

# 儿童社区获得性肺炎死亡病例中 b 型流感嗜血杆菌的检测

胡惠丽 胡翼云 何乐健 俞桑洁 高薇 杨永弘

**【摘要】 目的** 明确 b 型流感嗜血杆菌(Hib)在儿童社区获得性肺炎死亡病例中的地位;探讨直接原位聚合酶链反应(ISPCR)在小儿肺炎病原检测中的使用价值。**方法** 用普通 PCR、Southern 杂交和直接 ISPCR 三种方法检测 100 例死于肺炎的儿童尸检石蜡包埋肺组织标本中的 Hib,分析其致病、致死及在肺组织中的分布情况,并对这些方法对比分析。**结果** 不同年代 Hib 的检出率无明显差异。直接 ISPCR 对 Hib 的检出率高于其他方法;Southern 杂交阳性率为 8% (8/100),其中 20 世纪 50-60 年代阳性率为 7.1% (4/56),80 年代至 2002 年阳性率为 9.1% (4/44), $\chi^2 = 0.084, P > 0.05$ ;直接 ISPCR 阳性率为 17% (17/100),20 世纪 50-60 年代阳性率为 14.3% (8/56),80 年代至 2002 年阳性率 20.5% (9/44), $\chi^2 = 0.665, P > 0.05$ ;Southern 杂交和直接 ISPCR 均为阳性的占 7%。**结论** Hib 是儿童社区获得性肺炎的主要致病细菌之一,与患儿死亡有关系。直接 ISPCR 用于检测小儿肺炎病原,灵敏、特异、可定位。

**【关键词】** 流感嗜血杆菌;聚合酶链反应,直接原位

**Study on *Haemophilus influenzae* type b: data from autopsy of community-acquired pneumonia among children** HU Hui-li, HU Yi-yun, HE Le-jian, YU Sang-jie, GAO Wei, YANG Yong-hong. Laboratory of Microbiology and Immunology, Beijing Children's Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100045, China

Corresponding author: YANG Yong-hong, Email: yyh66@vip.sina.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the status of *Haemophilus influenzae* type b(Hib) on death cases of children from community-acquired pneumonia (CAP) and to estimate the value of direct in-situ polymerase chain reaction (ISPCR) on diagnosis of children CAP, pathogenically. **Methods** Ordinary PCR, Southern blot and direct ISPCR were applied and compared in detecting Hib in 100 paraffin-embedded lung tissues of autopsy children died of CAP. **Results** No major difference on the detection rate of Hib between 50-60s and 80s-2002 was found. The detection rate of Hib by direct ISPCR was higher than the other two methods. By Southern blot, Hib was identified from 8 out of 100 samples (8%), including 4 out of 56 in 1950-60s (7.1%) and 4 out of 44 (9.1%) ( $\chi^2 = 0.084, P > 0.05$ ) in 1980s-2002. By ISPCR, Hib was identified from 17 out of 100 samples (17%), including 8 out of 56 in 1950-60s (14.3%) and 9 out of 44 (20.5%) with  $\chi^2 = 0.665, P > 0.05$ , in 1980s-2002. Positive cases diagnosed by both Southern blot and ISPCR were 7%. **Conclusion** Hib was one of the main bacterial pathogens causing CAP and deaths among children. Direct ISPCR was preferable to be used in pathogenic diagnosis on children pneumonia, in terms of its sensitivity, specificity and localization.

**【Key words】** *Haemophilus influenzae*; Polymerase chain reaction, direct in-situ

社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 是相对于医院获得性肺炎而言,儿童时期常见的感染性疾病。虽经过几十年积极治疗,其发病率与死亡率仍处于较高水平,在门诊患

儿、呼吸系统疾病、住院所占床位和死亡病种中都处于第一位<sup>[1]</sup>。但我们尚未确切了解其主要病原,阻碍了治疗的针对性和疫苗的使用。本研究使用普通聚合酶链反应 (PCR)、Southern 杂交和直接原位 PCR (ISPCR) 检测死于肺炎的小儿石蜡包埋肺组织标本,分析 b 型流感嗜血杆菌 (Hib) 在儿童 CAP 死亡病例中的致病地位,探讨检测 Hib 的直接 ISPCR 方法。

