

实时荧光定量 PCR 与 细胞培养法在流感病毒检测中的比较

修 敏, 任妍妍

【摘要】目的 探讨实时荧光定量 PCR 与细胞培养法在流感病毒检测中的应用效果。**方法** 将我中心流感高峰季节接收的流感样病例样本 726 例分别采用实时荧光定量 PCR 和细胞培养检测方法进行检测, 分析 2 种检测方法的阳性检出率和实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度和特异度。**结果** 726 例流感样病例样本中, 细胞培养阳性 89 例, 阳性率 12.26%; 实时荧光定量 PCR 阳性 189 例, 阳性率 26.03%。以细胞培养法为金标准, 计算实时荧光定量 PCR 检测法灵敏度为 91.01%, 特异度为 83.05%。**结论** 实时荧光定量 PCR 具有灵敏度高、检出速度快等特点, 可广泛应用于临床诊断、常规监测以及流感疫情应急检测等。

【关键词】 流感病毒检测; 细胞培养; 实时荧光定量 PCR

【中国图书资料分类号】 R248.4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1007-8134(2019)04-0336-03

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2019.04.012

Comparison of real-time fluorescence quantitative PCR with cell culture in detection of influenza virus

XIU Min, REN Yan-yan

Inspection and Detection Department of Fuxin Health Service Center (Fuxin Center for Disease Control and Prevention), 123000, China

【Abstract】Objective To investigate the application of real-time fluorescence quantitative PCR and cell culture in influenza virus detection. **Methods** Seven hundred and twenty-six samples of influenza-like cases received in the peak season of influenza in our center were detected by real-time fluorescence quantitative PCR and cell culture detection methods respectively. The positive detection rate of the 2 methods and the sensitivity and specificity of real-time fluorescence quantitative PCR were analyzed. **Results** Of 726 influenza-like cases, 89 were positive in cell culture (12.26%) and 189 were positive in real-time fluorescence quantitative PCR (26.03%). Taking cell culture method as golden standard, the sensitivity and specificity of real-time fluorescence quantitative PCR were 91.01% and 83.05% respectively. **Conclusions** Real-time fluorescent quantitative PCR has a high sensitivity and rapid detection. It can be widely used in clinical diagnosis, routine monitoring and emergency detection of influenza.

【Key words】 influenza virus detection; cell culture; real-time fluorescence quantitative PCR

流行性感冒(流感)是由流感病毒引起的急性呼吸道传染性疾病。为进一步了解流感病毒流行株构成、基因特异性以及抗原性,避免流感大面积扩散,各地均实施了有效的监测^[1-2],国际上第一个实现全球监测的疾病是流感,对有效控制和预防流感起到很大作用^[3]。本研究针对实时荧光定量 PCR、细胞培养法在流感病毒检测中的应用效果进行分析,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 研究样本来源于阜新市卫生健康服务中心 2016 年 12 月—2017 年 5 月流感高峰季节接收的流感样本 726 例,所选样本均在 24 h 内送至检测实验室进行检查,对于无法在 24 h 内送检的样本,应置于 -70 °C 的环境中保存。

1.2 仪器与试剂 本次研究中所用的仪器:Ⅱ级生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司,型号 BSC-1500 II A2-X);高速离心机(美国贝克

曼 Microfuge 公司,型号 18);全自动实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司,型号 7500fast);旋涡振荡器(德国 Heidolph 公司);全自动核酸提取仪(德国 GIGAGEN 公司,型号 QIAcube);核酸提取试剂盒(德国 GIGAGEN 公司,型号 RNeasy Mini Kit);无核酸离心管;CIBIO 公司 DMEM 培养液;甲型/乙型流感病毒核酸 RNA 检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司)。

1.2.1 核酸提取 根据 QIAcube 全自动核酸提取仪使用说明书和配套 RNA 提取试剂盒的使用方法进行试验^[4]。

1.2.2 反应的体系以及条件 采用甲型/乙型流感病毒核酸 RNA 检测试剂盒。反应体系包括:反应液、反转录酶,所有反应体系的配置情况均以试剂盒的说明书为依据进行。反应条件:在 50 °C 下进行 30 min,按照此顺序进行 1 个循环然后在 95 °C 下进行 5 min,按照此顺序进行 1 个循环,在 95 °C 下进行 10 s,然后在 55 °C 下进行 40 s,按照此顺序进行 45 个循环,最后为荧光收集,在 55 °C 的环境下进行荧光检测。

