

细菌“大作战”

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003072

一种用于脓毒症快速检测的多重 PCR 检测体系构建

胡谢飞¹, 鄢文燕², 智深深², 李 逊², 张媛媛², 陶 杨², 曾 燕², 伍 建³, 王芃芃³, 庞 博³, 李 维²
(1. 重庆大学医学院, 重庆 404100; 2. 重庆大学附属中心医院/重庆市急救医疗中心检验科及重症医学科, 重庆 404100;
3. 北京迈基诺基因科技股份有限公司, 北京 101318)

【摘要】目的:建立一种基于多重实时荧光定量聚合酶链反应(multiple real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, 多重 PCR)技术的检测体系, 快速、特异检测脓症患者血液中的病原菌。**方法:**分析血液标本分离菌主要菌种分布, 绘制脓毒症特异性病原微生物谱。同时根据保守区序列设计特异性引物, 构建多重 PCR 检测反应体系。收集脓症患者静脉全血样本 79 例, 健康体检者样本(阴性样本)40 例, 用所建立的检测体系进行鉴定, 并与血培养方法比较。**结果:**多重 PCR 法缩短检出时间至 3 h, 是血培养法的 1/16。多重 PCR 法对目标病原菌样本符合率为 88%(22/25), 阴性样本符合率为 100%(20/20), 总符合率为 94%, 2 种方法对目标病原菌的检出差异无统计学意义($P=0.250$), 且一致性良好(Kappa=0.867, $P<0.05$)。多重 PCR 法与血培养法对临床诊断脓毒症样本的检出率分别为 23.0%(17/74)及 14.9%(11/74), 2 种方法间检出率差异有统计学意义($P=0.031$)。**结论:**与经典的“金标准”血培养法相比, 本项目构建的多重 PCR 法检测时间短、符合率好、检出率更高, 可为脓症患者更早诊断和治疗提供可靠依据。

【关键词】脓毒症; 临床诊断; 多重实时荧光定量聚合酶链反应; 快速检测

【中图分类号】R446.9

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-06-10

Establishment of a multiplex PCR system for rapid detection of sepsis

Hu Xiefei¹, Wu Wenyan², Zhi Shenshen², Li Xun², Zhang Yuanyuan², Tao Yang², Zeng Yan², Wu Jian³,
Wang Pengpeng³, Pang Bo³, Li Wei²

(1. School of Medicine, Chongqing University; 2. Department of Laboratory and Critical Care Medicine, The Affiliated Central Hospital of Chongqing University/Chongqing Emergency Medical Center; 3. MyGenostics Inc.)
【Abstract】Objective: To establish a detection system based on multiple real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (multiplex PCR) technique to rapidly and specifically detect pathogens in the blood of sepsis patients. **Methods:** The main strains of pathogens isolated from blood samples were analyzed, and the spectrum of pathogens specific to sepsis was drawn. Specific primers were designed according to the sequences of the conserved regions to construct a multiplex PCR detection reaction system. Blood samples of 79 sepsis patients were collected, and 40 health subjects were included as negative and health controls during the same period. Then they were identified by the established detection system, and the blood culture method was compared. **Results:** The detection time was shortened to 3 hours by multiplex PCR, which was 1/16 of blood culture. Compared with blood culture, the coincidence rate of multiplex PCR for target pathogen samples was 88%(22/25), the coincidence rate of negative samples was 100%(20/20), and the total coincidence rate was 94%. There was no significant difference between the two methods in the detection of target pathogens ($P=0.250$) with good consistency (Kappa=0.867, $P<0.05$). The detection rates of multiple PCR method and blood culture method for clinically diagnosed sepsis samples were 23.0%(17/74) and 14.9%(11/74), respectively. The detection rates of the two methods were statistically significant ($P=0.031$). **Conclusion:** Multiplex PCR method can provide a reliable basis for earlier diagnosis and treatment to sepsis patients. Compared with “gold standard” blood culture method, the multiplex PCR detection system constructed in the project has shorter detection time, better coincidence rate and higher detection rate, which can provide reliable evidence for the early diagnosis and treatment of sepsis patients.

【Key words】sepsis; clinical diagnosis; multiple real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; quick detection

作者介绍: 胡谢飞, Email: 766232328@qq.com,

研究方向: 脓毒症检测相关研究。

通信作者: 李 维, Email: liwei0111@163.com。

基金项目: 重庆市科技局面上资助项目(编号: cstc2019jcsx-msxmX0164); 重庆市中青年医学高端人才工作室资助项目(编号: ZQNYXGDRCGZS2019008)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220831.0929.004.html>
(2022-08-31)

脓毒症是一种复杂的综合征, 由感染引起宿主免疫反应失调, 与急性器官功能障碍和高死亡风险相关^[1-2]。在高等收入国家中, 脓毒症患者住院死亡率为 17%, 严重脓毒症患者住院死亡率为 26%。在低收入和中等收入国家缺乏流行病学调查数据, 考虑到传染病在这些国家更加普遍, 脓毒症患病的死

亡率应该更高^[3]。经验性广谱抗生素的治疗虽可降低死亡率,但会导致耐药病原菌的增加和传播,同时增加后期真菌感染的风险,不利于长期预后^[4]。及时、适当的抗生素治疗可降低死亡率,改善患者长期预后,降低后期治疗费用,减缓耐药菌株的产生^[5-8],因此快速检测和识别病原微生物至关重要。

