

• 临床检验研究论著 •

实时荧光定量 PCR 检测肺炎支原体 DNA 在小儿肺炎诊断中的应用价值

杨文青, 吕晓丽, 李锐成, 阎琳, 邹菊贤, 张惠中[△]

(第四军医大学唐都医院临床实验与检验、输血科, 陕西西安 710038)

摘要:目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测肺炎支原体(MP)DNA在小儿肺炎诊断中的应用价值。方法 采用FQ-PCR对该院742例儿科住院患儿的血清、痰液、胸腔积液、支气管灌洗液、肺泡灌洗液临床标本进行MP DNA的定量检测。结果 742例患儿中MP DNA检测总阳性率为40.3%(299/742);男、女性患儿MP DNA阳性率的差异无统计学意义($P>0.05$);4~<7岁、7~<10岁、10~<13岁、13~16岁组,MP DNA阳性率均高于0~<4岁组($P<0.05$);不同种类标本的阳性率不同,由高到低依次为支气管灌洗液(96.5%)、肺泡灌洗液(83.7%)、痰液(71.7%)、胸腔积液(38.9%)、血清(6.1%)。结论 4岁及4岁以上儿童易感染肺炎支原体,且随着年龄增长感染率逐渐增高;支气管灌洗液标本的MP DNA阳性率较高;FQ-PCR法检测MP DNA用于肺炎支原体感染的诊断有一定价值。

关键词:支原体, 肺炎; 聚合酶链反应; 儿童**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.015**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)04-0416-03**The value of the diagnosis of pediatric pneumonia by real-time quantitative PCR in detecting DNA of *Pneumonia mycoplasma***Yang Wenqing, Lv Xiaoli, Li Ruicheng, Yan Lin, Zou Juxian, Zhang Huizhong[△](Department of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, Tangdu Hospital of the
Forth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of MP DNA detection in the diagnosis of pediatric pneumonia. **Methods** Real-time quantitative PCR was used to detect MP DNA in serum, sputum, hydrothorax, bronchial lavage fluid and bronchoalveolar lavage fluid from 742 cases of pediatric pneumonia in the hospital. **Results** The rate of MP DNA(+) was 40.3% (299 cases in total); the difference between male infection rate(40.1%) and female infection rate (40.6%) was not statistically significant ($P>0.05$); The infection rates in groups of 4~<7 years old, 7~<10 years old, 10~<13 years old and 13~16 years old were significantly higher than in the group of 0~<4 years old ($P<0.05$); The positive rate differed from different types of samples from high to low were as follows, bronchial lavage fluid (96.5%), bronchoalveolar lavage fluid (83.7%), sputum (71.7%), hydrothorax (38.9%), serum (6.1%). The difference of positive rate between blood samples and other types of samples was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Children older than 3 years old were susceptible to MP, and the infection rate gradually increased with children growing up. The positive rate of alveolar lavage fluid was significantly higher than serum. It indicated that the diagnosis of *Pneumonia mycoplasma* with real-time quantitative PCR has some important application value in clinic.

Key words: Mycoplasma, pneumoniae; polymerase chain reaction; child

肺炎支原体(MP)是引起小儿下呼吸道感染的重要病原体之一^[1], 主要见于儿童和青少年。MP 感染发病率呈上升趋势^[2]。肺炎支原体感染占儿童社区获得性肺炎(CAP)病原体的40%以上^[3], 除呼吸道表现外, 其感染还可导致心肌炎、脑炎、肾炎等多种肺外并发症以及肺坏死^[4], 对儿童健康有较大的危害。及时、准确的病原学诊断对临床诊断、治疗具有重要意义。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对本院儿科742例肺炎患儿进行了MP DNA的检测, 对不同性别、年龄及标本类型的检测结果进行了比较分析, 以探讨其在小儿肺炎诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008年5月至2013年3月本院儿科收治的742例肺炎患儿, 其中男444例, 女298例;入院年龄0~16岁, 平均5.5岁;具体年龄分布为:0~<4岁252例, 4~<7岁187例, 7~<10岁160例, 10~<13岁116例, 13~16岁27例;标本类型分别为:血清378例, 痰液92例, 胸腔积液72例, 支气管

管灌洗液114例, 肺泡灌洗液86例。小儿肺炎诊断标准参照《诸福棠实用儿科学(第7版)》^[5]中的相关诊断标准。

1.2 仪器与试剂 仪器为美国ABI-7500型全自动荧光定量PCR仪;试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。严格按照仪器和试剂说明书进行操作。

