

者血清 PCT 浓度有显著的差别,其高敏感度及阴性预测值对于从细菌性社区获得性肺炎中区分和排除肺结核起到一个重要的补充作用。除细菌感染外,疟疾是主要的感染情况,PCT 水平也会升高。即使在没有神经系统并发症的疟疾发作时,PCT 的水平也常常升高,在疟疾患者体内 PCT 水平升高的原因可能是因为 TNF- α 水平升高,因为已知大量的 PCT 产生是在 TNF- α 在人体内释放后。

2.5 PCT 检测在大手术和严重创伤患者细菌感染并发症、胰腺炎鉴别诊断、早期诊断严重细菌感染及评价病情活动等方面的应用 PCT 与细胞因子和其他炎症指标不同,在创伤和手术时血浆 PCT 浓度通常不升高或仅轻微升高。无细菌感染或内毒素释放的轻度创伤和小手术患者,PCT 多在正常范围内;心胸外科手术时 PCT 出现轻微升高;胃肠道手术及严重多发伤和烧伤患者血浆 PCT 通常在术后或伤后 2 d 内出现暂时性升高,可能是肠道内毒素移位所致,若不并发细菌感染、脓毒症和多器官功能不全综合征,则 PCT 浓度很快下降。术后或伤后并发细菌感染,PCT 则一直保持高水平或持续升高,若感染和脓毒症得到根除和控制,则很快下降至正常水平^[15]。国外有学者发现,在感染坏死性胰腺炎时 PCT、IL-8 均值明显高于无菌坏死性胰腺炎,水肿性胰腺炎时均值最低,相比之下,PCT 与感染坏死性胰腺炎最为相关^[16]。严重细菌感染时血清 PCT 浓度不仅明显升高,并且与严重程度密切相关。PCT 对诊断感染有指导意义,尤其对重症感染的诊断价值更高。徐裕海等^[17]应用敏感抗生素治疗感染性休克 PCT 会迅速下降。说明血清 PCT 含量监测对感染性休克的早期诊断和疾病发展的监测及治疗具有重要意义,可作为感染性休克早期诊断指标之一。检测 PCT 水平还可以用于评估治疗效果,若感染被控制,则 PCT 水平在一个半衰期后(即 24 h)迅速降低到小于 0.5 ng/mL,有利于及时调整治疗措施和评估治疗效果。在卫生经济学方面,依据 PCT 水平来决定是否使用抗生素治疗或抗生素持续使用的时间,有利于降低抗生素的使用,减少患者的住院时间,从而降低患者的医疗费用。

3 展 望

随着实验性研究的不断深入和大量临床资料的积累,PCT 作为一种新的感染性炎症标志物,目前已被广泛认可,并得到推广。尽管学者们对 PCT 的研究做了很多工作,但在不同的病理情况下,其确切的产生机制还不甚明了,其病理、生理特点还不完全清楚,有待于进一步的研究和探索。但它可能成为一项快捷、有效的常规实验室指标,帮助临床对疾病的诊断、鉴别诊断、疗效观察及指导用药。

参考文献

[1] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 Sccm/ES-KM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

[2] 杨滨,康梅.降钙素原在细菌感染性疾病诊断及治疗中的应用[J]. 现代预防医学, 2009, 36(3): 596-598.

[3] Jensen JU, Heslet L, Jensen TH, et al. Procalcitonin increase in early identification of critically ill patients at high risk of mortality[J]. Crit Care Med, 2006, 34(10): 2596-2602.

[4] 俞姬芬,陈德昌,宋秀琴.早期诊断严重脓毒症脓毒性休克研究进展[J]. 中国急救医学, 2007, 2(27): 154-156.

[5] 王瑾,张蓉,邵肖梅.降钙素原在新生儿感染中的应用价值[J]. 临床儿科杂志, 2005, 23(2): 105-107.

[6] 吴娅娟,鲁涛,尹培刚,等.脓毒血症患者血浆降钙素原的变化及意义[J]. 中日友好医院学报, 2007, 18(2): 73-76.

[7] Ghorbani G. Procalcitonin role in differential diagnosis of infection stages and non infection inflammation[J]. Pak J Biol Sci, 2009, 12(4): 393-396.

