

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.010

两种仪器定量检测 HIV-1 病毒载量比较研究*

李丽华,余婷婷,丁彩梅,张润武,杨冬梅,王红英,白 经,普 冬[△]
(云南省昆明市第三人民医院检验科 650041)

摘要:目的 比较雅培 m2000 和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 两种全自动分析系统定量检测人类免疫缺陷病毒(HIV)-1 病毒载量的一致性,为临床选择高精度检测方法提供参考。**方法** 对 30 例艾滋病患者血浆标本同时采用雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪进行病毒载量测定,比较二者检出率、相关性和一致性。**结果** 雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪测得 HIV-1 病毒载量平均值分别为 $(2.990 \pm 0.284) \log \text{ copy/mL}$ 和 $(3.100 \pm 0.244) \log \text{ copy/mL}$, 差异无统计学意义 ($t=1.446, P>0.05$); 两种检测系统检测出的病毒载量有明显相关性 ($r=0.968, P<0.001$), 且与患者的 CD4^+ T 细胞数及 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 呈明显直线负相关。**结论** 雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪检测 HIV-1 病毒载量具有较好的相关性和一致性,在实际工作中,均可作为高精度检测 HIV-1 的可靠方法。

关键词: HIV 病毒载量; 雅培 m2000 全自动分析系统; 罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪; 高精度中图法分类号: R33 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2018)24-3678-04

Comparative evaluation of two detection systems for quantitative detection of HIV-1 viral load*

LI Lihua, YU Tingting, DING Caimei, ZHANG Runwu, YANG Dongmei,
WANG Hongying, BAI Jing, PU Dong[△](Department of Laboratory Medicine, the Third People's Hospital of
Kunming, Kunming, Yunnan 650041, China)

Abstract: Objective To compare the consistency of quantitative detection of HIV-1 viral load between two automatic analysis systems of Abbott m2000 and Roche AmpliPrep/TaqMan, and to provide reference for clinical selection of high-precision detection methods. **Methods** Plasma samples of 30 patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) were measured simultaneously by Abbott m2000 automatic analysis system and Roche AmpliPrep/TaqMan automatic analyzer. The detection rate, correlation and consistency between Abbott m2000 Real Time System and COBAS AmpliPrep/TaqMan detection system were compared. **Results** The average load of HIV-1 virus was $(2.990 \pm 0.284) \log \text{ copy/mL}$ and $(3.100 \pm 0.244) \log \text{ copy/mL}$, respectively. There was no significant difference between the two detection systems ($P>0.05$). The viral load detected by the two methods was significantly correlated ($r=0.968, P<0.001$), and was negatively correlated with the number of CD4^+ T cells and $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ in patients. **Conclusion** Two systems, Abbott m2000 automatic analysis system and Roche AmpliPrep/TaqMan automatic analyzer, have good correlation and consistency in detecting HIV-1 virus load. Therefore, they can be used as a reliable method to detect HIV-1 virus with high accuracy.

Key words: HIV viral load; Abbott m2000 Real Time System; Roche AmpliPrep/TaqMan detection system; high precision

随着艾滋病(AIDS)防治工作的不断强化, AIDS 实验室检测技术也在不断发展, 根据《艾滋病资料手册》规定^[1], 接受治疗的 AIDS 患者必须定期检测病毒载量, 人类免疫缺陷病毒(HIV)载量检测被认为是目前预示疾病演变、提示开始临床治疗和评估疗效的有

效指征^[2]。同时 HIV 病毒载量检测还可作为灵敏的 HIV 早期感染的诊断方法^[3-4], 特别是对 HIV 阳性产妇的婴儿和处于 HIV 抗体窗口期的感染者等特殊免疫性个体具有较好的提示作用^[5-6]。核酸高精度定量检测仪是获得准确临床实验室结果的关键因素, 减少

* 基金项目: 云南省应用基础研究青年项目(2017FD186)。

作者简介: 李丽华, 女, 主管技师, 主要从事 HIV 检测方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: ludipu@sina.com。

