and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: alliance or contradiction? (Review)[J]. Int J Oncol, 2015, 47(2): 429 – 436.
[17] Toren P, Zoubeidi A. Targeting the PI3K/Akt pathway in prostate cancer: challenges and opportunities (review)[J]. Int J Oncol, 2014, 45(5): 1793 – 1801.
[18] Zhuang Z, Qin X, Hu H, et al. Down-regulation of micro RNA-155 attenuates retinal neovascularization via the PI3K/Akt pathway[J]. Mol Vis, 2015, 21: 1173 – 1184.
[19] Min M, Peng L, Yang Y, et al. MicroRNA-155 is involved in the pathogenesis of ulcerative colitis by targeting FOXO3a[J]. Inflamm Bowel Dis, 2014, 20(4): 652 – 659.
[20] Ling N, Gu J, Lei Z, et al. microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2111 – 2118.

收稿日期: 2017-02-10 (解学魁编辑 郭薇校对)

· 检验技术 ·

登革 -2 型病毒一步法 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法建立*

牟小会[1], 郑祎扬[2], 韦艳[2], 颜凤[1], 程金芝[1], 吕清巧[1], 商正玲[3], 吴家红[1]

摘 要: 目的 建立一种针对登革 2 型病毒(DENV-2)的快速、灵敏、特异的检测方法。**方法** 从 GenBank 下载 105 株 DENV-2 病毒毒株全基因序列, 应用生物软件 Bioedit 进行比对分析筛选出保守序列, 在保守区域设计特异引物和探针, 建立检测 DENV-2 的 TaqMan 荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法。**结果** 该方法检测灵敏度达到 10^2 copies/μL; 特异性验证中除登革 2 型病毒有明显扩增外, 与墨累谷脑炎病毒、西尼罗病毒、蜱传脑炎病毒、登革病毒 1、3、4 型、黄热病毒和科萨努尔森林病毒、乙型脑炎病毒均无交叉反应。重复性实验结果表明该方法的组间和组内的变异系数(CV)均 <2%。对人工感染 DENV-2 的 87 只蚊虫标本进行比对实验, 结果荧光定量 RT-PCR 检测出 56 份阳性, 传统 RT-PCR 只检测出 16 份阳性, 差异有统计学意义($\chi^2 = 37.908$, $P = 0.000$)。**结论** TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法检测 DENV-2, 特异性强、敏感性高。

关键词: 登革 2 型病毒(DENV-2); TaqMan 荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR); 检测; 标准品
中图分类号: R 373.3 **文献标志码**: A **文章编号**: 1001-0580(2017)07-1074-05 DOI: 10.11847/zgggws2017-33-07-11

Development and evaluation of TaqMan-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assay for detection of dengue virus type 2

MOU Xiao-hui*, ZHENG Yi-yang, WEI Yan, et al (*Laboratory for Modern Pathogen Biology, Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province* 550025, China)

Abstract: Objective To develop a TaqMan-based reverse transcription-polymerase chain reaction assay (RT-PCR) for the detection of dengue virus type 2 (DENV-2). **Methods** The whole genome sequences of DENV-2 were downloaded from the GenBank and aligned with the Bioedit software. Specific primers and probes were designed on the conserved region of DENV-2 based on the alignment results to develop a TaqMan-based RT-PCR assay. **Results** The detection limit of the assay was 10^2 copies/μL. Besides the obvious amplification of DENV-2, there were no cross reactions with Murray Valley encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, West Nile virus, tick-borne encephalitis virus, other types of dengue virus, yellow fever virus, and Kyasanur Forest disease virus. The results of the stability assay showed that the between- and within-group coefficient of variation were less than 2%. For the 87 mosquito specimens detected with two different methods, 56 positive samples were confirmed with fluorescence quantitative RT-PCR, while only 16 positive samples were confirmed with the traditional RT-PCR method, with a significant difference ($\chi^2 = 37.908$, $P = 0.000$). **Conclusion** The developed TaqMan-based one-step reverse transcription-polymerase chain reaction assay is of strong specificity and high sensitivity for molecular diagnosis of DENV-2.

