

• 论 著 •

# 荧光定量 PCR 反应监测发热患者甲型 H1N1 流感病毒感染

金 欣,陈建魁<sup>△</sup>,于 农,田曙光,曾利军,左向华,王 森,宋世平,尹秀云,黄 媛  
(军事医学科学院附属医院检验科,北京 100071)

**摘 要:****目的** 通过荧光定量 PCR 反应监测发热患者甲型 H1N1 流感病毒感染情况,探讨该方法在流行性感冒检测诊断中的意义。**方法** 采用 WHO 推荐的荧光定量 PCR 方法对 3 361 例发热患者咽拭子标本进行病毒核酸检测,确定甲型 H1N1 流感感染患者。**结果** 共检测有流感样症状患者 2 156 例,甲型流感病毒核酸阳性 1 176 例,阳性率 35.0%,其中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 599 例,阳性率 17.8%。14 岁以下儿童甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 283 例,占甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性总数的 47.2%。**结论** 实时荧光定量 PCR 反应快速、准确,适用于 H1N1 流感病毒感染的早期诊断并可作为监测手段在临床广泛开展,为控制疫情的蔓延发挥了重要作用。

**关键词:**流感病毒 A 型,H1N1 亚型; 聚合酶链反应; 监测,免疫学  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2011.06.002 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)06-0627-02

**Monitoring swine-origin influenza A(H1N1) virus infection by fluorogence quantitative PCR assay from patients with fever**  
*Jin Xin, Chen Jiankui<sup>△</sup>, Yu Nong, Tian Shuguang, Zeng Lijun, Zuo Xianghua, Wang Miao, Song Shiping, Yin Xiuyun, Huang Yuan*  
(Department of Laboratory Medicine, The Affiliated Hospital, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

**Abstract: Objective** To apply an assay of fluorogence quantitative PCR for monitoring swine-origin influenza A(H1N1) virus infection from patients with fever and to examine its utility for rapid detection of H1N1 virus. **Methods** A total of 3 361 oral swab samples from suspected influenza outbreak patients in our hospital during the months of May to December in 2009 were detected by fluorogence quantitative PCR method of WHO standards. **Results** Total of 3 361 oral swab samples, 1 176 (35.0%) were positive for influenza A virus, 599 (17.8%) were positive for H1N1. 283 (47.2%) were positive for H1N1 for younger than 14-year-old children. **Conclusion** Fluorescent quantitative PCR is an ideal method for detecting of H1N1 virus and the early diagnosis in patients with fever.

**Key words:** influenza A virus, H1N1 subtype; polymerase chain reaction; monitoring immunologic

2009 年暴发的甲型 H1N1 流感疫情是由新的流感病毒变异株引起的急性呼吸道传染病,可引发急性呼吸道感染症状,部分重症患者可突发高热,甚至继发严重肺炎、急性呼吸窘迫综合征、肺出血、呼吸衰竭和多器官损伤。传统的实验室确诊方法是通过细胞培养或鸡胚培养分离流感病毒,该方法耗时长,实验室要求高,无法满足及时监测疫情以及临床早期诊断的需要。采用实时定量 PCR 方法对发热患者的鼻咽拭子样本进行检测,可快速检测甲型 H1N1 流感病毒。现将结果报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2009 年 5~12 月本院发热门诊疑似流感样患者共 2 156 例,所有患者均具有发热现象,体温大于或等于 38℃,伴有咳嗽、咽喉痛、全身肌肉酸痛或乏力。其中男 989 例,女 1 167 例,年龄在 0~60 岁之间。

