

chain reaction [J]. J Clin Microbio, 1991, 29 (3):426-430.

[12] 王刚, 卢行安, 秦成, 等. PCR 技术检测食品中金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因[J]. 中国卫生检验杂志, 2005 (2):186-187.

[13] 斯国静, 张蔚, 韦东芳. 检测金黄色葡萄球菌肠毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2002 (8):496.

[14] C Vernozy-Rozand, C Mazuy-Cruchaudet, C Bava, et al. Comparison of three Immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food [J]. Letters Appl Microbiol, 2004, 39:490-494.

[15] 陶军, 张树宏, 吴仲梁. 应用“自动荧光酶标免疫测试仪”与常规培养法对冻禽肉中沙门氏菌的检测效果比较试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1996 (5):15-17.

[16] 慈云祥, 臧凯赛, 高体玉. 几种微生物的红外光谱研究 [J]. 高等学校化学学报, 2002, 23 (6):1 047-1 049.

[17] 刘建学. 实用近红外光谱分析技术[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 25-26.

[18] 刘海洪. MALDI-TOF-MS 在细菌检测和鉴定中的应用 [J]. 微生物学免疫学进展, 2003, 31:47-53.

[19] 怡萍, 张红明. 激光解吸电离飞行时间质谱技术及应用 [J]. 现代仪器, 2002 (1):118-119.

[20] 吴多加, 李凤琴. 在食品微生物检测和鉴定中应用的一种质谱新技术 [J]. 中华预防医学杂志, 2005 (9):361-363.

[21] 李毅. 金黄色葡萄球菌及其肠毒素研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14 (4): 392-395.

收稿日期: 2010-07-20



艾滋病检测技术研究进展

韦雪芳

广西南宁市横县疾病预防控制中心(530300)

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus.HIV) 是获得性免疫缺陷综合症 (aquired immunodeficiency syndrome, AIDS. 艾滋病) 的病原体, 以细胞免疫缺陷为特征, 多伴发机会性致死性感染和罕见肿瘤^[1]. 1981 年美国首次报道第 1 例艾滋病病例, 1983 年由美国人罗伯特加洛领导的研究小组成功分离艾滋病病毒^[2]. 我国 1985 年发现第 1 例病例^[3], 以后每年疫情呈上升趋势, 估计我国现有 84 万感染者. 由于该病目前尚无法治愈, 也无疫苗可预防, 且流行快, 病死率及各种机会性感染伴发率高, 给人类造成巨大的经济损失和社会危害, 故引起世界各国的高度重视. 准确掌握 HIV 流行趋势, 制定有效控制和措施其传播成各国共同关注的一项基础研究. 通过检测 HIV 确定 HIV 的感染是艾滋病预防控制工作的重要组成部分. 目前 HIV 检测总体上可以分为抗体检测和病毒检测两大类. 现就该领域的研究进展作一综述.

1 抗体检测技术进展

临床上常规应用 HIV 抗体检测, 一般 HIV 抗体在感染 4 周后逐渐出现, 可延续至终身, 是人类重要的感染指标^[4]. 目前, 大多应用双抗原夹心法, 这种方法具有很好的灵敏性和特异性^[5]. 抗体检测由初筛和确证试验组成.

1.1 HIV 抗体检测初筛试验

1.1.1 免疫吸附试验(ELISA) 从 1985 年第 1 代的全病毒抗原间接法到第 2 代重组或多肽抗原的间接法发展到第 3 代以重组和多肽抗原包被的双抗原夹心法, 至 1997 年 HIV 抗原抗体联合检测试剂(即第 4 代)问世^[6]. 目前国内外主要使用第 3 代试剂, 也有少数使用第 2 代试剂; 血源筛查仍以第 3 代试剂为主. 国际上有些国家和地区已将第 4 代试剂用于血源筛查, 与第 3 代试剂相比, 第 4 代试剂检出时间提前 4~9.1 天, 窗口期缩短 1 周多, 且能同时检测抗

