

论著·临床研究

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

谢辉¹ 李基明² 张慧芬¹ 王烨² 钟立霖¹ 连清荣¹ 董鸿捌¹

(厦门市妇幼保健院 1. 儿内科; 2. 医学检验科, 福建 厦门 361003)

[摘要] **目的** 评估肺炎支原体载量指数(MPLI)与血清总抗体在MP肺炎诊断中的价值。**方法** 选取115例肺炎支原体肺炎患儿和400例健康儿童为研究对象, 荧光定量PCR与被动凝集法检测MP肺炎患儿不同病程阶段的MP-DNA及总抗体水平, 并计算MPLI。**结果** 肺炎支原体肺炎患儿的MPLI临界值为6.12。MPLI和MP总抗体滴度均随病程升高, MP-DNA则随病程迅速下降; MP-DNA载量较高组的总抗体滴度显著高于MP载量较低组($P<0.05$)。病程2周内抗体阴性组的MPLI显著大于抗体阳性组($P<0.05$)。**结论** MPLI提供了标准化的MP-DNA定量值, 对肺炎支原体感染的早期诊断有重要价值。

[中国当代儿科杂志, 2016, 18(10): 984-987]

[关键词] 肺炎支原体; 肺炎支原体载量指数; 总抗体滴度; 儿童

Application of Mycoplasma pneumoniae antibody and load index in the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae pneumonia in children

XIE Hui, LI Ji-Ming, ZHANG Hui-Fen, WANG Ye, ZHONG Li-Lin, LIAN Qing-Rong, DONG Hong-Ba. Department of Pediatrics, Xiamen Maternal and Children's Hospital, Xiamen, Fujian 361003, China (Email: lijm2030@sina.com)

Abstract: Objective To study the role of Mycoplasma pneumoniae (MP) load and antibody measurements in the diagnosis of MP pneumonia. **Methods** A total of 115 children with MP pneumonia and 400 healthy children were enrolled. The MP load and total antibody level were measured at different stages, and the MP load index (MPLI) was calculated. **Results** The cut-off value of MPLI for MP infection was 6.12. MPLI and total antibody titer increased during the course of the disease, while MP-DNA decreased rapidly. Within the same time of blood collection, the group with a higher MP load had a significantly higher total antibody titer than the group with a lower MP load ($P<0.05$). Within 2 weeks of the course of the disease, the negative antibody group had a significantly higher MPLI than the positive antibody group ($P<0.05$). **Conclusions** MPLI provides a standardized quantitative value of MP-DNA and plays an important role in the early diagnosis of MP infection. [Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(10): 984-987]

Key words: Mycoplasma pneumoniae; Mycoplasma pneumoniae load index; Total antibody titer; Child

肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae, MP)是儿童急性呼吸道感染的常见病原。目前MP感染的诊断主要通过检测血清MP-IgM抗体, 但其最佳窗口期为感染后7~10 d左右, 不适于早期诊断。被动凝集法能够同时检测MP总抗体(IgG+IgM+IgA), 具有精确度高、敏感度高、操作简便的特点, 但同样不适于MP感染的早期诊断, 更多地用于病例回溯性研究^[1]。除此之外, 血清学免疫检测还

存在特异性低的问题^[2]。实时荧光定量PCR检测MP-DNA则不受病程影响^[3], 有助于抗体尚未形成患者的早期诊断, 亦有助于抗体滴度下降或者已经消失患者的诊断。但MP-DNA检测存在标本难以“标准化”的问题, 而肺炎支原体载量指数(Mycoplasma pneumoniae load index, MPLI)作为新的MP-DNA诊断指标较好地克服了这个问题^[4]。因此我们检测MP肺炎患儿不同阶段的MPLI与总

