

严重多发伤后肠道细菌移位的临床研究

乔治 黎沾良 李基业 林洪远 邓群 陆连荣 吕艺 黎君友

【摘要】 目的 研究严重多发伤患者伤后肠道细菌移位发生情况及其与感染并发症和脓毒症的关系。**方法** 选择外科重症监护治疗病房(SICU)收治的严重多发伤患者 16 例[创伤严重程度评分(ISS) > 20 分], 分别于伤后 2、24 和 48 h 采集外周血, 利用聚合酶链反应(PCR)技术检测全血中细菌 DNA, 进行血细菌培养, 检测血浆 D-乳酸及脂多糖(LPS)水平。所有患者均观察 30 d 以监测感染并发症。检测 63 例择期手术患者术前血 D-乳酸和 LPS 水平作为对照。**结果** 严重多发伤后 2 h 即可从血中检测出细菌 DNA, 共有 10 例患者细菌 DNA 检测 PCR 阳性(62.50%)。PCR 阳性者脓毒症发病率为 100.00%, PCR 阴性者为 0, 差异有显著性($P < 0.01$)。脓毒症患者 PCR 阳性率为 100.00%, 无脓毒症患者 PCR 阳性率为 0, 差异有显著性($P < 0.01$)。脓毒症患者中 70.00% 发现有明确部位的感染并发症, 无脓毒症患者为 0, 差异有显著性($P < 0.05$)。发现感染灶的患者全部 PCR 阳性。血细菌培养阳性率 18.75%, 显著低于 PCR 阳性率(62.50%, $P < 0.01$)。所有 PCR 阳性结果中大肠杆菌 DNA 阳性率占 70.00%(7/10 例)。所有患者血浆 D-乳酸及 LPS 含量均明显升高, 且二者呈显著正相关($r = 0.94, P < 0.01$)。**结论** 严重多发伤后早期(伤后 2 h)即可发生肠道细菌移位, 以大肠杆菌为主。PCR 方法检测血中细菌 DNA 能准确反映肠道细菌移位并预告感染和脓毒症的发生。

【关键词】 多发伤; 肠道细菌移位; 聚合酶链反应; 脓毒症

Clinical study on bacterial translocation in severe multiple trauma patients QIAO Zhi, LI Zhan-liang, LI Ji-ye, LIN Hong-yuan, DENG Qun, LU Lian-rong, LÜ Yi, LI Jun-you. First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (Formerly 304th Hospital), Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate bacterial translocation in severe multiple trauma patients using polymerase chain reaction (PCR) to detect the presence of bacteria in the blood. **Methods** Sixteen severe multiple trauma patients [injury severity score (ISS) > 20] in surgery intensive care unit (SICU) were selected. Blood samples were collected 2, 24 and 48 hours after trauma for bacterial culture and microbial DNA detection. Meanwhile, plasma levels of D-lactate and lipopolysaccharide (LPS) in systemic circulation were determined. PCR was performed after DNA extraction, with target β -lactosidase gene of *E. coli* and 16SrRNA gene of most pathogenic bacteria. All patients were observed within 30 days for infectious complications. D-lactate and LPS levels were determined in 63 patients before selective operation. **Results** Microbial DNA could be detected in blood as early as 2 hours following severe trauma, and altogether positive results were found in 10 patients (62.50%). All PCR-positive patients manifested sepsis, but none of the PCR-negative patients did ($P < 0.01$). Bacterial DNA was discovered in 100.00% of sepsis patients and none in non-sepsis patients ($P < 0.01$). Seventy percent of PCR-positive patients developed infectious complications, while none of PCR-negative patients did ($P < 0.01$). The blood culture was positive only in 3 patients (18.75%), all of them were PCR-positive. *E. coli* DNA was found in 70.00% of all the PCR positive blood specimens. Systemic plasma concentration of D-lactate and LPS of all patients was significantly higher than that in control group, which consisted of 63 inpatients waiting for elective operations. Systemic plasma level of D-lactate showed a positive correlation with that of LPS ($r = 0.94, P < 0.01$). **Conclusion** Intestinal bacterial translocation (most commonly *E. coli*) might occur early (2 hours) after severe trauma. Infection and sepsis have a close relationship with bacterial translocation. Detection of blood microbial DNA using PCR could reflect bacteria translocation and forecast imminent infection and sepsis.