[8] 何建平,申昆玲,林影,等.降钙素原对新生儿重症感染的诊断价值[J]. 首都医科大学学报, 2007, 26(5): 545-548.

[9] Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster randomised, single-blinded intervention trial[J]. Lancet, 2008, 363(9409): 600-607.

[10] Mueller C, Huber P, Laifer G, et al. Procalcitonin and the early diagnosis of infective endocarditis[J]. Circulation, 2009, 119(14): 1707-1710.

[11] Kafkas N, Venetsanou K, Patsilinos S, et al. Procalcitonin in acute myocardial infarction[J]. Acute Card Care, 2008, 10(1): 30-36.

[12] Gerard Y, Hober D, Assicot M, et al. Procalcitonin as a marker of bacterial sepsis in patients infected with HIV-1[J]. J Infect, 2007, 35(1): 41-46.

[13] Gendrel D, Raymond J, Assicot M, et al. Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis[J]. Clin Infect Dis, 2005, 24(6): 1240-1242.

[14] Kang YA, Kwon SY, Yoon HI, et al. Role of C-reactive protein and procalcitonin in differentiation of tuberculosis from bacterial community acquired pneumonia[J]. Korean J Intern Med, 2009, 24(4): 337-342.

[15] 刘息平,芦嘉,陈雪琴,等.血清降钙素原在危重患者细菌感染检测中的应用[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(3): 29-31.

[16] 向大开,夏庆.降钙素原在急性胰腺炎中的研究进展[J]. 华西医学, 2008, 23(2): 412-413.

[17] 徐裕海,李桂新,刘谦慧.感染性休克体液复苏治疗后 C 反应蛋白和降钙素原动态变化的研究[J]. 大连医科大学学报, 2009, 31(1): 95-97.

(收稿日期:2011-04-10)

人类免疫缺陷病毒实验室诊断进展

石泽林¹综述,彭述英²,吴炳义¹审校(1. 广州市戒毒管理局医院 510435; 2. 广州市民政局精神病医院救助区检验科 510430)

【关键词】 HIV 感染; HIV 抗体; HIV 抗原; DNA, 病毒; 实验室技术和方法
DOI:10.3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 18. 041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)18-2254-03

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)简称艾滋病,是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的。HIV 呈球形或卵形双层结构,核

心由 2 个相同拷贝的 RNA 及蛋白质、反转录酶、核糖核酸及整合酶组成。核心外为病毒衣壳,衣壳最外层为膜蛋白,包膜

上有刺突。其结构蛋白为 gag、Env、pol。而所有的核心蛋白均位于病毒的核酸蛋白体上, P24、P40 和 P55 构成核心衣壳的外衣, 包被于内部核酸的外围, 主要为 P24^[1]。

迄今为止, 全球流行的 HIV 根据血清学反应和病毒核酸序列测定可分为两型, 即 HIV-1 型和 HIV-2 型。在 HIV-1 型内又可分为若干个亚型, 各亚型之间的基因离散率是 20%~35%, 同一亚型内的基因离散率是 7%~20%^[2]。HIV 侵入人体后, 通过表面糖蛋白 gp120、gp41 与宿主细胞膜的融合, 病毒 RNA 进入宿主细胞^[3]。从机体感染 HIV 到产生相应抗体的这段时间叫窗口期, 一般为 2~3 个月(可以 1~9 个月), 但 95% 以上的 HIV-1 感染者产生抗体是在感染 6 个月以内^[4]。自 1985 年, 美国食品药品监督管理局批准使用第一代酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂以来, HIV 的诊断得到了快速发展, 现已从以前的单纯 HIV 抗体检测, 发展到现在的抗原、核酸、CD4⁺、CD8⁺ 淋巴细胞计数、基因芯片技术等方法, 大大缩短了检出窗口期, 提高了检出率。本文就 HIV 实验室检测方法的研究进展作一综述。

