

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
A01N 59/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810037364.1

[43] 公开日 2009年11月18日

[11] 公开号 CN 101581720A

[22] 申请日 2008.5.14

[21] 申请号 200810037364.1

[71] 申请人 上海英旻泰生物技术有限公司

地址 201709 上海市青浦区外青松公路 3858
号内 9 号楼

[72] 发明人 王 力

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 19 页

[54] 发明名称

一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂盒

[57] 摘要

本发明提供一种 HIV 抗体确认试剂盒，所述试剂盒包括：HIV - 1 型和/或 HIV - 2 型特异性抗原；对照试剂，所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在 0.1 ~ 0.2 重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在 0.002 ~ 0.06 重量%之间的硫柳汞；以及辅助试剂。所述试剂盒特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测 HIV 等优点。

1. 一种HIV抗体确认试剂盒，所述试剂盒包括：
HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；
对照试剂，所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂含有浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞；
以及辅助试剂。
2. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述防腐剂中，所述碱金属叠氮盐与硫柳汞的重量比为20~200:1；
优选地，所述碱金属叠氮盐的浓度为0.1±0.01重量%之间，所述硫柳汞的浓度在0.05±0.005重量%之间。
3. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，
所述HIV-1型特异性抗原选自gp160抗原、gp120抗原、p66抗原、p51抗原、gp41抗原、p24抗原、p17抗原中的一个或多个；
所述HIV-2型特异性抗原选自gp36抗原；和/或
所述对照试剂选自阳性对照试剂、弱阳性对照试剂、阴性对照试剂中的一种或多种。
4. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原固定在免疫印迹膜上。
5. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述试剂还含有酶联物；
优选地，所述酶联物选自抗人IgG酶联物。
6. 如权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述辅助试剂选自浓缩洗涤缓冲液、样本稀释液、碱性磷酸酶底物溶液或其组合。
7. 一种对HIV进行确认的方法，其特征在于，包括如下步骤：

提供HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；

提供受测者的血清或血浆样本；

所述特异性抗原与所述样本反应后进行显色，得到的显色结果与对照试剂进行对照，从而对HIV进行确认；其中所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂含有浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

8. 如权利要求7所述的方法，其特征在于，所述显色步骤中，采用酶联物进行显色。

9. 一种对HIV进行检测的方法，其特征在于，包括如下步骤：

提供初筛为阳性的初筛血清或血浆样本；

所述初筛血清或血浆样本采用如权利要求7~8任一项所述的方法对HIV进行确认。

10. 一种防腐剂在对照试剂中的应用，其特征在于，所述防腐剂含有浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂盒

技术领域

本发明涉及一种试剂盒，具体地涉及人类免疫缺陷病毒(HIV)抗体确认试剂盒。

背景技术

获得性免疫缺陷综合症(AIDS Acquired Immunodeficiency Syndrome)是由人免疫缺损病毒(HIV, Human Immunodeficiency Virus)感染所引起的一种严重的传染性疾病。当前对HIV感染还没有安全有效的治疗方法。HIV 极高的突变率等原因又使研制HIV有效疫苗极为困难，所以目前防治的主要手段还是以预防为主，普及HIV抗原抗体检测，以尽早发现HIV感染者，控制其传播。

艾滋病病毒(HIV)是单链RNA病毒，属于逆转录病毒(retrovirus)科，慢病毒(lentivirus)亚科。目前发现的导致人类感染的HIV-1型和HIV-2型两种亚型中，HIV-1 的感染比较常见，世界各国的HIV感染的绝大多数都是由HIV-1 引起的。HIV-2的感染仅在西非和其他少数的地区被发现。

如前所述，HIV感染的实验室检测在HIV感染的诊断、疾病进展的监测、抗病毒疗效观察和耐药监测中至关重要。目前临床检测内容包括HIV抗体、P24抗原、HIV病毒载量、CD₄⁺T淋巴细胞计数等。

上述临床检测内容中，HIV抗体检测是目前检测HIV最为主要、有效的检测方法。血清学检测例如ELISA方法已经证实对于检测病人血液中的HIV抗体十分敏感。但是，血清学检测的不足之处在于，此类试验中频繁出现的假阳性结果使得我们必须寻找一种特异性更加好的测定方法。HIV抗体检测不同于其他病原微生物的检测，任何错误的诊断，包括假阳性或假阴性，都会对被检者甚至他人产生十分重要的影响。

为了获得针对HIV特异性更好以及更容易推广的测定方法，研究人员在该领域进行了不断研究。目前随着分子生物学技术的迅速发展，HIV抗体检测方法也随之不断更新，从常规的抗体检测到现在的逆转录PCR实验(RT-PCR)，分支DNA杂交实验(bDNA)，核酸序列扩增实验(NASBA)，尽管新的测定

