

HIV-1抗体检测初筛试剂质量评价

王哲¹ 曾毅¹ 孙新华² 甄宏元³ 涛波⁴ 邢雅珊⁵ 林旭东¹ 赵文萍¹
强来英¹ 纪燕¹ 赵煌君³ 王炳涛³ 陈光³ 周科清³ 贺延平³ 刘忠武⁴
李建国⁶ 杨德文⁵ 郑玉臣⁵

摘要 用134份HIV-1抗体阳性血清和1468份阴性血清对国内常用的PA、LA、ELISA(Wellcome)、IE、QWB等初筛试剂进行质量评价,用部分血清进行了国产试剂比较和快速方法的比较,并对混合血清检测的方法进行了评价。结果表明,上述试剂中ELISA、PA、IE和QWB试剂质量较好,能满足国内需要,并能进行混合血清检测。

关键词 HIV-1检测 试剂评价 初筛试验

艾滋病的传播和流行已成为当今全球性危害,我国发现的艾滋病病人和艾滋病毒(HIV)感染者也逐年迅速增加。由于目前尚无有效的疫苗和治疗药物,预防和控制其传播的一个主要手段是进行HIV血清学检测。近年来,HIV检测工作在我国发展很快,各地已先后建立了上百个检测实验室,HIV检测的管理和质控也在逐渐加强。

国内目前主要进行HIV-1抗体检测,使用的初筛方法主要是ELISA〔1〕、明胶颗粒凝集(PA)〔2〕和免疫酶法(IE)〔3〕等,其中前两种试剂基本靠进口,ELISA试剂的厂家很多,世界卫生组织(WHO)近年援助的主要是Wellcome产品。国产试剂的研制和生产已有了飞跃,特别是IE和蛋白印迹快速法(QWB)试剂已得到较广泛应用。最近进口乳胶凝集(LA)〔4〕试剂和国产ELISA试剂也得到一定的应用。这些试剂在检测中的使用情况未得到科学评价。由于经费等原因,国内大部分检测实验室在检测中不同程度地使用混合血清的方法,这种方法的具体步骤和适用性有待探讨。

由卫生部防疫司和中国预防医学科学院艾滋病研究与检测中心组织、部分省地卫生防疫站和卫生检疫所参加,对上述试剂进

行了大规模、系统的质量评价,现将结果报告如下。

材料和方法

一、血清:

评价血清来源分两部分,一是由各参加实验室新近采集的高危和重点人群血清,另一是国家实验室保存的HIV-1感染者血清。

二、试剂:

1.ELISA:进口ELISA试剂为Wellcome公司的Wellcozyme HIV Recombinant VK56/57,批号为K119410, K170910;国产ELISA试剂由上海生物制品研究所生产,批号:91001。

2.IE:由中国预防医学科学院艾滋病研究与检测中心生产,批号为910410, 910610。

3.QWB:由中国预防医学科学院艾滋病研究与检测中心生产,批号为910310,910516,

1 中国预防医学科学院艾滋病研究与检测中心,北京, 100052

2 卫生部卫生防疫司急传处

3 甘肃省卫生防疫站

4 内蒙古自治区卫生防疫站

5 哈尔滨卫生检疫所

6 内蒙古自治区赤峰市卫生防疫站

910610。

4.PA: 为Fujirebio公司生产的Serodia HIV, 批号为AP10808。

5.LA: 为Cambridge BioScience公司产品, 批号为A6600。

6.蛋白印迹试剂(WB): 为Bio-Rad公司生产的Novapath HIV-1 Immunoblot, 批号为197-1100。

三、方法:

1.常规方法: 采血后立即在现场分离血清, 尽量避免冻融并尽快检测; 血清检测前不做预处理, 不加防腐剂。检测时严格按试剂使用说明操作, 阳性结果均用原方法进行重复。

2.混合血清方法: 每三份血清等量混成一

份, 即各取50 μ l混合, 做为一份原倍血清进行检测。

结 果

一、试剂评价结果: 取国家实验室保存的134份HIV-1抗体阳性者血清及各实验室采集的高危及重点人群血清1468份, 同时用五种试剂检测, 阳性结果进行重复, 结果五种试剂的敏感性均达100% (表1), 特异性以初检计算均达到97%以上, 以复检计算达到99.9%以上; 假阳性率ELISA: 初检2.4%, 复检0.07%; LA: 初检1.3%, 复检0; PA: 初检0.4%, 复检0.14%; IE: 初检0.34%, 复检0.07%; QWB: 初检0.07%, 复检0 (表2)。

