

• 论 著 •

逆转录聚合酶螺旋反应快速检测蜱传脑炎病毒方法的建立及初步评价*

闫美田, 郑雨桐, 万楠[△]

北部战区总医院检验科, 辽宁沈阳 110016

摘要:目的 建立一种等温条件下蜱传脑炎病毒(TBEV)的现场快速检测的方法。方法 针对 TBEV NS1 基因设计一对特异性螺旋引物,在等温条件下建立逆转录聚合酶螺旋反应(RT-PSR)检测方法,优化反应条件,对特异性和灵敏性进行分析,应用全血模拟标本评价 RT-PSR 检测的符合率。结果 成功建立并优化了 TBEV 的 RT-PSR 检测方法,RT-PSR 法在 61 ℃ 的温度下只需一种酶可一步实现逆转录和扩增,55 min 可完成 TBEV 的检测,并可通过 SYBR Green I 直接肉眼判读结果,该方法特异性强,灵敏性高,最低检测限为 107.341×10^{-6} ng/ μ L,是 PCR 的 100 倍。全血模拟标本符合率为 100%,灵敏性比 RNA 标准品低 10 倍。结论 RT-PSR 方法具有良好的特异性和灵敏性,可用于基层对 TBEV 的现场快速检测。

关键词:蜱传脑炎病毒; 逆转录聚合酶螺旋反应; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.16.004

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2022)16-1935-06

文献标志码:A

Establishment and preliminary evaluation of rapid detection of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription polymerase spiral reaction*

YAN Meitian, ZHENG Yutong, WAN Nan[△]

Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Northern Theater Command, Shenyang, Liaoning 110016, China

Abstract: **Objective** To establish a rapid method for point-of-care detection of virulent tick-borne encephalitis virus (TBEV) under isothermal conditions. **Methods** A pair of specific spiral primers were designed for TBEV gene NS1, and the reverse transcription polymerase spiral reaction (RT-PSR) was established under isothermal conditions. The reaction conditions were optimized, the specificity and sensitivity were analyzed, and the coincidence rate of RT-PSR assay was evaluated by whole blood simulation samples. **Results** The RT-PSR method for TBEV detection was successfully established and optimized. The RT-PSR method could achieve reverse transcription and amplification in one step with only one enzyme at 61 ℃, and the TBEV detection could be completed in 55 min, the results could be read directly with the naked eye by addition of SYBR Green I. The RT-PSR method had high specificity and high sensitivity, and the minimum detection limit was 107.341×10^{-6} ng/ μ L, which was 100 times higher than that of PCR. The coincidence rate of whole blood simulated samples was 100%, and the sensitivity was 10 times lower than that of RNA standard samples. **Conclusion** RT-PSR method has good specificity and sensitivity, and could be used for rapid point-of-care detection of TBEV.

Key words: tick-borne encephalitis virus; reverse transcription polymerase spiral reaction; point-of-care detection

蜱传脑炎病毒(TBEV)又名森林脑炎病毒,属于黄病毒科黄病毒属中的烈性病毒,其基因组为单股正链 RNA,长约 11 kb,经蜱叮咬传播^[1-2],会引发以中枢神经系统病变为主要特征的森林地区自然疫源性

疾病^[3],感染者可出现发热、剧烈头痛、神经功能紊乱、外周性弛缓性麻痹等症状,甚至死亡^[4-5],严重威胁人类健康。近年来,军队森林驻扎频繁,林业人员和开发者采伐活动增多,加之森林游、野外游等旅游

* 基金项目:辽宁省重点研发联合计划技术专项(2021JH2/10300085)。

作者简介:闫美田,女,检验医师,主要从事病原微生物与分子生物学方向研究。 [△] 通信作者, E-mail: wannan@outlook.com。

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20220808.1101.004.html>(2022-08-09)

业的发展, 蜚叮咬的概率大大增加, 从而增加了 TBEV 感染的风险。为确保基层和野战现场对 TBEV 进行早期防控, 掌握最佳救治的良机, 本研究拟建立逆转录聚合酶螺旋反应 (RT-PSR) 法, 以对 TBEV 进行现场快速检测。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 2×EasyTaq PCR SuperMix、pGM-T 克隆试剂盒、EasyPure Plasmid MiniPrep Kit、Fly-Cut Sal I、T7 High Efficiency Transcription Kit、EasyPure RNA Purification Kit、EasyPure Blood RNA Kit 购自北京全式金生物技术有限公司, SYBR Green I、DNase/RNase-Free Water、石蜡油购自北京索莱宝科学技术有限公司, Bst 3.0 DNA 聚合酶购自 NEB 公司, 甜菜碱购自 Sigma 公司。

