 进行 BLSAT 比对分析。

1.3.3 MALDI-TOF MS 分析 20 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液配制 2 mmol/L 浓度的美罗培南溶液备用, 50% 乙醇配制 10 g/L 2,5-二羟基苯甲酸基质备用。1 mL 20 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) 缓冲液配 4 麦氏浓度的菌悬液, 14 000 g 离心 3 min, 弃上清, 沉淀中加入 30 μ L 美罗培南溶液及 10 μ L 0.045% NaCl 溶液, 混匀后置 37 °C 孵育 2 h。孵育完成后, 14 000 g 离心 3 min, 取 1 μ L 上清液与 1 μ L 基质充分混匀后加样 384 孔靶板, MALDI-TOF MS 仪进行分析。质谱仪采用线性正性模式, 采集区间 140 质荷比(m/z)至 600 m/z , 仪器主要参数: pulsed ion extraction delay of 160 ns, ion source voltage 1,19 kV, ion source voltage 2, 16.7 kV, and ion source lens voltage 8.5 kV。基质 2,5-二羟基苯甲酸(155.03 Da)和美罗培南(384.071 Da)进行仪器校准。质谱图谱采用 flexAnalysis 3.3 软件进行分析。每次实验以 30 μ L 美罗培南及 10 μ L 0.045% NaCl 混合溶液为阴性对照。

1.4 统计学处理 ClinProTool 软件分析各质谱峰的 ROC 曲线, SPSS16.0 软件进行统计学分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细菌鉴定、药敏和耐药基因检测 MALDI-TOF MS 鉴定结果与保存菌株名称一致。泛耐药鲍曼不动杆菌对美罗培南和亚胺培南均耐药, 且全部携带 OXA-23 基因。敏感组鲍曼不动杆菌均不携带 OXA 基因。

2.2 MALDI-TOF MS 分析 美罗培南 0.045% NaCl 溶液的质谱峰包含 3 个, 分别为 384 m/z , 以及含一或两个钠原子的峰 406 m/z , 428 m/z 。110 株碳青霉烯类敏感鲍曼不动杆菌及敏感的标准菌株的质谱峰与阴性对照完全一致。肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705, 嗜麦芽窄食假单胞菌的 384 m/z 峰消失, 出现了水解产物及水解脱羧产物的峰, 包括 358 m/z , 380 m/z , 402 m/z , 424 m/z , 446 m/z , 468 m/z 。125 株鲍曼不动杆菌的质谱图为不完全水解图, 质谱峰为 358 m/z , 380 m/z , 402 m/z , 406 m/z , 424 m/z , 428 m/z , 446 m/z , 468 m/z 。

2.3 统计学分析 质谱仪的 ClinProTool 软件分析 358 m/z 质谱峰与 380 m/z 质谱峰的 ROC 曲线下面积(AUC)均为 0.99, 见图 1。判断标准设定为, 水解反应后质谱峰出现 358 m/z , 380 m/z 即可判断为产 OXA-23 鲍曼不动杆菌, MALDI-TOF MS 检测方法的灵敏度及特异度均为 100%。McNemar test 显示 MALDI-TOF MS 检测方法与测序法之间高度一致($P=1.000$)。

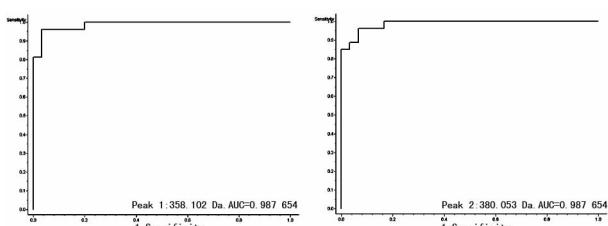


图 1 敏感组鲍曼不动杆菌与泛耐药鲍曼不动杆菌比较(质谱峰 358 m/z 与 380 m/z 的 ROC 曲线)

3 讨 论

MALDI-TOF MS 是近几年发展起来的新技术, 已有文献报道应用 MALDI-TOF MS 检测碳青霉烯酶的活性^[9-10], 但不同研究报道的质谱图不尽相同, 需要进行更多菌株的检测及检

