

• 检验技术与方法 •

免疫荧光分析法在快速诊断 A、B 型流感病毒中的临床应用

杨静红¹, 韩慧超², 詹伟^{1△}

(1. 罗田县人民医院, 湖北黄冈 438600; 2. 上海星耀医学科技发展有限公司, 上海 200444)

摘要:目的 探讨 Sofia Influenza A+B FIA 检测系统在快速诊断 A、B 型流感病毒中的临床应用价值。方法 获取临床 168 例流感患儿的鼻咽拭子样本, 分别通过 Sofia Influenza A+B FIA 检测系统和胶体金免疫层析(GICA)法分别进行 A、B 型流感病毒检测, 并通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)进行验证。结果 Sofia Influenza A+B FIA 检测系统的阳性检出率为 17.86%(30/168), 高于 GICA 法; 同时, 与 RT-PCR 相比, 对 A 型流感病毒和 B 型流感病毒的灵敏度分别达到 83.3%和 71.4%, 特异性均达到 100.0%。结论 Sofia Influenza A+B FIA 检测系统是一种灵敏度和特异性均较高, 能够快速检测 A、B 型流感病毒的方法。

关键词:流感病毒; 快速诊断; 免疫荧光分析; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.11.044

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)11-1476-03

The Clinical Application in Rapid Diagnosis Flu Virus A and Flu Virus B by Fluorescent Immunoassay Analysis

Yang Jinghong¹, Han Huichao², Zhan Wei^{1△}

(1. People's Hospital of Luotian County, Huanggang, Hubei 438600, China; 2. Shanghai Xingyao Medical Technology Development Co., Ltd., Shanghai 200444, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical application value of Sofia Influenza A+B FIA in detecting flu virus A and flu virus B. **Methods** Flu virus A and flu virus B was detected in 168 samples of nasopharyngeal secretions which collected from children with influenza infection by Sofia Influenza A+B FIA, GICA and RT-PCR methods. **Results** Sofia Influenza A+B FIA positive detection rate was 17.86%(30/168), higher than GICA method. Compared with RT-PCR, its sensitivity and specificity for flu virus A and flu virus B were 83.3%, 100% and 71.4%, 100% respectively. **Conclusion** Sofia Influenza A+B FIA is a rapid clinical application method with high sensitivity and specificity.

Key words: influenza virus; rapid diagnostics test; fluorescent immunoassay analysis; polymerase chain reaction

目前已证实大部分的呼吸道感染是由病毒感染引起的, 呈一定的季节性流行趋势^[1]。许多诊断方法都可以用来检测呼吸道样本中是否存在流感病毒, 例如在细胞培养物中进行病毒分离^[2]、快速抗原检测^[3]、酶联免疫法检测、电镜检测、通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)对流感病毒特定的 RNA 进行检测等^[4]。流感病毒快速诊断试剂使用简便, 以实验室研究为基础, 在床旁检测系统中是非常方便的工具。尽管快速诊断法的灵敏度较低, 临床仍然经常用它来实现流感的快速检测, 帮助确诊临床疑似病例^[5]。如今, 已经有许多商业化的流感病毒快速诊断试剂盒面世^[6]。

胶体金免疫层析(GICA)法是临床应用较为广泛的流感病毒快速诊断方法, 以胶体金作为示踪标志物, 结合免疫层析技术检测鼻咽分泌物标本中的流感病毒抗原。虽然大多数快速诊断试剂都能够特异地检测 A 型和 B 型流感病毒, 但灵敏度远不及 RT-PCR 及病毒培养法高, 无法进行精确的快速诊断^[6]。Sofia Influenza A+B FIA 检测系统将快速诊断试剂与先进的免疫荧光技术(FIA)相结合, 匹配 Sofia 分析仪来检测流感病毒核蛋白。基于 A 型流感病毒和 B 型流感病毒表面抗原的不同, 通过铺染色来增强对 A 型和 B 型流感病毒的敏感性, 灵敏度较高^[7]。

