

RT-PCR 和 ELISA 在检测小儿病毒性腹泻中的应用比较

陈松松¹, 何海秋², 李 陈¹, 刘红美³, 常春鹏¹, 张 丽⁴

(¹ 保定市儿童医院 消化科, 河北 保定 071000;

² 保定市儿童医院 检验科, 河北 保定 071000;

³ 保定市儿童医院 内镜室, 河北 保定 071000;

⁴ 保定市儿童医院 护理部, 河北 保定 071000)

摘要: [目的] RT-PCR 和 ELISA 在检测小儿病毒性腹泻中的效能分析。 [方法] 收集我院 2018 年 6 月~2019 年 1 月在门诊及住院的 1 个月~5 岁 400 例儿童的腹泻粪便标本。利用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测标本中的 RV、NV、AstV 和 AdV 病毒性病原。具体操作方法, 严格按照试剂盒说明书进行操作。 [结果] 采用 RT-PCR 检出至少有 132 份标本含有至少 1 种病毒核酸; 116 份单一病毒核酸呈现阳性, 14 份双重病毒核酸呈现阳性, 2 份三重以上病毒核酸阳性。核酸阳性的检出率为 36.7%。采用 ELISA 的方法检出 98 份标本含有至少 1 种病毒核酸; 86 份单一病毒核酸阳性, 12 份双重病毒核酸阳性。核酸阳性的检出率为 27.2%。2 种检测方法检测 RV、NV、AstV 和 AdV 病毒性病原差异有统计学意义。 [结论] RT-PCR 和 ELISA 2 种检测方法的检测结果具有很好的一致性。RT-PCR 和 ELISA 此 2 种检测方法均以 RV、NV 的阳性检出率较高, RT-PCR 法除对 EAdV 阳性检出率低于 ELISA 外, 对其他 3 种病毒的检出率均高于 ELISA。

关键词: 荧光定量-逆转录聚合酶链技术; 酶联免疫吸附试验; 小儿病毒性腹泻

doi: 10.3969/j.issn.1671-038X.2019.08.08

中图分类号: R442.2 文献标志码: A

Efficacy analysis of RT-PCR and ELISA in detecting viral diarrhea in children

CHEN Song-song¹, HE Hai-qi², LI Chen¹, LIU Hong-mei³, CHANG Chun-peng¹, ZHANG Li⁴

(¹ Department of Gastroenterology, Baoding Children's Hospital, Baoding 071000, China; ² Laboratory Medicine, Baoding Children's Hospital, Baoding 071000, China; ³ Department of Endoscopy, Baoding Children's Hospital, Baoding 071000, China; ⁴ Department of Nursing, Baoding Children's Hospital, Baoding 071000, China)

Corresponding author: CHEN Song-song, E-mail: csons1983@163.com

Abstract: [Objective] To analyze the efficacy of RT-PCR and ELISA in the detection of viral diarrhea in children. [Methods] the samples of 400 children aged between 1 to 5 years from June 2018 to January 2019 were collected. RV, NV, AstV and AdV viral pathogens were detected by RT-PCR and ELISA. The specific operation method is strictly in accordance with the instructions of the kit. [Results] At least 132 samples were found to contain at least one viral nucleic acid by RT-PCR. Among them, 116 were single virus nucleic acid positive, 14 were double virus nucleic acid positive, 2 were more than triple virus nucleic acid positive samples. The detection rate of nucleic acid positive was 36.7%. At least 98 samples were found to contain at least one viral nucleic acid. Of these, 86 were positive for single virus nucleic acid and 12 were positive for double virus nucleic acid. The detection rate of nucleic acid positive was 27.2%. [Conclusion] The results of RT-PCR and ELISA have good consistency. Both RT-PCR and ELISA have high positive detection rate of RV and NV. The detection rate of EAdV was lower than that of ELISA by RT-PCR, the detection rate of other three viruses is higher than that of ELISA.

