

文章编号: 1673-8640 (2020) 11-1165-04 中图分类号: R446.1 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2020.11.019

快速病原体检测技术在甲型流感病毒检测中的应用

付晓蕊¹, 康蓓佩¹, 徐修礼¹, 赵峰², 张鹏亮¹, 周磊¹

(1. 空军军医大学第一附属医院检验科 全军临床检验医学研究所, 陕西 西安 710032;

2. 空军军医大学第一附属医院呼吸内科, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 探究甲型流感病毒 (FluA) 抗原检测法、核酸检测法和快速病原体检测技术的临床应用价值。**方法** 收集2016年10月—2019年1月西京医院临床疑似FluA感染患者鼻咽拭子样本, 分别采用FluA核酸检测法、抗原检测法进行检测, 比较2种检测方法的结果, 评价快速呼吸道病原体检测技术的临床应用价值。**结果** FluA抗原检测法的阳性检出率为9.56%, FluA核酸检测法的阳性检出率为27.29%。每年12月—次年2月为FluA感染暴发季, 其抗原筛查阳性率为10.95%, 核酸检测阳性率为27.71%; <5岁的婴幼儿、约20岁的青少年以及>90岁的老年人为易感人群; 男性与女性比较, FluA核酸检测结果差异无统计学意义 ($P<0.05$)。快速呼吸道病原体检测检出阳性170例, 阳性结果207个, 其中部分患者为多种呼吸道病原体混合感染。**结论** 抗原和核酸检测均能较好地初步筛查FluA感染, 快速病原体检测技术可快速检出多种常见呼吸道感染相关病原体, 对临床呼吸道感染患者的诊断和治疗有重要意义。

关键词: 甲型流感病毒; 呼吸道感染; 抗原; 核酸; 快速病原体检测

Clinical application of rapid pathogen detection technologies for detecting influenza A virus FU Xiaorui¹, KANG Beipei¹, XU Xiuli¹, ZHAO Feng², ZHANG Pengliang¹, ZHOU Lei¹. (1. Department of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Center of clinical Laboratory Medicine of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi, China; 2. Respiratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical application roles of influenza A virus (FluA) antigen, FluA nucleic acid and Filmarray rapid pathogen detection technologies for detecting FluA. **Methods** The patients with suspected FluA infection in Xijing Hospital from October 2016 to January 2019 were enrolled for the detections of FluA nucleic acid and antigen. The results were analyzed comparatively. Filmarray rapid pathogen detection was used as well. **Results** The positive rate of FluA antigen detection was 9.56%, and the positive rate of FluA nucleic acid detection was 27.29%. The period from December to February was the outbreak season, and the positive rate of FluA antigen detection in this period was 10.95%, and the positive rate of FluA nucleic acid detection in this period was 27.71%. Infants <5 years old, adolescents around 20 years old and elders >90 years old were susceptible subjects. There was no statistical significance in FluA nucleic acid detection between males and females ($P<0.05$). Using Filmarray rapid pathogen detection technology, 170 positive specimens were detected, and 207 positive results were obtained, some of which included multiple infection resulted from different respiratory pathogens. **Conclusions** FluA antigen and nucleic acid detections could clarify the infection. Filmarray rapid pathogen detection technology could serve the diagnosis of infectious diseases and is of significance for the diagnosis and treatment of clinical respiratory tract infection.

Key words: Influenza A virus; Respiratory tract infection; Antigen; Nucleic acid; Filmarray rapid pathogen detection technology

急性呼吸道感染 (acute respiratory infection, ARI) 是社区和医院感染的主要感染之一。甲型流感病毒 (influenza A virus, FluA) 感染率高, 影响范围广, 已引起临床的高度关注。病毒感染可以通过传统的方法来检测, 如

培养或检测病毒的特异性抗原, 也可以通过免疫色谱法或分子核酸检测等方法快速检测^[1]。如何选择敏感性高、特异性强的FluA检测方法, 更好地为临床提供快速、准确的病原学依据, 是临床实验室的重要任务。本研究通过分析

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (81601816); 国家科技重大专项项目 (2017ZX10103004)

