

## • 综述 •

血吸虫核酸诊断方法研究进展<sup>\*</sup>孙莉军<sup>1</sup>,叶青<sup>2</sup>,赵友云<sup>3</sup>,齐自慧<sup>2</sup>,杨梦歌<sup>2△#</sup>综述,王业富<sup>2△#</sup>审校

(1. 湖北省临床检验中心,湖北武汉 430064;2. 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室,湖北武汉 430072;3. 湖北省中医院,湖北武汉 430061)

关键词:血吸虫病; 早期诊断; 核酸诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)01-0074-03

血吸虫病是由裂体吸虫属血吸虫引起的一种热带性疾病。主要通过接触血吸虫疫水,尾蚴经接触部位的皮肤、黏膜侵入人体而造成感染。根据 WHO 报告,全世界有超过 2 亿人感染血吸虫病,孩童的感染率高于成人,我国是日本血吸虫病流行最严重的 4 个国家之一。血吸虫病的诊断通常是通过显微观察排泄物中的虫卵来确定<sup>[1]</sup>。但这种方法的灵敏度不高,粪便中排出虫卵分布不均匀和排出量的波动性会对结果的准确性造成影响<sup>[2]</sup>。现行主要的血吸虫病诊断方法包括病原学诊断、免疫学诊断和核酸诊断,另外还有超声诊断技术,条形码技术诊断等方法诊断血吸虫病<sup>[3]</sup>。现有研究表明核酸诊断对发现血吸虫早期感染有较明显优势,本文就核酸诊断的方法进展作一综述。

## 1 聚合酶链式反应法

PCR 采用 DNA 聚合酶,以单链 DNA 为模板,以脱氧核苷酸为底物合成 DNA。到如今 PCR 已发展到第三代技术。在常规 PCR 的基础上,演变出了荧光定量 PCR、巢式 PCR 等一系列 PCR 技术。

**1.1 常规 PCR 法** 常规 PCR 法是提取患者的粪便、尿液与血液中的血吸虫 DNA 为模板用于 PCR 检测的一种核酸检测方法。有研究表明,在最初的感染后 4 周,在宿主体内血清中的日本血吸虫 DNA 主要来自于死亡的血吸虫幼虫和血吸虫在生长过程中的外皮脱落物。这就为血吸虫的早期检测核酸引物设计奠定了基础<sup>[4]</sup>。陆正贤等<sup>[5]</sup>探索了 PCR 检测法在日本血吸虫感染早期检测的特异性和敏感性。最终能在早期感染后 1 周在日本血吸虫的成虫、虫卵、日本血吸虫感染家兔的肝组织、粪便和外周血清中均扩增到相对分子质量为 230 bp 的特异性阳性条带,比粪检法和免疫学方法早 3~6 周。该方法首创在感染第 1 周即能扩增出特异性 DNA 阳性条带,且从日本血吸虫感染宿主血清中检测出特异性 DNA。说明 PCR 检测法具有一定的疗效考核价值。Lodh 等<sup>[6]</sup>用滤纸过滤尿液沉降物,提取其中物种专一性的重复片段,使用曼氏血吸虫和埃及血吸虫的特异引物 PCR 扩增,相比粪检虫卵法,PCR 扩增特异性引物有着更高的敏感性和特异性。此种方法有着更高的敏感性和特异性,可以检测粪检法和血尿症未检测出来的患者。此外,此种方法可使用单个尿液标本单个或同时检测出曼氏血吸虫和埃及血吸虫。

**1.2 荧光定量 PCR** 荧光定量 PCR(FQ-PCR)是 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种新定量试验技术,它是通过荧光染料或荧光标记的特异性的探针,对 PCR 产物进

