

· 综述 ·

狂犬病诊断的研究进展

王新伟 综述, 余光开 审校(泸州医学院附属医院感染科, 四川 泸州 646000)

Research Progress in Diagnosis of Rabies

WANG Xin-wei (Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Recently, the prevalence of rabies tends to rise, which is seriously imperilling the development of animal husbandry and the health of human beings. The diagnosis of rabies is of important hygiene significance. The research progress in diagnosis of rabies in the last several years is reviewed.

Key words: Rabies; Diagnosis; Research

摘要:近年来狂犬病在我国的流行呈上升趋势,严重威胁着畜牧业的发展和人类的健康,狂犬病的诊断具有重要的公共卫生意义。为此,就近年来有关狂犬病的诊断研究进展进行综述。

关键词:狂犬病;诊断;研究

中图分类号:R512.99 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-8174(2008)04-0236-03

狂犬病是由狂犬病病毒所致的急性、进行性、几乎不可逆转的致死性脑脊髓炎,属古老而严重的自然疫源性疾病。人狂犬病的临床特征是恐水、怕风、咽肌痉挛和进行性麻痹等,尤以恐水症状为突出,一旦发病,病死率几乎达100%^[1]。狂犬病呈世界性分布,严重威胁人畜的健康,在发展中国家尤为严重,印度人狂犬病病例居世界之首,中国是第二位^[2]。我国是狂犬病严重流行地区,近几年狂犬病的发病数呈快速上升趋势^[3]。狂犬病的诊断在临床上主要依靠流行病学和临床表现,缺乏对狂犬病特异性实验室诊断,而实验室诊断对狂犬病的确诊具有重要意义。本文就狂犬病实验室诊断方法作一综述。

1 狂犬病病毒抗原的检测方法

1.1 直接荧光抗体试验(DFA) 感染狂犬病病毒的细胞携带狂犬病病毒抗原,狂犬病病毒抗原可以特异性与异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗狂犬病病毒单克隆抗体结合。FITC在荧光显微镜下显示可见荧光,使抗原抗体的特异性反应在荧光显微镜能直接观察。此法快速、特异又敏感,为目前诊断狂犬病病毒感染的首选方法,已被世界卫生组织(WHO)和我国卫生部推荐。可用于狂犬病患者和感染动物的诊断,其标本可选受伤处的皮肤组织、后颈带毛囊的皮肤组织(皮肤切片)和部分体液(唾液、脑脊液等),而角膜(印片)因

取样困难,可靠性低,因此不推荐使用。死后可做脑组织检查,在细胞内病毒特异性荧光为黄绿色颗粒,分布在感染细胞的胞浆内。根据特异性荧光颗粒的多少、荧光亮度、阳性细胞在细胞总数中所占比例,可将免疫荧光反应分为“+ ~ + + + +”(阳性细胞数<25%为“+”,25%~50%为“++”,50%~75%为“+++”,>75%为“++++”),无特异性荧光为阴性。阳性结果表示有狂犬病病毒感染,有确诊意义。

1.2 酶联免疫吸附实验(ELISA) 根据抗原抗体特异性结合特点,用抗狂犬病病毒特异性单克隆抗体包被塑料板,与标本中待检抗原结合,其中待检抗原又与后加入的辣根过氧化物酶标记的抗狂犬病病毒单克隆抗体特异性结合,通过辣根过氧化物酶与底物作用而发生颜色反应,其显色程度与待检抗原含量呈正相关,检测到狂犬病病毒抗原阳性有诊断意义。此法又被称为快速狂犬病毒酶免疫诊断(RREID),由法国 Pasteur 研究所首创并被 WHO 推荐用于检测狂犬病病毒抗原。其灵敏度高、特异性强,加之无需昂贵设备,操作简便,因此便于推广使用。余光开等^[4]建立了 ELISA 检测家犬唾液中的狂犬病病毒抗原,并研制出检测狂犬病病毒抗原试剂盒,其方法敏感、特异,已应用到犬只测毒推广项目中。

1.3 免疫细胞化学检测(ICCA) 亦称免疫组织化学

或免疫酶化学检测,通常用于组织中的病毒抗原或感染病毒的组织的定性检测^[5]。可在不使用荧光显微镜情况下对狂犬病病毒进行定量检测,经济实用,适于基层推广。王继麟等^[6]用该方法成功进行了对狂犬病病毒的定量检测,具有较好的灵敏度和稳定性,与荧光抗体检测结果相当和平行。

1.4 动物接种试验 取患病动物的大脑皮层、海马角、小脑和延髓等脑组织研磨处理后,用含抗生素的等渗培养液制成匀浆,离心取上清液,接种于1~2日龄的乳鼠脑内,观察21天,第5天开始出现麻痹或其他神经紊乱症状而死亡时,可确诊为狂犬病,最好用DFA试验检查小鼠的脑组织加以确认。

