

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.17.028

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200428.1019.002.html\(2020-04-28\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200428.1019.002.html(2020-04-28))

诱导痰细胞分类计数在成人肺炎支原体肺炎早期诊断中的意义*

李婷¹,霍雅婷¹,肖刚²,全国莉¹,张达成¹,郑少强¹,陈立文¹,王锦鸿¹,崔海燕¹,程远雄^{1△}

(南方医科大学第三附属医院:1.呼吸科;2.检验科,广州 510630)

[摘要] **目的** 探讨诱导痰细胞分类计数在成人社区获得性肺炎支原体肺炎早期诊断中的意义。**方法** 回顾性分析 72 例单纯社区获得性肺炎患者的病历资料,均采用呼吸道病原体核酸环介导等温扩增技术(LAMP)明确诊断,其中肺炎支原体肺炎 49 例(非典型病原体组),其他细菌感染 23 例(典型病原体组),采用支气管镜收集痰液,涂片,采用迪夫快速染液进行快速现场评价,显微镜对非鳞状上皮细胞进行分类计数。**结果** 非典型病原体组痰液中巨噬细胞百分比为(21.98±12.11)%,典型病原体组为(11.15±8.83)%,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);非典型病原体组痰液中淋巴细胞百分比均值为 7%,典型病原体组均值为 2%,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$);非典型病原体组痰液中中性粒细胞百分比为(68.93±16.08)%,典型病原体组为(86.25±9.48)%,两组比较差异也有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 痰细胞分类计数可作为成人社区获得性肺炎支原体肺炎感染早期诊断的重要参考依据之一。

[关键词] 痰细胞分类计数;肺炎支原体;快速现场评价;社区感染**[中图法分类号]** R563.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)17-2901-04

The significance of the classification and counting of sputum cells in the early diagnosis of adult *Mycoplasma pneumoniae pneumoniae* *

LI Ting¹, HUO Yating¹, XIAO Gang², QUAN Guoli¹, ZHANG Dacheng¹, ZHENG Shaoqiang¹,
CHEN Liwen¹, WANG Jinhong¹, CUI Haiyan¹, CHENG Yuanxiong^{1△}

(1. Department of Respiratory Medicine; 2. Department of Laboratory Medicine, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510630, China)

[Abstract] **Objective** To explore the significance of sputum cell classification and counting in the early diagnosis of adult *Mycoplasma pneumoniae pneumoniae*. **Methods** A retrospective analysis on medical records of 72 patients who were clinically diagnosed as simple community-acquired pneumonia by using viral nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was done. Of the 72 patients, 49 cases were *Mycoplasma pneumoniae pneumoniae* (atypical pathogen group), 23 cases were typical bacterial infections (typical pathogen group). Sputum of these children was collected through bronchoscopy, and rapid on-site evaluation was performed by using Diff's rapid staining solution to do classification and sputum cells counting. **Results** The percentage of macrophage in the sputum of the atypical pathogen group was (21.98±12.11)%, and the typical pathogen group was (11.15±8.83)%, the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.01$). The percentage of lymphocytes in the sputum of the typical pathogen group was 7%, and the typical pathogen group was 2%, the difference between the two groups was statistically significant ($P<0.01$). The percentage of neutrophils in the sputum of the atypical pathogen group was (68.93±16.08)%, the typical pathogen group was (86.25±9.48)%, and the difference between the two groups was also statistically significant ($P<0.01$). **Conclusion** The classification and counting of sputum cells can be used as an important reference for the early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae pneumoniae* in adults.

[Key words] counting of sputum cells; *Mycoplasma pneumoniae*; rapid on site evaluation; community infection

* 基金项目:南方医科大学临床研究项目基金(LC2016PY001)。 作者简介:李婷(1984-),主治医师,硕士,主要从事呼吸科感染病原体研究。 △ 通信作者,E-mail:drchengyx@126.com。

社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)已成为全球第六大死因,是医疗卫生资源的主要负担之一。病原体的多样性及易变性导致 CAP 的诊治面临巨大的挑战,若得不到及时有效的诊治,发生重症肺炎的风险明显提高,大大增加了疾病的病死率。因此,快速明确病原体,尽早使用针对性抗菌药物是 CAP 患者得到快速有效救治、降低重症肺炎发生率的关键。

