

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00907

• 技术方法 •

SDS-NaOH 溶液处理快速鉴别尿液中革兰阳性和革兰阴性细菌

李虎^{1△}, 陈明坤^{1△}, 王慧¹, 陈燕¹, 苏献豪¹, 王靖¹, 胡志德², 秦琴¹, 刘云^{1*}, 邓安梅^{1*}

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 济南军区总医院实验诊断科, 济南 250031

[摘要] **目的** 研究十二烷基硫酸钠(SDS-NaOH)溶液对尿液中的革兰阳性和革兰阴性细菌的鉴别能力。**方法** 用 SDS-NaOH 溶液处理 79 份尿液标本 5 min, 以 UF-1000i 尿液分析仪检测处理前后的尿液中的细菌计数水平, 并计算细菌比值 (BR)。以受试者工作特征(ROC)曲线分析 BR 对革兰阳性和革兰阴性细菌的鉴别能力。**结果** 革兰阴性细菌的 BR 较革兰阳性细菌降低($P=0.01$)。BR 鉴别革兰阳性和革兰阴性细菌的曲线下面积为 0.70(95%可信区间:0.57~0.82)。当 BR 取值为 0.05 时, 鉴别革兰阳性细菌的敏感性为 0.83(95%可信区间:0.63~0.95), 特异性为 0.46(95%可信区间:0.32~0.59)。

结论 SDS-NaOH 处理有助于鉴别尿液中革兰阳性和革兰阴性细菌, 该法鉴别快速且易于自动化。

[关键词] 泌尿道感染; 细菌; SDS-NaOH; 革兰染色; 尿

[中图分类号] R 446.51 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)08-0907-03

SDS-NaOH solution for rapid discrimination of Gram-positive and Gram-negative bacteria in urine

LI Hu^{1△}, CHEN Ming-kun^{1△}, WANG Hui¹, CHEN Yan¹, SU Xian-hao¹, WANG Jing¹, HU Zhi-de², QIN Qin¹, LIU Yun^{1*}, DENG An-mei^{1*}

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Laboratory Diagnosis, General Hospital, PLA Jinan Military Area Command, Jinan 250031, Shandong, China

[Abstract] **Objective** To explore the efficiency of SDS-NaOH solution for discriminating Gram-positive and Gram-negative bacteria in urine. **Methods** Seventy-nine urine samples were treated with SDS-NaOH solution for 5 minutes. The bacterium counts were determined by UF-1000i urine analyzer before and after treatment, and the bacteria ratio (BR) was calculated. Receiver operation characteristics (ROC) curve analysis was used to assess the discrimination efficiency of BR.

Results BR in Gram-negative bacteria contained urine was significantly lower than that in Gram-positive one ($P=0.01$). The area under curve (AUC) of BR for discriminating Gram-positive and Gram-negative bacteria was 0.70 (95% confidence interval; 0.57-0.82). At a cut-off value of 0.05, the discrimination sensitivity and specificity of BR for Gram-positive bacteria were 0.83 (95% confidence interval; 0.63-0.95) and 0.46 (95% confidence interval; 0.32-0.59), respectively.

Conclusion Treatment with SDS-NaOH solution can help to discriminate Gram-positive and Gram-negative bacteria in urine, and the method is rapid and automatic.

[Key words] urinary tract infections; bacteria; SDS-NaOH solution; Gram staining; urine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(8):907-909]

尿路感染(urine tract infection, UTI)是常见的感染性疾病之一, 及时和准确的诊断是改善患者预后后的关键^[1]。尿常规检查是诊断和筛查 UTI 的重要工具, 我们近期开展的系统评价和 meta 分析表