【作者单位】 123000, 阜新市卫生健康服务中心(阜新市疾病预防控制中心)检验检测部(修敏、任妍妍)

1.2.3 病毒细胞分离鉴定 根据《流行性感冒诊疗方案（2018 年版修订版）》^[5] 对流感病毒实施鉴定和分离操作。将 10 000 U/ml 双抗置入到样本病毒采样液，对细胞病理变化进行观察，通过红细胞凝集试验对病毒培养液进行检测，对于红细胞凝集试验滴度达到 1:16 或者超过该比例的细胞培养液，利用红细胞凝集抑制试验对相关亚型标准血清进行检测和鉴定^[6-7]。

1.3 统计学处理 用 SPSS 20.0 软件处理数据，计算相应的阳性率。以细胞培养为金标准，计算实时荧光定量 PCR 检测法诊断流感的灵敏度和特异度。

2 结 果

2.1 细胞培养法以及实时荧光定量 PCR 检测法检测流感病毒阳性率 细胞培养法检测阳性标本 89 例，阳性率 12.26%，实时荧光定量 PCR 法共检测 189 例阳性，阳性率 26.03%。细胞培养法 A 型 H1、H3 亚型以及 B 型阳性检测率分别是 0.96%、4.82% 和 5.65%；实时荧光定量 PCR 法检出 A 型 H1、H3 亚型以及 B 型阳性率分别是 1.52%、10.33% 和 11.57%。见表 1。

表 1 细胞培养法和实时荧光定量 PCR 检测法检测流感病毒阳性结果 [例 (%)]

Table 1 Positive results of influenza virus by cell culture and real-time fluorescence quantitative PCR[cases (%)]

检测方法	n	A/B 型	A 型 H1 亚型	A 型 H3 亚型	B 型
细胞培养法	726	89(12.26)	7(0.96)	35(4.82)	41(5.65)
实时荧光定量 PCR 法	726	189(26.03)	11(1.52)	75(10.33)	84(11.57)

2.2 实时荧光定量 PCR 检测法的灵敏度和特异度 以细胞培养法为金标准，实时荧光定量 PCR 检测法灵敏度为 91.01%（81/89），特异度为 83.05%（529/637）。见表 2。

表 2 细胞培养法和实时荧光定量 PCR 检测法检测流感病毒结果（例）

Table 2 Results of influenza virus by cell culture and real-time fluorescence quantitative PCR(cases)

细胞培养法	实时荧光定量 PCR 检测法		合计
	阳性	阴性	
阳性	81	8	89
阴性	108	529	637
合计	189	537	726

3 讨 论

目前分离培养法、PCR 检测法都是检测流感病毒的主要方法。细胞培养方法是目前检测流感病毒的金标准，同样也是检测流感病毒的主要方法

和基础，但是其无法实现快速诊断的目标^[9-10]。PCR 检测可以准确、快速地检测流感病毒，而且是一种切实可行的方法，该方法具有较快的检测速度，而且具有较高的灵敏度，无论样品质量高低均能够进行检测^[11]。

本研究共收集 726 例样本，细菌培养阳性 89 例，阳性率为 12.26%，实时荧光定量 PCR 法阳性 189 例，阳性率为 26.03%。细胞培养 A 型 H1、H3 亚型以及 B 型阳性检测率分别是 0.96%、4.82% 和 5.65%；实时荧光定量 PCR 法检测 A 型 H1、H3 亚型以及 B 型阳性检测率分别是 1.52%、10.33% 和 11.57%。细胞培养法在样本采集时间、样本运输、样本活病毒含量以及保存等方面均存在较高的要求。PCR 法检测标本的病毒核酸，无论是病毒降解物还是病毒，都能够检出病毒 RNA，所以在实际检测过程中，PCR 阳性检出率要比培养法高^[12-13]。建议将 2 种检测方法结合在一起，以提高检出率。

实时荧光定量 PCR 检测法具有灵敏度高、检出速度快等特点，可被广泛应用于临床诊断、常规监测以及流感疫情应急检测中。细胞培养法能够取得病毒毒株，可用于研究耐药性、基因特性以及抗原性等。

【参考文献】

[1] 薛京昌, 卞琛, 徐晓怡. 实时荧光定量 PCR 法在流感病毒暴发疫情病原学检测诊断中的应用 [J]. 实用预防医学, 2017, 24(5):625-626.

