

· 实验研究 ·

一起由流感病毒引起的呼吸道疫情的实验室检测结果分析

石伟先 彭晓旻 丁丽新 王小梅 卢桂兰 高婷 董振英 吴疆

【中图分类号】R511.7 【文献标识码】B 【文章编号】1006-2483(2005)04-0055-02

2004 年 12 月 23 日,北京市崇文区某中学报告该校某班发生集体发热疫情,该班共有学生 56 人,3 天内发热 38℃ 以上有 12 人,发病年龄为 13 岁,临床症状表现为发热 38℃ ~39.5℃,咽痛、干咳、乏力、头痛、头晕。北京市疾病预防控制中心传染病地方病控制所对崇文区疾病预防控制中心送检的咽拭子标本,采用多种方法进行了呼吸道多病原检测及流感病毒相关检测,确认是一起由流感病毒引起的集体发热疫情,现将实验室检测结果分析如下。

1 材料与方法

1.1 材料 2004 年 12 月 23 日共采集 8 例患者咽拭子各 5 ml,冷藏送检。标本运送液为 MEM 培养基加入 2 000 μ/mL 青霉素、2 000 μ/mL 链霉素,无法于 24 小时内接种 MDCK 细胞的储存于 -80℃ 保存。

1.2 呼吸道多病原 ELISA 法检测 采用德国赛润公司产呼吸道合胞病毒、肺炎支原体、甲型和乙型流感病毒病原检测试剂盒,严格按试剂盒说明书进行操作及判断结果。

1.3 流感病毒酶免法快速检测试纸条 采用美国产 Quick-View 试纸条。

1.4 流感病毒巢式 RT-PCR 检测

1.4.1 引物由上海博亚公司合成,具体如下。

名称 (型别)	序列	目的片段长度 (bp)
AH1F1	CAGATGCAGACACAATATGT	
AH1R1	AAACCGGCAATGGCTCCAAA	1015
AH1F2	ATAGGCTACCATGCGAACAA	
AH1R2	CTTAGTCCTGTAACCATCCT	944
AH3F1	CAGATTGAAGTGACTAATGC	
AH3R1	GTTTCTCTGGTACATTCCGC	833
AH3F2	AGCAAAGCTTTTCAGCAACTG	
AH3R2	GCTTCCATTTGGAGTGATGC	591
BHF1	GTGACTGGTGTGATACCACT	
BHR1	TGTTTTACCCATATTGGGC	900
BHF2	CATTTTGCAAATCTCAAAGC	
BHR2	TGGAGGCAATCTGCTTACC	767

1.4.2 核酸提取 采用德国 QIAGEN 公司产 Mini Viral RNAeasy 提取试剂盒,按试剂盒说明书操作。

1.4.3 RT-PCR 反应 以 AMV 酶(Promega 公司产)合成 cDNA,产物进行第一轮 PCR,扩增条件为 95℃ 5 分钟,95℃ 40 秒,52℃ 1 分钟,72℃ 2 分钟,共 35 个循环,72℃ 7 分钟。取第一轮 PCR 产物 3 μl 进行第二轮 PCR,扩增条件为 95℃ 5 分钟,95℃ 40 秒,55℃ 1 分钟,72℃ 1 分钟,共 35

个循环,72℃ 7 分钟。取 PCR 产物 5 μl 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,记录结果。

1.5 病毒分离及型别鉴定 参照国标 GB15994-1995 中相关方法进行^[1]。

2 结果

2.1 呼吸道多病原检测

采用 ELISA 法分别对 8 份咽拭子标本进行呼吸道合胞病毒、肺炎支原体、甲和乙型流感病毒病原检测,结果显示呼吸道合胞病毒、肺炎支原体、乙型流感病毒检测均为阴性,有 2 份甲型流感病毒检测为弱阳性。

2.2 流感病毒相关检测

8 份标本流感病毒快速酶联免疫法检测,结果显示有 3 份为甲型流感阳性,乙型流感检测均为阴性;巢式 RT-PCR 法检测,结果显示有 5 份标本可扩增至 591 bp 长特异条带,为甲 3 亚型阳性,甲 1、乙型均未见检出(见图 1);8 份标本均使用 MDCK 细胞培养,结果有 4 份 CPE 阳性,经鉴定为 H3N2 亚型流感病毒。各检测结果见表 1。

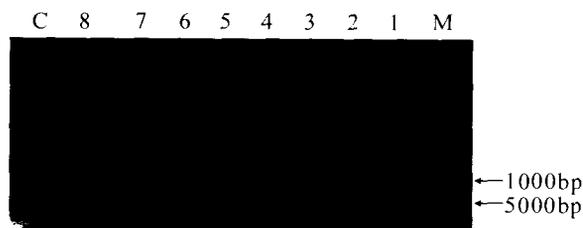


图 1 C 为阴性对照,1~8 为检测标本编号, M 为 DNA 分子量 Marker

2.3 几种流感相关检测结果比较

统计上述几种流感相关检测的阳性率及操作时间,结果表明 ELISA 法初筛阳性率可达 25%,RT-PCR 法检测阳性率可高达 75%;操作时间以快速酶联免疫法最快,病毒分离最慢,见表 2。

