

三种方法检测儿童肺炎支原体的比较分析

巫素婷¹ 钟文清²

(1 广东省惠州市第六人民医院检验科, 惠州市 516211; E-mail: 470309896@qq.com;

2 广东医学院附属医院儿科, 湛江市 524023)

【摘要】 目的 探讨合理的早期诊断儿童肺炎支原体肺炎的方法。**方法** 对312例疑似肺炎支原体感染的患儿, 留取咽拭子和血清, 分别进行荧光定量PCR法、快速培养法和血清抗体法检验, 对比分析3种方法的阳性率。**结果** 荧光定量PCR法、快速培养法和血清抗体法的阳性率分别为25.00%、26.68%和16.67%, PCR法与快速培养法的阳性率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); PCR法、快速培养法阳性率较血清抗体法高($P < 0.05$)。**结论** PCR法与快速培养法均能有效的检测肺炎支原体, 快速培养法能满足临床需求而且成本较低, 较适合基层医院应用。

【关键词】 肺炎支原体; 荧光定量PCR法; 快速培养法; 血清抗体法

【中图分类号】 R 375.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0253-4304(2012)07-0933-02

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是一种介于细菌和病毒之间的微生物, 是儿童呼吸道感染的主要病原体之一, 严重影响儿童的气道功能^[1], 近年来MP的发病率不断升高。随着检测方法的敏感性和特异性的提高, MP的检出率也增高。目前国内外用于检测MP的方法有多种, 主要包括荧光定量PCR法、培养法和血清抗体法等, 各种方法的敏感性和特异性各异。笔者对312例疑似病例分别采用荧光定量PCR法、快速培养法和肺炎支原体IgM抗体法(MP-IgM)进行检测分析, 以寻找更快速、方便和经济的检测方法, 筛选出适合基层医院诊断MP的方法。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集2010年8月至2011年7月广东惠州市第六人民医院儿科住院、怀疑肺炎支原体感染而且发病以来没有用过相关药物的患儿312例, 其中男172例, 女140例, 年龄3个月至12岁。患者入院时漱口后用一次性咽拭子取2份标本分别用PCR进行检测和细菌培养, 同时抽取静脉血3ml, 分离血清后做MP-IgM抗体的检测。

1.2 方法

1.2.1 荧光定量PCR法: 选择中山大学达安基因股份有限公司生产的肺炎支原体核酸定量检测试剂盒(PCR荧光探针法)。PCR扩增仪选择罗氏公司生产的LightCycler基因扩增仪。取1份咽拭子标本参照说明书操作。咽拭子标本的MP-DNA总含量 $\geq 5.0 \times 10^6$ 基因拷贝为阳性结果, 所有结果以阳性或阴性的方式报告。

1.2.2 快速培养法: 培养基选择武汉菁华时间科技

有限公司生产的肺炎支原体快检试剂盒。取中1份咽拭子标本接种于液体培养基中, 将咽拭子置于瓶中搅拌数次, 去除瓶外部分。在37℃环境中培养6h, 液体由红色变为澄清的黄色为阳性($MP \geq 10^4$ CFU), 仍然是红色者判为阴性($MP \leq 10^4$ CFU)。

1.2.3 血清抗体法: 取患者3ml血液经过3000 r/min离心10min后分离出血清, 进行MP-IgM检测, 选用潍坊市康华生物技术有限公司生产的肺炎支原体IgM抗体检测试剂盒(胶体金法)。按说明书操作, 3min后出现两个斑点的为阳性, 只出现质控点的为阴性, 而未出现质控点的为试剂失效, 应重新测试。

1.3 统计学分析 应用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 分别计算3种方法检测MP的阳性率, 并进行配对计数资料的 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

312例患者中, PCR法、快速培养法、血清抗体法的阳性率分别为25.00% (78/312)、26.28% (82/312)、16.67% (52/312)。PCR法与快速培养法的阳性率比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.237, P = 0.626$)。PCR法、快速培养法阳性率较血清抗体法高($\chi^2 = 15.363, P = 0.000; \chi^2 = 22.132, P = 0.000$)。见表1~3。

表1 PCR法与快速培养法检测结果比较(n)

快速培养法	PCR法		合计
	+	-	
+	61	21	82
-	17	213	230
合计	78	234	312

表2 PCR法与血清抗体法检测结果比较(n)

血清抗体法	PCR法		合计
	+	-	
+	43	9	52
-	35	225	260
合计	78	234	312

表3 快速培养法与血清抗体法检测结果比较(n)

