

肺炎患儿肺炎支原体感染的实验室检测

俞锡林, 余钟声, 汪天林

(浙江大学医学院附属儿童医院, 浙江 杭州 310003)

摘要: 目的: 探讨肺炎患儿肺炎支原体(MP)感染的实验室检测方法。方法: 使用聚合酶链反应(PCR)技术检测 676 例肺炎患儿 MP 的感染, 其中 139 例同时采用支原体培养进行检测, 112 例做间接血凝试验(IHA)。结果: PCR 法对 MP 感染的检出率明显高于培养法($P < 0.01$), 双份血清 IHA 的检出率和 PCR 法比较无显著性差异($P > 0.05$), 单份血清 IHA 的检出率明显低于 PCR 法($P < 0.01$)。结论: PCR 法是检测 MP 感染的简便有效的方法。PCR 和 IHA 方法结合使用, 可提高 MP 感染的检出率。

关键词: 肺炎, 支原体/诊断; 肺炎, 支原体/血液; 聚合酶链反应; 支原体, 肺炎/分离和提纯; 儿童
中图分类号: R563.1; R446.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9292(2000)02-0067-03

Detection of Mycoplasma Pneumoniae in Children with Pneumonia

YU Xi-lin, YU Zhong-sheng, WANG Tian-lin (*The Affiliated Children's Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China*)

Abstract: **Objective:** To evaluate the methods for detection and diagnosis of mycoplasma infections in children with pneumonia. **Methods:** The polymerase chain reaction (PCR) technique, mycoplasma culture and indirect haemagglutination assay (IHA) were used to detect mycoplasma pneumoniae in clinical samples obtained from 676 children (411 male and 265 female) with pneumonia. **Results:** Of 676 patients with pneumoniae, 115 children were confirmed to be positive of mycoplasma pneumoniae. The positive rate of detection was significantly higher with PCR than with mycoplasma culture ($P < 0.01$). There was no significant difference between the positive rate of detection with PCR and that with IHA ($P > 0.05$). **Conclusion:** PCR method and IHA are highly applicable in routine clinical laboratories for the preliminary detection and diagnosis of mycoplasma infections, particularly in extrapulmonary cases.

Key words: Pneumoniae, mycoplasma/diag; Pneumoniae, mycoplasma/blood; Polymerase chain reaction; Mycoplasma, pneumoniae/isol; Children

肺炎支原体肺炎(mycoplasmal pneumoniae pneumonia, MPP)肺部体征轻, 其病理形态可呈各种类型, 易误诊为细菌或病毒感染引起的肺炎, 在无实验室依据时, 临床难以与其他病原进行鉴别。1989 年 Bernet^[1]和 Jensen^[2]首先分别建立了聚合酶链反应(PCR)技术检测支原体 DNA 的方法。1992 年以来 PCR 开始应用于 MP 的临床标本的检测^[3-5]。作者应用 PCR 法检测肺炎患儿的 MP 感染, 部分患儿结合支原体培养和间接血凝试验(IHA), 探讨检测 MP

感染的理想方法, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本来源 676 例肺炎患儿均为 1994 年 1 月至 1997 年 6 月住院肺炎患儿。男 411 例, 女 265 例, 年龄 1 月~14 岁。灭菌棉签咽部取

收稿日期: 1999-03-18 修回日期: 1999-10-25

作者简介: 俞锡林(1948—), 男, 副主任医师, 从事儿科专业工作。

样,用于做 PCR;其中 139 例患儿,二支灭菌棉签咽部同时取样,一支用于做 PCR,一支用于支原体培养;其中 112 例患儿,抽取外周血用于 IHA。

1.2 标本 DNA 的提取 676 例患儿咽拭标本 DNA 的提取采用快速法。操作过程为,加入 1 mol/L NaOH 溶液震荡 20 s,放置 15 min 后,15 r/min 离心 10 min,生理盐水再洗涤沉淀二次,在沉淀物中加入 50 μ l 的样品处理液混匀,沸水浴 10 min,15 000 r/min 离心 3 min,上清即为标本 DNA 提取物。经典法用于特异性和敏感性的检测,过程为,菌液离心(15 000 r/min,10 min)后,沉淀用 TE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,5 mmol/L EDTA)悬浮,经典法裂解、提纯、沉淀 DNA。