Key words: dengue virus type 2; TaqMan real-time reverse transcription-PCR; detection; standard substance

登革病毒(dengue virus, DENV)是黄病毒科黄病毒属的单链 RNA 病毒, 根据病毒抗原特异性分为登革Ⅰ~Ⅳ 4 个血清亚型[1]。主要通过埃及伊蚊传播到人群, 所致疾病主要有登革热(dengue

* **基金项目**: 贵州省科技厅基础平台建设项目(黔科平台[2012(4006)]); 贵州省社会发展科技公关项目(黔科合 SY 字[2009]3056)
作者单位: 1. 贵州医科大学基础医学院现代病原生物学实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室; 3. 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室
作者简介: 牟小会(1989 –), 女, 贵州安顺人, 硕士在读, 研究方向: 病媒生物防控与虫媒病。
通讯作者: 吴家红, E-mail: 657490050@qq.com
数字出版日期: 2016 – 9 – 6 15: 12
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160906.1512.060.html

fever, DF)、登革出血热(dengue hemorrhagic fever, DHF)和登革休克综合征(dengue shock syndrome, DSS),是全球最严重的虫媒传染病之一。全球每年约发生 5 000 万 ~ 1 亿例 DENV 感染(大多数为儿童)[2-3]。DENV 的任何一种亚型都能引起 DF、DHF 和 DSS,再次感染其他型别的 DENV 是导致 DHF 和 DSS 的重要原因[4]。因此,建立一种既能快速检测 DENV 又能准确分型的检测方法,对于临床诊断及治疗、登革病毒的变化动态及登革传播媒介监测具有重要意义。本研究针对 DENV-2 设计建立一步法 TaqMan 荧光定量逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测方法,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 病毒细胞 DENV-2 NGC 株(2012 年 9 月引自北京军事医学科学院,贵州医科大学基础医学院现代病原生物学实验室保种)、乙型脑炎病毒 SA14-14-2(武汉生物制品研究所生产的减毒活疫苗)。Vero 细胞(非洲绿猴肾细胞)为贵州医科大学基础医学院现代病原生物学实验室保存。除 DENV-2、乙型脑炎毒株外,其余的墨累谷脑炎病毒、西尼罗病毒、蜱传脑炎病毒、DENV-1、DENV-3、DENV-4、黄热病毒、科萨努尔森林病毒共 8 种病毒由生工生物工程(上海)股份有限公司提供含有部分靶基因的 pBluescript II SK(+)质粒。87 份染病毒蚊虫样本由中山大学-密歇根州立大学热带病虫媒控制联合研究中心提供。体外转录试剂盒 T7 RiboMAX™Express Large Scale RNA Production System(美国 promega 公司);Trizol 试剂(美国 invitrogen 公司);逆转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser(Perfect Real Ⅰ Time)、One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real Time)、ExTaq、Easy Dilution 等[日本(大连)TaKaRa 公司],RNA 纯化试剂盒(北京全式金生物公司)。胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司),青-链霉素双抗生素、1640 基础培养基(美国 Hyclone 公司)。用于 PCR 扩增体外转录模板的引物(引物由北京博迈德科技发展有限公司合成)。TaqMan 探针引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成并标记,探针 5′端、3′端分别标记 CY5 荧光报告基团和 BHQ-3 荧光淬灭基团。二氧化碳细胞培养箱为香港力康公司产品;台式低温离心机为美国贝克曼库尔特公司产品;PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪均为美国伯乐公司产品;核酸电泳仪为上海谱振公司产品;凝胶成像系统为美国 Amersham Pharmacia 公司产品;核酸定量仪为美国 BioTek 产品。

1.2 方法

1.2.1 引物与探针设计与合成(表 1、2) 从 GenBank 共检索到 105 株 DENV-2 病毒的全基因序列。利用生物信息学分析软件 Bio Edit 对下载毒株全基因组进行保守性分析;以 GenBank 中 NC_001474.2 为参考株,首先设计涵盖保守区域并带有 T7 启动子的引物序列,再根据文献[5 - 7]提供的 TaqMan PCR 引物探针的设计原则,利用 DNASTAR 辅助在其 3′-UTR 的保守区域进行引物、探针设计筛选,然后通过 Blast 在线分析初步验证其特异性。

1.2.2 建立标准曲线

1.2.2.1 DENV-2 型病毒培养 Vero 细胞培养使用 1640 生长液(含 10% 胎牛血清,1% 青-链霉素双抗生素),于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中培养;待细胞长成单层时,先用磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)清洗 2 遍,再用 1640 维持液(含 2% 胎牛血清,1% 青 - 链霉素双抗生素)清洗 1 遍,然后接种 DENV-2 型病毒,静置吸附 1 h(期间每隔 15 min 取出振荡),补充 1640 维持液;继续培养5 ~ 7 d。待细胞病变后反复冻融收获病毒上清 - 80 ℃保存备用。

