

乙型流感病毒检测方法的研究进展*

杨 帆^{1,2}综述, 廖国阳^{2△}审校(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650550; 2. 中国医学科学院北京协和医学院
医学生物学研究所, 云南昆明 650118)

关键词: 乙型流感病毒; 免疫学检测; 核酸检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)10-1258-03

乙型流行性感(感)病毒是引起流感疾病发生和流行的主要病原之一, 至今为止发现其只有一个亚型, 宿主特异性较强, 至今发现其只能感染人和海豹^[1], 一般不引起世界范围内的大流行, 但是它能够引起地区性、季节性的流行^[2]。其引发的症状与其他呼吸道传染疾病难以准确区分, 需要实验室检测以支持后续工作。本文拟就现行的乙型流感病毒的检测方法作一综述。

1 病原学

流感病毒归属于正粘病毒科(Orthomyxoviridae), 有包膜、含单股负链 RNA。根据病毒核蛋白(NP)和膜蛋白(MP)基因特性和抗原特性的不同, 可将流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)型; 根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同, 又将流感病毒进一步分成不同的亚型^[3]。在 1990 年就已经报道了根据乙型流感病毒的抗原特性 HA1 区的核苷酸序列, 可将其分为两大谱系(lineage), 代表毒株为 B/Yamagata/16/88 和 B/Victoria/2/87(5)。有研究表明, 它们开始分化于 20 世纪 70 年代中期, 至少于 1983 年就在全世界范围内同时流行, 并认为这两个谱系起源于 1979 年的 B/Singapore/222/79 株^[4]。根据相关研究对遗传距离的计算, 到 20 世纪 90 年代末, 这两个谱系的遗传距离约为 10%。在过去的 20 年几乎所有乙型流感病毒引起的严重流行都是由于乙型流感病毒发生了较大变化, 这种变化可能是由于从其他地区传入新的流行株, 使得流行毒株与之前的不同, 如 1985~1986 年加拿大乙型流感的爆发和 1988~1989 年美国乙型流感的爆发; 也可能是由于病毒处于快速的变异时期, 如 1993~1994 中国乙型流感的爆发流行。在过去的 20 年里, 整体上看 Yamagata 系是流行的主流, 可能是其变异较快所致^[5]; 但 Victoria 系很可能会引发新一轮的爆发, 原因是首先近 10 年来该谱系没有在亚洲以外的地方流行过, 加上该谱系已经发生了相当多的变异, 再者这些地区的人群对该谱系病毒的抵抗力可能已经下降, 正因为如此国际上对该谱系的发展给予了相当的重视, 世界卫生组织(WHO)在近年来推荐的毒株都是该谱系^[6]。

2 病毒的分离

病毒能否成功分离很大程度上取决于临床标本的采集时间、质量及其保存和运输等环节。多数标本取自患者上呼吸道鼻咽腔, 其次为气管和支气管分泌物及组织标本。标本采集后应立即放入适当的采样液中低温保存。一般采集到的组织标本分 3 份, 一份用于鸡胚接种, 一份用于 MDCK 细胞接种, 一

份保存待复核用^[7]。

2.1 鸡胚培养法 培养分离流感病毒历史最久的是鸡胚培养法, 早在 1938 年鸡胚培养技术就广泛的应用于病毒的研究, 其优点为: 鸡胚组织分化程度较低, 对正粘科病毒高度敏感; 感染病毒的包膜和尿囊液含大量病毒, 接种途径较多, 操作简单, 对接种的病毒不产生抗体。缺点则为: 流感病毒通常不使鸡胚产生特异度的感染特征, 必须利用第二个指示系统来测定病毒的存在, 卵黄中可含有抗家禽病原体的母体抗体, 某些细菌、衣原体、病毒能从感染的母鸡传染给鸡胚, 鸡的食物中一般加有抗菌药物, 特别是四环素, 母鸡吃后会传递给鸡胚而影响病毒的分离, 最致命的是病毒在鸡胚中连续传代后常常引起 HA 的变异而导致分离的失败^[8]。

