

论著 · 临床研究

呼吸道感染患儿呼吸道合胞病毒核酸扩增荧光定量检测及分析

谭志团¹, 石霖¹, 陆桂香¹, 徐文², 贾雁平¹, 邢愚¹, 吴学礼³, 胡松³, 任翼¹, 吴礼循³

(海口市妇幼保健院 1. 儿内科; 2. PCR 实验室; 3. 检验科, 海南 海口 570102)

[摘要] 目的 核酸扩增荧光定量 PCR 用于病原学诊断, 是目前诊断呼吸道合胞病毒(RSV)感染的先进方法。通过检测呼吸道感染患儿 RSV- RNA 相关序列的存在, 探讨其敏感性和 RSV 感染情况。方法 收集 2007 年 1 月至 2008 年 10 月该院儿科 261 例呼吸道感染住院患儿鼻咽部分泌物标本, 用核酸扩增荧光定量检测痰标本 RSV 核酸 RNA。同时抽取静脉血用酶联免疫吸附法检测 RSV-IgM 作对照, 比较两种方法的敏感性。结果 ①痰标本 RSV-RNA 阳性率 38. 7%, 血 RSV-IgM 阳性率 21. 1%, 两种方法检测阳性率差异有显著性($P < 0. 01$)。②年龄 ≤ 6 个月组痰标本 RSV-RNA 阳性率 43. 6%, 显著高于 1~3 岁组阳性率 32. 1% ($P < 0. 01$)。③毛细支气管炎痰标本 RSV-RNA 阳性率最高(58. 5%), 与急性支气管炎和支气管肺炎痰标本比较, 差异有显著性($P < 0. 01$ 和 $< 0. 05$)。结论 核酸扩增荧光定量 PCR 检测呼吸道 RSV 感染敏感性高, RSV 是婴幼儿时期下呼吸道感染的主要病原, 年龄越小感染率越高, 毛细支气管炎感染率最高。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11 (10) : 825 - 828]

[关键词] 呼吸道合胞病毒; 聚合酶链反应; 呼吸道感染; 儿童

[中图分类号] R725. 6; R446. 1 [文献标识码] A [文章编号] 1008 - 8830(2009)10 - 0825 - 04

Detection of respiratory syncytial virus in children with respiratory tract infections by nucleic acid amplification fluorogenic quantitative assay

TAN Zhi-Tuan, SHI Lin, LU Gui-Xiang, XU Wen, JIA Yan-Ping, XING Yu, WU Xue-Li, HU Song, REN Yi, WU Li-Xun. Pediatric Internal Medicine, Haikou Maternal and Child Health Hospital, Haikou 570102, China (Shi L, Email: shil-in57@ 163. com)

Abstract: Objective Nucleic acid amplification (PCR) fluorogenic quantitative assay is used for the diagnosis of respiratory syncytial virus (RSV) infection. This study was designed to explore the sensitivity of PCR fluorogenic quantitative assay for ascertaining respiratory RSV infection and RSV infection conditions by detecting the presence of RSV-RNA related sequences in children. **Methods** Bronchial and nasopharyngeal secretions specimens from 261 hospitalized children with respiratory tract infections from January 2007 to October 2008 were collected. Respiratory syncytial virus nucleic acid (RNA) in the specimens was measured by PCR fluorogenic quantitative assay. Blood RSV-IgM was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The sensitivity for ascertaining respiratory RSV infection was compared between the two assays. **Results** The RSV-RNA positive rate ascertained by PCR fluorogenic quantitative assay (38. 7%) was significantly higher than blood RSV-IgM positive rate (21. 1%) ($P < 0. 01$). The RSV-RNA positive rate (43. 6%) in children at ages of less than 6 months was significantly higher than that in children at ages of 1 to three years (32. 1%) ($P < 0. 01$). The RSV-RNA positive rate in children with bronchiolitis (58. 5%) was the highest, followed by bronchopneumonia (38. 2%) and acute bronchitis (20. 0%). **Conclusions** The sensitivity of PCR fluorogenic quantitative assay for ascertaining respiratory RSV infection is higher. RSV is a major pathogen of lower respiratory tract infections in infants and young children. A higher rate of RSV infection is associated with a younger age. RSV infection is the most common in children with bronchiolitis. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (10) : 825 - 828]

Key words: Respiratory syncytial virus; Polymerase chain reaction; Respiratory tract infection; Child

呼吸道合胞病毒(RSV)是婴幼儿时期急性下呼吸道感染的首位病毒病原^[1,2], 有临床研究显示, RSV 感染是诱发哮喘, 特别是婴幼儿哮喘和儿童哮喘的重要致病因素^[3~6], 有基础疾病的患儿感染后病情严重甚至导致死亡。此外, RSV 还是院内感染的主要病原体。

