维普资讯 http://www.cqvip.com

29-31

第21卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.21 No.1
1996 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1996

聚合酶链反应诊断小儿支原体肺炎及临床研究

儿童医院内科 张儒谊 向国良
遗传病研究室 朱 静 王宁延 邓 兵

提 要 采用聚合酶链反应(PCR)技术对100例肺炎患儿的鼻咽分泌物标本进行肺炎支原体DNA(MP DNA)检测,用以诊断MP感染。结果MP DNA阳性24例,其中婴幼儿13例。30例健康对照均阴性,整个实验过程可在2~3h完成。MP阳性的24例中血清冷凝集试验>1:32者仅17例(70.8%)。提示MP系小儿肺炎常见病原,婴幼儿支原体肺炎并不少见。

关键词 聚合酶链反应(PCR);肺炎支原体;血清冷凝集试验 儿童
中图分类号 R446.61 R725.631

支原体肺炎是小儿时期较常见的一种呼吸道感染性疾病，近年来其发病率有增高趋势。本病用抗生素治疗有效，故早期准确诊断具有重要意义。支原体肺炎以往的病原学诊断主要采用分离培养和血清学方法，费时较长，只能作回顾性诊断。我们采用聚合酶链反应(PCR)技术对100例小儿肺炎患儿的鼻咽分泌物进行肺炎支原体DNA(MP DNA)检测，结果说明可用于早期诊断MP感染，现报告如下

1 对象及方法

1.1 对象 我院呼吸专科病房收治的肺炎患儿100例，其中男61、女39例；婴幼儿68例，学龄前期19例、学龄期13例。30例健康儿童为对照。

1.2 PCR检测方法

1.2.1 标本采集 入院次日(病程3~7天)用消毒吸痰管经鼻插入鼻咽部，刺激病儿咳嗽，抽吸下呼吸道分泌物，置入无菌管送检。

1.2.2 标本处理 选检标本尽快漂洗于2ml生理盐水中，15000rpm离心25min，弃去上清液，加入50μl裂解液，混匀后煮沸10min即可。

1.2.3 PCR扩增 总反应体积为25μl，其加入相当量的无菌水，4×dNTP、缓冲液、引物及受检模板DNA。95℃预变性5min，加入Taq DNA聚合酶1u，混匀，反应按93℃/30s，55℃/33s，72℃/60s为一个循环，共30个循环，最后72℃自动延伸7min，结束循环。

1.2.4 检测扩增结果 取15μl反应液，用2%琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色，紫外灯下观察结果，若144bp处出现橙黄色条带，肺炎支原体为阳性，否则为阴性。

1.3 其他实验室检查 X线胸片、血常规及血气分析。此外对50例患儿抽血作冷凝集试验。

2 结果

2.1 PCR检测 100例小儿肺炎患儿鼻咽分泌物标本中MP DNA阳性24例，阳性率24%，见表1。30例健康对照均阴性。

表1 PCR检测结果与年龄分布

年 龄	<1岁	~3岁	~7岁	~14岁
人 数	43	25	19	13
PCR(+)	7	6	5	6
%	16.2	24	26.3	46.1

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 冷凝集试验 共测 50 例（包括 MP－PCR 阳性的 24 例），滴度＞1：32 者为阳性。结果 17 例阳性，全部为 MP－PCR 阳性病例。

2.3 其他实验室检查

外周血 RBC3.57～4.3×10^{12}/L，Hb103～128/L，WBC5.7～12.4×10^{9}/L，N0.41～0.78，L0.59～0.22；血气分析除 3 例有低氧血症，1 例为代偿性呼吸性酸中毒外，其余正常。X 线胸片婴幼儿 13 例 MP－PCR 阳性病例中，呈片絮状改变 32 例；肺纹理增多、模糊 5 例；条絮、网点状改变 5 例。学龄前及学龄期 11 例阳性病例中，一侧或二侧中下肺片絮状改变 5 例（伴胸膜病变 3 例）；肺纹增多，模糊 1 例；左下及右上节段性炎症伴肺不张各 1 例）；右下大叶肺炎 2 例（伴胸膜病变 1 例）；一侧大量胸腔积液 1 例。

3 讨论

3.1 PCR 在诊料肺炎支原体感染中的意义

MP 是小儿呼吸道感染的常见病原体之一。对 MP 感染的实验室诊断，多年来一直靠传统的人工培养技术或血清学方法，这两种方法均操作繁琐，且耗时较长（需 2～3 周），不能为临床早期诊断及治疗提供依据。

