

痰标本革兰染色联合肺炎链球菌抗原检测快速诊断肺炎链球菌性肺炎

蒋瑶^{1,2,3}, 张红¹, 祝静², 廖涛¹, 郭晓兰^{1,2,3}, 谢宁²

(1. 川北医学院附属医院检验科; 2. 川北医学院检验医学院; 3. 川北医学院转化医学研究中心, 四川南充 637000)

【摘要】目的: 探讨肺炎链球菌抗原快速检测联合痰涂片革兰染色在肺炎链球菌肺炎感染中的临床应用价值。**方法:** 收集临床痰液标本分离得到的草绿色链球菌群、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌及卡他莫拉菌共 8 种细菌各 5 株, 肺炎链球菌培养阳性的痰液标本 30 例及痰涂片镜下疑似肺炎链球菌且合格的痰液标本 40 例, 利用 BinaxNOW 试剂盒进行胶体金法肺炎链球菌抗原检测。**结果:** 痰标本中分离得到的 8 种细菌经抗原检测结果均为阴性; 胶体金法检测 30 例肺炎链球菌培养阳性的痰液标本阳性率为 100%; 痰涂片联合抗原快速检测阳性率高于痰培养, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 痰液肺炎链球菌抗原检测法具有较好的特异性, 与痰培养结果有较好的一致性, 且痰涂片革兰染色联合抗原快速检测在早期鉴定肺炎链球菌肺部感染中具有较高的临床应用价值。

【关键词】 痰液; 肺炎链球菌; 肺炎; 胶体金法; 革兰染色

【中图分类号】 R378 **【文献标志码】** A

Rapid diagnosis of streptococcus pneumoniae pneumonia by Gram staining of sputum samples combined with streptococcus pneumoniae antigen detection

JIANG Yao^{1,2,3}, ZHANG Hong¹, ZHU Jing², LIAO Tao¹, GUO Xiao-lan^{1,2,3}, XIE Ning²

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 2. School of Laboratory Medicine, North Sichuan Medical College; 3. Translational Medicine Research Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the clinical value of streptococcus pneumoniae antigen rapid detection method combined with sputum smear gram stain in streptococcus pneumoniae pneumonia infection. **Methods:** Bacteria strains and sputum specimens were collected. 5 strains of Streptococcus viridans group, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Stenotrophomonas maltophilia, and Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis were isolated from sputum specimens. 30 sputum samples with Streptococcus pneumoniae and 40 sputum specimens suspected to be Streptococcus pneumoniae under the microscope were tested for streptococcus pneumoniae antigen using BinaxNOW kit. **Results:** 8 kinds of bacteria isolated from sputum samples were detected as negative. The positive rate of 30 sputum specimens cultured with streptococcus pneumoniae by colloidal gold method was 100% (30/30). The positive rate of sputum smear combined antigen rapid detection was higher than that of sputum culture ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sputum antigen detection method of Streptococcus pneumoniae has good specificity and consistency with sputum culture, and sputum smear gram stain combined with antigen rapid detection has high clinical application value in early identification of streptococcus pneumoniae infection.

【Key words】 Sputum; Streptococcus pneumoniae; Pneumonia; Colloidal gold method; Gram stain

肺炎链球菌 (streptococcus pneumonia, SP) 又称为肺炎球菌, 为一种革兰阳性球菌, 是导致婴幼儿和老年人发病及死亡的主要病原菌, 每年约有 100 万人死于与肺炎链球菌相关的感染^[1-2]。其最易引发肺炎链球菌肺炎 (streptococcus pneumoniae pneumonia, S. pp), 是社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 的主要致病菌, 也可进展为脑膜炎

和败血症等疾病, 因此早期诊断 S. pp, 从而制定及时、合理的用药治疗方案具有重要意义^[3-4]。研究^[5-6]表明, S. pp 临床表现及影像学等相关检查并无特异性, 故准确区分 SP 与其他病原体的“金标准”仍依赖于实验室培养、分离及鉴定。但由于痰液培养耗时长及阳性率偏低等原因, 寻找快速鉴定肺炎链球菌的方法已成为临床实验室研究的重

基金项目: 四川省南充市社科研究“十四五”规划项目 (NC23C130); 四川省南充市市校科技战略合作项目 (20SXQT0058)