表 1 用于 PCR 扩增体外转录模板的引物序列

引物名称	引物序列	扩增片段(bp)
DENV-T7-2F	5′-*TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC* GGT CGC GTA CTC GTT GTT CCA-3′	950
DENV-T7-2R	5′-GTG CCT GGA ATG ATG CTG AGG AG-3′	

表 2 DENV-2 TaqMan 探针荧光定量 RT-PCR 检测法引物探针序列

引物名称	引物序列	引物序列位置
DENV-2F	5′-CAG GTC GGA TTA AGC CAT AGT AC-3′	10 313 ~ 10 335
DENV-2R	5′-CAG GTG GAG CTA CAG GC-3′	10 341 ~ 10 367
DENV-2P	5′-AAA CTA TGC TAC CTG TGA GCC CCG TCC-3′	10 426 ~ 10 442

1.2.2.2 DENV-2 型病毒 RT-PCR 用 TRIzol 法提取核酸后逆转录为 cDNA,逆转录按照试剂盒说明书进行。-20 ℃保存备用。以 DENV-2 型病毒 cDNA 为模板,利用 PCR 的方法将 T7 启动子引入 DENV-2 型病毒阅读框的上游,以达到经过体外转录后,获得与病毒基因组序列一致的 RNA。扩增反应体系为 DENV-2 型病毒 cDNA 模板 4 μL;DENV-2F-T7/DENV-2R-T7(10 μmol/L)各2 μL;ExTaq 25 μL;DEPC 水[焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate,

DEPC)处理过并经高温高压灭菌不含 RNA 酶、DNA 酶和蛋白酶的水]17 μL,总体积 50 μL。反应条件:94 ℃ 10 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环;72 ℃ 10 min。利用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化。

1.2.2.3　体外转录制备 DENV-2 RNA 标准品　利用 T7 RiboMAX™Express Large Scale RNA Production System 试剂盒,室温配制 20 μL 反应体系:RiboMAX™Express T7 2 × Buffer 10 μL,线性 DNA 模板(0.1 ~ 0.15 μg/μL)5 μL,无 RNA 酶纯水 3 μL,Enzyme Mix T7 Express 2 μL。反应条件为 37 ℃ 30 min。转录产物加 DNase I(2U/μL)3 μL 继续反应 20 min 除去 DNA 模板。用 RNA 纯化试剂盒进行纯化后用核酸测定仪进行浓度测定。体外转录产物稀释到 100 ~ 300 ng/μL 后将稀释后浓度换算为拷贝/μL。拷贝数 = 浓度 × 阿伏加德罗常数/(340 × 总长度),阿伏加德罗常数为 6.02×10^{23}。10 倍梯度稀释,制备浓度为 $10^1 \sim 10^8$ 拷贝/μL 的标准品。

1.2.2.4　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 扩增　将 DENV-2 $10^1 \sim 10^8$ copies/μL 的标准品作为模板,运用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增。反应体系为 25 μL:2 × One Step RT-PCR Buffer Ⅲ 12.5 μL,TaKaRa Ex Taq HS(5 U/μL)0.5 μL,PrimeScript RT Enzyme Ⅱ Mix 0.5 μL,DENV-2F(10 μmol/L)0.5 μL,DENV-2R(10 μmol/L)0.5 μL,DENV-2P(10 μmol/L)0.5 μL,总 RNA 2 μL,无 RNA 酶纯水 8 μL。反应条件为:42 ℃ 5 min;95 ℃ 10 s;95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。

1.2.2.5　建立标准曲线　利用相对应的 Bio-Rad CFX Manager(version 1.5,Bio-Rad,USA)进行分析,标准曲线方程为:$y = -3.67x + 43.50$(y 代表 CT 值,x 代表模板浓度的对数值,计算相关系数 R^2(按积差方法计算)和扩增效率 E($E = 10^{-1/斜率} - 1$)。

1.2.3　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法建立

1.2.3.1　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 灵敏性检测　用体外转录所得的 RNA 进行 10 倍系列稀释,以制备的 $10^8 \sim 10^1$ copies/μL DENV-2 标准品进行荧光定量 RT-PCR 检测,以结果阳性的最高稀释度作为评价敏感性的指标。

