

- [16] 魏新素,张平安,李艳,等. MxA 启动子和 eIF-2a 调节区 2 基因多态性对 HBV 感染自然转归的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 536-537.
- [17] Yu Z, Wang Z, Chen J, et al. GTPase activity is not essential for the interferon-inducible MxA protein to inhibit the replication of hepatitis B virus[J]. Arch Virol, 2008, 153(9): 1677-1684.
- [18] Park IH, Baek KW, Cho EY, et al. PKR-dependent mechanisms of interferon- α for inhibiting hepatitis B virus replication[J]. Mol Cells, 2011, 32(2): 167-172.
- [19] Samuel CE. Antiviral actions of interferons[J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14(4): 778-809.
- [20] 林绮文, 吴长有. IFN- α 磷酸化 STAT1 和 STAT4 诱导人 NK 细胞产生 IFN- γ 并增强其杀伤活性[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 752-755.
- [21] Chen SH, Wu HL, Kao JH, et al. Persistent hepatitis B viral repli-
- cation in a FVB/N mouse model: impact of host and viral factors [J]. PloS One, 2012, 7(5): e36984.
- [22] 刘汉屈, 秦波. 干扰素治疗慢性乙型肝炎的分子机制研究进展 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(18): 1803-1808.
- [23] 闫涛, 李克, 王慧芬, 等. 长效干扰素治疗慢性乙型肝炎表面抗原转阴可能与 HBV 序列本身相关[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(4): 269-271.
- [24] 顾锡炳, 杨小娟, 王栋, 等. 慢性乙型肝炎患者血清 HBV DNA 水平与 HBV 特异性 CTL、非特异性 CTL、Th1、Th2 的关系[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(8): 1424-1426.
- [25] 杨凯, 徐元宏, 管世鹤. 乙型肝炎病毒抵抗 α -干扰素治疗研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(2): 142-143.

(收稿日期: 2012-06-09)

• 综 述 •

人类布鲁氏菌病实验室诊断和临床治疗研究进展*

乔秀强¹, 张海娟²综述, 朱德全^{1△}, 冯尚彩²审校

(1. 临沂市人民医院临床检验中心微生物检验科, 山东临沂 276003; 2. 临沂大学山东省鲁南中药材资源开发工程技术研究中心, 山东临沂 276000)

关键词: 布鲁氏菌病; 实验室技术和方法; 诊断; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2889-03

人类布鲁氏菌病难以早期诊断, 主要是由于本病早期常常表现为不明原因的发热, 缺乏特异性的临床症状和体征。布鲁氏菌的生长对营养和环境都有较高的要求, 所以临床普通血培养对本菌的检出率并不高, 实验室诊断大部分还是依靠血清学和分子生物学检测。然而, 也有研究发现部分患者体内血清布鲁氏菌抗体呈阴性, 具有诊断学意义的血清布鲁氏菌抗体滴度尚未确定。目前, 国内外对于应用分子生物学技术检测出体内存在布鲁氏菌 DNA 的患者是否应采用长期抗菌药物治疗仍然存在争议。本文就实验室检测结果对本病诊断与治疗的临床意义作一综述。

1 布鲁氏菌病

据报道, 全球每年大约五十万布鲁氏菌新增病例, 然而由于许多本病患者易被误诊为其他疾病, 或被诊断为“发热待查”进行治疗, 据世界卫生组织(WHO)估计, 真实的发病率要比报告的数字高 10~25 倍。本病可通过与动物直接接触感染, 但主要还是通过食用受污染的动物源性食品以及未经消毒处理的奶制品而感染。此外, 还有不少关于细菌实验室获得性感染本病的报道^[1]。

2 布鲁氏菌特征

布鲁氏菌革兰氏阴性, 需氧, 兼性细胞内寄生的球杆菌或短杆菌。该菌氧化酶、过氧化氢酶、硝酸还原酶和脲酶均为阳性。1985 年 WHO 布鲁氏菌病专家委员会按首选动物宿主、致病性以及某些特定的表型将本菌分外 6 个种 19 个生物型: 羊种(生物型: 1-3)主要寄生于绵羊和山羊体内; 牛种(生物型: 1-7 和 9)主要寄生于牛和其他牛科体内; 猪种(生物型: 1-5)主要寄生于猪体内; 绵羊型副睾种、沙林鼠种、犬种。最近有研究

