

· 论 著 ·

武汉市流感病毒流行特征及检测方法的比较*

盛鄂湘, 陈良君, 段勇威, 李一荣[△]

武汉大学中南医院检验科, 湖北武汉 430061

摘要:目的 探讨武汉市甲、乙型流感病毒的流行特征, 通过比较巢式 PCR 和胶体金法检测对流感病毒的检出情况, 评价后者能否为临床流感样患者的流感初筛和诊断提供快速有效的方法。方法 采集 2017—2019 年武汉市流感样患者的鼻咽拭子, 进行胶体金法检测, 分析该地区甲、乙型流感病毒的流行病学特征; 同时选取其中 600 份样本, 进行巢式 PCR 检测复核结果。结果 2017—2019 年, 各年份中甲型流感、乙型流感、混合感染检出率比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 流感呈季节性; 流感患者中 18 岁以下的人群所占比例较高($P < 0.05$); 巢式 PCR 和胶体金法的一致性检验显示, $Kappa = 0.40$, 二者一致性一般。结论 胶体金法检测简便快速, 能较好地满足对于临床标本初筛的要求, 但其检测的灵敏度和特异度仍待提高。

关键词: 流感病毒; 流行特征; 快速抗原检测; 巢式 PCR 检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.013

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)04-0444-04

文献标志码: A

Comparison of epidemic characteristics and detection methods of influenza virus in Wuhan area*

SHENG E'xiang, CHEN Liangjun, DUAN Yongwei, LI Yirong[△]

Department of Clinical Laboratory, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Hubei 430061, China

Abstract: Objective To investigate the epidemiological characteristics of influenza in Wuhan, and compare the consistency between the rapid antigen detection and nested PCR to verify whether the sensitivity and specificity of the former provide an effective method for the diagnosis of clinical influenza-like patients. **Methods** Collected the nasopharyngeal swabs from patients with flu-like symptoms from 2017 to 2019, and then colloidal gold method was used to test the samples. The epidemiological characteristics of influenza A and B viruses in the area were analyzed, meanwhile 600 samples were selected to be rechecked by nested PCR. **Results** From 2017 to 2019, there were statistically significant differences in the detection rates of influenza A, B and mixed infection in each year ($P < 0.05$); influenza was seasonal; the proportion of influenza patients under 18 years old was higher than the other age groups ($P < 0.05$); the consistency test of nested PCR and colloidal gold method showed that $Kappa = 0.40$, the consistency was general. **Conclusion** Colloidal gold method is convenient and rapid, which can meet the requirements of clinical samples screening, but its sensitivity and specificity still need to be improved.

Key words: influenza virus; epidemiology; rapid antigen detection; nested PCR detection

流感病毒是引起急性呼吸道感染的主要病原体之一, 具有传播途径广, 传染性强, 极易引起局部流行和暴发大流行等特点。流感病毒属于正黏病毒科, 为单股、负链、分节段的 RNA 病毒。根据核蛋白和基质蛋白的不同, 流感病毒可以分为甲、乙、丙、丁 4 个型别^[1]。人感染流感病毒严重者可导致病毒性肺炎、多脏器功能损伤、呼吸衰竭甚至死亡。流感的流行具有明显的季节性, 中国的流感疫情暴发主要集中在秋冬

季节, 南方地区是流感样病例的高发地区^[2]。

目前人类无法有效地防控流感的流行, 也缺乏可靠的预警、预测手段。每一次流感的大流行, 都会对人类健康构成严重威胁和给社会造成巨大的经济损失^[3]。因此, 应进一步加大流感监测力度, 密切关注流感病毒的变异及活动状态^[4]。目前, 流感患者的临床症状缺乏特异性, 一般以轻症感染为主, 但也可为重症并导致患者住院甚至死亡^[5], 临床医生仅凭临床

* 基金项目: 武汉大学自主科研项目(2042018kf0058)。

作者简介: 盛鄂湘, 女, 技师, 主要从事临床微生物学的研究。 [△] 通信作者, E-mail: liyirong838@163.com。

本文引用格式: 盛鄂湘, 陈良君, 段勇威, 等. 武汉市流感病毒流行特征及检测方法的比较[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(4): 444-446.

