

• 检验技术与方法 •

快速液体培养法检测呼吸道标本中的肺炎支原体

袁应华¹, 刘瑾¹, 成洁¹, 朱敏¹, 孙奋勇¹, 罗兰²

(1. 上海同济大学附属第十人民医院检验科, 上海 200072; 2. 苏州大学, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 探讨快速液体培养法检测肺炎支原体(MP)的临床应用价值, 分析其假阳性的情况及原因。方法 对 93 例呼吸道标本进行 MP 快速液体培养, 培养液用荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测肺炎支原体核酸, 同时测定血清中肺炎支原体抗体, 进行统计学分析。结果 在 93 例检测标本中, 肺炎支原体快速培养阳性 16 例, 检出率是 17.2%(16/93); FQ-PCR 法阳性 10 例, 检出率 10.7%(10/93); 血清学检测阳性 22 例, 检出率 23.6%(22/93)。3 种方法检测结果无显著差异。结论 快速液体培养法干扰因素多, 影响其特异性; 结果判断时结合显微镜检查, 排除细菌或真菌等导致的假阳性, 其特异性可达到与血清学及 FQ-PCR 法一致水平。

关键词:支原体, 肺炎; 快速液体培养; 聚合酶链反应; 血清学检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0343-02

肺炎支原体(mycoplasma pneumoniae, MP)是介于细菌和病毒之间的一种微生物, 为已知的最小独立生活的原核型微生物。MP 感染是社区获得性肺炎的重要病因, 占社区获得性肺炎的 15%~20%, 其人群发病率约为 2%, 平时散在发病, 流行周期为 3~5 年^[1]。引起社区获得性肺炎的病源体的错误和延迟诊断导致了抗菌药物不当使用, 患者预后不好^[2]。近年来关于 MP 感染的报道日益增多, 大环内酯类抗菌素在使用过程中出现了日趋严重的耐药性^[3]。肺炎支原体引起的呼吸道感染的临床诊断基本上依赖于临床症状, 由于其病史和临床表现常常缺乏特异性, 因此病原学的诊断非常困难。肺炎支原体的各种实验室检测手段不够特异、敏感、快速, 因而临床价值有限。培养分离病原体被认为是诊断感染的金标准, 但分离培养肺炎支原体难度大、耗时长, 不适用于肺炎支原体的感染诊断。近年来, MP 快速液体培养已有商品试剂供应, 但其临床应用价值文献报道差别较大^[4-5]。本研究对 93 例呼吸道感染咽拭子或痰标本分别用 MP 快速培养法、荧光定量 PCR 及血清学方法进行 MP 检测, 并作比较, 探讨快速液体培养法检测肺炎支原体(MP)的临床意义, 现报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 所有标本均来自本院住院及门诊呼吸道感染的患者, 共计 93 例, 采集质量合格的咽拭子或痰标本。

1.2 仪器与试剂 肺炎支原体快速液体鉴定培养基(48 h)为珠海迪尔生物工程有限公司产品; 肺炎支原体核酸定量检测试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供; PE-5700 PCR 扩增仪, 为美国 P-E 公司产品; 肺炎支原体抗体检测试剂盒为 FUJIREBIO INC(富士瑞必欧株式会社)产品。

1.3 方法

1.3.1 MP 快速液体培养法 按使用说明书进行操作, 用无菌咽拭子在被检测患者口腔咽部捻转数次采集标本或用无菌棉签在被检测患者痰标本捻转数次采集标本, 置培养基瓶内搅动数次, 挤压去除拭子, 置于 37℃ 孵箱中培养 48 h 后观察结果, 必要时延长至 1 周至 4 周。培养基颜色由原红色变成清亮的淡黄色判为阳性, 用接种环蘸取一快速液体培养阳性标本于清洁玻片上, 干燥后进行革兰染色, 40 倍光学显微镜下观察, 未发现细菌或真菌者, 判为培养显微镜法阳性, 发现细菌和(或)真菌者, 判为阴性。培养基颜色不变或颜色为非清亮的黄色判断为阴性。

