

环介导等温扩增法在登革病毒临床检测中的运用

周旋 钟丽梅 胡亮杉 林茂锐 曹东林

【摘要】 目的 探讨利用环介导等温扩增(LAMP)快速诊断登革病毒的可行性。**方法** 收集 226 例登革热患者和 30 名健康体检者的外周血标本,分离血清,分别使用血清特异性抗体、LAMP 及实时定量 PCR 检测登革病毒 RNA 载量,统计分析各种检测方法应用情况。**结果** 226 例登革热患者血清样本中,登革病毒血清抗体阳性率为 84.5%,PCR 检测登革病毒 RNA 阳性率为 95.6%,LAMP 检测登革病毒阳性率 96.9%,PCR 及 LAMP 所检测的登革病毒血清分型均以 1 型为主。3 种方法对 30 名健康体检者的登革病毒检测结果均为阴性。在登革病毒 $10^4 \sim 10^8$ copies 的范围内,随着病毒载量的增加,LAMP 的反应时间随之缩短。**结论** LAMP 可用于登革病毒的快速检测。

【关键词】 登革病毒;环介导等温扩增;快速检测

Application of loop-mediated isothermal amplification in clinical detection of dengue virus Zhou Xuan, Zhong Limei, Hu Liangshan, Lin Maorui, Cao Donglin. Department of Laboratory Medicine, Guangdong Second Provincial General Hospital, Guangzhou 510317, China

Corresponding author, Cao Donglin, E-mail: caodl@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the feasibility of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) applied in the rapid diagnosis of dengue virus. **Methods** Peripheral blood samples were collected from 226 dengue fever patients and 30 healthy subjects during physical examination. After serum isolation, the loading capacity of dengue virus RNA was measured by serological antibody-specific method, LAMP and real-time quantitative PCR, respectively. The detection results among three approaches were statistically compared. **Results** Among 226 serum samples, the positive rate was 84.5% detected by serological antibody-specific method, 95.6% for real-time quantitative PCR and 96.9% for LAMP. Both real-time quantitative PCR and LAMP mainly detected type I dengue virus. Negative results of dengue virus were obtained in the healthy individuals by three techniques. Within the range of 10^4 - 10^8 copies of dengue virus, the reaction time of LAMP was shortened along with the increasing loading capacity of dengue virus. **Conclusion** LAMP can be utilized for rapid detection of dengue virus.

【Key words】 Dengue virus; Loop-mediated isothermal amplification; Rapid detection

登革热是由登革病毒感染所致的急性传染病。登革病毒属黄病毒科,含单股线状 RNA,主要通过埃及伊蚊和白纹伊蚊传播^[1]。目前实验室检测登革病毒的方法主要包括病毒分离、血清学检测及核酸检测^[2-3]。运用细胞培养分离病毒的方法因耗费的时间长、操作要求高、敏感度低,已较少用于临床样本的检测中^[4-6]。血清学方法有的比较耗时,有的不够敏感,而且与其他黄病毒也有交叉反应的可能。目前核酸检测技术发展极为迅速,早期即有多种方法应用于登革病毒检测,然而对设备和技术的要求较高限制了其使用范围。环介导等温扩

增(LAMP)仅需到达某一恒定温度就能扩增反应,具有鉴定简便、成本低廉、设备要求低、特异度高、扩增高效的优点,在鉴定各种细菌与病毒中得到迅猛发展,应用该方法检测登革病毒在国外早有报道,而国内报道相关较少^[7]。为此,本研究探讨 LAMP 检测登革病毒应用于我国临床的可行性。

材料与方 法

一、血清样本的收集

2014 年 7 月至 2015 年 12 月我院收治的门诊发热患者中,经登革抗体检测与登革病毒 RNA 定量

检测，并根据 2009 年 WHO 颁布指南初诊为登革热 226 例。其中男 138 例、女 88 例，年龄 5 个月~93 岁、中位年龄 32 岁。采集患者全血置于干燥管中，离心，弃去有溶血现象的血液，再以 3 600 转/分离心 10 min，每例患者血清分装为 2 管，每管至少 300 μ l 样本，储存于 -80℃ 冰箱备用。同时，使用随机数字表法选取 2015 年 12 月在我院体检中心进行健康体检的 30 名健康体检者，取其血清，作为阴性对照使用，其中男 20 名、女 10 名，年龄 18~65 岁、中位年龄 32 岁。2 组受检者的性别构成及年龄比较差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。本研究经医院医学伦理委员会批准，受试者均已签署知情同意书。

二、标准登革病毒株制备与核酸提取

本研究采用的病毒株由南方医科大学病原生物学系 P3 实验室赵卫教授馈赠，病毒株的型别分别为：1 型夏威夷株，2 型新几内亚株，3 型 H87 株，4 型 H241 株。采用 QIAGEN 病毒 RNA 提取试剂盒提取 RNA，并采用实验室已存的标准质粒和探针对提取的 RNA 进行绝对定量，以标准株为阳性对照。