血培养是目前鉴定血液中病原菌的“金标准”,但培养时间长,阳性率低,灵敏度有限,是微生物检验常常被临床诟病的痛点,不能满足脓毒症诊断快速、及时的需求^[9]。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction)具有快速、灵敏度高、特异性强等特点,适用于脓毒症病原体检测^[5,10]。普通聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)每次只可鉴定 1 种病原菌,限制了其在脓毒症诊断中的应用。基于此,本研究拟建立一种针对脓毒症常见病原体的多重实时荧光定量聚合酶链反应(multiple real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, 多重 PCR)检测方法,以期实现对脓毒症的早期、快速诊断。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2020 年 1 月至 2021 年 2 月重庆大学附属中心医院/重庆市急救医疗中心(以下简称重大中心医院)重症医学科脓毒症患者静脉全血样本 79 例。入选标准:①24 h 内感染或疑似感染患者,SOFA 评分 ≥ 2 分^[1];②使用抗生素治疗前抽取血培养,同时抽取静脉全血。排除标准:留取标本前经验性使用抗生素者。收集同期健康体检者(无任何基础疾病,体检结果为完全合格)血液样本共 40 例作为阴性对照。所收集的脓毒症患者及健康体检者血液样本均储存于 -80°C 。本研究所有患者对此实验知情同意,符合 1975 年《赫尔辛基宣言》原则及相关伦理要求。

1.2 试剂与仪器

病原菌标准菌株(血液链球菌 BNCC 356104、嗜麦芽窄食单胞菌 BNCC 337116、粪肠球菌 BNCC 102668、鲍曼不动杆菌 BNCC 194496、大肠埃希菌 BNCC 336902、铜绿假单胞菌 BNCC 336458、肺炎链球菌 BNCC 338425、脆弱拟杆菌 BNCC 336948、肺炎克雷伯菌 BNCC 102997、白色念珠菌 BNCC 186382、光滑假丝酵母菌 BNCC 337348、热带念珠菌 BNCC 335988、鹌鸡肠球菌 BNCC 139341、阴沟肠杆菌 BNCC 336662、近平滑念珠菌 BNCC 336515、金黄色葡萄球菌 BNCC 186335 和奇异变形杆菌 BNCC 107943)购自北纳创联生物科技有限公司;MagMAX™ CORE 核酸提取试剂盒(Thermo, A40289)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;Premix Ex Taq™(Probe qPCR)购自宝生物工程(大连)有限公司。仪器采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪,购自美国应

用生物系统公司;BacT/ALERT®3D 全自动微生物检测系统购自法国梅里埃;AU5821 全自动生化分析仪购自美国贝克曼公司;Caris200 全自动化学发光免疫分析系统购自厦门优迈科医学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 绘制脓毒症特异性病原微生物谱 分析 2019 年至 2021 年中国细菌耐药监测网(CHINET)统计的三级医院及重大中心医院血液标本分离菌主要菌种分布,查阅脓毒症相关文献,与临床一线沟通交流,综合考虑脓毒症相关各病原菌的检测性能、检测全面性等因素,绘制脓毒症特异性病原微生物谱,确定本项目的目标病原菌。

1.3.2 血培养组、临床诊断组及阴性对照组感染性标志物的比较 将所收集的样本分为 3 组,第一组为血培养组(25 例),即血培养结果为目标病原菌的脓毒症患者样本;第 2 组为临床诊断组(54 例),即依据 SOFA 评分临床诊断为脓毒症患者样本;第 3 组为阴性对照组(40 例),即健康体检者样本。使用 Caris200 全自动化学发光免疫分析仪及 AU5821 全自动生化分析仪测量血培养组、临床诊断组及阴性对照组感染性标志物降钙素原(procalcitonin, PCT)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)及淀粉样蛋白 A(serum amyloid A, SAA)结果,分析 3 组间感染标志物水平,判断临床诊断作为参比标准的合理性。

1.3.3 引物设计 查阅 GenBank 中各目标病原菌的靶基因序列,针对序列保守区域,以 Primer3 在线软件进行引物及特异性探针序列设计^[11]。在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)将设计的引物进行序列比对,验证引物特异性,并由生工生物工程(上海)有限公司制作合成。

1.3.4 标准菌株培养和 DNA 提取 ①标准菌株:在无菌条件下,将 17 种标准菌株接种于血琼脂平板上,于 37°C 培养箱中培养 12~16 h,使各目标病原菌形成单个菌落。标准菌株 DNA 提取时,挑选单个菌落,配置细菌悬液,用 MagMAX™ CORE 核酸提取试剂盒(Thermo, A40289)对样本进行核酸模板制备。②临床样本用 MagMAX™ CORE 核酸提取试剂盒(Thermo, A40289)进行核酸模板制备。

1.3.5 多重 PCR 反应体系的建立 根据引物间相互干扰最小原则,将 17 种目标病原菌分为 6 组,每组反应液包含目标病原菌及内参基因的上、下游引物(各 200 nmol/L, 0.4 μL)、探针(100 nmol/L, 0.2 μL)、Takara Probe qPCR Mix(10 μL)、无酶水将每组反应液体积补至 15 μL 。将 15 μL 各组反应液和 5 μL 核酸模板依次加入反应孔,在 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。扩增程序为 95°C 预变性 30 s(1 个循环), 95°C 变性 5 s(1 个循环), 60°C 退火延伸 34 s(45 个循环),约 45 min,扩增结束后 FAM、VIC、ROX 通道分别读取实时荧光值并判读结果。以荧光阈值的缺省设置是 3~15 个荧光循环信号的标准偏差的 10 倍,得到病原微生物的 CT 值。

