

我国艾滋病实验室网络、检测技术及其质量保证体系进展

蒋 岩

(中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 100050)

〔摘要〕 艾滋病实验室检测在艾滋病防治工作中起着举足轻重的作用。我国艾滋病实验室网络及其质量保证体系已经建立并不断完善,截至 2004 年底全国共验收批准了 3 707 个筛查实验室、53 个确证实验室,已经开展的实验室检测能力验证包括血清学和免疫学检测,病毒学检测能力验证将于 2005 年启动。目前艾滋病实验室使用的常规检测技术包括 HIV 抗体检测、核酸检测和 CD4 细胞计数。正在研究和评价的新策略、新技术包括:确认试验替代策略、抗原检测、多亚型新感染酶联检测技术(BED-EIA)、滤纸干血片检测 HIV 抗体及核酸技术、集合 RT-PCR 方法等。这些研究工作紧跟国际步伐、符合中国国情。

〔关键词〕 人类免疫缺陷病毒, 实验室网络, 检测技术, 质量保证

〔中图分类号〕 R512.91

〔文献标识码〕 A

〔文章编号〕 1000-7857(2005)07-0017-07

Progress of Testing Technology and Quality Assurance System in HIV Laboratories in China

JIANG Yan

(National Center for AIDS/STD Control and Prevention, China CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: HIV/AIDS laboratory testing is very important in the prevention and the treatment of AIDS. HIV/AIDS laboratory network and its quality assurance system has been built and will be more and more perfect in China. 3 707 screening laboratories and 53 confirming laboratories in the whole country had been authorized by the end of year 2004; proficiency testing in serology and immunology has been developed and in virology will start this year. Routine testing technology, which is being used in the laboratory network, includes HIV antibody testing, nucleic acid testing and CD4⁺ T cells counting. The new technologies and the new strategies in study and evaluation include the alternative strategy of confirming testing, antigen testing, BED-EIA assay, antibody testing and nucleic acid testing with dry blood paper, pooling RT-PCR, and etc..

Key Words: HIV, laboratory network, testing technology, Quality assurance

Document Code: A

CLC Number: R512.91

Article ID: 1000-7857(2005)07-0017-07

1 我国艾滋病实验室网络

我国的艾滋病实验室分为 3 类,分别为国家参比实验室、确证实验室和筛查实验室。国家参比实验室由卫生部指定,确证实验室和筛查实验室分别由卫生部和省级卫生行政部门审批,专家组验收。截至 2004 年底,全国共验收通过了 53 个确证实验室和 3 707 个筛查实验室。筛查实验室只能进行 HIV 抗体筛查试验,包括酶联免疫试验(EIA)、快速检测(RT)和颗粒凝集试验(PA)。确证实验室可以进行 HIV 抗体筛查试验和确证试验。各类实验室具有其相应的职能。(图 1、图 2 为中国性病艾滋病预防控制中心实验室。)

1.1 国家参比实验室

国家参比实验室承担艾滋病实验室网络建设任务;组织确证实验室考核及诊断试剂临床质量评估;负责全国疑难样品的分析和确认,对有争议的结果进行仲裁;组织国家级业务培训,为艾滋病确证实验室提供技术支持和指导,编



图 1 中国 CDC 性病艾滋病预防控制中心 P3 实验室

图 2 中国 CDC 性病艾滋病预防控制中心核酸实验室

写技术指南和承担与检测相关的研究及其它任务。国家参比实验室建立了多种 HIV 检测及研究的相关技术,包括血清学检测技术,HIV-DNA、HIV-RNA 检测技术,细胞免疫和

收稿日期: 2005-05-20

基金项目: 卫生部艾滋病防治应用性研究课题(WA2003-17)、美国 CDC 全球艾滋病项目(GAP)资助

作者简介: 蒋岩,女;北京市宣武区南纬路 27 号中国 CDC 性病艾滋病预防控制中心研究员,参比实验室主任,主要从事艾滋病实验诊断及抗病毒药物研究;E-mail:jiangyan03@263.net

体液免疫学检测技术,病原学检测及病毒分离技术,基因序列测定,抗艾滋病病毒药物筛选和抗病毒药物耐药性检测技术,病毒生物型和基因型鉴定技术等。

1.2 确证实验室

确证实验室主要分布在各省及部分地、市级疾病预防控制中心。此外,检疫系统、医院、血液系统、中国人民解放军和武警部队等也分别建立了确证实验室。各省疾病预防控制中心的确证实验室作为确认中心实验室,中国人民解放军及检疫总局的确证实验室作为各系统的确认中心实验室,承担卫生部、省卫生行政部门或系统卫生行政主管部门指定区域的 HIV 抗体确认和部分筛查任务;负责省或本系统内 HIV 抗体检测实验室的人员培训;负责本省或本系统艾滋病检测实验室的质量管理和技术指导,组织省级检测技术和 HIV 诊断试剂质量考核。其它部门的确证实验室承担当地和省级卫生行政部门指定的 HIV 抗体筛查、确认试验和人员培训任务。

1.3 筛查实验室

筛查实验室承担辖区内 HIV 抗体筛查任务。负责辖区内 HIV 阳性反应标本的复检,及时将需要做确认试验的标本转送确证实验室。

2 我国艾滋病实验室检测程序及结果报告要求

《全国艾滋病检测技术规范》^[1]规定,HIV 抗体检测程序为初筛检测-重复检测-确认试验 3 个步骤。重复检测是对初筛呈阳性反应的标本用原有试剂和另外一种不同原理或不同厂家的试剂进行重复检测。如 2 种试剂重复检测均呈阴性反应,则报告 HIV 抗体阴性;如均呈阳性反应或一阴一阳,需送确证实验室进行确认。对结果报告的规定为:初筛试验呈阴性反应出具 HIV 抗体阴性报告;初筛试验呈阳性反应,只可出具“HIV 抗体待复查”报告,不能出具阳性报告,同时应尽快将样品送确证实验室进行确认。经确认试验 HIV 抗体阳性者,出具 HIV 抗体阳性确认报告,并按规定做好咨询和保密工作。

