

· 论 著 ·

应用 ddPCR 检测甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275Y 突变研究

楼秀玉, 颜浩, 孙逸, 王欣莹, 陈寅, 茅海燕

浙江省疾病预防控制中心微生物检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 评价微滴式数字 PCR (ddPCR) 检测甲型 H1N1 pdm09 流感病毒神经氨酸酶 (NA) H275Y 突变的方法。**方法** 根据甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 NA 片段包含 275 氨基酸位点的序列信息设计引物和双探针, 优化 ddPCR 退火温度, 建立甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275 耐药敏感基因和 H275Y 耐药突变基因检测方法。采用检出限比较 ddPCR 和荧光定量 PCR (qPCR) 的灵敏度, 通过检测甲型 H1N1 pdm09、季节性 H1N1、甲型 H3N2 流感病毒等 14 种呼吸道病毒样本比较 ddPCR 和 qPCR 的特异性。检测 64 份临床标本和 5 株流感病毒株, 获得拷贝数, 计算 H275Y 突变丰度, 并将 5 株毒株的突变丰度与二代测序结果进行比较。**结果** 确定 62.2 °C 为最优退火温度。采用 ddPCR 和 qPCR 检测甲型 H1N1 pdm09 H275 耐药敏感质粒和 H275Y 耐药突变质粒, ddPCR 检出限分别为 5.28 (95%CI: 4.28 ~ 7.45) 和 6.51 (95%CI: 5.25 ~ 9.37) 拷贝/反应; qPCR 检出限分别为 5.70 (95%CI: 4.83 ~ 7.45) 和 7.06 (95%CI: 5.92 ~ 9.40) 拷贝/反应。ddPCR 和 qPCR 均能检出甲型 H1N1 pdm09 样本中的 H275 耐药敏感质粒和 H275Y 耐药突变质粒, 其他 11 种呼吸道病毒均未检出, 两种方法检测结果一致。64 份临床标本中, ddPCR 检出 1 例感染甲型 H1N1 pdm09 的重症肺炎患者的 3 份咽拭子标本存在 H275Y 突变, 使用磷酸奥司他韦治疗第 4 天采集的标本突变丰度最高, 为 53.37%。ddPCR 检测分离自该病例治疗第 2、4、5 天标本的流感病毒 H275Y 突变丰度分别为 0.63%、88.93% 和 1.27%; 二代测序检测治疗第 4 天标本的 H275Y 突变丰度为 89.46%, 未检测到治疗第 2、5 天标本存在 H275Y 突变。**结论** ddPCR 的灵敏度和特异性较 qPCR 高, 对低频突变的检测灵敏度较二代测序高, 可定量检测甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 NA 片段 H275Y 突变。

关键词: 甲型 H1N1 pdm09; 流感病毒; H275Y 突变; 微滴式数字 PCR**中图分类号:** R511.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2022) 11-1139-06

Detection of H275Y mutation in influenza A H1N1 pdm09 virus by droplet digital PCR assay

LOU Xiuyu, YAN Hao, SUN Yi, WANG Xinying, CHEN Yin, MAO Haiyan

Department of Microbiology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To evaluate the effectiveness of droplet digital PCR (ddPCR) assay for detection of neuraminidase (NA) H275Y mutations in influenza A H1N1 pdm09 virus. **Methods** The primers and dual probes were designed based on the sequence of the H1N1 pdm09 NA gene fragment which contained 275 amino acid sites, and the annealing temperature of ddPCR assay was optimized to establish a method for detection of H275 drug-sensitive genes and H275Y drug-resistant genes in H1N1 pdm09 virus. The sensitivity of ddPCR assay and fluorescent quantitative PCR (qPCR) assay was compared using the detection limit, and the specificity of ddPCR and qPCR assays was compared for detection of 14 respiratory virus samples. In addition, 64 clinical samples and 5 influenza isolates were tested to calculate the

