DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.044

文章编号:1000-5404(2001)04-0459-03

论著

微量免疫荧光试验和PCR在诊断肺炎衣原体急性感染中的应用

李建标[1],蔡 庆[1],王 颖[1],赵建中[2],端 青[3],纪树国[2],朱美财[1] (空军总医院:[1]空军临床分子生物学研究中心;[2]呼吸内科;北京 100036;[3]军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

提 要:目的 探讨肺炎衣原体(Cpn)急性感染在呼吸道疾病中的重要性。方法 用微量免疫荧光(MIF)试验检测了93例住院病人血清中Cpn抗体IgG,同时用PCR测定了其中55例病人咽试子标本中Cpn DNA。结果 35.5%呼吸道疾病存在Cpn急性感染。在肺炎组抗体(效价≥512)阳性率为47.6%,提示1998~1999年可能处在北京市Cpn流行期;在哮喘组的阳性率达到50%;在肺心病组和肺癌组的阳性率分别为50.0%和26.3%。PCR检测Cpn的阳性率仅为9.1%,MIF和PCR的检测结果存在差别。结论 检测Cpn抗体IgG有助于对Cpn急性感染进行诊断,从而指导临床用药。

关键词:衣原体感染;呼吸道疾病;荧光免疫测定;聚合酶链反应
中图法分类号:R446.6;R518.04;R560.4 文献标识码:A

Application of microimmunofluorescence test and PCR in the diagnosis of acute *Chlamydia pneumoniae* infections

LI Jian-biao, CAI Qing, WANG Ying, ZHAO Jian-zhong, Duan Qing, JI Shu-guo, ZHU Mei-cai (Clinical Molecular Biology Center of Air Force, General Hospital of Air Force, Beijing 100036, China)

Abstract: Objective To explore the role of acute infection of *Chlamydia pneumoniae* (Cpn) in respiratory diseases. Methods Microimmunofluorescence test was used to detect IgG antibodies for Cpn in serum obtained from 93 inpatients and PCR was used to test Cpn in detection of Cpn DNA in throat specimens from 55 of the 99 patients. Results Acute Cpn infection was diagnosed in 35.5% of the respiratory diseases. Antibodies for Cpn (titer of ≥512) were present in 47.6% of the pneumonia group, which may suggest that during 1998 to 1999, Cpn caused an epidemic in Beijing. They were also present in 50% of asthma group, 50.0% of pulmonary heart disease group and 26.3% of lung cancer group. Only five patients (9.1%) were positive by PCR. There exists discrepancy between serological and PCR results. Conclusion Detection of IgG antibodies for Cpn conduces to diagnosis of acute Cpn infection and give advice for appropriate therapy.

Key words: chlamydia infection; respiratory diseases; fluoroimmunoassay; PCR

衣原体是专性细胞内寄生物。目前已发现的衣原体有3个种,即沙眼衣原体、鹦鹉热衣原体和肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae,Cpn),其中Cpn是1989年定名的新种[1]。Cpn主要引起人类非典型性肺炎,此病在世界各地广泛存在,一年四季均可发生,几乎每人一生中均受过感染,而且常常反复感染,再次感染或重复感染后,常在1~2周内出现较高水平的IgG抗体[1~4]。本研究用国产Cpn抗原片的微量免疫荧光(MIF)试验,检测呼吸道疾病患者血清Cpn抗体IgG,以诊断Cpn急性感染。同时用PCR测定了部分患者咽试子标本中Cpn DNA。

1 材料与方法

1.1 材料

军事医学科学院五所研制的Cpn抗原片(所用菌株为Cpn标准株AR39)批号980401)和FITC标记的羊抗人IgG。呼吸道疾病患者的血清标本和咽试子标本,来源于空军总医院呼吸内科1998年3月至1999年5月期间的住院病人,对照组血清取自空军总医院健康咨询中心健康体检者。标本贮存于-20 ℃待检。荧光显微镜为Olympus BHS-313型。Cpn PCR试剂盒(批号980316)购自广东老年医学研究所中心实验室,PCR仪为PE-9600 DNA热循环仪(Perkin-Elmer Cetus)。

1.2 方法

1.2.1 MIF 用磷酸缓冲液将血清稀释成1∶128、1∶256、1∶512 3个稀释度,分别加入3个抗原孔中,每孔10 μl,37 ℃温盒30 min,冲洗,凉干后加入抗人IgG荧光抗体,每孔10 μl,37 ℃湿盒30 min,冲洗。加无荧光镜油于抗原孔中,即可用油镜观察。查见发亮绿色荧光、边缘光滑、中心较暗的圆形颗粒(句号状)针尖样大小者,判为阳性,否则为阴性。急性感染判断标准:IgG抗体效价≥512。

