

金标层析法与酶联免疫吸附试验初筛 HIV1+2 型抗体对比分析

朱柏林(江西省抚州市中医院检验科 344000)

【摘要】 目的 对金标层析法(GICA)试剂和酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂初筛 HIV1+2 进行对比分析,评估 GICA 试剂的品质,并将筛查出阳性血清进行免疫印迹试验(WB)确认,探讨筛查结果与 WB 试验结果的关系。**方法** 选用市面上口碑较好的 5 个厂家的艾滋病病毒(HIV)抗体 GICA 快速筛查试剂与 ELISA HIV 抗体初筛试剂平行检测 16 780 例血清标本,初筛阳性血清送疾控中心用 WB 试验做确认,对 WB 试验结果不确定者进行 4、8 周随访检测,8 周随访标本补充 HIV-1 病毒载量检测。**结果** 7 种试剂敏感性为 99.23%~100.00%,其中 3 种 GICA 试剂在敏感性上已经达到 ELISA 试剂的水平(100%),假阳性率为 0.08%~0.12%,功效率均在 99.80%以上,282 例初筛阳性血清经 WB 法确认有 260 例为阳性,5 例不确定血清经随访检测确定均为阴性,初筛试剂阳性率可达 92.20%。**结论** GICA 检测试剂筛检 HIV 抗体检测敏感性、特异性和功效率均较高,某些厂家生产的试剂在敏感性、特异性方面已经达到了 ELISA 试剂的水平,且快速、简便、价廉,是理想的 HIV 抗体筛查试剂。

【关键词】 HIV1+2 型抗体; 金标层析法; 酶联免疫吸附试验; 免疫印迹

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.017 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)10-1341-03

Comparison between GICA and ELISA for the detection of HIV1+2 antibody ZHU Bo-lin (Department of Clinical Laboratories, Institute of Traditional Chinese Medicine of Fuzhou, Fuzhou, Fujian 344000, China)

【Abstract】 Objective To compare the performance of colloidal gold immunochromatographic (GICA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human immunodeficiency virus 1+2 (HIV1+2) antibody. **Methods** A total of 16 780 serum samples were tested detected by GICA kits and ELISA kit of 5 suppliers. The positive samples were then confirmed by western blot(WB) assay. Those with indefinite results of WB detection were re-tested 4 and 8 weeks later, and HIV-1 viral load testing(VL) was detected at the 8th week. **Results** Sensitivities of the 7 sets of kits were 99.23%—100.00%, including 3 sets of GICA kit with sensitivity of 100% as ELISA kits, false positive rates of 0.08%—0.12% and effective rates higher than 99.80%. In 282 samples with positive result of primary screening, 260 cases were confirmed to be positive. Five samples with indefinite results of WB detection were confirmed to be negative by follow-up detection. The positive rate of primary screening was 92.20%. **Conclusion** The sensitivity, specificity and effective rates of GICA reagents could be high, and performance of kits from some suppliers could reach the level of ELISA kits, and GICA detection might be fast, easy to operate and with low cost, which could be ideal reagents for screening HIV antibody.

【Key words】 HIV1+2 antibody; GICA; ELISA; Western blot

艾滋病病毒(HIV)抗体检测具有特殊性,检测结果的准确与否对就诊者的身心产生很大的影响,直接关系到患者以后的生活和治疗。因此,在实验室检测质量保证的基础上,对检测试剂的质量提出了更高的要求。检测 HIV 抗体常用的初筛方法有金标层析法(GICA)试剂和酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂,本文现将市面上应用广泛的几种 GICA 试剂和 ELISA 试剂进行 HIV 抗体初筛,并进行免疫印迹试验(WB)确认,探讨 GICA 检测 HIV 1+2 型抗体试剂的发展状况及筛查结果与 WB 试验结果的关系,为各医疗机构选择试剂提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源

