

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.12.013

❖ 临床研究 ❖

社区获得性肺炎患儿肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测情况及特点分析

侯萍萍, 黄小红, 温志园

(梅州市人民医院儿内科, 广东 梅州 514031)

【摘要】目的: 探讨社区获得性肺炎(CAP)患儿肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测病原体分布情况,并进一步分析病原体分布特点。**方法:** 选取240例行纤维支气管镜肺泡灌洗的CAP患儿作为研究对象,所有患儿均进行痰细菌培养、肺泡灌洗液细菌培养及肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测。比较上述三种检测方法结果的阳性率,并按照年龄将患儿分为<2岁、2~5岁、>5岁年龄组,分析肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测病原体在各组的分布特征。**结果:** 240例患儿中,痰细菌培养结果阳性44例,阳性率18.34%;肺泡灌洗液细菌培养结果阳性者19例,阳性率7.93%;肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测结果阳性140例,阳性率58.33%。肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测的阳性率高于肺泡灌洗液细菌培养及痰细菌培养($P < 0.05$)。<2岁、2~5岁、>5岁年龄组患儿的病原体感染率分别为44.00%、61.27%及64.58%。140例肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测阳性患儿共检测病原体162株,排名前三的是肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌;其中,肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌占比均以2~5岁年龄组感染率最高。**结论:** 肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测对CAP患儿诊疗具有重要价值,尤其是可准确检测肺部常见细菌、肺炎支原体感染情况。

【关键词】 社区获得性肺炎; 患儿; 肺泡灌洗液; 呼吸道病原体核酸十三项检测; 病原体

【中图分类号】 R446.5 **【文献标志码】** A

Analysis of 13 nucleic acid tests and characteristics of respiratory pathogen in alveolar lavage fluid of children with community-acquired pneumonia

HOU Ping-ping, HUANG Xiao-hong, WEN Zhi-yuan

(Department of Pediatric Medicine, Meizhou People's Hospital, Meizhou 514031, Guangdong, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the distribution of respiratory tract pathogen nucleic acid 13 test in alveolar lavage fluid of children with community-acquired pneumonia (CAP), and to further analyze the characteristics of pathogen distribution. **Methods:** A total of 240 children with CAP were selected as the research subjects. All children underwent sputum bacterial culture, alveolar lavage fluid bacterial culture and 13 tests of respiratory tract pathogen nucleic acid in alveolar lavage fluid. The positive rates of the above three detection methods were compared, and divide the children into three groups according to their age: <2 years old group, 2~5 years old group, and >5 years old group. The distribution characteristics of pathogens detected by 13 nucleic acids of respiratory pathogens in bronchoalveolar lavage fluid were analyzed. **Results:** Among the 240 children, 44 cases were positive in sputum bacterial culture, with a positive rate of 18.34%, 19 cases were positive in alveolar lavage fluid bacterial culture, with a positive rate of 7.93%, and 140 cases were positive in alveolar lavage fluid respiratory pathogen nucleic acid 13 test results, with a positive rate of 58.33%. The positive rate of respiratory pathogen nucleic acid 13 test in bronchoalveolar lavage fluid was higher than that in bronchoalveolar lavage fluid bacterial culture and sputum bacterial culture ($P < 0.001$). The pathogen infection rates of children aged <2 years, 2~5 years and >5 years were 44.00%, 61.27% and 64.58%, respectively. A total of 162 strains of pathogens were detected in 140 children with positive respiratory tract pathogen nucleic acid 13 test in bronchoalveolar lavage fluid, and the top three were Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Haemophilus influenzae. Among them, the infection rates of Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Haemophilus influenzae were the highest in the 2~5 years old group. **Conclusion:** The detection of respiratory tract pathogen nucleic acid 13 test in alveolar lavage fluid is of great value in the diagnosis and treatment of children with CAP, and especially in accurately detecting common bacterial and Mycoplasma pneumoniae infections in the lungs.