1.3.2 PCR 荧光探针法 将快速液体培养标本 1 mL, 12 000

r/min 离心 5 min, 去上清液, 沉淀加灭菌生理盐水 1 mL 混匀; 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 沉淀加入 50 μL DNA 提取液充分混匀, 100℃ 恒温处理(10±1)min; 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液行 PCR 扩增, 反应体系及扩增条件严格按试剂盒说明书进行操作。

1.3.3 肺炎支原体抗体检测 采用被动凝集法, 按使用说明书进行操作; 本试剂采用 MP 细胞膜成分(mac 株)致敏人工明胶粒子与人血清中存在的肺炎支原体抗体发生凝集反应, 其检测抗体效价广, 从 1:40~1:20 480, 结果以大于或等于 1:40 判断为阳性。

1.4 统计学处理 数据收集整理后, 采用 2×2 表的 χ^2 检验, 用 SPSS 13.0 统计软件作统计学分析, $P < 0.01$ 表示两种检测方法结果比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 快速液体培养法 93 例呼吸道标本进行 MP 快速液体培养, 培养阳性为 16 例, 阳性率为 17.2%(16/93), 结果见表 1。对快速液体培养法阳性的标本进行涂片, 革兰染色后观察, 69.2%(36/52)发现霉菌或细菌。

2.2 PCR 荧光探针法 93 例标本采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测肺炎支原体核酸, 10 例为阳性, 阳性率 10.7%(10/93), 见表 1。

2.3 MP 血清学试验结果 检测 93 例, 其中阳性占 22 例, 阳性率 23.6%(22/93), 见表 1。3 种方法检测结果差异无统计学意义。

2.4 统计学分析结果

2.4.1 3 种方法检测比较 快速液体培养法分别与血清学试验统计学分析($\chi^2 = 1.2, P > 0.01$), 两者差异无统计学意义; 与 FQ-PCR 法检测结果进行比较($\chi^2 = 1.5, P > 0.01$), 两者之间差异亦无统计学意义, 见表 1。

表 1 3 种方法检测肺炎支原体的结果比较

快速液体培养法	血清学		FQ-PCR 法		合计
	阳性	阴性	阳性	阴性	
阳性	4	12	1	15	16
阴性	18	59	9	68	77
合计	22	71	10	83	93

2.4.2 血清学测试与 FQ-PCR 法检测结果比较, 见表 2。统

计表明两者之间差异无统计学意义($\chi^2=5.5, P>0.01$)。

表 2 血清学方法与 PCR 方法结果比较

血清学方法	FQ-PCR 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	5	17	22
阴性	5	66	71
合计	10	83	93

3 讨 论

肺炎支原体感染由于其临床症状不典型,很难确诊。传统 MP 分离培养是诊断的“金标准”,但其难度大、耗时长(2~3 周)且敏感性一般,对标本运送及培养基的要求高,故未能普遍应用^[6]。检测肺炎支原体抗体方法比培养法更简单、更敏感。但是由于 IgM 抗体在发病 5~7 d 才产生,病程早期假阴性率较高,不能达到及时诊断的目的。同时检测结果也受患者年龄、免疫力等因素的影响。PCR 法具有很高的特异性、敏感性,但其要求操作技术高,仪器设备昂贵,不适合一般实验室开展。本文数据显示,快速液体培养法、PCR、血清学试验阳性率分别为 17.2%、10.7%和 23.6%,统计学处理分析表明这 3 种方法检测结果都无明显差异,见表 1。

检测 MP 快速液体培养基中主要含支原体基础肉汤、马血清、酵母提取液、培养基内加抑菌剂,可抑制细菌和真菌的生长,快速液体培养法由于其操作简单、实验室条件要求不高、明显缩短检测时间,可应用于临床^[7]。本研究中,研究者对快速液体培养法阳性的标本进行涂片,革兰染色后观察,69.2%(36/52)发现霉菌或细菌,假阳性率非常高。说明快速液体培养法液体培养基中的抑菌剂没有有效抑制真菌和细菌,它们的生长使得快速液体培养法出现假阳性^[8-9]。因此,快速液体培养法结果判断时结合显微镜检查,可排除细菌或真菌等导致的假阳性,与血清学检测、PCR 检测结果比较差异无统计学意义($P>0.01$)。

