

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.24.003
文章编号: 1005-8982(2020)24-0013-05

临床研究·论著

改良的 qPCR 检测水痘 - 带状疱疹 病毒的临床应用*

钟婷婷¹, 任虎¹, 席瑞澜¹, 许颢²

[1. 绵阳市第三人民医院(四川省精神卫生中心)皮肤科, 四川 绵阳 621000; 2. 西南医科大学附属医院 皮肤科, 四川 泸州 646000]

摘要: 目的 分析改良的 qPCR 与水痘 - 带状疱疹病毒(VZV) DNA 试剂盒检测 VZV DNA 的检出率, 并进一步探讨其临床应用。**方法** 选取 2017 年 5 月—2017 年 7 月在西南医科大学附属医院就诊的带状疱疹患者 31 例。利用患者疱液提取标准品, 并根据 VZV DNA 保守序列 ORF59 制备引物以设计一种改良的 qPCR。对比该方法与试剂盒检测 VZV DNA 的效果后, 用该方法测定伐昔洛韦抗病毒治疗前后外周血单个核细胞(PBMC)和血浆 VZV DNA 的阳性率。**结果** 患者疱液提取的标准品大小为 395 bp。经测序并与 VZV DNA 进行比对, 标准品被匹配上的碱基数占比 99%。该 qPCR 的标准曲线决定系数 $R^2=0.9999$, 回归方程 $Y=-3.9367X+45.07$, 其中 X 为 Log 值, Y 为 Ct 值。改良的 qPCR 与 VZV DNA 试剂盒检测 PBMC 中 VZV DNA 阳性率均为 73.3%。治疗前后 PBMC 与血浆的 VZV DNA 阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。PBMC 和血浆在治疗前与治疗后的 VZV DNA 阳性率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** 改良的 qPCR 与 VZV DNA 试剂盒的检测效果相近, 且血浆可替代 PBMC 作为检测标本。该方法具有经济、快捷的优势, 值得临床推广应用。

关键词: 水痘; 疱疹, 带状; 水痘 - 带状疱疹病毒; 标本; 血浆

中图分类号: R752.1

文献标识码: A

The clinical application of modified qPCR in detection of varicella-zoster virus*

Ting-ting Zhong¹, Hu Ren¹, Rui-lan Xi¹, Yang Xu²

(1. Department of Dermatology, The Third Hospital of Mianyang & Sichuan Mental Health Center, Mianyang, Sichuan 621000, China; 2. Department of Dermatology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To compare the efficacy of the modified quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and varicella-zoster virus (VZV) DNA Kit in detecting VZV DNA, and to explore the clinical application of the modified qPCR. **Methods** Thirty-one patients with shingles who were admitted to the Affiliated Hospital of Southwest Medical University from May 2017 to July 2017 were included in the study. The standard sample was extracted from the blister fluid of the patients, and primers for the modified qPCR were designed according to the conservative sequence of VZV DNA ORF59. After comparing the efficacy of the two methods in detecting VZV DNA, we detected the VZV DNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and plasma with the modified qPCR

收稿日期: 2020-06-23

* 基金项目: 四川省卫生计生委科研课题 (No: 16PJ556)

[通信作者] 许颢, E-mail: xxf2007@163.com

before and after the antiviral therapy with valaciclovir. **Results** The standard sample extracted from the blister fluid of the patients was 395 bp in size. The matched bases of the standard sample account for 99% after being sequenced and compared with VZV DNA. In the standard curve of the qPCR assay, the coefficient of determination (R^2) was 0.9999 and the regression equation was $Y = -3.9367X + 45.07$, in which X referred to the logarithm of initial copy number of template DNA and Y was the cycle threshold (Ct) value. To compare the efficacy of modified qPCR and VZV DNA kit in detecting VZV DNA extracted from PBMC, the positive rates were both found to be 73.3%. In the comparison of positive rates in detecting VZV DNA before and after antiviral therapy, no significant difference was observed both in PBMC specimens and in plasma specimens ($P > 0.05$). Besides, in the comparison of positive rates in detecting VZV DNA between PBMC specimens and plasma specimens, there was no significant difference found both before antiviral therapy and after antiviral therapy ($P > 0.05$). **Conclusions** The modified qPCR and the VZV DNA kit showed similar efficacy in detecting VZV DNA, and plasma may replace PBMC as the test specimen. Thus, the modified qPCR is economical and time-saving, and worthy of clinical application.

