

肺炎支原体的实验室检测技术研究进展

李青曌¹, 史文元¹, 陈虹亮^{1,2}

摘要: 肺炎支原体是引起呼吸道感染的重要病原体之一。近年来, 我国肺炎支原体发病率呈不断上升趋势, 占小儿肺部疾病发病率的30%。肺炎支原体感染后早期临床症状不典型, 并且对作用于细胞壁的抗生素不敏感, 所以早期实验室检测对肺炎支原体的治疗具有重要意义。因此, 本文就关于肺炎支原体检测的实验研究进展及展望进行简要综述。

关键词: 肺炎支原体; 检测技术; 进展

中图分类号: R375 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2694(2017)09-0841-04

Progress in clinical detection of *Mycoplasma pneumoniae*

LI Qing-zhao, SHI Wen-yuan, CHEN Hong-liang

(1. First People's Hospital of Chenzhou, Chenzhou 423000, China;

2. Institute of Translational Medicine, University of South China, Chenzhou 423000, China)

Abstract: *Mycoplasma pneumoniae* is one of the important pathogens leading to respiratory tract infection. Recently, the incidence of *M. pneumoniae* infection increased rapidly, which contributes about 30% of lung disease in children. The early clinical symptoms for *M. pneumoniae* infection is not typical, which is not sensitive to antibiotics acting on cell walls. Therefore, early laboratory detection of *M. pneumoniae* is very important for later treatment. Herein, this paper aims to sum up the recent development progress of *M. pneumoniae* detection.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*; detection technology; progress

Supported by the Foundation of Chenzhou Municipal Science and Technology Bureau (Nos. czkj2016052 and czkj2016045)

Corresponding author: Chen Hong-liang, Email: chenhongliang2007@126.com

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, *Mp*)是一种介于细菌与病毒之间、在有氧或无氧环境中均能独立存活的最小病原微生物, 主要通过呼吸道飞沫或气溶胶传播, 是引起社区获得性肺炎的重要病原体之一^[1-2]。*Mp*感染早期临床症状与其他细菌和病毒感染肺炎无明显区别, 多见剧烈咳嗽、发热(常为稽留热)、畏寒、头痛和咽痛^[3-5], 且对作用一般细菌细胞壁的抗生素, 如青霉素、头孢菌素等不敏感, 必须选用抑制蛋白质合成的大环内酯类、氟喹诺酮类、四环素类抗生素进行治疗^[6-8]。因此, *Mp*的早期实验室检测对合理选用抗生素治疗具有重要意义。目前*Mp*实验室检测方法主要有分离培养、抗原检测、抗体检测和基因诊断技术检测等。

郴州市科技局科技计划项目(czkj2016052, czkj2016045)资助

通讯作者: 陈虹亮, Email: chenhongliang2007@126.com

作者单位: 1. 郴州市第一人民医院检验医学中心, 郴州 423000;

2. 南华大学转化医学研究所, 郴州 423000

1 分离培养

*Mp*分离培养作为传统的检测手段, 是判断*Mp*感染的“金标准”。*Mp*分离培养常以牛心消化液为基础另加20%小牛血清及新鲜酵母浸液制成液体或固体培养基, 初次分离需要孵育7~15 d, 待培养基指示剂由粉红色变黄色后, 及时转种于固体平板培养基, 5% CO₂环境中培养1~2周可长出菌落直径小于0.5 mm的荷包蛋样菌落, 以此可初步诊断, 再进一步进行生化反应和血清学鉴定^[9]。Kashyap等^[10]认为采用咽拭子或痰液标本进行*Mp*分离培养是目前检测*Mp*感染的可靠方法之一, 但是*Mp*分离培养对培养环境要求较苛刻, 耗时长, 一般培养分离阳性率不高, 难以作为临床常规项目开展。近年来, Puppe等研发出快速检测*Mp*的培养基, 它是利用*Mp*生长代谢产物让培养基液体中指示剂从红色变成澄黄色来判断*Mp*生长, 快速培养法直接检测*Mp*病原体, 且培养基中富含高营养和快速生长

