

• 临床检验研究论著 •

961 例呼吸道感染患儿 MP-DNA 检测结果分析

李锐成, 阎琳, 邹菊贤, 杨文青, 张惠中[△]

(第四军医大学唐都医院检验科, 陕西西安 710038)

摘要:目的 分析肺炎支原体 DNA(MP-DNA)阳性患儿的临床和实验室资料,为诊断和治疗 MP 感染提供依据。方法 采用实时荧光定量 PCR 法对具有呼吸道症状的患儿进行 MP-DNA 检测,对其中 171 例 MP-DNA 阳性患儿的临床资料进行分析。结果 961 例患儿的总阳性率为 17.79%;2010~2012 各年份阳性率比较差异有统计学意义($P<0.01$);学龄前组感染率最高($P<0.01$);第 3 季感染率明显高于其他 3 个季度($P<0.05$);痰液和灌洗液有很高的阳性率;171 例 MP-DNA 阳性患儿临床诊断为肺炎支原体肺炎 90 例,占 52.93%。结论 本地区 MP 感染率较高,且呈逐年上升趋势,学龄前儿童为高危人群,实时荧光定量 MP-DNA 具有快速、简便、敏感性高、特异性强的特点,适宜多种标本类型的检测,是临床上早期诊断肺炎支原体感染的有效方法。

关键词:聚合酶链反应; 肺炎支原体脱氧核糖核酸; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2675-03

Analysis of mycoplasma pneumoniae DNA results detected from 961 children with respiratory tract infection

Li Ruicheng, Yan Lin, Zou Juxian, Yang Wenqing, Zhang Huizhong[△]

(Department of Clinical Laboratory, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710038, China)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical and laboratory data of children with positive mycoplasma pneumoniae DNA(MP-DNA), provide a basis for diagnosis and treatment of MP infection. **Methods** Real-time fluorescent quantitative PCR(RT-PCR) method was adopted to detect MP-DNA of the hospitalized children with symptoms of respiratory tract diseases, the clinical data of 171 children with positive MP-DNA were analyzed. **Results** Among 961 children, the positive rate of MP-DNA was 17.79%, there was significant difference in the positive rate of MP-DNA among 2010, 2011 and 2012($P<0.01$); the positive rate of MP-DNA among the preschool children was the highest($P<0.01$); the positive rate of MP-DNA in Autumn was the highest among 2010, 2011 and 2012($P<0.05$); sputum and irrigating solution had higher positive rate; among 171 children with positive MP-DNA, 90 children were found with mycoplasmal pneumonia, accounting for 52.63%. **Conclusion** The MP infection rate is high in this area, and the infection rate among children have an increasing trend year by year, children aged 4-7 years old are the high risk population, Real-time fluorescent quantity PCR is fast, simple with high sensitivity and specificity and suitable for detection of different types of sample, which is one of the effective methods for detection of MP-DNA in clinical situation and early diagnosis of MP.

Key words: polymerase chain reaction; mycoplasma pneumoniae deoxyribonucleic acid; children

肺炎支原体(MP)是呼吸道感染的常见病原体,尤其是社区获得性肺炎和儿童原发性非典型肺炎的最常见病原体^[1]。尽管 MP 感染后有一定特殊的临床表现和影像学改变^[2],但有时仍很难与其他病毒或细菌感染相鉴别。MP 感染不但引起原发性非典型性肺炎,还可引起全身多器官的病变,如脑炎、心肌炎、肝炎、肾炎、免疫溶血性贫血等,而且 MP 的耐药率也在呈上升趋势^[3-5],近年来已引起广泛关注,各地感染情况报道不一。为了解本地区呼吸道疾病患儿 MP 感染情况,该文回顾总结了近 3 年的检测资料,对 961 例 MP-DNA 检测结果进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择本院 2010 年 1 月至 2012 年 12 月儿科住院,具有呼吸道症状的 961 例患者为研究对象,男性 582 例,平均 4.68 岁;女性 379 例,平均 4.95 岁。其中 2010 年 286 例,男性 193 例,女性 93 例;2011 年 315 例,男性 168 例,女性 147 例;2012 年 360 例,男性 220 例,女性 140 例;年龄 0~14 岁,按年龄分为 4 组:<1 岁为婴儿组(140 例),1~3 岁为幼儿组 292 例,>3~7 岁为学龄前组(290 例),>3~14 岁为学龄组(238 例)。

1.2 标本来源 标本类型有血清 746 例、痰液 54 例、胸水 22 例、咽拭子 5 例、胸腔穿刺液 24 例、肺泡灌洗液 48 例、支气管灌洗液 62 例,共 961 份。

