

分子技术在流感病毒诊断中的应用*

李 勃¹, 孙 菲¹, 李文悌^{2△} 综述, 王晓春² 审校 (1. 湖南国际旅行社卫生保健中心, 长沙 410016;
2. 中南大学湘雅医学院医学检验系, 长沙 410013)

【关键词】 流感病毒; 诊断; 逆转录-聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.041 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)16-1992-03

流感病毒(influenza virus)属于正黏病毒科,根据病毒内部蛋白抗原性的不同分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型。根据病毒表面结构蛋白血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)抗原性的不同,又将 A 型流感分为不同的血清亚型,已发现有 15 种 HA 亚型(H1~H15)和 9 种 NA 亚型(N1~N9)^[1]。检测流感病毒的方法主要有:病毒分离培养、血清学诊断、抗原检测、核酸检测。病毒分离培养和血清学诊断耗时,敏感性差;抗原检测结果的特异性受抗体纯度影响较大,需要多个实验室相互佐证,限制了其在临床上的应用。随着分子生物学的飞速发展,分子技术被应用于流感病毒的检测中。本文就分子技术在诊断流感病毒中的应用综述如下。

1 定性 PCR 扩增

1.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 是将 RNA 的逆转录(RT)和 cDNA 的聚合酶链反应(PCR)相结合的技术。针对不同目的采用不同的 PCR 技术来设计不同的引物。如果鉴别流感病毒的型别,扩增片段常常是具有高度保守序列的核蛋白和 M 蛋白;如果鉴定某型流感病毒的亚型,则针对编码表面抗原基因的保守序列设计引物^[2]。Jindal 等^[3]报道了使用一个可降解的引物在一次 PCR 反应中,对 A 型流感病的 HA、NA、M 和 NSP 基因进行全长扩增。对扩增的 4 个基因进行琼脂糖凝胶电泳,并将各个条带从凝胶中提取出来以进行测序,特异性为 100%。

根据对 HA 的研究发现,各亚型病毒 HA 蛋白裂解位点的氨基酸组成不同。高致病性病毒的 HA 裂解位点含有 1 或 2 个碱性氨基酸,而高致病性病毒的 HA 裂解位点至少由 4 个碱性氨基酸组成^[1]。据此,Yea 等^[4]针对编码高致病性禽流感 H5 血凝素蛋白基因的蛋白酶裂解位点设计引物,来检测高致病性禽流感 H5。产物由测序法来分析。其灵敏度是泛血凝素 RT-PCR 法的 10^0 倍,达到 $10^1 \sim 10^2$ 基因拷贝。此实验设计的引物,只对高致病性禽流感 H5 进行扩增,不扩增低致病性禽流感病毒 H5,显示极高的特异性。

1.2 多重 RT-PCR(multiplex RT-PCR) 多重 PCR 用于多型病毒的分型检测或同时检测几种病毒,是在 RT-PCR 基础上实现单管多检的相对快速和经济的检测方法^[1]。He 等^[5]针对流感病毒 A、B 型和 H1、2、3、5、7、9 与 N1、2、7 亚型的基因序列保守区域设计特异性引物,利用多重 RT-PCR 技术建立的检测方法。该方法在一次性检测出 A、B 型流感病毒保守区域基因的同时,直接区分 H1、2、3、5、7、9 与 N1、2、7 亚型。一

次实验即可检测出流感病毒及其亚型,可节省时间、降低实验成本。Lee 等^[6]报道了一步法多重 RT-PCR 检测流感病毒以及对病毒进行分型的方法,使用一个双启动核苷酸系统(dual priming oligonucleotide DPO system),同时对流感病毒的 H1、H3、N1、和 N2 基因进行检测,检测水平可达 10^3 TCID₅₀/mL。是一个快速、敏感且经济有效的诊断和识别流感病毒亚型的方法。

另外还有多重巢式逆转录 PCR(multiplex nested RT-PCR),同时有两套 PCR 引物与模板的配对,增加了可靠性,使检测的亚型范围进一步扩展^[7]。半巢式 PCR 是在第 2 轮扩增时,设计单条引物,另一条引物与第 1 轮扩增共用,效果也优于单次扩增。Minosse 等^[8]用半巢式 PCR 扩增逆转录产物,与单轮 RT-PCR 进行比较,半巢式 RT-PCR 的灵敏度在检测甲型流感病毒时是单轮 RT-PCR 的 10 倍,在检测乙型流感病毒时是单轮 RT-PCR 的 4 倍。巢式 PCR 存在上述优点,但还存在繁琐、费时、费用高和易污染的缺点。