因子,标本中含有微量的病原体就可迅速增殖,大大缩短了培养时间。还有研究报道,该方法检测 *Mp* 的假阳性率较高,但容易被细菌和真菌污染而造成假阳性,故该方法特异性还有待进一步提高,因此有必要在培养 48 h 作第一次判定结果后转种进一步做一般细菌培养。

2 抗原检测

Mp 抗原检测方法包括对流免疫电泳(counter immunoelectro - phoresis)、免疫印迹(immunoblotting)和抗原捕获 EIA (antigen capture enzym eimmunoassay),这些方法操作耗时费力,敏感性较低,并且检测过程中需 *Mp* 特异性抗体,不适于临床检测。Miyashita N 等^[11]以不同菌株 *Mp* 单克隆抗体作为包被物,采用双抗体夹心 ELISA 检测 *Mp* 抗原,同时以 PCR 法作平行测定,结果显示两种方法无显著性差异。该方法具有快速、简便、灵敏度高、特异性强等诸多优点,并且和其它支原体没有交叉反应,但同时亦需要特异性好、效价高的 *Mp* 单克隆抗体,所以未能广泛普及,目前市场还尚无商品化的 *Mp* 抗原检测试剂盒。

3 血清学检测

Mp 感染机体后,经过免疫反应体内可产生特异性的 IgM、IgG 类抗体,其中 IgM 抗体在感染 1 周后可检测出阳性,3~4 周后达高峰,能作为早期感染的诊断指标。IgG 抗体出现较迟,其浓度峰在 *Mp* 感染后的第 5 周,一般提示有既往感染,单独检测意义不大^[4, 12]。*Mp* 血清学检测主要包括非特异性抗体试验和特异性抗体试验。

3.1 非特异性抗体试验 *Mp* 感染机体后,血清中除出现特异性抗体外,还存在刺激机体产生的非特异性冷凝集素。该凝集素能与 O 型 Rh 阴性红细胞在 4 ℃ 条件发生凝集反应,血清滴度 $\geq 1: 64$,判为阳性,效价越高或者双份血清效价呈 4 倍以上,提示近期 *Mp* 感染的可能性较大。非特异凝集试验操作简单,但其特异性相对较低,除 *Mp* 感染患者外,如流感病毒、立克次体和腺病毒等感染也会产生冷凝集素,造成假阳性,因此该方法只可作为辅助诊断 *Mp* 感染的方法。

3.2 特异性抗体试验 *Mp* 特异性抗体试验包括补体结合试验(Complement fixation test, CFT)、颗粒凝集试验 (particle agglutination test, PAT/PA)、间接血凝试验 (indirect hemagglutination test, IHT)、间接免疫荧光试验 (Immuno-fluores-

cence test, IFT) 和酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assays, ELISA)。

3.2.1 CFT 试验 CFT 试验是最早应用于 *Mp* 实验室常规诊断的试验方法。*Mp* 的抗原糖脂成分可刺激机体产生特异性抗体,与 *Mp* 抗体结合后形成固有补体使之不发生溶血反应^[13]。该方法以 *Mp* 糖脂类抗原为标记物,检测血清中是否存在 *Mp* 抗体,其中抗体效价呈倍增长,或单份血清效价 $\geq 1: 64 \sim 1: 128$ 者有诊断价值,通常用双份血清试验可判定 *Mp* 感染是否处于急性期或恢复期。刘方鹤等报道 CFT 试验反应稳定,敏感性和特异性均好,但较为烦琐,且以检测 IgM 抗体为主,不能检测 IgG 等抗体,初次感染时出现阳性率高,再感染者容易出现假阴性,并且在老年体弱患者中,因此,即使 CFT 试验呈阴性也不可以排除 *Mp* 感染,故临床应用较少。