1.3 方法

1.3.1 标本收集与处理 血清标本:以4 000 r/min 离心5 min, 分离血清;吸取血清100 μ L置于0.5 mL无菌的EP管内, 向血清中加入等量DNA提取液, 振荡混匀, 100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min, 12 000 r/min 离心5 min, 上清液用于DNA扩增。痰液标本:加入4倍体积的生理盐水, 用1 mL的枪头反复吹打混匀后置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜, 使痰液充分液化;将液化后的痰液以12 000 r/min 离心5 min, 弃上清液, 向沉淀中加入50 μ L DNA提取液, 振荡混匀, 100 $^{\circ}$ C恒温处理10 min, 12 000 r/min 离心5 min, 上清液用于DNA扩增。肺泡灌洗液:12 000 r/min 离心5 min, 弃上清液, 向沉淀中加入50 μ L DNA提取液,

振荡混匀,100 ℃恒温处理 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液用于 DNA 扩增。支气管灌洗液、胸腔积液的处理方法同肺泡灌洗液。

1.3.2 DNA 的扩增 将样品(标本和质控品)上清液 2 μL 或阳性定量参考品 2 μL 加入 DNA 扩增反应管中,以 8 000 r/min 离心数秒,转入仪器样品槽中进行扩增;扩增参数:93 ℃ 120 s 预变性,然后按 93 ℃ 45 s → 55 ℃ 60 s 先进行 10 个循环,不读取荧光计数,作为荧光本底信号,最后按 93 ℃ 30 s → 55 ℃ 45 s 进行 30 个循环,55 ℃时采集荧光。

1.4 结果判断 荧光定量 PCR 的结果以 C_t 值显示。根据阳性定量参考品所得数据进行分析并调节基线,确定起始值和阈值,使标准曲线图达到最佳,线性相关系数 $r > 0.97$ 。结果判定:如果增长曲线不呈 S 型或 C_t 值为 30,则判样品的 MP DNA 水平小于检测极限,结果为阴性;如果增长曲线呈 S 型且 C_t 值小于 30,结果为阳性。

1.5 统计学处理 所有数据用 SPSS16.0 软件分析,计数资料以率表示,组间阳性率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同性别患儿 MP 感染情况分析 742 例肺炎患儿 MP DNA 总阳性率为 40.3% (299/742)。其中,男性阳性率为 40.1% (178/444),女性阳性率为 40.6% (121/298)。男、女患儿阳性率的比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.889, P > 0.05$)。

2.2 不同年龄患儿 MP 感染阳性率情况分析 各年龄患儿组均可检出 MP DNA,13 岁以下各年龄组 MP DNA 阳性率随年龄增长而逐渐增高,13~16 岁年龄组 MP DNA 阳性率随年龄增加略有下降。0~<4 岁、4~<7 岁、7~<10 岁、10~<13 岁、13~16 岁组 MP DNA 阳性率分别为 16.7%、51.3%、51.9%、56.9%、44.4%。大于或等于 4 岁的各年龄组阳性率均与 0~<4 岁组进行比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 不同年龄患儿 MP 感染阳性率的比较

年龄(岁)	n	阳性[n(%)]
0~<4	252	42(16.7)
4~<7	187	96(51.3)*
7~<10	160	83(51.9)*
10~<13	116	66(56.9)*
13~16	27	12(44.4)*

*: $P < 0.01$, 与 0~<4 岁比较。

表 2 不同种类标本中 MP 检测阳性率

标本类型	n	阳性[n(%)]	MP DNA 检测值(copies/mL)
血清	378	23(6.1)	8.66×10^3
胸腔积液	72	28(38.9)	1.18×10^6 *
痰液	92	66(71.7)	2.65×10^9 *
支气管灌洗液	114	110(96.5)	9.64×10^9 *
肺泡灌洗液	86	72(83.7)	2.42×10^9 *

*: $P < 0.01$, 与血清比较。

2.3 不同标本类型 MP DNA 阳性率比较 血清标本阳性率

最低,支气管灌洗液标本阳性率最高。将不同类型标本阳性率分别与血清标本 MP DNA 阳性率进行比较分析,差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

3 讨 论

MP 是介于细菌与病毒之间的一类缺乏细胞壁并且能够独立生活的原核细胞型微生物,MP 基因组为双股环状 DNA,序列全长 816 394 bp,相对分子质量 511×10^8 ,是原核细胞中最小的。MP 是原发性非典型肺炎和急性呼吸道感染的重要病原体,常见于儿童和青少年呼吸道感染。每隔 3~5 年流行一次,常在军营和中、小学生中流行^[6]。

