

• 论 著 •

间接免疫荧光与实时荧光 PCR 检测小儿支原体肺炎*

王健容, 何 旭, 饶福光, 朱春婵

(深圳市龙岗区妇幼保健院儿科, 广东深圳 518172)

摘 要:目的 对比间接免疫荧光(IFA)与实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测小儿支原体肺炎的效果。方法 选取 137 例临床诊断的肺炎支原体(MP)感染患儿,按年龄划分为<1 岁(35 例)、1~<5 岁(69 例)、5~15 岁(33 例),采集血液标本和咽拭子,分别采用 IFA 和实时荧光 PCR 进行检测。同时对纳入的所有患儿行支原体肺炎的常规治疗,以治疗有效为判断 MP 感染的标准,按年龄段统计分析两种方式检测的阳性符合率。结果 <1 岁和 1~<5 岁患儿实时荧光 PCR 检测阳性符合率高于 IFA,5~15 岁患儿 IFA 检测阳性率高于实时荧光 PCR,差异均有统计学意义($P<0.05$);而两种方式检测总阳性符合率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 IFA 与实时荧光 PCR 都可作为检测 MP 的有效方式,但检测效果在不同年龄段存在一定的差异,建议对 5 岁以下患儿采用实时荧光 PCR 进行检测,5 岁及以上患儿则可选择 IFA 检测,以提高检测的准确度,更好地为临床用药提供指导。

关键词:支原体肺炎; 小儿; 间接免疫荧光; 实时荧光聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2633-03

Indirect immunofluorescence and real-time fluorescent PCR for detection of mycoplasma pneumonia in children*

Wang Jianrong, He Xu, Rao Fuguang, Zhu Chunchan

(Department of pediatrics, Shenzhen Longgang District Maternal and Child Care Service Center, Shenzhen, Guangdong 518172, China)

Abstract: Objective To compare efficacy of indirect immunofluorescence (IFA) and real-time fluorescent polymerase chain reaction(PCR) in detection of mycoplasma pneumonia in children. **Methods** A total of 137 children clinically diagnosed as Mycoplasma pneumoniae(MP) infection were selected and divided into groups by age, including <1 years old group(35 cases), 1—<5 years old group(69 cases) and 5—15 years old group(33 cases). Blood specimen and throat swabs were collected and detected by using IFA and real-time fluorescent PCR. At the same time, all of the selected children were treated with conventional therapy, according to total effective rate, positive coincidence rates of the two methods were statistically analysed by age. **Results** The positive coincidence rates in children with MP infection <1 years old and 1—<5 years old detected by using real-time fluorescent PCR were higher than that detected by using IFA, while among children 5—15 years old, the positive coincidence rate was higher detected by using IFA compared with that detected by using real-time fluorescent PCR, all had statistically significant differences ($P<0.05$). The overall positive coincidence rates of the two methods were not significantly different($P>0.05$). **Conclusion** IFA and real-time fluorescent PCR both could be used as effective methods for detecting MP, but there are some differences of detective efficacy between the two methods in each age group. Therefore, it is suggested that for children under 5 years old real-time fluorescent PCR might be selected, for children aged 5 years old and over IFA might be selected, in order to improve the detection accuracy and provide better guidance to clinical medication.

Key words: mycoplasma pneumonia; children; indirect immunofluorescence; real-time fluorescent polymerase chain reaction

肺炎支原体(MP)是导致呼吸道感染性疾病的重要病原体之一^[1],并且还可以引起其他系统的严重并发症。近年来 MP 感染的发病率呈现逐年上升的趋势^[2],临床对其诊断多依据病史、症状、辅助检查及用药进行判断。病原菌检查可以有效地将 MP 与其他病毒所致的呼吸道感染进行区别,从而对临床用药进行指导。因此,采用有效的实验室检查方式行病原菌检查具有重要意义。本研究选取 137 例经临床确诊的小儿支原体肺炎患儿作为观察对象,所有患儿均按支原体肺炎常规方式进行治疗,同时采集静脉血及咽拭子行间接免疫荧光(IFA)与实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测,并以临床治疗有效作为 MP 感染的判断标准,结合患儿年龄进行分析,以探讨两种方式的检测效果及临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 7 月至 2014 年 6 月临床诊断的 MP

