

酶联免疫吸附法与实时荧光定量聚合酶链式反应 检测不同感染阶段的儿童肺炎支原体感染 样本的性能差异

宫 俐^{1*}, 陈峰光²

(1. 吉林市第七人民医院, 吉林 132013; 2. 吉林市儿童医院, 吉林 132001)

摘要: 目的 对比酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)与实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)法在儿童肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)感染不同病程的性能差异。**方法** 收集 2024 年 1—12 月本院儿科 86 例疑似呼吸道支原体感染患儿血清及痰液样本。按病程分为超早期(≤ 3 d)、早期(4~7 d)、中晚期(> 7 d) 3 组。采用 ELISA 检测血清 MP-免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)/免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)抗体, qPCR 检测痰液 MP-DNA。以临床综合诊断标准为金标准, 评估两种方法的诊断灵敏度、特异性、阳性/阴性预测值及总符合率; 采用 Kappa 检验分析一致性; 通过受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线比较不同病程阶段两种方法的诊断效能。**结果** ELISA 法测定 MP-IgM 与 qPCR 的临床符合率为 82.6%, Kappa 值为 0.618 [95%置信区间(confidence interval, CI): 0.447~0.788]; MP-IgG 的与 qPCR 的总符合率为 62.3%, Kappa 值为 0.201 (95% CI: 0.027~0.376)。经 ROC 曲线比较发现, 中晚期 MP-IgM [敏感性为 90.9%, 特异性为 94.1%, 曲线下面积(area under the curve, AUC)为 0.925]相对于超早期的 AUC 显著升高($P < 0.05$); 中晚期 MP-IgG [敏感性为 63.6%, 特异性为 100.0%, AUC 为 0.818]相对于超早期、早期患儿的 AUC 显著升高($P < 0.05$)。MP-IgM/IgG 与 qPCR 结果一致者多以高热伴湿啰音、呼吸困难或脓痰等下呼吸道感染体征为主, 而结果不一致者则主要表现为刺激性干咳、卡他症状及喘息等上呼吸道特征。**结论** 对于超早期/早期或不典型病例, 建议首选 qPCR 或联合检测以提高检出率; 对于中晚期伴下呼吸道感染症状者, ELISA-IgM 可作为经济快速的筛查手段; ELISA-IgG 因早期诊断价值有限, 建议用于回顾性诊断或流行病学调查。本研究意义旨在为儿童 MP 感染不同病程阶段的精准检测策略选择提供循证依据, 优化临床诊断流程、减少抗生素滥用, 提升不典型病例的检出效率。

关键词: 酶联免疫吸附法; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 肺炎支原体感染; 敏感度; 特异性

0 引言

肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)是儿童社区获得性肺炎的重要病原体, 其快速准确的实验室诊断对临床早期干预和合理用药至关重要^[1]。目前, 实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)与酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是两种最为常用的检测手段, qPCR 具有早

期、高灵敏度的优点^[2]; ELISA 通过检测血清特异性抗体间接反映免疫应答, 且操作简便、成本较低, 通常在 5~7 d 出现抗体阳性^[3]。医学实验室在不同病程与临床表现的儿童感染样本时, 常面临检测策略选择与结果解读不当的困扰^[4]。本研究旨在系统比较 qPCR 与 ELISA 在儿童 MP 感染样本中的检测性能差异, 分析两者在不同发病阶段、不同临床表现及不同抗体类型的诊断效能差异, 进而建立基于病程特点且高效的实验室检测策略, 为优化儿童 MP 感染的诊

断筛查效率提供帮助。

1 材料与方法

1.1 样本来源

收集 2024 年 1—12 月本院儿科 86 例疑似呼吸道 MP 感染患儿血清及痰液样本。纳入标准: (1)符合《儿童社区获得性肺炎诊疗规范(2019 年)》^[5]中呼吸道感染诊断依据, 临床有发热(体温 ≥ 37.5 °C)、咳嗽症状, 可伴喘息; (2)采血前未使用抗生素治疗者; (3)发病病程清楚, 临床表现明确; (4)监护人已签署知情同意书。排除标准: (1)患有先天性免疫缺陷病或长期使用免疫抑制剂; (2)近 1 个月内曾有 MP 感染史; (3)伴严重肝肾功能异常。依据发病病程及临床诊断将患儿分为超早期组(< 3 d, $n=28$)、早期组($3\sim 5$ d, $n=30$)与中晚期组(≥ 5 d, $n=28$)。超早期组男 16 例、女 12 例, 年龄 2~7 岁, 平均年龄(4.05 ± 2.32)岁; 早期组男 18 例、女 12 例, 年龄 2~7 岁, 平均年龄(4.05 ± 2.32)岁; 中晚期组男 13 例、女 15 例, 年龄 2~7 岁, 平均年龄(4.31 ± 2.66)岁; 两组一般资料差异均无统计学意义($P>0.05$), 组间具有可比性。本研究遵循《赫尔辛基宣言》。

