

分离培养和血清学试验诊断肺炎支原体早期感染的应用及评价^{*}

潘庆军¹, 朱学芝² (1. 广东医学院附属医院, 广东湛江 524023; 2. 广东粤海饲料集团有限公司, 广东湛江 524017)

【摘要】 目的 应用并评价肺炎支原体(MP)快速培养法、被动凝集法检测总抗体和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测免疫球蛋白 M(IgM)抗体在 MP 感染早期诊断中的价值。**方法** 应用 MP 快速培养法对该院 2009 年 10 月至 2010 年 4 月 260 例急性下呼吸道感染住院患者的咽拭子标本进行培养, 同时用被动凝集法检测患者血清中 MP 的总抗体和 ELISA 检测 MP 的 IgM 抗体。**结果** 260 例急性下呼吸道感染患者咽拭子 MP 快速鉴定培养法培养阳性 58 例, 阳性率 22.3%。被动凝集法检测总抗体阳性 83 例, 阳性率 31.9%。ELISA 检测 IgM 抗体阳性 67 例, 阳性率 25.8%。**结论** MP IgM 抗体检测试剂因其方便、快捷, 可作为优先检测试验。

【关键词】 肺炎支原体; 培养法; 被动凝集法; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.22.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)22-2956-02

Application and evaluation of isolating culture and serological test in the early diagnosis of mycoplasma pneumoniae infection PAN Qing-jun¹, ZHU Xue-zhi² (1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 2. Guangdong Feed Group Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong 524017, China)

【Abstract】 Objective To apply and evaluate the mycoplasma pneumoniae(MP) rapid culture method and the value of passive agglutination detecting total antibody and IgM antibody test in the early diagnosis of MP infection. **Methods** MP rapid culture reagent was used in the culture of pharyngeal swab specimens in 260 patients that had acute lower respiratory tract infections from Oct. 2009 to April, 2010 in our hospital. The total antibodies of MP were detected by passive agglutination and IgM antibody was detected by ELISA. **Results** 58 of 260 cases accepted MP rapid culture method were positive, and the positive rate was 22.3%. There were 83 cases with positive result of passive agglutination method, and the positive rate was 31.9%. There were 67 cases with positive result of IgM antibody, and the positive rate was 25.8%. **Conclusion** The MP IgM antibody test is convenient and fast, and can be used as a priority testing.

【Key words】 mycoplasma pneumoniae; cultivation; passive agglutination; ELISA

肺炎支原体(MP)可引起间质性肺炎和急性支气管炎, 其发病率占肺炎发病率的 15%~20%, 占非细菌性肺炎的 30% 以上^[1-2]。MP 对罗红霉素和环丙沙星等敏感, 但对治疗肺炎的常规药物耐受, 为避免滥用抗菌药物, 准确快速的早期诊断在临床上尤为重要。MP 的诊断方法主要依靠分离培养和血清学试验。标本可采集可疑患者的痰或咽拭子, 接种于含血清或酵母浸膏的液体培养基或含琼脂的固体培养基。液体培养基通常在接种 1~2 d 后观察培养基是否变色(MP 生长代谢产生酸, 根据不同的酸碱指示剂变色不同)判断 MP 的生长与否。固体培养基通常需要 3~7 d 后观察有无直径 30~100 μm 的典型“荷包蛋”样菌落。血清学试验主要通过 MP 特异性抗原检测患者血清中的特异抗体, 在感染早期通常产生免疫球蛋白 M(IgM)抗体, 随着机体对 MP 的免疫反应逐渐产生免疫球蛋白 G(IgG)抗体。临床上常用检测 IgM 特异抗体和总抗体来判断 MP 感染。本文应用 MP 快速鉴定培养法对急性下呼吸道感染住院患者的咽拭子标本进行 MP 培养, 同时用被动凝集

法检测患者血清中 MP 的总抗体和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 MP 的 IgM 抗体, 现对 3 种方法的分析评价报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选择 2009 年 10 月至 2010 年 4 月在本院就诊的 260 例门诊患者。患者均有下呼吸道感染的明显症状, 高热、咳嗽咳痰, 有的伴有喘息。