3 我国艾滋病实验室常规检测技术

HIV 抗体检测是常规使用的 HIV 实验室诊断技术。其它检测方法,如核酸检测作为抗体检测方法的补充或用于辅助诊断,如窗口期、婴幼儿 HIV 感染早期诊断、HIV 抗体检测结果不确定等情况;HIV 病毒载量测定和 CD4 细胞计数作为判断预后和指导治疗用药的 2 项重要指标。

3.1 HIV 抗体检测技术

常用的 HIV 抗体检测技术包括 EIA、快速检测、颗粒凝集试验和免疫印迹试验。EIA、快速检测和颗粒凝集试验仅作为筛查试验(包括初筛和复检),免疫印迹试验作为确认试验。

3.1.1 HIV 抗体筛查试验

1) 酶联免疫试验(EIA):目前国内外主要使用第三代(双抗原夹心法)检测试剂。血源筛查以第三代 EIA 为主,国外有些国家和地区已将线性免疫酶测定(第四代 EIA 试剂)用于血源筛查。第四代 EIA 试剂是近年发展起来的 HIV 抗原抗体联合检测试剂,可同时检测 P24 抗原和抗 HIV 1/2 抗体。与第三代 EIA 试剂相比,检出时间提前了 4~9.1 天。其优点在于能同时检测抗原抗体,缩短了“窗口期”。国家参

比实验室对我国国家食品药品监督管理局(SFDA)批准的进口第四代 EIA 试剂进行评估的结果表明,其敏感性和特异性与第三代 EIA 试剂近似^[2]。

2) 快速检测(RT):随着艾滋病病人抗逆转录病毒治疗的进展和需求,以及对无症状 HIV 感染者提供自愿咨询检测(VCT)的迫切需求,快速、简单、廉价的 HIV 检测方法也得到相应发展。快速诊断试剂一般在 10~30 分钟内出结果。目前,我国使用的只有血液快速检测试剂,美国 FDA 已经批准了唾液快速检测试剂,也有一些公司开始了尿液快速检测试剂研究。目前,经国家 SFDA 注册批准的血液快速试剂有近 10 种(包括进口试剂),敏感性在 91.48%~99.15%之间,特异性在 96.48%~99.77%之间^[2,3]。

3) 明胶颗粒凝集试验(PA):PA 是 HIV 血清抗体检测的一种简单方法,该方法是将 HIV 抗原致敏明胶颗粒作为载体,与待检标本作用,混匀后保温(一般为室温)。当待检标本含有 HIV 抗体时,经抗原致敏的明胶颗粒与抗体发生抗原-抗体反应,根据明胶颗粒在孔中的凝集情况判读结果。PA 试剂有 2 种,HIV-1 和 HIV-2 抗原共同致敏的 PA 试剂(AFD HIV 1/2 PA),已经我国 SFDA 注册批准;HIV-1、HIV-2 抗原分别致敏的 PA 试剂(SERODIA-HIV-1/2)尚未引进,可初步区分 HIV-1 型和 HIV-2 型。

3.1.2 HIV 抗体确认试验

包括免疫印迹试验(WB)、条带免疫试验(LIATEK HIV III)、放射免疫沉淀试验(RIPA)及免疫荧光试验(IFA)。国内常用的确认试验方法是免疫印迹法(WB),结果判断见文献[1]。WB 条带中最早出现的条带是 P24 或 Gp160。目前,国内使用的确认试剂以进口为主,我国也已经有产品通过 SFDA 批准。

3.2 核酸检测

HIV 核酸检测包括定性和定量检测,前者用于 HIV 感染的辅助诊断,后者常用于监测 HIV 感染者的病程进展和抗病毒治疗效果,也可用于辅助诊断。定性检测通常使用 PCR 或 RT-PCR 技术,使用分子生物学实验室通用的基因扩增试剂,引物可来自文献或自行设计,应尽量涵盖所有的或流行的毒株,也可使用复合引物。DNA PCR 检测是定性检测前病毒 DNA,敏感性>99%,特异性 98%,单独用于诊断是不可靠的。定量检测为 HIV RNA PCR,敏感性为 95%~98%,假阳性率为 2%~9%,敏感性取决于病毒载量。在急性 HIV 感染时敏感性为 100%,特异性为 97%;在病毒载量大于 100 000/ml 时特异性为 100%。目前,常用的 HIV RNA 定量测定(病毒载量测定)方法^[4]有逆转录 PCR 试验(RT-PCR)、核酸序列扩增试验(NASBA)、分枝 DNA 杂交试验(bDNA)。2002 年用于荧光实时定量 PCR 技术的国产试剂获得 SFDA 批准,但尚未用于艾滋病检测工作。

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确定时;有高危行为史或暴露史,特别是伴有相应的临床表现时,用核酸检测进行辅助诊断。早期诊断主要应用在个体检测、血液筛查、性病门诊病人筛查、HIV 阳性产妇的婴儿诊断。日本红十字会使用基于荧光实时 PCR 技术的核酸检测系统(NAT),同时检测 HBV、HCV 和 HIV-1 核酸,对于血清学检查阴性的献血员进行筛查,以弥补窗口期造成的漏检^[4]。2002 年我国也已批准了第一个 HIV 荧光 PCR 检测试剂。

