

· 论著 ·

427例下呼吸道感染住院患儿肺炎支原体感染分析

伏瑾^a, 袁艺^b, 陈燕^a, 孙春荣^a, 崔小岱^a

(首都儿科研究所 a. 临床中心实验室; b. 附属儿童医院呼吸科, 北京 100020)

摘要: 目的 分析我院下呼吸道感染住院患儿肺炎支原体(MP)感染状况, 探讨近年来MP感染在下呼吸道感染儿童中的流行规律。方法 采用实时定量聚合酶链反应(PCR)法检测427例下呼吸道感染患儿呼吸道鼻咽深部分泌物、肺泡灌洗液及咽拭子MP DNA含量, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清MP IgM。结果 427例下呼吸道感染患儿中MP DNA阳性206例(48.2%), MP DNA含量 $5.01 \times 10^2 \sim 3.66 \times 10^7$ copies/ml。≤3岁(211例)、3~6岁(73例)和>6岁(143例)组MP感染阳性分别为55例(26.1%)、43例(58.9%)和108例(75.5%); MP DNA阳性患儿中肺炎患儿94.2%(194/206)。MP全年每月阳性率>29.2%, 秋冬季感染呈现高峰(阳性率>60.0%)。实时定量PCR与ELISA检测法结果一致性良好(Kappa=0.798, $P < 0.05$)。结论 MP是近年来住院患儿呼吸道感染的主要病原体, 下呼吸道感染尤其是肺炎中感染率较高; 随年龄增长阳性检出率逐渐上升; 感染与季节密切相关。

关键词: 支原体, 肺炎; 聚合酶链反应; 呼吸道感染; 儿童, 住院

中图分类号: R725.631 文献标识码: A 文章编号: 1004-583X(2010)10-0854-03

Analysis of Mycoplasma pneumoniae infection in 427 inpatient children with lower respiratory tract infections

FU Jin^a, YUAN Yi^b, CHEN Yan^a, SUN Chun-rong^a, CUI Xiao-dai^a

a. Clinical Central Laboratory, Capital Institute of Pediatrics; b. Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital affiliated to Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Corresponding author: CUI Xiao-dai, Email: xdcui@a-1.net.cn

ABSTRACT: **Objective** To investigate the prevalence of Mycoplasma pneumoniae (MP) infection in hospitalized children with lower respiratory tract infections. **Methods** Respiratory samples and serum specimens were collected from 427 children with lower respiratory tract infections. Real-time polymerase chain reaction (PCR) kits were applied for detecting MP DNA in the respiratory samples. And MP IgM in the serum was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** In the samples with lower respiratory tract infection, MP DNA contents ranged from 5.01×10^2 copies/ml to 3.66×10^7 copies/ml were detected in 206 cases (48.2%). According to their age, the MP-infection rates were 26.1% (55 cases) in the children under or equal to age 3, and 58.9% (43 cases) in the children aged from 3 to 6 and 75.5% (108 cases) in those 6 years older. Among those MP positive cases, 194 (94.2%) were pneumonia to the infection. Monthly, the average rate of MP infection was higher than 29.2% during the research period, and the peak occurred in autumn and winter (positive rate > 60.0%). The results of real-time PCR and ELISA uniform for the diagnosis of MP infection (Kappa=0.798, $P < 0.05$). **Conclusion** MP is one of the most important pathogens in hospitalized children with respiratory tract infections recently. The MP positive rate is higher in children with lower respiratory tract infections, especially pneumonia. And the infection rate increases with age and reaches peak in autumn and winter.