感染患儿 137 例作为观察对象,男 72 例,女 65 例;年龄 4 个月至 15 岁,平均(5.16±1.38)岁。将所有患儿根据年龄划分为<1 岁(35 例)、1~<5 岁(69 例)、5~15 岁(33 例)。临床诊断标准^[3]:(1)发热,以弛张热和不规则热为主;(2)刺激性咳嗽、咯浓痰,偶见血丝;(3)呼吸困难、喘憋,部分年龄稍大患儿可见咽痛、头痛、口腔溃疡等;(4)肺部体征多不典型,胸片可探及明显炎症表现,以大片云雾状阴影为主;(5)血常规示白细胞计数正常或稍高;(5)大环内酯类抗菌药物治疗效果明显。

1.2 方法

1.2.1 IFA 检测及结果判读 试剂盒由西班牙 Vircell 公司提供。患儿经临床确诊后抽取静脉血 2 mL 置于干燥的真空管中,分离血清后于 4℃ 冰箱保存。取 15 μL 血清标本,采用专用 IgG/类风湿因子(RF)吸附剂温育 15 min 后,3 000 r/min

* 基金项目:深圳市龙岗区科技计划项目(YLWS 20140606161637908)。 作者简介:王健容,男,主治医师,主要从事儿童重症监护研究。

离心 10 min,备用。在加样板的每个反应区均加入稀释血清 25 μ L,在对应的凹槽里放置载片盖,注意每个标本均能与生物薄片进行接触,而标本之间相互无接触,室温培育 30 min。流水冲洗载片后,置于装有磷酸盐缓冲液(PBS)-Tween 的无菌烧杯中浸泡 5 min 以上。取被荧光标记的抗人免疫球蛋白 20 μ L 置于清洁后的加样板反应区中,继续培育 30 min,经流水冲洗 1 s 后,于 PBS-Tween 中浸泡,在盖玻片上滴加甘油/PBS 封片,使用聚丙烯酸酯封片板。荧光显微镜下观察并判读结果。结果判读标准^[4]:根据标本的特异性荧光强度对结果进行判定,一表示无荧光,±表示可疑荧光,十表示清晰可见的荧光,++表示明亮的荧光,++++及以上表示闪亮的荧光。待检标本特异性荧光染色强度达+及以上,且对照显示为±或一即为样品 MP-IgG 阳性。

1.2.2 实时荧光 PCR 检测及结果判读 采用中山大学达安基因 MP 核酸扩增检测试剂盒进行检测;荧光定量 PCR 仪由美国 ABI 公司提供。患儿在临床确诊后均行咽拭子采集。在采集到的咽拭子中加入 1 mL 无菌生理盐水,充分摇荡至均匀后置于 1.5 mL 离心管中,以 12 000 r/min 离心 5 min,丢弃上清液后将沉淀物直接加入 DNA 提取液中摇匀。100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min,以 12 000 r/min 速度离心 5 min,取上清液 2 μ L 加入提前备好的 PCR 反应液中,并制备阴、阳性对照管各 1 管,放入 PCR 扩增仪中进行扩增。扩增条件:93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,以此循环 10 次后,再按照 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s 循环 30 次。结果判读^[5]:若增长曲线不呈"s"型或阈值循环数(Ct 值)等于 30 则为样品 MP-DNA 阴性;若增长曲线呈"s"型且 Ct 值小于 30,DNA 载量大于或等于 1×10^4 则为样品 MP-DNA 阳性。

