人类免疫缺陷病毒实验室检测方法研究进展

孙梅 国东 赵琢 赵海英 付晓亮 葛全序 乔文革 王明义

作者单位: 264200 山东威海, 威海市立医院中心实验室

通信作者: 王明义, Email: wangmingyi1973@outlook.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.03.020

【摘要】 获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 又称艾滋病, 是由人类免疫缺陷病毒 (HIV) 引起的严重影响人类健康的传染病, 该病会直接导致人类免疫系统功能缺陷, 造成人体免疫系统抵御外界侵害的能力受损, 且其特效药物和疫苗难以研制。因为 AIDS 具有高致病性和高传染性, 所以对疑似 AIDS 患者的早期筛查和诊断就显得格外重要。近年来, 有关 HIV 实验室检测方法的研究已有很大进展, 本文主要从 HIV 抗体、HIV 抗原、HIV 核酸检测、CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞、基因芯片 5 个方面简要阐述有关 HIV 实验室检测技术的研究进展, 以期探索 HIV 实验室检测新技术, 缩短 AIDS 检测“窗口期”, 遏制其蔓延。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒; 艾滋病; 实验室检测

基金项目: 国家科技重大专项 (2009ZX10004-719)

Advances in laboratory testing methods for human immunodeficiency virus

Sun Mei, Guo Dong, Zhao Zhuo, Zhao Haiying, Fu Xiaoliang, Ge Quanzu, Qiao Wenge, Wang Mingyi. Central Laboratory, Weihai Municipal Hospital, Weihai 264200, Shandong, China

Corresponding author: Wang Mingyi, Email: wangmingyi1973@outlook.com

【Abstract】 Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) also called AIDS disease caused by the human immunodeficiency virus (HIV) is a severe infectious disease affecting human health, it can directly lead to the functional defects of human immune system, resulting in the body's immune system playing an insufficient ability to defend the external invasion, and in the mean time, it is difficult to research and produce specific effective drugs and vaccines. Because of the high pathogenicity and high infectivity of AIDS, the early screening detection and early diagnosis of suspected infectious patients are particularly important. In recent years, very great progress has been made for the research of HIV laboratory detection methods; this article was mainly from the five aspects such as HIV antibody, HIV antigen, HIV nucleic acid detection, CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes and gene chips to briefly expounds the research progress of HIV laboratory detection technology in order to explore new laboratory detection techniques for HIV and to shorten the "window period" of AIDS detection and curb the spread of AIDS.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Acquired immunodeficiency syndrome; Laboratory test

Fund program: National Major Science and Technology Project (2009ZX10004-719)

获得性免疫缺陷综合征 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 又称艾滋病, 是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染引起的综合征, 感染后直接损伤人类免疫系统功能, 对人类健康造成巨大威胁。HIV 属 RNA 病毒, 电镜下病毒颗粒呈球形, 直径 100 ~ 120 nm。HIV 外层为脂蛋白包膜, gp120 和 gp41 两种特异糖蛋白镶嵌在其中; 内部为 20 面体对称核衣壳, 病毒核心含有 RNA、反转录酶和核衣壳蛋白^[1]。HIV 病毒广泛存在于患者的血液、精液、阴道分泌物和乳汁中^[2], 主要通过血液传播、垂直传播、母婴传播、性传播等方式感染正常人群^[3], 因此 AIDS 具有强大的传染性, 对人类社会发展造成严重威胁。美国疾病控制中心于 1986 年将从 HIV 初感染至进展并诊断为 AIDS 划分为 4 个时期, 即急性感染期、无症状感染期 (潜伏

