生儿败血症的首选药物。有文献报道应用喹诺酮类药物经长期随访未发现存在关节及软骨损害及影响生长发育[5]。在新生儿权衡利弊后可选用[6]。万古霉素因不良反应较大，较少用于新生儿。氨基糖类由于耳毒性而在新生儿禁用。本地新生儿败血症治疗中，第 3 代头孢、加酶半合成青霉素、喹诺酮类、利福平等仍为敏感抗生素，可据病原菌及药敏结果选用。

新生儿败血症临床表现因无特异性，难以和其他疾病鉴别。对早产、羊水污染、胎膜早破 12 h 以上、有插管、体温不稳定等危险因素及有感染性基础疾病时需及时行血培养以确诊，并根据药敏选择敏感抗生素，足量、足疗程使用抗生素，避免因抗生素不规范应用，耐药菌株迅速产生[7]。

参考文献：

[1] 金汉珍，黄德珉，官希吉. 实用新生儿学[M]. 3 版. 北京：人民卫生出版社，2002：267.

[2] 段荣，余晓君. 2248 例儿童血培养阳性致病菌分布特征[J]. 实用儿科杂志，2001，16(2)：92.

[3] 张铮，潘小梅. 新生儿败血症血培养菌株近 10 年变迁及耐药分析[J]. 临床儿科杂志，2002，20(5)：266.

[4] 霍晓慧，赵宏. 新生儿败血症 104 例临床分析[J]. 现代医用影像学，2009，18(2)：121.

[5] 李梅，董力杰，崔晓梅，等. 新生儿败血症血培养检出菌 13 年变迁及其药敏试验结果变化[J]. 临床儿科杂志，2003，21(2)：85.

[6] 余加林，吴仕孝. 新生儿感染的耐药问题[J]. 中国实用儿科杂志，2002，17(3)：135.

[7] 朱敏，郑龙，陈金妮，等. 晚发型新生儿败血症院内感染和社区感染的病原菌对比分析[J]. 中华儿科杂志，2008，46(2)：124.

(收稿日期：2010-06-04)

·经验交流·

原料乳中三聚氰胺和 β-内酰胺酶检测快速筛选法与确证方法比对研究

罗　祎[1]，宋　洋[1]，薛晓晶[1]，舒翠莉[2]，田世民[1]，仲维科[1]

(1. 中国检验检疫科学研究院综合检测中心，北京 100123；
2. 爱德士缅因生物制品贸易(上海)有限公司，上海 200336)

摘　要：目的　对原料乳中三聚氰胺检测的液质确证方法与快速筛选方法进行比对验证。**方法**　SNAP 双流向酶联免疫法快速检测还原乳中的三聚氰胺。**结果**　其最低检出限达到 0.10 mg/kg，还原乳中三聚氰胺浓度与 SNAP 读数仪读数呈显著正相关(r^2=0.986)。同时通过对原料乳中 β-内酰胺酶加标试样的比对快速筛选方法与微生物法(杯碟法)完全相符，且二者最低检出限均可达到 0.000 25 IU/mL。**结论**　双流向酶联免疫法可以用于原料乳中非法添加的三聚氰胺和 β-内酰胺酶的快速筛选，其检测速度和灵敏度均能满足奶户、奶站、乳品厂和部分实验室的快速筛选检测，但是其使用目前还仅限于原料乳或原料乳粉。

关键词：三聚氰胺；β-内酰胺酶；检测方法

doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.053

中图分类号：R446.61；R155.57　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1671-8348(2010)21-2967-03

为保障消费者的身体健康，保持乳品行业的健康发展，建立牛乳制品中三聚氰胺、β-内酰胺酶的快速、准确和行之有效的检测方法是十分必要的。

1　材料与方法

1.1　材料　藤黄微球菌(micrococcus luteus)CMCC(B)28001(购自国家医学菌种保藏管理中心)，在营养琼脂上传代培养备用。实验用 10 U 青霉素药敏纸片(购自北京天坛药物生物技术开发公司)；乙酸、乙酸铵等(购自北京试剂公司)；舒巴坦、青霉素 G(购自中国药品生物制品检定所)；β-内酰胺酶标准品(1 kIU)(购自 Sigma 公司)；三聚氰胺、β-内酰胺酶 SNAP 双流向酶联免疫试剂盒[购自爱德士缅因生物制品贸易(上海)有限公司]。

