

· 临床研究 ·

下呼吸道厌氧菌感染固相微萃-气相色谱快速诊断分析

薛存宽 王膜荣 蒋鹏 王玲 彭端 袁彬

【摘要】 目的 对固相微萃取(SPME)-气相色谱(GC)方法直接检测痰标本快速诊断下呼吸道厌氧菌感染结果的可信性进行分析。**方法** 用 SPME + GC 方法对 155 例老年和 65 例老年前期下呼吸道感染患者痰标本直接检测其下呼吸道厌氧菌,并与标准菌株培养液的结果作对照,以明确检出除乙酸和丙酸外的其他挥发性短链脂肪酸(VSCFA)者为阳性。**结果** 标准菌株培养液均未检出除乙酸和丙酸外的其他 VSCFA,厌氧菌培养液均检出多种除乙酸和丙酸外的 VSCFA;同步对比检测 80 例下呼吸道感染患者集痰和含漱水,其厌氧菌培养的阳性率分别为 100% 和 97.5%,半量集痰厌氧菌 SPME-GC 和乙醚萃取-GC 检测的阳性率分别为 63.75% 和 13.75%,含漱水的阳性率均为 0;220 例集痰 SPME + GC 检测,老年和老年前期患者厌氧菌感染的阳性率分别为 69.68% 和 43.08%。**结论** SPME + GC 方法诊断下呼吸道厌氧菌感染快速、简便,结果可信。

【关键词】 厌氧菌感染; 诊断; 固相微萃取; 气相色谱

Rapid diagnosis of anaerobic infection in the lower respiratory tract with solid-phase microextraction plus gas chromatography

XUE Cunkuan, WANG Morong, JIANG Peng, WANG Ling, PENG Duan, YUAN Bin

Geriatric Medical and Pharmaceutical Institute of Tongji Medical College,

Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430077, China

【Abstract】 Objective To study the rapid diagnosis of anaerobic infection in the lower respiratory tract by analyzing the sputum directly with solid-phase microextraction (SPME) plus gas chromatography (GC). **Methods** The substrata of the standard strains and the cumulative or single sputum samples were extracted with SPME after they were liquefied by full agitation and salted out, then were analyzed with GC. A positive diagnosis was determined when the volatile short-chain fatty acids (VSCFA) except acetic acid and propionic acid were found explicitly. **Results** VSCFA except acetic acid and propionic acid were not found in the substrata of the common aerobes in clinic, while they were observed significantly in the substrata of the common anaerobes in clinic. The positive rates of the anaerobe culture were 100% and 97.5% in cumulative sputum and mouthwash samples respectively. The positive rates using SPME-GC were 63.75% (sputum) and 0% (mouthwash), but the positive rates of sputum solvent extraction were 13.73% (sputum) and 0% (mouthwash) in the contrast analysis of the cumulative sputum and mouthwash samples from 80 cases of the lower respiratory tract infection. Among 220 inpatient cases with infection in the lower respiratory tract, there was a 69.68% (108/155) positive rate of anaerobic infection in the aged patients and a 43.08% (28/65) positive rate of anaerobic infection in the pre-aged patients. After treatment with tinidazole, the patient's symptoms were mitigated rapidly, the amount and peak area of VSCFA decreased or vanished in 22 patients with anaerobic infections in the lower respiratory tract diagnosed with SPME-GC. **Conclusions** Diagnosis of anaerobic infection in the lower respiratory tract with SPME + GC is rapid, simple and creditable.

