

论著·临床研究

## 支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 对儿童肺炎支原体肺炎诊断研究

钟礼立 彭力 黄寒 梁沫 周琼华 张兵 李云

(湖南省人民医院儿科,湖南 长沙 410005)

**[摘要]** 目的 探讨荧光实时定量 PCR(FQ-PCR)检测肺泡灌洗液(BALF)中 MP-DNA 基因在肺炎支原体肺炎(MPP)早期病原诊断中的价值。方法 采用 FQ-PCR 检测 61 例患儿 BALF 中 MP-DNA,并与目前常用血清 MP 抗体检测方法颗粒凝集法进行比较。结果 FQ-PCR 检测 MP-DNA 敏感度 94%,特异度 100%;病程早期及难治性病例中 FQ-PCR 检测 BALF 中 MP-DNA 准确性优于单份血清 MP 抗体检测( $P < 0.01$ )。难治性病例中 MP-DNA 拷贝数显著高于普通 MPP 组( $P < 0.05$ ),且与 CRP 呈正相关( $r = 0.845, P < 0.01$ )。结论 FQ-PCR 检测 BALF 中 MP-DNA 是早期 MPP 特别是难治性 MPP 病原诊断的可靠方法,优于血清 MP 抗体检测。MP-DNA 的拷贝量可以作为评价难治性 MPP 的转归以及判断药物疗效的指标。 [中国当代儿科杂志,2011,13(3):191-194]

**[关键词]** 肺炎支原体肺炎;支气管肺泡灌洗液;荧光实时定量 PCR;儿童

**[中图分类号]** R725.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)03-0191-04

### Value of fluorescence quantitative PCR assay of bronchoalveolar lavage fluid samples in the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children

ZHONG Li-Li, PENG Li, HUANG Han, LIANG Mo, ZHOU Qiong-Hua, ZHANG Bing, LI Yun. Department of Pediatrics, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China (Email: hnzll000@gmail.com)

**Abstract: Objective** To study the value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) for detecting Mycoplasma pneumoniae (MP)-DNA in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the early diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP). **Methods** FQ-PCR was used to detect MP-DNA in BALF obtained by fiberoptic bronchoscopy from 61 children with MPP, and the sensitivity and the specificity of FQ-PCR were compared with the traditional serological test. **Results** The sensitivity and the specificity of BALF FQ-PCR for detecting MP-DNA were 94% and 100% respectively. The accuracy of BALF FQ-PCR assay for detecting MP-DNA was higher than that of the serological test at the early stage of the disease (1-7 days) ( $P < 0.01$ ). In the children with refractory MPP, BALF FQ-PCR assay also showed higher accuracy for detecting MP-DNA than the serological test ( $P < 0.01$ ). The copies of MP-DNA in children with refractory MPP were significant higher than those in children with common MPP ( $P < 0.05$ ). The copies of MP-DNA were positively correlated with CRP values ( $r = 0.845, P < 0.01$ ). **Conclusions** FQ-PCR assay of BALF for detecting MP-DNA in BALF is superior to the serological test. It is a reliable method for the early diagnosis of MPP, especially refractory MPP. The copies of MP-DNA can be used as an index for evaluation of the treatment outcome of refractory MPP. [Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (3):191-194]

**Key words:** Mycoplasma pneumoniae pneumonia; Bronchoalveolar lavage fluid; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Child

肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae, MP)是引起小儿下呼吸道感染的重要病原之一<sup>[1]</sup>,肺炎支原体肺炎(Mycoplasma pneumoniae pneumonia, MPP)在儿童肺炎中约占 20%~40%,并随着年龄增加而上升<sup>[2-3]</sup>,而且近几年其发病率逐年增加,特别是难治性肺炎支原体肺炎(refractory Mycoplasma pneumoniae

pneumonia, RMPP)有逐年增加的趋势<sup>[4]</sup>。目前临床诊断 MP 感染仍多采用血清学方法,检测结果往往受抗体出现的时相等多方面因素的影响<sup>[5]</sup>,使得早期诊断 MP 感染难度增加。本研究运用荧光定量 PCR (FQ-PCR)法对 61 例支气管肺泡灌洗患儿的支气管肺泡灌洗液(BALF)进行 MP 检测,并与血清学方