PCR 是一项高效 DNA 分析技术，近年来国内外已成功地将这一技术应用于临床实践。辛氏报导用 PCR 药盒检测 MP，可出现预期的扩增片段，MP 的最小检出量为 1ccu。检测人型 PG21、口腔型支原体、唾液支原体、解脲脲原体 8 型以及空白对照则无此片段出现，可与呼吸道正常寄生的其他支原体区别。[1]。说明 PCR 检测 MP 具有灵敏度高，特异性强之优点。我们采用 PCR 技术对 100 例肺炎患儿鼻咽分泌物进行 MP DNA 检测，结果 24 例阳性，其中 4 例前后 2 次重复送检标本，均为阳性，1 例大量胸腔积液患儿鼻咽分泌物及 2 次胸水检测均为阳性，具有可重复性，支持 MP 感染。30 例健康对照均阴性。提示只要严格操作过程，假阳性机会较少。整个实验过程可在 2～3h 完成，能达到早期诊断 MP 感染的目的。本实验标本采取肺炎病儿鼻咽分泌物，较咽拭子更接近病变部位，提供肺炎病原的价值较咽拭子大。本组阳性病例，结合临床资料，治疗反应对其它抗生素无效，对红霉素有效，故诊断为支原体肺炎。

目前国内许多医院，因条件限制，仍用冷凝集试验作为诊断 MP 肺炎的主要手段[2]。本组 MP－PCR 阳性 24 例肺炎中，冷凝集试验也为阳性者 17 例，其余 7 例为阴性，提示用冷凝集试验诊断 MP 感染，其特异性差、费事，而且阳性率不高，易造成漏诊，只能起辅助诊断作用。

3.2 临床分析

据文献报导，各年龄支原体肺炎占肺炎发病的 10～20%[3]。本组 100 例小儿肺炎，MP－PCR 阳性者 24 例，阳性率 24%，略高于文献报告，提示 MP 是引起小儿肺炎的一种较常见病原。以往认为 MP 肺炎好发年龄为 5 岁以上儿童和青少年，婴幼儿少见。本组婴幼儿肺炎 68 例中 MP－PCR 阳性 13 例，阳性率 19%，说明婴幼儿 MP 肺炎并不少见。以往认为少见，可能因临床表现不典型，未及时作病原学检测有关。MP－PCR 阳性的 13 例婴幼儿肺炎，临床表现为声声咳嗽伴轻重不等喘憋及呼吸困难，发热仅 3 例，体温 37.5～38.1℃。肺部体征中细湿罗音 4 例，干鸣或哮鸣伴粗湿罗音 9 例，外周血基本正常。x 线胸片大多为肺间质改变。临床不具特征性，与一般病毒或细菌性肺炎不易区别。MP－PCR 阳性的 11 例学龄前及学龄期肺炎中，表现刺激性干咳 7 例，百日咳样咳嗽 2 例，一侧呼吸音降低伴叩浊 1 例；x 线胸片以下叶节段或大叶性肺炎改变多见，也可呈片絮状，或伴肺不张改变，5 例伴胸膜病变，其中 2 例有少量胸腔积液，1 例形成一侧大量胸腔积液，二次胸水 PCR 检测 MP－DNA 阳性，提示渗出性

维普资讯 http://www.cqvip.com

胸膜炎为 MP 肺炎常见合并症。

MP 是一种缺乏细胞壁的病原微生物。对阻碍病原微生物细胞壁合成的抗生素如：青霉素等无效，而对大环内酯类药物如：红霉素等效果肯定。本组 24 例阳性患儿曾先后用青霉素，氨苄青霉素、病毒唑等治疗 2～5 天无效，换用红霉素治疗 1～3 天后体温下降正常，咳嗽减轻，效果明显，最后全部治愈出院。故提出临床遇年长儿表现刺激性干咳、发烧、肺部体征少，x 线肺部呈节段或大叶性炎症改变，婴幼儿呈间质改变，外周血象正常，用青霉素等 β 内酰胺类抗生素无效、而红霉素治疗有效，可作为诊断支原体肺炎的线索。明确诊断除可采用病变部位标本分离培养出 MP 或血清中特异抗体 4 倍增高外，采用 PCR 技术，更能早期诊断 MP 感染，值得临床推广应用。

参 考 文 献

1. 辛德莉，等．中华儿科杂志 1994;3(5):296
2. 刘桂香，等．临床儿科杂志 1992;10(1):6
3. 范永琛．实用儿科杂志 1993;8(3):196

（收稿日期 1995－07－19）

A STUSY ON CLINICAL APPLICATION OF POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIAGNOIS OF CHILDREN MYCOPLASMA PNEUMONIA

Zhang Ruyi, et al

The Children's Hospital

Thus paper reports the use of the polymerase chain reaction to detect the mycoplasma pneumoniae DNA (MPDNA) to diagnose the infection of MP. Samples of nasopharyngeal secrations from 100 children with pneumonia were collected for detection. The results showed that MP DNA was positive in 24 of the 100 cases, of the 24, 13 were infants. MP DNA was negative in the control group of 30children. The proceddures of the PCR can be finished within 3 hours. Among 24 positive MP DNA samples, only 17(70.8%) were positive when detected with the cold agglutination test (CAT) (titer > 1 : 32). It is suggest that MP is the common pathogen which causes children pneumonia, and is not rare to be found in infants. The diagnosis with PCR are more rapid, sensitive and specific compared with CAT. Finally, we also discusses the clinical differences between the older and younger children patients who suffer from mycoplasma pneumonia.

KEY WORDS *Polymerase chain reaction; Mycoplasma pneumoniae; Serological cold agglutination test*