【Key words】 anaerobic infection; diagnosis; solid-phase microextraction; gas chromatography

基金项目: 湖北省科技攻关项目(2002P1701)

作者单位: 430077 武汉, 华中科技大学同济医学院老年医药学研究所

作者简介: 薛存宽, 男, 所长, 教授, 主任医师, 博士研究生导师

通讯作者: 薛存宽, 电话: 027-86785587

专利公告号: CN 1386863A

下呼吸道厌氧菌感染是临床上十分常见的感染性疾病,尤其是老年人。由于诊断技术的原因,大部分患者得不到及时的诊断,导致病情延误和药物浪费。作者采用固相微萃取(solid phase microextraction, SPME) + 气相色谱(gas chromatography, GC)

法直接对临床常规采集的痰液进行分析,用于临床下呼吸道厌氧菌感染诊断,取得很好效果,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 病例选择 220 例下呼吸道感染(排除同时有口腔感染)患者来源于 2000 年 1 月~2002 年 5 月华中科技大学同济医学院附属梨园医院、协和医院、同济医院;武汉大学附属人民医院、中南医院;武汉市第一医院的住院患者。老年患者 155 例(年龄 60~98 岁,平均 74.6 岁),老年前期患者 65 例(年龄 45~58 岁,平均 51.3 岁);肺炎 109 例,慢性阻塞性肺病(COPD)急性发作期 85 例,支气管扩张并感染 17 例,肺脓肿 9 例。

1.2 试剂、器材与工作参数

1.2.1 SPME 针头采用对短链脂肪酸有特异选择性的聚乙烯乙二醇-二乙烯苯复合涂层的石英纤维(CW/DVB,美国 Supelco 出品)。采用“液上空间萃取”(顶空萃取)——待检标本置于 30 mL 密封瓶中,超声震荡下,SPME 针头插至距液面 1 cm 萃取 3 min。

1.2.2 GC 仪器 气相色谱仪(SP-520),山东鲁南化工仪器厂、大口径弹性石英毛细管 FFAP 色谱柱(33.00 m×0.53 mm,武汉大学化学学院制备)、氢火焰检测器(FAD)、载气 N₂。气化室温度 250℃,脱附时间(SPME)10 s,进样量 0.6 μL(溶剂萃取)。柱温采用 60~100~150℃二阶程序升温,灵敏度 10³,衰减 1/4,纸速 4 mm/min。

1.2.3 试剂 乙醚(分析纯,上海马陆制药厂,20020133),次氯酸(38%)、盐酸(35%)、乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸、庚酸(分析纯,市售)。

1.3 标准挥发性短链脂肪酸(SCVFA)混合液的 SPME+GC 检测 10⁻⁵分析纯乙酸、丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸、异己酸、己酸、庚酸混合液,液上空间 SPME-GC,记录各种成分的保留值(图 1)。

1.4 临床常见需氧菌与厌氧菌的标准菌株培养液 GC 检测 需氧菌(20 属,47 种)以肉浸液培养基、厌氧菌(10 属,23 种)以蛋白胨酵母液体培养基(PYG)培养 72 h,分别以乙醚充分萃取并浓缩至原体积的 1/5 或 SPME 后 GC 检测。标准菌株由武汉大学基础医学院微生物教研室、华中科技大学同济医院及梨园医院检验科馈赠。

1.5 临床标本采集、预处理与 GC 诊断

1.5.1 痰样采集和预处理 以预置 5 ml 38%次氯

酸-35%盐酸(4:1)液化剂的普通消毒痰杯收集的晨痰、集痰。痰样充分震荡液化,加氯化钠饱和盐析。

1.5.2 含嗽水采集和预处理 取痰前温开水含嗽,检前加氯化钠饱和盐析。

1.5.3 SPME-GC 检测诊断标准 ①明确、清晰检出差有异丁酸、戊酸、异戊酸成分峰中之一者;②明确、清晰检出有乙酸、丙酸及另外一种短链脂肪酸成分峰者;③明确、清晰检出有两种非异丁酸、戊酸、异戊酸、乙酸、丙酸的短链脂肪酸成分峰者。

1.6 临床标本的细菌学培养

1.6.1 常规培养 血液琼脂培养基培养+革兰染色。

1.6.2 厌氧培养 厌氧罐法,新鲜配制的干燥厌氧菌分离鉴别培养基(卫生部上海生物制品研究所 95-1)。

2 结果

2.1 混合标准 SCVFA 溶液 SPME-GC 分析 各成分色谱峰分离良好,峰保留时间 2.70~10.80 min(图 1)。

2.2 标准菌株培养液 GC 检测 仅少数需氧菌检出有微量乙酸或(及)丙酸,全部需氧菌均未检出有除乙酸、丙酸外的其他 SCVFA,特别是异丁酸、戊酸、异戊酸;全部厌氧菌均检出有多种 SCVFA。本检测结果与文献报道基本一致^[1]。