行标记跟踪,实时在线监控反应过程,结合相应的软件可以对产物进行分析,计算待测样品模板的初始浓度。秦圆方<sup>[7]</sup>在国内首次建立了 SYBR GREEN 荧光定量粪检 PCR 法,建立了粪样虫卵数与定量 PCR 结果的定量关系,可望以 PCR 法精确测定日本血吸虫感染度。此方法具有灵敏度高、特异性强、可估计感染度等优点。18SrRNA 是核糖体 RNA 中的一类,存在核糖体当中与其他核糖体 RNA 和核糖体蛋白构成核糖体参与蛋白质的翻译,18SrRNA 经研究具有很高的保守性,且在血吸虫基因组中拷贝数相当大。周立等<sup>[8]</sup>根据日本血吸虫 18S 小亚基单位核糖体核酸(18SrRNA)基因设计特异性引物进行 PCR 扩增检测克隆后的日本血吸虫 18SrRNA 基因。最终重复性试验表明稳定性好,整个实验可在 3 h 内完成对样品的检测,用时短,最低能够检测出 6.15 pg 的血吸虫 18SrRNA,灵敏度高。王本敬<sup>[9]</sup>通过比较 4 种基因:pSjrh1.0、18SrRNA、SjR2 的 G55A 克隆在基因组中的丰度,初步确定 SYBR Green I 荧光实时定量 PCR(RQ-PCR)方法检测日本血吸虫的较适宜靶基因和反应条件。结论表明 RQ-PCR 具有较高的准确性和特异性。官威<sup>[10]</sup>建立了一种灵敏,高效的日本血吸虫 Taqman real-time PCR 定量检测法,选取日本血吸虫高度重复基因 SjR2 为靶序列设计引物和 Taqman 探针,和曼氏血吸虫、肝吸虫、旋毛虫、肺吸虫均无交叉反应,检测日本血吸虫 SjR2 基因重组质粒梯度最小浓度为  $4.47 \times 10$  copies/ $\mu$ L,表明荧光定量 PCR 检测法敏感度高、特异性强,具有潜在的应用价值。

**1.3 巢式 PCR** 巢式 PCR 是一种变异的 PCR,使用两对(而非一对)PCR 引物扩增完整的片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似。第二对引物称为巢式引物,结合在第一次 PCR 产物内部,使得第二次 PCR 扩增片段短于第一次扩增。巢式 PCR 的好处在于,如果第一次扩增产生了错误片断,则第二次能在错误片断上进行引物配对并扩增的概率极低。因此,巢式 PCR 的扩增非常特异。刘爱平等<sup>[11]</sup>通过优化巢式 PCR 反应体系,在低存活量的成虫感染家兔血清中 3 d 即可扩增到特异性目的条带,检出血吸虫成虫,具有很高的敏感性。Guo<sup>[12]</sup>筛选出了一段相对分子质量为 303 bp 的序列作为 DNA 检测的靶序列,能够快速在感染血吸虫的家兔血清中扩增到目的片段。童群波等<sup>[13]</sup>选取日本血吸虫高拷贝 420 bp 的 Sjα1 基因片段,设计了 2 对巢式引物扩增该基因片段,2 周即能从血清和全血样本中检出特异性 DNA。

## 2 LAMP 法

环介导等温扩增技术(LAMP)于 2000 年由日本学者 Not-

\* 基金项目:湖北省自然科学基金项目(2013CFB461)。 作者简介:孙莉军,女,湖北省临床检验中心主任医师,主要从事临床微生物学检验质量管理和临床实验室管理研究。 △ 通讯作者, E-mail: wangyefu@whu.edu.cn。

omi 在 Nucleic Acids Res 杂志上首次公开发表。其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异性引物, 在链置换 DNA 聚合酶(Bst DNA polymerase)的作用下, 60~65 ℃ 恒温扩增, 15~60 min 左右即可实现 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 倍的核酸扩增, 具有操作简单、特异性强、产物易检测等特点<sup>[14]</sup>。

许静<sup>[15]</sup>在参考陆正贤已建立的常规 PCR 法检测血吸虫病的基础上, 建立了 LAMP 法, LAMP 法的灵敏性和特异性均高于 PCR 法, 且敏感性显著高于 PCR 法, 约为 PCR 法的 104 倍。在疗效考核的实验中, LAMP 法较 PCR 法晚一周转阴, 即第 13 周时转为阴性, 显示出其具有更高的敏感性。曹仁祺<sup>[16]</sup>建立了粪便中血吸虫虫卵的 LAMP 检测方法和 PCR 检测方法, 选取日本血吸虫基因组中高度保守的多拷贝重复序列 rbp 基因为靶序列进行 LAMP 引物设计。不仅显示出较 PCR 更高的敏感性, 且对牛常见的病原体也有较好的特异性。王岑<sup>[17]</sup>选取了 4 种日本血吸虫基因组重复序列作为扩增片段, 并且筛选出一组特异性强、敏感性高的引物, 优化反应体系和反应条件, 建立了一种检测全血的简便、快速和高敏感性 LAMP 方法。