[2] 赵孟孟, 冯松林, 王文佳, 等. Nsp9 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其在感染细胞过程中表达量的变化 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(10):2534-2540.

[3] 刘婷婷, 谢芝勋, 宋德贵, 等. H3 和 H4 亚型禽流感病毒双重实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国家禽, 2015, 37(7):29-34.

[4] 魏明琳. 流感病毒分型与亚型实时荧光定量 PCR 检测能力验证结果分析 [J]. 临床检验杂志 (电子版), 2017, 6(2):393-394.

[5] 国家卫生健康委员会. 流行性感冒诊疗方案 (2018 年版修订版) [J]. 传染病信息, 2018, 31(6):500-504.

[6] 魏明琳. 流感病毒分型与亚型实时荧光定量 PCR 检测能力验证结果分析 [J]. 临床检验杂志 (电子版), 2017, 6(2):393-394.

[7] 付运星, 吴永丽, 徐道修, 等. 犬瘟热病毒一步法荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2016, 36(3):407-411.

[8] 杨燕, 单万水, 韩红星, 等. 化学发光法和实时荧光定量 PCR 法检验 EB 病毒的临床效果对比 [J]. 国际免疫学杂志, 2016, 39(5):463-465.

[9] 潘超, 韦天超, 农海连, 等. 鸽白细胞介素 8 基因实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(10):2547-2552.

[10] 孙文超, 解长占, 赵冠宇, 等. 犬圆环病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(5):6-10.

[11] 邸红芹, 杨永辉, 朱桂云, 等. 改良多重实时荧光定量 PCR 检测流感 A 型和 B 型病毒 [J]. 河北医药, 2016, 38(23):3529-3532.

治疗中。阿昔洛韦为第二代抗病毒广谱药物,主要应用于单纯疱疹病毒感染、免疫缺陷型水痘及带状疱疹等疾病的临床治疗。阿昔洛韦对于单纯疱疹病毒-1、单纯疱疹病毒-2具有选择性抑制作用,可选择性激活单纯疱疹病毒胸苷激酶而发挥拮抗病毒的功效,因此阿昔洛韦对于原发水痘与复发性单纯疱疹、生殖器疱疹、带状疱疹等疾病具有明确功效^[12-13]。虽然阿昔洛韦治疗水痘具有一定疗效,但对水痘成人患者的治疗效果欠佳。

本研究结果表明,阿昔组临床总有效率为78.18%,更昔组则高达96.36%;提示更昔洛韦在治疗成人水痘中具有更为良好的临床疗效,上述研究结果与德吉玉珍^[14]的研究结果相似,他们指出更昔洛韦治疗水痘的总有效率为96.67%,阿昔洛韦的总有效率为68.33%,分析更昔组临床总有效率更高的原因,可能是因为更昔洛韦半衰期更长,生物利用率高。且虽然阿昔洛韦与更昔洛韦的抗病毒机制基本一致,但更昔洛韦为新四类药物,抗病毒谱更广,不易发生耐药且疗效更为理想。

此外,更昔组VZV转阴时间、水疱结痂时间、退热时间、疼痛与瘙痒缓解时间均短于阿昔组;提示更昔洛韦具有更为强效的抗VZV功效,这与其他学者的研究结果一致^[15-16],分析原因可能是由于更昔洛韦对VZV、EB病毒、单纯疱疹病毒、巨细胞病毒等的复制均具有竞争性抑制功效,且其抗病毒谱更广、半衰期更长,因此能够更快的解除或缓解发热、疼痛、瘙痒等临床症状,促使水疱尽快干瘪结痂,从而起到迅速起效、缩短治疗周期的作用。更昔组不良反应发生率为3.64%,低于阿昔组14.55%的不良反应发生率,表明更昔洛韦治疗水痘过程中不良反应更少,用药安全性更高。本次研究2组共纳入成年水痘患者110例,样本数较少,因此本研究结果有待于进一步大样本量的研究验证。

