

艾滋病的病原学诊断

AIZIBING DE BINGYUANXUE ZHENDUAN

李敬云 编著

HN

军事医学科学出版社

R512.91
200
108104

艾滋病的病原学诊断

李敬云 编著



军事医学科学出版社

·北京·

解放军医学图书馆(书)



C0200066

内 容 简 介

本书介绍了常用艾滋病病原学检测方法的原理、特点、用途和应用注意事项。重点描述了 HIV 抗体、HIV 抗原、HIV-1 前病毒 DNA 和 HIV 病毒载量的测定方法。针对实验室工作容易出现的问题,还介绍了实验室质量控制方法、实验室安全措施和常用的筛选实验评价指标。在叙述各种方法时,注意结合近年的最新进展,强调了先进性和实用性。可供医疗、防疫、检疫等部门从事 HIV 检验的人员及有关科研人员阅读。

图书在版编目(CIP)数据

艾滋病的病原学诊断/李敬云编著.北京:军事医学科学出版社,
1999.5

ISBN 7-80121-131-6

I.艾… II.李… III.艾滋病-免疫测定 IV.R512.910.4
中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 11170 号

* *

· 军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

北京四环科技印刷厂印刷

开本:787mm×1092mm 1/32 印张:4.5 字数:100 千字

1999 年 5 月第 1 版 1999 年 5 月第 1 次印刷

印数:1-5000 册 定价:7.00 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

艾滋病病毒(HIV)检测是艾滋病防治工作的重要组成部分。随着我国艾滋病流行形势的发展和防治工作的需要,对艾滋病检测工作提出了全面的、更高的要求。例如常规的抗体检测方法需要进一步提高水平;检测 HIV 抗原、HIV 前病毒 DNA 以满足早期诊断的需要;测定 HIV 病毒载量用以监测治疗效果、评价预后等等。因此,从事检测工作的同志非常需要一本全面介绍检测方法和实验室质量控制以及实验室安全的专业书籍。有鉴于此,作者根据近几年从事艾滋病检测和研究工作的经验,查阅了大量国内外文献写成了这本书,期望能够为从事艾滋病检测的同志提供参考。

由于时间仓促,书中难免存在一些错误,恳请国内同行批评指正。

作者

1999 年 4 月于北京

目 录

第一章 概论	(1)
第二章 HIV 检测的病原学基础	(6)
一、形态和结构	(6)
二、HIV 的细胞敏感性	(8)
三、HIV 的复制	(9)
四、主要结构蛋白及其功能	(9)
五、HIV 的型和亚型及其分布	(13)
六、HIV 感染后的血清学改变	(16)
七、HIV 的抵抗力	(18)
第三章 HIV 抗体检测	(19)
一、HIV 抗体的初筛检测	(19)
二、HIV 抗体的确认实验	(29)
三、HIV-2 和 HIV-1 O 群的检测	(43)
四、唾液和尿液 HIV 抗体的检测	(47)
五、HIV 抗体检测方法的应用策略	(48)
第四章 HIV 抗原检测	(51)
一、P24 抗原检测的主要用途	(51)
二、P24 抗原检测的方法学	(53)
三、P24 抗原检测存在的问题和对策	(55)
第五章 PCR 法检测 HIV 核酸	(57)
一、方法学	(57)
二、容易出现的问题	(62)
三、质量控制	(63)
四、HIV PCR 检测的主要用途	(65)

第六章 病毒载量的测定	(67)
一、病毒载量的定义	(67)
二、病毒载量测定的方法学	(68)
三、影响测定结果的主要因素	(74)
四、评价病毒载量测定方法的指标	(75)
五、病毒载量测定的意义	(77)
六、展望	(83)
第七章 HIV 抗体检测的质量保证、质量控制和质量评价	(85)
一、质量保证	(85)
二、质量控制	(88)
三、质量评价	(94)
四、HIV 抗体检测常见的错误和误差	(95)
五、常见问题的解答	(95)
第八章 常用的筛选实验评价指标	(97)
一、常用的筛选实验评价指标	(97)
二、筛选实验评价指标的应用实例	(100)
第九章 HIV 感染的职业危险和实验室安全	(102)
一、HIV 感染的职业危险	(102)
二、影响传播发生的因素	(103)
三、HIV 职业暴露的处理	(105)
四、预防职业性感染的措施	(108)
附录 1 全国艾滋病检测工作规范	(112)
附录 2 实验室安全措施	(127)
附录 3 HIV 实验室操作技术要求	(130)
附录 4 HIV 抗体诊断试剂的临床评估方案	(133)

