第 40 卷 第 8 期
2015 年 8 月

贵 阳 医 学 院 学 报
JOURNAL OF GUIYANG MEDICAL COLLEGE

Vol. 40 No. 8
2015. 8

Real-time PCR 与 RT-PCR 检测儿童人偏肺病毒*

郭 鑫[1**]，崔玉霞[2***]，诸葛姝芮[2]，刘兴梅[2]
(1. 贵州医科大学，贵州 贵阳 550004；2. 贵州省人民医院 儿科，贵州 贵阳 550002)

[摘 要] **目的**：比较荧光定量 PCR(real-time PCR)与普通反转录酶－聚合酶链锁反应(RT-PCR)对人偏肺病毒(hMPV)的检测价值。**方法**：Real-time PCR 和 RT-PCR 同时对 500 例急性下呼吸道感染(ALRTI)患儿鼻咽部分泌物进行 hMPV 检测，分析两种方法的特异性和灵敏性。**结果**：Real-time PCR 和 RT-PCR 的检出率分别为 16% 及 9.8%，RT-PCR 与 Real-time PCR 比较，灵敏度为 31.3%(25/80)，特异度为 94.3%(396/420)。**结论**：Real-time PCR 检测 hMPV 敏感性高于 RT-PCR，是临床检测儿童鼻咽部分泌物 hMPV 感染的有效的方法。

[关键词] 实时荧光定量 PCR；逆转录聚合酶链反应；儿童；感染；人偏肺病毒
[中图分类号] R562.2；R563.12 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2015)08-0834-04

Comparative Study on Real-time PCR and RT-PCR Testing Methods for Detecting human Metapneumo Virus

GUO Xin[1], CUI Yuxia[2], ZHUGE Shurui[2], LIU Xingmei[2]
(*1. Graduate School, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pediatrics, Guizhou Medical University, Guiyang 550002, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of real-time quantitative PCR and RT-PCR in detection of human metapneumo virus. **Methods**: Real-time PCR and RT-PCR are adopted to test hMPV on throat exudate of 500 acute lower respiratory tract infection(ALRTI) child patients, analyzing the specificity and sensitivity of both assays. **Results**: Comparing Real-time PCR and RT-PCR, the detection rates were 16 % to 9.8%. Comparing Real-time PCR and RT-PCR, the sensitivity and specificity were 31.3 %(25/80) and 94.3%(396/420) respectively. **Conclusion**: The sensitivity of Real-time PCR is significantly higher than RT-PCR in detection of hMPV, which provid an effective method for detection of hMPV.

[**Key words**] real-time polymerase chain reaction; reverse transcription polymerase chain reaction; child; infection; human metapneumo virus

儿童急性下呼吸道感染(acute lower respiratory tract infection，ALRTI)是儿科常见的感染性疾病，是 5 岁以下儿童死亡的主要原因之一，病原谱中病毒感染占较大的比重[1]。目前除呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒以及腺病毒等常见病毒病原能迅速灵敏的检测外，仍有相当部分呼吸道感染病毒病原不能及时检出。人偏肺病毒(human metapneumovirus，hMPV)是 2001 年首次分离发现的新呼吸道病毒病原，目前尚没有成熟的检测试剂盒，文献报道的一些检测方法存在换地区及实验室后重复性不良等情况，因此迫切需要建立一种能特异和有效检测 hMPV 的方法，明确 ALRTI 患儿的 hMPV 感染情况，对阐明儿童呼吸道感染病毒病原的构成、发病率及感染后临床特征具有十分重要的

*[基金项目]2013 年贵阳市科技局计划基金项目[筑科合同(2013103)31 号]
**贵州医科大学 2012 级硕士研究生
***通信作者 E-mail：cuiyuxia1969@163.com
网络出版时间：2015－07－12 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150712.0944.040.html

实践意义。

1　材料与方法

1.1　标本来源

分泌物标本为 2014 年 1 月 ~2014 年 12 月儿内科新入院 500 例 ALRTI 患儿深部鼻咽分泌物，标本采集后低温保存，于 3 h 内送检；ALRTI 包括支气管肺炎、喘息性支气管炎、毛细支气管炎等，诊断标准均符合第 7 版《诸福棠实用儿科学》。同时收集检验科血液检验副流感病毒、腺病毒、甲型及乙型流感病毒感染阳性的儿童血液标本各 1 份。

