

新型显色基质法鲎试验对肺部 革兰氏阴性菌感染患者的诊断意义*

Diagnostic Significance of New Chromogenic Limulus Assay in Patients with Pulmonary GRAM-Negative Bacterial Infection

钟 定 覃寿明 许 辉
Zhong Ding Qin Shouming Xu Hui

张学荣 舒雨雁
Zhang Xuerong Shu Yuyan

(广西医科大学第一附属医院呼吸
内科 南宁市滨湖路 6号 530021)
(Department of Respiratory, The First
Affiliated Hospital, Guangxi Medical University,
6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

(广西医科大学蛇毒研究所
南宁市滨湖路 6号 530021)
(The Snake Venom Research Institute
of Guangxi Medical University,
6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 应用新型显色基质法鲎试验 (NCLA) 测定 41例肺部革兰氏阴性 (G^-) 细菌感染患者 (G^- 组); 32例肺部非革兰氏阴性细菌感染患者 (非 G^- 组); 42例无细菌感染的肺病患者 (无感染组) 的血浆内毒素浓度, 并与 100例健康者 (对照) 比较, G^- 组血浆内毒素水平明显高于对照组, 非 G^- 组及无感染组 (P 均 < 0.01)。提示新型显色基质法鲎试验有助于对肺部 G^- 细菌感染作出快速、灵敏的诊断。

关键词 鲎试验 内毒素 肺炎 革兰氏阴性细菌

Abstract The concentration of plasma endotoxin in 41 patients with pulmonary gram-negative (G^-) bacterial infection (G^- group), 32 patients with pulmonary non- G^- bacterial infection (non G^- group), 42 patients without pulmonary bacterial infection (non infection group) were measured by the New Chromogenic Limulus Assay (NCLA), and compared with a control group of 100 normal cases. The concentration of plasma endotoxin in G^- group was significantly higher than those of the control group, non G^- group and non infection group (all $P < 0.01$). The results showed that NCLA was a quick, sensitive and useful method for the diagnosis of pulmonary G^- bacterial infection.

Key words limulus assay, endotoxin, pneumonia, gram-negative bacterium

内毒素 (endotoxin) 系革兰氏阴性 (G^-) 菌胞壁所含的脂多糖, 测定病人血浆中内毒素水平有助于 G^- 菌感染的诊断^[1]。自从 1956 年发现鲎血变形细胞裂解物与内毒素接触可形成凝胶后, 虽然已建立了一系列检测内毒素的鲎试验 (Limulus Test), 但均因主

观误差大和灵敏度低而限制了鲎试验在临床上的应用。例如, 一般检验科使用的凝胶法只能定性, 美国常用的 MA Bioproducts Kits^[2]和国内一些单位用的偶氮显色法鲎试剂盒测定内毒素的灵敏度也只在 115 Eu/L 左右, 随着科学的进步, 这已不能满足临床需要。广西医科大学蛇毒研究所利用国家自然科学基金的资助, 合成了一种由三肽与 N, N-二乙氨基苯胺结合形成的新基质, 应用该基质建立的新型显色基质鲎试验法 (New Chromogenic Limulus Assay, NCLA) 除具有快速 (数小时内可出结果), 不受血浆色泽干扰的特点外, 能准确定量检测低至 2~6 Eu/L 的微量内毒素。为了探讨 NCLA 在临床上对肺部 G^-

1995-04-08 收稿。

* 本文“鲎试验”一词, 被作者译为“Limulus Assay”或“Limulus test”, 实际上并非用美洲鲎 (*Limulus polyphemus*) 的鲎试剂 (商品名缩写为 LAL, 全称 Limulus Amoebocyte Lysate) 做的试验, 而是用中国鲎 (*Tachypleus trideutalu*) 的鲎试剂 (TAL, Tachypleus Amoebocyte Lysate) 为了便于交流, 未将 Limulus 改为 Tachypleus, 特此注明。(编者)

菌感染的诊断意义,我们用该法检测了 115例肺病病人,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 无感染组:包括肺癌 21例,支气管哮喘 11例,支气管扩张 7例,老年性肺气肿 3例。合计男 28例,女 14例,年龄 52 ± 12.9 岁,均经临床确诊,且经细菌学及其它检查证实无细菌感染征象者。