1.2 模板制备 在 GeneBank 中下载 49 种 TBEV 序列, 通过 BLAST 分析选取保守区, 发现 NS1 基因保守性、同源性较高, 因此参考 TBEV 森张株序列

(NO.JQ650523) 选取 NS1 基因上的 310 bp 序列 (第 2 892~3 201 位核酸序列) 由安徽通用公司人工合成基因片段, 连接到 pGM-T 载体上 (pGM-T 克隆试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司), 并转化到 TOP10 感受态细胞中, 以 25% 甘油进行菌液储存, 提取的质粒经 Sal I 单酶切线性化、纯化后通过体外转录试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司) 制备 RNA 标准品。

1.3 引物设计 以 TBEV 森张株序列保守区 NS1 基因上的 310 bp 序列为模板, 应用 Primer 5.0 设计一对螺旋引物 (Ft/Bt), 该引物由 PCR 的正、反向引物 (F/B) 和植物序列 (Nr/N) 组成, Nr 和 N 序列顺序彼此相反, F 和 B 的 T_m 值比 Nr 和 N 高 5℃ 以上, 以确保 F 和 B 与目的基因结合早于螺旋^[5], 引物由通用生物系统 (安徽) 有限公司合成。RT-PSR 检测 TBEV 时所用引物序列和 T_m 值见表 1。

表 1 RT-PSR 检测 TBEV 时所用引物序列和 T_m 值

名称	引物序列 (5′-3′)	T _m (℃)
F	CGGTGGCAGAGTTTGGAGTT	59
B	CCGGCCATGAGCAATTTCT	60
Ft	acgaattcgtacatagaagtatagCGGTGGCAGAGTTTGGAGTT	67
Bt	gatatgaagatacatgcttaagcaCCGGCCATGAGCAATTTCT	66

注: 小写为植物序列 (Nr 和 N)。

1.4 RT-PSR 体系的建立及优化 由于 Bst 3.0 DNA 聚合酶不是热启动酶, 需要在冰上建立反应体系, 根据先前实验摸索出的成分及用量建立共 25 μL 的 RT-PSR 反应体系: 8 U Bst 3.0 DNA 聚合酶, 2.5 μL 的 10× Isothermal Amplification Buffer II, 0.8 mol/L 甜菜碱, 4 mmol/L MgSO₄, 1.4 mmol/L dNTPs, Ft、Bt 各 1.6 μmol/L, RNA 模板 1.0 μL, 最后加 DNase/RNase-Free Water 补齐到 25.0 μL。以 TBEV 基因组 RNA 为模板, 根据已建立的反应体系进行 RT-PSR, 以 DNase/RNase-Free Water 为阴性对照。为了防止气溶胶污染, 在反应液上层加入 25 μL 的石蜡油, 接下来在 65℃ 恒温金属浴中反应 55 min。扩增结果用琼脂糖凝胶电泳进行验证。由于琼脂糖凝胶电泳需要配胶和电泳, 操作复杂并且耗时长, 为了更满足基层现场的检测条件, 本研究通过加 1.0 μL 1:20 稀释过的 SYBR Green I 到反应体系中, 通过肉眼观察颜色变化来快速判断反应结果。在 65℃ 金属浴中反应 55 min, 对 RT-PSR 条件进行优化, 设置温度梯度为 60℃、61℃、62℃、63℃、64℃、65℃, Bst 3.0 DNA 聚合酶浓度梯度为 2、4、6、8、10、

12 U, 甜菜碱浓度梯度为 0.2、0.5、0.8、1.1、1.4 mol/L, MgSO₄ 浓度梯度为 4、6、8、10 mmol/L, dNTPs 浓度梯度为 1.0、1.4、1.8、2.2 mmol/L, 以上条件确定后将反应时间设定为 30、35、40、45、50、55、60 min, 根据 1.5% 琼脂糖凝胶电泳条带的亮度和清晰度来选出最佳反应条件。

1.5 RT-PSR 特异性及灵敏性分析 使用实验室先前合成的融合基因 (西尼罗病毒、乙型脑炎病毒、墨累谷脑炎病毒) 和 TBEV 的 RNA 标准品在同等条件下应用 RT-PSR 进行检测, 验证该方法的特异性。测定人工合成的 TBEV RNA 质量浓度为 107.341 ng/μL, 进行 10 倍梯度稀释 (依次稀释 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 倍), 分别取 1 μL 进行 PCR 和 RT-PSR 扩增, 应用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳验证两种方法的检测限, 并进行灵敏性比较。

