

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 09. 007

尿液分析仪和破膜剂的联合应用在快速判定 尿路感染病原菌中的价值分析*

黄 强¹, 陈 娟², 徐莉敏³, 刘兴晖³, 陈 庆^{3△}

(1. 上海市长寿社区医院检验科 200042; 2. 上海市浦东新区公利医院妇产科 200135;
3. 上海市浦东新区公利医院检验科 200135)

摘 要:目的 利用尿液分析仪和破膜剂,探讨快速鉴定尿路感染(UTI)病原菌的方法。方法 收集 200 例健康人中段尿液,采用尿液分析仪 UF-1000i 检测标本中的细菌数,以此建立健康人中段尿液细菌数基线值。收集 200 例疑似 UTI 患者中段尿液标本,UF-1000i 检测细菌数后,用破膜剂碱性十二烷基硫酸钠(NaOH-SDS)溶液处理高于基线值的标本 3 min,计算处理前后细菌减少比值(DR)。以细菌培养为标准,分析 DR 对革兰阳性(G⁺)菌和革兰阴性(G⁻)菌的鉴别能力,并绘制受试者工作特征(ROC)曲线。结果 健康人中段尿液细菌数检测结果呈偏态分布,以百分位数法($P \leq 95\%$)统计计算细菌数基线值为 $\leq 1\,510/\mu\text{L}$ 。DR 鉴别 G⁺ 菌和 G⁻ 菌的曲线下面积为 0.88。当 DR 为 2.035 时, G⁻ 菌的检测灵敏度为 0.892,特异度为 0.800。3 min 内, G⁺ 菌的 DR 较 G⁻ 菌显著降低($P < 0.05$)。结论 联合应用尿液分析仪 UF-1000i 和破膜剂 NaOH-SDS,能够快速、简便地鉴别不同革兰染色特性的细菌,为后续临床治疗提供新思路。

关键词: 尿路感染; 尿液分析仪; 细菌鉴定; 碱性十二烷基硫酸钠; 革兰染色

中图分类号: R446.51

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)09-1176-04

Value of urine analyzer and surfactant to rapid identification of urinary tract infection pathogens*

HUANG Qiang¹, CHEN Juan², XU Limin³, LIU Xinghui³, CHEN Qing^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Changshou Community Hospital, Shanghai 200042, China;
2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Pudong New Area Gongli Hospital,
Shanghai 200135, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Pudong
New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China)

Abstract: Objective To explore the efficiency of combined detection of urine analyzer and surfactant to urinary tract infection pathogens. **Methods** A total of 200 midstream urine samples from healthy persons were detected to set up a reference interval. Then, 200 patients' specimen whose bacterial population was above the reference interval were treated with surfactant for 3 min. Decreasing ratio (DR) of bacterial count was calculated. Receiver operating characteristic curve (ROC) analysis was used to assess the discrimination efficiency of DR. **Results** The reference interval of healthy population was less than $1\,510/\mu\text{L}$. And the area under curve of DR to identification gram-positive or gram-negative bacteria was 0.88. DR in gram-negative bacteria contained urine was significantly less than that in gram-positive ($P < 0.05$). **Conclusion** Combined exploring of urine analyzer UF-1000i and surfactant NaOH-SDS, it is rapid to identify urinary tract infection pathogens on gram staining characteristic, which is contribute to follow-up clinical treatment.

Key words: urinary tract infection; urine analyzer; bacterial identification; NaOH-SDS; gram stain

尿路感染(UTI)主要是由细菌感染引发的一种泌尿系统常见疾病^[1-2]。细菌按革兰染色的不同分为革兰阴性(G⁻)菌和革兰阳性(G⁺)菌,临床可据此选择相应的抗菌药物进行治疗^[3-5]。目前,在临床上主要通过中段尿液细菌培养对感染菌进行鉴定,检测过

程耗时长,难以尽早指导临床合理使用抗生素,而尿液分析仪 UF-1000i 可检测标本中的细菌数,辅助诊断 UTI。近期有学者发现,由于细菌胞壁结构的差异,不同革兰染色特性的细菌对表面活性剂碱性十二烷基硫酸钠(NaOH-SDS)溶液的耐受性明显不同,据

