

· 短篇论著 ·

甲型 H1N1 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的优化及应用

李永利 刘立明 廖华芳 王雪飞 王海滨

【摘要】 目的 优化甲型流感病毒核酸提取步骤和 RT-PCR 反应液组成,提高 RT-PCR 荧光检测敏感性、缩短报告时间。方法 优化 QIAamp Viral RNA mini Kit 核酸提取操作步骤,对核酸裂解液处理后的样本进行两次层析柱过滤,核酸洗脱由试剂盒的室温环境改为 72 °C 温育 5 min 后离心洗脱,荧光 RT-PCR 反应液采用 SuperScript III Platinum qRT-PCR 系统优化,RT-PCR 扩增程序修改如下: RT 反应为 50 °C, 10 min, 然后 95 °C, 5 min 破坏逆转录酶,继后为 45 个循环的 95 °C, 15 s 变性和 60 °C, 30 s 复性和延伸。结果 优化的甲型流感病毒核酸提取方法与 QIAamp Viral RNA 试剂盒方法获得的核酸 Ct 值基本一致,但低病毒含量样本的核酸提取效率明显高于未优化方法[优化方法 Ct 值(27.3, 32.2, 39.4),未优化方法 Ct 值(27.6, 32.7, 40.6)]。同一核酸在优化荧光 RT-PCR 扩增试剂的 Ct 值(25.0, 30.5, 35.6),扩增时间 1 h 10 min;明显优于配发试剂(27.3, 32.5, 40.1),扩增时间 2 h 25 min。结论 优化后的甲型 H1N1 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法,无论是核酸提取还是荧光 PCR 扩增,其敏感性均明显得到提升,报告时间明显缩短。

【关键词】 流感病毒 A 型, H1N1 亚型; 逆转录聚合酶链反应; 优化

为有效预防和控制甲型 H1N1 流感疫情在我国的流行,国家已将甲型 H1N1 流感纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病^[1],并将 H1N1 核酸检测定为疫情控制、疾病确诊和痊愈出院的标准。因此,如何进行既快又准的核酸检测便成为临床检验工作的重点和难点。2009 年全年我实验室共检测 H1N1 核酸标本 15 750 份(大约北京市 1/4 检测量),总结工作经验,作者根据病毒 RNA 提取的原理和不同逆转录酶的特点,优化了甲型流感病毒核酸提取步骤和 RT-PCR 荧光检测试剂与扩增程序。在显著提高检测敏感性的同时,还将批量检测的时间缩短了接近一半,为临床快速应对甲型 H1N1 流感的诊疗提供有力保障并争取时间。本文将对优化的细节和工作中的操作要点进行描述,以对相关经验进行交流。

一、材料与方法

1. 咽拭子样本处理:将收到的咽拭子冷冻保存,对冻存的样本需彻底融化到室温方可进行操作。检查样本管封闭完好后,在漩涡振荡器震荡混匀,然后 6000 g 离心 1 min,不取出咽拭子直接取样检测。

2. 核酸提取试剂配制:按说明书配制裂解液和洗涤液(AW1 和 AW2),配制好的裂解液和洗涤液直接放置在室温保存,配制后的裂解液和洗涤液 A(Buffer AW1)如果因环境寒冷而凝集则需在 72 °C 彻底融化后使用。

3. 病毒核酸裂解:在 1.5 ml 的已编号离心管中加入 300 μl 准备好的核酸裂解液(Buffer AVL),分别加入 100 μl 已处理的咽拭子样本,在裂解液中吹打 3~5 次混匀,室温放置 10 min,加入无水乙醇 300 μl,封盖颠倒混匀 3~5 次,轻轻甩下盖上的液滴,直接开盖将样本全部倒入层析柱中,残留大约 30~50 μl 左右的样品可忽略不计,将层析柱的系带朝向离心机的下方,6000 g 离心 1 min。将收集管中滤过的裂解液倒回层析柱中再次过柱,6000 g 离心 1 min。