1.3.6 单重 PCR 反应体系的建立 在建立的多重 PCR 反应体系基础上,无酶水将反应体积补至 15 μL ,加入 5 μL 核酸模板,其余反应程序与多重 PCR 反应体系均相同。

1.4 灵敏度和特异性检测

1.4.1 灵敏度检测 将 17 种目标病原菌经过已培养分离的菌落配置成细菌悬液,测定其麦氏浊度,将浓度分

别调至 10^4 CFU/mL、 10^2 CFU/mL、10 CFU/mL、1 CFU/mL、0.1 CFU/mL 和 0.01 CFU/mL, 提取 DNA 模板, 进行 PCR 检测, 根据最低可检测浓度确定各目标病原菌的灵敏度。

1.4.2 特异性检测 将 17 种病原菌菌株等量混合提取 DNA 作为模板, 再分别加入所设计的每种菌的引物, 进行 PCR 扩增, 并将单种菌核酸模板加单种病原菌引物探针作为阳性对照。通过比较 2 组的扩增曲线, 验证每种病原菌引物探针的特异性。

1.5 临床样本检测及比较

1.5.1 一致性比较 收集临床诊断为脓毒症, 且血培养结果为目标病原菌样本 (阳性样本) 25 例, 同期健康体检者样本 (阴性样本) 20 例。以血培养检测结果为参比标准, 用多重 PCR 反应体系对血液样本进行检测, 分析检测结果, 比较多重 PCR 法对目标病原菌检测结果的一致性。

1.5.2 检出率比较 收集临床诊断为脓毒症样本 (阳性样本) 54 例, 同期健康体检者样本 (阴性样本) 20 例。以临床诊断为参比标准, 血培养法及多重 PCR 法平行检测, 比较 2 种方法在脓毒症患者中的检出能力。临床样本检测流程如图 1 所示。

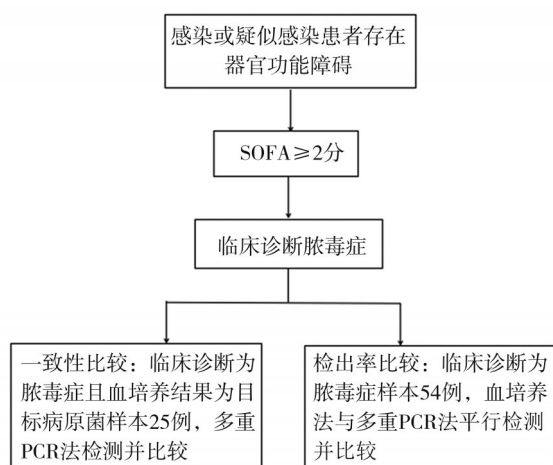


图1 临床样本检测流程

1.6 统计学处理

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理, 差异分析采用多个独立样本 Kruskal-Wallis 秩和检验, 配对样本卡方检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。结果的一致性分析采用 Kappa 值, $Kappa \geq 0.75$ 为一致性良好, $0.4 \leq Kappa < 0.75$ 为一致性一般, $Kappa < 0.4$ 为一致性较差。

2 结果

2.1 脓毒症病原特异性微生物图谱的绘制

分析 2019 年至 2021 年 CHINET 统计的三级医院及重大中心医院血液标本分离菌主要菌种分布。CHINET 血液标本分离菌 (不包括真菌) 主要包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌等细菌, 每年病原菌分布基本相似, 详见图 2。重大中心医院 2019 年至 2021 年共检出血培养阳性菌株 1 925 株, 血液标本分离菌前 20 种病原菌

主要菌种分布包括大肠埃希菌 (38.96%)、肺炎克雷伯杆菌 (14.7%)、阴沟肠杆菌 (4.16%)、金黄色葡萄球菌 (3.74%) 等, 其中真菌占 1.93%, 详见图 3。查阅脓毒症相关文献^[5,7,12-13], 导致脓毒症的细菌与图 2 和图 3 分布较相似。需要注意的是, 侵袭性真菌血流感染导致的脓毒症发病率随住院时间推移而增加, 真菌的检测不容忽视。最终, 经过全面分析并与临床充分沟通, 所绘制的病原微生物图谱中的目标病原菌包括血液链球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、粪肠球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、脆弱拟杆菌、肺炎克雷伯杆菌、白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、热带念珠菌、鸢尾肠球菌、阴沟肠杆菌、近平滑念珠菌、金黄色葡萄球菌及奇异变形杆菌。

