

热对流 PCR 用于甲型流感病毒检测的评价

杨坤宇¹, 陈帆¹, 张师音², 张毅¹, 李庶甘¹, 郑燕平¹, 林青¹

1. 厦门国际旅行卫生保健中心, 福建 厦门 361012; 2. 厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心

摘要: 目的 评价热对流 PCR 应用于口岸现场甲型流感病毒快速检测的效果。方法 设计热对流 PCR 的引物和探针, 用于甲型流感病毒的检测。用甲型和乙型流感病毒毒株和入境发热人员的鼻咽拭子样本验证热对流 PCR 的检测灵敏度、特异性及稳定性, 并与市售商品化实时荧光定量 PCR 试剂比较检测甲型流感病毒的效果。结果 通过对 8 株甲型流感病毒和 1 株乙型流感病毒毒株进行检测, 热对流 PCR 对 H1、H3 及 H5 亚型的甲型流感病毒毒株的检测下限为 0.001~0.005HAU, 具有较好的检测广谱性, 且不与乙型流感病毒发生交叉反应。对 155 份鼻咽拭子样本进行检测, 和实时荧光定量 PCR 相比, 检测灵敏度为 94.74%, 特异性为 97.44%, 且具有很好的检测稳定性。结论 热对流 PCR 具有很高的检测灵敏度和特异性, 可用于口岸现场的甲型流感病毒快速筛查。

关键词: 流感病毒; 热对流 PCR; 评价

中图分类号: R331 文献标识码: A DOI: 10.16408/j.1004-9770.2017.03.002

Evaluation of convective PCR for the detection of influenza A virus

YANG Kun-yu*, CHEN Fan, ZHANG Shi-yin, ZHANG Yi, LI Shu-gan, ZHENG Yan-ping, LIN Qing

*Xiamen International Travel Healthcare Center, Xiamen, Fujian 361012, China

Abstract: Objective To evaluate the efficiency of convective PCR on rapid detection of influenza A virus at frontier ports. **Methods** The convective PCR primers and probe were designed for the detection of influenza A virus. Influenza A virus strains, influenza B virus strain and nasopharyngeal swabs of entry travelers with fever were used to analyze the sensitivity, specificity and stability of convective PCR. The detection efficiency of convective PCR was compared with commercial Real-time PCR kit. **Results** A broad detection spectrum of convective PCR was observed in testing 8 influenza A virus strains with different genotypes (H1, H3 and H5) and 1 influenza B virus strain, the detection limit of convective PCR for influenza A virus strain was 0.001~0.005HAU. There was no cross reaction with influenza B virus. When convective PCR was applied to the detection of 155 nasopharyngeal swabs, comparison with Real-time PCR, the detection sensitivity was 94.74%, the detection specificity was 97.44%, and the detection stability was good. **Conclusion** Convective PCR had a high sensitivity and specificity, was fit for the rapid detection for influenza A virus at frontier ports.

Key words: Influenza virus; Convective PCR; Evaluation

流感是全球重要的公共卫生问题之一。流感病毒主要分为甲、乙、丙共 3 个型别, 其中乙型和丙型只能感染人, 而甲型可以感染禽类、人和猫等其他哺乳动物。3 个型别的流感病毒中, 变异大、危害重的主要是甲型和乙型, 尤以甲型为主^[1-2]。甲型流感病毒可通过抗原漂移和抗原转变的方式持续发生变异, 不仅使病毒能够轻易逃避宿主免疫系统的识别和清除^[3], 也给疫苗研发制造了困难。实时监测流感, 及时采取有效预防和防控措施, 仍是防止流感扩散最有效的方法^[3-5]。

甲型流感病毒检测方法主要包括病毒分离培

养、免疫荧光法、传统 PCR、血清学方法和抗原快速检测法等^[6-10]。其中抗原快速检测方法对环境、设备要求较低, 操作简单、快速, 且价格低廉, 已经在口岸监测现场推广应用。但该方法灵敏度和特异性较差, 容易出现假阳性和假阴性。其他几种方法要么对环境、设备要求高, 要么检测所需时间长, 均不适用于现场筛查工作。热对流 PCR(convective PCR, C-PCR) 是近年来发展起来的一种检测技术^[11-12], 与传统 PCR 相比具有操作简便、检测时间短、对环境要求低等优点, 可用于现场检测。本研究旨在研制与 C-PCR 配套的检测试剂, 并验证其在口岸监测现场甲型流感

