

• 临床研究 •

# 直接免疫荧光法检测儿童呼吸道病毒抗原的结果分析

杨 泉, 席金瓯<sup>△</sup>

(湖北省妇幼保健院检验科, 武汉 430000)

**摘要:**目的 评价直接免疫荧光法对儿童呼吸道病毒抗原的诊断价值,并探讨儿童呼吸道病毒的流行特征。方法 用直接免疫荧光法检测 6 282 例住院儿童呼吸道分泌物中呼吸道合胞病毒(RSV),流感病毒 A 型(FLUA),流感病毒 B(FLUB),副流感病毒 1 型(PIV1),副流感病毒 2 型(PIV2),副流感病毒 3 型(PIV3)和腺病毒(ADV)7 种呼吸道病毒。结果 6 282 例标本中病毒阳性检出 835 例,总阳性率 13.29%;其中 RSV 最高,阳性率 8.83%;其次是 PIV3,阳性率 2.80%;冬季发病较高,夏季最少。0~6 个月的幼儿发病率较高。结论 直接免疫荧光法简单、快速,可用于儿童呼吸道病毒感染的早期诊断。

**关键词:**呼吸道感染; 儿童; 呼吸道病毒; 直接免疫荧光

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.053

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)16-2331-03

呼吸道感染是常见感染性疾病,目前证明大部分是由病毒感染引起,呼吸道感染以空气或飞沫形式传播。病毒种类繁多,症状相似,临床上很难鉴别<sup>[1]</sup>,因此快速鉴别呼吸道病毒抗原对儿童呼吸道感染的早期诊断、治疗和预后有十分重要的意义。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 1~12 月在湖北省妇幼保健院儿科住院的呼吸道感染患儿共 6 282 例,其中男 3 451 例、女 2 831 例,年龄 0~12 岁。春季 1 651 例,夏季 1 289 例,秋季 1 544 例,冬季 1 798 例。0~6 个月 1 342 例,>6 个月至 1 岁 1 621 例,>1~3 岁 1 852 例,>3 岁 1 467 例。

**1.2 仪器与试剂** 荧光显微镜由日本 Olympus 公司生产,检测试剂盒由美国的 Diagnostic Huybrids. INC 公司生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集** 使用无菌的 8# 婴儿输液软管收集鼻咽抽吸液,该软管与一次性的抽吸液采集管和抽液装置相连接,在患者处于仰卧体位时,将 1~2 mL 生理盐水注入患者鼻腔然后吸出。抽吸液和灌洗液应用等体积的运输培养基在装有无菌玻璃珠的离心管中稀释。

**1.3.2 细胞涂片制备** 剧烈漩涡标本 10~15 s,(400~600)×g 离心 5~10 min,收集上清液并将其另置,用于病毒分离,加入 5 mL 的 1×PBS,剧烈涡旋 10~15 s,(400~600)×g 离心 5~10 min,并弃去上清液,重复数次,将沉淀加入 0.5~1 mL 的 1×PBS 液,剧烈涡旋 15 s 后在 8 孔的玻片上每孔分别加入 25 μL 标本悬浮液,将这些孔完全风干,冷丙酮固定。

**1.3.3 直接标本检测** 分别加一滴各种呼吸道病毒的荧光试剂于 8 孔对应的孔中,留一孔作为阴性,对于呼吸道抗原对照玻片分别加入一滴各种呼吸道病毒的荧光试剂于已标示的对应孔中,一起进行直接免疫荧光检测。

**1.4 原理** 采用荧光素直接标记的针对呼吸道病毒的特异性单克隆抗体,对呼吸道病毒进行快速检测和鉴定。该试剂盒包括 1 瓶呼吸道病毒荧光试剂,含有 FITC 标记的分别针对呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒(ADV)、副流感病毒 1~3 型(PIV