2 实时荧光定量 RT-PCR

实时 PCR(real time-PCR)利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线或公式法对流感病毒的 RNA 模板进行定性和定量分析。实时技术在同一个管内进行扩增和检测,是分子诊断方法明显的改善。此种定量使用荧光色素,目前常用的荧光探针有多种,如:Taqman 水解探针(cleavage-based probes)、荧光共振能量转移(FRET)杂交双探针、SYBR green 荧光染料法等。最常使用的是 Taqman 水解探针,Lorusso 等^[9]使用此方法检测 H1N1 病毒,敏感性可达到 1×10^1 copy/mL。

多重实时 RT-PCR 也被广泛应用于流感病毒的检测。在同一个反应体系中存在一对以上的引物和探针,对不同型别的流感病毒设计引物和探针,还可以对亚型设计引物和探针,进一步分型。使用不同的发射波长相差较大的荧光染料基因标记探针。Beck 等^[10]用此方法检测甲、乙型流感病毒,并进一步鉴别 H1N1 病毒,最低检测限为 $10^{-2} \sim 10^1$ TCID₅₀/mL。Suwannakarn 等^[11]用此方法检测甲、乙型流感病毒并分出 H1、H3、H5 型流感病毒。此种方法对甲型和乙型流感病毒有较高的敏感性和特异性,与其他呼吸道病毒及其他亚型病毒无交叉反应。

荧光定量 PCR 技术利用了 PCR 技术对 DNA 的高效扩增、探针技术的高特异性与光谱技术的敏感性以及定量的优

* 基金项目:湖南省出入境检验检疫局科技项目(2009hnhk001);长沙市科技局科技项目(K0904150-11)。

△ 通讯作者, E-mail:liwenti2008@163.com。

点,在实验室诊断中得到了很好的应用。与其他检测方法相比,实时 RT-PCR 具有明显的优势。首先,此种方法快速,对 PCR 产物进行实时监控,PCR 结束即可获得结果,省却了电泳和染色,避免了产物被污染。逆转录和扩增反应以及检测结果,整个过程只需 2 h 左右。其次,此种方法灵敏度高,由于采用了特异性的荧光探针和高灵敏度的荧光 PCR 仪,使该方法比传统的 PCR 方法灵敏度高 100~1 000 倍;特异性高,由于不仅采用了特异性的引物,而且采用了特异性的探针,使该方法的特异性高于传统 PCR 方法,大大杜绝了非特异性扩增造成的假阳性结果^[12-13]。

3 测序法

RT-PCR 以及实时 RT-PCR 无法获得病毒基因的序列信息,另外在检测出病毒的型别而无法进一步分型时,可以对 RT-PCR 的产物进行测序,对病毒进行鉴定、亚型判断以及致病性分析^[14]。当无法获得具体的流感病毒的检测方法时,可以把测序作为一个临时的检测方法。另外,当一个新的亚型病毒出现的时候,用测序可以检测新的病毒亚型,并且可以作为其他方法的确证实验^[15]。

4 非 PCR 扩增

4.1 逆转录-环介导等温扩增法(RT-LAMP) LAMP 引物的设计主要是针对靶基因的 6 个不同的区域设计 4 种引物,具有很高的敏感性和特异性。有报道用此方法检测甲 3 型流感病毒,敏感度可达 0.01 TCID₅₀/反应,与流感病毒其他亚型和呼吸道的其他病毒无交叉反应,特异性高^[16]。但大多用电泳观察结果,操作中应注意避免由污染而产生的假阳性。

4.2 依赖核酸序列的扩增(NASBA) 该技术使用 3 种酶(逆转录酶、RNA 酶 H 和 T7RNA 聚合酶)以及两条特别设计的引物,上游引物 5' 末端含有噬菌体 T7 RNA 聚合酶的启动子序列,下游引物的 5' 末端含有与标记的电化学发光检测探针互补的序列。适用于以 RNA 为模板的扩增,是一种持续等温的核酸扩增技术,具有灵敏度高、特异性强、操作简单等特点。可以减少人为造成的误差,而且是一种高通量的方法。扩增产物为 RNA 分子,不宜对实验仪器和环境造成污染,避免了产物交叉污染实验仪器、操作环境导致的假阳性结果^[17]。

5 基因芯片技术

基因芯片与经典的核酸杂交原理一致。针对病毒基因组序列的保守区域,设计特异性检测探针,制备病毒检测芯片;利用限制性显示技术标记样品中的病毒靶序列,将标记产物与芯片进行杂交、清洗、扫描及结果分析。可用于多种病毒及其亚型的早期检测,而且其敏感性可以与实时 RT-PCR 相提并论。此方法高通量、高灵敏度,特别适合于流感病毒基因和宿主多态性的特点,用于病毒型别及亚型的检测^[18]。然而芯片杂交技术仍有无法克服保守同源序列及重复序列对杂交信息干扰的缺点。

