

[15] Cordts EB, Santos MC, Peluso C, et al. COMT polymorphism influences decrease of ovarian follicles and emerges as a predictive factor for premature ovarian insufficiency[J]. J Ovarian Res, 2014, 7(1): 47-53.

[16] Paracchini V1, Pedotti P, Raimondi S, et al. A common CYP1B1 polymorphism is associated with 2-OHE1/16-OHE1 urinary estrone ratio[J]. Clin Chem Lab Med, 2005, 43(7): 702-706.

[17] Stubelius A, Erlandsson MC, Islander U. Immunomodulation by the estrogen metabolite 2-methoxyestradiol[J]. Clin Immunol, 2014, 153(1): 40-42.

[18] Faupel-Badger JM, Fuhrman BJ, Xu X, et al. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(2): 292-300.

[19] Lee JS, Ettinger B, Stanczyk FZ, et al. Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(36): 3791-3797.

[20] Santen RJ, Demers L, Ohorodnik S, et al. Superiority of gas chromatography/tandem mass spectrometry assay (GC/MS/MS) for estradiol for monitoring of aromatase inhibitor therapy[J]. Steroids, 2007, 72(6): 666-671.

[21] Stanczyk FZ, Lee JS, Santen RJ. Standardization of steroid hormone assays: why, how, and when[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(16): 1713-1719.

[22] Kabat GC, O'Leary ES, Gammon MD, et al. Estrogen metabolism and breast cancer[J]. Epidemiology, 2006; 17(1): 80-82.

[23] Li J, Kang Y, Wei L, et al. Tyrosine Phosphatase Shp2 Mediates the Estrogen Biological Action in Breast Cancer via Interaction with the Estrogen Extranuclear Receptor[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102847.

[24] Smith AJ, Phipps WR, Thomas W, et al. The effects of aerobic exercise on estrogen metabolism in healthy premenopausal women[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013, 22(5): 756-764.

[25] Huang HJ1, Chiang PH, Chen SH. Quantitative analysis of estrogens and estrogen metabolites in endogenous MCF-7 breast cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(20): 1748-1756.

(收稿日期: 2014-11-10)

• 综 述 •

## 恒温扩增技术在病原体检测中的应用\*

罗茗月 综述, 熊礼宽 审校

(深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518000)

**关键词:** 恒温扩增技术; 病原体; 感染性疾病

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 07. 046

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2015)07-0973-03

感染性疾病是最重要的公共健康卫生问题之一,据世界卫生组织统计,全世界每年有 1 300 万以上的人群死于感染性疾病<sup>[1]</sup>。感染性疾病主要由细菌和病毒引起,其次是真菌和寄生虫。某些不同的病原体感染可引起临床症状相似,但致病机制、发病进程完全不同,需要采取不同治疗方法。早期及时确定感染原因,合理使用抗菌药物可使严重感染的生存率下降 5 倍<sup>[2]</sup>。因此,对于发病率和病死率非常高的感染性疾病,早期明确诊断十分重要,不仅指导临床有效用药,还阻止耐药病原体蔓延,所以建立快速、准确、敏感且低廉的病原体诊断方法颇为重要。

直接涂片染色显微镜检查、培养是病原体检查的传统方法,其操作简单、费用低,但敏感性差,耗时长。血清学方法与培养方法同样敏感差,检测过程长,易导致延误治疗。核酸扩增技术特异性和敏感度虽比传统方法有了很大的提高,操作简单,易于标准化且快速,可直接分析病原体的基因序列,进行耐药性、毒力标志以及特异性分型,还可以进行定量。PCR 是最早的核酸扩增技术,其发明者 Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖<sup>[3]</sup>。虽然 PCR 方法在临床实验室已经广泛应用,但也存在一些不足,如标本中抑制物导致扩增失败,容易污染,所需设备昂贵,反应复杂且需要专业技术人员,限制了其在很多领域尤其是偏远地区的应用<sup>[3]</sup>。所以,急需研发能克服

这些缺陷的简单、快速、成本低廉且易携性好的新型分子诊断技术。

近年来,随着对体内 DNA、RNA 合成过程和一些辅助蛋白作用机制的不断深入,在恒温下扩增目的片段的技术应运而生,且表现出极大的优势。PCR 反应严格的热循环温度需要专用设备,而恒温扩增反应所需要的扩增温度由水浴锅、金属恒温器或保温箱即可提供,成本低廉;对标本要求低,血液、尿液、痰液和分泌物拭子等标本可能含有抑制 PCR 反应的多种杂质,但恒温扩增技术可以耐受这些抑制剂,标本无需经过复杂的核酸提取过程即可进行扩增;敏感性和特异性与 PCR 相当,甚至高于 PCR;此外,无需经过温度变化的时间间隔,反应快。

