

# 应用离子色谱法快速诊断厌氧菌感染

江西省科学院微生物研究所

熊德鑫 陈若莹 赖军 刘刚华 黄晓蓉

华西医科大学口腔医学研究所

雷莉 张萍 肖晓蓉 朱砾 刘豫蓉

**提要** 本实验对临床采集的51份标本,以常规的厌氧菌分离方法,与使用离子色谱仪直接分析标本的方法相对照,结果检出异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸的阳性相关率为93.5%。其中异丁酸和异戊酸与拟杆菌属检出相关性达94%。异丁酸、丁酸与梭杆菌属和梭菌属的阳性相关性为92~93%。使用离子色谱仪直接分析临床标本,对于厌氧菌感染症的快速推断性诊断有肯定价值,可推荐临床检验中试用。

**关键词:** 厌氧菌

厌氧菌感染已日益引起临床医师的关注,这不仅是因为厌氧菌的感染遍及临床各科,高达70~90%<sup>[1]</sup>,而且厌氧菌对临床常规使用的氨基糖苷类抗生素具有耐性<sup>[2]</sup>,因此临床工作者希望能快速诊断厌氧菌感染,以利于患者及时地获得有效治疗。尽管目前厌氧菌的分离培养技术有了很大的改进,标本中厌氧菌的检出率相应提高,然而,因为厌氧菌生长缓慢,用常规实验室方法分离,耗时较长(约1~2周)。近年来国外许多研究者报道了若干快速诊断厌氧菌感染的方法,其中有发展前途的是使用气液相色谱分析(Gas-Liquid chromatography)简称GLC,以及离子色谱分析法(Ion-Chromatography即IC)。关于利用GLC法笔者前有报告<sup>[3]</sup>,现将IC法的应用报告如下。

## 材料和方法

### 一、标本和菌株

1.标本:外科手术中(或无菌法)采集标本,立即注入输送培养基,在2小时内进行细菌分离培养,或暂存放在4℃冰箱,短时取出经10~20倍稀释,以10~20 $\mu$ l/次用于IC分析。

计胆汁标本19份,胃穿孔血性分泌物8份,阑尾、膈下、腹壁、肝脓疡脓汁标本23份,甲状腺合并感染(早期)的血性分泌物1份,标本共计51份。

2.临床分离菌株:取临床标本(置于输送液体培养基中)0.1毫升分别滴入选择性培养基(GAM加万古霉素、GAM加卡那霉素和KV平板、GAM加新霉素或再加卡那霉素、BBE血平板等)和非选择性培养基(GAM或BHI血平板)中,用灭菌“L”玻璃棒布开,置厌氧罐中(以抽气换气法、含触媒钯的厌氧培养法)37℃、培养5天。以后,从初代培养的血平板上挑取特征性菌落5个以上,划线接种在GAM或BHI血平板上,一式2份,一份置需氧培养,一份厌氧培养。在需氧培养下不生长、厌氧培养时生长的菌株为厌氧菌,进行进一步鉴定,同时,接种到BHI液体培养基中,经48小时厌氧培养,取培养物10或20倍稀释后作IC分析。

3.标准菌株:由中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所等单位引进的 *Veillonella parvula* (CDC 12098) . *Peptostreptococcus*

anaerobius (CDC 15689). Bacteroides distasonis (CDC 12014). Bacteroides fragilis (CDC 14462). Bacteroides fragilis (ATCC 8482). Eubacterium leutum (CDC 10610). Propionibacterium acnes (CDC 14340), 同法厌氧培养48小时, 取培养物10~20倍稀释后作IC分析, 作为标准对照。

4. 标准脂肪酸的配制和IC分析: 按《厌氧菌的分离和鉴定》[4]一书的方法配制标准脂肪酸, 除混合标准脂肪酸外, 都经10~20倍稀释后作IC分析。并作单一标准脂肪酸IC分析。其结果用以确定保留时间和出峰顺序。

5. 空白BHI或PYG培养基的IC分析, 用以校正待检菌株挥发性脂肪酸(VFA)和非挥发性脂肪酸(NVFA)的产量。

二、IC分析用仪器和条件: 使用成都解放仪器仪表厂生产的SL-1型离子色谱仪。100×8mm(内径)色谱柱, 分离树脂为天津化学试剂二厂生产的YSG-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>树脂, 填柱前经转化为YSG-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>H<sup>+</sup>树脂后填柱。洗脱液(即流动相)为0.4M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>和0.1M HNO<sub>3</sub>(1:1), 量程2, 衰减1/128, 流量选择为0.6毫升/分, 流量指示27毫升, 纸速0.2厘米/分, 进样量10~20μl/次。