既往认为肺炎链球菌是 CAP 最主要的致病菌,但近年来肺炎支原体肺炎的发病率明显增高,肺炎支原体逐渐成为 CAP 的主要致病菌之一,在世界范围内常以流行病的形式发生。据统计,在非流行季节及区域,肺炎支原体可导致人群中出现 4%~8% 的 CAP,在流行期此比例可上升至 20%~40%,而在封闭人群中可高达 70%^[1-2]。然而,肺炎支原体肺炎与其他细菌性肺炎难以从临床表现上明确鉴别,目前诊断肺炎支原体感染的检测方法主要包括:免疫学抗体测定、分子检测及病原体培养。抗体测定及病原体培养耗时长,且敏感性不高,分子检测方法多样,可快速明确病原体,但检测设备昂贵,检测费用高,难以广泛普及,因此如何快速明确诊断肺炎支原体感染成为临床亟待解决的问题。

肺炎支原体属于胞内寄生病原体,大量研究发现:肺炎支原体感染机体后,宿主将会启动体液免疫应答,此过程包括 B 细胞、巨噬细胞及 T 细胞的活化。这与细菌感染宿主后所启动的固有免疫截然不同,固有免疫主要涉及的炎性细胞为中性粒细胞及巨噬细胞^[3-5]。因此能否通过分析痰液中炎性细胞的种类来初步明确病原体值得探索。本研究拟对采用核酸环介导等温扩增技术(LAMP)^[6]确诊为单一病原体感染的 CAP 患者进行痰液细胞学分析,以期获得肺炎支原体感染者痰液的细胞学特点,为肺炎支原体肺炎的快速诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2018 年 3 月至 2019 年 8 月在本院呼吸科住院的 CAP 患者病历资料,采用呼吸道病原体 LAMP 十三联检试剂盒检测,选取明确诊断为单一病原体感染的社区获得性肺炎患者,包括肺炎支原体、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌及流感嗜血杆菌共 102 例,从中筛选出符合纳入排除标准的病例共 72 例,其中肺炎支原体肺炎病例 49 例,作为非典型病原体组,剩余病例进入典型病原体组共 23 例,包括肺炎链球菌 13 例,流感嗜血杆菌 4 例,金黄色葡萄球菌 6 例。

1.2 纳入标准和排除标准

纳入标准:(1)符合《中国成人社区获得性肺炎诊断及治疗指南》(2016 版)中诊断要点;(2)年龄 18~70 岁;(3)临床有发热、咳嗽等症状;(4)胸部 CT 显示肺部新发炎症病灶;(5)采用 LAMP 十三联检试剂盒行呼吸道病原体核酸检测结果均为单一病原体感染,且病原体类型与影像学表现相符。排除标准:(1)年龄小于 18 岁或大于 70 岁;(2)患有任何肿瘤;(3)同时存在其他气道炎症性疾病,如慢性阻塞性肺疾病、支气管哮喘、咳嗽变异性哮喘、嗜酸性粒细胞性支气管炎、变应性咳嗽、支气管扩张症、肺间质纤维化、肺结核等;(4)就诊前 1 个月内吸入、口服或静脉使用过激素。(5)存在过敏性疾病,如过敏性皮肤病、寄生虫感染、嗜酸性粒细胞肉芽肿性疾病等。

1.3 主要材料

迪夫染液专用固定液、迪夫 AB 溶液(珠海贝索生物技术有限公司),LAMP 十三联检试剂盒、RTiso-chip TM 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪(北京博奥生物集团有限公司),细胞计数器(江苏新康医疗器械有限公司)、荧光显微镜(日本奥林巴斯)。

1.4 方法

1.4.1 经纤维支气管镜痰标本获取及准备

所有患者术前均签署知情同意书。患者取仰卧位,在咪达唑仑+芬太尼镇静条件下经鼻进镜,仔细观察气管及各级支气管,直至影像学检查提示的病变部位,经支气管镜负压吸引气管或主支气管分泌物于无菌痰杯中。每份标本挑取其中密度较高,不透明部分粘稠痰液在 4 张专用玻片上均匀涂抹出大小约 1 cm×1 cm 厚薄适度的圆形区域,用于染色。支气管镜再次吸取病灶部位肺泡灌洗液 3 mL 用于 LAMP 十三联检试剂盒检测呼吸道病原体核酸。