1.5 聚合酶链式反应(PCR) 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)的方法可高灵敏度地检测狂犬病病毒的核酸并进行定量分析。在应用核酸检测技术时,样品的质量非常重要,由于其敏感度非常高,因此极微量的污染即可导致原来阴性的样品被扩增出现假阳性。RT-PCR方法常需要在不同的试管中多次转换核苷酸,易被污染出现假阳性^[7]。检测狂犬病病毒核蛋白(N)基因片段的TaqMan PCR检测方法较传统PT-PCR检测方法敏感度提高10倍,可检出、区别狂犬病病毒基因型^[8],是一种快速、灵敏、特效的方法。但狂犬病病毒的遗传异质性是该诊断技术发展的障碍^[9],基因点突变可出现假阴性结果^[10]。PCR技术在定量病毒水平上是有效的应用方法^[11],还可用于不适合做免疫荧光的标本,如唾液、脑脊液。

1.6 其他方法 狂犬病病毒的单克隆抗体技术可区别核蛋白和糖蛋白,能鉴别狂犬病病毒株分类。仅含少量狂犬病病毒的样品很难用常规检测方法进行确认,可将病毒在细胞培养物上复制,增加病毒浓度,再用DFA试验检测。

www.med126.com

2 狂犬病中和抗体的检测方法

2.1 病毒中和试验 最早的病毒中和试验采用动物接种,测定血清与病毒感染后残存的病毒感染力^[12]。目前这一方法基本上全部被细胞水平的中和试验取代。狂犬病病毒中和抗体的细胞中和试验有多种,分别叙述如下。

2.1.1 小鼠血清中和试验(SNT) 该方法^[13]采用动物实验,能够定量检测狂犬病病毒中和抗体的水平^[14]。主要用于人和动物疫苗后是否具有免疫力的中和抗体测定,以及被动免疫治疗用的精制抗狂犬病血清和人源抗狂犬病免疫球蛋白制品进行国际单位的测定。此法属经典方法,不需现代实验设施,但耗时长,成本高,需要大量实验动物。因此,WHO不推荐为

首选方法。

2.1.2 空斑减少中和试验(PRT) 是较精确的测定病毒感染力的方法。被狂犬病病毒感染的细胞通常不能被活性染料如中性红染色,是由于退化或死亡不能摄入染料所致,形成无色的细胞蚀斑。而病毒在被抗体中和后,会使样品中病毒减少导致蚀斑的减少。据此可以计算血清中狂犬病病毒中和抗体的效价。该测定方法主要在实验室研究时应用。

2.1.3 细胞病变中和试验 由兔脑或鼠脑连续传代适应的狂犬固定毒株的病毒直接接种细胞培养,大部分病毒不产生细胞病变,但是经连续在某种细胞中传代适应的狂犬病病毒株,可在其适应细胞中经培养后产生细胞病变。因此,可以通过血清中和抗体对狂犬病病毒的中和作用使病毒失去细胞病变作用的程度,测定相应的中和抗体水平。该方法观察结果直观,但是需要时间也较长,适用于实验室对不急于获得结果样本的中和抗体鉴定。

2.1.4 快速荧光灶抑制试验(RFFIT) 是1996年Smith等^[15]建立的,现被WHO推荐的检测狂犬病中和抗体的标准方法。是将一定量预先滴定的攻击病毒与系列稀释的待检血清一起孵育,让病毒与抗体在体外进行中和反应。用未被中和的残余活病毒的反应液接种细胞,培养24小时后再用荧光素标记的抗狂犬病病毒核蛋白抗体染色,病毒感染的细胞会形成荧光灶。根据荧光灶的数量与已知效价的血清标准品对照,可计算出待检血清的抗体效价,用国际单位表示。当血清稀释成0.5IU/ml为阳性时,WHO提示出现对狂犬病病毒攻击的保护。

2.1.5 荧光抗体病毒中和试验(FAVN) 是1998年Cliquet等^[16]建立的,目前在WHO狂犬病参考实验室中广泛使用。该方法的操作流程和RFFIT基本相似,但比前者所需时间长,需40~48小时。两种方法最后的测定结果在统计学上无显著性差异。

2.2 抗原-抗体间接凝集试验

2.2.1 间接血凝试验法 用吸附法或利用金属离子处理红细胞制备狂犬病病毒抗原或抗体的致敏细胞,在一定条件下,致敏细胞能和相应的抗原或抗体发生特异性凝集。该方法步骤繁琐,灵敏度低。

2.2.2 反向被动血凝试验(RPHI) 预先将不同稀释度的抗体和4单位抗原结合,再以抗体致敏细胞检测未被抗体结合的游离抗原,从而得知抗血清抑制血凝的能力或程度。此法以最高稀释度时血清不出现血凝者为该待检血清的抗体效价^[12]。该方法同样步骤繁琐,灵敏度低,较少被采用。

