

· 临床研究 ·

下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液定量培养及临床分析

丁树红^{1,2}, 金菲^{1*}, 倪芳¹, 许雨乔¹, 王珏¹, 刘根焰¹¹南京医科大学第一附属医院检验学部, 江苏 南京 210029; ²淮安市第一人民医院分院检验科, 江苏 淮安 223001

[摘要] 目的:探讨下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液病原菌分布及对常用抗菌药物的耐药性,为临床用药提供合理依据。方法:回顾性分析南京医科大学第一附属医院2018年下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液定量分离培养结果及临床资料。结果:178例患者共分离病原菌197株,其中社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)101例(56.7%),医院获得性肺炎(hospital acquired pneumonia, HAP)77例(43.3%),主要来源于重症监护病房(30.5%)、老年医学科(29.5%)、呼吸与危重症医学科(26.4%)。HAP病原菌以革兰阴性菌为主,占89.5%,CAP病原菌也以革兰阴性菌为主,但比例低于HAP病原菌,占77.5%。分离到的病原菌中,革兰阴性菌163株,占82.7%,排在前三位的是鲍曼不动杆菌(71株,36.0%)、铜绿假单胞菌(34株,17.3%)和肺炎克雷伯菌(28株,14.2%);真菌21株,占10.7%,其中念珠菌属16株,曲霉菌4株,糠皮马拉色菌1株;革兰阳性菌13株,占6.6%,主要为金黄色葡萄球菌(10株,5.1%)。鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南耐药率均为98.6%,铜绿假单胞菌对亚胺培南、美罗培南耐药率分别为29.4%、23.5%,肺炎克雷伯菌对亚胺培南、美罗培南耐药率均达57.1%。10株金黄色葡萄球菌共检出6株甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌,检出率为60.0%,未检出对万古霉素、利奈唑胺耐药的金黄色葡萄球菌。结论:支气管肺泡灌洗液常见致病菌为革兰阴性杆菌,各病原菌耐药情况严重。临床应严格按照药敏结果合理用药,降低多重耐药菌肺部感染的发生率。

[关键词] 肺泡灌洗液;定量培养;社区获得性肺炎;医院获得性肺炎;病原菌**[中图分类号]** R446.19**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)09-1354-05**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200919

下呼吸道感染是临床较为常见的感染,其诊断和治疗长久以来主要依据痰液培养及药敏结果,但因上呼吸道菌群定植或痰液标本质量的影响,痰培养出的细菌是否是真正的致病菌,这个问题一直困扰着临床医生。2018年出台的《临床微生物学检验标本的采集和转运》和2017年发布的《下呼吸道感染细菌培养操作指南》不建议将痰液作为诊断下呼吸道感染的最佳标本,推荐使用气管镜采集的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和保护毛刷标本。BALF是利用支气管镜,对肺段和亚肺段进行灌洗后采集到的肺泡表面液体,与痰液相比,对下呼吸道感染的诊断具有较高的特异性和敏感性,其药敏实验结果对临床抗感染治疗的指导价值相对较高^[1],现对南京医科大学第一附属医院2018年下呼吸道感染患者BALF定量培养结果及临床资料进行回顾性分析,报道如下。

[基金项目] 国家临床检验重点专科建设项目;江苏省实验诊断学重点实验室(ZDXKB2016005)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: kelly198736@163.com

1 对象和方法

1.1 对象

南京医科大学第一附属医院2018年1—12月下呼吸道感染的患者进行支气管肺泡灌洗后留取的BALF标本。支气管肺泡灌洗术参照2017年中华医学会呼吸病学分会制定的《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗液病原体检测中国专家共识》^[2]中操作流程进行。剔除同一患者相同病原菌后,178例患者共分离病原菌197株,19例患者为混合感染。患者年龄17~93岁,男132例(中位年龄63.5岁),女46例(中位年龄57岁)。本研究通过医院伦理委员会批准,所有患者知情同意。

1.2 方法

1.2.1 样本处理

BALF的细菌及真菌培养严格按《下呼吸道感染细菌培养操作指南》^[3]处理。在无菌操作下用10 μL定量接种环取BALF分别接种于血平板和巧克力平板,再用无菌L型玻棒涂布平板。再取100 μL四区划线分别接种于麦康凯和沙保弱平板,血平板和