* 基金项目:上海市浦东新区科技发展基金(PKJ2015-Y52);上海市浦东新区卫生系统重点学科群建设资助项目(PWZxq2017-15)。

作者简介:黄强,男,主管技师,主要从事临床检验研究。△ 通信作者,E-mail:3053532274@qq.com。

此可鉴别 G⁻ 菌与 G⁺ 菌^[6]。那么,能否将此发现应用于临床尿液细菌的快速鉴定?本研究以清洁中段尿液标本作为检测基质,采用尿液分析仪 UF-1000i 结合 NaOH-SDS 处理进行细菌检测,并采用统计学方法进行分析,以期评价该方法的临床诊断价值,为抗菌药物的选择提供新思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 1—12 月上海市长寿社区医院泌尿外科、妇产科和肾内科 200 例疑似 UTI 患者的中段尿液标本,其中男 86 例,女 114 例;年龄 10~30 岁患者 58 例,>30~80 岁患者 142 例。用灭菌离心管采集中段尿液 2 管,每管 8~10 mL。于 1 h 内送至检验科,并于 30 min 内完成检测。UTI 的诊断标准参照文献^[7]。排除标准:多重细菌感染。

1.2 仪器与试剂 NaOH-SDS 溶液由 0.2 mol/L 的 NaOH 和 1% 的 SDS 混合配制而成。尿沉渣检测的仪器与试剂同前。细菌检测的仪器、试剂为法国生物梅里埃公司 VITEK-Compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪及其配套鉴定卡。

1.3 方法 (1)取 1 管中段尿液标本,用无菌吸管吸取 4 mL 尿液标本至无菌离心管中,加入 4 mL 的 NaOH-SDS 溶液,颠倒混匀 3 次后静置 3 min。然后进行尿沉渣分析,细菌计数记为 D1。剩余的中段尿液标本,也进行尿沉渣分析,细菌计数记为 D2。计算细菌数减少比值(DR),公式为:DR=D1/D2。(2)取另外一管中段尿液标本,依据微生物室标准操作规程(SOP)进行中段尿液细菌培养,并依据文献报道判定结果:G⁻≥10⁵ CFU/mL 或 G⁺≥10⁴ CFU/mL,结果为阳性;同时有 2 种致病菌生长时,选菌落计数>10⁴ CFU/mL 的细菌为阳性菌;如杂菌生长超过 2 种,则被判为污染,重新留取标本。对病原菌进行革兰染色镜检以确定其染色特性,并用自动细菌鉴定药敏分析仪对细菌进行鉴定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行分析,非正态分布的计量资料采用中位数和四分位数间距[M(P₂₅,P₇₅)]表示,组间比较采用秩和检验;采用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)评价 DR 鉴别 G⁺ 菌和 G⁻ 菌的能力,选取约登指数最大时的界值作为最佳鉴别界值,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 健康人中段尿液细菌数基线值 细菌数均值为 1 020 CFU/mL,中位数 1 150 CFU/mL,偏度-1.88,P<0.05,数据呈偏态分布。因此,基线值范围上限取第 95%百分位数 1 510 CFU/mL。不同年龄之间细菌数差异无统计学意义(P>0.05),见表 1。

2.2 UTI 患者细菌分布构成比 200 例疑似 UTI 患者中,G⁻ 菌感染 126 例(占 63.0%),主要是大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌;G⁺ 菌感染 25 例(占 12.5%),主要是肠球菌和凝固酶阴性葡萄球菌;真菌感染 7 例(占 3.5%);阴性结果为 42 例(占 21.0%)。见表 2。

表 1 健康人不同年龄段中段尿细菌数		
年龄(岁)	频数(n)	中段尿细菌数[M(P ₂₅ ,P ₇₅),CFU/mL]
≥20~<26	5	1 048(970,1 140)
≥26~<31	9	1 012(861,1 106)
≥31~<36	21	1 027(896,1 095)
≥36~<41	30	1 029(947,1 178)
≥41~<46	50	1 017(982,1 083)
≥46~<51	38	995(906,1 021)
≥51~<56	29	1 048(1 003,1 124)
≥56~61	18	1 012(892,1 093)

表 2 UTI 患者细菌分布构成比		
细菌种类	数目(n)	占比(%)
大肠埃希菌	83	41.5
肺炎克雷伯	16	8.0
变形杆菌	8	4.0
弗氏柠檬酸杆菌	4	2.0
其他阴性菌	15	7.5
肠球菌	15	7.5
凝固酶阴性葡萄球菌	7	3.5
其他阳性球菌	3	1.5
真菌	7	3.5
阴性	42	21.0
合计	200	100.0

