

· 综述 ·

麻疹的实验室诊断研究进展

徐军¹ 赵晓¹ 侯存军²

【摘要】麻疹是一种致病力很强的传染病，当前仍不时有疫情暴发。其临床诊断准确率不高，需实验室检查辅助确诊。麻疹病毒IgM抗体检测易操作，结果可靠，但发病早期易出现假阴性。一步法实时荧光定量RT-PCR能在发病早期检出病毒RNA。操作简单、快速、结果敏感。使用单克隆抗体间接免疫荧光法检测脱落细胞内麻疹病毒抗原的可靠性有待进一步研究。病毒分离和蚀斑中和实验不宜作为常规诊断使用。

【关键词】麻疹病毒；酶联免疫吸附试验；实时荧光定量RT-PCR；实验室诊断；间接免疫荧光试验

Progression of laboratory diagnosis of measles Xu Jun¹, Zhao Xiao¹, Hou Cunjun². ¹Department of Physical Examination Center, ²Department of Dermatology and Venerology, Yantai City Hospital of Infectious Diseases, Yantai 264100, China

Corresponding author: Hou Cunjun, Email: cunjunhou@163.com

【Abstract】Measles is a serious infectious disease, even to now it could be widespread occasionally in some places. The diagnosis of measles could not only depend on clinical symptoms, also laboratory examinations should be necessary. MV-specific IgM antibody could be detected reliably by ELISA, but often with false negative in the earlier course of disease. The one-step real-time RT-PCR assay was a simple and sensitive method for MV diagnosis within 2 hours. It needs further study that use a specific antibody to find out MV in brushing off cells by indirect immunofluorescent assay. Measles virus isolation and plaque neutralisation assays weren't suitable for making routine diagnosis.

【Key words】Measles virus (MV); Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Real-time RT-PCR assay; Laboratory Diagnosis; Indirect immunofluorescence assay (IFA)

麻疹是一种传染性、致病性很强的疾病。疫苗问世前，全世界每年上百万人死于该病。现今发病率及病死率虽然已大大降低，但在疫苗接种率低的偏远地区仍有疫情暴发，即使在发达国家也难完全幸免。2007年日本神户出现麻疹疫情暴发；2008年法国出现疫情大暴发。即使接种疫苗后产生的保护作用，也会随时间推移而逐渐降低，可能会被感染发病^[1]；并且麻疹是一种人类和灵长类共患的疾病，想要将麻疹病毒完全灭绝非常困难。理论上人类可最终消灭麻疹的说法越来越被怀疑^[2]。

对麻疹病毒（measles virus, MV）感染者早期确诊、控制疫情是应对重点。由于麻疹散发、疫苗接种后有部分免疫力等原因，使症状不典型、临床诊断变得困难。Eskiocak等^[3]发现确诊病例中只有约50%与初诊医生的临床诊断相符，即疑似病例的阳性预测价值只有50%，如同时

有Koplik's斑者则可提高阳性预测值至80%，但该特异性斑在发疹后第二天就开始消退，使其诊断价值有限，因此麻疹的实验室诊断非常重要^[4-5]。

一、抗-MV IgM和IgG检测

抗-MV IgM在出疹后2~4 d开始出现，3 d内75%患者可检出IgM抗体，5 d后高度敏感，约10 d达到高峰，30~60 d后消失。适合用于麻疹实验室诊断，IgG抗体与IgM抗体可同时或较晚出现，终生存在，主要用于流行病学调查^[6]。

实验方法有酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）和间接免疫荧光试验（indirect immunofluorescence assay, IFA）。ELISA是一种常用的固相酶免疫测定方法，具有灵敏度高、特异性强、重复性好，所用试剂稳定、试验操作简便、结果判断客观等特点，是WHO推荐的抗-MV IgM检测方法。但有研究者认为IFA的敏感性高于ELISA，仍是抗体检测的重要补充手段^[7]。

