

• 论 著 •

广州地区儿童肺炎支原体核酸检测阳性病例的分析

刘美玲¹, 徐韞健²

(1. 广州医学院荔湾医院检验科 510170; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广州 510120)

摘要:目的 分析该地区儿童肺炎支原体核酸(MP-DNA)检测阳性病例的临床特征,为临床诊断和治疗儿童肺炎提供依据。方法 对广州医学院荔湾医院和广州医科大学附属第一医院 2014—2015 年门诊及住院患者中有呼吸道感染症状者,进行咽拭子采样,提取 DNA 后用聚合酶链反应法检测 MP 基因,同时抽血检测血常规和肺炎支原体抗体。结果 2 018 例呼吸道感染患儿中 MP-DNA 阳性 209 例,阳性率 10.36%。3~<14 岁年龄组 MP-DNA 阳性率为 18.25%,均高于其他年龄组,差异具有统计学意义($P<0.05$);7—9 月份阳性率为 16.11%,均高于其他月份组,差异具有统计学意义($P<0.05$);女性阳性率为 13.04%,明显高于男性的 8.79%,差异具有统计学意义($P<0.05$);MP-DNA 阳性患者白细胞计数偏高占 22.01%,白细胞计数正常内占 49.28%,白细胞计数偏低占 28.71%;MP-DNA 阳性患者血清 MP-IgG 检测中阳性 146 例,占 69.86%。结论 MP-DNA 检测对小儿呼吸道感染诊断有重要价值,进行多项目及时快速地检测,对预防该疾病加重有重要意义。

关键词:肺炎支原体; 呼吸道感染; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0054-03

Analysis of mycoplasma pneumoniae nucleic acid testing positive cases of children in Guangzhou

LIU Meiling¹, XU Yunjian²

(1. Department of Clinical Laboratory, Liwan Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou, Guangdong 510170, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To analysis the clinical features of mycoplasma pneumoniae nucleic acid(MP-DNA)testing positive cases of from the region's children, provide the basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Outpatient and hospitalized patients with respiratory infection symptoms were sampled pharyngeal swab in the region from 2014 to 2015. After DNA was extracted, polymerase chain reaction method was conducted to detect the MP gene. At the same time, blood routine and mycoplasma pneumoniae antibody were detected from drawing blood. **Results** There were 209 cases of MP-DNA positive from 2018 cases in children with respiratory tract infection, the positive rate was 10.36%. MP-DNA positive rate in 3—<14 years old age group was 18.25%, which was higher than other age groups($P<0.05$). The positive rate was 16.11% from July to September, which was higher than in other month groups($P<0.05$). The positive rate of girl(13.04%) was significantly higher than that of boy(8.79%) ($P<0.05$). WBC count was higher than normal for 22.01%, normal accounted for 49.28%, lower than normal for 28.71% in MP-DNA positive children. Serum MP-IgG positive rate was 69.86% in MP-DNA positive children. **Conclusion** MP-DNA testing has important value to the pediatric respiratory infection diagnosis, detection of multiple projects has important significance to preventing illness aggravating.

Key words: mycoplasma pneumoniae; respiratory tract infection; polymerase chain reaction

支原体肺炎是机体感染肺炎支原体(MP)而引起的肺部炎症,近年支原体肺炎的发病率出现逐年递增的趋势^[1]。MP是常见的引起儿童呼吸道感染的病原体,由于初期感染的临床表现非特异性症状,不易鉴别而被忽视,造成累及多系统和器官的损害^[2],往往过度自身免疫力是造成重症肺炎及肺外并发症的主要原因^[3]。实验室指标检查是诊断 MP 感染的可靠依据。为了解小儿呼吸道 MP 感染的情况,本研究对近 2 年来本地区接诊的婴幼儿,通过荧光 PCR 方法检测 MP-DNA,并检测血常规和 MP 抗体,现将检测结果作以下分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广州医学院荔湾医院和广州医科大学附属第一医院 2014—2015 年疑似 MP 感染患儿 2 018 例,其中男 1 274 例,女 744 例;年龄分布:<6 个月 319 例,6 个月至<1 岁 646 例,1~<3 岁 516 例,3~<14 岁 537 例。所有患儿均

有发热和咳嗽等症状。

1.2 仪器与试剂 无菌咽拭子及保存液由广州阳普医疗科技股份有限公司生产,MP-DNA 检测试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司生产,MP 血清 IgG 检测试剂盒由富士瑞必欧株式会社公司生产。主要仪器有 ABI 7500 荧光定量 PCR 扩增仪(美国 life 公司生产)和 Sysmex XS-1000i 血细胞分析仪(日本希森美康株式会社生产)。