1、2、3)、流感病毒 A 型(FLUA)、流感病毒 B 型(FLUB)的单克隆抗体混合物。另有分别含有针对相应病毒的单克隆抗体,该试剂盒可直接对标本或细胞进行检测。用于检测的细胞来自于临床标本,用丙酮固定载体上,呼吸道病毒荧光试剂被加于其上以检测是否有呼吸道病毒抗原存在。在 35~37 ℃ 孵育后,用洗涤液进行洗涤,然后加上封固液,用盖玻片覆于其上。最后用荧光显微镜进行观察。病毒感染的细胞被染上绿色荧光,未感染上的细胞无荧光但会染上红色。如标本中有感染的细胞,则进一步用各种针对不同病毒的荧光试剂进行检测,以鉴定其感染的病毒种类。如果直接对标本检测未发现荧光标记的细胞并且所有细胞都被染成红色,将标本进行细胞培养并用呼吸道病毒荧光试剂复检。如果观察到阳性结果,再按照上述步骤进行鉴定检测,将细胞用丙酮固定于载体上,分别将各种针对不同病毒的荧光试剂加于其上,在 35~37 ℃ 孵育后,用洗涤液进行洗涤。然后加一滴封固液,用盖玻片覆于其上,最后用荧光显微镜进行观察。病毒感染的细胞被染上绿色荧光,这样可以确定待检的呼吸道病毒的种类。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据处理,计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 病毒检出率** 6 282 例患儿中检出呼吸道病毒感染 835 例,总阳性率为 13.29%,其中 RSV 最高(8.83%,555/6 282),其次 PIV3(2.8%,176/6 282)、FLUA(0.7%,44/6 282)、ADV(0.35%,22/6 282)、FLUB(0.25%,16/6 282)、PIV1(0.24%,15/6 282)、PIV2(0.11%,7/6 282)。不同季节各类病原体检出率比较见表 1。冬季发病最高(19.9%),其次是春季发病(13.45%)、秋季发病(9.84%),夏季发病最少(7.91%)。冬、春季增高,夏、秋季降低。

**2.2 不同年龄各类病原体检出率比较** 0~6 个月发病率最高(20.86%),其次>1~3 岁(14.63%)和>6 个月至 1 岁(13.51%),>3 岁的最低(4.43%)。见表 2。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:xijinou@sina.com。

| 表 1 不同季节各类儿童呼吸道病毒检测率[n(％)] |       |          |            |          |          |          |         |           |            |
|----------------------------|-------|----------|------------|----------|----------|----------|---------|-----------|------------|
| 季节                         | n     | ADV      | RSV        | FLUA     | FLUB     | PIV1     | PIV2    | PIV3      | 合计         |
| 春季                         | 1 651 | 5(0.30)  | 151(9.14)  | 0(0.00)  | 3(0.20)  | 2(0.12)  | 4(0.24) | 57(3.45)  | 222(13.45) |
| 夏季                         | 1 289 | 4(0.31)  | 11(0.85)   | 4(0.31)  | 0(0.00)  | 6(0.47)  | 3(0.23) | 74(5.74)  | 102(7.91)  |
| 秋季                         | 1 544 | 6(0.39)  | 109(7.06)  | 0(0.00)  | 0(0.00)  | 3(0.19)  | 0(0.00) | 34(2.20)  | 152(9.84)  |
| 冬季                         | 1 798 | 7(0.39)  | 284(15.79) | 40(2.24) | 13(0.72) | 4(0.22)  | 0(0.00) | 11(0.61)  | 359(19.90) |
| 合计                         | 6 282 | 22(0.35) | 555(8.83)  | 44(0.70) | 16(0.25) | 15(0.24) | 7(0.11) | 176(2.80) | 835(13.29) |

| 表 2 不同年龄各类儿童呼吸道病毒检测率[n(％)] |       |          |            |          |          |          |         |           |            |
|----------------------------|-------|----------|------------|----------|----------|----------|---------|-----------|------------|
| 年龄                         | n     | ADV      | RSV        | FLUA     | FLUB     | PIV1     | PIV2    | PIV3      | 合计         |
| 0~6 个月                     | 1 342 | 8(0.60)  | 220(16.39) | 6(0.45)  | 2(0.15)  | 6(0.45)  | 3(0.22) | 35(2.61)  | 280(20.86) |
| >6 个月至 1 岁                 | 1 621 | 6(0.37)  | 123(7.59)  | 4(0.25)  | 4(0.25)  | 3(0.19)  | 3(0.19) | 72(4.44)  | 219(13.51) |
| >1~3 岁                     | 1 852 | 5(0.27)  | 185(9.99)  | 15(0.81) | 10(0.54) | 4(0.21)  | 0(0.00) | 52(2.81)  | 271(14.63) |
| >3 岁                       | 1 467 | 3(0.20)  | 27(1.84)   | 19(1.29) | 0(0.00)  | 2(0.14)  | 1(0.06) | 13(0.88)  | 65(4.43)   |
| 合计                         | 6 282 | 22(0.35) | 555(8.83)  | 44(0.70) | 16(0.25) | 15(0.24) | 7(0.11) | 176(2.80) | 835(13.29) |

