

多重实时 PCR 检测腹膜透析相关性腹膜炎致病菌的应用分析

燕雯雯¹, 沈继录², 李晓峰¹, 吴永贵¹

摘要 目的 探讨多重实时 PCR(RT-PCR)检测腹膜透析相关性腹膜炎(PDAP)致病菌的应用价值。方法 收集 70 例患者的腹透液标本,分别行传统细菌培养与荧光染料法细菌通用引物 RT-PCR 检测。根据 70 例样本培养结果及相关参考文献,选取最常见的 6 种 PDAP 致病菌作为检测菌,设计各检测菌特异引物,分别采用单一及多重荧光探针法 RT-PCR,针对通用 RT-PCR 法检出的阳性样本进行检测。结果

70 例标本中传统培养 46 例阳性,阳性率为 65.71%;通用 RT-PCR 法 57 例阳性,阳性率为 81.43%,两种检测方法阳性率差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 6 种常见致病菌检测中,对通用 RT-PCR 法检出的 57 例阳性样本行单一及多重 RT-PCR 检测,两者均检出 38 例样本在 6 种检测菌范围内,两种方法检测结果一致,1 例 RT-PCR 结果与培养结果不符,剩余 19 例菌种在 6 种检测菌范围以外。通用 RT-PCR 可在 4~6 h 内明确是否存在细菌感染;针对 6 种致病菌的检测,单一 RT-PCR 可在 6~9 h 内完成,多重 RT-PCR 仅需 3 h 即可明确菌种。结论 与传统培养法比较,RT-PCR 方法有较高灵敏性和特异性,多重 RT-PCR 因可同时检测多种致病菌,较单一 RT-PCR 更加迅速、简便、经济。

关键词 腹膜透析相关性腹膜炎;致病菌;实时荧光 PCR;传统培养

中图分类号 R 459.51;R 372

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0712-06

腹膜透析相关性腹膜炎是腹膜透析最常见的急性并发症及患者退出的重要原因。2010 年国际腹膜透析协会指南(ISPD)认为血培养为腹膜透析相关性腹膜炎(peritoneal dialysis-associated peritonitis, PDAP)明确致病菌的最佳方式,单中心培养阴性率不应高于 20%^[1];而我国目前培养阳性率仅 50.7%~69.9%^[2-3],远低于标准。因此,如何快速、精准的检出致病菌是 PDAP 诊疗的关键问题之一。实时聚合酶链式反应(RT-PCR)是目前用于病原菌检测的最热门技术之一,有高灵敏度、特异性强、快速、简

便以及可定量模板浓度等优点,已被广泛的应用于生物遗传、基因诊断、微生物分型鉴定等多个领域,并取得良好效果^[4-6]。该实验旨在通过 RT-PCR 与传统培养在 PDAP 致病菌检出率的对比及单一、多重 RT-PCR 对 PDAP 常见的 6 种致病菌检出率的对比分析,初步探讨多重 RT-PCR 在临床检测 PDAP 致病菌中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2014 年 1 月~2015 年 7 月因 PDAP 入住安徽医科大学第一附属医院肾内科的患者腹透液标本。参照 2010 年 ISPD 指南^[1],符合以下 3 条标准中的 2 条即可诊断为腹膜炎:①腹痛、腹透出液浑浊、伴或不伴发热;②透出液中白细胞计数大于 $100 \times 10^6/L$,中性粒细胞比例大于 0.50;③透出液中培养有病原微生物生长。满足①与②诊断标准者作为本研究病例共 70 例,其中男 33 例,女 37 例,年龄 18~73(49.94 ± 13.11)岁,透析龄 1~171(43.94 ± 31.95)个月。

1.2 方法

1.2.1 传统细菌培养 可疑 PDAP 患者入院时即刻抽取腹透流出液(以首袋出现浑浊的透出液最佳,6 h 内送检),送检腹透液常规,同时用血培养瓶(需氧及厌氧)留取透出液 16~20 ml 送检细菌培养。另留取 250 ml 透出液分装并行离心($4\,000\text{ r/min}$, 10 min)处理,弃上清液,保留沉淀分装至 1.5 ml 无菌离心管中,置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存用于后续模板 DNA 制备。