ELISA又分为间接法和捕获法。间接法是利用酶标记的抗抗体检测已与固相结合的IgG或IgM抗体。捕获法是先将IgM固定，去除IgG后再以特异性抗原检测IgM。因此理

论上检测IgG用间接法,检测IgM用捕获法比较合理。但有观点认为检测IgM间接法优于捕获法,全球麻疹网络实验室的推荐也是间接法。

Sampedro等^[8]用化学发光免疫分析法检测患者血清抗-MV IgM,并与酶免疫分析法对比,其敏感性和特异性均优于后者,可能会有良好的应用前景。

目前检测抗体所用标本是血浆,这限制了无症状人群、儿童疑似病例的标本采集。由于IgG在分泌物中含量很高,Goyal等^[9]用涎液代替血浆,使用ELISA捕获法检测IgG抗体,通过对无症状100名儿童涎液与血浆进行研究,使用商品生产的ELISA捕获法试剂检测IgG抗体,涎液检出敏感性为89.5%,特异性为90.6%,与血浆的一致性达为89%。在分泌物中IgM的含量比IgG低^[9-10]。但Hutse等^[11]对麻疹患者唾液中IgM抗体也进行了检测,发现敏感度与特异度分别为92%和100%。用涎液做标本无痛、易获取、安全,可有效鼓励患者和医生参与流行病学调查。尤其适合对儿童疑似病例的实验室诊断。

虽然ELISA简便易行,但麻疹患者早期IgM抗体产生较少,在出疹当天及次日产生更少,而患者就诊时间通常在这一时期。这时用IgM抗体作为诊断指标会出现很高的假阴性率;还存在结果稳定性不好,或者出现同一标本用不同试剂测试结果不一致,无法相互印证等问题。在开展广泛疫苗接种、低患病率的地区该方法更是存在弊端,在这些地区的患者血清学IgM检测可能有较低的阳性预测值,难以作为实验室诊断依据,因而需要其他方法加以确证^[12-13]。

二、MV RNA的逆转录聚合酶链反应检测

感染早期通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)即可检测出咽拭子、尿液、外周血单核细胞中MV RNA。出疹前后3 d内阳性率最高,此时期也正是患者首次就诊时间。随着分子生物学技术,尤其是PCR技术的不断发展和完善,病毒核酸检测越来越受到重视。PCR在诊断MV感染方面有许多其他方法无可比拟的优势,但由于缺乏统一的诊断标准,目前仅作为麻疹实验室诊断的一种补充方法。其应用还远不及IgM抗体的检测应用广泛^[14-15]。

由于MV为RNA病毒,序列扩增要使用逆转录或者称反转录PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR),为聚合酶链反应(PCR)的一种广泛应用的变形。在RT-PCR中首先用逆转录酶将RNA反转录成cDNA,再以cDNA为模板进行PCR扩增,获得足够多目的基因后凝胶电泳定性分析,这是最经典的实验方法。电泳法检测特异性不高,引物二聚体等杂交体出现很容易引起错误判断^[16]。

Binnendijk等^[17]用RT-PCR检测发现患者咽拭子MV

RNA阳性率达93%。还从3例与患者有接触的未患病者口咽部检出MV RNA,这3例患者同时有血清学确诊证据。适宜检测的时间从发病前5 d至发病后12 d。88%患者5周后尿液中还可检出MV RNA。如果涎液能同时检测病毒RNA和IgM,两者联合使用可大大提高诊断准确率。

巢式RT-PCR大大降低了错误片段的扩增,特异性显著提高。Akiyoshi等^[18]对麻疹患者63份咽拭子、84份外周血中单核细胞(PBMC)、85份血浆分别进行巢式RT-PCR和IgM抗体检测。咽拭子和PBMC巢式RT-PCR敏感性分别为91.2%和100%。IgM阳性率为79.6%,显著低于PBMC和咽拭子的RT-PCR阳性率。巢式RT-PCR检测PBMC中病毒RNA是最敏感的麻疹诊断方法。但该实验方法仍存在操作繁琐、只能定性观察的缺点^[19]。