作者简介: 付晓蕊, 女, 1988年生, 硕士, 检验技师, 主要从事临床微生物检测工作。

通信作者: 周磊, E-mail: iamwolf-snzq@163.com; 张鹏亮, E-mail: zhangpl0423@yeah.net。

FluA 特异性抗原和核酸的检测结果, 探讨快速病原体检测技术的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 样本来源

收集 2016 年 10 月—2019 年 1 月空军军医大学第一附属医院临床症状为发热、咳嗽的疑似 FluA 感染患者鼻咽拭子样本, 其中 FluA 抗原筛查样本 14 179 例, FluA 核酸检测样本 3 697 例。另收集同期临床症状为发热、咳嗽的疑似呼吸系统感染患者鼻咽拭子样本 312 例、支气管肺泡灌洗液样本 3 例, 采用 FilmArray 快速呼吸道病原体检测技术检测常见呼吸道感染相关病原体, 并对所有患者临床资料进行回顾性分析。本研究经空军军医大学第一附属医院伦理委员会审核通过, 所有患者均知情同意。

鼻咽拭子及支气管肺泡灌洗液样本采集后, 放入转运培养基中, 室温放置不超过 4 h, (2 ~ 8) °C 不超过 3 d, ≤ -15 °C 不超过 30 d, 样本避免反复冻融。

1.2 方法

1.2.1 FluA 抗原检测 采用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测样本中的特异性 FluA 抗原, 试剂盒购自北京万泰股份有限公司。严格按照试剂说明书进行操作。

1.2.2 FluA 核酸检测 采用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) - 荧光探针法检测 FluA 核酸, 试剂盒购自达安基因股份有限

公司。严格按照试剂说明书进行操作。

1.2.3 FilmArray 快速呼吸道病原体检测 FilmArray 快速呼吸道病原体检测试剂盒及全自动医用 PCR 分析系统购自法国生物梅里埃公司, 可同步对多种呼吸道病原体的核酸进行扩增与检测。严格按照仪器和试剂说明书进行操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计数资料以例或率表示, 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 FluA 抗原与核酸检测结果

14 179 例 FluA 抗原筛查样本中, 阳性 1 355 例, 抗原筛查阳性率为 9.56%; 3 697 例 FluA 核酸检测样本中, 阳性 1 009 例, 核酸检测阳性率为 27.29%。见表 1。

FluA 核酸检测	FluA 抗原检测			合计
	阳性	阴性	未检测	
阳性	236	615	158	1 009
阴性	0	1 524	1 164	2 688
未检测	1 119	9 363		10 482
合计	1 355	11 502	1 322	14 179

2.2 FluA 感染的时间分布

FluA 抗原检测的平均阳性率为 9.56%, FluA 核酸检测的平均阳性率为 27.29%; 暴发季 (12 月—次年 2 月) FluA 抗原检测阳性率为 10.95%, FluA 核酸检测阳性率为 27.71%。见图 1。