基金项目:国家“十五”科技攻关课题资助项目(2003BA712A11-20);北京市科委资助项目(Y0204004040131)

作者单位:100045 北京,首都医科大学附属北京儿童医院微生物免疫学实验室

通讯作者:杨永弘, Email: yyh66@vip.sina.com

材料与方法

1. 研究对象:随机抽取 1953-2002 年在北京儿童医院临床和尸检均诊断为肺炎(院内感染的肺炎除外)的石蜡包埋肺组织标本 100 例。男 64 例,女 36 例,年龄 1 月龄至 5 岁。

2. 实验方法:应用普通 PCR、Southern 杂交和直接 ISPCR 三种方法检测 100 例石蜡包埋组织标本中的 Hib。

(1)普通 PCR:①引物:Hib 荚膜基因引物(本实验室自行设计),扩增片段长度为 735 bp。序列:上游引物 5' CCT CGC AAT GCA GTT TAT GGT CC 3';下游引物 5' AAG CGG GAA TTT GAT ACC TGA TGC 3'。实验证实此引物特异性强。②DNA 提取:每例标本均切取 10 μm 蜡膜 4 片,经二甲苯脱蜡,无水乙醇洗涤,蛋白酶 K 消化,酚-氯仿抽提肺组织 DNA。③普通 PCR:25 μl 最佳反应体系。94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 40 s,37 个循环后 72℃ 再延伸 5 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。煮沸法提取纯菌 DNA 和酚-氯仿抽提小鼠 Hib 肺炎模型石蜡包埋肺组织标本 DNA 作为阳性对照,同时设立阴性对照(已知非肺炎石蜡包埋肺组织标本和空白对照)。

(2)Southern 杂交:①制备 Hib 特异探针:Hib 特异性 DNA 探针片段的纯化与回收,操作规程严格按照 DNA 片段快速纯化/回收试剂盒(购自北京鼎国生物技术有限责任公司)说明书进行;特异性核酸探针的地高辛标记,操作规程严格按照地高辛 DNA 标记及检测试剂盒(购自 Roche 公司)说明书进行。②转膜:PCR、琼脂糖凝胶电泳后,将 DNA 片段从凝胶转移至尼龙膜。③预杂交、杂交:65℃ 预杂交 1 h,相同温度下加入探针过夜杂交。④显色:NBT/BCIP 显色。

(3)直接 ISPCR<sup>[2,4]</sup>:①每例标本均切取 5 μm 蜡膜,将蜡膜贴附于明胶载玻片。②常规二甲苯脱蜡,梯度酒精入水,蛋白酶 K 消化。③直接 ISPCR:25 μl 反应体系中加入 digoxin-11-dUTP、Mg<sup>2+</sup>、Taq 酶、dNTP 浓度均高于普通 PCR。将反应体系滴于载玻片,加盖盖玻片,指甲油封片。94℃ 预变性 3 min 后,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 40 s,29 个循环后 72℃ 再延伸 5 min。④NBT/BCIP 显色。光学显微镜下观察结果,散在或成堆的紫蓝色颗粒为阳性信号。⑤对照组:已知阴性对照(已知

非肺炎石蜡包埋肺组织标本)、已知阳性对照(小鼠肺炎模型石蜡包埋肺组织标本)、无引物、无 Taq 酶。

3. 统计学分析:应用 SPSS 10.0 软件对数据进行统计处理,各组之间率的差异比较应用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  视为差异有统计学意义。

结 果

1. 儿童 CAP 死亡病例中 Hib 的检出率:见表 1。其中 Southern 杂交法阳性率 8% (8/100),直接 ISPCR 法阳性率为 17% (17/100)。Southern 杂交法和直接 ISPCR 法均为阳性的占 7% (7/100)。两种方法检测结果的差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 3.703, P > 0.05$ )。

