

• 临床流行病学 •

# 聚合酶链反应诊断小儿支原体肺炎及其意义

王 群<sup>1</sup> 夏绍源<sup>2</sup> 龙建秋<sup>1</sup> 黄秋花<sup>3</sup> 顾立琴<sup>2</sup> 陈赛娟<sup>3</sup>

**摘要** 笔者用聚合酶链反应技术对70例小儿支原体肺炎鼻咽分泌物中肺炎支原体 DNA 进行检测。采用快速制备 DNA 模板的方法,简化了 PCR 实验过程,结果53例阳性,阳性率75.7%,而用支原体培养方法,阳性率仅53.8% ( $P < 0.05$ ),差异有显著性。对其中13例 PCR 阳性患者经红霉素静脉滴注治疗10~14天后,复测 PCR,8例转阴性,5例仍为阳性。该方法既保持了 PCR 的敏感性和特异性,又简化过程,能够检测到相当于50个基因组 DNA,可用于常规检测肺炎支原体,有助于支原体肺炎的早期诊断、早期对因治疗及疗效评价。

**关键词** 聚合酶链反应 肺炎支原体 早期诊断

**The Detection of Pediatric Mycoplasma Pneumonia Cases by Polymerase Chain Reaction and It's Clinical Significance** Wang Qun, Xia Shao-yuan, Long Jian-qiu, et al. Naval Medical Institute, Shanghai 200433

**Abstract** Mycoplasma DNA in nasopharynx secretion from seventy pediatric mycoplasma cases was detected, using rapid feat of PCR DNA sample preparation method and simple PCR processes. The result of PCR showed that: fifty-three positive cases with a positive rate 75.7%, comparing with only 53.8% positive rate using mycoplasma culture method ( $P < 0.05$ ). Thirteen PCR positive patients were treated by Venoclysis Erythromycin for 10-14 days but mycoplasma DNA was identified by PCR again. Among them, eight cases turned negative, but five cases still remained positive. The result showed that this method was not only more sensitive and reliable than conventional culture techniques, but also could simplify the PCR processes. It could be used for routine mycoplasma pneumonia test and for early diagnosis, which leads to early treatment and evaluation of therapeufic effect.

**Key words** Polymerase chain reaction Pneumonia mycoplasma Early diagnosis

支原体肺炎 (Mycoplasma Pneumonia, MP) 是儿童时期肺炎和其它呼吸道感染的重要病因之一。近年来,关于支原体肺炎感染的报道日益增加<sup>[1,2]</sup>,且有局部流行和散发的趋势,它不但是引起原发性非典型性肺炎的病原,而且可引起全身器官的病变,故有关肺炎支原体在人类致病地位已受到临床医生的重视。肺炎支原体的实验诊断在发达国家

中已被列为呼吸道感染性疾病的常规检测项目,用分离培养和检测抗体的方法均不能达到早期诊断的目的,且缺乏特异性强和灵敏度高等特点。目前聚合酶链反应 (PCR) 检测呼吸道分泌物肺炎支原体 DNA 受到人们的关注<sup>[3]</sup>,其特异性和敏感性都较分离培养为高、简便、快速,一天可出结果。笔者对一组小儿肺炎101例 (包括支原体肺炎70例) 进行 PCR 支原体 DNA 检测。

1 海军医学研究所 上海 200433  
2 上海市儿童医院  
3 上海市第二医科大学瑞金医院血液研究所

## 材料与方

一、标本来源:全部病例均于1994年5~



12月在上海地区发病住院患儿，共101例。其中支原体肺炎70例，年龄1.5~12岁，平均7.2岁，男:女为1.18:1。临床表现为发热、咳嗽十余天，X线表现胸部有大片或条索状病理改变，最后确诊为支原体肺炎，诊断标准见文献<sup>[4]</sup>。余31例为支气管肺炎、支气管哮喘和其他肺炎患儿。用负压吸引方法从鼻咽处收集分泌物，置2mlPBS溶液中，加入粘液分散剂2滴，充分吹打，离心，弃上清。加裂解液30 $\mu$ l，混匀，100 $^{\circ}$ C10分钟，离心10 000转/分20分钟，上清液用于PCR检测。同时采集10例无呼吸道系统感染儿童的鼻咽分泌物为对照。