6 展 望

综上所述,多重荧光 RT-PCR 因其快速、灵敏、特异的优点,值得在流感病毒的快速诊断方面推广应用。随着以分子技术为基础的流感病毒检测方法和类型的显著增长,使得快速确证性诊断成为可能,特别在流感大暴发时为流感病毒的预防控制提供了可靠的技术支持。对于流感病毒而言,早诊断和早发现是控制其流行和进行有效治疗的前提。因此,快速、特异、敏感、经济的诊断试剂仍然是流感病毒检测研究的发展方向。

参考文献

- [1] 黄文林. 分子病毒学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2006:431-450.
- [2] 蔡欣,朱泽铁,邹民吉,等. 流感病毒诊断方法的研究进展[J]. 医学研究杂志,2009,38(5):7-9.
- [3] Jindal N, Chander Y, de Abin M, et al. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method[J]. J Virol Methods, 2009,160(1-2):163-166.
- [4] Yea C, Adachi D, Johnson G, et al. Design of a single tube RT-PCR assay for the diagnosis of human infection with highly pathogenic influenza A (H5) viruses[J]. J Virol Methods, 2007,13(2):220-226.
- [5] He J, Bose ME, Beck ET, et al. Rapid multiplex reverse transcription-PCR typing of influenza A and B virus, and subtyping of influenza A virus into H1, 2, 3, 5, 7, 9, N1 (Human), N1 (Animal), N2, and N7, including typing of novel swine origin influenza A (H1N1) virus, during the 2009 outbreak in Milwaukee, Wisconsin[J]. J Clin Microbiol, 2009,47(9):2772-2778.
- [6] Lee CS, Kang BK, Lee DH, et al. One-step multiplex RT-PCR for detection and subtyping of swine influenza H1, H3, N1, N2 viruses in clinical samples using a dual priming oligonucleotide (DPO) system[J]. J Virol Methods, 2008,151(1):30-34.
- [7] Gronesová P, Mizáková A, Betáková T. Determination of hemagglutinin and neuraminidase subtypes of avian influenza A viruses in urban pigeons by a new nested RT-PCR[J]. Acta Virol, 2009,53(3):213-216.
- [8] Minosse C, Selleri M, Zaniratti MS, et al. Improved detection of human influenza A and B viruses in respiratory tracts specimens by hemi-nested PCR[J]. J Virol Methods, 2007,141(2):225-228.
- [9] Lorusso A, Faaberg KS, Killian ML, et al. One-step real-time RT-PCR for pandemic influenza A virus (H1N1) 2009 matrix gene detection in swine samples[J]. J Virol Methods, 2010,164(1-2):83-87.
- [10] Beck ET, Jurgens LA, Kehl SC, et al. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin[J]. J Mol Diagn, 2010,12(1):74-81.
- [11] Suwannakarn K, Payungporn S, Chieochansin T, et al. Typing (A/B) and subtyping (H1/H3/H5) of influenza A viruses by multiplex real-time RT-PCR assays[J]. J Virol Methods, 2008,152(1-2):25-31.
- [12] Gunson R, Maclean A, Davies E, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR that allows universal detection of influenza A viruses and simultaneous typing of influenza A/H1N1/2009 virus[J]. J Virol Methods, 2010,

163(2):258-261.

[13] Pabbaraju K, Wong S, Wong AA, et al. Design and validation of real-time reverse transcription-PCR assays for detection of pandemic (H1N1) 2009 virus[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11):3454-3460.

[14] 汪维鹏, 武海萍, 周国华. 焦测序法检测禽流感[J]. 分析化学, 2008, 36(6):775-780.

[15] Hall RJ, Peacey M, Huang QS, et al. Rapid method to support diagnosis of swine origin influenza virus infection by sequencing of real-time PCR amplicons from diagnostic assays[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(9):3053-3054.

[16] 姜晓慧, 陈寅, 卢亦愚, 等. 甲 3 型流行性感冒病毒介导

逆转录等温扩增检测方法的建立与应用[J]. 中国疫苗和免疫, 2008, 14(3):242-245.

[17] Ge Y, Cui L, Qq X, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification[J]. J Virol Methods, 2010, 163(2):495-497.

[18] Gall A, Hoffmann B, Harder T, et al. Rapid haemagglutinin subtyping and pathotyping of avian influenza viruses by a DNA microarray[J]. J Virol Methods, 2009, 160(1-2):200-205.

