

采用集合 RNA 检测方法估计高危人群的 HIV 感染发病率

董莉娟 陈敏 苏莹珍 李俊杰 章任重 杨莉 杨朝军 施玉华
陈会超 陈玲 马艳玲 贾曼红

【摘要】 目的 及时发现艾滋病自愿咨询检测(VCT)人群和男男性行为人群(MSM)HIV 抗体窗口期感染者,并估计发病率。**方法** 收集 2012 年 1—10 月云南省疾病预防控制中心 VCT 门诊和 MSM 活动室 HIV 抗体筛查阴性样本,以 50 : 1 和 10 : 1 二级集合方式进行 HIV-1 RNA 检测,并随访 HIV-1 RNA 阳性者,最后以 Ron Brookmeyer 方法估计 VCT 和 MSM 人群的 HIV 感染年发病率。**结果** 1400 份 VCT 门诊 HIV 抗体筛查阴性样本中,发现 2 名 HIV-1 RNA 阳性窗口期感染者,HIV 感染年发病率为 1.87%(95%CI: 1.23% ~ 2.65%)。MSM 500 份 HIV 抗体筛查阴性样本中,发现 2 名 HIV-1 RNA 阳性窗口期感染者,HIV 感染年发病率为 5.31%(95%CI: 3.52% ~ 7.45%)。**结论** 集合 RNA 检测为及时发现 VCT 和 MSM 的 HIV 窗口期感染者提供有效方法,建议通过提高集合 RNA 检测频率等方式,加强 MSM 及其他高危人群 HIV 感染窗口期的筛查。

【关键词】 艾滋病病毒;集合 RNA 检测;窗口期;高危人群

Estimation on the HIV-1 incidence among high risk groups using the pooling RNA technique

DONG Li-juan, CHEN Min, SU Ying-zhen, LI Jun-jie, ZHANG Ren-zhong, YANG Li, YANG Chao-jun, SHI Yu-hua, CHEN Hui-chao, CHEN Ling, MA Yan-ling, JIA Man-hong. Center for AIDS/STD Control and Prevention, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China
Corresponding authors: MA Yan-ling, Email: mayanling68@yahoo.com.cn; JIA Man-hong, Email: jmanhong@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Major Special Project of China's "Twelfth Five-Year Plan" for Science and Technology Development (No. 2012ZX10001-006).

【Abstract】 Objective To timely identify the HIV-1 infection in window-period and to estimate the HIV-1 incidence among people who came for voluntary counseling and testing (VCT) service as well as men who have sex with men (MSM), respectively. **Methods** HIV antibody negative samples that were determined by screening tests between January and October 2012, were collected and tested with pooling HIV-1 RNA testing technique (2-staged pooling by 50 : 1, 10 : 1). Positive cases were followed-up for HIV antibody testing while HIV incidence was calculated under Ron Brookmeyer's method, among VCT and MSM populations. **Results** Among 1400 HIV antibody negative samples of VCT, two showed HIV-1 RNA positive during the antibody window period with the HIV-1 incidence as 1.87% per year (95% CI: 1.23%-2.65%). Among 500 HIV antibody negative samples from MSM population, two showed HIV-1 RNA positive in the antibody window period, with HIV-1 incidence as 5.31% per year (95% CI: 3.52%-7.45%). **Conclusion** Pooling HIV-1 RNA testing seemed a powerful tool for HIV antibody testing in the window-period. Measures should be taken to strengthen the HIV diagnostic programs among MSM and other high risk groups, during the HIV antibody window-period. More frequent detection approach as pooling HIV-1 RNA testing might be a good choice.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Pooling RNA testing; Window period; High risk groups

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.08.014

基金项目:国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10001-006)

作者单位:650022 昆明,云南省疾病预防控制中心性病艾滋病防治中心

董莉娟、陈敏同为第一作者

通信作者:马艳玲, Email: mayanling68@yahoo.com.cn; 贾曼红, Email: jmanhong@yahoo.com.cn

HIV 急性期感染者在临床上尚未出现显著病理特征, HIV 抗体检测阴性, 但机体已出现高病毒血症和高抗原血症时, 传播概率较高, 是慢性感染期的数十倍^[1]。因此早期发现 HIV 抗体窗口期感染者在降低传播及患者更早治疗方面有极其重要意义。目前在 HIV 感染窗口期可进行病毒核酸检测, 但单份检测成本较高, 而集合 RNA 检测方法在兼顾敏感性的同时, 具有更高的成本效益, 在 HIV 流行地区具有很大的应用价值。为及早发现感染者, 降低传播风险, 本研究在自愿咨询检测 (voluntary counseling and testing, VCT) 和男男性行为人群 (MSM) 中开展了集合 RNA 检测。

