

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.21.012

应用 COPAN WASPLab 评估痰液标本经不同液化剂作用后的细菌分离和接种效果*

白露¹,周柯¹,郑恬¹,于恒超^{2△}

空军军医大学西京医院:1. 检验科;2. 肝胆外科,陕西西安 710032

摘要:目的 应用 COPAN WASPLab 评估痰液标本经不同液化剂处理后的细菌分离和接种效果。方法 收集抽吸的痰液标本 100 份,分别采用 COAPN SL solution、OXOID SPUTASOL、胰蛋白酶溶液处理,评估三者液化时间、接种效果及单个菌落分离数量。另收集同期患者自主咳出痰液标本 105 份,以手工直接接种法为对照,比较不同方法去除唾液成分后,菌落分离质量分数的差异性。结果 经 3 种液化剂处理后,90% 的痰液标本的液化时间均在 30 min 内完成,接种效果及单个菌落分离数量差异无统计学意义($P > 0.05$)。经不同方法去除唾液成分,再消化痰液后评估,无论应用 COPAN 无菌螺旋挑痰棒挑取脓性痰液的方法,还是无菌生理盐水洗痰法,与手工直接接种法两两比较,其菌落分离质量分数水平均高于手工直接接种法($P < 0.05$)。结论 COAPN SL solution、OXOID SPUTASOL、胰蛋白酶溶液均可用于痰液标本的液化处理,经液化处理后的菌落分离效果均优于未处理的手工直接接种法。COAPN SL solution 在应用于 COPAN WASPLab 时,具有更好的临床实用性。

关键词:痰液; COAPN SL solution; OXOID SPUTASOL; 胰蛋白酶

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)21-3119-04

Evaluation effect of bacterial isolation and inoculation on sputum samples treated with different liquefying agents by COPAN WASLab*

BAI Lu¹, ZHOU Ke¹, ZHENG Tian¹, YU Hengchao^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Hepatic Surgery,

Xijing Hospital of the Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: Objective To evaluate the effect of different liquefying agents (COAPN SL solution, OXOID SPUTASOL and trypsin solution) on bacterial isolation and inoculation of sputum samples after different methods of liquefaction. **Methods** Totally 100 sputum samples were collected and treated with COAPN SL solution, OXOID SPUTASOL and trypsin solution respectively. The liquefaction time, inoculation effect and isolation quantity of single colony were evaluated. In addition, another 105 specimens of sputum coughed up by patients themselves during the same period were collected, manual direct inoculation method was used as control group, and the difference in the quality fraction of bacterial colony separation after removing saliva components by different methods was compared. **Results** After three different methods of liquefaction, the liquefaction time of 90% of the sputum specimens was completed within 30 minutes, and the inoculation effect and the number of isolated colonies were not statistically significant ($P > 0.05$). After different methods of removing saliva components and digesting sputum, whether using COPAN sterile spiral sputum picking stick to pick up purulent sputum or sterile normal saline washing method, compared with manual direct inoculation method, the colony separation mass fraction level was higher than that of manual direct inoculation method ($P < 0.05$). **Conclusion** COAPN SL solution, OXOID SPUTASOL and trypsin solution can be used in the liquefaction pretreatment of sputum samples, and the effect of colony isolation after liquefaction treatment is better than that of the manual direct inoculation method. COAPN SL solution has better clinical applicability when applied to COPAN WASPLab.

