

呼吸道九联检 IgM 检测对儿童急性下呼吸道感染的早期诊断价值

何成禄, 徐从琼, 王玉明, 石洪琼

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南 昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨昆明地区小儿急性下呼吸道感染 (ALRI) 主要病原体及其流行特点, 分析本地区小儿 ALRI 病原体与年龄的相关性, 同时, 评价呼吸道九联检 IgM 检测对 ALRI 的早期诊断价值。 **方法** ALRI 患儿 625 例, 按年龄将患儿分为 3 组: ~1 岁 (婴儿组), ~3 岁 (幼儿组), >3 岁, ~10 岁 (儿童组)。同时, 健康儿童 100 例作为对照组。应用间接免疫荧光法 (IFA) 检测九项主要病原体的 IgM 抗体, 包括嗜肺军团菌 (LP)、肺炎支原体 (MP)、Q 热立克次体 (COX)、肺炎衣原体 (CP)、腺病毒 (ADV)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、甲型流感病毒 (IFA)、乙型流感病毒 (IFB) 及副流感病毒 1、2 和 3 型 (PIVS)。 **结果** 625 例 ALRI 患儿中, 检出病原体感染 345 例, 总检出率为 55.2%。单一病原体感染 132 例, 占阳性病例数的 38.26%, 以 MP 最多, 其次为 IFV、RSV 和 ADV, 检出率依次为 62.88%、27.27%、5.30% 及 4.55%; 2 种病原体混合感染 148 例, 阳性检出率为 69.48%; 3 种及以上混合感染 65 例, 阳性检出率为 30.52%。单一呼吸道病原体感染中, 随着年龄增长, MP 和 IFB 感染率呈上升趋势, 而 RSV 和 ADV 感染率呈下降趋势, 但 3 个年龄组间仅 RSV 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.143$, $P = 0.017$); 而在 2 种 / ≥ 3 种病原体混合感染中, 随着年龄增长, 感染率呈上升趋势, 3 个年龄组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 26.899$, $P < 0.001$) / ($\chi^2 = 6.138$, $P < 0.046$); 而且, 随着年龄增长, 总的混合感染 (2 种及 ≥ 3 种) 趋势更明显, 各组间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 30.930$, $P < 0.001$)。 **结论** 九项呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测对明确昆明地区 ALRI 的病原体种类、流行病学特点、早期诊断和治疗很有帮助, 具有经济、高效、便于操作和易于判读结果等优点。

[关键词] 呼吸道病原体感染; 儿童; 间接免疫荧光

[中图分类号] R551 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0129-04

Value of Nine Respiratory Pathogens Detection in Early Diagnosis of Children with Acute Lower Respiratory Tract Infections

HE Cheng-lu, XU Cong-giong, WANG Yu-ming, SHI Hong-qiong

(Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** This study was aimed to investigate the major pathogens and popular features of acute lower respiratory infections (ALRI) in children in Kunming area, analyze the correlation between the age of the children and ALRI pathogens in this region, and evaluate the diagnostic value of nine respiratory pathogens detection of IgM. **Methods** 625 children with ALRI were divided into three age groups: ~1 year old (infant group), 1 ~ 3 years old (preschool group), and > 3~10 years old (children's group). Meanwhile, 100 cases of healthy children were selected as a control group. IgM antibodies nine major pathogens were detected by indirect immunofluorescence assay (IFA), including *Legionella pneumophila* (LP), *Mycoplasma pneumoniae* (MP), Q fever Rickettsia (COX), *Chlamydia pneumoniae* (CP), adenovirus (ADV), respiratory syncytial virus (RSV), influenza A virus (IFA), influenza B virus (IFB), and parainfluenza virus types 1, 2 and 3 (PIVS). **Results** Pathogens

[作者简介] 何成禄 (1981~), 男, 云南昆明市人, 医学硕士, 主管检验师, 主要从事临床免疫学检查工作。

[通讯作者] 石红琼. E-mail: sf1557@sina.com

were detected in 345 cases from 625 cases of children with ALRI, with the total detection rate of 55.2%. Single pathogen infections were found in 132 cases, accounting for 38.26% of positive cases, among which MP was most, followed by IFV, RSV and ADV, with the detection rate of 62.88%, 27.27%, 5.30% and 4.55%, respectively. Mixed infections with two kinds of pathogens were found in 148 cases of pathogens, with the positive rate of 69.48%, and mixed infections three kinds of pathogens and above were found in 65 cases, with the positive detection rate of 30.52%. MP and IFB infection rate increased with age in single respiratory pathogen infection, while the RSV and ADV infection rates decreased. There was a significant difference only in RSV among the three age groups ($\chi^2 = 8.143$, $P = 0.017$), while in mixed infections with two kinds or \geq three kinds of pathogens, the infection rate increased with age, and the differences were significant among three groups ($\chi^2 = 26.899$, $P < 0.001$) / ($\chi^2 = 6.138$, $P < 0.046$). Moreover, the total mixed infections (two kinds or \geq three kinds) trend was more obvious with age, and the differences became more significant among groups ($\chi^2 = 30.930$, $P < 0.001$).

