

· 临床研究 ·

革兰阴性菌挥发性有机物的检测与分析*

黄冬薇^{1,2}, 张德明^{2△}, 王露霞², 谭瑞星²

(1. 广州医学院, 广州 510600; 2. 广州军区广州总医院干部病房三科, 广州 510010)

摘要:目的 通过分析测定常见革兰阴性菌培养产生的上层气体中的挥发性有机物(VOCs), 达到鉴别细菌种类的目的, 为呼出气检测在肺部感染诊断中的应用提供实验依据。**方法** 将 30 例革兰阴性菌(肺炎克雷伯菌 6 株、大肠埃希菌 6 株、铜绿假单胞菌 6 株、鲍曼不动杆菌 6 株、嗜麦芽假单胞菌 6 株)分别制成混悬液后注入血培养皿中, 并于恒温箱中培养 24 h。培养瓶上层气体通过固相微萃取-气相色谱/质谱联用技术(SPME+GC/MS)收集并检测分析。**结果** 肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌共能检测出 13 种挥发性有机物, 包括乙醇、1-癸醇、1-十二醇、顺式-9-十六碳单烯酸、1-十六醇等物质, 而铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽假单胞菌此类非发酵菌则检测不到挥发性有机物。**结论** 通过 SPME+GC/MS 检测革兰阴性菌培养产生的上层气体中的挥发性有机物, 可鉴别发酵菌与非发酵菌。

关键词:革兰氏阴性菌; 挥发性有机物; 气相色谱质谱

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2013. 11. 009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)11-1224-02

Determination of head space volatile organic compounds from cultured gram-negative bacteria*

Huang Dongwei^{1,2}, Zhang Deming^{2△}, Wang Luxia², Tan Ruixing²

(1. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510600, China; 2. Dpartment of Cadre Ward, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

Abstract: Objective To identify the bacterial species by detecting the volatile organic compounds(VOCs) in headspace of gram-negative bacteria, and to provide experimental basis for exhaled detection in the diagnosis of pulmonary infection. **Methods** 30 sample of gram-negative bacteria(including klebsiella pneumoniae, escherichia coli, acinetobacter baumannii, pseudomonas maltophilia and pseudomonas maltophilia) were cultured in the mycobottles for 24 hours, then the headspace from cultured bacteria were captured and assayed by solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry technique(SPME+GC/MS). **Results** Thirteen VOCs were detected in headspace of klebsiella pneumoniae and escherichia coli. The most abundant were ethyl alcohol, 1-Decanol, 1-Dodecanol, cis-9-Tetradecen-1-ol, naphthalene were included, but in headspace of Acinetobacter baumannii, pseudomonas maltophilia and pseudomonas maltophilia, none of VOCs can be detected. **Conclusion** Zymogenic bacteria and non-fermentive bacteria can be differentiated by identify the headspace VOCs of Gram-negative bacteria with SPME+GC/MS.

Key words: gram-negative bacteria; VOCs; GC/MS

肺部感染是临床常见病、多发病, 在感染性疾病死因中位居第一位。引起肺部感染的细菌种类复杂, 临床上常难以做出快速诊断, 是否能针对病原菌及时正确的选择抗菌药物是直接影响患者预后的主要因素。不同种类细菌生长时会产生不同的代谢产物, 代谢产物包含有一些挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs), 通过这些挥发性有机物的检测分析可达到鉴别菌种的目的。本研究通过应用固相微萃取及气相色谱/质谱联用技术(solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry, SPME+GC/MS)对临床常见革兰阴性菌培养产生的上层气体进行检测, 比较革兰阴性菌各菌种产生的 VOCs 成分差异, 达到鉴别细菌菌种的目的, 为进一步探讨 SPME+GC/MS 检测人呼出气 VOCs 在肺部感染细菌诊断中的应用提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料 肺炎克雷伯菌 6 株[标准株 2 株, ESBL(+)临床分离株 2 株, ESBL(-)临床分离株 2 株]; 大肠埃希菌 6 株[标准株 2 株, ESBL(+)临床分离株 2 株, ESBL(-)临床分离株 2 株]; 铜绿假单胞菌 6 株(标准株 2 株, 临床分离株 4 株), 鲍曼