法颗粒凝聚法(PA)进行比较。

## 1 资料与方法

### 1.1 对象与分组

回顾性分析我院2009年1月至2010年3月住院行纤维支气管镜检查并进行了支气管肺泡灌洗的49例肺炎(符合实用儿科学第7版肺炎诊断标准<sup>[6]</sup>)患儿及12例支气管异物取出术后复查无肺部病变的对照患儿的临床资料,49例肺炎患儿中有34例双份血清MP抗体滴度有4倍及以上升高,为确诊支原体肺炎组(MPP组)<sup>[7]</sup>,余下15例为非支原体感染肺炎组(非MPP组)。34例MPP组内有28例患儿符合RMPP的诊断标准<sup>[8]</sup>,余下6例作为普通肺炎组。

对照组12例患儿中,男7例,女5例,年龄0岁~2例,4岁~6例,7~14岁4例;MPP组34例患儿中,男18例,女16例,年龄0岁~9例,4岁~17例,7~14岁8例;非MPP组15例患儿中,男9例,女6例,年龄0岁~3例,4岁~7例,7~14岁5例。

### 1.2 标本采集

1.2.1 试剂和仪器 MP血清学抗体PA法采用日本富士瑞必欧株式会社生产的赛乐迪亚-麦克II试剂盒。PCR试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。PCR仪为美国BIO-RADicycler基因扩增仪。

1.2.2 血液标本采集和测定 入院第1天采集静脉血检测血常规及CRP。入院后动态采集血清标本,采用明胶颗粒载体的间接凝集试验检测MP特异性抗体。首份血清MP抗体滴度>1:160者,于首次采血2周后再次采血作为检测MP-Ab第2份血清标本;首份MP血清抗体滴度<1:160者,每5~7d复查,直到MP血清抗体有4倍以上升高,或直到首次采血4周后采集最后1份血清,取最后1次血清标本作为第2份血清标本。双份血清以MP抗体滴度4倍及以上升高为确诊MP感染。

1.2.3 BALF标本采集和测定 病程早期1~7d内完成纤维支气管镜下收集BALF置于1.5mL离心管中,12000 r/min离心5 min,留取管底沉淀作为DNA提取标本,严格按照试剂说明书要求的操作规程上机检测。MP-DNA拷贝数>10<sup>3</sup> copy/mL为阳性。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析,组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验;计量资料用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料采用t检验;两变量相关分析采用

Pearson 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BALF FQ-PCR 检测 MP-DNA 准确性

确诊MP感染的34例患儿BALF中MP-DNA阳性为32例,其敏感度是94%;确诊为非MP感染的15例灌洗患儿及12例支气管异物对照者中阳性为0,检测特异度是100%;阳性预测值是100%,阴性预测值是93%,与MP确诊标准的符合率是97%,见表1。

表1 FQ-PCR 检测 MP-DNA 结果与 MP 确诊标准比较

FQ-PCR	MP 确诊标准(双份血清 MP 抗体滴度 4 倍升高)		合计
	+	-	
+	32	0	32
-	2	27	29
合计	34	27	61

注: $\chi^2 = 53.45, P < 0.01$

### 2.2 BALF FQ-PCR 检测 MP-DNA 与首份血清 MP 抗体阳性率比较

MPP组中34例患儿首份血清检出阳性13例,BALF FQ-PCR检测阳性32例,FQ-PCR检测敏感度显著高于血清MP抗体检测( $\chi^2 = 4.97, P < 0.05$ );非MPP组及对照组首份血清共检出13例MP抗体阳性(均为假阳性,FQ-PCR未见假阳性者),因而FQ-PCR特异度显著高于血清MP抗体检测。见表2。

表2 各组 BALF FQ-PCR 与血清 MP 抗体阳性率比较 [例(%)]