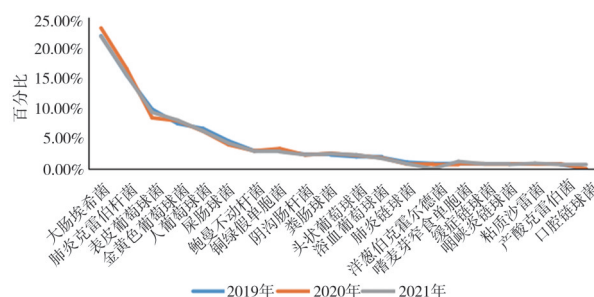


图2 2019年至2021年CHINET三级医院血液标本分离菌主要菌种分布图

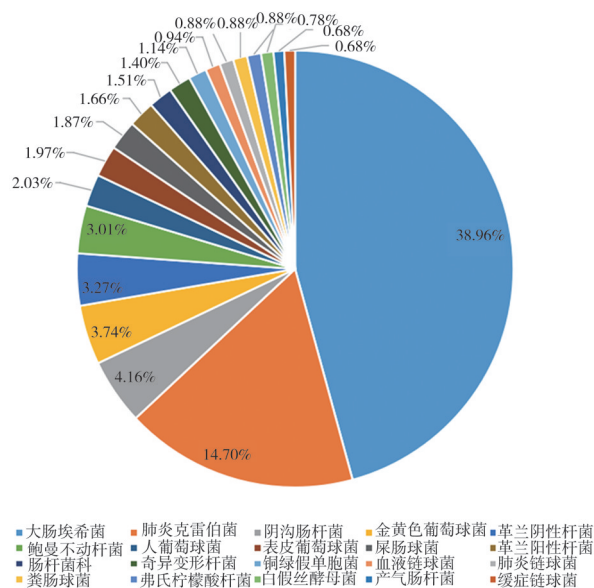


图3 2019年至2021年重大中心医院血液标本分离菌主要菌种分布图

2.2 血培养组、临床诊断组及阴性对照组间感染性标志物水平比较

统计分析血培养组、临床诊断组和阴性对照组各项感染标志物 (PCT、CRP、IL-6、SAA) 水平, 采用多个独立样本 Kruskal-Wallis 秩和检验, 比较发现血培养组、临床诊断组和阴性对照组各感染指标水平差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 血培养组和临床诊断组各感染指标水平间差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$), 具体数据详见表 1 及图 4。

表 1 血培养组、临床诊断组和阴性对照组间感染性标志物水平比较 [$M_d(P_{25}, P_{75})$]

感染性标志物	血培养组(①)	临床诊断组(②)	阴性对照组(③)	统计量	P 值
PCT/(ng·mL ⁻¹)	15.90(1.88, 53.56)	12.45(1.05, 42.81)	0.02(0.01, 0.03)	①-②: -0.34 ①-③: 5.45 ②-③: 6.63	1.000 <0.001 <0.001
CRP/(mg·L ⁻¹)	109.25(26.08, 191.95)	136.00(50.35, 183.90)	3.40(1.80, 6.20)	①-②: -0.19 ①-③: 4.68 ②-③: 5.93	1.000 <0.001 <0.001
IL-6/(pg·mL ⁻¹)	126.31(48.13, 1 430.42)	707.32(103.88, 5 957.34)	1.23(0.48, 4.10)	①-②: -1.46 ①-③: 4.36 ②-③: 6.66	0.433 <0.001 <0.001
SAA/(ng·L ⁻¹)	984.10(144.80, 1251.10)	510.60(179.10, 1218.80)	3.30(1.93, 5.48)	①-②: 0.42 ①-③: 5.99 ②-③: 5.47	1.000 <0.001 <0.001

