

($P < 0.05$), 而 TSH 差异无统计学意义($P > 0.05$), 由此说明文献参考区间对孕妇 FT₄ 诊治易造成误诊。

新生儿时期先天性甲状腺功能减低症(CH)是新生儿筛查的重要疾病之一, 它常因甲状腺激素合成不足或其受体缺陷所导致^[8]。婴幼儿身体快速生长发育, 出生后新生儿如果甲状腺功能异常可严重影响神经系统及体格的发育。FT₄、TSH 作为先天性甲状腺功能减低症诊断依据, 不但能避免漏诊, 早期诊断, 还可及时补充甲状腺素, 避免造成不可逆的损伤。本研究对新生儿 FT₄、TSH 水平参考区间进行探讨, 结果显示, 本研究新生儿 FT₄ 为 6.84~29.38 pmol/L, TSH 为 0.646~19.242 μ U/L, 新生儿 FT₄、TSH 明显高孕妇, 以及成年人 FT₄、TSH 水平, 以 TSH 尤为突出, 这与较早前文献^[9]报道的结果一致。据文献报道, 新生儿甲状腺激素随年龄增长而降低, 且生后 1 个月内明显高于其他年龄段^[10], 这与本研究结果相一致。应用本实验室参考区间与文献参考区间对研究对象的 FT₄、TSH 结果进行分析, 本实验室 FT₄、TSH 参考区间低于文献参考区间, 二者比较 FT₄ 差异有统计学意义($P < 0.05$); TSH 差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明应用文献参考区间对新生儿 FT₄、TSH 诊治易造成误诊。

本研究以本单位为中心, 参考个体涵盖面不够广泛, 若能进行多单位联合研究, 则能获取更多的客观数据, 降低客观因素的影响, 使参考区间更加客观有效, 更有助于对临床孕妇及新生儿甲状腺疾病的诊治。

参考文献

[1] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 526-527.

• 临床研究 •

- [2] 托马斯, 朱汉民等译. 临床实验诊断学: 实验结果的应用和评估 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 1004-1007.
- [3] Lazarus JH. Thyroid function in pregnancy [J]. Br Med Bull, 2011, 97(2): 137-148.
- [4] 陈桂山, 杨有业, 温冬梅, 等. 临床生化检验项目生物参考区间适用性验证探讨 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(2): 170-174.
- [5] Patel J, Landers K, Li H, et al. Thyroid hormones and fetal neurological development [J]. J Endocrinol, 2011, 209(1): 1-8.
- [6] 康燕. 孕妇甲状腺疾病对胎儿及新生儿的影响 [J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(2): 80-82.
- [7] 范建霞, 宋梦帆. 妊娠期甲状腺功能特异性参考值的意义 [J]. 中华围产医学杂志, 2012, 15(2): 69-72.
- [8] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 中华预防医学会儿童保健分会新生儿疾病筛查学组. 先天性甲状腺功能减低诊疗共识 [J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(6): 421-423.
- [9] 胡亚美. 诸福棠实用儿科学 [M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 101-105.
- [10] Chaler EA, Fiorenzano R, Chileli C, et al. Age-specific thyroid hormone and thyrotropin reference intervals for a pediatric and adolescent population [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(5): 885-890.

(收稿日期: 2016-01-13 修回日期: 2016-03-21)

链球菌溶血素 O 的表达、纯化及生物活性鉴定

陈鸿恩¹, 梁海琦¹, 肖士宾¹, 李富勇²

(1. 江西省赣州市立医院 341000; 2. 宁波美康生物科技股份有限公司, 浙江宁波 315104)

摘要:目的 重组表达链球菌溶血素 O(SLO), 纯化后验证其生物学活性。方法 合成目的基因, 采用聚合酶链反应扩增、酶切连接的方式构建 SLO-pET28a 载体, 经酶切和测序验证后, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 经诱导表达条件优化, 采用镍亲和柱和分子筛纯化 SLO。分别检测重组 SLO 和天然 SLO 对试剂盒校准品的响应情况和与临床样本匹配程度。结果 成功构建了 SLO-pET28a-BL21(DE3) 菌株, 在 OD₆₀₀=0.8 时, 25℃, 0.4 mmol IPTG 诱导, 大于 90% 目的蛋白会可溶性表达。纯化后 SLO 纯度大于 95%。重组的 SLO 与提取的 SLO 对试剂盒校准品的响应相当, 与临床样本的匹配程度一致。结论 重组 SLO 的生物学活性与提取相当, 为检测血清中的抗链球菌溶血素 O 奠定了基础。