根据不同反应酶和引物、反应方式及原理,恒温扩增方法可分为核酸序列依赖的恒温扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、环介导的恒稳扩增(loop-mediated amplification, LAMP)、依赖解旋酶的恒温扩增技术(helicase-dependent amplification, HDA)、滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)和转录介导的扩增(transcription mediated amplification, TMA)等。其中 NASBA 和 TMA 基于 RNA 的转录, LAMP 和 RCA 基于 DNA 聚合酶的链置换活性, HAD 则是基于解旋酶的解链功能。不同类型的恒温扩增各具特点,目前已

\* 基金项目: 深圳市知识创新计划基础研究项目(JC20140302120929)。 作者简介: 罗茗月,女,检验技师,主要从事常见病原体的快速诊断技术及临床应用研究。 △ 通讯作者, E-mail: xionglk@sina. cn。

经有多种商品化试剂应用于临床病原体检测。本文就应用最广泛的 NASBA、LAMP 和 HDA 的原理、特点及其在病原体检测中的应用综述如下。

## 1 核酸序列依赖扩增

**1.1 NASBA 反应原理** NASBA 技术是一种在恒定温度条件下模拟体内逆转录过程的 RNA 连续扩增方法。反应体系包括正向引物(P1)、反向引物(P2)、逆转录酶、RNaseH 和依赖 DNA 的噬菌体 T7 RNA 聚合酶。P1 由两部分组成,分别与目标 RNA 3' 端和 T7 启动子序列互补。当 P1 与 RNA 结合后,在逆转录酶的作用下合成互补 DNA 链,RNaseH 无需经过高温变性即可降解 RNA-DNA 上的 RNA 链,随后 P2 结合到单链 DNA,合成包含 T7 启动子序列的双链 DNA 中间产物。上述过程完成以后,反应进入扩大阶段。依赖于 DNA 的 T7 RNA 聚合酶识别双链 DNA 上的 T7 启动子序列,合成大量 RNA 链,与 P2 结合,通过逆转录酶合成互补 DNA 链,RNaseH 将 RNA-DNA 上的 RNA 链降解,产生的单链 DNA 又作为 P1 的模板进行下一步的循环反应<sup>[4]</sup>。产物可通过凝胶电泳、荧光探针或化学发光方法检测<sup>[3]</sup>。此方法主要用来扩增 RNA,经过改良设计也可扩增 DNA,但过程复杂,应用较少。

## 1.2 NASBA 技术优势

**1.2.1 扩增效率非常高,耗时短** T7RNA 聚合酶能从一条 DNA 模板扩增产生 10-103RNA 拷贝,这种高效的 RNA 拷贝生成方式,使得 NASBA 反应呈指数增长,远远快于 PCR 一变二的过程;在恒温条件下,反应没有温度变化的时间间隔,中间产物可以快速进入下一步反应。故 NASBA 扩增效率高,一次扩增可以得到 1 012 次拷贝<sup>[1]</sup>。

**1.2.2 扩增靶基因是 RNA,独具优势** 污染是 PCR 反应最常见的问题,由于 NASBA 的扩增产物是 RNA,RNA 比 DNA 更容易在环境中降解,这就大大降低了操作污染和出现假阳性结果的可能性<sup>[5]</sup>。与 DNA 相比,RNA 的浓度高,约为基因组或质粒 DNA 的 1 000 倍,所以检测敏感性更高。

**1.2.3 假阴性率低** 与 Taq DNA 聚合酶相比,T7RNA 聚合酶受标本中的抑制剂作用较小,所以 NASBA 更加敏感,假阴性率低。

**1.3 NASBA 在病原体检测中的应用** NASBA 扩增 RNA 的特点使其特别适合于 RNA 病毒的检测,如肠病毒、流感病毒、呼吸道合胞病毒、人类免疫缺陷病毒 1 型、副流感病毒、诺如病毒、偏肺病毒、鼻病毒、丙型肝炎病毒和 SARS 样冠状病毒等等<sup>[6]</sup>。NASBA 联合化学发光方法(NASBA-ECL)检测丙型肝炎病毒和人类免疫缺陷病毒 1 型已通过 FDA 批准。禽流感病毒、口蹄疫病毒和呼吸道合胞病毒等已有商业化试剂<sup>[1]</sup>。

