

论著·基础研究

16S rDNA 测序在儿童细菌性脑膜炎病原菌鉴定中的应用*

黄君华¹, 张书婉²

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

摘要:目的 探讨 16S rDNA-PCR 结合测序快速检测儿童细菌性脑膜炎病原菌的价值。方法 收集 2013 年 1 月至 2016 年 12 月西安市儿童医院 4 016 例儿童脑脊液标本进行 16S rDNA-PCR; 测序阳性扩增产物并 BLAST 比对, 与培养结果比较。结果 4 016 例脑脊液标本 16S rDNA-PCR 阳性 161 例(阳性率 4.0%), 培养阳性 104 株(阳性率 2.6%), 二者比较差异具有统计学意义($\chi^2=57, P<0.05$); 从测序结果看, 莱兰阳性菌 101 株(62.7%), 莱兰阴性菌 60 株(37.3%); 最常见的 5 种病原菌依次为表皮葡萄球菌 41 株(25.5%), 肺炎链球菌 22 株(13.7%), 大肠埃希菌 21 株(13.0%), 流感嗜血杆菌 15 株(9.3%) 和金黄色葡萄球菌 13 株(8.1%)。结论 16S rDNA-PCR 结合测序能够很好地鉴定细菌性脑膜炎病原菌, 比培养法检测时间更短、菌谱分布更宽, 可作为一种新的检测方法和流行病学方法在临床应用; 儿童细菌性脑膜炎病原菌以莱兰阳性球菌为主。

关键词:细菌性脑膜炎; 16S 核糖体核糖核酸; 测序; 新生儿; 儿童**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.17.004 **中图法分类号:**R372**文章编号:**1673-4130(2018)17-2092-03**文献标识码:**A

Identification of the pathogenic bacteria from the cerebrospinal fluid samples of children with bacterial meningitis by sequencing the 16S rDNA*

HUANG Junhua¹, ZHANG Shuwan²

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

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

Abstract: Objective To explore the value of sequencing the 16S rDNA to identify pathogenic bacteria species from the cerebrospinal fluid samples of children with bacterial meningitis. **Methods** 4 016 cerebrospinal fluid samples that were collected from children in Xi'an Children's Hospital between January 2013 and December 2016 were detected by 16S rDNA -PCR. The positive PCR were sequenced and BLAST, and the results were compared with culture method statistically. **Results** Of the 4 016 case of cerebrospinal fluid, the positive rate of PCR and cultivation were 4.0% and 2.6%, respectively. There was a significant difference between the two methods ($\chi^2=57, P<0.05$). Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria accounted for 62.7% (101/161) and 37.3% (60/161), respectively. The five most frequently isolated pathogens were *Staphylococcus epidermidis* (41 strains, 25.5%), *Streptococcus pneumoniae* (22 strains, 13.7%), *Escherichia coli* (21 strains, 13.0%), *Haemophilus influenzae* (15 strains, 9.3%) and *Staphylococcus aureus* (13 strains, 8.1%). **Conclusion** 16S rDNA-PCR which is faster in cut-time and wider in frequency distribution of pathogens than cultivation provides a new way of analyzing bacteria infection in the cerebrospinal fluid. It can be applied in clinical detection and epidemiological investigation as a new method. Gram-positive cocci are the predominant pathogens for childhood BM over the past four years.

Key words:bacterial meningitis; 16S rDNA; sequencing; neonate; child

细菌性脑膜炎(BM)是儿童常见的急性中枢神经系统感染性疾病, 其病情进展迅速, 如不及时有效治疗常有不同程度的神经系统后遗症和较高致死率^[1-2]。快速鉴定 BM 病原菌对降低 BM 后遗症发生

率和致死率至关重要^[3]。目前, 细菌鉴定主要依靠培养和生化鉴定, 费时费力, 容易延误最佳治疗时机, 而 16S rDNA-PCR 为病原菌的快速鉴定提供了新的途径^[4-5]。本研究旨在通过对脑脊液标本同时进行培养

* 基金项目: 西安医学院青年科研基金项目(2015QN09)。

作者简介: 黄君华, 男, 讲师, 主要从事感染性疾病的分子诊断研究。

本文引用格式: 黄君华, 张书婉. 16S rDNA 测序在儿童细菌性脑膜炎病原菌鉴定中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(17):2092-2094.

