

~31%, 脑脊液中嗜酸性粒细胞增高, 也可见于其他肠道寄生虫病或过敏性脑炎, 或中枢神经系统其他炎症性疾病等, 但一般嗜酸性粒细胞增高比例多在 50% 以下。

血清中广州管圆线虫特异性抗体检测对该病是重要的辅助诊断, 目前多采用酶联免疫吸附试验 (ELISA), 从脑脊液中检测出广州管圆线虫的幼虫, 即可确诊, 但一般检出阳性率比例低^[4]。

由广州管圆线虫引起的脑膜炎, 本组 10 例发病前均有半生食福寿螺、蛇肉等, 因此预防本病重要在于卫生健康教育, 应避免半生食动物类食物。

参考文献

[1] 栗秀初, 孔繁元. 神经系统临床脑脊液细胞学[M]. 北京:

人民军医出版社, 2001: 73-74.

[2] 陈红岩, 陈梅根. 脑脊液嗜酸性粒细胞增加对中枢神经系统炎症的诊断意义探讨[J]. 福建医药杂志, 2001, 23(6): 116.

[3] 许隆祺, 蒋纯良. 重要寄生虫病诊治指南[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 47-50.

[4] 梁瑜, 俞慕华. 广州管圆线虫免疫与分子生物学研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 2001, 17(5): 100-102.

(收稿日期: 2010-08-31)

• 临床研究 •

实时荧光逆转录聚合酶链反应对疑似甲型 H1N1 流感样本的检测结果及分析

杨 婵(湘西自治州疾病控制中心, 湖南吉首 416000)

【摘要】 目的 对流感疑似患者咽拭子样本进行检测, 保证患者早诊断和及时分析湘西自治州甲型 H1N1 疫情流行动态。**方法** 依据世界卫生组织 2009 年 4 月 30 日颁布的检测甲型 H1N1 流感操作规程, 利用实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术及 7300 型实时荧光定量 PCR 仪的 SDS 操作软件进行检测。**结果** 737 例流感疑似患者咽拭子样本中, 甲型 H1N1 流感病毒阳性率为 25.5%。**结论** 运用 RT-PCR 检测结果显示湘西自治州甲型 H1N1 流感疫情具有传播快, 强度大, 但其病死率较低的流行特征, 与全国流行规律基本一致。

【关键词】 甲型 H1N1 流感病毒; 实时荧光定量聚合酶链反应; 核酸序列

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 04. 038 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)04-0448-03

甲型 H1N1 流感是一种新型的甲型流感病毒亚型, 该病毒包含有禽流感、猪流感和人流感 3 种流感病毒的核糖核酸基因片段, 主要造成人际间传播^[1]。自 2009 年 4 月在墨西哥和美国等国家先后出现甲型 H1N1 流感流行以来, 甲型 H1N1 流感已经在世界各国迅速蔓延。2009 年 6 月 11 日, 世界卫生组织(WHO)将甲型 H1N1 流感警戒级别提升至 6 级, 意味着疫情已经发展为全球性“流感大流行”^[2]。为了快速对疑似病例做出诊断, 保证阳性患者早治疗, 本中心流感网络实验室承担检测工作, 利用实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术, 对流感疑似患者咽拭子进行检测。

1 材料与方法

1.1 标本 来自于全州各医院和 8 县市各疾病控制中心自 2009 年 7 月以来采集的发热或流感样症状的临床咽拭子样本, 共计 737 例。

1.2 试剂 甲型、乙型流感病毒核酸诊断试剂盒购自上海之江生物科技有限公司, SuperScript™ Plantium® One-Step Quantitative RT-PCR System 购自 Invitrogen(上海)贸易有限公司。

1.3 阳性质控 由湖南省疾病控制中心通过 MDCK 细胞培养的甲型 H1N1 流感病毒阳性毒株制备而成。

1.4 引物、探针的合成 参考 WHO 公布的甲型 H1N1 流感病毒引物、探针序列^[3], 由 invitrogen(上海)贸易有限公司合成。引物用 DEPC 处理的超纯水, 溶解配制成 40 μmol/L 应用浓度, 探针用 DEPC 处理的超纯水, 溶解配制成 10 μmol/L 应用浓度。表 1 为 invitrogen(上海)贸易有限公司合成诊断甲型

