瘤、肌肉量、体温、性别及蛋白摄入量等因素的影响。Cys-C 可以自由通过肾小球滤过膜，并在近曲小管被重吸收和降解，外周血水平主要决定于 GFR，因此被认为是反映 GFR 较理想的内源性标志物[6]。本研究结果发现，T2DM 患者血清 Cys-C 水平随肾损伤程度的加重逐渐升高，与对照组、单纯 DM 组相比，早期 DN 组血清 Cys-C 水平已有明显升高（$P<0.05$）。Cys-C 的相对分子质量大于 CR，且生成速度和外周血浓度的稳定性优于 CR，不受其他病理及生理因素的影响，其外周血浓度与 GFR 的线性关系也优于 CR，因此血清 Cys-C 水平能够更为敏感地反映肾小球滤过膜通透性的早期变化。当肾小球出现轻微损伤时，血清 Cys-C 水平即可升高，并且随着病情的加重而逐渐升高[7]。本研究中，早期 DN 组血清 Cys-C 水平已高于对照组（$P<0.05$），而 BUN、CR 水平仍处于正常范围内，当 DN 逐渐加重到临床 DN 阶段，BUN、CR 水平才明显升高，因此 BUN、CR 反映肾功能损伤的敏感性和特异性远不如 Cys-C。这是由于肾脏具有强大的储备能力和代偿能力，在肾小球损伤早期或轻度损伤时，外周血 BUN、CR 水平改变不明显。与此同时，BUN、CR 水平易受食物、肌肉含量等多种因素的干扰，不能准确反映肾功能的变化。因此，利用血清 Cys-C 诊断 DN 早期肾损伤具有明显的优势。

目前，DN 早期诊断主要依赖于 UAER 检测，因此尿 mALB 是发现早期肾损伤的重要标志物[8]。清蛋白是外周血中所占比例最大的低分子量蛋白质，也是可从肾小球滤过膜通过的最小蛋白质，滤过的清蛋白在近曲小管几乎被完全吸收。正常情况下，UAER 水平为 30 mg/24 h。当 DM 患者肾小球滤过膜受损，表面电荷发生改变导致血-尿屏障受损时，mALB 滤过量大于近曲小管的重吸收量，造成尿 mALB 水平增高，UAER 升高至 30～300 mg/24 h，说明患者已经发展为早期 DN；如果此时进行有效的干预和治疗，肾小球功能可被及时修复，尿 mALB 水平恢复至正常，早期 DN 的临床症状也可得以逆转，防止向临床蛋白尿阶段发展。当 UAER 水平持续高于 300 mg/24 h 时，可诊断为 DN。因此，尿 mALB 也是反映肾小球受损的敏感标志物。本研究显示，DM 患者尿 mALB 水平随着肾损伤程度的加重而升高，并且与血清 Cys-C 水平具有良好的相关性（$P<0.05$），说明二者对 DM 早期肾损伤的诊断具有重要的临床价值。然而，尿 mALB 检测有其自身的局限性，检测结果易受泌尿系统感染、酮症状态、妇女月经期、运动及血压等肾内及肾外因素的影响，特异性稍差[9]。因此，对血清 Cys-C 和尿 mALB 进行联合检测可有效提高早期 DN 的诊断率。本研究中，血清 Cys-C、尿 mALB 单项检测的总阳性率分别为 68.8% 和 61.3%，而二者联合检测的总阳性率为 85.0%，联合检测的总阳性率高于单项检测（$P<0.05$），说明联合检测可提高诊断灵敏度，能够为 DN 的预防与早期诊治提供参考。此外，随着 DM 患者病程的延长，血清 Cys-C 和尿 mALB 阳性率逐渐升高，说明二者能较好地反映病情的严重程度，不仅是 DM 早期肾损伤的敏感标志物，也是 DN 病情监测及预后评估等方面的重要观察指标。

综上所述，血清 Cys-C 和尿 mALB 是诊断 T2DM 早期肾损伤的重要标志物，二者联合检测的诊断效能更高，对 DM 早期肾损伤的诊断具有极其重要的临床应用价值。

参考文献

[1] 李树法，欧亚萍，张喜，等. 贵阳市糖尿病住院患者死亡原因分析[J]. 中国老年学杂志，2011，31(12)：2325-2327.