1.2 材料与试剂

MP-IgM/IgG 抗体联合检测酶联免疫试剂盒(96T)、MP-P1 蛋白抗原(包被用)、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgM/IgG 抗体、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤液(含 0.05%吐温-20)、MB 底物液、2 mol/L 硫酸终止液(北京万泰生物药业股份有限公司); MP-核酸检测试剂盒(25 人份/盒)、逆转录酶混合液、MP 引物探针混合液、无酶水(上海之江生物科技股份有限公司); 真空采血管(3 mL, 美国 BD 公司); 一次性使用痰液收集器 I 型(25 mL, 江苏耀华医疗器械科技有限公司)。

1.3 仪器与设备

ST16R 高速冷冻离心机(最高转速 15200 r/min, 最大离心力 $25830\times g$, 温度范围 -10 °C至 $+40$ °C)、ABI 7500 实时荧光定量聚合酶链反应核酸扩增(Polymerase chain reaction, PCR 仪)、Multiskan FC 酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 标本采集

患儿入院 24 h 内采用真空采血管采集静脉血, 经离心机离心 3000 r/min 离心 10 min 获得血清, -20 °C保存并于 24 h 内完成 ELISA 检测。同时, 使用痰液收集器采集痰液标本, 4 °C冷藏并于 6 h 内通过实时荧光定量 PCR 仪完成检测。

1.4.2 ELISA 法检测 MP-IgM/IgG 抗体

采用 MP-免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM)/免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)抗体联合检测酶联免疫试剂盒, 操作严格参照说明书。设置空白孔、阴性孔、阳性对照孔。于 405 nm/620 nm 波长条件下对吸光度进行

评测, 并计算抗体含量。将 MP-IgM ≥ 17 U/mL 视为 MP-IgM 阳性, 将 MP-IgM < 13 U/mL 视为 MP-IgM 阴性, 当将 MP-IgM 介于 13~17 U/mL 视为临界区间, 于 7 d 后再次采集血液样本进行复核, 仍为临界值或阴性者视为阴性, 达到阳性标准视为阳性; 将 MP-IgG ≥ 30 U/mL 视为 MP-IgM 阳性, 将 MP-IgG < 20 U/mL 视为 MP-IgG 阴性, 当将 MP-IgG 介于 20~30 U/mL 视为临界区间, 临界区间样本复核方法同 MP-IgM 检测。

1.4.3 qPCR 检测 MP 核酸

采用 MP-核酸检测试剂盒, 搭配荧光定量 PCR 仪完成检测。按试剂盒说明书以磁珠法提取痰液标本总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA), 反应体系设为 25 μ L(含 RNA 模板 5 μ L、逆转录酶混合液 10 μ L、MP 引物探针混合液 5 μ L、无酶水 5 μ L), 扩增条件为 42 °C逆转录 30 min、95 °C预变性 5 min, 后续按 95 °C变性 15 s、60 °C退火延伸 30 s 进行 40 个循环, 结果判读以循环阈(cycle threshold, Ct)值小于等于 38 为阳性, Ct 值大于 38 或无 Ct 值为阴性。

1.5 观察指标

(1) ELISA 与 qPCR 的一致性。收集两种方法所测定患儿 MP 感染情况进行对比。(2)不同病程组间 ELISA 与 qPCR 结果差异。收集超早期、早期、中晚期组 3 组患儿的 ELISA 与 qPCR 结果在敏感性、特异性及受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线下面积(area under the curve, AUC)差异。(3)不同临床表现患儿间 ELISA 与 qPCR 结果差异。根据患儿病史记录收集患儿临床主要症状表现, 即高热、咳嗽(剧烈、干咳)、咳痰、呼吸急促、听诊闻及哮鸣音或湿啰音、卡他症状等或体征, 进行汇总, 并结合患儿 ELISA 与 qPCR 结果, 确定 ELISA 与 qPCR 阳性的核心症状组合。为便于描述, 将 ELISA 法与 qPCR 结果分为符合、不符合 2 大类分析。

1.6 统计学处理

使用 Medcalc 20.217 软件进行统计分析: 计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”描述, 组间比较采用独立样本 t 检验; 计数资料用例(%)表示, 组间比较行 χ^2 检验; 一致性检验采用 Kappa 值(Kappa >0.75 提示一致性较好, 0.4~0.75 为中等, 小于 0.4 则较差), 核心症状组合采用气泡图描述, 临床符合率计算将 ELISA 检验结果与 qPCR 结果一致的样本数, 除以同期总样本数, 再乘以 100%, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 ELISA 与 qPCR 的一致性

