

• 论 著 •

实时荧光定量 PCR 检测 75 例疑似甲型流感结果分析

吴 敏, 张 立, 王冰冰

(天津市海河医院检验科, 天津 300350)

摘 要:目的 分析 75 例疑似甲型流感检测结果, 了解本市流感患者分布情况, 为疾病早期防控提供指导。方法 采用实时荧光定量 PCR 的方法, 检测 75 疑似甲型流感患者的鼻、咽拭子标本中病毒感染情况。结果 75 例疑似患者标本中, 共检出甲型流感病毒 13 例, 其中 H1N1 亚型 9 例, 平均年龄大于 50 岁。时间分布为 2013 年 3 月份 3 例、4 月份 1 例, 2014 年 1 月份 7 例、2 月份 2 例; 未检测出 H7N9 亚型。结论 实时荧光定量 PCR 具有快速、准确率高的特点, 冬季为流感高发季节, 老年患者为流感病毒易感人群, 应及时加强监测, 早期治疗。

关键词:甲型流感; 实时荧光 PCR; H1N1; H7N9

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)07-0932-02

Analysis of 75 cases of suspected type A influenza results by real-time fluorescent quantitative PCR test

Wu Min, Zhang Li, Wang Bingbing

(Department of Clinical Laboratory, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract: **Objective** To analyze the detection results of 75 suspected type A influenza cases and to understand the distribution situation of influenza patients to provide the guidance for its early prevention and control. **Methods** The nasopharyngeal swabs specimens from 75 patients with suspected type A influenza were detected for understanding the viral infection situation by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** In the specimens of 75 suspected patients, 13 cases with type A influenza virus were detected out, in which 9 cases were the H1N1 subtype, mean age > 50 years old. The temporal distribution was 3 cases in March 2013, 1 case in April, 7 cases in January 2014 and 2 cases in February. No H7N9 subtype was detected out. **Conclusion** Real-time fluorescent quantitative PCR has the characteristics of rapidness and high accuracy. The winter is the high onset season of flu, elderly patients are susceptible to influenza virus. The monitoring and early treatment should be strengthened.

Key words: influenza A; real-time fluorescent PCR; H1N1; H7N9

甲型 H1N1 流感为急性呼吸道传染病, 是由甲型 H1N1 流感病毒引起的急性呼吸道传染病, 该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。人群对甲型 H1N1 流感病毒普遍易感, 并可以人传染人。人感染甲型流感后的早期症状与普通流感相似, 包括发热、咳嗽、喉痛、身体疼痛、头痛、发冷和疲劳等, 有些还会出现腹泻或呕吐、肌肉痛或疲倦、眼睛发红等^[1]。H7N9 禽流感是由新亚型 H7N9 禽流感病毒引起, 该病毒是全球首次发现, 因其是一种新亚型, 起病急、进展快、致死率高, 受到广泛关注^[2]。由于目前尚无有效针对病毒的病原治疗办法, 因此尽早确诊和及时隔离治疗是最有效的预防办法。本院为天津市公共卫生突发事件定点医院, 现对 2013 年 2 月至 2014 年 2 月接收的 75 例疑似甲型流感标本检测结果进行分析。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集于本院 2013 年 2 月至 2014 年 2 月期间住院患者送检的 75 份鼻分泌物、咽拭子标本, 其中女性 21 例, 年龄为 18~81 岁; 男 54 例, 年龄为 15~78 岁。

1.2 方法

1.2.1 甲型流感通用型和 H1N1 亚型检测 采用上海科华试剂盒, 采用实时荧光 PCR 技术, 设计针对甲型流感病毒和甲型 H1N1 病毒特异性引物, 检测通道 FAM 通道为 H1N1 RNA 信号, VIC 通道为甲型流感病毒 RNA 信号, ROX 通道为内标

通道。使用荧光定量 PCR 仪 ABI7500 进行 PCR 扩增, 并检测荧光信号, 仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线, 根据阈值 (CT 值) 实现对未知样本的定性检测。

