

恒温扩增法检测肺炎支原体 RNA 临床应用研究

徐晨¹, 刘周¹, 梁伟¹, 黄玲玲², 李昕¹, 童杨¹, 杨凯¹, 陈礼文¹

1. 安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽医科大学第二附属医院儿科

摘要: **目的** 研究恒温扩增法检测肺炎支原体(MP)RNA对临床诊断儿科患者MP感染的应用价值。**方法** 收集2016年10月—2017年7月安徽医科大学第二附属医院临床住院急性呼吸系统感染178例患儿咽拭子/痰标本及血清标本,其中咽拭子/痰液标本同时检测MP-DNA及MP-RNA,血清标本检测MP-Ab。根据患儿病程分为A组(病程≤10 d)和B组(病程>10 d),分别以MP-Ab、MP-DNA检测为参考比较恒温扩增法检测MP-RNA在各组间的阳性率差异,并评估其灵敏度、特异度、阳性预测值及阴性预测值。应用SPSS 21.0统计软件对数据进行统计分析。**结果** MP-DNA、MP-Ab与MP-RNA总体阳性率差异无统计学意义。A组中,MP-RNA阳性率(37.8%)高于MP-Ab阳性率(22.9%),B组中MP-RNA阳性率(10.6%)低于MP-Ab阳性率(23.1%),差异有统计学意义($P=0.003$, $P=0.001$)。与MP-DNA结果相比,MP-RNA阳性率差异无统计学意义。分别以MP-Ab、MP-DNA为参考方法评估MP-RNA的总体灵敏度为0.63/0.79、特异度为0.91/0.96、阳性预测值为0.67/0.85、阴性预测值为0.89/0.94。其中A组的灵敏度、特异度分别为0.94/0.88、0.79/0.90。**结论** 恒温扩增法检测MP-RNA具有较好的临床诊断效能,可应用于MP感染的早期临床诊断。

关键词: 肺炎支原体; 小儿肺炎; 荧光核酸恒温扩增; 方法学比较

中图分类号: R375.2 R725.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-4152(2018)09-1522-04

DOI: 10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000416

Clinical application of simultaneous amplification and testing method for detection the RNA of *Mycoplasma pneumoniae*

XU Chen, LIU Zhou, LIANG Wei, et al

Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Anhui

Medical University, Hefei, Anhui 230601, China

Abstract: Objective To evaluate the clinical application of simultaneous amplification and testing method for detection the RNA of *mycoplasma pneumoniae* (MP) in diagnosis of MP infection in pediatric patients. **Methods** During October, 2016 to July, 2017, Throat swab/sputum and serum specimens were collected from children with acute respiratory infections in inpatient departments. Among them, throat swab/sputum specimens were used to detect MP-DNA and MP-RNA, while serum specimens were used to detect MP-Ab. According to the children's course, Group A (disease course ≤10 d) and Group B (disease course >10 d) were divided, Based on the results of MP-Ab and MP-DNA detection, the difference of the positive rates of MP-RNA between each group was compared, while the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of MP-RNA were evaluated. Data were analyzed using SPSS 21.0.

Results Compared with the positive rate of MP-DNA, MP-Ab and MP-RNA, there was no significant difference among them. In Group A, the positive rate of MP-RNA (37.8%) was higher than MP-Ab (22.9%), and in Group B, the positive rate of MP-RNA (10.6%) was lower than MP-Ab (23.1%). The difference between the two groups was statistically significant ($P=0.003$, $P=0.001$, respectively). Compared with the results of MP-DNA, there was no significant difference in the positive rate of MP-RNA between the two groups. Compared with MP-Ab and MP-DNA, the sensitivity of MP-RNA was 0.63/0.79, the specificity was 0.91/0.96, the positive predictive value was 0.67/0.85, and the negative predictive value was 0.89/0.94. In group A, the sensitivity and specificity of MP-RNA were 0.94/0.88 and 0.79/0.90, respectively. **Conclusion** Simultaneous amplification and testing Method for detection the RNA of MP has high sensitivity and specificity, and this method for early diagnosis of MP infection had better clinical diagnostic efficiency. It is a new method for the early diagnosis of MP infection.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*; Pneumonia in children; Simultaneous amplification and testing method; Method comparison