发现了两个海洋动物源型的新物种: 海豹种和海豚种^[2], 以及普通的田鼠种^[3]、赤狐种^[4]。临床上以羊、牛、猪三种意义最大, 羊种致病力最强。

除猪种 3 型只有 1 条 3.1Mb 染色体外, 其余生物型均有 2.1Mb 和 1.5Mb 两条环状染色体。机体感染本菌后可引起体液免疫和细胞免疫, 以细胞免疫为主。

3 布鲁氏菌病临床表现和治疗

本病潜伏期从几个星期到几个月不等, 急性期感染的表现颇似重度感冒, 典型病例热型呈波浪状, 初起体温逐日升高, 达高峰后缓慢下降, 热程约 2~3 周, 间歇数日至 2 周, 发热再起, 反复数次, 称“波状热”。感染初期, 患者常表现为头痛, 关节痛和肌肉痛, 疲劳, 乏力, 消瘦, 寒战, 大汗淋漓等。急性期通常伴有菌血症, 布鲁氏菌随血液蔓延到合身各个器官系统, 主要侵犯网状内皮组织, 例如肝、脾、骨骼和造血系统。因此, 主要临床表现为肝肿大, 脾肿大^[4]。由于布鲁氏菌可在单核吞噬细胞中生存和繁殖, 急性期可继续发展为慢性期, 本期以骨关节病变最为常见, 例如脊柱炎, 骶髂关节炎等^[5]。神经布鲁菌氏病和心内膜炎是本病致命性的慢性期并发症^[6], 虽然部分并发症可危及生命, 但人类布鲁氏菌病患者病死率比较低(<1%)。

布鲁氏菌病是可以预防和治愈的传染性疾病。适当的抗菌药物治疗的主要目的是缩短疾病的自然病程, 减少并发症的发生率和预防复发。然而, 本病患者临床表现的多样性, 常导致误诊或延误诊断, 使并发症和病死率增高^[7-8]。

虽然布鲁氏菌对抗菌药物的耐药性尚未研究明确, 但是研究认为应用单一抗菌药物或者短期应用抗菌药物对人类布鲁氏菌病的治疗都是不恰当的^[9]。

* 基金项目: 山东省科技发展计划资助项目(2010GSF10285)。△ 通讯作者, E-mail: zhudequan886@126.com。

最常用的抗菌药物治疗方案是每日口服多西环素(DOX) 100 mg 2 次和利福平(RIF) 600~900 mg 1 次,持续服用 6 周。也可以每日肌肉注射链霉素(STR) 1 g(15 mg/kg·d)连续注射 2~3 周末代替利福平^[10]。在联合应用多种抗菌药物对布鲁氏菌病进行治疗时,可以选用氨基糖苷类抗菌药物的庆大霉素(GENTA)代替链霉素,而药效并没有降低^[11]。

研究发现,在治疗布鲁氏菌病时,尽管联合应用 DOX-RIF 比联合应用 DOX-STR 有着更高的复发率^[11],但是 DOX-RIF 方案是口服疗法易于被患者接受,以及副作用更少,所以仍被建议作为治疗本病的首选方案^[12]。虽然 DOX、RIF 和 GENTA 的三联疗法要比仅联合应用 DOX 和氨基糖苷类更为有效^[11],但在对没有并发症的急性期患者时应慎重考虑是否选用三联疗法。在对 8 周岁以内的幼儿进行治疗时,因用药禁忌,应用复方新诺明(TMP-SMX)代替四环素^[10],在某些特殊情况下,可单独应用复方新诺明(TMP-SMX)作为长期(超过 6 个月)的治疗药物^[11]。

