

重程度有关,疾病暴发或晚期时 PLR 可显著升高,但本研究纳入的例数较少,且为单中心研究,更可信的结果有待大样本的多中心研究证实。

综上所述, MG 患者的 NLR 和 PLR 均显著升高, NLR 的诊断价值更高, PLR 可能与疾病严重程度有关。

参考文献:

[1] Suliman MARM, Juma AAB, Almadhani AAA, et al. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in outcomes of patients with acute coronary syndrome [J]. Arch Med Res, 2010, 41(8): 618-622.

[2] Kemal Y, Yucel I, Ekiz K, et al. Elevated serum neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios could be useful in lung cancer diagnosis [J]. Asian Pac J Cancer Prey, 2014, 15(6): 2651-2654.

[3] 中国免疫学会神经免疫学分会, 中华医学会神经病学分会神经免疫学组. 重症肌无力诊断和治疗中国专家共识[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2012, 19(6): 401-408.

Neuroimmunology Branch of Chinese Society of Immunology, Neuroimmunology Group, Neurology Society, Chinese Medical Association. Diagnosis and treatment of myasthenia gravis, an expert consensus in China[J]. Chinese Journal of Neuroimmunology and Neurology, 2012, 19(6): 401-408.

[4] 徐祖龙, 董苏荣, 张亚明. WBC, CRP 和 ESR 联合检测在肺炎支原体肺炎中的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(1): 153-155.

Xu ZL, Dong SR, Zhang YM. Significance of combining with WBC, CRP and ESR detection in patients

with *mycoplasma pneumoniae* pneumonia[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(1): 153-155.

[5] Azab B, Jaglall N, Atallah JP, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of adverse outcomes of acute pancreatitis[J]. Pancreatolgy, 2011, 11(4): 445-452.

[6] Hu ZD, Sun Y, Guo J, et al. Red blood cell distribution width and neutrophil/lymphocyte ratio are positively correlated with disease activity in primary Sjögren's syndrome[J]. Clin Biochem, 2014, 47(18): 287-290.

[7] Celikbilek M, Dogan S, Ozbakir O, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio as a predictor of disease severity in ulcerative colitis[J]. J Clin Lab Anal, 2013, 27(1): 72-76.

[8] Polat M, Senol T, Ozkaya E, et al. Neutrophil to lymphocyte and platelet to lymphocyte ratios increase in ovarian tumors in the presence of frank stromal invasion[J]. Clin Transl Oncol, 2015; Epub Ahead of Print.

[9] Fan W, Zhang Y, Wang Y, et al. Neutrophil-to-lymphocyte and platelet-to-lymphocyte ratios as predictors of survival and metastasis for recurrent hepatocellular carcinoma after transarterial chemoembolization[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0119312.

[10] Fu H, Qin B, Hu Z, et al. Neutrophil- and platelet-to-lymphocyte ratios are correlated with disease activity in rheumatoid arthritis[J]. Clin Lab, 2015, 61(3/4): 269-273.

收稿日期: 2015-09-24

修回日期: 2015-10-16

流感病毒分子检测技术的研究进展\*

刘 华, 陈 宇 (南京军区福州总医院第二住院部, 福州 350003)

摘要: 流感病毒在自然环境的不断流行与重组, 持续威胁着人类的生存与发展。近些年来, 流感的频繁暴发促使流感病毒检测领域的研究成为热点。分子生物学检测方法, 相较传统的分离培养法与免疫学检测方法, 具有更加灵敏、特异、快速等特点, 逐渐成为了当前流感病毒检测方法的主要研究方向。该文就近年来流感病毒分子生物检测技术的研究进展进行综述, 以期对临床上流感病毒快速诊断提供一定的理论依据。

关键词: 流感病毒; 分子生物学; 检测技术

中图分类号: R373. 13; R446 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2016)01-068-03

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-7414. 2016. 01. 019

Research Progress on Molecular Detection Technology of Influenza Virus

LIU Hua, CHEN Yu (Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Second in Patient Department, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Influenza viruses are global epidemic and diversely difficult to distinguish, which threaten human's survival and development very much. In recent years, the frequent outbreaks of influenza prompt the rapid development of Influenza virus detection. Compare with the traditional isolated culture and immunological detection, molecular diagnostic technology is of high detection speed, high sensitivity and specificity, that gradually play an important role in the current Influenza virus detection. In order to provide a theoretical basis for the rapid diagnosis of Influenza virus in the clinic, the article summarize the update progress of molecular biology and diagnostic techniques of Influenza viruses.