1.2　仪器　液相色谱-质谱/质谱仪(LC-MS/MS)(Agilent 6410)；SNAP 加热器(北京安普公司)；SNAP DSR 读数仪[爱德士缅因生物制品贸易(上海)有限公司]。

1.3　方法

1.3.1　还原乳配制　称取 235.3 g 工业奶粉(经 LC-MS/MS 确证为无三聚氰胺，无 β-内酰胺)，溶解于 2 000 mL 温水中；三聚氰胺还原乳试样的配制：取 100 mg/kg 三聚氰胺标准保存液(本实验室配制并经 LC-MS/MS 确认浓度为 100 mg/kg)各 0、0.1、0.3、1、2、2.5 mL，分别加入 100 mL 还原乳中，配制为各含 0.0、0.1、0.3、1.0、2.0、2.5 mg/kg 的还原乳试样。β-内酰胺酶还原乳试样的配制：将 Sigma 的青霉素酶 1 kIU 溶于 1 mL 缓冲液中(0.1 mol/L Tris HCl，pH 7.0，含有 0.1% BSA)得到 1 000 IU/mL 的青霉素酶。取 10 L 1 000 IU/mL 的青霉素酶加入 1 mL 还原乳中配制成 10 IU/mL 的青霉素酶，再取 10 L 1 000 IU/mL 的青霉素酶加入 1 mL 还原乳中配制成 0.1 IU/mL 的青霉素酶；取 0.1 IU/mL 的青霉素酶各 0、0.25、0.5、1 mL，分别加入 100 mL 还原乳中，配制为各含 0、0.000 25、0.000 5、0.001 IU/mL 的还原乳试样。

1.3.2　液相色谱-质谱/质谱法检测还原乳中三聚氰胺含量，参照 GB/T 22388-2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法。

1.3.3　SNAP 双流向酶联免疫法快速检测还原乳中的三聚氰胺　按试剂盒说明书操作，用配套吸管吸取 45 050 L 待检奶样滴入装有冻干试剂的试管中，充分晃动混匀，在预热到(45±5)℃的加热器上孵育样品 2 min，将样品管中的所有液体倒入 SNAP 样品孔中后。倒入的样品孔中的样品会流向蓝色的激活圈。当蓝色的激活圈开始消失时，快速而有力的压下操作键直至其与 SNAP 盒体齐平。当操作正确时会听到清晰的“啪”的声音。保温至少 7 min。读数仪读数大于 1.05 为阴性；读数仪读数小于 1.05 为阳性。

1.3.4　杯碟法检测还原乳中 β-内酰胺酶

1.3.4.1 加样 取待检还原乳样品，按表 1 顺序加入终浓度为 0.5 g/mL 青霉素 G、25 g/mL 舒巴坦和 0.5 IU/L 的阳性对照用 β-内酰胺酶，并将表 1 中 A～D 试样各 200 μL 放置于加有藤黄微球菌的同一抗生素检测用培养基上的 4 个 8 mm 钢管中，37 ℃培养 18～22 h，测量抑菌圈直径。每个试样重复测试 3 遍后取平均值，同时做牛奶试样的空白对照、25 g/mL 舒巴坦对照，见表 1。

1.3.4.2 牛奶试样中 β-内酰胺酶检测结果判定 (1)如果待检还原乳试样空白对照在加有藤黄微球菌的抗生素检测用培养基上出现抑菌圈，说明该试样中含有抗菌物质。(2)25 μg/mL 舒巴坦对 0.5 g/mL 青霉素 G 的抑菌作用没有影响；同时 25 g/mL 舒巴坦可有效抑制 0.5 IU/L β-内酰胺酶阳性对照样品对 0.5 g/mL 青霉素 G 的分解作用。(3)在待检还原乳试样中，如果添加 0.5 g/mL 青霉素 G 的抑菌圈与添加 0.5 g/mL 青霉素 G 和 25 g/mL 舒巴坦试样的抑菌圈差异在 3 mm 以上(含 3 mm)，且重复性良好，应判定该试样添加有内酰胺酶。(4)在待检还原乳试样中，如果添加 0.5 g/mL 青霉素 G 试样的抑菌圈与添加 0.5 g/mL 青霉素 G 和 25 g/mL 舒巴坦试样的抑菌圈差异在 3 mm 以下(不含 3 mm)，且重复性良好，应判定在该试样品未检出 β-内酰胺酶。(5)经测试，本方法在牛奶试样中对 β-内酰胺酶的检出限为 0.5 IU/L。