[收稿日期] 2016-04-21; [接受日期] 2016-08-11

[基金项目] 厦门市科技局计划项目(3502Z20144048)。

[作者简介] 谢辉, 女, 本科, 主任医师。

抗体,评估其在MP肺炎中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2012年1月至2015年12月厦门市妇幼保健院儿科115例肺炎支原体肺炎住院患儿作为研究对象,其中男67例、女48例,年龄1岁6个月至7岁11个月,平均年龄 5.0 ± 1.8 岁。同期健康体检儿童400例作为对照组,男225例、女175例,年龄2岁6个月至5岁10个月,平均年龄 4.8 ± 1.5 岁。根据病程第1周的MP-DNA载量,分为低载量组(MP-DNA拷贝数 $<10^3/\text{mL}$),中载量组(拷贝数 $10^3/\text{mL} \sim 10^6/\text{mL}$),高载量组(拷贝数 $>10^6/\text{mL}$)。根据第1周总抗体检测结果分为抗体阴性组(滴度 $<1:80$)与阳性组(滴度 $\geq 1:80$)。本研究获得医院医学伦理委员会批准及研究对象监护人的知情同意。

肺炎支原体肺炎的诊断和疗效判断参照支原体肺炎临床路径^[5]。

1.2 MP-DNA定量检测

收集患儿及对照组咽拭子用于MP-DNA检测。采样时间分别为入院当天,病程第1、2、4周和第8周。第1次采样前均无抗MP治疗史。

荧光定量PCR检测MP-DNA含量,试剂盒由中山大学达安基因股份有限公司提供。应用ViiA7Dx基因检测系统进行PCR扩增及数据处理,具体按说明书操作。PCR循环条件:93℃ 2 min, 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 共10个循环; 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 共30个循环。以H肌动蛋白DNA(H actin-DNA)作为内参,引物、探针由上海英潍捷基公司合成。H actin-DNA引物正向:5'-ACCGAGCGCGCTACAG-3', 反向:5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3', 探针序列:5'-TTCACCACACGCGCCGAGC-3'。H actin PCR循环条件:94℃ 4 min预变性, 93℃ 变性30 s, 60℃ 退火延伸30 s, 共40个循环。计算MP-DNA阳性样本的MP-DNA相对定量值,即MPLI。

$\text{MPLI} = -\lg(\text{MP-DNA拷贝量}/\text{H actin-DNA拷贝量})$ 。

1.3 被动凝集法检测MP总抗体

采集患儿及对照组非抗凝静脉血,取血清用

于MP总抗体检测。采样时间分别为入院当天及病程第1、2、4、8周。第1次采样前均无抗MP治疗用药史。

血清MP总抗体(IgG+IgM+IgA)检测采用被动凝集法,试剂盒采用日本富士瑞必欧株式会社的SE-RODIA-MYCO-II型,严格按照说明书进行。

1.4 统计学分析

应用SPSS 17.0统计学软件进行数据处理。正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析、*t*检验。计数资料的比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

115例肺炎支原体肺炎患儿中男67例、女48例,年龄 5.0 ± 1.8 岁。400例健康儿童中男225例、女175例,年龄 4.8 ± 1.5 岁。两组之间年龄、性别构成比差异无统计学意义($t=0.876$, $\chi^2=0.582$, $P > 0.05$)。

2.2 MPLI的临界值

400例健康儿童咽拭子MP-DNA拷贝数为 62 ± 13 , H actin-DNA的平均拷贝数为 $(7 \pm 4) \times 10^8$, MPLI为 7.0 ± 0.2 。根据药监局体外生物诊断试剂申报技术要求^[6]计算得出MPLI临界值为6.12,即MPLI >6.12 的视为阴性、 ≤ 6.12 的为阳性。所有肺炎支原体患儿在未予治疗时的MPLI均 <6.12 ,治愈后MPLI均转阴。