2.2.3 乳胶凝集试验 是将狂犬病病毒糖蛋白在一定条件下致敏的乳胶颗粒与被检血清在载玻片上进行反应,根据凝集的有无判断有无抗体的一种检测方法。该方法操作简单,反应时间一般只需3~5min,特异性高,但最低检出水平为2IU/ml,可以用于疫苗接种动物血清阳转的检测^[17]。

2.3 间接酶或荧光标记检测法

2.3.1 间接免疫荧光试验 在含有已知抗原,如感染狂犬病病毒的细胞涂片或组织切片上,加入待检血清,抗原和抗体作用之后,再以荧光标记的抗体染色,出现荧光反应时提示待检血清含抗狂犬病抗体。但因参与反应的组份较多,受干扰的机会较大,故不常应用。

2.3.2 酶联免疫吸附检测(ELISA) 该方法由Cliquet等人建立^[18,19],法国Pasteur研究所的Platelia狂犬病ELISA试剂是一种检测人血清中抗狂犬病毒糖蛋白抗体的免疫酶技术。试剂盒有灭活及提纯的狂犬病毒膜提取的糖蛋白抗原包被固相,结合物为过氧化物酶标记的A蛋白,3~4小时可完成试验。主要用于疫苗接种后抗体阳转的大量筛选,可进行定性和定量结果判定。Yang等^[20]建立了一种新型的双抗体夹心酶联免疫吸附试验,可快速测定多种标本中的狂犬病毒抗体。而糖蛋白上的有些表位诱导产生的抗体是非中和抗体^[21],目前ELISA方法测定的是总抗体,不代表具有保护性的中和抗体水平,所测抗体为所有能与包被板上抗原结合的IgG抗体,包括一些非特异性抗体,结果不能用国际单位(IU/ml)表示,只能用等价单位(EU/ml)表示,其结果仅供参考,WHO和我国卫生部不推荐此法检测狂犬病中和抗体。

3 组织病理学检测

狂犬病脑部病理检查为一般性炎症,与一般病毒性脑炎无明显差异,而内基小体在中枢神经系的检出是狂犬病的病理学诊断依据。因内基小体的检出率较低(20%~70%),故灵敏度不高。

4 结语

欧美国家对狂犬病的确定除了通过症状判定外,必须经过实验室诊断确诊。我国对狂犬病的判断一般没有经过实验室诊断,缺乏充分的科学依据。相信随着分子生物学等新技术在狂犬病研究上的广泛应用,会有更多的、实用的诊断方法在基层医疗机构推广。

参考文献:

[1]唐家琪.自然疫源性疾病[M].北京:科学出版社,2005.358.
[2]WHO. Rabies situation and trends in Asia[J]. WER,1997,72(35):266-268.

[3]唐青,李洁.中国狂犬病流行近况及相关因素分析[J].中华流行病学杂志,2005,26(3):223-224.
[4]余光开.狂犬病的现代概念[M].成都:四川大学出版社,1993.70-90.
[5]Arslan A, Saglam YS, Temur A, et al. Detection of rabies viral antigens in non-autolysed and autolysed tissues by using an immunoperoxidase technique[J]. Vet Rec,2004,155(18):550-552.
[6]王继麟,朱家鸿,徐葛林,等.用免疫细胞化学、RT-PCR等方法定量检测狂犬病毒及其核酸的比较研究[J].中国人兽共患病学报,2007,23(2):101-105.
[7]Wakeley PR, Johnson N, McElhinney LM, et al. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1,5 and 6[J]. J Clin Microbiol,2005,43(6):2786-2792.
[8]Black EM, Lowings JP, Smith J, et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology[J]. J Virol Methods,2002,105:25-35.
[9]Schutten M, van den Hoogen B, van der Edne ME, et al. Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma[J]. J Virol Methods,2000,88:81-87.
[10]Hughes GJ, Smith JS, Hanlon CA, et al. Evaluation of a TaqMan PCR assay to detect rabies virus RNA; influence of sequence variation and application to quantification of viral loads[J]. J Clin Microbiol,2004,42(1):299-306.
[11]Alexandersen S, Oleksiewicz MB, Donaldson AI. The early pathogenesis of foot-and-mouth disease virus in pigs infected by contact; a quantitative time-course study using TaqMan RT-PCR[J]. J Gen Virol,2001,82:747-755.
[12]谢世宏.狂犬病防治手册[M].成都:四川科学技术出版社,2003.117-129.
[13]Wunderli P, Shaddock J, Scott D, et al. The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccine[J]. Vaccine,1991,9:638-642.
[14]俞永新.狂犬病和狂犬病疫苗[M].北京:中国医药科技出版社,2001.93-110.
[15]Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for detecting rabies neutralizing antibody[M]. Geneva: World Health Organization, 1996.181-188.
[16]Cliquet F, Aubert M, Sagn L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody[J]. Immunol Methods,1998,212(1):79-87.
[17]Madhusudana SN, Saraswati S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies[J]. Clin Virol,2003,27(2):129-135.
[18]Cliquet F, Muller T, Mutinelli F, et al. Standardization and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns[J]. Vaccine,2003,21:2986-2993.
[19]Cliquet F, McElhinney LM, Servat A, et al. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus specific antibodies from vaccinated dogs and cats[J]. J Virol Methods,2004,117(1):1-8.