1.2　方法

1.2.1　提取核酸　采用 TIANamp Virus DNA/RNA Kit 试剂盒（北京天根生物工程公司）提取标本中总 RNA，再以提取的总 RNA 为模板，采用 Prime Script RT Reagent Kit 试剂盒（ TaKaRa，中国）逆转录 cDNA，然后分别进行荧光定量 PCR（Real-time PCR）及反转录酶 - 聚合酶链锁反应（RT-PCR）检测。

1.2.2　RT-PCR 检测　根据文献[2]，以 hMPV NLD00-1（核苷酸登录号 AF371337）为模板，合成针对 hMPVF 基因片断的引物（由上海生工生物技术有限公司合成），引物序列为 450F（5′-CTTTG-GACTTAATGACAGATG-3′）和 450R（5′-GTCTTC-CTGTGCTAACTTTG-3′），扩增后片段长度 450 bp。设置 hMPV 标准株 cDNA 质粒（重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室惠赠）为阳性对照，ddH_2O 为阴性对照，将标本 cDNA 2 μl 加入 RT-PCR 反应液 23 μL 中，混匀后放入 RT-PCR 仪中扩增，反应条件为 94 ℃ 4 min、94 ℃ 1 min、55 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min、35 cycle、72 ℃ 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，160 V，25 min 后观察目的条带。

1.2.3　Real-time PCR 检测　根据 hMPVF 基因保守位点选择引物及探针，引物及探针序列为 F-F（5′-TTCGGAATCCTGATAGGGGTCT-3′），F-R（5′-CCTGTGCTAACTTTGCATGGGT-3′），F-P（5′-CTC-CGTAATTTACATGGTGCAGCTGCC-3′），荧光定量 RealMasterMix（Probe）试剂盒购自北京天根生物工程有限公司。将标本 cDNA 2 μL 加入荧光定量反应液 18 μL 中，震荡混匀后放入 Real-time PCR 仪中反应，反应条件为 95 ℃ 3 min、1 cycle、95 ℃ 15 sec、62 ℃ 10 sec、68 ℃ 26 sec、40 cycles，设置 hMPV 标准株 cDNA 质粒（重庆医科大学附属儿童医院 P2 实验室惠赠）为阳性对照，ddH_2O 为阴性对照，阳性结果判断标准为 Ct≤36。

1.2.4　PCR 特异性分析　将血液标本 cDNA（逆转录的 cDNA 经紫外分光光度计测量，OD 均值 1.8 ~2.0）从 -20 ℃从冰箱取出，置于冰上溶解，4 种病毒的 cDNA 标本混匀后分别按照上述 2 种 PCR 反应条件及反应体系进行检测，设置 hMPV NL/1/00 株质粒为阳性对照，ddH_2O 为阴性对照。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。计数资料用率表示，组间比较采用卡方检验，$P<0.05$ 具有统计学意义，两种方法一致性比较采用 kappa 分析。

2　结果

2.1　建立 Real-time PCR 标准曲线

将 10 倍浓度 7 个梯度稀释的 hMPV 标准株 cDNA 质粒，经 Real-time PCR 扩增仪扩增后，建立 hMPV-cDNA 标准曲线及扩增曲线，见图 1、2。相关系数 $R^2=0.992$，说明线性关系良好。

