

血液病患者血液中肺炎支原体和发酵支原体的检出

刘欢乐, 胡旭东, 周丽萍, 谢海啸, 王霄霞

摘要: 目的 探讨血液病患者血液中肺炎支原体和发酵支原体的分离检出。方法 分别对101例确诊为血液病患者和65名非血液病对照者的血液标本进行肺炎和发酵支原体分离培养和聚合酶链反应鉴定,阳性标本进一步经电镜确认。结果 101例血液病患者血液标本中共计检出肺炎和发酵支原体17例(16.8%),其中肺炎支原体9例(8.9%),发酵支原体8例(7.9%),体检对照组血液中未检出肺炎和发酵支原体(0.0%),组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 血液病患者血液中肺炎支原体和发酵支原体的检出显著高于非血液病对照组,确切机制有待进一步探讨。

关键词: 肺炎支原体; 发酵支原体; 血液病; 分离培养; 聚合酶链反应

中图分类号: R552

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)01-0043-03

Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma fermentans* from the blood of hematopathy patients LIU Huan-le, HU Xu-dong, ZHOU Li-ping, XIE Hai-xiao, WANG Xiao-xia. Department of Laboratory Science, The First Affiliate Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Corresponding author: ZHOU Li-ping, Email: zlpzlp194919492@163.com

Abstract: Objective To discuss the detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma fermentans* from the blood of hematopathy patients. **Methods** The blood samples were collected from 101 hematopathy patients and 65 normal volunteers (control group) to isolate *M.pneumoniae* and *M.fermentans* in *Mycoplasma* special medium and identified by PCR, and the positive samples were confirmed by electron microscope. **Results** Seventeen strains (16.8%) of *Mycoplasma* were detected from 101 blood samples of hematopathy patients, including 9 strains of *M.pneumoniae* and 8 strains of *M.fermentans*, and no *M.pneumoniae* and *M.fermentans* were detected from the blood samples of control group. The difference was statistical significant ($P < 0.01$). **Conclusions** The detection rate of *M.pneumoniae* and *M.fermentans* from the blood of hematopathy patients was significant higher than the control group of non-hematopathy patients. The exact mechanism should be explored.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; *Mycoplasma fermentans*; hematopathy; isolation and culture; polymerase chain reaction

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)除引起原发性非典型性肺炎、支气管炎等呼吸道疾病外,还可引起其他多系统、多器官的肺外并发症,如免疫性溶血性贫血、原发性血小板减少、心肌炎及肾炎等^[1]。Tsai等^[2]1995年通过发酵支原体(*Mycoplasma fermentans*, Mf)与鼠胚细胞(C3H)共同培养,提示Mf具有致癌潜能,近年来的研究进一步证实穿通支原体和发酵支原体的感染与肿瘤发生相关^[3]。1986年华人罗氏(Lo)首次报道从AIDS患者尸体中分离出无名株Mf(i)。从血液病患者血液中分离肺炎支原体国外偶见报道。本研究报道对101例确诊血液病患者的血液进行支原体分离培养、聚合酶链反应(PCR)、电镜观察,以及肺炎支原体分离培养阳性病例进行抗体(IgG)检测。报告如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料及标本来源

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(399088)

作者单位:浙江省温州医学院第一附属医院,浙江温州 325000

作者简介:刘欢乐,浙江省人,医学硕士,主要从事病原微生物学研究工作

通信作者:周丽萍,Email:zlpzlp194919492@163.com

收稿日期:2008-06-30

月在浙江温州医学院附属第一医院就治的经骨髓MICM(细胞形态学、免疫学、遗传学和分子生物学)确定为血液病,X线胸片检查心肺未见异常患者101例。其中,急性髓细胞白血病(AML)32例,非霍奇金淋巴瘤(NHL)31例,原发性血小板减少性紫癜(ITP)10例,急性淋巴细胞白血病(ALL)8例,慢性髓细胞白血病(CML)4例,再生障碍性贫血(AA)6例,慢性淋巴白血病(CLL)2例,骨髓增生异常综合征(MDS)1例,多发性骨髓瘤(MM)3例,巨幼细胞性贫血(MA)1例以及真性红细胞增多症(PV)1例。对照组65名为本院健康体检职工。取血液标本进行支原体的分离培养及鉴定。