1.3 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 检测试剂为中山大学达安基因股份有限公司生产的肺炎支原体核酸检测试剂盒(实时荧光定量),仪器采用美国 ABI-7500 实时荧光定量 PCR 扩增仪。

1.4 检测方法 标本为痰液、灌洗液,需加入 4 倍体积含 4% NaOH 的溶痰剂,室温放置 1 h 液化,咽拭子需加入无菌生理盐水 1 mL 浸泡 0.5 h,取 1 mL 处理后的标本于 1.5 mL 无菌离心管中,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀中加无菌生理盐水 1 mL,振荡悬浮,14 000 r/min 离心 10 min,再重复洗涤一次后弃上清,留沉淀备用。血性标本:取 1 mL 血性标本标本于 1.5 mL 无菌离心管中,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀中加去离子水 1 mL,振荡悬浮,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清,留沉淀,反复洗涤直至上清清亮(红细胞被洗掉)弃上清,留沉淀备用。沉淀中加 50 μ L DNA 提取液,血清标本按 1:1 比例加入提取液,振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 后 14 000 r/min 离心 10 min,取上清液 2 μ L 加入 PCR 反应管

内。设置循环条件为:92 ℃ 预变性 2 min,然后按 93 ℃ 45 s→55 ℃ 60 s,先进行 10 个循环,最后按 93 ℃ 30 s→55 ℃ 45 s,进行 30 个循环。结果判定:如 Ct 值无数值,实验结果为阴性;如 Ct<30 并曲线为标准 S 形曲线,则实验结果为阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,率的比较用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MP-DNA 检测的阳性率 961 例患儿中 MP-DNA 阳性 171 例,占 17.79%。2010 年 286 例患儿中阳性数 34 例,阳性率 11.89%;2011 年 315 例患儿中阳性数 47 例,阳性率 14.92%;2012 年 360 例患儿中阳性数 90 例,阳性率 25.00%。2010~2012 年 MP-DNA 阳性率之间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 MP-DNA 阳性率与年龄的关系 各年龄组 MP-DNA 阳

性率比较,婴儿组阳性率最低,学龄前组阳性率最高,差异有统计学意义($\chi^2=36.871, P<0.01$),提示学龄前组为儿童 MP 感染的好发人群。见表 1。

表 1 2010~2012 年不同年龄组 MP-DNA 阳性率			
年龄组	总例数(<i>n</i>)	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)
婴儿组	140	7	5.00
幼儿组	292	36	12.33
学龄前组	290	73	25.17
学龄组	239	55	23.01
合计	961	171	17.79

2.3 MP-DNA 阳性率与季节的关系 2010~2012 年不同季节 MP-DNA 阳性率见表 2。

表 2 2010~2012 年不同季节 MP-DNA 阳性率									
季度	2010 年			2011 年			2012 年		
	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)	<i>n</i>	阳性数(<i>n</i>)	阳性率(%)
第一季度	91	9	9.90	135	18	13.33	100	21	21.00
第二季度	70	10	14.29	73	4	5.48	47	5	10.64
第三季度	58	12	20.69	50	17	34.00	95	38	40.00
第四季度	67	3	4.48	57	8	14.04	118	26	22.03
χ^2	—	—	8.533	—	—	19.767	—	—	17.977
<i>P</i>	—	—	<0.05	—	—	<0.01	—	—	<0.01

—:无数据。

2.4 MP-DNA 阳性率与标本类型的关系 血清标本有 746 份,占总例数的 77.63%,但阳性率在所有标本类型中最低,仅为 3.75%。其余标本类型共 215 例,其中痰液、肺泡灌洗液和支气管灌洗液的阳性率较高,分别为 62.96%、77.08%和 88.71%。961 份标本的总阳性率为 17.90%。

2.5 MP-DNA 阳性患儿的临床诊断情况 MP-DNA 阳性患儿的临床诊断情况见表 3。

表 3 171 例 MP-DNA 阳性患者的临床诊断情况		
临床诊断	<i>n</i>	阳性率(%)
肺炎支原体肺炎	90	52.63
肺炎支原体肺炎伴胸腔积液	1	0.58
大叶性肺炎	57	33.33
大叶性肺炎伴胸腔积液	7	4.10
大叶性肺炎伴脓胸	1	0.58
支气管肺炎	5	2.93
间质性肺炎	8	4.68
呼吸道感染	2	1.17
合计	171	100.00

