

限性。本研究通过比较 ELISA 和 ECLIA 检测结果,发现 25 例 ELISA 检测 CEA 阳性标本中 7 例 ECLIA 检测结果高于参考值,阳性符合率为 28%;13 例 ELISA 检测 AFP 阳性标本中 9 例 ECLIA 检测结果高于参考值,阳性符合率为 70%。20 例阴性标本两法两种方法检测结果无差异,具有良好的相关性。1 例 ELICA 检测 CEA 大于 300 $\mu\text{g/L}$ 的体检者经 X 线胸片确认为肺癌;ECLIA 检测 AFP 大于 200 $\mu\text{g/L}$ 的 3 例受检者,2 例为肝癌术后患者,1 例为孕 4 月女性。ELISA 检测 CEA、AFP 出现较高假阳性的原因与试剂质量、操作步骤复杂、影响因素较多有直接关系,如洗涤不充分造成吸光度升高;标本溶血或污染,产生过氧化物酶样物质造成假阳性等。ELISA 定量检测标准曲线呈 S 形且范围较宽,头、尾部趋于平坦,处于尾部的低值阳性准确性大大降低。本研究中,16 例标本 ELISA 检测 CEA 呈低值阳性,ECLIA 检测仅 1 例高于参考值;7 例 AFP 低值阳性,仅 3 例高于参考值。因此需慎重报告 ELISA 检测 CEA、AFP 阳性结果。ECLIA 具有敏感、快速、稳定等优点,使 CEA 和 AFP 检测准确性大大提高。遇到 ELISA 检测 CEA、AFP 阳性标本时,应建议受检者进行 ECLIA 定量测定。

CEA 测定的特异性不高,吸烟者的水平比非吸烟者高 1

• 检验技术与方法 •

实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹和风疹病毒检测中的应用

张金菊,牛桓彩

(北京市昌平区疾病预防控制中心检验科 102200)

摘要:**目的** 探讨实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹和风疹病毒检测中的应用。**方法** 采用病毒分离、荧光定量 PCR 及 ELISA 法对临床标本进行检测。**结果** 20 例临床标本病毒分离率为 45%,DNA 检测阳性率为 100%,患者发病 5 d 内 IgM 抗体阳性率为 65%、10~12 d 内为 100%。**结论** 荧光定量 PCR 法适合用于疾病的早期诊断和鉴别诊断。

关键词:麻疹病毒; 风疹病毒; 逆转录聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 02. 057 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)02-0256-02

麻疹、风疹分别是由麻疹病毒、风疹病毒感染所引起的急性呼吸道传染病,严重危害人民健康,特别是少年儿童的健康。在实验室诊断技术方面,现主要采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中麻疹、风疹特异性 IgM 抗体,但由于个体免疫系统的应答差异,且发病后不同天数之间抗体的产生有较大差异,用该法检测存在一定程度的漏检。我们运用实时荧光定量 RT-PCR(real time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)技术对麻疹病毒、风疹病毒相关基因的进行检测并与病毒分离、ELISA 方法进行比对,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 为 2008~2009 年送至本单位进行麻疹和风疹病例诊断的 20 例标本,包括发病初期的咽拭子、血液及 1 周后患者血液,患者发病初期均有发热、皮疹等感染症状。

1.2 仪器与试剂 (1)仪器:罗氏 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 扩增仪;瑞士帝肯 Sunrise 酶标仪。(2)引物、探针等 PCR 反应混合液及酶混合液委托北京迅必达基因技术有限责任公司合成。(3)核酸提取试剂盒为 QIAampViral RNA Mini Kit。(4)麻疹和风疹 IgM 抗体 ELISA 法检测试剂由德国 Virion 公司生产。(5)麻疹和风疹病毒分离检测试剂由美国 GIBCO 公司生产,分别用 Vero-SLAM 和 Vero 细胞进行分离培养。

倍以上,同时普遍认为有较高的假阴、假阳性,所以不太适合一般人群的肿瘤筛查^[1-2]。只有在肿瘤高危人群中适当增加肿瘤初步筛查项目,对于提高肿瘤的早期诊断率才有意义。AFP 是目前公认的少数特异性较好的肿瘤标志物之一,是原发性肝癌最灵敏、最特异的肿瘤标志,慢性乙肝和慢性丙肝等肝癌高危人群可定期测定 AFP 进行肝癌筛查^[2]。AFP 和 CEA 是存在于人体内的一种动态血清学指标,有部分正常人也升高。因此其升高并不一定提示恶性肿瘤,对于异常 CEA、AFP 结果,医生应综合其他检查与临床体征做出正确判断^[3]。

