

· 综述 ·

肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎诊断的研究进展

全敏 邢卉春

自发性细菌性腹膜炎 (spontaneous bacterial peritonitis, SBP) 是在无腹腔内邻近器官直接细菌感染 (如肠穿孔、肠脓肿) 的情况下发生于腹腔的感染, 是肝硬化腹水患者常见的并发症之一。肝硬化患者肝内 Kupffer 细胞和肝窦内皮细胞的破坏导致了补体经典途径和替代途径功能障碍; 同时门脉高压可致肠壁血流缓慢、肠壁屏障功能障碍、肠道微生态失衡和细菌发生移位; 脾功能亢进导致白细胞、中性粒细胞减少及免疫功能减退等, 致使肝硬化患者极易发生腹腔感染。肝硬化及肝衰竭患者中 SBP 的发生率分别为 10% ~ 25% 和 18% ~ 47%, 而合并腹水的肝病患者 SBP 的发生率为 30%^[1]。SBP 的传统诊断是依靠腹水细菌培养, 但近年来生物化学和分子生物学技术在 SBP 诊断中的应用已取得很大进展, 本文就此方面内容做一综述。

一、腹水中细菌学检查

典型的 SBP 诊断并不困难, 但 SBP 患者并非均会出现典型的临床症状, 如发热、腹痛等。腹水细菌培养是诊断 SBP 的金标准, 然而腹水培养阳性率最高仅为 40%。采用床边抽取腹水立即注入血培养瓶, 并在全自动培养仪内培养, 使腹水中多形核白细胞 (polymorphonuclear, PMN) ≥ 250 个/ml 的腹水标本细菌培养阳性率可得以提高, 但并非所有 SBP 患者腹水 PMN 均可 ≥ 250 个/ml。腹水细菌培养阳性可确诊 SBP, 阴性却不可排除 SBP; 而且细菌培养需要的周期长、阳性率低, 尚不能满足快速诊断的临床需求。

二、腹水中 PMN 的检测

腹水 PMN 检测也是临床上诊断 SBP 的常用指标之一, 当腹水中 PMN ≥ 250 个/ml 时可不依赖细菌培养而诊断 SBP。传统的 PMN 计数法是用光学显微镜在细胞计数池里计数, 既耗时又耗力, 目前多数医院检验科均采用血细胞自动计数仪检测腹水 PMN 水平。Riggio 等^[2]对自动计数仪与手工计数的准确度进行了比较, 发现结果高度一致, 自动计数仪能检测到白细胞各种类别的数量。将手工计数 PMN > 250 个/ml 作为诊断标准时, 自动计数仪诊断 SBP 时敏感性、特异性、阳性和阴性预测值分别达到 100%、97.7%、94.1% 和 100%。自动计数仪优于手工计数的另一点体现在血性腹水的检测, 可将腹水中得到的总 PMN 计数减去随血液外渗到腹水中的 PMN 数 (按每 1 个 PMN 对应 250 个红细胞换算)。