3.3 CD4⁺ T 淋巴细胞计数

准确可靠的 CD4⁺ T 淋巴细胞检测是评价 HIV 感染者免疫状况、预测病程进展、评价抗病毒药物治疗效果和估测预后的重要指标。进行性 CD4⁺ T 细胞损耗可能与临床上出现严重症状有关,也预示可能预后不良。因此,世界卫生组织(WHO)和欧美等国家均推荐 HIV 感染者每 3~6 个月监测 1 次 CD4⁺ T 细胞水平,并以该指标作为开始预防间质性浆细胞肺炎和其它机会性感染,以及开始抗逆转录病毒治疗的决定因素。依照美国 CDC 成年人和未成年人 AIDS 病例中 HIV 感染和病例监测分类系统定义,CD4⁺ T 细胞水平也作为判断 HIV 相关临床病程的标准。我国《艾滋病诊疗指南》^[5]中指出:CD4⁺ T 淋巴细胞检测的临床意义是了解机体的免疫状态和病程进展,确定疾病分期和治疗时机,评估治疗效果和 HIV 感染者的临床合并症。CD4⁺ T 淋巴细胞计数的检测间隔时间需根据病人的具体情况由临床医生决定。一般建议对于 CD4⁺ T 淋巴细胞数>350 个/mm³ 的 HIV 无症状感染者每年检测 1 次;对于 CD4⁺ T 淋巴细胞数 200~350 个/mm³ 之间,且尚未开始抗病毒治疗的病人每半年检测 1 次;对于已接受抗病毒治疗的病人在治疗的第 1 年内每 3 个月检测 1 次,治疗 1 年以上且病情稳定的病人可改为每半年检测 1 次。

常用的 CD4⁺ T 淋巴细胞亚群检测方法为流式细胞术,可以直接获得 CD4⁺ T 淋巴细胞数绝对值,或通过白细胞分类计数后换算为 CD4⁺ T 淋巴细胞绝对数。目前有双平台法(DPT)和单平台法(SPT)设备。美国 CDC 于 1997 年颁布了双平台法(DPT)操作指南。该指南用于规范双平台法 CD4⁺ T 淋巴细胞计数的实验室操作。2003 年对该指南进行了补充和修改。加拿大也于 2001 年制定了淋巴细胞免疫表型流式细胞仪相关技术规范。国家参比实验室正在组织制订适合于我国艾滋病病人治疗的 CD4⁺ T 淋巴细胞检测的质量保证与质量控制指南。随着我国 IV/AIDS 防治工作的深入,尤其是抗病毒治疗和 VCT 工作的开展,截至 2004 年,全国已经有约 600 余台各型流式细胞仪和/或 CD4⁺ T 淋巴细胞计数仪。其中,直接服务于艾滋病防治工作的有近百台,在艾滋病流行病学调查和区域性防治工作中发挥了重要作用。

4 国际艾滋病检测技术新进展及我国的研究现状

4.1 替代 WB 的 HIV 筛查试剂及其检测策略研究

目前,国内外对 HIV 感染诊断的金标准依然是 HIV 抗体确认试验阳性。在我国,由于确认试验必须在有确认资格的实验室进行,且检测试剂价格较高,加之一些实验室因为工作量小需要积累样本 2 周以上才能进行一批检测,造成待检者等待时间过长。这些因素都不同程度地降低了 HIV 检测的可及性,致使大量的感染者无法及时接受检测,表现为我国的 HIV 感染报告数与估测数之间存在着巨大的差距(检出阳性数为估计阳性数的 15% 以下)。这些潜在的感染者成为 HIV 继续传播的重要来源。因此,积极探索更加简单、省时、可及性高的替代确认试验的检测策略非常必要。近年来的研究表明,用 EIA 联合快速试验替代免疫印迹试验在 HIV 感染的确诊诊断方面同样可靠^[6-8],EIA 联合快速试验与免疫印迹试验相比,检测成本低,试验操作简单,不确定结果更少^[9]。因此,UNAIDS 和 WHO 已经建议将 EIA 和快速试验的联合应用作为替代策略对 HIV 初筛阳性的结果

进行确认。需要指出的是,用作首轮检测的试剂应当具有高敏感性,以确保能够检测到样本中的抗体。用作复检试验的第二个检测试验应当具有高特异性,以确认样本中确实含有 HIV 特异性抗体^[6]。在我国现行的艾滋病流行病学监测和疫情报告制度中规定,2 次初筛检测的结果阳性,且其中 EIA 检测的 S/CO 值 ≥ 6 ,即可作为疫情上报;S/CO 值 < 6 、 > 1 的样本须经蛋白印迹试验确认后再报告^[1]。

据 WHO 统计,由于艾滋病疫情在世界范围的进一步蔓延,目前各个国家(特别是发展中国家)对于自愿咨询检测(VCT)的需求快速增长,多数大城市都已设有 VCT 中心。但是,在广大的农村地区,正是由于上面提到的专业设备和技术人员的缺乏,以及检测费用昂贵等方面的原因,VCT 服务的可利用性受到了很大的限制。因此,作为免疫印迹试验的替代检测方案,简单、快速试验能够大大促进 VCT 服务的推广和普及^[10,11],从而有效遏制艾滋病疫情的蔓延。依据 WHO 的推荐,一些发展中国家已经开始将简单、快速检测方案应用于 HIV 感染的个体诊断,以代替免疫印迹确认试验。UNAIDS 和 WHO 建议在边远地区、实验室条件差或没有实验室的地区以及每天检测量少于 100 份样本的基层实验室,应当首选快速试验,因为这类方法快速、易于操作,并且多数试剂的有效期都比 EIA 长;而在实验室条件良好并且具备经过培训的技术人员,以及每天检测量超过 100 份样本的国家或地区级实验室,则应当选用 EIA,因为 EIA 非常适合于样本的成批测定^[7]。

