瓣膜赘生物组织均质处理后病原体培养方法研究

刘玉磊¹, 蒋 晔^{2#}

1. 首都医科大学附属北京安贞医院检验科, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京同仁医院检验科, 北京 100069

摘要:目的 探索组织均质前处理赘生物标本适宜条件, 验证组织均质处理临床标本的使用效果, 提高赘生物病原体检出率。**方法** 首先通过定量培养, 选择条件验证菌株的菌液稀释度。在不同温度、转速和时长条件下验证金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、近平滑念珠菌、戈登链球菌及艾肯菌均质处理后的存活数。选择菌株存活数无差异的均质程序进行菌株和赘生物组织的同时处理, 确定组织破碎程度较高和菌株存活数较多的最佳条件。最后进行临床赘生物标本均质处理, 将均质后的标本进行增菌分离培养和染色镜检后统计阳性率, 与传统剪碎、研磨方法进行比对。**结果** 1 麦氏浊度的菌悬液取 10 μL 进行定量培养时 1 : 1 000 稀释是适宜的稀释倍数; 在温度为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、-20 $^{\circ}\text{C}$ 及 -80 $^{\circ}\text{C}$, 转速和时长分别为 6 m/s 1 min、4 m/s 1 min 30 s、4 m/s 1 min 条件下, 验证菌株的存活数与对照菌液差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, 6 m/s 1 min 条件下, 组织破碎效果和菌株存活状况最佳; 30 份感染性心内膜炎患者心脏瓣膜赘生物直接培养阳性率为 20.0%, 剪碎培养阳性率为 16.7%, 研磨培养阳性率为 20.0%, 均质直接培养阳性率为 23.3%, 均质增菌培养阳性率为 36.7%, 均质增菌培养联合镜检阳性率为 76.7%。**结论** 均质处理临床心脏瓣膜赘生物标本的最佳条件是 6 m/s 1 min、-20 $^{\circ}\text{C}$; 均质处理后培养阳性率明显提高; 组织均质前处理后, 培养联合镜检的方法能够进一步提高病原体检出率; 在组织病原体分离培养中, 均质处理的方法是目前最佳的前处理方法, 推荐临床验证和使用。

关键词: 感染性心内膜炎; 赘生物; 均质; 前处理; 细菌培养

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.24.003

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)24-2953-06

文献标志码: A

Study on pathogen culture method after homogeneous pretreatment of heart vegetation tissue

LIU Yulei¹, JIANG Ye^{2#}

1. Department of Clinical Laboratory Center, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tongren Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Abstract: Objective To explore the suitable conditions for pretreatment of cardiac vegetations by homogeneous, verify the effectiveness of the use of tissue homogeneous in treating clinical samples, and improve the detection rate of pathogens on cardiac vegetations samples. **Methods** Select appropriate dilution ratio of the experimental bacteria strains by quantitative culture. Verify the survival rate of *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Candida parapsilosis*, *Streptococcus gordon* and *Eikenella corrodens* after homogenization under different temperature, speed and duration conditions. Pretreat the bacterial strains and the biological tissue under the program with on different survival number of the bacterial strains, find the best conditions for tissue fragmentation and higher survival rate of the strains. The clinical samples were homogenized by homogeneous. Bacterial culture and microscopic examination were carried out after homogenization. Positive rate were compared with the traditional methods, take cutting and grinding for example. **Results** The dilution rate of 1 : 1 000 was appropriate for the preparation the bacteria working solution for quantitative culture from 10 μL bacteria solution of 1 Mc. Under the speed of 6 m/s 1 min, 4 m/s 1 min 30 s, 4 m/s 1 min at temperatures of 4 $^{\circ}\text{C}$, -20 $^{\circ}\text{C}$ and -80 $^{\circ}\text{C}$ conditions, there was no significant difference of the survival rate between the verified strains and the control. We got the best tissue crushing effect and survival number under -20 $^{\circ}\text{C}$ froze for 30 min 6 m/s 1 min conditions. A total of 30 clinical cardiac vegetation samples were involved in this study. the positive rate of normal culture was 20.0%, culture after cut with scissors was 16.7%, culture after grinding was 20.0%, direct culture after homogenization was 23.3%, culture after enriching of the homogenized samples was 36.7%, homogeneous allied with microscopic examination was 76.7%. **Conclusion** The best conditions for

作者简介: 刘玉磊, 男, 主管技师, 主要从事微生物检验研究。 # 共同第一作者简介: 蒋晔, 女, 技师, 主要从事微生物检验研究。

本文引用格式: 刘玉磊, 蒋晔. 瓣膜赘生物组织均质处理后病原体培养方法研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(24): 2953-2957.

homogeneous instrument treatment of clinical heart valve biopsy is 6 m/s 1 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. The positive rate of culture after homogeneous treatment is significantly improved. Allied with microscopic examination can further improve the rate of pathogen detection after tissue homogeneous pretreatment. Homogeneous treatment is the better pretreatment method in tissue pathogen separation culture. Clinical verification and use are recommended.

