

实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹病毒检测中的应用价值

王颖,赵志武

(天津市蓟州区疾病预防控制中心检验科,天津 301900)

摘要:目的 分析实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹病毒检测中的应用价值。方法 选取 2018 年 12 月~2020 年 12 月我院收治的 65 例疑似麻疹患者作为研究对象,分别通过酶联免疫吸附试验(ELISA)法和实时荧光定量 RT-PCR 法对麻疹病毒进行检测,比较两种方法检测阳性率以及不同检测时间阳性率。结果 实时荧光定量 RT-PCR 检测阳性率为 29.23%,高于 ELISA 法的 10.77%,差异有统计学意义($P>0.05$);第 1 天,ELISA 法检测阳性率低于实时荧光定量 RT-PCR 法,差异有统计学意义($P<0.05$),第 5 天,ELISA 法检测阳性率高于实时荧光定量 RT-PCR 法,差异有统计学意义($P<0.05$),其余时间段两种方法检测阳性率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 实时荧光定量 RT-PCR 法检测麻疹病毒具有较高的应用价值,灵敏度较高,且操作简单。

关键词:实时荧光定量;麻疹病毒;酶联免疫吸附试验

中图分类号:R446.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.07.050

文章编号:1006-1959(2021)07-0174-03

The Application Value of Real-time Fluorescence Quantitative RT-PCR in the Detection of Measles Virus

WANG Ying,ZHAO Zhi-wu

(Department of Laboratory Medicine,Center for Disease Control and Prevention,Jizhou District,Tianjin 301900,China)

Abstract:Objective To analyze the application value of real-time fluorescent quantitative RT-PCR in the detection of measles virus.Methods 65 cases of suspected measles patients admitted to our hospital from December 2018 to December 2020 were selected as the research objects.The measles virus was detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method and the real-time fluorescent quantitative RT-PCR method respectively, and the positive rate of the two methods and the positive rate of different detection times were compared.Results The positive rate of real-time fluorescent quantitative RT-PCR detection was 29.23%, which was higher than the 10.77% of ELISA method, the difference was statistically significant ($P>0.05$);On day 1, the positive rate of ELISA method was lower than that of real-time fluorescent quantitative RT-PCR method,the difference was statistically significant ($P<0.05$).On the 5th day, the positive rate of ELISA method was higher than that of real-time fluorescent quantitative RT-PCR method,the difference was statistically significant ($P<0.05$).There was no statistically significant difference in the positive rates of the two methods in the other time periods ($P>0.05$).Conclusion Real-time fluorescent quantitative RT-PCR method for detecting measles virus has high application value, high sensitivity, and simple operation.

Key words:Real-time fluorescence quantitative;Measles virus;Enzyme linked immunosorbent assay

麻疹(measles)是一种由于麻疹病毒导致的急性呼吸道感染病,患者临床症状主要表现为发热、皮疹、咳嗽、结膜炎等^[1]。近年来,随着生活节奏的加快以及饮食习惯的改变,麻疹的发病率逐年上升,且传染性较强,因此有效地预防措施至关重要。麻疹与急疹、药疹、风疹等具有一定的相似性,临床鉴别诊断的难度较大,如何选择有效地诊断方式,是目前临床面临的重要课题之一^[2]。目前临床中检测麻疹病毒的常用方法包括酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)、实时荧光定量 RT-PCR 等,前者是传统临床诊断麻疹病毒的方法,而实时荧光定量 RT-PCR 则是近年来出现的一种核酸检测技术,不仅检测速度较快,且具有高敏感度、高灵敏度的特性^[3]。本研究对比了 ELISA 法与实时荧光定量 RT-PCR 法在麻疹病毒检测中的应用效果,旨在分析实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹病毒检测中的应用价值,具体报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 12 月~2020 年 12 月天

作者简介:王颖(1970.2-),女,天津人,本科,副主任技师,主要从事(以病毒)检验工作

津市蓟州区疾病预防控制中心收治的 65 例疑似麻疹患者作为研究对象,其中男性 38 例,女性 27 例,年龄 1~13 岁,平均年龄(7.28±1.36)岁。患者临床症状均表现为不同程度的发热、咳嗽、结膜炎等。

