

· 论 著 ·

PCR-荧光探针法检测婴幼儿和儿童人鼻病毒的初步评估^{*}

甘正飞, 欧顺婧, 邓国珍, 黄晓雪, 罗弘志, 郑 杨, 查 何[△]

遵义医科大学第三附属医院(遵义市第一人民医院)检验科/中心实验室, 贵州遵义 563000

摘 要:目的 通过 PCR-荧光探针法和 Sanger 测序法检测呼吸道感染婴幼儿和儿童人鼻病毒(HRV)的感染情况,以评估 PCR-荧光探针法的病毒检测能力,并分析 HRV 载量对患儿临床指标的影响。方法 收集 2019 年 5—7 月在遵义医科大学第三附属医院住院收治的具有呼吸道感染症状的 175 例患儿的鼻咽拭子标本,采用 PCR-荧光探针法和 Sanger 测序法检测 HRV 感染情况并分析 HRV 载量对婴幼儿和儿童临床指标的影响。结果 PCR-荧光探针法检出阳性标本 51 份(51/175, 29.14%),阴性标本 124 份(124/175, 70.86%)。Sanger 测序法检出阳性标本 48 份(48/175, 27.43%),阴性标本 127 份(127/175, 72.57%)。与 Sanger 测序法相比,PCR-荧光探针法检测 HRV 的灵敏度和特异度分别为 100.00%和 97.64%,阳性预测值和阴性预测值分别为 94.12%和 100.00%,一致率为 95.80%。两种方法对 HRV 的检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。高载量病毒组和低载量病毒组住院天数、入院前最高体温、发热天数、白细胞计数、淋巴细胞百分比及降钙素原比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),超敏 C 反应蛋白比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 PCR-荧光探针法检测 HRV 灵敏度高、特异度高、检测周期短、费用较低且操作简便快捷,可在临床检测 HRV 中广泛推广。此外,高载量 HRV 的婴幼儿和儿童的超敏 C 反应蛋白水平较低载量 HRV 的婴幼儿和儿童更高。

关键词:人鼻病毒; PCR-荧光探针法; Sanger 测序法; 临床特征

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.09.002

中图法分类号:R446.8

文章编号:1673-4130(2022)09-1033-04

文献标志码:A

Preliminary evaluation of PCR fluorescence probe method for detection of human rhinovirus in children and infants^{*}

GAN Zhengfei, OU Shunjing, DENG Guozhen, HUANG Xiaoxue, LUO Hongzhi, ZHENG Yang, ZHA He[△]

Department of Clinical Laboratory/Scientific Research Center, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (Zunyi First People's Hospital), Zunyi, Guizhou 563000, China

Abstract: **Objective** To evaluate the virus detection ability of PCR fluorescent probe method, and analyze the effect of HRV load on clinical indicators of patients by detecting human rhinovirus (HRV) infection in patients with respiratory tract infection by PCR fluorescent probe method and Sanger sequencing method. **Methods** The nasopharyngeal swab specimens of totally 175 patients with respiratory tract infection symptoms in the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical University from May to July 2019 were collected, and the PCR-fluorescent probe method and Sanger sequencing method were used to detect HRV infection status and the impact of HRV load on clinical indicators of children and infants was analyzed. **Results** A total of 51 positive specimens (51/175, 29.14%) and 124 negative specimens (124/175, 70.86%) were detected by the PCR-fluorescence probe method. A total of 48 positive specimens (48/175, 27.43%) and 127 negative specimens (127/175, 72.57%) were detected by Sanger sequencing method. Compared with the Sanger sequencing method, the sensitivity and the specificity of PCR-fluorescent probe method for detecting HRV were 100.00% and 97.64%, the positive predictive value and negative predictive value were 94.12% and 100.00% respectively, and the agreement rate was 95.80%. There was no statistically significant difference on the detection rate of HRV by the two methods ($P>0.05$). There was no statistically significant differences on the days of hospi-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81760475);遵义市“15851 人才精英工程”科研项目(81760475)。

作者简介:甘正飞,男,硕士研究生在读,主要从事分子生物学研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhahe666@126.com。