### 结 果

一、标准脂肪酸的色谱图和出峰顺序, 保留时间见图1。

二、标准菌株的脂肪酸代谢产物经IC分析的结果见表1。其中 Bacteroides fragilis (CDC 14462) IC分析的色谱图见图2。

三、从临床标本分纯的172株菌中, 随机抽取62株菌, 经IC分析的结果列于表2。临床分离分纯的厌氧消化链球菌, 其48小时厌氧培养物经IC分析结果见图3。

A: 乙酸, P: 丙酸, iB: 异丁酸, B: 丁酸, iV: 异戊酸, V: 戊酸, L: 乳酸, S: 琥珀酸。大写英文字母符号: 酸峰高>1.8cm, 小写英

表1 标准菌株经IC分析的结果

| 标准菌株                                      | 脂肪酸代谢产物        |
|---|----------------|
| Veillonella Parvula (CDC 12098)           | A.P.S.         |
| Peptostreptococcus anaerobius (CDC 15689) | A.iV.L.P.iB.b. |
| Bacteroides distasonis (CDC 12014)        | A.P.iB.iV.S.L. |
| Bacteroides fragilis (CDC 14462)          | A.P.iB iV.S.   |
| Bacteroides fragilis (ATCC 8482)          | A.P.iB iV.S.L. |
| Eubacterium lentum (CDC 10610)            | L.a.           |
| Propionibacterium acnes (CDC 14340)       | P.A.L.         |