2.3 80 例老年下呼吸道感染患者的同步痰和含嗽水厌氧菌培养、痰和含嗽水 GC 结果 80 例常规采集和保存送检的晨痰标本厌氧菌培养的阳性率为 100%,同步含嗽水厌氧菌培养的阳性率高达 97.5%(78/80);12 h 夜集痰(半量)SPME+GC 检测的阳性率为 63.75%(51/80),另半量痰乙醚萃取+GC 检测的阳性率为 13.75%(11/80);含嗽水 SPME 或乙醚萃取+GC 检测的阳性率均为 0(0/80)(图 2~4)。

2.4 220 例下呼吸道感染患者的痰 SPME+GC 结果 老年和老年前期患者厌氧菌感染阳性率分别为 69.68%(108/155)和 43.08%(28/65),两组间比较具有极显著性差异($P<0.01$)。比对各种厌氧菌的产酸谱^[1],多数患者为多种厌氧菌混合感染;同步痰菌常规培养表明 80%(109/136)为厌氧/需氧菌混合感染,以金葡菌、链球菌及嗜血流感杆菌为多见。

2.5 22 例 SPME-GC 阳性患者替硝唑静脉点滴治疗的病情追踪 该组患者均系临床顽固感染,头孢或喹诺酮类治疗效果差,经 SPME+GC 拟诊为厌氧菌感染。加用替硝唑后病情迅速缓解,痰 SPME+GC 监测检出的短链脂肪酸成分峰数目及峰面积逐渐减少,最后消失(图 5~6)。

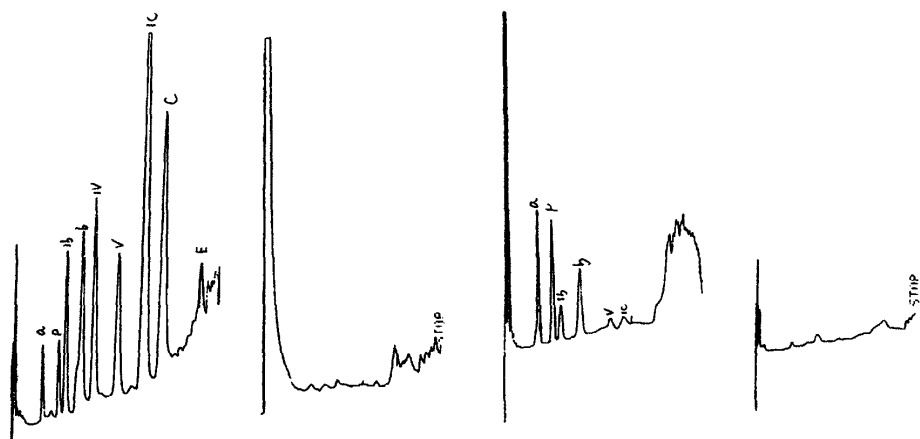


图 1 10⁻⁵标准短链脂肪酸 (SPME-GC) 图 2 患者张××集痰 (乙醚萃取-GC) 图 3 患者张××集痰 (SPME-GC) 图 4 患者张××含嗽水 (SPME-GC)

