

· 论著 ·

多重聚合酶链反应检测呼吸机相关性气管-支气管炎和肺炎患者常见致病菌的研究

王小红 董晨明 杨朝晖 张红松 牟成华 张虹

【摘要】 目的 探讨多重聚合酶链反应(PCR)技术在快速检测呼吸机相关性气管-支气管炎(VAT)和呼吸机相关性肺炎(VAP)常见致病菌中的临床作用和价值。方法 留取 75 例外科重症监护病房(ICU)机械通气并发 VAT 或 VAP 患者的痰标本,进行细菌培养、普通 PCR、多重 PCR 检测,比较 3 种方法对致病菌检出率的差异。结果 细菌培养法对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯杆菌分离阳性检出率分别为 50.7%、45.3%、30.7%、41.3%和 58.7%,普通 PCR 阳性检出率分别为 88.0%、89.3%、78.7%、85.3%和 93.3%,多重 PCR 阳性检出率分别为 92.1%、90.7%、82.7%、89.3%和 96.0%。普通 PCR 和多重 PCR 对 5 种致病菌的阳性检出率均高于细菌培养(均 $P < 0.05$);且多重 PCR 较普通 PCR 具有快速检测的优点。结论 与细菌培养比较,普通 PCR 和多重 PCR 对 VAT 和 VAP 5 种常见致病菌的阳性检出率高,且多重 PCR 可有效节省人力、财力。

【关键词】 多重聚合酶链反应; 呼吸机相关性气管-支气管炎; 呼吸机相关性肺炎; 致病菌

The multiplex polymerase chain reaction for detection of ventilator-associated trachea-bronchitis and pneumonia in patients with common pathogens WANG Xiao-hong, DONG Chen-ming, YANG Zhao-hui, ZHANG Hong-song, MOU Cheng-hua, ZHANG Hong. Intensive Care Unit, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu, China

Corresponding author: DONG Chen-ming, Email: Dongcm0608@163.com

【Abstract】 Objective To explore the clinical utility of multiple polymerase chain reaction (M-PCR) in the rapid detection of the common pathogens in ventilator-associated trachea-bronchitis (VAT) and ventilator-associated pneumonia (VAP). **Methods** Sputum samples of 75 patients complicated VAT or VAP in surgical intensive care unit (SICU), were examined by bacterial culture, ordinary PCR, the M-PCR detection. The pathogen detection rates among three methods were compared. **Results** The *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* of the positive detection rates were 50.7%, 45.3%, 30.7%, 41.3% and 58.7% by bacterial culture. By ordinary PCR, the positive detection rates were respectively 88.0%, 89.3%, 78.7%, 85.3% and 93.3%, and by M-PCR, the positive detection rates were respectively 92.1%, 90.7%, 82.7%, 89.3% and 96.0%. The positive rates of five common pathogens of ordinary PCR and M-PCR were higher than those of bacterial culture (all $P < 0.05$). The M-PCR had merit for rapid detection compared with ordinary PCR. **Conclusion** Compared with bacterial culture, ordinary PCR and M-PCR yield higher positive rates in identifying five common pathogens of VAT and VAP, meanwhile, it also demonstrated the tendency that M-PCR may save cost and labor power.

【Key words】 Multiplex polymerase chain reaction; Ventilator-associated trachea-bronchitis; Ventilator-associated pneumonia; Pathogen

重症监护病房(ICU)是医院高危患者集中的区域,并且在此病区的患者接受着许多侵入性的诊疗措施,所以其发生致病菌感染的机会较普通病房更大^[1],机械通气是 ICU 抢救患者生命的重要手段,但其应用可使患者极易发生呼吸机相关性气管-支气管炎(VAT)和呼吸机相关性肺炎(VAP)。VAP 是指机械通气 ≥ 24 h 后和停用机械通气、拔除人工气

道导管后 48 h 内发生新的感染性肺实质炎症。VAT 是下呼吸道细菌定植和 VAP 之间的一个中间过程,具有临床症状和体征的局部性疾病。据调查,VAP 患者的病死率国外报道为 20%~71%^[2-3],国内报道为 51%^[4]。有文献报道,革兰阴性(G⁻)杆菌是 VAP 的主要致病菌,占 64.65%,革兰阳性(G⁺)菌占 8.58%;真菌感染比例也较大,多与细菌合并感染,可见引起 VAP 的病原通常为混合感染,这与危重患者机体免疫力低下,住院时间长、广谱抗菌药物使用时间长等因素致使机体菌群失调有关^[5],使得 VAP 的诊断较为困难。如何及时准确地获取致病菌

