

## • 研究报告 •

## 应用聚合酶链反应技术检测重症感染患者血中细菌 DNA 的临床评价

魏宏建 赵有成 段勇 刘华

【关键词】 感染; 聚合酶链反应; 细菌 16SrRNA 基因

重症感染病死率高,目前其临床确诊主要依据细菌学培养,而现行的血培养阳性率较低。本研究拟探讨采用规范的聚合酶链反应(PCR)技术,从基因水平直接检测细菌 16SrRNA 基因<sup>[1]</sup>,为感染的准确诊断提供依据。

## 1 资料与方法

1.1 研究对象:重症感染组 40 例均为本院住院患者,其中男 22 例,女 18 例;年龄 19~83 岁,平均(49.18±6.26)岁。感染性休克 15 例,肺炎 10 例,胆道感染 10 例,伤口感染 5 例。均符合以下条件:①急性生理学和慢性健康状况评分系统 I (APACHE I) > 12 分。②符合美国胸科医师学会/危重病医学会共同制定的脓毒症诊断标准<sup>[2]</sup>。正常对照组为随机留取的 30 例正常体检者血标本,其中男 19 例,女 11 例;年龄 22~57 岁,平均(47.32±5.32)岁。

1.2 实验方法:用 BacT Alert 120 型全自动培养仪进行血培养。取待测血浆,用 20 g/L 蛋白酶 K 和质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠(SDS)将细菌破壁,酚/氯仿/异戊醇萃取,异丙醇沉淀和体积分数为 70% 的乙醇洗涤,将沉淀物重溶于磷酸盐缓冲液(TE)缓冲液中作为 DNA 模板备用。细菌 16SrRNA 基因通用引物根据文献<sup>[3]</sup>方法合成(上海生工生物工程公司),序列如下:引物 1:5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3',所在基因位置为 8~27;引物 2:5'-GGTT-ACCTTGTTACGACTT-3',所在基因位置为 1510~1492。PCR 循环条件:预变性 95 °C, 5 min; 94 °C, 40 s; 56 °C, 40 s; 72 °C, 延伸 2 min, 循环 40 次。最后 72 °C, 5 min 以使反应充分。提取 DNA

基金项目:云南省卫生厅应用基础研究基金资助(99M006)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院 ICU(魏宏建,赵有成);检验科(段勇,刘华)

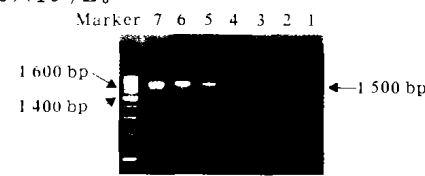
作者简介:魏宏建(1957-),女(汉族),河北省唐县人,教授,硕士研究生导师,云南省危重病学会副主任委员。

及 PCR 扩增,均以双蒸水作为空白对照,以大肠杆菌为阳性对照,以正常人的标本作为阴性对照。

1.3 统计学处理:用 PCR 法扩增细菌 16SrRNA 基因和血细菌培养,结果用阴性、阳性表示。采用 SPSS for Windows 10.0 统计软件包对数据进行配对  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

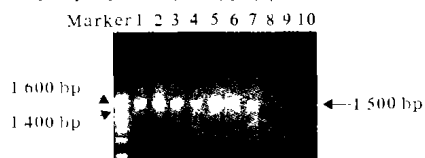
2.1 细菌 DNA 提取和基因 PCR 扩增的敏感性(图 1):采用倍比稀释法,以无菌去离子水将标准大肠杆菌悬液稀释到相应浓度进行细菌 DNA 提取和基因扩增。结果显示,大肠杆菌的最小检测量为  $5 \times 10^6$  /L。



注:1:  $5 \times 10^4$  /L; 2:  $5 \times 10^5$  /L; 3:  $5 \times 10^6$  /L; 4:  $5 \times 10^7$  /L; 5:  $5 \times 10^8$  /L; 6:  $5 \times 10^9$  /L; 7:  $5 \times 10^{10}$  /L

图 1 大肠杆菌 DNA 提取和 16SrRNA 基因扩增的敏感性

2.2 通用引物扩增细菌 16SrRNA 基因的特异性(图 2):7 种细菌 16SrRNA 基因均获得扩增产物,经电泳在相当于 1500 bp 区域均可见相应的一条 DNA 带。扩增白色念珠菌、人乳头瘤病毒和对照的双蒸水,均未见特异性条带。



注:1:大肠杆菌;2:金黄色葡萄球菌;3:伤寒杆菌;4:淋菌、奈瑟菌;5:铜绿假单胞菌;6:乙型溶血性链球菌;7:结核分枝杆菌;8:白色念珠菌;9:人类乳头瘤病毒;10:双蒸水

