

3 种检测生殖器疱疹方法的对比研究

张帆, 莫银娟, 朱丽婷(南方医科大学珠江医院皮肤科, 广州 510282)

【摘要】 目的 寻找更为准确、经济、实用的生殖器疱疹病毒感染的检测方法。方法 取根据病史及典型的临床症状表现的生殖器疱疹疑似病例患者标本 50 例, 分别采用病毒培养、荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)及酶联免疫吸附试验(ELISA) 3 种方法进行实验室检测, 比较各种方法检测的阳性率。结果 病毒培养阳性 30 例, 阳性率 60.0%; FQ-PCR 检测阳性 34 例, 阳性率 68.0%; ELISA 检测阳性 32 例, 阳性率 64.0%, 经 χ^2 检验, 三者差异无统计学意义($\chi^2=0.69, P>0.05$)。水疱和脓疱标本的阳性率分别为 94.6% 和 83.3%, 明显高于其他来源标本的阳性率。结论 3 种检测方法对临床疑似生殖器疱疹患者的检测阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。相对另外两种检测方法, ELISA 因其便宜、实用的优点而适用于临床推广应用。水疱和脓疱标本阳性率明显高于其他类型标本的阳性率, 对临床疑似病例的实验诊断, 标本以采集水疱和脓疱液为佳。

【关键词】 生殖器疱疹; 病毒培养; 荧光定量聚合酶链反应; 酶联免疫吸附试验

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.21.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)21-3182-02

Contrastive study on three methods in detection of genital herpes virus ZHANG Fan, MO Yin-juan, ZHU Li-ting
(Department of Dermatology, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

【Abstract】 Objective To search for a more accurate, economic and practical detection method of genital herpes virus (HSV). **Methods** 50 specimens were collected from the suspected as genital herpes according to the disease history and the typical clinical symptoms and tested by adopting 3 kinds of method: virus culture method, fluorescence quantitative-PCR (FQ-PCR) and ELISA. The positive rates were compared among 3 kinds of method. **Results** 30 cases were positive in the virus culture, the positive rate was 60.0%, 34 cases were positive in FQ-PCR with the positive rate of 68.0%, 32 cases were positive in ELISA with the positive rate of 64.0%, the differences were not statistically significant($\chi^2=0.69, P>0.05$). However, the positive rates of blister and pustules specimens were 94.6% and 83.3% respectively, which were significantly higher than those of other sources of samples. **Conclusion** The positive rate of clinically suspected genital herpes detected by using three methods had no statistically significant difference. ELISA is more suitable for clinical application compared with other two methods because of cheap and convenient advantages. The positive rate of blister and pustules specimens is significantly higher than that of other types of samples, therefore in the laboratory diagnosis for the suspected case, collecting the blister and pustules samples is best.

【Key words】 genital herpes; virus culture; FQ-PCR; ELISA

单纯疱疹病毒(HSV)包括 HSV-1 和 HSV-2 两个血清型, HSV 感染引起疱疹性口腔炎、眼炎、脑炎及生殖器炎等诸多临床表现^[1]。而生殖器疱疹是临床最常见的一种性传播疾病, 具有反复发作及癌变特性, 对患者的身心健康构成严重威胁^[2-4]。引起生殖器疱疹的主要病毒类型为 HSV-2, 约占 90%^[5], HSV-1 和混合型只占很少的一部分。本文主要研究的是检测 HSV-2 感染。该病的诊断主要依据临床表现, 结合实验室检测。目前, HSV-2 的实验室诊断方法主要有病毒分离培养、聚合酶链反应(PCR)、酶联免疫吸附试验(ELISA)及血清抗体检测等方法。其中, 病毒分离培养为“金标准”。但病毒培养操作难度大, 时间周期长(一般需要 4~7 d), 条件要求严格, 很难在临床推广。而荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测结果特异性和敏感性都高, 但费用昂贵。作者采用 3 种检测方法对 50 例生殖器疱疹临床标本进行检测并对比分析, 以帮助找到一种适合于临床实验广泛应用的有效检测 HSV-2 的方法。

