

jury[J]. Top Spinal Cord Inj Rehabil, 2012, 18(4): 291-299.

[22] Cola MG, Daniels K, Stephanie, et al. Relevance of subcortical stroke in dysphagia[J]. Stroke, 2010, 41(3): 482-486.

[23] Gallas S, Marie JP, Leroi AM, et al. Sensory transcutaneous electrical stimulation improves post-stroke dysphagic patients[J]. Dysphagia, 2010, 25(4): 291-297.

[24] Blumenfeld L, Hahn Y, Lepage A, et al. Transcutaneous electrical stimulation versus traditional dysphagia therapy: a nonconcurrent cohort study[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2006, 135(5): 754-757.

[25] Chetney R, Waro K. A new home health approach to swallowing disorders[J]. Home Health Nurse, 2004, 22(10): 703-707.

[26] 韩淑凯, 张保昌. 加味止痉散治疗脑血管意外假性球麻痹 42 例[J]. 新中医, 2008, 17(7): 78-79.

[27] 谭旭宏. 升降散合侯氏黑散治疗脑梗塞后假性球麻痹 40 例[J]. 陕西中医, 2009, 30(2): 158-159.

[28] 窦祖林. 吞咽障碍评估与治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 8.

[29] 祖菲娅·吐尔迪, 付怀成, 古丽娜孜·那比尔. 逐痰祛瘀汤配合针刺治疗中风吞咽障碍疗效观察[J]. 新疆医科大学学报, 2011, 34(7): 737-739.

[30] 许丰. 综合疗法治疗脑卒中后吞咽障碍的疗效观察[J]. 按摩与康复医学, 2011, 2(8): 5.

[31] 马俊勇. 综合疗法治疗假性球麻痹 42 例[J]. 山东中医杂志, 2006, 25(2): 105-107.

(收稿日期: 2016-01-21 修回日期: 2016-04-18)

• 综 述 •

单独抗-HBc 阳性隐匿性 HBV 检测方法研究进展

何成禄 综述, 石洪琼, 李梦瑶, 杨 珏, 万秋涵, 李 庆[△]审校
(昆明医科大学第一附属医院检验科 650032)

关键词: 乙肝; 抗体; 检测方法; 抗-HBc; 隐匿性 HBV
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 14. 062 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-9455(2016)14-2055-03

隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)是 HBV 感染的一种特殊形式,指血清 HBsAg 阴性,肝脏组织 HBV DNA 阳性,伴或不伴血清 HBV DNA 阳性的 HBV 感染。国内报道 OBI 在献血者及健康人群中的发生率为 0. 010 6%~2. 710 0%^[1]。OBI 患者能够经输血、器官组织移植等传播 HBV,合并 OBI 可能会对丙肝患者的治疗效果造成影响或引发肝癌。研究显示,作为 OBI 血清学表现形式之一,单独抗-HBc 阳性患者 HBV DNA 检出率达 8. 1%^[2],提示临床工作中对抗-HBc 阳性者的 HBV DNA 检测不容忽视。目前临床上检测 OBI 的方法主要有免疫学检测方法、分子生物学方法及肝组织穿刺免疫组化法。这些方法均存在不同的优缺点,本文就 OBI 常见血清学检测方法的的优势及缺陷进行综述,以寻找 OBI 检测的最适宜方法或方法组合,从而减少临床上 OBI 的误诊和漏诊。

1 免疫学检测

1.1 酶联免疫吸附实验(ELISA) ELISA 采用固相包被板式法,根据抗原抗体结合的专一性进行定性分析。该方法由于特异性强、操作简单快速、成本低廉等优点广泛应用于普通人群乙肝病毒标志物的筛查。但其结果用阴性和阳性来表示,只能反映患者当前感染乙肝病毒与否,不能定量反映出患者感染的病毒具体数量。OBI 患者由于各种原因导致血清中 HBsAg 低水平表达或表达异常,用 ELISA 方法对其进行检测易出现假阴性,从而造成临床漏诊。因此,若抗-HBc 阳性,需要采用更敏感的定量方法进一步检测 HBsAg 的具体数值,尽可能避免 OBI 漏检^[3]。