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2022.11.012**基金项目:** 浙江省基础公益研究计划 (LGF18H190003); 浙江省重点研发计划 (2021C03044); 浙江省卫生领军人才培养项目 [(2018) 22]**作者简介:** 楼秀玉, 硕士, 工程师, 主要从事微生物检验工作**通信作者:** 茅海燕, E-mail: hymao@cdc.zj.cn

abundance of H275Y mutations, and the mutation abundance of 5 influenza isolates was compared with next-generation sequencing results. **Results** The optimal annealing temperature was 62.2 °C. The detection limits of ddPCR assay were 5.28 (95%CI: 4.28–7.45) copies/reaction for H1N1 pdm09 H275 drug-sensitive plasmids and 6.51 (95%CI: 5.25–9.37) copies/reaction for H1N1 pdm09 H275Y drug-resistant plasmids, and the detection limits of qPCR assay were 5.70 (95%CI: 4.83–7.45) copies/reaction for H1N1 pdm09 H275Y drug-sensitive plasmids and 7.06 (95%CI: 5.92–9.40) copies/reaction for H1N1 pdm09 H275Y drug-resistant plasmids. Both ddPCR and qPCR assays detected H275 and H275Y drug-resistant plasmids in H1N1 pdm09 viral samples but did not detect H275 and H275Y drug-resistant plasmids in other 11 respiratory virus samples, and these two assays showed consistent results. Of the 64 clinical samples, ddPCR assay detected H275Y mutation in three pharyngeal swab specimens from a severe pneumonia patients infected with H1N1 pdm09 virus, and the greatest mutation abundance was detected in samples collected on day 4 post-treatment with oseltamivir phosphate (53.37%). ddPCR assay detected 0.63, 88.93% and 1.27% H275Y mutation abundance in samples collected on days 2, 4 and 5 post-treatment with oseltamivir phosphate, and next-generation sequencing detected 89.46% H275Y mutation abundance in samples collected on day 4 post-treatment with oseltamivir phosphate; however, no H275Y mutation was detected in samples collected on days 2 or 5 post-treatment with oseltamivir phosphate. **Conclusions** ddPCR presents a higher sensitivity and specificity than qPCR assay for detection of H275Y mutations in H1N1 pdm09 virus, and presents a higher sensitivity than next-generation sequencing for detection of low-frequency mutations, which is effective for quantitative detection of H275Y mutations in the NA fragment of the H1N1 pdm09 virus.

Keywords: influenza A H1N1 pdm09; influenza virus; H275Y mutation; droplet digital PCR

甲型 H1N1 pdm09 流感病毒最常见的耐药突变是神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 发生的 H275Y 突变^[1-2], 导致流感病毒对奥司他韦耐药^[3]。目前, 检测流感病毒耐药的方法主要是表型法和基因法^[4], 但表型法耗时较长, 基因法定量检测操作繁琐, 因此需要建立一种耗时短、操作简便的定量检测方法筛查 H275Y 突变, 指导临床用药。微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 技术将 PCR 反应体系平均分配至独立的微滴单元中进行扩增, 根据荧光信号将每个微滴标记为阳性或阴性, 通过泊松分布将阳性微滴数转化为核酸拷贝数^[5], 可对目标核酸拷贝数进行绝对定量^[6]。本研究评价 ddPCR 检测甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 NA 片段 H275Y 突变的方法, 为 H275Y 痕量突变的流感病毒提供检测手段。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 PCR 仪 T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD); 热封仪 PX1 (BIO-RAD); 微滴读取仪 QX200 (BIO-RAD); 生物安全柜 A2 (Thermo Fisher); 台式微量离心机 Microfuge 20 (BECKMAN); 质粒提取试剂盒 MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver 4.0 (TaKaRa, 货号 9760); RNA 提取试剂盒 RNeasy R Mini Kit (QIAGEN, 货号 74104); DNA 扩增试剂盒 ddPCR™ Supermix for Probes (no dUTP) (BIO-RAD, 货号 1863024); RNA 扩增试剂盒 One-step RT-ddPCR Advanced Kit for Probes (BIO-RAD,