本文引用格式:甘正飞,欧顺婧,邓国珍,等. PCR-荧光探针法检测婴幼儿和儿童人鼻病毒的初步评估[J]. 国际检验医学杂志, 2022, 43(9): 1033-1036.

talization, maximum body temperature before admission, days of fever, white blood cell count, lymphocyte percentage, procalcitonin between high viral load group and low viral load group ($P>0.05$), while there was statistically significant difference on hypersensitivity C-reactive protein between high viral load group and low viral load group ($P<0.05$). **Conclusion** The PCR-fluorescent probe method for detecting HRV has good sensitivity, high specificity, short detection cycle, low cost, simple and quick operation, and could be widely used in clinical detection of HRV. In addition, children and infants with high HRV load have higher levels of hypersensitivity C-reactive protein than children and infants with low HRV load.

Key words: human rhinovirus; PCR-fluorescent probe method; Sanger sequencing method; clinical feature

人鼻病毒(HRV)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属,是一组单股正链小分子 RNA 病毒,是引起人类呼吸道感染的最常见病原体之一^[1]。HRV 是婴幼儿和儿童上呼吸道感染的重要病原体,感染 HRV 后大多数患儿急性起病,表现为咳嗽、流清涕、鼻塞、喷嚏、声音嘶哑等普通感冒症状。近年来,有研究表明,HRV 还可引起婴幼儿及儿童的下呼吸道感染,包括支气管炎及肺炎^[2],是儿童哮喘性疾病的独立危险因素及加重的主要原因^[3-4]。且 HRV 还可引起成人的慢性阻塞性肺疾病或伴免疫功能减弱者的下呼吸道感染^[5-6]。临床对于 HRV 的诊断多基于血清学诊断结果,但其检测花费时间长,往往会延误患儿病程和增加医疗成本^[7]。随着分子生物学技术的迅猛发展,快速、准确的分子诊断技术成为临床首选。目前测序法被公认为基因检测的“金标准”^[8]。本研究主要探讨了 PCR-荧光探针法相较于 Sanger 测序法对 HRV 的检测能力,并简要分析了 HRV 载量对婴幼儿和儿童临床指标的影响。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 5—7 月遵义医科大学第三附属医院收治住院的有呼吸道感染症状的患儿 175 例为研究对象,并收集其鼻咽拭子标本和临床病例资料,其中男 111 例(63.43%),女 64 例(36.57%),年龄 1 月至 13 岁。纳入标准:(1)选取临床疑似为 HRV 感染的呼吸道感染病例,包括肺炎、支气管炎等;(2)性别不限,年龄 ≤ 13 岁。排除标准:(1)样本量不足以检测;(2)不符合纳入标准;(3)病情危重,不能配合采集标本;(4)登记表记录核心信息不完整;(5)标本因收集或保存不当不能用于检测或检测失败。对于同一病例在不同时期采集的同类标本不得重复入组。本研究经遵义医科大学第三附属医院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 核酸提取或纯化试剂盒与 HRV 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)均购自中山大学达安基因股份有限公司。ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪购自美国应用生物系统公司(Applied Biosystems)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和保存 将棉拭子轻轻转动,缓缓

插入患儿鼻孔至颞部,停留片刻后缓慢转动退出,将鼻咽拭子置入无菌采样管,密封送检。所采集的标本可立即用于测试,或长期保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,也可以保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中待测,保存期为 6 个月,标本应避免反复冻融。标本运送采用 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰壶或以泡沫箱加冰密封,低温运输时间不应超过 8 h。

1.3.2 检验指标 在 175 份标本中 139 例为普通病区住院患儿,36 例为儿童 ICU 住院患儿。来自儿童 ICU 的患儿因不同病因导致其病情严重,因此本研究仅对普通病区住院,经 PCR-荧光探针法判读为阳性的 41 例患儿的住院天数、入院前最高体温、发热天数、白细胞计数、淋巴细胞百分比、降钙素原及超敏 C 反应蛋白进行初步探讨。