参考文献

[1] 丛玉隆. 实用检验医学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:696-698.
[2] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:691-692.
[3] 翟庆桂,王爱新,焦艳文. 正确看待甲胎蛋白和癌胚抗原检测结果[J]. 中国城乡企业卫生,2008,22(2):20-21.

(收稿日期:2010-08-01)

1.3 方法 (1)核酸提取:按核酸提取试剂盒操作手册进行。(2)核酸扩增:以反应混合液 17 μL 、酶混合液 1 μL 、模板 RNA 2 μL 制备 PCR 反应体系。PCR 反应条件为:50 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 40 个循环;延伸阶段采集荧光信号。

2 结果

麻疹及风疹疑似患者临床标本不同检测方法结果见表 1。

表 1 麻疹及风疹疑似患者临床标本不同检测方法结果

序号	标本号	FQ-PCR	病毒分离	IgM 抗体 (≤ 5 d)	IgM 抗体 (10~12 d)
1	CPCDC08-0001	阳性	阴性	阴性	阳性
2	CPCDC08-0003	阳性	阴性	阳性	阳性
3	CPCDC08-0006	阳性	阳性	阳性	阳性
4	CPCDC08-0007	阳性	阳性	阳性	阳性
5	CPCDC08-0008	阳性	阴性	阴性	阳性
6	CPCDC08-0009	阳性	阴性	阴性	阳性
7	CPCDC08-0012	阳性	阳性	阳性	阳性
8	CPCDC08-0013	阳性	阳性	阳性	阳性
9	CPCDC08-0015	阳性	阴性	阳性	阳性
10	CPCDC08-0016	阳性	阴性	阴性	阳性
11	CPCDC08-0019	阳性	阳性	阳性	阳性

续表 1 麻疹及风疹疑似患者临床标本不同检测方法结果

序号	标本号	FQ-PCR	病毒分离	IgM 抗体 (≤5 d)	IgM 抗体 (10~12 d)
12	CPCDC08-0020	阳性	阳性	阳性	阳性
13	CPCDC08-0021	阳性	阳性	阳性	阳性
14	CPCDC08-0022	阳性	阳性	阳性	阳性
15	CPCDC08-0024	阳性	阴性	阴性	阳性
16	CPCDC08-0025	阳性	阴性	阳性	阳性
17	CPCDC09-0001	阳性	阳性	阳性	阳性
18	CPCDC09-0002	阳性	阴性	阴性	阳性
19	CPCDC09-0003	阳性	阴性	阳性	阳性
20	CPCDC09-0004	阳性	阴性	阴性	阳性
阳性率(%)		100	45	65	100

讨 论

麻疹引起的并发症几乎存在于人体的各个器官,其中造成死亡的最常见原因是肺炎、喉炎及脑炎,麻疹病毒感染在发病初期症状很难与风疹病毒感染鉴别。目前为止,ELISA 法检测血清中特异 IgM 抗体仍是诊断麻疹病毒感染最主要的方法之一。许多学者认为 ELISA 法简单易行,但患者感染病毒后,血清中产生特异 IgM 抗体需要一段时间,发病早期 IgM 抗体产生较少或不产生,阳性率仅为 50%~73%,尤其在发病的当天与次日检出的 IgM 抗体阳性率更低。但患者临床就诊与采血的时间往往处于发病的初期,所以临床上用 IgM 抗体作为确诊指标,不可避免地会形成一定程度的漏检。本研究通过对 20 例患者的咽拭子和血清检测也证实了这一点,血清检测 IgM 抗体往往是患者发病的第 4~5 天,此时的血清 IgM 抗体阳性率为 65%,而此时的 FQ-PCR 法检测咽拭子阳性率为 100%。1 周后再次测血清 IgM 抗体,7 例阴性者全部转为阳性,反过来也证实了起初 FQ-PCR 检测未有假阳性的产生,这进一步说明了 FQ-PCR