货号 1864021); 文库构建试剂盒 (杰毅生物, 货号 MD001T-P4-B)。携带甲型 H1N1 pdm09 NA 片段耐药敏感型 (H275, S) 和耐药突变型 (H275Y, R) 质粒均购自上海生工生物工程公司。

1.2 样本来源 64 份临床样本来源于 12 例甲型 H1N1 pdm09 感染的重症肺炎住院患者, 包括痰液、咽拭子和下呼吸道吸出物, 由绍兴人民医院和树兰医院提供。甲型 H1N1 pdm09 耐药敏感株 A/California/12/2012 (H275) 和突变株 A/Texas/23/2012 (H275Y) 由国家流感中心提供。季节性 H1N1 流感病毒 (季节性 H1N1)、甲型 H3N2 流感病毒 (H3N2)、乙型流感病毒 Victoria 系 (B/Victoria)、乙型流感病毒 Yamagata 系 (B/Yamagata)、甲型 H7N9 流感病毒 (H7N9)、副流感病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、人冠状病毒 NL63 (human coronavirus NL63, HCoV-NL63)、严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 核酸由本实验室提供。MDCK 细胞由国家流感中心提供。流感病毒的分离培养由本实验室完成。

1.3 引物和探针 根据 GenBank 数据库中序列信息设计引物探针, 由 AMBIENT 公司合成, 序列见表 1。将所有引物和探针的初始浓度配制为 20 μmol/L, 再按照上游引物、下游引物、VIC-MGB 探针、FAM-MGB 探针的体积比 2 : 2 : 1 : 1 配制引物探针工作液。

1.4 ddPCR 检测方法的建立

表1 甲型 H1N1 pdm09 的 PCR 引物和探针序列

Table 1 PCR primer and probe sequences of influenza A H1N1 pdm09

引物和探针 Primers/probes	序列 5'-3' Sequences 5'-3'
N1RO-H275Y-Forward	GCTTTACCATAATGACCGATGGA
N1RO-H275Y-Reverse	CACTAGAATCAGGGTAACAGGAGCAT
N1RO-H275-VIC-MGB (S)	VIC-AAAGCCCCTAATTATCACT-MGB
N1RO-H275Y-FAM-MGB (R)	FAM-AAAGCCCCTAATTATCACT-MGB

1.4.1 质粒与样本核酸提取 采用质粒和 RNA 试剂盒分别提取质粒和样本核酸,按照试剂盒说明书操作,提取产物于-80℃保存。

1.4.2 ddPCR 检测 按照 DNA 和 RNA 扩增试剂盒说明书,分别配置 20 μL 反应体系:DNA 反应体系为 Super mix 10 μL,引物探针工作液 1 μL, DNA 1 μL, ddH₂O 8 μL; RNA 反应体系为 Super mix 5 μL,引物探针工作液 1 μL, RNA 1 μL, 逆转录酶 2 μL, 300 mmol/L 二硫苏糖醇 1 μL, ddH₂O 10 μL。

将反应体系加入微滴生成卡槽“sample”列中,缓慢加样避免产生气泡,在“oil”列加入 70 μL 微滴生成油,用 ddPCR 专用垫圈扣好卡槽,放入微滴生成器中制备微滴。生成的微滴吸取 40 μL 转移至 96 孔板,通过热封膜防止微滴挥发。封膜后将 96 孔板放置于 PCR 仪上进行 PCR 扩增,扩增条件为反转录 (RNA) 45℃, 1 h; Taq 酶激活 95℃, 10 min; 94℃变性 30 s, 61~64℃退火 1 min, 40 个循环; 酶灭活 98℃, 10 min; 保存 4℃。

将扩增后的核酸置于微滴读取仪上进行读数。每个反应管的总微滴数≥10 000,判定结果有效;阳性微滴数≤3 个,判定为阴性;阳性微滴数>3 个,判定为阳性。采用 QuantSoft 1.7.4.0917 软件确定核酸拷贝数,结果以拷贝/反应或拷贝/μL 计数 (拷贝/反应=20×拷贝/μL)。