Conclusion Nine respiratory pathogens detection of specific IgM antibody is helpful to clear the pathogen species, epidemiology, early diagnosis and treatment of ALRI in Kunming area, with the advantages of economy, efficiency, ease of operation and ease of interpretation of the results and so on.

[**Key words**] Respiratory pathogen infection; Children; Indirect immunofluorescence

呼吸道感染是儿童最常见的感染性疾病, 感染病原体种类繁多, 临床表现错综复杂, 同时可并发多系统、多器官的损害. 由于目前检测方法的局限, 给临床早期、快速诊断急性下呼吸道感染 (acute lower respiratory infection, ALRI)、及时治疗带来极大困难, 本文采用呼吸道九联检试剂, 同时检测血清中九种呼吸道常见病原体 IgM 抗体, 现将结果报道如下.

1 资料与方法

1.1 研究对象

2013 年 11 月至 2014 年 3 月昆明医科大学第一附属医院儿科经《实用儿科学》^[1]确诊为 ALRI 病例 625 例, 男 408 例, 女 217 例, 其中 ~ 1 岁 (婴儿组) 258 例, ~ 3 岁 (幼儿组) 161 例, >3 岁, ~ 10 岁 (儿童组) 206 例. 选择同期健康儿童 100 例作为对照组.

1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 九项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测试剂盒 (间接免疫荧光法), 郑州安图生物工程股份有限公司.

1.2.2 仪器 BX-51 奥林巴斯荧光显微镜.

1.3 方法

1.3.1 检测原理 间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 是基于待测样本中的抗体与吸附在载玻片上的抗原结合, 未与抗原结合的抗体在洗涤步骤中除去, 然后抗原-抗体复合物与荧光素标记的抗人球蛋白结合, 形成

抗原-抗体-荧光素标记抗体复合物, 再用水洗去未结合的标记抗体, 干燥、封片, 用免疫荧光显微镜观察结果.

1.3.2 检测步骤 将 25 μL 血清加入 25 μL PBS 溶液中, 再加入 150 μL 吸附剂, 混匀后 3 000 r/min 离心 15 min; 在载玻片的每 1 孔中加 15 μL 上清液, 在另一张载玻片的每孔中加入 15 μL 不稀释的阳性对照和不稀释的阴性对照; 然后放入湿盒 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 90 min; 用 PBS 液冲洗载玻片并浸泡在 PBS 液中, 放在摇床上摇动 15 min, 再用去离子水冲洗 3~5 次; 自然晾干, 每孔加入 15 μL FITC 结合物, 放入湿盒 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min; 用 PBS 液冲洗载玻片后, 浸泡在 PBS 液中放在摇床上摇动 15 min, 再用去离子水冲洗 3~5 次, 自然晾干, 加封闭介质封片镜检.

1.4 统计学处理

采用 SPSS 软件进行统计学处理, 两组及多组间计量资料比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 阳性结果判读

2.1.1 肺炎支原体阳性 细胞外围苹果绿荧光; 亮度明亮; 荧光细胞比例超过 10% (图 1).

2.1.2 腺病毒、合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒及副流感病毒阳性 细胞核和胞浆或胞膜苹果绿荧光; 亮度较亮, 荧光比例超过 1%, 即 400 倍镜下, 每个视野约 2~3 个阳性细胞 (图 2).