1.2.2 腹透液细菌 DNA 提取 按照 HiPure Plasmid EF Micro Kit 微量 DNA 提取试剂盒操作步骤从标本中提取细菌 DNA,用无菌双蒸水溶解后,用紫外线分光光度仪测吸光度(optical density, OD),计算 OD_{260}/OD_{280} ,在 1.7~2.0 范围内,说明 DNA 纯度较高。

1.2.3 通用 RT-PCR 实验 参考文献^[7],针对细菌 16SrRNA 基因保守片段,选用一对通用引物,上游引物序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物序列为:5'-ACGGCTACCTGTACGACTT-3'。

2016-02-22 接收

基金项目:安徽省自然科学基金资助(编号:1408085MH183)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾内科,合肥 230022

作者简介:燕雯雯,女,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

使用 SYBR Green 1 荧光染料法进行检测,设立金黄色葡萄球菌的标准菌株 DNA 提取液为阳性对照,无菌 DEPC 水为阴性对照,每个样本设置 3 个重复孔以验证可重复性。反应体系为 20 μ l,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;循环反应:95 $^{\circ}$ C、10 s,60 $^{\circ}$ C、33 s(收集荧光,循环 40 次);溶解曲线:95 $^{\circ}$ C、15 s,60 $^{\circ}$ C、60 s,95 $^{\circ}$ C、15 s(收集荧光)。结果判定:在对照孔表达良好的前提下,荧光信号存在指数扩增期,且阳性扩增信号的最小拷贝数(CT 值) ≤ 32 及溶解曲线呈现单峰,则判为 PCR 阳性。

1.2.4 单一 RT-PCR 实验 参考文献^[8-10]及本实验病例培养结果,确立 6 种细菌作为检测菌种,使用荧光探针法 PCR 进行检测,荧光探针法试剂购自常州博闻迪医药科技有限公司(各菌种引物及探针序列见表 1),设立含各试验菌种靶基因片段的质粒为阳性对照,无菌 DEPC 水为阴性对照,反应体系为 25 μ l,反应步骤设置如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,58 $^{\circ}$ C 复性延伸 40 s(收集荧光,循环 40 次)。结果判定:在对照孔表达良好的前提下,荧光

信号若存在指数扩增期,且 Ct 值 ≤ 37 则判为 PCR 阳性。

1.2.5 多重 RT-PCR 实验 将 6 种检测菌分为两组:表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌和溶血性葡萄球菌为一组,草绿色链球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌为一组。针对 6 种细菌分别设计一对通用引物及荧光探针(表 2)。按上述分组行多重 RT-PCR 反应条件优化,建立适宜的反应体系和反应条件。设立含各细菌靶基因片段质粒为阳性对照,无菌 DEPC 水为阴性对照,反应体系为 20 μ l,反应步骤设置如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s;95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 复性延伸 32 s(收集荧光,循环 50 次)。结果判定:在对照孔表达良好的前提下,相应荧光通道收集的荧光信号出现指数扩增期,且 Ct 值 ≤ 37 则判为 PCR 阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用配对 χ^2 检验。

