

· 临床论著 ·

PCR方法在自发性细菌性腹膜炎快速诊断中的应用

赵莹莹 全敏 王琦 程丹颖 段英 李贲 杨松 吴淑玲 刘顺爱 邢卉春 成军

【摘要】 目的 探讨PCR法在快速诊断自发性细菌性腹膜炎中的临床应用价值。**方法** 本研究选取64例肝硬化失代偿期伴腹水的住院患者作为研究对象,收集其血液标本及腹水标本,用基于细菌16S rRNA基因的聚合酶链反应(PCR)方法检测患病组(A组,15例)、非患病组(B组,6例)以及临床感染组(C组,43例)腹水中的细菌;并比较PCR方法与腹水培养法的灵敏度和特异度等。**结果** PCR法检测A组、B组和C组患者腹水细菌的阳性率分别为100% (15/15)、0 (0/6)和83.7% (36/43)。PCR法诊断自发性细菌性腹膜炎的方法学指标显示, A组:灵敏度和阳性预测值分别为100% (15/15)和100% (15/15); C组:灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为97.1% (33/34)、77.8% (7/9)、94.3% (33/35)和87.5% (7/8)。PCR法诊断非感染性腹水的特异度和阴性预测值分别为100% (6/6)和100% (6/6)。PCR法与腹水培养鉴定细菌种属的差异无统计学意义($\chi^2 = 5.625, P = 0.25$)。**结论** PCR法优于腹水培养,其阳性率、灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均较高,具有早期、快速诊断自发性细菌性腹膜炎的重要的临床应用价值。

【关键词】 自发性细菌性腹膜炎; 16S rRNA基因; 聚合酶链反应; 腹水培养; 诊断

Clinical application of PCR in the rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis ZHAO Ying-ying, QUAN Min, WANG Qi, CHENG Dan-ying, DUAN Ying, LI Ben, YANG Song, WU Shu-ling, LIU Shun-ai, XING Hui-chun, CHENG Jun. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China
Corresponding author: XING Hui-chun, Email: hchxing@sohu.com; CHENG Jun, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application value of polymerase chain reaction (PCR) in the rapid diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis (SBP). **Methods** Blood and ascitic fluid samples were both collected from 64 hospitalized patients with liver cirrhosis and ascitic; bacterial DNA in ascitic fluid was isolated by PCR based on 16S rRNA gene, and identified from these subjects: 15 patients with positive culture (Group A), 6 patients with non-infectious ascites (Group B) and 43 culture negative patients with clinical infection (Group C). Methodological parameters such as positive rate, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of PCR assay were evaluated, respectively. The statistical difference in bacterial colonization identification between ascitic fluid culture and PCR was also analyzed. **Results** Positive rate of PCR assay for detecting bacterial DNA was 100% (Group A, 15/15), 0 (Group B, 0/6) and 83.7% (Group C, 36/43). Methodological parameters for PCR assay of diagnosis SBP: Group A: sensitivity was 100% (15/15), positive predictive value was 100% (15/15); Group C: sensitivity was 97.1% (33/34), specificity was 77.8% (7/9), positive predictive value was 94.3% (33/35), negative predictive value was 87.5% (7/8). PCR assay for the diagnosis of ascites with no infection: specificity was 100% (6/6), negative predictive value 100% (6/6). There was no significant difference between the two assays applied in bacterial colonization identification ($\chi^2 = 5.625, P = 0.25$). **Conclusions** PCR assay for SBP diagnosis is a rapid method with higher positive rate, sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value, and is superior to ascitic fluid culture.

【Key words】 Spontaneous bacterial peritonitis (SBP); 16S rRNA gene; Polymerase chain reaction (PCR); Ascitic fluid culture; Diagnosis

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.02.005

基金项目: 首都医学发展科研基金 (No. 2007-3054)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院 (赵莹莹、王琦、程丹颖、段英、李贲、杨松、吴淑玲、刘顺爱、邢卉春、成军); 北京大学北京地坛医院教学医院 (全敏); 新发突发传染病研究北京市重点实验室 (王琦、刘顺爱、成军)

通讯作者: 邢卉春, Email: hchxing@sohu.com; 成军, Email: chengjdt@ccmu.edu.cn

自发性细菌性腹膜炎 (spontaneous bacterial peritonitis, SBP) 是腹腔内及邻近器官在无需外科处理的细菌感染来源 (如肠穿孔、肠脓肿、急性胰腺炎) 的情况下发生的细菌性腹膜炎, 是失代偿期肝硬化伴腹水患者常见的并发症^[1]。患者一旦发生 SBP, 1个月内的病死率为33.3% (10/30)^[2]。目前 SBP 的确诊主要依赖于腹水培养及腹水检查, 但既往研究结果证实 SBP 腹水培养阳性率很低, 即使腹水中性粒细胞计数 (polymorphonuclear, PMN) $\geq 0.25 \times 10^9$ cells/L 的腹水, 其培养阴性率也高达65%^[3-4], 而且该方法耗时长、费用高。随着分子生物学发展, 通过细菌 16S rRNA 基因检测细菌的技术已应用于多个领域^[5], 并且省时、敏感度高, 具有很大的应用价值。本实验室前期已建立针对细菌 16S rRNA 的检测方法, 本研究采用前瞻性研究方法, 探讨该技术在自发性腹膜炎快速诊断中的价值。