图 2 通用引物扩增细菌 16SrRNA 基因的特异性

2.3 重症感染组患者 PCR 扩增细菌 16SrRNA 基因与血细菌培养结果:40 例重症感染患者中,13 例出现一条 DNA

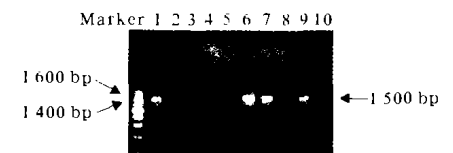
带,其中 6 例血培养结果为阳性,另 7 例患者均为阴性;27 例未出现 DNA 带。由表 1 可见,重症感染组 PCR 阳性率明显高于血培养阳性率( $P < 0.01$ ),PCR 方法较现行血培养方法敏感。PCR 阳性率为 32.5%,而血培养为 15.0%。由图 3 可看出,阳性对照和患者 6、7、9 均在约 1500 bp 处出现一条 DNA 条带,阴性对照、空白对照和患者 4、5、8、10 均未出现 DNA 条带。

表 1 PCR 与血培养方法比较 例

PCR 结果	血培养法(+)	血培养法(-)	合计
PCR(+)	6	7	13
PCR(-)	0	27	27
合计	6	34	40

注:连续校正  $\chi^2$  检验,  $\chi^2 = 11.264$ ;

$P = 0.001$



注:1:阳性对照(已知的大肠杆菌);2:阴性对照;3:空白对照;4~10:重症合并感染患者血标本

图 3 重症感染组部分患者血细菌 DNA 扩增产物电泳图

2.4 30 例正常人血标本细菌 DNA 提取和基因产物扩增结果均为阴性。

## 3 讨论

rRNA 基因对所有生物的生存都必不可少,并在细菌及其他微生物领域的进化过程中和功能上高度保守<sup>[4]</sup>。细菌 rRNA 按沉降系数分为 5S、16S 和 23S 3 种,而 16SrRNA 基因是细菌染色体上编码 rRNA 相对应的 DNA 系列,除存在于所有细菌外,也存在于衣原体、立克次体、支原体、螺旋体等原核生物中,但不存在于非原核生物如病毒、真菌的体内。该基因的内部结构由保守区及可变区两个部分组成,保守区为所有细菌所共同拥有,细菌之间无明显差别。由于 16SrRNA 基因具有高度保守性,其核苷酸片段长度适宜<sup>[5]</sup>。基于这一特性,在其保守区设计一对引物,成为通用引物,可

用于检测所有细菌。

尚士强等<sup>[6]</sup>在细菌 16SrRNA 基因保守区设计了一对通用引物,对 20 种不同细菌的标准菌株进行 PCR 扩增,均获得 371 bp 片段,与病毒和人的基因组 DNA 无交叉反应。这与本实验的结果相似。我们根据文献报道<sup>[3]</sup>合成一对细菌通用引物,对 7 种细菌进行扩增,结果显示,均获得了大约 1 500 bp 的 DNA 片段,而病毒和真菌 DNA 未被扩增,可见该引物具有较高的特异性。对 40 例重症感染患者血标本的细菌 16SrRNA 基因 PCR 扩增结果显示,有 13 例获得了大约 1 500 bp 的 DNA 片段,出现 PCR 阳性结果,而血培养仅 6 例为阳性,该 6 例血标本 PCR 全部为阳性。临床上许多脓毒症患者具有典型的脓毒症临床表现,但血培养却为阴性<sup>[7]</sup>,应用 PCR 方法可弥补现行细菌学检验的不足。

PCR 法检测细菌 16SrRNA 基因与细菌培养法比较,其具有速度快、敏感性高的特点。临床常规血培养法要求培养 8 h 以上,98% 以上阳性报告需要 3 d,生长缓慢的细菌则需要更长时间。而 PCR 法检测细菌 16SrRNA 基因只需 6 h 左右,时间明显缩短。

血培养法可检出的最低细菌浓度为  $1 \times 10^8/L$ <sup>[8]</sup>,而本研究中 PCR 法检测的最低细菌浓度为  $5 \times 10^6/L$ ,敏感性显著高于血培养法。在本研究中,细菌的血培养检出率为 15.0%,而 PCR 的检出率为 32.5%,且即使对于正在使用抗生素

治疗的患者,也具有识别细菌特异性 DNA 的能力<sup>[9,10]</sup>。用 PCR 方法检测临床危重患者肠缺血-再灌注损伤所导致的细菌移位,其血中细菌成分比血培养更敏感。因此可以认为,PCR 方法可作为一种诊断全身感染和(或)来自肠道细菌迁移的方法<sup>[11-13]</sup>。