Key words: RT-PCR; ELISA; child virus diarrhea

收稿日期: 2019-02-27

基金项目: 河北省保定市 2018 年科技支撑计划项目 (No: 18ZF064)

作者简介: 陈松松, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 儿科消化

通讯作者: 陈松松, E-mail: csons1983@163.com

在日常生活中,婴幼儿发生腹泻的概率非常高,位居儿童常见性疾病的第 2 位^[1]。在临床上,病毒性腹泻的主要流行期大约集中在每年的 8~12 月份。病毒具有感染力强,传播快,潜伏期短,发病急,病后免疫力不能持久等特点,极易造成疾病的大流行^[2]。目前,引起婴幼儿腹泻的病毒主要包括轮状病毒(ro-tavirus, RV)、肠道腺病毒(enteric adenovirus, EAdV)、星状病毒(as-trovirus, AstV)和诺如病毒(norovirus, NV)等。目前临床对腹泻病毒的检测多为一对一的检测方法,虽然 ELISA 检测方法操作简便,但是与 PT-PCR 相比较,其敏感性和特异性均较差,而多重联检技术的使用比较少。

实时荧光定量逆转录聚合酶链(quantitative real-time PCR, RT-PCR)是一项近些年来迅速发展的高灵敏度和高特异性的对核酸进行快速检测的技术,截至目前为止,在临床上已经被广泛应用于病毒等各种病原微生物核酸的快速检测^[3-4]。有研究报道,在处置麻疹疫情过程中,由于实时 RT-PCR 技术具有灵敏度以及准确度比较高、检测快速以及操作简单等的诸多优点,大约在几个小时内就可得到实验室的确诊^[5]。酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是把抗原抗体的特异性反应和酶的高效催化作用有机地结合起来,检测微量的特异性抗原或抗体的新技术,由于 ELISA 方法的操作简便、快速、容易观察结果等优点,故而亦便于大规模的样品检测。目前在国内,对于小儿病毒性腹泻的样品检测中,传统的实验室早期诊断主要方法是通过 ELISA 检测急性期患者的大便样本。

本文旨在通过选取我院 2018 年 6 月~2019 年 1 月在我院儿科门诊就诊的诊断为腹泻的患儿 400 例,采用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-PCR)方法和酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)2 种方法对其大便样品进行检测,对比 2 种检测方法之间的差异,从而对于 2 种方法的临床价值做出客观的评价。对比分析 2 种检测方法的效能,以便为提高本地小儿病毒性腹泻的检测工作提供技术支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集我院 2018 年 6 月~2019 年 1 月在门诊及住院的 1 个月~5 岁 400 例儿童的腹泻粪便标本。

腹泻诊断标准:每日排便次数增加(≥ 3 次)或粪便性状发生明显改变(如稀水样、蛋花样或稀糊样等)。

排除标准:外观为黏液便或脓血便,或确诊为其

他疾病患儿的粪便标本,或便常规检查白细胞 >5 个/HP,或可见红细胞。

1.2 主要仪器

QIAxtractor 全自动核酸抽提仪;7000 实时荧光定量 PCR 仪、Opticon 2 实时荧光定量 PCR 仪、LightCycler480 II、7500 fast 实时荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 粪便样品的处理 取粪便(2 g 左右)加入 10 mL 磷酸缓冲液中,于 15 mL 离心管中拧紧并离心,之后采用震荡器剧烈震荡,于 3 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液备用。

1.3.2 核酸的提取 根据 QIAxtractor 全自动核酸抽提仪核酸提取操作方案进行,样本体积为 200 μ L,提取以后得到总核酸体积为 60 μ L。

1.3.3 实时荧光定量-聚合酶链反应(real-time-PCR) 引物根据 Liu 等^[7]文献所述,由 Invitrogen 公司合成。试剂采用 Qiagen 公司生产的 QuantiTectProbe RT-PCR Kit,反应体系为 25 μ L,由 12.5 μ L、2 $\times$ QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix,0.6 μ L、0.4 μ mol/L 上下游引物,0.3 μ L、0.2 μ mol/L 探针,0.3 μ L QuantiTect RT Mix、5.7 μ L RNase-free Water 以及 5 μ L 模板核酸组成。根据各仪器操作说明,设置反应条件为:50 $^{\circ}$ C, 30 min;95 $^{\circ}$ C, 15 min;再按 94 $^{\circ}$ C, 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C, 60 s 循环 40 次,荧光检测在 60 $^{\circ}$ C。Ct 值 ≤ 35 时,判断结果为阳性。