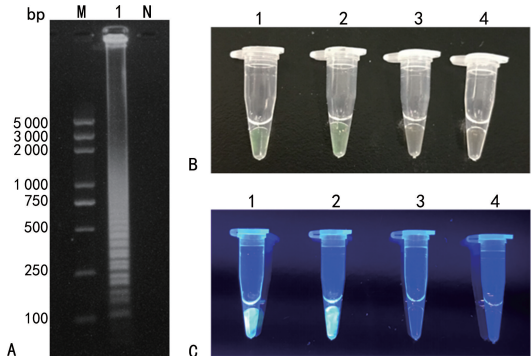
1.6 模拟全血标本检测 由于 TBEV 是烈性病毒, 不易收集临床标本, 因此选取体检健康的全血标本为模拟标本的基质, 加入已知质量浓度的 TBEV RNA, 制备 7 个浓度的模拟标本, 全血中 TBEV RNA 的终浓度分别为 107.34×10⁻¹、107.34×10⁻²、107.34×

10^{-3} 、 107.34×10^{-4} 、 107.34×10^{-5} 、 107.34×10^{-6} 、 107.34×10^{-7} ng/ μ L,以纯全血标本作为阴性对照。按照 EasyPure Blood RNA Kit 说明书进行 RNA 提取。

2 结 果

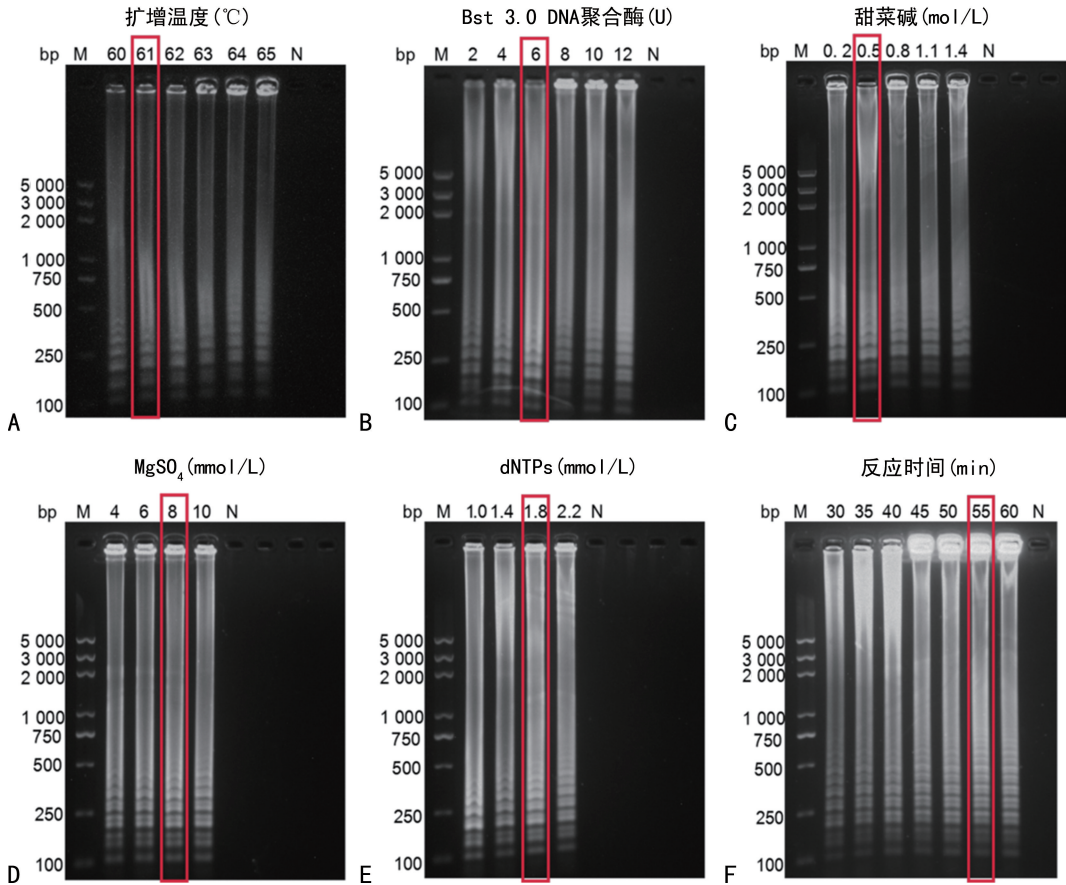
2.1 RT-PSR 体系的建立及优化 琼脂糖凝胶电泳结果显示,TBEV 基因组出现明显的梯状条带,阴性对照无条带,TBEV 基因组的 SYBR Green I 由橙色变为绿色,阴性组保持橙色不变,并且在紫外灯下 TBEV 基因组可见绿色荧光,阴性组无荧光。结果表明,SYBR Green I 可作为 RT-PSR 的指示剂(图 1),验证了建立的 RT-PSR 反应体系的可行性。在 60~65 ℃条件下,61 ℃条带最亮、最清晰;在同等温度条件下分别加入 2~12 U Bst 3.0 DNA 聚合酶,结果显示,6 U 的 Bst 3.0 DNA 聚合酶条带最亮、最清晰;分别加入 0.2~1.3 mol/L 的甜菜碱,结果显示 0.5 mol/L 浓度的甜菜碱结果最理想;4、6、8、10 mmol/L 浓度梯度的 $MgSO_4$ 中,结果显示 8 mmol/L 的结果