实时荧光定量RT-PCR,是以一定时间内cDNA量的增幅为基础进行定量分析。将荧光探针或荧光染料加入反应体系,使每扩增一条链即有一个荧光分子释放发光,实现了荧光信号积累与PCR扩增产物完全同步。每一轮循环记录一次荧光信号强度。经软件计算分析,利用阳性对照、阴性对照标准曲线可实时定量分析PCR扩增产物,是目前定量最准确、重复性最好的方法^[20-21]。

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。使实验变得更加简单、敏感,减少了污染机会,并在几小时内即可得出结果。取感染麻疹病毒动物模型少量外周血,用一步法定量RT-PCR也可检测出麻疹病毒的RNA表达,证明其有高度敏感性^[22]。Michel等^[23]使用该方法发现患者涎液中阳性率为98%,血浆中为95%,灵敏度高于传统方法。

三、病毒分离培养

病毒分离培养对MV的研究和诊断仍是一种不可替代的经典方法。标本采集时间以出疹前3 d和出疹后3 d内为宜,需2℃~8℃保存、24 h内接种。

用于MV接种的细胞有Vero细胞、B95a细胞、PRMK细胞和A549细胞。麻疹病毒有致细胞融合形成多核巨细胞的特点,可作为病毒分离成功的标志。也可用抗MV特异性抗体经IFA证实^[24]。

将MV野毒株和MV疫苗株分别接种在B95a和Vero细胞培养基上,在B95a细胞中MV野毒株和疫苗株都能增殖,而在Vero细胞中只能培养疫苗株。MV在B95a细胞中增殖、释放比在Vero细胞快^[25]。因此,B95a细胞适合用于分离MV野毒株。

通过B95a细胞培养分离病毒所需时间,与患者是否曾注射过疫苗有关。未注射过疫苗患者培养所需时间(0.9 ± 0.5) d,最早14 h;而注射过疫苗患者所需时间(3.1 ± 2.3) d^[26]。

与PRMK细胞相比, A549细胞接种后1~2 d即能识别是否被感染, 并且病毒分离的成功率、敏感性、花费时间上有优势。

用采集不同部位标本培养MV成功率有显著性差异, 以外周血单核细胞做标本成功率最高。其次混合的鼻咽+口咽拭子标本要比咽拭子或尿液标本高^[26]。

由于病毒分离培养费时, 易出现假阴性且对技术条件要求较高。多用于病例的回顾验证、分析以及病毒分离培养后进一步研究用。

四、间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测脱落细胞内MV抗原

IFA检测MV最初用作对培养病毒的分离鉴定。通过改进方法可从黏膜脱落细胞中直接检测MV抗原。将咽拭子黏附的脱落上皮细胞用丙酮固定在玻片上, 加抗-MV单克隆抗体、荧光标记的抗抗体, 经孵育充分反应后。荧光显微镜下观察, MV感染的上皮细胞内会有荧光颗粒。有些区域还能看到特异性多核巨细胞和合胞体。结果显示, 咽拭子MV抗原的阳性率为91.9%^[27]。

被感染细胞可在呼吸道分泌物、尿液和黏膜表面如喉部、鼻腔、颊黏膜和结膜中找到, 时间以出疹前2 d至出疹后1 d阳性率最高, 部分患者出疹后7 d的痰液中仍可找到阳性细胞。感染细胞内MV抗原检测有助于临床早期诊断, 尤其可以早期发现疑似患者及不典型麻疹患者, 争取早隔离、早治疗, 对麻疹的防治有着重要意义^[28]。检测过程简单快速, 整个过程仅需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和质量会直接影响观察结果, 存在不确定性。

