

气相色谱法检测腹部厌氧菌感染

师锦波 申虹 孟庆漪 李世福 张子洋

(长春第一汽车制造厂职工医院)

摘要 本文就 40 例腹部感染标本进行气相色谱法检测厌氧菌,并与培养法对照。结果证明,临床标本直接用气相色谱法检测,与常规培养法比较,有速度快、精确度高、不受药物及细菌死亡的影响,标本用量少等优点,该法有临床实用价值。

关键词 气相色谱;厌氧菌;挥发性脂肪酸;非挥发性脂肪酸;感染

近年来,厌氧菌感染已引起临床工作者的重视。为了及时诊断厌氧菌感染和合理用药,必须开展厌氧菌的检测工作。用常规培养法费时较多,难以满足临床需要。应用气相色谱法检测厌氧菌不但速度快,而且准确度也较高,有临床实用价值。本文就 40 例腹部感染标本进行气相色谱直接检测,并附以培养法平行对照。同时对某些腹部厌氧菌感染气相色谱法检测结

果进行讨论。

材料与方 法

(一) 材料来源

采集标本共 40 份。均来自本院临床腹部感染患者,其中急性阑尾炎 18 例;胆管结石 9 例;肝脓肿 1 例;原发性腹膜炎 3 例;急性坏死性胰腺炎 1 例;肛旁脓肿 4 例;腹部刀口感染 4

例。标本采集方法：急性阑尾炎标本采集是从切除的阑尾中抽取脓汁 1—3ml，注入厌氧输送管 0.5ml，立即送细菌培养。剩余标本马上进行酸化提取，准备色谱分析。若阑尾内无脓汁或脓汁少，则剖开阑尾刮取阑尾粘膜及腔内存留物为标本。胆管结石病的标本采集是经皮肝穿胆管或手术中穿刺胆管取胆汁，注入厌氧输送管 0.5ml，立即送细菌培养。再取 4ml 马上进行酸化提取，准备色谱分析。其他疾病的标本采集方法同前。

(二) 临床标本的处理

供色谱检测的样品分两种：一种为经分离培养的厌氧菌 PYG 培养液；一种为临床直接采集的标本。色谱分析前均按 VPI 手册方法进行予处理^[1]。临床标本经厌氧菌培养结果阳性者接种于 PYG 培养基，增殖 48 小时。酸化至 pH2 后取 1ml 用乙醚提取挥发性脂肪酸 (VFA) 及取 1ml 用甲醇硫酸法提取非挥发性脂肪酸 (NVFA)。临床标本直接处理方法：将标本用 50% H₂SO₄ 酸化至 pH2，然后依上法进行 VFA, NVFA 分析。

(三) 气相色谱检测条件

用上海分析仪器厂 1001 型气相色谱仪。氢离子火焰检测器。不锈钢柱长 200cm，内径 3 mm。上试 101 白色担体。固定液为改性聚乙二醇 20M，加 1% 磷酸。

操作条件：载气为纯氮气，流速 30ml/min。氢气 25ml/min。空气 250ml/min。柱温 140℃，气化室温度 190℃，检测器温度 200℃。衰减 8。记录仪纸速 0.6cm/min。灵敏度 10⁹。

每测 1—3 份样品前先做一套脂肪酸标准液色谱图。

结 果

(一) 短链脂肪酸标准溶液色谱图

1. VFA 色谱图(图 1)及保留时间

乙酸 (A) 6'00" 丙酸 (P) 8'44"
 异丁酸 (IB) 9'55" 丁酸 (B) 13'09"
 异戊酸 (IV) 15'56" 戊酸 (V) 21'42"

异己酸 (IC) 29'00" 己酸 (C) 35'00"