方法不断推出，但这些方法在实际应用中存在灵敏度与特异性的问题，技术上的问题尚不能使这些新型检测试剂大规模应用于临床应用。

目前，世界卫生组织（WHO）和国家疾病预防控制中心（CDC）建议使用HIV Western Blot试验来重复检测经由ELISA或者其他血清学试验方法发现为阳性的标本，作为HIV检测的最终判断，以尽可能的避免假阳性结果的出现。

在实践中，HIV抗体检测方法由初筛试验和确认试验组成。初筛试验结果阳性者再做确证试验以明确诊断。目前国内的HIV抗体检测使用的试剂，要求能同时检测HIV1型和HIV2型。初筛检测的方法有间接酶联免疫吸附试验（ELISA）、明胶颗粒凝集试验（PA）和金标法（SPOT），其中最常用的方法为酶联免疫吸附试验。HIV抗体筛查试剂敏感性较高，存在潜在的非特异性反应，有假阳性的可能，因此确认试验在HIV检测的最终判别中尤为重要。确认试验的方法包括免疫印迹试验、条带免疫试验、放射免疫沉淀试验及免疫荧光试验，目前以免疫印迹试验最为常用。

总之，由酶联免疫吸附检测(ELISA)联合免疫印迹检测（WB）组合而成的抗体检测至今还是公认的HIV检测的“金标准”方法。也就是说，目前对人类免疫缺陷病毒(以下简称为HIV)抗体进行筛查的整个流程主要是：应用HIV抗体酶联免疫试剂盒，然后对检测为阳性的样品需要进行HIV抗体确认检测，一般采用HIV抗体确认试剂。因此HIV抗体确认试剂在HIV的诊断中尤为重要。

由于HIV抗体确认试剂的技术含量较HIV初筛试剂的含量高，目前，HIV抗体确认试剂在我国完成注册仅有两家，其中包括美国MP公司在新加坡生产的HIVBlot2.2试剂和杭州澳亚公司的人类免疫缺陷病毒（HIV）1+2 抗体确认试剂盒。国内每年HIV确认试剂用量大约在十万人份，由于进口试剂的特异性较国内生产的试剂相对稳定，进口试剂在我国市场占有率达95%以上。但是进口试剂的缺点在于成本较高，检测过程时间较长。

而国内生产试剂的主要缺点在于稳定性、特异性相对于进口试剂有所欠缺。

在现有技术中，文献报道叠氮钠和硫柳汞可作为防腐剂使用。但是，通常的观点是，叠氮钠和硫柳汞用于纯的HIV抗体质控血清时，对血清的稳定性没有影响。

综上所述，本领域缺乏一种特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点的HIV抗体确认试剂盒。因此，本领域迫切需要开发一种特

异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点的HIV抗体确认试剂盒。

发明内容

本发明的目的在于获得一种特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点的HIV抗体确认试剂盒。

本发明的另一目的在于获得一种对HIV进行确认的方法，该方法特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点。

本发明的另一目的在于获得一种对HIV进行检测的方法，该方法特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点。

本发明的另一目的在于获得一种防腐剂在对照试剂中的应用。

本发明的一种HIV抗体确认试剂盒，所述试剂盒包括：

HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；

对照试剂，所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞；

以及辅助试剂。

优选地，所述碱金属叠氮盐选自叠氮钠、叠氮钾或其组合。

在本发明的一个具体实施方式中，所述防腐剂中，所述碱金属叠氮盐与硫柳汞的重量比为20~200:1；

优选地，所述碱金属叠氮盐的浓度为0.1±0.01重量%之间，所述硫柳汞的浓度在0.05±0.005重量%之间。

在本发明的一个具体实施方式中，

所述HIV-1型特异性抗原选自gp160抗原、gp120抗原、p66抗原、p51抗原、gp41抗原、p24抗原、p17抗原中的一个或多个；

所述HIV-2型特异性抗原选自gp36抗原；和/或

所述对照试剂选自阳性对照试剂、弱阳性对照试剂、阴性对照试剂中的一种或多种。

在本发明的一个具体实施方式中，所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原固定在免疫印迹膜上。

优选地，所述免疫印迹膜为硝酸纤维素膜。

在本发明的一个具体实施方式中，所述试剂还含有酶联物。

优选地，所述酶联物选自抗人IgG酶联物。

在本发明的一个具体实施方式中，所述辅助试剂选自浓缩洗涤缓冲液、样本稀释液、以及碱性磷酸酶底物溶液。

本发明的第二方面提供一种对HIV进行确认的方法，其包括如下步骤：

提供HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；

提供受测者的血清或血浆样本；

所述特异性抗原与所述样本反应后进行显色，得到的显色结果与对照试剂进行对照，从而对HIV进行确认；其中所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

