

九项呼吸道联检试剂对多种呼吸道感染病原体检测的临床意义

秦茵茵 吴国锋 秦笙

【摘要】 目的 为临床提供一种快速诊断呼吸道感染病原体的方法。方法 对1318例呼吸道感染患者的血清标本应用九项呼吸道联检试剂(间接免疫荧光法)同时检测九项主要病原体的IgM抗体,包括嗜肺军团菌(LP)、肺炎支原体(MP)、Q热立克次体(COX)、肺炎衣原体(CP)、腺病毒(ADV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、甲型流感病毒(IFA)、乙型流感病毒(IFB)和副流感病毒1、2和3型(PIVS)。结果 非典型病原体感染率为33.3%(439/1318),其中以肺炎支原体最为多见,其次为呼吸道合胞病毒,流感病毒B、A次之;混合感染率达15.7%(207/1318);感染人群以儿童多见。结论 九项呼吸道联检试剂(间接免疫荧光法)检测快速、操作简便、准确性高,检测范围广、利于早期发现,费用不高,适合各大医院推广应用。

【关键词】 呼吸道感染; 无特异性病原体有机物; 荧光抗体技术,间接; 抗体

Clinical significance of nine-item combined reagent for detection of pathogens in various respiratory tract infection QIN Yin-yin*, WU Guo-feng, QIN Sheng. *State Key Laboratory of Respiratory Diseases, Guangzhou Institute of Respiratory Diseases, The First Affiliated Hospital, Guangzhou Medicine College, Guangzhou 510120, China

Corresponding author: QIN Yin-yin, Email: qinyinyin8333@163.com

【Abstract】 Objective To introduce a rapid approach for the diagnosis of pathogens in various respiratory tract infection. **Methods** The sera were collected from 1318 patients with respiratory tract infection and were subjected to simultaneous detection of immunoglobulin M of nine major pathogens, including *Legionella pneumophila* (LP), *Mycoplasma pneumonia* (MP), *Coxiella burnetii* (COX), *Chlamydia pneumoniae* (CP), adenovirus (ADV), respiratory syncytial virus (RSV), influenza A virus (IFA), influenza B virus B (IFB) and parainfluenza virus (PIVS) type 1, 2 and 3, via indirect immunofluorescence assay. **Results** Infection of atypical pathogen, predominantly MP, followed by RSV, IFB and IFA, accounted for 33.3% (439/1318). Combined pathogen infection, to which children were predisposed, amounted to 15.7% (207/1318). **Conclusions** Indirect immunofluorescence assay using nine-item combined reagent can be applied extensively as a result of rapid detection, simplified processing, high accuracy and low cost. This may be helpful upon diagnosis in a timely manner, allowing for further popularization among various hospitals.

【Key words】 Respiratory tract infection; Specific pathogen-free organisms; Fluorescent antibody technique, indirect; Antibodies

急性呼吸道感染常见的疾病有急性上呼吸道感染、急性气管-支气管炎、支气管肺炎、支气管扩张

等,临床表现并不一致。引起呼吸道感染的病原体种类繁多,如病毒、细菌、支原体、衣原体、军团菌等微生物,一种病原体可引起多种临床表现,同一临床表现又可由多种病原体引起^[1]。临床中往往很难针对病原体进行治疗,容易造成某些患者长期发热、甚至病情加重以及滥用抗生素。因此,呼吸道感染的病原体快速检测,对临床及时诊断和疫情报

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1674-1927. 2012. 02. 009

作者单位: 510120 广州医学院第一附属医院广州呼吸疾病研究所呼吸疾病国家重点实验室(秦茵茵、秦笙); 广州医学院荔湾医院内科(吴国锋)

通信作者: 秦茵茵, Email: qinyinyin8333@163.com

告均有重要意义。应用进口九项呼吸道联检试剂,采集患者血清进行检测,可尽早明确病原学诊断,及时指导临床用药。本文回顾性分析广州医学院第一附属医院1318例呼吸道感染患者采用进口九项呼吸道联检试剂测定血清情况,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