1.2.2 PCR 将咽试子用1 ml生理盐水洗涤,5 000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀于50 μl处理液中50 ℃作用1 h,95 ℃5 min取上清作PCR反应。取标本DNA 4 μl加入PCR反应体系中,反应参数为:95 ℃60 s、30 ℃60 s、72 ℃180 s,4个循环后改为94 ℃60 s、55 ℃60 s、30个循环后取10 μl扩增产物用2%琼脂糖凝胶电泳检测。扩增片段大小为455 bp。

1.2.3 统计学处理 采用适合小样本和小概率的t检验。

2 结果

93例呼吸道疾病患者和15例正常人血清中Cpn抗体IgG检

作者简介:李建标(1965—),男,重庆市忠县人,硕士,主治医师,主要从事分子细菌学、临床免疫学方面的研究,发表论文21篇。电话:(010)66928266

收稿日期:2000-08-31;修回日期:2000-10-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测结果，见表1。疾病组总体、肺炎组、急性支气管炎组、肺心病组、哮喘组和慢性支气管炎组分别与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$）；肺炎组和上呼吸道感染组比较，差异有显著性（$P<0.05$）。

MIF和PCR检测结果的比较，见表2。用PCR同时检测了55例病人咽试子标本中Cpn DNA，PCR检测的阳性率仅为9.1%。以MIF为金标准，PCR的灵敏度和特异性分别为13%和94%。

表1 病人及正常对照组 **Cpn** 抗体 **IgG** 的检测结果

Tab 1 Detection of IgG antibodies for Cpn in patients and control

Group	*n*	Titer of antibodies				Positive rate of antibody (Titer≥512)(%)
		<128	128	256	≥512	
Pneumonia	21	8	1	2	10	47.6 **△
Lung cancer	19	9	4	1	5	26.3
Upper respiratory infection	13	8	1	2	2	15.4
Acute bronchitis	10	5	0	1	4	40.0 *
Pulmonary heart disease	10	5	0	0	5	50.0 *
Asthma	8	2	1	1	4	50.0 *
Chronic bronchitis	4	0	1	1	2	50.0 *
Bronchiectasis	3	1	0	2	0	0
Tuberculosis	2	1	0	1	0	0
Pneumothorax	2	1	0	0	1	50.0
Emphysema	1	1	0	0	0	0
Total	93	42	8	10	33	35.5 **
Control	15	13	0	1	1	6.7

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* group of upper respiratory infection

表2 **MIF** 和 **PCR** 检测结果的比较

Tab 2 Comparison of detection of Cpn-specific IgG by MIF and Cpn DNA by PCR

PCR	MIF(Titer≥512)		Total
	+	−	
+	3	2	5
−	20	30	50
Total	23	32	55

3 讨论

在Cpn非流行期，10%社区获得性肺炎是由Cpn引起的；在流行期，43%住院病人的致病因子是Cpn。在北欧国家，Cpn流行间隔时间约6年[3]。MIF检测结果表明：35.5%呼吸道疾病存在Cpn急性感染，在肺炎组抗Cpn IgG阳性率高达47.6%，提示1998～1999年可能处在北京市Cpn流行期。上呼吸道感染组抗Cpn IgG阳性率为15.4%，明显比肺炎组低（$P<0.05$），可见Cpn更多的引起下呼吸道感染。在哮喘组的阳性率高达50%，虽然Cpn导致哮喘的病原学意义尚未十分肯定[1]，但Cpn肺炎可引起哮喘加剧[5]，实验结果显然支持了这一观点。值得注意的是：在肺心病组和肺癌组的阳性率分别为50.0%和26.3%，可能这两种疾病特别是肺心病和Cpn有关，或者因患者免疫功能低下易并发Cpn感染，少见相关文献报道。Cpn可单独引起不同年龄段成人患社区获得性肺炎而需住院治疗[3]；Cpn更常同其它病原体一同被检测出，最常见的是肺炎链球菌，这种情况在75岁以上病人最常见。因此Cpn和肺炎链球菌常导致混合感染，并且Cpn感染可能先于肺炎链球菌感染，这类似于呼吸道病毒感染。Cpn也常同肺炎支原体、流杆嗜血杆菌、卡它摩拉菌和呼吸道病毒一同被检出。

