

NS1 抗原捕获 ELISA 在登革热筛查及诊断中的应用

李启欣, 朱嫦琳, 陈文翠, 李炜煊[△] (广东省佛山市第一人民医院检验科 528000)

【摘要】 目的 评价检测登革病毒 NS1 抗原捕获酶联免疫吸附试验(NS1-ELISA)在登革热实验室诊断中的应用价值。**方法** 选取 2014 年 9~10 月在广东省佛山市第一人民医院就诊的疑似登革热病毒感染的患者共 173 例,分别采用 NS1-ELISA、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)和胶体金免疫层析法(以下简称金标法)对其血清中的登革病毒标志物进行检测,比较 3 种方法对登革热诊断的灵敏度、特异性、预测值、似然比、约登指数和卡帕值。**结果** 173 例疑似患者中共 88 例(50.87%)被确诊为登革热患者,检测结果阳性率最高为金标法,显著高于 NS1-ELISA 和 PCR;NS1-ELISA 敏感度、阴性预测值和约登指数均高于 PCR 和金标法,阴性似然比低于 PCR 和金标法,3 种方法的敏感度差异无统计学意义($P>0.05$),PCR 和 NS1-ELISA 特异性显著优于金标法,差异有统计学意义($P<0.05$),PCR 特异性高于 NS1-ELISA,但差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** NS1-ELISA 对登革热的检测效能和应用价值优于 PCR 和金标法,可作为登革热暴发或散发的筛查及确诊方法。

【关键词】 登革热; 登革病毒; NS1 抗原; 酶联免疫吸附试验

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.24.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)24-3673-03

Application of NS1 antigen capture ELISA in screening and diagnosis of dengue fever LI Qi-xin, ZHU Chang-lin, CHEN Wen-cui, LI Wei-xuan[△] (Department of Medical Laboratory, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 528000, China)

【Abstract】 Objective To assess the application value of NS1 antigen capture ELISA (NS1-ELISA) in the laboratory diagnosis of dengue fever. **Methods** Serum samples were obtained from 173 borderline cases of dengue virus infection in the First People's Hospital of Foshan from September to October in 2014. Serum markers of dengue virus were detected by NS1-ELISA, PCR and immunogold labeling assay (IGLA), respectively. The sensitivity, specificity, predictive value (PV), likelihood ratio (LR), Youden's index (YI) and kappa value of 3 methods in diagnosis of dengue fever were assessed. **Results** Among 173 patients, there were 88 cases (50.87%) diagnosed to be dengue fever. IGLA had the highest positive rate, which was significantly higher than NS1-ELISA and PCR. The sensitivity, PV, and YI of NS1-ELISA were higher than IGLA and PCR, while LR was lower. No significant differences were found in sensitivities among 3 methods ($P>0.05$). The specificities of NS1-ELISA and PCR were both higher than IGLA ($P<0.05$), but no significant differences of the specificities were found between NS1-ELISA and PCR ($P>0.05$). **Conclusion** NS1-ELISA had better detection efficiency and application value than PCR and IGLA, which could be the ideal method for screening and diagnosis of dengue fever when it outbreaked or sporadically occurred.

【Key words】 dengue fever; dengue virus; NS1 antigen; ELISA

登革热是一种全球性的急性虫媒传染病,由登革病毒引起,经伊蚊传播,多流行于热带和亚热带,尤其是东南亚国家,是我国重点监测与控制的传染病之一^[1]。广东省是登革热高发流行区,2005~2012 年全国报道发病人数中,广东省病例占全国的 71.65%,暴发病例所占比例更高达 85.68%^[2]。2014 年夏、秋季,广东地区再次暴发登革热,至 2014 年 10 月止,全省确诊病例超过 4 万例,因此,及时准确的检测和预防十分重要。目前基层医院常用的检测方法为胶体金免疫层析法,初筛阳性后再送当地疾病预防控制中心,采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)确诊,检测周期较长,不利于早期发现,且检测要求较高。针对登革病毒 NS1 抗原的酶联免疫吸附试验(ELISA)具有耗时较短且敏感性和特异性较好的特点,本研究对此 3 种方法进行比较,为寻找快速准确诊断登革热的方法提供重要实验室依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来自 2014 年 9~10 月于本院就诊的疑似登革热病毒感染患者共 173 例,其中男 90 例,女 83 例,年龄 1~83 岁,平均(35.13±20.18)岁。采用普通干燥管采集静脉

