

应用 BED-CEIA 检测干血斑样本监测 HIV-1 发病率的可行性研究

沈圣 田飞 江华洲 孙国清 缪礼锋 郭晓黎 肖瑶 贾玉江 Sten H. Vermund 蒋岩

【摘要】 目的 研究干血斑样本应用于现场 HIV-1 BED-CEIA 新近感染的检测以及监测 HIV-1 发病率的可行性。方法 收集 27 个自愿咨询检测(VCT)哨点的 10 313 名咨询者的血浆和干血斑样本,进行 HIV 抗体检测,对经免疫印迹方法确认的 349 例 HIV 感染者的血浆和干血斑样本同时进行 BED-CEIA 检测,检验干血斑样本 BED-CEIA 新近感染检测结果的稳定性和重复性,比较两种样本检测结果的差异及对 HIV 发病率估计的一致性。结果 应用干血斑样本检测具有较好的稳定性和重复性, R^2 值分别达到 0.9551 和 0.95。349 对样本的检测结果显示,294 对样本被同时判定为长期感染,53 对样本被同时判定为新近感染,两种样本对 HIV-1 是否为新近感染判断的一致性达到 99.43%。而 2 对样本得到不同的结果,其 An 值均处于临界值附近。在人群总体水平上,两种样本计算得到的 HIV-1 发病率完全一致。结论 在 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测中,尽管个别样本检测结果存在差异,但在人群水平上干血斑样本的检测结果对 HIV-1 发病率的估计与血浆样本没有差异,因此在中国可以应用于干血斑样本进行 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测。

【关键词】 艾滋病病毒;发病率;干血斑

Evaluation of BED-CEIA assay with dried blood spot specimens in China SHEN Sheng*, TIAN Fei, JIANG Hua-zhou, SUN GUO-qing, MIAO Li-feng, GUO Xiao-li, XIAO Yao, JIA Yu-jiang, Sten H. Vermund, JIANG Yan. *National AIDS Reference Laboratory, National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China
Corresponding author: JIANG Yan, Email: jiangyan03@263.net

【Abstract】 **Objective** To study the feasibility of using dried blood spot (DBS) specimens in BED-CEIA assay and to estimate the HIV-1 incidence with DBS in China. **Methods** 10 313 participants from 27 voluntary counseling and testing (VCT) sites were enrolled in this study. Both plasma and DBS specimens were collected. 349 eligible pairs of HIV-1 positive specimens confirmed by Western Blot were available for BED-CEIA and the results compared. Negative control, low positive control, high positive control and calibrator in DBS were used to evaluate the stability and repeatability of the detection results of DBS specimens. **Results** Of the total HIV positives, 294 and 53 participants were tested as long-term or recent HIV infections by both DBS and plasma specimens. Two participants showed different results from DBS and plasma specimens, but their final An values were close to the cutoff value of BED-CEIA assay. The concordance rate between the two types of specimens was 99.43% and the R^2 linear of the stability and repeatability results of DBS specimens reached 0.9551 and 0.95, respectively. **Conclusion** Although some individual specimens showed different results, the incidence rates calculated from both types of specimen were equivalent. DBS specimens were suitable for estimating the HIV incidence and could be popularized in China. However, further studies regarding window period and adjustment coefficients of BED-CEIA assay are needed.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Incidence; Dried blood spot

目前, HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测法主要应

用的样本是血清和血浆,这两种样本不足之处,一是采血量;二是具有潜在的传染性,不便于操作及运输;三是保存条件较为苛刻。滤纸片干血斑样本正好弥补了血清和血浆样本的缺陷,具有采血量少、制备简便、生物危险性低、方便运输、保存条件简单等诸多优点,有望成为现场工作采集样本的有效方法。但是,目前国内还未见应用于干血斑样本进行

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.018

基金项目:美国国立卫生院基金资助项目(1R03 AI 073134-01 A2)
作者单位:100050 北京,中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(沈圣、田飞、江华洲、肖瑶、蒋岩);河南省疾病预防控制中心(孙国清);安徽省疾病预防控制中心(缪礼锋);山西省疾病预防控制中心(郭晓黎);Vanderbilt School of Medicine, USA (贾玉江、Sten H. Vermund)

