

用于 HIV 感染早期监测及发病率调查的实验室检测技术——STARHS 检测法

肖瑶 冯基刚 蒋岩

艾滋病是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的一种免疫缺陷性疾病,目前尚无法治愈,也无有效疫苗可预防^[1]。HIV 感染的诊断,特别是早期感染的诊断是艾滋病预防控制工作的重要组成部分。近年来在美国发展了一种对 HIV 抗体检测的酶联免疫试验(EIA)加以改良的方法——serologic testing algorithm for recent HIV seroconversion(STARHS),该方法可以判断 HIV 感染者是否为早期感染,进而可以进行发病率的测算,为艾滋病的防治又提供了一个有效的方法。

1. STARHS 目的和意义:STARHS 也称“检测早期 HIV 阳转血清的血清学规程”,是一种对 HIV 抗体 EIA 加以改良的方法,又称为减敏检测方法(detuned assay)或敏感/低敏试验(sensitive assay/less sensitive assay)。该方法具有区别早期和长期感染的能力,可以通过一次横断面调查来估计目前的 HIV 发病率,对于评估目前 HIV 感染的趋势是十分有价值的。

传统的诊断学方法是应用 EIA 初筛阳性后通过免疫印迹试验(WB)进行确认。但是识别出的血清阳转人群包括早期感染与长期感染两种人群。因而迫切需要一种检测 HIV 早期感染的试验方法。STARHS 是对同一样品用两种 EIA 检测的比较,一种是常规 HIV-1 抗体检测用来诊断 HIV 感染情况,在此步骤中通过标准的 EIA 和 WB 试验来识别血清阳性者;在上述实验的基础上再用低敏感性的 EIA 检测血清阳性样本中是否存在高滴度的 HIV 抗体。因为在感染 HIV 后一个人的抗体水平会逐渐增加,因而长期感染要高于早期感染的抗体水平,低敏感性的 EIA 可显示出抗体水平的高低,进而该实验的结果可显示出是否为早期感染(≤6 个月)。

2. STARHS 的原理与方法:1998 年 Jassens 等^[2]对原有的 EIA 进行了改良,这种改良的 EIA 即低敏的 EIA 方法可以检测出早期的 HIV 阳转血清者。最初使用的是 Abbott 3A11-LS,可以确定一个 HIV 感染者是否在早期被感染,能够指明一个人是否在检测前的平均大约 129 天内发生血清阳转(产生 HIV 抗体),目前应用的是 Vironostika-LS 判断是否在检测前的平均大约 169 天内发生血清阳转,进而测算 HIV 新发感染率。

(1)STARHS 的原理:HIV 的抗体通常感染后 3-4 周内可以检测到,在血清阳转后抗体发生质和量的变化,表现为

抗体类别、抗体亲和性、抗体滴度、HIV-IgG 的构成,抗原特性的改变。这些特性可用于来区别早期感染与长期感染。而 STARHS 利用血清阳转后 HIV 的抗体滴度在感染早期随时间升高的特性,来检测已确认为血清阳性的样本,判断该血清阳性样本是否为早期感染。早期感染的抗体滴度要低于长期感染的抗体滴度,因而对血清阳转的样本进行稀释,若为长期感染,由于抗体滴度高,虽经稀释,低敏 EIA 仍呈反应性,若为早期感染由于抗体滴度原本就低,经稀释后更低,则低敏 EIA 不呈反应性。因而应用 STARHS 可从血清阳转样本中检测出早期感染者。

低敏的 EIA 通过提高血清稀释度和减少孵育时间来降低敏感度。最早使用的是 Abbott 3A11-LS,目前应用的是 Vironostika-LS,它不仅检测血清还可以检测干燥血(表 1)。

表 1 敏感与低敏感试验的比较

参 数	敏感 EIA		低敏感 EIA	
	Abbott	Vironostika	Abbott	Vironostika
样品稀释倍数(1:)	400	76	20 000	20 000
样品孵育时间(min)	60	90	30	30
酶联孵育时间(min)	120	30	30	30
分类标准	以 cutoff 值为基础		以标准品为基础	

敏感的 EIA 只是相对低敏 EIA 而言,用来检测 HIV-1 抗体是否存在,其检测的信号值在血清阳转后很快呈平稳状态。而低敏 EIA 则有较长的动态范围,不同于以往 EIA 获得的吸光度值(一般称为粗吸光度值),标准吸光度值是应用阴性对照(ANC)与校准品(CAL)校准后获得的吸光度值,如 Vironostika-LS 是从分子和分母减去阴性对照吸光度值而获得:标准吸光度值=(样本中值-ANC 中值)/(CAL 中值-ANC 中值)。标准吸光度值间接反映了抗体滴度的高低。如早期应用的 Abbott 3A11-LS 用一个预先设定的阳性确定值(cutoff)来区分抗体滴度低于 1/20 000(早期感染)与抗体滴度高于 1:20 000(长期感染)的样本。