2 结果

2.1 传统培养 70 例样本中,腹透液培养的阳性

表 1 单一 RT-PCR 各试验菌种引物及探针序列

细菌	引物序列(5'-3')	荧光探针(5'-3')
表皮葡萄球菌	F: ATATTTCAGATGCGGCATTAG R: CAATTCCTTTTCGAGTTGACTGAT	ACATTGCACAGTCTCGGATTAGTC
溶血葡萄球菌	F: ACGCTTATGAAAAAGTGCTGTC R: TGACGCATCGAATCATCTTAT	AACATACCACTACGAGGCCCAATA
金黄色葡萄球菌	F: TGATACACCTGAAACAAAGCAT R: ACTCGACTTCAATTTTCTTTGC	TGGTCTGAAGCAAGTGCATT
草绿色溶血链球菌	F: TGACAGCCGTCTTTTGCTAG R: CAGGTAGCGTCTCTTGACATC	CAACCTCAATTTTAC GGGCAT
大肠埃希菌	F: CTTGAGACCGGCTACGC R: GAACGCTTATGCTCAGGCTCT	CGTCAGCATCGGGAGCGTT
铜绿假单胞菌	F: GCGGATGACTGATGACCGT R: GCTGCAACCTCGACGATACC	TGTCCAGGTCATGCT TCGCC

表 2 多重 RT-PCR 各试验菌种引物及探针序列

细菌	引物序列(5'-3')	荧光探针(5'-3')
表皮葡萄球菌	F: TCGTTTCCGTAGCTTGTG R: TGGACGTTCTTCAGGTGTC	TGATTTAGACGCCGAGCAAGTGACA
溶血葡萄球菌	F: TCGTCTGCAACACACAATA R: CGACTAAGCGACCACTTCT	CGCGGAGCAGAAGCAAGTGC
金黄色葡萄球菌	F: AGCGATTGATGCTGATACGG R: CGCTAAGCCACGTCCATATT	TGGTCTGAAGCAAGTGCATTACG
草绿色溶血链球菌	F: CACTGCAGCAGCAACAACCTC R: CGTTGCGGTATTTACAGTAG	TGGGCTTGGACGTTTGGGAA
大肠埃希菌	F: GTGGCGCGCGCACTT R: GTCGCCACCAATCCCCA	CCATCGCCATCTGCTGCACGC
铜绿假单胞菌	F: ATTCTCTGCTCTGGCTCTGG R: CAGAGCTTCGTCAGCCTTG	CACCGGTTGCAGCAGCCACT

率为 65.71% (46/70), 革兰阳性球菌占 71.74% (33/46), 革兰阴性杆菌占 28.26% (13/46); 其中表皮葡萄球菌 9 例、金黄色葡萄球菌 3 例、溶血葡萄球菌 10 例、草绿色链球菌 6 例、大肠埃希菌 5 例、铜绿假单胞菌 3 例、肺炎克雷伯杆菌 2 例、头部葡萄球菌头部亚种、屎肠球菌、华纳葡萄球菌、腐生葡萄球菌、解没食子酸链球菌、产酸克雷伯杆菌、少动鞘氨醇单胞菌、深红沙雷氏菌均为 1 例。

2.2 单一及多重 RT-PCR

2.2.1 通用 RT-PCR 70 例样本中, 通用 RT-PCR 检出 57 例阳性; 46 例培养阳性的样本中 RT-PCR 检出 44 例阳性, 2 例阴性; 24 例培养阴性的样本中, 通用 RT-PCR 检测出 13 例阳性, 11 例为阴性; 以培养法为金标准, 通用 RT-PCR 阳性率为 81.43% (57/70), 敏感性为 95.65% (44/46), 特异性为 45.83% (11/24), 假阳性率 54.17% (13/24), 假阴性率 4.34% (2/46), 行 χ^2 检验, 两者阳性率比较差异有统计学意义 ($P=0.007$)。扩增曲线见图 1。

2.2.2 单一 RT-PCR 针对通用 RT-PCR 检出的 57 例阳性样本, 行单一 RT-PCR 检测, 检出 38 例样本菌种在 6 种检测菌范围内, 1 例与培养结果不符; 19 例单一 RT-PCR 检测未明确致病菌。部分扩增

曲线见图 2、3。

2.2.3 多重 RT-PCR 针对通用 RT-PCR 检出的 57 例阳性样本, 行多重 RT-PCR 检测, 检出 38 例样本菌种在 6 种检测菌范围内, 1 例与培养结果不符; 19 例多重 RT-PCR 检测未明确致病菌。本实验中 6 种检测菌的分布与单一 RT-PCR 检测结果一致, 其中表皮葡萄球菌 11 例、金黄色葡萄球菌 3 例、溶血性葡萄球菌 10 例、草绿色链球菌 6 例、大肠埃希菌 5 例、铜绿假单胞杆菌 3 例; 部分扩增曲线见图 4。