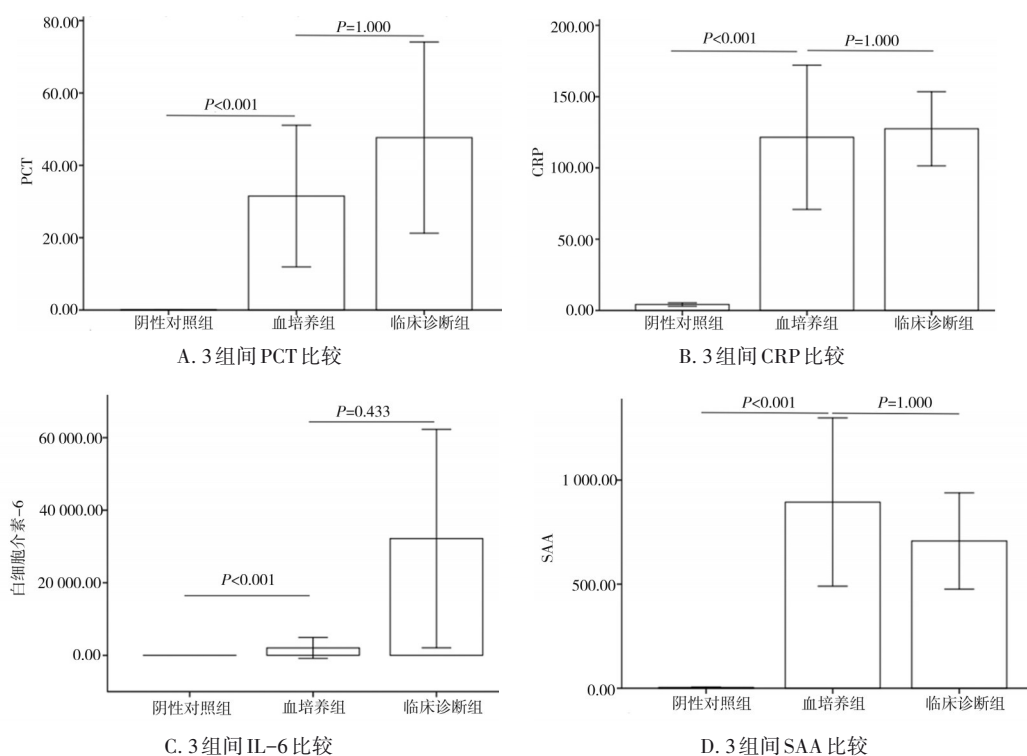


图 4 阴性对照组、血培养组及临床对照组感染性标志物水平显著性比较

2.3 分组及引物与探针序列信息

为避免引物间相互干扰,将 17 种目标病原菌分为 6 组,每种病原菌的分组、引物、探针序列信息详见表 2 和表 3。

表 2 分组信息表

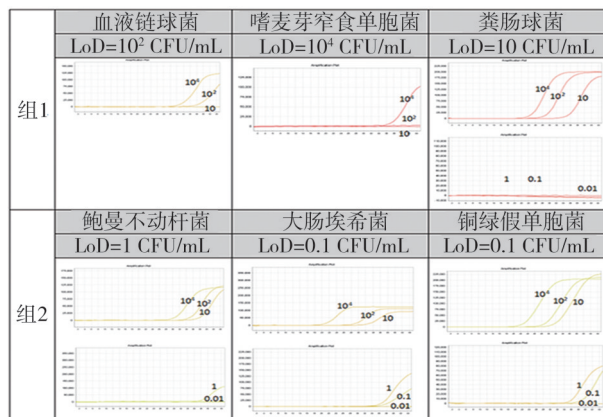
分组	组分
组 1	血液链球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、粪肠球菌
组 2	鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌
组 3	肺炎链球菌、脆弱拟杆菌、肺炎克雷伯菌
组 4	白色念珠菌、光滑假丝酵母菌、热带念珠菌
组 5	鹌鸡肠球菌、阴沟肠杆菌、近平滑念珠菌
组 6	金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌

2.4 目标病原菌灵敏度检测结果

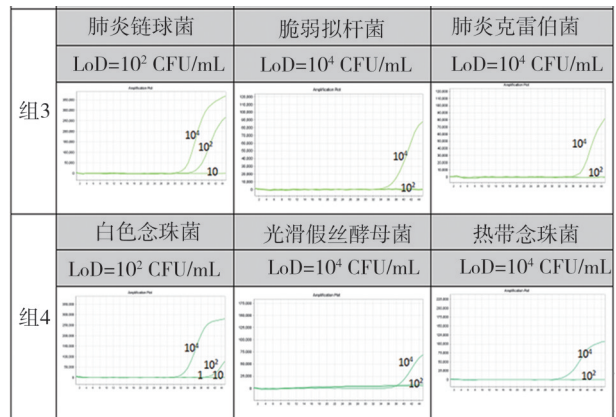
根据实时荧光 PCR 仪计算结果,目标病原菌 CT \leq 37 为阳性,CT>37 为阴性。PCR 结果显示,17 种目标病原菌完全检出时的灵敏度分别为:血液链球菌 10² CFU/mL、嗜麦芽窄食单胞菌 10⁴ CFU/mL、粪肠球菌 10 CFU/mL、鲍曼不动杆菌 1 CFU/mL、大肠埃希菌 0.1 CFU/mL、铜绿假单胞菌 0.1 CFU/mL、肺炎链球菌 1 CFU/mL、脆弱拟杆菌 10⁴ CFU/mL、肺炎克雷伯菌 10⁴ CFU/mL、白色念珠菌 10² CFU/mL、光滑假丝酵母菌 10⁴ CFU/mL、热带念珠菌 10⁴ CFU/mL、鹌鸡肠球菌 10⁴ CFU/mL、阴沟肠杆菌 0.1 CFU/mL、近平滑念珠菌 10² CFU/mL、金黄色葡萄球菌 10 CFU/mL 及奇异变形杆菌 10² CFU/mL,详见图 5。