综上所述,更昔洛韦与阿昔洛韦应用于水痘的治疗中,更昔洛韦可发挥更为良好的疗效,起效更为迅速,治疗时间更短,且具有不良反应少,

用药安全性高等明显优势。

【参考文献】

- [1] Akahoshi Y, Kanda J, Ohno A, *et al.* Acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 infection early after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with T-cell depletion [J]. *J Infect Chemother*, 2017, 23(7):485-487.
- [2] 徐慧玲, 陈军刚, 何灿辉. 人疱疹病毒感染及抗疱疹病毒感染药物研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2017, 17(6):719-724.
- [3] Bialas KM, Swamy GK, Permar SR, *et al.* Perinatal cytomegalovirus and varicella zoster virus infections: epidemiology, prevention, and treatment [J]. *Clin Perinatol*, 2015, 42(1):61-75.
- [4] Jiang YC, Feng H, Lin YC, *et al.* New strategies against drug resistance to herpes simplex virus [J]. *Int J Oral Sci*, 2016, 8(1):1-6.
- [5] De PM, Clerici P. Microbiology laboratory and the management of mother-child varicella-zoster virus infection [J]. *World J Virol*, 2016, 5(3):97-124.
- [6] 刘启方, 刘元林, 杨润平, 等. 牛痘疫苗致炎免疫皮提取物注射液治疗带状疱疹后遗神经痛的可行性观察及对脑源性神经营养因子、 β -内啡肽表达的影响 [J]. *传染病信息*, 2018, 31(3):255-257.
- [7] 何文英, 朱会宾, 李秀宏, 等. 实用传染病学 [M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010:112.
- [8] 李玺琨, 高晓丽, 李岩, 等. 2016年哈尔滨市1~19岁健康人群水痘血清流行病学调查 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(3):203-207.
- [9] 苏琪茹, 姚开虎. 疫苗时代疫苗可预防疾病流行病学和临床表现的变化 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(3):195-198.
- [10] 任玉梅, 姚自凤. 银翘解毒汤治疗儿童水痘的疗效及不良反应研究 [J]. *中药材*, 2016, 39(4):908-910.
- [11] 莫小辉, 林飞燕, 杨连娟, 等. 聚合酶链反应检测带状疱疹患者外周血和疱液中水痘-带状疱疹病毒 [J]. *临床皮肤科杂志*, 2019, 48(3):133-136.
- [12] 贾丽莹. 疏风解毒胶囊联合阿昔洛韦片治疗成人水痘临床观察 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12):5393-5394.
- [13] 张启明. 更昔洛韦治疗病毒性角膜炎的疗效及对血清炎症因子的影响 [J]. *国际眼科杂志*, 2019, 19(3):376-379.
- [14] 德吉玉珍. 更昔洛韦与阿昔洛韦治疗水痘的临床疗效 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2016, 16(72):166.
- [15] 静晨瑾, 叶俊巧. 更昔洛韦眼用凝胶治疗眼睑带状疱疹的临床评价 [J]. *广东医学*, 2017, 38(20):3188-3190.
- [16] 王金范. 脾氨肽联合更昔洛韦治疗对小儿巨细胞病毒感染的T淋巴细胞亚群及CMV-DNA载量影响 [J]. *现代免疫学*, 2018, 38(2):124-128.

(2019-04-19 收稿 2019-07-24 修回)

(本文编辑 揣征然)

(上接第337页)

- [12] 李丹丹, 徐义刚, 李梦圆, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌实时荧光定量PCR快速检测方法的建立 [J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(6):1453-1457.
- [13] 赵鸿, 李妍, 戎国栋, 等. 实时荧光定量PCR检测外周血

白细胞和血浆EB病毒DNA载量 [J]. *江苏医药*, 2017, 43(7):509-511.

(2019-06-15 收稿 2019-08-06 修回)

(本文编辑 张云辉)