

# 化学发光法用于甲型流感检测的效果评价

杨坤宇<sup>1</sup>, 张毅<sup>1</sup>, 徐飞海<sup>2</sup>, 李庶甘<sup>1</sup>, 陈清瑞<sup>2</sup>, 杨苹<sup>1</sup>, 郑燕平<sup>1</sup>, 童玲玲<sup>1</sup>, 陈毅歆<sup>3</sup>

1. 厦门国际旅行卫生保健中心, 福建 厦门 361012; 2. 厦门万泰沧海生物技术有限公司;

3. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

**摘要:**目的 考核甲型流感化学发光检测试剂的灵敏度和特异性。方法 分别利用病毒分离培养液和入境人群的鼻咽拭子标本考查甲型流感试剂盒的检测灵敏度和特异性。结果 化学发光法对 H1、H3、H5、H7、H9 等亚型的甲型流感病毒株均有很好的检出率, 灵敏度明显优于 FluA-DOT 和 Directigen EZ Flu A; 对 102 份入境人群鼻咽拭子标本的检测灵敏度为 97.62%。结论 甲型流感化学发光检测试剂具有很好的灵敏度和特异性, 适用于口岸现场的甲型流感快速筛查。

**关键词:** 化学发光; 甲型流感; 检测; 效果评价

中图分类号: R183.3 文献标识码: B DOI: 10.16408/j.1004-9770.2015.04.002

## Evaluation of chemiluminescence immunoassays kits for detection of influenza A virus

YANG Kun-yu\*, ZHANG Yi, XU Fei-hai, LI Shu-gan, CHEN Qing-rui, YANG Ping, ZHENG Yan-ping, TONG Ling-ling, CHEN Yi-xin

\*Xiamen International Travel Healthcare Center, Xiamen, Fujian 361012, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the sensitivity and specificity of chemiluminescence immunoassays kit for detection of influenza A virus. **Methods** To analyze the sensitivity and specificity of three different assay kits for detection of influenza A virus by using the viral culture liquid and nasopharyngeal swabs from entry-exit travelers. **Results** The chemiluminescence immunoassays kit had a good detection rate when it was tested against a panel of influenza A virus strains (H1/H3/H5/H7/H9), and its sensitivity was much better than FluA-DOT kit's and Directigen EZ Flu A kit's. **Conclusion** Chemiluminescence immunoassays kit used for the detection of 102 nasopharyngeal swabs from entry-exit travelers had a detection sensitivity of 97.62%. **Conclusion** Chemiluminescence immunoassays kit had good sensitivity and specificity, which was fit for the rapid detection of influenza A virus at frontier ports.

**Key words:** Chemiluminescence immunoassays; Influenza A virus; Detection; Evaluation

甲型流感是由甲型流感病毒引起的急性呼吸道疾病, 具有传染性强和致病性强的特点, 可对人群尤其是儿童、老年人及机体免疫力低下的人群造成巨大伤害<sup>[1]</sup>, 是全球性监测疾病。甲型流感病毒属于正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 是一种球形或杆状、有包膜的单股负链 RNA 病毒。甲型流感病毒具有很高的突变率<sup>[2,3]</sup>, 可通过抗原漂移和抗原转变两种方式持续发生变异<sup>[4-6]</sup>, 这使它能逃避宿主免疫的识别与清除, 增加了疫苗研制的难度。因此, 实时监测甲型流感疫情, 对流感病例做到早发现、早诊断、早治疗仍是防止流感扩散的有效手段。

目前用于以监测为目的的甲型流感病毒检测方

法主要有核酸检测方法和免疫学检测方法, 核酸检测对仪器和环境的要求较高, 操作繁琐且成本较高, 适用于实验室确诊工作<sup>[7-9]</sup>。免疫学检测方法主要有胶体金法和免疫渗滤法, 这两种方法操作简便, 检测速度快, 且价格低廉, 适合用于社区、口岸等现场的甲型流感快速筛查, 但是这两种方法均存在灵敏性和特异性较低的缺点, 对病毒含量较低样本的检出率较差<sup>[10-13]</sup>。化学发光法是一种将免疫检测和化学发光分析联合应用的检测方法<sup>[14]</sup>, 具有灵敏性和特异性高、检测快速、可自动化的特点, 适合用于大批量人群的甲型流感快速筛查。本研究利用自主制备的甲型流感病毒的 NP 单抗<sup>[7,13]</sup>为原料制备甲型流感

