

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.026

呼吸道病原菌恒温扩增检测与 PCT、WBC 等关联研究*

江杨华¹, 宋 然¹, 林应标¹, 代国知¹, 刘正立²

1. 郴州市第一人民医院检验医学中心, 湖南郴州 423000;

2. 北京博奥晶典生物技术有限公司, 北京 101111

摘要:目的 探讨呼吸道病原菌恒温扩增检测与降钙素原(PCT)、白细胞计数(WBC)等关联性研究。方法 对 593 份合格的痰标本进行呼吸道恒温扩增检测,同时抽取患者血液进行 WBC、PCT 检测,对结核杆菌复合群检测为阳性的个体进行 γ 干扰素释放试验。结果 采用呼吸道病原体恒温扩增系统进行检测标本数量为 593 份,阳性标本数量为 394 份,阳性率为 66.44%。PCT 与呼吸道核酸检测阳性的相关系数高达 0.988 5 ($P < 0.05$),WBC 升高与呼吸道核酸检测阳性的相关系数高达 0.994 6 ($P < 0.01$),7 例标本为结核杆菌复合群检测阳性,其中 2 例标本为 γ 干扰素释放试验阳性。结论 恒温扩增芯片法可以联合 WBC 与 PCT 作为诊断下呼吸道感染的敏感指标,同时此法对结核杆菌复合群的检测比 γ 干扰素释放试验更灵敏,特异性更强。

关键词:呼吸道; 恒温扩增; γ 干扰素; 降钙素原; 白细胞计数**中图法分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2019)21-3161-03

下呼吸道感染是常见的临床感染性疾病,在世界前十大死因中,下呼吸道感染位列第 4 位。引起呼吸道感染的病原体主要有细菌、病毒、支原体、衣原体等^[1],但是一种病原体可引起多种临床表现,且差异较大,而不同的病原体感染,其临床表现又非常的相似,仅依靠简单的临床症状进行用药,给临床医生带来困难,同时盲目用药与经验用药又会造成临床细菌耐药性的升高^[1-2]。

传统的细菌培养法是诊断下呼吸道感染的重要手段,但是培养周期长,敏感性较低,同时部分病原体很难培养出来,例如流感嗜血杆菌需要含有 NAD 和铁的培养基,支原体培养条件非常苛刻,培养时间需要 6 周,结核杆菌培养需要罗氏培养基,培养时间需要 3 周^[3]。恒温扩增芯片法是利用环介导恒温扩增(LAMP)技术和微流控芯片的原理,可一次性同时检测呼吸道常见的 12 种病原体及 1 个耐药基因^[4]。

在医院就诊的感染性疾病患者,常规检测降钙素原(PCT)、白细胞计数(WBC)、总蛋白等指标,如果怀疑感染结核则会同时进行 γ 干扰素释放试验,通过这些生化指标辅助临床医生判断患者感染情况。

本研究通过恒温扩增芯片法检测下呼吸道感染的病原体,同时结合临床常见的生化指标,发现检测指标之间的关联性,供临床医生参考。

1 资料与方法

1.1 标本收集 收集 2018 年 6—12 月在本院被诊断为下呼吸道感染或肺炎的新入院患者的合格痰标本 593 份,痰合格标准:多形核白细胞 > 25 个/低倍镜视野(LP),鳞状上皮细胞 < 10 个/LP,同时收集其血常规和生化指标结果。

1.2 仪器与试剂 采用呼吸道病原菌核酸检测(恒温扩增芯片法)试剂盒、RTisochip-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(博奥生物集团有限公司);采用 VITEK II-Compact 细菌鉴定仪、血平板、麦康凯培养基(法国生物梅里埃公司)。革兰染色试剂、抗酸染色试剂购于珠海贝索生物技术有限公司;结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测(ATB)试剂盒购于海口维琨瑗生物研究院。

