

儿童肺炎支原体呼吸道感染实验室诊断 中国专家共识

中华医学会儿科学分会临床检验学组

通信作者:尚世强,Email:shangsq33@sina.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2019.07.005

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)是一种常见的病原微生物,主要引起人类呼吸道感染,尤其以儿童和青年为主。Mp感染广泛存在于世界各地,平时散在性发病,每隔3~7年出现一次地区流行,每次流行持续1~2年^[1-2]。自2012年全球多地区发生Mp暴发流行,除2015年中国外,日本、英国报道的感染病例也出现显著升高^[3]。Mp是儿童社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia, CAP)的重要病原体,可占CAP的10%~30%,Mp流行时可增加3~5倍^[4]。目前认为,Mp的致病机制是通过黏附及细胞毒效应对呼吸道上皮造成直接损伤,也可通过免疫机制引起重症肺炎及其他系统损伤^[5]。

自2000年起,大环内酯类耐药Mp在全球各地流行的证据越来越多^[6],对临床抗菌治疗造成一定的影响。中国、日本等国家报道的部分地区Mp耐药率已达到90%~100%^[7]。重症Mp肺炎治疗挑战性大,需要早诊断、早治疗,实验室病原学诊断是Mp感染诊断的关键。由于Mp的特殊病原学特征,实验室检测方法多样,为规范儿童Mp呼吸道感染实验室诊断程序,提高诊断效率,经中华医学会儿科学会临床检验学组专家讨论,达成并制订儿童Mp呼吸道感染实验室诊断专家共识。

Mp属于柔膜体纲,支原体属,是能够进行自我复制的、有能力在体外不依靠活体细胞而生存的最小微生物^[1]。Mp直径125~150 nm,长约1~2 μm,无细胞壁,仅有细胞膜,革兰染色阴性。因无细胞壁,Mp呈多形性,其细胞体积小于典型细菌体积的5%,能够通过0.45 μm孔径的细菌滤器,在营养丰富的固体培养基(如SP4培养基)上生长,显微镜下能够看到Mp的典型菌落。Mp的基因组长度约800 000 bp^[8],包含大约700个蛋白编码基因和一些非编码DNA序列。核糖体由30S和50S亚基组成,

其基因组为环状双股DNA,分子量约 5×10^8 ^[9]。Mp较小的基因组长度以及有限的生物合成能力限制了其生物合成和代谢能力,需要复杂的培养基添加成分才能在体外进行分离培养^[10]。Mp生长缓慢,以二分裂方式繁殖,每6 h进行一次分裂,有时需要经过长达数周的生长和(或)多次传代才能获得阳性菌株。

Mp的检测方法主要分病原学检测和血清学检测两大类,需掌握不同检测方法的特点,依据不同需求和目的选择不同方法。

一、病原学检测

(一)培养法

获取合格的呼吸道标本,用特殊的液体培养基进行3~7 d培养,培养基变色后转入固体培养基继续培养至镜下见到Mp典型菌落或经基因、生化鉴定后判断为Mp阳性。Mp菌株生长缓慢,需要经过多次传代培养才出现阳性反应,敏感度为34.78%,Mp培养阳性的诊断特异度接近100%^[11],并能对分离株进行种属鉴定、分型及药敏实验,具有重要的临床意义。Mp专用培养基中必须含有葡萄糖作为代谢底物,同时还应包括血清(作为胆固醇来源)、酵母提取物以及pH显色剂。推荐使用SP4肉汤及琼脂培养基进行传统法Mp培养。

目前有基于培养方法的快速检测试剂盒,其方法原理是Mp利用试剂中的高营养和快速生长因子迅速增殖,产酸使试剂pH值降低,通过指示剂颜色变化来判断Mp的存在,或进行药敏分析。快速培养Mp出现阳性结果的时间较短,6~90 h不等,与Mp生长传代时间不符。有学者质疑这种快速培养法的特异性,认为导致培养基快速出现阳性变色的原因是其他微生物污染而出现的假阳性。如:患者带菌或在标本采集、运输、接种等过程出现细菌或真菌污染,而培养基中相应抗菌素用量不足或含量

不均匀也是导致细菌污染发生的因素。另外,口腔酸碱度的影响,如食物残渣、酸性饮料等,培养操作过程中使用的材料、环境的酸碱度均能改变培养基的颜色。对临床高度怀疑 Mp 感染患儿的标本,72 h 培养阴性者建议继续观察至 7 d^[12],快速培养阳性应采用分子生物学方法进行病原学诊断确证。