H1N1 流感的引物、探针序列。

1.5 方法 实时荧光 RT-PCR 法。具体依据世界卫生组织 2009 年 4 月 30 日颁布的《检测甲型 H1N1 流感操作规程》和国家卫生部制定的《甲型 H1N1 流感监测方案》实验检测程序及 7300 型实时荧光定量 PCR 仪(购自美国应用生物系统中国公司)的 SDS 操作软件进行检测。

表 1 诊断甲型 H1N1 流感的引物、探针序列

引物和探针	序列 (5'→3')
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK GGT CTA
InfA Probe ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC AIT TGG TC
SW InfA Probe ²	CYA CTG CAA GCC CA“T”ACA AAG CAG GCA
SW HI Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
SW HI Reverse	CGG GAT AIT CCT TAA TCC TGT RGC
SW HI Probe ²	CA GAA TAT ACA “T”CC RGT CAC AAT TGG ARA A

注: ¹ 5' FAM, 3' BHQ1 修饰; ² 5' FAM, 3' 磷酸化, 中间“T”为 BHQ1 修饰。

1.5.1 核酸提取 用上海之江生物科技有限公司生产的核糖核酸(RNA)抽提试剂盒提取核酸, 具体步骤参考试剂盒说明书。

1.5.2 RT-PCR 反应体系建立 筛查甲型、乙型流感病毒反

应体系(上海之江医药科技有限公司生产)配置:甲型(乙型)核酸荧光 PCR 检测混合液 19 μ L,RT-PCR 酶 1 μ L,处理好的样本 5 μ L(或阳性质控 5 μ L),反应体系为 25 μ L。反应条件设定:45 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 min→95 $^{\circ}$ C 15 s→60 $^{\circ}$ C 60 s,40 个循环→94 $^{\circ}$ C 15 s,55 $^{\circ}$ C 35 s,40 个循环。荧光通道设定为 FAM。鉴定甲型 H1N1 流感病毒反应体系配置:每对 2 条引物(40 μ mol/L)各 0.5 μ L,探针(10 μ mol/L)0.5 μ L,Taq 酶 0.5 μ L,Nuclease-free Water 5.5 μ L,2XPCR MasterMix 12.5 μ L,处理好的样本 5 μ L(或阳性质控 5 μ L),反应体系为 25 μ L。反应条件设定:50 $^{\circ}$ C 30 min→95 $^{\circ}$ C 2 min→95 $^{\circ}$ C 2 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,45 个循环。荧光通道设定为 FAM。

1.5.3 RT-PCR 结果分析 在 SDS 操作软件上,基线确定取 3~15 个循环的荧光信号。根据甲型、乙型流感病毒核酸诊断试剂盒说明书判定:CT $\leq$ 40 为阳性,CT>40 为阴性。甲型 H1N1 流感病毒阳性依据 WHO 颁布的检测甲型 H1N1 流感操作规程判定^[3],InFA、SW InFA、SW H1 CT 值均小于或等于 40 为阳性。

2 结 果

2.1 各月份及总检出情况 737 例咽拭子样本中,共检出甲型 H1N1 阳性 188 例,总阳性率 25.5%;各月份检出率在 0.0%~45.7%之间,以 12 月检出率为高(45.7%)(见表 2)。

2.2 不同年龄、性别的检出情况 按年龄阶段分为婴幼儿组(0~6 岁)、少年组(7~17 岁)、青年早期组(18~28 岁)、青年成熟期组(29~40 岁)、中年组(41~65 岁)、老年组(>65 岁),受检人年龄覆盖在 7 个月至 81 岁。阳性检出率以少年组为高,组间差异具有统计学意义($\chi^2=13.51,P<0.025$);男性患者阳性率 23.3%,女性患者 27.8%,差异无统计学意义($\chi^2=2.016,P>0.05$)(见表 3)。

表 2 2009 年 7 月至 2010 年 1 月甲型 H1N1 流感病毒检测结果

月份	受检人数	阳性人数	阳性率(%)
7	4	0	0
8	89	0	0
9	210	27	12.9
10	127	48	37.8
11	115	54	45
12	116	53	45.7
1	76	6	7.9
合计	737	188	25.5

