

• 经验交流 •

利用巢式聚合酶链反应方法快速鉴定脓毒症细菌的革兰分型

刘宁 胡龙华 叶倩

【关键词】 脓毒症； 16S rRNA； 巢式聚合酶链反应； 革兰菌

脓毒症是由各种病原体(主要为细菌)侵入血液循环引起的严重疾病,常见细菌有革兰阳性(G⁺)球菌和革兰阴性(G⁻)杆菌。但由于血培养结果往往滞后于临床的要求,所以医师通常应用广谱抗菌药物,或针对 G⁺球菌和 G⁻杆菌联合用药,导致耐药菌增加与扩散、费用增加,并且使厌氧菌、真菌及一些条件致病菌的感染率升高,加重患者病情。所以临床上需要尽早检测出脓毒症致病菌并对细菌分型。本研究中利用 16S rRNA 基因可变区序列随菌种不同有较大变化这一特点分别设计 G⁺菌和 G⁻菌特异性引物,同时用于扩增脓毒症患者的血液标本,以期对脓毒症感染的 G⁺菌和 G⁻菌进行快速鉴定与分析,为临床用药提供帮助。

1 资料与方法

1.1 标本来源:20 例细菌血培养阳性的本院住院脓毒症患者均符合脓毒症诊断标准。另选 20 例健康体检者作为阴性对照。

1.2 细菌参照菌株:G⁺菌株有金黄色葡萄球菌(金葡菌)、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、肠球菌;G⁻菌有大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌,均由本院细菌室提供。

1.3 引物设计:选择细菌 16S rRNA 基因可变区域设计特异性引物,并设计一对外侧引物。外侧上游:5'-ACGTCATC CCCACCTTCTC-3',外侧下游:5'-TT GGAGAGTTTGATCCTGGCTC-3';阴性上游:5'-GGCGCAKGCCTAAYAC ATGCAAGT-3',阴性下游:5'-GGTG CCTTCGGAAC-3',扩增产物大小为 985 bp;阳性上游:5'-GACGACAGCCA TGCASCACCTGT-3',阳性下游:5'-GC GRCTCTCTGGTCTGTA-3',扩增产物

大小为 355 bp;引物均由上海捷瑞生物公司合成。

1.4 检测方法

1.4.1 血培养及鉴定:取静脉血 8 ml 注入含血液增菌液 25 ml 的培养瓶中,混匀后采用美国 BD 公司的 BACTEC 9120 血培养仪进行细菌培养,再采用 VITEK 32 系统鉴定细菌。

1.4.2 血液标本 DNA 提取:抗凝血 1 ml 离心 5 min,取血浆 50 μl 加等量的抽提裂解液,100 °C 煮沸 10 min,离心 5 min,取上清液进行巢式聚合酶链反应(PCR)检测 16S rRNA 基因。

1.4.3 参照菌株 DNA 提取:取培养皿中单个菌落放入含 50 μl 抽提裂解液的小离心管(EP 管),100 °C 煮沸 10 min,离心 5 min,取上清液进行巢式 PCR 检测 16S rRNA 基因。

1.4.4 巢式 PCR 扩增^[1]:①第一轮:PCR DNA 模板 2 μl,加入外侧上、下游引物各 1 μl,Taq 酶混合液 12.5 μl,双蒸水补足反应体系总量为 25 μl。94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 10 s,55 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,共循环 30 次;72 °C 延伸 5 min。②第二轮:PCR 以第一轮扩增产物 2 μl 为模板,加入革兰特异性上、下游引物各 1 μl,Taq 酶混合液 12.5 μl,双蒸水补足反应体系总量为 25 μl。94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 10 s;G⁺菌 63 °C、G⁻菌 65 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 5 s,共循环 30 次;72 °C 延伸 5 min。

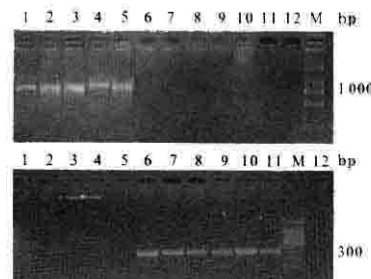
1.4.5 电泳:取 5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,40 min 后采用紫外透射分析仪观察并拍照、记录结果。

2 结果

2.1 细菌参照菌株结果(图 1):11 株标准细菌分别得到特异性条带,G⁻菌条带为 985 bp,G⁺菌条带为 355 bp。

2.2 脓毒症患者检测结果:阴性对照组未出现阳性条带。培养阳性的脓毒症患者静脉血标本都得到革兰特异性条带,12 例患者 G⁺菌中包括金葡菌 6 例,表皮葡萄球菌 2 例,链球菌 3 例,肠球菌