资料与方法

一、研究对象

选取2012年3月至2012年9月首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心收治的肝硬化失代偿期伴腹水的住院患者共64例, 按入组先后顺序编号1~64, 具体分为A、B、C三组: (1) A组: 患病组: 共15例。明确为腹腔感染、腹水细菌培养阳性的患者, 出现不同程度的发热、腹痛、腹泻, 不明原因的肝性脑病, 酸中毒, 氮质血症, 低血压或体温过低等症状, 和 (或) 腹部压痛、反跳痛等腹膜刺激征等体征^[1]; 且排除继发性腹膜炎者。

(2) B组: 非患病组, 共6例。明确无上述提到的腹腔感染和 (或) 全身感染的表现, 在排除继发性腹膜炎的基础上, 需同时符合下列3项指标: ①腹水常规细菌培养未见细菌; ②腹水白细胞计数 $< 0.3 \times 10^9$ /L, 腹水 PMN $< 25\%$, 腹水 pH ≥ 7.30 , 或血清腹水 pH 梯度 ≤ 0.10 , 腹水乳酸盐 ≤ 0.63 mmol/L, 腹水鲎试验阴性; ③在临床后续随访中证实无腹腔感染^[6]。

(3) C组: 临床感染组, 共43例。腹水细菌培养阴性的患者, 还需符合: ①血常规示白细胞计数、中性粒细胞百分比、C-反应蛋白、降钙素原等指标高于正常上限值, 提示感染, 甚至出现感染性休克、败血症等; ②出现肝功能严重受损 (出现肝性脑病) 或肾功能严重受损, 上消化道出血等严重并发症; ③除外继发性腹膜炎者; ④入院时出现不同程度的发热 ($> 37.8^\circ\text{C}$)、腹痛、腹泻等胃肠动力学改变, 和

(或) 腹部压痛、反跳痛等提示提示临床腹腔感染症状、体征, 经抗感染治疗后, 患者局部及全身体征消失, 腹水 PMN 及血中性粒细胞百分比降至正常, 腹水培养结果呈阴性^[7-8]。其中, ③④两项必须同时符合的基础上, 再具备①②中至少一项。

本研究方案已通过本院伦理委员会的批准, 且和每位同意参加的受试者签署知情同意书, 并给患者一定的经济补偿。

二、研究方法

1. 资料收集: (1) 临床资料的收集: 包括每位患者的体温、脉搏、尿量等一般情况; 是否出现腹痛、腹泻等症状, 腹部压痛、反跳痛、腹膜刺激征等体征; 是否有消化道出血、肝性脑病、感染性休克等严重并发症。

(2) 临床标本的收集: ①血标本: 留取每位患者的血标本, 用于检测血常规、C-反应蛋白、降钙素原、血氨、肝肾功能等。②腹水标本: 每例患者的腹水留取50 ml用于PCR检测; 同时将腹水、床旁接种于血培养瓶及肝素锂抗凝管, 用于腹水厌氧及需氧培养、腹水鲎试验、腹水生化指标、腹水常规等检测。

2. 实验方法: (1) 血常规检测采用 LH755 全自动血液分析仪; C-反应蛋白、降钙素原、血氨、肝肾功能、腹水生化、腹水常规、鲎试验等检测采用全自动 H7600 生化分析仪 (日立, 日本); 腹水厌氧及需氧培养采用微生物鉴定分析仪 (BD, 美国)。(2) 腹水细菌基因组 DNA 用 Wizard® Genomic DNA Purification 试剂盒提取。

(3) PCR 反应用于检测同步腹水的细菌基因组 DNA。设计 16S rRNA 基因保守区通用引物^[3,9], 为 P-U、P-D, 扩增产物大小为 525 bp: ①P-U: 5' - AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3', T_m 58°C; ②P-D: 5' - ACCGCGACTGCTGCTGGCAG-3', T_m 58°C; 位置分别为 (以 *E. Coli* 为准) 6~7, 523~531^[9]。反应条件为 95°C 预变性 10 min → 94°C 变性 45 s → 63°C 退火 30 s → 72°C 延伸 1 min, 循环 35 次 → 72°C 10 min 完成扩增 → 4°C 保存, 此过程需要约 2.5 h。PCR 检测阳性的标本, 提示腹水存在细菌感染, 将 PCR 产物外送直接测序, 测序结果与互联网上的数据库 (GenBank) 进行序列比对 (用 BLAST 程序) 来鉴定其种属。腹水细菌 PCR 产物鉴定的种属结果与腹水培养结果进行比较。

