

异常妊娠提供一个新的方向。

# 参考文献

- 1 Carbrey JM, Agre P. Discovery of the aquaporins and development of the field[J]. Handb Exp Pharmacol, 2009,190:3-28
- 2 Benga G. The first discovered water channel protein, later called aquaporin 1: molecular characteristics, functions and medical implications[J]. Mol Aspects Med, 2012, 33(5-6):518-534
- 3 Agre P. The aquaporin water channels[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(1):5-13
- 4 Kobayashi K, Yasui M. Cellular and subcellular localization of aquaporins 1, 3, 8, and 9 in amniotic membranes during pregnancy in mice[J]. Cell Tissue Res, 2010,342(2):307-316
- 5 Beall MH, Wang S, Yang B, et al. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition[J]. Placenta, 2007, 28: 421-428
- 6 Liu H, Koukoulas I, Ross MC, et al. Quantitative comparison of placental expression of three aquaporin genes[J]. Placenta, 2004, 25(6):475-478
- 7 Escobar J, Gormaz M, Arduini A, et al. Expression of aquaporins early in human pregnancy[J]. Early Hum Dev, 2012, 88(8):589-594
- 8 Prat C, Blanchon L, Borel V, et al. Ontogeny of aquaporins in human fetal membranes[J]. Biol Reprod, 2012, 86(2):48
- 9 Aralla M, Mobasher A, Groppetti D, et al. Expression of aquaporin water channels in canine fetal adnexa in respect to the regulation of amniotic fluid production and absorption[J]. Placenta, 2012, 33(6):502-510
- 10 Hasegawa H, Lian SC, Finkbeiner WE, et al. Extrarenal tissue distribution of CHIP28 water channels by in situ hybridization and anti-

- body staining[J]. Am J Physiol, 1994, 266(4): C893-903
- 11 Mann SE, Rieke EA, Yang BA, et al. Expression and localization of aquaporin 1 and 3 in human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(4):902-907
- 12 张睿, 杨冬梓, 刘颖琳, 等. 水通道蛋白-1、3、8、9mRNA 在人胎膜中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(5):702-704
- 13 李留霞, 刘月玲, 文建国, 等. 水通道蛋白 1 在妊娠期高血压疾病患者胎盘、胎膜及腹膜组织中的表达及其意义[J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43(7): 479-501
- 14 刘慧妹, 宋小飞, 郝荣增. 水通道蛋白 1 在人胎盘和胎膜中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(3):333-336
- 15 Zhu XQ, Jiang SS, Zhu XJ, et al. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios[J]. Placenta, 2009, 30(8):670-676
- 16 Mann SE, Rieke EA, Torres EA, et al. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice[J]. Am J Obstet Gynecol, 2005, 192(6):2041-2044
- 17 Mann SE, Dvorak N, Gilbert H, et al. Steady-state levels of aquaporin 1 mRNA expression are increased in idiopathic polyhydramnios[J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 194(3):884-887
- 18 蒋珊珊, 胡迎春, 朱雪洁. 水通道蛋白 1 在羊水量异常产妇中的表达及意义[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(4):570-571
- 19 刘慧妹, 郝荣增, 熊正方. 羊水过多孕妇胎膜组织中水通道蛋白-1、3、8、9 mRNA 的表达[J]. 中华围产医学杂志, 2009, 12: 197-200
- 20 郝荣增, 刘慧妹, 熊正方. 水通道蛋白-1 在人羊水过少胎盘和胎膜组织中的表达[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(6):1130-1136

(收稿日期:2012-08-31)  
(修回日期:2012-10-15)

## 人类免疫缺陷病毒感染实验室免疫学检测及其研究进展

张永乐 厉小玉 潘克女 刘寿荣

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒(HIV)感染所引起的一种危害人类健康的传染病,被誉为传染类疾病的“头号杀手”。全球自1981年在美国发现首例 HIV 患者的报道到经过 20 多年的传播目前全球每年因 HIV/AIDS 致死的人数

