

• 综 述 •

EB 病毒实验室检测技术研究进展

王荣就 综述, 邵继红 审校

(广西壮族自治区北海市卫校附属医院检验科 536100)

关键词: 疱疹病毒 4 型, 人; 病毒培养; 免疫学技术; 聚合酶链反应**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.029**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)09-1090-03

EB 病毒(epstein-barr virus, EBV) 又称人类疱疹病毒 4 型, 可引起传染性单核细胞增多症, 并与鼻咽癌(NPC)、伯基特(Burkitt)淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤及多发性硬化症的发生关系密切^[1-2]。因此, 检测 EBV 可作为相关疾病的辅助诊断。EBV 实验室检测方法包括病毒分离和鉴定、免疫学检测以及核酸检测等。现将 EBV 实验室检测技术研究进展综述如下。

1 培养法

EBV 培养是将标本直接接种人新鲜的脐带血淋巴细胞或 B 细胞, 培养 4 周, 如果出现大量的转化淋巴细胞, 则提示病毒培养阳性, 可通过免疫荧光技术或其他检测手段检测转化淋巴细胞中的 EBV 核抗原(EBNA)进行鉴定。由于 EBV 分离鉴定耗时长而且需要特殊的组织培养条件, 因而不适宜常规检测所采用。目前 EBV 培养主要应用于对 EBV 感染的发病机制、预防、治疗的体外研究^[3-4]。Gotoh 等^[5]使用人类扁桃体的淋巴组织建立 EBV 感染模型并观察到 EBV 在最初阶段的感染和扩散, 此项研究已应用于当地的病理分析和筛选新型抗病毒药物。

2 免疫学检测技术

EBV 感染的个体不论是否发生恶性肿瘤均可产生一系列抗体。临床上主要检测血清中 EBV 感染产生的相应抗体。

2.1 免疫荧光法(immunofluorescence assay, IFA) IFA 以 EBV 激活的 B95-8 细胞或 Raji 细胞涂片, 经显色剂显色后用荧光显微镜观察结果。IFA 较早应用于检测 EBV 并具有较高的特异性和敏感性, 被视为检测 EBV 特异性抗体的“金标准”^[6-7], 常被作为参考方法^[8]。IFA 需要细胞培养, 因具有操作繁琐、表达的病毒抗原无法定量、需要荧光显微镜观察、结果的判断带有主观性等缺点, 使其在临床上的应用受到限制。

2.2 免疫组化技术 免疫组化技术又称免疫组化法或免疫酶法, 是以带有 EBV 基因组的淋巴母细胞株 B95-8 细胞或 Raji 细胞涂片, 经显色剂显色后用普通显微镜观察结果。该方法常用于检测血清中 EBV 的抗 EBV 壳抗原(VCA)-IgA 或抗早期抗原(EA)-IgG。有研究表明免疫酶法具有较高的特异性和敏感性^[9-11], 目前仍是检测 EBV 理想的方法, 但由于该方法不同的抗原需分别制备相应的酶标抗体进行检测, 比较麻烦, 而且需在显微镜下逐一判断, 结果带有一定的主观性, 影响了检测方法的特异性和敏感性。因此, 临床未广泛应用。

3 ELISA 法

ELISA 法可根据不同的检测目的设计出多种类型。将 EBV 抗原联接到固相载体上, 样品中待检抗体与之结合成固相抗原-受检抗体复合物, 再用酶标二抗体(针对受检抗体的抗体)与固相免疫复合物中的抗体结合, 形成固相抗原-受检抗体-酶标二抗复合物, 测定加底物后的显色程度, 确定待检 EBV 相应抗体含量。目前对 EBV 抗原研究较多的是 VCA、EA 和 EBNA、潜伏膜蛋白(LMP)、EBV 编码的早期核糖核酸