本研究结果显示,本院 MP 感染总阳性率达 40.3%,其中,男性感染率为 40.1%,女性感染率为 40.6%,男性与女性感染率差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 MP 是儿科住院患儿感染的重要病原体,男、女感染机会均等,与其他报道一致^[7-8]。MP 感染在 0~16 岁各年龄组均可发生。13 岁以下各年龄组 MP DNA 的阳性率随年龄增长而逐渐增高,13~16 岁组 MP DNA 阳性率随年龄增长略有下降。 ≥ 4 岁的各年龄组的 MP DNA 阳性率均高于 0~<4 岁组。 ≥ 4 岁儿童是 MP 感染的主要人群,可能与幼儿园和学龄儿童的免疫力较弱、集体活动增加有关,与文献[9]的报道一致。13~16 岁组 MP DNA 阳性率随年龄增加略有下降,可能与进入青春期及成人期后机体的免疫功能已经相对健全,或既往感染过 MP,其再次发生 MP 感染的机会明显下降有关^[10]。

本研究采用 FQ-PCR 对不同类型标本中的 MP DNA 进行定量检测,阳性率由高到低依次为支气管灌洗液(96.5%)、肺泡灌洗液(83.7%)、痰液(71.7%)、胸腔积液(38.9%)、血清(6.1%)。血清中亦可检出 MP DNA,提示有部分肺炎支原体侵入血液中,引起支原体血症,与钟天鹰等^[11]的报道一致。其他类型标本阳性率均高于血清且差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 MP 主要在呼吸道感染患儿的呼吸系统部位增殖。支气管肺泡灌洗液阳性率最高,可能与支气管肺泡灌洗液直接取自病灶处支气管肺泡内有关。痰液标本相对于支气管肺泡灌洗液更易获得,但是儿童 MP 感染早期干咳分泌物少,且儿童配合度不好,不易取到合适的痰液标本。此外,健康人群也可能携带 MP^[12-13]而导致上气道标本 PCR 检测结果易出现假阳性,而难治性肺炎支原体肺炎患儿往往因为呼吸衰竭或者肺不张需行气管插管或纤维支气管镜灌洗,便于获取支气管肺泡灌洗液标本。因此,支气管肺泡灌洗液作为 PCR 检测的标本有重要临床意义。

目前,国内外采用的 MP 感染诊断方法主要包括分离培养、血清学抗体检测和 PCR 检测法。传统的肺炎支原体分离培养繁琐、费时、培养阳性率低,不利于肺炎支原体感染的早期快速诊断^[14];MP IgM 抗体是机体最早出现的特异性抗体,于发病后 1 周左右可被检出,但是易受患儿年龄、病程、免疫功能状态等因素的影响而存在一定的局限性^[15]。PCR 法直接检测患儿肺炎支原体核酸水平,具有高敏感性和高特异性、检测快速(2~3 h)、不存在交叉反应^[16]等特点,是现症感染指标;另外,FQ-PCR 的检测值越大越支持 MP 感染诊断^[17]。因此,FQ-PCR 检测 MP DNA 可作为早期肺炎支原体感染的诊断方法。

MP 感染的临床表现常无特异性,可累及多个脏器,引起严重的肺外并发症。肺外并发症使得临床症状复杂化,尤其当

肺外并发症为首发症状时,易造成误诊。因此,早期诊断相当重要,及时进行MP DNA的检测,对于小儿肺炎的诊断、治疗和避免滥用抗菌药物都具有重要意义^[6]。

综上所述,FQ-PCR检测MP DNA对小儿肺炎的早期诊断和鉴别诊断及疗效观察均有一定的价值。根据患儿临床症状、发病阶段,选择适当的标本类型,采用PCR技术进行MP DNA的检测,可以更好地为临床提供诊断治疗依据。

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] 朱宪侠. 小儿肺炎支原体检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(7): 840-841.
- [3] Youn YS, Lee KY, Hwang JY, et al. Difference of clinical features in childhood Mycoplasma pneumoniae pneumonia[J]. BMC Pediatr, 2010, 10(1): 48.
- [4] Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection with special reference to pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(3): 162-169.
- [5] 胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2002:1175-1180.
- [6] 李金明. 实时荧光定量PCR技术[M]. 北京:人民军医出版社,2008:363-368.
- [7] 陈远平,黎金凤. 1 379例儿童肺炎支原体快速培养鉴定结果分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2749-2750.
- [8] 欧阳航. 衡阳市1 918例儿童肺炎支原体检测结果分析[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(11): 1513-1514.