突发的恶性传染病流行会给人带来了极大的恐慌,早期快速诊断对阻止其流行至关重要。2009 年 6 月新发猪流感病毒 H1N1 爆发流行,江苏省疾控预防与控制中心<sup>[7]</sup>采用实时 NASBA 的方法,直接检测 H1N1 基因 RNA 而无需经过逆转录步骤,反应和检测在 90 min 内即可完成,比 RT-PCR 和实时 RT-PCR 方法更加简单高效。以病毒培养、RT-PCR 和实时 RT-PCR 参考方法作为参照,其敏感度、特异性、阳性预测值和阴性预测值都达到 100%。其敏感度与商业化的实时 RT-PCR 方法相当,高于 Taqman 法,检测极限约为 50 个 RNA 拷贝。

近年来发展起来的实时荧光核酸恒温扩增技术(simulta-

neous amplification and testing, SAT)是采用 NASBA 技术的原理,结合实时荧光检测的一种方法,检测敏感性高。Xu 等<sup>[5]</sup>用 SAT 技术检测柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16),204 名疑似手足口病患儿中 87 例阳性,而实时 PCR 82 例阳性,经测序验证这 5 个有差异的标本中 4 个为 CA16,可见 SAT 方法更为敏感,最少可以检测到 10 个 RNA 拷贝,敏感性比实时 PCR 方法高 100 倍,且 1 h 内即可完成检测。Cui 等<sup>[8]</sup>用 SAT 方法和 Bactec MGIT 960 自动快速培养法检测 253 例肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌 16S rRNA,涂片阳性标本的敏感性分别是 97.6%和 95.9%,涂片阴性标本的敏感性分别是 39.2%和 30.2%。培养方法仍然是结核确诊的金标准,Bactec MGIT 960 培养法虽然比传统方法进行了改良,涂片阳性标本仍需要 7~10 d 才能得到结果,而 NASBA 仅需 90 min。

除检测基因组 RNA 外,NASBA 还可以用来检测基因组转录产物 mRNA。DNA 性状非常稳定,在活菌和死菌中均可检出,但完整的 RNA 只存在于活菌,因为 RNA 在死亡的病原体中会迅速降解。对已经治愈但机体还残留死菌的患者如果仅检测 DNA,容易出现假阳性结果而造成过度治疗<sup>[9]</sup>。所以对复诊患者 mRNA 进行检测,有利于临床用药后的疗效检测及判愈。机体 mRNA 转录拷贝数远高于基因组 DNA,所以检测 mRNA 比 DNA 敏感性更高。国内已有报道用 SAT 技术检测泌尿生殖道沙眼衣原体、解脲脲原体和淋球菌 mRNA,检测结果可以准确指导临床医生治疗<sup>[10-12]</sup>。

多重 NASBA 方法通量较大,可一次性检测几种或多种病原体。Lau 等<sup>[13]</sup>建立了多重 NASBA 同时检测甲型流感病毒、乙型流感病毒、人副流感病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒和柯萨奇病毒等常见的呼吸道感染病原体的方法;Loens 等<sup>[14]</sup>建立了检测社区获得性肺炎患者呼吸道标本肺炎支原体、肺炎衣原体和军团菌等非典型肺炎病原体的方法。虽然多重 NASBA 方法快速、通量大、耗时短、节约成本,但其敏感性比单一 NASBA 低。

NASBA 方法的主要缺点就是仅限于检测 RNA,尽管有报道通过这种方法联合其多种酶检测 DNA,但是比较复杂,应用较少。

## 2 环介导恒温扩增

**2.1 LAMP 反应原理** LAMP 是一种基于自动循环的链置换核酸扩增的方法,2000 年首次由 Notomi 报道。反应体系包括具有强的链置换活性 Bst DNA 聚合酶、两对内引物(FIP, BIP)和两对外引物(F3, B3)。反应分为 3 步:非循环起始阶段、环扩增阶段、循环延伸阶段。反应过程如下:内引物结合于靶基因,由 DNA 聚合酶延伸,外引物在 DNA 聚合酶链置换活性的作用下释放内引物合成的链,释放的链 5' 端互补序列配对形成茎环结构,反向的内引物结合到 3' 端延伸,形成两端各有一个茎环结构的单链模板。环结构再折叠,哑铃结构的 DNA 进入指数扩增阶段,最终形成一系列有多个靶 DNA 反向重复序列串联的不同大小的产物,整个过程在 45~60 min 即可完成<sup>[4]</sup>。

