

- 导管引流干预时 NF- κ B、IL-6、TNF- α 的表达意义[J]. 河北医科大学学报, 2010, 31(8): 905-908.
- [7] Won JH, Shin JS, Park HJ, et al. Anti-inflammatory effects of madecassic acid via the suppression of NF-kappa B pathway in LPS-induced RAW 264. 7 macrophage cells[J]. Planta Med, 2010, 76(3): 251-257.
- [8] 李建萍, 叶文琴, 田梅梅, 等. 重症急性胰腺炎患者监护期间实施临床路径的效果[J]. 解放军护理杂志, 2012, 29(4): 17-19.
- [9] 黄崇文, 于迎春, 张颖, 等. 乌司他丁治疗急性胰腺炎临床小结[J]. 临床外科杂志, 2010, 19(21): 33-34.
- [10] 肖钟林. 中西医结合治疗重症胰腺炎疗效及安全性的临床观察[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 715-716.
- [11] 李春雷, 邹盛海, 李忠志. 中西医结合治疗急性胰腺炎的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21(5): 393-394.
- (收稿日期: 2017-03-13 修回日期: 2017-05-28)

• 临床探讨 •

人肺炎支原体抗原循环增强荧光免疫方法的建立*

肖春海, 梁 爽, 瞿培培, 刘静凡, 董志武[△]

(上海市第六人民医院金山分院检验科 201500)

摘 要:目的 采用循环增强免疫荧光技术(CEIFA), 建立人肺炎支原体抗原(Mp)的检测方法, 并对其性能进行初步探讨。方法 采用 CEIFA 检测 Mp 肺炎抗原, 对 Mp 标准物质及 54 份临床标本用培养法进行测定, 采用 CEIFA 检测 Mp 的灵敏度及该方法与培养法检测的符合率。结果 生物素标记 Mp 兔多抗与亲和素偶联花青染料 5 的工作浓度分别为 5、8 μ g/mL 时, 阳性对照与阴性对照吸光度(P/N)比值最大。检测 Mp 抗原灵敏度为 2 μ g/mL。54 份临床标本培养法检测阳性率为 29.6%(16/54), CEIFA 法的阳性率为 35.2%(19/54), 二者符合率为 75.9%, 差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 建立的 CEIFA 法检测 Mp 抗原具有灵敏度高、特异性强等优点。

关键词:肺炎支原体; 肺炎支原体的快速培养; 抗原

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.19.035 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)19-2911-02

肺炎支原体(Mp)是引起支原体肺炎的主要病原体^[1]。目前临床上对 Mp 的实验室检查主要是 Mp 的抗体检测、核酸检测和抗原检测。其中后两种为 Mp 感染的直接证据, 但核酸检测需要在聚合酶链反应(PCR)实验室中进行, 且 Mp 生长缓慢, 培养法最长可能要几周才能确定 Mp 是否生长^[2]。抗原直接检测目前大多是用微孔板的酶联免疫吸附法(ELISA)进行检测, 适用于批量标本的检测, 不适用于单个标本的随到随检。本文用循环增强荧光免疫技术(CEIFA)检测 54 份临床咽拭子中的 Mp 抗原, 以快速培养法作为对照, 从而探讨循环增强荧光免疫法检测 Mp 在临床应用中的价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院儿科门诊患者咽拭子 54 例, 其中男 25 例, 女 29 例, 年龄 2~10 岁, 中位年龄 7.5 岁。对每例患者取 2 份咽拭子分别用于 Mp 的抗原检测(CEIFA 法)和 Mp 的快速培养。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 星童公司 Pylon Core 荧光免疫分析仪, 恒温培养箱。

1.2.2 试剂 Fitzgerald 公司的 Mp 兔多克隆抗体(5.0 mg/mL), Mp 鼠单克隆抗体(1.8 mg/mL), Mp 抗原(0.21 mg/mL)。苏州星童公司的 Fluorescein-NHS 荧光标记物(10.0 mg/mL), 生物素(Biotin-NHS)溶液(5 mg/mL), 亲和素偶联花青染料 5 (Cy5-SA)(10.0 mg/mL)。珠海迪尔生物工程有限公司的 Mp 快速培养试剂盒。