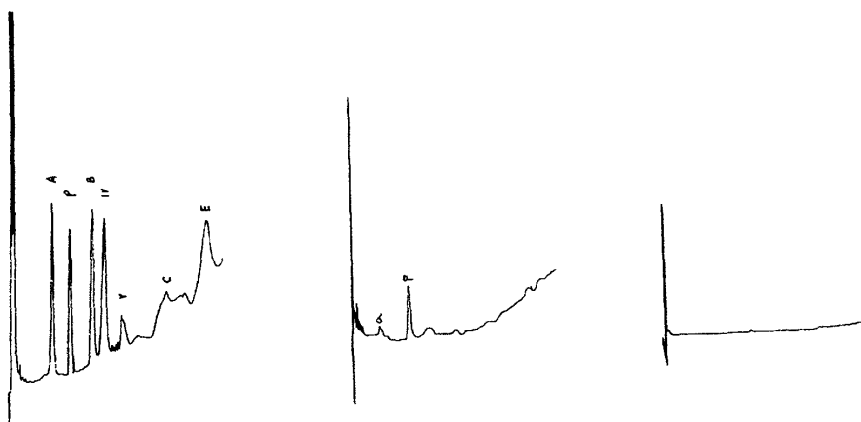


图 5 患者喻××集痰 (治疗前 SPME-GC) 图 6 患者喻××集痰 (治疗中 SPME-GC) 图 7 患者喻××集痰 (治疗后 SPME-GC)

3 讨 论

厌氧菌只能从无氧酵解中获得能量,其主要最终代谢产物为短链脂肪酸等。虽然少数需氧菌亦可代谢产生少量的乙酸或丙酸,而丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸、琥珀酸等则是厌氧菌特征产物^[2]。不同种、属需氧菌产酸谱各异,短链脂肪酸的 GC 分析是厌氧菌属、株的鉴定主要方法^[2]。

厌氧菌作为正常菌群广泛存在于人体皮肤深部和腔道深部黏膜表面,由于各种原因引起机体免疫功能下降、菌群失调或细菌易位导致感染。厌氧菌是下呼吸道感染中十分常见的病原菌,发生率高达 60%,特别是老年体弱与并存有严重慢性疾病患者,多

数系需氧菌-厌氧菌混合感染^[2]。细菌学诊断是厌氧菌感染的经典方法,但它对标本采样、标本保送及厌氧培养都有严格要求。尤其是对下呼吸道标本的诊断,为了避免口、咽腔正常寄居菌污染的影响,多主张采用肺穿刺、环甲膜穿刺或带防污套的纤维支气管镜毛刷取样,临床上难以常规开展。近年来,荧光抗体染色法、酶联免疫组化法及 DNA 探针、基因扩增(PCR)技术都已成功应用于厌氧菌感染的诊断。但它们科、属、种特异性高,不同的厌氧菌要求不同的诊断盒,这大大影响了它的临床实用价值^[2-5]。

短链脂肪酸的 GC 分析从 20 世纪 80 年代开始用于临床厌氧菌感染诊断。大量研究表明,深部脓

肿的脓液、烧伤感染的脓液、败血症的血液、胆总管引流液、感染性胸腹水等,采用厌氧培养细菌学检查与 GC 分析对照,其结果与厌氧培养相符,差异无显著性^[6~8]。GC 的临床诊断标准尚不统一,大致上有“半定量”与“定性”两种。文献报道中多数采用“半定量”,它以标本中含有某种浓度以上的短链脂肪酸为阳性,由于标本来源不同、实验条件与操作的差异,其限量标准也不统一^[4,11];定性诊断以标本中检出有特征性短链脂肪酸者即诊断为厌氧菌感染。Gorbach 等^[12]认为检出丁酸、异丁酸或琥珀酸之一者即可诊断;孟宪钧等^[13]提出检出除乙酸外的其他短链脂肪酸,特别是 >3 种时即可拟诊。鉴于“半定量标准”比“定性”的工作量成倍增加,而且由于标本来源不同、培养或萃取细节条件差异、单种或多种菌感染的区别,“半定量”法难以统一标准。非挥发性的琥珀酸 GC 检测必须先进行衍生化处理,该操作比较烦琐,从 VPI, Ladas 等^[14]及作者的研究结果来看,它的检测对临床拟诊结果影响不大。由于原方法的标本前处理采用有机溶剂萃取而使灵敏度受限,故临床上大部分标本仍需先行短程厌氧培养扩增。由于常规采集的痰样存在口腔正常寄居菌污染,故它不能用于厌氧菌细菌学诊断(包括短程厌氧培养 + GC),作者的研究资料也充分证明了这一点。