3 讨 论

急性呼吸道感染是导致发展中国家儿童住院及死亡的常见疾病,RSV、FLUA、FLUB、PIV1、PIV2、PIV3、ADV 感染是多发急性呼吸道感染的常见原因<sup>[2]</sup>。在诊断是否有细菌引起的呼吸道感染中,病毒检测变得越来越重要,采用荧光标记的单克隆抗体对直接抗原标本进行检测是病毒实验室的标准检测方法。呼吸道感染常为季节性的,流感病毒典型的流行期为冬季和春季,ADV 常发于晚冬至早夏,RSV 好发于早春和冬季,PIV 则在全年都有可能发生。因此进行早期快速的呼吸道病毒检测十分重要。有研究证明呼吸道病毒抗原检测阳性结果的患者接受抗菌药物治疗的时间明显缩短,这样既可以减少抗菌药物的使用,又使住院时间缩短<sup>[3-4]</sup>。

目前诊断呼吸道感染的方法较多。传统方法为电镜检测病毒颗粒,但阳性率低,诊断时间较长,且电镜难以在临床实验室普及;病毒分离培养过去常作为“金标准”,但费时、费力、要求高,很难常规普及;碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶(AP-PAAP)侨联酶标法,操作步骤繁杂易出现非特异性着色,阳性结果难以判断;血清学方法由于特异性抗体产生慢、滴度低。分子检测是呼吸道病毒检测的新标准,分子方法(如 PCR 技术)的灵敏度比组织培养方法高 12%~30%,但 PCR 技术实验要求高,易污染<sup>[5]</sup>。寻求一种快速、简便的检测方法对儿童呼吸道感染的早期诊断有重要的意义。因此本研究用直接免疫荧光法检测儿童呼吸道病毒抗原,结果显示,病毒检出 835 例,总阳性率 13.29%,检出率低于国内外大多数地区,如广州 69.7%<sup>[6]</sup>,常州 25.93%<sup>[7]</sup>,厦门 42.5%<sup>[8]</sup>,可能本院是妇幼保健院病例较多的原因。其中 RSV 最高占总阳性 8.8%,RSV 是武汉地区的重要病原体,与国内外相关报道一致。RSV 是儿童下呼吸道感染最常见的病毒体,婴幼儿最高,通常在冬春季流行<sup>[9]</sup>。其次是 PIV3 占总阳性数的 2.8%,ADV 却不是武汉地区的主要感染原因。冬季发病较高,RSV 检出 284 例(15.79%)最高,其次为 FLUA 检出 40 例(2.24%);夏季 RSV 检出 11 例(0.85%)最少,PIV3 检出 74 例(5.74%)最高。武汉地区冬季阴冷,早晚温差大,是儿童呼吸道感染的高发

季节,0~6 个月的幼儿发病率较高,婴幼儿检测率高可能与婴幼儿期细胞免疫功能尚未完成,气道分泌物中缺少分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)有关,且血清中母体抗体降低,而自身产生的 IgG 水平不高有关<sup>[10]</sup>。这个阶段的幼儿免疫系统较弱,呼吸道黏膜还没有发育健全,较易发生感染。因此本研究用直接免疫荧光检测儿童呼吸道病毒抗原,方法简便、快速,为保证质量,在每次染色时,都同时需对一片未使用过的呼吸道病毒抗原对照玻璃片进行染色,以保证结果的可靠性。该方法准确可靠,值得推广,对儿童呼吸道感染用药具有指导作用,同时能监督并预测可能传播的病毒亚型,以指导疫苗的生产。

参考文献

[1] 侯云德. 急性呼吸道病毒感染的病原学和防治[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005:6-10.

