

免疫印迹法带型作为判定 HIV-1 新发感染的研究

王继宝 张娜 于海英 李艳玲 段星 颜浩 杨锦 段松 蒋岩

【摘要】 目的 从 HIV 确证的免疫印迹法(WB)带型中获得新发感染相关信息。**方法** 收集云南省德宏州 2011 年经 WB 确证为 HIV 抗体阳性样本 1466 份,分别用 BED 捕获酶免疫法(BED-CEIA)和限制性抗原亲和力酶联法(LAg-Avidity EIA)检测新发感染者,分析比较 WB 检测中不同条带特征对新发感染判定的意义。**结果** BED-CEIA 或 LAg-Avidity EIA 检出的新发感染者,其 WB 的 p17、p24、p31、gp41、p51、p55、p66、gp120 和 gp160 条带反应强度与长期感染的差异有统计学意义($P < 0.05$),均低于长期感染者相应的条带反应强度。**结论** WB 条带中的 p31 呈阴性反应、WB 条带反应强度总分不高于 13 分、*env* 区条带反应强度不高于 5 分或 *pol* 区条带反应强度不高于 4 分时应高度怀疑其为新发感染。

【关键词】 HIV 新发感染;免疫印迹法带型

Study on the role of western blot band profile for the detection of recent HIV infection WANG Ji-bao¹, ZHANG Na², YU Hai-ying³, LI Yan-ling¹, DUAN Xing¹, YAN Hao³, YANG Jin¹, DUAN Song¹, JIANG Yan³. 1 Dehong Prefecture Center for Disease Control and Prevention, Yunnan 678400, China; 2 Jiangxi Provincial Center for Disease Control and Prevention; 3 National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention
Corresponding authors: JIANG Yan, Email: jiangyan03@263.net; DUAN Song, Email: dhduansong@sina.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Mega-Projects of China (No. 2012ZX10001001-001-002).

【Abstract】 Objective To obtain information on HIV disease progression through western blot (WB) band profile. **Methods** 1466 available serum samples of newly reported HIV/AIDS cases, confirmed by WB from Dehong prefecture of Yunnan province in 2011, were tested, using the BED HIV Incidence Capture Enzyme Immunoassay (BED-CEIA) and Limiting Antigen Avidity Enzyme Immunoassay (LAg-Avidity EIA), respectively. Differences of WB band profiled between recent infections and established infections were then compared. **Results** Infections defined as 'recent' showed lower mean antibody intensities to p17, p24, p31, gp41, p51, p55, p66, gp120 and gp160 in WB when compared to those established infections with statistical difference ($P < 0.05$). **Conclusion** These WB band profiles which were considered as 'recent' infections would include factors as: lack of antibody reactivity to gp41 antigen, with intensity scores of all bands lower than 13, and those intensity scores of antibody to *env* protein lower than 5 or to *pol* protein lower than 4.

【Key words】 Recent HIV infections; Western blot band

BED 捕获酶免疫法(BED-CEIA)和限制性抗原亲和力酶联法(LAg-Avidity EIA)是目前常用的新发感染检测方法,是利用 HIV-1 感染早期抗体浓度或

亲和力低于晚期的特性区分新发感染者和长期感染者^[1-4]。两种检测方法的步骤均为首先检测 HIV 抗体,阳性者再用特定的 HIV 新发感染检测方法,即一份样本必须经过至少两次实验室检测才能得到可靠的 HIV 新发感染检测结果。但 Schüpbach 等^[5,6]研究发现确证检测的免疫印迹法(WB)带型中蕴含新发感染信息,可在抗体确证检测的同时不需额外增加检测成本获得新发感染信息。为此本研究将 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 判定的新发感染者和长期感染者的 WB 带型进行比较和分析,探索其

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.10.013

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10001001-001-002)

作者单位:678400 芒市,云南省德宏州疾病预防控制中心(王继宝、李艳玲、段星、杨锦、段松);江西省疾病预防控制中心(张娜);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心参比实验室(于海英、颜浩、蒋岩)