1.1.1 HIV 抗体国家参考品(中国药品生物制品检定所),此参考品由 20 支阴性参考品、20 支阳性参考品、1 支基质血浆、5 支最低检出限参考品组成。

1.1.2 从美国波士顿生物医学有限公司(BBI Diagnostics, West Bridgewater, MA, USA)购买 8 套 HIV-1 阳转血清盘,包括 PRB924、930、940、942、943、944、946、948,每套含有 4~8 份系列标本,共 45 份。

1.1.3 2010 年 1 月至 2011 年 10 月来本院就诊的临床可疑患者、手术前检测人员、自愿检测者和孕产妇的血清标本 16 780 例。潜在的标本干扰因素如下:溶血、类风湿因子(RF)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类 T 淋巴细胞病毒-1(HTLV-1)、乙肝病毒表面抗原(HBsAg)、EB 病毒(EBV)和甲型肝炎病毒(HAV)感染。

1.2 仪器与试剂 GICA: HIV 抗体筛查试剂为人类免疫缺陷病毒(HIV1+2 型)抗体检测试剂盒(GICA)由潍坊市康华生物技术有限公司提供;人类免疫缺陷病毒(HIV 1+2)抗体诊断试剂盒(GICA)由北京金豪制药股份有限公司提供;人类免疫缺陷病毒抗体(HIV 1/2)诊断试剂盒(GICA)由广州万孚

生物技术有限公司提供;人类免疫缺陷病毒(HIV 1+2 型)抗体诊断试剂盒(GICA)由北京万泰生物药业股份有限公司提供;人类免疫缺陷病毒抗体诊断试剂盒(GICA)由英科新创(厦门)科技有限公司提供。ELISA: HIV 抗体筛查试剂(第 3 代)为人类免疫缺陷病毒 HIV (1+2 型) 抗体诊断试剂盒(ELISA),由北京万泰生物药业股份有限公司提供;第 4 代试剂为人类免疫缺陷病毒抗原抗体诊断试剂盒(ELISA),由北京万泰生物药业股份有限公司提供。WB:MP 生物医学亚太有限公司,人类免疫缺陷病毒(HIV 1+2)型抗体免疫印迹试剂(HIV BLOT 2.2)。HIV-1 核酸定量测定试剂:法国生物梅里埃公司 NucliSense EasyQ HIV-1 version1.2 包括裂解液试剂、提纯试剂、扩增检测试剂。以上试剂均经中国药品生物制品监督管理局注册批准,批检合格,并在有效期内使用。严格按照试剂盒说明书进行试验操作。

1.3 方法

1.3.1 HIV 抗体国家参考品检测标准 20 支阴性参考品至少 18 份结果为阴性;20 支阳性参考品结果全部为阳性;1 支基质血浆结果为阴性;5 支最低检出限参考品至少 3 份结果为阳性。

1.3.2 HIV 阳转血清盘检测标准 8 套 HIV-1 阳转血清盘为 8 个不同患者不同时期的系列阳转血清,阳性标本的检出可用于评价试剂的质量。

表 1 7 种 HIV1+2 型抗原/抗体筛查试剂检测 HIV 抗体国家参考品的结果(份)

国家参考品	标准要求	GICA (康华)	GICA (金豪)	GICA (万孚)	GICA (万泰)	GICA (英科新创)	ELISA 第 3 代(万泰)	ELISA 第 4 代(万泰)
阴性参考品 20 份	至少 18 份结果为阴性	20(—)	19(—)	19(—)	1(—)	19(—)	20(—)	20(—)
阳性参考品 20 份	结果全部为阳性	20(+)	20(+)	20(+)	20(+)	20(+)	20(+)	20(+)
基质血浆 1 份	结果为阴性	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
最低检出限 5 份	至少 3 份结果为阳性	3(+)	3(+)	3(+)	3(+)	3(+)	3(+)	4(+)

注: + 表示, — 表示阴性。

2.3 收集标本检测结果 用不同厂家的 HIV1+2 型抗体筛查试剂平行检测近两年收集的 血清标本,筛查阳性标本共 282 例,将筛查阳性标本送市疾控中心进行确认试验。经 WB 法确认,其中 260 例 HIV-1 抗体阳性,22 例阴性,初筛试剂阳性符合率可达 92.2%,未发现 HIV-2 抗体阳性者,5 例不确定,7 种筛查试剂的结果见表 2。根据表 2 结果,计算出各种试剂的敏感性、特异性、假阳性率、假阴性率、功效率、阳性预期值、阴性预期值和约登指数,见表 3。

