DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.022
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0565-03

论著

院内感染性肺炎逆行感染途径的基因多态性研究

代 芊,邓 宏,黄汉朝,王晓辉,张红艳 (第四军医大学吉林军医学院,吉林 132013)

提 要:目的 为确证胃→咽→下呼吸道逆行感染途径存在与否,研究胃液pH值变化与院内感染性肺炎(Nosocomial pneumonia,NP)发生的关系。方法 以气管切开(或插管)病人为对象,用防污染标本刷(PSB)采集标本,由细菌表型分型,直至质粒DNA、酶切、随机扩增多态性DNA(RAPD)等基因分型,前瞻性观察NP的发生情况。结果 11名患者有逆行感染存在(发生率为22%),即在胃部分离出病原菌1、2 d后,PSB在咽部及下呼吸道也检出相同的细菌,应用质粒图谱、酶切图谱和RAPD等分子生物学技术进行同源性分析,证明其具有很高的同源性。将美蓝经胃管注入病人胃内,1、2 d后在咽部及下呼吸道可检出蓝色分泌物。随着胃液pH值升高,胃内细菌定植增加,NP的发生率升高。结论 存在胃→咽→下呼吸道的逆行感染途径。NP的发生与胃液pH值显著相关。

关键词:随机扩增多态性DNA(RAPD);院内感染性肺炎(NP);逆行感染
中图法分类号:R392.13;R563.1 文献标识码:A

Study of retrograde transmission route of nosocomial pneumonia with random amplified polymorphism DNA

DAI Qian, DENG Hong, HUANG Han-chao, WANG Xiao-hui, ZHANG Hong-yan (Jilin Army Medical College, Fourth Military Medical University, Jilin 132013, China)

Abstract: Objective To study the relationship between the incidence of nosocomial pneumonia (NP) and the pH value of gastric juice in order to verify whether there is the existence of a retrograde transmission route from the stomach through the pharynx to the lower respiratory tract. Methods One hundred and eight patients with mechanical ventilation (tracheotomy or intubation) were selected from our 3 teaching hospitals in this study. The secretion of lower respiratory tract was collected with protected specimen brush (PPB) and quantitatively cultured. Gastric aspirate was cultured and gastric pH was determined with a digital acid-based analyzer. All the patients were observed every other day for the occurrence of NP. Gene typing of the bacteria from the secretion of the lower respiratory tract and gastric juice was done with plasmid profile analysis, restriction endonuclease fingerprint analysis and random amplified polymorphism DNA (RAPD) in the bacteria with same phenotype. Results fifty out of 108 patients developed NP and identical bacteria from 11 subjects of those with NP were first isolated from gastric juice and then from tracheal secretion 1 to 2 d later. The bacteria isolated from 2 places were quite homologous exhibiting same fingerprints in plasmid profile, endonuclease fingerprints and RAPD. Methylene blue was injected into the stomach through a gastric tube. One or 2 d later, blue secretion was found from the oropharynx and trachea. The bacterial count was increased along with the increase of gastric pH and the incidence of NP was increased simultaneously. Conclusion It is confirmed with our findings that the retrograde transmission route of NP definitely exists in our series of cases and the incidence of NP is positively correlated to gastric pH.

Key words: random amplified polymorphism DNA; nosocomial pneumonia; retrograde infection

关于院内感染性肺炎(Nosocomial pneumonia,NP)是否存在胃→咽→下呼吸道的逆行感染途径一直存有争议[1~3],且以往有关研究多限于细菌的表型分型或质粒图谱分析,缺乏基因组DNA水平上的确凿证据。本研究以气管切开(或插管)病人为对象,用防污染标

基金项目:全军"九五"攻关项目(96Z053)
作者简介:代 芊(1965—),女,四川省成都市人,硕士,讲师,主要从事医院感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(0432)4651127
收稿日期:1999-11-10;修回日期:2000-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