表现难以确诊,所以实验室病原学检测成为流感的主要诊断依据。流感病毒的检测方法有病毒的分离培养、血清学检测和病毒快速检测,应用了免疫学和基因检测技术。病毒的分离培养是流感诊断的金标准,常依赖于鸡胚接种,是流感实验室诊断中高度灵敏、准确的方法之一,但鸡胚接种分离周期长,分离效率低^[6]。血清学方法是检测流感病毒特异性抗体最常用的方法,如血凝抑制试验(HAI),但灵敏度难以令人满意^[7]。胶体金法快速检测是利用抗原抗体反应,然后用胶体金结合物标记达到检测的目的;其优点是快速、简便,大大缩短了检测时间;灵敏、准确,结果受外界因素影响较少;安全简便,不需任何仪器和设备;成本低廉,所需时间和样本量少^[8];但不能检测病毒亚型。临床上大多用此方法来初步快速筛查流感患者。PCR 技术可以从核酸水平检测病毒,具有高灵敏度、特异度和较高的检出率,检测标本用量少,在病毒感染诊断中发挥着重要作用。

本研究对武汉市甲型流感(以下简称“甲流”)、乙型流感(以下简称“乙流”)的流行病学特征进行了分析;选取 600 份经流感病毒胶体金法检测的标本,然后用巢式 PCR 来进行结果复核,旨在评价胶体金法检测的灵敏度和特异度能否满足流感患者初筛或诊断的要求。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据《全国流感监测方案(2010 年版)》中流感样病例的定义:发热(体温 $\geq 38\text{ }^{\circ}\text{C}$),伴咳嗽或咽痛者,将 2017—2019 年因流感样症状于本院就诊的患者共 60 944 例纳入研究,采集患者的鼻咽拭子标本,在检验科门诊进行流感病毒胶体金法检测;选取其中的 600 份样本,采用巢式 PCR 检测对结果进行复核。

1.2 方法

1.2.1 咽拭子标本的采集和保存 将拭子从口腔完全插入咽喉中,以咽喉壁,上颚扁桃的发红部位为中心,适度用力擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁,避免触及

舌部。采集完拭子后,迅速将其放入采样管(内含 3~4 mL 标本保存液)中,弃去尾部,旋紧管盖并密封,保存至 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

1.2.2 流感病毒胶体金法检测 应用广州万孚生物技术股份有限公司生产的甲/乙型流感病毒抗原检测试剂盒(胶体金法)对甲/乙型流感病毒抗原进行检测,严格按照试剂盒检测说明书进行操作并在有效期内使用。

1.2.3 流感病毒的巢式 PCR 检测 采用美国 TRIzol 即用型试剂提取咽拭子标本的核酸,按照实验室标准操作流程进行。以武汉大学基础医学院病毒研究所实验室提供的特异性引物和扩增条件进行第一轮扩增:引物序列,上游为 GAYCCNCCNTACAGC-CATGG,下游为 AYCCTCTNATTTGCATYCC-NGG;扩增条件如下, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s(36 个循环), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。第二轮扩增:引物序列,上游为 ACNGGNTAYAC-NATGGACACRGT,下游为 PB1_679R CCTC-TYTCNGCRTCYTTNGTCAT;扩增条件如下, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s(36 个循环), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min。制备 1%琼脂糖凝胶,取 5 μL 第二轮扩增产物,在 120 U 的电压下,电泳 20 min,在 526 bp 对应区段出现阳性条带者为检测阳性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 Kappa 一致性检验分析两种方法的一致性:若 Kappa 为 0.0~<0.20,则一致性极低;若 Kappa 为 0.20~0.40,则一致性一般;若 Kappa 为 $>0.40\sim 0.60$,则一致性中等;若 Kappa 为 $>0.60\sim 0.80$,则一致性高;若 Kappa 为 $>0.80\sim 1.00$,则几乎完全一致。

2 结果

2.1 2017—2019 年流感病毒检测的总体情况 2017—2019 年,各年份中甲流、乙流、混合感染检出率比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 武汉市 2017—2019 年流感病毒的流行情况[n(%)]