1.3 原理 利用生物素化的捕捉抗体对待测抗原的特异性,

以及对链霉亲和素荧光偶联物质的特异性, 通过循环反应, 实现荧光信号循环放大, 从而测定样品中 Mp 水平^[3]。

1.4 方法

1.4.1 克隆捕捉抗体的固化 (1)将 1.1 mL 的 Mp 鼠单克隆抗体溶解到 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中, 装入透析袋透析 12.0 h, 然后将透析后的溶液取出, 室温下平衡 0.5 h, 制成抗体溶液。(2)将 4.5 μ L 的 Fluorescein-NHS 荧光标记物加入到 1 mL 的单克隆抗体溶液中, 室温下反应 1.0 h。(3)将反应后的溶液用 PD-10 脱盐纯化柱(G25), 得到荧光素化的捕捉抗体溶液。(4)将镀有 3-氨基丙基硅烷, 直径为 1 mm 的石英针, 在疏水作用下与荧光素化的捕捉抗体结合, 形成固化的单克隆捕捉抗体^[3]。

1.4.2 生物素化标记抗体的制备 (1)将 0.8 mL Mp 兔多克隆抗体溶解到 1 mL PBS 溶液中, 装入透析袋透析 12.0 h, 然后将透析后的溶液取出, 室温下平衡 0.5 h。(2)将 10 μ L 生物素溶液加入到 2 mL 的多克隆抗体溶液中, 室温下反应 1.0 h。(3)将反应后的溶液用 G25, 获得生物素标记的多克隆标记抗体溶液。

1.4.3 生物素标记 Mp 兔多抗(Biotin-Pab)及亲和素 Cy5-SA 工作浓度确定 以 Mp 抗原 0.2、5 μ g/mL 为标本, 对 Biotin-Pab 和 Cy5-SA 的使用浓度进行交叉测试, 确定 Biotin-Pab 和 Cy5-SA 的工作浓度。

1.4.4 灵敏度试验 先将 2.1 mg/mL 的 Mp 标准物质用生理盐水稀释成 64 μ g/mL, 然后对其进行对倍稀释, 制成 64、32、16、8、4、2 μ g/mL 物质, 其中以生理盐水作为阴性对照样

* 基金项目: 上海市金山区科学技术创新资金资助项目(2014-3-09)。

[△] 通信作者, E-mail: dongzw312@163.com。

品,每个样品测定 2 次,计算各浓度标准物质的发光值和阴性对照的发光值的比值(P/N)>2 作为此方法的灵敏度。

1.4.5 特异度比对试验 (1) CEIFA 法检测 Mp 抗原:咽拭子用 1 mL 生理盐水进行洗涤,取 200 μ L 洗涤液加等量 Triton-114 裂解液体,混匀作为待测标本,具体操作参照文献[3]。(2)Mp 快速培养:具体操作按照试剂说明书进行。

2 结 果

2.1 Biotin-Pab 及 Cy5-SA 的工作浓度配比 Biotin-Pab 和 Cy5-SA 浓度为 5、8 μ g/mL 时,抗原为 2、10 μ g/mL 的 P/N 值最大且>2.1,故选择此时的 Biotin-Pab 与 Cy5-SA 的配比为较理想的工作浓度。见表 1。

表 1 Biotin-Pab 及 Cy5-SA 的工作浓度配比

Biotin-Pab+Cy5-SA 浓度配比(μ g/mL)	各抗原浓度下发光值			P/N	
	0	2	10	2/0	10/0
3+5	58	70	251	1.21	4.33
3+8	86	161	570	1.87	6.63
3+10	118	203	610	1.72	5.17
5+5	62	120	367	1.94	5.92
5+8	106	225	799	2.12	7.54
5+10	138	259	810	1.88	5.87

2.2 CEIFA 法检测 Mp 的灵敏度试验 当 Mp 抗原浓度分别为 1、2、4 μ g/mL 时的 P/N 值分别为 1.27、2.28、3.66。故选浓度 2 μ g/mL 作为 CEIFA 法检测 Mp 的灵敏度。

2.3 CEIFA 法检测 Mp 抗原与 Mp 培养法比较 对 54 例临床咽拭子标本进行检测,两种方法的符合率为 75.9%(41/54),检测结果比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

表 2 CEIFA 法检测 Mp 抗原与 Mp 培养法比较(n)