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.07.012

基金项目:甘肃省重点中医药科研发立项课题(GZK2010Z15)

作者单位:730030 甘肃,兰州大学第二医院重症医学一科

通信作者:董晨明,Email: Dongcm0608@163.com

信息,降低 VAP 的病死率,目前尚缺乏快速理想的病原学诊断方法。传统病原学检测方法及血培养结果往往滞后于临床的要求,所以临床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^[6]。因此,临床医师需要尽早检测出引起 VAP 或 VAT 的致病菌。多重聚合酶链反应(PCR)技术是近年来发展起来的一种病原检测技术,由于其特异性强、灵敏度高、操作简便、成本低、检测速度快等优点,越来越多地被用于呼吸系统疾病病原微生物的检测。为此,本研究中拟探讨多重 PCR 技术在检测 VAT 和 VAP 常见致病菌中的应用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料: Tag 酶、dNTPs、引物合成、DNA 提取试剂 Tris 饱和酚、溶菌酶、蛋白酶 K 均购自上海生物工程有限公司;多重 PCR 试剂盒、PCR 缓冲液、DNA 标记 Marker、琼脂糖均购自大连宝生物工程科技有限公司;细菌培养基由兰州大学第二医院微生物实验室提供;其余生化试剂均为市售分析纯。

1.2 病例选择: 选择 85 例本院外科 ICU 收住的 VAT 或 VAP 患者,肺部感染符合 VAT 或 VAP 的诊断标准^[7-8]。除外机械通气之前有下呼吸道感染、免疫明显缺陷患者 10 例,最终 75 例资料完整的机械通气患者的 75 份痰标本纳入本研究,其中男性 44 例,女性 31 例;年龄 19~74 岁,平均 46 岁。所有患者机械通气期间进行标准的呼吸道管理,未用持续声门下吸引取痰标本。

本研究符合医学伦理学要求,所有治疗和检测得到患者家属的知情同意。

1.3 标本采集和病原学检测: 采用连接灭菌密闭容器的一次性无菌吸痰管,经气管切开或气管插管取得机械通气患者的下呼吸道分泌物,30 min 内送检。无菌收集痰标本后分成 2 份,一份送病原微生物室鉴定,另一份采用普通 PCR 和多重 PCR 方法进一步检测细菌。

1.3.1 引物设计: 选择各致病菌特异性基因^[9-14],金黄色葡萄球菌的 *mecA* 和 *femA* 基因、鲍曼不动杆菌的 OXA-51 型酶基因(*blaOXA-51-like*)、大肠埃希杆菌的 *PhoA* 基因、铜绿假单胞菌的脂蛋白 I 基因(*OprI*)、肺炎克雷伯杆菌的 *mdh* 基因作为靶序列,用计算机软件 Primer Premier 5.0 查阅设计相应致病菌特异性引物,GeneBank 检索未见非特异性匹配的其他微生物 DNA。

1.3.2 DNA 模板的制备: 采用经典的酚氯仿提取 DNA 方法。随后用 DNA 模板定量,置于紫外分光光度仪(德国 Eppendorf 公司)上进行 DNA 浓度测定。取 1 μl DNA 模板用于 PCR 反应。

1.3.3 普通 PCR: 在终体积 25 μl 反应体系中加入模板 DNA 1 μl,上下游引物各 0.5 μl。扩增方案为:94 °C 预变性 5 min,随后 94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,最终 72 °C 延伸 7 min,共 25 个循环;扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.4 多重 PCR: 在终体积 50 μl 反应体系中同时加入 1 μl 5 对引物标本 DNA。扩增方案为:94 °C 预变性 1 min,随后 94 °C 变性 1.5 min,52 °C 退火 1.5 min,72 °C 延伸 1.5 min,最终 72 °C 延伸 10 min,共 30 个循环;将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳分析,以普通 PCR 作为对照。判断标准:扩增产物条带电泳位置与 Marker 电泳位置相同者为该菌阳性。

1.3.5 细菌培养: 按常规方法进行细菌培养分离菌株,采用美国全自动生化仪进行细菌快速鉴定。

1.4 统计学方法: 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多重 PCR 与细菌培养结果比较(表 1): 多重 PCR 对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯杆菌阳性检出率高于细菌培养法,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 1 细菌培养、普通 PCR 和多重 PCR 对 75 例 VAT 和 VAP 患者 75 份痰标本中 5 种致病菌的阳性检出率比较

