**干血斑用于HIV-1新发感染（限制性抗原亲和力法）研究**

赫晓霞1，程焕义1，王月华1，马洁琼1，姚均1，邢文革1，蒋岩1

(1. 中国疾病预防控制中心 性病艾滋病预防控制中心 参比实验室，北京 102206）

**摘要：目的** 研究探讨干血斑样本用于HIV-1新发感染检测（限制性抗原亲和力法）的可行性与最佳检测条件。**方法** 用制备的三套系列稀释干血斑-血浆配对样本和来自临床的71对人群干血斑-血浆配对样本，使用国产HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)，同时对血浆样本与干血斑样本进行检测并分析等效性。其中DBS样本（6mm斑）洗脱分别在500μL、600μL、800μL和1000μL样本稀释液4℃过夜洗脱。**结果** 三套系列稀释干血斑-血浆配对样本检测结果显示，500μL、600μL、800μL和1000μL样本稀释液洗脱后的DBS样本与血浆样本的Pearson相关系数分别依次为0.955（R2=0.912）、0.944（R2=0.892）、0.948（R2=0.899）、0.933（R2=0.870）；来自临床的71对人群干血斑-血浆配对样本检测结果显示，500μL、600μL、800μL和1000μL样本稀释液洗脱后的DBS样本与血浆样本的Pearson相关系数分别依次为0.968（R2=0.936）、0.965（R2=0.932）、0.959（R2=0.919）、0.879（R2=0.773）；其中以500μL样本稀释液4℃过夜洗脱后的DBS检测结果与血浆等效性最佳，71对临床配对样本的检测一致性为98.59%（70/71）。**结论** DBS样本可用于HIV-1新发感染检测（限制性抗原亲和力法），且与血浆样本具有良好的等效性。

**关键词：**艾滋病病毒；新发感染；干血斑；限制性抗原亲和力法

**中图分类号：**R512.91 **文献标志码：** A  **文章编号：**

**Researched on the HIV-1 recent infection detect (Limiting antigen avidity enzyme immunoassay, Lag-Avidity EIA) with dry blood spot sample.** *HE Xiaoxia1, SU Bin2, CHEN Huanyi1, WANG Yuehua1, MA Zhonghui1, XING Wenge1, JIANG Yan1.* （*1. National Center for AIDS/STD Control and Prevention, China CDC, National HIV/AIDS Reference Laboratory, NARL. Beijing 102206, China*）

Corresponding author：*JIANG Yan.*, Email：jiangyan03@263.net

Supported by the 13th Five-Year Plan of China (2017ZX10201101-002-003)

**Abstract:** **Objective** To research the feasibility and the best test conditions of the DBS sample for the detection of recent HIV-1 infection (Limiting antigen avidity enzyme immunoassay, Lag-Avidity EIA). **Methods** Prepared three sets of serial dilution samples of DBS-plasma matched samples, and collected 71 samples of DBS-plasma matched samples from clinical infected person. Used the domestic recent HIV-1 infection detection kit (Limiting antigen avidity enzyme immunoassay, Lag-Avidity EIA) to detect these samples, and analysis of samples equivalence. There into, the DBS samples (6 mm spot) eluted respectively in 500μL , 600μL , 800μL and 1000μL sample diluents (in the kit) at 4℃ for one night. **Results** The results of serial dilution DBS-plasma matched samples showed that the Pearson correlation coefficients of the DBS samples, which eluted in 500μL , 600μL , 800μL and 1000μL, and plasma samples were 0.955 (R2=0.912), 0.944 (R2=0.892), 0.948 (R2=0.899), 0.933 (R2=0.936), and the results of 71 DBS-plasma matched samples from clinical infected person were 0.968(R2=0.936), 0.965(R2=0.932), 0.959(R2=0.919), 0.879(R2=0.773), respectively. The concordance rate between the two types of specimens was 98.59% (70/71). DBS after the elution conditions of 500μL sample diluents at 4 ℃ for one night had the equivalence testing results with plasma. Conclusion DBS samples can be used to the detection of recent HIV-1 infection (Limiting antigen avidity enzyme immunoassay, Lag-Avidity EIA), and have good equivalence with matched plasma samples.

