

## 内标多重荧光 RT-PCR 同时检测肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16 型

肖性龙<sup>1,3</sup>, 何雅青<sup>2</sup>, 余以刚<sup>1</sup>, 杨洪<sup>2</sup>, 李惠芳<sup>3</sup>, 杨晓泉<sup>1</sup>, 张经纬<sup>3</sup>, 陈谷<sup>1</sup>, 刘冬梅<sup>1</sup>, 李小凤<sup>1</sup>, 吴晖<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华南理工大学轻工与食品学院食品安全研究室, 广州 510640)

(<sup>2</sup>深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518000)

(<sup>3</sup>深圳太太基因工程有限公司, 深圳 518057)

**摘要** 【目的】为对当前爆发的手足口病进行快速准确的检测。【方法】本研究建立了含内标的同时检测 EV71 和 CA16 的多重荧光 RT-PCR 方法, 对该方法的特异性、灵敏度等进行评估, 并对 400 多份临床样品进行了检测。【结果】实验结果表明, 该检测方法特异性强, 对 10 株 EV71 病毒、8 株 CA16 病毒和 25 株其他人类病毒进行了检测, 特异性为 100%; 该检测方法对 EV71 和 CA16 的检测灵敏度分别达到 0.1 TCID<sub>50</sub> 和 1 TCID<sub>50</sub>, 将 0.1 ~ 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mL EV71 和 CA16 样本进行重复性实验, 其变异系数分别为 0.9% ~ 2.0% 和 0.9% ~ 2.3%。对 400 多份临床样品分别进行荧光 RT-PCR 检测和传统方法检测, 结果显示, 荧光 RT-PCR 对 EV71 和 CA16 的阳性检出率平均为 46.1% 和 14.2%, 比传统方法 (34.5% 和 12.8%) 的阳性检测率高。另外, 实验数据显示, 在粪便、直肠拭子、咽喉拭子样本中, PCR 抑制物存在的比例为 1.8% ~ 3.4%, 表明内标对监控 PCR 抑制物的存在具有重要作用。【结论】本方法能同时对 EV71 和 CA16 进行快速检测, 并且灵敏度高, 特异性好, 由于加入了内标, 能有效地监控假阴性的出现, 适合于手足口病的临床检测。

**关键词:** 内标; 多重荧光 RT-PCR; EV71; 柯萨奇病毒 A16 型; 检测

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0098-07

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是全球性传染病, 研究表明, 肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, CA16)是引起人类手足口病的两种主要病原<sup>[1]</sup>。两种病毒基因型相似并且表现类似的临床症状, EV71 还能引起严重的神经系统疾病, 甚至危及生命, 因而具有更大的危害性<sup>[2-3]</sup>。自 2008 年 3 月份以来, 中国的很多省份受 EV71 病毒感染严重, 超过 3 万儿童感染该病, 将近 50 人因该病而死亡, 该病在五月份

已被中华人民共和国卫生部定为一类传染病。因此, 快速、简单、高灵敏度的检测方法对该病的防控极其重要。经典的检测肠病毒的方法多采用细胞培养、特异性抗体检测, 该方法步骤烦琐, 检测周期长, 而且一些肠道病毒难以在细胞中进行增殖, 容易出现漏检<sup>[4-6]</sup>; 传统的 RT-PCR 也被用于检测 EV71 和 CA16, 但该方法存在污染严重和灵敏度不高的特点, 而且检测周期也需要 6 ~ 8 h<sup>[7-11]</sup>。

实时荧光 RT-PCR(real-time fluorescent RT-PCR)

基金项目: 国家自然科学基金(20676042)

\* 通信作者。Tel: +86-20-87112853, +86-13828797202; Fax: +86-20-87112853; E-mail: redtreer@163.com

作者简介: 肖性龙(1977-)男, 江西泰和人, 博士研究生, 研究方向为食品质量与安全。

收稿日期: 2008-07-14; 修回日期: 2008-10-13

采用特异性标记的探针来实时监控扩增产物,该检测方法已经被广泛地应用于各种病原的检测<sup>[12]</sup>。研究表明,临床标本如血清、全血、痰液或分泌物等含有大量的杂质,一些标本中可能含有抑制 PCR 扩增的物质,核酸抽提过程中残留的一些试剂也可能导致 PCR 扩增的抑制,从而出现假阴性结果或定量值偏低<sup>[13-14]</sup>。本研究采用 TaqMan 探针,建立了含有监控内标(Internal Control, IC)同时检测 EV71 和 CA16 的多重荧光 RT-PCR 检测方法,内标同步参与样品核酸的提取,不仅能够有效地监控样本中的抑制物,还能避免了操作误差所造成的假阴性。该方法可靠性强,无假阴性结果,能同步检测 EV71 和 CA16。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器**:ABI7500 实时荧光 RT-PCR 仪;Genequant Pro 型核酸蛋白分析仪;Qiagen Viral RNA/DNA Extraction Kit 为德国 QIAGEN 公司产品; *in vitro* Transcription T7 Kit、TaKaRa One Step RNA PCR Kit 为宝生物工程(大连)有限公司产品, pUCm-