[2] Detection WR. Pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 39(3):275-278.

[3] Byington CL, Castillo H, Gerber K, et al. The effect of rapid respiratory viral diagnostic testing on antibiotic use in a children's hospital[J]. Arch Pediatr Adolesc Med, 2002, 156(12):1230-1234.

[4] Rocholl C, Gerber K, Daly J, et al. Adenoviral infections in children: the impact of rapid diagnosis [J]. Pediatrics, 2004, 113(1 Pt1):e51-e56.

[5] 许琴,金涛,林素香,等. 直接免疫荧光法检测儿童多种呼吸道病毒抗原的临床应用[J]. 中国临床研究, 2014, 27(7):868-870.

[6] 朱美华,周志刚,温红艳,等. 广州地区儿童呼吸道感染流行情况及混合感染调查[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(18):2951-2955.

[7] 黄志英,程宝金,林红,等. 3483 例儿童急性呼吸道感染病病原学分析[J]. 儿科科学杂志, 2014, 20(8):38-40.

[8] 戴淑惠,任小英. 直接免疫荧光法对儿童呼吸道感染

病原学检测的临床意义[J]. 中国医药指南, 2014, 6(16): 147-148.

[9] 周长江. 呼吸道合胞病毒感染流行病学研究[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(4): 425-426.

[10] 王莉佳, 刘恩梅, 赵晓东. 重庆医科大学儿童医院急性呼吸窘迫综合征病原学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2005, 20(12): 735-737.

(收稿日期: 2016-03-27 修回日期: 2016-06-20)

• 临床研究 •

# 碳青霉烯类非敏感肠杆菌的耐药性与基因型研究

杜任生, 庾永基, 肖伟明

(广州市花都区第二人民医院检验科 510850)

**摘要:**目的 研究碳青霉烯类非敏感肠杆菌的耐药性与基因型。方法 自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月采集碳青霉烯类非敏感肠杆菌共计 110 株, 选用 K-B 纸片分析细菌对药物有无敏感性, 采用改良后的 Hodge 试验分析碳青霉烯细菌在临床上的使用反应。测试菌株耐药基因对 BLAST 对比(局部序列比对)与 PCR、DNA 进行分析测试。结果 测试出替加环素中介 11 株和耐药 4 株(黏质沙雷菌、产气肠杆菌 2 株)。110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌对头孢噻肟和阿莫西林/克拉维酸耐药率最高, 头孢他啶、四环素、复方磺胺甲噁唑、亚胺培南、厄他培南、环丙沙星、氨基曲南等耐药率均为 64.9%~88.4%; 而妥布霉素、阿米卡星、呋喃妥因、头孢吡肟耐药率较低, 为 16.6%~40.1%; 敏感率增高的为替加环素、米诺环素, 分别为 82.0% 和 86.6%。研究发现 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌当中, 检测出 blaSHV-12、blaCTX-M-15、ESBLs、blaCTX-M-33 等基因。在 110 株碳青霉烯细菌当中还检测出 1 株黏质沙雷菌, 基因型号为 blaKPC-2; 改良后的 Hodge 试验 77 株阳性, 检出率为 70%。36 株(32.7%) ESBLs 呈阳性, 5 株阴沟肠杆菌(blaIMP-26)与 1 株产气肠杆菌(blaVIM-2)基因、31 株大肠埃希菌。结论 碳青霉烯类肠杆菌的基因型主要有 blaKPC-2 基因、blaIMP-26 基因、blaVIM-2 基因。药敏结果显示碳青霉烯类肠杆菌科细菌对米诺环素和替加环素敏感率增高, 临床用药时可根据患者病情进行合理选择, 以达到控制感染的效果。

**关键词:**碳青霉烯类抗菌药物; 耐药性; 基因型; 肠杆菌

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.054 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)16-2333-02