2.2 组织培养法 由于鸡胚分离病毒的缺陷, 组织培养技术在流感监测等方面的运用日益受到人们的重视, 用该技术所分离到的流感病毒, 其抗原性和基因特性比用鸡胚分离到的更接近原始采集标本, 故近年来 WHO 号召全世界的科研人员寻找合适的细胞株来检测流感病毒与制备疫苗。最近我国发现“O”相流感病毒株在人群中消失 30 多年后, 又重现发现; 用组织培养技术分离“O”相毒株比鸡胚敏感。目前可用于流感分离的细胞有: 原代细胞, 如人胚肾、猴肾和鸡胚肾细胞; 二倍体细胞; 传代细胞, 如非洲绿猴肾细胞(African green kidney cells, Vero cells), 狗肾传代细胞(MDCK)等细胞。其优点除上述几点外还有: 可提供大量生物性状相同的细胞, 较经济, 消除了外源因子影响, 减少过敏反应; 其缺点为: 病毒复制后滴度较低, 保存时易使病毒丢失而不易保存, 传代细胞含有潜在致癌因子等。故在分离病毒时依然是两种方法都采用^[9]。

3 检测方法

流感临床症状易与其他呼吸道传染疾病混淆, 最终必须通过实验室检测来进行确认。检测流感病毒的方法很多, 各有优缺点。

3.1 免疫学检测 免疫学检测流感病毒技术比较成熟, 常用的抗原血凝素(HA)、神经氨酸酶(NA)等。

3.1.1 传统免疫学检测 传统的免疫学检测是检测流感病毒的经典方法, 它包括红细胞凝集及凝集抑制试验(HI), 可鉴定病毒和血清抗体亚型; 补体结合试验, 主要测定 HA 抗原及其抗体; 琼脂免疫扩散试验(AGP), 可对病毒型与亚型做血清学诊断; 流感病毒神经氨酸酶活性及其活性抑制试验等。其中 HI 试验是诊断人类流感病毒感染的血清学常用方法。其试验

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)基金资助项目(2006AA02Z409); 云南省自然科学基金项目(2004C07-0M); 云南省国内科技合作项目(2006YX29)。作者简介: 杨帆, 男, 在读硕士研究生, 主要从事流感病毒在细胞上的冷适应性研究。△ 通讯作者, E-mail: liaogy@imbcams.com.cn。

结果准确可靠,不需要太多昂贵的辅助设备,在基层单位有较大应用价值。但这些试验均属于回顾性检测,仅对已发现的病毒有效,试验条件繁琐,对实验技术的要求也较为苛刻^[10]。

3.1.2 快速免疫学检测 主要包括胶体金免疫层析(GICA)、酶联免疫吸附(ELISA)、免疫荧光技术(IFA)。免疫金标记技术是以胶体金作为示踪标志物,基于抗原抗体反应原理而产生的一种新型免疫标记技术,其中 GICA 因其具有检测速度快、操作简便等特点被运用于样品量较大的快速检测中。但其特异度相对较低,假阳性率较高等缺点限制其使用的范围。必须通过其他方法来确认最终结果^[11]。

ELISA 是一种以免疫过氧化物酶技术为基础的技术对流感病毒进行快速诊断和单克隆抗体筛选。由于其特异度不够高,不同亚型间的毒株易出现交叉反应,很少用于病毒抗原性分析^[12-13]。

IFA 是组织化学与免疫学方法的结合,目前检测流感最常用的有直接法和间接法。前者是用荧光标记好的抗流感病毒抗体直接检测标本中的未知抗原,优点是步骤简单,快速,测定所需对照少,缺点是要对每种流感病毒抗体进行标记;后者是利用荧光标记好的抗抗体进行检测,其优点为既能检测抗原又能检测抗体,检测样本可为鼻咽部采集的标本或者标本接种的细胞,敏感度比直接法高 5 倍以上^[14],但是其方法较为繁琐,时间较长,出现非特异度荧光的机会增多,需增设更多的对照。两种方法对抗原标本都有较高的要求:只能检测活病毒,抗原形态变化要尽可能小,不溶解,不变性,操作要快速,低温^[15]。

