embolism[J]. Int J Clin Pract, 2008, 62(8):1177-1182.

[12] Yano S, Kobayashi K, Kato K, et al. The study of pulmonary hypertension and plasma BNP values in respiratory diseases[J]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 2006, 44(2):99-103.

[13] Stolz D, Breidhardt T, Christ-Crain M, et al. Use of B-type natriuretic peptide in the risk stratification of acute exacerbations of COPD[J]. Chest, 2008, 133(5):1088-1094.

[14] Nikolaou NI, Goritsas C, Dede M, et al. Brain natriuretic peptide increases in septic patients without severe sepsis or shock[J]. Eur J Intern Med, 2007, 18(7):535-541.

[15] Nakamura T, Suzuki T, Kawagoe Y, et al. Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion attenuates increased plasma atrial natriuretic peptide and brain natriuretic Peptide levels in patients with septic shock[J]. ASAIO J, 2008, 54(2):210-213.

[16] Kandil E, Burack J, Sawas A, et al. B-type natriuretic peptide; a

biomarker for the diagnosis and risk stratification of patients with septic shock[J]. Arch Surg, 2008, 143(3):242-246.

[17] Goei D, Schouten O, Boersma E, et al. Influence of renal function on the usefulness of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as a prognostic cardiac risk marker in patients undergoing noncardiac vascular surgery[J]. Am J Cardiol, 2008, 101(1):122-126.

[18] Yildiz R, Yildirim B, Karıncaoglu M, et al. Brain natriuretic peptide and severity of disease in non-alcoholic cirrhotic patients[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(7):1115-1120.

[19] Obi T, Takatsu M, Konishi T, et al. Secretion of natriuretic peptides caused by an epileptic attack[J]. Acta Neurol Scand, 2002, 106(4):225-228.

(收稿日期:2011-01-28)

• 综 述 •

手足口病实验室诊断的研究进展

周 艳^{1,2}, 李维春²综述, 徐元宏^{1△}审校

(1. 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230031; 2. 安徽医科大学滁州临床学院检验科, 安徽滁州 239000)

关键词:手足口病; 肠道病毒属; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.028

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)08-0886-03

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)是多种肠道病毒引起的常见传染病。患儿大多数症状轻微,以发热和手、足、口腔等部位的皮疹或疱疹为主要特征。少数患儿可出现中枢神经系统损害,引发脑炎、脑水肿和心肌炎等,个别重症患儿病情进展快,易发生死亡^[1]。引起 HFMD 的肠道病毒有 20 多种,主要是小 RNA 病毒科肠道病毒属的一组肠道病毒,其中肠道病毒 71 型(EV71)及柯萨奇病毒 16 型(CoxA16)最常见。在中国部分地区也有散在流行,且其并发症的发生率与病死率也有增高趋势^[2]。为了解 HFMD 的实验室检查及其在 HFMD 诊断及治疗中的应用价值,现将 HFMD 实验室诊断的研究进展综述如下。

1 一般实验室检查

1.1 血常规检查 白细胞计数轻症病例大多正常,血红蛋白、红细胞及血小板一般无明显异常变化^[3],表明血细胞参数对 HFMD 的诊断与鉴别诊断意义不大。但重症病例白细胞计数明显增高($>15 \times 10^9/L$)或显著降低($<2 \times 10^9/L$),淋巴细胞分类明显升高^[4]。

1.2 尿常规检查 一般无异常变化,有极少数报道尿中检出微量蛋白^[5]。

1.3 血生化检查

1.3.1 血糖 血糖一般偏低,可能与患者发热以及口腔疱疹影响进食等因素有关^[5],但重症患者血糖可明显升高($>9 \text{ mmol/L}$)^[4]。研究表明, HFMD 患儿一旦血糖增高,肢体无力,常提示病变累及脑干,多病情危重,预后不佳,应引起重视^[6]。也有研究认为,高血糖是发生肺水肿最有意义的预测指标^[7]。