1.4.3 退火温度优化 采用章节 1.4.2 方法,设置 8 个退火温度:61.0、61.2、61.6、62.2、62.8、63.4、63.8、64.0℃,重复进行 2 组平行实验,评估信号区分程度和核酸拷贝数,确定最优退火温度。

1.5 ddPCR 检测方法的评价

1.5.1 灵敏度试验 本研究通过评估 ddPCR 对 S 质粒和 R 质粒的最低检出限 (limit of detection, LOD) 确定该方法的灵敏度。采用 ddPCR 预实验确定 S 质粒和 R 质粒初始浓度,再对适宜初始浓度的质粒 2 倍连续稀释 4 次,对不同稀释度的质粒 DNA 同时进

行 ddPCR 和 qPCR 测定。qPCR 在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。每组样本重复测定 16 次,两种检测方法所用试剂、反应体系和反应程序均一致,分别计算阳性检出率。参照美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI) EP17-42 文件,分析 LOD 值。采用 SPSS 25.0 软件 probit 分析确定 LOD 值。

1.5.2 特异性试验 选用 A/California/12/2012 (H275)、A/Texas/23/2012 (H275Y)、季节性 H1N1、H3N2、B/Victoria、B/Yamagata、H7N9、副流感病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、HCoV-NL63 和 SARS-CoV-2 核酸进行 ddPCR 和 qPCR 扩增,评估 ddPCR 的特异性并与 qPCR 比较。

1.5.3 ddPCR 检测临床标本 利用建立的 ddPCR 方法检测 64 份临床标本,每份临床标本重复进行 3 次试验,获得 H275 耐药敏感基因和 H275Y 耐药突变基因拷贝数,计算突变丰度,确定临床标本的耐药突变情况。突变丰度= [耐药突变基因拷贝数/(耐药敏感基因拷贝数+耐药突变基因拷贝数)] × 100%。

1.5.4 ddPCR 与二代测序检测流感病毒 通过 ddPCR 筛选出含有 H275Y 耐药突变基因的临床标本进行 MDCK 细胞增殖。以 A/California/12/2012 (H275) 和 A/Texas/23/2012 (H275Y) 分别作阴性对照和阳性对照,采用 ddPCR 和二代测序检测增殖后的流感病毒,重复检测 3 次,比较两种方法检测得到的标本耐药突变丰度。

二代测序采用文库构建试剂盒构建高通量测序文库,按照测序仪说明书确定上机文库的最终浓度,进行全基因组测序。用于序列分析的基因数据均来源于 NCBI 数据库。

2 结果

2.1 退火温度优化 当退火温度处于 61.0~62.2℃时, S 质粒 (VIC 通道) 和 R 质粒 (FAM 通道) 的阳性微滴和阴性微滴能较好分离,见图 1;且检测到的核酸拷贝数高于其他退火温度,见表 2。为保证 PCR 较高的特异性,选择 62.2℃为最优退火温度。

2.2 ddPCR 和 qPCR 的灵敏度比较 当设定阳性检出率为 95% 时, ddPCR 检测 S 质粒浓度的 LOD 值为 5.28 (95%CI: 4.28~7.45) 拷贝/反应; R 质粒的 LOD 值为 6.51 (95%CI: 5.25~9.37) 拷贝/反应。qPCR 检测 S 质粒浓度的 LOD 值为 5.70 (95%CI:

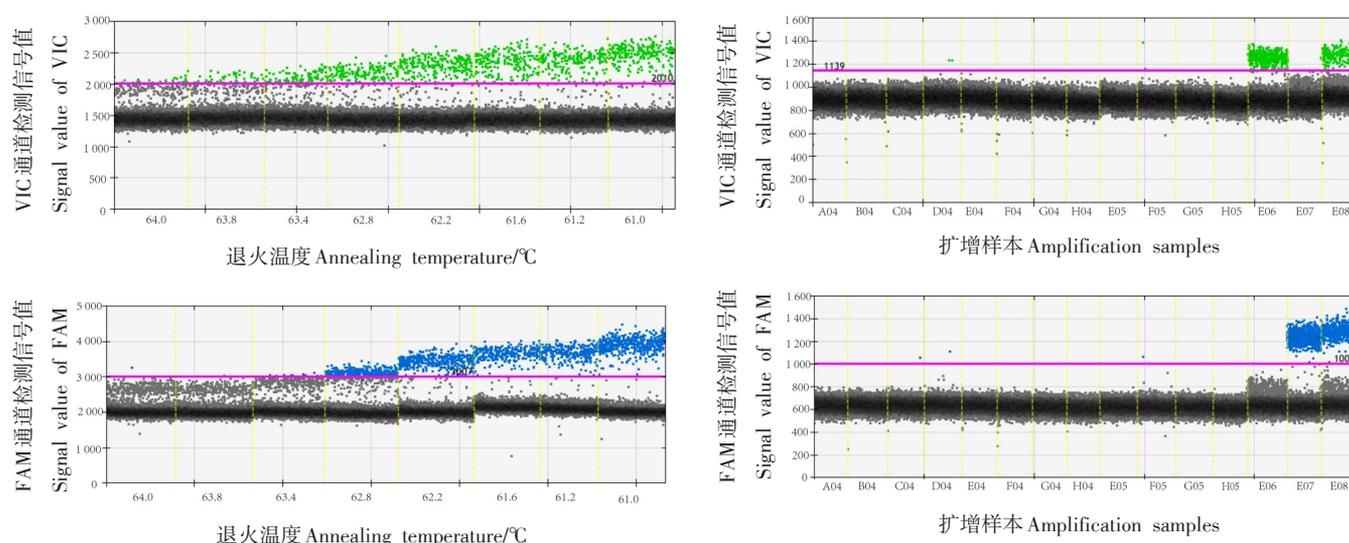


图 1 S 质粒 (VIC 通道) 和 R 质粒 (FAM 通道) 在不同退火温度下 ddPCR 检测结果

Figure 1 Plasmid S (VIC) and R (FAM) detected by ddPCR at different annealing temperature

表 2 在不同退火温度下 ddPCR 检测 S 质粒和 R 质粒的拷贝数

Table 2 The copies of plasmid S and R at different annealing temperature detected by ddPCR

温度 Temperature/°C	S 质粒/ (拷贝/μL) Plasmid S/(Copies/μL)			R 质粒/ (拷贝/μL) Plasmid R/(Copies/μL)		
	组 1 Group 1	组 2 Group 2	均值 Mean value	组 1 Group 1	组 2 Group 2	均值 Mean value
	61.0	17.7	17.9	17.8	38.9	38.9
61.2	15.5	15.6	15.6	25.5	27.0	26.3
61.6	14.3	16.4	15.4	27.6	22.4	25.0
62.2	13.8	17.1	15.5	28.1	29.5	28.8
62.8	12.0	12.3	12.2	13.9	24.3	19.1
63.4	10.4	9.3	9.9	0.8	1.5	1.1
63.8	8.3	4.4	6.4	0.6	0.8	0.4
64.0	5.2	3.0	4.1	0.7	0.8	0.4

4.83~7.45) 拷贝/反应; R 质粒浓度的 LOD 值为 7.06 (95%CI: 5.92~9.40) 拷贝/反应。ddPCR 的 LOD 低于 qPCR, 即 ddPCR 灵敏度优于 qPCR。

2.3 ddPCR 和 qPCR 的特异性比较 ddPCR 检测 14 种呼吸道病毒生成 14 290~18 013 个微滴数。阴性和阳性微滴能明显区分, A/California/12/2012 (H275) 在 VIC 通道检测中产生阳性微滴, A/Texas/23/2012 (H275Y) 在 FAM 通道检测中产生阳性微滴, 甲型 H1N1 pdm09 耐药敏感株和耐药突变株混合核酸在 VIC 和 FAM 通道检测中均产生阳性微滴,