1.2 化学发光微粒子免疫(CMIA) CMIA 综合了电化学发光技术、磁性微珠包被技术、生物素-亲和素技术,以吡啶酯作

为标记发光剂,通过检测光强度从而对待测标本进行定量分析。该方法检测 HBsAg 的灵敏度可达 0. 05 IU/mL^[4],提高了低浓度 HBsAg 的检出率;而且检测速度快、重复性好、线性范围广,在一定程度上可用作抗病毒治疗和病情发展变化监测的参考指标。但是由于部分 OBI 患者机体免疫功能低下或处于免疫耐受状态时,会出现特殊的乙肝病毒标志物组合模式,CMIA 法具有局限性。因此,若抗-HBc 阳性时,采用灵敏度更高的分子生物学方法检测 HBV-DNA 以避免 OBI 漏检^[5]。

2 分子生物学方法

2.1 实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 对 HBV DNA 的检测是利用 PCR 的高度特异性,根据特定的引物能在复杂样品中得到特定序列的 DNA 且 DNA 的产量与初始模板量相关来进行测定。RT-PCR 检测技术是进行 HBV DNA 检测最为有效的方法之一,在技术上,RT-PCR 采用荧光标记和闭管检测,克服了常规 PCR 扩增产物污染所致假阳性的缺点,使结果具有极高的敏感度和特异性。但是由于 RT-PCR 的反应体系复杂,易受多种因素影响。有学者认为,HBV 的整合及突变是 OBI 发生的机制之一^[6],当病毒整合到肝细胞染色体上随肝细胞一起复制、表达或发生突变不能与荧光探针结合时,RT-PCR 可呈阴性^[7]。因此,若抗-HBc 阳性时,采用灵敏度更高的超敏 PCR 检测 HBV-DNA 以避免 OBI 漏检。

2.2 超敏 PCR 超敏 PCR 定量检测是在传统 PCR 的基础上采用磁珠吸附法对血清标本中的 HBV DNA 进行提取纯化,并采用内部标准品,在检测前加入每一个血清标本中,与标本同时提取和扩增。该方法回收率高,重复性好,消除了由于 HBV DNA 提取、扩增效率不同而造成的管间差异,检测灵敏

[△] 通讯作者, E-mail: kossy3791@sina. com.

度更高,定量线性范围更宽,定量结果更准确、可靠,能准确定量低载量 HBV DNA^[8],提高 OBI 的检出率。但是,超敏 PCR 试剂成本较高,检测费用是传统方法的 3~4 倍,因此临床医生可根据患者的病情,选择合适的检测方法,当 HBV DNA 在 10^4 IU/mL 以上时,传统方法的结果是可靠的;而单独抗-HBc 阳性时,HBV DNA 往往低于 10^4 U/mL^[9,12],应建议患者进行超敏法检测,以获取更可靠的信息避免 OBI 漏检。

2.3 分支 DNA 技术(bDNA) bDNA 技术是近年来发展的一种信号扩增技术,以微孔形式对杂交信号级联放大,实现特异性核酸扩增,并通过化学发光或其他显色系统显示检测结果,对 HBV DNA 进行定性或定量分析。该技术与 RT-PCR 相比特异性和重复性均较高,且假阳性率低,成本低廉,易于自动化,比较适用于 OBI 的检测^[10]。但研究发现该技术的灵敏度低于 RT-PCR 的 190 KU/L,存在漏检可能,而且线性范围较窄,为 $3.38 \times 10^3 \sim 3.38 \times 10^6$ kU/L,随着标本中 HBV DNA 浓度的增加超过阈值后,定量检测的准确性下降^[11]。

2.4 巢式 PCR 抗-HBc 阳性感染者血液中的 HBV DNA 大多呈低水平复制^[9,12],采用常规 PCR 无法得到理想的扩增产物,巢式 PCR 可对靶基因进行特异性第二次扩增,获得足够且特异的扩增产物。研究证实该方法特异性强并具有较高的准确性和敏感性,可减少假阳性和假阴性的发生。对于 OBI 患者外周血单个核细胞 HBV 感染这一普遍现象^[13],用巢式 PCR 的方法可有效避免 rcDNA 的干扰扩增出 cccDNA^[14],为发现隐匿于细胞内的 HBV 提供可靠依据,这是常规 PCR 方法做不到的。不过也有实验发现此种方法步骤较复杂,污染机会大,虽特异性高但无法避免出现非特异性扩增条带的出现。