作者简介: 蒋瑶 (1995 -), 女, 硕士研究生, 主管技师。E-mail: 2076229970@qq.com

通讯作者: 谢宁。E-mail: 2437291901@qq.com

点^[7]。BinaxNOW 试剂盒通过检测患者尿液、脑脊液标本的 C-多糖而达到鉴定 SP 的目的,但因无法用于儿童患者且标本类型有特殊要求而致该方法的应用存在局限^[8-9]。痰液是临床医师怀疑患者下呼吸道感染时首选送检的标本,痰液涂片革兰染色能反映标本的原始状态,但因主观性强且细菌形态变异性大而在临床不能作为细菌鉴定的确切指标。因此,为进一步探究抗原快速检测法的价值,本研究拟验证抗原检测法在痰液分离菌株检测中的特异性,随后比较其与痰液培养结果间的一致性,探究其与痰涂片革兰染色联合检测在早期诊断 S. pp 中的应用。

1 材料与方法

1.1 标本

收集 2022 年 1 月至 2022 年 10 月川北医学院附属医院检验的临床标本。本研究所用菌株包括草绿色链球菌群、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌均分离自痰液标本。30 例肺炎链球菌培养阳性的痰液标本及 40 例痰涂片镜下疑似肺炎链球菌且合格的痰液标本均来源于经临床症状、影像学及实验室检查后诊断为肺炎球菌性肺炎的患者。本研究获得医院伦理委员会批准(批件号:2022ER188-1)。

1.2 仪器设备与试剂

生物安全柜、CO₂ 孵箱(中国海尔公司),漩涡震荡仪(中国天翎仪器有限公司),1%胰酶(上海源叶有限公司),低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),BinaxNOW 试剂盒(美国 Binax 公司),革兰染液(珠海贝索生物科技有限公司),光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司),哥伦比亚血琼脂培养基、麦康凯琼脂选择培养基、嗜血杆菌巧克力琼脂选择培养基(重庆庞通医疗器械有限公司),比浊仪、VITEK MS 质谱仪(法国生物梅里埃公司)。

1.3 BinaxNOW 检测 8 种分离菌株

收集分离自痰液标本经 VITEK MS 鉴定为草绿色链球菌群、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和肺炎链球菌各 5 株,用生理盐水配制菌悬液,经比浊仪测定浊度为 0.5 McF,后按照 BinaxNOW 说明书进行操作,即用配套拭子浸入菌悬液中,取出后插入检测卡内,加入 A 试剂 3 滴,将检测卡闭合,使样本和检测条接触,15 min 后读取结果,若同时出现样本线和对照线为阳性结果,只出现对照线为阴性结果,如未出现对照线视为无效结果。

1.4 BinaxNOW 检测 SP 培养阳性痰标本

收集经 VITEK MS 鉴定为 SP 的痰液标本 30 例,向无菌试管内加入与痰液标本等量的 1% 胰酶,漩涡震荡仪混匀后放置 35 °C 孵箱孵育 90 min,让痰液充分均质化。后 3 500 r/min 离心 5 min,取拭子沾取上清液后,操作同 1.3 进行抗原检测。

1.5 痰涂片革兰染色联合 BinaxNOW 检测痰标本

痰液涂片进行革兰染色后,镜下如观察到“革兰阳性双球菌,矛头相对,有荚膜”疑似肺炎链球菌,半定量结果在 2+ 及以上,且达到标本可接受培养的标准(鳞状上皮细胞 < 25/低倍镜视野,白细胞 > 25/低倍镜视野)时对标本进行抗原检测^[10],操作同 1.4,并将标本接种于哥伦比亚血琼脂、麦康凯及嗜血杆菌巧克力琼脂选择培养基后置于 CO₂ 孵箱培养过夜,后观察各平板细菌生长情况,并利用 VITEK MS 对疑似菌落进行鉴定。

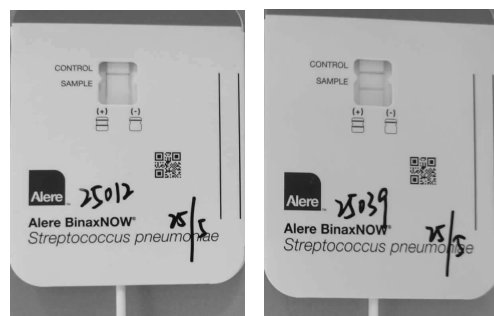
1.6 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析。计数资料以[n(%)]表示,P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BinaxNOW 在痰液分离株测定中的特异性

