

• 论 著 •

肺炎支原体快速培养检测法的临床应用价值评估

张广清,戴洪法,葛晶晶,黄美琼,刘玉线
(清远市妇幼保健院,广东清远 511515)

摘要:目的 探讨 6 h 快速检测法、PCR 检测法、血清抗体检测法在肺炎支原体(MP)诊断中的价值。方法 选择 2012 年 8 月至 2014 年 8 月呼吸科收治的 140 例患者作为研究对象,收集患者入院次日咽拭子进行快速鉴定培养基检测;抽取患者静脉血 2 mL,采用 ELISA 法检测患者 MP 特异性抗体;取 MP 快速培养基,对 MP 基因片段进行 PCR 扩增。结果 140 例患者中共有 43 例咽拭子培养呈阳性,其中男 25 例,女 18 例,年龄 2 个月至 14 岁,其中肺炎 24 例,急性支气管炎 9 例,慢性肺部疾病 10 例。MP 快速培养法检出阳性率为 30.7%(43/140),PCR 检测法检出阳性率为 45.0%(63/140),PCR 检测法检出阳性率显著高于 MP 快速培养法($\chi^2=4.347, P=0.037$);两种方法一致性检验, $\kappa=0.554(t=6.868, P=0.000)$;MP 特异性抗体检出阳性率为 37.9%(53/140),MP 快速培养法与特异性抗体检测阳性检出率比较差异无统计学意义($\chi^2=1.150, P=0.284$);两种方法一致性检验, $\kappa=0.338(t=4.050, P=0.000)$ 。结论 MP 6 h 快速检测法用时短、操作简单,但是依然存在假阳性的可能,将其作为 MP 诊断指标可能存在一定误差。

关键词:肺炎支原体; 快速检测; 酶联免疫吸附法; PCR 检测法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.07.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)07-0890-03

Evaluation of clinical application value of rapid culture and detection method of *Mycoplasma pneumoniae*

Zhang Guangqing, Dai Hongfa, Ge Jingjing, Huang Meiqiong, Liu Yuxian

(Qingyuan Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Qingyuan, Guangdong 511515, China)

Abstract: **Objective** To explore the value of *Mycoplasma pneumoniae*(MP) 6 h rapid detection method, PCR detection method and serum antibody detection method in diagnosis of MP. **Methods** A total of 140 patients admitted in the respiration department of our hospital from August 2012 to August 2014 were selected as the research subjects. The throat swab on the next d of admission was collected for conducting the rapid identification medium detection; 2mL of vein blood was extracted from the patients for detecting MP specific antibody by the ELISA method; the MP fast medium was taken for conducting the amplification of MP gene fragment by PCR. **Results** Among 140 cases, 43 cases of throat swab cultures were positive, included 25 male cases and 18 female cases; the age ranged 2? 14 years old, in which 24 cases were pneumonia, 9 cases were acute bronchitis and 10 cases were chronic lung diseases. The positive rate in the MP rapid culture method was 30.7%(43/140), which in the PCR detection method was 45%(63/140), the PCR detection method was significantly higher than the MP rapid culture method ($\chi^2=4.347, P=0.037$); in the consistency test of the two methods, $\kappa=0.554(t=6.868, P=0.000)$; the positive detection rate of MP specific antibody was 37.9%(53/140), which had no statistical difference between the MP rapid culture method and the specific antibody detection ($\chi^2=1.150, P=0.284$); in the consistency test of two methods, $\kappa=0.338(t=4.050, P=0.000)$. **Conclusion** The MP 6 h rapid detection method has the advantages of short time and simple operation, but there is still the possibility of false positive, so certain errors may exist with which as the MP diagnostic index.