通信作者:蒋岩, Email: jiangyan03@263.net

HIV-1新近感染检测的报道。本研究旨在探索用滤纸片作为样本载体,制备干血斑样本后,使用BED-CEIA方法进行HIV-1新近感染检测,判断其结果的准确性和应用的可行性。

材料与方法

1. 材料:

(1)检测样本:所有检测样本来自2006年8月至2007年6月,河南、山西、安徽三个省的27个自愿咨询检测(VCT)点。各省VCT检测点均覆盖了本省HIV感染率高流行、中流行和低流行地区,其中15个位于河南省,7个位于安徽省,5个位于山西省。在征得咨询者知情同意后,无菌抽取静脉血于EDTA抗凝管中,轻轻颠倒抗凝管6~8次使血液和抗凝剂充分混匀,吸取70~80 μ l血样,缓慢滴加在滤纸片印圈中心处,每份样本连续滴加4个血斑,室温下自然干燥4h后,与干燥剂、湿度指示卡一起放入密封袋。其他抗凝血在6h内分离血浆。所有样本个人信息准确,并在-20℃以下进行保存和运送。

(2)检测试剂:英科创新HIV 1+2型快速检测试剂盒[英科创新(厦门)科技有限公司,中国,批号:2006070506];Determine HIV 1+2型胶体硒快速检测试剂盒(美国雅培制药有限公司,批号:43802u100);金豪HIV 1+2型抗体检测试剂(酶联免疫双抗原夹心法,北京金豪制药有限公司,批号:20061010);澳亚HIV 1+2型抗体检测试剂(免疫印迹法,杭州澳亚生物技术有限公司,批号:20061102);Calypte HIV-1 BED-CEIA新近感染检测试剂盒(Calypte Biomedical Corporation,美国,批号:CRP-104);Calypte HIV-1 BED-CEIA新近感染检测干血斑质控品(Calypte Biomedical Corporation,美国,批号:V1010601)。

2. 方法:

(1)样本HIV抗体初筛及确认实验:所有血浆样本均严格按照试剂盒操作说明进行HIV检测的初筛和确认实验,检测程序采用HIV抗体检测替代策略^[1]。

(2)排除HIV-1既往感染的样本:①问卷调查VCT咨询者的HIV-1既往感染史,并通过姓名等惟一标识查阅以往HIV检测结果数据库,排除所有HIV既往感染的样本;②所有已知HIV-1抗体阳性超过6个月的原阳性样本,CD₄淋巴细胞数<200个/ml的样本,以及艾滋病患者和接受抗病毒治疗感染者的样本,也将视为既往感染样本,不纳入

BED-CEIA检测。

(3)血浆样本的HIV-1新近感染检测:血浆样本的新近感染检测按Calypte HIV-1 BED-CEIA新近感染检测试剂盒说明操作。BED-CEIA初筛实验后,对于 A_n 值 ≤ 1.2 的样本,需要重新进行相同操作的3次检测,即为确认实验,3次检测的中值为确认实验的最终检测结果。对于血浆量不足或发生严重溶血而不能进行新近感染检测的样本,均按样本缺失处理。

(4)干血斑样本的HIV-1新近感染检测:用一个6 mm的打孔器,从DBS阴性对照滤纸片上打2个孔,从校准品、弱阳性、强阳性对照滤纸片上打3个孔,按板布局分别放入不同的试管中。用多道加样枪在每管加入400 μ l样品稀释液,小心混匀3次以保证样本纸片全部浸入稀释液中。用封板膜封住试管,于2~8℃下孵育至少12~16 h,混匀,按Calypte HIV-1 BED-CEIA新近感染检测试剂盒说明进行。如做确认实验的样本,需重新打孔检测。