Key words: infective endocarditis; cardiac vegetations; homogeneous; pretreatment; bacterial culture

感染性心内膜炎(IE)是一种罕见病,主要由病原体感染心内膜所致,容易累及心脏瓣膜,特征性损伤为心脏瓣膜的赘生物生成,其临床表现的多样性给临床医生的诊断及治疗带来了很大的困难,年发生率为 1.5/100 000~9.6/100 000,致死率约为 25%,具有非常高的院内病死率和长期病死率^[1-2]。目前,临床诊断 IE 的证据主要包括患者临床症状,体征,感染性标志物,胸或食管超声心动图、CT、核磁共振等影像学结果,二代测序、血及赘生物培养等病原学检查结果等^[3-6]。目前,导致 IE 的病原体包括革兰阳性(G^+)球菌(以链球菌、金黄色葡萄球菌为主)、革兰阴性(G^-)菌(HACEK 等)、真菌(念珠菌为主)及巴尔通体等^[7-10]。IE 主要的治疗手段分为以使用抗菌药物为主的内科治疗和以瓣膜修复或置换为主的外科治疗^[4,11-12],其中术后赘生物培养结果与抗菌药物使用方案及术后复发率有关,不充分的抗菌药物治疗会导致瓣膜置换术后感染复发,具有极高的病死率^[10,13-15]。但目前赘生物培养病原体检出率很低,如何充分释放赘生物内病原体,提高病原体检出率是临床急需解决的问题^[3,16]。因此,本研究探讨了组织均质前处理赘生物标本适宜条件,验证组织均质处理临床标本的使用效果,以期提高赘生物标本的病原体检出率。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2020 年 1—12 月首都医科大学附属北京安贞医院感染性心内膜炎患者外科手术中切除的心脏瓣膜赘生物 30 份。

1.2 仪器与试剂 麦氏比浊仪(法国生物梅里埃)、组织均质仪(杭州奥盛)、生物安全柜(ESCO)、二氧化碳细菌培养箱(Thermo Fisher Scientific)、微生物鉴定质谱仪(Bruker)、显微镜(NIKON)。细菌鉴定培养液(BD);无菌拭子;金黄色葡萄球菌菌株;大肠埃希菌菌株;近平滑念珠菌菌株;艾肯菌菌株;戈登链球菌菌株;组织均质管;304 不锈钢大钢珠($R=5\text{ mm}$)、小钢珠($R=3\text{ mm}$);无菌手术剪;无菌手术钳;组织研磨器;血琼脂增菌平板(OXOID);巧克力平板(郑州安图生物);脑心浸液增菌肉汤、脑心浸液琼脂平板、脑心浸液琼脂培养液(广州迪景)。

1.2 方法

1.2.1 质量控制 整个研究过程遵循以下措施保证实验的质量。实验前进行手部卫生消毒和安全柜使用前的乙醇擦拭;实验器材和耗材进行 $134\text{ }^{\circ}\text{C}$ 8 min 压力蒸汽灭菌,通过灭菌指示卡和芽孢杆菌灭菌效果监测,保证高压灭菌器的灭菌效果;实验耗材(钢珠、组织均质管、手工组织研磨器)每批次进行无菌试验;每批次脑心浸液增菌肉汤和分离培养用平板进行验

证菌株的生长实验和无菌实验;制订实验中组织均质管破碎后的生物安全应急处理流程和预案(立即停止组织均质,静置 20 min 后,打开组织均质的盖子用乙醇喷洒、擦拭)。

