

常见呼吸道病原体的实验室检测

陈华根¹, 刘小花¹ 综述, 许颖² 审校 (1. 四川省成都市新都区人民医院检验科 610500;
2. 成都医学院附属医院检验科, 成都 610500)

【关键词】 呼吸道; 病原体; 感染; 实验室; 检测

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 20. 055 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)20-2920-02

20 世纪 90 年代世界卫生组织的统计资料表明, 各种感染性疾病仍然是威胁人类健康的主要杀手, 占世界人口死因的 32.7%, 其中呼吸道感染位居首位^[1]。特别是甲型流感病毒基因变异重排, 曾引起百年来数次世界范围内流感爆发流行, 死亡人数超过 2 000 万。从 1997 年香港发现首例禽流感 (H5N1) 患者至今, 国内数省市有禽流感 (H7N9) 散发, 死亡人数已达数百人^[2-3]。2003 年因冠状病毒所致严重急性呼吸道综合征, 死亡 1 千余人^[4]。因艾滋病、糖尿病和耐药等因素影响, 国内结核菌感染及肺结核患者居高不下^[5]。不仅造成患者死亡, 同时严重影响经济发展。呼吸道病原体的实验室检测, 可以明确感染病原体, 有利于对疾病做出及时诊断、治疗, 制定防控策略, 阻止传播和流行。呼吸道病原体的实验室检测技术有多种, 主要分为病原体分离培养、血清学检测和分子生物学检测。本文通过查阅文献, 将主要检测技术及其在呼吸道病原体检测中的具体应用作一概述。

1 病原体分离培养

标本来源为鼻洗液、咽漱液、咽拭子、鼻拭子、痰、血液、穿刺标本和尸检材料等。以防污染, 及时接种较好, 或将标本置于冰壶内送交实验室, 选定合适的培养基或细胞组织, 在 2~3 h 内接种培养。

痰是分离培养应用最广泛的标本, 合格的痰标本要求白细胞数大于 25 个/低倍视野, 鳞状上皮细胞小于 10 个/低倍视野, 或白细胞/鳞状上皮细胞大于 2.5/1。定量培养菌量大于或等于 10^7 cfu/mL 可判定为致病菌^[6-7]。细菌培养一般选用血平板、巧克力平板、中国蓝/麦康凯培养基。病毒培养常选用猴肾或人胚肾细胞、二倍体细胞株、Hela、HepG2 细胞、犬肾传代细胞和鸡胚接种, 通过电子显微镜、细胞病变效应、凝血实验、凝血抑制实验、中和实验和空斑形成实验进行鉴定。

病原体分离培养是鉴别呼吸道病原体类型的金标准。特别是细菌培养不仅能鉴定病原体, 而且可通过药敏实验选择合适的抗菌药物。病毒培养由于实验条件要求较高, 且操作繁琐, 在普通实验室应用受限, 多通过血清学实验和分子生物学技术鉴定病毒。

2 血清学检测

利用抗原抗体反应特异性原理, 用已知抗原测定抗体或用已知抗体测定抗原, 从而判定感染病原体类型。通常根据抗原抗体特性, 偶联不同载体或不同标记物, 设计不同检测方法。常用检测方法有如下几种。

2.1 凝集实验 分为直接凝集实验和间接凝集实验。直接凝集实验无需偶联载体, 抗原抗体直接发生肉眼可见的凝集反应, 如血型鉴定实验和伤寒杆菌凝集实验。间接凝集实验利用红细胞、明胶颗粒、胶乳及细菌等作为载体, 和抗原偶联后, 与特异性抗体发生凝集反应, 常根据载体名称命名, 例如红细胞凝集实验、明胶颗粒凝集实验、胶乳凝集实验等。间接凝集实验应用多于直接凝集实验。

2.2 中和实验 用已知抗体血清和待测病毒悬液混合, 室温下作用一段时间后接种敏感细胞, 经培养后观察细胞病变效应或红细胞吸附现象是否消失, 即特异性抗体能否中和相应病毒的感染性。

2.3 补体结合实验 补体结合实验是一种以免疫溶血系统作为指标, 检测另一反应系统中抗原或抗体的传统方法。具有灵敏度高、实验条件要求低、操作简便等优点, 是一种经典的实验方法。

2.4 固相膜免疫实验 利用硝酸纤维素膜、玻璃纤维素膜和尼龙膜等作为载体, 金元素、硒元素和酶促底物置于载体上, 抗原和抗体通过穿流或横流的形式在载体上反应, 常用的实验方式有免疫层析实验、免疫渗滤实验、酶联免疫斑点实验、免疫印迹法等。呼吸道病原体的抗原或抗体皆可通过此方法检测, 但应用并不普遍。

