

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 19. 022

RTFQ-PCR 检测儿童肺炎支原体 16S rRNA 的临床意义

刘君丽

(湖北省武汉市蔡甸区人民医院检验科 430050)

摘 要:**目的** 研究实时荧光定量聚合酶链反应(RTFQ-PCR)检测儿童肺炎支原体(MP)16S rRNA 的临床意义。**方法** 回顾性分析 2014 年 12 月至 2016 年 12 月在该院接受治疗的肺炎患儿 156 例,将以上患儿分为 MP 感染肺炎(MPP)组,非 MP 感染肺炎(非 MPP)组;另选 24 例健康儿童作为对照组。使用颗粒凝集试验检测血清 MP 抗体,使用 RTFQ-PCR 检测患儿 MP 16S rRNA 基因,并与血清学的检测结果进行对比,分析患儿病情和基因拷贝数量的联系。**结果** 156 例患儿中两份血清 MP 抗体有 4 倍以上升高者 112 例,两份和单份血清 MP 抗体检测结果差异有统计学意义($P<0.05$);单份血清检测的阴性预测值为 37.11%,阳性预测值为 62.02%,MP 诊断的正确率为 50.89%;112 例确诊的 MP 感染患儿中 RTFQ-PCR 检测为阳性 109 例,敏感度为 97.30%;对照组和非 MPP 组检测为阴性 68 例,其特异度为 100.00%;RTFQ-PCR 检测阴性预测值为 97.10%,阳性预测值为 100.00%;难治性 MPP 检测出基因拷贝数量为 (6.32 ± 1.80) copy/mL,高于普通性 MPP [(1.51 ± 0.02) copy/mL],差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** RTFQ-PCR 检测儿童 MP 16S rRNA 基因是诊断前期 MP 感染肺炎的可靠方法,效果好于血清 MP 抗体的检测,值得临床关注。

关键词: 实时荧光定量聚合酶链反应; 肺炎支原体; 16S rRNA

中图法分类号: R375+.2

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2018)19-2919-04

Clinical significance of real-time fluorescence quantitative PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae 16S rRNA in children

LIU Junli

(Department of Clinical Laboratory, Caidian District People's Hospital, Wuhan, Hubei 430050, China)

Abstract: Objective To study the clinical significance of real-time fluorescence quantitative(RTFQ) PCR detection of Mycoplasma pneumoniae (MP) 16S rRNA in children. **Methods** A total of 156 children cases of pneumonia treated in this hospital from December 2014 to December 2016 were retrospectively analyzed. The cases were divided into the MP infected pneumonia group (MPP group) and non-MP infected pneumonia group(non-MPP group); other 24 healthy children were selected as the control group. Serum MP antibody level was detected by using the particle agglutination test. MP 16S rRNA gene was detected by RTFQ-PCR, the results were compared with the serological detection results. The relationship between disease condition with gene copy number was analyzed. **Results** Among 156 cases, 112 cases had the MP antibody with over 4 fold increase in 2 serum samples, the MP antibody detection results had statistical difference between the 1 serum sample and 2 serum samples ($P<0.05$); the negative predicting value of single serum sample was 37.11%, the positive predicting value was 62.02%, the accuracy rate of MP diagnosis was 50.89%; among 112 cases of definitely diagnosed MP infection, 109 cases were positive in RTFQ-PCR detection, the sensitivity was 97.30%, 68 cases were negative in the control group and non-MPP group, the specificity was 100.00%; the negative predicting value 97.10%, the positive predicting value was 100.00%, the detected gene copy number in refractory MMP was (6.32 ± 1.80) copy/mL, which was higher than (1.51 ± 1.02) copy/mL in common MMP, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** RTFQ-PCR for detecting MP 16S rRNA gene in children is a reliable method for the diagnosis of early stage MP infection pneumonia, the effect is better than the detection of serum MP antibody, it deserves clinical attention.

