

儿童细菌性下呼吸道感染两种采样方法的结果分析

陈蓉¹ 赵根明¹ 林玉尊¹ 郝创利² 丁云芳³

(1. 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室, 教育部公共卫生安全重点实验室, 上海 200032;

2. 苏州大学附属儿童医院呼吸科; 3. 苏州大学附属儿童医院检验科, 苏州 215003)

[中图分类号] R725.6 [文献标识码] D [文章编号] 1008-8830(2010)05-0393-03

儿童急性下呼吸道感染 (acute lower respiratory tract infections) 是婴幼儿时期的常见病, 严重威胁婴幼儿的健康^[1]。肺炎链球菌和流感嗜血杆菌是婴幼儿下呼吸道感染的主要条件病原菌^[2], 同时其也是引起儿童死亡的重要病原菌。由于儿童痰标本比较难采集, 再加上儿童鼻咽部条件病原菌的携带率很高, 所以痰培养的方法在儿童下呼吸道感染的病原学诊断上有一定的争议。气管吸痰法 (tracheal aspiration, TA) 采取合格的痰标本进行培养的方法对于细菌性下呼吸道感染的病原学诊断具有一定的参考价值^[3-4]。有研究显示在肺炎链球菌引起的疾病中, 肺炎链球菌的分离率与其相应的鼻咽部携带率有关, 且菌株在基因学上也有联系^[5]。本研究旨在比较 3 岁以下细菌性下呼吸道感染住院患儿痰液和鼻咽拭子中病原菌的分布特点, 从而分析对比 TA 和鼻咽拭子法 (NPS) 在婴幼儿细菌性下呼吸道感染的病原学诊断上的意义。

1 资料和方法

1.1 对象

收集苏州大学附属儿童医院 2006 年 3 月至 2007 年 3 月因急性下呼吸道感染住院的 3 岁以下患儿为研究对象, 病例诊断按《实用儿科学》儿童下呼吸道感染临床诊断标准^[6]。入选的肺炎病例 X 胸片显示片状、斑片状阴影或两肺纹理粗乱、周围模糊。气管插管及接受免疫抑制治疗的患儿被排除。同时选取同期入院的外科患儿作为对照组, 符合最近 2 周无发热, 无呼吸道感染的症状/体征。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 在患儿入院次日上午, 由专业

技术人员同时用 TA 和 NPS 法采集标本。TA 法是经鼻腔将抽吸导管沿腔道深入 15 ~ 18 mm (视年龄而定) 至气管处, 停留 5 ~ 10 s 后待患儿咳嗽时通过负压吸引器将痰液抽吸至无菌生理盐水试管中。NPS 法是由相同的技术人员将咽拭子 (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) 由患儿的另一个鼻腔深入至鼻咽部, 停留 10 s 后缓慢抽出获得咽拭子。标本在 2 h 内送实验室检测病原体。

1.2.2 细菌鉴定 痰液接种前用力振摇, 制成悬液。将悬液接种于哥伦比亚选择性培养基 (血平板、巧克力平板各一) 和胰蛋白胨肉汤 (含 5 μg/mL 的庆大霉素), 置 5% CO₂ 培养箱 (35℃, 18 ~ 24 h) 培养。根据培养基上菌落特点、革兰染色、显微镜下观察、生化反应等方法鉴定细菌。操作及结果判定根据痰标本的细菌学检验程序^[7]进行, 在苏州大学附属儿童医院检验科细菌室完成。对实验室操作人员未告知样本来源。

1.2.3 革兰染色 将痰标本进行革兰染色后, 在显微镜下记录痰标本中的鳞状上皮细胞数以及是否有革兰阳性双球菌。每张玻片在镜下读三个视野, 计算平均值。鳞状上皮细胞 < 10 个/低倍视野的痰液作为合格标本, 纳入统计学的分析。

1.2.4 统计方法 Epi Data 3.1 软件建立数据库, 双份录入资料; 用 Check 模块进行逻辑纠错, SPSS 15.0 进行数据的统计分析。应用 Kappa 统计量对 NPS 法和 TA 法的细菌检出情况进行一致性检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Kappa ≥ 0.75 时表示两者一致性较好, $0.75 > \text{Kappa} \geq 0.4$ 时一致性一般, Kappa < 0.4 时表示两者一致性较差。

[收稿日期] 2009-10-08; [修回日期] 2009-12-09
[基金项目] 上海市公共卫生重点学科 (08GWZX0201)。
[作者简介] 陈蓉, 女, 博士研究生。

