

临床厌氧菌感染的快速诊断——用气液相色谱法 分析菌的代谢产物

熊 德 鑫

(江西省科学院微生物所,南昌)

刘 秉 阳

(中国预防医学中心流行病学微生物学研究所,北京)

厌氧菌感染症已日益引起临床关注,这不仅因为厌氧菌的感染遍及临床各科,而且在许多化脓性感染症中,厌氧菌的感染率高达 70—90%^[1],在牙周脓肿中高达 100%^[1],从许多危重的感染休克的患者血样

中也常分离到厌氧菌。并且厌氧菌对许多常用抗生素如青霉素,链霉素,四环素,卡那霉素等都具有耐药性^[2]。因此临床工作者希望能快速诊断厌氧菌感染,以利于患者尽早治疗。尽管目前厌氧菌的培养技术有了

很大改进,样品中厌氧菌的检出率也大大提高,然而因厌氧菌生长缓慢,用常规实验室方法从临床样品中分离、鉴定(包括药敏试验)厌氧菌仍相当耗费时间(确定菌种需1—2周)。近年,国外许多研究者报告了一些快速诊断临床厌氧菌感染的方法,其中较有发展前途的一种方法是使用气液相色谱(GLC)分析临床样品中的短链脂肪酸,包括挥发性脂肪酸(VFA)和非挥发性脂肪酸(NVFA)。此法在一些国家和地区的医院检验室中已被列为常规检查方法之一。

以无菌操作采血、脓等样品,直接接种到胰酶消化植脉(Phytone)肉汤或心脑浸液或GAM液体培养基中,(Shanson)强调培养基中加入0.05%L-一半胱氨酸^[4],有利于脆弱拟杆菌*B. fragilis*生长,可提高其检出率)。经厌氧培养肉眼观察有生长,或涂片染色发现有菌而作需氧培养时无菌生长的培养物或直接取脓、血样,以VPI^[5]或上野^[6]等方法,先酸化再加等量的乙醚,或制备成甲基衍生物后加氯仿提取,按检测器的要求,如用热导池(TCD)检测器注入10—15 μ l,氢焰离子检测器(FID)注入1—1.5 μ l的提取物作GLC分析。用最佳操作条件每周制备VFA和NVFA的标准图谱一次,分析时还应包括空白培养基作对照。

Randils等报道^[7],从血样中分离的需氧菌或兼性菌如大肠杆菌,克雷伯氏菌,铜绿假单胞菌,粘质沙雷氏菌,D族链球菌,摩根氏菌,弗氏肺炎杆菌,它们的代谢产物经GLC分析都未检出异丁酸,丁酸,异戊酸,戊酸。而检出琥珀酸,乙酸,或混合出现丙酸,后三种脂肪酸在需氧、兼性或厌氧生长的血培养物中都出现,因此不是厌氧菌的特定代谢产物。Reig等报道^[8];从144份血培养物中曾分离到表皮葡萄球菌,金黄色葡萄球菌,链球菌,棒状杆菌,白色念珠菌,大肠艾希氏菌,肺炎克雷伯氏菌,粘质沙雷氏菌,哈夫尼氏菌,变形杆菌,小肠结肠炎耶氏菌,阴沟杆菌,伤寒沙门氏菌,铜绿假单胞菌等需氧或兼性菌。仅1例从血标本中分离到棒状杆菌的有丁酸,异戊酸(占0.7%);有丙酸,丁酸,异戊酸的共21例(占14%);有丙酸,丁酸,异戊酸,琥珀酸的共51例(占35%);其中41例血培养物中含琥珀酸,而丁酸,异戊酸只有痕迹量。Reig等并认为对厌氧菌有诊断价值的量:丁酸为0.2 μ mol/ml,而需氧或兼性菌虽检出上述短链脂肪酸,但检出量都远低于上述量。成川等^[9]报道40例需氧菌或兼性菌感染样品中也只检出乳酸或琥珀酸。Wüst^[10]等也报告类似结果。Wüst指出:检出琥珀酸的解释要谨慎,它是多数需氧菌和兼性菌的代谢产物。Randils等认为^[7],此点不仅对琥珀酸重要,对丙酸也一样。因此,虽然含厌氧菌的血、脓样品中也检出琥珀酸和丙酸,但它们不是厌氧菌的特定产物,尤其不能用以区别与需氧或兼性菌的混合感染症。