肺炎支原体肺炎(*mycoplasma pneumoniae pneumonia*, MPP)是社区获得性儿童呼吸系统感染常见疾病,其发病率高,占有社区获得性肺炎的30%左右^[1]。

肺炎支原体(*mycoplasma pneumoniae*, MP)作为其病原体,分离培养是检测MP的“金标准”,但该方法阳性率低且检测周期较长^[2]。虽然有学者报道了快速培养技术检测MP,但其培养周期仍然需要6~8 h^[3]。因此该方法未广泛应用于临床。通过血清学检测MP抗体(MP-Ab)是目前临床最常用的检测方法,但其检测结

基金项目: 安徽省卫生计生委科研项目(2016QK036)

通信作者: 刘周, E-mail: liuzhou0112@126.com

果也存在诸多影响因素,如疾病病程、个体免疫状态差异等^[4]。近年来,针对MP的分子生物学检测技术逐渐应用于临床,其方法学灵敏度、特异性均较高,且检测周期短,在疾病的早期诊断方面有较大的临床意义。作为一种新兴的分子生物学技术,恒温扩增检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)主要用于检测MP-RNA,但其临床诊断效能需要进一步验证。本研究比较MP-RNA与MP-DNA、MP-Ab检测对临床患儿MP诊断的实际效果,评估SAT方法检测MP-RNA临床诊断效能。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集我院2016年9月—2017年7月临床诊断为急性呼吸系统感染的住院患儿痰液/咽拭子标本及血清标本,其中男95例,女83例,年龄分布为1~14岁。根据入院时疾病病程将患儿分为A组(病程≤10 d)和B组(病程>10 d),其中A组患儿74例、B组患儿104例,相关人口学资料见表1。所有患儿均于抽血同时采集咽拭子标本。实验室接收到血液标本后立即离心分离血清4℃保存,痰液标本取4倍体积生理盐水稀释,用微量加样器反复吹打使其液化后取1 ml置无菌EP管-20℃冻存,咽拭子标本取1 ml生理盐水反复搅拌洗脱后-20℃冻存。

表1 急性呼吸道感染患儿相关人口学资料[例(%)]

组别	例数	年龄($\bar{x} \pm s$)	男	女
A组	74	3.58 ± 3.27	39(52.7)	35(47.3)
B组	104	3.46 ± 3.15	56(53.8)	48(46.2)
合计	178	3.51 ± 3.19	95(53.4)	83(46.6)

1.2 肺炎支原体抗体检测 采用免疫被动凝集法检测血清中的MP-Ab,检测试剂为日本富士瑞必欧株式会社产品(SERODIA-MYCO II)。严格按照试剂盒说明书进行操作。结果判定:MP-Ab滴度>1:80者为阳性。

1.3 MP-DNA检测 采用荧光探针法检测临床标本中MP-DNA,Mx3000P型PCR仪为美国安捷伦公司产品,检测试剂盒为上海复星长征医学科技有限公司产品。取PCR缓冲液、荧光探针及DNA聚合酶(比例21:3:2)于离心管混匀,按26 μl分装扩增反应管备用。取待测样本13 000 r/min(×10 cm)离心10 min,弃上清后于沉淀中加入50 μl DNA裂解液,振荡混匀后100℃保温10 min,13 000 r/min(×10 cm)离心10 min。取样品上清液及校准品各4 μl加入26 μl反应体系中。扩增条件为50℃2 min后94℃5 min,94℃10 s,-60℃45 s共40个循环,60℃采集FAM荧光通道信号,读取扩增循环数(Ct值)。Ct值≤38判定为阳性,Ct值=40判定为阴性,38<Ct<40需复检一次。阴阳性对照处理同上。