血 4 mL,3 000 g 离心 15 min 后分离血清待测。

1.2 检测原理

1.2.1 针对登革病毒 NS1 抗原的 ELISA(以下简称 NS1-ELISA) 登革病毒 NS1 抗原检测试剂盒购自北京万泰生物药业股份有限公司,采用双抗体夹心 ELISA 原理,检测样品中登革病毒 NS1 抗原。

1.2.2 实时荧光定量 PCR(以下简称 PCR) 登革热病毒通用型核酸检测试剂、登革热 DENV-1、DENV-2、DENV-3 和 DENV-4 型病毒核酸荧光检测试剂盒均购自上海之江生物科技有限公司,核酸提取试剂盒为 Qiagen 公司产品。

1.2.3 胶体金免疫层析法(以下简称金标法) 登革热快速诊断试剂盒购自澳大利亚 PanBio 公司。

1.3 检测方法 全部送检血清标本同时采用 3 种方法进行检测,所有方法均严格按照说明书进行操作。

1.4 确诊标准 按卫生部发布的登革热诊断标准(WS216-2008)^[3]进行确诊。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件,采用四格表 χ^2 检验进行组间比较,计算 3 种方法对登革热诊断的敏感度、特异性、

阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比、约登指数(YI)及 Kappa(κ)值。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 根据患者的登革热诊断标准(WS216-2008)送检的 173 例疑似患者中,88 例(50.87%)被确诊为登革热,85 例(49.13%)为其他病因引起的发热。

2.2 3 种方法检测登革热检出率分析 见表 1。173 例登革热疑似患者中,检测结果阳性率(72.25%,125/173)最高为金标法,高于 NS1-ELISA 的(58.96%,102/173)和 PCR 的(54.34%,94/173),差异有统计学意义($\chi^2=6.776, P=0.009$; $\chi^2=11.955, P=0.001$),NS1-ELISA 又高于 PCR,但差异无统计学意义($\chi^2=0.753, P=0.385$)。

2.3 3 种方法对登革热的检测效能分析 3 种方法对登革热疑似患者血清检测的灵敏度、特异性、阳性预测值、阴性预测值、阳性似然比、阴性似然比、YI 和 κ 值见表 2。由表 2 可见,

NS1-ELISA 敏感度、阴性预测值和 YI 均高于 PCR 和金标法,阴性似然比低于 PCR 和金标法, κ 值与 PCR 相等,特异性和阳性似然比明显高于金标法,稍低于 PCR,由此表明 NS1-ELISA 对登革热诊断价值较高。

表 1 3 种方法检测登革热检出率分析

检测方法	检测结果	登革热($n=88$)		合计
		阳性	非登革热($n=85$) 阴性	
NS1-ELISA	阳性	86	16	102
	阴性	2	69	71
PCR	阳性	82	12	94
	阴性	6	73	79
金标法	阳性	83	42	125
	阴性	5	43	48

表 2 3 种方法对登革热检测效能

检测方法	灵敏度 (%)	特异性 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	阳性似然比 (%)	阴性似然比 (%)	YI	κ
NS1-ELISA	97.73	81.18	84.31	97.18	519.19	2.80	0.82	0.79
PCR	93.18	85.88	87.23	92.41	660.02	7.94	0.79	0.79
金标法	94.32	50.59	66.40	89.58	190.88	11.23	0.45	0.45

2.4 3 种方法敏感度和特异性比较 见表 3。对 3 种方法的敏感度和特异性进行两两比较,结果显示敏感度差异无统计学意义($P>0.05$),PCR 和 NS1-ELISA 特异性显著优于金标法,差异有统计学意义($P<0.05$),PCR 特异性高于 NS1-ELISA,但差异无统计学意义($P=0.408$)。

表 3 3 种方法敏感度和特异性比较

检测方法	敏感度		特异性	
	χ^2	P	χ^2	P
NS1-ELISA vs PCR	1.179	0.278	0.684	0.408
NS1-ELISA vs 金标法	0.595	0.440	17.691	<0.05
金标法 vs PCR	0.097	0.755	24.425	<0.05

3 讨 论

登革热是世界上尤其是热带地区最重要的虫媒传播疾病之一。登革热检测有登革热病毒分离、抗体血清学检测及针对病毒核酸分子生物学检测等多种方法。病毒分离法准确可靠,是登革病毒检测的金标准,但操作繁琐,敏感度低,不宜用于早期诊断^[4]。血清学检测方法主要有血凝抑制试验、间接免疫荧光抗体试验、IgM//IgG 捕获 ELISA 及快速免疫层析法等,都是针对登革病毒抗体进行检测,各种方法都存在一定的优缺点^[5-6]。分子生物学方法主要包括反转录-PCR、实时荧光定量 PCR、转录介导的扩增方法等,敏感性更高,可用于早期诊断,但检测要求较高,不适合于基层医院开展^[7]。