三、登革病毒的血清特异性抗体检测

采用胶体金快速免疫层析法(试剂盒由广州万孚生物技术有限公司提供)对登革病毒非结构蛋白 1(NS1) IgG/IgM 抗体进行定性检测，当样品中含有登革病毒 IgG/IgM 抗体，且浓度高于最低检出限时，将在检测区 T1 或 T2 形成肉眼可见的红色反应线，此时结果为登革病毒 IgG 或登革病毒 IgM 抗体阳性，相反，当样品中不含有登革病毒 IgG/IgM 抗体或浓度低于最低检出限时，则检测区 (T1、T2) 无红色反应线出现，此时结果为登革病毒

IgG/IgM 抗体阴性。无论样本中是否含有登革病毒 IgG/IgM 抗体，在质控区 (C) 都会形成一条红色的反应线。

四、登革病毒 RNA 的 PCR 定量检测

使用 Taqman 探针法，采用 OMIGA 病毒 RNA 提取试剂盒提取病毒 RNA，将所得 RNA 分装后存于 -70℃ 备用。同时提取正常人血清用作阴性对照，标准毒株用于阳性对照。采用与检测标准株相同的方法对患者与正常人血清 RNA 样本进行检测定量。试剂盒的登革病毒最低检出限为 10 copies。

五、登革病毒 RNA 的 LAMP 分析

采用迪澳生物公司所提供的登革病毒型特异性 LAMP 试剂盒及配套仪器检测前述提取的 RNA 样本，将已知病毒载量各型标准毒株倍比稀释行 LAMP 检测，制作出对应的标准曲线图。试剂盒的登革病毒最低检出限为 10 copies。

六、统计学处理

所采集的数据采用 Excel 进行数据处理，使用 SPSS 20.0 分析。组间年龄比较行秩和检验，性别构成行 χ^2 检验，登革病毒阳性率以百分比表示。

结 果

一、不同检测方法对登革病毒诊断结果分析

226 例登革热患者血清样本中，登革病毒血清抗体阳性率为 84.5% (191/226)，PCR 检测登革病毒 RNA 阳性率为 95.6% (216/226)，LAMP 检测登革病毒阳性率 96.9% (219/226)，PCR 及 LAMP 所检测的登革病毒血清分型均以 1 型为主，见表 1。30 名健康体检者的登革病毒检测结果均为阴性。

表 1		不同检测方法的登革病毒诊断结果分析					例（%）	
受检对象	血清型	例数	阳性样本					
			抗体			RNA		
			IgM	IgG	IgM + IgG	PCR	LAMP	
登革热患者	登革病毒 1 型	226	123	30	38	190（84.1）	196（86.7）	
	登革病毒 2 型					8（3.5）	8（3.5）	
	登革病毒 3 型					0	0	
	登革病毒 4 型					14（6.2）	15（6.6）	
健康体检者		30	0	0	0	NA	NA	

注：NA 为未检出

二、登革病毒载量的 LAMP 检测标准曲线分析在 $10^4 \sim 10^8$ copies 时，随着登革病毒载量的增

加，LAMP 的反应时间随之缩短，见图 1。当登革病毒载量小于或大于上述范围时，则无法得出良好

的标准曲线。

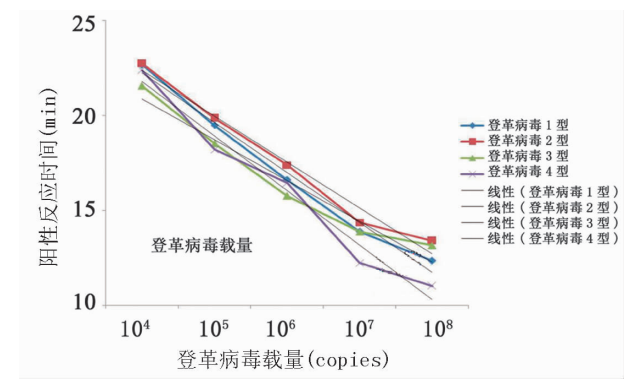


图 1 登革病毒载量的 LAMP 检测标准曲线

讨 论

近年来，登革热在世界范围内的大规模爆发，成为流行最广的蚊媒疾病，约有 3.9 亿热带与亚热带地区的人群受到登革病毒感染的威胁，其中有约 500 000 例病情严重的患者需要住院治疗^[2]。广东省由于其亚热带气候特点及伊蚊的分布成为登革病毒流行的重灾区。广州市自 1978 年以来发生 10 次登革热流行，4 种血清型均曾出现。2014 年 7 月以来，登革热在广东省暴发，据不完全统计共有 45 189 例登革热确诊患者及 6 例死亡病例^[3]。至 2015 年登革热仍有小规模流行。登革热的暴发和流行给社会带来很大负担，目前仍无有效的疫苗和特异有效的药物用于预防和治疗登革病毒的感染，早期发现和治疗干预可降低其致死性，因此临床需要寻找早期快速诊断登革病毒感染的方法。

