

HIV-1 P24 抗原国家参考品的研制*

许四宏, 宋爱京, 李秀华, 王佑春**

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

Studies on National Reference of HIV-1 P24 Antigen

XU Si-hong, SONG Ai-jing, LI Xiu-hua, WANG You-chun**

(National Institute for the control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: To develop national reference of HIV-1 P24 antigen and establish the corresponding standard, specimens collected from normal population, HIV cultivated cell lysates and patients infected with HIV or suspected infection, were detected for HIV antibody, HIV P24 antigen, HCV antibody and HBsAg. 21 specimens positive for HIV P24 antigen, from patients infected with HIV or suspected infection, were detected for HIV RNA and, at the same time, HIV genotypes of these samples positive for HIV RNA were analyzed. The national references of HIV P24 consisted of 20 negative samples, 10 positive samples, 10 sensitivity samples and 2 precision samples, were developed. After analysed the p24 references with the P24-detecting reagents from different manufactures, the corresponding standards were established. It also showed that 3 times freeze-thawing did not affect the stability of the references. The national references of HIV-1 P24 antigen would provide important guides on quality control of HIV P24-detecting reagents.

Key words: HIV-1, P24 antigen, National reference

摘要: 收集正常人、HIV 感染者和疑似感染者血浆以及 HIV-1 病毒培养裂解液, 对其进行 HIV 抗体、HIV P24 抗原、HCV 抗体和 HBsAg 检测, 对 HIV P24 抗原阳性者进行 HIV RNA 检测, 并对部分样品进行基因分型。以 NIBSC P24 抗原标准品的系列稀释样品作为线性灵敏度参考品。经过实验筛选出 20 份阴性参考品, 10 份阳性参考品, 10 份线性灵敏度参考品, 2 份精密性参考品, 共同组成 HIV-1 P24 抗原国家参考品, 经多家不同的试剂进行标定, 制定了相应的标准。稳定性研究结果表明, 反复冻融三次对该参考品的稳定性没有影响。由此, 初步建立了 HIV-1 P24 抗原国家参考品, 该参考品将对 HIV-1 P24 抗原、HIV 抗体/P24 抗原联合检测试剂的质量控制提供重要依据。

关键词: HIV-1; P24 抗原; 国家参考品

中图分类号: R 511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0102-04

自 1982 年命名获得性免疫缺陷病综合症 (AIDS) 以来, HIV (Human immunodeficiency virus) 的感染在全球广泛流行, 严重威胁着人们的生命健康, 因此, 必须对 HIV 感染进行监控。目前, 在 HIV 感染的筛选中, 大多采用检测 HIV 抗体的方法, 此方法在 HIV 的发现、监控中起到了相当重要的作用。但是, 由于该方法只能检测到 HIV 抗体, 不能检测出 HIV 感染的窗口期样本。据估计血液经 HIV 抗体筛选以后, 因 HIV 处于窗口期感染而造成输血

后 HIV 传播的危险性在 $1.4/10^{7[1]}$, 而增加抗原检测以后可以再减少残余风险的 10%^[2]。而且采用酶联免疫法检测 HIV-1 P24 抗原成本较低, 操作简便, 可以在普通实验室得到普及。目前已经有 P24 抗原检测试剂在中国申请注册, 但是我们尚没有对该类诊断试剂的质量进行控制的国家参考品。因此, 研制该类参考品对检测进口注册产品以及指导我国该类试剂的发展均具有重要的意义。现将 HIV-1 P24 抗原国家参考品研制的结果报告如下。

收稿日期: 2005-08-16, 修回日期: 2005-09-16

* 基金项目: 国家十五科技攻关课题 (2004BA71907)