为了长期、有效地保证 HIV 检测的可及性,确认试验的替代检测策略应当最终落实到本国的 HIV 检测规范中。HIV 检测策略的国家级评估一般采取 UNAIDS 和 WHO 建议的三阶段评估方式。这种评估方式已经在世界上许多国家得到了实际应用^[10,12]。依据上述 UNAIDS 和 WHO 的指导性建议,国家艾滋病参比实验室最近完成了艾滋病检测替代策略的国家级评估^[13,14],研究结果显示:① 在各种艾滋病替代检测策略中,2 种检测试剂及 3 种检测试剂联合使用,无论在检测的特异性、稳定性方面都明显优于单试剂检测;② 双试剂策略与三试剂策略在各项评估指标以及各指标的稳定性方面无显著性差别(三试剂策略的特异性略强于双试剂策略,双试剂策略的敏感性略强于三试剂策略);③ 替代策略中快速试剂的环节越多,策略的特异性、阳性预测值越好,而 EIA 的环节越多,策略的敏感性、阴性预测值越好。我们将 2 158 份血清样本用 EIA 和快速试剂分别检测,2 种试验结果不一致的样本用免疫印迹试验(WB)进行确认。结果显示并联法(即 2 种试剂同时使用)的敏感度和特异度分别为 98.0%、98.3%;而串联法(即 1 种试剂检测阳性样品,再用另 1 种试剂检测)的敏感性和特异性分别为 96.8%、100.0%。串联法中,先用酶联法检测敏感度为 96.9%,阳性预测值为 98.1%;先用快速试剂检测则敏感度和阳性预测值分别为 96.9%、99.5%。提示在流行率较低的地区使用串联法可以节省检测成本,而酶联试剂与快速试剂的联合使用中,先用快速试剂检测可以获得较高的阳性预测值。需要指出的是,这些评价选用的试剂以进口试剂为主(待发表)。

4.2 HIV P24 抗原检测

4.2.1 新的检测方法

机体感染 HIV 后,能从血清中较早检出的病原学标志

是 P24 抗原。HIV 感染后约 2~3 周即可检出抗原,1~2 个月达到高峰,以后随着抗体的产生,抗原抗体形成复合物,P24 抗原浓度降至难以测出的水平。进入无症状期,HIV 抗体持续阳性。P24 抗原的检测通常是采用 EIA 夹心法,为提高其灵敏度,近几年发展了一些新的检测技术方法。① 免疫复合物裂解检测法(Immune Complex Dissociation, ICD),标本先用盐酸或甘氨酸处理,使抗原抗体复合物分离以增加 P24 抗原的浓度。P24-ICD 的敏感性为 90%(另有报告为 6%~53%),对 HIV 阳性母亲的 1 月龄内儿童敏感性更低;特异性>95%(或>97%)^[15]。② 超敏感酶免疫测定法(Ultra-sensitive Enzyme Immunoassay)又称双位点免疫复合物转移酶免疫测定,基本技术路线是利用高亲和力抗体浓缩富集血清中的 P24 抗原,然后进行检测。该法可将下限延伸至 0.24pg/ml,缺点是对试剂要求高,需要一定仪器,操作复杂。③ 免疫吸附电泳法(ISEM),是将抗原与抗体的特异性与电子显微镜的高分辨力相结合,实现了对病毒颗粒的直接特异性检测,灵敏度高。但需昂贵仪器,操作复杂。④ 线性免疫酶测定 (Lineal Immunoenzymatic Assay) 和 Cobas Core HIV Combi EIA 是新近发展起来的第四代 HIV 检测试剂^[16]。一般来讲,第四代试剂检测 P24 抗原的敏感度(>30 pg/ml),不如单独检测 P24 抗原试剂的敏感度高(3~5pg/ml)^[4, 16]。目前最敏感的抗原检测试剂盒的检测阈值为 0.01pg/ml。

在《全国艾滋病检测技术规范》^[11]中,建议 P24 抗原检测的适用范围为:① HIV-1 抗体不确定或窗口期的辅助诊断;② HIV-1 抗体阳性母亲所生婴儿早期的辅助鉴别诊断;③ 第四代 HIV 抗原/抗体 ELISA 试剂检测呈阳性反应,但 HIV-1 抗体确认试验呈阴性者的辅助诊断;④ 监测病程进展和抗病毒治疗效果。

4.2.2 结果

结果报告和解释:① HIV-1 P24 抗原的阳性结果必须经过中和试验确认,若阳性标本的 OD 值比中和反应前减少 50%以上,才确定为 HIV P24 抗原结果阳性;② HIV-1 P24 抗原阳性仅作为 HIV 感染的辅助诊断依据,不能据此确诊;③ HIV-1 P24 抗原阴性结果只表示在本试验中无反应,不能排除 HIV 感染。

4.3 不同于传统队列法的检测早期感染和估测新发感染率的新技术

1998 年,Jassen 等人对 EIA 技术进行了改良,这种改良的 EIA 即低敏的 EIA(LS-EIA)方法(第一代 HIV 新感染检测 EIA 方法),可以检测出早期的 HIV 阳转血清,能够指明一个人是否在检测前的平均大约 130 天内发生血清阳转(产生 HIV 抗体)。该方法用于许多国家的 HIV 早期感染及发病率预测^[17-19]。由于该方法需要对样本进行大量的稀释(20 000 倍),且仅对 B 亚型感染较为适用,使其应用受到很大限制。为了弥补上述缺陷,近年来美国 CDC 研究了多亚型 HIV 新感染 EIA 检测方法,即 HIV-1 BED-EIA 试验(第二代新感染检测 EIA 方法),弥补了第一代试剂的不足。2001 年,Parekh 等^[19]把 HIV 的 B、E、D 亚型的 Gp41 合成肽连接起来,包被反应板,研究表明不仅对 B、E 亚型有相似的检测结果,而且对于 A、C、D 亚型的 HIV 样品也有较好的新发感染率估计,能够指明是否在检测前平均大约 160 天内发生血清阳转。HIV-1 BED 试验是一种定量的酶联免疫试验,由于血清阳转后 HIV-IgG 占总 IgG 的比例随之升高,

