

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

薛京昌, 卞琛, 徐晓怡

江苏省常州市疾病预防控制中心, 江苏 常州 213022

摘要: 目的 对疑似流感病毒患者标本进行病毒核酸检测诊断, 探讨实时荧光定量 PCR 法在流行性感胃检测诊断中的意义。方法 采用 WHO 标准实时荧光定量 PCR 法对 2010 年 10 月本地区采集的 8 份疑似甲型 H1N1 流感患者咽拭子标本进行病毒核酸检测。结果 8 份咽拭子标本中有 6 份呈甲型 H1N1 流感病毒核酸阳性, 阳性率 75%。结论 实时荧光定量 PCR 法操作相对简单, 耗时短, 特异性强, 灵敏度高, 可作为基层疾控中心流感疫情可靠的快速诊断方法。

关键词: 荧光定量 PCR 法; 流感; 病原学检测

中图分类号: R373.1⁺3 文献标识码: B 文章编号: 1006-3110(2017)05-0625-02 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.05.033

2009 年初以来, 发端于墨西哥的猪流感病毒 (swine influenza virus, SIV) 疫情肆虐全球, 研究人员认为引发此次全球流感大暴发的是由一种禽流感病毒, 一种人流感病毒和二种猪流感病毒基因重排形成的一种新型流感病毒, 并将其改称为甲型 H1N1 流感病毒。2010 年 10 月在常州市某小学发生了一起群发流感疑似症状疫情, 根据实验室的病原学最终检测结果, 判定这起事件为一起甲型 H1N1 流感暴发事件。现将本次事件的相关实验室病原学检测报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本的采集和处理 对具有发热 (体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$)、伴有咳嗽, 咽喉痛, 全身肌肉酸痛或乏力等流感症状的疑似流感患者共 19 名学生中的 8 名采集咽拭

子, 标本严格按照卫生部 2009 年《甲型 H1N1 流感病毒实验室检测技术方案 (试行)》执行, 置于 3 ml 病毒保存管振荡均匀、冷藏运送至实验室 -70°C 保存待检。

1.2 仪器与试剂 力新 HFsa1200 生物安全柜 (设备序列号: SIB0190)、核酸提取仪 (美国 Applied Biosystems 公司, 设备序列号: 700-432)、三洋超低温冰箱 MDF-382EN (设备序列号: 38409098)、Cenfringe 5415R 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司, 设备序列号: 5426XP627043)、ABI7500 荧光定量 PCR 扩增仪 (美国 life 公司, 设备序列号: 275005380)、MagMax-96 Uiral RNA IsoLafial Kit 核酸提取试剂盒。上海硕世生物有限公司试剂盒《甲型 H1N1 流感病毒核酸检测试剂盒 (荧光探针 PCR 法)》。

综上所述, 结直肠癌患者血浆中 FIB 和 ANG-2 水平显著高于健康对照组, 并且与结直肠癌的临床分期密切相关, 结肠癌与直肠癌患者血浆中的 FIB 和 ANG-2 含量无明显差异, 提示 FIB 和 ANG-2 共同参与了结直肠癌的形成并与其严重程度有关, 在临床上检测血浆中 FIB 和 ANG-2 含量, 可作为诊断结直肠癌并评价其预后的敏感指标, 抑制血管生成, 改善血液循环, 防止血栓形成, 可能是治疗肿瘤的一种有效手段。

参考文献

- [1] 黄妍姣, 郑智明, 林素香, 等. CEA 和 CA724 联合检测在结直肠癌诊断中的应用[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(12): 2252-2254.
- [2] Bhaskar A, Gupta B, Sreenivas V, et al. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 on progression free survival in multiple myeloma[J]. Leuk Res, 2013, 37(4): 410-415.
- [3] Lee SE, Lee JH, Ryu KW, et al. Preoperative plasma fibrinogen level is a useful predictor of adjacent organ involvement in patients with advanced gastric cancer[J]. J Gastric Cancer, 2012, 12(2): 81-87.
- [4] Daly C, Eichten A, Castanaro C, et al. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhi-

