

· 论 著 ·

直接免疫荧光法快速检测甲型流感病毒抗原的临床意义*

刘玉兰¹, 何凤屏^{1△}, 肖 芸¹, 马占忠¹, 管振祺¹, 郭艳乐¹, 肖 捷¹, 候红梅¹, 杨玉婷²

(1. 广东省韶关市粤北人民医院 512026; 2. 上海星耀医药有限公司 200444)

摘要:目的 探讨直接免疫荧光法快速检测早期甲型流感病毒抗原及其临床应用。方法 选择临床上诊断为急性呼吸道感染入院的患儿,采集标本 200 例,将其分为两组:冬春两季流行季节儿童组(100 例)和夏秋两季非流感流行期间儿童组(100 例),使用美国 D3 Ultra 甲型流感病毒抗原检测试剂,采用荧光标记的单克隆抗体对感冒患者进行甲型流感病毒抗原检测。结果 在冬春两季流感流行期间,100 例儿童检测有 8 例阳性,阳性率为 8%;在夏秋两季非流感流行期间 100 例儿童检测有 2 例阳性,阳性率为 2%;两组阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 运用直接免疫荧光法快速检测甲型流感病毒抗原是一种经济、高效、快速、特异的检测方法,能指导临床快速诊断,合理用药。

关键词:甲型流感病毒; 直接免疫荧光; 抗原; 儿童

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2234-02

Clinical significance of direct immunofluorescence assay for rapidly detecting influenza A virus antigen*

LIU Yulan¹, HE Fengping^{1△}, XIAO Yun¹, MA Zhanzhong¹, GUAN Zhenqi¹,GUO Yanle¹, XIAO Jie¹, HOU Hongmei¹, YANG Yuting²

(1. Yuebei People's Hospital, Shaoguan, Guangdong 512026, China; 2. Shanghai Xingyao

Pharmaceutical Co. Ltd., Shanghai 200444, China)

Abstract: Objective To study the direct immunofluorescence method for rapidly detecting influenza A virus antigen and its clinical application. **Methods** The inpatients with clinically diagnosed acute respiratory tract infection were selected. Two hundred samples were collected and divided into two groups: the winter and spring epidemic seasons children group and the summer and autumn non-epidemic seasons children group, 100 cases in each group. The US D3 Ultra influenza A virus antigen detection reagent was used. The fluorescence labeled monoclonal antibody was adopted to detect influenza A virus antigen in the patients with cold. **Results** During the winter and spring seasons of influenza prevalence, 8 cases of 100 detected cases were positive with the positive rate of 8%; during the summer and autumn seasons of non-influenza prevalence, 2 cases of 100 cases were positive with positive rate of 2%, the difference in the positive rate between the two groups had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** Applying the direct immunofluorescence method for rapidly detecting influenza A virus antigen is an economical, efficient, rapid and specific detection method, and can guide clinical rapid diagnosis and rational medication.

Key words: influenza A virus; direct immunofluorescence; antigen; children

呼吸道病毒是指一大类能侵犯呼吸道引起呼吸道局部病变或仅以呼吸道为侵入门户,主要引起呼吸道外组织器官病变的病毒。目前已证明儿童 95% 的急性上呼吸道感染和大部分下呼吸道感染是由细菌以外的病原体引起的,其中病毒感染最为常见。呼吸道感染的病毒病原学因不同国家、不同省市和地区、不同年份、季节和年龄等而异。近年来随着各种抗生素的广泛应用,呼吸道细菌感染有所降低,而呼吸道病毒感染呈上升趋势^[1]。国内目前对于呼吸道病毒诊断的方法和技术还落后于发达国家,从病发到确诊往往需要一周左右的时间从而错过了治疗的最佳时间。采用免疫荧光抗原检测既能实现在呼吸道病毒感染的初始阶段进行特异性诊断,又可以避免病毒分离培养费时费力的缺点,因此是对呼吸道病毒进行检测的理想方法^[2]。本文分析直接免疫荧光法用于甲型流感抗原的快速检测,该研究对粤北人民医院 2013 年和 2014 年两年间分别在春、夏、秋、冬季节住院的 200 例呼吸道感染患儿的呼吸道病