2011年1月至7月在广州医学院第一附属医院门诊及住院的1318例呼吸道感染患者,男性736例,女性582例,年龄2月~85岁,平均21.3±0.6岁。

1.2 检测试剂

九项呼吸道感染病原体IgM抗体检测试剂PNEUMO2SLIDE2M为西班牙VIRCELL公司原装进口产品,购自郑州博赛生物工程有限公司。一卡同时检测人血清中呼吸道感染9项主要病原体的IgM抗体,包括嗜肺军团菌(LP,孔1)、肺炎支原体(MP,孔2)、Q热立克次体(COX,孔3)、肺炎衣原体(CP,孔4)、腺病毒(ADV,孔5)、呼吸道合胞病毒(RSV,孔6)、甲型流感病毒(IFA,孔7)、乙型流感病毒(IFB,孔8)和副流感病毒1、2和3型(PIVS,孔9);孔10为质控孔。试剂盒包括:(1)载玻片:检测的物理载体,覆有聚四氟乙烯并包被有针对检测物的特异性抗原;(2)吸附剂:羊抗人IgG用来吸附人IgG,避免干扰IgM检测;(3)荧光素标记的抗人免疫球蛋白结合物(FITC结合物):含有染色液、防腐剂 and 蛋白稳定剂,和抗原抗体复合物反应并显色;(4)封闭介质:甘油缓冲液;(5)磷酸盐缓冲液(PBS):用于洗涤步骤,从反应介质中除去未结合的免疫球蛋白和结合物。

1.3 检测方法

1.3.1 标本收集与处理 (1)样本的稀释:发病初期患者静脉血2.0~3.0 ml,按1:1比例稀释血清标本,即25 μL血清加入25 μL PBS中。(2)用吸附剂处理稀释后的血清:将30 μL稀释后的血清加入150 μL吸附剂中,彻底混匀,移至离心管,以3000 r/min离心(半径12 cm)10 min除去沉淀。(3)在载玻片的每孔中加15 μL吸附剂处理过的血清。在一个载玻片的每孔中加入15 μL不稀释的阳性对照,在另一载玻片的每孔中加入15 μL不稀释的阴性对照;并将载玻片放入湿盒中,37℃温育90 min。(4)用PBS洗液的缓慢水流冲洗载玻片(避免直接冲入孔内)后,浸泡在PBS中并放置在水平摇床上轻轻摇动10 min。将载玻片用蒸馏水缓慢水流冲洗。(5)载玻片自然风

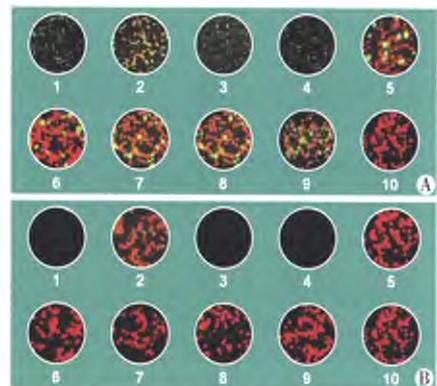
干后每孔加入15 μL FITC结合物溶液(不需稀释),将载玻片放入湿盒,37℃温育30 min。(6)风干后加几小滴封闭介质,盖上盖玻片。(7)尽快用荧光显微镜在400倍放大率下观察结果。如果不能立即观察,可将其避光放置于2~8℃不超过24 h。

1.3.2 检测原理 间接免疫荧光法(IFA)是基于待测样本中的抗体与吸附在载玻片上的抗原发生的反应。样本中存在的特异性抗体和抗原反应,未与抗原结合的免疫球蛋白在洗涤步骤中除去。在下一步骤中,抗原-抗体复合物与荧光素标记的抗人球蛋白反应,用免疫荧光显微镜观察结果。见图1。



图1 九项呼吸道感染病原体IgM抗体检测试剂盒检测原理

1.3.3 结果判断 阳性结果:可以观察到腺病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒或副流感病毒对阳性血清的1%~15%细胞的细胞核、细胞质或细胞膜出现苹果绿色荧光(在副流感病毒和呼吸道合胞病毒中能同时观察到着色的合胞);军团菌、衣原体或立克次体中所有的细菌呈现出苹果绿色荧光;支原体对阳性血清在细胞外围呈现苹果绿色荧光。阴性结果:可观察到军团菌、肺炎衣原体和立克次体无荧光,支原体、腺病毒、甲型和乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒和副流感病毒的细胞呈现红色。见图2。



注:A:阳性结果;B:阴性结果;1:LP;2:MP;3:COX;4:CP;5:ADV;6:RSV;7:IFA;8:IFB;9:PIVS;10:质控

图2 荧光图谱

表1 呼吸道病原体的阳性率

项目	LP	MP	COX	CP	ADV	RSV	IFA	IFB	PIVS
阳性例数	64	325	0	0	64	189	102	174	41
阴性例数	1254	993	1318	1318	1254	1129	1216	1144	1277
阳性率(%)	4.8	24.7	0	0	4.8	14.3	7.7	13.2	3.1