2.3 MP载量和抗体水平的动态变化

各载量组的MP-DNA均随着病程而下降,115例MP肺炎患儿随访至第8周时MP-DNA均 $<1 \times 10^3/\text{mL}$; MPLI则随着病程而上升,其中低载量组至第2周即转阴(>6.12),中载量组和高载量组在第8周转阴。MP总抗体滴度随着病程而逐步上升,第4周达最高,第8周有所下降。低载量组的抗体滴度在整个病程中均低于中、高载量组($P < 0.05$);中载量组的抗体滴度在前4周低于高载量组($P < 0.05$),第8周中、高载量组的抗体滴度差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表 1 不同载量组 MP-DNA 拷贝数、MPLI 和总抗体滴度水平的动态变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第 1 天			第 1 周			第 2 周		
		MP-DNA 对数值	MPLI	总抗体滴度	MP-DNA 对数值	MPLI	总抗体滴度	MP-DNA 对数值	MPLI	总抗体滴度
低载量组	23	3.11 ± 0.12	5.7 ± 1.0	54 ± 14 ^{a,b}	2.72 ± 0.19	6.0 ± 1.0	344 ± 40 ^{a,b}	2.41 ± 0.18	6.4 ± 1.0	631 ± 209 ^{a,b}
中载量组	43	5.67 ± 0.37	3.1 ± 0.6	109 ± 20 ^b	4.80 ± 0.29	4.1 ± 1.3	736 ± 153 ^b	3.55 ± 0.17	5.3 ± 0.8	1463 ± 292 ^b
高载量组	49	6.93 ± 0.28	1.9 ± 0.3	160 ± 38	6.19 ± 0.32	2.5 ± 0.5	942 ± 276	4.96 ± 0.17	3.9 ± 0.9	1813 ± 390

续表 1

组别	例数	第 4 周			第 8 周		
		MP-DNA 对数值	MPLI	总抗体滴度	MP-DNA 对数值	MPLI	总抗体滴度
低载量组	23	2.04 ± 0.15	6.8 ± 1.2	1372 ± 313 ^{a,b}	1.78 ± 0.06	7.0 ± 1.2	969 ± 375 ^{a,b}
中载量组	43	2.98 ± 0.16	5.9 ± 0.9	2256 ± 207 ^b	2.11 ± 0.12	6.7 ± 1.2	1977 ± 296
高载量组	49	3.12 ± 0.18	5.7 ± 0.8	3407 ± 421	2.27 ± 0.10	6.5 ± 1.3	2062 ± 286

注: [MPLI] 肺炎支原体载量指数。a 示与中载量组相比, $P < 0.05$; b 示与高载量组相比, $P < 0.05$ 。

2.4 不同 MP-DNA 载量的 MP 肺炎热程比较

MP-DNA 高载量组的 MP 肺炎患儿的热程 (9.8 ± 2.4 d) 较中载量组 (6.8 ± 2.9 d) 和低载量组 (6.4 ± 2.3 d) 长 ($P < 0.05$), 中、低载量组的热程差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 总抗体检测阴性或阳性组的 MPLI 水平比较

根据肺炎支原体肺炎患儿入院第 1 周的 MP 总

抗体结果分为抗体阳性组和阴性组。在病程前 2 周, 抗体阴性组 MPLI 均高于抗体阳性组 ($P < 0.05$); 在第 4 和第 8 周, 抗体阴性组 MPLI 虽仍大于抗体阳性组, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 总抗体检测阴性和阳性组的肺炎支原体载量指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	第 1 天	第 1 周	第 2 周	第 4 周	第 8 周
抗体阴性组	47	5.6 ± 0.8	6.0 ± 1.0	6.1 ± 1.2	6.5 ± 1.0	6.7 ± 1.5
抗体阳性组	68	3.2 ± 0.6	4.0 ± 0.8	5.0 ± 1.0	5.9 ± 1.0	6.4 ± 1.3
F 值		15.24	12.89	9.13	3.59	1.08
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.13	0.42

3 讨论

MP 感染的诊断一般是采用免疫学方法检测机体产生的 IgM、IgG 等抗体, 而 IgM 和 IgG 抗体常常在感染 1~2 周左右才出现; 此外, 由于婴幼儿免疫系统发育不完全, 感染后抗体生成不足可能导致免疫学检测结果假阴性^[7-8], 因此 MP 抗体检测在婴幼儿 MP 感染的早期诊断中具有一定的局限性。PCR 技术检测 MP-DNA 具有高度特异性和敏感性^[8-12], 使 MP 的早期诊断成为可能。MPLI 则通过引入咽部上皮细胞的看家基因 H actin 作内参实现了咽拭子 MP-DNA 检测的样本“标准化”问题, 因为 H actin 的表达不受环境因素影响^[13-14]。因此,