1 例;8 例患者 G⁻菌中包括大肠埃希菌 3 例,铜绿假单胞菌 2 例,洋葱假单胞菌 1 例,鲍曼不动杆菌 1 例,嗜麦芽黄单胞菌 1 例;与血培养鉴定结果一致。



1,大肠埃希菌,2,肺炎克雷伯菌,3,阴沟肠杆菌,4,奇异变形杆菌,5,铜绿假单胞菌,6,金黄色葡萄球菌,7,表皮葡萄球菌,8,腐生葡萄球菌,9,肺炎链球菌,10,化脓性链球菌,11,肠球菌,12,阴性对照,M,Marker

图 1 11 株细菌分别用革兰阴性(上)和革兰阳性(下)引物扩增后电泳图

3 讨论

在临床上引起脓毒症的病原菌很多,尽早使用针对病原菌的敏感抗菌药物是控制病情发展、降低病死率最关键的治疗手段。临床中医师通常先期应用广谱抗菌药物,或针对 G⁺球菌和 G⁻杆菌联合用药以增强疗效;但这也使致病菌的耐药性逐年上升^[2],出现多重耐药,严重时患者会面临无药可医的局面。随着抗菌药物的广泛应用,致病菌种已发生变化,G⁺球菌引起的脓毒症有所下降,而 G⁻杆菌、厌氧菌和真菌感染者逐年上升,并且由于阳性菌致病因子与内毒素的协同效应,患者临床表现愈加复杂^[3],导致脓毒症诊治困难,增加了患者和社会的负担。由于 G⁺球菌(以金葡菌为主)和 G⁻杆菌(以大肠杆菌为主)脓毒症在应用抗菌药物选择上截然不同,因此,对细菌阴、阳性作出初步判断极为重要。本研究中利用分子生物学技术检测 16S rRNA 基因,可以对脓毒症感染细菌初步分型。16S rRNA 基因是细菌染色体上编码 16S rRNA 相对应的 DNA

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.05.018

作者单位:330006 江西,南昌大学医学院第二附属医院检验科

序列,存在于所有细菌的染色体基因上,也存在于衣原体、立克次体等原核生物中,但病毒与真菌等非原核生物不含 16S rRNA 基因。16S rRNA 基因序列高度保守而被称为“分子化石”。但这种保守是相对的,在其保守区之间存在 9 个或 10 个变异区,可变区和保守区交叉排列组成,保守区序列在所有细菌菌种中高度一致,而可变区序列则随菌种的不同有较大的变化。本研究中针对 G⁺菌和 G⁻菌的可变区设计特异性引物,通过扩增得到特异性条带,可以对脓毒症感染细菌进行初步分型,为临床用药提供针对性指导。由于 PCR 方法灵敏度高,受抗菌药物影响小,可以为血培养阴性的可疑患者提供病原学依据,提高抗感染措施的效率^[4]。

本实验中利用巢式 PCR 技术对 11 株参照细菌菌株和 20 例血培养阳性的脓毒症患者血液标本进行扩增,均得到特异性单一条带,并与血培养结果一致。在预实验中分别以金葡菌代表 G⁺菌、大肠埃希菌代表 G⁻菌,选最佳退火温度,并在后面的实验中采用最佳退火温度均得到单一的目的条带。本实验中采用的巢式 PCR 也是成功获取目的条带的重要原因,它是利用两套 PCR 引物(巢式引物)进行两轮 PCR 来扩增目的条带。第一轮用外引物产生的扩增产物在内引物的存在下进行第二轮扩增,从而降低了扩增多个靶位点的可能性(因为与两套引物都互补的引物很少),增加了检测的敏感性;又有两对 PCR 引物与检测模板的配对,增加了检测的可靠性^[5]。