材料与方法

1. 样本: 连续收集 2012 年 1—10 月在云南省疾病预防控制中心 VCT 门诊和昆明彩云天空 MSM 活动室的 HIV 抗体筛查阴性血浆样本, 其中 VCT 样本 1400 份, MSM 样本 500 份。每个采样点样本集够 50 份立即进行一次集合 RNA 检测。

2. 方法:

(1) 仪器和试剂: 采用 Easy Mag 全自动核酸提取仪、NucliSens EasyQ 孵育器和 NucliSens EasyQ 分析仪 (法国生物梅里埃公司) 等。试剂为 HIV1+2 型抗体诊断试剂盒 (胶体硒法) (Alere Medical 公司)、HIV 抗体检测试剂盒 (胶体金法) (韩国 SD 公司)、NucliSens EasyQ® HIV-1 v1.1 和 NucliSens EasyQ® HIV-1 v2.0 (法国生物梅里埃公司)、HIV 1+2 型抗体检测试剂盒 (免疫印迹法) (MP 生物医学亚太私人有限公司), 均在有效期内使用。

(2) 样品的集合程序: 经两种艾滋病抗体快速检测试剂检测为阴性的血浆样本, 按《全国艾滋病检测技术规范》(2009 版)^[2]中的方法进行集合和拆分, 即取 50 份阴性血浆样本, 平均分成 5 组, 每组 10 份, 再从这 10 份样本中各取出 130 μ l 于同一试管中涡旋混匀 (即 1 个二级集合), 将 5 个二级集合各取出 210 μ l 于同一试管中涡旋混匀 (即 1 个一级集合)。使用 EasyQ 核酸检测方法对一级集合进行检测, 阳性结果的一级集合进一步检测组成该阳性一级集合的 5 个二级集合样品, 最后出现阳性结果的二级集合样品再进一步检测对应的 10 份单个样本, 最终确定核酸阳性的单个样本。如检测出 HIV RNA 阳性样本, 则立即通知其在 2~4 周内检测 HIV 抗体, 如检测结果不确定, 要求 2~4 周内再复检一次 HIV 抗体。

(3) HIV 抗体确证实验: 采用免疫印迹试验 (过夜法)。具体操作和结果判定按照 HIV1+2 型抗体检测试剂盒 (免疫印迹法) 说明书和《全国艾滋病检测技术指南》(2009 版)^[2]。

(4) HIV 年发病率估计: 参照 Brookmeyer^[3]方法和文献[4]方法, 估计 HIV-1 年发病率。其公式

$$I = [1 - (M/N)^{1/\mu}] \times 365/\mu \times 100\%$$

式中 N 为参加集合的样本总数, M 为 HIV-1 RNA 检测为阴性集合中的样本总数, C 为 HIV-1 RNA 检测为阳性集合的单个集合中样本数量, μ 为抗体阳转前 RNA 检测持续为阳性的时间 (以标准血清估计为 28 d^[3,5])。

结 果

1. 集合 RNA 检测: 从 1400 份 VCT 门诊抗体筛查阴性的样本中, 共检测出 2 份 HIV-1 RNA 阳性样本, 病毒载量分别为 88 000 copy/ml 和 790 000 copy/ml, 前者随访 26 d 后确证为 HIV 抗体阳性, 后者随访 18 d 后 HIV 抗体不确定, 35 d 后再次随访确证为 HIV 抗体阳性; 500 份 MSM 抗体筛查阴性样本中, 共检测出 2 份 HIV-1 RNA 阳性样本, 病毒载量分别为 1 900 000 copy/ml 和 8 100 000 copy/ml, 前者随访 20 d 后确证为 HIV 抗体阳性, 后者通知随访, 并在其他实验室确证为 HIV 抗体阳性。4 例急性期感染者分别在两级集合和最终单份检测的病毒载量值见表 1。

表 1 HIV RNA 阳性集合和原始样本的病毒载量值 (copy/ml)

样本编号	一级集合	二级集合	原始样本
Z0584	1 300	20 000	88 000
Z2256	9 500	60 000	790 000
M200082	170 000	420 000	1 900 000
BDMSM098	190 000	1 100 000	8 100 000

2. HIV 年发病率估计: 2012 年 VCT 参加集合的总样本数为 1400 份 ($N=1400$), HIV-1 RNA 检测为阴性集合中的总样本数为 1380 份 ($M=1380$), 检测为阳性集合单个集合中的样本数为 10 份 ($C=10$), $\mu=28$ d, 代入上述公式计算得 HIV-1 年发病率为 1.87% (95% CI: 1.23% ~ 2.65%); 2012 年 MSM 参加集合的样本总数为 500 份 ($N=500$), HIV-1 RNA 检测为阴性集合中的总样本数为 480 份 ($M=480$), 检测为阳性集合单个集合中的样本数为 10 份 ($C=10$), $\mu=28$ d, 代入公式计算得 HIV-1 年发病率为 5.31% (95% CI: 3.52% ~ 7.45%)。

