

• 调查报告 •

深圳地区儿童 MP 实验室常规检测及分子流行病学特征*

蔡德丰, 袁 艳, 张 霞, 赵瑞珍, 王红梅, 马东礼[△]

(深圳市儿童医院检验科, 广东深圳 518026)

摘要:目的 分析深圳地区 2010~2012 年该院门诊及住院患儿肺炎支原体(MP)感染分子流行病学特征,探讨实验室常规检测结果在 MP 感染诊断中的意义。方法 选取 2010~2012 年诊断为呼吸道感染患儿,筛选出 MP 感染及非 MP 感染。对 MP 感染患儿 3 年间性别、年龄等流行病学特征进行分析,比较 MP 感染及非 MP 感染实验室常规检测及超敏 C 反应蛋白水平的差异。结果 男性 MP-DNA 阳性检出率略高于女性,差异无统计学意义($P>0.05$);MP 感染在不同年龄群体均有发生,小于 1 岁 MP-DNA 阳性检出率最低,3~<6 岁患儿 MP-DNA 检出率最高($P<0.05$);实验室常规检测及超敏 C 反应蛋白水平在 MP 感染诊断中无特异性。结论 深圳地区 MP 分子流行病学显示 MP 感染具有季节性,实验室常规检测及超敏 C 反应蛋白水平不能作为 MP 实验室诊断的依据。

关键词:肺炎,支原体; 实验室技术和方法; 流行病学,分子

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.05.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)05-0569-03

Characteristics of laboratory routine tests and molecular epidemiology for child
mycoplasma pneumoniae infection in Shenzhen area*

Cai Defeng, Yuan Yan, Zhang Xia, Zhao Ruizhen, Wang Hongmei, Ma Dongli[△]

(Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518026, China)

Abstract: Objective To analyze the epidemiological characteristics of mycoplasma pneumoniae (MP) infection among the out-patients and inpatients children in Shenzhen area during 2010—2012 and to explore the significance of the results of the laboratory routine tests in the diagnosis of MP infection. **Methods** The children patients with respiratory tract infection from 2010 to 2012 were selected and the MP infection and the non-MP infection were screened out. The epidemiological characteristics of gender, age, etc., among the children patients with MP infection during these 3 years were analyzed. The differences in the laboratory routine tests and high sensitivity C reactive protein(hsCRP) were compared between the MP infection and the non-MP infection. **Results** The positive detection rate of MP-DNA in males was slightly higher than that in females, the difference had no statistical significance ($P>0.05$);MP infection occurred in different age groups, the positive detection rate of MP-DNA was lowest in the children patients aged <1 year old and highest in the children patients aged 3—<6 years ($P<0.05$); the routine laboratory tests and hsCRP level had no specificity in the diagnosis of MP infection. **Conclusion** The MP molecular epidemiology in Shenzhen area shows that MP infection has the seasonality, the laboratory routine tests and hsCRP level can not be used as the basis of the MP laboratory diagnosis.

Key words: pneumonia, mycoplasma; laboratory techniques and procedures; epidemiology, molecular

肺炎支原体(MP)肺炎是 MP 感染的重要表现,MP 引起原发性非典型性肺炎最常见的病原体,因缺乏细胞壁,对 β -内酰胺类及青霉素类抗菌药物具有耐药性^[1-2],临床上常表现为发病缓、发烧、咳嗽、头痛、肌痛、咽喉痛及其他非典型性症状,但 MP 感染常伴随着多重肺外其他症状 严重威胁着患儿的健康及生命^[3]。目前实验室检测 MP 感染的耗时较长且相对不敏感^[4];血清学抗体的检测在实验室的应用目前较为广泛,但是存在着交叉反应及非特异性的反应。聚合酶链反应(PCR)技术目前已应用于临床检测 MP 感染,具有灵敏度高、特异度强及快速诊断的优势。本研究中对 2010~2012 年 48 019 例呼吸道感染疾病患儿进行 MP-DNA 测定,分析 3 年间患儿 MP 感染情况,包括性别、年龄、季节流行病学特征;比较 MP 感染及非 MP 感染的实验室常规检测中白细胞及超敏 C 反应蛋白水平的差异,探讨除 MP-DNA 检测外其他实验室检测在

MP 感染诊断中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 深圳市儿童医院 2010~2012 年住院及门诊临床诊断为呼吸道感染患儿 48 019 例,其中男性 29 479 例,女性 18 540 例。年龄为 11 d 至 15 岁,平均年龄为 4.9 岁。将其分为 MP 感染,符合呼吸道感染临床症状,同时 MP-DNA 检测阳性患儿人群;非 MP 感染,符合呼吸道感染临床症状,由其他病原体引起的呼吸道感染患儿人群。排除心血管疾病、慢性肺部疾病、病毒、结合感染、肿瘤、肝脏及肾脏疾病、免疫缺陷、消化系统营养不良、医院感染及应用药物等患儿。

