

· 论 著 ·

细菌培养联合 Tem-PCR 在肺炎患儿病原检测中的应用价值

度晓霞

(四川省广元市妇幼保健院检验科 628017)

摘要:目的 探讨细菌培养联合靶序列富集多重聚合酶链反应(Tem-PCR)在肺炎患儿病原检测中的价值。方法 选取 2015 年 1—12 月该院住院肺炎患儿 141 例,收集深部呼吸道引物进行细菌培养,采用 Tem-PCR 检测常见病原菌的特异性 DNA。结果 141 例患儿中 83 例患儿标本培养呈阳性,阳性率为 58.87%(83/141);共分离出 85 株病原菌,病原菌检出率为 60.28%(85/141);Tem-PCR 检测阳性率为 40.43%(57/141),病原菌检出率为 50.35%(71/141)。细菌培养联合 Tem-PCR 检测的病原菌检出率为 78.01%(110/141),明显高于细菌培养和 Tem-PCR 的检出率($P < 0.05$);其中,流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌及鲍曼不动杆菌的检出率依次为 28.37%(40/141)、19.15%(27/141)、8.51%(12/141)、6.38%(9/141)、5.67%(8/141)、5.67%(8/141)、2.84%(4/141)。结论 细菌培养联合 Tem-PCR 检测能够提高住院肺炎患儿的病原菌检出率,提高临床细菌病原学评估价值。

关键词:肺炎; 聚合酶链反应; 细菌培养

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.23.029 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)23-3506-03

The value of bacterial culture combined with Tem-PCR in detection for the bacterial etiology in hospitalized children with pneumonia

TUO Xiaoxia

(Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Guangyuan, Guangyuan, Sichuan 628017, China)

Abstract: **Objective** To investigate the value of bacterial culture combined with target sequence enrichment multiplex polymerase chain reaction(Tem-PCR) in detection for the bacterial etiology in hospitalized children with pneumonia. **Methods** A total of 141 hospitalized children with pneumonia in hospital between January to December 2015 were collected, deep respiratory aspirate sample of the children was cultured by conventional plate and special selective plate, and the aspirate samples amplified for DNA of common bacterial pathogens were tested with Tem-PCR. **Results** In 141 cases of children, the total positive rate by bacterial culture was 58.87%(83/141), and the pathogen detection rate was 60.28%(85/141); the positive rate and pathogen detection rate by Tem-PCR was 40.43%(57/141) and 50.35%(71/141). The pathogen detection rate of 14 bacteria by bacterial culture combined with Tem-PCR was 78.01%(110/141), which was higher than that of the bacterial culture and Tem-PCR. And the combined detection rates of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter Bauman* were 28.37%(40/141), 19.15%(27/141), 8.51%(12/141), 6.38%(9/141), 5.67%(8/141) and 2.84%(4/141), respectively. **Conclusion** The bacterial culture combined with Tem-PCR detection could improve the positive rate of bacterial pathogens in hospitalized children with pneumonia, as well as improve the value of clinical assessment for pathogenic bacteria.

Key words: pneumonia; polymerase chain reaction; bacterial culture

小儿肺炎是儿童时期常见的呼吸系统感染性疾病,是导致我国 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一。儿童多因细菌感染诱发,少数患儿可由病毒、衣原体及支原体感染所致。抗菌药物是目前临床治疗小儿肺炎的主要手段,早期准确诊断并明确细菌病原构成具有重要的意义。细菌培养是临床诊断感染性疾病的“金标准”,但常规细菌培养耗时较长,往往需要 2 d 左右,且对于流感嗜血杆菌(HINF)、肺炎链球菌(SPN)等部分病原菌的细菌培养要求较高,检出难度较大^[1]。聚合酶链反应(PCR)是一种通过放大扩增特定 DNA 片段而进行检测的分子生物学技术,对于病原学分析具有重要的意义。近年来,靶序列富集多重聚合酶链反应(Tem-PCR)技术逐渐应用于呼吸系统感染性疾病病原菌的检测,能够明确诊断和鉴别病原菌,为临床早期治疗提供参考^[2]。本研究对 141 例住院肺炎患儿应用细菌培养联合 Tem-PCR 技术检测肺炎患儿病原分布,旨在评估两种方法联合应用检测肺炎病原分布的价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1—12 月本院住院肺炎患儿