期)、AIDS 相关综合征期、AIDS 期 (AIDS 完全型)^[4]。

正是由于 HIV 的高致病性和高传染性, 对疑似 HIV 感染者进行早期筛查和诊断显得尤为重要。目前主要检测方法包括 HIV 抗原检测、HIV 抗体检测、HIV 核酸检测等, 其中 HIV 抗体检测因操作便捷被广泛应用^[5]。HIV 抗原测定和核酸定性检测等作为抗体检测的补充方法, 是 AIDS 早期诊断、辅助鉴别、病情监测、选择相应临床治疗方案和药物疗效评估的重要依据。本研究针对近几年 HIV 实验室相关检测方法的研究进展和总体发展趋势进行阐述, 现报告如下。

1 抗体检测

诊断 HIV 感染的常规检测方法是抗体检测。根据适用范围的不同, HIV 抗体检测方法大致可分为两种: 初筛试验和确认试验。初筛试验主要包括酶联免疫吸附试验 (enzyme

linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金快速检测试验 (rapid tests, RT) 和微粒子化学发光法等; 确认试验主要包括蛋白免疫印迹试验 (Western Blot 法)、线性免疫试验和免疫荧光试验等, 其中 Western Blot 法最常用, 被认为是金标准。

1.1 ELISA 法 ELISA 法的应用范围最广泛, 适用于大批量标本的筛查。一般采用间接 ELISA 法, 原理为采用 HIV 抗原包被固相载体后与血清样本相互发生作用, 再利用酶标记的抗人免疫球蛋白抗体与底物的显色反应, 检测被测样本中是否有 HIV 抗体的存在。目前, ELISA 检测相关试剂已发展至第 4 代^[6]。将完全病毒的裂解产物作为第 1 代试剂的抗原, 利用间接 ELISA 法检测有无抗体的存在, 由于其中含杂质较多, 敏感性和特异性受到一定限制, 出现较多假阳性结果。第 2 代试剂的抗原为基因工程抗原, 使用重组或合成的多肽抗原, 检测抗体采用的方法依旧是间接 ELISA 法, 但可同时检测 HIV-1、HIV-2, 检测方法的敏感性和特异性有所提升。与此同时, 由于第 2 代试剂采用的是基因工程抗原, 这就造成重组抗原中存在载体组成部分的问题, 使检测结果出现假阳性。发展至第 3 代试剂时, 抗原使用人工合成带有 HIV 抗原决定簇的多肽, 采用双抗原夹心法检测抗体, 第 3 代试剂的一大优势为可探测出所有与 HIV 抗原相关的抗体亚型, 所以 HIV 抗体检测敏感性明显升高, 但仍会出现标本漏检的情况。HIV 抗原和抗体联合检测试剂是 HIV 抗体检测的第 4 代试剂, 可一次性检出 p24 抗原、HIV-1 和 HIV-2 抗体^[7]。因为第 4 代试剂的敏感度较高, 所以能在一定程度上缩短 HIV 感染后检测的窗口期。截至目前, 我国主要使用第 3 代试剂, 第 4 代试剂已被部分国家用于血源筛查。

1.2 RT 法 此技术的原理为利用硝酸纤维素膜, 硝酸纤维素膜的加样区被特殊材料标记的 HIV 抗原包被, 而硝酸纤维素膜的检测区和对照区则用重组 HIV-1 和 HIV-2 抗原包被。如果此时患者标本中存在 HIV 抗体, 则抗体会最先与被标记抗原结合, 经相应的抗原抗体反应形成复合物, 此物质在层析作用下向前端移动, 与之前包被在检测区的抗原发生反应后结合, 形成标记 HIV 抗原-重组 HIV 抗原抗体复合物, 发生显色反应显色, 有助于检验人员判读结果。RT 法结果的判断: 若检测区与对照区均有一条红线出现, 则为 HIV 抗体阳性; 若仅对照区出现一条红线, 则认为是 HIV 抗体阴性; 若检测区与对照区均无红色条带的出现, 则认为此次试验无效。RT 法操作简便, 结果易判定, 适合单份标本的检测^[8]。

