

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.07.030

多重 RT-PCR 与毛细电泳联用技术在儿童下呼吸道感染病原体检测中的应用*

冯星星¹, 李明², 贺晓丽^{3△}

云南省昆明市儿童医院/云南省儿童重大疾病研究重点实验室:1. 检验科;2. 呼吸内科;

3. 云南省儿科研究所, 云南昆明 650028

摘要:目的 采用多重逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)与毛细电泳联用技术对 13 种儿童呼吸道常见病原体痰液标本进行检测, 研讨其在儿童下呼吸道感染病原体检测中的价值。方法 采集 2019 年 12 月至 2020 年 1 月该院 38 例因下呼吸道感染住院患儿的痰液标本, 应用多重 RT-PCR 技术检测 13 种呼吸道病原体, 同时采用直接免疫荧光法检测 7 种常见呼吸道病毒抗原。结果 38 例下呼吸道感染住院患儿的痰液标本中, 多重 RT-PCR 检出至少一种病原体阳性 36 份, 检出率 94.7%(36/38), 其中乙型流感病毒检出最多, 阳性 20 例(52.6%), 其次检出呼吸道合胞病毒 14 例(36.8%)阳性, 甲型流感病毒 H1N1(2009)8 例(21.0%)阳性, 鼻病毒 6 例(15.8%)阳性, 副流感病毒 4 例(10.5%)阳性, 其中检出 2 种或 2 种以上呼吸道病原体混合感染 14 份, 检出率为 36.8%(14/38)。选取与直接免疫荧光法(DFA)检测相同的 7 种病毒进行比较, DFA 检出阳性 16 份, 检出率仅有 42.1%(16/38), 多重 RT-PCR 阳性检出率高于 DFA 方法, 两种方法病毒阳性检出率差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 多重 RT-PCR 与毛细电泳联用方法是一种高效快速、高通量、准确的检测技术; 同 DFA 比较特别在流感病毒检测方面具有更高灵敏度, 可同时检测更多病原体, 能指导临床了解儿童下呼吸道感染病原并进行及时有效治疗。

关键词:呼吸道感染; 多重逆转录聚合酶链反应; 直接免疫荧光法; 儿童**中图分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2021)07-0969-03

急性下呼吸道感染(ALRTI)是临床儿童最为常见的感染性疾病, 病原学复杂, 对儿童健康造成严重威胁, 其中病毒是婴幼儿和学龄前儿童最为主要的 ALRTI 病原^[1]。在儿童 ALRTI 中明确感染的病原体, 对于疾病早期诊断和特异性抗病毒治疗, 选择合理治疗方案非常重要。目前, 国内实验室开展检测较多的是采用直接免疫荧光法(DFA)检测 7 种常见的呼吸道病毒抗原: 呼吸道合胞病毒(RSV)、腺病毒(ADV)、甲型流感病毒(InfA)、乙型流感病毒(InfB)、副流感病毒 1、2、3(PIV I、PIV II、PIV III), 但是在 ALRTI 中常见的鼻病毒(HRV)、冠状病毒(HCOV)和近年来新发现的偏肺病毒(HMPV)、博卡病毒(HBOV)等也被证实是引起儿童呼吸道感染的重要病原, 这几种病毒均不能采用 DFA 进行常规检测。为了满足临床诊治的需要, 近年来核酸检测技术的应用成为呼吸道病原体外诊断的新方向, 采用多重 RT-PCR 技术可同时检测 RSV、HRV 等在内的 13 种呼吸道病原体, 因此, 本研究应用多重 RT-PCR 技术和 DFA 同时对 38 例儿童 ALRTI 痰液标本进行呼吸道

病原体检测, 比较两种方法的检测结果, 探讨多重 RT-PCR 技术在儿童 ALRTI 检测中的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 12 月至 2020 年 1 月昆明市儿童医院因呼吸道感染收治入院患儿 38 例。其中男 22 例, 女 16 例, 年龄 12 d 至 7 岁。收集其痰液标本 38 份。

