

· 论 著 ·

常见腹泻病毒多重荧光逆转录聚合酶链反应检测方法的建立及临床应用

曾军荣, 李榕娇, 陈永强, 邝炽庄, 孙慧冰
(广东省从化市中心医院检验科 510900)

摘要:目的 建立能同时检测星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒和诺如病毒的多重荧光逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法。方法 根据上述 4 种病毒基因组保守序列设计引物和探针,建立并分析多重荧光 RT-PCR 的特异性、敏感性、灵敏度;以所建立方法对 256 例病毒性腹泻患者粪便标本进行检测,同时以基因测序进行验证。结果 所建立的腹泻病毒多重荧光 RT-PCR 检测方法对具有星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒特异性,灵敏度可达 500 copy/mL。256 例粪便标本中,星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒和诺如病毒的检出率分别为 3.13%、42.97%、9.38% 和 10.16%,与基因测序比对结果相符。结论 成功构建可用于常见腹泻病毒检测的多重荧光 RT-PCR 检测方法,该法具有快速、灵敏、特异等优点,可用于临床病原诊断。

关键词:星状病毒科; 轮状病毒属; 肠道病毒属; 聚合酶链反应; 诺如病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.027

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1461-02

Construction and clinical application of a multiplex real-time reverse-transcript PCR for the detection of common diarrhea virus

Zeng Junrong, Li Rongjiao, Chen Yongqing, Kuang Zhizhuang, Sun Huibing

(Department of Laboratory, Centre Hospital of Conghua City, Guangdong 510900, China)

Abstract: Objective To construction a multiplex real-time reverse-transcript polymerase chain reaction(RT-PCR) to detect Astrovirus, Rotavirus, Enteric Adenovirus and Norovirus. **Methods** Primers and probes were designed according to the conserved genome sequence of 4 virus mentioned above. A multiplex real-time RT-PCR was constructed, and the specificity and sensitivity of it were evaluated. Fecal samples from 256 cases of patients with viral diarrhea were detected by constructed method and the results were compared with gene sequencing. **Results** The constructed multiplex real-time RT-PCR was specific for Astrovirus, Rotavirus, Enteric Adenovirus and Norovirus, with sensitivity about 500 copy/mL. In 256 fecal samples, the detection rates of Astrovirus, Rotavirus, Enteric Adenovirus and Norovirus were 3.13%, 42.97%, 9.38% and 10.16%, respectively, which were in accord with gene sequencing. **Conclusion** A new multiplex real-time RT-PCR for the detection of common diarrhea virus was successfully constructed, with the advantages such as rapid detecting, sensitive and specific, and could be used for the clinical pathogen diagnosis.

Key words: astroviridae; rotavirus; enterovirus; polymerase chain reaction; Norovirus G I /G II

腹泻是严重危害人类健康的常见病。除细菌、寄生虫外,多种病毒可引起腹泻,如星状病毒、A 族轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒 GI/GII 等,均具有较强的离体存活力和感染性(10~100 个即可引发感染)。人体被上述病毒感染后的临床症状相似,主要是呕吐和腹泻^[1-3]。腹泻病毒的常见诊断方法有电镜观察、细胞培养、核酸杂交、酶联免疫法及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),但都存在着各种缺点。常规 PCR 每次只能检测 1 种目的基因,不能短时间内完成大批量样品多种指标检测;需要对产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,易造成交叉污染,导致出现假阳性结果。多重荧光逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)是通过在反应体系中加入多套引物和探针,利用探针上所标记的不同波长的发光基团进行检测,不需要对产物进行处理,避免了交叉污染,而且具有快速、灵敏、特异、高通量等优点,弥补了常规 PCR 的不足^[4-5]。

1 材料与方法

1.1 病毒及标本来源 星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、人 3 型腺病毒、人 7 型腺病毒、人冠状病毒 OC43、呼吸道合胞病毒 long 株、甲型流感病毒 H1N1、乙型流感病毒为呼吸疾病国家重点实验室白培胜博士惠赠。256 例粪便标本收集自于本院确诊的非细菌性腹泻患者,标本收集后 24 h 内以 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)悬浮,4 ℃、5 000 r/min 离

心取上清液, -80 ℃冻存备用。

1.2 主要试剂和仪器 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver. 4.0 病毒核酸提取试剂盒、One Step PrimeScript RT-PCR Kit 试剂盒(TaKaRa, 日本), UNIVERSAL 32R 台式低温离心机(Hettich, 德国), PTC-200 型 PCR 仪(BIO-RAD, 美国), Prism7500 型荧光定量 PCR 仪(ABI, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 病毒 RNA 提取 按照病毒核酸提取试剂盒说明书进行,测定病毒 RNA 浓度和纯度后分装, -80 ℃冻存备用。