3.2 核酸检测 流感病毒的基因分析随着技术的进步越来越受人们重视,它不仅能揭示流感病毒不同毒株间基因的关系,基因与毒力关系,能从分子水平对病毒做进一步研究,与免疫学检测方法相比,核酸检测最明显的两个优点为快速性与高度的特异度^[16]。

3.2.1 RT-PCR RT-PCR 技术作为一种高度灵敏、快速简便的检测方法,已经在流感病毒的实验室诊断中得到应用。其主要步骤为将流感病毒的 RNA 逆转录为 DNA,选定特定引物对特定片段进行扩增,根据目的片段特异度来鉴别流感病毒。国内外运用 RT-PCR 检测流感设计引物的方法主要根据相对保守的 M、NP 基因,检测甲、乙型流感病毒;其次是根据甲型流感病毒的 HA 和 NA 基因序列设计引物检测亚型。RT-PCR 灵敏度高,可用于流感的快速检测,一般 24 h 内即可得出结果,需要说明的是 PCR 敏感度高,要防止污染产生假阳性^[17]。由 RT-PCR 衍生的核酸检测技术日趋成熟,其中巢式 PCR(nested PCR)不仅提高了灵敏度而且在减少二次产物对一次反应的影响上也起到了较好的作用,采用该方法对我国近几年乙型流感病毒的流行与爆发进行了检测与快速诊断,收到了良好效果^[18]。

3.2.2 实时定量 RT-PCR(Real-time PCR) 实时荧光定量 RT-PCR 是在普通 RT-PCR 技术基础之上发展起来,具有高灵敏性和准确性,现在已经作为流感病毒感染的主要筛查方法,其灵敏度高于细胞组织培养,比血凝试验高 25 以上^[19]。其工作原理是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测特异度产物的量,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析。由于整个检测过程都在封闭管中进行,能有效防止扩增产物的交叉污染,同时确保样本不污染环境,确保实验的准确。卢亦愚等采用该技术检测对乙型流感病毒进行检测,3 h 即可完成实验,灵敏度可达 0.01TCID₅₀,对甲 1 型、禽流感病毒 H5、SARS 病毒及其他呼吸道病毒均无交叉反应^[20]。

3.2.3 PCR-RELP PCR 结合限制性片段长度多态性技术(PCR-RELP)是 PCR 与 RFLP 的有机结合。它首先设计合成引物,然后扩增基因,接着利用限制内切酶对扩增出的核酸产物进行切割,由于位点具有严格的特异度,导致核苷酸片段数目和长短不同,在琼脂糖凝胶上形成不同分布来鉴定流感病毒^[21]。姚栩等^[22]发现,运用该技术对乙型流感病毒维多利亚株进行检测有高度特异度,敏感度可达 0.1TCID₅₀,与甲 1 和甲 3 型流感病毒无交叉反应。

3.2.4 非 PCR 扩增 依赖核酸序列的扩增法(NASBA)技术是一项以 RNA 为模板的快速等温扩增技术^[23],这项技术特别适用于 RNA 分子的检测。其特点是整个扩增过程在恒温条件下进行,因此不需要特殊(如 PCR 仪)的控温装置,大大避免了 PCR 扩增过程中复杂的温度变化,所以在同一时间内,NASBA 拥有比 PCR 更高的扩增效率。此外,有很多因素会影响 PCR 反应,如一些 PCR 抑制物质(特别在取样过程中),NASBA 技术却不会受这些因素的影响,而且即使在有 DNA 污染或存在的情况下,同样具有较高特异度和灵敏度。Fung 等^[24]研究表明运用该技术可在 4~6 h 内准确检测出 H5、H7 等型别的 AIV。

3.2.5 环介导等温扩增(LAMP) LAMP 是一种新型核酸扩增技术,其原理是在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下,利用能识别目的基因上 6 个独立区段的 4 条引物,在 60~65℃ 恒温条件下高效特异地扩增目的基因,在扩增的过程中会产生大量焦磷酸根离子,其与金属离子形成不可溶的盐,生成白色焦磷酸盐沉淀,可直观观察扩增结果。也在反应体系中加入荧光染色试剂,可在紫外光或直接在日光下观察颜色变化,无需电泳或特殊仪器。Ito 等^[25]运用该技术选择 NP 为靶基因,成功的检测出了乙型流感病毒,灵敏度达到 1 PFU。