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2014IK045); 厦门市科技惠民项目 (3502Z20144083)

通讯作者: 杨坤宇, E-mail: yangky@xmciq.gov.cn

化学发光检测试剂,并对试剂进行效果评价。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 细胞株和甲型流感病毒分离培养液由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术中心提供。

1.1.2 主要试剂 甲型流感病毒抗原(FluA-Ag)快速检测试剂盒(FluA-DOT)购自北京万泰生物药业股份有限公司;Directigen EZ Flu A+B 购自美国 BD 公司。病毒 RNA 提取试剂盒购自瑞士罗氏公司。流感病毒核酸一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒(AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit)购自美国 AB 公司。Hanks 液购自美国 sigma-aldrich 公司。甲型流感病毒化学发光检测试剂由厦门万泰沧海生物技术有限公司提供。

1.1.3 主要仪器设备 LightCycler480 荧光定量 PCR 仪由瑞士罗氏公司生产。二级生物安全柜购自美国 Baker 公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 病毒培养株血凝抑制试验(HI) 采集新鲜鸡血或豚鼠血进行试验,方法参考文献<sup>[10]</sup>,用于确定病毒滴度。

1.2.2 甲型流感病毒化学发光(Chemiluminescence Immunoassays, CLIA)检测原理 采用双抗体夹心法检测标本中的甲型流感病毒核蛋白抗原(Influenza A virus NP,Flu A NP)。在微孔条上预包被 anti-Flu A NP 的单克隆抗体,待测标本在裂解液处理后,可被包被抗体捕获于微孔板上,形成抗原-抗体复合物(Ag-Ab)。随后加入 anti-Flu A NP 酶标抗体 (Ab-HRP),形成抗体-抗原-酶标抗体复合物 (Ab-Ag-Ab-HRP),复合物上连接的 HRP 催化显色剂反应,生成蓝色产物,终止反应后,变为黄色。若样品中无相应抗原时,不显色。

1.2.3 甲型流感病毒化学发光检测步骤 ①稀释:将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水稀释 20 倍;②编号:将样品对应微孔按序编号,每板设阴性对照 3 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 1 孔(用双波长检测,可

不设空白对照孔);③原倍样品加样:每孔先加入裂解液 50 μl,分别在相应孔中加入待测原倍样品或阴、阳性对照 50 μl,空白孔除外;④温育:用封板膜封板后置 37℃中温育 30 min;⑤洗涤:揭掉封板膜,用洗板机洗涤 5 遍,最后一次尽量扣干;⑥加酶:每孔加入酶标试剂 100 μl,空白孔除外,轻轻振荡混匀;⑦温育:操作同④;⑧洗涤:操作同⑤;⑨反应:每孔加入发光底物 A、B 液各 50 μl,轻轻振荡混匀,室温避光反应 15 min;⑩测定:用化学发光仪去背景后测定各孔发光值。

1.2.4 试剂盒检测 北京万泰公司的甲型流感病毒抗原(FluA-Ag)快速检测试剂盒(FluA-DOT)、美国 BD 公司的 Directigen EZ Flu A+B 等两种试剂盒的检测分别按照试剂盒说明书进行。

1.2.5 入境人群鼻咽拭子样本的采集 采集样本时,受采集人员的头稍微抬起,将聚酯纤维头拭子轻轻转动缓缓插入受采集人员鼻孔至鄂部,停留数秒吸取分泌物,轻轻旋转取出拭子,将拭子折断,弃去手接触部分,将带有医用棉签的部分浸泡至 1 ml 的 Hanks 液体中<sup>[10]</sup>。