文字母符号: 酸峰高<1.2cm(下同)。

四、51份临床标本, 经10倍稀释后直接行IC分析结果列于表3。含厌氧菌标本经IC直接分析结果见图4, 不含厌氧菌标本经IC直接分析结果见图5。

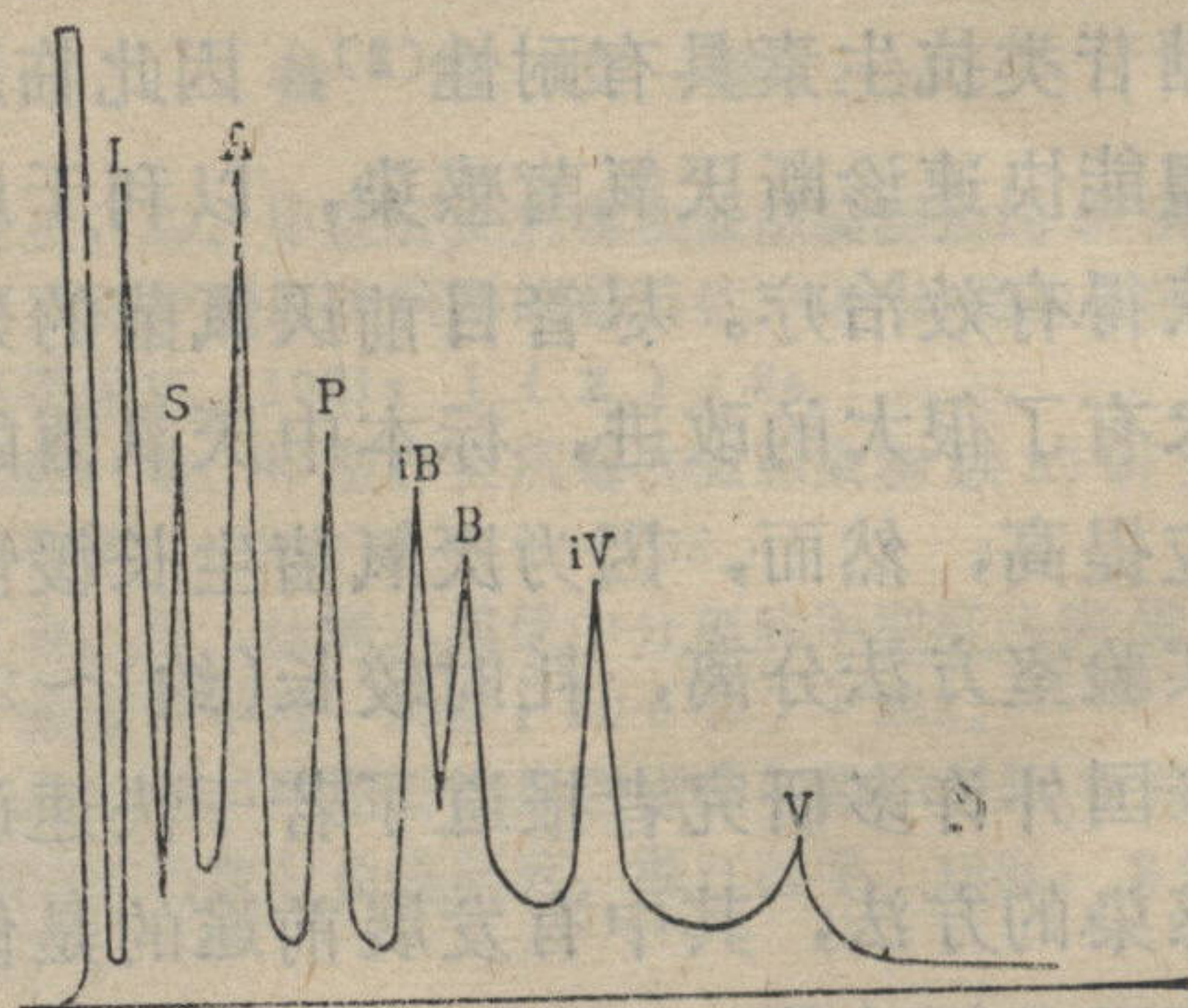


图1 标准脂肪酸的IC分析色谱图

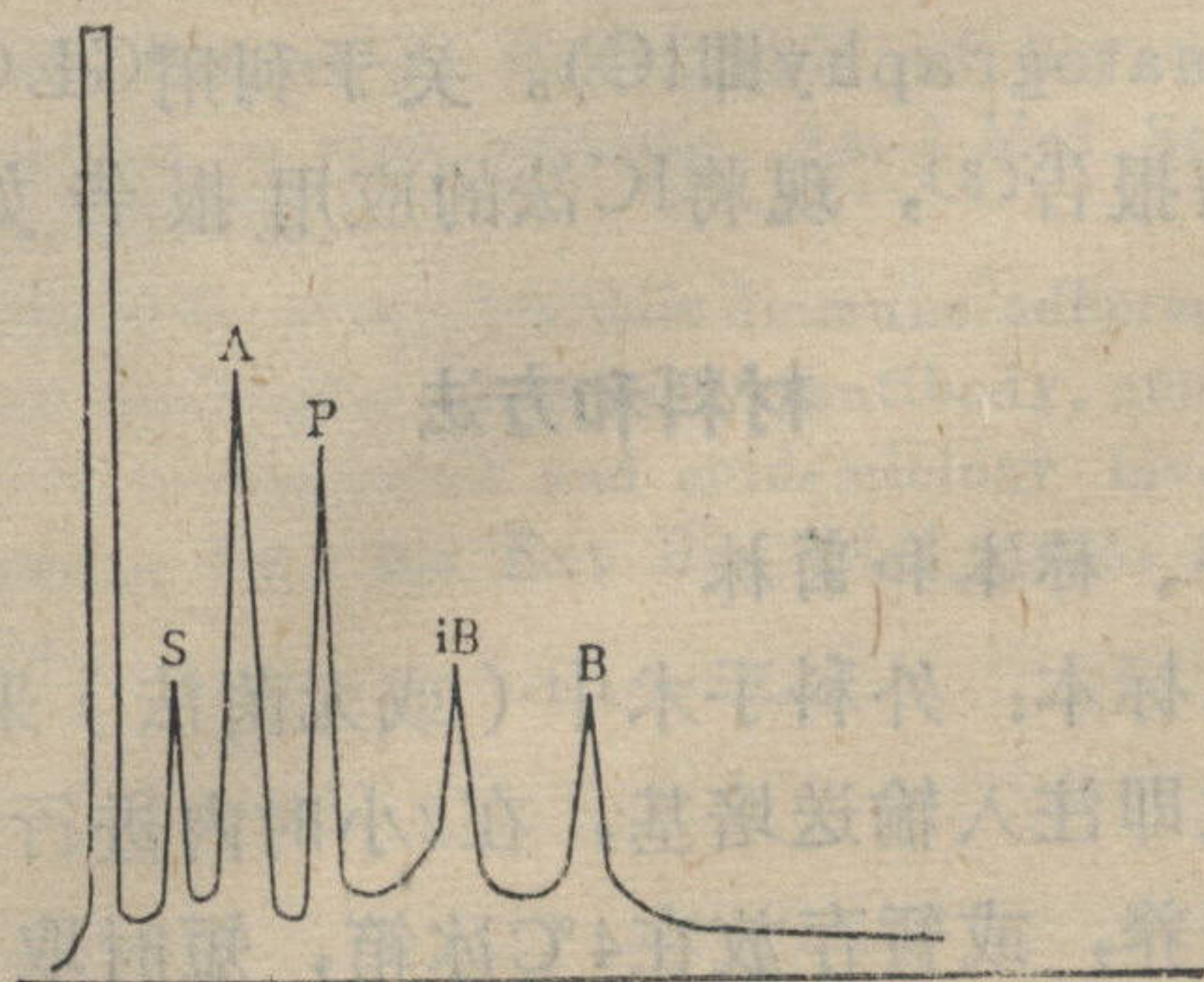


图2 B.fragilis (CDC14462) 代谢产物的IC分析 色谱图

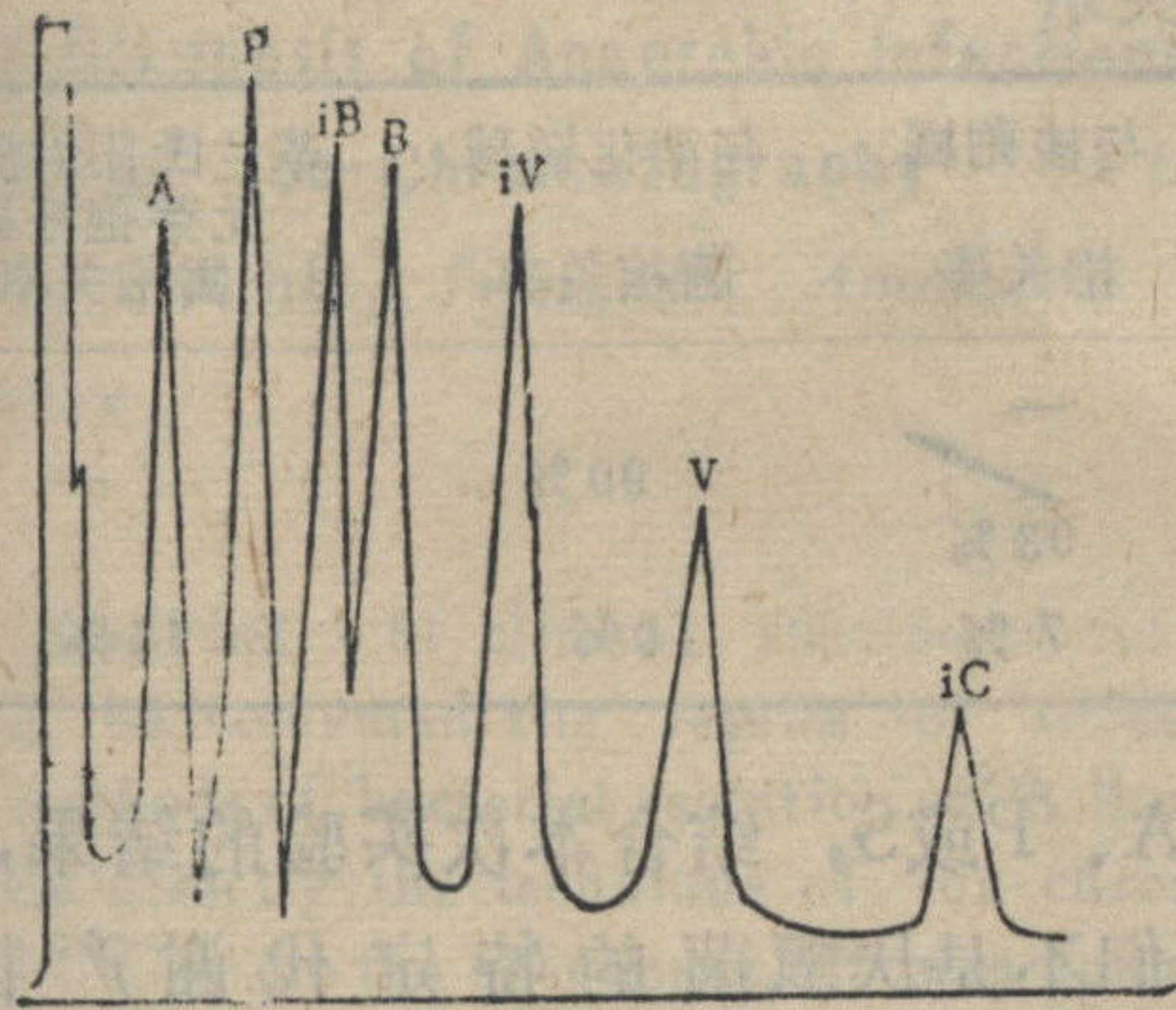


图3 Pepto. anaerobius代谢产物的IC分析色谱图

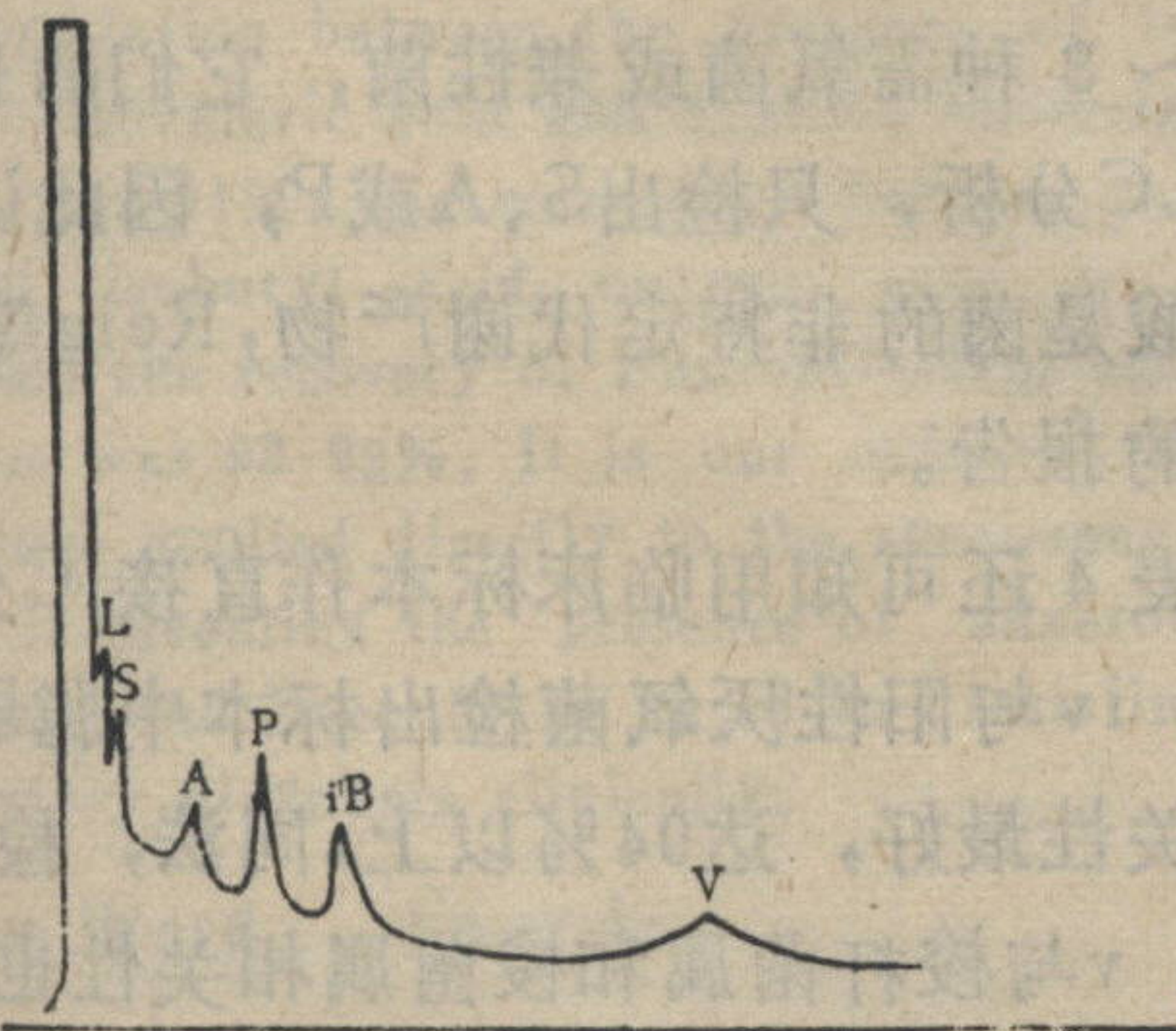


图4 含厌氧菌的临床标本直接IC分析色谱图

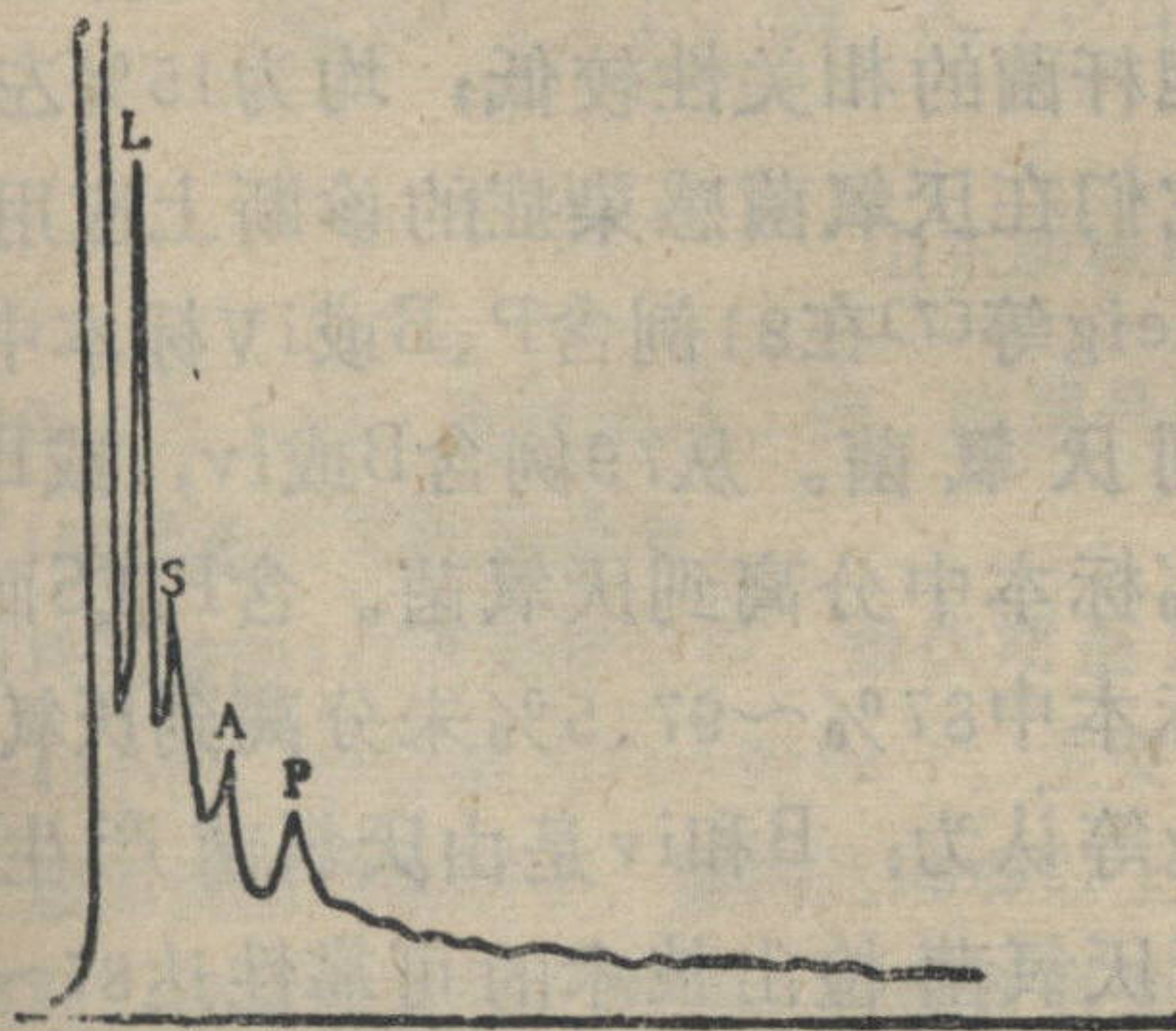


