• 论 著 •

下呼吸道肺炎克雷伯菌感染诊断与痰液半定量培养 细菌数量的相关研究*

陈旭, 杨肇立, 周文, 李俊如, 李键, 杨锦云, 任萍, 黄静

(四川省凉山州第一人民医院检验科 615000)

摘要:目的 探讨自然咳出痰标本半定量培养 12 级法筛检肺炎克雷伯菌的指标。方法 每份痰标本均同时涂片和接种。涂片观察标本质量,以白细胞吞噬菌或白细胞浓集区域优势菌为拟分离菌;培养采用半定量 12 级法。查阅 2005 年 6 月 1 日至 2010 年 5 月 31 日住院患者痰内筛检出肺炎克雷伯菌者病历,统计分析首次培养的细菌数量、标本质量与出院诊断的关系。结果 白细胞吞噬菌的确存在,但阳性率不高;肺炎克雷伯菌 131 株,其首次培养的相对数量为 0.1、 ≥ 0.2 的阳性率分别为 52.78%、66.31%;两者确诊率比较, $\chi^2=5.24, 0.05 < P < 0.1$ 。首次培养的标本质量为 A/B 级、C 级的阳性率分别为 64.77%、58.14%;两者确诊率比较, $\chi^2=0.54, P > 0.25$ 。结论 按规定要求采集自然咳出痰标本,若其半定量 12 级法培养出涂片拟分离菌对应性肺炎克雷伯菌的相对数量大于该菌口咽部平均携带数量时,应作药敏实验并报告医师。

关键词:克雷伯菌,肺炎; 呼吸道感染; 痰半定量培养; 细菌数量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1033-02

Investigation of the correlation of diagnosis of klebsiella pneumoniae infection in lower respiratory tract and the bacteria quantity confirmed by semi-quantitative culture of sputum*

Chen Xu, Yang Zhaoli, Zhou Wen, Li Junru, Li Jian, Yang Jinyun, Ren Ping, Huang Jing

(The First Hospital of Liangshan Prefecture, Sichuan 615000, China)

Abstract: Objective To explore the indexes of naturally expectorated sputum cultured by the "semi-quantitative 12 order method" to screening the infection of klebsiella pneumoniae(Kp). **Methods** Smear and inoculation test were performed for each sputum sample at the same time. The quality of samples were confirmed by smear test, and the bacteria phagocytized by white blood cells or the dominant bacteria in the white blood cells centralized region were isolated. The inoculated sputum samples were cultured by "semi-quantitative 12 order method". The case history of patients, sputum samples of whom were detected with Kp from June 1, 2005 to May 31, 2010. Then the relationship of the bacteria quantity in the sputum samples at the first time of culture, the quality of samples and the diagnosis of patients. **Results** The bacteria phagocytized by white blood cells were detected, but the positive rate was not high. There were total 131 strains of Kp. The positive rate of relative number of 0.1 and ≥ 0.2 were 52.78% and 66.31%, at the first time of culture and there was no significant difference between them ($\chi^2=5.24, 0.05 < P < 0.1$). The positive rate of samples at grade A/B and C were 64.77% and 58.14% respectively, and there was no significant difference between them ($\chi^2=0.54, P > 0.25$). **Conclusion** In the qualified naturally expectorated sputum samples, if Kp, which cultured by "semi-quantitative 12 order method", is according to the smear, and its quantity is more than the average carrying quantity in pars oralis pharyngis, susceptibility test should be performed.

Key words: klebsiella pneumoniae; respiratory tract infections; semi-quantitative culture of sputum; total bacteria amount

肺炎克雷伯菌为周围环境及人肠道长居菌群,是常见的机会致病菌,更是医院感染的重要病原菌,在呼吸道感染中尤为突出^[1-2]。如何准确识别自然咳出痰等下呼吸道分泌物中的机会致病性感染菌,却是一大难题。影响痰培养准确、可靠的因素众多且不易控制,因此本院的痰标本细菌学检验一直定位于“筛查”,并明确告知临床医护人员和患者。现将痰内肺炎克雷伯菌半定量培养 12 级法数量与出院诊断的关系报道如下。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 2005 年 6 月 1 日至 2010 年 5 月 31 日住院患者中,痰液半定量 12 级法培养首次筛检出肺炎克雷伯菌数量大于该菌口咽部平均携带数量的全部患者病历 131 份。

1.2 标准菌株 流感嗜血杆菌(ATCC49247)、肺炎链球菌(ATCC49619)、大肠埃希菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)。