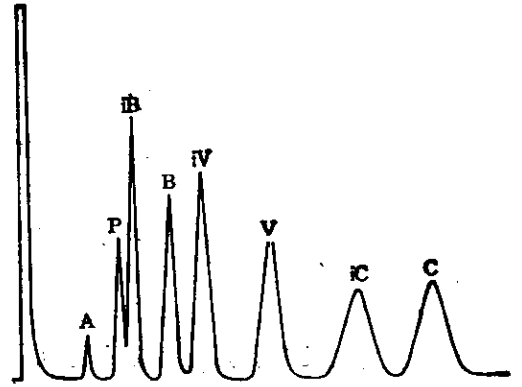


图 1 标准液 VFA 色谱图

2. NVFA 色谱图(图 2)及保留时间

乳酸 (L) 3'30"
 丙酮酸 (Py) 10'35"
 琥珀酸 (S) 11'35"

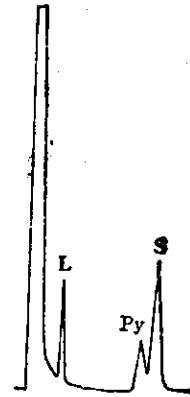


图 2 标准液 NVFA 色谱图

(二) 临床标本直接检测结果

1. 气相色谱直接检测临床标本脂肪酸及厌氧菌培养结果(表 1)
2. 临床标本直接检测的色谱图(图 3—6)
3. PYG 培养基及其增殖的菌株色谱图(图 7—10)

(三) 经分离培养的菌株气相色谱检测结果

1. 检测结果：40 份临床标本。经培养有厌氧菌生长者用 PYG 培养基增殖分离。有 34

表1 气相色谱直接检测临床标本脂肪酸及菌株培养结果

序号	标本号	标本来源	主要脂肪酸	需氧菌	厌氧菌
1	003	肝胆管结石术中胆汁	L S	大肠杆菌	无
2	005	急性坏疽性阑尾炎脓汁	A. P. IB. B. IV. V. IC. L S	副大肠杆菌	粘液真杆菌 吉氏拟杆菌 II型
3	006	胆管结石、经皮肝穿胆汁	L a	无	无
4	007	肝胆管结石术后T型管引流胆汁	A. P. S	大肠杆菌, 哈夫尼亚菌	无
5	008	急性坏疽性阑尾炎, 脓汁	A. P. B. ic. IV. V. L S	无	产链真杆菌 V 吉氏拟杆菌
6	009	急性单纯性阑尾炎、阑尾内存留物	A. P. IB. B. iv. L S	大肠杆菌	消化链球菌 吉氏拟杆菌
7	010	肝胆管结石术后T型管引流胆汁	A. P. ib. B. IV. S	大肠杆菌	产酸蛛网菌
8	011	腹部刀口感染脓汁	L a	变形杆菌	口颊拟杆菌
9	012	急性坏疽性阑尾炎脓汁	A. P. ib. B. iv. L S	大肠杆菌	普遍拟杆菌
10	015	坏死性胰腺炎, 腹腔血性脓汁	L	无	无
11	016	肝胆管结石术中胆汁	L. a	大肠杆菌	无
12	017	肝胆管结石术中胆汁	L a	大肠杆菌	无
13	018	急性化脓性阑尾炎、脓汁	a. p. b	绿脓杆菌	无
14	020	胆管结石, 胆囊胆汁	A. P. L S	蜂窝哈夫尼亚菌	双歧杆菌
15	021	腹部刀口感染脓汁	A. P. IB. b. IV. L	未送培养	未送培养
16	022	急性单纯性阑尾炎, 阑尾内存留物	a. p. ib. B. iv. L	大肠杆菌 绿脓杆菌	吉氏拟杆菌
17	024	阑尾周围脓肿 脓汁	L	大肠杆菌	无
18	026	急性化脓性阑尾炎、脓汁	a. p. L S	大肠杆菌	脆弱拟杆菌
19	029	急性化脓性阑尾炎、脓汁	a. p. ib. B. L	大肠杆菌	无
20	031	原发性腹膜炎, 腹腔渗液	A. P. L S	大肠杆菌	无
21	032	急性化脓性阑尾炎、脓汁	a, s	大肠杆菌 粪肠球菌	产生消化链球菌
22	034	原发性腹膜炎脓汁	L, a	肠炎双球菌	无
23	035	急性坏疽性阑尾炎脓汁	A. P. IB. B. IV. V. L, S	产酸杆菌 大肠杆菌	口颊拟杆菌 吉氏拟杆菌