急性呼吸道感染是儿童感染性疾病中最常见的疾病, 本研究采用 GICA 法与 Sofia Influenza A+B FIA 同时检测罗田县人民医院 6 岁以下婴幼儿呼吸道分泌物中的 A 型和 B 型流感病毒抗原, 并以 RT-PCR 方法对检测结果作为参比, 探讨 Sofia

Influenza A+B FIA 检测系统在临床上的实际应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 3 月罗田县人民医院收治的 168 例具有流感疑似症状的患者的鼻咽拭子样本, 取样时间均在患者发病 48 h 以内。患者年龄在 1 个月到 14 岁不等, 其中男童 105 例, 女童 63 例。经鼻咽拭子取样的样本在病毒传递培养基中于 -80℃ 保存备用。

1.2 仪器与试剂 A/B 型流感病毒抗原检测试剂盒(GICA 法)购自杭州艾博生物医药有限公司。Sofia Influenza A+B FIA 与 Sofia 分析仪(配备校准 cassette)、A/B 型流感病毒 RNA 荧光 PCR 检测试剂盒与核酸提取试剂盒均购自上海复星医学科技发展有限公司。

1.3 方法

1.3.1 取样 本研究采用鼻咽拭子、鼻腔吸取物取样, 将拭子紧贴鼻黏膜缓缓深入至鼻咽后部, 旋转或者负压取得分泌物。

1.3.2 Sofia Influenza A+B FIA 检测 将拭子漂洗液加入到试剂瓶中, 轻轻旋转试剂瓶溶解内容物, 挤干其中所有的液体后丢弃拭子, 用试剂盒内固定体积移液器从试剂瓶中取样 120 μL, 并加样至试纸条的样本孔中。采用 Sofia 免疫荧光分析仪对处理好的样本进行检测。

1.3.3 GICA 法检测 在样本抽提管中加入 6 滴(约 192 μL)流感病毒裂解液, 使样本与裂解液完全混合, 按流感病毒检测试剂上箭头所示方向将其插入样本抽提管, 浸入混合液中并开始计时, 进行结果判读。

1.3.4 RT-PCR 检测 在 1.5 mL 离心管中加入 400 μ L 裂解结合缓冲液 B、4 μ L Carrier RNA、200 μ L 样本以及 20 μ L 蛋白酶 K,涡旋振荡 5 s,70 $^{\circ}$ C 金属浴保持 10 min,低速离心数秒。加入 500 μ L 异丙醇,涡旋振荡 5 s,低速离心数秒。取 550 μ L 上述样本裂解溶液加入到核酸纯化柱中,8 000 $\times$ g 离心 1 min,弃滤液;重复 1 次。在核酸纯化柱中加入 500 μ L 清洗缓冲液 W1,8 000 $\times$ g 离心 1 min,弃滤液。在核酸纯化柱中加入 500 μ L 清洗缓冲液 W2,8 000 $\times$ g 离心 1 min,弃滤液;重复 1 次。将核酸纯化柱于 13 000 $\times$ g 离心 10 s,置入一新的 1.5 mL 离心管。在吸附柱硅胶膜中央加入 70 $^{\circ}$ C 预热的洗脱缓冲液 50 μ L,室温静置 1 min。8 000 $\times$ g 离心 1 min,完成 RNA 的提取,设置如下扩增程序:50 $^{\circ}$ C 反应 15 min;95 $^{\circ}$ C 保温 2 min;94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 40 s,循环 50 次;55 $^{\circ}$ C 采集 FAM 荧光通道的信号。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Sofia Influenza A+B FIA 与 GICA 法阳性检出率比较 在 168 例患儿中,Sofia Influenza A+B FIA 检测阳性例数为 30 例,其中 A 型流感病毒 25 例,B 型流感病毒 5 例,阳性检出率为 17.86%(30/168)。GICA 法检测阳性例数为 15 例,其中 A 型流感病毒 13 例,B 型流感病毒 2 例,阳性检出率为 8.93%(15/168),见表 1。Sofia Influenza A+B FIA 的灵敏度高于 GICA 法。