1.2 方法 所有患者均在出疹后 7 d 内抽取血液样本、采集咽拭子标本进行检测。抽取患者静脉血 2~3 ml,在 4℃环境下离心处理,以 2000 r/min 的速率持续离心 10 min。离心结束后收集上层血液,在 2℃~8℃环境下保存待测。

1.2.1 ELISA 法检测 根据麻疹病毒 IgM 抗体检测试剂盒(珠海经济特区海泰生物制药有限公司,产品注册号:国食药监械<准>字 2014 第 3401262 号)的说明书进行操作,结束后空白调零,通过酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)得出 450 nm 处吸光度值,或通过 A450-630 nm 计算吸光度值,分析检测结果。

1.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 检测 在患者出疹第 5 天采集咽拭子样本,通过无菌棉签蘸取咽部分泌物,蘸取时应避开口腔黏膜、舌等部位。置入添加 3-5 ml 病毒标本保存于液内,在标本袋顶端折断棉签。之后提取 RNA,进行后续扩增。采用 RT-PCR 法进行检测,严格按照试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司)

说明书进行操作,合理配置反应体系,在 PCR 仪(美国 ABI 公司)中进行扩增实验。反应条件如下:逆转录温度控制在 50 ℃,时间为 15 min,循环 1 次;预变性温度控制在 95 ℃,时间为 15 min,循环 1 次;退火、变性、延伸温度控制在 94 ℃,时间为 15 s,循环 40 次。当温度达到 55 ℃时,收集所有荧光信号。

1.3 观察指标 比较两种方法检测阳性率及不同采样时间阳性检出率。

1.4 统计学方法 通过 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计数资料以率(%)表示,采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法检测阳性率比较 实时荧光定量 RT-PCR 检测阳性率为 29.23%(19/65), 高于 ELISA 法检测阳性率的 10.77%(7/65), 差异有统计学意义($\chi^2=6.923, P=0.009$)。

2.2 不同检测时间两种方法阳性率比较 第 1 天, ELISA 法检测阳性率低于实时荧光定量 RT-PCR 法, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 第 5 天, ELISA 法检测阳性率高于实时荧光定量 RT-PCR 法, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 其余时间段两种方法检测阳性率比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 不同检测时间两种方法阳性率比较[n(%)]

检测方法	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
实时荧光定量 RT-PCR	19	14(73.68)	3(15.79)	1(5.26)	1(5.26)	0	0	0
ELISA	7	1(14.29)	1(14.29)	1(14.29)	2(28.57)	2(28.57)	0	0
χ^2		7.394	0.009	0.586	2.723	5.881	/	/
P		0.007	0.925	0.444	0.099	0.015	/	/

3 讨论

麻疹是国际范围内较常见的疾病类型, 患者得病后会有发热、出疹等症状。该疾病多发生于 2 岁以下的患者, 发病率约为 40%~50%, 其次为 20~39 岁的患者, 发病率为 25%~35%^[4]。近年来, 疫苗在临床得到了广泛的应用, 但同时随着病毒毒性变化以及成年麻疹病毒感染的发生率的上升, 导致麻疹患者受到病毒感染后无明显症状, 不仅延长了诊断时间, 也难以有效与风疹等类似疾病鉴别, 大大提高了临床诊断的难度^[5]。麻疹在发病的前后 5 d, 具有较高的传染性, 易感患者与感染源接触后, 发病率极高^[6]。因此, 临床一旦发现疑似麻疹患者, 应给与高度重视, 及时进行相关临床检测, 提高检出率, 保证诊断的及时性与准确性, 从而避免麻疹的广泛传播^[7]。

传统临床对麻疹患者进行相关检测时, 会提取患者的血液样本或鼻咽分泌物。当麻疹患者出现皮疹时的第 1 天即可检测出麻疹病毒, 因此临床检测对于早期麻疹的鉴别诊断中具有重要的作用。临床检测麻疹病毒的方式较多, 其中 ELISA 法和实时荧光定量 RT-PCR 法是目前最常见的类型, 和其他方法相比, 这两种方法的操作较为简单, 且可实现短时间内检测, 灵敏度高^[8]。多项研究显示^[9-11], 实时荧光定量 RT-PCR 相比 ELISA 法对麻疹病毒的检出率更高, 可能是由于当患者受到麻疹病毒感染后, 特异性 IgM 抗体反应需要一定的时间, 随着采血时间的改变, 诊断的结果也会发生一定的变化。若采血时间过早, 可能导致检测结果出现假阴性, 若采血时间过迟, 不仅会增加采血的难度, 还可能错过最佳的治疗窗口时间, 影响临床疗效, 对患者的早期诊断与治疗造成了严重的影响。由此可以看出, ELISA 法在

