

反转录多聚酶链反应联合间接免疫荧光法对儿童下呼吸道非典型病原体感染早期诊断的意义

刘国英, 樊 冒

(昆明市儿童医院 感染科, 昆明 650032)

摘要: 目的 评价实时反转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 联合间接免疫荧光 (IIF) 法 (联检法) 对提高儿童下呼吸道非典型病原体感染检出率的效果。方法 临床可疑非典型肺炎患儿 152 例采用联检法检测肺炎支原体 (MP)、嗜肺军团菌 (LP)、肺炎衣原体 (CP) 和 Q 热立克次体 (QP) 感染情况, 同时采用间接血凝法、免疫荧光法或微量凝聚试验等多种方法进行验证, 对比分析各种检测方法对 MP、LP、CP 和 QP 的检出率, 并以此检验结果为依据, 对所有检出的非典型病原菌感染病例使用敏感抗生素, 观察治疗后患儿心率、呼吸、体温和 WBC 变化及临床症状改善情况。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果 单独采用 IIF 法与 RT-PCR 法检测比较, 对 MP、LP、CP 和 QP 的检出率差异均无统计学意义 ($P_a > 0.05$); 采用联检法时, 对 MP 和 LP 感染的检出率和总检出率均明显高于其余 3 种检测方法 ($P_a < 0.05$)。根据联检法结果选用敏感抗生素治疗, 临床疗效较好。结论 使用联检法可明显提高 MP 和 LP 感染的检出率和总的检出率, 有效避免漏诊, 但对能否提高 CP 和 QP 感染的检出率, 仍有待进一步研究。

实用儿科临床杂志, 2010 25(4): 269-270

关键词: 反转录多聚酶链反应; 间接免疫荧光; 下呼吸道; 非典型感染; 儿童

中图分类号: R 725.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-515X(2010)04-0269-02

Early Diagnostic Value of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Combined with Indirect Immunofluorescence Method for Atypical Pathogens Infection of Lower Respiratory Tract in Children

LIU Guo-ying, FAN Mao

(Department of Infectious Diseases, Kunming Children's Hospital, Kunming 650032, Yunnan Province, China)

Abstract Objective To evaluate the early diagnostic value of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) combined with indirect immunofluorescence (IIF) method (RT-PCR+IIF) for atypical pathogens infection of lower respiratory tract in children.

Methods One hundred and fifty-two children with suspecting of atypical pneumonia were detected by coplasm pneumoniae (MP), legionella pneumophila (LP), chlamydia pneumoniae (CP) and rickettsia burnetii (QP) by RT-PCR+IIF method and indirect hemagglutination method, immunofluorescence method and micro condensation experiment were performed at the same time as control. The detection ratio of MP, LP, CP and QP by every method were contrasted and analyzed, and according to these detection result sensitive antibiotics was used for all the children with atypical pathogenic bacteria, the heart rate, respiration, body temperature and WBC changes and clinical symptom improvement of children post-treatment were observed. **Results** The diagnosis ratio of MP, LP, CP and QP were not different significantly between RT-PCR and IIF method ($P_a > 0.05$). While the diagnosis ratio of MP and LP with RT-PCR+IIF method were higher than any of other 3 methods significantly ($P_a < 0.05$). According to the results by RT-PCR+IIF method to use sensitive antibiotics for the children, the therapeutic efficacy was better. **Conclusions** RT-PCR+IIF can enhance the diagnosis ratio of MP and LP, and it can well avoid the missed diagnosis whether the diagnosis ratio of CP and QP can be enhanced need further study.

J Appl Clin Pediatr, 2010 25(4): 269-270

Key words reverse transcription polymerase chain reaction; indirect immunofluorescence; lower respiratory tract; atypical pathogens; child

儿童下呼吸道非典型病原体指肺炎双球菌以外的病原体, 包括肺炎支原体 (MP)、肺炎衣原体 (CP)、嗜肺军团菌 (LP) 和 Q 热立克次体 (QP) 等^[1-2]。虽然呼吸道非典型病原菌感染率不断上升, 但是依据临床确诊较为困难。研究报告非典型肺炎约占我国儿童下呼吸道感染的 1/3^[3], 但具体比例仍然不明^[2]。下呼吸道分泌物细菌培养是明确病因的有效手段, 但由于检测技术等原因, 造成较多的假阳性或假阴性^[4]。反转录多聚酶链反应 (RT-PCR) 和血清学的诊断由于快捷、标准化操作和易于判断等优点而受到重视。然而, 单一使用时诊断效果仍不理想, 其漏诊率有时可达 50%^[1, 5]。本研究采用 RT-PCR 联合间接免疫荧光 (IIF) 法 (联检法) 对 152 例可疑下呼吸道非典型感染患儿进行 MP、CP 和 LP 诊断, 同时以免疫荧光法