巧克力平板置于5%~10%CO₂孵育,麦康凯和沙保弱平板置于普通孵箱,35℃培养18~24h,观察细菌生长情况,依据参考文献[2],BALF细菌培养计数≥10⁴ CFU/mL或防污染BALF≥10³ CFU/mL时具有临床诊断意义。接种标本所用平板、Vitek 2-Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统及其配套的细菌鉴定卡、药敏卡,均为法国生物梅里埃公司产品;受试抗菌药物纸片为英国OXOID公司产品。

1.2.2 细菌鉴定及药敏试验

细菌及念珠菌的鉴定采用VITEK-2 COMPACT全自动微生物鉴定及药敏分析系统;丝状真菌鉴定采用氢氧化钾涂片及乳酸苄棉兰涂片方法进行。细菌药物敏感试验采用VITEK-2 COMPACT全自动微生物鉴定及药敏分析系统,药敏结果依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)2018版^[4]标准判读。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922、金黄色葡萄球菌ATCC25913和铜绿假单胞菌ATCC27853。

本研究中多重耐药(multi-drug resistant, MDR)菌株定义为:该菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类中的3类或以上抗菌药物不敏感^[5]。

1.3 统计学方法

采用WHO推荐的WHONET5.6软件进行药敏结果统计。统计学分析采用SPSS 22.0,分析方法采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床科室分布

132例(74.2%)患者存在不同程度发热,体温(38.2±0.7)℃(37.1~40.0℃)。其中社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)101例(56.7%),医院获得性肺炎(hospital acquired pneumonia, HAP)77例(43.3%)。分布科室分别为:重症监护病房(30.5%)、老年医学科(29.5%)、呼吸与危重症医学科(26.4%)、门诊(4.6%)、神经外科监护病房(3.0%)、急诊监护病区(2.5%)、泌尿外科(1.5%)、脑外科监护病房(1.0%)、风湿科(0.5%)和全科医学(0.5%)。白细胞计数范围为2.25×10⁹~27.98×10⁹个/L,平均值为10.23×10⁹个/L,中性粒细胞比例为78.90%,C反应蛋白1~404 mg/L,均值为85.7 mg/L,降钙素原0.02~19.62 ng/mL,均值为1.88 ng/mL。重症监护病房患者中位年龄59岁,老年医学科患者中位年龄65岁,呼吸与危重症医学科患者中位年龄47岁。

2.2 CAP与HAP病原菌比较

下呼吸道感染患者中,HAP病原菌以革兰阴性菌为主,占89.5%,CAP病原菌也以革兰阴性菌为主,但比例低于HAP,占77.5%,革兰阳性菌和真菌所占比例高于HAP(表1)。

表1 患者的病原菌比较 [n(%)]

病原菌	HAP(n=86)	CAP(n=111)	χ^2 值	P值
革兰阴性菌	77(89.5)	86(77.5)	5.067	0.024
革兰阳性菌	4(4.7)	9(8.1)	0.940	0.332
真菌	5(5.8)	16(14.4)	3.764	0.052

2.3 菌种分布及定量

2018年共送检BALF 758份,分离细菌267株,阳性率为35.2%,剔除同一患者的相同细菌,分离到细菌197株,来自178例患者。其中分离革兰阴性菌163株,占82.7%,主要为鲍曼不动杆菌(36.0%)、铜绿假单胞菌(17.3%)、肺炎克雷伯菌(14.2%);真菌21株,占10.7%,主要为念珠菌属(8.1%);革兰阳性菌13株,占6.6%,主要为金黄色葡萄球菌(5.1%,表2)。

2.4 革兰阴性菌耐药性

2018年支气管BALF鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌药物耐药性见表3。鲍曼不动杆菌对亚胺培南、美罗培南耐药率均达98.6%,其中MDR鲍曼不动杆菌有70株,占98.6%。铜绿假单胞菌对抗菌药物的耐药率均小于30%,对亚胺培南、美罗培南耐药率分别为29.4%、23.5%,共分离MDR铜绿假单胞菌7株,占20.6%。除阿米卡星和复方磺胺甲噁唑外,肺炎克雷伯菌对其他抗菌药物的耐药率都大于50%,对亚胺培南、美罗培南耐药率均达57.1%。2018年共分离对碳青霉烯类耐药的肠杆菌科(carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)细菌18株,占肠杆菌科细菌的42.9%(18/42),分别为肺炎克雷伯菌16株和黏质沙雷菌2株。其他分离的阴性菌均少于10株,不做统计。