(上接第415页)

力下降,携氧能力下降,致组织缺氧又使红细胞代偿性增生,造成全血黏度增高^[11]。由于物质代谢紊乱,血浆中脂质成分增高及纤维蛋白升高,表面负电荷减少,聚集黏附机会增加,使血浆黏度升高^[12]。本组资料结果分析还显示,血流变指标变化最明显的是在GHbA1c控制一般的人群,控制良好的与健康对照相当或稍高,例如当GHbA1c≥8.0%时,全血高切、中切黏度有下降趋势,但仍处比较高的黏度范围,可能原因有高血糖患者并发酸中毒和代谢紊乱,医源性等因素造成HCT下降,如输液、贫血等,导致全血黏度下降。

综上所述,2型糖尿病患者存在明显的血液流变学异常,大多数糖尿病的并发症均是由高黏血症的基础上发展而来。控制血糖水平可有效降低和预防眼、肾等器官的并发症发生,但单纯控制血糖水平,无法有效地降低血黏度,也不能有效的大幅度的降低心脑血管疾病等并发症的发生。笔者认为定期检测糖尿病患者血液流变学指标,对并发高黏血症者给予早期干预,对糖尿病患者的治疗及预防并发症的发生有重要意义。

参考文献

- [1] 孙云霞. 血液流变学检测在糖尿病患者的应用与分析[J]. 中国医疗前沿, 2009, 4(24): 46.
- [2] 葛琴. 糖尿病患者血液流变学检测的临床分析和应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(21): 3462-3463.

- [9] 伏瑾,袁艺,陈燕,等. 427例下呼吸道感染住院患儿肺炎支原体感染分析[J]. 临床荟萃, 2010, 25(10): 854-856.
- [10] Defilippi A, Silvestri M, Tacchella A, et al. Epidemiology and clinical features of Mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. Respir Med, 2008, 102(12): 1762-1768.
- [11] 钟天鹰,毛志红,张其华. 荧光定量PCR法检测呼吸系统感染儿童肺炎支原体DNA的分析[J]. 临床儿科杂志, 2002, 20(3): 137-139.
- [12] 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): 223-230.
- [13] 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.
- [14] Namano-Hasagawa K, Morozumi M, Nakayama E, et al. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatrics community. Acquired pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2008, 14(6): 424-432.
- [15] 董传莉,谢怀珍. 不同年龄组支原体肺炎临床分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2008, 33(3): 333-335.
- [16] 孔梅,周乐全,钟芳华. PCR法检测肺炎支原体的临床应用及结果分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(36): 21-22.
- [17] 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): 442-445.

(收稿日期:2013-10-08)

- [3] 王慧珠. ADA:糖尿病诊治实用标准纲要-2013[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(3): 193-199.
- [4] American Diabetes Association. ADA: Clinical Practice Recommendations[J]. Diabetes care, 2013, 36(Suppl 1): s4-10.
- [5] 黄绍宽,李玲,彭斌武. 老年糖尿病患者血液流变学分析[J]. 现代医院, 2009, 9(z1): 143-144.
- [6] 赵红艳,赵军艳,王育强. 2型糖尿病患者糖基化血红蛋白和血流变学的相关性[J]. 武警医学院学报, 2010, 19(7): 548-549, 567.
- [7] 宋柯瑞. 糖尿病患者血流变及血脂检测的相关性研究[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(14): 1104-1105.
- [8] 马亚峰,潘军强,刘宁,等. 2型糖尿病患者糖化血红蛋白水平与红细胞流变学相关性研究[J]. 陕西医学杂志, 2009, 38(7): 847-848.
- [9] 王逢春. 糖尿病的血流变学改变[J]. 医学理论与实践, 2010, 23(12): 1497-1498.
- [10] 邹德学. 2型糖尿病患者血浆纤维蛋白原含量、抗凝血酶活性、血小板聚集及血液动力学的检测[J]. 血栓与止血学, 2011, 17(5): 219-220.
- [11] 王莹,朱泉,虞成毕. 丹红注射液对2型糖尿病患者血脂、血流变学的影响[J]. 中国医学创新, 2010, 7(5): 89-90.
- [12] 赵建红,黎土生. 糖尿病患者血液流变学结果分析[J]. 吉林医学, 2010, 31(18): 2797-2798.

(收稿日期:2013-09-13)