



第二届全国现代免疫诊断技术学术研讨会 论文汇编

中华医学会微生物学与免疫学分会
中华预防医学会生物制品分会

二零零五年十月 中国长沙

第二届全国现代免疫诊断 技术学术研讨会

论 文 汇 编

中华医学会微生物学与免疫学分会

中华预防医学会生物制品分会

2005 年 10 月 中国长沙

中华医学会微生物学与免疫学分会

免疫诊断技术专业学组专家名单

组 长：尹红章

副组长：王佑春 邢文革 王兆强

成 员：李银太 祁自柏 李敬云 曾 明 刘保奎

杜 轶 王 缦 张 誌 高东英 章金刚

康熙雄 吴国球 储迅涛 毕胜利

秘 书：李秀华

办公地点：中国药品生物制品检定所细胞室

日常工作负责人：李秀华

电话：010-67017755-415

传真：010-65113538

E-mail: lixihua2005@163.com

地址：北京天坛西里 2 号

邮编：100050

前 言

免疫诊断技术发展迅速，国内外不断研究出新技术和新方法应用于临床诊断和疾病的检测，为了解国内外的研究动态和发展方向，加强有关学科的交流 and 沟通，促进我国免疫诊断技术的研究、开发、生产和应用，中华医学会微生物学与免疫学分会、中华预防医学微生物制品分会于 2005 年 10 月在长沙联合召开第二届全国现代免疫诊断技术学术研讨会，大会邀请了国内外知名专家作大会专题报告。

本次大会在各有关领域专家学者的帮助下共计收集了 209 篇文章，其内容包括疾病诊断中新检测物和标志物、体液和细胞免疫、核酸诊断技术、蛋白芯片和基因芯片、诊断技术自动化、SARS 和禽流感等新发性传染病诊断技术的发展等。其领域涉及大专院校、科研单位、医疗机构、采供血机构、疾病预防控制机构、检验检疫机构以及生物制品、试剂和相关仪器的生产单位等。

在中华医学会微生物学与免疫学分会和中华预防医学会生物制品分会的支持下，通过会议筹备组工作人员的努力，本次大会的顺利召开定能为广大的科研、生产及临床技术人员提供良好的交流机会，同时也希望我们携手共创我国诊断技术发展的新局面。

在此次大会筹备的过程中，得到了全国医药、医疗、血站、农业、食品卫生、计划生育、科研、生产等许多单位及技术人员的大力支持，在此向支持本次大会的各位领导和同志们表示衷心的感谢！

同时也对给予帮助和支持的中华微生物学和免疫学杂志、微生物学与免疫学进展、临床输血与检验杂志、临床检验杂志、检验医学（原上海医学检验杂志）、中国生物制品学杂志等杂志社表示衷心的感谢！

第二届全国现代免疫诊断技术学术研讨会大会筹备组

2005. 9. 16

目 录

一、专家

禽流感病毒检测试剂的发展方向·····	1
HCV 新型 C 蛋白与丙型肝炎免疫诊断·····	2
体外诊断试剂的生产及质量管理·····	5
SARS 实验室诊断的研究策略·····	7
原料血浆病原体核酸检测技术的应用及其管理·····	10
蛋白质组学的临床应用·····	15
肿瘤检测试剂的研究方法和技术·····	17
肿瘤标志物及临床应用·····	22
诊断试剂的临床验证和评价的原则及要求 (多媒体略)	
细胞免疫和体液免疫技术在疫苗评价中的应用 (多媒体略)	
蛋白芯片和基因芯片的研究进展 (多媒体略)	
诊断试剂的生产及质量管理 (多媒体略)	
诊断试剂的规范化使用 (多媒体略)	

二、血源筛查

1445 份可疑血液标本再检结果分析·····	28
红细胞免疫与临床输血·····	30
ELISA 方法检测传染病标志物的阳性拖带现象·····	33
血液集中化检测模式中试剂选择·····	36
输血前受血者 9 项血清学指标检测·····	38
抗 E 致配血不合 2 例·····	41
西安市无偿献血者 SEN 病毒 D 亚型感染的分布特征及西安株的序列分析·····	42
国产与进口抗-HCV ELISA 试剂盒对无偿献血者筛检价值比较·····	46
新喋呤检测将会是我国血液检测中必不可少的一个项目·····	49
NAT 技术筛查血液后输血传播病毒感染的残余危险·····	52
血液全自动核酸筛查及阳性献血源追踪的研究·····	56
人工红细胞制品毒性实验与组织学变化研究·····	60
NAT 血筛试剂的质量评估及其在血筛中的初步应用·····	65
人类免疫缺陷病毒/丙型肝炎病毒抗体联合检测试剂盒在献血员、人群大规模筛查中的应用·····	76
血液筛查中梅毒实验方法适用性探讨·····	81