1.3.2 引物、探针设计与合成 在 NCBI GeneBank 中查找并比对星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒基因组序列,根据 4 种病毒的基因序列保守区分别设计 4 套引物和探针,要求引物、探针之间不形成局部配对;以 NCBI BLAST 验证引物、探针的特异性;引物、探针由上海英骏生物技术有限公司合成。引物、探针序列见表 1。

1.3.3 多重荧光 RT-PCR 检测 使用 One Step PrimeScript RT-PCR Kit 进行检测。多重荧光 RT-PCR 反应体系 50 μL,其中上述各引物终浓度为 0.4 pmol/μL,各探针终浓度为 0.1 pmol/μL, 2×One Step RT-PCR Buffer III 25 μL、TaKaRa Ex Taq HS(5 U/μL) 1 μL、PrimeScript RT Enzyme Mix II 1 μL、模板核酸 5 μL、RNase Free dH₂O 18 μL。反应条件为 42 ℃ 10 min, 94 ℃ 2 min; 94 ℃ 10 s, 55 ℃ 40 s, 40 个循环,每次循环结束时检测荧光。

1.3.4 多重荧光 RT-PCR 特异性试验 按 1.2.3 的反应体系检测肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、人 3 型腺病毒、人 7 型腺病毒、人冠状病毒 OC43、呼吸道合胞病毒 long 株、甲型流感病毒 H1N1、乙型流感病毒。

表 1 多重荧光 RT-PCR 引物、探针序列

病毒名称	引物或探针	序列
星状病毒	上游引物 AstrovF	TTCTACCWCTCTGGTGAAGTCAC
	下游引物 AstrovR	GCCTGTAACCAAAAATTGACCATG
	探针 AstrovP	Cy3-CCATCTGGNCAGTTTTCAACAACDATGG-BHQ1
轮状病毒	上游引物 RotavF	ATGTCCTGTACTCCTTGCAAAA
	下游引物 RotavR	CCAGTTTGGAAGCTATTTCCTCA
	探针 RotavP	FAM-ATAATGTGCCTTCGACAAT-MGB
肠道腺病毒	上游引物 EAdvF	GCACTTAACTGTTCTTGTCGTA
	下游引物 EAdvR	CCAAAATAGTTTGCAAAATTGTCTGTT
	探针 EAdvP	HEX-CCAACTCGTTCAGTGGCGCGC-BHQ1
诺如病毒	上游引物 NorovF	CCCAGACAAGAGTCAATGTTTA
	下游引物 NorovR	CAGCGTCATTCGACGCCATCT
	探针 NorovP	Texas red-CTAAGCACATGGGAGGGCGATCGC-BHQ2

1.3.5 多重荧光 RT-PCR 敏感性试验 将星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒核酸、4 种病毒核酸等量混合液及 4 种病毒和肠道病毒 71 型核酸等量混合液按 1.2.3 的反应体系分别进行荧光 RT-PCR 检测。

1.3.6 多重荧光 RT-PCR 灵敏度试验 以 10 倍梯度配制星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒核酸的 10 个不同浓度水平的稀释液，每份稀释液按 1.2.3 的反应体系重复检测 8 次。

1.3.7 多重荧光 RT-PCR 的临床应用 按 1.2.3 的反应体系对 256 例粪便标本离心上清进行星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒检测。多重荧光 RT-PCR 产物序列由上海英骏生物技术有限公司测定。

2 结 果

2.1 多重荧光 RT-PCR 特异性 对肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、人 3 型腺病毒、人 7 型腺病毒、人冠状病毒 OC43、呼吸道合胞病毒 long 株、甲型流感病毒 H1N1、乙型流感病毒以所建立的方法进行核酸扩增，均未检出荧光信号。

2.2 多重荧光 RT-PCR 敏感性 对各种病毒核酸或病毒核酸混合液以所建立的方法进行核酸扩增，均只检出特异性荧光信号，未检出非特异性荧光信号，单重反应与多重反应扩增效率基本相当。

2.3 多重荧光 RT-PCR 灵敏度 在循环阈值小于或等于 35 时(病毒核酸稀释至原液的 10⁻⁷)，4 种病毒检测均表现为阳性，且重复性良好；在循环阈值大于 35 时，扩增效率差异较大，重复性较差，个别稀释标本无荧光信号。以分光光度计检测星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒核酸原液 10⁻⁷ 稀释液中的核酸含量，分别为 0.08、0.06、0.05、0.06 pg。

2.4 临床标本检测 256 例粪便离心上清标本中，星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒阳性率分别为 3.13%(8/256)、42.97%(110/256)、9.38%(24/256)和 10.16%(26/256)。对扩增后的目的条带进行测序，并以 NCBI BLAST 进行比对，星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒和诺如病毒与已知病毒株基因的同源性分别为 96.1%~100.0%、96.3%~