五、蚀斑中和试验

MV感染细胞后, 病毒释放只能由最初感染细胞向周边扩展, 经几个增殖周期后形成一个局限性细胞病变区, 此即病毒蚀斑。蚀斑减少中和试验是加入被感染者血清, 以使蚀斑数减少来确定病毒和血清抗体效价。蚀斑中和试验仍被认为是定量研究抗-MV水平的金标准^[29]。由于本试验操作比较繁琐, 目前在国内极少应用。

Terletskaia-Ladwig等^[30]经过改良试验方法, 通过软件自动执行对MV蚀斑变化情况的观察记录, 使实验过程变得简单明了, 提高了可操作性和结果判断的客观性。与酶免疫分析法有较高的一致性。有望作为MV鉴定、确证的补充方法。

六、结语

抗-MV IgM检测方法简便、准确性高, 但要发病后3~4 d才能检出, 对早期诊断无帮助, 仅适合流行病学调查和回顾性分析。MV RNA的RT-PCR检测、IFA检测脱落

细胞内MV抗原在疾病早期即可做出诊断。一步法实时荧光定量RT-PCR的出现, 极大简化了操作步骤、提高了准确性, 是最值得推广的方法。而IFA检测脱落细胞内MV抗原如取材不当易致假阴性, 广泛使用前还需进一步完善。病毒分离培养、蚀斑中和试验由于耗时长、操作繁琐, 不适合实验室诊断使用。

由于各种原因导致的麻疹疫苗漏种以及接种后保护周期存在时效性, 决定了麻疹在我国仍会是一种流行较广的传染病, 早期诊断避免疫情扩散为有效防控手段。为达到这一目的, 可靠的诊断方法必须满足早期、快速和简便的要求。

参 考 文 献

- 1 Rosen JB, Rota JS, Hickman CJ, et al. Outbreak of measles among persons with prior evidence of immunity, New York City, 2011[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(9):1205-1210.
- 2 Ostermann T, Raak C, Boehm K, et al. Attitudes towards the eradication of measles and CAM orientation of general physicians. Is there a direct link? A decision tree analysis[J]. Forsch Komplementmed, 2013, 20(5):369-375.
- 3 Eskioçak M, Ekuclu 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 Zenner D, Nacul L. Predictive power of Koplik's spots for the diagnosis of measles[J]. Infect Dev Ctries, 2012, 6(3):271-275.
- 5 Zhang Y, Yu YS, Zang GQ, et al. Maculopapular rash and Koplik's spots in adult measles[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2015, 48(2):231.
- 6 de Ory F, Minguito T, Balfagón P, et al. Comparison of chemiluminescent immunoassay and ELISA for measles IgG and IgM[J]. APMIS, 2015, 123(8):648-651.
- 7 Tischer A, Gassner M, Richard JL, et al. Vaccinated students with negative enzyme immunoassay results show positive measles virus-specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralisation tests[J]. Clin Virol, 2007, 38(3):204-209.
- 8 Sampedro A, Rodríguez-Granger J. Comparative evaluation of a new chemiluminiscent assay and an ELISA for the detection of IgM against measles[J]. Clin Lab Anal, 2013, 27(6):477-480.
- 9 Goyal A, Shaikh NJ, Kinikar AA, et al. Wairagkar NS. Oral fluid, a substitute for serum to monitor measles IgG antibody?[J]. Indian Med Microbiol, 2009, 27(4):351-353.
- 10 Warrenner L, Slibinskas R, Brown D, et al. Development and evaluation of a rapid immunochromatographic test for mumps-specific IgM in oral fluid specimens and use as a matrix for preserving viral nucleic acid for RT-PCR[J]. Med Virol, 2010, 82(3):485-493.
- 11 Hutse V, Van Hecke K, De Bruyn R, et al. Oral fluid for the serological and molecular diagnosis of measles[J]. Int Infect Dis, 2010, 14(11):991-997.
- 12 Tipples G, Hiebert J. Detection of measles, mumps, and rubella viruses[J]. Methods Mol Biol, 2011, 665:183-193.
- 13 Mamaeva TA, Naumova MA, Zheleznova NV, et al. Evaluation of the commercial ELISA test-systems of different formats to