1.2.6 样本核酸提取 按照罗氏公司的 RNA 提取试剂盒说明进行。

1.2.7 Real-time RT-PCR 的条件设置与结果判定 按照 AB 公司的 AgPath-ID One-Step RT-PCR Kit 操作说明进行。

### 2 结果

选取 H1、H3、H1N1(2009)、H5、H7、H9 共 11 株不同亚型的甲型流感病毒培养分离液,进行系列稀释,确定病毒的血凝素效价(HA),对 3 种甲型流感检测试剂盒的灵敏度进行比较,从结果(表 1)可以看出,化学发光法检测下限为 0.01HA~0.0001HA,Flu A-Dot 对 11 株病毒株能检测到 0.01HA~0.005HA,而 Directigen EZ Flu A 试剂的检测下限为 0.1HA~0.8HA。对化学发光法而言,除了对 H7(DA47/04)病毒株的检测下限与 Flu A-Dot 相同外,对另外 10 株病毒株的检测下限均明显高于其他两种检测试剂,这提示化学发光法具有更好的检测灵敏度。

表 1 3 种不同的甲型流感检测试剂盒灵敏度比较

病毒亚型	美国 BD 公司的 EZ 检测试剂	北京万泰公司的 FluA-Dot 检测试剂	化学发光(CLIA)检测试剂
Seasonal H1 (N66/09)	0.5HA	0.01HA	0.001HA
Seasonal H1 (N585/09)	0.1HA	0.005HA	0.001HA
H3 (N511/09)	0.5HA	0.005HA	0.0001HA
H3 (B154/09)	0.1HA	0.005HA	0.001HA
pan H1N1(N465/09)	0.5HA	0.005HA	0.0001HA

续表 1

病毒亚型	美国 BD 公司的 EZ 检测试剂	北京万泰公司的 FluA-Dot 检测试剂	化学发光 (CLIA) 检测试剂
pan H1N1 (N622/09)	0.1HA	0.001HA	0.0005HA
H5(YU22/02)	0.1HA	0.005HA	0.0001HA
H5(1038/06)	0.5HA	0.005HA	0.0005HA
H7(DA47/04)	0.1HA	0.001HA	0.001HA
H9(Y280/97)	1.0HA	0.01HA	0.001HA
H9(G9/99)	0.5HA	0.01HA	0.005HA

从厦门口岸出入境人员中采集鼻咽拭子样本 102 份,用 Real time RT-PCR 对这些样本进行检测,得到 42 份甲型 H1N1 流感阳性样本和 60 份阴性样本。再用 CLIA 对这些样本进行检测,CLIA 对这 42 份阳性样本的检测灵敏度为 97.62%,对 60 份阴性样本的检测特异性为 96.67%,阳性预测值为 95.35%,阴性预测值为 98.31%。灵敏度和特异性均优于 Flu A-Dot 检测试剂<sup>[10]</sup>(表 2)。

表 2 甲型流感化学发光检测试剂 (CLIA) 对口岸送检样本的检测

实时荧光定量 PCR 检测	甲型流感化学发光检测		
	样本量(份)	阳性数量(份)	阴性数量(份)
甲型流感阳性	42	41	1
甲型流感阴性	60	2	58
合计	102	43	59
灵敏度 (%)	97.62(41/42)		
特异度 (%)	96.67(58/60)		
阳性预测值 (%)	95.35(41/43)		
阴性预测值 (%)	98.31(58/59)		

### 3 讨论

目前应用较广泛的甲型流感免疫学快速检测试剂主要由胶体金法或免疫渗滤法制备而成,这两种检测方法都具有检测时间短、操作简单的特点,一次检测可在 15 min 内完成,适用于现场快速筛查工作<sup>[7,10,15]</sup>。但是,这两种检测方法都需要依靠人工操作完成,个人难于同时完成大批量样本的检测,且容易出现人为误差。化学发光法检测时间较长,一批检测需要 2 h 左右,但是化学发光法可以利用仪器设备完成检测工作,避免人为差错,并且可以根据需要同时完成几百甚至几千份样本的检测,适合大批量样本的检测工作。

前期工作中,已经比较过北京万泰生物药业股份有限公司生产的 FluA-Dot、美国 BinaxNOW 公司生产的 Influenza A&B 快速检测试剂盒和美国 BD 公司生产的 Directigen EZ Flu A+B 等 3 种试剂盒的灵敏度,发现 FluA-Dot 较其他两种试剂盒有更高的灵敏度和特异性<sup>[7,10]</sup>。本研究采用病毒分离培养液比较 CLIA、FluA-Dot 和 Directigen EZ Flu A+B 等