Keywords: varicella-zoster virus; peripheral blood mononuclear cell; plasma; qPCR

水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 可导致水痘和带状疱疹^[1], 监测 VZV 有助于评价其传染性^[2]。VZV 是医院感染的常见病毒之一, 而血液病毒检测有助于早期诊断^[3-4]。早期持续性监测外周和中枢 VZV DNA 水平变化, 对判断病毒性脑膜炎和病毒性脑炎病情进展十分重要^[5]。目前 qPCR 试剂盒成本高昂, 难以得到普遍应用^[6], 急需一种快捷、经济、有效的 VZV 检测方法。有研究利用巢式 PCR 从病毒感染宿主血液中得到 DNA, 经纯化后作为标准品用于病毒核酸的 qPCR 检测^[7]。本研究据此设计一种改良的 qPCR, 与 VZV DNA 试剂盒进行对比, 并进一步分析其临床应用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2017 年 5 月—2017 年 7 月在西南医科大学附属医院就诊的带状疱疹患者 31 例。诊断标准参考《中国临床皮肤病学》^[8]。患者均无认知障碍, 同意参与本研究, 并接受标准伐昔洛韦抗病毒治疗方案。伐昔洛韦 (西班牙 Glaxo Wellcome, S.A. 公司, 批号 H20150209) 1 000 mg/次, 3 次/d, 连续 7 d^[9]。

1.2 主要试剂及仪器

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 及引物购自北京天根生化科技公司, PCR Master Mix (2X) 试剂购自北京博迈德生物公司, 琼脂糖凝胶试剂购自北京沃比森科技有限公司, VZV 的 qPCR 试剂盒 (Taqman 探针法) 购自上海之江生物科技股份有限公司。实时荧光定量 PCR 仪购自美国

ABI 公司, 设计引物的 Primer Premier 6.0 软件购自美国 Premier 公司。

1.3 标本采集和处理

采集带状疱疹患者的疱液标本, 利用离心柱法提取其 DNA。采集临床 VZV 感染患者的外周血标本, 分离出外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 和血浆, 用离心柱法提取 PBMC 和血浆中的 DNA。

1.4 巢式 PCR 和凝胶电泳制备标准品

标准品引物 1 正向引物: 5'-GATCTCGGGTTCGCCTTTA-3', 反向引物: 5'-CCAGAGCATTTCGGTGTGTA-3', 长度 489 bp; 标准品引物 2 正向引物: 5'-ATCTCGGGTTCGCCTTTAC-3', 反向引物: 5'-TGGCATAACACCACCGTCT-3', 长度 404 bp; 标准品引物 3 正向引物: 5'-CTCGGGTTCGCCTTTA-3', 反向引物: 5'-ACACCACCGTCTAGTCTTAA-3', 长度 395 bp。巢式 PCR 反应体系: 疱液 DNA 样品 5 μ l, 正反向引物各 1 μ l, 2 \times MasterMix 12.5 μ l, ddH₂O 5.5 μ l; 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 共 30 个循环。DNA 产物在 4 $^{\circ}$ C 下保存。琼脂糖凝胶电泳步骤: 配置 1.5% 琼脂糖, 装入锥形瓶放入微波炉中加热溶解, 待冷却后倒入模具, 常温下放置 30 min, 拔除模具卡槽并将琼脂糖凝胶放入 1 \times TAE, 加入 Marker I 和 DNA 产物在 120 V 下电泳约 20 min, 取出琼脂糖胶块并在紫外灯下显影, 胶块上 300 ~ 400 bp 为所需标准品的区间, 切下该区间的琼脂糖, 通过胶回收得到标准品。采用紫外分光光度计检测标准品浓度, 标准品定量为 6.02×10^{23} (拷