[2] 贾建民，孟菁菁. 尿微量白蛋白与血清胱抑素 C 的联合检测在糖尿病肾病早期诊断中的临床意义[J]. 中国卫生检验杂志，2010，20(9)：2210-2211.

[3] 徐静. 血清胱抑素 C 及尿微量白蛋白联合检测对早期糖尿病肾损伤的诊断价值[J]. 中国实用医药，2012，7(8)：86-87.

[4] 郝建军. 血清胱抑素 C、尿微量白蛋白在糖尿病早期肾损害诊断中的应用价值评估[J]. 实验与检验医学，2011，29(2)：171-173.

[5] 李玉艳，杨振坤. 胱抑素 C 在临床中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志，2006，27(9)：812.

[6] 李海霞，徐国宾. 胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 与肌酐在评价糖尿病患者肾小球滤过功能中的比较[J]. 中华检验医学，2002，28(6)：602.

[7] 陈玮，段贞. 糖尿病肾病早期监测血清胱抑素 C 的临床意义[J]. 实用预防医学，2009，16(1)：31.

[8] 陈燕，赵敏，张家红，等. 尿微量白蛋白检查对糖尿病早期肾损伤的诊断价值[J]. 中华检验医学杂志，2003，26(9)：262-264.

[9] 吴敏敢，吴坤利. 胱抑素 C 和尿微量白蛋白联合检测对诊断糖尿病早期肾损伤的价值[J]. 中国医药指南，2010，8(25)：133-134.

（收稿日期：2015-04-01）

·临床研究·

双糖铁试验改良安瓿法试验研究

刘　刚，魏莲花△，邹凤梅，杨永清

（甘肃省人民医院检验中心，甘肃兰州 730000）

摘　要：目的　对鉴定细菌常用的克氏双糖铁琼脂（KIA）培养基试管法进行改良，为实验室鉴定肠杆菌科细菌提供方便、准确的鉴定方法。**方法**　配制试剂，分装至安瓿管中，高压灭菌备用；对标准菌株、质控菌株、临床分离菌株共 534 株进行试验，与试管法进行对比，根据常规方法判断结果。**结果**　安瓿法与试管法结果完全一致。**结论**　用安瓿法进行 KIA 试验，简单方便，结果准确，试剂用量小，且能室温长期保存，该方法可以推广应用。

关键词：细菌鉴定；　双糖铁试验；　安瓿法

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.046　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)18-2726-04

无论实验室有无微生物自动鉴定仪，克氏双糖铁琼脂（KIA）培养基是不可或缺的，可用于肠杆菌和非发酵菌的初步鉴别。KIA 可用于观察细菌能否发酵葡萄糖、乳糖及分解蛋白质产生硫化氢，尤其适用于肠杆菌科细菌的鉴定[1-3]。一般实验室常采用试管法进行[2]，试管法试剂用量大，配制烦琐，冰箱贮存占位面积大，实际应用十分不便。为了克服这些不足，

△　通讯作者，E-mail：weilianhua0199@sina.com。

本研究对试管法进行了改良，研制成安瓿法，可以室温保存，实际应用效果良好，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　甘肃省人民医院检验中心微生物实验室从 2005 年开始分离自血液、气管抽出液、痰液、烧伤创面等临床标本中的菌株约 1 000 株。选择其中生物学特性典型的肠杆菌科细菌 509 株用于本研究，包括大肠埃希菌 82 株、阴沟肠杆菌 156 株、肺炎克雷伯菌 83 株、弗劳地枸橼酸盐杆菌 20 株、产气肠杆菌 12 株、奇异变形杆菌 10 株、摩根摩根菌 8 株、鼠伤寒沙门菌 6 株、聚团多源菌 5 株、异型枸橼酸杆菌 4 株、产酸克雷伯菌 4 株、坂歧肠杆菌 3 株；以及痢疾志贺菌、福氏志贺菌、鲍氏志贺菌、普通变形杆菌、潘尼变形杆菌、黏质沙雷菌、小肠结肠炎耶尔森菌，各 2 株；蜂房哈夫尼菌、臭鼻克雷伯菌，各 1 株。