Key words: sputum; COAPN SL solution; OXOID SPUTASOL; trypsin

随着对微生物学研究和技术手段的变革创新,微生物自动化实验室建设已悄然兴起,并引领着临床微

* 基金项目:空军军医大学西京医院 2018 年度学科助推计划(XJZT18ML24);陕西省自然科学基金项目(S2019-JC-YB-0556)。

作者简介:白露,女,主管技师,主要从事微生物自动化应用及研究。△ 通信作者,E-mail:yuhech1882@163.com。

生物走进全面自动化的新时代^[1-2]。在实验室常规标本接种及应用自动化接种仪接种时,均要求痰液标本均匀液化,合格均质的标本是保证培养质量及后续正确鉴定的前提。所以,如何选择适宜痰液标本均质化的试剂,成为困扰实验室接种的一大难题。本研究应用 COPAN WASPLab 全自动接种孵育流水线系统,与传统的手工直接接种法进行比较,旨在为临床实验室工作中选择合适的痰液标本前处理方法提供参考依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2018 年 7—10 月本院呼吸科重症监护病房(ICU)及麻醉 ICU 患者经呼吸道抽出的痰液标本 100 份(>3 mL)为研究对象,另收集同期呼吸科患者自主咳出痰液标本 105 份(含唾液及黏稠脓性痰液)为对照。根据《全国临床检验操作规程》第 4 版^[3]标准作痰液标本合格性筛查。选取 ATCC 700603 肺炎克雷伯菌、ATCC 25923 金黄色葡萄球菌、ATCC 27853 铜绿假单胞菌、ATCC 19606 鲍曼不动杆菌、ATCC 49619 肺炎链球菌及 ATCC 49247 流感嗜血杆菌,传代培养。

1.2 仪器与试剂 COAPN SL solution 1 mL 二硫苏糖醇(DTT)痰液化剂、COPAN 无菌螺旋挑痰棒购自意大利 Copan 公司,SPUTASOL 痰液化剂购自英国 Oxoid 公司,胰蛋白酶干粉购自美国 Sigma 公司。SPUTASOL 痰液化剂配制:7.5 mL 浓缩液加入无菌蒸馏水 92.5 mL,现用现配,可 4 °C 保存 48 h。1%胰蛋白酶溶液配制:称取 1 g 胰蛋白酶干粉,加入 100 mL 无菌 PBS 中(pH 7.6)低速搅拌混匀,过滤除菌,可在 4 °C 短期保存或 -20 °C 分装冻存,避免反复冻融,宜尽快使用完毕。血平板、嗜血巧克力平板、麦康凯平板购自郑州安图生物技术有限公司。COPAN WASPLab 全自动接种孵育流水线系统购自意大利 Copan 公司。

1.3 方法

1.3.1 液化剂作用不同时间点接种的效果评估 分别取肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎链球菌及流感嗜血杆菌,配制成 0.5 麦氏浊度菌悬液,各取 10 μL 分别加入 1 mL 无菌生理盐水、COAPN SL solution、OXOID SPUTASOL、1%胰蛋白酶溶液中振荡混匀。应用 COPAN WASPLab 全自动接种孵育流水线系统取 1 μL 在作用 0、15、30、45、60、75、90、105、120 min 时间点接种。

1.3.2 抽出痰液标本的处理方法 呼吸道抽出痰液标本 100 例,以手工直接接种法为对照,按称重法分配,大致分为 3 等份,分别应用 COAPN SL solution 痰液化剂、OXOID SPUTASOL 痰液化剂、胰蛋白酶溶液 1:1 液化。将液化后的痰液接种孵育,以平板上的单个菌落数量计数为评判标准:≤5 个,+;>5~20 个,++;>20~35 个,+++;>35 个,++++。

若该标本中含有 2 种致病菌,以分离量较少的病原菌数为准,用以评估^[4]。参照手工计数标本,比较 3 种液化剂的液化时间、接种效果及单个菌落分离数量。

1.3.3 咳出痰液标本的处理方法 患者自主咳出痰液标本 105 例,均含唾液及黏稠脓性分泌物,做痰液标本合格性筛查,涂片初步评估为不合格痰液标本,分为 3 组,每组 35 份。以手工直接接种为对照组,COAPN SL solution 液化剂组应用 COPAN 无菌螺旋挑痰棒挑取脓性或带血部分痰液,放入管内液化。OXOID SPUTASOL 组及胰蛋白酶溶液组,需用无菌生理盐水洗涤,去除通过口腔咳出的痰液中混有的正常菌群部分,取痰液脓性部分等比液化。以上处理后的痰液脓性部分经痰液标本合格性筛查,为合格痰液标本。参照手工计数标本,以 QIS 菌落分离质量分数为判读标准^[5],评估以上 3 种方法处理后的标本的分离质量分数。