## 2.2 LAMP 技术优势

**2.2.1 产物肉眼可见,检测方法简单** LAMP 在扩增过程中产生大量焦磷酸盐,与  $Mg^{2+}$  结合后形成白色不溶性焦磷酸镁沉淀用肉眼观察可见,用简单的光度计即可实现对反应实时定量,不需要荧光试剂和昂贵的荧光检测系统。

**2.2.2 LAMP 特异性高** 因为 4 对引物准确识别靶序列 6 个

不同的区域以后,扩增反应才会发生,故 LAMP 比单一一对引物 PCR 对模板序列的识别更特异。

**2.2.3 与 PCR 相比, LAMP 敏感性高** 具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶对能耐受标本中其他抑制剂,使标本纯化环节更加简化,节约时间和费用。如检测鸡蛋标本中沙门氏菌,一般需将鸡蛋全卵液进行沙门氏菌富集培养,由于 LAMP 能耐全卵液成分的抑制作用,所以,可以直接检测鸡蛋全卵液标本而无需培养。

**2.3 LAMP 在病原体检测中的应用** 迄今, LAMP 检测病原体的报道较多<sup>[15]</sup>, 包括人乳头瘤病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、人疱疹病毒 6-7、腺病毒、BK 病毒, 以及人乳头瘤病毒 6、11、16、18 型, 巨细胞病毒等病毒, 金黄色葡萄球菌, 军团菌, 霍乱弧菌, 结核分枝杆菌, 大肠杆菌, 沙门氏菌, 霍乱弧菌, 伤寒杆菌, 李斯特菌, 空肠弯曲杆菌等细菌, 还有隐孢子虫, 疟原虫, 弓形虫和卡氏肺孢子虫等寄生虫。

LAMP 性能优于传统 PCR, 检测病原体 DNA 有诸多优势。Lim 等<sup>[16]</sup>通过 LAMP 检测金黄色葡萄球菌 DNA, 反应温度为 58.5 °C, 耗时 1 h, 敏感性高于 PCR, 特异性与 PCR 方法相当。Aizawa 等<sup>[17]</sup>通过 LAMP 检测了患有社区获得性肺炎的 111 例儿童肺炎支原体的感染情况, 比颗粒凝集法检出时间早 6 d。由于肺炎支原体寄生于细胞内且无细胞壁, 对经验用药最常用的  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物无效, 所以, 早期检测出肺炎支原体感染可以指导患者正确使用大环内酯类抗菌药物治疗。Aryan 等<sup>[18]</sup>检测了 101 例痰标本结核分枝杆菌, LAMP、巢式 PCR 和 PCR 检测时间分别为 1.5、5 和 2.5 h, 阴性预测值分别为 75%、60% 和 43.6%, 阳性预测值均为 100%, LAMP 对标本中抑制剂的耐受性好。

LAMP 体系中加入逆转录酶可从 RNA 高效扩增 DNA, 即 RT-LAMP, 检测敏感性高于 RT-PCR, 1 h 内即可完成扩增, 而 RT-PCR 需要 3~4 h<sup>[6]</sup>。目前报道 RT-LAMP 的应用包括甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、人偏肺病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒和肠道病毒等 RNA 病毒, 还有西尼罗病毒、登革热、SARS 样冠状病毒、高致病性的禽流感 H5N1 和诺沃克病毒等新发 RNA 病毒。Wang 等<sup>[19]</sup>通过 RT-LAMP 检测 33 例临床标本人肠道病毒 71 型感染情况, 检测结果与实时 RT-PCR 完全一致, RNA 检测极限是 160 个拷贝; 检测敏感性是 RT-PCR 的 10 倍, 但低于实时 RT-PCR。Song 等<sup>[20]</sup>建立了针对人偏肺病毒 A 型和 B 型的基因型特异的 RT-LAMP 方法, 检测极限是 RT-PCR 的 10 倍, 特异性好, 与呼吸道合胞病毒、副流感病毒、腺病毒、鼻病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒和肠道病毒等呼吸道病毒均无交叉反应, 偏肺病毒 A 型和 B 型之间也无交叉反应。且对 A 型和 B 型混合感染标本检出率高于 RT-PCR 和实时 PCR, 但由于该研究中仅有 2 例是混合感染, 对混合感染的检测性能还有待通过大样本验证。