1.1.2 非 G⁻细菌性肺炎组:包括金黄色葡萄球菌 6例,表皮葡萄球菌 3例,草黄色链球菌 5例,抗酸杆菌 18例,均经痰细菌学检查证实 合计男 19例,女 13例,年龄 50.9 ± 17.6 岁。

1.1.3 G⁻细菌性肺炎组:包括绿脓杆菌 14例,肺炎克雷白杆菌 13例,大肠艾希氏菌 7例,醋酸杆菌 4例,变形杆菌 2例,黄杆菌 2例,合计男 27例,女 14例,年龄 51.9 ± 16.6 岁。均经痰细菌学培养证实。

1.1.4 对照组:100名健康献血员的血浆内毒素测定结果为正常对照组,其中男 56例,女 44例。

1.2 研究方法

1.2.1 血浆样品准备:住院病人于清晨用一次性无热原注射器抽取外周静脉血 2~3 mL,置于含 0.1 mL肝素溶液的经处理无内毒素污染的试管内并封口送检。血标本经离心 1000 rpm (200 g) 10 min,得富含血小板血浆,取该血浆 0.1 mL加蒸馏水 0.9 mL混匀置 75°C水浴 10 min,冷至室温备用 (24 h内检测)。

1.2.2 标本测定:采用新型显色基质鲎试验法测定:分取鲎试剂 (广西医科大学蛇毒研究所制备,简称 TAL) 0.1 mL加入各无热原试管中,再加入前述血浆样品 0.2 mL混匀,置 37°C水浴中保温 60 min,然后分别加入 0.4 mL的 Tris-HCl缓冲液 (pH值 8.5) 0.1 mL和 3 mmol的显色基质液 (Boc-Lue-Gly-Arg-DEAA^o·H₂SO₄) 0.1 mL,混匀后准确保温 15 min,然后顺序加入 0.6 mL的 1-萘-2-磺酸钠 (用 0.05 mmol的硼酸缓冲液配制, pH值 8.9) 0.5 mL和 0.2%高碘酸钠 1 mL,混匀,室温放置 20 min后用分光光度计 (国产 721-3型) 测定 675 nm波长处的吸收度 (简称 A₆₇₅,采用 0.5 cm厚度比色杯,用蒸馏水调零)。在血浆样品吸光度座标曲线上或用直线回归方程找出经过预处理的样品中内毒素含量,将该值乘以稀释倍数即为原血浆样品的内毒素含量。

1.2.3 细菌培养:病人于晨间采血后漱口三次咯痰做细菌培养及药物敏感试验。

1.2.4 数据统计方法:数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示,实验结

果进行 *q* 检验 (Newman-Keuls法)。

2 结果

四组血浆内毒素浓度结果见附表:G⁻组血浆内毒素浓度明显高于对照组,非 G⁻组和无感染组 (P 均 < 0.01);对照组、非 G⁻组和无感染组各组间的血浆内毒素浓度虽然也有差异,但差异无显著性 (P 均 > 0.05)。

附表 四个组的血浆内毒素浓度

Table The concentration of plasma endotoxin of 4 groups

组别 Group	病例数 No. cases	血浆内毒素浓度 The concentration of plasma endotoxin $\bar{x} \pm S$ (Eu/L)
对照组 Control group	100	11.0 ± 7
非 G ⁻ 组 Non G ⁻ group	32	14.18 ± 13.5
无感染组 Non infection group	42	14.5 ± 13
G ⁻ 组 G ⁻ group	41	72.4 ± 38.†

G⁻ = Gram-negative; + : 与对照组相比 Compared with control, $P < 0.01$; * : 与 G⁻组相比 Compared with G⁻ group, $P < 0.01$.

3 讨论

肺炎是临床上最常见的疾病之一。在肺炎病例中,G⁻菌感染所占的比例已逐渐超过 G⁺菌和其它病原体,成为最主要的引起肺炎的病原体^[13]。G⁻菌和 G⁺菌及其它病原体对抗生素的敏感性各不相同,使得对各病原体的鉴别显得非常重要;近 10年来各种病原体所引起的肺炎,尤其是医院内获得性肺炎,在临床表现上往往不具有特征性,又使得对这些病原体的鉴别,尤其是用药前的鉴别变得不易。传统采用的痰培养,显然可以帮助准确地认定细菌,但因需要 4~7 d才能得出结果,并且约有半数的病例培养结果呈阴性^[4],这就不利于及时、正确的指导用药。在痰培养未果前用药,显然有可能导致滥用抗生素,容易产生耐药菌株和引起二重感染;若待培养结果出来后才用药,又有可能延误治疗时机。为此,尽早对病原做出判断,对指导治疗有着十分显著的意义。我们利用 NCLA鲎试验检测了不同病人的血浆内毒素浓

(下转第 70页 Continue on page 70)

fects of protein quantity, protein solubility, and feeding frequency. *J Dairy Sci.* 1987, 70: 983-989.

