

血浆内毒素检测在革兰阴性菌引起肺部感染诊断中的应用

杨辛^{1*}, 吴颖稚¹, 范君¹, 钱重玲¹, 林洁¹, 李菁¹, 张庆五¹, 曹启迪²

(1. 上海市杨浦区控江医院检验科, 上海 200093; 2. 上海市杨浦区沪东老年护理医院检验科, 上海 200082)

中图分类号: R563; R446.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-2084(2019)06-1237-04

摘要:目的 探讨血浆内毒素检测在革兰阴性菌引起肺部感染诊断中的应用价值。方法 选取 2017 年 6 月至 2018 年 5 月上海市杨浦区控江医院住院部临床确诊的 277 例肺部感染患者作为研究对象, 分别进行血浆内毒素动态光度法和痰培养同时检测。结果 277 例肺部感染患者中, 根据痰培养鉴定结果分为革兰阴性菌感染 196 例, 革兰阳性菌感染 81 例, 革兰阴性菌感染患者血浆内毒素水平高于革兰阳性菌感染患者 [(0.283 ± 0.108) EU/mL 比 (0.034 ± 0.010) EU/mL] ($P < 0.01$)。以细菌培养出革兰阴性菌结果为金标准, 内毒素检测的灵敏度为 97.44%, 特异度为 83.95%, 阳性预测值为 94.08%, 阴性预测值为 93.24%, 准确度为 93.86%。结论 与细菌培养相比, 血浆内毒素检测法的优点在于快速、准确性高, 可用于革兰阴性菌感染的早期辅助诊断。

关键词: 内毒素; 痰细菌培养; 肺部感染; 革兰阴性菌; 革兰阳性菌; 动态光度比浊法

Application of Plasma Endotoxin Dynamic Turbidimetry in Diagnosis of Pulmonary Infection Caused by Gram-Negative Bacteria YANG Xin¹, WU Yingzhi¹, FAN Jun¹, QIAN Zhongling¹, LIN Jie¹, LI Jing¹, ZHANG Qingwu¹, CAO Qidi². (1. Department of Laboratory, Shanghai Yangpu District Kongjiang Hospital, Shanghai 200093, China; 2. Shanghai Yangpu District Hudong Geriatric Nursing Hospital, Shanghai 200082, China)

Abstract: Objective To explore the application of plasma endotoxin detection in the diagnosis of pulmonary infection caused by gram-negative bacteria. **Methods** From Jun. 2017 to May 2018, 277 cases of pulmonary infection clinically confirmed in the inpatient department of Shanghai Yangpu District Kongjiang Hospital were included in the study, and the plasma endotoxin dynamic spectrophotometry and sputum culture were conducted for simultaneous detection. **Results** Among the 277 patients with pulmonary infection, 196 cases were identified as the gram-negative bacterial infection group and 81 cases were as the gram-positive bacterial infection group according to sputum culture results. The plasma endotoxin level in the gram-negative bacterial infection group was higher than that in the gram-positive infection group [(0.283 ± 0.108) EU/mL vs (0.034 ± 0.010) EU/mL] ($P < 0.01$). With the Gram-negative bacteria culture result as gold standard, the sensitivity and specificity of endotoxin detection were 97.44%, 83.95%, and 94.08% for the positive, 93.24% for the negative and the accuracy was 93.86%, respectively. **Conclusion** Compared with bacterial culture, plasma endotoxin detection has the advantages of high speed and accuracy, and can be used for as early auxiliary diagnosis of Gram-negative bacterial infections.

