

· 实验室研究 ·

HIV 抗体免疫印迹试验不确定结果的特征及鉴别方法研究

鲍作义 刘永健 王海燕 王全力 骆群 刘元东 马峰 邢颜超 童贻刚 李敬云

【摘要】 目的 研究 HIV 抗体确认不确定结果的血清学特征并比较不同实验方法鉴别不确定结果的效果。**方法** 以解放军艾滋病检测确认实验室 2005-2006 年确认的 42 例 HIV 抗体不确定者为研究对象,对血清样本进行 HIV 抗体条带免疫印迹检测、HIV 病毒载量检测和 HIV-1 p24 抗原检测,同时进行随访,将随访前后的标本同时检测,比较免疫印迹带型的进展,判断 HIV 感染的真实状况,以随访的结果为标准,判断不同的方法鉴别不确定结果的效果。**结果** (1)42 例 HIV 抗体不确定病例中,共有 8 种带型:p24(45.2%)、gp160(30.9%)、gp160±p24(11.9%)。(2)对 23 例进行 3 个月以上随访,其中 22 例带型没有变化,判断为 HIV 抗体阴性;1 例的带型在随访后出现显著进展,满足 HIV 抗体阳性诊断标准;随访证实,22 例(95.6%)的不确定是非特异反应,只有 1 例是早期 HIV 感染。(3)对 23 例通过随访确定 HIV 感染状态的病例,条带免疫印迹检测 1 例血清学阳转的病例为阳性,22 例血清学没有进展的病例中 16 例为阴性,6 例仍为不确定,特异性是 72.7%。HIV-1 p24 抗原检测 23 份标本全部为阴性,1 例血清学阳转标本漏检。检测 7 份血浆标本的病毒载量,1 例血清学阳转的病例病毒载量为 18 000 cp/ml,而 6 例血清学没有进展的病例检测结果全部低于最低检测限(<LDL)。**结论** 条带免疫印迹试验能够鉴别大约 70.0% 的不确定反应,病毒载量检测也是鉴别不确定结果的有效方法;使用这两种方法,可以对 HIV 抗体不确定进行早期鉴别诊断。

【关键词】 艾滋病病毒; 抗体; 免疫印迹确认

Study on the indeterminate results of characterization and verification of HIV antibody from Western blot test BAO Zuo-yi*, LIU Yong-jian, WANG Hai-yan, WANG Quan-li, LUO Qun, LIU Yuan-dong, MA Feng, XING Yan-chao, TONG Yi-gang, LI Jing-yun. *Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Corresponding author: LI Jing-yun, Email: lijy@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To study the serological characterization of indeterminate Western blot (WB) results of HIV antibody and to find a new way to verify the HIV antibody indeterminate results and provide references for editing "National Guideline for Detection of HIV/AIDS". **Methods** All of the 42 subjects who were confirmed as indeterminate HIV antibody in People's Liberation Army HIV Confirmation Laboratory from 2005 to 2006, were collected. Line immunoassay, HIV viral load test and HIV-1 p24 were tested and followed up for 3-6 months' to compare the changes of WB bands patterns. **Results** (1) For the 42 individuals with indeterminate HIV antibody, a total of 8 different patterns of bands were found in WB test including 45.2% of them were p24 monoband, 30.9% were gp160 monoband, 11.9% were gp160 with p24, 2.4% (only one case) were gp160gp120±, gp41p24, p24p17, gp41 or gp120 respectively. It was noticed that the most patterns of common bands with indeterminate results were p24 monoband, gp160 monoband and gp160 with p24, which composed 88.0% of the whole indeterminate WB band patterns. (2) Twenty three cases had been followed up for more than 3 months with 22 giving no WB band image change and were confirmed as HIV sero-negative. The other one with case gp160 and p24 had developed to more bands in the period of 77 days follow-up with more bands, including gp160, gp120, p66, p31, p24 and p17, showed up and was confirmed as HIV primary infection. (3) Line immunoassay was applied to all of those 23 cases who had been followed up and the results showed that only one serological change was found and the case was confirmed to be HIV-positive. Among the other 22 cases