- detect specific IgM and IgG in the measles patients sera[J]. *Vopr Virusol*,2013,58(5):43-48.
- 14 Michel Y, Saloum K, Tournier C, et al. Rapid molecular diagnosis of measles virus infection in an epidemic setting[J]. *Med Virol*,2013,85(4):723-730.
- 15 Xu C, Feng Y, Chen Y, et al. Rapid detection of measles virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification coupled with a disposable lateral flow device[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2016,85(2):168-173.
- 16 Ammour Y, Faizuloev E, Borisova T, et al. Quantification of measles, mumps and rubella viruses using real-time quantitative TaqMan-based RT-PCR assay[J]. *Viol Methods*,2013,187(1):57-64.
- 17 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]. *Infect Dis*,2003,188(6):898-903.
- 18 Akiyoshi K, Suga T, Nukuzuma S, et al. Reevaluation of laboratory methods for diagnosis of measles[J]. *Jpn Infect Dis*,2010,63(4):225-228.
- 19 Sheikhabari S, Mokhtari-Azad T, Salimi V, et al. The use of oral fluid samples spotted on filter paper for the detection of measles virus using nested rt-PCR[J]. *Clin Lab Anal*,2012,26(3):215-222.
- 20 Abera T, Thangavelu A. Development of a two-step SYBR Green I based real time RT-PCR assay for detecting and quantifying peste des petits ruminants virus in clinical samples[J]. *Viol Methods*,2014,209:25-29.
- 21 Czećik A, Trzcińska A, Dunał-Szczepaniak M, et al. The use of real-time RT-PCR method for the determination of Toll-like genes expression at mRNA level[J]. *Med Dosw Mikrobiol*,2014,66(1):17-22.
- 22 Ikeno S, Suzuki MO, Muhsen M, et al. Sensitive detection of measles virus infection in the blood and tissues of humanized mouse by one-step quantitative RT-PCR[J]. *Front Microbiol*,2013,11(4):298.
- 23 Michel Y, Saloum K, Tournier C, et al. Rapid molecular diagnosis of measles virus infection in an epidemic setting[J]. *Med Virol*,2013,85(4):723-730.
- 24 张燕, 何吉兰, 孙莉, 等. 我国首例输入性D9基因型麻疹病毒的分离和鉴定[J]. *中国疫苗和免疫*,2009,15(4):304-309.
- 25 Keniscope C, Juliana R, Subri H, et al. Isolation of measles virus from clinical specimens using B95a and Vero/hSLAM cell-lines[J]. *Med Malaysia*,2009,64(1):37-40.
- 26 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 Infect Dis*,2008,61(6):506-507.
- 27 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.
- 28 Chua KY, Thapa K, Yapa CM, et al. What assay is optimal for the diagnosis of measles virus infection? An evaluation of the performance of a measles virus real-time reverse transcriptase PCR using the Cepheid Smart Cycloer® and antigen detection by immunofluorescence[J]. *Clin Virol*,2015,70:46-52.
- 29 Tischer A, Gassner M, Richard JL, et al. Vaccinated students with negative enzyme immunoassay results show positive measles virus-specific antibody levels by immunofluorescence and plaque neutralisation tests[J]. *Clin Virol*,2007,38(3):204-209.
- 30 Terletskaia-Ladwig E, Enders G, Meier S, et al. Development and evaluation of an automatable focus reduction neutralisation test for the detection of measles virus antibodies using imaging analysis[J]. *J Virol Methods*,2011,178(1-2):124-128.
- (收稿日期: 2015-06-27)
(本文编辑: 孙荣华)

徐军, 赵晓, 侯存军. 麻疹的实验室诊断研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2016,10(3):261-264.