4 布鲁氏菌的实验室诊断

4.1 布鲁氏菌的培养和鉴定 人类布鲁氏菌病的确诊需要从血液、骨髓或其他组织和体液中的检测出病原体。布鲁氏菌的成功检出取决于疾病的病程,是否前期应用抗菌药物,临床标本类型以及培养的方法。由于布鲁氏菌病患者血液循环中的活菌数量较低,本菌的检出对患者血液标本量有着较高的要求,同时研究表明,血培养标本中活菌的浓度与培养时间的长短呈负相关^[13]。因此,对急性期布鲁氏菌病患者进行多次血培养,以及对伴有并发症的患者在其感染部位的采集标本进行检测有助于提高布鲁氏菌的检出率。菌血症是布鲁氏菌病早期的并发症,伴有菌血症的患者比没有菌血症的患者体温升高更为明显,且在发热期对患者进行血培养时布鲁氏菌的检出率要更高^[14]。研究表明,对布鲁氏菌病患者进行骨髓培养比血培养诊断灵敏度高,检测时间短^[15],而且在患者接受抗菌药物后骨髓培养仍然有较高的检出率。布鲁氏菌能够在血琼脂平板、巧克力平板、葡萄糖琼脂平板上生长,但是从临床标本中分离出的布鲁氏菌生长非常缓慢,往往需要数天到数周才能培养出来。布鲁氏菌菌落呈圆形,突起状,半透明,直径约为 0.5~1 mm,氧化酶和脲酶阳性,革兰氏染色阴性球杆菌,显微镜下呈“细沙状”。

4.2 布鲁氏菌的血清学检测 临床上多依靠血清学间接检测对本病进行诊断。此外,血清学检测不仅可用于本病早期诊断,也可辅助该病的后续治疗。

目前有多种血清学检测方法被用于诊断人类布鲁氏菌病^[16],其中最为常用的有试管凝集试验(SAT)、虎红平板凝集试验(RBT)、补体结合试验(CT)和酶联免疫吸附试验(ELISA)等方法,按其在临床实际应用中的检测精确度排序:ELISA > SAT > RBT > CT^[17]。

SAT 作为一种敏感性和特异性都比较高的诊断方法,被广泛用于布鲁氏菌病的常规血清学检测方法,主要检测患者血清中 IgG 和 IgM 的水平。结合临床表现,血清滴度高于 1:160 作为诊断布鲁氏菌病的参考标准^[18]。RBT 常作为筛选试验用于高危人群的筛查及流行病学的研究。对于 RBT 测试阳性的患者,需要通过其他检测方法进行确诊。CT 常作为 SAT 的辅助诊断方法用于不完全抗体和非凝集抗体的检测,对于慢性布鲁氏病患者及复发患者的诊断有较高的敏感性和特异性。ELISA 可检测患者体内 IgM 的滴度,可为临床有可疑症状的急性期患者提供可靠的诊断。然而,当患者体内存在高滴度的

IgG 抗体时,可干扰应用 ELISA 方法对 IgM 抗体的检出,导致假阴性的结果;当患者体内存在类风湿因子(RF)时,可导致假阳性的结果,因此在检测 IgM 前应将患者血清中的 RF 除去。如果仅对患者血清中单一的布鲁氏菌抗体进行 ELISA 定量检测,许多患者将会得到假阴性的结果^[19],所以 IgM 和 IgG 两种抗体应同时检测以为本病的诊断提供可靠的参考^[20-21]。研究发现,采用 ELISA 对本病患者进行检测可得出采用 SAT 和 CT 方法相一致的检测结果^[22],尤其在对慢性患者诊断时 ELISA 比 SAT 具有更高的敏感性^[23]。但是,对于急性期患者 RBT 检测结果与 ELISA 结果相一致,且 RBT 检测费用更低^[23]。

4.3 布鲁氏菌的基因诊断 PCR 技术可对少量的布鲁氏菌作出诊断,用相关引物对布鲁氏菌基因进行扩增后,可检测到 1pg 的 DNA。传统研究发现,编码布鲁氏菌 31-kDa 免疫原性膜蛋白的 BSCP31 基因序列非常保守,在各型布鲁氏菌中同源性高达 99%,这为利用 BSCP31 作为目的基因通过 PCR 技术检测布鲁氏菌提供了基础。另外,16S rRNA 基因测序^[24]和布鲁斯阶梯 PCR^[25]可作为布鲁氏菌快速鉴定的基因诊断方法。