ELISA 法测定 MP-IgM 与 qPCR 的临床符合率为 82.6%, Kappa 值为 0.618 [95%置信区间(confidence interval, CI): 0.447~0.788]; MP-IgG 的与 qPCR 的总符合率为 62.3%, Kappa 值为 0.201 (95% CI: 0.027~0.376), 见表 1。

表 1 ELISA 与 qPCR 的一致性

ELISA	qPCR MP 核酸		临床符合率/%	Kappa 值
	阳性(n=34)	阴性(n=52)		
IgM	阳性	22	82.6	0.618
	阴性	12		
IgG	阳性	8	62.3	0.201
	阴性	26		

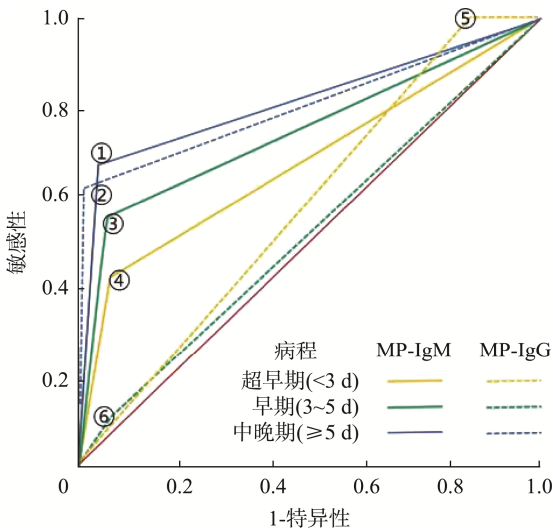
2.2 不同病程组间 ELISA 与 qPCR 结果差异

MP-IgM 在超早期组、早期组、中晚期组敏感性分别为 45.5%、58.3%、90.9%，特异性为 94.1%、94.4%、94.1%，AUC 为 0.698、0.764、0.925。MP-IgG 在超早期组、早期组、中晚期组敏感性为 0.0%、8.3%、63.6%，特异性分别

为 88.2%、94.4%、100.0%，AUC 为 0.441、0.514、0.818。见表 2。经 ROC 曲线成对比较发现，中晚期 MP-IgM 相对于超早期的 ROC 曲线下面积 AUC 显著升高(Z=2.273, P<0.05); 中晚期 MP-IgG 相对于超早期、早期患儿的 AUC 显著升高(Z=3.014、3.341, P<0.05)。见图 1。

表 2 不同病程组间 ELISA 与 qPCR 结果差异(%)

ELISA 法	超早期组			早期组			中晚期组		
	敏感性	特异性	AUC	敏感性	特异性	AUC	敏感性	特异性	AUC
MP-IgM	45.5	94.1	0.698	58.3	94.4	0.764	90.9	94.1	0.925
MP-IgG	0.0	88.2	0.441	8.3	94.4	0.514	63.6	100.0	0.818



注: ①为中晚期 MP-IgM 的 ROC 曲线; ②为中晚期 MP-IgG 的 ROC 曲线; ③为早期 MP-IgM 的 ROC 曲线; ④为早期 MP-IgG 的 ROC 曲线; ⑤为超早期 MP-IgM 的 ROC 曲线; ⑥为超早期 MP-IgG 的 ROC 曲线, ROC 曲线下面积为 AUC。

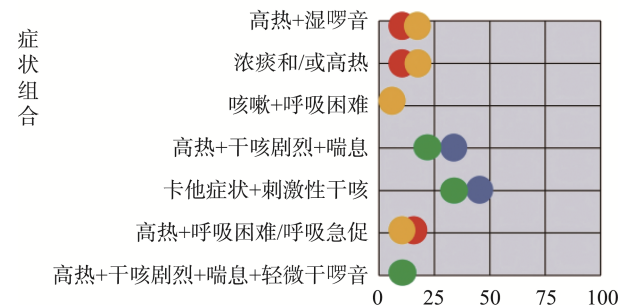
图 1 不同病程患儿的 MP-IgM、MP-IgG 的 ROC 曲线

2.3 不同临床表现患儿间 ELISA 与 qPCR 结果差异

MP-IgM 结果与 qPCR 符合的 71 例中, 主要症状为高热+湿啰音 10 例, 高热+呼吸困难/呼吸急促 13 例, 脓痰和/或高热 10 例, 其余组合均低于 5 例; 不符合的 15 例, 主要

