

· 短篇论著 ·

两种甲型 H1N1 流感病毒检测方法的比较

张素美 李鲁英 孟保平

甲型 H1N1 流感流行期间,快速鉴别患者是否感染甲型 H1N1 流感病毒关系到患者能否被及时治疗、减少并发症,以及如何更好地控制其流行,减少扩散。常用的检测方法为 RT-PCR 法和胶体金法。目前普遍推荐的方法是 RT-PCR 法^[1,2],但此法需时较长,患者不能得到及时救治,同时费用较高。胶体金法用时较短,约 15 min,如果此检测方法能得到认可,不但可缩短检测以及诊断时间,同时可节省医疗资源、减少浪费。为此,本文对以上两种方法进行比较,以指导临床更合理地利用医疗资源。

一、资料和方法

1. 研究对象和资料:收集 2009 年 10 月至 2010 年 3 月就诊于太原市中心医院发热门诊,血常规检测符合白细胞总数不高、淋巴细胞减少的发热患者共 132 例,每位患者同时采取两份标本分别进行 RT-PCR 法和胶体金法检测,RT-PCR 法检测阳性患者 61 例,其中男 36 例,女 25 例,年龄 9~88 岁(平均 31.39 岁);RT-PCR 法检测阴性患者 71 例,其中男 41 例,女 30 例,年龄 14~86 岁(平均 43.14 岁)。

2. 试剂及检测原理:RT-PCR 法(PCR-荧光探针法):试剂购自中山大学达安基因股份有限公司。其检测原理是利用实时荧光 PCR 技术,分别以甲型 H1N1 流感病毒 HA 和 NA 两个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,通过一步法 RT-PCR 扩增甲型 H1N1 流感病毒 RNA 进行 H1 型及 N1 型的定性检测。使用试剂盒提供的核酸提取数据对临床样本进行处理和 RNA 提取,以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制 PCR 反应管,将提取的核酸加入 PCR 反应管中,使用荧光定量 PCR 仪进行扩增,并检测荧光信号,仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线,根据阈循环值(Ct 值)实现对未知样本的定性检测。具体操作完全按照试剂盒操作说明。

结果判定:(1)如果检测样品的 H1 及 N1 RT-PCR 反应体系扩增曲线在 FAM 检测通道无对数增长期或 Ct 值 > 37,且在 Vic 检测通道有对数增长期,可判样品为甲型 H1N1 流感病毒阴性。(2)如果检测样品的 H1 及 N1 RT-PCR 反应体系扩增曲线在 FAM、Vic 检测通道均有对数增长期且 FAM 检测通道 Ct 值 ≤ 35;或扩增曲线在 FAM 检测通道有对数增长期且 Ct 值 ≤ 35,在 Vic 检测通道无对数增长期,可判样品为甲型 H1N1 流感病毒阳性。(3)如果检测样品的 H1 及 N1

RT-PCR 反应体系扩增曲线在 Vic 检测通道均有对数增长期且 FAM 检测通道 $35 < Ct \leq 37$, 需要对样品重新进行核酸提取和检测操作, 若再次实验结果 FAM 检测通道 $Ct \leq 35$, 且曲线有明显对数增长期, 判断样品为甲型 H1N1 流感病毒阳性; 若 FAM 检测通道 $Ct > 35$, 可判断样品为甲型 H1N1 流感病毒阴性。(4) 如果检测样品的 H1 及 N1 RT-PCR 反应体系仅其中之一的扩增曲线满足判为阳性的要求, 则需重复检测; 若重复检测结果为 H1 及 N1 均阳性, 则判断为 H1N1 阳性; 若重复检测结果仍为 H1 或 N1 阳性, 则判断为 H1N1 阴性, 并建议以其他方法进一步确认。

胶体金法: 试剂购自北京阿斯可来生物工程有限公司, 采用胶体金免疫层析法。实验原理: 在检测试纸上预先固定抗甲型 H1N1 流感病毒核心蛋白的单克隆抗体, 以及胶体金标记的另一株抗甲型 H1N1 流感病毒核心抗原的单克隆抗体, 建立双抗体夹心的免疫学检测方法。具体操作完全按照试剂盒操作说明, 结果以阴性或阳性报告。

3. 统计学处理: 采用 SPSS 11.0 统计学软件, 样本率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。采用效度评价方法对其进行评价^[3]。

二、结果

两种方法检测结果见表 1。检测结果的一致率 p_o 为 0.6742, 在检测结果无关联的假定下计算期望一致率 p_e 为 0.5069, Kappa 值为 0.3393, 两种方法检测结果的相关系数 r 为 0.3414。

表 1 RT-PCR 法和胶体金法检测结果的比较

		胶体金法(例)		$p_o(\%)$	$p_e(\%)$	Kappa 值	相关系数 r
		阳性组	阴性组				
RT-PCR 法	阳性组	36	25	0.6742	0.5069	0.3393	0.3414
	阴性组	18	53				

注: p_o , 两种方法检测结果的一致性; p_e , 两种方法期望一致率

讨论 自 2009 年 4 月 23 日起, 全球暴发了甲型 H1N1 流感, 其早期临床症状与其他流感相似, 但部分患者病情可迅速进展, 来势凶猛、突然高热、体温超过 39°C , 甚至继发严重肺炎、急性呼吸窘迫综合征、肺出血、胸腔积液、全血细胞减少、肾功能衰竭、败血症、休克及 Reye 综合征、呼吸衰竭及多器官损伤, 甚至死亡^[4,5]。因此, 如何在早期快速鉴别甲型 H1N1 流感和其他流感成为关注的焦点, 咽拭子检测需时较长, 因此各种快速检测方法应运而生^[6-10]。若患者鼻拭子检测结果阳性, 其感染甲型 H1N1 流感的可能性则较大, 因此需对其进行评价, 了解二者的符合率, 以便临床工作者更好地应用。本研究表明两种方法检测结果的相关系数 r 为 0.3414, 说明检测结果一致性差。

参 考 文 献

- 1 Cao B, Li XW, Mao Y, et al. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in Chi-

- na. N Engl J Med, 2009, 361(26):2507-2517.
- 2 Uyeki T. Diagnostic testing for 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in hospitalized patients. N Engl J Med, 2009, 361(25):e114.
 - 3 孙振球主编. 医学统计学. 北京:人民卫生出版社, 2002:106-107, 488-489.
 - 4 Libster R, Bugna J, Coviello S, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. N Engl J Med, 2010, 362(1):45-55.
 - 5 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(第三版). 2009.
 - 6 汤一苇. 加强新现感染性病原体的快速检测和应需检测方法的研发. 微生物与感染, 2009, 4(2):67.
 - 7 周淑新, 王伟刚. WHO 和美国疾病预防控制中心关于甲型 H1N1 流感资讯(二)——美国疾病预防控制中心关于甲型 H1N1 流感药物治疗导则. 中国全科医学, 2009, 12(14):1331.
 - 8 朱君华, 丁刚强. 甲型 H1N1 流感疫情综述. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(3):299-301.
 - 9 张海燕, 马文丽, 黄吉成, 等. 寡核苷酸芯片技术在甲型流感及登革病毒检测分型中的初步应用. 山东医药, 2008, 48(4):22-23.
 - 10 郑伯承. 甲型 H1N1 流感在世界蔓延. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2009, 4(5):封3.

(收稿日期:2010-05-07)

(本文编辑:孙荣华)

张素美, 李鲁英, 孟保平. 两种甲型 H1N1 流感病毒检测方法的比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2010, 4(4):441-443.