贝 /mol) × 质量浓度 (g/ml) / (DNA 长度 × 660)。

1.5 改良的 qPCR

根据 VZV DNA 保守序列 ORF59 设计出正向引物: 5'-CGGTTGGGTTGCTTCTGTG-3', 反向引物: 5'-GCGACGAACCGTAAGCGTGG-3', 长度 1 955 bp。改良的 qPCR 反应体系: VZV DNA 样品 1 μl (梯度稀释的标准品及 PBMC、血浆中提取的 DNA)、正反向引物各 0.3 μl、MasterMix (SYBR Green 法) 10 μl 和 ddH₂O 8.4 μl; 反应条件: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 40 个循环。qPCR 检测下限为 15.5 拷贝 /μl。熔解曲线: 95℃ 变性 1 min, 55℃ 冷却 1 min, 使 DNA 双链充分结合, 最后从 55℃ 逐步加热至 98℃, 每一步增加 0.5℃ 并保持 10 s, 同时采集荧光信号。

1.6 VZV DNA 试剂盒

采用 Taqman 探针法 qPCR, 反应体系: 混合液 35.0 μl、酶 (Taq+UNG) 0.4 μl 和样品 4.0 μl (梯度稀释的标准品及 PBMC、血浆中提取的 DNA)。反应条件: 94℃ 预变性 2 min, 93℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 60 s, 共 40 个循环。

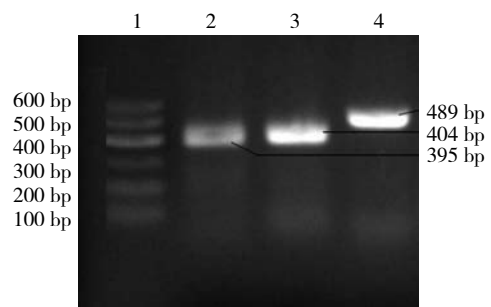
1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计数资料以率 (%) 表示, 比较用 Fisher 确切概率法, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 标准品分析

在 3 次巢式 PCR 反应中, 分别加入标准品引物 1、标准品引物 2 和标准品引物 3。在第 1 次 PCR 反应中利用疱液中的 VZV DNA 作为模板, 得到大小为 489 bp 的产物 1; 在第 2 次 PCR 反应中以产物 1 作为模板, 得到大小为 404 bp 的产物 2; 在第 3 次 PCR 反应中以产物 2 为模板, 得到大小为 395 bp 的产物 3, 即标准品。以上产物在凝胶电泳实验中均无杂带出现 (见图 1)。标准品经测序, 并与 VZV DNA 进行比对, 发现两者匹配程度高, 且匹配片段相似性良好, 标准品被匹配的碱基数占比为 99% (见图 2)。故利用巢式 PCR 制备的产物 3 纯度、特异性和稳定性均良好, 可以用作 qPCR 实验的标准品。



1: Marker; 2 ~ 4: PCR 扩增产物

图 1 3 次巢式 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Sequence ID: Query_74421 Length: 124884 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
627 bits(339)	0.0	344/346(99%)	2/346(0%)	Plus/Plus
Query 12	ACG-AATGTCGAC-ATTCCGAAATGGAACACGGGACAATGGCGACGGATGCGCGTGTGTT			69
Sbjct 100363	ACGAAATGTCGACAAATTCGAAATGGAACACGGGACAATGGCGACGGATGCGCGTGTGTT			100422
Query 70	AGCACCAGATGACATCTTGAATTCGGTTGGGTTGTCTTCTGTGCATGCGCACCCACAGC			129
Sbjct 100423	AGCACCAGATGACATCTTGAATTCGGTTGGGTTGTCTTCTGTGCATGCGCACCCACAGC			100482
Query 130	ATAAAAACTAACCCTGTACGGTTCTCGCATAAACCCTCTGTAGCACGCGTTGCACCAGCCGC			189
Sbjct 100483	ATAAAAACTAACCCTGTACGGTTCTCGCATAAACCCTCTGTAGCACGCGTTGCACCAGCCGC			100542
Query 190	CCCCAGCCTAAGTATACATGCGACCCCGGAGTCCCGCGACGAACCGTAAGCGTGGTATTC			249
Sbjct 100543	CCCCAGCCTAAGTATACATGCGACCCCGGAGTCCCGCGACGAACCGTAAGCGTGGTATTC			100602
Query 250	AGCAATAACACCCCTGCCTTGCCCAACTCTCCAGGCATCCGTGAGTGGGCGGAGTCATA			309
Sbjct 100603	AGCAATAACACCCCTGCCTTGCCCAACTCTCCAGGCATCCGTGAGTGGGCGGAGTCATA			100662
Query 310	TTTGGGTATGATTCCATGAGGGCCGCAAAAATATTTTTAAGACTAG		355	
Sbjct 100663	TTTGGGTATGATTCCATGAGGGCCGCAAAAATATTTTTAAGACTAG		100708	