3. 统计学分析:得到血浆样本和干血斑样本BED-CEIA新近感染检测的 A 值及 A_n 值后,分析干血斑样本阴性对照、弱阳性对照、强阳性对照和校准品的 A 值和 A_n 值,观察其检测结果的稳定性。比较干血斑样本初筛实验和确认实验的检测结果,以评价其可重复性。比较两种样本材料的检测结果,观察两种不同样本材料在HIV-1新近感染的判断和估计人群HIV-1发病率上是否存在差异。

结 果

1. 样本筛查:在采集的10 313份样本中,共检测出388份HIV-1阳性样本,其中既保存有血浆又保存有干血斑的样本共352对。经样本质量筛查,发现有3份干血斑样本血细胞少,颜色浅,不符合样本要求,因此剔除不计。最后,进行BED-CEIA检测的样品共349对。

2. 干血斑样本BED-CEIA检测的稳定性:本研究在不同时间共进行了9次干血斑样本的BED-CEIA检测,其质控品的 A 值和 A_n 值如图1所示。结果显示,检测结果具有较好的稳定性,特别是反映最终结果的 A_n 值,质控品 A_n 值的变异系数均<5%。

3. 干血斑样本BED-CEIA检测的可重复性:初筛实验和确认实验的检测结果如图2所示。检测结果表明,以干血斑样本进行BED检测,具有较好的重复性,其初筛实验和确认实验的检测结果一致性

较好, R^2 值达到 0.9551。

4. 血浆和干血斑样本 BED-CEIA 检测结果的比较: 血浆样本和干血斑样本 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测 An 值结果, 如图 3 所示。检测结果显示, 两种样本的检测结果显示具有较好的一致性, 其 R^2 值达到 0.95。

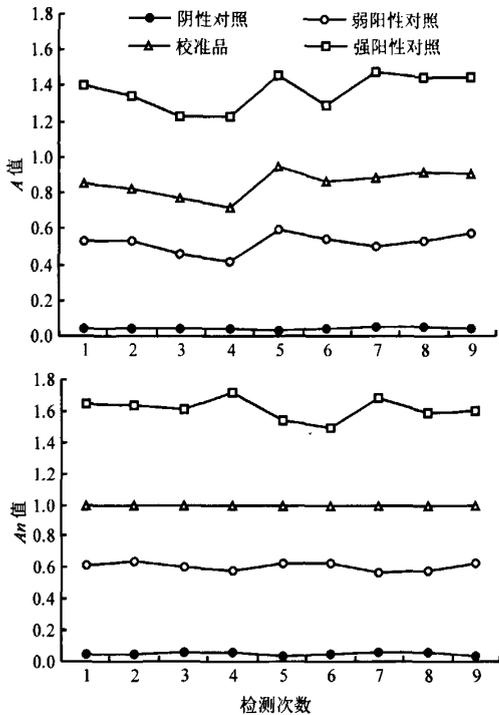


图 1 干血斑样本 BED-CEIA 检测的稳定性

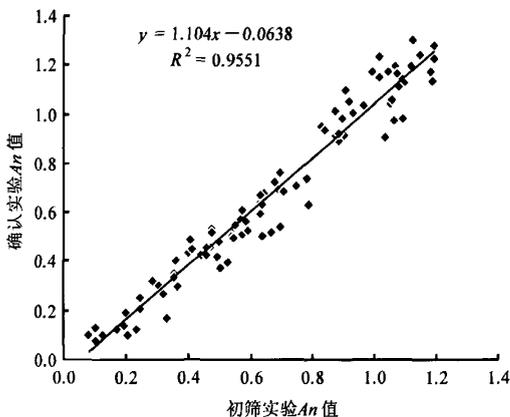


图 2 干血斑样本 BED-CEIA 检测的可重复性

两种样本的 BED-CEIA 新近感染检测结果显示, 在检测的 349 对 HIV-1 阳性样本中, 有 294 对样本被同时判定为 HIV 长期感染, 有 53 对样本被同时判定为 HIV 新近感染, 两种方法对 HIV-1 是否为新近感染的判断一致性为: $(294 + 53) / 349 \times 100\% =$

