

- ripheral polymorphonuclear leukocytes in the oxidative stress and inflammation among cigarette smokers[J]. Isr Med Assoc J, 2002, 4(11):1015-1019.
- [17] Spooner R, Yilmaz O. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(1):334-352.
- [18] Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal"[J/OL]. Sci Signal, 2009-02-03[2011-09-12], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193605>.
- [19] Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, et al. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(22):10631-10634.
- [20] Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond[J]. Cell, 2008, 134(5):703-707.
- [21] Israelsen WJ, Vander Heiden MG. ATP consumption promotes cancer metabolism[J]. Cell, 2010, 143(5):669-671.
- [22] Dearth LR, Brachmann RK. ATP, Cancer and p53[J]. Cancer Biol Ther, 2004, 3(7):638-640.
- [23] Miki K, Tanaka H, Nagai Y, et al. Transforming growth factor beta1 alters calcium mobilizing properties and endogenous ATP release in A549 cells: possible implications for cell migration[J]. J Pharmacol Sci, 2010, 113(4):387-394.
- [24] Rotte A, Garmann D, Buss I, et al. Effect of extracellular ATP on cisplatin-induced cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells[J]. Chemotherapy, 2010, 56(1):1-8.

(收稿日期:2011-10-09)

• 综 述 •

口腔黏膜渗出液在 HIV、梅毒抗体检测中的研究进展

郑冰洁¹, 徐 辰²综述, 尹跃平^{1△}审核

(1. 中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所、中国疾病预防控制中心性病控制中心, 北京 210042;
2. 成都医学院医学检验系 07 级 610083)

关键词: HIV; 梅毒; 口腔黏膜渗出液; 抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.03.038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0340-03

口腔黏膜渗出液(oral mucosal transudate, OMT)是一种复杂的体液,能反映血液中各种蛋白质和抗体水平的变化,并具有采集方便、快速、无创性等特点,可代替血液作为感染性疾病筛查所用的诊断性液体。

1 OMT 抗体检测的原理和方法

1.1 OMT 的成分 OMT 由唾液和齿龈隙液混合而成。唾液由腮腺、下颌腺、舌下腺以及其他一些小唾液腺分泌混合而成,含有电解质、酶、低分子化合物、激素、免疫球蛋白、维生素等^[1]。唾液中的免疫球蛋白主要是分泌型 IgA,约占唾液中免疫球蛋白的 87%^[2]。齿龈隙液由齿龈缘和颊黏膜毛细血管中的血浆渗透进入口腔产生,故而含有和血浆中一致的 IgA、IgG、IgM 以及其他的血浆成分。有研究认为齿龈隙液中的蛋白 7% 是免疫球蛋白,其中约 58% 来源于血浆^[3]。齿龈隙液中不同免疫球蛋白浓度有所不同, IgG、IgM、IgA 的浓度分别约为血浆中的 1/4、1/5、1/2^[4]。因为齿龈隙液中含有丰富的免疫球蛋白,所以含有齿龈隙液体的 OMT 样本最适宜检测抗体^[4],其中 IgG 是检测的主体。

1.2 OMT 的收集方法 一般有两种收集 OMT 的方法,直接收集法和特殊设备收集法。早期使用的是直接收集法,通过流涎或吐口水的方式收集,但这种方法收集的全唾液中抗体含量较低^[2],收集量不够,并且可能因为不太雅观而不被一些患者所接受。目前以特殊设备收集法为主,使用含有吸收垫、抗蛋白水解物、缓冲液及稳定剂等特殊设备在口腔前庭、牙齿唇颊面颈 1/3 和牙龈间摩擦,能最大程度收集到抗体含量较高的齿龈隙液体^[5]。特殊的 OMT 收集设备可以大大提高检测的敏感性和特异性,设备中含有的吸收垫和稳定剂等提高了样本中免疫球蛋白浓度的同时增加了其稳定性,延长了常温下样