王继宝、张娜同为第一作者

通信作者:蒋岩, Email: jiangyan03@263.net; 段松, Email: dhduansong@sina.com

中蕴含的新发感染信息。

材料与方法

1. 检测样本: 云南省德宏州 2011 年新诊断的 HIV 抗体阳性样本 1466 份(包括常规检测策略和替代检测策略), 样本人群年龄 2~81 岁, 平均(34.77±11.60)岁, 男女性别比为 2.2:1(1008/458)。其中 497 份样本仅有 WB 条带阴性信息, 另 969 份样本在分别进行 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检测后补做了 WB 确证检测, 且有 WB 确证条带反应强度的得分数据。所有样本在进行 HIV 抗体检测后均置于 -80 °C 冻存, 进行新发感染检测前将样本置 4 °C 冻融, 待平衡到室温后再检测, 检测后剩余样本仍放 -80 °C 长期冻存。

2. 检测方法:

(1) WB: 采用 HIV1+2 型抗体检测试剂盒(新加坡 MP 生物医学亚太有限公司, 批号: AE9015), 按试剂盒说明书进行 HIV 抗体确证检测, 以试剂盒中自带的强阳性和弱阳性对照作为 WB 条带反应强度的判定标准[分别代表 3 分(强阳性)和 1 分(弱阳性)], 据此将样本的 WB 条带反应强度得分由低到高依次分为 0 分(阴性)、1 分(弱阳性)、2 分(强于弱阳性, 但弱于强阳性)、3 分(强阳性), 由 2 名以上检测人员肉眼观察每个样本 WB 各条带的反应强度, 当反应强度位于 2 个等级之间时优先满足低得分(如条带反应强度 > 1 分但 < 2 分时判为 1 分, 依次类推), 并以观察结果的平均值计算得分; 组合条带得分是所属区内各条带反应强度得分之和。

(2) BED-CEIA: 采用美国 Calypte 生物医药公司的 BED-CEIA, 并严格按照说明书操作。固相载体微孔板用羊抗人 IgG 包被, 以捕获血浆或血清中的抗 HIV-1 特异性 IgG 抗体和总 IgG 抗体, 计算受检样品中抗 HIV-1 特异性 IgG 抗体占总 IgG 抗体的比例。将检测所得吸光度(A)值通过标准品吸光度(A_n)值换算为 A_n 值, A_n 值 > 0.8 为感染时间 > 168 d, ≤ 0.8 为在采样前 168 d 内感染, 从而判断新发感染者和长期感染者。

(3) LAg-Avidity EIA: 采用 HIV-1 新发感染 LAg-Avidity EIA 检测试剂盒(北京金豪制药股份有限公司, 科研试用装, 批号为 20120711, 有效期为 2013 年 7 月 10 日)。每个试剂盒配置一套质控品, 包括阴性质控品(NC)、校准品(CAL)、弱阳性质控品(LPC)和强阳性质控品(HPC)各 1 份。实验分为初筛试验和确认试验, 每次试验必须加 2 孔 NC 及

CAL、LPC 和 HPC 各 3 孔。将每次实验得到的 LPC 和 HPC 控品 A 值的中位数、NC 质控品 A 值的平均数和样品 A 值(确认试验中为 A 值的中位数)除以 CAL A 值的中位数, 得到 A_n 值。实验中质控品的 A 值和 A_n 值必须在试剂盒规定的范围内, 否则为无效实验, 需重复检测。试验操作严格按照试剂盒说明书进行, 实验流程如图 1 所示。美国 Sedia 公司生产的 LAg-Avidity EIA 商品化试剂盒的窗口期为 130 d, A_n 值的临界值为 1.5, 其操作流程与北京金豪公司生产的 LAg-Avidity EIA 科研用试剂盒相同。

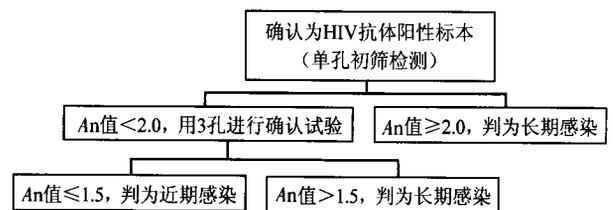


图 1 LAg-Avidity EIA 实验流程

3. 判定标准: 本研究依据 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检测结果(新发感染、长期感染)作为判定标准。在计算不同条带新发感染判定规则的敏感性和特异性时, 排除 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检测结果不一致样本。