(收稿日期:2011-02-23)

圆锥角膜治疗研究进展

赵海涛¹, 李景传¹ 综述, 尹小磊² 审校 (1. 解放军 92094 部队卫生队, 广东湛江 524009; 2. 解放军第三〇五医院眼科, 北京 100017)

【关键词】 圆锥角膜; 角膜环植入术; 角膜移植; 核黄素; 角膜接触镜; 深层角膜板层移植术
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.16.042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)16-1994-02

组成眼睛的每个部分都很重要,但聚焦功能主要依靠角膜实现,角膜在视觉信息的获得中发挥重要作用。圆锥角膜是一种因结构或组成成分异常造成角膜比较薄弱的疾病。眼内压将薄弱的角膜顶起变形,由正常的类似弧形成为圆锥形,造成光学相差,出现视物变形症状。本文拟将近年来关于圆锥角膜的治疗进展简要综述如下。

1 角膜接触镜

早期的圆锥角膜可以通过佩戴框架眼镜矫正,但到了晚期,由于角膜已经严重变形,不规则散光就只能靠佩戴角膜接触镜进行矫正。角膜接触镜可为严重变形的角膜提供一个正常的屈光面,从而有效矫正不规则散光。该方法是治疗轻中度圆锥角膜最简易的途径,在所有的治疗方法中占到了至少 90% 的比例^[1]。角膜接触镜使用的类型主要取决于疾病的严重程度。早期阶段软性角膜接触镜完全可以到达矫正的效果,到了晚期,角膜的生物机械性降低,硬性透气性角膜接触镜则可提供非常好的机械支撑功能。混合型角膜接触镜是一种中间硬、边缘软的型号,且能像软接触镜一样舒适,因此是较常用的类型^[2-3]。虽然角膜接触镜治疗圆锥角膜的优点不胜枚举,但也有一些并发症。如角膜变形的时间过长,使晶状体维持较好视力的时间受限;润滑不充分,角膜上皮擦伤,引起眼部不适感,并出现视物变形^[4]。进一步完善角膜接触镜设计,有望减少此类并发症的发生。

2 角膜环植入术

角膜环植入术是另一种圆锥角膜的治疗方法,美国食品药品监督管理局于 2004 年正式批准^[5]。这种手术是在角膜周边部做两个放射状 2/3 深度的切口,将两片环状片段植入角膜基质层内,对角膜塑形。该术式可降低圆锥角膜的陡峭程度,而使角膜可以适应角膜接触镜的佩戴^[6]。由于操作精细程度的提高和能量可控性的改进,飞秒激光在角膜环植入术中成为一种非常有用的工具,并明显降低了术后并发症的发生。多数情况下,角膜环植入术都能有效矫正早、中期圆锥角膜,并对不能佩戴角膜接触镜,而需要进行角膜移植的患者,可提供另外一种选择。最关键在于它保持了角膜中央的透明。但随着疾病

的加重,角膜环植入术也不能矫正圆锥角膜,而不得不进行角膜移植。

3 角膜移植

角膜移植亦称为全层角膜移植术 (penetrating keratoplasty),是严重圆锥角膜和角膜中央瘢痕的标准治疗方法。角膜移植治疗圆锥角膜可取得非常好的效果,手术成功率高达 95% 以上^[7-8],并且随着设备的改进,如飞秒激光的使用,还有望进一步提高。常见的并发症主要有移植排斥,眼内组织如虹膜、晶状体的损伤,术后散光,术后再次出现圆锥角膜^[9]。近年来,由于治疗技术的改进,这些并发症明显减少。但术后患者仍需佩戴角膜接触镜,以矫正残留的近视和散光。

4 深层角膜板层移植术

如果患者的角膜内层组织健康,如内皮层和后弹力层,往往采用深层角膜板层移植术治疗圆锥角膜^[10]。与全层角膜移植术不同,仅角膜的外层即上皮层和基质层被移植替代,而后弹力层和内皮细胞层仍完全保留。这种术式有利于减少移植术后并发症的发生。但该术式手术时间长,在上皮层和基质层的去除过程中,尽量减少对后弹力层的损伤而使手术难度加大,移植界面瘢痕化的形成也容易造成患者术后视力的低下^[11]。

5 核黄素促进角膜胶原交联

目前认为,圆锥角膜硬度下降是因为基质层胶原纤维组成的网状结构交联下降引起^[1]。核黄素的使用可促进角膜胶原交联增加,而减缓甚至阻止圆锥角膜的发展^[12-13]。通过使用光敏剂核黄素并紫外线照射 30 min 可增加胶原交联。当核黄素被活化,可产生氧自由基,通过光聚合作用,增加胶原纤维的交联,而使得角膜硬度恢复。胶原纤维的交联仅局限于 250 μm 以内角膜深度,这主要是由于核黄素对紫外线射线的快速吸收所造成^[14]。这种局限性反而增加了该治疗方式的优越性,因为其更有利于保护角膜内皮细胞和深层眼内结构,如晶状体及视网膜免受紫外线损伤。但治疗中为了防止核黄素在角膜上皮层中的扩散而降低治疗效果,往往需要去除角膜上皮,这使得患者术后 1 周内视物模糊和疼痛都无法避免。