T 载体购于上海生工生物工程有限公司。

**1.1.2 病毒株**:10 株 EV71 病毒、8 株 CA16 病毒和 22 株其他病毒株由深圳疾病预防控制中心(SZCDC)和广州疾病预防控制中心(GZCDC)提供,临床检测采用的 238 份粪便样品、15 份疱疹样品、112 份直肠拭子和 43 份咽喉拭子为今年 3 月到 8 月手足口病爆发期间于深圳收集。

### 1.2 样品处理

所有样本均进行过测序鉴定、RD 细胞分离培养及中和实验、免疫荧光实验确定其血清型<sup>[15-16]</sup>。

### 1.3 引物、TaqMan 探针的设计

据 Oberste 等和 Brown 等的研究,VP1 区核酸序列与决定肠道病毒血清型的抗原决定因子密切相关<sup>[17-18]</sup>,我们根据 GenBank 登录的 EV71 和 CA16 VP1 基因序列,利用生物软件 Primer Express V2.0 分别在其保守位点设计引物和 Taqman 探针,并通过 NCBI 数据库进行了 Blast 同源性比对验证。EV71 和 CA16 探针 5' 端标记的荧光报告基团分别是 FAM 和 VIC,3' 端标记的荧光淬灭基团均为 BHQ1,具体序列特征和探针标记如表 1 所示。

表 1 引物和荧光探针的核酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers and fluorogenic probes

Primer or probe <sup>a</sup>	Sequence(5'→3') <sup>b</sup>	T <sub>m</sub> /°C <sup>c</sup>	Location <sup>d</sup> within the genome	Size/bp	GC Content/%	Amplicon/bp
EV71P <sup>f</sup>	AGTGATGAGACTATGATTGAGACACG	57.6	2613-2638	26	42.3	89
EV71P <sup>r</sup>	CCCCTCTGCTGAAGAAACT	58.3	2682-2701	20	55.0	
EV71P <sup>b</sup>	FAM-TCGCACAGCACAGCTGAGACCACTC-BHQ1	68.8	2652-2672	25	60.0	
ICP <sup>b</sup>	CY5-TGAGACCAGCACTAGCACCTCGCAC-BHQ1	67.6		25	60.0	
CA16P <sup>f</sup>	GAACCATCACTCCACACAGGAG	58.1	2650-2671	22	54.5	90
CA16P <sup>r</sup>	GTACCCGTGGTGGCATTG	60.6	2721-2739	19	60.6	
CA16P <sup>b</sup>	VIC-CAGCCATTGGGAATTTCTTTAGCCGTG-BHQ2	68.5	2673-2699	27	48.1	

<sup>a</sup> primers and probes were designed by using Primer Express V2.0 software. <sup>b</sup> FAM, VIC and CY5 are fluorescent reporter dyes and BHQ1, BHQ2 are the quencher dyes. <sup>c</sup> melting temperature estimated by Primer Express 2.0 primer test document, dyes are not accounted for in the calculations. <sup>d</sup> nucleotide positions are based on GenBank AF302996 for EV71 and AY790926 for CA16. <sup>e</sup> Pf: forward primer; Pr: reverse primer; P<sub>b</sub>: probe.

### 1.4 内标的设计与制备

为了防止假阴性的出现,我们设计并且制备了监控提取和反应的内标,所构建的内标核酸包含 EV71 引物识别序列和特有的内标探针识别序列。内标的构建首先参照 Malorny 等<sup>[19]</sup>和 Rosenstraus 等<sup>[13]</sup>所发表的方法制备含 89 bp 内标片段的 pUCm-IC 重组质粒。89 bp 内标片段由两个合成的片段采用 Klenow 酶连接而成并采用 EV71 引物进行扩增,将 89 bp 的目标片段插入 pUCm-T 载体制备 pUCm-IC 重组质粒。内切酶 *Eco*R I 酶切重组质粒,使其线性化,参考 Sarah<sup>[20]</sup>所发表的方法,采用 *in vitro*

Transcription T7 Kit(TAKARA)体外转录 RNA。采用 DNA 酶消化剩余的 DNA,Trizol 法提取转录 RNA,将其保存在含有 EDTA, poly(A) RNA 和叠氮钠的溶液中。内标探针 5' 端标记的荧光报告基团分别是 CY5 与 EV71 共用一套引物序列,其引物与探针的序列如表 1 所示。

### 1.5 病毒核酸的提取

病毒样品 RNA 的抽提按 Qiagen Viral RNA/RNA Extraction Kit 操作说明书进行,病毒细胞培养物和疱疹液按上述方法直接提取,粪便样品、直肠拭子和咽