超过 2500 万人。1985 年,我国首次报道艾滋病病例。截至目前,我国累计报道 HIV/ARDS 病人 43.4 万例,死亡 8.8 万例,据世界卫生组织和卫生部联合专家评估,截至 2011 年底,我国存活 HIV/AIDS 人在 78 万左右。20 多年来,实验室免疫学检测是诊断 HIV/AIDS 的主要依据<sup>[1]</sup>。实验室免疫学检测主要包括病毒抗体和抗原检测、免疫细胞检测等,在我国目前对 HIV/AIDS 的检测机构主要分为初筛实验室和确诊实验室,不同级别的实验室检测方法也存在明显差异。现就目前 HIV/AIDS 实验室免疫学检测方

基金项目:杭州市科技局重点计划项目(20110733Q006)

作者单位:310014 杭州市西溪医院(杭州市第六人民医院)分子诊断实验室(张永乐),开放实验室(厉小玉),检验科(潘克女),感染科(刘寿荣)

通讯作者:刘寿荣,电子信箱:lsr85463990@sina.com

法及其进展做以下综述。

### 一、初筛实验室

HIV 抗体初筛实验室检测方法主要采用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、凝胶颗粒凝集试验 (PA)、免疫斑点试验、免疫层析试验等。

1. 酶联免疫吸附试验 (ELISA): 该方法是初筛实验室最常用的、也是最主要的检测 HIV 抗体的方法, ELISA 法的试剂盒发展比较迅速目前已发展到第 4 代<sup>[2-5]</sup>。美国 FDA 早在 1985 年批准了第 1 代 ELISA 检测 HIV 抗体试剂, 此试剂主要用于献血员的筛查, 该试剂的最大缺点是假阳性率高, 这是由于试剂中含有宿主细胞成分。1990 年, 以基因工程重组技术为抗原的第 2 代试剂问世, 该试剂抗原包括了 P24、gp36、gp41、gp120 等, 能同时检测 HIV - 1、HIV - 2 型, 该试剂的特异性较第 1 代试剂有了很大的提高, 检测窗口期也比第 1 代试剂缩短了 3 周左右。1994 年, 第 3 代 HIV 抗体检测出现, 该试剂采用双抗原夹心法检测抗体, 能同时检测 IgM 抗体, 试剂盒的灵敏度较第 2 代试剂有所提高, 假阳性控制在 0.26% 左右, 检测窗口也比第 2 代检测方法又缩短了 1 周左右, 该试剂是目前初筛实验室最常用的试剂盒。近两年第 4 代试剂盒也问世了, 该试剂盒是在第 3 代试剂盒的基础上增加了 P24 抗原的检测, 此方法提高了试剂的敏感度, 缩短了感染窗口期, 较 3 代试剂又缩短了 4 天左右的窗口期, 这样减少了窗口期漏检的概率。但第 4 代试剂盒也存在着自己的缺点, 由于抗原核抗体同时包被在反应板上, 存在相互干扰的可能, 影响了免疫反应的特异性。单从检测抗体的角度出发第 4 代试剂检测 P24 抗原敏感度最低为 20pg/ml, 而第 3 代单独检测抗体分析法敏感度最低可达 3.5pg/ml<sup>[6]</sup>。因此在初筛实验室第 4 代试剂想完全取代第 3 代试剂尚需进一步提高试剂盒的检出敏感度。

2. 凝胶颗粒凝集试验 (PA): 该方法是通过包被 HIV 抗原的颗粒凝集来检测 HIV 抗体是否存在的一种方法, 血清中的抗体与试剂中颗粒载体上的 HIV 抗原结合带动载体颗粒的凝集, 出现肉眼可见的凝集现象。该方法是一种简便快速筛选的方法, 由于该方法的敏感度和特异性较低, 故在献血及大型医院不作为常规检测方法。