1.3 仪器及试剂 新加坡艺思科 AC2-E 2 级生物安全柜、美

国 THERMO FORMA 311 二氧化碳培养箱、美国德灵 MicroScan-Walk Away 40SI 自动微生物鉴定及药敏测试系统等。有效期内贝瑞特公司无菌培养基、MicroScan 阴性复合 31 型检测板等。

1.4 方 法

1.4.1 涂片和培养 用药前,采集漱洗口咽部 3 次后用力从气管深处咳出的第一口痰液,挑选肉眼观察合格标本内的可疑病理成分,同时涂片和接种。涂片革兰染色,油镜观察,按《全国临床检验操作规程》2 版判定 A、B、C 级,以白细胞吞噬菌或白细胞浓集区域的优势菌为拟分离菌^[3-4]。培养采用半定量 12 级法:3~5 区划线接种,35℃培养 1~2 d 观察,于菌落散在区域计数 100 个,按各种菌落的相对数量判定结果。若某菌于各个平板均无,为(-);计数区没有而非计数区可见,或者于计数的 100 个菌落中仅有 1~4 个,为少量(< 0.1);5~14 个为 0.1;15~24 个为 0.2;25~34 个为 0.3;余者类推,纯培养为

* 基金项目:四川省卫生厅科研课题项目(080160)。

1.0。菌落分布不均匀者,计数大于或等于 2 个区域,取平均值。对数量大于该菌口咽部平均携带数量的涂片对应性肺炎克雷伯菌进行药敏实验并报告临床^[5]。

1.4.2 鉴定及抗菌剂敏感实验 按《全国临床检验操作规程》2、3 版规定进行细菌分离;一般 G⁻杆菌用 MicroScan 阴性复合 31 型检测板,通过 MicroScan-Walk Away 40SI 自动微生物鉴定及药敏测试系统进行鉴定和抗菌剂敏感实验,结果判定遵照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2007 年及其以后的标准。

1.4.3 感染诊断 由临床医师根据患者症状、体征、病原学检验、影像学检查、住院期间的观察和抗菌治疗效果等信息,按照中华医学会呼吸病学会《社区获得性肺炎诊断及治疗指南(草案)》和《医院获得性肺炎诊断及治疗指南(草案)》作出^[6]。文字确认和(或)参考药敏报告治疗有效为确诊;文字否定(含未提及)和(或)参考药敏报告治疗无效为否诊;介于两者之间者为疑诊。

1.5 统计学处理 痰培养肺炎克雷伯菌阳性患者首次细菌数量和标本质量与出院时感染诊断的符合率统计行 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 痰标本半定量 12 级法首次培养肺炎克雷伯菌数量与出院时感染诊断的关系 结果显示,白细胞吞噬菌的确存在,但阳性率不高。菌量 0.1 和大于或等于 0.2 的确诊率比较, $\chi^2 = 5.24, 0.05 < P < 0.1$ 。见表 1。

表 1 12 级法首次培养肺炎克雷伯菌数量与出院时感染诊断符合情况[n(%)]

半定量 12 级法菌量	确诊	疑诊	否诊
0.1	19(52.78)	9(25.00)	8(22.22)
≥0.2	63(66.31)	10(10.53)	22(23.16)
合计	82(62.60)	19(14.50)	30(22.90)

2.2 痰培养肺炎克雷伯菌阳性患者的首次标本质量与出院时感染诊断的关系 见表 2。

表 2 痰培养肺炎克雷伯菌阳性患者的首次标本质量与出院时感染诊断的符合情况[n(%)]

首次标本质量	确诊	疑诊	否诊
A/B 级	57(64.77)	11(12.50)	20(22.73)
C 级	25(58.14)	8 (18.60)	10(23.26)
合计	82(62.60)	19(14.50)	30(22.90)