年份	n	流感合计	甲流	乙流	混合感染	χ^2	P
2017 年	10 292	2 323(22.6)	1 319(12.8)	956(9.3)	48(0.5)	1 197.12	<0.001
2018 年	13 647	2 620(19.2)	2 068(15.2)	529(3.9)	23(0.2)	3 886.46	<0.001
2019 年	37 005	8 045(21.7)	6 147(16.6)	1 794(4.8)	104(0.3)	7 815.94	<0.001

2.2 流感病毒检出例数在不同月份的分布特点

2017 年的检出高峰为 8 月、9 月和 12 月;2018 年的检出高峰为 12 月、1 月和 2 月;2019 年与 2017 和 2018 年比较,检测总例数增加,从而各月份的检出例数有所增

加,且检出高峰集中在 1 月、2 月和 12 月;见图 2。

2.3 不同年龄患者的流感病毒感染情况 6 岁以下及 6~18 岁的人群的流感病毒检出率较高,分别为 24.53%和 27.26%,各年龄段之间比较,差异有统计

学意义 ($\chi^2 = 1\,490.85, P < 0.05$), 见表 2。

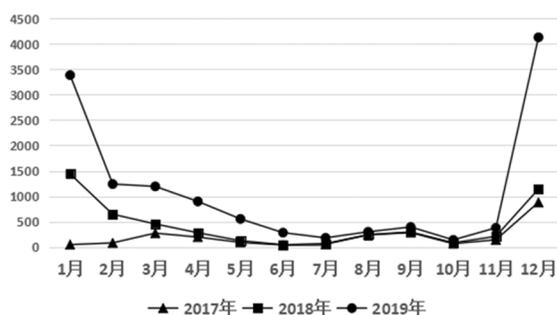


图 2 2017—2019 年流感病毒检出例数在不同月份的分布情况

表 2 2017—2019 年不同年龄段患者的流感病毒检出率

年龄	总数(n)	阳性(n)	检出率(%)
<6 岁	27 794	6 819	24.53
6~18 岁	14 662	3 997	27.26
>18~45 岁	13 437	1 603	11.83
>45 岁	5 051	569	11.27

2.4 流感病毒胶体金法和巢式 PCR 检测结果的比较 选取 2018 年 1 月份采集的 600 份流感样病例的标本, 采用巢式 PCR 检测进行复核。两种方法一致性检验的 Kappa 系数为 0.40, 一致性一般。见表 3。

表 3 胶体金法与巢式 PCR 检测的结果

胶体金法	巢式 PCR 阳性	巢式 PCR 阴性	合计
阳性	137	53	190
阴性	118	292	410
合计	255	345	600

3 讨 论

流行性感胃是由于流感病毒感染人或动物, 导致其急性发病的一类以上呼吸道症状为特点的疾病。参与流感病毒复制的 RNA 聚合酶没有校正功能, 所以流感病毒会频繁地出现基因突变。流感病毒具有节段分布的结构特点, 易导致基因重组, 亦称抗原漂移^[9], 这种变异易发生于甲型流感病毒, 导致产生新的病毒亚型, 人类历史上多次流感流行或暴发均与其相关^[10]。乙型流感病毒只有一种型别, 病毒变异少, 其感染者为散发病例。本研究中, 甲流检出率高于乙流, 混合感染的检出率最低。流感病毒的流行具有明显的季节性, 北方流行均发生在冬春季, 而南方大部分发生在秋冬季或夏季^[11]。本研究中, 流感也具有季节流行性。

流感病毒的易感人群为老年人、儿童、慢性病人, 以及免疫功能受到抑制者^[12]。本研究对不同年龄段人群的病毒感染情况的分析表明, 阳性患者中 18 岁以下的人群所占比例最高, 特别是 6 岁以下的婴幼儿,

为流感病毒的主要传播对象; 而 45 岁以上的中年和老年人所占比例较低。这可能与就诊习惯有关, 婴幼儿和青少年以发热和上呼吸道感染症状作为初始就诊原因的比例较高, 较易筛查出流感病例, 而中年人和老年人则以其他主诉症状为就诊原因的居多。对儿童和有基础疾病的老年人均应加强防护措施, 及时接种疫苗, 预防流感。