讨 论

HIV急性期感染者精液或阴道分泌物中病毒载量值高,极具传染性,及时发现HIV抗体窗口期感染者对降低传播尤为重要。血浆HIV-1 RNA检测是急性HIV感染的检测方法中最敏感的方法,如目前使用的NucliSens EasyQ检测HIV-1 RNA的范围在 $10 \sim 10\,000\,000$ copy/ml, HIV感染急性期样本血浆病毒载量一般 $>100\,000$ copy/ml^[6],即使将HIV感染急性期样本稀释50~100倍也可检测到。故将多份样本混合成集合以RT-PCR检测,不但具有较高的敏感性和特异性,且降低成本,是HIV窗口期感染诊断可行的策略之一^[7]。在许多发达国家,集合核酸检测已成为献血员窗口期检测的常规方法。该方法除对HIV窗口期感染检测具有重要指导意义,也可用于新发感染率的估算^[3]。相比队列研究而言,在发病率估算方面,集合RNA检测简便易行,提高了资源的利用率。虽然不同方法获得的结果略有差异,但利用集合RNA检测也可以连续监测特定人群发病率的变化,可作为评价防治效果和制定干预策略的依据。

本研究利用集合RNA检测的数据在两类检测人群中估算了HIV新发感染率。VCT门诊和MSM人群HIV发病率分别为1.87%(95%CI: 1.23%~2.65%)和5.31%(95%CI: 3.52%~7.45%),两者95%CI值无重叠,差异有统计学意义,说明MSM感染HIV的风险比一般高危人群要高。2008年我国一项覆盖61个城市18 000名MSM的调查显示, HIV患病率和发病率分别为4.9%和2.6/100人年~5.4/100人年^[8]。本研究估计的MSM年发病率在此范围内,且与本实验室运用BED-CEIA方法估算2012年昆明市MSM的HIV年新发感染率为2.88%(95%CI: 0.06%~5.69%)(数据未发表)在95%CI值有重叠,差异无统计学意义。

实际应用中要考虑样品的稀释倍数对结果的影响。本研究一级集合稀释倍数为50。如将二级集合的样本数增加为20($C=20$),一级集合仍包括5个二级集合,即最终的稀释倍数为100。理论上也能发现上述4例窗口期样本,且估计VCT人群和MSM

的HIV年发病率分别为1.89%(95%CI: 1.24%~2.67%)和5.42%(95%CI: 3.61%~7.58%),均与本研究结果的差异无统计学意义,但实际工作中为保证更高的敏感性,取50倍稀释较为可靠。

与我国其他地区类似,云南省MSM的HIV新发感染率上升趋势较快,为提高该人群检出率,集合RNA检测是一种有效的技术手段,但在实际运用中还应注意检测的时效性。此外,对于有其他高危行为的阴性受检者,在条件允许情况下建议开展聚合核酸检测,以最大限度提前发现感染者,并进行有效的管理,减少HIV的二代传播。

参 考 文 献

- [1] Miller WC, Rosenberg NE, Rutstein SE, et al. The role of acute and early HIV infection in the sexual transmission of HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, 2010, 5(4): 277-282.
- [2] Chinese Center for Disease Control and Prevention. National Guideline for Detection of HIV/AIDS (Revised in 2009). Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2009. (in Chinese)
中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2009年修订版). 北京: 中国疾病预防控制中心, 2009.
- [3] Brookmeyer R. The analysis of multistage pooling studies of biological specimens for estimating disease incidence and prevalence. *Biometrics*, 1999, 55(2): 608-612.
- [4] Liu GJ, Hong Q. Application of confidence in interval (CI). *Chin J Evidence-Based Med*, 2001, 1(4): 235-238. (in Chinese)
刘关键, 洪旗. 可信区间的意义. *中国循证医学*, 2001, 1(4): 235-238.
- [5] Busch MP, Lee LL, Satten GA, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion*, 1995, 35(2): 91-97.
- [6] Daar ES, Little S, Pitt J, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. *Ann Intern Med*, 2001, 134(1): 25-29.
- [7] Han XX, Xu JJ, Chu ZX, et al. Screening acute HIV infections among Chinese men who have sex with men from voluntary counseling & testing centers. *PLoS One*, 2011, 6(12): e29792.
- [8] Lau JTF, Lin C, Hao C, et al. Public health challenges of the emerging HIV epidemic among men who have sex with men in China. *Public Health*, 2011, 125: 260-265.

(收稿日期: 2013-02-20)

(本文编辑: 张林东)