- biton[J]. Cancer Res, 2013, 73(1): 108-118.
- [5] Diaz-Sanchez A, Matilla A, Nuñez O, et al. Serum angiopoietin-2 level as a predictor of tumor invasiveness in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Scand J Gastroenterol, 2013, 48(3): 334-343.
- [6] Goede V, Coutelle O, Neuneier J, et al. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy[J]. Br J Cancer, 2010, 103(103): 1407-1414.
- [7] Mazziere R, Pucci F, Moi D, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells[J]. Cancer Cell, 2011, 19(4): 512-526.
- [8] Halkia E, Kalinoglou N. Challenges with identification of angiogenesis biomarkers in cancer[J]. Surg Endosc, 2011, 25(8): 2769-2770.
- [9] Holopainen T, Saharinen P, D'Amico G, et al. Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(6): 461-475.
- [10] 龙璐, 陶亚, 王望, 等. 同型半胱氨酸, 超敏 C 反应蛋白及纤维蛋白原检测对急性脑梗死患者的临床意义[J]. 实用预防医学, 2013, 20(5): 599-601.
- [11] Falanga A, Russo L, Verzeroli C. Mechanisms of thrombosis in cancer[J]. Thromb Res, 2013, 131(Suppl 1): S59-62.

收稿日期: 2016-11-20

1.3 引物及探针 扩增引物为中国疾病预防控制中心常规检测甲流病毒所用引物,引物合成由上海生工生物工程有限公司完成,序列见表 1。

表 1 检测甲流病毒所用引物和探针序列表

引物和探针	序列
H1(2009) Forward	5'-GGG TAG CCC CAT TGC AT-3'
H1(2009) Reverse	5'-AGA GTG ATT CAC ACT CTG GAT TTC-3'
H1(2009) Probe	5'-TGG GTA AAT GTA ACA TTG CTG GCT GG-3'
AN1Forward	5'-TAY AAC TCA AGG TTT GAG TCT GTY GCT TG-3'
AN1 Reverse	5'-ATG TTR TTC CTC CAA CTC TTG ATR GTG TC-3'
AN1 Probe	5'-TCA GCR AGT GCY TGC CAT GAT GGC A-3'

1.4 反应体系及反应条件

1.4.1 试剂准备(试剂准备区) 在试剂准备区将四种反应液按规定剂量混合为总体积 25 μl 的反应试剂,依次为 RT-PCR Reaction Buffer7.5 μl,甲型 H1N1 流感反应液 7.5 μl,酶混合液 5 μl,待测标本 RNA5 μl。

1.4.2 样本处理(样本处理区) 取 200 μl 的待检样本及阴性对照样本进行核酸提取。病毒 RNA 按 Mag-Max-96 Uiral RNA Isolafial Kit 核酸提取试剂说明书要求进行操作。提取好的 RNA 及时用于检测。

1.4.3 加样 在准备好试剂的 PCR 反应管中分别加入阴、阳性质控品、待测样本 RNA 各 5 μl,盖紧管盖后,瞬时低速离心。

1.4.4 PCR 扩增检测(扩增区) 待检 PCR 管转移至扩增区,按顺序置于 PCR 仪上,编辑样本信息,设定循环参数(参照仪器的操作说明进行设置)。见表 2。

表 2 PCR 扩增检测步骤

步骤顺序	温度(℃)	时间	循环数(次)
1 逆转录反应	50	30min	1
2 预变性	95	5min	1
3 变性	95	10s	40
退火、延伸及检测荧光	55	45s	

注:步骤 3 中 55℃时荧光检测,检测通道:FAM。

2 结果

2.1 基本情况 学校共有 30 个班级 1 560 名学生,教职工 110 人,占地面积 35 亩,教室通风条件好,学校卫生状况好。现场调查发现该校八(4)班近 5 d 来 19 名学生出现发热、咳嗽、咽痛等症状,部分伴有头晕、乏力症状,无住院及重症病例。

