

NALC-NaOH 前处理法具有耐受性。

综上所述,当痰液等被杂菌污染的标本直接接种在非选择性培养基上时,由于其中常常会有大量的正常菌群等,致使不易检出可能存在的诺卡菌<sup>[8-9]</sup>。因此,对于可疑为肺诺卡菌病的患者,若能将痰标本经 NALC-NaOH 法消化处理后再接种<sup>[10]</sup>,将有利于诺卡菌的检出。

参考文献

[1] Martínez R, Reyes S, Menéndez R. Pulmonary nocardiosis: risk factors, clinical features, diagnosis and prognosis[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2008, 14(3): 219-227.  
 [2] Gupta E, Dhawan B, Thabab MM. Nocardia pyopneumothorax in an immunocompetent patient[J]. *Indian J Med Res*, 2006, 124(3): 363-364.  
 [3] 张卓然,倪语星. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版,北京:人民卫生出版社,2003:229-230.  
 [4] Minero MV, Marín M, Cercenado E, et al. Nocardiosis at the turn

of the century[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2009, 88(4): 250-261.  
 [5] 中国防痨协会基础专业委员会编著. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006:30-35.  
 [6] 俞树荣. 微生物学和微生物学检验[M]. 2 版,北京:人民卫生出版社,2002:271.  
 [7] 王敬萍,李宝兰,刘涌,等. 原发性奴卡氏菌病 1 例[J]. *中国防痨通讯*, 2004, 26(2): 128.  
 [8] Murray PR, Niles AC, Heeren RL. Modified Thayer-Martin medium for recovery of Nocardia species from contaminated specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 1988, 26(6): 1219-1220.  
 [9] 吴立平,杨艺,刘婷. 肺诺卡菌病 1 例[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2005, 5(2): 117-118.  
 [10] 李术惠. N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH 法前处理痰标本检出星形诺卡菌 1 例[J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(5): 360.

(收稿日期:2012-11-09)

• 检验技术与方法 •

## 单纯疱疹病毒核酸分型诊断方法的建立

支丽霞<sup>1</sup>, 赵云生<sup>2</sup>, 江秀娟<sup>3</sup>

(1. 兰州市第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730046; 2. 甘肃省定西市红十字会中心血站, 甘肃定西 743000; 3 甘肃省肿瘤医院检验科, 甘肃兰州 730050)

**摘要:**目的 应用荧光定量聚合酶链式反应(FQ-PCR)技术,建立一种快速、灵敏度高、特异性强且可以定量分型检测单纯疱疹病毒(HSV)的方法。方法 根据单纯疱疹病毒糖蛋白 B 基因序列设计引物和探针,建立 HSV1、2 型检测的方法;构建标准品进行定量分析,测试方法的灵敏度;检测相关的其它临床分离菌株和样本,测试方法的特异性。结果 检测 HSV1、2 的自建标准品,检测下限分别可以到达 300 copy/mL 和 400 copy/mL,且标准曲线的相关系数均大于 0.998。通过检测参考菌株和临床标本,证明具有 100% 的特异度;且可以对 HSV1、2 分型。结论 本方法是一种快速、灵敏且准确的 HSV 分型检测方法,具有重要的临床使用价值。

**关键词:**单纯疱疹病毒属; 核酸分型; PCR

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.034

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)06-0707-02

单纯疱疹病毒(HSV)是人类病毒性疾病中常见的病原体之一,根据抗原性不同,可分为 HSV1 和 HSV2 两种血清型。两种血清型的临床表现不同,HSV1 主要引起腰部以上,如眼、口、唇的皮肤黏膜以及中枢神经系统的感染,HSV2 主要引起生殖器部位的皮肤黏膜及新生儿感染,并与女性外阴癌和宫颈癌的发生有关。HSV 两种亚型感染的预后和治疗方法不同,因此对 HSV 感染进行早期诊断和分型具有重要的临床意义和流行病学意义<sup>[1-3]</sup>。目前对单纯疱疹病毒性疾病的实验室诊断主要以免疫学方法为主,检测的灵敏度和准确度不够理想。而荧光定量 PCR 技术是目前较先进的分子生物学技术,具有剪剪性强、剪剪度高且剪剪性好等优点,另外荧光 PCR 仪可以同时检测 5 种不同波长的荧光信号,可用于 HSV 的核酸分型鉴定<sup>[4-7]</sup>。本研究拟利用多色实时荧光定量 PCR 技术在同一反应体系中建立一种对 HSV1 和 HSV2 型核酸分型准确、特异、简便的鉴别诊断方法。