1.2 仪器与试剂 3500Dx 基因分析仪和 PCR 基因扩增仪是购自美国 ABI 公司; Olympus-BX65 荧光显微镜购自 Olympus 公司; 13 种病原体多重检测试剂盒是购自宁波海爾施科技有限公司, 各病毒扩增核酸片段大小信息见表 1; 核酸提存或纯化试剂, 备案号: 浙甬械备 2015 0006 号; 7 项呼吸道病毒检测试剂盒(免疫荧光法)购自美国 Diagnostic Hybrids 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 患儿入院后由专业护士用一次性吸痰管抽吸痰液 1.0~2.0 mL 置于无菌培养管中, 不得倾斜或颠覆, 标本采集后 2 h 内送检, 将标本分成 2 份, 分别进行多重 RT-PCR 实验和 DFA 实验。

* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2018NS0172); 云南省昆明市卫生科技人才培养暨“十百千”工程培养计划项目[2020-SW(后备)-117]。

△ 通信作者, E-mail: hexiaoli@etyy.cn。

1.3.2 多重 RT-PCR

1.3.2.1 样本前处理 在痰液中加入等体积生理盐水,彻底混匀,吸取上清液进行核酸提取。

1.3.2.2 核酸提取 使用核酸提取或纯化试剂(备案号:浙甬械备 2015 0006 号)进行手动核酸提取,向每份参与提取的标本(包括 ResP 阳性对照和阴性对照)中加入 2 μL 的 RT-PCR 内参共同提取。13 种呼吸道病原体多重检测试剂盒所检测的病原体对应扩增片段如下:InfA, 105.2 nt; ADV, 112.7/114.7 nt; Boca, 121.1 nt; HRV, 129.5 nt; 人 RNA 内参(huRNA), 147.0 nt; 甲型流感病毒 H1N1(2009)(09H1), 158.6 nt; PIV, 179.1 nt; 衣原体(Ch), 188.2 nt; HMPV, 199.9 nt; InfB, 207.0 nt; 肺炎支原体(Mp), 212.3 nt; 人 DNA 内参(huDNA), 232.5 nt; 甲型流感病毒 H3N2(H3N2), 241.0 nt; HCOV, 261.7 nt; RSV, 276.7 nt; RT-PCR 内参(IC), 313.0 nt。

1.3.2.3 配制 RT-PCR 体系 (1)对 ResP 预混液进行彻底涡旋,瞬时离心 10 s;将 RT-PCR 酶混合液瞬时离心 10 s 后竖直置于冰上。(2)计算样品数目 N ($N = \text{阳性对照} 1 \text{ 个} + \text{阴性对照} 1 \text{ 个} + \text{临床待检样品数目}$),在 1.5 mL 离心管中依次加入以下体积试剂:14 $\mu\text{L} \times (N+1)$ 的 ResP 预混液和 1 $\mu\text{L} \times (N+1)$ 的 RT-PCR 酶液。将离心管中的混合液颠倒混匀并瞬时离心后,竖直置于冰上。(3)取 15 μL 的混合液分装至各个 PCR 管中,瞬时离心 10 s,将 PCR 管竖直置于冰上,由于混合液较黏稠,为确保分装准确,建议采用反向移液法(吸液时先将移液器按压至第 2 档,之后放松移液器以吸取混合液,推液时压至第 1 档结束)。

1.3.2.4 RT-PCR 扩增 在上述 PCR 管中按顺序分别加入阳性对照、阴性对照和待检测的核酸样品各 5 μL ,完成加样后,将 PCR 管瞬时离心 10 s,并置于冰上。为避免污染,建议先加入阴性对照,再加入待检测核酸,最后加入阳性对照。PCR 扩增条件:25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 6 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 29 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2.5 毛细电泳仪荧光信号强度的测量 (1)配置毛细电泳液:使用标准品测量毛细电泳平台中所有毛细管的荧光信号强度,配置标准品电泳液,Hi-DiTM Formamide 9 $\mu\text{L} \times 8$ 孔 SIZE-500 Plus 0.25 $\mu\text{L} \times 8$ 孔,标准品 1 $\mu\text{L} \times 8$ 孔。(2)加样:将配制好的标准品电泳液涡旋混匀后,分别取 10 μL 加入到每道毛细管对应的 96 孔板上进行电泳分离,得到每道毛细管中标准品的峰高度。(3)PCR 产物的毛细电泳分离:制备电泳样品,Hi-DiTM Formamide 9 $\mu\text{L}/\text{孔}$, SIZE-