表 1 Sofia Influenza A+B FIA 与 GICA 法检测结果对比(n)

项目	SofiaInfluenza A+B FIA	GICA 法
A 型流感病毒阳性	25	13
B 型流感病毒阳性	5	2
阴性	138	153
总计	168	168

2.3 Sofia Influenza A+B FIA 的灵敏度与特异性验证 本研究采用 RT-PCR 技术对这 168 例样本中的 A 型和 B 型流感病毒进行检测验证,结果显示 Sofia Influenza A+B FIA 对 A 型流感病毒的灵敏度为 83.3%,见表 2。对 B 型流感病毒的灵敏度为 71.4%,见表 3。同时,对 A、B 型流感病毒阴性样本检测的特异性均达到 100.0%。两种方法检测结果比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。可见,Sofia Influenza A+B FIA 的灵敏度和特异性均有较高水平。

表 2 Sofia Influenza A+B FIA 对 A 型流感病毒的检测结果(n)

Sofia Influenza A+B FIA	RT-PCR		合计
	+	-	
+	25	0	25
-	5	138	143
合计	30	138	168

2.4 Sofia Influenza A+B FIA 检测不同年龄组患儿呼吸道病毒的感染情况 将 168 例样本按患儿年龄进行分组,通过 χ^2 检验,发现不同年龄组患儿的感染率不同,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 4。其中 6 个月以下婴儿的感染率较高,达 24.0%(18/75),感染率随年龄的增长呈现逐渐降低的趋势。3

岁以上患儿的感染率相对较低,为 12.5%(3/24)。

表 3 Sofia Influenza A+B FIA 对 B 型流感病毒的检测结果(n)

Sofia Influenza A+B FIA	RT-PCR		合计
	+	-	
+	5	0	5
-	2	161	163
合计	7	161	168

表 4 Sofia Influenza A+B FIA 检测不同年龄组患儿流感病毒的感染情况

年龄	n	A、B 型流感病毒阳性例数(n)	检出率(%)
< 6 个月	75	18	24.0
6 个月至 3 岁	69	9	13.0
>3 岁	24	3	12.5
合计	168	30	17.8

3 讨 论

近年研究表明,婴幼儿急性呼吸道感染多由病毒引起。医院往往因为不能及时进行病原体检测,经验用药造成抗菌药物滥用等严重问题^[8]。因此,呼吸道病毒的快速诊断对指导临床治疗具有重要意义,快速、有效地进行床旁检测并给临床判断提供依据,减少了实验室检测环节,缩短了患者的住院时间^[9]。目前,通过商业手段可以获得多种快速检测试剂,使用最为广泛的是通过 GICA 法检测流感病毒抗原。大多数快速检测试剂能够快速并特异地检测 A 型和 B 型流感病毒,但是灵敏度往往远低于 RT-PCR 或者病毒培养法^[6,9]。

GICA 是以胶体金为示踪标记物的抗原检测技术,操作简便,适用于临床检测,但其灵敏度相对较低^[10]。而 RT-PCR 法虽然灵敏度高,但成本较高,对实验室要求也比较高。Sofia Influenza A+B FIA 检测系统采用横向流动的免疫测试技术检测 A 型和 B 型流感病毒的核蛋白抗原,配合 Sofia 免疫荧光分析仪,在 15 min 内便可完成检测。除了具有客观的数据读取功能之外,Sofia 分析仪还可与实验室信息系统相连接,更为快速、精确地报告结果^[11]。作为新引进的一种快速检测流感病毒的方法,目前地区还没有关于该方法特性的报道。