不动杆菌 6 株(标准株 2 株, 临床分离株 4 株), 嗜麦芽假单胞菌(标准株 2 株, 临床分离株 4 株)。

1.2 主要仪器 0.45% 盐水(Biomerieux Inc, 批号: g084103) 血培养基、血液增菌培养液(杭州天和微生物试剂有限公司); 磁搅拌子; 恒温恒湿箱(上海精宏实验设备有限公司)、比浊测定仪(VITEK DENSICHEK); 双相血培养瓶(梅里埃公司); 气-质联用仪(美国 Voyager GC/MS), SPME 手柄; 75 μm CAR/PDMSPME 萃取头; 毛细管柱(INNOWAC 30 μm × 0.25 μm × 0.25 μm)。

1.3 方法 (1) 细菌的增殖培养: 刮取培养基上生长的菌落, 制成 1.0McFarland 混悬液。用注射器取 3 mL 1.0McFarland 混悬液注入已标记菌种的双相血培养瓶内, 同时将生理盐水 3 mL 注入培养瓶中作为空白对照。血培养瓶放入恒温恒湿箱中培养 24 h。(2) 萃取细菌培养瓶上层气体及进样检测: 细菌培养液用磁力搅拌子中速搅拌, 将 SPME 纤维针头插入标本中萃取培养瓶上层气体, 在室温下萃取 30 min 后立即进入 GC/MS 进样口检测。GC/MS 条件为 HP25MS 石英毛细管柱; 载气为 He, 流速 1.0 mL/min, 进样口温度 250 e; 程序升温:

* 基金项目: 广州市科技计划项目(2009Z1-E421)。作者简介: 黄冬薇(1982~), 主治医师, 硕士主要从事老年呼吸病学研究工作。

△ 通讯作者, Tel: (020)36653494; E-mail: zdmzdm@tom.com。

表 1 革兰阴性菌挥发性有机物检出比较

	发酵菌						非发酵菌				
	肺炎克雷伯菌		肺炎克雷伯菌		大肠埃希菌		大肠埃希菌		鲍曼不动杆菌	铜绿假单胞菌	嗜麦芽假单胞菌
	标准株	临床株	ESBL(+)	临床株	ESBL(-)	标准株	临床株	ESBL(+)	标准株	ESBL(-)	
乙醇	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3-甲基-1-丁醇	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
乙酸	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
乙酸十二烷基酯	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
1-葵醇	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1-十一烷基醇	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1-十二醇	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
磷酸-1-十三烷基醇	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-十四碳烯	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
顺式-9-十六碳单烯酸	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1,6 二甲基-4-异丙基四氢萘	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
1-十六醇	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
吡啶	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

起始 50 ℃,保持 2 min,再以 8 ℃/min 升温至 180 ℃,再以 10 ℃/min 升温至 240 ℃,保持 5 min;GC/MS 接口温度 280 ℃;质谱扫描范围 35~550 u;离子源:EI 源;电子能量:70 eV;谱图检索:采用 Wiley2713 和 Nist98 谱库进行检索。

2 结 果

肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌共能检测出 13 种 VOCs,两种细菌共有的 VOCs 包括乙醇、1-葵醇、1-十二醇、顺式-9-十六碳单烯酸、1-十六醇等物质,标准株与临床株之间有一定差异性,3-甲基-1-丁醇只在肺炎克雷伯菌中检出,乙酸、吡啶只在大肠埃希菌检出,铜绿假单胞、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽假单胞类非发酵菌则检测不到 VOCs,见表 1。

3 讨 论

随着萃取及气相色谱/质谱技术的进步,近年来将该检测方法应用于呼出气疾病诊断的研究报道层出不穷,研究范围涵盖了肺癌^[1-5]、乳腺癌^[6-7]、肝癌^[8]等肿瘤性疾病和哮喘、慢性阻塞性肺病^[9-10]等气道炎症性疾病,也涉及了器官移植排斥、心绞痛、肾功能不全等疾病^[11-14]。2007 年 Phillips 等^[15]通过气相色谱/质谱法检测体外培养结核菌的上层气体,分析出萘、1-甲基环己烷、庚烷等结核菌产生的特异性 VOCs,随后收集患者呼出气体进行气相色谱/质谱检测,应用该特异性气体来诊断肺结核敏感性为 82.6%,特异性为 100%。挥发性有机物检测在其他细菌感染中的应用国内外文献尚未见报道。

本研究以临床常见革兰阴性杆菌为研究对象,收集细菌培养的上层气体通过 SPME+GC/MS 技术进行检测,最终发现肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌的 VOCs 中普遍存在乙醇、1-葵醇、1-十二醇、顺式-9-十六碳单烯酸、1-十六醇等物质,铜绿假单胞、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽假单胞类非发酵菌则检测不到 VOCs,因此可明确鉴别发酵菌与非发酵菌。但发酵菌之间鉴别较难,各种发酵菌是否存在其特异性气体尚不确定,如 3-甲基-1-丁醇只在肺炎克雷伯菌中检出,乙酸、吡啶只在大肠埃希菌检出,这是否可认为这些 VOCs 为该细菌的特异性气体仍有待下一步扩大细菌种类及大样本量的研究。