【Key words】 multiple trauma; intestinal bacterial translocation; polymerase chain reaction; sepsis

严重多发伤、失血性休克患者往往继发全身炎

症反应综合征(SIRS)、脓毒症甚至多器官功能障碍综合征(MODS), MODS 患者多伴有脓毒症, 但许多这类患者临床或尸检未能发现明确感染病灶。Herndon 等^[1]研究认为, 这与肠屏障衰竭和肠道细菌移位有关。本研究中应用聚合酶链反应(PCR)技术检测严重多发伤患者全血细菌 DNA, 并探讨其与 SIRS、感染并发症和脓毒症的关系。

基金项目: 全军医学科研“十五”计划面上项目(01MA207)

作者单位: 100037 北京, 解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)普外科(乔治, 黎沾良, 李基业, 陆连荣), ICU(林洪远, 邓群), 中心研究室(吕艺, 黎君友)

作者简介: 乔治(1974-), 男(汉族), 山西长治人, 医学硕士, 主治医师(E-mail: drqiaozhi@yahoo.com.cn)。

1 资料和方法

1.1 研究对象:多发伤组为我院外科重症监护治疗病房(SICU)2003 年 5—10 月收治的严重多发伤患者 16 例,男 11 例,女 5 例;年龄 18~55 岁,平均 32.4 岁,其创伤严重度评分(ISS)>20 分。对照组为普外科择期手术患者 63 例,男 35 例,女 28 例;年龄 22~71 岁,平均 41.8 岁。多发伤组患者于伤后 2、24 和 48 h,对照组于术前分别在严格无菌条件下抽取肘静脉血 10 ml 进行相关指标检测。

1.2 检测指标

1.2.1 血细菌 DNA 检测:大肠杆菌 DNA 检测引物采用靶基因为大肠杆菌特异性 β 半乳糖苷酶基因的 BG-1、BG-4,扩增产物长度 762 bp。细菌 DNA 检测引物采用所有细菌共有 16SrRNA 基因的高度保守区引物 16SrRNA+,16SrRNA-,扩增产物长度 798 bp。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天为时代公司产品)提取多发伤患者全血细菌 DNA。PCR 扩增后,用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.2 血细菌培养:多发伤患者按常规方法作需氧菌及厌氧菌培养。

1.2.3 血浆 D-乳酸含量:两组患者血浆经高氯酸去蛋白后,用酶学分光光度法检测^[2]。

1.2.4 血浆脂多糖(LPS)含量:两组患者血浆经改良过氯酸法预处理,偶氮显色法鲎试验(LAL)定量测定血浆 LPS 浓度^[3]。

1.2.5 感染并发症发生情况:观察伤后 30 d 内多发伤患者有无感染并发症,包括伤口、创面、肺部、腹腔、泌尿系感染等。

1.2.6 脓毒症发生情况:判断脓毒症诊断^[4]需要具备以下两个条件:①有活跃细菌感染的确实证据(在本研究中为存在明确感染并发症和/或 PCR 检测到细菌 DNA);②有 SIRS。具备以下 2 项或 2 项以上体征者可诊断为 SIRS:体温>38℃或<36℃;心率>90 次/min;呼吸频率>20 次/min 或动脉血二氧化碳分压(PaCO₂)<32 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa);外周血白细胞计数>12×10⁹/L,或者<4×10⁹/L,或者未成熟粒细胞>0.10。

1.3 统计学处理:采用 Wstata 软件进行数据分析。各项指标均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料采用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血中细菌 DNA 检测:16 例患者中共有 10 例(占 62.50%)血细菌 DNA 检测 PCR 阳性,50.00%

(8/16 例)的患者伤后 2 h 即可以检出;6 例血细菌 DNA 检测 PCR 阴性。PCR 阳性患者 SIRS、脓毒症、失血性休克的发生率,有明确感染灶患者比例均明显高于 PCR 阴性患者(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。见表 1。脓症患者全血细菌 DNA 检测 PCR 阳性率为 100.00%(10/10 例),无脓症患者 PCR 阳性率为 0(0/6 例),差异有显著性(*P*<0.01)。血细菌 DNA 检测 PCR 阳性患者中大肠杆菌 DNA 阳性率为 70.00%(7/10 例),死亡 2 例,均为 PCR 阳性。

表 1 多发伤组 PCR 阳性和阴性患者 SIRS、感染、脓毒症及失血性休克发生情况比较

Table 1 Comparison of incidence of SIRS, infection, sepsis and hemorrhagic shock in PCR positive or negative patients with multiple injury 例(%)