Key words: mycoplasma pneumoniae; rapid detection; ELISA; PCR assay

肺炎支原体(M. pneumoniae, MP)是一种介于病毒和细菌之间的微生物^[1-2],也是呼吸系统感染常见的病原菌。临床调查显示近年来 MP 感染呈显著上升趋势^[3],其发病率约占肺炎的 15%以上,以婴幼儿最为常见。一直以来血清学检测被认为是诊断 MP 感染最可靠的手段^[4],然而肺炎支原体 IgG 于血清 IgM 之后出现,且持续时间较长,即使诊断出 IgG 阳性也并非代表 MP 现症感染^[5],因此其仅在回顾性分析及流行病学调查中有临床价值。PCR 检测法具有较高的灵敏度,但是对技术和硬件要求较高,难以在基层推广。MP 6 h 快速培养法是近年来国内开发出的新型 MP 检测方法,其操作简单、准确率高,受到广大临床医生的青睐。本研究对 MP 6 h 快速培养法、PCR 检测法、血清抗体检测法的应用进行比较,旨在探讨

MP 快速培养法对 MP 感染的诊断价值,现将研究成果总结如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012 年 8 月至 2014 年 8 月儿科收治的 140 例患者作为研究对象,男 72 例,女 68 例,年龄 2 个月至 14 岁,其中慢性肺部疾病者 43 例,急性支气管炎 38 例,肺炎 59 例。本研究均取得患者本人同意后签署知情同意书,并经过医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 MP 6 h 快速培养法 取无菌拭子 1 支,规范足量采集患者咽后部、扁桃体部位的分泌物或痰液,置于培养瓶中,在瓶内旋转数圈充分混匀后盖上瓶塞,并放入 37℃ 恒温箱中培养,

培养 6 h 后读取培养基颜色。判定标准^[6]:培养 6 h 后培养基由红色变为黄色为阳性,培养基颜色无变化为阴性。使用试剂来源于武汉菁华时间科技有限公司。

1.2.2 PCR 检测法 痰标本由专人于入院 24 h 之内用一次性导管鼻腔送入 5~8 cm,利于负压吸引的原理,吸取鼻咽分泌物 1~2 mL,标本采用实时荧光 PCR 法检测 MP-DNA,操作按标准严格执行,仪器来源于美国 ABI-PCR 扩增仪,使用试剂来源于深圳亚能生物有限公司。

1.2.3 MP 特异性抗体 IgM、IgG 检测 患儿与入院当天急性期或恢复期分别采集非抗凝静脉血 2 mL,2 次采血间隔时间为 1 周,采用酶联免疫吸附法检测患者 MP-IgM、IgG 抗体,试剂盒来源于德国欧蒙医学实验诊断股份公司(ELISA 法),严格按照试剂盒说明书的操作流程规范操作。判定标准:比值<0.8 结果阴性、1.1>比值≥0.8 结果可疑、比值≥1.1 结果阳性(比值=对照或患者样本的吸光度值/标准品的吸光度值)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行检验,计数资料以率的形式表示,率的比较采用 χ^2 检验,一致性采用 kappa 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者一般情况 140 例患者中共有 43 例 6 h 快速培养呈阳性,其中男 25 例,女 18 例,年龄 2~14 岁,其中临床诊断肺炎 24 例、急性支气管炎 9 例、慢性肺部疾病 10 例。

2.2 MP 6 h 快速培养法与 PCR 检测法比较 MP 6 h 快速培养法检出阳性率为 30.7%(43/140),PCR 检测法检出阳性率为 45.0%(63/140),PCR 检测法检出阳性率显著高于 MP 快速培养法($\chi^2=4.347, P=0.037$);两种方法一致性检验, kappa=0.554($t=6.868, P=0.000$),两种方法一致性不高,见表 1。

表 1 MP 快速培养法与 PCR 检测法比较(n)

PCR 检测法	MP 6 h 快速培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	38	25	63
阴性	5	72	77
合计	43	97	140

2.3 MP 6 h 快速培养法与 MP 特异性抗体检测比较 MP 快速培养法检出阳性率为 30.7%(43/140),MP 特异性抗体检出阳性率为 37.9%(53/140),两种方法阳性检出率比较差异无统计学意义($\chi^2=1.150, P=0.284$);两种方法一致性检验, kappa=0.338($t=4.050, P=0.000$),两种方法一致性亦不高,见表 2。