1 HIV 抗体检测

HIV 抗体检测适用于 HIV 感染窗口期后至 AIDS 患者死亡的整个过程, 是最常用的实验室诊断方法。HIV 抗体检测又分初筛实验和确认实验。

1.1 HIV 抗体初筛试验

1.1.1 ELISA 法检测 HIV 抗体 ELISA 的基本原理是免疫反应物通过化学或免疫学的方法形成酶结合物, 酶结合物能与待检样品中相应的抗原或抗体结合成为免疫复合物, 然后加入酶底物, 经酶的催化或水解作用, 无色底物产生颜色, 用肉眼、酶标仪观察结果。1985 年第一代 ELISA 试剂使用纯化的裂解 HIV 病毒作为包被抗原, 存在较多的假阳性, 其敏感性和特异性分别为 97.2% 和 70.0%^[5], 窗口期大约有 6~12 周^[4]。1990 年, 第二代试剂产生, 采用基因工程的重组或人工合成肽为包被抗原, 主要包被 gp24、gp36、gp41、gp120, 能同时检测 HIV-1 和 HIV-2, 特异性明显提高。1994 年, 美国研制出使用双抗原夹心法的第三代诊断试剂, 由于能同时检出 IgM 抗体, 因此可以缩短检测窗口期 4~5 d, 同时敏感性也有所提高, 假阳性率大约为 0.26%^[6]。第四代试剂则在第三代的基础上增加了 P24 抗原的检测, 用 HIV 抗原和抗 P24 抗体同时包被反应板, 同时检测血清中的 HIV 抗体和 P24 抗原, 进一步缩短了“窗口期”, 时间大约为 4~5 d, 但由于同时把抗原和抗体包被在反应板上, 存在互相干扰的可能, 出现了“第二窗口期”^[7]。

1.1.2 快速检测试验(RT) HIV 抗体快速检测试剂是以胶体金或硒标记物, 硝酸纤维素膜为载体, 采用层析形式进行固相免疫测定的技术为原理制备的。该方法操作简单, 不需要仪器设备, 尤其适用于单份标本的测定, 30 min 内可以得到检测结果, 尤适用于 HIV 监测哨点、乡镇卫生院及社区卫生站等。

1.1.2.1 凝胶颗粒凝集试验(PA) 它是通过包被 HIV 抗原的颗粒凝集来检测抗体的存在。标本中的抗体与颗粒载体上的 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。

1.1.2.2 免疫斑点试验 通常使用硝酸纤维素膜作为固相载体, 将 HIV 抗原包被在膜上。若待测血清中存在 HIV 抗体即可与包被的抗原结合, 然后该复合物可与酶标记的抗人免疫球蛋白结合, 再加入底物时在膜上就可以出现肉眼可见的着色斑点。

1.1.2.3 免疫层析试验 在硝酸纤维素膜上预置胶体金标记的基因重组 HIV-1/2 抗原, 同时分别在其下方的检测区包被基

因重组 HIV-1/2 抗原, 对照区包被兔抗 HIV 单克隆抗体。若样品中有 HIV 抗体, 则在检测区和对对照区形成红色条带。若为阴性样品, 则只在对照区形成一条红色条带。

1.1.2.4 艾滋病唾液检测卡 此卡的硝酸纤维素膜基质上包被人工合成的 HIV gp41/gp36 蛋白抗原, 可同时检测含在唾液中的 HIV-1/HIV-2 抗体。

1.1.3 尿液 HIV 抗体检测 尿液检测已成为艾滋病检测的一种全新手段, 在安全、便捷等方面更具有优势。据报道, 尿液试剂盒 ELISA 法的灵敏度达 100%, 特异性达 99.1%, 与确认结果比较阳性符合率为 100%^[8]。

1.2 HIV 抗体确认试验

1.2.1 免疫印迹试验 免疫印迹试验检测原理: HIV-1/2 混合型试剂的硝酸纤维素膜上结合了多种 HIV-1 病毒裂解物抗原和特异的 HIV-2 型合成多肽, 加入稀释的血清标本, 如含有 HIV 抗体, 在显色反应后就会在膜的相应位置出现肉眼可见的条带。阳性结果应至少形成 2 条 Env 带或 1 条 Env 加 p24 带; 无带形成则为结果阴性; 出现带形而不满足阳性标准则为可疑^[9]。

1.2.2 条带免疫试验 条带免疫试验检测原理与免疫印迹试验相近似, 只是用重组抗原或合成胎作抗原来替代 WB 的裂解物抗原。

1.2.3 免疫荧光试验 免疫荧光试验既可用于初筛也可用于确认, 其基本原理是将 HIV 感染的细胞固定于载玻片上, 加入待测血浆, 如果血浆中含有 HIV 抗体, 就会和细胞内的 HIV 反应, 加入带有荧光标记的第二抗体后通过荧光显微镜观察到结果。