原抗体,降低血源筛查的残余危险度。在艾滋病早期诊断的效果上优于第3代。但使用第4代试剂对艾滋病病毒进行检测,仍然有2~3周的窗口期,此外,由于把抗原抗体同时包被在反应板上存在着相互干扰的可能,影响免疫反应的特异性,其敏感度和特异度尚需通过大量的临床评估加以确认^[4]。目前很多试剂厂家生产的ELISA检测试剂敏感性和特异性都很高且操作简便,很适合于初筛实验室及临床的操作,但其缺点是有一定的假阳性。

1.1.2 抗体初筛快速检测 随着对HIV感染者和AIDS病人抗逆转录病毒治疗的进展,及时对无症状HIV感染者提供自愿咨询检测(VCT)的迫切需求,简便、快速的HIV检测方法被广泛应用^[7]。目前国内外已经开发了不少于15~60分钟内可以检测出HIV抗体的快速试剂。HIV快速检测成为检测工作中不可缺少的部分。特别是在发展中国家的偏远地区,是目前常用的HIV抗体检测方法之一。快速检测有免疫斑点、免疫层析及凝集试验,主要包括酶标记法、金标记法和凝集(明胶颗粒凝集、乳胶凝集和自身红细胞凝集)法。可检测血清、血浆、全血、唾液及尿液标本。目前常用于血浆和血清标本中的抗体检测。唾液标本的检测法敏感性及特异性均较高,但尿液检测法的敏感性尚可但特异性稍低。唾液及尿液检测比较适合于采血比较困难及不具备采血条件的场所。由于快速检测试剂具有便于操作、反应时间短,可目测不需特殊仪器且敏感性及特异性与目前广泛使用生物ELISA试剂相媲美。利用几种快速试剂对ELISA阳性结果作出判断时的试验预测值与ELISA-WB联合判断结果时的试验预测值相近。快速试剂被各国广泛接受。

1.2 确证实验 确证实验包括免疫试验(WB),条带免疫试验(LIATEK, HIV III),放射免疫试验(RIPA)及免疫荧光试验(IFA)。国内常用的确证试验方法为WB。WB是世界上公认的,最常用的HIV抗体确认方法^[8]。目前常用的WB法判断标准有:WHO:至少2种以上的被膜组分(env);美国CDC:P₂₄,gp41或gp120/160任2个;美国红十字会:gag, pol, env每一组分至少1种^[9];我国则规定:HIV阳性:至少2条env带和至少1条env带和p24同时出现。HIV阴性:无任何特异性带出现。HIV不确定:出现HIV抗体特异带,但带型不足以确认阳性。WB试验操作比ELISA法稍复杂,成本也较高且须在确证实验室

进行,由于存在自身抗体的或其他特异性反应的干扰,会出现大约2%的假阳性^[2]和一些不确定的结果,但WB依然是目前最常用的HIV确认试验。

2 病毒检测研究进展

2.1 病毒培养 是检测HIV最精确的方法。一般采用培养外周血单个核细胞(PBMC)的方法进行HIV的诊断。其方法专一性强,不会出现假阳性,对于确认那些抗原-抗体检测不确定的个体和阳性母亲新生儿是否感染HIV有重要的意义。但须一定的感染细胞存在才能培养和分离病毒。因而敏感性差,操作时间长,操作复杂,环境要求高,需在p3实验室进行,费用高,不适于临床应用^[10]。

2.2 核酸检测 随着分子生物学技术的发展,核酸检测越来越受到人们的重视并将其与抗原抗体反应的高特异性结合起来形成了免疫PCR技术。这一技术具有特异性强灵敏度高的特点,可用于单个抗原的检测。这促进了应用PCR技术进行HIV核酸检测的快速发展。自2005年^[11]COBAS Ampliscreen HIV1Test等4种HIV核酸检测技术通过了FDA的批准,作为进筛选分析技术来进行HIV-1的检测。最近,实时荧光PCR检测技术的应用使HIV核算检测技术又进入到一个新境界^[12]。该技术不仅实现了PCR从半定量到定量的飞跃,而且由于可以一边扩增,一边检测,与常规的PCR相比,特异性强、自动化程度高,有效解决了PCR污染问题^[13]。Bartetta等将这一技术应用到HIV的检测中,大大降低了病毒载量的检测限(0.66个拷贝相当于0.33个病毒粒子)。2002年国家药品监督管理局(SDA)批准了第1个HIV荧光PCR检测试剂盒^[5]。

