

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.09.009

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2016.09.009

抗生素治疗时限对化脓性脑膜患儿脑脊液细菌16s rRNA 基因检测的影响

郑可鲁, 杨思达, 高媛媛, 陈文雄, 黄怡玲, 张雅妮

(广州市妇女儿童医疗中心儿童神经内科, 广州 510623)

[摘要] 目的: 研究抗生素治疗时限对化脓性脑膜患儿脑脊液细菌16s rRNA基因检测的影响。方法: 选取2014年2月至2016年3月在我院收治的化脓性脑膜炎患儿60例。对所有患儿予以16s rRNA基因检测和脑脊液细菌培养检测, 比较两种方法检测结果, 观察抗生素使用对两种检测方法的影响。结果: 脑脊液细菌培养阳性率显著低于16s rRNA基因芯片检测阳性率[15%(9/60) vs. 35%(21/60)] ($P < 0.05$)。抗生素应用早期的16s rRNA基因检测阳性率和抗生素使用后期的阳性率比较差异不显著[36.67%(11/30) vs. 33.33%(10/30)] ($P > 0.05$); 抗生素使用早期的脑脊液细菌培养阳性率显著高于抗生素应用后期的阳性率[13.33%(4/30) vs. 0.00%(0/30)] ($P < 0.05$)。结论: 和脑脊液培养相比, 16s rRNA基因芯片法检测化脓性脑膜患儿脑脊液细菌受抗生素治疗时限的影响更小。

[关键词] 化脓性脑膜炎; 脑脊液; 16s rRNA基因; 抗生素

The effects of antibiotic treatment time limit for children with purulent meningeal cerebrospinal fluid bacterial 16s rRNA genes detection

ZHENG Kelu, YANG Sida, GAO Yuanyuan, CHEN Wenxiong, HUANG Yiling, ZHANG Yani

(Department of Child Neurology, Guangzhou Women and Children Health Care Center, Guangzhou 510623, China)

Abstract **Objective:** To study the effects of antibiotic treatment time limit for children with purulent meningeal cerebrospinal fluid bacterial 16s rRNA genes detection. **Methods:** From February 2014 to March 2016, selected 60 cases of patients with suppurative meningeal cerebrospinal fluid in our hospital. All children were given 16s rRNA gene detection and cerebrospinal fluid bacterial culture, compared the results of the two methods, and observed the effects of antibiotic on two kinds of detection methods. **Results:** The positive rate of CSF germiculture was significantly lower than that of 16s rRNA gene chip testing [15% (9/60) vs. 35% (21/60)] ($P < 0.05$). 16s rRNA genes detection positive rate of early and late antibiotic application had no significant difference [36.67% (11/30) vs. 33.33% (10/30)] ($P > 0.05$); cerebrospinal fluid germiculture positive rate in early antibiotic application

收稿日期 (Date of reception): 2016-06-15

通信作者 (Corresponding author): 郑可鲁, Email: zhao86453@163.com

基金项目 (Foundation item): 广州市卫生局课题项目 (20151A010050)。This work was supported by the Health Bureau of Guangzhou (20151A010050), P. R. China.

were higher than that in late antibiotic application [13.33% (4/30) vs. 0.00% (0/30)] ($P < 0.05$). **Conclusion:** Compared with CSF cultures, 16s rRNA gene chip method detection in cerebrospinal fluid bacteria of suppurative meningial children is less affected by pmin of antibiotic treatment.

