

疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者流感病毒通用引物检测结果分析

唐国建,李国民,焦夕琴,蒋海燕,王国芳,季捷,戴小平,姜雁(江苏大学附属金坛医院,江苏金坛 213200)

【摘要】 目的 分析疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者流感病毒通用引物检测结果。**方法** 采用逆转录聚合酶链反应对 26 例疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者咽拭子标本进行流感病毒通用引物筛查。**结果** 共检出 3 例流感病毒通用引物扩增阳性患者。**结论** 对疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者进行流感病毒核酸检测,能够为临床及时干预提供实验室依据,有助于有效控制病情进展,改善患者预后。

【关键词】 H7N9 禽流感病毒; 流感病毒通用引物; 逆转录聚合酶链反应; 禽流感

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.24.059 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)24-3359-02

2013 年 2 月起,国内江苏、上海、安徽和浙江等地区相继出现了 H7N9 禽流感病毒感染患者,由于病情进展快,患者病死率较高。为此,卫生行政部门组织相关专家及时进行了流行病学调查,并对该病毒基因序列进行了分析,及时研制出病毒通用引物检测试剂盒。本院在接到江苏省卫生厅下发的检测试剂盒后,对 26 例临床疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者开展了病毒通用引物检测,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2013 年 4 月 22 日至 2013 年 5 月 23 日收治的 26 例临床疑似 H7N9 禽流感病毒感染患者,部分患者有明确的流行病学接触史,但所有患者均有急性呼吸系统感染症状,且与国家卫生与计划生育委员会公布的人感染 H7N9 禽流感临床表现一致,包括腋下体温高于 39℃,伴咳嗽、头痛、肌肉酸痛,血常规检查结果显示外周血白细胞计数降低,X 线片检查显示肺部有感染。

1.2 仪器与试剂 StepOne 型基因扩增仪(美国应用生物系统公司),H7N9 禽流感系列核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司),QIAamp RNA Mini Kit 核酸提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 为保证检测的时效性,以便临床医生及时对基因扩增检测阳性患者进行药物干预,在 26 例患者住院期间,每天以无菌技术采集患者咽拭子标本,并采用 QIAamp RNA Mini Kit 核酸提取试剂盒提取标本 RNA。

1.3.2 反应体系及处理 严格按试剂盒说明书要求准备试剂后,在准备好的反应液中加入已处理的待测标本 RNA、空白对照、阳性对照各 5 μL,每一检测管终体积为 25 μL,盖紧管盖后瞬时低速离心。

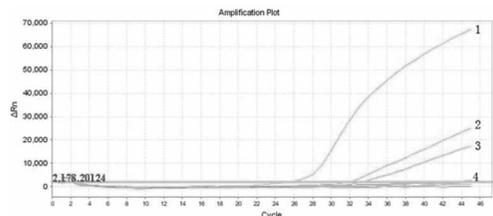
1.3.3 基因扩增 在 StepOne 型基因扩增仪中进行聚合酶链反应(PCR)扩增,扩增循环参数设定为逆转录反应,温度及反应时间依次为 50℃ 30 min、95℃ 5 min、95℃ 10 s、55℃ 40 s 循环 45 次,检测通道为羧基荧光素(FAM)及绿色荧光蛋白(VIC)通道。

1.3.4 结果分析 反应结束后扩增仪自动保持结果,根据分析后的图像调节扩增基线的起始值、终止值以及阈值(Ct 值),点击 Analysis 后仪器自动获得分析结果及结果报告页面。

2 结果

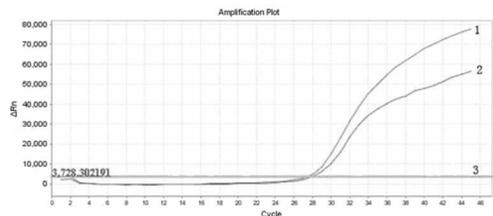
在 26 例患者住院期间进行连续检测,共检出 PCR 扩增阳

性 3 例,阴性 23 例。3 例阳性患者中,2 例于 2013 年 4 月 22 日检出,1 例于 2013 年 4 月 25 日检出,见图 1~2。



注:曲线 1 为阳性质控(Ct 值为 26.3);曲线 2 为阳性患者 A(Ct 值为 32.2);曲线 3 为阳性患者 B(Ct 值为 33.6);曲线 4 为基线。