3 讨论

目前检测 PDAP 致病菌的主要方式为血培养, 尽管培养法较为准确, 但耗时长, 敏感性低, 易受细菌生理条件、数量和抗生素使用等限制, 致使常规培养阳性率较低。传统培养阳性率为 65.71%, 其中革兰阳性球菌占 71.74%, 仍以表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等为主, 这与其他腹透中心近几年 PDAP 培养阳性率及细菌分布基本相符^[9-10], 但仍远低于 ISPD 指南中阳性率大于 80% 的建议。临床上在明确致病菌前, 先给予经验性广谱抗生素治疗, 但对于 PDAP 最佳初始治疗方案的选择目前国际上暂无明确共识^[11]; 且长时程的超广谱抗菌素

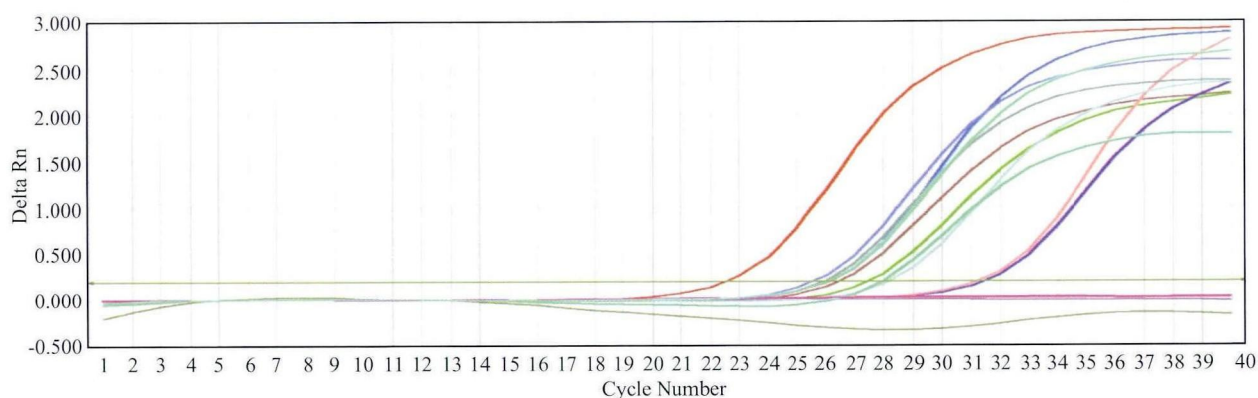


图1 腹透液样本通用 RT-PCR 扩增图

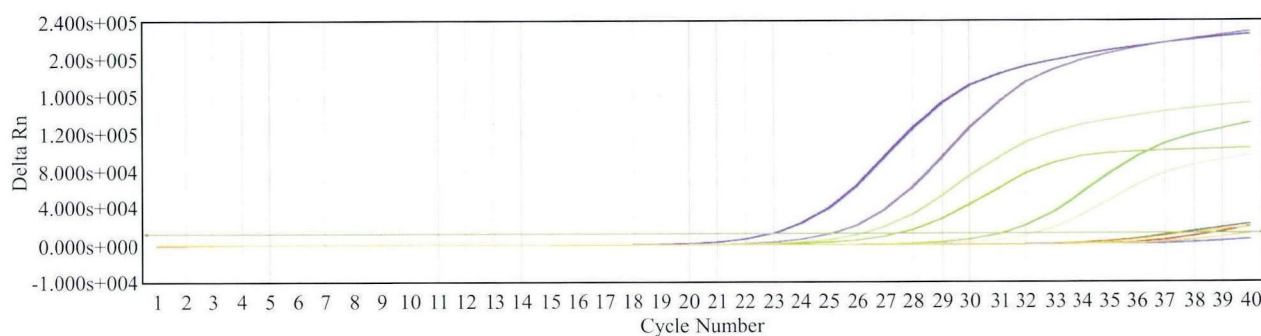


图2 表皮葡萄球菌阳性样本单一 RT-PCR 扩增曲线

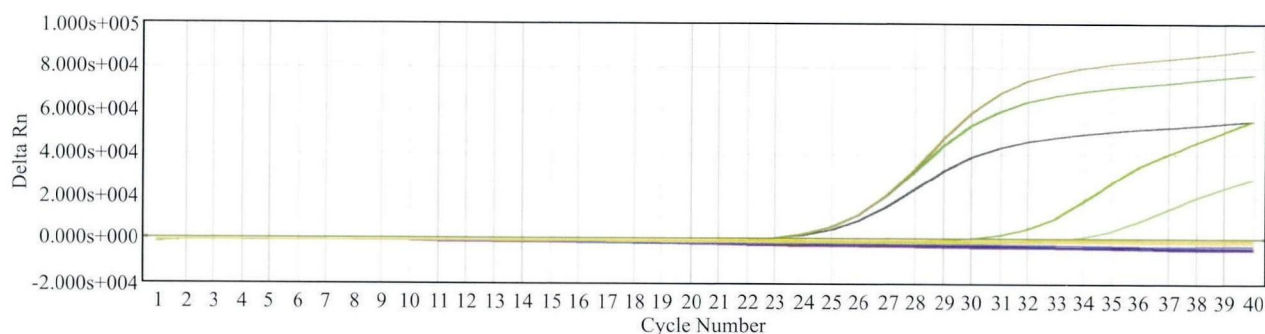


图3 金黄色葡萄球菌阳性样本单一 RT-PCR 扩增曲线

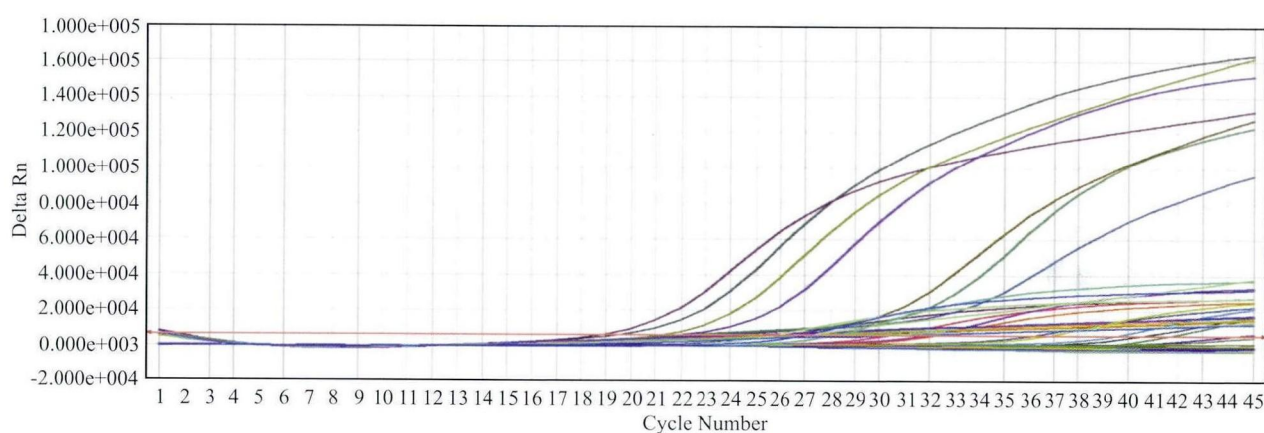


图4 腹透液样本多重 RT-PCR 扩增曲线

的使用可能改变细菌耐药性、增加二重感染及腹膜硬化等风险。如何快速灵敏的检出致病菌,指导抗生素的使用,是及时控制感染、保护腹膜功能的关键。