病毒核酸检测方法可用于HIV的早期诊断,如窗口期辅助诊断、病程监控、指导治疗方案及疗效测定、预测疾病进展等。目前有2种方法用于HIV感染的检查:PCR DNA用于扩增前病毒DNA以诊断HIV感染;PCR RNA用逆转录PCR(RT-PCR)法可检测出血浆中HIV基因组的存在。定量PCR检测病毒载量主要有3种方法,常用的测定方法有逆转录PCR(RT PCR)、核酸序列扩增(NASBA)、分支DNA杂交(bDNA)。RT PCR及NASBA检测属于靶扩增,bDNA属信号扩增。

RT PCR的基本原理类似于DNA的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷

酸引物。由变性—退火—延伸3个基本反应步骤构成。即先利用逆转录反应将RNA转录为cDNA,再以cDNA为模板进行PCR扩增。目前已推出试剂有1.0版本和升级版本1.5版本。此试剂有普通敏感方法和超敏感方法2种。其优点是操作相对简单,试验完成需1天时间,可同时检测大量标本;敏感性较好:1.5版本标准型检测范围400~750 000拷贝/ml,超敏感型50~75 000拷贝/ml,对M组亚型较敏感。缺点是:对其他亚型反应性较差,操作易污染,不能覆盖所有的生物样本^[4]。但因其有内部定量标准,被临床和包括美国NIH ACTG实验室在内的大批实验室广泛接受。

NASBA是由一对引物介导的、连续均一的、体外特异性核苷酸序列等温扩增RNA的新技术。其扩增机制分非循环和循环两个阶段。反应在42℃进行,可在2小时内将RNA模板扩增约 10^9 倍。其原理是提取病毒RNA,加入AMV逆转录酶、RNA酶H、T7RNA聚合酶和引物进行扩增^[15]。优点:使用的样品量较少(标准是1.0ml,0.01~2.0ml均可)、具有高度敏感性和广泛的动态范围(50~ 3.0×10^6 IU/ml)、反应快(2小时可以检测48份样品)、能对几乎所有的生物样品进行检测、敏感性好,最低检测限可达40cp/ml、对抗凝剂无要求、每个样品均有内部对照,可排除提取过程的误差。缺点:早期版本对部分亚型反应性较差;实验内、外误差相对较大^[14]。基于NASBA技术发展起来的Easy-Q病毒载量检测,是一种将NASBA扩增和应用分子信标技术进行检测相结合的方法,由于针对检测HIV核酸所设计的引物非常特异,特异性高达99.7%,完全的成品试剂,人为影响非常小。结果非常稳定是普通PCR不能替代的。

bDNA是定量检测血浆中HIV1型RNA的一种方法。bDNA是只人工合成的带有侧链的DNA片段,在其每个侧链上都可以标记被激发的标记物。将HIV的RNA病毒通过离心从病毒颗粒中释放出来后。利用两套靶探针分别与病毒RNA的pol基因的不同区域特异结合形成HIVRNA寡核苷酸复合物,再利用发光物质放大发光信号,通过发光强度检测HIVRNA的含量。早期试剂为Quantiplex HIVRNA2.0 Assay,现已被Quantiplex HIVRNA3.0 Assay取代。其优点:操作简便;适合大量样品的操作,3.0版本可每次操作样品多达168份;重复性好;不存在扩

增物的交叉污染,覆盖基因组的探针数有数十个,能测到更广泛的亚型标本。缺点:对低值样品检测的特异性较差;无内部质量控制,尤其是3.0版本中为单孔检测时,无法避免由于提取或加样操作的失误;不同版本差异较大,2.0版本约为RT-RNA的50%,3.0版本结果与Roche基本相同表明两个版本间的差异可能达到50%;对血浆、血清外的大部分体液无法进行检测;对抗凝剂敏感^[16],只能使用EDTA。