Key words: real-time fluorescence quantitative PCR; Mycoplasma pneumoniae; 16S rRNA

临床急性呼吸道感染中较为常见的病原体是肺炎支原体(MP),特别在儿童肺炎病原体中尤为常见。儿童社区获得性肺炎中有 30% 患儿是由 MP 所引起,但其他一些病原体感染所引起肺炎和 MP 感染所引起肺炎在临床体征和症状方面没有特殊差异,所以很难及时地进行诊断和治疗,造成抗菌药物在临床治疗中滥用^[1-2]。诊断 MP 金标准是直接对病原体进行检测,但由于 MP 生长非常慢,培养需要很长时间,而且对病原体分离条件要求高,使其在临床应用上受到很多的限制^[3]。咽拭子标本内 MP-DNA 能够在实时荧光定量聚合酶链反应(RTFQ-PCR)中较快检测出来,是目前临床上使用较为广泛的 MP 所导致肺炎的检测手段。本文通过 RTFQ-PCR 对儿童 MP 16S rRNA 的检测,以为患儿治疗提供一些新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2014 年 12 月至 2016 年 12 月在本院接受治疗的肺炎患儿 156 例。入选患儿的诊断依据:(1)在发病的 4 周内双份血清 MP 抗体滴度上升 4 倍以上;(2)符合《实用儿科学(第 7 版)》中肺炎的诊断依据。根据是否 MP 感染将以上患儿分为 MP 感染肺炎(MPP)组、非 MP 感染肺炎(非 MPP)组,另选 24 例健康儿童纳入对照组。3 组研究对象的一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性,见表 1。本研究经医院伦理委员会批准。

表 1 3 组研究对象临床资料状况对比				
组别	n	年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	病程($\bar{x}\pm s$,d)	男/女(n/n)
MPP 组	112	4.6 $\pm$ 3.8	10.4 $\pm$ 5.2	60/52
非 MPP 组	44	5.1 $\pm$ 3.5	11.2 $\pm$ 5.5	26/18
对照组	24	6.5 $\pm$ 3.1	—	14/10
F/χ^2		1.904	2.053	1.273
P		>0.05	>0.05	>0.05

注:—表示无数据

1.2 仪器与试剂 仪器:高速的低温离心机(德国 Eppendorf 公司生产)、离心沉淀机(德国 Heraeus 公司生产)、RTFQ-PCR 扩增仪(美国 BIO-RADicycler 公司生产)、微量的移液器(德国 Brand 公司产生)。试剂:Mp 16S rRNA 试剂盒(中国达安基因有限公司生产)、SERODIA-MYCO II 的试剂盒(日本富士瑞必欧公司生产)。

1.3 MP 抗体的血清学检测 使用明胶颗粒载体的凝集试验对 MPP 组和非 MPP 组患儿的 MP 特异性抗体进行检测,依据试剂盒的说明书来进行^[4]。

1.3.1 反应图像的判定^[5] (1)颗粒呈现出纽扣形状的集合,外部的周边比较均匀且呈现为平滑圆形判定为(—);(2)颗粒呈现为小环形状,外部的周边比较均匀且呈现为平滑圆形判定为(±);(3)颗粒的环形

显著变大,外部的周边不够杂乱,不均匀分布在四周判定为(+);(4)底部的颗粒集合表现为膜形状的延伸判定为(++).

1.3.2 阳性判别依据^[6] 单份的血清 MP 抗体 $>1:150$ 时判定为 MP 抗体阳性。

1.3.3 血清标本的动态收集 (1)患儿第 1 份血清 MP 抗体 $>1:150$,在第 1 次采血后的两周再次进行采血,作为第 2 份的血清标本;(2)第 1 份血清 MP 抗体 $<1:150$,在第 1 次采血的 4 周后或者 MP 血清抗体呈现 4 倍以上升高再收集第 2 份血清标本。

1.4 RTFQ-PCR 检测 RTFQ-PCR 对 MP 16S rRNA 的基因进行检测,检测标本为患儿支气管的肺泡灌洗液,拷贝量大于 10^3 copy/mL 时判定为阳性^[7]。PCR 扩增与结果判定的依据:计算荧光强度曲线判别标本到达临界的阈值时所使用循环数量(C_t 值), C_t 值 <29.0 判定为阳性, C_t 值 ≥ 29.0 判定为阴性^[8]。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析使用 Pearson 相关进行检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患儿首份血清的 MP 抗体检测情况 156 例患儿中两份血清的 MP 抗体有 4 倍以上升高者 112 例,两份和单份血清 MP 抗体检测结果差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。在确诊的 MPP 患儿中,检测出阳性者 64 例,检测的敏感度为 56.27%;在对照组 24 例幼儿与非 MPP 组 44 例患儿内检测出阴性者 28 例,假阳性者 40 例,特异度为 40.98%;单份血清检测的阴性预测值为 37.11%,阳性预测值为 62.02%,MP 诊断的正确率为 50.89%。