PCR 对于病原微生物的检测不依赖于微生物表型标记、酶学等方法,而是直接对于微生物保守基因片段进行特异扩增,因此更加快速灵敏特异。实验中 70 例样本,通用 RT-PCR 阳性率为 81.43%,与传统培养阳性率比较,两者差异有统计学意义。以传统培养为金标准,通用 RT-PCR 敏感性为 95.65%,特异性为 45.83%,具有较高的灵敏度。且通用 RT-PCR 在 4~6 h 内即可明确有无细菌感染,较传统培养耗时明显缩短。实验中,对于 46 例培养阳性的样本中有 2 例通用 RT-PCR 反复检测 3 次均为阴性,考虑可能在培养过程中样本被污染,或在样本原液保存、DNA 提取及保存过程中 DNA 被破坏、分解,亦或是样本中存在抑制 PCR 反应的物质,在细菌 DNA 被提取后该抑制作用仍然存在。有文献^[12-13]报道,在血液、粪便、尿液中存在 PCR 反应的抑制物,如脂多糖、肝素能干扰 Taq 聚合酶的作用;这种抑制可减小 PCR 的灵敏度,提高假阴性结果;改变样本保存温度、模板 DNA 浓度及提取方法

可减少抑制作用,但不能完全消除。对于 24 例培养阴性的样本,有 13 例通用 RT-PCR 阳性,这可能与 PCR 技术的高灵敏度相关,在样本所含的细菌量极少时,传统培养检出的难度增大,但 PCR 通过指数扩增可检出含量极少的细菌。此外,其还可对已使用过抗生素样本、苛养菌、疑难菌株、死菌、生化反应及形态改变的细菌进行鉴定。因荧光染料法 PCR 无特异性,只要出现扩增即可收集到荧光,若操作过程中有极少量的 DNA、气溶胶等污染均可出现非特异性扩增,提高假阳性率;但暂无更为有效的检验手段,用以明确这 13 例样本是否存在假阳性的可能。