1.2.2 实验方法 (1)组织均质前处理赘生物标本适宜条件的探索和验证。①定量培养稀释度的确认:用金黄色葡萄球菌做定量培养稀释度确认。取菌株到 5 mL 鉴定培养液中调整菌量麦氏浊度为 1,然后取 10 μL 菌液加入 10 mL 的鉴定培养液中,调整为 1:1 000 稀释的工作菌液。取 10 μL 工作菌液按连续划线法接种到血平板上进行定量培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察,验证分离菌落与理论菌落(3 000 cfu)的一致性。取 100 μL 的 1 麦氏浊度菌液加入 9 900 μL 的麦氏浊度管中,调整为 1:100 稀释工作菌液。然后取 10 μL 工作菌液按连续划线法接种到血平板上进行定量培养,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察,验证分离菌落与理论菌落(33 000 cfu)的一致性。选择适宜的稀释倍数(后文称之为“原稀释菌液”)进行菌株存活情况验证。②不同条件菌株存活率验证:配制金黄色葡萄球菌、戈登链球菌、大肠埃希菌、近平滑念珠菌、艾肯菌 5 种细菌的鉴定培养液。每次准备 16 支组织均质管,分为 4 组,管内依次加入 2 个大钢珠、3 个小钢珠、2 个大钢珠,然后加入 0.5 mL 提前配制好的鉴定培养液,将每组的 4 支均质管分别标记 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及常温(RT),放入对应的冰箱中静置 30 min。取出不同温度的均质管进行均质模拟处理。均质处理程序为 3 个循环,每个循环停顿 10 s(inter),采用不同的 4 个速度和时间,分别为 6 m/s 1 min 30 s、6 m/s 1 min、4 m/s 1 min 30 s、4 m/s 1 min。取模拟均质处理后的菌液 10 μL ,定量接种在分离培养血平板上,同时取 10 μL 原稀释菌液进行定量培养。35 $^{\circ}\text{C}$ 24 h 后观察菌落形成数量(cfu),验证不同模拟条件处理时细菌存活情况。③不同条件组织破碎效果验证:选择菌株存活数无明显差异的模拟均质处理条件进行组织破碎效果的验证。在组织均质管内加入顺序为 2 个大钢珠、3 个小钢珠、赘生物组织、2 个大钢珠,加入 500 μL 鉴定培养菌液。不同的均质程序进行均质处理后,肉眼观察和涂片显微镜观察赘生物组织的破碎程度。按组织破碎效果最佳、菌株存活数无明显降低的均质程序进行临床心脏瓣膜赘生物组织的均质处理。(2)临床赘生物标本的均质处理。临床送检的新鲜心脏瓣膜赘生物组织标本同时进行 3 种不同的前处理,分别为均质仪均质处理、剪刀剪碎处理和研磨管手工研磨处理。收到的瓣膜赘生物标本用无菌手术剪将病变部位平均剪成 3 块,每块直径大

约为 5 mm,要尽可能地使每一块都含有明显病变的组织或钙化组织。①均质前处理:在均质管中依次放入 2 个大钢珠、3 个小钢珠,然后放入其中一小块剪下的赘生物组织,再放入 2 个大钢珠,然后加入 0.5 mL 的脑心浸液琼脂培养液,盖紧管盖后放入 -20 °C 冰箱中,30 min 后取出进行均质处理,均质处理程序为 6 m/s 1 min。经前期标本验证发现,仅需 2 个循环就可以将组织充分破碎,在后续实验中均调整为 2 个循环。均质处理后,取组织匀浆 10 μL 定量接种在血琼脂平板、巧克力平板和脑心浸液琼脂平板上进行直接分离培养,CO₂ 孵育箱 35 °C 培养 24 h 后进行菌落观察和鉴定。同时,再取匀浆涂 8 张玻片,分别进行革兰染色 1 张、抗酸染色 1 张、真菌荧光染色 1 张、瑞氏染色 1 张,剩余 4 张作为备片使用。涂片染色后,先用 ×10 显微镜观察染色是否均匀,有无真菌孢子及菌丝等较大病原体,然后再转换到 ×100 油镜下观察是否有链球菌、G⁺ 球菌、G⁻ 球菌、G⁻ 杆菌及 G⁺ 球杆菌。剩余组织匀浆全部转移入脑心浸液琼脂培养液中进行增菌培养,然后次日进行分离培养,分离培养的培养基和条件同均质后直接分离培养。②手工研磨前处理:取第 2 块剪出的赘生物组织,用无菌手术剪尽可能剪碎后放入手工研磨器中,同时加入 0.5 mL 脑心浸液琼脂培养液一起进行手工研磨。充分研磨后,将全部研磨后组织液用无菌吸管转换到脑心浸液琼脂培养液中进行增菌培养,次日进行分离培养,培养基及条件同上。③手工剪碎处理:取第 3 块剪出的赘生物组织,用无菌手术剪尽可能剪碎后,转移入脑心浸液琼脂培养液中进行增菌培养,次日进行分离培养,培养基及条件同上。(3)分离培养和镜检。临床标本采用不同方法进行病原体检测,比较不同方法或组合的病原体检出率。①直接培养:标本不进行任何前处理,脑心浸液增菌培养后进行分离培养;②剪碎培养:将标本尽可能剪碎成为细小颗粒(直径 1~2