### 3 基因芯片检测

基因芯片检测是一块带有 DNA 微阵列的特殊玻璃片或硅芯片片, 在数平方厘米之面积上布放数千或数万个核酸探针; 检体中的 DNA、cDNA、RNA 等与探针结合后, 借由荧光或电流等方式侦测。经由一次测验, 即可提供大量基因序列相关信息。它是基因组学和遗传学研究的工具。

周钧等<sup>[18]</sup>运用基因芯片技术与曼氏血吸虫、埃及血吸虫及其他所有基因进行 BLAST, 均无同源性。基因芯片可一次性大规模检测日本血吸虫, 尤其适用于血吸虫病流行区现场的检测及监测, 该方法解决了操作效率低和结果客观性差等问题, 具有快速、灵敏、特异性等优势, 可获得准确、可靠的日本血吸虫病流行病学资料, 为及时地报告疫情, 有效遏止疫情提供保障<sup>[19]</sup>。

基因芯片作为一种先进的、大规模、高通量检测技术, 应用于疾病的诊断, 研究人员应用基因芯片就可以在同一时间定量地分析大量(成千上万个)的基因表达, 具有信息量大、快速、可进行高通量筛选以及数据一致性好等优势<sup>[20]</sup>。有相关报道利用基因芯片技术分析曼氏血吸虫不同性别成虫接触后诱导的基因表达情况<sup>[21]</sup>。也有报道利用基因芯片技术分析日本血吸虫尾蚴阶段高表达的基因<sup>[22]</sup>。通过侵入, 尾蚴将经历巨大的变化, 并且释放分泌产物以适应新环境并且逃避宿主的免疫攻击, 利用基因芯片技术分析日本血吸虫在尾蚴阶段高表达的基因对研究血吸虫的检测也具有深远意义。

### 4 小结

血吸虫病仍然是我国流行病防治重点工作之一, 根据 2012 年全国血吸虫病疫情通报, 截至 2012 年底, 全国仍至少有 24 万血吸虫患者<sup>[23]</sup>, 我国日本血吸虫病流行形势仍然严峻。能够在疫区建立快速准确诊断血吸虫病的方法是一种发展趋势, 而核酸检测因其高敏感性、高特异性逐渐成为检测血吸虫病方法的热门研究方向。同时, 根据生物信息学方法、基因比对方法等, 针对不同靶序列片段的核酸诊断方法也在进一步研究, 但目前为止尚未见到用于血吸虫病流行疫区现场的核酸诊断报道。推测其原因可能有:(1)DNA 的在标本的提取过程中会有损失, 无论是通过粪便或是血清提取血吸虫 DNA, 因其复杂的提取过程、提取方法、提取试剂盒的不同, 都会对血吸虫基因组 DNA 造成一定的损失, 而多拷贝的靶基因能够在一

定程度上弥补 DNA 提取有损失的缺陷。(2)通常在实验室的研究方法是建立实验动物模型, 实验动物模型中很多因素可人为控制, 如选择相同大小天数的家兔、感染相同数量的血吸虫等, 而疫区患者具有个体的差异性、自身的复杂性和感染病原体的多样性。综合上述情况对现场核酸检测均会造成一定影响。(3)实验条件和实验操作限制了现场核酸检测, 大部分的核酸检测都需要运用 PCR 仪等, 而 LAMP 技术对实验环境要求极高, 这些客观条件都会对现场核酸检测造成一定的限制和影响。(4)用于扩增靶序列的基因种类有限, 目前研究较多用于扩增靶序列的基因主要有来源于曼氏血吸虫的 121 bp 高度重复序列、18SrRNA 基因、逆转录子 SjR2、Sjrh1.0、线粒体 DNA 等, 这些靶序列的特异性和敏感性在面临现场核酸检测时仍不够理想。