1.2.2 甲型流感 H7N9 亚型检测 采用广州达安基因检测试剂盒, 利用实时荧光 PCR 技术, 分别以甲型 H7N9 流感病毒 HA 和 NA 两个基因组编码区的高度保守区为靶区域, 设计特异性引物及荧光探针, 通过一步法 RT-PCR 扩增甲型 H7N9 流感病毒基因组的 RNA 进行 H7 型和 N9 型的定性检测。阴性对照中加有内标物质 (VIC 通道), 用于对核酸提取的整个过程进行监控, 减少假阴性结果的出现。阳性对照 (FAM 通道) 使用本试剂盒提供的含有目的片段的质粒。使用荧光定量 PCR 仪 ABI7500 进行 PCR 扩增, 仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线, 根据阈值 (CT 值) 实现对未知样本的定性检测。

2 结 果

2.1 阴性样本 仅内标 ROX 检测通道有扩增曲线, VIC、FAM 通道无扩增曲线, 见图 1。甲型流感病毒阳性, VIC 检测通道有扩增曲线; H1N1 阳性样本, FAM 通道有扩增曲线; 同时内标 ROX 检测通道也有扩增曲线见图 2。

2.2 H7N9 阳性样本 参考值为 H7 及 N9 的 PCR 反应体系 FAM 检测通道均有扩增曲线且 Ct 值 < 42 , VIC 检测通道有或无扩增曲线, 阴性样本参考值为 FAM 检测通道无扩增曲线或 Ct 值 ≥ 42 , VIC 检测通道有或无扩增曲线。

2.3 75 例疑似患者标本中,共检出甲型流感病毒 13 例,其中 H1N1 亚型 9 例,其中女 2 例,男 7 例,平均年龄>50 岁,2013 年 3 月份 3 例、4 月份 1 例;2014 年 1 月份 7 例、2 月份 2 例;未检测出 H7N9 亚型,见表 1。

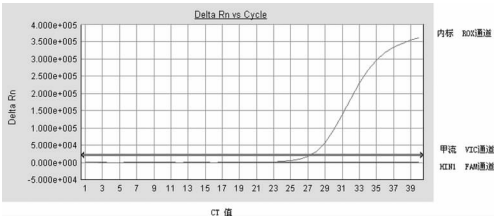


图 1 甲型流感病毒和 H1N1 亚型病毒阴性样本

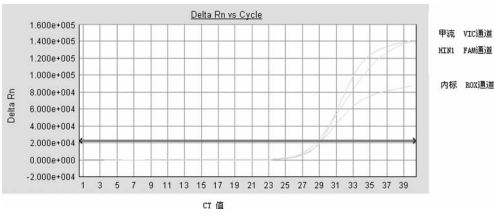


图 2 甲型流感病毒和 H1N1 亚型病毒阳性样本

表 1 75 例疑似甲型流感患者标本检测结果
(阳性标本/检测标本)

| 流感分类 | | 2013 年 2~12 月 | 2014 年 1~2 月 | 合计 |
|---------|-----|---------------|--------------|----|
| 甲型流感病毒 | 阳性数 | 4 | 9 | 13 |
| | 标本数 | 37 | 38 | 75 |
| H1N1 亚型 | 阳性数 | 0 | 9 | 13 |
| | 标本数 | 37 | 38 | 75 |
| H7N9 亚型 | 阳性数 | 0 | 0 | 0 |
| | 标本数 | 37 | 38 | 75 |

3 讨 论

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种禽类烈性传染病,导致此病的病毒属于正黏病毒科,RNA 病毒形态近似球形,直径 80~120 nm,病毒外有包膜,包膜内部为螺旋对称的核衣壳甲型流感病毒的基因组由 8 个片段组成病毒表面的糖蛋白抗

原分为 16 个血细胞凝集素(HA 亚型)和 9 个神经氨酸酶(NA 亚型),不同亚型病毒之间的基因可杂交,形成一个庞大而复杂的病毒家族^[3]。荧光定量 PCR 方法因其具有准确性高重现性好等特点,已广泛应用于基因表达、病原体检测等诸多研究领域^[4-6]。

