

泌尿系感染常见细菌对尿液磷酸铵镁结晶的影响*

李采青, 韩旭颖, 曹 静, 张 伟, 李玉芬, 刘金禄

(河北北方学院附属第一医院微生物科, 河北张家口 075000)

摘要:目的 了解泌尿系感染常见细菌对尿液中磷酸铵镁结晶形成的影响, 为临床积极抗感染治疗, 防止结石形成提供依据。方法 将大肠埃希菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌五种细菌分别配成 0.5 McFarland, 取 10 μ l 菌悬液于 2 ml 新鲜无细菌及其他有形成分的尿液中, 置 35℃ 孵箱培养, 24 h 和 48 h 后用超高倍显微镜对培养液进行观察和对磷酸铵镁结晶计数。25 μ l 菌悬液于 5 ml 新鲜无细菌及其他有形成分的尿液重复进行试验。结果 从无磷酸铵镁结晶培养液观察到磷酸铵镁结晶, 男性形成率高于女性。奇异变形杆菌培养液中磷酸铵镁结晶形成最多, 铜绿假单胞菌次之, 肺炎克雷伯菌第三, 肠球菌在 2 ml 培养液有 1 例形成, 大肠埃希菌在 5 ml 的培养液中有 2 例形成。形成的结晶以未成形羽毛状结晶最多, 立方和方柱状次之, 洋信封状结晶最少。结论 具有尿素酶细菌在尿液中繁殖时容易促进磷酸铵镁结晶形成, 奇异变形杆菌是促进磷酸铵镁结晶形成的重要病原菌之一。

关键词:磷酸铵镁结晶; 细菌; 培养; 尿液

中图分类号: R691.3; R446.12 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2017)02-131-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.036

Study Formation of Ammonium-Magnesium Phosphate Crystals in Urine with Bacteria Growing

LI Cai-qing, HAN Xu-ying, CAO Jing, ZHANG Wei, LI Yu-fen, LIU Jin-lu

(Microbiological Laboratory,

the First Affiliated Hospital, Hebei Northern University, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: Objective To study formation of ammonium-magnesium phosphate crystals in urine with bacteria growing and provide guidance for clinical prevention of urinary calculi. **Methods** Bacterial culture fluid of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus* in urine was examined directly under the ultrahigh sensitive microscope system for ammonium-magnesium phosphate crystals. The number of ammonium-magnesium phosphate crystals was measured when the 24th and the 48th hour. **Results** Ammonium-magnesium phosphate crystals were observed from the culture fluid without ammonium-magnesium phosphate crystals. The rate of male formation was higher than that of female. Ammonium-magnesium phosphate crystals in culture fluid of *Proteus mirabilis* was the highest, *Pseudomonas aeruginosa* was the second, the third was *Klebsiella pneumoniae*, and there was formed 1 case in 2 ml culture fluid of enterococcus, and 2 cases of formation in 5 ml culture fluid of *Escherichia coli*. The crystals formed were the most unformed feather crystals, followed by cubic and square cylinders, and the envelope-like crystals were the least. **Conclusion** Bacteria with urease play a significant role in ammonium-magnesium phosphate crystals formed, *Proteus mirabilis* is the main pathogen.

Keywords: ammonium-magnesium phosphate crystals; bacteria; culture; urine

磷酸铵镁结晶 (ammonium-magnesium phosphate crystals) 是尿沉渣检验中常见结晶之一, 正常或病理情况下均可出现, 是形成感染性结石的基础, 感染性结石是指由于尿液中分解尿素病原体感染泌尿系统使尿液中磷酸盐、碳酸磷灰石、尿酸铵等成分处于过饱和状态, 磷酸铵镁和磷酸钙发生沉淀形成结石。为了解泌尿系感染常见细菌对磷酸铵镁结晶的影响, 将分离自尿液中大肠埃希菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌五种细菌置于无菌无污染尿液中培养后观察磷酸铵镁结晶的形成, 以确定容易促进磷酸铵镁结晶形