在本发明的一个具体实施方式中，所述显色步骤中，采用酶联物进行显色。

优选地，所述酶联物为抗人IgG酶联物。

本发明的第三方面提供一种对HIV进行检测的方法，其包括如下步骤：

提供初筛为阳性的初筛血清或血浆样本；

所述初筛血清或血浆样本采用本发明所述的方法对HIV进行确认。

优选地，所述初筛法采用酶联免疫吸附检测法测定。

本发明的第三方面提供一种防腐剂在对照试剂中的应用，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

优选地，所述对照试剂选自阳性对照试剂、弱阳性对照试剂、阴性对照试剂中的一种或多种。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，通过改进制备工艺，将特定组合的叠氮钠和硫柳汞用于对照试剂，从而获得了一种特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点的HIV抗体确认试剂盒。在此基础上完成了本发明。

本发明的抗体确认方法的发明构思如下：检测人血清或血浆中针对HIV-1/2抗原（包括HIV-1 gp160、gp120、p66、p51、gp41、p24、p17以及HIV-2 gp36等）产生的特异性IgG抗体，依据所出现的条带反应，确认初筛为HIV抗体阳性的人血清或者血浆中存在的HIV-1或HIV-2抗体。在一个具体实施方式中，本试剂盒运用免疫印迹实验。

以下对本发明的各个部分进行详述：

HIV抗体确认试剂盒

本发明的HIV抗体确认试剂盒，包括：

HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；

对照试剂，所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞；

以及辅助试剂。

所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原中，所述HIV-1型特异性抗原包括gp160抗原、gp120抗原、p66抗原、p51抗原、gp41抗原、p31抗原、p24抗原、p17抗原中的一个或多个。优选地，所述HIV-1型特异性抗原为HIV-1病毒裂解蛋白（HTLV-III B株）的7个特异性抗原，包括gp160抗原、gp120抗原、p66抗原、p51抗原、gp41抗原、p24抗原和p17抗原。

所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原中，所述HIV-2型特异性抗原包括HIV-2重组蛋白，例如为gp36抗原。

所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原还可以采用本领域其他的各种种类的HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原，只要不对本发明的发明目的产生限制即可。

所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原可以采用各种本领域的方式固定在载体上，只要不对本发明的发明目的产生限制即可。优选地，所述HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原固定在免疫印迹膜上。更优选地，所述免疫印迹膜为硝酸纤维素膜。

具体地例子包括，HIV-1病毒裂解蛋白通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分离不同分子量的多肽，分离的HIV-1多肽通过电转移从凝胶转移到硝酸纤维素膜上；同时另外两个多肽分子直接点在膜上，它们分别是：1）一条是金黄色葡萄球菌A蛋白（SPA）的质控带，2）一条是通过重组表达的HIV-2特异性包膜抗原。含有上述多肽的硝酸纤维素膜切成可用于单样本检测的膜条。

本发明的对照试剂含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

所述对照试剂中，对照试剂的种类选自阳性对照试剂、弱阳性对照试剂、阴性对照试剂中的一种或多种。

所述阳性对照试剂含高滴度HIV-1/2抗体以及HBsAg阴性的人血清。所述“高滴度”的范围只要使得所述试剂可以作为阳性对照试剂进行定性比对即可。通常，阳性对照试剂中HIV感染人血的血清转换盘为6个月左右。

所述弱阳性对照试剂含低滴度HIV-1/2抗体以及HBsAg阴性的人血清。所述“低滴度”的范围只要使得所述试剂可以作为弱阳性对照试剂进行定量比对即可。通常，弱阳性对照试剂中艾滋病感染人血清转换盘为14天左右。

所述阴性对照试剂为HIV-1/2抗体阴性以及HBsAg阴性的人血清。

所述防腐剂中，优选地，所述碱金属叠氮盐选自叠氮钠、叠氮钾或其组合。

所述防腐剂中，优选地，所述碱金属叠氮盐与硫柳汞的重量比为20~200:1。更优选地，所述碱金属叠氮盐的浓度为 0.1 ± 0.01 重量%之间，所述硫柳汞的浓度在 0.05 ± 0.005 重量%之间。

发明人发现，在使用特定组合的碱金属叠氮盐和硫柳汞作为防腐剂后，可以大大提高对照试剂的稳定性，从而提高试剂盒的质量水平。

优选地，所述试剂盒中还含有酶联物。更优选地，所述酶联物选自抗人IgG酶联物。

所述辅助试剂包括各种试剂盒中需要的试剂，例如，包括浓缩洗涤缓冲液、样本稀释液、以及碱性磷酸酶底物溶液。

对HIV进行确认的方法

本发明的对HIV进行确认的方法，包括如下步骤：

提供HIV-1型和/或HIV-2型特异性抗原；

提供受测者的血清或血浆样本；

所述特异性抗原与所述样本反应后进行显色，得到的显色结果与对照试剂进行对照，从而对HIV进行确认；其中所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