1.3.2 心肌酶检查 近年来,国内有很多关于 HFMD 患儿心

肌酶检查资料的报道,其血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)、肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)等分别有不同程度的增高,尤其是重症患儿,增高幅度及比例都有明显差异。杨江华等^[5]报道 LDH、HBDH 升高例数较多。王晓卫等^[8]报道 LDH、CK-MB、HBDH 升高比例均较大。唐红平等^[4]报道 CK-MB 活性明显升高。心肌酶活性升高表明 HFMD 患者合并有心肌损伤,而心肌炎是一种比较严重的并发症,也是造成患儿死亡的主要原因。因此,对于 HFMD 患儿,应重视心肌酶的联合检查,以便及早发现心肌损伤,及时给予相应的治疗。仅有极少数病例丙氨酸氨基转移酶升高,提示肝脏损害发生率较低^[5]。

1.3.3 肌钙蛋白 I(cTnI)检查 很多研究表明, cTnI 是心肌特异性抗原,具有高度的特异性,当受到病毒感染的心肌细胞发生变性坏死时, cTnI 随即通过破损的细胞膜释放入血,在血液中持续较长时间,因此, cTnI 在诊断 HFMD 患儿心肌损伤中具有特异性强、灵敏度高、持续时间长、可早期诊断等优点^[9]。与心肌酶学联合应用,可以提高其检出率,做到早发现、早治疗, HFMD 患儿的心肌损伤率乃至死亡率就会明显降低。

1.3.4 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP) CRP 是急性时相反应蛋白中重要的蛋白之一,是一种敏感的炎性反应标志物,在急性创伤和感染时其血液浓度急剧升高^[10]。 HFMD 由肠道感染所引起,部分初期表现为上呼吸道感染,感染早期血清 CRP 水平迅速升高,升高与感染程度呈正相关。这表明 CRP 有助于 HFMD 的诊断和监测,但是 CRP 是非特异性炎症指标,一些炎症反应和其他慢性疾病也会引起 CRP 的不同程度升高,因此最好与其他指标联合检测以提高其诊断价值^[9]。

△ 通讯作者, E-mail:xyhong1964@163.com。

1.4 脑脊液检查 HFMD 患儿的脑脊液外观清亮,白细胞数可轻度升高,蛋白、糖及氯化物浓度大多正常^[3]。但重症患儿脑脊液白细胞数常增高,且以单个核细胞升高为主。鉴于重症 HFMD 患儿起病急、进展快,而 HFMD 患儿核磁共振检查阳性改变多需要 5~7 d,而脑脊液在初期就有改变,因此脑脊液检查对有神经系统症状的 HFMD 患者早期诊断、疗效和预后很有帮助^[8]。

2 病原学检查

2.1 病毒分离培养 病毒分离是病毒性疾病诊断的“金标准”。自咽拭子或咽喉洗液、粪便或肛拭子、疱疹液以及脑、肺、脾、淋巴结等都是常用分离病原的标本。如果患者出现神经系统症状,可以采集脑脊液标本^[2]。标本均需接种到横纹肌瘤细胞(RD)和 HEp-2(来源于人喉癌上皮细胞)两种细胞系,联合使用上述两种或更多细胞(如 Vero 细胞)有助于分离到更多的肠道病毒^[7]。张红梅等^[11]报道分离出的肠道病毒大多来自咽拭子和粪便,脑脊液中没有分离到病毒。

但是,由于病毒的分离鉴定对技术要求较高、费用较昂贵、耗时,且各实验室分离阳性率各不相同,无法满足病毒流行期间同时处理大量样本的需要,目前仅用于实验研究^[12]。

2.2 血清学检测 比较患者急性期与恢复期血清中和抗体滴度,可作为肠道病毒感染的血清学诊断方法,最常用的是中和实验,即用微量板法测定抗体滴度,该方法精确且具有型特异性^[7]。此法不适用于早期诊断,可作为回顾性诊断,且由于肠道病毒血清型别众多,临床使用检测价值有限,而多为流行病学采用^[2]。