3 种试剂盒的检测效能,从实验结果可以得出 CLIA 对 H1、H3、H5、H7、H9 等目前主要流行株均有较好的检出率,检测灵敏度优于 FluA-Dot(免疫渗滤法)和 Directigen EZ Flu A+B(胶体金法),可作为核酸检测的有益补充。FluA-Dot 和 Directigen EZ 检测灵敏度的差别与以前的实验结果基本一致。

本研究通过采集入境人员的鼻咽拭子样本考核化学发光方法在口岸的实际应用价值,从表 2 可以看出,CLIA 对 102 份样本的检测灵敏度高达 97.62%,检测特异性高达 96.67%。CLIA 漏检的 1 份阳性标本,其 Real-time RT-PCR 检测的 CT 值约为 37。试验结果表明,当 35 ≤ CT ≤ 37 时,CLIA 的检出率约为 83.22%。

与社区、医院等其他口岸现场不同,国境口岸具有人流量大、通关速度快的特点,口岸卫生检疫人员往往需要在很短的时间内完成大量样本的采集、处理和检测等工作,这对检测试剂的灵敏度和检测时间提出了很高的要求。在目前市面上成熟的甲型流感酶联免疫试剂较少的前提下,本研究研制的化学发光检测试剂具有很好的检测灵敏度和特异性,可以很好地弥补胶体金法和免疫渗滤法的不足。化学发光法可以和胶体金法、免疫渗滤法等其他快速检测方法一起应用于口岸流感的监测工作。

### 参考文献

- [1] Ma J, Dushoff J, Earn DJ. Age-specific mortality risk from pandemic influenza[J]. J Theor Biol. 2011,11(288):29-34.
- [2] 刘金,汉雨梅.甲型流感病毒研究进展[J].现代畜牧兽医,2012,1(11):62-64.
- [3] Pales P. Influenza: old and new threats [J]. Nature Medicine Supplement, 2004,10(12):S82-S87.
- [4] 袁彦婷,陈建威,陆祖宏.中国甲型流感病毒血凝素基因进化分析[J].解放军医学院学报,2014,35(9):906-908.
- [5] Höper D, Kalthoff D, Hoffmann B, et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Subtype H5N1 escaping neutralization: more than HA variation[J]. J Virol,2012,86(3):1394-1404.
- [6] Webster RG. Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza[J]. Lancet,2004,363(9404):234-236.
- [7] 徐飞海,王锐,白佳伟,等.一种 A 型流感病毒 NP 抗原快速检测

(下转第 288 页)

的风险进一步增加。据调查,我省广泛存在登革热传播媒介——白纹伊蚊<sup>[5]</sup>,机场办 2014 年 5 月-10 月对石家庄航空口岸进行了生物媒介本地调查,共监测到蚊类 209 只,其中白纹伊蚊 19 只,主要集中在 5、6、7 月份。登革热临床表现复杂多样,具有传播迅速,发病率高,人群普遍易感,且没有疫苗可免疫等特点,加上登革热的输入性、突发性、易致误诊、漏诊,造成传染源“逍遥”传播,如疫情报告、调查处理不及时,在蚊媒生物活动期更易造成疫情蔓延<sup>[6]</sup>。

4.2 风险分析,防患未然 针对疫情形势发展,结合口岸通航目的地及主要人员构成等信息,对既有及新开航线的疫情输入风险进行分析十分必要。对高风险入境航班要重点查验,依据国家卫计委《登革热诊疗指南(2014 年版)》重点筛查有症状旅客,充分利用现场快速筛查试剂;注意监测航空器医学媒介生物特别是蚊类生物,定期对口岸区域内蚊媒生物做好监测分析。对重点航班,加强对航空公司、旅行社、旅客做好培训和宣教活动,提高旅客传染病防治意识。