表 2 7 种 HIV1+2 型抗原/抗体筛查试剂检测结果(n)

试剂	真阳性	假阳性	真阴性	假阴性
GICA(康华)	260	16	16 504	0
GICA(金豪)	260	14	16 506	0
GICA(万孚)	259	17	16 503	1
GICA(万泰)	260	19	16 501	0
GICA(英科新创)	258	16	16 504	2
ELISA 第 3 代(万泰)	260	14	16 506	0
ELISA 第 4 代(万泰)	260	12	16 508	0

1.3.3 标本初筛 所有标本用 GICA 法和 ELISA 试剂进行平行检测。

1.3.4 潜在干扰标本的检测 评价试剂的特异性。

1.3.5 WB 试验确认阳性标本 分析反应条带出现率。

1.3.6 标本确认 凡阳性标本用 WB 试剂进行确认,WB 试验不确定者初检 4、8 周后进行随访,8 周随访标本补充 HIV 病毒载量检测。

1.3.7 WB 试验中阴性标本分析 GICA、ELISA 显色程度与之对应关系。

2 结 果

2.1 HIV 抗体国家参考品检测结果 7 种试剂平行检测 HIV 抗体国家参考品,结果均符合质量要求(表 1)。

2.2 HIV 阳转血清盘检测结果 根据 BBI 公司 HIV 阳转血清盘的背景资料,使用第 3 代抗体检测试剂,在 45 份标本中最多能检出 16 份阳性;本研究中使用康华 GICA 试剂、金豪 GICA 试剂、万泰 GICA 试剂、万泰第 3 代 ELISA 试剂的定性结果与背景资料一致,达到了最佳水平;用英科新创 GICA 试剂检出了 15 份阳性标本(PRB943-05 未能检出);万孚 GICA 试剂虽然也检出了 15 份阳性标本,但其中 PRB9464~2 为假阳性,而 PRB943-06 和 944-05 未能检出。在每套 BBI 阳转血清盘中,第 4 代 ELISA 检测试剂都比第 3 代 ELISA 检测试剂较早检出 HIV 感染。

2.4 潜在干扰标本检测结果 溶血、RF、HCV、HTLV-1、HBsAg、EBV、HAV 7 个不同类型潜在干扰标本需要评估的标本数和实际评估的标本数均为 25 个。175 个潜在干扰标本经 GICA 试剂检测均为阴性,经 ELISA 检测没有一个 S/CO>1,92%(161/175)的标本结果 S/CO<0.5。

2.5 WB 试验检测结果 260 例抗体阳性及 5 例抗体不确定标本 WB 反应条带分析:WB 试验确认阳性的 260 例标本中出现 9 条带的为 147 例,8 条带的为 42 例,7 条带的为 20 例,三者占阳性标本总数的 80.4%。gp160 和 p24 的出现率最高,均为 100%,p66、gp120、p51、gp41、p31、p55、p17 出现率分别为 96.9%、96.2%、95.0%、93.8%、93.8%、93.1%和 88.5%,未见 HIV-2 型特异性条带。5 例不确定标本中,2 例仅出现 p24 带,1 例出现 gp160,1 例出现 p17 和 gp160,1 例出现 p31 和 p24。

2.6 5 例 HIV 抗体不确定者流行病学资料调查及随访检测结果 5 例 HIV 抗体不确定者 4 男 1 女,均自述无不洁性行为,无输血史,无吸毒史。1 例女性 HIV 抗体不确定者有人流史,人流手术在正规医院进行,对其配偶调查否认有与 HIV 感染相关的高危行为;4 例男性 HIV 抗体不确定者中 2 例有无