141 例,均符合《社区获得性肺炎诊断和治疗指南》^[3]中的临床诊断标准,研究获得患儿家长的同意,并且签署了书面知情同意书。研究对象中男 93 例,女 48 例;年龄 1 月至 10 岁,平均(5.45±1.02)岁;病程 1~25 d,平均(2.98±1.67)d;治疗情况:9 例尚未接受任何药物治疗,132 例已经接受 1 d 以上抗菌药物治疗,其中,86 例接受第二代或第三代 β-内酰胺类药物治疗,25 例接受青霉素类药物治疗,46 例接受大环内酯类药物治疗,部分患儿接受两种药物联合治疗方案。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 患儿入院 48 h 内,晨取呼吸道深部痰液置于无菌容器中保存并立即送检。标本接种于普通培养基、SPN 及 HINF 选择性培养基中,然后置于温度 37 ℃、CO₂ 浓度为 5%~10% 条件下进行培养,培养时间 24 h。HINF 检测:采集透明或半透明的可疑菌落进行革兰染色,并予以 X、V 因子检测和鉴定。采集可疑菌落置于 M-H 培养基上进行卫星试验,并在 M-H 培养基上分别粘贴 X+V、X 及 V 因子纸片,如仅 X+V 因子纸片周围有菌落生长,其余纸片周围无菌落生长,

则确认为 HINF 生长。其余病原菌均将其分为单个菌落,然后应用 VITEK-32 型全自动微生物鉴定仪实施细菌鉴定,操作按照实验室规程及相关试剂说明书进行。

1.2.2 Tem-PCR 检测 将采集到的深部呼吸道引物进行解冻处理,应用基因组试剂盒(美国 Axy Gen Scientific 公司)进行细菌 DNA 提取,操作严格按照试剂说明书执行。细菌 DNA 应用 PCR 试剂盒(德国 Qiagen 公司)进行 PCR 扩增处理,设计 14 种细菌的 PCR 特异性引物,包括 HINF 的靶基因 *OmpP2*、SPN 的靶基因 *LytA*、大肠杆菌(ECO)的靶基因 *Eac*、肺炎克雷伯菌(KPN)的靶基因 *Khe*、金黄色葡萄球菌(SA)靶基因 *Nuc*、鲍曼不动杆菌(ABM)的靶基因 *Npo1*、铜绿假单胞菌(PA)的靶基因 *AlgD*、阴沟肠杆菌(ECL)的靶基因 *AmpC*、嗜肺军团菌(LPN)的靶基因 *Mip*、奇异变形杆菌(PM)的靶基因 *Topoiso*、脑膜炎奈瑟氏菌(NMG)的靶基因 *ctrA*、化脓链球菌(SPY)的靶基因 *Mf*、粪肠球菌(EFLS)的靶基因 *Ddl*、尿肠球菌(EFCM)的靶基因 *Ddl*。特异性与超级引物试剂盒为 ResPlex I 及 HAI I (美国 Genaco 公司)。Tem-PCR 反应条件如下。(1)能量循环:预变性条件为 95 °C 下 15 min,变性条件为 94 °C 下 30 s,退火条件为 52 °C 下 1 min,延伸条件为 72 °C 下 1 min,连续 15 个循环。(2)第二循环:94 °C 下 15 s,70 °C 下 1 min,6 个循环。(3)第三循环:94 °C 下 15 s,52 °C 下 15 s,72 °C 下 15 s;30 个循环。(4)最后延伸:72 °C 下 3 min。(5)贮存:4 °C 下 50 min。采用悬浮阵列法进行 PCR 产物 DNA 水平测