表 2 检测患儿两份血清 MP 抗体情况对比(n)			
单份血清检测	两份血清 MP 抗体有 4 倍以上升高		总计
	—	+	
+	40	64	104
—	28	48	76
总计	68	112	180

注: $\chi^2=3.105, P<0.05$

2.2 RTFQ-PCR 对 MP 16S rRNA 检测情况 本研究检测的重复率较好,批间变异系数(CV)为 3.03%,批内 CV 为 0.94%,标准曲线斜率是 -2.904,线性的相关系数 r 为 0.973。线性方程为 $Y=-2.793+39.004$ 。阳性标本拷贝的数值(10.01×10^3)~(3.98×10^3) copy/mL,平均为 $(6.04\pm 0.57)\times 10^3$ copy/mL。见图 1~2。

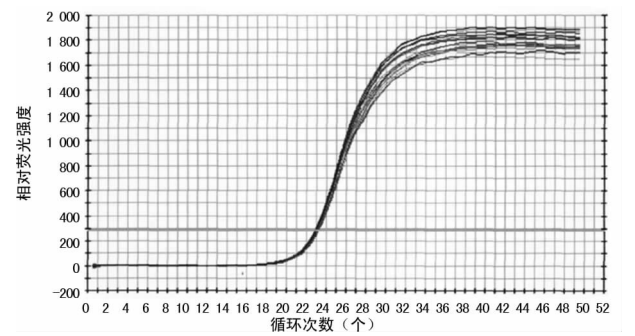


图 1 RTFQ-PCR 检测批内重复性

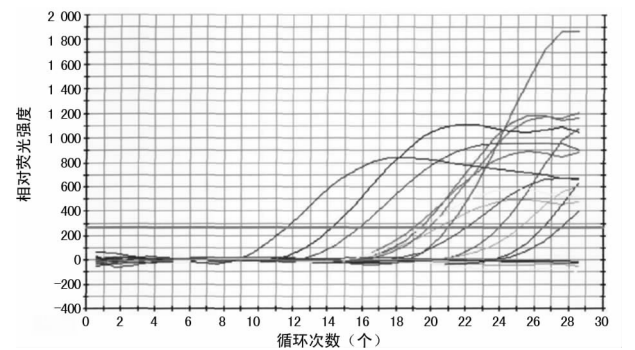


图 2 部分样品和质控品扩增的曲线

2.3 RTFQ-PCR 对 MP 16S rRNA 检测正确性
112 例确诊 MP 感染患儿中 RTFQ-PCR 检测出阳性 109 例,敏感度为 97.30%;对照组 24 例和非 MPP 组 44 例患儿中检测出阴性 68 例,特异度为 100.00%;RTFQ-PCR 检测的阴性预测值为 97.10%,阳性预测值为 100.00%。见表 3。

RTFQ-PCR 检测结果	两份血清 MP 抗体呈 4 倍以上升高		总计
	-	+	
-	68	3	71
+	0	109	109
总计	68	112	180

注: $\chi^2=24.174, P<0.05$

2.4 RTFQ-PCR 对 MP 16S rRNA 检测的拷贝量与患儿病情程度联系情况 难治性 MPP 检测出基因拷贝数量为 (6.32 ± 1.80) copy/mL,比普通型 MPP 水平 $[(1.51 \pm 0.02)$ copy/mL]要高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

伴随着 MP 领域中分子生物学的广泛使用,PCR 技术对 MP 感染的快速检查已成为近些年来发展较快的一种检查 MP 的方法^[9]。相关研究显示,PCR 对 MP 感染检测敏感度为 76.0%,比抗原检测方法(8.4%)与培养法(26.0%)要高很多,但是 PCR 检测假阴性率仍然比较高,而且普通 PCR 在操作中容易受到外界的污染,不利于在临床广泛使用^[10-12]。