SPME 是 20 世纪 90 年代发展起来的新技术,它远比液相萃取法简便、快捷、选择性好、萃取效率高,对复杂样品中萃取有机物可获得 $>10^9$ 的检测限,并且无污染^[15-19]。SPME-GC 或液相色谱联用已广泛应用于刑侦、辑毒、环监、食品及制药,但尚未应用于临床。CW/DVB-SPME 针头对短链脂肪酸有很好的选择性和萃取效率,故对小量的临床样本无需预先厌氧培养即可直接成功地进行 SPME-GC 分析。

同步进行的集痰、含嗽水的 SPME-GC 分析结果表明,该法不仅阳性率高,并在没有并存口、咽腔感染时可基本排除假阳性。口、咽腔正常污染不影响检测结果是因为:口、咽腔正常寄居的厌氧菌密度及繁殖、代谢率低,即产生的短链脂肪酸量远远低于感染灶,在选择适中的 GC 灵敏度足以测出痰中各种短链脂肪酸时却不受口、咽腔分泌液的影响。由于 SPME-GC 检测的是厌氧菌代谢产物而非活菌,预置液化剂可以灭菌,所以标本采集与保送不必严格厌氧和限时,标本瓶避热封盖即可。作者研究资料中的这组 220 例下呼吸道感染患者包括支气管感染与肺感染,病情轻重不一,并源自多家医院,未能

同步做经皮肺穿刺或特殊保护套细胞刷取材厌氧培养作为对照是一缺憾。但是,同期一组 16 例感染型腹水、阑尾脓肿、烧伤感染及十二指肠引流液的厌氧培养与 SPME-GC 对比检测,其结果完全一致。加上 80 例含嗽水与痰的 SPME-GC 对比检测结果表明,可以基本排除口腔正常寄居菌的影响。作者认为:在没有并发口、咽腔感染前提下,常规集痰或晨痰标本 SPME-GC“定性”分析,是一个比较理想的、快速拟诊下呼吸道厌氧菌感染的方法。本研究结果还显示,短链脂肪酸峰数目及峰面积与病情相平行,SPME-GC 法还可用于病情转归监测。SPME-GC 法不需要特殊复杂仪器设备,30~40 min 即可获得诊断。一根 SPME 针头可以使用 80 次左右,针头进口价格比较贵,目前作者正在与有关单位进行国产化研制,成功后价格将可大幅度下降,以便普及推广。

本资料结果显示,老年人的下呼吸道感染发生率远高于老年前期。其原因可能有:①随老化增龄免疫力下降;②老年人口腔卫生状况往往较差、咽黏膜及淋巴组织萎缩、上皮角化和甲状软骨钙化使防御反射钝化,使口-咽腔寄居的厌氧菌密度升高并容易发生误吸;③老年人常患有多种基础疾病而导致免疫功能下降、误吸,以及下呼吸道微生态改变,后者造成局部缺氧环境与利于厌氧菌生长等。

参考文献

- 1 Holdemans LV. Anaerobe, In: Anaerobe laboratory manual. 4th ed. Virginia: VPI, 1977. 1-116.
- 2 彭文伟,主编. 现代感染性疾病与传染病学. 北京:科学出版社,2000,1214-1228.
- 3 Finegold SM, Jousimies-Somer HR, Summanen P. *Bacteroides levii*-like organisms isolated from clinical specimens. Clin Infect Dis, 1995,20:208-209.
- 4 Jousimies-Somer HR. Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. Clin Infect Dis, 1997,25:78-87.
- 5 Zhang G, Weintraub A. Rapid and sensitive assay for detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. J Clin Microbiol, 1998,36:3545-3548.
- 6 Willis AT. Anaerobic bacteriology. 3rd ed. London: Butterworth, 1977;96-104.
- 7 Mitruka EM. Gas chromatographic application in microbiology and medicine. New York, John Wiley; 1975, 251-278.
- 8 Tuner K, Baron EJ, Summanen P, et al. Cellular fatty acids in *Fusobacterium* species as a tool for identification. J Clin Microbiol, 1992,30:3225-3229.
- 9 卢焱,叶萍,瞿振兴. 气相色谱法检测感染标本的短时

