

I 型脊髓灰质炎野病毒实时荧光 RT-PCR 快速检测方法的评价

龚成 罗明 陈萌 张铁钢 张合润 王玉梅 李仁清 董梅 陈维新 陈丽娟

【摘要】 目的 评价和探讨 I 型脊髓灰质炎(脊灰)野病毒快速检测策略。方法 采集 671 名来自脊灰野病毒流行疫区的在京学生粪便标本,采用一组实时荧光 RT-PCR 代替标准方法分别进行肠道病毒通用型检测、脊灰病毒分型检测、I 型脊灰疫苗株和野毒株鉴别检测。并利用 I、II 和 III 型脊灰病毒标准株(Sabin 株)和 I 型野毒株对实时荧光 RT-PCR 和标准方法的灵敏度进行比较和评价。结果 (1)新脊灰病毒检测流程(肠道病毒通用型检测+脊灰病毒分型检测+脊灰野毒鉴别检测)检出非脊灰肠道病毒 33 例;脊灰病毒疫苗株 16 例,其中 I 型 5 例、II 型 1 例、III 型 3 例、I + II 型 1 例、I + III 型 4 例、I + II + III 型 2 例;脊灰病毒 I 型野毒株 3 例。(2)3 种实时荧光 RT-PCR 检测脊灰病毒比标准方法敏感 1 ~ 100 倍。其中肠道通用型检测和脊灰病毒分型检测 2 种方法对 II 型脊灰病毒疫苗株的检测,比标准方法敏感 100 倍;脊灰病毒分型检测能准确区分 I、II 和 III 型脊灰疫苗株,脊灰野毒株鉴别检测对 I 型疫苗株的检测比标准方法敏感 10 倍;3 种实时荧光 RT-PCR 均能有效检测出 I 型脊灰野毒株,比标准方法敏感 10 倍。结论 新的脊灰病毒检测流程,可大幅缩短检测时间,提高检测通量,且灵敏度高于标准方法,适合于脊灰应急检测应对突发疫情。

【关键词】 脊髓灰质炎病毒; 脊髓灰质炎野病毒; 实时荧光 RT-PCR

Study on the Fast Testing Strategy for identifying the wild poliovirus I GONG Cheng, LUO Ming, CHEN Meng, ZHANG Tie-gang, ZHANG He-run, WANG Yu-mei, LI Ren-qing, DONG Mei, CHEN Wei-xin, CHEN Li-juan. The Immunization Institute, Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

Corresponding author: CHEN Li-juan, Email:bjcdcchlj@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the Fast Testing Strategy (FTS) for wild poliovirus I (WPV1). **Methods** Epidemiological investigations were carried out on 671 students from WPV1 epidemic areas in China. A set of real time RT-PCR assays, including panenterovirus testings (PE) assay, poliovirus serotypings (PS) assay and the assay distinguishing wild strain from vaccine strain of poliovirus I (DWV) were introduced into the screening program for WPV1 to replace the conventional RT-PCR, recommended by the China National Polio Laboratory (GNPL). Additionally, sensitivities of all the assays were assessed by poliovirus type I to III (Sabin stain) and the isolated WPV1. **Results** (1) 33 non-poliovirus enterovirus (NPEV) cases were detected, with 16 polio vaccine-related cases including 5 polio I, 1 polio II, 3 polio III, 1 polio I + II, 4 polio I + III and 2 polio I + II + III. Three WPV1 cases were also detected in this study and confirmed by GNPL. (2) For polio virus vaccine strain, sensitivities of the set of real time RT-PCR assays ranged from 1 to 100 times than that of the in-house RT-PCR assay. The sensitivities of PE and PS assays for the detection of polio II were 100 times than that of the RT-PCR assay and the sensitivity of DWV assay used for the detection of polio I were 10 times than that of the RT-PCR assay. For WPV1, the sensitivity of three real time RT-PCR was 10 times higher than that of the RT-PCR assay. **Conclusion** The novel FTS for WPV1 suggested by this study would include PE, PS and DWV. It not only could greatly shorten the testing time but also more sensitive than the RT-PCR and suited for emergency detection for WPV1.