4.3 联防联控,不留死角 面对突发公共卫生事件,现场处置往往需要机场各驻场单位配合,后续处置则需要地方卫生部门发挥关键作用。结合本口岸特点,在各兄弟单位的大力支持下,河北检验检疫局石家庄机场办事处制定了《口岸突发公共卫生事件应急处置预案》,组建了各部门联席的口岸突发公共卫生事件应急处置领导小组。本次登革热疑似病例的发现、通关、转诊、后续追踪各个环节的妥善处置都是口岸卫生检疫部门和各联检部门及地方卫生行政部门密切沟通,通力合作的结果,充分验证了各部门联防联控在处置类似事件时的有效性。

4.4 国内航线联防联控不容忽视 登革热疫情波及广东、福建、广西、云南等多个省,石家庄机场与上述省份开通的航线较为密集,为了弥补国内航线检疫环节的缺失,防止国内登革热疫情从石家庄航空口岸传入河北省,应加强全口岸范围内(包含国内区域)的传染病监测及卫生监督工作。健全、完善与机场内运营的所有航空公司、经营商户、机场急救中心等相关单位关于疫病、疫情防控的协作机制,设置疫情观察员,建立覆盖整个石家庄航空口岸传染病疫情监测哨点,能在第一时间发现、全面收集疫情,形成口岸范围内传染病疫情全方位、立体防控网络。同时,检验检疫机构加强与协作单位的沟通与交流,及时开展相关的法律法规和传染病知识的宣教工作,加强口岸卫生监督。做到及早发现、控制传染源,消灭传播媒介、切断传播途径,从源头上控制疫情。

#### 参考文献

- [1] 肖东楼.登革热防治手册[M].北京:人民卫生出版社,2008.
- [2] 国家卫生计生委.登革热病例超 2.7 万输入性病例仍是主要原因[EB/OL].[2014-10-09].http://news.xinhuanet.com/politics/2014-10/09/c\_1112752842.htm.
- [3] 国家卫计委办公厅.关于印发登革热诊疗指南(2014 年版)的通知 [EB/OL].[2014-08-26].http://www.moh.gov.cn/yzygj/s3593g/201408/02c903ec21164fb296e847f75b3bf1b9.shtml.
- [4] 国家质检总局卫生司.关于加强口岸登革热疫情防控工作的通知质检卫函[2014]60 号[EB/OL].[2014-08-26].http://www.lnciq.gov.cn/nsjg/wjch/tzgg/201410/t20141030\_104805.htm.
- [5] 安继尧,严格,张学文,等.白纹伊蚊-登革热的重要媒介[J].医学动物防治,2003,17(8):449-452.
- [6] 郝宗宇,李晓红,马景芳,等.一例输入性登革热病例的调查处理报告[J].河南预防医学杂志,2006,17(1):62-63.

收稿日期 2015-03-12

(上接第 237 页)

试剂的建立[J].中国人兽共患病学报,2008,24(1):22-25.

- [8] Michelle Q, Ann C, Maura N, et al. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 759-763.
- [9] Weinberg A, Walker M L. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, 12(3): 367-370.
- [10] 杨坤宇,陈慧,陈毅歆,等.3 种甲型流感快速检测试剂的性能评价[J].中国国境卫生检疫杂志,2012,35(5):317-319.
- [11] 杨溪霖,罗皓.应用胶体金免疫层析法快速检测甲型流感病毒[J].国际检验医学杂志,2013,34(19):2593-2593.

- [12] 邱海燕,卢文波,覃世榕,等.两种甲型流感病毒抗原检测方法的比较[J].中华医院感染学杂志,2010,1(18):2890-2891.
- [13] 桂勋,张旭辉,枢少君,等.禽流感病毒特异性 NP 单克隆抗体的鉴定及禽流感特异性检测方法的建立[J].中国人兽共患病学报,2014,30(8):777-781.
- [14] 蓝兴国,曹领改,魏德强,等.抗人 CA19-9 单克隆抗体的制备和鉴定及化学发光检测体系的建立 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,1(12):1282-1286.
- [15] 余光清,郑晓晨,雷蕾,等.胶体金法在甲型流行性感筛查中的应用价值[J].应用预防医学,2014,20(4):249-251.

收稿日期 2015-04-28