4. 核酸洗涤:更换新的套管,按离心管相同的方向将层析柱放入离心机,打开层析柱盖,直接在离心机中小心加入洗涤液 A(Buffer AW1),6000 g 离心 1 min。加洗涤液使用的 1 ml 吸头应将其尖部剪去,以保证在离心机上加样时无洗涤液的洒落。更换套管后,采用同样的方法加入洗涤液 B(Buffer AW1),6000 g 离心 1 min。

5. 核酸洗脱:洗涤后,将层析柱的套管换成 1.5 ml 的离心管,加入 50 μl 的 AVE 洗脱液,盖上层析柱盖,放置 72 °C 温育 5 min,6000 g 离心 1 min。上清液即为提取的流感病毒 RNA。

6. 荧光 PCR 扩增:(1) CDC 推荐方法:将配发的引物、探针、扩增缓冲液和酶等组分按要求配制,PCR 扩增程序如下:65 °C, 5 min;42 °C, 30 min;95 °C, 15 min 变性后进行 95 °C, 30 s;60 °C, 60 s 扩增 45 个循环。(2) 优化方法:将配发的引物、探针分别采用 SuperScript III Platinum qRT-PCR 缓冲液系统进行配制,扩增程序如下:50 °C, 10 min;95 °C, 5 min,变性后进行 95 °C, 15 s;60 °C, 30 s 扩增 45 个循环。(3) 荧光阈值(Ct 值)的判断:按照 PCR 扩增曲线最高荧光值的 5% 设定为基线,计算 Ct 值。

7. 对比试验:取高、中、低拷贝的阳性患者咽拭子作为对比试验样本,采用 QIAamp Viral RNA mini Kit 标准方法和本文优化的方法提取核酸,同时采用优化的试剂和北京市 CDC 配发的试剂进行扩增,然后进行灵敏性分析。

8. 统计分析:计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 优化方法与标准方法提取核酸的效率对比:取高、中、低不同含量的 H1N1 阳性患者样本,采用优化方法和标准 QIAamp Viral RNA mini Kit 要求的方法提取核酸。以北京市 CDC 配发的试剂对其进行 RT-PCR 扩增,结果显示,优化方法提取的核酸扩增 Ct 值(27.3, 32.2, 39.4)明显优于未优化方法(27.6, 32.7, 40.6),特别是低病毒含量的样本最为显著(图 1)。

2. 优化试剂对两种方法提取的核酸进行荧光 RT-PCR 扩增的对比:采用 SuperScript III Platinum qRT-PCR 缓冲液系统配制试剂。对两种方法提取的核酸进行荧光 PCR 扩增,结果表明:优化的试剂逆转录只需要 10 min,整个扩增时间只需要 1.5 h,而扩增的敏感性明显优于配发试剂,并且两种方法提取的核酸,在不同病毒含量的咽拭子样本其扩增的 Ct 值基本一致(图 2)。

3. 优化试剂与配发试剂扩增灵敏度的比较:在同一浓度的核酸样本,优化试剂的荧光 PCR 扩增 Ct 值比配发试剂大约早 2~4 个 Ct 值,二者比较差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。特别是低拷贝样本,表明优化的试剂具有较高的敏感性。

表 1 优化试剂与配发试剂扩增灵敏性的比较($\bar{x} \pm s$)

不同 H1N1 拷贝样本	优化试剂 Ct 值	配发试剂 Ct 值
高	25.0 \pm 0.6	27.3 \pm 0.4 ^a
中	30.5 \pm 0.2	32.5 \pm 0.6 ^a
低	35.6 \pm 0.3	40.1 \pm 0.8 ^a