本研究中对 20 例脓毒症患者血液标本扩增后均得到特异性条带,12 例为 G⁺菌,8 例为 G⁻菌,与血培养鉴定结果相符;而在 20 例健康对照者中未检出特异性条带。说明利用革兰特异性引物巢式 PCR 方法检测临床血液标本具有良好的特异性和敏感性,能用于脓毒症细菌的检测与分型。魏宏建和赵有成^[6]研究发现,PCR 法检测的最低细菌浓度为 5×10⁶/L,敏感性显著高于血培养法,应用 PCR 方法可弥补现行细菌学检验的不足。国内虽然有利用 16S rRNA 基因来进行细菌分型,但采用的方法是基因芯片^[7],操作繁琐,费用昂贵,并不适合临床的推广使用。而巢式 PCR 方法不仅检测速度快,数小时内可得到结果,并且方法简单、结果可靠,只要具备 PCR 条件的实验室都能开展检测,为临床细菌感染性脓毒症提供了快速、灵敏的检测方法^[8-9];同时也为临床医师及时、合理地使用抗菌药物治疗提供了病原学依据,降低了耐药的发生^[10-11]。

参考文献

[1] Carroll NM, Jaeger EE, Choudhury S, et al. detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:1753-1757.
 [2] 胡瑛,石汉振,曹永坚. 3 694 株检出细菌的分布及其 VITET2 药敏试验的分析. *中华临床医学研究杂志*, 2005, 11: 1-2.
 [3] 姚咏明,盛志勇. 内毒素与革兰阳性菌致病因子的协同效应与意义. *中国危重*

病急救医学, 2005, 17:193-196.
 [4] 孙华,李峰,谢晓谦. 快速细菌学诊断在全身炎症反应综合征中的应用. *中国危重病急救医学*, 2001, 13:550-552.
 [5] 曹新国,王礼文. 套式实时荧光定量 PCR 检测人外周血单个核细胞中 FOXP3 mRNA. *临床检验杂志*, 2006, 24:289-291.
 [6] 魏宏建,赵有成. 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. *中国危重病急救医学*, 2005, 17:238-239.
 [7] La Duc MT, Osman S, Vaishampayan P, et al. Comprehensive census of bacteria in clean rooms by using DNA microarray and cloning methods. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 6559-6567.
 [8] 同志勇,王斌,苏维奇,等. 多重半套式聚合酶链反应检测脑脊液中细菌 16S rRNA 基因. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2001, 21:376.
 [9] 吴亦栋,尚世强,李建平,等. 细菌 16 S rRNA 基因荧光定量 PCR 诊断新生儿败血症. *中华儿科杂志*, 2007, 45:446-449.
 [10] 范广智,沙学明,庞晓黎,等. 肠杆菌科产超广谱 β-内酰胺酶菌的检测及耐药性分析. *中国医学检验杂志*, 2009, 10: 230-231.
 [11] Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 335-351.

(收稿日期, 2010-09-30)

(本文编辑, 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用的不需要标注中文的缩略语

急性肺损伤 (ALI)
 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)
 严重急性呼吸综合征 (SARS)
 全身炎症反应综合征 (SIRS)
 多器官功能障碍综合征 (MODS)
 多器官功能衰竭 (MOF)
 多器官功能障碍评分 (MODS 评分)
 重症监护病房 (ICU)
 急性生理学及慢性健康状况评分系统 (APACHE)
 感染相关器官功能衰竭评分系统 (SOFA)
 心肺复苏 (CPR)
 磁共振成像 (MRI)
 随机对照研究 (RCT)
 肿瘤坏死因子 (TNF)
 白细胞介素 (IL)
 核转录因子-κB (NF-κB)

动脉血二氧化碳分压 (PaCO₂)
 动脉血氧分压 (PaO₂)
 脉搏血氧饱和度 (SpO₂)
 氧合指数 (PaO₂/FiO₂)
 一氧化氮 (NO)
 一氧化碳 (CO)
 丙氨酸转氨酶 (ALT)
 天冬氨酸转氨酶 (AST)
 异硫氰酸荧光素 (FITC)
 四甲基偶氮盐 (MTT)
 脂多糖 (LPS)
 盲肠结扎穿孔术 (CLP)
 支气管肺泡灌洗液 (BALF)
 磷酸盐缓冲液 (PBS)
 乙二胺四乙酸 (EDTA)
 3,3'-二氨基苯胺 (DAB)
 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)
 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting)

酶联免疫吸附法 (ELISA)
 原位末端标记法 (TUNEL)
 链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶法 (SABC)
 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)
 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase)
 β-肌动蛋白 (β-actin)
 三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH)
 苏木素-伊红染色 (HE 染色)
 美国食品与药物管理局 (FDA)
 世界卫生组织 (WHO)
 美国心脏病学会 (ACC)
 美国胸科医师协会 (ACCP)
 危重病医学会 (SCCM)
 欧洲危重病医学会 (ESICM)
 美国心脏协会 (AHA)