成的细菌, 为临床抗感染治疗, 防止感染性结石的形成提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2016 年 9~12 月间来我院就诊的门诊和住院患者, 送检到微生物科超高倍显微镜室的尿液标本; 女性 38 例 (均无磷酸铵镁结晶), 年龄 14~68 岁; 男性 50 例 (其中 2 例是含磷酸铵镁结晶, 编为 1 号、2 号), 年龄 2~78 岁。留取早晨中段尿于无菌容器立即送检。微生物科细菌室分离自尿液的大肠埃希菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌 (美国 B-D 公司 Pho-

* 作者简介: 李采青 (1969-), 女, 大学本科, 副主任技师, 主要从事病原微生物学研究, Tel: 15933138532, E-mail: lcqyffs@163.com。

nex100™全自动细菌鉴定/药敏系统鉴定)。

1.2 仪器与试剂 上海复星公司 ACT2000 超高倍显微成像系统;杭州特种纸业有限公司 pH 精密试纸。美国 B-D 公司 Phonex100™全自动细菌鉴定/药敏系统,美国 B-D 公司 Phonex100™全自动细菌鉴定/药敏系统鉴定板。

1.3 方法

1.3.1 培养:将无菌、无污染、无各种结晶、红细胞、白细胞尿液和含有磷酸铵镁结晶的无菌尿液置于无菌带盖试管中并分为三组,第一组男性和女性尿液各 20 例,每试管加入约 2 ml;第二组有磷酸铵镁结晶的尿液,男性 2 例;第三组无磷酸铵镁结晶的尿液,男性 28 例,女性 18 例,每试管加入约 5 ml,将细菌配制成 0.5McFarland 菌悬液,分别取 10 μ l 不同菌悬液加入第一组和第二组试管中和取 25 μ l 不同菌悬液加入第三组试管中,每份尿液均设立空白对照,放入 35℃ 孵箱中培养 24 h 和 48 h。

1.3.2 镜检和计数:取培养液 20 μ l 于载玻片上,用 24 mm×24 mm 盖玻片压片,用超高倍显微镜观察结晶形态,保存结晶图像。同时对 2 ml 尿液

的培养液用血细胞计数板计数磷酸铵镁结晶数量,每份标本重复 3 次,取平均值。

1.3.3 结晶显微镜判定:磷酸铵镁结晶有很强的折光性,有洋信封状、方柱状、立方形、未成形羽毛状等形态。

2 结果

2.1 培养液 pH 值 对照管中尿液的 pH 值范围为 5.4~7.0,所有奇异变形杆菌培养液 pH 值远远超过 7.0,达到 8.5 甚至 9.0,有磷酸铵镁结晶形成的铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌培养液 pH 值超过 7.0,大肠埃希菌培养液与对照一致。

2.2 第一组、第三组无结晶尿液和细菌混合培养后促进磷酸铵镁结晶形成的细菌和形成例数 24 h 后奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌的菌悬液中可以观察到磷酸铵镁结晶,肠球菌仅有 1 例形成,48 h 后奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌的培养液中观察到的磷酸铵镁结晶例数增多,奇异变形杆菌形成率最高。大肠埃希菌在 5 ml 的培养液中有 2 例观察到结晶。男性培养液中结晶的形成率高于女性。结晶形成例数和时间,见表 1。

表 1 细菌尿液中繁殖后磷酸铵镁结晶的形成例数

| 细菌名称 | 24h | | | | 48 h | | | |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 2 ml | | 5 ml | | 2 ml | | 5 ml | |
| | 男(n=20) | 女(n=20) | 男(n=28) | 女(n=18) | 男(n=20) | 女(n=20) | 男(n=28) | 女(n=18) |
| 大肠埃希菌 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 奇异变形杆菌 | 8 | 3 | 15 | 5 | 10 | 5 | 17 | 7 |
| 铜绿假单胞菌 | 3 | 2 | 4 | 1 | 4 | 3 | 6 | 3 |
| 肺炎克雷伯菌 | 0 | 0 | 1 | 0 | 4 | 1 | 4 | 2 |
| 肠球菌 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |

2.3 第一组无磷酸铵镁结晶的尿液和细菌共同培养后结晶数量(个/ μ l) 24 h 后每份培养液形成的结晶数量范围:奇异变形杆菌 1~7,铜绿假单胞菌 2~6,肺炎克雷伯菌 0~1,肠球菌 0~1;48 h 后每份培养液形成的结晶数量范围:奇异变形杆菌 2~14,铜绿假单胞菌 2~16,肺炎克雷伯菌 1~3,肠球

菌 0~3。

2.4 第二组有磷酸铵镁结晶尿液和细菌共同培养后结晶数量 见表 2。1 号标本中除大肠埃希菌无明显变化,其余四种细菌均有变化,奇异变形杆菌数量增加最多;2 号标本总体数量变化不大,奇异变形杆菌数量增长明显。

表 2 细菌于有磷酸铵镁结晶尿液中繁殖后结晶数量(个/ μ l)

| 标本号 | 对照 | 大肠埃希菌 | 奇异变形杆菌 | 铜绿假单胞菌 | 肺炎克雷伯菌 | 肠球菌 |
|-----|----|-------|--------|--------|--------|-----|
| 1 | 26 | 29 | 149 | 62 | 59 | 50 |
| 2 | 12 | 13 | 21 | 12 | 12 | 16 |

2.5 有和无磷酸铵镁结晶的尿液和细菌共同培养后结晶形态 无磷酸铵镁结晶的尿液和细菌共同培养后培养液中可观察到方柱状、立方形、未成形羽毛状等形态,以未成形羽毛状多见,立方形和方

柱状次之、洋信封状形态结晶最少;同一培养液中可观察到不同形态的磷酸铵镁结晶。48 h 的磷酸铵镁结晶和有磷酸铵镁结晶的尿液和细菌共同培养后培养液中可观察到磷酸铵镁结晶体积变大、