[收稿日期] 2008 - 12 - 30; [修回日期] 2009 - 02 - 17
[基金项目] 海南省卫生厅科研立项课题(琼卫 2006 - 31 号)。
[作者简介] 谭志团, 男, 大学, 副主任医师。主攻方向: 小儿呼吸系统疾病。
[通讯作者] 石霖, 男, 教授, 主任医师, 海口市妇幼保健院儿科, 邮编: 570102。

检测 RSV 有多种方法,核酸扩增荧光定量 PCR 用于病原学诊断,是目前诊断 RSV 感染的先进方法^[2]。本研究将荧光定量 PCR (FQ-PCR) 技术和 Line Gene 定量检测系统相结合,选取 RSV 的 M 基因的一个保守区为靶区域,设计特异性引物及荧光探针,扩增片段长度为 119 bp,逆转录体系将 RNA 逆转录为 cDNA 后,再对 cDNA 进行 PCR 扩增,利用实时荧光 PCR 技术,检测患儿痰标本中 RSV 核酸 RNA,了解患儿呼吸道 RSV 感染情况,同时抽取静脉血用酶联免疫吸附法 (ELISA 法) 检测 RSV IgM 抗体 (RSV-IgM) 作对照,比较两种方法的敏感性。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 临床资料 海南省海口市妇幼保健院 2007 年 1 月至 2008 年 10 月住院的呼吸道感染患儿 261 例,其中男 179 例,女 82 例;≤6 个月 140 例,6 个月~59 例,1 岁~53 例,3~11 岁 9 例;临床诊断支气管肺炎 191 例,毛细支气管炎 41 例,急性支气管炎 20 例,急性上呼吸道感染 7 例,疱疹性咽峡炎 2 例。

1.1.2 标本 入院第 1 天用消毒一次性婴儿吸痰器负压吸取呼吸道感染患儿鼻咽支气管分泌物 1~3 mL,密封送检或保存于 -20℃ 冰箱中,保存期 7 d,标本运送采用 0℃ 冰壶。同时抽静脉血 2 mL。

1.1.3 仪器及试剂 Line Gene 核酸扩增荧光定量检测仪、中山大学达安基因股份有限公司生产惠赠的 RSV 核酸扩增 (PCR) 荧光检测试剂盒、晶美生物工程有限公司生产的传染病 IgM 抗体 ELISA 试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 的提取及 cDNA 的合成 RSV 的 FQ-PCR 反应在 Line Gene 核酸扩增荧光定量检测仪上进行。充分混匀 RNA 提取液 A,吸取 10 μL RNA 提取液 A 加至 100 μL 标本或阴性、阳性质控品中,混匀;加入 200 μL RNA 提取液 B,混匀,室温放置 10 min,8 000 r/min 离心 1 min,小心吸去上清;加预冷的 DEPC 水配制的 75% 乙醇 400 μL 充分混匀,8 000 r/min 离心 1 min,小心吸去上清;加预冷的 DEPC 水配制的 75% 乙醇 400 μL 充分混匀,8 000 r/min 离心 1 min,尽量吸取所有液体至余下少于 5 μL 液体。打开管盖,65℃ 抽干 5 min,盖上管盖待用于逆转录。向管加入 19 μL PCR 反应液 I 打匀,再加逆转录酶系 1 μL,混匀后瞬时离心;37℃ 放

置 60 min,95℃ 加热 3 min。瞬时离心,待用。取 PCR 反应管若干,加入逆转录后的样品 (标本或阴性或阳性质控品) 上清液 2 μL,8 000 r/min 离心数秒,放入仪器样品槽。循环条件:93℃ →2 min;93℃ 45 s→55℃ 60 s→10 个循环;93℃ 30 s→55℃ 45 s→30 个循环。每个循环的最后一步结束时进行荧光检测,由仪器自带软件计算出 Ct 值并给出定量结果。RSV 阳性定量参考值: >1 × 10³ 拷贝/毫升,RSV 阴性定量参考值: <1 × 10³ 拷贝/mL。

1.2.2 ELISA 法检测 RSV-IgM 对临床进行鼻咽支气管分泌物 RSV-RNA 检测的患儿同时抽取静脉血进行 ELISA 法检测血清中的 RSV-IgM,具体操作按照说明书进行。

1.2.3 统计学处理 对计数资料进行卡方检验,比较两种方法阳性率的差别。

2 结果

2.1 痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果

痰 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测相比,阳性检出率差异有显著性 ($\chi^2 = 17.5, P < 0.01$)。两种方法均阳性 21 例,两种方法均阴性 129 例,总符合例数 150 例,占总例数的 57.5% (表 1)。