BinaxNOW 检测痰液来源的草绿色链球菌群、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌结果仅出现对照线,即全为阴性,而肺炎链球菌作为阳性对照,结果出现对照线及样本线,即为阳性。见图 1。



A. 阴性结果

B. 阳性结果

图 1 BinaxNOW 抗原检测结果示意图

2.2 BinaxNOW 在痰液检测中与痰培养的一致性

痰培养 SP 阳性的痰液标本,经 BinaxNOW 测定均为阳性 100% (30/30)。

2.3 痰革兰染色联合 BinaxNOW 与痰培养的结果比较

痰涂片革兰染色后镜下观察发现疑似 SP 40 例,经 BinaxNOW 测定痰标本阳性为 38 例(95%),

经痰培养及鉴定后确定为 SP 30 例 (75%), 痰涂片联合抗原快速检测与痰培养符合率为 78.95% (30/38)。见图 2 及表 1。

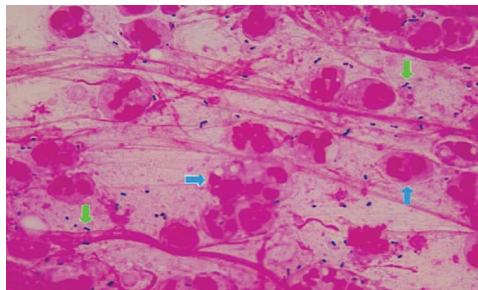


图 2 疑似肺炎链球菌的痰涂片革兰染色后镜下图(1000×)
绿色箭头指细菌疑似肺炎链球菌,蓝色箭头指白细胞

表 1 镜检疑似“肺炎链球菌”标本与 BinaxNOW、痰培养结果比较 [n(%)]

结果	痰涂片革兰染色	痰液抗原检测	痰培养
阳性	40(100.00)	38(95.00)*	30(75.00)
阴性	0(0.00)	2(5.00)	10(25.00)

* $P < 0.05$, 与痰培养检出率比较。

2.4 抗原快速检测与痰培养结果不一致标本的临床信息分析

经收集临床资料发现, BinaxNOW 测定为阳性而痰培养为阴性的标本有 8 例, 均有咳嗽 3 d 以上或伴有基础疾病。见表 2。

表 2 BinaxNOW 抗原检测与痰培养不一致标本的临床资料分析

标本号	镜检结果 (E/LP, W/LP)	用药	合并其他细菌 感染种类
1	<10, >25	阿奇霉素 + 头孢匹胺	流感嗜血杆菌
2	<10, >25	头孢他啶	-
3	<10, >25	-	肺炎克雷伯菌
4	<10, >25	阿奇霉素	-
5	<10, >25	阿奇霉素及阿莫西林克拉维酸钾	-
6	10-25, >25	头孢哌酮舒巴坦钠	-
7	10-25, >25	头孢唑林钠	-
8	<10, >25	-	铜绿假单胞菌

E/LP, W/LP 表示鳞状上皮细胞数/低倍镜视野, 白细胞数/低倍镜视野。

3 讨论

SP 在老年人及儿童人群中具有很高的致病性, 可引起肺炎、菌血症、脑膜炎等疾病, 其中以肺炎最为常见^[11]。S. pp 患者病情进展较快, 严重时危及生命, 据世界卫生组织 (WHO) 报道^[12], 每年约有 70~100 万儿童死于肺炎球菌病, 其中大多数死亡发生在包括中国在内的发展中国家。但 S. pp 诊断仍需依靠实验室的传统培养, 而该方式的 SP 检出

率远低于实际感染率, 可能原因有标本因素 (标本未及时送检、患者院外已用药等)、实验室条件 (SP 初代培养需 CO₂ 环境)、技术人员水平 (SP 菌落形态不典型而漏检) 等, 且实验室培养得到最终结果至少需 48 h, 故临床迫切需要更特异、快速、早期鉴定 SP 的方法^[7]。