测条件的优化。MALDI-TOF MS 检测碳青霉烯酶活性的原理是碳青霉烯类抗菌药物的 β 内酰胺酶被细菌产生的碳青霉烯水解, 导致碳青霉烯类抗菌药物相对分子质量增加 18 \times 10³, 某些环境下, 水解产物会直接脱羧, 引起相对分子质量减少 44 \times 10³。碳青霉烯类抗菌药物的羟基会与盐溶液中的 Na 结合导致相对分子质量增加 22 Da。通过质谱监测碳青霉烯类抗菌药物相对分子质量的变化, 即可准确鉴定产碳青霉烯酶细菌。本研究应用 MALDI-TOF MS 检测 125 株泛耐药鲍曼不动杆菌碳青霉烯酶活性。同时, 选择国内最常用的碳青霉烯类抗生素美罗培南作为检测靶标。因为美罗培南的降解产物质谱峰 380 m/z 与常用质谱基质 α -氰-4-羟基苯丙烯酸质谱峰 379 m/z 重叠而干扰结果分析, 所以研究中选择了 2,5-二羟基苯甲酸作为基质。

110 株敏感菌株与美罗培南 0.045% NaCl 溶液孵育后, 质谱峰与阴性对照完全相同, 分别为 384 m/z , 以及含 1~2 个钠原子的峰 406 m/z , 428 m/z 。125 株泛耐药鲍曼不动杆菌与美罗培南 0.045% NaCl 溶液孵育后, 质谱峰与阳性对照肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705, 嗜麦芽窄食假单胞菌的质谱峰有一些区别, 表现为不完全水解, 包括 358 m/z , 380 m/z , 402 m/z , 406 m/z , 424 m/z , 428 m/z , 446 m/z , 468 m/z 。其中美罗培南质谱峰消失, 虽然出现了水解产物及水解脱羧产物的峰, 但是仍然存在美罗培南的钠离子合物的质谱峰。此现象也证实了 OXA-23 水解碳青霉烯类抗生素的能力较 KPC 和金属酶弱。Poirer 等^[11] 报道 11 100 mmol/L NaCl 能抑制 OXA-23 的水解活性, 所以本研究中尽量降低 NaCl 的浓度至 20 mmol/L, 来降低抑制作用, 保证 OXA-23 能更快的水解美罗培南。Kempf 等^[12] 研究了 MOLDI-TOF MS 检测鲍曼不动杆菌碳青霉烯类耐药, 结果也显示了鲍曼不动杆菌与亚胺培南在体外孵育 2 h, 不能完全水解亚胺培南, 其碳青霉烯耐药的判断标准为亚胺培南与其代谢产物质谱峰面积比值, 其质谱检测结果的判断繁琐。本研究应用质谱仪的 ClinProTool 软件分析各个峰的 ROC 曲线显示 358 m/z 质谱峰与 380 m/z 质谱峰的 ROC 曲线下面积(AUC)均为 0.99, 表明无论不完全水解的质谱图多么复杂, 只要水解反应后出现了质谱峰 358 m/z 与 380 m/z , 即可判断鲍曼不动杆菌产 OXA-23, 此时统计学分析也显示检测灵敏度及特异度均为 100%。McNemar test 显示 MALDI-TOF MS 检测方法与测序法之间高度一致($P=1.000$)。

本研究采用 MOLDI-TOF MS 鉴定细菌并检测 OXA-23, 全程仅需要 3 h, 与传统微生物及分子生物学检测相比, 有很大的优势。因为本研究中只能获得产 OXA-23 的鲍曼不动杆菌, 所以没有检测产其他碳青霉烯酶的鲍曼不动杆菌, 需要进一步研究。

MOLDI-TOF MS 操作简单、成本低, 能快速准确地检测产 OXA-23 鲍曼不动杆菌。虽然此方法只能检测碳青霉烯酶, 不能检测其他耐药机制, 但是 MOLDI-TOF MS 仍然是临床微生物实验室非常有应用前景的耐药检测方法。

参考文献

- [1] Cao J, Song W, Gu B, et al. Correlation Between Carbapenem Consumption and Antimicrobial Resistance Rates of Acinetobacter baumannii in a University-Affiliated Hospital in China[J]. J Clin Pharmacol, 2013, 53(1): 96-102.
- [2] Heritier C, Poirer L, Lambert T, et al. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in