图5 不含厌氧菌的临床标本直接IC分析色谱图

五、临床标本直接IC分析主要脂肪酸，与常规标本分离、鉴定的厌氧菌检出率，主要厌氧菌属的关系列于表4。

### 分析与讨论

早在七十年代中期，Phillipe等<sup>[5]</sup>就提出使用气相色谱分析直接分析临床液、血标本提

表2 66株临床分离厌氧菌株IC分析结果

| 细菌           | 菌株数 | 脂肪酸代谢产物           |
|--------------|-----|-------------------|
| 革兰氏阴性无芽孢厌氧杆菌 |     |                   |
| 脆弱拟杆菌        | 32  | A.P.iB.iV.S.      |
| 普通拟杆菌        | 6   | A.P.iV.S.ib.f.    |
| 多形拟杆菌        | 4   | A.P.iB.iV.S.f.    |
| 吉氏拟杆菌        | 2   | A.P.iB.iV.S.      |
| 单形拟杆菌        | 1   | A.P.iB.iV.S.      |
| 产黑色素拟杆菌      | 1   | A.iB.b.iV.S.      |
| 具核梭杆菌        | 2   | B.A.P.S.          |
| 坏死梭杆菌        | 3   | B.A.P.            |
| 未定           | 2   | A.P.iV.V.S.       |
| 革兰氏阳性杆菌      |     |                   |
| 放线菌          | 2   | A.L.S.            |
| 疮疱丙酸杆菌       | 2   | A.P.S.            |
| 革兰氏阳性厌氧球菌    |     |                   |
| 厌氧消化链球菌      | 1   | A.P.iV.b.ib.ic.V. |
| 微小消化链球菌      | 2   | A.f.S.L.          |
| 消化球菌属        | 3   | A.P.f.L.          |
| 革兰氏阴性无芽孢厌氧球菌 |     |                   |
| 韦荣氏球菌属       | 1   | A.P.L.S.          |
| 革兰氏阳性芽孢杆菌    |     |                   |
| 产气荚膜梭菌       | 1   | A.B.L.S.          |
| 梭菌属          | 1   | A.P.ib.b.iV.      |