100.0%、96.5%~100.0%和 97.0%~100.0%。

3 讨 论

病毒性腹泻是人类常见病，以呕吐、腹泻为主要临床症状，并有可能导致婴幼儿死亡；星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒是引起病毒性腹泻的主要病毒类型^[6-7]。本研究显示，在 256 例非细菌性腹泻患者中，轮状病毒检出率最高(42.97%)。轮状病毒以粪-口形式传播，最常见的 4 种血清型分别为 G1、G2、G3 和 G4，其中 G1 和 G3 在中国流行广泛，是病毒性腹泻最常见致病因素^[8]。本研究中，诺如病毒检出率为 10.16%。诺如病毒也具有高致病性和高传染性，能引起急性胃肠炎，临床症状与轮状病毒所致腹泻相似；通过生冷食物、贝类等传播，人群中一旦出现感染病例，极易发展为群体性大规模流行^[2,9-10]。星状病毒和肠道腺病毒可呈散发或爆发性流行。

由于病毒性腹泻患者的粪便中含有致病性病毒，易导致病毒性腹泻的爆发流行，为防止疾病的大规模流行，需要短时间内作出准确诊断，从而阻断病原传播。电镜观察、细胞培养等检测方法由于操作复杂，耗时长，已不能满足要求。荧光 RT-PCR 具有高敏感性、高特异性、操作简单、耗时短、产物间无交叉污染等优点^[4-5]，多重荧光 RT-PCR 则是常规荧光 RT-PCR 的进一步改进，可一次性检测多种不同目的核酸，实现了高通量检测。应用多重荧光 RT-PCR 检测粪便标本中的腹泻病毒，有利于有利于提高病毒的检出率。

本研究成功建立了星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒、诺如病毒多重荧光 RT-PCR 检测方法，仅特异性扩增上述 4 种病毒的目的核酸片段，检测结果不受其他病原的干扰；扩增片段序列分析显示，阳性标本扩增片段与已知病毒株基因序列具有较高的同源性，证实多重荧光 RT-PCR 检测结果与测序结果一致，表明该方法可同时检测星状病毒、轮状病毒、肠道腺病毒和诺如病毒。

综上所述，本研究建立的多重荧光 RT-PCR 方法具有简便、快速、高效、特异、敏感等特点，有利于提高对病毒性腹泻的诊断能力，为大规模突发性腹泻的病因诊断(下转第 1468 页)

蔽进入血液,此时 MBP 会明显增加,因此,脑脊液和血液 MBP 含量的测定,是反应神经组织细胞有无实质性损伤的一个灵敏而可靠的指标^[9]。

在本研究中,脑外伤患者应急期和水肿期的血清、脑脊液 MBP 浓度高低依次为:重型、中型、轻型,且均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),说明血清、脑脊液 MBP 浓度与损伤的程度有关,损伤越严重,MBP 浓度越高。

试验组中,患者康复期血清、脑脊液 MBP 浓度均低于应急期和水肿期,不同时期比较,差异有统计学意义($P<0.01$),说明血清、脑脊液 MBP 浓度随病情的康复而降低;轻型患者血清 BMP 在康复期基本降到正常水平,与对照组比较 $P>0.05$,差异无统计学意义,但中型和重型患者,因病情相对严重,其血清、脑脊液 MBP 浓度仍然明显高于对照组, $P<0.01$,差异有统计学意义,说明病情越严重,康复所需的时间越长;轻型患者康复期血清 BMP 浓度虽基本降至正常,但脑脊液 BMP 浓度仍高于对照组, $P<0.05$,差异有统计学意义,说明不能只凭血清 BMP 浓度作为康复的惟一标准,还需结合脑脊液 BMP 浓度及临床症状进行判断。

试验组患者不同时期的脑脊液 BMP 浓度均高于血清,两者比较 P 值均小于 0.05,差异有统计学意义,说明脑外伤后,患者脑脊液 BMP 升幅高于血清,其对于疾病的诊断更敏感;脑挫裂伤合并血肿患者血清、脑脊液 MBP 浓度高于局限性脑挫裂伤和硬膜外血肿,相互比较 P 值均小于 0.01,差异有统计学意义,说明血清、脑脊液 MBP 水平与脑外伤受损类型有关;脑外伤颅内出血量大于 50 mL 者的血清、脑脊液 MBP 浓度高于出血量小于 50 mL 者,相互比较 P 值小于 0.01,差异有统计学意义,说明脑外伤颅内出血量大者脑组织受损越严重,所以血清、脑脊液 MBP 水平更高。