1.3 方法

1.3.1 咽拭子 MP-DNA 检测 采用荧光定量 PCR 技术, $>1\times 10^3$ copies/mL 为阳性。具体步骤:咽拭子采样后放入保存液中送检,充分震荡摇匀,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清取沉淀加入 50 μ L 的核酸提取液混匀,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清进行 PCR 测定。每次操作均设阴性、阳性对照,操作过程严格按照操作规程进行。

1.3.2 白细胞计数和分类 用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝管抽取 2 mL 外周血,摇匀后上血细胞分析仪进行白细胞计数和分类。正常值参照:<1 岁,白细胞总数为(5~12)×10⁹/L,中性粒细胞百分比为 31%~40%,淋巴细胞百分比为 40%~60%;1~14 岁,白细胞计数总数为(4~10)×10⁹/L,中性粒细胞百分比为 50%~70%,淋巴细胞百分比为 20%~40%。

1.3.3 血清 MP-IgG 检测 用无抗凝管抽取 2 mL 外周血,分离血清后,采用被动凝集法进行血清 MP-IgG 检测,>1:40 为阳性。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同年龄组 MP-DNA 阳性率比较 >1~3 岁组 MP-DNA 阳性率为 10.66%,均明显高于<6 个月组和 6 个月至<1 岁组($P < 0.001$),而 3~<14 岁组 MP-DNA 阳性率为 18.25%,均高于其他年龄组($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 不同年龄组 MP-DNA 阳性率比较

年龄	<i>n</i>	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
<6 个月	319	15	4.70
6 个月至<1 岁	646	41	6.35
1~<3 岁	516	55	10.66
3~<14 岁	537	98	18.25
合计	2 018	209	10.36

2.2 不同月份 MP-DNA 阳性率比较 7~9 月份阳性率为 16.11%,均明显高于其他月份($P < 0.05$),10~12 月份阳性率为 11.8%,均明显高于 1~6 月份($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 不同月份 MP-DNA 阳性率比较

月份	<i>n</i>	阳性例数(<i>n</i>)	阳性率(%)
1~3 月	518	25	4.83
4~6 月	367	23	6.27
7~9 月	633	102	16.11
10~12 月	500	59	11.80
合计	2 018	209	10.36

2.3 不同性别 MP-DNA 阳性率比较 女性总阳性率为 13.04%(112/1 274),高于男性的 8.79%(97/744),且差异具有统计学意义($\chi^2 = 9.122 7, P < 0.05$)。

2.4 MP-DNA 阳性患者白细胞计数检测情况 在 209 例阳性患者中,白细胞计数平均值为(7.9±3.5)×10⁹/L;白细胞计数、中性粒细胞比例和淋巴细胞比例在阳性病例中的分布见表 3。

表 3 MP-DNA 阳性患者白细胞计数检测情况[*n*(%)]

MP-DNA	白细胞计数	中性粒细胞比例	淋巴细胞比例
偏高	46(22.01)	52(24.88)	48(22.97)
正常	103(49.28)	100(47.85)	117(55.98)
偏低	60(28.71)	57(27.27)	44(21.05)

2.5 MP-DNA 阳性患者血清 MP-IgG 检测情况 209 例 MP-DNA 阳性中 146 例血清 MP-IgG 阳性,阳性率为 69.86%。

3 讨 论

3.1 MP 检出情况分析 MP 在全球范围内存在,一般为散发性,3~6 年可发生地区性流行,人群密集地区会集中发病;我国 MP 引起的肺炎发病率高于国外地区;在中国支原体肺炎有季节性特点,秋冬季发病率较高;有 2%~5% 的 MP 感染患儿发生肺炎^[4],多有发热,伴有头痛和刺激性咳嗽。MP 感染引起的儿童肺炎大部分为 5~15 岁的少年儿童,偶然会在 5 岁以下儿童中发生。23%~50% 的学龄前儿童和青少年社区获得性肺炎是由 MP 感染导致的^[5]。本研究结果显示,3~<14 岁组 MP-DNA 阳性率为 18.25%,均高于其他年龄组,随着年龄的减小阳性率而降低;7~9 月份 MP-DNA 阳性率为 16.11%,均高于其他月份的阳性检测率,10~12 月份阳性率为 11.80%,均明显高于 1~6 月份,存在季节性差异,秋冬季发病率高;同时,女性患儿 MP-DNA 阳性率为 13.04%,高于男性患儿的 8.79%,与安徽刘伶^[6]报道的一致。通过本研究发现,MP 感染患儿的阳性率为 10.36%,远低于陕西西安地区^[7]的检出率,但与浙江嘉兴地区^[8]一致,可能与地域、取样季节和选择的检测对象有关。