表 1 杯碟法加样方法

编号	杯碟法加样方法
A	还原乳待检试样＋0.5 g/mL 青霉素 G
B	还原乳待检试样＋25 g/mL 舒巴坦＋0.5 g/mL 青霉素 G
C	含 0.5 IU/L β-内酰胺酶阳性对照奶样＋0.5 g/mL 青霉素 G
D	含 0.5 IU/L β-内酰胺酶阳性对照奶样＋25 g/mL 舒巴坦＋0.5 g/mL 青霉素 G

1.3.5 SNAP 双流向酶联免疫间接法快速检测还原乳中的 β-内酰胺酶 按试剂盒说明书操作将 1 mL 或 1.5 mL 待检还原乳奶样加入 β-内酰胺酶检测试剂瓶中，充分混匀溶解试剂瓶中的干燥粉剂。将加入样品后的 β-内酰胺酶试剂瓶置于加热器上(45±5)℃、(113±9)°F 孵育 20 min，然后于室温下放置 10 min，β-内酰胺酶 SNAP 操作步骤进行检测。用配套吸管吸取(450±50)μL 试剂瓶中奶样滴入装有冻干试剂的试管中，充分晃动混匀，在预热到(45±5)℃的加热器上孵育样品 5 min，将样品管中的所有液体倒入 SNAP 样品孔中后。倒入的样品孔中的样品会流向蓝色的激活圈。当蓝色的激活圈开始消失时，快速而有力的压下操作键直至其与 SNAP 盒体齐平。当操作正确时会听到清晰的“啪”的声音。保温至少 4 min。读数仪读数大于 1.05 为 β-内酰胺酶阴性；读数仪读数小于或等于 1.05 为 β-内酰胺酶阳性。

1.4 统计学方法 统计学方法采用 SPSS13.0 统计软件。

2 结 果

2.1 液相色谱-质谱/质谱法检测还原乳中三聚氰胺含量 该方法检出限为 0.01 mg/kg，经确认所配置的含三聚氰胺还原乳试样中三聚氰胺实际浓度分别为 0.00、0.10、0.27、0.89、1.72 mg/kg 和 2.37 mg/kg。

2.2 SNAP 双流向酶联免疫法快速检测还原乳中的三聚氰胺 还原乳中不含三聚氰胺时，20 次 SNAP 检测读数均小于 1.05，均为阴性结果；当还原乳中含有 0.10 mg/kg 的三聚氰胺时，20 次 SNAP 检测均小于 1.05 为阴性结果，但读数均较不含三聚氰胺组明显增加，其差异有统计学意义($P<0.01$)；当还原乳中含有 0.27、0.89、1.72、2.37 mg/kg 的三聚氰胺时，20 次 SNAP 检测读数均大于 1.05 全部为阳性结果，与不含三聚氰胺组比较差异有统计学意义($P<0.01$)，见表 2；另外，0.00、0.10、0.27、0.89、1.72、2.37 mg/kg 各组间的读数差异有统计学意义($P<0.01$)。还原乳中三聚氰胺浓度与 SNAP 读数仪读数呈正相关关系，见图 1。

表 2 SNAP 双流向酶联免疫法快速检测还原乳中的三聚氰胺(mg/kg)

三聚氰胺浓度	0.00	0.10	0.27	0.89	1.72	2.37
SNAP 读数平均值	0.71	0.90	1.21	1.93	2.19	2.61
SNAP 读数标准差	0.05	0.05	0.09	0.31	0.30	0.40

