

15 种呼吸道病原体的实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

方健, 王静宇, 宋海燕, 吴伟立, 刘波, 张骏飞, 陈唯军, 陈从新

[摘要] 目的 建立 15 种呼吸道常见病原体的实时荧光定量 PCR 检测方法, 用于新兵发热病因的快速检测。方法 根据生物信息学分析结果选定 15 种常见呼吸道病原体的检测靶基因, 建立实时荧光定量 PCR 方法。采用 15 种病原体的培养物和正常人的基因组对检测方法的敏感性和特异性进行测试, 并对健康和发热新兵各 50 例的咽拭子进行检测。结果 所建立的荧光定量 PCR 方法的有效检测线性范围为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$ 拷贝/ml, 最低检测限为 5~50 拷贝/ml, 敏感性和特异性均较高。在 50 例发热新兵咽拭子中, 24.0% 嗜肺军团菌阳性, 30.0% 乙型流感病毒阳性, 24.0% 肺炎支原体阳性, 8.0% 甲型流感病毒阳性。对照组上述病原的阳性率依次为 20.0%、6.0% ($P < 0.05$)、22.0% 和 0.0%, 而腺病毒、麻疹病毒、SARS 相关冠状病毒、人冠状病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒 H5N1、风疹病毒、猪链球菌、肺炎衣原体和肺炎链球菌均阴性。18 例 (36%) 流感病毒感染急性期血清 IgM 和 IgG 阳性率分别为 88.9% (16/18) 和 72.2% (13/18), 在恢复期则分别为 16.8% (3/18) 和 100% (18/18)。健康新兵的两次血清抗体检测无临床意义。在咽拭子嗜肺军团菌及肺炎支原体阳性个体, 发热期和恢复期血清抗体阳性率分别为 8.3% 和 8.3%、8.3% 和 16.7%。结论 成功建立可同时进行 15 种呼吸道病原体早期诊断的实时荧光定量 PCR 方法, 该方法检测结果表明此次新兵营集训新兵发热病因以流感病毒感染为主。

[关键词] 军事人员; 发热; 聚合酶链反应; 呼吸道感染

[中图分类号] R37

[文献标志码] A

[文章编号] 0577-7402(2010)10-1254-04

Establishment and application of real-time fluorescent quantitative PCR assay for detecting 15 species of respiratory pathogens

FANG Jian, WANG Jing-yu, SONG Hai-yan, WU Wei-li, LIU Bo, ZHANG Jun-fei, CHEN Wei-jun, CHEN Cong-xin*. Department of Infectious Disease, 105th Hospital, Heifei 230031, China

*Corresponding author, E-mail: congxinc@mail.hf.ah.cn

[Abstract] **Objective** To establish a real-time fluorescent quantitative PCR assay for rapid detection of 15 species of common respiratory pathogens in the recruits with fever. **Methods** A real-time fluorescent quantitative PCR assay was established with 15 species of respiratory pathogenic genes selected based on their relevant reference strains by bioinformatics analysis as target genes. The sensitivity and specificity of the assay was tested with the cultures of the 15 species of pathogens and the genome of normal person. The throat swabs and blood samples were collected for etiological study from 50 conscripts who were in acute stage of infection and with fever, and 50 conscripts who were in convalescent stage and without fever. **Results** The linear range of effective detection of the established PCR assay was $1 \times 10^2 - 1 \times 10^9$ copies/ml, the lowest detection limit was 5-50 copies/ml, both sensitivity and specificity were higher. Out of the 50 throat swabs from the recruits with fever, 12 (24%) were positive for *Legionella pneumophila*, 15 (30%) for influenza B virus, 12 (24%) for *Mycoplasma pneumoniae* and 4 (8%) for influenza A virus. The positive rates of *Legionella pneumophila*, influenza B virus, *Mycoplasma pneumoniae* and influenza A virus in control group were 20.0%, 6.0% ($P < 0.05$), 22.0% and 0.0%, respectively. The detection results were negative for adenovirus, measles virus, severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus, human coronavirus, epidemic mumps virus, human respiratory syncytial virus, influenza A virus H5N1, rubella virus, *Streptococcus suis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Streptococcus pneumoniae*. In the 18 cases (36%) infected with influenza A or B virus, the positive rates of serum IgM and IgG were 88.9% (16/18) and 72.2% (13/18) in febrile stage, and 16.7% (3/18) and 100% (18/18) in convalescence, respectively. While the two detection results of serum antibody in healthy recruits showed no clinical significance. In the individuals from whom the throat swabs were positive for *Legionella pneumophila*, the positive rate of serum antibody was 8.3% both in febrile stage and convalescence; while in the individuals, from whom the throat swabs were positive for *Mycoplasma pneumoniae*, the positive rates of serum antibody were 8.3% and 16.7%, respectively, in febrile stage and convalescence. **Conclusions** The real-time PCR assay for detecting 15 species of respiratory pathogens has been successfully established. It is shown that the main cause of outbreak of fever in conscripts is influenza viral infection.