mm)后,脑心浸液进行增菌培养后,再进行分离培养;③研磨培养:手工组织研磨器(管)研磨的标本进行增菌培养后,再进行分离培养;④均质直接培养:组织均质前处理后,直接取匀浆进行分离培养;⑤均质增菌培养:组织均质前处理后,匀浆转移入脑心肉汤增菌培养,然后进行分离培养;⑥均质后镜检:均质处理后的组织标本(匀浆)进行涂片、革兰染色和显微镜镜检观察病原体。(4)病原体种属鉴定。分离培养有病原体生长时,利用全自动微生物鉴定质谱仪进行病原体(细菌、真菌)的种属鉴定。质谱鉴定方法按照实验室标准操作程序进行。有真菌生长时,通过棉兰染色进行形态学鉴定。

2 结 果

2.1 稀释倍数的选择 1:100 的稀释倍数在培养基上形成的菌落过于密集,而 1:1000 的稀释倍数能够形成密度适中的菌落,采取此倍数验证均质处理后菌落的存活情况。

2.2 不同均质条件下病原体的存活率 初次实验验证,金黄色葡萄球菌在 6 m/s 1 min 30 s 各温度下均未长菌,所以后续实验的其他 5 种菌株筛选了此转速条件。其中金黄色葡萄球菌在各转速及温度条件下生长情况与原稀释菌液无明显差异。戈登链球菌筛选了 6 m/s 1 min 中的 -80 °C 和 RT 条件。大肠埃希菌筛选了 6 m/s 1 min 中的 -80 °C 条件。近平滑念珠菌筛选了 6 m/s 1 min 中的 4 °C 和 RT 条件。艾肯菌只有在 6 m/s 1 min 中 -80 °C 和 -20 °C、4 m/s 1 min 30 s 中 -20 °C 和 4 m/s 1 min 中 -80 °C 和 -20 °C 条件下生长无明显差异。不同均质程序下验证菌株存活结果见表 1。

2.3 不同均质条件组织破碎效果及细菌存活情况 4 m/s 1 min 30 s 和 4 m/s 1 min 条件下组织未被均匀打碎,管内仍有 1~2 mm 的组织块。而 6 m/s 1 min 条件下组织被均匀打成泥浆泡沫状,模拟赘生物标本处理时实验菌株的存活情况见表 2。

表 1 5 种均质程序验证菌株在不同均质程序下的存活情况(cfu)

均质条件	金黄色葡萄球菌				戈登链球菌				大肠埃希菌				近平滑念珠菌				艾肯菌			
	-80 °C	-20 °C	4 °C	RT	-80 °C	-20 °C	4 °C	RT	-80 °C	-20 °C	4 °C	RT	-80 °C	-20 °C	4 °C	RT	-80 °C	-20 °C	4 °C	RT
6 m/s 1 min 30 s	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 m/s 1 min	10 ²	10 ³	10 ³	10 ³	<10	10 ³	10 ²	<10	10	10 ³	10 ³	10 ³	10 ²	10 ²	10	<10	10	10	0	0
4 m/s 1 min 30 s	10 ³	10 ²	10 ³	<10	10	<10	<10													
4 m/s 1 min	10 ²	10 ²	10 ²	10 ²	10 ³	10	10	<10	<10											
原稀释菌液	10 ³				10															

注: - 为无数据。

表 2 加入赘生物标本后不同条件下模拟菌株存活情况(cfu)

均质条件	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	近平滑念珠菌	艾肯菌
6 m/s 1 min				
-80 °C	10 ²	10 ²	10	<10
-20 °C	10 ²	10 ²	10 ²	10
4 °C	10	10 ²	10	<10
稀释菌液				
RT	10 ²	10 ²	10 ²	10