三、统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件对计数资料进行 χ^2 检

验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同组别PCR方法检测腹水细菌的阳性率
PCR方法检测细菌阳性率在患病组(A组)为100%(15/15), 临床感染组(C组)为81.4%(35/43), 非患病组(B组)患者的PCR检测及腹水培养均为阴性。由于临床感染组的腹水培养均为阴性, 因此PCR方法检测细菌的阳性率明显高于腹水培养方法。

二、不同组别PCR方法检测腹水细菌的灵敏度及预测值

以确诊SBP为对照, A组的PCR方法灵敏度、阳性预测值为100%, B组PCR方法特异度、阴性预测值为100%; C组共43例, 诊断SBP的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均较高(表1)。

三、腹水培养阳性结果与PCR测序结果的比较

与腹水培养相比, PCR方法检测细菌有12例革兰染色结果与之相符合(表2); 出现了4例种属不一致的患者: 患者编号分别为4、11、53、64号; 其腹水培养鉴定依次为牛链球菌、屎肠球菌、头状葡萄球菌和溶血葡萄球菌, 而PCR方法进行序列比对鉴定依次为大肠埃希菌、肺炎链球菌、克雷伯菌和大肠埃希菌(表3)。这些患者均出现了腹痛、腹泻、发热、腹膜刺激征等不同程度的腹腔或全身感染的征象, 其中4号患者血氨升高。经配对资料的 χ^2 检验对两种方法鉴定细菌种属进行验证, McNemar检验结果显示 $\chi^2 = 5.625$, $P = 0.25$, 表明两种鉴定细菌种属方法的差异无统计学意义; 吻合度检测结果表明两种检测方法的吻合度具有统计学意义($\kappa = 0.545$, $P = 0.018$), 但一致性程度一般。

讨 论

自发性细菌性腹膜炎最早描述于上世纪60年代, 是肝硬化合并腹水患者的严重并发症, SBP发生率高(10%~30%)、复发率高(第1年高达70%)、预后差(第1年病死率达50%~70%),

表2 A组PCR测序结果与腹水培养比较(例)

PCR	腹水培养结果		合计
	革兰阳性	革兰阴性	
革兰阳性	3	0	3
革兰阴性	3	9	12
合计	6	9	15

表3 腹水培养阳性结果与PCR序列比对结果

患者编号	腹水细菌培养	PCR法
4	屎肠球菌	大肠埃希菌
11	牛链球菌	肺炎链球菌
53	头状葡萄球菌	克雷伯菌
64	溶血葡萄球菌	大肠埃希菌

建议发生过SBP的肝硬化患者接受肝移植^[7]。多数SBP患者在疾病早期的中毒症状不明显, 腹水白细胞数可在正常范围, 腹水细菌培养或血培养阳性率低^[8,11]、耗时长, 腹水常规检查及培养不能及时、有效指导临床诊治。因此, 寻找一种早期快速诊断SBP的方法具有重要的临床意义。

16S rRNA基因序列总长度适宜、结构完整, 普遍存在于所有细菌基因组中, 故在细菌学研究中常被作为研究的靶分子, 并且已有研究证实基于16S rRNA基因引物的扩增方法, 具有快速诊断某些感染性疾病的价值, 如SBP、新生儿败血症、幽门螺旋杆菌感染等^[12-14]。因此, 本研究以16S rRNA基因作为PCR反应的通用引物。

本研究在实验室前期工作基础上, 分别对患病组(A组)、非患病组(B组)和临床感染组(C组)病例进行分析, 评价了PCR方法诊断SBP的临床应用价值。A组的PCR方法诊断SBP阳性率高, 灵敏度及阳性预测值均达到100%; PCR方法排除SBP的特异度及阴性预测值均达到100%。腹水培养阴性的C组中, PCR方法检出细菌的阳性率高(81.4%), 诊断SBP的灵敏度为97.1%、特异度为77.8%、阳性预测值为94.3%、阴性预测值为87.5%。由于C组的腹水细菌培养结果呈阴性, 因此, 分析其临床资料发现这些患者的共同特点是血

表1 PCR方法诊断SBP的结果[例(%)]

组别	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
A组	15/15 (100)	/	15/15 (100)	/
B组	/	6/6 (100)	/	6/6 (100)
C组	33/34 (97.1)	7/9 (77.8)	33/35 (94.3)	7/8 (87.5)