3.2 MP 核酸检测与抗体检测的一致性分析 感染的肺炎近年发病率持续升高,耐药性不断增加,探讨早期、快速检测 MP 方法非常重要。在临床上对顽固性剧咳、哮喘、持续发热和普通抗菌药物治疗无效的患者,应及时进行 MP-DNA 检查,以免漏诊和误诊。文献^[9]报道采用 PCR 技术检测痰液标本中的 MP,116 例标本中 66 例标本 PCR 试验阳性,32 例血清 MP 抗体阳性,PCR 法灵敏度要高于血清学检测。另外文献^[10]报道核酸检测阳性为 87 例,真阳性 85 例,灵敏度为 85%,特异度 96%;而抗体检测阳性为 103 例,真阳性为 70 例,灵敏度为 70%,特异度为 69%。本研究对 209 例 MP-DNA 阳性患者行血清 MP-IgG 检测,146 例 MP-IgG 阳性,阳性率为 69.86%。血清学检测结果不能避免患儿的假阳性和假阴性问题,因为感染 MP 肺炎的儿童,临床治疗治愈后体内仍存有一定强度的抗体滴度,接受抗体检测时会出现假阳性;而免疫缺陷不产生抗体或免疫力低下的儿童自身抗体滴度低,检测结果出现假阴性就会失去临床治疗的机会^[11]。但任何一种检测方法都有其检测范围和局限性,且还和标本取材有关。因此,MP-DNA 和抗体联合检测才可以提高 MP 检测的灵敏度和特异度。

3.3 MP 感染与白细胞计数的关系 由于 MP 引起小儿呼吸道感染临床症状不明显,与病毒性和细菌性呼吸道感染很难区分鉴定。所以本研究对患者进行了血常规检测,由白细胞计数来判断是 MP 感染还是病毒性和细菌性感染。文献^[12]报道白细胞计数≤10×10⁹ 时,MP 抗体阳性患者的阳性率明显高于白细胞计数>10×10⁹/L 的患者,也有报道血常规白细胞计数升高占 65%,降低占 20%^[13],与本研究结果存在一定差异(升高占 22.01%,降低占 28.71%)。白细胞计数低于 10×10⁹/L,呼吸道感染患者也很难鉴别是 MP 还是病毒性呼吸道感染,所以白细胞计数不能判断与诊断部分患者的 MP 感染。对小儿感染 MP 进行血常规的测定的同时应进行 MP-DNA 测定,才能做到明确诊断与及时治疗。

参考文献

[1] 陈学高. 小儿支原体肺炎的诊治进展[J]. (下转第 60 页)

3 讨 论

ISO15189 CNAS-CL02:2012《医学实验室质量和能力认可准则》中规定,对开展某一新的检测项目,更换检测系统或仪器或改变检测试剂盒产商时,实验室需对其相关方法学分析性能予以验证,对产商提供的评价资料中的主要性能予以确认。每年并定期对仪器进行性能验证。本文依据 CL1A'88^[4]、EP15-A2^[5]、EP9-A2^[6] 等对 VITROS 5600 进行精密度、准确度、线性范围、可报告范围、参考区间进行验证。17 个生化项目 2 个水平质控批内精密度小于 $1/4TEa$,批间精密度小于 $1/3TEa$,表明本仪器检测结果重复性良好。准确度验证偏倚均小于 $1/2TEa$,表明该仪器检测结果准确。线性范围是一种能力,在一定测量区间,可提供测量结果与样本中测量物的量值直接成比例,在此范围内,报告结果显示标本中确实含有被检测物的含量线性范围验证^[7]。17 项回归方程 a 值均在 1.00 ± 0.05 范围内,相关系数 $r \geq 0.975$,表明本仪器线性范围良好。为了保证稀释后结果的准确可靠,本研究针对临床不同项目高值的需要,选用仪器线性范围内的高值患者标本进行不同稀释倍数的验证^[8]。临床可报告范围可报告范围验证结果 17 个项目的 $R < 1/2TEa$,表明该仪器说明稀释后的结果准确可靠。生物参考区间验证均合格,厂商或提供参考区间的实验室报告的 95% 参考区间可以接受,表明可以引用此参考范围。