变厚且有聚集现象。形成结晶,见图1~6。

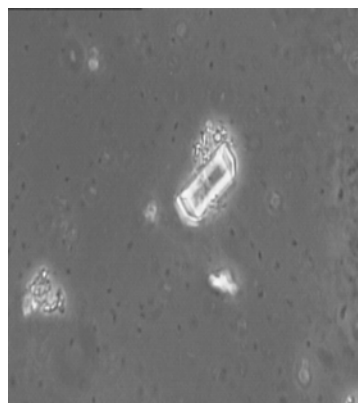


图1 变形杆菌培养液中方柱状结晶

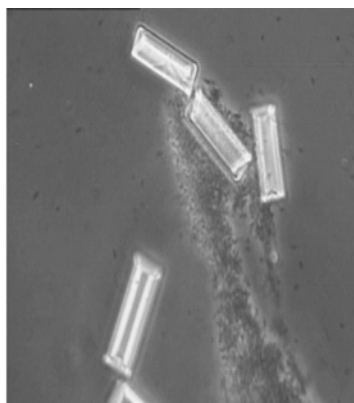


图2 铜绿假单胞菌培养液立方体结晶

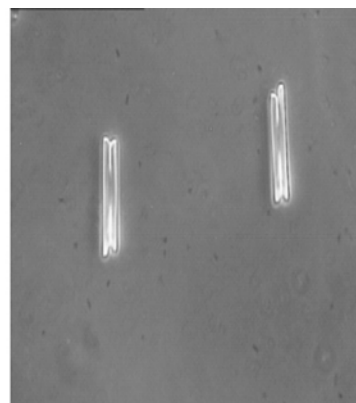


图3 变形杆菌培养液未成形羽毛状结晶

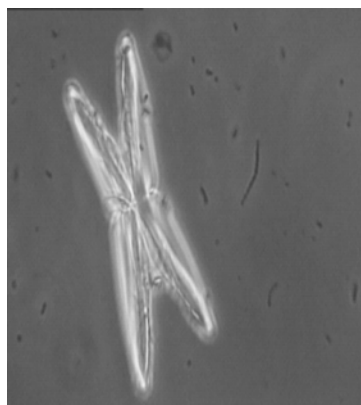


图4 肠球菌培养液未成形羽毛状结晶



图5 肠球菌培养液中未成形羽毛状结晶

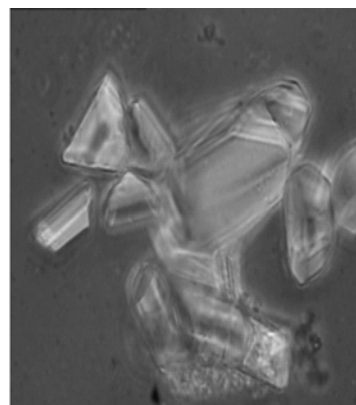


图6 有结晶尿液培养后结晶的聚集现象

3 讨论 正常人尿液包括有机物和无机物的代谢产物,如尿素、氨基酸、肌酐、尿酸等, Na^+ , K^+ , Cl^- , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , SO_4^{2-} 等,有些物质可作为细菌生长所必须的营养物质,正常人新鲜尿液可以用作培养细菌。尿液中磷酸铵镁结石、碳酸磷灰石结石等为感染性结石,尿路感染是其发病原因^[1]。本研究用新鲜的正常人尿液加入分离自尿液的常见细菌,旨在观察哪种细菌生长繁殖时影响感染性磷酸铵镁结晶形成。

本研究对离心后的尿液直接显微镜检验有、无磷酸铵镁结晶存在,然后选择无菌无污染、无其它有形成分及仅有磷酸铵镁结晶的新鲜尿液与泌尿系感染常见大肠埃希菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、肠球菌的五种细菌分别混合培养,观察生成结晶的细菌培养液的共同特点是pH值远超过7.0显示较强碱性,奇异变形杆菌培养液的碱性最强,可达8.5甚至9.0,这是由于奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌三种细菌均有脲酶,有脲酶的细菌能分解尿液中的尿素为

氨和二氧化碳,氨与水结合形成氢离子、铵离子、碳酸离子,铵离子使培养液中pH值增加成碱性。奇异变形杆菌尿素酶比较丰富,因此培养液的碱性更强。大肠埃希菌没有尿素酶不能分解尿液中的尿素产氨,所以pH值不能升高为弱酸性或中性。

对不同细菌培养液进行显微镜检验,镜检观察到无磷酸铵镁结晶的2 ml和5 ml培养液中有结晶的形成,本研究为体外试验,实验显示以尿液为培养基时细菌繁殖生长后两组尿液的培养液48 h男性结晶的形成率高于女性,这种差异可能与女性和男性的饮食生活习惯有关,如女性饮水比较多使尿液稀释进而无机盐浓度降低,影响结晶的形成;或女性使用抗菌药物使得细菌生长受到不完全抑制而尿液达不到足够的碱性等,这种差异是否真实存在还需要增加样本量或检查尿液中无机盐的浓度加以确定。无结晶的两组尿液培养后结晶在最短时间形成和数量最多的是奇异变形杆菌,这是由于变形杆菌含有丰富的尿素酶,可迅速分解尿素产氨,使尿液pH值增高,以利于变形杆菌生长,如此

使尿液短时间成碱性,氨与水结合形成铵离子、碳酸离子,铵与尿中镁离子和磷酸根结合,形成磷酸铵镁结晶以及碳酸磷灰石结晶等进而形成感染性结石,奇异变形杆菌在2~4 h内就可促使磷酸铵镁形成结晶,本研究显示奇异变形杆菌无结晶的尿液组在24,48 h形成阳性率和形成结晶的量,在有结晶组结晶的再生量均高于其它细菌。铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌含有尿素酶,在尿液中生长繁殖时可分解尿素使尿液呈碱性,有利于磷酸铵镁结晶的形成,分解尿素次于奇异变形杆菌,因此结晶的形成率和结晶的量均低于奇异变形杆菌。而大肠埃希菌在第一组生长繁殖后一直未观察到磷酸铵镁结晶,在5 ml尿液培养液中两例男性尿液培养液中有结晶形成,与报道大肠埃希菌是最常见的泌尿系感染致病菌,但只有约1.4%能够产生尿素酶,故大肠埃希菌并不是导致感染性结石的主要致病菌^[2]相一致,说明引起泌尿系感染的奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌等含有尿素酶的细菌在生长繁殖后容易促进结晶的形成,而含有大量尿素酶又容易在碱性环境中生长的奇异变形杆菌更容易促进磷酸铵镁结晶的形成,是引起感染性结石的主要病原菌。碱性尿液环境和感染持续存在时,磷酸铵镁浓度逐渐增加,老年人排尿不畅、长期留置导尿管或尿路任何部位的狭窄、梗阻、憩室都可使尿液滞留,导致晶体或基质在该部位形成沉积,而尿液滞留继发尿路感染有利于结石形成^[3]。肠球菌不含尿素酶,所以在尿液中不是形成磷酸铵镁结晶的主要病原菌。