(EBER)等。EBV 感染人体后均可产生一系列抗体, 检测 EBV 各项抗体是诊断 EBV 感染的重要指标之一。早期用于 ELISA 法检测的抗原主要为亲和层析纯化的天然抗原, 由于干扰因素较多, 敏感性和特异性均不理想。随着基因重组技术的发展, 使得在原核和真核表达系统中大量表达纯化 EBV 蛋白成为可能, 多种 EBV 抗原已被表达纯化, 使 ELISA 法诊断相关疾病的价值大大提高。通过 ELISA 法检测诊断 NPC 获得较好结果的抗原含有 gpl25、EA、ZEBRA、EBNA1、TK 激酶、DNA 聚合酶、核糖核酸还原酶等, 其中 VCA gpl25 编码是敏感性最高的基因片段, 并具有极强的免疫原性。盛平等^[12]选用 gpl25 制成重组 BALF4 蛋白, 用于 ELISA 法检测 NPC 患者血清中 IgA 抗体, 结果特异性和敏感性分别为 81.0% 和 94.0%。目前测定 EBV 抗体所用抗原主要为基因重组抗原, 重组抗原通常用大肠埃希菌或酵母菌来制备, 因此, 难免会带有该菌本身的蛋白而影响检测结果。Fachiroh 等^[13]采用 EBNA1 和 VCA-P18 制成人工合成多肽, 建立新的 ELISA 法用于诊断 NPC, EBNA1-IgA 诊断 NPC 的敏感性为 86.2%, 特异性为 92.0%; VCA-P18-IgA 诊断 NPC 的敏感性为 84.1%, 特异性为 90.3%; 如果将两段人工合成肽混合包被, 检测 NPC 的敏感性达 95.1%, 特异性可达 90.6%; 他们用 EBNA1-P18-ELISA 法检测 151 例 NPC 患者和 199 例 EBV 携带者, 同时用 EA-ELISA 法进行确证测试, 结果其敏感性由 85.4% 提高到 96.7%, 特异性由 90.1% 提高到 98.0%^[14]。由于人工合成多肽抗原没有细菌蛋白混杂, 且相对分子质量小, 结构简单, 从而避免了交叉反应的可能, 使结果的准确性得到提高。

4 EBV 的基因诊断技术

EBV DNA 的相对分子质量为 $815 \times 10^7 \sim 1.105 \times 10^8$, 基因组全序列平均 172 kb, 由 5 种重复序列单位即内部重复序列、末端重复序列和 5 种特异的间隔性序列构成。主要表达的基因有先导蛋白基因(LP 基因)、EBNA 基因、终末蛋白基因(TP 基因)和 LMP 基因。潜伏基因编码 6 种 EBN(EBNA1、2、3a、3b、A3c 和 LP)和 3 种 LMP(LMP1、2a、2b)及在各种潜伏感染中均表达 EBV 编码的小 RNA(EBER), 其中 EBNA1、LMP1、LMP2 及 EBER 等基因与癌变有关^[15]。根据 EBV 特异性基因序列设计引物进行基因检测。

4.1 原位杂交技术 EBV 原位杂交技术是将 EBV DNA 或 RNA 杂交到与其互补的核苷酸序列探针上, 清除掉未被杂交的探针, 留下的探针通过标记的自显像或色谱分析而被确定。临床上常用 EBER-1 作为探针, 该探针是一段能与 EBV 编码的小 mRNA 特异性结合的碱基序列, 其可探查经甲醛固定、石蜡包埋的 NPC 标本, 因此, 用 EBER-1 作探针能在肿瘤细胞原位检测 EBV 的存在。原位杂交所用的探针可用地高辛、荧光物质或放射性物质进行标记。Ito 等^[16]采用荧光物质标记 EBER 探针, 建立一种新型的 EBER 荧光原位杂交定量分析

法,定量检测 EBV 感染的外周淋巴,用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)确证,结果显著相关,该方法可用于移植后 EBV 感染的定量分析。原位杂交既可确定病毒的存在情况,还可区别感染的细胞种类,是检测 EBV 最为敏感指标。然而操作比较繁琐,探针价格略贵,不利于临床推广。