2.3 NaOH-SDS 溶液处理尿液细菌后 DR 变化 UTI 患者尿液经 NaOH-SDS 溶液处理后的 DR 如图 1 所示。G⁺ 菌的 DR 为 3.19(2.33,4.73),G⁻ 菌的 DR 为 1.52(1.27,1.92),差异有统计学意义(P<0.001)。

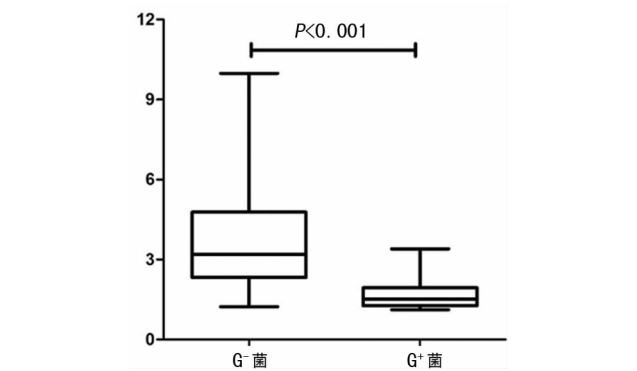


图 1 NaOH-SDS 溶液处理尿液细菌后 DR 变化

2.4 DR 对疑似 UTI 患者尿液病原菌的诊断意义

如图 2 所示, ROC 曲线下面积为 0.88。当 DR 为 2.035 时, G^- 菌的检测灵敏度为 0.892, 特异度为 0.800。结果表明, 以 2.035 为两种革兰染色特性细菌的检测界值, 则约 89.2% 的 G^- 菌和 80.0% 的 G^+ 菌可被检出。

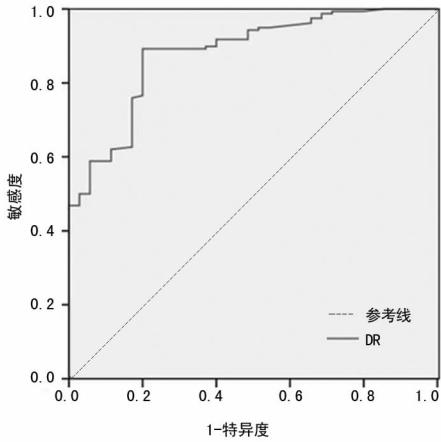


图 2 DR 鉴别 UTI 细菌的 ROC 曲线

3 讨论

UTI 的实验室诊断, 普遍采用的方法包括: 中段尿液细菌培养与鉴定、细菌革兰染色、尿液分析。中段尿液细菌培养和鉴定是 UTI 诊断的金标准, 特异度高, 但灵敏度不够, 阳性率仅在 30% 左右、检测周期长(约 48~72 h)、检测成本较高。细菌革兰染色, 可提供病原菌的革兰染色特性, 缺点也相当明显: 操作过程繁琐, 需手工完成耗费人力, 对操作者要求高; 整个过程至少 30 min, 加上标本接收与转运时间, 一般需要 3~4 h。简而言之, 细菌革兰染色费时费力, 无法作为常规检测手段。尿液分析属于临床实验室常规检测项目, 操作简便, 可快捷提供尿液成分信息, 但却无法确定细菌类型^[8-10]。以上 3 种方法, 为 UTI 的诊断提供了实验室依据, 却无法完全满足临床需要。目前 UTI 的治疗, 还处于经验性用药, 难以避免细菌耐药等问题的发生^[3-5]。

G^+ 菌与 G^- 菌具有不同的药物敏感性。对于 G^+ 菌, 临床治疗首选药物为 β -内酰胺类抗菌药物或第一代头孢菌素; 而对于 G^- 菌, 第三、第四代头孢菌素的治疗效果比较显著。因此, 区分 UTI 致病菌的革兰染色类别, 便于倾向性地选用相应抗菌药物, 从而有利于 UTI 的临床治疗。