近几年随着科技不断发展, 临床上应用广谱  $\beta$ -内酰胺酶与 Amp C 酶的肠杆菌科细菌越来越广泛, 对广谱  $\beta$ -内酰胺酶使用率也是不断增加。由于临床上经常使用碳青霉烯类抗菌药物进行抗菌治疗, 随着时间推移, 造成临床使用抗感染药物的困难逐年上升。目前, 碳青霉烯类肠杆菌被国内外学者广泛关注<sup>[1-4]</sup>。为进一步研究碳青霉烯类肠杆菌基因型情况, 采集本院感染菌株 110 株, 分析碳青霉烯类肠杆菌抗耐药性与基因型。

## 1 材料与与方法

**1.1 菌株** 自 2013 年 6 月至 2014 年 6 月收集本院临床标本当中分离的碳青霉烯类非敏感肠杆菌共 110 株, 其中黏质沙雷菌 10 株、布氏柠檬酸杆菌 1 株、阴沟肠杆菌 20 株、大肠埃希菌 62 株、气肠杆菌 14 株、奇异变形杆菌 1 株、摩根摩根菌 2 株, 实验过程中亚胺培南与厄他培南只要出现上述两种或两种以上细菌耐药即为非敏感菌株。产 IMP-4 型酶、KPC-2 型酶肺炎克雷伯菌、TEM-5 型、肺炎克雷伯菌 ATCC700603 酶肺炎克雷伯菌、IMI-1 型酶阴沟肠杆菌、SHV-3 型酶。

**1.2 试剂与仪器** 血琼脂平板、M-H 肉汤、血液增菌培养基、M-H 琼脂均为杭州天微生物公司生产。PCR 检测试剂盒为北京天根公司生产。阿米卡星、环丙沙星、头孢西丁、头孢噻肟、头孢他啶/克拉维酸、阿莫西林/克拉维酸、妥布霉素、四环素、头孢噻肟/克拉维酸、维酸头孢他啶、氨基曲南、亚胺培南、米诺环素、药敏纸片头孢吡肟、呋喃妥因、替加环素、复方磺胺甲噁唑, 以上产品均为上海生工公司生产。本次使用的 VITEK-33 全自动微生物分析仪为 SP1000 PCR 扩增仪, Tanon1600 凝胶成像系统以及 DYY-III 电泳仪。三羟甲基氨基甲烷(Tris)、溴化乙

锭和琼脂糖、乙二胺四乙酸(EDTA)使用试剂盒均由上海天能公司生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 鉴定细菌及药敏试验** 本次采用菌株经 VITEK-32 全自动微生物分析仪进行鉴定, 根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)使用 K-B 纸片检测菌株的药物敏感性<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 检测碳青霉烯** 本次检测 KPC-2 型酶肺炎克雷伯菌显示为阳性对照株, 按照 GLSI 标准进行改良的 Hodge 试验。

**1.3.3 扩增产物测序及 DNA 序列分析** 本文的扩增引物根据文献[6-8]设计, 委托上海生工公司合成。本次检测 PCR 扩增产物使用 ABI-PRISM3730 仪器进行测试, 对检测出的 Gen-Bank 与 BLAST 数据进行分析, 试剂使用配套试剂, 操作过程完全按照仪器和试剂的说明书进行。

**1.3.4 ESBLs 检测** 使用 2013 年版 CLSI 推荐的纸片法表型确证试验<sup>[5]</sup>。

## 2 结果

**2.1 药敏试验结果** 实验数据显示, 本次测试出替加环素中介 11 株和耐药 4 株(黏质沙雷菌、产气肠杆菌 2 株)。本次试验耐药率为 93.9%, 显示 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌对与头孢噻肟和阿莫西林/克拉维酸耐药率最高, 头孢他啶、四环素、复方磺胺甲噁唑、亚胺培南、厄他培南、环丙沙星、氨基曲南等耐药率均为 64.9%~88.4%; 而妥布霉素、阿米卡星、呋喃妥因、头孢吡肟耐药率较低, 为 16.6%~40.1%; 敏感率增高的为替加环素、米诺环素, 分别为 82.0% 和 86.6%。

**2.2 ESBLs 与 MHT 检测结果** 本次从 110 株碳青霉烯类非敏感肠杆菌细菌当中测出产碳青霉烯酶细菌 77 株(70%)、阴