NS1-ELISA 检测的是登革病毒的 NS1 抗原,NS1 是登革病毒的非结构蛋白,仅存在于 4 种型别的登革病毒而不存在于其他黄病毒属病毒,因此无交叉反应,特异性好。NS1 在发病早期即出现,检测窗口宽,可达到早期检测和随时检测的目的,灵敏度和特异性较高,应用前景良好^[8]。本研究选用的金标法采用未稀释的血清检测,根据测试卡上的条带直接判断抗体类型(如 IgM、IgG)和感染情况(如初次感染、二次感染)^[9]。金

标法简单实用、结果直观,可用于疾病流行期间的疾病初筛,增加检出率,但由于特异性较差,在散发情况下可能会产生较多的假阳性。PCR 是在反应体系中加入荧光基团,将荧光技术与常规 PCR 技术结合,对病毒核酸进行精确定量,敏感度和特异性好,但一般仅在地区疾病控制中心及少部分大型综合医院开展,不用于常规筛查。

本研究结果显示,对送检的登革热疑似患者,金标法阳性率显著高于 NS1-ELISA 和 PCR,差异有统计学意义($P<0.05$),3 种方法检测的阳性率均高于文献^[10-11]的报道,与本年度登革热暴发流行及试剂厂家不同有关。高流行率导致确诊患者在疑似患者中的比例上升,因此检出率随之上升。不同厂家生产的试剂采用的检测抗体和标记方法不完全相同,敏感度和特异性也存在一定差异。从检测效能分析结果可见,3 种方法的敏感度未发现差异,NS1-ELISA 和 PCR 的特异性相当(81.18% vs. 85.88%),均显著高于金标法(50.59%),差异有统计学意义($P<0.05$),略低于文献^[12-13]报道的数据。由此提示金标法敏感度好但特异性较差,仅适合于初筛而不能用于确诊。NS1-ELISA 和 PCR 特异性较好,可用于登革热的实验室辅助诊断。YI 又称为正确指数,是综合评价筛查试验真实性的方法,YI 越大说明筛查试验效果越好,真实性越大。本研究结果表明,NS1-ELISA 和 PCR 的 YI 均达到 0.8 左右,由此提示两种方法对登革热有较好的筛查价值。对 3 种方法进一步评价结果显示,PCR 和 NS1-ELISA 的阳性预测值和阴性预测值均在 90%左右,由此表明这两种方法检测结果与实际符合程度较高。由于在选择诊断试验时应当选择阳性似然比大而阴性似然比小的试验,因此,PCR 和 ELISA 都可作为登革热的诊断手段。

考虑到 PCR 检测要求较高,需要特定的检测环境和技术人员,且易出现假阳性,因此目前尚未在临床上广泛使用。本研究证明,NS1-ELISA 与 PCR 检测效能相当,敏感度、YI 甚至高于 PCR,且 NS1-ELISA 检测的是病毒抗原,不同于传统 ELISA,无需等到患者恢复期出现抗体,在整个发病期均可检

测到,可用于登革热的早期诊断^[4]。此外,由于 ELISA 对设备要求不高,操作简便,价格相对低廉,易实现批量检测,因此可作为登革热暴发或散发的筛查及确诊方法。目前常用的实验室手段为金标法筛查阳性后送当地疾病预防控制中心进行 PCR 确诊,NS1-ELISA 可简化流程,节省人力物力,大大缩短实验室诊断时间,可作为登革热筛查和早期诊断的首选方法,可于临床推广应用。

参考文献

- [1] Murrell S, Wu SC, Butler M. Review of dengue virus and the development of a vaccine[J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29 (2): 239-247.
- [2] 张顺先, 王英, 闫磊, 等. 我国 2005~2012 年登革热流行特征分析[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(16): 401-402.
- [3] 肖东楼, 罗会明, 李德新, 等. 登革热防治手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 259-262.
- [4] Castro-Jorge LA, Machado PR, Favero CA, et al. Clinical evaluation of the NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of dengue virus infection in Brazil[J]. *J Med Virol*, 2010, 82(8): 1400-1405.
- [5] Maeda A, Maeda J. Review of diagnostic plaque reduction neutralization tests for flavivirus infection [J]. *Vet J*, 2013, 195(1): 33-40.
- [6] Runge-Ranzinger S, Horstick O, Marx M, et al. What does dengue disease surveillance contribute to predicting and detecting outbreaks and describing trends[J]. *Trop Med Int Health*, 2008, 13(8): 1022-1041.
- [7] Watthanaworawit W, Turner P, Turner CL, et al. A prospective evaluation of diagnostic methodologies for the a-

cute diagnosis of dengue virus infection on the Thailand-Myanmar border[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2011, 105(1): 32-37.

