

• 经验交流 •

测定双份血清标本的中和抗体滴度在诊断手足口病中的作用

叶春红

(广东省深圳市龙岗区横岗人民医院检验科 518115)

摘要:目的 探讨双份血清标本的中和抗体滴度在手足口病(HFMD)患儿中的诊断价值。方法 参考手足口病预防控制指南(2009 版)中血清学诊断方法,对 986 例患者进行双份血清标本的中和抗体滴度进行检测。结果 986 患者以 1~2 岁年龄居多,不同临床类型 HFMD 患者血清学标本的双份抗体滴度检测结果具有统计学意义差异($P<0.01$)。结论 检测患者急性期血清和恢复期血清中和抗体滴度,方法精确,成本低廉,且具有特异性,值得在临床上推广。

关键词:手足口病; 中和抗体滴度; 肠道病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.044

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2012)11-1370-02

手足口病(HFMD)是由肠道病毒如柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)、肠道病毒 71 型(EV71)等感染引起的疾病,其临床症状主要为四肢末端水疱样皮疹以及口腔黏膜溃疡性疱疹,多见于 6 岁以下的儿童感染。近年来,马来西亚、新加坡、澳大利亚、中国台湾、香港等地不断有暴发流行 HFMD^[1-2],2008 年,安徽省阜阳地区暴发 HFMD,造成 22 人死亡^[3]。2008 年 5 月 2 日卫生部将其纳入丙类法定传染病管理,并制定了相应的诊疗、防控指南^[4-5]。笔者选择 2009~2010 年在本院接受治疗的 HFMD 患者的双份血清标本的中和抗体滴度资料进行分析,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 1 月至 2010 年 1 月经本院临床诊断为 HFMD 的患者血清标本,发病 1~3 d 内采集患者急性期血清,发病后 2~4 周采集恢复期血清,-20℃冻存备检。共计 986 例,女 398 例,男 588 例,患者发病年龄为 0~21 岁,其中 0~1 岁 171 例(17.39%),>1~2 岁 429 例(43.48%),>2~3 岁 150 例(15.22%),>3~4 岁 193 例(19.57%),>4~21 岁 43 例(4.35%)。HFMD 血清学诊断方法参考文献[6]。中和试验采用的病毒株为本实验室分离毒株,细胞株为人横纹肌 RD 细胞。

1.2 方法

1.2.1 攻击病毒细胞微量病变滴定和滴度梯度制备 (1)冻融增殖的病毒悬液 3 次离心分离,温度 4℃,12 000 r/min 离心 10 min 取上清液,用 10 支冻存管分装,每管 1.5 mL。(2)用 10 倍的 Eagle 培养液稀释上述病毒液后,将其加入细胞板,每个稀释度加 4 孔,50 微升/孔。(3)另设(50 μL 稀释液+50 μL 细胞悬液)/孔作为对照组,于 36℃下培养 7 d 后观察细胞的病变情况。(4)参照 Behrens-Kärber 公式计算分离病毒株的 50%的细胞培养液感染剂量(CCID50): $\lg \text{CCID50}(\text{病毒株}) = L - d(S - 0.5)$,L 表示实验中最低稀释度的对数值;d 表示稀释梯度的对数值;S 表示出现细胞病变(CPE)的孔所占比例之和。(5)另取小试管 3 支,分别加入病毒稀释液,每支 0.9 mL。(6)吸取 0.1 mL 已稀释的攻击病毒液(100 CCID50/0.05 mL),置于一支小试管中,混合均匀,以同样的方法将另两支试管稀释为 1、0.1 CCID50/0.05 mL。

1.2.2 稀释血清 (1)取若干支无菌小试管,均置于试管架,每管加入 0.3 mL 血清处理液和 0.1 mL 待测血清(1:4 稀释)后,混合均匀,置于 4℃冰箱保存过夜,次日于 56℃下灭活 30 min。(2)取独立、无菌的 48 孔组织培养板,纵向使用,每孔加入 0.3 mL 血清稀释液。用移液器吸取 0.1 mL 处理好的血清