二、PCR检测：按文献<sup>[5]</sup>设计一对引物A、B及寡核苷酸探针C，由中国科学院细胞生物所合成。按文献<sup>[6]</sup>在25 $\mu$ lPCR反应体系中，DNA样品5 $\mu$ l；10 $\times$ 缓冲液2.5 $\mu$ l，A和B引物0.5 $\mu$ l（30 $\mu$ mol/ $\mu$ l）；dNTPs 0.5 $\mu$ l（10mM）；TaqDNA酶1单位；超纯水至25 $\mu$ l；石蜡油封顶，离心，置PE-Cetus热循环仪上扩增，94 $^{\circ}$ C5分钟；94 $^{\circ}$ C45秒、52 $^{\circ}$ C1分钟、72 $^{\circ}$ C1.5分钟，35个周期；72 $^{\circ}$ C7分钟，取10 $\mu$ l产物于2%琼脂糖凝胶上电泳，溴化乙啶染色，紫外灯下观察、拍照，肺炎支原体阳性菌株由Jense博士赠送。

三、探针标记和杂交：PCR反应产物10 $\mu$ l，在2%琼脂糖凝胶中电泳，Southern blot<sup>[6]</sup>转移至尼龙膜，80 $^{\circ}$ C烤膜1~2小时。用<sup>32</sup>P-ATP末端标记探针C，按文献<sup>[6]</sup>进行预杂交，杂交。预杂交50 $^{\circ}$ C2小时，杂交50 $^{\circ}$ C过夜，5 $\times$ SSC50 $^{\circ}$ C洗膜，膜片放入带增感屏的暗盒，-80 $^{\circ}$ C放射自显影2小时。

### 结 果

用肺炎支原体标准菌株和鼻咽分泌物PCR扩增，结果肺炎支原体标准菌株和支原体肺炎患儿鼻咽分泌物PCR扩增产物为154bp片段(图1)，与设计引物预期得到产物大小相同，未见非特异条带，阴性对照(正常儿童鼻咽分泌物)无PCR产物。寡核苷酸

探针C对PCR阳性条带进行杂交(图2)，进一步证实PCR阳性产物为特异性扩增条带。将纯化的肺炎支原体标准株DNA用于PCR扩增，模板DNA浓度在0.01~0.1pg/ $\mu$ l仍能观察到阳性片断，敏感度相当于50个基因组DNA(图3)。