1.3 电化学发光免疫分析法 (electrochemiluminescence immunoassay, ECLIA) ECLIA 法的原理为在抗原或抗体上标记发光的物质或酶, 待抗原或抗体的免疫反应结束后, 在反应体系中加入特定酶底物或氧化剂, 再利用光电倍增管检测发光强度, 由于发光强度与反应体系中的复合物浓度呈一定线性关系, 根据发光强度测得待测样本中的抗体含量^[9]。因为生物素-亲和素技术、磁性微珠包被技术、电化学发光技术等多种新颖检测技术均在 ECLIA 检测中被综合利用, 所以 ECLIA 法检测 HIV 抗体的敏感度在很大程度上得以提升, 同时还使检测过程更为标准化与自动化, 批内和批间误

差明显减少, 检测结果更精确可信^[10]。

1.4 微粒子化学发光法 AutolumiS 3000 全自动化学发光测定仪采用双抗原夹心法, 在磁微粒上标记如 gp41 和 gp3 的 HIV 相关抗原, 加入待测血清后发生反应形成包被抗原-抗体结合物, 温浴后再加入被异鲁米诺标记的 HIV 抗原, 经免疫反应生成磁微粒标记的抗原-抗体-异鲁米诺标记抗原复合物, 通过以上反应形成免疫反应与发光之间的联系。随后在体系中加入激发液, 继而催化已被标记 HIV 抗原的异鲁米诺在 425 nm 处激发的光, 这样发光值 (relative light unit, RLU) 就与待测血清中 HIV 抗体含量呈正相关, 再根据样本吸光度值/临界值 (S/CO 比值) 对标本的检测结果进行判读。该方法可批量上机实施自动化分析检测, 操作简便, 试剂稳定性高, 具有更好的检测敏感性、稳定性及重复性。

1.5 Western Blot 法 Western Blot 法是常用的 HIV 抗体阳性确证试验, 该方法将纯化 HIV 抗原裂解成不同的片段, 通过凝胶电泳将抗原成分按分子质量大小顺序排列, 并转移到硝酸纤维素膜上, 借助酶标抗体和底物使 HIV 抗原显色, 再根据各条带出现的位置判读检测结果, 一般情况下出现 2 条以上的条带则能判定 HIV 结果阳性^[11]。Western Blot 法能显示针对 HIV 各抗原成分的抗体谱, 敏感性和特异性较好, 但操作步骤较多, 对技术要求较高。有研究显示, Western Blot 法也存在一定的弊端, 会将仅有包膜蛋白 (gp41+gp20/gp160) 或 gag+ 包膜 (p24+gp41 或 gp120/gp160) 的部分人群判断为 HIV 阳性^[12]。关于现有 Western Blot 检测漏检的问题, 多采用 ELISA 法和 Western Blot 法联合检测的方式判断 HIV 感染患者, 必要时需补充核酸试验进行确定^[13]。

2 HIV 抗原检测

HIV 的核心蛋白是 p24 抗原。患者感染 HIV 后, p24 抗原水平可随病毒的不断复制而升高, 故 p24 抗原在患者感染 HIV 后 14~21 d 即可被检出, 1~2 个月左右开始进入抗原高峰, 但随后由于抗体的中和作用, 游离性抗原逐渐减少, p24 抗原浓度持续降低, 直至难以测出, 此后人体 HIV 抗体虽持续表现为阳性, 却进入无症状感染期。所谓窗口期, 即从机体感染 HIV 至产生 HIV 抗体的这段时间。HIV 感染后期 p24 抗原浓度会随 HIV 的复制再度升高, 所以 p24 抗原检测主要用于诊断 HIV 的早期感染^[14], 同时 p24 抗原的浓度水平也可反映患者疾病的发展情况。针对 HIV p24 的检测方法包括 ELISA 法、间接免疫荧光法、放射免疫分析等^[15]。以 ELISA 双抗体夹心法最常用, 原理为将已知的纯化抗体包被在反应孔板底部, 若患者标本中存在 p24 抗原, 则其与被包被的抗体发生相应免疫反应形成抗原-抗体复合物, 随后再加入已被酶标记过的 HIV 抗体, 与底物发生显色反应后, 利用酶标仪读取结果。但该方法也存在假阳性的可能, 需进一步行确证实验加以确证。

