

151 例术中胆汁标本厌氧培养分析*

陈圣开¹, 郑明友¹, 张 涛¹, 商阳阳¹, 王淑玲^{2△}, 王云英³
(重庆市人民医院三院院区: 1. 肝胆外科; 2. 检验科 400014;
3. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400014)

摘 要:目的 探讨临床胆汁厌氧培养的结果及厌氧菌感染情况。方法 选取 2014 年 9 月至 2016 年 1 月重庆市人民医院收治的社区获得性急性胆道感染患者 89 例(A 组)和非急性胆道感染患者 62 例(B 组)。所有胆汁标本均在术中无菌空针抽取, 采集标本后迅速用无菌橡皮塞封闭无菌针头, 1 h 内迅速送实验室做厌氧培养。结果 A 组急性胆囊炎标本 54 例, 阳性 2 例, 阳性率 3.7%; 胆管炎标本 35 例, 阳性 1 例, 阳性率 2.9%。B 组慢性胆囊炎标本 54 例, 阳性 1 例, 阳性率 1.9%; 胆管胆汁标本 8 例, 阳性 0 例。2 组胆汁厌氧菌培养阳性率分别为 3.4% 和 1.6%, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 胆道疾病无论有无胆道感染表现, 均可能在胆道存在厌氧菌。目前胆汁厌氧菌培养较困难, 阳性率较低, 需进一步改善有关技术和设备。

关键词:胆道感染; 胆汁标本; 培养; 厌氧菌

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 14. 004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)14-2014-03

Analysis of anaerobic culture of bile specimens in 151 cases*

CHEN Shengkai¹, ZHENG Mingyou¹, ZHANG Tao¹, SHANG Yangyang¹, WANG Shuling^{2△}, WANG Yunying³
(1. Department of Hepatobiliary Surgery; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing General Hospital, Chongqing 400014, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the anaerobic culture of bile specimens in 151 cases. **Methods** From September 2014 to January 2016, 89 patients (group A) suffering from community-acquired acute biliary infection and 62 patients (group B) suffering from biliary tract disease without biliary infection were selected prospectively in our hospital. All bile samples were collected for anaerobic culture. **Results** In group A, anaerobic bacteria were found only in 2 samples of the 54 samples collected from acute cholecystitis (the positive rate 3.7%), while anaerobic bacterium was found only in 1 sample of the 35 samples collected from acute cholangitis. In group B, anaerobic bacterium was found only in 1 sample of the 54 samples collected from chronic cholecystitis (the positive rate 1.9%), while anaerobic bacterium was not found in the 8 samples collected from bile duct without acute biliary infection. The positive rate of bile anaerobic culture in group A and group B were separately 3.4% and 1.6% ($P>0.05$). **Conclusion** The positive rate of biliary anaerobes are lower in biliary tract infection, the technology and equipment need improvement.

Key words: biliary tract infection; bile specimen; culture; anaerobic bacterium

细菌培养在临床抗感染治疗中具有重要的指导意义。一般认为胆道感染均为需氧菌、厌氧菌感染, 但厌氧菌多与需氧菌混合感染。胆道感染治疗中常根据经验进行抗厌氧菌治疗, 缺乏厌氧菌培养的依据。从精准治疗的角度进行胆道感染的抗厌氧菌治疗, 应有厌氧菌培养依据。众多原因造成既往临床胆汁厌氧菌培养困难^[1-3]。现探讨社区获得性急性胆道感染和非急性胆道感染患者的厌氧菌培养, 了解感染情况和指导临床治疗。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 9 月至 2016 年 1 月重庆市人民医院 151 例急性胆道感染患者和非急性胆道感染患者。急性胆道感染患者 89 例, 男 44 例, 女 45 例, 年龄 31~95 岁, 中位年龄 60.9 岁; 急性胆囊炎 54 例, 男 26 例, 女 28 例, 年龄 31~85 岁, 中位年龄 55.4 岁, 涉及胆囊基础疾病均为胆囊结石; 急性胆管炎患者 35 例, 男 18 例, 女 17 例, 年龄 31~95 岁, 中位