了核酸手工提取中容易出现的操作失误,增加了核酸提取的一致性和重复性^[7]。当前常用的核酸高精度定量检测技术包括雅培 m2000 全自动分析系统、罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪、梅里埃 Nuclisens EasyQ HIV-1 及西门子公司 Versant HIV-1。国内已有关于几种检测技术的相关研究^[8],但同时对于雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪进行 HIV-1 病毒载量定量检测的研究鲜见报道。本研究通过采用雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪高精度定量检测方法,对 30 例 HIV-1 病毒载量结果不同患者标本进行检测比较,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究涉及的标本为 2017 年 1—6 月到本院就诊的,免疫印迹法 HIV-1 确证试验结果为阳性的 AIDS 患者标本 30 例。所选取患者的 HIV-1 病毒载量从 0~10⁵ copy/mL 均有覆盖。

1.2 标本采集 采集患者血液后立即放入有乙二胺四乙酸三钾试管中,充分混匀。然后将全血在 4 h 内离心并分离血浆,存放于 -70 °C 冰箱内,以备检测 HIV-1 病毒载量使用。

1.3 仪器与试剂 采用雅培 m2000 全自动分析系统、Abbott RealTime HIV-1 Kit 检测试剂盒及罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析系统、罗氏 AmpliPrep/TaqMan HIV-1 Test V2.0 试剂盒同时进行检测。所有检测试剂盒均在有效期内,操作严格按照试剂盒和仪器说明书进行。

1.4 方法

1.4.1 雅培 m2000 全自动分析系统检测方法 Abbott m2000sp 系统采用多种操作方法从血浆标本中纯化核酸,采用 Abbott 内部研发的化学试剂,以未包裹的氧化铁磁珠作为捕获介质从 0.6 min 血浆或血清标本中提取 RNA,m2000sp 将磁珠、细胞裂解缓冲液和患者标本混合,将标本在 50 °C 细胞裂解缓冲液中孵育 20 min,细胞裂解缓冲液裂解细胞并释放出 RNA,RNA 被吸附到磁珠上,通过优化磁铁吸附过程在单管中进行磁珠捕获,清洗磁珠以便除去未结合的血浆或血清标本组分,重复捕获和清洗过程,从而除去其他多余的标本组分、污染物和抑制剂,然后在 75 °C 低水平磷酸盐缓冲液中孵育 20 min,从磁珠上洗脱获得 RNA,加水孵育,将缓冲液稀释至极低水平,磁珠被磁铁吸附,核酸被转移到 96 深孔板中,获得聚合酶链反应(PCR)反应板,密封并装入 Abbott m2000rt 进行实时 PCR 检测。

1.4.2 罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪检测方法 AmpliPrep/TaqMan 仪器可自动制备标本。该程序可以处理 850 μL 血浆标本。在稍高的温度下,蛋白酶和裂解液/结合缓冲液与标本孵育,裂解 HIV-1 病毒颗粒,释放出核酸,并保护 HIV-1 RNA

免受血浆中 RNA 酶的破坏。蛋白酶和已知拷贝数的 HIV-1 定量标准物 QS 带盔甲 RNA 与裂解试剂和磁性玻璃珠一起加入到每一份标本中。混合物经孵育后,HIV-1 RNA 和 HIV-1 QS RNA 结合于磁性玻璃珠表面。未结合的一些物质,如盐、蛋白质及其他细胞杂质经洗涤磁性玻璃珠后被除去。经磁性玻璃珠分离和完全洗涤步骤,吸附的核酸在较高温度下洗脱下来。样品处理后释放出来的 HIV-1 RNA 及 HIV-1 QS RNA 被加入至扩增混合物中,并被转移至 COBAS TaqMan 分析仪,HIV-1 靶 RNA 及 HIV-1 QS RNA 随之进行反转录、扩增,并经切除靶特异的和 QS 特异的双标记寡核苷酸探针完成实时定量检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件包进行数据处理,并进行绘图和比较分析,两组间计量资料采用配对 *t* 检验,相关分析采用 Pearson 分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种仪器检测 HIV-1 病毒载量与外周血 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 结果 见表 1。30 例患者 HIV-1 病毒载量检测结果显示,雅培 m2000 全自动分析系统阳性检出率为 100%,检测结果均值为 (2.990±0.284) log copy/mL;罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪阳性检出率也为 100%,检测结果均值为 (3.100±0.244) log copy/mL,差异均无统计学意义 (*t*=1.466, *P*>0.05)。