[20] Yang LM, Zhao LZ, Hu RL, et al. A novel double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibodies against rabies virus[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(8): 966-968.

[21] Cliquet F, Sagne L, Seherfer JL, et al. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields[J]. Vaccine, 2000, 18(23): 3272-3279.

收稿日期: 2008-03-31; 修回日期: 2008-04-03

作者简介: 王新伟(1974-), 男, 河南新乡人, 主治医师, 硕士在读, 研究方向: 病毒性脑炎的早期诊断及防治。

无精子症病因学研究进展

刘群龙 综述, 蔡志明 审校(汕头大学医学院, 广东 汕头 515041)

Research Progress in Pathogenic Factors of Azoospermia

LIU Qun-long (Medical College, Shantou University, Shantou 515041, China)

Abstract: Azoospermia is one of important factors causing male infertility. The etiology of azoospermia include pretestis factor, testis factor and posttestis factor. The etiology of most of azoospermia is unknown. The further discuss of the etiology of azoospermia is helpful for guiding clinical treatment.

Key word: Azoospermia; Etiology

摘要: 无精子症是导致男性不育的常见原因, 引起无精子症病因较多, 有睾丸前因素、睾丸因素及睾丸后因素。大部分无精子症病因仍未明确, 现就无精子症的病因学研究进展做一综述。

关键词: 无精子症; 病因学

中图分类号: R711.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-8174(2008)04-0239-03

目前大多数学者认为育龄期夫妇同居1年以上而因男性原因导致不育的称为男性不育症。男性生育功能障碍约占总不育原因的50%。按致病因素男性不育症基本可分为三大类:(1)睾丸前因素:包括下丘脑-垂体-睾丸轴内分泌调控失衡等原因;(2)睾丸因素:睾丸先天发育异常、感染、肿瘤等因素;(3)睾丸后因素:输精管道发育异常、损伤、感染, 射精功能障碍等因素。无精子症则是男性不育中最严重的一种, 估计发病率约为7%~10%。必须是育龄期男性, 3次精液检查(并经射精管后尿液检查排除逆向射精)都显示无精子才能诊断为无精子症。现就导致无精子症相关病因综述如下。

1 睾丸前因素

1.1 特发性促性腺激素减退性性功能低下症(IHH)和Kallamann综合征 临床可表现无精子症和少精子症, 导致男性不育。下丘脑分泌GnRH不足是IHH和Kallamann综合征的共同原因。Kallamann除了有IHH症状外合并嗅觉丧失或减退。已经发现这两种疾病的遗传方式是常染色体显性、常染色体隐性或X染色体隐性遗传。引起下丘脑-垂体-性腺轴调控异常的基因包

括:(1)KAL 1(Kallamann syndrome 1)基因:编码蛋白为anosmin-1蛋白, 目前对这个基因研究较多, 认为anosmin-1蛋白可能是成纤维细胞生长因子(FGF)信号传导通路中的重要介质^[1]。(2)NROB 1(又称DAX 1)基因:NROB 1位于X染色体, 有两个外显子, 编码的蛋白是核受体家族成员。NROB 1表达在性腺和肾上腺分化阶段以及下丘脑发育阶段, 可以抑制睾丸发育, 促进卵巢发育^[2]。成纤维细胞生长因子受体-1(FGFR 1)基因突变引起功能的丧失可导致发生Kallamann综合征, 对于FGFR 1基因的突变与表型之间的关系仍需进一步研究。在特发性的IHH家族中发现50%有GnRHR发生基因突变, 并且发生突变的严重程度与临床症状有明显关系, 在男性严重程度可发生对GnRH的治疗发生抵抗, 青春期丧失或者发生隐睾。PPR54是最近在IHH家族中发现的一个新的基因, 目前对其功能仍不清楚^[3]。

1.2 高泌乳素(PRL)血症 垂体腺瘤是高PRL血症最常见原因。PRL的作用是增加LH受体的数量, 使LH作用于Leydig细胞发挥促激素生成作用。而高PRL则抑制促性腺激素分泌, 引起性激素的合成和释