

# HIV 抗体检测免疫酶试剂的质量评价

王哲<sup>1</sup> 林旭东<sup>1</sup> 曾毅<sup>1</sup> 赵尚德<sup>2</sup> 李祖正<sup>2</sup> 寇静冬<sup>2</sup>

**提要** 以进口ELISA试剂作对照,结合蛋白印迹确认结果,用包括云南边境居民血清和各地送检血清的四批血清对HIV抗体检测免疫酶试剂(IE)进行质量评价。结果表明,IE敏感性达100%,特异性为99.4%,其它指标也已接近或达到进口ELISA试剂的水平,完全适用于国内HIV监测和实验室检测。由于血清量大且有代表性,所以这次质量评价结果是可信的。

**关键词** HIV抗体检测 免疫酶法 质量评价

获得性免疫缺陷综合症(AIDS)在短短十年间已波及全球大多数国家,截止1990年10月底,上报WHO的AIDS病例数已近30万,实际数字估计还要高2~3倍以上。人免疫缺陷病毒(HIV)是AIDS的病原体,可通过性接触、血液和母婴途径传播,其感染者已达数千万。我国自1984年发现血友病病人因输入进口血制品而感染HIV后,又先后在归国人员和同外国人发生性关系的同性恋者中发现HIV感染者。去年十月份,在云南边境发现HIV在静脉嗜毒者中流行,至1990年9月份,已发现368名吸毒者及其配偶被HIV感染,随着检测数量的增加,上述数字仍在迅速增加。这一切表明,HIV已通过各种途径传入我国,并开始严重威胁人民群众的健康和生命。因此,必须进一步加强HIV抗体的检测,尽快尽早地发现感染者以预防和控制HIV在我国的传播。

HIV抗体检测试剂分为初筛试验和确认试验两种,确认试验以用蛋白印迹试剂(WB)为主。初筛试剂有许多种,国际上常用的有ELISA〔1〕、PA(明胶颗粒凝集)〔2〕等。近年来,各种进口试剂已相继在国内使用,但由于来源不一,难以进行质量控制,而且价格昂贵,需要特殊仪器,不利于国内广泛使用。国产试剂的研制已取得很大成果,免疫荧光试剂作为第一个国产HIV检测试剂,为国家HIV监测作出很大贡献〔3〕;但其尚需荧光显微镜且

有非特异荧光,限制了基层应用。我们于1989年研制出HIV抗体检测免疫酶试剂,克服了免疫荧光的缺点〔4〕。免疫酶试剂(IE)在过去的一年中,已被许多HIV检测实验室应用。最近,我们又成功研制了ELISA试剂。

为评价IE试剂的质量,我们在将其用于云南边境和其它省血清流行病学调查的同时,选择了四批血清对IE和进口ELISA试剂进行比较,现将结果报告如下。

## 材料与方法

一、血清:第一批1145份血清于1989年12月采自云南边境某县,第二批807份血清于1990年上半年采自其邻县,这二批血清均为当地居民血清,其中吸毒者占很大比例。第三批240份血清为云南省卫生防疫站今年送检血清,均为吸毒者及其家属。第四批38份血清为各检测实验室今年送检的初筛试验阳性和可疑样本,包括外国人、归国人员、性病病人和妓女、献血员等。

血清均于当地分离,4℃或-20℃保存,不加防腐剂,少部分有溶血现象。

二、免疫酶法:人免疫缺陷病毒I型抗体

1 中国预防医学科学院艾滋病研究和检测中心;北京  
邮政编码100052

2 云南省卫生防疫站

检测免疫酶试剂由中国预防医学科学院艾滋病研究和检测中心生产。操作方法及结果判断见文献〔4〕，阳性结果重复一次，重复阳性的视为阳性，重复阴性的视为可疑。

三、ELISA：进口ELISA试剂分别为Abbott公司生产(1458-24)和Wellcozyme公司生产(HIV Recombinant VK57, K170910)，操作方法及结果判断参照各自说明书。

Pepti-ELISA由中国预防医学科学院艾滋病研究和检测中心生产。操作方法：血清1:50稀释后每孔100μl, 37℃ 1小时；PBS-T洗四次，加酶结合物，每孔100μl, 37℃ 30分钟；PBS-T洗四次，TMB室温显色20分钟，2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止。450nm/630nm阅读。结果判断：CUT OFF 值为阴性平均值+0.15。