2.3 聚合酶链反应(PCR)技术检测

2.3.1 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 技术克服了病毒分离、中和抗体滴度等方法在操作上费时、费力、无法进行快速、早期诊断的缺点^[12],该方法检测标本中的 EV71 快速、简单、敏感性高,适用于咽拭子、粪便、各种体液及组织中 EV71 RNA 的检测,是诊断 EV71 感染的有效方法。但此法 PCR 后仍需进行凝胶电泳分析,操作也较为繁琐,同时存在假阴性、早期患者阳性率低以及无法对多种病毒联合检测等不足^[13]。

2.3.2 实时荧光 PCR(real-time RT-PCR) 实时荧光 PCR 应用与靶序列直接结合的荧光探针可将生产的 RNA 加以定量,其特点为检测快速(从样品准备到数据分析只 3 h)、剪感性强、扩增产物可直接定量、密闭系统防止交叉污染等^[2]。刘丽艳等^[12]报道通过实时荧光定量 RT-PCR 法检测 HFMD 患儿大便标本中 EV71 型,方便、快捷,且能报告出病毒载量。

2.3.3 基因芯片技术 这是近年来发展十分迅速的一门微生物诊断技术。其主要优点是可以同时检测多段基因,因此具有较高的灵敏度。同时,应用多组探针联合判断检测结果,也可以有效地降低检测的假阳性率。此外,可以将多种与 EV71 早期症状类似的病毒点样到芯片上进行联合诊断,对于确诊患者、排除疑似患者具有重要意义^[13]。

3 免疫功能检测

3.1 T 细胞功能检测 刘虹等^[1]研究表明 HFMD 患儿 T 淋巴细胞亚群中 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD8⁺ T 淋巴细胞计数均升高,而 CD4⁺/CD8⁺ 比值下降,提示肠道病毒感染可以引起患儿细胞免疫功能紊乱。因此,适当应用免疫球蛋白等免疫调节、给予糖皮质激素抗炎等治疗,可能有利于 HFMD 患儿的恢复。

而孙广超等^[14]经过大量标本研究发现危重症组 HFMD 患儿 T 细胞百分比均较正常值降低,组间比较结果显示,危重症组患儿 T 细胞百分比显著低于重症组,治疗后较治疗前显著升高,呈趋向于正常值的趋势。

3.2 B 细胞功能及补体检测 当机体受到 CoxA16 和 EV71 感染后刺激 B 细胞产生 IgG 及 IgM 抗体,引起宿主细胞膜抗原结构的改变,产生自身抗体而导致病理免疫反应,同时病毒感染导致免疫球蛋白消耗增加,机体免疫受到抑制。有研究表明 HFMD 患儿免疫功能紊乱、低下,IgA、IgG 水平下降,而 IgM 水平升高^[15],也有研究^[1]表明 HFMD 患儿存在一定程度的体液免疫功能紊乱,其 IgA 水平下降,而 IgG、IgM 升高。因此,建议在治疗 HFMD 患儿的过程中,应增加一些免疫调节功能的药物,提高疗效、缩短病程^[15]。

而孙广超等^[14]从 B 细胞相对计数方面研究发现重症组 HFMD 患儿 B 细胞百分比较正常值降低,危重症组患儿 B 细胞百分比均较正常值明显升高,更偏离于正常值(平均约升高 2 倍)。组间比较结果显示,危重症组患儿 B 细胞百分比显著高于重症组,治疗后较治疗前显著降低,呈趋向于正常值的趋势。结果显示,B 细胞百分比显著升高可能反映 HFMD 进入危重症期,应用静脉内免疫球蛋白(IVIG)和甲泼尼松龙有助于恢复危重症 HFMD 患儿的异常免疫状态。

补体是血清蛋白的正常组成成分,由多种蛋白成分组成。它与机体的免疫系统有密切关系,参与机体的免疫应答和自稳功能,可引起机体的免疫损伤。补体在血清中的含量是相对稳定的。研究证实手足口患儿血清中 C3 及 C4 水平相对稳定,提示血清补体在疾病发病过程中未起主导作用^[1]。

3.3 NK 细胞 孙广超等^[14]研究发现重症组 HFMD 患儿 NK 细胞百分比较正常值明显升高,更偏离于正常值(平均约升高 2 倍);危重症组患儿 NK 细胞百分比均较正常值降低,组间比较结果显示,危重症组患儿 NK 细胞百分比显著低于重症组,治疗后较治疗前显著升高。病毒侵入人体后,NK 细胞增加,有利于病毒的清除,但同时 NK 细胞对病毒结合的靶组织细胞亦有杀伤,对免疫功能有不良作用。