喉拭子需经过预处理,在抽提前需加0.01 mol/L PBS,PH7.5,其中,0.5 g 粪便样品(0.5 mL 液态粪便)加5 mL PBS,然后将悬液12000 × g 离心10 min,取上清液进行RNA抽提,用40 μL DEPC水重溶,于-80℃保存。每份样品均加入监控内标同步参与样品核酸的提取。

### 1.6 多重荧光 RT-PCR 的检测方法的建立和条件优化

多重荧光 RT-PCR 的反应体系参照 TaKaRa One Step RNA PCR Kit 说明书配制,采用25 μL 反应体系,将 EV71、CA16 和监控内标的上游引物、下游引物和 TaqMan 探针同时加入反应体系中,于 ABI 7500 荧光 RT-PCR 仪进行反应。对多重荧光 RT-PCR 反应体系中引物和 TaqMan 探针浓度进行筛选,以获得最低的 CT 值和较高的荧光强度增加值(ΔRn)。

### 1.7 多重荧光 RT-PCR 的特异性试验

利用建立起来的多重荧光 RT-PCR 反应体系分别对43株不同的人类病毒进行检测,其中10株 EV71 病毒、8株 CA16 病毒和25株其他人类病毒,验证其特异性。

### 1.8 多重荧光 RT-PCR 的灵敏度检测

利用 RD 细胞对 EV71 和 CA16 进行培养增殖并测定病毒滴度,然后按 Reed-Muench 氏法<sup>[21]</sup>计算 TCID<sub>50</sub>。将病毒培养液进行10倍系列稀释(0.1~10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL),抽提核酸后进行荧光 RT-PCR 检测,观察其最低的检测限。

### 1.9 多重荧光 RT-PCR 的重复性试验

对十倍系列稀释的 EV71、CA16 样品(10<sup>4</sup>~0.1 TCID<sub>50</sub>/mL)进行组内和组间荧光 RT-PCR 检测,对各稀释度的 CT 值进行统计,计算变异系数。

### 1.10 多重荧光 RT-PCR 临床试验

利用所建立的多重实时荧光 RT-PCR 对408份临床疑似阳性样品,并与测序鉴定结果和传统检测结果进行比较。

## 2 结果

### 2.1 多重荧光 RT-PCR 的条件优化

在25 μL 反应体系中,于一管中加入 EV71、CA16 和内标的特异性引物和探针及 EV71、CA16 病毒 RNA 和适量的内标(大约100 copies/μL),于 ABI7500 荧光 RT-PCR 仪上进行多重荧光 RT-PCR 反应,优选反应体系中各引物和 TaqMan 探针的最佳浓度。结果表明,各引物探针采用以下添加量时,扩增效果最好:1.3 μL EV71P(10 μmol/L),1.5 μL EV71Pr

(10 μmol/L),0.6 μL EV71PK(10 μmol/L),0.5 μL ICPb(10 μmol/L),1.0 μL CA16P(10 μmol/L),1.2 μL CA16PK(10 μmol/L),0.6 μL EV71PK(10 μmol/L)。优化后的反应程序如下:42℃ 30 min 反转录,94℃ 4 min 终止反转录,94℃ 15 s,55℃ 1 min,40个循环。

采用优化后的反应条件,于一管内同时检测 EV71、CA16 病毒核酸样品,分别得到相应荧光信号的特异性荧光扩增曲线,2条特异性荧光扩增曲线的 CT 值分别为21.5、24.3,结果显示两种病毒均具有高效率的扩增,见图1-A。而阴性对照组中检测 EV71、CA16 的 FAM 和 VIC 通道均没有荧光信号产生,为一平直的线,但检测内标的 CY5 通道有特异性扩增曲线产生,表明 PCR 正常扩增,可排除假阴性存在,结果见图1-B。

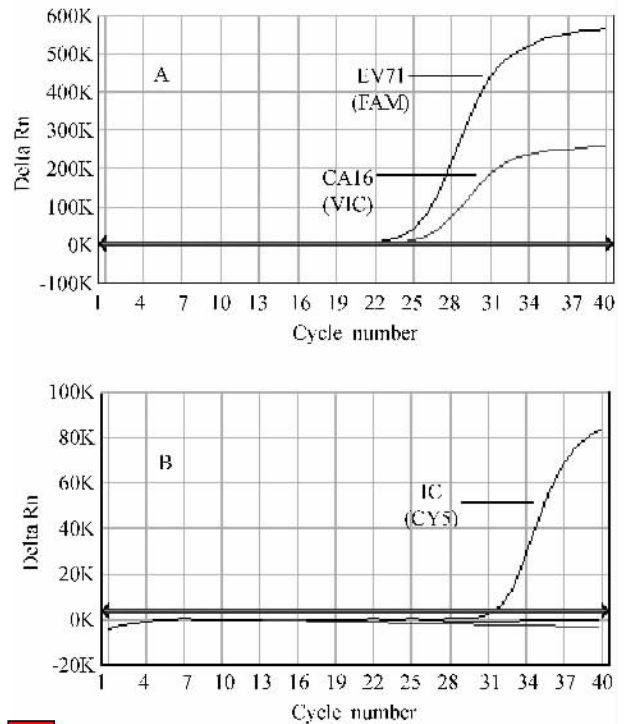


图1 多重荧光 RT-PCR 检测结果

Fig.1 The results of multiplex real-time RT-PCR. A: Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16. B: Detection of negative control.