RT-PCR法测定范围不及NASBA。bDNA法和NASBA法检测HIV病毒载量具有高度一致性,在实际工作中可任选,NASBA法在HIVRNA低浓度时敏感性更高,bDNA法则测得更广泛的亚型标本^[17]。

此外,还有转录介导的扩增技术(TMA)和连接酶促链式反应(LCR)。TMA技术原理与NASBA基本一致,不同的是TMA利用的是MMLV逆转录酶及T7RNA聚合酶,MMLV逆转录酶既有逆转录酶的活性又有RNA酶的活性。反应在41.5℃进行,可在1小时内将RNA模板扩增到 10^9 倍。LCR是基于靶分子依赖的寡核苷酸探针互相连接的一种探针扩增技术,是继PCR后重新发展起来的一种较有前景的体外扩增技术。由于实时荧光PCR和连接酶促式反应推出较晚,目前使用还较少,但其发展前景非常看好。

核酸检测方法具有很高的灵敏度,对疾病进展的监测、抗病毒治疗的疗效观察和耐药性监测非常重要。但是,由于HIV基因的多样性,没有一套引物可以覆盖所有的HIV序列,故检测的敏感性又受到限制;而且现有的病毒核酸检测成本高,操作复杂,对样品的处理要求高,运输前都应在-20℃或-70℃冷冻。因而很难在一般的实验室推广,也很难在临床广泛应用。

2.3 抗原检测 机体感染HIV后,HIV P24抗原是最早能从血清中检测到的免疫标志物,p24抗原几乎与感染后临床急性发病症状表现同步^[18],感染后的2~3周便可从患者的血清中检出,对于阴性标本,可通过检测P24抗原识别是否为早期感染。抗原检测主要应用于HIV-1抗体不确定或窗口期的辅助诊断、HIV-1抗体阳性母亲所生因而早期的鉴别诊断、第4代HIV-1抗原、抗体ELISA试剂检测呈阳性反应,但HIV-1抗体确认阴性者的辅助诊断和监测病程的进展及抗病毒治疗效果。然而由于

在血清阳转前, p24 抗原存在的时间非常短 (1~2 周)^[18]。随后抗体出现, 由于抗体的中和作用, p24 抗原的水平随机体产生的增长而降低。因而利用 p24 抗原很难捕捉到足够的人群来估计发病率及其可信区间^[18]。

P24 抗原的检测通常采用 ELISA 夹心法。为了提高检测血清中 p24 抗原的敏感性, 需将血清中免疫复合物解离后再进行测定, 目前已发展了 ICDp24 抗原测定试剂, 用于 HIV-1p24 抗原测定, 使检测 HIV 感染的时间大大提前^[19]。但即使将复合物解离, 敏感性提高, 也只能在大约 50% 无症状感染者中检出 p24 抗原。由于其成本相对于核酸检测要低很多。所以高灵敏度的 P24 抗原检测方法的建立成为在发展中国家使用的病毒载量测定方法的一种选择。近几年, 国外对建立高灵敏度检测 p24 抗原的研究一直没有停止。2003 年 Sutthent^[20] 等将免疫复合物解离后通过 TSA 信号放大系统使用 ELISA 进行检测, 使 p24 抗原检测的最小检出值由原来的 10pg/ml 降低到 0.5pg/ml, 在 HIV-1 抗体阳性母亲所生婴儿早期的诊断中与 RNA 检测相当, 与 HIV 核酸检测具有可比性, 具有重要的实用价值^[21]。P24 抗原的检测被认为是低成本、适合发展中国家使用的替代现有昂贵的 RNA 测定方法的一种选择。但相对于抗体检测, 该方法价格昂贵^[22], 要求技术较高, 很难广泛应用于 HIV-1 早期感染的监测。

综上所述, 用高灵敏度的分析方法诊断艾滋病将有助于实现早期诊断、避免漏检, 有助于对治疗艾滋病药物的疗效评价、预测和检测病程进展, 提高检测的灵敏性, 缩短窗口期、降低检测成本, 简化操作过程, 是 HIV 诊断技术持续发展的主要方向。