4. 统计学分析: 采用独立样本 t 检验, 比较新发感染方法检出的新发感染与长期感染样本的 WB 条带得分, 并以本研究中新发感染判定标准计算不同条带新发感染判定规则的敏感性和特异性。以 SPSS 17.0 软件完成统计分析。

结果

1. 新发感染检测: 采用 BED-CEIA 从 1466 份 HIV 抗体阳性样本中检出 177 份新发感染和 1289 份长期感染, 新发感染者平均年龄(32.03±11.28)岁, 长期感染者平均年龄(35.14±11.59)岁。采用 LAg-Avidity EIA 从 1466 份 HIV 抗体阳性样本中检出 80 份新发感染和 1386 份长期感染, 新发感染者平均年龄(30±11.46)岁, 长期感染者的平均年龄(35±11.60)岁。

2. 新发感染者和长期感染者 WB 检测得分: 969 份样本无论是 BED-CEIA 还是 LAg-Avidity EIA, 其检出的新发感染者 p17、p24、p31、gp41、p51、p55、p66、gp120 和 gp160 条带反应强度与长期感染的差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 1 和图 2、3), 均低于长期感染者 WB 条带的反应强度。将这些 WB 条带按照其基因编码所属的区域分为 *env* 区(包括 gp41、

gp120 和 gp160)、*pol* 区(包括 p31、p51 和 p66)和 *gag* 区(包括 p17、p24 和 p55)^[7,8], 比较不同基因编码区 WB 条带反应强度。结果显示, 新发感染者 *env* 区、*pol* 区和 *gag* 区条带反应强度与长期感染者的差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 1 和图 2、3), 且均低于长期感染者。

3. 不同条带判定规则的敏感性和特异性: 在 969 份具有 WB 条带反应强度的样本中, 将 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检测结果均为新发感染的

样本判定为新发感染($n=35$), 检测结果均为长期感染的判定为长期感染($n=871$), 以此为金标准, 比较不同条带判定规则的敏感性(敏感性=具有某特定条带特征的新发感染者数/两种新发感染均判为新发感染者数)和特异性(特异性=不具有某特定条带特征的长期感染者数/两种新发感染检测方法均判为长期感染者数)。由表 2 可见, 单条条带判定规则中 p31 的敏感性和特异性均较好(敏感性和特异性均约为 80%), 即 WB 确证检测结果中, p31 呈阴性反应时应高度怀疑其为新发感染。

表 1 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检出新发感染者和长期感染者 WB 条带反应强度的 *t* 检验

条带	BED-CEIA		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	LAg-Avidity EIA		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	新发感染者 WB 反应强度 均值($n=96$)	长期感染者 WB 反应强度 均值($n=873$)			新发感染者 WB 反应强度 均值($n=35$)	长期感染者 WB 反应强度 均值($n=934$)		
gp41	1.14	1.95	7.50	0	0.44	1.92	9.77	0
gp120	1.76	2.28	5.54	0	1.03	2.27	9.99	0
gp160	2.68	2.95	5.01	0	2.22	2.92	6.25	0
<i>env</i> 区	5.57	7.19	7.07	0	3.69	7.14	12.28	0
p31	0.70	1.51	7.92	0	0.19	1.47	12.90	0
p51	1.67	2.30	5.33	0	0.58	2.28	8.67	0
p66	2.13	2.60	4.56	0	1.34	2.60	7.49	0
<i>pol</i> 区	4.49	6.41	6.72	0	2.41	6.35	13.49	0
p17	1.16	1.55	3.27	0.001	0.94	1.53	3.35	0.002
p24	2.40	2.64	2.45	0.016	2.13	2.63	2.53	0.017
p55	0.36	0.68	4.15	0	0.22	0.66	4.37	0
<i>gag</i> 区	3.92	4.87	4.10	0	3.28	4.83	3.97	0
总分	13.98	18.47	7.05	0	9.38	18.32	10.90	0

组合条带判定规则中, WB 条带反应强度总分 ≤ 13 、*env* 区条带反应强度得分 ≤ 5 和 *pol* 区 ≤ 4 等判定规则的敏感性和特异性均较高(敏感性和特异性均约为 80%), 即 WB 条带反应强度总分不高于 13 分、*env* 区条带反应强度不高于 5 分或 *pol* 区条带反应强度不高于 4 分时应高度怀疑其为新发感染, 这与 Duri 等^[9]对 HIV 血清阳转的急性期感染者的研究结果一致, 即新发感染者 *pol* 区 p31、p51、p66 条带出现的频率明显低于长期感染者。Sudha 等^[10]对不同阶段 HIV 感染者 WB 结果进行