表 2 MP 快速培养法与特异性抗体检测比较(n)

MP 特异性抗体	MP 6 h 快速培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	27	26	53
阴性	16	71	87
合计	43	97	140

3 讨 论

MP 感染常无特异性,好发于儿童和青少年。通常情况下

MP 感染经过门诊治疗后即可痊愈,然而对于老年或儿童,严重 MP 感染常表现出严重心内膜炎或肾炎^[7-8]。因此,准确诊断 MP 感染对临床治疗具有重要指导意义。目前临床对于 MP 感染诊断方法包括血清特异性抗体检测、PCR 检测、MP 快速分离培养、冷凝集试验等;其中最常用的方法是血清抗体检测。一般 MP 感染后常于 1 周出现相应临床症状,此时 IgM 被检出,至 20 d 左右达高峰,25 周后消失。然而 IgG 常出现较晚,且持续时间长,即使临床检测 IgG 抗体阳性也并非代表出现 MP 现症感染,因此只限于回顾性分析或流行病学调查,对临床治疗价值较小。Li^[9]报道证实 MP-IgM 在发病 10 d 左右阳性检出率最高,对 MP 早期诊断较为困难。另外,部分免疫系统缺陷的人群难以产生正常免疫应答,即使发生 MP 感染也难以产生抗体,导致临床 MP 检出率偏低^[10-11]。

随着分子生物学技术的快速发展,许多病原体核酸的检测方法得以建立,其中多聚酶链式反应(PCR)应用最为广泛。PCR 通过体外 DNA 扩增技术将微量 DNA 样品迅速扩增百万倍,从而进行序列测定。利用 PCR 技术可以检测 MP 的 16sRNA、P1 蛋白等,其具有较高的敏感度和特异性,检测时间快,还能有效避免交叉反应,被认为是 MP 感染诊断的发展趋势。目前 PCR 主要用于衣原体、支原体等生长缓慢或培养困难的病原体鉴定。国外一项报道对血清学、PCR 诊断 MP 感染进行比较^[12],结果显示 PCR 最高灵敏、可靠。然而 PCR 需要专业的仪器、操作繁琐,在现阶段难以在基层医院推广,这也是其应用受到限制的客观原因。

MP 快速培养检测技术是通过人工液体作为培养介质,主要由 MP 生长、繁殖所必需的营养物质和抑制其他细菌生长的抗菌药物组成,因此对 MP 的特异性较强。MP 快速培养的工作原理是当 MP 在培养基内生长后,培养基内 pH 值会降低,导致培养基颜色由红色变为黄色。目前临床上大量报道均证实 MP 快速培养对 MP 诊断的价值。周燕^[13]报道称快速培养法与血清特异性抗体检测的一致性较高,这与本研究结论不符。本研究中 MP 快速培养法检出阳性率为 30.7%,显著低于 PCR 检测法(45.0%),与 MP 特异性抗体检出阳性率(37.9%)相比差异无统计学意义。其中 MP 快速培养法与 PCR 检测法、MP 特异性抗体法检测一致性都偏低,说明 MP 快速培养法作为诊断 MP 感染指标仍值得商榷。邱素清^[14]报道称快速培养中可能存在真菌生长,导致培养基 pH 值降低,颜色也随之变化,进而出现假阳性结果。此外,本组中选择的人群包括成人、儿童和老年,在不同年龄组中培养基 pH 值、抗菌药物用量是否存在差异依然不明确。这最少提示不同年龄组用 MP 快速检测法检测结果可能会出现偏倚。Ratliff^[15]亦证实儿童 MP 感染者中约有 30%培养基存在真菌污染的可能性。另外,支气管炎、呼吸道感染患者中同时伴有肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、链球菌等细菌感染,上述细菌在培养基中生长也会导致假阳性的可能。因此,在 MP 快速培养基鉴定时,培养基的制备方法、抗菌药物用量等还需要进一步改进。