最理想;确定 dNTPs 的浓度为 1.8 mmol/L;在不同时间范围内进行反应(30~60 min),最终确定反应时间为 55 min 时最理想(图 2)。



注:A为 1.5%琼脂糖凝胶电泳结果,M为 5 000 DNA 标记物,1 为 TBEV 的 RNA 标准品,N 为阴性对照(DNase/RNase-Free Water); B 为 SYBR Green I 在自然光下扩增产物的显色结果;C 为 SYBR Green I 在紫外光下扩增产物的显色结果;B、C 中 1、2 为 TBEV 的 RNA 标准品,3、4 为阴性对照(DNase/RNase-Free Water)。

图 1 RT-PSR 的扩增结果



注:A 为优化 RT-PSR 扩增的温度;B 为优化 Bst 3.0 DNA 聚合酶的浓度;C 为优化甜菜碱的浓度;D 为优化 $MgSO_4$ 浓度;E 为优化 dNTPs 的浓度;F 为优化 RT-PSR 的反应时间;M 为 5 000 DNA 标记物;N 为阴性对照(DNase/RNase-Free Water)。

图 2 RT-PSR 扩增反应条件的优化

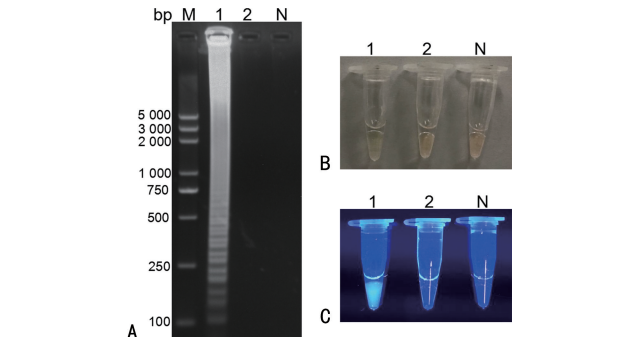
2.2 RT-PSR 特异性及灵敏性分析 电泳结果显示,含有 TBEV 的 RNA 标准品才呈现标准的梯形条

带,而西尼罗病毒、乙型脑炎病毒、墨累谷脑炎病毒的融合基因和阴性对照没有明显条带,有 TBEV 的

RNA 标准品在自然光下 SYBR Green I 由橙色变为绿色,而融合基因和阴性对照在自然光下 SYBR Green I 仍为橙色,只有 TBEV 的 RNA 标准品在紫外光下发出绿色荧光,结果表明,RT-PSR 可特异检测出 TBEV(图 3)。已稀释的模板分别进行 PCR 和 RT-PSR,电泳结果显示,PCR 在 $107.34\text{ ng}/\mu\text{L}$ 稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 倍时有条带,当质量浓度低于 $107.34\times 10^{-4}\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时无明显条带,RT-PSR 在 $107.34\text{ ng}/\mu\text{L}$ 稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍时有条带,当质量浓度低于 $107.34\times 10^{-6}\text{ ng}/\mu\text{L}$ 时无明显条带,指示剂在自然光和紫外光下显色结果与电泳结果相同,可见 RT-PSR 最低检测限是 PCR 的 100 倍,见图 4。

