

## 评价荧光定量逆转录-聚合酶链反应和酶联免疫吸附 试验方法在麻疹监测中的价值

丁亚兴,田宏,孙静,雷玥,黄海涛,骆晓艳,万丽霞,高志刚

(天津市疾病预防控制中心,天津 300011)

**摘要:** 目的 评价荧光定量逆转录-聚合酶链反应(real-time RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)方法在麻疹病毒感染病例中的诊断价值。方法 分析2014年天津市麻疹监测信息报告管理系统报告数据,运用 $\chi^2$ 检验(Chi-square Test)、配对McNemar检验和效度分析,比较2种方法的判定价值。结果 171例麻疹疑似病例同时采集了血清和干血片标本,ELISA法检测两种标本IgM抗体阳性率分别为53.22%和49.71%,差异无统计学意义( $\chi^2 = 3.60, P = 0.06$ ),两种标本ELISA法检测一致率为94.15%。2512例麻疹确诊病例中,2439例采集了血标本,ELISA法检测IgM抗体阳性率为76.38%;871例采集了咽拭子,real-time RT-PCR检测核酸阳性率为86.68%。咽拭子采样间隔在3天内的real-time RT-PCR核酸阳性率达到91.14%,3天后的阳性率只有66.26%( $\chi^2 = 72.46, P < 0.01$ )。血标本采样间隔在3天内的ELISA IgM抗体阳性率为71.47%,3天后达到94.14%( $\chi^2 = 118.06, P < 0.01$ )。检验效度分析,ELISA方法灵敏度为71.60%,特异度为85.29%,约登指数为0.57。real-time RT-PCR方法灵敏度为99.60%,特异度为67.65%,约登指数为0.67。结论 real-time RT-PCR方法更敏感,适合发病早期诊断,ELISA方法更适合发病中后期诊断。

**关键词:** 麻疹;酶联免疫吸附试验;逆转录-聚合酶链反应;效度

中图分类号: R181.1; R511.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-916X(2015)06-0616-04

**Evaluation the Value of Real-time Fluorescent Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction and Enzyme-linked Immunosorbent Assay in Measles Surveillance** DING Ya-xing, TIAN Hong, SUN Jing, et al. (Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the value of real-time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of measles. **Methods** Data from Measles Monitoring Information System of Tianjin in 2014 were analyzed, and Chi-square test, paired McNemar test, and validity analysis were used to compare the two detection methods. **Results** Serum and dried blood spots specimens were collected from 171 suspected measles cases, and IgM antibody positive rates by ELISA in these two kinds of specimens were 53.22% and 49.71%, respectively, with no significant difference ( $\chi^2 = 3.60, P = 0.06$ ) and a consistent rate of 94.15% between the two results. In 2512 confirmed measles cases, 2439 cases had blood specimen, in which IgM antibody positive rate by ELISA was 76.38%. 871 cases had swab specimen, in which the nucleic acid positive rate by real-time RT-PCR was 86.68%. When swab samples were collected within 3 days of rash onset, the nucleic acid positive rate was 91.14%, while it was only 66.26% when samples were collected after 3 days ( $\chi^2 = 72.46, P < 0.01$ ). By ELISA, IgM antibody positive rate was 71.47% for blood specimen collected within 3 days of rash onset, and 94.14% for specimens collected after 3 days of rash onset ( $\chi^2 = 118.06, P < 0.01$ ). Validity analysis for ELISA showed a sensitivity of

收稿日期: 2015-05-22; 修回日期: 2015-07-02

基金项目: 天津市疾病预防控制中心科技基金项目 (CDCKY1405)。

作者简介: 丁亚兴(1979-)男,天津人,天津市疾病预防控制中心主管医师,硕士。主要从事免疫规划和传染病监测工作。电话: 022-24333046。E-mail: louisdyx@163.com

71.60%, a specificity of 85.29%, and Youden's index of 0.57. For real-time RT-PCR, the analysis showed a sensitivity of 99.60%, a specificity of 67.65%, and Youden's index of 0.67.