通过检测样本中的 HIV-1 特异性的 IgG 抗体相对于总 IgG 抗体的比例来确定 HIV-1 感染的时间。原理如图 3 所示。



图 3 BED-EIA 原理图

样品的 OD 值反映了 HIV-1 特异性的 IgG 抗体的高低,该方法可较好地地区分新发感染和长期感染^[20, 21]。该方法采用 96 孔板的形式,使用普通的洗板机和酶标仪,样本稀释倍数较小(1/100),并且只要特异性的 IgG 抗体相对于总 IgG 抗体的比例保持不变,稀释的变异对结果的影响不大。试验内设校准品和对照品进行质量控制,实验结果的 OD 值(光密度值)通常需要进行标化得到标准 OD 值进行结果的判断,从而减少了试验间的变异,精确性较高。在实验敏感性和特异性最佳状态时设定 OD-n 的临界值,OD-n 的临界值为 1 时,B、E 亚型血清阳转时间分别为 170 天和 150 天。研究还发现该实验与第一代新感染检测方法对 B 亚型有较好的一致性^[20]。该实验是以 HIV-IgG 占总 IgG 的比例为基础判断是否为新感染,由于个体间存在差异,因此该实验只应用于人群发病率的估计,而不适用于个体诊断。大约 2%~3% 长期感染的人群,包括 AIDS 病人,可被错分为新发感染。通常可以通过排除 AIDS 或 CD4 计数低的病人来提高实验的预测值。近年来用 BED-EIA 方法监测 HIV-1 发病率已应用于多种高危人群发病率的估计和危险因素的评价,如在泰国曼谷应用 BED-EIA 估计吸毒人群的发病率^[22, 23]。

我国国家参比实验室于 2004 年引进了该方法,已经完成方法学评价和预实验,结果显示该方法试剂盒内对照可重复性好、结果稳定、实验易于操作、系统误差小,已经完成经静脉吸毒的 HIV 感染者新感染检测的预实验(待发表)。该方法即将用于新感染检测及发病率估计,对于我国的艾滋病监测工作将发挥重要作用。

4.4 滤纸干血片检测 HIV 抗体及核酸研究进展

传统的 HIV-1 抗体检测是采集静脉血,分离出血清或血浆后进行抗体检测。近年来发展的滤纸干血样(DBSs) HIV-1 抗体检测方法弥补了传统方式样本采集、运输和储存等方面的困难,特别是在发展中国家和边远地区。由于滤纸干血样便于储存和运输,且具有很好的生物稳定性,已应用于 HIV 感染的检测^[24-27]。有研究报道,正确储存的干血滤纸片可以在至少 2 年内保持稳定。用滤纸干血样检测 HIV 抗体不会降低实验的敏感性和特异性^[28]。滤纸干血样在 35.8°C/湿度 73% 放置 6 天,用 ELISA 和 WB 检测敏感性分别是 100% 和 92%,特异性分别是 100% 和 100%^[25]。不过滤纸干血样在储存过程中,HIV-1 抗体的稳定性还是会受很多因素的影响,主要是储存的时间、温度和湿度^[25, 29, 30],其次还与样本抗体滴度有关。储存条件潮湿、温度高、时间长,会导致滤纸干血样的 OD 值下降程度较大;抗体滴度越低越

不稳定。

滤纸干血片不仅用于 HIV-1 抗体检测,还能用于 HIV-1 DNA 和 HIV-1 RNA 的定性和定量检测^[29,31]。取合适大小的滤纸干血片,提取 HIV-1 前病毒 DNA 作模板,选高度保守区域的基因作引物,进行巢氏 PCR 或实时荧光定量 PCR。传统的 HIV-1DNA 检测是以全血为样本,先从全血中分离外周血单个核淋巴细胞(PBMC),然后对细胞进行裂解,洗提、抽提和纯化 HIV-1 前病毒 DNA。检测过程繁琐,需配置相应设备,成本较高,给试验带来很大的局限性。滤纸干血片法和 PBMC 法相比,敏感性可达 90%,特异性可达 94%^[32]。固定其中的 DNA 具有显著的稳定性,滤纸干血片在温度 37℃、湿度 60% 条件放置 7 天或 22℃ 储存 12 周或冻融 2 次均不会对检测结果产生影响^[23];滤纸经纯化试剂和 TE 冲洗后,洗去了血红素等 PCR 抑制物;固定有 DNA 的滤纸直接放入 PCR 扩增体系,直接扩增,不会丢失 DNA 模板;不需离心机等设备,操作简便、省时;滤纸血样干燥后不再具有传染性^[33,34]或仅有低的生物危害性^[35]。该方法成本较低。但是同从新鲜全血中提取 HIV-1 前病毒 DNA 相比,是否会减少样本中前病毒 DNA 的含量,有待进一步验证。目前,该方法主要用于 HIV-1 阳性母亲所生婴儿的检测。年龄越小,前病毒 DNA 的含量越高。同 PBMC 的巢氏 PCR 比,敏感性可达 98.4%,特异性可达 98.3%^[34]。

目前,滤纸干血片 HIV 抗体检测方法在国内尚未见文献报道。2004 年国家艾滋病参比实验室开始研究干血滤纸片样品是否可替代血浆样品用于艾滋病病毒抗体检测。实验评价了滤纸干血片的保存温度、存放时间对检测结果的影响。实验表明,不同温度(-20℃、2℃~8℃、15℃~30℃)和不同时间(24 小时、3~5 天、2 周、1 个月)条件下,干血滤纸片与血浆样品 ELISA 检测结果比较, $p>0.05$,尚不能认为时间、温度对 ELISA 实验结果(OD 值)有影响。相同血样的干血滤纸片样品与血浆样品用 EIA 法检测,符合率为 100%,相关性为 0.919;两种样本经 WB 确认,条带完全一致的占总数的 42.85%,其中主要条带(至少有 2 条 env 带出现,或至少 1 条 env 带和 p24 带同时出现)的符合率为 100%^[36]。