1.2.3 治疗方法 所有入选患儿均行退热、止咳、平喘等对症治疗,同时采用东北制药集团沈阳第一制药有限公司生产的阿奇霉素针,溶于 5%葡萄糖注射液中静脉滴注,剂量根据小儿体质量而定,每次 10 mg/kg,每日 1 次,配制液浓度为 1%~1.5%,滴注时间约为 2~3 h。治疗 5 d 后停用 3 d,并再次按原剂量连用 3 d,再次停用 3 d 后改口服阿奇霉素颗粒(湖南千金湘江药业股份有限公司生产,国药准字 H20063898),每次 10 mg/kg,每日 1 次,连续 3 d。总共治疗时间为 17 d。

1.2.4 疗效判定 参照文献^[6]拟定,显效:临床症状和体征均全部消失,胸部 X 线片复检正常;有效:体征消失或较治疗前有改善,临床症状偶有,胸部 X 线片复查较治疗前有明显好转,但未完全恢复;无效:临床症状及体征较治疗前均无明显改变或加重。治疗总有效率=(显效例数+有效例数)/患者总例数 $\times 100\%$ 。

1.3 观察指标及判定 观察指标为两种方式的检测阳性符合率。以临床治疗效果(即治疗总有效率)为标准,比较两种方式的检测的阳性符合率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理与统计分析,计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各年龄段患儿及总体治疗效果 <1 岁患儿治疗总有效率为 91.43%(32/35),1~<5 岁患儿治疗总有效率为 97.10%(67/69),5~15 岁患儿治疗总有效率为 84.85%(28/33),纳入的所有患儿治疗总有效率为 92.70%(127/137)。见表 1。

2.2 两种检测方法阳性符合率比较 <1 岁、1~<5 岁、5~15 岁及纳入的所有患儿中分别有 23、58、26、107 例 MP-IgG 阳

性,30、65、20、115 例 MP-DNA 阳性。以临床治疗效果为标准,比较两种检测方法的阳性符合率。<1 岁患儿 IFA 检测阳性符合率[71.88%(23/32)]低于实时荧光 PCR 检测[93.75%(30/32)],1~<5 岁患儿 IFA 检测阳性符合率[86.57%(58/67)]低于实时荧光 PCR 检测[97.01%(65/67)],5~15 岁患儿 IFA 检测阳性符合率[92.86%(26/28)]高于实时荧光 PCR 检测[71.43%(20/28)],差异均有统计学意义($P<0.05$)。而纳入的所有患儿 IFA 检测阳性符合率[84.25%(107/127)]与实时荧光 PCR 检测阳性符合率[90.55%(115/127)]比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 各年龄段患儿及总体治疗效果

年龄	<i>n</i>	显效 (<i>n</i>)	有效 (<i>n</i>)	无效 (<i>n</i>)	治疗总有效率 [<i>n</i> (%)]
<1 岁	35	21	11	3	32(91.43)
1~<5 岁	69	40	27	2	67(97.10)
5~15 岁	33	17	11	5	28(84.85)
合计	137	78	49	10	127(92.70)

表 2 两种检测方法阳性符合率比较[*n*(%)]

检测方法	<1 岁 (<i>n</i> =32)	1~<5 岁 (<i>n</i> =67)	5~15 岁 (<i>n</i> =28)	总阳性符合率 (<i>n</i> =127)
IFA	23(71.88)	58(86.57)	26(92.86)	107(84.25)
实时荧光 PCR	30(93.75)	65(97.01)	20(71.43)	115(90.55)
χ^2	5.38	4.85	4.38	2.29
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

3 讨 论

MP 作为一种常见的呼吸道病原体,以导致呼吸道感染为主,部分患儿因病程延误而累及肺及其他组织,导致心肌炎、脑炎、肾炎等并发症^[7],威胁患儿的生命安全。MP 感染后起病多较隐匿,多无特异性的症状和体征,同时 X 射线胸片也多无特异性表现,故临床诊断患儿实属支原体肺炎疑似患儿。此外,该病病程长、并发症多种多样,临床诊治时易出现误诊、漏诊的情况。因此,对该类患儿进行实验室检查以确定是否为 MP 感染极为重要。