血清抗体法	快速培养法		合计
	+	-	
+	48	4	52
-	30	230	260
合计	78	234	312

3 讨论

肺炎支原体肺炎占儿童肺炎的10.00%~20.00%，本研究用PCR法、快速培养法、血清抗体法的阳性率分别为25.00%、26.28%、16.67%。总体来说，阳性率并不高，且这只是针对疑似病例的检测，不能对群体的发病情况进行评估。本研究所用的方法阳性率较低，可能是由于其对病毒敏感性较低。笔者经过调查发现本组病例中部分患儿是病毒感染，小部分是病毒合并肺炎支原体感染。快速培养法的阳性率最高，其次是荧光定量PCR法，阳性率最低的是血清抗体法。咽拭子检测存在假阴性的现象，其原因可能与临床医生在取咽拭子时标本中MP含量较低有关。当肺炎支原体感染1周后IgM才升高，3~4周才达到高峰期，之后又逐渐降低。入院时有部分患儿并不是在感染1~4周住院的，因此病程可能是导致血清抗体法的检出率低的主要原因。

实时荧光定量PCR法一直以其高度的敏感性和特异性，被认为是检测MP快速有效的方法^[2]。实时荧光定量PCR法的操作比较繁琐，在标本的处理过程中有可能互相污染，而且这种方法需要特殊的设备，这对于基层医院来说比较难实现。针对这种情况，最近有研究^[3]表明与PCR方法相比微流控平台检测MP的相符性为98.00%，在拥有相同敏感性的基础上，微流控平台比PCR快3倍的时间，更方便和经济。但由于各种原因这种方法还没有在临床广泛开展。

培养法被认为是检测MP的“金标准”，但普通MP培养法的敏感性较低，而且耗时，在临床中面临着被淘汰的危险^[4]。然而快速培养法却显示出其优越性。一般做培养时都是先将咽拭子在培养基中进行搅拌洗脱后丢弃咽拭子。笔者在操作时做了改进，就是在搅拌后把咽拭子带棉花的一端剪断与培养基一起培养，结果发现这种方法进行培养，其阳性率会更高，能提高检测的敏感性。而且这种方法能在6h

后观察结果，大大提高了检测的效率，使得大部分检测在当天就能完成。但MP的培养存在假阳性的问题，王楠等^[5]用快速培养结合显微镜排除法发现真菌和耐药菌是导致快速培养假阳性的主要原因。笔者在实验过程中也发现有培养基的颜色介于黄色和红色之间，从此培养基提取DNA做PCR发现MP为阴性。

本研究利用血清抗体法检测的是MP-IgM。有研究^[6]指出，MP感染的IgM检测的阳性率较IgG的低，如果同时检测IgG就能够提高阳性率。Liu等^[7]的研究表明ELISA法在检测MP时敏感性较高，在儿童诊断中有明显的优越性。对于基层医院来说，血清抗体法检测MP基本上都是检测IgM，较少同时检测IgG。这就说明临床医生明确患者病程很重要，发病1~4周的患儿检测IgM才有较大的意义。

综上所述，血清抗体法检测MP-IgM的阳性率较PCR法和快速培养法低，这要求临床医生把握好患儿的病程，适当选择这种方法。因PCR法对实验室的条件要求比较高，难以普及。快速培养法操作简便、价格低廉，对实验室条件要求不高，只需要一个培养箱和相关配套设备即可开展，为MP感染的早期诊断提供了一个有效的方法，能满足临床的需求，便于推广，对基层医院而言是一个比较好的选择。

参 考 文 献

- [1] Wu LX, Wu M, Gu DP. Pulmonary functions in children with segmental Mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi, 2011, 13(3): 185-187.
 - [2] Xu D, Li S, Chen Z, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae in different respiratory specimens [J]. Eur J Pediatr, 2011, 170(7): 851-858.
 - [3] Wulff-Burchfield E, Schell WA, Eckhardt AE, et al. Microfluidic platform versus conventional real-time polymerase chain reaction for the detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory specimens [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 67(1): 22-29.
 - [4] She RC, Thurber A, Hymas WC, et al. Limited utility of culture for Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae for diagnosis of respiratory tract infections [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9): 3380-3382.
 - [5] 王楠, 张国成, 刘芳, 等. 快速培养结合显微镜排除法检测肺炎支原体的研究 [J]. 临床儿科杂志, 2010, 28(8): 758-760, 767.
 - [6] Martínez MA, Ruiz M, Zunino E, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 12): 1491-1495.
 - [7] Liu FC, Chen PY, Huang FL, et al. Do serological tests provide adequate rapid diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection? [J]. Jpn J Infect Dis, 2008, 61(5): 397-399.
- (收稿日期: 2012-02-12 修回日期: 2012-03-12)