注:LP:嗜肺军团菌,MP:肺炎支原体,COX:Q热立克次体,CP:肺炎衣原体,ADV:腺病毒,RSV:呼吸道合胞病毒,IFA:甲型流感病毒,IFB:乙型流感病毒,PIVS:副流感病毒1、2和3型

2 结果

2.1 各种病原体阳性感染率

在1318例呼吸道感染的患者中,感染阳性者439例,总阳性率为33.3%(439/1318);各种病原体中阳性感染率最高的为非典型病原体,MP占24.7%(325/1318),其次为RSV占14.3%(189/1318)、IFB占13.2%(174/296)、IFA占7.7%(102/296)次之。此外感染人群以儿童为主,占92.0%(404/439)。见表1,表2。

表2 呼吸道病原体的混合感染率

项目	样本例数	阳性例数	混合感染(2种)	混合感染(3种)	混合感染(≥4种)
成人	162	35	12	5	3
占总样本(%)			7.4	3.1	1.9
占阳性病例(%)			34.2	14.3	8.6
儿童	1156	404	111	59	17
占总样本(%)			9.6	5.1	1.5
占阳性病例(%)			27.5	14.6	4.2
总数	1318	439	123	64	20
占总样本(%)			9.3	4.9	1.5
占阳性病例(%)			28.0	14.6	4.6

2.2 呼吸道病原体混合感染率

呼吸道病原体检标本1318例中,混合感染有207例,混合感染率高达15.7%(207/1318),在阳性病例占47.1%(207/439)。

3 讨论

近年来,随着国内各类抗生素的广泛应用,呼吸道感染细菌有所降低,而非典型肺炎、长期原因不明的发热患者,往往由于无法确定致病原因,并经常规治疗无效,以至病情加重。医院目前对呼吸道感染源尤其是非典型病原体不能及时确诊,造

成滥用抗生素以及医源性交叉感染上升。因此,呼吸道感染病原体感染的快速诊断具有重要意义。

目前已证实,80%的上呼吸道疾病和部分的下呼吸道疾病是由细菌外的病原引起。其中以非典型病原体包括呼吸道病毒最为常见,如嗜肺军团菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒等微生物,病原学不仅复杂且常常混合存在^[2]。精确的病原学分析不仅是确诊依据,也是合理选择治疗方案的基础^[3]。因此了解呼吸道感染病原体的检测手段和开展快速检测手段,已成为当务之急^[4]。

呼吸道感染非典型病原体因其临床的非特异性症状,大部分依靠实验室检查方法,而检测方法多种多样,主要的方法有病原体的分离培养及组织细胞培养法、血清学、直接检测法(包括电镜法)、间接和直接免疫荧光抗体法(IFA/DFA)、酶免疫测定(EIA)、核酸扩增法(PCR)、碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶桥联酶标(AP-PAAP)法等。尽管方法多,但确诊感染病原仍非常困难。病原体的分离培养及组织细胞培养法过去常作为“金标准”,但因其操作复杂、培养时间长、技术难度大、阳性率低等缺点而很难实现,近10年已被分子方法所取代。近期有报道组织培养法对分析病毒种群(如每年的流感疫苗)的遗传学和抗原性变化以及发现新病毒仍具有重要作用^[5]。随着快速诊断技术的迅速发展,分子检测技术愈趋完善,已经被作为呼吸道感染病原体检测的新标准,与组织培养法或抗原检测法相比,它几乎具有100%的特异性,灵敏度比组织培养方法高12%~30%,但因其对实验室条件要求高而无法普及,而且商品化的产品较少,未形成系列,多数病原尚不能检测^[6]。电镜检测法虽是直接检测病原体颗粒,但检出阳性率不高、时间较长,不适合临床快速诊断^[7]。核酸检测应用杂交或聚合酶链反应技术,灵敏性强、特异性高,能进行微量检测,但实验条件要求严格,成本高,不适合广大基层医院,同时不能