目前常用的实验室检查方式较多,以 MP 的分离培养、血清学检查和分子生物学方法较为常用^[8]。其中分离培养能真实地反映 MP 感染的存在,是目前诊断支原体肺炎的金标准^[9],该方式包括传统培养法和快速培养法两种,传统培养法需要的时间较长,难以在早期进行诊断,快速培养法具有快速、经济等优点,可帮助早期进行确诊,但其对真菌及多重耐药菌的抑制效果较差,故假阳性率高,特异性低^[10]。血清学检查的灵敏度较快速培养法高,MP-IgG 是机体被感染 MP 后最早产生的特异性抗体,多在发病一周内即可检出,而 IFA 则是近年来常用的检测方式,其检测病原体抗体(MP-IgG)具有特异性强、阳性与阴性样品对照明显、可精确判读荧光分布、操作简单等优点^[11],但 MP-IgG 受到患儿年龄较小、病程及机体免疫功能的影响,检测存在一定的局限性。实时荧光 PCR 法直接对患儿 MP 核酸水平进行检测,故灵敏度更高,检测结果的准确度也更高,且可有效防止交叉感染^[12],但其检测时不能较好地存活 MP 和死亡的 MP 进行鉴别。因此,(下转第 2637 页)

CNS 感染具有很高的价值,但是血糖值易受进食、输液等因素影响,故单独用于诊断 CNS 感染的价值需要探讨^[10]。CSF 中乳酸与丙酮酸盐检测及二者比值都可作为良好的感染标志物,由于血液中乳酸与 CSF 中乳酸水平会动态平衡,所以其他系统或器官的病变也会引起 CSF 中乳酸水平的改变^[11]。均表明 CSF 中生化指标结果需结合患者具体情况进行分析。CSF 中的乳酸水平检测相对于传统的生化指标包括 CSF 中的 Glu、CSF 与血清中 Glu 的比值、CSF 中的 PRO、白细胞总数,对于鉴别细菌性脑膜炎是更好的指标^[12]。虽然临床并未开展 CSF 乳酸的定量检测,但是乳酸可能会成为 CNS 感染更有诊断价值的检测指标。

本研究通过对细菌培养阳性与阴性的 CSF 生化指标进行单独变量与多变量的 ROC 曲线分析,研究了 CSF 生化指标在 CNS 感染中的诊断价值。结果表明每种指标均有诊断价值,但是联合检测能够提高检测水平。本研究结果显示虽然 CSF 单项生化指标及联合检测均对 CNS 感染具有较好的诊断价值,但其 AUC 值均较低,诊断的灵敏度与特异度均较低,因此有必要开发灵敏度与特异度高的新的 CSF 快速检测指标,更好地为临床诊治 CNS 感染提供支持。

参考文献

[1] 李幽然,张国军. 脑脊液实验室检查对颅内感染的诊断价值[J]. 标记免疫分析与临床,2014,21(4):474-478.
[2] 刘润幸. 使用 SPSS 作多变量观察值的 ROC 曲线分析[J]. 中国公共卫生,2003,19(9):1151-1152.
[3] Saez-Llorens X, Mccracken GH. Bacterial meningitis in children [J]. Lancet, 2003, 361(9375):2139-2148.
[4] Bamberger DM. Diagnosis, initial management, and prevention of

meningitis[J]. Am Fam Physician, 2010, 82(12):1491-1498.
[5] Joshi D, Kundana K, Puranik A, et al. Diagnostic accuracy of urinary reagent strip to determine cerebrospinal fluid chemistry and cellularity[J]. J Neurosci Rural Pract, 2013, 4(2):140-145.
[6] 丁锦荣,管义祥,吴德模,等. 56 例疑诊颅内感染患者脑脊液中病原菌的基因芯片技术检测结果[J]. 山东医药, 2014, 54(35):83-85.
[7] Sundaram C, Shankar SK, Thong WK, et al. Pathology and diagnosis of central nervous system infections[J]. Patholog Res Int, 2011, 2011:878263.
[8] 邹自英,朱冰,汤雪晴,等. 脑脊液各项指标联合检测对颅内细菌感染的诊断价值[J]. 西南军医, 2012, 14(2):199-201.
[9] 张燕龙,乔琳. 脑脊液生化测定结果与标本放置时间的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24):3417-3418.
[10] Tamune H, Takeya H, Suzuki W, et al. Cerebrospinal fluid/blood glucose ratio as an indicator for bacterial meningitis[J]. Am J Emerg Med, 2014, 32(3):263-266.
[11] Zhang WM, Natowicz MR. Cerebrospinal fluid lactate and pyruvate concentrations and their ratio[J]. Clin Biochem, 2013, 46(7/8):694-697.
[12] Huy NT, Thao NT, Diep DT, et al. Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis[J]. Crit Care, 2010, 14(6):R240.