与染料法 PCR 不同的是探针法 PCR 在保证普通 PCR 高灵敏度的基础上,在反应体系中添加了指探针,增加了实验的特异性,用于鉴定细菌种类比染料法更为可靠。在探针法 PCR 的 57 例样本中,两种 RT-PCR 均检出 38 例样本,其中 1 例传统培养结果为金黄色葡萄球菌,RT-PCR 结果为溶血性葡萄球菌,考虑可能在样本培养过程中混入金黄色葡萄球菌,大量繁殖并作为优势菌抑制其他细菌生长所致;其余 19 例样本可能因实验检测范围较窄,致病菌种类不在检测范围内,后期实验中可扩大菌群检测范围,以便更大程度上明确菌种。该试验中单一 RT-

PCR 完成 6 种致病菌检测所用时间为 6 ~ 9 h, 而多重 RT-PCR 仅需 2 ~ 3 h 即可完成。且单一 RT-PCR 需对同一样本反复检测, 不但工作量大幅增加, 检测周期延长, 同时增加了失误概率及样本污染、样品生物危害等风险, 对检测结果的可靠性亦有影响^[14]。多重 RT-PCR 虽在时效性及操作简便等方面有明显优势, 但其要求多个不同靶基因片段同时扩增, 因而在引物设计、反应条件的优化、反应体系的配置等环节均需反复试验, 建立最佳反应条件, 以期最大程度上避免非特异性扩增及片段间的竞争性扩增, 实现高效灵敏、特异性强的扩增反应, 具有一定难度。

与传统培养法比较, RT-PCR 技术鉴定病原菌具有较高的灵敏度, 且检测周期明显缩短。多重 RT-PCR 因可同时检测多种致病菌, 比单一 RT-PCR 检测更迅速、简便, 且更节约成本; 在 PDAP 细菌鉴定中有一定的临床应用价值, 有望与传统培养相结合成为全面、客观认识 PDAP 致病菌的新途径。