【Key words】 Community-acquired pneumonia; Children; Bronchoalveolar lavage fluid; 13 detections of respiratory pathogen nucleic acid; Pathogens

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金项目(A2016491)

作者简介: 侯萍萍(1980-),女,副主任医师。E-mail:13622970582@163.com

社区获得性肺炎 (community acquired pneumonia, CAP) 是指在医院外罹患的肺实质炎症, 是儿科最常见疾病, 也是 5 岁以下儿童最主要死因之一^[1-2]。儿童 CAP 病原体种类繁多, 临床表现隐匿, 加上儿童气道阻力大、咳嗽反射弱, 分泌物排出困难使得临床治疗较为困难^[3]。早期明确病原学可及时给予针对性靶向抗感染治疗, 对提高儿童 CAP 治疗效果非常关键。目前临床病原体检测主要有细菌培养及血清学试验, 但上述方法操作繁琐, 耗时较长, 且检测阳性率仅为 30% ~ 40%^[4-5], 敏感度和特异度均不高。因此, 临床亟需一种高效、敏感、准确、快速的病原学检测方法。近年来, 随着分子诊断技术的发展, 其在病原学检测中得到广泛应用。呼吸道病原体核酸十三项检测即是利用分子诊断方法 (生物芯片技术) 对呼吸道常见的 13 种病原微生物进行核酸检测, 以协助临床精准诊断、精准治疗的方法。既往报道显示^[6], 呼吸道病原体核酸十三项检测在成人 CAP 肺泡灌洗液检测中具有特异度高、敏感度高、灵敏度高的特点, 但在儿童 CAP 肺泡灌洗液检测中的报道较少。因此, 本研究对 CAP 患儿进行肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测, 并进一步分析其与细菌培养的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2022 年 1 月至 2023 年 2 月梅州市人民医院收治并行纤维支气管镜肺泡灌洗的 240 例 CAP 患儿为研究对象。纳入标准: (1) 符合 CAP 相关诊断^[7]; (2) 所有病例均行胸部 CT 检查; (3) 年龄 29 d ~ 14 岁; (4) 经纤维支气管镜医师评估, 计划行纤维支气管镜肺泡灌洗术。排除标准: (1) 标本不符合要求; (2) 新生儿; (3) 医院获得性或非感染性肺炎患儿。240 例患儿中, 男性 122 例, 女性 118 例, 年龄 (6.78 ± 2.23) 岁。本研究通过医院伦理委员会审批, 所有研究对象及家属均知情同意。

1.2 检测方法

1.2.1 痰细菌培养 患儿在进行抗生素治疗前采集痰标本。采取前 30 min 禁食、水, 用生理盐水漱口。常规消毒后, 护士持连接负压装置的一次性吸痰器经患儿口腔进行深部吸痰, 收集痰液 1 ~ 2 mL, 及时送至微生物室检测。痰培养合格标本判断标准为: 每低倍镜视野上皮细胞 < 10 个, 白细胞 > 25 个。将合格痰液标本接种于培养基, 置于培养箱孵育 (35 °C, 5% CO₂), 根据培养基上的菌落特点、革兰染色及镜下形态等, 对致病菌进行鉴定及药敏试验, 具体操作及结果判读依据微生物检验标准。

1.2.2 肺泡灌洗液标本获取 由纤维支气管镜医师在护士配合下完成纤维支气管镜操作。完善内镜检查前进行局麻或全麻, 根据患儿年龄及体重选择合适内镜, 经鼻将支气管镜送至病变支气管内, 经支气管镜工作孔注入 0.9% 生理盐水, 注入量 1 mL/kg, 每次 < 10 mL, 注入 3 ~ 5 次。采用负压吸引器吸取支气管肺泡灌洗液, 弃去第 1 次肺泡灌洗液, 将之后吸取的肺泡灌洗液分别用作细菌培养及呼吸道病原体核酸十三项检测。

1.2.3 肺泡灌洗液细菌培养 将获得的肺泡灌洗液标本及时送至微生物室, 将标本接种于培养基, 置于培养箱孵育 (35 °C, 5% CO₂), 根据培养基上的菌落特点、革兰染色及镜下形态等, 对致病菌进行鉴定及药敏试验, 具体操作及结果判读依据微生物检验标准操作程序。