本的保存时间,可以保存至少 3 个星期^[2,6]。目前国外商品化的口腔液体样本收集设备主要有 Salivette、Orapette、OmniSAL、OraSure、Oracol 5 种^[2,4,7]。OraSure(OraQuick)是目前口腔液体收集设备中唯一获得 FDA 认证的产品,有文献报道 OraSure(OraQuick)对 IgG、IgM、IgA 的收集效果都比较好^[7]。相比于发达国家,国内对于 OMT 的采样及应用研究还比较欠缺,尚处于起步阶段,多数相关产品由国外引进销售,自主研发者较少,也鲜见相关的文献与报道。

1.3 OMT 抗体检测方法 由于 OMT 中免疫球蛋白含量较低,故宜采用较敏感的方法。临床上常用的是酶联免疫吸附法(ELISA),主要有抗体捕捉 ELISA、实时荧光免疫技术等。抗体捕捉 ELISA 常用于检测特殊抗体,原理在于用固定好的抗体捕捉样本中的人类抗体形成抗原抗体复合物,然后再用针对样本中人类抗体的抗原和该抗原相应的特殊标记的抗体捕捉并产生信号。抗体捕捉 ELISA 和其他试验不同之处在于信号的强度不是取决于样本中特异性抗体的浓度,而是取决于可被抗原捕捉到的人类抗体的比例。因为 OMT 中的血浆渗出液是免疫球蛋白的主要来源,所以对所有的免疫球蛋白产生的信号在血浆和 OMT 中是相似的。因此,只要样本中含有足够的特异性抗体可以渗透抗特异性抗体的结合板,信号即会显现^[4]。实时荧光免疫技术使用放射性物质标记抗人抗体,与样本中抗体和抗原形成的免疫复合物发生反应,并产生荧光。该法现在被广泛用于 HIV 的 OMT 抗体检测。抗体捕捉 ELISA 是现在 OMT 检测的主要方法。还有一种方法是免疫 PCR 试验^[8],是对 ELISA 的改进,将 ELISA 中和抗原抗体复合物发生反应的酶分子用一个可与 DNA、RNA 结合的抗体代替, DNA、RNA 可以用来作为 PCR 扩增的模板,所得产物可以用

△ 通讯作者, E-mail: yinyp@ncstdlc.org。

凝胶电泳和溴乙锭染色的技术检测。该技术既有对抗原抗体复合物的高特异性,又可以进行 PCR 扩增,其灵敏度是 ELISA 的 5 倍^[4],可以检测到 0.01~0.1 amoL 的 IgG 抗体^[8]。但目前尚未广泛应用到 OMT 抗体的检测中。但不论是哪种方法,最后检测的阳性结果都应该应用确证试验来证实。

2 OMT 抗体检测在 HIV、梅毒检测中的应用

2.1 HIV 抗体检测 HIV 抗体检测分为初筛试验和确认试验,前者包括 ELISA、凝胶颗粒凝集试验、乳胶凝集试验、放射免疫试验和各种快速检测试验等。后者包括免疫印迹法、免疫荧光法、条带免疫试验和放射免疫试验等^[9]。快速检测可以使用 OMT、指尖血、静脉血、尿液等样本,OMT 检测较为常用。OMT 的 HIV 抗体检测从上世纪 80 年代研发到现在,已经发展的比较成熟。商品化试剂包括 OraQuick HIV1/2 快速检测试剂盒,爱尔兰 TrinityBiotech 公司出品的 SalivaCard HIV-1/HIV-2 快速检测试剂盒,以及以色列 Orgenics 公司出品的 ImmunoComb II HIV-1/HIV-2 快速检测盒。其中,美国 OraSure 公司出品的 OraQuick HIV1/2 快速检测试剂是第 1 个在临床实验室推荐的 HIV 快速 OMT 检验试剂盒,也是 FDA 唯一批准的可以同时使用 OMT、指尖血、血浆、全血的试剂盒^[10]。它操作简单,可由没有临床背景的人员进行操作,试剂盒说明书显示该方法检测 OMT 标本的特异度为 99.8% (95% CI: 99.6%~99.9%)^[12]。Pant 等^[11]在印度农村对 450 例疑似 HIV 感染者进行检测时发现 450 例中 146 例是血清学阳性感染者。OraSure 公司的两种快速检测试剂对唾液和指尖血的检测灵敏度均为 100%,但唾液特异性(100%)比指尖血特异性(99.7%)更高。结果表明,唾液快速检测试剂比指尖血快速检测试剂效果更好,且易于接受。Scott 等^[13]使用 OraQuick 检测 81 例 HIV 感染者的 OMT 样本,灵敏度为 96.3%,假阴性的 HIV 感染者均进行过抗逆转录病毒治疗。Pavie 等^[5]的研究则表明 OraQuick 的灵敏度仅为 86.5%,并把低灵敏度的原因归结为多数感染者已经接受了抗逆转录病毒治疗。假阳性和假阴性的出现除了跟 OraQuick 试剂盒本身因素有关外,还受到操作流程不规范及感染者检测频率的影响。Facente 等^[14]发现快要过期的 OraQuick 试剂盒会影响到检测结果的准确性。他们发现还有 6 个月以上、4 个月、3 个月、2 个月、1 个月到失效期的试剂盒其检测特异度逐渐降低,分别是 99.92%、99.76%、98.83%、99.52% 和 99.37%。