第一章 概 论

获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS, 又称艾滋病)是1981年首先在美国被发现的, 现已知该病是由人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)引起。在将近20年的时间内, 已经在全世界发生了非常广泛的流行, 造成了十分严重的危害。据世界卫生组织统计, 截止到1997年12月, 全世界累计有HIV感染者3 060万例、死亡1 170万例、AIDS孤儿820万人。1997年新感染580万例, HIV正在以每天感染16 000人的速度扩散。HIV感染的90%发生于经济落后的发展中国家和地区。

近五年来, 全世界AIDS流行的趋势发生了明显的变化, 主要表现为: ① 欧美等工业化国家的流行状况趋于稳定, 非洲感染的人数最多, 亚洲已经成为全球流行增长速度最快的地区。② 以性传播为主, 由性传播而导致的HIV感染占全部感染的75%。在AIDS流行的早期, 发达国家是以同性恋传播为主。近年来, 世界各地均呈现以异性性传播为主的趋势。世界卫生组织估计, 到2000年, 全球经性传播感染的人数将占总感染人数的90%。③ 随着异性性传播的增加, HIV对妇女的威胁日益严重。至1997年末, 已有1 220万妇女被感染, 女性感染者的比例已由1990年的25%上升到1997年末的40%, 到2000年, 女性新感染的人数将与男性相等。④ 由于女性感染者的增加, 因母婴传播而发生的婴儿HIV感染不断增加。不论是自身感染HIV还是因母亲感染HIV

死亡而成为孤儿, HIV 感染对儿童的威胁也越来越严重(图 1-1)。

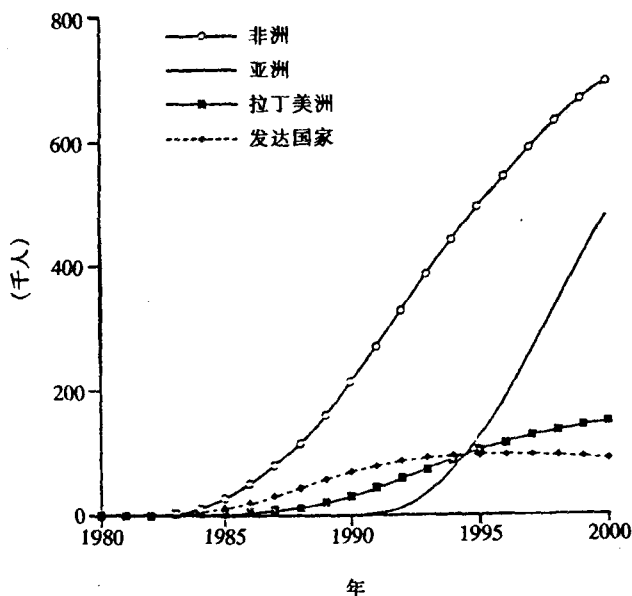


图 1-1 全世界 HIV/AIDS 流行的趋势(Lancet 1997)

我国于 1985 年发现首例 AIDS 传入病例,十多年来我国 HIV/AIDS 的流行经历了传入、增长和快速扩散 3 个阶段。截止到 1998 年 6 月底,我国 31 个省、自治区、直辖市共报告 HIV 感染者 10 676 例,其中 AIDS 病人 301 例。估计我国 HIV 感染的实际人数已经达到 30 万,到 2000 年,有可能超过 100 万,流行形势非常严峻(图 1-2)。

