

荧光定量 RT-PCR 快速检测乙型流感病毒核酸的价值分析

史永海, 王伟*

江苏省扬州市江都区疾病预防控制中心, 江苏 扬州 225200

摘要: 目的: 评价荧光定量 RT-PCR 对于乙型流感病毒核酸的检测意义。方法: 选择 2023 年 1 月 -2024 年 5 月间扬州市江都区人民医院送检的 54 例乙型流感患者。随机法分组, 甲组使用 RT-PCR 快速检测法测定乙型流感病毒, 乙组使用胶体金法检测, 对比阳性率、检测精准度。结果: 甲组的检测阳性率略高于乙组 ($P > 0.05$)。以诊断报告书为准, 甲组的检测准确率、敏感度均略高于乙组; 漏诊率略低于乙组 ($P > 0.05$)。结论: RT-PCR 对于乙型流感病毒的检出率略高于胶体金法, 且不易导致漏诊和误诊情况, 具有相对较高的应用价值。

关键词: 荧光定量 RT-PCR; 快速检测; 乙型流感病毒核酸

Value Analysis of Fluorescence Quantitative RT-PCR for Rapid Detection of Influenza B virus Nucleic Acid

Shi Yonghai, Wang Wei*

Yangzhou City Jiangdu District Center for Disease Prevention and Control, Jiangsu, Yangzhou 225200

Abstract: Objective: To evaluate the significance of fluorescence quantitative RT-PCR for the detection of influenza B virus nucleic acid. Methods: 54 cases of influenza B patients sent to the Jiangdu People's Hospital of Yangzhou between January 2023 and May 2024 were selected and grouped by random method. Group A used RT-PCR rapid assay to determine influenza B virus, and group B used colloidal gold assay to compare the positivity rate and accuracy of detection. Results: The positive rate in group A was slightly higher than that in group B ($P > 0.05$). Based on the diagnostic report, the detection accuracy and sensitivity of group A were slightly higher than that of group B. The rate of missed diagnosis was slightly lower than that of group B ($P > 0.05$). Conclusion: The detection rate of RT-PCR for influenza B virus is slightly higher than that of colloidal gold method, and it is not easy to lead to leakage of diagnosis and misdiagnosis, so it has relatively high application value.

Keywords: fluorescence quantitative RT-PCR; rapid detection; influenza B virus nucleic acid

流感病毒可细分为甲型、乙型等, 会诱发流行病学感冒, 是正粘病毒科的常见病毒类型^[1]。乙型流感病毒会导致发热、咳嗽和乏力等症状, 其潜伏期比较短, 传播速度较快, 而且传染性强。为抑制病毒传播, 需早期检测病毒类型, 予以针对性治疗。胶体金法是该病毒的常用检测方法, 其操作流程简单, 检测速度快, 但特异性较低, 容易出现结果误诊^[2]。RT-PCR 可在每次循环中获取荧光信号, 以信号强度为基准检出病毒, 其精准度更高。为此, 本研究选择 54 例乙型流感患者, 评价 RT-PCR 的检测作用。

一、资料与方法

(一) 一般资料

选择 2023 年 1 月 -2024 年 5 月间扬州市江都区人民医院送检的 54 例乙型流感患者。随机法分组, 甲组 27 例, 男患: 女患为 16:11; 年龄 13 至 77 岁, 均数 (41.29 ± 3.34) 岁; 病程 1 至 3d, 均数 (2.02 ± 0.57) d; 乙组 27 例, 男患: 女患为 17:10;

年龄 12 至 75 岁, 均数 (41.38 ± 3.42) 岁; 病程 1 至 3d, 均数 (2.05 ± 0.52) d。组间数据经对比后, 记为 $P > 0.05$ 。

(二) 方法

乙组采取胶体金法检测, 采集患者的咽拭子, 使拭子深入咽喉内, 将咽后壁作为中心, 轻微用力擦拭该区域, 禁止接触舌部, 而后将拭子取出。用病毒采样液处理标本, 若无法即刻处理, 则将其放于塑料管内, 置于 2 至 8°C 的环境下保存。标本提取