序号	标本号	标本来源	主要脂肪酸	需氧菌	厌氧菌
24	036	急性化脓性阑尾炎、脓汁	A, P, IB, B, IV, L, S	变形杆菌	吉氏拟杆菌
25	037	急性单纯性阑尾炎、阑尾内存留物	L, a	大肠杆菌	多形拟杆菌 吉氏拟杆菌
26	038	腹部刀口感染脓汁	A, P, IB, B, IV, L, S	甲型链球菌 粪链球菌	口颊拟杆菌
27	039	急性坏疽性阑尾炎脓汁	A, P, IB, B, IV, V, IC, L, S	大肠杆菌 哈夫尼亚菌	多形拟杆菌
28	040	腹部刀口感染脓汁	a, L	大肠杆菌	无
29	041	肛周脓肿、脓汁	A, P, ib, B, IV, L, S	大肠杆菌	多形拟杆菌 齿双歧杆菌
30	042	急性单纯性阑尾炎、阑尾腔存留物	A, P, ib, b, iv	大肠杆菌	多形拟杆菌
31	043	急性化脓性阑尾炎、脓汁	A, P, ib, B, IV, V, S	大肠杆菌	普通拟杆菌 卵圆拟杆菌
32	044	急性单纯性阑尾炎、阑尾腔存留物	无	大肠杆菌 粪肠杆菌	普通拟杆菌 多形拟杆菌
33	045	肛周脓肿、脓汁	A, P, ib, B, iv, L, S	聚集肠杆菌 粪链球菌	无
34	046	急性单纯性阑尾炎、阑尾腔存留物	A, P, ib	大肠杆菌 粪肠杆菌	多形拟杆菌
35	047	肛周脓肿、脓汁	A, P, IB, B, IV, L, S	奇异变形杆菌	黑色消化球菌 吉氏拟杆菌
36	048	肛周脓肿、脓汁	A, P, IV, L, S	枸橼酸杆菌 粪链球菌	吉氏拟杆菌 齿双歧杆菌
37	001	腋脓肿、脓汁	A, ib, L, S	未送培养	未送培养
38	004	肝胆管结石, 胆汁	A, P, L	未送培养	未送培养
39	013	肝胆管结石术后T型管引流胆汁	A, P, B, S	未送培养	未送培养
40	027	原发性腹膜炎, 腹腔渗出物	L	未送培养	未送培养

注: A(乙酸) P(丙酸) IB(异丁酸) B(丁酸) IV(异戊酸) V(戊酸) IC(异己酸) C(己酸) L(乳酸) S(琥珀酸)

份标本分离出 12 种无芽孢厌氧菌, 其中消化链球菌 1 份, 丙酸蛛网菌 2 份, 吉氏拟杆菌 10 份, 普通拟杆菌 3 份, 粘液真杆菌 1 份, 迟缓真杆菌 1 份, 齿双歧杆菌 4 份, 脆弱拟杆菌 1 份, 口颊拟杆菌 3 份, 多形拟杆菌 6 份, 卵圆形拟杆菌 1 份, 黑色消化球菌 1 份(表 2)。

2. 检测结果的判断标准^[2]: 厌氧菌的最终代谢产物挥发性脂肪酸和非挥发性脂肪酸由于

其沸点及极性不同, 致使各组份出峰顺序和保留时间不同。根据出峰顺序和保留时间可以判定是那种脂肪酸。依据出现的脂肪酸又可以确定有否厌氧菌。另据 PYG 培养基分离的厌氧菌色谱图, 结合微生物的其他性状, 还可确定厌氧菌的属或种。

