

• 临床检验研究 •

实时荧光 RT-PCR 检测不同标本中甲型 H1N1 流感病毒核酸的临床意义

陈双峰, 陈海英, 张颖新, 郑丽丽

(山东省聊城市人民医院中心实验室 252000)

摘要:目的 通过检测甲型 H1N1 流感感染患者不同标本中甲型 H1N1 流感病毒核酸, 了解其对甲型 H1N1 流感的快速诊断及病程进展的关系。方法 118 例甲型 H1N1 流感患者, 采用实时荧光逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)分别检测发病 48 h 后和(或)恢复期咽拭子、血浆及下呼吸道分泌物中甲型 H1N1 流感病毒核酸。结果 118 例甲型 H1N1 流感患者发病 48 h 后咽拭子甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性; 23 例(23/40)重症患者下呼吸道分泌物中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性; 15 例(15/40)重症患者血浆中检测到甲型 H1N1 流感病毒核酸。结论 实时荧光 RT-PCR 方法可以快速检测甲型 H1N1 流感病毒感染, 血浆中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性可能是重症患者的标志。

关键词:聚合酶链反应; 流感病毒 A 型, H1N1 亚型; 血浆

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0861-03

Clinical significance of fluorescent real-time RT-PCR in the detection of influenza A virus (H1N1) nucleic acid in different types of specimens

Chen Shuangfeng, Chen Haiying, Zhang Yingxin, Zheng Lili

(The Central Laboratory, Liaocheng People's Hospital, Shandong 252000, China)

Abstract: **Objective** To explore the relationship of influenza A virus (H1N1) nucleic acid with rapid diagnosis of influenza A (H1N1) and the progress of disease course by the detection of viral nucleic acid in different specimens from patients with influenza A (H1N1). **Methods** Fluorescent real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to detect influenza A virus (H1N1) nucleic acid in throat swabs, plasma and secretion of lower respiratory tract from 118 patients with influenza A (H1N1) 48 hours after onset and (or) during convalescence respectively. **Results** Viral nucleic acid was detected in throat swabs from all 118 patients 48 hours after onset, secretion of lower respiratory tract from 23 severe cases and plasma from 15 severe cases. **Conclusion** Fluorescent real-time RT-PCR could be used for the rapid detection of influenza A virus (H1N1) infection. Influenza A virus (H1N1) nucleic acid, when be detected in plasma, may be the indication of the severe cases.

Key words: polymerase chain reaction; influenza A virus H1N1 subtype; plasma

随着现代生物技术的发展, 分子生物学技术广泛应用于流感病毒的快速诊断。实时荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术检测甲型 H1N1 流感病毒核酸具有快速、敏感和特异的特点^[1-2], 卫生部将其定为诊断甲型 H1N1 流感感染的诊断方法之一^[3]。目前, 甲型 H1N1 流感病毒核酸检测的标本主要是咽拭子, 尚未见有血液学核酸检测结果的报道。根据呼吸道病毒侵袭的特点, 早期病毒在病变局部的浓度较高, 随着病情发展, 病毒可侵袭入血, 形成病毒血症, 因此, 应用敏感的 RT-PCR 技术检测血液中的甲型 H1N1 流感病毒核酸可能有助于监测病毒血症, 了解病情发展及其严重程度。本研究采用实时荧光 RT-PCR 方法检测不同来源样本中的甲型流感病毒及甲型 H1N1 流感病毒核酸, 探讨其对甲型 H1N1 流感患者的快速诊断、病情进展和预后的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2009 年 10 月 2 日至 12 月 25 日, 来自本院流感病房和重症监护病房 118 例甲型 H1N1 感染患者, 均经山东省疾控中心网络实验室确认咽拭子甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性, 年龄 4~32 岁, 其中男 56 例, 女 62 例。40 例重症患者符合卫生部《甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第 3 版)》重症与危重病例的诊断标准, 其中中、晚期妊娠孕妇 14 例, 2

例为死亡病例。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 采集患者发病 48 h 后和恢复期咽拭子, 同时取外周血 1 mL, 乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝。40 例重症患者采用真空吸引术吸取下呼吸道分泌物, 同时采集外周血液标本。咽拭子标本置于-4℃冰箱中保存, 血液标本于 180×g 离心 5 min, 分离血浆, 取 500 μL 血浆于-80℃冻存备用, 24 h 内检测。