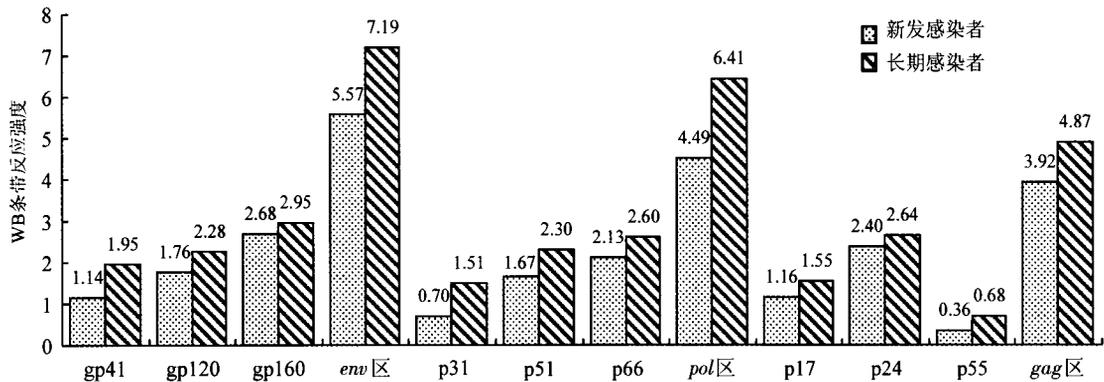


图 2 BED-CEIA 检出的新发感染者和长期感染者 WB 条带反应强度比较

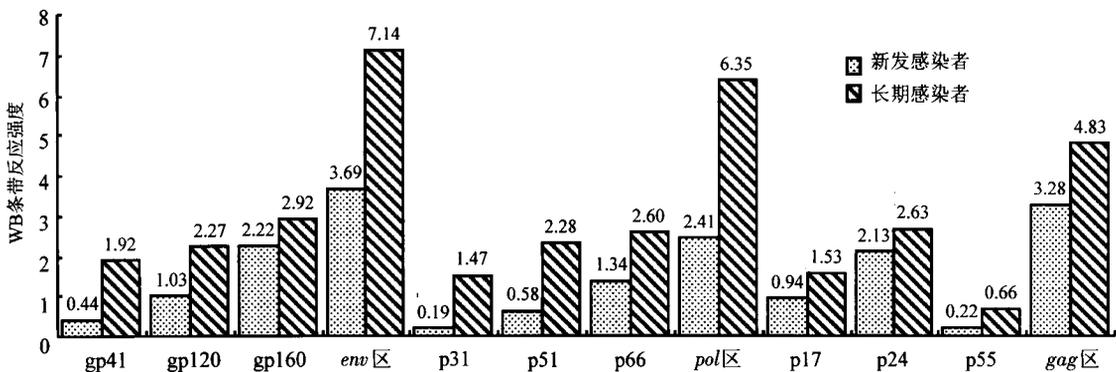


图 3 LAg-Avidity EIA 检出的新发感染者和长期感染者 WB 条带反应强度比较

表 2 WB 不同条带判定规则的敏感性和特异性(%)