基金项目: 厦门市科技惠民计划项目(3502Z20174044), 国家质检总局科技计划项目(2014IK045), 福建省自然科学基金项目(2010J01152)

通讯作者: 杨坤宇, E-mail: yangky@xmciq.gov.cn

病毒快速检测中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备 病毒 RNA 提取试剂盒购自瑞士罗氏公司, 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自上海之江生物科技股份有限公司, Hank's 液购自美国 Sigma 公司, dNTPs、DNA 聚合酶及其缓冲液购自 Takara 公司, MMLV 逆转录酶购自 TRANSGEN 公司。

C-PCR 检测仪及配套检测试纸条由厦门万泰沧海生物技术有限公司提供, LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪由瑞士罗氏公司生产。

1.2 C-PCR 的检测引物与探针 从 GenBank 下载各种亚型甲型流感病毒核酸序列, 分析编码 NP 蛋白基因的保守序列, 利用 Insight II 软件设计适用于 C-PCR 检测的引物和探针(表 1)。

表 1 C-PCR 检测的引物和探针

| 引物和探针 | 序列(5'-3') |
|-------|--------------------------|
| 上游引物 | GAGRAGHRTTGGCTCTCAHCC |
| 下游引物 | TGCARCCATTCATGAGAACY |
| 探针 | TCATGGADTGGETAAGACAAGDCC |

注: H=A/T/C, R=A/G, Y=C/T, D=A/G, E=C/T。

1.3 流感病毒毒株 流感病毒毒株由厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心赠送, 其中甲型流感病毒 8 株, 乙型流感病毒(FluB)1 株(N697)。甲型流感病毒株分别为 H1N1(N66、N585)、H1N1(2009)(N465、N622)、H3N2(N511、B154)及 H5N1(Yu22、QH15)。

1.4 方法

1.4.1 C-PCR 检测 从流感病毒毒株和鼻咽拭子样本中提取的 RNA 为模板。反应体系: 10×PCR 缓冲液 2.5 μl, 10mmol/L dNTPs 0.5 μl, 模板 RNA 5 μl, 上/下游引物(10 μmol/L)及探针(10 μmol/L) 各 0.8 μl, DNA 聚合酶 1U, MMLV 逆转录酶 0.5U, 用无菌去离子水补足至 25 μl。反应条件: 上控温度为 96℃, 下控温度为 50℃, 反应时间为 25 min; 结果判读: 检测试纸条上的 C 点和 T 点都出现条带, 判断为甲型流感病毒核酸阳性; 检测试纸条上的 C 点(对照线)出现条带, T 点(检测线)未出现条带, 为甲型流感病毒核酸阴性; 检测试纸条上的 C 点未出现条带, 不论 T 点是否出现条带, 均说明实验未成功, 需重新检测。

1.4.2 流感病毒毒株验证 C-PCR 灵敏度 先用血凝抑制试验^[13]确定甲型流感病毒毒株的血凝滴度值(HAU), 再用 20 mmol 磷酸盐缓冲液对病毒株进行稀释。取各个稀释度的病毒液各 150 μl, 用 C-PCR

进行检测, 获得 C-PCR 检测所能达到的最低 HAU 值(即检测下限)。C-PCR 检测乙型流感病毒毒株时, 直接使用原液进行检测。

1.4.3 入境人员鼻咽拭子样本的采集与实时荧光定量 PCR 检测 在厦门高崎国际机场和厦门国际邮轮码头对入境旅客进行流感监测。入境时体温 ≥ 37.5℃ 或具有其他流感样症状的旅客采集鼻咽拭子, 保存于 Hank's 液中。先用市售实时荧光定量 PCR 进行检测, 确定是否含有甲型流感病毒、乙型流感病毒或不含有流感病毒(即其他样本)。再用能区分亚型的实时荧光定量 PCR 试剂盒对甲型流感病毒阳性样本进行亚型鉴定。

1.4.4 稳定性实验 从不同亚型的甲型流感病毒阳性样本(鼻咽拭子)中提取 RNA, 重复进行 C-PCR 检测, 最后用检测试纸条对扩增产物进行显色, 通过显色程度比较检测结果。

