

间接免疫荧光法检测呼吸道病原体质量控制*

陈华根, 黄学斌, 宋 强, 刘小花(四川省成都市新都区人民医院检验科 610500)

【关键词】 间接免疫荧光法; 呼吸道; 病原体; 质量控制

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 21. 063 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)21-3086-02

呼吸道感染性疾病的常见病原体有肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、葡萄球菌、嗜肺军团菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、结核杆菌等细菌;腺病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、禽流感病毒、副流感病毒、鼻病毒、埃可病毒、柯萨奇病毒、冠状病毒等病毒;肺炎支原体;肺炎衣原体;真菌等^[1-4]。感染病原体种类繁多,不仅可见单一感染,还可见多种混合感染^[5],加上病原体耐药,给疾病的诊治带来困难,严重影响患者健康,甚至危及生命。因此,呼吸道感染病原体的及时检测,对明确病原体,诊治呼吸道感染性疾病,避免或减少对患者的危害具有重要意义。检测呼吸道病原体的实验室方法众多,如普遍应用的细菌培养和药敏试验、酶联免疫吸附试验、分子生物学技术^[6-7]。但多种病原体各具不同生物学特性,实验条件要求迥异,致检测繁琐、周期较长,灵敏度和特异性难以满足需要。及时、简便、准确,且能一次检测多种病原体的实验技术,便成为实验人员探索和应用的目标。近年来,利用经典的荧光抗体技术,同时对多种呼吸道病原体一次联检,正广泛应用于呼吸道病原体实验室检测。如西班牙 Vir-cell 公司的呼吸道感染病原体免疫球蛋白 M(IgM)九联检,采用间接免疫荧光法,可在一张玻片上同时检测嗜肺军团菌、肺炎支原体、Q 热立克次体、肺炎衣原体、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 种病原体 IgM^[8-11]。间接免疫荧光法检测呼吸道病原体及时准确,利于呼吸道疾病的早期诊治。准确可靠的检测结果,是诊治疾病的必要依据,也是实验室工作的核心要求^[12]。间接免疫荧光法检测呼吸道病原体 IgM,包括标本的采集和制备、标本和试剂的平衡、加样、温育、洗涤、玻片晾干和加封闭介质、镜检和结果判断。该法操作简便,但任何步骤操作不当都会影响结果判定。保证检测结果的准确可靠,必须在各个环节抓好质量控制。

1 标本的采集和制备

采集合格的标本是保证检测质量的前提。无菌静脉采血,室温 1~2 h 或孵育 30 min 待血液收缩,3 000 r/min,离心 10~15 min 分离血清,如不能立即检测,1 周内应在 2~8 ℃ 保存标本,更长时间应在 -20 ℃ 以下温度冷冻保存标本。慎用黄疸和脂血标本。标本忌反复融冻,否则因机械剪切力造成蛋白质破坏。不宜存储过久,以免 IgG 聚集,影响分离。避免细菌污染,其分泌的一些酶可能会分解抗原、抗体。类风湿因子、自身抗体、补体等大分子免疫球蛋白,影响含荧光素二抗与待检 IgM 结合,此类标本不宜用间接免疫荧光法检测,检测时可能在以细胞背景观察的病原体(肺炎支原体、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)和质控孔出

现非特异荧光。

制备合格的标本同样是保证检测质量的前提。标本中含有待检病原体 IgG 和 IgM,检测时需要分离 IgG。首先按要求适量稀释标本,量过少,难以加完检测孔且易带入沉淀物,无法完成检测或因加入 IgG 致假阳性;量过多,稀释过量,影响结果判断。加入吸附剂离心沉淀 IgG 时,3 000 r/min,离心 10~15 min,保证分离充分,上清液中不含 IgG。

2 标本和试剂的平衡

操作前,取出标本和试剂在室温(20~25 ℃)中平衡 20 min 以上,保证抗原抗体反应初始温度能较快达到反应温度(37 ℃),以免后续温育时抗原抗体反应时间不足。