3 HIV 核酸检测

核酸检测是目前检测 HIV 最敏感的方法。HIV 检测分为定性和定量两类, 定性检测的主要作用是进行 HIV 感染的辅助诊断, 而定量检测则主要发挥对 HIV 感染者的病

情发展观察和抗病毒治疗的疗效监测作用。核酸检测大致可分为核酸序列扩增试验、逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、分支 DNA 杂交试验和荧光实时 PCR 技术等。理论上 PCR 的敏感性和特异性较高,但由于扩增倍数极大,微量的污染即可造成假阳性。目前应用的 PCR 自动检测系统把 PCR 的扩增和检测两大步骤分别在单个反应管内分开进行反应和检测,可有效避免实验过程中的污染^[16]。

4 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞计数

T 淋巴细胞中的 CD4⁺ 主要表示 T 辅助细胞,而 CD8⁺ 则代表 T 抑制细胞和 T 杀伤细胞。在人体免疫反应过程中,CD4⁺ T 淋巴细胞起着重要的作用。因为 HIV 病毒的主要靶细胞为 CD4⁺ 淋巴细胞,所以人体感染 HIV 病毒后的临床改变主要为 CD4⁺ T 淋巴细胞的绝对计数减少,与此同时,CD8⁺ T 淋巴细胞数量不断增加,造成 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的比例失调^[17]。CD4⁺ T 淋巴细胞在患者体内的数量随着患者病情的加重明显降低,人体的免疫系统被严重破坏。因此 CD4/CD8 比值是评估患者病情严重程度和治疗时机以及预后的指征之一,比值越低,表示细胞免疫缺陷的程度越严重。

5 基因芯片技术的应用

基因芯片技术,又称 DNA 芯片或生物芯片技术,是近几年新兴的生物技术。此技术的核心原理主要是在支持物上将特定探针分子进行有规律地排布,再将探针分子与待测标记样品进行杂交,利用激光共聚焦技术扫描芯片探测杂交信号的强弱和位置分布情况,再利用计算机软件统计探针上的荧光信号,对其进行对比分析从而得出结果。基因芯片检测技术效率高、速度快,可在短时间内获得所需信息。早在 1998 年,Hauser 等^[18]就利用 DNA 芯片技术在 HIV 感染患者出现抗体反应前从其体内检测到了 HIV。由于基因芯片技术直接测定 HIV 病原体,一定程度上解决了因基因变异和低拷贝样本造成的漏检问题,提高了样本检测的准确性^[19]。

6 展望

本文主要从 HIV 抗体、HIV 抗原、HIV 核酸检测、CD4⁺ T 淋巴细胞和 CD8⁺ T 淋巴细胞、基因芯片 5 个方面简要对 HIV 实验室检测技术的研究进展进行综述。AIDS 是目前国际公认的最大公共危害之一,已对无数人造成严重的生理和心理损害。1985 年发现我国第 1 例 AIDS 确诊患者,之后我国 AIDS 感染者数量不断增多,2010—2016 年我国 AIDS 的发病人数和死亡人数呈现明显的上升趋势;2017 年,我国 AIDS 发病人数已升至 57 194 例,数量约为 2010 年发病人数的 3 倍^[20]。选择 HIV 检测敏感度和特异度高的方法将有效避免临床漏检,有助于 HIV 的早期诊断。

自 1985 年第 1 代 HIV 抗体被发明以来,HIV 实验室检测技术实现了跨越式的进步。目前分子生物技术得到快速发展,基因芯片和微粒子化学发光技术被广泛应用,HIV 的实验室检测正朝着快速、高效、准确、自动化的方向发展。相信随着检测技术的不断提高,将不断有新试剂和新方法用于 HIV 检测,使 HIV 感染者在感染早期即可得到诊断。