3.4 细胞因子与趋化因子 近年来,国内、外研究发现细胞因子和趋化因子可能在肺水肿的发病机制中起重要作用。有研究发现 EV71 感染患儿脑脊液及血浆中白细胞介素 8(IL-8)、 γ -干扰素(INF- γ)诱导蛋白 10、单核细胞趋化蛋白 1、INF- γ 诱导单核因子等趋化因子水平升高^[16]。在 EV71 感染早期这些趋化因子具有一定的保护作用,但是最终可能使有神经系统并发病的患儿病情加重,提示这些趋化因子可能和其他炎症介质相互影响,在疾病的发生和发展过程中起到重要作用^[17]。有研究认为,炎性细胞因子白细胞介素 6(IL-6),白细胞介素 1 β (IL-1 β),白细胞介素 10(IL-10),白细胞介素 13(IL-13)和 INF- γ 等可能参与脑干脑炎及肺水肿的发生^[7]。目前,国内相关报道还比较少。

综上所述,HFMD 的实验室检查包括一般实验室检查、病原学检查及免疫功能检查,对 HFMD 的临床诊断、临床分型、个性化免疫调控治疗及病情评估等具有一定的价值。但是,部分检测药盒(如细胞因子)的检测结果精密度较差,需建立统一标准、溯源及参考区间。联合检测更有利于提高临床价值。

参考文献

[1] 刘虹,王春妍.手足口病患儿免疫功能临床分析[J].天津医科大

学学报, 2009, 15(3): 503-504.

[2] 潘家华. 实用小儿手足口病诊疗指南[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2010: 41-77.

[3] 徐之良. 手足口病研究进展[J]. 临床内科杂志, 2009, 26(8): 509-510.

[4] 唐红平, 汪秋珍, 李德辉, 等. 手足口病 42 例临床分析[J]. 新医学, 2008, 9(11): 718-719.

[5] 杨江华, 喻艳林, 李志鸿. 168 例手足口病临床与实验室检查特征[J]. 皖南医学院学报, 2008, 27(6): 427-428.

[6] 何时军, 陈贤楠. 病毒相关性小儿危重病[J]. 中国小儿急救医学, 2006, 13(1): 72.

[7] 刘映霞, 周伯平. 肠道病毒 71 相关性手足口病新进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志, 2010, 4(1): 71-75.

[8] 王晓卫, 钟天鹰, 岳玉林. 123 例重症手足口病患儿脑脊液和心肌酶谱结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(11): 1109-1110.

[9] 夏国文. 69 例手足口病患儿血清 CRP、cTnI 联合结果分析[J]. 放射免疫学杂志, 2010, 23(1): 99-100.

[10] 孟卫东, 陈双峰. 高敏 C 反应蛋白的研究现状[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 346-348.

[11] 张红梅, 李成荣, 刘勇军, 等. 2008 年深圳地区手足口病病原学调查[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(5): 334-336.

[12] 刘丽艳, 叶颖子, 王建设, 等. 实时荧光定量 RT-PCR 法检测手足口病患儿大便标本中肠道病毒 71 型[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27(2): 142-145.

[13] 杨峻, 郑文岭, 马文丽. 肠道病毒 71 型的生物学特征与实验室诊断[J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 5(6): 546-549.

[14] 孙广超, 杨思达, 陶建平, 等. 重症和危重症手足口病患儿外周血淋巴细胞亚群分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2010, 5(4): 251-255.

[15] 韦海春. 手足口病患儿血清心肌酶与免疫球蛋白水平变化及结果分析[J]. 中国医学创新, 2008, 5(35): 103-104.

[16] Wang SH, Lei HY, Yu CK, et al. Acute chemokine response in the blood and cerebrospinal fluid of children with enterovirus 71-associated brainstem encephalitis[J]. J Infect Dis, 2008, 198(7): 1002-1006.