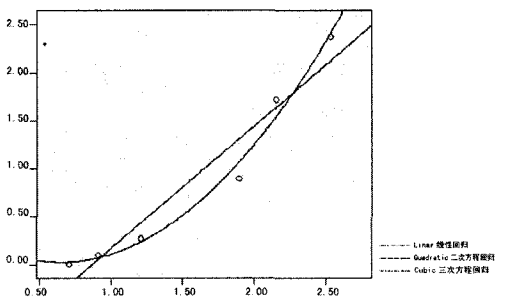


图 1 三聚氰胺浓度与 SNAP 读数仪读数

2.3 杯碟法检测还原乳中 β-内酰胺酶 经杯碟法检测表明所配制的各含 0.000 25、0.000 5、0.001 IU/mL β-内酰胺酶的还原乳试样均为 β-内酰胺酶阳性检出，见封 2 图 2。

2.4 SNAP 双流向酶联免疫间接法快速检测还原乳中的 β-内酰胺酶 还原乳中 0 IU/mL β-内酰胺酶时，15 次 SNAP 检测读数均大于 1.05，均为阴性结果；当还原乳中含有 0.000 25 IU/mL β-内酰胺酶时，15 次 SNAP 检测中 6 次读数大于 1.05 为阴性，9 次读数小于 1.05 为阳性；当还原乳中含有 0.000 5 IU/mL 和 0.001 IU/mL β-内酰胺酶时，各组的 15 次 SNAP 检测读数均小于 1.05，均为阳性结果，见表 3。

表 3 SNAP 双流向酶联免疫间接法快速检测还原乳中的 β-内酰胺酶

β-内酰胺酶浓度	读数仪读数	阴性例数	阳性例数
0 IU/mL			
1 mL	—	—	—
1.5mL	1.753	20	0
0.000 25 IU/mL			
1 mL	0.927	6	9
1.5 mL	0.822	0	20
0.000 5 IU/mL			
1 mL	0.806	0	20
1.5 mL	0.740	0	20
0.001 IU/mL			
1 mL	0.718	0	20
1.5mL	0.792	0	20

—：未做实验。

3 讨　论

3.1 2008 年 10 月 8 日，中国卫生部等 5 个部门联合发布公告，制定三聚氰胺在乳与乳制品中的临时管理值：要求婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 1 mg/kg；液态奶（包括原料乳）、奶粉、其他配方乳粉中三聚氰胺的限量值为 2.5 mg/kg；含乳 15%以上的其他食品中三聚氰胺的限量值为 2.5 mg/kg。在三鹿婴幼儿奶粉事件发生后，国家标准化管理委员会制定了《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》国家标准。标准规定了高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱/质谱法 3 种方法为三聚氰胺的检测方法，检测定量限分别为 2、0.05 和 0.01 mg/kg。上述方法均为定量的确证方法，其可以普遍使用于各类检测实验室，对于奶户、奶站、乳品厂和不具备大型检测仪器的实验室可以选用适宜的快速筛选方法。通过本次实验验证，SNAP 双流向酶联免疫法快速检测还原乳中的三聚氰胺，当还原乳中三聚氰胺浓度达到 0.27 mg/kg 时，SNAP 双流向酶联免疫法能够检出所有阳性样品，其最低检出限能够达到 0.10 mg/kg，符合目前大部分乳品厂对原料奶三聚氰胺含量在 0.3 mg/kg 以下的控制要求，还原乳中三聚氰胺浓度与 SNAP 读数仪读数呈显著正相关关系（$r^2=0.986$）。因此，采用筛选方法检测乳品中三聚氰胺，当检到阳性或可疑样品后，再用液相/质谱或气相/质谱方法确认，从而节约大量的时间和人力。