定,PCR 产物严格按照 ResPlex I 及 HAI I 试剂盒说明书执行。杂交产物均应用多功能悬浮阵列检测平台(美国 Luminex 公司生产)。以荧光强度中位值(MFI)大于 250 或者超过平均阴性结果值+5×标准差判定为阳性。

1.3 统计学处理 研究数据应用 SPSS18.0 统计学软件进行分析,计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细菌培养结果 141 例患儿的深部呼吸道标本经细菌培养,57 例细菌培养呈阴性,83 例标本培养呈阳性,阳性率为 58.87% (83/141);共分离出 85 株病原菌,包括 18 株 HINF,14 株 ECO,9 株 KPN,7 株 SA,5 株 SPN,2 株 PA,2 株 ABM,2 株 ECL,26 株其他(14 株粘质沙雷菌,10 株副流感嗜血杆菌,2 株表皮葡萄球菌)。

2.2 Tem-PCR 检测结果 141 例患儿经 Tem-PCR 扩增检测,84 例标本呈阴性,57 例呈阳性,阳性率为 40.43% (57/141);共检出 71 株病原菌,病原菌检出率为 50.35% (71/141),包括 30 株 HINF,27 株 SPN,8 株 ABM,3 株 PA,3 株 SA。

2.3 5 种细菌的培养结果与 Tem-PCR 检测结果比较 细菌培养与 Tem-PCR 对于 SPN、HINF、ABM、SA、PA 的测定结果比较见表 1。以细菌培养为标准,评价 Tem-PCR 的检出效能见表 2。

表 1 5 种细菌的培养结果与 Tem-PCR 检测结果比较 (n=141, n)

Tem-PCR	细菌培养 SPN		细菌培养 HINF		细菌培养 SA		细菌培养 ABM		细菌培养 PA	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	5	22	8	22	1	2	1	7	1	2
阴性	0	114	10	101	6	132	1	132	1	137

表 2 Tem-PCR 的病原菌检出效能 (%)

指标	SPN	HINF	SA	ABM	PA
灵敏度	100.00	44.44	14.29	50.00	50.00
特异度	83.82	82.11	98.51	94.96	98.56
符合率	84.40	77.30	94.33	94.33	97.87

表 3 两种方法单独应用及联合使用对 14 种病原菌的检出率比较 [n=141, n (%)]

病原菌类型	细菌培养	Tem-PCR	细菌培养+Tem-PCR
HINF	18(12.77)	30(21.28)*	40(28.37)*
SPN	5(3.55)	27(19.15)*	27(19.15)*
ECO	12(8.51)	0(0.00)	12(8.51)
KPN	9(6.38)	0(0.00)	9(6.38)
SA	7(4.96)	3(2.13)	8(5.67)
ABM	2(1.42)	8(5.67)	8(5.67)
PA	2(1.42)	3(2.13)	4(2.84)
ECL	2(1.42)	0(0.00)	2(1.42)
LPN	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
PM	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
NMG	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
SPY	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
EFLS	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
EFCM	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
合计	57(40.43)	71(50.35)	110(78.01)

注:与细菌培养比较,* $P < 0.05$

2.4 两种方法单用及联合应用对 14 种病原菌的检出率比较

细菌培养联合 Tem-PCR 检测的病原菌检出率为 78.01% (110/141),联合检测的病原菌检出率明显高于单独检测 ($P < 0.05$),主要表现为 HINF、SPN、ECO、SA、ABM、PA 的检出率提高,见表 3。

3 讨 论

小儿肺炎是儿科临床中较为常见的呼吸系统疾病之一,主要表现为气促、咳嗽及咳痰等,如未获得及时、准确的诊断和治疗可能导致病情进展,引起败血症、脓毒血症甚至呼吸衰竭等,威胁患儿的生命健康。因此,及时、准确地对肺炎病原菌分布进行分析对于指导临床合理用药治疗具有重要的意义。

