

• 临床检验研究论著 •

PCR 检测在血液病患儿血流感染细菌谱分析中的应用

黄君华¹, 张书婉²

(1. 西安医学院医学技术系, 陕西西安 710021; 2. 西安市儿童医院检验科, 陕西西安 710003)

摘要:目的 探讨聚合酶链式反应(PCR)技术在分析血流感染细菌谱中的应用,为血液病患儿细菌性血流感染的流行病学调查提供新的思路。方法 从西安市儿童医院血液内科收集 80 例疑似血流感染患儿的外周静脉血标本进行血培养,同时扩增并测序细菌 16 S rDNA,对血培养和 PCR 结果进行比较。结果 80 例血液标本中 7 例细菌培养阳性,阳性率为 8.8%;PCR 检测出 16 例阳性,阳性率为 20.0%,二者差异有统计学意义($\chi^2=5.82, P<0.05$);在 16 例 PCR 阳性标本中,革兰阳性菌占 68.7%,其中表皮葡萄球菌最多[占 31.3%(5/16)],革兰阴性菌占 31.3%,以非发酵菌为主[占 18.7%(3/16)]。结论 16 S rDNA-PCR 结合测序的方法可以很好地鉴定血流感染病原菌,可作为一种新的流行病学方法在临床应用;血液病儿童血流感染病原菌以革兰阳性球菌为主,尤以表皮葡萄球菌最常见。

关键词:聚合酶链式反应; 血流感染; 细菌培养; 血液病; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)17-2307-02

Analysis of etiology of bloodstream infection in children with hematologic disease by using PCR

Huang Junhua¹, Zhang Shuwanyan²

(1. Department of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China;)

Abstract: Objective To explore the value of PCR for analyzing the pathogenic spectrum of bloodstream infection(BSI) in children with blood disease, and to provide a new thought for epidemiological survey of BSI. **Methods** A total of 80 children with blood disease in hematology department with suspected bacterial infections were recruited in the study, whose blood samples were collected and detected by using blood cultivation(BC) and 16 S rDNA-PCR. The results obtained by the two methods were compared. **Results** Among the 80 children, the positive rate of BC and PCR were 8.8% and 20.0%, respectively. There was significant difference between the two methods($\chi^2=5.82, P<0.05$). Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria accounted for 68.7% and 31.3% respectively in 16 bacteria. The predominant pathogen was Staphylococcus epidermidis (31.3%). **Conclusion** Compared with BC, 16 S rDNA-PCR and sequencing provide a new way for analyzing the pathogenic spectrum of BSI, which might be effective for epidemiological investigation. The pathogens of BSI are mainly Gram-positive bacteria in children of hematology department, and Staphylococcus epidermidis is the most common pathogen.

Key words: polymerase chain reaction; bloodstream infection; bacteria cultivation; hematopathy; child

血流感染是一种严重的全身感染性疾病,病原微生物在循环血液中呈一过性、间歇性或持续性存在,并引起机体损伤和临床症状^[1]。发生血流感染的血液病患儿大多数为中性粒细胞减少或血液系统恶性肿瘤,这些患儿机体免疫功能低下,同时应用化疗、糖皮质激素及免疫抑制剂,一旦发生血流感染则会严重威胁生命^[2]。目前,血流感染的实验室诊断及病原菌分布的流行病学资料来源主要依靠血培养。然而,由于血培养耗时长,阳性率低,所得到的统计学资料与客观现实有一定的差距。本研究旨在通过对疑似血流感染标本同时进行血培养和 16 S rDNA 通用引物的聚合酶链式反应(PCR)检测,比较二者的阳性率及病原菌分布上的差异,为获取能更加完整、客观反映血流感染病原菌分布的流行病学资料提供新的方法学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 10 月至 2013 年 5 月在西安市儿童医院血液内科住院的疑似血流感染患儿 80 例,临床表现:发热高于 38℃或低体温低于 36℃,可伴有寒战等全身中毒症状或中性粒细胞增多伴核左移等。严格按照无菌操作流程采集上述患儿外周静脉血 6 mL,其中 2 mL 注入 BD 公司 EDTA-K₂ 抗凝管,4 mL 注入 2 瓶儿童专用血培养瓶(每瓶 2 mL)。