在本发明的一个具体实施方式中，所述显色步骤中，采用酶联物进行显色。优选地，所述酶联物为抗人IgG酶联物。

在本发明的一个具体实施方式中，通过含有HIV-1/2蛋白的膜条与血清/血浆样本反应，洗涤除去未结合的抗体，与HIV-1/2蛋白特异性结合的人免疫球蛋白与结合有碱性磷酸酶的单抗人免疫球蛋白反应，碱性磷酸酶催化底物BCIP/NBT发生显色反应，把出现条带的位置与用HIV-1/2阳性对照血清孵育的参照卡上的条带位置进行比较，判定是否存在HIV特异性抗体条带，带的强度与HIV-1/2弱阳性对照进行比较。

对HIV进行检测的方法

本发明的对HIV进行检测的方法，包括如下步骤：

提供初筛为阳性的初筛血清或血浆样本；

所述初筛血清或血浆样本采用本发明所述的方法对HIV进行确认。

优选地，所述初筛法采用酶联免疫吸附检测法测定。具体地，采用间接酶联免疫吸附试验（ELISA）。

所述初筛法还可以采用本领域其他的初筛方法进行，只要不对本发明的发明目的产生限制即可。例如明胶颗粒凝集试验（PA）、金标法（SPOT）等。

应用

本发明还提供一种防腐剂在对照试剂中的应用，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞。

优选地，所述对照试剂选自阳性对照试剂、弱阳性对照试剂、阴性对照试剂中的一种或多种。

本发明所提供的各种试剂可以通过市售原料和传统化学转化方式合成。

本发明的优点在于：

(1)通过526份考核样品和1045份临床样品，得出本试剂敏感性为100%，特异性98.58%。考评结果一致认为本试剂实验方法比较简单，易于操作，特异性较好，与参比试剂HIVBlot2.2相比，二者检测HIV-1感染者样品没有明显差异，但本试剂特异性略高。

本发明的其他方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

除非另有定义或说明，本文中所使用的所有专业与科学用语与本领域技术熟练人员所熟悉的意义相同。此外任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。

实施例 1~9、对比例 1~8

试剂盒成分

实施例 1 的试剂盒配方成分如下：

(1)HIV-1/2 膜条①： 24 条/板 × 2

在硝酸纤维素膜上含有 HIV-1 病毒裂解蛋白 (HTLV-III B 株) 的 7 个特异性抗原 gp160, gp120, p66, p51, gp41, p24, p17 和一条 HIV-2 重组蛋白(gp36)。

(2) HIV-1/2 阳性对照 100 μ L \times 2 :

含高滴度(艾滋病感染人血清转换盘为 6 个月)HIV-1/2 抗体以及 HBsAg 阴性的人血清, 含 0.1%叠氮钠和 0.005%硫柳汞作为防腐剂。

(3) HIV-1/2 弱阳性对照 100 μ L \times 2: 含低滴度(艾滋病感染人血清转换盘为 14 天)HIV-1/2 抗体以及 HBsAg 阴性的人血清, 含 0.1%叠氮钠和 0.005%硫柳汞作为防腐剂。

(4) 人 IgG 阴性对照 100 μ L \times 2: HIV-1/2 抗体阴性以及 HBsAg 阴性的人血清, 含 0.1%叠氮钠和 0.005%硫柳汞作为防腐剂。

(5) 浓缩洗涤缓冲液 (10 \times) 25mL \times 2:

稀释成 250mL 溶液。NaCl: 1.400Mol/L, Na₂HPO₄·12H₂O: 0.080 Mol/L, KH₂PO₄: 0.020Mol/L, KCl: 0.026Mol/L。含 0.5% Tween-20 和 0.005%硫柳汞作为防腐剂。

(6) 样本稀释液: 30mL \times 2

可直接使用。NaCl: 0.140Mol/L, Na₂HPO₄·12H₂O: 0.008Mol/L, KH₂PO₄: 0.002Mol/L, KCl: 0.003Mol/L。含有 0.5%Gentamicin 和 ProClin (体积比: 1:250) 作为防腐剂。

(7) 抗人 IgG 酶联物 30mL \times 2:

可直接使用的与碱性磷酸酶结合的羊抗人 IgG(Fc 片断特异性的)。含 0.1% Tween-20, 含无汞无叠氮化物的防腐剂。

(8) 碱性磷酸酶底物溶液 30mL \times 2:

直接使用的碱性磷酸酶底物溶液 BCIP/NBT (5-溴-4-氯-3-吲哚基-磷酸盐/氮蓝四唑), 组成浓度为: BCIP 0.692mMol/L, NBT:0.734mMol/L, 含 0.1% Tween-20。