参考文献

- 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南(第三版)[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(10): 577-593. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2015.10.001.
- 孙建军, 卢洪洲. 人类免疫缺陷病毒母婴传播预防[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2016, 32(6): 511-514.
- Chamie G, Kwarisiima D, Clark TD, et al. Uptake of community-based HIV testing during a multi-disease health campaign in rural Uganda[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e84317. DOI: 10.1371/journal.pone.0084317.
- 李彤, 王玥. HIV 感染的免疫细胞异常与功能障碍[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(2): 317-319, 320. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.26.166.
- 尚红, 张林琦, 徐小宁, 等. HIV 感染者疾病进展相关因素研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(1): 29-35. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2013.01.009.
- 郑艳梅, 释艳华. 第三代和第四代 HIV 抗体 ELISA 试剂检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(1): 115-116. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.047.
- 边礼, 陈默新. ELISA 试验中抗原抗体联合检测法检测 HIV 病毒的影响因素及其排除方法探讨[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(79): 146, 149. DOI: 10.19613/j.cnki.1671-3141.2018.79.096.
- 许晶. 艾滋病抗体血清学检测的两种方法比较: 附 3 年 4514 份标本的比较[J]. 实用检验医师杂志, 2017, 9(2): 89-92. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2017.02.009.
- 靳丽丽, 王晓伟, 邵春燕, 等. 化学发光法检测人类免疫缺陷病毒抗体高值阴性样本的分析[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(5): 508-509. DOI: 10.3969/j.issn.1671-2587.2017.05.030.
- 姜莹, 黄晓群, 庞栋, 等. 电化学发光法用于献血者梅毒特异性抗体酶联免疫试验反应性样本补充试验的效果评价[J]. 广西医学, 2018, 40(14): 1624-1625. DOI: 10.11675/j.issn.0253-4304.2018.14.30.
- 李艳, 潘彤, 李浩龙, 等. 液相芯片法验证蛋白免疫印迹试验检测 HIV-1 结果的敏感性和特异性[J]. 实用检验医师杂志, 2018, 10(3): 176-178, 181. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.03.015.
- 董莉娟, 陈会超, 杨朝军, 等. HIV-1WB 试验不确定样本的 HIV-1RNA 定量检测结果分析[J]. 中国艾滋病性病, 2017, 23(6): 550-552. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2017.06.21.
- 张亚兰, 卫晓丽, 郑海潮, 等. 使用四代 HIV 抗原抗体试剂筛查联合蛋白印迹或核酸补充实验的检测策略临床评价[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(3): 286-288, 306. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2018.03.20.
- Groopman JE. Current advances in the diagnosis and treatment of AIDS: an introduction. [J]. Rev Infect Dis, 1990, 12(5): 908-911.
- Liang TS, Erbeling E, Jacob CA, et al. Rapid HIV testing of clients of a mobile STD/HIV clinic [J]. AIDS Patient Care STDS, 2005, 19(4): 253-257. DOI: 10.1089/apc.2005.19.253.
- 蔡勇进. 3 种不同免疫检验方法检测抗 HIV 结果可靠性比较观察[J]. 中国医学工程, 2015, 23(10): 49.
- 唐任光, 农乐根. 人类免疫缺陷病毒检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(6): 356-359. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2008.06.021.
- Hauser MT, Adhami F, Dorner M, et al. Generation of co-dominant PCR-based markers by duplex analysis on high resolution gels [J]. Plant J, 1998, 16(1): 117-125.
- 朱京京, 汪圣强, 谢晓谦, 等. HIV 检测基因芯片的研制和应用评价[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(1): 13-16. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2010.01.004.
- 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心性病控制中心. 2018 年第 2 季度全国艾滋病性病疫情[J]. 中国艾滋病性病, 2018, 24(8): 1075. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2018.08.01.

(收稿日期: 2019-06-11)

(本文编辑: 张耘菲)