1.2 标准菌株和培养基 已知对照菌株:穿通支原体(MPe, GTU ATCC55252)、发酵支原体(Mf, ATCC19989)、肺炎支原体(Mp, ATCC15531),解脲支原体(Uu, ATCC27618)和人型支原体(Mh, ATCC 23114)均分别由东南大学医学院流行病学教研室赵季文教授惠赠。SP4、Uu和Mh液体培养基的制备分别参考文献[4,5]。

1.3 试剂与仪器 肺炎支原体和发酵支原体nPCR试剂购自江苏无锡遗传研究所。Mp抗体试剂购自上

海晶美试剂公司,RMC-PT超薄切片机;H-7500透射电镜。

1.4 血液标本的处理 血液标本采自未经抗生素治疗的研究对象6:00时的空腹静脉血,不抗凝或抗凝(但不能加肝素抗凝,以免导致PCR假阴性),采血后2 h内将标本离心5 min(2500 r/min),分别抽取上层血清或血浆0.2 ml接种于SP4、Uu和Mh液体培养基^[4]。取淋巴细胞层置于电镜检查瓶的底部,将电镜液缓缓加于细胞层的上面。置4℃冰箱保存,以备电镜检查^[4]。

1.5 分离培养及其菌落鉴定 取确诊但未经治疗的血液病患者血清接种SP4和Uu和Mh液体培养基。对照组血清接种SP4液体培养基,置CO₂ 37℃ 4~5 d,发现液体澄清,变黄,过滤除菌后分别取0.1 ml转种支原体固体培养基和普通血平板(排除L型细菌),置CO₂ 37℃ 24~72 h,置低倍镜下观察,发现油煎蛋样菌落,并与标准菌株对照,初步鉴定菌株置-20℃保存备用。

1.6 PCR分析 取经生化试验初筛的肺炎和发酵支原体菌株分别进行PCR检测,确认为检出特异的肺炎和发酵支原体的DNA。

1.7 肺炎支原体抗体检测 严格按照试剂操作说明书操作。

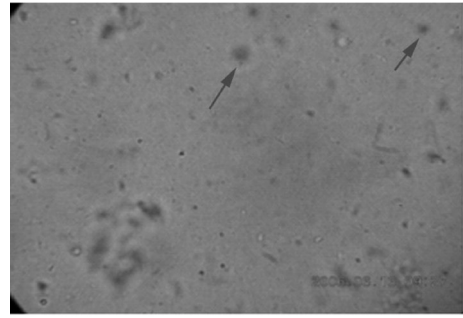
1.8 电镜观察 取经PCR确定为肺炎支原体的纯培养物和血液标本,电镜下观察。

1.9 统计学处理 血液病组和非血液病组支原体的分离率组间比较采用χ²检验以及χ²校正检验。

2 结果

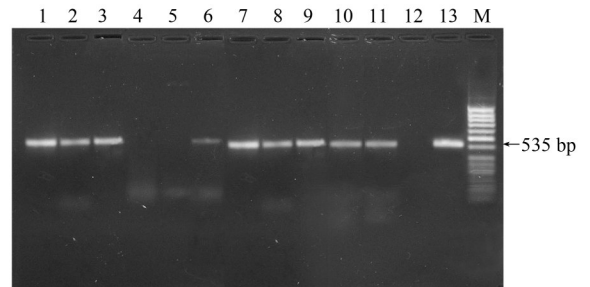
2.1 分离培养结果 101例血液病患者血液标本中有20例分离培养阳性:血液病患者血液标本接种改良SP4支原体液体培养基颜色变黄后,接种支原体固体培养基,低倍镜下可见“油煎蛋样”菌落,见图1。经生化反应初筛后,采用PCR进一步验证。

2.2 PCR结果 取经SP4液体培养阳性,生化初筛,将符合肺炎支原体和发酵支原体生化反应的培养物分别进行肺炎支原体和发酵支原体巢式PCR扩增。101例血液病患者的血液中,9例在535 bp区带阳性,与肺炎支原体阳性对照一致,为肺炎支原体,见图2,检出肺炎支原体阳性的分别是AML 4例,ITP 2例,ALL 2例,NHL 1例,总共9例。8例在272 bp区带阳性,与发酵支原体阳性对照一致,为发酵支原体,见图3,检出发酵支原体阳性的分别是NHL 3例,CML 1例,AA 2例,MM 1例以及PV 1例,总共8例。从血液病患者血液中未同时检测出肺炎和发酵2种