表 1 两种仪器检测 HIV-1 病毒载量与外周血 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 结果

标本编号	CD4 ⁺ T 细胞数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	病毒载量结果(log copy/mL)	
			雅培 m2000 全自动分析系统	罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪
1	560.4	1.1	2.98	3.09
2	956.5	1.0	1.30	1.34
3	414.1	0.3	3.92	3.98
4	287.5	0.3	2.20	1.98
5	482.4	0.4	2.13	2.13
6	350.0	0.3	2.73	2.86
7	753.8	0.3	3.22	3.59
8	26.7	0.0	5.82	5.45
9	517.6	0.6	1.60	1.65
10	492.7	0.3	2.49	2.66
11	500.0	0.4	1.30	1.59
12	205.6	0.1	2.52	2.50
13	26.5	0.1	5.73	5.33
14	518.6	0.7	1.89	1.49
15	629.2	0.9	1.30	1.74
16	915.1	0.9	4.34	4.47
17	354.7	0.4	1.98	1.81
18	508.0	0.6	1.28	1.32
19	603.7	0.6	2.20	2.46
20	342.3	0.4	4.24	4.16

续表 1 两种仪器检测 HIV-1 病毒载量与外周血 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 结果

标本编号	CD4 ⁺ T 细胞数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	病毒载量结果(log copy/mL)	
			雅培 m2000 全自动分析系统	罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪
21	200.1	0.2	2.88	2.83
22	590.0	0.3	4.08	4.01
23	362.9	0.3	3.42	3.49
24	292.2	0.3	4.92	4.91
25	725.4	0.4	3.00	3.05
26	319.0	1.0	2.22	2.24
27	130.8	0.1	3.94	3.97
28	310.2	0.5	2.19	2.21
29	201.2	0.1	5.88	5.96
30	291.7	0.1	4.90	4.81

2.2 两种仪器检测 HIV-1 病毒载量与外周血 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 的相关性 见表 2。相关性分析结果显示,雅培 m2000 全自动分析系统、罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪 HIV-1 病毒载量检测结果均与 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 呈明显直线负相关。

表 2 两种仪器检测 HIV-1 病毒载量与外周血 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 的相关性

仪器	CD4 ⁺ T 细胞数	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
雅培 m2000 全自动分析系统	<i>r</i>	-0.444
	<i>P</i>	0.014
罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪	<i>r</i>	-0.409
	<i>P</i>	0.025

2.3 两种仪器测得病毒载量之间的相关性分析 见图 1。雅培 m2000 和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 两种全自动分析系统检测的病毒载量呈线性关系($r = 0.968, P < 0.001$)。