所述试剂盒中还含有: 孵育板 (6 块)、记录表 (2 张)、说明书 (1 本)、参照卡 (1 张)。

注: ①HIV-1/2 膜条 的制备: HIV-1 病毒裂解蛋白通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离不同分子量的多肽, 分离的 HIV-1 多肽通过电转移从凝胶转移到硝酸纤维素膜上; 同时另外两个多肽分子直接点在膜上, 它们分别是: 1) 一条是金黄色葡萄球菌 A 蛋白 (SPA) 的质控带, 2) 一条是通过重组表达的 HIV-2 特异性包膜抗原。含有上述多肽的硝酸纤维素膜切成可用于单样本检测的膜条。得到的 HIV-1/2 膜条为含有 HIV-1 病毒裂解蛋白 (HTLV-III B 株) 的 7 个特异性抗原 gp160, gp120, p66, p51,

gp41, p24, p17 和一条 HIV-2 重组蛋白的免疫印迹膜。

操作过程

在检测过程中, 含有 HIV-1/2 膜条与血清样本反应, 洗涤除去未结合的血清中抗体, 如果血清样本中含有与膜上相应的 HIV 多肽反应的特异性抗体, 则通过随后加入的标记有碱性磷酸酶的羊抗人免疫球蛋白(羊抗人 IgG) 与底物 BCIP/NBT 的作用条带被显现出来。出现条带的位置与用 HIV-1/2 阳性对照血清孵育的参照卡上的条带位置进行比较。带的显色强度与 HIV-1/2 弱阳性对照进行比较。

使用本试剂盒时, 应严格按照国家有关传染性物质的操作要求, 至少在生物安全 II 级实验室进行操作。操作过程如下(记载于试剂盒中说明书):

1. 稀释洗涤缓冲液 (1×) 的配制

按 1: 10 稀释, 即: 将 1mL 的浓缩洗涤缓冲液 (10×) 加入到 9mL 去离子水中, 彻底混匀即可。每个模条配制 10mL 稀释洗涤缓冲液

2. 注意事项

1) 按前面的配方准备好所有试剂。在使用前让其达到室温。所有的步骤都在室温 (20—25℃) 下完成。

2) 仅仅使用摇摆摇床用作搅拌, 不要用水平摇床。所有的孵育都在摇摆速度以 30—40 转/分钟的摇床上完成。检查摇床的速度和振幅, 加 1mL 的稀释洗涤缓冲液到托盘每个槽孔里并打开摇床。调整速度避免溶液溅到旁边的槽孔中。

3) 使用连接在真空系统的一次性吸液头把每个槽孔中的液体吸尽。带捕集器的吸液器就足够了。不要倾倒托盘以排空槽孔, 这会引入液体越过槽边而与临近的样本混合。

3. 实验步骤

1) 向槽孔中加入 1mL 稀释洗涤缓冲液。

2) 用剪刀从试剂膜条靠近数字的一边剪去连接的部分, 以便分开单个膜条。

3) 用镊子把膜条依次放入实验槽孔内, 有数字的一面朝上。

- 4) 在摇床上孵育 1 分钟直到所有的膜条均匀地浸湿。用吸液器分别吸去液体。
- 5) 加 1mL 样本稀释液到实验槽孔中。
- 6) 再加 10 μ L 检测样本、或 HIV-1/2 阳性对照、弱阳性对照或阴性对照到适当的有膜条的槽孔中，在各孔中刷洗枪头以便混匀。
- 7) 在摇床上孵育 2 小时。用吸液器分别吸去液体。
- 8) 向各孔中加入 1mL 稀释洗涤缓冲液洗涤所有膜条，在摇床上摇 3 分钟然后吸去液体。再重复本步骤 2 次。
- 9) 向各孔中加 1mL 酶联物，在摇床上孵育 15 分钟。吸去液体。
- 10) 向各孔中加 1mL 稀释洗涤缓冲液漂洗所有膜条。摇 3 分钟然后吸去液体。再重复本步骤 1 次。
- 11) 向各孔中加 1mL 去离子水漂洗所有膜条。摇 3 分钟然后吸去液体。再重复本步骤 1 次。
- 12) 向各孔中加 1mL 底物液，在摇床上孵育 6-8 分钟。吸去所有槽孔的液体。
- 13) 在短暂的时间内更换 2 次去离子水漂洗所有槽孔内膜条以终止显色。
- 14) 使用镊子把膜条面朝上转移到一张纸巾上晾干。不要把它们放在纸巾中间吸干或拍干。在印迹没有完全干燥之前不要解释结果。
- 15) 把膜条保存在暗处，干燥的膜条对检测结果提供了永久的记录，在任何时候它们都可用于解释。

4. 质量控制：

- (1) 每个实验室都应该建立符合自己实验室的质量保证。
- (2) 在每个试剂盒中提供了阳性对照、弱阳性对照和阴性对照。这些血清提供了所期望的阳性和阴性条带类型。弱阳性对照用作确定什么时候终止显色反应以及作为衡量条带显色强度的指导。