本研究对新形成结晶图像进行保存和比较,结果显示培养后可见方柱状、立方形、未成形羽毛状、洋信封状等形态,以未成形羽毛状多见,立方形和方柱状次之,洋信封状形态结晶最少,48 h结晶的数量变多、体积变厚而大、结晶显示很饱满、趋于典型的结晶形态,大量结晶时出现结晶的聚集现象。有些尿液培养液中结晶因培养液中无机盐成分有限和时间不足,结晶数量和形态上可能受到制约,结晶形态随时间而无变化。当无机盐持续存在和细菌感染持续的情况下,磷酸铵镁结晶可以不断形成。图6显示有结晶的尿液与细菌混合培养后结晶大量形成后出现聚集现象,在体内当结晶形成没有及时排出体外滞留时,与细菌感染产生脓块、坏死组织等聚集在一起可进一步成为结石核心^[1]。

结晶是尿沉渣检验中常见有形成分之一,显微镜检是明确结晶何种类型的有效方法,当尿常规检验显示尿液pH>7.0,并含大量白细胞、红细胞、细菌及结晶^[4]时,临床更应引起重视,积极进行尿

沉渣显微镜检验,镜检发现有磷酸铵镁结晶存在时,患者可以通过饮食生活习惯加以预防:大量饮水使尿液中盐类饱和度降低、晚饭勿多食、饭后不要短时间就寝、睡前饮水习惯等;感染性结石生长比较快、复发率高、对患者造成痛苦较大,如有尿路感染的存在积极早期进行感染治疗,防止感染性结石的形成。

综上所述,在体外试验中显示尿液的量对磷酸铵镁结晶的形成无影响,当泌尿系存在细菌感染时,由于尿液中无机盐和有机物存在,既利于细菌繁殖,又能给感染性结晶形成提供原料,进而形成感染性结石,奇异变形杆菌在感染性结晶的形成中占有举足轻重的地位,由于变形杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌是引起社区和医院泌尿系感染的主要病原菌^[5],我院的细菌耐药性监测分析显示细菌出现了高耐药性和多重耐药性,因此,当发生尿路感染时,积极进行尿沉渣显微镜检验和细菌培养,明确尿液有形成分、细菌种类和依照药敏结果积极正规抗菌药物治疗,有效地控制感染和防止感染性结石形成。

参考文献:

- [1] 高振利,刘庆祚.泌尿系结石的微创治疗[M].北京:人民卫生出版社,2011:232-239.
Gao ZL, Liu QZ. Minimally invasive treatment of urinary calculi[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011: 232-239.
- [2] Bichler KH, Eipper E, Naber K, et al. Urinary infection stones[J]. J Int Antimicrob Agents, 2002, 19(6): 488-498.
- [3] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:680.
Wu ZD, Wu ZH. Surgery[M]. 7th Ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 680.
- [4] 高逢彬,金讯波,崔子连.泌尿系感染性结石的成因及诊治现状[J].泌尿外科杂志(电子版),2015,7(4): 51-54.
Gao FB, Jin XB, Cui ZL. Causes and current diagnosis and treatment of urinary infection stones[J]. Journal of Urology for Clinicians(Electronic Version), 2015, 7(4): 51-54.
- [5] 李岳西,王华,苍金荣.西安地区社区与医院内尿路感染病原菌分布与耐药状况调查[J].现代检验医学杂志,2013,28(4):141-142.
Li YX, Wang H, Cang JR. Investigation on the distribution and drug resistance of urinary tract infection pathogens in community and hospital of Xi'an[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2013, 28(4): 141-142.