偿献血史,均由单位组织,法定血站献血。4、8 周随访 WB 试验检测:3 例带型无变化,1 例 8 周随访测条带消失,1 例条带

减少。8 周随访检测标本 HIV-1 病毒载量,结果均小于最低检测限(50 IU/mL),判为阴性结果,见表 4。

表 3 7 种 HIV1+2 型抗原/抗体试剂诊断性能指标

不同厂家试剂	敏感性 (%)	特异性 (%)	假阳性率 (%)	假阴性率 (%)	阳性预期值 (%)	阴性预期值 (%)	功效率 (%)	约登指数
GICA(康华)	100.00	99.90	0.10	0.00	94.20	100.00	99.90	0.999 0
GICA(金豪)	100.00	99.92	0.08	0.00	94.89	100.00	99.92	0.999 2
GICA(万孚)	99.62	99.90	0.10	0.38	93.84	99.99	99.89	0.995 2
GICA(万泰)	100.00	99.88	0.12	0.00	93.19	100.00	99.89	0.998 8
GICA(英科新创)	99.23	99.9	0.10	0.77	94.16	99.99	99.89	0.991 3
ELISA 第 3 代(万泰)	100.00	99.92	0.08	0.00	94.89	100.00	99.92	0.999 2
ELISA 第 4 代(万泰)	100.00	99.93	0.07	0.00	95.59	100.00	99.93	0.999 3

表 4 5 例 HIV 抗体不确定者随访检测结果

病例	初检条带分布	4 周后 条带分布	8 周后 条带分布	HIV-1 病毒载量 (IU/mL)	结果
标本 1	p24	p24	/	<50	阴性
标本 2	p31,p24	p31,p24	p31	<50	阴性
标本 3	gp160,p17	gp160,p17	gp160,p17	<50	阴性
标本 4	p24	p24	p24	<50	阴性
标本 5	gp160	gp160	gp160	<50	阴性

注:/表示无数据。

2.7 WB 试验中阴性标本分析 282 例初筛阳性标本中经 WB 试验确认有 22 例为阴性。其中 ELISA:1<S/CO<4;GICA:弱阳性为 14 例;ELISA:4<S/CO<7;GICA:阴性为 2 例;ELISA:S/CO<1;GICA:弱阳性为 6 例。

由此可见 WB 试验确认的 22 例阴性标本中 GICA 法结果为弱阳性的有 20 例,结果判定根据显色程度,显色 0.1~2.0 可判定为弱阳性。可见 GICA 法弱阳性结果时与 WB 确认试验的符合度不高,反之中性标本与强阳性标本与 WB 确认试验完全符合。

3 讨 论

7 种试剂平行检测 HIV 抗体国家参考品,结果虽然均符合预期的质量要求,但在检测最低检出限标本时,第 4 代 ELISA 检测试剂要优于第 3 代 ELISA 检测试剂,敏感性较强。HIV 阳转血清盘是评价 HIV 早期感染检测方法的有效工具,本研究所用的阳转血清盘是采自 HIV-1 抗体、p24 抗原和(或) HIV RNA 阳转期间献血者的系列血样。由于背景信息清楚,便于各检测方法间的比较。第 4 代 HIV 试剂相对于第 3 代试剂,可以通过抗原检测缩短窗口期,这对诊断 HIV 早期感染、保证血液安全等具有一定的意义。

本研究中,表 2 数据表明康华、金豪、万泰 3 种 GICA 试剂在敏感性已经达到了 ELISA 的水平(100%),不存在漏检,在特异性方面,金豪 GICA 试剂与万泰第 3 代 ELISA 的相同(99.92%),其他 GICA 试剂均达到了 99.9%以上,无显著差异,口碑较好厂家的 GICA 试剂已经在特异性和敏感性方面已经达到了 ELISA 试剂的水平。