表 3 17 种目标病原菌引物及探针序列

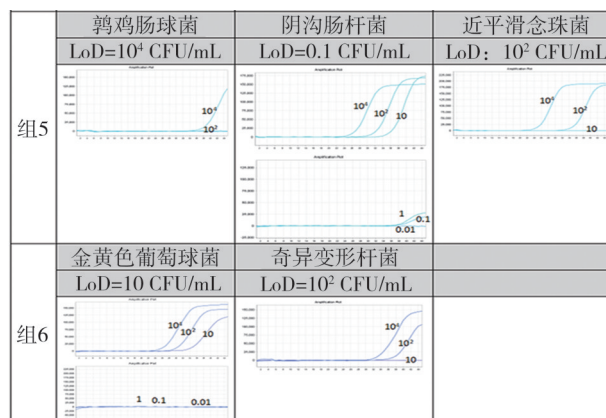
目标病原菌	上游引物	下游引物	探针	靶基因
血液链球菌	CAAAATTGTTGCAATCCAAAGG	GCTATCGCTCCCTGTCTTTGA	AAAGAAAGATCGCTTGCCAGAACCGG	<i>gtfp</i>
嗜麦芽窄食单胞菌	AAGGACAAGGCGATGACCATC	CCCCACCACGAYTTCATCA	CAGAACCACATCTGGTTGGCG	<i>fdnG</i>
粪肠球菌	TGATGCCCGCGTTCATTTA	CGTTCTTGTAATTTTTCACGATCAA	AAACCAAAATCGGCGAAACAACGCTCTG	<i>groL</i>
鲍曼不动杆菌	CGCTGCAGCATCAAATCATG	TGGGTCAACCGAGAAAGTTACG	AGCACCTGCTGACACCACTCCACCA	<i>baP</i>
大肠埃希菌	CGGAAGCAACGCGTAAATC	TGAGCGTCGCAGAACATTACA	CGCGTCCGATCACCTGCGTC	<i>uidA</i>
铜绿假单胞菌	TGCTGGTGGCAGGACAT	TTGTTGGTGCAGTTCTCCTATTG	CAGATGCTTTGCCTCAA	<i>toxR</i>
肺炎链球菌	ACGCAATCTAGCAGATGAAGCA	TCGTGCGTTTTAATTCACGCT	TGCCGAAAACGCTTGATACAGGGAG	<i>lytA</i>
脆弱拟杆菌	CAC TTGACTGTTGTAGATAAAGC	CATCTTCATTGCAGCATTATCC	TGTGCTTGCTTCCAGTCTCTATG	<i>leuB</i>
肺炎克雷伯菌	ATCCACTATCGCCAGCAG	TGTTATCGCTCATGTAATGG	TGGTGGACTACTCGCC	<i>SHV</i>
白色念珠菌	GGTTTGCTTGAAAGACGGTA	AGTTTGAAGATATACGTGTA	TTACCGCCGCAAGCAATGTT	<i>5.8S rRNA</i>
光滑假丝酵母菌	CCTGTTTGAGCGTCATTTCC	AGCACGCACAAAACACTCACTTAT	TAGGTTTTACCAACTCGGTGTTGAT	<i>ITS2</i>
热带念珠菌	GGGGGCACATACGATCCATC	ACTGTGCTTTTGACCCAGGT	GTTCTTCCACAATCCAAGAGTTGGGT	<i>SAPT2</i>
鸢鸡肠球菌	GCAGGCACAGCTGCTTTATC	ATCCCGCATGGTGTGATT	GGGATTGACGGGTCTGGCTCG	<i>vanC</i>
阴沟肠杆菌	ACAAAGGAGTCGGGATGAGTTC	CGACCATTGCTCGTAAGGCT	CAATCCAGGCCAAATCACCGG	<i>apbC</i>
近平滑念珠菌	AGCAACACTAAAGGCAGATCT	TGCTGTGTTTTAGTTGTTTTAAACTG	AAGTGAACCACATTCGAAAGGACCA	<i>nad3</i>
金黄色葡萄球菌	CAGCAAACCATGCAGATGCTA	CGCTAATGATAATCCACCAAATACA	AAAGCTCAAGCATTACCAGAAACTG	<i>spa</i>
奇异变形杆菌	GCACGTTTAGCAGCAGCAGTT	TGCCGATGGTATTGATCCAA	CGCCAGCAGCTTCAAGCAGGTCA	<i>hns</i>
内参基因 <i>RPP30</i>	AGATTGACCTGCGAGCG	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG	<i>RPP30</i>



A. 1~2组目标病原菌灵敏度检测



B. 3~4组目标病原菌灵敏度检测

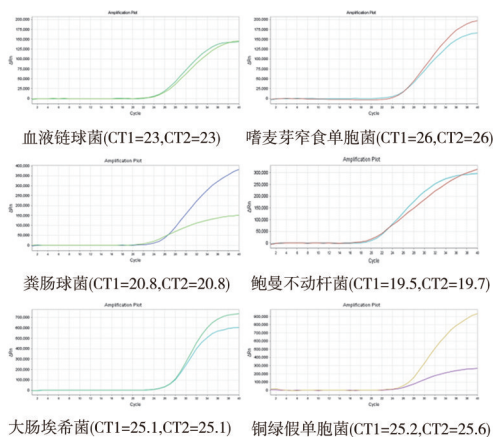


C. 5~6组目标病原菌灵敏度检测

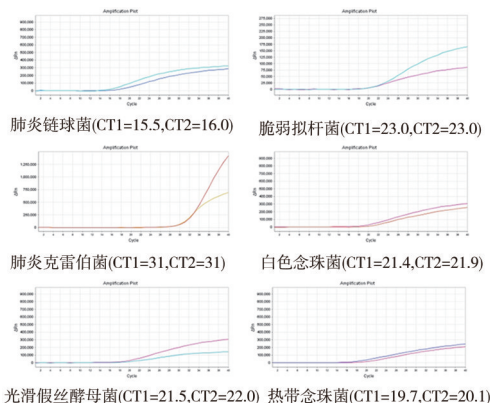
图 5 17 种目标病原菌灵敏度检测

2.5 多重 PCR 检测体系特异性检测结果

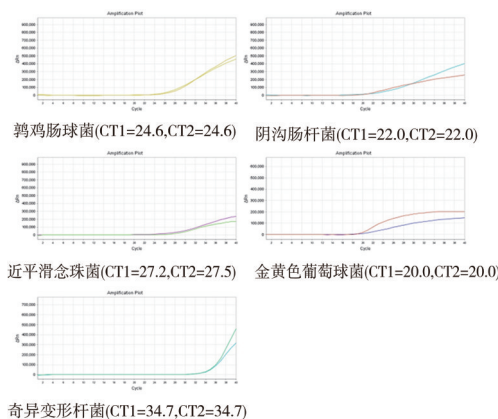
如图 6 所示, CT1 表示 17 种病原菌菌株等量混合提取 DNA 作为模板, 再分别加入所设计的每种菌的引物, 进行 PCR 扩增所得结果; CT2 表示单种菌核酸模板加单种病原菌引物探针作为阳性对照所得结果。所有目标病原菌的 CT1 与 CT2 之间结果基本一致, 每种目标病原菌无非特异性扩增。