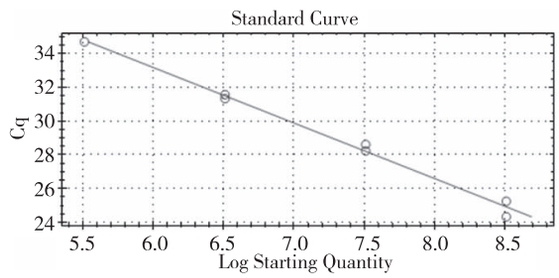


图 1　hMPV- cDNA 标准曲线

Fig. 1　Standard curve of hMPV- cDNA

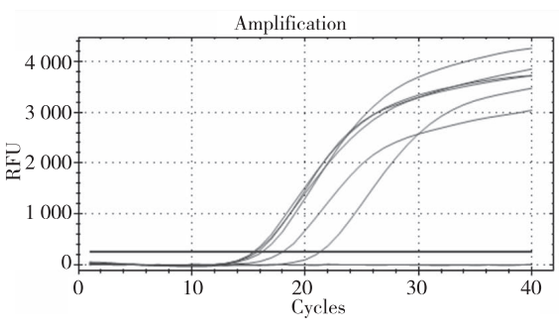


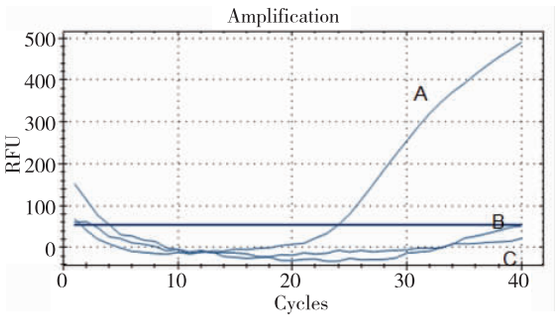
图 2　hMPV- cDNA 扩增曲线

Fig. 2　Amplification curve of hMPV- cDNA

2.2　Real-time PCR 检测标本 hMPV

分泌物标本共检出 80 例 hMPV 阳性病例，阳

性率 16%，说明该检测具有特异性，见图 3。



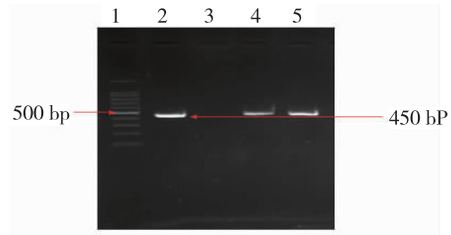
注：A 为阳性，B 为无扩增，C 为阴性

图 3　hMPV 特异性（Real-time PCR）

Fig. 3　The specificity analysis of hMPV for Real-time PCR

2.3　RT-PCR 检测标本 hMPV

RT-PCR 扩增产物经 1% 凝胶电泳后显示目的条带，长度 450 bp，阴性对照无条带显示，结果见图 4。分泌物标本共检出 49 例 hMPV 阳性病例，阳性率 9.8%。检测混合 4 种病毒的血液标本无特异性扩增条带出现，说明该方法对 hMPV 的检测具有特异性。



注：1 为 100 bp DNA Marker，2 为阳性对照，3 为阴性对照，4－5 为标本 hMPV 扩增阳性病例

图 4　hMPV 阳性病例 F 基因 RT-PCR 扩增结果

Fig. 4　The RT-PCR amplification results of hMPV positive F gene samples

2.4　验证 hMPV 阳性扩增产物

随机抽取 2 种 PCR 方法扩增检测阳性的标本各 3 份送上海生物工程有限公司，通过 BLAST 软件进行核苷酸序列测定。测序结果经与 GeneBank 中 hMPV 的基因序列比对发现阳性标本基因序列与 hMPV 荷兰株的最高相似度达到 99%，证实为 hMPVF 基因，见图 5。

