

· 临床论著 ·

麻疹实验室诊断中病毒抗原与 RNA 检测的对比研究

侯存军 陈洪晓 柳君如 林洁 石建凤 牟海娟 徐爱玲 张文景

【摘要】目的 单克隆抗体检测麻疹病毒抗原与一步法 RT-PCR 检测麻疹病毒 RNA 在实验室诊断中的对比。方法 收集疑似麻疹患者咽拭子标本。出疹 3 d 后血清抗麻疹病毒 IgM 抗体阳性者咽拭子纳入对比试验。用荧光标记的鼠抗麻疹病毒单克隆抗体检测标本中麻疹病毒抗原成份；用一步法 RT-PCR 结合 Taqman 技术检测麻疹病毒 RNA 成份。结果 82 份疑似麻疹患者抗麻疹病毒 IgM 抗体阳性率 81.71% (67/82)。67 例确诊病例标本单克隆抗体间接免疫荧光阳性率 88.06% (59/67)；一步法 RT-PCR 结果阳性率 98.51% (66/67)。结论 麻疹病毒 RNA 的一步法 RT-PCR 结合 Taqman 检测敏感性高于其抗原的间接免疫荧光检测。

【关键词】麻疹病毒；一步法聚合酶链式反应；单克隆抗体；间接免疫荧光

Contrasting study between antigen detection and RNA detection of measles virus in laboratory diagnosis HOU Cunjun*, CHEN Hongxiao, LIU Junru, LIN Jie, SHI Jianfeng, MOU Haijuan, XU Ailing, ZHANG Wenjing. *Yantai City Hospital for Infectious Diseases, Yantai 264100, China
Corresponding author: CHEN Hongxiao, Email: hongxiaochen@126.com

【Abstract】Objective To contrast the effective rate between measles virus antigen detection by monoclonal antibody and RNA detection by one step RT-PCR. Methods The throat swab samples were collected from every suspected measles patient. Then the measles virus antigen using monoclonal antibody were detected while the measles virus RNA detected by one step RT-PCR after the patients' anti-measles viral IgM antibody were defined positive. Results Total of 67 plasma cases' anti-measles viral IgM antibody among 82 patients were positive. In the 67 cases, monoclonal antibody indirect immunofluorescence positive ratio was 88.06% (59/67). One step RT-PCR positive ratio was 98.51% (66/67). Conclusions One step RT-PCR detection method was surpass to the monoclonal antibody detection method for the diagnosis of the measles infection on the laboratory level.

【Key words】Measles virus; One step reverse transcription polymerase chain reaction; Monoclonal antibody; Indirect immunofluorescence

麻疹是传染性、致病性很强的一种疾病，在该疫苗问世前每年上百万人死于该病。现今发病率已大大降低。但在偏远地区仍时有疫情暴发。即使在发达国家也难幸免，2007 年日本神户出现疫情暴发；2008 年法国出现疫情大暴发^[1-2]。部分患者由于免疫、疫苗接种以及病毒变异等问题，使症状变得不典型。Eskiocak 等^[3]发现临床诊断的正确率仅 50%。因此，麻疹的实验室诊断非常重要；简化实验方法、缩短所需时间、提高敏感性可靠性、降低费用是研究重点。

为选择出更理想的诊断方法，收集本院 2011

至 2013 年每年 3～5 月份麻疹高发季节疑似病例咽拭子标本，流行季结束后集中试验，共收集标本 82 例，经 ELISA 检测血清抗麻疹 IgM 抗体，阳性者 67 例为确诊病例，纳入下一步实验。采用单克隆抗体间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 和一步法聚合酶链式反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 对确诊患者的咽拭子进行检测和回顾性对比分析，报道如下。

资料与方法

一、研究对象

收集 2011 年 3 月至 2013 年 7 月烟台市传染病医院 82 例疑似麻疹患者，其中男性 43 例，女性 39 例；年龄 17～33 岁 (平均年龄 24.38 岁)。其中本地常住居

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.011

基金项目：烟台市科技发展计划项目 (No. 2011249)

作者单位：264100 烟台市，烟台市传染病医院 (侯存军、石建凤、牟海娟、徐爱玲、张文景)；解放军第 404 医院 (陈洪晓、柳君如、林洁)

通讯作者：陈洪晓，Email: hongxiaochen@126.com

民49例;外来务工人员33例。有5例患者来到本地2~3 d即发病,为外来输入病例。用病毒采集专用拭子取咽部分泌物,放入病毒保存液于-70℃冰箱保存待测^[4]。并收集患者出疹3 d后血清各1份。本研究经过医院伦理委员会批准,标本采集前已向患者告知,并签署知情同意书。

二、主要试剂及仪器

1. 广东珠海经济特区海泰生物制药有限公司生产的麻疹 IgM 抗体酶联免疫检测试剂盒。

2. 上海恒远生物科技有限公司的病毒 RNA 磁珠法提取试剂盒。上海之江生物科技股份有限公司生产的麻疹病毒核酸测定试剂盒(一步法荧光定量 RT-PCR)。PCR 荧光定量检测仪 7500FAST, ABI 公司。