1.2 方法

1.2.1 细菌总 DNA 的提取 将 2 mL 血液标本以 12 000 r/

min 离心 5 min,取沉淀,用 QIAamp Blood DNA Mini Kit 试剂盒(QIAGEN 公司)进行 DNA 提取,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增 引物序列参照文献[3-4]设计,PSL(f): AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA; XB4(r): GTG TGT ACA AGG CCC GGG AAC;扩增产物大小为 615 bp。25 μ L PCR 反应体系,包括:10 \times buffer 2.5 μ L,10 mmol/L dNTP 0.25 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μ L,3.3 μ mol/L 的引物各 0.5 μ L,Taq 酶(5 U/ μ L) 0.125 μ L,DNA 模板 1 μ L,ddH₂O 17.625 μ L。PCR 反应程序:预变性 96℃ 10 min;96℃变性 1 min,退火 55℃ 1 min,延伸 72℃ 1 min,共 30 个循环;最后 72℃延伸 7 min,4℃保存。PCR 产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测,电泳的电压为 6 V/cm,最后用凝胶成像分析系统拍照保存。

1.2.3 细菌培养 将儿童专用血培养瓶放入全自动血培养仪 BACK-ALERT 3D 进行培养,对阳性瓶细菌用 VITEK 全自动微生物鉴定系统鉴定到种。

1.2.4 测序比对 扩增产物经纯化后送上海生工生物工程有限公司测序,将测序结果进行 BLAST 比对。

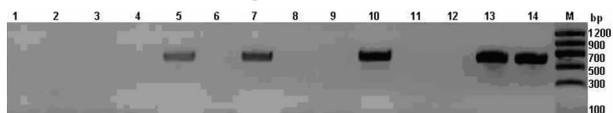
1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 进行数据分析,采用配对四格表资料的 χ^2 检验,对血培养和 PCR 方法检测的阳性率进

行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床标本的 PCR 扩增

16 S rDNA 通用引物的扩增产物与预期片段大小(615 bp)相符合, 见图 1。



1: PCR 阴性对照; 2: 提取物阴性对照; 3、4、6、8、9、11、12: 阴性标本; 5、7、10: 阳性标本; 13: 提取物阳性对照(鼠李糖乳杆菌); 14: PCR 阳性对照(鼠李糖乳杆菌 DNA); M: DNA 标记物。

图 1 16 S rDNA 通用引物扩增临床标本

2.2 两种不同方法检测的比较

血培养与 PCR 检测阳性率的差异有统计学意义($\chi^2 = 5.82, P < 0.05$), 见表 1。

表 1 两种方法检测血流感染的比较(n)

PCR	血培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	6	10	16
阴性	1	63	64
合计	7	73	80

2.3 PCR 与血培养检出病原菌分布

见表 2。

表 2 16 S rDNA-PCR 与血培养检测血流感染病原菌分布[n(%)]

病原菌	PCR(n=16)	血培养(n=7)
表皮葡萄球菌	5(31.3)	2(28.6)
金黄色葡萄球菌	3(18.7)	1(14.3)
溶血葡萄球菌	2(12.5)	1(14.3)
大肠埃希菌	2(12.5)	3(42.8)
铜绿假单胞菌	2(12.5)	0(0.0)
鲍曼不动杆菌	1(6.3)	0(0.0)
屎肠球菌	1(6.3)	0(0.0)

3 讨 论

传统血培养是目前诊断血流感染的金标准, 然而, 血培养检出率受到众多因素影响^[5], 导致其所得到的菌谱资料与客观情况有较大的差异。

血流感染在儿童血液病中发生率高, 在不进行抗感染治疗的情况下, 极易引起死亡, 因此临床上对于这些患儿往往预防性应用广谱抗菌药物, 导致血培养的阳性率很低。本研究共收集了 80 例血液标本, 用细菌 16 S rDNA 通用引物扩增测序, 所用引物 PSL/XB4 具有很高的检测灵敏度, 能够达到 1.5×10^2 CFU/mL^[6]。80 例标本中, 血培养阳性 7 例, 而 PCR 方法阳性 16 例, PCR 阳性率(20.0%)是血培养阳性率(8.8%)的 2.28 倍, 二者差异有统计学意义($P < 0.05$), PCR 方法检测的阳性率高于血培养。

从表 2 可以看出, 对于血液病患者, PCR 方法所得到的细菌谱与血培养相比略有差异, PCR 检出的病原菌数量和种类多于血培养, 以葡萄球菌和大肠埃希菌为主。如果增加样本量并避免假阳性, 则 PCR 方法所得到的统计学结果能更加客观全面地反映血流感染细菌性病原菌分布。