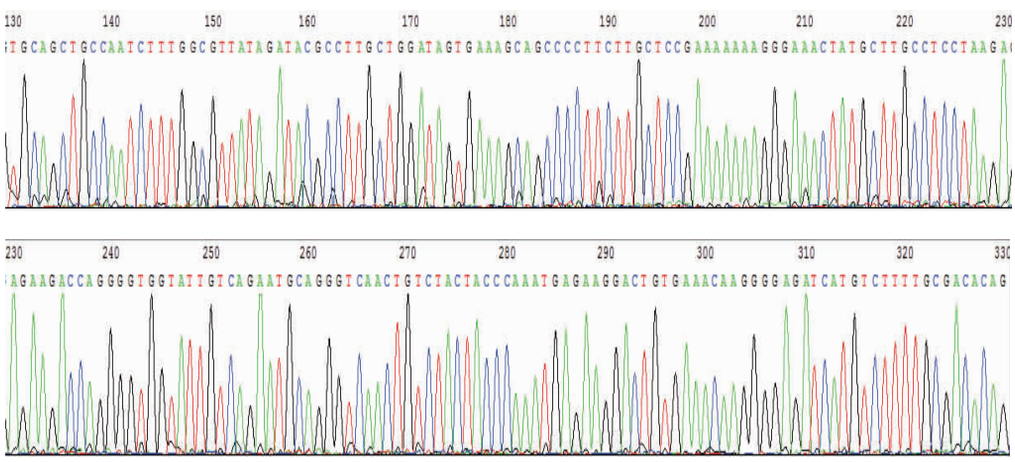


图 5　hMPV F 基因片段测序图

Fig. 5　hMPV F gene segment sequence diagram

2.5　Real-time PCR 与 RT-PCR 的敏感性及特异度比较

分别采用 2 种方法对 500 例分泌物标本进行 hMPV 检测，Real-time PCR 共检出 hMPV 阳性标本 80 例，检出率 16%，RT-PCR 检出 49 例阳性标本，检出率 9.8%；RT-PCR 与 Real-time PCR 相比较，灵敏度为 31.3%（25/80），特异度为 94.3%（396/420）；2 种检测方法的敏感性有显著的差异（χ^2 = 8.553，P = 0.002），见表 1。

表 1　两种 PCR 方法 hMPV 检出率比较

Tab. 1　The detection rate comparison between two PCR methods

检验方法	标本数	阳性例数	检出率
Real-time PCR	500	80	16%
RT-PCR	500	49	9.8%
	x^2 = 8.553	P = 0.002	

2.6　Real-time PCR 和 RT-PCR 的相关性比较

Real-time PCR 检测出的 80 例 hMPV 阳性标本中，有 25 例经 RT-PCR 检测出阳性，Real-time

PCR 检测 420 例 hMPV 阴性标本中有 24 例 RP-PCR 检测出阳性，两者比较差异具有统计学意义（$\chi^2 = 49.572$，$P = 0.000$）。进一步一致性 kappa 分析，kappa 值 = 0.343，$P = 0.000$，说明两种检测方法结果基本相符合，一致性一般。见表 2。

表 2　Real-time PCR 与 RT-PCR 检测 hMPV 的相关性比较

Tab. 2　The correlation comparison between of Real-time PCR and RT-PCR

RT-PCR	Real-time PCR		合计
	hMPV(+)	hMPV(-)	
hMPV(+)	25	24	49
hMPV(-)	55	396	451
合计	80	420	500
	$\chi^2 = 49.572$	$P = 0.000$	

3　讨论

自 2001 年发现 hMPV 以来，世界各地对其已经进行了大量的研究，均有该病毒被检出的报道[3-4]。荷兰一项血清学研究表明，hMPV 感染人类不少于 50 年，大部分 2 岁以下婴幼儿都存在 hMPV 感染，hMPV 特异性抗体检测中发现 5 岁以上的儿童几乎都感染过该病毒[5]。2003 年我国科研人员研究发现 hMPV 感染的证据，提示 hMPV 也是我国急性呼吸道感染的病毒病源谱成员之一[6]。随后我国多地相继报道了儿童感染 hMPV 的流行病学调查，长沙的检出率为 6.25%[7]，北京的检出率可达到 30%[5]，成都检出率为 10.26%[8]，表明 hMPV 在儿童呼吸道感染中具有很重要的地位，应引起临床工作者的重视。但目前的调查都是小规模地域性检测，大规模的流行病学调查仍然少见报道，究其原因是目前尚无简便、快捷、特异、可靠、稳定地针对 hMPV 病原的检测方法，因此，建立快速、准确、稳定、可靠性高的 hMPV 检测方法十分迫切，对 hMPV 感染的早期诊断、治疗和预防具有非常重要的临床意义。