Keywords suppurative meningial; cerebrospinal fluid; 16s rRNA genes; antibiotics

化脓性脑膜炎是儿童时期较为常见的一种疾病, 发病急, 若不能及时有效地做出诊断治疗, 可能会导致运动障碍、脑积水、癫痫、失明、失聪等神经系统后遗症, 严重者会危及患儿的生命安全^[1-2]。由于化脓性脑膜炎患儿的早期缺乏典型的临床症状, 主要根据脑脊液培养对病情做出诊断, 然而此方法所耗费的时间较长, 较低的阳性率, 难以做出早期的临床诊断^[3]。张军毅等^[4]研究者提出16s rRNA基因芯片杂交技术的应用可对化脓性脑膜炎做出尽早诊断, 其效果较好。因此, 本研究就抗生素治疗时限对化脓性脑膜炎患儿脑脊液细菌16s rRNA基因检测的影响予以探讨。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2014年2月至2016年3月在我院收治的化脓性脑膜炎患儿30例。其中男16例, 女14例。纳入标准: 1)临床表现及脑脊液生化、常规符合化脓性脑膜炎改变; 2)有效抗生素治疗3 d内; 3)临床资料完善者。排除标准: 1)依从性较差者, 难以完成本次研究; 2)各种原因下不能坚持有效抗生素治疗2周以上者, 包括中途死亡或自动出院; 3)临床资料缺失者。整个研究均在监护人知情同意下完成, 同时获得本院伦理委员会的批准与实施。30例于抗生素治疗早期、后期各留取1次脑脊液标本, 分别为早期组和后期组, 其中抗生素治疗3天内视为早期, 治疗2周为后期。

1.2 方法

1.2.1 采集样本

在无菌条件下收集所有患儿4 mL的脑脊液, 将其中2 mL放置在血培养瓶中, 进行生化检测。剩余2 mL放置在-50 °C低温箱中, 检测时使用细菌16s rRNA基因芯片进行操作。

1.2.2 培养脑脊液细菌

标本接种于美国BacT/ALERT的儿童专用树脂培养瓶中, 放置BACTEC9120全自动培养箱中培养。培养阳性报警后移种血、流感嗜血杆菌XV琼脂平皿, 培养18~24 h, 分离菌株。采用VITEK

COMPACT系统或临床实验室标准委员会(NCCLS)制定的标准进行判断和药敏试验。

1.2.3 基因芯片技术

1.2.3.1 菌株

在临床中引发脑脊液较为常见的细菌, 此细菌易出现聚合酶链式反应(PCR)污染的细菌共有21个菌属22个菌种51株, 收集毒菌株、病毒株以及人基因组DNA, 测试样品均由本实验室提供。

1.2.2.2 建立 PCR 反应体系

由美国ABI公司提供型号为ABI 7500型荧光定量PCR仪, 用荧光标记PCR体系, 使用杭州皓丰生物技术有限公司提供的荧光物质CY5进行标记, 提取脑脊液DNA; PCR循环: 94 °C预变性94 °C预变性3 min后, 94 °C变性30 s, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 即为1个循环, 一共循环30次, 在每次PCR中均设计空白、阴性、阳性对照。

1.2.2.3 探针和引物

设计21条寡核苷酸探针, 定位点探针1条、常见菌探针17条、革兰阴性菌探针1条、格兰阳性菌探针1条; 引物序列: 上游引物TGTGTAGCGGTGAAATGCC 690-708; 下游引物CATCGTTTACGGCGTGGAC829-811。

1.2.2.4 扫描

杂交, 芯片洗脱, 晾干, 使用美国PerkinElmer公司提供的AcanArray Express激光扫描仪进行扫描分析。

基因芯片特异性以及16s rRNA基因PCR的检测均使用标准菌株扩增产物电泳分析方式完成。整个检测过程在5 h内完成即可。

1.3 观察指标

观察脑脊液细菌培养及16s rRNA基因芯片检测情况, 分析抗生素的使用时间和两种检测方法之间的关系。

1.4 统计学处理

本次实验数据处理选择SPSS11.5软件包进行, 计数资料用 $[n (%)]$ 来表示, 并采取Fisher精确概率检验, 其 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析