ELISA所用酶标仪为Bio-Tek Microplate Auto Reader EL309。ELISA最终结果判断同IE。

四、蛋白印迹法：进口蛋白印迹试剂为Bio-Rad公司产品(Novapath™HIV-1 Immunoblot, 197-1100)，操作方法参照说明书。

国产蛋白印迹试剂由中国预防医学科学院艾滋病研究和检测中心生产，操作方法见文献〔5〕。

蛋白印迹法的结果判断见文献〔6〕。

### 结 果

一、第一批血清的初筛和确认结果：用IE和Abbott ELISA对第一批血清进行初筛所检出的阳性结果中有225份相同，8份不同(表1)。对这233份血清用Wellcozyme ELISA检测并用蛋白印迹试剂(WB)进行确认(表2)。对WB阳性的220份血清，三种方法均为阳性。WB5份可疑样本(均为P24抗体阳性)IE与Abbott ELISA阳性，Wellcozyme ELISA为阴性

二、第二批血清检测结果：用IE, Pepti-ELISA和 Wellcozyme ELISA对第二批血

清进行检测，ELISA结果有1份阳性，EI结果除这一份外还有3份阳性。WB对这4份血清确认结果，只有三种方法查到的1份阳性(表3)。

表1 云南HIV感染高流行区血清HIV抗体检测初筛结果

方法	血清数	阳性数	阳性率	阴性数	阴性率
IE	1145	230	20.1%	915	79.9%
ELISA	1145	228	19.9%	917	80.1%

注：ELISA为Abbott试剂盒

表2 云南HIV感染高流行区血清HIV抗体检测确认结果

血清数	ELISA						
	IE		Abbott		Wellcozyme		
	P	N	P	N	P	N	
P	220	220	0	220	0	220	0
WB ID	5	5	0	5	0	0	5
N	8	5	3	3	5	0	8
总计	233	230	3	228	5	220	13

注：P-阳性，N-阴性，ID-未确定

表3 云南HIV感染低流行区HIV抗体检测结果

血清数	ELISA						
	IE		Wellcozyme		Pepti		
	P	N	P	N	P	N	
P	1	1	0	1	0	1	0
N	806	3	803	0	806	0	806
总计	807	4	803	1	806	1	806

注：P-阳性，N-阴性

三、第三批血清检测结果：云南省卫生防疫站1990年对几千份血清初筛共发现240份阳性和可疑结果，经WB确认224份阳性，14份阴性，2份可疑。二份可疑结果的带型为P24、P24+P31+P55。用IE对这批血清进行检测，并对照Abbott试剂初筛结果，除分别有2份和5份假阳性外，还分别有4份和6份可疑IE可疑为第一次阳性，第二次阴性。ELISA可疑3份

为第一次阳性,第二次阴性;三份其OD值接近CUT OFF值(表4)。

表4 1990年云南省血清HIV抗体确认结果

	血清数	IE			ELISA		
		P	ID①	N	P	ID②	N
P	224	224	0	0	224	0	0
WB ID	2	2	0	0	2	0	0
N	14	2	4	8	5	6	3
总计	240	228	4	8	231	6	3

注: P-阳性, N-阴性;

IE: 免疫酶法;

ELISA: Abbott公司试剂盒

①初筛阳性, 重复阴性;

②三份初筛阳性, 重复阴性; 三份OD值接近CUT OFF值

四、第四批血清检测结果: 从今年各检测实验室送检血清中取38份经蛋白印迹确认12份阳性, 18份阴性, 8份可疑, 可疑结果带型为P18、P24和P55。用IE和Wellcozyme试剂对这批血清进行检测, WB阳性和可疑结果IE为阳性, WB阴性结果IE均为阴性; Wellcozyme试剂检测WB阳性血清为阳性, 阴性和可疑结果均为阴性(表5)。

表5 第四批血清HIV-1抗体检测结果

	IE		W-ELISA		总计
	P	N	P	N	
P	12	0	12	0	12
WB ID	8	0	0	8	8
N	0	18	0	18	18
总计	20	18	12	26	38

注: IE-免疫酶, W-Wellcozyme,

P-阳性, N-阴性, ID-可疑

五、对IE和ELISA试剂质量评价: 将各批数字汇总, 按文献〔6〕规定将IE和Abbott ELISA可疑结果视为阴性, WB可疑结果对IE和Abbott ELISA视为阳性, Wellcozyme ELISA忽略不计, 这样统计出三种试剂检测结

果(表6), 并计算出这三种试剂的质量系数(表7)。

表6 各批血清HIV-1抗体检测结果

	Western Blot	P+ID	N	总计
IE	P	472	10	482
	N	0	1748	1748
	小计	472	1758	2230
A-ELISA	P	451	8	459
	N	0	926	926
	小计	451	934	1385
W-ELISA	P	457	0	457
	N	0	853	853
	小计	457	853	1310