Cpn感染的实验室诊断主要依靠病原体的分离和血清学检测，由于分离Cpn相当困难，所以一般以检测它的特异性抗体作为主要诊断手段。MIF是目前检测Cpn最常用最敏感的血清学方法，流行病学研究和临床感染诊断的报道大部分应用的是这一方法[1,3,4]，被公认为是Cpn感染血清学诊断的金标准。该试验阳性者50%～70%可分离出Cpn[1]。近年来，PCR被用来检测呼吸道标本Cpn DNA，和血清学诊断相互进行评估，结果并非令人满意[6～8]。以MIF为金标准，PCR的灵敏度和特异性分别为13%和94%，敏感度太低。与Verkooyen等[6]报道的20.0%和89.9%相近。20例MIF阳性中仅3例PCR阳性。2例患者的咽试子标本PCR阳性，而血清标本MIF阴性。PCR仅能证实上呼吸道存在Cpn DNA，而Cpn主要引起下呼吸道感染，因此这种情况意味着Cpn在上呼吸道无害定植，而不是导致肺炎的致病因子。Vincent等[7,8]也报道MIF和PCR检测Cpn的结果存在差别。MIF检测Cpn比培养法和PCR法更敏感[3]。PCR检测需特殊实验室，其准确性易受标本中杂质干扰和实验人员技能水平影响。目前不适合作常规诊断。PCR技术有待从手工操作向自动化过渡，从定性向定量发展[9]，以满足临床微生物常规检测的需要。

Cpn感染与鸟类及其它动物无关，人是Cpn的自然宿主，传播方式可能是人-人通过飞沫传染。Cpn感染缺乏特征性的临床表现，通常以咽痛和音哑起病，数日至7 d后才出现咳嗽[1]。和其它急性呼吸道感染相比，自起病至就医的时间，以Cpn感染最长。异常呼吸音和鼻窦区压痛为最常见的特征。X线胸片表示，类似非典型性肺炎，常为单侧节段性肺炎。严重者病变较广泛，甚至波及双肺，也可伴有胸膜炎或胸腔种液。微量免疫荧光试验检测血清Cpn抗体IgG有助于对Cpn急性感染进行诊断，从而指导临床用药。

参考文献：

[1] 李子华. 肺炎衣原体(衣原体TWAR株)[A]. 见：罗海波 主编. 现代医学细菌学[M]. 北京：人民卫生出版社，1995. 214－227.

[2] Kuo C C, Jackson L A, Campbell L A, *et al*. Chlamydia pneumoniae (TWAR)[J]. Clin Microbiol Rev, 1995, 8(4): 451－461.

[3] Kauppinen M T, Herva E, Kujala P, *et al*. The etiology of community-acquired pneumonia among hospitalized patients during a Chlamydia pneumoniae epidemic in Finland[J]. J Infect Dis, 1995, 172(5): 1 330－1 335.

[4] Gencay M, Dereli D, Ertem E, *et al*. Prevalence of Chlamydia pneumoniae specific antibodies in different clinical situations and healthy subjects in Iznir, Turkey[J]. Eur J Epidemiol, 1998, 14(5): 505－509.

[5] Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M, *et al*. Chlamydia pneumoniae and exacerbations of asthma in adults[J]. Ann Allergy Asthma Immunol, 1998, 80(5): 405－409.

[6] Verkooyen R P, Willemse D, Hiep-van Casteren S C A M, *et al*. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of chlamydia pneumoniae respira-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tory infections[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2 301—2 037.
[7] Vincent F, Petitjean J, Filmont J E, *et al*. Acute respiratory Chlamydia pneumoniae infections in adults. Value of direct gene amplification diagnosis [J]. Rev Mal Respir, 1999, 16(6): 1 131—1 137.
[8] Petitjean J, Vincent F, Fretigny M, *et al*. Comparison of two serological methods and a polymerase chain reaction-enzyme immunoassay for the diagnosis of acute respiratory infections with Chlamydia pneumoniae in adults[J]. J Med Microbiol, 1998, 47(7): 615—621.
[9] 张 正, 赵晓涛. 聚合酶链反应及其相关技术在临床微生物检测的应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2000, 23(2): 69—70.