三、生化指标在检测腹水感染中的应用

生化法检测腹水感染的技术主要有白细胞酯酶试纸条

(leukocyte esterase reagent, LER) 和腹水中硝酸盐的检测。

1. LER 的应用: 该方法的基本原理是白细胞胞质内所含的酯酶作用于试纸条中的吲哚酚酯, 产生的吲哚酚与重氮盐反应形成紫色缩合物而显色, 颜色深浅与白细胞数量呈正相关, 是一种间接反映腹水中白细胞水平的方法。早期研究报道称 LER 的敏感性达 85% ~ 100%, 特异性达 90% ~ 100%^[3]。然而其研究样本量较少, 且仅局限于两个中心实验室。Nousbaum 等^[4]研究 (1041 例患者, 腹腔穿刺次数达 2123 次) 显示, 使用 LER 诊断 SBP 的敏感性仅有 45%, 可见其敏感性尚需进一步验证。有研究显示 LER 的颜色和观察时间点的选择是影响其敏感性的重要因素。Mendler 等^[5]通过对腹水中白细胞等级稀释来界定最佳的观察时间点和最佳的观察颜色, 结果显示在反应 3 min 时获得的敏感性和特异性最佳, 分别为 100% 和 57.9%, 当试纸条的颜色呈现茶色/棕色时确诊 SBP 相对更准确。de Araujo 等^[6]建议选择最佳的 LER 参考指标不可仅靠厂家提供的参考值, 要以研究得出的敏感性与特异性之间的最佳界值作为参考标准。总之, LER 只是一项快速简便的检测技术, 在诊断 SBP 时并不优于自动细胞计数, Rerknimitr 等^[7]对不同的 LER 和自动细胞计数进行比较, LER 诊断 SBP 的准确度低于自动细胞计数。

2. 腹水中硝酸盐的检测: 有报道称肝硬化腹水患者并发 SBP 时腹水中的 NO 和硝酸盐含量会上升^[8]。内毒素超抗原会激活单核巨噬细胞和内皮细胞进而诱导一氧化氮合成酶表达并产生 NO, 但是 NO 存在时间短、易扩散且难测量, 只有测量腹水中亚硝酸盐和硝酸盐来反映 NO 的生成量, 因此硝酸盐就成为反映细菌感染的间接指标。Torun 等^[9]用硝酸盐试纸条检测腹水中硝酸盐的含量, 此方法诊断 SBP 的敏感性和阳性预测值只有 13% 和 40%, 分析可能受饮食和并发其他部位感染等影响, 可见硝酸盐试纸条尚不能很好地诊断 SBP。

四、分子生物学技术在腹水中细菌检测的应用

1. 基于 16S rRNA 的分子技术: 核糖体 16S rRNA 为所有细菌所共有, 由于 16S rDNA 序列为恒定区与可变区交错排列, 因此, 以恒定区设计的通用引物扩增片段常是大小相等或相近, 但序列不同的多种细菌 DNA 片段的混合物 (含有可变区序列)。通过适当的方法获得其序列信息, 再与标准菌株的信息比较, 或直接与数据库中的序列进行比对, 即可鉴定标本中可能存在的细菌种类。也可根据可变区序列设计出细菌属、种特异性引物或探针, 经 PCR 或核酸杂交直接在属、种的水平对菌群进行分析。目前基于 16S rRNA 的分子生物学技术对 SBP 的诊断也崭露头角, 如 Mostafa 等^[10]运用 PCR 方法对腹水细菌 DNA 进行扩增, 通过对产物进行测序来鉴别细菌种属, 结果显示 PCR 可以检测到 95% (19/20) 患者有腹水感染, 相比之下, 腹水细菌培养只有 45% 的阳性率。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.019

基金项目: 首都医学发展科研基金 (2007-3054)

作者单位: 100015 北京, 北京大学北京地坛医院教学医院 (全敏); 首都医科大学附属北京地坛医院 (邢卉春)

通讯作者: 邢卉春, Email: huichunxing@126.com

El-Naggar 等^[11-13]进行类似的研究也证实用 PCR 技术检测腹水中的细菌 16S rDNA, 阳性率远远高于同期细菌培养和 PMN 计数的阳性率。以上研究表明基于 16S rDNA 的 PCR 技术较传统细菌培养有更高的敏感性。此外, 与细菌培养相比, 整个过程只需 1 d 即可完成, 诊断时间缩短了 4 倍^[13]。但细菌 DNA 提取和 PCR 技术要求严格的无菌操作, 各个环节都有可能造成假阳性结果。