床旁检验要求检测方法易携带、快速、敏感甚至可实时定量, 进行病原体基因诊断的床旁检验技术在临床感染监测方面将有较好的应用潜力。将样本提取、核酸扩增和检测过程整合等多个步骤整合的微流体检测系统具有快速、高通量和试剂耗量低等优势。Hsieh 等<sup>[21]</sup>使用微流体系统联合电化学系统 (MEQ-LAMP) 检测鼠伤寒沙门氏菌, 在 50 min 内即可得到结果, 检测极限是 16 个拷贝的 DNA, 检测性能高, 且整个过程全自动化, 无需手动操作。未来进一步探索开发多重微流体芯片与 LAMP 联合的检测方法, 在床边检验领域将有较好的应用

前景。

### 3 依赖解旋酶的恒温扩增

**3.1 HDA 反应原理** HDA 是在一种体外模拟体内复制又复制模式的反应, 2004 年由 Vincent 首次报道。与 NASBA 和 LAMP 等恒温扩增方法相比, HDA 的反应体系更为简单, 更接近体内 DNA 复制方式。反应体系主要包括大肠杆菌 UvrD 解旋酶、Bst DNA 聚合酶和单链 DNA 结合蛋白。在 ATP 作用下, DNA 解旋酶在腺嘌呤和胸腺嘧啶富集的模板处打开双链 DNA, SSB 特异地与解链产生的单链 DNA 结合, 阻止其降解或与互补的单链 DNA 再次退火。序列特异性引物分别和两条单链 DNA 模板 3' 端结合, 然后 DNA 聚合酶延伸引物, 合成双链 DNA<sup>[4]</sup>。新合成的双链 DNA 又可作为 DNA 解旋酶的底物, 进入下一轮循环。

#### 3.2 HDA 技术优势

**3.2.1 反应过程更简单,** 可以扩增比 PCR 更长的片段 HDA 与 PCR 反应过程非常相似, 解旋酶替代了热变性过程, 无需其他恒温扩增方法热变性的步骤, 实现了真正意义上的恒温扩增。大肠杆菌 UvrD 解旋酶扩增速度不高 (20 bp/s), 持续合成能力有限, 且只能检测几百个拷贝的 DNA, 不能扩增长序列, 因此, 逐渐被性能更好的解旋酶取代。T7 噬菌体 gp4 解旋酶能以 300 bp/s 的速度解旋双链 DNA<sup>[6]</sup>, 虽其合成能力并不是持续性的, 但与持续合成因子共同作用后, 每次结合持续合成能力可高达 10 kb, 可以扩增长线性和环状双链 DNA 模板, 其应用日益普遍。解旋酶/聚合酶嵌合蛋白具有热稳定的解旋酶和聚合酶活性, 可以扩增的长度达到 2.3 kb。