**Key words:** HIV; Dry blood spot; recent HIV-1 infection; Limiting antigen avidity enzyme immunoassay

**收稿日期：** ；**修回日期：**

**基金项目：**十三五重大专项课题(2017ZX10201101-002-003)

**作者简介：**赫晓霞，女(蒙)，博士在读，医学免疫学专业。Email：124945608@qq.com。

**通信作者：**蒋岩，博士生导师， Email：jiangyan03@263.net

用于HIV-1新发感染检测的限制性抗原亲和力酶联免疫法（Limiting antigen avidity enzyme immunoassay, Lag-Avidity EIA），是在酶标板上包被极低浓度抗原，从而通过单孔检测HIV抗体亲和力的高低区分长期和新近感染[1]。该方法操作简便，较BED-CEIA法具有更加良好的检测性能[2,3]，已先后纳入“全国艾滋病检测技术规范（2009版、2015版）”，并作为常规哨点监测内容之一在全国推广应用，是目前我国新发感染监测的重要技术支撑。

滤纸片干血斑（Dry blood spots, DBS）是一种具备成本低廉、采血量少、制备简单、运输安全方便等多重优势的样本类型，在HIV新发感染监测工作中极具吸引力和使用价值。研究报道，干血斑样本在HIV-1 BED-CEIA新近感染检测法中具有良好的稳定性与重复性[4]，与配对血浆样本的一致性达到99.43％[5]，且在人群水平上估计的HIV-1新发感染率与血浆无差异[5]。然而，目前国内唯一的HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)适用的样本为血清或血浆[6]，国内尚无用于滤纸片干血斑样本中HIV-1新发感染 (限制性抗原亲和力法)检测的试剂与相关研究。因此，本研究旨在探索使用DBS样本进行Lag-Avidity EIA新近感染检测的方法，并判断其检测结果的准确性和应用的可行性。

1. 材料与方法
	1. 样本来源与制备 5份HIV-1抗体阳性全血收集自北京市佑安医院5例(随机选取)HIV感染者静脉血(EDTA抗凝)，10份HIV-1抗体阴性全血来自10位(随机选取)HIV阴性健康人群静脉血(EDTA抗凝)。将5份阳性全血和10份阴性全血分别进行混合，使用混合阴性全血将混合阳性全血21-210平行稀释三套。

每套中DBS样本制备方法：70μL滴至采集卡圆圈内（北京金豪公司生产的903滤纸血样采集卡），置于室温下自然干燥4小时制备成直径1.5cm DBS[7]。同时，每套中每个稀释度分出2ml全血，12000rpm离心分离配对血浆样本。

71对临床血浆-DBS配对样本由云南省德宏州疾控收集自HIV感染人群。

* 1. DBS与血浆样本等效性研究 使用北京金豪公司生产的HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)（批号为20180312801），分别对三套21-210系列稀释的血浆样本进行新发感染检测。同时，对配对的三套DBS样本打取6mm小斑一个，分别使用500μL，600μL，800μL，1000μL样本稀释液（试剂盒自带）4℃过夜洗脱后，进行新发感染检测。全部检测操作均严格按照试剂盒说明书进行，每个反应重复三次后取ODn均值进行相关性分析。
	2. 临床DBS与血浆样本等效性验证 使用北京金豪公司生产的HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)（批号为20180312801），对来自德宏州临床HIV感染人群的71份血浆样本进行新发感染检测，同时分别使用500μL，600μL，800μL，1000μL样本稀释液（试剂盒自带）对配对的71份DBS样本（6mm小斑一个）4℃过夜洗脱后进行新发感染检测。全部检测操作均严格按照试剂盒说明书进行，每个反应重复三次后取ODn均值进行相关性分析。
	3. 结果分析 应用SPSS统计软件分析ODn值结果，*P*<0.05为有统计学意义。（HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)的结果以ODn值=1.5作为判断阈值所代表的平均阳转时间为130天[6]。）
1. 结果
	1. DBS与血浆样本等效性研究 三套21~210系列稀释制备DBS样本，使用500μL，600μL，800μL，1000μL样本稀释液4℃过夜洗脱后的HIV-1新发感染酶免检测结果均具有良好的线性关系（图1）；通过与其各自配对血浆样本检测结果的相关性分析显示，500μL，600μL，800μL，1000μL样本稀释液洗脱后的DBS样本与血浆样本的Pearson相关性系数依次为0.955（R2=0.912），0.944（R2=0.892），0.948（R2=0.899），0.933（R2=0.870）（图2），以500μL样本稀释液4℃过夜洗脱后的DBS检测结果与血浆等效性最佳。