1.4 PCR-荧光探针法

1.4.1 核酸提取 严格按照核酸提取或纯化试剂盒说明书进行操作。

1.4.2 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 根据 HRV 核酸检测试剂盒说明书将 HRV PCR 反应液 A 与 B 室温融化后振荡混匀,8 000 r/min 离心 5~10 s 后使用,按照所需将 HRV PCR 反应液 A($17\text{ }\mu\text{L}$)+HRV PCR 反应液 B($3\text{ }\mu\text{L}$)加入总 EP 管振荡混匀并短时离心,然后分装到各 PCR 反应管中,向其中加入提取后的待测标本核酸、阴性质控品核酸、阳性质控品核酸 $5\text{ }\mu\text{L}$,盖紧管盖,8 000 r/min 离心 5~10 s 后扩增检测。ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)设置扩增程序如下: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min,1 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min,1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s $\rightarrow 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s(采集荧光),共 40 个循环。

1.4.3 质量控制 (1)HRV 阴性质控品:FAM 检测通道无扩增曲线,VIC 检测通道有扩增曲线。(2)HRV 阳性质控品:FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 32 ,VIC 检测通道有或无扩增曲线。以上要求需在同一次试验中同时满足,否则,本次试验无效,需重新进行。

1.4.4 结果判读 (1)若检测标本的 FAM 检测通道无扩增曲线,且该 VIC 通道有扩增曲线,可判标本为 HRV 阴性。(2)若检测标本的 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 40 ,VIC 检测通道有或无扩增曲线,可判标本为 HRV 阳性。

1.5 Sanger 测序法 将 PCR 扩增后的标本外送华大基因公司(中国,广州)进行 Sanger 测序法测序,并将结果进行对比分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本 t 检验;呈偏态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,组间比较采用非参数 Kolmogorov-Smirnov 检验;计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种方法检出结果比较 采用 PCR-荧光探针法在 175 份标本中检出阳性标本 51 份(29.14%),阴性标本 124 份(70.86%)。采用 Sanger 测序法在 175 份标本中检出阳性标本 48 份(27.43%),阴性标本 127 份(72.57%)。两种方法检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.127, P > 0.05$)。见表 1。与 Sanger 测序法比较,PCR-荧光探针法检测 HRV 的灵敏度和特异度分别为 100.00%和 97.64%,阳性预测值和阴性预测值分别为 94.12%和 100.00%,两种方法的一致率为 95.80%,见表 2。此外,有 3 份标本采用 PCR-荧光探针法检出结果 Ct 值位于 37~40,被判为

阳性,而 Sanger 测序法检出为阴性。

表 1 两种检测方法检出结果比较[n(%)]

检测方法	<i>n</i>	阳性	阴性
PCR-荧光探针法	175	51(29.14)	124(70.86)
Sanger 测序法	175	48(27.43)	127(72.57)

表 2 PCR-荧光探针法与 Sanger 测序法的一致性评价(*n*)

检测方法	PCR-荧光探针法		合计
	阳性	阴性	
Sanger 测序法			
阳性	48	3	51
阴性	0	124	124
合计	48	127	175

2.2 HRV 载量对患儿临床指标的影响 以患儿 HRV 平均 Ct 值(31.03 ± 4.87)为分界线,将 Ct 值 < 31 的患儿作为高载量病毒组, $31 \leq \text{Ct 值} \leq 40$ 的患儿作为低载量病毒组。两组住院天数、入院前最高体温、发热天数、白细胞计数、淋巴细胞百分比及降钙素原比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),超敏 C 反应蛋白比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 41 例普通病区住院患儿住院天数和相关感染指标的情况[$\bar{x} \pm s / M(P_{25}, P_{75})$]

组别	<i>n</i>	住院天数 (d)	入院前最高体温 (℃)	发热天数 (d)	白细胞计数 ($\times 10^9 / \text{L}$)	淋巴细胞百分比 ($\times 100\%$)	超敏 C 反应蛋白 (mg/L)	降钙素原 ($\mu\text{g/L}$)
高载量病毒组	19	6.89 $\pm$ 2.49	38.92 $\pm$ 0.76	1(1~4)	11.29 $\pm$ 4.02	41.81 $\pm$ 19.19	15.21(8.95~32.30)	0.24(0.12~0.30)
低载量病毒组	22	6.73 $\pm$ 2.49	38.90 $\pm$ 0.63	1(1~2)	11.46 $\pm$ 5.52	43.96 $\pm$ 20.79	5.20(0.50~14.99)	0.10(0.08~0.18)
<i>t</i> / χ^2		0.83	0.93	0.71	0.91	0.73	0.04	0.10
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