1.4.2 迪夫染色

涂好的玻片立即进行染色:把玻片按先后顺序分别浸泡于迪夫染液专用固定液中固定 10 s,迪夫 A 溶液浸泡 20~30 s;磷酸盐缓冲液冲洗;然后把玻片置于迪夫 B 溶液浸泡 30~40 s;最后用清水洗掉染液,用吸水纸将玻片上残留的液体擦干即可进行结果判读。痰液标本合格标准:镜下鳞状上皮细胞小于 10 个/低倍视野、多核白细胞大于 25 个/低倍视野,或二者比例小于 12.5,选取合格痰液染色玻片进行判读,具体判读方法为:由受训的临床医师用显微镜观察不同视野中共计 400 个非鳞状上皮细胞并进行分类计数。

1.4.3 LAMP 十三联检试剂盒检测呼吸道病原体

按试剂盒说明书收集、转运、处理灌洗液并提取基因组 DNA,采用恒温扩增、微流控碟式芯片相结合

表 1 两组性别构成、年龄比较

组别	n	性别(n)		年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	年龄分布(n)		
		男	女		18~45 岁	46~65 岁	66~70 岁
非典型病原体组	49	21	28	29.47±8.15	47	2	0
典型病原体组	23	13	10	50.83±15.43	9	6	8

的技术,利用具有链置换功能的聚合酶在恒温(65℃)条件下进行靶核酸扩增,荧光染料掺入法进行实时荧光检测,应用 RTisochip TM 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪和相应软件进行结果分析,一步完成对 13 种常见下呼吸道病原体的检测,包括肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌复合群、肺炎支原体、肺炎衣原体^[7]。

1.5 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件分析数据,正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用独立标本 *t* 检验,不服从正态分布的采用中位数和四分位间距 [$M(P_{25}, P_{75})$] 表示,比较采用非参秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 发病年龄差异

非典型病原体组发病年龄为(29.47±8.15)岁,典型病原体组发病年龄为(50.83±15.43)岁。非典型病原体组发病年龄主要分布在 18~45 岁,共 47 例,46 岁以上 2 例;而典型病原体组发病年龄分布 18~45 岁 9 例,46~65 岁 6 例,65~70 岁 8 例。说明肺炎支原体肺炎以青中年发病为主,符合流行病学分布规律,而典型病原体感染患者发病年龄无特异性,见表 1。

表 2 两组患者的痰液细胞分类比较

项目	非典型病原体 (n=49)	典型病原体组 (n=23)	P
N%($\bar{x} \pm s$)	68.93±16.08	86.25±9.48	<0.01
L% [$M(P_{25}, P_{75})$]	7(0,32)	2(0,11)	<0.01
M%($\bar{x} \pm s$)	21.98±12.11	11.15±8.83	<0.01
EO% [$M(P_{25}, P_{75})$]	0(0,14)	0(0,2)	0.943

M%:巨噬细胞百分比;L%:淋巴细胞百分比;N%:中性粒细胞百分比;EO%:嗜酸性粒细胞百分比。

2.2 痰液炎性细胞分类计数

与典型病原体组比较,非典型病原体组患者痰液中巨噬细胞百分比、淋巴细胞百分比明显升高,而中性粒细胞百分比明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。嗜酸性粒细胞百分比两组比较差异无统计学

意义($P = 0.943$),见表 2。

3 讨 论

肺炎支原体感染机体后,通过抗体及补体调节,启动宿主免疫应答,首先由巨噬细胞吞噬,随后中性粒细胞、淋巴细胞聚集产生炎性渗出。有研究证实:肺泡巨噬细胞在清除支原体的过程中起重要作用,若缺乏巨噬细胞,会降低机体对支原体的清除率^[8]。在肺炎支原体感染的动物模型中,肺泡巨噬细胞的数量决定肺部感染的严重程度^[9],巨噬细胞活化和随后杀死肺炎支原体依赖于 Toll 样受体(TLR),特别是 TLR2^[10-11],因此巨噬细胞在肺炎支原体感染机体后发挥非常重要的作用。本研究通过回顾性分析 72 例单一病原体感染的 CAP 患者病历资料,采用 LAMP 十三联试剂盒明确病原体后,收集痰液标本进行细胞学分析,结果发现:非典型病原体组患者痰液中巨噬细胞百分比比较典型病原体组明显增高,且镜下表现主要以游走巨噬细胞为主,说明与细菌感染相比,巨噬细胞在肺炎支原体感染机体的过程中发挥重要作用。与非典型病原体组比较,中性粒细胞百分比在典型病原体组明显升高,说明中性粒细胞在细菌感染机体中发挥重要作用,这与我们以往的认知一致。中性粒细胞在肺炎支原体感染机体后所起作用仍有待进一步研究。