年龄 69.4 岁, 包括胆总管结石、肝内胆管结石、胆管癌。非急性胆道感染患者 62 例, 男 24 例, 女 38 例, 年龄 21~82 岁, 中位年龄 44.5 岁; 慢性胆囊炎患者 54 例, 男 22 例, 女 32 例, 年龄 24~82 岁, 中位年龄 43.4 岁, 包括胆囊结石、胆囊息肉; 非急性胆道感染胆管患者 8 例, 男 2 例, 女 6 例, 年龄 21~75 岁, 中位年龄 52.6 岁, 包括胆总管结石、肝内胆管结石、胰头癌。

1.2 纳入和排除标准

1.2.1 急性胆囊炎 符合《急性胆道系统感染的诊断和治疗指南(2011 年版)》的诊断标准^[4]。(1) 症状和体征: 右上腹疼痛(可向右肩背部放射), Murphy 征阳性, 右上腹包块、压痛、肌紧张、反跳痛。(2) 全身反应: 发热, C 反应蛋白大于或等于 30 mg/L, 白细胞升高。(3) 影像学检查: 超声、CT、MRI 检查发现胆囊增大, 胆囊壁增厚, 胆囊颈部结石嵌顿, 胆囊周围积液等表现。以上症状、体征及全身反应中至少各有 1 项阳性。

1.2.2 急性胆管炎 符合《急性胆道系统感染的诊断和治疗

* 基金项目: 重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(20143018)。

作者简介: 陈圣开, 男, 副主任医师, 主要从事临床胆道感染研究。 △ 通信作者, E-mail: 448040984@qq.com。

指南(2011 年版)》的诊断标准^[4]:(1)症状和体征:胆道疾病史,高热和(或)寒战,黄疸,腹痛及腹部压痛(右上腹或中上腹)。(2)实验室检查:炎症反应指标(白细胞、C 反应蛋白升高),肝功能异常。(3)影像学检查:胆管扩张或狭窄,肿瘤,结石等。以上症状和体征中至少 2 项符合+实验室检查+影像学检查确诊急性胆管炎。

1.2.3 非急性胆道感染 有胆道疾病但不符合《急性胆道系统感染的诊断和治疗指南(2011 年版)》的诊断标准(包括确诊标准和疑似标准)^[4]。

1.2.4 排除标准 院内胆道感染。

1.2.5 病例分组 (1)A 组(急性胆道感染组):共 89 例,包括急性胆囊炎 54 例和急性胆管炎 35 例。(2)B 组(非急性胆道感染组):共 62 例,包括慢性胆囊炎 54 例和非急性胆道感染的胆管相关疾病 8 例。

1.3 抗菌药物使用情况 A 组患者标本采集前均使用抗菌药物 1~3 d,其中 12 例患者在标本采集前仅使用了头孢西丁,5 例使用哌拉西林钠/他唑巴坦,72 例患者在以上抗菌药物的基础上联合使用甲硝唑或奥硝唑。B 组患者在标本采集前均未使用抗菌药物。

1.4 标本采集与送检

1.4.1 腹腔镜手术 术中将 5 mL 无菌空针针头拔下,针筒接上无菌输液用头皮针,头皮针针管内空气用瓶装无菌生理盐水排除,头皮针经右肋缘下戳孔处进入腹腔,使用腹腔镜分离钳夹住头皮针针头穿刺胆囊底部抽取胆囊胆汁 1~2 mL,或穿刺肝总管、胆总管抽取肝外胆管胆汁 1~2 mL。拔出穿刺针后针尖迅速用预先准备好的无菌橡皮塞封闭,以隔绝空气。将抽取胆汁标本后的无菌空针连同头皮针一起置于无菌袋内密闭,1 h 内送重庆医科大学附属第二医院检验科做厌氧菌培养及药敏试验。