注:41 例普通病区住院患儿 7 项呼吸道病毒核酸检测结果均为阴性。

3 讨 论

据研究报道,HRV 通常感染人类的上呼吸道,还可向下蔓延导致下呼吸道感染,其甚至是诱发儿童哮喘性疾病的重要原因^[2-4]。由于传统检测方法的限制,HRV 在婴幼儿和儿童急性呼吸道感染中的作用可能被低估,因此早期、快速、准确地检出 HRV 对临床疾病的评估意义重大。本研究以 HRV 基因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,进行一步法 RT-qPCR 扩增,用于标本中 HRV RNA 的定性检测。另外,扩增体系中带有内标物质,用于对核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控,可减少假阴性结果的出现。本研究结果显示,与 Sanger 测序法相比,PCR-荧光探针法检测 HRV 具有较高的灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,两种方法的一致率为 95.90%。两种方法 HRV 检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与赖建辉等^[7]、陈淑丹等^[9]报道的 PCR 荧光探针法检测 HRV 的有效率基

本一致,说明 PCR-荧光探针法具有快速、灵敏度高、特异度高等优点,适用于 HRV 的快速检测。

Sanger 测序法是传统的第一代 DNA 测序技术,被公认为基因测序的“金标准”,但其灵敏度低,实际检测中易出现假阴性结果^[10-11]。在本研究 PCR-荧光探针法检测结果中,有 3 份标本结果与 Sanger 测序法不一致,其 Ct 值位于 37~40,提示当 Ct 值偏大时,PCR-荧光探针法对 HRV 的检测结果应判为可疑,需再次复查。但总体上两种方法的检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

各地区、各年龄段、各季节 HRV 的检出率均有差异。蔡晓莹等^[12]报道汕头大学医学院第二附属医院住院的 2 900 多例呼吸道感染患儿中单一 HRV 检出率为 5.85%,患儿各年龄段中以婴儿期组检出率最高。张明新等^[13]报道首都医科大学附属北京同仁医院收治的 479 例呼吸道感染患者临床标本中检出率较高的为甲型流感病毒 H1 型(22.76%),HRV 为

4.80%,但 HRV 在不同年龄段检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$),原因可能是没有纳入婴幼儿和儿童患儿的临床标本。余光清等^[14]报道深圳地区急性上呼吸道感染患者中 HRV 的检出率为 18.27%;HRV 感染以幼儿检出率最高,其次为婴儿和学龄前儿童;此外,HRV 主要在春季、夏季、秋季检出,冬季检出较少。王丰等^[15]报道自贡市第四人民医院收治的急性呼吸道感染患者中 HRV 的检出率为 8.31%;呼吸道合胞病毒(RSV)秋季、冬季检出率高,HRV 春季、夏季检出率高。从以上报告中可以看出,HRV 的检出率存在地区、年龄,甚至季节的差异,分析其原因可能与样本量的多少、样本收集的时间段,各年龄段纳入人群量有关,还可能与不同地区温度、湿度及气候等差异有关,多种因素均可能影响病毒的易感性。而本研究收集标本的时间段为肠道病毒高发季节^[16],纳入人群、样本量有限且未考虑肠道病毒的混合感染,因此本研究仅探讨 HRV 的检出情况。HRV 在本院的总体检出情况还需长时间、大样本量的补充;而 HRV 在本地区的感染情况,还需多个哨点医院的数据参与评估。

