

• 临床检验研究论著 •

## Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪计数 L 型大肠埃希菌研究

万芳, 陈恒, 杜利军, 崔敏涛

(广东同江医院检验科, 广东佛山 528300)

**摘要:**目的 分析 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪对大肠埃希菌 L 型细菌计数的特点。方法 氨苄西林诱导大肠埃希菌成 L 型, 观察细菌 L 型的菌落、形态、染色特点; 配制一定菌液浓度, 并用培养法验证配制菌液的实际浓度; 用 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪对已知菌液浓度菌液进行细菌计数; 比较大肠埃希菌 L 型理论浓度与 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果的差异。结果 氨苄西林极易诱导大肠埃希菌成为 L 型, 细菌 L 型形态、染色与细菌型有极大不同; Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪测定大肠埃希菌 L 型细菌计数结果远低于理论浓度。结论 大肠埃希菌不稳定 L 型与相对稳定 L 型在 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果, 与细菌型计数不同; 由于细菌的聚集性, 所测定的细菌个数远低于实际细菌数; 为了准确得出尿沉渣细菌计数结果, 最好在临床用药前送检尿液标本。

**关键词:** 大肠埃希菌 L 型; 尿沉渣分析仪; 培养法; 细菌计数

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.07.024

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)07-0855-03

Experimental research of counting *Escherichia coli* L-type bacterial by Sysmex UF-500i full-automatic urine sediment analyzer

Wan Fang, Chen Heng, Du Lijun, Cui Mintao

(Clinical Laboratory, Guangdong Tongjiang Hospital, Foshan, Guangdong 528300, China)

**Abstract: Objective** Analyze the characteristics of counting *Escherichia coli* L-type bacterial by UF-500i full-automatic urine sediment analyzer. **Methods** Induce *Escherichia coli* into *Escherichia coli* L-type with ampicillin, and observe the bacterial colony, form and dying characteristics. Prepare a certain concentration of bacteria fluid, and test the actual concentration by cultivation. Count bacteria with UF-500i full-automatic urine sediment analyzer. Compare the theoretical concentration of the *Escherichia coli* L-type with the result of bacteria count by UF-500i full-automatic urinary sediment analyzer. **Results** *Escherichia coli* could be easily induced to L-type. *Escherichia coli* L-type and bacteria type were obviously different in form and staining. The bacterin count result of *Escherichia coli* L-type, tested by Sysmex UF-500i full-automatic urinary sediment analyser was far lower than the theoretical concentration. **Conclusion** The bacterin account result of *Escherichia coli* L-type unstable and relatively stable, tested by Sysmex UF-500i full-automatic urinary sediment analyser is different from bacterin count. The number of the *Escherichia coli* L-type bacteria tested by Sysmex UF-500i full-automatic urinary sediment analyser is far less to actual number of bacteria, due to bacterium aggregation. In order to draw an accurate urine bacterial count results, the urine specimens been transported and tested before clinical treatment is best.

**Key words:** *Escherichia coli* L-type; urinary sediment analyzer; culture method; bacteria count

细菌 L 型 (bacterial L-forms) 即细菌细胞壁缺陷型 (cell wall-deficient bacteria, CWDB), 是细菌等微生物细胞壁缺陷的变异型<sup>[1]</sup>。β-内酰胺类抗菌药物<sup>[2-4]</sup>、75% 乙醇、聚维酮<sup>[5]</sup> 等均可导致细菌 L 型形成。尿沉渣分析仪的细菌计数在泌尿系感染快速诊断中应用价值, 已在多篇文献中证实<sup>[5-6]</sup>。当细菌由普通形态变成 L 型后, 在尿沉渣分析仪中细菌计数特点, 尚未见专门研究。为了解细菌 L 型在尿沉渣分析仪中的计数特点, 本文以大肠埃希菌为例, 进行以下研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 菌种** 大肠埃希菌标准菌株 (ATCC 25922 株) 购于广州天和微生物有限公司。

**1.2 主要仪器与试剂** 氨苄西林购于河南新乡华星药厂, Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪及配套试剂 (包括质控品) 购自日本希森美康医用电子有限公司, 血平板由安图生工有限公司提供, L 型培养基购自杭州天和微生物有限公司, 滤