A. 1~2 组目标病原菌特异性检测



B. 3~4 组目标病原菌特异性检测



C. 5~6 组目标病原菌特异性检测

图 6 多重 PCR 检测体系特异性检测

2.6 多重 PCR 法与血培养法一致性比较

以血培养法为标准, 阳性样本(目标病原菌样本)25 例, 阴性样本(同期健康体检者样本)20 例, 多重 PCR 法阳性样本符合率为 88% (22/25), 阴性样本符合率为 100% (20/20),

总符合率为 94%。将 2 种方法结果进行配对样本卡方检验, 提示 2 种方法对目标病原菌的检出差异无统计学意义 ($P=0.250$), 检出一致性良好 ($Kappa=0.867$)。

2.7 多重 PCR 法及血培养法在脓毒症患者中检出率比较

以临床症状及诊断为标准, 阳性样本(临床诊断脓毒症患者样本)54 例, 阴性样本(同期健康体检者)20 例, 多重 PCR 法检出 17 例, 检出率为 23.0% (17/74), 血培养法检出 11 例, 检出率为 14.9% (11/74), 阴性样本 2 种方法检测结果均为阴性, 如图 7 所示。将 2 种方法的检出率进行配对样本卡方检验, 提示 2 种方法的检出率差异有统计学意义 ($P=0.031$), 2 种方法诊断一致性未达到良好水平 ($Kappa=0.739$)。

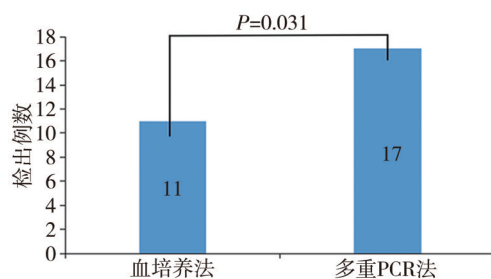


图 7 血培养法和多重 PCR 法检测结果比较 ($n=74$)

3 讨论

脓毒症是一种常见疾病。医学技术发展至今, 对其认知和诊疗都有所提高, 但仍具有较高死亡率^[1]。患者延迟使用抗生素和死亡之间存在明显关联, 每延迟 1 h, 死亡风险就增加 7%; 早期检出特异性病原菌可降低死亡风险, 同时减少细菌耐药性的发生^[14-15]。以往临床以血培养法作为诊断脓毒症金标准, 但因其阳性率较低、影响因素多, 不能实现早期诊断^[16-17]。多重 PCR 技术可同时实现对多种病原菌的检测, 因其灵敏、快速、通量高及特异性强等优点, 可满足临床对脓毒症早期、快速诊断需求。本研究旨在绘制脓毒症病原特异性微生物图谱并针对脓毒症常见病原体构建多重 PCR 检测方法。

由统计的历年血液标本分离菌分布图可见, 导致脓毒症的病原菌主要为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌等。念珠菌属等真菌导致的血流感染所占比例虽小, 但呈现出上升趋势, 其中白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌和克柔念珠菌占有确诊病例的 90% 以上^[18]。结合重大中心医院念珠菌检出情况, 最终确定将检出频率最高的白色念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌加入所绘制的微生物谱。因此, 本研究所绘制的脓毒症病原特异性微生物图谱所包含的目标病原菌已覆盖可能导致脓毒症的大部分病原菌, 且可同时对细菌及真菌进行检测。目标病原菌确定后, Primer 3 设计的引物长度为 18~27 bp, GC 含量为 40%~60%, 上下游引物 GC 含量和 Tm 值保持接近。对软件得出的每种病原菌的理论 Tm 值进行验证, 得到每种病原菌的最佳 Tm

值。根据引物间互相不干扰原则,将 17 种病原菌分为 6 组,最终选取最低 Tm 值引物的退火温度 60℃ 为该反应体系的退火温度。

比较血培养组、临床诊断组及阴性对照组各项感染指标水平,结果显示“金标准”血培养组、临床诊断组感染标志物水平明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$),血培养组和临床诊断组感染性标志物水平差别不大 ($P > 0.05$),说明本研究依据临床症状及 SOFA 评分得到的脓毒症诊断可作为参比标准。