参考文献

- [1] Li P K, Szeto C C, Piraino B, et al. Peritoneal dialysis-related infections recommendations: 2010 update[J]. *Perit Dial Int*, 2010, 30(4): 393 - 423.
- [2] 黎伟, 杨楨华, 廖蕴华, 等. 腹膜透析相关性腹膜炎的菌谱及其耐药性分析[J]. *广东医学*, 2013, 34(14): 2227 - 9.
- [3] 刘华, 杨敏, 高小夏, 等. 腹膜透析相关性腹膜炎的致病菌及其耐药性分析[J]. *江苏医药*, 2014, 40(11): 1309 - 11.
- [4] Paolucci M, Landini M P, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36 Suppl 2: S6 - 16.
- [5] 侯瑞生, 王丽, 张勤, 等. 多重 PCR 技术及其在病原体检测中的应用[J]. *中华全科医学*, 2011, 9(8): 1288 - 90.
- [6] 陈明洁, 方侗, 柯涛, 等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术[J]. *武汉理工大学学报*, 2005, 27(10): 33 - 6.
- [7] Dabiri H, Azimi Rad M, Tavafzadeh R, et al. Bacteriologic study of cirrhotic patients with non-neutrocytic ascites [J]. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014, 7(4): 224 - 9.
- [8] 雷蕾, 刘冠贤, 黄成文, 等. 腹膜透析相关性腹膜炎 239 例次致病菌菌谱及药敏分析[J]. *广东医学*, 2014, 35(5): 729 - 31.
- [9] 赵珉, 戴宏, 沈继录, 等. 132 例腹膜透析相关性腹膜炎病原菌及其耐药性分析[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2015, 15(3): 236 - 43.
- [10] 张连云, 刘向东, 张燕, 等. 68 例次持续性非卧床腹透腹膜炎临床分析[J]. *中国实用医学*, 2010, 5(18): 131 - 3.
- [11] Barretti P, Doles J V, Pinotti D G, et al. Evidence-based medicine: An update on treatments for peritoneal dialysis-related peritonitis[J]. *World J Nephrol*, 2015, 4(2): 287 - 94.
- [12] 沈克锋, 杨默, 江千里. 血液和骨髓标本中常见 PCR 反应抑制物的探究与分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 22(3): 842 - 6.
- [13] Toye B, Woods W, Bobrowska M, et al. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for chlamydia trachomatis testing[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(8): 2356 - 8.
- [14] 张平平, 王浩然, 郭兆彪, 等. 多重生物检测技术研究进展[J]. *军事医学*, 2012, 36(9): 713 - 7.

Application analysis of multiplex real-time PCR assays for detection of pathogenic bacterium in peritoneal dialysis-associated peritonitis

Yan Wenwen¹, Shen Jilu², Li Xiaofeng¹, et al

(¹Dept of Nephrology, ²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To estimate the clinical value of bacterial detection in peritoneal dialysis-associated peritonitis (PDAP) by multiplex real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Methods** Seventy peritoneal dialysate specimens were collected, conventional bacterial culture and SYBR Green RT-PCR detection of the bacterial universal primers were used respectively. According to references and the bacterial culture results of these 70 specimens, six common bacteria of PDAP were selected in this assay, multiplex and monoplex RT-PCR were used respectively to exam the positive specimens by SYBR Green RT-PCR detection. **Results** The positive rate of traditional culture among the 70 cases was 65.71%. The SYBR Green RT-PCR detection results showed that 70 specimens total positive rate was 81.43%, and there was statistical difference between the two methods ($P < 0.05$). In the detection of these 6 common pathogenic bacteria, both multiplex and monoplex RT-PCR assays found 38 cases of positive samples among the 57 specimens detected by SYBR Green RT-PCR. The results of the two methods were