基金项目:卫生部艾滋病防治应用性研究资助项目(WA-2006-07);国家自然科学基金资助项目(30771856)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所全军艾滋病检测中心病原微生物生物安全国家重点实验室(鲍作义、刘永健、童贻刚、李敬云);武警总医院检验科(王海燕);解放军 307 医院输血科(王全力);解放军总医院输血科(骆群);济南军区疾病预防控制中心(刘元东);成都军区疾病预防控制中心(马峰);新疆军区总医院输血科(邢颜超)

通讯作者:李敬云,Email:lijy@nic.bmi.ac.cn

without serological changes, 16 cases were proved to be HIV-negative, 6 cases were still indeterminate. The specificity was 72.7%. P24 antigen test showed negative in all the 23 cases, including the case which later was confirmed as HIV-positive. Of all the 23 originally indeterminate cases, viral loads were tested in 7 cases. Positive result was found in the case which was proved later to be HIV-positive. No viral loads were detected in the other 6 cases ($< LDL$). **Conclusion** The most common band patterns of indeterminate HIV antibody were mainly p24 monoband, gp160 monoband or with p24. Most of them (95.6%) were not infected by HIV, the bands showed up in WB test and demonstrated as non-specific reactions. Line immunoassay could determine about 70% of the indeterminate reactions. Results from viral load test also suggested that it was an efficient method to discriminate indeterminate results. With these two techniques, HIV serology could be diagnosed without 3 months' follow-up in primary infection which gave indeterminate WB results.

【Key words】 Human Immunodeficiency virus; Antibody; Western blot confirmatory test

HIV 抗体检测分为筛查和确认二个步骤, 筛查试验呈阳性反应的标本需要经过确认以后才能下结论。常用的确认实验方法是免疫印迹法(WB), 可能得出 HIV 抗体阳性、HIV 抗体阴性和 HIV 抗体不确定 3 种结论^[1,2]。HIV 抗体阳性和阴性都是明确的诊断, HIV 抗体不确定却是含糊的、模棱两可的诊断; “全国艾滋病检测技术规范”(2004 年版)规定对不确定结果需进行每 3 个月 1 次、连续 2 次、为期 6 个月的随访, 将随访的标本与第 1 次采集的标本同时检测, 如果带型没有进展或条带消失, 可以下 HIV 抗体阴性的结论; 如果在随访期间发生了带型的进展并满足诊断阳性的标准, 就可以下 HIV 抗体阳性的结论。为此本研究对 HIV 抗体不确定结果的血清学特征及鉴别不确定结果的方法进行了探讨。

材料与方 法

1. 病例及随访方法: 研究对象为 2005 年 1 月至 2006 年 12 月到解放军艾滋病检测中心实验室确认的 42 例 HIV 抗体不确定者, 主要为新兵、军人献血员和其他做 HIV 检测的军队人员, 均为男性, 其中 18~30 岁 39 例、31~39 岁 2 例、54 岁 1 例。在得出 HIV 抗体不确定的结果后进行随访, 将前后 2 份标本同时进行免疫印迹检测, 比较带型的变化, 同时还对首次标本进行 HIV 抗体条带免疫印迹检测、HIV-1 病毒载量检测和 HIV-1 p24 抗原检测。

2. HIV 抗体判断标准: 按照“全国艾滋病检测技术规范”(2004 年版)制定的标准。

(1) HIV 抗体阳性: 对初次检测的标本确认实验至少出现 2 条 env 条带(gp160/gp120、gp41)或 1 条 env 带加 1 条 p24 条带; 对初次检测为不确定进行随访的标本在随访的过程中出现了带型的进展, 满足上述 HIV 抗体阳性的诊断标准。

(2) HIV 抗体阴性: 对初次检测的标本确认实验没有任何条带出现; 对初次检测为不确定进行随访的标本随访 3 个月以上确认实验的带型没有发展, 仍不满足 HIV 抗体阳性诊断标准。

(3) HIV 抗体不确定: 对初次检测的标本确认实验有条带出现, 但是不满足 HIV 抗体阳性的诊断标准; 对初次检测为不确定进行随访的标本随访时间不足 3 个月, 确认实验的带型没有进展, 仍不满足 HIV 抗体阳性诊断标准。