检测方法	阳性检出率[% (株)]				
	金黄色葡萄球菌	鲍曼不动杆菌	大肠埃希杆菌	铜绿假单胞菌	肺炎克雷伯杆菌
细菌培养	50.7(38)	45.3(34)	30.7(23)	41.3(31)	58.7(44)
普通 PCR	88.0(66) ^a	89.3(67) ^a	78.7(59) ^a	85.3(64) ^a	93.3(70) ^a
多重 PCR	92.0(69) ^a	90.7(68) ^a	82.7(62) ^a	89.3(67) ^a	96.0(72) ^a

注:PCR:聚合酶链反应,VAT:呼吸机相关性气管-支气管炎,

VAP:呼吸机相关性肺炎;与细菌培养比较,^a $P < 0.05$

2.2 多重 PCR 与普通 PCR 结果比较(表 1;图 1): 普通 PCR 对金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯杆菌阳性检出率与多重 PCR 比较差异无统计学意义(均 $P > 0.05$),但是在检测速度上多重 PCR 优于普通 PCR。

3 讨论

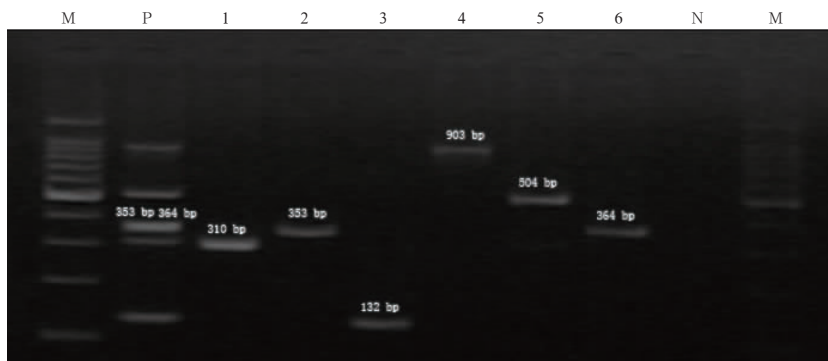
VAT 和 VAP 是机械通气患者常见的并发症,是可以预防和治疗的院内下呼吸道感染性疾病,可

由多种病原微生物引起,主要作用于人体并与人体发生反应,最终导致疾病发生发展^[15],是 ICU 内最常见的感染,所以感染控制的成败直接影响 ICU 患者预后。现已证实下呼吸道感染的发生率逐渐增加,主要是由于金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯杆菌、鲍曼不动杆菌和大肠埃希杆菌等多重耐药菌的不断出现^[16]。近年来研究显示: VAT 及 VAP 的发生率逐年增高,刘滨等^[17]研究显示,应用机械通气的患者 7 d 内并发 VAP 的感染率为 59.26%。因此,提高病原学诊断的准确率不仅对疾病的确诊提供了重要依据,而且为临床合理选择抗菌药物治疗提供了依据。

目前呼吸道的主要病原学检查方法有直接涂片法、细菌加真菌培养及血培养等,其中培养法是诊断细菌感染的金标准。但是传统病原学检查方法因耗时长、操作繁琐、影响因素多等,对早期指导临床用药带来诸多不便,故临床医师不能一味地只等待细菌培养和药敏试验结果再选择用药,这样会延误危重症患者的最佳抢救时机,使病情加重^[18]。相比之下,分子生物学技术如多重 PCR 可以同时在一个反应管中扩增出多个不同的目标 DNA 片段,从而达到快速检测多种致病菌的目的,尤其对多种病原体的混合感染可以大大提高检测效率,并且节省时间、经费开支和检测的人力、物力及财力,为临床医师提供更早、更准确的信息。而普通 PCR 检测指标单一,细菌培养耗时、检出率相对较低。

Fan 等^[19]对多重 PCR 技术进行了灵敏度和特异性的检测实验后显示,与普通 PCR 方法相比,多重 PCR 检测的灵敏度可达 95% 以上。本实验中通过留取 75 例外科 ICU 机械通气并发 VAT 或 VAP 患者的痰标本,进行细菌培养、普通 PCR、多重 PCR 检测,并比较其对致病菌的检出率,结果发现,普通 PCR 与多重 PCR 对致病菌的检出率要高于细菌培养法,两种 PCR 检测的阳性检出率相近,但多重 PCR 在检测速度及成本等方面较普通 PCR 有明显优势,与何新平等^[20]通过多重 PCR 检测社区获得性肺炎患者中 4 种病原体的结果在阳性检出率上均一致。可见多重 PCR 检测非常适合混合感染(如 VAT 或 VAP)的病原学诊断,应用前景广阔。