纸购自杭州新华集团有限公司, 一次性针头式过滤器 (0.45 μm) 购自天津津腾公司, Phoenix Spec™ 比浊计购自美国 BD 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 大肠埃希菌-L 型的诱导** 参照文献<sup>[2]</sup> 并加以改进。(1) 制备每片 200 μg 氨苄西林药物纸片: 用无菌生理盐水稀释药粉, 取含 1 g 氨苄西林干粉倍比稀释成 20 μg/μL 的水溶液, 每张无菌小纸片滴加 10 μL, 干燥后制成。(2) L 型培养基制备: 制备 85-7 无血浆 L 型固体平板培养基。(3) L 型诱导: 采用平板纸片法, 在 L 型平板上用每片 200 μg 氨苄西林药物纸片不断传代诱导成 L 型, 逐日观察, 取生长物涂片作革兰氏染色和细胞壁染色并观察细菌形态及染色性的变化。连续诱导 7~10 代后, 用 0.45 μm 一次性无菌滤嘴加压过滤, 获得 L 型细菌, 再继续传代一次。(4) 细菌 L 型检测: 采用细胞壁染色法, 细菌涂片后自然干燥, 先加 10% 鞣酸水溶液固定 15 min, 水洗

后加 0.5% 结晶紫溶液染 3 min, 水洗, 干燥后镜检。细菌型菌体仅细胞壁着色呈空泡状, 示细胞壁完整; 细菌 L 型因细胞壁缺损, 菌体浓染。

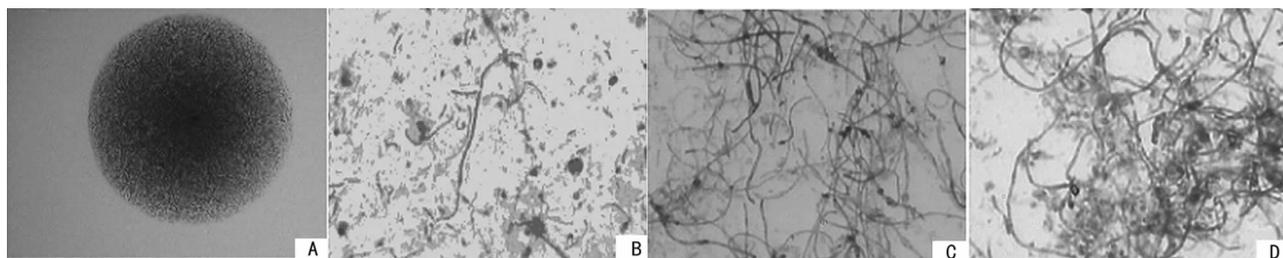
**1.2.2 菌悬液的配制及菌液浓度的验证** 挑取具有典型 L 型形态的菌落, 无菌生理盐水配制菌悬液, 用 0.45 μm 一次性无菌滤嘴加压过滤制备 0.15 麦氏点浊度菌悬液, 用培养法验证细菌浓度, 方法同文献[7]。

**1.2.3 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数** 将培养后剩余菌悬液混匀后, 立即用 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数(分别测定 3 次, 求均值), 记录检测

结果并分析理论浓度与尿沉渣细菌计数间的相关性。

### 2 结 果

**2.1 大肠埃希菌 L 型观察** 在 L 型平板上药物纸片抑菌圈处, 诱导 2~3 代后开始发现有细菌 L 型颗粒状菌落, 见图 1A; 涂片染色可见革兰氏阴性, 长短、弯曲程度不一的杆菌, 可见圆球体, 见图 1B; 继续培养至第 7 代, 涂片有许多圆球体、长丝体缠绕在一起, 偶见巨型体, 见图 1C~D; 继续诱导传代, 细菌菌落形态均为典型颗粒型, 未见油煎蛋及丝状体菌体形态, 用此法诱导出来的大肠埃希菌 L 型在诱因存在条件下保持相对稳定, 去除诱因易返祖。



A: 大肠埃希菌 L 型颗粒型菌落镜下照片(诱导 2~3 代, ×40); B: 大肠埃希菌 L 型菌革兰氏染色照片(诱导 2~3 代, ×1 000); C: 大肠埃希菌 L 型菌革兰氏染色照片(诱导 7 代, ×1 000); D: 大肠埃希菌 L 型菌细胞壁染色照片(诱导 7 代, ×1 000)。

图 1 大肠埃希菌 L 型观察照片

**2.2 大肠埃希菌 L 型菌悬液浓度验证及相关性分析** 大肠埃希菌 L 型理论细菌浓度与培养菌落浓度呈正相关( $r = 0.974, P < 0.05$ ), 见图 2。

大肠埃希菌 L 型理论细菌浓度与 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果呈正相关( $r = 0.969, P < 0.05$ ), 见图 3。

