

• 论 著 •

RT-PCR 检测在疑似肺炎支原体感染患者中的应用研究

胡 森¹, 马燕芬², 李向平³, 马亚琼⁴, 李平法^{5△}

(1. 新乡医学院三全学院, 河南新乡 453003; 2. 西安交通大学第一附属医院, 西安 710061; 3. 河南省骨科医院, 郑州 450000; 4. 汝州市人民医院, 河南平顶山 467500; 5. 新乡医学院, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测肺炎支原体(MP)DNA 在疑似 MP 感染患者中的应用价值。方法 采用 RT-PCR 对疑似 MP 感染患者血清、痰、胸腔积液、鼻咽拭子、肺泡灌洗液、支气管灌洗液标本进行 MP-DNA 检测。结果 1 402 例标本 MP-DNA 检测总阳性率为 12.20%, 血清标本检测阳性率最低, 仅为 2.36%, 痰、肺泡灌洗液及支气管灌洗液检测阳性率较高, 依次为 62.96%、77.08% 和 88.71%。结论 RT-PCR 法适用于多种类型标本 MP-DNA 检测, 是诊断 MP 感染的有效方法之一。

关键词:实时荧光定量; 聚合酶链反应; 肺炎支原体; DNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.014 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2017)11-1480-03

Application value of RT-PCR in Mycoplasma pneumoniae infection

HU Miao¹, MA Yanfen², LI Xiangping³, MA Yaqiong⁴, LI Pingfa^{5△}

(1. San Quan Collage of Xin Xiang Medical University, Xinxiang, He'nan 453003, China; 2. the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shanxi 710061, China; 3. Orthopaedic Hospital of Henan Province, Zhengzhou, He'nan 450000, China; 4. Ruzhou People's Hospital, Pingdingshan, He'nan 467500, China; 5. Xinxiang Medical University, Xinxiang, He'nan 453003, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinic significance of real-time fluorescent quantity polymerase chain reaction(RT-PCR) for detection of Mycoplasma pneumoniae(MP) DNA in patients suspected with MP infection. **Methods** A total of 1 402 samples, including serum, sputum, pleural fluid, nasopharyngeal swab, alveolar irrigating solution and bronchial irrigating solution, were detected for MP-DNA by using RT-PCR. **Results** The total positive rate all samples were 12.20%. The positive rate of serum was the lowest, which was 2.36%. The positive rates of sputum, alveolar irrigating solution and bronchial irrigating solutions were relatively high, which were 62.96%, 77.08% and 88.71%, respectively. **Conclusion** RT-PCR could be fitted for the detection of MP-DAN in various samples, which could be effective method for the diagnosis of MP infection.

Key words: real-time fluorescent quantity; polymerase chain reaction; Mycoplasma pneumoniae; DNA

肺炎支原体(MP)是呼吸道感染常见病病原体之一^[1-2],虽然 MP 感染具有部分典型的临床症状、体征和影像学改变,但难以与其他肺部感染相鉴别。目前,MP 耐药率呈逐年上升趋势,2009 年两项研究显示,儿童 MP 感染耐药率分别为 83%^[3]和 92%^[4],2010 年进行的研究显示,成人 MP 感染耐药率为 69%^[5]。实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)是检测病原体 DNA 的常用方法,具有灵敏度高、特异性强等优点,适用于感染性疾病的病原体检测。本研究采用 RT-PCR 对疑似 MP 感染患者各类型标本进行 MP-DNA 检测,旨在分析该方法的临床应用价值。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 1 月到 2016 年 11 月,于新乡医学院第一附属医院就诊的疑似 MP 感染患者。

1.2 仪器与试剂 美国 ABI 公司 7500 型 PCR 扩增仪;中山大学达安基因有限公司 RT-PCR 法 MP-DNA 检测试剂盒。

1.3 方法 采集患者标本类型包括支气管灌洗液、痰或胸腔积液等标本。采用 RT-PCR 法对各类型标本进行 MP-DNA 检测,结合患者出院诊断结果,分析 MP-DNA 检测结果与临床诊断结果的符合率。MP-DNA 检测方法 & 结果判断标准参照

试剂盒及仪器说明书。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以例数和百分率表示,组间比较用卡方检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结 果