(二)肺炎支原体的直接检测

采用免疫双抗夹心的方法^[13],取患者呼吸道拭子或吸取物,采用荧光、量子点、胶体金等标记的鼠抗人 Mp 单克隆抗体,异硫氰酸荧光素或显色物标记的羊抗鼠抗体 IgG 来检测 Mp 抗原,在荧光显微镜下观察被特异性荧光标记的 Mp 活跃性或肉眼看到颜色条带来判断是否感染。目前多利用高特异性地识别 Mp 的黏附相关 P1 蛋白单克隆抗体直接检测 Mp 抗原,有报道特异度和敏感度为 100% 和 97.4%^[13]。此类方法方便快捷,但易受人为因素干扰,如未取到感染细胞、没有选中合适的视野或其他病原及自身的交叉抗体干扰等,均会影响结果。

(三)分子生物学

分子生物学检测主要有 DNA 和 RNA 检测两大类。该类方法具有高特异性、检测速度快、样本周转时间短的优点,为临床诊治提供明确依据。

1. DNA 检测技术:基于 DNA 检测技术的方法众多,主要有荧光定量 PCR 和环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)两种,其检测样本为痰、鼻咽拭子、支气管肺泡灌洗液,检测靶标为 Mp-DNA,根据 P1 蛋白、16S rRNA 等目标基因设计扩增引物。以 DNA 为靶标的检测技术灵敏度和特异性都能满足临床需求。但是 Mp 死亡后其 DNA 仍可存在于部分患者体内,时间达 7 周~7 个月,且不易降解,导致 DNA 检验结果不能很好地用于治疗效果的评估。

2. RNA 检测技术:RNA 检测技术是基于核酸恒温扩增技术和实时荧光检测技术相结合的一种核酸检测方法,简称实时荧光恒温扩增技术(simultaneous amplification and testing, SAT)。其采用的靶标为 16S rRNA,在 Mp 中以多拷贝形式存在(多达 10⁴ 拷贝量),其灵敏度和准确性与 DNA 检测方法相比都有很大提高^[14]。由于 RNA 随病原体死亡而降解,可作为评价 Mp 感染转归、药物疗效的指标,其检测结果与 Mp 的感染严重程度相关性较好,因此 Mp 的 RNA 检测是目前早期快速诊断、判断疗效的最好方法之一^[15]。

对于上述病原学检测的方法,均需检测人员严

格掌握检验前质量,尤其是标本采集、运输、保存、接种、培养方法及操作过程的规范,以期获得最准确检测结果。

二、血清学检测

通常情况下,人体感染 Mp 后能产生 IgM、IgA、IgG 类抗体。IgM 抗体一般在初次感染 1 周内开始升高,2~3 周达到高峰,4 周时下降,2~3 月降至最低^[16]。IgA 抗体在 Mp 感染早期迅速上升,由 IgM 型转换产生,7~14 d 至峰值水平,回落比 IgM 或 IgG 更早。IgA 抗体变化与 IgM 一致,成人 Mp 感染 IgA 阳性率高,与 IgM 检测相比,儿童 IgA 检出率较低^[17-18]。IgG 较 IgM 和 IgA 出现晚,一般于感染后 14 d 左右出现,浓度峰值一般在感染后的第 5 周,具有较长的维持时间^[20]。

与病原学检测方法比较,抗体产生有时间窗和个体差异,但抗体检测结果不受抗生素治疗的影响。临床上 Mp 血清学诊断常用方法有酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、颗粒凝集法(particle agglutination, PA)、免疫胶体金技术(immune colloidal gold technique, GICT)、化学发光法(chemiluminescent immunoassay, CLIA)、间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)。用于抗体检测试剂的 Mp 抗原选择非常重要,它决定了检测的敏感度和特异性。目前主要有 4 大类抗原, Mp 全细胞裂解物(全菌体抗原)、蛋白提取物、膜制备物、糖脂提取物。Mp 全菌体抗原包括细胞膜的糖脂、蛋白质等成分,特异度和敏感度较差,与人体多种组织细胞膜、某些细菌(如流感嗜血杆菌、奈瑟脑膜炎球菌等)以及其他支原体都会出现非特异性交叉反应;黏附相关蛋白,如 P1 蛋白、P30 蛋白、P116 蛋白、重组 AtpD 蛋白、重组 P1-C 蛋白等是重要的免疫原,尤其 P1 蛋白,能刺激机体产生较强烈的免疫应答,是 Mp 诊断的重要抗原,重组 P1 蛋白的特异度和敏感度可以达到 97.7% 和 85.0%^[16]。

下面介绍各类血清学检测方法的特点。

(一)ELISA

ELISA 作为实验室常用的双抗体夹心法,利用其基本原理检测人血清中 Mp 的 IgM、IgG、IgA 各类型抗体,具有较高的敏感度和特异性,其包被的 Mp 抗原来源多样,建议选择敏感度和特异性均较高的抗原包被试剂盒检测。