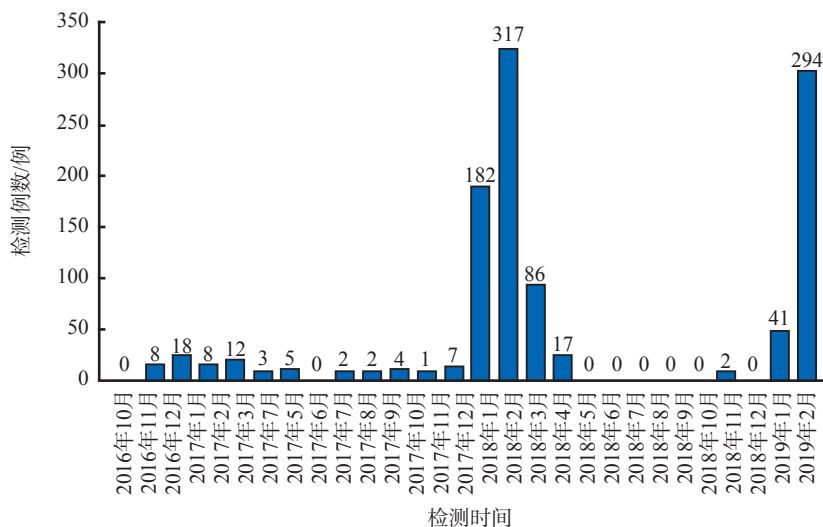


图 1 2016 年 10 月—2019 年 1 月 FluA 时间分布

2.3 FluA 感染年龄分布

<5 岁的婴幼儿、约 20 岁的青少年以及 >90 岁

的老年人均为易感人群, 筛查的阳性率较高。见表 2。

表2 FluA核酸检测阳性患者年龄分布

年龄/岁	筛查例数	阳性例数	阳性率/%
<5	189	58	30.69
5~	127	32	25.20
10~	301	89	29.57
20~	491	149	30.35
30~	464	138	29.74
40~	503	124	24.65
50~	552	136	24.64
60~	502	125	24.90
70~	265	56	21.13
80~	226	55	24.34
>90	77	47	61.04
合计	3 697	1 009	27.29

2.4 FluA感染性别分布

2 075例男性患者FluA核酸检测阳性573例，阳性率为27.61%；1 622例女性患者FluA核酸检测阳性436例，阳性率为26.88%。男性与女性比较，FluA核酸检测阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2=0.227, P>0.05$)。

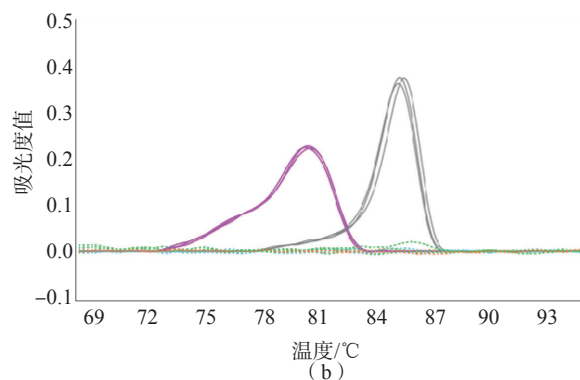
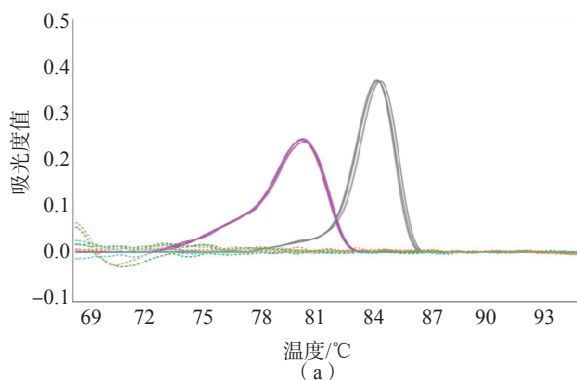
2.5 FilmArray快速呼吸道病原体FluA检测结果

采用FilmArray快速呼吸道病原体检测技术对312例发热、咳嗽的疑似呼吸系统感染患者进行常见呼吸道感染相关病原体检测，阳性170例，阳性结果207个，部分样本检测结果包括多项阳性结果，见表3。有2例暂未判断出型别的FluA核酸检测阳性样本（图2），因反应测试条中引物

