

应用实时荧光 RT-PCR 技术检测诺如病毒感染^{*}

廖国东¹, 陈家图¹, 李晖², 麦充志¹, 许桂锋¹, 李志式³, 罗光毅¹, 何展¹, 卢崇南³

(1. 广东省茂名市疾病预防控制中心 525000; 2. 广东省疾病预防控制中心,
广州 510300; 3. 广东省高州市疾病预防控制中心 525200)

【摘要】 目的 应用实时荧光 RT-PCR 检测技术对诺如病毒(NV)感染进行快速检测,为疾病预防控制提供准确、可靠的实验室诊断依据。方法 采集急性胃肠炎暴发流行事件的标本(2 例呕吐物、35 例粪便和 8 例自来水等外环境标本)进行实时荧光 RT-PCR 检测。结果 共有 20 例标本(1 例呕吐物、16 例粪便和 3 例自来水)的诺如病毒核酸实时荧光 RT-PCR 检测阳性。结论 这是由诺如病毒感染引起的急性胃肠炎暴发流行;实时荧光 RT-PCR 检测技术可应用于传染病的快速应急检测。

【关键词】 荧光; 诺如病毒; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0091-02

诺如病毒(norwalk virus, NV),即诺瓦克病毒或诺沃克病毒^[1]。诺如病毒属于杯状病毒属,具有较强的传染性,可以通过污染的食物、水等多种传播方式而引起腹泻流行,目前已成

为引起人类非细菌性胃肠炎的重要病原体,特别是病毒性腹泻暴发的重要病因^[2-3]。2009 年 9 月 5 日,广东省茂名市的某镇中学陆续有学生和教职员出现腹痛、腹泻、恶心、呕吐、头痛、

* 基金项目:广东省茂名市 2010 年科技计划项目(20102092)。

胸闷等症状。根据流行病学调查资料和实验室的检测结果,确定这是一起由诺如病毒感染引起的急性胃肠炎暴发流行,共有76例病例符合诺如病毒感染的病理意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 首先采集该中学4例病例的标本4例(呕吐物2例、粪便2例)在茂名市疾病预防控制中心实验室进行实时荧光RT-PCR检测。每例标本加入1mL PBS至1.5mL EP管中,加入0.1mL呕吐物或粪便标本,制成10%的悬液,置于漩涡震荡器充分混匀,以离心半径8cm 8000r/min离心5min,备用。另外,再采集该中学其他33例患者的33例粪便标本以及8例自来水等外环境标本,送广东省疾病预防控制中心进行实时荧光RT-PCR检测。

1.2 核酸提取 利用德国QIAGEN公司的QIAGEN Viral RNA Mini Extraction Kit试剂提取核酸。

1.3 引物及探针 由广东省疾病预防控制中心微生物检验所提供,引物NLVG2F的序列为CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG;引物NLVG2R的序列为TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA;探针NLVG2-P的序列为(FAM)-TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT-(TAMRA)。

1.4 RT-PCR扩增反应体系 每份扩增反应体系按以下比例配制:2×buffer 10 μL;Taq polymerase HS 0.4 μL;Enzyme Mix 0.4 μL;引物NLVG2F(10 μmol/L) 1.6 μL;引物NLVG2R(10 μmol/L) 1.6 μL;探针NLVG2-P(5 μmol/L) 1.6 μL;水2.4 μL;RNA 2 μL。

1.5 RT-PCR扩增反应条件 标本和阴、阳性对照同时按以下扩增程序进行扩增:42℃ 20 min,95℃ 10 s,95℃ 15 s,52℃ 30 s,72℃ 30 s(共40个循环),72℃收集荧光。

1.6 仪器 PCR仪为美国应用生物公司生产的ABI-7300型实时荧光PCR仪。

1.7 质量控制 同一次实验必须同时满足以下2个条件:阴性对照的RT-PCR扩增曲线无对数增长期或无Ct值显示;阳性对照的RT-PCR扩增曲线有明显对数增长期且Ct≤35。

2 结 果

2.1 实验有效性判断 本实验中阴性对照RT-PCR扩增曲线无对数增长期,阳性对照的RT-PCR扩增曲线均有明显对数增长期,且Ct值为15.43,小于35。综合判断本实验有效,结果准确。

