

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2018.09.009

论著·临床研究

实时荧光核酸恒温扩增检测技术在肺炎支原体肺炎早期诊断中的价值及影响因素分析

陈丹¹ 孙晓敏¹ 郭明发² 郭青¹ 张广超¹ 任彦红¹

(郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院 1.呼吸科; 2.检验科, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 评估实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)在儿童肺炎支原体肺炎(MPP)早期诊断中的应用价值及影响因素分析。**方法** 选取2016年12月至2017年12月住院治疗的社区获得性肺炎患儿526例,采用颗粒凝集法检测MP血清学抗体(MP-Ab),并以此结果为参照,评价SAT用于诊断MPP的价值。**结果** 以血清MP-Ab检测结果确诊MPP患儿165例,MP-SAT诊断MPP的敏感度为90.9%(150/165)、特异度为97.9%(368/376),准确性高(约登指数为0.89),两者的一致性良好($Kappa=0.90$)。MP-SAT在短病程患儿中的诊断敏感度明显高于长病程患儿($P=0.031$);MP-SAT诊断敏感度明显高于单次血清MP-Ab($P=0.018$),两者的一致性差($Kappa=0.039$);MP-SAT与双份血清MP-Ab一致性好($Kappa=0.91$)。多因素logistic回归分析结果显示:病程(≥ 7 d)、院外应用大环内酯类药物是影响MP-SAT检出结果的主要因素($P<0.05$)。**结论** MP-SAT在MPP的早期诊断中应用价值高,可以有效弥补急性期单份血清MP-Ab检测的不足,辅助临床进行早期诊断;尽可能在病程早期(<7 d)和大环内酯类药物应用前进行MP-SAT检测。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(9): 737-741]

[关键词] 肺炎支原体;实时荧光核酸恒温扩增检测;早期;诊断;儿童

Value of simultaneous amplification and testing in early diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia and related influencing factors

CHEN Dan, SUN Xiao-Min, GUO Ming-Fa, GUO Qing, ZHANG Guang-Chao, REN Yan-Hong. Department of Respiratory Medicine, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University/Henan Provincial Children's Hospital/ Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou 450052, China (Sun X-M, Email: 13513892805@163.com)

Abstract: Objective To investigate the value of simultaneous amplification and testing (SAT) in the early diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia (MPP) in children and related influencing factors. **Methods** A total of 526 children with community-acquired pneumonia who were hospitalized between December 2016 and December 2017 were enrolled. Particle agglutination was used to measure serum Mycoplasma pneumoniae (MP) antibody (MP-Ab). The value of SAT in the diagnosis of MPP was evaluated based on these results. **Results** Based on the results of serum MP-Ab measurement, 165 children were diagnosed with MPP. MP-SAT had a sensitivity of 90.9% (150/165), a specificity of 97.9% (368/376), and high accuracy (Youden index=0.89) in the diagnosis of MPP, suggesting that there was good consistency between these two methods ($Kappa=0.90$). The diagnostic sensitivity of MP-SAT in children with a short course of disease was significantly higher than that in children with a long course of disease ($P=0.031$). The diagnostic sensitivity of MP-SAT was significantly higher than that of single serum MP-Ab measurement ($P=0.018$), with poor consistency between these two methods ($Kappa=0.039$). MP-SAT had good consistency with double serum MP-Ab measurement ($Kappa=0.91$). The multivariate logistic regression analysis showed that course of disease (≥ 7 days) and out-of-hospital macrolide treatment were the main factors influencing the results of MP-SAT ($P<0.05$). **Conclusions** MP-SAT has high value in the early diagnosis of MPP and can effectively cover the shortage of single serum MP-Ab test in the acute stage and thus provide help for early clinical diagnosis. MP-SAT test should be performed in the early stage of the disease (<7 days) and before the application of macrolide treatment. [Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(9): 737-741]

Key words: Mycoplasma pneumoniae; Simultaneous amplification and testing; Early stage; Diagnosis; Child

[收稿日期] 2018-03-20; [接受日期] 2018-08-08

[作者简介] 陈丹,女,硕士研究生,主治医师。

[通信作者] 孙晓敏,女,主任医师。

肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*, MP) 是儿童社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 的重要病原之一, MP 所致的肺炎占住院儿童 CAP 的 10%~40%^[1-2]。部分患儿可并发坏死型肺炎、肺不张、胸腔积液, 或发生慢性肺间质性疾病、闭塞性细支气管炎等, 严重影响患儿的健康及日后生活, 需尽早明确诊断及治疗。但由于其临床征象及影像学不具备特征性^[3], 早期诊断存在困难。