近年来, 胶体金法在体外快速诊断中有着越来越广泛的应用, 其中对 SP 抗原检测以 BinaxNOW 试剂盒为代表。BinaxNOW 试剂盒采用薄膜免疫层析试验, 用于检测人类尿液和脑脊液中肺炎链球菌的可溶性抗原—C-多糖。而患者如患有 S. pp, 以下呼吸道不适为主要症状, 故临床上送检最多的标本为痰液, 因此胶体金法在痰液中的应用有待进一步探究。

本研究首先探讨了胶体金法在痰液检测中的特异性, 收集了与 SP 菌落形态相似的草绿色链球菌群, 和呼吸道标本分离菌中最常见菌株包括肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和嗜麦芽窄食单胞菌, 以及 CAP 中常见的流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌, 以痰液中分离得到的 SP 作为阳性对照, 结果发现胶体金法在上述 8 种纯菌中检测均为阴性, 且 SP 测定为阳性, 说明该方法在分离自痰液的细菌检测中具有较好的特异性, 但痰液标本成分复杂、细菌种类繁多, 故其能否直接用于痰液标本的检测仍需进一步探索。

为验证胶体金法在痰液标本中的应用, 收集痰培养 SP 为阳性的痰液标本, 经胰酶均质化后直接进行检测, 结果发现与痰培养符合率为 100%, 表明其与痰培养结果具有很好的一致性。但这并不能说明该方法能直接用于痰液 SP 的检测, 即胶体金法检测痰液 SP 阳性并不能直接诊断 S. pp, 因为 SP 在正常人鼻咽部也可有定植, 我国儿童 SP 定植率高达 16.6%~88.6%^[4], 所以需要将胶体金法联合某种方法一起才能直接用于痰液中 SP 的鉴定。痰涂片革兰染色能直接反映患者痰液原始情况, 即通过镜下观察白细胞数量及其与细菌间的关系可大致判断该菌是否有临床意义, 且该方法能较快地得到结果, 故在临床上应用十分广泛。但单凭革兰染色并不能准确判断细菌的种类, 因为不同细菌间形态可能具有相似性, 且易受药物的影响, 而镜下对细菌形态的准确识别也依赖于实验室技术人员的知识储备^[13]。故本研究将痰涂片革兰染色与胶体金法进行联合, 通过比较其与痰培养的结果来进一步阐述胶体金法在痰液直接检测中的应用。本研究发现在痰涂片革兰染色镜下疑似 SP 的 40 例标本中, 胶体金法检出阳性率为 95%, 明显高于痰培养检出率, 差异具有统计学意义。有 8 例标本经抗原检测为阳

性,而痰培养为阴性,通过分析其临床资料及培养结果发现,其中6例在入院前已使用阿奇霉素或头孢哌酮钠舒巴坦钠等抗生素,这可能是导致痰培养为假阴性的原因,还有2例标本平板上有大量的肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌生长,因其菌落大而黏,可能覆盖了SP的生长。多种因素均可导致SP的漏检,所以抗原检测联合革兰染色能降低SP的漏检率,为早期SP的鉴定、合理应用抗生素以及耐药数据监测提供更完善的实验室依据。还有2例标本痰涂片镜下疑似SP,但抗原检测为阴性,后经培养鉴定为假肺炎链球菌,有研究报道假肺炎链球菌也为革兰阳性球菌,菌体似矛头状,成双或成短链状排列,形似肺炎链球菌,故单纯的革兰染色在区分SP与否上仍有一定局限性^[14]。

本研究发现胶体金法联合痰涂片革兰染色可以对SP进行早期、高效的鉴定,可以减少因标本运送不及时、用药等因素导致的漏检发生。其实,胶体金法检测SP还可以有更广泛的应用,由SP导致的其他部位感染,比如脓液标本,若镜下见到疑似SP的形态,也可加做抗原检测进行早期鉴定。SP在血培养报阳标本中检出率也很高^[15],血培养报阳后如未及时涂片、转种,SP因产生自溶酶而导致菌体自溶,结果可能会误报为假阴性^[16]。之前本实验室有2例血培养报阳,但涂片后革兰染色及瑞氏染色均未查见典型、完整的细菌菌体形态,而血培养仪上的生长曲线良好,后加做SP抗原检测结果为阳性,故抗原快速检测可能在降低血培养预报告假阴性率中具有重要应用。此外,SP在正常人鼻咽部具有高定植率,而细菌定植是感染的前提,当机体抵抗力减退时,或寒冷刺激、患有麻疹、流感等因素极易导致SP引发内源性感染,故SP是儿童及老年人群CAP感染的主要病原菌,那么对这一特殊人群采取抗原快速检测进行SP筛查对预防其引起机体严重感染可能具有重要意义^[4,17]。