加入第一孔,再进行倍比稀释,最终稀释度依次为 1:4、1:16、1:64、1:256、1:1 024。每份血清标本、每个稀释度平行两孔,相邻放置。

1.2.3 病毒中和抗体测定 (1)取 1 块 96 孔组织培养板,横向使用,A1~A2、A3~A4、A5~A6、A7~A8、A9~A10 孔中依次加入稀释度为 1:1 024、1:256、1:64、1:16、1:4 的待测血清,每孔 0.05 mL,A11~A12 每孔加入待测血清作为对照孔,最后补加稀释液,每孔 0.05 mL,B~H 孔重复上述操作;(2)分别于上述孔中,加入 0.05 mL 病毒滴度已稀释为 100 CCID50/0.05 mL 的病毒;(3)上盖混匀,置于 CO₂ 孵箱中,36℃孵育 2 h;(4)另取 1 块 96 孔组织培养板,纵向使用,用以核实 100 CCID50/0.05 mL 的病毒滴度。每孔先加 0.05 mL 病毒稀释液,然后从 0.1 CCID50/0.05 mL 加起,加至 100 CCID50/0.05 mL,每孔 0.05 mL,每个稀释度平行做 8 孔;余下 4 孔用作细胞对照,每孔加入 0.1 mL 病毒稀释液,置于 4℃冰箱内保存;(5)孵育期间,使用消化液帮助消化细胞,并准备浓度为 2×10^5 /mL 的细胞悬液,每块 96 孔组织培养板准备超过 10 mL 的量;(6)孵育结束后,于每个待测血清孔、病毒回滴孔、血清对照孔(待检标本板)和细胞对照孔(病毒回滴板)中分别加入细胞悬液,每孔 0.1 mL,用微量板混匀器将其混合均匀,置于 CO₂ 孵箱中,36℃培养孵育;(7)每日用倒置显微镜观察 CPE,记录病毒滴定的结果,终点效价选择不产生 CPE 的血清最高稀释度的倒数。当 100 CCID50/0.05 mL 的病毒对照孔发生完全病变时,可判定最终结果;(8)实验无效的标准为病毒对照结果(病毒回滴)超出 32~320 CCID50/0.05 mL 范围内,需重做。

1.2.4 结果判定 血清标本的中和抗体效价:稀释度选择标准为最高稀释度的血清的 2 孔中有 1 孔出现 CPE,另一孔未出现,取其倒数为效价;若高稀释度 2 孔完全病变,而相邻的低稀释度 2 孔完全不病变,则取两者稀释度平均值的倒数为效价;若两相邻稀释度血清,均只出现 1 孔 CPE,则取两者稀释度平均值的倒数为效价。确诊标准:若较之急性期,恢复期血清 EV71 或 CVA16 的中和抗体滴度出现 4 倍以上(包括 4 倍)增高,可确诊;若较之急性期,恢复期血清其他肠道病毒中和抗体滴度,出现 4 倍以上(包括 4 倍)增高,可证明该肠道受到病毒感染,但需依据其他相关实验确诊;若单份血清的中和抗体滴度比 1:256 大,也具有诊断意义,可疑阳性的标准为血清中和抗体滴度为 1:128。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件,不同类型 HFMD 血清标本的检测结果显示采用多个独立样本非参数检验

分析。

2 结 果

不同临床类型 HFMD 患者血清学标本的双份抗体滴度检测结果见表 1。不同类型检出率具有统计学意义差异($\chi^2=87.989, P<0.01$)。

表 1 986 例临床诊断不同类型 HFMD 血清标本的血清学诊断结果(n)

检测结果	散发重症	散发轻症	聚集性	合计
阳性	248	69	62	399
需重复验证	161	40	43	244
可疑阳性	107	51	47	205
阴性	24	86	48	158
合计	540	246	200	986

3 讨 论

引起 HFMD 的病原体多达二十余种,均为肠道病毒,可引起手、足、口腔等部位疱疹。随着社会不断进步,人们的生活水平普遍提升, HFMD 的发病率也逐年上升。关于 HFMD 的报道,中国始于 1980 年,当时认为 CA16 是引发 HFMD 的单一病原体,但随后的研究使 EV71 的病原学地位逐渐提升^[7-10]。目前,检测患者肠道病毒抗体最常用的方法就是微量板法检测抗体滴度,既精确又具有特异性,通过中和试验来检测患者恢复期血清和急性期血清滴度。中和实验的检测原理:病毒感染敏感靶细胞后,引起细胞形态学变化,出现 CPE,特异性中和抗体与病毒结合后,可使病毒颗粒失去感染性,抑制 CPE 的出现。然而,肠道病毒的隐性感染也很普遍,因此在评价检测结果时要特别注意。