毒采用直接免疫荧光法进行快速检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013~2014 年粤北人民医院呼吸道感染住院患儿 200 例,由患者的病史、X 线片以及辅助检查等结果以及原卫生部颁发的《甲型 H1N1 流感诊疗方案及诊断标准(2010 年版)》^[3]中规定的呼吸道感染诊断标准得到确诊。其中男 120 例、女 80 例,年龄 0~12 岁。按照入院的季节将其分为两组:冬春两季流行季节儿童组(100 例)和夏秋两季非流感流行期间儿童组(100 例)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 由专职人员将一次性采样导管经鼻腔插入 7~8 cm 到达鼻咽部,通过负压诱导吸取 1.0~2.0 mL 分泌物置于 10~15 mL 放入微生物转运液的试管中,避免混入唾液及奶液而影响检出率,标本 2 h 内送检。

1.2.2 标本处理及制片 用漩涡混匀器打散黏液,2 500 r/

* 基金项目:广东省韶关市科技计划项目(2013CX/K199)。

作者简介:刘玉兰,女,主管技师,主要从事检验医学工作。△ 通讯作者,E-mail:fengphe@hotmail.com。

min 离心 10 min, 弃去上清液(用于病毒分离鉴定), 留约 100~150 μL , 吸管吹打混匀, 形成混浊细胞悬浮液。将标本点样在载玻片上(15~20 μL), 用电吹风机冷风下风干 10~15 min 至干燥, 浸没在冷丙酮中固定 10 min, 取出晾干。

1.2.3 标本反应及观察 每个标本分别加 D3 试剂一滴(25 μL), 必须完全覆盖待测标本。将载玻片放在湿盒中置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 15~30 min。载玻片用 PBS 冲洗一遍, 然后浸没在 PBS 中洗两遍(PBS 不能重复使用)。在载玻片中央加一滴封闭液, 盖上盖玻片, 在荧光显微镜下观察。

1.2.4 结果判断 200 倍显微镜下每视野找到 ≥ 2 个绿色荧光细胞即为阳性, 否则为阴性。阴性细胞被 Evans Blue 染成红色。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 计数资料以率表示, 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 甲型流感病毒阳性结果 FITC 标记的病毒特异性抗体和细胞中相应的抗原结合后, 形成抗原抗体复合物, 在荧光显微镜下细胞内呈黄绿色荧光, 该细胞称为阳性细胞, 见图 1。而未发生抗原抗体特异性反应的细胞被 Evans Blue 染成红色, 见图 2。

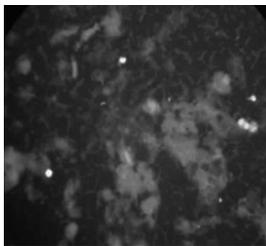


图 1 甲型流感病毒阳性结果

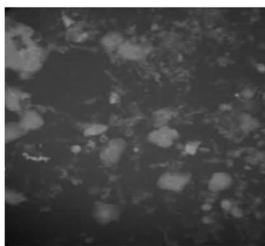


图 2 甲型流感病毒阴性结果

2.2 不同季节两组儿童甲型流感病毒感染情况 冬春两季流感流行期间, 100 例儿童检测有 8 例阳性, 阳性率为 8%; 在夏秋两季非流感流行期间 100 例儿童检测有 2 例阳性, 阳性率为 2%; 两组阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