气相色谱/质谱检测有着高选择性、高分离效能、高灵敏度、高速度等特点,在疾病的快速诊断方面有着很大的优势,本实验为进一步探讨气相色谱/质谱检测人呼出气 VOCs 在肺部

感染诊断中的应用提供了良好的实验依据。

参考文献:

[1] Corradi M, Poli D, Selis L, et al. Volatile hydrocarbons in exhaled air preliminary data on the characteristic profile associated with lung tumors[J]. G Ital Med Lav Ergon, 2003, 25(3): 59-60.

[2] Poli D, Carbognani P, Corradi M, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer[J]. Respir Res, 2005, 6(1): 71.

[3] Horvath Z, Lazar N. Exhaled biomarkers in lung cancer [J]. Eur espir J, 2009, 34: 261-275.

[4] 宋耕, 秦涛, 刘虎, 等. 早期肺癌患者呼气中痕量挥发性有机化合物的定量检测[J]. 安徽医科大学学报, 2008, 43(3): 323-325.

[5] 胡燕婕, 邱园华, 陈恩国, 等. 有机性挥发物在肺癌组织和癌细胞株中的检测和分析[J]. 浙江大学学报, 2010, 39(3): 278-284.

[6] 宋琪, 刘虎, 高署, 等. 乳腺癌患者呼气中挥发性标志物的筛选与定量分析[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(1): 76-79.

[7] Phillips M, Cataneo RN, Ditzf BA, et al. Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath[J]. Breast Cancer Res Treat, 2006, 99(1): 19-21.

[8] 秦涛, 刘虎, 高署, 等. 肝癌患者呼气挥发性标记物的筛选与定量分析[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(1): 106-109.

[9] Dragonieri S, Schot R, Mertens BJ, et al. An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls[J]. Allergy Clin Immunol, 2007, 120(4): 856-862.

[10] Fens N, Zwinderman AH, van der Schee MP, et al. Exhaled Breath Profiling Enables Discrimination of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(11): 1076-1082.

[11] Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Scho-(下转第 1228 页)

胱、肠道、内分泌功能抑制。本研究表明,脑卒中患者急性期血浆 NE 水平比对照组明显升高,提示交感神经活性增强。Marthol 等^[3]研究致死性脑出血或卒中患者发现:患者在脑死亡前数小时内表现出交感神经过度兴奋,这可能导致终末器官功能衰竭。Siu 等^[4]报道 1 例急性右侧基底节区出血患者,住院期间连续 3 d 出现呼吸急促、出汗、高血压、高热和心动过速,这位患者被诊断为交感风暴,源于比较少见的原因:扭结的气囊导管,其发生的根本原因是交感神经过度兴奋。

脑卒中患者血浆 NE 水平升高,而且脑梗死组明显高于脑出血组,可能提示脑梗死患者交感神经活性高于脑出血患者。在脑梗死急性期,Kurivama 等^[5]研究表明急性幕上脑梗死患者显示副交感神经调节减少,交感神经输出相应增加。升高的去甲肾上腺素浓度与岛叶梗死、夜间血压升高、心电图延长的 QT 间期有关,卒中后 1 年,这些患者仍表现出较高心脑血管事件发生率^[6]。急性缺血性卒中患者交感神经功能亢进和自主神经功能失调,导致严重心律失常、心源性猝死的发生率增加^[7-10]。心血管自主神经功能在发病后不久即被损害,本研究表明,经过 10 天治疗患者 NIHSS 评分降低,而 NE 水平并没有明显变化。在老年卒中幸存者中,受损的自主神经功能可能增加全因病死率和心血管疾病病死率的风险^[10]。

自主神经功能紊乱是缺血性卒中常见的并发症,临床和实验数据表明大脑半球一侧控制自主神经活性,目前认为,岛叶是自主神经的中枢,右侧岛叶对交感神经效应有控制优势^[11]。右侧大脑缺血性卒中患者交感神经对心血管的调节增加,急性卒中后的患者,在无对抗的交感神经刺激下有增加心率失常的风险^[12]。Meyer 等^[13]研究也表明:累及右侧大脑半球岛叶皮质的患者,交感神经系统被过度病理性激活,患者最易出现心脏自主神经功能紊乱。本研究表明,左侧和右侧脑卒中患者,其血浆 NE 水平差异没有统计学意义,可能与样本量不足,统计学处理未考虑累及岛叶的卒中有关。