1.2 检测方法

1.2.1 实时定量 PCR MP-DNA 测定 本研究采用达安基因 MP-DNA 定量诊断试剂盒, TaqMan 荧光探针法测定 MP 基因组中 16S rRNA 基因中特异性片段。鼻咽拭子经过 NaOH 消

* 基金项目:深圳市儿童重症疾病诊断重点实验室(深发改【2012】866号)。 作者简介:蔡德丰,男,主管技师,主要从事临床分子诊断相关工作。 [△] 通讯作者, E-mail: madl1234@126.com。

化后 12 000 r/min 离心 5 min 后取沉渣, 0.9% NaCl 洗涤 2 遍, 每次 12 000 r/min 离心 5 min, 取沉渣, 加入 50 μL DNA 提取液, 100 °C 孵育 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清点样, 反应体系为 45 μL。反应条件为 93 °C、2 min; 10 个循环, 93 °C、45 s, 55 °C、60 s; 30 个循环 93 °C、30 s, 55 °C、45 s。每次实验需同时进行加入标准品 (105, 106, 107, 108 拷贝/毫升)、阴性对照、阳性对照。PCR 扩增仪为 ABI7300 核酸扩增系统, MP-DNA 大于 500 拷贝/毫升为 MP 阳性。

1.2.2 血液细胞学检测 EDTA-K₂ 抗凝的血液标本, 充分混匀 sysmex XT-800i 全自动血球仪检测。

1.2.3 超敏 C 反应蛋白检测 深圳国赛生物技术有限公司提供免疫比浊仪及配套试剂。

1.3 统计学处理 所有数据均来自于实验室信息管理系统 (Lis 系统), 实验室数据均以 或中位数表示, MP 感染在年龄及季节关系分析采用 logistic 回归分析, MP 感染及非 MP 感染实验室检测结果间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 男女患儿 MP-DNA 阳性检出率比较 男女患儿 MP-DNA 阳性检出率比为 1.623:1.000。总 MP-DNA 阳性检出率为 16.04%, 其中男性患儿 MP-DNA 阳性检出率为 16.17%, 女性患儿 MP-DNA 阳性检出率为 15.84%, 男、女患儿 MP-DNA 阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 本地区 MP-DNA 阳性检出率比较 2010 年共送检标本 16 016 例标本, 其中 MP-DNA 阳性数为 3 884 (24.25%); 2011 年共送检标本 15 927 例标本, MP-DNA 阳性数为 1 475 (9.26%); 2012 年共送检标本 15 076 例标本, MP-DNA 阳性数为 2 350 (15.59%)。本地区 2010~2012 年各月份 MP-DNA 阳性检出率比较见表 1。

表 1 深圳地区 2010~2012 年各月份 MP-DNA 阳性检出率比较

月份	<i>n</i>	MP 感染 [<i>n</i> (%)]	非 MP 感染 [<i>n</i> (%)]
1	3 454	362(10.48)	3 092(89.52)
2	3 286	361(10.98)	2 925(89.02)
3	3 539	372(10.51)	3 167(89.49)
4	4 170	499(11.97)*	3 671(88.03)*
5	3 769	475(12.60)*	3 294(87.40)*
6	4 270	779(18.24)*	3 491(81.76)*
7	4 453	951(21.36)*	3 502(78.64)*
8	4 590	1 129(24.60)*	3 461(75.40)*
9	3 912	829(21.22)*	3 083(78.08)*
10	3 781	749(19.81)*	3 032(80.19)*
11	4 031	657(16.30)*	3 374(83.70)*
12	3 819	539(14.11)*	3 280(85.89)*

*: $P < 0.05$, 与 1 月份比较。

2.3 MP-DNA 阳性检出率与年龄的关系 2010~2012 年患儿的 MP-DNA 阳性检出率的年龄分布见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。本地区 2010~2012 年 MP-DNA 阳性检出率及年龄分布见表 2。

2.4 实验室常规检测结果比较 见表 3。

表 2 深圳地区 2010~2012 年 MP-DNA 阳性检出率及年龄分布

月份	<i>n</i>	MP 感染 [<i>n</i> (%)]	非 MP 感染 [<i>n</i> (%)]
<1	13 454	1 289(9.58)	12 165(90.42)
1~<3	13 429	1 869(13.92)*	11 560(86.08)*
3~<6	10 694	2 717(24.41)*	7 977(75.59)*
≥6	10 442	827(17.50)*	8 615(82.50)*
合计	48 019	7 702 (16.04)	40 317(83.96)