1 资料与方法

1.1 标本采集 临床疑似生殖器疱疹患者 50 例均来自 2014 年 8 月至 2015 年 2 月珠江医院皮肤科门诊就诊患者, 其中男 37 例, 女 13 例; 年龄 19~56 岁。具有临床症状的患者先暴露

皮损部位, 采集疱液、脓疱液或溃疡面痂面皮屑; 无临床症状的患者, 男性采集前 2 h 内未排尿, 尿道口内 1~3 cm 取材, 女性宫颈口内 1~3 cm 取材。

1.2 病毒分离培养

1.2.1 细胞培养 培养病毒细胞采用 A549(肺腺癌细胞), 来自 The American Type Culture Collection (ATCC)。A549 使用含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司)的低糖 DMEM 培养液(美国 Invitrogen 公司), 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 胰酶消化, 转至 24 孔细胞培养板, 培养至单层。

1.2.2 临床标本接种 将病毒运送液摇匀, 取 0.2 mL 经处理标本接种于细胞培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养 1 h, 以便病毒吸附, 然后加入 2 mL 含 2% 胎牛血清的完全培养基, 36℃、5% CO₂ 的培养并观察细胞形态改变。

1.2.3 细胞观察 将培养物反复冻融 3 次, 取 0.2 mL 培养物接种到新 HEP-2 细胞管中, 经培养后, 将 HEP-2 细胞管用吸管吹打下来, 以 200×g 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀混悬液加入 100 mL、pH 7.2 的 PBS 中, 取 25 mL 滴于载玻片上, 并涂成 1 cm 圆膜, 干燥后, 丙酮固定 10 min, 用 HSV 单克隆抗体(达科生物技术有限生物公司)染色, 荧光显微镜观察。

1.3 FQ-PCR 检测

1.3.1 DNA 模板制备 试剂购自达安基因股份有限公司。用无菌生理盐水洗脱拭子的分泌物或疱液。10 000×g 离心 10 min,弃上清液,沉淀加 50 μLDNA 提取液,100 ℃干浴 10 min,10 000×g 离心 5 min,取 5 μL 上清液作 PCR 扩增模板。

1.3.2 引物设计 设计引物序列为 P1:5'-AGGAGTGGCT-GGCGCGACC-3'; P2: 5'-ATCCGGTCCTTGATGGACG-3'。取 5 μL 模板提取液加入到 HSV-2 反应管中,各反应管放入 LIGHTCYCLER 型 PCR 仪中,扩增 93 ℃ 2 min 后 93 ℃ 5 s, 57 ℃ 45 s,40 个循环后再 37℃ 1 s。循环结束后,自动读取定量结果值。

1.4 ELISA 检测 ELISA 试剂盒购自 DAKO 公司。恢复至室温,取 200 μL 标本液加入 96 孔聚乙 烯酸标板各反应孔,另取阴阳性对照各 200 μL 加入反应孔。各孔加酶结合物 50 μL,37 ℃ 孵育 90 min,洗涤 4 次,加底物 A、B 各 100 μL,振荡 30 min,加硫酸终止液 100 μL,450 nm 酶标仪测 A 值,A>CO+0.015 为阳性,表示有疱疹病毒感染。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行统计分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用 χ² 检验,以 α=0.05 为检验水准,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

在 50 例标本中,经病毒培养法检测,30 例阳性,阳性率 60.0%。FQ-PCR 检测阳性 34 例,阳性率 68.0%。ELISA 检测阳性 32 例,阳性率 64.0%。3 组检测方法阳性检出率差异无统计学意义(χ²=0.69,P>0.05)。

从取材的结果类型来看,水疱和脓疱标本检出的阳性率较高,分别为 94.6%和 83.3%,明显高于其他取材类型的标本阳性率(糜烂 38.8%,痂面 20.0%,拭子 16.6%)。见表 1。