3.2 目前国际上尚无牛奶中 β-内酰胺酶的标准检测方法，而市面上的抗生素分解剂原液中的 β-内酰胺酶浓度均在每毫升微克级[1]，而其推荐在牛奶中 1∶1 000 000 稀释使用，这一低使用浓度限制了 β-内酰胺酶直接检测方法的使用，如酶联免疫方法、高效液相色谱法及蛋白杂交等方法。尽管多种微生物可以产生 β-内酰胺酶，但到目前为止还没有在无人为添加 β-内酰胺酶的牛奶中检出 β-内酰胺酶的报道[2]。究其原因可能是由于采奶方式、牛奶的组分、消毒方法和包装储存方法等不适于产 β-内酰胺酶微生物的生存，基于目前已有的知识，应认为牛奶中检出的 β-内酰胺酶是人为添加的。为了应对这一特殊情况的出现，本实验室按卫生部推荐的微生物法（即杯碟法）检测牛奶中 β-内酰胺酶，经长时间的反复摸索实验条件和验证，最终建立了稳定、可靠的 β-内酰胺酶微生物法（杯碟法）检测方法，最低检出限达到 0.000 25 IU/mL，灵敏度为 0.000 5 IU/mL。该方法可用于确认乳制品中 β-内酰胺酶的存在。同时 SNAP 双流向酶联免疫间接法快速检测还原乳中的 β-内酰胺酶，并平行比较微生物（杯碟法）和 SNAP 间接法的精确度和灵敏度，结果表明二者的检出下限均可达到 0.000 25 IU/mL。因此采用快速筛选法进行筛选，阳性或可疑样品再使用微生物（杯碟法）进一步确认。

参考文献：

[1] 崔生辉，李景云，马越，等. “生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测[J]. 中国食品卫生杂志，2007，19(2)：113.

[2] Samaha-Kfoury JN，Araj GF. Recent developments in β-lactamases and extended spectrum β-lactamases[J]. BMJ，2003，327(7425)：1209.

（收稿日期：2010-03-24）

·经验交流·

一种快速冷冻切片方法制作小鼠眼球切片

彭周贵

（重庆医科大学附属第一医院眼科　400016）

摘　要：目的　快速制作小鼠眼球切片。**方法**　OCT 包埋，用液氮快速冷冻，切片后 HE 染色。**结果**　制片时间较快，眼球壁结构完整，视网膜各层次清晰，无冰晶形成。**结论**　快速冷冻切片方法能快速制作高质量的切片。

关键词：眼球；冷冻切片；小鼠

doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.054

中图分类号：R322.91；R361.2　　**文献标识码：**B　　**文章编号：**1671-8348(2010)21-2969-01

眼球壁是眼球的重要结构，从外向内分为巩膜、色素膜和视网膜 3 层。制作完整的眼球组织切片，常用火棉胶包埋和使用固定液固定后切片。因冷冻切片操作简单，效果比较理想，大多数研究者常用其做免疫组化和免疫荧光。本文介绍一种简单、快速的冷冻切片方法供大家参考。

1 材料与方法

1.1 材料　LeicaCM1900 冷冻切片机（德国 Leica 公司），C57 小鼠，OCT（日本樱花公司）液氮等。

1.2 方法

1.2.1 取材　用断颈处死法处死小鼠，立即用弯镊子取出眼球，快速将周围肌肉剔除。

1.2.2 包埋　把剔好的眼球放入准备好的 OCT 里，尽量让眼轴与水平面平行。将包埋框放入装有快速冷冻液的杯子里面，把杯子放入液氮里快速冷冻，1～2 min 即可取出。

1.2.3 切片　将处理好的 OCT 块固定到载物台上，选择 10 μm 厚度切片。

1.2.4 固定　将切好的切片放入 4 ℃冷丙酮中，固定 10 min，取出，晾干。

1.2.5 染色与封片　取出固定好的切片，用自来水清洗 30 s；苏木精染色 2 min，水洗；在 1%盐酸乙醇（70%）分化 2～3 s，水洗；饱和碳酸锂蓝化数秒，伊红[1]染色 1 min，75%～100%梯度乙醇各脱水 1 min，二甲苯透明，中性树胶封片。镜下观察结果。

2 结　果

以上方法快速冷冻切片，操作简单，耗时较短。一个标本从切片到封片只需 10～15 min。无冰晶形成，无脱片现象。HE 染色（封 2 图 1、2），细胞核呈蓝色，细胞质呈桃红色，眼球壁外面染色较内膜深，色素膜染色较浅。眼（下转第 2987 页）