BDNF 可促进受损神经元再生、分化及成熟,在中枢神经系统的损伤修复中具有重要的作用。理论上,检测 BDNF 可间接预测脑外伤的预后。但 BDNF 除神经细胞表达外,血小板也表达^[10-11]。BDNF 试剂盒说明书上已标明:血浆中处于 ng/L 水平,而血清处于 $\mu\text{g/L}$ 水平,相差近千倍,显然与血小板释放 BDNF 有关。因血小板内含有 BDNF,对神经细胞表达的 BDNF 检测造成很大的干扰,故而检测血清 BDNF 没有临床价值;脑外伤后,脑脊液中混有血液成分,血小板也随之混

入,且混入的比例在不同患者中差异巨大,无规律可言,严重干扰脑脊液 BDNF 检测,故而检测脑脊液 BDNF 的临床意义也不大。

ELISA 定量检测不同于化学发光、时间分辨等方法,试剂盒本身的质量对结果的影响很大,检测样本前必须对其进行评估,合格后方可使用。

参考文献

[1] Tzakos AG,Troganis A,Theodorou V,et al. Structure and function of the myelin proteins:current status and perspectives in relation to multiple sclerosis[J]. Curr Med Chem,2005,12(13):1569-1587.

[2] Lamers KJ,Vos P,Verbeek MM,et al. Protein S-100B,neuron-specific enolase(NSE),myelin basic protein(MBP)and glial fibrillary acidic protein(GFAP)in cere-brospinal fluid(CSF)and blood of neurological patients[J]. Brain Res Bull,2003,61(3):261-264.

[3] 伍益. 颅脑外伤后血清、脑脊液髓鞘碱性蛋白的变化及其临床意义[J]. 中国微侵袭神经外科杂志,2008,13(3):115-117.

[4] 季丽莉,佟雷,唐源远,等. 脑源性神经生长因子促进成年大鼠脑海马神经干细胞定向分化的浓度选择[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,46(11):9255-9258.

[5] 张拥军,袁小兵,顾学范. 脑源性神经生长因子抑制苯丙氨酸诱导的神经元凋亡[J]. 临床儿科杂志,2008,26(12):1067-1070.

[6] 巴迎春,段艳萍,王金德,等. 内源性 BDNF 促进受损神经系统再生的实验研究[J]. 四川大学学报:医学版,2009,40(3):418-421.

[7] 林伟华,陈华英,洪流,等. 血清和脑脊液胱抑素 C 检测在 4 种脑疾病患者中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1295-1296.

[8] 吴正林,吴意,叶军,等. 血清中肝纤维化指标测定在肝病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(1):31-32.

[9] 王忠诚. 神经外科学[M]. 武汉:湖北科学技术出版社,2005:169-179.

[10] 王鲁民,吴群政,尹作民,等. BDNF 修饰神经干细胞移植对脑缺血损伤的影响[J]. 齐鲁医学杂志,2005,4(20):298-300.

[11] 苏立新,张陈平,胡永杰,等. BDNF 和 TrkB 在唾液腺腺样囊性癌中的表达及意义[J]. 中国口腔颌面外科杂 2006,5(4):330-335.

(收稿日期:2011-02-08)

(上接第 1462 页)

提供了新的诊断方法,也为腹泻病毒流行病学调查的深入奠定了基础。

参考文献

[1] 吴清平,寇晓霞,张菊梅. 多重 RT-PCR 用于临床检测三种胃肠道病毒的研究[J]. 微生物学通报,2004,31(3):101-105.

[2] 吕元聪. 诺如病毒感染性腹泻简介[J]. 应用预防医学,2007,13(2):F1.

[3] Zheng DP,Ando T,Fankhauser RL,et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature[J]. Virology,2006,346(2):312-323.

[4] Boom R,Sol CJ,Sallmans MM,et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids[J]. J Clin Microbiol,1990,28(3):495-503.

[5] Kageyama T,Kojima S,Shinohara M,et al. Broadly reactive and highly sensitive assay for norwalk-like viruses based on real-time quantitative reverse transcription PCR[J]. J Clin Microbiol,2003,41(4):1548-1557.

[6] 罗小芳,陆学东. 病毒性腹泻的实验室诊断进展[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(12):1190-1191.

[7] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001:565-578.

[8] 周玉,史新辉,马兰花. 腹泻患儿 1 064 例粪便中轮状病毒抗原检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(5):486-487.

[9] 方肇寅. 诺如病毒胃肠炎及其防控对策[J]. 中华流行病学杂志,2007,28(3):222-223.

[10] 王晓欢,于恩庶. 诺如病毒胃肠炎的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(6):621-624.

(收稿日期:2011-01-04)