图 2 Blast 检测标准品碱基与 VZV DNA 碱基的配对

2.2 改良的 qPCR 反应的标准曲线、扩增曲线及熔解曲线

以巢式 PCR 制备的产物 3 作为标准品, 并梯度稀

释 (1 × 10⁰、1 × 10^{1/2}、1 × 10¹、1 × 10²、1 × 10³), 然后采用改良的 qPCR 进行检测。其中标准曲线决定系数 R²=0.9999, 回归方程 Y=-3.9367X+45.07。见图 3 ~ 5。

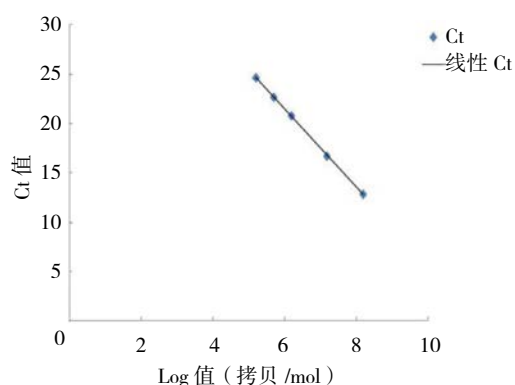


图 3 改良的 qPCR 反应的标准曲线

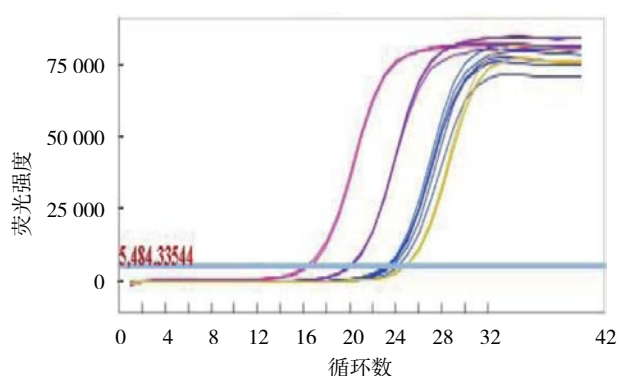


图 4 改良的 qPCR 反应的扩增曲线

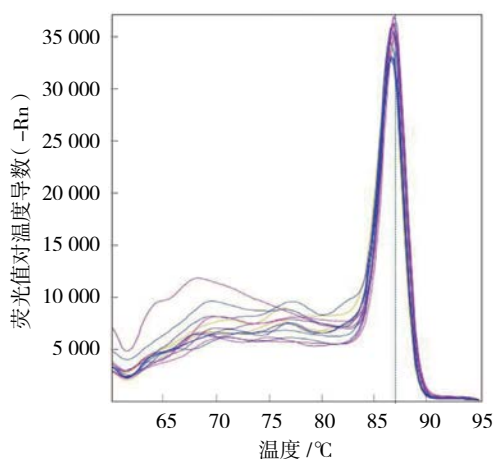


图 5 改良的 qPCR 反应的熔解曲线

2.3 两种 VZV DNA 检测方法比较

随机抽取 15 例带状疱疹患者, 分离出 PBMC 标本, 分别采用改良的 qPCR 与 VZV DNA 试剂盒检测 PBMC 中 VZV DNA 阳性率。2 种方法的阳性率均为 73.3% (11/15), 经 Fisher 确切概率法检验, 差异无统计学意义 ($P=1.000$)。2 种检测方法效果相近。