HIV/AIDS 的流行给社会和经济带来了十分严重的影

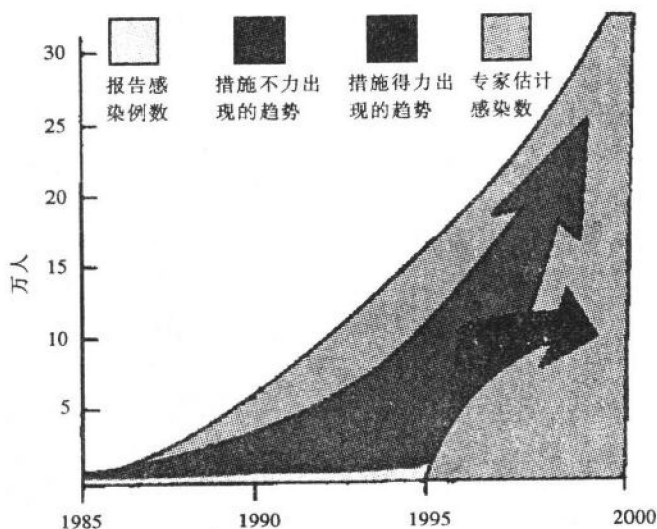


图 1-2 我国 HIV/AIDS 的流行趋势(引自:健康报 1998)

响,在全球范围内,AIDS 病例及其所致的死亡不断增加,已经成为十大主要死因之一,按照目前的发展趋势预计在不远的将来,HIV/AIDS 死亡将代替一些常见的死亡而进入五大死因之列。在非洲等一些国家 HIV/AIDS 流行造成人均期望寿命明显下降,在博茨瓦纳这个全世界 HIV/AIDS 流行最严重的国家,人均期望寿命已经从 5 年前的 61 岁下降到现在的 47 岁,2000~2005 年将下降到 41 岁。在津巴布韦,由于 HIV/AIDS 流行,人口增长率已经由 1980~1985 年的 3.3% 下降到现在的 1.4%,2000 年将下降到 1%。如果没有有效的干预措施,今后 10 年内博茨瓦纳、津巴布韦等国家的人口

将减少 20%，直接危及民族的生存和发展。全球每年用于 AIDS 控制的预算高达 15 亿美元，如果加上医疗费用和劳动力损失带来的间接经济损失，HIV/AIDS 流行对世界经济的影响更加严重。除此之外，对立法、国防、保险、教育、社会稳定等方面也有十分不利的影响。采取有效措施控制 HIV/AIDS 流行是目前世界各国面临的一个十分重要的任务。

HIV 检测是 HIV/AIDS 防治工作的一个重要的组成部分。AIDS 是绝对依赖病原学诊断的传染病，况且 AIDS 还有较长时期的潜伏期，只有通过病原学检测才能发现 HIV 感染，从而有效地控制 HIV 通过血液、性接触和母婴途径传播。对 HIV 病毒载量的测定是估计预后、制订和调整治疗方案的主要依据，对 HIV 亚型和变异等遗传特性的检测是在分子水平上掌握 HIV 传播和分布规律的主要手段，也是 HIV 疫苗研究的基础。

HIV 的病原学诊断可以从检测标本中病毒和病毒的成分和免疫反应的产物两个方面入手，前者包括病毒分离、检测病毒抗原(P24)、检测病毒核酸等，后者主要是检测病毒特异性的抗体。其中抗体检测方法是常规使用的 HIV 病原学诊断方法，其他方法或在特殊情况下使用(窗口期、婴儿诊断、HIV 抗体检测的不确定结果等)，或作为抗体检测方法的验证和补充、或作为判断预后和指导治疗的依据(病毒载量测定)，一般不用作常规的诊断。自从 1984 年分离出 HIV 以来，各种检测方法相继问世。目前已经有多种检测 HIV 抗体的初筛和确认试剂，检测唾液、尿液 HIV 抗体的试剂，检测 P24 抗原的试剂以及定量测定 HIV RNA 的试剂。

与其他病原微生物诊断不同的是，HIV 检测具有特殊的

严肃性,任何诊断的错误结果不论是假阳性还是假阴性,都将造成十分严重的危害。一个 HIV 抗体阳性的诊断将对个人的名誉、工作、生活乃至生存产生十分严重的影响,而 HIV 抗体阴性的结论是能够捐献血液、器官的依据之一,对于保证输血和移植的安全十分重要。为了最大限度地保证诊断结果准确,HIV 诊断采用特殊的检测策略,即先用具有高度敏感性的方法进行初筛,对初筛阳性的结果再用特异性强的方法进行确认,同时还要采取严格的质量保证、质量控制和质量评价措施。