表3 临床标本直接IC分析结果

| 临床诊断     | 标本性质  | 标本数 | 脂肪酸代谢产物             | 阳性标本数 |
|----------|-------|-----|---------------------|-------|
| 急性化脓性    | 胆汁*   | 10  | L.S.A.              | 10    |
| 胆囊炎、胆石症  |       |     | ib或iv               |       |
| 胆囊炎、胆石症  | 胆汁    | 9   | L.S.a.p.或f          | 1     |
| 胃、十二指肠   | 血性分泌物 | 4   | L.S.a.p.或iv或ib      | 3     |
| 溃疡穿孔     | 血性分泌物 | 4   | L.S.A.P.            | 1     |
| 阑尾脓肿或腹膜炎 | 脓汁    | 15  | L.S.A.P.或ib.B.iv.v. | 14    |
| 急性阑尾炎    | 分泌物   | 4   | L.S.a.p.            | 0     |
| 肝脓肿      | 脓汁    | 1   | L.S.A.P.或ib.iv.     | 1     |
| 膈下脓肿     | 脓汁    | 1   | L.a.b.              | 1     |
| 腹壁脓肿     | 脓汁    | 2   | L.S.A.P.            | 0     |
| 甲状腺囊肿    | 血性    | 1   | L.S.P.              | 0     |
| 合并感染     | 分泌物   |     |                     |       |

\*混浊

表4

直接IC分析与常规分离厌氧菌关系

| 直接标本IC<br>脂肪酸 | 阳性<br>标本率 | 阴性<br>标本率 | 与拟杆菌<br>属相关率 | 与梭杆菌<br>属相关率 | 与梭菌属<br>相关率 | 与消化链球<br>菌相关率 | 革兰氏阳性厌氧<br>无芽孢杆菌<br>属相关率 |
|---------------|-----------|-----------|--------------|--------------|-------------|---------------|--------------------------|
| ib、iv         | 93.5%     | 6.5%      | 94%          | —            | —           | 90%           | —                        |
| b、ib或v        | —         | —         | —            | 92%          | 93%         | —             | —                        |
| L、A、P或f       | 6%        | 94%       | 6%           | 8%           | 7%          | 10%           | 15%                      |

取物中的VFA，可在30分钟内向临床医师提供厌氧菌感染症的报告。本实验应用离子色谱仪直接分析临床脓、血性分泌物、胆汁等标本，并与厌氧菌常规分离、鉴定相比较，从临床分纯的172株菌中，随机取出66株菌，用48小时厌氧培养物作IC分析，并综合菌落形态、菌的革兰氏染色性和形态、最佳培养条件、需氧对照试验和耐热试验，以及生化性状、耐药性试验结果，将厌氧菌鉴定到菌属和菌种。表1是标准菌株IC分析结果，表2是临床66株菌IC分析结果。

表3是临床标本直接IC分析的结果。51份临床标本，其中31份经厌氧菌常规分离检出厌氧菌，阳性率为60%左右。阳性分离标本中28%检出脆弱拟杆菌，其次是革兰氏阳性球菌和梭杆菌属。临床厌氧菌感染症中最常见的是脆弱拟杆菌属，这与国外、国内的报告类似。

综合表3和表4结果可知，临床标本直接IC分析，检出ib、iv、b、v等脂肪酸，同时，临床标本用常规厌氧菌分离法检出厌氧菌，阳性率高达93.5%。检出L、A、S、P、f等脂肪酸、阳性标本数16%左右。也就是说ib、b、iv、v与厌氧菌感染的相关性最好。由表3中10份检出ib或iv的胆汁标本中全部分离到厌氧菌。阑尾脓肿或阑尾穿孔腹膜炎15份标本中，检出ib、b、iv、v的，有14份标本分离到厌氧菌。肝脓疡和膈下脓肿的脓标本各一份中检出ib、iv或b，都分离到厌氧菌。8份胃、十二指肠溃疡穿孔的腹膜炎患者的血性分泌物标本中，4份检出iv或ib，其中3份标本分离到厌氧菌。笔者曾用GLC分析金黄色葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌等需氧和兼性菌的代谢产物，也发现存在少

量L、A、P或S，结合本次实验的结果，可以认为它们不是厌氧菌的特定代谢产物<sup>[3]</sup>。Randalls等<sup>[6]</sup>报告，从临床标本分离的大肠杆菌，克雷白氏菌、铜绿假单胞菌、粘质沙雷氏菌等7~8种需氧菌或兼性菌，它们的代谢产物经GLC分析，只检出S、A或P，因此认为这些脂肪酸是菌的非特定代谢产物，Reig等<sup>[7]</sup>也有类似的报告。