和 16S rDNA 通用引物 PCR, 比较二者在细菌鉴定上的差异, 探索 BM 病原学诊断及流行病学资料新的方法学依据。

1 材料与方法

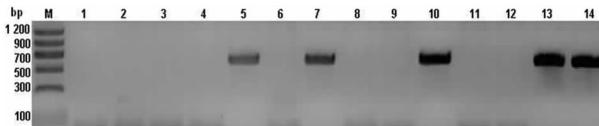
1.1 标本来源及处理 收集 2013 年 1 月至 2016 年 12 月西安市儿童医院送检脑脊液标本 4 016 例。每例样本均在应用抗菌药物前采集 1~3 mL, 取 0.5 mL 于无菌 Eppendorf 管中并 4 ℃暂存; 剩余接种到专用培养瓶, 仪器报告阳性后取适量培养液接种于血平板和巧克力平板(5% CO₂ 环境下 35 ℃培养 48 h), 所有菌株按要求分纯, 经 VITEK compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪鉴定到种。

1.2 细菌 DNA 提取及扩增测序 0.5 mL 脑脊液标本 12 000 r/min 离心 5 min, 取沉淀, 应用 QIAamp Blood DNA Mini Kit 试剂盒(Qiagen), 操作步骤按试剂盒说明书。应用引物 PSL(f): 5'-AGGATT-AGATACCCTGGTAGTCCA-3', P13P(r): 5'-AG-GCCCGGGAACCGTATCCAC-3', 扩增产物 607 bp。PCR 反应体系及后续处理详见文献^[6]。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 分析数据, 采用配对四格表的 χ^2 检验, 比较培养和 PCR 阳性率, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 16S rDNA-PCR 检测标本 标本经扩增后可见阳性者在 500~700 bp 之间有一条明显的条带, 阴性者无条带; 同时 PCR 阴性对照和提取阴性对照均无条带, PCR 阳性对照和提取阳性对照均有条带, 说明扩增结果可信。见图 1。



注: 1 道为 PCR 阴性对照; 2 道为提取阴性对照; 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12 道为阴性标本; 5, 7, 10 道为阳性标本; 13 道为提取阳性对照; 14 道为 PCR 阳性对照

图 1 部分标本电泳结果

2.2 PCR 与培养阳性率比较 4 016 份标本中 16S rDNA-PCR 阳性 161 例, 阳性率 4.0%; 培养阳性 104 株, 阳性率 2.6%, 其中 57 例培养阴性标本均得到扩增条带, 经 χ^2 检验, 二者差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 57, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 PCR 与培养阳性率比较

PCR	培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	104	57	161
阴性	0	3 855	3 855
合计	104	3 912	4 016

2.3 PCR 与培养检测 BM 病原菌分布

养结果均表明儿童 BM 病原菌主要是革兰阳性菌, 以表皮葡萄球菌、肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌为主; 革兰阴性菌主要是大肠埃希菌, 但 PCR 检测出较多的流感嗜血杆菌以及鲁氏不动杆菌、嗜水气单胞菌等培养未检出的病菌。见表 2。另外, 表 3 数据显示表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌引起低龄幼儿 BM 较高年龄幼儿高。

表 2 PCR 与培养检测 BM 病原菌分布[n(%)]