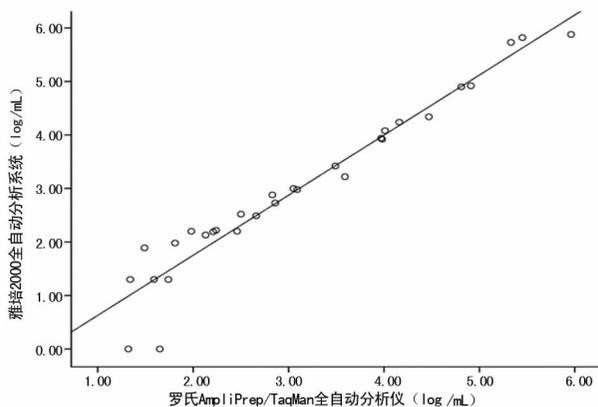


图 1 两种仪器测得 HIV 病毒载量相关性分析

3 讨论

雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪均能够检测所有 M 组和 O 组

的 HIV-1 毒株及非 B 亚型 HIV-1 的病毒载量,这些检测系统提供了一种既快速又高度准确的检测方法,有助于患者接受最有效的治疗^[8]。

雅培 m2000 和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 两种检测系统在检测原理、方法上都基本相似,均是对 HIV-1 病毒载量进行定量高精度检测,其检测结果在 AIDS 抗病毒治疗过程中可作为临床医生制订用药方案的参考指标,确定药物耐受水平,也可为更换治疗方案或对现有方案进行改进做准备。本研究对 30 例 AIDS 患者血浆采用雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪同时测定病毒载量,所选患者的 HIV-1 病毒载量从 0 ~ 10⁵ copy/mL 均有覆盖,所有标本两种方法阳性检出率均为 100%,特异度和重复性、阳性检出率一致,两种方法检测结果差异无统计学意义($P > 0.05$),提示两种检测系统均有较高的灵敏度。

HIV 载量反映的是 HIV 在体内复制的数量,CD4⁺T 细胞数指 HIV 感染靶细胞的数量,预示着人体不同的免疫水平^[9],CD4⁺T 细胞数低下或降低提示患者病情恶化。因此,可通过分析病毒载量和 CD4⁺T 细胞数变化来了解抗病毒疗效。本研究结果显示,雅培 m2000 全自动分析系统和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪检测的 HIV-1 病毒载量均与 CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 呈明显负相关,当病毒载量检测值较低时,CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 一般较高,反之,当病毒载量值升高时,CD4⁺T 细胞数及 CD4⁺/CD8⁺ 呈下降趋势,这与路新利等^[10]和李玲等^[11]的研究结果相一致。

雅培 m2000 和罗氏 AmpliPrep/TaqMan 两种检测系统也存在一定的差异。主要表现在:雅培 m2000 全自动分析系统在操作时可用标本采集原始管直接上机,避免手工混合操作,相对于罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪手工操作标本加载和卸载,消除了交叉污染,同时降低了操作时工作人员易造成的误差。雅培 m2000 全自动分析系统可开放模式,一次提取,多次应用,便于实时复查,可用于其他如耐药性分析及分型等,大大节约了试验成本。罗氏 AmpliPrep/TaqMan 全自动分析仪提供了整合的自动化标本制备系统,使整个标本检测过程自动化,提高了操作流程的效率。雅培 m2000 系统的 m2000sp 和 m2000rt 2 个部分是分开的,在安装上就可遵循分子生物实验室的分区理念,而罗氏 AmpliPrep 和 TaqMan 两种分析系统是连在一起的,对实验室场地、环境要求相对较高,但操作过程相对易于掌握。

当然,两种全自动分析系统也有各自的不足之处,由于是高精度的定量分析系统,两种分析系统均需使用原装配套试剂及耗材,在带来稳定可靠结果的同时检测成本也相对较高,耗材消耗量较大。但是,随着联合国艾滋病规划署提出“2030 年终结艾滋病”

愿景的提出,以及 2020 年实现“3 个 90%”防治目标,即:90%的感染者通过检测知道自己的感染状况,90%已经诊断的感染者接受抗病毒治疗,90%接受抗病毒治疗的感染者病毒得到抑制,HIV RNA 载量的高精度检测将具有重要意义。两种精准的定量分析系统对病情的准确判断,特别是对 HIV 阳性产妇的婴儿和处于 HIV 抗体窗口期的感染者等特殊免疫个体^[5-6],在其感染的早期诊断中发挥了重要作用。此外,两种精准的定量分析系统还能指导 AIDS 抗病毒治疗的疗效监控,以尽量清除病毒或抑制病毒复制^[12]。AIDS 患者在很大程度上依赖 HIV RNA 载量的精确测定,因此,只有采用高精度的检测方法才能为临床医生提供更准确可靠的 AIDS 治疗依据。

参考文献

[1] 严延生,颜莘莘,陈亮,等. 艾滋病治疗的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2017,35(5):383-388.
 [2] 刘敏,陈秀英,梅少林,等. 不同核酸提取方法检测 HIV 病毒载量和耐药基因的研究[J]. 中国现代医生,2016,54(20):111-114.
 [3] 黑发欣,张启云,孙伟东,等. 病毒载量检测鉴别诊断 HIV 早期感染[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2008,28(6):557-559.
 [4] KRAJDEN M, COOK D, MAK A, et al. Pooled nucleic acid testing increases the diagnostic yield of acute HIV infections in a high-risk population compared to 3rd and 4th generation HIV enzyme immunoassays[J]. J Clin Vir-

ol,2014,61(1):132-137.

