

荧光 RT-PCR 同步检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒

临床研究

A 组 16 型方法的建立及应用

曾昭森(湖北省钟祥市中医院检验科 湖北 钟祥 431900)

【摘要】 目的 建立快速、灵敏、特异的肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型的荧光 PCR 检测及分型方法。方法 针对肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型的特异性保守基因 vp1 基因分别设计一对引物和对应的探针,对荧光 RT-PCR 反应体系进行优化,验证方法的特异性、灵敏度和重复性,并对临床样品进行检测分析。结果 该方法对肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型的检测有高度特异性,与甲肝、腮腺炎、风疹、乙型脑炎等病毒均无交叉反应,检测灵敏度可达 10 拷贝/ μl ;43 例患儿肛拭子标本中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型检测率分别为 37.21% (16/43) 和 13.95% (6/43)。结论 荧光 RT-PCR 法分型检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型的方法具有快速、便捷、特异、灵敏等特点,适用于肠道病毒的早期诊断。

【关键词】 肠道病毒 71 型号 柯萨奇病毒 A 组 16 型 荧光 RT-PCR TaqMan 探针 手足口病

肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 和柯萨奇病毒 A 组 16 型 (Coxsackievirus A16, CA16) 是引起手足口病的两种主要的病原体^[1],主要在夏、秋季节高发于 5 岁以下儿童,3 岁以下比较容易出现并发症。感染病毒后,大多数患者呈隐性感染状态,显性感染者可表现为发热、手、足、臀部、口腔颊黏膜等处出现小的斑丘疹或水泡,重症伴发肺水肿、休克、无菌性脑膜炎、脑炎等并发症^[2]。中华人民共和国卫生部在 2008 年 5 月份将手足口病定为一类传染病,并在《手足口病预防控制指南》(2008 年版)中推荐了手足口病实验室检测方案[病毒分离、测定人双份血清标本的中和抗体滴度及逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)],此方案是目前手足口病病原检测的常用方法,然而在实际操作中,步骤过于复杂且 PCR 污染问题严重,不适合大样本量检测。近年来,国内外已有采用荧光定量 PCR 技术进行肠道病毒诊断的报道,该方法具有灵敏度高 特异性强,耗时短、不易污染等优点^[3]。本研究旨在利用实时荧光 RT-PCR 方法建立一种准确、简便而特异的对 EV71 和 CA16 感染进行鉴别诊断的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒株与临床样本 EV71 和 CA16 标准株由湖北省疾控中心提供,甲型肝炎病毒等其他病毒株由武汉大学生命科学院惠赠,43 例肠道病毒样本由钟祥市人民医院检验科提供。

1.1.2 试剂和仪器 RNA 提取、逆转录扩增试剂均购自美国 QIAGEN 公司;核酸相对分子质量标准 DL2000 DNA marker 购自日本 TaKaRa 公司;荧光定量 PCR 仪为

ABI7500;凝胶成像仪为 BIO-Rad UV HOOD II。

1.2 方法

1.2.1 引物与 TaqMan 探针的设计与合成 从 GenBank 数据库中查找 EV71 和 CA16 的特异性保守基因 vp1,利用 Primer Express 2.0 分别设计引物和 TaqMan-MGB 探针,并在 NCBI 数据库进行 Blast 同源性比对验证。序列为:EV71F:5'-CGCGCAAATGCGTAGAAAG-3';EV71R:5'-CAAAAGTGAAGTCTGCATCAAAGC-3';EV71-Probe:5'-FAM-TGGAGCTATTCACCTACATG-MGB-3';CA16F:5'-GGACCCACCAGCTCAAGTGT-3';CA16R:5'-CATCGTA-AAACCATTGGTATGCA-3';CA16-Probe:5'-ROX-AGTC-CCCTTCATGTGTCAC-MGB-3'。EV71 和 CA16 的 5'端分别标记 FAM 和 ROX 荧光报告基团,3'端标记的荧光淬灭基团均为 BHQ1。引物和探针均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.2.2 病毒模板的制备 EV71 和 CA16 等 RNA 病毒采用 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Kit 进行病毒 RNA 提取所有操作按试剂盒说明进行。提取的 RNA 于 -80℃ 保存。