Micieli 等^[14]提出假说,自主神经功能障碍与脑卒中相互联系,并证实这两者之间可能的联系,提出了完全不同的诊断和治疗方法。Sykora 等^[15]建议对急性缺血性和出血性卒中患者,改变其自主神经功能可能有重要的治疗意义。重视自主神经功能障碍,尤其是心血管自主神经功能障碍,并根据其发病机制进行对因和对症治疗,最大程度缓解患者临床症状。

参考文献:

- [1] Labuz-Rozsak B, Pierzchala K. Stroke induces disturbances of autonomic system function[J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2007, 41(6): 495-503.
- [2] Korpelainen JT, Sotaniemi KA, Myllylä VV. Autonomic nervous system disorders in stroke[J]. *Clin Auton Res*,

1999, 9(6): 325-333.

- [3] Marthol H, Intravooth T, Bardutzky J, et al. Sympathetic cardiovascular hyperactivity precedes brain death[J]. *Clin Auton Res*, 2010, 20(6): 363-369.
- [4] Siu G, Marino M, Desai A, et al. Sympathetic storming in a patient with intracranial basal ganglia hemorrhage[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(3): 243-246.
- [5] Kurivama N, Mizuno T, Niwa F, et al. Autonomic nervous dysfunction during acute cerebral infarction[J]. *Neurol Res*, 2010, 32(8): 821-827.
- [6] Sander D, Winbeck K, Klingelhäfer J, et al. Prognostic relevance of pathological sympathetic activation after acute thromboembolic stroke[J]. *Neurology*, 2001, 57(5): 833-838.
- [7] Barron SA, Rogovski Z, Hemli J. Autonomic consequences of cerebral hemisphere infarction[J]. *Stroke*, 1994, 25(1): 113-116.
- [8] Naver HK, Blomstrand C, Wallin BG. Reduced heart rate variability after right-sided stroke[J]. *Stroke*, 1996, 27(2): 247-251.
- [9] Colivicchi F, Bassi A, Santini M, et al. Cardiac autonomic derangement and arrhythmias in right-sided stroke with insular involvement[J]. *Stroke*, 2004, 35(9): 2094-2098.
- [10] McLaren A, Kerr S, Allan L, et al. Autonomic function is impaired in elderly stroke survivors[J]. *Stroke*, 2005, 36(5): 1026-1030.
- [11] Oppenheimer S. Cerebrogenic cardiac arrhythmias: Cortical lateralization and clinical significance[J]. *Clin Auton Res*, 2006, 16(1): 6-11.
- [12] Dütsch M, Burger M, Därfler C, et al. Cardiovascular autonomic function in poststroke patients[J]. *Neurology*, 2007, 69(24): 2249-2255.
- [13] Meyer S, Strittmatter M, Fischer C, et al. Lateralization in autonomic dysfunction in ischemic stroke involving the insular cortex[J]. *Neuroreport*, 2004, 15(2): 357-361.
- [14] Micieli G, Cavallini A. The autonomic nervous system and ischemic stroke: a reciprocal interdependence[J]. *Clin Auton Res*, 2008, 18(6): 308-317.
- [15] Sykora M, Diedler J, Turcani P, et al. Baroreflex: a new therapeutic target in human stroke[J]. *Stroke*, 2009, 40(12): e678-682.

(收稿日期: 2012-10-28 修回日期: 2013-01-22)

(上接第 1225 页)

- mburg GF. Diagnostic potential of breath analysis -focus on volatile organic compounds[J]. *Clin Chim Acta*, 2004, 347(1/2): 25-39.
- [12] Phillips M, Herrera J, Krishnan S, et al. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans [J]. *Chromatog B Biomed Sci Appl*, 1999, 729(1/2): 75-88.
- [13] Phillips M, Cataneo RN, Greenberg J, et al. Breath markers of oxidative stress in patients with unstable angina

[J]. *Heart Dis*, 2003, 5(2): 95-99.

- [14] Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, et al. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis [J]. *Breath Res*, 2008, 2(2): 1-7.
- [15] Phillips M, Cataneo RN, Condos R, et al. Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath[J]. *Tuberculosis*, 2007, 87(1): 44-52.

(收稿日期: 2012-11-08 修回日期: 2013-02-12)