分组	例数	首份血清	FQ-PCR
对照组	12	3(25)	0
非MPP组	15	10(67)	0 <sup>b</sup>
MPP组	34	13(38)	32(94) <sup>a</sup>

a:与同组首份血清比较, $P < 0.05$ ; b:与同组首份血清比较, $P < 0.05$ (Fisher's 确切概率法)

### 2.3 病程早期两种检测方法准确性的比较

病程早期(1~7d)有11例患者进行MP血清抗体检测,仅有1例患者首份血清MP抗体检测阳性;而其中8例进行FQ-PCR检测有7例阳性,这7例经回顾性双份血清4倍升高,确诊为MP感染,无假阳性。病程早期血清MP抗体检测与FQ-PCR检测MP-DNA准确性差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。见表3。

**表3 病程早期血清MP抗体检测与FQ-PCR检测MP-DNA阳性率的比较**

检测方式	n	阳性例数	阳性率(%)
首份血清	11	1	9
FQ-PCR	8	7	88 <sup>a</sup>

a: 与首份血清比较,  $P < 0.01$  (Fisher's 确切概率法)

### 2.4 不同病情MPP组两种检测方法准确性的比较

28例RMPP组患儿中,首份血清仅检出MP抗体阳性11例,灵敏度39%,而FQ-PCR检出阳性28例,灵敏度100%,且无假阴性,特异度100%,RMPP患儿FQ-PCR检测准确性显著高于血清MP抗体检测( $P < 0.01$ )。而普通MPP患儿FQ-PCR检测和血清MP抗体检测准确性差异无统计学意义。见表4。

**表4 不同病情组首份血清MP抗体和FQ-PCR检测MP-DNA结果比较 [例(%)]**

分组	例数	阳性	
		首份血清	FQ-PCR
普通MPP组	6	4(67)	4(67)
RMPP组	28	11(39)	28(100) <sup>a</sup>

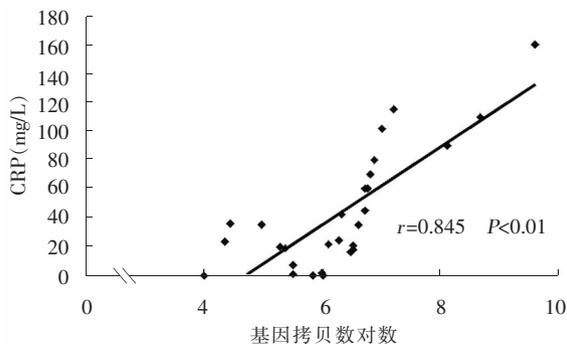
a: 与同组首份血清比较,  $P < 0.01$  (Fisher's 确切概率法)

### 2.5 病情与MP-DNA基因拷贝数的关系

RMPP组FQ-PCR检测基因拷贝数显著高于普通MPP组( $P < 0.01$ ),且MPP灌洗组中基因拷贝数与CRP呈正相关( $r = 0.845, P < 0.01$ ),基因拷贝数与白细胞总数无明显相关性( $r = 0.124, P = 0.084$ )。见表5,图1。

**表5 不同病情MPP组FQ-PCR检测基因拷贝数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

分组	例数	拷贝数[log(MP-DNA copy/mL)]
普通MPP组	6	1.5 ± 1.0
RMPP组	28	6.2 ± 1.7
t值		32.74
P值		<0.01



**图1 FQ-PCR检测基因拷贝数与CRP的关系(n=28)**

## 3 讨论

明确病原是诊治MPP的关键,由于目前MPP临床、影像特点以及纤维支气管镜下改变缺乏较强的特异度,因而MPP病原诊断目前仍需依赖实验室检查。

目前并没有快速、有效的MP病原特异度诊断方法<sup>[9-10]</sup>。MP检测方法中被喻为诊断金标准的支原体培养阳性率较低,传统上临床诊断主要依靠血清学方法,但在急性期该方法灵敏度欠佳<sup>[11]</sup>,难以满足早期诊断要求。