- [8] Blacksell SD, Doust JA, Newton PN, et al. A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of rapid immunochromatographic assays for the detection of dengue virus IgM antibodies during acute infection[J]. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2006, 100(8): 775-784.
- [9] 傅强, 田疆, 方丹云, 等. 登革病毒 NS1 蛋白的原核表达及其在登革热快速诊断中的应用[J]. *中山大学学报*, 2012, 33(3): 316-321.
- [10] 卢业成, 陈万山, 张复春, 等. 三种登革热抗体检测方法的临床对比研究[J]. *热带医学杂志*, 2005, 5(5): 586-588.
- [11] Gupta E, Mohan S, Baipai M, et al. Circulation of Dengue virus-1 (DENV-1) serotype in Delhi, during 2010-11 after Dengue virus-3 (DENV-3) predominance: A single centre hospital-based study[J]. *J Vec Bor Dis*, 2012, 49(2): 82-85.
- [12] Puttikhunt C, Prommool T, U-thainual N, et al. The development of a novel serotyping-NS1-ELISA to identify serotypes of dengue virus[J]. *J Clin Virol*, 2011, 50(4): 314-319.
- [13] Kong YY, Thay CH, Tin TC, et al. Rapid detection serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real-time one-step RT-PCR [J]. *J Virol Met*, 2006, 138 (1/2): 123-130.

(收稿日期: 2015-06-04 修回日期: 2015-08-10)

(上接第 3672 页)

观察组患者妊娠终止时间长于对照组, 产后出血量显著少于对照组, 新生儿体质量明显重于对照组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。研究结果提示, 饮食疗法联合药物治疗可以有效延长终止妊娠时间, 增加新生儿体质量, 减少产后大出血。可能原因是控制刺激食物及良好的进食习惯可以有效改善患者体内生化指标, 降低体内 TBA 水平。TBA 会有效刺激胎儿的结肠运动, 导致胎便排除, 增加羊水粪染概率, 增加早产发生率。合理饮食可以缓解生化指标, 改善妊娠结局。

综上所述, 饮食疗法联合优思弗应用于妊娠期胆汁淤积症患者, 可以有效缓解患者的瘙痒症状, 改善患者生化指标, 延长妊娠终止时间, 减少术后大出血及增加新生儿体质量, 值得临床推广应用。

参考文献

- [1] 徐海青. 优思弗治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的疗效观察[J]. *医学理论与实践*, 2013, 26(8): 1061-1062.
- [2] Azzaroli F, Turco L, Lisotti A, et al. The pharmacological management of Intrahepatic cholestasis of pregnancy[J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2011, 6(1): 12-17.
- [3] Stieger B, Geier A. Genetic variations of bile salt transporters as predisposing factors for drug-induced cholestasis, intrahepatic cholestasis of pregnancy and therapeutic response of viral hepatitis[J]. *Expert Opin Drug Metab*

Toxicol, 2011, 7(4): 411-425.

- [4] 徐玮玮, 杨璐, 余国政, 等. 妊娠期肝内胆汁淤积症 78 例临床治疗分析[J]. *现代医药卫生*, 2014, 30(7): 988-989.
- [5] 王建定, 赖启明. 中西医结合治疗妊娠期肝内胆汁淤积症 35 例[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2011, 21(2): 102-103.
- [6] Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Nikolopoulou E, et al. Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(7): 3172-3181.
- [7] 赵展, 李宁, 袁丽, 等. 口服药物治疗妊娠期肝内胆汁淤积症 116 例临床分析[J]. *中国医药指南*, 2011, 9(35): 271-273.
- [8] 俞丁丁. 不同剂量 S-腺苷蛋氨酸对重度妊娠期肝内胆汁淤积症的疗效观察[J]. *临床合理用药杂志*, 2011, 4(23): 57-58.
- [9] Martineau M, Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, et al. Cholestatic pregnancy is associated with reduced placental 11 β HSD2 expression[J]. *Placenta*, 2014, 35(1): 37-43.
- [10] Schuh CM, Tarney C, Sewell M. A Review of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy[J]. *Curr Wom Heal Rev*, 2014, 10(1): 43-49.

(收稿日期: 2015-06-18 修回日期: 2015-08-11)