[5] 张艳,程周祥,王毅,等. 病毒载量检测在 HIV 抗体不确定标本诊断中的应用[J]. 中国艾滋病性病,2016,22(4):237-240.
 [6] 赵璇,程绍辉,郑敏娜,等. 病毒载量检测对 HIV 抗体确证实验结果不确定样本的辅助诊断研究[J]. 中华流行病学杂志,2016,37(7):992-995.
 [7] 陈科,马洪滨,李珺等. 罗氏 COBAS AmpliPrep 全自动 PCR 分析仪的应用与维护[J]. 中国医学装备,2013,10(11):125-126.
 [8] 张岭,蒋岩,潘品良,等. HIV-1 病毒载量检测常用技术及研究进展[J]. 传染病信息,2015,12(6):352-356.
 [9] 傅卫辉,张晓燕. 固有免疫与 HIV-1 相互作用的研究进展[J]. 病毒学报,2011,27(5):494-496.
 [10] 路新利,赵宏儒,李巧敏,等. HIV/AIDS 患者病毒载量与 CD4 细胞数相关性研究[J]. 现代预防医学,2011,38(20):4256-4257.
 [11] 李铃,古雪,敬雨佳,等. 人类免疫缺陷病毒,艾滋病毒 I 型艾滋病患者 CD4⁺T 淋巴细胞水平与机会感染及病毒载量的相关性分析[J]. 中国现代医学杂志,2016,26(2):13-18.
 [12] CLUMECK N, POZNIAK A, RAFFI F. European AIDS Clinical Society (EACS) guidelines for the clinical management and treatment of HIV-infected adults[J]. HIV Med,2008,9(2):65-71.

(收稿日期:2018-05-29 修回日期:2018-09-06)

(上接第 3677 页)

总之,该方法在 40 min 内实现产 NDM-1 耐药菌扩增产物的快速分离检测,细菌检测敏感度为 1.15×10^1 CFU/mL,对 NDM-1 基因检测准确性高、特异性强,具有快速、廉价等特点,适合超级细菌 NDM-1 的早期快速现场诊断。

参考文献

[1] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India. and the UK; a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(9):597-602.
 [2] WAILAN A M, PATERSON D L, CAFFERY M, et al. Draft genomes sequence of NDM-5-producing Escherichia coli sequence type 648 and genetic context of blaNDM-5 in Australia[J]. Genome Announc,2015,3(2):e00194.
 [3] CHEN Y, ZHOU Z, JIANG Y N, et al. Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter baumannii in China[J]. J Antimicrob Chemother,2011,66(6):1255-1259.
 [4] KARTHIKEYAN K, THIRUNARAYAN M A, KRISHNAN P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and armA in clinical isolates of Acinetobacter baumannii from

India[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(10):2253-2254.

[5] LIU D, OU Z, XU M, et al. Simplified transient isotachopheresis/capillary gel electrophoresis method for highly sensitive analysis of polymerase chain reaction samples on a microchip with laser-induced fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2008, 1214(1/2):165-170.
 [6] SAIZ C, VILLAMIL V, GONZALEZ M M, et al. Enantioselective synthesis of new oxazolidinylthiazolidines as enzyme inhibitors [J]. Tetrahedron Asymmetr, 2017, 28(1):110-117.
 [7] YANG K W, ZHOU Y, GE Y, et al. Real-time activity monitoring of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 in living bacterial cells by UV-Vis spectroscopy [J]. Chem Commun, 2017, 53(57):8014-8017.
 [8] NABARRO L E B, SHANKAR C, PRAGASAM A K, et al. Clinical and bacterial risk factors for mortality in children with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bloodstream infections in India[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(6):161-166.

(收稿日期:2018-06-02 修回日期:2018-09-08)