关键词:重组链球菌溶血素 O 抗原性; 溶血活性; 表达; 纯化; 生物活性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1556-04

大部分链球菌溶血素 O(SLO)是由 β -溶血型中的 α 组链球菌(GAS)分泌的, 是具有溶血活性的蛋白分子, 相对分子质量约为 68×10^3 , 其溶血活性和抗原性对氧敏感^[1]。抗链球菌溶血素 O(ASO)是常用的诊断感染的标志, 测定的机制是 SLO 和 ASO 的抗原抗体反应, 可以采用 ELISA 或者胶乳比浊等技术手段放大反应的信号, 配以标准品可以定量检测血清中的 ASO^[2-3]。SLO 属于细菌膜穿孔蛋白家族, 由于这个家族绝大多数成员的膜受体都是胆固醇, 所以命名为胆固醇依赖溶细胞毒素家族(CDCs)。CDCs 中多数蛋白对氧非常敏感, 其功能活性是依靠还原剂而存在。国内医学微生物学教材解释 SLO 对分子氧敏感, 是因为在氧化时 SLO 可形成链内二硫键。但 SLO 肽链内只有 1 个半胱氨酸残基(Cys, C), 有的 CDC 甚至 1

个 Cys 也没有, 根本不可能形成链内二硫键。同时说明 SLO 对氧敏感与二硫键无关。SLO 的获得一般有两种途径: (1) 用含有 1% 葡萄糖的 Todd-Howitt 肉汤培养 GAS^[4]。该方法培养提取的 SLO 虽然活性及抗原性好, 但是产量低, 提纯方法较复杂, 且有链球菌感染的风险, 现较少使用。 (2) 通过重组表达。该蛋白为原核蛋白, 故可以采用大肠杆菌表达, 该技术成熟简便、产量高、加入标签后易纯化^[5]。本研究即利用 pET 系统表达重组 SLO, 通过优化诱导表达条件, 减少原核表达包涵体蛋白比例。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞 TOP10、BL21(DE3)感受态和 pET28a

质粒由宁波美康生物科技股份有限公司实验室保存。

1.1.2 主要试剂 抗 SLO 检测试剂盒及其校准品购于宁波美康生物科技股份有限公司;天然的 SLO 购于武汉华美生物有限公司;限制性内切核酸酶 Nco I 和 Xho I、T4 DNA 连接酶、ExTaq DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司;SLO 基因及 PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒等购自上海拜力生物科技有限公司;Ni-Hp 亲和填料和 Sephadex G-50 凝胶购自 GE 公司;羊抗人 IgG-HRP 购于博奥森生物有限公司;其他试剂和药品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 SLO 基因序列转译成大肠杆菌偏好的密码序列,并对优化后的基因序列设计引物。在引物上、下游分别引入 Nco I、Xho I 酶切位点和保护碱基。引物序列(斜体序列为酶切位点):上游引物 5'-CAT GCC ATG GGC CTT GCT CCC AAA GAA ATG CC-3';下游引物 5'-CGC CT CGA GCT TAT AAG TAA TCG-3'。

1.2.2 表达载体 SLO-pET28a 的构建 首先以 SLO-PUC57 质粒为模版扩增目的片段。PCR 扩增体系为:灭菌双蒸水 136 μ L, 5 $\times$ PCR 缓冲液 40 μ L, dNTPs 16 μ L, SLO-PUC57 (0.2 ng/ μ L) 2 μ L, 上游引物 (25 mmol) 2 μ L, 下游引物 (25 mmol) 2 μ L, ExTaq DNA 聚合酶 2 μ L 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定结果。然后 PCR 扩增所得 SLO 基因片段经胶回收后,用 Nco I 和 Xho I 双酶切,与经过同样双酶切的 pET-28a 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物转化 TOP10 感受态,提取其质粒双酶切鉴定和测序。

1.2.3 SLO 表达及可溶性分析 提取鉴定正确的 SLO-pET28a 质粒转化至表达型菌株 BL21(DE3)感受态中,挑取单菌落接种至 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 12 h 活化菌种后,按 1% 的比例接种于新鲜的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养至 OD600 为 0.8 左右时,加入终浓度 0.4 mmol 的 IPTG,25 $^{\circ}$ C 诱导 8 h,离心收集菌体。取 1 g 菌体,加入 10 mL PBS,超声破碎后,离心分离上清和沉淀。取诱导培养前的菌体和诱导后菌体、破碎后上清和沉淀进行 12%SDS-PAGE 分析。