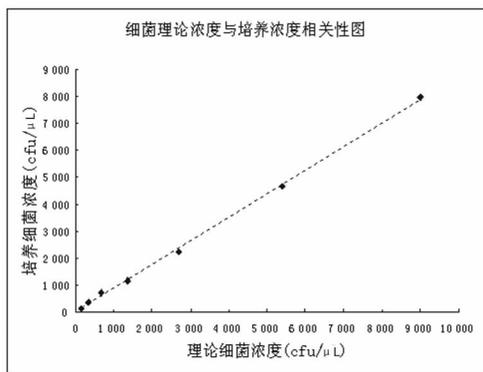


图 2 大肠埃希菌 L 型菌理论细菌浓度与培养细菌浓度相关性分析

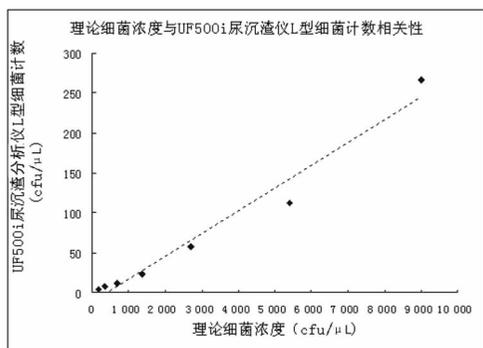


图 3 理论细菌浓度与 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪 L 型细菌计数相关性分析

### 2.3 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果

### 3 讨 论

尿路感染(UTI)是临床常见病和多发病, 严重危害人类健康和生活质量, 所以及时准确的诊治显得尤其重要[8]。尿液检查以其简便、快捷、标本易得、结果有效而被临床广泛应用[9]。相比 UTI 诊断的金标准(尿液培养)的较长报告时间, 尿沉渣细菌计数已被临床科室用于 UTI 的快速诊断。

但是, 随着抗菌药物的广泛应用, 临床上部分 UTI 患者, 即使出现明显症状, 却不能通过常规的尿细菌培养确诊, 此时应考虑 L 型细菌感染的可能[8]。细菌的细胞壁缺陷既包括天然具有细胞壁的各种细菌在受到影响细胞壁合成或破坏细胞壁结构的因素作用下形成的细胞壁缺陷变异型, 也包括天然缺乏细胞壁的支原体[10]。对于 UTI 细菌感染的病原学诊断与治疗来说, 研究天然缺乏细胞壁的支原体具有更加重要的意义。

细菌 L 型由于缺失细胞壁, 在分裂时不能像原菌那样按时断裂, 可膨胀成巨型体, 或在其中增殖、破裂成原生小体(如无壁的病毒), 或因不能按时分裂而增殖成长丝[1]。在普通光学显微镜下常见形态特征为明显大于经典细菌型的圆球形和长丝形, 其中圆球形的 L 型细胞直径可小于 0.01 μm 或大于 50 μm, 丝形 L 型的长度和宽度都显著大于各种经典细菌型[10]。目前已有使用全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数时, 大量成堆细菌菌团误认为红细胞的相关报道[11]。当形态明显异于正常细菌的 L 型原球体或丝状体存在的情况下, 是否会干扰尿沉渣分析仪的细菌计数? L 型细菌在仪器中细菌计数的特点又是怎样的? 解决上述问题是本次研究的目的。

本文采用平板法, 以临床常见的抗菌药物对大肠埃希菌诱

导,发现在氨苄西林诱导作用下,大肠埃希菌的菌落变成颗粒型,而菌体形态则由最初的革兰阴性小杆菌逐渐变成长杆菌、圆球体、丝状菌、巨形体,当菌液浓时成为丝状,可形成网状,类似于真菌菌丝,与正常菌体有明显区别。

在本研究中,大肠埃希菌 L 型在 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪中的细菌计数,理论浓度与仪器细菌计数之间有一定的差异,并且尿沉渣细菌计数明显低于理论浓度,说明尿沉渣分析仪的细菌计数并不能准确反映 L 型细菌实际浓度,这一计数特点与细菌型相同,原因还可能是与细菌的聚集性相关<sup>[7]</sup>。但是,细菌型在同一尿沉渣分析仪细菌计数较细菌 L 型高出近一倍,此差异是否能说明同一细菌的细菌型在尿沉渣分析仪的计数一定就大于 L 型? 作者认为是否定的,理由有 3 点:(1)由 L 型菌生长特性决定,其液体培养基内都表现为沉淀生长,混悬在生理盐水或蒸馏水内也可迅速沉积,可导致吸样不均匀;(2)检测结果重复性不佳,由于细菌的聚集程度、振荡程度不同,导致结果有较大的差异;(3)细菌 L 型分为稳定 L 型、相对稳定 L 型与不稳定 L 型,稳定 L 型不论是在不含诱导剂的培养基中多次传代培养或是在动物体内,都能够保持相对稳定的性质或不能自发返祖<sup>[10]</sup>。而本次研究仅诱导出相对稳定 L 型与不稳定 L 型,尚不能预知稳定 L 型在尿沉渣分析仪中的特点。但是根据稳定 L 型无法自发返祖导致了培养困难的特点,推测此型菌用 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪计数可能会出现尿沉渣分析仪细菌计数阳性但培养阴性的结果。因此,对泌尿系统感染的诊断除了缩短检验时间,改进检测方法的特异性与敏感性外,在临床用药前进行尿液标本的送检,避免 L 型细菌的形式,也是快速准确诊断与治疗的关键。