2 抗原检测

HIV 抗原检测主要是检测 p24, p24 抗原不仅是 HIV 的主要结构蛋白, 还是机体感染 HIV 后最早从血清中检出的病原学标志, 一般在 2~3 周即可检出, 1~2 个月进入抗原高峰期, HIV 抗体产生后出现抗原抗体复合物。由于抗体的中和作用, p24 抗原在血液中越来越少, 直至难以检测水平, 标志着 HIV 感染者进入无症状期。如 HIV 抗原再度在血液中升高, 意味着病毒的大量繁殖和免疫系统的破坏, HIV 携带者已经或即将进入艾滋病发作期。

目前检测 p24 抗原的主要方法有 ELISA、放射免疫法、免疫荧光抗体法等, 其中夹心法 ELISA 是检测最为常用的方法。其他检测 p24 的方法还有免疫复合物裂解检测法、超敏感酶免疫法、免疫吸附电泳法、线性免疫酶测定和罗奎尔艾滋病酵素免疫法、荧光联结抗原定量法等^[7]。

3 HIV 核酸检测

近年来, 随着分子生物学技术的快速发展, 应用分子生物学技术检测 HIV 的核酸已经成为 HIV 实验室诊断的重要发展方向。核酸检测技术主要用于被高度怀疑有原发感染, 且经抗体检测之后抗体检测阴性或不定时; 有高危行为或暴露史, 特别是伴有相应临床表现时, 早期诊断主要用于个体检测、血液筛查、HIV 阳性产妇的婴儿诊断^[10]。

3.1 原位杂交技术 应用特定的标记探针以分子杂交法直接检测样品中的 HIV 病毒靶核酸, 初期为放射性标记, 现在多以酶标记或化学发光试剂标记。

3.2 HIV 核酸定性检测 最常用的技术是聚合酶链反应(PCR)和逆转录 PCR(RT-PCR), 核酸检测技术能在 HIV 感染 1~14 d 的患者血浆中检测到 HIV RNA, 可用于急性感染患者、抗体检测不确定等情况的辅助诊断或用于血液筛查, 使 HIV 感染窗口期缩短至 2 周以内。尤其在 HIV 阳性母亲产下

的婴儿是否感染 HIV 的诊断中有着非常重要的意义,前病毒 DNA PCR 检测法对出生 48 h 内的婴儿检测敏感性为 38%,出生 2 周的婴儿检测敏感性达 93%^[11]。

3.3 HIV 核酸定量检测 目前 HIV 核酸定量检测技术主要有 RT-PCR、分支 DNA 信号扩大系统(bDNA)、核酸序列依赖的扩增系统、转录介导的扩增系统(TMA)^[12]。

RT-PCR 法主要是在 RT 作用下 HIV RNA 变成双链 DNA 分子使引物与各链 DNA 结合,在 DNA 合成酶作用下产生大量单链 DNA。经反复循环后使原有的 HIV RNA 扩增底物大量产生,进行定时测定。bDNA 法是通过将捕捉到的病毒基因信号扩增直接检测 RNA。核酸序列依赖性扩增法是裂解样品中的病毒颗粒和细胞,释放出核酸,在其缓冲液中加入人工合成的 RNA 作为内部控制系统,在二氧化硅参与下,将样品中的 RNA 与人工合成的 RNA 同时扩增,检测两者扩增产物。TMA 法的技术原理是利用 MLV 逆转录酶及 T7RNA 聚合酶两种酶进行核酸扩增后进行检测。

3.4 实时荧光定量 PCR(FQ-PCR) FQ-PCR 的原理是使用荧光基团标记探针,5'端标记荧光基团,3'端标记淬灭基团,在没有 PCR 扩增时,由于荧光基团和淬灭基团空间距离很近,使荧光基团被淬灭,不发荧光;当 PCR 扩增时引物与荧光标记的特异性探针同时结合在模板上,荧光标记的探针与模板结合的位置位于上下游引物之间,利用 Taq 酶的 5'-3'外切酶活性,将荧光探针水解,荧光基团被释放出来,由于在空间上与淬灭基团分开,则发出荧光,发出的荧光则可以被荧光探头检测到,一过扩增,一边检测,这样就实现了“实时”检测^[13-14]。