Keywords: influenza viruses; molecular biology; detection technology

\* 作者简介: 刘 华(1963—), 女, 本科, 副主任技师, 副院长, 从事医院管理、院感防控工作, E-mail: liuhua63@21cn. com。

通讯作者: 陈 宇, 检验师, E-mail: ayuchen@163. com。

流行性感冒,简称流感,是由流感病毒感染引起的急性呼吸道传染病,人群普遍易感。该病症状可累及全身,主要表现为急性高热、全身疼痛、显著乏力和轻度的呼吸道症状,可引起严重的并发症导致死亡。流感属于乙类传染性,其致病因子流感病毒属于正黏病毒科,核酸种类为RNA<sup>[1]</sup>。根据病毒的核蛋白及基质蛋白的基因特性和抗原性将流感病毒分为甲型(A)、乙型(B)和丙型(C)三种血清型。其中,甲型和乙型流感病毒可引起人群中季节性的流行,甚至是世界范围的大流行,引起全球范围的关注。甲型流感病毒的传染性、致病性和变异性都明显高于其他两种血清型。因此,对甲型流感病毒的关注和研究明显多于其他两种。国家卫计委公布的流感病毒的检测方法包括分离培养法、免疫学检测与核酸检测等。我国大部分的临床实验室达不到重大传染病病毒分离培养要求,因而临床实验室诊断通常采用免疫学检测与核酸检测法<sup>[2]</sup>。而经典的免疫学检测实验一般指中和试验、补体结合试验与血凝-血凝抑制试验等,其操作费时且敏感性较差<sup>[3]</sup>。因此,核酸检测是业内公认灵敏度和特异度最好的一种检测方法。本文主要对近年来流感病毒的核酸检测的新技术和新进展进行分析和总结,以期对临床上流感病毒快速诊断提供一定的理论依据。

**1 流感病毒的诊断和分型** 流感病毒的核酸检测可以检测早期感染的病人,可在短时间内大量扩增流感病毒基因序列的保守区,达到早期诊断的目的。随着越来越多的流感病毒亚型的出现,针对单一亚型的检测方法也成为实验室检测的重要组成部分。在PCR原理的基础上,先后建立了多种PCR相关检测方法,最常用的如逆转录PCR(RT-PCR),实时荧光PCR等以及新型的环介导-等温扩增技术(RT-LAMP)技术。

**1.1 RT-PCR** RT-PCR技术是最早应用于流感病毒核酸检测的技术。其检测原理是根据流感病毒保守的M基因或NP基因设计特异性引物,以逆转录后的cDNA为模板进行扩增,通过对扩增产物进行电泳或测序进行病原学上的诊断。针对流感病毒每个不同的亚型设计不同的特异性扩增引物即可对流感病毒进行亚型的鉴定。为了对流感病毒的扩增产物进行快速的鉴别和诊断,韩国学者Kim等<sup>[4]</sup>在RT-PCR的基础上,对不同的扩增引物进行末端修饰,再将修饰物抗体固定于检测板中不同的位置,通过扩增产物在显色板上的层析和抗原抗体的特异性结合,对不同的扩增产物进行显色,可以同时流感病毒的种(M基因)和亚型(H1,H3和H5)进行鉴定。

**1.2 实时荧光定量PCR** 为了避免RT-PCR需要开盖检测扩增产物的缺陷,实时荧光定量PCR在反应体系中加入荧光探针,可以对检测结果进行实时监测和定量。该方法目前普遍应用于实验室的流感病毒检测,多种商品化的国产检测试剂盒已经能达到良好的灵敏度和特异度。在该方法的基础上,通过引物的严格筛选和比对,可以实现对一些流感病毒的变异株进行快速的鉴别和诊断,以适应新型流感病毒的监测。Wong等<sup>[5]</sup>就建立了一种用于检测人感染禽流感H7N9变异株(HA Q226L和PB2 E627K)的实时荧光定量PCR的快速检测方法。该方法所用的引物对人感染禽流感H7N9变异株的HA基因特异,而对其他8种H7亚型和阴性对照病毒株的检测阴性。由于流感病毒较易发生基因变异,使得常规检测方法的灵敏度下降。台湾学者Yang等<sup>[6]</sup>就发现了一些变异位点存在于实时荧光定量PCR扩增引物或者探针引物区,导致引物错配使得检测

的灵敏度下降。而通过对扩增引物或者探针引物的改良,可以克服这个问题。Monavari等<sup>[7]</sup>通过对引物的严格设计和筛查,建立一种同时监测甲型流感、乙型流感和禽流感的实时荧光定量PCR的方法,并且这些引物在这三种病毒中无交叉结合。