的局限性不能判定出型别，送西安市疾病预防控制中心检测，回报结果为H5N1型流感病毒。

表3 FilmArray快速呼吸道病原体检测结果

混合感染类型	阳性例数	百分比/%
腺病毒+人鼻/肠病毒+甲型流感病毒H3型	1	0.59
腺病毒+人鼻/肠病毒+副流感病毒4型	1	0.59
腺病毒+人鼻/肠病毒+百日咳鲍特菌	1	0.59
人鼻/肠病毒+甲型流感病毒H1-2009型+乙型流感病毒	1	0.59
人鼻/肠病毒+FluA+乙型流感病毒	1	0.59
人鼻/肠病毒+冠状病毒229E+甲型流感病毒H1-2009型	1	0.59
呼吸道合胞病毒+FluA+乙型流感病毒	1	0.59
腺病毒+甲型流感病毒H3型	1	0.59
腺病毒+甲型流感病毒H1-2009型	2	1.18
腺病毒+冠状病毒HKU1	1	0.59
腺病毒+乙型流感病毒	1	0.59
腺病毒+肺炎支原体	1	0.59
冠状病毒229E+呼吸道合胞病毒	1	0.59
冠状病毒229E+甲型流感病毒H1-2009型	1	0.59
冠状病毒229E+冠状病毒OC43	1	0.59
冠状病毒OC43+百日咳鲍特菌	1	0.59
人鼻/肠病毒+副流感病毒1型	1	0.59
人鼻/肠病毒+人偏肺病毒	1	0.59
人鼻/肠病毒+甲型流感病毒H3型	1	0.59
人鼻/肠病毒+冠状病毒HKU1	1	0.59
人鼻/肠病毒+副流感病毒3型	3	1.76
呼吸道合胞病毒+副流感病毒4型	1	0.59
呼吸道合胞病毒+人鼻/肠病毒	1	0.59
呼吸道合胞病毒+百日咳鲍特菌	1	0.59
呼吸道合胞病毒+FluA	1	0.59
副流感病毒1型+副流感病毒2型	1	0.59
人偏肺病毒+乙型流感病毒	1	0.59
合计	30	17.65



注：(a)和(b)分别表示2株未判断出型别的FluA；在检测过程中，试剂条包被的目标引物仅包括及其2个具体型别H3、H1-2009，这2株FluA所属型别不在仪器监测范围内，但也能提示FluA感染，可体现新型检测方法的优点，故单列出来

图2 2株未判断出型别的FluA实时PCR溶解曲线

3 讨论

FluA可通过空气或飞沫传播，所致甲型流感为急性呼吸道传染性疾病^[2]。甲型流感能够在短时间内出现聚集性暴发，潜伏期为1~7 d，早期症状与普通感冒相似，在临床上主要表现为全身酸痛、咳嗽、咽痛、高热困倦等^[3-4]，病情严重时还会出现肌肉酸痛、腹泻等症状。甲型流感起病较急、全身症状较轻，但病情严重者可以出现

肺炎、呼吸衰竭等严重并发症^[5]，切断早期传播途径和传染源能够有效地控制疫情的蔓延^[6]。流感病毒有甲、乙、丙和丁4型，目前感染人的主要是FluA中的H1N1、H3N2亚型及乙型流感病毒中的Victoria和Yamagata系。近2年西安地区最主要的FluA型别为H1N1型和H3N2型^[7-9]。

FluA抗原检测属于定性检测，仅进行FluA核蛋白抗原检测，由于免疫学检验存在一定的

局限性, 抗原筛查并不能确定感染时间和感染阶段, 故而应配合FluA核酸检测。而单独的FluA核酸检测也存在感染时间、感染阶段、核酸拷贝数低可能出现的假阴性结果等问题。此外, 由于流感病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变也会产生假阴性结果。对于突变的新FluA, 在其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间尚不明确时, 均会对FluA核酸检测结果产生影响, 需要通过分次、多部位采集样本来降低假阴性结果产生的可能性。

本研究结果显示, FluA抗原检测阳性率为9.56%, FluA核酸检测阳性率为27.29%; 暴发季(12月一次年2月)FluA抗原检测阳性率为10.95%, FluA核酸检测阳性率为27.71%。本研究发现, <5岁的婴幼儿、20岁左右的青少年以及>90岁的老年人为易感人群, 筛查的阳性率较高。与文献报道的年龄<5岁、>65岁为高危人群, 新生儿早期感染出现呼吸系统症状是正常人的3倍的结果^[10]一致。婴幼儿和老年人由于身体素质较差, 抵抗力不足, 容易出现相应的感染, 且感染后病情严重、死亡的风险较高^[11-12]; 20岁左右的青少年多为学生和上班族, 出现交叉感染的概率比较大, 建议其预防性接种疫苗^[7]。本研究结果显示, 近3年疑似FluA感染与性别无关。

FilmArray快速呼吸道病原体检测技术采用巢式多重PCR技术, 是集样本制备、扩增、检测和分析功能为一体的快速病原体检测方法, 可以同步检测17种呼吸道病毒和3种细菌, 仅需5 min的人工样本处理和65 min的上机检测时间, 快速、方便, 且灵敏度高, 可快速报告检测结果。

