

荧光实时定量 PCR 法检测流感病毒核酸 的质控结果分析

宋广萍*

(绥芬河市疾病预防控制中心检验科, 牡丹江 157399)

摘要: 目的 分析浅析荧光实时定量 PCR 法检测流感病毒核酸的质控结果。**方法** 在 2021 年 5 月至 2022 年 11 月期间, 120 例流感病毒感染样本进行研究。对这些样本的流感病毒 RNA 进行了核酸抽提, 并利用 PCR 实时荧光定量技术进行检测以评估其效果。**结果** 运用该技术检测到乙型流感病毒 44 例, 甲 1 型 40 例, 以及甲 3 型 36 例。所有检测结果均符合分子生物学操作的质控标准, 合格率达到 100.0%。**结论** 实时核酸 PCR 技术在临床流感病毒检测中被广泛应用。PCR 实时荧光定量检测法在流感病毒核酸检测中的表现精确且迅速, 适宜作为应对突发公共卫生事件的首选检测手段。

关键词: 荧光实时定量; PCR 法检测; 流感病毒核酸; 质控结果

Analysis of quality control results for fluorescence real time quantitative PCR detection of influenza virus nucleic acid

SONG Guang-Ping*

(Suifenhe Disease Prevention and Control Center Laboratory, Mudanjiang 157399, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the quality control results of detecting influenza virus nucleic acid by fluorescence real-time quantitative PCR. **Methods** From May 2021 to November 2022, 120 samples of influenza virus infection were studied. The RNA of influenza virus in these samples was extracted by nucleic acid and detected by PCR real-time fluorescence quantitative technique to evaluate its effect. **Results** 44 cases of influenza B virus, 40 cases of influenza A 1 virus and 36 cases of influenza A 3 virus were detected by this technique. All the test results meet the quality control standards of molecular biology operation, and the qualified rate reaches 100.0%. **Conclusion** Real-time nucleic acid PCR technology is widely used in clinical influenza virus detection. PCR real-time fluorescence quantitative detection method is accurate and rapid in the detection of influenza virus nucleic acid, which is suitable as the first choice to deal with public health emergencies.

KEY WORDS: real-time fluorescence quantification; PCR detection; influenza virus nucleic acid; quality control results

0 引言

在临床上, 可能会表现出呼吸道症状, 伴随疲劳、肌肉疼

痛和高热等症状。流感病毒以其快速传播、短暂的潜伏期和高传染性著称, 因此, 控制其扩散速度的需求迫切。荧光实时定量 PCR 技术在临床实践中, 有效克服了传统 PCR 技术存在

* 通信作者: 宋广萍, 硕士, 主管技师, 研究方向为生物化学与分子生物学、微生物检测。E-mail: 1535528998@qq.com

*Corresponding author: SONG Guang-Ping, Master, Technician in Charge, Suifenhe Disease Prevention and Control Center Laboratory, Mudanjiang 157399, China. E-mail: 1535528998@qq.com

的特异性不足和易污染的挑战,它借助计算机程序的辅助,能够在每个循环中精确地监测荧光信号的强度,据此绘制标准曲线,从而实现样本的定量分析。如今,这一方法已在疾病诊断,如临床疾病;动物健康监控,如动物疫病检测;以及食品安全等多个领域展现出显著价值。为了提升本机构利用荧光实时定量 PCR 技术检测流感病毒核酸的能力和质量管理水平,我们特别对此进行了深入研究^[1-2]。实时定量荧光 PCR 检测法在此背景下应运而生,它借助计算机软件进行操作,有效解决了传统 PCR 方法可能存在的污染问题和较低的特异性难题,荧光强度的测量在每个循环中都得以实施^[3]。本文选取了 2021 年 5 月至 2022 年 11 月期间,120 例流感病毒感染者样本进行研究,运用实时荧光定量 PCR 方法进行检测,并对其质量控制结果进行了评估,以下为详细报告。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取本中心 2017 年 5 月至 2019 年 11 月期间检测的 120 例流感病毒感样本做为研究。依据流感病毒类型划分,乙型流感病例为 44 例,甲 1 型流感 40 例,以及甲 3 型流感 36 例。入选条件样本均符合中国卫生部在 2008 年发布的流行性感冒诊断标准 (WS 285-2008);临床确诊的病例依据严格的医学评估,包括实验室检测、影像资料和病患症状;所有病例均为初次病症发作。排除标准:处于孕期或哺乳期的女性,两周内已服用抗病毒药物的个案,肝肾功能存在异常的病人,以及样本采集过程中出现污染的情况。