75 例疑似甲型流感标本检测结果显示,2013 年 2~12 月期间共检测 37 例样本,其中甲型流感病毒阳性数为 4 例;未检测出 H1N1 亚型,表明本市疾病检测及时,防控合理;H7N9 亚型为 2013 年 4 月新发现的亚型,因此于 2013 年 6 月份开始检测,未检测出该亚型。2014 年 1~2 月期间共检测 38 例样本,其中甲型流感病毒阳性数为 9 例,H1N1 亚型阳性数为 9 例,其中 1 月份 7 例、2 月份 2 例,平均年龄>50 岁,表明冬季为流感高发季节,且老年患者由于基础疾病较多,身体免疫力低下,成为流感易感人群,实时荧光定量 PCR 方法检测具有快速、准确率高的特点,对于疾病早期诊断具有重要价值;未检测出 H7N9 亚型。甲型流感是一种暴发性疾病,本院作为定点医院,必须严格做好实验室检测,及时统计检测结果,早发现、早诊断疾病。

参考文献

[1] 冯来强,李洪权. 2009 年北京市甲型 H1N1 流感疫情流行病学特征[J]. 首都公共卫生杂志,2010,5(2):224-225.
[2] 董晓毅,孙长贵. H7N9 禽流感病毒感染及实验室诊断[J]. 实验与检验医学,2013,31(2):105-114.
[3] 宋蕊,成军. 认识甲型 H7N9 禽流感[J]. 首都医科大学学报,2013,34(3):475-478.
[4] Fend R,Geddes R,Livak K J,et al. Use of an electronic nose to diagnose Mycobacterium boris infection in badgers and cattle[J]. J Clin Microbio,2005,43(16):1745-1751.
[5] 陈旭,齐凤坤,康立功,等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J]. 东北农业大学学报,2010,41(1),148-155.
[6] 郝秀静. 荧光定量 PCR 在医学诊断中的应用[J]. 中国医疗前沿,2008,3(1):93.

(收稿日期:2014-11-18)

(上接第 931 页)

ELISA 法在检测过程中要时刻注意由于抗原抗体过量而引起的假阴性,即免疫学中的勾带效应。患者血清中如存在大量的大分子免疫球蛋白如 RF 因子,也可引起假阳性结果。有文献报道采用 ELISA 二步法可消除勾带效应^[9]。

总之,ELISA 方法检测乙肝五项的影响因素有许多,在出现 HBsAg 弱阳性和 HBsAg 和 HBsAb 同时阳性的情况时,应首先检查试剂及操作有无不妥,必要时复查。然后结合临床患者资料,给予临床医生恰当的解释和建议。

参考文献

[1] 朱平安,郭奕明,徐汉平,等. 电化学发光免疫分析法定量测定乙肝表面抗原的初步评价[J]. 中华现代中西医杂志,2003,1(6):487.
[2] 何应中,郑国波,邹焰,等. ECLIA 和 ELISA 检测乙肝病毒血清标志物对比探讨[J]. 遵义医学院学报,2010,33(5):439-442.
[3] Hsu HY,Chang MH,Ni YH,et al. Survey of hepatitis B surface

variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in taiwan[J]. Gut,2004,53(10):1449-1503.
[4] 田拥军,覃莉,刘慎沛,等. 8 种国产 HbsAg 试剂盒检测变异 HBsAg 的效果评价[J]. 临床检验杂志,2007,25(4):250-252.
[5] 张爱民,王慧芬,李桂英,等. HBV 突变与 HBV 相关慢加急性肝衰竭相关性研究[J]. 传染病信息,2014,27(2):74-77.
[6] 彭静,管青,王斌,等. HbsAg 检测结果弱反应的分析与处置[J]. 临床检验杂志,2008,26(4):284-285.
[7] 周艳萍,倪诗强,黄勇进. 酶联免疫吸附试验“灰区”结果探讨[J]. 检验医学与临床,2008,5(14):876-877.
[8] 刘晓华,林月好,李纯,等. ELISA 与 ECLIA 对 HBsAg 弱反应性标本检测的比较[J]. 临床医学工程,2011,10(18):1544-1546.
[9] 陶洪群,叶剑彪. ECLIA 和 ELISA 检测血清 HBsAg 的结果比较[J]. 江西医学检验,2002,20(3):323-324.

(收稿日期:2014-11-16)