临床麻疹病毒的检测中存在明显的缺陷。本次研究结果显示, 实时荧光定量 RT-PCR 检测阳性率明显高于 ELISA 法, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。65 例疑似麻疹患者均在出疹 7 天内采集样本, ELISA 法出疹第 1 天检测阳性率为 14.29%;, 实时荧光定量 RT-PCR 出疹第 1 天检测阳性率为 73.68%, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。ELISA 法出疹第 5 天阳性率为 28.57%, 实时荧光定量 RT-PCR 法出疹第 5 d 阳性率为 0, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果显示, 不同的采血时间其检出率也有所不同。在出疹后的 1~3 d, ELISA 法检出率较高, 当出疹时间延长至 4~7 d 时, ELISA 法检出率有明显的下降趋势。因此, 临床对于疑似麻疹患者, 应在出疹后立即采集样本, 并通过 ELISA 法检测血清样本 IgM 体, 若病毒检测显示特异性为阴性, 则应在出疹后 4~28 d 内再次检测, 从而有效控制疾病的传播。实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹病毒检测方面具有明显的优势, 阳性率高于 ELISA 法, 且能够在出疹后 1 d 检测出麻疹病毒, 对早期诊断、治疗具有重要的参考价值, 还有利于控制疾病的传播。

根据荧光定量 RT-PCR 计数的特点, 检测方法可分为绝对定量和相对定量两种。绝对定量指的是通过对已知标准品进行稀释, 根据稀释后的标准品建立标准曲线, 曲线中 ct 值与初始 RNA 或 eDNA 拷贝数有线性关系, 医务人员可以根据这种关系, 通过分析 CT 值明确未知样品起始模板拷贝数^[12]。使用这种方法时, 首先需要架设标准品与未知样品的扩增效率相等, 在稀释标准品时, 要保证处于可测量的范围内。对于标准品的选择较为多样化, 既可以是双链 DNA, 也可以是单链 DNA 或承载靶序列的 eRNA^[13]。

该测量方法主要用于体液中病毒或肿瘤负荷的定量。绝对定量法的检测准确度与标准品的准确度密切相关。但这种方法也存在一定的缺陷,即检测时样品中可能存在抑制剂,可能会影响结果的准确性^[14]。相对定量指的是在测量目的基因的同时,测量另一内源性管家基因,先对目的RNA的ct值与管家基因ct值进行对比,根据结果设置目的RNA的值,实现各个样品之间的互相对比,能够分析出不同样品RNA的相对表达量^[15]和绝对定量相比,相对定量法的关键在于保证RNA与内源性管家基因的扩增效率相同,否则也会对检测结果的准确性造成影响^[16]。

在荧光定量RT-PCR技术中,每个环节都至关重要,一旦出现人为失误,就会对检测的结果造成影响^[17,18]。目前医学界认为Oligo(dT)是合成cDNA的最佳选择,特异性明显高于其他随机引物。该物质仅会与带有poly A+(多聚腺苷酸)尾巴的mRNA结合,但是Oligo(dT)对RNA序列的要求较高,不仅需要高质量,还要保证是全长,因此甲醛固定经石蜡包埋组织中提取的片段RNA难以进行逆转录^[19]。另一方面,在逆转录过程中若出现二级结构或引物探针结合点位于mRNA的5'端时可能会造成影响,因此临床使用时可以将Oligo(dT)与随机引物混合使用,从而提高检测的准确率。最好的方法是选择目标特异性引物合成的cDNA特异,这样能得到较为精确的结果,但由于不同目标的特异性RNA逆转录需要单独进行,当提取到的RNA量较少时,会出现浪费的情况^[20];第三,抑制剂影响。RNA在提取、纯化所经历各个环节中,都存在着不同的抑制剂,会对mRNA的定量造成一定的影响,例如体液成分、血红蛋白、尿素等。另一方面,DNA片段、残余抗凝剂等也会对PCR的发生效率造成影响,不同的多聚酶对不同抑制剂的敏感性也有所区别,导致PCR结果存在一定的误差。因此,在选择材料时,应以耐热DNA多聚酶为主。此外,还有一些其他因素可能影响RT-PCR的检测结果,如实验室、操作人员、公司试剂等,临床中必须要对这些因素进行全面的控制,保证RT-PCR的检测质量。