1.2 方法

样本收集:建议在疾病初期的 1 到 3 天内进行,以获取最佳效果。收集的样本类型为咽喉冲洗样本,使用 10 mL 的采集液对咽喉部位进行大约 1 min 的温和冲洗,随后将液体吐入容器中。样本采集完毕后,应立即存放在 4℃ 的冷藏器中,以便迅速送至实验室。处理样本时,需用细管对咽拭子施加压力,以分解黏液。在 4℃ 环境下静置 5 到 10 min,待其自然沉淀后,提取上层清液 3 mL。每毫升样本中添加 1000 μg 链霉素和 1000 单位青霉素,混合均匀后在 4℃ 条件下处理 2 到 4 小时,之后可进行接种操作。(1) RNA 的获取步骤如下:首先,在 1.5 mL 的离心管中,放入 100 μL 的流光病毒培养液,随后添加 500 μL 的流光病毒裂解液。接着,混合均匀后,注入 600 μL 70% 的乙醇溶液。然后,取出 RNA 提取柱,倒入混合液 600 μL。紧接着,以 12000 r/min 的速度进行 15 s 的快速冷冻离心。之后,移除收集管中的液体,再次进行 15 s 的冷冻离心,同样保持 12000 r/min 的转速。在确保无污染的情况下,将 RNA 提取柱转移至收集管中,并加入 700 μL 的 RW1 溶液,随后以 12000 r/min 的速度离心 15 s。接着,将提取柱转移到另一个无菌收集管,加入 500 μL 的 RPE 洗涤液,以 13000 r/min 的转速离心 3 min。然后,将提取柱移

至 1.5 mL 的无菌收集管内,注入 50 μL 的无 RNA 酶水,静置于 20℃ 环境中 2 min。最后,以 12000 r/min 的速度离心 60 s,去除提取柱,得到的流感病毒核酸 RNA 保存在 20℃ 条件下。(2) 扩增:采用 25 μL 的反应体系,对样本 5 μL 与 1 μL 的混合酶进行 19 μL 的处理,通过 VIC 荧光通道来探测甲 1 型流感病毒的核酸。同样,使用相同的样本量和酶混合液,但在 FAM 荧光通道下,进行 25 μL 反应体系的处理,以此检测甲 3 型流感病毒的核酸。此外,利用 FAM 荧光通路,在相同条件下,也能检测乙型流感病毒的核酸。PCR 实时定量扩增的程序设定为:45℃ 下预处理 10 min,随后 95℃ 预处理 15 min,然后在 60℃ 进行 1 min 的扩增,此步骤重复 50 次。选取 3 至 15 个循环的基线数据作为荧光信号参考值。整个过程严格按照 PCR 实时荧光定量检测的操作规程和分子生物学实验的标准执行,以确保质量控制的结果准确无误。

1.3 仪器与试剂

新加坡制造的 Model No. CFX96 touch Serial No.785BR54688 的实时荧光定量分析系统,用于检测的乙型、甲 3 型及甲 1 型流感病毒 PCR 荧光检测试剂盒由上海蕊试生物技术有限公司提供。