注: A04 扩增样本为 ddH₂O, B04、C04、D04、E04、F04、G04、H04、E05、F05、G05、H05、E06、E07、E08 扩增样本分别为季节性 H1N1、H3N2、B/Victoria、B/Yamagata、H7N9、副流感病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、呼吸道合胞病毒、HCoV-NL63、SARS-CoV-2、A/California/12/2012 (H275) 与 A/Texas/23/2012 (H275Y) 混合核酸。Note: amplification samples of A04 is ddH₂O; amplification samples of B04, C04, D04, E04, F04, G04, H04, E05, F05, G05, H05, E06, E07, E08 are nucleic acid of seasonal H1N1, influenza A H3N2, B/Victoria, B/Yamagata, influenza A H3N2, H7N9, parainfluenza virus, human metapneumovirus, rhinovirus, respiratory syncytial virus, HCoV - NL63, SARS-CoV-2, A/California/12/2012(H275), A/Texas/23/2012(H275Y), and the mixture of A/California/12/2012(H275) and A/Texas/23/2012 (H275Y).

图 2 VIC 通道和 FAM 通道的 ddPCR 特异性检测结果

Figure 2 Specific detection results in VIC and FAM channels of ddPCR

其他病毒检测结果均为阴性。见图 2。qPCR 检测阳性结果与 ddPCR 一致。

2.4 临床标本 ddPCR 检测结果 ddPCR 检测 64 份临床标本显示每份标本的总微滴数均超过 10 000 个, 均带有甲型 H1N1 pdm09 耐药敏感基因。其中 3 份临床标本存在 H275Y 突变, 来源于 1 例感染甲型 H1N1 pdm09 的重症肺炎患者不同采集日期的咽拭子标本。该患者在磷酸奥司他韦 (达菲) 治疗前采集的标本中未检测到 H275Y 突变, 治疗 2 天后检测到 H275Y 突变, 治疗第 4 天突变丰度最高, 为 53.37%。见表 3。

2.5 ddPCR 与二代测序检测获得的突变丰度比较 ddPCR 检测结果显示, 5 株分离自临床标本的流感毒株中, WWD-C-4 的突变丰度最高, 为 88.93%, WWD-C-3、WWD-C-5 的突变丰度分别为 0.63% 和

表 3 5 份临床标本 ddPCR 检测结果

Table 3 The results of five clinical samples detected by ddPCR

标本 编号 No.	采样时间 Sampling time	达非使用 时间 Tamiflu use/d	检测通道 Detection channel	拷贝数/ (拷贝/ μ L) Copy number/(Copies/ μ L)			突变丰度 Mutation abundance/%			
				组 1	组 2	组 3	组 1	组 2	组 3	均值
				Group 1	Group 2	Group 3	Group 1	Group 2	Group 3	Mean
1	2018.01.01	未使用 Not use	FAM	0	0	0	0	0	0	0
			VIC	1.2	1.1	1.6				
2	2018.01.03	1	FAM	0	0	0	0	0	0	0
			VIC	8.0	7.5	8.3				
3	2018.01.04	2	FAM	1.6	1.2	1.3	2.83	2.03	2.77	2.54
			VIC	55.0	57.9	45.6				
4	2018.01.06	4	FAM	1.8	1.1	1.1	64.29	57.89	37.93	53.37
			VIC	1.0	0.8	1.8				
5	2018.01.07	5	FAM	1.2	1.1	0.9	50.00	42.31	50.00	47.44
			VIC	1.2	1.5	0.9				

1.27%，WWD-C-1 和 WWD-C-2 的突变丰度均为 0。见表 4。

二代测序结果显示 WWD-C-4 第 825 位碱基发生替换 (C→T)，导致 H275Y 突变。WWD-C-4 替换碱基 T 占 89.46%，与 ddPCR 检测结果 (88.93%) 接近，但未检测到 WWD-C-3、WWD-C-5 存在 H275Y 突变。见表 4。