(二)PA

PA 的原理是将 Mp 细胞膜(可溶性抗原)致敏

或吸附在一定大小的颗粒状载体的表面,与人血清中存在的 M_p 抗体结合后,在有电介质存在的适宜条件下,可发生凝集,称为间接凝集反应。目前常用作载体的颗粒或微球多为人工合成或天然高分子材料制成的,如明胶颗粒、聚苯乙烯胶乳微球等。由于载体颗粒增大了可溶性抗原的反应面积,当颗粒上的抗原与微量抗体结合后,产生肉眼可见的凝集反应。该方法检测有效性的指标是试剂盒内提供的阳性对照滴度达到 1:320,抗体滴度检测范围为 1:40~1:10 240。患者血清 M_p 抗体滴度 \geq 1:160 作为 M_p 近期或急性感染的诊断标准;恢复期和急性期 M_p 抗体滴度呈 4 倍及以上增高或减低时,可确诊 M_p 感染^[18,20]。PA 检测 M_p 总抗体,方法重复性好,特异度、敏感度佳,治疗前后双份血清滴度的变化更有利于诊断。

(三)GICT

GICT 是一种以新型的免疫标记——胶体金作为示踪标志物,应用抗原抗体特异性结合的免疫反应原理检测 M_p 抗体,主要有免疫层析法和免疫渗滤法。基本原理是反应板上的 M_p 抗原可与待测样本中 M_p 抗体结合,再与胶体金标记的抗人 IgM 抗体结合并显色,形成肉眼可见的红色斑点或条带判断阳性。GICT 检测 M_p 的 IgM 抗体,研究显示儿童 MP-IgM 阳性与 PA 滴度 1:160 和 \geq 1:320 的符合率均为 95%;单次测定 M_p-IgM 阳性对诊断儿童 M_p 近期感染有价值,适合门诊的快速检测^[21]。目前是定性试验,患者抗体含量较低时可能造成漏检,且抗体在部分治愈患者体内持续存在,使得对短期内再次感染的阳性判断造成困扰。

(四)CLIA

CLIA 的原理是将发光物质直接标记在 M_p 抗原上,或免疫复合物上的酶作用于发光底物,通过大型发光仪测量光量子产额,定量、成批地检测 M_p 的 IgM、IgG,目前此方法的应用、与常用抗体检测方法的比对研究较少,需进一步积累数据。

(五)IFA

IFA 的原理是用标本血清和已知的 M_p 抗原相互作用,经温育后洗涤。若待检测标本中含有相应抗体,则与 M_p 抗原发生特异性结合且不会被洗掉,与标记有荧光素的抗球蛋白抗体结合,在显微镜下观察绿色荧光。该方法主要检测 M_p IgM 抗体,特异度和敏感度较好,具有对照明显、结果判读和操作简单等优点^[16]。但该实验易受人为判断荧光结果影响,包被抗原含量不足可能会产生假阴性,体

内含有关风湿因子、多种自身免疫性抗体等与包被抗原交叉反应可能出现假阳性。

(六)补体结合试验(complement fixation assay, CFA)

CFA 的原理是利用 M_p 抗原抗体反应消耗补体从而使补体参与指示系统的抗原抗体反应的浓度降低或消失。CFA 检测抗 M_p 的总抗体,一般认为滴度 $>$ 1:64 或恢复期血清呈 4 倍以上升高有诊断意义。与其他检测方法相比,CFA 采用糖脂抗原,特异性较差,操作过程中存在较多干扰,目前已经很少用于 M_p 临床诊断。

(七)冷凝集试验(cold agglutination test, CAT)

多年前 CAT 应用于 M_p 感染的实验室诊断,血清冷凝集素在感染 1 周开始升高,4 周达高峰,第 6 周下降或者消失,红细胞 CAT 阳性,效价大于 1:32,恢复期效价增加 4 倍有诊断意义。但冷凝集素增高也可见于其他疾病,如流行性感、传染性单核细胞增多症、风疹等,故 CAT 的特异性差,现已逐渐被其他 M_p 的检测方法取代。

(八)实验室 M_p 血清学检测结果的判读

1. 颗粒凝集试验抗体滴度 \geq 1:160:提示近期或现症感染。

2. 只有 IgM 抗体(+):提示近期感染。

3. 只有 IgM 及 IgA(+):提示现症感染。

4. 只有 IgG 抗体(+):提示既往感染。

5. IgM、IgG 及 IgA 均为(+)/IgM 及 IgG(+)/IgA 及 IgG(+):提示现症感染或近期感染。

6. 间隔 2~4 周双份血清抗体亚型转化/血清抗体水平 4 倍及以上增加或降低:确诊 M_p 感染。

评价血清学检测结果时需要结合患者的临床病程、基础状况以及年龄等因素综合考虑,如:免疫功能低下、缺陷的人群、产生抗体能力较低的婴幼儿,可能不产生或产生低滴度的抗体^[22-23]。抗体在部分治愈患者体内会持续阳性,期间再次感染的确诊应做 M_p 的抗体滴度或 RNA 检测以佐证。