避免出现假阳性或假阴性。AP-PAAP法虽然可检测病原体抗原,但由于操作步骤过多而易出现非特异性着色,阳性结果很难判断。

近年来由于免疫技术的发展,特别是免疫标记技术的广泛应用,如直接、间接免疫荧光法等标记技术,检测方便,快速且成本低,适合于临床要求,因此在临床上有重要意义^[8-10]。我们应用的新型呼吸道联检试剂,运用的是间接免疫荧光法。该方法作为一种常规免疫诊断手段,为临床检验实验室广泛采用,并为某些病原体检测的标准检测方法。针对临床常见的呼吸道病原体,同时检测患者血清中9种病原体,只需1份血清样品,即可在短时间内完成检测,既可确定致病因子,又可发现多种病原体的混合感染,方便临床医生对患者进行针对性治疗。本法特异性达96%,敏感性达98%。而设备仅需荧光显微镜,在普通实验室即可开展,是一种快速、简便、特异性及敏感性高的诊断呼吸道病原体感染的方法。

本研究中,1318例患者中IgM抗体检测阳性率为33.3%,其中以肺炎支原体最多,其次为呼吸合胞病毒、流感病毒B、流感病毒A;与国内报道相似^[11-12]。在检测中发现混合感染率高,达15.7%,在阳性病例中几乎占一半;其中超过3种(含3种)病原体的混合感染率为6.4%,超过4种(含4种)病原体的混合感染在阳性病例中达4.6%;且好发人群为儿童。与国内外报道相似^[13-14]。及早进行呼吸道病原体检测对指导临床医生针对性治疗、避免盲目使用抗生素及双重感染有重要作用,对易感人群注射疫苗有重要的预防意义。

本文应用的新型呼吸道联检试剂,对所有患者进行常见的9种呼吸道病原体的IgM抗体筛查,该项检测临床应用已较广泛,具有敏感性高、高效简便、成本低廉、适合于临床筛查的优点^[15-16]。但由于参加反应的因素较多,可能会有偏差,受成本和患者诸因素影响而未进行双份血清抗体检测,故方法学上存在一定局限性;且成人例数偏少,该项呼吸道联检试剂在临床中的长期意义有待进一步探讨。

参考文献

- [1] 周一平,陆学东,陈小可,等.急性下呼吸道感染患者支气管肺泡灌洗液非典型病原体与病毒检测.中华医院感染学杂志,2007,17:901-904.
- [2] Johnstone J, Majumdar SR, Fox JD, et al. Viral infection in adults hospitalized with community-acquired pneumonia: prevalence, pathogens, and presentation. Chest, 2008, 134:1141-1148.
- [3] 李海珠,吕波,林志方.小儿急性下呼吸道感染病原体检测与临床分析.中华检验医学杂志,2006,29:433-434.
- [4] 徐军,郭静霞,李浩,等.不明原因呼吸道感染疫情病原学分析.解放军医学杂志,2010,35:252-255.
- [5] 朱汝南,邓洁.2000年秋冬至2002年夏北京地区急性呼吸道感染病毒病原学研究.临床儿科杂志,2003,21:25-28.
- [6] 顾伟中,曹群,汤宏峰,等.直接免疫荧光法对呼吸道分泌物多种呼吸道病毒检测的临床意义.实用儿科临床杂志,2004,19:857-858.
- [7] 景艳桃.病毒性呼吸道疾病的实验室诊断进展.国外医学预防诊断治疗用生物制品分册,2005,28:30-31.
- [8] Welliver RC. Detection, pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections. Clin Microbiol Rev, 1988, 1:27-39.
- [9] Ray CG, Minnich LL. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. J Clin Microbiol, 1987, 25:355-357.
- [10] 黄秋琳,许翔,江淑芳,等.直接免疫荧光法对多种呼吸道病毒检测的临床意义.检验医学与临床,2008,5:135-136.
- [11] 赵铁梅,刘又宁.社区获得性肺炎常见病原体构成谱的新动态.中华结核和呼吸杂志,2002,25:753-755
- [12] 刘又宁,陈民钧,赵铁梅,等.中国城市成人社区获得性肺炎665例病原学多中心调查.中华结核和呼吸杂志,2006,29:3-8.
- [13] 林清,钱渊,王之梁,等.呼吸道合胞病毒检测方法比较.临床儿科杂志,2003,21:20-24.
- [14] McDonald JC, Quennec P. Utility of a respiratory virus panel containing a monoclonal antibody pool for screening of respiratory specimens in nonpeak respiratory syncytial virus season. J Clin Microbiol, 1993, 31:2809-2811.
- [15] 耿素珍.间接免疫荧光法对多种呼吸道病毒快速检测方法.包头医学院学报,2008,24:1477-1478.
- [16] 陆学东,陆长东,周一平,等.呼吸道病毒感染多重、快速检测技术.中华微生物学和免疫学杂志,2006,26:760.

(收稿日期:2011-10-18)

(本文编辑:郑颖)