- (3) 每次实验都设置阳性、弱阳性和阴性对照。

每个膜条都有内在的质控条带以确保病人的样本和所有的试剂没有漏加。实验按顺序完成后质控带清晰可见，才表明实验结果有效。

实施例 2~9、对比例 1~8 的试剂盒成分、检测方法与实施例 1 相似，不同在于叠氮钠与硫柳汞的浓度不同，其浓度与稳定性结果见如下表 1。

表 1 配方稳定性实验总结

| 被保护抗体对象： | 保护剂（防腐剂） | | ELISA 检测抗体滴度 稳定时间 | |
|-----------|----------|--------|----------------------|-------|
| | 叠氮钠 | 硫柳汞 | 第一次结果 | 第二次结果 |
| HIV-1/2抗体 | | | | |
| 对比例1 | 0.2% | | 14小时 | 16小时 |
| 对比例2 | 0.1% | | 14小时 | 14小时 |
| 对比例3 | 0.05% | | 12小时 | 10小时 |
| 对比例4 | 0.01% | | 6小时 | 8小时 |
| 对比例5 | | 0.001% | 40天 | 40天 |
| 对比例6 | | 0.005% | 160天 | 180天 |
| 对比例7 | | 0.010% | 140天 | 160天 |
| 对比例8 | | 0.10% | 20天 | 60天 |
| 实施例1 | 0.1% | 0.005% | 600天 | 600天 |
| 实施例2 | 0.1% | 0.001% | 390天 | 360天 |
| 实施例3 | 0.1% | 0.010% | 600天 | 600天 |
| 实施例4 | 0.1% | 0.050% | 600天 | 600天 |
| 实施例5 | 0.1% | 0.100% | 120天 | 90天 |
| 实施例6 | 0.1% | 0.200% | 60天 | 180天 |
| 实施例7 | 0.2% | 0.005% | 600天 | 600天 |
| 实施例8 | 0.05% | 0.005% | 400天 | 400天 |
| 实施例9 | 0.01% | 0.005% | 200天 | 160天 |

由如上表1所示，采用保护剂配方组合能够显著提高对于蛋白抗体的保护能力。采用两种复配成份的稳定液，可以显著延长蛋白抗体的保存时间。

不同配方和不同组合的保护液显示出不同的结果。经过4度同等保存条件并经长期观察和使用ELISA检测，证明叠氮钠0.1%+硫柳汞0.005%效果最好，最

经济。本配方使用于临床用诊断试剂，经过1045例临床试验，证明效果良好，未见任何产品检验效能的减弱，表明稳定液对蛋白抗体的保护作用非常明显和实用。

性能测定

(一)稳定性测定：稳定性测定结果见如上表1

(二)临床试验结果

临床研究用所有产品的名称、规格、来源、批号、效期及保存条件，对比试验产品的注册情况：

(1)考核试剂：实施例 1 的试剂盒

(2)其它试剂：

所有试剂均经我国 SFDA 批准。

HIV 抗体检测：生物梅里埃公司人类免疫缺陷病毒（HIV）1+2 抗体诊断试剂（酶联免疫法），批号 A44CC、A45EC、A45HA 和 A46AA；

HIV 抗体确认试剂(参比试剂)：Genelabs 公司 HIV Blot2.2, 批号 AE4050 和 AE2029；

生物梅里埃 Nuclisens EasyQ HIV-1 试剂盒，批号 05071101

HIV 病毒载量测定：Roche 公司 The Amplicor HIV-1 Monitor® Test, v1.5, 批号：FO8869 和 EXE074；

试验目的

本试验主要用于评价考核试剂的实际应用情况，分析考核试剂的敏感性、特异性以及考核试剂检测不同基因型HIV-1感染者样品的能力。

试验总体设计及方案：

整个临床考核工作由中国药品生物制品检定所组织完成。

中国药品生物制品检定所、上海市预防医学研究院和湖南省疾病预防控制中心负责对HIV感染者和疑似感染者样品以及HIV抗体阴性样品进行考核；解放

军艾滋病检测确认实验室负责对HIV感染者样品进行考核；所有考核样品均经生物梅里埃HIV抗体试剂进行检测，对检测为HIV抗体阳性的样品进一步经HIV Blot2.2试剂（参比试剂）进行确认检测。然后利用考核试剂检测所有样品。

对中国药品生物制品检定所保存的样品，同时经生物梅里埃Nuclisens HIV-1 easyQ试剂和Roche Cobas Amplicor HIV-1 Monitor V1.5试剂等进行病毒载量检测，对HIV-1感染者样品进行env V3区基因型分析，以分析考核试剂检测不同基因型HIV-1样品的能力。