2 结果

2.1 用流感病毒毒株评价 C-PCR 的灵敏度 用 C-PCR 方法检测甲型流感病毒和乙型流感病毒毒株, 对 C-PCR 的灵敏度进行评价。结果如表 2 所示。8 株甲型流感病毒毒株的检测结果均为阳性, 检测下限为 0.001~0.005 HAU; 乙型流感病毒毒株的检测结果为阴性。

表 2 C-PCR 应用于流感病毒毒株检测的效果

| 流感亚型 | 病毒株 | 检测下限(HAU) |
|------------|------|-----------|
| H1N1 | N66 | 0.001 |
| H1N1 | N585 | 0.005 |
| H1N1(2009) | N465 | 0.001 |
| H1N1(2009) | N622 | 0.001 |
| H3N2 | N511 | 0.001 |
| H3N2 | B154 | 0.001 |
| H5N1 | Yu22 | 0.005 |
| H5N1 | QH15 | 0.001 |
| Flu B | N697 | — |

注: “—”表示未检出。

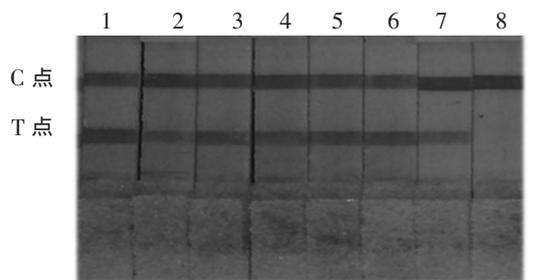
2.2 用鼻咽拭子样本检测 C-PCR 的灵敏度和特异性 共采集到入境发热人员的鼻咽拭子样本 155 份。先用市售实时荧光定量 PCR 试剂盒进行检测, 获得甲型流感病毒阳性 38 份, 其中 Ct 值 ≤ 30 的 29 份, 30 < Ct 值 ≤ 37 的 6 份, 37 < Ct 值 ≤ 40 的 3 份(经病毒分离培养后做血凝抑制试验确定为阳性样本); 甲型流感病毒阴性样本 117 份, 其中乙型流感病毒阳性样本 11 份, 其他样本 106 份。再用 C-PCR 方法检测, 38 份甲型流感病毒阳性样本中, C-PCR 检出 36 份, 灵敏度为 94.74%(36/38)。漏检的 2 份样本的实时荧光定量 PCR 检测中 Ct 值分别为 38.2 和

39.1,均属于弱阳性。117 份甲型流感病毒阴性样本中,C-PCR 检测阴性的有 114 份,特异性为 97.44%(114/117)。未发现甲型和乙型流感病毒交叉错检的情况。提示 C-PCR 不仅具有很好的检测灵敏度和特异性,也可以很好地区分甲型流感病毒和乙型流感病毒。

表 3 C-PCR 与实时荧光定量 PCR 在甲型流感病毒检测中的比较

| 实时荧光定量 PCR | C-PCR | | |
|------------|--------|--------|--------|
| | 样本数(份) | 阳性数(份) | 阴性数(份) |
| 阳性(份) | 38 | 36 | 2 |
| 阴性(份) | 117 | 3 | 114 |
| 合计(份) | 155 | 39 | 116 |

2.3 稳定性实验 对 2.2 中经实时荧光定量 PCR 检测为甲型流感病毒阳性的 38 份样本进行亚型鉴定,获得 H1N1(2009)、H1N1、H3N2 各 1 份,再取 1 份乙型流感病毒阳性样本作为阴性对照,用于评价 C-PCR 的稳定性。如图 1 所示,泳道 1~7 的 T 点均有显色,且显色效果均匀,说明 C-PCR 方法应用于 3 种不同亚型的甲型流感病毒检测的重复性好。对乙型流感病毒本的检测为阴性。



1~3:H1N1(2009);4~5:H1N1;6~7:H3N2;8:乙型流感病毒

图 1 C-PCR 检测稳定性实验

3 讨论

目前应用于口岸监测现场的流感快速检测方法主要有胶体金法、免疫渗滤法等免疫学方法,这些方法优缺点都比较明确,可用于筛查,但不能用于确诊^[13-14]。传统的 PCR(包括实时荧光定量 PCR)检测可用于流感的确诊,但是不适合口岸现场检测。近年来发展起来的等温扩增技术(如环介导等温扩增技术)仅需等温条件(如 65℃)就可完成扩增,检测速度明显快于传统 PCR 法,操作也比较简便,目前正在部分口岸推广应用。但是该技术一般需要多套酶协同作用,引物设计也比较复杂,普通操作人员难于根据实际需求开发出配套的试剂。C-PCR 技术是基于热循环开发的一种检测技术,其检测引物、探针与传统的 PCR 检测引物基本类似,具有分子生物学