【参考文献】

[1] 唐珊熙. 微生物学及微生物学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社. 1998.
 [2] 宋兴华, 姜世辉, 向国华. HIV 检验技术研究进展[J]. 实用医技杂志, 2006, (14): 250.
 [3] 肖 瑶, 冯基刚综述, 蒋 岩审校. 用于 HIV 感染早期监测发病率调查的实验室检测技术-STARHS 方法[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26: 544.
 [4] 康来仪. 对 HIV 抗体窗口期和疑难标本的处理情况[J]. 艾滋病检测实验室网络通信, 2006, 1(1): 2.
 [5] 王佑春. 国产艾滋病病毒检测试剂的发展状况[J]. 艾滋病

检测实验室网络通信, 2008, 1(6): 2.

[6] 许文燕摘译, 邢文革审校. 六种 HIVp24 抗原和 HIV 抗体联合检测试剂的敏感度和特异度评估[J]. 艾滋病检测实验室网络通信, 2006, 1(1): 23.
 [7] Bernard M Bramson, MD. 2000. Rapid Test for HIV Antibody, AIDS Reviews, 2: 76.
 [8] 张永刚, 季 阳, 贾桂芳. HIV 抗体 ELISA 阳性标本蛋白印迹试验研究[J]. 中国性病艾滋病防治. 1997, 3 (2): 81.
 [9] 周惠琼, 曾书炎, 江立敏. HIV-1 抗体蛋白印迹试验带型分析[J]. 中国性病艾滋病防治, 1997, 3(5): 223.
 [10] Gurtier L, Michi U. Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and humar immunodeficiency virus antibody screening assay [J]. J Virolog Metho, 1998, 75(1): 27-38.
 [11] 冯晓英. 吸毒人群尿液血液标本 HIV-1 抗体 ELISA 检测对比分析[J]. 中国性病艾滋病防治, 2003, 9(3): 132.
 [12] Meleer T, Henkes M, Henkes M. Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV [J]. Journal of Clinical Virology, 2001, 23: 113-116.
 [13] 魏 民. HIV 实验室检测研究进展和发展趋势[J]. 国外医学(病毒学分册), 2003, 10(3): 65-69.
 [14] 王 红, 何少蓉, 莫志宏. 艾滋病核酸检测方法研究进展[J]. 中华医学研究杂志. 2004, 4 (7): 7.
 [15] 骆利敏, 黄建生, 李 明, 等. 应用 NASBA 定量检测 HCV RNA 的研究进展[J]. 热带医学杂志, 2002, 2 (1): 64-66.
 [16] 潘品良综述, 蒋岩审校. 影响血样本中 HIV-1 病毒载量检测值的因素分析[J]. 中国艾滋病性病. 2006(5): 67.
 [17] 薛以乐, 郑晓红, 方 蕙, 等. HIV 病毒载量定量测定方法的比较研究[J]. 上海预防医学杂志, 2001, 13(7): 548.
 [18] 冯基刚, 蒋 岩, 肖 瑶. 检测 HIV 早期感染的血清学方法[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20: 83-85.
 [19] 徐克近, 王 瑛. 同时检测 HIV 抗体及 p24 抗原快速诊断的研制[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2002, 16(4): 377-379 .
 [20] Sutthent, Jeyakumar D. A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration [J]. J Virol, 2003, 76(21): 10942-10950.
 [21] 吕传臣, 马雪梅, 曾 毅, 等. 人类免疫缺陷病毒检测技术的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2006(4): 421-422.
 [22] 张 麟, 佐 拉, 秦光明, 等. 用第四代 HIV 酶联免疫法诊断试剂对静脉吸毒者感染窗口期的检测能力评估[J]. 中华医学检验杂志, 2006, (7): 83.