1.2.3 荧光 RT-PCR 检测体系 反应体系为 50 μl ,包括 5 \times 反转录缓冲液 10 μl ,DNTP(2.5 mM)10 μl ,上下游引物 (10 μM)各 2 μl ,探针 (10 μM)各 1 μl ,RNA 酶抑制剂 (40 U/ μl) 2 μl ,M-MLV(200 U/ μl) 2 μl ,rTaq(5 U/ μl) 1 μl ,DEPC 处理水 10 μl ,稀释后的 RNA 模板 5 μl 。在 ABI 7500 型 FQ-PCR 仪上进行扩增,循环条件:45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s (40 个循环)。延伸阶段收集荧光,实时分析标本的荧光阈值。

施,只有这样才能使我们的治疗达到事半功倍的效果。

参考文献

- [1] 中国高血压防治指南修订委员会. 中国高血压防治指南 2010[J]. 中华心血管病杂志, 2011,40(8):701-743.
- [2] 中国成人血脂异常防治指南制定联合委员会. 中国成人血脂异常防治指南[J]. 中华心血管病杂志, 2007,35(5):390-410
- [3] 彭强, 苏海. 血脂异常与高血压的关联[J]. 中华高血压杂志,

2007,15(10):874-877.

- [4] 闫杰, 宋玉娥. 他汀类药物降压作用研究进展[J]. 内科急危重症杂志, 2010,16(2):97-99.
- [5] 刘力生, 王文, 姚崇华. 中国高血压防治指南(2009 基层版)[J]. 中华高血压杂志, 2010,18(1):11-30.

(收稿日期:2011-12-16)

1.2.4 荧光 RT-PCR 反应特异性、灵敏度及重复性实验 选择 EV71 和柯萨奇病毒 A16 型、以及容易引起肺炎的非肠道病毒, 甲肝、腮腺炎、风疹、乙型脑炎等分别提取核酸, 用上述荧光 RT-PCR 反应体系检测, 验证方法的特异性。取 EV71 和 CA16 的 RNA 提取物通过分光光度测定法计算其浓度后, 以 8 个 10 倍梯度稀释成为系列标准品, 分别用系列标准品 ($1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{11}$ Copies/L) 为模板检测, 找出最低检测限。此外, 对每一个浓度的病毒稀释液用同一反应体系作 5 次重复检测, 计算变异系数。

1.2.5 临床样本的检测 利用所建立的荧光 RT-PCR 同步检测法对 43 份临床疑似阳性样品进行检测, 计算其阳性检出率。

2 结果

2.1 荧光 RT-PCR 方法的特异性与重复性 所建立的荧光 RT-PCR 同步检测法对肠道病毒具有较好的特异性, 可检测 EV71 和 CA16, 而与甲肝、腮腺炎、风疹、乙型脑炎等均无交叉反应, 4 个对照参考株和阴性对照均显示阴性(见图 1)。重复性实验结果变异系数(CV)为 3.2%。

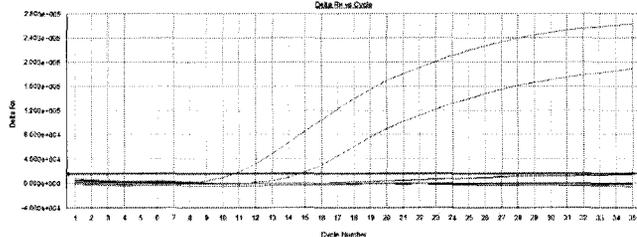
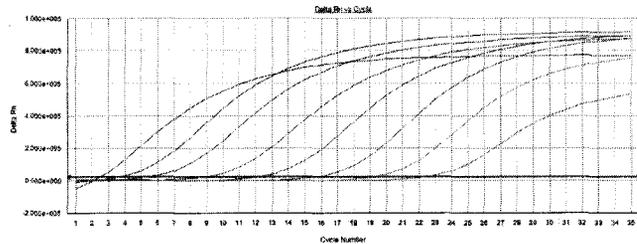
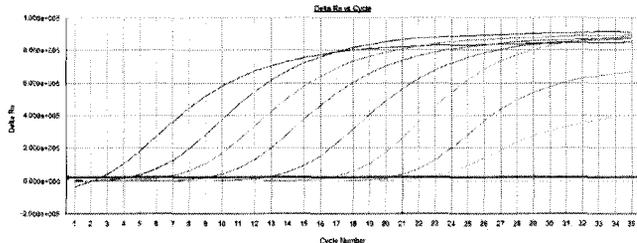