1.3 方法

1.3.1 恒温扩增芯片法病原检测 参照博奥生物恒温扩增检测试剂盒说明书,进行提取核酸、加样、检测,检测结果判读参照恒温扩增芯片分析系统软件。

1.3.2 PCT、WBC 等指标的检测 这些指标均在本院检验科进行检测,PCT 的检测利用 mini-VIDAS 全自动免疫荧光分析仪与专用原装试剂盒进行,WBC 的检测在西门子血液分析仪上进行, γ 干扰素释放试验采用结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测(ATB)试剂盒。目前大部分成人的 WBC 参考区间为 $(4.0 \sim 10.0) \times 10^9/L$,PCT 参考范围一般为 $< 0.5 \mu g/L$ 。

1.3.3 恒温扩增检测的病原菌 (1)肺炎链球菌(Spn)、(2)金黄色葡萄球菌(Sau)、(3)大肠埃希菌(E. Coli)、(4)肺炎克雷伯菌(Kpn)、(5)铜绿假单胞菌(Pae)、(6)鲍曼不动杆菌(Aba)、(7)嗜麦芽窄食单胞菌(Sma)、(8)流感嗜血杆菌(Hin)、(9)嗜肺军团菌(Lpn)、(10)肺炎支原体(Mpn)、(11)肺炎衣原体(Cpn)、(12)耐甲氧西林葡萄球菌(MRS)、(13)结合分枝杆菌复合群(MTBC)。

1.4 统计学处理 Excel 软件分析数据,计数资料以

* 基金项目:湖南省郴州市第一人民医院科学研究项目(N2019-021)。

例数或百分率表示,采用 correl 函数计算相关性,以 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 病原体 DNA 检测 采用呼吸道病原体恒温扩增系统进行检测的标本总数为 593 份,阳性标本数量为 394 份,阳性率为 66.44%,其中检出率最高为 MRS 182 份,阳性率 30.69%,其后依阳性率从高到低依次排序为 Kpn、Hin、Aba、Sau、Sma、Pae、Spn 等。MRSA 阳性数量为 44 份,MTBC 检出 7 份,Mpn 只检出 1 份,未检测到 Cpn。具体各阳性指标分布数据见表 1。PCT 与呼吸道核酸检测阳性的相关系数高达 0.988 5 ($P < 0.05$),WBC 升高与呼吸道核酸检测阳性的相关系数高达 0.994 6 ($P < 0.01$),WBC 降低与呼吸道核酸检测阳性的相关系数为 0.859 0 ($P > 0.05$)。

表 1 呼吸道病原体检测指标与 PCT、WBC 的相关性

检测指标	n	阳性率 (%)	PCT >	WBC >	WBC <
			0.5 $\mu\text{g/L}(n)$	$10^{10}/\text{L}(n)$	$4 \times 10^9/\text{L}(n)$
Aba	80	13.49	44	47	3
E. Coli	34	5.74	14	17	4
Kpn	149	25.13	74	88	8
Spn	42	7.09	20	27	0
Mpn	1	0.17	1	0	0
MTBC	7	1.18	4	2	0
Sau	71	11.98	29	48	3
Hin	91	15.35	36	56	2
MRS	182	30.69	87	123	8
Sma	45	7.59	26	28	4
Pae	45	7.59	26	31	3
总计			361	467	35

2.2 γ 干扰素释放试验结果 MTBC DNA 阳性患者同时进行 γ 干扰素释放试验,结果 DNA 检测阳性 7 例,而这 7 例患者中只有 2 例 γ 干扰素释放试验阳性。

3 讨 论

本研究采用已获临床验证的恒温扩增核酸检测解决方案,将 LAMP 技术、微流体芯片技术及高速数字信号处理技术进行有机整合,可以对常见的肺炎病原体进行检测,该芯片可在 2 h 之内完成从痰标本提取到出具临床报告,一次性完成检测 12 种病原体和 1 种耐药基因的检测。与传统痰培养法比较,该方法大幅缩短微生物检测报告周期,可以解决传统细菌培养法在检测敏感性、检测周期等方面难以满足肺部感染治疗要求的不足^[1],同时该检测方法具有简单快速、不易污染、自动化程度高、试剂耗量低、病原体覆盖面广等优势,具备了对呼吸道感染性疾病的快速诊断能力。