1.4 结果评估标准

阳性判定:当 Ct 值小于 40 时;阴性判定:若 Ct 值未显示或超过 40.0,样本需复检,原测试视为不可靠。在分子生物学评估中,我们采用 F1 通道作为检测路径,仅考虑 F1 通道的检测输出。设置阈值的标准是确保阈值线略高于常规阴性对照的峰值。只有当结果显示为阴性,并且阈值线符合此条件时,测试才被视为有效。如果阴性对照显示出扩增现象,可能暗示存在环境污染导致的假阳性结果。在这个阶段,应当设置无菌对照以检查环境的污染状况。如果检测到阳性结果,这表明存在环境污染的情况,因此需要对室内进行充分的通风,清洁工作台以及实验设备,并对使用的离心管和吸头进行再次高压消毒。同时,所有试剂也应予以更换。如果阳性对照的 Ct 值超过 40,这可能指示 RNA 有降解的现象,对此应当重新高压灭菌实验用的离心管和吸头,并确保严格遵循实验操作步骤。

1.5 统计学方法

将本组数据代入 SPSS21.0 软件处理分析,计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实施 *t* 检验;计数资料用 % 表示,用 χ^2 检验。 $P < 0.05$,差异有统计学意义。

2 结果与分析

大多数新鉴定的流感病毒株形态表现为丝状,其直径测量在 80 纳米至 120 纳米之间。这些病毒以球形展现,结构上可划分为三个主要部分:核心、基质区和包膜。包膜中包含了神经氨酸酶 (NA) 和血凝素 (HA) 这两种成分;基质蛋白主要由 M 蛋白组成,具有特定的类型标识;核心部分则包含 RNA 聚

合酶、核蛋白以及分段的 RNA。在采用 PCR 实时荧光定量分析法的实验中，对乙型流感病毒进行了 44 次测试，甲型病毒包括 40 例甲 1 型和 36 例甲 3 型（见表 1）。严格遵循分子生物学操作规程进行质量控制，所有核酸测定的结果都达到了预期标准，令人满意，其成功率达到了 100%，在检测过程中，选取 F1 作为分析通道，并对 F1 通道的数据进行详细分析。设置阈值的标准是确保阈值线恰好高于常规阴性对照样本的峰值。当检测输出为阴性时，这一标准即被满足。如果阴性对照显示出扩增现象，这可能暗示存在环境污染导致的假阳性结果。在这种情况下，执行空白对照检测是必要的。一旦检测到阳性结果，这通常指示着存在环境污染的情况。立即执行室内环境的清洁与消毒程序，包括工作区的擦拭和实验设备的彻底清洗，特别是离心管和吸头需进行深度的高压消毒。

表 1 流感病毒核酸的质控结果

Table 1 Quality control results of influenza virus nucleic acids

类型	例数
乙型流感病毒	44
甲型病毒	
甲 1 型	40
甲 3 型	36

3 讨论与结论

神经氨酸酶和血凝素的抗原性质并不稳定，容易发生变异，这正是流感病毒亚型划分的关键依据^[4]。流感病毒的表面抗原因其变异性，成为区分病毒不同亚型的重要标志^[5]。流感病毒的 HANA 伪标签展现出了显著的变异性，这种变异程度的增强极大地促成了大规模流感的暴发。该病毒可以通过多种鉴定手段来确定其类型，如基因序列分析、实时 PCR 定量荧光检测以及核酸杂交技术^[4]。同时，抗原性可以通过检测呼吸道细胞或分泌物中的抗原来确认。血清学检测也是重要途径，包括酶联免疫检测、补体结合试验、中和试验以及血凝抑制试验^[6]。据报告，采用 PCR 实时荧光定量检测，确认了 44 例乙型流感病毒，40 例甲 1 型流感病毒以及 36 例甲 3 型流感病毒。依据分子生物学评价准则，所有核酸测试结果均符合标准，表现出 100.0% 的合格率。质量控制至关重要，它直接反映了实验的检测效能和精度。此外，外部质量控制能检验实验室内的不同检测流程，并有助于判断检测结果的可靠性^[7]。