表1 HIV-1 感染者血清检测结果

人 群	血清数	阳 性 数									
		W-ELISA		LA		PA		QWB		IE	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
吸毒人员	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87
血友病患者	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
归国人员	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
外国人	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
总 计	134	134	134	134	134	134	134	134	134	134	134

表2 高危和重点人群检测结果

人 群	血清数	阳 性 数									
		W-ELISA		LA		PA		QWB		IE	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
静脉嗜毒	227	0	0	5	0	1	1	1	0	2	1
吸 毒	492	29	0	9	0	1	1	0	0	0	0
出入境人员	447	1	0	2	0	1	0	0	0	2	0
暗 娼	59	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
献血员	136	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
外国人	40	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
其 他	67	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0
总 计	1468	35	1	19	0	6	2	1	0	5	1

对表2结果进行分析及确认, 其中LA初检19例阳性, 按使用说明标准从1+到4+进行

了划分, 其中80%为1+和2+, 而3+和4+仅占20% (表3)。ELISA初检和复检的阳性OD

值与试剂盒的Cut Off值相差很近,大部分在0.05以内,而且没有大于0.15的,重复阳性的OD值与Cut Off值之差也小于0.05(表4)。对各

试剂重复阳性的血清用WB试剂进行了确认,除IE阳性的血清为可疑(P66)外,其余三份均为阴性(表5)。

表3 LA初测阳性情况

阳性情况	例数	%
1+	9	47.4
2+	6	31.6
3+	3	15.8
4+	1	5.2

表4 ELISA初测阳性OD值差值情况

OD值差值范围	例数	%
<0.05	23	65.7
0.05~0.1	9	25.7
0.1~0.15	3	8.6
>0.15	0	0

表5 蛋白印迹法确认结果

编号	初筛情况	WB结果
1	ELISA+	-
2	PA+	-
3	PA+	-
4	IE+	±P66

二、国产试剂比较:取429份血清用Wellcome ELISA试剂做对照,对三种国产检测试剂进行了比较。进口试剂初检一份阳性,复检阴性,国产ELISA试剂初检三份阳性,复检二份阳性,这两份样品经WB确认为阴性;IE和QWB试剂检测结果均为阴性(表6)。

表6 国产HIV-1检测试剂比较

血清数	W-ELISA		国产ELISA		QWB		IE	
	1	2	1	2	1	2	1	2
429	1	0	3	1	0	0	0	0

三、快速检测试剂比较:用部分已知阳性和阴性血清对PA、LA和QWB试剂进行了比较,表明QWB试剂质量最佳(表7)。

表7 HIV-1快速检测试剂比较

血清数	阳性数						
	PA		LA		QWB		
	1	2	1	2	1	2	
阳性血清	77	77	77	77	77	77	77
阴性血清	324	2	1	7	1	0	0

四、混合血清检测:在现场及国家实验室内进行了两次混合血清检测,在现场主要用QWB、IE和PA进行检测,结果表明三种试剂在进行大量阴性混合样品检验时假阳性数均很低(表8)。

在国家实验室取34份阳性血清,每份与两份阴性血清混成一份,另取144份阴性血清混

表8 QWB、IE和PA混合血清检测结果

方法	血清数	阳性数	
		混合	分开
QWB	188(564)	1	0
PA	188(564)	1	1
IE	188(564)	2	0

合成48份,用五种方法检测,结果LA有5份假阴性,3份假阳性,PA2份假阳性,其余方法与真实结果相符,这些血清同时单份用五种方法检测,结果与真实结果一致(表9)。

表9 五种试剂混合血清检测结果

血清数	阳性数				
	ELISA	IE	PA	QWB	LA
34(102)*	34	34	34	34	29
48(144)	0	0	2	0	3

*一份阳性,两份阴性

讨 论

目前,国家对HIV检测进口试剂尚无质量审批规定,各种进口试剂从不同渠道进入各级实验室,应用中问题很多,国产试剂在使用中也存在不少问题。这些问题中一些是试剂质量问题,另一些则是因为各实验室检测技术上的原因所致。全国HIV检测质量评估问卷调查结果也表明不少实验室检测技术上还有待改进之处。检测中不少技术环节的处理缺乏科学证据支持。值得一提的是,有部分实验室进行的试