目前,新核酸检测技术 RTFQ-PCR 发展起来,它

检测结果快,操作流程也比较简单,整个过程是在封闭空间内进行的,也没有普通 PCR 后续的操作步骤,操作中污染的发生概率很小,也降低了假阳性率。相关研究显示,RTFQ-PCR 能够精准、敏感、快速地检测 MP-DNA 中的基因,整个检测过程只需要数小时,而且敏感度和特异度都比较高,可得知患儿体内 MP 的复制与感染状况,在诊断 MP 感染中有广阔应用前景^[13-15]。本研究显示,MP 感染血清学检测中,单份血清检测的阴性预测值只有 37.11%,阳性的预测值为 62.02%,MP 诊断的正确率仅为 50.89%。而使用 RTFQ-PCR 对患儿支气管的肺泡灌洗液检测结果其特异度为 100.00%,阴性预测值为 97.10%,阳性预测值为 100.00%,各项指标均优于血清学的检测结果。本研究也发现,病情严重患者其基因拷贝数量也更高,说明病情严重的患儿其体内 MP 的复制更加活跃。在临床上若怀疑患儿为严重的 MP 感染,则需要及时采用大环内酯类药物进行治疗,从而抑制 MP 的增殖。患者体内的 MP 复制较多时,体内黏液纤毛组成的清除系统受到的侵害就越严重,所以在临床治疗上采用大环内酯类药物的同时还要清除对黏液纤毛系统的侵害。由于大部分 MP 感染对大环内酯类药物高度敏感,临床诊断越早,用药越早,可明显降低 MP 感染程度;同时 MP 感染易诱发全身免疫反应及引起胸腔积液,前期使用糖皮质激素对减轻症状、改善预后有重要影响;另外,对大环内酯类药物耐药和免疫功能较差患儿可给予免疫球蛋白,改善机体免疫状态,减少合并感染发生。

综上所述,RTFQ-PCR 检测儿童 MP 16S rRNA 基因是诊断前期 MP 感染肺炎的可靠方法,效果好于血清 MP 抗体的检测,值得临床关注。

参考文献

[1] 王宗润,张力文,王宗美,等.实时荧光定量 PCR 法检测人粪便中艰难梭状芽孢杆菌[J].中国卫生检验杂志,2015,25(3):305-307.

[2] 林超群,黎运西,黎冠峰,等.血清肺炎支原体 DNA 定量对肺炎支原体感染的诊断价值[J].广东医学,2015,114(12):1880-1882.

[3] 朱镭,祁春茹,周向红,等.实时荧光聚合酶链反应检测肺部感染患者痰标本中军团菌[J].国际检验医学杂志,2015,73(18):2674-2676.

[4] 张焰荣,黄世杰,刘云高.荧光定量 PCR 与 ELISA 法检测儿童肺炎支原体感染的方法比较[J].中外医疗,2015,82(31):5-7.

[5] 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.

[6] 黄培,叶飞,吴胜军,等.基于定量 PCR 的(下转第 2925 页)