KEY WORDS: pneumoniae, mycoplasma; polymerase chain reaction; respiratory tract infections; child, hospitalized

肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae, MP)是儿童时期肺炎及其他呼吸道感染的重要病原之一。MP感染的发病率各地报道差异较大, 不同检测方法、试剂或不同判断标准等均可影响对MP感染率的评估, 文献中MP感染发病率资料可比性并不强^[1]。过去曾将支原体培养法作为诊断的金标准, 但由于其阳性率较低等原因限制了其应用。近年来

实时定量聚合酶链反应(PCR)应用于MP的检测^[2-5], 该技术将PCR的灵敏性与探针杂交的特异性结合, 有效地提高了MP感染诊断的准确性和重复性。为了解MP感染在呼吸道感染住院患儿中的流行情况, 本研究采用实时定量PCR法结合酶联免疫吸附测定(ELISA)方法, 对我院下呼吸道感染住院患儿进行MP检测, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择 2008年6月至2009年9月首都儿

基金资助: 北京市优秀人才培养专项(20071D0303200119)

(通信作者: 崔小岱, Email: xdcui@capil.net.cn) Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

科研究所附属儿童医院住院的下呼吸道感染患儿 427 例, 男 260 例, 女 167 例, 年龄 39 天至 15 岁, 病程 2~62 天。其中肺炎 351 例, 支气管炎 54 例, 毛细支气管炎 22 例。

1.2 标本采集 患儿住院 5 天内, 239 例用负压吸引器收集其鼻咽深部分泌物; 141 例行纤维支气管镜术留取肺泡灌洗液(BAL); 无法留取上述标本的患儿, 取咽拭子标本 47 例。同期采集患儿静脉血, 分离血清。

1.3 MP 实时定量 PCR 检测 采用肺炎支原体核酸定量检测试剂盒(PCR 荧光探针法, 中山大学达安基因股份有限公司生产)对呼吸道标本进行测定。每次反应以 1.0×10^4 、 1.0×10^5 、 1.0×10^6 及 1.0×10^7 copies/ml 阳性定量参考做标准曲线, 确保相关系数 $r > 0.98$, 阳性和阴性质控品均在参考范围内。仪器采用美国应用生物系统公司 7500 定量 PCR 仪。

1.4 MP 的 ELISA 检测 用 MP IgM ELISA 检测试剂盒(SERION ELISA classic, 德国 Virion/Serion 研发有限公司生产)对血清标本进行检测。

1.5 统计学方法 应用 SPSS 11.0 软件处理数据。一致性检验用 Kappa 检验; 计数资料分析用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 住院患儿 MP 感染情况 427 例患儿 MP 阳性 206 例 (48.2%)。MP DNA 含量为 $5.01 \times 10^2 \sim 3.66 \times 10^7$ copies/ml。不同类型标本阳性率见表 1。

表 1 不同类型标本阳性率、MP DNA 含量

标本类型	例数	MP DNA (copies/ml)	阳性[例(%)]
鼻咽深部分泌物	239	$6.87 \times 10^2 \sim 3.55 \times 10^7$	108(45.2)
肺泡灌洗液	141	$5.01 \times 10^2 \sim 3.66 \times 10^7$	77(54.6)
咽拭子	47	$5.6 \times 10^2 \sim 1.54 \times 10^7$	21(44.7)

2.2 MP 感染患儿年龄分布情况 见表 2。

表 2 MP 感染与年龄分布

年龄(岁)	例数	MP DNA (copies/ml)	阳性[例(%)]
≤3	211	$6.87 \times 10^2 \sim 3.24 \times 10^7$	55(26.1)
>3~6	73	$1.73 \times 10^3 \sim 3.66 \times 10^7$	43(58.9)**
>6	143	$5.01 \times 10^2 \sim 3.55 \times 10^7$	108(75.5)**△
χ^2 值		87.500	
P 值		<0.05	

注: 与 ≤3 组阳性率比较, ** $P < 0.01$; 与 >3~6 组阳性率比较, △ $P < 0.01$

2.3 肺炎组与非肺炎组 MP 感染率比较 肺炎组 351 例, 其中阳性 194 例(55.3%), 非肺炎组 76 例, 其中阳性 12 例(15.8%)。差异有统计学意义 ($P < 0.05$)