本刷(PSB)采集下呼吸道分泌物,同时采集胃液,应用质粒 DNA 图谱、酶切图谱分析及随机扩增的多态性 DNA(RAPD)等分子生物学技术,由细菌表型分型直至基因分型,前瞻性研究逆行感染途径存在与否。同时研究胃液 pH 值变化与 NP 发生的关系,为 NP 的预防提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1998年7月至1999年6月选择3所教学医院脑外科、神经内科行气管切开或插管的患者。按全国医院感染监控中心制订的诊断标准确诊 NP[4],年龄≤15岁,确诊为肺部感染时间≤48 h 者除外。发生 NP 的归为病例组,未发生 NP 的为对照组。二组年龄、性别、基础病、病情程度经均衡性检验具有良好的可比性。

1.2 标本采集及鉴定

自患者行气管切开或插管之日起,用 PSB 采集下呼吸道分泌物,同时采集空腹胃液作细菌定量培养并测定 pH 值,每1~2 d 1次。用美国 DADE-Microscan 自动微生物分析系统进行生化及耐药谱鉴定。采用成都生物制品研究所生产的血清诊断试剂盒进行血清学分型。

1.3 基因分型

对上述来自胃和下呼吸道细菌表型鉴定结果相同者,进一步作质粒 DNA、酶切图谱分型,在此基础上分别选用二种随机引物 Primer 1: 5′-GCAGGTGG-3′和 Primer 2: 5′-AGCCACCATG-3′进行 RAPD 基因分型。反应体系为 25 μl,含引物 2.0 μmol/L, 4× dNTP 125 μmol/L, $MgCl_2$ 4.0 mmol/L,模板 1 μl,阴性对照除不加模板外,其余条件与样本管相同。反应条件为 94℃ 90 s、42℃ 90 s、72℃ 60 s, 40个循环。

1.4 统计学处理

采用第四军医大学 SPLM 统计程序包,进行 t 检验、χ^2 检验、曲线拟合、直线相关回归分析,显著水准一律取 $\alpha=0.05$。对部分细菌表型鉴定结果及 RAPD 基因组指纹图谱进行聚类分析,以中国科学院微生物研究所 MINTS 数值分类软件包进行处理,聚类方式为平均链锁聚类方式。

2 结果与分析

纳入研究的108例患者中,男84例,女24例,年龄16~83岁,平均年龄为(47.7±14.6)岁。将确诊为肺部感染的50例归为病例组,NP 的发生率为46.3%(50/108)。PSB 采样有76例次出现有诊断意义(▷ 10^3 cfu/ml)的结果,分离到76株细菌,包括革兰氏阳性菌23株,阴性菌45株,真菌8株。胃液细菌培养分离到68株菌,包括革兰氏阳性菌11株,阴性菌50株,真菌7株。有22株菌(分别来自11名患者的胃部和肺部)在胃液分离鉴定出1~2 d后,在肺 PSB 也分离到相同的细菌,且连续2~3次采样均得到一致的结果。对其中6名患者将美蓝经胃管注入胃内,第2天在患者咽部用咽拭子可检出蓝色分泌物,PSB 在下呼吸道也有蓝色分泌物检出,初步证明有逆行途径存在。逆行感染发生率为10.2%(11/108)占感染病例的22%(11/50)。来源于同一病人的肺、胃部表型鉴定结果相同的菌株,其质粒 DNA 图谱 *Hind* Ⅲ酶切电泳图谱完全相同,提示它们在质粒 DNA 水平具有很高的同源性。更有意义的是 RAPD 在各对应菌株之间得到完全相同的扩增带,见图1~3。MINTS 聚类分析相似系数为100%,从基因组 DNA 水平进一步说明它们很可能为同源菌株。至此由细菌表型特征到基因组 DNA 水平均证明存在胃→咽→下呼吸道逆行感染途径。

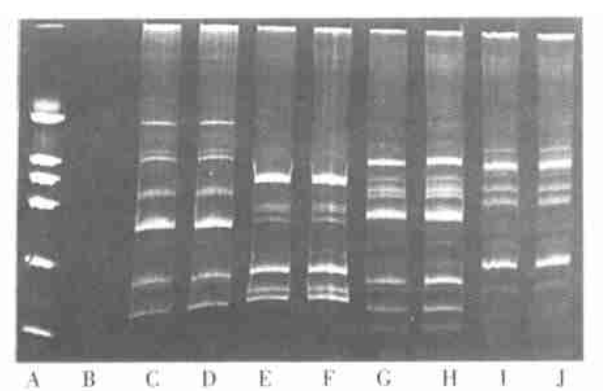


图1 各菌株 RAPD 图谱(1)