PCT 是一种无生物学活性以及由 116 个氨基酸组成的降钙素前肽物质,机体在正常状况下 PCT 含量极低,并且半衰期长、稳定性好。当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时它在血浆中的水平升高^[5-7]。自身免疫、过敏和病毒感染时 PCT 不会升高^[8-9]。局部有限的细菌感染、轻微的感染和慢性炎症不会导致其升高。PCT 反映全身炎症反应的活跃程度。通过数据分析可以得出,呼吸道病原体检测为阳性的 394 份标本中,有 361 份标本出现 PCT 水平升高,该指标与呼吸道核酸检测阳性的相关系数高达 0.988 5 ($P < 0.05$),表现为显著相关。

WBC 是鉴别细菌性肺炎的传统指标^[10]。WBC 升高既有生理性因素也有病理性因素,WBC 明显减少也是不可忽视的问题。WBC 升高和减少往往有以下情况:(1)化脓性细菌性炎症、尿毒症、白血病、组织损伤、手术创伤等时发生病理性增高。(2)病毒性感染、伤寒、副伤寒、黑热病、疟疾、再生障碍性贫血、化疗和放疗后等时发生病理性减少。这些因素限制了 WBC 对细菌性肺炎诊断的灵敏度和特异度,因此,诊断细菌性肺炎时,检测 WBC 的同时还需要结合其他的检测指标。在本研究检测的 593 份标本中,有 467 份标本出现 WBC 水平升高,该指标与呼吸道核酸检测阳性的相关性高达 0.994 6 ($P < 0.01$),35 份标本出现 WBC 降低,该指标与呼吸道核酸检测阳性的相关性为 0.859 0 ($P > 0.05$)。因此 WBC 升高与呼吸道检测相关性更高。

γ 干扰素释放试验是检查结核感染者体内是否存在特异的效应 T 淋巴细胞,当效应 T 淋巴细胞再次受到结核抗原刺激时会分泌 γ 干扰素。 γ 干扰素释放试验利用结核分枝杆菌而非牛分枝杆菌 BCG 株系表达的抗原刺激外周血单核产生 γ 干扰素,具有高灵敏度和高特异度。在本研究中 MTBC 阳性 7 份,但是 γ 干扰素释放试验只有 2 份检测结果为阳性,根据已发表文献的推断可能是由于患者接种卡介苗,自身免疫功能较差导致,而且操作人员的差异性也会导致阳性结果判定的不确定性存在,因此呼吸道病原体 DNA 检测拥有更高的灵敏度和特异度。

综上所述,恒温扩增芯片法为下呼吸道感染的诊断提供了更为快速、简便、敏感的方法。可以联合 WBC 与 PCT 作为诊断下呼吸道感染的敏感指标,而且相关性非常高,同时恒温扩增芯片法比 γ 干扰素释放试验具有更高的灵敏度和特异度,能快速地筛查出结核病原体携带者,降低误诊率和漏诊率并合理指导临床治疗。

参考文献

[1] 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原体基因中的检测[J].昆明医科大学学报,2017,38(1):8-12.

[2] 刘志远,潘健,张婷菊,等. 恒温扩增芯片法在下呼吸道感染病原体检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(8): 1052-1053.

[3] 刘琳,张湘燕,高占成. 气道分泌物病原菌培养在呼吸系统感染诊断中的应用价值[J]. 山东医药, 2016, 56(31): 103-105.

[4] 黄国亮,田浩,李志永,等. 痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究[J]. 光学学报, 2012, 32(2): 206-213.

[5] 霍喜华. 血清降钙素原、C 反应蛋白及外周血白细胞计数联合检测在儿童呼吸道感染性疾病诊断中的应用[J]. 河南预防医学杂志, 2019, 30(2): 81-83.

[6] 徐亚静. 血清降钙素原检测在急性胰腺炎合并感染中的应用分析[J]. 中国医药指南, 2016, 14(28): 73-74.

[7] 陈筱菲,刘存丽,丁红香,等. 温州市区血清总蛋白、白蛋

白及 A/G 比值参考值调查[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(1): 49-50.

[8] 方全中,丁振尧,余宇龙,等. 血清降钙素原对下呼吸道感染患儿的诊断及指导抗菌药物合理治疗的应用价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(22): 5243-5246.