全自动检测在血液筛查凝集试验中的应用·····	85
在外采车上开展金标 HBsAg/TP 检测的研究·····	89
FAME24/20 中两步法 ELISA 试剂工作表的优化设计与应用·····	91
供血者 ALT 检测的几点意见·····	95
利用微板法实现血型正反定型·····	96

三、应用检测技术

ELISPOT 国际标准参照多肽池 CEF 对中国人 PBMC 的刺激以及 建立国内标准 ELISPOT 质控系统的设想·····	98
POC 与 ELISA 检测的临床对比考证及 POCT 在中国的应用前景·····	107
酶联免疫破伤风抗体定量试剂的研制及应用·····	110
HCV 聚合酶作用模板及酶浓度对 HCV 细胞外聚合酶模型的影响·····	116
发光试剂与酶联免疫试剂检测丙型肝炎抗体的临床评价·····	122
丙型肝炎病毒抗体试剂检测结果的可信度分析·····	125
BEPⅢ一例特殊故障的排除·····	130
乙型肝炎病毒核酸检测及基因分型与临床·····	131
BC ELISA 定量检测人表皮生长因子试剂盒的研制及初步应用·····	132
心肌肌钙蛋白 I 两种全自动检测方法的比较分析·····	137
部分自身抗体的检测及其在疾病诊疗中的临床应用·····	142
地高辛标记引物酶显色法检测 HBV 基因多态性应用体会·····	146
¹ 类风湿性关节炎患者外周血 T 淋巴细胞 Ag-NORs 及 T 亚群的变化·····	148
白介素 18 与冠心病·····	152
丙型肝炎病毒抗原 ELISA 检测方法的初步建立·····	154
汉坦病毒 Z10 株 N 蛋白的表达及其在 HFRS 早期诊断中的应用·····	159
一种新的截短的 HSV-Ⅱ gD 重组抗原的制备及特异性鉴定·····	164
血清 CA125 和 CEA 的检测在妇科肿瘤诊治中的临床价值·····	170
100 例儿童幽门螺杆菌感染多方法检测分析·····	175
系统性红斑狼疮患者巨噬细胞诱导的趋化因子与细胞免疫的相关性·····	179
反复呼吸道感染患儿 T 亚群和血清 IL-2, sIL-2R 的检测及临床应用·····	183
滤纸干血样用于 HIV-1 抗体检测·····	186
贵州省 16 例 HIV-2 可疑感染者的血样分析·····	188
幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位特异性抗体检测方法的建立与评价研究·····	194
抗 SARS 刺突蛋白单克隆抗体的制备和鉴定·····	200
DNA chip 的基本原理及其在疾病检测中的应用·····	203
乙型肝炎病毒 Pre-S1 蛋白与 HBV 血清标志物的相关性探讨·····	207
HIV 感染诊断替代检测策略现场应用评价设计中的相关问题探讨·····	209

心肌酶及肌钙蛋白 I 在射频消融术前后变化的意义·····	214
霍乱弧菌 O139 实时荧光 PCR 检测方法的建立及应用·····	217
肿瘤主动免疫治疗的细胞免疫应答——细胞免疫应答的测定与临床治疗关系·····	221
两种方法检测肺炎支原体抗体的结果分析·····	229
医学病毒属水平基因芯片检测探针数据库的建立·····	231
丙肝病毒感染抗体阴性“窗口期”系列样品核心抗原检测·····	232
实时 RT-PCR 在黄病毒和甲病毒检测中的应用 ¹ ·····	236
英科新创乙型肝炎病毒表面抗原/梅毒螺旋体联合全血金标试纸条在无偿献血筛选中的应用·····	242
建立一种简便细菌金属 β -内酰胺酶筛选方法·····	248
阴沟肠杆菌 TEM-1 型 β -内酰胺酶的质粒传播·····	253
¹ 血清Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原、透明质酸及层粘蛋白在乙型肝炎检测中的意义·····	257
过敏性疾病相关实验室检查的进展·····	259
微球技术在检验医学中的应用·····	260
检测细胞凋亡几种染色方法的对比研究·····	261
流式细胞仪检测小鼠 Th1/Th2 型细胞因子的表达·····	262
人破伤风类毒素特免血浆筛选试验中两种抗体检测方法的比较·····	263
应用PCR-CE-RFLP方法快速诊断女性生殖道细菌的研究·····	267
抗HCV阳性标本的分片段抗体确认研究·····	275
BN prospec 比色血清洗剂的研制·····	279
乳腺珠蛋白基因的克隆及重组蛋白的表达和纯化·····	282
人乳腺珠蛋白 mRNA FQ-PCR 检测方法的建立及对乳腺癌微小转移的研究·····	288
Epstein-Barr病毒与IL-8、MCP-1关系研究·····	295
低密度脂蛋白胆固醇清除法试剂研制及应用·····	297
人类免疫缺陷病毒 2 型 gp36 抗原的表达和应用·····	302
两种戊型肝炎病毒 IgM 抗体捕获法诊断试剂盒在新疆地区的临床应用分析·····	307
DNA 芯片联合检测耐利福平和异烟肼分枝杆菌及其临床应用·····	309
用酶联免疫与微粒子酶免疫两种方法检测血清乙型肝炎病毒核心抗体 IgM 的临床应用评价·····	315
不同位点抗 HBeAg 单克隆抗体杂交瘤细胞株的制备和应用·····	318
两种方法检测甲胎蛋白的比较·····	323
血清和脑脊液中 β 2-微球蛋白 (β 2-MG) 和超敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 的测定 在中枢神经系统疾病中的临床意义·····	326
毛细管电泳技术的临床应用及进展·····	327
心脑血管疾病标志物蛋白质组学研究进展·····	328
酶标法普通光学显微镜检测抗核抗体的临床应用·····	329
两种免疫分析仪检测血浆同型半胱氨酸含量的方法比较·····	330