30例化脓性脑膜炎患儿中年龄为1~9岁, 平均(5.34±0.46)岁; 9例患儿临床表现为头痛、3例惊厥、5例呕吐、8例发热、1例脑脊液化脓性改变、4例意识障碍; 有2例患儿伴有硬脑膜下积液, 3例出现脑积水, 3例为脑疝, 1例伴有脑脓肿; 若患儿脑膜无炎症时可采取利福平、异烟肼、氯霉素进行治疗, 若脑膜有炎症时选取头孢曲松、头孢呋辛、美洛西林、青霉素、阿昔洛韦、乙胺丁醇、氧氟沙星进行治疗。

2.2 脑脊液细菌培养及16s rRNA基因芯片检测情况

60例脑脊液标本中共有21份为基因芯片阳性, 其阳性率为35.00%, 主要有4例金黄色葡萄球菌, 4例大肠埃希菌, 3例肺炎链球菌, 3例无乳链球菌, 3例脑膜炎球菌, 3例流感嗜血杆菌, 1例脆弱拟杆菌。脑脊液细菌培养检测阳性数9例, 占15.00%。脑脊液细菌培养及16s rRNA基因芯片检测阳性情况比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), 见表1。

2.3 抗生素的使用时间和两种检测方法之间的关系

抗生素应用早期的16s rRNA基因检测阳性率和抗生素使用后期的阳性率比较差异不显著($P > 0.05$); 抗生素使用早期的脑脊液细菌培养阳性率显著高于抗生素应用后期的阳性率, 差异显著($P < 0.05$), 见表2。

3 讨论

伴随着侵入性操作及抗生素使用的不断增加, 在很大程度上改变了化脓性脑膜炎常见的致病菌谱。通常情况下, 将革兰阴性杆菌视为化脓性脑膜炎常见的致病菌, 然而最近几年里, 也逐渐增加了革兰阳性菌感染的比例^[5]。由于化脓性脑膜炎有着较为复杂的致病菌谱, 在暂未获取细菌培养结果前而凭借经验选取抗生素的使用时存在困难, 特别是抗感染效果较差而细菌培养处于阴性状态时更是增加了抗生素选取的难度^[6-7]。除此之外, 在使用抗生素后再进行脑脊液细菌培养, 会明显降低阳性率, 有部分患者在使用抗生素前并没有进行脑脊液样本的采集^[8-9]。另外患者多为小婴儿, 不宜留取过多脑脊液以提高培养阳性率也导致培养阳性率不高。为改变此种状况, 给临床在使用抗生素治疗的时间选取上提供更多的参考价值, 本次研究中使用了16s rRNA PCR基因芯片技术使细菌检测技术进一步改进。

本次研究中将16s rRNA基因作为基因芯片检测的靶基因, 在所有衣原体、细菌等原生物的染色体基因中均存在16s rRNA基因, 但真菌、病毒等非原核生物体内中并没有16s rRNA基因存在, 因此属于细菌染色体上编码rRNA的DNA序列, 因此也将16s rRNA基因称之为细菌“分子化石”^[10-13]。本次研究结果显示, 在诊断化脓性脑膜炎患儿中使用16s rRNA基因芯片检测方式具有较高的特异性和敏感性, 相对于细菌培养更为快捷, 在5 h内即得到结果。本次研究结果表明, 脑脊液细菌培养的阳性

表1 脑脊液细菌培养及16s rRNA基因芯片检测情况[n(%)]

Table 1 Cerebrospinal fluid bacterial culture and 16s rRNA gene chip testing [n(%)]

方法	例数	阳性	阴性
16s rRNA基因检测	60	21 (35.00)	39 (65.00)
脑脊液细菌培养	60	9 (15.00)	51 (85.00)
χ^2	-	6.4000	
P	-	0.0114	

表2 抗生素的使用时间和两种检测方法之间的关系[n(%)]

Table 2 The relationship between antibiotic use time and the two kinds of detection methods [n(%)]

组别	例数	16s rRNA基因检测	脑脊液细菌培养
抗生素应用早期	30	11 (36.67)	4 (13.33)
抗生素应用后期	30	10 (33.33)	0
χ^2	-	0.0733	4.2857
P	-	0.7866	0.0384