2.2 检测结果 采集 8 名患者咽拭子样本 8 份,经实验室进行 PCR 核酸检测,结果为 6 份甲型流感 H1N1 阳性,阳性率 75%。结合现场科室对患者临床表现、流行病学史和本实验室的病原学检测结果,确定这起事件为一起甲型 H1N1 流感暴发事件。

3 讨论

甲型 H1N1 流感是由变异后的新型甲型 H1N1 流感病毒所引起的急性呼吸道传染病。通过飞沫、气溶

胶、直接接触或间接接触传播,临床主要表现为流感样症状,少数病例病情重,进展迅速,可出现病毒性肺炎,合并呼吸衰竭、多脏器功能损伤,严重者可以导致死亡。人群对该病毒普遍易感,经由人-人形式传播,且传播性高于季节性流感^[2-3]。根据本起疫情患者的临床表现来看,目前甲型 H1N1 流感患者临床症状并不严重,均未出现肺炎等重症表现,这与国内外文献报道一致^[4-6]。本起疫情虽控制有效,但该起 3 名患者为同一家庭成员,可见该流感病毒能明显引起家庭传播,对于下阶段可能导致的本地流感病毒传播提供一定的指示作用。

根据国家流行性感冒诊断标准及处理原则(GB 15994-1995),流行性感冒病原学常规的实验室检测方法是病毒培养法(细胞培养法与鸡胚培养法)。虽然准确、可靠、稳定,但确诊耗时至少要 10~15 d,而且还受限于特定的实验室条件和人员条件。而此次本实验室采用实时荧光定量 RT-PCR 方法从核酸的提取到完成检测,全程仅需 3~4 h 而且操作方便,特异性强,灵敏度高,极大程度上缩短了甲型 H1N1 流感病毒的检测时间,的确为疑似甲型 H1N1 流感暴发疫情的实验室应急诊断提供了一种快速、有效的实验室检测手段^[7]。

对此次流感小范围内发生,常州市疾控中心流感监测实验室通过实时荧光定量 RT-PCR 方法快速的病原学检测,在最短时间内为本中心急消所提供准确的实验室检测数据,从而为 H1N1 流感病毒引发流感的防控监测提供了有力的技术支撑。此次体会是:本次实验建立的实时荧光 PCR 反应体系,操作简单,检测时间短,连同核酸提取时间可以在 3~4 h 后出结果。另外,荧光探针的引入除提高检测灵敏度、特异性外,其实验结果不需再用酶切分析、探针杂交或序列测定来加以验证,完全的闭管操作大大减少了假阳性污染的顽弊,也使得流感病毒高通量检测完全成为可能,且易在基层疾控中心推广。

参考文献

[1] 陈小华. 永州市第一中学甲型 H1N1 流感暴发疫情调查[J]. 实用预防医学,2010,17(1):66-68.

[2] 雷达,艾立新,邓红樱,等. 流感大流行特征启示甲型 H1N1 流感防控策略[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2009,32(3):145-150.

[3] 王勇,徐元勇,张传福,等. 甲型 H1N1 流感的研究进展[J]. 解放军医学,2009,34(6):651-654.

[4] 刘亚玲,陈红,何盛华,等. 中国内地首例输入性甲型 H1N1 流感诊治经过及文献复习[J]. 华西医学,2009,101(6):1325-1327.

[5] 林磊,童贻刚,祝庆余. 新甲型 H1N1 流感病毒及疫情分析[J]. 军事医学科学院院刊,2009,154(3):201-204.

[6] 欧剑鸣,洪荣涛,许龙善,等. 福建省 2009 年甲型 H1N1 流感 122 例流行病学特征分析[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(8):711-714.

[7] 张萍,韩文清,宫连凤,等. 实时荧光 RT-PCR 与细胞培养法在流感病毒检测中的应用[J]. 中国病原生物学杂志,2011,49(1):34,45-46.

收稿日期:2016-11-24