共采集标本 1 402 例,检出 MP-DNA 阳性标本 171 例,对应患者 164 例。秋季是 MP 感染高发季节,婴儿组阳性率低,学龄前组阳性率较高,血液标本阳性率低,而痰、肺泡灌洗液、支气管灌洗液标本阳性率较高,不同标本检测阳性结果与临床诊断结果的符合率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。不同年份、不同季节、不同年龄组、不同类型标本 MP-DNA 检测阳性率见表 1~4。

表 1 不同年份及不同季节标本 MP-DNA 检测结果

季度	2014 年		2015 年		2016 年	
	n	阳性[n(%)]	n	阳性[n(%)]	n	阳性[n(%)]
第一季度	127	9(7.09)	171	18(10.53)	136	21(15.44)
第二季度	106	10(9.43)	108	4(3.70)	83	5(6.02)
第三季度	94	12(12.77)*	86	17(19.77)*	131	38(29.01)*

续表 1 不同年份及不同季节标本 MP-DNA 检测结果						
季度	2014 年		2015 年		2016 年	
	<i>n</i>	阳性[<i>n</i> (%)]	<i>n</i>	阳性[<i>n</i> (%)]	<i>n</i>	阳性[<i>n</i> (%)]
第四季度	113	3(2.65)	93	8(8.60)	154	26(16.88)
合计	440	34(7.73) [#]	458	47(10.26)	504	90(17.86)

注:与同年度其他季度检测阳性率比较,* $P<0.05$;与 2016 年检测阳性率比较,[#] $P<0.05$ 。

表 2 不同年龄组标本 MP-DNA 检测结果			
年龄组	年龄范围(岁)	标本例数(<i>n</i>)	阳性[<i>n</i> (%)]
婴儿组	0~<1	250	7(2.80)
幼儿组	1~<3	402	36(8.96)* [#]
学龄前组	3~<7	400	73(18.25)*
学龄组	7~14	350	55(15.71)* [#]
合计	—	1 402	171(12.20)

注:—表示无数据;与婴儿组检测阳性率比较,* $P<0.05$;与学龄前组检测阳性率比较,[#] $P<0.05$ 。

表 4 164 例 MP-DNA 阳性患者的主要临床诊断及感染符合率			
标本类型	<i>n</i>	MP 感染符合率[%(<i>n</i> / <i>n</i>)]	主要临床诊断
血清	24	92.31(24/26)	12 例大叶性肺炎,8 例支气管肺炎,2 例支气管哮喘,2 例过敏性紫癜
痰液	34	100.00(34/34)	19 例大叶性肺炎,10 例支气管肺炎,3 例支气管哮喘,2 例毛细支气管炎
胸腔积液	8	100.00(8/8)	5 例大叶性肺炎,3 例支气管肺炎
鼻咽拭子	1	100.00(1/1)	1 例大叶性肺炎
胸腔穿刺液	8	100.00(8/8)	5 例大叶性肺炎,2 例支气管哮喘,1 例支气管肺炎
肺泡灌洗液	37	100.00(37/37)	18 例大叶性肺炎,13 例支气管肺炎,1 例呼吸道感染,2 例支气管哮喘,3 例过敏性紫癜
支气管灌洗液	52	98.11(52/53)	27 例大叶性肺炎,16 例支气管肺炎,1 例呼吸道感染,3 例支气管哮喘,5 例过敏性紫癜

3 讨 论

MP 是呼吸道感染常见病原体之一,可引起慢性支气管炎、支原体肺炎、大叶性肺炎等呼吸系统疾病^[6-7]。MP 感染检测方法较多,包括分离培养法、RT-PCR 检测病原体,化学发光法检测 MP 抗体。其中,分离培养法是 MP 感染检测的金标准,但耗时费力,临床广泛应用受限^[8]。有学者认为,季节、温度及患者年龄、性别对 MP 检测阳性率有一定的影响^[9]。RT-PCR 具有独特的优势,在生命科学基础研究和应用研究方面具有重要作用^[10-11]。尤其是具有较高的检测精密度和准确度,因此广泛应用于疾病基因诊断及病原体检测等领域^[12]。