1.2.4 肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测

采用核酸提取试剂提取患儿肺泡灌洗液标本中 DNA 和 RNA (提取步骤按照试剂盒说明进行), 将提取到核酸与十三项呼吸道病原体核酸检测试剂盒扩增试剂混合后 (按照扩增试剂盒说明进行) 进行聚合酶链反应扩增, 将扩增后样本进行杂交检测。使用 Luminex Magpix 液相芯片检测平台, 通过聚合酶链反应仪进行杂交显色, 并完成检测。检测内容包括 13 种临床常见呼吸道病原体 (肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、大肠杆菌、结核分枝杆菌)。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计学分析。计数资料采用 [n (%)] 形式描述, 组间比较行独立样本 χ^2 检验/Fisher 精确概率法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 痰细菌培养

240 例痰液标本中, 细菌培养结果阳性 44 例, 阳性率 18.34% (44/240)。各病原检测率均不高, 其中以流感嗜血杆菌 (9.17%) 及肺炎链球菌 (5.83%) 为主。见表 1。

2.2 肺泡灌洗液细菌培养结果

240 例肺泡灌洗液标本中, 细菌培养结果阳性者 19 例, 阳性率 7.93%。各病原菌检测阳性率较低, 其中感染病原体以肺炎链球菌 (3.75%) 及流感嗜血杆菌 (2.08%) 为主, 且检测出 1 例烟曲霉复合菌。见表 2。

表1 痰细菌培养结果[$n(\%)$]

病原体	阳性	χ^2 值	P 值
流感嗜血杆菌	22(9.17)		
肺炎链球菌	14(5.83)		
金黄色葡萄球菌	7(2.92)		
肺炎克雷伯菌	1(0.42)		
总计	44(18.34)	23.438	<0.001

表2 肺泡灌洗液细菌培养结果[$n(\%)$]

病原体	阳性	χ^2 值	P 值
肺炎链球菌	9(3.75)		
流感嗜血杆菌	5(2.08)		
金黄色葡萄球菌	1(0.42)		
肺炎克雷伯菌	1(0.42)		
鲍曼不动杆菌	1(0.42)		
大肠埃希菌	1(0.42)		
烟曲霉复合菌	1(0.42)		
总计	19(7.93)	-	0.004

“-”为 Fisher 确切概率法。

2.3 肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测

240 例肺泡灌洗液标本中,呼吸道病原体核酸十三项检测结果阳性者 140 例(58.33%),140 例阳性患儿共检测出病原体 162 株。其中,革兰氏阳性菌 84 株,其中,肺炎链球菌 78 例、金黄色葡萄球菌 6 例、耐甲氧西林葡萄球菌 0 例、以肺炎链球菌为主,占比为 48.15%(78/162);革兰氏阴性菌 34 株,其中,肺炎克雷伯菌 2 例、铜绿假单胞菌 4 例、鲍曼不动杆菌 1 例、嗜麦芽窄食单胞菌 5 例、流感嗜血杆菌 19 例、嗜肺军团菌 0 例、大肠埃希氏菌 2 例,结核分枝杆菌复合菌 1 例,以流感嗜血杆菌为主,占比为 11.72%(19/162);支原体衣原体 44 株,以肺炎支原体为主,占比为 26.54%(43/162)。见表 3。

表3 肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测结果

病原体	株数	占比(%)	单一感染		混合感染	
			株数	占比(%)	株数	占比(%)
肺炎链球菌	78	32.50	61	78.21	17	21.79
金黄色葡萄球菌	6	2.50	3	50.00	3	50.00
耐甲氧西林葡萄球菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
肺炎克雷伯菌	2	0.83	0	0.00	2	100.00
铜绿假单胞菌	4	1.67	1	25.00	3	75.00
鲍曼不动杆菌	1	0.42	1	100.00	0	0.00
嗜麦芽窄食单胞菌	5	2.08	1	20.00	4	80.00
流感嗜血杆菌	19	7.92	11	57.89	8	42.11
肺炎支原体	43	17.92	38	88.37	5	11.63
肺炎衣原体	1	0.42	1	100.00	0	0.00
嗜肺军团菌	0	0.00	0	0.00	0	0.00
大肠埃希氏菌	2	0.83	1	50.00	1	50.00
结核分枝杆菌复合菌	1	0.42	0	0.00	1	100.00
总计	162	100	118	72.84	44	27.16