综上所述,对麻疹病毒采取实时荧光定量RT-PCR检测,具较高的阳性检出率,降低麻疹漏诊率,操作简单,为麻疹疫情早期控制及处理起到积极的促进意义。

参考文献:

- [1]王瑞雪.实时荧光定量RT-PCR在麻疹病毒检测中的应用价值[J].河南医学研究,2018,27(5):839-841.
- [2]闵文光.麻疹病毒检测中实时荧光定量RT-PCR的价值

分析[J].口岸卫生控制,2019,24(4):31-33.

- [3]陈玲霞,姬莉莉,孙建飞.麻疹实验室诊断中ELISA法和实时荧光定量RT-PCR法的比较[J].实用预防医学,2016,23(1):106-108.
- [4]付倩,文奇,廖秀海.ELISA法和RT-PCR法在麻疹病毒检测中的应用对比[J].中国医学创新,2017,14(36):91-94.
- [5]褚文达.ELISA法和RT-PCR法在麻疹病毒检测中的应用比较分析[J].标记免疫分析与临床,2016,23(11):1352-1354.
- [6]李东,杨秀惠,张苏晗,等.福建省发现输入性B3基因型麻疹病毒[J].中华流行病学杂志,2020,41(6):946-951.
- [7]段云权,丁启能,徐梅琼,等.楚雄州2014年-2015年疑似麻疹/风疹病例标本检测结果分析[J].中国卫生检验杂志,2016,26(21):3121-3122,3125.
- [8]任虎,曹蕾,毛乃颖,等.基于核蛋白的麻疹病毒IgG抗体间接ELISA检测方法的建立及应用[J].中华实验和临床病毒学杂志,2020,34(1):61-66.
- [9]闫艳丽,李焱,吴瑞,等.麻疹病毒核酸和IgM抗体检测的应用比较分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2020,34(3):313-315.
- [10]陈萌,王怡婷,张朱佳子,等.2017-2018年北京市麻疹疑似病例中发热伴出疹疾病相关病毒检测[J].国际病毒学杂志,2019,26(5):324-327.
- [11]刘凤.2014-2018年天津市南开区疑似麻疹病例血清学和病毒核酸检测结果分析[J].现代预防医学,2020,47(3):492-494,517.
- [12]白婧,张娜,葛言,等.2013-2016年北京市海淀区麻疹病毒实验室检测结果分析[J].现代预防医学,2018,45(14):2651-2653,2661.
- [13]文奇,付倩,宋利军,等.一种基于N基因的麻疹病毒实时荧光RT-PCR检测技术[J].实验与检验医学,2019,37(5):813-815.
- [14]单元春,周剑惠,王爽,等.应用多重荧光定量RT-PCR技术检测麻疹病毒的适用性分析[J].中国卫生检验杂志,2016,26(12):1706-1707,1710.
- [15]胡满丽,张燕,王慧玲,等.2018年中国麻疹风疹疑似病例的实验室检测和监测[J].病毒学报,2020,36(1):20-25.
- [16]熊衍峰,张艳妮,陈祥发,等.江西省赣州市2013-2016年麻疹病毒分离株N基因和H基因特征分析[J].国际病毒学杂志,2020,27(5):377-380.
- [17]刘冷,郝焱英,王慧玲,等.广东省含麻疹成分疫苗接种后发热出疹病例的血清学和病毒学检测[J].中国疫苗和免疫,2017,23(3):257-261.
- [18]朱晓光,李斌,刘冰,等.麻疹病毒属病毒检测基因芯片的建立[J].中国病原生物学杂志,2010,5(5):329-331,封3.
- [19]赵娣伟.实时荧光定量PCR和ELISA检测麻疹病毒的探讨[J].中国城乡企业卫生,2016,31(5):75-76.
- [20]牟纲,罗如平.儿童亚急性硬化性全脑炎血清和脑脊液中麻疹病毒特异性IgM的检测及意义[J].医学临床研究,2015,32(12):2452-2453.

收稿日期:2021-01-06;修回日期:2021-01-15

编辑/林瑞颖