1.2.2 实验室检测 双荧光探针、甲型流通用型及甲型 H1N1 流感病毒核酸 RT-PCR 扩增试剂盒由上海科华生物工程股份有限公司提供。咽拭子、下呼吸道分泌物和血浆中的核酸提取采用柱提取法。扩增的循环参数: 逆转录反应 50℃ 25 min, 预变性 95℃ 2 min, 预扩增 5 个循环; 95℃ 10 s, 55℃ 15 s, 72℃ 15 s, 然后 95℃ 10 s, 60℃ 40 s, 扩增 40 个循环。检测通道为 FAM 和 VIC 通道, 其中 FAM 通道为 H1N1 RNA 信号, VIC 通道为甲型流感病毒 RNA 信号。

1.3 统计学处理 数据采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结果判断 Ct 无数值或大于或等于 40 的样本为阴性

(图 1), Ct ≤ 36 的样本为阳性(图 2)。

2.2 发病 48 h 后甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性率 118 例患者咽拭子标本经山东省疾控中心网络实验室确认甲型 H1N1 流感病毒 RNA 检测结果均为阳性,轻症和重症患者咽拭子中病毒 RNA 阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$);23 例重症患者气管插管下呼吸道分泌物病毒 RNA 检测结果为阳性;118 份血浆中有 15 例为阳性结果,并且均为重症患者,阳性率占重症患者的 37.5%,与轻症患者比较,血浆病毒 RNA 阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

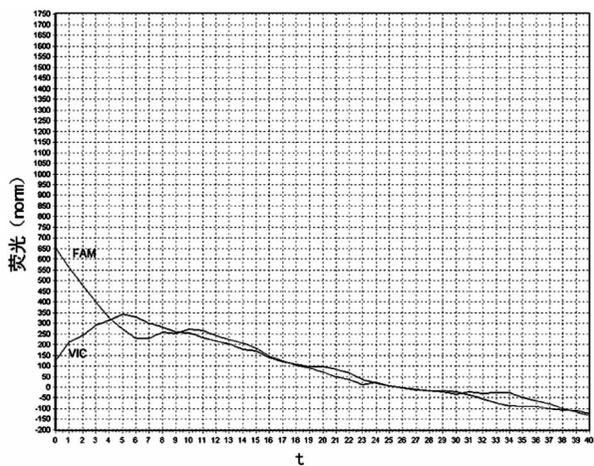


图 1 甲型 H1N1 流感病毒 RNA 扩增曲线(阴性)

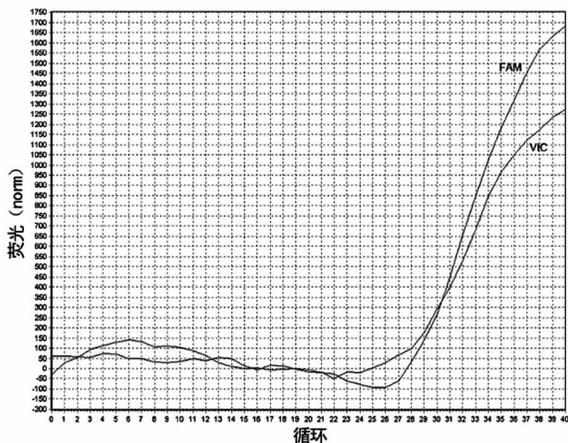


图 2 甲型 H1N1 流感病毒 RNA 扩增曲线(阳性)

表 1 发病 48 h 后甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性率[n(%)]

标本来源	轻症患者(n=78)	重症患者(n=40)
咽拭子病毒 RNA	78(100.0)	40(100.0) [#]
下呼吸道分泌物病毒 RNA	—	23(57.5)
血浆病毒 RNA	0(0.0)	15(37.5) ^{**}

[#]: $P > 0.05$, ^{**}: $P < 0.01$, 与轻症患者比较; —: 未检出。

2.3 恢复期甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性率 恢复期轻症患者咽拭子均为阴性。3 例重症患者脱机后咽拭子及下呼吸道分泌物中 H1N1 病毒核酸检测为阳性,继续抗病毒治疗后,出院时病毒核酸检测结果均呈阴性;血浆甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性的 13 例重症患者脱离呼吸机后,恢复期血浆中甲

型 H1N1 流感病毒核酸检测结果为阴性,但 2 例患者 14 d 内的血浆标本仍为阳性,见表 2。

表 2 恢复期甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性率[n(%)]

标本来源	轻症患者(n=78)	重症患者(n=40)
咽拭子病毒 RNA	78(100.0)	0(0.0)
下呼吸道分泌物病毒 RNA	—	0(0.0)
血浆病毒 RNA	0(0.0)	2(5.0)