所有样品经考核试剂检测后，分析考核试剂和HIV抗体试剂之间是否存在差异，若存在差异，分析差异产生的原因并利用其他试剂进行进一步检测分析。

样本选择依据、入选标准、排除标准和剔除标准：

本研究旨在评价考核试剂在我国的实际应用情况，分析考核试剂的敏感性、特异性以及检测不同基因型HIV-1样品的能力。因此，考核样品所用的HIV-1感染者样品，应考虑我国HIV-1流行的地区因素、基因型差异、以及样品所处的HIV-1感染阶段等。对分析试剂特异性所用的HIV抗体阴性样品，同样应该考虑样品所处的地域因素。

所有样品经考核试剂检测后，检测结果均应该严格根据试剂的说明书进行判断，对检测结果判断为“无效”的样品进行重新检测，若仍无效，则统计分析时应该剔除该样品。

所有样品同样经考核试剂检测，分析考核试剂和参比试剂的一致性，对检测结果不一致的样品，应进行双份复试，以复试结果为最终的结果；同时，需进一步确定或者鉴别那些结果不一致样品所处的HIV-1感染状态。对没有进行跟踪随访的样品、以及HIV-1 NAT检测无效的样品，应不计算入有效的统计数据中。

储存条件：

储存于2~8℃；

操作情况：

严格按照操作方法进行操作并判定结果。

样本采集、保存、运输方法：

所有样品均为橘橼酸钠抗凝的血浆，分装为 0.5mL 每管，冻存于-80℃冰箱。

质量控制方法：

每一次试验，均设三个对照（阴性对照、弱阳性对照和强阳性对照），而且每个膜条均设有质控带，只有每条膜条上出现质控带，且阴性对照、弱阳性对照和强阳性对照均成立，试验才有效。

检测单位：

共组织4家单位（中国药品生物制品检定所、解放军艾滋病检测确认实验室、上海市预防医学研究院、湖南省疾病预防控制中心）共1045例样本对实施例1的人类免疫缺陷病毒HIV（1+2）抗体确认试剂盒（免疫印迹法）进行了评价。

共对1045份临床样品进行了考核，其中HIV抗体确认阳性样品共683份；HIV抗体不确定样品共25份；HIV抗体阴性样品337份，样品分别来自北京、新疆、河北、辽宁、山西、河南、广东、广西、湖南和湖北等地区。具体样品来源如下表2所示：

表2：具体样品来源

| | HIV抗体阳性 | 不确定 | 阴性 | 合计 |
|-----------|---------|-----|-----|------|
| 检定所 | 308 | 6 | 212 | 526 |
| 解放军HIV实验室 | 206 | | | 206 |
| 上海预防医学研究院 | 89 | 10 | 64 | 163 |
| 湖南CDC | 80 | 9 | 61 | 150 |
| 合计 | 683 | 25 | 337 | 1045 |

结果判定方法

(1) 试验有效性：

在实验完成后，每个膜条的质控带清晰可见，表明实验结果有效。

(2) 结果判定：

HIV-1结果判断如下表3所示：

表3：试验结果判读表

| HIV-1结果判断 | 条带情况 |
|-----------|--|
| 阴性结果 | 无病毒特异性条带存在 |
| 不确认结果 | 既不符合阳性条带模式标准又不符合阴性条带模式标准的任何条带模式 |
| 阳性结果 | 任何两个或更多的以下条带（p24, gp 41, gp120/gp160）存在，其它的HIV-1蛋白条带可能存在也可能不存在 |

HIV-2型判定如下表4所示：

表4：试验结果判读表

| HIV-2结果判断 | 条带情况 |
|-----------|--------------------------------|
| 阴性 度淡 | HIV-2条带不存在或比弱阳性对照上的HIV-2条带强度淡 |
| 阳性 当或深 | HIV-2条带强度与弱阳性对照上的HIV-2条带强度相当或深 |

结果讨论

I. 考核试剂与抗体试剂检测结果的比较

1045 份临床样品，经 HIV 抗体检测试剂和 HIV 抗体确认试剂检测（参比试剂），结果 683 份样品为 HIV 抗体确认阳性，25 份为 HIV 抗体不确定，337 份为 HIV 抗体阴性样品。

经考核试剂检测，结果 683 份样品为 HIV 抗体确认阳性，13 份样品为 HIV 抗体不确定，349 份样品为 HIV 抗体阴性。

考核试剂和参比试剂的检测结果比较见表 5，综合数据，考核试剂和 HIV Blot2.2 试剂的总体符合率为 $(681+8+334) \div 1045 = 97.89\%$ 。