1.2　仪器与试剂　2 mL 安瓿（重庆北碚玻璃仪器厂），血琼脂基础及 KIA 培养基（英国 OXOID 公司），API-20E 鉴定卡及 VITEK-32 全自动微生物鉴定及药物敏感试验分析系统（法国生物梅里埃）。标准菌株：大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603、阴沟肠杆菌 ATCC029M 均购自中国药品生物鉴定所。质控菌株：弗劳地枸橼酸杆菌（MM2503），异型枸橼酸杆菌（MM2208、MM2716），大肠埃希菌（MM2201、MM2313、MM2405、MM2503、MM2512），大肠埃希菌 O_{157}：H_7（MM2610），福氏志贺菌（MM2515），肺炎克雷伯菌（MM2314、MM2708），产酸克雷伯菌（MM2202、MM2403），臭鼻克雷伯菌（MM2216），奇异变形杆菌（MM2315），普通变形杆菌（MM2511），猪霍乱沙门菌（MM2213），B 群沙门菌（MM2603）及鼠伤寒沙门菌（MM2209）为香港医管局质控菌株，黏质沙雷菌（MM2302）与潘氏变形杆菌（WHO9001）为世界卫生组织质控菌株。

1.3　方法

1.3.1　菌株复活及鉴定　打开菌种管，分别加入 0.5 mL 肉汤，使其充分溶解，吸取 1～2 滴菌液至血琼脂平板，分段划线。将接种好的平板置于 35 ℃环境，孵育 24 h，用常规方法分离。涂片、染色镜检，采用试管法、API-20E 鉴定卡或 VITEK-32 全自动微生物鉴定及药物敏感试验分析系统鉴定。

1.3.2　传统法（试管法）　配制 KIA，加 4 mL 于 12 mm×150 mm 试管中[2]，加盖硅胶塞，115 ℃ 10 磅，高压灭菌 15 min。灭菌后，立即取出摆成高层斜面（确保高度为 3 cm）。冷却后，装塑料袋扎口，4 ℃冰箱保存。使用前放置室温 30 min[4]，用接种针挑取孵育 24 h 的上述各种细菌，接种于培养基底层穿刺、斜面上划线接种，置 35 ℃培养，结果观察不能小于 18 h，不能大于 24 h[1-2]。

1.3.3　安瓿法　配制 KIA，取 1.5 mL 加入 2 mL 安瓿中，汽油酒精喷灯拉丝封口[5]。115 ℃ 10 磅，高压灭菌 15 min。灭菌后，立即取出摆高层斜面。冷却后，室温保存。用小砂轮将安瓿颈处据开，接种观察结果同传统法。

1.4　结果判断　参照文献[2]。

1.4.1　仅发酵葡萄糖　斜面：碱性反应，红色；高层（底部）：酸性反应，黄色。若同时产生硫化氢（H_2S）气体，黑色沉淀可掩盖高层酸性反应，但要记录高层产酸。

1.4.2　葡萄糖和乳糖都发酵　斜面：酸性反应，黄色；高层：酸性反应，黄色。如果因 H_2S 产生在高层观察不到酸性反应，同样要记录高层产酸。

1.4.3　葡萄糖和乳糖均不发酵　斜面：碱性反应，红色；高层：需氧菌不生长，颜色无变化，与接种的培养基颜色相同或为橙红色。

1.4.4　产气菌　产二氧化碳（CO_2）和氢气（H_2）。可通过下述征象之一来证明气体产生：在培养基内有单个气泡；在培养基内有多个气泡；培养基裂开；培养基由底部全部上移，在底部有一明显的空白区；在试管的一侧培养基出现缺口。