作者简介: 许四宏 (1972-), 男, 湖北武汉籍, 助理研究员, 主要从事 HIV 分子生物学研究及 HIV 诊断试剂质量控制。

** 通讯作者. Corresponding author. Tel: 010-67095415, E-mail: wangyc@nicbp.org.cn

1 材料和方法

1.1 实验材料

151 份 HIV 感染者和疑似感染者的血浆来源于河南、广西、四川、山西、北京、广东、湖北等地; 2 份细胞裂解液样品分别来自杭州某公司(A 样品)和军事医学科学院(L 样品); 1 份窗口期样品(P 样品)来自上海地区; 稀释用血浆为 HIV、HCV 和 HBV 标志物阴性的样品, 且经去纤维处理。200 余份 HIV 非感染者血浆样品分别来自上海、北京以及江西等地区。

1.2 试剂

HIV 抗体试剂为生物梅里埃公司产品; HIV-1 P24 抗原试剂及 HIV 抗体/P24 抗原试剂为美国雅培公司和生物梅里埃公司产品; HCV 抗体试剂为 Ortho 公司产品; HBsAg 试剂为上海科华公司产品; HIV Blot2.2 确证试剂为 Genelabs 公司产品, HIV RNA 检测试剂为 Chiron 公司产品。

1.3 HIV-1 p24 抗原标准品

WHO 推荐, 来自英国 NIBSC, 为冻干样品, 每瓶 P24 含量为 1000U。

1.4 检测方法

所有试剂的检测方法及结果判定均严格按照试剂的说明书进行。按参考文献^[3]进行 HIV 基因型分析。稀释用血清的制备依据 WHO 报告^[4], 具体方法为: 取 0.5mL 新鲜配制的 2mol/L CaCl_2 加入 100mL 血浆, 混匀, 置于 37℃ 水浴 60min 至血浆凝集后(若血浆不发生凝集, 可适当增加 CaCl_2 用量, 但其用量不得超过血浆体积的 1%), 将样品于 -20℃ 以下放置过夜, 室温重溶样品, 无菌纱布过滤除去纤维, 3000r/min 离心 20min, 取上清, 即为去纤维血浆。

1.5 R 值分析

所用试剂为生物梅里埃 P24 抗原试剂, 用样品稀释液对试剂盒中的定量标准品进行 2 倍系列稀释(共稀释 5 个梯度), 对这 5 个梯度的样品进行双孔检测, 检测后对 5 份定量标准品样品的检测值(S/CO)和 P24 含量进行回归分析, 依据回归分析得到线性相关系数(R 值)。

1.6 稳定性研究

利用不同的试剂平行检测反复冻融三次后的参考品和-70℃ 保存的参考品样品, 比较测定结果, 了解冻融对参考品的影响。

2 结果

2.1 HIV-1 P24 抗原国家参考品样品的筛选

将收集的样品经多种不同的试剂筛选, 同时考虑检测试剂的灵敏度、样品本身 P24 抗原的测定结果值及其基因分型结果等因素, 我们选择了 10 份样品作为 HIV-1 P24 抗原阳性参考品的候选, 20 份样品作为 HIV-1 P24 抗原阴性参考品的候选。

2.1.1 阳性参考品: 从 151 份血清库样品中选择了 4 份 HIV 抗体和 HIV P24 抗原均为阳性样品, 将其编号为 P1~P4, 其中 P3 和 P4 为 HCV 抗体阳性, P3 也为 HBsAg 阳性, 核酸检测显示该 4 份样品为 HIV RNA 阳性; 将 2 份细胞裂解液样品(L 样品和 A 样品)经系列稀释并用 HIV-1 P24 抗原检测试剂进行检测, 最终选择 A 样品的 5×10^2 和 10^3 两个稀释度、L 样品的 10^3 和 10^4 两个稀释度作为参考品组分, 将其分别编号为 P5~P8; 经 HIV 抗体、抗原和核酸检测证明 P 样品为窗口期样品, 即该样品 HIV 抗体阴性而 HIV P24 抗原和核酸阳性, 将其进行适当稀释后作为参考品组分, 将其编号为 P9; 以 NIBSC HIV-1 P24 标准品稀释样品(25U/mL)为 P10 号参考品。