**1.3 RT-LAMP技术** 环介导-等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是日本Notomi等<sup>[8]</sup>在2000年报道的一种新的核酸扩增技术。在流感病毒的应用中,需要先对其核酸RNA进行逆转录,即为RT-LAMP。随后利用2对特殊引物和由置换活性的Bst DNA聚合酶,使反应中在模板两端引物结合处循环出现环状单链结果,在等温条件下使引物顺利与模板结合并进行链置换扩增反应。与传统的扩增技术相比,该技术扩增的特异性更强,反应过程只需要1~2 h,反应结束后只需要进行浊度测定或者加入核酸染色剂后进行目测即可判断结果。因此,该技术有望成为未来流感病毒检测应用最广泛的技术之一。Imai等<sup>[9]</sup>建立了一种检测H5亚型的RT-LAMP检测方法,用来快速检测禽流感的H5亚型。该方法快速,检测灵敏度比传统一步法RT-PCR的灵敏度高出100倍。对15种HA亚型的扩增结果显示只有H5亚型才能扩增。Shigemoto等<sup>[10]</sup>建立了一种快速检测新型猪甲型流感病毒H1N1和季节性流感病毒(H1N1和H3N2)的RT-LAMP方法。所设计的引物针对新型H1N1,季节性H1N1,H3N2的HA基因。整个反应过程只需要在63℃反应40 min即可。由于在反应体系中加入铬黑T核酸染色剂作为扩增指示剂,因此反应结束后直接目测即可判断结果。LAMP方法也可以设计成多重检测的体系,Mahony等<sup>[11]</sup>就设计了一种同时检测甲型流感H1,H3以及乙型流感病毒的方法。该方法设计6对引物,分别靶向甲型H1和H3的M基因,以及乙型的NS1基因。该方法可以直接使用商品化的PCR反应试剂和实时荧光检测仪。扩增时间只需要12 min而全过程从标本到结果也只需要30 min。

**2 流感病毒的高通量检测** 由于流感病毒具有16种HA亚型和9种NA亚型,在流感流行中,需要对流行株鉴定到亚型,而上述的PCR方法在对多种亚型进行分型时,仍受通量的限制。

**2.1 基因芯片** 由于流感病毒亚型众多,病毒来源种类多,目前的检测技术无法对其在一次检测中做到准确的分型。而基因芯片技术(Microarray)具有强大的高通量检测能力,通过将多种特异的探针引物固化于支持物的表面,然后与标记的扩增产物进行杂交,通过检测杂交信号的强弱来实现对样品的快速和高效诊断。该技术能实现在一个芯片上同时检测各种亚型,不需要分别对各个亚型进行检测。根据所制备的基因芯片上的探针的多少,基因芯片的检测能力各不同。王斗<sup>[12]</sup>建立了一种可以检测常见流感病毒分型的基因芯片,该芯片主要针对甲型流感、乙型流感、甲型H1N1、季节性H1N1和季节性H3N2等5种流感病毒。而田明尧<sup>[13]</sup>构建了一种能同时检测流感病毒及甲型流感病毒的16种HA亚型的基因芯片。该芯片包含了甲型流感病毒M基因,乙型流感病毒M基因和16种甲型HA基因共18种基因。通过在美国国家生物技术信息中心(NCBI)上选择具有代表性的上述18种基因序列各10株,分析比对各异的同源性,并选择在10株病毒株中基因序列一致的作为扩增引物和探针引物。将设计的18种探针引物进行化学修饰后固化于基片上。使用上述18种扩增引物对待测样品进行分管的多重PCR扩增,将扩增产物与基片上的

探针进行杂交,根据杂交信号的强弱进行判断。该基因芯片对保存确诊的 H1N1 亚型 3 株, H3N2 亚型 3 株, H9N2 禽源分离株 8 株, H5N1 亚型 4 株进行回顾性检测, 均能准确检测出来。

### 3 流感病毒微小变异的检测

**3.1 单链构象多态性的检测** 尽管流感病毒检测的方法已经很成熟, 但是有些微小变异的检测也是有必要, 因为单个核苷酸的变异都有可能导致治疗上的耐药。而单链构象多态性的检测使这一检测成为可能。单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 的检测原理是, 双链 DNA 若存在单个核苷酸的差异, 在电泳中也不一定能够区分出来; 但是, 当双链 DNA 变性为单链 DNA 后, 单链 DNA 会有一个三维结构上的折叠, 不同的单链核苷酸序列, 其三维结构上折叠的构象也不同。而不同构象的单链 DNA 在凝胶电泳中的迁移率不同, 即使其核苷酸的数目是一致的。而 MSSCP (multitemperature single strand conformation polymorphism) 通过逐步降低温度, 筛选出不同组分得到分离的最佳温度, 因此比传统的 SSCP 在分离单链核苷酸上具有更高的灵敏度和可重复性。Lep-ek 等<sup>[14]</sup>发现该方法可以识别 H1N1 的不同分离株, 发现不同分离株之间的微小变异。这些微小变异是其它常规检测方法识别不出来的。病毒的混合感染常常引起基因组之间的重排。Paiaak 等<sup>[15]</sup>用 MSSCP 的方法分析了波兰 2009 年甲型 H1N1 阳性的 23 例临床标本。标本先进行扩增, 扩增产物在 15℃~10℃~5℃电泳中形成条带, 最后进行银染。结果发现, 大部分标本分离出来的基因条带属于甲型 H1N1。然而, 在这些标本中, 有 4 个标本含有属于季节性 H1N1 的基因条带, 提示存在混合感染。MSSCP 能将甲型 H1N1 和季节性 H1N1 的 ssDNA 分开, 通过胶回收再扩增后测序, 可以得出一些 ssDNA 条带含有甲型 H1N1, 而另一些条带含有季节性特异的 HA 基因序列。