滤纸干血片用于 HIV-1 前病毒 DNA 的检测国内仅有 1 篇报道^[37]。实验采集 12 例样本,结果是在室温下保存 28 周,在 4℃ 保存 34 周仍可检出 HIV-1 目的基因,敏感性可以达到检出 10 个靶 DNA 分子。国家艾滋病参比室为建立一种简单、经济、敏感、特异的滤纸干血片 HIV-1 型前病毒 DNA 的检测方法,2004 年已开始进行此方面的研究。采用巢氏 PCR 扩增,为了提高实验的敏感性,同时克服 PCR 的假阳性问题,用 3 对引物分别扩增。滤纸干血片样本和全血样本分别扩增,比较两种扩增结果。评价指标有滤纸干血片 HIV-1DNA 检测法的最低检测限、敏感性、特异性。此方法尚处于摸索阶段。

4.5 集合 RT-PCR 方法在 HIV 检测中的应用

由于核酸检测方法成本很高,为降低其检测成本,将多个样本集成为一个样本后进行,检测的方法称之为集合 RT-PCR 方法。该方法主要用于血液安全筛查和估计 HIV 的感染率或新发感染率两方面。有些国家和地区已经将病毒核酸检测纳入常规筛查中。最初在欧洲普遍流行 96 个样本集合检测^[38],随后更换成 48 个样本集合,直至目前的 24 个样本集合。转录介导的扩增系统(Transcription Mediated

Amplification, TMA)刚开始在美国 ARC 进行评估时是将 128 份血样标本集合起来检测,随后改成 16 人份集合。这样更改的原因,一是可以防止低拷贝的病毒阳性血液的漏检;二是集合样品增多。一旦发现阳性检测结果,进一步拆分集合样品,最终找到阳性血液标本的工作变得复杂耗时,有时还会影响正常的血液供应。

COBAS AmpliScreen HIV -1 test, version 1.5 (Roche Molecular System) 是为筛检 24 份血样组成的集合设计的。敏感度为 25c/ml, M 群的所有株系浓度在 20~200 个病毒粒子/ml 都可重复检测到。血浆样品中含有高浓度的血红蛋白、白蛋白、三甘油或胆红素,不影响测试结果。采用 Multi-prep 样本处理程序,可同时从血浆中提取 HIV-1、HCV、HBV 病毒粒子,提取的效率分别为 98%、23%~45%、59%。这种在一个样本处理程序中同时提取 3 种病毒的能力具有非常重要的实际意义,节省了劳动力。可缩短窗口期 2~14 天^[39]。

我国还没有把核酸检测作为血液的常规检测。任芙蓉等^[40]采取 24 个样本集合的方法(1:1, 1:6, 1:24)对献血者血样进行核酸测定,为减少由于样品集合造成的灵敏度下降,采用超离心浓缩病毒、Roche 核酸提取柱提取病毒核酸,进行 HIV 和 HCV 核酸扩增分析,结果提示集合样本的核酸检测体系适用于献血者血液病毒筛查。在非洲撒哈拉地区献血员献血前需用快速法检测 HIV、HCV 和 HBV,一研究采用 10 份血清样本集合的核酸检测来评估其筛查效率。阳性集合拆分到单份核酸阳性样本,并用病毒基因鉴定来验证。研究者建议在献血前做血清学快速检测,献血后以 10 个样本集合做核酸检测^[41]。

由于急性感染者 HIV RNA 水平很高,即使样本稀释,在大量集合中仍能检测到,故可以用这种方法找到 HIV 急性感染者,并可根据 Brookmeyer R^[42]的公式计算 HIV 的新发感染率。这种方法比队列研究节省人力和物力,更少涉及伦理问题和偏倚问题。Quinn 等^[43]证明多阶段集合方法检测 HIV-1 RNA 比 p24 抗原检测更敏感,他们采用 1:1, 1:10, 1:50, 1:100 的四阶段集合方式,比 p24 抗原检测节省了 34.4% 的费用,非常适用于发展中国家。

国家艾滋病参比实验室建立了 50 份样本三阶段集合的方法,并在吸毒严重地区的静脉吸毒人群中进行了初步应用,结果证明该方法可以在该高危人群中检出口期感染者,并计算出新发感染率(结果待发表)。

4.6 新一代病毒载量检测技术

Nuclisens Easy Q HIV-1 为新一代定量检测 HIV-1 RNA 方法,国家参比实验室对 Nuclisens Easy Q HIV-1 和传统的 NASBA 病毒载量方法进行了比较研究。结果在 98 份临床标本中,用上述 2 种方法共同检测出 81 份阳性样本、12 份阴性样本,2 种方法的符合率为 94.9%(93/98),相关系数为 0.882 ($p<0.01$),且 2 种方法对 8 种不同亚型的 HIV-1 RNA 均能检出。Nuclisens Easy Q HIV-1 在检测低、中、高 3 个浓度的批内变异系数分别为 8.6%、3.6%和 3.2%。证明 Nuclisens Easy Q HIV-1 病毒载量法与 NASBA 有良好的相关性和亚型敏感性,并且有简便、快速、防污染和重复性好等优点^[44]。

5 艾滋病实验室检测质量保证与质量控制

为了保证艾滋病检测质量和检测结果的可靠性,经过

多年的努力和尝试,我国已经建立了一套较完整的艾滋病检测质量保证与质量控制体系,包括对检测人员的技术培训、对实验室实行严格的验收和考核制度、对 HIV 诊断试剂进行质量评价和监督。

5.1 定期的人员培训

各级艾滋病检测实验室均实行培训上岗制度,确证实验室技术人员需接受国家参比实验室培训,筛查实验室技术人员需接受省级确认中心实验室技术培训。国家参比实验室每年至少举办 1~2 次全国 HIV 检测常规技术及新技术培训班。各省确认中心实验室每年至少举办 1 次省级 HIV 检测技术培训班。2004 年全国共举办 4 期国家级培训班、133 期省级培训班,受益人数超过 7 000 人次。

5.2 严格的实验室验收和考核制度

5.2.1 实验室审批

《全国艾滋病检测工作规范(1997)》^[45]对申请建立艾滋病检测实验室单位的技术人员、环境条件和检测设备均有明确要求。拟申请艾滋病检测实验室的单位,须经有关部门审核批准。