- Acinetobacter baumannii[J]. Anti Agents Chem, 2005, 49(8): 3198-3202.
- [3] Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12(9): 826-836.
- [4] Gur D, Korten V, Unal S, et al. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing Acinetobacter baumannii: report from the Turkish SENTRY Program sites[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(12): 1529-1532.
- [5] He C, Xie Y, Fan H, et al. Spread of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii of European clone II in Western China[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 38(3): 257-260.
- [6] Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, et al. Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(5): 2241-2245.
- [7] Bessede E, Angla-Gre M, Delagarde Y, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization biotyping: experience in the routine of a University hospital[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(4): 533-538.
- [8] Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, et al. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant Acinetobacter baumannii isolates from Iraq and Georgia[J]. Int J Anti Agents, 2011, 38(2): 164-168.
- [9] Hrabak J, Studentova V, Walkova R, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2441-2443.
- [10] Burekhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3321-3324.
- [11] Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases[J]. Antimicrob Agents Chem, 2010, 54(1): 24-38.
- [12] Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. PLoS one, 2012, 7(2): e31676.

(收稿日期:2013-03-19)

• 检验技术与方法 •

改变离心条件制备乏血小板血浆凝血试验结果比较

王 贞¹, 靳 岩¹, 马晓露¹, 潘佳星¹, 杨 冬^{2△}

(大连医科大学附属第一医院:1. 检验科;2. 消化内科,辽宁大连 116011)

摘要:目的 探讨增加离心速度减少离心时间制备乏血小板血浆检测凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血酶原时间(APTT)和纤维蛋白原(FIB)的结果是否与标准操作步骤具有可比性。方法 共收集 40 例健康体检者的新鲜血液标本,平均分成两份。使用同台离心机,分别以 3 000 r/min 离心 10 min,4 000 r/min 离心 5 min,离心分离血浆,使用同台全自动凝血分析仪测定 PT、APTT 和 FIB,并对结果进行统计学分析和差异性比较。结果 4 000 r/min 离心 5 min 的 PT、INR 测定结果与 3 000 r/min 离心 10 min 比较,差异无统计学意义($P>0.05$);4 000 r/min 离心 5 min 的 APTT、FIB 测定结果与 3 000 r/min 离心 10 min 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。相关回归分析显示两种离心方法显著相关,PT、APTT、FIB 的相关系数分别为 0.975、0.981、0.996。新离心条件下 PT、APTT、FIB 检测结果临床可接受性能的评价均为全部接受。结论 可用 4 000 r/min 离心 5 min 的离心方法替代 3 000 r/min 离心 10 min,以达到快速向临床提供准确凝血检验报告的目的,具有较高的临床应用价值。

关键词:凝血试验; 离心速度; 离心时间; 结果比对

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2589-03

凝血试验已广泛应用于出血与血栓性疾病的诊断、抗凝药剂量的监测以及溶栓治疗^[1],准确的凝血试验检测结果对疾病的诊断和治疗均具有重要意义。《全国临床检验操作规程》(第 3 版)要求:凝血试验标本的离心速度为 3 000 r/min,离心时间为 10~15 min 以得到乏血小板血浆^[2]。但是日益增长的样本量使样本预处理花费了很多时间,特别是急诊手术时,需要快速准确地向临床提供检验报告,以争取患者的最佳抢救时间。因此作者试图探讨增加离心速度、减少离心时间制备乏血小板血浆,比较这种样本制备方法对 APTT、PT、FIB 测定结果是否有影响,以寻求快捷合适的离心条件处理临床标本。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 10 月 15 日至 2012 年 10 月 27 日大连医科大学附属第一医院健康体检及住院患者新鲜血液或血浆标本共 80 例。

1.2 仪器与试剂 CA-6000 全自动血凝分析仪, XE-5000 全

自动血细胞分析仪, LEGEND MACH 1.6 高速离心机。所用试剂均为 SIEMENS 公司、SYSMEX 公司配套质控物和试剂。

1.3 方法

1.3.1 离心方法 将经枸橼酸钠抗凝的新鲜血液样本,充分混匀后,吸出约 1 mL 到洁净塑料试管中,使其变成两份相同的血液样本,一份为标准离心条件:离心速度为 3 000 r/min,离心时间为 10 min;另一份改变离心条件:离心速度为 4 000 r/min,离心时间为 5 min。

1.3.2 凝血项目的测定 CA6000 全自动血凝分析仪采用散射比浊法;不同水平的 SIEMENS 质控物均按日常标本操作,测定 1 次/d。质控在控后选择新鲜血浆 8 份,连续收集 5 d,共 40 份标本。测定其标准离心条件下和增加离心速度减少离心时间条件下,血浆样本 PT、APTT、FIB 的值。保证在相同条件下完成检测。

1.3.3 血小板的测定 使用 XE-5000 全自动血细胞分析仪,