Key words: Endotoxin; Sputum bacterial culture; Pulmonary infection; Gram-negative bacteria; Gram-positive bacteria; Dynamic photometric Turbidimetry

肺部感染是呼吸系统最常见多发的疾病之一, 其病因是由于肺部感染病原微生物(以细菌感染为主)而引起的炎症。免疫功能低下, 临床表现不典型,

早期诊断困难。致使患者出现咳嗽、咳痰, 伴或不伴胸痛, 发热。由于肺部感染病原体种类不同, 感染何种病原体不明, 无法针对敏感菌准确用药, 致使大量使用广谱抗生素, 造成致病微生物的基因发生改变而产生耐药, 其中以革兰阴性菌最为突出^[1-2]。所以临床往往急需病原体检测, 而常规细菌培养所需

时间较长,为 4~6 d,而且采集标本易污染,真阳性率不高,不利于疾病治疗^[3]。近年来对细菌感染快速检测诊断的新试验项目不断增加,血浆内毒素对革兰阴性菌感染早期鉴别具有一定的诊断价值,革兰阴性菌的细胞壁上含有脂多糖,而其他革兰阳性菌、真菌、动物及人的细胞成分和血浆中均不含脂多糖成分,如果在感染患者血浆中检测到脂多糖,是诊断革兰阴性菌感染的有效依据^[4]。本研究采用血浆内毒素动态光度比浊法对肺部感染患者脂多糖水平进行检测,旨在探讨其在革兰阴性菌诊断中的应用价值。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 6 月至 2018 年 5 月上海市杨浦区控江医院确诊为肺部感染患者 277 例,其中男 235 例、女 42 例,年龄 62~82 岁,平均(73.3±1.2)岁;病程 11~15 d,平均(13±2.0) d。纳入标准:符合 2009 年《临床诊疗指南:呼吸病学分册》肺部感染的诊断标准^[5];排除标准:排除肺部肿瘤、肺水肿、肺不张、肺栓塞等疾病,病毒性感染,自身免疫性疾病及过敏性疾病所致免疫功能紊乱的患者。

1.2 仪器和试剂 采用法国(梅里埃)VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪及相应革兰阳性菌,革兰阴性菌药敏卡均由法国梅里埃生物有限公司提供,上海市临床检验中心提供细菌质控标准菌株大肠埃希菌(ATCC25922),金黄色葡萄球菌(ATCC25923),铜绿假单胞菌(ATCC27853)由细菌室保存。血平板,麦康凯及巧克力平板均由上海市康勤科技有限公司提供,采用英国(莱伯金耐特)LKMO2-32 型动态试管检测仪(英国莱伯金耐特生物有限公司)检测内毒素水平,TAL-80 试管恒温仪、革兰阴性菌脂多糖检测试剂盒(批号:1703240)及质控品均由广东湛江安度斯生物有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 血浆内毒素检测 采用革兰阴性菌脂多糖动态光度浊法检测血浆内毒素水平:①采用无菌,无热源真空采血管采集静脉血 3 mL,离心半径为 10 cm,3 000 r/m 离心 10 min 后,吸取上层富有血小板的血浆 0.1 mL 加入 0.9 mL 样品稀释液中后,放入 TAL-80 试管恒温仪中进行 75 ℃ 保温 10 min 和冷却 5 min 后,配制成检测血浆。②取 0.25 mL

试剂复溶液加入反应试剂中,摇匀静置 2 min 配制反应液。③加入 0.1 mL 检测血浆和 50 μL 反应液于反应管中,混匀后插入 LKM-02-32 型动态试管测试仪中检测 75 min 反应结束后,自动计算血浆中内毒素的含量^[6-7]。血浆内毒素定量检测结果分析:<0.053 EU/mL 为正常值;0.053~0.109 EU/mL 为临床观察期;>0.109 EU/mL 为革兰阴性菌感染^[8-9]。

