

感染性疾病实验诊断实用技术—免疫层析试验

廖远泉

作者单位: 242500 安徽宣城, 安徽省泾县医院检验科

通信作者: 廖远泉, Email: liaoyuanquan@aliyun.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.019

【摘要】 免疫层析试验是即时检验(POCT)采用的临床免疫学检测技术之一,在日本已广泛应用于感染性疾病、心肌标志物、激素、肿瘤标志物、药物浓度、过敏等的临床检测。本文从感染性疾病实验诊断实用技术—免疫快速诊断试剂盒的实用性,其在流行性感冒、小儿感染性疾病、社区获得性肺炎、性传播疾病等中的临床应用现状,试剂盒临床检测的实验操作、敏感度、特异度以及使用时应注意的事项等方面进行论述。同时也提示,感染性疾病的快速诊断试剂仅可用于辅助临床诊断,必须根据临床所见,进行严谨的分析,解读检测结果以对疾病做出明确的临床诊断。

【关键词】 即时检验; 感染; 诊断; 免疫层析试验; 快速诊断试剂盒

Immunochromatography assay: a practical technique for experimental diagnosis of infectious diseases

Liao Yuanquan. Jingxian Hospital of Anhui Province, Xuancheng 242500, Anhui, China

Corresponding author: Liao Yuanquan, Email: liaoyuanquan@aliyun.com

【Abstract】 Immunochromatography assay is one of the clinical immunology detection techniques adopted by point-of-care-testing (POCT), and has been widely used in detection of infectious diseases, myocardial markers, hormones, tumor markers, drug concentration, allergy, etc. in Japan. In this article, the practicability of rapid immunodiagnosis kit as a practical technique for experimental diagnosis of infectious diseases, and its clinical application in influenza, infectious diseases of children, community acquired pneumonia, sexually transmitted diseases, etc., as well as the operation, sensitivity, specificity, precautions of clinical detection of the kit and the matters needing attention when using it were reviewed. At the same time, it is also suggested that the rapid diagnostic reagent for infectious diseases can only assist clinical diagnosis. It is necessary to conduct rigorous analysis and interpretation of test results according to clinical findings in order to make a clear clinical diagnosis of the disease.

【Key words】 Point-of-care-testing; Infection; Diagnosis; Immunochromatography assay; Rapid diagnostic kit

2019 年底,湖北武汉出现新型冠状病毒肺炎,后证实是由新型冠状病毒(2019-nCoV)感染导致^[1]。2019-nCoV 可经呼吸道飞沫、密切接触传播,目前已知的传染源主要是 2019-nCoV 感染患者和病毒携带者^[2-3]。临床实验室诊断新冠肺炎主要采用核酸检测技术,但该方法成本较高,有一定局限性,所以研究和探讨新的诊断检测方法十分必要。

本文参考日本国际医疗福祉大学热海医院检验医学部谷直人教授的原著《抗原檢出用迅速キットの有用性で使用上の留意点》^[4]进行全文编译,希望能够借他山之石为“抗疫”工作者和临床实验室检验医师提供参考资讯和科研思路。亦希望检验医学不断地创新,可以为临床医学的发展以及 2019-nCoV 的快速实验诊断插上翅膀^[5-6]。

1 感染性疾病实验诊断的实用技术—免疫层析试验

近年来,在临床检查手段多样化的趋势下,即时检验(point-of-care-testing, POCT)备受关注。POCT 是在患者身旁,医护人员应用便携式仪器和诊断试剂实施的临床检

测,其最大的优点是可在临床现场快速获得检测结果报告,从而可以缩短决定治疗方案的时间,并根据 POCT 的检测结果快速采取治疗措施。单纯寻求临床现场紧急检查的时代已经过去,感染性疾病的快速诊断和在家检查等亦扩展为临床医学检验的一个分支范畴。

作为可应用于“门诊诊疗”或“常规设施”概念纳入快速诊断技术的理想条件是:①判定检测结果所需时间短(数十分钟之内);②实验操作简便;③不需要特殊的仪器设备;④可用肉眼判定实验结果;⑤标本采集容易;⑥检测前样本不需要预处理;⑦敏感度及特异度符合试验要求。