目前,临床对于呼吸道感染病原菌的检测方法较多,主要有血清抗原检测、抗体检测、细菌培养及 PCR 检测。其中,细菌培养仍是病原学诊断呼吸系统感染的“金标准”,也是当前临床应用最为广泛的诊断方法之一。但细菌培养法时间较长,对于临床早期用药治疗的指示作用不强。细菌培养阳性率容易受到抗菌药物使用情况、标本采集、处理、运输、保存及培养等条件的影响。此外,SPN 及 HINF 的细菌培养条件特殊,检出率并不高^[4-5]。本研究中,细菌培养对 HINF 和 SPN 的检出率仅为 12.77% 和 3.55%。近年来,随着分子生物学技术的发展,PCR 技术在感染性疾病的病原学分析中获得了广泛应用。PCR 是一种针对细菌特异性 DNA 而开展检测的技术,通过高温变性处理、低温退火处理,以及适温延伸处理等周期性循环而实现目标 DNA 的迅速扩增^[6]。该技术检测耗时较短、操作简便、特异性强并且灵敏度高,且能够直接对采集到的标本进行检测,对于特异性细菌病原的检测具有重要价值,目前已成

为经典细菌培养法的重要补充手段,从而提高病原学分析和诊断的特异度与灵敏度^[7]。

单纯 PCR 检测每次只能对一种病原菌进行检测,无法满足病原学鉴别要求。近年来,为了弥补单纯 PCR 检测的缺陷, Tem-PCR 技术逐渐应用于临床,其能够在单次反应过程中对多个病原进行同时检测,从而实现病原学的鉴别诊断。Tem-PCR 技术利用特殊扩增技术,克服了传统 PCR 存在的不同靶基因扩增不均匀所致特异度及灵敏度降低等缺陷,更好地鉴别诊断病原菌^[8]。Tem-PCR 技术在初始循环中对靶基因序列进行富集处理,然后再引入一对能够识别所有 PCR 内引物的共用超级引物实施大量扩增处理,仅保留下游超级引物实施生物素标记而被检测,从而在同一个反应体系中对多种病原菌的核酸片段进行有效扩增,并应用悬浮阵列技术进行测定,具有操作简便快速、重复性好、特异度及灵敏度高等优点,快速获取测定结果^[9]。目前,国内外已有诸多临床实践研究证实, Tem-PCR 技术对于呼吸系统病毒和细菌检测及验证的可靠性较高。

本研究对 141 例住院肺炎患儿进行研究,细菌培养结果显示, HINF 为最主要的病原菌,检出率为 12.77%(18/141),而 Tem-PCR 对 HINF 的检出率高达 21.28%(30/141),细菌培养与 Tem-PCR 联合检测后 HINF 检出率达 28.37%(40/141),相较于单纯细菌培养明显提高。表明 Tem-PCR 与细菌培养联用时能够有效提高检出率。此外,细菌培养对 SPN 的检出率仅为 3.55%(5/141),而 Tem-PCR 检出率达到 19.15%(27/141),后者的检出率明显高于细菌培养,提示 Tem-PCR 对于 SPN 的检测相较于细菌培养具有更高的灵敏度,这对小儿肺炎的临床治疗具有重要的指导意义。既往研究表明, ECO 及 KPN 在医院感染或者条件性感染中具有重要意义^[10]。但本研究入选病例均为社区获得性感染,经细菌培养后检出率也较高,分别为 8.51%(12/141)、6.38%(9/141),可能是由于标本采集前已经使用抗菌药物等有关。此外, Tem-PCR 对于 ABM、SA、PA 这 3 种重要的病原菌检出率并不高,分别为 5.67%(8/141)、2.13%(3/141)、2.13%(3/141),与细菌培养的 1.42%(2/141)、4.96%(7/141)、1.42%(2/141)相比,差异无统计学意义($P>0.05$),可能是由于本组患儿均为住院患儿,在入院前多已经接受抗菌药物治疗,继而导致 HINF 及 SPN 等敏感病原菌降低,而 KPN、ECO 等定植增加引起,同时也反映两种检测技术在这 3 种病原菌的检出率方面并无明显差异。谭文涛等^[11]对肺炎患儿进行病原学检测,细菌培养结果显示细菌是小儿肺炎的主要病原菌,其中,以 HINF、ECO、KPN、SPN 最为多见,阳性率依次为 12.78%(23/180)、7.22%(13/180)、5.56%(10/180)、2.78%(5/180),与本研究结论基本一致。以细菌培养为标准, Tem-PCR 对于 SA、HINF、PA 及 ABM 的灵敏度不如预期理想(14.29%~50.00%),但对于 SPN 的灵敏度高达 100.00%,且这 5 种常见病原菌的特异度均较高(82.11%~98.56%),符合率也较高(77.30%~97.87%)。此外, Tem-PCR 从开始提取 DNA 至获得报告结果的时间仅为 6 h,相较于细菌培养明显缩短,对于肺炎的早期治疗具有更高的价值。