1.4.2 开腹手术 采用 5 mL 无菌空针直接穿刺胆囊底部抽取胆囊胆汁 1~2 mL,或穿刺肝总管、胆总管抽取肝外胆管胆汁 1~2 mL。拔出穿刺针后针尖迅速用预先准备好的无菌橡皮塞封闭,隔绝空气,标本处理同腹腔镜手术。

1.4.3 经皮肝穿刺胆道置管引流术(PTCD) 按外科无菌术规范,穿刺点及周围 20 cm 内皮肤用碘伏消毒,铺无菌巾,穿刺引导使用的超声探头套入无菌套隔绝污染。使用一次性无菌 PTCD 针在超声引导下穿刺肝内胆管,抽取肝内胆管胆汁 1~2 mL,迅速拔出空针,套上针头,针尖用预先准备好的无菌橡皮塞封闭,以隔绝空气,标本处理同腹腔镜手术。

1.5 厌氧菌培养、鉴定和药敏试验

1.5.1 仪器与试剂 接种用具,比浊仪,BC-J160S 二氧化碳培养箱,厌氧手套箱,生物安全柜,显微镜,VITEK-Compact 2 全自动细菌鉴定仪等。培养基采用厌氧血琼脂平板和厌氧菌肉汤。鉴定卡使用 VITEK-Compact 2 型全自动细菌鉴定仪配套的 ANC 厌氧菌鉴定卡、AST 药敏卡。

1.5.2 细菌培养 根据《全国临床检验操作规程》进行厌氧菌培养。将送检标本接种厌氧血琼脂平板和厌氧菌肉汤,放入厌氧培养柜进行厌氧培养。分离致病菌株,挑取纯的单个菌落配制菌悬液上机鉴定和药敏试验。

1.5.3 菌株鉴定及药敏试验 采用法国生物梅里埃 VITEK-Compact 2 全自动细菌鉴定仪分析纯的培养菌株,使用配套的

鉴定卡进行鉴定,AST 药敏卡进行药敏分析,全过程严格按照产品说明书进行。药敏结果按照 CLSI 2013 年 M100 S23 规定的折点,判定耐药(R)、中介(I)、敏感(S)。

1.6 统计学处理 采用 WHONET5.4 和 SPSS22.0 等统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较使用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

A 组:急性胆囊炎胆汁厌氧菌培养 54 例,2 例厌氧菌生长(均为脆弱类拟杆菌),阳性率 3.7%;急性胆管炎胆汁厌氧菌培养 35 例,1 例厌氧菌生长(消化链球菌),阳性率 2.9%。B 组:慢性胆囊炎胆汁厌氧菌培养 54 例,1 例厌氧菌生长(可变梭杆菌),阳性率 1.9%;非急性胆道感染胆管相关疾病胆汁厌氧培养 8 例,无厌氧菌生长。2 组阳性率分别为 3.4%(3/89)和 1.6%(1/62),差异无统计学意义($P>0.05$)。2 组患者胆汁厌氧培养总阳性率为 2.6%(4/151)。

3 讨论

厌氧菌是一类必须在无游离氧环境中生长繁殖,不能在空气(18%氧气)和(或)10%二氧化碳浓度下的固体培养基表面生长细菌。该细菌缺乏完整的代谢酶体系,其能量代谢以无氧发酵(糖酵解)的方式进行。厌氧菌大量存在健康者各腔道内,特别是肠道、口腔、阴道,与需氧菌共同构成这些器官的正常菌群;厌氧菌少部分为单独感染,大部分与需氧菌混合感染。根据是否形成芽孢,厌氧菌可分为厌氧芽孢杆菌和无芽孢厌氧菌。厌氧芽孢杆菌主要引起外源性感染,无芽孢厌氧菌引起内源性感染^[5]。胆道感染为内源性感染,所涉及的厌氧菌应为无芽孢厌氧菌。有研究认为,胆道感染的细菌是通过十二指肠乳头、静脉或淋巴来源于肠道^[6]。无芽孢厌氧菌包括革兰阴性杆菌、革兰阳性球菌,在人体正常菌群中占绝对优势,是其他非厌氧菌的 10~1 000 倍^[5]。无芽孢厌氧菌在肠道内同样占绝对优势,占肠道所有细菌总数的 99.9%,大肠埃希菌等其他细菌仅占 0.1%^[7]。脆弱类杆菌是肠道最常见的革兰阴性厌氧杆菌^[5]。有研究提示脆弱类杆菌也是胆道感染最常见的厌氧菌,提示胆道厌氧菌感染与肠道厌氧菌的关系^[8]。有学者研究报道,胆汁非厌氧菌培养的阳性率达 67.2%,主要细菌为大肠埃希菌等肠道常见菌^[9]。因此推测在肠道菌群中占绝对优势的厌氧菌,在胆道感染中可能有较高比例,厌氧菌培养中也可能有较高的阳性率。