**Conclusions** Real-time RT-PCR was more sensitive and suitable for early diagnosis. ELISA was

more suitable for middle-late diagnosis.

**Key words:** Measles; ELISA; Real-time RT-PCR; Validity

麻疹是由麻疹病毒引起的最常见和最具有传染性的急性呼吸道传染病之一,在人口密集而未普种疫苗的地区易发生流行<sup>[1]</sup>。麻疹传染性极强,易感者接触后 90% 以上均发病,全球每年麻疹死亡数高达 164 000 人<sup>[2]</sup>。通过麻疹疫苗常规免疫<sup>[3]</sup>和强化免疫<sup>[4]</sup>,天津市 2012 年麻疹发病率降到历史最低水平(0.15/10 万),但近两年受周边疫情影响和成人麻疹高发,麻疹发病率不断升高,2013 年为 2.01/10 万,2014 年达到 18.36/10 万,为近 25 年来最高。

2013 年天津市引入了荧光定量逆转录-聚合酶链反应(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, real-time RT-PCR)方法开展麻疹核酸检测,2014 年在全市推广。同时在酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)检测麻疹病例血清的基础上,开展使用干血片法(Dry Blood Spots)检测麻疹 IgM 抗体。本文针对这些检测方法进行对比分析。

## 材料与方法

### 1 研究对象和内容

1.1 麻疹疑似病例定义 具备发热、出疹,并伴有咳嗽、卡他性鼻炎或结膜炎症状之一者;或传染病责任疫情报告人怀疑为麻疹的病例。

1.2 麻疹确诊病例定义 符合下面条件之一的麻疹疑似病例为麻疹确诊病例。①血标本检测麻疹 IgM 抗体阳性者;②咽拭子标本检测麻疹病毒核酸阳性或分离到麻疹病毒者。

1.3 研究对象 研究对象来自 2014 年麻疹监测信息报告管理系统报告的麻疹病例,对病例标本开展 real-time RT-PCR 和 ELISA 检测。病例就诊的医疗机构或辖区疾控机构负责标本的采集,血清标本由全市 18 家区县疾控机构麻疹网络实验室检测,干血片由市疾控中心麻疹实验室检测,咽拭子由市疾控中心和 6 家区县 PCR 网络实验室检测。采样间隔 = 标本采集日期 - 病例出疹日期,单位为天(d)。标本采集和送检方法:采集静脉血分离血清,血清量不少于 0.5 ml,无溶血,无污染,冷藏条件下送检;干血片使用 Whatman 903 蛋白保存卡,采集 5 滴指血,晾干后送检;采集咽拭子置于 2~3 ml 病毒保存液(94% DMEM, 1% 谷氨酰胺, 1% 青霉素和链霉素各 10 000 U, 7.5% 碳酸氢钠溶液, 2% 胎牛血清, pH7.2)中, 2~8℃ 冷藏条件下及时送检。

### 2 仪器与试剂

仪器:TECAN 酶标仪、BIOMERIEUX easy MAG 自动核酸提取仪、ABI7500 fast 荧光定量 PCR 仪。ELISA 检测采用德国维润赛润(virion\serion)公司生产的检测试剂盒,real-time RT-PCR 检测采用美国 AB 公司试剂盒。

### 3 检测方法

3.1 ELISA 法 IgM 检测 血清检测:使用德国维润试剂盒,每板设立阴性对照 1 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 1 孔和内部质控 1 孔(弱阳),按照试剂盒说明书稀释样品后加样检测。干血片检测(参照 WHO 推荐)<sup>[5]</sup>:使用德国维润试剂盒,每板设立阴性对照 1 孔、阳性对照 2 孔、空白对照 1 孔和内部质控 2 孔(阳性和阴性各 1 孔)。使用打孔器在干血片上打出 6 mm 圆血片,使用含脱脂牛奶的缓冲液对血片进行洗脱,然后加样进行检测。判断标准为:IgM 抗体单位 U/ml,临界值 10~15, < 10 为阴性, > 15 为阳性。