MP 培养一直被认为是诊断 MP 感染的“金标准”^[4], 但该方法操作复杂、培养周期长、且阳性率低, 缺乏早期诊断价值。MP 血清学抗体 (MP-Ab) 检测是临床最常用的诊断 MP 感染的方法, 但由于 MP 感染后诱导体液免疫反应约 1 周后才产生抗体, 容易出现假阴性的结果。国内 MP 核酸检测技术主要基于 DNA 靶标^[5], 不依赖于支原体是否存活, 无法有效区分“死菌”和“活菌”, 且检测时易引发实验室内交叉污染, 出现假阳性的结果^[6]。实时荧光核酸恒温扩增检测技术 (simultaneous amplification and testing, SAT) 作为一种新型的分子生物学检测方法, 针对病原体的靶标核酸设计特异的引物和分子信标, 实现了特异性的扩增和检测, 同时可以有效区分“死菌”和“活菌”, 具有较高的敏感性和特异性^[7-8]。目前已成功应用于结核分枝杆菌、泌尿生殖道沙眼衣原体、肠道轮状病毒等病原的检测^[9-11], 最近开始应用于 MP 的检测, 但相关的临床报道很少, 而且主要集中在总体诊断价值的比较, 对于早期诊断价值和影响 MP-SAT 检出因素的分析鲜有报道。本研究拟通过对在郑州大学附属儿童医院呼吸科住院的 CAP 患儿的咽拭子标本进行 SAT 检测, 并对检测结果进行分析, 从而评估 SAT 在儿童肺炎支原体肺炎 (MPP) 中的早期诊断价值及影响因素, 为 SAT 在儿童 MPP 上的应用提供临床依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2016 年 12 月至 2017 年 12 月在郑州大学附属儿童医院呼吸科住院的 CAP 患儿 526 例为研究对象, 诊断标准参照《儿童社区获得性肺炎管理指南 (2013 年修订版)》^[12]。其中男 351 例,

女 175 例; 年龄 2 个月至 9 岁 10 个月, 平均年龄 2.8 ± 2.6 岁; 入院病程 2~23 d。排除入院时已行机械辅助通气, Glasgow 评分 <8 分, 合并先天性免疫缺陷、营养不良、病史资料不完整的患儿。本研究经医院伦理委员会批准通过, 并征得家长的知情同意。

1.2 研究方法

所有患儿均于入院 24 h 内行 MP-SAT、MP-Ab (IgM+IgG) 初测, 初测 MP-Ab 阴性的患儿于病程 10 d 后 (恢复期) 进行复测, 以 MP-Ab 检测作为 MPP 诊断的参照试验, 评估 MP-SAT 在 MPP 早期诊断中的应用价值。MPP 的诊断标准参照《儿童支原体肺炎诊治专家共识》: 在 CAP 的基础上满足以下任意 1 项: (1) 入院 24 h 内 MP-Ab $\geq 1:160$; (2) 急性期及恢复期双份血清抗体滴度呈 4 倍及以上升高^[13]。

MP-SAT 检测: 采用 MP 核酸检测试剂盒 (上海仁度生物科技有限公司) 进行检测。患儿入院当天由经过培训的专业人员采集咽拭子, 并将其融于 9 g/L 盐水后加入等量裂解液制成待测样本。样本加入内标后, 采用磁珠法提取靶标 RNA, 配置扩增检测液转至实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, 42℃ 1 min 为 1 个循环, 共 40 个循环, 荧光通道为 FAM (样本通道) 和 HEX (内标通道)。样本曲线与阈值曲线交叉点的横坐标读数 (监测时间) 为 dt, dt ≤ 35 min 为阳性, dt > 40 min 为阴性; 35 < dt ≤ 40 min 的样本重新检测, dt ≤ 35 min 为阳性, dt > 35 min 为阴性。

MP-Ab 滴度测定: 采用颗粒凝集法, 应用 SERODIA-Myco II 试剂盒 (珠海丽珠试剂股份有限公司) 检测 IgM 和 IgG 的混合抗体。所有患儿于入院时采集静脉血, 初次检测阴性的患儿于入院 10 d 再次采集静脉血, 分离血清待测。检测步骤按试剂盒说明书进行。MP-Ab 滴度 $\geq 1:160$ 判为阳性结果。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析。定量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 定性资料采用率 (%) 表示, 阳性率比较采用 χ^2 检验。准确性检测采用约登指数 (Youden index, YI), 取值在 0~1 之间, YI 越大, 表明准确性越高; 一致性分析采用 Kappa 检验, 取值