参考文献

[1] 林特夫,黄谷良. 细菌 L 型感染的意义和研究进展(四)——细菌

L 型的检验和鉴定[J]. 蚌埠医学院学报,2008,33(2):127-131.  
 [2] 陈登宇,陈艺林,徐萍萍. 哌拉西林诱导铜绿假单胞菌 L 型形成的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报,2010,35(2):115-116.  
 [3] 王珊,齐慧敏,张再红,等. 苯唑西林诱导金黄色葡萄球菌形成 L 型研究[J]. 中国临床药理学杂志,2010,26(7):502-505.  
 [4] 林业杰,欧剑鸣,王晓萍,等. 霍乱弧菌 L 型诱导实验观察[J]. 海峡预防医学杂志,2001,7(3):19-21.  
 [5] 高东旗,李仕英,侯雨丰,等. 消毒剂对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌诱导 L 型形成的实验观察[J]. 中国消毒学杂志,1998,15(3):152-155.  
 [6] 陈丽,张坤,李月强,等. UF-1000i 尿沉渣分析仪检测细菌的性能及对尿路感染的筛查价值[J]. 华中科技大学学报:医学版,2011,40(3):354-356.  
 [7] 万芳,杜利军,陈恒,等. UF-500i 全自动尿沉渣分析仪在细菌计数中应用的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(13):1636-1637.  
 [8] 刘贵建,程实. 尿路感染的实验室诊断进展[J]. 中华检验医学检验杂志,2009,32(6):616-620.  
 [9] Santra J, Eeva LP, Paulina K, et al. Screening of urine samples by flow cytometry reduces the need for culture[J]. J Clin Microbiol, 2010,48(9):3117-3121.  
 [10] 王和. 现代前列腺炎基础与临床[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2005:132-136.  
 [11] 黄福达,杨志钊,张秀明,等. UF-1000i 全自动尿液有形成成分分析仪性能评价[J]. 检验医学,2011,26(8):560-563.

(收稿日期:2013-08-28)

(上接第 854 页)

购中分离到致病性大肠埃希菌[J]. 中国实验动物学杂志,2012,(9):81-83.  
 [4] Yatsuyanagi J, Saito S, Miyajima Y, et al. Characterization of atypical enteropathogenic Escherichia coli strains harboring the astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan[J]. J Clin Microbiol, 2003,41(5):2033-2039.  
 [5] Lopes LM, Fabbriotti SH, Ferreira AJ, et al. Heterogeneity among strains of diffusely adherent Escherichia coli isolated in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(4):1968-1972.  
 [6] 赵红庆,苑锡铜,王玉飞,等. 多重 PCR 检测致泻大肠埃希菌方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(10):2223-2226.  
 [7] Müller D, Greune L, Heussipp G, et al. Identification of unconventional intestinal pathogenic Escherichia coli isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2007,73(10):3380-

3390.  
 [8] Hamiton MJ, Hadi AZ, Griffith JF, et al. Large scale analysis of virulence genes in Escherichia coli strains isolated from Avalon Bay, CA[J]. Water Res, 2010,44(18):5463-5473.  
 [9] 于新芬,潘劲草,孟冬梅,等. 多重实时 PCR 检测致泻性大肠埃希菌志贺毒素和紧密素基因[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(5):529-532.  
 [10] 朱敏,冉陆,沈圣,等. 多重 PCR 快速检测致泻性大肠埃希菌[J]. 中华预防医学杂志,2010,44(4):345-348.  
 [11] 王辉,马焕丽,邱燕飞. 社区细菌感染性腹泻病原学监测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2404-2406.  
 [12] 黄芳,邓瑛,曲梅,等. 2010 年北京市感染性腹泻病原学监测分析[J]. 中华预防医学杂志,2011,45(9):820-824.

(收稿日期:2013-10-14)