率要明显比脑脊液细菌 16s rRNA 基因检测的阳性率低, 并且脑脊液细菌 16s rRNA 基因检测的阳性率在早期使用抗生素和后期使用抗生素中无显著差异性, 表明疑似化脓性脑膜炎患儿中使用抗生素早期治疗并不会对脑脊液细菌 16s rRNA 基因检测造成影响, 而抗生素使用早期的脑脊液细菌培养阳性率显著高于抗生素应用后期的阳性率, 表明抗生素治疗的时限会对化脓性脑膜炎患儿脑脊液细菌培养结果造成影响。

本次研究中检测 16s rRNA 基因使用的是基因芯片法, 此方法不会因为细菌生长状态而造成影响, 并且对于浓度较低的细菌而言, 能在高敏感的基因 PCR 扩增放大效果下得到呈现, 这也可能和本次研究中发现抗生素治疗时限的选取上并不会对基因芯片检测脑脊液细菌造成影响的原因所在, 然而 PCR-基因芯片技术也有不足之处, 即较高的敏感性易造成假阳性^[14-15]。本次研究中的不足之处就是脑脊液细菌检测的阳性率相对较低, 可能和样本量偏少以及小婴儿不宜留取过多脑脊液有关, 因此在日后的研究中需进一步扩大样本量, 以提高检测的有效性, 使临床获得更为准确的指导治疗方案。

总之, 和脑脊液培养相比, 16s rRNA 基因芯片法检测化脓性脑膜炎患儿脑脊液细菌受抗生素治疗时限的影响更小, 因此, 对于化脓性脑膜炎患儿在选取抗生素治疗和抗感染治疗无效后更换抗生素有着更为重要的价值。如能进一步明确其敏感度及特异度, 也可为停用抗生素提供有力依据, 避免过长时间使用抗生素导致更多不良后果。

参考文献

1. 刘驰, 李家宝, 芮俊鹏, 等. 16S rRNA 基因在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2015, 35(9): 2769-2788.
LIU Chi, LI Jiabao, RUI Junpeng, et al. The applications of the 16S rRNA gene in microbial ecology: current situation and problems[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(9): 2769-2788.
2. 王步英, 郎继东, 张丽娜, 等. 基于 16S rRNA 基因测序法分析北京霾污染过程中 PM2.5 和 PM10 细菌群落特征[J]. 环境科学, 2015, 36(8): 2727-2734.
WANG Buyong, LANG Jidong, ZHANG Lina, et al. Based on 16 s rRNA gene sequencing method Beijing haze pollution in the process of PM2. 5 and PM10 bacteria flora characteristics[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2015, 36(8): 2727-2727.
3. Sharma N, Jaiswal AA, Banerjee PK, et al. Complications of Chronic

Suppurative Otitis Media and Their Management: A Single Institution 12 Years Experience[J]. Indian J Otolaryngol Head Neck Surg, 2015, 67(4): 353-360.