500 Plus 0.25 $\mu\text{L}/\text{孔}$, PCR 产物 1 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。3500Dx 遗传分析仪毛细电泳分离样品,选择“Fragment”电泳分离方法(参照 3500Dx 基因分析仪使用说明书)。

1.3.2.6 样品检测结果判断 检测样品的峰型图中同时出现人 RNA 内参、人 DNA 内参,且峰高度高于该道毛细管中标准品高峰,说明样品取样成功,未发生明显降解且核酸提取成功;若出现内置 RT-PCR 内参的特征峰,且峰高度高于该道毛细管中标准品高峰,其监控整个操作流程,说明实验流程正常。由于竞争扩增原因,该峰可能降低甚至消失。(1)以 ResP 阳性对照为模板的峰型图中必须出现 16 个特征峰,且 16 个特征峰的峰高度均高于该道毛细管中标准品高峰。以阴性对照为模板的峰型图中必须出现人 DNA 内参和 RT-PCR 内参的特征峰(也有可能出现人 RNA 内参的特征峰),且这 2 个特征峰的峰高度均高于该道毛细管中标准品高峰。(2)扩增产物中的目标位点峰高度低于该道毛细管标准品峰低峰(NegS)的,判该位点阴性。(3)扩增产物中的目标位点峰高度高于该道毛细管标准品峰高峰(PosS)的,判该位点阳性。(4)扩增产物中的目标位点高于该道毛细管标准品低峰,但低于标准品高峰的,判断该点灰区;峰高度落在灰区的样品建议重新提核酸进行检测,若样品仍在灰区或落在阳性区域的,判阳性。若重复检测落在阴性区域的,判阴性。

1.3.3 DFA 痰液标本中加入磷酸盐缓冲液(PBS) 5~10 mL,在涡旋混匀器上轻微混匀,以 1 500 r/min 离心 5 min,去除上清留取沉淀,再用 PBS 洗涤沉淀 1~2 次,洗涤要彻底,避免残留黏液产生非特异性荧光。最后,将沉淀液溶解在 0.5~1.0 mL PBS 中,吸管轻轻吹打使其成为细胞悬液,移液器吸取 25 μL 细胞悬液于玻片上点样共 7 点,分别用于检测 RSV、ADV、InfA、InfB、PIV I、PIV II、PIV III。玻片空气中室温干燥后,冷丙酮固定 10 min。玻片上每个细胞点加 1 滴相应的荧光抗体,必须完全覆盖待测标本,将载玻片放在湿盒中置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 30 min,然后用事先配置好的 PBS 浸泡洗涤。干后用封闭液封片,盖上盖玻片,于荧光显微镜下观察,以 200 倍视野见到 ≥ 2 个苹果绿荧光细胞为阳性,否则为阴性。试剂盒提供的阳性对照按同样方法处理。

1.4 统计学处理 应用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,组间比较采用配对四格表 McNemar 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 多重 RT-PCR 病原体检测结果 38 例住院下呼吸道感染患儿的痰液标本中,多重 RT-PCR 检出至少一种病原体阳性 36 份,检出率 94.7%(36/38),其

中 InfB 阳性最多,为 20 例(52.6%),其次检出 RSV 阳性 14 例(36.8%),09H1 阳性 8 例(21.0%),HRV 阳性 6 例(15.8%),PIV 阳性 4 例(10.5%)。其中检出 2 种或 2 种以上呼吸道病原体混合感染 14 份,检出率为 36.8%(14/38),分别检出 2 种呼吸道病毒混合感染 12 份,3 种病毒混合感染 2 份,混合感染中最常见的病毒为 InfB,占 31.6%(12/38)。另有 8 种病原体未检出阳性样本。

2.2 多重 RT-PCR 和 DFA 检测结果比较 选取与 DFA 检测相同的 RSV、ADV、InfA、InfB、PIV I、PIV II、PIV III 7 种病毒进行比较,RT-PCR 检出阳性 36 份,检出率 94.7%(36/38),DFA 检出阳性 16 份,检出率 42.1%(16/38),多重 RT-PCR 阳性率高于 DFA 法阳性率,差异有统计学意义($P<0.01$)。