4 小 结

针对乙型流感病毒的检测研究主要集中于两个方面的探讨,第一检测的特异度,第二检测的时效性。病毒分离鉴定是检测乙型流感病毒的常用方法,但需要细胞或鸡胚等基质,需 4~7 d,对实验人员及实验条件有较高的要求,在流感疫情暴发时不能进行快速检测。HI 和 AGP 是传统的检测手段,特异度较好,不需要复杂的设备即可检测,但只可检测已经发现的病毒。GICA、ELISA 这类基于免疫学检测的技术速度快,操作简单,可在短时间内处理大量样本,但其特异度较低。RT-PCR,Real-time-PCR,PCR-RELP 等核酸检测技术可以直接检测临床样本,时效性与特异度较好,但是需要其他昂贵设备的辅助。上述方法各有其优缺点,应该根据检测者的后续工作进行选择。

参考文献

- [1] Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication[M]. Knipe DM, Howley PM, Field's Virology. 4th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publisher, 2001: 1487-1531.
- [2] 吕燕宁,彭晓,梁慧洁,北京地区 2009-2010 年流感监测季乙型流感病毒 HA 基因特征分析[J]. 中国疾病控制杂志,2011,15(8): 689-693.
- [3] Kumar S, Chusid M J, Willoughby R E, et al. Introduction of a novel swine—origin influenza A(H1N1) virus into Milwaukee Wisconsin in 2009[J]. Viruses, 2009, 1(1): 17-83.
- [4] 王敏,郭元吉,徐西雁,当前流行的乙型流感病毒血凝素蛋白的抗原性及其基因特性[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1995,9(3):

- 258-261.
- [5] 陈继明,郭元吉,吴昆昱,等.乙型流行性感冒病毒两大谱系的起源及其演变特征[J].病毒学报,2001,17(4):321-327.
- [6] Shao HX. Influenza vaccine: present and future[J]. Int J Virol, 2010,17(4):110-115.
- [7] Shi WX, Cui SJ, Hang F, et al. Establishment of testing capacity evaluation system on avian influenza viruses[J]. International J Virology, 2011,18(2):52-54.
- [8] Brady RC, Treanor JJ, Atmar RL, et al. Safety and immunogenicity of a sub-virion inactivated influenza A/H5N1 vaccine with or without aluminum hydroxide among healthy elderly adults[J]. Vaccine, 2009,27(37):5091-5095.
- [9] Palache B. New vaccine approaches for seasonal pandemic influenza[J]. Vaccine, 2008,26(49):6232-6236.
- [10] 史芳芳,李红叶.不同方法检测流感病毒的敏感度[J].国际检验医学杂志,2011,32(18):2119-2120.
- [11] Quattrocchi M, Campa A, Guido M, et al. Evaluation of a rapid diagnostic test for influenza viruses A and B[J]. Ig Sanita Pubbl, 2010,66(3):345-356.
- [12] 丘立文,廖志勇,王压娣. B 型流感病毒核衣壳蛋白 ELISA 捕获法的建立和临床应用[J]. 广东医学,2009,10(30):1435-1438.
- [13] Jia N, Yan ZQ, Liu G, et al. Colloidal gold and dot-ELISA rapid tests for screening influenza A virus[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2010,30(10):2267-2269.
- [14] Kaiser L, Briones MS, Hayden FG. Performance of virus isolation and Directigen Flu A to detect influenza A virus in experimental human infection[J]. J Clin Virol, 1999,14(3):191-197.
- [15] Chan KH, Lam SY, Puthavathana P, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2, and H5N1[J]. J Clin Virol, 2007,38(2):169-171.
- [16] Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza[J]. Science, 2003,302(5650):1519-1522.
- [17] 张德玺,朝洪彦,王希良.一种快速检测甲型流感病毒的方法[J].中国比较医学杂志,2007,17(1):42-45.
- [18] 张洁,姚文清,刘敏.急性呼吸系统疾病暴发疫情多重巢式 PCR 检测分析[J].中国公共卫生,2012,28(11):1455-1457.
- [19] Janette T, Kenneth M, Julian D, et al. Evaluation of twenty rapid antigen tests for the detection of human influenza A H5N1, H3N2, H1N1, and B Viruses[J]. J Med Virol, 2009,81(11):1918-1922.
- [20] 卢亦愚,严菊英,冯燕.荧光定量 RT-PCR 快速检测乙型流感病毒核酸[J].浙江预防医学,2005,17(3):1-3.
- [21] Lizheng Guo, Rebecca J, Garten, et al. Rapid identification of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses with H274Y mutation by RT-PCR/restriction fragment length polymorphism assay[J]. Antiviral Res, 2009,82:29-33.
- [22] 姚栩,张彩云,陈智伟.应用 PCR-RFLP 技术进行乙型流感病毒鉴别的实验研究[J].中国卫生检验杂志,2007,17(11):1948-1950.
- [23] Moore C, Corden S, Sinha J, et al. Dry cotton or flocked respiratory swabs as a simple collection technique for the molecular detection of respiratory viruses using real-time NASBA[J]. J Virol Methods, 2008,153(2):84-89.
- [24] Fung YW, Lau LT, Yu AC. The necessity of molecular diagnostics for avian flu[J]. Nat Biotech, 2004,22:267-269.
- [25] Ito M, Watanabe M, Nakagawa N, et al. Rapid detection and typing of influenza A and B by loop-mediated isothermal amplification: comparison with immunochromatography and virus isolation[J]. J Virol Methods, 2006,135(2):272-275.