三、药敏试验和耐药基因检测

因 M_p 培养条件要求苛刻,生长缓慢,不推荐临床实验室常规做体外药物敏感性试验。美国临床与实验室标准委员会(CLSI)2011 年颁布了支原体体外药敏测定即 M43-A 指南 9,可用于 M_p 耐药流行病学调查和分析^[24]。指南推荐微量稀释法测定 M_p 最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC),其敏感/耐药的判断标准(MIC 值):左氧氟沙星 \leq 1 mg/L,莫西沙星、红霉素及阿奇霉素 \leq 0.5 mg/L

L, 四环素 ≤ 2 mg/L 为敏感;红霉素及阿奇霉素 > 1 mg/L 为耐药^[10], 质控菌株为肺炎支原体 FH (ATCC15531)。

Mp 重症感染合并多种肺外并发症且药物治疗不佳的病例报道日渐增多。有研究显示, 23S rRNA 结构域 II 区和 V 区基因位点突变可导致抗生素与核糖体亲和力下降而引起耐药, 基因突变导致的药物结合靶点改变是 Mp 对大环内酯类耐药的最重要原因^[25], 结构域 V 区 A2063G、A2064G 突变导致高水平耐药, A2067G、C2617G 突变发生低水平耐药^[26]。临床上可以参考 Mp 23S rRNA 基因突变位点进行耐药分析^[27]。

四、肺炎支原体检测的质量控制

Mp 检测的质量控制是获得准确可靠结果的前提, 检验的质量控制从检验前、中、后质量控制三部分阐述。

(一) 检验前质量控制

检验前质量控制主要是样本采集、运输、保存过程的质量控制和标准化, 应作为重点培训和规范内容推广。

病原学检测标本采集尽可能采集多种类型的标本和(或)连续多个时间点采集不同部位的标本, 以满足最低检测阈值采集量、阳性率和多种检测方法联合检测的需求。咽、鼻、喉拭子最易获得, 痰液需判断是否合格, 肺泡灌洗液的杂菌污染较少, 不同标本的病原学检测灵敏度和特异性研究报道不一致, 40%~80% 不等^[28-29], 晨痰对呼吸道支原体的检测价值较高, 可依据临床实际情况选择, 具体操作规范见表 1。用做核酸检测的样本容器不可含核酸酶, 以防止核酸降解; 容器内应预装具有防核酸降解功能的保存液, 有利于标本保存和转运。呼吸道标本室温下 30 min 内送检, 4℃ 环境下 2~4 h 内送检, 标本 4℃ 保存不应超过 48 h, 预计延迟送检的标本应在 -70℃ 条件下保存^[30]。血液应尽可能采集急性期和至少间隔 2 周的恢复期双份血清。

(二) 检验中质量控制

检验中质量控制主要包括检测方法的选择、性能验证、室内质控、室间质评四方面。

1. 检测方法的选择: 鉴于 Mp 独特的病原学特点、病原学检测的合格取材问题、血清学检测的时间窗和机体免疫条件影响以及不同检测方法的敏感度、特异度的不同, 采用一种检测方法无法达到最终确诊, 因此病原学与血清学联合诊断仍然是目前提倡的 Mp 感染诊断策略^[11]。本共识给出分等级

推荐的检测方法, 应用时可根据实验方法学的优劣势、贡献度和实验室能力选择。

一级推荐方法: Mp 病原学采用分子生物学 RNA 检测; Mp 血清学检测方法采用颗粒凝集法抗体滴度测定。

二级推荐方法: Mp 病原学采用分子生物学 DNA 检测; Mp 血清学检测方法采用 ELISA 抗体分型检测。

三级推荐方法: Mp 病原学采用培养法或直接检测法; Mp 血清学检测方法采用间接免疫荧光法、免疫胶体金法; 非特异性血清学检测方法。

一级为最佳方法, 阳性可确诊 Mp 感染, 三级推荐方法中的 Mp 直接检测法和 GICT 对门急诊患者 Mp 感染诊断的快速初筛是有价值的, 进一步诊断需一级、二级推荐方法的确认或动态复检。建议有能力的实验室开展一级、二级推荐方法, 病原学培养法虽不作为常规临床诊断推荐方法, 但其真阳性可确诊 Mp 感染, 分离株对进行种属鉴定、耐药基因检测及药敏实验具有重要的临床意义。CLIA 因应用不广泛, 暂不列入推荐等级。