背景的人员可通过软件自行设计引物和探针,从而达到随时拓展检测项目的目的。此外,C-PCR 检测系统还具有几个优点:设备体积小(单通道检测的设备相当于易拉罐大小),可随带随检;可用锂电池作电源;检测速度快,一般不超过 25 min,与胶体金法基本相似;操作简单,一般卫生检疫工作人员经过简单培训就可独自操作;对环境要求低。本研究选择 C-PCR 检测方法进行评价,旨在为口岸传染病监测提供一种新的思路。

本研究用流感病毒毒株检测 C-PCR 的灵敏度,能够检出 H1、H3、H5 等亚型的流感病毒毒株,且不受乙型流感病毒的影响,说明该方法具有较好的特异性。但是受样本量的限制,本研究未能考核 C-PCR 方法在其他亚型甲型流感病毒(如 H7、H9 等)的检测效果,在以后的工作中,将尽可能收集样本补充实验。

在比较 C-PCR 与实时荧光定量 PCR 的实验中,用入境发热人员的鼻咽拭子样本进行检测有 2 个目的:一是考核 C-PCR 的检测效能;二是考核 C-PCR 在口岸现场应用的价值。从实验结果可以看出,C-PCR 与实时荧光定量 PCR 检出符合率较高,除了 2 份弱阳性样本(C_t 值>37,在实时荧光定量 PCR 中可判为阴性)外,C-PCR 对阳性样本的检出率为 100%。在阴性样本检测中,C-PCR 错检 3 份标本,错检率为 2.56%,在口岸流感筛查中,一定比例的错检可通过后期的实验室确认工作得到纠正。

参考文献

- [1] Ma J, Dushoff J, Earn DJ, et al. Age-specific mortality risk from pandemic influenza[J]. *J Theor Bio*, 2011, 11(288):29-34.
- [2] Chen Y, Xu F, Gui X, et al. A rapid test for the detection of influenza A virus including pandemic influenza A/H1N1 2009 [J]. *J Virol Methods*, 2010, 167(3):100-102.
- [3] Pales P. Influenza: old and new threats[J]. *Nature Medicine Supplement*, 2004, 10(12):S82-S87.
- [4] Höper D, Kalthoff D, Hoffmann B, et al. Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 escaping neutralization: more than HA variation[J]. *J Virol*, 2012, 86(3):1394-1404.
- [5] Webster RG. Wet markets—a continuing source of severe acute respiratory syndrome and influenza[J]. *Lancet*, 2004, 363(9404):234-236.
- [6] 徐飞海, 王锐, 白佳伟, 等. 一种 A 型流感病毒 NP 抗原快速检测试剂的建立[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(1):22-25.
- [7] Michelle Q, Ann C, Maura N, et al. Comparison of sensitivities of virus isolation, antigen detection, and nucleic acid amplification for detection of equine influenza virus [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(2):759-763.
- [8] Weinberg A, Walker ML. Evaluation of three immunoassay kits for rapid detection of influenza virus A and B [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2005, 12(3):367-370.

(下转第 163 页)