目前，临床上主要使用免疫荧光、Real-time PCR、RT-PCR 及病毒分离培养 4 种方法检测 hMPV 病毒[9]，虽然确诊的金标准为病毒分离培养法，但对于 hMPV 的培养，国内外的很多研究认为 hMPV 分离较为困难，对其敏感的细胞较少，病毒在细胞中不能快速生长，且培养病毒所需要的时间较长，故临床上未能常规进行病毒分离培养，而仅用于实验室研究[10]。免疫荧光法检测病毒抗体，主要用于诊断既往是否感染或再感染，对早期诊断意义不大。RT-PCR 技术曾一度被认为是检测病毒最敏感、最特异的检测方法，临床上应用广泛，但 RT-PCR 无法准确定量起始模板，只能对终产物进行分析，而且必须进行电泳分析扩增后产物，费时费力，同时 PCR 产物容易造成对环境的污染，导致假阳性结果的出现。近年来，随着 Real-time PCR 方法的建立，灵敏度较 RT-PCR 高，缩短了检测时间，而且能够定量检测，更加具有现实意义[11]。

本研究选择用 hMPV 相对保守的 F 基因来设计引物及探针序列，完成了反应条件及反应体系的最佳优化，建立了较为成熟的 Real-time PCR 方法用于检测 hMPV，并与 RT-PCR 方法进行了对比，Real-time PCR 的阳性检出率明显高于 RT-PCR，RT-PCR 的灵敏度不如 Real-time PCR。将 2 种方法均检测出 hMPV 阳性的标本送核苷酸测序鉴定证实为 hMPV，排除了检测结果中出现的假阳性。混合副流感病毒、腺病毒、甲型及乙型流感病毒等 4 种病毒的血液标本，Real-time PCR 检测未见阳性扩增曲线，RT-PCR 方法亦无扩增，说明两种方法均有一定的特异性[12]。Real-time PCR 检测出的 80 例阳性标本中，有 25 例经 RT-PCR 检测出阳性，420 例 Real-time PCR 阴性标本中有 24 例 RT-PCR 检测出阳性，显示 2 种方法具有一定的相关性，一致性欠佳，研究发现，Real-time PCR 可以检测到存放数周甚至更长时间的的呼吸道病毒标本，因此 Real-time PCR 检测阳性但 RT-PCR 检测阴性结果的原因可能是由于标本在检测的过程中反复冻融导致拷贝数较低的标本病毒载量降低，对检测结果产生了一定的影响或已经存在很长时间的感染史。

综上，本研究针对 hMPV 的 F 基因设计的特异性的引物及探针建立的 Real-time PCR 方法能够显著提高呼吸道分泌物标本中 hMPV 的检出率，是具有时间短、针对性强、灵敏度较高、污染率较低的检测方法，较 RT-PCR 具有更高的灵敏度及更好的特异性，可以在临床和科研中推广。

4　参考文献

[1] 蒋最明，彭俊，顾敏，等. 1 410 例儿童呼吸道感染病原体分析[J]. 中国感染控制杂志，2013(2):129-131.

[2] 陈昕，张志勇，李荣培，等. 重庆地区急性下呼吸道感染住院患儿人偏肺病毒感染的流行病学研究[J]. 中国循证儿科杂志，2010(4):256-262.

（下转第 840 页）

BLBC 发生情况[7-10]。本研究检测结果证实 BLBC 癌灶组织中 TOPOIIα 表达明显高于非 BLBC,其 TOPOIIα 表达与淋巴结转移、组织分级有关,但与年龄、肿瘤大小、临床分期无关。因此,临床医师通过检测乳腺癌患者 TOPOIIα,可了解 BLBC 的转移、组织分级,为指导 BLBC 的化疗方案提供依据,避免无效或过度治疗对患者造成不良的影响。

4 参考文献

[1] Perou C M Pemu CM,Sorlie T,Eisen MB,et al. Molecular portrait of human breast. tumors[J]. Nature, 2012(406): 747 - 752.

[2] Nielsen TO,Hsu FD,Jensen K,et al. Immunohistochemical and clnicalcharacterization of the basal like subtype of iii vasive breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2011 (10):5367 - 5374.