1.4 MP-RNA检测 应用SAT法检测临床标本中MP-RNA,Mx3000P型PCR仪为美国安捷伦公司产品,检测试剂盒为上海仁度生物科技公司产品。取待测样品加入裂解液处理后,洗涤2次后加100 μl核酸提取液及10 μl内标置于60℃保温5 min后室温10 min。将样本管置于磁珠分离装置手工提取RNA后,与扩增体系混匀置于PCR仪中,扩增条件:42℃1 min,40个循环,荧光通道为FAM,读取RNA的Ct值,并分析40~80℃熔解曲线,Ct值≤35判定为阳性;Ct值=40判定为阴性;35<Ct<40之间需复检一次。阴阳性对照处理同上。

1.5 统计学方法 检测数据的统计学分析应用SPSS 21.0统计软件进行,采用百分率表示计数资料,各方法学检测结果阳性率比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MP-RNA与MP-Ab及MP-DNA阳性率比较 荧光探针法检测MP-DNA、免疫凝集法检测血清MP-Ab、SAT法检测MP-RNA的总体阳性率分别为:23.6%、23.0%、21.9%,3项检测总体阳性率差异无统计学意义。其中A组患者临床标本MP-RNA阳性率(37.8%)高于血清学MP-Ab阳性率(22.9%),B组患者临床标本MP-RNA阳性率(10.6%)低于血清学MP-Ab阳性率(23.1%),差异有统计学意义($P<0.01$)。MP-RNA与MP-DNA各分组间阳性率差异无统计学意义,见表2~3。

表2 MP-RNA与MP-Ab阳性率比较[例(%)]

组别	例数	MP-RNA阳性	MP-Ab阳性	χ^2 值	P值
A组	74	28(37.8)	17(22.9)	7.692	0.003
B组	104	11(10.6)	24(23.1)	9.600	0.001
合计	178	39(21.9)	41(23.0)	0.035	0.851

表3 MP-RNA与MP-DNA阳性率比较[例(%)]

组别	例数	MP-RNA阳性	MP-Ab阳性	χ^2 值	P值
A组	74	28(37.8)	26(35.1)	0.125	0.727
B组	104	11(10.6)	16(15.4)	2.285	0.125
合计	178	39(21.9)	42(23.6)	0.267	0.607

2.2 MP-RNA与MP-Ab及MP-DNA临床诊断效能比较 分别以MP-DNA、MP-Ab两组方法作为参考方法,评估MP-RNA方法的相对灵敏度(Se)、特异性(Sp)、阳性预测值(PPV)及阴性预测值(NPV)。以MP-Ab为参考方法,MP-DNA的总体Se为0.63、Sp为0.91、PPV为0.67、NPV为0.89;其中A组Se值(0.94)高于B组Se值(0.42)。以MP-DNA为参考方法,MP-RNA的总体Se为0.79、Sp为0.96、PPV为0.85、NPV为0.94,其中A组Se值(0.88),高于B组Se值(0.63),见表4~5。

表4 MP-RNA与MP-Ab临床诊断效能比较

组别	评价指标			
	Se	Sp	PPV	NPV
A组	0.94(16/17)	0.79(45/57)	0.57(16/28)	0.98(45/46)
B组	0.42(10/24)	0.99(79/80)	0.91(10/11)	0.85(79/93)
合计	0.63(26/41)	0.91(124/137)	0.67(26/39)	0.89(124/139)

注:Se为灵敏度;Sp为特异度;PPV为阳性预测值;NPV为阴性预测值。

表5 MP-RNA与MP-DNA临床诊断效能比较

组别	评价指标			
	Se	Sp	PPV	NPV
A组	0.88(23/26)	0.90(43/48)	0.82(23/28)	0.93(43/46)
B组	0.63(10/16)	0.99(87/88)	0.91(10/11)	0.94(43/46)
合计	0.79(33/42)	0.96(130/136)	0.85(33/39)	0.94(130/139)