**3.2.2 扩增效率非常高** 在解旋酶和单链 DNA 结合蛋白的配合作用下, DNA 双链打开和扩增是同时进行的, 而 PCR 是间断的, 所以 HDA 比 PCR 反应更加快速, 在 10 min 内就可以放大百万倍。

**3.2.3 检测敏感性高** Bst DNA 聚合酶对扩增抑制剂的耐受性比 Taq DNA 聚合酶好, 所以反应对标本要求更低, 标本处理流程可以更加简化。

**3.3 HDA 在病原体检测中的应用** HAD 被用于检测多种病原体感染, 包括人乳头瘤病毒、人类免疫缺陷病毒 1 型、单纯疱疹病毒 1 型和 2 型、肠病毒和埃博拉病毒、冠状病毒、麻疹病毒、幽门螺杆菌、艰难梭菌、淋球菌和金黄色葡萄球菌等<sup>[6]</sup>。Barbieri 等<sup>[22]</sup>通过 HAD 检测人乳头瘤病毒高危型 16 和 18 型, 阳性预测值和阴性预测值均为 100%, 这种成本低廉的恒温扩增方法用于人乳头瘤病毒筛查, 可有效降低宫颈癌的发生。Kim 等<sup>[23]</sup>的研究显示 HAD 对生殖道标本单纯疱疹病毒 1 型和 2 型的检测极限分别是 5 个拷贝和 34 个拷贝, 与培养方法相比, 特异性和敏感度分别是 96.3% 和 100%。类似于 LAMP, 在 HAD 的反应体系中加入逆转录酶也可扩增 RNA 靶标, 即逆转录 HAD (RT-HAD)。Tang 等<sup>[24]</sup>建立的 RT-HAD 方法, 检测人类免疫缺陷病毒一份标本花费是 5 美元, 远低于逆转录 PCR 的价格。设计多重 HAD 的方法可以一次检测多种感染, 并且能检出多重感染。Doseeva 等<sup>[25]</sup>采用多重 HAD 的方法同时扩增沙眼衣原体和淋球菌, 可有效筛查泌尿生殖道感染性疾病。此外, 针对沙眼衣原体的 omp1 基因和质粒可同时进行双重扩增, 有效避免漏检质粒缺失的沙眼衣原体。Andresen 等<sup>[26]</sup>将 HAD 和芯片联合起来 (On Chip-HAD), 同时检测淋球菌和金黄色葡萄球菌, 节约成本和时间。该技术具有反应简单、微型化和多重检测的特点, 解旋酶的解

链作用省去了高温热变性过程,比其他恒温扩增方法更简单,未来可应用到小型的芯片实验室,实现基因多重检测的床旁检验。除以上 3 种方法以外,常见的恒温扩增技术还有链置换扩增、滚环扩增、单引物恒温扩增、重组酶聚合酶扩增和信号介导的 RNA 扩增等。不同的方法各具优势,联合应用可以互相补充。如粪便中的诺如病毒含量较高容易检测,但牡蛎中病毒基因组含量非常低,逆转录半巢式 PCR 是标准的检测方法,但两步 PCR 反应步骤复杂、耗时长。Fukuda 等<sup>[27]</sup>通过两步恒温扩增方法(NASBA-RT-LAMP),即用第一步 NASBA 扩增产物作为 RT-LAMP 的模板 RNA,3 h 内即可成功检测到牡蛎中的诺如病毒,节省了时间,但检测敏感性与逆转录半巢式 PCR 无差异。

#### 4 总 结

总之,新一代的恒温扩增技术独具优势,不需要热循环加热设备,成本低廉,更适合在经济落后地区,对结核病、疟疾等经济落后的高负担国家控制疾病有较好的经济效益;无需昂贵专用设备,反应不需要反复变换温度,在标本处理、检测速度、费用、易携性等方面比 PCR 有很大的优势;其敏感性高,能检测感染早期低载量的病原体,对于感染早期的诊断极为重要。基于恒温扩增方法快速、敏感、设备简单等优势,其在床旁检验领域的应用具有很大的潜力<sup>[2]</sup>,但目前还处在初级研究阶段,随着对其研究的不断深入,将恒温扩增技术与高度自动化的芯片技术联合,实现快速、便捷、微型且自动化的多重检测将彻底革新传统的病原体检测方法。

#### 参考文献

- [1] Yu AC, Vatcher G, Yue X, et al. Nucleic acid-based diagnostics for infectious diseases in public health affairs[J]. *Front Med*, 2012, 6(2): 173-186.
- [2] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review[J]. *Lab Chip*, 2012, 12(24): 2469-2486.
- [3] Fakruddin M, Mannan KS, Chowdhury A, et al. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction[J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013, 5(4): 245-252.
- [4] Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA[J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(8): 970-1003.
- [5] Xu J, Cao L, Su L, et al. A new accurate assay for Coxsackievirus A 16 by fluorescence detection of isothermal RNA amplification[J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(3): 459-462.
- [6] Sidoti F, Bergallo M, Costa C, et al. Alternative molecular tests for virological diagnosis[J]. *Mol Biotechnol*, 2013, 53(3): 352-362.
- [7] Ge Y, Cui L, Qi X, et al. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification[J]. *J Virol Methods*, 2010, 163(4): 495-497.
- [8] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(6): 646-650.
- [9] Won JY, Min J, Park JH. Bacteria adsorption on hydrophilic surfaces for the sensitive detection of pathogenic bacteria using a single tube chamber system[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(16): 1763-1767.
- [10] 顾伟鸣, 杨阳, 吴磊, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术检测泌尿生