【Key words】 Poliovirus; Poliomyelitis, wild poliovirus; Real time RT-PCR

2011年8月26日我国新疆和田地区发现4例I型脊髓灰质炎(脊灰)野病毒感染病例。北京市为了应对可能出现的脊灰野病毒输入^[1,2],于9月对来自疫区的在京学生开展了脊灰野病毒筛查。本次筛查采用与国家脊灰实验室推荐方法不同的检测流程^[3,4],发现3例I型脊灰野病毒健康携带者。为此本文对筛查中的I型脊灰野病毒快速检测策略进行评价和探讨。

对象与方法

1. 调查对象:为来自本次脊灰疫区的所有在京学生,入组条件为2个月内未服用脊灰疫苗者,在知情同意下填写调查表,采集粪便标本,送至北京市疾病预防控制中心免疫预防所脊灰实验室检测。

2. 主要仪器和试剂:仪器包括ABI MagMax Express-96自动核酸提取仪、ABI 7500 Fast实时荧光PCR仪、ABI 3130 XL测序仪(均为Life Technology),II级生物安全柜(Bake)和QIAxcel自动核酸电泳仪(Qiagen)。试剂包括MagMax Viral RNA Isolation(Life Technology),肠道病毒核酸检测试剂盒(实时荧光PCR法)、脊灰病毒核酸多重检测试剂盒(实时荧光PCR法)、I型脊灰病毒核酸鉴别检测试剂盒(实时荧光PCR法)(均为迅必达产品),BigDye Cycle Terminator Kit 3.1(Life Technology),SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity(Invitrogen),脊灰特异性引物(UC11:5'-AAG AGG TCT CTA TTC CAC AT-3',UG1:5'-TTT GTG TCA GCG TGT AAT GA-3'),QIAGEN DNA Screening Kit(QIAGEN),POP-7测序胶(Life Technology)。其中SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity和脊灰特异性引物为中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家脊灰实验室提供。

3. 检测前方法评价:I、II和III型脊灰病毒标准株(Sabin株,由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家脊灰实验室提供),在L20B细胞上滴度(IgCCID₅₀/0.1 ml)分别为4.78、4.82和4.77。对3种脊灰病毒用含2%FBS的MEM培养基,做10倍系列稀释,从1×10⁷倍稀释至1×10⁰倍。对每个稀释度提取RNA,提取方法参照MagMax Viral RNA Isolation说明书。采用4种方法[分别为肠道病毒核酸检测试剂盒(实时荧光PCR)(简称肠道通用法)、脊灰病毒核酸多重检测试剂盒(实时荧光PCR)(简称脊灰分型法)、I型脊灰病毒核酸鉴别检测试剂盒

(实时荧光PCR)(简称野毒鉴别法)和国家脊灰实验室推荐的普通RT-PCR(简称标准法)]进行核酸检测,每种方法所能检测出的某型脊灰病毒标准株的最大稀释倍数,即为此方法检测该型脊灰病毒的最低检测限。例如采用某方法可检测到的I型脊灰病毒标准株最大稀释倍数为10 000倍,则认为该方法检测I型脊灰病毒的最低检测限为1×10⁻⁴(本文简记作-4,以此类推)。

4. 检测过程:①标本处理:根据WHO《脊髓灰质炎实验室手册》(2004年4版)处理粪便标本,制备便悬液。②核酸提取:对粪便悬液用ABI MagMax Express-96自动核酸提取仪提取RNA。③实时荧光PCR检测:用肠道病毒核酸检测试剂盒和脊灰病毒核酸多重检测试剂盒平行检测提取的RNA,对脊灰病毒检测阳性者,同时鉴定血清型。④复核:对I型脊灰病毒检测阳性者,将粪便悬液在二级生物安全柜中接种至RD和L20B细胞,观察细胞病变效应,同时将粪便悬液送至国家脊灰实验室复核,并做VP1区序列分析(阳性分离物随后也送至国家脊灰实验室)。本实验室也采用国家脊灰实验室推荐的RT-PCR对阳性标本平行检测和VP1区序列分析。