2.5 基因芯片技术 该技术是将大量已知序列基因片段或寡核苷酸片段作为探针有序地、高密度地排列固定于载体上,然后与荧光标记的待测样品核酸按碱基配对的原则进行杂交,通过激光共聚焦系统检测杂交信号强度及分布,对基因序列及功能进行大规模、高通量的研究。近年来,许多报道证实不同地区 OBI 患者体内 HBV 的基因型不同,多以 B、C 基因型为主^[15-16],采用基因芯片技术不仅能准确地检测出单个基因型,同时可以检测不同基因型的重叠感染。一次性对样品大量序列进行检测和分析,使基因芯片技术更易于突变及多重变异的 OBI 检测。

3 非核酸扩增技术(NAT)血清学方法

乙型肝炎病毒表面大蛋白(HBSP)是运用生物学技术结合现代免疫学技术检测 HBV 病毒外膜大蛋白前 S 抗原,它比以往停留在线性表位基础上的 ELISA 方法检测 HBsAg 灵敏度高数倍^[17]。HBV 区分为 Dane 颗粒(完整病毒颗粒)、管状颗粒(亚病毒颗粒)和小球形颗粒。HBLP 是 HBV Dane 颗粒和管状颗粒包膜蛋白的主要成分之一,Dane 颗粒含有大蛋白和 HBV-DNA 成分,管状颗粒含有含有大蛋白,无 HBV-DNA 成分,因此血液中含有 Dane 颗粒而缺乏或缺少管状颗粒时,HBLP 检测仍然为阳性而 PCR 方法为阴性结果^[18]。同时,HBLP 与 HBV 的复制程度密切相关,HBV 感染肝细胞合成的 HBLP 数量远远超过病毒形态发生所需要的量,有学者证实了 HBV 感染者血清的感染性不仅依赖于 Dane 颗粒的多少,还依赖于富含大蛋白的亚病毒颗粒的数量^[19-20]。因此 HBLP 检测可大大提高了隐匿性 HBV 感染的筛查阳性率,避免 OBI 漏检。

综上所述,单独抗-HBc 阳性的 OBI 是输血、血液透析以

及脏器移植传播 HBV 的潜在危险,如何提高其检出率避免漏检导致的漏诊及误诊已成为一个迫切需要解决的问题。由于以上方法各有优缺点,故常以组合的形式进行联合检测。从灵敏度及特异性、操作步骤、成本等方面综合考虑,可以采用 ELISA 法进行初筛后对其中单独抗-HBc 阳性的标本用 CMIA 法进行定量分析,若此时 HBsAg 仍为阴性或出现特殊的组合模式,则进一步采用超敏 PCR、巢式 PCR 等分子生物学方法对标本中的 HBV DNA 进行定量分析或检测 HBLP,综合考虑患者肝功及临床症状,从而提高 OBI 的诊断率,指导临床医生及时对症治疗。