乙酸、丙酸、琥珀酸或混合出现的乳酸在需氧菌、兼性厌氧菌及厌氧菌中都可出现, 因此它

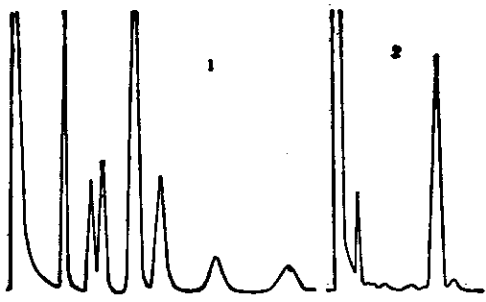


图3 急性阑尾炎,胆汁 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

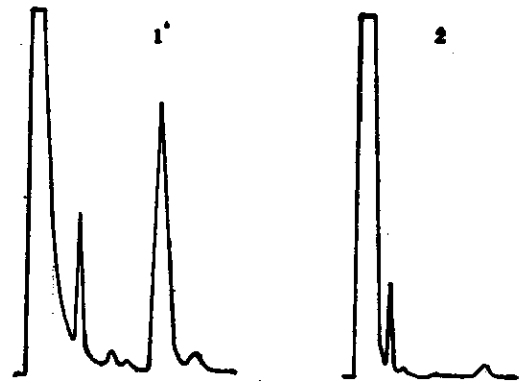


图6 肛旁脓肿,胆汁 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

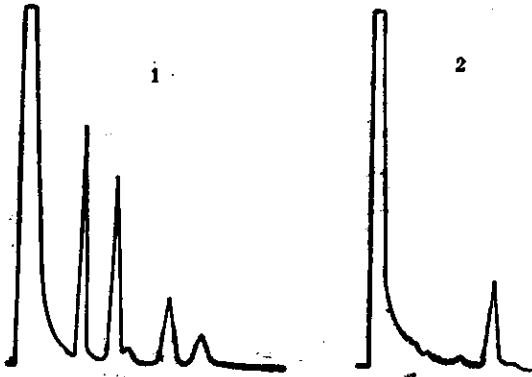


图4 胆管结石、胆道感染胆汁 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

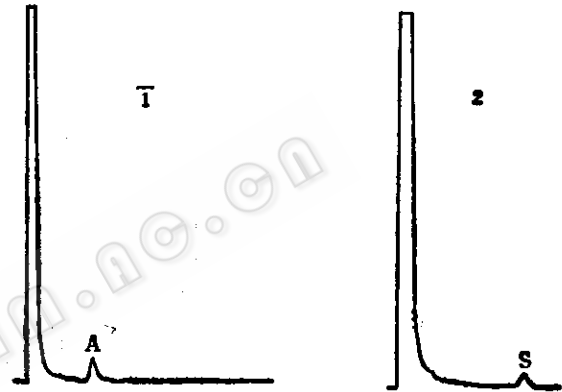


图7 空白 PYG 培养基 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

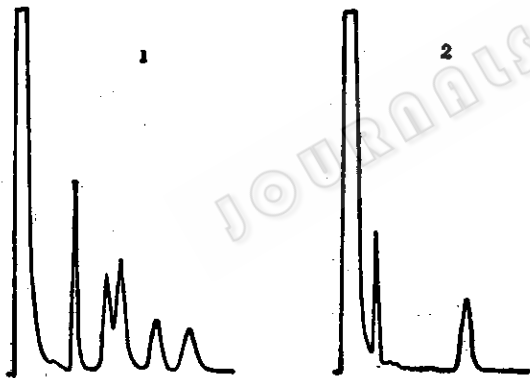


图5 腹部刀口感染,胆汁 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

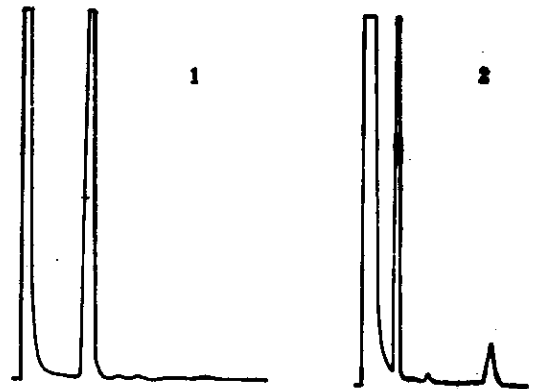


图8 消化链球菌VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

们不是厌氧菌的特定产物。而丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸、异己酸则在需氧菌或兼性菌中不能检出或含量极微。如果在临床标本中检出这些脂肪酸,对厌氧菌感染的诊断具有很大价值。