第一作者简介: 史永海, (1982-12), 男, 江苏省扬州市, 汉族, 本科, 研究方向: 微生物检验学

通讯作者简介: 王伟, (1983-12), 女, 江苏省扬州市, 汉族, 本科, 研究方向: 微生物检验学, 邮箱: 75165535@qq.com

的方法为：取提取管，垂直加入样本提取液，剂量为400 μ L。将拭子放入提取管内，紧贴管内壁进行旋转，次数为10次，使标本溶于溶液内。挤压棉签头后，弃去拭子，将滴头盖住。取出测试卡并平放，朝测试卡的加样孔内部滴入病毒采样液，剂量为80 μ L，等待15至20min后观察结果。

甲组采取 RT-PCR 检测，仪器为伯乐 Bio-Rad CFX96 荧光定量 PCR 仪六通道，型号为伯乐 CFX96。使用微生物采样棉签，在双侧扁桃体区域、咽后壁区域拭刮，禁止接触舌部。采集标本后，立即将其放入采样管（外螺旋盖设计，规格 15ml，装有保存液 3ml）内，使咽拭子标本在保存液内搅动 40 下以上，并于 4 $^{\circ}$ C 环境下进行离心处理，参数为 10000rpm，离心时间为 20min，取上清液，进行核酸提取操作。分区进行实验，使实验室湿度在 35% 至 75%，温度在 10 至 30 $^{\circ}$ C，提取仪为硕世全自动核酸提取仪，以磁珠法提取核酸，根据说明书提取病毒 RNA。PCR 扩增步骤为：经 FluBv 反应液测定标本，判断其检测结果，并设置阳性对照以及阴性对照品。取出试剂盒，室温环境下使其融化，并进行 60s 的漩涡震荡操作，注意酶无需震荡，离心处理 10s，转速设定 6000rpm。FluBv 反应液的每人份加样量为 18 μ l，酶混合液加样量为 2 μ l。以上试剂使用量计算完成后，将其混匀，并离心 10s，转速同上，根据 20 μ l 量将其分装至 PCR 反应管内。待测样本与对照样本均取 5 μ l 试剂加入 PCR 扩增管内，而后将其置于全自动 RRT-PCR 检测仪上反应的总体积等于 25 μ l。反应程序见表 1。若灰区结果，需二次试验。取标本剂量 200 μ l，提取 RNA 后检测，以相同步骤进行复检。

表 1 反应程序

步骤	反应时间	反应温度	采集荧光	循环次数
逆转录与变性	30min	50 $^{\circ}$ C	否	1
	3min	95 $^{\circ}$ C	否	
预扩增	15s	95 $^{\circ}$ C	否	5
	30s	50 $^{\circ}$ C	否	
	1min	72 $^{\circ}$ C	否	
扩增与荧光收集	10s	95 $^{\circ}$ C	否	40
	40s	55 $^{\circ}$ C	是	

(三) 观察指标

阳性标准：甲组阳性：CT 值介于 0 至 37.0 之间即为阳性；CT 值为 0，或未显示 CT 值即为阴性；灰区则 CT 值介于 37.0 至 40.0 之间。乙组阳性：出现 1 条粉色或红色反应线，即质控区与检测区各有 1 条粉色或红色的反应线。

以诊断报告书为准，检验准确率等于真阴加真阳，除以本组例数；敏感度等于真阳除以真阳加假阴的和；漏诊率等于假阴除以真阳加假阴的和。

(四) 统计学分析

数据经 SPSS 28.0 软件处置，计量值经 t 值对比 / 检验，计数值经 χ^2 值对比 / 检验，统计学有意义计为 P 值不足 0.05。

二、结果

(一) 两组的检测阳性率比较

甲组的检测阳性率略高于乙组 (P > 0.05)。

表 1 两组的检测阳性率比较 [n/%]

分组	例数	阳性	阴性
甲组	27	25 (92.59)	2 (7.41)
乙组	27	23 (85.19)	4 (14.81)
χ^2	-	0.7500	
P	-	0.3865	

(二) 两组的检验精准确度比较

甲组的真阳数为 24 例，真阴数为 2 例，假阳数为 0 例，假阴数为 0 例；乙组的真阳数为 21 例，真阴数为 1 例，假阳数为 2 例，假阴数为 3 例，见表 2。以诊断报告书为准，甲组的检测准确率、敏感度均略高于乙组；漏诊率略低于乙组 (P > 0.05)，见表 3。