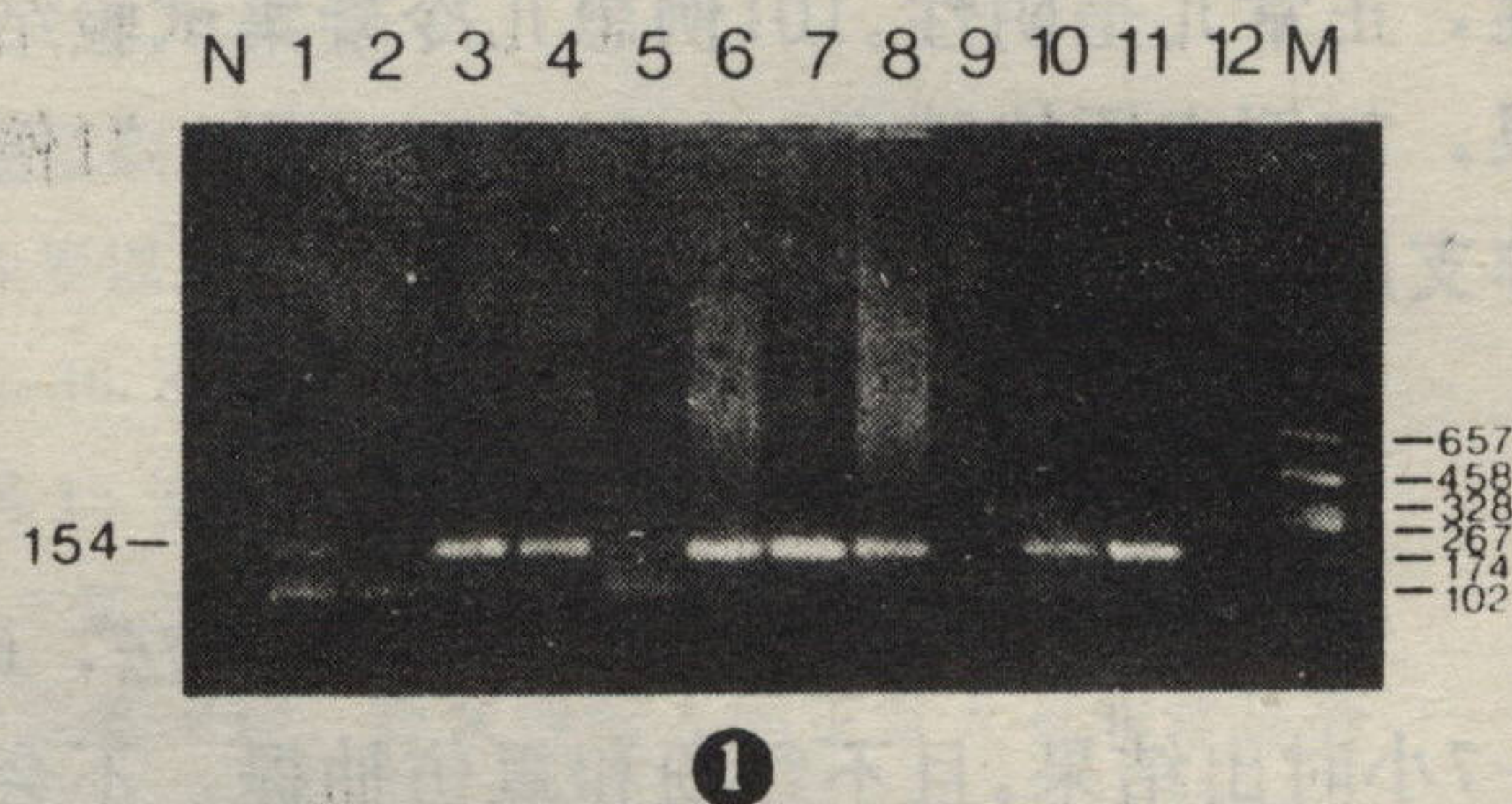


图1 PCR产物在2%琼脂糖凝胶电泳结果：N为阴性对照；1为标准菌株；2~12为患儿标本；M为分子量标记。

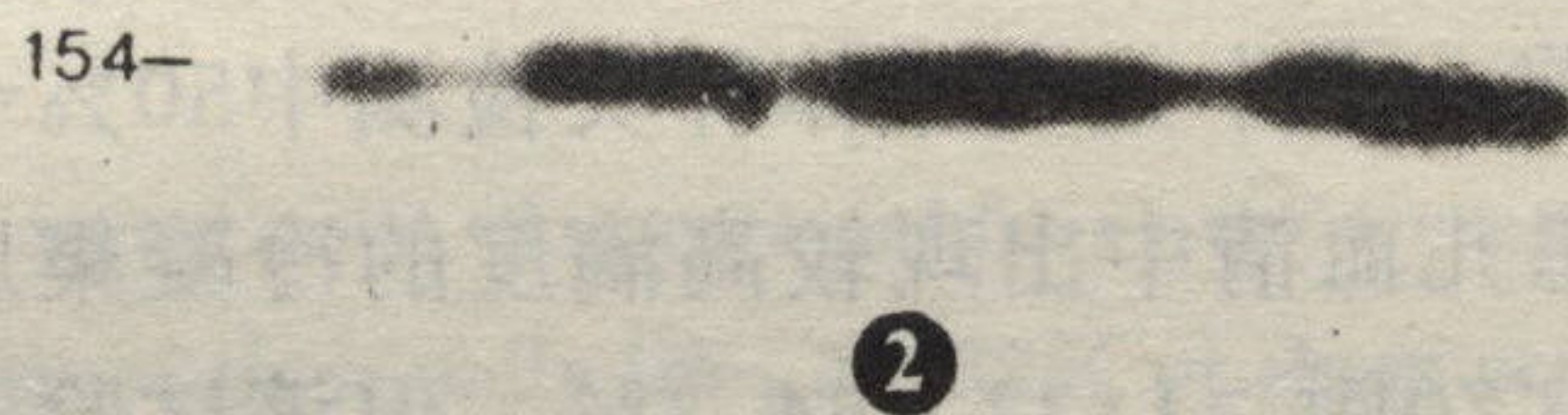


图2 寡核苷酸探针C杂交结果。

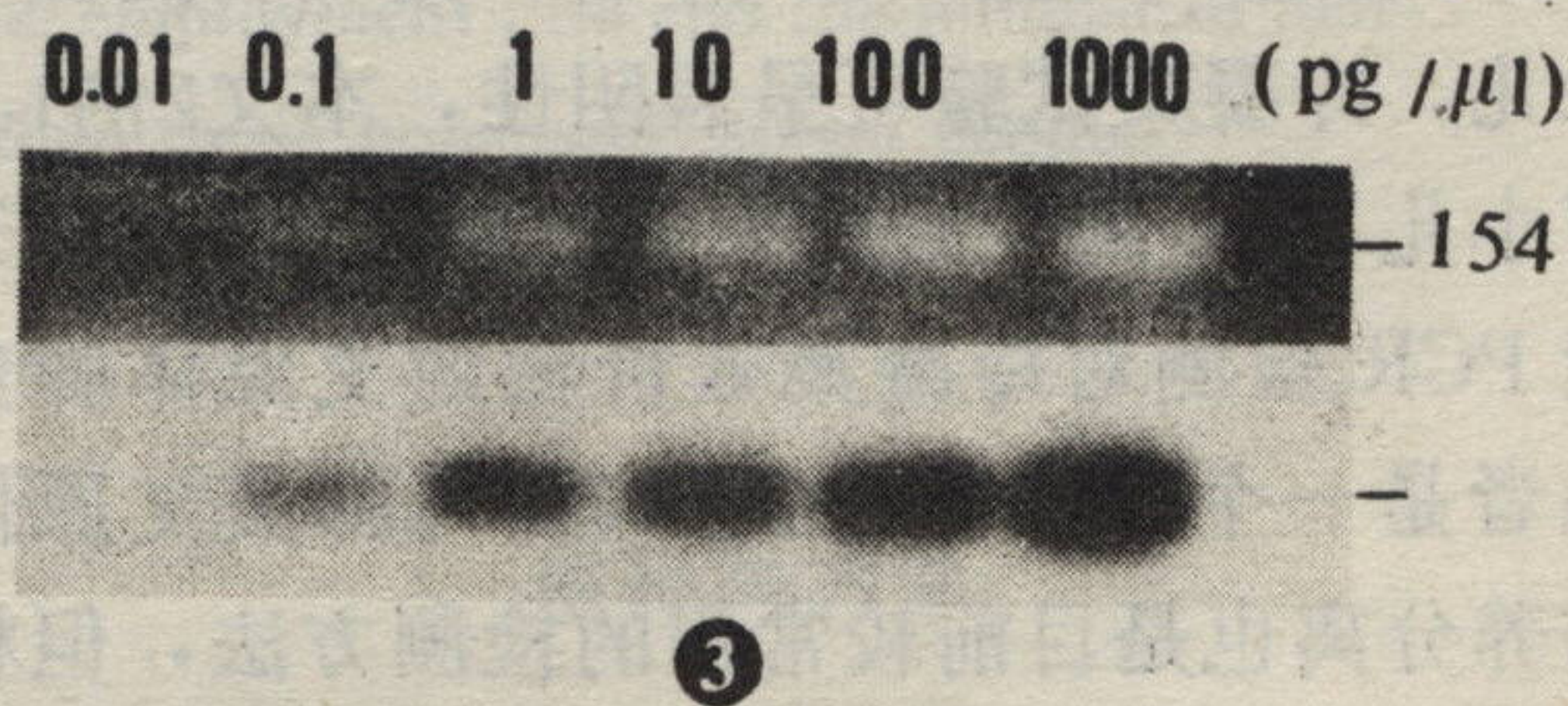


图3 肺炎支原体标准株不同稀释度(<0.01、<0.1、<1、<10、<100、<1 000pg/ $\mu$ l) PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶电泳及杂交结果

对70例支原体肺炎患儿进行了PCR检测，52例阳性，阳性率75.7%。年龄分布：<6岁20例、6~10岁42例、>10岁8例，其PCR阳性率分别是70%、73.8%、100%。同时对13例阳性患儿经红霉素静滴治疗10~14天后复测PCR，8例转阴性，5例仍为阳性。同时随