1.2.4 SLO 的纯化 采用 Ni-Hp 进行纯化,以 20 mmol Tris-HCl,0.5 mol NaCl,50 mmol 咪唑为平衡液,经过梯度洗脱测试,采用 20 mmol Tris-HCl,0.5 mol NaCl,300 mmol 咪唑一步洗脱,根据 280 nm 处的紫外吸收值收集穿出和洗脱。之后将 20 mmol Tris-HCl,0.5 mol NaCl,300 mmol 洗脱液上样至 20 mmol Tris-HCl,0.5 mol NaCl 平衡的 Sephadex G-50 脱掉咪唑。

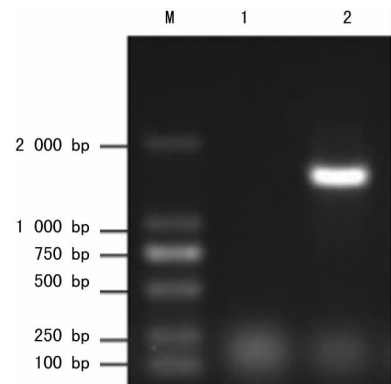
1.2.5 SLO 的生物学鉴定 (1)Western Blot 验证 SLO 与血清中 ASO 的相互作用将纯化后的 SLO 和商业 SLO 各 5 μ g 一同做 12%SDS-PAGE,然后转移至 PVDF 膜上,5%的脱脂奶粉封闭 1.5 h,ASO 试剂盒检测值为 185 U/mL 用 5%的脱脂奶粉稀释 1 000 倍,室温孵育 1 h 后,换成 1:2 000 稀释的羊抗人 IgG-HRP 室温孵育 1 h,去处膜清洗后加入显色液,判断其与血清中 ASO 的匹配关系。(2)ELISA 检测 SLO 与 ASO 校准品的相互作用将纯化后的 SLO 和商业 SLO 用包被液稀释至 1 μ g/mL,每孔 100 μ L 加至酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,后 3% BSA 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜。用 3% BSA 稀释 ASO 试剂盒的校准品,获得终浓度为 4 U/mL 的样品,之后等倍稀释,并依次分别加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,换成 1:2 000 稀释的羊抗人 IgG-HRP,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TMB 显色 1 min 后 2 mol H₂SO₄ 终

止显色,酶标仪 450 nm 处读数,判断重组 SLO 与校准品的匹配关系。此试验做 3 组复孔。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,组间计量资料比较采用成组设计 *t* 检验,组间计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

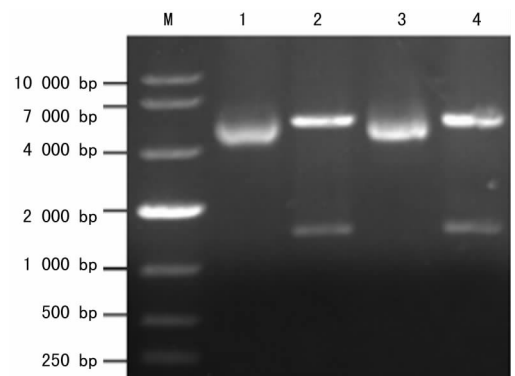
2 结果

2.1 重组克隆载体的构建鉴定 PCR 扩增出的片段大约在 1 600 bp 左右,与预期的大小相符,没有其他非特异的条带(图 1a);从转化的 TOP10 中提取质粒,送样测序,结果与 PUC57 中的目的序列一致,经 Nco I 和 Xho I 双酶切鉴定,切出约 1 600 bp 左右的片段,与目的片段大小相当(图 1b)。



注:M 为 DNA Marker;1 为无模板的对照;2 为扩增的 SLO。

图 1a 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增 SLO 基因



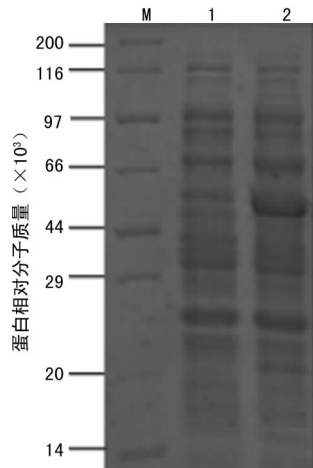
注:M 为 DNA Marker;1 和 3 为 SLO-pET28a;2 和 4 为 Nco I 和 Xho I 双酶切 SLO-pET28a。