综上所述,MP 快速检测法用时短、操作简单,但是依然存在假阳性的可能,将其作为 MP 诊断指标可能存在一定误差。MP 快速鉴定培养基需要对抗真菌及其他细菌感染方面进行技术改进,以避免对结果造成的影响。

参考文献

[1] 曲久鑫,谷丽,吴疆,等.北京地区成年人社区获(下转第 894 页)

激时,会迅速大量生成的一种非特异炎性反应标志物。CRP 的生成与机体损伤、体内炎症反应有着密切的关系。本研究发 现 CRP 在手术后第 1 天即开始迅速升高(手术前 10 倍以上), 手术后第 3 天即达到高峰,术后 1 个月即恢复正常,与国内外 的研究结果一致^[7]。本研究中,患者术后未发现显著的细菌感 染等症状,CRP 的大量生成可能与手术过程中造成的组织破 坏有关。同时试验后并发静脉阻塞的患者 CRP 水平显著高于 同一时间,提示在手术后 5 d,CRP 仍维持高水平的患者可能 需要做进一步深入检查,确认患者有无发生深静脉血栓阻塞。

ESR 是指全血置于抗凝管静止以后,红细胞单位时间内的 沉降速度,其沉降速度主要与红细胞所处的血清环境相关, 主要与血浆蛋白相关。ESR 是一种简单且廉价的实验室检查 手段,主要用于间接评价患者机体状态。有研究表明,ESR 在 急性细菌性炎症反应、组织坏死或损伤等情况下,ESR 水平会 上升。由于 ESR 受较多因素干扰,其测量价值主要与 CRP 联 合,评价机体炎症反应状态^[8]。本研究中,手术后 ESR 水平缓 慢升高,直至 7 d 达到峰值后缓慢下降,术后 3 个月可恢复至 正常。而出术术后下肢深静脉血栓阻塞的患者 ESR 水平始终 维持在一个较高的水平,因此综合考察 CRP 和 ESR 对于预测 患者术后并发症有着重要的意义。

SAA 是阻止淀粉样蛋白 A 的前体,在恶性肿瘤、感染、移 植排斥中可以检测到。近年来,SAA 被用于检测急性期反 应^[9-10]。在本研究中,SAA 在术后第 1 天急剧升高,第 3 天到 达峰值,之后缓慢消退,直至术后 3 个月恢复至术前水平。与 CRP 结果相比,SAA 的变化速度更快,到达峰值的时间也更 短,可能是一个髋关节置换手术中比 CRP 更为敏感的指标。 在术后并发下肢深静脉血栓阻塞的患者中,SAA 水平显著高 于正常恢复的患者,且在术后维持在一个较高的水平,这可能 使得 SAA 可以作为髋关节置换术后并发症的预测指标。

综上所述,髋关节置换术术后并发症后果严重,通过动态 监测患者 CRP、ESR 和 SAA 水平可以有效评价患者的术后并 发症风险。更为细致的术后风险评估,则需要进一步的深入 评价。

参考文献

[1] 古婉仪,陈柳娟,曾采采.全髋关节置换术后并发症的预防与护理 [J].全科护理,2010,8(17):1815-1816.

[2] 张东亮,刘军,田峥巍.髋关节置换术并发症原因分析及其防治分 析[J].当代医学,2012,18(1):45.

[3] 黄娇鸿,盛振华.人工髋关节置换术后下肢深静脉血栓形成的因 素及护理措施[J].中医正骨,2012,24(1):73-74.

[4] 黄瑞良,林伟文,阮艺,等.红细胞沉降率、C 反应蛋白及血清淀粉 样蛋白在不同类型人工髋关节置换术前后的变化及临床意义研 究[J].华西医学,2014,30(12):1234-1237.

[5] 陈展宇,梁晓春,万智慧.人工髋关节置换术前后 CRP 与 ESR 水 平变化研究[J].中国医疗前沿,2010,5(1):11-12.