4. 张军毅, 朱冰川, 徐超, 等. 基于分子标记的宏基因组 16S rRNA 基因高变区选择策略[J]. 应用生态学报, 2015, 26(11): 3545-3553.
ZHANG Junyi, ZHU Bingchuan, XU Chao, et al. Strategy of selecting 16S rRNA hypervariable regions for metagenome-phylogenetic marker genes based analysis[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(11): 3545-3553.
5. 邓敏峰, 龙曼, 柯以铨. 脑脊液肿瘤坏死因子 α 检测对细菌性脑膜炎与病毒性脑膜炎鉴别诊断价值的 Meta 分析[J]. 中国全科医学, 2013, 16(23): 2718-2723.
DENG Minfeng, LONG Man, KE Yiquan. Diagnostic Accuracy of Cerebrospinal Fluid Tumor Necrosis Factor- α for Differentiating Bacterial Meningitis from Viral Meningitis: A Meta-analysis[J]. Chinese General Practice, 2013, 16(23): 2718-2723.
6. 林应荣, 江金彪, 罗玲玲, 等. 降钙素原在儿童不同病原体感染脑膜炎鉴别中的临床应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(2): 492-494.
LIN Yingrong, JIANG Jinbiao, LUO Lingling, et al. Clinical value of serum procalcitonin in identifying pathogenic bacteria causing meningitis in children[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2014, 24(2): 492-494.
7. Robveille C, Albaric O, Gaide N, et al. Disseminated mycobacteriosis manifesting as paraplegia in two Parma wallabies (*Macropus parma*) naturally exposed to *Mycobacterium avium*[J]. J Vet Diagn Invest, 2015, 27(6): 767-771.
8. 何粒立, 黄延风. 30 例儿童隐球菌性脑膜炎的临床分析[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(11): 1011-1015.
HE Lili, HUANG Yanfeng. Cryptococcal meningitis in children: a retrospective study of 30 cases[J]. The Journal of Clinical Pediatrics, 2012, 30(11): 1011-1011.
9. Song RB, Vitullo CA, da Costa RC, et al. Long-term survival in a dog with meningoencephalitis and epidural abscessation due to *Actinomyces* species[J]. J Vet Diagn Invest, 2015, 27(4): 552-557.
10. 林华, 童晓燕, 林一聪, 等. 以无菌性脑膜炎为首发症状的组织细胞坏死性淋巴结炎一例[J]. 中国全科医学, 2013, 16(24): 2904-2905.
LIN Hua, TONG Xiaoyan, LIN Yicong, et al. A Case of Kikuchi -Fujimoto's Disease with Aseptic Meningitis as Initial Manifestations[J]. Chinese General Practice, 2013 16(24): 2904-2905.
11. 金雪华. 结核性脑膜炎脑脊液腺苷脱氨酶检测的临床意义及应用价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(10): 2513-2514.
JIN Xuehua. Clinical significance and application value of detection of cerebrospinal fluid adenosine in patients with tuberculous meningitis[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(10): 2513-2514.

12. 刘敏, 庞玉生, 石靖, 等. 细菌性脑膜炎并脑积水的临床特点及危险因素[J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(10): 774-776.
LIU Min, PANG Yusheng, SHI Jing, et al. Clinical characteristics and risk factors for bacterial meningitis and hydrocephalus[J]. Journal of Pediatric Clinical Practical Magazine, 2012, 27(10): 774-774.
13. Valles JM, Fekete R. Gradenigo syndrome: unusual consequence of otitis media[J]. Case Rep Neurol, 2014, 6(2): 197-201.
14. 陈秀俭, 郑华雨, 常丁印, 等. 常规脑脊液细胞学检查诊断病毒性脑炎36例[J]. 转化医学电子杂志, 2015, 2(4): 59-60.
CHEN Xiujian, ZHENG Huayu, CHANG Dingyin, et al. Routine CSF cytology examination in the diagnosis of viral encephalitis 36 cases[J]. Journal of Translational Medicine Electronic Journal, 2015, 2(4): 59-60.
15. Zegarra-Linares R, Moltz KC, Abdel-Haq N. Pituitary abscess in an adolescent girl: a case report and review of the literature[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2015, 28(3-4): 457-462.

本文引用: 郑可鲁, 杨思达, 高媛媛, 陈文雄, 黄怡玲, 张雅妮. 抗生素治疗时限对化脓性脑膜患儿脑脊液细菌16s rRNA基因检测的影响[J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(9): 1288-1292. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.09.009

Cite this article as: ZHENG Kelu, YANG Sida, GAO Yuanyuan, CHEN Wenxiong, HUANG Yiling, ZHANG Yani. The effects of antibiotic treatment time limit for children with purulent meningeal cerebrospinal fluid bacterial 16s rRNA genes detection[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2016, 36(9): 1288-1292. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2016.09.009