2.5 革兰阳性菌耐药性

2018年BALF中检出的10株金黄色葡萄球菌中有6株甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA),占60.0%。4株甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌对苯唑西林、庆大霉素、利福平、复方新诺明、万古霉素和利奈唑胺耐药性为0,2株对环丙沙星、左氧氟沙星耐药,1株对红霉素、克林霉素和四环素耐药;6株MRSA对庆大霉素、利福平、复方磺胺甲噁唑、利奈唑胺、万古

表2 2018年支气管肺泡灌洗液病原菌定量分离培养结果分布及构成比

病原菌	菌株数(株)	构成比(%)	$\geq 10^3 \sim 10^4$ CFU/mL[n(%)]	$\geq 10^4$ CFU/mL[n(%)]
革兰阴性菌				
鲍曼不动杆菌	71	36.0	5(7.0)	66(93.0)
铜绿假单胞菌	34	17.3	7(20.6)	27(79.4)
肺炎克雷伯菌	28	14.2	6(21.4)	22(78.6)
嗜麦芽窄食单胞菌	7	3.6	0(0)	7(100.0)
黏质沙雷氏菌	7	3.6	1(14.3)	6(85.7)
阴沟肠杆菌	2	1.0	2(100.0)	0(0)
大肠埃希菌	2	1.0	0(0)	2(100.0)
流感嗜血杆菌	2	1.0	0(0)	2(100.0)
其他革兰氏阴性杆菌	10	5.1	5(50.0)	5(50.0)
革兰阳性菌				
金黄色葡萄球菌	10	5.1	0(0)	10(100.0)
凝固酶阴性葡萄球菌	1	0.5	0(0)	1(50.0)
α -溶血链球菌	1	0.5	1(100.0)	0(0)
诺卡菌属	1	0.5	1(100.0)	0(0)
真菌				
念珠菌属	16	8.1	6(37.5)	10(62.5)
曲霉菌	4	2.0	4(100.0)	0(0)
糠皮马拉色菌	1	0.5	0(0)	1(100.0)
总计	197	100.0	38(19.3)	159(80.7)

表3 2018年支气管肺泡灌洗液革兰阴性菌耐药性

抗菌药物	[株(%)]		
	鲍曼不动杆菌(n=71)	铜绿假单胞菌(n=34)	肺炎克雷伯菌(n=28)
哌拉西林	—	1(2.9)	23(82.1)
氨苄西林/舒巴坦	68(95.8)	—	23(82.1)
哌拉西林/他唑巴坦	68(95.8)	0(0)	16(57.1)
头孢他啶	70(98.6)	0(0)	21(75.0)
头孢吡肟	70(98.6)	0(0)	20(71.4)
氨曲南	—	7(20.6)	21(75.0)
美罗培南	70(98.6)	8(23.5)	16(57.1)
亚胺培南	70(98.6)	10(29.4)	16(57.1)
阿米卡星	58(81.8)	4(11.8)	9(32.1)
庆大霉素	62(87.9)	6(17.6)	16(57.1)
妥布霉素	60(84.8)	0(0)	15(53.6)
环丙沙星	70(98.6)	3(8.3)	20(71.4)
左氧氟沙星	70(98.6)	7(20.6)	18(64.3)
复方磺胺甲噁唑	68(95.8)	—	11(39.3)

霉素耐药性都为0,有5株对环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素、克林霉素和四环素耐药。凝固酶阴性葡萄球菌和 α -溶血链球菌各1株,不做统计分析。

2.6 治疗与转归

HAP和CAP患者,均采用抗菌药物单药或联合治疗。转归:114例好转,11例治愈,25例死亡,28例

放弃治疗。对于19例混合感染患者,按菌量多的一种菌划分。菌量 $\geq 10^3 \sim 10^4$ CFU/mL,治愈或好转85.3%(29/34);菌量 $\geq 10^4 \sim 10^5$ CFU/mL,治愈或好转78.0%(39/50);菌量 $\geq 10^5$ CFU/mL,治愈或好转60.6%(57/94)。

3 讨论

下呼吸道感染是威胁人类健康常见的疾病之一,CAP的病原谱比较明确^[6],而HAP的病原谱始终不明,这在一定程度上是标本所致。由于痰液易采集,痰液标本仍是医院送检率最高的标本。但因痰液标本易受口咽部及口腔正常菌群的污染,其临床价值有限,而BALF直接取自病变部位,是进行病原学检查的理想标本^[7]。2005年美国感染性疾病学会发布的HAP诊疗指南^[8]推荐使用BALF作为肺炎的诊断标本。