1.2 试剂 被动凝集法采用日本富士瑞必欧株式会社生产的赛乐迪亚-麦克 II 试剂盒, MP 快速培养试剂和 MP IgM 抗体检测试剂盒(ELISA)购自广州博特生物科技有限公司。

1.3 标本采集和测定方法 MP 快速培养法: 用棉拭子吸附生理盐水, 在喉深部(最好是扁桃体发炎部)捻转数次, MP 对细胞表面有很强的亲和力, 尽可能收集到更多的标本。取 1 支分装的冻干培养基, 加 1.5 mL 超纯水复溶, 完全溶解后, 把被检测的棉拭子置于瓶内, 并要搅动棉拭子数次, 剔出瓶外部分, 盖上瓶盖置 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养 24 h 等待结果。

采集静脉血标本, 空腹抽取静脉血 3 mL, 于 2 000 r/min

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202346); 广东省自然科学基金资助项目(S2012040006216); 广东省卫生厅基金资助项目(B2012284); 湛江市科技攻关项目(2012C3101028)。

离心 6 min,取血清检测。被动凝集法:严格按说明书进行操作,吸取血清后按要求加入血清稀释液和明胶颗粒,室温静置 3 h,设阴阳对照,滴度大于 1∶80 为阳性。MP IgM 抗体检测采用 MP IgM 抗体检测试剂盒,严格按说明书进行操作。

以上 3 种检测方法均严格按试剂盒要求执行。所有检测试剂均在有效期内使用。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种检测方法的阴阳性结果 被动凝集法检测 MP 总抗体阳性率最高(31.9%),高于 MP 快速培养试剂和 MPIgM 抗体检测试剂的阳性率,而后两者阳性率相差不大(分别为 22.3%和 25.8%),见表 1。

表 1 3 种检测方法的检测结果[n(%)]

方法	阳性	阴性
MP 快速培养试剂	58(22.3)	212(77.3)
MP IgM 抗体检测试剂	67(25.8)	193(74.2)
被动凝集法检测 MP 总抗体	83(31.9)	177(68.1)

2.2 3 种方法检测结果的符合例数 被动凝集法检测 MP 总抗体与其他 2 种检测试剂的阳性不符合例数最多(30 例),其次为 MP IgM 抗体检测试剂(14 例);MP 快速培养试剂与其他 2 种检测试剂的不符合例数最多(44 例),其次为 MP IgM 抗体检测试剂。见表 2。

表 2 3 种检测方法的阴阳性符合和不符合(n)

方法	阳性符合	阳性不符合	阴性符合	阴性不符合
MP 快速培养试剂	53	5	168	44
MP IgM 抗体检测试剂	53	14	168	25
被动凝集法检测 MP 总抗体	53	30	168	9

2.3 3 种检测方法的灵敏度和特异性 MP 快速培养试剂和 IgM 抗体检测试剂的灵敏度和特异性差异无统计学意义($P>0.05$),两者特异性均显著高于被动凝集检测总抗体法($P<0.05$),但两者灵敏度则显著低于被动凝集检测总抗体法($P<0.05$)。见表 3。

表 3 3 种检测方法的灵敏度和特异性[%(n/n)]

方法	灵敏度	特异性
MP 快速培养试剂	54.6(53/97)	97.1(168/173)
MP IgM 抗体检测试剂	67.9(53/78)	92.3(168/182)
被动凝集法检测 MP 总抗体	85.5(53/62)	84.8(168/198)

3 讨 论

分离培养是确诊支原体感染的可靠方法,传统培养方法通常需要长时间培养,患者和临床不易接受。目前,商品化改良型 MP 快速培养法,利用培养基中快速生长因子而进行的增殖分解糖类,在 24 h 内产生氢离子使培养基中的 pH 下降,可以观察培养基中酚红等指示剂,由最初的红色转变为黄色来判断 MP 的生长,而标本中其他的支原体和细菌则被培养基中的青