1.3.2 痰液细菌培养检测 受试者晨起洗漱后,深咳留取痰液于无菌试管内 30 min 送检,收到标本后初步镜检和革兰染色。合格标本判断标准为鳞状上皮细胞<10 个/低倍视野,白细胞>25 个/低倍视野为合格标本进行痰液培养^[10]。先将痰液标本及时接种血平板,麦康凯和巧克力平板,放入 35 ℃ 孵箱孵育 24~48 h 后取出。如怀疑有致病菌进行革兰染色,镜检区分阳性和阴性,确定后挑取单个菌落于 2.0 mL 无菌 0.9% NaCl 溶液中,调整菌落浊度为 0.5 麦氏比浊度后,分别接种于鉴定药敏板,放入 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪中,24 h 后自动出结果^[11]。痰液细菌培养鉴定结果判定;根据文献[12-13],按法国梅里埃生物有限公司提供的 VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪细菌鉴定评估标准说明书进行评定。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料服从正态分布用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以痰液培养检测出革兰阴性菌结果作为金标准与血浆内毒素检测阳性结果进行比较,进行诊断及评价指标;采用灵敏度 = $a / (a + c) \times 100\%$,特异度 = $d / (d + b) \times 100\%$,阳性预测值 = $a / (a + b) \times 100\%$,阴性预测值 = $d / (d + c) \times 100\%$,准确度 = $(a + c) / (a + b + c + d) \times 100\%$ 对比方法进行评价。

2 结果

2.1 痰细菌培养阳性率分布情况 277 例肺部感染患者中,革兰阴性菌感染 196 例,阳性率为 79.76%,分别为大肠埃希菌 30 例,铜绿假单胞菌 52 例,肺炎克雷伯菌 94 例,奇异性变形杆菌 12 例,鲍曼不动杆菌 8 例。革兰阳性菌感染 81 例,阳性率为 29.24%,分别为金黄色葡萄球菌 72 例,肺炎双球菌 9 例。

2.2 内毒素含量水平检测结果比较 196 例革兰阴性菌感染患者血浆内毒素水平为(0.283 ±

0.108) EU/mL, 81 例革兰阳性菌感染患者血浆内毒素水平为 (0.034 ± 0.010) EU/mL。革兰阴性菌感染组与革兰阳性菌感染组内毒素水平比较差异有统计学意义 ($t = 29.773, P = 0.001$)。

2.3 血浆内毒素与痰液细菌培养检测结果比较

以细菌培养结果作为金标准, 血浆内毒素检测的灵敏度为 97.44%, 特异度为 83.95%, 阳性预测值为 94.08%, 阴性预测值为 93.24%, 准确度为 93.86%。见表 1。

表 1 血浆内毒素与痰细菌培养检测阳性结果比较 (例)

内毒素	痰液细菌培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	191	12	203
阴性	5	69	74
合计	196	81	277

3 讨论

内毒素是革兰阴性菌细胞壁中的一种成分, 称之为脂多糖。脂多糖对宿主具有毒性作用。内毒素只有当细菌死亡或裂解破坏细菌细胞后才释放出来。革兰阴性菌是肺部感染的主要致病菌, 临床上最常用痰培养来鉴定感染细菌的种类, 并同时提供药物敏感试验结果。但培养时间较长, 需 4~6 d, 无法提供及时的检验结果^[14]。近年来, 实验室运用血浆内毒素检测, 不但可以快速鉴别致病菌种类, 而且具有高度敏感性, 尤其是革兰阴性菌感染, 检测时间短, 操作简单仅需 2 h 便可出结果, 能及时为临床医师提供早期诊断和针对敏感菌如何应用抗感染药物治疗进行有效指导^[15-16]。

本研究结果显示, 277 例肺部感染患者中, 痰细菌培养阳性率分别为革兰阴性菌感染 196 例, 阳性率为 79.76%, 革兰阳性感染 81 例, 阳性率为 29.24%, 革兰阴性菌感染组血浆内毒素水平明显高于革兰阳性感染组 ($P < 0.01$), 因为革兰阴性菌裂解后释放出来内毒素是其细胞壁中的脂多糖组分, 因此对于革兰阴性菌致病的肺部感染的患者, 检测血浆内毒素可以确定革兰阴性菌感染, 并且进行针对革兰阴性菌的抗生素治疗。如果肺部感染患者依赖血常规检查结果, 发现白细胞计数升高不明显或在正常参考值范围以内影响使用广谱抗生素, 等痰培养结果出来再调整用药方案, 肺部感染患者可能