血清和脑脊液中腺苷脱氨酶 (ADA) 水平变化对于神经系统疾病诊断价值的探讨	331
液体芯片技术进行肿瘤标志物检测的应用研究	322
脂肪因子与妊娠糖尿病	333
IFN γ - ELISPOT 检测 HCV 患者外周血单个核细胞 (PBMC) 对表位合成肽的反应	334
肝癌患者纤维蛋白原和 D-二聚体的检测及其临床意义	337
戊型肝炎病毒重组抗原的研制及其在抗 HEV-IgM 试剂盒中的应用	341
病毒性肝炎病人重叠感染对其肝功能影响的探讨	345
真菌感染后的保护性体液免疫研究进展	347
乙型肝炎病毒 e 抗原相互作用蛋白基因的克隆化及功能的初步研究	352
HIV-1 p24 抗原检测方法的建立及初步应用	357
人类免疫缺陷病毒抗原抗体联合检测方法的建立及初步应用	358
HBV DNA 定量分析、乙肝血清学标志、前 C/C 变异的相关性及其临床意义的研究	359
磷霉素对腹泻病原菌的敏感性及其疗效分析	360
慢性肝病腹水全自动细菌培养结果分析	363
梅毒和梅毒诊断试剂	366
EHEC O157:H7 志贺样毒素 II 结合亚单位 Stx2B 的基因克隆、表达与纯化	368
人乳头瘤病毒分型基因芯片的制备及应用	374
抗 Hp UreB 与 HpaA 蛋白单克隆抗体的制备及特性鉴定	380
多肿瘤标志物蛋白芯片技术在肺癌中的应用探讨	386
免疫胶体金定量测定尿微量白蛋白的研究	390
应用高效毛细管电泳对血清中 M 蛋白的筛检和鉴定	496
荧光定量 PCR 技术及其在病毒诊断上应用	403
荧光实时定量 PCR 检测铜绿假单胞菌外膜蛋白 oprI 基因的标准品的构建	409
抗曲霉菌半乳糖甘露聚糖单克隆抗体的制备与鉴定	416
免疫芯片的研究与应用现状	421
幽门螺杆菌感染与脑梗死的关系探讨	425
三种免疫学检验新方法	426
乙型肝炎病毒 e 抗原免疫层析快速检测试剂盒的研制	430
抗 SARS-CoV 卵黄免疫球蛋白 IgY 的制备研究	434
抗吗啡多克隆抗体的制备	440
酸碱度 (pH) 对对硝基酚 (PNP) 呈色反应研究及应用	444
HIV 耐药性检测方法与应用	448
壳聚糖-hVEGF ₁₆₅ 基因纳米粒的制备及转染心肌细胞的研究	453
208-星形胶质细胞对鱼藤酮致多巴胺能神经元损伤的保护作用研究	454
超抗原及其融合蛋白抗肿瘤免疫效应的研究进展	455
抗狂犬病毒糖蛋白三明治单克隆抗体的制备	461
化学发光免疫测定 PSA 及其临床应用	465

干燥血 HIV 核酸提取方法的进展·····	469
四种常见性病的实验室诊断方法研究进展·····	472
胶体金免疫层析条法检测沙门氏菌 O ₃ 抗原的研究·····	476
直接 ELISA 和 PCR 相结合快速检沙门氏菌的研究·····	482
减毒鼠伤寒沙门氏菌运送 CD8 ⁺ T 细胞表位的细胞免疫应答·····	487
基因芯片检测奶牛乳房炎主要致病菌的方法研究·····	493
心脏移植受者一例 HLA-G5 水平的动态观察·····	498
O 型口蹄疫病毒 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及其抗原识别位点的初步分析·····	502
编码 SARS 主要结构基因 S,M 和 N 的核酸疫苗在小鼠模型中的免疫研究·····	503
口蹄疫病毒三价核酸疫苗分子设计与免疫原性研究·····	504
口蹄疫病毒 3ABC 基因截短体在毕赤酵母中表达及鉴定*·····	505
HIV-1 与 HIV-2 二价重组鸡痘病毒疫苗研究·····	506
抗人凝血因子Ⅶ单抗的制备与初步应用·····	507
抗人红细胞 H 抗原非凝集型单抗可变区基因的克隆与分析·····	509
绵羊乙型肝炎病毒的检测和鉴定·····	515
鼠抗猪 IgM 单克隆抗体的制备及简单应用·····	519
乙肝两对半检测结果准确性评价·····	521