目前国内关于 Mp 检测的各类试剂盒生产厂家众多, 抗原、抗体选择不同, 方法的敏感度和特异性不同, 使判断结果存在差异, 因此实验室应至少开展两种及以上不同的检测方法以弥补相互之不足, 并且同一类检测方法应进行两种及以上试剂的对比试验, 选取结果更好的作为最终使用试剂。

2. 检测方法的性能验证: Mp 的实验室检测项目均需开展性能验证, 即是检测结果准确可靠的保证, 也是 ISO15189 对临床实验室的要求。血清学项目的检测应按照定性检测项目的性能验证指南进行, 分子诊断方法的检测按照分子生物学检测方法的性能验证指南进行。

3. 室内质控和室间质评: 按照 ISO15189 对临床实验室的要求, Mp 所有检测项目需要开展室内质控和室间质评。

室内质控物的选择: 阴、阳性质控物为外部对照, 用于监控实验的有效性, 实验室在选择时应考虑类型(宜选择人血清基质, 避免工程菌或动物源性等的基质)、浓度(弱阳性质控物浓度宜在 2~4 倍临界值左右, 阴性质控物浓度宜在 0.5 倍临界值左右)、稳定性(宜选择生产者声明在一定保存条件下 2~8℃ 或 -20℃ 以下, 有效期为 6 个月以上)、均一性。

室内质控频率: 每检测日或分析批, 应使用弱

表 1 样本采集、运输、保存规范表

检测原理	样本类型	采集载体	采集方法、送检
病原学检测	咽拭子	塑料柄的尼龙拭子、涤纶拭子、植绒拭子(可吸附更多的生物样本并达到较高的释放率)或人造棉拭子(不要采用带木柄的棉花拭子,因为后者可能含有抑制支原体生长及抑制分子反应的成分) 样本采集注意事项:观察患者口腔黏膜、咽喉部有无红肿、溃疡、脓性分泌物等情况,采集前让家长、患者知晓采集部位及目的,并获得其积极配合	采集前用生理盐水漱口,让患者头部微仰,嘱其张口发“啊”音,必要时使用压舌板轻压舌面,暴露咽喉,手持消毒拭子,以灵敏而轻柔的动作擦拭两侧腭弓、咽、扁桃体上的分泌物及上皮组织,稍微用力来回擦拭至少 3 次,然后在咽后壁上下擦拭至少 3 次;取毕,将拭子插入试管,或放入适宜的保存液中,塞紧管口,注明标本采集时间,立即送检。洗脱时将拭子头浸入采样液中,把拭子头部与管壁接触数下,使标本尽量多地冲洗到采样液中。最好在使用抗菌药物治疗前采集标本。咽拭子必须保持湿润
	鼻、喉拭子	观察鼻、喉部黏膜,余同上	直接擦拭鼻、喉部黏膜,次数及其他同上,立即送检
	肺泡灌洗液	无菌瓶	肺泡首次灌洗液用于病原学检查效果优于第 2 次及第 3 次灌洗液的效果。无菌操作,立即送检
	胸腔积液	无菌瓶	抽吸法采集,立即送检
血清学检测	痰	无菌瓶(集痰器)	抽吸采集、自然咳出采集前用生理盐水漱口,立即送检;晨痰最佳
	末梢血	末梢抗凝管	新生儿选取足跟内侧缘或外侧缘部位采血;≥29 d 的患者选择左手无名指指尖尺侧采血(具体参考 2018 年《中国末梢采血操作共识》)
	静脉血	血清管、血浆管、全血抗凝管	血清、血浆或全血的采集严格按照 CLSI(GP41-A6)执行 ^[31]

阳性和阴性质控物进行质控。

室内质控物位置:不能固定而应随机放置且应覆盖检测孔位(标本间隔)。

室内质控评定规则:肉眼判断:阴性、阳性质控物的检测结果分别为阴性、阳性即在控;滴度判断:阴性质控物必须阴性,阳性质控物结果在上下 1 个滴度内为在控。

判断规则:根据不同项目可以采用肉眼判断的规则,也可采用统计学质控规则,至少利用一个偶然误差及一个系统误差规则。

室间质评:目前,国家及省市级临检中心尚未开展针对 Mp 项目的室间质评计划。因此, Mp 检验项目应采用实验室间比对的方式进行评价,比对实验应满足如下要求:(1)规定比对实验的选择原则;(2)样本数量:至少 5 份,包括阴性和阳性;(3)频率:至少每年 2 次;(4)判定标准:应有 ≥80% 的结果符合要求;(5)结果不一致时,应分析不一致的原因,必要时,采取有效的纠正措施,并定期评价实验室间比对对其质量的改进作用,保留相应的记录。