图 1 2013 年 4 月 22 日 PCR 扩增结果



注:曲线 1 为阳性质控(Ct 值为 27.5);曲线 2 为阳性患者 C(Ct 值为 28.2);曲线 3 为基线。

图 2 2013 年 4 月 25 日 PCR 扩增结果

3 讨论

禽流感病毒属正黏病毒科甲型流感病毒属,基因组为分节段单股负链 RNA,依据外膜血凝素(H)和神经氨酸酶(N)蛋白抗原性不同,目前可分为 16 个 H 亚型和 9 个 N 亚型^[1]。禽甲型流感病毒除感染禽类动物外,还可感染人、猪、马和海洋哺乳动物,已知的可感染人的禽流感病毒亚型为 H5N1、H9N7、H7N7、H7N2、H7N3,本次检出的 PCR 扩增阳性患者为新型重配病毒 H7N9 感染。H7NP 禽流感病毒基因组中有 6 个内部片段来源于 H9N2,主要经呼吸道传播,也可通过密切接触已感染病毒的禽类分泌物或排泄物等而被感染,高危人群是从事禽类养殖、销售、斩杀、加工作业的人员,但目前尚无人际间传播的证据^[2]。

2004 年 7 月卫生部颁布了《全国不明原因肺炎病例监测实施方案(试行)》^[3]。本次检出的 3 例人感染禽流感病毒的患者均是通过实施该监测方案而被发现和报告的,由此说明该监测方案的实施对及时发现新型呼吸道感染疾病患者发挥了积极作用。本研究中 26 例患者均有发热、咳嗽、全身酸痛等流感

样症状,血常规检查结果显示外周血白细胞计数降低,X线影像学检查显示肺部有感染,部分患者有禽类接触史;3例PCR扩增检测阳性患者(后经江苏省疾病预防控制中心检测确诊为H7N9禽流感病毒感染)病情进展迅速,并发重症肺炎,出现呼吸衰竭及多脏器功能不全,因此,及时治疗至关重要。奥司他韦是全球第一个口服有效的特异性流感病毒神经氨酸酶抑制剂,能有效防治甲型和乙型流感病毒感染,且在感染早期使用能显著缩短发热及流感样症状持续时间,阻止疾病进展^[4-6]。

由于H7N9禽流感病毒具有高致病性,且感染患者病死率高,因此在标本采集、检测过程中需重视生物安全,做好个人防护^[7]。对疑似及确诊的H7N9禽流感病毒感染患者临床标本进行诊断性实验检测操作,均需在生物安全二级(BSL-2)实验室中进行,且所有标本处理步骤均需在生物安全柜中完成。

多位感染医学、呼吸内科学及重症医学等不同学科专家参与了本研究中3例PCR扩增阳性患者的治疗,且所有专家均认为对疑似H7N9禽流感病毒感染患者应及时进行通用引物实验室检测,并尽早给予达菲抗病毒治疗,从而避免出现呼吸衰竭及多脏器损伤,提高抢救存活率,同时要加强对基层医务人员的培训,提高认识,高度警惕。

参考文献

[1] 中国疾病预防控制中心. 人感染 H7N9 禽流感诊疗方案

(上接第 3325 页)

肢体、恢复功能”;在损伤现场,矿工和井上医务人员呼救后,在等待救护车到来的同时,加强自救,互救,分批转入,争取为救援赢得宝贵黄金 1 h 和白金 10 min^[7]。急救治疗中,在把抢救生命作为第一前提下,在遵循边抢救、边治疗、边诊断的原则下,按照“CRASHPLAN”构成顺序逐一部位检查,防止漏诊;治疗上抓住主次,要早期诊断和伤情评估,重视复合伤,分清轻重缓急,安排抢救顺序,等待病情稳定后,再进行一般性损伤治疗。入院后无论开放性多发伤还是闭合性多发性伤,间或伴发休克患者,均应在在患者生命体征较平稳、呼吸道、静脉通道通畅基础上,积极、全面、快速物理检查和影像学检查与抢救同时进行,早期明确判断创伤损伤部位和疾病严重程度,积极分诊、会诊、协诊,快速转入特色专科治疗或者直接进入手术室手术治疗,降低病死率。对于并发严重创伤如严重颅脑、脊髓创伤、休克、多脏器、多组织损伤患者,身体状态较差者,应该避免 2 次手术伤害打击,等患者病情稳定后再进行第 2 次、3 次手术治疗^[8-9]。