在全国乃至全省的实验室操作中，对比历史数据时，确保在实验前对校准设备、核查测量工具、挑选试剂和实验程序进行严谨评估是质量控制的关键环节。采用如 3% 过氧化氢擦拭和紫外线消毒等方式预防污染至关重要。所有实验器材、试剂和设备应遵循从准备区到扩增区的单向流动规则，禁止交叉使用实验物品。实验室区域划分分明，且应有高压灭菌的备用 PCR 管以备不时之需^[8]。所有试剂须全部替换，以确保无污染。若阳性对照的 Ct 值超过 40，可能暗示 RNA 稳定性问题，对此，务必对相关器具重新实施高压灭菌，并严格按照标准操作规程

进行后续实验。实验环境设定为生物安全二级，其个人防护措施需符合二级实验室的规定。至于核酸提取步骤，应严谨地在生物安全三级实验室的生物安全柜中进行，确保全程无菌操作^[9]。PCR 实时荧光技术对实验条件有着严格的需求，必须在恒定的温度和环境下执行，并且实验人员需精通其操作流程、基础理论及各种注意事项。本研究结果显示，运用 PCR 实时荧光定量技术检测了 44 例乙型流感病毒、40 例甲 1 型流感病毒以及 36 例甲 3 型流感病毒样本，所有核酸检验结果依据分子生物学评价标准均达标，实现 100.0% 的合格率。检测试剂的浓度与检测结果之间存在一定的相关性^[10]。

综上所述，流感病毒的核酸检测采用 PCR 实时荧光定量检测法能确保高精度的结果，因此，该方法适宜作为应对突发公共卫生事件的主要检测手段。

参考文献

- [1] 董小蓉, 孙俊聪, 周晓蓉. 不同核酸提取方法在恶性疟原虫实时荧光定量 PCR 检测中的效果 [J]. 热带医学杂志, 2024, 24(04): 490-493, 508.
- [2] 张鑫, 周辰刚. 实时荧光定量 PCR 检测不同结核标本及其联合玻璃珠磨菌法检测的价值 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(06): 637-641.
- [3] 于丽丽. EB 病毒感染诊断中实时荧光定量 PCR 法检测 EB 病毒 DNA 的应用价值及对检出率的影响 [J]. 中国卫生工程学, 2022, 21(04): 622-624.
- [4] 张月新. 探讨实时荧光定量 PCR 仪用于流感病毒检测的效果分析 [J]. 中国医疗器械信息, 2022, 28(02): 62-64.
- [5] 于子洛. 实时荧光定量 PCR 法用于流感病毒检测的效果分析 [J]. 中国实用医药, 2021, 16(36): 95-97.
- [6] 朱彤, 商瑞, 程凯慧, 等. H13 亚型禽流感病毒实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及其应用 [J]. 病毒学报, 2022, 38(01): 1-7.
- [7] 关文竹, 王云瑾, 火文, 等. 人 3 型副流感病毒滴度 TaqMan 实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立 [J]. 微生物学免疫学进展, 2021, 49(04): 30-37.
- [8] 王颖. 流感病毒检测中细胞培养法与实时荧光定量 PCR 法效果比较 [J]. 医学信息, 2021, 34(09): 179-181.
- [9] 崔方瑞. 荧光实时定量 PCR 法检测流感病毒核酸的质控效果分析 [J]. 中国医疗器械信息, 2021, 27(03): 134-135.
- [10] 张学勇, 简莹娜, 李志, 等. 基于重组酶介导等温扩增技术的羊口疮病毒核酸检测方法的建立及初步应用 [J]. 中国预防兽医学报, 2023, 45(3): 271-275.

作者简介

宋广萍，硕士，主管技师，研究方向为生物化学与分子生物学、微生物检测。