注：纵轴为ODn值，横轴为稀释倍数。

图1 三套21~210系列稀释DBS-血浆配对样本线性关系



图2 系列稀释样本在不同体积稀释液下的DBS-血浆样本检测结果相关性

* 1. 临床DBS与血浆样本等效性验证 对来自德宏州临床HIV感染人群的71对血浆-DBS配对样本验证检测结果进行相关性分析显示，500μL，600μL，800μL，1000μL样本稀释液洗脱后的DBS样本与血浆样本的Spearsman相关性系数依次为0.968（R2=0.936），0.965（R2=0.932），0.959（R2=0.919），0.879（R2=0.773）（图3）；以500μL样本稀释液4℃过夜洗脱后的DBS检测结果与血浆等效性最佳。

其中23例感染者的血浆样本与DBS样本同时被判定为新发感染，47例感染者的血浆样本与DBS样本同时被判定为既往感染，其中1例感染者的血浆样本被判定为既往感染（ODn值1.514）而DBS样本判定为新发感染（ODn值1.214），其ODn值在临界值附近。两种样本的检测一致性为98.59%（70/71）。



图3 临床样本在不同体积稀释液下的DBS-血浆样本检测结果相关性

3 讨论

HIV新发感染率是了解艾滋病流行趋势、评估疫情和防治效果的核心指标。本研究旨在结合具有良好检测性能的限制性抗原亲和力新发感染检测方法和运输制备更加便捷的滤纸片干血斑样本二者的优势，研究建立可应用到偏远落后地区、不便采血人群中有效、易行、价廉的新发感染检测技术，从而解决目前艾滋病新发感染监测中面临的实际问题。本研究分别通过三套系列稀释的配对血浆-DBS样本研究表明，一个6mm DBS样本用500μL试剂盒自带样本稀释液4℃洗脱过夜后的Lag-Avidity EIA新近感染检测结果与其配对血浆结果等效性最佳，二者的Pearson相关系数为0.955（R2=0.912）。

使用71对来自德宏州临床HIV感染人群的血浆-DBS配对样本对上述最佳检测条件进行验证，结果一致，等效性最佳的稀释液体积仍为500μL，配对样本的Pearson相关系数为0.968（R2=0.936）。且得出血浆与DBS两种样本的检测一致性为98.59%（70/71），其中1对不一致样本的ODn值在临界值附近。由于新发感染（限制性抗原亲和力法）是用于群体横断面大样本量监测的一种方法，所以这一数据与本研究中验证使用的临床配对样本数量较少有关。

因此，本研究表明，目前国内唯一的Lag-Avidity EIA新近感染检测试剂盒可用于DBS样本，具有与配对血浆样本的良好等效性。本研究得出的用于国产Lag-Avidity EIA新近感染检测试剂盒的DBS样本最佳洗脱条件，与已上市的美国Maxim公司用于DBS样本Lag-Avidity EIA新近感染检测方法一致[9]。

**参考文献**:

1. Wei X, Liu X, Dobbs T, et al. Development of two avidity-based assay to detect recent HIV-1 seroconversion using a multisubtype gp41 recombinant protein [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2010,26(1):61-71.
2. Yen TD, Maofeng Q, Aninaya KD, et al. Detection of recent HIV-1 infection using a new limiting-antigen avidity assay: potential for HIV-1 incidence estimate and avidity maturation studies [J]. PLoS ONE, 2012,7(3):e33328.
3. 张娜, 刘丽萍, 易志强, 等. LAg-Avidity EIA法用于HIV-1新发感染检测的性能评价研究[J]. 现代预防医学, 2016,1: 157-159,173.
4. 张艺, 王凤英, 金涛, 等. 滤纸片干血斑在HIV-1 BED-CEIA新发感染检测方法中的应用[J]. 疾病预防控制通报, 2014,29(3): 6-7,40.
5. 沈圣, 田飞, 江华洲, 等. 应用BED-CEIA检测干血斑样本监测HIV-1发病率的可行性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 3(30): 273-276.
6. 北京金豪制药股份有限公司. HIV-1新发感染酶免检测试剂盒(限制性抗原亲和力法)说明书[Z].
7. 郝钦芳, 杨晓莉, 鲍作义, 等. HIV抗体干血浆滤纸片质控品制备的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2007(5): 816-818.
8. 美国Maxim生物药业公司. Single Well Avidity Enzyme Immunoassay for Detection of Recent HIV-1 Infection –HIV-1 LIMITING ANTIGEN AVIDITY EIA (Cat. No. 92003, DBS) [Z].