5. 检测后方法评价:利用检出的I型脊灰野病毒代替疫苗株,再次评价上述4种方法的灵敏度,评价方法同前。

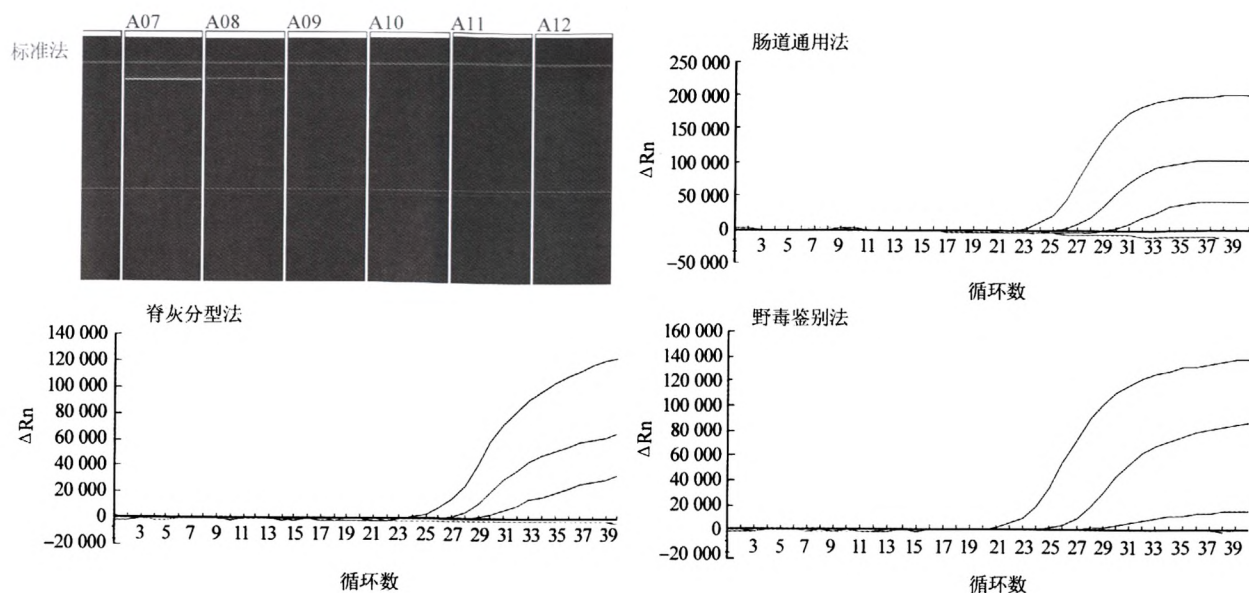
结 果

1. 灵敏度比较与评价:检测前利用I、II和III型脊灰病毒疫苗株分别对上述4种方法进行灵敏度评价,肠道通用法检测脊灰病毒疫苗株II型比标准法灵敏100倍;脊灰分型法能准确区分脊灰病毒疫苗株3个血清型,其中检测II型比标准法灵敏100倍;野毒鉴别法检测脊灰疫苗株I型比标准法灵敏10倍。检测后利用所获得的I型脊灰野病毒对4种方法再次进行灵敏度评价,4种方法均能有效检测出I型脊灰野病毒,3种实时荧光PCR检测脊灰I型野病毒比标准法灵敏10倍(表1和图1)。

表1 采用不同脊灰病毒株评价4种检测方法

检测方法	I型疫苗株	II型疫苗株	III型疫苗株	I型野病毒株
标准方法	-4	-3	-4	-1
肠道通用法	-4	-5	-4	-2
脊灰分型法	-4	-5	-4	-2
野毒鉴别法	-5	-	-	-2

2. 实际应用:采用3种实时荧光RT-PCR检测671份标本,肠道通用法筛检出肠道病毒阳性53份;



注:A07和A08分别为脊灰野毒原液和10倍稀释液,每泳道均有2条15 bp和3000 bp的比对Marker条带;从左至右3条扩增曲线分别为野毒原液、10倍稀释液和100倍稀释液