2.4 三种检测方式阳性率比较

240 例患者中,痰细菌培养检出阳性 44 例,阴性 196 例,阳性率 18.34%(44/240);肺泡灌洗液细菌培养检出阳性 19 例,阴性 221 例,阳性率 7.92%(19/240);肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检出阳性 140 例,阴性 100 例,阳性率 58.33%(140/240)。肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测的阳性率高于痰细菌培养及肺泡灌洗液细菌培养($P < 0.05$)。见表 4。考虑到细菌培养不能检测出肺炎支原体和衣原体,去掉肺炎支原体及衣原体的单一阳性病例 39 例,痰细菌培养总例数 201 例,阳性和阴性例数分别为 44 例和 157 例;肺泡灌洗液细菌培养检测总例数 201 例,阳性和阴性例数分别为 19 例和 182 例。此时肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测的阳性率仍高于痰细菌培养及肺泡灌洗液细菌培养($P < 0.05$)。见表 5。

表4 三种检测阳性率比较[$n(\%)$]

检测方式	阳性	χ^2 值	P 值
痰细菌培养($n=240$)	44(18.34)		
肺泡灌洗液细菌培养($n=240$)	19(7.92)	167.955	<0.001
肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测($n=240$)	140(58.33)		

表5 去掉肺炎支原体及衣原体单一阳性病例后三种检测阳性率比较[$n(\%)$]

检测方式	阳性	χ^2 值	P 值
痰细菌培养($n=201$)	44(21.89)		
肺泡灌洗液细菌培养($n=201$)	19(9.45)	133.690	<0.001
肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测($n=240$)	140(58.33)		

2.5 不同年龄组肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测病原体分布情况比较

<2 岁、2~5 岁、>5 岁年龄组患儿的病原体感染率分别为 44.00%(22/50)、61.27%(87/142)及 64.58%(31/48)。<2 岁年龄组感染率最低,低于 2~5 岁($\chi^2 = 4.493, P = 0.034$)及 >5 岁组($\chi^2 = 4.178, P = 0.041$),2~5 岁组及 >5 岁组比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.168, P = 0.682$)。

140 例阳性患儿共检测病原体 162 株,排名前三的是肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌;其中 <2 岁年龄组感染以肺炎链球菌为主,占比为 53.85%(14/24);2~5 岁年龄组感染以肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌为主,占比分别为 52.94%(54/102)、21.57%(22/102)、12.75%(13/102);>5 岁年龄组以肺炎支原体及肺炎链球菌为主,占比分别为 50.00%(18/36)、27.78%(10/36)。见表 6。

表 6 不同年龄段肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测病原体分布情况[n(%)]

病原体	株数	<2 岁组		2~5 岁组		>5 岁组	
		株数	占比(%)	株数	占比(%)	株数	占比(%)
肺炎链球菌	78	14	58.33	54	52.94	10	27.78
金黄色葡萄球菌	6	2	8.33	4	3.92	0	0.00
肺炎克雷伯菌	2	1	4.17	1	0.98	0	0.00
铜绿假单胞菌	4	0	0.00	4	3.92	0	0.00
鲍曼不动杆菌	1	1	4.17	0	0.00	0	0.00
嗜麦芽窄食单胞菌	5	0	0.00	3	2.94	2	5.56
流感嗜血杆菌	19	1	4.17	13	12.75	5	13.88
肺炎支原体	43	3	12.50	22	21.57	18	50.00
肺炎衣原体	1	0	0.00	1	0.98	0	0.00
大肠埃希氏菌	2	2	8.33	0	0.00	0	0.00
结核分枝杆菌复合群	1	0	0.00	0	0.00	1	2.78
合计	162	24	100	102	100	36	100