会因抗生素使用不当而发生不良反应, 产生延误患者病情^[17]。本研究以血浆内毒素水平检测值 > 0.109 EU/mL 作为临界值, 血浆内毒素与痰细菌培养检测结果比较, 血浆内毒素的灵敏度和特异度分别为 97.44% 和 83.95%, 阳性预测值为 94.08%, 阴性预测值为 93.24%, 准确度为 93.86%, 效能较好。痰培养不能区分感染菌和定植菌, 而血浆内毒素能区分感染菌和定植菌, 在对患者进行初步筛选过程中表现方便、快捷, 所以血浆内毒素为诊断革兰阴性菌的有效方法。但是当人体局部或浅部革兰阴性菌感染时, 因脂多糖较少释放入血或不入血, 人体自身免疫系统能给予清除, 造成血浆内毒素检测结果出现假阴性。另外血浆内毒素检测也会出现极低比例的假阳性结果, 而导致假阳性因素有试验器材污染, 患者用药, 血清标本高溶血, 高脂及高胆红素等。因此血浆内毒素检测结果应与临床患者体征相联系: ①新出现的咳嗽、咳痰或原有的呼吸道症状加重; ②发热; ③肺实变体征和(或)闻及湿啰音; ④白细胞计数 $> 10 \times 10^9/L$ 或 $< 4 \times 10^9/L$, 伴或不伴中性粒细胞核左移; ⑤胸部 X 线见片状、斑片状浸润性阴影或间质性改变。以上 1~4 项任何一项加上第 5 项的情况结合进行诊断和治疗^[17-18]。血浆内毒素随病情恶化而升高, 随病情缓解而降低, 因此血浆内毒素检测可以作为监测病情变化的参考指标, 并且还可用于指导临床用药和治疗。内毒素鲎试验检测是通过酶的级联反应, 内毒素在二价阳离子参与激活 C 因子, 然后激活其他酶原, 产生一系列凝集反应, 目前应用鲎试验阳性对肺部感染的进行诊断, 血浆内毒素水平 > 0.109 EU/mL 为定量标准, 并证实它对革兰阴性菌肺部感染患者的判断优于痰培养^[19-21]。

综上所述, 内毒素检测具备 2 h 得到检测结果, 因此对于临床肺部感染患者应动态监测血浆内毒素含量。在未得出细菌培养结果的情况下, 可早期确定患者感染的细菌种类, 以利于临床合理选择针对内毒素的抗菌药物, 而及时的治疗可以避免患者发生感染加重, 导致不良后果。本法快速、简单、准确性高, 可用于革兰阴性菌的辅助诊断。

参考文献

- [1] 刘书盈. 对老年性肺炎有关问题的认识[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(21): 9403-9405.