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.048.html>

肾周脂肪面积是胃癌术后短期并发症的影响因素

贾彝黎¹, 汪泳¹, 汪正广², 万圣云¹, 孟翔凌², 周连帮¹, 于刚¹, 钱波¹, 程云生¹, 刘志宁¹

摘要 目的 探讨肾周脂肪面积用于评估腹型肥胖的价值及对经腹胃癌根治术后短期并发症的影响。方法 回顾性分析接受胃癌外科治疗的114例患者临床资料,根据Clavien系统分为有并发症组和无并发症组进行比较分析。结果 总体的体质指数(BMI)为 (21.1 ± 3.2) kg/m²,总体的肾周脂肪面积为 (26.0 ± 8.2) cm²,肾周脂肪面积与腹腔脂肪面积有较高的相关性($r=0.928, P<0.001$)。年龄、肾周脂肪面积在两组间的差异有统计学意义($P<0.05$),而性别、手术方式、TNM分期两组间差异无统计学意义。多因素分析显示年龄、BMI、肾周脂肪面积均为独立危险因素($P<0.05$)。结论 肾周脂肪面积是反映腹腔内脂肪情况的较好指标,在经腹胃癌根治术后短期并发症的预期上可作为独立风险因素,预测价值高于BMI。

关键词 胃癌;肥胖;肾周脂肪面积;并发症

中图分类号 R 656.611

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)05-0717-04

胃癌是世界上最常见的消化道肿瘤之一。近年来,随着生活水平的提高,我国肥胖胃癌患者逐渐增多,研究^[1]证实肥胖会增加胃癌手术的手术时间、出血量及术后并发症。但目前评估肥胖的指标较多,较常用的方法是体质指数(body mass index, BMI)。但实际上,脂肪的分布情况较整体肥胖水平

更有意义,而BMI在用于判断脂肪分布的准确性上存在缺陷。目前国内外主要采用CT或MRI在某层面通过软件来测量腹部脂肪的面积(visceral adipose area, VAA)衡量腹部肥胖情况,但存在较多局限。研究^[2]提示左肾周围脂肪的面积较BMI更好反映了VAA水平,但这一方法是否适用于我国人群,尤其是胃癌患者,尚无报道。该研究拟通过对胃癌根治术后并发症的分组比较,探讨这一指标评估VAA的可行性及对胃癌术后短期并发症的影响。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集2012年1月~2012年6月在安徽医科大学第二附属医院接受胃癌外科治疗的患者临床资料。纳入标准:①临床资料完整,术前行腹部CT检查,测量BMI;②术前ASA评分1~2级患者;③行经腹胃癌根治术+D2淋巴结清扫的患者。排除标准:①行姑息性手术或探查手术患者;②行腹腔镜胃癌根治术,或手助腹腔镜胃癌根治术患者;③术中联合其他脏器切除患者;④合并肾疾病患者或既往行肾脏手术患者。

1.2 方法及观察指标 共计144例患者入选本项研究。根据术后并发症Clavien系统对所有入组病例进行并发症分级^[3],其中Clavien I级27例,II级9例,III级3例,IV级2例,V级0例。根据国际抗癌协会(UICC)2014胃癌TNM分期为标准。根据并发症有无分为有并发症组、无并发症组进行对照研究,观察时间至本次住院结束,两组的一般资料情况见表1。

2016-02-22 接收

基金项目:安徽省科技攻关项目(编号:1301043054)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

²安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022

作者简介:贾彝黎,男,硕士,住院医师;

汪泳,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: yongwangsz@sina.com

completely identical. One of the positive samples examined by RT-PCR was different from classical bacterial culture, and the remaining 19 cases failed to clear strains of pathogenic bacteria. SYBR Green PCR for detecting pathogenic bacteria could show results in 4~6 hours, and in the experiments of the 6 common bacteria, multiplex RT-PCR could be finished in 6~9 hours, but multiplex RT-PCR just needed at most 3 hours. **Conclusion** Compared with the traditional culture method, all of the three RT-PCR assays are sensitive, specific, and more rapidly. The multiplex RT-PCR can detect several kinds of bacteria simultaneously, be more practical, convenient and economical than that of the multiplex RT-PCR.

Key words peritoneal dialysis-associated peritonitis; pathogenic bacteria; real-time polymerase chain reaction; bacteria cultures