收稿日期: 2010-02-21

作者: [韦雪芳, Wei Xue-fang](#)
作者单位: [广西南宁市横县疾病预防控制中心, 530300](#)
刊名: [应用预防医学](#)
英文刊名: [JOURNAL OF APPLIED PREVENTIVE MEDICINE](#)
年, 卷(期): 2010, 16(z1)
被引用次数: 1次

参考文献(22条)

1. 唐珊熙 [微生物学及微生物学检验](#) 1998
2. 宋兴华;姜世辉;向国华 [HIV检验技术研究进展](#)[期刊论文]-[实用医技杂志](#) 2006(14)
3. 肖瑶;冯基刚;蒋岩 [用于HIV感染早期监测发病率调查的实验室检测技术-STARHS 方法](#)[期刊论文]-[中华流行病学杂志](#) 2005(7)
4. 康来仪 [对HIV抗体窗口期和疑难标本的处理情况](#) 2006(01)
5. 王佑春 [国产艾滋病病毒检测试剂的发展状况](#) 2008(06)
6. 许文燕;邢文革 [六种HIVp24抗原和HIV抗体联合检测试剂的敏感度和特异度评估](#) 2006(01)
7. Bernard M;Bramson, MD [Rapid Test for HIV Antibody](#) 2000
8. 张永刚;季阳;贾桂芳 [HIV抗体ELISA阳性标本蛋白印迹试验研究](#) 1997(02)
9. 周惠琼;曾书炎;江立敏 [HIV-1抗体蛋白印迹试验带型分析](#) 1997(05)
10. Gurtier L;Michi U [Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and humar immunodeficiency virus antibody screening assay](#) 1998(01)
11. 冯晓英 [吸毒人群尿液血液标本HIV-1抗体ELISA检测对比分析](#)[期刊论文]-[中国性病艾滋病防治](#) 2003(03)
12. Meleer T;Henkes M [Evidence for a diagnostic window in fourth generation assays for HIV](#) 2001
13. 魏民 [HIV实验室检测研究进展和发展趋势](#)[期刊论文]-[国外医学\(病毒学分册\)](#) 2003(03)
14. 王红;何少蓉;莫志宏 [艾滋病核酸检测方法研究进展](#) 2004(07)
15. 骆利敏;黄建生;李明 [应用NASBA定量检测HCV RNA的研究进展](#)[期刊论文]-[热带医学杂志](#) 2002(01)
16. 潘品良;蒋岩 [影响血样样本中HIV-1病毒载量检测值的因素分析](#)[期刊论文]-[中国艾滋病性病](#) 2006(05)
17. 薛以乐;郑晓红;方蕙 [HIV病毒载量定量测定方法的比较研究](#)[期刊论文]-[上海预防医学](#) 2001(07)
18. 冯基刚;蒋岩;肖瑶 [检测HIV早期感染的血清学方法](#)[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#) 2006(1)
19. 徐克近;王瑛 [同时检测HIV抗体及p24抗原快速诊断的研制](#)[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#) 2002(04)
20. Sutthent;Jeyakumar D [A sensitive, quantitative assay for human immunodeficiency virus type 1 integration](#) 2003(21)
21. 吕传臣;马雪梅;曾毅 [人类免疫缺陷病毒检测技术的研究进展](#)[期刊论文]-[临床和实验医学杂志](#) 2006(04)
22. 张麟;佐拉;秦光明 [用第四代HIV酶联免疫法诊断试剂对静脉吸毒者感染窗口期的检测能力评估](#) 2006(07)

本文读者也读过(4条)

1. 顾颖,靳晓红 [HIV检测技术的研究进展](#)[期刊论文]-[预防医学文献信息](#)2004, 10(3)
2. 潘超英 [人类免疫缺陷病毒实验室检测技术研究进展](#)[期刊论文]-[中外健康文摘](#)2010, 07(29)
3. 李自钊,周慧君,苏莉 [艾滋病的个体化用药与药物基因组学研究进展](#)[期刊论文]-[中华实验和临床病毒学杂志](#) 2010, 24(5)
4. 李素敏,王润田,赵云珠 [输血相关HIV感染的免疫学检测进展](#)[期刊论文]-[中国输血杂志](#)2004, 17(3)

引证文献(1条)

1. 黄忠禧, 张培东 中西医治疗艾滋病的研究及其进展[期刊论文]-亚太传统医药 2011(9)

引用本文格式: 韦雪芳, Wei Xue-fang 艾滋病检测技术研究进展[期刊论文]-应用预防医学 2010(z1)