(2)STARHS 的窗口期:为方便估计人群 HIV 发病率,规定了该方法的窗口期。STARHS 的窗口期区别于传统意义上 EIA 抗体检测的窗口期(一般指感染后到抗体出现之前的时间段),该法的窗口期是指敏感 EIA 能首次呈反应性到低敏感 EIA 能首次呈反应性之间的时间段。STARHS 窗口期的长度取决于低敏 EIA 中区分反应性与非反应性的 cutoff 值的大小。BioMerieux Vironostika 低敏 EIA 标准吸光度值

作者单位:100050 北京,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心国家参比实验室

的 cutoff 值定为 1 时, STARHS 窗口期的平均近似值为 170 天(图 1)。

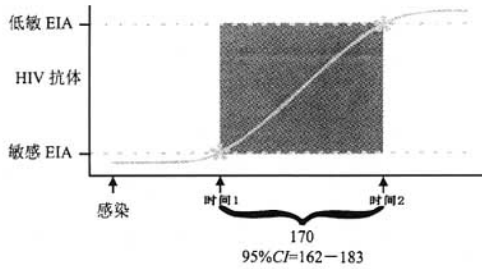


图1 STARHS 的窗口期

敏感的 EIA 对于低水平的 HIV 抗体是敏感的, 低敏的 EIA 对低水平的 HIV 抗体是不敏感的。在图 1 中, 时间 1, 已有足够的抗体可以检测到, 因而敏感的 EIA 呈反应性, 若敏感 EIA 不呈反应性, 则判定没有 HIV 感染。在时间 2, 由于抗体急剧增加, 因而改良的即低敏的 EIA 开始呈反应性, 表明不是早期感染, 应判定为长期感染^[3]。当敏感的 EIA 呈反应性而低敏 EIA 不呈反应性即在时间 1 与时间 2 的区间内时, 表明为早期感染。

表2 STARHS 窗口期的估计*

标准吸光度值 (A)	时间 (d)	95% CI	艾滋病的错分率 (%)
0.50	97	93~103	1.5
0.75	133	127~140	4.2
1.00	170	162~183	5.0
1.25	210	199~227	6.9
1.50	249	230~277	7.6
2.00	336	314~400	8.4

* Vironostika 低敏 EIA, HIV-1 B 亚型

(3) STARHS 方法结果的解释: 对于血清阳转样本, 低敏试验通过两个试验参数来估计人群年发病率, ①低敏试验的 cutoff 值, 若低于该值判为阴性(早期感染); ②平均窗口期, 即低敏试验持续呈阴性的时间跨度^[4]。应用 STARHS

$$\text{计算年发病率(I)公式为: } I = \frac{n}{(m+n)} \times \frac{365}{T} \times 100$$

式中 n 为早期感染人数, 即敏感的 EIA 呈反应性而低敏 EIA 不呈反应性的人数; m 为敏感的 EIA 呈阴性的人数; T 为窗口期的时间。

STARHS 依赖于患者血清中高亲和性 HIV 抗体的水平, 如果抗体水平低, 则可能为早期感染。然而, 其他人群也可以出现低水平的 HIV 抗体: 艾滋病患者、进行有效的抗逆转录病毒治疗者、进行 HBV 治疗的患者、长期感染而病情无进展者^[3]。结果解释时应注意: ①STARHS 识别的早期感染者, 感染时间大约发生在诊断前 6 个月, 其结果解释时应辅以临床表现及流行病学史。②识别出 6 个月内感染的概率依赖于 HIV 检测的频率, 高危人群比其他人群检测的频数多, 因而被检测出早期(6 个月)的感染的概率大。③吸光度值只是指明一个人是否在检测前 6 个月左右产生 HIV 抗体