在0~1之间, $Kappa \geq 0.75$ 表明两者一致性较好; $0.4 < Kappa \leq 0.75$ 表明两者一致性一般; $Kappa < 0.4$ 表明两者一致性较差。多因素分析采用 logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

526例CAP患儿中, 单份血清MP-Ab阳性112例, 双份血清MP-Ab呈4倍及以上升高53例, 共诊断MPP 165例。其中男106例, 女59例; 年龄3个月至9岁10个月, 平均年龄 3.5 ± 3.4 岁; 入院病程2~15 d, 平均病程 4.5 ± 4.2 d; 合并病毒感染23例, 合并细菌感染35例; 难治性MPP 25例, 重症MPP 11例; 院外有大环内酯类药物治疗史32例; 在发病季节方面, 春季发病37例, 夏季发病20例, 秋季发病45例, 冬季发病63例。

2.2 MP-SAT 诊断 MPP 的准确性分析

以MP-Ab结果为参照, MP-SAT检测结果阳性共158例, 其中MPP 150例, 非MPP 8例。MP-SAT诊断MPP的敏感度为90.9% (150/165)、特异度为97.9% (368/376)、阳性预测值为94.9% (150/158)、阴性预测值为98.1% (361/368)、阳性似然比为43.3、阴性似然比为0.09。诊断的准确性分析显示, YI为0.89, 准确性高; 一致性分析显示, $Kappa$ 值为0.90 ($P < 0.001$), 两者的一致性较好。

根据入院时病程, 将患儿分为短病程组 (< 7 d) 和长病程组 (≥ 7 d), 在短病程组中, MP-SAT阳性率为95% (93/98); 长病程组中MP-SAT阳性率为85% (57/67), MP-SAT在短病程组的诊断敏感度明显高于长病程组 ($\chi^2 = 4.646$, $P = 0.031$)。

2.3 MP-SAT 与单、双份血清 MP-Ab 的比较

在165例MPP患儿中, 单份血清MP-Ab阳性112例, 阳性率为67.9% (112/165), MP-SAT检测阳性150例, 阳性率为79.4% (150/165), MP-SAT的诊断敏感度明显高于单份血清MP-Ab检测 ($\chi^2 = 5.635$, $P = 0.018$)。一致性分析显示, $Kappa$ 值为0.039 ($P < 0.001$), 两者的一致性差。

单份血清MP-Ab阴性的414例患儿于入院10 d后再次行血清MP-Ab检测, 结果有53例患儿血清MP-Ab较入院时呈4倍及以上增高。414例

患儿中, 51例入院时MP-SAT检测结果阳性, 其中MPP 48例; 非MPP 3例。一致性分析显示, $Kappa$ 值为0.91 ($P < 0.001$), 两者的一致性较好。

2.4 MP-SAT 检出结果的影响因素分析

将可能影响MP-SAT诊断MPP的7个因素进行单因素分析。结果显示: 性别(女)、年龄(≤ 3 岁)、病程(≥ 7 d)、院外应用大环内酯类药物治疗、难治性MPP对MP-SAT诊断MPP的准确性产生影响 ($P < 0.05$), 而季节和是否为重症MPP对MP-SAT诊断MPP的准确性无影响 ($P > 0.05$)。见表1。

表1 MP-SAT 在不同影响因素下的 MPP 检出情况

因素	例数 (n=165)	MP-SAT 阳性率 [例 (%)]	χ^2 值	P 值
性别				
男	106	95(89.6)	5.256	0.022
女	59	45(76.3)		
年龄				
≤ 3 岁	61	51(83.6)	6.245	0.012
> 3 岁	104	99(95.2)		
季节				
春季	37	33(89.2)	0.256	0.968
夏季	20	18(90.0)		
秋季	45	41(91.1)		
冬季	63	58(92.1)		
病程				
< 7 d	98	93(94.9)	4.646	0.031
≥ 7 d	67	57(85.1)		
院外应用大环内酯类 药物治疗				
是	32	25(78.1)	9.851	0.005
否	133	125(94.0)		
难治性 MPP				
是	25	17(68.0)	6.506	0.011
否	140	123(87.9)		
重症 MPP				
是	11	9(81.8)	1.179	0.278
否	154	141(91.6)		

为了消除混杂因素的干扰, 将单因素分析有意义的因素, 进一步采用多因素 logistic 回归模型进行分析, 结果显示病程 (≥ 7 d)、应用大环内酯类药物治疗是影响MP-SAT检出结果的主要因素 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 MPP 患儿 MP-SAT 检出影响因素的 logistic 分析