表 1 50 例临床标本的病毒培养、FQ-PCR 和 ELISA 的检测结果

标本类型	n	病毒培养 [n(%)]	FQ-PCR [n(%)]	ELISA [n(%)]	平均(%)
水疱	25	23(92.0)	24(96.0)	24(96.0)	94.6
脓疱	4	3(75.0)	4(80.0)	3(75.0)	83.3
糜烂	6	2(33.3)	3(50.0)	2(33.0)	38.8
痂面	5	1(20.0)	1(20.0)	1(20.0)	20.0
拭子	10	1(10.0)	2(20.0)	2(20.0)	16.6
合计	50	30(60.0)	34(68.0)	32(64.0)	64.0

3 讨 论

生殖器疱疹是由 HSV 感染泌尿生殖器及肛门周围皮肤黏膜而引起的一种慢性、复发性、难治愈的性病,该病临床表现多样,多发且具有致癌、致畸性。近年研究发现,生殖器疱疹患者较健康人更易感染 HIV^[6-7]。临床上典型病例可以根据病史和临床表现诊断,但很多病例临床表现不典型或处于亚临床感染状态,一些病例合并其他感染,如梅毒、尖锐湿疣及念珠菌等^[8],因此实验室检测对于生殖器疱疹的诊断非常必要。随着医学分子生物学的发展,生殖器疱疹实验室诊断方法亦有了很大发展,病毒培养法、抗原检测法、FQ-PCR 及抗体检测法等相继应用于 HSV 感染的检测^[9-10]。目前,病毒的分离培养法是国际公认的诊断生殖器疱疹的金标准,但操作复杂费时、技术要求高,并且分离培养的成功率与标本采集、标本中活病毒数量以及标本的运送和保存等多种因素有关^[11],难以成为检测 HSV-2 的临床常规方法。随着检测技术的进步,FQ-PCR 逐渐取代传统的 PCR 检测法。FQ-PCR 由于多使用了一条与模板互补配对的核酸探针,因此比传统 PCR 法具有更高敏感性

和特异性^[12],同时减少了假阳性的概率。但 FQ-PCR 所需检测仪器价格昂贵,实验场所要求必须达到国家规定的 PCR 实验室条件,且实验操作人员必须经严格的岗前培训并具有相应的资质。而 ELISA 方法具有方便、快速及费用低等有点,且实验条件要求不高。国外研究证实,ELISA(DAKO 试剂盒)检测疱疹病毒抗原有较高的敏感性和特异性^[13]。在本研究中,作者发现 3 种检测方法对 HSV-2 的检测结果差异无统计学意义(P>0.05),提示用相对简单的 ELISA 代替其他两种方法检测 HSV-2 的可行性。本试验中,还发现不同的标本来源,检测结果差异有统计学意义(P<0.05),其中水疱和脓疱的标本阳性率明显高于其他类型的标本,提示水疱和脓疱中病毒的活力最强或处于病毒复制期,而其他类型标本中的活力明显减弱甚至消失。提示实验室检测生殖器疱疹,标本的采集最好为水疱或脓疱的疱液。

参考文献

[1] 周翠,曹春来,樊建勇,等.单纯疱疹病毒 2 型全长糖蛋白 D 抗原的原核表达及抗原性 分析[J]. 实用医学杂志, 2008,24(10):1668-1670.

[2] Jones CA, Isaacs D. Management of herpes simplex virus infections [J]. Current Paediatrics,2004,14(2):131-136.

[3] Sanchez-Alemán MA, Conde-Glez CJ, Gayet C, et al. Sexual Behavior and Herpes Simplex Virus 2 Infection in College Students [J]. Arch Med Res,2005,36(5):574-580.

[4] Avgil M, Ornoy A. Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy; consequences of neonatal or intrauterine infection [J]. Reprod Toxicol,2006, 21(4):436-445.

[5] 赖伟红,冯莲凤,韩国柱,等.生殖器溃疡中单纯疱疹病毒的检测和分型[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2003,19(1):13-15.