2 结果

2.1 一般资料

本研究共收集合格入选对象 773 名,下呼吸道感染组 379 名,男 221 名,女 158 名,男女比例 1.4:1,1 岁以下的患儿 193 名(50.9%),入院前 1 周内用过抗生素的患儿 87.5%;对照组 394 名,男 350 名,女 44 名,男女比例 7.9:1,1 岁以下的患儿 64 名(16.2%),入院前 1 周内用过抗生素的患儿 <1%。

2.2 两组儿童检出细菌的组成

两组患儿的痰标本中各有 4 名患儿的痰液不符合培养的要求,因此 375 名下呼吸道感染患儿和 390 名对照组患儿纳入以下分析。下呼吸道感染患儿 NPS 法和 TA 法检出的细菌均以肺炎链球菌和流感嗜血杆菌为主。对照组患儿 NPS 法检出细菌以卡他布兰汉菌、流感嗜血杆菌和肺炎链球菌为主,而 TA 法检测出的肺炎链球菌阳性率略低(表 1)。

表 1 两组患儿两组样本中主要病原菌的组成 [例(%)]

	对照组(n=390)		下呼吸道感染组(n=375)	
	NPS	TA	NPS	TA
肺炎链球菌	59(15.1)	32(8.2)	44(12.1)	38(10.1)
流感嗜血杆菌	63(16.2)	107(27.4)	46(12.7)	58(15.5)
卡他布兰汉菌	81(20.8)	86(22.1)	20(5.3)	18(4.8)
金黄色葡萄球菌	42(10.8)	65(16.7)	10(2.7)	14(3.7)
其他	18(4.6)	15(3.8)	10(2.7)	16(4.3)

2.3 两种方法检出病原菌的比较

2.3.1 两种方法检出肺炎链球菌情况的比较

本研究发现对照组有 59 名患儿鼻咽部检出携带肺炎链球菌,其中 TA 法检测阳性有 20 名,占 33.9% (95% CI: 20.7% ~ 43.0%)。在 331 例鼻咽部未检出肺炎链球菌携带的患儿中,有 12 例(3.6%)患儿 TA 法检测阳性。一致性检验分析显示两种方法在肺炎链球菌的检出上存在一致性,但一致性较差($P < 0.01$, $Kappa = 0.366$)。而在下呼吸道感染组的患儿中,44 名患者鼻咽部检出携带肺炎链球菌,其中 TA 法检测阳性有 28 名,占 63.6%。一致性检验分析显示两种方法在肺炎链球菌的检出上存在较好的一致性($P < 0.01$, $Kappa = 0.644$)。同时两种方法的一致率在两组患儿中差异有统计学意义($\chi^2 = 7.979$, $P < 0.01$),下呼吸道感染组的一致率更高。

表 2 两种方法检出肺炎链球菌的情况比较

	NPS	TA		总计	P 值	Kappa 值
		+	-			
对照组	+	20	39	59	<0.01	0.366
	-	12	319	331		
	总计	32	358	390		
下呼吸道感染组	+	28	16	44	<0.01	0.644
	-	10	321	331		
	总计	38	341	375		

2.3.2 两种方法检出流感嗜血杆菌情况的比较

本研究发现对照组有 63 名患儿鼻咽部检出携带流感杆菌,其中 TA 法检测阳性有 34 名,占 54.0%。在 327 例鼻咽部未检出肺炎链球菌携带的患儿中,有 73 例(22.3%)患儿 TA 法检测阳性。一致性检验分析显示两种方法在流感杆菌的检出上存在一致性,但一致性较差($P < 0.01$, $Kappa = 0.247$)。而在下呼吸道感染组的患儿中,46 名患者鼻咽部检出携带流感杆菌,其中 TA 法检测阳性有 31 名,占 67.4%。一致性检验分析显示两种方法在流感杆菌的检出上存在较好的一致性($P < 0.01$, $Kappa = 0.532$)。同时两种方法的一致率在两组患儿中差异有统计学意义($\chi^2 = 27.978$, $P < 0.01$),下呼吸道感染组的一致率更高。

表 3 两种方法检出流感嗜血杆菌的情况比较

	NPS	TA		总计	P 值	Kappa 值
		+	-			
对照组	+	34	29	63	<0.01	0.247
	-	73	254	327		
	总计	107	283	390		
下呼吸道感染组	+	31	15	46	<0.01	0.532
	-	27	302	329		
	总计	58	317	375		