3 讨论

呼吸道疫情具有传播快、起病急、影响面广、危害大等特点。同时呼吸道致病原很多,上呼吸道感染中 90% 以上是由病毒引起,而引起急性呼吸道病毒感染的病毒群至少有 7 个病毒科 10 多类共 239 个型别的病毒^[2],目前有研究表明引起呼吸道感染病毒的还有约四分之一尚未被发现^[3]。而科学、有效控制疫情需要明确病原,因此实验室如何在呼吸道疫情处理中采取快速、有效、准确的检测方法一直是各级疾控部门关注的问题之一。

表 1 流感病毒各相关检测结果

标本编号	ELISA*	快速酶联免疫法		RT-PCR			病毒分离		
	甲型	甲型	乙型	H1	H3	B	甲 3	甲 1	乙型
1	-	-	-	-	+	-	+(1;4)	-	-
2	+	+	-	-	+	-	+(1;32)	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	+	-	+(1;8)	-	-
5	-	-	-	-	+	-	-	-	-
6	-	+	-	-	+	-	+(1;4)	-	-
7	-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: * 此处仅列出呼吸道多病原检测中甲型流感检测结果

表 2 几种流感检测方法比较

	快速酶联免疫法	ELISA	RT-PCR	病毒分离
阳性率(%)	37.5(3/8)	25(2/8)	75(6/8)	50(4/8)
操作时间(h)	1/4	4	5	72

由于人间禽流感的出现及北京市 2003 年 SARS 疫情的发生,北京市疾病预防控制中心在呼吸道疫情的实验室检验方面积累了较多经验。在此次疫情处理中,首先针对多种呼吸道病原进行初筛,在此基础上,进一步使用多种方法相互验证,结果表明此次疫情为流感病毒所致。公卫医生针对实验室检测结果及时采取控制措施,使疫情迅速得到控制。

流感病毒病原学相关检测目前有 ELISA 法、间接免疫荧光法、组织培养法、快速检测、分子生物学方法等。其中 ELISA 法、间接免疫荧光法可筛查多种呼吸道病原^[4],但由于价格昂贵,间接免疫荧光法结果判断主观性较强等因素均较少使用。病毒分离方法作为流感病毒的金标法为常规方法^[5],而快速检测、分子生物学方法具有操作简便、准确、特异并可分型等特点越来越多应用于疫情处理中^[6,7],此次疫情在实验室接收标本 5 小时后即获得可靠的初步检验结果,为现场处理及时提供病原学依据。

此次实验室检测结果比较,显示 ELISA 法初筛阳性率

最低,RT-PCR 法检测阳性率最高。操作时间以快速酶联免疫法最快,仅需 15 分钟,而病毒分离需要时间最长,为 72 小时。综合考虑检测阳性率及操作时间,以 RT-PCR 法为最理想,可在不具备其他方法时首选使用。

【参考文献】

- [1] 中华人民共和国国家标准 GB 15994-1995[S].
- [2] 侯云德. 急性呼吸道病毒感染的病原学与防治[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2005 年 1 月.
- [3] Heikkinen T, Jarvinen A. The common cold[J]. Lancet, 2003, 361(9351):51-59.
- [4] 陆怡,俞蕙,赵国昌. 上海地区儿童春季下呼吸道感染 291 例病原学分析[J]. 世界感染杂志,2003,3(5):388-389.
- [5] 刘建军,程小雯,贺建华. 用鸡胚和 MDCK 细胞分离流感病毒的实验研究[J]. 中国公共卫生,2002,18:335-336.
- [6] 朱汝南,钱渊,刘成贵,等. 用逆转录聚合酶链反应鉴别甲型和乙型流感病毒感染[J]. 中华儿科杂志,2000,38:537-540.
- [7] B. SCHWEIGER, I. ZADOW, HECKLER, et al. Application of a Fluorogenic PCR Ass. ay for Typing and Subtyping of Influenza Viruses in Respiratory Samples[J]. J Clinical Microbiology, 2000,4:1552-1558.

(收稿日期:2005-05-28)

(本文编辑:宋晓东)

· 实验研究 ·

操作因素对 ELISA 检测结果的影响

刘运保

【中图分类号】R446.61

【文献标识码】B

【文章编号】1006-2483(2005)04-0056-02

酶联免疫吸附试验(ELISA)是目前临床中应用最为普遍的一种血清学检测方法,但影响 ELISA 检测质量的因素很多,如试剂因素、标本因素和操作因素等。试剂的质量固然是影响检测结果准确性的关键因素,然而检测人员的操作是否规范合理对 ELISA 检测结果的影响也不可忽视。该文选用 3 个厂家的 ELISA HBsAg 检测试剂分别就洗涤次数、孵育条件、显色剂加入方式及试剂混用等操作因素对检测结果产生的影响进行了分析比较,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 仪器 TECAN GENESIS RSP 100 加样器,TECAN 洗板机,SUNRISE 酶标仪,Heidolph INKUBATOR 1000 恒温震荡仪,设备仪器经厂家检定合格。

1.2 试剂 HBsAg 诊断试剂盒,武汉爱恩地生物技术有限公司生产,批号 20040203;深圳月亮湾生物工程有限公司生产,批号 20040404;珠海丽珠试剂有限公司,批号 20040315-1;阴性为试剂盒阴性对照,低值临界阳性为卫生部临检中心质控血清 0.5ng/ml,批号 0404;临界阳性为卫生部临检中心质控血清 1ng/ml,批号 0404;中、高值阳性为阳性样本。

1.3 方法 分别取阴性、0.5 ng/ml 阳性、1 ng/ml 阳性、中