3 讨 论

MP 是介于细胞和病毒之间的一种缺乏细胞壁的能独立生活的最小微生物,含有 RNA 和 DNA,广泛存在于自然界中^[6],是呼吸道感染常见的病原体,主要引起上呼吸道感染、支气管炎、间质性肺炎、肺炎支原体肺炎等呼吸道系统疾病^[7]。目前其检测手段层出不穷^[8-10],主要有分离培养、免疫学方法检测抗原及抗体和 PCR 技术。MP 培养法仍然是目前诊断

MP 的金标准^[11],传统培养法由于耗时长,一般不用于临床。快速培养法是近年来兴起的早期诊断 MP 感染的手段之一,但其易受多方面因素的影响。Ma 等^[12]认为影响 MP 阳性检出率的主要因素为年龄、性别和季节,尤其气候和温度是影响 MP 检出率的最主要因素。实时荧光定量 PCR 技术具有准确性高、重现性好等特点,已广泛应用于基因表达、病原体检测等诸多研究领域^[13]。

本研究采用实时荧光定量 PCR 技术检测 961 例呼吸道感染患儿 MP-DNA,结果显示:(1)2010~2012 年呈现 MP 感染患儿逐年增加趋势。(2)以婴儿组阳性率最低,学龄前组阳性率最高,原因可能为婴幼儿活动范围小,感染机会少;随着年龄的增长,到学龄前期,活动范围增大,群居时间较长,加上免疫功能低下,感染机会增多。(3)每年的秋季阳性率均高于其他季节,提示秋季 MP 感染率最高,可能与本地区秋季气候干燥、炎热适合 MP 的生存和传播有关。(4)961 份标本的总阳性率为 17.90%,但除外血清标本,其余标本类型的总阳性率达 66.51%(143/215),分析原因可能为穿刺液、灌洗液直接取自病灶部位,痰、咽拭子和胸水也与病灶部位密切相关,因而阳性检出率较高。因此疑似肺炎支原体感染的患者,留取痰、胸水、咽拭子、穿刺液及灌洗液做 MP-DNA 检测是诊断肺炎支原体感染的较好方法。(5)MP 主要引起肺炎支原体肺炎、大叶性肺炎、支气管肺炎、间质性肺炎、上呼吸道感染等呼吸道系统疾病,以肺炎支原体肺炎为主。MP 感染者之所以易出现片状实变影,即大叶性肺炎表现,推测与其生物学特性及免疫病理损伤有关。从临床诊断结果分析,MP-大叶性肺炎患者易伴发胸腔积液,形成原因可能与 MP 直接侵入和自身免疫反应有关,但本研究 24 例胸腔穿刺液 MP-DNA 检测仅有 8 例阳性,阳性率 33.33%,相比较于痰液、灌洗液检出率较低。分析原因可

能 MP 感染后引起的自身免疫反应在胸腔积液的形成中起主要作用,因为 MP 感染后可导致多种肺外并发症^[14],其机制主要是抗原-抗体交叉反应导致的免疫损害。

综上所述,临床医师应加强儿童 MP 感染的重视,当发现有呼吸道感染时,要考虑 MP 感染的可能,利用 MP-DNA 快速、简便、敏感性高、特异性强和适宜多种标本类型的检测的特点,做到对肺炎支原体感染的早诊断、早治疗和疗效检测,从而避免滥用抗菌药物。MP-DNA 检测是临床上早期诊断肺炎支原体感染的有效方法。

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] Paul D Mde L, Vega-Briceno LE, Potin SM, et al. Clinical characteristics of respiratory infection due to Mycoplasma pneumoniae in hospitalized children[J]. *Rev Chilena Infectol*, 2009, 26(4): 343-349.

[3] Liu Y, Ye X, Zhang H, et al. Antimicrobial susceptibility of Mycoplasma pneumoniae isolates and molecular analysis of macrolide-resistant strains from Shanghai, China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 2160-2162.

[4] Xin D, Mi Z, Han X, et al. Molecular mechanisms of macrolide resistance in clinical isolates of Mycoplasma pneumoniae from China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(5): 2158-2159.

[5] Cao B, Zhao C, Yin Y, et al. High prevalence of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China[J]. *Clin*

Infect Dis, 2010, 51(2): 189-194.

[6] 钟伟明,郭静,陈俏. 1206 例呼吸道感染儿童肺炎支原体 DNA 检测结果分析[J]. *中国医药导报*, 2010, 7(29): 60-61.

[7] 齐振勇,葛俊丽,齐振水. MP-DNA 与 IgM 在儿童肺炎支原体感染病程中动态检测的意义[J]. *国际医药卫生导报*, 2012, 18(1): 14-19.