综上所述,肺炎支原体液体快速培养基鉴定的方法,干扰

• 检验技术与方法 •

用 sysmex CA-7000 血凝仪测量血浆 D-二聚体全量法与减量法的比较

徐正良,李德璇,刘光彩,沈 乾

(云南省第三人民医院/大理学院昆明附属医院检验科,云南昆明 650031)

摘要:目的 为了给临床在深静脉血栓和肺栓塞的排出及 DIC 的诊断和溶栓治疗监测方面有一个很好的评价指标,采用血浆 D-二聚体定量测定具有简便、快捷、安全、无创伤性等优点,但是西部地区经济欠发达,试剂成本昂贵,而收费标准又较低,不能普通应用。为了降低成本,服务于基层,特做此试验。**方法** 以 CLSI 颁布的 EP9-A2 文件《用患者样本进行方法比对及偏倚评估》^[1]为方案,在 sysmex CA-7000 血凝仪上对血浆 D-二聚体采用全量法和减量法进行检测,以评价二者有无显著差异。**结果** 通过采用两种方法分析 40 例患者样本的血浆 D-二聚体含量,采用线性回归分析结果,以全量法所测得结果为 X,以减量法所测结果为 Y。通过 SPSS 17.0 统计软件处理计算斜率(b)、截距(a)和相关系数(r),分别为 b=0.9772, a=0.032 7, r=0.999 6 及配对 t 检验得 $t_{0.05, 双测} = 2.024, t = 1.646, P > 0.05$ 其结果差异无统计学意义。**结论** 血浆 D-二聚体全量法和减量法对于在仪器线性范围内的测量结果从本实验来看是无显著性差异的,但是超出线性范围的测量是否有相关性还有待进一步的验证。

关键词: 血浆 D-二聚体; 定量检测; 全量法; 减量法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.03.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)03-0344-03

D-二聚体是纤维蛋白单体经活化因子 XIII 交联后,再经纤溶酶水解所产生的一种特异性降解产物,是一个特异性的纤溶过程标记物。D-二聚体来源于纤溶酶溶解的交联纤维蛋白

因素多,影响了其特异性。结果判断时若结合显微镜检查,以排除细菌或真菌等导致的假阳性,该法的特异性可达到与血清学及 FQ-PCR 法一致水平,可以作为肺炎支原体呼吸道感染性疾病实验诊断方法之一。

参考文献

- [1] Lind K, Benzon MW, Jensen JS, et al. A seroepidemiological study of Mycoplasma pneumoniae infections in Denmark over the 50-year period 1946~1995[J]. Eur J Epidemiol, 1997, 13(5): 581-586.
- [2] Nakayama EK, Hasegawa M, Morozumi, et al. Rapid optimization of antimicrobial chemotherapy given to pediatric patients with community acquired pneumonia using PCR techniques with serology and standard culture[J]. J. Infect. Chemother, 2007, 13(2): 305-313.
- [3] Morozumi M, Iwata S, Hasegawa K, et al. Increased macrolide resistance of Mycoplasma pneumoniae in pediatric patients with community-acquired pneumonia[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(1): 348-350.
- [4] 张浩. 支原体培养和鉴定方法的探讨[J]. 中国现代医生, 2007, 45(6): 65.
- [5] 钱新红, 张国成, 许东亮. 肺炎支原体快速鉴定培养基在儿童支原体感染快速诊断中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2006, 21(5): 71-72.
- [6] Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, et al. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(6): 708-710.
- [7] 张善弟, 张驰. 肺炎支原体快速鉴定培养基的临床应用及结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(4): 97-98, 101.
- [8] 刘长德, 张艳, 于成源, 等. 支原体培养假阳性结果原因分析[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 214.
- [9] 吕泰霞, 赵水娣. 肺炎支原体液体培养假阳性原因分析及解决方法探讨[J]. 实验与检验医学, 2009, 27(3): 323-324.

(收稿日期: 2012-10-03)

凝块^[2]。其含量增高表明体内有血栓形成及纤维系统的激活, 可以作为体内血栓前状态和血栓形成的分子标志物之一。应用定量检测血浆中 D-二聚体的含量具有简便、快捷、安全、无