以血培养法结果为参照标准,多重 PCR 法与血培养法一致性较好。多重 PCR 法 3 例结果与血培养法不符合(白色念珠菌 1 例、阴沟肠杆菌 2 例)。可能原因为:白色念珠菌等真菌类病原菌因存在细胞壁,核酸模板制备存在一定困难,多重 PCR 法检测难度大^[5];血液中病原菌浓度较低;样本存放过久。某些病原菌(如白色念珠菌、鹌鸡肠球菌、近平滑念珠菌等)因发生血流感染概率相对较低,此次收集例数较少,后续可继续收集并验证多重 PCR 法对此类较稀少目标病原菌的检出能力。以临床诊断为参照标准,多重 PCR 法(23.0%)检出率高于血培养法(14.9%)。54 例阳性样本中,7 例多重 PCR 法与血培养法均检出,10 例仅多重 PCR 法检出,其中 3 例结果值得关注。1 例多重 PCR 法检出鲍曼不动杆菌,痰标本曾先后 7 次培养出相同细菌,临床诊断重症肺炎和脓毒性休克;1 例多重 PCR 法检出血液链球菌,腹腔积液培养结果为链球菌,临床诊断为化脓性弥漫性腹膜炎和脓毒性休克;1 例多重 PCR 检出大肠埃希菌,腹腔积液培养结果为革兰阴性杆菌,临床诊断急性弥漫性粪质性腹膜炎和顽固性脓毒性休克。此 3 例血培养法均未检出,多重 PCR 法结果与其他部位培养结果及患者临床症状符合,检出的病原菌为致病菌的可能性较大。16 例多重 PCR 法检测结果虽未达到诊断阈值,但有信号值产生。可能的原因为:由非特异性干扰而产生的假阳性信号;血液中细菌浓度过低,仅产生少量扩增;标本存放过久,可能影响检出。21 例无任何信号值产生,可能原因为:血液中病原菌浓度较低;病原菌不在 17 种目标病原菌之内;病原菌代谢产物一过性入血等^[4]。后续可增加更灵敏的方法如测序技术对多重 PCR 法结果进行验证。

综上所述,本研究建立的多重 PCR 法抗干扰能力强,与血培养法检测一致性好,检出率高于血培养法,检出时间缩短至传统血培养法的 1/16(3 h/2~5 d)。以上技术的改进对属于危重症的脓毒症具有重要意义,可为脓毒症患者早诊断、早治疗提供可靠依据,最大限度降低脓毒症患者的病死率^[10,17,19]。

参 考 文 献

[1] Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, 2018, 392(10141): 75-87.

- [2] Prescott HC, Angus DC. Enhancing recovery from sepsis: a review[J]. *JAMA*, 2018, 319(1): 62-75.
- [3] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259-272.
- [4] 郭 鹰, 江代红, 郭富饶. 血流感染的实验室诊断技术进展[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(17): 2300-2303.
- Guo Y, Jiang DH, Guo FR. Progress in laboratory diagnostic technology of bloodstream infection[J]. *J Pract Med*, 2021, 37(17): 2300-2303.
- [5] Groep K, Bos MP, Savelkoul PHM, et al. Development and first evaluation of a novel multiplex real-time PCR on whole blood samples for rapid pathogen identification in critically ill patients with sepsis[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(7): 1333-1344.
- [6] Philip N, Affendy NB, Masri SN, et al. Combined PCR and MAT improves the early diagnosis of the biphasic illness leptospirosis[J]. *PLoS One*, 2020, 15(9): e0239069.
- [7] Long Y, Zhang YX, Gong YP, et al. Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients[J]. *Arch Med Res*, 2016, 47(5): 365-371.
- [8] 孟凡超. 全自动血培养仪阳性结果分析及应用[J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27(14): 73-74.
- Meng FC. Analysis and application of positive results of automatic blood culture instrument[J]. *China Med Device Inf*, 2021, 27(14): 73-74.
- [9] Papafiliopou L, Claxton A, Dark P, et al. Nanotools for sepsis diagnosis and treatment[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(1): e2001378.
- [10] Huang HS, Tsai CL, Chang J, et al. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and Meta-analysis[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2018, 24(10): 1055-1063.
- [11] Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction[J]. *BMC Bioinformatics*, 2012, 13: 134.
- [12] Etchebarne BE, Li ZG, Stedtfeld RD, et al. Evaluation of nucleic acid isothermal amplification methods for human clinical microbial infection detection[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2211.
- [13] 王 晶, 马 娟, 范 云, 等. 2015—2017 年陕西省人民医院临床血流感染病原菌的分布及耐药性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2019, 34(4): 87-90, 95.
- Wang J, Ma J, Fan Y, et al. Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria of blood culture in Shaanxi Provincial People's Hospital from 2015 to 2017[J]. *J Mod Lab Med*, 2019, 34(4): 87-90, 95.
- [14] Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine[J]. *Intensive Care Med*, 1996, 22(7): 707-710.
- [15] Reinhart K, Daniels R, Kissoon N, et al. Recognizing sepsis as a global health priority: a WHO resolution[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(5): 414-417.
- [16] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)[J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801-810.
- [17] 熊晓玫. 血培养阳性标本病原菌构成及其与 PCT 的相关性分析[J]. *基层医学论坛*, 2019, 23(22): 3196-3198.
- Xiong XM. The correlation analysis of composition of pathogenic bacteria in positive samples of blood culture and its correlation with PCT[J]. *Med Forum*, 2019, 23(22): 3196-3198.
- [18] McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and invasive candidiasis[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2021, 35(2): 389-413.
- [19] Gu W, Deng XD, Lee M, et al. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids[J]. *Nat Med*, 2021, 27(1): 115-124.

(责任编辑:唐秋娟)