注:Se为灵敏度;Sp为特异度;PPV为阳性预测值;NPV为阴性预测值。

3 讨论

肺炎支原体(MP)是一种可在无生命培养基上生长的最小原核细胞型微生物,通过其细胞膜特殊结构粘附于人体呼吸道的上皮细胞,从宿主细胞内摄取营养物质进行生长繁殖。MP主要通过飞沫传播,可在呼吸道内定植数周^[5]。主要引起呼吸系统感染,特别是儿科患者。其引起的支原体肺炎病理变化以间质性肺炎为主,临床缺乏典型症状,仅表现为咽部疼痛、咳嗽和发热等^[6],与其他细菌或病毒性肺炎所致感染症状非常相似,加之影像学也缺乏典型特征,因此早期诊断MPP存在一定困难^[7]。儿童由于免疫功能较差,若不进行早期治疗极易发展为重症MPP,严重影响患儿预后。因此,加强MPP的早期诊断是疾病控制和治疗的关键。

通过本研究数据可见,与临床常用诊断MPP方法相比,MP-RNA总体阳性率(21.9%)与MP-Ab(23.0%)、MP-DNA(23.6%)的总体阳性率基本一致,差异无统计学意义。而根据患儿病程划分的短病程组(A组)及长病程组(B组)中,MP-RNA在A组中阳性率(37.8%)高于血清学MP-Ab阳性率(22.9%),在B组阳性率(10.6%)低于血清学MP-Ab阳性率(23.1%),2组差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果提示与MP-Ab检测相比,MP-RNA在MPP疾病早期诊断中有较好的临床价值,与相关学者研究结果相似^[8]。分析其原因为,机体从感染MP到产生特异IgM-Ab,一般需要7~14d,在3~4周达到高峰^[9]。因此血清学MP-Ab检测存在一定的窗口期,在感染的早期阶段检测Ab抗体易出现假阴性结果^[10]。而SAT检测技术主要针对特异性MP-RNA序列,可有效检测处于感染窗口期MPP患者。将MP-Ab作为参考方法对MP-RNA的临床诊断效能进行评估可见:其总体Se、Sp、PPV及NPV分别为0.63、0.91、0.67及0.89。

其中在A组中的Se、NPV值为0.94、0.98,高于B组的0.42、0.85。提示SAT技术检测MP-RNA对于MPP短病程患者的临床诊断效能优于长病程患者。

目前临床针对MP感染主要选用的抗菌药物为大环内酯类如红霉素、阿奇霉素等,治疗疗程不少于2~3周^[11]。临床需要相关MP检测方法可有效判断抗感染治疗效果,为治疗疗程提供参考。MP-RNA在长病程(B组)患者阳性率低,仅为10.6%,显著低于B组患者MP-Ab的阳性率(23.1%),分析其原因为特异MP-RNA仅仅存在于处于增殖阶段的MP菌体内,当抗感染治疗有效时,MP菌体内特异RNA快速降解至不能检测。而随着病程发展,机体血清IgG抗体出现并逐渐升高,即使在疾病痊愈后IgG抗体仍然在长时间内维持较高的滴度水平^[12-13],可能会导致假阳性的结果。因此,应用SAT技术检测MP-RNA较免疫学方法检测血清中特异性的抗体在MPP疾病的预后判断有一定价值。相关研究^[14]也表明,应用SAT技术检测MP-RNA结果转阴时间与临床痊愈时间更为接近,提示MP-RNA可作为临床动态监测抗感染效果及停用大环内酯类抗菌药物的客观指标。荧光探针法检测MP-DNA是目前临床较为普遍采用的MPP早期诊断分子生物学技术,此方法不受患者抗体产生时间及免疫水平的影响,且其方法的敏感性、特异性和准确度都比较高,特别是对早期检测MP感染具有重要意义^[15]。与之相比,MP-RNA的总体阳性率及A、B两组的阳性率差异均无统计学意义。同时,将其作为参考方法评估MP-RNA的临床诊断效能可见,MP-RNA的总体Se为0.79、Sp为0.96、PPV为0.85、NPV为0.94。在A、B两组患者中Se为0.88/0.63、Sp为0.90/0.99、PPV为0.82/0.91、NPV为0.93/0.94。综合分析上述方法学性能指标,提示MP-RNA也具有较好的临床诊断效能。但有研究显示MP感染临床治愈后1个月内其DNA的检出率仍然高达50%,菌体死亡后其DNA持续携带的中位数时间为7周,个别长达7个月之久^[16]。相关学者提出即使在患者临床标本中检测到MP-DNA,也需要结合临床症状及其他诊断方法综合判断^[17]。此外,与MP-DNA采用煮沸法提取核酸模板不同,MP-RNA应用磁珠法提取RNA核酸模板,相关研究提示在分子生物学检测中应用磁珠法提取效率高于煮沸法^[18]。因此,两种提取方法在MP分子生物学检测中的差异程度还有待进一步深入研究。