病原菌	PCR(n=161)	培养(n=104)
革兰阳性菌	101(62.7)	72(69.2)
表皮葡萄球菌	41(25.5)	34(32.7)
肺炎链球菌	22(13.7)	12(11.5)
金黄色葡萄球菌	13(8.1)	10(9.6)
溶血葡萄球菌	7(4.3)	5(4.8)
屎肠球菌	6(3.7)	3(2.9)
腐生葡萄球菌	6(3.7)	5(4.8)
粪肠球菌	4(2.5)	2(1.9)
人葡萄球菌	2(1.2)	1(1.0)
革兰阴性菌	60(37.3)	32(30.8)
大肠埃希菌	21(13.0)	17(16.3)
流感嗜血杆菌	15(9.3)	4(3.8)
鲍曼不动杆菌	6(3.7)	5(4.8)
肺炎克雷伯菌	5(3.1)	5(4.8)
阴沟肠杆菌	4(2.5)	1(1.0)
鲁氏不动杆菌	3(1.9)	0(0.0)
嗜水气单胞菌	2(1.2)	0(0.0)
铜绿假单胞菌	2(1.2)	0(0.0)
嗜麦芽窄食单胞菌	1(0.6)	0(0.0)
马耳他布鲁菌	1(0.6)	0(0.0)
合计	161(100.0)	104(100.0)

表 3 脑脊液主要病原菌年龄分布[n(%)]

病原菌	n	<28 d	28 d 至 1 岁	>1~3 岁	>3 岁
表皮葡萄球菌	41	24(58.5)	12(29.3)	3(7.3)	2(4.9)
肺炎链球菌	22	9(40.9)	10(45.5)	2(9.1)	1(4.5)
大肠埃希菌	21	4(19.0)	5(23.8)	7(33.3)	5(23.8)
流感嗜血杆菌	15	6(40.0)	4(26.7)	3(20.0)	2(13.3)
金黄色葡萄球菌	13	3(23.0)	4(30.8)	4(30.8)	2(15.4)
合计	112	46(41.1)	35(31.2)	19(17.0)	12(10.7)

3 讨 论

BM 是严重威胁儿童生命健康的中枢神经系统感染^[7], 脑脊液培养是诊断 BM 的重要病原学方法。然而, 培养的局限性导致其所得到的相关资料与客观情况有较大差异^[8]。16S rDNA-PCR 的发展为 BM 的病原学诊断带来新的途径^[9]。本研究选取近 4 年送检的怀疑 BM 的脑脊液标本 4 016 例作为研究对象,

应用灵敏度和特异性很高的通用引物 PSL/P13P^[6]进行检测并与培养结果进行比较。结果显示4 016份标本 PCR 阳性 161 例,培养阳性 104 例,PCR 阳性率(4.0%)是培养阳性率(2.6%)的 1.5 倍,二者差异具有统计学意义($P < 0.05$),表明 PCR 检测阳性率高于培养法。

本研究显示,近 4 年西安地区儿童 BM 病原菌以革兰阳性球菌为主(62.7%),与国内文献报道相近^[10-11]。从表 2 可见,引起儿童 BM 的病原菌主要是表皮葡萄球菌 41 株(25.5%),肺炎链球菌 22 株(13.7%),大肠埃希菌 21 株(13.0%),流感嗜血杆菌 15 株(9.3%)和金黄色葡萄球菌 13 株(8.1%),这与蒋鸿超等^[11]的报道较相近而与其他一些文献有差异^[12-14],其中林罗娜等^[10]报道引起儿童 BM 的首要菌是肺炎链球菌,说明不同地区的病原菌构成是不同的^[15]。与培养相比,PCR 检出的流感嗜血杆菌以及其他较少引起儿童 BM 的病原菌要多,说明由于培养法低灵敏度等方面的缺点可能导致病原菌检出率较客观情况偏低。病原菌分布与年龄差异也有一定的关系,表皮葡萄球菌和肺炎链球菌在低年龄段儿童(<1岁)中检出率高于高年龄段儿童(>1岁),这与蒋鸿超等^[11]及林罗娜^[10]等的报道一致,可能与侵入性治疗、血脑屏障功能不健全、免疫功能较低等因素有关;成人 BM 主要病原菌虽也以革兰阳性球菌为主,但病原菌构成与儿童不同^[16]。另外,在病原菌分布上两种检测方法也有差异,PCR 检测的病原菌的种类多于培养法,而且检出马耳他布鲁菌等不常见菌,说明在充分避免污染的前提下 PCR 所得到的统计学结果能更加客观全面地反映 BM 病原菌分布。