2.2 茂名市疾病预防控制中心实验室检测结果 在该实验室进行实时荧光RT-PCR检测的4例标本中,呕吐物2例的扩增曲线无明显对数增长期,且无Ct值,可判为阴性;呕吐物1例和粪便2例的诺如病毒核酸的扩增曲线均有明显对数增长期,Ct值分别为28.61、14.48和17.78,均小于35,因此可判定呕吐物1例和2例粪便的诺如病毒核酸检测呈阳性。

2.3 广东省疾病预防控制中心检测结果 该中心进行实时荧光RT-PCR检测的33例粪便标本中,14例诺如病毒核酸检测呈阳性,8例自来水等外环境标本中,3例诺如病毒核酸检测呈阳性。

2.4 疫情判断 根据省、市2级实验室的检测结果,再结合流行病学调查资料,判定这是一起由诺如病毒感染引起的急性胃

肠炎暴发流行。

3 讨 论

诺如病毒感染对象主要是成年人和学龄儿童,主要分布在在学校、幼儿园、养老院、医院、军队、旅游区等,多在集体机构以暴发形式出现,全年均有发病。诺如病毒流行地区也极为广泛,曾经于2006~2007年全球暴发流行,欧洲多国及澳大利亚、日本等先后发生全国性诺如病毒感染和流行,我国的山西、北京、广州等省市也曾相继发现过诺如病毒性腹泻散发病例^[4-5]。

近年来,随着分子生物学技术的发展,实时荧光RT-PCR技术为快速检测诺如病毒提供了强有力的技术支持,这起诺如病毒感染事件便是利用该技术建立起的快速检测平台作为实验室确诊方法。

相对于病毒分离方法所需最少1周的时间,实时荧光RT-PCR检测方法大大缩短了检测周期,为疫情的及时控制争取了宝贵的时间。同时,实时荧光RT-PCR检测方法与普通的RT-PCR检测方法相比具有独特的优势:1)扩增反应和结果分析是在完全封闭的反应管内进行的,能有效防止PCR扩增产物在空气中的扩散,发生交叉污染的概率更小,确保了检测结果的可靠性;2)试剂和标本核酸是在PCR扩增仪上进行扩增和分析,扩增效率高,又无需进行琼脂糖电泳,因此实验人员不需要接触到溴化乙锭等致癌物,有效保障了实验人员的身体健康,并且节省了电泳的时间;3)结果不需要用紫外灯进行观测,可直接通过电脑软件收集荧光信号并及时在电脑上显示扩增曲线,具有结果直观、重复性好、特异性和敏感性强、操作简易等优点^[6]。可见,实时荧光RT-PCR检测技术平台的建立将会在传染病的快速应急检测上发挥积极的作用,十分值得推广应用^[7]。

参考文献

- [1] 陆德源. 医学微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 315.
- [2] 陈志强, 陈小霜, 罗雷, 等. 一起感染诺瓦克样病毒引起的群体性胃肠炎的流行病学调查与分析[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(2): 190-192.
- [3] 金玉姬, 岳丽杰, 李蔷, 等. 深圳地区婴幼儿诺如病毒感染的分子流行病学检测及分析[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(5): 402-403.
- [4] 郭宁晓, 栾玉明. 一起学校诺瓦克样病毒性胃肠炎暴发[J]. 预防医学情报杂志, 2009, 25(8): 664-666.
- [5] 李灵辉, 郑慧贞, 李晖, 等. 广东省2005年诺瓦克样病毒感染暴发疫情[J]. 华南预防医学, 2006, 32(5): 11-14.
- [6] 杨方华, 张德纯. 定量PCR法检测人巨细胞病毒感染的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 368-370.
- [7] 王虹, 许颂霄, 尹一兵. 荧光定量PCR检测HCV-RNA的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(1): 74-76.

(收稿日期:2010-01-04)

告示: 本刊2011年起拟开设硕博论坛、专题、专栏,欢迎投稿。有意组稿者请电话联系编辑部刘志刚主任
(023)63876382, 邮箱: editorial2002@vip.sina.com

《国际检验医学杂志》编辑部