表 2 两组的检验结果分析

诊断方式	临床诊断			
	阳性	阴性	总计	
甲组	阳性	24	1	25
	阴性	0	2	2
乙组	阳性	21	2	23
	阴性	3	1	4

表 3 两组的检验精准确度比较 [n/%]

分组	准确率	敏感度	漏诊率
甲组	96.30 (26/27)	100.00 (24/24)	0 (0/24)
乙组	81.48 (22/27)	87.50 (21/24)	12.50 (3/24)
χ^2	3.0000	3.2000	3.2000
P	0.0833	0.0736	0.0736

三、讨论

流感病毒的类型多样，是流感的致病体，其包含甲型和乙型流感病毒，二者的结构类似，疾病症状较为相近^[3-4]。其中，乙型流感的症状为高热、腰酸背痛以及全身乏力，其传染性较强，潜伏期较短，易发病于免疫力低下、身体素质较低的人群，会影响患者的生活质量。此外，乙型流感不易造成病毒大爆发，因此诊断难度比较大^[5]。

乙型流感病毒的常规检测方法为免疫学检测，常规化的免疫学检测可开展红细胞凝集试验与红细胞凝集抑制试验，可以预测流感病毒的感染情况，其操作方法简便，检测结果的准确性较高。但其无法检出未知类型的病毒感染，对于操作人员的专业性要求较高，需要其具备高超的操作技能^[6-7]。相比较而言，快速免疫学检测多实施胶体金法，可借助抗体、抗原之间的反应原理，以胶体金作为标记物，判断病毒感染情况^[8]。其操作流程较为简单，检测的速度快。但是以上方法的检测准确性均比较低，具有局限性。而且胶体金法的检测结果受到样本采集过程和储存方法的影响，若样本重复冻融或是不新鲜，也会导致结果误差。

加之该方法具有抗原类检测试剂方法学的局限性,其敏感度低于核酸类试剂,因此检测结果容易出现假阳或假阴情况。现阶段,常规RT-PCR成为该病的较新型检测方法,可对病毒片段实施逆转录与扩增处理,进而获得特异性片段,检出病毒感染。其应用范围广泛,对于流感病毒的检出精度高。但其存在假阳性情况,原因是扩增期间会检出其他病毒,进而污染标本,造成阳性率假性升高^[9]。加之甲型与乙型流感病毒具有相似性结构,也会提高假阳性率。在PCR检测时,病毒包括基质蛋白与包膜等结构,而病毒类型的区分基础是其核心差异,可通过病毒核心的精准判断,预测病毒类型。基于此,本研究采取RT-PCR检测,其检测过程更加干净与卫生,实验周期比较短,操作流程较为规范和简便^[10-11]。其检测原理为:在PCR反应液内添加荧光基因,以荧光信号作为基础,对产物数量实施监测,并利用标准曲线算出模板,对其开展定量分析。该项检测在密封管内开展,不易导致交叉感染。而且操作全程整洁且无菌,可以完整保留乙型流感病毒的结构特征。测定流感病毒核酸,可判断不同毒株的基因差异,其检测操作更为精准和快速^[12-13]。

结果显示,甲组的检测阳性率略高于乙组($P > 0.05$)。以诊断报告书为准,甲组的检测准确率、敏感度均略高于乙组;漏诊

率略低于乙组($P > 0.05$)。原因是RT-PCR检测能够测出单个拷贝形态下的基因,能够检出低表达量基因,对于乙型流感病毒早期感染的判断效果较佳^[14]。其利用外参法亦或是内参法定量分析RAN序列,可以防止操作失误或是标本处理不当所致的假阳性结果。此外,该项检测可对单个碱基差异进行精准预测,准确且快速的识别目标基因,能够预防非特异性扩增情况,因此假阳性结果较少,敏感度略高^[15-17]。其所检测的是乙型流感病毒的保守基因,即Victoria系基因,其毒株之间的稳定性较强,具有高度保守特征,若靶序列内伴有基因突变,则会导致假阴性结果,进而造成漏诊情况^[18]。为保证检测结果的准确性,需在发病2d内采集咽拭子,避免病毒被大量清除,病毒核酸水平下降。在早期采样的基础上,也可实行多部位同时采样方法,以此提升诊断效能。但需注意的是,RT-PCR结果需要结合临床症状、相关体征、影像学检查等多种资料,对患者进行综合性诊断,不可单纯依靠RT-PCR结果判断病毒类型^[19-20]。