[9] YANG A P, LIU J, YUE L H, et al. Neutrophil CD64 combined with PCT, CRP and WBC improves the sensitivity for the early diagnosis of neonatal sepsis[J]. Clin Chem Lab Med, 2016, 54(2): 345-351.

[10] 武艳霞,邱邴郡,苏卫东. 白细胞计数、C 反应蛋白和降钙素原在细菌性肺炎患者中的诊断价值[J]. 医疗装备, 2018, 31(15): 55-56.

(收稿日期:2019-03-27 修回日期:2019-08-09)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 21. 027

344 例泌尿生殖道支原体感染检测及药敏分析

钟 敏,喻 华,杨永长[△]

四川省医学科学院/四川省人民医院检验科,四川成都 610072

摘 要:目的 了解四川省人民医院泌尿生殖道感染患者支原体感染情况及 9 种抗菌药物对其的体外敏感性,为临床用药提供合理依据。方法 采用支原体培养、鉴定药敏试剂盒,统计分析该院收集的 344 例泌尿生殖道感染患者支原体鉴定及药敏情况。结果 344 例患者标本中支原体感染阳性 133 例(38.66%),其中男性患者 30 例,女性患者 103 例。133 份支原体感染阳性标本对强力霉素、原始霉素、四环素、交沙霉素最敏感,敏感率大于 84%;对环丙沙星、氧氟沙星耐药率高,耐药率分别为 73.86%、62.41%。其中单纯解脲脲原体(Uu)阳性 113 例(84.96%)、单纯人型支原体(Mh)阳性 5 例(3.76%)、Uu+Mh 阳性 15 例(11.28%)。2015—2018 年单纯 Uu 检出率逐渐升高,Uu 混合 Mh 感染和单纯 Mh 感染检出率变化不大。药敏结果显示 Uu 对强力霉素、原始霉素、四环素、交沙霉素较敏感,对环丙沙星和氧氟沙星耐药率较高,耐药率分别为 75.22%和 61.95%;Mh 对交沙霉素、强力霉素、四环素最敏感(敏感率均为 100.00%),对环丙沙星、氧氟沙星和红霉素耐药率较高,耐药率均为 60.00%;Uu 和 Mh 混合性感染对强力霉素(73.34%)和原始霉素(66.67%)敏感。133 例支原体药敏试验结果中,70.68%的菌株对 2 种及 2 种以上的抗菌药物耐药,支原体感染多重耐药较多。结论 该院泌尿生殖道感染支原体以 Uu 为主,患者检出率逐年升高,感染患者以多重耐药菌株为主,针对单纯的 Uu、Mh 感染及 Uu 和 Mh 混合性感染治疗建议以强力霉素、原始霉素、交沙霉素为首选,合理联合用药。

关键词:泌尿生殖道感染; 支原体; 药敏分析

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)21-3163-04

支原体是人类泌尿生殖道最常见的寄生菌之一,在特定的环境下可以致病,支原体属种类繁多,其中对人类致病的支原体有肺炎支原体、人型支原体(Mh)等,条件致病支原体有解脲脲原体(Uu)、穿透支原体等。如今 Uu、Mh 感染已成为非淋球菌性尿道炎致病的重要原因之一,主要引起泌尿生殖道感染,它不仅引起尿道炎、宫颈炎,还与慢性前列腺炎、输卵管炎、自然流产、缺陷死胎、男女不孕不育等多种疾病相关^[1]。支原体无细胞壁,对营养物质要求高于一般细菌,一般细菌培养不易发现。近年来由于对抗生素的

不规则使用,Uu 和 Mh 均在不同地区出现多重耐药菌株,并且其感染率呈上升趋势。如今多重耐药菌株的出现为患者的治疗增加难度,为研究成都市泌尿生殖道支原体感染及药敏情况,以四川省人民医院为例进行调查。本研究收集近几年四川省人民医院门诊及病房内患者支原体感染情况及耐药情况,并对其进行分析,结果如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2015 年 1 月到 2018 年 12 月病房及门诊的泌尿生殖道感染患者标本 344 例,其

[△] 通信作者, E-mail: dad005030@163.com.