通过测定咽部上皮细胞的 H actin-DNA 表达计算得到的 MPLI 克服了 MP-DNA 检测难以“标准化”的问题。

本研究显示, 患儿 MP 总抗体在第 1 周滴度较低, 随着病程进展, 抗体滴度水平迅速升高并保持在较高水平, 表明血清总抗体检测不适于 MP 肺炎早期诊断, 但在病例回溯性研究有意义。本研究还显示, 通过测定咽部上皮细胞的看家基因 H actin-DNA 表达计算 MPLI, 得出的 MPLI 临界值为 6.12, 与张瑾等的研究相接近^[15]。所有患儿在入院当天的 MPLI 均呈阳性, 而且 MPLI 随着病程而上升即逐渐转阴, MP-DNA 载量则随病程而下降。提示 MPLI 可作为 MP 肺炎早期诊断的指标,

并可通过动态监测以指导治疗调整。结果还显示, MP-DNA 载量较高的患儿其抗体滴度也较高, 总热程也较长; 此外, 入院2周内抗体阴性组患儿的 MPLI 显著高于抗体阳性组, 这与类似研究的结果一致^[16-19], 提示 MP 肺炎患儿的 MP-DNA 载量、免疫应答及临床特征有一定的相关性。

综上所述, 本研究引入一个新的肺炎支原体检测指标 MPLI, 发现了 MP-DNA、总抗体滴度和 MPLI 在 MP-肺炎患儿的动态变化规律, 为 MP 肺炎的早期诊断和疗效监测提供了实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 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.
- [2] Xue G, Wang Q, Yan C, et al. Molecular characterizations of PCR-positive mycoplasma pneumoniae specimens collected from Australia and China[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(5): 1478-1482.
- [3] 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.
- [4] 胡大康, 张瑾, 刘池波, 等. 荧光 PCR 法半定量肺炎支原体的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(4): 755-760.
- [5] 中华医学会. 支原体肺炎临床路径 (县医院 2013 年版) [DB/OL]. (2013-12-23). <http://www.cma.org.cn/kjps/jsqf/>.
- [6] 马玉楠. 体外生物诊断试剂申报技术要求 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(6): 482-485.
- [7] 吴跃平, 赵瑞珍. 小儿肺炎支原体感染 IgM 抗体检测分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(7): 656-657.
- [8] 董晓艳, 陆权. 小儿肺炎支原体感染的诊治现状与进展 [J]. 中华实用儿科临床杂志, 2011, 26(4): 235-238.
- [9] 王晶, 甘轶文, 毛李征, 等. 实时荧光定量 PCR 在儿童肺炎支原体感染中的诊断价值 [J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(15): 91-93.
- [10] 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.
- [11] Wang M, Wang Y, Yan Y, et al. Clinical and laboratory profiles of refractory mycoplasma pneumoniae pneumonia in children [J]. Int J Infect Dis, 2014, 29: 18-23.
- [12] 陈正荣, 严永东. 小儿肺炎支原体感染流行病学特征 [J]. 中国实用儿科杂志, 2015(3): 180-183.
- [13] 钟礼立, 彭力, 黄寒, 等. 支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 对儿童肺炎支原体肺炎诊断研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(3): 191-194.
- [14] Jiang W, Yan Y, Ji W, et al. Clinical significance of different bacterial load of mycoplasma pneumoniae in patients with mycoplasma pneumoniae pneumonia [J]. Braz J Infect Dis, 2014, 18(2): 124-128.
- [15] 张瑾, 胡大康. 肺炎支原体载量指数在儿童肺炎支原体感染诊断中的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(12): 1613-1615.
- [16] Nilsson AC, Björkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute Mycoplasma pneumoniae infection and reveals a high rate of persistent infection [J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 93.
- [17] 卢志威, 赵辉, 郑跃杰, 等. 三种方法对儿童肺炎支原体感染诊断的动态评价 [J]. 临床儿科杂志, 2012, 30(4): 382-385.
- [18] 成云改, 李淑娴, 李雪静, 等. 肺炎支原体肺炎患儿肺泡灌洗液细菌量与临床特征相关性研究 [J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(10): 736-740.
- [19] 张晓波, 陆爱珍, 王立波, 等. 肺炎支原体荧光定量聚合酶链反应在肺炎支原体感染中的诊断评价 [J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(6): 442-445.

(本文编辑: 俞燕)