1.4.5　H_2S 产生　通过以下几点证明黑色沉淀（硫化亚铁）的存在：黑色蔓延整个高层并掩盖酸性；接近高层顶部呈现一黑色环；黑色沉淀物散布整个高层。当判定 KIA 结果时，上述反应的各种方式可同时出现，应记录所观察到的全部结果。

2　结　　果

2.1　KIA 试管法与改良安瓿法结果对比　KIA 斜面试管法显示：1 号管底层葡萄糖阳性，上层乳糖阴性；2 号管底层葡萄糖阳性，上层乳糖阴性，H_2S 阳性；3 号管底层葡萄糖阳性，产气，上层乳糖阳性；4 号管 H_2S 强阳性，见图 1（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”）。KIA 斜面改良安瓿法显示：1 号管为成品培养基；2 号管底层葡萄糖阳性，上层乳糖阳性；3 号管底层葡萄糖阳性，产气，上层乳糖阴性，见图 2（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”）。图 3（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”）显示：1 号管为成品培养基；2 号管底层葡萄糖阳性，产气，上层乳糖阴性，H_2S 强阳性。图 4（见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”）显示：细菌产气使培养基裂开。KIA 试管法与改良安瓿法结果对比颜色反应一致。

2.2　标准菌株和质控菌株 KIA 传统试管法与安瓿法结果　见表 1。

2.3　509 株试验菌 KIA 传统试管法与安瓿法结果　见表 2。

表 1　标准菌株和质控菌株细菌 KIA 斜面试验结果

细菌名称	株数（n）	KIA 斜面							
		斜面		底层		H_2S		气体	
		传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法
ATCC25922 大肠埃希菌	1	A	A	A	A	−	−	+	+
ATCC700603 肺炎克雷伯菌	1	A	A	A	A	−	−	+	+
ATCC029M 阴沟肠杆菌	1	A	A	A	A	−	−	+	+
弗劳地枸橼酸杆菌	1	A	A	A	A	+	+	+	+
异型枸橼酸杆菌	2	A	A	A	A	−	−	+	+
大肠埃希菌	5	A	A	A	A	−	−	+	+
大肠埃希菌 O_{157}：H_7	1	A	A	A	A	−	−	+	+

续表 1　标准菌株和质控菌株细菌 KIA 斜面试验结果

细菌名称	株数（*n*）	KIA 斜面							
		斜面		底层		H_2S		气体	
		传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法
福氏志贺菌	1	K	K	A	A	−	−	−	−
肺炎克雷伯菌	2	A	A	A	A	−	−	+	+
产酸克雷伯菌	2	A	A	A	A	−	−	+	+
臭鼻克雷伯菌	1	K	K	A	A	−	−	−	−
奇异变形杆菌	1	K	K	A	A	+	+	+	+
普通变形杆菌	1	K	K	A	A	+	+	+	+
猪霍乱沙门菌	1	K	K	A	A	+	+	+	+
B 群沙门菌	1	K	K	A	A	+	+	+	+
鼠伤寒沙门菌	1	K	K	A	A	+	+	+	+
黏质沙雷菌	1	K	K	A	A	−	−	+	+
潘氏变形杆菌	1	K	K	A	A	−	−	−	−