3. 实验室检测方法: HIV 抗体免疫印迹检测为 Genelab 公司试剂; HIV 抗体条带免疫印迹检测为杭州澳亚公司试剂; HIV 病毒载量(HIV-1 RNA 定量)检测为 NucliSens EasyQ 试剂; 法国生物梅里埃公司的试剂和读数仪, 最低检测限是 40 IU/ml; HIV-1 p24 抗原检测用 ELISA 双抗体夹心法, 为法国生物梅里埃公司的试剂; 以上检测均按照说明书操作并判断结果。

结 果

1. 不确定结果的带型特征: 在 42 份不确定标本中共有 8 种不同的免疫印迹反应带型, 最多的是 p24, 占 45.2%; 其次是 gp160 和 gp160 ± p24, 分别占 30.9% 和 11.9%。另外还有 gp160/gp120 ±、gp41 ± p24、p24p17、gp41 和 gp120, 分别各有 1 例, 占 2.4%。p24、gp160 以及 gp160 ± p24 是本研究最常见的不确定带型, 占全部不确定的标本的 88.0% (表 1)。gp160 ± p24、gp41 ± p24 和 gp160/gp120 ± 带型中的“±”表示条带反应很弱, 两人的判读结果不一致。

2. 不确定结果的血清学进展: 对 28 例初次确认为不确定的病例进行了随访, 其中随访时间 > 3 个月、得出肯定结论的有 23 例。22 例初次检测为不确定的病例随访 3 个月以后带型没有变化, 诊断为

HIV 抗体阴性。1 例带型为 gp160 ± p24 的病例,在随访 77 d 以后,带型发展为 gp160、gp120、p66、p31、p24、p17,满足 HIV 抗体阳性诊断标准,判断该病例初次检测时处于 HIV 感染早期,HIV 抗体应答不典型,在随访的过程中 HIV 抗体血清学反应显著增强,转变为 HIV 抗体阳性(表 2)。经询问,该病例在随访的 154 d 前有一次怀疑 HIV 暴露的经历(表 3)。因此,对 23 例不确定病例 3 个月以上的随访证实,22 例(95.6%)的不确定是非特异反应,只有 1 例是早期 HIV 感染。

表1 HIV 抗体不确定的带型构成(%)

带型	例数	构成比	带型	例数	构成比
p24	19	45.2	gp41 ± p24	1	2.4
gp160	13	30.9	p24p17	1	2.4
gp160 ± p24	5	11.9	gp120	1	2.4
gp160/gp120 ±	1	2.4			
gp41	1	2.4	合计	42	100.0

表2 随访病例的血清学进展

带型	例数	随访 > 3 个月 例数	随访结果	
			阳性	阴性
p24	10	8	0	8
gp160	9	7	0	7
gp160 ± p24	3	2	1	1
gp41 ± p24	2	2	0	2
gp160/gp120 ±	1	1	0	1
gp41	1	1	0	1
p24p17	1	1	0	1
gp120	1	0	-	-
合计	28	22	1	21

表3 早期 HIV 感染病例的血清学特征

标本类型	免疫印迹确认 (带型)	病毒载量 (cp/ml)	条带免疫印迹	HIV-1 p24
首次样本	gp160 ±, p24	18 000	gp160	阴性
12 d 随访样本	gp160, p24	NT	NT	阴性
77 d 随访样本	gp160, gp120, p66, p31, p24, p17	210	NT	阴性

3. 不同实验方法鉴别不确定结果的效果:以初次确认为 HIV 抗体不确定,随访时间超过 3 个月,通过随访免疫印迹检测判断为 HIV 抗体阳性或阴性的 23 例病例为标准,观察条带免疫印迹试验、HIV-1 病毒载量和 HIV-1 p24 抗原检测鉴别不确定结果的效果。条带免疫印迹试验检测初次送检的标本,1 例发生血清学阳转的病例为不确定;22 例血清学没有进展的病例中 16 例为阴性,6 例仍为不确定,特异性是 72.7%。HIV-1 p24 抗原检测 23 份标