3 讨论

儿童因自身免疫力低下及呼吸系统发育不完善,是呼吸系统疾病高发人群,CAP 是儿童占比最高的疾病,也是全球儿童发病率和死亡率最高的疾病^[8]。引起儿童 CAP 的病原体十分复杂,加上不同地区、不同年龄段及不同季节病原体构成比亦有显著差异^[9]。因此,为实施精准靶向治疗,提高儿童 CAP 治愈率,需对病原体进行检测分析。随着纤维支气管镜的成熟应用,肺泡灌洗液作为检测标本被广泛应用。研究^[10]显示,肺泡灌洗液直接取材于病变部位,可避免上呼吸道正常菌群污染,能更准确反映肺部病原学。本研究中,CAP 患儿肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测阳性率高于痰培养和肺泡灌洗液细菌培养,表明肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测可提高 CAP 患儿病原体检测阳性率,对临床诊疗具有较高价值。

一直以来,痰液作为最常规且最易获得的标本在临床上广泛使用,但痰液标本不仅在采集时易被污染,在培养过程中也易被污染。同时,CAP 患儿年龄小,配合度低,不愿配合深部吸痰取得标本。而标本获取是检测病原体准确性的关键^[11]。相较于痰液,肺泡灌洗液是通过支气管镜取得,直接来源于病灶,不易受上气道正常菌群干扰,样本质量更高^[12]。因此,肺泡灌洗液标本可准确反映呼吸系统疾病病原体情况。李小梦等^[13]研究表明,对痰培养阴性的原发性肺隐球菌病患者,肺泡灌洗液培养是其有效诊断手段。本研究显示,呼吸道病原体核酸十三项检测阳性率高于痰培养及肺泡灌洗液细菌培养,由此表明,肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测可作为 CAP 患儿病原体诊断的最适方案。本

研究中,肺泡灌洗液细菌培养阳性率低于既往结果,原因可能与本研究肺泡灌洗液标本是在经验性治疗 3~4 d 后取得有关,也可能与本研究中肺炎支原体感染占比较高有关,而细菌培养仅能诊断细菌感染,对支原体感染无法诊断。虽然痰培养和肺泡灌洗液细菌培养的阳性率不及肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测,但二者能诊断出十三项之外的细菌,如本研究肺泡灌洗液细菌培养液诊断出 1 例烟曲霉复合菌。一旦诊断出此种不常见呼吸道细菌,经过药敏试验可指导临床用药,提高临床治愈率^[12,14]。

导致 CAP 的病原体较复杂,临床上易存在单一感染与混合感染的情况,但通过传统痰液及肺泡灌洗液细菌培养较难发现混合感染而准确诊断。本研究中,肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测可同时检出两种或多种病原体。其中,阳性率最高的肺炎链球菌和肺炎支原体多以单一感染存在,流感嗜血杆菌单一感染与混合感染比例接近;而肺炎克雷伯菌、嗜麦芽窄食单胞、铜绿假单胞菌多以混合感染的形式存在。因此,肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测是 CAP 患儿有效诊断手段,尤其是有助于临床明确混合感染病原体,避免经验性用药,减少不必要的抗生素联用。

有研究对 195 个国家下呼吸道感染数据进行分析,2016 年全球死于肺炎的儿童有 100 万左右,其中,<5 岁儿童占比为 15% 左右^[15]。因此,本研究将 5 岁作为一个临界点。分析不同年龄组患儿肺泡灌洗液呼吸道病原体核酸十三项检测病原体分布情况显示:<2 岁年龄组感染率最低,低于 2~5 岁及 >5 岁组。原因可能是小婴儿感染多以病毒感染为主,而呼吸道病原体核酸十三项主要包含下呼吸道常见的 8 种病原菌及 5 种其他病原体,不包含病毒。本研究还显示,排名前三的病原体是肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌;其中,肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌占比均以 2~5 岁年龄组最高。<2 岁年龄组感染以肺炎链球菌为主;2~5 岁年龄组感染以肺炎链球菌、肺炎支原体及流感嗜血杆菌为主;>5 岁年龄组以肺炎支原体及肺炎链球菌为主。由此表明,肺炎链球菌是导致儿童 CAP 最主要原因。近年来流行病学研究^[16-17]显示,肺炎支原体已逐步成为儿童 CAP 的重要致病菌,其检出率为 20%~40%,本研究检出 43 株,检出率为 26.54% (43/162)。本研究中,>5 岁是肺炎支原体占比最高人群,亦与上述结果一致。

(下转第 1655 页)