流感病毒感染者的症状不明显, 临床诊断主要依赖于实验室检测, 可引起人类呼吸道感染的病毒有 200 余种, 因此检测试剂和方法的灵敏度和特异度对临床诊断尤为重要。巢式 PCR 的检测具有高特异度, 和定量 PCR 相比, 灵敏度提高了, 可以减少假阴性结果的出现, 有助于临床治疗^[13]。而流感病毒快速检测试剂具有操作简单、快捷, 分析结果清楚、易于判断, 且不需要任何仪器、成本低廉等优点, 非常适用于临床大量标本的初筛^[14]。本研究中, 胶体金法和巢式 PCR 检测结果的一致性一般, 具有较高的灵敏度和特异度。假阴性出现的原因可能为胶体金法检测依赖于抗原的表达, 病毒感染初期和后期受自身免疫系统清除的影响, 抗原的表达量低, 未达到试剂盒的检测限。当临床流感症状明显而胶体金法检测阴性时, 应进一步检测。出现假阳性的原因可能是包被的病毒抗体纯化不够, 导致其和非特异性病毒发生交叉反应。本课题组后续还将胶体金法检测结果为假阴性的 118 例样本送去测序, 发现其中 80.95% 为甲型 H1N1, 1.20% 为甲型 H3N2, 14.29% 为甲型 H5N6, 3.60% 为乙型流感, 表明漏检的样本主要是甲流 H1N1, 为临床医生提供了一定的判断依据, 同时本研究中发现巢式 PCR 检测存在一定的污染, 应注重实验人员的操作技能和专业培训。

流感的发生具有明显的季节性, 发病率具有上升的趋势, 好发于秋冬季, 应加强流感病毒变异的监测和防控。6 岁以下的婴幼儿是流感的高发和易感人群, 应及时接种疫苗, 加强管理。胶体金法检测操作快速、简便, 能基本满足对临床大量标本进行初筛和诊断的要求, 但还应不断提高灵敏度和特异度, 为流感病毒的早期、准确筛查提供更有效的帮助。

参考文献

[1] JAKUBCOVA L, VOZAROVA M, HOLLY J, et al. Biological properties of influenza A virus mutants with amino acid substitutions in the HA2 glycoprotein of the HA1/HA2 interaction region[J]. J Gen Virol, 2019, 100(9): 1282-1292.

[2] 刘丽军, 杨静, 祝菲, 等. 2017—2018 年中国流感样病例暴发疫情分析[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(10): 982-986.