的指标。在感染的不同阶段, 个体间的抗体滴度是不同的, 因而在急性感染期应用低敏试验时, 个体间的抗体滴度同样是不同的。

(4) STARHS 质量控制: 由于该试验具有量化的性质, 因而需要校准品和对照品来对试验进行校正, 以提高试验的准确性和可重复性。目前美国疾病预防控制中心(CDC)提供 3 种质控品: 校准品(CAL)、弱阳性对照(LPC)、强阳性对照(HPC), 并规定了 LPC、HPC 的参考值及标准范围。同时提供计算机软件系统支持资料管理、数据处理和结果报告。必须用 LPC 和 HPC 的标准吸光度值的中位值制作质控图。质量控制界限为 95% 和 99% CI, 首先要用 20 次分析实验的数据计算出来, 这个质控界限在进行了 30 次实验后要重新计算。每一次实验的中间值, 即所有 20 次(或 30 次)实验的中间值的平均值, 都要绘在一个质控图内。每一次实验的结果, 其 LPC 和 HPC 的标准吸光度值的中位值必须在质量控制的界限内。当使用不同批号的试剂盒时, 在检测患者样品前需用质控试剂进行连续的分析实验对其进行评价。

3. STARHS 的应用与局限性: 应用 STARHS 可从感染人群中检测出早期感染者, 拓宽了 HIV 检测的领域, 并为 HIV 的防治提供了有力的工具。然而该法主要应用于人群发病率的监测, 不适用于个体诊断。该法用于估计 HIV 人群发病率的横断面调查, 在监测和预防项目中有重要作用, 对早期感染者的识别及治疗有重要意义。获得的 HIV 血清监测资料可以快速识别 HIV 早期感染, 以提供早期的临床治疗; 在进行疫苗试验的过程中, 筛选和确定适当的研究人群时起到很重要的作用^[5-7]; 以 HIV 感染的病毒学与免疫学特征为基础, 监测特殊人群 HIV 流行的时间变化趋势, 以及确定处于感染高危状态的人群。这些信息将用来帮助国家制定 HIV 防治策略和确定优先领域、计划和评价预防项目, 以及评估国家对流行状况加以控制的效果^[4]。如 1998 年 10 月至 1999 年 12 月在美国加州旧金山运用 STARHS 方法对性传播疾病门诊的病例进行了 HIV 检测, 调查的结果用来了解 HIV 在不同人群中的发病率, 评估 HIV 在人群中的变化趋势, 同时对高危人群制定相应的预防项目^[8]。

在初期, 低敏 EIA 应用改良的 Abbott HIV-1 EIA (3A-11), 由于 3A-11 试剂盒 2000 年后不再生产, 试剂来源困难, 转而对商业上应用的 EIA (Vironostika HIV-1 EIA, Organon Teknika, Durham, NC) 进行改良作为低敏 EIA。目前该试验达到了预期的效果, 并且在美国和其他地区多项横断面研究中用来估计 HIV 感染发生率^[9,10]。然而该试验对于来自感染 HIV-1 B 或 E 亚型泰国地区的样本则显示为亚型依赖性^[11]。血清阳转后的窗口期不同, B 亚型窗口期(≥ 180 天), 而 E 亚型窗口期要很长(≥ 270 天), 在商品试剂盒中, 一般只应用 B 亚型抗原的 EIA 试剂盒, 这样会造成亚型专一性偏倚。虽然应用 B 亚型抗原可以诊断所有亚型的感染(定性), 但由于 STARHS 试验要对抗体滴度进行量化, 不同的亚型, 抗体滴度的表现要依赖于交叉反应的程度。同时

操作过程中,由于低敏的 EIA 需要稀释很大的倍数(1:20 000),在移液过程中,一个极细小的差错就会导致极大的稀释错误,孵育的时间和温度也要极其准确,操作繁琐,结果的变异性很大,并且需要配备专用的设备。目前,应用专用的洗板机、酶标仪、孵育箱及特定厂家的移液器及试剂盒等措施,使得该试验更加准确,重复性更高。

4. 检测 HIV 早期感染的其他方法:

(1)HIV 抗体阴性但检测到 HIV-1 RNA/p24 抗原说明为 HIV-1 早期感染,这些方法已应用于估计发病率的研究^[12],然而 HIV-1 RNA 或 p24 阳性、抗体阴性这种状态持续时间很短(≤1-2周)随后抗体很快出现,因此检测到处于该期感染时段的人数不多,不能准确的估计发病率及其可信区间,尤其当发病率低于 5% 时更难准确地估计发病率,而且该方法需要对众多血清阴性的人(一般为高危人群)反复的检测 HIV-1 RNA 或 p24 抗原,操作技术复杂并且价格昂贵,很难广泛应用于 HIV-1 早期感染的监测。