在病毒流行季节, 根据患儿的年龄和临床表现, 不难作出病毒感染诊断, 但特异性病因学诊断对临床预后、传播方式、防治措施、危重患儿的监护及合理用药十分重要。甲型流感病毒又称 A 型流感病毒, 在动物中广为分布, 能造成世界流感大流行, 病毒感染免疫力较弱的儿童时会引起较严重的症状, 如肺炎或是心肺衰竭等^[4-5]。血清学检查是目前应用较广泛的感染性疾病检测方法, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中是否存在针对呼吸道病毒的特异性抗体, 作为呼吸道感染诊断的依据, 但病毒特异性抗体通常在病毒感染一周以后方能在血液中被检测到, 因此难以实现对病毒感染的早期及时诊断。在甲型流感病毒流行季节, 快速、准确检测出该病毒感染能及时指导临床治疗, 为合理选用抗病毒、抗细菌药物提供依据, 从而能避免严重并发症的出现。目前临床甲型流感病毒有多种方法, 但均存在一定的局限性^[6]。电镜可检测病毒颗粒, 但操作复杂、昂贵, 不适用于临床快速诊断; 病毒分离培养被称为

“金标准”, 但费时、耗力, 标本内病毒数量少时会出现假阴性。病毒核酸检测应用杂交或 PCR 技术, 通过检测病毒特异性核酸来发现相关病毒; 此法灵敏度高, 能进行微量检测, 但实验条件严格, 容易出现假阳性或假阴性^[7]。本文采用荧光标记的单克隆抗体对感冒患儿进行甲型流感病毒抗原检测, 结果判断以见到 ≥ 2 个完整细胞内有明亮的黄绿色荧光为阳性, 整个实验到发出报告可以在 3 h 内完成, 而设备只需要荧光显微镜, 在普通实验室即可开展, 有效地保证了快速出具诊断结果, 满足临床对治疗时效性的要求。

在冬春两季流感流行期间, 本文所检测的甲型流感病毒感染患儿阳性率为 8%, 夏秋两季非流感流行期间阳性率为 2%, 可见不同季节儿童感染甲型流感病毒的情况也有所不同, 冬春两季的感染率高于夏秋两季($P < 0.05$), 说明冬春两季是甲型流感病毒感染的好发季节^[8-9]。该病毒感染患儿时会引起较严重的症状, 早期快速检测病原体能为临床提供病原学资料, 及时对症治疗, 缩短病程。运用直接免疫荧光法快速检测甲型流感病毒抗原是一种经济、高效、快速、特异的检测方法^[10], 能指导临床快速诊断, 合理用药。

参考文献

- [1] 李军伟, 孙南叶, 王慧晶. 流感病毒快速检测法对甲型 H1N1 流感的临床诊断价值[J]. 当代医学, 2013, 19(12): 83.
- [2] 赖晓亚, 栗燕. 直接免疫荧光抗体法和血清 IgM 检测呼吸道病毒的比较[J]. 中外妇儿健康, 2011, 19(3): 6-7.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案: 2010 年版[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2010.
- [4] 黄一伟, 高立冬, 李芳彩, 等. 湖南省甲型 H1N1 流行性感冒大流行后乙型流行性感冒病毒的特征[J]. 中华传染病杂志, 2012, 30(6): 334-338.
- [5] 李忠, 刘倜, 林艺, 等. 2009 年山东省四起甲型 H1N1 流行性感冒样病例暴发疫情病原学分析[J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(12): 1069-1074.
- [6] 马建敏. 流感病毒分离的主要影响因素分析[J]. 河南预防医学杂志, 2015, 26(4): 244-245.
- [7] Deng J, Ma Z, Huang W, et al. Respiratory virus multiplex RT-PCR assay sensitivities and influence factors in hospitalized children with lower respiratory tract infections[J]. Virol Sin, 2013, 28(2): 97-102.
- [8] Liu Q, Lu L, Sun Z, et al. Genomic signature and protein sequence analysis of a novel influenza A(H7N9) virus that causes an outbreak in humans in China[J]. Microbes Infect, 2013, 15(6/7): 432-439.
- [9] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 甲型 H1N1 流感病毒临床实验室诊断策略[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(2): 19-22.
- [10] 李剑鸿. 直接免疫荧光法用于多种呼吸道病毒抗原的快速检测分析[J]. 中外医疗, 2013, 32(22): 15-16.