本研究发现,Sofia 在检测季节性流感病毒中具有相对较高的灵敏度,利用 Sofia Influenza A+B FIA 与 GICA 法同时对 168 例疑似流感患儿进行检测,结果显示:Sofia Influenza A+B FIA 的阳性检出率为 17.8%(30/168),GICA 法的阳性检出率为 8.93%(15/168),可见 Sofia Influenza A+B FIA 的灵敏度远高于 GICA 法。与 RT-PCR 法检测结果相比,Sofia Influenza A+B FIA 对 A、B 型流感病毒的灵敏度分别为 83.3%和 71.4%,对阴性样本检测的特异性均达到 100.0%,与 RT-PCR 法检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。可见,Sofia Influenza A+B FIA 具有相对较高的灵敏度和特异性,与报道的结果相一致。同时,本研究对不同年龄阶段的患儿进行分析发现,不同年龄组患儿的流感病毒感染率不同($P<0.05$),其中 6 个月以下婴儿的感染率较高,达 24.0%(18/75),感染率随年龄的增长而逐渐降低,可能与婴儿时期细胞免疫功能低下有关。提示临床要及时监控该时期内免疫力低下的患儿的病情。

综上所述,作为新兴快速诊断方法,Sofia(下转第 1481 页)

表 1 仪器法和试管法血型检测结果对比

方法	A 型(n)	B 型(n)	O 型(n)	AB 型(n)	Rh 阳性(n)	Rh 阴性(n)	符合率(%)
试管法	623	498	862	317	2 295	5	100.00
仪器法	621	498	861	317	2 295	5	99.87

3 讨 论

ABO 血型系统是人类血型系统中最重要血型系统,在临床输血工作中占有极其重要的地位,ABO 定型错误将严重影响输血工作的正常开展,只有 ABO 血型鉴定正确才能保障输血的有效性和安全性。

试管法鉴定 ABO 血型操作简单,对仪器要求相对较低,简便快速,但该实验对离心时间及离心速度要求较高,观察结果时须立即记录观察结果,但在临床检测过程中由于离心时间及速度不当,操作者粗心加错样本、结果判读错误等因素会导致结果鉴定错误。此外某些引起血型抗原减弱的疾病可能会导致患者血型抗原水平下降不易被检出,部分受检者抗体效价较低也会导致血型难以检出。戴安娜全自动血型/配血系统能将所有样本血型卡、试剂、稀释液和测试细胞均用条码识别录入仪器数据库,实现了血型鉴定、交叉配血过程中加样、离心、结果判读、数据保存与查询的自动化、标准化^[3-5],在节省人力的同时最大限度地减少了工作人员间的操作差异和失误对检测结果的影响。

交叉配血是检测患者与献血员血液间是否有相应的抗原抗体的试验,其目的是检测出不相配合的血液及发现有临床意义的不规则抗体^[6]。交叉配血是输血治疗前的必检项目,是临床安全输血的重要保障。聚凝胺配血法是通过中和红细胞表面的负电荷,缩短红细胞之间的距离引起红细胞的非特异性凝聚,促进红细胞抗原与相应的抗体结合,此方法对于结果的观察是从凝集到凝集消失的过程,对弱凝集的标本由于用力振摇或放置时间稍长凝集也会消失^[7],因此对试管振摇的力度和解聚的时间需要严格掌握,此方法快速简便,假阳性少,因此适用于急诊抢救时进行交叉配血。微柱凝胶法交叉配血实验方法简单,易于批量操作,结果明确可靠,反应灵敏^[8-9],工作程序和

结果判定易于标准化、自动化,重复性好,可减少标记,避免错误,判读结果不受人为因素的影响,可将结果输入电脑长期保存。在工作中输血科工作人员应将微柱凝胶配血法和聚凝胺配血两种方法结合应用,以微柱凝胶配血为主,聚凝胺用于复检和急诊的配血,提高工作效率和质量,保证输血安全。

参考文献

[1] Schoenfeld H, Pretzel KJ, Von Heymann C, et al. Validation of a hospital-laboratory workstation for immunohematologic methods [J]. Transfusion, 2010, 50(1): 26-31.