(MF)、间接血凝法、微量凝聚试验 (MAT) 检测作对照, 以期提高儿童下呼吸道非典型病原体的早期诊断率。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2007 年 1 月 - 2008 年 12 月在本院感染科就诊、符合非典型肺炎临床表现的病例 152 例。男 84 例, 女 68 例; 年龄 1~14 岁, 平均 4.7 岁, 其中 1~3 岁 69 例, >3~6 岁 41 例, >6~9 岁 29 例, >9~14 岁 13 例; 起病时间 2~7 d, 平均 3.2 d。入院时体温 (39.1±0.9) °C, WBC (3.8±0.3) ×10⁹ L⁻¹。

1.2 方法

1.2.1 病原血清学检查 按课题组以前报道的检测方法^[6], 同一小组操作, 每份血清标本重复 3 次, 以 2 次及 2 次以上阳性为准。联检法: 患儿入院后次晨空腹采集上臂静脉血 10 mL, IIF 试剂盒 (购自西班牙 VRC/IC 公司) 检测 MP、LP、CP 和 QP, 按说明书操作及结果判定; 同时

作者简介: 刘国英, 女, 副主任医师, 学士学位, 研究方向为感染性疾病, 电子信箱 liuyisheng@126.com。

局部麻醉下采集环状软骨以下分泌物行 RT-PCR, 检查病原菌基因标志物。对照试验: 间接血凝法和 MAT(日本富士株式会社), 按照说明书操作检测 MP、LP、CP 和 QP。结果判断: 联检法检查阳性或 PCR 阳性, 同时具有肺炎临床表现作为用药依据, 选用敏感抗生素。

1.2.2 评价指标 对比分析各个检测方案对 MP、LP、CP 和 QP 的检出率。对所有检出非典型病原菌感染病例使用敏感抗生素治疗, 观察患者的心率、呼吸、体温和 WBC 变化及临床症状改善情况, 并于治疗 1 周后摄 X 线胸片了解肺部情况。总有效率 = (有效例数 + 显效例数) / 总例数 × 100%。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件, 不同检测方案检出率间行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检测方案对非典型病原体的检出率 单独采用 IIF 法对 MP、LP、CP 和 QP 的检出率与 RT-PCR 法比较差异均无统计学意义 ($P_a > 0.05$), 这 2 个方案与 IIF 间接血凝法或 MAT 检测法检出率比较, 差异亦无统计学意义 ($P_a > 0.05$)。联检法检测方案对 4 个非典型病原体的检出率均明显高于其余 3 种检测方案 ($P_a < 0.05$), 见表 1。

表 1 不同检测方法对非典型病原体的检出率 [n(%)]

项目	IIF 法	PCR 法	联检法	对照试验
MP 检出率	20(13.1)*	22(14.5)*	26(17.1)	15(9.9)*
LP 检出率	19(12.5)	15(9.9)*	23(15.1)	14(9.2)*
CP 检出率	5(3.3)	4(2.6)	7(4.6)	4(2.6)
QP 检出率	1(0.6)	0(0.0)	1(0.6)	0(0.0)
合计	45(29.5)*	41(27.0)*	57(37.5)	33(21.7)*

* 与联检法比较 $P < 0.05$

2.2 联检法检测方案检出患儿对治疗的反应 IIF 法、RT-PCR 或联检法检测阳性结果的患儿根据药理使用敏感抗生素之后, 均取得良好的治疗效果。治疗 2~3 d 生命体征基本正常, 发热和临床症状缓解。治疗 7 d 联检法检测阳性的 57 例患儿心率、呼吸和体温恢复正常, WBC 升至 $(6.5 \pm 2.3) \times 10^9 L^{-1}$, 见图 1。其中 53 例感染症状基本消失或明显好转, X 线胸片示炎症消退, 总有效率为 92.4% (53/57 例)。余 4 例中 2 例因入院时间较晚, 心力衰竭未纠正, 临床症状改善不明显; 2 例住院期间并发细菌感染, 无效率 7.1% (4/57 例); 3 例放弃, 1 例死亡。