### 2.2 多重荧光 RT-PCR 方法的特异性

利用建立起来的多重荧光 RT-PCR 反应体系分别对43株不同的人类病毒进行检测,结果,10株 EV71 病毒和8株 CA16 病毒均出现相应的特异性荧光扩增曲线,呈阳性反应。而其他25株人类病毒则均没有荧光信号产生,为一平直的线,判为阴性(表2)。结果表明,所设计的引物探针只对目的病毒特异,与其它检测对象无交叉反应。

表 2 EV71 和 CA16 荧光 RT-PCR 特异性检测

Table 2 Specificity of real-time RT-PCR for EV71 and CA16

Strain( source ,No. )	Original source	Result <sup>a</sup>	Strain( source ,No. )	Original source	Result <sup>a</sup>
Human Enterovirus 71 SHZH98	stool ,1998	+	Human Coxsackievirus A13 SZA13-FT	stool 2007	-
Human Enterovirus 71 SHZH01	stool 2001	+	Human Coxsackievirus A21 GZA21-1A	stool 2006	-
Human Enterovirus 71 SHZH03	stool 2003	+	Human Enterovirus 68 GZ07-2A	stool 2007	-
Human Enterovirus 71 SHZH03-NS	vesicle 2003	+	Human Poliovirus I Sabin	vaccine 2008	-
Human Enterovirus 71 SHZH06-YT	stool 2006	+	Human Poliovirus II Sabin	vaccine 2008	-
Human Enterovirus 71 SHZH07-FT	vesicle 2007	+	Human Poliovirus III Sabin	vaccine 2008	-
Human Enterovirus 71 SHZH08-YT1	vesicle 2008	+	Human Coxsackievirus B2 SHZH-CB2-a	stool 2005	-
Human Enterovirus 71 SHZH08-YT2	stool 2008	+	Human Coxsackievirus B3 SHZH-CB3-a	stool 2004	-
Human Enterovirus 71 AHFY08-ST02	stool 2008	+	Human Echovirus 5 GZECV5-LX-1	stool 2003	-
Human Enterovirus 71 AHFY08-ST07	stool 2008	+	Human Echovirus 6 NSECV6-1	stool 2003	-
Human Coxsackievirus A16 shzh99-ca	stool ,1999	+	Human Echovirus 9 SHZH-ECV9-1121	stool 2004	-
Human Coxsackievirus A16 sz00-lu	vesicle 2000	+	Human Echovirus 11 SHZH-ECV11-a	stool 2003	-
Human Coxsackievirus A16 shzh00-1f	stool 2000	+	Human Echovirus 13 SHZH-ECV13-06	stool 2006	-
Human Coxsackievirus A16 SZCA06	vesicle 2006	+	Human Echovirus 18 GZECV18TH-1	stool 2007	-
Human Coxsackievirus A16 SZCA07	stool 2007	+	Human Echovirus 25 GZECV25-HZ-b	stool 2007	-
Human Coxsackievirus A16 SZCA08-1	stool 2008	+	Norovirus GI SZNV2-06	stool 2006	-
Human Coxsackievirus A16 SZCA08-2	stool 2008	+	Norovirus GI SZNV2-07	stool 2007	-
Human Coxsackievirus A16 SZCA08-3	vesicle 2008	+	Rotavirus A SZRV-A-061110	stool 2006	-
Human Coxsackievirus A1 GDCA1-2	stool 2006	-	Rotavirus A SZRV-A-071213	stool 2007	-
Human Coxsackievirus A3 GDCA3-1	stool 2004	-	Rotavirus B SZRV-B-050121	stool 2005	-
Human Coxsackievirus A4 NS-CA4-1	stool 2005	-	Rotavirus B SZRV-B-071008	stool 2007	-
Human Coxsackievirus A11 NS-CA-11-1	stool 2007	-			

<sup>a</sup> results of real-time RT-PCR :+ ,positive result for EV71 or CA16 ; - ,negative result.