参考文献

- [1] 张燕,曾飞翔,何学新,等.四川地区供血浆人群隐匿性乙型肝炎病毒的感染[J].中国输血杂志,2011,24(11):944-947.
- [2] Hollinger FB. Hepatitis B virus infection and transfusion medicine: science and the occult[J]. Transfusion, 2008, 48(5):1001-1026.
- [3] 宋斌斌,沈敏娜,张春燕,等.2 种检测乙型肝炎病毒表面抗原的酶联免疫吸附试验试剂盒的性能比较[J]. 诊断学理论与实践,2010,9(2):186-189.
- [4] 龙贤能.比较化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)与酶联免疫法(ELISA)两种方法检测乙肝表面抗原的灵敏度[J].医学信息,2013,26(8):639.
- [5] 宋芳,马庆庆.应用 ARCHITECT i2000SR 检测就诊者乙型肝炎血清学标志物及其结果分析[J].吉林医学,2013,34(32):6753-6755.
- [6] 江红,汤正好,臧国庆.隐匿性乙型肝炎[J].临床肝胆病杂志,2004,20(5):311-312.
- [7] 胡淑芬,梁嘉琪,高慧,等.荧光定量聚合酶链反应定量检测乙型肝炎病毒-DNA 与酶联免疫吸附试验定性检测乙型肝炎病毒血清标志物的对比分析[J].实用医技杂志,2010,17(11):1012-1014.
- [8] Sun S, Meng S, Zhang R, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection[J]. Virol J, 2011, 8:227.
- [9] 戎国栋,徐婷,赵鸿,等.超敏 HBV DNA 定量检测系统的临床应用研究[J].临床与病理杂志,2015,35(8):1537-1540.
- [10] Tsongalis GJ. Branched DNA technology in molecular diagnostics[J]. Am J Clin Pathol, 2006, 126(3):448-453.
- [11] 刘辉,江凌,商红艳,等.分支 DNA 技术定量检测 HBV DNA 的临床意义[J].中华检验医学杂志,2013,36(3):252-254.
- [12] 金辉,孙桂娟,高岭,等.健康体检人群中 500 例乙肝核心抗体阳性的 HBV-DNA 检测探讨[J].中国民康医学,2014,26(8):59-60.
- [13] 王晓霖,杨京.隐匿性乙型肝炎病毒感染[J].临床肝胆病杂志,2009,25(1):67-69.
- [14] 蔺淑梅,张英,陈瑞琳,等.酶切联合巢式 PCR 法检测外周血单个核细胞中的 HBV DNA 与 HBV cccDNA[J].医学争鸣,2008,29(21):1990-1993.
- [15] 涂东晋,赵亮,林授,等.福州地区献血者人群隐匿性乙型

肝炎病毒感染及其基因型与 S 区突变的研究[J]. 中国输血杂志, 2015, 28(5): 523-527.

[16] 姚晴青, 董晓莲, 王学才, 等. 浙江省农村自然人群隐匿性乙型肝炎病毒感染(OBI)情况及进化特征分析[J]. 复旦学报:医学版, 2013, 40(5): 534-540.

[17] 吴正林, 刘玢, 肖桂初, 等. 乙型肝炎病毒表面大蛋白检测的临床应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(6): 624-626.

[18] Chai N, Gudima S, Chang J, et al. Immunoadhesins containing Pre-S domains of hepatitis B virus large envelope protein are secreted and inhibit virus infection[J]. J Virol, 2007, 81(10): 4912-4918.

[19] Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, et al. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking[J]. J Virol, 2007, 81(8): 3842-3851.

[20] 饶高峰, 陈恩福, 颜鸣鹤, 等. 乙型肝炎病毒基因型和 DNA 载量与外膜大蛋白关系研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2008, 22(5): 348-350.

(收稿日期: 2016-03-23 修回日期: 2016-06-09)

• 综 述 •

无乳链球菌的研究现状及进展

刘泽滨¹综述, 陆学东², 林立鹏¹, 聂署萍², 邓凤娟³审校

(1. 广东省深圳市福田区妇幼保健院检验科 518000; 2. 广东医学院附属福田医院检验医学部, 广东深圳 518033; 3. 广东医学院检验学院, 广东东莞 523808)

关键词: 无乳链球菌; 二胎; 孕妇; 新生儿
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 14. 063 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)14-2057-03

随着二胎政策的实施, 临床上将迎来众多孕产妇和新生儿, 在威胁孕产妇及新生儿健康的各种因素中, 感染是最重要的原因之一。而无乳链球菌(GBS)又是重要的病原体之一。自 1938 年, Fry 报道了 3 例死于无乳链球菌引起的产后心内膜炎的病例以来, GBS 在西方国家的感染率逐渐上升, 是引起产妇和新生儿感染的最常见致病菌, 更有报道称其是间接导致发达国家围生儿死亡的主要原因。在我国 GBS 感染率稍低, 但近年来研究显示其感染率有上升的趋势, 在临床上引起感染的比例不可忽视^[1]。GBS 可引起孕产妇败血症, 子宫内膜炎, 产褥感染, 晚期流产、早产等疾病, 并可引起新生儿败血症, 脑膜炎, 肺炎等疾病^[2]。本文就 GBS 生物学特性、对孕产妇及新生儿疾病的影响以及临床检测方法的研究现状及进展, 将以综述。