1.2.3.2　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 特异性检测　为验证本实验设计的特异性,本实验同时以墨累谷脑炎病毒、西尼罗病毒、蜱传脑炎病毒、DENV-1、DENV-3、DENV-4、黄热病毒、科萨努尔森林病毒及乙型脑炎病毒共 9 种黄病毒属黄病毒科的病毒 RNA 标准品为模板,无 RNA 酶纯水为阴性对照进行检测。其中乙型脑炎病毒与 DENV-2 型病毒采用相同的方法获得 RNA 标准品。其余病毒模板运用人工合成方法获得病毒株部分片段基因并克隆到含有 T7 启动子的 pBluescript II SK(+)质粒上,通过对质粒测序确认合成 DNA 序列的准确性后,运用 PCR 方法获取体外转录模板并进行体外转录获取 RNA 标准品。分别以这 10 种病毒的 10^5 copies/μL RNA 标准品进行 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测,以评价该检测方法的特异性。

1.2.3.3　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的重复性检测　选取 3 个不同浓度(10^7、10^6、10^5 copies/μL)的 DENV-2 RNA 标准品进行 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测,每个浓度分别进行 3 个平行重复,不同时间点重复试验 3 次。

1.2.4　蚊虫样本检测　(1)RNA 提取:将蚊虫样本 1 只转入 1 只 1.5 mL 去酶的离心管中,先加入 50 μL Trizol,用小型电动组织研磨器将蚊虫磨匀,再补加 450 μL Trizol 混匀后进行 RNA 提取。(2)运用传统 RT-PCR 检测方法(DENV-2F:CAT GCC ATC CAT GAA AAG ATT CAG A;DENV-2R:TTG TTG CTG CGA TTT GTA AGG GAG)与本研究建立的 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法进行对照检测。

1.3　统计分析　采用 SPSS 17.0 软件进行分析,计算变异系数(coefficient of variation,CV),率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 标准曲线(图 1)　以 DENV-2 型 $10^1 \sim 10^8$ copies/μL RNA 标准品为模板。荧光定量 PCR 在 $10^1 \sim 10^8$ copies/μL 具有良好的线性关系,标准曲线方程为:$y = -3.67x + 43.50$,相关系数 $R^2 = 0.998$,扩增效率为 87.20%。根据 DENV-2 型 RT-PCR 检测体系的标准曲线,以 CT 值≤35 作为阳性标准。

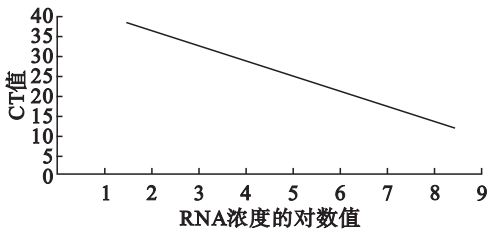

图 1　DENV-2 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法标准曲线

2.2　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的灵敏性(图 2)　将 DENV-2 $10^8 \sim 10^1$ copies/μL 的 8 个浓度 RNA 标准品进行 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 扩增,根据 CT 值≤35 的阳性标准界限,灵敏性结果显示:TaqMan 荧光定量 RT-PCR 最低浓度为

10^2 copies/μL。

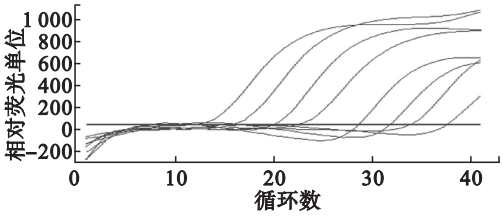

图 2　DENV-2 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法灵敏性

2.3　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的特异性（图 3）　对墨累谷脑炎病毒、西尼罗病毒、蜱传脑炎病毒、DENV-1～4、科萨努尔森林病毒及乙型脑炎病毒检测结果表明，只有 DENV-2 型病毒出现阳性扩增曲线，其他病毒及阴性对照检测结果均为阴性。

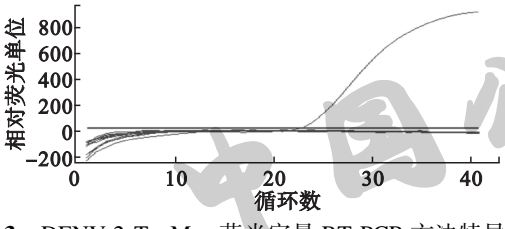

图 3　DENV-2 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法特异性

2.4　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 检测方法的重复性（表 3、4）　将 DENV-2 RNA 标准品（10^7、10^6、10^5 copies/μL）进行 TaqMan 荧光定量 RT-PCR，各浓度分别进行 3 次重复，每次试验每个浓度设3 个重复。结果显示组内和组间的变异系数（variation coefficient，CV）均 <2%。