### 1 材料与方方法

**1.1 菌株与临床标本** 标准菌株单纯疱疹病毒 1 型 ATCC VR-1493 和单纯疱疹病毒 2 型 ATCC VR-540 购自美国 ATCC 公司。实验室分离菌株单纯疱疹病毒 1 型(4 株)、单纯疱疹病毒 2 型(10 株)、淋球菌(3 株)、沙眼衣原体(2 株)、解脲脲原体(2 株)、白色念珠菌(1 株)、巨细胞病毒(1 株)、人乳头瘤病毒阳性标本(HPV 6、11、16 和 18 型各 2 例)、杜克雷氏杆菌(1 株)、阴道毛滴虫阳性标本(2 株)和 60 例生殖器疱疹标本

均由兰州市第二人民医院检验科提供。

**1.2 试剂与仪器** QIAamp DNA Mini Kit 和 artus HSV-1/2 PCR Kit CE(德国 Qiagen 公司产品);pMD18-T 载体(TAKARA 公司产品);Wizard Plus SV Minipreps DNA 纯化试剂盒(Promega 公司产品);TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 公司产品);DU730 核酸蛋白分析仪(贝克曼公司产品);ABI9700PCR 扩增仪及 ABI7500 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司产品)。

### 1.3 方法

**1.3.1 引物与探针设计** 根据 GenBank 中提供的 HSV 糖蛋白 B 基因序列分别设计特异性检测 HSV1 和 HSV2 的引物和探针。以 HSV1 的糖蛋白 B 基因(序列号: AF311740. 1)和 HSV2 的糖蛋白 B 基因(序列号: AF295528)为模板,使用 Primer Express 3.0 软件设计引物和探针。最后将设计好的引物和探针序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对,确定 HSV1 或 HSV2 引物和探针的保守性。HSV1:上游引物 HS1-F 为 5'-AAG GTC ACC GAC ATG GTC ATG-3',下游引物 HS1-R 为 5'- TCA CCG TCT TTG TTG GGA ACT -3',探针 HS1-P 为 5'- FAM-AAG CGC CGC AR(R= A/G)CAC CAA CTA CAC C-BHQ1-3';HSV2:上游引物 HS2-F 为 5'- ACG GAA CAC AAG GCC AGA AA-3',下游引物 HS2-R 为 5'-AGC GGA GAG TAC CTG GCT TTG-3',探针 HS2-P: 5'-HEX-CAA CAT GGT TCT GCG CAA GCG C-BHQ1-3'。引物和探

针由宝生物工程(大连)有限公司合成。

**1.3.2 DNA 提取** 菌株直接取 200  $\mu\text{L}$  培养物用于 DNA 提取;临床标本处理方法为:往样本收集管中加入 2 mL 无菌生理盐水,充分震荡洗涤棉拭子,然后将拭子靠管壁挤干丢弃,取 200  $\mu\text{L}$  液体用于 DNA 提取。所有菌株和临床标本均采用 QIAamp DNA Mini Kit 按照产品说明书提取 DNA。

**1.3.3 标准品的构建** HSV1 和 HSV2 标准株扩增的 PCR 产物分别连接到 pMD18-T 载体上,测序正确的质粒分别作为 HSV1 和 HSV2 的标准品。构建成功的载体使用 DNA 纯化试剂盒进行纯化后,再采用 DU730 核酸蛋白分析仪测定质粒的浓度,换算成拷贝数后,作为阳性标准品制作标准曲线。