- 殖道沙眼衣原体感染[J]. *临床检验技术研究*, 2010, 28(4): 271-272.
- [11] 高志华, 金印, 陈峰. 实时荧光核酸恒温扩增技术检测尿液中淋球菌的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(4): 463-464.
- [12] 李林海, 陈丽丹, 刘文婷, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术和液体培养法检测解脲脲原体的比较[J]. *生物技术通讯*, 2013, (24): 251-253.
- [13] Lau LT, Feng XY, Lam TY, et al. Development of multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of human respiratory tract viruses[J]. *J Virol Methods*, 2010, 168(1-2): 251-254.
- [14] Loens K, Beck T, Ursi D, et al. Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia[J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 73(3): 257-262.
- [15] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases[J]. *J Infect Chemother*, 2009, 15(1): 62-69.
- [16] Lim KT, Teh CS, Thong KL. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 895816.
- [17] Aizawa Y, Oishi T, Tsukano S, et al. Clinical utility of loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in children[J]. *J Med Microbiol*, 2014, 63(2): 248-251.
- [18] Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, et al. Clinical value of IS6110-based loop-mediated isothermal amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens[J]. *J Infect*, 2013, 66(6): 487-493.
- [19] Wang X, Zhu JP, Zhang Q, et al. Detection of enterovirus 71 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. *J Virol Methods*, 2012, 179(2): 330-334.
- [20] Song Q, Zhu R, Sun Y, et al. Identification of human metapneumovirus genotypes A and B from clinical specimens by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Virol Methods*, 2014, 196(1): 133-138.
- [21] Hsieh K, Patterson AS, Ferguson BS, et al. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(20): 4896-4900.
- [22] Barbieri D, Venturoli S, Rosl F, et al. Detection of high-risk human papillomavirus type 16 and 18 using isothermal helicase-dependent amplification[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2014, 79(2): 178-182.
- [23] Kim HJ, Tong Y, Tang W, et al. A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2[J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(1): 26-30.
- [24] Tang W, Chow WH, Li Y, et al. Nucleic acid assay system for tier II laboratories and moderately complex clinics to detect HIV in low-resource settings[J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(1): 46-51.
- [25] Doseeva V, Forbes T, Wolff J, et al. Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(4): 354-365.
- [26] Andresen D, von Nickisch-Roseneck M, Bier FF. Helicase depend-

ent OnChip-amplification and its use in multiplex pathogen detection[J]. Clin Chim Acta, 2009, 403(1-2): 244-248.

[27] Fukuda S, Sasaki Y, Seno M. Rapid and sensitive detection of norovirus genomes in oysters by a two-step isothermal amplification assay system combining nucleic acid sequence-based amplification

and reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assays[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 74(37): 3912-3914.

(收稿日期: 2014-11-15)

• 综 述 •

## 皮质醇测定分析前的影响因素

黎 宇, 兰周燕, 玉韦勇 综述, 戴盛明<sup>△</sup> 审校

(广西医科大学第四附属医院检验科, 广西柳州 545005)

**关键词:** 皮质醇; 测定; 影响因素

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.047

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2015)07-0976-04

皮质醇是由机体下丘脑-垂体-肾上腺皮质神经轴系(HPA)的调节控制下分泌, 受到生物节律性、体液性及神经的调控。尽管当前大多实验室运用全自动生化仪器已能较为准确地测定出血清中皮质醇的含量, 但由于检测的标本在进入实验室前的所有工作环节是不受检验科所监控, 标本的采集质量, 检验人员是无从得知, 检验质量更是无法保障。为了使广大医务人员能对实验室分析前质量控制引起重视, 了解皮质醇在检测前所需要注意的事项, 有效提高皮质醇测定的检验质量。本文在此重点阐述皮质醇分析前的各类影响因素, 并探讨如何尽量控制和避免这些因素对皮质醇测定的影响。在实际工作过程中, 皮质醇分析测定前的影响因素可归纳为生理因素、病理因素、外界因素和人为影响四类。以下将对这些因素作一综述。

### 1 生理因素

**1.1 性别** 性别的差异是否能成为男性与女性间机体分泌皮质醇水平不同的根本原因, 目前国内外学者的研究结论尚未统一。其中以 Laughlin, Gusenoff, Rosmalen 等学者的研究表明, 青少年及成人的皮质醇分泌水平存在有性别上的差异。而 Edwards, Knutsson 等学者则认为, 性别因素不是引起机体皮质醇分泌水平差异的根本原因。