[Key words] military personnel; fever; polymerase chain reaction; respiratory tract infections

[基金项目] 全军“十一五”医学科技攻关项目(2008G021)

[作者简介] 方健, 主任医师。主要从事公共卫生和医院管理研究

[作者单位] 230031 合肥 解放军 105 医院感染病科(方健, 宋海燕, 刘波, 张骏飞, 陈从新); 101300 北京 中国科学院北京基因研究所(王静宇, 吴伟立, 陈唯军)

[通讯作者] 陈从新, E-mail: congxinc@mail.hf.ah.cn

冬春季为呼吸道疾病发病高峰期, 2000 年以后的文献相继报道了大量不明原因的发热疫情¹⁻³。越来越多的实验致力于研究能同时检测多种病原体的实时荧光定量 PCR 方法, 但目前大部分仍以病毒检测为主, 很少同时兼顾细菌、支原体和衣原体⁴。在新兵训练营中, 上呼吸道感染仍是发热的主要病因, 本研究建

立并评价了可同时检测 15 种呼吸道病原体的实时荧光定量 PCR 法, 以用于新兵发热的病因学检测。

1 材料与方法

1.1 呼吸道分泌物及血液标本的收集 2008 年 12 月—2009 年 2 月合肥某教导大队新兵 215 例, 收集入营至其后 2 个月的军训中发热新兵 (发热组 50 例, 其中男 40 例, 女 10 例) 的咽拭子和外周静脉血。用 3ml 生理盐水中洗咽拭子, 冻存于 -40°C 冰箱备检。随机挑选在观察期间无发热及其他感染症状的健康士兵 100 名, 取外周血 2ml, 提取白细胞 DNA, 以检验所建方法的特异性。

1.2 病原体标准株 以下标准株由军事科学研究院和中国药品生物制品检定所赠送 (ATCC 标准株由以上两家单位引进), 包括: 甲型流感病毒 [influenza A virus/Guangzhou/555/2006 (H1N1)、influenza A virus/Guangdong/05/2005 (H3N2)、influenza A virus/Anhui/1/2005 (H5N1)], 乙型流感病毒 (influenza B virus/Jilin/20/2003), SARS 冠状病毒 (SARS CoV BJ01), 人冠状病毒 (hCoV) OC43 (ATCC VR-759), 风疹病毒 (RV) Gos, 腮腺炎病毒 SP, 呼吸道合胞病毒 (RSV, ATCC VR-26), 麻疹病毒 (MV) Changchun-47,

腺病毒 (ADV) 2 型 (ATCC VR-1079AS/RB), 肺炎支原体 (*M pneumoniae*, ATCC M129-B7), 肺炎衣原体 (*C pneumoniae*) TW-183, 肺炎军团菌 (*L pneumophila*, ATCC 43703), 肺炎链球菌 (*S pneumoniae*, ATCC 700669) 和猪链球菌 (*S. suis*) 05ZYH33。

1.3 DNA 和 RNA 的提取 取 140 μl 咽拭子或标准株培养液, 分别用 DNA (QIAGEN Plasmid Purification[®], Qiagen, 德国) 和 RNA (QIAamp viral RNA mini kit[®], Qiagen, 德国) 提取试剂盒提取 DNA 和 RNA, 置 -80°C 冻存备用。

1.4 引物及探针设计 根据生物信息学分析结果结合文献报道, 确定各种病原体检测的特异性靶基因。RSV、乙型流感病毒、RV、流行性腮腺炎病毒 (MSV)、MV、hCoV、SARS CoV 均选定 NP 基因; 甲型流感病毒选定 MP 基因和 HA 基因 (H5N1); ADV 选定 penton 基因; 肺炎衣原体选定外壳主蛋白 (ompA) 基因; 肺炎支原体选定 P1 cytoadhesin 基因; 嗜肺军团菌选定 mip 基因; 猪链球菌选定 epf 基因; 肺炎链球菌选定 lytA 基因。采用 Primer Express 3.0 (ABI) 和 Primer 3 Input 4.0 设计引物探针, 并在 NCBI 数据库中进行同源性比对。各检测引物探针名称、序列、扩增基因和扩增长度见表 1。

表 1 15 种病原体靶基因的引物与探针
Tab 1 Primers and probes of targeted genes of fifteen pathogens