注:与优化试剂比较,^a $P < 0.01$

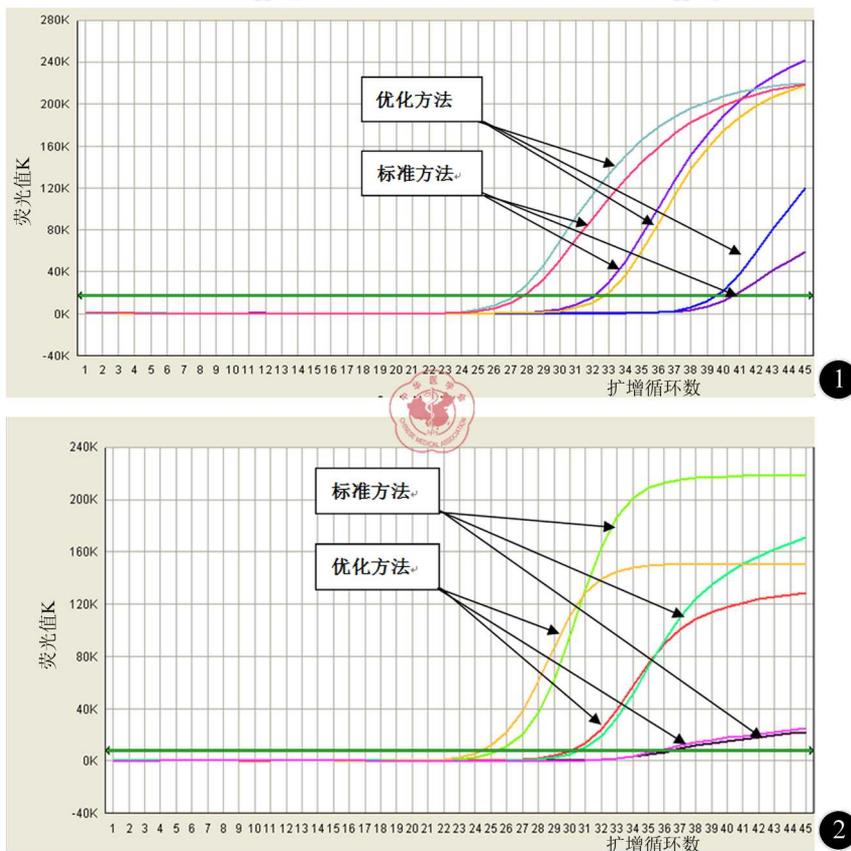


图 1 不同核酸提取方法高、中、低拷贝 H1N1 核酸对比 图 2 优化试剂对不同核酸提取方法灵敏性的比较

4. 两种方法检测时间比较:同一个操作人员采用优化核酸提取方法与 PCR 扩增试剂和常规工作方法检测 10 个咽拭子样本,前者报告时间为 1 h 10 min,后者为 2 h 25 min。

三、讨论

甲型 H1N1 流感的病原体是变异后的新型甲型 H1N1 流感病毒。该毒株包含有猪流感、禽流感和人流感 3 种流感病毒的基因片段,可以在人间传播^[2-3]。早发现、早诊断、早隔离和早治疗是预防和控制甲型 H1N1 流感的重要环节。自 2009 年 6 月

到12月,北京市推荐采用 QIAamp Viral RNA mini Kit 核酸提取试剂提取咽拭子甲型 H1N1 流感病毒核酸,使用统一配发的 PCR 缓冲系统和引物探针进行荧光 PCR 检测。标准的甲型 H1N1 流感病毒 RNA 核酸扩增过程费时费力,对逐日增加的样本量,难以实现当日报告的需求。此外,在影响检测质量的环节中,如果所取咽拭子不能在采样液中充分混匀,将大大增加假阴性结果发生的概率,如果采用将咽拭子取出在取样液中反复混匀的操作方法,将会增加样本间污染的机会并且费时费力。因此,对检测流程进行科学规范,并对操作试剂进行简化和改进,在提高敏感性的同时,尽可能缩短检测时间,从而满足社会需求。为此我们根据研究进展^[4-11]在下列几点作了重要改进和优化:(1)样本预处理:先封闭振荡混匀,再离心。确保咽拭子和取样液完全混匀,避免假阴性和加样所致的样本间污染。(2)核酸提取步骤增加了“核酸裂解液处理后的样本进行两次层析柱滤过”和“核酸洗脱过程由试剂盒的室温环境改为 72 °C 温育 5 min 后离心洗脱”两个步骤,是提高核酸得率的重要环节。(3)样本洗脱等操作过程全部在离心机中进行,减少操作中间环节和样本间交叉污染的机会。(4)采用高效逆转录酶 Super-Script III Platinum 和相应的 One-Step qRT-PCR 缓冲液系统配制 PCR 反应液,逆转录时间只需 10 min,整个扩增过程比传统 RT-PCR 扩增程序节省 40% 左右的时间,大大缩短了临床报告的时间,并且其敏感性显著提升。不足之处是试剂的成本稍高。