2.4 临床赘生物标本均质处理后培养、镜检结果 30 份临床赘生物标本经过不同前处理程序进行处理后,分离培养出的病原体包括凝固酶阴性葡萄球菌、肠球菌、棒杆菌、链球菌、念珠菌、莫拉菌、青霉菌、曲霉菌、芽孢杆菌(可疑污染菌)。部分标本疑似存在处理前标本采集送检过程中的污染,部分标本在手工研磨处理过程中存在污染的现象。研磨后镜检可直接观察检出的病原体包括 G⁺ 球菌、G⁺ 链球菌、真菌、

G⁺杆菌等。革兰染色镜检可见较多染成阳性的沉渣,疑似钢珠在研磨过程中剧烈碰撞导致材质脱落造

成。30 份临床心脏瓣膜赘生物标本均质后培养、镜检结果见表 3。

表 3 30 份临床赘生物标本均质处理后培养、镜检结果

序号	检验号	血培养	直接培养	剪碎培养	研磨培养	均质直接培养	均质增菌培养	镜检	备注
1	3004079181	—	无	无	无	无	无	G ⁺ 球菌	—
2	3009706366	—	无	—	—	无	无	无	—
3	3009865429	—	无	非发酵棒杆菌	非发酵棒杆菌	无	无	G ⁻ 杆菌	疑似污染
4	3010071431	无	无	无	无	无	无	G ⁺ 球杆菌	—
5	3010124145	无	无	无	蜡样芽孢杆菌	无	无	疑 G ⁺ 球菌	研磨污染
6	3010204436	—	无	非发酵棒杆菌	非发酵棒杆菌	非发酵棒杆菌	非发酵棒杆菌	G ⁺ 球杆菌	既往污染
7	3010284309	无	奥斯陆摩拉菌	无	无	奥斯陆摩拉菌	奥斯陆摩拉菌	G ⁻ 杆菌	—
8	3010308925	无	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	G ⁺ 球杆菌	—
9	3010301973	无	无	无	无	无	无	G ⁺ 球菌	—
10	3010145342	无	无	无	无	无	无	无	—
11	3004970089	—	无	无	无	无	无	无	—
12	3005049527	—	无	无	—	无	无	G ⁺ 球杆菌	—
13	3005049527	—	无	无	无	无	无	无	—
14	3006622523	—	无	无	无	无	2 cfu 粪肠球菌	大量真菌	—
15	3006595021	无	无	无	粪肠球菌	无	无	G ⁺ 球杆菌	不确定
16	3006868255	无	无	无	无	无	无	无	—
17	3005031217	—	无	无	无	无	无	G ⁺ 球菌	—
18	3006519461	无	无	无	蜡样芽孢杆菌	无	无	无	研磨污染
19	3004128959	佩腾科夫葡萄球菌	无	无	蜡样芽孢杆菌	无	无	无	研磨污染
20	3004718482	—	人葡萄球菌和表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌	蜡样芽孢杆菌	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌	G ⁺ 球菌	研磨污染
21	3005762980	—	蜡样芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	蜡样芽孢杆菌	G ⁺ 杆菌	—
22	3003459086	—	戈登链球菌	戈登链球菌	戈登链球菌	戈登链球菌	戈登链球菌	链球菌	—
23	3003556412	无	无	胶红酵母菌	人葡萄球菌	胶红酵母菌	胶红酵母菌	酵母菌孢子	研磨污染
24	3006234754	—	无	无	无	无	无	疑似 G ⁺ 杆菌	—
25	3004776194	—	无	无	蜡样芽孢杆菌	无	根特节杆菌	无	—
26	3004776194	—	无	无	人葡萄球菌	无	人葡萄球菌	疑似 G ⁺ 球菌	—
27	3010410534	无	无	无	无	无	无	疑似 G ⁺ 杆菌	—
28	3004334982	—	无	无	无	无	无	G ⁺ 球菌	—
29	3006825403	—	无	无	人葡萄球菌	无	无	疑似 G ⁺ 球菌	研磨污染
30	3003612039	表皮葡萄球菌	污沟罗氏球菌	污沟罗氏球菌	污沟罗氏球菌	污沟罗氏球菌	污沟罗氏球菌	G ⁺ 球菌	—