2.1.2 阴性参考品: 将收集的 200 余份未感染 HIV 者血浆经 HIV 抗体试剂、HIV-1 P24 抗原试剂、HIV-1 抗体/P24 抗原试剂、HCV 抗体试剂、HBsAg 试剂检测, 筛选出 20 份 HIV 抗体、HIV P24 抗原、HCV 抗体以及 HBsAg 均为阴性的样品作为阴性参考品的候选, 将其编号为 N1~N20。

2.1.3 线性灵敏度参考品: 用 1mL 去纤维血浆将 NIBSC HIV-1 P24 抗原标准品溶解(其浓度为 1000U/mL)并用去纤维血浆稀释至浓度为 20 U/mL(命名为 L1); 将 L1 进行 2 倍系列稀释, 依次命名为 L2、L3, ..., L9, 其 P24 浓度分别为 20U/mL、10U/mL、5U/mL、2.5U/mL、1.25U/mL、0.625U/mL、0.3125U/mL、0.15625U/mL、0.078125U/mL, 并将稀释用的去纤维血浆命名为 L10, 初步确定以这 10 份样品为线性和灵敏度参考品的候选。

2.1.4 精密性参考品: 由于 HIV P24 抗原检测试剂和 HIV 抗体/抗原联合检测试剂的灵敏度不同, 对同一样品检测 A 值的大小也不同, 为正确评价两种试剂的精密性, 应分别选择合适滴度的样品。对 L 样品的多个稀释度样品用不同的试剂分别检测, 结果显示 L 样品经 4×10^5 稀释后用生物梅里埃 HIV P24 抗原试剂四次检测, 其测定值为 0.966、0.630、0.593 和 0.561, 均值为 0.688; 生物梅里埃 HIV 抗体/p24 抗原试剂检测 L 样品经 2×10^3 稀释后的样品, 其测定值为 0.898; 因此初步确定 HIV P24 抗原检测试

剂的精密性参考品为 L 样品经 4×10^5 稀释后的样品, HIV 抗体/P24 抗原精密性 V 参考品为 L 样品经 2×10^3 稀释后的样品。

2.2 HIV p24 阳性参考品的基因分型

对候选的 HIV-1 P24 阳性参考品样品的 *env* V3 区基因进行克隆并测序, 将测序结果与参考序列进行比较, 并用进化树分析, 确定其 HIV 亚型, 结果如下 (表 1):

2.3 参考品的组成、分装和标定

2.3.1 参考品的组成、分装: 根据以上筛选结果, 选择了 44 份样品组成 HIV-1 P24 抗原国家参考品, 具体组成如下: 10 份阳性参考品 (P1 ~ P10); 20 份阴性参考品 (N1 ~ N20); 10 份线性灵敏度参考品 (L1 ~ L10); 2 种精密性参考品 (HIV P24 抗原 CV 参考品和 HIV 抗体/P24 抗原 CV 参考品), 每种各 2 份样品。

在本室 P2 实验室将上述样品以 0.5mL/支分装在 1.0mL 的进口冻存管中, 最后组装为成套 HIV p24 抗原参考品; 其外包装采用 50 支/盒的包装盒; 参考品标签全部为不干胶标签。组装后参考品样品

保存在-20 冷库中备用。

表 1 p24 抗原阳性参考品候选样品的基因分型结果

Table 1 The genotyping results of p24 positive samples

| No. of references | Derivation of references | Genotype |
|-------------------|---------------------------------|----------|
| P1 | Sample 34# from PCR serum pool | AE |
| P2 | Sample 106# from PCR serum pool | B |
| P3 | Sample 116# from PCR serum pool | B |
| P4 | Sample 119# from PCR serum pool | B |
| P5 | 500 fold-diluted Sample A | ND* |
| P6 | 1000 fold-diluted Sample A | ND* |
| P7 | 1000 fold-diluted Sample L | B |
| P8 | 10000 fold-diluted Sample L | B |
| P9 | 50 fold-diluted Sample P | AE |
| P10 | WHO Standard | B |