[收稿日期] 2014-02-09 **[接受日期]** 2014-06-10

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划, 2013CB531606), 国家自然科学基金(81273282, 81202353, 81371786, 81302579), 上海科委基金(11JC1410902), 第二军医大学优秀研究生苗子基金, 第二军医大学长海医院“1255”计划基金(CH125530300)。Supported by National Program on Key Basic Research Project of China(“973” Program, 2013CB531606), National Natural Science Foundation of China (81273282, 81202353, 81371786, 81302579), Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai (11JC1410902), Outstanding Graduate Foundation of Second Military Medical University, and “1255” Project of Changhai Hospital of Second Military Medical University (CH125530300)。

[作者简介] 李虎, 检验技师。E-mail: lihu1127@126.com; 陈明坤, 检验技师。E-mail: cmk_123_good@163.com

△共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 021-31162075, E-mail: liuyun1258@163.com; Tel: 021-31162061, E-mail: amdeng70@163.com

明,全自动尿液分析仪 UF-1000i 和 UF-100 提供的检测参数(白细胞计数和细菌计数)对 UTI 有较高的筛查和诊断价值^[2]。

在 UTI 的治疗过程中,革兰阳性和阴性细菌感染引起的 UTI 在治疗原则上有较大区别。若在患者就诊之初就能大致明确致病菌种为革兰阳性还是革兰阴性细菌,对选择抗生素具有极为重要的价值。近期有学者发现革兰阳性和阴性的细菌对十二烷基硫酸钠(SDS-NaOH)溶液的抗性不同^[3],因此可用 SDS-NaOH 溶液来快速地鉴别细菌。然而,由于样本量的限制,该研究并未采用合适的统计学手段对这种方法鉴别细菌的准确性进行评价。在本研究中,我们开展了一项样本量相对较大的、以自然形成的菌尿样本作为检测基质的研究,以评价这种方法对细菌的鉴别能力。

1 材料和方法

1.1 标本收集 连续性收集 2013 年 1 月至 5 月于第二军医大学长海医院就诊的 79 例 UTI 患者的尿液标本进行研究,其中男性 19 例,女性 60 例。UTI 的诊断标准:革兰阳性细菌 $>10^4$ cfu/mL 或革兰阴性细菌 $>10^5$ cfu/mL^[4]。排除标准:(1)真菌感染导致的 UTI;(2)同时感染革兰阳性和革兰阴性细菌。所有标本在接受尿培养之前均进行了尿沉渣分析,仪器为 Sysmex UF-1000i。

1.2 尿液细菌的培养和鉴定方法 入选对象在进行尿常规检查时同时留取清洁中段尿,按照第二军医大学长海医院实验诊断科微生物室标准操作程序(SOP)进行细菌培养。先以 10 μ L 一次性定量接种环对细菌进行接种,接种的平板为哥伦比亚血平板和麦康凯平板,接种方法采用四分区划线。然后将平板置于含 5% CO₂ 的 37℃ 孵箱中,18~24 h 后取出,计数细菌数量,同时对细菌进行革兰染色以初步鉴定菌种,其后根据革兰染色情况,使用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定药敏分析及配套的 GN、GP、NH 等鉴定卡对细菌进行鉴定和药敏测试。

1.3 SDS-NaOH 溶液处理鉴别革兰阳性菌和革兰阴性菌的方法 以 SDS-NaOH 溶液对尿液进行处理,通过观察尿液经过 SDS-NaOH 溶液处理后细菌计数的变化来确定尿液中的细菌类型。SDS-NaOH 溶液的成分为 0.2 mol/L 的 NaOH 和 1% 的 SDS^[3],可近似认为该溶液在与尿液混合后 pH 值为

13。具体操作方法:将每例患者的尿液标本分为 2 等份,第一等份用于 UF-1000i 尿沉渣分析,得出的细菌计数值,记为 Bac₁;第二等份加入等体积的 SDS-NaOH 溶液,吹打混匀 2 次后于室温下静置 5 min,之后对样品进行 UF-1000i 尿沉渣分析,得出的细菌计数记为 Bac₂。根据 Bac₁ 和 Bac₂ 来计算细菌比率(bacteria rate, BR),公式为:BR = 2 × Bac₂ / Bac₁。