法的灵敏性与特异性比 ELISA 法检测血清麻疹特异性 IgM 抗体要高。综上所述,FQ-PCR 法检测有敏感性和特异性高、定性准确、重复性好等特点,有助于动态反映病毒复制、突变情况,预测抗病毒治疗效果,是了解病情严重程度、病情转归及预后的有效手段之一。FQ-PCR 法可在发热 1 天的患者标本中检测出麻疹病毒,同时不受标本量的限制,更适合于早期诊断的实验室检查或鉴别诊断,为临床医生提供准确的诊断依据。更重要的是,医务人员还可以根据患者的实际情况选择更加科学有效的检验方法,满足临床诊断的不同需求。

参考文献

[1] 罗小铭,张晋昕. 全球麻疹消除的意义与发展现状[J]. 医学综述, 2008,14(1):119-120.

[2] Himan AR. 中国麻疹控制策略的建议[J]. 中国计划免疫, 2002,8(2):111-114.

[3] 许文波,朱贞,蒋小泓,等. 中国麻疹实验室网络的建立及运转[J]. 中国计划免疫,2006,12(1):1-6.

[4] 姜明杰,甘云,梁勇,等. 荧光定量-聚合酶链反应法快速检测麻疹病毒核酸[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(4):20-22.

[5] 刘毅,武继守,候铁军,等. 2007 年陕西省麻疹减毒活疫苗强化免疫效果评价[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(2):176-177.

[6] 王虹,许颂霄. 荧光定量 PCR 检测 HCV-RNA 的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(1):74-76.

[7] 刘斌剑,李佳霖,孙月庭. 终点法荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(10):865-867.

[8] Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence[J]. Nat Biotechnol,1999,17(8):804-807.

(收稿日期:2010-04-03)

(上接第 252 页)

及衍生技术进行诊断,可能会导制误诊。特别是产前诊断取材时,易受母亲标本的污染,极低量的母亲 DNA 污染均可干扰检测结果。

近年来新发展的诊断方法弥补了传统方法的不足,如超声诊断。超声诊断是目前最易为患者接受,无创伤,最易普及的 1 种诊断 Bart's 水肿胎的方法。Bart's 水肿胎是最严重的 α 地中海贫血,但由于水肿胎有多种原因引起,若需查明胎儿的基因型背景,仍需进行 DNA 分析。Shihabi 等^[9]报道了使用毛细管电泳技术诊断 α 地中海贫血的方法,缺失型和非缺失型 α 地中海贫血均可采用,显示出了巨大优势及应用潜能。有报道用抗转铁蛋白受体单克隆抗体从母血中筛选出胎儿细胞,应用于地中海贫血在内的众多单基因病诊断^[10]。以上研究均预示着基因诊断发展的方向,相信在不久的将来,地中海贫血的基因诊断技术将更加成熟、完善。

参考文献

[1] Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Prenatal diagnosis and screening of the haemoglobinopathies [J]. Baillieres Clin Haematol, 1998,11(1):215-238.

[2] 张俊武,龙桂芳. 血红蛋白与血红蛋白病[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2003:204-234.

[3] 李巍,何蕴韶. 遗传咨询[M]. 郑州:郑州大学出版社,2003:405-

419.

[4] 陈忠领,魏新燕,范美珍,等. 血红蛋白电泳在地中海贫血筛查中的应用价值[J]. 现代预防医学,2007,34(6):1132-1134.

[5] Huang CC, Lee CN, Chen CP, et al. Molecular assay of α (3, 7) and α (4, 2) deletions causing α -thalassemia by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. Clin Bioche, 2007, 40(11): 135-139.

[6] 何雅军,杨小华,马福广,等. 平均红细胞体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):244-226.

[7] Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, et al. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia[J]. Blood, 2000, 95(1):360-362.

[8] Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, et al. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray[J]. Haematologica, 2004, 89(8):1010-1012.

[9] Shihabi ZK, Hinsdale ME, Dangherty HK Jr. Hemoglobin A2 quantification by capillary zone electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2000, 21(4):749-752.

[10] Chen HP, Wang TR, Xu JP, et al. Fetal origin of single nucleated erythroblasts and free DNA in the peripheral blood of p regnant woman[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2003, 85(1):1-5.

(收稿日期:2010-06-12)