### 2.3 多重荧光 RT-PCR 的检测灵敏度

将已测定滴度的 EV71 和 CA16 病毒培养液进行 10 倍系列稀释(0.1 ~ 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL), 抽提核酸后进行荧光 RT-PCR 检测。结果显示, 该方法检测 EV71 和 CA16 的灵敏度分别达到 0.1 TCID<sub>50</sub>/mL 和 1 TCID<sub>50</sub>/mL。

### 2.4 多重荧光 RT-PCR 的重复性

在同一次实验中, 对十倍系列稀释的 EV71、CA16 样品(10<sup>4</sup> ~ 0.1 TCID<sub>50</sub>/mL) 进行荧光 RT-PCR 检测, 每个样品做 4 个平行的反应管, 结果各稀释度样品的 4 个平行反应获得的 CT 值变异系数均在

2.3% 以下。对上述各梯度稀释的样品进行组间重复实验(每天检测一次, 检测 4 d), 结果各稀释度样品的 4 次检测所获得的 CT 值变异系数均在 2.0% 以下(见表 3)。以上数据表明本研究所建立的多重荧光 RT-PCR 检测方法重复性好, 可对 EV71、CA16 进行稳定、可靠的检测。

### 2.5 多重荧光 RT-PCR 临床试验

对 408 份临床疑似阳性样品, 包括 238 份粪便样品、15 份疱疹样品、112 份直肠拭子和 43 份咽喉拭子, 利用荧光 RT-PCR 和传统方法进行检测。结果, 荧光 RT-PCR 对粪便样品、疱疹样品、直肠拭子、

表 3 EV71、CA16 实时荧光 RT-PCR 组内和组间检测的重复性

Table 3 Intra- and inter-assay reproducibility of real-time RT-PCR for EV71 and CA16

c( specimens ) ( TCID <sub>50</sub> /mL )	Replicate( CT <sup>a</sup> value )								CT mean ( S. D. <sup>b</sup> )		CV <sup>c</sup> /%	
	1		2		3		4		EV71	CA16	EV71	CA16
	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16
Intra-assay												
10 <sup>4</sup>	18.53	20.32	19.15	19.87	18.91	20.27	18.77	19.52	18.( 0.26 )	20.( 0.38 )	1.4	1.9
10 <sup>3</sup>	22.41	23.97	21.97	24.01	22.35	23.54	22.13	23.83	22.( 0.20 )	23.8( 0.21 )	0.9	0.9
10 <sup>2</sup>	26.01	27.81	25.87	26.95	25.18	27.62	25.54	26.81	25.7( 0.37 )	27.3( 0.49 )	1.4	1.8
10 <sup>1</sup>	29.11	31.32	28.19	32.07	28.37	31.63	29.44	33.05	28.8( 0.59 )	32.0( 0.75 )	2.0	2.3
1	32.50	35.35	31.97	34.83	32.02	36.02	31.68	35.79	32.0( 0.34 )	35.5( 0.52 )	1.1	1.5
0.1	35.71	ND <sup>d</sup>	36.23	ND	37.31	ND	36.57	ND	36.5( 0.67 )	ND	1.8	ND
Inter-assay												
10 <sup>4</sup>	18.41	20.11	19.13	19.87	18.68	19.59	19.07	20.03	18.8( 0.34 )	19.9( 0.23 )	1.8	1.2
10 <sup>3</sup>	22.13	23.76	22.93	23.89	22.68	24.11	23.15	24.23	22.7( 0.44 )	24.0( 0.21 )	1.9	0.9
10 <sup>2</sup>	26.22	27.35	26.18	26.87	26.76	26.91	26.57	27.61	26.3( 0.28 )	27.3( 0.36 )	1.1	1.3
10 <sup>1</sup>	28.80	31.98	29.12	31.46	29.63	31.25	30.01	32.30	29.4( 0.54 )	31.7( 0.48 )	1.8	1.5
1	32.43	36.10	33.23	35.11	32.89	34.85	32.57	36.41	32.8( 0.36 )	35.6( 0.75 )	1.1	2.1
0.1	37.18	ND	36.92	ND	36.24	ND	36.31	ND	36.7( 0.46 )	ND	1.3	ND

<sup>a</sup> Cycle threshold value ; <sup>b</sup> Standard deviation ; <sup>c</sup> Coefficient of variation = S. D. / CT mean ; <sup>d</sup> Not detected.

咽喉拭子进行 EV71 检测的阳性率分别为 50.0%、53.3%、32.1%、48.8% ,而传统方法的阳性率分别为 31.5%、40.0%、26.8%、39.5% ;荧光 RT-PCR 对 CA16 各样品材料检测的阳性率分别为 16.4%、20.0%、13.4%、7.0% ,而传统方法的阳性率分别为 11.8%、20.0%、12.5%、7.0% ,如表 4 所示。上述数据显示荧光 RT-PCR 检测 EV71 和 CA16 的阳性率都明显比传统检测方法的要高 ,而且荧光 RT-PCR 阳性结果与测序鉴定结果一致。结果表明 ,荧光 RT-PCR 检测的灵敏度比传统检测方法的要高 ,并且没有假阳性产生。