2 Bryant M P, I M Robinson. Some nutritional characteristics of predominant cultural ruminal bacteria. *J Bacteriol.* 1962, 84: 605-614.

3 Chalupa W. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *J Anim Sci.* 1976, 43: 828-834.

4 Scheifinger C N, Russel W, Chalupa. Degradation of amino acids by pure cultures of rumenbacteria. *J Anim Sci.* 1976, 43: 821-827.

5 Ben-Ghedalia, D N P, McMeniman, D G, Armstrong. The effect of partially replacing urea nitrogen with protein N on N capture in the rumen of sheep fed a purified diet. *Br J Nutr.* 1978, 39: 37-42.

6 Hume I D. Synthesis of microbial protein in the rumen III: the effect of dietary protein. *Aust J Agri Res.* 1970, 21:

305-310.

7 Nelder J R, Mead. A simplex method for function minimization. *Comp J.* 1965, 7: 308-312.

8 Dehority B A, R R Johnson, O G Bentley et al. Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 1958, 78: 15-23.

9 Russell J B, C J Sniffen, P J Van Soest. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumenbacteria. *J Dairy Sci.* 1983, 66: 763-771.

10 Maeng W J, C J Van Nevel, R L Baldwin et al. Rumen microbial growth rates and yields: Effect of amino acids and protein. *J Dairy Sci.* 1976, 59: 68-79.

11 Maeng W J, R L Baldwin. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effects of urea and amino acids over time. *J Dairy Sci.* 1976, 59: 643-651.

(责任编辑 蒋汉明 邓大玉)

(上接第 61页 Continue from page 61)

度, 仅需 3~4 h 即可得出结果, 结果显示 G⁻菌组的血浆内毒素浓度不但明显高于正常对照组和无细菌感染组, 也明显高于非 G⁻菌感染组 (P均 < 0.01), 这提示用 NCL A 测定血浆内毒素浓度的改变, 确实可以帮助诊断有无 G⁻菌的感染, 从而为临床选用抗生素提供了线索。近年来发现, 引起肺炎, 尤其是医院内获得性肺炎的 G⁻菌是一些毒力相对低的菌群^[5], 机体受感染后常见的反应如发热、白细胞升高等往往表现不出来或表现不明显, 血浆内毒素也存在同样情况。我们观察的 41 例 G⁻菌肺炎患者, 血浆内毒素浓度为 72.4 ± 36.1 Eu/L, 其中大于 115 Eu/L 8 例, 占 19.5%; 小于 115 Eu/L 33 例, 占 80.5%。这意味着若使用凝胶法、偶氮显色法等鲎试验, 将有约 80% 病例得不到阳性结果。NCL A 可检测出 2~6 Eu/L 的内毒素水平, 意味着毒力低的 G⁻菌感染也可以得到发现。这显示 NCL A 不失为一种快

速、灵敏、有效的诊断方法。

参考文献

1 Jorgenson JH. Clinical application of the Limulus amoebocyte lysate test. In: Procter R A ed. Handbook of endotoxins. Vol 4. Elsevier science publishers Br. 1986. 127.

2 Piotrowicz BI, McCartney AC. Chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin: comparison of three commercial products. *Med Lab Sci.* 1987, 44: 89.

3 邓伟吾. 加强医院内获得性肺炎的防治研究. *中华结核和呼吸杂志*, 1994, 17 (2): 4.

4 Bates JH, Campbell GD, Barron AL et al. Microbial Etiology of Acute Pneumonia in Hospitalized Patients. *Chest.* 1992, 101 (4): 1005.

5 王爱霞, 贺联印. 重视免疫功能低下所致感染的诊断和治疗. *中华医学杂志*, 1991, 71 (12): 663.

(责任编辑 蒋汉明)