综上所述,根据煤矿事故致多发伤流行病学特点,要加强煤矿企业的监管机制,加强矿工的自我保护意识,改善煤矿生产环境,提高医疗水平,防范、降低近年煤矿事故多发伤的高发生率;改变矿工饮食、生活习惯,适时调整工作时间,预防骨质疏松,降低煤矿骨折损伤的严重性;加强矿工自救培训,切实提高自救、互救实际水平,建立专业化创伤科,为患难矿工赢得急救时间,降低病死率。重视煤矿多发伤,积极预防、治疗并发症,加强伤员心理辅导,在生命体征平稳情况下,就不同创伤类型、不同损伤形式,给予恰当治疗形式^[10]。

参考文献

[1] 张连阳. 多发伤的紧急伤情评估策略[J]. 中华创伤外科

(2013 年第 2 版)[Z]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2013.

[2] 朱军礼,张子根,王凤英,等. 职业暴露人群人感染高致病性禽流感 H5N1 风险研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2012,13(10):799-802.

[3] 中华人民共和国卫生部. 全国不明原因肺炎病例监测实施方案(试行)[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部,2004.

[4] 陈旭岩,谭伟,汪波. 奥司他韦治疗流行性感胃的临床随机对照研究[J]. 中国全科医学,2007,10(4):274-276.

[5] Writing Committee of the Second World Health Organization Consultation on Clinical Aspects of Human Infection With Avian Influenza A(H5N1) Virus. Update on avian influenza A(H5N1) virus infection in humans[J]. N Engl J Med,2008,358(3):261-273.

[6] 董伟,王艳彩. 磷酸奥司他韦治疗疑似甲型 H1N1 流感患者 23 例疗效及安全性分析[J]. 中国药物与临床,2010,10(11):1273-1274.

[7] 高素香,董华,唐竹英. 甲型 H1N1 流感 35 例临床分析[J]. 南方医科大学学报,2010,30(8):2023-2024.

(收稿日期:2013-07-21 修回日期:2013-09-12)

杂志,2010,12(1):1-3.

[2] 都定元,高劲谋,林曦,等. 严重交通伤与坠落伤救治结局比较和创伤急救模式探讨[J]. 中华创伤杂志,2000,16(1):189-191.

[3] 李晓双,董克习,邵作峰. 鲁南地区煤矿工人血清 25-OH-D 水平检测及关因素分析[J]. 山东医药,2010,50(35):53-56.

[4] 栗树伟,孙海钰,王东. 煤矿事故所致多发性骨折 312 例的综合分析[J]. 临床和实验医学杂志,2007,6(3):567-569.

[5] 徐长广,王树华,李凤权,等. 煤矿瓦斯爆炸伤的临床特点[J]. 黑龙江医学,2005,29(6):430-432.

[6] 齐志伟,于学忠. 多发伤的治疗进展[J]. 中国急救医学,2010,30(3):356-359.

[7] Buddha G,Mc RD. Missed injuries in patients J with multiple. Trahnas[J]. J Trauma,2000,49(4):600-605.

[8] Johnson JW,Gmcias VH,Schwab CW,et al. Evolution in damage Control fro esanguinating penetrating abdominal injury[J]. J Trauma,2001,5(1):269-271.

[9] 高劲谋. 道路交通伤的早期救治[J]. 创伤外科杂志,2011,13(3):202-204.

[10] 王怀海,谭庆荣,王志忠,等. “7. 29”矿难幸存者心理状况初步调查[J]. 中国精神-神经病学杂志,2009,35(7):432-434.

(收稿日期:2013-04-11 修回日期:2013-08-15)