表 3 肺炎组与非肺炎组 MP 感染

组别	例数	MP DNA (copies/ml)	阳性[例(%)]
肺炎	351	$5.01 \times 10^2 \sim 3.66 \times 10^7$	194(55.3)
非肺炎	76	$6.87 \times 10^2 \sim 1.62 \times 10^7$	12(15.8)*
χ^2 值		39.000	
P 值		<0.05	

2.4 MP 感染患儿的情况季节分布 2008 年 6 月至 2009 年 9 月各月的 MP 阳性检出率分别为: 29.2% (7/24)、45.1% (23/51)、57.1% (20/35)、61.1% (11/18)、69.6% (16/23)、64.7% (11/17)、61.1% (11/18)、63.3% (19/30)、48.8% (20/41)、38.1% (16/42)、37.5% (15/40)、50.0% (10/20)、38.1% (8/21)、30.8% (4/13)、38.1% (8/21)、53.8% (7/13), 见图 1。

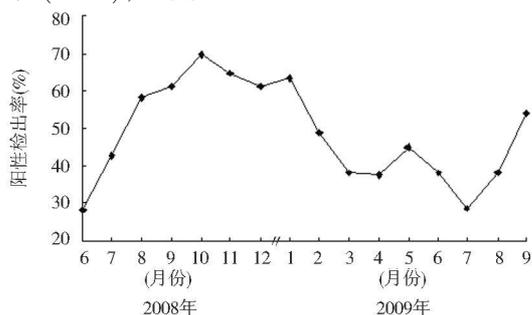


图 1 MP 阳性检出率的季节分布

2.5 实时定量 PCR 与 ELISA 法检测结果比较 两种方法对 MP 感染检测结果的一致性良好。实时定量 PCR 法检测阳性而 MP IgM 阴性有 27 例; 将此 27 例患儿采集二次血清 MP IgM 测定中, 有 6 例 MP DNA 阳性患儿出现了 MP IgM 阳转, 见表 4。

表 4 实时定量 PCR 与 ELISA 法检测结果(例)

PCR 法检测结果	ELISA 法检测结果		合计
	+	-	
+	179	27	206
-	16	205	221
合计	195	232	427

注: Kappa=0.789, $P < 0.05$

3 讨论

MP 感染诊断方法有分离培养法、血清学抗体检测法和 PCR 核酸检测法。传统 MP 分离培养法费时、繁琐, 要求条件较高且培养阳性率低, 不利于 MP 感染的早期诊断。MP IgM 抗体是 MP 感染后机体最早产生的抗体, 但其形成仍需一定的时间, 感染后 5~7 天可检测到。利用 PCR 检测呼吸道标本中 MP DNA 为早期诊断 MP 感染提供了可能^[6-8], 而实时定量 PCR 将 PCR 的灵敏性和探针杂交的特异性合

二为一,其快速、定量的优势是传统 PCR 无法比拟的,目前已广泛应用到 MP 的检测中^[2-5],甚至可同时检测不同的病原^[9]。通过定量结果可了解 MP 在患儿体内感染及复制的情况,有助于临床早期诊断;比较用药前后患儿呼吸道标本的 MP DNA 含量,可定量动态评估 MP 感染患儿治疗效果。国内张晓波等^[10]研究表明荧光定量 PCR 的拷贝数与 MP 感染诊断呈正相关,具有很高的特异度和敏感度。

应用实时定量 PCR 法对我院住院患儿下呼吸道标本进行 MP 检测,标本处理及实验方法简单,结果判断明确快速,鼻咽深部分泌物、肺泡灌洗液、咽拭子等标本中均可检测到 MP DNA,基因达 $10^2 \sim 10^7$ copies/ml。鼻咽深部分泌物及肺泡灌洗液标本表达高拷贝数的比例远远大于咽拭子标本的表达,这可能与患儿的病情有关,亦可能与所取标本类型有关。有文献报道标本类型对 PCR 法诊断 MP 感染至关重要,与痰和鼻咽分泌物比较,咽拭子标本的 MP PCR 敏感度较低^[11]。

