

实时荧光 RT-PCR 快速检测肠道病毒 RNA 及其临床意义

谢建红,肖奇志,张永良,周玉球,田 芬(广东省珠海市妇幼保健院检验科 519001)

【摘要】 目的 应用实时荧光逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法快速检测肠道病毒 RNA,为手足口病的早期诊断提供临床依据。**方法** 采用实时荧光 RT-PCR 法检测手足口病患者粪便、脑脊液中肠道病毒通用型、柯萨奇病毒 A 组 16(CA16)和肠道病毒 71 型(EV71)RNA。**结果** 234 份粪便标本中肠道病毒通用型阳性 214 例,检出率为 91.45%;CA16 阳性 56 例,阳性率为 23.50%;EV71 阳性 87 例,阳性率 37.17%,其中有 4 例同时检出 CA16 和 EV71。2 份脑脊液标本中 3 种肠道病毒核酸结果均为阴性。**结论** 实时荧光 RT-PCR 能对肠道病毒 RNA 进行快速检测,为手足口病的早期诊断提供诊断依据,并对手足口病患者的病情分析、治疗及预后观察起到指导作用。

【关键词】 手足口病; 实时荧光逆转录-聚合酶链反应; 肠道病毒

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.032 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0581-02

手足口病近年来呈爆发趋势,严重影响婴幼儿的生活及学习,且在一定程度上给社会造成不稳定的因素。特别是 2008 年 3 月在安徽阜阳爆发的手足口病疫情,出现了部分死亡病例,从而引起广泛关注^[1]。如何对手足口病的病原学进行快速检测,对手足口病的早期诊断、治疗和预后观察显得尤为重要。本文应用实时荧光逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测了 236 份手足口病患者粪便、脑脊液标本,分别测定肠道病毒(EV)通用型(以下简称 EV)、柯萨奇病毒 A 组 16(CA16)和 EV71 核酸,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 检测标本均来自 2010 年 5~8 月本院手足口病住院患儿,采集粪便及脑脊液标本 236 份,所采集标本 30 min 内送本实验室-20℃保存,集中检测。其中男 145 例,女 91 例,年龄 1 个月至 8 岁,平均 2 岁零 1 个月。手足口病诊断标准参照卫生部颁布的《手足口病预防控制指南(2009 版)》^[2]。

1.2 仪器与试剂 荧光 PCR 试剂购自中山大学达安基因股份有限公司,包括肠道病毒通用型、CA16 和 EV71 3 种。采用美国 ABI PRISM7500 实时荧光 PCR 仪进行检测。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 肠道病毒 RNA 提取:先将粪便标本用生理盐水重悬,然后取阴性质控品、阳性质控品及粪便重悬液(脑脊液)100 μL,放置于 1.5 mL 灭菌离心管,加入 200 μL Trizol 试剂及 100 μL 氯仿,用振荡器强力振荡 20 s 后放置 3 min。12 000 r/min 离心 2 min,取上清液转移至新灭菌的 1.5 mL 离心管中,加 10 μL RNA 提取液 A,用振荡器充分混匀,8 000 r/min 离心 1 min 后,弃去上清液;加入溶液 C 400 μL,振荡混匀,8 000 r/min 离心 1 min,60℃加热 5 min,待沉淀变白后,加入 30 μL DEPC 水,充分混匀后可直接用于 PCR。

1.3.2 实时荧光 RT-PCR 扩增 取阴性质控、阳性质控及样本 RNA 模板 5 μL 加入 PCR 反应液中,使总体积为 25 μL,8 000 r/min 离心数秒,40℃25 min,1 个循环,94℃3 min,1 个循环,然后 93℃15 s,55℃45 s,循环 40 次,在 55℃收集荧光。