3 加 样

加样时,包括加入标本和含荧光素二抗,需准确加入检测孔内,不能触及检测孔底部,更不能溢出,以免划掉反应物和污染,影响最后结果判定。

4 温 育

温育是检测中重要环节,按要求保证足够的温度和时间。第 1 次温育是待检抗体与玻片包被相应抗原反应,37 ℃,90 min,湿盒温育。第 2 次温育是荧光素标记二抗与待检抗体和包被抗原结合物的反应,37 ℃,30 min,湿盒温育。达到温度合适,受热均匀,反应时间足够,特异性抗原抗体结合充分。

5 洗 涤

洗涤也是检测中的重要环节。用磷酸盐缓冲液冲洗后,玻片放入加有同样缓冲液的洗涤盒置水平摇床震荡 10 min。整个反应过程需 2 次洗涤,第 1 次是在待检抗体与玻片包被相应抗原反应温育完成后,第 2 次是在荧光素标记二抗与待检抗体和包被抗原结合物的反应温育完成后。目的是去除反应体系中未结合或过多结合物,避免非特异性干扰。要按规范进行操作,操作时应从玻片上部或中间均匀冲洗,不能直冲检测孔,震荡时振幅不能过大,以免洗掉反应物,造成结果判断假阴性。洗涤不彻底,背景影响镜检观察。

6 玻片晾干和加封闭介质

玻片冲洗后,需要晾干。采用自然晾干或加热干燥,多采用自然晾干,加热干燥时温度均匀,不易过高,以免致细胞固缩影响观察。加甘油封闭介质时不宜过多,过多的甘油溢到盖玻片上易导致镜检视野模糊。

7 镜 检

按以上步骤制备好的玻片在荧光显微镜下观察结果。玻片制备完毕,开启荧光显微镜,待荧光稳定后,立即开始镜检,集中在 1~2 h 检测,最好在 1 h 内检测完毕。时间过长,荧光强度将下降或淬灭。如遇较多标本,可关掉光源,待冷却后重

* 基金项目:四川省卫生厅科研课题(130534)。

新启动检测,或者避光 2~8 ℃ 保存,24 h 内检测。

8 结果判定

由于采用异硫氰酸荧光素,在荧光显微镜下呈黄绿色荧光。嗜肺军团菌、Q 热立克次体、肺炎衣原体 IgM 在黑色背景下可见典型的杆状、球杆装和球状黄绿色荧光。肺炎支原体、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 IgM 在红色细胞的胞膜、胞质和胞核上可见黄绿色荧光。每次检测,均需加入阴性和阳性对照,只有阴性对照片和质控孔无荧光出现,阳性对照片出现荧光,实验才算成功有效。嗜肺军团菌、Q 热立克次体、肺炎衣原体 IgM 在黑色背景下需要仔细观察典型荧光,否则容易漏检。肺炎支原体 IgM 每个视野阳性细胞应达到 50%,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 IgM 每个视野阳性细胞应达到 1%~15%。

总之,间接免疫荧光法用于呼吸道病原体检测,简便、灵敏、特异,且一次能检测多种病原体,适合在各级实验室开展,及时为临床诊治呼吸道感染性疾病提供可靠依据。但在实验室检测中,应重视分析前、分析中和分析后质量控制,规范操作,注重细节,才能保证检测结果准确可靠。

参考文献

[1] Fishman AP, Elisa JA, Fishman SA, et al. Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders[M]. 4th ed. McGraw-Hill Company, 2008; 361-457.
 [2] 王辉,刘亚丽,陈民钧,等. 2009-2010 年中国六城市成人社区获得性呼吸道感染病原菌耐药性监测[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(2): 113-119.
 [3] 岳红梅,王万淑. 慢性呼吸道疾病并发下呼吸道感染病原

菌及耐药情况调查分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(30): 3509-3512.
 [4] 印洁,施毅. 非典型病原体混合感染的诊断和治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(3): 236-238.
 [5] 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.
 [6] Díaz A, Barria P, Niederman M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients in Chile: the increasing prevalence of respiratory viruses among classic pathogens[J]. Chest, 2007, 131(3): 779-787.
 [7] 向彩云,金海山,庾照林. 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.
 [8] 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.
 [9] 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.
 [10] 谢红梅,胡必杰,马艳,等. 1647 例呼吸道感染病原体的 IgM 抗体检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(12): 2696-2698.
 [11] 叶婷,刘靳波,邓剑,等. 泸州地区冬春季儿童呼吸道感染病原体研究[J]. 现代医药卫生, 2012, 28(24): 3687-3688.
 [12] 吴正铜. 微生物实验室内部质量控制分析[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2): 287-288.