病原体	引物和探针 (5'→3')	靶基因	产物(bp)
呼吸道合胞病毒	RSV-1: CCAACGGAGCACAGGAGATA RSV-2: TCCATGTGATGCTTGACGA RSV 探针: CCATTWGCYTTWACATGATATCCHGCA	NP	145
风疹病毒	RV-1: ACGCCGACGGAACA RV-2: TGTTGGTTGCCGGTGTAATTC RV 探针: AGGTCCAGGTCCCGCCGAC	NP	86
麻疹病毒	MV-1: ATGGTTGGATGTGTGAGGA MV-2: CCAGATTAGAGCCAACATGA MV 探针: AGGATTGCCGAGGACCTCTCTTACGC	NP	74
流行性腮腺炎病毒	MSV-1: TCAGATAGAACGCTGYGAGA MSV-2: AGCAAAGCATAGGCAGCAAT MSV 探针: ATTCCAAATGCACGCGCAATCTTAC	NP	108
甲型流感病毒	MP-1: AGTTGCATGGTCTCATATCAACA MP-2: TGCTGGGAATCAGCAATCTG MP 探针: TTTGGCCTRGTGTGTCCACTT	MP	101
乙型流感病毒	BV-1: TGATTGGCATTCAACAGATG BV-2: ACCTCCTTTGATYGCAACAC BV 探针: AAAGAGTTGGACTTGACCTTCAATTAAT	NP	149
嗜肺军团菌	LP-1: AAAGGCATGCAAGACGCTATG LP-2: TGCCATCAAACTTTCTGAAACTT LP 探针: TGGCCTCAATTGGCTTTAAACCGA	mip	147
肺炎衣原体	CPN-1: CGTGGAGCCTTATGGGAATG CPN-2: CAACCTTTAGGTTTGGACTGTGCAT CPN 探针: TTGTGCAACTTTGGAGCTGAATTC	ompA	76
肺炎链球菌	P-1: GATCGTGTCCGATGACTTA P-2: AATGTCTGGGGTCTTCCACT P 探针: CTGTTTTGCAAGTAGCGATAGCTTTCTCC	lytA	85
猪链球菌	SS-1: AAAACCGTGCAGCTGAAATC SS-2: CGGAATAACTGGTCTTGGT SS 探针: GCCGAGGCGCTGATGCTA	epf	71

(续 表)

病原体	引物和探针(5'→3')	靶基因	产物(bp)
甲型流感病毒(H5N1)	H5-1: GCA AACAACTCGACAGAGCA H5-2: GAGGAGCCATCCA GCTACAC H5 探针: CACA ACGGGA AGCTCTGCGATCT	HA	162
肺炎支原体	P1-1: GCAGTTGCTGCGCTAAGTT P1-2: AAGCGAGGTACGGTAGCGGTAT P1 探针: TGGTAGG AAC TCGT TTTAGCGGGTACC	P1	86
SARS 冠状病毒	S-1: AACCTCGCCA AAAA CGTAC S-2: AAGTCAGCCATGTTCCGAA S 探针 CGTCA CTCAAGCATTTGGGAGACG	NP	229
腺病毒	AD-1: CAACAAGTCAACGGATGTGG AD-2: CCGGCTGTAGTCATTGTTT AD 探针: ACGACCA CA GCAAC TTTC TA ACCA CGGT	Penton	92
人冠状病毒	CoV-1: A CAGCTGGTGCGTTTT TCTT CoV-2: GCCGTTATAGCGCAATT CAT CoV 探针: TGG GAGTCTGTACG AGCCTCAGA	NP	111

1.5 质粒标准品的构建 对上述提取的病原体基因组 DNA 或 RNA 进行扩增, 扩增产物克隆至 PMD19T 载体中, 转化至 DH-5 α 感受态细胞。采用蓝白斑和 PCR 筛选阳性克隆, 采用质粒提取试剂盒(TIANprep mini plasmid kit², TIANGEN, 中国)提取质粒, 并对阳性质粒进行测序, 检验插入片段序列是否正确。采用紫外分光光度计测定质粒浓度并计算其拷贝数, 已知浓度的质粒用 ddH₂O 按 10 倍系列稀释, 作为各病原体的标准品, 用于评价检测引物探针的敏感性、特异性和最低检出限, 并构建标准曲线。

1.6 实时荧光定量 PCR 的建立 采用 ABI 7300 荧光检测仪进行荧光定量 PCR 反应, 反应混合物配比如下: 2 \times Master Mix 10 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ l, 荧光探针 (10 μ mol/L) 0.25 μ l, 模板 2 μ l, 加入 ddH₂O 至总体积为 20 μ l。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 10min; 94 $^{\circ}$ C 15s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 40 个循环。建立每种质粒的标准曲线并获得每套引物探针系统的最低检出限。