此外,有研究发现肺炎支原体感染后可刺激 T、B 细胞有丝分裂增加^[12],机体会产生以淋巴细胞占优势的免疫反应^[13],淋巴细胞活化及细胞因子的产生可使疾病最小化并清除病原体^[14],因此淋巴细胞在肺炎支原体感染机体后也发挥重要作用,本研究发现与典型病原体组比较,非典型病原体组淋巴细胞百分比明显增高,说明痰液中淋巴细胞百分比升高也与肺炎支原体感染密切相关。

综上所述,与细菌感染相比较,肺炎支原体感染机体后痰液中巨噬细胞百分比及淋巴细胞百分比升高,而中性粒细胞百分比降低,这一特点或可成为临床诊断肺炎支原体肺炎的又一重要参考依据,且痰液细胞分类计数操作简单、经济方便,利于广泛普及,有利于提高肺炎支原体肺炎的早期诊断率及救治率,降低重症肺炎的发生率和病死率。而如何根据痰液细胞分类计数的结果提示肺炎支原体感染,痰液中巨噬细

胞、淋巴细胞百分比升高,中性粒细胞百分比降低的切点是多少,仍有待大样本数据提供依据。

参考文献

- [1] JACOBS E, EHRHARD I, DUMKE R. New insights in the outbreak pattern of *Mycoplasma pneumoniae*[J]. *Int J Med Microbiol*, 2015, 305(7):705-708.
- [2] LOENS K, GOOSSENS H, IEVEN M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*; current status of diagnostic methods [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, 29(9):1055-1069.
- [3] ZHOU H, YU M, FUKUDA K, et al. IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NF-kappa B activation and cytokine production[J]. *EMBO J*, 2013, 32(4):583-596.
- [4] COLEMAN F T, BLAHNA M T, KAMATA H, et al. Capacity of pneumococci to activate macrophage nuclear factor kappaB; influence on necroptosis and pneumonia severity[J]. *J Infect Dis*, 2017, 216(4):425-435.
- [5] ZIGMOND S H. Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes [J]. *Nature*, 1974, 249(456):450-452.
- [6] 陈炫颖, 陈愉生. 环介导等温扩增技术在呼吸系统疾病中的应用[J]. *临床肺科杂志*, 2011, 16(3):410-412.
- [7] JAIN S, SELF W H, WUNDERINK R G, et al. Community acquired pneumonia requiring hospitalization among U S adults [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(5):415-427.
- [8] LAI J F, ZINDL C L, DUFFY LB, et al. Critical role of macrophages and their activation via MyD88-NFkappaB signaling in lung innate immunity to *Mycoplasma pneumoniae*[J]. 2010, *PLoS One*, 5:e14417.
- [9] SIMECKA J W. What have we learned from animal models of *Mycoplasma pneumoniae* disease; virulence mechanisms and host responses [J]. *Curr Pediatr Rev*, 2013, 9:314-323.
- [10] WU Q, JIANG D, MINOR M N, et al. In vivo function of airway epithelial TLR2 in host defense against bacterial infection[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011, 300: L579-586.
- [11] SHIMIZU T, KIMURA Y, KIDA Y, et al. Cytoadherence of *Mycoplasma pneumoniae* induces inflammatory responses through autophagy and toll-like receptor 4[J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7): 3076-3086.
- [12] ATKINSON T P, WAITES K B. *Mycoplasma pneumoniae* infections in childhood[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(1):92-94.
- [13] YOUN Y S, LEE K Y. *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. *Korean J Pediatr*, 2012, 55(2):42-47.
- [14] JIANG W, QIAN L, LIANG H, et al. Relationships between the varied ciliated respiratory epithelium abnormalities and severity of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. *Scand J Infect Dis*, 2014, 46(7):486-492.

(收稿日期:2020-03-08 修回日期:2020-05-15)