**4 小结与展望** 流感病毒是能引起全球流行的传染病, 历史上曾经发生过多次的全球大范围的流行, 给人类带来了巨大的生命和健康的威胁。至今, 全球化的流感病毒的监测和检测成为流感病毒防控的重要过程。由于流感病毒的种类来源广泛、分离株的地理分布遍布全球, 而其流行的亚型的变异频繁, 这使得流感病毒的诊断、亚型的鉴定和变异的检测带来了巨大的挑战。因此建立检测速度快、特异度与灵敏度高的流感病毒检测方法体系, 显得尤为重要。目前人类已经研究出了多种可以检测流感病毒的检测方法, 研究表明分子检测技术是检测灵敏度、特异度和效率最高的方法, 相对传统检测方法, 在临床上具有非常明显的优势。从当前来看, 流感病毒的检测已进入分子诊断的新时代, 许多新技术应运而生, 在临床实践中具有广泛的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 候文郁, 李焱, 黄银娟, 等. 西安地区 2009~2012 年流行性感冒监测结果分析[J]. 现代医学检验杂志, 2014, 29(4): 139-141.  
Hou WY, Li Y, Huang YJ, et al. Survey of the epidemic characteristics of influenza in Xi'an from 2009 to 2012[J]. J Mod Lab Med, 2014, 29(4): 139-141.
- [2] 苏明权, 杨柳, 马越云, 等. 甲型 H1N1 流感病毒临床实验室诊断策略[J]. 现代医学检验杂志, 2011, 26(2): 19-22.  
Su MQ, Yang L, Ma YY, et al. Clinical laboratory diagnostic strategies of influenza A/H1N1 virus[J]. J

Mod Lab Med, 2011, 26(2): 19-22.

- [3] Brittain-long R, Nord S, Olofsson S, et al. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections[J]. J Clin Virol, 2008, 41(1): 53-56.
- [4] Kim YT, Jung JH, Choi YK, et al. A packaged paper fluidic-based microdevice for detecting gene expression of influenza A virus [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 61: 485-490.
- [5] Wong CK, Zhu H, Li OT, et al. Molecular detection of human H7N9 influenza A virus causing outbreaks in China[J]. Clin Chem, 2013, 59(7): 1062-1067.
- [6] Yang JR, Kuo CY, Huang HY, et al. Newly emerging mutations in the matrix genes of the human influenza A (H1N1) pdm09 and A (H3N2) viruses reduce the detection sensitivity of real-time reverse transcription-PCR[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 76-82.
- [7] Monavari SH, Mollaie HR, Fazlalipour M. Simultaneous detection of influenza viruses A, B, and swine origin influenza A using multiplex one-step real-time RT-PCR assay[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(2): 984-992.
- [8] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [9] Imai M, Ninomiya A, Minekawa H, et al. Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection[J]. Vaccine, 2006, 24(44/46): 6679-6682.
- [10] Shigemoto N, Fukuda S, Takao S, et al. Rapid detection of novel influenza A virus and seasonal influenza A (H1N1, H3N2) viruses by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. Kansenshogaku Zasshi, 2010, 84(4): 431-436.
- [11] Mahony J, Chong S, Bulir D, et al. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity[J]. J Clin Virol, 2013, 58(1): 127-131.
- [12] 王斗. 常见流感病毒分型基因芯片检测方法的建立和应用[D]. 北京: 北京工业大学, 2013.  
Wang D. Development of visual DNA microarray for subtyping influenza virus [D]. Beijing: Beijing University of Technology, 2013.
- [13] 田明尧. A 型流感病毒 16 种 HA 血清型 DNA 微阵列检测方法研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.  
Tian MY. Identification and subtyping of influenza viruses by DNA microarray [D]. Jilin: Jilin University, 2013.
- [14] Lepek K, Pajak B, Siedlecki P, et al. Genetic diversity of hemagglutinin gene of A (H1N1) pdm09 influenza strains isolated in Taiwan and its potential impact on HA-neutralizing epitope interaction[J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(3): 577-585.
- [15] Pajak B, Stefanska I, Lepek K, et al. Rapid differentiation of mixed influenza A/H1N1 virus infections with seasonal and pandemic variants by multitemperature single-stranded conformational polymorphism analysis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(6): 2216-2221.