1.3.4 病毒性病原检测 采用 ELISA、RT-PCR 检测标本中的 RV、NV、AstV 和 AdV 病毒性病原。具体操作方法,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学处理

采用配对资料的 χ^2 检验对于分析检测结果进行统计分析,使用 SPSS 19.0 软件,以 $P < 0.05$ 为检验水准,以 Kappa 值作为 2 种方法一致性好坏的评价标准(≥ 0.75 一致性极佳, $0.4 < \text{Kappa} < 0.75$ 中高度一致, ≤ 0.4 一致性差)。

2 结果

2.1 腹泻病例感染病原的检出情况

剔除 400 例中的流失样本后,最终对符合研究目标的 360 份标本进行了 RV、NV、AstV 和 AdV 病毒性病原检测分析,其中采用 RT-PCR 检出至少有 132 份标本含有至少 1 种病毒核酸:单一病毒核酸呈现阳性 116 份,双重病毒核酸呈现阳性 14 份,三重以上病毒核酸阳性 2 份。核酸阳性的检出率为 36.7%。采用 ELISA 的方法检出至少 98 份标本含有至少 1 种病毒核酸:单一病毒核酸阳性 86 份,双重病毒核酸阳性 12 份。核酸阳性检出率为 27.2%。

2.2 RT-PCR 与 ELISA 2 种检测方法比较

分别用 RT-PCR 和 ELISA 方法检测粪便 360 份,2 种检测方法检测 RV、NV、AstV 和 AdV 病毒性病原差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。采用 *Kappa* 值一致性评价对结果进行分析,结果见表 1。

表 1 RT-PCR 和 ELISA 2 种方法的检测结果
例 (%)

类型	RV	NV	AstV	AdV
RT-PCR	80(22.2) ¹⁾	64(17.8) ¹⁾	32(8.9) ¹⁾	12(3.3) ¹⁾
ELISA	48(13.4)	42(11.7)	21(5.9)	28(7.8)
<i>Kappa</i>	0.632	0.688	0.548	0.529

与 ELISA 组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究弥补了国内尚未对 RT-PCR 和 ELISA 2 种检测方法对检测小儿病毒性腹泻的效能分析,为实验室诊断小儿腹泻病毒所选择的快速、精确、灵敏和特异性强的检测方法提供了一定的技术支持。针对引起婴幼儿腹泻的病毒 RV、NV、AstV 和 EAdV 等,此类病毒具有感染力强,传播快,潜伏期短,发病急,病后免疫力不能持久等特点,极易造成疾病的大流行。因此,临床诊断上应用快速的筛查方法对腹泻病毒的检测显得尤为重要。目前临床对腹泻病毒的检测多为一对一的检测方法,虽然 ELISA 检测方法操作简便,但是和 RT-PCR 相比较,其敏感性和特异性均较差,而多重联检技术的使用比较少。

实时荧光定量 RT-PCR 是一项于近些年以来发展迅速的高灵敏性以及高特异性的对核酸进行快速检测的技术,截至目前位置,已然被广泛应用于病毒等各种病原微生物核酸的快速检测^[6]。有研究报道,在处置麻疹疫情过程中,由于实时 RT-PCR 技术具有灵敏度以及准确度比较高、检测快速以及操作简单等的诸多优点,大约在几个小时内就可得到实验室的确诊^[7]。ELISA 是把抗原抗体的特异性反应和酶的高效催化作用有机地结合起来,检测微量的特异性抗原或抗体的新技术,ELISA 方法使用的酶的标记物仍能够保持酶的活性以及免疫活性,故而在遇到对应的底物时,能够催化无色的底物产生还原反应或者水解氧化,从而生成可溶的有色物质,用肉眼或者比色法即可进行定性或者定量的测定^[8-9]。由于 ELISA 方法的操作简便、快速、容易观察结果等的有点,故而亦便于大规模的样品检测。