**1.3.4 反应体系的优化** 反应体系的优化是在 TaqMan 通用 PCR 反应体系基础上进行的,所有引物终浓度选择 0.2  $\mu\text{mol/L}$  至 0.4  $\mu\text{mol/L}$  范围内优化,所有探针终浓度选择 0.1  $\mu\text{mol/L}$  至 0.3  $\mu\text{mol/L}$  范围内优化。HSV1 和 HSV2 模板使用构建的质粒标准品,包括 HSV1 和 HSV2 独立的和混合的两种类型的模板,浓度选择 100 000 拷贝/反应体系和 1 000 拷贝/反应体系两个梯度。

**1.3.5 反应条件的选择** 本研究采用两步法进行反应条件的优化,其中主要是优化延伸加退火步骤的温度和时间,有 3 种组合供选择:60  $^{\circ}\text{C}$ ,50 s;58  $^{\circ}\text{C}$ ,60 s 和 60  $^{\circ}\text{C}$ ,60 s。

## 2 结果

**2.1 最佳反应体系建立** 最终确定的反应体系中各成分的终浓度为:HS1-F 和 HS1-R 各 0.3  $\mu\text{mol/L}$ ,HS2-F 和 HS2-R 各 0.2  $\mu\text{mol/L}$ ,HS1-P 为 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ,HS2-P 为 0.2  $\mu\text{mol/L}$ 。最终确定的反应条件为:94  $^{\circ}\text{C}$ ,预变性 10 min;45 个循环包括:94  $^{\circ}\text{C}$ ,15 s 和 60  $^{\circ}\text{C}$ ,50 s。

**2.2 特异性** 本试剂检测单纯疱疹病毒 1 型 ATCC VR-1493、单纯疱疹病毒 2 型 ATCC VR-540、单纯疱疹病毒 1 型(4 株)和单纯疱疹病毒 2 型(10 株)均为阳性,且可以对两者分型;参考菌株淋球菌、沙眼衣原体、解脲脲原体、白色念珠菌、巨细胞病毒、人乳头瘤病毒阳性标本、杜克雷氏杆菌、阴道毛滴虫阳性标本均为阴性。说明引物和探针的特异性好。

**2.3 灵敏度及标准曲线** HSV1 的质粒标准品从 3 000 000 拷贝/mL 按 10 倍梯度稀释至 300 copy/mL,均可以检出;HSV2 的质粒标准品从 4 000 000 copy/mL 按 10 倍梯度稀释至 400 copy/mL,均可以检出;而且 HSV1 和 HSV2 同一梯度的模板在同一管中进行扩增的。该方法对 HSV1 的检测范围在 30 000 copy/mL 到 300 copy/mL 之间,且灵敏度达到 3 拷贝/反应体系;该方法对 HSV2 的检测范围在 40 000 copy/mL 到 400 copy/mL 之间,且灵敏度达到 4 拷贝/反应体系;相互间不影响彼此的扩增。选择 HSV1 的 5 个浓度梯度的模板制作的标准曲线,相关系数  $r^2$  为 0.998 9;选择 HSV2 的 4 个浓度梯度的模板制作的标准曲线,相关系数  $r^2$  为 0.998 1;说明该方法对 HSV1 和 HSV2 定量检测的标准曲线的线性较好。HSV1 的标准曲线的斜率为-3.98,HSV2 的标准曲线的斜率为-4.08,斜率接近,说明两者的扩增效率基本一致。

**2.4 60 例临床样品的测试** 对 60 例生殖器疱疹临床标本同时使用本试剂和 artus HSV-1/2 PCR Kit CE(德国 QIAGEN 公司产品)进行检测,对比检测结果表明两种试剂的阳性符合率为 100%,两种试剂的阴性符合率也为 100%,所以,两种试剂检测结果完全相符合。60 例样本中,HSV 阴性的标本 9 例(占 15%),HSV1 阳性的 3 例(占 5%),HSV2 阳性的 80%,未检测到 HSV1 和 HSV2 同时感染的样本。对 3 例 HSV1 阳性的 PCR 产物和随机抽取了 10 例 HSV2 阳性的 PCR 产物送往 Invitrogen 上海公司进行测序,测序结果和 GenBank 中 HSV