表 3　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 组内重复实验结果（n =3）

标准品拷贝数	CT 平均值	SSD	CV
10^7	16.313	0.139	0.85
10^6	19.836	0.222	1.12
10^5	23.214	0.151	0.65

表 4　TaqMan 荧光定量 RT-PCR 组间重复实验结果（n =3）

标准品拷贝数	CT 平均值	SSD	CV
10^7	16.314	0.103	0.63
10^6	19.836	0.204	1.03
10^5	23.238	0.058	0.25

2.5　样本检测　运用本研究建立的 DENV-2 一步法实时荧光 RT-PCR 检测方法对 87 份 DENV-2 感染的蚊虫样本进行检测，检出 56 份阳性样本，同时运用常规 RT-PCR 方法对 87 份样本进行检测，共检测出 16 份阳性样本。将 2 种方法的检出率作 χ^2 检验，差异有统计学意义（χ^2 =37.908，P =0.000）。

3　讨　论

登革热在中国的流行区域主要分布在广东、广西、福建、浙江和海南等地。自 1978 年广东佛山暴发流行后疫情不断出现。DENV 的 4 种血清型都曾在我国流行。DENV-2 作为 DENV 的重要成员之一，引起的感染最为严重。DENV-2 1985 年 9 月在海南岛引起高强度大流行[8]，随后又在台湾岛、福州、湛江等地区引起严重的暴发流行[9-11]；1993 年在佛山、1999 和 2007 年在福建省、2001 年在澳门与广东省中山市发生的流行均由 DENV-2 引起[12-15]；2014 年在广州暴发的登革热也是由 DENV-2 及 DENV-1 两种血清型感染所引起，这次疫情的发病人数创了历史新高，并出现了死亡病例[16]。综上可知，DENV-2 在登革热流行中扮演了重要角色。因此，建立一种能对 DENV-2 引起的登革热进行早期快速诊断的方法显得尤为重要。目前，DENV 的检测主要包括病毒分离培养法，血清学检测法，分子生物学检测方法。能够对 DENV 血清型分型鉴定的方法主要有以下几种：（1）根据扩增片断的长度进行分型；（2）采用型特异探针进行杂交；（3）酶切分型法[17]。TaqMan PCR 技术是实时荧光定量 RT-PCR 技术中被广泛应用的一种技术，近年来该技术因其敏感性高、特异性强、能够实时定量等优点已被广泛应用病毒的快速检测及分型鉴定：Kong 等[18]针对 DENV NS5 建立的 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 方法不仅能快速检测 DENV，同时还能对 DENV 进行分型；Gurukumar 等[19]运用针对 DENV 的 3′UTR 设计的 4 种血清型的通用引物对临床血清样本进行了检测；Cecilia 等[20]建立了既能检测及鉴定 DENV 的血清型，还能同时检测出基孔肯尼雅病毒的 TaqMan 实时荧光方法。这些研究都表明 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 方法与传统 RT-PCR 方法相比，其敏感性高、特异性好、操作简便迅速。但是 Kong 等[18]在研究中用来设计引物探针的毒株只包括 DENV-1（AF513110）、DENV-2（AF489932）、DENV-3（AY099336）和 DENV-4（AF326573）各 1 株；而 Gurukumar 等[19]研究中涉及到毒株主要在印度分离。本研究在前人研究的基础上，通过美国国立生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）检索到 105 条地理位置覆盖古巴、泰国、越南等主要流行区域和基因型别的 DENV-2 全基因序列。通过比对找到高度保守区域后经生物信息学分析和考虑引物探针设计的原则后将扩增区段定位于高度保守的 3′UTR，采用 TaqMan 探针法建立了一种能检测 DENV-2 病毒的荧光定量 PCR 方法。本研究中经过大量序列比对后设计的特异性引物探针，通过 NCBI 的 Blast 组件进行在线虚拟比对，结果表明与其他虫媒病毒基因无任何交叉反应可能，比 Kong 等[18]和 Gurukumar