3.2 RNA 的提取和 real-time RT-PCR 用 Rneasy Mini Kit 提取病毒悬液中的 RNA,反转录和 PCR 使用一步 RT-PCR Kit,具体方法按照说明书进行。反转录反应条件为 50℃ 30min, 95℃ 15min。PCR 反应条件为 94℃ 45s, 51℃ 45s, 72℃ 45s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。Ct 值无数值的标本为阴性样本, Ct 值 ≤ 35.0 的标本为阳性, Ct 值 > 35.0 的标本为阴性。

### 4 统计分析

使用 Excel 2010 进行数据的录入和整理, SPSS 18.0 完成数据分析。计算 ELISA 方法和 real-time RT-PCR 方法采样间隔的中位数(Median, M)和四分位间距(Interval of Quartiles, IQR);运用配对的 McNemar 检验分析血清和干血片 ELISA 检测方法的一致性;采用  $\chi^2$  检验(Chi-square Test)分析 ELISA 和 real-time RT-PCR 2 种检测方法标本阳性率的差别;然后对 ELISA 和 real-time RT-PCR 方法检测敏感性和特异性进行效度分析,比较 2 种方法的判定价值。

## 结 果

### 1 血清和干血片标本 ELISA 检测

171 例麻疹疑似病例同时采集了血清和干血片标本,采样间隔是 0~16 d, M = 7 d, IQR = 5~10 d。血清 ELISA-IgM 抗体阳性率为 53.22%,干血片 ELISA-IgM 抗体阳性率为 49.71%。采用配对的 McNemar 检验,两者阳性率差别无统计学意义( $\chi^2 = 3.60, P = 0.06$ ),血清和干血片 ELISA 法检测一致率为 94.15% (表 1)。

表1 血清和干血片麻疹 IgM 抗体 ELISA 法检测结果

Table 1 Measles IgM Antibody Results of Serum and Dried Blood Spots Samples by ELISA

干血片 Dried Blood Spots	血清 Serum		总计 Total
	阳性 Positive	阴性 Negative	
阳性 Positive	83	2	85
阴性 Negative	8	78	86
合计 Total	91	80	171

## 2 血清 ELISA 和 real-time RT-PCR 检测方法比较

在 2 512 例确诊的麻疹病例中 2 439 例采集了血清标本(采集率为 97.09%) ,ELISA 法 IgM 抗体阳性率 76.38% (表 2) 。871 例采集了咽拭子标本(采集率为 34.67%) ,real-time RT-PCR 核酸检测阳性率 86.68% ,两种方法的检测结果存在显著差别 ( $\chi^2 = 41.16 P < 0.01$ ) 。

表2 麻疹 ELISA 和 real-time RT-PCR 检测结果

Table 2 The Results of Measles Detection by ELISA and real-time RT-PCR

采样间隔 (d) Interval	ELISA		real-time RT-PCR	
	检测数 Detected Cases	阳性率/% Positive Rate	检测数 Detected Cases	阳性率/% Positive Rate
0	474	53.16	223	91.03
1	672	70.09	255	92.55
2	446	82.96	143	88.81
3	318	85.53	87	93.10
4	233	91.42	65	80.00
5	115	94.78	39	71.79
6	68	94.12	21	71.43
7	33	96.97	11	58.18
8	17	100.00	7	57.14
9	20	100.00	2	50.00
10	8	100.00	2	50.00
≥11	35	100.00	16	31.25
合计 Total	2 439	76.38	871	86.68

ELISA 方法阳性病例的采样间隔是 0~26d , M = 2d , IQR = 1~3d; real-time RT-PCR 方法阳性病例的采样间隔是 0~16d , M = 1d , IQR = 0~3d。咽拭子采样间隔在 3d 内的 real-time RT-PCR 阳性率达到 91.14% ,显著高于 3d 后的标本阳性率 66.26% ( $\chi^2 = 72.46 P < 0.01$ ) ,核酸检测阳性率随着采样间隔的增加而逐渐降低(图 1) 。血清采样间隔在 3d 后的抗体阳性率 94.14% ,显著高于 3d 内的阳性率 71.47% ( $\chi^2 = 118.06 P < 0.01$ ) ,血清抗体阳性率随着采样间隔的增加而逐渐增高。