2. 基因芯片技术的应用: 基因芯片技术能够快速、敏感、高效和大规模地获得相关的生物信息, 在基因研究的许多领域都有重要的应用价值。目前新的 DNA 芯片技术能够快速检测包括细菌在内的多种病原体并鉴定菌种。Sugihara 等^[14]将腹水接种到血培养瓶中, 35℃ 孵育 6 h 后提取细菌 DNA 进行 PCR 扩增, 有明显阳性条带的扩增产物用于 DNA 芯片技术分析。使用的 4 种探针分别是根据 16S rRNA 基因序列的前 500 bp 及 3 个变异区 (V1、V2 和 V3) 设计而成。研究结果显示, DNA 芯片技术在检测 SBP 和细菌性腹水中的阳性率分别是 75% (6/8) 和 50% (4/8)。此方法的阳性率虽然略高于腹水细菌培养, 但考虑到细菌 DNA 基因芯片需要高密度芯片制作的精密机械系统、操作工艺和杂交的微弱信号的检出装置, 及对杂交信号、相关信息、数据的大规模处理和能力的分析, 目前只应用科研, 尚未在临床中广泛开展。

五、血浆和腹水中的炎性细胞因子检测

白细胞介素-6 (IL-6) 是与 SBP 相关的主要促炎因子, 其与 IL-18 和 TNF- α 均由单核/巨噬细胞在细菌脂多糖 (LPS) 刺激下活化分泌。梁坚等^[15]采用双抗体夹心 ELISA 法测定血清及腹水中 TNF- α 和 IL-6 水平, 二者在 SBP 组均显著高于漏出液组, 在腹水中的水平高于血清; 感染控制后, 二者水平较控制前显著降低。陈银芸等^[16]也证实, 肝炎肝硬化合并 SBP 患者血清、腹腔积液中 TNF- α 、IL-8 和 IL-18 水平显著高于未合并 SBP 患者。但在不同菌种感染的腹水里, 增高的细胞因子也有所不同, 如 G⁻ 菌腹水 TNF- α 、LPS 水平显著高于 G⁺ 菌感染的腹水。通过检测腹水 TNF- α 和 LPS 水平, 对 SBP 的诊断及推测感染的菌种提供了一定的线索, 有利于指导临床及时合理应用抗菌药物^[17]。由于以上检测指标不具备特异性, 所以并不能作为确诊 SBP 的依据, 仅提供一定的参考价值。

六、腹水中乳铁蛋白的检测

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 是在前中幼粒细胞转化为中幼粒细胞过程中合成的, 从多形核中性粒细胞释放, 分布于哺乳动物的乳汁和其他多种组织及其分泌液中, 在血浆以及中性粒细胞的次级溶酶体内也广泛存在。腹水中乳铁蛋白 (ascitic fluid lactoferrin, AFLAC) 是由 PMN 在激活状态下释放出来的, 在体液中与中性粒细胞呈比例出现, AFLAC 的浓度可通过酶联免疫吸附法检测, 因此设想通过其推测 PMN 的数量来诊断 SBP。Parsi 等^[18]对 148 例肝硬化腹水患者的 218 份腹水标本, 同时进行菌培养、PMN 计数及 AFLAC 检测。结果发现 SBP 患者的腹水中 AFLAC 明显高于非 SBP 样本, 如将 AFLAC 的临界值定为 242 ng/ml, 诊断 SBP 敏感性和特异性可达 96% 和 97%, AFLAC 有望成为简单且快速诊断肝硬化腹水患者并发 SBP 敏感且特异的指标。

综上所述, 细菌培养和腹水中 PMN 计数都应作为诊断

SBP 的常规检测项目, 多数情况下临床诊断 SBP 还需依赖间接指标, 如在排除继发性腹膜炎后出现发热、腹痛及腹部压痛和反跳痛等腹膜刺激征; 腹水白细胞 $> 0.5 \times 10^9/L$, PMN $> 50\%$, 腹水培养有致病菌生长或涂片阳性者; 或腹水白细胞 $> 0.3 \times 10^9/L$, PMN $> 50\%$, 结合临床表现可诊断为 SBP。而 LER 检测法虽简单易行, 但用于检测腹水其敏感性和特异性都尚不尽人意。腹水及血清中的细胞因子、NO 等目前只能作为辅助诊断 SBP 的参考指标。AFLAC 的检测研究较少, 其应用价值有待深入研究。基因芯片检测细菌的技术操作复杂、耗费高。基于 16S rRNA 基因方面的检测可以快速、准确地检测到腹水中的细菌, 应用此技术可望成为简单易行的检测腹水中细菌感染的方法。