在结果分析方面,荧光阈值除了常规按照平均荧光值的 5% 制定外,对弱阳性的样本应结合阴性对照单独分析其荧光 PCR 曲线,具备以下条件者应视为阳性:(1)样本的荧光 PCR 曲线应呈典型 S 型指数增长特点;(2)荧光 PCR 曲线与阈值线交接的 Ct 值小于总扩增循环数的 10% (<40.5)。如果样本的 Ct 值介于 5% ~ 10% (42.5 ~ 40.5) 之间,应视为阳性可疑样本。建议同一份样本复查或重新采样再测。

改进和优化的甲型 H1N1 操作方法和检测系统,不但缩短了报告时间,更重要的是显著提升了检测的敏感性,尤其是低病毒含量的样本,这对临床诊疗和疫情的处理显得尤为重要。对具体操作细节的规范,对全面提高检测质量至关重要,本文的创新性一般,但实用性和可操作性较强,并具有重要的社会推广价值。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 甲型 H1N1 流感诊疗方案(2009 年试行版第 1 版). 2009.
- [2] Chidlow G, Harnett G, Williams S, et al. Duplex real-time RT-PCR assays for the rapid detection and identification of pandemic (H1N1) 2009 and seasonal influenza viruses A/H1, A/H3 and B. J Clin Microbiol, 2010, 48:862-866.
- [3] Gimeno C, Navarro D. Real-time reverse-transcription PCR in the diagnosis of influenza A (H1N1) v in intensive care unit adult patients. Crit Care, 2009, 7, 13:428.
- [4] Cao B, Li XW, Mao Y, et al. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. National Influenza A Pandemic (H1N1) 2009 Clinical Investigation Group of China. N Engl J Med, 2009, 361:2507-2517.
- [5] 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 Mol Diagn, 2010, 12:74-81.
- [6] Karre T, Maguire HF, Butcher D, et al. Comparison of becton dickinson directigen EZ Flu A + B test against the CDC real-time PCR assay for detection of 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus. J Clin Microbiol, 2010, 48:343-344.
- [7] Dong H, Zhang Y, Xiong H, et al. Detection of human novel influenza A (H1N1) viruses using multi-fluorescent real-time RT-PCR. Virus Res, 2010, 147:85-90.
- [8] Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. J Virol Methods, 2010, 163:495-497.
- [9] Shu B, Wu KH, Emery S, et al. Design and performance of the CDC Real-time RT-PCR swine flu panel for detection of 2009 A (H1N1) pandemic influenza virus. J Clin Microbiol, 2011, 49:2614-2619.
- [10] Wong S, Pabbaraju K, Wong A, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for detection of resistance to oseltamivir in influenza A pandemic (H1N1) 2009 virus using single nucleotide polymorphism probes. J Virol Methods, 2011, 173:259-265.
- [11] Hatano B, Goto M, Fukumoto H, et al. Mobile and accurate detection system for infection by the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus with a pocket-warmer reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification. J Med Virol, 2011, 83:568-573.

(收稿日期:2011-03-31)

(本文编辑:戚红丹)