上述 2 种检测方法各有优缺点,ELISA 方法的操作比较简单,不需要对临床的样品进行前期的处理,同时消耗的时间较短,一般仅需要 3~4 h。但是有研究报道显示,ELISA 的检测范围窄是其最大的缺点,其有效检测范围在 5~80 pg/mL^[6]。实时荧光定量 RT-PCR 方法的最大优势在于其非常广的检测范围,有研究报道显示,荧光定量 RT-PCR 的检测范围是 $10^3 \sim 10^9$ 拷贝/mL,几乎所有的样品 RNA 载量均在此范围之内^[7]。但是在临床的实际操作中,实时荧光定量 PCR 实验所需要的仪器比较昂贵,同时其试剂耗材等的相关费用也比较高,实验室生物安全要求也相对较高^[10]。

本文经过对 RT-PCR 和 ELISA 2 种检测方法的对比发现,RT-PCR 方法的阳性检测率高于 ELISA,并且 RT-PCR 方法能够检测出三重以上的病毒核酸阳性,说明 RT-PCR 方法的特异性更好,可以从分子流行病学的角度来分析病毒的变化规律,故而更加有针对性地检测以及控制病毒,争取最大程度地避免 ELISA 中可能存在的抗原交叉反应,进一步增强小儿病毒性腹泻的早期病毒的诊断,最终能够更好地、针对性强地提供有效的治疗方案。

RT-PCR 和 ELISA 此 2 种检测方法均以 RV、NV 的阳性检出率较高,RT-PCR 法除对 EAdV 阳性检出率低于 ELISA 外,对其他 3 种病毒的检出率均高于 ELISA。2 种检测方法对 4 种病毒的阳性检出率差异均有统计学意义。

RT-PCR 和 ELISA 2 种检测方法对 RV、EAdV、AstV 的检测结果具有很好的一致性,其中对于 NV 检测的准确性和一致性更高。

比较 2 种方法的使用功效,ELISA 法的试验步骤较为繁琐,耗时约 2 h,若人工操作,劳动强度大,且一次试验只能检测单种病毒,但是 ELISA 具有操作简便、检测成本低、检测环境要求低^[11]的优点;RT-PCR 尽管具有灵敏度高、检测时间短^[12]、人员要求低^[13]的优点,但检测成本高、检测环境要求严格,不易在基层实验室推广。

参考文献

- [1] Dubey P, Mishra N, Rajukumar K, et al. Development of a RT-PCR ELISA for simultaneous detection of BVDV-1, BVDV-2 and BDV in ruminants and its evaluation on clinical samples[J]. J Virol Methods, 2015, 213: 50-56.
- [2] Bhat BN. Detection of Tobacco streak virus infecting sunflower by ELISA and RT-PCR method[J]. Intern J Plant Protect, 2015, 8(1): 99-103.

(下转第 603 页)