1.7 临床标本检测

1.7.1 咽拭子检测 从 100 名健康士兵中选取 50 人, 列入对照组。采用实时荧光定量 PCR 法对咽拭子进行检测, 同时采用普通 PCR 法对本标本进行扩增。普通 PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 15s, 58 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并测序, 以验证前述实时荧光定量 PCR 的检测结果。

1.7.2 血清学检测 对照组新兵取入营和军训结束时, 发热组新兵取发热期和恢复期双份血清, 根据实时荧光定量 PCR 检测咽拭子的阳性结果选择检测相应病原体的试剂盒。抗嗜肺军团菌抗体采用间接免疫荧光法(德国 EUROIMMUN 公司, 4 型血清型)检测; 血清抗 MP-IgM 和 IgG 采用 ELISA 法(赛润试剂盒, 德国 Virion-Serion 公司)检测; 抗流感病毒抗体采用 ELISA 法检测。发热时血清 IgM 抗体阳性或恢复期血清 IgG 抗体滴度与发病时相比升高 4 倍者被认为是阳性, 而

IgM 阴性、IgG 阳性者视为曾经感染。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行分析, 率的比较行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时荧光定量 PCR 的建立 所建立的荧光定量 PCR 方法的有效检测线性范围为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^9$ 拷贝/ml, 最低检测限为 5 ~ 50 拷贝/ml, 与正常人基因组、15 种病原体及其他呼吸道病原体基因组之间均无交叉反应, 提示所建方法敏感性和特异性均较高, 符合临床检测要求。

2.2 病原体检测 经实时荧光定量 PCR 检测, 嗜肺军团菌、乙型流感病毒、肺炎支原体和甲型流感病毒的咽拭子为阳性(表 2)。在 14 例检出 2 种病原体的发热新兵中, 嗜肺军团菌与乙型流感病毒同时阳性者 5 例 (35.7%), 嗜肺军团菌与肺炎支原体同时阳性者 4 例 (28.6%), 嗜肺军团菌与甲型流感病毒同时阳性者 2 例 (14.3%), 乙型流感病毒和肺炎支原体同时阳性者 2 例 (14.3%), 乙型流感病毒与甲型流感病毒同时阳性者 1 例 (7.1%)。而腺病毒、麻疹病毒、SARS 冠状病毒、人冠状病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒 H5N1、风疹病毒、猪链球菌、肺炎衣原体和肺炎链球菌等均为阴性。

表 2 咽拭子检测病原体核酸阳性率比较(例(%))

Tab 2 Positive rates of pathogens detected with throat swab[cases(%)]

组 别	嗜肺军团菌	乙型流感病毒	肺炎支原体	甲型流感病毒
发热组(n=50)	12(24.0)	15(30.0) ⁽¹⁾	12(24.0)	4(8.0)
对照组(n=50)	10(20.0)	3(6.0)	11(22.0)	0(0.0)

注: 与对照组比较, (1) $P < 0.05$

2.3 PCR 扩增及测序验证 对上述检测为阳性的标

本再采用相应引物的 PCR 扩增, 结果与荧光定量 PCR 检测结果完全一致。对扩增产物进行测序, 并在 NCBI 数据库中核对, 也分别获得靶基因序列。

2.4 血清抗体检测结果 咽拭子检出的嗜肺军团菌和肺炎支原体核酸阳性个体, 发热期和恢复期血清抗体阳性率分别为 8.3% 和 8.3%、8.3% 和 16.7%; 发热组 18 例流感病毒感染患者发热时血清抗甲、乙型流感病毒 IgM 和 IgG 抗体的阳性率分别为 88.9% (16/18) 和 72.2% (13/18), 在恢复期则分别为 16.8% (3/18) 和 100% (18/18), 而在 50 例健康新兵入营时血清抗甲、乙型流感病毒 IgM 和 IgG 的阳性率分别 0% 和 8%, 而在军训结束时则分别为 0% 和 10%, 显著低于发热组 ($P < 0.01$)。

3 讨论

传统的诊断呼吸道感染的方法主要有病原体分离培养法和血清学检测法, 前者通常被认为是诊断的“金标准”, 但因细胞分离对培养技术的要求高, 耗时长, 不利于早期诊断; 血清学检测法虽方便易行, 但灵敏度或特异性不高, 而且由于窗口期的存在, 也无法在感染早期进行诊断。PCR 法可直接检测病原体核酸, 能在感染早期对疑似患者进行诊断。与普通 PCR 法比较, 实时荧光定量 PCR 法为闭管检测, 不仅避免了普通 PCR 需要电泳而造成的交叉污染, 同时因荧光探针法灵敏度高, 大大提高了病原体的检出率。本实验的目的是建立一种可以同时检测 15 种呼吸道常见及新型病原体早期诊断的实时荧光定量 PCR 法。