从表4还可知用临床标本作直接IC分析，检出ib、iv与阳性厌氧菌检出标本中脆弱拟杆菌的相关性最好，达94%以上。同法，检出b、ib或iv、v与梭杆菌属和梭菌属相关性也好，达92%以上。而从临床标本直接检出ib、b、iv、v与消化链球菌等革兰氏阳性厌氧球菌的相关性也达90%。L、A、S、P或F与革兰氏阳性无芽孢杆菌的相关性较低，均为15%左右。因此，它们在厌氧菌感染症的诊断上应用意义不大。Reig等<sup>[7]</sup>在81例含P、B或iv标本中约91%分离到厌氧菌。从79例含B或iv，或B、iv的98.7%标本中分离到厌氧菌。含P或S而无B、iv的标本中87%~97.5%未分离到厌氧菌。因此Reig等认为：B和iv是由厌氧菌产生的，它们用于厌氧菌检出技术的可靠性达87~89%，特异性达89~100%。Gorbash等<sup>[8]</sup>也发现iB、B、iv、v和s与标本中分离的革兰氏阴性无芽孢厌氧菌有很好的相关性。Randalls等<sup>[6]</sup>用色谱分析代谢产物，认为检出iv与标本中分离出脆弱拟杆菌群有相当好的相关性。而在含有梭菌属和梭杆菌属(Fusobacterium)的标本中，丁酸常被检测出来，这两属菌可利用革兰氏染色法观察菌的染色性和形态加以鉴别。

## Rapid Diagnosis of Anaerobic Infections with the Aid of Ion-Chromatography

Xiong Dexin, et al., Jiangxi Academy of Sciences

In studying 51 clinical specimens for anaerobes, we compared the results of using the usual methods of bacterial isolation with those by applying directly the technique of ion-chromatography (IC) on the specimens. It was found that the correlation between the presence of isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid and positive culture of anaerobes was 93.5%, the correlation between the presence of isobutyric acid, isovaleric acid and that of Bacterial isolation was 94%; the correlation between the presence of isobutyric acid, butyric acid or valeric acid and the recovery of *Fusobacterium* and *Clostridium* was 92-93%. It is our opinion that IC technique applied directly to the specimens is of value in revealing the presence of anaerobic infections, and it could be used in assisting the laboratory diagnosis clinically.

Key Word Anaerobe

## 参 考 文 献

1. Finegold SM. Anaerobic infection. Surg Clin North America 1980; 60(1): 49.
2. Macy JM. The biology of gastrointestinal bacteroides. Ann Rev Microbiol 1979; 33: 566.
3. 熊德鑫, 等. 色谱分析在菌群研究中的应用. 江西省科学院院刊 1984; 2(2): 27.
4. 熊德鑫编译. 厌氧菌分离和鉴定方法. 第一版. 南昌: 江西科技出版社, 1986: 108~109.
5. Phillips KD, et al. Rapid diagnosis of anaerobic infections by gas-liquid chromatography of clinical material. J Clin Pathol 1986; 24: 428.
6. Edson RS, et al. Gas-Liquid chromatography of positive blood cultures for rapid presumptive diagnosis of anaerobic bacteremia. J Clin Microbiol 1982; 15(6): 1059.
7. Reig M, et al. Gas-Liquid chromatography in routine processing of blood cultures for detecting anaerobic bacteremia. J Clin Pathol 1981; 34(2): 189.
8. Gorbach SL, et al. Rapid diagnosis of anaerobic infections by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens. J Clin Invest 1976; 57: 478.

## 一起沙门氏菌变形杆菌混合性食物中毒的调查报告

山东聊城地区卫生防疫站 亢相印

1984年4月下旬,聊城地区二院、临清县医院先后收治了156例急性胃肠炎患者。

据资料完整的117例患者分析,潜伏期最短1小时,最长49小时,中位数为11小时52分。主要症状为腹痛(上腹部或脐周剧痛),腹泻达95%以上,其次为恶心呕吐,半数有发热、寒战。严重者有抽搐,神志不清。病程最短1天,最长达9天,平均为91.2小时。经抗菌素、对症等治疗,无死亡。

查其原因,117例患者均有食用临清县某牛羊肉总店所售的熟羊下货史。食者绝大部分为凉拌,造成156人中毒的严重事故。

经实验室检查,2份呕吐物分别检出沙门氏菌和变形杆菌。3份剩余食物,其中2份检出变形杆菌,且为优势菌。1份同时检出沙门氏菌及变形杆菌。沙

门氏菌经系统生化培养及血清学分型鉴定为伦敦沙门氏菌。变形杆菌经系统生化定为普通变形杆菌。病后11例患者血清凝集效价抗原12号(剩余食物中检出的变形杆菌)第二次比第一次明显增高( $T=3.33, P<0.01$ ),与对照组比较也有非常显著差异( $T=3.286, P<0.01$ )。抗原7号(呕吐物中检出的沙门氏菌)第二次与第一次及对照组的凝集效价差别不显著( $T=0.97; T=0.96, P>0.05$ ),但从第一次与第二次的凝集效价看,半数患者有显著增高。

经分析,此次中毒主要原因是污染的熟下货在适宜的温度下存放时间过长,食前又未充分加热造成的。教训是深刻的。

(省防疫站作细菌学鉴定,临清县防疫站参加了调查,特致谢)