本研究结果显示,2014—2016 年 MP-DNA 检测阳性呈上升趋势,且 2014 年与 2016 年 MP-DNA 检测阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$),可能与 MP 耐药性增强,导致感染率上升有关。在不同季度中,第三季度标本 MP 检测阳性率最高,说明秋季是 MP 易感季节。本研究结果表 2 显示,在不同年龄组患者送检标本中,婴儿组标本 MP 检测阳性率最低,学龄前组标本阳性率最高,原因可能在于婴幼儿与外界接触较少,MP 感染风险小,但学龄期儿童活动范围加大,群居生活增多,但免疫力尚未完全形成,因此感染风险明显升高。在各类型标本中,支气管灌洗液标本 MP 检测阳性率最高,达到 88.71%,痰、肺泡灌洗液标本 MP 检测阳性率则达到 62.96%和 77.08%;血清标本 MP 检测阳性率最低,仅为 2.36%,与其

表 3 不同类型标本 MP-DNA 检测结果					
标本类型	<i>n</i>	构成比(%)	阳性(<i>n</i>)	阳性构成比(%)	阳性率(%)
血清	1 187	84.66	28	16.37	2.36
痰液	54	3.85	34	19.88	62.96*
胸水	22	1.57	8	4.68	36.36*
鼻咽拭子	5	0.36	1	0.59	20.00*
胸腔穿刺液	24	1.71	8	4.68	33.33*
肺泡灌洗液	48	3.42	37	21.64	77.08*
支气管灌洗液	62	4.42	55	32.16	88.71*
合计	1 402	100.00	171	100.00	12.20

注:构成比指某类型标本在所有标本中的构成比,构成比=某类型标本数/所有标本总数 $\times 100$;阳性构成比指某类型阳性标本在所有阳性标本中的构成比,阳性构成比=某类型阳性标本数/阳性标本总数 $\times 100$;阳性率指某类型阳性标本在该类型标本中所占比例,阳性率=某类型阳性标本数/该类型标本总数 $\times 100$;与血清标本检测阳性率比较,* $P<0.05$ 。

他标本类型检测阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$)。因此,选择合适类型的标本对提高 MP-DNA 检出率十分重要。1 402 例标本 MP-DNA 检测总阳性率为 12.20%,除血清标本外,其他类型标本检测阳性率达到 66.51%,说明对于疑似 MP 感染患者,在病灶临近部位采集灌洗液、胸腔积液、鼻咽拭子、痰标本,并进行 MP-DNA 检测,可提高 MP 感染检测阳性率。各种类型标本经 RT-PCR 检测,均可检出 MP-DNA 阳性标本,但不同类型标本的检测阳性率有一定的差异,说明对于不同类型的标本,以 MP-DNA 检测诊断 MP 感染的价值有所不同,也说明选择合适类型的标本对提高 MP-DNA 检测阳性率十分重要。

综上所述,RT-PCR 适用于疑似 MP 感染患者不同类型标本的 MP-DNA 检测,可提高 MP 感染的诊断率,为临床提供可靠的依据,避免抗菌药物滥用及耐药性的产生。

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] 殷皓,唐建英,孙伟峰. 呼吸道感染患儿肺炎支原体 IgM、白细胞及快速 C-反应蛋白检测的应用(下转第 1484 页)

外,PG I 检测也可用于胃癌早期诊断及患者病情评价^[11]。G-17 是胃 G 细胞合成并分泌的一种肽类,主要参与胃癌的发生、发展,影响胃肠肿瘤的调控及增殖,包括细胞恶性转化及癌细胞生长等^[12]。胃癌进展期患者可由于 PG I 基因突变导致 PG I 水平严重降低,也可因胃蛋白酶原基因突变,而失去分泌 PG I 的能力,若黏膜细胞持续更新,则 PG I 分泌水平将进一步降低。因此,进展期胃癌患者 PG I 水平降低较为明显。此外,进展期或化疗无效胃癌患者血清 G-17 水平显著升高。本研究结果显示,化疗疗效客观评价有效患者化疗后血清 CEA 及 G-17 水平较化疗前明显降低,且化疗后血清水平低于化疗无效患者,化疗无效患者血清 CEA、G-17S 水平则明显升高,PG I 水平则呈相反的变化趋势。因此,胃癌化疗患者血清 PG I、CEA、G-17 水平随化疗疗效的变化而变化。本研究 ROC 曲线分析结果显示,血清 PG I 以 70 μg/L 为临界值,CEA 以 7.35 μg/L 为临界值,G-17 以 14.22 pmol/L 为临界值时,三者联合检测评价胃癌患者化疗效果的 ROC 曲线下面积、灵敏度、特异性均优于三则单独检测,说明三者联合检测在胃癌化疗疗效评价方面具有更为重要的意义。