4 基因芯片检测技术

该技术起始于 20 世纪 90 年代,Kozal 等^[15]通过对 HIV 基因组分析,将病毒的高度保守序列作为鉴定指标,将这些特定的寡核苷酸片段作为探针,有规律地排列于固相支持物上,然后与待测的标记样品的基因进行杂交,经过计算机系统进行分析得出结果,后来由 Hauser 等^[10]应用到 HIV 实验室检测。

HIV 的实验室检测正朝着早期、快速、敏感、准确、自动化方向发展,相信不久的将来,一些新的技术会逐步应用到这一领域,使 HIV 的诊断和治疗技术又上一个新的台阶。

参考文献

[1] 黄莹,郭柳薇.艾滋病病毒分子生物学检测进展[J].北京医学,2009,9(31):564-566.
[2] 姚均. HIV 分型的分子流行病学和临床意义[J]. 传染病

信息,2002,15(2):65-67.
[3] 吕伟臣,马雪梅. 人类免疫缺陷病毒(HIV)检测技术的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志,2006,5(4):421-422.
[4] 康来仪. HIV/AIDS 目前实验诊断方法及其价值[J]. 诊断学理论与实践,2007,6(3):185-188.
[5] 代丽丽. 人免疫缺陷病毒感染的实验室检测概况[J]. 中国病原生物学杂志,2008,3(4):312-314.
[6] Barbe F, Klein M, Badonnel Y. Early detection of antibodies to human immunodeficiency virus 1 by a third-generation enzyme immunoassay. A comparative study with the results of second-generation immunoassays and western blot[J]. Ann Biol Clin(Paris), 1994, 52(5):341-345.
[7] 吴忠华,罗鹏,吕沁风. HIV 实验室检测及其研究进展[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2009,32(4):285-292.
[8] 白浪,雷秉钧. HIV/AIDS 实验室检测及其研究进展[J]. 中国循证医学杂志,2008,8(3):206-209.
[9] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范[S]. 2009 修订版. 北京:中国疾病预防控制中心,2009.
[10] Hauser MT, Adhami F, Dorner M, et al. Generation of codominant PCR-based markers by duplex analysis on high resolution gels[J]. Plant J, 1998, 16(1):117-125.
[11] 李敬云. 艾滋病的实验室诊断[J]. 中华全科医师杂志, 2006, 5(11):653-655.
[12] 郭兆诚. 艾滋病实验诊断进展[J]. 中国实用医药, 2008, 3(13):197-198.
[13] Zhao Y, Yu M, Miller JW, et al. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by using TaqMan technology[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 675-678.
[14] O'Doherty U, Swiggard WJ, Jeyakumar D, et al. A sensitive, immunodeficiency virus type 1 quantitative assay for human integration[J]. J Virol, 2002, 76(21): 10942-10950.
[15] Kozal MJ, Shah N, Shen N, et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays[J]. Nat Med, 1996, 2(7):753-759.

(收稿日期:2011-03-21)

丙氨酸氨基转移酶筛查对献血不合格率的控制作用

王 磊, 黄公昌, 姜悦波(青岛市中心血站胶州采血点 266300)

【关键词】 供血者; 丙氨酸转氨酶; 普查
DOI:10.3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 18. 042 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2011)18-2256-01

随着《中华人民共和国献血法》的实施,我国的献血工作取得了长足的进步。近年来,胶州地区不断加大无偿献血工作的宣传力度,改进工作方法,提高技术水平,使本地区临床用血自 1998 年以来已全部来自无偿献血,献血人数逐年上升,献血工作成效显著。由于多方面因素的影响,不可避免地会出现献血者检测不合格的情况,因此,有效控制献血不合格率,减少血液

浪费,一直是献血工作中值得关注的重要问题^[1]。为此,2010 年本站引入了丙氨酸氨基转移酶(ALT)筛查机制,在血液采集之前用半自动生化分析仪对献血者的血液样品进行 ALT 测试,希望以此筛查出 ALT 不合格的献血者,从而减少献血不合格情况的发生。本文对本采血点 2009 年 1 月至 2010 年 12 月无偿献血者的献血不合格情况进行了(下转第 2291 页)