由于布鲁氏菌病患者需要长期联合应用多种抗菌药物进行治疗,所以对患者制定治疗策略时必须依靠明确的实验室诊断,应在患者接收抗菌药物治疗之前采集标本进行检测,临床症状须与相关实验室检测的阳性结果相结合才可以对患者作出诊断,如:从血液、其他体液或组织样本中分离培养出布鲁氏菌,血清学相关抗体的效价超过 1:160 或抗体效价在后续检测时升高四倍以上,在临床标本中检测出布鲁氏菌的 DNA^[25]。

5 展 望

本病的诊断仍缺乏可靠的实验室检测方法,费时的血培养及鉴定一直被作为本病诊断的“金标准”,但是布鲁氏菌培养阳性检出率较低,往往会延误诊断及早期治疗,所以临床上常通过血清学检测对本病作出诊断。血清学诊断虽然操作过程相对省时,但目前仍然没有国际化的参考标准,而且经过长期治疗痊愈的患者及交叉反应性细菌感染的患者会干扰本病的诊断,所以具有诊断学意义的血清布鲁氏菌抗体滴度尚未确定。目前,需要对布鲁氏菌病不同的流行地区的不同人群制定相应的血清学检测方法的参考值范围,而这仍需进一步大规模的血清流行病学研究。随着分子生物学的发展,新的基因诊断技术的研究将作为快速有效的方法用于布鲁氏菌病的诊断。在本病的不同发病阶段血清学及分子生物学的检测结果需要另外的检测方法进行验证,以区分抗菌药物治疗后抗体滴度的下降和细菌 DNA 含量的减少是短暂性的还是有效的治愈。另外,由于分子生物学检测价格昂贵,血清学检测被用于布鲁氏菌病流行地区常规的检测方法。所以,在本病广泛流行的地区迫切需要一种简单、快速、便宜的检测方法用于大规模的流行病学筛查。

参考文献

- [1] Yagupsky P, Baron EJ. Laboratory exposures to brucellae and implications for bioterrorism[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(8): 1180-1185.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Human exposures to marine Brucella isolated from a harbor porpoise - Maine, 2012[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2012, 61(25): 461-463.