虽然血清特异性抗体可对登革病毒初次或再次感染作出初步判断，并具有诊断时间快、操作简便等优点，但该方法在病例散发情况下或对无症状人群检测时，出现的假阳性率比较高，而且部分患者在感染后 7~10 d 内的抗体水平也较低，只有当患者症状持续出现时，再次采样测试，才会有较好的效果^[4-5]。本研究，血清登革病毒抗体检测的阳性率为 84.7%，低于 RNA 的检测率，IgM 阳性及 IgM/IgG 双阳性者的血清登革病毒 RNA 检测均为阳性，少数单纯 IgG 阳性的血清并未检测出核酸，这可能与抗体形成时间及病毒扩增复制的时间差有关。

过去十年来，各种各样的核酸扩增技术包括 RT-PCR、巢式 PCR、Taqman 探针实时定量 PCR、SYBR Green I 实时定量 PCR 以及依赖核酸序列的扩增技术 (NASBA) 等被广泛地用于登革病毒核酸的检测^[8-12]。然而，上述核酸检测方法大多对扩增

仪器要求较高，或者对扩增产物的检测要求高，使得这些检测方法难以普及，特别是在社区卫生服务中心、私人诊所等。LAMP 因其只需一恒定温度就能扩增反应，扩增产物鉴定简便，成本低廉，设备要求低，受到了 WHO、各国学者和相关政府部门的关注。本研究采用的 LAMP 与 Taq-man 探针实时定量 PCR 相比，其最低检出限均为 10 copies，且 2 种方法的特异度均较好，在绝对定量的能力上，LAMP 在登革病毒 10⁴~10⁸ copies 时随着病毒载量的上升，出峰时间缩短。因此，LAMP 法在偏远地区或条件较差的卫生服务中心以及现场快速检测方面能够得以广泛应用，而 Taq-man 探针 RT-PCR 虽然能够很好地定量检测登革病毒 RNA，但成本昂贵、检测耗时较长以及对实验环境要求高，限制了其推广使用。

RT-LAMP 恒定温度扩增反应具有鉴定简便、高特异度、高效扩增的优点，在我国登革病毒检测的领域正逐步进入市场，然而，该技术对引物设计的要求极高，而病毒又存在高变异的特点，使其在应用范围上存在局限性，而高的扩增效率导致实验区域极易污染，也有可能提高其假阳性率。这些不足将是此项实验技术改进和完善的主要方向。

综上所述，对于登革病毒的早期诊断，基层卫生服务中心以及有条件的私人诊所应该普及使用快速免疫层析的方法初步判断病情，对于阳性患者结合病情应尽快送往上级医疗机构完善检查并给予对应的支持治疗；对于快速免疫层析检测阴性而临床症状极度怀疑，结合当时的流行病学状况，应该尽早进行 RNA 检测，推荐使用 RT-LAMP 检测方法，如此才可使患者的病情能够尽早确诊，尽早得到相应治疗，流行病学的监测与控制也才能够更加全面地实施。

参 考 文 献

[1] Jarman RG, Nisalak A, Anderson KB, Klungthong C, Thaisomboonsuk B, Kaneechit W, Kalayanaroj S, Gibbons RV. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84 (2): 218-223.

[2] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GR, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013, 496 (7446): 504-507.

[3] Zhao H, Zhao L, Jiang T, Li X, Fan H, Hong W, Zhang Y, Zhu Q, Ye Q, Tong Y, Cao W, Zhang F, Qin C. Isolation and

- characterization of dengue virus serotype 2 from the large dengue outbreak in Guangdong, China in 2014. *Sci China Life Sci*, 2014, 57 (12): 1149-1155.
- [4] 何似, 陈润, 李世清, 吴护华, 陈燕, 徐珊, 杨建娜, 陈敏红. 快速免疫色谱测试法与免疫荧光法检测登革病毒 IgG 抗体的比较. *中国人兽共患病杂志*, 2001, 17 (2): 56-58.
- [5] 徐建敏, 何丽娟, 狄飏. 登革热抗体二种检测方法的比较. *中国人兽共患病杂志*, 2002, 18 (4): 92-93.
- [6] 秦鄂德, 秦成峰, 姜涛. 登革病毒和登革病毒病. 北京: 科学出版社, 2008, 20-53.
- [7] Parida M, Horioka K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, Islam MA, Inoue S, Hosaka N, Morita K. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (6): 2895-2903.
- [8] Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *J Virol Methods*, 1998, 72 (1): 27-41.
- [9] Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1992, 30 (3): 545-551.
- [10] Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (8): 2543-2547.
- [11] 王涛, 凌士奇, 黄挺, 黄捷. 实时定量 PCR 技术在角膜移植供体乙型肝炎病毒筛查中的应用. *新医学*, 2011, 42 (11): 720-722.
- [12] Sudiro TM, Ishiko H, Green S, Vaughn DW, Nisalak A, Kalayanaroj S, Rothman AL, Raengsakulrach B, Janus J, Kurane I, Ennis FA. Rapid diagnosis of dengue viremia by reverse transcriptase-polymerase chain reaction using 3'-noncoding region universal primers. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 56 (4): 424-429.

(收稿日期: 2017-06-15)

(本文编辑: 林燕薇)