- [10] DAMMERMANN W, POLYWKA S, DETTMANN I, et al. Autoantibodies against "rods and rings"-related IMP-DH2 in hepatitis C genotype 1 and DAA therapy in a "real life" cohort [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2017, 206(5):379-382.
- [11] ALBERTI M L, PAULIN F, TOLEDO H M, et al. Undifferentiated connective tissue disease and interstitial lung disease: trying to define patterns [J]. *Reumatol Clin*, 2018, 14(2):75-80.
- [12] AGGARWAL R, DHILLON N, FERTIG N, et al. A negative antinuclear antibody does not indicate autoantibody negativity in myositis: role of anticytoplasmic antibody as a screening test for antisynthetase syndrome [J]. *J Rheumatol*, 2017, 44(2):223-229.
- [13] PRAPINJUMRUNE C, PRUCKTRAKUL C, SOOKTONGLARNG T, et al. Serum antinuclear antibody in adult Thais [J]. *Gerodontology*, 2017, 34(1):86-89.
- [14] MINAMIYAMA S, UEDA S, NAKASHIMA R, et al. Thigh muscle MRI findings in myopathy associated with anti-mitochondrial antibody [J]. *Muscle Nerve*, 2020, 61(1):81-87.
- [15] BECKER Y, MARCOUX G, ALLAEYS I, et al. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus target mitochondrial RNA [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1026.
- [16] 周仁芳, 王勇, 曾爱平, 等. 17 例抗高尔基抗体阳性患者的临床特点 [J]. *中华临床免疫与变态反应杂志*, 2014, 8(4):273-277.
- [17] FUJITA Y, OHAMA E, TAKATAMA M, et al. Fragmentation of golgi apparatus of nigral neurons with alpha-synuclein-positive inclusions in patients with Parkinson's disease [J]. *Acta Neuropathol*, 2006, 112(3):261-265.
- [18] MA L, ZENG A, CHEN Y, et al. Anti-golgi antibodies: prevalence and disease association in Chinese population [J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 496:121-124.
- [19] ZHANG L, ZHAI J, WANG L, et al. The value of anti-rods and rings antibodies in Western China population: a retrospective study [J]. *Scand J Immunol*, 2020, 91(3):e12848.
- [20] KEPPEKE G D, CALISE S J, CHAN E K L, et al. Ribavirin induces widespread accumulation of IMP dehydrogenase into rods/rings structures in multiple major mouse organs [J]. *Antiviral Res*, 2019, 162(1):130-135.
- [21] DA SILVA SACERDOTE A B, FILGUEIRA N A, DE BARROS BARRETO S, et al. Long-term persistence of anti-rods and rings antibodies in patients with chronic hepatitis C after antiviral treatment [J]. *Immunol Res*, 2018, 66(5):605-610.
- [22] DHAOUADI T, ABDELLATIF J, JALLOULI M, et al. Association of autoantibody to rods and rings with hepatitis C outcome and viral load [J]. *Viral Immunol*, 2019, 32(5):214-220.
- [23] MOISEEV S, NOVIKOV P, BULANOV N, et al. Assessing cardiovascular risk in patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: comment on the article by wallace et al [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2020, 72(1):200-201.
- [24] OATES T, SALAMA A D. Epigenetic modifications in ANCA-associated vasculitis: potential for insights into disease pathogenesis and prediction of outcome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(4):1011-1013.

(收稿日期:2020-04-02 修回日期:2020-09-11)

(上接第 446 页)

- [3] ALEXANDER D J. An overview of the epidemiology of avian influenza [J]. *Vaccine*, 2007, 25(30):5637-5644.
- [4] 刘振荣, 李兰艳, 刘丹, 等. 2011—2015 年河北省唐山市流行性感冒流行特征分析及防控策略研究 [J]. *医学动物防制*, 2017, 33(9):937-939.
- [5] 张奕, 潘阳, 赵佳琛, 等. 2016—2018 年北京市流行性感冒住院病例的流行病学和临床特征分析 [J]. *疾病监测*, 2019, 34(7):626-629.
- [6] 范东瀛, 陈俊英, 张新文, 等. 流感病毒在不同细胞中适宜培养条件的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(6):510-512.
- [7] 王江, 徐轶, 陈俊峰, 等. 流感病毒实验室检测方法研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(2):308-312.
- [8] 白洁. 流感病毒快速检测法在甲型 H1N1 流感诊断中的应用 [J]. *心血管外科杂志*, 2019, 8(1):96-97.
- [9] 杨先知, 崔大伟, 谢国良, 等. 杭州市 2013—2014 年流感暴发流行期甲型流感病毒 H3N2 亚型基因特性分析 [J]. *临床检验杂志*, 2015, 33(8):586-590.
- [10] 黎毅敏, 杨子峰. 流行性感 冒 诊 断 与 治 疗 指 南 (2011 年 版) 解 读 [J]. *中国实用内科杂志*, 2012, 32(2):105-108.
- [11] 梁筱露, 白海涛, 苏喆, 等. 圆形分布法分析北海市流行性感冒的季节性和长期趋势 [J]. *现代预防医学*, 2015, 42(8):1383-1385.
- [12] 王甲楠. 流行性感冒(流感)的预防机制及控制措施分析 [J]. *中国医药指南*, 2019, 17(5):151-152.
- [13] GUO J Q, LIN H, KANTARJIAN H, et al. Comparison of competitive-nested PCR and real-time PCR in detecting BCR-ABL fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients [J]. *Leukemia*, 2002, 16(12):2447-2453.
- [14] 贾宁, 闫中强, 刘刚, 等. 免疫渗滤与胶体金快速检测在筛查甲型流感中诊断效率分析 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(10):2267-2269.

(收稿日期:2020-04-16 修回日期:2020-10-17)