综上所述,胃癌化疗无效患者血清 PG I 水平明显降低,CEA、G-17 水平明显升高,化疗有效患者呈相反变化趋势。PG I、CEA、G-17 联合检测评价胃癌化疗疗效的准确性高、特异性强、敏感度高,可作为胃癌化疗疗效评价的参考指标。

参考文献

[1] 谢津璧,万坚,张慧,等.血清胃蛋白酶原在胃癌及胃溃疡筛查中的临床意义[J].世界华人消化杂志,2014,10(31):4820-4824.

[2] Jing Q,Qian Y,Jian W,et al. A clinical prognostic scoring system for resectable gastric cancer to predict survival and benefit from paclitaxel-or oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy[J]. Drug Des Devel Ther, 2011, 10(1): 241-258.

[3] Kotowicz B,Fuksiewicz M,Jonska-Gmyrek JA,et al. The

assessment of the prognostic value of tumor markers and cytokines as SCCAg,CYFRA 21-1,IL-6,VEGF and sT-NF receptors in patients with squamous cell cervical cancer,particularly with early stage of the disease[J]. Tumor Biology,2016,37(1):1271-1278.

[4] 马颖杰,曹邦伟,李琴.胃癌患者及其化疗后胃蛋白酶原与胃泌素变化的临床意义[J].临床和实验医学杂志,2014,13(3):186-189.

[5] 陈晓秋,刘楠楠,王树滨.晚期胃癌维持化疗的生存分析[J].肿瘤防治研究,2014,11(12):1339-1342.

[6] 杨春,潘勇,朱学强,等.FOLFOX6 方案对进展期胃癌新辅助化疗的临床疗效[J].中华肿瘤防治杂志,2015,11(2):122-124.

[7] 袁立新,陈忠.胃癌患者血清 CEA、CA19-9 及 CA72-4 联检的临床意义[J].中国误诊学杂志,2011,11(12):2868-2869.

[8] 杜宁.影像学检查和血清肿瘤标志物检测对肺癌诊断及病理分型的价值[J].中国医药科学,2013,3(20):95-97.

[9] 田荣华,查云飞.血清 Cyfra21-1、CEA 及影像学变化早期诊断肺癌复发与转移的研究进展[J].医学综述,2012,18(21):3568-3570.

[10] 张学军,吕少华,李玉震.胃癌化疗前后血清 CA19-9、CA72-4、癌胚抗原表达的变化与化疗疗效关系的分析[J].山西医药杂志,2014,4(3):264-267.

[11] 程兆明,李龙,陈琳娜.血清胃蛋白酶原 I、II 与胃泌素联合检测对胃癌的诊断价值[J].中华消化内镜杂志,2002,19(1):32-34.

[12] 蒋孟肖,肖志坚,张荣军,等.血清胃蛋白酶原 I、II 与胃泌素联合检测对胃癌诊断的临床意义[J].标记免疫分析与临床,2004,11(3):131-133.

(收稿日期:2017-01-12 修回日期:2017-03-11)

(上接第 1481 页)

探讨[J].国际检验医学杂志,2010,31(12):1464-1465.

[3] Liu Y,Ye XY,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 DL,Mi ZH,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 CJ,Yin YD,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] Ferwerda A,Moll HA,de Groot R. Respiratory tract infections by Mycoplasma pneumoniae in children:a review

of diagnostic and therapeutic measures[J]. Eur J Pediatr, 2001, 160(8): 483-491.

[8] 苑鑫,刘又宁.肺炎支原体感染检测技术的研究进展[J].军事医学,2012,36(4):316-318.

[9] 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.

[10] Rees B,Li WM. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining CYP1A transcripts in three genera of salmonids[J]. Aquat Toxicol, 2004, 66(4): 357-368.

[11] 张立群,王云霞,姚春艳,等.高特异性基因芯片法检测结核分枝杆菌的临床应用评价[J].中华医院感染学杂志,2010,20(11):1505-1508.

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

(收稿日期:2016-12-28 修回日期:2017-02-28)