因此, 近年来出现了一种 UTI 诊断的新方法: 基于尿液分析仪的细菌革兰染色类型判断^[1,7]。NaOH-SDS 溶液, 可用于破坏细菌细胞壁。 G^+ 菌细胞壁含有肽聚糖成分, 比含有脂多糖的 G^- 菌细胞壁坚固, G^+ 菌对 NaOH-SDS 溶液的破膜作用耐受性强, 细菌溶解慢^[7]。用于检测细菌数的设备为 UF-1000i, 其基

本原理是采用激光、核酸染色和流式细胞术检测尿液中的各种有形成分的散射光和荧光, 并以散点图的形式进行呈现, 可得到包括白细胞、红细胞、管型等有形成分的多种参数, 并对细菌进行单独检测, 以利于 UTI 的诊断^[11-16]。然而, 该方法只能鉴定出 83% 的 G^+ 菌和 46% 的 G^- 菌, 诊断价值有限^[7]。原因可能是: 研究采集清洁中段尿液标本, 要求严格消毒尿道口, 操作繁琐、耗费人力, 难以实现, 尤其是门诊患者, 一旦消毒不彻底, 必然混入杂菌干扰检测结果。

本研究在此基础上, 采用健康人中段尿液标本, 建立了中段尿液细菌基线值。并以此为 UTI 诊断标准, 提高了“基于尿液分析仪的细菌革兰染色类型判断”方法的特异度, 可鉴定约 89.2% 的 G^- 菌和 80.0% 的 G^+ 菌。标本使用 NaOH-SDS 溶液处理 3 min, 上机检测 1 min, 全部操作只需 5 min 内即可完成。因此, 该方法更为简单高效。

综上所述, 本研究发现采用 NaOH-SDS 溶液处理中段尿液标本结合 UF-1000i 检测, 能有效鉴别 UTI 患者尿液标本中致病菌的种类, 为临床倾向性的使用抗菌药物提供了新思路。

参考文献

- [1] GARRIDO D, GARRIDO S, GUTIÉRREZ M, et al. Clinical characterization and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in pediatric patients with urinary tract infection at a third level hospital of Quito, Ecuador[J]. Bol Med Hosp Infant Mex, 2017, 74(4): 265-271.
- [2] TAHA H, RAJI S J, KHALLAF A, et al. Improving catheter associated urinary tract infection rates in the medical units [J]. BMJ, 2017, 6(1): 1-4.
- [3] 郭锦. 疑似尿路感染患者尿液标本常见病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(12): 1706-1707.
- [4] 王宪灵, 王缚鲲, 赵会海, 等. 快速超广谱 β -内酰胺酶筛查在尿路感染中的应用价值研究[J]. 河北医药, 2017, 39(13): 2018-2020.
- [5] 郭薇, 孙凤军, 邱学文, 等. 尿路感染及其治疗药物的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(17): 2441-2444.
- [6] WADA A, KONO M, KAWAUCHI S, et al. Rapid discrimination of Gram-Positive and Gram-Negative bacteria in liquid samples by using NaOH-Sodium dodecyl sulfate solution and flow cytometry[J]. PLoS One, 2012, 7(10): 1-10.
- [7] 孔宪春. 留置导尿患者尿常规红细胞计数的变化与尿路感染的诊断标准[D]. 大连: 大连医科大学, 2010.
- [8] 钟伟英. 尿常规诊断尿路感染的临床价值分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2017, 27(12): 83-84.
- [9] 岑恩光. 尿有形成分检测联合应用于化学分析在尿路感染诊断中的应用价值[J]. 全科医学临床与教育, 2017, 15(4): 384-387.