表 1 儿童 CAP 死亡病例中 Hib 的检出率

时间	Hib 阳性			
	PCR	Southern 杂交	直接 ISPCR	其中一种方法
50-60 年代	1/56(1.8)	4/56(7.1)	8/56(14.3)	8/56(14.3)
1982-2002 年	1/44(2.3)	4/44(9.1)	9/44(20.5)	10/44(22.7)
合计	2/100(2.0)	8/100(8.0)	17/100(17.0)	18/100(18.0)

注:括号外数据分母为检测例数,分子为阳性例数;括号内数据为阳性率(%)

2. 不同年代儿童 CAP 死亡病例中 Hib 的检出率比较:见表 1。其中 Southern 杂交法,20 世纪 50-60 年代阳性率为 7.1% (4/56),80 年代至 2002 年阳性率为 9.1% (4/44),前者低于后者,但两者之间差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.084, P > 0.05$ )。直接 ISPCR 法,50-60 年代阳性率 14.3% (8/56),80 年代至 2002 年阳性率 20.5% (9/44),前者低于后者,两者间差异亦无统计学意义 ( $\chi^2 = 0.665, P > 0.05$ )。50-60 年代与 80 年代以后,Hib 在 CAP 中的检出率均无明显差异。

3. 儿童 CAP 死亡病例中 Hib 的检出率与年龄的关系:≤2 岁组 87 例中 Hib 阳性 6 例(6.9%),>2 岁组 13 例中阳性 2 例(15.4%),两组间比较, $\chi^2 = 0.925, P > 0.05$ ,差异无统计学意义(数据以 Southern 杂交法为例,直接 ISPCR 检测结果亦然)。

4. PCR、Southern 杂交和直接 ISPCR 三种检测方法的比较:见表 1 和图 1~3。三种方法中 Southern 杂交和直接 ISPCR 对 Hib 的检出率均明显高于普通 PCR 法,且三种方法之间差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 13.919, P < 0.01$ )。两两比较,就 Southern 杂交与直接 ISPCR 比较而言,两者差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 3.703, P > 0.05$ )。

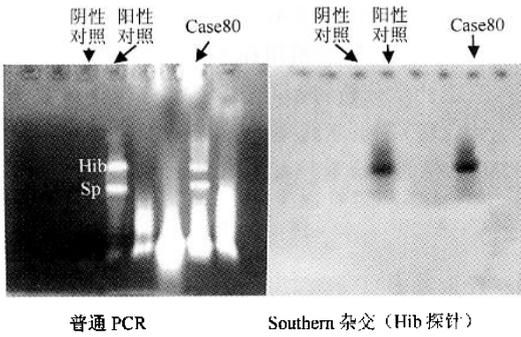


图1 普通 PCR、Southern 杂交结果

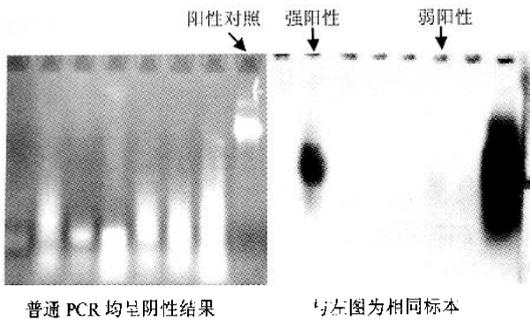
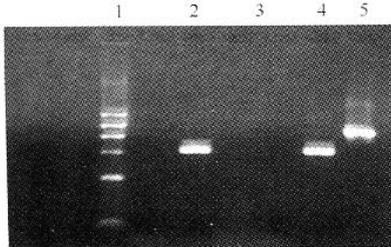


图2 普通 PCR 呈阴性而 Southern 杂交呈阳性结果



1:Marker; 2:Hib 标准菌株(采用 Hib 菌株通用引物); 3:与 2 相同的 Hib 菌株(采用 Hib 特异引物); 4:Hib 菌株(采用 Hib 菌株通用引物); 5:与 4 相同的 Hib 菌株(采用 Hib 特异引物)