(三)检验后质量控制

检验后质量控制主要是检验结果质量的保证、检验结果的报告和发布,一个实验室具备多种检验方法时,要注意报告发出时的逻辑性。当检测结果

不相符时,应查找检验前、中的质量问题;排除检测导致的假阴性和假阳性后,分析如下。

1. 双阳性结果:血清学检测结果阳性,分子生物学检测结果阳性:基本可确诊为 Mp 感染。此类患者,发病时间多超过一周,抗体已经产生,后期进行疗效观察时可采用 RNA 检测。

2. 单阳性结果:血清学检测结果阴性,分子生物学检测结果阳性:基本可确诊为 Mp 早期感染。其一,发病时间较短,抗体尚未产生;其二,免疫系统发育不完善、免疫功能低下,未产生抗体或抗体滴度较低。抗体效价 4 倍变化可进一步确证 Mp 感染。

血清学检测结果阳性,分子生物学检测结果阴性:需依据抗体阳性类型和滴度来判断 Mp 的现症或既往感染,多为治疗后的既往感染。

3. 双阴性结果:血清学检测和分子生物学检测结果均阴性, Mp 感染的可能性很小,需要进一步鉴别诊断时可监测抗体滴度或重新采样。

五、儿童 Mp 呼吸道感染实验室诊断共识的意义

本共识规范了儿童呼吸道 Mp 感染的实验室诊断方法的类型、概念和价值,旨在根据患者现症和既往、门诊和住院、筛查和确诊等不同的感染情况选择不同的检测方法,结合患者临床症状、体征以

及胸片等其他辅助检查,同时对患者年龄、全身状况、用药、病程等综合判断,为临床Mp感染的诊断提供合理、经济、高效的参考建议。经归纳总结形成Mp实验室诊断流程图,见图1。

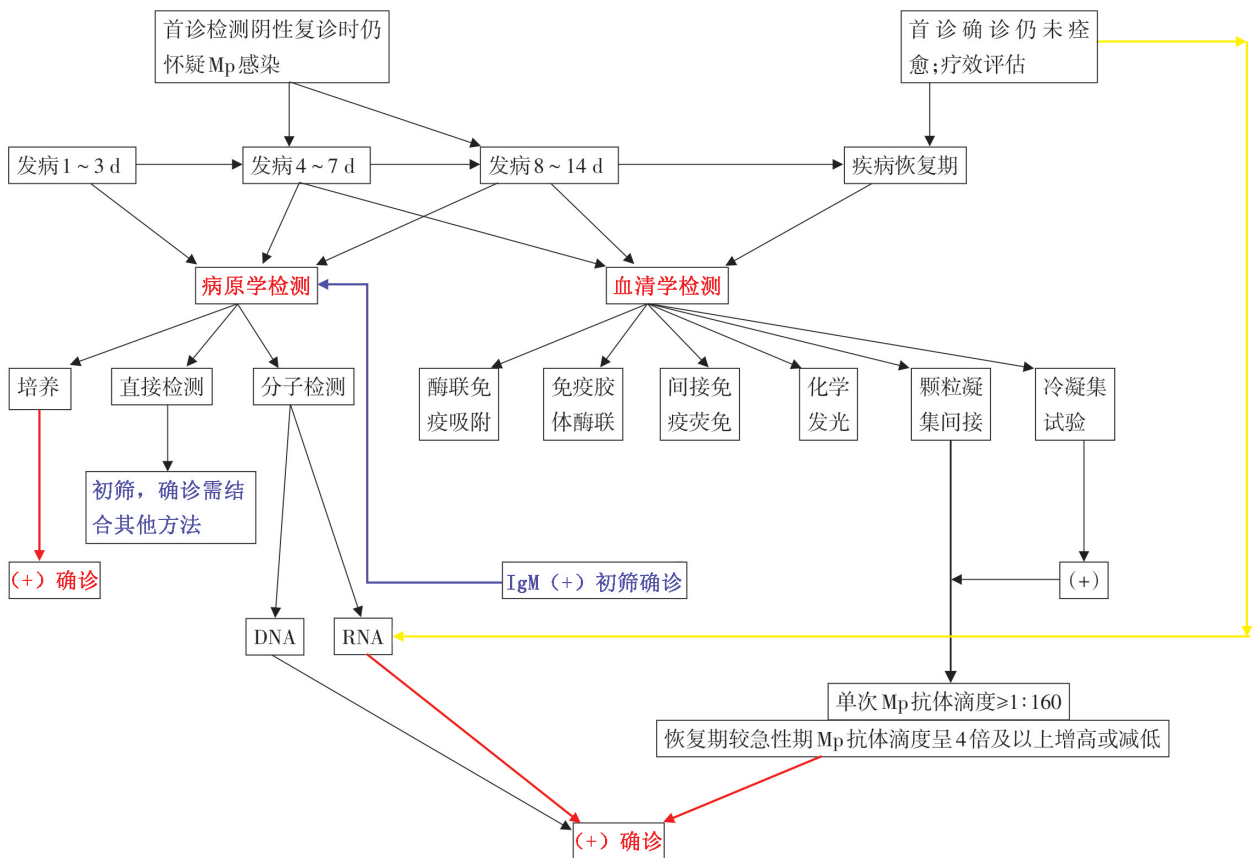
(马丽娟、张泓、孙红妹 执笔)