3.2.2 PA 试验 PA 试验是采用致敏粒子与试验血清进行孵育发生凝集的血清学试验。双份血清(间隔 2 周)抗体滴度呈 4 倍或 4 倍以上上升或降低或抗体滴度持续 $> 1: 160$ 时,均可确诊为 *Mp* 感染,这是目前国际公认的标准。我国学者靳冰等研究结果显示 PA 试验灵敏度为 96.4%,特异性为 100%,以及准确度为 97.9%,说明 PA 试验特异性强,操作简便,适用于临床快速诊断,但该方法采用的 *Mp* 进口试剂价格昂贵,窗口期不能被检测,易造成漏检。

3.2.3 IHT 试验 IHT 试验主要用于检测 IgM 抗体,在微量凝血板上被检血清与血清对照,其余各孔加致敏红细胞后震荡混匀,红细胞凝集程度在“+”、血凝抗体滴度 $\geq 1: 32$ 以上即有诊断意义^[14]。李正秋等报道, IHT 实验的灵敏度为 97.5%,显著高于 ELISA 检测法 86.5%,其特异性 70.9% 不及 ELISA 检测法 91.5%,二者联合检测可提高检测阳性率。该试验操作方法相对简单、快捷,但因其特异性不高,且与生殖道支原体存在交叉反应而未推广。

3.2.4 IFT 试验 IFT 试验是标记免疫技术中发展最早的一种。该法以培养基中生长的 *Mp* 菌落制作抗原印片,与被检血清(*Mp*-IgM、IgG 抗体)孵育形成抗原抗体复合物,再用抗抗体的荧光标记抗体着色,荧光显微镜下观察,效价 $> 1: 16$ 为阳性^[11, 15]。有学者报道 IFT 试验检测 *Mp* 感染阳性率为 64%,灵敏度为 98.3%,特异性为 87.5%,明显优于快速培养基法(阳性率 26%,灵敏度为 33.3%,特异性为 85%),两方法比较而言,该方法特异性较高,但需购置荧光显微镜才能观察,只适用

于一般实验室。

3.2.5 ELISA 试验 ELISA 试验利用酶标记抗体作为标志物,并将提纯的 *Mp* 膜蛋白 P1、P116 或 P30 抗原^[16-17]吸附在固相载体表面,再用洗涤液将游离成分洗除,最后加入 TMB 底物后显色来判断结果。ELISA 法是国内应用较为成熟的实验方法,目前临幊上多应用商品化试剂盒来进行快速简便检测,Narita Mitsu 等研究认为 ELISA 法具有较好的准确度和特异性,可分别高达 96%、98%,优于 CFT 法,是诊断 *Mp* 感染实用可靠的手段,并且敏感、快速,适合于各级临幊实验室,可作为 *Mp* 感染的常规检测方法。

4 分子生物学检测

自 1980 年以来,通过实验室和临幊研究,证实了聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 技术检测 *Mp* 感染的可靠性,目前 PCR 技术也是国内外发展较快的检测支原体的方法之一。PCR 可分为普通 PCR、实时荧光定量 PCR,而普通 PCR 容易被污染而出现假阳性;实时荧光定量 PCR 具有快速,特异性强,灵敏度高等特点且无交叉反应现象,对 *Mp* 感染的诊断价值优于普通 PCR 法。运用实时荧光定量 PCR 技术检测患者痰液、咽拭子、支气管灌洗液中的 *Mp*-DNA,通过高温加热使模板的两条 DNA 链解链后,引物分别与模板 DNA 和荧光探针一起退火,通过基因扩增技术,可以在短时间内使含量极低的核酸片段扩展至数百万个拷贝,可检出 $\geq 10 \text{ cfu/mL}$ 的 *Mp*^[18]。佟青研究发现,PCR 诊断 *Mp* 感染的阳性率为 73%,明显高于培养法 25%,但血清学阳性率为 98.5%,PCR 灵敏度不及血清学,但特异性能达到 97%,在 *Mp* 感染早期诊断优于培养法和血清学试验。PCR 技术大大提高了检测特异性,并且可了解 *Mp* 在患者体内感染及自我复制的情况,对早期检测 *Mp* 感染具有重要意义^[19]。但其过于敏感,操作不当或环境因素容易受到污染会导致结果出现假阳性或假阴性,另外该技术要求特殊仪器设备,较高的人员素质,所以在县级医院中难以普及。