症状为高热+干咳剧烈+喘息 4 例, 卡他症状+刺激性干咳 6 例, 其余组合均为 1 例。MP-IgG 结果与 qPCR 符合的 57 例中, 主要症状为高热+湿啰音 10 例, 高热+呼吸困难/呼吸急促 7 例, 脓痰和/或高热 11 例, 咳嗽+呼吸困难 6 例, 其余组合均低于 5 例; 不符合的 29 例, 主要症状为卡他症状+刺激性干咳 8 例, 高热+干咳剧烈+喘息 7 例, 高热+干咳剧烈+喘息+轻微干啰音 4 例, 卡他症状+刺激性干咳+持续高热 3 例, 其余组合均为 1 例。由图 2 可见, ELISA 与 qPCR 结果在 MP-IgM/IgG 与 qPCR 结果一致者多以高热伴湿啰音、呼吸困难或脓痰等下呼吸道感染体征为主, 不一致者则主要表现为刺激性干咳、卡他症状及喘息等上呼吸道特征。

MP-IgM: 符合 ● MP-IgG: 不符合 ●
MP-IgM: 不符合 ● MP-IgG: 符合 ●



注: 图中圆圈为症状组合在符合/不符合患者中占比。

图 2 符合和不符合患儿的临床症状分布情况

3 讨论与结论

本研究初步发现, ELISA 与 qPCR 核酸检测在儿童 MP 临床感染诊断性能差异, MP-IgM 与 qPCR 具有中等程度的一致性(Kappa=0.618), MP-IgG 一致性较差(Kappa=0.201), 诊断效能随病程进展呈现动态变化。MP 感染后机体免疫应答存在明显的时间窗效应, IgM 抗体通常在感染后 5~7 d 开始产生, 2~3 周达到峰值, IgG 出现更晚且持续时间长; qPCR 可在感染早期即检测到病原体核酸, 不受抗体产生窗口期限制, 故在病程超早期和早期敏感性更高^[6]。此外, 本研究中两种方法结果一致者多表现为下呼吸道感染体征, 提示此时病原体载量高且免疫系统已充分应答^[7-8]; 而不一致者以上呼吸道症状为主, 可能为感染早期或其他病原体混合感染, 此时核酸阳性而抗体阴性, 或抗体假阳性为既往感染。对于高热伴湿啰音、呼吸困难等患儿, ELISA-IgM 属于经济有效筛查手段^[9]; 对刺激性干咳、卡他症状或喘息者, 应优先考虑 qPCR 检测以避免漏诊^[10]。未来应建立基于病程和临床症状表型筛查策略, 避免受患儿临床病程影响导致检验结果的临床诊断准确效能不足问题。

参考文献

[1] 甘泽洪. 实验室快速培养与血清学检验在小儿肺炎支原体感染诊断中的应用[J]. 实验室检测, 2025, 3(24): 60-62.

- [2] 杨泽敏, 唐杏, 卢慧兵, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应与快速培养法在肺炎支原体检验中的应用效果观察[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(14): 102-103.
- [3] 孙娟子, 孙苏娟, 白娇红, 等. 酶联免疫吸附法与冷凝集试验在早期肺炎支原体感染中的诊断比较[J]. 中国医学工程, 2021, 29(6): 15-17.
- [4] 刘冬霞, 张艳芹. 明胶颗粒凝集试验和 RNA 核酸检测技术诊断儿童肺炎支原体肺炎的有效时间窗口[J]. 济宁医学院学报, 2025, 48(4): 335-340.
- [5] 赵顺英, 钱素云, 陈志敏, 等. 儿童肺炎支原体肺炎诊疗指南(2023 年版)[J]. 传染病信息, 2023, 36(4): 291-297.
- [6] 刘朔婕, 逯晓辉, 黄宇. 不同检测方法对学龄前儿童支原体肺炎早期诊断价值比较[J]. 山西卫生健康职业学院学报, 2022, 32(1): 51-53.
- [7] 郑庆藩, 徐嘉鸿, 胡新娅. 2023—2024 年汕头地区儿童呼吸道感染的病原学和流行病学特征分析[J]. 中国妇幼保健, 2025, 40(20): 3766-3771.
- [8] 杜鸿飞, 赵梦川, 张晓双, 等. 2016—2024 年河北省儿童医院呼吸道感染住院患儿肺炎支原体感染的流行病学特征分析[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(9): 1097-1102.
- [9] 张学伶, 尹青琴, 吴喜蓉, 等. 血清肺炎支原体特异性抗体检测对儿童肺炎支原体肺炎诊断价值的 Meta 分析[J]. 现代检验医学杂志, 2025, 40(4): 188-193.
- [10] 朱康, 李芳, 李洪德, 等. 流行季节儿童支气管肺炎支原体感染的临床特点及 CT 分型价值[J]. 医药前沿, 2025, 15(25): 65-68.