1.3.4 液化后的效果及孵育 入组标本均需震荡混匀(2 000 r/min,30 s),置于 37 °C 孵箱液化 15 min,观察液化效果,以无结块可流动为宜,如未达到均质化水平,延长孵育时间至完全液化。应用 COPAN WASPLab 全自动平板接种仪取 1 μL 接种。血平板及巧克力平板 5% CO₂ 孵箱孵育,麦康凯平板 35 °C 孵箱孵育,16 h 后自动拍摄菌落图片,观察结果。

1.4 统计学处理 所有数据均采用 SPSS19.0 软件进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰液化不同作用时间对呼吸道常见致病菌的影响 以生理盐水为对照,COAPN SL solution 及 OXOID SPUTASOL 在 0~120 min 内对肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎链球菌及流感嗜血杆菌均无明显的抑制作用,四区均有生长。胰蛋白酶溶液对肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌无明显的抑制作用,四区均有生长;但在作用 15 min 后,对肺炎链球菌及流感嗜血杆菌出现抑制作用,且菌量随着时间的延长逐步减少,在 60 min 时,被完全抑制,无肺炎链球菌及流感嗜血杆菌生长。

2.2 抽出标本液化效果及所需时间比较 在使用 3 种痰液化剂分别作用于同一标本后,皆能达到均质化水平无结块,呈可流动的均匀痰液,可通过微生物自动化仪器接种自检。但经评估,所需的液化时间略有不同,COPAN SL solution 在 30 min 内完成的液化标本占 92%(92/100);OXOID SPUTASOL 占 90%(90/100);胰蛋白酶溶液占 95%(95/100)。各液化结果比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 抽出痰液标本处理后单个菌落分离数量评估 患者留取的 100 份痰液中,痰培养阳性 71 份。本实验入组标本因多来源于住院患者,故未分离出肺

炎链球菌及流感嗜血杆菌。其中 19 份标本只生长革兰阳性球菌,在含万古霉素的巧克力平板及麦康凯平板上不生长,故评估此两类平板仅有 52 份为统计标本。

在使用 3 种痰液化剂分别作用于同一标本后,皆能达到良好的接种效果,见图 1。对上述血平板、嗜血巧克力平板及麦康凯平板中的单个菌落分离数量评估,分别应用痰液化剂处理后的标本间差异无统计意义($P > 0.05$),但分别与手工直接接种法两两比较,均

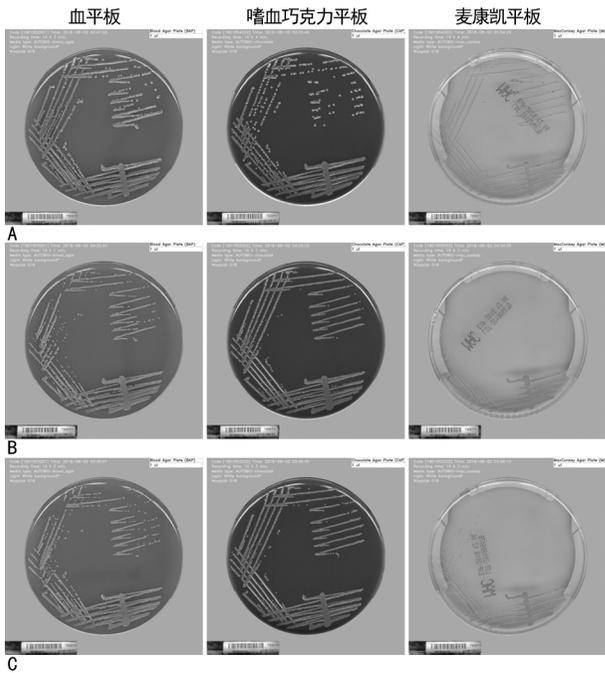
显著高于手工直接接种法,差异有统计学意义($P < 0.001$)。见表 2。

表 1 3 种痰液化剂不同液化时间的标本数(n)