由于肺炎患儿在患病早期广泛接受抗菌药物治疗,导致细菌培养检出率降低,临床应有针对性地使用抗菌药物治疗。而将细菌培养与 Tem-PCR 联合应用,以两者中任意一项或两项阳性时为标准,能够提高病原菌检出率。本研究中,细菌培养+ Tem-PCR 对 14 种常见病原菌检出率为 78.01%(110/

180),相较于单纯细菌培养的 40.43%(57/141)及单纯 Tem-PCR 的 50.35%(71/141)明显提高,尤其对 HINF、SPN 检出率较单纯细菌培养明显提高(12.77% vs. 28.37%, 3.55% vs. 19.15%),与薛冠华等^[12]报道相似,认为这一结果可能更为客观、真实地反映儿童肺炎的细菌病原学特征,同时也提示 HINF、SPN 等仍为小儿肺炎感染的主要病原菌。

综上所述,儿童肺炎的各种病原学检查方法各具优劣,而细菌培养联合 Tem-PCR 技术,能够提高儿童肺炎的病原菌检出率,为早期合理用药提供可靠依据和指导,具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 吴旭耀,沈彩燕,顾玲萍. 儿童细菌性肺炎的病原菌及耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(10): 2124-2126.
- [2] Wang C, Zhou H, Zhu W, et al. Ultrasensitive electrochemical DNA detection based on dual amplification of circular strand-displacement polymerase reaction and hybridization chain reaction[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 47(28): 324-328.
- [3] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中国临床医生, 2001, 29(1): 20-22.
- [4] 饶春梅,张中和,王勇,等. 荧光定量 PCR 检测社区获得性肺炎患者痰标本中肺炎链球菌[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(4): 367-369.
- [5] 丁振尧,李红微,郭美丽,等. 多重 PCR 检测浙江沿海地区儿童肺炎细菌性病原研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014, 26(1): 46-50.
- [6] 井发红,慕玉东,辛娜,等. 实时荧光定量 PCR 检测血流感染常见病原菌的临床应用[J]. 山西医科大学学报, 2015, 46(11): 1126-1129.
- [7] Gollomp K, Rankin SC, White C, et al. Broad-range bacterial polymerase chain reaction in the microbiologic diagnosis of complicated pneumonia[J]. J Hosp Med, 2012, 7(1): 8-13.
- [8] 黄艳飞,鲁辛辛,孙宇峰. 多重 PCR 同时检测病原菌及其耐药基因[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(4): 623-625.
- [9] Chang HY, Chang LY, Shao PL, et al. Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological tests for the confirmation of Mycoplasma pneumoniae infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2014, 47(2): 137-144.
- [10] 王喆,季伟,郭红波,等. 儿童社区与院内获得性肺炎的细菌病原构成及其耐药性对比研究[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(3): 211-216.
- [11] 谭文涛,笄欣. 细菌培养和聚合酶链反应在肺炎患儿细菌病原学检测中的应用价值[J]. 中国实验诊断学, 2015, 15(1): 98-100.
- [12] 薛冠华,徐文健,马晓红,等. PCR 法与培养法检测儿童肺炎易感细菌结果比较[J]. 北京医学, 2012, 34(6): 466-469.