(收稿日期:2014-02-23 修回日期:2014-05-12)

狼疮性肾炎合并肺栓塞 1 例报道

黄娟, 吴江渝, 陈枫, 梁莉[△] (第三军医大学新桥医院肾内科, 重庆 400037)

【关键词】 狼疮性肾炎; 肺栓塞; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2014. 21. 064 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2014)21-3087-02

系统性红斑狼疮(SLE)是一种以免疫调节异常为特征,累及多系统脏器的自身免疫性疾病^[1]。SLE 存在肾损害者,一般称之为狼疮性肾炎。现将本科及时诊断、成功治疗的 1 例狼疮性肾炎合并肺栓塞患者报道如下。

1 病历资料

1.1 一般资料 患者女, 34 岁, 因“乏力、双下肢及眼睑水肿 3 个月余”, 于 2014 年 1 月 3 日收入本科治疗, 入院查体: 体温 36.7 ℃, 呼吸 18 次/分, 心率 89 次/分, 血压 113/76 mm Hg。患者有面部蝶形性红斑, 无口腔溃疡、脱发等症状, 实验室检查血常规: 白细胞 $9.87 \times 10^9/L$, 红细胞 $3.47 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 105.0 g/L, 血小板计数 $91 \times 10^9/L$; 尿常规: 尿红细胞(++++), 尿蛋白(++++), 尿白细胞(-); 24 h 尿蛋白定量 10.39 g/d; 肝功能: 转氨酶未见明显异常, 总蛋白 38.4 g/L, 白蛋白 16.7 g/L, 球蛋白 21.7 g/L; 肾功能电解质: 尿素氮 4.43 mmol/L, 血肌酐 42.4 $\mu\text{mol/L}$, 尿酸 345 $\mu\text{mol/L}$, 血钙 1.95 mmol/L; 免疫系列: 抗核抗体谱阳性(+), 抗体抗双链 DNA

抗体(+), 抗核抗体滴度 1:1 000 阳性, 抗 SSA 抗体阳性, 抗核糖体 P 蛋白阳性; 凝血 4 项: 活化部分凝血活酶时间 43 s, 凝血酶原时间 9.7 s, 国际标准化比值 0.81、纤维蛋白原 4.84 g/L。期间行肾活检术, 病理诊断为狼疮性肾炎(Ⅲ+Ⅴ型), 给予激素冲击治疗及环磷酰胺抑制免疫治疗, 患者眼睑及双下肢水肿减轻, 病情有所好转。2014 年 1 月 8 日 10:00 患者无明显诱因突感左侧胸痛, 伴呼吸困难, 不能平卧, 全身湿冷。立即转监护室, 取半卧位, 给予鼻导管吸氧 4 L/min, 测体温 37.5 ℃, 心电监护提示心率 122 次/分, 呼吸 30 次/分, 血压 105/56 mm Hg, 血氧饱和度 88%。结合患者高凝状态, 且突发呼吸困难, 不排除肺栓塞可能。急查动脉血气分析结果提示: pH 7.44, 氧分压 72 mm Hg, 二氧化碳分压 39 mm Hg, 二氧化碳总量 29.1 mmol/L, 血浆碱剩余 3.3 mmol/L, 碳酸氢根 27.8 mmol/L, 二氧化硫 93%。急查 D 二聚体 16.64 mg/L; 血常规提示白细胞 $17.03 \times 10^9/L$, 红细胞 $3.51 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 108.0 g/L, 血小板 $94 \times 10^9/L$; 心梗标志物、心衰标志物提示 B 型尿

[△] 通讯作者, E-mail: shen_39@163.com。