注: “/”表示计算公式的分母为0

白细胞计数、中性粒细胞百分比及不同程度的局部腹膜刺激征提示腹腔感染明确,经抗感染治疗后,血常规各项指标复常,感染体征消失,临床治疗有效。临床诊断SBP的过程中,PCR法能够很大程度地避免误诊和漏诊。

A组患者PCR产物测序结果有4例与培养结果不一致。但是两种方法鉴定细菌种属的整体差别无统计学意义,表明PCR方法鉴定细菌种属依然可靠,且与腹水培养方法具有一定的吻合度。分析这几例患者的临床资料并进行后续随访发现,尽管腹水细菌的药敏结果提示其对临床所选用抗菌药物不敏感或某一组成成分耐药,但是经验性抗感染治疗后,患者腹膜刺激征消失,腹水消退,血白细胞计数及中性粒细胞百分比、C-反应蛋白、降钙素原等降至正常,临床治疗有效。考虑可能与下列因素相关:①PCR反应过程中的污染:由于PCR反应敏感性高,检测细菌的最低浓度为1 pg^[9],如果整个反应过程出现污染则会出现不同的扩增产物;但本研究中整个过程中操作严格,污染的可能较小,会在以后的研究中更加注意严格的无菌操作,以最大程度的避免污染现象。②此4例患者腹腔为非单一性的菌种感染:其中3例很可能革兰阳性球菌数量居多,但革兰阴性菌发挥了主要的致病作用;另外1例患者腹水中牛链球菌数量居多,肺炎链球菌发挥主要的致病作用;由于慢性肝病失代偿期患者的免疫功能减弱,对外界细菌的抵御能力降低有关。而且由于PCR方法灵敏度高,扩增结果不受细菌存活状态的影响,很可能扩增出了那些不会再增殖的细菌。③可能与所选扩增引物覆盖的靶序列有关:靶序列的局限性可能会影响PCR产物;会在后续工作中应用两种不同的引物,深入研究不同覆盖度的引物对整个反应的影响。

与目前所沿用的腹水细菌培养方法相比,PCR方法更具快速、更灵敏的优点,而且灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均较高;B组患者的例数相对较少,这可能会在一定程度上影响统计结果。综上所述,PCR方法具有快速、早期诊断SBP的临床价值,尤其是对腹水培养阴性的临床感染组,显著优于腹水培养方法,可以提高SBP的确诊率,利于临床指导诊治;但由于PCR方法具有局限性,并不能完全替代腹水培养方法,但是可以用于快速诊断SBP或作为腹水培养的补充方法,具有重

要的临床应用价值。

参 考 文 献

- Runyon BA. Practice Guidelines Committee, American Association for the study Liver Disease (AASLD). Management of adult patients with ascites due to cirrhosis. *Hepatology*,2009,49(6):2087-2107.
- Shizuma T, Fukuyama N. Investigation into bacteremia and spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis in Japan. *Turk J of Gastroenterol*,2012,23(2):122-126.
- Wiest R, Krag A, Gerbes A. Spontaneous bacterial peritonitis: recent guidelines and beyond. *Gut*,2012,61(2):297-310.
- Rimola A, Garcia-Tscao G, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites club. *Hepatology*,2000,32(1):142-153.
- 黄正根, 刘昕. 应用16S rDNA检测致病菌的研究进展. *中华检验医学杂志*,2005,28(6):663-665.
- 张继明, 翁心华. 自发性细菌性腹膜炎的诊断及防治. *中华肝脏病杂志*,2005,13(6):459-460.
- Barreales M, Fernández I. Spontaneous bacterial peritonitis. *Rev Esp Enferm Dig*,2011,103(5):255-263.
- Cho CH, Han SH, Chin BS, et al. Diagnosis and species identification of *Mycobacterial* infections by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of sterile body fluids. *Korean J Intern Med*,2009,24(2):135-138.
- 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.
- Navasa M, Rodes J. Bacterial infection in cirrhosis. *Liver Int*,2004,24(4):277-280.
- Fernández J, Navasa M, Gome Z, et al. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology*,2002,35(1):140-148
- 潘红英, 孙洪运, 谌翠容, 等. 16S rRNA基因检测在自发性细菌性腹膜炎快速诊断中的应用. *中国医学科学院学报*,2010,32(5):557-560.
- 童美琴, 尚世强, 吴亦栋. 16S rRNA基因PCR加基因芯片杂交快速诊断新生儿败血症. *中华儿科杂志*,2004,42(9):663-667.
- 季尚玮, 王江滨, 张永贵. 慢性乙型肝炎患者肝组织中螺旋杆菌菌属特异性16S rRNA基因及HP特异性基因分析. *肝脏*, 2009,14(6):449-453.

(收稿日期: 2012-10-22)

(本文编辑: 孙荣华)