表 1 261 例临床标本 RSV 检测结果比较 例 (%)		
检测方法	阳性	阴性
RSV-IgM	55 (21.1)	206 (78.9)
RSV-RNA	101 (38.7) ^a	160 (61.3)

a: 与 RSV-IgM 检测法比较, $\chi^2 = 17.5, P < 0.01$ 。

2.2 不同性别患儿痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果

痰标本 RSV-RNA 及血 RSV-IgM 阳性率与性别关系经卡方检验差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 不同性别患儿痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果 例 (%)			
性别	例数	RSV-IgM 阳性	RSV-RNA 阳性
男	179	36 (20.1)	66 (36.9)
女	82	17 (20.7)	35 (42.7)

2.3 不同年龄患儿痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果

用 FQ-PCR 检测年龄 ≤6 个月组痰标本 RSV-RNA 阳性率 43.6% 与 1 岁~组阳性率 32.1% 比较,差异有显著性 ($\chi^2 = 21.10, P < 0.01$); 年龄 ≤6 个月

组痰标本 RSV-RNA 阳性率与血 RSV-IgM 阳性率比较,差异有显著性($\chi^2 = 24.56, P < 0.01$),其他年龄组差异无显著性($P > 0.05$)(表 3)。

表 3 不同年龄组患儿痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果
例(%)

年龄	例数	RSV-IgM 阳性	RSV-RNA 阳性
≤6 个月	140	23(16.4)	61(43.6) ^{a,b}
6 个月 ~	59	16(27.1)	22(37.3)
1 岁 ~	53	14(26.4)	17(32.1)
3 ~ 11 岁	9	2(22.2)	1(11.1)

a: 与 1 岁 ~ 组比较, $\chi^2 = 21.10, P < 0.01$; b: 与同年龄组 RSV-IgM 阳性率比较, $\chi^2 = 24.56, P < 0.01$ 。

2.4 不同临床诊断患儿痰标本 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果

痰标本 RSV-RNA 阳性结果均为下呼吸道感染(包括急性支气管炎,毛细支气管炎,支气管肺炎)患儿,其中毛细支气管炎痰标本 RSV-RNA 阳性检出率最高(58.5%),与急性支气管炎、支气管肺炎比较,经卡方检验(χ^2 分别为 27.81、5.73),阳性率差异有显著性(P 分别 < 0.01 和 < 0.05)。查血 RSV-IgM 阳性率在不同临床诊断比较差异无显著性($P > 0.05$),见表 4。

表 4 不同临床诊断患儿痰标本中 RSV-RNA 与血 RSV-IgM 检测结果
例(%)

临床诊断	例数	RSV-IgM 阳性	RSV-RNA 阳性
急性上呼吸道感染	7	1(14.3)	0(0)
疱疹性咽峡炎	2	1(50.0)	0(0)
急性支气管炎	20	6(30.0)	4(20.0)
毛细支气管炎	41	8(19.5)	24(58.5) ^{a,b}
支气管肺炎	191	39(20.4)	73(38.2)

a: 与急性支气管炎组比较, $\chi^2 = 27.81, P < 0.01$; b: 与支气管肺炎组比较, $\chi^2 = 5.73, P < 0.05$ 。

3 讨论

毛细支气管炎婴儿 RSV 感染的临床诊断与多数实验室诊断一样准确,一个群体的感染以某些特有基因表型的病毒占优势^[7]。目前 RSV 的临床检验常用病毒分离培养法、免疫学方法和逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法。病毒分离培养虽有“金标准”之称^[8,9],但其技术复杂、费时,一般需要 1 ~ 2 周的时间且成本高^[10],不适合用于早期诊断,由于 RSV 不耐冰冻和冻融,除非通过特殊的培养基保护,标本很难贮存或远距离运送。RT-PCR 法只能

定性或半定量检测,无法评价治疗方案的效果,且易造成产物污染,无法标准化,漏检率较高^[9],不利推广。

ELISA 法是目前应用最为广泛的病毒抗原、抗体检测技术,此种方法要求标本含有一定量的抗原和高质量的特异性抗体,特异性强、检测快速,是检测呼吸道感染 RSV 的重要检测手段之一。但小婴儿可由于免疫力低下而出现假阴性^[11],儿童可能从早期 RSV 感染时获得抗体,成人轻型病人中常常不会引起抗体滴度升高。因此 ELISA 虽然操作简便,可出现假阳性和假阴性,单靠血清学检查结果难以判断。

近年来发展起来的荧光定量 PCR 技术以其灵敏度高、检测速度快、特异性强等优点,已在病原体定性定量检测、肿瘤基因检测、免疫分析、基因表达水平分析及其多态性研究等多个领域得到应用^[12,13]。