相关序列同源性大于 99%,证明检测结果正确。

## 3 讨论

病毒细胞分离培养是实验室诊断 HSV 感染最为敏感的方法,且可以对分离株分型鉴定,但该方法对实验条件要求严格,且成本高、操作繁琐、实验周期长,在临床应用有很大的局限性,不易开展。HSV 的血清学试验主要检测存在于血清中的 HSV 抗原或特异性抗体,常用方法为 ELISA、间接免疫荧光法和胶体金方法等。ELISA 检测 HSV 抗原具有方便、快速、特异性较强等特点,对疱疹皮损的 HSV 抗原检出率较高,但疱疹后期皮损的 HSV 抗原检出率较低。而血清 HSV 特异性 IgM 和 IgG 抗体需要在感染后一定的时间产生,有可能出现假阳性或假阴性,同时 HSV 感染所造成的临床症状各有不同,可能会产生误诊和误治<sup>[8-9]</sup>。PCR 和 ELISA 检测单纯疱疹病毒,两方法特异性完全一致,PCR 检测阳性率高,比 ELISA 敏感近 20 倍<sup>[10]</sup>。目前,国家食品药品监督管理局批准上市的单纯疱疹病毒荧光 PCR 检测试剂盒有 7 个,其中检测 HSV1 的有 1 个,检测 HSV2 的有 6 个,但未有 HSV1、2 同时检测或分型检测的荧光 PCR 试剂盒得到批准上市,现有研究对 HSV1、2 的 PCR 分型检测方法大多在 2 个反应管中进行,本研究在同一反应管中利用多色荧光定量 PCR 技术建立的 HSV1 和 HSV2 核酸分型诊断方法使实验操作更为简便。通过检测标准菌株和临床标本,具有 100%的特异性;通过检测 HSV1 和 HSV2 的自建标准品,灵敏度分别可以达到 300 copy/mL 和 400 copy/mL,且标准曲线的相关系数均大于 0.998;整个实验过程在 1 个半小时内完成,不但可以对 HSV 定量,而且可以对 HSV1 和 HSV2 分型,是一种快速、灵敏且准确的 HSV 分型检测方法,具有重要的临床使用价值。

## 参考文献

- [1] 姬小微,毛旭虎,邹全明.单纯疱疹病毒型特异性的鉴别诊断[J].国际检验医学杂志,2006,27(8):739-740.
- [2] 赖迪辉,朱威,连石.单纯疱疹病毒实验室检测方法的研究进展[J].中国计划生育学杂志,2010,18(6):380-381.
- [3] Michael-Costello MT, Sabatini L, Yungbluth P. Herpes simplex virus infections and current methods for laboratory detection[J]. Clin Microbiol News,2006,28(24):185-192.
- [4] Pandori MW, Lei J, Wong EH, et al. Real-Time PCR for detection of herpes simplex virus without nucleic acid extraction[J]. BMC Infect Dis,2006,6(6):104.
- [5] 陈淑云,采云,陈激扬.不同实时荧光定量聚合酶链反应技术研究进展[J].国际检验医学杂志,2012,33(5):558-560.
- [6] 王晓莉,江秀娟.荧光定量聚合酶链反应在淋球菌检测中的应用评价[J].国际检验医学杂志,2012,33(10):1238-1240.
- [7] 赵友云,周立,高应林,等.实时荧光定量 PCR 鉴别检测单纯疱疹病毒方法的建立[J].武汉大学学报:医学版,2008,29(5):617-619.
- [8] 徐安健,赵高潮,乌姗姗,等.单纯疱疹病毒血清学检测及其临床应用进展[J].国际医学寄生虫病杂志,2010,37(6):381-383.
- [9] Binnie KL, Jespersen DJ, Hatting JA. Evaluation of three multiplex flow immunoassays compared to an enzyme immunoassay for the detection and differentiation of IgG class antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2[J]. Clin Vaccine Immunol,2010,17(2):253-257.
- [10] 唐家琪,陶开华. PCR 和 ELISA 检测单纯疱疹病毒的比较[J].中华微生物学和免疫学杂志,1993,13(5):329-331.