图3 Hib 引物扩增特异性

### 讨 论

儿童 CAP 病原谱多种多样,病原学诊断比较困难,各国研究结果存在差异。在发展中国家,多项研究已证实,细菌尤其是肺炎链球菌、Hib 和金黄色葡萄球菌是严重肺炎的重要致病菌<sup>[5]</sup>。本组研究结果显示,死于肺炎的患儿中 Hib 感染 17 例(17%),高于大多数发达国家的<sup>[6,7]</sup>,这可能与病原学检测方法有关。大多数国家采取咽分泌物培养、血培养、血清学等检测方法,但这并不能反映肺炎病原学的真实情况。首先,多数病原如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌(Hi)既是肺炎的最常见致病菌,又是呼

吸道的正常菌群,因而咽分泌物培养不能真正反映下呼吸道的致病菌。其次,血培养虽然特异性强,但 CAP 常仅有短时的病毒血症或菌血症过程<sup>[8]</sup>,再加上抗生素的普遍使用,血培养的阳性率极低,甚至 100% 阴性。再次,血清标本特异性抗原、抗原-抗体复合物免疫学测定是日前常用的 CAP 病原学研究方法,但由于细菌抗原的量较低,加之多数患者在就诊前已使用过抗生素,易出现假阴性,故敏感性较低;细菌特异性抗体检测易出现交叉反应,另一方面,特异性抗体在治疗好转后仍在血循环中存在较长时间,使抗原-抗体复合物免疫学测定的特异性下降。本组研究以死于肺炎的小儿石蜡包埋肺组织标本为研究对象,用 PCR 和杂交法检测病原特异性 DNA 片段,这是检测肺炎病原最直接、特异、敏感的途径。本组研究还发现,20 世纪 50-60 年代与 80 年代以后 Hib 在儿童 CAP 死亡病例中的检出率无明显差异,进一步证明此种研究途径对病原菌的检测不受是否使用过抗生素治疗的干扰。

Hi,尤其是 b 型,是引起小儿严重细菌感染的主要致病菌,据估计,全球每年有 38 万~50 万儿童死于 Hib 感染性疾病(WHO Hib management guidelines,2000)。过去 50 年中,发达国家广泛开展了对此菌的研究,并于近年来采用 Hib 结合疫苗进行预防,取得了成功,使得 Hib 疾病大大减少,甚至消失。1996 年 WHO 已将 Hib 蛋白结合疫苗列入扩大的计划免疫中,至 2004 年 12 月,全球有 94 个国家(包括美洲、欧洲大部和澳洲)将这种疫苗纳入国家计划免疫中,另有 15 个国家在 GAVI 资助下使用这种疫苗,这样将这种疫苗纳入国家计划免疫的就占全球所有国家和地区的一半左右。虽然不少发展中国家也逐渐认识到这一细菌在小儿感染性疾病中的重要地位,但亚洲国家包括我国在内,对其研究深度尚远远不够, Hib 疾病负担仍未十分清楚,亚洲绝大多数国家仍未考虑使用这一疫苗。自 1988 年以来本实验室对 Hib 疾病进行了一系列研究,证实正常小儿鼻咽部 Hi 的带菌率为 23.9%,北京地区上呼吸道感染患儿 Hi 携带率为 36%,而 Hib 携带率仅为 1%<sup>[9]</sup>,下呼吸道感染患儿 Hi 检出率为 15.7%,Hib 检出率为 13.7%,初步证实 Hib 在我国小儿下呼吸道感染病原中占有重要地位<sup>[10,11]</sup>。本研究进一步证实,儿童 CAP 死亡病例中存在 Hib 感染的占 17%,表明 Hib 是我国儿童 CAP 尤其是细菌性肺炎的重要病原,且与患儿死亡有关系。这提

示我国也要尽快将 Hib 疫苗列入扩大计划免疫中的必要。至于 Hib 究竟是原发感染还是继发感染,有待于进一步研究。

患儿年龄不同, CAP 病原谱也有所不同<sup>[12]</sup>。本组研究发现, Hib 的检出率随着患儿年龄的增长而上升, 2~5 岁检出率高于 2 岁以下儿童。这与一些报道不相符。可能的原因: 我们的研究对象为随机抽取的死于 CAP 的患儿标本, 不包括痊愈出院的肺炎和门诊肺炎患儿; 患儿年龄范围 1 月龄至 5 岁, 其中 2 岁以下儿童有 87 例, 2~5 岁的仅有 13 例, 考虑进一步扩大样本量可消除这一差异。