四、制品评价

评价 HFRS 疫苗效果的攻击毒株的选择·····	522
ELISA 法检测疫苗中牛血清残留量的适用性研究·····	524
对 HIV 抗体快速检测试剂的临床评价·····	528
人类免疫缺陷病毒 I 型和丙型肝炎病毒核酸联合检测试剂的评价·····	531
丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂的临床评价·····	535
双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体酶联免疫试剂临床评价·····	539
基于结核分枝杆菌 16KD、38KD 重组蛋白为抗原的血清学鉴定方法评价·····	541
超敏感 C-反应蛋白 (hsCRP) 定量测定试剂盒评估及临床应用·····	547
HIV-1 核酸扩增 (PCR) — 荧光定量检测试剂盒的临床应用评价·····	551
HIV 抗原/抗体检测试剂诊断 HIV 感染的效果评价·····	555
不同梅毒螺旋体抗体诊断试剂盒检测结果的比较·····	560

五、流行病学调查及病历报告

郑州市民办学校中小學生 HBsAg 携带率和抗-HBs 水平状况分析·····	563
破伤风抗体酶联免疫诊断试剂盒的临床考核及人体破伤风抗体水平调查·····	565
吸毒人群中 HIV/HCV 核酸和抗体关系的分析·····	567
第四代 HIV 抗原抗体联合诊断试剂检测静脉吸毒人群样本结果分析·····	570

我区在冬季首次检出 O ₁₃₉ 群霍乱弧菌·····	574
无锡地区慢性乙型重型肝炎基因型和核苷酸多态性分析·····	577
海南岛“不明热”病人血中虫媒病毒的分离鉴定及其抗体调查·····	580
艾滋病合并马尔尼菲青霉菌感染一例·····	585
90 例小儿 HCV 感染患者血清型与基因型分布特点初探·····	588
北京地区近 50 年来沙门菌流行病学的特征·····	592
成都地区无偿献血者中巨细胞病毒抗体调查·····	597
B(A)亚型一例的探讨分析·····	600
1998 年至 2005 年新疆昌吉州献血员 HIV 检测报告·····	602
3 例抗-HIV 阳性献血者报告·····	604
不同病期 HIV-1 感染者的病毒学和免疫学研究·····	606
贵州省织金县性服务小姐 HIV 感染状况及行为相关知识调查·····	611
流感复合多表位核酸疫苗的初步研究·····	614
抗酸杆菌引起双跟骨结核一例·····	615
智力低下小儿血同型半胱氨酸水平检测及意义·····	616

六、动植物病原检测

检测猪圆环病毒 DNA 的竞争定量 PCR 方法的建立及初步应用·····	618
猪繁殖与呼吸综合征胶体金抗体检测技术的建立和初步应用·····	625
猪圆环病毒引起的断奶后多系统衰竭综合征诊断方法标准的建立·····	631
猪圆环病毒诊断技术研究进展·····	641
禽流感病毒抗体胶体金检测方法 with 试剂的研制·····	646
禽流感发生的流行病学分析·····	654
禽流感和新城疫流行病学调查·····	660
肿瘤“病毒治疗”的新纪元—新城疫鸡瘟病毒(NDV 修饰自体肿瘤细 胞疫苗特异性主动免疫治疗·····	666
胶体金免疫层析试纸条法与血凝抑制试验、琼脂扩散法检测禽流感病毒抗体的比较研究*·····	672
重组 N 蛋白抗原检测 PRRSV 抗体 ELISA 的研究 IV. ELISA 方法与 Western blot 的比较·····	677
重组 N 蛋白抗原检测 PRRSV 抗体 ELISA 的研究 I. ELISA 方法的初步建立及其标化·····	681
重组 N 蛋白抗原检测 PRRSV 抗体 ELISA 的研究 III. ELISA 试剂盒的制造及保存期试验·····	694
重组 N 蛋白抗原检测 PRRSV 抗体 ELISA 试剂盒的研究*II.试剂盒阴阳性临界值的测定及 其与 IDEXX 公司试剂盒的比较·····	702
SARS-CoV S 蛋白 B 细胞优势表位的筛选·····	715
H5N1 亚型禽流感病毒 NS1 基因的克隆及表达·····	723
新城疫、禽流感及高致病型禽流感荧光 PCR 检测方法的建立和初步应用·····	729
猪瘟荧光定量 PCR 检测方法的建立·····	735