总之,应用SAT技术检测MP-RNA与MP-Ab、MP-DNA的总体阳性率基本一致,MP-RNA在MPP早期患者阳性率显著高于MP-Ab。以荧光探针法检测MP-DNA作为参考方法进行比较可见,SAT法检测MP-RNA具有较高的特异性和敏感性。因此,综上所述,

SAT法可作为一种MP感染的实验室检测与临床早期诊断及治疗效果监测辅助工具。

参考文献

- [1] Marcos PJ, Restrepo MI, Anzueto A. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(9): 835.
- [2] 李少丽,赵汉青,孙红妹,等. 培养法、PCR法和血清学法在检测儿童肺炎支原体感染中的应用比较[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(1): 73-77.
- [3] 谢启武,时澄,汪海波. 咽拭子快速培养在肺炎支原体感染中的临床应用价值[J]. *中华全科医学*, 2013, 11(1): 58-59.
- [4] 谢辉,李基明,张慧芬,等. 肺炎支原体抗体和载量指数在儿童肺炎支原体肺炎诊断中的应用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2016, 18(10): 984-987.
- [5] Meyer Sauter PM, van Rossum AM, Vink C. Mycoplasma pneumoniae in children: carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2014, 27(3): 220-227.
- [6] Yan C, Sun H, Zhao H. Latest Surveillance Data on Mycoplasma pneumoniae Infections in Children, Suggesting a New Epidemic Occurring in Beijing [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(5): 1400-1401.
- [7] Rogozinski LE, Alverson BK, Biondi EA. Diagnosis and treatment of Mycoplasma pneumoniae in children [J]. *Minerva Pediatr*, 2017, 69(2): 156-160.
- [8] 冯雪莉,李勤静,徐保平,等. RNA恒温扩增检测技术在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值评估[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016, 31(16): 1222-1226.
- [9] Messous S, Trabelsi I, Grissa MH, et al. Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae IgM and IgG antibodies in Tunisian patients presenting with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Med Mal Infect*, 2017, 47(2): 158-163.
- [10] 章建伟,王卓英,钟永兴. 3788例0~5岁婴幼儿急性呼吸道肺炎支原体感染分析[J]. *中华全科医学*, 2015, 13(2): 175-177.
- [11] 陈兰举. 小儿肺炎支原体肺炎及肺外感染的诊断和治疗[J]. *中华全科医学*, 2016, 14(3): 344-345.
- [12] Spuesens EBM, Fraaij PLA, Visser EG, et al. Carriage of Mycoplasma pneumoniae in the Upper Respiratory Tract of Symptomatic and Asymptomatic Children: An Observational Study [J]. *PLoS Med*, 2013, 10(5): e1001444.
- [13] Lee SC, Youn YS, Rhim JW, et al. Early Serologic Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Pneumonia: An Observational Study on Changes in Titers of Specific-IgM Antibodies and Cold Agglutinins [J]. *Medicine*, 2016, 95(19): e3605.
- [14] 郭丽,孙琳,郭琰,等. 肺炎支原体RNA检测在儿童肺炎支原体肺炎疗效监测中的应用价值[J]. *中国循证儿科杂志*, 2016, 11(2): 109-112.
- [15] Katherine L, Margareta I. Mycoplasma pneumoniae: Current Knowledge on Nucleic Acid Amplification Techniques and Serological Diagnostics [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 448.
- [16] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015年版) [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [17] Medjo B, Atanaskovic-Markovic M, Radic S, et al. Mycoplasma pneumoniae as a causative agent of community-acquired pneumonia in children: clinical features and laboratory diagnosis [J]. *Ital J Pediatr*, 2014, 40(1): 104.
- [18] 查瑶,王小灵,朱诗艳,等. 煮沸裂解法与磁珠法在HBV DNA荧光定量检测中的核酸提取效果[J]. *浙江预防医学*, 2015, 27(12): 1292-1293, 1296.
- [15] 郑东宇,沈赞,秦思,等. 环介导恒温扩增检测小肠结肠炎耶尔森菌[J]. *江苏预防医学*, 2017, 28(2): 133-136.
- [16] 林群,冯洁仪,黄金华,等. 应用环介导等温扩增技术对分离自呼吸系统感染铜绿假单胞菌的快速检测[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(16): 2677-2679.
- [17] Liu W, Xu Y, Dong D, et al. Survey and rapid detection of Bordetella pertussis in clinical samples targeting the BP485 in China [J]. *Front Public Health*, 2015, 10(3): 39.
- [18] Li Y, Shi L, Pan A, et al. Evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum samples [J]. *J Microbiol Methods*, 2014, 104: 55-58.
- [19] 唐睿珠,罗正琼,徐秋月,等. 呼吸道病原体核酸恒温扩增芯片十三联检在下呼吸道感染常见病病原体基因中的检测[J]. *昆明医科大学学报*, 2017, 38(1): 8-12.
- [20] 柳宏波,李爱敏. 病原菌核酸检测技术在儿童肺炎诊断中的临床应用分析[J]. *首都食品与医药*, 2017, 24(24): 158-159.
- [21] 孙艳丽. 不同检测技术检测痰液标本中肺炎链球菌的应用价值[J]. *临床医学研究与实践*, 2017, 2(21): 138-139.
- [22] 廖远泉. 感染性肺炎病原学实验室诊断——肺炎链球菌检测技术进展[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2018, 7(1): 1-6.