**1.2 心理** 紧张、焦虑和压抑等心理状态可促使皮质醇分泌增加。其原因在于患者抽血时产生的紧张、恐惧等心理状态变化易引起 HPA 轴的持续激活, 致使机体分泌皮质醇增加, 导致检测结果与患者体内原有的皮质醇水平存在一定差异。有学者研究表明, 心态的变化会影响皮质醇的分泌水平<sup>[1]</sup>。

**1.3 睡眠** 睡眠时间的合理性及规律性可影响皮质醇的分泌。其原因可能为人体脑神经的功能性调节和生理性休整需要在规律且充足睡眠时间的条件下才能维持机体应有的良好状态。当机体在睡眠时间不足时, 大脑神经会因其生理性休整受限而影响其功能性调节能力下降, 从而抑制了 HPA 轴的活性, 最终导致体内肾上腺分泌皮质醇减少。有研究显示, 受试者在失眠的不同条件下, 他们体内的皮质醇水平均较在正常睡眠条件下其体内皮质醇水平低<sup>[2]</sup>。

**1.4 运动** 运动的方式、强度及时间不同对皮质醇分泌水平的影响程度也不同。其主要的原因因为运动造成体内的高能消耗需要机体大量血糖和脑神经通过调节加速脂肪动员及分解蛋白质为机体提供能量来支持。其过程为运动带来的机体内

部高能代谢可引起 HPA 轴兴奋, 从而刺激肾上腺分泌皮质醇增多。另外, 由于皮质醇具有抗炎作用, 其水平升高还可能与运动引起的炎症有关。有研究表明<sup>[3]</sup>, 小、中强度运动后机体各组织对皮质醇摄取量增加, 使血液循环的皮质醇浓度减少; 剧烈运动或是运动持续时间长时, 可使机体皮质醇水平升高。

**1.5 妊娠和分娩** 妊娠可使女性机体皮质醇分泌水平发生变化。其原因因为女性在妊娠期间, 胎盘给机体造成的劳力负担可促使脑神经释放促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)和促肾上腺皮质激素(ACTH)促进肾上腺合成, 造成分泌皮质醇增多。且该途径不受激素反馈调节。有研究表明, 妊娠期女性的血清皮质醇浓度较其正常状态下的血清皮质醇浓度水平高。另外, 分娩时的女性也会因为处在应激状态中, 精神极度紧张而导致皮质醇增多; 有文献<sup>[4-5]</sup>报道, 皮质醇水平的变化与分娩的发生和发展有密切关系。

**1.6 先天遗传** 皮质醇合成酶的基因缺失和突变可影响皮质醇在机体的分泌水平。其主要原因因为人体合成皮质醇某些酶的基因存在有先天缺陷或基因突变, 这些基因的 DNA 编码序列在 RNA 转录和翻译后, 无法合成一类具有有效促进皮质醇合成的皮质醇合成酶, 最终导致皮质醇无法合成或合成不足, 致使该类疾病患者血清的皮质醇水平较正常人低。有研究表明<sup>[6-7]</sup>, 先天性肾上腺皮质增生症患者, 其体内皮质醇水平较正常人低。

**1.7 年龄差异** 不同年龄阶段的人群的血清皮质醇水平也可能不尽相同。其原因因为随着年龄的增大, 人体的各器官组织发生功能性衰退导致骨质修复功能减弱, 造成成骨细胞合成能力下降, 破骨细胞合成能力增多。因破骨细胞具有促进皮质醇分泌的能力, 因此皮质醇的分泌水平会随着老龄人体内破骨细胞的增加而升高。有文献表明, 老年组血清中的 ACTH 水平和皮质醇水平略高于青年组水平<sup>[8]</sup>。还有研究结果显示, 年龄的增长与皮质醇水平的变化呈正相关, 老年人血清皮质醇水平较健康成年人显著升高。此外, 新生儿在出生后其体内皮质醇的改变是由于新生儿处在人体内外环境的改变中, 本能的应激反应刺激了他的大脑神经中枢, 激活了新生儿的 HPA 轴系统, 最终促使皮质醇分泌增多, 以便于新生儿更快适应子宫外环境。有研究显示<sup>[9]</sup>, 刚出生的新生儿脐血皮质醇水平明显升高。

**1.8 营养不良** 营养不良可影响机体皮质醇分泌水平。其主