用牛分枝杆菌融合蛋白建立间接 ELISA 方法·····	739
单克隆抗体夹心 ELISA 检测 SARS 病毒抗原的探索·····	744
RT-PCR 检测猪瘟病原方法的建立及应用·····	749
鸡补体分子 C3d 的基因克隆及结构分析*·····	752
抗 A 型禽流感病毒核蛋白特异性单克隆抗体的研制及其特性·····	760
应用基因芯片检测禽常见病毒的研究*·····	766
鸡新城疫病毒荧光双链引物实时荧光 PCR 检测方法的研究·····	771
猪圆环病毒 II 型 PCR 方法的建立及应用·····	777
RT-PCR 检测猪繁殖与呼吸综合征病原方法的建立及应用·····	781
口蹄疫二价重组鸡痘病毒疫苗的构建及其免疫原性研究*·····	785
禽流感病毒 H ₇ 亚型血凝素单克隆抗体的制备·····	786
五指山猪、巴马小型猪中内源性反转录病毒存在与表达的检测·····	787

七、实验室质量管理及生物安全

做好室内质控 保证血液安全·····	792
ELISA 室内质控数据直线回归实时分析方法的建立及初步应用·····	794
质量控制在血液免疫检测中的重要作用·····	799
2004 年广东省免疫学检验室间质评与室内质控总结·····	801
艾滋病实验室管理技术与常见的问题·····	804
免疫学室间质评中的生物安全防护·····	807
梅毒螺旋体抗体诊断试剂国家参考品(第二套)的研制·····	809
微生物检验的安全问题(讲座稿摘要)·····	816
高能微波辐照 AHH1 细胞早期损伤指标·····	818
乙肝患者血清 HBV-DNA 与乙肝标志物相关性分析·····	821
血站检验科预防医源性感染的措施·····	823
土拉热菌胶体金法快速检测盒的研制·····	825
生物恐怖及其生物战剂的侦检进展·····	830
生物安全实验室—生物世纪的避雷针和加速器·····	837

禽流感病毒检测试剂的发展方向

田克恭

农业部兽医诊断中心

(北京市海淀区圆明园西路2号 100094)

4 禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒 (Influenza Virus Type A) 引起的禽类的急性、烈性传染病, 其特征从低致病性毒株引起的禽类轻度呼吸疾病、产蛋下降到高致病性毒株引起的急性致死性等多种形式。

高致病性禽流感是世界动物卫生组织 (OIE) 规定的 A 类动物传染病, 我国动物防疫法也将此病例为一类动物疫病。该病在全世界范围内均有发生, 不仅给养禽业生产带来严重危害, 而且近年来发生的多起高致病性禽流感疫情, 导致人感染发病和死亡, 直接威胁公共卫生和人类健康, 因此, 国际组织和各国政府对其都极为重视, 投入了大量的人力、物力开展检测技术与试剂的研究工作。

目前, 常规血清学试验方法包括琼脂扩散试验 (AGID)、血凝抑制 (HI) 试验、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等, 快速病原筛查方法包括免疫胶体金试纸和免疫荧光试验 (IFA) 等, 实验室确诊方法包括: 鸡胚分离鉴定、静脉接种致病指数 (IVPI) 测定、血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验、RT-PCR 或荧光 RT-PCR 等。

针对禽流感病毒有 15 个血凝素亚型 (H_1-H_{15})、9 个神经氨酸酶亚型 (N_1-N_9) 亚型, 不同亚型或同一亚型不同毒株之间致病力不同以及我国目前广泛使用 H_5 、 H_9 亚型禽流感病毒灭活疫苗的实际情况, 作者认为, 应从以下几方面开展禽流感病毒检测试剂的研究和开发。

- 1、鉴别灭活疫苗免疫抗体和野 (活) 毒感染抗体;
- 2、快速、灵敏检测 A 型流感病毒;
- 3、快速、灵敏鉴别 A 型流感病毒血凝素亚型和神经氨酸酶亚型;
- 4、高通量 (基因芯片、蛋白芯片) 检测 A 型流感病毒及其亚型;
- 5、快速测定新分离毒株的致病力。

HCV 新型 C 蛋白与丙型肝炎免疫诊断

第二军医大学微生物学教研室 戚中田

U 【摘要】 近年来,有关新的丙型肝炎病毒(HCV)核心基因及其编码产物的研究时有报道。与HCV传统单一读框翻译的病毒蛋白不同,新的核心(C)蛋白是由HCV核心蛋白基因读框序列+1移位后翻译产生的。新型C蛋白普遍存在于各个HCV基因型中,约40%及20% HCV感染者体内可检测到针对新型C蛋白的抗体和细胞免疫反应。在HCV感染所致的肝癌患者中,新型C蛋白的表达量增高。新型C蛋白可能与HCV感染慢性化、肝癌和丙型肝炎免疫诊断有关。