注: P-阳性, N-阴性, ID-可疑;

A-Abbott, W-Wellcozyme

表7 三种试剂质量系数

	IE	A-ELISA	W-ELISA
敏感性	100%	100%	100%
特异性	99.4%	99.1%	100%
假阳性率	0.6%	0.9%	0
假阴性率	0	0	0
阳性预示值	97.9%	98.3%	100%
阴性预示值	100%	100%	100%
粗一致性	99.6%	99.4%	100%
调整一致性	99.3%	99.4%	100%
约登指数	0.994	0.994	1

注: IE-免疫酶, A-Abbott, W-Wellcozyme

### 讨 论

前几年, 由于国内发现的HIV感染者极少, 用于试剂质量评价的阳性血清大多数是国外的AIDS病人血清, 数量不多, 代表性差, 无法对HIV检测使用的试剂予以正确评价; 而且由于未经现场考核, 难以了解试剂适用性, 稳定性等情况。云南边境HIV流行给试剂应用

和评价提供了一个极好的现场,一年来监测中发现的阳性感染者包括感染初期、感染潜伏期和AIDS病人,其滴度强弱不一,大多数较近年在国内发现的被HIV感染的外国人血清HIV抗体高度为低。本文所选用的阳性血清基本包括了近年来国内发现的HIV感染者血清,总数达472份,超过了国内以往进行试剂评价所用阳性血清数几倍甚至十几倍<sup>[7]</sup>,阴性血清也选择了同阳性血清相同来源的血清,同时有意识选择了一批WB可疑及初筛假阳性的血清。整个血清数量大,所用阴性血清较多,符合我国HIV感染流行情况。血清以云南边境居民为主,并包括了吸毒者、妓女、性病病人,归国人员及外国人等各高危人群,因此,这次质量评价结果是可信的。

第一批血清及第二批血清为某二县大规模采集的血清标本,前者为HIV感染高发区,后者为HIV感染低发区,血清包括该地区不同民族,不同年龄和性别,不同职业及高危人群的血清,血清均于当地采集,按日常检测进行操作,同时考核了试剂及血清的运输保存情况。第三、四批血清以阳性和可疑标本为主,进一步评价试剂的敏感度。在结果的计算上,由于IE和Abbott ELISA为全病毒抗原试剂,WB可疑结果视为阳性;Wellcozyme ELISA为重组抗原试剂,所以对WB可疑结果忽略不计。在检测时,进行严格质量控制,排除了操作上的问题。这样得到的结果基本上反映了试剂本身的质量,也是以往质量评价及产品审核所无法比拟的。

质量评价结果表明,WB阳性血清对三种试剂均有反应,其敏感度均达100%。IE和Abbott试剂能查出可疑样本,但有少数非特异性,其特异性均为99%以上,Wellcozyme试剂比上述二种试剂更为特异,但不能测出可疑结果。三种试剂结果符合初筛试剂的要求,由于本文未包括云南省卫生防疫站用Abbott试剂初筛阴性的数字,故Abbott试剂特异性等稍低。Pepti ELISA仅用于检测第二批样品,其

结果与Wellcozyme试剂相同。该试剂目前仅处于试制阶段,经大批量血清检测,结果很好,可望成为在HIV检测中应用的初筛试剂<sup>[8]</sup>。

第四批血清根据原始送检材料,所用初筛方法为ELISA、PA、LA(乳胶凝集)、IF(免疫荧光)、IE等,其中12份经两种或两种以上方法检测。各方法阳性结果与WB结果比较,其阳性、可疑和阴性数为:ELISA: 3, 3, 5; PA: 3, 3, 7; LA: 3, 0, 5; IF: 7, 0, 4; IE: 5, 3, 1<sup>[9]</sup>。假阳性以PA最多,IE仅一份,说明IE适用于我国情况,与IF比较,IE假阳性少,而且能查到可疑样品,比IF更为敏感。上述结果及我们复查的结果表明试剂使用中存在着操作上的问题,影响了检测质量,因此有必要对各HIV检测实验室进行质量评估,以进一步完善提高其操作水平和监测质量。