## 3 检测效度分析

以病毒分离为金标准 ,分离到麻疹病毒的疑似病例作为麻疹病例组 ,分离到风疹病毒的疑似病例作为排除麻疹组。共有 284 例病例采集了出疹 3d

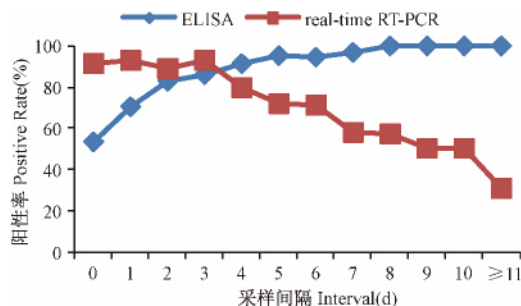


图1 不同采样间隔对 ELISA 和 real-time RT-PCR 检测结果的影响

Figure 1 ELISA and real-time RT-PCR Detection Results by Sample-collection Interval

内血清标本和咽拭子 ,对麻疹 IgM 抗体检测阴性的病例于出疹 7d 后采集第二份血标本进行抗体检测。根据病毒分离结果 ,麻疹病例组 250 例 ,排除麻疹组 34 例。效度分析显示 ,ELISA 方法灵敏度为 71.60% ,特异度为 85.29% ,约登指数 (Youden's Index) 为 0.57。real-time RT-PCR 方法灵敏度为 99.60% ,特异度为 67.65% ,约登指数为 0.67。

## 讨 论

目前 ,ELISA 方法检测血清中特异性 IgM 抗体是中国诊断麻疹病毒感染最主要的方法。本研究显示血清检测和干血片检测一致率较高 ,达到 94.15% ,提示使用微量血的干血片法效果良好。按照全国麻疹监测要求 ,医疗机构负责就诊病例的血标本采集 ,出疹 3 天内血标本 IgM 抗体检测阴性的 ,需要采集出疹 3 天后的第二份血进行确诊。但门诊病例回家后 ,再次采集静脉血的依从性较差。微量血伤害小 ,依从性较高 ,因此干血片适合疾控机构第二份血标本的采集检测。同时 ,也适用于大范围的健康人群麻疹抗体水平监测<sup>[6]</sup>。

ELISA 法简单易行 ,但麻疹发病 1~3 天内阳性率仅为 50%~73%<sup>[7]</sup> ,患者临床就诊与采血的时间往往处于发病的初期 ,如果临床上用 IgM 抗体作为确诊指标 ,易产生漏诊<sup>[8]</sup>。如何解决病例早期诊断问题? 本研究发现采样间隔在 3 天内 ,real-time RT-PCR 检测阳性率达到 91.14% ,而 ELISA 法只有 71.47%。同样 ,采样间隔在 3 天后 ,ELISA 法检测阳性率达到 94.14% ,real-time RT-PCR 仅有 66.26% ,表明两种检测方法阳性率与采样间隔有密切联系。real-time RT-PCR 方法更适合发病早期诊

断,ELISA 方法更适合发病中后期诊断。

麻疹检测方法效率分析显示,real-time RT-PCR 方法灵敏度高于 ELISA 方法,这与浙江<sup>[9]</sup>检测结果一致,但特异度低于 ELISA。real-time RT-PCR 方法约登指数略高于 ELISA,提示其在检测麻疹方面有更好的价值。但目前荧光定量 PCR 扩增仪价格较高,试验环境要求比较严格,检测费用明显高于 ELISA 方法。因此 real-time RT-PCR 适用于大型综合医院和市级疾控机构,而 ELISA 方法更适合于基层医院和区县疾控机构开展。