Fig 1 Bacteria profiles of RAPD generated by different primers(1)

A: PCR marker; B: Negative; C: P. Aeruginosa from stomach (Primer 1); D: P. Aeruginosa from lung(Primer 1); E: P. Aeruginosa from stomach(Primer 2); F: P. Aeruginosa from lung(Primer 2); G: *E. coli* from stomach(Primer 1); H: *E. coli* from lung (Primer 1); I: *E. coli* from stomach(Primer 2); J: *E. coli* from lung(Primer 2)

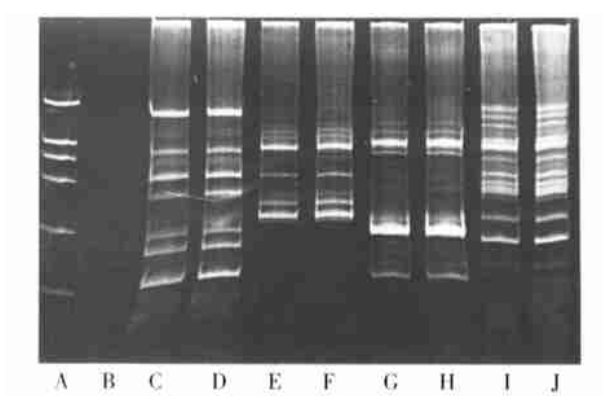


图2 各菌株 RAPD 图谱(2)

Fig 2 Bacteria profiles of RAPD generated by different primers(2)

A: PCR marker; B: Negative; C: K. pnemoniae from stomach (Primer 1); D: K. pnemoniae from lung(Primer 1); E: K. pnemoniae from stomach (Primer 2); F: K. pnemoniae from lung (Primer 2); G: P. Maltophilia from stomach(Primer 1); H: P. Maltophilia from lung(Primer 1); I: P. Maltophilia from stomach (Primer 2); J: P. Maltophilia from lung(Primer 2)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

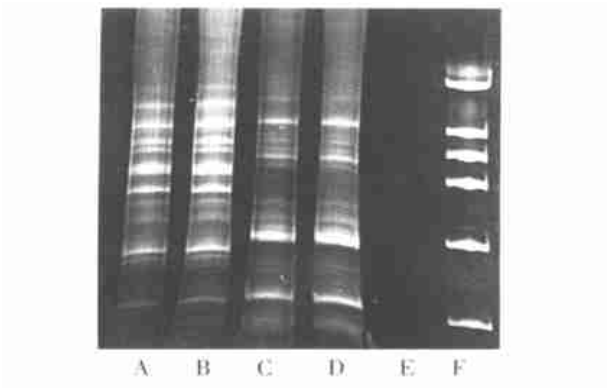


图 3　各菌株 RAPD 图谱(3)

Fig 3　Bacteria profiles of RAPD generated by different primers(3)

A: P. alcaligenes faecalis from stomach(Primer 1); B: P. alcaligenes faecalis from lung(Primer 1); C: P. alcaligenes faecalis from stomach(Primer 2); D: P. alcaligenes faecalis from lung(Primer 2); E: Negative; F: PCR marker

在测定胃液 pH 值的同时, 计数该 pH 环境下胃内细菌总数。结果表明随着胃液 pH 值的升高, 胃内定植细菌总数明显增加, 两者呈显著相关($P<0.01$)。病例组 pH 均值(4.89±1.48), 对照组 pH 均值 3.27±1.19, $P<0.01$。按 pH≥4 及 pH<4 将病例组分为 2 组, 当 pH<4 时 NP 的发生占 26%, pH≥4 时, NP 的发生占 74%, $\chi^2=32.94$, $P<0.01$, 即随着胃液 pH 值的升高, NP 的发生率显著增高。

3　讨论

国内报道 NP 的发病率为 23.3%~42.0%, 国外资料为 19.5%~19.7%[5]。本实验 NP 的发病率为 46.3%, 高于文献报道, 与本研究对象多为病情重, 有昏迷并接受气管切开(或插管)的病例加之使用 PSB 采样提高了检出率有关。