综上,本研究发现胶体金法检测SP抗原具有很好的特异性,且联合痰涂片革兰染色可直接用于痰液标本检测,为早期诊断S. pp提供了可靠的实验室依据。

参考文献

[1] El-Kholy A, Badawy M, Gad M, et al. Serotypes and antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal isolates of *Streptococcus pneumoniae* from children less than 5 years old in Egypt [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 3669 - 3677.

[2] Chikhaoui A, Nzoyikorerwa N, El Mouadden M, et al. A rare case of pneumococcal appendicitis in a child [J]. *Case Reports in Pediat-*

rics, 2022, 2022: 9262149.

[3] Goh SL, Kee BP, Abdul Jabar K, et al. Molecular detection and genotypic characterisation of *Streptococcus pneumoniae* isolated from children in Malaysia [J]. *Pathogens and Global Health*, 2020, 114(1): 46 - 54.

[4] 周丽,王森,董晓艳. 5岁及以下儿童社区获得性肺炎进展为重症肺炎的流行病学特点[J]. *上海医学*, 2023, 46(7): 465 - 470.

[5] 温志红. 儿童肺炎链球菌肺炎诊断及防治策略[J]. *中国临床新医学*, 2021, 14(3): 238 - 244.

[6] Wang C, Hao W, Yu R, et al. Analysis of pathogen distribution and its antimicrobial resistance in bloodstream infections in hospitalized children in East China, 2015 - 2018 [J]. *Journal of Tropical Pediatrics*, 2021, 67(1): fmaa077.

[7] Lemay JA, Ricketson LJ, Kellner JD. Trends in asymptomatic nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* carriage with qPCR and culture analysis [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2074.

[8] Liapikou A, Konstantinidis A, Kossyvakis V, et al. Pneumococcal serotypes in adults hospitalized with community-acquired pneumonia in Greece using urinary antigen detection tests: the EGNATIA study, November 2017-April 2019 [J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2022, 18(5): 2079923.

[9] Dowell SF, Garman RL, Liu G, et al. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients [J]. *Clinical Infectious Diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2001, 32(5): 824 - 825.

[10] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 499 - 2017 中华人民共和国卫生行业标准. 下呼吸道细菌感染培养操作指南[S]. 2017 - 01 - 15.

[11] 卢婷,张长庚,许沙沙,等. 衡水地区儿童急性下呼吸道感染病原菌构成与耐药性分析及对病情加重的影响[J]. *广西医科大学学报*, 2022, 39(10): 1666 - 1671.

[12] Wu X, Zhao S, Jiang Y, et al. Effect of pneumococcal conjugate vaccine availability on *Streptococcus pneumoniae* infections and genetic recombination in Zhejiang, China from 2009 to 2019 [J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 606 - 615.

[13] 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社, 2011.

[14] 赖希希,蔡鹏威,王军军,等. 应用16S rRNA基因序列分析鉴定从痰培养中分离的假肺炎链球菌[J]. *实验与检验医学*, 2020, 38(2): 222 - 224.

[15] Pneumonia Etiology Research for Child Health Study Group. Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without HIV infection from Africa and Asia: the PERCH multi-country case-control study [J]. *Lancet (London, England)*, 2019, 394(10200): 757 - 779.

[16] 蔡婷婷,屈平华,穆小萍,等. 连续监测血培养系统中肺炎链球菌自溶特点分析[J]. *临床检验杂志*, 2013, 31(12): 945 - 947.

[17] 廖远泉. 感染性肺炎病原学实验室诊断——肺炎链球菌检测技术进展[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2018, 7(1): 1 - 6.

(收稿日期:2023 - 09 - 12

修回日期:2023 - 11 - 19)