同时采集麻疹病例血标本和咽拭子进行检测的并联设计,会提高诊断麻疹病例的敏感性,但降低了特异性,同时增大了标本的检测量和经费支出。为此,天津市 2014 年修订了麻疹监测方案,要求各医疗机构和疾病预防控制中心,对出疹 3 天内的病例采集咽拭子检测,出疹 3 天后的病例采集血标本进行检测,避免标本的重复采集和检测。

#### 参考文献:

- [1] Uzicanin A, Zimmerman L. Field effectiveness of live attenuated measles-containing vaccines: a review of published literature [J]. J Infect Dis. 2011, 204 Suppl 1: S133-S148.
- [2] CDC. Global measles mortality, 2000-2008 [R]. MMWR, 2009, 58: 1321-1326.
- [3] 朱向军,丁亚兴,田宏,等. 天津市 2005~2008 年麻疹流行特征及其流行因素分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(10): 1088-1089.  
ZHU Xiang-jun, DING Ya-xing, TIAN Hong, et al. Analysis on measles epidemic in Tianjin, 2005-2008 [J]. Chinese Journal Epidemiology, 2009, 30(10): 1088-1089.
- [4] 丁亚兴,朱向军,张颖,等. 天津市 2008 年麻疹减毒活疫苗强化免疫活动效果分析 [J]. 中国疾病控制杂志, 2012, 16(6): 547-548.  
DING Ya-xing, ZHU Xiang-jun, ZHANG Ying, et al. Effect evaluation of measles attenuated live vaccine supplementary immunization activities in Tianjin City, 2008 [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2012, 16(6): 547-548.
- [5] Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection, 2nd Edition. 2007. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- [6] Riddell MA, Byrnes GB, Leydon JA, et al. Dried venous blood samples for the detection and quantification of measles IgG using a commercial enzyme immunoassay [J]. Bull World Health Organ, 2003, 81(10): 701-707.
- [7] 伍稚梅,李秀珠,徐天强,等. 检测麻疹 IgM 抗体对诊断麻疹的意义和麻疹 IgM 阳性病例的临床表现 [J]. 中国计划免疫, 2000, 6(2): 85-87.  
WU Zi-mei, LI Xiu-zhu, XU Tian-qiang, et al. The diagnostic significance of measles IgM antibody detection by capture ELISA and the clinical manifestations of cases showing positive measles IgM [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2000, 6(2): 85-87.
- [8] 傅燕,卢亦惠,张严峻,等. 麻疹病毒 H 基因的特异性逆转录-聚合酶链反应检测 [J]. 中国计划免疫, 2001, 7(1): 20-22.  
FU Yan, LU Yi-yu, ZHANG Yan-jun, et al. Detection of measles virus hemagglutinin gene by RT-PCR [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2001, 7(1): 20-22.
- [9] 陈刚,张永乐,徐爱芳,等. 麻疹病毒荧光定量 RT-PCR 反应体系的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1797-1798.  
CHEN Gang, ZHANG Yong-le, XU Ai-fang, et al. Establishment of a reaction system of fluorescent quantitation RT-PCR to detect measles virus [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008, 18(9): 1797-1798.
- [10] WHO. Monitoring progress towards measles elimination [J]. WER, 2010, 49(3): 490-495.
- [11] 苏宁,邢启明. 2011-2013 年广州市番禺区麻疹流行病学特征分析 [J]. 热带医学杂志, 2014, 14(8): 1113-1146.  
SU Ning, XING Qi-ming. Measles epidemiological characteristics analysis and prevention Countermeasures in Panyu, Guangzhou, 2011-2013 [J]. Journal of Tropical Medicine, 2014, 14(8): 1113-1146.
- [12] 张元峰,梅岭,卫萍. 广德县 2007-2009 年麻疹疫情分析及防治对策探讨 [J]. 安徽预防医学杂志, 2010, 16(4): 261-262.  
Zhang YF, Mei L, Wei P. Epidemiological analysis of measles situation from 2007 to 2009 and its control strategies in Guangde county [J]. Anhui J Prev Med, 2010, 16(4): 261-262.

(上接第 626 页)