3. 美国 Millipore 公司生产的鼠抗麻疹病毒硫氰酸荧光素标记的单克隆抗体(mouse anti-measles ftc monoclonal antibody)。

三、方法

1. 用 ELISA 捕获法对出疹 3 d 后采集的血清进行抗麻疹病毒 IgM 抗体检测,按试剂盒说明书的要求进行试验操作和结果判定^[5]。结果阳性者咽拭子标本纳入之后试验。

2. 咽拭子标本常温下解冻,用旋涡混合器打散粘液,1500 r/min离心10 min(离心半径 $r=13.5$ cm),弃上清,沉淀物用少量PBS调成悬液。

3. 将混悬液均匀涂在玻片上,空气中干燥后用丙酮固定。加入硫氰酸荧光素标记的抗麻疹病毒单克隆抗体,37℃湿盒孵育30 min, PBS、蒸馏水各洗涤2次,荧光显微镜下观察结果^[6]。如图1所示,

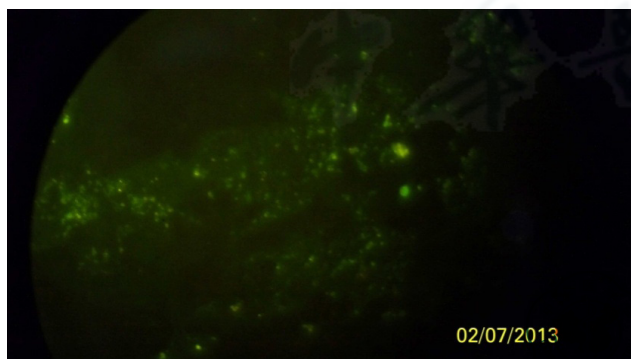


图1 咽拭子间接免疫荧光表达情况

咽拭子中鳞状细胞内可见荧光染色阳性表达,高倍镜分析,荧光表达多位于细胞内病毒包涵体中,可排除非特异性免疫荧光着色情况。

4. 用病毒 RNA 提取试剂盒提取混悬液中麻疹病毒 RNA 成份:采用一步法 RT-PCR 结合 Taqman 技术,对麻疹病毒的特异性 RNA 核酸片段进行荧光定量检测^[7-8](具体过程按试剂说明书操作)。部分标本 PCR 曲线见图2,阳性标本均可有扩增产物,其扩增曲线明显,Ct 值有效。

四、统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据处理,对计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、不同方法检测结果的阳性率

82 份疑似麻疹患者血清标本抗麻疹病毒 IgM 检测,阳性结果 67 例为确诊病例,阳性率 81.71% (67/82)。对 67 例确诊患者的咽拭子标本一步法 RT-PCR 结果阳性率 98.51% (66/67);咽拭子标本涂片间接免疫荧光实验结果阳性率 88.06% (59/67)。

二、RT-PCR 结果与 MV 抗原检测结果的比较

对 67 例麻疹确诊病例咽拭子标本,病毒 RNA 一步法 RT-PCR 检测阳性率明显高于抗原间接免疫荧光结果见表1。应用 χ^2 检验对二者阳性结果对比分析,阳性率有显著差异($\chi^2 = 4.288$, $P < 0.05$)。结果提示,感染部位麻疹病毒 RNA 基因扩增检测法较患者麻疹病毒抗原检测更敏感,而基因的特性决定该检测方法的特异性更高;且有利于

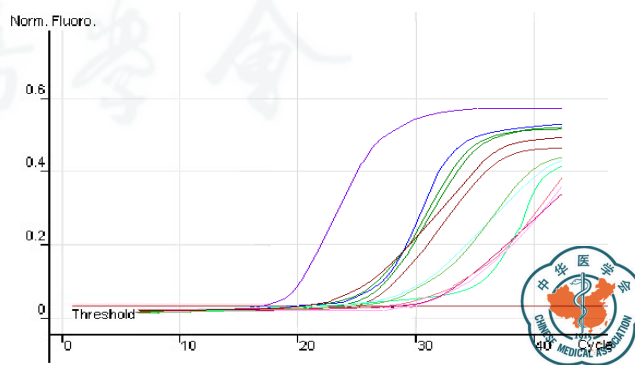


图2 麻疹患者咽拭子麻疹病毒 RNA 测定结果

表1 67 例咽拭子标本麻疹病毒一步法 RT-PCR 和抗原检测结果(例)

RT-PCR	MV 抗原检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	59	7	66
阴性	0	1	1
合计	59	8	67

更进一步分析麻疹病毒变异情况。

讨 论

虽然麻疹疫苗的问世使麻疹发病率大大下降。但由于是一种人类和灵长类共患的疾病,并且还有病毒变异、慢性感染者是否有传染性等不确定因素存在^[9]。决定了麻疹这一疾病将长期伴随着人类。而早期确诊是控制麻疹蔓延的关键环节。

目前麻疹实验室诊断多采用ELISA检测血清的抗麻疹病毒IgM抗体。虽然ELISA简便易行,但该抗体要在出疹后2~4 d才能检出。若当患者就诊时间早于抗体产生高峰期,IgM抗体仍作为诊断指标,将会有一定比例的漏诊。因此,该方法对麻疹早期诊断有一定局限性^[10]。