Reig等报告^[8]以GLC分析常规处理的血培养物

检查厌氧菌感染时,应着眼于菌代谢产物中短链脂肪酸,有哪几种脂肪酸可以作为多数厌氧菌存在的指示标志。有意义的脂肪酸与血培养物中厌氧菌的检出的相关性如何?它们中有诊断价值的量如何?作者在89例血样中82例检出丙酸、丁酸,异戊酸和琥珀酸,并分离到专性厌氧菌;81例含丙酸,丁酸或异戊酸(占91%);79例血样中78例含丁酸或异戊酸或同时具两者(占98.7%)的,都分离到厌氧菌,包括14例有厌氧菌生长迹象。另23例中仅有丙酸而无丁酸或异戊酸的其中20例(87.0%)未分离出厌氧菌。41例中含琥珀酸而无丁酸或异戊酸的40例(97.5%)中未分离到厌氧菌,70例血样中29例检出琥珀酸,丁酸,异戊酸,或两者都有的,都分离到厌氧菌(它们的短链脂肪酸都检出含有价值量)其余病例虽检出琥珀酸,而未检出或仅检出痕迹量异戊酸或丁酸,这些样品中(除1例外)都分离到需氧菌或兼性菌。Reig等经定量分析后指出:61例血培养物中检出有价值量的丙酸,丁酸和异戊酸,琥珀酸的54例(88%)分离到厌氧菌,检出有价值量的丙酸,丁酸和异戊酸的53例(87%)中分离出厌氧菌,检出有价值量的丁酸,异戊酸或两者都有的53例(87%)中分离到厌氧菌。因此,结论是丁酸和异戊酸是由厌氧菌产生的,这两种短链脂肪酸对于厌氧菌检出的可靠性达87~89%,特异性为89~100%。Gorbash^[11]和Phillips等也发现异丁酸,丁酸,异戊酸,戊酸和琥珀酸与标本中分离革兰氏阴性无芽孢厌氧菌有很好的相关性。Randils等报告^[7]从29份血标本中26份(占90%)分出脆弱拟杆菌群,经GLC分析检出异戊酸其量为2.1 μ mol/ml,含梭杆菌的3份血标本中都检出了丁酸其含量大大超过10 μ mol/ml。7例分离出梭状芽孢杆菌的血样中6例检出丁酸(86%),其量为2.3 μ mol/ml。3例分离到脆弱拟杆菌和梭状芽孢杆菌的血中都检出超过有意义的丁酸量,以及相应的异丁酸和异戊酸量。因此,Randils认为经GLC分析菌的代谢产物其中检出异戊酸与样品中分离出脆弱拟杆菌群有相当好的相关性。而在含有大多数梭状芽孢杆菌和梭杆菌的血样中丁酸常被检测出来,这两属菌可经革兰氏染色法观察菌的染色和形态加以鉴别。而异戊酸和丁酸在仅含兼性或需氧菌的血样中都未查出。故Randils等认为用GLC分析血培养物时,检出异戊酸和丁酸,对于厌氧菌分离阳性其相关性90%,特异性达100%。由此可知,此法用于确定厌氧菌感染的病原菌是很有价值的,包括敏感性和特异性都很强。Sunday等^[12]则认为在13例血样中仅有4例(30%)中异戊酸被检出,故相关性不强。

成川新一等^[9]报告,由临床脓样品中直接提取VFA和NVFA,和经分离出培养物的培养基中提取VFA和NVFA,以及小鼠背部作单一厌氧菌感染化脓样品中提取VFA和NVFA,作GLC分析进行比较,实验