本全部为阴性,虽然 22 例血清学没有进展的病例全部检测为阴性,但是 1 例血清学阳转的病例检测也为阴性,发生了阳性标本的漏检。由于首次标本多数是血清,不适于病毒载量检测,只检测了 7 份血浆标本的病毒载量。1 例发生血清学阳转的病例病毒载量为 18 000 cp/ml(表 4),而 6 例血清学没有进展的病例检测结果全部低于最低检测限(< LDL)。

表4 不同方法鉴别 HIV 抗体不确定效果的比较

实验方法	HIV 抗体			特异性 (%)	敏感性
	阳性	阴性	不确定		
随访免疫印迹结果	1	22	0		
初次条带免疫印迹	0	16	7	72.7(16/22)	1/1
初次 HIV-1 p24 抗原	0	23	0	100.0(22/22)	0/1
初次 HIV-1 病毒载量 ^a	1	6	0	100.0(6/6)	1/1

注:^a 检测了 7 例

讨 论

不确定结果发生的频率在不同人群不尽相同,美国的一项研究发现^[3],没有 HIV 感染危险的献血员发生不确定结果的频率超过 20.0%,主要是针对 gag(p17,特别是 p24)的反应,这种反应与 HIV 无关。还有一项对美国献血员的研究发现^[4],HIV ELISA 阴性的人有 20.0%~40.0%的可能确认试验不确定,也就是任何一个人做免疫印迹检测都有很大的可能被诊断为 HIV 抗体不确定,这是 AIDS 检测领域存在的一个严重问题,迫切需要采取有效的方法加以解决。

一般认为,导致 HIV 抗体不确定的原因可能有两个方面^[5,6],一是 HIV 早期感染,二是非特异反应。大量研究证实^[7-10],不确定结果是早期 HIV 感染的可能性很小,绝大多数都是非特异反应。目前鉴别不确定结果的方法是随访,根据随访以后带型的变化鉴别是 HIV 早期感染还是非特异反应。HIV 抗体确认非特异反应的原因十分复杂且尚不清楚,一般认为与血清标本的加热灭活、溶血、高胆红素水平、类风湿因子、多克隆丙种球蛋白血症、系统性红斑狼疮、DR 人类白细胞抗原的抗体、多次输血和使用血液制品等因素有关。

研究显示,本研究人群中 HIV 抗体不确定的类型主要有 p24、gp160 以及 gp160 ± p24,这 3 种类型占全部不确定的 88.0%。随访证实 22 例(95.6%)的不确定是非特异反应,只有 1 例是早期 HIV 感染。国外的研究也证实多数是非特异反应。多项研究随访了大批 HIV 抗体不确定结果的献血员,证实

没有 HIV 感染危险行为的献血员均未发生 HIV 抗体的阳转, 只在有高危行为的献血员中观察到 HIV 抗体的阳转。1989 年的一项研究发现^[1], 100 名 ELISA 阴性的健康献血员中 20 人被诊断为 HIV 抗体不确定, 多数(70.0%)的带型是 p24, 在接受 HIV 抗体不确定血液的受血者中, 36.0% 在输血后转变为 HIV 抗体不确定, 但是在接受 HIV 抗体阴性血液的人中也有 42.0% 转变为 HIV 抗体不确定, 他们都没有感染 HIV。说明在随机选择的献血员和受血者中, 不确定与 HIV 的感染和传播没有关系, 多数是非特异反应。

针对不确定结果多数是非特异反应的情况, 可以采用特异性更好的实验方法进行鉴别^[11-13]。免疫印迹试验使用的是来自细胞培养纯化的病毒抗原, 难免带有宿主细胞的成份而导致交叉反应, 而条带免疫印迹试验使用重组的或合成多肽 HIV 抗原, 不带有宿主细胞的成分, 因而特异性更好。本研究的结果显示, 使用条带免疫印迹试验, 能够排除 72.7% 的不确定结果。