- [3] 彭继仁,葛萱.联合检测和肽素与高敏心肌肌钙蛋白 T 对急性心肌梗死早期诊断的价值[J]. 中国循环杂志,2014,29(10):772-775.
- [4] 付立强,赵文萍,贾辛未,等.急性 ST 段抬高型心肌梗死合并应激性高血糖患者围手术期应用 GLP-1 效果观察[J]. 山东医药,2017,57(6):65-67.
- [5] 郭英,都向阳,聂鑫,等.低风险心电图联合初次超敏肌钙蛋白 T 水平早期排除胸痛患者中的急性心肌梗死[J]. 实用医学杂志,2017,33(15):2573-2576.
- [6] 苏周.血清 BNP、HCY、hs-CRP 及心肌三联在急性心肌梗死中的诊断价值[J]. 临床医学研究与实践,2017,2(30):21-22.
- [7] 陈金安,张传耀,许勤华,等.阿替普酶联合依诺肝素钠对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者血浆 cTnT、LDH、CK-MB 和 SOD 水平的影响[J]. 临床心身疾病杂志,2017,23(4):5-7.
- [8] 徐景俊,张丽,卢晓潇,等.二维斑点追踪成像对急性心肌梗死患者经皮冠状动脉介入效果的评价及其与高敏肌钙蛋白 T 的相关性[J]. 中国全科医学,2015,18(23):2758-2761.
- [9] 刘家军,李小燕,杜成芬,等.丹参酮 II A 磺酸钠对急性心肌梗死大鼠心肌组织间液钙离子与心功能的影响[J]. 安徽医药,2016,20(4):643-646.
- [10] 赵倩,范亚平.血清 hs-cTnT 水平在急性心肌梗死早期诊断中的价值[J]. 山东医药,2015,45(13):35-37.
- [11] 范洪起. CK-MB、cTnT、cTnI 指标变化与急性心肌梗死范围的相关性研究[J]. 海南医学院学报,2014,20(5):602-604.
- [12] 孙晓溪,胡东旭,刘洋. PCI 术前应用血管通注射液对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者相关指标的影响[J]. 中国药房,2017,28(12):1633-1637.
- [13] HOFFMAN U, FERENCIK M, UDELSON J E, et al. Prognostic value of noninvasive cardiovascular testing in patients with stable chest pain: insights from the PROMISE trial (Prospective Multicenter Imaging Study for Evaluation of Chest Pain)[J]. Circulation, 2017, 135(24): 2320-2332.
- [14] 陈见红,陈宇,汪彪,等.高敏肌钙蛋白 T 在老年慢性心力衰竭与急性心肌梗死鉴别诊断中的价值[J]. 中国老年学杂志,2017,37(5):1150-1151.
- [15] JANSEN C H, PERERA D, WIETHOFF A J, et al. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging for the detection of ruptured coronary plaques in patients with acute myocardial infarction[J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188292.
- [16] 王峰. 四逆汤口服联合尿激酶溶栓治疗对改善急性 ST 段抬高型心肌梗死患者缺血再灌注损伤的效果观察[J]. 安徽医药,2016,20(9):1735-1738.
- [17] RADOVANOVIC D, SEIFERT B, ROFFI M, et al. Gender differences in the decrease of in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction during the last 20 years in Switzerland[J]. Open heart, 2017, 4(2): e000689.
- [18] 周莉莎,赵珍珍,李贵星,等. hs-cTnT 和 NT-proBNP 在急性心肌梗死患者预后中的价值研究[J]. 中国实验诊断学,2016,20(11):1859-1863.

(收稿日期:2018-01-08 修回日期:2018-04-21)

- (上接第 2921 页)
- 活性污泥 DNA 提取方法研究[J]. 安全与环境学报, 2016,16(3):221-226.
 - [7] 傅琼瑶,陈春羽,邬娇,等.一种快速定量检测类鼻疽伯克霍尔德菌的方法建立及评价[J]. 第三军医大学学报, 2015,37(17):1734-1738.
 - [8] 程忠雨,周亮,汤海霞. 16S rRNA 基因在肺炎支原体鉴定中的应用[J]. 中国疗养医学,2015,24(4):369-370.
 - [9] 张晓丽,高宝德,刘海燕,等. 巴什拜羊重组 SPLUNC1 蛋白对体外培养的绵羊肺炎支原体生长的影响[J]. 中国预防兽医学报,2016,38(5):361-365.
 - [10] 敬宏,韩晓华,陈琪玮,等. 巢氏 PCR 法扩增 16S rRNA 基因检测肺炎支原体[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(14):2310-2312.
 - [11] ZHOU Z B, LI X Z, CHEN X J, et al. Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of Mycoplasma pneumoniae by nested PCR in adults in Zhejiang, China[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(3):244-253.
 - [12] GREUB G, SAHLI R, BROUILLET R, et al. Ten years of R/D and full automation in molecular diagnosis[J]. Future Microbiol, 2016, 11(3):403-425.
 - [13] TATTI E, MCKEW B A, WHITBY C, et al. Simultaneous DNA-RNA extraction from coastal sediments and quantification of 16S rRNA genes and transcripts by real-time PCR[J]. J Vis Exp, 2016, 106(112):78-83.
 - [14] LI Y H, ZHOU W, YANG L, et al. Establishment of real-time fluorescence quantitative PCR for gluconobacter using SYBR green I[J]. Modern Food Sci Technol, 2015, 31(4):272-276.
 - [15] ORCE I G, SENDN L N, MARANO M R, et al. Novel set of real-time PCR primers for simultaneous detection of Liberibacter species associated with citrus Huanglongbing[J]. Sci Agric, 2015, 72(3):252-259.

(收稿日期:2018-01-20 修回日期:2018-05-04)