1.3.3 结果判断 检测样本无典型 S 型曲线或 Ct 值大于 35 为阴性,样本呈典型 S 型曲线且 Ct 值小于或等于 35 则为阳性。

1.3.4 质量控制 阴性质控品无典型 S 型扩增曲线或无 Ct 值显示;阳性质控品呈典型 S 型扩增曲线或 Ct 值小于或等于

30,同时满足两个条件,则实验有效,否则需重新检测。

1.3.5 统计学方法 所有数据使用 SPSS11.5 统计软件进行分析,全部采用 χ^2 检验分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 236 份手足口病患者粪便及脑脊液标本检测结果 234 份粪便标本中 EV 阳性 214 例,检出率为 91.45%;CA16 阳性 56 例,阳性率 23.93%;EV71 阳性 87 例,阳性率为 37.17%,二者比较差异具有统计学意义($\chi^2=9.64, P<0.05$),表明本地区手足口病患者中 CA16 和 EV71 均有感染,但以 EV71 为主。其中有 4 例标本同时检出 EV71 和 CA16,表明存在这两种病毒的混合感染。但部分标本中 EV 阳性,而 CA16 和 EV71 阴性,表明还存在非 CA16 和 EV71 的其他肠道病毒感染。2 例脑脊液标本中 3 种肠道病毒核酸均为阴性。结果统计见表 1。

表 1 实时荧光 RT-PCR 检测 EV、CA16 和 EV71 阳性结果

标本类型	标本数	EV		CA16		EV71	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
粪便	234	214	20	56	178	87	147
脑脊液	2	0	2	0	2	0	2

2.2 CA16 和 EV71 检测阳性率的年龄分布 年龄 3 岁以下诊断为手足口病者 186 例,占 78.81%,表明 3 岁以下幼儿更易患手足口病。但各年龄段患儿感染 CA16 差异无统计学意义,不同年龄段患儿 EV71 检出率差异也无统计学意义。见表 2。

表 2 CA16 和 EV71 感染情况的年龄分布[n(%)]

年龄(岁)	n	CA16 阳性	EV71 阳性
0~2	143	33(23.07)	46(32.16)
>2~3	43	11(25.58)	18(41.86)
>3~5	40	11(27.50)	17(42.5)
>5	10	1(10.0)	6(60.0)
χ^2	—	1.47	4.66
P	—	>0.05	>0.05

注:—表示无数据。

3 讨 论

手足口病是一种由肠道病毒引起的常见疾病,主要由 EV71 和 CA16 感染所致。特别是 EV71 可出现无菌性脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎等中枢神经系统病变,严重者可致死亡^[3]。而此病是一种可预防、可治愈的疾病,主要在于早期诊断、早期隔离、早期治疗。因而对手足口病病原学进行快速检测对该病的早期诊断显得尤为重要。目前手足口病诊断以临床表现为主要手段,传统的实验室诊断方法有病毒分离、中和试验和 ELISA 等^[4]。病毒分离时间长,操作繁琐。血清中和试验和 ELISA 用于疾病早期诊断灵敏度不高。而实时荧光 RT-PCR 灵敏度高、特异性强,反应和分析完全在封闭的条件下完成,防止 PCR 污染。整个检测过程只需 3~4 h 左右,操作简便、快速,可为手足口病的早期诊断提供实验依据,因而已广泛应用于肠道病毒核酸检测。研究表明应用实时荧光 RT-PCR 检测 EV、EV71 和 CA16^[5-7],可为手足口病提供快速而准确的病原学诊断依据,适合于手足口病的早期诊断。

本实验室应用实时荧光 RT-PCR 检测了 236 份手足口病患儿粪便及脑脊液标本,肠道病毒阳性率为 91.45%,EV71 和 CA16 检出率分别为 37.17%和 23.93%,EV71 阳性率高于 CA16,表明本地区以 EV71 感染为主。其中有 4 例同时检出 EV71 和 CA16,其临床症状是否比单一感染更严重还有待进一步分析。2 例脑脊液标本中均未检测到 3 种肠道病毒核酸。有部分标本 EV 阳性而 EV71 和 CA16 均为阴性,表明还存在非 EV71 和 CA16 肠道病毒感染,究竟为何种肠道病毒感染还有待于进一步确认。

实时荧光 RT-PCR 检测样本类型范围广,可采用血液、大

便、咽拭子、疱疹液、脑脊液、肛拭子等进行检测,标本采集方便,阳性率高于 RT-PCR^[7],结果快速准确,家长易于接受,可作为手足口病的常规检测方法。

参考文献

[1] 万俊峰,朱理业,刘红,等.阜阳市手足口病(EV71 感染)疫情流行病学分析[J].安徽医学,2008,6(4):268-269.