图1 4种检测方法对脊灰I型野病毒的检测限

脊灰分型法筛检出脊灰病毒20份(其中I型9份,II型1份,III型3份,I+II型1份,I+III型4份,I+II+III型2份)(注:后对7份含脊灰I型病毒的混合型标本采用野毒鉴别法检测,脊灰I型病毒均为疫苗株);9份脊灰I型标本经野毒鉴别法检测,3份为野病毒,5份为疫苗株,1份(标本编号551)为阴性(该标本分别采用4种方法复测均为阴性)。该9份标本经国家脊灰实验室复核和VP1区序列分析与本文检测结果一致(表2)。

讨论

国家脊灰实验室推荐的脊灰病毒核酸检测方法,可特异性检测I、II和III型脊灰病毒疫苗株和野病毒株,亦可扩增VP1区全长序列,扩增产物能直接用

于序列分析。但该方法为普通RT-PCR,需电泳,易导致污染,工作量较大,且相当于脊灰病毒的通用型检测,不能区分脊灰病毒血清型,也不能区分疫苗株和野病毒株。本研究结合前期工作^[3],采用新的检测流程,即肠道病毒通用型检测+脊灰病毒分型检测+I型脊灰野病毒株和疫苗株鉴别检测。第一步为筛查,平行进行肠道病毒通用型检测和脊灰病毒分型检测;第二步为初步鉴别,对于第一步筛检出的脊灰病毒阳性标本再进行野毒鉴别检测,以区分脊灰野病毒和疫苗株。

新的检测流程在筛查阶段采用双靶点检测,与标准方法相比,增加了一个检测靶点(肠道病毒通用型),有利于防止漏检,而且利用可分型的优点,将下一步需要鉴别的检测范围缩小至脊灰I型阳性标

表2 不同方法检测9例脊灰I型野病毒标本

标本号	性别	年龄(岁)	荧光RT-PCR筛检(Ct值)			病毒分离(CPE天数)		RT-PCR复核(UC11/UG1)	与SABIN株VP1区同源性(%)比较
			肠道通用法	脊灰分型法	野毒鉴别法	RD	L20B		
125	男	18	+(26)	I(23)	W(23)	###(2)	###(2)	+	79.4
298	男	18	+(25)	I(21)	W(23)	###(2)	###(2)	+	78.8
470	女	18	+(25)	I(26)	W(23)	###(3)	###(3)	+	79.0
337	女	25	+(24)	I(22)	V(22)	###(3)	###(4)	+	99.8
340	男	25	+(21)	I(23)	V(22)	###(6)	###(6)	+	99.1
341	女	24	+(24)	I(20)	V(20)	###(2)	###(2)	+	99.9
551	女	26	-	I(31)	-	-	-	-	-
623	男	22	+(19)	I(17)	V(18)	###(3)	###(3)	+	99.9
678	女	17	V(18)	I(17)	V(18)	###(3)	###(3)	+	99.9

注:UC11/UG1为标准法;W为脊灰I型野病毒株,V为脊灰I型疫苗株,###为75%≤CPE<100%,-为无CPE

本,大幅减少工作量。本研究采用脊灰病毒疫苗株和野毒株 RNA 对二者进行灵敏度比较,两种实时荧光 RT-PCR 比标准方法敏感 1~100 倍。对于野病毒的鉴别检测,标准方法不能分型,检出的脊灰病毒阳性标本全部需要进行病毒分离和血清中和试验(时间约 1 周),分成单一血清型,再进行序列分析,才能鉴别野毒株和疫苗株。如出现 I 型脊灰病毒野毒株和疫苗株混合的情况(本次调查后,即给调查对象服用疫苗,结果有 3 人可能同时排出野毒株和疫苗株),通过血清中和试验无法进一步区分单型的 I 型野毒株和 I 型疫苗株,此时直接测序较为困难,新检测流程采用实时荧光 RT-PCR 鉴别脊灰野毒株和疫苗株,则有效避免了这一问题。本研究采用疫苗株和野毒株 RNA 对这种方法与标准方法进行灵敏度比较,前者比后者对 I 型脊灰的野病毒和疫苗株的均敏感 10 倍。