综上所述,强生 VITROS 5600 全自动生化免疫分析仪是一部具有良好精密度、准确度、可报告范围宽的检测系统,每年定期对该系统进行性能验证,保证检测结果可靠、准确。同时与检验科这 17 个生化项目其他检测方法进行比对,统一参考范围,为临床提供统一、标准化可靠准确的检测结果。干湿生化分析仪在统一参考区间后,解决了患者在门诊急诊检测同一项目时检测结果无可比性的障碍,给临床提供方便,在疾病的诊断和治疗方面意义重大^[9]。同时,当发现验证不合格的部分应按规定重新验证,并查找仪器系统故障。并对新购置的检测系统在正式用于检测样本前和正在运行的检测系统分析性能进行评价,确认检测系统的分析性能满足临床要求,保证检验

结果的可靠性。

参考文献

- [1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL02 医学实验室质量和能力认可准则(ISO15189:02)[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [2] 丛玉隆,秦小玲. 临床实验室概论[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:1-10.
- [3] Pezzini A, Del Zotto E, Archetti S, et al. Plasma homocysteine concentration, C667T MTHFR genotype, and 844 ins 68bp CBS genotype in young adults with spontaneous cervical artery dissection and athero thrombotic stroke[J]. Stroke, 2002, 33(3):664-669.
- [4] CL1A'88 Rules and regulation[S]. Federal Register, 1992, 57-40.
- [5] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP15-A2. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2000.
- [6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using patient Samples[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [7] 李婷婷, 宁芬, 陆雅春. 日立 7600 全自动生化分析仪检测系统性能验证[J]. 安徽医学, 2013, 34(11):1679-1682.
- [8] 马红雨, 熊雪松, 罗丹, 等. 7600 生化分析仪检测系统的性能验证[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2011, 5(9):2619-2623.
- [9] 于森琛, 李士军, 孙国华, 等. 生化部分常规项目干湿化学检测结果一致性分析[J]. 大连医科大学学报, 2016, 38(2):172-176.

(收稿日期:2016-08-03 修回日期:2016-10-22)

(上接第 55 页)

临床肺科杂志, 2011, 16(8):1246-1247.

- [2] Meyer SP, Streuli JC, Iff T, et al. Mycoplasma pneumonia associated encephalitis in childhood-nervous system disorder during or after a respiratory tract infection[J]. Klin Padiatr, 2011, 223(4):209-213.
- [3] Narita M. Pathogenesis of extra pulmonary manifestations of Mycoplasma pneumonia n infection with special reference to pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(3):162-169.
- [4] 潘庭荣, 简国江, 黎金凤, 等. 432 例儿童呼吸道感染患者肺炎支原体检测结果分析[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(4):395-397.
- [5] Waites KB. What is new in diagnostic testing and treatment approaches for Mycoplasma pneumonia infections in children[J]. Adv Exp Med Biol, 2011, 719:47-57.
- [6] 刘伶. 肺炎支原体-DNA 检测对小儿呼吸道感染的诊断价值[J]. 蚌埠医学院学报, 2014, 39(11):1564-1565.
- [7] 杨文青, 吕晓丽, 李锐成, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4):416-418.

- [8] 宁瑶, 李红胜, 陈松劲. 实时荧光定量 PCR 在肺炎支原体 DNA 检测中的应用[J]. 浙江临床医学, 2014, 16(5):810-811.
- [9] 章海峻, 陆春琴. 痰液肺炎支原体 DNA 与血清 MP-Ab 联合检测在儿童急性肺炎支原体肺炎感染中的诊断价值[J]. 中国乡村医药, 2015, 22(17):65-66.
- [10] 舒美莲. 肺炎支原体核酸荧光 PCR 法与血清被动凝集法的比对分析[J]. 延边医学, 2014, 125(18):31-33.
- [11] 卢志威, 赵辉, 郑跃杰, 等. 三种方法对儿童肺炎支原体感染诊断的动态评价[J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(4):382-385.
- [12] 卓卫民. 小儿肺炎支原体抗体检测结果及相关分析[J]. 中外医疗, 2012, 31(18):163-164.
- [13] 付卓, 郑跃杰. 20 例儿童难治性支原体肺炎临床分析[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(3):348-350.

(收稿日期:2016-08-20 修回日期:2016-11-09)