剂评价由于所用血清量小, 实验设计不正确等原因, 其结果未能真正反映试剂质量〔5〕。本次评价一方面严格设计, 在检测中尽可能地排除主观因素影响; 另一方面取样量大, 因此结果可信性大。我国大部分地区HIV感染者极少, 因而检测中往往遇见假阳性结果, 因此这次评价也着重于考察试剂在检测时出现假阳性的情况。

几种试剂的检测结果, 在正确使用试剂的情况下, 均能发现感染者; 在实际应用中, 如果血清质量较高, 假阳性率很低, 一些实验室使用其中个别试剂假阳性较高的原因可能与不能正确使用和血清经长时间运输、保存、冻融后所致。虽然进口ELISA和LA试剂检测假阳性较多, 但根据使用说明书要求进行重复检测, 可以将其中绝大部分排除。

进口ELISA试剂初检35份阳性中, 使用批号K170910的占34例。包括重复阳性的一例, 另一批号的仅一例。说明该试剂不同批之间质量上有差异。突出表现在试剂配备的Cut Off对照上, 由于稳定性等原因, 其滴度会下降, 造成邻界血清较多。而阳性结果OD值与之相差较多, 对Cut Off值进行调整后可排除几乎全部假阳性而不漏检。一些实验室反映LA试剂假阳性较多, 我们过去用冻溶过的血清检测时也发现这一现象, 此次用新鲜血清检测, 假阳性较少。PA试剂质量较高但重复假阳性较高。IE和QWB两种试剂在评价中结果很好, IE有一份重复阳性的血清最终确认为可疑, 说明该试剂较敏感。我们认为, 使用前和使用中进行培训使之能正确使用国产试剂, 是提高国产试剂检测质量的关键。由于试剂问题, 这次未对国产ELISA试剂进行完整的评价。

快速方法中, LA最为方便快捷; PA步骤虽少但做大量血清稀释费时, 整个操作时间也较长; QWB介于两者之间。三种试剂比较, QWB试剂的质量已达到其他两种试剂的水平。

国内各实验室进行混合血清检测中血清混合份数在2~5份之间, 国外资料表明以三份进

行混合较适当〔6〕, 这次也采用三份混合的方法, 除LA外, 其他四种试剂均能很好地用于混合检测, 而且假阳性较少, 不会发生漏检, 使用这种方法检测可大大地节省时间和经费。

这次试剂评价结果表明, 两种国产检测HIV-1抗体的初筛试剂即IE和QWB试剂在实际检测中检测质量已达到进口试剂水平, 能够在国内大规模应用。WHO援助的Wellcome的ELISA试剂和PA试剂质量也较好, 适用我国情况。混合血清检测的方法适用于我国低感染地区。

Evaluation of Screening Reagents for Detection of HIV-1 Antibody Wang Zhe, et al., AIDS Research and Detection Center, Chinese Academy of Preventive Medicine

Evaluation of screening reagents including PA, ELISA (Wellcome), IE, QWB, and LA by using 134 sera from HIV-1 infected persons and 1468 sera from normal persons. Comparing of domestic reagent and rapid methods by using part of the sera, and evaluating pooling sera method. The results suggested that the quality of PA, IE, QWB and the ELISA were enough for using in HIV testing in China and could be used for pooling method.

Key words HIV-1 Testing Reagents Evaluation Screening Test

参 考 文 献

1. McDougal JS, et al. Immunoassay for the detection of quantitation of infectious human retrovirus lymphadenopathy-associated virus (LAV). J Immunol Methods 1985; 76:171~183.
2. 曾毅, 等. 应用明胶颗粒凝集试验检测人免疫缺陷病毒(HIV-1)抗体. 病毒学报 1988; 4(1): 65.
3. 王哲, 曾毅. 人免疫缺陷病毒血清学诊断免疫酶法的建立及其应用. 中华流行病学杂志 1990; 11(4): 243.
4. Riggin CH, et al. Detection of antibodies to human immunodeficiency virus by latex agglutination with recombinant antigen. J Clin Micro 1987; 25(9): 1772.