[8] 刘承巨. 肺炎支原体临床检测方法的研究进展[J]. *中外医学研究*, 2009, 7(6): 37-39.

[9] 胡志刚,唐建英,周颖. 肺炎支原体-DNA 检测方法比较及临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2008, 5(10): 66-67.

[10] 袁艺,伏瑾,曹玲,等. 肺炎支原体荧光定量聚合酶链反应检测在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断意义[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(10): 760-762.

[11] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of Mycoplasma pneumoniae infection[J]. *Future Microbiol*, 2008, 3(6): 635-648.

[12] Ma LD, Chen B, Dong Y, et al. Rapid mycoplasma culture for the early diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection[J]. *J Clin Lab Anal*, 2010, 24(4): 224-229.

[13] Fend R, Geddes R, Lesellier S. Use of an electronic nose to diagnose Mycobacterium bovis infection in badgers and cattle[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1745-1751.

[14] Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection with special reference to pneumonia[J]. *J Infect Chemother*, 2010, 16(3): 162-169.

(收稿日期:2013-04-10)

(上接第 2674 页)

[6] Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, et al. Sources of variation and bias in studies of diagnostic accuracy: a systematic review[J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140(3): 189-202.

[7] Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, et al. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews[J]. *BMC Med Res Methodol*, 2003, 3: 25.

[8] Walter SD. Properties of the summary receiver operating characteristic (SROC) curve for diagnostic test data[J]. *Stat Med*, 2002, 21(9): 1237-1256.

[9] DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials[J]. *Control Clin Trials*, 1986, 7(3): 177-188.

[10] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, et al. Measuring inconsistency in meta-analyses[J]. *BMJ*, 2003, 327(7414): 557-560.

[11] Zamora J, Abraira V, Muriel A, et al. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data[J]. *BMC Med Res Methodol*, 2006, 6: 31.

[12] Lam HS, Wong SP, Cheung HM, et al. Early diagnosis of intra-abdominal inflammation and sepsis by neutrophil CD64 expression in newborns[J]. *Neonatology*, 2011, 99(2): 118-124.

[13] Genel F, Atlihan F, Gulez N, et al. Evaluation of adhesion molecules CD64, CD11b and CD62L in neutrophils and monocytes of peripheral blood for early diagnosis of neonatal infection[J]. *World J Pediatr*, 2012, 8(1): 72-75.

[14] Dilli D, Oguz SS, Dilmen U, et al. Predictive values of neutrophil CD64 expression compared with interleukin-6 and C-reactive protein in early diagnosis of neonatal sepsis[J]. *J Clin Lab Anal*, 2010, 24(6): 363-370.

[15] Groselj-Grenc M, Ihan A, Pavcnik-Arnol M, et al. Neutrophil and monocyte CD64 indexes, lipopolysaccharide-binding protein, procalcitonin and C-reactive protein in sepsis of critically ill neonates and children[J]. *Intensive Care Med*, 2009, 35(11): 1950-1958.

[16] Groselj-Grenc M, Ihan A, Derganc M. Neutrophil and monocyte CD64 and CD163 expression in critically ill neonates and children with sepsis: comparison of fluorescence intensities and calculated indexes[J]. *Mediators Inflamm*, 2008, 2008: 202646.

[17] Bhandari V, Wang C, Rinder C, et al. Hematologic profile of sepsis in neonates: neutrophil CD64 as a diagnostic marker[J]. *Pediatrics*, 2008, 121(1): 129-134.

[18] Ng PC, Li G, Chui KM, et al. Quantitative measurement of monocyte HLA-DR expression in the identification of early-onset neonatal infection[J]. *Biol Neonate*, 2006, 89(2): 75-81.

[19] Ng PC, Li G, Chui KM, et al. Neutrophil CD64 is a sensitive diagnostic marker for early-onset neonatal infection[J]. *Pediatr Res*, 2004, 56(5): 796-803.

[20] Ng PC, Li K, Wong RP, et al. Neutrophil CD64 expression: a sensitive diagnostic marker for late-onset nosocomial infection in very low birthweight infants[J]. *Pediatr Res*, 2002, 51(3): 296-303.

[21] Layseca-Espinosa E, Perez-Gonzalez LF, Torres-Montes A, et al. Expression of CD64 as a potential marker of neonatal sepsis[J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2002, 13(5): 319-327.

[22] Streimish I, Bizzarro M, Northrup V, et al. Neutrophil CD64 as a diagnostic marker in neonatal sepsis[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2012, 31(7): 777-781.

(收稿日期:2013-04-05)