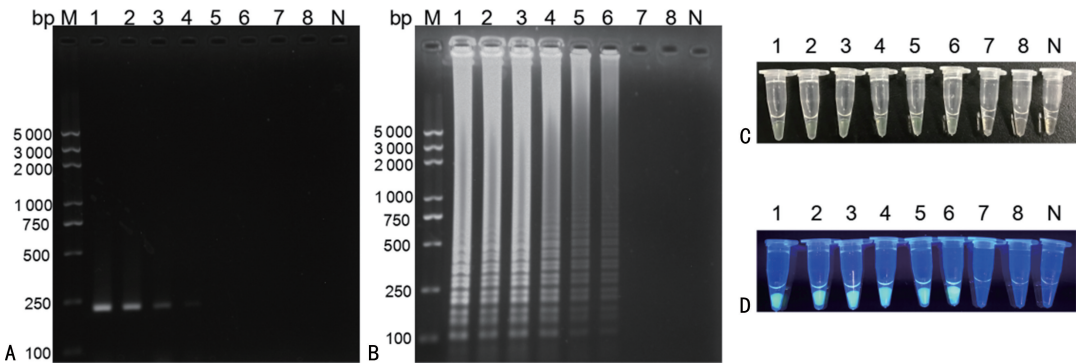
2.3 模拟全血标本 RT-PSR 检测 7 种不同浓度的 TBEV 模拟全血标本,结果表明符合率为 100%,见

图 5。最低检测限为 $107.341\times 10^{-5}\text{ ng}/\mu\text{L}$,灵敏性比 RNA 标准品低 10 倍。



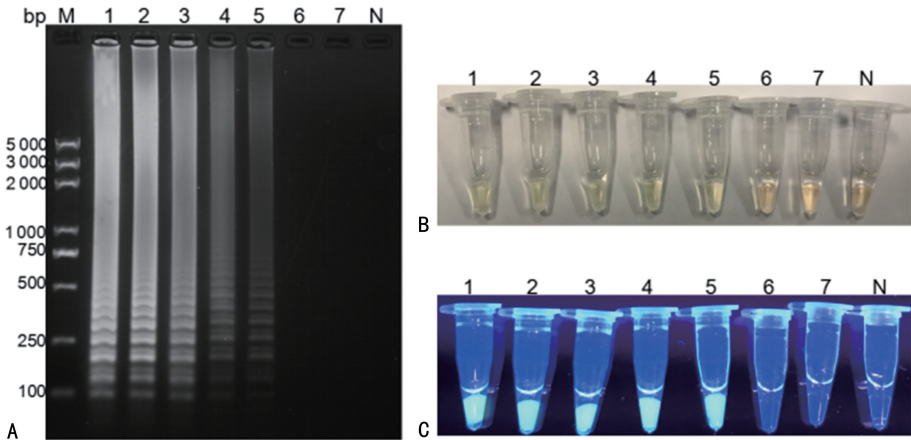
注:A 为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果;B 为自然光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 反应结果;C 为紫外光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 结果;M 为 5 000 DNA 标记物,1 为 TBEV RNA,2 为融合基因(西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、墨累谷脑炎病毒);N 为阴性对照(DNase/RNase-Free Water)。

图 3 RT-PSR 特异性分析



注:A、B 为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果;C 为自然光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 结果;D 为紫外光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 结果;M 为 5 000 DNA 标记物,1~8 TBEV RNA 质量浓度分别为 107.34×10^{-1} 、 107.34×10^{-2} 、 107.34×10^{-3} 、 107.34×10^{-4} 、 107.34×10^{-5} 、 107.34×10^{-6} 、 107.34×10^{-7} 、 $107.34\times 10^{-8}\text{ ng}/\mu\text{L}$,N 为阴性对照(DNase/RNase-Free Water)。

图 4 RT-PSR 灵敏度分析



注:A 为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果;B 为自然光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 结果;C 为紫外光下 SYBR Green I 的 RT-PSR 结果;M 为 5 000 DNA 标记物,1~7 为质量浓度分别为 107.34×10^{-1} 、 107.34×10^{-2} 、 107.34×10^{-3} 、 107.34×10^{-4} 、 107.34×10^{-5} 、 107.34×10^{-6} 、 $107.34\times 10^{-7}\text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 TBEV 模拟全血标本;N 为阴性对照(体检健康者的纯全血标本)。