机对39例支原体肺炎患儿进行了肺炎支原体培养<sup>[7]</sup>,结果21例阳性,阳性率53.8%,PCR与培养结果阳性吻合率>90%。

对31例非支原体肺炎(支气管肺炎、支气管哮喘和其它肺炎)患儿,PCR检测结果:支气管哮喘患儿28.6%(2/7)例阳性,余阴性,正常儿呈阴性。101例患儿冷凝集试验结果,70例支原体肺炎 $\geq 1:32$ 为54.3%,31例非支原体肺炎患儿 $\geq 1:32$ 为16%。

## 讨 论

笔者选用快速制备PCR模板的方法,6~7小时出结果。且不经酚和氯仿抽提,不会导致在模板量少时模板丢失引起假阴性,其引物具有高度特异性,不存在交叉反应现象,克服了培养分离中杂菌污染问题,灵敏度为0.01~0.1pg/ $\mu$ l(相当几十个基因组),可以在感染早期检测肺炎支原体DNA,达到早期诊断的目的<sup>[7,9]</sup>。

目前,在小儿支原体肺炎检测中50%~70%<sup>[7]</sup>患儿血清中出现较高滴度的冷凝集反应,本文70例 $\geq 1:32$ 为54.3%,但该试验不是支原体肺炎特异性检测方法,并与年龄和机体状态有关,较小幼儿( $\leq 2$ 岁)其免疫功能不健全及一些肝病、肿瘤和免疫功能低下患儿,冷凝集试验可呈假阴性,本文2例1.5岁小儿PCR阳性而冷凝集试验仅为1:4,无疑PCR检测对冷凝集效价低的支原体肺炎患者是一个有力的检测手段<sup>[7]</sup>。肺炎支原体培养分离也是目前较常用的检测方法,但相对PCR方法敏感性差,本文中前者53.8%,后者75.7%, $\chi^2$ 检验 $P < 0.05$ 。且培养分离法有一显著特点,需7~10天才出结果,虽支原体肺炎预后良好,但也有不少肺外并发症,因此早期诊断,早期给与红霉素静滴治疗,可减少并发症和死亡率。本文所举几例支原体肺炎可疑患儿经PCR确诊并及时治疗获得治愈,提示PCR快速、敏感和特异在指导疾

病诊断和治疗上的重要性。

对13例PCR阳性患者经红霉素治疗10~14天后,其症状、体征和X线表现均提示治愈,复测PCR,8例转为阴性,5例仍为阳性,表明PCR对疾病治疗期间的监护具有重要作用。虽患儿临床表现提示治愈,但PCR阳性患者仍具有传染性,应进一步隔离和治疗。31例非支原体肺炎患儿中,28.6%(2/7)的支气管哮喘PCR结果为阳性,提示支气管哮喘发病可能与肺炎支原体感染有关,特别是在支原体肺炎流行期<sup>[8]</sup>。用分子生物学手段如PCR方法检测病原体是医学发展方向,由于PCR快速、敏感、特异及单项检测一次仅几十元,该方法已在各医疗机构开展和发展。

(本文实验工作在上海市血液研究所分子生物学实验室完成,承蒙陈竺研究员指导,在此深表谢意)

## 参 考 文 献

- 1 戴银菊,王永午. 小儿支原体肺炎115例临床分析. 临床儿科杂志, 1993, 11:372.
- 2 穆恩永, 王建箴. 100例支原体肺炎流行特征及临床分析. 临床儿科杂志, 1992, 10:4.
- 3 Berhet C, et al. Detection of Mycoplasma Pneumoniae by Using the Polymearase Chain Reaction J of Clinical Microbiology, 1989, 27:2492.
- 4 诸福棠, 吴瑞萍, 胡亚美. 实用儿科学(下册). 北京: 人民卫生出版社, 1990:68.
- 5 Inamine JM, et al. Nucleotide sequence of the Plattachment protein gene of Mycoplasma Pneumoniae. Gene, 1988, 64:217.
- 6 Sambrook J, et al. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 691.
- 7 曹玉璞. 肺炎支原体感染的实验室诊断. 实用儿科杂志, 1993, 8:203.
- 8 韩忠. 肺炎支原体感染与小儿哮喘时疾病. 实用儿科杂志, 1993, 8:207.
- 9 李延壮, 杨洪江, 张桦, 等. 聚合酶链式反应诊断肺炎支原体特异性、灵敏性及咽拭子标本检测研究. 实用儿科杂志, 1993, 8:211.

(收稿: 1995-04-25 修回: 1996-05-10)