(2)在血清阳转后,HIV-IgG 占总 IgG 的比例随之升高,竞争性 IgG 捕获的 EIA(BED-EIA)可用来检测血清阳转后 HIV-IgG 所占的比例。该实验样本稀释度为 1:100,相对于低敏 EIA 1:20 000 操作简便,而且只要 HIV-IgG/非 HIV-IgG 比例保持不变,试验就不会因稀释变化而受影响,在其他亚型(A、B、D、E)无显著差别^[13]。结果能够指明是否在检测前平均大约 160 天内发生血清阳转,然而由于该实验是以 HIV-IgG 占总 IgG 的比例为基础,在不同人群中 IgG 浓度的差异可影响试验结果。IgG 捕获的 BED-EIA 在检测早期 HIV 感染上是一种新型方法,商品化的试剂盒即将投产,前景乐观,目前该法的应用主要还在研究阶段。

(3)HIV 感染者血清阳转后抗体亲和力会逐渐增加。早期感染时抗体亲和力比较低,随时间延长亲和力升高,因而可通过抗体亲和力为指标来检测 HIV 早期感染^[14,15]。传统检测抗体亲和力的方法比较繁琐,已对该方法进行了简化,使实验更易于操作^[14]。目前正在深入研究针对不同 HIV 抗原(同亚型或不同亚型)亲和力的方法。

5. STARHS 技术展望:虽然目前 STARHS 技术只是被美国食品和药品管理局归类为研究中的新方法(investigational new drug),只能作为研究而应用。然而,该方法在现场监测中的应用目前正处于开发阶段,截至 2002 年 7 月,世界各地已有 32 个实验室应用 STARHS 技术来检测 HIV 的早期感染,并取得了成功。在我国,该方法刚刚由国家参比实验室引入。相信不久的将来监测 HIV 发病率的新的方法和技术会在中国得到有效的利用。

参 考 文 献

- 1 Marcus U, Dittmar MT, Krausslich HG, et al. HIV: Epidemiology and strategies for therapy and vaccination. *Intervirology*, 2002, 45: 260-266.
- 2 Jassens RS, Satten GA, Stramer SL, et al. New testing strategy to

- detect early HIV-1 incidence estimate and for clinical and prevention purpose. *JAMA*, 1998, 280: 42-48.
- 3 HIV Incidence In New York City, 2001. HIV Surveillance and Epidemiology Program Quarterly Report (Special Supplemental Report). The New York City Department of Health and Mental Hygiene, Vol 1, No. s1, 2003.
- 4 Gouws E, Williams BG, Sheppard HW, et al. High incidence of HIV-1 in South Africa using a standardized algorithm for recent HIV seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002, 29: 531-535.
- 5 Weniger B. Experience from HIV incidence cohorts in Thailand: implications for HIV vaccine efficacy trials. *AIDS*, 1994, 8: 1007-1010.
- 6 Heyward W, Osmanov S, Saba J, et al. Preparation for phase III HIV vaccine efficacy trials: methods for the determination of HIV incidence. *AIDS*, 1994, 8: 1285-1291.
- 7 Vanichseni S, Kitayaporn D, Mastro T, et al. Continued high HIV-1 incidence in a vaccine trial preparatory cohort of injection drug users in Bangkok, Thailand. *AIDS*, 2001, 15: 397-405.
- 8 Schwarcz SK, Kellogg TA, McFarland W, et al. Characterization of sexually transmitted disease clinic patients with recent human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis*, 2002, 186: 1019-1022.
- 9 Weinstock H, Dale M, Gwinn M, et al. HIV seroincidence among patients at clinics for sexually transmitted diseases in 9 cities in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002, 29: 478-483.
- 10 Murphy G, Parry JV, Gupta SB, et al. Test of HIV incidence shows continuing HIV transmission in homosexual/bisexual men in England and Wales. *Commun Dis Public Health*, 2001, 4: 33-37.
- 11 Parekh BS, Hu DJ, 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. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17: 453-458.
- 12 Lindback S, Thorstensson R, Karlsson A, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*, 2000, 14: 2333-2339.
- 13 Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18: 295-307.
- 14 Parekh B, Pau C, Kennedy M, et al. Assessment of antibody assays for identifying and distinguishing recent from long-term HIV type 1 infection. *AIDS Res Human Retroviruses*, 2001, 17: 137-146.
- 15 Cole K, Paliotti M, Murphey-Corb M, et al. Maturation of envelope-specific antibody responses to linear determinants in monkeys inoculated with attenuated SIV. *J Med Primatol*, 2000, 29: 220-230.

(收稿日期:2004-05-12)

(本文编辑:尹廉)