**1.2 方法** 咽拭子样本的采集严格按照《甲型 H1N1 流感病

毒实验室检测技术方案(试行)》执行<sup>[1]</sup>,样本置于 3 mL HA-NKS 病毒保存液中,4℃可保存 72 h,-80℃可长期保存。

**1.3 实时荧光定量 PCR 检测甲型 H1N1 流感病毒特异性核酸** (1)RNA 的提取:采用 QIAGEN 公司的 Reansy™ Mini Kit 提取病毒 RNA,操作严格按照试剂盒说明书进行。(2)采用 WHO 推荐的引物与探针<sup>[2]</sup>:InfA 用于甲型流感病毒通用检测,swInfA 用于检测 Swine 流感病毒,swH1 用于检测 H1 亚型的甲型 H1N1 流感病毒,RnaseP 用于检测临床标本中的人上皮细胞,作为室内质控对照。(3)检测仪器:Roche 公司 Light Cycler 1.2 扩增仪进行实时荧光定量 PCR。(4)PCR 反应条件为 48℃逆转录 30 min,95℃预变性 10 min,然后以 95℃15 s,60℃60 s 扩增 45 个循环,在 60℃时收集荧光。反应体系为 25 μL,模板 5 μL。

**1.4 结果判断** 在阴、阳性对照均成立的情况下,各引物所代表的意义见表 1。

表 1 甲型 H1N1 流感病毒检测结果的判断

| 引物探针   | 带检样品 A   | 带检样品 B    | 带检样品 C         | 带检样品 D         | 带检样品 E  | 带检样品 F     |
|--------|----------|-----------|----------------|----------------|---------|------------|
| InfA   | +        | -         | +              | +              | +       | +/-        |
| swInfA | -        | -         | +              | +              | -       | +/-        |
| swH1   | -        | -         | -              | +              | +       | +/-        |
| RnaseP | +        | +         | +              | +              | +       | -          |
| 结果判断   | 甲型流感病毒阳性 | 非甲型流感病毒感染 | 甲型 H1N1 流感病毒阳性 | 甲型 H1N1 流感病毒阳性 | 理论上不能出现 | 标本不合格,重新留取 |

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:chenjiankui@hotmail.com。

2 结 果

2.1 1 例临床样本经特异性引物扩增后, InfA、swInfA、swH1、RnaseP 结果显示均为阳性, 各引物的阴性对照均为阴性。

2.2 共检测有流感样症状的患者 2 156 例, 3 361 例咽拭子样本中, 甲型流感病毒核酸阳性 1 176 例, 阳性率 35.0%, 其中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 599 例, 阳性率 17.8%。14 岁以下儿童甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 283 例, 占阳性总数的 47.2%。见表 2。

| 表 2 该院 2009 年 5~12 月流感疫情实时<br>荧光 PCR 检测结果比较 |           |            |               |                |                |
|---------------------------------------------|-----------|------------|---------------|----------------|----------------|
| 月份                                          | 例数<br>(n) | 甲型流感<br>阳性 | H1N1 流感<br>阳性 | 甲型流感<br>阳性率(%) | H1N1<br>阳性率(%) |
| 5 月                                         | 32        | 0          | 0             | 0.0            | 0.0            |
| 6 月                                         | 280       | 1          | 0             | 0.4            | 0.0            |
| 7 月                                         | 476       | 14         | 0             | 2.9            | 0.0            |
| 8 月                                         | 668       | 137        | 6             | 20.5           | 0.9            |
| 9 月                                         | 730       | 262        | 74            | 35.9           | 10.1           |
| 10 月                                        | 840       | 571        | 395           | 68.0           | 47.0           |
| 11 月                                        | 204       | 132        | 94            | 64.7           | 46.1           |
| 12 月                                        | 131       | 59         | 30            | 45.0           | 22.9           |
| 合计                                          | 3 361     | 1 176      | 599           | 35.0           | 17.8           |

2.3 甲型 H1N1 流感发病率从 5 月以来呈上升趋势, 10 月下旬至 11 月上旬达到高峰, 10~12 月检测的甲型流感样病例 50% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染, 儿童流感样病例中 80% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染。