*: $P < 0.05$, 与小于 1 岁的患儿比较。

表 3 深圳地区 2010~2012 年实验室常规检测结果比较

实验室参数	MP 感染	非 MP 感染
白细胞 ($\times 10^9/L$)	11.89 ± 3.65*	13.43 ± 5.19
中性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	6.97 ± 2.34*	7.92 ± 3.96
淋巴细胞 ($\times 10^9/L$)	2.82 ± 1.13*	2.65 ± 1.02
单核细胞 ($\times 10^9/L$)	5.63 ± 2.09*	4.17 ± 1.89
嗜酸性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	0.51 ± 0.36*	0.49 ± 0.35
嗜碱性粒细胞 ($\times 10^9/L$)	0.27 ± 0.17*	0.29 ± 0.16
超敏 C 反应蛋白 ($\mu g/dL$)	18.26 ± 11.96*	19.68 ± 13.34

*: $P > 0.05$, 与非 MP 感染比较。

3 讨 论

MP 感染引起儿童原发性非典型肺炎日趋受到重视, 但对于诊断急性和慢性的 MP 感染很难建立起一个规范性的标准^[5]。目前临床诊断 MP 支原体感染主要诊断标准是临床症状、血清学抗体检测及核酸扩增的方法。有研究表明, 全球儿童群体 MP 感染率为 20.23%, 不同年龄人群 MP-DNA 阳性检出率不一致, 男性 MP-DNA 阳性检出率略微高于女性^[6]。本研究男性 MP-DNA 阳性检出率为 16.17%, 女性 MP-DNA 阳性检出率为 15.84%, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。综合 3 年数据表明, 6~10 月份 MP-DNA 阳性检出率较高, 高峰期在 7~8 月份, 分别为 21.36%, 24.60%; 1~3 月份 MP-DNA 阳性检出率最低。本研究结果与国内外其他报道不符^[7-8], 这可能与深圳地区处于亚热带气候, 季节不分明, 造成与其他地区流行病学差异。

MP 是种常见的造成呼吸道感染的病原体, 但临床症状不典型, 实验室常规检测结果对 MP 的诊断也不是特异的, 给 MP 的诊断及进一步用药造成一定的困难。MP 感染及非 MP 感染在血液常规及超敏 C 反应蛋白水平等实验室参数上比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 故常规实验室检测结果对 MP 感染不具有特异度, 需结合患儿临床症状, 同时结合其他的实验检测来确诊。

目前, 用于 MP 检测有较多的方法, MP 培养特异度可以达到 100%, 但是敏感度较低故不推荐作为实验室常规检测^[9]。本研究者采用 MP-DNA 检测, 直接克隆 MP 核酸分子上特异性片段, 给 MP 实验室诊断提供可靠的、科学的依据, 可作为 MP 感染检测的首选方法^[10]。与血清学及支原体培养相比, 该方法具有省时、敏感度高及特异性强等特点^[11-12]。

对 MP 感染患儿 MP-DNA 阳性检出率的年龄分布进行了分析, MP 感染可发生在儿童任何年龄阶段, 在儿童呼吸道感染疾病中占有重要地位, 小于 1 岁患儿 MP-DNA 阳性检出率

最低(9.58%),3~<6岁患儿 MP-DNA 阳性检出率最高(24.41%)。1~<3岁、3~<6岁、大于或等于6岁患儿的 MP-DNA 阳性检出率与小于1岁患儿比较差异有统计学意义($P<0.05$)。这可能与小于1岁患儿与外界接触较少,接触病原体机会较少。学龄期及学龄前期 MP-DNA 阳性检出率较高,这与儿童与外界接触机会较多,接触病原体机会较多有关,这与国内文献[13-14]报道一致。

综上所述,2010~2012年深圳地区 MP 分子流行病学特征显示男性 MP-DNA 阳性检出率略高于女性。MP 感染在不同年龄群体均有发生,学龄期及学龄前期有较高的 MP 发病率。深圳地区 7~9 月份有较高的 MP-DNA 阳性检出率,1~3 月份 MP-DNA 阳性检出率较低。实验室常规检测及超敏 C 反应蛋白水平在 MP 感染诊断中无特异度。故 MP 感染临床诊断需结合患儿临床症状结合实验室检测以达到确诊。

参考文献

[1] Biscardi S, Lorrot M, Marc E, et al. Mycoplasma pneumoniae and asthma in children[J]. Clin Infect Dis. 2004, 8(10):1341-1346.
 [2] Fischer JE, Steiner F, Zucol F, et al. Use of simple heuristics to target macrolide prescription in children with community-acquired pneumonia[J]. Arch Pediatr Adolesc Med. 2002, 156(10):1005-1008.
 [3] Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection with special reference to pneumonia[J]. J Infect Chemother. 2010, 16(3):162-169.
 [4] El Sayed Zaki M, Raafat D, El Metaal AA. Relevance of serology for Mycoplasma pneumoniae diagnosis compared with PCR and culture in acute exacerbation of bronchial asthma[J]. Am J Clin Pathol. 2009, 131(1):74-80.
 [5] Ginevra C, Barranger C, Ros A, et al. Development and evaluation of Chlamyge, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydomphila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens

by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol. 2005, 43(7):3247-3254.
 [6] Kamizono S, Ohya H, Higuchi S, et al. Three familial cases of drug-resistant Mycoplasma pneumoniae infection[J]. Eur J Pediatr. 2010, 169(6):721-726.
 [7] Principi N, Esposito S, Blasi F, et al. Role of mycoplasma pneumoniae and chlamydia pneumoniae in children with community-acquired lower respiratory tract infections[J]. Clin Infect Dis. 2001, 32(9):1281-1289.
 [8] He XY, Wang XB, Zhang R, et al. Investigation of mycoplasma pneumoniae infection in pediatric population from 12,025 cases with respiratory infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013, 75(1):22-27.
 [9] Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection[J]. Clin Microbiol Infect. 2003, 9(4):263-273.
 [10] Loens K, Beck T, Ursi D, et al. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydomphila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol. 2008, 46(1):185-191.
 [11] Ginevra C, Barranger C, Ros A, et al. Development and evaluation of Chlamyge, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydomphila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens by multiplex PCR[J]. J Clin Microbiol. 2005, 43(7):3247-3254.
 [12] Honda J, Yano T, Kusaba M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose Mycoplasma pneumoniae[J]. J Clin Microbiol. 2000, 38(4):1382-1384.
 [13] 王素梅,刘欣.肺炎支原体感染的流行病学研究[J].蚌埠医学院学报,2006,31(2):132-133.
 [14] 韩丽婷.276例肺炎支原体感染患儿临床资料分析[J].海南医学,2008,19(9):72-73.

(收稿日期:2013-10-23)

(上接第 566 页)

48 周后,IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 明显升高,而 HBV DNA、IL-4 和 IL-10 明显下降,与治疗前比较差异有统计学意义($P<0.01$),CHB 对照组治疗前后各项指标比较差异无统计学意义($P>0.05$),表明补肾清透方既能抑制 HBV DNA 复制又能调节 Th1 和 Th2 细胞因子,其作用机制可能是补肾清透方可以促进 Th1 细胞发育,抑制 Th2 细胞发育,进而促进 IL-2、TNF- α 和 IFN- γ 等 Th1 型细胞因子的分泌,抑制 IL-4 和 IL-10 等 Th2 型细胞因子的分泌,提高细胞免疫反应,抑制体液免疫反应,清除细胞内病毒,降低血清 HBV DNA 水平。

综上所述,补肾清透方对 CHB HBeAg 阳性患者具有明显的临床疗效,其抗病毒的作用可能是通过改善患者机体的细胞免疫功能间接抑制病毒,本研究结果证实了中药补肾清透方对 CHB HBeAg 阳性患者的治疗作用,为乙型肝炎的治疗多提供一种选择。与拉米夫定、干扰素等抗病毒药物相比,其不存在病毒耐药的问题,且具有多角度、多方位治疗的特色,适应症较广,副作用较少,医疗成本低,是一种很有发展前景的抗 HBV 药物。

参考文献

[1] 贺劲松,周大桥,童光东,等.补肾健脾胶囊治疗慢性乙肝病病毒携

带者的随机双盲实验[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(6):246-249.
 [2] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J].临床肝胆病杂志,2006,22(1):3.
 [3] 潘喜峰.细胞因子在乙型肝炎病程中作用的研究进展[J].中国医药导报,2009,6(18):5-6.
 [4] 何登明,王宇明,毛青.拉米夫定对慢性乙型肝炎血清 IFN- γ 和 IL-10 水平的影响[J].实用医药杂志,2004,21(10):881-883.
 [5] 石虹.干扰素- γ 和肿瘤坏死因子- α 对表达乙型肝炎病毒的 HepG2. 2. 15 细胞的协同致凋亡作用[J].复旦学报:医学,2007,34(4):576-579.
 [6] 郑贤干,罗利飞.苦参素对慢性乙型肝炎患者外周血 Th1/Th2 平衡的调控作用[J].医药导报,2009,28(1):70-71.
 [7] 赖志伟,田东波,钟国权,等.拉米夫定对慢性乙型肝炎患者血清 IFN- γ 、IL-4 的影响[J].临床和实验医学杂志,2007,6(3):18-19.
 [8] 童光东,彭胜权.从“肾虚伏气”论慢性乙型肝炎的治疗[J].中医杂志,2004,45(10):726-728.
 [9] 朱宇同,方宏勋.叶下珠治疗乙型病毒性肝炎研究的简况及其发展策略[J].广州中医药大学学报,1998,15(A12):63-66.

(收稿日期:2013-10-12)