[3] Carey LA,Perou CM,Livasy CA,et al. Race,breast cancer subtypes,and survical in the Carolina breast cancer study [J]. JAMA, 2006(21):2492 - 2502.

[4] Jarvinen TA,Tanner M,Rantanen V,et al. Amplification and deletion of topoisomerase Ⅱ alphah associate with ErB2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase Ⅱ alphah inhibitor dosorubicin doxorubicin in breast cancer [J]. Am J Pathol, 2010(3):839 - 847.

[5] Sorile T,Perou CM,Tibshirani R,et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor sumor subclasses with clinical implications[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2010(69):10869 - 10874.

[6] Nielsen TO,Hsu FD,Jensen K,et al. Immunohistochemical and clnicalcharacterization of the basal like subtype of iii vasive breast carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004 (10):5367 - 5374.

[7] MIN Li-shan,CHEN Ying-rong,MA Zhi-hong,et al. Expression and clinical significance of midkine in breast carcinomas with different immunohistochemical profiling[J]. Current Immunology, 2012(5):381 - 386.

[8] Bauer K R,Brown M,CressR D,et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER) Negative,progesterone receptor (PR)negative,and HER-2 negative invasive breast cancer,the socalled triple negative phenotype: a population based study from the California cancer Regaistry [J]. Cancer, 2007(109):1721 - 1728.

[9] Sng JH,Heaton VJ,Bell M,et al. Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase Ⅱ alpha and Ⅱ beta genes:Evidence for isoform evolution through gene duplication[J]. Biochim Biophys Acta, 2009(1444):395 - 406.

[10] 孟辉,李文才,王留兴,等. 拓扑异构酶Ⅱα 表达与乳腺癌患者生存的相关性[J]. 中华肿瘤杂志, 2011(5): 363 - 366.

(2015-03-15 收稿,2015-05-18 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 刘 华

(上接第 837 页)

[3] Chang A, Masante C, Buchholz UJ,et al. Human metapneumovirus(HMPV) binding and infection are mediated by interactions between the HMPV fusion protein and heparan sulfate[J]. J Virol, 2012(6):3230 - 3243.

[4] Jose O,Jose AB,M alta AA,et al. Role ofMetapneumovirus in Viral Respiratory Infections in Young Children [J]. J Clin M icro, 2006(8):2739 - 2742.

[5] Gregory A. Storch. Diagnostic Virology. Diagnostic Virology[J]. Clinical Infectious Diseases, 2000(31):739 - 751.

[6] 朱汝南, 钱渊, 邓洁, 等. 北京地区 2 岁以下儿童急性呼吸道偏肺病毒 感染[J]. 中华儿科杂志, 2003(1): 441 - 444.

[7] 梁沫,谢志萍,段招军,等. 长沙地区急性下呼吸道感染儿童呼吸道合胞病毒 、偏肺病毒临床特征及流行状况分析[J]. 实用预防医学, 2012(7):968 - 972.

[8] 李天舒,潘明,杨慧萍,等. 成都地区急性呼吸道感染病例人偏肺病毒感染状况研究[J]. 现代预防医学, 2012 (3):698 - 705.

[9] Hideaki Kikuta, Chikako Sakata, Reiko Gamo. , et al. Comparison of a Lateral-Flow Immunochromatography Assay with Real-Time Reverse Transcription-PCR for Detection of Human Metapneumovirus[J]. Journal of clinical microbiology, 2008:928 - 932.

[10] Deffrasnes C, Cote S, Boiving G. Analysis of replication kinetics of the Human metapneumovirus in difierent cell-lines by real-time PCR [J] . J Clin Microbiol, 2005(1): 488 - 490.

[11] 陈明艳,朱飞,刘爱玲,等. 实时荧光 PCR 技术诊断人偏肺病毒检测效果分析[J]. 现代生物医学进展, 2013(30):5981 - 5983.

[12] 向蕾,陈仕菊,王昕,等. 实时荧光定量 RT-PCR 快速检测四种呼吸道病毒的研究[J]. 热带医学杂志, 2014 (4):461 - 465.

(2015-04-06 收稿,2015-05-23 修回)
中文编辑: 戚 璐; 英文编辑: 赵 毅