表 4 ddPCR 和二代测序检测甲型 H1N1pdm09 流感病毒突变丰度 (%)

Table 4 Mutation abundance of influenza A H1N1 pdm09 detected by ddPCR and next-generation sequencing (%)

毒株编号 No.	ddPCR				二代测序 Next- generation sequencing
	组 1 Group 1	组 2 Group 2	组 3 Group 3	均值 Mean value	
WWD-C-1	0	0	0	0	0
WWD-C-2	0	0	0	0	0
WWD-C-3	0.57	0.70	0.61	0.63	0
WWD-C-4	87.50	87.10	92.16	88.93	89.46
WWD-C-5	2.00	0.79	1.03	1.27	0
A/California/12/2012 (H275)	0	0	0	0	0
A/Texas/23/2012 (H275Y)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

注：WWD-C-1、WWD-C-2、WWD-C-3、WWD-C-4、WWD-C-5 流感毒株分别分离自表 3 中序号 1~5 的标本。Note: WWD-C-1、WWD-C-2、WWD-C-3、WWD-C-4、WWD-C-5 were isolated from the sample 1 to 5 in table 3, respectively.

3 讨论

甲型 H1N1 pdm09 流感病毒曾引起 21 世纪首次世界范围内流感大流行，该病毒目前仍不断变异，在局部地区引发不同程度的流感流行，对公共卫生安全有持续威胁。神经氨酸酶抑制剂是世界卫生组织推荐的唯一抗流感病毒药物，包括奥司他韦、扎那米韦、帕拉米韦等^[7]。但随着神经氨酸酶抑制剂在临床上的普遍使用，流感病毒逐渐产生耐药性，临床上亟需建立一种高效便捷的耐药性检测方法。ddPCR 技术对样本的绝对定量不受限于标准曲线和扩增效率，具有更高的灵敏度和特异性^[5, 8]，已被应用于多项临床领域，如布鲁氏菌^[9]和微生物载量极低的临床样本检测^[10]等。利用 ddPCR 技术对甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275Y 突变进行绝对定量，在临床上具有较好的应用前景。

本研究建立的甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275Y 突变的 ddPCR 检测方法，通过双重探针实现对甲型 H1N1 pdm09 流感病毒耐药敏感基因和耐药突变基因的绝对定量，在确定基因的突变数量和所占比例方面更具优势。灵敏度试验参考孙婷婷等^[11]的研究，以质粒为质控，未考虑反转录的效率对灵敏度的影响。相比于 qPCR，ddPCR 检测 S 质粒和 R 质粒浓度的 LOD 较低，灵敏度较高。相比于二代测序结果，ddPCR 的操作和数据分析更简单，且检测发现标本 WWD-C-3 和 WWD-C-5 存在 H275Y 突变，突变丰度分别为 0.63% 和 1.27%，提示 ddPCR 检测低频突变的灵敏度高于二代测序。在方法特异性方

面, ddPCR 检测方法与 H3N2、乙型流感病毒、副流感病毒、SARS-CoV-2 等常见呼吸道病毒不存在交叉反应, 可实现对耐药敏感基因和耐药突变基因的精确分类, 具有较好的特异性。因此 ddPCR 检测方法在突变基因的绝对定量、灵敏度和特异性方面较既往检测方法有明显优势。

本研究检测到 3 份存在甲型 H1N1 pdm09 耐药突变的临床标本均来源于 1 例感染甲型 H1N1 pdm09 流感病毒的重症肺炎患者。在患者治疗过程中检测到 H275Y 突变, 可能是使用达菲诱导病毒发生耐药突变^[12], 但随着患者病情好转和自身免疫能力的增强, 突变后的病毒在人体内未能稳定传代, 最终突变病毒比例下降。提示采用 ddPCR 可快速精准地追踪检测患者体内甲型 H1N1 pdm09 的突变情况, 在流感病毒的耐药机制研究和临床耐药情况监测中具有良好的应用潜力。