图 5 以不同质量浓度的 TBEV 全血模拟标本和阴性对照为模板 RT-PSR 结果

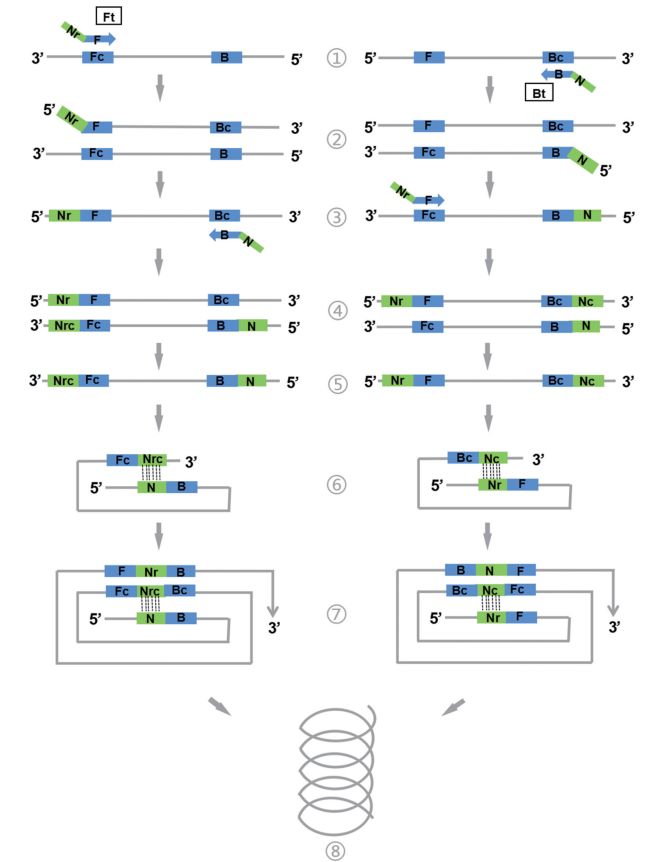
3 讨 论

聚合酶螺旋反应(PSR)是 2015 年 LIU 等^[6]团队

发明的一种新的等温核酸扩增方法,利用 Bst DNA 聚合酶的链置换功能、热稳定性及 DNA 聚合酶活性,

以及甜菜碱解开 DNA 双链的作用进行检测,该方法只需要一对引物(Ft/Bt),即在 PCR 的正、反向引物的 5'端加上植物序列 Nr/N,并且 Nr 和 N 序列彼此相反,从而实现反复的引物延伸(①→②、③→④)、解链(②→③、④→⑤)、置换(⑤)、卷曲(⑥),接下来卷曲结构的 3'端继续向前延伸(⑦),最终通过自螺旋方式(⑧)大量扩增(图 6),从而实现简单快速、高灵敏性和特异性检测。

目前,已有研究人员应用 PSR 方法进行细菌、真菌及病毒的检测^[7-11],而先前适当研究对 RNA 病毒检测时需要在反应前进行逆转录或者是在反应体系内加入逆转录酶等才能实现 PSR 扩增,本研究建立的 RT-PSR 仅需一种酶,即 Bst 3.0 DNA 聚合酶,它不仅具有链置换活性,还具有耐高温逆转录酶活性,在等温条件下一种酶可同时实现逆转录和核酸扩增。此外,PSR 反应体系中加入颜色指示剂,可以通过阴阳性反应的颜色差异现场快速判断实验结果。



注:①→②、③→④为引物延伸,②→③、④→⑤为解链,⑤为置换,⑥为卷曲,⑦为延伸,⑧为通过自螺旋方式扩增。

图 6 PSR 模式图

TBEV 分为 3 个亚型,欧洲型 TBEV(TBEV-Eu)、西伯利亚型 TBEV(TBEV-Sib)和远东型 TBEV(TBEV-FE)^[4,12],我国流行的主要是 TBEV-FE,流行主要地区有吉林、黑龙江和内蒙古地区,新疆和云南也有病例出现^[13]。目前 TBEV 感染的检测方法有血清学方法及核酸检测方法,但是血清学方法要求待检验品的抗原、抗体含量高,而且检测灵敏度较低,易出

现“窗口期”导致漏检;核酸检测方法主要是 PCR,需要反复变温循环和元件精密的复杂仪器,时间成本和经济成本较高,核酸检测领域还有分子杂交等技术,但成本高昂、操作烦琐。本研究建立 RT-PSR 在恒温条件下只需一对特异性引物就可实现核酸大量扩增,具有高特异性、高灵敏性、节约时间和成本等优点,可实现基层现场对 TBEV 的精准检测,能够对 TBEV 进行早期防控,对感染者进行早期治疗,避免后遗症,甚至死亡的发生。