[2] 卫生部.手足口病预防控制指南(2009 版)[J].全科医学临床与教育,2010,8(2):125-133.

[3] Chen SC,Chang HL,Yan TR,et al. An Eight-Year Study of Epidemiologic Features of Enterovirus 71 Infection In Taiwan[J]. Am J Trop Med Hyg,2007,77(1):188-191.

[4] 吴海波,郭潮潭.肠道病毒 71 型检测方法研究概况[J].国际流行病学传染病学杂志,2008,35(3):188-190.

[5] 张永乐,潘克女,徐岱,等.手足口病病原体实时荧光 RT-PCR 反应体系的建立与临床应用[J].中华微生物学和免疫学杂志,2009,29(3):276-278.

[6] 钟天鹰,陈倩,胡正.荧光定量 PCR 检测手足口病患儿肠道病毒 RNA[J].中国当代儿科杂志,2010,12(2):145-146.

[7] 何雅青,肖性龙,杨洪,等.实时荧光 RT-PCR 及 RT-PCR 快速检测肠道病毒 71 型和柯萨奇 A16 病毒[J].中国卫生检验杂志,2008,18(12):2780-2781.

(收稿日期:2010-09-08)

• 临床研究 •

三种方法检测梅毒螺旋体抗体的结果比较

毕红琳¹,马 娟¹,朱中梁¹,徐升强²(1.湖北省黄石市中心医院医学检验科 435000;
2.武汉市一医院检验科 430022)

【摘要】 目的 比较梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)与微粒子化学发光法(CMIA)检测梅毒螺旋体特异性抗体的敏感性与特异性。**方法** 分别用 TPPA、ELISA 与化学发光法对 1 473 份患者血清标本进行梅毒螺旋体特异性抗体检测。**结果** 检测的 1 473 份血清标本中,TPPA 确证阳性 196 例,阳性率 13.3%。以 TPPA 作为参照,CMIA 敏感性为 100%(196/196),特异性为 98.9%(1 263/1 277);ELISA 的敏感性为 97.4%(191/196),特异性为 97.6%(1 246/1 277)。**结论** 三种方法具有较好的可比性,CMIA 法可用于梅毒抗体的临床筛查。

【关键词】 梅毒螺旋体特异性抗体; 微粒子化学发光法; 梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验; 酶联免疫吸附试验
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.05.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)05-0582-02

梅毒是由梅毒螺旋体感染引起的性传播疾病(STD),具有高度传染性。近年来我国梅毒发病率呈较大幅度的上升趋势。国家卫生部公布的甲、乙类法定报告传染病中,梅毒发病人数已从 2005 年的第 5 位跃居为 2007 年的第 3 位。梅毒的临床表现较复杂,且梅毒螺旋体培养很难,故血清学检测是诊断梅毒的重要依据之一,常用的血清学方法包括梅毒螺旋体凝集试验(TPHA)、梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)、梅毒螺旋体荧光抗体吸收试验(FTA-ABS)、酶联免疫吸附试验(ELISA)和微粒子化学发光法(CMIA)。本文应用 CMIA、ELISA 和 TPPA 3 种方法同时检测梅毒抗体,并对这 3 种方法进行比较,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂 美国雅培公司的全自动微粒子化学发光仪器 ARCHITECT i-2000 System,配套试剂为 ARCHITECT R Syphilis TP。ELISA 检测梅毒特异性抗体试剂盒为北京万泰生物公司产品。TPPA 试剂盒为日本富士瑞必欧株式会社试剂盒(试剂盒包含溶解液、血清稀释液、致敏粒子和阳性对照血清)。

1.2 标本来源 1 473 份血清标本来自 2009 年 1 月至 2010 年 7 月本院性病专科门诊患者,采静脉血及时分离血清,置-20℃保存。

1.3 方法 所有血清标本分别用 TPPA、ELISA 和 CMIA 进