FilmArray快速呼吸道病原体检测技术有其独特的优势, 如肺炎支原体、肺炎衣原体非典型病原体、百日咳鲍特菌培养条件苛刻, 而此方法可以快速报告结果, 对疑难病例具有重要的临床指导价值。本研究结果表明, 人鼻/肠病毒检测阳性率最高。但由于人鼻病毒与肠病毒的遗传学相似性, 该检测方法不能将这2种病毒区分开, 因此人鼻病毒和肠病毒合并为人鼻/肠病毒检测^[13]。快速病原体检测技术还可以同时检测到多种呼吸道相关病原体, 有利于临床及时了解患者感染情况, 及时施治。

在FluA感染暴发季, FluA抗原筛查是病毒感染筛查的第一步, 能更好地对FluA感染做出初步筛查和诊断。对于临床疑似FluA感染或者呼吸道病毒感染患者, 可以首先考虑同时进行FluA抗原筛查及FluA核酸检测, 快速明确病原体, 从而预防性服用奥司他韦。奥司他韦联合干扰素治

疗有利于各项临床症状的消退, 且患者耐受, 可以提高治疗效果。一般来说, 奥司他韦推荐使用5 d, 但需要根据病毒学检测结果及时调整^[14]。如遇病情迁延不愈或高度怀疑病毒感染而又暂时无法确认时, 可以考虑采用FilmArray快速呼吸道病原体检测常见呼吸道感染相关病原体, 更好地指导临床合理使用药物, 对临床呼吸道感染患者的诊断和治疗有很重要的意义。

参考文献

- [1] CALIENDO A M. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52 (Suppl 4): S326-S330.
- [2] PIRALLA A, LUNGHI G, PERCIVALLE E, et al. FilmArray® respiratory panel performance in respiratory samples from neonatal care units[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, 79 (2): 183-186.
- [3] 何国强. 分析甲流流行病学特征及预防措施[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18 (39): 83.
- [4] 胡丽娜. 中西医结合防控甲流H1N1流感疫情临床观察[J]. 中医临床研究, 2017, 9 (2): 134-135.
- [5] CHIU S C, LIN Y C, WANG H C, et al. Surveillance of upper respiratory infections using a new multiplex PCR assay compared to conventional methods during the influenza season in Taiwan[J]. Int J Infect Dis, 2017, 61: 97-102.
- [6] XU M, QIN X, ASTION M L, et al. Implementation of filmarray respiratory viral panel in a core laboratory improves testing turnaround time and patient care[J]. Am J Clin Pathol, 2013, 139 (1): 118-123.
- [7] 周鹏, 蔡晶, 吴然, 等. 2008—2017年湖北省流行性感冒监测结果分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29 (6): 33-36.
- [8] 李硕, 张云辉, 王永怡, 等. 2017年11—12月全球主要疫情回顾[J]. 传染病信息, 2017, 30 (6): 382-383.
- [9] 李硕, 张云辉, 王永怡, 等. 2018年11—12月全球主要疫情回顾[J]. 传染病信息, 2018, 31 (6): 575-576.
- [10] MARCONE D N, ELLIS A, VIDELA C, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina[J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32 (3): e105-e110.
- [11] GILCA R, DE SERRES G, BOULIANNE N, et al. Risk factors for hospitalization and severe outcomes of 2009 pandemic H1N1 influenza in Quebec, Canada[J]. Influenza Other Respir Viruses, 2011, 5 (4): 247-255.
- [12] VIASUS D, PAÑO-PARDO J R, PACHÓN J, et al. Factors associated with severe disease in hospitalized adults with pandemic (H1N1) 2009 in Spain[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17 (5): 738-746.
- [13] MCMULLEN P, BOONLAYANGOOR S, CHARNOT-KATSIKAS A, et al. The performance of Luminex ARIES® Flu A/B & RSV and Cepheid Xpert® Flu/RSV XC for the detection of influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus in prospective patient samples[J]. J Clin Virol, 2017, 95: 84-85.
- [14] 杨立新. 磷酸奥司他韦颗粒联合小儿氨酚黄那敏颗粒治疗小儿季节性流感的效果[J]. 中国医药导报, 2016, 13 (15): 120-123.

(收稿日期: 2019-04-18)

(本文编辑: 李欣)