就 POCT 而言,抗原抗体反应所采用的免疫层析试剂盒检测基本可以满足上述要求。该方法在初级卫生保健等实地医疗现场能够直接获得必要的诊疗相关检测数据,是在诊所或医生办公室可以利用的有效工具。目前,免疫层析技术的应用已进入临床检验领域并扩展到感染性疾病、心肌标志物、激素、肿瘤标志物、药物浓度、过敏等的临床检测。

免疫层析试剂盒在感染性疾病快速诊断中的应用见表 1。感染性疾病快速诊断试剂盒对于感染性疾病的诊断结果可能出现无法明确解读的情况。但也有可能作为明确诊断典型病例十分有用的信息。在“门诊诊疗”乃至“平时的常规诊疗”中发挥了重要作用。

表 1 免疫层析试剂盒在感染性疾病快速诊断中的应用

感染类型	临床快速检测项目
病毒感染	HBV (HBsAg、HBsAb) HCV (抗 - HCV) HIV (抗 - HIV) A 型流感病毒抗原 B 型流感病毒抗原 呼吸道合胞病毒抗原 腺病毒抗原 轮状病毒抗原 诺如病毒抗原
细菌感染	A 群溶血性链球菌抗原 肺炎链球菌抗原 (尿液中) 大肠埃希菌 O 157 抗原 结核菌群特异抗原 梭状芽孢杆菌毒素 A 抗原 军团菌抗原 (尿液中) 幽门螺杆菌抗原 幽门螺杆菌抗体 幽门螺杆菌抗体 (尿液中) 脓毒症 (细菌性) 的鉴别和重症度判定
衣原体感染	衣原体抗原
螺旋体感染	梅毒密螺旋体抗体

注:HBV 为乙型肝炎(乙肝)病毒,HBsAg 为乙肝表面抗原,HBsAb 为乙肝表面抗体,HCV 为丙型肝炎病毒,HIV 为人类免疫缺陷病毒

2 感染性疾病快速诊断试剂盒的临床实用性

2.1 感染性疾病的临床快速检测 引起感染性疾病的病原体在初诊阶段就必须予以明确诊断。因此,在诊疗时间内病原微生物检查的快速检测结果对于感染性疾病的初期治疗十分重要。为适应这一需求,感染性疾病快速诊断试剂盒的开发和研制成果颇丰。

POCT 中感染性疾病快速诊断试剂盒检测所需时间或等候检测时间(turn around time, TAT)与感染性疾病病原体细菌学培养所需的时间相比明显缩短,并且其检验结果可以直接应用于临床治疗。病原体抗原的检出时间可缩短至数十分钟以内,实用性较强。快速诊断试剂盒的代表是应用抗原抗体反应 - 免疫层析试验的临床检验方法。目前,感染性疾病快速诊断的相关试剂盒已被开发并应用于临床现场的检查,如对流行性感冒(流感)的检测试剂盒已开始应用,其他如社区获得性肺炎、小儿感染性疾病、性传播疾病(sexually transmitted disease, STD)等的快速诊断试剂盒也在日本的城市医药商场有售。

2.2 感染性疾病快速诊断试剂盒的临床应用现状

2.2.1 流感 流感等传染性强的感染性疾病应该迅速获得检测结果,以制定早期防止其传播的策略。为预防流感的流行,防患于未然,也强调了实验检测的快速性。流感快速诊断试剂盒可以检测出流感病毒的 A、B 型,操作时只需滴下

试剂,大约 10~15 min 即可得到检测结果,而且可依据显色带上的着色情况判读结果,方法简便,其实用性也获得很高的评价。流感的快速诊断决定了抗流感病毒药物的处方,有利于流感的治疗。目前在日本已有多种流感病毒快速诊断试剂盒出售,但在流感流行前期试剂盒需求量的急增往往导致库存短缺,一时难以获得。应用免疫层析试验检测流感病毒抗原,不仅在公立医院,私人诊所也已频繁使用。

2.2.2 小儿感染性疾病 感染性疾病快速诊断试剂盒的优点在于操作简便、快捷,并可即时报告检测结果,而快速诊断试剂盒所需检测时间较病原体的细菌学培养明显缩短,且检测结果可以直接应用于疾病诊疗。

根据 A 群溶血性链球菌感染的病变程度来确定其治疗方法,咽炎及发热等症状应用青霉素类或头孢类抗菌药物治疗。通过快速诊断试剂盒检测结果显示阳性即可诊断 A 群溶血性链球菌感染,不必进行咽部分泌物的细菌培养。