关于是否存在胃→咽→下呼吸道的逆行感染途径问题, 观点不尽一致。本组 50 例 NP 病人中, 发现有 11 例患者存在胃→咽→下呼吸道的逆行感染。即在胃内分离出病原菌, 1~2 d 后, 在肺 PSB 采样也分离到表型和基因型均相同的病原菌, 美蓝试验也佐证逆行感染途径的存在。大多文献对院内感染的同源性分析多限于表型鉴定, 如细菌形态、生化反应、血清学特点、耐药谱等, 这些鉴定虽很重要, 但比较肤浅, 只能达到型或亚型的水平。目前认为在表型特征一致的情况下, 尚须从基因结构上分析。RAPD 技术具快速、简捷、高效的优点, 甚至可以区分一个碱基的差异, 是一种新型遗传标记检测技术, 其结果更为准确可靠。

关于逆行感染的发生, 近来研究认为主要原因之一是由于胃食管反流症的结果。尤其强调食管下端括约肌暂时和持久松弛作用的重要性[6]。在危重病人和老年人这种力学作用尤为突出, 加上胃排空以及长期放置胃管, 刺激咽部, 极易引起反流, 将胃内细菌带至咽部进而入下呼吸道引起感染。此外食道下端括约肌的持久松弛, 使得胃内细菌可沿管壁逆行上移至咽, 再进入下呼吸道。这还与病人所处的体位有关。

关于胃液 pH 值的变化是否与 NP 的发生率相关, 尚无定论[7~8]。本研究结果显示随着 pH 值升高, NP 的发生率随之增高。正常胃液 pH ≈1.0, 具有强大的杀菌作用。但当胃液 pH≥4.0 时(也有认为>3.4)胃内细菌出现过度生长。目前认为应激性溃疡的预防用药是引起胃液 pH 升高的主要原因。在脑损伤等危重病人多常规使用制酸剂、H_2-受体阻断剂或/和质子泵抑制剂。这些药物主要是中和胃酸, 抑制胃酸分泌, 减轻 H^+ 对胃粘膜的损害, 但与此同时又引起胃内环境碱化, 细菌定植增加, NP 的发病率升高。

总之, 尽管传统的观点认为, 下呼吸道感染的发生主要是空气污染、医源性操作的结果, 但本研究认为逆行感染途径的确存在, 且占有一定比例, 不容忽视。此外, NP 的发生还与胃液 pH 等其它因素有关, 是多因素综合作用的结果。因此提示我们制定预防措施必须有的放矢, 才能取得良好的预防效果。

参考文献:

[1] Barker A M, Meredith J M, Haponik E F, *et al*. Pneumonia in intubated trauma patients, Microbiology and outcomes[J]. AM J Respir Cris Care Med, 1996, 153(1): 343—349.

[2] Thomason M H, Payseur E S, Hakeneweth A M, *et al*. Nosocomial Pneumonia in ventilated trauma patients during stress ulcer prophylaxis with sucralfate, antacid, and ranitidine[J]. J Trauma, 1996, 41(3): 503—508.

[3] Craven D E, Kunches L M, Lilinsky V, *et al*. Risk factors for pneumonia and fatality on patients receiving continuous mechanical ventilation[J]. Am Rev Respit Dis, 1996, 133(5): 792—798.

[4] 医院内获得性支气管-肺感染诊断标准. 全国肺部感染学术会[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1990, 13(6): 372—374.

[5] NNIS. National nosocomial infection surveillance semiannual report[J]. Am J Infect Control, 1995, 23(1): 377—385.

[6] Lundell L, Myer J C, Jamieson G. The effect of antireflux operation on lower oesophageal sphincter tone and postprandial symptoms[J]. Scand J Gastroenterol, 1993, 28(5): 725—729.

[7] Spilder C A, Hinthorn D R, Pingleton S K, *et al*. Intermittent enteral feeding in mechanically ventilated patient. The effect on gastric pH and gastric cultures[J]. Chest, 1996, 110(1): 243—248.

[8] Chendradkhar A. Are routine blood culture effective in the evaluation of patients clinically diagnosed to have nosocomial pneuimonia[J]? Am J Surg, 1997, 62(5): 373—376.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net