[6] 张志勇,孙晓威,解光越,等.CRP、ESR 水平在人工关节置换术前 后变化的回顾性研究[J].中国实验诊断学,2012,16(6):698-699.

[7] 陈家富,孔荣.CRP ESR 和 WBC 计数在髋关节置换手术前后的 变化及临床意义[J].安徽医学,2012,33(2):162-164.

[8] 冯兵,苏呈玺,胡红霞.外周血中性粒细胞 CD64 在非感染成人髋 关节置换术后的表达及分析[J].医学信息,2014,30(6):670-673.

[9] 张玲.髋关节置换术后深静脉血栓的预防及护理[J].中国保健营 养,2014,24(1):34-36.

[10] 盛秀芝,蔡溢,周杰.血清淀粉样蛋白 A 在肾移植术后排斥反应 诊断中的价值[J].中国实验诊断学,2010,14(2):242-243.

(收稿日期:2015-11-10)

(上接第 891 页)

得性肺炎中肺炎支原体急性感染的调查[J].中华流行病学杂志, 2012,33(5):545-546.

[2] 陈正荣,季伟,王宇清,等.肺炎支原体致支气管肺炎和大叶性肺 炎患儿的临床及实验室检查特征分析[J].临床儿科杂志,2012, 30(8):744-748.

[3] 方爱姿,钟亮尹,曾淑珍,等.肺炎支原体抗体检测结果及流行病 学分析[J].实用医学杂志,2012,28(15):2611-2613.

[4] 张健,李莉,王文龙,等.肺炎支原体抗体分型检测和被动颗粒凝 集检测结果比较[J].中华检验医学杂志,2012,35(7):639-642.

[5] Castro AR,Mody HC,Parab SY,et al. An immunofiltration device for the simultaneous detection of non-treponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. [J]. Sex Transm Infect,2010, 86(7):532-536.

[6] 徐明忠,晏群,邹明祥,等.肺炎支原体快速培养法在小儿支原体 肺炎诊断中的应用[J].湖南师范大学学报:医学版,2013,28(1): 33-35.

[7] 刘艳,刘丹,黄泽智,等.湖南地区 4 276 例急性呼吸道感染患儿肺 炎支原体感染状况及药敏分析[J].临床儿科杂志,2015,30(2): 195-196.

[8] 姜越,刘禧杰,秦选光,等.2011 年北京地区儿童肺炎支原体耐药 情况及其耐药机制研究[J].中国全科医学,2013,16(32):3778- 3782.

[9] Li X,Chen H,You L,et al. Evaluation of the commercial rapid

Mycoplasma pneumoniae medium method using the medium PCR and serum antibody test. [J]. Clin Lab,2011,57(3):351-355.

[10] 李德志,王云龙,李玉林,等.胶体金免疫层析捕获法检测人血清 中肺炎支原体 IgM 抗体[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版, 2014,4(1):29-32.

[11] 李雪辉,陈杭薇,魏娟,等.冬季成人急性呼吸道疾病住院患者肺 炎支原体抗体检测及分析[J].临床肺科杂志,2012,17(8):1359- 1361.

[12] Komatsu H, Tsunoda T, Inui A, et al. Successful use of saliva without DNA extraction for detection of macrolide-resistant My- coplasma pneumoniae DNA in children using LNA probe-based real-time PCR[J]. Journal of infection and chemotherapy:official journal of the Japan Society of Chemotherapy,2013,19(6):1087- 1092.

[13] 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(1):94-96.

[14] 邱素清,覃珊珊,向华国,等.儿童肺炎支原体咽拭子快速液体培 养结果分析[J].中国微生态学杂志,2012,24(6):552-553.

[15] Ratliff AE, Duffy LB, Waites KB, et al. Comparison of the illumi- gene mycoplasma DNA amplification assay and culture for detec- tion of Mycoplasma pneumoniae[J]. Journal of Clinical Microbiol- ogy,2014,52(8):1060-1063.

(收稿日期:2015-11-15)