目前判断标准尚未统一。因厌氧菌种类繁多,特点各异,用一个简单的标准难以全面地判断。多数人认为色谱图中只要出现上述厌氧菌特定的足够量的脂肪酸就可以认为存在厌氧

菌。孟宪钧认为除乙酸以外的其他短链脂肪酸在检出3个以上时,即可拟诊为有厌氧菌的存在^[2]。我们所依据的判断标准是:(1)、检出一种以上大量的特定脂肪酸。检出的脂肪酸多

表 2 12种无芽胞厌氧菌检出的脂肪酸及与 VPI 手册比较

菌 株	革兰氏染色	测出主要脂肪酸	VPI 手册
消化链球菌	G ⁺ C	A, P, L, S	a, p, ib, b, iv, ic
丙酸蛛网菌	G ⁺ B	A, P, ib, B, L	A, P, L, S
吉氏拟杆菌	G ⁻ B	A, P, ib, iv, L, S	A, P, B
普通拟杆菌	G ⁻ B	A, L, S	
粘液真杆菌	G ⁺ B	A, P, L	A, B, L
迟缓真杆菌	G ⁺ B	A, B, L	A
齿双歧杆菌	G ⁺ B	A, P, ib, b, iv, L, S	
脆弱拟杆菌	G ⁻ B	A, iv, L, S	A, P, ib, iv, L, S
口腔拟杆菌	G ⁻ B	A, P, ib, b, L, S	A, P, iv, L, S
多形拟杆菌	G ⁻ B	A, P, ib, iv, L, S	A, L, S
卵圆形拟杆菌	G ⁻ B	A, b, L, S	A, P, iv, L, S
黑色消化球菌	G ⁺ C	A, P, ib, B, iv, L, S	

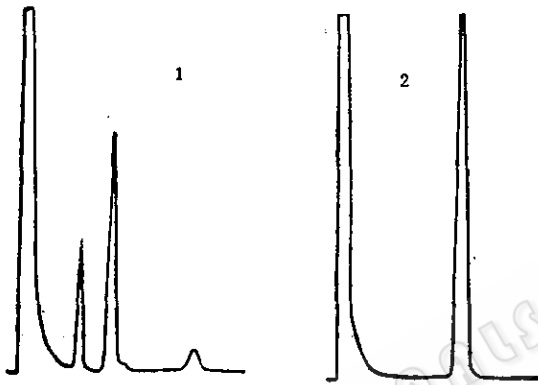


图 9 脆弱拟杆菌 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

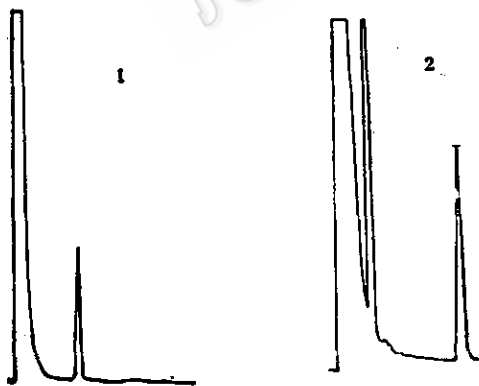


图 10 多形拟杆菌 VFA(1) 和 NVFA(2) 色谱图

于 1meq/100ml 为大量^[4], 用大写英文字母表示。少于 1meq/100ml 为少量^[4], 用小写英文字母表示。(2)、或出现一种以上少量特定脂