综上所述, 本研究通过 ddPCR 建立甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275Y 突变检测方法, 能够对甲型 H1N1 pdm09 流感病毒 H275Y 突变实现痕量检测, 可用于早期流感耐药的监测以及治疗过程中对流感病毒 H275Y 突变的及时发现, 能良好适用于临床检测。

参考文献

- [1] HUANG W J, CHENG Y H, LI X Y, et al. Neuraminidase inhibitor susceptibility profile of human influenza viruses during the 2016–2017 influenza season in Mainland China [J]. *J Infect Chemother*, 2018, 24 (9): 729–733.
- [2] CHAUDHRY A, BASTIEN N, LI Y, et al. Oseltamivir resistance in an influenza A (H3N2) virus isolated from an immunocompromised patient during the 2014–2015 influenza season in Alberta, Canada [J]. *Influenza Other Respir Viruses*, 2016, 10 (6): 532–535.
- [3] 包佳琪, 王晓晨, 邹迁达, 等. 流感病毒对神经氨酸酶抑制剂耐药性的研究进展 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2018, 11 (6): 473–481.
BAO J Q, WANG X C, ZOU Q D, et al. Research progress on drug-resistance of influenza virus to neuraminidase inhibitors [J]. *Chin J Clin Infect Dis*, 2018, 11 (6): 473–481.
- [4] NGUYEN H T, ALICIA M F, GUBAREVA L V. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods [J]. *Antivir Ther*, 2012, 17: 159–173.
- [5] 刘译利, 高晶. 数字聚合酶链反应在病原微生物检测中的应用进展 [J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41 (21): 2684–2688.
LIU Y L, GAO J. The application of digital polymerase chain reaction in pathogen detection [J]. *Int J Lab Med*, 2020, 41 (21): 2684–2688.
- [6] WHALE A S, BUSHELL C, GRANT P R, et al. Detection of rare drug resistance mutations by digital PCR in a human influenza A virus model system and clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54 (2): 392–400.
- [7] MITCHELL S L, CHANG Y C, FEEMSTER K, et al. Implementation of a rapid influenza A/B and RSV direct molecular assay improves emergency department oseltamivir use in paediatric patients [J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67 (3): 358–363.
- [8] BOSMAN K J, NIJHUIS M, HAM P V, et al. Comparison of digital PCR platforms and semi-nested qPCR as a tool to determine the size of the HIV reservoir [J/OL]. *Sci Rep*, 2015, 5 [2022-09-16]. <http://doi.org/10.1038/srep13811>.
- [9] 韩冰, 吴翠萍, 赵芯, 等. 数字 PCR 和荧光定量 PCR 诊断急性期布鲁菌病的灵敏度比较初步研究 [J]. *传染病信息*, 2019, 32 (4): 312–316.
HAN B, WU C P, ZHAO X, et al. A preliminary study on the sensitivity of digital PCR and fluorescence quantitative PCR in the diagnosis of acute brucellosis [J]. *Infect Dis Inf*, 2019, 32 (4): 312–316.
- [10] JEANNOT E, BECETTE V, CAMPITELLI M, et al. Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma [J]. *J Pathol Clin Res*, 2016, 28, (4): 201–209.
- [11] 孙婷婷, 姜艳芳, 宫平, 等. 应用数字 PCR 检测环境中微量新型冠状病毒残留 [J]. *科学通报*, 2021, 66 (13): 1653–1662.
SUN T T, JIANG Y F, GONG P, et al. Detection of microamounts of novel coronavirus residues in environment by digital PCR [J]. *Chin Sci Bull*, 2021, 66 (13): 1653–1662.
- [12] 王晓晨. H1N1 pdm09 流感重症肺炎患者耐药位点筛查及 H275Y 突变与奥司他韦耐药相关性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
WANG X C. Screening of drug-resistant sites in patients with severe H1N1 pdm09 influenza pneumonia and research of the association between H275Y mutation and oseltamivir-resistance [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.

收稿日期: 2022-07-08 修回日期: 2022-09-16 本文编辑: 徐文璐