5.2.2 实验室考核

我国的艾滋病检测实验室实行分级管理,即国家参比实验室对确证实验室进行考核,各省确认中心实验室对辖区内的筛查实验室进行考核。考核包括检测技术考核,即实验室能力验证(PT)和职能工作考核。目前,国家艾滋病参比实验室组织的国家级 PT 包括 HIV 抗体检测能力验证和 CD4 细胞检测能力验证,病毒学检测能力验证将于 2005 年正式启动。所有确证实验室参加国家参比实验室组织的国家级考核,2004 年参加考核的实验室有 57 个,全部通过。参加国家级 CD4 细胞检测能力验证的实验室有 50 个,46 个实验室获得满意结果,其余 4 个结果为不满意。筛查实验室参加由各省确认中心实验室组织的省级 HIV 抗体检测能力验证,2004 年全国共组织省级考核 53 期,2 320 个筛查实验室参加了考核。职能工作考核包括实验室问卷调查及现场抽查,2004 年对 8 个确证实验室和 743 个筛查实验室进行了现场督导和检查。通过年度检测技术及职能工作考核,有力地促进了实验室质量管理,保障了检测质量,提高了检测的准确性。

5.3 对 HIV 检测试剂进行监督与考核

每年由国家参比实验室组织部分考核成绩优秀的确证实验室,对国内市场上流通的进口及国产 HIV 诊断试剂进行临床质量评估,评估结果公布在艾滋病信息及中国 CDC 网页上。用户将根据评估结果选择使用质量优良的试剂。通过评估保障 HIV 抗体检测实验室尽可能使用高质量的试剂,同时有力地促进了试剂生产厂家不断提高诊断试剂质量。

6 未来展望及挑战

由于我国的经济水平有限,科学技术仍处于发展阶段,加之艾滋病自身的特点,我们面临着巨大的挑战。迫切需要进一步完善检测技术方法,特别是建立 HIV 感染窗口期及早期感染监测模式,完善可及性更高的检测策略,做到早发现、早预防、早治疗;在加强艾滋病监测的同时,应积极开展性病、结核病和肝炎病毒等的检测,探索综合监测模式;研究和开发较为经济的病毒载量和 CD4 细胞检测技术,在更

大范围内持续开展艾滋病抗病毒治疗。同时,为保证实验室检测技术有效地服务于艾滋病防治工作,还需不断地完善和提高实验室质量保证及质量控制体系。展望未来,我们相信,在政府、国际组织和广大艾滋病工作者的共同努力下,艾滋病实验室检测工作会取得长足的发展和进步。

(致谢:本文在撰写过程中得到了国家参比实验室许文燕、李秋荣、刘波和冯基刚的大力支持,在此表示衷心的感谢。)

参考文献(References)

- [1] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范 (2004 年版)[S]. 2004-08
- [2] 中国疾病预防控制中心. 2004 年全国 HIV 抗体诊断试剂临床质量评估结果[R]. 2004
- [3] 中国疾病预防控制中心. 2003 年全国 HIV 抗体诊断试剂临床质量评估结果[R]. 2003
- [4] 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
- [5] 中华医学会. 艾滋病诊疗指南[S]. 2005, 9~10
- [6] WHO/CDS/CSR/EDC/2000.5. UNAIDS/00.03E. 2000. UNAIDS/WHO. Operational characteristics of commercially available assays to determine antibodies to HIV-1 and/or HIV-2 in human sera. Report 11[R]. January 1999
- [7] UNAIDS/WHO Recommendations. The importance of simple/rapid assays in HIV testing [J]. *Weekly Epidemiological Record*, 1998, (73): 321~328
- [8] Branson B, Woehrle T, Fridlund C, et al. Performance of newer whole-blood rapid tests for HIV antibody [abstract] [R]. In Program and abstracts of the Association of Public Health Laboratories Conference on Laboratory Aspects of Human Retrovirus & Hepatitis C Testing. Charlotte. North Carolina: Association of Public Health Laboratories 2000
- [9] Tam M R. Serological and biomolecular detection of human immunodeficiency virus types 1 and 2. Seattle (WA): Program for Appropriate Technology in Health (PATH) [Z]. June 1999
- [10] Downing R G, Otten R A, Marum E, et al. Optimizing the delivery of HIV counseling and testing services [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998, 18 (4): 384~388
- [11] Kassler W J, Alwano-Edyegu M G, Marum E, et al. Rapid HIV testing with same-day results: A field trial in Uganda [J]. *Int J STD AIDS*, 1998, (9): 134~138
- [12] Mujurizi T, Alwano-Edyegu M G, Biryahwaho B, et al. Performance of a rapid HIV testing algorithm for same day results at the AIDS Information Centre [C]. Uganda. Presented at: 12th World AIDS Conference, Geneva. Abstract 43109, June 28~July 3, 1998
- [13] 刘波,蒋岩. HIV 感染确诊的免疫印迹试验的替代检测策略(综述)[J]. 中国艾滋病性病杂志, 2005, 11(3): 236~238
- [14] 刘波,强来英,蒋岩,等. HIV 感染检测的替代检测策略的研究[J]. 中国艾滋病性病杂志, (待发表)
- [15] Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, et al. The first large-scale nucleic acid amplification testing (NAT) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and significance of NAT for HBV [J]. *Microbiol Immunol*, 2001, 45 (9): 667~672
- [16] Guay LA, Hom DL, Kabenger SR, et al. HIV-1 ICD p24