流行病学资料显示人类对 MP 有普遍易感性,最易感人群是4~20岁;亦可发生在婴幼儿,但高峰发病年龄依然是学龄前和学龄儿^[1]。本研究结果显示在下呼吸道感染患儿中,不同年龄段 MP 感染率不同,随年龄增长而增加, ≤ 3 岁 $> 3 \sim 6$ 岁和 > 6 岁分别为26.1%、58.9%和75.5%。MP 感染由于各地气候、环境不同,发病高峰有明显季节差异,我国北方以冬季为多,南方则以夏秋季较多^[1]。研究显示,2008年6月至2009年9月下呼吸道感染住院患儿 MP 感染率超过29.2%,秋冬季可达60.0%以上。提示 MP 感染一年四季均可发生,2008年9月至2009年1月是感染的高峰。

本研究中肺炎患儿351例,非肺炎患儿76例,肺炎病例中194例检测到 MP DNA,在肺炎组中阳性率为55.3%,在所有阳性标本中比例高达94.2%(194/206)。比较两组的 MP 感染率,显示肺炎与 MP 感染高度相关。文献报道,MP 作为呼吸道感染的常见病原,超过40%的社区获得性肺炎是由 MP 引起的^[12]。

实时定量 PCR 法 MP DNA 检测与 ELISA 检测 MP IgM 结果比较,两者的符合率较高,然而就早期诊断而言,因为机体产生血清特异性 IgM 需要大约1周的时间,所以前者在准确度和敏感度方面更有优势。本研究结果也说明了这一点:27例 MP DNA 阳

性而 MP IgM 检测阴性病例中有6例在二次血清中检出了 MP IgM 阳转。可见应用 MP IgM 早期诊断 MP 感染时存在假阴性,与文献报道相似^[8,13]。另有部分 PCR 结果阴性而 MP IgM 阳性的病例,分析其可能的原因有:标本采集的时间、保存方式的影响,标本中含有 PCR 抑制物,部分咽拭子标本 PCR 敏感度相对较低,或血清 MP IgM 检测为假阳性等。

参考文献:

- [1] 陆权,陆敏.肺炎支原体感染的流行病学[J].实用儿科临床杂志,2007,22(4):241-243.
- [2] Touati A, Benard A, Hassen AB, et al. Evaluation of five commercial real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(7): 2269-2271.
- [3] Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for detection of *Mycoplasma pneumoniae* [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(2): 441-444.
- [4] Winchell JM, Thurman KA, Mitchell SL, et al. Evaluation of three real-time PCR assays for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in an outbreak investigation [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 3116-3118.
- [5] Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, et al. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt 2): 149-155.
- [6] Liu FC, Chen PY, Huang F. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children by polymerase chain reaction [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2007, 40(6): 507-512.
- [7] Kashyap B, Kumar S, Sethi GR, et al. Comparison of PCR, culture & serological tests for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in community-acquired lower respiratory tract infections in children [J]. Indian J Med Res, 2008, 128(2): 134-139.
- [8] Nilsson AC, Bjökman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 93.
- [9] Gullsbjörk K, Storm M, Bondeson K. Simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 727-731.
- [10] 张晓波,陆爱珍,王立波,等.肺炎支原体荧光定量聚合酶链反应在肺炎支原体感染中的诊断评价 [J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(6): 442-444.
- [11] Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M. Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR [J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 3): 287-291.
- [12] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection [J]. Future Microbiol, 2008, 3(6): 635-648.
- [13] 袁艺,伏瑾,曹玲,等.肺炎支原体荧光定量聚合酶链反应检测在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断意义 [J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(10): 760-762.

收稿日期:2010-03-09 修回日期:2010-03-18 编辑:武峪峰