HIV 抗体是机体针对病毒产生免疫反应的产物, 理论上采用针对病毒的检测方法能够有效地进行病原学诊断, 鉴别非特异反应^[11]。但实际上, HIV 分离培养的方法敏感性低, 操作繁琐, 很难应用。HIV-1 p24 抗原检测方法也存在敏感性低的问题。一直以来, 体外核酸扩增方法由于影响因素多、操作复杂且易污染导致假阳性, 检测结果一直被认为只能作为参考, 不能作为诊断的依据。最近几年, HIV RNA 定量检测技术采用了实时(real time)检测方法, 在指数扩增期进行实时检测, 减少了操作步骤, 降低了污染的危险^[14,15]。污染控制和操作程序的日臻完善使得检测的准确性大幅度提高, 逐渐被应用于 HIV 感染的诊断。本研究由于标本采集的限制, 只对 7 例病例进行 HIV 病毒载量检测。1 例发生血清学阳转的病例病毒载量为 18 000 cp/ml, 而 6 例血清学没有进展的病例检测结果全部低于最低检测限(< LDL), 可看出病毒载量检测是有效的鉴别不确定结果的实验方法。而 HIV-1 p24 抗原由于敏感性较低, 存在漏诊的危险。

研究结果提示, 在本研究的人群中, p24、gp160 以及 gp160 ± p24 是最常见的 HIV 抗体不确定的类型, 其中的 95.6% 是非特异反应, 条带免疫试验和病毒载量检测能够有效鉴别不确定结果。研究结果可为修订我国艾滋病检测技术规范提供依据。得出最

后结论还需要扩大样本进行研究。

参 考 文 献

- [1] Centers for Disease Control. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. MMWR, 1989, 38(S-7): s1-7.
- [2] Constantine NT. Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. AIDS, 1993, 7:1-13.
- [3] Kleinamn S. The significance of HIV-1 -indeterminate Western blot results in blood donor populations. Arch Pathol Lab Med, 1990, 114:240-245.
- [4] Groegoulas VA, Malliaraki NE, Theodoropoulou M, et al. Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western blot may indicate an abortive infection in some low-risk blood donors. Transfusion, 1997, 37:65-72.
- [5] Jackson JB. Human immunodeficiency virus-indeterminate Western blot and abortive infection. Transfusion, 1997, 37:1-2.
- [6] Dock NL, Kleinman SH, Rayfield MA, et al. Human immunodeficiency virus infection and indeterminate Western blot patterns, prospective studies in a low prevalence population. Arch Intern Med, 1991, 151:525-530.
- [7] Jackson JB, MacDonld KL, Cadwell J, et al. Absence of HIV infection in blood donors with indeterminate Western blot tests for antibody to HIV-1. N Eng J Med, 1990, 322:217-222.
- [8] Jackson JB. Human immunodeficiency virus (HIV)-indeterminate Western blots and latent HIV infection. Transfusion, 1992, 32:497-499.
- [9] Cremonesi D, Mesquita PE, Romao MM, et al. Prevalence of indeterminate human immunodeficiency virus Western blot results in pregnant women attended at a public hospital in Presidente Prudente, Brazil. Braz J Infect Dis, 2005, 9(6):506-509.
- [10] Celum CL, Coombs RW, Lafferty W, et al. Indeterminate human immunodeficiency virus type 1 Western blots: seroconversion risk, specificity of supplemental tests, and an algorithm for evaluation. J Infect Dis, 1991, 164:656-664.
- [11] Damato JJ, O' Bryen BN, Fuller SA, et al. Resolution of indeterminate HIV-1 test data using the department of defense HIV-1 testing program. Lab Med, 1991, 22:107-113.
- [12] Tebourski F, Slim MA, Elgaaied A. The significance of combining World Health Organization and center for disease control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus type-1 Western blot results. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004, 48(1):59-61.
- [13] Tebourski F, Slim MA, Elgaaied A. Diagnosis of HIV-1 infection: importance of taking into account the anti-pol gene product reactivity in the interpretation of Western blot results. Immunol Lett, 2004, 94(1-2):39-41.
- [14] Liegler TJ, Grant RM. Nucleic acid-based HIV-1 viral load assays. HIV InSite Base Chapter [OL]. May 2006//http://www.hivinsite.com.
- [15] Constantine N. HIV antibody assays. HIV InSite Base Chapter [OL]. May 2006// http://www.hivinsite.com.

(收稿日期:2007-10-11)

(本文编辑:尹康)