多重 PCR 在实际应用中还是存在某些问题,例



M: Marker, 100 bp DNA ladder, P: 阳性结果, N: 阴性对照, 1 和 3: 金黄色葡萄球菌的 *mecA* 和 *femA* 基因, 2: 鲍曼不动杆菌的 OXA-51 型酶基因, 4: 大肠埃希杆菌的 *PhoA* 基因, 5: 铜绿假单胞菌的脂蛋白 I 基因, 6: 肺炎克雷伯杆菌的 *mdh* 基因

图 1 多重聚合酶链反应检测呼吸机相关性气管-支气管炎和呼吸机相关性肺炎患者痰标本致病菌结果

如污染问题,一旦有极少量的外源性 DNA 被污染,就可能出现假阳性结果;多对引物同时扩增或者各种实验条件控制不当,都很容易导致扩增失败或非特异性扩增产物出现。尽管多重 PCR 技术存在一定弊端,但其检测快速、检出率高等等都是其他方法无法相比的^[21-22],因此,设想将其直接应用于临床 VAT 或 VAP 的致病菌检测具有重要的意义。

参考文献

- [1] 王少利,安卫红,李宏亮,等.北京市某三级甲等医院综合重症监护病房患者器械相关感染的监测分析.中国危重病急救医学,2011,23:681-684.
- [2] Cook D. Ventilator associated pneumonia: perspectives on the burden of illness. Intensive Care Med, 2000, 26 Suppl 1: S31-37.
- [3] Morehead RS, Pinto SJ. Ventilator-associated pneumonia. Arch Intern Med, 2000, 160: 1926-1936.
- [4] 徐秀华. 临床医院感染学. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998: 225-228.
- [5] 贾超,邹晋梅,朱伦刚.呼吸机相关性肺炎病原学及临床相关因素分析.中国危重病急救医学,2005,17:490.
- [6] 刘宁,胡龙华,叶倩.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.中国危重病急救医学,2011,23: 316-317.
- [7] Craven DE, Chroneou A, Zias N, et al. Ventilator-associated tracheobronchitis: the impact of targeted antibiotic therapy on patient outcomes. Chest, 2009, 135: 521-528.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会.医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案).中华结核和呼吸杂志,1999,22:201-203.
- [9] Geha DJ, Uhl JR, Gustafiero CA, et al. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant *staphylococci* in the clinical laboratory. J Clin Microbiol, 1994, 32: 1768-1772.
- [10] Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1032-1035.
- [11] De Vos D, Lim A Jr, Pirnay JP, et al. Direct detection and

- identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1295-1299.
- [12] Sun Z, Chen Z, Hou X, et al. Locked nucleic acid pentamers as universal PCR primers for genomic DNA amplification. *PLoS One*, 2008, 3: e3701.
- [13] Yang HY, Lee HJ, Suh JT, et al. Outbreaks of imipenem resistant *Acinetobacter baumannii* producing OXA-23 beta-lactamase in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med J*, 2009, 50: 764-770.
- [14] Kong RYC, So CL, Law WF, et al. A sensitive and versatile multiplex PCR system for the rapid detection of enterotoxigenic (ETEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) strains of *Escherichia coli*. *Mar Pollut Bull*, 1999, 38: 1207-1215.
- [15] 李建生. 下呼吸道感染若干问题的思考. *中国危重病急救医学*, 2011, 23: 3-4.
- [16] Craven DE, Hjalmarson KI. Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: thinking outside the box. *Clin Infect Dis*, 2010, 51 Suppl 1: S59-66.
- [17] 刘滨, 黄敏容, 周敏, 等. 重症加强治疗病房住院患者使用导管所致相关医院感染的调查. *中国危重病急救医学*, 2008, 20: 508-509.
- [18] 闫素英, 田虹. 综合重症监护病房医院感染病原菌的调查分析. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 58-59.
- [19] Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, et al. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol Cell Probes*, 2007, 21: 245-256.
- [20] 何新平, 刘竞芳, 谭慧敏. 多重 PCR 检测社区获得性肺炎患者中的病原体. *中国现代医生*, 2009, 47: 57-58.
- [21] Deng J, Zheng Y, Zhao R, et al. Culture versus polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia in antibiotic-pretreated pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*, 2009, 28: 53-55.
- [22] Pinar A, Bozdemir N, Kocagöz T, et al. Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR. *Cent Eur J Public Health*, 2004, 12: 3-5.