2.4 2 种标本治疗前后的 VZV DNA 阳性率变化

随机抽取 22 例带状疱疹患者, 分离出 PBMC 和

血浆标本, 采用改良的 qPCR 检测伐昔洛韦抗病毒治疗前后 VZV DNA 的阳性率。在治疗前、治疗后, PBMC 与血浆的 VZV DNA 阳性率比较, 经 Fisher 确切概率法检验, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 表明血浆可替代 PBMC 进行 VZV DNA 的检测。PBMC、血浆标本治疗前与治疗后 VZV DNA 阳性率比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 表明伐昔洛韦抗病毒治疗方案未降低 VZV DNA 水平。见表 1。

表 1 2 种标本治疗前后的 VZV DNA 阳性率比较

[$n=22$, 例 (%)]

标本	治疗前	治疗后	P 值
PBMC	17 (77.3)	10 (45.4)	0.062
血浆	14 (63.6)	4 (31.8)	0.069
P 值	0.322	0.353	

3 讨论

VZV 属于人类疱疹病毒 3 型, 其 DNA 相对分子质量大小约为 12 000 bp。目前普遍使用 qPCR 进行 VZV DNA 的定量检测, qPCR 操作简便, 敏感性和特异性高, 其标准品可为质粒和纯化的 DNA^[10]。DWORKIN 等^[11]在进行 VZV DNA 的 qPCR 检测时, 使用 SYBR Green I 作为染料, 选用 VZV DNA 的保守区域 ORF59 设计特异性引物, 并采用纯化的病原体作为标准品。本实验中 qPCR 所用的染料和引物均与之相同, 但独创之处在于笔者使用巢式 PCR 制备标准品, 并通过凝胶电泳及基因序列比对, 验证了所得 DNA 片段的纯度和特异性。而质粒作为标准品, 制作工艺复杂且成本较高, 所以本研究选取上述 DNA 片段作为标准品^[12]。另外, 带状疱疹患者 VZV DNA 检测结果表明, PBMC 与血浆标本的阳性检出率无差异, 鉴于血浆的获取更加便捷, 所以临床或许可以采用血浆代替 PBMC。国外的研究表明, 血液中大约 39% VZV DNA 存在于血液细胞外成份中, 这也是血浆能够用于检测 VZV DNA 的理论依据之一^[13]。

国外有研究表明, 带状疱疹患者留取皮肤病变、PBMC 和血浆标本进行 VZV 检测, 所有患者检测阳性^[14]。本研究从带状疱疹患者皮肤病变中获得标准品进行 qPCR, 从 PBMC 和血浆中检测 VZV DNA 效果良好, 且抗病毒治疗前后 PBMC 和血浆标本中 VZV DNA 的阳性检出率未显著下降, 通过 Taqman 探针法也得出了相同结果, 这或许与抗病毒治疗时间和随访时间

较短有关^[9]。笔者下一步研究将扩大样本量、延长抗病毒治疗时间和随访时间,以观察 VZV DNZ 的阳性检出率变化。

目前临床对于带状疱疹的抗病毒治疗往往需要等到疱疹出现并确诊带状疱疹后才开始进行,而疱疹的出现标志着带状疱疹病程已进入中后期,故难以实现抗病毒疗效的最大化。最近研究表明,若带状疱疹患者出现发热、疲劳不适等全身症状,则提示病毒血症,结合血液病毒检测阳性结果,即具备抗病毒治疗指征^[15]。带状疱疹合并病毒血症,容易导致带状疱疹患者预后不良,且外周血 VZV 病毒载量与带状疱疹后遗神经痛发生率呈正相关^[16]。带状疱疹患者合并病毒血症的早期抗病毒治疗有助于缩短病变愈合时间;带状疱疹患者发病 72 h 内实施抗病毒治疗,能够实现疗效的最大化,显著降低外周血 VZV DNA 水平,并有助于缓解带状疱疹相关性疼痛^[14]。