注:—表示未进行实验或无相关内容;无表示无细菌生长或未见细菌。

均质直接培养的阳性率较研磨培养升高,可达 23.3%。均质增菌培养阳性率可达 36.7%。均质后增菌培养联合镜检阳性率高达 76.7%。不同前处理方法病原体检出情况见表 4。

表 4 赘生物标本不同前处理条件病原体检出结果

处理方法	阳性 (n)	阴性 (n)	检查阳性率 (%)	污染率 (%)	培养时间 (d)
直接培养	6	24	20.0	—	2~3
剪碎培养	5	25	16.7	6.7	3~4
研磨培养	6	24	20.0	36.7	3~4
均质直接培养	7	23	23.3	3.3	2~3
均质增菌培养	11	19	36.7	13.3	3~4
均质后镜检	23	7	76.7	—	2~3
均质增菌培养+镜检	23	7	76.7	—	—

注:—为无数据。

处理的 30 份标本中,研磨培养阳性 6 例,阴性 24 例,均质增菌培养阳性 11 例,阴性 19 例,均质增菌培养联合镜检阳性 23 例,阴性 7 例。研磨培养与均质增菌培养病原体阳性率分别为 20.0%、36.7%,差异有统计学意义($\chi^2 = 2.052, P = 0.126$)。研磨培养与均质增菌培养联合镜检的病原体阳性率分别为 20.0%、76.7%,差异有统计学意义($\chi^2 = 17.954, P < 0.001$)。

3 讨论

目前,在心脏瓣膜赘生物标本或其他人体组织标本微生物培养前处理方面,尚无足够的研究明确最佳的组织前处理方案。仅在人工假体等骨科组织标本前处理中,超声波前处理、表面研磨处理、酶消化处理、化学物质处理等方案有极少的研究证明不同的前

处理方法细菌培养阳性率差异较大^[17-19]。本研究中,针对心脏瓣膜标本,探索了不同的前处理程序,以提高瓣膜赘生物标本微生物培养阳性率及病原体检出率。

均质条件探索实验证明,6 m/s 1 min; -20 °C 条件是处理临床瓣膜标本的适宜条件。此条件下病原体存活数最多,可以将组织完全被打碎,使得组织内的病原体得到充分释放,而且组织均质管也无破碎情况,并且只有在 -20 °C 下细菌存活数与原稀释菌液无明显差异,其他温度下,细菌可能受温度或高或低的影响而死亡。但在 6 m/s 1 min 30 s 时,4 种温度(-80 °C、-20 °C、4 °C、RT)条件下组织均质管均有出现管壁或管底破碎的情况,可能由于在 6 m/s 1 min 30 s 条件下转速过高导致。在 -80 °C 其他转速条件下也会出现均质管破碎情况,原因可能是均质管温度过低,脆性提高,在均质处理过程中,均质管温度又急剧升高,温差突然的改变导致管壁破碎。所以后期尚需改进以下几点:(1)工业化均质在临床应用时应加入温控系统进行简化操作,适应不同生物学特性的病原体,提高菌株存活率;(2)选择优质耗材(均质管),提高均质管条件耐受范围。

均质增菌培养联合镜检的方法能够明显提高病原体检出率。均质处理心脏瓣膜赘生物可降低手工操作污染率,同时组织充分破碎,病原体充分释放。均质化处理后显微镜镜检可发现一些不可培养的病原体,并可根据镜检结果选择和调整培养条件,从而提高病原检出率。均质增菌培养病原检出率最高,但是报告时间相对延长(1 d)。仍需改进的是镜检中镜下会有沉渣影响,沉渣由钢珠在均质过程中互相剧烈碰撞,材质破碎所致,后续实验可以更换更加优质的钢珠,或用瓷珠代替。另外,均质前处理方法相对手工研磨来说,污染率已经大大减少,但实验过程中污染问题仍是存在的,例如将组织放入组织均质管的过程中,取均质后增菌培养液进行分离培养接种时,依旧有可能会被污染,所以这些步骤中应尽可能地去规范实验操作,避免污染。

研磨培养与均质增菌培养标本结果相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),可能是因为本次试验入组的标本量过少导致,组织标本较多的实验室可进一步增加样本量,进行统计分析。由于部分病原体镜检观察可见而培养阴性,导致均质增菌培养联合镜检与研磨培养相比,病原体检出率明显升高。例如部分病原菌营养要求较高,实验室内无法培养或部分病原体在使用抗菌药物后已死亡导致培养阴性。