1.3 PCR 法 反应体系 28 μ l,内含:2.8 μ l 10 倍 PCR 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl pH 8.8;15 mmol/L $MgCl_2$;300 mmol/L KCl;0.1 g/dl 明胶);dNTPs 200 mmol/L;引物 1 和 2(5'-GAAGCTTATGGTACAGGTTGG-3';5'-ATTACCATCCTTGTGTAAGG-3')均为 0.5 μ mol/L;Taq 酶 1 u;DNA 模板或提取液 8 μ l。石蜡油 30 μ l 覆盖在 PCR 反应体系上。每次实验均设阴性、阳性和空白对照。每次扩增过程是:93℃300 s 后;93℃65 s、54℃70 s、73℃85 s 循环 35 周;最后 73℃300 s。取 15 μ l PCR 产物加在 20 g/L 琼脂糖凝胶(已混匀适量溴化乙锭)的加样孔中,电泳,紫外透射仪上观察记录结果,与阳性对照有相同条带的判为阳性。

1.4 PCR 法特异性的检测 检测对象为 MP、FH 株、IB 株、解脲脲原体、莱氏支原体、猪鼻支原体、唾液支原体、人支原体、口腔支原体、结核杆菌、肺炎球菌、大肠杆菌、呼吸道合胞病毒、腺病毒、人基因组 DNA。DNA 用量均为 0.5 μ g。结果只有 MP FH 株和 IB 株扩增出预期的条带(144 bp),其余均为阴性。

1.5 PCR 法敏感性的检测 把 MP FH 国际标准株接种于液体培养基中,在 CO₂ 培养箱中培养(37℃、5%CO₂)2~3 周。使用经典法提取 DNA。在纯化 FH 株 DNA 有 50 fg 时,PCR 法检测,仍然能观察到清楚的阳性条带,敏感性与文献报道相似^[3,6,7]。

1.6 MP 的培养 把灭菌棉签取样的标本接种于 2 ml 无血清液体培养基,并以培养基 10 倍连续稀释二管,三管同时培养。6 周后培养液颜色未改变的判为阴性。不能判断的,取 0.1 ml 接种于固体培养平板,在 5%CO₂ 下培养,5 天后定期显微镜观察 5 周,如果出现乳头状菌落,做豚鼠红细胞吸附试验,代谢抑制试验,并将菌落移至玻片 Dinens 染色,以便确认。

1.7 IHA 血清标本-20℃以下保存,集中检验。单份血清滴度 $\geq 1:32$ 或双份血清抗体滴度 4 倍以上变化提示感染可判为阳性。发病 7 天后 IHA $<1:32$ 方可记录为 IHA 阴性。本文双份血清的采集时间间隔为六天以上。

2 结 果

2.1 PCR 法 MP 的检出 676 例肺炎患儿 MP 检出 115 例,其比例为 17.01%。按年龄分组,2 岁以下、2~6 岁、7~14 岁三组肺炎患儿分别为 243 例、185 例和 248 例,各组 MP 阳性分别占 6.58%(16 例)、25.41%(47 例)、20.97%(52 例)。男性 411 例肺炎,MPP 73 例,占 17.76%,女性 265 例肺炎,MPP 42 例,占 15.85%,男女感染 MP 无显著性差异($\chi^2=0.297$, $P>0.05$)。

2.2 PCR 法和培养法检测 MP 的比较 在 PCR 法检测 MP 阴性的 29 例患儿中,培养法检出阳性 5 例;110 例患儿 PCR 法 MP 阴性,支原体培养也阴性。二种方法检测的符合率为 82.73%(115/139)。培养法检出率为 3.60%(5/139),PCR 法检出率为 20.86%(29/139),二者之间有显著性差异($\chi^2=22.042$, $P<0.01$)。