本研究根据 RT-PSR 方法的原理,以 TBEV NS1 基因序列设计一对引物 Ft/Bt,对反应条件及主要成分采用单因素变化法进行优化,最终确定的反应条件为在 25.0 μ L 的反应体系中:6 U 的 Bst 3.0 DNA 聚合酶,0.5 mol/L 的甜菜碱,8 mmol/L 的 $MgSO_4$,1.8 mmol/L 的 dNTPs,1.0 μ L 的 RNA 模板,Ft、Bt 各 1.0 μ L,加入无菌无酶水补齐 25.0 μ L,61 $^{\circ}C$ 恒温金属浴中反应 55 min。SYBR Green I 能与双链 DNA 结合,由橙色变为绿色,紫外光下会发出荧光,但 SYBR Green I 会抑制 PSR 反应,因此需要反应结束后开盖加入^[14]。

当前的核酸扩增方法对于 RNA 需要事先进行逆转录,而 RT-PSR 检测方法最佳反应温度 61 $^{\circ}C$,逆转录酶的活性为 30~68 $^{\circ}C$,正好包括了 RT-PSR 的最佳反应温度,因此可以逆转录和扩增同时进行;当前的核酸扩增方法要么需要 95 $^{\circ}C$ 初始变性,要么需要加入 DNA 解旋酶,而 RT-PSR 检测方法只需加入甜菜碱,当达到反应温度时,便可以使 DNA 双链解开,达到单双链的动态平衡。

由于 TBEV 是烈性病毒,不易收集标本,因此本研究制备了 7 种不同浓度模拟全血标本,用 RT-PSR 进行检测,将检测结果与加入 RNA 标准品进行对比,评价该方法检测实际全血感染标本的能力。本研究表明,用该 RT-PSR 检测模拟标本的符合率可达到 100%,最低检出浓度为 107.341×10^{-7} ng/ μ L,提示 RT-PSR 检测方法可以对全血标本中微量的 TBEV 进行准确检测。

综上所述,RT-PSR 检测方法对 TBEV 具有良好的特异性和灵敏性,检测限是 PCR 的 100 倍。此外,该方法所用仪器简单、成本低(水浴锅或者恒温金属浴),只需要一种酶,通过观察指示剂的颜色变化即可判断结果,操作简便,反应稳定性高,实现了现场快速检测,有助于基层对 TBEV 的早期诊断。

参考文献

[1] HELMOVÁ R,HÖNIG V,TYKALOVÁ H,et al. Tick-Borne encephalitis virus adaptation in different host environments and existence of quasispecies[J]. Viruses,2020,12(8):902.
[2] MANSFIELD K L,JOHNSON N,PHIPPS L P,et al. Tick-borne encephalitis virus:a review of an emerging zoonosis[J]. J Gen Virol,2009,90(Pt 8):1781-1794. (下转第 1944 页)

南医学, 2020, 31(13): 1655-1658.