表5: 考核试剂检测结果与HIV抗体检测结果的符合率

| | 样品数量 | 考核试剂 | | | 参比试剂 | | |
|--------------|------|------|-----|----|------|-----|----|
| | | 阴性 | 不确定 | 阳性 | 阴线 | 不确定 | 阳性 |
| HIV抗体阳性 | 683 | 0 | 2 | | 681 | | |
| HIV抗体不 确定 | 25 | 15 | 8 | | 2 | | |
| HIV抗体阴性 | 337 | 334 | 3 | | 0 | | |
| 合计 | 1045 | 349 | 13 | | 683 | | |

综合上述数据,有效的考核样品数量为1041份,其中HIV-1感染者样品689份,HIV阴性样品352份(见表2、3)。

由此,考核试剂敏感性为100%,特异性98.58%;参比试剂敏感性100%,特异性94.89%。

II. HIV 基因型分析

中国药品生物制品检定所保存的样品中,HIV抗体确证阳性、HIV抗体不确定样品共186份,对这186份样品进行env V3区基因分型,结果见表6。

表6: 不同地区血清/血浆样品的基因型分析

| | 总样品 数 | AE | B | BC | 未定型 数 |
|----|----------|----|----|----|----------|
| 北京 | 33 | 2 | 18 | 10 | 3 |
| 甘肃 | 6 | | 2 | 1 | 3 |
| 广东 | 7 | | 1 | 4 | 2 |
| 贵州 | 1 | 1 | | | |
| 河北 | 15 | | 13 | | 2 |
| 湖北 | 15 | 1 | 12 | | 2 |
| 青海 | 1 | | | | 1 |
| 山东 | 1 | | 1 | | |
| 陕西 | 2 | | | | 2 |
| 上海 | 4 | 4 | | | |
| 四川 | 30 | | | 24 | 6 |
| 新疆 | 30 | 2 | 1 | 20 | 7 |
| 云南 | 39 | 4 | | 28 | 7 |
| 重庆 | 1 | | | 1 | |
| 天津 | 1 | | 1 | | |
| 合计 | 186 | 14 | 49 | 88 | 35 |

基因分型结果显示, 总共有151份样品成功完成基因分型, 其中, B亚型占32.45%、BC亚型占58.28%, AE亚型占9.27%。

III. 临床讨论和结论

从上述1045例血清样本的实际检测中, 可以认为实施例1的试剂盒具有与市售同类产品相同的检出率和准确性, 该试剂实验方法比较简单, 易于操作; 通过对以上样品的检测, 说明该试剂特异性较好; 同时, 对于我国主要流行的HIV-1病毒株的感染均能比较准确的完成确认检测; 与参比试剂相比, 二者检测HIV-1感染者样品没有明显的差异, 但考核试剂特异性略高。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

| | | | |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN101581720A | 公开(公告)日 | 2009-11-18 |
| 申请号 | CN200810037364.1 | 申请日 | 2008-05-14 |
| [标]发明人 | 王力 | | |
| 发明人 | 王力 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 A01N59/00 | | |
| 代理人(译) | 徐迅 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供一种HIV抗体确认试剂盒，所述试剂盒包括：HIV - 1型和/或HIV - 2型特异性抗原；对照试剂，所述对照试剂中含有防腐剂，所述防腐剂为浓度在0.1~0.2重量%之间的碱金属叠氮盐和浓度在0.002~0.06重量%之间的硫柳汞；以及辅助试剂。所述试剂盒特异性好、灵敏度高，同时具备成本低、能够迅速检测HIV等优点。

| 被保护抗体对象： | 保护剂（防腐剂） | | ELISA 检测抗体滴度 | |
|-----------|----------|--------|--------------|-------|
| | 叠氮钠 | 硫柳汞 | 稳定时间 | |
| HIV-1/2抗体 | | | 第一次结果 | 第二次结果 |
| 对比例1 | 0.2% | | 14小时 | 16小时 |
| 对比例2 | 0.1% | | 14小时 | 14小时 |
| 对比例3 | 0.05% | | 12小时 | 10小时 |
| 对比例4 | 0.01% | | 6小时 | 8小时 |
| 对比例5 | | 0.001% | 40天 | 40天 |
| 对比例6 | | 0.005% | 160天 | 180天 |
| 对比例7 | | 0.010% | 140天 | 160天 |
| 对比例8 | | 0.10% | 20天 | 60天 |
| 实施例1 | 0.1% | 0.005% | 600天 | 600天 |
| 实施例2 | 0.1% | 0.001% | 390天 | 360天 |
| 实施例3 | 0.1% | 0.010% | 600天 | 600天 |
| 实施例4 | 0.1% | 0.050% | 600天 | 600天 |
| 实施例5 | 0.1% | 0.100% | 120天 | 90天 |
| 实施例6 | 0.1% | 0.200% | 60天 | 180天 |
| 实施例7 | 0.2% | 0.005% | 600天 | 600天 |
| 实施例8 | 0.05% | 0.005% | 400天 | 400天 |
| 实施例9 | 0.01% | 0.005% | 200天 | 160天 |