参与编写的专家(按姓氏汉语拼音排序):葛梦蕾(首都儿科研究所附属儿童医院检验中心);贾伟(宁夏医科大学总医院医学实验中心);江咏梅(四川大学华西第二医院检验科);蒋玉红(青岛市妇女儿童医院检验科);李贵霞(河北省儿童医院检验科);林书祥(天津市儿童医院儿科研究所);马丽娟(首都儿科研究所附属儿童医院检验中心);莫丽亚(湖南省儿童医院检验中心);渠巍(贵阳市妇幼保健院/贵阳市儿童医院检验科);尚世强(浙江大学医学院附属儿童医院实验检验中心);孙红妹(首都儿科研究所细菌研究室);杨铭华(哈尔滨市儿童医院检验科);张泓(上海交通大学附属儿童医院检验科);张乐海(山东大学齐鲁儿童医院科教外事科)。

参与征求意见的专家(按姓氏汉语拼音排列):陈红兵(南京医科大学附属儿童医院检验科);成玲(福建省妇幼保健院医院感染管理科);段荣(江西省儿童医院检验科);樊茂(昆明医科大学附属儿童医院检验科);傅启华

(上海儿童医学中心检验科);黄晶(吉林大学第一医院检验科);马东礼(深圳市儿童医院检验科);马慧英(青海红十字医院检验科);强荣(西北妇女儿童医院医学遗传中心);阮强(中国医科大学附属盛京医院检验科);余尚扬(广西壮族自治区妇幼保健院/儿童医院检验科);石磊(兰州大学第二医院/甘肃省儿童医院检验医学中心);宋文琪(国家儿童医学中心首都医科大学附属北京儿童医院检验中心);孙立颖(北京大学第一医院检验科);田礼军(徐州市儿童医院检验科);王洁(海南省妇幼保健院/儿童医院检验科);翁莹(华中科技大学同济医学院附属同济医院检验科);吴亦栋(杭州市儿童医院检验科);徐锦(复旦大学附属儿科医院临床检验中心);向贲(华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院检验科);杨治理(内蒙古自治区妇幼保健院/儿童医院/妇产医院检验科);张文利(乌鲁木齐儿童医院检验科);赵锐(山西省儿童医院检验科);赵晓明(郑州大学第一附属医院儿科实验室);张鹏辉(重庆医科大学附属儿童医院检验科);郑晓群(温州医科大学附属第二医院育英儿童医院检验科);周珍文(广州市妇女儿童医疗中心检验科);朱宏(苏州大学附属儿童医院检验科)。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突