痰液化剂类型	0 min	15 min	30 min	45 min	60 min
COAPN SL solution	0	55	37	7	1
OXOID SPUTASOL	0	54	36	9	1
胰蛋白酶溶液	0	61	34	5	0

表 2 单个菌落分离数量评估(n)

痰液化剂类型	血平板				嗜血巧克力平板				麦康凯平板			
	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++	+	++	+++	++++
手工直接接种法(无液化)	79	23	31	10	9	18	15	10	6	18	17	11
COAPN SL solution	0	3	17	51	0	2	12	38	0	4	13	35
OXOID SPUTASOL	0	5	18	48	0	2	16	34	0	3	12	37
胰蛋白酶溶液	1	7	17	46	0	4	15	33	0	4	12	36



注: A 表示 COAPN SL solution 接种效果; B 表示 OXOID SPUTASOL 接种效果; C 表示胰蛋白酶溶液接种效果。

图 1 3 种痰液化剂处理后的接种效果

表 3 手工直接接种法与挑痰法 + COPAN SL solution 的效果评估(n)

接种方法	极差(QIS)	差(QIS2)	良(QIS3)	优(QIS4)
手工直接接种	2	13	15	5
COAPN SL solution	1	6	18	10

2.4 咳出痰液标本处理后菌落分离质量分数评估 参照手工直接接种法接种标本,以菌落分离质量等级为评判标准。分别评估去除唾液成分后,痰液化剂对痰液标本的影响。结果表明,无论应用 COPAN

无菌螺旋挑痰棒挑取脓性痰液的方法,还是无菌生理盐水洗痰法,与手工直接接种法两两比较,其菌落分离质量分数水平均高于手工直接接种法($P < 0.05$),见表 3~5。

表 4 手工直接接种法与应用生理盐水洗痰法 + OXOID SPUTASOL 效果评估(n)

接种方法	极差(QIS)	差(QIS2)	良(QIS3)	优(QIS4)
手工直接接种	2	12	16	5
OXOID SPUTASOL	1	10	15	9

表 5 手工直接接种法与应用生理盐水洗痰法 + 胰蛋白酶溶液的效果评估(n)

接种方法	极差(QIS)	差(QIS2)	良(QIS3)	优(QIS4)
手工直接接种	2	11	18	4
胰蛋白酶溶液	1	8	19	7

3 讨 论

在国内,大部分医院仍然采用不液化痰液标本、直接无菌棉签接种的方法。由于痰液标本受采集方法不正确的限制,往往标本唾液成分较多,受上呼吸道黏膜表面及其定植菌的影响,致使途经口咽部咳出的痰液常受到干扰^[6-7]。且病原菌感染肺部在下呼吸道深处,炎症会局限在炎性渗出物中,导致有意义的病原菌包裹其中,难以突破炎性渗出物的包围,直接接种不利于细菌的生长,而痰液的均质化处理则利于细菌的暴露,以便细菌更好地生长,提高痰液中致病菌的检出。

本研究结果显示,应用 COPAN WASPLab 全自动接种孵育流水线系统评估 COPAN SL solution、OXOID SPUTASOL 及胰蛋白酶溶液均对痰液有良

好的均质作用,且液化效果良好,单个细菌数量均优于手工直接接种法,因此,可以满足常规痰液接种及微生物自动化接种仪器的上机需求^[8]。其中,COPAN SL solution 及 OXOID SPUTASOL 主要成分均为 DTT 及 PBS,二者主要成分并无差异。DTT 是一种很强的还原剂,可用于蛋白质中二硫键的还原,在痰液标本中,利用 DTT 可使糖蛋白纤维丝之间交联的二硫键打开,降低痰液的黏稠度,从而溶解黏液中杂质等非有效成分,分散细胞,使得黏稠的痰液均匀呈液化状态;且在 PBS 中可保证盐平衡作用,调整适宜的 pH 值,维持最佳的条件,以保证生物活性物质具有最完整的特性。二者区别在于,COPAN SL solution 为 1 mL 成品,无须配制,直接使用,且采用改良技术真空包装,稳定性长达 2 年之久;加之配以 COPAN 无菌螺旋挑痰棒,可直接挑取痰液中的脓性成分,避开唾液干扰,无需增加洗痰步骤,节省时间,便于上机使用。加入痰液后在震荡时,螺旋状的设计可加速助力痰液的液化时间及效果。OXOID SPUTASOL 液化剂则在使用前须将浓缩液加入到蒸馏水中,配制成 100 mL 稀释液,效期很短,只能在 48 h 内保证其稳定性;在使用时,含唾液的标本,推荐增加生理盐水洗脱,但此步骤较繁琐,耗时长,不宜大样本量广泛应用,且因痰液量的差异,每一份痰液液化的时间不一样,痰液量较多的标本,还需增加液化剂的使用量及液化时间,才能确保其均质化的效果及上机验证^[9-10]。