(收稿日期: 2012-03-16) (本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸能抑制脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠炎症反应

据统计,全球每年约有 20 万患者发生急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。研究表明,肺血管内皮细胞在 ALI 的发生中扮演着重要角色。最近一项体外研究表明,β-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(β-NAD)对肺炎球菌溶血素(PLY)和脂多糖(LPS)引起的肺血管内皮细胞(EC)屏障功能障碍具有保护作用。为证实 β-NAD 在体内是否具有保护作用,研究人员再次评估了 β-NAD 对 LPS 诱导小鼠 ALI 的保护作用。研究人员将 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、β-NAD 组、LPS 组和 LPS/β-NAD 组 4 组。结果显示,给予 β-NAD 能显著抑制 LPS 引起的炎症反应,减少支气管肺泡灌洗液中细胞和蛋白质的沉积,减少肺泡中性粒细胞的浸润,防止毛细血管渗漏。此外,病理检查证实,与 LPS 组相比,LPS/β-NAD 组肺泡间质水肿明显减轻。因此,研究人员认为,β-NAD 可以作为对细菌毒素引起的小鼠肺部炎症和 ALI 的治疗选择。

喻文,编译自《Exp Lung Res》,2012, 38: 223-232; 胡森,审校

药物相关急性肺损伤: 一项回顾性队列研究

目前有很多药物被认为是急性肺损伤(ALI)和急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的危险因素。然而,目前的证据主要来源于病例报告,尚缺乏药物相关急性肺损伤(DALI)的发病率和结局的相关数据。为此,美国学者最近进行了一项有关 DALI 的回顾性队列研究。研究对象为确诊 ALI 的危重患者,并根据患者发生 ALI 之前是否接受过可能引起 ALI 的药物治疗分为 DALI 组和非药物相关急性肺损伤(Non-DALI)组。结果发现,在 514 例 ALI 患者中,有 49 例(9.5%)为 DALI,按基础人口为 10 万估计,每年约有 6.6 例患者发生 DALI。在 49 例 DALI 患者中,有 36 例接受过化疗或抗炎药,14 例使用过胺碘酮。DALI 组和非 DALI 组患者具有类似的基线特征,然而,DALI 组急性生理学与慢性健康状况评分系统 III(APACHE III)评分(中位数为 83 分比 70 分, $P=0.03$)、重症监护病房(ICU)病死率(35%比 20%, $P=0.03$)和住院病死率(63%比 32%, $P<0.001$)均显著高于 Non-DALI 组。因此,研究人员认为,药物是 ALI 的重要危险因素,早期识别并及时停止使用相关的药物对防治 DALI 有重要意义。

喻文,编译自《Chest》,2012-04-28(电子版); 胡森,审校

血管外肺水指数能提高休克患者肺损伤诊断的准确性

如有更准确的生理指标,那么急性肺损伤(ALI)的诊断就能更可靠。血管外肺水(EVLW)是一个可能的指标,它已被证明与脓毒症患者的呼吸功能和病死率相关。然而,目前尚不清楚 EVLW 在休克患者中是否具有诊断价值以及若有诊断价值哪个指标诊断最准确。对此,瑞典的研究人员进行了一项前瞻性队列研究,探讨了休克患者多种 EVLW 指标诊断 ALI 的准确性。研究对象为 51 例重症监护病房(ICU)收治的休克患者。患者入住 ICU 6 h 内测量 EVLW,并与实际体重(ABW)、预测体重(PBW)和肺血容量(PBV)进行比较(EVLW/ABW、EVLW/PBW、EVLW/PBV);分析这些指标与 ALI 的诊断、严重程度和 ICU 病死率之间的关系。结果显示,所有 ALI 患者的血管外肺水指数(EVLWI)均升高,并与呼吸参数显著相关;此外,所有死亡患者的 EVLWI 均升高;EVLW/ABW 和 EVLW/PBW 是 ALI 的最好诊断指标。据此,研究人员得出结论:不论使用哪个指标,EVLW 与 ALI 的程度和病死率具有相关性;EVLW 可作为疾病严重程度的床旁指标。

杜明华,编译自《Crit Care》,2012, 16: R1; 胡森,审校