2.5 酶联免疫吸附试验 用已知的抗原(抗体)包被在聚苯乙烯微孔上, 和待测的抗体(抗原)、酶标的抗原(抗体)进行反应, 通过洗涤分离, 继而加入酶促底物显色, 根据呈色的强弱, 判定待测物的有无或多少。该方法是临床实验室通过检测抗原抗体诊断病原体感染应用最广泛的技术, 绝大多数呼吸道病原体可用酶联免疫吸附试验进行检测。

2.6 荧光免疫技术(荧光抗体技术) 利用荧光素(异硫氰酸荧光素)标记抗体, 与载玻片上的抗原(抗体)、待测抗体(抗原)反应, 洗涤分离后, 用荧光显微镜观察有无显荧光的抗原抗体复合物存在。测定方式分为直接法和间接法, 间接法的敏感度比直接法高 5~10 倍, 故实验室常采用间接法。该方法是呼吸道病原体, 特别是新发高致病性病原体检测的常用方法。如甲型流感病毒 H1N1、禽流感病毒 H5N1、禽流感病毒 H7N9、引起严重急性呼吸道综合征冠状病毒的检测。由于呼吸道病原体多呈混合型感染, 一次联检多种病原体的抗原或抗体, 对于呼吸道疾病的防治具有重要意义。陈辉兰^[8]、俞小卫等^[9]报道了用直接免疫荧光法检测呼吸道合胞病毒、腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒以及副流感病毒 1、2、3 型等 7 种呼吸道常见病毒抗原。单咏梅等^[10]、艾洪武等^[11]、吉祖活等^[12]报道了用间接免疫荧光法检测呼吸道肺炎支原体、肺炎衣原体、嗜肺军团菌、Q 热立克次体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒等 9 种呼吸道病原体 IgM 抗体。

2.7 蛋白芯片技术 将病原体蛋白(抗原或抗体)固定在微阵列上, 通过一系列反应, 利用芯片阅读仪收集反应信号, 从而检测病原体。该方法可以一次检测多种病原体, 有利于快速诊治呼吸道感染性疾病。杨侃等^[13]报道用蛋白芯片技术检测流感病毒、呼吸道合胞病毒、柯萨奇病毒、腺病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体。邢颖等^[14]报道用蛋白芯片法检测肺炎支原体、腺病毒、呼吸道合胞病毒、流感病毒。

3 分子生物学技术

从 20 世纪 50 年代 Watson 和 Crik 提出 DNA 双螺旋结构

至今,分子生物学领域取得了巨大的成就。完成了生命天书“基因草图”的绘制,使人们从基因角度明白了生命现象的本质和调控机制。蛋白组学的研究,丰富和完善了基因组学,不仅能直接解释生命活动规律,还在疾病的诊断和防治中拥有更大的应用前景。以杂交技术和探针技术为基础,以 Mullis 的聚合酶链反应(PCR)技术为标志的基因扩增技术更是层出不穷,极大地丰富和完善了分子生物学技术^[15]。PCR 基本原理类似 DNA 的天然复制,特异性引物与靶序列互补,通过变性、复性、延伸多个重复循环,从而获得大量靶序列产物。从早期单一基因扩增检测单一病原体,发展到现在的同时多基因检测多种病原体,满足了多种病原体混合感染的诊断。对于感染性病原体的诊断,检测方法主要有如下几种。

3.1 多重 PCR 技术 多重 PCR 技术利用多对引物,同时扩增多种病原体基因。如 Mo 等^[16]检测甲型流感病毒、乙型流感病毒和新型甲型流感病毒 H1N1。向彩云等^[17]检测肺炎链球菌,流感嗜血杆菌,肺炎支原体,肺炎衣原体。

3.2 依赖核酸序列的扩增技术(NASBA) NASBA 从 PCR 技术基础上发展而来,扩增速率和灵敏度超过 PCR 的恒温扩增技术。Demian 等^[18]报道用于呼吸道合胞病毒两个血清型的扩增,灵敏度高于间接荧光法和病毒培养。

3.3 环介导等温扩增技术(LAMP) LAMP 是一种简单、快速、灵敏的基因扩增技术,适宜病原体的快速分子生物学诊断。Ito 等^[19]用于检测甲型流感病毒 H1N1、甲型流感病毒 H3N2、乙型流感病毒。刘毅等^[20]用于检测痰液结核分枝杆菌。