条带判定规则	敏感性 (n=35)	特异性 (n=871)	条带判定规则	敏感性 (n=35)	特异性 (n=871)	条带判定规则	敏感性 (n=35)	特异性 (n=871)
p17			p55			gag 区(p17+p24+p55)		
≤0	43.3	75.5	≤0	83.3	43.5	≤0	10.0	97.4
≤1	70.0	53.2	≤1	93.3	19.6	≤1	20.0	94.5
≤2	93.3	26.5	≤2	100.0	5.1	≤2	36.7	85.6
p24			p66			≤3	56.7	72.1
≤0	13.3	96.9	≤0	16.7	99.1	≤4	66.7	56.3
≤1	23.3	90.8	≤1	66.7	90.4	≤5	86.7	39.7
≤2	46.7	76.6	≤2	100.0	71.0	≤6	90.0	24.3
p31			gp120			pol 区(p31+p51+p66)		
≤0	85.7	81.9	≤0	23.3	99.3	≤0	16.7	99.3
≤1	93.3	54.9	≤1	73.3	88.4	≤1	36.7	97.7
≤2	100.0	14.8	≤2	100.0	40.6	≤2	70.0	93.6
p41			gp160			≤3	73.3	89.8
≤0	73.3	95.3	≤1	10.0	100.0	≤4	83.3	82.2
≤1	90.0	72.7	≤2	66.7	95.4	总分		
≤2	100.0	27.4	env 区(gp41+gp120+gp160)			≤2	10.0	99.9
p51			≤1	6.7	100.0	≤5	23.3	99.7
≤0	40.0	95.3	≤2	23.3	99.8	≤6	33.3	99.4
≤1	76.7	80.5	≤3	53.3	99.0	≤7	46.7	98.9
≤2	93.3	54.3	≤4	80.0	95.8	≤10	60.0	94.7
			≤5	88.3	89.6	≤11	73.3	92.8
			≤6	90.0	72.3	≤12	76.7	90.2
						≤13	80.0	85.6
						≤15	83.3	76.3

注:总分包括 gp41、gp120、gp160、p31、p51、p66、p17、p24、p55

的研究结果显示,虽然早期感染者和晚期感染者 WB 反应条带数都较少,但早期感染者的 env 区(gp160、gp120 和 gp41)WB 反应条带部分缺失或较弱且伴有 p31 条带缺失,这与本研究结论一致;晚期感染者 env 区(gp160、gp120 和 gp41)WB 反应条带全出现且伴有 p24 条带同时出现。

讨 论

2011 年云南省德宏州新诊断的 1466 份 HIV 抗体阳性样本中, BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 检测均为新发感染者 76 份,均为长期感染者 1285 份,检测结果不一致 105 份。两种新发感染检测方法结果不一致的 105 份样本中有 101 份是 BED-CEIA 判定为新发感染,而 LAg-Avidity EIA 判定为长期感染(其中有 10 份为艾滋病患者样本);仅 4 份样本 BED-CEIA 判定为长期感染,但 LAg-Avidity EIA 判定为新发感染,均为 HIV 感染者。因此,与 BED-CEIA 相比, LAg-Avidity EIA 的特异性更好,与 Duong 等^[4]的研究结果相似。

本研究采用 WB 条带反应强度判定新发感染。随着条带反应强度的增强其特异性逐渐降低,但敏

感性逐渐增加,说明用 WB 条带进行新发感染判定的窗口期可能比 BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 的窗口期短(本研究的“窗口期”是指自抗体出现至新发感染检测方法依据其判定标准判定为近期感染所间隔的平均时间^[11])。江华洲^[8]用标准血清盘得到的 p31 的窗口期约为 38.9 d,有待于更多研究证实。BED-CEIA 和 LAg-Avidity EIA 均判定为新发感染样本中,有 30 份 p31 为阴性,有研究表明 WB 的 p31 条带的窗口期为 38.9 d^[8],即这 30 份新发感染样本的感染时间约为 38.9 d 内。30 份 p31 阴性的新发感染样本中有 26 份 p24 呈阳性反应,即 p31 抗体阳转时间迟于 p24 抗体,这与 Fiebig^[12]和 Lindback^[13]等的研究结果一致。4 份 p31 和 p24 均为阴性的新发感染样本其 WB 条带仅有 gp160 和 gp120,依据《全国艾滋病检测技术规范》^[7]中的相关规定应判为不确定样本,但是替代策略检测结果为阳性,且在 6 个月后的随访中 WB 带型有进展并达到阳性判定标准(表 3)。由此可见我国 HIV 抗体替代策略检测敏感性较好,同时提示 WB 检测结果仅有 gp160 和 gp120 时应高度怀疑其为新发感染的早期(即急性感染期),并做好检测后咨询和随访工作。日常 HIV 抗体

检测工作中,若 WB 反应条带数较少或反应强度较弱(如 *env* 区条带反应强度不高于 2 分),且无艾滋病临床症状,应高度怀疑其为新发感染;若 WB 条带不满足阳性判定标准,尤其是 gp160 和 p24 同时出现,在排除自身免疫性疾病^[14]或恶性肿瘤等有可能造成非特异性抗体反应的情况后,应怀疑其为感染早期^[15],并定期随访,防止二代传播。