图 1b 琼脂糖凝胶电泳检测酶切 SLO-pET28a

2.2 SLO 的诱导表达和可溶性分析 转化得到 SLO-pET28a-BL21(DE3)经过诱导温度和诱导剂浓度优化,可表达相对分子质量约为 60×10^3 的蛋白,目的蛋白约占总蛋白的 30%(图 2a),并且 90% 以上为可溶表达(图 2b)。

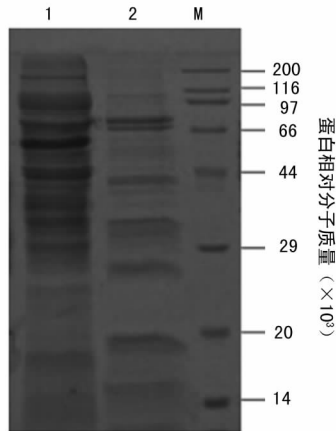
2.3 重组 SLO 的分离纯化 离心收集菌体、超声破碎后用 Ni-Hp 纯化,低浓度咪唑洗杂后,用高浓度咪唑洗脱得到纯度约为 95% 的 SLO(图 3),后用 Sephadex G-50 脱掉咪唑,最终产量约为 12 mg/g 菌体。

2.4 重组 SLO 的生物学鉴定 以试剂盒检测的含 ASO 的血清为一抗,用 Western Blot 验证重组的 SLO 与血清中 ASO 反应能力,显色曝光(图 4a),结果显示,重组 SLO 与血清的 ASO 反应能力较强,且与天然 SLO 相当。以 ASO 校准品为一抗,用 ELISA 验证 SLO 的抗原性,通过作图比较,重组的 SLO 与 ASO 反应能力较好,且与天然 SLO 相当(图 4b)。以校准品 ASO 浓度为横坐标,复孔吸光度均值为纵坐标,STDEV 为偏差,作图比较,二者吸光度差异无统计学意义($P > 0.05$)。



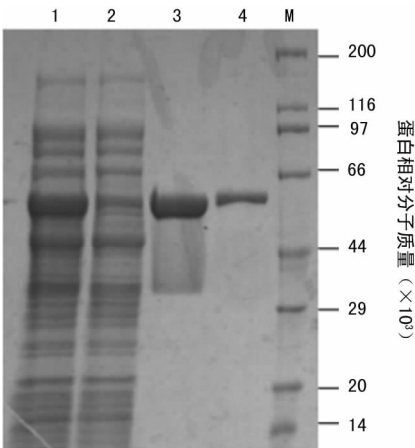
注:M 为蛋白 Marker;1 为诱导前全菌体蛋白;2 为诱导后全菌体蛋白。

图 2a SDS-PAGE 分析 SLO-pET28a-BL21(DE3) 的诱导表达



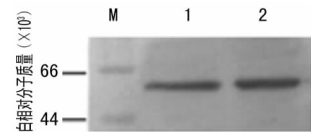
注:M 为蛋白 Marker;1 为超声破碎后上清;2 为超声破碎后沉淀。

图 2b 目的蛋白的可溶性分析



注:M 为蛋白 Marker;1 为超声破碎后上清;2 为经 Ni-Hp 柱的穿出;3 为收集的洗脱蛋白;4 为外购天然 SLO。

图 3 Ni-Hp 纯化 SLO



注:M 为部分蛋白 Marker;1 为重组的 SLO;2 为外购天然 SLO。

图 4a Western Blot 验证重组的 SLO 与血清中 ASO 反应

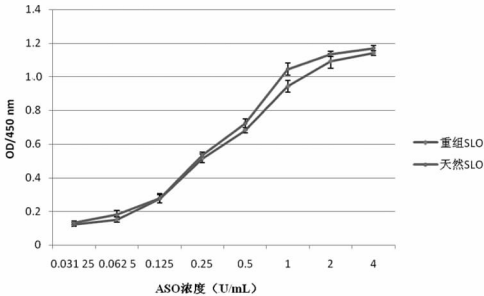


图 4b ELISA 验证重组的 SLO 与 ASO 校准品反应

3 讨论

SLO 是 A 群链球菌的代谢产物之一,因为在临床检测中的重要应用,SLO 也受到了越来越多的关注^[6]。该蛋白的全长有 571 个氨基酸,其中包括信号肽在内的 1~77 氨基酸与 SLO 的溶血活性和抗原性不相关,并且对宿主细胞有毒害作用^[7]。Bhakdi 等^[8]在链球菌中提取出相对分子质量为 68×10^3 和 57×10^3 的 SLO,并且均有同等的溶血活性。所以本研究选择表达 SLO 的 78~571 氨基酸片段,理论相对分子质量约为 57×10^3 。虽然原核表达缺乏翻译后的蛋白修饰加工系统,但是对于原核来源的蛋白质,采用大肠杆菌表达,却是不错的选择,真核表达可能会导致过度糖基化^[9]。为了利于纯化,且不大幅度影响蛋白的结构功能,本研究在蛋白的 N 端加入了 $6 \times \text{His}$ 。