箭头所示为支原体“油煎蛋样”菌落
图1 固体培养基支原体菌落图

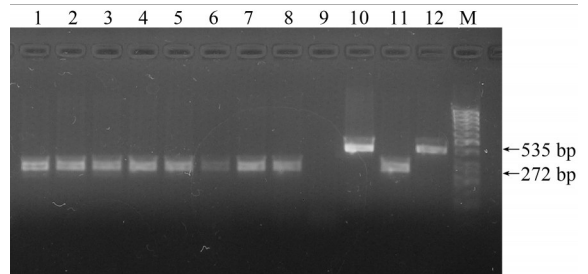
Figure1 Colony of *Mycoplasma* in solid medium



M:DNA分子标准,1~11取自血液病患者血液标本,其中4和5为阴性,其余均为阳性培养物在535 bp区带阳性,与13肺炎支原体阳性对照一致,12为阴性对照,13为阳性对照。在多个标本的肺炎支原体扩增产物区带前都出现了不同程度的非特异性扩增产物。

图2 分离自血液病患者血液阳性培养物肺炎支原体PCR扩增产物电泳图

Figure 2 Electropherogram of PCR amplification products of *Mycoplasma pneumoniae*



M:DNA分子标准,1~8取自血液病患者血液标本,在272 bp区带阳性,与11发酵支原体阳性对照一致,9为阴性对照,11为发酵支原体阳性对照,10和12为肺炎支原体阳性对照,535 bp区带阳性。

图3 分离自血液病患者血液阳性培养物发酵支原体PCR扩增产物电泳图

Figure 3 Electropherogram of PCR amplification products of *Mycoplasma fermentans*

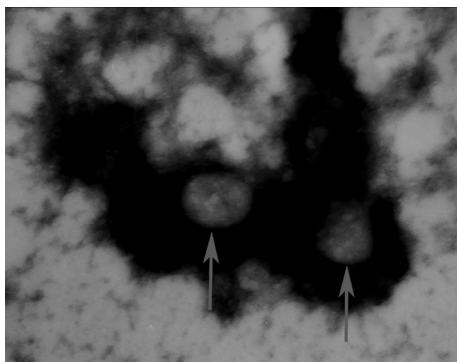
支原体。血液病患者血液中肺炎支原体和发酵支原体的分离检出结果见表1。65名对照组未检出肺炎和发酵支原体,组间差异有统计学意义(P<0.01)。101例确诊血液病患者的血液中未检出Uu、Mh和Mpe。2.3 Mp-IgG抗体检测 从101例血液病患者中共检出Mp-IgG抗体阳性12例,其中,与分离培养阳性以及PCR验证吻合11例(阳性符合率为91.7%),仅1例Mp-IgG抗体阳性分离培养为阴性。非血液病体检对照组20名均为阴性。两组间差异有统计学意义(P<0.05)。

表1 血液病患者血液Mp和Mf检出结果

Table 1 Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma fermentans* from blood of hematopathy patients

病种	病例数	Mp 检出	Mf 检出	Mp 和 Mf	总检出	
		例数 (%)	例数 (%)	同时检出例数 (%)	例数	构成比 (%)
AML	32	4	0	0	4	12.0
NHL	31	1	3	0	4	13.0
ALL	8	2	0	0	2	25.0
ITP	10	2	0	0	2	20.0
CML	4	0	1	0	1	25.0
AA	6	0	2	0	2	33.0
CLL	2	0	0	0	0	0.0
MDS	1	0	0	0	0	0.0
MM	3	0	1	0	1	33.0
MA	1	0	0	0	0	0.0
PV	1	0	1	0	1	100.0
合计	101	9	8	0	17	17.0

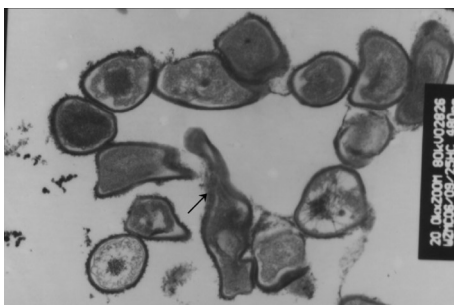
2.4 电镜观察结果 取经生化和PCR检测阳性的血液病患者的血液在电镜下观察,证实3层膜结构的肺炎支原体颗粒图,见图4、5。