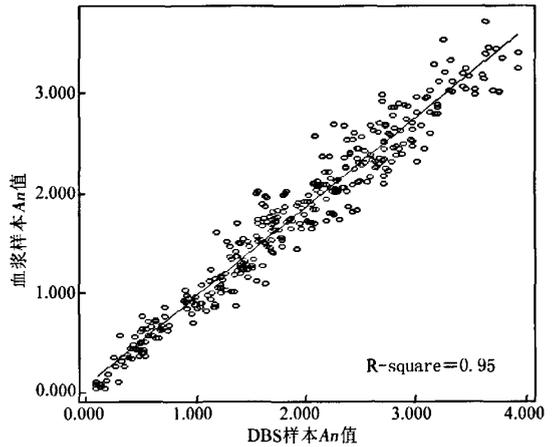


图 3 血浆样本和干血斑样本 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测 An 值散点图

99.43%。另外, 有两对样本的检测结果显示不一致。其中对样本干血斑的检测结果显示为 HIV 新近感染, 血浆样本的检测结果显示为 HIV 长期感染; 另对样本干血斑的检测结果显示为 HIV 长期感染, 血浆的检测结果显示为 HIV 新近感染。经过观察可以发现, 这两对样本的 BED-CEIA 检测结果 An 值均位于 0.8 的界值附近, 因而出现的判断不一致情况可能由检测结果的波动所致。本研究中, 虽然血浆和干血斑样本的 BED-CEIA 新近感染检测, 在极个别样本的判断上存在差异, 但从人群总体水平来说, 两种样品的检测结果和计算的发病率没有差别。

讨 论

传统的发病率监测方法为队列研究, 所需巨大的人力、物力、财力使其无法纳入常规监测。2005 年国家艾滋病参比实验室开始采用 BED-CEIA 检测法进行 HIV-1 的新发感染检测, 以识别 HIV-1 新发感染与既往感染, 计算 HIV-1 发病率。前期的研究结果显示, BED-CEIA 检测法具有较好的重复性和稳定性^[2], 其检测结果虽然会受到 CD₄T 淋巴细胞数和抗病毒治疗药物等因素的影响, 但在人群总体水平上, 排除各种干扰因素后, 对人群 HIV-1 发病率的估算是准确的^[3]。早期在我国 6 个省的试点研究结果表明, BED-CEIA 能较好的区分 HIV-1 新近感染和既往感染, 并可正确的估计高危人群 HIV-1 发病率, 其估计发病率的结果与队列差异无统计学意义^[4,5]。除应用于 HIV 发病率监测外, BED-CEIA 新发感染检测法对于预测疫情变化趋势, 了解新发感染者的群体流行病学特征, 指导艾滋病防控经费导向, 制定

和评价艾滋病预防控制措施等,均具有重要的现实意义。

但在方法的应用过程中,样本采集、保存和运输困难等问题显现。特别在一些条件有限的偏远地区,血浆等样本采集后,难以立即进行冷冻保存并及时运输和检测。由于 BED-CEIA 检测的原理是基于血清阳转后抗 HIV-1 的特异性 IgG 占总 IgG 比值来区分 HIV-1 新近感染与既往感染,若样本在采集和运输过程中处理和保存不当,则有可能造成样本抗体效价降低,使既往感染样本错误的判定为新近感染,造成估算的 HIV-1 发病率偏高。早年非洲在应用 BED-CEIA 检测法监测 HIV-1 发病率时,往往得到高估的发病率值,部分原因正是由于非洲一些国家样本保存条件有限,致使样本质量下降,最终造成检测结果不准确^[6,7]。