按肺炎发生场所进行分类,HAP和CAP都以革兰阴性菌为主,但是HAP中革兰阴性菌所占比例高于CAP,HAP患者大多存在气管插管、气管切开等呼吸道侵入性操作,细菌种类以鲍曼不动杆菌属、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌等院内感染菌为主;CAP细菌种类以鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌为主,但是细菌种类较HAP更多、更复

杂,分离到革兰阳性菌和真菌的比例高于HAP。

从菌种看,分离到口咽部定植的微生物如草绿色链球菌、血浆凝固酶阴性葡萄球菌、念珠菌属等,甚至有些菌株浓度高于 10^4 CFU/mL。这提示我们,BALF也是有污染标本,但是和痰液相比,污染的概率和程度要大大下降。《肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗液病原体检测中国专家共识(2017版)》中指出,BALF细菌培养计数 $\geq 10^4$ CFU/mL或防污染BALF $\geq 10^3$ CFU/mL时认为是可能的病原菌,但不能机械使用该阈值,要结合患者实际情况及有无使用抗菌药物等因素综合判断。设定阈值的目的是判断标本污染与否。本研究将结果分析中阈值设为 $\geq 10^3 \sim 10^4$ CFU/mL和 $\geq 10^4$ CFU/mL两层,考虑到标本主要来源于ICU、呼吸与危重症医学科和老年医学科这3个科室,且以老年患者居多,这些患者多患有严重的基础疾病,免疫力低下,呼吸道和全身防御功能减退,多使用各种广谱抗菌药物,抗生素使用后留取标本细菌分离株判断阈值相应降低1个数量级,本研究计数 $\geq 10^3 \sim 10^4$ CFU/mL的菌株中有37例(97.4%)来源于这3个科室;且考虑到这些患者接受过各种侵入性操作,引起院内肺部感染的机会增加,经过与临床沟通,当分离株纯培养生长时,即使菌株计数在 $\geq 10^3 \sim 10^4$ CFU/mL,我们也分离报告临床,提示医生结合临床表现综合判断。

本研究从BALF中分离到的革兰阴性菌以鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌为主,与俞国峰等^[9]报道一致。而刘远新等^[10]报道的医院BALF病原菌分别以肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌和鲍曼不动杆菌为主,略有差别,可能与不同地区、院内感染病原菌分布存在差异有关系。鲍曼不动杆菌是分离率最高的细菌,占34.1%,该菌对抗菌药物耐药率均 $>80%$,且对碳青霉烯类药物耐药率已达98.6%,MDR株的分离率为98.6%,高于余湛等^[11]报道。鲍曼不动杆菌耐药形势已相当严峻,成为临床抗感染治疗的难点,53例死亡或放弃治疗患者中有31例分离到了该菌。鲍曼不动杆菌具有较强的形成生物被膜的能力,能黏附在包括呼吸机在内的各种物体表面,有报道称ICU是多重耐药鲍曼不动杆菌下呼吸道感染的高危场所^[12-13],不仅与ICU大量使用抗菌药物有关,还与环境中鲍曼不动杆菌定植有关。合理使用抗菌药物,严格隔离消毒、彻底消毒环境、提高护理质量,对有效控制感染十分重要。铜绿假单胞菌对抗菌药物耐药率均小于30%,总体来说耐药性不高,MDR株的分离率为

18.9%。肺炎克雷伯菌除阿米卡星和复方磺胺甲噁唑外其他抗菌药物耐药率都较高,对碳青霉烯类药物的耐药率已达57.1%。值得注意的是,2018年分离到18株CRE,其中17株都来自ICU患者。CRE的耐药机制主要以产碳青霉烯酶为主,同时也有膜孔蛋白缺失或减少以及靶位蛋白改变等机制参与,本院CRE以产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶为主,也有少量产金属 β -内酰胺酶的CRE株被检出。因此平时临床工作中应重视CRE的检出与表型复核。CRE治疗目前正面临着无药可用的困境,有研究表明,2种或2种以上抗菌药物联合用药优于单一用药,碳青霉烯类协同氨基糖苷类或替加环素能够降低CRE感染患者的病死率^[14]。

革兰阳性菌主要为金黄色葡萄球菌,MRSA检出率为60.0%,与张真等^[15]报道检出率相近。本研究暂未检出万古霉素耐药或中介的金黄色葡萄球菌,但是,自美国报道了首例耐万古霉素的金黄色葡萄球菌(vancomycin-resistant *S.aureus*, VRSA)后^[16],已报告了11例VRSA感染病例^[17-19],葡萄牙也在2013年报道了欧洲首个VRSA分离株^[20]。临床医生应根据药敏结果合理选用抗菌药物,不合理使用可能会导致治疗失败和耐药菌株的出现。