- 型功能性消化不良患者疗效及焦虑抑郁状态的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(1): 83—86.
- [6] 于迎, 庄红艳, 尹冬青, 等. 中医体质类型与抗精神病药物不良反应的关系研究[J]. 首都医科大学学报, 2018, 4(2): 204—208.
- [7] 单海燕, 张雪莹, 谷海燕, 等. 电针联合五音疗法治疗伴焦虑抑郁状态溃疡性结肠炎 40 例临床观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(9): 66—68, 73.
- [8] 杜明君, 肖伟霞, 申丽娟, 等. 西酞普兰联合中药郁乐方治疗对于抑郁症的 HAMD、HAMA、MADS 评分及安全性研究[J]. 国际精神病学杂志, 2018, 6(1): 17—20.
- [9] 刘伟, 王静, 王钦鹏, 等. 乌灵胶囊联合盐酸文拉法辛缓释胶囊治疗脑梗死后患者躯体化症状的评价[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(24): 62—65.
- [10] 汪谋岳, 中华医学会神经病学分会神经心理学与行为神经病学组. 综合医院焦虑、抑郁与躯体化症状诊断治疗的专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(12): 908.
- [11] 陈文泽, 陈雪芬, 张君青, 等. 躯体化障碍者的治疗及其神经电生理指标的变化研究[J]. 浙江医学, 2016, 38(10): 688—690.
- [12] 中华医学会神经病学分会神经心理学与行为神经病学组. 综合医院焦虑、抑郁与躯体化症状诊断治疗的专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2016, 49(12): 95—98.
- [13] 马闯胜, 马玲, 张淑芳, 等. 氯米帕明治疗难治性抑郁症对照研究[J]. 临床精神医学杂志, 2016, 26(4): 274—274.
- [14] 李前龙, 古赛. 舒肝解郁胶囊治疗伴轻中度抑郁症的功能性消化不良的临床效果观察[J]. 临床消化病杂志, 2016, 28(1): 13—16.
- [15] 任虹, 孙俊伟. 疏肝解郁胶囊联合文拉法辛治疗伴有躯体症状老年抑郁症对照研究[J]. 中国药物与临床, 2016, 16(1): 77—79.

(上接第 599 页)

- [3] Aravindhbabu RP, Manoharan S, Ramadass P. Diagnostic evaluation of RT-PCR-ELISA for the detection of rabies virus[J]. Indian J Virol, 2014, 25(1): 120—124.
- [4] Puppe W, Weigl J, Gröndahl B, et al. Validation of a multiplex reverse transcriptase PCR ELISA for the detection of 19 respiratory tract pathogens[J]. Infection, 2013, 41(1): 77—91.
- [5] Singh M, Singh RP, Fageria MS, et al. Optimization of a Real-Time RT-PCR Assay and its Comparison with ELISA, Conventional RT-PCR and the Grow-out Test for Large Scale Diagnosis of Potato virus Y, in Dormant Potato Tubers[J]. Am J Potato Res, 2013, 90(1): 43—50.
- [6] Mahajan S, Agrawal R, Kumar M, et al. Comparative evaluation of RT-PCR with sandwich-ELISA for detection of Peste des petits ruminant in sheep and goats[J]. Veterinary World, 2013, 6(6): 288—290.
- [7] Parashar D, Paingankar MS, Sudeep AB, et al. Assessment of qPCR, nested RT-PCR and ELISA techniques in diagnosis of Chikungunya[J]. Current Sci, 2014, 107(12): 2011—2013.
- [8] 陈玲霞, 姬莉莉, 孙建飞. 麻疹实验室诊断中 ELISA 法和实时荧光定量 RT-PCR 法的比较[J]. 实用预防医学, 2016, 23(1): 106—108.
- [9] Soltan MA, Tsai YL, Lee PY, et al. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A(RVA) in feces of different animal species[J]. J Virol Methods, 2016, 235: 99—104.
- [10] Eichmeier A, Komínek P. Detection of Moravian Isolates of GFLV: Comparison of Real-Time RT-PCR and ELISA[J]. Intern J Virol, 2014, 10(4): 263—271.
- [11] 赵娣伟. 实时荧光定量 PCR 和 ELISA 检测麻疹病毒的探讨[J]. 中国城乡企业卫生, 2016, 31(5): 75—76.
- [12] 薄芳, 马玉杰, 黄鹤, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 和血清学方法联合应用检测风疹病毒[J]. 中国公共卫生管理, 2014, 30(3): 450—451.
- [13] 侯存军, 陈洪晓, 柳君如, 等. 麻疹实验室诊断中病毒抗原与 RNA 检测的对比研究[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2014, 8(3): 349—351.