1.4 统计学处理 所有的统计学分析均在 Sigma-plot 12.0 中完成。两组资料之间的比较采用 Mann-Whitney U 检验。采用受试者工作特征(ROC)曲线分析法评价 BR 鉴别革兰阳性和革兰阴性细菌的能力,选取约登指数最大时的界值作为最佳鉴别界值。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细菌感染情况 79 例 UTI 患者中革兰阳性细菌感染 24 例,病原菌分别为:尿肠球菌 8 例;粪肠球菌 8 例;溶血葡萄球菌 2 例;缓症链球菌 1 例;沃氏葡萄球菌 2 例;巴氏链球菌、无乳链球菌和血型链球菌各 1 例。革兰阴性细菌感染 55 例,分别为:大肠埃希菌 37 例;肺炎克雷伯杆菌 6 例;鲍曼不动杆菌和奇异变形杆菌各 3 例;铜绿假单胞菌 2 例;恶臭假单胞菌、摩氏摩根菌、浅金黄色单孢菌和杀鲑气单孢菌各 1 例。

2.2 革兰阳性和革兰阴性细菌感染的尿液经 SDS-NaOH 溶液处理后的 BR 如图 2 所示,细菌感染的尿液经 SDS-NaOH 处理后,革兰阳性细菌的 BR 中位数(四分位间距)为 0.20(0.08~0.53),革兰阴性细菌的 BR 中位数(四分位间距)为 0.08(0.03~0.24),两者差异有统计学意义($P=0.01$)。

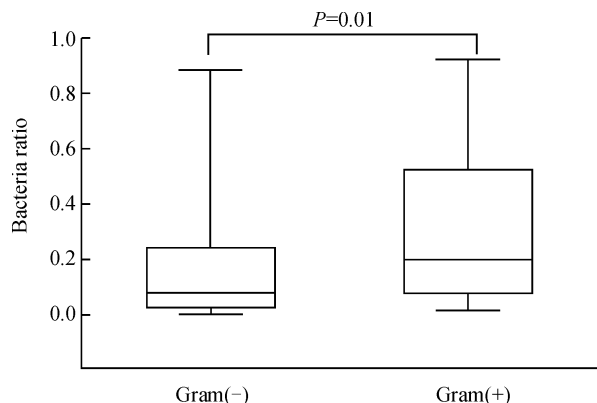


图 1 尿液中的革兰阳性和革兰阴性细菌经过 SDS-NaOH 溶液处理后 BR 变化状况的箱式图

Fig 1 Box plot of bacteria ratio(BR) changes for Gram-negative or positive bacteria in urine

2.3 SDS-NaOH 溶液处理后 BR 对革兰阳性细菌的鉴别价值 如图 2 所示,ROC 曲线下面积为 0.70 (95%可信区间:0.57~0.82),当 BR 的界值设定为 0.05 时,鉴别革兰阳性细菌的敏感性为 0.83(95%可信区间:0.63~0.95),特异性为 0.46(95%可信区间:0.32~0.59)。这一结果表明,若以 0.05 作为鉴别革兰染色阳性和阴性细菌的界值,则可以鉴定出 83%的革兰阳性细菌和 46%的革兰阴性细菌。