在病原体种类的选择上, 主要选择了文献报道的常见、青年人易患和一些新近发现的新型病原体^[5-7]。本组 50 例发热新兵中, 30% 为乙型流感病毒感染, 8% 为甲型流感病毒感染, 24% 个体携带嗜肺军团菌和肺炎支原体, 而腺病毒、MV、SARS COV、人冠状病毒、MSV、RSV、甲型流感病毒 H5N1、RV、猪链球菌、肺炎衣原体和肺炎链球菌检测均阴性。

在本实验中, 我们对部分靶基因较文献有所修改, 如人 ADV 共有 7 型 53 种 (AdA-F, AdI-53), 其中 hADV7 为主要致病病原体。如果选择种群特异性差的靶基因, 有可能出现亚群间的交叉阳性。目前报道中使用较多的是 hexon 基因和病毒相关 RNA 基因 (virus-associated RNA gene, VA-RNA)。但我们通过生物信息源性分析后认为, 使用 ADV penton 基因检测的特异性可能更强, 实际检测结果也非常满意。van de Pol 等^[8] 比较了实时荧光定量 PCR 法与病毒分离培养的检测效果, 在 267 份儿童和成年呼吸道标本中, 前者检出流感病毒和副流感病毒的阳性率分别为 43.0% 和 36.0%, 而后者只有 24.0% 和 3.5%, 说明荧光定量

PCR 为目前检测呼吸道病原体的有效方法。

检测嗜肺军团菌的常用靶基因为 5S rRNA 基因、mip 基因和 16S rRNA 基因。但有实验发现 5S rRNA 和 mip 基因的灵敏度和特异性相当, 均比 16S rRNA 基因高^[9]。因此, 我们采用 mip 检测, 经测序并结合血清学检测结果证实检测效率较高。此外, 本研究还发现实时荧光定量 PCR 法优于血清学检测。

本组发热新兵临床症状轻微, 预后良好, 外周血白细胞为 $6.0 \times 10^9 \sim 10.2 \times 10^9 / L$, 中性粒细胞为 0.70 ~ 0.88, X 线胸片表现为肺纹理增多, 均未见明显的浸润性改变, 给予头孢类抗生素治疗 3 ~ 5d 后症状消失出院。

本次检测发现入伍新兵中有上呼吸道携带嗜肺军团菌和肺炎支原体现象, 与正常人群的携带率相当^[10], 其意义还有待观察。

【参考文献】

- [1] Liu PY, Wang LC, Lin YH, *et al*. Outbreak of influenza A and B among military recruits: evidence from viral culture and polymerase chain reaction [J]. *J Microbiol Immunol Infect*. 2009, 42(2): 114-121
- [2] 方建, 宋海燕, 陈从新, 等. 一起肺炎支原体感染爆发的报告 [J]. *中华疾病控制杂志*. 2008, 12(4): 347-349
- [3] 赵海龙, 姜涛, 陈水平, 等. 重要呼吸道病毒病原的多重 RT-PCR 检测 [J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31(9): 890-892
- [4] Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, *et al*. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays [J]. *J Med Virol*. 2004, 72(3): 484-495
- [5] Bellau-Pujola S, Vabreta A, Legrand L, *et al*. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses [J]. *J Virol Methods*. 2005, 126(1-2): 53-63
- [6] Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, *et al*. Real-time detection of mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control [J]. *J Med Microbiol*. 2006, 55(2): 149-155
- [7] Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, *et al*. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children [J]. *J Clin Microbiol*. 2006, 44(7): 2382-2388
- [8] van de Pol AG, van Loon AM, Wolfs TF, *et al*. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms [J]. *J Clin Microbiol*. 2007, 45(7): 2260-2262
- [9] Diederer BM, de Jong CM, Mamouk F, *et al*. Evaluation of real-time PCR for the early detection of legionella pneumophila DNA in serum samples [J]. *J Med Microbiol*. 2007, 56(1): 94-101
- [10] McDonough EA, Metzgar D, Hansen CJ. A cluster of legionella-associated pneumonia cases in a population of military recruits [J]. *J Clin Microbiol*. 2007, 45(6): 2075-2077

(收稿日期: 2010-04-11; 修回日期: 2010-08-11)

(责任编辑: 熊晓然)