4.2 PCR PCR 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种技术,当存在模板 DNA、底物、上下游引物和耐热 DNA 聚合酶时经多次“变性-复性-延伸反应”的循环过程,模板 DNA 可得到大量扩增。检测 EBV 需选择特异性高的靶基因。EBV PCR 有常规 PCR、巢式 PCR、多重 PCR、逆转录 PCR 和实时 PCR 等。常规 PCR 只需要设计一对相应的引物,扩增后需进行凝胶电泳鉴定,故操作比较繁琐,同时扩增产物极易受到污染造成假阳性。巢式 PCR 先用一对外引物进行第 1 轮 PCR,然后再使用第 1 对引物扩增的 DNA 序列内部的一对引物再次扩增,因其采用两对引物进行两轮扩增,因此,敏感性和特异性均有所增强,优点是减少扩增产物的污染,缺点是增加了每次试验的复杂性。多重 PCR 是在同一个反应管中用多对引物同时扩增几条 DNA 片段。Matsuda 等^[17]采用 EBV 特异性 T 细胞抗原受体(TCR)基因,建立标准化引物系统(BIOMED-2)多重 PCR,分析 TCR 基因重排,对 6 例 EBV 感染的噬血细胞性淋巴瘤(EBV-HLH)患儿进行检测,结果在所有患者中均发现 TCR β 、 γ 的单克隆峰。BIOMED-2 多重 PCR 可应用于 EBV-HLH 患者的治疗观察。逆转录 PCR 是提取组织或细胞中的总 RNA,以其为模板进行 PCR 扩增,从而获得目的基因或检测基因表达。伊强等^[18]从 B95-8 细胞扩增 EBV BZLF1N 基因的 cDNA 片段,为下一步进行重组 EBV BZLF1N 的表达及其在 NPC 诊断应用中的研究奠定了基础。但逆转录 PCR 的产物需要凝胶电泳进行鉴定,操作比较繁琐,临床上不常使用。

随着检测技术的进步,近年来出现了 real-time PCR。real-time PCR 是在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用对荧光信号积累的实时检测来监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对扩增产物进行定量分析。real-time PCR 需要加入荧光物质作为监测信号。常用于检测 EBV 的荧光物质有荧光探针和荧光染料(SYBR Green I)两种。Kimura 等^[19]用 EBV BamH I A 片段左向的第 5 个阅读框编码(BALF5)作为引物,采用荧光探针,首先建立检测 EBV 的 real-time PCR,对 EBV 感染患者外周单个核细胞的病毒载量进行检测,结果敏感性和特异性分别为 85.0%和 93.0%。Lay 等^[20]采用 SYBR Green I 作为扩增产物累积的荧光标记,选取 EBV 的 EB-1(EBNA1)和 BamH I 片段 H 向右开放阅读框 1(BHRF1)作为引物,建立两个独立的 real-time PCR,并共用一条量化标准曲线。所建立的方法敏感、特异,并成功地应用于检测诊断与 EBV 有关的疾病。金欣等^[21]和黎庆梅等^[22]应用 real-time PCR 检测血液中 EBV DNA 载量后亦认为该方法准确、快速,在确诊 EBV 感染相关性疾病中具有重要的作用。real-time PCR 不仅实现了对 DNA/RNA 模板的定量,而且采用完全闭管荧光检测,不需要电泳确证,自动化程度高,降低了 PCR 产物污染造成的假阳性,因而在一定程度上具有较高的灵敏度和特异性。但 real-time PCR 需要专门和相对昂贵的实时激光扫描设备,目前尚未有规范化的 EBV real-time PCR 的标准,尚需进一步完善。

综上所述,实验室检测 EBV 的方法很多,培养法耗时而且需要特殊的组织培养条件;IFA 和免疫组化法需要荧光显微镜和普通显微镜,操作繁琐;原位杂交法需要昂贵的探针,以上几种方法在临床上虽然有较好的评价,也常被作为参考方法,但

自动化操作程度低,不能在临床上广泛应用。PCR 快速,敏感性和特异性高,特别是 real-time PCR 实现了从定性到定量的飞跃,可用于早期诊断和监测患者预后,具有广阔的应用前景。但目前还需要昂贵设备,检测费用高,限制其在基层医院实验室的应用。近年来 ELISA 法诊断 EBV 的敏感性和特异性不断提高,操作简单、快速,试验结果应用酶标仪读数,准确性高,自动化操作程度高,在临床得到广泛应用。

参考文献:

- [1] 汪洋,许红梅. EB 病毒的流行病学研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(12):1405-1407.
- [2] Ascherio A, Munger KL. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review[J]. J Neuroimmune Pharmacol, 2010, 5(3): 271-277.
- [3] Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, et al. A new humanized mouse model of Epstein-Barr virus infection that reproduces persistent infection, lymphoproliferative disorder, and cell-mediated and humoral immune responses[J]. J Infect Dis, 2008, 198(5): 673-682.
- [4] Yajima M, Imadome K, Nakagawa A, et al. T cell-mediated control of Epstein-Barr virus infection in humanized mice[J]. J Infect Dis, 2009, 200(10): 1611-1615.
- [5] Gotoh K, Ito Y, Maruo S, et al. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25490.
- [6] Altuglu I, Aksoy A, Zeytino? lu A, et al. Evaluation of immunoblot-based assay for detecting Epstein-Barr virus viral capsid antibodies[J]. Mikrobiyol Bul, 2010, 44(2): 231-236.
- [7] Koidl C, Riedl R, Schweighofer B, et al. Performance of new enzyme-linked fluorescent assays for detection of Epstein-Barr virus specific antibodies in routine diagnostics[J]. Wien Klin Wochenschr, 2011, 123(7-8): 230-234.
- [8] de Ory F, Guisasaola ME, Sanz JC, et al. Evaluation of four commercial systems for the diagnosis of Epstein-Barr virus primary infections[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(3): 444-448.
- [9] 阳茂春,陆爱英,李山,等. 免疫酶法与 ELISA 法检测 EB 病毒 VCA-IgA 的比较[J]. 标记免疫分析与临床, 2009, 16(2): 93-95.
- [10] 成积儒,蔡永林,郑裕明,等. EB 病毒不同抗原 IgA 抗体检测在鼻咽癌诊断中的作用[J]. 医学创新, 2009, 6(27): 101-103.
- [11] 潘少霞,石宗盛. 两种 ELISA 法与免疫酶法检测 EB 病毒的比较分析[J]. 中国医药导刊, 2009, 11(11): 1918-1919.
- [12] 盛平,贺华,黄鑫. 重组 EBV 壳抗原 BALF4 蛋白的制备及其在鼻咽癌患者检测中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2010, 17(6): 648-652.
- [13] Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus(EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G(IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(4): 1459-1467.
- [14] Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, et al. Two-step Epstein-Barr virus immunoglobulin A enzyme-linked immunosorbent assay system for serological screening and confirmation of nasopharyngeal carcinoma[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(5): 706-711.
- [15] Samanta M, Takada K. Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis[J]. Cancer Sci, 2010, 101(1): 29-35.

[16] Ito Y, Kawabe S, Kojima S, et al. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B cells in patients after transplantation[J]. J Gen Virol, 2011, 92(Pt 11):2590-2595.

[17] Matsuda K, Nakazawa Y, Yanagisawa R, et al. Detection of T-cell receptor gene rearrangement in children with Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis using the BIOMED-2 multiplex polymerase chain reaction combined with GeneScan analysis[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17-18):1554-1558.

[18] 伊强, 陈丹, 李雯, 等. EB 病毒 BZLF1N 基因的克隆与序列分析[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(6):910-912.

[19] Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay[J]. J Clin

Microbiol, 1999, 37(1):132-136.

[20] Lay ML, Lucas RM, Ratnamohan M, et al. Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye[J]. Virrol J, 2010, 7:252.

[21] 金欣, 陈建魁, 于农, 等. 血液系统恶性肿瘤患者巨细胞病毒和 EB 病毒定量检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(7):793-794.

[22] 黎庆梅, 陈辉, 庄碧英. 实时荧光定量 PCR 在 EB 病毒 DNA 检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13):1423-1424.

(收稿日期:2012-01-08)

• 综 述 •

阿尔茨海默病患者体液生物标志物的研究进展

李 妹 综述, 邱 玲[△], 秦绪珍 审校

(北京协和医院检验科生化与免疫实验室 100730)

关键词: 阿尔茨海默病; 脑脊髓液; 血液; 尿; 淀粉样蛋白; tau 蛋白质类; 生物标志物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.030

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)09-1092-04

阿尔茨海默病(alzheimer's disease, AD)是一种在老年人群中常见的神经系统退行性疾病,临床主要表现为记忆和认知功能损害、行为异常和人格改变等,典型病理特征是老年斑(senile plaques, SPs)、神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)和广泛神经元缺失等。2011 年 4 月由美国国家老年研究所和 AD 协会发布的一项指南中将 AD 自然病史分为 3 个阶段:临床前期、轻度认知损害期(mild cognitive impairment, MCI)和 AD 痴呆期,但多数患者确诊时已处于不可逆转的 AD 痴呆期,寻找一种或几种 AD 早期诊断的生物标记物已成为国内外学者共同关心的课题^[1-2]。现将近年来脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)、血液及尿液标本中 AD 生物标记物和检测方法新进展综述如下。