- [3] Jiménez de Bagüés MP, Ouahrani-Bettache S, Quintana JF, et al. The new species *Brucella microti* replicates in macrophages and causes death in murine models of infection[J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(1):3-10.
- [4] Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, et al. Isolation of *Brucella microti* from mandibular lymph nodes of red foxes, *Vulpes vulpes*, in lower Austria[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2009, 9(2):153-156.
- [5] Buzgan T, Karahocagil MK, Irmak H, et al. Clinical manifestations and complications in 1028 cases of brucellosis: a retrospective evaluation and review of the literature[J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(6):469-478.
- [6] Abid L, Frikha Z, Kallel S, et al. *Brucella* myocarditis: a rare and life-threatening cardiac complication of brucellosis [J]. *Intern Med*, 2012, 51(8):901-904.
- [7] Erbay AR, Erbay A, Canga A, et al. Risk factors for in-hospital mortality in infective endocarditis: five years' experience at a tertiary care hospital in Turkey[J]. *J Heart Valve Dis*, 2010, 19(2):216-224.
- [8] Sasmazel A, Baysal A, Fedakar A, et al. Treatment of *Brucella* endocarditis: 15 years of clinical and surgical experience[J]. *Ann Thorac Surg*, 2010, 89(5):1432-1436.
- [9] Heo EJ, Kang SI, Kim JW, et al. In vitro activities of antimicrobials against *Brucella abortus* isolates from cattle in Korea during 1998-2006[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2012, 22(4):567-570.
- [10] Sandalakis V, Psaroulaki A, De Bock PJ, et al. Investigation of rifampicin resistance mechanisms in *Brucella abortus* using MS-driven comparative proteomics [J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(4):2374-2385.
- [11] Skalsky K, Yahav D, Bishara J, et al. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *BMJ*, 2008, 336(7646):701-704.
- [12] Ariza J, Bosilkovski M, Cascio A, et al. Perspectives for the treatment of brucellosis in the 21st century: the Ioannina recommendations[J]. *PLoS Med*, 2007, 4(12):e317.
- [13] Alsayed Y, Monem F. Brucellosis laboratory tests in Syria: what are their diagnostic efficacies in different clinical manifestations? [J]. *J Infect Dev Ctries*, 2012, 6(6):495-500.
- [14] Kadanali A, Ozden K, Altoparlak U, et al. Bacteremic and nonbacteremic brucellosis: clinical and laboratory observations[J]. *Infection*, 2009, 37(1):67-69.
- [15] Mantur BG, Mulimani MS, Bidari LH, et al. Bacteremia is as unpredictable as clinical manifestations in human brucellosis[J]. *Int J Infect Dis*, 2008, 12(3):303-307.
- [16] Araj GF. Update on laboratory diagnosis of human brucellosis [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(Suppl 1):12-17.
- [17] Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, et al. Laboratory-based diagnosis of brucellosis—a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis[J]. *Clin Lab*, 2003, 49(11/12):577-589.
- [18] Mantur BG, Amarnath SK, Parande AM, et al. Comparison of a novel immunocapture assay with standard serological methods in the diagnosis of brucellosis[J]. *Clin Lab*, 2011, 57(5/6):333-341.
- [19] Fadeel MA, Hoffmaster AR, Shi J, et al. Comparison of four commercial IgM and IgG ELISA kits for diagnosing brucellosis[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60(Pt 12):1767-1773.
- [20] Mantur B, Parande A, Amarnath S, et al. ELISA versus conventional methods of diagnosing endemic brucellosis[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 83(2):314-318.
- [21] Özdemir M, Feyzioglu B, Kurtoglu MG, et al. A comparison of immunocapture agglutination and ELISA methods in serological diagnosis of brucellosis[J]. *Int J Med Sci*, 2011, 8(5):428-432.
- [22] Prince HE, Lopez J, Yeh C, et al. Performance characteristics of the Euroimmun enzyme-linked immunosorbent assay kits for *Brucella* IgG and IgM[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 65(2):99-102.
- [23] Al Dahouk S, Nöckler K. Implications of laboratory diagnosis on brucellosis therapy[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9(7):833-845.
- [24] Dash N, Panigrahi D, Al-Zarouni M, et al. 16S rRNA gene sequence analysis of a *Brucella melitensis* infection misidentified as *Bergeyella zoohelcum*[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2012, 6(3):283-286.
- [25] López-Goni I, García-Yoldi D, Marin CM, et al. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 154(1/2):152-155.

(收稿日期:2012-06-23)

• 综 述 •

CD4⁺ T 淋巴细胞与自身免疫性疾病的关系研究进展*

李志¹, 杨婷婷²综述, 徐维家^{1△}审校

(1. 大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033; 2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116033)

关键词: 淋巴细胞亚群; 自身免疫疾病; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.23.035

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)23-2891-04

在很长的一段时间内, 对于 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群的认识局限于 Th1 和 Th2 细胞。但随着新的亚群包括 Th17 细胞和 Th9 细胞陆续被发现, 打破了长期以来 CD4⁺ T 淋巴细胞一直被划分为 Th1 和 Th2 的结论。各细胞亚群在细胞微环境中发挥着各自的功能来维持免疫稳态, 当微环境发生改变时, 各细

胞间又会相互拮抗使免疫机能紊乱进而导致自身免疫病的发生。现就近年来对 CD4⁺ T 淋巴细胞的生物学功能及与各种自身免疫病的关系做一综述, 便于深入了解 CD4⁺ T 淋巴细胞的分化及功能, 各细胞亚群间的相互关系及其在疾病中的免疫学作用。

* 基金项目: 大连市医药卫生科学研究项目(2010051005)。 △ 通讯作者, E-mail: xuweijia@dl.cn。