由于 OMT 检测中存在假阳性以及假阴性,所以其检测结果应该被认为是初步结果,国际通行的指导推荐,所得的阳性标本须经过 Western bolt 或者免疫荧光分析法(IFA)进行确认^[14-15]。

2.2 梅毒抗体检测 梅毒的实验室检测方法主要有显微镜检查法和血清学检测法。显微镜检测法可以检测早期现症梅毒感染,适应于人体感染梅毒初期,但阴性者不能排除。血清学检测法常用于梅毒感染的筛查和确证试验,是现在国内外诊断梅毒的主要方法^[16]。

目前针对梅毒 OMT 抗体检测的研究并不多,因为 OMT 中的梅毒特异性 IgG 和 IgM 水平比血浆低了 1 000 倍,所以需要使用针对 IgG 和 IgM 抗体的高敏感性的免疫方法进行检测。2005 年,Baguley 等^[17]首次使用实时荧光免疫技术检测 OMT 中的梅毒特异性抗体。研究者招募了 34 例血清学阳性的患者和 97 例无梅毒症状且血清学阴性的受试者作为病例组和对照组,并同时采集检测两组的 OMT 及血液标本。对血液

标本使用梅毒 ELISA 筛查,阳性者用 TPPA 和 VDRL 确证。对 OMT 标本使用实时免疫荧光法检测其特异性 IgG 抗体。研究显示,所有的受试者都能正确使用收集设备,并无不适。当使用(均数+3 倍标准差)计算临界值时,在所有患者中 OMT 检测的灵敏度和特异度分别是 76.5% 和 97.9%,而在早期梅毒中,这两个数字分别是 100% 和 97.9%。但使用(均数+5 倍标准差)计算临界值时,所有的早期梅毒都被检测出来并且没有假阳性出现。在这项研究中,研究者认为灵敏度较低可能与样本量小有关。已治愈和长期感染的患者在其口腔标本中未检测到特异性 IgG。

2006 年,Maple 等^[18]在该研究的基础上进行了一个更大样本量的研究,他们选择了 210 例受试者,主要是感染 HIV 的男同性恋人群。其中 101 例在医疗机构已经血清学检测确证为梅毒,全部收集血清和唾液标本。在剔除 14 例不合格 OMT 标本后,经检测得到对于所有受试者 OMT 检测的敏感度和特异度分别是 95.8% 和 86.1% (以阳性结果的 5% 计算临界值)。通过混合模型分析得到的临界值计算的敏感度和特异度分别是 93.7% 和 91.1%。对于早期梅毒患者,敏感度是 87.5%,二期和早期潜伏梅毒患者敏感度则分别是 100% 和 94.7%。研究者认为这个方法对于二期梅毒和早期潜伏梅毒有较高的敏感度和特异度。在早期梅毒患者检测的敏感度有所下降是因为检测方法对 IgM 敏感性不高,并且样本保存时间较长增加了抗体的降解。