参 考 文 献

- 1 骆抗先. 乙型病毒性肝炎基础及临床. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 163.
- 2 Riggio O, Angeloni S, Parente A, et al. Accuracy of the automated cell counters for management of spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(37): 5689-5694.
- 3 Riggio O, Angeloni S. Ascitic fluid analysis for diagnosis and monitoring of spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(31): 3845-3850.
- 4 Nousbaum JB, Cadranet JF, Nahon P, et al. Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology*, 2007, 45(5): 1275-1281.
- 5 Mendler MH, Agarwal A, Trimzi M, et al. A new highly sensitive point of care screen for spontaneous bacterial peritonitis using the leukocyte esterase method. *J Hepatol*, 2010, 53(3): 477-483.
- 6 de Araujo A, de Barros Lopes A, Trucollo MM, et al. Is there yet any place for reagent strips in diagnosing spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients? An accuracy and cost-effectiveness study in Brazil. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(12): 1895-1900.
- 7 Rerknimitr R, Limmathurotsakul D, Bhokaisawan N, et al. A comparison of diagnostic efficacies among different reagent strips and automated cell count in spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(5): 946-950.
- 8 Coskun U, Ozenirler S, Sancak B, et al. Serum and ascetic fluid nitrate levels in patients with cirrhosis. *Clin Chim Acta*, 2001, 306(1-2): 127-132.
- 9 Torun S, Dolar E, Yilmaz Y, et al. Evaluation of leukocyte esterase and nitrite strip tests to detect spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(45): 6027-6030.
- 10 Mostafa MS, El-Seidi EA, Kassem AM, et al. Detection of ascitic fluid infections in patients with liver cirrhosis and ascites. *Arab J Gastroenterol*, 2011, 12(1): 20-24.
- 11 El-Naggar MM, el-SA K, El-Daker MA, et al. Bacterial DNA and its consequences in patients with cirrhosis and culture-negative, non-neutrocytic ascites. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt12): 1533-1538.
- 12 袁春, 黄长形, 连建奇. PCR 测肝硬化腹水中细菌 DNA 的研究. *透析与人工器官*, 2007, 18(1): 20-24.
- 13 Bruns T, Sachse S, Straube E, et al. Identification of bacterial DNA in neutrocytic and non-neutrocytic cirrhotic ascites by means of a

- multiplex polymerase chain reaction. *Liver Int*, 2009, 29(8):1206-1214.
- 14 Sugihara T, Koda M, Maeda Y, et al. Rapid identification of bacterial species with bacterial DNA microarray in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Intern Med*, 2009, 48(1):3-10.
- 15 梁坚, 吴康英, 周宇, 等. 肝硬化并自发性腹膜炎患者血清及腹水瘦素、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 临床意义的探讨. *中西医结合肝病杂志*, 2009, 19(5):278-280.
- 16 陈银芸, 霍继荣. 乙型肝炎肝硬化并发腹膜炎患者血清及腹腔积液 TNF- α 、IL-8、IL-18 水平临床意义的探讨. *中国当代医药*, 2010, 17(14):32-33.
- 17 付晓梅, 吕汉文. 肝硬化自发性腹膜炎患者细胞因子水平. *中山大学学报(医学科学版)*, 2006, 27(3S):207-208.
- 18 Parsi MA, Saadeh SN, Zein NN, et al. Ascitic fluid lactoferrin for diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology*, 2008, 135(3):803-807.
- (收稿日期:2011-06-14)
(本文编辑:孙荣华)
- 全敏, 邢卉春. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎诊断的研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*, 2012, 6(2):156-158.