- [2] 陈兰波,董波.老年性肺炎的临床表现、诊断和治疗[J].中国医药指南,2011,9(4):5-6.
- [3] 张晶,袁玉涛,梁小亮,等.老年性肺炎的病原细菌分布及耐药情况分析[J].中国老年学杂志,2012,32(3):473-474.
- [4] 焦炳华,余庆.内毒素的化学结构及其功能的关系[J].国外医学(生分子生物学分册),1987,9(4):168-170.
- [5] 中华医学会.临床诊疗指南:呼吸病学分册[M].北京:人民卫生出版社,2009:6-293.
- [6] 袁平宗,汤雪彪,王小龙,等.革兰氏阴性细菌感染患者血清内毒素检测临床探讨[J].现代检验医学杂志,2016,31(6):121-123.
- [7] 蔡志军,韦群,周鹰豪,等.血浆内毒素检测在快速诊断革兰氏阴性菌引起全身性感染的应用[J].河北医学,2015,21(4):690-691.
- [8] 左勇.呼吸道感染患者血浆内毒素水平测定的临床价值[J].检验医学与临床,2012,8(7):862-863.
- [9] 中华人民共和国卫生部医政司.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:715-869.
- [10] 俞树荣.微生物学和微生物学检验[J].2版.北京人民卫生出版社,2004:194-165.
- [11] 谢世营.分析全自动微生物鉴定药敏分析仪的临床应用价值[J].国际检验医学杂志,2014,35(6):750-751.
- [12] 王瑶,徐英春,谢秀丽,等.全自动微生物鉴定药敏分析仪对临床相关细菌和酵母菌鉴定能力的评估[J].中华检验医学杂志,2007,30(1):20-30.
- [13] 辛力华.全自动微生物分析鉴定和药敏测定的质量保证[J].预防医学情报杂志,2000,16(2):158-159.
- [14] 温奕欣,洪晓鹏,张镇娃.399份痰液培养及药敏结果分析[J].海南医学,2005,16(7):156-157.
- [15] 徐修礼,詹远长,张建芳,等.尿液内毒素定量测定快速诊断革兰氏阴性菌尿路感染的研究[J].中华检验医学杂志,2006,29(10):929-930.
- [16] 王书花,张芳.动态浊度法测定尿液内毒素含量可快速诊断G⁻菌泌尿系统感染[J].齐齐哈尔医学学报,2010,31(14):750-278.
- [17] 陈德珠,卢剑海,左六二.血浆内毒素检测在重症患者感染诊疗中的临床意义[J].实用医学杂志,2013,9(45):2531-2532.
- [18] 马金玲,刘扬,李伟保,等.内毒素检测与临床应用现状[J].国外医学(临床生物化学与检验分册),2003,24(2):64-65.
- [19] 许淑秀,李玲.血浆内毒素测定在革兰阴性杆菌感染患者中的应用[J].实用医技杂志,2013,20(9):988-989.
- [20] 雇启录,邵红霞.内毒素的鲎实验法检测与疾病诊断评估[J].国外医学(临床生物化学和检验学分册),2004,25(1):94-95.
- [21] 中华人民共和国卫生部.医院感染诊断标准(试行)[J].中华医学杂志,2001,81(5):314-315.

收稿日期:2018-08-31 修回日期:2019-02-24 编辑:相丹峰

(上接第 1236 页)

- [24] Carter WO, Narayanan PK, Robinson JP. Intracellular hydrogen peroxide and superoxide anion detection in endothelial cells[J]. J Leukoc Biol, 1994, 55(2):253-258.
- [25] Islas MS, Naso LG, Lezama L. Insights into the mechanisms underlying the antitumor activity of an oxidovanadium(IV) compound with the antioxidant naringenin. Albumin binding studies[J]. J Inorg Biochem, 2015, 149:12-24.
- [26] Ji Y, Dou YN, Zhao QW, et al. Paeoniflorin suppresses TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis through a Smad-dependent pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37(6):794-804.
- [27] 夏小健,黄蓓.芍药苷在治疗肝癌中作用及其机制的研究进展[J].中南药学,2018,16(2):209-212.
- [28] 晏雪生,李瀚旻,彭亚琴,等.芍药苷对人肝癌细胞 HepG2 凋亡及其调控基因的影响[J].中华中医药学刊,2007,25(7):1346-1347.
- [29] Lee SM, Li ML, Tse YC, et al. Paeoniae radix, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway[J]. Life Sci, 2002, 71(19):2267-2277.
- [30] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, et al. Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(2):141-147.
- [31] Hu S, Chen SM, Li XK, et al. Antitumor effects of chi-shen extract from Salvia miltiorrhiza and Paeoniae radix on human hepatocellular carcinoma cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(8):1215-1223.
- [32] Li W, Qi Z, Wei Z, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation and induces apoptosis of human glioma cells via microRNA-16 upregulation and matrix metalloproteinase-9 downregulation[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2):2735-2740.
- [33] Shi L, Teng H, Zhu M, et al. Paeoniflorin inhibits nucleus pulposus cell apoptosis by regulating the expression of Bcl-2 family proteins and caspase-9 in a rabbit model of intervertebral disc degeneration[J]. Exp Ther Med, 2015, 10(1):257-262.
- [34] Hu PF, Chen WP, Bao JP, et al. Paeoniflorin inhibits IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis by regulating the Bax/Bcl-2/caspase-3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4):6194-6620.

收稿日期:2018-08-20 修回日期:2019-01-14 编辑:辛欣