理想的诊断检测方法应具备准确度高、敏感度高、易于操作、价格低廉, 尽量无创等特点。对于一些诊断来说, 早期诊断和治疗在阻止长期并发症或者阻断致病因子的传播方面发挥着重要作用<sup>[24]</sup>。Zhou 等<sup>[25]</sup>根据日本血吸虫 18S 小亚基单位核糖体核酸(18SrRNA)基因设计特异性引物进行荧光定量 PCR 扩增检测克隆后的日本血吸虫 18SrRNA 基因, 可以检测到 10 fg 的日本血吸虫, 比传统的 PCR 检测灵敏 100 倍。同时, 也能在感染后 1 周的小鼠血清中检测到日本血吸虫, 在感染后 4 周的小鼠排泄物中检测到日本血吸虫, 比镜检粪便中的虫卵早了一个星期。LAMP 虽然灵敏度也较高, 反应时间短, 但 LAMP 方法对实验环境要求太高, 一旦开盖容易形成气溶胶污染, 假阳性问题比较严重。且相比荧光定量 PCR 方法, LAMP 不能定量。荧光定量 PCR 相较传统 PCR 特异性更强, 通过引物和探针设计的“双保险”, 能够避免检测的假阳性。且灵敏度更高, 分析 PCR 产物的对数期, 通过自动化仪器收集的荧光信号, 避免了人为因素干扰, 且荧光定量 PCR 不需要对扩增产物进行后续实验分析, 操作简单。而巢式 PCR 相较于荧光定量 PCR 的灵敏度也较低。目前核酸检测技术中易于操作这一项仍有很大的提升空间, 而准确度和敏感度的提高, 随着技术和研究的不断发展, 可以用生物信息学寻找特异性和敏感性更高的靶序列。随着对实验环境和条件的降低, 实验操作步骤的简化, 血吸虫核酸检测的成本也能随即下降。在无创方面, 可以多开发针对粪便的检测方法, 而唾液、尿液也可以选作检测样本进行开发研究, 以简化取样, 减少患者取样这一过程带来的创伤。

### 参考文献

- [1] Gryseels B, Polman K, Clerinx J, et al. Human schistosomiasis [J]. Lancet, 2006, 368(11): 1106-1118.
- [2] 周立. 血吸虫病早期诊断方法和白介素 22 转基因小鼠模型的建立 [D]. 武汉: 武汉大学, 2011.
- [3] 周帅锋, 余路新, 汪世平. 血吸虫病的诊断检测技术及研究进展 [J]. 热带医学杂志, 2009, 9(3): 335-346.
- [4] Jing X, Ai PL, Jun JG, et al. The sources and metabolic dynamics of Schistosoma japonicum DNA in serum of the host. [J]. Parasitol Res, 2013, 112(1): 129-133.
- [5] 陆正贤. 聚合酶链反应在日本血吸虫病家兔感染早期检测及疗效考核中的应用研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2007.
- [6] Lodh N, Naples JM, Bosompem KM, et al. Detection of parasite-specific DNA in urine sediment obtained by filtration differentiates between single and mixed infections of schistosoma mansoni and S. haematobium from Endemic Areas in Ghana [J]. PLoS One,

- 2014, 9(3):312-314.
- [7] 秦圆方. PCR 技术用于日本血吸虫感染检测研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2009.
- [8] 周立, 梁冰, 赵友云, 黄露, 王业富. 实时荧光定量 PCR 法检测日本血吸虫 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2008, 26(4): 299-301.
- [9] 王本敬. Real-time PCR 检测水体日本血吸虫尾蚴和小鼠感染早期检测的研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011.
- [10] 官威. Real-time PCR 检测感染宿主血清日本血吸虫 DNA 水平动态变化及其在血吸虫病诊断和疗效考核中的意义 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [11] 刘爱平, 杨巧林, 郭俊杰, 等. 巢式 PCR 法检测日本血吸虫低感染度宿主血清 DNA 的研究 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2010, 30(5): 915-917.
- [12] Guo JJ, Zheng HJ, Xu J, et al. Sensitive and specific target sequences selected from retrotransposons of *Schistosoma japonicum* for the diagnosis of schistosomiasis [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(3): e1579.
- [13] 童群波, 陆绍红, 汪天平, 等. 巢式 PCR 检测日本血吸虫感染的研究 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2009, 16(4): 203-205.
- [14] 李秉鸿. 实时荧光定量检测技术及应用 [J]. 动物医学进展, 2003, 28(1): 4-6.
- [15] 许静. 核酸检测技术在日本血吸虫感染宿主早期诊断及疗效考核中的应用研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2008.
- [16] 曹仁祺. 日本血吸虫病环介导等温扩增诊断方法的建立和初步应用 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- 综述 •
- [17] 王岑. 环介导同温扩增检测全血日本血吸虫 DNA 的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2011.
- [18] 周钩, 钱万红, 李越希, 等. 日本血吸虫检测基因芯片的研制及初步应用 [J]. 江苏医药杂志, 2004, 30(6): 455-456, 483.
- [19] 周钩, 陶开华, 李越希, 施正良, 等. 基因芯片检测日本血吸虫及其现场应用 [J]. 医学动物防治, 2003, 19(5): 524-527.
- [20] Chang L, Zhong S, Zhao N, et al. Application of genetic deafness gene chip for detection of gene mutation of deafness in pregnant women. [J]. J Otology, 2014, 9(2): 347-381.
- [21] Waisberg M, Lobo FP, Cerqueira GC, et al. Microarray analysis of gene expression induced by sexual contact in *Schistosoma mansoni*. [J]. BMC Genomics, 2007, 20(8): 812-814.
- [22] Hu S, Law PK, Fung MC, et al. Microarray analysis of genes highly expressed in cercarial stage of *Schistosoma japonicum* and the characterization of the antigen Sj20H8. [J]. Acta Trop, 2009, 112(1): 26-32.
- [23] 李石柱, 郑浩, 高婧, 等. 2012 年全国血吸虫病疫情通报 [J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2013, 25(6): 557-562.
- [24] The TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles.
- [25] Zhou L, Tang J, Zhao Y, et al. A highly sensitive TaqMan real-time PCR assay for early detection of *Schistosoma* species [J]. Acta Trop, 2011, 120(1/2): 88-94.