1 GBS 的生物学性状

β -GBS 主要来自于牛和人, 人型毒力更强, 常可引起肺炎、泌尿系统感染、软组织感染等。GBS 为 β 溶血型链球菌, 常居于人类的下消化道和泌尿生殖道中, 为革兰染色阳性成对或短链状排列的条件致病菌, 大多数携带者无明显的症状。根据细胞壁型特异性荚膜多糖抗原(S 物质)将 GBS 分为 7 个血清型, 即 I a、I b、I c、II、III、IV 和 V 型。其中 III 型毒力最强^[3], 可产生多种外毒素和溶组织酶, 引起严重感染。

2 GBS 对孕产妇妊娠结局的影响的研究进展

由于孕期机体的免疫功能减低, 孕妇中的 GBS 的携菌率较高。美国 and 北欧等国家孕妇携菌率相似^[4], 约 5%~35%; 而国内研究表明, 国内孕妇 GBS 携菌率约 2.4%~10.1%。各年龄携菌率无明显差异, 但种族和地区的差异比较大, GBS 的检出率受较多因素的影响, 例如采集的样本质量、检测时间、检测方法等^[5]。妊娠妇女感染 GBS 的高危因素包括肥胖、妊娠期糖尿病、妊娠期糖耐量减低、多次妊娠、多个性伴侣、肿瘤患者等。孕产妇 GBS 感染性疾病主要包括绒毛膜羊膜炎、子宫内膜炎、败血症、泌尿道感染、产褥感染、化脓性关节炎等。

2.1 GBS 对胎膜早破和早产的影响 胎膜破裂发生在正式产程之前称为胎膜早破, 是产科较为常见的并发症。对于

GBS 与胎膜早破和早产有无明显的因果关系, 仍存在争议。但有报道称, 感染是胎膜早破和早产的主要原因, 其中 GBS 的感染是导致的胎膜早破的最重要原因之一^[6]。孕妇生殖道中的 GBS 可上行感染胎膜, 通过炎症细胞的吞噬作用和蛋白酶、胶质酶等物质的侵袭作用, 导致胎膜早破。朱敏等^[7]研究数据表明, GBS 感染的孕妇易发生胎膜早破和早产, 胎膜早破的孕妇的 GBS 阳性率高于正常孕妇的, 但早产只与孕晚期的 GBS 感染有关, 与孕中期和孕早期无明显关系。但也有不少研究提示孕妇 GBS 感染与胎膜早破无直接关系, 王建红等^[8]报道, 通过收集胎膜早破孕妇 875 例的阴道分泌物进行细菌培养等研究, 共检出 60 例 GBS 阳性孕妇, 阳性率为 6.9%。孙丹华等^[9]研究也指出胎膜早破、早产、产褥感染与 GBS 没有明显的相关性, 这与国内其他文献对 GBS 与胎膜早破和早产的关系报道相似。对于 GBS 的感染是否与孕产妇胎膜早破和早产存在直接相关关系, 还有赖于进一步的研究。

2.2 GBS 与产褥感染的研究进展 GBS 是产褥感染的重要致病菌之一。朱敏等研究表明, GBS 培养阳性的产妇, 其产后子宫内膜炎、盆腔炎及败血症的发生率均高于 GBS 培养阴性的产妇, 临床表现多为发热, 心率加快, 腹痛腹胀, 子宫复旧不佳等症状, 妇科检查发现子宫或附件压痛, 体温超过 38℃, 往往提示败血症的发生。在贺晶等^[10]研究报道中, 在产科发热患者的血培养所分离到的细菌中, GBS 检出率高达 11%~21%, 在 GBS 培养阳性的妇女中行剖宫产, 产后子宫内膜炎发生率高达 61.1%, 显著高于 GBS 培养阴性的产妇。国外文献也表示, 绒毛膜羊膜炎与患者阴道中 GBS 携菌相关^[11]。

2.3 GBS 对晚期流产和死胎的影响 资料显示, GBS 可引起孕产妇晚期流产, 其机制与早产相似, GBS 培养阳性率与孕妇产晚期流产率成正比例相关。在发达国家, GBS 感染引起的死胎占 10%~25%, 在发展中国家的比率明显增加。GBS、埃希菌及解脲支原体为引起死胎的三大病原体, 其发生机制可能与胎膜破坏、母体感染等因素有关。

3 GBS 对新生儿的影响的研究进展

新生儿感染 GBS 主要有两种途径, 一种是通过 GBS 培养