(本文编辑:赵瑞)

收稿日期:2017-09-21

(上接第1514页)

- [7] 刘青,施毅. 肺炎链球菌肺炎诊治进展[J]. *东南国防医药*, 2013, 15(5): 499-502.
- [8] 刘美蓉. 肺炎链球菌实验室诊断方法的研究进展[J]. *河北医科大学学报*, 2016, 37(2): 235-239.
- [9] 金萍. 以cpsB基因测序为主的序贯分子生物学方法检测肺炎链球菌血清型及临床应用研究[D]. 广州:南方医科大学, 2016.
- [10] Kinoshita Y, Niwa H, Katayama Y, et al. Use of loop-mediated isothermal amplification to detect six groups of pathogens causing secondary lower respiratory bacterial infections in horses [J]. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(6): 365-370.
- [11] Kakuya F, Kinebuchi T, Fujiyasu H, et al. Genetic point-of-care diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection using LAMP assay [J]. *Pediatr Int*, 2014, 56(4): 547-552.
- [12] 齐诗蕊,李环,陈俊,等. 通过环介导恒温扩增技术检测空肠弯曲杆菌[J]. *军事医学*, 2017, 41(4): 306-309, 317.
- [13] 王伟,王海连,玄立印,等. 环介导等温扩增技术在肠道传染病检测中的研究进展[J]. *职业与健康*, 2017, 33(20): 2873-2876.
- [14] 李辉腾,郭旭光,柯茂彬,等. LAMP技术检测社区获得性非典型肺炎中的嗜肺军团菌感染[J]. *中国医药科学*, 2017, 7(23): 113-115, 149.

(本文编辑:谢飞凤)

收稿日期:2018-02-24