综上所述,推荐临床组织标本进行均质前处理。感染性心内膜炎心脏瓣膜赘生物的特性是纤维结缔组织致密,部分瓣膜存在“钙化”情况,不易通过手工研磨或酶消化处理释放内部的病原体,并且手工研磨或剪碎处理不能够将病原体充分释放。而均质处理的优点在于耗材成本低,手工操作流程少,标本被污染的概率降低,临床瓣膜组织标本得到充分破碎,使

得组织内的病原体充分释放,提高了病原体的检出率和镜检阳性率,适用于外科手术量大的临床医院,节省时间,且方便快捷。

参考文献

- [1] LAMAS C D. Infective endocarditis; still a deadly disease [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2020, 114(1): 9-11.
- [2] SCULLY D R, WOIDMAN S, PRENDER B D. Infective endocarditis; we could (and should) do better [J]. *Heart*, 2021, 107(2): 96-98.
- [3] 程军, 胡欢, 周洲, 等. 二代测序在检测感染性心内膜炎患者心脏瓣膜组织病原体中的应用 [J]. *中国感染控制杂志*, 2019, 18(4): 277-284.
- [4] HABIB G, LANCELLOTTI P, ANTUNES M J, et al. 2015 ESC guidelines for the management of infective endocarditis; the task force for the management of infective endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM) [J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(44): 3075-3128.
- [5] YUAN X C, LIU M, HU J, et al. Diagnosis of infective endocarditis using echocardiography [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(38): e17141.
- [6] MGBOJIKWE N, JONES S R, LEUCKER T M, et al. Infective endocarditis; beyond the usual tests [J]. *Cleve Clin J Med*, 2019, 86(8): 559-567.
- [7] MA L, GE Y, MA H, et al. Infective endocarditis at a tertiary-care hospital in China [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2020, 15(1): 135.
- [8] 龙小平, 戴仲秋, 谢轶, 等. 长奈瑟菌致感染性心内膜炎 1 例案例分析及文献回顾 [J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(8): 1022-1024.
- [9] 王佳, 高辉, 徐益, 等. 感染性心内膜炎患者病原菌分布及耐药性分析 [J]. *中国抗生素杂志*, 2019, 44(8): 958-962.
- [10] TINICA G, TARUS A, ENACHE M, et al. Infective endocarditis after TAVI: a meta-analysis and systematic review of epidemiology, risk factors and clinical consequences [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2020, 21(2): 263-274.
- [11] WANG A, GACA J G, CHU V H. Management Considerations in Infective Endocarditis: A Review [J]. *JAMA*, 2018, 320(1): 72-83.
- [12] REZAR R, JIRAK P, LICHTENAUER M, et al. Partial oral antibiotic therapy is non-inferior to intravenous therapy in non-critically ill patients with infective endocarditis: review and meta-analysis [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2020, 132(23/24): 762-769.
- [13] PRENDERGAST B D, REDWOOD S, CAHILL T J. Infective endocarditis after TAVR [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2020, 75(24): 3031-3032.
- [14] CHAMBERS H F, BAYER A S. Native-valve infective endocarditis [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(6): 567-576.
- [15] 戴江, 李进华, 刘岳, 等. 心脏瓣膜术后感染性心内膜炎再次手术后临床预后的分析 [J]. *心肺血管病杂志*, 2020, 39(3): 284-287.

(95%CI:0.678~0.918),说明神经酰胺 C16 对脑出血后抑郁具有较好的诊断能力。

本研究结果显示,随着病程的进展血清神经酰胺 C16、C24 及 C16/C24 总体上有逐渐向健康人群水平接近的趋势。其他学者研究 PSD 多发生于脑卒中发病后 1 年内,3 个月内发病率尤其较高^[16];另有研究认为,PSD 发病高峰在脑卒中后 1 个月^[17],也有报道称发病高峰在脑卒中后 3~6 个月^[18-19]。本研究虽然发现脑出血后随病程进展以上 3 项指标的水平呈现一定规律性变化,但未发现在脑出血后每个病程组 3 项指标比较有明显差异,可能与研究对象、标本类型、方法学、评估时间点和用于测量抑郁的工具不同有关。

综上所述,脑出血后神经酰胺 C16 水平升高可能会增加抑郁发生的风险,C16 也有望成为诊断脑出血后抑郁的生物标志物之一。

参考文献

[1] SAARNI S I, SUVISAARI J, SINTONEN H, et al. Impact of psychiatric disorders on health-related quality of life: general population survey[J]. *Brit J Psychiat*, 2007, 190(4):326-332.