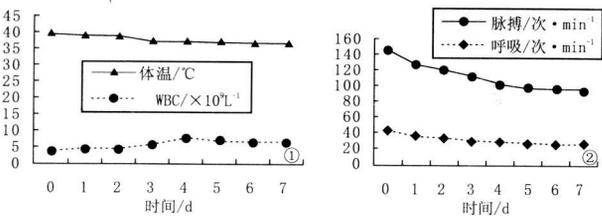


图 1 抗生素治疗 7 d 非典型肺炎患儿体温和 WBC 变化 图 2 抗生素治疗 7 d 非典型肺炎患儿心率和呼吸的变化

3 讨论

实验室检查是诊断下呼吸道感染的主要手段, 但目前诊断效果仍不理想^[1-7,8]。细菌学培养虽然可以直接明

确病原, 并获得药敏指标, 但由于药物滥用及检测技术等因素, 致使非典型病原体不仅培养困难, 而且各个医院的检出率出现偏差, 有时阳性率甚至只有 26%^[4]。IIF 法是一种方便、快捷有效的检测方式, 可对 MP、LP、CP 和 QP 等病原菌感染同时作出诊断^[6], 因此在临床上广为使用。但在临床仍存在漏诊的病例。近年 PCR 技术因具有高敏感性和高特异性而在诊断非典型肺炎中受到重视^[9]。研究证实, 联检法可明显提高下呼吸道非典型病原菌的早期诊断率^[9,10]。本研究结果也证实, 联检法检测可以明显提高儿童下呼吸道非典型病原菌的检出率。单独使用 IIF 法或 RT-PCR 法, 对 4 种病原菌总的检出率分别为 29.5% 和 27.0%, 而对照检测方案检出率为 21.7%; 虽然 IIF 法的检出率高于另 2 种, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而采用联检法检测时, 总检出率提高到 37.5%, 与其余检测方法比较差异有统计学意义 ($P_a < 0.05$)。同时, 采用联检法对 MP 和 QP 的检出率同样表现出良好的优越性, 显著高于其他检测方案 ($P_a < 0.05$)。而对 CP 和 QP 的检出率与其余方案比较差异无统计学意义 ($P_a > 0.05$)。可能是由于 CP 或 QP 感染病例少, 影响了结果的判断, 因此联检法检测方案检测能否提高 CP 和 QP 的检出率, 仍有待进一步的研究。

为确认联检法检出的正确性, 对根据其检测结果用药的患儿进行疗效观察, 结果显示检出的 57 例中 53 例根据检测结果使用敏感抗生素 2~3 d 发热和临床表现等指标明显好转; 治疗 7 d 胸片也证实肺部炎症消退, 临床症状基本消失, 总有效率达 92.4%。证实联检法可明显提高儿童下呼吸道非典型性病原菌的诊断率。

参考文献:

- [1] Cunha BA. The atypical pneumonias: Clinical diagnosis and importance [J]. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(3): 12-24
- [2] Blasi F. A typical pathogens and respiratory tract infections [J]. *Eur Respir J* 2004; 24(1): 171-181
- [3] Jahn z- Rózyk K, Targowski T, Jurkiewicz D, et al. A typical bacteria in respiratory tract infections - pathogenesis and diagnosis [J]. *Pol Merkur Lekarski* 2008; 25(149): 412-414
- [4] 何权瀛, 王爱东, 古利明, 等. 不同层次医院肺部感染的痰细菌培养及菌株耐药性的比较 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2000; 10(5): 391-392
- [5] Wolf J, Daky A. J. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: A typical pathogens [J]. *Paediatr Respir Rev* 2007; 8(3): 212-219.
- [6] 吴茜, 倪木仙, 陈祝, 等. 小儿下呼吸道感染非典型病原体的检测 [J]. *中华儿科杂志*, 2005; 43(3): 218
- [7] Bartlett JG. Is activity against "atypical" pathogens necessary in the treatment protocols for community-acquired pneumonia? Issues with combination therapy [J]. *Clin Infect Dis* 2008; 47(suppl 3): S232-326
- [8] Polverino E, Torres A. Diagnostic strategies for healthcare-associated pneumonia [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2009; 30(1): 36-45
- [9] 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.
- [10] Liu FC, Chen PY, Huang F, et al. Rapid diagnosis of mycoplasma pneumoniae infection in children by polymerase chain reaction [J]. *JM Microbiol Immunol Infect*, 2007; 40(6): 507-512

(收稿日期: 2010-01-02)
(本文编辑: 王家勤)