HIV 诊断的需要促进了微生物诊断技术的发展,如抗体检测方法(ELISA、各种快速方法等),目前已达到了空前的敏感性和特异性;分子生物学技术的发展也带动了 HIV 检测水平的提高,如病毒载量测定水平的提高就是基于体外核酸扩增技术的高度发展。检测技术的发展和检测水平的提高,不仅有效地控制了 HIV 的传播和扩散,也加深了人们对 HIV 自然史和致病机理的认识,而所有这些对于从根本上控制 HIV,即研制 HIV 疫苗又是至关重要的。HIV 检测技术的发展和应用,对于人类了解和控制 HIV/AIDS 已经并将继续发挥重要的作用。

第二章 HIV 检测的病原学基础

1981 年美国疾病控制中心首先在美国发现获得性免疫缺陷综合征, 1983~1984 年法国巴斯德研究所的 L. Montagnier、美国国立卫生研究院癌症研究所的 R. Gallo 和美国加州大学旧金山分校的 J. A. Levy 分别从 AIDS 病人的血液和淋巴组织中分离到一种新的病毒, 分别命名为淋巴结病相关病毒 (LAV)、嗜人 T 细胞病毒 III 型 (HTLV-III) 和艾滋病相关病毒 (ARV), 1986 年国际病毒命名委员会统一命名为人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV), 它在分类学上属于逆转录病毒科、慢病毒属、灵长类免疫缺陷病毒亚属。

一、形态和结构

HIV 病毒体呈球形, 直径 90~130 nm, 浮密度 1.16 g/ml。病毒体表面包绕着糖蛋白刺突镶嵌的包膜。病毒中间的核心呈中空锥形, 由两个拷贝的单股正链 RNA 基因组、逆转录酶和衣壳的结构蛋白组成。核心直径约 40 nm, 两侧各有一个侧体包在病毒内膜蛋白中。HIV 的主要基因结构与其他逆转录病毒相同, 均由 5'LTR, gag, pro, pol, env, 3'LTR 组成, 另外还含有许多调节基因(图 2-1)。

HIV 的精细结构是由脂质双层包绕核蛋白核心组成的毒粒, 脂质双层含有病毒的表面 (GP120) 和跨膜蛋白

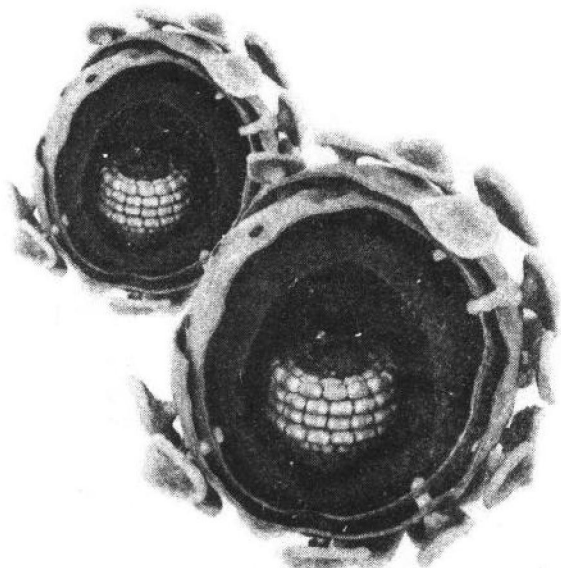


图 2-1 HIV 的形态(Organon Teknika 1998)

(GP41)。GP120 是病毒与宿主细胞表面受体结合的部位, GP41 含有一个 N 末端亲水基团, 它可以启动病毒和细胞膜融合的过程, 也起锚定脂质双层中 Env 蛋白的作用(图 2-2)。