一般认为,HCV基因组仅含一个开放读码框(ORF),编码大的多蛋白。该多蛋白在病毒及细胞蛋白酶的作用下裂解为HCV的结构蛋白(C,E1,E2等)和非结构蛋白(P7,NS2,NS3,NS4a,NS4b,NS5a,NS5b等)。核心(C)蛋白位于多蛋白的N端,全长191aa,分子量约23kD(p23)。p23酶解去除部分C端后形成长约173—179aa的p21蛋白,p21蛋白与病毒RNA结合参与HCV颗粒的包装,是成熟HCV的功能型核心蛋白,在细胞信号转导、抑制免疫反应、影响脂类代谢及诱导细胞转化等多方面有重要作用。但近来对HCV基因组同义密码子保守性分析发现,HCV核心区基因序列还存在与ORF叠搭的另一个读框(Alternative Reading Frame,ARF),该读框移位翻译的产物比传统的C蛋白略小,被称为ARFP或新型C蛋白。目前国内外关于新型C蛋白及其功能的研究还处于起步阶段。

一、新型 C 蛋白产生的机制

HCV C 区基因是基因组序列中最为保守的区段,而且其同义密码子也十分保守,第3位碱基很少有简并情况,提示可能存在另一个读框即第3位碱基作为另外一个读框密码子第1或第2位的可能性。Walewski等利用Framesplitter软件检索分析基因库中的HCV序列,证实在登录的C区214条序列中有89%存在+1 ORF,其编码蛋白的长度为124aa~160aa不等。采用来源于新型C蛋白的4条人工合成肽检测HCV感染者的相应抗体,尽管这4条多肽不能涵盖新型C蛋白的所有免疫决定簇,但还是发现有10/100感染者血清呈阳性反应(有统计学意义),Walewski等最初将新型C蛋白的产生归因于野生型C蛋白起始密码子AUG被AUC替代。

南加州大学的Xu等提出核糖体+1移位翻译是新型C蛋白产生的原因,用兔网织红细胞裂解物(RRL)体外蛋白翻译系统表达HCV 1a C蛋白,除了获得p21蛋白外还有p16产生,并进一步推断HCV p16蛋白就是这种读框翻译出的产物。通过检测血清抗体,证实在6例HCV感染者中有5例检出了新型C蛋白抗体,而非丙型肝炎患者无一例检出。与-2移码多在发生原核细胞中的情形不同,作者认为核糖体第8—11位密码子连续出现的10个腺嘌呤(10As)+1移码翻译可能是感染细胞内出现新型C蛋白的主要原因。Varaklioti等用不同读框表达的新型融合C蛋白检测HCV感染者血清,也证实了新型C蛋白抗体的存在,但对其产生机制未进行深入阐述。

由于在+1读框5'端没有AUG起始密码子的存在,新型C蛋白由程序化的核糖体移位翻译的可能性最大,这需要mRNA分子内部具有使核糖体结束原有翻译次序而跳入另一个读框的序列。此外,

关于 nt - 1 核糖体移码翻译的情况也被有关研究证实,但由于终止密码子的迅速出现使该蛋白太小故不易检出。Choi 等证实,第 8 - 11 位密码子为连续的 10As 除产生 + 1 新型 C 蛋白外,还能同时产生 - 1 新型 C 蛋白。连续的 10As 虽是核糖体移位发生的重要原因,但仍不能解释多数不具备该结构的 HCV 亚型同样存在新型 C 蛋白的现象。Vassilaki 等定点突变 C 基因观察 + 1 读框表达的蛋白,发现在感染细胞内新型 C 蛋白的表达并不是由于连续 10As 核糖体移位造成的,也与 C 蛋白起始密码子 AUG 无关;认为是 + 1 读框的第 85 位和 87 位 AUG 密码子协同起始翻译的结果,即在感染细胞内存在着完整的、带有起始与终止密码子的 + 1 读框序列,而体外原核及非细胞系统表达新型 C 蛋白则是由于核糖体移位。绝大多数 HCV C 蛋白在 80aa 附近存在一个或者多个 AUG 起始密码子,这种读框的翻译产物显然更短,其表达受 C 蛋白的负调节。

Boulant 等在对 HCV 1b 的研究中观察到, C 蛋白在 ORF 第 42 位密码子的茎 - 环结构 IV 处发生 + 1 移码翻译后,又在 ARF 的第 144 位终止子茎 - 环结构处发生 - 1 (或 + 2) 的第二次移码突变,即又重新恢复为野生型 C 蛋白。这种两端为野生型 C 蛋白,而中间 101 个氨基酸为新型 C 蛋白序列 (Double Frameshift Core, DFC) 的发生几率约为 0.04% (2% × 2%)。该 DFC 蛋白中间 101aa 的抗体在 HCV1a 和 1b 感染者体内都能检测到,说明这种新型 C 蛋白在两个亚型间存在交叉免疫反应。新型 C 蛋白的这一翻译机制是在体外原核细胞表达纯化 C 蛋白时偶然发现的,关于 DFC 的功能还未见更进一步的报道。