值得注意的是,带状疱疹患者唾液中 VZV DNA 的拷贝数和带状疱疹相关性疼痛亦存在关联^[13, 17]。通过接触带状疱疹患者的唾液及呼吸道分泌物,非免疫人群可感染 VZV 并发生带状疱疹^[18],故带状疱疹患者咽拭子或唾液中 VZV DNA 的分布情况和诊断价值,以及带状疱疹发病 72 h 内抗病毒治疗降低唾液等分泌物中 VZV DNA 的效果等尚需要进一步研究。另外,对于患有水痘且合并病毒血症的孕妇,VZV 可透过胎盘屏障并对胎儿的生长发育造成不良影响^[19]。下一步笔者将研究带状疱疹孕妇患者合并病毒血症对胎儿的影响,并探索咽拭子和唾液标本对带状疱疹的诊断价值等,以深入了解带状疱疹的致病性和传染性。

参 考 文 献:

- [1] LUDLOW M, KORTEKAAS J, HERDEN C, et al. Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed[J]. *Neuropathology*, 2016, 131(2): 159-184.
- [2] JAMES S F, CHAHINE E B, SUCHER A J, et al. Shingrix: the new adjuvanted recombinant herpes zoster vaccine[J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 2018, 52(7): 673-680.
- [3] DAYAN P R. Herpes zoster—typical and atypical presentations[J]. *Postgrad Med*, 2017, 129(6): 567.
- [4] IGLAR K, KOPP A, GLAZIER R H. Herpes zoster as a marker of underlying malignancy[J]. 2013, 7(2): 68-73.
- [5] 王维, 李佳, 王立利, 等. 振幅整合脑电图与磁共振成像对儿童病毒性脑炎急性期诊断及预后的评估价值分析[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2019(2): 81-84.
- [6] 张馨月, 钟婷婷, 钟建桥, 等. 带状疱疹患者疱液及外周血病毒载量与血浆 S100 β 和神经元特异性烯醇化酶水平的研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2017, 50(2): 109-112.
- [7] KIM E J, BAUER C, GREVELDING C G, et al. Improved PCR/nested PCR approaches with increased sensitivity and specificity for the detection of pathogens in hard ticks[J]. *Ticks Tick Borne Dis*, 2013, 4(5): 409-416.
- [8] 赵辨. 中国临床皮肤病学[M]. 第 2 版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2010: 391-398.
- [9] KIM S R, KHAN F, TYRING S K. Varicella zoster: an update on current treatment options and future perspectives[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2014, 15(1): 61-71.
- [10] DHANASEKARAN S, DOHERTY T M, KENNETH J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification[J]. *J Immunol Methods*, 2010, 354(1/2): 34-39.
- [11] DWORKIN L L, GIBLER T M, van GELDER R N. Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis[J]. *Archives of Ophthalmology*, 2002, 120(11): 1534-1539.
- [12] 朱振洪, 李金辉, 万海同. 不同荧光定量 PCR 分析方法检测大鼠脑缺血再灌注损伤中 Caspase-3 基因的表达研究[J]. *激光生物学报*, 2016, 20(3): 388-393.
- [13] ZERBONI L, SEN N, OLIVER S L, et al. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis[J]. *Nature Reviews Microbiology*[J], 2014, 12(3): 197-210.
- [14] QUINLIVAN M L, AYRES K L, KELLY P J, et al. Persistence of varicella-zoster virus viraemia in patients with herpes zoster[J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(2): 130-135.
- [15] BREWER E C, HUNTER L. Acute liver failure due to disseminated varicella zoster infection[J]. *Case Reports Hepatol*, 2018, 2018: 1-5.
- [16] GALETTA K M, GILDEN D. Zeroing in on zoster: a tale of many disorders produced by one virus[J]. *J Neurol Sci*, 2015, 358(1/2): 38-45.
- [17] WARREN-GASH C, FORBES H, MAPLE P, et al. Viral load and antibody boosting following herpes zoster diagnosis[J]. *J Clin Virol*, 2018(103): 12-15.
- [18] ROONEY B, CRUCIAN B E, PIERSON D, et al. Herpes virus reactivation in astronauts during spaceflight and its application on earth[J]. *Front Microbiol*, 2019(10): 1-9.
- [19] 刘爱花. 67 例妊娠期带状疱疹的治疗及对妊娠结局的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(8): 143-144.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 钟婷婷, 任虎, 席瑞澜, 等. 改良的 qPCR 检测水痘-带状疱疹病毒的临床应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(24): 13-17.