3 讨论

儿童急性下呼吸道感染是儿童的常见病,同时也是发展中国家 5 岁以下儿童主要的死亡原因,明确其病原菌是非常重要的。儿童年龄较小,采样比较困难,目前尚无可靠的、侵袭性小的诊断方法。TA 法采取合格痰标本进行培养具有一定的参考价值。鼻咽部病原菌的携带情况不仅对于该病原菌引起的感染有重要的作用,而且可以用来预测感染性疾病中该病原菌的耐药情况^[5],但在病原学诊断上的意义尚待研究。

本研究选在病例较为集中的苏州儿童医院,虽

然有严格入选标准,但是下呼吸道感染组和外科组的患儿在年龄、性别和抗生素的使用情况都存在差异,这些并不会影响两种方法的比较结果。目前对于儿童急性呼吸道感染的病原学较一致的看法是发展中国家以细菌为主^[8]。本研究显示肺炎链球菌和流感嗜血杆菌为主要病原菌。结果显示无论是对照组还是下呼吸道感染组,两种方法对肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的检出存在一致性($P < 0.01$),而且两种方法在下呼吸道组的一致性更好($P < 0.05$, $Kappa = 0.644$ vs $Kappa = 0.366$; $Kappa = 0.532$ vs $Kappa = 0.247$)。对于卡他和金黄色葡萄球菌的检验结果类似。以上结果说明在无法获得合格痰标本的情况下,可以采取操作相对简单、无创伤的NPS法采集鼻咽部的携带菌进行培养检验,用以指导临床用药。

对照组有33.9% (95% CI:20.7% -43.0%)的鼻咽部携带肺炎链球菌的患儿TA法检测阳性。假设如果TA法能很好地检出下呼吸道感染的致病菌,那么对照组的患儿TA法理论上应该不能检出肺炎链球菌,说明TA法检测肺炎链球菌的特异度不高,对于流感嗜血杆菌的分析结果也类似。成人细菌性肺炎的研究也有类似的报道^[9]。以上结果显示,如果要了解健康儿童肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的携带情况,吸痰培养的方法可能并不准确,最好使用NPS法。

为了减少其他影响因素对于两种方法的比较,在整个研究中进行了严格的质量控制。首先,在采样时,由同一个专业技术人员进行抽痰和采集咽拭子,减少由于不同采样人员造成的误差;其次对于实验室操作人员采用盲法,让他们无法获知样本来自呼吸道感染组还是外科组,而且也无法获知这两个样本是否来自同一个病人,避免了在接种培养上由于主观偏向造成的误差;最后,痰液是否合格是痰培养的重要因素。在革兰氏染色法检测鳞状上皮细胞的数量时,由同一个专业技术人员进行观察,且观察3个视野的细胞数量取平均值。镜检中鳞状上皮细胞 < 10 个/低倍视野视为合格痰液,纳入痰培养的

分析。

本研究的结果均从新入院的儿童中获得,采样的技术人员受过专业培训,研究的结果基本可以反映TA法和NPS法在诊断3岁以下的下呼吸道感染住院患儿的应用价值。鼻咽拭子法可以在一定程度上为临床提供治疗依据,从而避免抗生素经验选药的盲目性。当然由于本研究样本量相对较小、研究时间相对较短等原因,其结果是否可以外推到更广泛的范围还需进一步验证。

[参 考 文 献]

- [1] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children [J]. *Lancet*, 2005, 365 (9465):1147-1152.
- [2] Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fiett J, Hryniewicz W. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharynxes of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9):3942-3949.
- [3] Bartlett JG. Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2004, 18(4):809-827.
- [4] 马君玲,马玲,叶扬. 下呼吸道感染采用两种不同方法采样培养的对比分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(16):2117.
- [5] Cardozo DM, Nascimento-Carvalho CM, Souza FR, Silva NM. Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update [J]. *Braz J Infect Dis*, 2006, 10(4):293-304.
- [6] 江载芳,申昆玲. 呼吸系统疾病 [M]//胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学上册. 第7版. 北京:人民卫生出版社,2002:1139-1265.
- [7] 朱建国. 微生物学检验 [M]//叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程. 第2版. 南京:东南大学出版社,1997:437-575.
- [8] 亓晓,赵根明,张建华,丁云芳,陶云珍,诸丽娟,等. 5岁以下呼吸道感染住院患儿痰标本的细菌与病毒病原学 [J]. *复旦大学学报(医学版)*, 2004, 31(3):270-273.
- [9] Stralin K, Stralin K, Tornqvist E, Kalltoft MS, Olcen P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(2):643-645.

(本文编辑:黄 榕)