[6] Martinelli E, Tharinger H, Frank I, et al. HSV-2 infection of dendritic cells amplifies a highly susceptible HIV-1 cell target [J]. PLoS Pathog,2011,7(6):e1002109.

[7] Mujugira A, Magaret AS, Baeten JM, et al. Risk factors for HSV-2 infection among sexual partners of HSV-2/HIV-1 co-infected persons[J]. BMC Res Notes,2011,4: 64-69.

[8] 赖伟红,韩国柱,王千秋.生殖器疱疹合并其他性传播感染的临床研究[J]. 中华皮肤科杂志,2002,35(3):209-211.

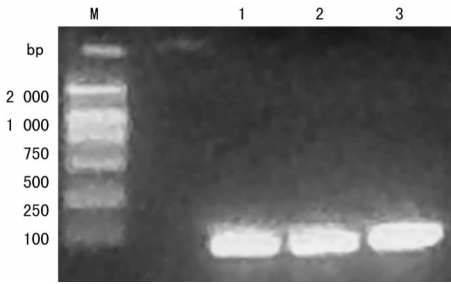
[9] 秦运军,孙文会,郑艳姬,等. FQ-PCR、ELISA 检测生殖器疱疹患者 HSV-2 相关指标结果分析[J]. 山东医药, 2009,49(38):76.

[10] 陈戴红,毛会军,邱建萍,等. 电化学发光法检测单纯疱疹病毒 2 IgG 抗体应用评估[J]. 检验医学,2012,27(11): 887-889.

[11] Schmutzhard J, Riedel HM, Zweyberg B, et al. Detection of herpes simplex virus typel, herpes simplex virus type 2 and varicellazoster virus in skin lesions. Comparsion of real-time PCR, nested PCR and virus isolation [J]. J Clin Virol,2004,29(2):120-126.

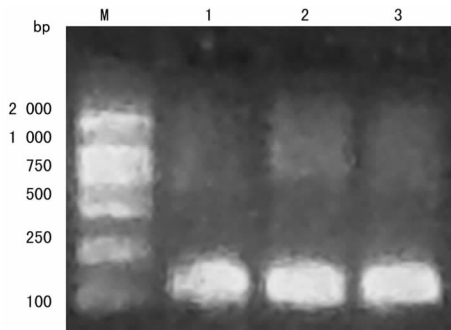
[12] 杨帆,李永双. 荧光定量 PCR 仪检女性商业性工作者性传播感染[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2004,12(4):334-335.

样品是同一批样品,但是比较胶法染色(图 1)、预染样品法染色(图 2)及两者相结合的染色方法(图 3),发现 3 种方法显示的核酸分子的大小不完全一致。这可能是样品加入染料后,影响了样品的迁移速率,以致不能准确地判断 DNA 条带的大小。



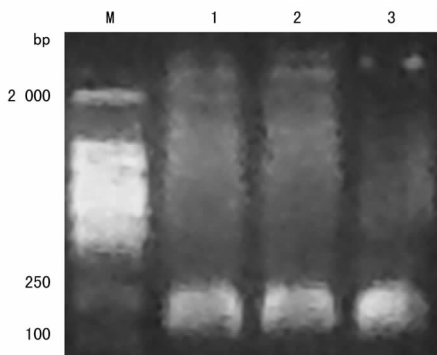
注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 1 胶染法染色



注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 2 预染样品法染色



注:M 为 DL2000 Marker;泳道 1、2、3 为核酸样品。

图 3 胶染法+预染样品法

3 讨论

EB 因其在核酸电泳中有着条带边缘清晰、背景低、灵敏度高的优点,曾经是实验室用于检测核酸的常规染料。但由于 EB 是一种强诱变剂并具有一定的致癌性而逐渐减少使用。Genefinder 是近几年推出的新型荧光核酸染料,属于花青类染料,毒性低,使用安全,可有效保护操作者和环境。Genefinder 与核酸结合后的最大吸收峰为 490 nm,与染料结合的核酸在紫外线下呈现绿色荧光。但该染料同样能引起有机体突变,在使用时要采取适当的保护措施^[4-6]。有报道表明,新型荧光核