图1 荧光 RT-PCR 特异性检测图

2.2 荧光 RT-PCR 方法的灵敏度 采用无菌水将 EV71 和 CA16 的 RNA 模板 10 倍稀释为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{11}$ 拷贝/L, 阴性对照未出现扩增, 标准曲线中的 RNA 拷贝数与 CT 值之间有良好的线性关系 (EV71: $r = 0.9841$; CA16: $r = 0.9934$), 最低检测限为 1.0×10^4 拷贝/L(见图 2)。



EV71 灵敏度检测图



CA16 灵敏度检测图

图2 EV71 和 CA16 的灵敏度检测图

2.3 样本的检测 对 43 份临床疑似阳性样品, 包括 21 份粪便样品, 13 份疱疹样品和 9 份直肠拭子样本进行荧光 RT-PCR 方法检测。结果 EV71 和柯萨奇病毒 A16 型检测率分别为 37.21% (16/43) 和 13.95% (6/43)。

3 讨论

随着 PCR 技术的发展, 对肠道病检测及分型的 PCR 技术有常规 RT-PCR、多重 RT-PCR PCR-RFLP、套式 PCR、PCR 产物的测序技术以及多重实时荧光 RT-PCR 等^[4-6]。这些方法分别存在污染严重、引物较多、成本较高、操作复杂、设备要求高等缺点。本研究根据 EV71 和 CA16 型的特异性保守基因 vp1 区设计 TaqMan 荧光 RT-PCR 引物和探针, 同时检测和区分 EV71 和 CA16, 经验证对 EV71 和 CA16 核酸均扩增成功, 线性范围为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{11}$ 拷贝/L, 其特异性为 100%, 灵敏度为 1.0×10^4 拷贝/L, 整个实验需时较短, RNA 提取后仅需 1.5 h 即可一次性地完成样本检测, 且不需扩增后续处理, 操作简便。

手足口病是常见的肠道病毒感染疾病, EV71 和 CA16 型是主要病原体。传染源包括患者和隐性感染者, 该病传播方式多样, 以通过人群密切接触传播为主。病毒可通过唾液、疱疹液、粪便等污染的手、毛巾、玩具、食具、奶具以及床上用品、内衣等引起间接接触传播; 患者咽喉分泌物及唾液中的病毒可通过飞沫传播; 如接触被病毒污染的水源, 亦可经水感染。因此对肠道病毒尽早做出实验室确诊是提高诊断和治疗水平并减少患者死亡的关键。我们通过建立荧光 RT-PCR 同步检测法, 同时检测和区分了临床 43 例肠道病毒患者样本的 EV71 和 CA16, 发现存在 EV71 (37.21% 的检出率) 或 CA16 (13.95% 的检出率) 的感染。本研究建立的荧光 RT-PCR 同步检测法特异性强、敏感度高、效率高, 且操作简单, 稳定性好, 重复性好, 因此对肠道病毒的临床早期诊断具有重要的临床意义和流行病学意义。

参考文献

[1] 张伟, 王玉光, 杨朝晖, 等. 肠道病毒 71 型与柯萨奇 A 组 16 型混合感染致手足口病并发中枢神经系统感染临床分析[J]. 中国全科医学, 2012, 15(29): 3341-3343, 3346.
 [2] Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(6): 2212-2219.
 [3] 杨克红, 祝晓光, 蒋志文, 等. 实时 RT-PCR 定量检测 NGF mRNA 表达水平方法的建立[J]. 蚌埠医学院学报, 2012, 37(1): 5-7.
 [4] 张文艳, 金晶, 汪秀琴, 等. 合肥地区 328 例手足口病患者肠道病毒实时 RT-PCR 检测结果分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2010, 18(11): 877-879.
 [5] 伏瑾, 张艳玲, 孙春荣, 等. 实时 RT-PCR 检测 159 例手足口病患者样本中肠道病毒的结果分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 18(6): 488-490.
 [6] 蔡刚, 李闻捷, 丁健华, 等. 构建 cRNA 作为标准曲线的实时 RT-PCR 检测方法[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(3): 172-174.

(收稿日期: 2012-02-06)