结果指出:以脆弱拟杆菌加 5% 粘蛋白液可在鼠背部形成脓肿,脓样品直接提取和自分离培养基中提取,都检出含有乙酸,丙酸和异戊酸的 VFA 而 NVFA 脓中检出乳酸而培养基中未检测到。可变梭杆菌在鼠中形成化脓, VFA: 脓中以及培养基中都检出乙酸,丙酸,丁酸。NVFA 中都检出乳酸和琥珀酸。非解糖消化球菌在鼠中形成化脓时 VFA 都检出乙酸和丁酸,而 NVFA 仅在感染鼠的脓中直接检出乳酸和琥珀酸。厌氧消化球菌只形成轻度脓肿,故所含脂肪酸量也较少, VFA 中有乙酸,异丁酸,异戊酸和己酸, NVFA 中培养基内检出乳酸,脓中直接检出琥珀酸。非解糖拟杆菌所致感染中含的 VFA 中都检出乙酸,丙酸,异丁酸,丁酸和异戊酸, NVFA 仅在培养基中检出乳酸,接种鼠背形成湿性坏疽。韦荣氏球菌引起化脓的 VFA 中都检出乙酸,丙酸; NVFA 仅在脓液中直接检出琥珀酸。大肠艾希氏菌化脓的 VFA 中只在培养基里能检出乙酸和丙酸,而脓中直接只检出乙酸。NVFA 中于培养基里仅检出乳酸而脓中直接可检出乳酸和琥珀酸。此外临床化脓样品有 3 例,病例 1 取自阑尾炎非开放性的脓肿中只分离到脆弱拟杆菌,而脓直接检查和在培养基中检查都检出了乙酸,丙酸和异戊酸,丙酸的量比培养基中的少。NVFA 中都检出乳酸和琥珀酸。第二病例,取自非开放性的皮下脓肿,脓中分离出可变梭杆菌,脆弱拟杆菌和大肠杆菌,在培养基和脓中直接检查都检出了乙酸,丙酸,丁酸和异戊酸。而 NVFA 中检出了乳酸和琥珀酸。病例 3 取自腹腔脓肿样品,分离到厌氧消化球菌,脆弱拟杆菌,非解糖消化球菌和弗劳地氏柠檬酸菌, VFA 中检出乙酸,丙酸,异丁酸,丁酸,异戊酸和异己酸,而 NVFA 中检出乳酸和琥珀酸。此外从 40 例分离到需氧菌和兼性菌的脓样品的 VFA 中有 38 例检出乙酸,2 例检出乙酸和丙酸,都未检出异丁酸,丁酸,异戊酸,戊酸,异己酸和己酸。在无菌材料(包括骨髓液,血液,血清) 30 例中,仅 4 例(其中 2 例骨髓液,2 例血清)检出痕迹量的乙酸(在 $0.1\mu\text{mol/ml}$ 以下) 8 例检出琥珀酸,量也少。通过临床脓样品,鼠中化脓样品中和分离菌的培养基中的 GLC 结果比较,成川指出: GLC 分析单一厌氧菌感染的脓样品,直接检查和培养基检出了同样类型的 VFA,其中脓直接检出的量少,而 NVFA 则有所不同。临床混合感染脓样品中所检出的 VFA 为其中单一菌感染中检出 VFA 量的总和,从 40 例仅分离到需氧菌和兼性菌的脓样品经 GLC 分析时,都未检出异丁酸,丁酸,异戊酸,戊酸,异己酸和己酸;而从 36 例厌氧菌感染的脓样品中上述脂肪酸都分别被检出。但 NVFA 中的乳酸和琥珀酸,不仅在含厌氧菌的标本中,而且在含需氧或兼性菌的脓标本中也被检出,所以它们无特异性。因此经 GLC 分析脓样品的提取物 VFA,上述乙酸,丙酸及异戊酸可用以确定厌氧菌感染的存在。Heldman 等指出^[14]:厌氧菌