A：产酸；K：产碱；+：阳性；−：阴性。

表 2　509 株肠杆菌科细菌 KIA 斜面试验结果

细菌名称	株数（*n*）	KIA 斜面							
		斜面		底层		H_2S		气体	
		传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法	传统试管法	改良安瓿法
弗劳地枸橼酸杆菌	20	A	A	A	A	+	+	+	+
异型枸橼酸杆菌	4	A	A	A	A	−	−	+	+
产气肠杆菌	12	A	A	A	A	−	−	+	+
阴沟肠杆菌	156	A	A	A	A	−	−	+	+
聚团肠杆菌	5	K	K	A	A	−	−	−	−
坂崎肠杆菌	3	A	A	A	A	−	−	+	+
大肠埃希菌	182	A	A	A	A	−	−	+	+
痢疾志贺菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−
福氏志贺菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−
鲍氏志贺菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−
蜂房哈夫尼菌	1	K	K	A	A	−	−	+	+
肺炎克雷伯菌	83	A	A	A	A	−	−	+	+
产酸克雷伯菌	4	A	A	A	A	−	−	+	+
臭鼻克雷伯菌	1	K	K	A	A	−	−	−	−
摩根摩根菌	10	K	K	A	A	−	−	+	+
奇异变形杆菌	8	K	K	A	A	+	+	+	+
普通变形杆菌	2	K	K	A	A	+	+	+	+
潘尼变形杆菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−
鼠伤寒沙门菌	6	K	K	A	A	+	+	−	−
黏质沙雷菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−
小肠结肠炎耶尔森菌	2	K	K	A	A	−	−	−	−

A：产酸；K：产碱；+：阳性；−：阴性。

2.4　改良培养基储存期观察　分别于制备后半年及 1、2 年观察，培养基无干燥、变色、生长细菌等；接种相应质控菌株反应结果准确无误。

3　讨　论

目前，引起人类感染的革兰阴性菌中，以肠杆菌科细菌引起的感染在临床位居首位，可引起临床各科室、人体各部位感染，近年来其感染率还在不断上升[6]。革兰阴性菌菌落及镜下形态特征相似，鉴定过程繁琐，耗时长，易出错，常常耗费大量人力、物力，影响了检验结果的快速报告，远不能满足临床的迫切需要。目前，细菌的准确鉴定技术已经成为微生物室的迫切需求，但由于方法的局限性等因素严重影响了细菌的快速鉴定，最终影响了细菌感染的及时诊治。

KIA 斜面试验是手工法肠杆菌科细菌鉴定中的关键试验，笔者在传统手工试管法的基础上，进行了改良研究，研制成安瓿法鉴定用培养基。通过试验对比，传统试管法与小样法结果完全相同，将为基层医院开展微生物检验、规范操作、提高培养阳性率等提供良好的手段。

综上所述，KIA 试验改良安瓿管试剂用量小，大大降低了

成本，且体积小，管口密封，可长期室温保存，比传统法具有优越性。

参考文献

[1] 李根生. 干燥培养基的制造及使用[M]. 上海：上海科学技术文献出版社，1994：438-439.

[2] 麦克法丁[英]，林万明译. 医学细菌生化试验鉴定手册[M]. 北京：人民卫生出版社，1985：141-147.

[3] 张秀珍，朱德妹. 临床微生物检验问与答[M]. 北京：人民卫生出版社，2008：136.

[4] 叶应妩，王毓三，申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京：东南大学出版社，2006：372。

[5] 邹凤梅，魏莲花，刘刚. 安瓿法系列 O-F 糖醇管在非发酵菌鉴定中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志，2011，32(3)：371-372.

[6] 胡付品，朱德妹，汪复，等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志，2014，14(5)：365-374.

（收稿日期：2015-03-24）

·临床研究·

大肠埃希菌致新生儿感染分析

刘　婧，扈会整，任超杰，汪建军，吴斌艳，任伟娟，文　杏

（陕西省核工业 215 医院，陕西咸阳 712000）

摘　要：目的　分析新生儿感染大肠埃希菌的耐药性及治疗效果，探索预防措施。**方法**　选取 2011 年 1 月至 2013 年 12 月该院收治的大肠埃希菌感染新生儿 20 例，对分离的 20 株大肠埃希菌进行药物敏感性分析，并依据药物敏感性分析结果进行治疗。**结果**　20 株大肠埃希菌医院内感染占 80.0%；对多数第 3 代头孢类抗菌药物高度耐药，对第 4 代头孢类抗菌药物的敏感率达 70%以上，对碳青霉烯类亚胺培南、美洛培南高度敏感，敏感率均为 100.0%；超广谱 β-内酰胺酶（ESBLs）阳性率为 60.0%；经治疗后 16 例痊愈，4 例死亡，治愈率为 80.0%。**结论**　医院内感染是新生儿期大肠埃希菌感染的主要途径，病死率高，应引起临床高度重视，且临床还应严格消毒灭菌，减少侵袭性操作以减少医院内感染的发生。