单克隆抗体检测麻疹病毒抗原最初用作培养病毒的分离鉴定。通过改进方法可从患者咽拭子或尿液标本中直接检测麻疹病毒抗原。张淑芹等^[6]研究结果显示,咽拭子麻疹病毒抗原的阳性率为91.9%。本实验中阳性率稍偏低,可能与标本低温保存及实验操作有关。其次,不同的标本中麻疹病毒含量不同,也可对实验结果产生影响。针对感染细胞内麻疹病毒抗原成份的检测,可早期发现疑似和不典型麻疹病例。检测过程简单快速,整个过程只需2 h,适合高发季对可疑病例的筛查。但采集的脱落细胞数量会直接影响观察结果,必须保证脱落细胞的数量和质量。如采集时操作不规范、力度不够、患儿不配合,都会影响脱落细胞采集量,进而影响试验结果。

RT-PCR在出疹前后3 d内可检测到麻疹病毒RNA。经过方法改进的一步法实时荧光定量RT-PCR,将逆转录过程和扩增过程在一个反应管中完成。实行完全闭管式操作,大大减少扩增产物被污染的机会。本研究结果显示,PCR法检测过程中部分标本曲线Ct值较大时,仍可见明显PCR曲线,表明即使标本中病毒含量较低时,仍能保证实验结果有较高准确性。且结合TaqMan探针后特异性也大大提高。较常规RT-PCR技术,无论从敏感性、特异性与速度上都更具有优势^[11]。Michel等^[12]使用该方法发现患者唾液中阳性率98%,血

浆中95%。灵敏度高于传统方法。且本方法重复性好,证明其方法可靠。本试验所用试剂盒为特异检测专用,无需自行设计引物和探针。使实验变得更加简单,在3 h内即可做出诊断。本试验阳性率为98.51%,与文献报道基本相符。

一步法实时荧光定量RT-PCR实验操作和结果判定都是自动执行,保证了结果的客观性,对操作人员的要求相对要低^[12]。商用试剂盒国内已有生产,费用更经济。而针对感染细胞内麻疹病毒抗原成份的检测,整个过程都由操作者完成,个人经验和熟练程度将直接影响结果的可靠性。因此,一步法实时荧光定量RT-PCR是目前更值得推广的实验室诊断方法。

参 考 文 献

- 1 Akiyoshi K, Suga T, Haruta T, et al. Isolation of measles virus classified as D5 genotype during an outbreak in Kobe City, Japan, in 2007[J]. Jpn J Infect Dis, 2008, 61(6):506-507.
- 2 Mortamet G, Dina J, Freymuth F, et al. Measles in France[J]. Arch Pediatr, 2012, 19(11):1269-1272.
- 3 Eskiocak M, Ekuklu G, Doğaner E, et al. Short communication: the sensitivity of measles diagnosis by physicians and families during an intraepidemic period in Edirne: implications for measles surveillance[J]. Mikrobiyol Bul, 2008, 42(1):143-148.
- 4 Akiyoshi K, Suga T, Nukuzuma S, et al. Reevaluation of laboratory methods for diagnosis of measles[J]. Jpn J Infect Dis, 2010, 63(4):225-228.
- 5 王虹玲. 两种ELISA试剂检测麻疹病毒IgM抗体实验室对比与评估[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10):1817-1818.
- 6 张淑芹, 赵文静, 王莹, 等. 间接免疫荧光法检测咽拭子和尿残渣麻疹病毒抗原的诊断价值[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2010, 4(4):390-394.
- 7 卢亦愚, 严菊英, 冯燕, 等. TaqMan荧光定量逆转录-聚合酶链反应快速检测麻疹病毒核酸[J]. 中国计划免疫, 2005, 2(1):1-4.
- 8 van Binnendijk RS, van den Hof S, van den Kerkhof H, et al. Evaluation of serological and virological tests in the diagnosis of clinical and subclinical measles virus infections during an outbreak of measles in The Netherlands[J]. J Infect Dis, 2003, 188(6):898-903.
- 9 Anlar B. Subacute sclerosing panencephalitis and chronic viral encephalitis[J]. Handb Clin Neurol, 2013, 112(3):1183-1189.
- 10 Bellini WJ, Rota PA. Biological feasibility of measles eradication[J]. Virus Res, 2011, 162(1-2):72-79.
- 11 Takao S, Shigemoto N, Shimazu Y, et al. Detection of exanthematic viruses using a TaqMan real-time PCR assay panel in patients with clinically diagnosed or suspected measles[J]. Jpn J Infect Dis, 2012, 65(5):444-448.
- 12 Michel Y, Saloum K, Tournier C, et al. Rapid molecular diagnosis of measles virus infection in an epidemic setting[J]. J Med Virol, 2013, 85(4):723-730.

(收稿日期: 2013-11-08)

(本文编辑: 孙荣华)

侯存军, 陈洪晓, 柳君如, 等. 麻疹实验室诊断中病毒抗原与RNA检测的对比研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(3): 349-351.