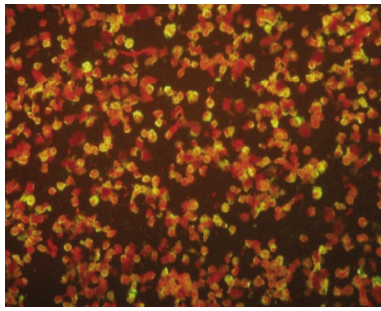


图 1 肺炎支原体阳性

Fig. 1 MP positive infective

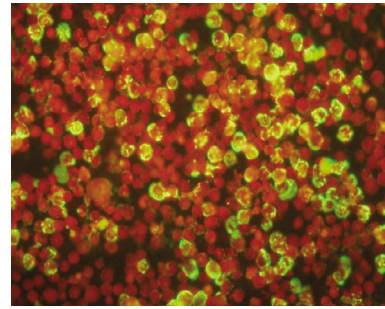


图 2 腺病毒、合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒

Fig. 2 CP, ADV, RSV, IFA, IFB and PIVS

2.2 9 种病原体检出情况

在 625 例 ALRI 的患者中, 感染阳性者 345 例, 总阳性率为 55.2% (345/625); 单一病原体感染 132 例, 占阳性病例数的 38.26% (132/345). 各种病原体中阳性感染率最高的为 MP, 占 24.06% (83/345), 其次为 IFB 占 10.43% (36/345)、RSV 占 7% (7/345)、ADV

占 1.74% (6/345), 其余病原体检出率均未检出. 132 例单一病原体阳性患儿中, 随着年龄的增长 MP 和 IFB 感染率有所增长, 而 RSV 和 ADV 感染率有所下降, 同时, 不同年龄组间 RSV 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.143, P = 0.017$), 其余 3 种病原体组间无差异 ($P > 0.05$), 见表 1.

表 1 132 例单一病原体阳性患儿各年龄组病原感染阳性率比较 [n (%)]

Tab. 1 The positive rates of single pathogen infections in different age groups of 132 cases [n (%)]

组别	MP(+)	IFB(+)	RSV(+)	ADV(+)
婴儿组	25(30.12)	9(25.00)	5(71.43)	3(50.00)
幼儿组	27(32.53)	11(30.56)	2(28.57)	2(33.33)
儿童组	31(37.35)	16(44.44)	0(0.00)	1(16.67)
阳性总数	83(24.06)	36(10.43)	7(2.03)	6(1.74)

注: MP: 婴儿组、幼儿组和儿童组, $\chi^2 = 1.012, P = 0.603$; IFB: 婴儿组、幼儿组和儿童组, $\chi^2 = 3.25, P = 0.197$; RSV: 婴儿组、幼儿组和儿童组, $\chi^2 = 8.143, P = 0.017$; ADV: 婴儿组、幼儿组和儿童组, $\chi^2 = 1.50, P = 0.472$.

2.3 呼吸道病原体混合感染情况

625 例 ALRI 中, 混合感染者 213 例, 感染率高达 34.08% (213/625), 占阳性病例数的 61.74% (213/345). 213 例 2 种及 3 种混合病原体阳性患

儿中, 随着年龄的增长占总标本数的阳性率呈增长趋势, 而占阳性标本数的阳性率变化不明显, 不同年龄组间不同病原体感染情况经 χ^2 检验差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2.

表 2 呼吸道病原体的混合感染率

Tab. 2 The mixed infections rates of respiratory pathogens

组别	样本 (例数)	阳性 (例数)	混合感染 (2 种)	混合感染 (≥ 3 种)
婴儿组	258	43	29	14
占总标本数 (%)			11.24	5.43
占阳性病例 (%)			67.44	32.56
幼儿组	161	73	48	25
占总标本数 (%)			29.81	15.52
占阳性病例 (%)			65.75	34.25
儿童组	206	97	71	26
占总标本数 (%)			34.47	12.62
占阳性病例 (%)			73.20	26.80
总数	625	213	148	65
占总标本数 (%)			23.68	10.4
占阳性病例 (%)			69.48	30.52

注: 3 种混合感染中的婴儿组、幼儿组和儿童组: $\chi^2 = 6.138, P < 0.046$; 总混合感染 (2 种及 ≥ 3 种) 中的婴儿组、幼儿组和儿童组: $\chi^2 = 30.930, P < 0.01$.