等[19]研究中的引物探针更保守,特异性更高。进一步试验结果表明,建立的检测方法循环阈值与 RNA 拷贝数的对数呈良好的线性关系扩增效率达 87.2%。其重复性结果显示组内和组间 CV 均 < 2%。敏感性试验结果表明该方法能检测出 3.0×10^2 copies/μL RNA 标准品,具有较高的灵敏性。运用包括 DENV-2 在内的黄病毒科黄病毒属中的 10 种较重要的病毒 RNA 标准品对建立的方法进行特异性验证,RT-PCR 扩增结果表明,仅 DENV-2 病毒呈现阳性,阴性对照及其他病毒均无扩增,与 Blast 比对结果相符。同时,运用建立的方法及传统 RT-PCR 方法对蚊虫样本中DENV-2的感染率进行检测,结果显示该方法的阳性率是传统 RT-PCR 的 3 倍多。从荧光结果分析发现:本研究能检测出感染 RNA 拷贝数较低的样本,而传统 RT-PCR 只能检测到感染 RNA 拷贝数较高的样本。

综上所述,本研究建立的方法实现了对 DENV-2 快速、简便、敏感、特异的定量检测及血清型鉴定,可应用于急性期登革热的临床诊断及对蚊媒监测,对监控登革热流行和预防控制疾病发展具有非常重要的意义。

参考文献

[1] Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature[J]. Virology, 1990, 74(2): 479 – 493.

[2] Halsetced SB. Dengue hemorhagic fever – a public health problem and a field for research[J]. Bull World Health Organ, 1980, 58(1): 1 – 22.

[3] Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue hemorrhagic fever[J]. World Health Stat, 1997, 50(1): 3.

[4] 董瑞玲,甄胜西,孙杰,等. 登革病毒 TaqMan 双重荧光 PCR 分型研究[J]. 中国热带医学,2011,11(12):1438 – 1439.

[5] Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, et al. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza virus 1, 2, 3 and 4 [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(4): 1564 – 1569.

[6] Stone B, Burrows J, Schepetiuk S, et al. Rapid detection and simultaneous subtype differentiation of influenza A viruses by real Time PCR[J]. J Virol Meth, 2004, 117(2): 103 – 112.

[7] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR assays[J]. J Mol Endocrinol, 2000, 25(2): 169 – 193.

[8] 王传滋,陈文洲. 海南省登革热历年流行概况[J]. 海南医学,1992,3(3):1 – 4.

[9] 许龙善. 台湾登革热的流行与控制[J]. 海峡预防医学杂志,2000,6(1):21 – 23.

[10] 郑能雄,许龙善,王宗汉,等. 福州市仓山区登革热流行及预防效果的调查研究[J]. 海峡预防医学杂志,2000,6(1):4 – 6.

[11] 杨芬,何剑锋,蔡松武,等. 2007 年广东省湛江雷州市登革热流行病学分析[J]. 疾病监测,2008,23(7):409 – 411.

[12] 廖育煌,罗惠容,伍颂民,等. 登革热病人 2/4 型登革热病毒的双重感染[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,1996,10(4):361 – 363.

[13] 翁育伟,洪荣涛,张山鹰,等. 福建省莆田市 2007 年登革热暴发的流行病学调查分析[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(4):330 – 333.

[14] 陈耀球,董绮红,朱雪茵,等. 澳门登革热 989 例[J]. 中华传染病杂志,2005,23:43 – 45.

[15] 杜建伟,潘先海. 中国登革热流行概况与流行特征[J]. 中华流行病学杂志,2010,31(12):1429 – 1433.

[16] 应若素,王建,洪文昕,等. 广东省 2014 年登革热暴发流行的临床和实验室特点[J]. 中华传染病杂志,2014,32(12):719 – 723.

[17] 但妍,郑建,黄爱龙. 登革病毒的分子生物学检测技术研究进展[J]. 国际病毒学杂志,2007,14(6):181 – 185.

[18] 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 Meth, 2006, 138(1): 123 – 130.

[19] Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA, et al. Development of real time PCR for detection and quantitation of dengue viruses [J]. J VIROL, 2009, 6(10): 1 – 8.

[20] Cecilia D, Kakade M, Alagarasu K, et al. Development of a multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of dengue and chikungunya viruses[J]. Arch Virol, 2015, 160(1): 323 – 327.

收稿日期: 2016-04-07 (吴少慧编辑 郭薇校对)