作为鉴定抗原抗体反应的手段,ELISA 综合表现更为全面,在有校准品对照时,若使用的抗体均识别抗原上的特定位点,可以做成灵敏的定量方法,市场上有单抗夹心定量抗原的试剂盒。WB 抗原纯度较低且没有夹心抗体能展现其优势,在应用于科研方面,图片结果更能被接受,WB 被广泛采用^[10]。在半定量细胞蛋白时,不需要纯化该蛋白,仅需一种一抗即可。

为了确认重组 SLO 能否作为试剂盒的原料应用于临床检验,购买了市场上应用良好的 ASO 胶乳比浊试剂盒,以获取浓度较为准确的 ASO 校准品和 ASO 血清样本。以天然 SLO 为对照,用重组抗原去匹配试剂盒的校准品和该试剂盒检测的血清,分别采用 ELISA 和 WB 去验证。全面认证了重组 SLO 对校准品和血清 ASO 的响应。

总之,本研究成功构建了 SLO 原核表达菌株,经过表达条件的优化,实现了可溶性表达。亲和纯化后得到了高纯度的目的蛋白,之后通过验证重组 SLO 与 ASO 校准品和 ASO 血清样本,确认他们有良好的结合能力,为该蛋白在诊断试剂中的应用做好了铺垫。

参考文献

[1] Keyel PA, Roth R, Yokoyama WM, et al. Reduction of streptolysin O (SLO) pore-forming activity enhances inflammasome activation [J]. Toxins (Basel), 2013, 5 (6): 1105-1118.

[2] Pozzi M, Pellegrino P, Carnovale C, et al. On the connection between autoimmunity, tic disorders and obsessive-compulsive disorders: a meta-analysis on anti-streptolysin O titres [J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2014, 9 (5): 606-614.

[3] Ota H, Sato A, Matsumoto H, et al. Immunological analysis of pseudo-positive reaction in healthy adults at anti-streptolysin O measurement by latex agglutination method [J]. Rinsho Byori, 2005, 53 (4): 279-283.

[4] 曹之舫,武建国. 链球菌溶血素 O 的研究进展 [J]. 国外

- 医学微生物学分册,1988,11(5):208-211.
- [5] Velazquez B, Massaldi H, Battistoni J, et al. Construction and expression of recombinant streptolysin-o and preevaluation of its use in immunoassays [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(5): 683-684.
- [6] Oh SH, Lee KY, Lee JH, et al. Clinical manifestations associated with high titer of anti-streptolysin O in Behcet's disease [J]. Clin Rheumatol, 2008, 27(8): 999-1003.
- [7] Pinkney M, Kapur V, Smith J, et al. Different forms of streptolysin O produced by Streptococcus pyogenes and by Escherichia coli expressing recombinant toxin; cleavage by streptococcal cysteine protease [J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2776-2779.
- 临床研究 •
- [8] Bhakdi S, Roth M, Szegoleit A, et al. Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O [J]. Infect Immun, 1984, 46(2): 394-400.
- [9] Vogl T, Hartner FS, Glieder A. New opportunities by synthetic biology for biopharmaceutical production in Pichia pastoris [J]. Curr Opin Biotechnol, 2013, 24(6): 1094-1101.
- [10] Mielenz M, Mielenz B, Singh SP, et al. Development, validation, and pilot application of a semiquantitative Western blot analysis and an ELISA for bovine adiponectin [J]. Domest Anim Endocrinol, 2013, 44(3): 121-130.
- (收稿日期:2016-01-13 修回日期:2016-02-23)

痰标本分析前涂片镜检的临床价值分析

张 肖, 朱同华, 沈国荣

(江苏省苏州市吴江区第一人民医院 215200)