毒粒的核蛋白核心包含两个拷贝的病毒 RNA 基因、有关的 tRNA 分子, 以及成熟的 Gag 和 Pol 蛋白产物。基质 Gag 蛋白(MA)与脂质双层的内侧相连, 衣壳 Gag 蛋白(CA)形成病毒核蛋白复合物的结构核心, 核壳 Gag 蛋白(NC)选择性地与病毒基因组 RNA 结合。成熟的 Pol 蛋白包含病毒复

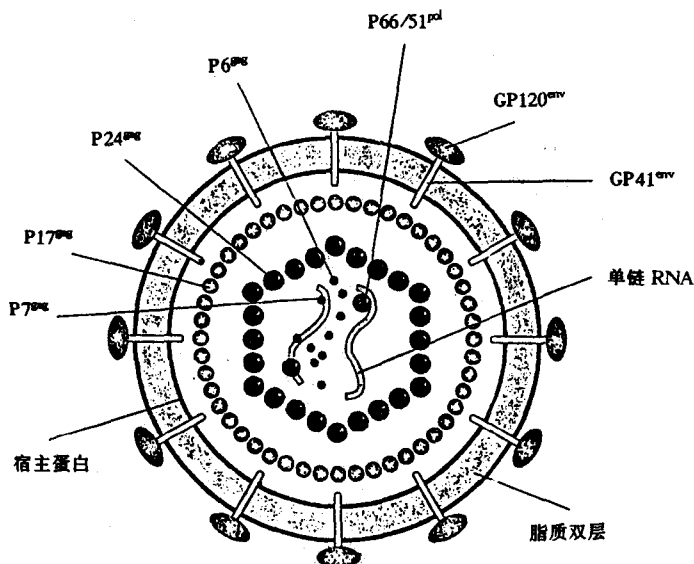


图 2-2 HIV 的结构(Constantine N T *et al* 1992)

制必需的酶类,有蛋白酶(PR)、反转录酶(RT)和整合酶(IN)。HIV 颗粒也包含病毒的 Vpr 蛋白和 Nef 蛋白。

二、HIV 的细胞敏感性

HIV 的包膜糖蛋白能够与带有 CD4 分子的细胞表面的 CD4 分子结合,促成 HIV 的感染,因此带有 CD4 分子的细胞是 HIV 的易感细胞。这类细胞主要有人淋巴细胞(人脐血、外周血及骨髓淋巴细胞、各种人 T 细胞系)、人巨噬细胞系(包括脑、肺、外周血中巨噬细胞、树枝细胞、表皮郎格罕细胞)

和部分肿瘤细胞(结肠癌、SW480、直肠癌、SW1463 细胞等)。目前实验室中使用较多的细胞是自淋巴样白血病患者建立的 T 细胞克隆,称为 HT 细胞系。

将表达 CD4 受体蛋白的基因克隆转染于没有 CD4 分子的细胞,可以使细胞变得对 HIV 易感,如 HeLa CD4 细胞等。

三、HIV 的复制

HIV 的复制过程包括以下几个步骤:病毒穿入、反转录、整合、基因表达、装配、出芽和成熟。病毒复制的第一步是病毒的包膜蛋白与特异的宿主细胞表面受体和其他辅助因子相互作用,导致病毒与细胞膜融合,病毒的核蛋白复合物进入靶细胞的胞浆内,并很快被转运到细胞核内,在那里反转录酶催化合成病毒 RNA 基因组的 DNA 拷贝。整合蛋白指导病毒的 DNA 与宿主细胞的染色体 DNA 整合形成前病毒。整合的前病毒表达生成拼接和未拼接的病毒 mRNA,分别表达病毒的调节蛋白和结构蛋白。Gag 和 Gag - Pol 蛋白的前体与病毒 RNA 一道在宿主细胞表面被装配进入新的病毒颗粒。在它们通过宿主细胞膜出芽的时候,病毒颗粒获得含有 Env 蛋白的脂质双层。在出芽过程中或出芽以后,病毒的蛋白酶(PR)裂解 Gag 和 Gag - Pol 前体蛋白成为成熟的蛋白,成为有传染性的毒粒(图 2-3)。