(收稿日期:2013-01-19)

• 综 述 •

整合子介导细菌耐药调控机制的研究进展*

冯 银,陈 体 综述,伍 勇[△] 审校

(中南大学湘雅三医院检验科,湖南长沙 410013)

关键词:整合子; 耐药基因盒; 启动子; SOS 反应; 重组位点**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.028**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2013)10-1260-03

自从青霉素出现的半个多世纪以来,抗菌药物一直都是临床抗感染治疗的最重要、最有力武器。然而,近年来,随着抗菌药物的广泛使用甚至是滥用,细菌在抗菌药物的选择性压力下不断地产生耐药菌株,并且多重耐药菌株也在不断增加。在对细菌耐药机制的研究中,1989 年 Stokes 和 Hall 提出了整合子-基因盒耐药系统的概念。整合子是细菌特别是革兰阴性菌中的一种可移动性基因元件,通常位于转座子、接合性质粒、噬菌体或染色体上。它能够识别外源性基因盒,通过位点特异性重组捕获或切除耐药性基因盒,并能使捕获的耐药性基因盒表达。在耐药基因的水平转移中,整合子起到了至关重要的作用。

1 整合子的结构和分类

整合子的基本结构由 5'-保守末端(5'-CS)、3'-保守末端

(3'-CS)及中间的可变区组成。5'端为高度保守的核心区,含有编码整合酶(integrase, IntI)的基因、整合酶基因(intI)的启动子 Pint、整合子重组位点 attI 及整合子可变区启动子 Pant; 可变区含有不同数量和功能的耐药基因盒,也有少数整合子的可变区是不含基因盒的;3'端的结构根据整合子种类不同而异^[1](见图 1)。在整合酶的作用下,整合子能够特异性地识别移动性耐药基因盒的 attC 位点而将其捕获,并将基因盒插入到 attI 位点,使耐药基因成为整合子的一部分,也可在 attC 位点特异性地切除耐药基因盒。

根据整合酶基因的不同,现在发现的整合子至少可以分为 9 类。目前,对 I、II、III 类整合子的研究相对较多,而且它们在细菌耐药方面也起着主要作用。I 类整合子在临床菌株中

* 基金项目:湖南省自然科学基金(08JJ3069);湖南省科技厅计划(2010FJ3079);中南大学研究生创新基金(2011ssxt197)。 作者简介:冯银,女,检验技师,主要从事临床微生物学与检验研究。 [△] 通讯作者, E-mail: wuyong_xy@yahoo.com.cn。