[2] 肖展宏, 庞晓敏, 韦宗勇. 脑卒中后抑郁的病理生理机制及其临床干预的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 24(23):4683-4687.

[3] 刘世钰, 赵亮, 陈俊, 等. 基于组学技术的抑郁症相关生物标志物研究进展[J]. *药学实践杂志*, 2018, 36(3):198-203.

[4] 王甜甜, 王成坤, 韩峰. 脑卒中后抑郁病理机制及药物治疗进展[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(11):1628-1634.

[5] 孔维星, 李功迎. 神经酰胺与抑郁症的相关性研究进展[J]. *四川精神卫生*, 2019, 32(1):74-77.

[6] 任晓莉, 赵月琦. 缺血性脑卒中后患者情感障碍发病机制及治疗的研究[J]. *医学信息*, 2021, 34(14):40-42.

[7] 郑书恭. 缺血性脑卒中患者脑卒中后抑郁的相关因素分析[J]. *中国现代药物应用*, 2021, 15(12):105-107.

[8] 唐甲凡, 翟万庆, 宋丽艳, 等. 多种血清指标预测老年脑卒中后抑郁的临床价值[J]. *河北医科大学学报*, 2021, 42

(6):651-655.

[9] 陈艳, 马丽明. 脑卒中后抑郁患者血清 MAO 水平升高与单胺类神经递质和氧化应激的关系[J]. *临床医学研究与实践*, 2021, 6(17):127-129.

[10] GULBINS E, PALMADA M, REICHEL M, et al. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs[J]. *Nat Med*, 2013, 19(7):934-938.

[11] KORNHUBER J, REICHEL M, TRIPAL P, et al. The role of ceramide in major depressive disorder[J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2009, 259 (Suppl 2):S199-204.

[12] GRACIA-GARCIA P, RAO V, HAUGHEY N J, et al. Elevated plasma ceramides in depression[J]. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 2011, 23(2):215-218.

[13] KORNHUBER J, MEDLIN A, BLEICH S, et al. High activity of acid sphingomyelinase in major depression[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2005, 112(11):1583-1590.

[14] GULBINS A, GRASSMÉ H, HOEHN R, et al. Regulation of neuronal stem cell proliferation in the hippocampus by endothelial ceramide[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2):790-801.

[15] GULBINS E, WALTER S, BECKER K A, et al. A central role for the acid sphingomyelinase/ceramide system in neurogenesis and major depression [J]. *J Neurochem*, 2015, 134(2):183-92.

[16] 张子良, 陈金波, 宋晓文, 等. 脑卒中后抑郁的血清生物标志物[J]. *国际脑血管病杂志*, 2018, 26(3):207-212.

[17] PAN A, SUN Q, OKEREKE O I, et al. Depression and risk of stroke morbidity and mortality: a meta-analysis and systematic review[J]. *JAMA*, 2011, 306(11):1241-1249.

[18] ROBINSON R G, SPALLETTA G. Post-stroke depression: a review[J]. *Can J Psychiatry*, 2010, 55(6):341-349.

[19] YANG R R, LU B C, LI T, et al. The relationship between high-sensitivity C-reactive protein at admission and post stroke depression: a 6-month follow-up study [J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2016, 31(3):231-239.

(收稿日期:2021-07-30 修回日期:2021-10-10)

(上接第 2957 页)

[16] SHMUELI H, THOMAS F, FLINT N, et al. Right-sided infective endocarditis 2020: challenges and updates in diagnosis and treatment[J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(15):e017293.

[17] CAI Y, FANG X, ZHANG L, et al. Microbial yield from infectious tissues pretreated by various methods: an in-vitro study[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2021, 22(1):209.

[18] FANG X, ZHANG L, CAI Y, et al. Effects of different

tissue specimen pretreatment methods on microbial culture results in the diagnosis of periprosthetic joint infection[J]. *Bone Joint Res*, 2021, 10(2):96-104.

[19] ROTHENBERG A C, WILSON A E, HAYES J P, et al. Sonication of arthroplasty implants improves accuracy of periprosthetic joint infection cultures[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2017, 475(7):1827-1836.

(收稿日期:2021-03-11 修回日期:2021-07-13)