因素	B	SE	OR	95%CI	P
病程 (≥ 7 d)	1.875	0.699	5.667	2.256~7.854	0.041
院外应用大环内酯类药物治疗	2.289	0.586	7.752	3.125~12.487	0.022

3 讨论

MP-Ab 检测是目前临床最常用的诊断 MP 感染的方法, 单份血清 MP-Ab 滴度 $\geq 1:160$ 对近期 MP 感染有诊断意义; 恢复期和急性期 MP 抗体滴度呈 4 倍或 4 倍以上增高时可以确诊。但是由于 MP 感染后诱导体液免疫反应约 1 周后才产生抗体, 3~6 周可达高峰, 2~3 个月后逐渐下降^[14], 故难以达到早期诊断的目的。重症感染、婴幼儿患儿, 由于免疫功能紊乱或免疫功能发育不完善, 产生抗体的能力差, 早期容易出现假阴性的结果^[15]。此外血清学检查属于有创操作, 多次采集静脉血对于儿童尤其是低龄儿童来说存在一定的困难。故探索一种 MP 的早期诊断方法, 有较重要的临床意义。

SAT 作为一种新型的分子生物学检测方法, 联合了 PCR 和荧光探针技术, 以病原体特异的 RNA 为靶标, 采用恒温扩增的方法, 15~30 min 即可将模板扩增 10^9 倍, MP-SAT 检测最低可以准确地识别出 10 CFU/mL 的病原菌, 具有极高的灵敏度^[8]。本研究中也显示 MP-SAT 在 MPP 的诊断中敏感度高达 90.9% (150/165), 且诊断的准确性高 ($YI=0.89$), 与血清 MP-Ab 抗体总体检测的一致性高 ($Kappa=0.90$), 提示 MP-SAT 在 MPP 的诊断中应用价值高。在本组资料中, 入院时单份血清 MP-Ab 敏感度仅为 67.9%, 明显低于 MP-SAT 的敏感度 (79.4%), 两者的一致性差 ($Kappa=0.039$), 但是 MP-SAT 与双份血清 MP-Ab 的一致性高 ($Kappa=0.91$)。这可能与部分患儿抗体产生较晚, 或免疫功能发育不完善产生抗体能力较弱, 从而导致单次 MP-Ab 检测不出有关。而 MP-SAT 检测的是病原体本身, 不受自身免疫等相关因素的影响, 可以有效弥补 MP 感染后因抗体产生延迟而导致的单份血清抗体检测假阴性的不足。本研究还发现 MP-SAT 在短病程组的诊断敏感度明显高于长病程组, 进一步提示 MP-SAT 在 MPP 的早期诊断中具有较高应用价值。

本研究中, 由经过专门培训的护士进行咽拭子采集, 应用同一批次的试剂, 排除标本采集和试剂选择这些因素干扰。通过查阅文献^[16-17], 把临床上可能影响 MPP 检出的相关因素进行分析, 结果显示: 院外大环内酯类药物的应用和长病程是影响检出率的主要因素。SAT 技术检测的靶标是 RNA, 而 RNA 只存在活的菌体中, 当病程较长时, 由于自身免疫等因素可能会导致病原体活性下降, RNA 裂解而不易检测。而经大环内酯类药物治疗的患儿, 部分 MP 被清除, 导致 MP 的载量降低, RNA 减少, 出现检测不出的情况。年龄、性别、是否为难治性或重症 MPP 等并不影响 MPP 的诊断, 提示 MP-SAT 对于年龄小、病情危重、产生抗体慢或能力差的个体, 可能具有更高的应用价值。

综上, MP-SAT 在 MPP 的早期诊断中应用价值高, 可以有效弥补急性期单份血清 MP-Ab 抗体检验的不足, 辅助临床进行早期诊断; 临床应用 MP-SAT 进行检测时, 需注意病程长 (≥ 7 d) 和院外应用大环内酯类药物对检测结果的影响, 尽量在病程早期或应用大环内酯类药物进行治疗前进行检测, 必要时结合双份血清 MP-Ab 检测进行判断。

[参 考 文 献]