## 2.6 内标的监控结果

临床试验数据统计显示 ,利用传统方法和荧光 RT-PCR 方法进行检测均存在假阴性现象 ,两种方法对各种样品检测的假阴性率平均值分别为 7.3% 和 0.8% ,如表 4 所示。传统方法由于其灵敏度较低 ,因此其假阴性率也相对较高 ,传统方法并不能对假阴性样品进行监控 ,而本研究采用内标来监控假阴性。实验结果显示 ,对存在 PCR 抑制因子的临床样品进行荧光 RT-PCR 扩增时 ,监控内标的 CY5 通道均没有特异性扩增曲线产生 ,表明 RT-PCR 扩增受抑制 ,将此类样品再进行病毒分离鉴定 ,结果部分样品的检测结果为阳性 ,假阴性的出现表明内标对于 PCR 检测是非常重要的。

表 4 Real-time RT-PCR 和传统方法对 408 份疑似阳性样品检测的结果比较

Table 4 Comparison of detection results of 408 suspected positive samples by real-time RT-PCR and common assay

Real-time RT-PCR/Common assay <sup>a</sup>	408 suspected positive samples							
	Stools (238)		Vesicles (15)		Rectal swabs (112)		Throat swabs (43)	
	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16	EV71	CA16
Positive/ Positive <sup>b</sup>	71	26	6	3	29	13	16	3
Negative/ Positive <sup>c</sup>	4	2	0	0	1	1	1	0
Positive/ Negative <sup>d</sup>	48	13	2	0	7	2	5	0
Negative/ Negative <sup>e</sup>	115 (4)	197 (6)	7	12	75 (1)	96 (1)	21	40 (1)
Real-time PCR positive ratio <sup>f</sup>	50.0%	16.4%	53.3%	20.0%	32.1%	13.4%	48.8%	7.0%
Common assay positive ratio <sup>g</sup>	31.5%	11.8%	40.0%	20.0%	26.8%	12.5%	39.5%	7.0%
Real-time PCR false negative rate <sup>h</sup>	1.7%	0.8%	0%	0%	0.9%	0.9%	2.3%	0%
Common assay false negative rate <sup>i</sup>	20.2%	5.5%	13.3%	0%	6.3%	1.8%	11.6%	0%
Samples containing inhibitory factor( % ) <sup>j</sup>	3.4%	3.4%	0.0%	0.0%	1.8%	1.8%	2.3%	2.3%

<sup>a</sup> Including virus isolation and serotypes identification by neutralization testing and IFA. <sup>c</sup> Real-time PCR negative samples with IC negative indicated that the samples contained inhibitory factor ,and then detected by Common assay , the result were positive. <sup>d</sup> Real-time PCR positive samples were confirmed by Sequencing. <sup>e</sup> numbers in brackets are the numbers of inhibition samples in the negative samples group. <sup>f</sup> Real-time PCR positive ratio = number of positive samples in <sup>b</sup> + <sup>d</sup> / number of all samples in the same row. <sup>g</sup> Common assay positive ratio = number of positive samples in <sup>b</sup> + <sup>c</sup> / number of all samples in the same row. <sup>h</sup> Real-time PCR false negative rate = number of negative samples in <sup>c</sup> / number of all samples in the same row. <sup>i</sup> Common assay false negative rate = number of negative samples in <sup>d</sup> / number of all samples in the same row. <sup>j</sup> The sample containing inhibitory factor( % ) = number of inhibition samples in <sup>e</sup> + <sup>f</sup> / number of all samples in the same row.

## 3 讨论

PCR 技术目前已经广泛应用在病原微生物的检测上 ,Chen 等曾报道利用传统多重 RT-PCR 技术同时检测 EV71 和 CA16 病毒<sup>[10]</sup> ,但由于需要将 PCR 扩增产物进行电泳 ,因而很容易产生 PCR 产物气溶胶的污染问题 ,造成假阳性 ,而且该方法在灵敏度和检测时间上也存在缺陷。最近 ,Tan 等也有关于利用杂交探针多重实时荧光 RT-PCR 同时检测 EV71 和 CA16 的报道<sup>[22]</sup> ,该检测方法特异性强、灵敏度高、与传统 PCR 相比 ,由于实时荧光 PCR 采取全封闭式反应 ,因而能有效解决 PCR 产物气溶胶的污染问题 ,且自动化程度高 ,无需电泳 ,避免了检疫人员接触有毒物质。本研究与该方法相比 ,由于引入了“内在扩增控制”的设计 ,可避免因测试样本中存在的 RT-PCR 反应抑制因子而导致的假阴性结果 ,因