- antigen detection in ugandan infants: use in early diagnosis of infection and as a marker of disease progression [J]. *J Med Virol*, 2000, (62): 426~434
- [17] Janssen R S, Satten G A, Stramer S L, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes [J]. *JAMA*, 1998, (280): 42~48
- [18] Young C L, Hu D J, Byers R, et al. Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the bioMerieux Vironostika-LS assay for detecting recent HIV-1 subtype B or E infection in Thailand [J]. *AIDS Res Hum Retrovir*, 2003, (19): 481~486
- [19] Parekh B S, Hu D J, Vanichseni S, et al. Evaluation of a sensitive/less-sensitive testing algorithm using the 3A11-LS assay for detecting recent HIV seroconversion among individuals with HIV-1 subtype B or E infection in Thailand [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, (17): 453~458
- [20] Parekh B, Dobbs T, Pau C-P, et al. Quantitative detection of increasing HIV-1-antibodies following seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence [J]. *AIDS Res Hum Retroviruse*, 2002, (18): 295~307
- [21] Parekh B, Kennedy S, Dobbs T, et al. A New Laboratory Assay to Detect Recent HIV-1 Seroconversion among People Infected with Diverse HIV-1 Subtypes for Use in Incidence Estimates[R]. National HIV Prevention Conference. Atlanta, 2001
- [22] Hu D J, Vanichseni S, Mock P A, et al. HIV-1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: Use of the IgG Capture BED enzyme immunoassay [J]. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2003,(19): 727~730
- [23] Parekh B S, McDougal J S. New approaches for detecting recent HIV-1 infection[J]. *AIDS Rev*, 2001, (3):183~193
- [24] Jourbert J J, Dewar J B, Weinberg J, et al. A cost-effective particle agglutination assay to detect viral antibodies in dried blood spots—a simple solution to HIV and HCV screening[J]. *Cent Afr J Med*, 2003, 49(11~12): 127~130
- [25] Solomon S S, Solomon S, Rodriguez II, et al. Dried blood spots (DBS): a valuable tool for HIV surveillance in developing/tropical countries [J]. *Int J STD AIDS*, 2002 Jan, 13 (1): 25~8. Guay LA, Hom DL, Kabenger SR, et al. *J Med Virol*, 2000, (62): 426~434
- [26] Kakizawa J, Ushijima H, Oka S, et al. Detection of human immunodeficiency virus-1 DNA, RNA and antibody, and occult blood in inactivated saliva: availability of the filter paper disk method[J]. *Acta Paediatr Jpn*, Jun,1996 , 38(3): 218~223
- [27] Pappaioanou M, Kashamuka M, Behets F, et al. Accurate detection of maternal antibodies to HIV in newborn whole blood dried on filter paper[J]. *AIDS, Apr*, 1993 , 7(4): 483~488
- [28] Chanchancherd P, Brown A E, Trichavaroj R, et al. Application of Dried Blood Spot Specimens for Serologic Subtyping of human immunodeficiency virus Type 1 in Thailand[J]. *JCM*, 1999, 37(3): 804~806
- [29] Behets F, Kashamuka M, Pappaioanou M, et al. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood dried on filter paper and stored under various tropical conditions in Kinshasa, Zaire[J]. *Clin Microbiol*, May, 1992, 30 (5): 1 179~1 182
- [30] Arya S C. Stability of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in whole blood-impregnated filter papers under various tropical conditions[J]. *Clin Microbiol*, 1993, 31(3): 765~766
- [31] Brambilla D, Jennings C, Grace A, et al. Multicenter Evaluation of use of dried blood spots and Plasma Spot specimens in Quantitative Assays for human immunodeficiency virus RNA Measurement, precision, and RNA Stability [J]. *JCM*, 2003, 41(5): 1 888~1 193
- [32] Fischer A, Lejczak C, Lambert C, et al. Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda[J]. *J Clin Microbiol.*, 2004, 42 (1): 16~20
- [33] Panteleeff D D, John G, Nduati R, et al. Rapid Method for Screening Dried Blood Samples on Filter Paper for Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA [J]. *JCM*, 1999, 37 (2): 350~353
- [34] Beck I A, Drennan K D, Melvin A J, et al. Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B DNA in Dried Blood Samples for Diagnosis in Infants in the Field [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 (1): 29~33
- [35] Cassol S S, Salas T, Arellam M, et al. Use of Dried Blood Spot Specimens in the Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by the Polymerase Chain Reaction [J]. *JCM*, 1991, 29 (4): 667~671
- [36] 臧希慧,佐拉,张麒,等. 干血滤纸片样品用于 HIV 抗体检测的研究[J]. 中国艾滋病性病杂志(已接收)
- [37] 王斌,鲁晓晴,路永波,等. 干血滤纸片中人免疫缺陷病毒 1 型前病毒基因的检测 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1998,12(3):281~284
- [38] Roth W K, Buhr S, Drosten C, et al. NAT and viral safety in blood transfusion[J]. *Vox Sanguinis*, 2000, 78(suup12): 257~259
- [39] Yang Y F, Lamendola M H, Mendoza M, et al. Performance characteristics of the COBAS AmpliScreen HIV-1 test, version 1.5, an assay designed for screening plasma mini-pools [J]. *Transfusion*, 2001, (41): 643~651
- [40] 任芙蓉,刘长利,吕秋霜,等. 病毒核酸检测在献血者血液筛查中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 596~599
- [41] Owusu-Ofori S, Temple J, Sarkodie F, et al. Predonation screening of blood donors with rapid tests: implementation and efficacy of a novel approach to blood safety in resource-poor settings[J]. *Transfusion*, 2005, 45(2): 130~132
- [42] Brookmeyer R. Analysis of multistage pooling students of biological specimens for estimating disease incidence and prevalence[J]. *Biometrics*, 1999,(55): 608~612
- [43] Quinn T C, Brookmeyer R, Kline R, et al. Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA to diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence [J]. *AIDS*, 2000,14: 2 751~2 757
- [44] Yao jun, Liu zhen, Lung-sang-Ko, et al. Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSens EasyQ HIV-1 assay [J]. *Journal of virological methods*. (Accepted)
- [45] 中华人民共和国卫生部. 全国艾滋病检测工作规范(1997)[S]. 1997-09, 1~3