[17] 柯坤, 赵东赤. EV71 感染致重症手足口病的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37(2): 199-202.

(收稿日期: 2011-02-03)

• 综 述 •

微量肿瘤源性未知突变基因的检测方法及进展

司徒博 综述, 郑 磊[△], 王 前 审校

(南方医科大学南方医院检验医学中心, 广州 510515)

关键词: 肿瘤; 突变; 分子诊断技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.08.029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)08-0888-03

恶性肿瘤已跃居中国农村与城市居民死因第一位。从分子水平上看, 肿瘤是由于细胞在致癌因素的影响下发生基因突变, 失去对生长的正常调控而导致的单克隆性异常增生所致。随着分子生物学技术的迅猛发展, 不仅肿瘤组织, 其他临床标本如血浆^[1]、穿刺液^[2]、尿液^[3]、粪便^[4]等均能检测出肿瘤源性 DNA (常为突变的癌基因或抑癌基因)。突变基因的检测不仅能为肿瘤早期诊断、预后提供重要依据, 同时也渐渐成为病情监测、肿瘤个体化治疗的风向标^[5-7]。但与肿瘤相关的突变基因却常混杂于大量野生型基因中, 即使肿瘤组织本身也是如此。因此, 如何在临床标本中有效富集并检测出微量的肿瘤源性突变基因是目前实验室肿瘤分子诊断的关键问题。现阶段, 针对肿瘤源性微量已知突变基因的检测手段数量众多、发展迅速, 但低水平未知突变的筛查方法发展却相对缓慢。作为确定突变的金标准, 测序虽然直接可靠, 但灵敏度却不高, 因此需结合其他上游技术提高检出率。本文就目前临床实验室常用的筛查少量未知突变的方法及进展作一综述。

1 电泳方法

1.1 单链构象多态性 (single-strand conformation polymorphism, SSCP) 及异源双链核酸构象分析 (heteroduplex analysis, HET) SSCP 是一种检测未知突变的常用方法。其基本原理是单链 DNA 片段呈复杂的空间构象, DNA 序列差异甚至点突变都能导致这种空间构象的改变, 表现在聚丙烯酰胺凝胶电泳时电泳迁移率不同, 达到分离正常链与突变链的目的。SSCP 分析的灵敏度依赖于突变是否影响到 DNA 的折叠及折

叠后单链 DNA (ssDNA) 分子在电泳中的移动速度。Jugessur 等^[8]和 Frost 等^[9]结合限制性内切酶的 SSCP 技术 (restriction endonuclease fingerprinting-SSCP, REF-SSCP) 检测家族性乳腺癌/卵巢癌 BRCA1 基因的突变情况, 解决了灵敏度随 DNA 片段长度的增加而降低的问题, 一定程度上提高了突变检出率。在 SSCP 原理基础上发展起来的低离子强度 PCR-SSCP (PCR-LIS-SSCP)、RNA-SSCP、DDF, 以及与毛细管电泳、非同位素标记等技术的结合, 使 SSCP 的速度、敏感性得到一定的提高。

HET 的基本原理与 SSCP 相似。突变和野生型 DNA 形成的异源双链 DNA 错配时, 在非变性凝胶电泳时呈现与同源双链 DNA 不同的电泳速度, 因而可将野生型和突变型双链 DNA 分开。一般认为, HET 对 200~300 bp 大小的片段突变检测效果较好, 且对 SSCP 法不敏感的 DNA 片段检出率很高, 因此两者常联合应用以提高突变的检出率^[10]。

SSCP 和 HET 方法开展较早, 被广泛用于未知突变分析, 虽技术上已有所发展, 但通量低、检出率不高、假阳性率高等问题有待进一步解决。

1.2 梯度变性凝胶电泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) DGGE 又称温度梯度凝胶电泳 (temperature gradient gel electrophoresis, TGGE), 最早于上世纪八十年代出现, 历经多次改进。其基本原理是当双链 DNA 在变性剂浓度或温度梯度增加的聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 电泳至与 DNA 变性温度 (溶解温度) 一致的凝胶变性位置时, DNA 发生解旋变

[△] 通讯作者, E-mail: nfyzyz@163.com.