本研究结果表明,急性胆道感染和非急性胆道感染患者厌氧菌阳性率均较低(3.4%、1.6%);急性胆道感染患者需氧菌培养的阳性率为 39.3%,非急性胆道感染患者的阳性率为 17.7%,与相关研究差异较大。有学者认为胆道厌氧菌感染的比例约为 5%~10%^[6]。Mukaiya 等^[10]对原发性胆道感染研究提示厌氧菌菌株占胆汁培养所获菌株总数的 12%。Sung 等^[11]研究报道医院感染厌氧菌比例占所有细菌的 1.8%,社区感染厌氧菌比例占所有细菌的 1.3%,均明显低于肠道厌氧菌所占肠道细菌总数的比例。Yu 等^[12]和邹雪飞等^[13]对胆汁进行厌氧菌培养并未获得厌氧菌菌株,提示在当前的设备和技术条件下胆汁厌氧菌培养仍存在较大困难。

本研究认为胆汁厌氧培养的关键环节:(1)采用排除空气的无菌空针穿刺密闭的胆囊或胆管获取胆汁。(2)密闭条件下迅速转运标本至实验室(可使用厌氧标本收集瓶等)。(3)选择

高质量的厌氧培养基(新鲜、营养丰富的含有还原剂的培养基、特殊培养基或选择培养基)。(4)可靠的厌氧培养设备(如厌氧培养罐、厌氧培养袋、厌氧手套箱等)。参与本研究的实验室具备厌氧培养的设备、试剂、技术,严格按照要求控制各个环节,但胆汁厌氧培养阳性率仍较低,推测原因:(1)社区获得性急性胆囊炎和社区获得性急性胆管炎患者的厌氧菌感染比例原本较低。(2)与需氧菌培养比较,厌氧菌培养对培养设备、培养技术、标本采集的要求更高。(3)本研究 80.9%(72/89)的急性胆囊炎和急性胆管炎患者在胆汁标本采集前使用了 1 次或以上的抗厌氧菌药物(甲硝唑或奥硝唑),5.6%(5/89)急性胆囊炎和急性胆管炎患者使用了 1 次或以上的兼具抗厌氧菌作用的抗菌药物(如哌拉西林钠/他唑巴坦等),厌氧菌对以上抗菌药物敏感。

为提高胆汁厌氧培养的阳性率,作如下改进措施:(1)急性胆道感染患者入院后,尽量压缩术前检查和准备时间,在不违反医学伦理学情况下,争取在使用抗厌氧菌药物之前取得胆汁标本。(2)严格在密闭情况下抽取和运送标本,避免接触空气或氧气,可考虑将采集的胆汁标本立即注入厌氧标本收集瓶或厌氧增菌瓶等运送标本。(3)取得胆汁标本后,尽可能短时间内送往实验室。(4)实验室收到标本后,立即严格按操作规程进行厌氧培养处理。(5)实验室采用厌氧工作站等较为先进的厌氧菌培养设备,以保障厌氧环境。有研究报道胆汁培养阴性者,可通过提取胆汁细菌群落 DNA,扩增胆汁细菌 16 S rDNA,进行终端限制性片段长度多态性(TRFLP)分析,了解胆汁的细菌种类^[14]。由于目前胆汁厌氧培养对设备和技术等要求较高,培养阳性率低,能否采用以上技术代替厌氧培养,以判断有无胆道厌氧菌感染及厌氧菌种类,值得临床进一步的研究。