ELISA 是利用酶催化底物反应的放大作用^[1-3],用来提高特异性抗原抗体反应的敏感性,其特点为特异性和灵敏度高,准确性、重复性好,但实验操作繁琐,干扰因素较多,且耗时较长,易出现假阳性^[4],对操作人员的要求也较高,故适合需要检验大量标本的 HIV 实验室使用。GICA 是继 ELISA 之后发展起来的一种固相免疫测定技术,以硝酸纤维素膜为反应介质,胶体金作为标记物,利用免疫层析来检测抗原或抗体^[5]。该方法操作简便、快速,结果立即可读,无需特殊设备,稳定性好,在室温即可储存,最大程度的避免标本处理、温度等对实验结果的影响,既可用于批量检测,也可用于少量标本的检测,现在临床和各医疗机构已广泛使用。由于筛查试剂方法的不同其结果也有所差异,本次筛查试验的假阳性率为 0.08%~0.12%,假阳性反应的原因可能是与筛查试剂敏感性高及一些传染病病原体 and 某些自身免疫性疾病患者自身抗原与 HIV 某些抗原决定簇有交叉反应有关^[6-8],假阳性标本存在于 WB 试验抗体阴性与不确定标本中,且 GICA 显色较弱,因此筛查弱阳性结果尤其要慎重,必须经确证试验才能报告结果。

此次研究中有潜在标本干扰因素标本,如溶血、RF、HCV、HTLV-1、HBsAg、EBV 和 HAV。经 GICA 检测,干扰因素标本结果均为阴性,ELISA 试剂检测 S/CO 值均小于 1,说明上述干扰因素标本可基本排除感染 HIV 的可能。

WB 实验出现了 5 例 HIV 抗体不确定,相对初筛结果,这 5 例不确定血清 GICA 的显色程度较弱,ELISA 的 S/CO<4。HIV 抗体不确定结果发生的概率和原因不尽相同,不同的研究结果也略有差异。一般认为,HIV 抗体不确定结果的原因可能有两个方面,一是 HIV 早期感染,二是非特异性反应,不确定者是早期 HIV 感染的可能性很小,绝大多数是非特异性反应。本实验经随访最终确定剩余 5 例 HIV 抗体不确定者为阴性,这与文献^[9]报道相符,在低流行人群中,HIV 抗体不确定标本最终以阴性转归为主。

世界卫生组织认为,理想的 HIV 抗体筛查试剂应是快速、简便、价廉、有高敏感性及特异性,室温保存并且判断结果直观^[10]。随着生物技术的发展,越来越多厂家生产的 GICA 法 HIV 抗体筛查试剂(比如 GICA 康华、金豪、万泰试剂)的敏感性和特异性有了很大的提高,有的甚至达到了 ELISA 的水平,是理想的 HIV 抗体筛查试剂。任何一种试(下转第 1346 页)

CHD 相关性报道。

本研究结果显示,病例组母亲 C/T 型及 T 等位基因频率分别为 54.84%和 27.42%,对照组分别为 40.32%和 20.16%,C/T 型及 T 等位基因频率分布在两组均差异无统计学意义($P>0.05$),提示母亲 C770T 突变与子代 CHD 发病无明显相关性;C/T 型 OR 略大于 1.0,提示在广西人群中,母亲 C770T 位点可能并不足以构成子代 CHD 发病的独立遗传危险因素。此外,结果还显示,病例组 C/T 型及 T 等位基因频率分布与对照组比较差异亦无统计学意义($P>0.05$),这表明 C770T 突变与广西儿童 CHD 发病无明显相关性,并进一步证实,在广西人群中,母亲 C770T 突变不足以构成子代 CHD 发病的独立遗传危险因素。钟秋安等^[9]检测 115 对广西 CHD 患儿及对照儿父母 CBS T833C 基因型,结果也未发现父母 CBS T833C 基因型与子女 CHD 存在明显关联性。据此推测在广西人群中,子代 CHD 的发病可能与 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶或蛋氨酸合成酶等 Hcy 其他代谢途径的相关酶基因突变有关。由于 CHD 是多基因共同作用而形成的疾病,仅仅从母亲 CBS 基因某个或某几个位点突变来确定其对子代 CHD 发病的作用,其意义可能较为有限,况且,研究本身受标本例数及基因位点代表性等因素的限制。因此,要全面阐述母亲 CBS 基因突变与子代 CHD 发病的相关性,仍需要在增加标本例数的基础上开展多基因、多位点以及多因素的综合研究。

参考文献

[1] Zhu JL, Olsen J, Sørensen HT, et al. Prenatal maternal bereavement and congenital heart defects in offspring: a registry-based study [J]. *Pediatrics*, 2013, 131 (4): e1225-e1230.