PCR 结果	例数(例)	SIRS	有明确感染灶	脓毒症	失血性休克
阳性	10	10(100.00)	7(70.00)	10(100.00)	6(60.00)
阴性	6	1(16.67)*	0(0)*	0(0)**	0(0)*
合计	16	11(68.75)	7(43.75)	10(62.50)	6(37.50)

注:与细菌 PCR 阳性比较;* *P*<0.05,** *P*<0.01

血细菌培养阳性 3 例(占 18.75%,其中大肠杆菌 1 例,鲍曼不动杆菌 1 例,厌氧类杆菌 1 例),显著低于 PCR 阳性率(62.50%,*P*<0.01)。

2.2 血浆 D-乳酸与 LPS 含量(表 2):严重多发伤患者血浆 D-乳酸及 LPS 含量均较对照组明显升高,且二者呈显著正相关(*r*=0.94,*P*<0.01)。

表 2 严重多发伤患者外周血浆 D-乳酸及 LPS 浓度的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of D-lactate and endotoxin levels in peripheral of severe multiple trauma patients($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	D-乳酸(mg/L)	LPS(kEU/L)
对照组	63	0.41±0.28	0.055±0.027
多发伤组伤后 2 h	16	13.23±2.74*	0.209±0.032*
伤后 24 h	16	17.36±2.57*	0.215±0.041*
伤后 48 h	16	15.20±2.66*	0.198±0.034*

注:与对照组比较;* *P*<0.01

3 讨论

虽然大量实验研究已证明实验动物(尤其是啮齿类动物)存在肠道细菌移位,并可能导致全身性感染,尤其在发生失血性休克后肠道细菌移位率明显上升;而临床对肠道细菌移位是否存在及其意义仍存在争议^[5-8]。这是因为临床缺乏证实肠道细菌移位的可靠方法。肠系膜淋巴结培养实际上不可行;而外周血培养一般需 3~5 d,需时较长,阳性率又极低;同位素标记、荧光示踪法、质粒菌示踪法^[9]等临床可操作性仍有待探讨。1996 年 Kane 等^[10,11]将 PCR 技术应用于临床患者全血细菌 DNA 的检测,开创了临床肠道细菌移位研究的新局面。理论上,如果发生

肠道细菌移位,只要血中存在微量细菌 DNA,无论是活菌或已裂解的细菌碎片,应用 PCR 技术都可检测出来。本研究结果也显示,PCR 较传统方法更为敏感及快捷。

本研究中发现,严重多发伤后早期(伤后 2 h)即可发生肠道细菌移位。PCR 阳性患者发生感染并发症、脓毒症及 SIRS 的比例(70.00%、100.00%和 100.00%)增加,明显高于细菌 PCR 阴性组(0、0 和 16.67%)。发生感染并发症的患者 PCR 检测均为阳性,PCR 阴性患者均未发生有明确病灶的感染,表明肠道细菌移位与感染及脓毒症的发生密切相关。与择期手术患者术前相比,本组患者血浆 D-乳酸和 LPS 水平明显升高,提示肠通透性异常增高并存在内毒素血症。LPS 是革兰阴性细菌的主要致病物质,而肠道则是机体最大的内毒素池。正常情况下,由于肠道屏障功能的作用,只有极微量的肠道 LPS 漏入血循环。D-乳酸是肠道固有细菌的代谢终产物,由于哺乳动物机体各种组织均不产生 D-乳酸,也没有快速代谢分解 D-乳酸的酶系统,所以血中的 D-乳酸基本来源于肠道,其水平变化与肠黏膜屏障密切相关;且 D-乳酸在肝内不被分解,故可利用外周血浆 D-乳酸水平反映肠道屏障中机械屏障的功能状态^[12-14]。而伤后肠黏膜细胞病理性凋亡也可能导致肠黏膜屏障严重受损^[15]。在本研究中,血浆 D-乳酸与 LPS 水平呈显著正相关,二者均明显升高,表明严重多发伤后可发生肠屏障功能损伤、肠通透性异常升高,成为肠道细菌移位的病理生理基础。肠道在严重多发伤后脓毒症及感染并发症的发生过程中起重要作用。本研究中有 1 例患者有脓毒症临床表现而全血细菌 DNA 检测阴性,其血浆 D-乳酸和 LPS 水平均明显升高,考虑虽然存在肠黏膜屏障功能损伤,但未发生细菌移位,而仅为内毒素血症。所有 PCR 阳性结果中大肠杆菌 DNA 占绝大多数,提示在细菌移位中最常见的是大肠杆菌,这与相关报道^[16]一致。本研究中有 16 例严重多发伤患者发生失血性休克 6 例,均 PCR 阳性并出现脓毒症,说明失血越多,肠道缺血、缺氧越严重,越容易发生肠道细菌移位,PCR 方法检测血中细菌 DNA 能准确反映肠道细菌移位并预告脓毒症的发生。目前对肠道细菌移位的治疗研究正在进行中,如早期应用肠内营养、双歧杆菌、蛙皮素、碱性成纤维细胞生长因子、中药等^[17-21],其效果尚待临床检验。