- [6] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [7] MICKEIN R, SOHRD, RUDEN H, et al. The severity of illness measured by APACHE II as a predictor for developing a nosocomial ventilator associated pneumonia[J]. Int J Med Microbiol 2006, 296: 59.
- [8] KHALEEQ G, GARCHA P, HIRANI A, et al. Clinical pulmonary infection score (CPIS): relationship to mortality in patients with ventilator associated pneumonia (VAP)[J]. Chest, 2006, 130(4): 218-219.
- [9] FOURDRAIN A, BOUABDALLAH I, GUST L, et al. Screening and topical decolonization of preoperative nasal *Staphylococcus aureus* carriers to reduce the incidence of postoperative infections after lung cancer surgery: a propensity matched study[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2020, 30(4): 552-558.
- [10] WANG Y Q, LIU X, JIA Y, et al. Impact of breathing exercises in subjects with lung cancer undergoing surgical resection: a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Nurs, 2019, 28(5/6): 717-732.
- [11] 张节平, 孙京焕, 吴文娟, 等. 肺部感染相关急性呼吸窘迫综合征影响因素及其 miRNA 表达水平[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(23): 3622-3625.
- [12] 袁嫫, 廖灿, 卢芳国, 等. 外泌体在流感病毒感染及其引发的肺部炎症中作用的研究进展[J]. 病毒学报, 2019, 35(5): 831-835.
- [13] 纪迎洁, 倪洁, 邓水香, 等. 颅脑损伤继发肺部感染患者外周血单个核细胞 miRNA 表达谱及其临床意义[J]. 中华
- 医院感染学杂志, 2021, 31(11): 1660-1664.
- [14] 李明, 王德勇, 袁娟, 等. 血清 TLR4、PA、Lac 水平与老年患者全身麻醉手术后肺部感染程度及预后的关系[J]. 山东医药, 2021, 61(23): 61-63.
- [15] 康书红, 蔺红丽, 周福有. 胸腔镜根治术对老年食管癌患者术后肺部感染与呼吸功能及炎症因子的影响[J]. 实用癌症杂志, 2021, 36(4): 609-613.
- [16] 秦逸辉, 李毅, 余研, 等. 替加环素联合头孢哌酮舒巴坦对老年多耐药不动杆菌肺部感染的临床疗效及血浆中 TLR-4、IV-C 及 MMP-9 表达的影响[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(2): 312-316.
- [17] 李慧, 李丽, 李朝锋, 等. 无创正压通气联合纤维支气管镜肺泡灌洗对肺部感染患者临床疗效及基质金属蛋白酶 9、白细胞表面 Toll 样受体 4 水平的影响[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(2): 69-72.
- [18] 吕俊宏, 彭盘俐, 林少欢, 等. 血清 PCT、CRP 与 sTREM-1 在肺癌患者术后肺部感染中表达及其诊断价值分析[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(9): 1711-1715.
- [19] 楼洋, 陈献国, 许博, 等. 肺癌患者术后肺部感染病原菌特征及对血清 sTREM-1 与 PCT 和 VEGF 水平的影响[J]. 中国预防医学杂志, 2020, 21(4): 375-378.
- [20] 邱浩, 赵志宏, 程丰, 等. 血清 sTREM-1 和 CRP/Alb 比值在肺癌患者术后肺部感染早期诊断中的应用价值[J]. 西部医学, 2020, 32(3): 443-447.
- [21] 魏志杰, 张靖华, 孟利芳. 呼吸道管理及呼吸训练对肺癌术后患者肺功能指标、排痰效果、肺部感染及康复情况的影响[J]. 癌症进展, 2021, 19(13): 1386-1389.

(收稿日期: 2021-09-26 修回日期: 2022-06-15)

(上接第 1939 页)

- [3] VELAY A, PAZ M, CESBRON M, et al. Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen[J]. Crit Rev Microbiol, 2019, 45(4): 472-493.
- [4] ERGUNAY K, TKACHEV S, KOZLOVA I, et al. A review of methods for detecting tick-borne encephalitis virus infection in tick, animal, and human specimens[J]. Vector Borne Zoonotic Dis, 2016, 16(1): 4-12.
- [5] WEBER W. Germany halts tick-borne encephalitis vaccination[J]. Lancet, 2000, 356(9223): 52.
- [6] LIU W, DONG D, YANG Z, et al. Polymerase spiral reaction (PSR): a novel isothermal nucleic acid amplification method[J]. Sci Rep, 2015, 5: 12723.
- [7] KIDD T J, GRIMWOOD K, RAMSAY K A, et al. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 263-268.
- [8] DERONG D, ZOU D Y, LIU H, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from Beijing, China[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1100.
- [9] DONG D, LIU W, LI H, et al. Survey and rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples targeting the *rcsA* gene in Beijing, China[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 519.
- [10] 董德荣. 一种新型核酸恒温扩增方法的研究及其在现场检测中的应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [11] LIU W, XU Y, DONG D, et al. Survey and rapid detection of *bordetella pertussis* in clinical samples targeting the BP485 in China[J]. Front Public Health, 2015, 3: 39.
- [12] REUSKEN C, BOONSTRA M, RUGEBREGT S, et al. An evaluation of serological methods to diagnose tick-borne encephalitis from serum and cerebrospinal fluid[J]. J Clin Virol, 2019, 120: 78-83.
- [13] 张桂林, 孙响, 刘然, 等. 新疆中哈边境地区分离到远东型和西伯利亚型蜱传脑炎病毒[J]. 中国人兽共患病学报, 2017, 33(4): 312-315.
- [14] NAVARRO E, SERRANO-HERAS G, CASTAÑO M J, et al. Real-time PCR detection chemistry[J]. Clin Chim Acta, 2015, 439: 231-250.

(收稿日期: 2022-01-05 修回日期: 2022-06-28)