—: 未检出。

3 讨论

甲型 H1N1 流感又称为 A(H1N1)型流感,原称人感染猪流感。甲型 H1N1 流感病毒毒株包含有猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒的基因片段,是一种新型猪流感病毒,可以在人群之间传染^[4]。人类对 2009 年流行的甲型 H1N1 流感病毒缺乏免疫力,普遍易感,不断有甲型 H1N1 流感患者重症病例及部分死亡病例的报道。由于各种综合因素的影响,甲型 H1N1 流感病毒阳性患者的临床特征、病情发展和预后等具有较大差异,较难早期预测病情进展,然而妊娠期妇女、肥胖者、5 岁以下儿童、65 岁以上老年人、伴有慢性疾病人群和免疫功能低下者却易成为重症病例的高危人群^[5]。高危人群中病情进展迅速,危重合并严重并发症者可导致患者死亡,这可能与重症患者存在细胞免疫功能损伤有关。因此,寻找快捷有效的诊断方法及早期预测患者病情进展的指标具有重要意义。实时荧光定量 RT-PCR 技术作为一项高度敏感、程序结束无需后处理和可高通量检测的新型技术已广泛用于基因表达的定量检测^[6]。本研究采用这一技术同时检测甲型流感病毒和甲型 H1N1 流感病毒,该法可避免出现假阳性并有助于发现非 H1N1 型的其他类型的甲型流感病毒。本研究采用双荧光探针 RT-PCR 法检测咽拭子、下呼吸道分泌物及血浆中甲型 H1N1 流感病毒 RNA,探讨不同标本病毒 RNA 的检测结果对病情的预测。研究发现,血浆中的病毒 RNA 阳性可能是重症、病情进展的指征。

Jamieson 等^[7]和 Li 等^[8]通过调查研究发现甲型 H1N1 流感病毒对中、晚期妊娠孕妇感染者具有很大的危害性。与此研究类似,本院甲型 H1N1 流感病毒感染的重症患者病情进展迅速,特别是中、晚期妊娠孕妇,重症及危重症比例较多,40 例甲型 H1N1 流感重症患者中,中、晚期妊娠孕妇有 14 例,占重症患者的 35.0%,其中 2 例为死亡病例。季节性流感病毒主要侵及上呼吸道,甲型 H1N1 流感病毒与季节性流感病毒均可在肺中大量复制,具有很高的病毒含量^[9]。本研究显示,咽部及下呼吸道分泌物中可检测到甲型 H1N1 流感病毒 RNA,提示肺部有感染。

实时荧光 RT-PCR 检测结果显示,血浆中的病毒 RNA 在轻症患者发病 48 h 后和恢复期始终为阴性,而重症患者发病 48 h 后血浆中病毒 RNA 阳性率为 37.5%,恢复期仍有 2 例为阳性。一般在血浆中很少能检测到流感病毒,但也有在脑脊液、粪便和血浆中检测到流感病毒的个别报道^[10]。此外,Chutinimitkul 等^[11]报道,采用实时 RT-PCR 法在 H5N1 感染患者的血浆中可检测到 H5N1 病毒核酸,经鸡胚培养检测到活病毒的存在;De Jong 等^[12]对 18 例 H5N1 感染患者不同标本检测病毒 RNA 发现,血浆中病毒 RNA 阳性患者多为重症患者,

且预后不良。与上述研究类似,本研究中的 40 例重症患者血浆中的 H1N1 病毒 RNA 有 15 例阳性,2 例恢复期患者 14 d 内血浆中仍能检测到 H1N1 病毒 RNA,而其他轻症患者的血浆中均未检测到 H1N1 病毒 RNA,提示血浆中 H1N1 病毒 RNA 阳性可能是重症及预后较差的标志。研究认为输注甲型 H1N1 流感患者康复后的血浆可治疗重症甲型 H1N1 流感感染患者,但从生物安全角度考虑,有必要对供体的血浆进行 H1N1 核酸检测,以确保治疗的安全性。

综上所述,实时荧光 RT-PCR 法可快速检测甲型 H1N1 流感病毒 RNA,有助于对患者的快速诊断;下呼吸道分泌物中甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性,提示甲型 H1N1 流感病毒可快速感染下呼吸道,病毒侵入血液并发病毒血症,血浆中可检测到病毒 RNA;血浆中甲型 H1N1 流感病毒 RNA 阳性是病情进展为重症或危重症的标志。