3. 免疫斑点试验: 是将硝酸纤维膜作为固相载体, 将 HIV 抗原包被在膜上, 当被检测血清中含有 HIV 抗体时即可与抗原结合, 然后结合物与酶标记的

抗人免疫球蛋白结合, 在底物的参与下可在膜上形成肉眼可见的着色斑点, 由于该试剂需要洗涤、加底物等, 所以完成一个检测需要时间较长, 试剂价格高, 使用者较少。

4. 免疫层析试验: 该技术与免疫斑点技术相似均采用了硝酸纤维膜, 该方法是在纤维膜条的上方和下方均置入胶体金标记的基因重组 HIV - 1/2 抗原, 同时在对照区域包被 HIV 单克隆抗体, 当被检测者的血清从膜条的一端加入时, 血清与上方的胶体金标记的基因重组 HIV - 1/2 抗原结合形成复合物, 在免疫层析的作用下, 复合物移动至纤维膜的下方到达检测区, 此时如果被检血液中含有 HIV - 1/2 抗体时, 则与下方的胶体金标记重组 HIV - 1/2 抗原结合形成双抗原夹心免疫复合物, 显示肉眼可见的红色条带, 剩余的重组 HIV - 1/2 抗原继续移动到对照区域与抗 HIV 单克隆抗体结合, 出现另一条红色为质控线。当检测区域和对照区域均出现红色条带时, 即可确定被检测血清中含有 HIV - 1/2 抗体。如果检测区域没有红色条带, 只有对照区域存在红色条带, 可认为被检测血清中无 HIV - 1/2 抗体。该方法与酶联免疫吸附试验相比敏感度远不及, 但该方法试剂盒常温保存, 实验操作简单, 肉眼可观测无需特殊检测仪器, 备受基层实验室的青睐<sup>[7]</sup>。

### 二、确认试验

很多 HIV 的检测方法均有不同程度的假阳性存在, 而对 HIV 感染的诊断是一个严肃而又严谨的试验, 诊断要求高度准确性, 否则会给患者和社会带来极大的不安和恐慌。故应对初筛阳性的标本送到更高一级的实验室进行确定, 对确认试验的机构要求极为严格, 一般只存在于县级以上疾病控制预防中心中进行。确认试验目前国内多采用免疫荧光、放射免疫沉淀试验、免疫印迹法。

1. 免疫荧光: 该方法是将感染了 HIV 的细胞作为 HIV 抗原固定在玻片上, 将被检测者的血清加入玻片, 如被检测者血清中含有 HIV 抗体, 则可以固定的抗原形成抗原抗体复合物。进一步加入荧光标记的抗人 IgG, 荧光标记的抗人 IgG 使抗原抗体复合物着色, 通过荧光显微镜可观测到着色的细胞, 此时即可断定被检者血中是否存在 HIV 抗体, 进而诊断是否感染了 HIV, 此方法操作简单, 敏感度和特异性较 ELISA 要高, 但也存在不足, 很多在着色过程中存在非特异性的荧光着色难以去除, 在判断结果时需要有经验的检验师才能区分, 同时该检测需要高倍荧光显

微镜。

2. 放射免疫沉淀试验:此方法是采用放射性核素标记的 HIV 蛋白与被检者的血清结合反应,如果被检者血清中含有 HIV 抗体,则抗体与试剂中的 HIV 蛋白抗原结合,低速低温离心,弃上清将沉淀复合物取出做蛋白电泳,如血中存在 HIV 抗体则与蛋白抗原结合离心沉淀,蛋白在电泳中可形成清晰的蛋白带。本方法敏感度和特异性均较高,但因试剂制备复杂、成本高,且放射性核素对人体及环境有严重的危害,对操作者要有严格的防护,对检测后的残物垃圾要深埋处理。

3. 免疫印迹法:该方法是我国卫生部颁布的《艾滋病检测技术规范》中唯一的 HIV 感染确诊实验方法,该方法常用来甄别其他 HIV 检测试剂盒的“优劣性”的金标准,免疫印迹法的特异性和敏感度较 ELISA 要高很多,其假阳性率  $< 1/10000$ ,假阴性更低约为  $1/25$  万<sup>[8]</sup>。该技术在 DNA 印迹技术发展而来的新型免疫生化技术,它是将 HIV 病毒蛋白通过 SDS-PAGE 把分子质量的大小不等的蛋白带分离,再把这些分离的不同蛋白转移到硝酸纤维素膜上,再将此膜切割成条状,每一条硝酸纤维薄膜上均含有经电泳分离过的 HIV 病毒抗原,当被检血液中含有 HIV 抗体时,就与膜上的抗原结合,洗涤掉多余的抗体,加入抗人 IgG 酶结合物,洗涤后加入底物,有反应的抗原结合呈现紫褐色,该方法是目前最特异、最敏感的证实 HIV 感染的方法,也是目前国内 HIV 确诊试验的首选方法。该方法检测时实验操作一定要按严格要求,文献报道不当的操作可使假阳性率超过 2%<sup>[9]</sup>。