本研究还发现,细菌分离量不同,患者的病死率也不同,细菌分离量越少,患者好转或治愈率越高,当然,这也要结合患者分离到的病原菌进行分析,本研究未做讨论,可在进一步研究中,结合BALF中培养到的细菌种类、菌量及患者临床危险因素进一步分析。

BALF培养主要以革兰阴性菌为主,细菌的耐药突出问题主要是CRE、MDR鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌。除加强对MDR菌的监测外,更应从多环节着手,严格控制抗菌药物的使用,对分离到MDR菌的患者进行隔离,并重视病房的环境消毒。呼吁临床提高下呼吸道标本的送检质量,减少痰液标本送检量,提高BALF等高质量呼吸道标本量,以明确病原菌感染,避免经验用药导致的抗菌药物滥用及耐药菌株的产生。

【参考文献】

- [1] 邹单东,韦柳华,程红革.肺泡灌洗液培养在肺部感染检测中的应用研究[J].重庆医学,2012,41(27):2845
- [2] 中华医学会呼吸病学分会.肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗液病原体检测中国专家共识(2017版)[J].中华结核和呼吸杂志,2017,40(8):578-583
- [3] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会.下呼吸道感染

- 染细菌培养操作指南:WS/T 499-2017[S/OL]. [2020-04-21]. <https://wenku.baidu.com/view/c9de82424a35eefdc8d376eeaeaad1f346931127.html>
- [4] CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100-S28 performance standards for antimicrobial susceptibility[S]. Wayne, PA:CLSI, 2018
- [5] FALAGAS M E, KOLETSI P K, BLIZIOTIS I A. The diversity of definitions of multidrug - resistant (MDR) and pandrug - resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Med Microbiol, 2006, 55 (Pt 12): 1619-1629
- [6] LIU Y, CHEN M, ZHAO T, et al. Causative agent distribution and antibiotic therapy assessment among adult patients with community acquired pneumonia in Chinese urban population[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9: 31
- [7] 梁璐, 渠巍, 陈敏. 重症肺炎患儿支气管肺泡灌洗液病毒检测结果分析[J]. 贵阳医学院学报, 2014, 39 (3): 106-408
- [8] AMERICAN THORACIC SOCIETY ; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171: 388-416
- [9] 俞国峰, 严一核, 应利君. ICU肺部感染患者肺泡灌洗液病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国现代医生, 2018, 56(7): 89-92
- [10] 刘远新, 黄亮, 彭娇凤, 等. 湖南省二级妇幼保健机构2014年3288份细菌培养标本病原菌分布及耐药监测[J]. 中国医师杂志, 2015, 17(12): 1855-1857
- [11] 余湛, 王军, 何飞, 等. 2015—2017年重症监护病房患者分离菌监测及耐药性分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2019, 39(8): 1229-1234
- [12] 张保荣, 徐婷, 梅亚宁, 等. 2012~2014年鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 临床与病理杂志, 2015, 35(5): 800-805
- [13] 王黎一, 史利克, 王悦. ICU是多重耐药鲍曼不动杆菌下呼吸道医院感染的高危场所[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(8): 725-731
- [14] TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *K.pneumoniae*: importance of combination therapy [J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(7): 943-950
- [15] 张真, 田磊, 陈中举, 等. 2013—2015年某院患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(6): 516-520
- [16] SIEVERT D M, BOULTON M L, STOLMAN G, et al. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2002, 51: 565-567
- [17] CHAKRABORTY SP, KARMAHAPATRA S, BAL M, et al. Isolation and identification of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* from post operative pus sample [J]. Al Ameen J Med Sci, 2011, 4: 152-168
- [18] THATI V, SHIVANAVAR C T, GADDAD S M. Vancomycin resistance among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from intensive care units of tertiary care hospitals in Hyderabad [J]. Indian J Med Res, 2011, 134: 704-708
- [19] AZIMIAN A, HAVAEI SA, FAZELI H, et al. Genetic characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from the respiratory tract of a patient in a university hospital in northeastern Iran [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50: 3581-3585
- [20] MELO-CRISTINO J, RESINA C, MANUEL V, et al. First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe [J]. Lancet, 2013, 382(9888): 205

[收稿日期] 2019-09-25