最近 (2005 年), Baril 等以 C 基因上游片段不同长度的 + 0、+ 1 序列与 Luc 基因融合,发现了新型 C 蛋白产生的另一种机制:当 C 基因含 10As 时, + 1 质粒在原核细胞和感染细胞内都可表达;当 10As 被置换成更为普遍的 AAAGAAAAC 序列后, + 1 序列在 293FT 细胞内可以表达而在 RRL 内不能检测到表达。在 10As 前插入碱基,野生型 C 蛋白表达消失,而新型 C 蛋白的表达不受影响。因此 Baril 等认为新型 C 蛋白不是在多蛋白基础上核糖体移位翻译、而是由独立读框编码的结果。通过逐段引入 + 1 读框终止子,作者最终将新型 C 蛋白的起始位点定在 C 基因 + 1 读框的第 26 位 GUG (18% 的 HCV 序列中存在) 或 GCG (81% 的 HCV 序列中存在)。

目前倾向于认为,原核细胞及非细胞系统表达新型 C 蛋白是由核糖体 10As 移位造成;而在真核细胞内则是由独立读框编码翻译的,其起始密码子可以是 AUG 或 GUG、GCG。

二、新型 C 蛋白的生物学特性

已经证明,新型 C 蛋白在 HCV 各基因型中普遍存在,其表达量相对于 HCV 多蛋白约为 2%。新型 C 蛋白位于 HCV 单一读框的上游且游离于多蛋白之外,细胞内新型 C 蛋白每翻译一次都可使多蛋白翻译流产一次,从这一点上说,新型 C 蛋白可能具有调节 HCV 蛋白表达的作用。新型 C 蛋白似乎不是 HCV RNA 复制所必需,因为缺少它并不影响 HCV 亚基因组 RNA 在细胞内的复制。HCV 感染所致的肝癌 (HCC) 患者癌组织可高表达新型 C 蛋白,而且患者血清中新型 C 蛋白抗体的阳性率和滴度也显著高于非 HCC 的 HCV 感染者。同样的抗体升高现象也存在肝脂肪变性的 HCV 3 型患者中,但在 HCV 感染引起的肝纤维化与非纤维化患者之间,新型 C 蛋白抗体并未见显著差异。另一新型 C 蛋白抗体升高的现象发生在干扰素治疗后,Branch 等^[17]用新型 C 蛋白合成肽检测发现,干扰素治疗组的 HCV 感染者血清中存在新型 C 蛋白抗体 3/6 (50%),而对照组的阳性率仅为约 5% (6/110)。

Bain 等 (2004) 对新型 C 蛋白特异性体液与细胞免疫反应进行了分析,利用人工合成的一 99 肽

和四条 MHC-I 限制性 9 肽检测发现, 47 例 HCV 感染者中新型 C 蛋白的抗体检出率为 41.6%, 特异性细胞免疫反应的检出率为 20%, 淋巴细胞分泌 IFN 和/或 IL-10 增加, 且来自 HCV 1a 和 3 型感染者的淋巴细胞能与 1b 型来源的新型 C 蛋白肽反应^[18]。Pradel 等^[19]用 HCV 1a 来源的 3 种 C 蛋白(161 aa 的新型 C 蛋白、去除 N 端 10aa 的新型 C 蛋白及野生 C 蛋白), 检测 154 名 HCV 感染者血清标本, 抗体的检出率分别为 62%、25% 和 97%, 表明前 10aa 对稳定新型 C 蛋白有意义。比较新型 C 蛋白抗体与患者年龄、性别、病毒基因型、血清 ALT 水平、血清病毒滴度及肝纤维化等的关系, 未发现有统计学意义的关联。Basu 等选择受 C 蛋白影响的细胞因子或细胞活动来考察新型 C 蛋白的功能, 证明新型 C 蛋白不影响细胞 c-myc、hTERT 和 p53 的表达, 不加快 TNF α 受体介导的细胞凋亡, 也不刺激胚胎纤维母细胞的异常增殖。但与野生型 C 蛋白不同, 新型 C 蛋白作为反式因子能降低 p21 的表达。

HCV 新型 C 蛋白的产生机制和功能研究有待进一步深入, 目前国内的工作应侧重在建立该蛋白的抗原、抗体检测方法, 通过检测该蛋白在不同临床病程阶段的 HCV 感染者肝组织及肝外相关组织中的表达及其抗体反应情况, 探讨其与疾病的相关性; 用 HCV 复制细胞模型分析该蛋白对病毒组装及复制和表达的可能调控作用; 用细胞转染模型检测该蛋白对细胞的信号转导、增殖、凋亡、细胞因子调控网络及癌基因、抑癌基因表达的影响, 并鉴定细胞内与该蛋白相互作用的分子, 探讨该蛋白的功能及其对宿主细胞的影响。这些工作对认识 HCV 及其致病的多样性、复杂性, 以及免疫诊断试剂的开发无疑会有促进作用。

体外诊断试剂的生产及质量管理

中国药品生物制品检定所 曾明

一、国内外现有管理体系

- ISO13485: 2003 Medical devices —Quality management system — Requirements for regulatory purposes 《医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求》