4 结 论

本研究直接从脑脊液提取细菌基因组 DNA,扩增细菌 16S rDNA 部分片段,经测序来鉴定细菌种类,为得到更加客观真实的 BM 细菌菌谱提供了一种新的方法和思路,有利于更有效地鉴定病原菌和更好地选择抗菌药物。引起儿童 BM 的病原菌主要是革兰阳性球菌,不同年龄段感染菌谱不同。

参考文献

- [1] MAÏNASSARA H B, SIDIKOU F, DJIBO S, et al. Epidemiological patterns of bacterial meningitis in Niger from 2002 to 2010[J]. Sci J Pub Health, 2014, 2 (2): 58-63.
- [2] KU L C, BOGESS K A, COHEN-WOLKOWIEZ M. Bacterial meningitis in infants[J]. Clin Perinatol, 2016, 42 (1): 29-45.
- [3] KULIK D M, ULERYK E M, MAGUIRE J L. Does this child have bacterial meningitis: a systematic review of clinical prediction rules for children with suspected bacterial meningitis[J]. J Emerg Med, 2013, 45 (4): 508-519.
- [4] 梁志娟,侯晓霖,王振海,等.细菌性脑膜炎患者脑脊液细菌基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 的鉴定[J].华中科技大学学报(医学版),2013,42 (3):314-316.
- [5] 郑可鲁,杨思达,高媛媛,等.脑脊液细菌 16S 核糖体 RNA 基因检测在抗生素治疗后化脓性脑膜炎患儿中的应用价值[J].广西医学,2016,38 (10):1367-1369.
- [6] 黄君华,黄凤霞,张书婉,等.16S rDNA 测序在儿童自发性细菌性腹膜炎病原学诊断中的作用[J].山西医科大学学报,2016,47 (8):764-767.
- [7] HADZIC E, SINANOVIC O, MEMISEVIC H. Is bacterial meningitis a risk factor for developing attention deficit hyperactivity disorder[J]. Isr J Psychiatry Relat Sci, 2017, 54 (2): 54-57.
- [8] 黄君华,张书婉.16S rDNA 测序在儿童血流感染细菌性病原菌分布中的应用[J].海南医学,2014,25 (10):1467-1469.
- [9] 曹敬荣,高世超,陈典典,等.基于细菌 16S rDNA 基因扩增临床不常见病原菌的价值[J].中国感染控制杂志,2016,15 (4):222-226.
- [10] 林罗娜,林立,温顺航,等.儿童细菌性脑膜炎 100 例病原分布及耐药分析[J].临床儿科杂志,2016,34 (2):105-110.
- [11] 蒋鸿超,奎莉越,黄海林,等.116 例细菌性脑膜炎儿童脑脊液病原菌分布及耐药性分析[J].中国当代儿科杂志,2013,15 (4):264-267.
- [12] 武坚锐,孟晋华,徐辉,等.2011—2013 年儿童脑脊液分离菌的构成及耐药性分析[J].临床医药实践,2015,24 (1):45-48.
- [13] 张莉,王传清,王艺.病原菌明确的细菌性脑膜炎 146 例临床及病原学分析[J].中国循证儿科杂志,2013,8 (3): 161-166.
- [14] 杨欢,邵丽佳,李佳慧,等.细菌性脑膜炎患儿的病原菌分布特征及耐药性分析[J].解放军预防医学杂志,2017,35 (6):655-657.
- [15] DIALLO A O, SAWADOGO H M, YAMEOGO I, et al. Bacterial meningitis epidemiology and return of Neisseria meningitidis serogroup A cases in Burkina Faso in the five years following MenAfriVac mass vaccination campaign [J]. PLoS One, 2017, 12 (11): 1-15.
- [16] 牛晓艳,杨娟,刘强,等.回顾性分析成人化脓性脑膜炎细菌构成及其脑脊液分布特点[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2017,24 (2):110-113.

(收稿日期:2018-01-10 修回日期:2018-04-24)