本组 986 例 HFMD 患者中,1~2 岁患者较多,占 43.48%,研究发现,不同临床类型的 HFMD 患者,其血清学标本的双份抗体滴度检测结果差异具有统计学意义($P<0.01$),这可能与病况轻重程度有关,若病况加重,阳性检出率会增加。

• 经验交流 •

血浆 D-二聚体及纤维蛋白原测定在肺部疾病中的临床意义

王 莉

(广西壮族自治区桂林市人民医院检验科 541002)

摘 要:目的 探讨血浆 D-二聚体(DD)及纤维蛋白原(FIB)水平与肺部疾病的关系及其临床意义。方法 对 227 例肺炎、慢性支气管炎、慢性阻塞性肺疾病、急性肺栓塞、肺癌及支气管哮喘患者的血浆 DD 及 FIB 水平进行测定,以 40 例健康者作为对照组,分析 DD 及 FIB 与各肺部疾病的关系。**结果** 肺部疾病各组与对照组 DD 和 FIB 水平比较,差异均有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 凝血及纤溶的异常在肺部疾病发生和发展中起重要的作用,具有一定的临床意义。

关键词:肺疾病; D-二聚体; 纤维蛋白原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.11.045 文献标识码:B 文章编号:1673-4130(2012)11-1371-03

肺部疾病是多由炎症和缺氧等刺激导致肺部组织损伤的一系列疾病,特别是慢性阻塞性肺疾病、急性肺栓塞及肺癌,由于死亡率高,已成为重要的公共卫生问题^[1]。作为体内高凝状态和纤溶亢进的分子标志物之一,D-二聚体(DD)是交联纤维蛋白纤溶酶降解后产生的一种特异性降解物^[2],其水平的增高反映继发性纤溶活性增强。纤维蛋白原(FIB)是凝血系统中唯一的相对分子质量较大的凝血蛋白。血浆中 FIB 水平的增高

在本研究方法中,亦存在需重复验证、可疑、阴性结果,需要借助于临床诊断及其他 HFMD 检测手段进行验证。

综上所述,检测患者急性期血清和恢复期血清中和抗体滴度,方法精确,成本低廉,且具有特异性,在帮助患者确诊的同时,还为患者减轻了经济负担,值得在临床上推广。

参考文献

[1] Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated Enterovirus 71 infection[J]. Pediatr Neurol, 1999, 20(1): 17-23.

[2] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan[J]. New Engl J Med, 1999, 341(13): 929-935.

[3] 万俊峰, 朱理业, 刘红, 等. 阜阳市手足口病(EV71 感染)疫情流行病学分析[J]. 安徽医学, 2008, 29(4): 344-345.

[4] 中华人民共和国卫生部. 肠道病毒(EV71)感染诊疗指南(2008 版)[EB/OL]. [2008-06-20]. <http://www.moh.gov.cn>.

[5] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2009 版)[J]. 全科医学临床与教育, 2010, 8(2): 125-127, 133.

[6] Zheng ZM, He PJ, Caueffield D, et al. Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype E71 BrCr strain but differs in the 5'-noncoding region[J]. J Med Virol, 1995, 47(2): 161-167.

[7] 杨帆, 金奇, 何雅青, 等. 肠道病毒 71 型中国分离株全基因组核苷酸序列分析[J]. 中国科学 C 辑, 2001, 31(2): 163-167.

[8] 陈立, 李秀珠, 张礼璧, 等. 一起引发手足口病流行的肠道病毒 71 型的分子特征[J]. 中国计划免疫, 2003, 9(5): 283-287.

[9] 石旦, 李坤, 史伟峰, 等. 常州地区 2009 年 5~10 月肠道病毒 71 型遗传进化初步分析[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(6): 473-474.

[10] 杨智宏, 朱启镛, 李秀珠, 等. 2002 年上海儿童手足口病病例中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的调查[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(9): 648-652.

(收稿日期:2012-02-13)

会促进血小板聚集,加重血液的高凝状态。本文通过对 227 例肺部疾病患者血浆 DD 和 FIB 的定量检测,以探讨该指标与这些疾病的关系及意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2008~2010 年来本院住院治疗的 227 例患者,其中肺炎患者 64 例[男性 33 例,女性 31 例,年龄 18~61 岁,平均(36.22±11.43)岁],慢性阻塞性肺疾病患者 35 例