(收稿日期:2015-06-15)



(上接第 2634 页)

IFA 检测与实时荧光 PCR 法各具利弊。

本研究选取 137 例临床诊断的支原体肺炎患儿作为观察对象,所有患儿均按支原体肺炎常规治疗方式予以治疗,并根据年龄对患儿进行分组,同时患儿在获得临床诊断后即采集静脉血液和咽拭子,分别行 IFA 和实时荧光 PCR 检测,经分析显示,以治疗总有效率为标准, <1 岁和 1~<5 岁患儿 IFA 检测阳性符合率分别为 71.88% 和 86.57%,均低于实时荧光 PCR 检测阳性符合率(93.75% 和 97.01%),差异均有统计学意义($P<0.05$);5~15 岁患儿 IFA 检测阳性符合率为 92.86%,明显高于实时荧光 PCR 检测阳性符合率(71.43%),差异有统计学意义($P<0.05$);而两种方式总阳性符合率分别为 84.25% 和 90.55%,差异无统计学意义($P>0.05$)。

综上所述,IFA 与实时荧光 PCR 都可作为检测 MP 的有效方式,但不同方式检测效果在不同年龄段之间存在一定的差异,建议对 5 岁以下患儿采用实时荧光 PCR 进行检测,而 5 岁及以上患儿则可选择 IFA 检测,以提高检测的准确度,更好地为临床用药提供指导。

参考文献

[1] 周喜友,肖克林,袁康凯,等. 实时 PCR 和颗粒凝集法检测儿童呼吸道感染肺炎支原体感染[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(9):701-702.
[2] 倪少娟,黄丽英,曾尚娟,等. 两种血清学检测方法在婴、幼儿肺炎支原体感染早期诊断中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志,

2013, 34(21):2827-2829.

[3] 王利君,袁黎. 儿童血清肺炎支原体抗体 IgM 两种检测方法比较[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(19):3311-3312.
[4] Register KB, Sacco RE, Olsen SC. Evaluation of ELISAs for detection of Mycoplasma bovis-specific antibody in bison sera[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(9):154-156.
[5] 宁瑶,李红胜,陈松劲. 实时荧光定量 PCR 在肺炎支原体 DNA 检测中的应用[J]. 浙江临床医学, 2014, 16(5):810-811.
[6] 胡晓静. 阿奇霉素联合痰热清治疗小儿肺炎支原体肺炎疗效[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(5):514-516.
[7] Narita M. Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of Mycoplasma pneumoniae infection with special reference to pneumonia[J]. J Infect Chemother, 2010, 16(3):162-169.
[8] 樊茂,张倩. 两种方法检测肺炎支原体感染的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(5):586-587.
[9] 蔡叶琴,黄黎,宋俊,等. 3 种不同方法在小儿肺炎支原体检测中的价值比较[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(12):1608-1609.
[10] 周燕,申旭霞. 快速培养法与实时荧光定量聚合酶链反应检测肺炎支原体的对照研究[J]. 实用医院临床杂志, 2012, 9(5):94-96.
[11] 王涛. 肺炎支原体不同检测方法的比对分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20):2709-2710.
[12] 杨文青,吕晓丽,李锐成,等. 实时荧光定量 PCR 检测肺炎支原体 DNA 在小儿肺炎诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(4):416-418.

(收稿日期:2015-07-25)