近年来,随着监测的扩大和深入,发现了十几例可疑标本,其带型多为gag基因编码的P18、P24、P55,个别为pol基因编码的P31,未见env基因编码的蛋白带型。对其中几份追踪监测的结果,证实为非特异反应,对其它几份还在继续追踪监测中<sup>[9]</sup>,但尚不能排除早期感染的可能。因此,在初筛试验中还应使用全病毒抗原制备的试剂。文献<sup>[6]</sup>推荐了PA→ELISA程序,由于尚无国产PA试剂而无法大面积推广。IE试剂在过去一年来根据使用情况,不断改进完善,其价格低廉,适用性强,敏感性高,特异性高于PA试剂,操作简单,对仪器要求低,可作为初筛首选试剂。至于ELISA试剂,作为复查,应使用重组抗原和多肽抗原制备的试剂,如Pepti ELISA和Wellcozyme ELISA,从结果上看,Pepti ELISA完全可以替代进口试剂作为复查及大规模HIV抗体检测使用。用IE→Pepti-ELISA比用进口PA→ELISA试剂价格低数倍,可以大大增加监测数量。目前,已研制成功国产HIV抗体快速诊断方法并准备在国内试用。

### Quality Evaluation of the Immunoenzymatic Reagent for Detection of Antibody to HIV

Wang Zhe, et al, AIDS Research and Surveillance Center, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

Comparing with foreign ELISA reagent and Western blot, evaluation of the quality of the immunoenzymatic reagent was done by testing four set of sera from residents in the border of Yunnan province and other provinces results suggested that the sensitivity of IE was 100% and its specificity was 99.4%. Other indexes were similar to imported ELISA reagent. So IE reagent can be used in national HIV surveillance. The quality evaluation is credible because of the great number of tested sera.

**Key Words** HIV antibody detection Immunoenzymatic test Quality evaluation

#### 参 考 文 献

1. McDougal JS, et al. Immunoassay for the detec-

tion of quantitation of infectious human retrovirus lymphadenopathy-associated virus (LAV). J Immunol Methods 1985; 76: 171.

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. 王必嫦, 等. 应用间接免疫荧光试验检测我国正常人和血友病病人血清中嗜T细胞Ⅲ型病毒抗体. 病毒学报 1985; 1(4): 391.  
4. 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.  
5. 邵一鸣, 等. 人免疫缺陷病毒蛋白印迹法的改进. 病毒学报 1990; 6(2): 184.  
6. 全国HIV检测管理规范 (试行). 艾滋病简报 1990; 1: 3.  
7. 郑锡文, 等. 国产HIV抗体检测试剂盒的评价. 中华流行病学杂志 1990; 11(3): 141.  
8. 王哲, 等. 合成多肽用于HIV诊断的研究. I. ELISA方法的建立. 待发表.  
9. 王哲, 等. 1990年HIV抗体确认工作. 艾滋病简报; 1991; 1: 3.

## 一起百日咳爆发性流行的调查报告

湖北省潜江市卫生防疫站· 胡向东

1989年8月10日至11月27日潜江市周矶农场议合桥村发生一起百日咳爆发性流行。现将流行病学调查结果报告如下:

**一、调查方法:** 逐户进行登记、复核、诊断病人。百日咳诊断标准按卫生部1987年6月5日颁布的《计划免疫技术管理规程》第六章针对疾病的诊断及疫情控制。收集该村历年百日咳疫情情况、百白破预防接种等有关资料。

**二、流行概况。** 议合桥村地处江汉油田腹地, 交通便利。全村有六个小队, 总人口1818人。1989年8月10日至11月27日共发病35例。发病率19.25%, 其中男13例, 占发病数的37.14%, 女22例, 占62.86%。年龄最小的8个月, 最大10岁, 平均年龄4.61岁。大年龄组发病较多, 0~3岁发病人数17例, 4~7岁13例, 8~10岁5例。病例分布于25户, 其中一户一例的14户, 占发病户数的60%, 一户两例的10户, 占

40%。

**三、流行经过:** 首发病例为该村四队6岁男孩。发病时间为1989年8月10日, 接触史不详。此后常与患儿一起玩耍的三名儿童相继于8月14日和8月下旬发病。再由患病学生带到学校, 再由学生从学校带入各小队及家庭, 直到全村发生流行。从8月出现病例后, 9月份病例增加, 10月达到高峰, 11月下旬病例下降。

**四、流行原因分析:** 本次爆发性流行原因复杂, 但易感者积累是主导因素。该村已连续几年未发生百日咳流行, 易感人群逐年增加, 一旦传染源引入, 即可形成流行。调查表明35例患者只有3人仅种过一针百白破混合制剂。1985至1988年该村百白破基础免疫平均接种率为31.91%。此外疫情发生后, 村卫生室、农场医院都未及时上报疫情, 传染源未得到及时治疗 and 隔离, 亦是此次流行原因之一。