霉素和醋酸铊所抑制。这不仅提高了该方法的特异性,且对 MP 的早期感染诊断有着重要的诊断价值。MP 快速培养法是一种简便、快速的检测方法,便于推广,特别是在基层医疗机构。分子生物学,如实时荧光 PCR 方法检测最为快速,但其过于敏感,容易受污染,另外设备昂贵,特别是基层医疗单位不易普及^[3]。免疫学检测 MP 感染后的特异性抗体,特别是 IgM 抗体广受临床欢迎,MP 感染后发病早期患者血清中产生的抗体主要是 IgM 抗体,感染后约 10~30 d 达高峰,12~26 周可消失^[4]。因此用免疫学方法,如 ELISA 实际检测 MP 特异性 IgM 抗体可用于 MP 感染的早期检测。ELISA 间接法用于检测患者急性期和恢复期血清中特异性 IgM、IgG 抗体,即其敏感度与标本采集期有关,感染初期阳性率 39%,疾病后期可达 76%,溶血、混浊和脂血标本会干扰该试验^[5-7]。当怀疑感染时,即使试验为阴性也要隔一段时间进行重新检测。被动凝集法采用 MP 细胞膜主要抗原成分致敏人工明胶粒子制造而成,致敏粒子与血清中存在的 MP 的全部抗体(包括 IgM、IgG 和 IgA 等)发生凝集反应,其检测抗体滴度广,该法用明胶颗粒作载体,从而消除了许多非特异性反应^[8]。需要注意的是,发病的早期极低含量的抗体不能被检测出是可能的。当怀疑感染时,即使试验为阴性也要隔一段时间进行重新检测^[9]。而且阳性结果并不能判断 MP 感染,需多次检测,根据其滴度变化进行判断。

MP 快速培养试剂和 IgM 抗体检测试剂可判定 MP 近期感染,而被动凝集检测总抗体法阳性则需要排除非 IgM 抗体,才可判定 MP 感染。同时,MP 的 IgM 抗体检测试剂需要检测时间短(1.5 h),而 MP 快速培养试剂则需要 24 h 判断结果,在两者灵敏度和特异性无显著区别的前提下,MP IgM 抗体检测试剂因其方便、快捷,可作为优先检测试验。同时,需要注意的是,在判断 MP 感染时,培养法因受标本采集,试剂质量等因素影响,容易导致漏检。被动凝集法因检测的是总抗体,在判断 MP 感染时易出现假阳性。ELISA 检测 MP 的 IgM 抗体,易受 MP 抗原的特异性影响,也可能影响 MP 感染的判断^[7,10]。不管哪种检测方法,均应结合患者临床症状加以分析和诊断。临床上选择具有国家食品药品监督管理局认证资质,并获行业高度认可的体外诊断试剂产品,才可保证监测结果的准确可靠。

参考文献

[1] Atkinson TP,Balish MF,Waites KB. Epidemiology,clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections[J]. FEMS Microbiol Rev,2008,32(6):956-973.

[2] Waites KB,Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004,17(4):697-728.

[3] 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.

[4] 张美玲,端青. 商品化酶免疫检测试剂盒在支原体肺炎血清学诊断的应用[J]. 微生物学免疫学(下转第 2959 页)

表 2 G6PD 基因突变检测结果表[n(%)]

突变类型	c. 1388G>A	c. 1376G>T	c. 95A>G	c. 1024C>T	c. 871G>A	c. 1004C>T	c. 392G>T	c. 442G>A
男	2(1.0)	1(0.5)	—	—	1(0.5)	—	—	—
女	6(3.0)	4(2.0)*	2(1.0)*	1(0.5)	—	1(0.5)	—	1(0.5)**

注：* 各有 1 例为 G6PD 酶活性检测正常；** 为 G6PD 酶活性重度缺乏个体，基因型为 c. 1376G>T/c. 442G>A 双重杂合；—表示无数据。

3 讨 论

G6PD 缺乏症是 X 连锁不完全显性遗传病,G6PD 基因定位于 X 染色体上,男性为半合子,基因突变携带者即为患者,表现为 G6PD 酶重度缺乏,通过酶活性检测可很容易查出。本研究 200 例男性人群的检测结果显示,4 例重度缺乏个体经基因检测予以证实;其他个体均为酶活性正常,可排除 G6PD 基因突变而无须进行基因检测。由此进一步说明,针对男性人群,将表型筛查 G6PD 酶活性缺乏个体进行基因检测确诊的流程切实可行。