由此可见,在二期梅毒和早期潜伏梅毒患者中,OMT 检测可以代替血清学检测,但因为目前还没有研发出针对特异性 IgM 敏感度较高的检测方法和避免 IgM 降解的样本保存技术,不能检测 IgM 来判断有无早期感染和现症感染,限制了其应用。Cohen 等^[19]认为在高危人群中严格按照采样规范采集样本,或者是在第 1 次采样后时隔 1 月重复采样,可作为增加早期特异性抗体检出率的有效办法。同时,OMT 标本的采集方法和标准有待规范和完善。Baguley 等^[17]的研究中,出现了假阴性和假阳性各 1 例。假阴性出现在 1 例没有牙齿的晚期潜伏梅毒患者,在其 OMT 样本中未检测到梅毒特异性 IgG 抗体,可能与没有收集到齿龈隙液有关。而假阳性是一位女性受试者的口红污染了样本。现有的两个研究中,都要求受试者将收集设备沿着牙龈外侧牙齿龈段及基底部来回擦拭并将收集设备最大程度浸润,以保证能采集到足够的齿龈隙液。

3 OMT 抗体检测的展望

OMT 标本收集为非侵入性,生物安全性高。同时,OMT 具有采集方便、易操作、快速、经济、贮存与携带方便和无创性等特点。标本采集过程无疼痛感,适合婴幼儿、肥胖人群、晕针者、害怕抽血者及浅表静脉不明显的人群^[6,20],对患者来说有更好的可接受性和依从性^[6,7,11,13,20]。

虽然 OMT 的抗体检测有很多优点,但尚存在需要解决的问题。OMT 检测的物质单一,不能完全替代血液标本。OMT 中的酶原颗粒和蛋白酶等具有潜在的破坏作用,因此需要加入一定量的稳定剂以保证标本的质量^[2]。OMT 标本中抗体含量不稳定,其中含有的其他物质如病毒、细菌、胆红素等以及吸烟、服药、牙周炎等可能会影响检测的效率和准确性^[2]。另外,OMT 标本的抗体采集量和检测方法是有限的,缺乏敏感的检测方法使得早期 HIV 检测、现症感染和一些经过抗逆转录病毒治疗、抗体载量减少的病例不能有效检出。对于特殊人群,如孕妇等,OMT 的检测是否受到潜在机制的影响尚不明

确^[6]。这些都有待今后的研究。

参考文献

[1] Parisi MR, Soldini L, Di Perri G, et al. Offer of rapid testing and alternative biological samples as practical tools to implement HIV screening programs[J]. New Microbiol, 2009, 32(4): 391-396.

[2] Tamashiro H, Constantine NT. Serological diagnosis of HIV infection using oral fluid samples[J]. Bull World Health Organ, 1994, 72(1): 135-143.

[3] Loo JA, Yan W, Ramachandran P, et al. Comparative human salivary and plasma proteomes[J]. J Dent Res, 2010, 89(10): 1016-1023.

[4] McKie A, Vyse A, Maple C. Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid[J]. Lancet Infect Dis, 2002, 2(1): 18-24.

[5] Pavie J, Rachline A, Loze B, et al. Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger-stick whole blood; a real-time comparison in a healthcare setting[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11581.

[6] Pascoe SJ, Langhaug LF, Mudzori J, et al. Field evaluation of diagnostic accuracy of an oral fluid rapid test for HIV, tested at point-of-service sites in rural Zimbabwe[J]. AIDS Patient Care STDS, 2009, 23(7): 571-576.

[7] Chang CK, Cohen ME, Bienek DR. Efficiency of oral fluid collection devices in extracting antibodies[J]. Oral Microbiol Immunol, 2009, 24(3): 231-235.

[8] Malou N, Raoult D. Immuno-PCR: a promising ultrasensitive diagnostic method to detect antigens and antibodies[J]. Trends Microbiol, 2011.

[9] 白浪, 雷秉钧. HIV/AIDS 实验室检测及其研究进展[J]. 中国循证医学杂志, 2008, 8(3): 206-209.

[10] Branson BM. State of the art for diagnosis of HIV infection[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(Suppl 4): 221-225.