自然流产患者蜕膜组织疾病特异蛋白的初步筛选与鉴定

（见正文第 2861 页）

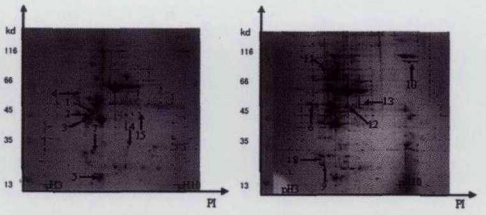


图 1　蜕膜组织总蛋白 2-DE 图谱（左：实验组；右：对照组）

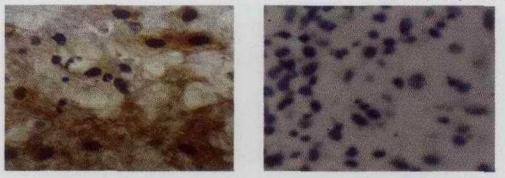
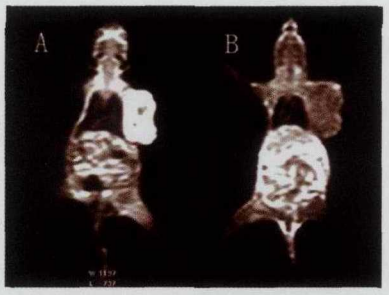


图 3　免疫组化检测膜联蛋白 A5 在子宫蜕膜组织中的表达（左：实验组；右：对照组）

磁共振对比剂 Gd-DTPA-DG 的制备及动物实验研究

（见正文第 2866 页）



实验组尾静脉注射对比剂 Gd-DTPA-DG 30 min 后，在冠状位可见明显肿瘤强化（A）；对照组尾静脉注射对比剂 Gd-DTPA（B）5 min 后，冠状位可见肿瘤轻度强化。

图 2　两组功能对比剂注入裸鼠后显像图

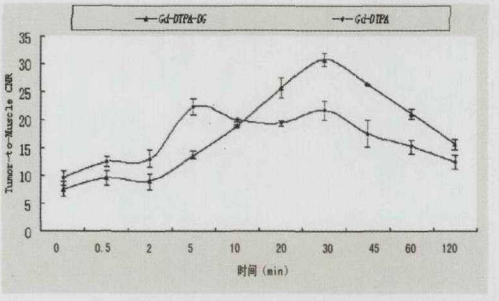
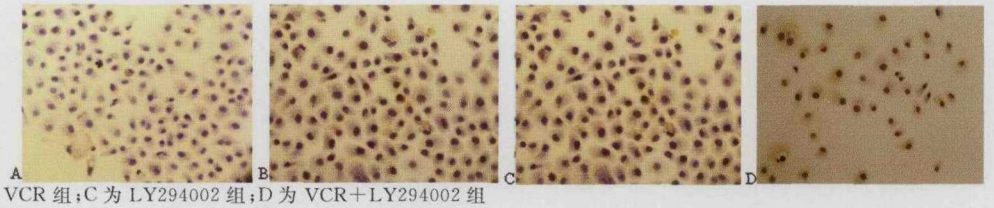


图 3　实验组和对照组平扫及各延迟点注射对比剂后瘤体与肌肉对比度信噪比 CNR 值变化曲线

LY294002 对 SGC7901/VCR 细胞 VCR 耐药逆转作用研究

（见正文第 2875 页）



A 为对照组；B 为 VCR 组；C 为 LY294002 组；D 为 VCR＋LY294002 组

图 3　药物处理对 SGC7901 及 SGC7901/VCR 细胞凋亡的影响

原料乳中三聚氰胺和 β-内酰胺酶检测快速筛选法与确证方法比对研究

（见正文第 2967 页）

A：还原乳待检试样＋ 0.5 μg/mL 青霉素 G；B：还原乳待检试样＋ 25 μg/mL 舒巴坦 ＋ 0.5 μg/mL 青霉素 G；C：含 0.5 IU/L -内酰胺酶阳性对照奶样 ＋ 0.5 μg/mL 青霉素 G；D：含 0.5 IU/L -内酰胺酶阳性对照奶样 ＋ 25 μg/mL 舒巴坦＋0.5 μg/mL 青霉素 G。

图 2　杯碟法检测还原乳试样的中 β- 内酰胺酶

一种快速冷冻切片方法制作小鼠眼球切片

（见正文第 2969 页）

图 1　正常 C57 小鼠眼球切片染色（10 μm，10×20）

图 2　正常 C57 小鼠眼球切片染色（10 μm，10×40）