5 展望

综上所述,基于分离培养、抗原检测、抗体检测和基因诊断技术为 *Mp* 感染的诊断提供了非常有效的检测手段,但迄今为止还尚无统一的 *Mp* 实验室检测方法。由于各种检测技术参差不齐,各种检测手段都有优缺点,建议根据临幊要求,选择合适的检

测方法,如 *Mp* 初筛可选用灵敏度较高的 ELISA 法、确诊可采用特异性较好的分子生物学诊断方法,同时还可采用多种检测手段结合可提高 *Mp* 感染阳性检出率。相信随着 *Mp* 基础研究的深入以及检测技术的进一步发展,必将发现新的 *Mp* 检测靶点,并开发出更加特异、敏感的检测方法,从而能够准确、快速地诊断 *Mp* 感染。

参考文献:

- [1] Waites KB, Balish MF, Atkinson TP. New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Future Microbiol, 2017, 3(6): 635-648. DOI: 10.2217/17460913.3.6.635
- [2] Ravelomanana L, Bouazza N, Rakotomahefa M, et al. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* infection in Malagasy children [J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(5): 467-471. DOI: 10.1097/INF.0000000000001471
- [3] Wang HR, Xiao JX, Yan YS. Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* infection [J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(11): 1062-1066. (in Chinese)
王惠榕,萧剑雄,严延生. 肺炎支原体感染的流行病学研究进展 [J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(11):1062-1066.
- [4] Rogozinski LE, Alverson BK, Biondi EA. Diagnosis and treatment of *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. Minerva Pediatr, 2017, 69(2): 156-160. DOI: 10.23736/S0026-4946.16.04866-0
- [5] Chang Q, Yan C, Yu R, et al. Distribution of *Mycoplasma pneumoniae* and respiratory pathogens in the specimen collected from Wuxi in the spring of 2015[J]. Chin J Zoonoses, 2016, 32(7): 636-640. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.07.009 (in Chinese)
常青,闫超,俞蓉,等. 2015 年春季无锡地区儿童肺炎支原体及呼吸道常见致病菌的分析 [J]. 中国人兽共患病学报,2016, 32(7):636-640.
- [6] Lu A, Wang L, Zhang X, et al. Combined treatment for child refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia with ciprofloxacin and glucocorticoid[J]. Pediatric Pulmonol, 2011, 46(11): 1093-1097. DOI: 10.1002/ppul.21481
- [7] Li ZW, Xiao GW, Zhang GX, et al. *Mycoplasma pneumoniae* infection and drug resistance in children in Meizhou area from 2010 to 2014[J]. Chin J Zoonoses, 2016, 32(3): 306-311. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2016.03.019 (in Chinese)
李舟文,肖光文,张国雄,等. 梅州地区 2010—2014 年儿童肺炎支原体感染及耐药情况分析 [J]. 中国人兽共患病学报,2016, 32(3):306-311.
- [8] Ishiguro N, Koseki N, Kaiho M, et al. Therapeutic efficacy of azithromycin, clarithromycin, minocycline and tosufloxacin against macrolide-resistant and macrolide-sensitive *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173635. DOI: 10.1371/journal.pone.0173635
- [9] Miyashita N, Kawai Y, Kato T, et al. Rapid diagnostic method for the identification of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory

- tract infection[J]. J Infect Chemother, 2016, 22(5): 327-330. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.02.005
- [10] Kashyap S, Sarkar M. *Mycoplasma pneumoniae*: Clinical features and management[J]. Lung India, 2010, 27(2): 75-85. DOI: 10.4103/0970-2113.63611
- [11] Miyashita N, Kawai Y, Tanaka T, et al. Diagnostic sensitivity of a rapid antigen test for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*: Comparison with real-time PCR[J]. J Infect Chemother, 2015, 21(6): 473-475. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.02.007
- [12] Messous S, Trabelsi I, Grissa MH, et al. Prevalence of *Chlamydophila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* IgM and IgG antibodies in Tunisian patients presenting with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Med Mal Infect, 2017, 47(2): 158-163. DOI: 10.1016/j.medmal.2016.12.002
- [13] Bébéar CM. Pathogenesis and laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections[J]. Arch Pediatr, 2008, 15(7): 1253-1256. DOI: 10.1016/j.arcped.2008.02.010
- [14] Jha AK, Das A, Chowdhury F, et al. Clinicopathological study and management of liver abscess in a tertiary care center[J]. J Nat Sci Biol Med, 2015, 6(1): 71-75. DOI: 10.4103/0976-9668.149091
- [15] Wang XM, Zheng DX, Liang SY, et al. Analysis of assays to community-acquired *Mycoplasma pneumoniae* infection in the elderly patients[J]. Chin J Zoonoses, 2015, 31(2): 189-190.
- DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2015.02.021 (in Chinese)
- 王希敏, 郑东旭, 梁双吟, 等. 老年获得性肺炎支原体感染的检测与分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(2): 189-190.
- [16] Tabassum I, Chaudhry R, Chourasia BK, et al. Identification of an N-terminal 27 kDa fragment of *Mycoplasma pneumoniae* P116 protein as specific immunogen in *M. pneumoniae* infections[J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 350. DOI: 10.1186/1471-2334-10-350
- [17] Drasbek M, Nielsen PK, Persson K, et al. Immune response to *Mycoplasma pneumoniae* P1 and P116 in patients with atypical pneumonia analyzed by ELISA[J]. BMC Microbiol, 2004, 4(1): 7. DOI: 10.1186/1471-2180-4-7
- [18] Li C, Wu YM. Comparision of clinical diagnostic value between PCR and TaqMan real-time PCR for *M. pneumoniae* in throat swabs[J]. Chin J Zoonoses, 2012, 28(2): 127-130. (in Chinese)
- 李淳, 吴移谋. 两种不同方法检测咽拭子标本中肺炎支原体临床诊断价值的比较[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(2): 127-130.
- [19] Loens K, Ieven M. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on nucleic acid amplification techniques and serological diagnostics[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 448. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00448

收稿日期: 2017-03-29 编辑: 刘岱伟

(上接第 840 页)

- 谈潘莉, 汪浙炯, 赵金方. 白假丝酵母菌临床菌株对氟康唑耐药性及其与 CAP1 基因相关性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 3(4): 325-329.
- [26] Ramirez-Zavala B, Mogavero S, Scholler E, et al. SAGA/ADA complex subunit Ada2 is required for Cap1- but not Mrr1-mediated upregulation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump MDR1[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5102-5110. DOI: 10.1128/AAC.03065-14
- [27] Znaidi S, Barker KS, Weber S, et al. Identification of the *Candida albicans* Cap1p regulon[J]. Eukaryotic Cell, 2009, 8(6): 806-820. DOI: 10.1128/EC.00002-09
- [28] Chen C, Yang Y, Tseng K, et al. Replp negatively regulating

MDR1 efflux pump involved in drug resistance in *Candida albicans*[J]. Fungal Genetics Biol, 2009, 46(9): 714-720. DOI: 10.1016/j.fgb.2009.06.003

- [29] Lo H, Tseng K, Kao Y, et al. Cph1p negatively regulates MDR1 involved in drug resistance in *Candida albicans*[J]. Int'l J Antimicrob Agents, 2015, 45(6): 617-621. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.01.017
- [30] Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole[J]. Europ J Pharmaceutic Sci, 2013, 48(1-2): 80-86. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.09.016

收稿日期: 2017-02-20 编辑: 梁小洁