近年,也有较多研究应用胰蛋白酶溶液作为痰液化剂,胰蛋白酶为肽链内切酶,对氨基酸肽链有选择性水解作用,可分解黏液型痰液及脓性痰液等黏性分泌物,但其活性与其浓度、作用时间密切相关,液化过度会导致细胞损伤及菌体的破坏。特别在液化痰液时,不宜时间过长,经本研究发现,胰蛋白酶溶液虽然对于常见呼吸道致病菌并无影响,但是对肺炎链球菌及流感嗜血杆菌有抑制作用,易导致菌落计数出现偏差及遗漏菌体的检出。故应依据自身实验室要求,酌情选择合适的液化剂。

本研究均应用统一的接种标准,COPAN WAS-PLab 全自动接种孵育流水线系统是一种高级的机器平台,与传统的手工直接接种法相比,可显著提高接种效率,减少人力投入及消耗,定量接种使其接种效果高度一致并标准化,单个细菌分离数量增加;还可与实验室信息管理系统连接实现信息化管理,留存所

有的菌落图片,保证其有效的溯源性;此外,还可用于回顾性分析,并能缩短标本周转时间^[11-13]。总之,微生物自动化的发展,推进了微生物技术的创新且日益精进,但其对标本前处理方法有一定要求,需要在常规使用前做仪器接种验证评估性分析。

参考文献

- [1] GREUB G, PROD'HOM G. Automation in clinical bacteriology: what system to choose[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(5): 655-660.
- [2] 郝晓柯. 国内实验室自动化的现状与思考[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(1): 25-28.
- [3] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 1-10.
- [4] BURCKHARDT I. Laboratory automation in clinical microbiology[J]. Bioengineering, 2018, 5: e102.
- [5] CROXATTO A, PROD'HOM G, FAVERJON F, et al. Laboratory automation in clinical bacteriology: which system to choose[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(2): 217-235.
- [6] 王敬华, 葛平, 陈蓉, 等. 临床微生物实验室细菌分离接种技术的研究进展[J]. 检验医学, 2015, 30(7): 757-760.
- [7] FROMENT P, MARCHANDIN H, VANDE PERRE P, et al. Automated versus manual sample inoculations in routine clinical microbiology: a performance evaluation of the fully automated inoqula instrument[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(3): 796-802.
- [8] 张有江, 刘丽芝, 王磊利, 等. ISOLA 全自动平板接种仪对三种痰消化液液化和接种效果的评估[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20): 4614-4616.
- [9] 徐兴平, 朱明祥, 张树仁. 用于细菌学检查的痰液标本的质量问题[J]. 实用医技杂志, 2004, 11(12): 1097.
- [10] LOPEZ-VIDRIERO M T, REID L. Respiratory tract fluid-chemical and physical properties of airway mucus[J]. Eur J Respir Dis Suppl, 1980, 110(1): 21-26.
- [11] LEDEBOER N A, DALLAS S D. The automated clinical microbiology laboratory: fact or fantasy[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(9): 3140-3146.
- [12] BURNHAM C A, DUNNE W M, GREUB G, et al. Automation in the clinical microbiology laboratory[J]. Clin Chem, 2013, 59(12): 1696-1702.
- [13] LAM C W, JACOB E. Implementing a laboratory automation system: experience of a large clinical laboratory[J]. J Lab Autom, 2012, 17(1): 16-23.