表 3 甲型 H1N1 在不同年龄、性别的检出分布

年龄	男			女			合计		
	受检人数	阳性人数	阳性率(%)	受检人数	阳性人数	阳性率(%)	受检人数	阳性人数	阳性率(%)
0~6	69	9	13.0	56	10	17.9	125	19	15.2
7~17	174	47	27.0	163	52	31.9	337	99	29.4
18~28	65	17	26.2	82	25	30.5	147	42	28.6
29~40	38	9	23.7	38	8	21.1	76	17	22.4
41~65	25	5	20.0	19	6	31.6	44	11	25.0
>65	3	0	0	0	5	0	8	0	0
合计	374	87	23.3	363	101	27.8	737	188	25.5

2.3 各月不同类型流感确证病例分布情况 甲型流感在连续监测的月份中占比不断减少,甲型 H1N1 流感在连续监测的前 6 个月占比不断增加,在 2010 年 1 月占比迅速下降(见表 4)。

表 4 2009 年 7 月至 2010 年 1 月不同类型流感确证病例分布

月份	甲型流感		乙型流感		甲型 H1N1 流感	
	阳性 ¹	%	阳性	%	阳性	%
7	3	100.0	0	0.0	0	0.0
8	34	94.4	2	5.6	0	0.0
9	29	51.8	0	0.0	27	48.2
10	6	10.9	1	1.8	48	87.3
11	3	5.3	0	0.0	54	94.7
12	2	3.6	1	1.8	53	94.6
1	0	0.0	10	62.5	6	37.5

注:¹ 为不包括甲型 H1N1 流感阳性人数在内的其他甲型流感阳性人数。

3 讨 论

截止 2010 年 1 月 31 日湘西自治州共报告甲型 H1N1 流感确证病例 188 例,危重病例 10 例,其中死亡 3 例。运用实时荧光 RT-PCR 结果表明,本州甲型 H1N1 流感疫情与全国流

行规律基本一致,具有以下 5 个流行特征:(1)疫情范围扩大迅速,传播速度快。本州自 9 月 7 日第 1 例甲型 H1N1 流感病例确证以后,阳性率增加迅速。表 2 显示 9 月份阳性率为 12.9%,而 10 月份检出率比 9 月份增加 2.9 倍。且在 9 月上旬,随着院校的开学,大量学生人群聚集,本州甲型 H1N1 流感聚集性疫情明显增多。(2)确诊病例年龄集中度较高。全州确证病例集中在 7~28 岁,以学校学生为主,占到 75%。国外专家认为,年龄可能是本次流感的一个危险因素,青壮年更易发病^[4],这与本实验室数据基本一致,本州 40 岁以下感染者占总感染者的 94.1%,不同年龄组检出率存在统计学差异。(3)流行强度增加明显。表 4 显示,从 9 月开始甲型 H1N1 流感病毒逐渐成为主要流行株,11、12 月连续两个月甲型 H1N1 确证病例占流感确证病例均超过 90%。(4)危重病例逐步增加,但病死率较低。新生儿、孕妇,免疫功能低下者,有基础性疾病者感染率上升,成为危重病例。全州累计报告危重病例 10 例,其中 3 例死亡病例,1 例为孕妇,1 例为长期吸毒人员,1 例为有基础性疾病并发 H1N1 的学生。甲型 H1N1 在本州病死率为 1.60%,低于以往的人禽流感、非典病死率。(5)疫情下降趋势快。2010 年 1 月,甲型 H1N1 检出率仅为 7.9%,比上一月下降 37.8%。流行强度也迅速下降,乙型流感病毒的检出率明

显增加。实验室 2010 年 2 月不完全数据显示,至 2 月 24 日,甲型 H1N1 检出率为 0,乙型流感病毒阳性检出 4 例。相信依据国家制定的防控措施和本州的实际情况,结合免疫接种等预防手段,本州将遏制此次疫情。

流感常引起全球性的大流行,如在 1957 年和 1968 年源于亚洲的全球流感疫情分别导致 400 万和 200 万人死亡。在全球范围内,每年流行的季节性流感也造成约 300 万至 500 万例严重疾病和约 25 万至 50 万例死亡。而此次甲型 H1N1 疫情,截止 2010 年 2 月 19 日,WHO 公布至少 15 924 人死亡。由此可见,流感是一个严重的全球公共卫生问题。目前我国甲型 H1N1 疫情总体有所缓解,本州疫情也得到缓和,然而季节性流感开始增加,因此继续加强对流感的监测是本中心流感网络实验室的工作重点。

参考文献

[1] Novel Swine-Origin Influenza A(H1N1)Virus Investiga-

tion Team. Emergence of a novel swine-origin Influenza A (H1N1)Virus in humans[J]. Engl J Med,2009,360(25): 2605-2615.