#### 参考文献:

- 1 Dees P M, Ghiorse W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA [J]. FEMS Microbiol Eco, 2001, 35: 207-216.
- 2 Members of the ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference; definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. Crit Care Med, 1992, 20: 864-874.
- 3 Eden P A, Schmidt T M, Blakemore R P, et al. Phylogenetic analysis of Aquaspirillum magnetotacticum using polymerase chain reaction-amplified 16SrRNA-specific DNA [J]. Int J Syst Bacteriol, 1991, 41: 324-325.
- 4 Hoshina S, Machida K. Diagnostic microbiology of DNA in septicemia [J]. Rinsho Byori, 1996, 44: 314-321.
- 5 Nickel J C, Downey J, Johnston B, et al. Predictors of patient response to antibiotic therapy for the chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a prospective multicenter clinical trial [J]. J Urol, 2001, 165: 1539-1544.
- 6 尚士强, 洪文澜, 俞惠民, 等. 16SrRNA 基

因 PCR 反相杂交技术检测细菌 DNA [J]. 中华传染病杂志, 1999, 17: 30-32.

- 7 陈灏珠, 主编. 实用内科学 [M]. 第 10 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 488-495.
- 8 Leonard J, Lascolea J R, Drya D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance [J]. J Clin Microbiol, 1984, 19: 87-90.
- 9 Isaacman D J, Zhang Y, Rydquist W, et al. Identification of a patient with Streptococcus pneumoniae bacteremia and meningitis by the polymerase chain reaction (PCR) [J]. Mol Cell Probes, 1995, 9: 157-160.
- 10 Ley B E, Linton C J, Bennett D M, et al. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16SrRNA gene amplification by polymerase chain reaction [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998, 17: 247-253.
- 11 Kane T D, Alexander J W, Johannigman J A. The detection of microbial DNA in the blood; a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients [J]. Ann Surg, 1998, 227: 1-9.
- 12 Kucukaydin M, Kocaoglu C, Koksai F. Detection of intestinal bacterial translocation in subclinical ischemia-reperfusion using the polymerase chain reaction technique [J]. J Pediatr Surg, 2000, 35: 41-43.
- 13 邱海波, 刘大为. 《2004 严重感染和感染性休克治疗指南》系列讲座 (1) 2004 严重感染和感染性休克治疗指南概要 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 390-393.

(收稿日期: 2004-09-17)

修回日期: 2005-04-02)

(本文编辑: 郭方)

## • 启事 •

### 关于召开“全国内科危重病医学学术交流会”的征文通知 暨“全国内科危重病医学新进展高级学习班”的报名通知

中华医学会继续教育部决定于 2005 年 6 月 18-22 日在重庆市召开“全国内科危重病医学学术交流会”暨“全国内科危重病医学新进展高级学习班”。其中 2005 年 6 月 17 日为报到日期。会议期间举办高级学习班,将邀请胡大一、王一镗、刘大为、景炳文、孙宁玲等专家进行以下讲座:急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 进展,危重病与机械通气,心肺脑复苏进展,抗菌药物的合理应用,细菌耐药与药物选择,危重病监测,休克、多器官功能障碍综合征 (MODS) 有关进展,器官功能支持,各类中毒的诊疗进展,心脑血管、呼吸、消化、神经、内分泌系统等危重病的热点难点问题等。参会者授予 I 类继续教育学分。现将有关事宜通知如下:

**1 征文内容:**内科各专科急危重病的研究、诊断与治疗,心肺脑复苏,重症监护,感染、休克及各类中毒诊疗,营养支持,抗菌药物合理应用,ARDS、MODS 的救治,内窥镜、影像学及介入治疗,新技术、新业务应用及其他与急危重病有关的内容。征文可以是论著、经验总结、病案报道等形式。

**2 征文要求:**全文 3 000 字以内并附 600 字左右摘要 1 份,或只寄大摘要 1 份,征文请打印,题目下注明省、市、工作单位、科室、姓名及邮编。

**3 来稿请寄:**100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“内科危重病会议”梁鸿同志收。Email: cbcmc@public3.bta.net.cn, Email 发稿时务必注明会议名称。征文截止日期: 2005 年 5 月 18 日 (以当地邮戳为准), 学习班报名截止日期: 2005 年 5 月 28 日。请通过邮局寄审稿费 20 元/篇, 汇款单上请注明会议名称。

联系人及电话: 杨桂芳, 010-88283858, 88285961 (传真); 梁鸿, 010-65249989-1701。

(中华医学会继续教育部)