属于医疗器械的国际通用标准。ISO13485是一份独立的标准，不是ISO9001标准在医疗器械行业中的实施指南，两者不能兼容。新标准特别强调的是满足法律法规的要求。该标准在总则中说：“本标准的主要目的是便于实施经协调的质量管理体系的法规要求。因此，本标准包含了一些医疗器械的专用要求，删减了ISO9001中不适用于作为法规要求的某些要求。由于这些删减，质量管理体系符合本标准的组织不能声称符合ISO9001标准，除非其质量管理体系还符合ISO9001中所有的要求。”

- 美国 FDA 医疗器械质量体系规范 (Quality System Regulation), 简称 QSR

体外诊断试剂进入美国市场的准入标准。是 cGMP 在医疗器械管理中的应用。

- 欧盟体外诊断医疗器械指令 (IVDD, EC— Directive 98/79/EC)

体外诊断试剂进入欧洲市场的准入标准。

欧洲委员会于1998年10月27日正式通过98/79/EC体外诊断医疗器材指令(In Vitro Diagnostic Medical Devices Directive, 以下简称IVDD指令), 并公告于1998 年12月7日的第L331号欧盟公报上。根据公报的内容, 欧盟各成员国必须于2000年6月7日之前完成执行本指令所需要的相关法规命令修制定与公告, 自2003年12月起, 所有在欧盟各成员国销售的体外诊断医疗器材(In Vitro Diagnostic Medical Devices, 以下简称IVD)均须依照本指令完成符合性评价程序, 贴上CE标记, 才能在欧盟上市。根据该指令的定义, 体外诊断医疗器材的定义是指: 任何试剂、校正物质、对照物质、仪器、装置、设备或系统的医疗器械, 无论是单独或合并使用, 由制造商指定其用途为用于体外检验采自人体的样本包括血液与组织, 单独或主要用以提供以下相关信息者: 关于生理或病理状态、关于先天异常、决定与潜在接受移植人员之安全性与兼容性或监控治疗效果。

IVDD对质量管理体系的协调标准是ISO13485/8:1996或ISO13485: 2003, 因此, 厂家应按照ISO13485的要求建立质量管理体系, 再增加IVDD的一些特殊要求, 如警戒系统, 自我符合性声明等。

- 其他国家关于体外诊断医疗器械规范要求

体外诊断试剂进入日本、印度、印尼、菲律宾等国家也必须通过该国相关的体系认证。

- 中国药品生产质量管理规范 (Good Manufacturing Practice), 简称 GMP

属于中国药品 (含体外诊断试剂) 的生产质量管理标准。

对于已经建立了 GMP 体系的厂家来说, 在未打破原来所熟悉的 GMP 或 ISO13485 文件体系结构的基础上把 IVDD 的要求有机的结合进去, 从而建立一个 GMP/ISO13485/IVDD 三合一的统一的质量管理体系, 以备不同机构审核的需要。

二、国内质量管理规范的法律依据

中华人民共和国药品管理法: 第八、九条对药品生产企业的要求, 第六十八条对药监部门的要求, 第七十九条对违规企业的罚则, 第九十四条对违规药监部门的罚则, 第一百零二条药品定义中含诊断

药品。

中华人民共和国药品管理法实施条例：第五、六、七、五十六条规定对药监部门、生产企业的相应要求，第六十三、七十九条对违反规定企业的罚则。

药品生产监督管理办法（2003 年 2 月 1 日起实施）：第五章监督检查中，规定了各级药品监督管理局对企业实施 GMP 情况的监督检查，以及法则。

药品生产质量管理规范及附录（1998 年修订）：共十四章八十八条，涉及药品生产质量管理的各个方面。附录中生物制品项共 39 条，目前正进行修订，与诊断试剂相关的重要变化为阴、阳性对照样品分装间要求改为 10 万级，同时强调生物安全的要求，如生物安全柜、原位消毒灭菌等。

药品生产质量管理规范认证管理办法（2003 年 1 月 1 日起实行）：规定了药品 GMP 认证的申请与审查、现场检查、审批与发证、监督管理和检查员管理等各方面的要求。

药品 GMP 认证检查评定标准（修订）

三、体外诊断试剂的生产和质量管理要求

药品认证检查项目共 235 项，其中关键项目 58 项，一般项目 177 项。生物制品项目 207 项，关键项目 54 项，一般项目 153 项；

体外诊断试剂认证项目 183 项，关键项目 44 项；一般项目 139 项；

结果评定：

项目		结果
严重缺陷	一般缺陷	
0	≤32	通过 GMP 认证
0	33-64	限期 6 个月整改后追踪检查
≤3	≤32	
≤3	> 32	不通过 GMP 认证
> 3		

主要包括以下几方面的内容：

一、机构与人员

二、厂房与设施

三、设备

四、物料

五、卫生

六、验证

七、文件

八、生产管理

九、质量管理

十、产品销售与收回

十一、投诉与不良反应报告

十二、自检