[11] Pant PN, Joshi R, Dogra S, et al. Evaluation of diagnostic accuracy,

feasibility and client preference for rapid oral fluid-based diagnosis of HIV infection in rural India[J]. PLoS One, 2007, 2(4): e367.

[12] Birrell F, Staunton S, Debattista J, et al. Pilot of non-invasive (oral fluid) testing for HIV within a community setting[J]. Sex Health, 2010, 7(1): 11-16.

[13] Scott LE, Noble LD, Langeveldt M, et al. Can oral fluid testing be used to replace blood-based HIV rapid testing to improve access to diagnosis in South Africa[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009, 51(5): 646-648, 648-649.

[14] Facente SN, Dowling T, Vittinghoff E, et al. False positive rate of rapid oral fluid HIV tests increases as kits near expiration date[J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8217.

[15] Pai NP. Rapid oral fluid-based point-of-care HIV testing: applicability in developing countries[J]. Indian J Med Res, 2007, 126(3): 171-173.

[16] Little JW. Syphilis: an update[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005, 100(1): 3-9.

[17] Baguley SD, Horner PJ, Maple PA, et al. An oral fluid test for syphilis[J]. Int J STD AIDS, 2005, 16(4): 299-301.

[18] Maple PA, Simms I, Kafatos G, et al. Application of a noninvasive oral fluid test for detection of treponemal IgG in a predominantly HIV-infected population[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2006, 25(12): 743-749.

[19] Cohen CE, Winston A, Asboe D, et al. Increasing detection of asymptomatic syphilis in HIV patients[J]. Sex Transm Infect, 2005, 81(3): 217-219.

[20] Pant PN. Oral fluid-based rapid HIV testing: issues, challenges and research directions[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2007, 7(4): 325-328.

(收稿日期: 2011-10-09)

• 综 述 •

同型半胱氨酸血症与重症肝炎关系的探讨

张银辉, 张有忠, 朱国勇, 湛晓燕 综述, 都 青, 王 霓, 郑 伟, 杨荣生 审校
(湖北省襄阳市中医院检验科 441000)

关键词: 肝炎; 同型半胱氨酸

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 03. 039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)03-0342-03

重症肝炎, 国外又称作“暴发型肝炎 (fulminant hepatitis)”, 是一种由于肝细胞大量坏死而出现肝功能严重损害的临床综合征, 国内多见于病毒性肝炎, 也偶见于药物性肝炎、中毒性肝炎、及脂肪肝等。临床表现凶险而复杂, 黄疸急剧加深、肝脏迅速缩小、并伴有肝性脑病、肝肾综合征等并发症, 病死率很高。由于中国是乙型肝炎病毒 (HBV) 感染较为严重的国家之一, 感染者约占总人口的 9. 09%。因此, 重症乙型肝炎在中国是常见的慢性乙型肝炎致命转归之一, 病死率高达 70%, 严重威胁人民的生活和健康, 且目前尚无有效治疗方法。重型肝炎的发病机制较为复杂, 迄今为止还远未能阐明。一般认为主要由病毒复制和宿主防御反应及其相互作用所致^[1]。肝炎病毒在一定条件下引起宿主的免疫反应异常, 大概是重型肝炎发病

机制中的主要环节, 其病理基础是肝细胞的大量坏死和严重变性, 从而导致肝细胞功能的衰竭, 由此引起的内毒素血症进一步加重肝细胞损害, 使肝衰竭更为严重, 成为后阶段的重要致病因素。

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是一种对机体有害的含硫氨基酸, 高同型半胱氨酸血症与冠心病、卒中、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎等多种慢性炎症及自身免疫病的发病有关^[2-4], 大量临床研究和流行病学调查还证实高 Hcy 血症是动脉粥样硬化发病的独立危险因素^[5]。1999 年, Mahmud 等报道发生性肠道疾病 (inflammatory bowel disease, IBD) 患者血浆中同型半胱氨酸水平增高, 随后这一发现被多个不同的研究小组所证实, 并且进一步研究还发现免疫性肠道疾病 (inflam-