轮状病毒感染所致胃肠炎的主要症状是腹泻,呈灰白色的水样便,伴呕吐,在小儿病毒性胃肠炎中很容易进展为重症,给予抗菌药物后反而有可能转变为慢性迁延性腹泻,因此有必要与细菌性胃肠炎进行鉴别诊断。除去快速诊断试剂盒以外,在日常诊疗中尚无病毒检验方法可用。

腺病毒感染的临床症状多表现为约 40℃ 的高热,持续 4~5 d,鉴于患儿白细胞计数及 C- 反应蛋白水平常见升高,易与重症细菌感染性疾病混淆而被误诊。如果应用快速诊断试剂盒检测就容易予以鉴别诊断。因为不是应用抗病毒药物治疗而是采用对症疗法,应用快速诊断试剂盒检测明确为腺病毒感染的临床诊断能够提示预后,这样也就缓解了患儿监护人的不安情绪。

病毒的分离培养等经典检验方法所需时间长,所以快速诊断试剂盒作为小儿感染性疾病实验诊断的一个分支在门诊的应用已经明显增加。而且,根据快速诊断试剂盒检测结果也可以向患儿的监护人说明患儿是否需住院接受治疗。

2.2.3 社区获得性肺炎 革兰氏染色是快速检验诊断技术之一,但其操作过程繁杂,检验结果的解释也较为困难。快速诊断试剂盒鉴定病原菌不取决于操作者的技能,然而革兰氏染色、细菌分离培养等检验技术则有一定操作规程。

肺炎链球菌是细菌性肺炎最常见的病原菌,作为社区获得性肺炎的病原菌检出率很高。社区获得性肺炎发病初期其病原体的一部分即可从尿液中被排出,快速诊断试剂盒约 15 min 即可检测出尿液中的肺炎链球菌抗原。而且细菌培养未能分离到病原菌的病例亦可应用快速诊断试剂盒检测出肺炎链球菌感染。

军团菌肺炎具有高致死率,所以早期诊断十分重要。应用快速诊断试剂盒早期诊断军团菌感染的实用性很高,仅约 15 min 即可检测出尿液中的军团菌抗原。

通过细菌学培养和鉴定可以明确诊断支原体感染所致的支原体肺炎,但因为支原体的细菌学检查通常需要 1 周以上时间,临床很少进行这项检查。一般的支原体抗体效价检测使用血清学诊断,而快速诊断试剂盒比血清抗体法检测所

需时间短(约 10 min),且检测的敏感度较好。基于快速检测结果给予恰当的治疗可以改善重症肺炎和脓毒症患者的预后,所以应强调临床检查的快速性。

2.2.4 STD 在日本,很多医院采取业务外包形式进行聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)等基因检测诊断。因此,需要等待一段时间才能获得检测结果。很多医师往往在患者初诊时仅根据临床症状就给予基本的抗菌药物处方。尤其当 STD 患者就诊时,即使抗菌药物的疗效并不十分显著,患者也主观认为症状有所减轻,因此再次就诊的可能性较低。临床使用快速诊断试剂盒进行检测,从初诊时即可明确诊断并给予治疗,避免了仅依据临床症状就给予抗菌药物治疗,减轻患者的经济负担。

3 免疫层析快速诊断试剂盒临床使用时的注意事项

3.1 试剂盒临床检测的操作 大部分免疫层析试剂盒(包括检测必需的器具以及试剂等全部备用品)均为一次性使用,而且采样器具(棉棒等)、样本前处理液、样本的滴液仪器、检测试剂等构成品均应包装在一起。即使同一检查项目的试剂盒,如果生产厂商不同也不可共用(或混用)。另外,检验标本的种类和采集方法也对试剂盒的检测结果具有很大的影响,因此,需要熟练、正确地掌握检验标本的采集技术才能获得可信度大的检测结果。

免疫层析快速诊断试剂盒在使用时应注意,必须准确把握检测的反应时间。一般情况下,免疫层析试验由于反应停止或中断无法进行操作,未完成免疫反应(或变化)而单方面从层析的构像谱来判读这一时间段的检测结果是欠准确的。因为,免疫层析试验快速诊断试剂盒检测结果记录的主要是结果不再变化时所显示的最长时间段。在这种情况下,未在规定的检测时间段内出现的阳性层析构像谱的可信度较低。因此,严格遵照免疫层析的规定反应时间是快速诊断试剂盒性能评价的重要指标。为确保免疫层析快速诊断试剂盒质量的可靠性,必须严格遵守检测结果的判读时间。