本研究应用荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术检测 261 例呼吸道感染患儿痰标本 RSV-RNA,阳性率 38.7%,与文献报道采用荧光标记的呼吸道单克隆抗体检测或采用间接免疫荧光检测 RSV(试剂由美国 Chemicom 公司生产)阳性率一致^[14,15],ELISA 法查静脉血 RSV-IgM 阳性率 21.1%,两种方法阳性检出率比较差异有显著性($P < 0.01$),说明核酸扩增荧光定量 PCR 检测呼吸道 RSV 感染敏感性高。痰标本 RSV-RNA 及血 RSV-IgM 阳性率与性别差异无显著性,与文献报道男性患儿高于女性患儿不一致^[14],结果不同可能与地域不同有关。用 FQ-PCR 检测痰标本 RSV-RNA 阳性率,年龄 ≤ 6 个月组阳性率与 6 个月 ~ 组阳性率比较差异无显著性,与 1 岁 ~ 组阳性率比较差异有显著性($P < 0.01$),说明年龄越小 RSV 感染率越高,与文献报道一致^[16]。3 ~ 11 岁组阳性率最低,因例数少,无统计学意义。年龄 ≤ 6 个月婴儿 RSV-IgM 阳性率低,可能与婴儿免疫系统发育未成熟有关。因此,血 RSV-IgM 阳性率受年龄因素影响,痰标本 RSV-RNA 阳性率不受年龄因素影响,这是 FQ-PCR 敏感性高的原因之一。痰标本 RSV-RNA 阳性结果均为下呼吸道感染患儿,阳性检出率在 20.0% ~ 58.5% 之间,说明 RSV 是婴幼儿下呼吸道感染的主要病原体^[17,18],其中毛细支气管炎痰标本 RSV-RNA 阳性率最高(58.5%),与张丽丽等^[19]报道阳性率(62.5%)相当。

[参 考 文 献]

[1] Collinas PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial vi-

rus[M].//Field BN, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al. Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, 1443-1484.

[2] 孙宇,朱汝南,邓洁,赵林清,王芳,钱渊. 应用实时聚合酶链反应技术检测儿童呼吸道标本中的呼吸道合胞病毒[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(6):450-454.

[3] 陈育智. 支气管哮喘[M].//胡亚美,江载芳. 诸福棠实用儿科学上册. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2002, 631-642.

[4] 牟京辉,陈慧中. 病毒感染与婴幼儿喘息性疾病[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16):1212-1214.

[5] 陈彩霞,单晔,葛蕾,于宝生,汪受传. 婴幼儿喘息与呼吸道合胞病毒肺炎支原体感染及过敏的关系[J]. 中国实用儿科杂志, 2007, 22(12):908-910.

[6] 董琳,黄志英,陈小芳,周晓聪,李锦燕,林剑. IFN- γ /A + 874T 位点基因多态性与呼吸道合胞病毒毛细支气管炎的相关性[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(1):21-24.

[7] 李成荣. 现代儿科疾病诊断与治疗[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005, 955.

[8] Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harris RJ. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification[J]. Clin Microbiol, 1992, 30(4):901-904.

[9] 谢平. 用PCR技术及常规病毒学检测诊断呼吸道合胞病毒感染的方法学比较[J]. 苏州医学院学报, 1997, 17(5):844-845.

[10] 赵林清,钱渊,王之樑,朱汝南,邓洁. 呼吸道合胞病毒检测方法比较[J]. 临床儿科杂志, 2003, 21(1):20-24.

[11] 鲁继荣,乔红梅. 儿童病毒性呼吸道感染的诊断治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16):1206-1208.

[12] 张其威,游上游,孙继民,吴旗,余春华,张楚瑜. 呼吸道合胞病毒实时荧光定量PCR检测[J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(7):847-852.

[13] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(3):225-227.

[14] 曹淑彦,陈小芳,蔡晓红,李孟荣,宫剑,王秀娣,等. 温州地区2005~2006年急性呼吸道感染患儿病毒病原学检测的情况[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16):1234-1235.

[15] 刘亚谊,谢正德,刘春艳,买颖. 北京地区2005年12月~2006年4月下呼吸道感染住院患儿病毒病原检测分析[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(16):1236-1237.

[16] 吕晓娟,徐丹,陈志敏. 小儿呼吸道合胞病毒感染流行特点分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(12):898-900.

[17] 李兰,王智斌,李敏,张剑波,陈昌辉,李波,等. 呼吸道合胞病毒毛细支气管炎患儿T细胞亚群检测的临床价值[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(5):421-422.

[18] 高武红,李成荣. 婴儿急性毛细支气管炎随访分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2003, 5(4):357-358.

[19] 张丽丽,唐浏英,谢正德,檀晓娟,李崇山,崔爱利,等. 急性下呼吸道感染患儿病毒病原学及其临床特征[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(22):1743-1756.

(本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于1974年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个紧密相联学科的专业学术期刊。创刊以来深受广大读者的好评和喜爱。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价13元,全年定价78元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号(中南大学湘雅医院内) 《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail 地址:jinn@vip.163.com。