*ND: Not done

2.3.2 参考品的标定: 本参考品研制完成后, 利用多批不同的检测试剂进行了标定, 标定结果见下表 (表 2、表 3):

表 2 p24 抗原试剂对参考品的标定结果

Table 2 The detecting results of p24 references by HIV p24 antigen assay

| Assay | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Negative Reference(20 samples) | 20/20* | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |
| Positive Reference(10 samples) | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Sensitivity Reference(U/mL) | 1.25 | 0.625 | 0.625 | 1.25 | 0.625 | 0.625 |
| Precision reference(CV: %) | 6.6 | 12.3 | 8.6 | 5.70 | 7.10 | 2.50 |
| R | /** | 0.9997 | 0.9906 | 0.9982 | 0.9984 | 0.9949 |

Note : * numerator indicated the numbers of detected samples according with the standard, denominator indicated the numbers of detected references samples

** Assay 1 was a kit for detecting P24 qualitatively, so R value analysis on assay 1 was not done.

表 3 HIV 抗体/p24 抗原试剂对参考品的标定结果

Table 3 The detecting results of p24 references by HIV antibody/p24 antigen assay

| Assay | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Negative Reference (20 samples) | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |
| Positive Reference (10 samples) | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Sensitivity Reference (U/mL) | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 1.25 | 2.5 | 5 | 5 | 10 | 10 | 5 | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| Precision eference (CV: %) | 3.60 | 9.90 | ND | 7.10 | ND | 7.8 | 7.6 | 2.7 | 4.90 | 2.90 | 4.70 | ND | ND | ND |

ND : Not done

以上的标定结果显示, 20 份阴性参考品所有试剂均检测为阴性, 10 份阳性参考品均检测为阳性, 所有进行 CV 分析的试剂 CV 均 $< 15\%$; 线性灵敏度参考品方面, HIV P24 抗原试剂的最低 P24 检出量为 $0.625 \sim 1.25 \text{ U/mL}$, R 值均 > 0.95 , 而 HIV 抗体/p24 抗原试剂的最低 P24 检出量仅为 $1.25 \sim 10 \text{ U/mL}$ 。

2.3.3 HIV P24 抗原参考品标准的制定: 根据不同试剂的标定结果, 初步制定该参考品的标准如下: 10 份阳性参考品不得检测为阴性; 20 份阴性参考品不得检测为阳性; 对灵敏度参考品, HIV 抗体/P24 抗原试剂的最低检出量不得高于 10 U/mL , HIV P24 抗原试剂的最低检出量不得高于 2.5 U/mL , 若 HIV

P24 抗原试剂同时为定量检测 P24 抗原的试剂时, 则须进行 R 值分析, 且 R 值必须 > 0.95 。

2.4 参考品的稳定性研究

将参考品置 -70°C 后融化, 反复冻融 3 次后, 与 -70°C 保存的参考品平行进行检测, 所用试剂为生物梅里埃公司 HIV-1 P24 抗原试剂和 HIV 抗体/P24 抗原试剂, 检测结果显示冻融 3 次的参考品样品和 -70°C 保存的样品检测结果一致, 均符合参考品的标准, 证明反复冻融 3 次对参考品的稳定性没有影响。

3 讨论

对诊断试剂质量控制主要考虑试剂的特异性、灵敏度和精密度, 考虑到本参考品主要用于 HIV P24 抗原诊断试剂和 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂的质量控制, 而且 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂在制备时, 固相载体上同时包被抗 P24 单克隆抗体和 HIV 抗原, 而载体的表面积是一定的, 因此吸附到载体上的抗体和抗原的量均会受到限制, 造成抗原和抗体检测之间的干扰现象, 使试剂检测 HIV 抗体和 P24 抗原的灵敏度均降低。据报道单独检测 P24 抗原的试剂灵敏度可达到 $3 \sim 5\text{pg/mL}$, 而 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂检测 P24 抗原的灵敏度则在 30pg/mL 以上⁽⁵⁾, 因此, 本参考品的研制充分考虑这两种类型试剂各自不同的特点, 同时也对试剂的特异性、灵敏度和精密度提出了相应的要求。