而应用滤纸片干血斑则是解决上述问题的有效办法之一。Phillips 等^[8]曾报道用小样本量的干血斑和干清斑进行 BED-CEIA 新近感染检测的研究,其结果显示,干血斑样本在室温下保存 1 个月 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测结果仍然稳定可信,重复性实验及与血浆样本的一致性实验与本研究结果相当。本次研究首次采用了 VCT 现场的大规模干血斑样本进行 HIV-1 新近感染检测,结果表明,在中国的流行背景和检测条件下,干血斑样本完全可以应用于 HIV-1 BED-CEIA 新近感染检测,其结果具有很好的稳定性和可重复性,且对人群 HIV-1 发病率的估算与检测血浆样本无差异,值得在全国条件有限的地区进行试点推广。由于 BED-CEIA 新近感染检测法可以对全血、血清和血浆样本进行检测,因此,在某些情况下制备的干血斑样本可能没有使用抗凝剂,这样的样品对 BED-CEIA 检测法实际影响不大。

应用滤纸片干血斑,不仅能应用于 HIV-1 的新近感染检测,还可对 HIV 进行定性检测/监测^[9]、耐药测定及基因分型研究^[10,11],并可作为婴儿 HIV 早期感染检测和艾滋病病情监测的辅助手段^[12,13]。

本研究中,有 3 份干血斑样本因为在采集过程中操作不规范,从而导致样本质量不符合要求。因此在样本的制备过程中,应当对样本的采集和制备进行质量控制,避免由于采血量过多或过少而发生样本失真,导致检测方法敏感性变化等问题的出现。

参 考 文 献

- [1] 田飞, 蒋岩, 孙国清, 等. 适合 VCT 的 HIV 抗体检测替代策略研究. 中国艾滋病性病, 2008, 14: 220-222.
- [2] 王憨杰, 蒋岩, 韩梅, 等. 检测 HIV-1 新近感染的 BED 捕获酶免疫实验的重复性和稳定性评价. 中国艾滋病性病, 2007, 13: 305-307.
- [3] Xiao Y, Jiang Y, Feng J, et al. Seroincidence of recent human immunodeficiency virus type 1 infections in China. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(10): 1384-1386.
- [4] Jiang Y, Wang M, Ni M, et al. HIV-1 incidence estimates using IgG-capture BED-enzyme immunoassay from surveillance sites of injection drug users in three cities of China. AIDS, 2007, 21 Suppl 8: S47-51.
- [5] 韩梅, 王豫林, 王憨杰, 等. 应用 BED-CEIA 方法估算重庆市静脉吸毒人群艾滋病病毒感染的发病率. 中华流行病学杂志, 2007, 28(11): 1077-1080.
- [6] Westreich D, Pettifor A, Karita E, et al. Overestimation of the South African HIV incidence using the BED IgG assay? S Afr Med J, 2007, 97(7): 476-478.
- [7] Sakarovitch C, Rouet F, Murphy G, et al. Do tests devised to detect recent HIV-1 infection provide reliable estimates of incidence in Africa? J Acquir Immune Defic Syndr, 2007, 45(1): 115-122.
- [8] Phillips S, Dobbs T, Kuehl D, et al. Use of dried blood spot (DBS) or dried serum spot (DSS) to detect recent seroconversion by HIV-1 BED incidence assay. HIV diagnostics: New Developments and Challenges, Orlando. 2005: invited oral and poster.
- [9] Solomon SS, Solomon S, Rodriguez II, et al. Dried blood spots (DBS): a valuable tool for HIV surveillance in developing/tropical countries. Int J STD AIDS, 2002, 13(1): 25-28.
- [10] Hallack R, Doherty LE, Wethers JA, et al. Evaluation of dried blood spot specimens for HIV-1 drug-resistance testing using the Trugene HIV-1 genotyping assay. J Clin Virol, 2008, 41(4): 283-287.
- [11] 张麒, 潘品良, 邓红, 等. 干血斑样本用于 HIV-1 基因序列测定和亚型分析的研究. 中华流行病学杂志, 2006, 27(9): 798-802.
- [12] Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA. Simultaneous measurement of antibodies to three HIV-1 antigens in newborn dried blood-spot specimens using a multiplexed microsphere-based immunoassay. Early Hum Dev, 2001, 64(1): 21-25.
- [13] Uttayamakul S, Likanonsakul S, Sunthornkachit R, et al. Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. J Virol Methods, 2005, 128(1-2): 128-134.

(收稿日期: 2008-09-22)

(本文编辑: 尹廉)