婴幼儿和儿童身体器官和免疫功能尚未发育成熟,当机体遭受病原体入侵时,其症状与成人患者大相径庭,因此本研究仅对婴幼儿和儿童感染 HRV 后的临床参数进行对比分析。在实验室指标方面,本院感染 HRV 的患儿白细胞计数、淋巴细胞百分比、超敏 C 反应蛋白及降钙素原等均超过正常范围,高载量病毒组与低载量病毒组超敏 C 反应蛋白水平比较,差异有统计学意义($P<0.05$),与邓敏等^[17]报告的情况有偏移,这可能与本研究患儿病情较重有关。

综上所述,Sanger 测序法虽具有准确性高且特异度高的优点,但因其检测周期长、检测费用昂贵等问题,目前其仅能在设备齐全、资金雄厚的基因检测公司和国家级实验室使用,在普通医院的实验室很难被推广和应用于临床。而 PCR-荧光探针法检测 HRV 具有灵敏度高、特异度高、检测周期短、费用较低、操作简便快捷等优点,可替代 Sanger 测序法在临床检测 HRV 感染,并能被广泛推广和应用。此外,高载量 HRV 的婴幼儿和儿童的超敏 C 反应蛋白水平较低载量 HRV 的婴幼儿和儿童更高。

参考文献

[1] 奚志敏,沈军,王立波. 人鼻病毒感染研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(3):333-336.
[2] CHARLTON C L,BABADY E,GINOCCHIO C C,et al.

Practical guidance for clinical microbiology laboratories: viruses causing acute respiratory tract infections[J]. Clin Microbiol Rev,2018,32(1):42-56.
[3] 周小鹤,赵林清. 人鼻病毒感染与儿童哮喘的关系研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2018,32(3):333-337.
[4] 冀红,吴泰华. IL-17 在鼻病毒感染后哮喘中的作用机制研究进展[J]. 大连医科大学学报,2018,40(5):458-461.
[5] TURNER R B. Rhinovirus: more than just a common cold virus[J]. J Infect Dis,2007,195(6):765-766.
[6] KAISER L,AUBERT J D,PACHE J C,et al. Chronic rhinoviral infection in lung transplant recipients[J]. Am J Res Pir Crit Care Med,2006,174(12):1392-1399.
[7] 赖建辉,周建明,李惠卿. 实时荧光定量 PCR 快速检测人鼻病毒[J]. 实用预防医学,2015,22(8):1011-1013.
[8] 余占娟,李向阳. PCR-荧光探针法检测 HBsAg 低反应性 HBV 基因型的初步评估[J]. 中国卫生检验杂志,2020,30(17):2083-2085.
[9] 陈淑丹,张小平,李杰,等. 重组酶介导恒温扩增快速检测人鼻病毒的方法学研究[J]. 中国卫生检验杂志,2020,30(19):2305-2307.
[10] 董天宇. DNA 测序技术[J]. 当代化工研究,2018,18(11):71-73.
[11] 时运,王卓. ddPCR 技术和 Sanger 测序法检测甲状腺乳头状癌患者 BRAF V600E 基因突变的比较分析[J]. 中国肿瘤外科杂志,2021,13(3):287-290.
[12] 蔡晓莹,张丹桂,林广裕,等. 不同年龄段儿童鼻病毒的检测及临床特点[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2020,47(6):505-508.
[13] 张明新,王玫,张韶娅,等. 北京市某医院住院患者急性呼吸道感染病毒检测结果分析[J]. 中华医院感染学杂志,2020,30(18):2754-2758.
[14] 余光清,黄运美,在静,等. 深圳地区 2011—2012 年急性上呼吸道感染鼻病毒检测分析[J]. 中国热带医学,2013,13(5):575-577.
[15] 王丰,范波,赵芳丽,等. 急性呼吸道感染患者病毒检测及相关危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志,2020,15(7):830-832.
[16] AI Y,ZHANG W,WU J,et al. Molecular epidemiology and clinical features of enteroviruses-associated hand, foot, and mouth disease and herpangina outbreak in Zunyi, China, 2019 [J]. Front Med (Lausanne), 2021, 8: 656699.
[17] 邓敏,夏晓影,杨玉霞,等. 一起学校人鼻病毒感染聚集性疫情流行病学和临床特征分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2021,21(4):418-422.