G6PD 基因突变携带者女性多为杂合子,存在明显的临床表现异质性,多表现为中度缺乏,但少数表现为酶活性正常,因此目前常用的基于 G6PD 酶活性检测的表型筛查方法有一定的漏检率。有报道指出,用于检测 G6PD 缺陷的各种检验方法的杂合子检出率小于 70%,即使是目前国内较先进的 G6PD/6PGD 比值法,也只能检出 76.9%^[5]。本研究的 200 例女性人群的检测结果显示,有 2 例为 G6PD 酶活性正常但为 G6PD 基因突变携带者;14 例 G6PD 酶中度缺乏的个体中,11 例经基因检测予以证实,其余 3 例,可能为其他罕见 G6PD 基因突变、基因表达调控或其他疾病因素等所导致,具体原因还有待以后的研究进一步探索。此结果说明,针对女性人群,基于 G6PD 酶活性的表型筛查有明显的漏检率,基因检测可大大提高诊断准确性与可靠性。

本研究的结果初步显示本地区 G6PD 基因突变类型以 c. 1388G>A、c. 1376G>T 和 c. 95A>G 三种类型为主,与相关报道相符。总的来看,本地区 G6PD 基因突变人群携带率为 4.5%,低于广东省 G6PD 缺乏症发生率 5%~6%^[6];且检出了其他少见突变类型,可能是由于深圳是一个移民城市,居民来自全国不同地方,降低了人群携带率,但也导致基因突变谱相对复杂。

总之,虽然本研究的标本量不大,尚不能完全说明本地区

G6PD 缺乏症的具体情况,但研究结果足以提示本地区 G6PD 基因突变谱的复杂性,也充分说明基因检测在 G6PD 缺乏症诊断中的重要性与必要性。研发简单实用、结果准确可靠的基因检测方法,结合当前常规使用的表型筛查方法,准确诊断 G6PD 缺乏症,以期实现预防患者发病、有效防止和处理新生儿黄疸的目的。

参考文献

[1] Luzzatto L. G6PD deficiency and malaria selection[J]. Heredity(Edinb),2012,108(4):456.
[2] 姚英姿,方小武,杨孜,等. 应用荧光斑点法和 G6PD/6PGD 比值法检测新生儿 G6PD[J]. 中国优生与遗传杂志,2010,18(8):78-79.
[3] Liang Li, Yu-Qiu Zhou, Qi-Zhi Xiao, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism[J]. BCMD,2008,41(1):17-21.
[4] Yan T,Cai R,Mo O,et al. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China;description of four novel mutations[J]. Haematologica,2006,91(10):1321-1328.
[5] 景尉,王方,罗旋,等. 广州东山区地中海贫血和 G6PD 缺乏症的调查[J]. 现代临床医学生物工程学杂志,2004,10(5):421-422.
[6] 杜传书. 我国葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症研究 40 年的回顾和展望[J]. 中华血液学杂志,2000,4(21):4.

(收稿日期:2013-06-06 修回日期:2013-07-12)

(上接第 2957 页)

进展,2006,34(1):7880.
[5] 杨平岭,李金叶. 1058 例患儿肺炎支原体 IgM 抗体检测结果分析[J]. 山东医药,2005,45(35):60.
[6] 叶新明. 儿童肺炎支原体培养与肺炎支原体抗体检测的比较[J]. 实用临床医学,2008,9(9):82-84.
[7] 庞保军. 肺炎支原体实验室检测方法进展及其临床应用[J]. 临床肺科杂志,2004,5(9):515.
[8] Barker CE,Sillis M,Wreghitt TG. Evaluation of Serodia Myco II particle agglutination test for detecting mycoplas-

ma pneumoniae antibody: comparison with mu-capture ELISA and indirect immunofluorescence [J]. J Clin Pathol,1990,43(2):163-165.
[9] 金爱琴,吴尤佳,孙宝兰,等. 肺炎支原体快速培养法与被动凝集法的应用价值[J]. 江苏医药,2010,36(23):2739-2741.
[10] 袁壮,董宗祈,鲁继荣,等. 肺炎支原体肺炎诊断治疗中的几个问题[J]. 中国实用儿科杂志,2002,17(8):449-457.

(收稿日期:2013-04-27 修回日期:2013-05-28)