2.4 对于甲型流感病毒核酸检测阳性的患者给予相应的抗病毒治疗, 1 周后复检, H1N1 核酸检测大部分为阴性, 转阴率为 95.5%。

3 讨 论

根据国家流行性感冒诊断标准及处理原则 (GB15994-1995)<sup>[3]</sup>, 流行性感冒病原学常规的检测方法是病毒培养法 (细胞培养法与鸡胚培养法)。该方法虽然准确度高, 但培养时间长, 一般要 10~15 d, 而且对实验室和人员素质要求也很高, 不适用于临床常规早期快速诊断。实时荧光定量 PCR 方法从核酸提取到完成检测只需 3~4 h, 且操作方便, 特异性强、灵敏度高, 缩短了检测的时间。

2009 年 3 月暴发于北美的甲型 H1N1 流感疫情, 是由新的流感病毒变异株引起的急性呼吸道传染病, 以前在人和猪身

上均未发现过, 这种新型病毒具有传染性, 包含北美猪流感、禽流感、人流感和欧亚猪流感病毒 4 种不同流感类型的基因片段, 可以在人群之间传播<sup>[4]</sup>。5 月份中国内地确诊首例甲型 H1N1 流感病例<sup>[5]</sup>, 本实验室从 2009 年 5 月 20 日开始采用实时荧光定量 PCR 方法检测发热患者的咽拭子标本, 从 5~12 月共检测了 3 361 例咽拭子样本, 甲型流感病毒核酸阳性 1 176 例, 阳性率 35.0%, 其中甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 599 例, 阳性率 17.8%。6、7、8 月份甲型 H1N1 流感感染阳性率较低, 标本来源于本院发热门诊患者, 主要为医院附近居民。9 月份以后学校开学, 由于此次流感的传染性很强, 出现了多所学校的小范围流行, H1N1 流感阳性率上升至 10.1%。10、11 月随着气温的降低, 流感疫情迅速蔓延, 呈快速上升趋势, 达到 47.0% 左右。尤其是 14 岁以下儿童由于抵抗力差更易感染, 本组检测的病例中, 14 岁以下儿童甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性 283 例, 占阳性总数的 47.2%, 而且在儿童流感样病例中 80% 以上都是甲型 H1N1 流感病毒感染。该病毒感染传播迅速但由于能够早期快速诊断, 大部分患儿经过对症治疗和抗病毒治疗后都能很快好转, 1 周后 H1N1 核酸检测转阴率达到 95.5%。12 月中、下旬以后随着 H1N1 疫苗的广泛注射和防护意识的加强, 感染阳性率迅速下降。2010 年以后 H1N1 感染的阳性率也一直持续在很低的水平, 几乎已检测不到阳性病例。

总之, 采用实时荧光定量 PCR 反应监测发热患者甲型 H1N1 病毒感染快速、准确, 适用于 H1N1 流感病毒感染的早期诊断并可作为监测手段在临床广泛开展, 为控制疫情的蔓延发挥了重要作用。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感病毒实验室检测技术方案(试行)[S]. 2009.

[2] World Health Organization. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1) [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr/en/index.html>

[3] 国家技术监督局. GB15994-1995 流行性感冒诊断标准及处理原则[S]. 北京: 中国标准出版社, 1995.

[4] Fatimah S, Dawood MD, Jain MDS, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans[J]. N Engl J Med, 2009, 6(1): 361-370.

[5] 王伟, 潘明, 常国辉, 等. 中国内地首例确诊甲型 H1N1 流感病例的实验室检测[J]. 病毒学报, 2009, 25(ZI): 4-7.

(收稿日期: 2010-09-11)

(上接第 626 页)

of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation[J]. J Immunol, 2002, 169(8): 4332-4339.

[11] Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1[J]. Nat Immunology, 2003, 4(7): 670-679.

[12] Gonzalez LC, Loyet KM, Calemine-Fenaux J, et al. A coreceptor

interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1116-1121.

[13] 王沛坚, 施旭光. 类风湿关节炎的抗氧化治疗展望[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(3): 39-42.

(收稿日期: 2011-03-15)