关键词：大肠埃希菌；　新生儿；　交叉感染；　药物敏感性试验

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.047　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1673-4130(2015)18-2729-02

大肠埃希菌寄居在人和动物的肠道，是肠道正常菌群，也是院内感染和社区感染的常见病原菌，可引起各部位感染，如尿路感染、菌血症、败血症、新生儿脑膜炎、胆囊炎、手术后腹腔感染及灼烧创面感染等[1]。对此笔者就本院收治的 20 例大肠埃希菌感染新生儿进行分析，现报道如下。

1　资料与方法

1.1　一般资料　2011 年 1 月至 2013 年 12 月本院收治的大肠埃希菌感染新生儿 20 例，男 7 例，女 13 例；日龄 4～26 d，平均（13.21±6.21）d；平均体质量（2 751.0±830.0）g，其中小于 1 500 g 者 3 例，1 500～2 500 g 者 4 例，大于 2 500 g 者 13 例；败血症 11 例（其中并发化脓性脑膜炎 3 例），肺炎 4 例（其中社区获得性肺炎 1 例、呼吸机相关性肺炎 3 例），皮肤脓肿 5 例，

1.2　方法　细菌鉴定使用法国生物梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统和专用鉴定卡（GN 卡），药敏试验采用纸片扩散法（K-B 法），根据美国临床实验室标准化协会（CLSI）规定的标准进行，结果解释标准参照 2012 年 CLSI 标准进行[2]。超广谱 β-内酰胺酶（ESBLs）按 2010 年 CLSI 标准进行，用双纸片法确证试验检测 ESBLs，两组纸片为头孢他啶与头孢他啶/克拉维酸及头孢噻肟与头孢噻肟/克拉维酸，其两个药物中有任何一个在加入克拉维酸后，抑菌环直径与不加克拉维酸的抑菌环相比，增大值大于或等于 5 mm，判定为产 ESBLs[3]。

2　结　　果

2.1　菌种分布　20 例患儿共有血液、脑脊液、痰液、脓液标本 25 份检出大肠埃希氏菌，其中 3 例脑脊液与血液、2 例脓液与血液、1 例痰液与血液同时检出大肠埃希菌且药敏结果相同，视为同一菌株。20 株大肠埃希菌医院内感染 16 株，占 80.0%。分离标本中，共 11 份血液标本检出大肠埃希菌，为呼吸道、皮肤、消化道感染；5 份脑脊液标本检出大肠埃希菌，为脑脊膜膨出病变；4 份痰液标本检出大肠埃希菌，为呼吸道感染；5 份脓液标本检出大肠埃希菌，为皮肤表面感染。

2.2　药物敏感性试验结果　检出的大肠埃希菌中 60.0%的菌株为产 ESBLs 菌株，大肠埃希菌对常用抗菌药物的敏感率及耐药率，见表 1。

表 1　大肠埃希菌对常用抗菌药物的敏感率及耐药率（n=20，%）

抗菌药物	敏感率	耐药率
氨苄西林	0.0	100.0
头孢呋辛	20.0	80.0
头孢曲松	25.0	75.0
亚胺培南	100.0	0.0
哌拉西林/他唑巴坦	91.9	8.1
头孢吡肟	73.2	26.8
美罗培南	100.0	0.0
阿米卡星	81.1	18.9
左氧氟沙星	62.3	37.7
环丙沙星	56.8	43.2

2.3　治疗结果　20 例患儿均选用敏感的抗菌药物治疗，4 例死亡，为化脓性脑膜炎及败血症患儿，死亡原因均为严重的感染性休克；16 例痊愈，治愈率为 80%，其中选用头孢吡肟治疗 11 例，美洛培南治疗 5 例。