A/B 和 C 级的确诊率比较, $\chi^2 = 0.54, P > 0.25$ 。

3 讨 论

痰内机会致病性感染菌的识别判定比较困难,《全国临床检验操作规程》1、2、3 版均强调“判断下呼吸道分泌物中是否有病原菌存在,需对上呼吸道的正常菌群有所了解,相比较而鉴别”。有文献指出,若于痰涂片检出白细胞吞噬菌,应视为感染菌而进行鉴定和药敏实验。本院坚持“两条腿走路”,即以“白细胞内的吞噬菌”或“白细胞浓集区域优势菌所对应的机会致病菌 12 级法培养数量大于该菌口咽部平均携带数量”为进行鉴定、药敏实验的依据。吞噬现象的形成,取决于吞噬细胞的吞噬能力和被吞噬物体抗吞噬能力的强弱。前者强于后者,形成吞噬现象;前者弱于后者,不形成吞噬现象;暂时相持,大约也难以形成吞噬现象。由于肺炎克雷伯菌具有较厚荚膜,抗吞噬力较强,故胞内吞噬现象比较少见,另一条腿的作用就凸显出来了^[7]。表 1 显示,肺炎克雷伯菌半定量培养 12 级法数量大于或等于 0.1 时,出院诊断的确诊率为 62.60%;如果加

上疑诊率,则达到 79.10%,与文献报道呼吸道感染与定植菌种类及其数量有关大体相符^[8-9]。本院调查表明,健康人群口咽部非厌氧菌的携带概率,G⁻杆菌为 33.00%,平均携带量小于 0.1,如果只要培养出来就报告,势必导致较多假阳性,显然不可取;如果以菌量大于或等于 0.2 为指针,将漏检 27.50%(36/131),漏诊 23.20%(19/82),也不可取。因此,本院以大于或等于 0.1 为筛检肺炎克雷伯菌的指标。值得注意的是,上呼吸道携带菌的种类及数量,受机体内外环境影响较大,时间和空间的差异明显;拟定痰标本感染菌筛检标准,需要对当地当前各年龄段非呼吸道炎症反应人群进行上呼吸道携带菌的半定量调查。

标本质量直接影响到检验结果的准确、可靠。对于自然咳出的痰标本,本院坚持于用药前漱口咽 3 次后,用力自气管深处咳出第一口痰,强化质量等级、白细胞吞噬菌和白细胞浓集区域优势菌的常规化革兰染色观察,肉眼观察合格但涂片为 C 级的标本不退回,如实报告,由医师酌情重新取标本复查。表 2 显示,A/B 级标本的确诊率高出 C 级 3.25%,之所以缺乏统计学意义,可能与样本量过小有关。痰液系典型的非均质标本,制作较薄涂片用以观察标本质量所取的标本量较少,而培养所取标本量较多,两者选中病理成分的概率有别,其标本质量未必一致。如果拒绝接收涂片为 C 级的标本,势必漏检 33.59%(43/131),漏诊 30.49%(25/82)。实践发现,按要求采集的未经治疗的急、慢性下呼吸道细菌感染患者痰标本,大多能够达到《全国临床检验操作规程》3 版合格标准(白细胞:鳞状上皮细胞大于或等于 2.5:1);有效治疗之后,其合格率明显降低。为满足临床诊断、鉴别诊断、疗效观察和预后评估的检验需求,本院仍旧沿用《全国临床检验操作规程》1、2 版标准。

综上所述,筛查痰内机会致病性肺炎克雷伯菌,需重视按标准要求采集标本,不宜单纯强调涂片检出“胞内吞噬菌”,尤需重视“半定量培养出的、与涂片中白细胞浓集区域优势菌对应的机会致病菌数量大于该菌口咽部平均携带数量”这一比较鉴别性指征。

参考文献

- [1] 李坤.肺炎克雷伯菌分型方法研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(9):993-994.
- [2] 杜海燕.肺炎克雷伯菌质粒介导 AmpC 酶和 ESBLs 的研究进展[J].国际检验医学杂志,2008,29(10):911-912.
- [3] 杨肇立,周文,李俊如,等.细菌半定量培养新法(12 级法)研究报告[J].四川医学,2010,31(5):561-563.
- [4] 杨进,卢先雷,罗宇鹏.痰液细菌学检验的标准化操作程序初探[J].医学检验与临床,2008,19(2):7-12.
- [5] 杨肇立,周文,郑遥奇,等.健康人群 322 例口咽部非厌氧菌半定量调查报告[J].四川医学,2002,23(5):548-549.
- [6] 中华医学会呼吸学会.社区获得性肺炎诊断及治疗指南(草案)[J].中华结核和呼吸杂志,1999,22(4):199-202.
- [7] 贾文祥.医学微生物学[M].北京:人民卫生出版社,2005:204-205.
- [8] Cabello H, Tores A, Celis R, et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease; a bronchoscopic study[J]. Eur Respir J, 1997, 10(5):1137-1144.
- [9] Hill AT, Campbell EJ, Hill ST, et al. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis[J]. Am J Med, 2000, 109(4):288-295.