新检测流程灵敏度高,大幅缩短检测时间,提高检测通量,适合脊灰疫情应急检测和大规模筛查,但新流程并不能获得整个 VP1 区核酸片段,也不能鉴别疫苗衍生脊灰病毒(VDPV),因此应与标准方法结合。当新流程方法筛查出脊灰病毒阳性者,再采用标

准方法结合序列分析,进行复核,不仅可确保检测结果的准确性,同时还可发现脊灰病毒新的突变信息。

参 考 文 献

- [1] Wild poliovirus confirmed in China. http://www.who.int/csr/don/2011_09_01/en/index.html.
- [2] The Progress of Prevention of control of the imported wild poliovirus epidemic in Xinjiang Uygur Autonomous Region. <http://www.xjwst.gov.cn/zwgknry.jsp?urltype=news.NewsContentUrl&wbtreeid=789&wbnewsid=4848>. (in Chinese) 新疆维吾尔自治区脊髓灰质炎野病毒输入性疫情防控工作进展. <http://www.xjwst.gov.cn/zwgknry.jsp?urltype=news.NewsContentUrl&wbtreeid=789&wbnewsid=4848>.
- [3] Gong C, Luo M, Zhang TG. Sensitivity comparison of three detection assays for poliovirus. *Int J Virol*, 2011, 18(4): 116-121. (in Chinese) 龚成, 罗明, 张铁钢. 脊髓灰质炎病毒三类检测方法的灵敏度比较. *国际病毒学杂志*, 2011, 18(4): 116-121.
- [4] Kilpatrick DR, Yang CF, Ching K, et al. Rapid group-, serotype-, and vaccine strain-specific identification of poliovirus isolates by real-time reverse transcription-PCR using degenerate primers and probes containing deoxyinosine residues. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(6): 1939-1941.

(收稿日期:2011-12-26)

(本文编辑:张林东)

· 会 讯 ·

全国传染病流行病学学术研讨会暨第十一届全军流行病学专业学术会议通知(第一轮)

为进一步加强全国传染病流行病学、全军流行病学专业学术交流,掌握流行病学国内外最新研究进展,推动流行病学学科发展,“全国传染病流行病学学术研讨会暨第十一届全军流行病学专业学术会议”拟于 2012 年 9 月中旬在浙江省宁波市召开。会议由全国流行病学专业委员会传染病流行病学组、军队流行病学专业委员会主办,军事医学科学院微生物流行病学研究所、病原微生物生物安全国家重点实验室、南京军区疾病预防控制中心、中国人民解放军第 113 医院、第二军医大学联合承办。具体事宜通知如下:

一、会议内容:①流行病学研究最新进展;②新发突发传染病流行病学;③新发突发传染病的监测、实验室诊断、病原检测、鉴定、预防及防护等;④新技术、新方法在流行病学研究中的应用;⑤媒介生物控制及防治研究。

二、会议时间、地点:会议定于 2012 年 9 月中旬在宁波市召开,具体会议地点见第二轮会议通知。

三、会议征文:包括流行病学研究最新进展;新发突发传染病流行病学研究;新发突发传染病的监测、实验室诊断、病原检测、鉴定、预防及防护等;新技术、新方法在流行病学研究中的应用;媒介生物控制及防治研究。会议热忱欢迎流行病学研究领域的专家和从事相关工作的人员踊跃投稿,积极参会交流。大会组委会将组织有关专家对征文进行评定,录用的优秀论文将被推荐到《中华流行病学杂志》、《中国热带医学杂志》、《解放军预防医学杂志》等核心期刊发表。

四、征文要求:①未公开发表的论文或论文摘要(论文限 5000 字内,摘要限 400 字)。②论文以电子版 Word 文本提交,请在文章中详细注明作者单位名称及通讯地址、邮政编码、手机号码和 Email。③来稿请附单位论文投稿介绍信(扫描件以电子版传送,同时邮寄原件)。④征文截止日期:2012 年 8 月 1 日。

五、联系方式:联系人:刘玮、杨红 通讯地址:北京市丰台区东大街 20 号五所四室(邮编:100071) 电话:010-66948442, 66948499, 0201-948442, 948499(军) 传真:010-63896082 Email:liuxingbingy@sohu.com

全军流行病学专业委员会
病原微生物生物安全国家重点实验室