引起血流感染的病原菌种类广泛。近 20 年来, 凝固酶阴性葡萄球菌等革兰阳性菌和大肠埃希菌引起的血流感染发病率增加^[7]。本研究显示, 2012 年 10 月至 2013 年 5 月西安市儿童医院血液病患者血流感染以革兰阳性球菌最多(占 68.7%),

这与徐月波等^[8]的报道一致。本组资料显示表皮葡萄球菌(占 31.3%)是血液内科血流感染病原菌中排在首位的病原菌, 与 Lv 等^[9]的研究一致。在本研究中, 革兰阴性菌占 31.3%, 以非发酵菌为主(占 18.7%), 与 Al-Hasan 等^[10]的报道有差异, 其他为大肠埃希菌(占 12.5%); 革兰阳性菌以葡萄球菌属为主(占 62.5%), 其中凝固酶阴性葡萄球菌占 43.7%。另外, 实验室诊断血流感染的方法众多, 本研究所用 16 S rDNA-PCR 结合测序的方法也可以作为一种检测技术在临床应用。

由于环境和人体表面存在着数量大和种类复杂的细菌。因此, 在应用 16 S rDNA 通用引物进行 PCR 时, 最难解决的关键问题就是污染。为了避免将污染菌误认为是致病菌, 本实验各个环节都严格按照无菌操作规程, 所用耗材(如 Ep 管、Tip 头、乳胶手套等)均经钴-60 辐照消毒, 并采集了 5 名健康人血液标本作为采样、DNA 提取和 PCR 扩增阴性对照; 同时为了避免交叉污染, 每批次实验均设置 DNA 提取和 PCR 扩增阴性对照, 且阳性对照使用了目前未发现会引起血流感染的鼠李糖乳杆菌, 定期对实验环境进行消毒处理。通过采取上述一系列避免污染的措施, 在本研究进行过程中并没有发生影响结果判断的污染事件, 因此本方法的统计结果是可靠的。

综上所述, 为了获得更加客观真实的血流感染细菌性病原菌分布, 本研究直接从全血标本中提取细菌基因组 DNA, 并应用通用引物 PCR 扩增细菌 16 S rRNA 基因部分片段, 通过测序来鉴定病原菌种类, 从而用分子生物学方法得到血流感染细菌菌谱, 为得到更加准确完善的统计学资料提供了一种新的思路和方法。另外, 细菌性病原菌因时间、地区、科室的不同而有不同的分布, 每个地区或医院应该建立自己的血流感染病原菌分布数据库, 这可以更好地指导本院合理地诊断血流感染和选择抗菌药物。

参考文献

- [1] See LL. Bloodstream infection in children[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2005, 6(Suppl 3): S42-44.
- [2] Couto RC, Pedrosa TM, Tofani Cde P, et al. Risk factors for nosocomial infection in a neonatal intensive care unit[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2006, 27(6): 571-575.
- [3] Campbell PW, Phillips JA, Heidecker GJ, et al. Detection of pseudomonas (burkholderia) cepacia using PCR[J]. *Pediatr Pulmonol*, 1995, 20(1): 44-49.
- [4] Xu J, Moore JE, Millar BC, et al. Employment of broad range 16 S rDNA PCR and sequencing in the detection of aetiological agents of meningitis[J]. *New Microbiol*, 2005, 28(2): 135-143.
- [5] 王娟, 南志敏, 杨柳. 影响血流感染中病原菌检出率的重要因素[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(9): 1149.
- [6] 张宁, 孟欣, 惠凌云, 等. 细菌性感染 PCR 诊断方法的建立及其应用研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(14): 3079-3081.
- [7] 魏泽庆, 沈萍, 陈云波, 等. Mohnarin 2011 年度报告: 血流感染细菌构成及耐药性[J]. *中华医院感染学杂志*, 2012, 22(24): 5497-5502.
- [8] 徐月波, 董琳, 刘琳, 等. 儿童医院获得性血流感染的临床特征和病原学分析[J]. *中华传染病杂志*, 2013, 31(4): 221-226.
- [9] Lv H, Ning B. Pathogenesis of bloodstream infection in children with blood cancer[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1): 201-204.
- [10] Al-Hasan MN, Huskins WC, Lahr BD, et al. Epidemiology and outcome of Gram-negative bloodstream infection in children: a population-based study[J]. *Epidemiol Infect*, 2011, 139(5): 791-796.