[2] 王云龙,李彦霞,李智涛,等. 甲型(H1N1)流感病毒三重 RT-PCR 快速检测方法的建立[J]. 山东医药,2010,50 (32):22-24.

[3] 常宏伟. 流感病毒 RT-PCR 核酸检测及流行病学特点 [J]. 中华疾病控制杂志,2010,14(8):701-704.

[4] Vaqu Rafart J,Gil Cuesta J,Brotons Agull M. Main fea- tures of the new influenza virus a pandemic (H1N1)[J]. Med Clin(Barc),2009,133(13):513-521.

[5] Whiley DM,Bialasiewicz S,Bletchil C,et al. Detection of novel influenza A (H1N1) virus by real time PT-PCR [J]. J Clin Virol,2009,45(3):203-204.

(收稿日期:2010-08-30)

• 临床研究 •

比色时间与存放温度对酶联免疫吸附试验结果判读的影响

李 颖,黄永升(广西中医学院附属瑞康医院检验科,南宁 530011)

【摘要】 目的 探讨比色时间与存放温度对酶联免疫吸附试验(ELISA)结果判读的影响。**方法** 用酶免试剂盒对两对半标本进行检测。加终止液后分别置于不同条件下保存,用双波长(450 nm/630 nm)在不同时间段读取各孔吸光度(OD)值。**结果** 各时间段与第一次相比,结果有明显变化。**结论** 比色时间及标本终止后的保存条件对 ELISA 的检测结果影响明显,应对其作有效限定。

【关键词】 比色时间; 存放温度; 酶联免疫吸附试验

DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 04. 039 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)04-0450-03

酶联免疫吸附试验(ELISA)有敏感性高、特异性强、重复性好的特点,但该法影响因素较多,如加样、温育、显色、比色等都对检测结果的判读有着直接影响,国内亦有多篇报道^[1-2]。本文着重对 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 等两对半项目进行检测,探讨比色时间延迟与存放温度对 ELISA 吸光度(OD)变化的影响,以提高 ELISA 的质量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 英科新创(厦门)科技有限公司提供的 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗-HBc 质控品,英科新创(厦门)科技有限公司提供的两对半检测试剂盒。Rayto RT-

6000 酶标仪。

1.2 方法 标本按说明书操作,加终止液后混匀,用双波长(450 nm/630 nm)读取 OD 2 次,取其均值。将终止后标本分别置于 37 ℃温箱、8 ℃冰箱、室温(25 ℃)暗处及室温(25 ℃)亮处保存,前 1 小时每隔 15 min 比色 1 次,2 h 后每隔 30 min 比色 1 次,比色方法同上。观察 OD 值至 3 h 的变化。

2 结 果

两对半各项在不同存放温度下不同时段 OD 值见表 1。两对半各项目 3 h 不同存放温度下 OD 值的变化分别见图 1~5。

表 1 两对半各项在不同存放温度下不同时段 OD 值

项目	保存温度	保存时间(min)							
		0	15	30	45	60	90	120	180
HBsAg	37℃	3. 117	2. 835	2. 676	2. 400	2. 328	2. 154	2. 039	1. 944
	8 ℃	2. 729	2. 375	1. 424	0. 893	0. 734	0. 555	0. 488	0. 425
	25 ℃(暗)	3. 114	3. 078	2. 456	2. 003	1. 782	1. 427	1. 312	1. 218
	25 ℃(亮)	2. 759	2. 635	2. 309	1. 830	1. 547	1. 292	1. 123	1. 034
抗-HBs	37 ℃	3. 132	2. 894	2. 628	2. 467	2. 345	2. 188	2. 085	1. 993
	8 ℃	2. 671	2. 380	1. 833	1. 182	0. 950	0. 713	0. 616	0. 528
	25 ℃(暗)	2. 943	2. 700	1. 875	1. 521	1. 368	1. 136	1. 075	1. 019
	25 ℃(亮)	2. 737	2. 516	1. 942	1. 590	1. 421	1. 231	1. 098	1. 013