肪酸和两种以上大量非特定脂肪酸。(3)、或虽未出现或出现少量特定脂肪酸, 但检出的脂肪酸其量和种类与某种厌氧菌相符。

讨 论

1. 临床标本直接气相色谱检测与常规培养法比较: 本试验共检测 40 例。气相色谱法检测有厌氧菌感染者 27 例, 厌氧菌感染率为 67.5%。

腹内厌氧菌感染率比较高, 一般报道为 50—60%。Gorbach 的报道高达 94%^[5]。厌氧菌的气相色谱法检出率受仪器的灵敏性和稳定性, 标本的采集和处理等影响。本试验 18 例急性阑尾炎中厌氧菌阳性者 13 例 (72.22%)。其中坏疽性阑尾炎 5 例均为阳性。可见急性阑尾炎厌氧菌感染率相当高, 尤其是坏疽性阑尾炎厌氧菌检出率可达 100%。本试验胆汁标本 9 份, 厌氧菌阳性者 3 份 (33.33%)。可见胆管结石患者胆汁厌氧菌感染率也比较高。提示厌氧菌感染和胆管结石的形成可能存在某些关系。

临床标本直接进行气相色谱检测, 同时又做常规厌氧菌培养共 35 份, 其中二者符合者 28 份, 符合率 80%。

本试验 28 例临床标本, 经色谱与培养相对照, 其中单纯厌氧菌感染 1 例, 单纯需氧菌感染 8 例, 混合感染 17 例, 细菌检验阴性 2 例。

本试验 35 例临床标本有 7 例气相色谱和常规培养不符合, 不符合率为 20%, 其中气相色谱检测阳性而培养阴性者 3 例。气相色谱阴性而培养阳性者 4 例。分析其不符合原因。培养阳性而色谱阴性者可能为标本采取困难或量少。例如 044 号标本为急性单纯性阑尾炎, 经培养是普通拟杆菌和多形拟杆菌, 气相色谱检测无脂肪酸。急性单纯性阑尾炎阑尾腔内只有极少量存留物, 因此不能取得足够量标本, 影响色谱结果。后来我们采取刮取阑尾粘膜的方法采集标本, 取得了较好的效果。色谱阳性而培养阴性者可能因为培养标本处理较晚或输送管漏气等。例如 045 号标本色谱检测有 A、P、ib、B、iv、L、S, 培养无厌氧菌生长。

气相色谱法检测厌氧菌具有快速、精确, 不受药物及细菌死亡的影响, 标本用量少等优点。因此有临床实用价值。

(二)、PYG 培养物气相色谱检测和常规培养对比: 常规厌氧菌培养阳性者, 经 PYG 培养增殖 48 小时, 然后进行气相色谱检测, 同时进行生化试验。共 34 份标本, 鉴定菌种符合

率 31 例 (91.18%)。厌氧菌的鉴定是一个比较复杂和繁琐的问题。受很多因素影响。尚存在不少问题。我们认为气相色谱法检测厌氧菌在定性方面是可靠的, 也可进行半定量分析。对于鉴定到菌属也有肯定价值。本试验用于确定菌属的脂肪酸和 VPI 手册基本相符。例如拟杆菌属为 A、P、S, 丙酸杆菌属为 A、P、S, 真杆菌属为 A、B、L, 消化链球菌属为 A、P 等。在气相色谱检测定属的基础上再行某些必要的生化反应定种, 不但可以增加准确性, 也能节省时间, 但鉴定到种单靠气相色谱法目前尚有困难, 还需结合常规法综合分析方能确定。

参 考 文 献

- [1] Flodeman, L.V. and W. E. C. moore: *Anaerobe laboratory manual*. 134 4th Edition The Virginia polytechnic Institute and State university Anaerobe laboratory Blacksburg, VIRGINIA 1977.
- [2] 周方、朱厚础: 气相色谱法在微生物学和医学中的应用, 科学出版社, 北京, 1984。
- [3] 孟宪钧等: 中华医学杂志, 63(11): 661, 1983。
- [4] Watt B et al.: *J. clin. pathol.*, 35:709—714, 1982.
- [5] Gorbach SB: *Anaerobic infection*, 83:377, 1975.