目前临床确诊MP急性感染强调双份血清(间隔2周)恢复期抗体滴度上升4倍或MP-IgM抗体滴度持续 $> 1:160$ <sup>[7]</sup>。由于本研究选用的是PA法测定MP抗体,其所测得的抗体80%~90%为MP-IgM,但也包含了10%~20%左右的MP-IgG。检测MP-IgG只可供回顾性诊断,因而本研究采用短期(2~4周)双份血清MP抗体滴度上升4倍作为确诊MP近期感染标准。但MP感染后诱导体液免疫反应约1周后抗体产生,3~6周可达高峰,2~3个月后逐渐下降,故早期发病7d内采血检测,难以达到早期诊断的目的。因此抗体检测不宜作为临床唯一的诊断方法,需积极采用其他种检测手段同时作出病原学诊断<sup>[12]</sup>。

随着分子生物学技术在支原体研究领域的应用,PCR技术已经成为快速诊断支原体感染的方法,可检测MP-DNA或MP-RNA。PCR技术目前是国内外近年来发展较快的检测支原体的方法之一<sup>[11]</sup>。

赵青<sup>[13]</sup>发现PCR诊断支原体感染的灵敏度为75%,远高于培养法(25%)和抗原检测法(8.3%),但它的假阴性率仍然达到了25%。且由于普通PCR操作过程中易污染,使假阳性率较高,临床运用受到限制。荧光实时定量PCR法(FQ-PCR)是近些年发展起来的新的核酸检测技术,简单快速,整个实验是完全封闭式操作,与传统PCR相比,明显地降低了污染的发生,避免了假阳性干扰<sup>[13]</sup>。已有研究表明,FQ-PCR可快速敏感准确地定量检测标本中的MP-DNA,整个操作数小时,特异度强,灵敏度高,可了解MP在患儿体内感染和复制情况,在MP诊断中有广阔的前景<sup>[14]</sup>。不同类型的肺炎支原体PCR检测靶基因包括MP-DNA, P1粘附蛋白, ATP酶操纵子基因和tuf基因及重复序列repMpl等<sup>[15]</sup>。

Michelow等<sup>[14]</sup>报道鼻咽部和口咽部的标本经PCR检测MP是同等有效的。但Räty等<sup>[15]</sup>发现在血清学证明有MP感染的患者中,痰标本FQ-PCR检测

优于鼻咽部吸取物和咽拭子。然而目前在其他试验中并未证明最适合用于PCR检测的标本的结论<sup>[16]</sup>。

虽然痰标本相对于BALF而言更易获得,但是儿童MP感染早期干咳分泌物少,且儿童配合度不好,不易取到合适的痰标本;此外健康人群也可能携带MP<sup>[7,17]</sup>而导致上气道标本PCR容易出现假阳性。RMPP患儿往往因为呼吸衰竭或者肺不张需要行气管插管或纤维支气管镜灌洗,便于获取BALF标本。此外,由于本研究收集BALF是按体重标准灌洗,回收量严格控制,可以像血及尿标本一样进行靶基因个体定量监测,为疾病的转归判断以及药物疗效判断打下了基础,因而BALF作为FQ-PCR检测的标本是很有临床意义的。

本组资料采用FQ-PCR检测MPP、非MPP患者及支气管异物患儿BALF中MP-DNA的拷贝量,并与血清学检查做对照发现:与双份血清MP抗体4倍升高确诊标准相比,灵敏度是94%,检测特异度是100%,阳性预测值是100%,阴性预测值是93%,与MP确诊标准的符合率是97%。而与单份血清MP抗体阳性率相比较,FQ-PCR检测灵敏度明显高于单份血清;且假阳性率为0,特异度好。说明用BALF作为检测标本的FQ-PCR具有很高的准确性。同时本组资料还显示,病程早期(1~7d)患者的首份血清MP抗体阳性率明显低于FQ-PCR检测MP-DNA阳性率;RMPP患儿FQ-PCR检测MP-DNA阳性率显著高于首份血清MP抗体检测。说明FQ-PCR法相对于单份血清MP抗体检测,阳性出现更早,并且在重症患儿中检测率更高。