- American Public Health Association (2015)[M]. APHA Press, Washington DC, 2015.
- [2] LI Q, ZHOU L, ZHOU M H, et al. Epidemiology of human infections with avian influenza a (H7N9) virus in China[J]. N Engl J Med, 2014, 370(6): 520-532.
- [3] JONGES M, WELKERS M R, JEENINGA R E, et al. Emergence of the Virulence-Associated PB2 E627K substitution in a fatal human case of highly pathogenic avian influenza virus a(H7N7) infection as determined by illumina Ultra-Deep sequencing[J]. J Virol, 2014, 88(3): 1694-1702.
- [4] 张保强, 张晓. Luminex 液态芯片在临床及科研中的应用[J]. 当代医学, 2012, 18(4): 18-20.
- [5] 黎俊宏, 姚萍, 李琼, 等. 多重 PCR 液相芯片技术在腹泻病原体检测中的应用[J]. 现代预防医学, 2017(18): 3390-3394.
- [6] 冯伟明, 顾秀丽, 隋文君, 等. xTAG(R) GPP 多重核酸技术在北京地区感染性腹泻诊断中的应用及流行病学研究[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(6): 435-439.
- [7] 伊洁, 徐英春, 窦亚玲. 多重荧光定量 PCR 和液态芯片技术对下呼吸道病毒检测的应用比较[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(7): 544-547.
- [8] 王洁, 王卫萍, 胡毓安, 等. 靶序列富集多重 PCR-液相芯片联合检测 4 种常见呼吸道病毒的初步应用[J]. 医学研究生学报, 2016, 29(9): 958-963
- [9] DEL VALLE-MENDOZA J, ORELLANA-PERALTA F A, VERNE E, et al. High prevalence of mycoplasma pneumoniae and chlamydia pneumoniae in children with acute respiratory infections from Lima, Peru [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170787.
- [10] WISHAUP J O, PLOEG T V, SMEETS L C, et al. Pitfalls in interpretation of CT-values of RT-PCR in children with acute respiratory tract infections[J]. J Clin Virol, 2017, 90(1): 1-6.
- [11] 汤美玲, 刘洪根, 胡丽娟. 深圳市儿童急性呼吸道感染的病原学流行特点[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(10): 796-797.
- [12] JOHNSTONE J, MAJUMDAR S R, FOX J D, et al. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation[J]. Chest, 2008, 134(6): 1141-1148.
- [13] 齐英, 陈叶, 王冰, 等. 沈阳市学龄前儿童上呼吸道感染病原谱及流行特征分析[J]. 国际病毒学杂志, 2018, 25(5): 1673-4092.
- [14] 谢爱香. 呼吸道九项病原体检测在儿童呼吸道感染中的应用价值[J]. 实验与检验医学, 2018, 36(3): 1129-1674.
- [15] 顾艳红, 刘兰吉, 孙利, 等. 儿童急性上呼吸道感染夏季和冬季病毒病原学分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(35): 4079-4082.
- [16] 许晶, 张蕾, 史伟, 等. 西安市儿童呼吸道病毒感染谱分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(7): 663-666.
- [17] 王慧玲. 鼻病毒感染研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(13): 2032-2034.
- [18] 赖科峰, 连距飞, 陈柳青, 等. 广州地区 12 359 例急性呼吸道感染儿童呼吸道 9 项病原体检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2018, 33(13): 1001-4411.
- [19] 闫俊平, 曹东林. 液相芯片技术在传染病快速诊断中的应用[J]. 现代医院, 2017, 17(12): 1782-1785.

(收稿日期: 2018-10-25 修回日期: 2019-01-22)

(上接第 1178 页)

- [10] 黄业亚, 孙鸿高. 尿沉渣定量检测白细胞及细菌总数对尿路感染的诊断价值[J]. 海南医学, 2017, 28(14): 2309-2311.
- [11] BARAKE S S, EMRICK A, TABAK Y, et al. Impact of automation process on microbiological laboratory efficiency[J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4 (Suppl 1): S593-S593.
- [12] KIM Y, PARK K G, LEE K, et al. direct identification of urinary tract pathogens from urine samples using the vitek MS system based on matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Ann Lab Med, 2015, 35(4): 416-422.
- [13] WANG J, ZHANG Y, XU D W, et al. Evaluation of the sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133(4): 577-582.
- [14] MONSEN T, RYDEN P. A new concept and a comprehensive evaluation of SYSMEX UF-1000i flow cytometer to identify culture-negative urine specimens in patients with UTI[J]. Euro J Clin Microbiol Infect Dis, 2017, 36(9): 1691-1703.
- [15] MONSEN T, RYDÉN P. Flow cytometry analysis using sysmex UF-1000i classifies uropathogens based on bacterial, leukocyte, and erythrocyte counts in urine specimens among patients with urinary tract infections[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(2): 539-545.
- [16] SHANG Y J, WANG Q Q, ZHANG J R, et al. Systematic review and meta-analysis of flow cytometry in urinary tract infection screening[J]. Clin Chim Acta, 2013(424): 90-95.

(收稿日期: 2018-10-09 修回日期: 2018-12-28)