表 3 4 名 HIV 感染者随访 6 个月后 WB 检测带型

感染者编号	WB 带型
1	gp160、gp120、p66、p55、gp41、p31、p24
2	gp160、gp120、p66、p55、gp41、p31、p24、p17
3	gp160、gp120、p66、p55、p51、gp41、p31、p24、p17
4	gp160、gp120、p66、p55、p51、gp41、p24

WB 条带中除蕴含新发感染的信息外,还蕴含多种信息,如 Garland 等^[16]在队列研究中发现 HIV 血清阳转后 WB 检测结果中 p55 条带的缺失与疾病进展的速度有关,即缺少 p55 条带者疾病进展速度快。WB 确证检测是判定 HIV 感染的重要实验方法,除 HIV 感染信息外,检测人员还可以利用专业知识从条带信息中发现与 HIV 疾病进程相关的信息。

参 考 文 献

[1] 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(4):295-307.

[2] Thomas HI, Wilson S, O'Toole CM, et al. Differential maturation of avidity of IgG antibodies to gp41, p24 and p17 following infection with HIV-1. *Clin Exp Immunol*, 1996, 103(2):185-191.

[3] Wei X, Liu X, Dobbs T, et al. Development of two avidity-based assays to detect recent HIV type 1 seroconversion using a multisubtype gp41 recombinant protein. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2010, 26(1):61-71.

[4] Duong YT, Qiu M, De AK, et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimates and avidity maturation studies. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33328.

[5] Schüpbach J, Gebhardt MD, Tomasik Z, et al. Assessment of recent HIV-1 infection by a line immunoassay for HIV-1/2 confirmation. *PLoS Med*, 2007, 4(12):e343.

[6] Schüpbach J, Bisset LR, Regenass S, et al. High specificity of line-immunoassay based algorithms for recent HIV-1 infection independent of viral subtype and stage of disease. *BMC Infect Dis*, 2011, 11(1):254.

[7] National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention. National guideline for detection of HIV/AIDS. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2009. (in Chinese)
中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范. 北京:中国疾病预防控制中心, 2009.

[8] Jiang HZ. Evaluation and applied research of HIV-1 screening strategy and estimation of incidence among MSM population in China. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2011. (in Chinese)
江华洲. 男男性行为人群 HIV-1 早期感染检测策略及新发感染率研究. 北京:中国疾病预防控制中心, 2011.

[9] Duri K, Müller F, Gumbo FZ, et al. Human immunodeficiency virus (HIV) types Western blot (WB) band profiles as potential surrogate markers of HIV disease progression and predictors of vertical transmission in a cohort of infected but antiretroviral therapy naïve pregnant women in Harare, Zimbabwe. *BMC Infect Dis*, 2011, 11(1):7.

[10] Sudha T, Lakshmi V, Teja VD. Western blot profile in HIV infection. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2006, 72(5):357-360.

[11] Parekh BS, Hanson DL, Hargrove J, et al. Determination of mean recency period for estimation of HIV type 1 incidence with the BED-capture EIA in persons infected with diverse subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2011, 27(3):265-273.

[12] Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*, 2003, 17(13):1871-1879.

[13] Lindbäck S, Thorstensson R, Karlsson AC, 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(15):2333-2339.

[14] Esteva MH, Blasini AM, Ogly D, et al. False positive results for antibody to HIV in two men with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 1992, 51(9):1071-1073.

[15] Bao ZY, Yang XL, Liu YJ, et al. Serological characteristics of HIV antibody indeterminate and the discrimination assay. *Chin J Microbiol Immunol*, 2010, 30(5):427-430. (in Chinese)
鲍作义, 杨晓莉, 刘永健, 等. HIV 抗体不确定结果的特征与鉴别方法研究. *中华微生物和免疫学杂志*, 2010, 30(5):427-430.

[16] Garland FC, Garland CF, Gorham ED, et al. Western blot banding patterns of HIV rapid progressors in the U.S. Navy Seropositive Cohort: implications for vaccine development. *Navy Retroviral Working Group. Ann Epidemiol*, 1996, 6(4):341-347.

(收稿日期:2013-05-21)
(本文编辑:张林东)