5. 黎润林, 等. 比较国产及进口诊断药盒对已知血清艾滋病病毒抗体检测敏感性的探讨. 中华医学检验杂志 1990; 13(1): 38.

6. Monzon OT, et al. HIV-1 testing pooling blood

using ELISA and agglutination methods. presented at 6th International Conference on AIDS, San Francisco California, June 20-24, 1990.

69月

豫北基本灭疟后28例(带虫)残存病例调查

河南省安阳市卫生防疫站* 陈喜庭

我市为间日疟流行区, 自1983年发病率已降至1/万以下, 进入灭疟后期。为进一步研究其流行特点及分布规律, 我们对近四年28例(带虫)残存病例进行了调查, 结果如下。

1. 发病年龄最小6岁, 最大68岁。其中以16~30岁年龄组发病最高为13例(46.43%), 15岁以下发病者2例(7.14%)。28例中, 男性21例, 女性7例, 男女发病率差异极显著($P < 0.001$)。全年各月均有病例发生, 6~8月发病占57.14%。4、7月呈现两个小高峰, 分别占12.12%和21.21%。

2. 病例分类。潜隐散发18例, 占64.28%, 其中流行期初发16例、休止期初发2例(很可能有长潜伏期间日疟存在); 输入9例(其中初发5例, 继发2例, 外地感染2例), 占32.14%; 复发1例, 占3.57%。

3. 疫点高度分散: 28例病人分布于8个县(区), 12

个乡镇, 17个村庄, 9个机关单位。一个疫点2例以上者仅一处。各疫点之间无明显联系。

4. 所有病人采用氯、伯8日疗法治疗, 正规治疗28例(100%), 复治19例, 复治率为67.86%, 治疗后复发1例。此外对23例(82.14%)的家属及四邻采用氯、伯4日疗法服药。并用DDT等药物灭蚊。28例病人中。有露宿习惯者4例(14.28%), 有防蚊设施者12例(42.86%)。

说明我市疟疾传播并未阻断, 四年间共输入病例9人。因此应加强重点流动人口的管理, 及时发现输入病例, 也是灭疟后期一项重要任务。

(本文承我站杨诚老师指导, 王兴洲副站长审核, 特此致谢)

* 邮政编码 455000

高滴度无症状HBsAg携带者的传染性及其判定指标的探讨

华西医科大学附一院* 陈可跃 赵连三 林勇 刘丽 周思亮 王小飞 王锦蓉

为探讨无症状乙型肝炎病毒表面抗原携带者(ASC)的传染性及其合适的判定指标, 本文对有高滴度HBsAg的ASC血中的三种HBV标志物进行了对比性研究。

材料和方法: 198例ASC均系制备血源性乙肝疫苗的献血员(男186例、女12例), 年龄在18~40岁。血HBsAg强阳性(ELISA)持续半年以上。平行检测HBV DNA (^{32}P -HBV DNA探针直接斑点杂交), 多聚人血清白蛋白受体(PHSAr)和HBeAg(ELISA)。

结果与讨论: HBV DNA、HBeAg及PHSAr的检出率分别为73.2%、97.5%和88.9%; 提示该组ASC虽无症状、查体及肝功亦无异常, 但其中大多数人体内存在HBV复制, 其血液有传染性。HBeAg阳性ASC

中HBV DNA阳性者占74.1% (143/193), 但HBeAg阴性ASC中仍有1例(1/5)为HBV DNA阳性。PHSAr阳性ASC中HBV DNA阳性和HBeAg阳性者分别为76.1% (134/176)和99.4% (175/176); 而PHSAr阴性ASC中, 有50% (11/22)为HBV DNA阳性外周血检出HBV DNA即证明患者体内HBV正在复制, 可释放入血且也可能存在于其它体液或排泌液中。因此, 外周血HBV DNA是表明乙肝患者传染性的直接指标现已被广泛采用。本文资料提示: HBeAg与HBV DNA有较好的符合率, 可作为间接反映患者传染性的简易指标, 但须注意部分HBeAg阴性者仍可能检出HBV DNA; 而用PHSAr来判定ASC的传染性则有较大的局限性。

* 成都, 610041