3 讨论

ALRI 是儿童常见的呼吸道感染性疾病, 据文献报道^[2], 约 95% 由非细菌性病原体引起, 尤其以病毒感染最为常见, 且混合感染^[3]呈上升趋势, 主要病原体为 MP、IFB、RSV 及 ADV 等, 因此, 早期、快速的呼吸道特异性病原体联合检测^[4]能够及时辅助临床诊断及指导用药, 并减少抗生素的滥用等^[5]。

检测呼吸道病原体的“金标准”是分离培养及组织细胞培养法, 因其操作繁琐、培养时间长、阳性率低等缺点而很难实现, 已被 PCR 方法所取代, 但是 PCR 方法很难达到多种病原体的系列检测。免疫荧光技术利用抗原抗体反应的高敏感性、高特异性和荧光的敏感性, 能够快速而准确地检测多种病原体, 特别适合混合感染。本文采用间接免疫荧光法联检检测九种呼吸道病原体的 IgM, 具有早期、经济、高效等特点。

本研究的 625 例 ALRI 患儿中, 感染阳性者 345 例, 总阳性率为 55.2%, 高于耿素珍的报道^[6], 而低于吴茜等报道^[7], 可能与本方法检测 IgM 抗体, 婴幼儿可因免疫应答弱未能产生高效价的 IgM 抗体, 导致检测出现假阴性。单一病原体感染者 132 例, 占阳性病例数的 38.26%。其中以 MP 的感染率最高, 占 24.06%, 高于吴茜等的报道^[7], 与徐慧香等^[8]报道一致; 其次为病毒, IFB 占 10.43%、RSV 占、ADV 占 1.74%, 其余病原体检出率均未检出, 与国内外报道的以 RSV 感染为主略有不同^[7,9], 可能与所使用的标本类型及检测方法不同有关。文献^[7]采用直接免疫荧光法检测鼻咽部分泌物的抗原, 而为本研究采用的是间接免疫荧光法检测病原体的 IgM 抗体。不同的病原体检测方法对不同种类的病原体的敏感性不一致, 且各种病原体感染早期, 机体对不同病毒产生的 IgM 抗体效价也不一致, 尚有待进一步研究。132 例单一病原体阳性患儿中, 随着年龄的增长 MP 和 IFB 感染率有所增长, 而 RSV 和 ADV 感染率有所下降, 与国内外报道一致^[7], 同时, 不同年龄组间 RSV 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 8.143$, $P = 0.017$), 其余 3 种病原体组间无差异 ($P > 0.05$)。

研究结果显示, 不同病原体混合感染率是

ALRI 的特点, 高达 34.08% (213/625), 占阳性病例数的 61.74 (213/345), 较秦茵茵等报道^[10]的 15.7% 高。213 例混合病原体阳性患儿中, 感染随着年龄的增长占总标本数的阳性率呈增长趋势, 而占阳性标本数的阳性率变化不明显, 2 种或 ≥ 3 种的不同年龄组间不同病原体感染情况经 χ^2 检验, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且总的混合感染 (2 种及 ≥ 3 种) 趋势更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

随着 2 种及 ≥ 3 种混合感染类型越来越为临床所常见, 因此呼吸道九联检 IgM 检测可作为一种经济、高效的方法, 运用于早期诊断儿童呼吸道病原体感染, 尤其是多重混合感染的临床筛查。

[参考文献]

- [1] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学[M]. 第7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1 167 - 1 175.
- [2] 周晓聪, 徐强. 儿童呼吸道病毒感染谱临床分析[J]. 浙江医学杂志, 2006, 28(4): 293.
- [3] J JOHNSTONE J, MAJUMDAR SR, FOX JD, et al. Viral infection in adults hospitalized with community acquired pneumonia: prevalence, pathogens and presentation [J]. Chest, 2008, 134(6): 1 141 - 1 148.
- [4] JUVEN T, MERTSOLA J, WERIS M. Etiology of community acquired pneumonia in 254 hospitalized children [J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19(4): 293.
- [5] 王同权, 何亚香, 季正华, 等. 快速检测小儿肺炎病毒病原体 1615 例报告 [J]. 苏州医学院学报, 1995, 15(1): 153.
- [6] 耿素珍. 间接免疫荧光法对多种呼吸道病毒快速检测方法[J]. 包头医学院报, 2008, 5(24): 477 - 478.
- [7] 吴茜, 温柏平, 李杨方, 等. 1402 例小儿急性下呼吸道感染多病原学临床研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志, 2012, 8(3): 312 - 316.
- [8] 徐慧香, 张慧燕, 车大钊, 等. 小儿肺炎支原体肺炎 106 例临床分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2000, 19(4): 293.
- [9] RAY C G, MINNICH L L. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses [J]. Clin Microbiol, 1987, 2(25): 355.
- [10] 秦茵茵, 吴国锋, 秦笙, 等. 九项呼吸道联检试剂对多种呼吸道感染病原体检测的临床意义[J]. 中华生物医学生物工程杂志, 2012, 18(2): 124 - 127.

(2014 - 09 - 04 收稿)