四、主要结构蛋白及其功能

HIV 基因编码至少 9 种蛋白(图 2-4),可以将这些蛋白分为 3 组:①主要结构蛋白 Gag、Pol 和 Env。②调节蛋白 Tat

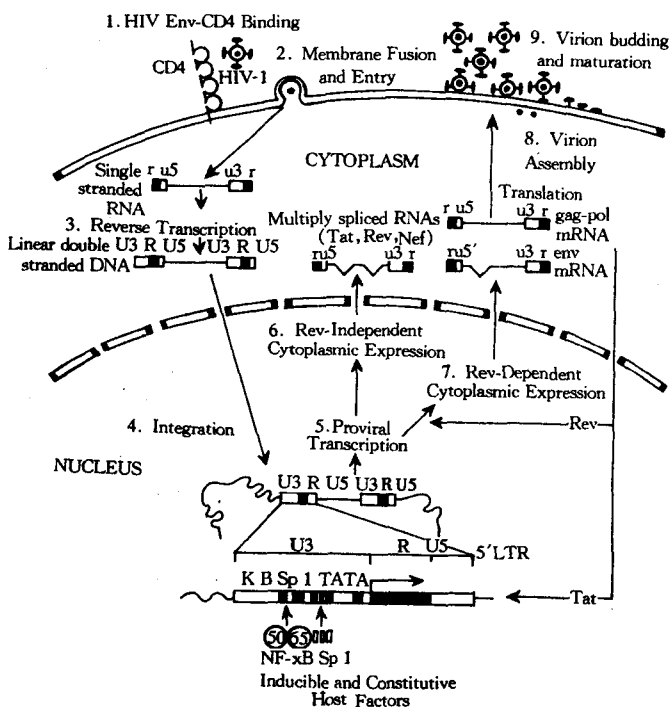


图 2-3 HIV 的复制过程(Feinberg M B 1998)

1. HIV Env 蛋白与 CD4 分子结合; 2. 膜融合和穿入; 3. 反转录; 4. 整合; 5. 前病毒翻译; 6. 不依赖 Rev 的胞浆内表达; 7. 依赖 Rev 的胞浆内表达; 8. 毒粒装配; 9. 毒粒芽生和成熟

和 Rev。③附属蛋白 Vpu、Vpr、Vif 和 Nef。现将主要的结构蛋白和它们的功能分述如下。

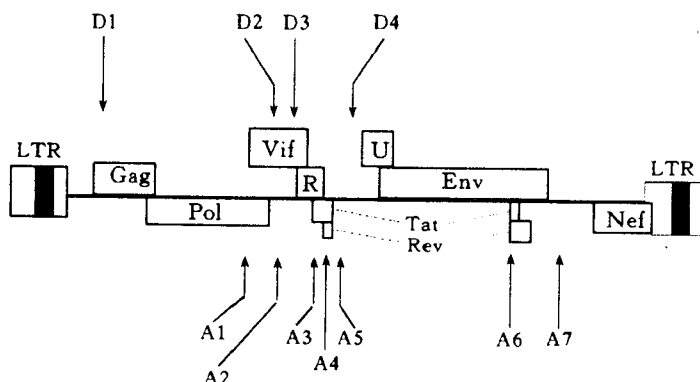


图 2-4 HIV 的基因组结构(Feinberg M B 1998)

(一)Gag 蛋白

gag 基因编码分子量为 55 kD 的前体蛋白,也叫 P55,它由未拼接的病毒 mRNA 表达,在翻译的过程中,P55 的氨基端被烷基化,与细胞膜的胞浆面相连,并与其他病毒和细胞蛋白一道吸收两个拷贝的病毒 RNA 基因组。这些蛋白与病毒从感染细胞的表面芽生有关。出芽以后,在病毒成熟的过程中,P55 被病毒编码的蛋白酶裂解为 4 个更小的部分,分别称为基质(MA)P17、衣壳(CA)P24、P9 和 P6。

MA 多肽来源于 P55 的氨基端,多数 MA 分子附着于病毒脂质双层的内侧,起稳定病毒颗粒的作用。一小部分 MA 与整合酶结合,被包裹在病毒颗粒的更深层,这一部分 MA 分子起着促进病毒基因组转运的作用。

P24 蛋白形成病毒颗粒的 Conical 核。已经证实 Cy-