(编辑 潘式文)

文章编号: 1000-5404(2001)04-0461-01

经验与短篇

2 型糖尿病患者血清唾液酸浓度与尿微量白蛋白关系的探讨

Relationship between serum sialic acid concentration and microalbuminuria in type 2 diabetic patients

龚小云[1], 王 毅[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院综合实验研究中心, 重庆 400038; [2] 重庆市第九人民医院内科, 重庆 400000)

本实验观察 2 型糖尿病(DM)患者尿微量白蛋白、血清总唾液酸(TSA)、血清脂质结合唾液酸(LSA)的变化, 及其与空腹血胰岛素(FINS)、空腹血糖(FBG)等指标的相关性[1]。

1 资料与方法

病例来源: 选自 1998 年 5 月至 1999 年 5 月我院住院 2 型糖尿病(DM)患者共 54 例, 根据尿白蛋白定量分为 A 组(n= 28): 微量白蛋白组(UAER 30~300 mg/24 h); B 组(n= 26): 正常白蛋白尿组(UAER≤30 mg/24 h); C 组(n= 12): 正常对照组为我院查体者, 无糖尿病、肿瘤、肝脏等疾病。每组研究对象平均年龄、体重指数、男女比例无明显差别。

2 型 DM 纳入标准: ①符合 1985 WHO 糖尿病诊断标准。②无肝炎、结核、甲状腺疾病、肿瘤。③尿白蛋白排泄率(UAER)≤300 mg/24 h。

方法: 血糖采用氧化酶法, TSA 采用比色法, LSA 采用改良间苯二酚法, HbA1c 采用亲和层析微柱法, 胰岛素采用放免法, 尿白蛋白采用放免法。

$$\text{胰岛素敏感指数} = \frac{1}{\text{空腹血糖} \times \text{空腹胰岛素}}$$

统计学处理: 各数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析及相关分析。

2 结果

A 组 TSA、LSA 较 B、C 组显著增高(P< 0.01、P< 0.05 和 P< 0.01); 其中, B、C 组 TSA 差异无显著性(P> 0.05); LSA 其 B 组较 C 组显著增高(P< 0.05)。A、B 组 FBG、HbA_1C、INS、ISI 差异无显著性, 但与 C 组差异均有显著性(P< 0.01), 3 组血压差异无显著性。

TSA、LSA 与其它指标相关分析: TSA 与 logUAER(r= 0.43、P< 0.05), HbA_1C(r= 0.46、P< 0.05)、ISI(r= 0.47、P< 0.05)有显著性相关, 与 FBG、INS、SBP、BBP 无显著性相关。LSA 与 logUAER(r= 0.46、P< 0.05), FBG(r= 0.43、P< 0.05), ISI(r= 0.47、P< 0.05)有显著相关, 与 INS、SBP、DBP 均无显著性相关(P> 0.05)。

3 讨论

本实验结果显示: A 组 TSA、LSA 较 B、C 组均显著增高; 其中 TSA 其 B 组虽比 C 组有所上升, 但无显著差别; 而在 LSA 其 B 组较 C 组却显著升高。结果说明: 2 型 DM 血清 TSA 与 LSA 随着尿白蛋白的增加而逐渐增加, 不伴有尿微量白蛋白的 2 型 DM 与对照组 TSA 无差别; 而在 LSA, 前者显著增高, 说明在糖尿病状态, LSA 升高较 TSA 更为明显。本实验还发现血清 TSA 与 24 h logUAER、HbA_1C、ISI 正相关。LSA 除与上述指标正相关外, 还与 FBG 正相关, 说明血糖控制不佳及胰岛素敏感性下降对血清 TSA 及 LSA 水平升高有影响。

糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见而严重的微血管并发症, DN 的发生发展和肾小球血流动力学异常及内皮细胞的功能损害密切相关[2]。微量白蛋白尿期的糖尿病患者持续的肾小球毛细血管高内压可损伤内皮细胞使滤过膜屏障功能障碍, 血浆大分子物质渗出并沉积于基底膜、系膜并刺激局部细胞外膜基质的合成, 从而加重 DN 的病理损害[3]。可见, 血清 TSA、LSA 在 2 型 DM 中随着尿蛋白增加而逐渐增加, 是反应 2 型 DM 微量白蛋白尿的一个敏感指标, 有助于糖尿病肾病的早期诊断。

关键词: 2 型糖尿病; 血清唾液酸; 尿白蛋白排泄率
中图法分类号: R587.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 李德发, 周 蓓. 糖尿病患者血清唾液酸水平观察[J]. 蚌埠医学院学报, 1999, 24(3): 190.
[2] Crook M A, Khandhadia S, Lumb P, *et al*. No difference in serum sialic acid in type II diabetic patients from the united Arab Emirates with and without diabetic retinopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2000, 47(2): 147—150.
[3] Riser B L, Cortes P, Zhao X, *et al*. Intraglomerular pressure and mesangial stretching stimulate extracellular matrix formation in the rat[J]. J Clin Invest, 1992, 90(5): 1 932—1 943.

(编辑 王 红)

作者简介: 龚小云(1972—), 女, 重庆市人, 技师, 主要从事临床基因检测方面的研究。电话: (023)68754487
收稿日期: 2000-07-25; 修回日期: 2001-01-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net