[2] Yakub M, Moti N, Parveen S, et al. Polymorphisms in MTHFR, MS and CBS genes and homocysteine levels in

a Pakistani population [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e33222.

[3] 陈亚红, 鲁科峰, 蒋埜. 冠心病、高血压患者血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白的水平变化及临床意义[J]. *检验医学与临床*, 2010, 7(21): 2350-2351.

[4] Brouns R, Ursem N, Lindemans J, et al. Polymorphisms in genes related to folate and cobalamin metabolism and the associations with complex birth defects[J]. *Prenat Diagn*, 2008, 28(6): 485-493.

[5] Kozich V, Sokolová J, Klatovská V, et al. Cystathionine beta-synthase mutations: effect of mutation topology on folding and activity[J]. *Hum Mutat*, 2010, 31 (7): 809-819.

[6] Sebastio G, Sperandio MP, Panico M, et al. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations[J]. *Am J Hum Genet*, 1995, 56 (6): 1324-1333.

[7] 李丽帆, 李金平, 顾国龙. 冠心病患者胱硫醚 β -合酶基因 G919A 和 C572T 突变频率[J]. *第四军医大学学报*, 2008, 29(4): 317-319.

[8] Kim J, Hong SJ, Park JH, et al. Expression of cystathionine beta-synthase is downregulated in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1449-1454.

[9] 钟秋安, 仇小强, 曾小云, 等. 父母 MTHFR 基因、CBS 基因与子代先天性心脏病关系的研究[J]. *广西医学*, 2006, 28(8): 1140-1142.

(收稿日期: 2013-10-15 修回日期: 2013-12-23)

(上接第 1343 页)

剂都不可能避免假阳性和假阴性, 鉴于 HIV 的筛查结果对感染者及其家属在心理和生理方面均会产生很大影响, 可选用高敏感性和特异性的 GICA 试剂和 ELISA 试剂联合使用, 减少假阳与假阴的出现。

参考文献

[1] 邢辉, 梁浩, 洪坤学, 等. 我国 HIV-1 主要流行株外膜蛋白 (env) 基因 V3~V4 区变异及其与生物学特性的关系 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2005, 25(3): 185-189.

[2] 刘行德, 邓春发. ELISA 法和胶体金快速法检测 HIV 抗体的体会[J]. *中国医学研究与临床*, 2008, 6(2): 56-57.

[3] 李影林. *中华医学检验全书* [M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 379-382.

[4] 符丽芝, 许彬, 张万明. 酶免法检测抗-HIV 假阳性结果的消除[J]. *临床输血与检验*, 2004, 6(2): 122-123.

[5] 马义才, 贾桂芳, 周琼秀, 等. 五种艾滋病病毒抗体诊断试剂临床质量比较[J]. *中国性病艾滋病防治*, 2002, 8(4): 224-226.

[6] 黄泓艳, 胡中旺, 王海. HIV 抗体可疑标本实验室检测结果分析[J]. *安徽预防医学杂志*, 2005(4): 227-228.

[7] 许健, 令颖颖, 周贤位, 等. 2007-2008 年贵州省医疗和采供血机构 HIV 感染者检测确证结果分析[J]. *贵州医药*, 2009, 33(3): 216-218.

[8] 杨晓莉, 李敬云. HIV 感染确认的现状和发展趋势[J]. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(6): 585-587.

[9] Dock NL, Kleinman SH, Rayfield MA, et al. Human immunodeficiency virus infection and indeterminate western blot patterns. Prospective studies in a low prevalence population[J]. *Arch Intern Med*, 1991, 151(3): 525-530.

[10] Ribeiro-Rodrigues R, Da Silva Pinto Neto LF, Carla CB, et al. Performance characteristics of a rapid new immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2003, 10(2): 303-307.

(收稿日期: 2013-11-25 修回日期: 2014-01-17)