Nilsson等<sup>[18]</sup>发现MPP患者病情轻重与MP拷贝数呈正相关,与MP表型无关。本组资料也显示,MPP患者的FQ-PCR检测基因拷贝数与病情轻重有关,RMPP组基因拷贝数显著高于普通MPP组。另外,本组资料还显示,RMPP患者的FQ-PCR检测基因拷贝数与CRP呈正比,但与患者白细胞总数无明显相关,与既往研究一致<sup>[19]</sup>,因此,本研究认为FQ-PCR检测MP-DNA基因的拷贝数与病情轻重及炎症指标CRP相关,可以作为评价RMPP的转归以及判断药物疗效的指标。

#### [参 考 文 献]

[1] Yang E, Altes T, Anupindi SA. Early Mycoplasma pneumoniae infection presenting as multiple pulmonary masses: an unusual presentation in a child[J]. *Pediatr Radiol*, 2008, 38(4): 477-480.  
[2] Nagalingam NA, Adesiyun AA, Swanston WH, Bartholomew M. Prevalence of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae in pneumonia patients in four major hospitals in Trinidad[J]. *New*

*Microbiol*, 2004, 27(4): 345-351.  
[3] Gaillat J, Flahault A, de Barbeyrac B, Orfila J, Portier H, Ducroix JP, et al. Community epidemiology of Chlamydia and Mycoplasma pneumoniae in LRTI in France over 29 months[J]. *Eur J Epidemiol*, 2005, 20(7): 643-651.  
[4] Tamura A, Matsubara K, Tanaka T, Nigami H, Yura K, Fukaya T. Methylprednisolone pulse therapy for refractory Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children[J]. *J Infect*, 2008, 57(3): 223-228.  
[5] Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narita M, Izumikawa K, Mat-suoka M, et al. Genotyping analysis of Mycoplasma pneumoniae clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of M. pneumoniae clinical strains[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 4): 469-475.  
[6] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1180.  
[7] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(试行)(下)[J]. *中华儿科杂志*, 2007, 45(3): 225-226.  
[8] 曹兰芳. 儿童难治性肺炎支原体肺炎的诊治现状和进展[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(1): 94-97.  
[9] Verloet LA, Marguet C, Camargos PA. Infection by Mycoplasma pneumoniae and its importance as an etiological agent in childhood community-acquired pneumonias[J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(5): 507-514.  
[10] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection of children[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13(6): 708-710.  
[11] Matas Andreu L, Molinos Abós S, Fernández Rivas G, González Soler V, Ausina Ruiz V. Serologic diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infections[J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2006, 24(Suppl 1): 19-23.  
[12] Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses[J]. *J Clin Microbiol*. 2007, 45(11): 3631-3640.  
[13] 佟青. 肺炎支原体三种检测方法的评价[J]. *实用医技杂志*, 2002, 9(1): 47-48.  
[14] Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Duffy LB, McCracken GH, Hardy RD. Diagnostic utility and clinical significance of naso-and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose Mycoplasma pneumoniae infection in children with community-acquired pneumonia[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(7): 3339-3341.  
[15] 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.  
[16] Stelmach I, Podsiadłowicz-Borzecka M, Grzelewski T, Majak P, Stelmach W, Jerzyńska J, et al. Humoral and cellular immunity in children with Mycoplasma pneumoniae infection: a 1-year prospective study[J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(10): 1246-1250.  
[17] Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control[J]. *J Med Microbiol*, 2006, 55(Pt 2): 149-155.  
[18] Nilsson AC, Björkman P, Welinder-Olsson C, Widell A, Persson K. Clinical severity of Mycoplasma pneumoniae (MP) infection is associated with bacterial load in oropharyngeal secretions but not with MP genotype[J]. *BMC Infect Dis*, 2010, 10: 39.  
[19] 韩晓华, 刘立云, 敬宏, 刘铁英, 赵永强, 尚云晓, 等. 小儿肺炎支原体肺炎合并全身炎症反应综合征时炎症相关因素的变化及临床意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(4): 347-350.

(本文编辑:王霞)