- 间培养物诊断厌氧菌感染. 中华医学检验杂志, 1992, 15:158-159.
- 10 卢焱, 瞿振兴, 叶萍. 气相色谱法快速诊断厌氧菌感染. 中华医学杂志, 1992, 72(1):14-17.
- 11 李勤, 张雅萍, 肖光夏. 烧伤厌氧菌快速检测的实验研究及临床应用. 中华创伤杂志, 1995, 11:371-373.
- 12 Gorbach SL, Mayhew JW, Bartlett JG, et al. Rapid diagnosis of anaerobic infection by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens. J Clin Invest, 1976, 57:478-484.
- 13 孟宪钧, 侯大和, 杨可桢, 等. 气相色谱法快速拟诊厌氧菌感染. 中华医学杂志, 1983, 63:661-664.
- 14 Ladas S, Arapakis G, Malamou-Ladas H. Rapid diagnosis of anaerobic infection by gas-liquid chromatography. J Clin Pathol, 1979, 32:1163-1167.
- 15 Zhang Z, Pawthorne S. Analysis of organic compound in environmental samples by headspace solid phase microextraction. J High Resolut Chromatogr, 1993, 16:689-692.
- 16 Buchholz K, Pawliszyn J. Optimization of solid-phase microextraction (SPME) condition for phenol analysis. Anal Chem, 1994, 66:160-167.
- 17 Chai M, Arthur C, Belardi R, et al. Determination of volatile chlorinated hydrocarbons in air and water with solid phase microextraction. Analyst, 1993, 118:1501-1505.
- 18 Boyd-Boland A, Pawliszyn J. Solid-phase microextraction: solvent-free sample preparation for GC and HPLC. Chem Aust, 1998, 65:10-12.
- 19 Page B, Lacroix G. Application of solid-phase microextraction to the headspace analysis of halogenated volatiles in selected foods. J Chromatogr, 1993, 648:199-211.
- (收稿日期:2003-06-30)
(本文编辑 缪其宏)

· 消 息 ·

第十次全国急诊医学学术交流暨亚太地区 灾害急救医学学术交流征文通知

中华医学会急诊分会定于 2004 年 10 月中旬在上海召开“亚太地区灾害急救医学学术交流会”和“第十次全国急诊医学学术交流会”。会议具体报到时间、地点另行通知。欢迎国内外从事急诊急救、灾害医学、危重病救治和重症监护病房工作的临床医务人员踊跃投稿, 参加会议, 参会者授予国家级 I 类继续教育学分。

1. 征文内容: 急诊医学危重病急救医学方面的基础理论研究、动物实验的新发现、新成果、心肺脑复苏、急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征/多器官衰竭、创伤、高危手术、重症胰腺炎、严重感染、水电解质和酸碱平衡紊乱、休克、急性冠脉综合征、严重心律失常、高血压危象、重症哮喘、消化道出血、各类中毒的临床研究、诊断、救治及护理的经验总结或个案报道; 急危重症和重症监护病房诊疗方面的新技术、新疗法及中西医结合开展的研究; 灾难性事件如地震、台风、洪水、水灾、海啸、空难、战争、瘟疫等方面的急救组织与经验总结; 院前急救方面的经验总结; 院内急诊医学、急救医学和重症监护病房管理体制的经验与探讨。

2. 征文要求: 文体不限, 论文请寄全文及 500 字以内中文摘要各 1 份; 加盖单位公章, 文责自负、自留底稿、恕不退稿; 按结构式摘要撰写, 论文请用 A4 打印稿, 请附上软盘, 截稿日期: 2003 年 12 月 30 日。来稿地址和联系人: 上海市北京西路 163 号上海市医学会, 邮政编码: 200040, 联系人, 史伟云, 电话: 021-62677790。