- [1] Jain S, Williams DJ, Arnold SR, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children[J]. N Engl J Med, 2015, 372(9): 835-845.
- [2] 彭懿, 舒畅, 符州, 等. 儿童社区获得性肺炎 1613 例病原学特点分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(11): 1193-1199.
- [3] 王菲, 尚云晓. 肺炎支原体肺炎发病机制及相关临床问题[J]. 中国实用儿科杂志, 2015, 30(3): 184-189.
- [4] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童支原体肺炎诊治专家共识[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [5] 顾文婧, 张新星, 陈正荣, 等. 呼吸道吸出物 MP-DNA 检测对儿童肺炎支原体肺炎诊断的临床意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(9): 937-941.
- [6] 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]. 中国实用儿科临床杂志, 2016, 31(16): 1222-1225.
- [7] Wang L, Feng Z, Zhao M, et al. A comparison study between GeXP-based multiplex-PCR and serology assay for Mycoplasma pneumoniae detection in children with community acquired pneumonia[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 518.
- [8] Li W, Fang YH, Shen HQ, et al. Evaluation of a real-time method of simultaneous amplification and testing in diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children with pneumonia[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177842.
- [9] 张海晴, 黄海滨, 王春颖, 等. RNA 恒温扩增实时荧光检

- 测技术在检测脑脊液中结核分枝杆菌的应用[J]. 广东医学, 2017, 38(11): 1715-1716.
- [10] 张睿, 叶阿里, 孔令君, 等. 临床患者三种性传播疾病分子生物学检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 107-110.
- [11] 曹凌峰, 苏犁云, 董姐姐, 等. 荧光恒温扩增技术检测肠道病毒 71 型方法的建立与评价[J]. 检验医学, 2014, 29(11): 1115-1119.
- [12] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013 修订)(上)[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 745-752.
- [13] 中华医学会儿科学分会呼吸学组, 《中华实用儿科临床杂志》编辑委员会. 儿童支原体肺炎诊治专家共识[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308.
- [14] 栗俊杰, 张诗蒙, 李小燕. 肺炎支原体感染的两种不同实验室检测方法分析[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(5): 799-801.
- [15] 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, 33(9): 643-645.
- [16] 庄严, 栗俊杰, 张诗蒙, 等. 肺炎支原体感染的两种不同实验室检测方法分析[J]. 中国实验诊断学, 2017, 12(5): 799-801.
- [17] 刘香花, 穆义英, 赵玥, 等. 肺炎支原体 DNA 检测对儿童肺炎的诊断价值[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(22): 3248-3249.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

关于举办 2018 亚洲新生儿医学国际研讨会的通知

复旦大学附属儿科医院、国家儿童医学中心、国家卫健委新生儿疾病重点实验室拟于 2018 年 11 月 23~25 日在上海举办第二届亚洲新生儿医学国际研讨会(The Neonate 2018: 2nd International Symposium for Asia), 内容包括国际新生儿医学临床新技术理论研究最前沿进展及亚洲与中国新生儿医学发展、交流与合作中的热点议题。大会学术交流包括主题演讲、工作研讨会、壁报讨论及专题卫星会议等。主办方委托上海迈诗会展有限公司承办大会所有会务事宜。

中方大会学术委员会主席为孙波教授(bsun@shmu.edu.cn), 中方组织委员会主席为孙波、陈超教授(chen6010@163.com)。会议地点: 上海虹桥假日酒店(旗舰店), 上海市闵行区七莘路 3555 号, 邮编 201101。大会将对主题演讲提供中文同声翻译服务。对正式注册的国内代表授予国家级继续医学教育 I 类学分 10 分。

壁报投稿须知:

1. 投稿交流论文须提供英文摘要, 按目的、方法、结果、结论四段式格式书写, 第一作者须为投稿者本人, 并且是该研究的主要完成者。随稿用英文注明作者姓名、单位、联系方式等基本信息。
2. 投稿论文内容须为 2018 年 5 月 1 日以前未公开发表的, 属于以下类别的研究(包括临床研究及相关基础研究)。
 - Stabilization of high risk infants
 - Pulmonary diseases and respiratory care
 - BPD
 - Brain injury, outcome
 - Neurology
 - Follow-up
 - Infections, neonatal sepsis
 - Nutrition and metabolism
 - Drugs
 - Preventive strategies

投稿方式, 请链接获得具体要求: www.mcascientificevents.eu/the-neonate/abstract-submission 或登录以下中文网址: neonate2018.medmeeting.org。

不接受邮件投稿。投稿截止日期: 2018 年 10 月 1 日, 经学术委员会专家评议后, 于 2018 年 10 月 15 日前通知投稿者结果。

中国参会代表可登录 <http://neonate2018.medmeeting.org/cn> 注册并付费, 及预订旅馆住宿。大会会务组确认并发送正式参会邀请函。

联系方式: 会务: 上海迈诗会展有限公司朱老师, 电话: 18201820813, Email: Jasonzhu@shanghaimice.com; 学术: 复旦大学附属医院袁琳医师(会议秘书), Email: drlynnnyuan@163.com。

复旦大学附属儿科医院
2018 年 4 月 30 日