综上,为乙型流感病毒采取RT-PCR快速检测的阳性率略微偏高,可精准检出病毒感染情况,相比于胶体金法的漏诊率略微降低。但其检测时间较长,对于操作人员的专业要求比较高,因此需要不断提升其检测技术,以保障RT-PCR的检测优势。

参考文献

- [1]王瑾. 荧光定量RT-PCR快速检测乙型流感病毒核酸的价值分析[J]. 中国现代药物应用, 2020,14(17):54-56.
- [2]程子恩,刘芷宁,曹鹏程,等. 分型鉴别HPIV1、HPIV2及HPIV3多重荧光定量RT-PCR方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2023,36(9):1121-1126.
- [3]申梁,汪娇,蓝佳明,等. 基于逆转录环介导等温扩增技术的SARS-CoV-2检测方法的建立[J]. 国际病毒学杂志, 2021,28(3):245-250.
- [4]刘莉,包名家,王彬,等. 2015年至2019年佳木斯市儿童流感病原学监测结果分析[J]. 国际医药卫生导报, 2021,27(12):1889-1892.
- [5]年慧慧,周辉,李军英,等. 乙型流感病毒荧光定量RT-PCR检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2022,35(9):1090-1095,1101.
- [6]李杨霞,陈文铎,朱晓云,等. 甲型、乙型流感病毒核酸检测试剂盒的质量评价[J]. 中国医疗器械信息, 2020,26(9):23-24.
- [7]郑夔,孙芳芳,姚璨璨,等. 一步法多重巢式荧光RT-PCR检测新型冠状病毒和甲、乙型流感病毒[J]. 中华检验医学杂志, 2022,45(11):1144-1149.
- [8]赵盼,赵刚,倪赞,等. 杭州地区7株重排乙型流感病毒基因组特征分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2023,43(5):341-350.
- [9]董泽丰,杨瑞敏,刘洋,等. 2021—2022年苏州市乙型流感病毒的基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2023,37(2):178-183.
- [10]王永虎,郑勤妮,庄丽,等. 2017—2021年贵州省乙型流感病毒遗传进化分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2022,42(6):464-471.
- [11]汪海霞,杜伟鹏,冯扬帆,等. 临床检测乙型流感病毒的方法学应用评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2023,33(1):51-54.
- [12]赵文欣,朱翔宇,肖妍,等. 乙型流感病毒TaqMan荧光定量PCR分型检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2024,44(4):685-691.
- [13]陈绍森,胡佩村,郑伟强,等. 2012—2019年佛山地区乙型流感病毒流行特征及毒株变化分析[J]. 现代预防医学, 2020,47(24):4503-4506.
- [14]李爱华,王雪,龚成,等. 实时荧光RT-PCR法和NASBA方法在呼吸道多病原检测中的应用评价[J]. 现代预防医学, 2022,49(7):1279-1283.
- [15]吴华伟,秦义娴,陈晓春,等. 副流感病毒5型荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2021,55(9):1-7.
- [16]雷宇平,图门巴雅尔,张仲萍,等. H7N9亚型流感病毒荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2021,38(8):90-94.
- [17]潘玉平. 荧光定量PCR技术在筛查甲型流感病毒中的应用[J]. 中国农村卫生, 2019,11(22):49-50.
- [18]李晓光,陈静,王伟,等. 新型快速流行性感冒病毒抗原检测方法免疫荧光法在流行性感冒筛查中的应用价值研究[J]. 中国全科医学, 2020,23(36):4651-4655.
- [19]吴华伟,秦义娴,陈晓春,等. 副流感病毒5型荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2021,55(9):1-7.
- [20]汪海霞,杜伟鹏,冯扬帆,等. 临床检测乙型流感病毒的方法学应用评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2023,33(1):51-54.