在培养基中葡萄糖发酵产物最具特征性的是短链脂肪酸,结合革兰氏染色和菌的形态观察,可确定厌氧菌属甚至种。Gorbach 等也提出^[15],在已知的无芽孢厌氧菌腹腔或盆腔脏器感染中,脆弱拟杆菌可从绝大多数厌氧菌感染中分离出,加之它对青霉素,头孢霉素,四环素类等临床常用的抗生素等表现耐药性,这一特性可能与脆弱拟杆菌具特异性受体有关。因此 Phillips 等提出使用 GLC 直接分析脓,血样品提取物 VFA,可在 30 分钟内向临床医师提供厌氧菌感染的报告。Reig 报告^[16] 14 例血样用直接提取法作 GLC 分析,同时进行厌氧菌的分离,培养,从分析 11 例结果得到丁酸并具有意义的量,从另外 3 例有意义的异戊酸的量,它们提示存在厌氧菌感染。以后经分离培养,分别证实有产气荚膜梭状芽孢杆菌和脆弱拟杆菌。故 Reig 等^[17]认为对早期有生长迹象的血培养物作 GLC 分析 VFA,可在一日内为临床医师提供厌氧菌感染的信息,以防止临床上使用单一的氨基糖甙类药物,并着手有效的化疗。同时这样做还有利于厌氧菌属的鉴定。Moss 等^[18]在使用带毛细管柱的 GLC 分析菌的代谢产物时指出:厌氧菌的主要代谢产物是 C_1 — C_7 短链脂肪酸和芳香酸。作者在分析艰难梭菌的主要脂肪酸时检出乙酸,丙酸,丁酸,异丁酸,戊酸,异戊酸,己酸等,芳香酸中则检出苯乙酸,氢化苯丙烯酸,吡啶乙酸,酮基丁酸,硫代戊酸和硫代乙酸等。

综上所述,厌氧菌主要代谢产物是短链脂肪酸中的丁酸,异丁酸,戊酸,异戊酸,己酸,异己酸等,这些短链脂肪酸在需氧或兼性菌类中几乎都未被检出或有极少量存在。其中尤以丁酸和异戊酸,它们对厌氧菌感染的诊断的敏感性达 80% 以上,特异性 90% 以上。异戊酸和异丁酸与临床上最常分离到的脆弱拟杆菌之间的相关性最明显,而丁酸,戊酸和异己酸等则与梭杆菌和梭状芽孢杆菌间的相关性最好。当然临床上常见的多是混合感染,经 GLC 直接分析临床样品检出的 VFA,往往是各种菌类混合感染的 VFA 的总和。此外,不仅从定性而且也从定量上可以判断,检出丁酸在 $0.2\mu\text{mol/ml}$ 以上,异戊酸在 $0.1\mu\text{mol/ml}$ 以上时才认为是含有价值的量,也就是说,认为有厌氧菌感染的存在。在需氧或兼性菌感染时可能检出上述 VFA,但只为痕迹量,也就是说远远低于有价值的量。因此 GLC 分析菌的代谢产物(从标本或培养物)中的 VFA,可以快速诊断厌氧菌感染症,为临床尽早地采取有效治疗措施,使患者早日康复创造前提。

参 考 文 献

- [1] Finegold, S. M.: *Surg clinic of North America*, 60(1): 50, 1980.
- [2] Jally, F. P. et al.: *J. Infect. Dis. Suppl.*, 1: 25. 1979.

- [3] Chung, K. T. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 558, 1978.
- [4] Shanson, D. C. et al.: *J. clin. patol.*, 34: 221—223, 1981.
- [5] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe Laboratory Manual*, 3rd ed, Virginia Polytechnic Institute and state University, Blacksburg, Va, 1977.
- [6] 上野一惠等: 临床检查, 21(10): 25, 1977.
- [7] Randalls, E. et al.: *J. Clini. MICrobiol.*, 15(6): 1059—1061, 1982.
- [8] Reig, M. et al.: *J. Clini. Pathol.*, 34(2) 189—190, 1981.
- [9] 成川新一等: 感染症学杂志, 52(6): 457—465,

- 1982。
- [10] Wüst, J.: *J. Clini. Pathol.*, 29: 428—432, 1976.
- [11] Gorbach, S. L. et al.: *J. Clini. Invest.*, 57: 478—484, 1976.
- [12] Phillips, K. D. et al.: *J. Clini, pathol.*, 29: 428—432, 1976.
- [13] Sonday, J. E. et al.: *J. Clini. Microbiol.*, 11: 274—277, 1980.
- [14] Holdeman, L. V. et al.: *A. J. Med. Tech.*, 41: 49—54, 1975.
- [15] Moss, C. W. et al.: *J. Clini Microbiol.*, 15(2): 308—311, 1982.