摘 要:目的 对 634 例痰标本进行分析前涂片革兰染色镜检的结果与其培养结果进行比较,了解痰培养标本分析前涂片镜检的临床价值。方法 收集 634 例痰标本,肉眼观察痰标本分析前的性状、颜色等,然后进行涂片、革兰染色、镜检,根据涂片镜检结果,将痰标本分为 A、B、C 三大类。同时对上述痰培养标本进行培养鉴定,分析比较镜检结果与细菌检出率的关系。结果 634 例痰培养标本中,涂片结果合格标本 495 例,占 78.08%;不合格标本 139 例,占 21.92%。共检出 457 株细菌。在 495 例涂片结果合格的标本中,检出 408 株细菌,细菌检出率为 82.42%,合格痰培养标本涂片结果与培养结果的符合率为 71.72%。在 139 例涂片结果不合格的标本中,检出 49 株细菌,检出率为 35.25%。肉眼观察痰培养标本分析前的性状,黏性、血性和脓性痰的合格率和细菌检出率明显高于水样或泡沫样痰;在不同颜色痰标本中,无色痰的合格率和细菌检出率低于其他颜色的痰标本。结论 痰培养标本分析前做涂片革兰染色镜检可以筛选不合格的痰标本,提高痰培养的细菌检出率,对检验结果的正确与否具有重要价值。

关键词:分析前; 痰涂片; 痰颜色; 痰性状; 痰培养

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.11.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)11-1559-03

急、慢性下呼吸道感染、社区获得性感染及医院获得性感染临床各科住院患者呼吸系统感染的常见病,因此对痰液进行培养及药物敏感度试验具有重要临床意义。痰标本留取质量直接关系到细菌培养的准确性,痰培养前做涂片镜检评价其质量,是保证标本高质量的一个重要环节,只有符合标准的痰标本才能进一步培养鉴定。如何把好痰标本质量关是培养前的重要问题。在临床工作中收集的痰标本很多是不合格的,结果会导致培养不出细菌或即使培养出细菌也是口腔或咽部的正常菌群,这会导致临床误诊及抗菌药物滥用。本研究对 634 例痰标本在分析前进行涂片、染色镜检,根据上皮细胞及白细胞数量,对痰标本的质量进行评价,加强细菌培养的质量控制,并与分离培养结果进行对比分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2015 年 1 月 1 日至 8 月 20 日来本院住院患者的 634 例痰培养标本。

1.2 仪器与试剂 血平板、巧克力平板、中国蓝平板和沙保罗平板,快速革兰染色液为珠海贝索生物技术有限公司产品。Siemens MicroScan WalkAway96plus 全自动微生物鉴定仪及法国生物梅里埃公司 API 细菌鉴定系统,细菌药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品。

1.3 方法

1.3.1 涂片染色镜检 用无菌棉签挑取脓性、血性、黏性痰液制成薄而均匀的涂片,自然干燥后革兰染色镜检。低倍镜下观察白细胞和上皮细胞数目,依据《临床微生物检验标准化操作》

第 2 版^[1],按照 A、B、C 三分类的标准对痰标本进行分类,A、B 为合格,适合做培养,C 为不合格,不适合做培养。

1.3.2 分离培养 将痰标本中加入等量的 1%胰酶溶液,使痰液均质化后备用。处理后接种于血平板、巧克力平板、中国蓝平板和沙保罗平板,置 5%~10%CO₂ 环境中,35℃培养 18~24 h,细菌培养阳性用 Siemens MicroScan WalkAway96plus 全自动微生物鉴定仪进行鉴定和药物敏感试验。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,计数资料以 $n(\%)$ 表示,各组间率的比较采用 χ^2 检验,配对资料比较采用配对 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痰培养标本的合格率 见表 1、2。收集 634 例痰培养标本,依据痰标本 A、B、C 三分类标准,合格的痰培养标本 495 例,合格率为 78.08%,包括 A 类 260 例,占总数的 41.01%,B 类 235 例,占总数的 37.07%,不合格的 C 类 139 例,占总数的 21.92%。痰培养标本涂片前对其状和颜色进行肉眼观察,水或泡沫样痰标本的合格率明显低于其他性状痰标本,差异有统计学意义($P<0.05$)。无色的痰标本合格率也同样低于其他颜色的痰标本,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 痰培养标本的细菌检出率

2.2.1 A、B、C 三分类痰标本细菌检出率 见表 3。634 例痰培养标本有 457 例标本检出有细菌(排除草绿色链球菌、奈瑟菌等口腔正常菌群),阳性检出率为 72.08%,合格标本检出率为 82.42%(408/495),不合格标本检出率为 35.25%(49/