参考文献:

1 Herndon D N, Zeigler S T. Bacterial translocation after thermal

- injury[J]. Crit Care Med, 1993, 21: 50-54.
- 2 于勇, 盛志勇, 柴家科, 等. 烧伤患者血浆 D-乳酸水平和肠道内 IgA 含量的变化[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5: 122-124.
- 3 姚咏明, 田惠民, 王亚平, 等. 氨酸新法预处理血浆定量检测微量内毒素的酶试验方法及其应用[J]. 上海医学检验杂志, 1993, 8: 31.
- 4 ACCP/SCCM Consensus Conference. Definitions of sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. Crit Care Med, 1992, 20: 864-874.
- 5 王达利, 王玉明, 程代薇, 等. 烧伤患者早期肠源性感染临床研究[J]. 遵义医学院学报, 2000, 23: 110-111.
- 6 郑常杰, 贾长库, 时岩. 失血性休克促进细菌移位的发生[J]. 中华外科杂志, 2000, 38: 176-178.
- 7 Cirera I, Bauer T M, Navasa M, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis[J]. Hepatol, 2001, 34: 32-37.
- 8 Ammori B J, Fitzgerald P, Hawkey P, et al. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients with severe acute pancreatitis is not associated with systemic bacterial translocation; molecular investigation of microbial DNA in the blood[J]. Pancreas, 2003, 26: 18-22.
- 9 吴承堂, 黎洁良, 熊德鑫, 等. 质粒载体示踪法用于急性坏死性胰腺炎肠道细菌易位的研究[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10: 501-504.
- 10 Kane T D, Johnson S R, Alexander J W, et al. Detection of intestinal bacterial translocation using PCR[J]. J Surg Res, 1996, 63: 59-63.
- 11 Kane T D, Alexander J W, Johannigman J A. The detection of microbial DNA in the blood[J]. Ann Surg, 1998, 227: 1-9.
- 12 姚咏明, 盛志勇, 吴叶, 等. 大鼠急性肠缺血后血浆 D-乳酸的变化及肠黏膜损害的关系[J]. 中华整形与烧伤外科杂志, 1998, 14: 266-269.
- 13 Murry M J, Gonze M D, Nowak L R, et al. Serum D-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia[J]. Am J Surg, 1994, 167: 575-578.
- 14 孙晓庆, 付小兵, 张蓉, 等. 创伤后肠道通透性改变血浆标志物 D-乳酸的实验研究[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 476-478.
- 15 张诚, 盛志勇, 胡森, 等. 烫伤延迟复苏后肠上皮细胞凋亡诱导肠道内毒素和细菌移位[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 150-153.
- 16 O'Boyle C J, MacFie J, Mitchell C J, et al. Microbiology of bacterial translocation in humans[J]. Gut, 1998, 42: 29-35.
- 17 万林骏, 杨家驹, 黄青青, 等. 急性坏死性胰腺炎大鼠早期肠内营养的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9: 213-215.
- 18 王忠堂, 姚咏明, 肖光夏, 等. 双歧杆菌对烫伤大鼠肠道黏膜机械及生物屏障的改善作用[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 154-158.
- 19 王军民, 张正, 文黎明. 蛙皮素抑制失血-感染大鼠肠道细菌移位的实验研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 496-498.
- 20 王亚平, 付小兵, 孙同柱, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对肠缺血大鼠细菌易位的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1996, 8: 710-712.
- 21 次秀丽, 王宝恩, 张淑文, 等. 肿瘤坏死因子和内毒素致大鼠肠黏膜屏障损伤的中药治疗研究[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 262-265.

(收稿日期: 2005-10-12 修回日期: 2005-12-27)

(本文编辑: 郭方)