2.3 PCR 法和 IHA 检测 MP 的比较 检测结果见表 1。

表 1 PCR 和 IHA 检出 MP 的比较

PCR	双份血清 IHA		单份血清 IHA	
	+	-	+	-
+(23)	22	1	5	18
-(89)	7	82	4	85

PCR 对肺炎支原体感染的检出率为 20.54%(23/112),双份血清 IHA 检出率为

25.89%(29/112),二种检测方法的检出率无显著性差异($\chi^2=3.125, P>0.05$),二种方法检测的符合率为92.86%。如果仅以第一份血清检测为依据,IHA的检出率为8.04%(9/112),PCR法对肺炎支原体的检出率明显高于单份血清IHA的检出率($\chi^2=7.682, P<0.01$),二种方法检测的符合率为80.36%。

3 讨论

MPP的实验室诊断方法较多。病原体培养,需时2~3周,难以临床应用,并且检出率不高,本文支原体培养的检出率也很低;血清学检查,它们在特异性、敏感性方面仍然不理想,免疫功能低下患者容易感染MP^[8],感染后由于抗体产生不足,血清抗体不升高等原因会造成免疫学检测失败,本文有1例PCR法阳性,而IHA阴性,可能与此有关。另外本文研究表明单份血清IHA对MP感染的检出率比较低,双份血清IHA比较高,然而双份血清检测需间隔较长时间,检测结果不能及时提供临床应用。而PCR法具有实验时间短、特异性和敏感性高、不存在交叉反应和放射性污染等特点,而且对非MP感染患者的研究表明,咽部极少带有病原体^[9],也为PCR法检测准确性提供了保证。本文应用PCR技术,并结合培养法和IHA的检测观察,表明PCR法比较准确,而且检测快速,可以在感染早期就检测到MP DNA,有助于临床早期诊断,及时治疗。

然而本文有7例PCR法阴性,但IHA阳性,这可能与敏感药物的治疗有关,7例中有6例采咽拭标本前已接受MP敏感药物红霉素的治疗,故会影响PCR法的检出;也可能由于生殖支原体感染和MP感染有血清学的交叉反应,从而引起假阳性;另外呼吸道分泌物中经常存在PCR反应抑制物^[4],本文标本处理采用的是快速法,不能清除抑制物,因此会影响PCR法的检出率。本文还有1例PCR法阳性,而

IHA阴性,也不能排除因污染而造成假阳性。因PCR法敏感性很高,在条件不够完善的实验室,或一次处理标本较多时,就更有可能造成假阳性。因此血清学检测不宜放弃,如果二者能结合在一起检测,就有可能提高MP感染的检出率。

参考文献

- [1] Bernet C, Garret M, Barbeyrac B, et al. Detection of mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(11): 2492-2496.
- [2] Jensen JS, Sondergard J, Uldum SA, et al. Detection of mycoplasma pneumoniae in simulated clinical samples by polymerase chain reaction [J]. APMIS, 1989, 97(11): 1046-1048.
- [3] Kai M, Kamiya S, Yabe H, et al. Rapid detection of mycoplasma pneumoniae in clinical samples by the polymerase chain reaction [J]. J Med Microbiol, 1992, 38(3): 166-170.
- [4] Skakni L, Sardet A, Just J, et al. Detection of mycoplasma pneumoniae in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(10): 2638-2643.
- [5] Williamson J, Marmin BP, Worswick DA, et al. Laboratory diagnosis of mycoplasma pneumoniae infection 4 antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the mycoplasma: problems of clinical correlation [J]. Epidemiol Infect, 1992, 109(3): 519-531.
- [6] Narita M, Matsuzono Y, Togashi T, et al. DNA diagnosis of central nervous system infection by mycoplasma pneumoniae [J]. Pediatrics, 1992, 90(2): 250-253.
- [7] Luneberg E, Jensen JS, Frosch M, et al. Detection of mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction and non-radioactive hybridization in microtiter plates [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(5): 1088-1094.
- [8] Roifman CM, Rao CP, Lederman HM, et al. Increased susceptibility to mycoplasma infection in patients with hypogammaglobulinemia [J]. Am J Med, 1986, 80(4): 590-594.
- [9] Azimi PH, Chase PA, Petru AM. Infections due to M. pneumoniae [J]. Curr Probl Pediatr, 1984, 14(8): 9-25.

[责任编辑 严少洁]