3.4 靶序列富集多重 PCR 技术 一次反应中对多种靶序列进行敏感而特异的扩增和检测,适宜呼吸道病原体混合感染的快速诊断。王鑫磊等^[21]报道检测鲍曼不动杆菌等 14 种病原体。

3.5 基因芯片技术 将多种靶序列基因固定在载体上,与标记的样本核酸杂交,杂交信号经芯片阅读仪处理而得出检测结果,可一次快速检测多种呼吸道病原体^[21-22]。

综上所述,病原体的检测方法层出不穷,为临床医生准确、快速诊断提供了有效途径,并且随着医学知识与技术的不断发展,病原体的检测方法也将随之发展。在临床工作中结合实际,采用最适宜的检测方法可为结果的准确、快速提供必要的保证。

参考文献

- [1] Fishman AP, Elisa JA, Fishman SA, et al. Fishman's Pulmonary Disease and Disorders[M]. 4th ed. McGraw-Hill Company, 2008;361-457.
- [2] 周先志. 禽流感病[J]. 临床内科杂志, 1999, 16(4): 172-174.
- [3] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian origin influenza (H7N9) virus[J]. N Engl J Med, 2013, 368(20): 1888-1897.
- [4] 黄平, 俞守义. 人类冠状病毒与 SARS-CoV[J]. 中国预防医学杂志, 2005, 6(6): 552-555.
- [5] 唐神结, 高文. 临床结核病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011;39-44.
- [6] Dfaz A, Barria P, Niederman M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized Patients in child: the increasing prevalence of respiratory viruses among classic pathogens[J]. Chest, 2007, 131(3): 779-787.
- [7] Miyashita N, Shimizu H, Ouchi K, et al. Assessment of

useful-Ness of sputum Gram stain and culture for diagnosis of Community-acquired pneumonia requiring hospitalization[J]. Med Sci Monit, 2008, 14(4): 171-176.

- [8] 陈辉兰. 直接免疫荧光法病毒抗原测定在呼吸道感染性疾病诊断中的应用[J]. 中外医学研究, 2013, 11(31): 53-54.
- [9] 俞小卫, 王亚楠, 程宝金, 等. 直接免疫荧光法病毒抗原测定在呼吸道感染性疾病诊断中的应用[J]. 检验医学, 2013, 28(1): 76-79.
- [10] 单咏梅, 周宏, 杨凡, 等. 呼吸道非典型病原体抗体实验室检测及病原分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2297-2299.
- [11] 艾洪武, 孙红, 陈莎, 等. 武汉地区冬春季儿童急性呼吸道感染病原学研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(5): 1075-1077.
- [12] 吉祖活, 梁少君, 魏庆, 等. 呼吸道病原体九联检试剂的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(10): 1306-1306.
- [13] 杨侃, 陈智, 巫玉峰. 蛋白芯片技术对 1022 例急性呼吸道感染的病原学检测分析[J]. 广西医学, 2008, 30(5): 628-630.
- [14] 邢颖, 黄佳玲, 程金华, 等. 蛋白芯片法对 1076 例急性呼吸道感染患儿的病原体检测与分析[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(22): 2752-2754.
- [15] 陈宇宁, 刘冰, 陈华根. 目前检验医学的发展趋势和任务[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(2): 302-303.
- [16] Mo QH, Yang CL, Lin JC, et al. One-step multiplex RT-PCR for rapid screening of type A, B and novel A(H1N1) influenza viruses[J]. J South Med Univ, 2009, 29(8): 1545-1547.
- [17] 向彩云, 金海山, 虞照林. 多重 PCR 检测支气管肺泡灌洗液中细菌性病原体的研究[J]. 中国热带医学, 2011, 11(7): 797-799.
- [18] Deiman B, Schrover C, Moore C, et al. Rapid and highly sensitive qualitative real-time assay for detection of respiratory syncytial virus A and B using NASBA and molecular beacon technology[J]. J Virol Methods, 2007, 146(1/2): 29-35.
- [19] Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation[J]. J Virol Methods, 2006, 135(1): 272-275.
- [20] 刘毅, 黄曙海, 谭慧媚, 等. 环介导等温扩增技术检测肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(1): 24-26.
- [21] 王鑫磊, 姚静怡, 马建新, 等. 液相芯片技术用于医院获得性呼吸道感染病原谱筛查[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(4): 257-258.
- [22] Cannon GA, Carra MJ, Yandlea Z, et al. A low density oligonucleotide microarray for the detection of viral and atypical bacterial respiratory pathogens[J]. J Clin Virol, 2010, 163(1): 17-24.