(收稿日期: 2015-07-28)

## SIgE 监测对上市后中药注射剂免疫毒理学评价的意义<sup>\*</sup>

顾敏<sup>1,2</sup>, 谢雁鸣<sup>1△</sup>, 赵玉斌<sup>2▲</sup>, 郭新娥<sup>2</sup>, 王志飞<sup>1</sup>

(1. 中国中医科学院中医临床基础研究所, 北京 100700; 2. 石家庄市中医院, 河北石家庄 050000)

关键词: SIgE; TIgE; 中药注射剂; 免疫毒理

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.01.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)01-0076-03

上市后中药作为注入性抗原、可溶性抗原, 其引起的过敏反应按照修改后的 Coombs 和 Gell 分类属于 I 型超敏反应(变态反应)。I 型超敏反应是上市后中药免疫毒理学监测的重点内容, 对 I 型超敏反应发生机制、主要参与成分的分析提示免疫球蛋白 IgE 是引发 I 型超敏反应的主要抗体, SIgE 检测是中药注射剂致过敏反应特异性诊断最重要的检测方法之一。

### 1 上市后中药免疫毒理学监测背景

上市后中药(中药注射剂)大多由复方组成, 其成分十分复杂且有效成分尚不完全清楚, 中药注射剂中的动植物蛋白、鞣质等也极易引起变态反应。中药注射剂的药品不良反应(ADR)常涉及多个器官或系统。研究表明, 与中药注射剂有关的 ADR, 其中 92% 属于变态反应, 解决中药注射剂引起的变态反应是中药注射剂研制中的一项重要工作<sup>[1]</sup>。目前我国在上市后中药注射剂危险性评估方面的工作与国际趋势和实际需要远不相符, 有待完善和发展。因此, 建立快速、灵敏的免疫毒理学安全评价的检测方法迫在眉睫。

### 2 上市后中药免疫毒理学监测内容

**2.1 监测内容依据** 上市后中药作为注入性抗原和可溶性抗原, 其引起的过敏反应按照修改后的 Coombs 和 Gell 分类属于 I 型超敏反应。I 型超敏反应是上市后中药免疫毒理学监测的重点内容。

对 I 型超敏反应发生机制、主要参与成分的分析提示免疫球蛋白 IgE 是引发 I 型超敏反应的主要抗体, SIgE 检测是中药注射剂致过敏反应特异性诊断最重要的检测方法之一。

**2.2 变态反应的诊断依据** 变态反应是指药物及其体内代谢产物作为抗原或半抗原刺激机体而发生的非正常免疫反应。美国国立变态反应和感染性疾病研究所(NIAID)与食物过敏及急性全身过敏反应联盟(FAAN)在第 2 次专题讨论会上制定急性全身过敏反应的诊断标准。包括皮肤过敏反应、呼吸道过敏反应、消化道过敏反应等<sup>[2]</sup>。应根据这个标准可以准确地对 95% 的患者作出急性全身过敏反应的诊断。临幊上根据变应原进入途径分吸入性、摄入性、注入性、接触性等, 上市后中药

\* 基金项目: 重大新药创制子课题项目(2015X09501004-001-009)。 作者简介: 顾敏, 女, 医师, 主要从事血液病及中西医结合 MDS 的临床与实验研究。 △ 通讯作者, E-mail: ktzu2014@163.com。 ▲ 共同通讯作者, E-mail: drzhyubin@sina.com。