直接 ISPCR 的应用始于 20 世纪 90 年代初<sup>[3]</sup>, 其设计思想是将 PCR 的高效扩增与原位杂交细胞定位相结合, 在组织细胞原位检测单拷贝或低拷贝的特定 DNA 或 RNA 序列; 将 PCR 的结果与组织细胞的形态特征联系起来, 并能够判断含特异性靶序列的细胞类型。直接 ISPCR 是在反应体系中使用标记的三磷酸核苷酸或引物, 使扩增产物直接携带标记分子, 再利用放射自显影术、免疫组织化学或亲和组织化学等方法检测扩增产物。其优点在于: 操作简便, 流程短, 省时, 结果直观<sup>[4]</sup>。本组研究使用地高辛-11-dUTP, PCR 原位扩增后, 经免疫组织化学法显色扩增产物, 分析结果发现: Hib DNA 的阳性颗粒主要分布于组织细胞间, 包括肺泡内(常伴有出血)、扩张充血的血管中或周围, 呈小灶状或片状分布。我们在研究中发现, 直接 ISPCR 对 Hib 的检出率高于 Southern 杂交, 分析原因: 首先, Hib 阳性的标本中, 其阳性颗粒大多呈小灶状而非大片状分布, 表明感染的 Hib 菌量较少, 其 DNA 拷贝数较低, 可能在普通 PCR 和 Southern 杂交中无法反应出来。其次, 直接 ISPCR 避免了 DNA 提取过程中 DNA 量的丢失, 避免了出血坏死等因素对液相 PCR DNA 扩增的抑制作用。本组研究结果阴性对照均为阴性结果, 阳性对照均为阳性结果, 考虑其结果可

靠, 故得出结论: 直接 ISPCR 检测肺炎病原较 Southern 杂交灵敏、特异、且可定位。

#### 参 考 文 献

- 1 袁壮. 儿童社区获得性肺炎的概念及临床意义. 中国实用儿科杂志, 2003, 18: 517-518.
- 2 Long AA, Komminoth P, Lee E, et al. Comparison of indirect in-situ polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Histochemistry, 1993, 99: 151-162.
- 3 Haase AT, Retael EF, Staskus KA. Application and detection of lentiviral DNA inside cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1990: 4971-4975.
- 4 苏慧慧, 刘彦芳, 主编. 原位 PCR. 北京: 科学出版社, 1995. 121-126.
- 5 沈叙庄, 杨永弘. 儿童社区获得性肺炎病因诊断和流行病学研究进展. 国外医学儿科学分册, 2003, 31: 225-227.
- 6 Juven T, Mertosa J, Waris M. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19: 293.
- 7 Vuori E, Peltola H, Kallio MJ. Etiology of pneumonia and other common childhood infections requiring hospitalization and parenteral antimicrobial therapy. SE-TU Study Group. Clin Infect Dis, 1998, 27: 566.
- 8 Nascimento-Carvalho CM, Lopes AA, Gomes MD, et al. Community acquired pneumonia among pediatric outpatient in Salvador, Northeast Brazil, with emphasis on the role of pneumococcus. Braz J Infect Dis, 2001, 5: 13-20.
- 9 Hu YY, Yu SJ, Yang YH. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* among children in Beijing, China, 1999-2000. Acta Paediatr, 2002, 91: 136-140.
- 10 王亚娟, 杨永弘. b 型流感嗜血杆菌在儿童急性下呼吸道感染中的地位. 中华医学杂志, 2000, 80: 373-374.
- 11 Wang YJ, Vuori-Holopainen E, Yang YH. Relative frequency of *Haemophilus influenzae* type b pneumonia in Chinese children as evidenced by serology. Pediatr Infect Dis J, 2002, 21: 271-277.
- 12 McIntosh K. community-acquired pneumonia in children. N Engl J Med, 2002, 346: 429-437.

(收稿日期: 2005-01-07)

(本文编辑: 张林东)