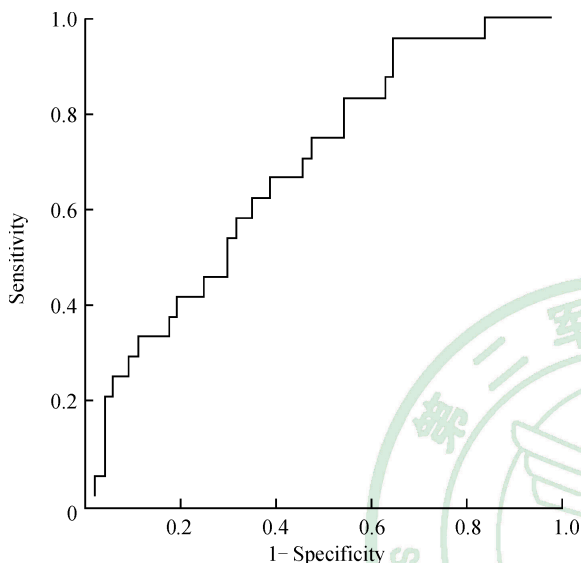


图 2 BR 对尿液中革兰阳性和革兰阴性细菌鉴别的 ROC 曲线图

Fig 2 Receiver operation characteristics (ROC) curve of discrimination efficiency of bacteria ratio (BR) for Gram-negative or positive bacteria in urine

3 讨论

在分子生物学实验中,SDS-NaOH 溶液能破坏细菌的细胞壁,因此常被用于从大肠埃希菌中提取质粒。从理论上讲,革兰阳性细菌细胞壁较革兰阴性细菌厚,因此对 SDS-NaOH 溶液的抵抗能力相对较强,经 SDS-NaOH 溶液处理后,细菌计数的降低幅度较小。因此,本研究采用 SDS-NaOH 溶液处理 UTI 患者的尿液标本,以 UF-1000i 来检测处理前后尿液细菌计数的变化。我们发现,虽然革兰阳性细菌和革兰阴性细菌在经过 SDS-NaOH 溶液处理后细菌计数均减少,但是革兰阴性细菌减少的幅度更大。通过 ROC 分析法发现,BR 鉴别革兰阳性和阴性细菌的曲线下面积为 0.70,表明其对革兰阳性和革兰阴性细菌具有中等的鉴别效率。我们发现采用此法鉴别革兰阳性细菌和革兰阴性细菌的最佳界值是 0.05,BR 大于 0.05 即为革兰阳性细菌,反之则为

革兰阴性细菌,使用该界值可以准确地鉴别出 83%的革兰阳性细菌和 46%的革兰阴性细菌。

传统的尿沉渣革兰染色是目前最为快速的鉴别尿液中细菌革兰染色特性的方法,其基本步骤为:(1)获取尿液沉渣(400×g,离心约 5 min);(2)沉渣涂片以及晾干(约 5~10 min);(3)革兰染色(约 3 min);(4)晾干玻片(约 5~10 min);(5)镜检观察(约 1 min)。其全部操作过程约需要 20 min。相比之下,本研究采用的方法在 10 min 内即可完成:加入 SDS-NaOH 溶液需要等待 5 min,标本上机检测后仅需要 2 min 即可出具报告。该方法简便易行,且易于自动化。目前,以 UF-100 和 UF-1000i 为代表的全自动尿沉渣分析仪设有独立的细菌检测通道,如果能对仪器的细菌检测通道进行改进,增加 SDS-NaOH 溶液处理通道和程序,将可以自动获得 BR 这一指标。

总之,本研究发现 SDS-NaOH 溶液对于鉴别 UTI 患者尿液标本中致病菌为革兰阳性细菌还是革兰阴性细菌具有一定价值。由于该法鉴别快速且易于自动化,因此建议在临床工作中引入该法。同时,该研究结果也提示我们,有必要开发相关的自动化检测设备,以为 UTI 致病菌的判断提供更加便捷的手段。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection [J]. Nat Rev Urol, 2010, 7:653-660.
- [2] Shang Y J, Wang Q Q, Zhang J R, Xu Y L, Zhang W W, Chen Y, et al. Systematic review and meta-analysis of flow cytometry in urinary tract infection screening [J]. Clin Chim Acta, 2013, 424:90-95.
- [3] Wada A, Kono M, Kawauchi S, Takagi Y, Morikawa T, Funakoshi K. 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:e47093.
- [4] Wang J, Zhang Y, Xu D, Shao W, Lu Y. Evaluation of the Sysmex UF-1000i for the diagnosis of urinary tract infection[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 133:577-582.