而明显优于 Tan 等的设计。

本研究以 EV71 和 CA16 高度保守的 VP1 基因为靶基因设计引物和探针 ,特异性实验表明 ,该方法只能够检测到 EV71 和 CA16 ,与其他具有相似临床症状的人类病毒均没有交叉反应 ,灵敏度结果表明 ,该方法检测 EV71 和 CA16 的灵敏度分别达到 0.1 TCID<sub>50</sub>/mL 和 1 TCID<sub>50</sub>/mL ,所构建的标准曲线显示具有高扩增效率 ,重复性实验表明 ,组内和组间的变异系数均小于 2.3% ,可以进行可靠、稳定的检测。对 408 份临床样品分别进行荧光 RT-PCR 检测和传统方法检测 ,结果显示 ,荧光 RT-PCR 对 EV71 和 CA16 的阳性检出率均比传统方法的高 ,而荧光 RT-PCR 阳性检测结果与测序鉴定结果完全一致 ,表明荧光 RT-PCR 检测没有假阳性产生 ,因此荧光 RT-PCR 要比传统检测方法要更灵敏。

另外 ,本研究的临床实验结果显示 ,直肠拭子的

阳性率比粪便样品、疱疹、咽喉拭子的阳性率都要低,如果不对直肠拭子检测结果进行统计,荧光 RT-PCR 和传统方法对 EV71 的平均阳性率可达到 50.7% 和 37.0%,这表明粪便样品、疱疹、咽喉拭子是作为 EV71 临床检测的良好材料。Ooi 等<sup>[23]</sup>曾报道,对于不同的手足口病患者,咽喉拭子是最佳的检测材料,对 592 位肠道病毒患者的咽喉拭子进行检测,结果有 288 位显示阳性,阳性率为 49%。而对疱疹样品检测的阳性率为 48%,如果疱疹采集的数量在两个或以上其检测率会更高。Ooi 等还指出,直肠拭子和溃疡拭子检测的阳性率较低,然而该文并没有使用粪便作为样品来检测 EV71。而我们研究发现,使用粪便作为检测样品比咽喉拭子的阳性率更高,如果患者长有疱疹,那么采用疱疹作为检测样品也是个很好的选择。

本研究数据表明,病毒分离鉴定,同时利用中和试验和 IFA 进行血清型分型。仍然是检测 EV71 或 CA16 的好方法,尽管其检测灵敏度比荧光 RT-PCR 要低且耗时较长。然而,对于一些含有 PCR 抑制因子的样品来说,病毒分离方法也许是唯一的检测方法,本研究数据显示粪便样品、直肠拭子、咽喉拭子中含有 PCR 抑制因子的样品数(%)分别为 3.4%、1.8%、2.3%,PCR 抑制发生的概率虽然比较低,但假阴性的出现表明内标对于 PCR 检测是非常重要的。另外,PCR 反应试剂(如酶、dNTP)偶然的变性失活或者人为的操作失误也能导致假阴性的产生,由于内标参与核酸提取和 RT-PCR 反应全过程,因而对于 PCR 反应试剂的有效性和实验人员操作的正确性都能起到有效的监控作用。

致谢 本研究得到深圳太太基因工程有限公司的帮助,特此致谢!

## 参考文献

- [ 1 ] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illness during the Taiwan enterovirus epidemic. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1999, 18( 12 ):1092 - 1096.
- [ 2 ] Cardoso MJ, Perera D, Brown BA, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes. *Emerging Infectious Diseases*, 2003, 9( 4 ):461 - 468.
- [ 3 ] Lin TY, Chang SH, Hsia, et al. The 1998 enterovirus 71 outbreak in Taiwan: pathogenesis and management. *Clinical Infectious Diseases* 2002, 34( Suppl. 2 ):S52 - S57.
- [ 4 ] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38( 3 ):1170 - 1174.
- [ 5 ] Wong KT, Chua KB, Lam SK. Immunohistochemical detection of infected neurons as a rapid diagnosis of enterovirus 71 encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 1999, 45( 2 ):271 - 272.
- [ 6 ] Rignonan AS, Mann L, Chonmaitree T. Use of monoclonal antibodies to identify serotypes of enterovirus isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36( 7 ):1877 - 1881.
- [ 7 ] Tsao KC, Chang PY, Ning HC, et al. Use of molecular assay in diagnosis of hand, foot and mouth disease caused by enterovirus 71 or coxsackievirus A16. *Journal of Virological Methods* 2002, 102: 9 - 14.
- [ 8 ] Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 2006, 44( 8 ):2698 - 2704.
- [ 9 ] Singh S, Chow VTK, Phoon MC, et al. Direct detection of enterovirus 71 ( EV71 ) in clinical specimens from a hand, foot and mouth disease outbreak in Singapore by reverse transcription-PCR with universal enterovirus and EV71-specific primers. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40( 8 ):2823 - 2827.
- [ 10 ] Chen TC, Chen GW, Hsiung CA, et al. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44( 6 ):2212 - 2219.
- [ 11 ] Kidd IM, Clark DA, Emery VC. A non-radioisotopic quantitative competitive polymerase chain reaction method: application in measurement of human herpesvirus 7 load. *Journal of Virological Methods* 2000, 87: 177 - 181.
- [ 12 ] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000, 25( 2 ):169 - 193.
- [ 13 ] Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, et al. An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, 36( 1 ):191 - 197.
- [ 14 ] Gruber F, Falko G, Dorner F, et al. Quantitation of Viral DNA by Real-Time PCR Applying Duplex Amplification, Internal Standardization, and Two-Color Fluorescence Detection. *Applied and environmental microbiology* 2001, 67( 6 ):2837 - 2839.
- [ 15 ] Melnick JL, Rennick V, Hampil B, et al. Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. Bulletin of the World Health Organization ( WHO )*, 1973, 48: 263 - 268.