阳性纯培养物负染电镜下见球形3层膜Mp结构,箭头所示为阳性纯培养物负染后所见3层膜状支原体颗粒。(×50 000)

图4 Mp阳性纯培养物负染电镜图

Figure 4 Negative staining electronmicrograph of pure *Mycoplasma pneumoniae* positive culture



原发性血小板减少症血液超薄切片电镜图,见葫芦形3层膜Mp结构,箭头所示。(×50 000)

图5 血液超薄切片电镜图

Figure 5 Electronmicrograph of extra thin section of blood

3 讨论

笔者于2006年曾报道从肿瘤患者的血液和肿瘤组织中分离检出穿通支原体。2007年报道从IgA

肾病患者的血液中分离检出穿通支原体^[4,5]。本文再次报道从血液病患者的血液分离检出肺炎支原体和发酵支原体,并与非血液病对照人群相比较,组间差异有统计学意义,以及在电镜下证实分离培养阳性个体的血液中检出3层膜典型结构的支原体颗粒。从1898年Nocard首先在牛胸腔积液中发现支原体之后,支原体先后被证实与多种疾病的发生相关。1960年肺炎支原体正式被认为是引起原发性非典型肺炎以及支气管炎等呼吸道疾病的病原体,Campbell 1943年首次报道肺外病症^[1]。近年来陆续报道还可引起其他多系统、多器官的肺外并发症,如免疫性溶血性贫血、原发性血小板减少、中枢神经系统损害和肾炎等。本实验从患者血清中分离检出Mp,经PCR扩增验证阳性提示存在肺炎支原体感染,无论是肺炎支原体纯培养物还是阳性血液标本在电镜下均观察到3层膜结构支原体颗粒。其中,Mp-IgG抗体检出与Mp分离培养阳性以及PCR验证吻合11例(阳性符合率为91.7%)。

1986年Lo从AIDS患者尸体中分离出发酵支原体incognitus株,国外对它的致病性展开了广泛的研究,对其发病或毒性机制进行了探讨。Tsai等^[2]1995年通过Mf与鼠胚细胞(C3H)共同培养,提示Mf具有致癌潜能,Kaori等^[6]报道发酵支原体的慢性感染会影响癌症形成的速度。我们在101例血液病患者的血液中检出发酵支原体8例,其中非霍奇金淋巴瘤3例,占37%。

本实验从血液病患者血液中分别检出了肺炎支原体和发酵支原体。但是,至于是由于支原体感染引起血液病,还是血液病免疫低下伴随支原体的机会感染,确切的机制以及意义还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ken B, Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 697-728.
- [2] Tsai S, Wear DJ, Shih JW, et al. Mycoplasmas and onogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation [J]. *Natl Acad Sci*, 1995, 92(22): 10197-10201.
- [3] Su Huang, Li JW, Meng L, et al. *Mycoplasma* infections and different human carcinomas [J]. *World J Gastroentero*, 2001, 7: 266-269.
- [4] Zhou LP, Yu ZX, Lan SH, et al. Isolate culture and being observed by electron microscope of *Mycoplasma penetrans* of blood and adjacent tissues from cancer patients [J]. *National Medical Journal of China*, 2006, 86(26): 1862-1864. (in Chinese)
周丽萍, 余志贤, 蓝升红, 等. 肿瘤患者血液和肿瘤组织中穿通支原体的分离与鉴定及其电镜观察 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(26): 1862-1864.
- [5] Wen XS, Xu FF, Zhou LP, et al. Isolate culture of *Mycoplasma penetrans* in blood of IgA nephropathy patients [J]. *Chinese Journal of Microecology and Immunology*, 2007, 27(5): 477-478. (in Chinese)
温秀姝, 许菲菲, 周丽萍, 等. IgA肾病患者血液中穿通支原体的分离检出 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2007, 27(5): 477-478.
- [6] Kaori I, Zhang SM. Effects of Mycoplasmal LAMPs on receptor responses to steroid hormones in Mammalian cell [J]. *Current Microbiol*, 2001, 43(6): 163-169.