3.2 试剂盒临床检测的敏感度及特异度 抗原检测试剂盒敏感度的问题,从现在已售的流感检测试剂盒开始上市就备受关注。虽然不能说与 PCR 检测技术的敏感度并列(或相近),以辅助临床诊断为目的,其检测的敏感度已经有了较大的提升,但“交叉污染”仍是值得关注的问题。为防止“交叉污染”,应认真进行检测样本的处理。此外,考虑到有利于临床检查,一般认为免疫层析试验检测设定的敏感度范围,即临床应用上阳性与阴性的临界点,应该恰当实用。

免疫层析快速诊断试剂盒的特异度,与所使用的抗体性质以及有效除去来源于检体样本中的非特异性反应物质密切相关。现在市售的检测试剂制品已被叠加了相关功能,在实用性方面达到较高水平。但是,因为检体标本存在差别,所以非特异性反应物质的影响是否能够被完全排除仍有待进一步探讨,必须予以注意。

此外,细菌抗原检测试剂盒因为存在微生物共同抗原的影响,在检测中与抗体的交叉反应问题亦应受到重视。

4 总结与展望

感染性疾病病原体的检验方法大体可区分为病原体的培养与鉴定、血清学诊断、基因扩增、抗原检测等 4 类(表 2)。其中病原体的培养与鉴定、血清学诊断不适合感染性疾病的快速诊断;PCR 检测代表了基因扩增技术,但需要一定的时间;另一方面,关于病原体抗原的检测,所需时间缩短至数十分钟以内的检测方法被认为是适用的。作为感染性疾病诊疗中实验诊断的另一分支,免疫层析快速诊断试剂盒已经开发并应用于 POCT。

表 2 感染性疾病病原体检验方法的种类及特点

检验方法	快捷性	简便性	特殊仪器	门诊检查	特点
病原体的培养与鉴定	较差	尚可	有时需要	不可能	分离的菌株可用于耐药菌的检测,经典方法
血清学诊断	较差	尚可	有时需要	部分可能	抗体效价上升需要一定时间,可反映病况
基因扩增	尚可	尚可	必须	不可能	易出现假阳性、缺乏定量、敏感度高
抗原检测	良好	良好	有时需要	可能	检测对象有限、缺乏定量

综上所述,免疫层析快速诊断试剂盒可用于感染性疾病的临床辅助快速诊断,其检测质量和性能受操作和使用方法影响。该方法操作简单,虽然相比可大量应用、价廉的液体试剂检测成本较高,但其具有的利用价值弥补了该缺点。未来针对感染性疾病的快速诊断试剂盒应用范围将更加广泛,与多种微生物相对应的快速诊断试剂盒有望面世,能够量化分析的快速诊断试剂盒也可能会逐渐出现。但应注意,感染性疾病的快速诊断试剂盒为辅助诊断方法,必须根据临床症状,综合考虑进行疾病的临床诊断。

志谢:本文主要参考日本国际医疗福祉大学热海医院检验医学部谷直人教授的原著《抗原検出用迅速キットの有用性和使用上の留意点》编译,谨致谢忱。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. N Engl J Med, 2020, 382 (8): 727-733. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
- 2 Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: the species and its viruses: a statement of the Coronavirus Study Group [J]. Nat Microbiol, 2020, 5: 536-544. DOI: 10.1101/2020.02.07.937862.
- 3 Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. Lancet, 2020, 395 (10223): 497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
- 4 谷直人. 概論: 抗原検出用迅速キットの有用性和使用上の留意点 [J]. 日本臨床, 2010, 68 (S1): 130-134.
- 5 刘菁, 李银平. 检验医学为临床医学发展插上翅膀 [J]. 实用检验医师杂志, 2019, 11 (3): 129-130. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.03.001.
- 6 廖远泉. 日本“POCT”在临床诊断和治疗中的意义 [J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9 (1): 56-58. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.01.017.

(收稿日期: 2020-03-20)
(本文编辑: 邵文 张耘菲)