[2] 肖星甫. 输血技术手册[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1992: 156-162.

[3] 宋建, 彭涛, 李翠莹, 等. 全自动血型及配血分析系统的应用[J]. 中国输血杂志, 2011, 24(1): 60-61

[4] 周筱嫣, 向东, 徐忠, 等. ABO 血型自动化检测[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(3): 205-206.

[5] 武泽, 刘亚玲. 微柱凝胶技术在血型免疫学相关检测中的应用进展[J]. 临床血液学杂志, 2008, 21(2): 101-104.

[6] 邹海虹, 甘福生. 凝聚胺发在交叉配血试验中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(22): 2889-2891.

[7] 尚霞, 杭海. 微柱凝胶与凝聚胺交叉配血试验比较[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(13): 1699-1700.

[8] 杜海燕, 吴涛, 安恒奇, 等. 全自动配血系统在新生儿交叉配血中的应用[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(7): 504-505.

[9] 涂茹, 陶翠华. ORTHOAutoVueInnova 全自动血型仪在血型检测中的应用[J]. 临床血液学杂志, 2012, 25(2): 68-69.

(收稿日期: 2014-01-25)

(上接第 1477 页)

Influenza A+B FIA 具有相对较高的灵敏度, 不需要进行多步验证实验, 减少了不必要的实验消耗; 操作方便快捷, 检测结果准确、客观, 值得在临床推广使用。医生可以根据病患需求选择使用, 做到早发现, 早治疗, 根据检测结果配合临床针对性地用药, 对减少抗菌药物滥用具有重要意义。

参考文献

[1] Leonardi GP, Mitrache I, Pigal A, et al. Public hospital-based laboratory experience during an outbreak of pandemic influenza A (H1N1) virus infections[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1189-1194.

[2] Bakerman P, Balasuriya L, Fried O, et al. Direct fluorescent-antibody testing followed by culture for diagnosis of 2009 H1N1 influenza A[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3673-3674.

[3] Gavin PJ, Thomson Jr RB. Review of rapid diagnostic tests for influenza[J]. Clin App Immunol Rev, 2004, 4(3): 151-172.

[4] Berg B, Newton D, LeBar W. Comparison of direct fluorescent antibody staining and real-time reverse transcriptase PCR for the detection of novel 2009 influenza A (H1N1) in nasopharyngeal samples[J]. J Clin Virol, 2011, 52(1): 65-66.

[5] Hurt AC, Alexander R, Hibbert J, et al. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens [J]. J Clin Virol, 2007, 39(2): 132-135.

[6] Uyeki TM, Prasad R, Vukotich C, et al. Low sensitivity of rapid diagnostic test for influenza[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(9): e89-e92.

[7] Lee CK, Cho CH, Woo MK, et al. Evaluation of Sofia fluorescent immunoassay analyzer for influenza A/B virus[J]. J Clin Virol, 2012, 55(3): 239-243.

[8] Rath B, Tief F, Obermeier P, et al. Early detection of influenza A and B infection in infants and children using conventional and fluorescence-based rapid testing[J]. J Clin Virol, 2012, 55(4): 329-333.

[9] Beck ET, Jurgens LA, Kehl SC, et al. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin[J]. J Mol Diagn, 2010, 12(1): 74-81.

[10] Bucher DJ, Mikhail A, Popple S, et al. Rapid detection of type A influenza viruses with monoclonal antibodies to the M protein (M1) by enzyme-linked immunosorbent assay and time-resolved fluoroimmunoassay[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(11): 2484-2488.

[11] Lewandrowski K, Tamerius J, Menegus M, et al. Detection of influenza A and B viruses with the sofia analyzer[J]. Am J Clin Pathol, 2013, 139(5): 684-689.

(收稿日期: 2014-01-12)