项目	CEIFA 法		
	阳性	阴性	总计
阳性	11	5	16
阴性	8	30	38
总计	19	35	54

3 讨 论

Mp 在治疗上与其他普通细菌感染引起的肺炎在治疗上不尽相同,Mp 感染仍以大环内酯类为一线药物,Mp 抗体通常感染 1 周后才能明显升高,作为诊断依据^[4-5]。Mp 培养法主要是依靠 Mp 在培养基中的快速生长,分解糖类,产生氢离子后促使培养基的 pH 值逐渐降低,通过观察培养基颜色的变化作为 Mp 生长的判断标准^[6]。但培养法通常需要 24~48 h,才能进行判定其有无生长。这导致临床上 Mp 的培养结果常晚于病情的变化,无法满足临床快速诊断的需求。因此,在临床工作中,Mp 的诊断在实验室依据大多为 C 反应蛋白、降钙素原和支原体抗体等指标间的联合应用^[7-9]。Mp 的核酸检测有实时荧光 PCR、多重 PCR 及等温扩增等技术^[10]。Mp 核酸检测也渐渐增多,但根据目前我国核酸扩增实验室对人员、设备和场地的要求,依然决定了核酸检测无法普及,特别是在门急诊实验室。根据以上介绍,Mp 诊断的直接证据,如 Mp 培养和 Mp 核酸使用是有一定的局限性,前者是报告周期长,后者是核酸实验室较难普及。而 Mp 抗原检测目前多为 ELISA 方法^[11-12],也有报道采用量子点免疫层析法检测 Mp 抗原^[13],但都不适合门诊患者随到随测的实际需求。

本研究中建立的 CEIFA 法检测 Mp 抗原,在标本前处理上与普通的 ELISA 方法相同,都需要对标本进行裂解,使得待抗原混匀充分暴露,这样可以更有利于该抗原的检出。方法中液相试剂 Biotin-Pab 和 Cy5-SA 的工作浓度分别为 5、8 μ g/mL,此时的 P/N 值最大且>2,也就意味着此时有较好的灵敏度。依据 P/N>2 的条件,建立的 CEIFA 法检测 Mp 抗原的灵敏度为 2 μ g/mL,与刘开运^[12]的 ELISA 检测 MP 抗原一致。本文对 54 例临床标本用 CEIFA 进行了 Mp 抗原的检测,并用 Mp 培养法做了平行测定。结果显示此两种方法的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$),符合率达 75.9%。本研究建立的方法为 Mp 的抗原检测提供了一种新的途径,CEIFA 能单个标本进样,并随到随做,能满足临床,特别是门诊快速准确检测 Mp 的需求,在实际临床工作中具有一定的应用价值。

参考文献

[1] 马春明. 儿童肺炎支原体肺炎的研究新进展[J]. 医学信息, 2017, 30(5): 26-28.

[2] 杨笑琼, 秦亚军, 詹剑峰. 肺炎支原体快速培养法在呼吸道感染诊断中的应用[J]. 中国医药科学, 2014, 4(15): 84-85.

[3] 肖春海, 梁爽, 刘静凡, 等. 单位点夹心抗体法结合循环增强荧光免疫技术检测 BNP 的评估[J]. 检验医学, 2015, 30(5): 495-499.

[4] Yamazaki T, Kenri T. Epidemiology of mycoplasma pneumoniae infections in Japan and therapeutic strategies for Macrolide-Resistant M. pneumoniae[J]. Front Microbiol, 2016, 7(5): 693.

[5] 谢辉, 李基明, 张慧芬, 等. 肺炎支原体抗体和载量指数在儿童肺炎支原体肺炎诊断中的应用[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(10): 984-987.

[6] 华成周. 呼吸道感染患儿肺炎支原体和沙眼衣原体检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(1): 87-88.

[7] 曾庆娣, 林爱翠. 肺炎支原体抗体 C-反应蛋白及血清降钙素原检测在儿童呼吸道医院感染诊断中的应用评价[J]. 河北医学, 2016, 22(4): 563-566.

[8] 董西华, 阿布都外力·吐尼牙孜, 杜毅鑫. PCT 和 CRP 联合检测在细菌性肺炎和支原体肺炎鉴别诊断中的价值[J]. 广东医学, 2014, 35(10): 1532-1534.

[9] 金瑄. 肺炎支原体抗体联合超敏 C 反应蛋白检测在小儿支原体肺炎感染诊断中的临床价值[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(8): 744-746.

[10] 严春霞, 闻人庆, 陆伟宏, 等. 可视化环介导等温扩增技术在肺炎支原体检测中的应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2): 85-89.

[11] 蔡翠云, 黄新喜, 吕葆真. 肺炎支原体 ELISA 检测试剂盒的临床应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(4): 46-49.

[12] 刘开运. 肺炎支原体感染实验室诊断方法研究进展[J]. 中国小儿急救医学, 2015, 22(1): 56-58.

[13] 胡纪文, 熊建辉, 陈卓诚, 等. 人肺炎支原体抗原量子点免疫层析法的建立[J]. 中国热带医学, 2015, 15(7): 795-798.