3 讨论

急性下呼吸道感染是全球婴幼儿感染性疾病发病和死亡的一个重要原因,大多数感染由呼吸道病毒引起,由于这些病毒感染的临床表现和流行特点相似,因此难以用临床症状和常规检测方法进行病原鉴定区分^[2]。多重 RT-PCR 与毛细电泳联用技术一次性检测 13 种呼吸道病原体,该平台特异度强,灵敏度高,与荧光定量 PCR 检测结果的一致率达 97.5%^[3]。本研究中检出 InfB 最多,阳性率为 52.6%(20/38)。InfB 是引起流行性感发生和流行的主要病原体之一,近年来儿童在流感高发季节感染率呈上升趋势^[4],所以要警惕在冬春季由于 InfB 引起的流感暴发流行对儿童身体健康带来的危害。本研究检出 RSV 阳性 14 例(36.8%)、HRV 阳性 6 例(15.8%),RSV 感染是诱发或加重婴幼儿哮喘的重要危险因素,HRV 是引起 ALRTI 患儿喘息的重要病毒病原可诱发儿童哮喘急性发作^[5],儿童感染 HSV 与 RSV 引起的临床表现相类似,故应重视区分由 HSV 和(或)HRV 感染引起的 ALRTI。本研究中检出 8 例(21.0%)InfA 全部为 09H1 亚型,通过本研究可鉴别 InfA 的 09H1 和 H3N2 两个亚型,为儿童流感预防接种和流行病学调查提供依据。本研究检出 2 种或 2 种以上呼吸道病毒混合感染 14 例,检出率为 36.8%(14/38),目前普遍认为混合感染的流行病学特点和临床特征与单一感染有所不同^[6],多重 RT-PCR 具有更广病原谱,有助于发现 ALRTI 患儿病原体混合感染情况。本次研究受制于样本量关系有 8 种病原体未能检出,随后将进一步研究。

DFA 是目前实验室检测呼吸道病毒抗原的常规方法,它用荧光标记单克隆抗体对 7 种呼吸道病毒抗

原直接进行检测,是一种特异性及敏感性较高的诊断呼吸道病毒感染的方法^[7]。本研究中,多重 RT-PCR 病毒阳性检出率显著高于 DFA($P<0.01$),与相关文献报道相符^[8]。原因可能为 RT-PCR 法灵敏度高于 DFA,同时 DFA 技术手工操作易受到标本采集的影响,导致检测细胞数量不够,影响阳性检出率,在结果判断上依赖技术人员的主观判断,也会影响结果判断。

综上所述,多重 RT-PCR 与毛细电泳联用技术是一种快速和准确的高通量分析的新型技术,可同时检测常见的 13 种病原体,实验在一个扩增管中进行一步法 RT-PCR 扩增,采用毛细管分离不同长度扩增产物得到病原体检测结果,通过对样品中人 RNA 和人 DNA 同时检测进行质量控制,整个实验具有封闭体系,可有效防止产生气溶胶,可以检测多重感染,能为规范儿童 ALRTI 实验室快速诊断和临床治疗提供有力保证。

参考文献

- [1] 谢正德,肖艳,刘春艳,等. 儿童急性下呼吸道感染病毒病原学 2007—2010 年监测[J]. 中华儿科杂志,2011,49(10):745-749.
- [2] RUUSKANEN O,LAHTI E,JENNINGS L C,et al. Viral pneumonia[J]. Lancet,2011,377(9773):1264-1275.
- [3] 王乐,赵梦川,石仲仁,等. GeXP 多重 RT-PCR 技术在儿童呼吸系统病毒感染病原体检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(12):852-856.
- [4] 李佳泽,姜春明. 儿童乙型流感病毒感染特点及防治的研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2019,31(9):1105-1109.
- [5] JACOBS S E,LAMSON D M,ST GEORGE K,et al. Human rhinoviruses[J]. Clin Microbiol Rev,2013,26(1):135-162.
- [6] 刘晓红,谢正德. 儿童急性呼吸道多病原体混合感染的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2016,43(1):51-53.
- [7] 黄蓉,段荣. 呼吸道病毒检测方法进展与临床意义[J]. 实验与检验医学,2009,27(4):393-396.
- [8] GANZENMUELLER T,KLUBA J,HILFRICH B,et al. Comparifugal shell of the perfor mance of direct fluorescent antibody staining,a point-of-care rapid anti gen test and virus isolation with that of RT-PCR for the detection of novel 2009 infiuenza A(H1N1) virus in respiratory specimens[J]. J Med Microbiol,2010,59(Pt 6):713-717.