- [ 16 ] Shih SR , Ho MS , Lin KH , et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan , 1998. *Virus Research* 2000 68( 2 ) :127 – 136.
- [ 17 ] Oberste MS , Mather K , Kilpatrick DR. Molecular evolution of the human enterovirus : correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *Journal of Virology* 1999 73( 3 ) :1941 – 1948.
- [ 18 ] Brown BA , Kilpatrick DR , Oberste MS , et al. Serotypespecific identification of enterovirus 71 by PCR. *Journal of Clinical Virology* 2000 16( 2 ) :107 – 112.
- [ 19 ] Malorny B , Hoorfar J , Bunge C , et al. Multicenter Validation of the Analytical Accuracy of Salmonella PCR : towards an International Standard. *Applied and Environmental Microbiology* 2003 69( 1 ) :290 – 296.
- [ 20 ] Palmer S , Ann P. Wiegand , Maldarelli F , et al. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *Journal of clinical microbiology* 2003 41( 10 ) :4531 – 4536
- [ 21 ] Reed , LJ , Muench , H. A simple method of estimating fifty percent end points. *American Journal of Epidemiology* , 1938 27 :709 – 716.
- [ 22 ] Tan EL , Chow VT , Quak SH , et al. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* , 2008 , 61( 3 ) :294 – 301 .
- [ 23 ] Ooi MH , Solomon T , Podin Y , et al. Evaluation of Different Clinical Sample Types in Diagnosis of Human Enterovirus 71-Associated Hand-Foot-and-Mouth Disease. *Journal of clinical microbiology* 45( 6 ) :1858 – 1866.

## Simultaneous detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by multiplex real-time PCR with an internal control

Xinglong Xiao<sup>1,3</sup> , Yaqing He<sup>2</sup> , Yigang Yu<sup>1</sup> , Hong Yang<sup>2</sup> , Huifang Li<sup>3</sup> , Xiaoquan Yang<sup>1</sup> , Jingwei Zhang<sup>3</sup> , Gu Chen<sup>1</sup> , Dongmei Liu<sup>1</sup> , Xiaofeng Li<sup>1</sup> , Hui Wu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institut of Food Safety , Department of Food Science , College of Light Industry & Food Science , South China University of Technology , Guangzhou 510640 , China )

(<sup>2</sup>Shenzhen Center for Disease Control and Prevention , Shenzhen 518000 , China )

(<sup>3</sup>Shenzhen Taitai Genomics , Inc. , Shenzhen 518057 , China )

**Abstract [ Objective ]** To rapidly identify EV71 and CA16 simultaneously. **[ Methods ]** A multiplex real-time PCR with an internal control ( IC ) was developed. The specificity , sensitivity , reproducibility of the real time RT-PCR assay were estimated and more over 400 clinical samples were tested. **[ Results ]** The results showed 100% specificity for the selected panel. The assay met the sensitivity of 50% tissue culture infective dose ( TCID<sub>50</sub> ) per milliliter samples for CA16 and 0.1 TCID<sub>50</sub> for EV71 . Analysis with 10<sup>4</sup> ~ 0.1 TCID<sub>50</sub>/mL EV71 or CA16 samples demonstrated high reproducibility with a coefficient of variation ( CV ) of 0.9% ~ 2.0% for EV71 and 0.9% ~ 2.3% for CA16. More than 400 clinical samples were detected by real-time PCR , The results showed that the average positive ratio for EV71 and CA16 were 46.1% and 14.2% , higher than common assay ( 34.5% and 12.8% ). Moreover , the result statistics indicated that there were PCR inhibition in stools , rectal swabs and throat swabs specimens with inhibition ratio from 1.8% to 3.4% . The inhibition ratio of these samples showed the importance of IC when PCR was used to detect the RNA of EV71 , CA16 or other enterovirus. **[ Conclusion ]** As a result of its high specificity , sensitivity and avoiding false negative results by using an internal control , the assay is suitable for rapid clinical diagnosis of EV71 and CA16.

**Keywords :** internal control ; multiplex real-time PCR ; human enterovirus 71 ; coxsackievirus A16 ; detection

( 本文责编 张晓丽 )