参考文献

- [1] Wright TL. Introduction to chronic hepatitis B infection[J]. *Am J Gastroenterology*, 2006, 101 (Suppl):1-6.
- [2] 肖蕾,王雪刚,曾国兵,等. 中国广东地区乙型肝炎病毒基因亚型的分布[J]. *肝脏*, 2006, 11(3):149-151.
- [3] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology innucleotide sequence; comparison of surface antigen subtypes[J]. *J Gen Virol*, 1988, 69(10):2575-2583.
- [4] Kramvis A, Kew M, Francois G. Hepatitis B virus genotypes [J]. *Vaccine*, 2005, 23(19):2409-2423.
- [5] Norder H, Courouce AM, Coursaget P, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes [J]. *Intervirology*, 2004, 47(6):289-309.
- [6] Yu H, Yuan Q, Ge SX, et al. Molecular and phylogenetic analyses suggest an additional hepatitis B virus genotype "I" [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2):92-97.
- [7] Arankalle VA, Gandhe SS, Borkakoty BJ, et al. A novel HBV recombinant (genotype I) similar to Vietnam/Laos in a primitive tribe in eastern India [J]. *J Viral Hepat*, 2010, 17(7):501-510.
- [8] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype [J]. *J Virol*, 2009, 83(20):10538-10547.
- [9] 许军,王齐欣,蒋栋,等. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(1):11-13.
- [10] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China [J]. *J Viral Hepat*, 2005, 12(6):609-617.
- [11] Liu CJ, Kao JH, Chen DS. Therapeutic implication of hepatitis B virus genotype [J]. *Liver Int*, 2005, 25(6):1097-1107.
- [12] Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances [J]. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2011, 26(1):123-130.
- [13] Palumbo E. Hepatitis B genotypes and response to antiviral therapy: a review [J]. *Am J Ther*, 2007, 14(3):306-309.
- [14] Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods [J]. *Rev Med Virol*, 2004, 14(1):3-16.
- [15] Liu WC, Mizokami M, Buti M, et al. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(12):4491-4497.
- [16] Tang XR, Zhang JS, Zhao H, et al. Detection of hepatitis B virus genotypes using oligonucleotide chip among hepatitis B virus carriers in Eastern China [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(13):1975-1979.
- [17] Li D, Chen R, Jia ZS, et al. Detection of hepatitis B virus genotypes A to D by the fluorescence polarization assay based on asymmetric PCR [J]. *J Virol Methods*, 2010, 168(1-2):31-37.
- [18] Bortolin S. Multiplex genotyping for thrombophilia-associated SNPs by universal bead arrays [J]. *Methods Mol Biol*, 2009(496):59-72.
- [19] Boving MK, Pedersen LN, Moller JK. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4):908-913.
- [20] Lee WM, Grindle K, Pappas T, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(8):2626-2634.
- [21] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1-2):71-82.
- [22] Clavijo A, Hole K, Li M, et al. Simultaneous detection of antibodies to foot-and-mouth disease non-structural proteins 3ABC, 3D, 3A and 3B by a multiplexed Luminex assay to differentiate infected from vaccinated cattle [J]. *Vaccine*, 2006, 24(10):1693-1704.
- [23] Gegia M, Mdivani N, Mendes RE, et al. Prevalence of and molecular basis for tuberculosis drug resistance in the republic of Georgia: Validation of a QIAplex system for detection of drug resistance-related mutations [J]. *Anti Microb Agents Chemother*, 2008, 52(2):725-729.
- [24] Lee HJ, Kim YT, Park PJ, et al. A novel detection method of non-small cell lung cancer using multiplexed bead-based serum biomarker profiling [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2012, 143(2):421-427.
- [25] 史玲莉, 闫冀焕, 李云, 等. 分型悬液芯片检测疟原虫的方法建立及应用 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2015, 38(2):90-94.
- [26] 史玲莉, 闫冀焕, 李云, 等. 多种蚊媒传染病病原体悬液芯片检测及分型方法的建立 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2015, 38(S):55-59.
- [27] 高正琴, 邢进, 冯育芳, 等. TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(11):995-1000.
- [28] 史玲莉, 闫冀焕, 李云, 等. 登革病毒悬液芯片分型检测方法的建立 [J]. *国际病毒学杂志*, 2016, 23(3):173-176.

收稿日期 2017-01-24

(上接第 158 页)

- [9] William DR, Zubair MW, Michael F, et al. New point of care test is highly specific but less sensitive for influenza virus A and B in children and adults [J]. *J Med Virol*, 2004(74):127-131.
- [10] Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW and Directigen for rapid detection of influenza A and B [J]. *J Clin Virol*, 2004, 31(2):113-115.
- [11] Krishnan M, Ugaz VM, Burns MA. PCR in a Rayleigh-Benard Convection Cell [J]. *Science*, 2002, 298(5594):793.
- [12] PChou WP, Chen PH, Miao JM, et al. Rapid DNA amplification in a capillary tube by natural convection with a single isothermal heater [J]. *Biotechniques*, 2011, 20(50):52-57.
- [13] 杨坤宇, 陈慧, 陈毅歆, 等. 3 中甲型流感快速检测试剂的性能评价 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2012, 35(5):317-319.
- [14] 杨坤宇, 张毅, 徐飞海, 等. 化学发光法用于甲型流感检测的效果评价 [J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2015, 38(4):235-237.

收稿日期 2016-12-30