综上所述,胆道疾病无论胆道感染与否,均有一定程度的厌氧菌存在。目前临床胆汁厌氧培养仍较困难,培养阳性率较低,对临床抗厌氧菌治疗的指导作用有限,因此有必要进一步研究和改善有关设备和技术,并加强人员培训。

参考文献

[1] 王志刚,潘乐玉,徐金莲,等.胆道感染致病菌分布及耐药性的研究[J].中华实验外科杂志,2015,32(8):1973-1975.
[2] 赵登秋,邬叶锋,朱威,等.上海市金山地区胆道感染患者

胆汁细菌感染及耐药分析[J].中华消化杂志,2010,30(8):522-524.
[3] 陈秉烈,应福明,范天逸.胆道感染患者胆汁培养及药敏分析[J].中国药物与临床,2010,10(7):840-842.
[4] 中华医学会外科学分会胆道外科学组.急性胆道系统感染的诊断和治疗指南(2011 版)[J].中华消化外科杂志,2011,10(1):9-13.
[5] 贾文祥.医学微生物学[M].2 版.北京:人民卫生出版社,2013:171.
[6] Rajan K, Subhas B. Infections of the Biliary Tract[J]. Gastrointest Endoscopy Clin N Am, 2013, 23(4): 199-218.
[7] 李凡,徐志凯.医学微生物学[M].8 版.北京:人民卫生出版社,2015:137-138.
[8] 叶观瑞,李美荣,卢树荣,等.胆石病的胆汁病原菌培养及药敏分析[J].中华普通外科杂志,2002,17(8):478-480.
[9] 吴晓春,侯章梅,成燕,等.2011—2013 年某院胆道感染病原菌与细菌耐药性分析[J].重庆医学,2015,44(30):4207-4209.
[10] Mukaiya M, Hirata K, Katsuramaki T, et al. Isolated bacteria and susceptibilities to antimicrobial agents in biliary infections[J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(63): 686-690.
[11] Sung K, Lee K, Lee H, et al. The clinical epidemiology and outcomes of bacteremic biliary tract infections caused by antimicrobial-resistant pathogens[J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(3): 473-483.
[12] Yu H, Guo Z, Xing W, et al. Bile culture and susceptibility testing of malignant biliary obstruction via PTBD[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2012, 35(5): 1136-1144.
[13] 邹雪飞,吴广利,王伟,等.胆石症合并急性胆管炎患者胆汁及血液病原菌培养及药敏分析[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(1):91-95.
[14] 黄洁,丁绍晖,孙敏,等.117 例梗阻性黄疸患者胆汁细菌群落限制性片段多态性分析[J].中华消化杂志,2014,34(12):823-825.

(收稿日期:2017-01-27 修回日期:2017-03-29)

(上接第 2013 页)

al. Long-term follow-up of cervical abnormalities among women screened by HPV testing and cytology-Results from the Hammersmith study[J]. Int J Cancer, 2008, 122(10): 2294-2300.
[9] Ronco G, Dillner J, Elfström KM, et al. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials[J]. Lancet, 2014, 383(99): 524-532.
[10] 张东红,林美珊.人乳头瘤病毒在国人宫颈病变中感染及型别分布特征的 Meta 分析[J].中国全科医学,2010,13

(12):1287-1290.
[11] 刘婷艳,毛玲芝,孙小丽,等.不同 HPV 基因亚型单纯性感染与宫颈病变的关系[J].中国生育健康杂志,2015,26(3):211-215.
[12] 邱峰,晁艳,袁丽娜,等.流式荧光杂交法检测 26 种 HPV 亚型在不同程度宫颈病变中的分布规律[J].临床检验杂志,2012,30(12):957-959.
[13] 王银亮. HPV 分型检测在子宫颈癌病变诊断中的价值[J].中国冶金工业医学杂志,2015,32(6):624-625.

(收稿日期:2017-01-12 修回日期:2017-02-20)