注:红色示确诊方法;紫色示初筛阳性,确诊需要病原学检测;黄色示疗效或复发评估

图1 Mp呼吸道感染实验室诊断流程图

参 考 文 献

- [1] Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A. Pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*: An update[J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(1):7-16. DOI:10.4103/0255-0857.174112.
- [2] Yan C, Sun H, Zhao H. Latest surveillance data on Epidemiology of *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Japan and therapeutic strategies for macrolide-resistant M [J]. Clin Microbiol, 2016, 54(5):1400-1401.
- [3] Brown RJ, Nguipod-Djomo P, Zhao H, et al. *Mycoplasma pneumoniae* epidemiology in England and Wales: a national perspective[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 157. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00157.
- [4] McCulloh RJ, Patel K. Recent developments in pediatric community-acquired pneumonia[J]. Curr Infect Dis Rep, 2016, 18(5):14. DOI:10.1007/s11908-016-0521-1.
- [5] Meyer Sauter PM, van Rossum AM, Vink C. *Mycoplasma pneumoniae* in children: Carriage, pathogenesis, and antibiotic resistance[J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(30):220-227. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000063.
- [6] Zhang Y, Zhou Y, Li S, et al. The Clinical characteristics and predictors of refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[R]. Sci Rep, 2016, 6: 39929. DOI: 10.1371/journal.pone.0156465.
- [7] Zhou Z, Li X, Chen X, et al. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in adults in Zhejiang, China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(2): 1048-1051. DOI: 10.1128/AAC.04308-14.
- [8] Chen FQ, Yang YZ, Yu LL. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae*: a cause for community-acquired infection among pediatric population[J]. Niger J Clin Pract, 2015, 18(3):354-358. DOI:10.4103/1119-3077.153247.
- [9] Lluch-Senar M, Cozzuto L, Cano J, et al. Comparative -omics in *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals key virulence factors[J]. PLoS One, 2015, 10: e0137354. DOI: 10.1371/journal.pone.0137354.
- [10] 刘杨, 张泓. 肺炎支原体的临床微生物学特征[J]. 中华儿科杂志, 2016, 54(20):89-90. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578-1310.2016.02.003.
- [11] 李少丽, 赵汉青, 孙红妹. 培养法、PCR法和血清学法在检测儿童肺炎支原体感染中的应用比较[J]. 中华微生物和免疫学杂志. 2017, 37(1):73-76.
- [12] 赵汉青, 闫超, 孙红妹, 等. 肺炎支原体快速液体培养法的评价和存在的问题[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2016, 36(7): 517-518. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2016.07.007.
- [13] Wei Li, Yujie Liu, Yun Zhao, et al. Rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia by an immunochromatographic antigen assay[J]. Nature, Scientific Reports, 2015, 5:15539. DOI:10.1038/srep15539.
- [14] Li W, Fang YH, Shen HQ, et al. Evaluation of a real-time method of simultaneous amplification and testing in diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with pneumonia[J]. PLoS One, 2017, 12(5):e0177842. DOI:10.1371/journal.pone.0177842.
- [15] 冯雪莉, 李琴静, 徐保平, 等. RNA 恒温扩增检测技术在儿童肺炎支原体肺炎中的诊断价值评估[J]. 中华实用儿科杂志, 2016, 31(16): 1222-1226. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2016.16.007.
- [16] 白晓晨, 孙红妹. 肺炎支原体血清学抗体检测现状与研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2017, 44(3):147-151. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2017.03.001.
- [17] 郭丽, 孙琳, 郭琰, 等. 肺炎支原体 RNA 检测在儿童肺炎支原体肺炎疗效监测中的应用价值[J]. 中国循证儿科杂志, 2016, 11(2): 109-112. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5501.2016.02.005.
- [18] Lee WJ, Huang EY, Tsai CM. Role of Serum *Mycoplasma pneumoniae* IgA, IgM, and IgG in the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*-related pneumonia in school-age children and adolescents[J]. Clin Vaccine Immunol, 2017, 24(1):e0047116. DOI: 10.1128/CLIN.00471-16.
- [19] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程第四版[M]. 北京:人民教育出版社, 2015:485-486.
- [20] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 儿童肺炎支原体肺炎诊治专家共识(2015版)[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(17): 1304-1308. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-428X.2015.17.006.
- [21] 黎翠翠, 李嵩文, 苗霞, 等. 胶体金法和被动凝集法在肺炎支原体检测中的比较[J]. 实用医学杂志, 2017, 33(12): 2036-2038. DOI:CNKI:SUN:SYYZ.0.2017-12-042.
- [22] Fei Zhao, Liyong Liu, Xiaoxia Tao, et al. Culture-independent detection and genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from Beijing, China[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0141702. DOI:10.1371/journal.pone.0141702.
- [23] 陈倩, 王会中, 郭燕菊, 等. 肺炎支原体实验室检测方法研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(16):3181-3187. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.048.
- [24] Waites KB, Bade DJ, Bebear CM, et al. CISI M43.P. Methods for antimicrobial susceptibility testing of human *Mycoplasmas*, Approved Guideline [S]. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2011.
- [25] Yang HJ, Song DJ, Shim JY, et al. Mechanism of resistance acquisition and treatment of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children[J]. Korean J Pediatr, 2017, 60(60): 167-174. DOI:10.3345/kjp.2017.60.6.167.
- [26] Sun H, Xue G, Yan C, et al. Changes in molecular characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from children in Beijing between 2003 and 2015[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170253. DOI: 10.1371/journal.pone.0170253.
- [27] Lee E, Cho HJ, Hong SJ, et al. Prevalence and clinical manifestations of macrolide resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Korean children[J]. Korean J Pediatr, 2017, 60(5):151-157. DOI:10.3345/kjp.2017.60.5.151.
- [28] Waites KB, Xiao L, Paralanov V. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology[J]. J Mol Diagn, 2012, 14(5):437-450. DOI:10.1016/j.jmoldx.2012.06.001.
- [29] Xu D, Li S, Chen Z, Du L. Reply to "how to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* etiology in a child with pneumonia" [J]. Eur J Pediatr, 2012, 171(3): 595-596. DOI: 10.1007/s00431-011-1594-3.
- [30] 中华医学会儿科学分会呼吸学组. 呼吸道感染协作组. 儿童呼吸道感染微生物检验标本采集转运与检测建议(病毒篇)[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(9):657-662.
- [31] CLSI. H3-A6 guideline: procedure for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture[S]. Wayne, PA: CLSI; 2010.

(收稿日期:2019-01-30)

(本文编辑:武昱)