酸染料在成本、灵敏度、安全性方面都具有较大优势,适合实验室的常规核酸检测,可以作为 EB 的替代品^[7]。但是,不同的染色方式下,检测效果有很大差异,通过比较图 1~3 可以看出,使用胶染法染色 Genefinder 对 100~2 000 bp 的核酸分子,其显色效果条带清晰,平直,边缘整齐;预染样品法和两者相结合的染色方法都会导致核酸条带模糊拖尾及 DNA MARK 分辨率不高的现象。这个结果与刘阳等^[8]的研究结果是一致的,不论是对于 EB 还是新型核酸染料,使用胶染法的灵敏度较高。此外,在实验过程中还发现,当 Genefinder 在上样前与 DNA 混匀后再电泳时,DNA 片段的电泳迁移率会有一定程度的降低,因此,不能用于准确地判断 DNA 条带的大小,只适用于简单的电泳试验,如胶回收、简单 PCR 产物分析等。上述结果提示,对于 PCR 产物而言,条带大小的不同可能是 PCR 产物的大小不同或同一 PCR 产物的染料浓度不同所致^[8-10]。

综上所述,Genefinder 是花青素类的染料,安全、环保,灵敏度高,对琼脂糖凝胶中的 DNA/RNA 进行染色,可以作为 EB 的替代品用于实验室的常规检测;在实验条件相同的情况下,使用胶染法进行染色可以得到清晰整齐的染色条带,与预染样品法及胶染法+预染样品法相比较,是比较理想的染色方式,而且可以减少电泳中 Genefinder 对核酸迁移率的影响。

参考文献

- [1] Bensaude O. Ethidium bromide and safety-readers suggest alternative solutions[J]. Trends Genet,1988,4(4):89-90.
- [2] Lunn G,Sansone EB. Ethidium bromide;destruction and decontamination of solutions[J]. Anal Biochem,1987,162(2):453-458.
- [3] Lunn G. Decontamination of ethidium bromide spills [J]. Trends Genet,1990,6(2):31-34.
- [4] 张全波,冉黎,陆长青,等. 四种核酸荧光染料在琼脂糖凝胶中染色特性的比较分析[J]. 四川解剖学杂志,2007,15(3):11-13.
- [5] 王洪梅,李艳霞,王福德,等. Genefinder 和 Goldview 两种核酸染料的灵敏度比较[J]. 林业科技,2012,37(6):1-3.
- [6] 赵伟,方炳雄,牛宇杰,等. 3 种常见核酸染料的安全性和灵敏度研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(22):2954-2958.
- [7] 崔成德,王克林,李滨,等. Genefinder 和 EB 在 DNA 电泳谱带定量分析中的比较[J]. 安徽农业科学,2008,36(2):452-453.
- [8] 刘阳,杨淑霞,李敏惠,等. 三种染色方式下四种核酸染料的灵敏度比较[J]. 成都医学院学报,2008,3(1):20-23.
- [9] 常冰梅,张栋,李美宁,等. 一种新型核酸染料在琼脂糖凝胶电泳中的应用[J]. 现代预防医学,2010,37(19):3717-3718.
- [10] 娄静,刁保卫,李伟,等. 三种核酸染料应用于细菌脉冲场凝胶电泳染色的比较研究[J]. 疾病监测,2011,26(5):388-391.

(收稿日期:2015-02-15 修回日期:2015-07-06)

(上接第 3183 页)

- [13] Brinker JP, Herrmann JE. Comparison of three monoclonal antibody-based enzyme immunoassays for detection of herpes simplex virus in clinical specimens [J]. Eur

J Clin Microbiol Infect Dis,1995,14(4):314-317.

(收稿日期:2015-04-29 修回日期:2015-06-24)