1 生物标记物的定义及满足条件

生物标记物是一项经客观测量能够反映人体内生理或病理过程改变的代表性指标,其所提供的信息在疾病预测、早期诊断、预后判断、疗效评价和疾病监测等方面具有重要价值。根据国际老年协会的规定,理想的诊断 AD 的生物标记物应符合以下标准:能够检测基础且特征性的神经系统病理改变,诊断 AD 的敏感性大于 80%,鉴别 AD 与其他形式痴呆的特异性大于 80%,结果可重复,非创伤性,简单易行,价格低廉。目前通过多项指标联合诊断,AD 生物标记物的检测性能已经达到临床要求。

2 CSF、血液和尿液中的生物标记物

2.1 CSF 中的生物标记物 CSF 直接与中枢神经系统的细胞外空间联系,大脑的生物学变化将最先在 CSF 中反映出来,因此 CSF 成为研究 AD 生物标记物最多的一种标本类型。

2.1.1 β 淀粉样蛋白(amyloid β peptide, A β)和 Tau 蛋白 A β 是 SPs 主要成分,含 36~43 个氨基酸的多肽。 β 淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)经过 β 、 γ 分泌酶裂解成 A β 片段,主要有 A β 40、A β 42 两种单体形式, A β 42 比 A β 40 多 2

个疏水性氨基酸,聚集能力更强,先聚集成可溶性 A β 寡聚体,后进一步聚集成 SPs, A β 40 是在 AD 疾病进展过程中逐渐形成的,聚集的不溶性 A β 具有较强的神经毒性。Tau 是 NFTs 主要成分,是一种神经元微管相关蛋白,具有稳定微管网状结构的功能,AD 患者脑内 Tau 蛋白高度磷酸化,易于聚集,形成 NFTs,导致神经元微管破坏,胞体-轴突营养物质运输及传递障碍,神经元退化死亡。Tau 蛋白至少存在 30 个磷酸化位点,目前检测的磷酸化位点主要是苏氨酸 181(P-Tau181)、苏氨酸 231(P-Tau231)和丝氨酸 199(P-Tau199)^[1]。

相对于健康对照组,研究发现多数 AD 患者 CSF 中 A β 42 水平下降, A β 40 水平保持不变,总 Tau 蛋白(total tau, T-Tau)和磷酸化 Tau 蛋白(phorylated tau, P-Tau)升高。A β 42 水平下降可能是因为在 SPs 中沉积过多,扩散至 CSF 中的相应减少, T-Tau 和 P-Tau 水平升高可能是 NFTs 导致神经元退化死亡,然后被胶质细胞吞噬并向细胞外释放大量 T-Tau 和 P-Tau,一部分进入 CSF 中所致。

A β 42 下降、T-Tau 和 P-Tau 升高三者在诊断 AD 方面显示了很高的准确性。Blennow^[3]报道在鉴别 AD 和正常老年化时 A β 42 的敏感性为 86%,特异性为 89%; T-Tau 敏感性为 81%,特异性为 91%。Hulstaert 等^[4]进行的一项多中心大样本研究显示,诊断 AD, A β 42 的敏感性为 85%,特异性为 55%; T-Tau 的敏感性为 85%,特异性为 65%;而联合应用 A β 42 和 T-Tau 的敏感性为 85%,特异性为 86%,联合应用优于单项指标。另有研究发现 P-Tau199 诊断 AD 的价值重大,敏感性和特异性均达 85%^[5]。A β 42 水平不随年龄而改变, T-Tau 水平随年龄增长而升高,二者均与性别无关, Sjogren 等^[6]建议健康者的参考范围: T-Tau 21~50 岁, <300 ng/L; >50~70 岁, <450 ng/L; >70~93 岁, <500 ng/L。 A β 42 >500 ng/L。

A β 42 下降、T-Tau 和 P-Tau 升高在预测 MCI 患者进展为 AD 方面有重要意义,稳定型 MCI(MCI-MCI) A β 42 基线水平

[△] 通讯作者, E-mail: linqiubj@yahoo. com. cn.