参考文献

[1] Wang R, Sheng ZM, Taubenberger JK. Detection of novel (Swine Origin) H1N1 influenza A virus by quantitative real-time reverse transcription-PCR[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10): 2675-2677.
 [2] Whiley DM, Bialasiewicz S, Bletchly C, et al. Detection of novel influenza A(H1N1) virus by real-time RT-PCR[J]. J Clin Virol, 2009, 45(3): 203-204.
 [3] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年试行第 1 版)[R]. 2009-05-08.
 [4] 吕圣秀. 甲型 H1N1 流感胸部 X 线表现[J]. 国际检验医学杂志,

2010, 31(2): 167-168.
 [5] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年第 3 版)[R]. 2009-10-12.
 [6] 刘永萍, 凌扬. 实时荧光定量 RT-PCR 技术在疾病相关 mRNA 定量检测方面的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 872-874.
 [7] Jamieson DJ, Honein MA, Rasmussen SA, et al. H1N1 2009 influenza virus infection during pregnancy in the USA[J]. Lancet, 2009, 374(9688): 451-458.
 [8] Li YG, Thawatsupha P, Chittaganpitch M, et al. Higher in vitro susceptibility of human T cells to H5N1 than H1N1 influenza viruses[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 371(3): 484-489.
 [9] Maines TR, Jayaraman A, Belser JA, et al. Transmission and pathogenesis of swine-origin 2009 A (H1N1) influenza viruses in ferrets and mice[J]. Science, 2009, 325(5939): 484-487.
 [10] Naficy K. Human influenza infection with proved viremia: report of a case[J]. N Engl J Med, 1963, 269: 964-966.
 [11] Chutinimitkul S, Bhattarakosol P, Srisuratanon S, et al. H5N1 influenza A virus and infected human plasma[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6): 1041-1043.
 [12] De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia[J]. Nat Med, 2006, 12(10): 1203-1207.

(收稿日期: 2011-02-25)

(上接第 860 页)

参考文献

[1] Xu XM, Zhou YQ, Luo GX, et al. The prevalence and spectrum of alpha and beta thalassaemia in Guangdong province: implications for the future health burden and population screening[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(5): 517-522.
 [2] Xiong F, Sun M, Zhang X, et al. Molecular epidemiological survey of haemoglobinopathies in the Guangxi zhuang autonomous region of southern China[J]. Clin Genet, 2010, 78(2): 139-148.
 [3] 周玉球, 李文典, 徐湘民. 用于血红蛋白病遗传筛查的实验室诊断技术[J]. 国际遗传学志, 2008, 31(1): 17-22.
 [4] Old J, Traeger-synodinos J, Galanello R, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders[M]. 1st ed. Nicotia: Thalassaemia International Federation, 2005: 2-3.
 [5] 汪国庆, 陈望, 周玉球. MCV、MCH 在妊娠周期中的变化及其对地贫筛查的价值[J]. 中国妇幼保健, 2010, 25(23): 3247-3250.
 [6] Yeo GS, Tan KH, Liu TC. Screening for beta thalassaemia and HbE traits with the mean red cell volume in pregnant women[J]. Ann Acad Med Singapore, 1994, 23(3): 363-366.
 [7] 周玉球, 张永良, 李莉艳, 等. 单管多重 PCR 快速检测中国人三种

常见缺失型 α -珠蛋白生成障碍性贫血基因[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22(2): 180-184.
 [8] Mark G. Receiver-operating characteristic(Roc) plots: fundamental evaluation tool in clinical medicine[J]. Clin Chem, 1993, 30(4): 561-567.
 [9] 周玉球, 李莉艳, 肖鸽飞, 等. 珠海市户籍人群中 α -珠蛋白生成障碍性贫血的分子流行病学调查[J]. 中华医学遗传学杂志, 2002, 19(4): 358-360.
 [10] 梁玉全, 吴素芹, 谢健敏, 等. 广东顺德地区 α 和 β -珠蛋白生成障碍性贫血的分子流行病学调查[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 629-633.
 [11] 李亚红, 梁玉全, 岑妙珍, 等. 珠蛋白生成障碍性贫血基因携带者产前筛查及实验室指标的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 673-680.
 [12] 林军, 李勇, 戈一峰, 等. 高血糖对红细胞平均体积测定的影响[J]. 临床检验杂志, 1998, 16(5): 280-283.
 [13] Ryan KI, Bain BJ, Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis[J]. Br J Haematol, 2012, 149(1): 35-49.

(收稿日期: 2011-03-06)