本参考品的研制, 从 200 余份未感染 HIV 的血浆中筛选出 20 份 HIV 抗体、HIV P24 抗原、HCV 抗体以及 HBsAg 均为阴性的样品作为阴性参考品 ($N1 \sim N20$); 要求 HIV P24 抗原诊断试剂和 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂试剂必须均检测为阴性, 由此对试剂的特异性进行严格的控制。

从 HIV 感染者和疑似感染者血浆以及 HIV 病毒培养裂解产物、WHO P24 标准品中筛选 10 份样品作为阳性参考品 ($P1 \sim P10$), 其中其中 P3 和 P4 为 HCV 抗体阳性, P3 也为 HBsAg 阳性。在这些阳性参考品中, 不仅包括 P24 抗原强阳性样品, 也有 P24 抗原阳性较弱的样品, 既有 HIV P24 抗原单独阳性的样品, 也有 HIV 抗原和抗体同时阳性的样品。考虑到我国流行的 HIV 基因型中 B、BC、AE 亚型共占约 95%, 因此阳性参考品组分尽可能选取这 3 种亚型的样品。同时, 利用 WHO 推荐的 P24 标准品制备了一组线性灵敏度参考品。考虑到 HIV P24 抗原诊断试剂和 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂在检测

P24 抗原灵敏度上的差异, 分别要求这 2 种试剂有相应的 P24 最低检出量, 而且对定量检测 P24 的试剂还要求进行 R 值分析 (R 值必须 > 0.95), 由此将所有试剂统一到某一水平, 为 P24 抗原检测试剂的质量控制及参考品的标准化研究提供了理论基础。

对试剂精密度的要求, 同其他的诊断试剂一样, CV 值必须 $< 15\%$ 。考虑 HIV P24 抗原诊断试剂和 HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂在检测 P24 抗原灵敏度上的差异, 因此, 在应用 HIV 病毒培养裂解产物制备精密性参考品时, 针对这 2 种类型的试剂制备了两种不同的精密性参考品, 但是要求其 CV 均必须 $< 15\%$, 以保证试剂的精密性。

据本实验室在临床应用的实验和一些相关文献报道, HIV 抗体/p24 抗原诊断试剂可以检出窗口期样品, 并将窗口期缩短 $4 \sim 5\text{d}$ ⁽⁶⁾, 但是应该看到 HIV 感染的窗口期样品存在的几率毕竟很低, 目前对血液筛查的主要指标仍然是 HIV 抗体。因此, HIV 抗体/P24 抗原诊断试剂应该在增加检测 HIV P24 抗原的情况下, 不影响 HIV 抗体检测的灵敏度和特异性, 该类试剂的质量应该同时符合 HIV 抗体国家参考品和 HIV P24 抗原国家参考品的要求。

References

- [1] Soldan K, Davison K, Dow B. Estimates of the frequency of HBV, HCV and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996 to 2003 [J]. *Eurosurveillance*, 2005, 10 (2):17-9
- [2] Chiavetta JA, Escobar M, Newman A, *et al.* Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000[J]. *CMAJ*, 2003, 169:767-773
- [3] Song A J, Li X H, Zhang C T (宋爱京, 李秀华, 张春涛) *et al.* Genotyping of some HIV-1 from Beijing Area[J]. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 2004, 19 (5) :517-519
- [4] WHO, Guidelines for organizing national external quality assessment schemes for HIV serological testing [DB/OL]. 1996, www.who.int/entity/diagnostics_laboratory/quality/en/
- [5] Weber B, Gurtler L, Thorstensson R, *et al.* Multicenter evaluation of a new automated fourth-generation human immunodeficiency virus screening assay with a sensitive antigen detection module and high specificity[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40:1938-1946
- [6] Gurtler LA, Muhlbacker U, Michl H, *et al.* Reduction of the diagnostic window with a new combined p24 antigen and human immunodeficiency virus antibody screening assays[J]. *J Virol Methods*, 1998, 75:27-38