### 三、HIV-1p24 抗原检测

HIV-1p24 抗原检测是 HIV-1 诊断过程中的辅助诊断,目前采用 ELISA 双抗体夹心法测定被检患者血液中 P24 蛋白,此方法敏感度差,只作为 HIV 的辅助诊断,不能依次确诊,主要是用于初筛时 HIV 阳性,确认试验阴性时的一种辅助诊断,近年来 P24 抗原检测有了不同程度的提高,其中免疫复合物裂解法检测 P24 抗原敏感度提高到了 90%,线性免疫酶法测 P24 抗原最低检出阈值可达  $0.01\text{pg/ml}$ <sup>[10]</sup>。

### 四、其他相关免疫检测

HIV 病毒侵入体内后,主要侵犯宿主免疫系统,因此 HIV 感染者,免疫系统相关指标的检测极为重要,目前主要采用流式细胞技术对 HIV 感染者外周

血中 CD4、CD8 及 NK 细胞,细胞因子和趋化因子及趋化因子受体的检测,其中 CD4T 淋巴细胞检测尤为重要,已证实 HIV 病毒侵入体内主要侵犯 CD4T 淋巴细胞,通过 CD4T 淋巴细胞的技术对于诊断 HIV 感染状态至关重要。CD8T 淋巴细胞检测主要与 CD4T 淋巴细胞联合来评价患者免疫状态,当 CD4T/CD8T  $< 1$  时(正常比值  $> 2$ )则提示免疫状态不佳,比值越低说明患者免疫缺陷越严重<sup>[11]</sup>。

综上所述,对 HIV 的免疫学检测,采用特异性、敏感度高的方法将有助于 HIV 的早期诊断,也对艾滋病的治疗及药物评价、预防和监测具有重要意义。提高检出的敏感度和特异性缩短检出窗口期对遏制艾滋病的流行起到重要意义,也是今后提高诊断 HIV 试剂盒持续发展的主要方向。

### 参考文献

- Ortiz MR. HIV, AIDS and asexuality [J]. Nurs Clin North Am, 2007, 42(4): 639-653
- Chen P. Measures needed to strengthen strategic HIV/AIDS prevention program esin China [J]. Measures Asia Pac J Public Health, 2007, 19(1): 3-7
- Weber B, Berger A, Rabenau H, et al. Evaluation of a new combined antigen and antibody human immunodeficiency virus screening Assay, VIDAS HIV DUO Ultra [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(4): 1420-1426
- Weber B, Gbirtler L, Thorstenson R, et al. Multicenter evaluation of a new automated fourth generation human immunodeficiency virus screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(6): 1938-1946
- 周琰,宋斌斌,郑晓虹,等.电化学发光法联合检测 HIV 抗原抗体试剂的评价 [J]. 检验医学, 2011, 26(12): 845-849
- 鲍作义,刘永健,李韩平,等. GENSCREEN ULTRA HIV 抗原抗体酶联免疫诊断试剂盒的敏感性评价 [J]. 中国艾滋病性病, 2010, 16(4): 341-343
- 尚红. 中国艾滋病流行和检测及治疗现状与发展趋势 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(10): 1088-1090
- 白浪,雷秉钧. HIV/AIDS 实验室检测及其研究进展 [J]. 中国询证医学杂志, 2008, 8(3): 206-209
- 肖建春,郑启堂,赵子伟. HIVp24 抗原检测技术的进展 [J]. 国外医学:病毒学分册, 2003, 10(4): 111-114
- 郝钦芳,杨京民,马艳华,等. 我国现行 HIV 抗体检测策略的评价 [J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(14): 2018-2020
- 肖瑶,张可,裴丽健,等. 中国 HIV/AIDS 患者 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞与外周血各组份间关系研究 [J]. 中国艾滋病性病, 2004, 10(2): 83-88

(收稿日期:2012-07-17)

(修回日期:2012-09-29)