



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105659092 B

(45)授权公告日 2018.05.25

(21)申请号 201480057848.6

(22)申请日 2014.10.20

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105659092 A

(43)申请公布日 2016.06.08

(30)优先权数据

61/894332 2013.10.22 US

61/945974 2014.02.28 US

62/025886 2014.07.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.04.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2014/072386 2014.10.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/059065 EN 2015.04.30

(73)专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 P.鲍姆 M.克拉斯克 X.吴

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 唐华东 林森

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

(56)对比文件

US 2010184069 A, 2010.07.22, 说明书第
[0029]、[0035]–[0044]段.

FR 2901281 A1, 2007.11.23, 全文.

WO 2008066858 A2, 2008.06.05, 全文.

CN 101542285 A, 2009.09.23, 全文.

CN 101742995 A, 2010.06.16, 全文.

WO 2010091080 A2, 2010.08.12, 全文.

WO 2013144743 A1, 2013.10.03, 全文.

Sofiane Mohamed等.Dried Blood Spot
Sampling for Hepatitis B Virus Serology
and Molecular Testing.《PLOS ONE》.2013,第8
卷(第4期),摘要,第2页第1栏第6段–第2栏第1
段.

Sofiane Mohamed等.Dried Blood Spot
Sampling for Hepatitis B Virus Serology
and Molecular Testing.《PLOS ONE》.2013,第8
卷(第4期),摘要,第2页第1栏第6段–第2栏第1
段. (续)

审查员 张婷

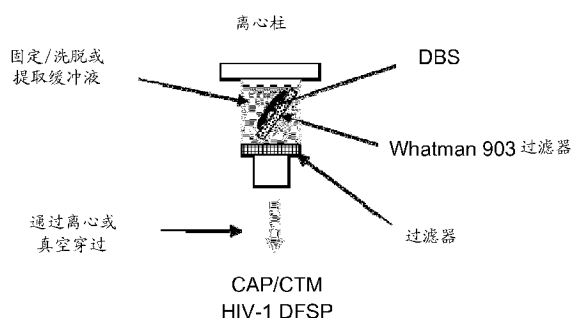
权利要求书1页 说明书11页 附图7页

(54)发明名称

测量干血斑中无细胞病毒颗粒的方法

(57)摘要

描述了测量干血斑中游离核酸和/或病毒颗粒的方法。所述方法可包括以下步骤:再水化干血样、任选地将存在于所述再水化的干血样中的细胞固定、将游离病毒颗粒从所述再水化的干血样中洗脱、使用过滤器将所述游离病毒从可能存在于所述再水化的干血样中的任何细胞残渣上分离以及通过病毒颗粒定量技术测量游离病毒颗粒。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

Edward R.B. McCabe.Utility of PCR for DNA analysis from dried blood spots on filter paper blotters.《Genome Research》.1991,第1卷(第2期),protocol 1.

刘世国等.抗胰岛素样生长因子I型受体单克隆抗体的制备及鉴定.《细胞与分子免疫学杂志》.2011,第27卷(第6期),第647页第2栏第4段.

Caroline Mitchell等.Diminished Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Yield from Dried Blood Spots after Storage in a Humid Incubator at 37°C Compared to -20°C.《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2008,第46卷(第9期),全文.

Oriane Soetens等.Evaluation of Different Cytomegalovirus (CMV) DNA PCR Protocols for Analysis of Dried Blood Spots from Consecutive Cases of Neonates with Congenital CMV Infections.《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2008,第46卷(第3期),全文.

Katharina Gohring等.Influence of different extraction methods and PCR

techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood spot (DBS) filter cards.《Journal of Clinical Virology》.2010,第48卷(第4期),全文.

Jutte J.C. de Vries等.Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection.《Journal of Clinical Virology》.2009,第46卷全文.

Patrick H Corran等.Dried blood spots as a source of anti-malarial antibodies for epidemiological studies.《Malaria Journal》.2008,全文.

A. Fischer等.Simple DNA Extraction Method for Dried Blood Spots and Comparison of Two PCR Assays for Diagnosis of Vertical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission in Rwanda.《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》.2004,第42卷(第1期),全文.

1. 测量干血斑中无细胞病毒颗粒的方法,包括:
再水化干血样,其通过向干血样施加缓冲溶液以产生再水化的干血样;
任选地,使用固定剂将存在于所述再水化的干血样中的细胞固定以用细胞包含与细胞结合的RNA和/或DNA;
使用包含磷酸盐缓冲盐水(PBS)的洗脱剂将所述无细胞病毒颗粒从所述再水化的干血样中洗脱,所述洗脱剂优先地洗脱所述无细胞病毒颗粒而不破坏所述与细胞结合的RNA和/或DNA;
使用过滤器将所述无细胞病毒从可存在于所述再水化的干血样中的任何细胞碎片上分离;以及
通过病毒颗粒定量技术测量无细胞病毒颗粒,
其中所述病毒选自HIV和HTLV。
2. 根据权利要求1的方法,其中所述病毒颗粒定量技术选自序列特异性核酸定量、ELISA、PCR、等温核酸扩增、核酸杂交、原位杂交和电子显微镜。
3. 根据权利要求1的方法,其中所述固定剂选自甲醇、乙醇、甲醛、氯仿和丙酮。
4. 根据权利要求1的方法,其中所述分离步骤包括通过离心或真空进行离心柱过滤。
5. 根据权利要求1或4的方法,其中所述过滤器包含在约0.1 μm 至约100 μm 之间的孔径范围。
6. 根据权利要求1的方法,其中所述缓冲溶液包含固定剂和洗脱剂。
7. 根据权利要求1或6的方法,其中所述固定剂包含甲醇且所述洗脱剂包含PBS。
8. 根据权利要求1的方法,其中所述缓冲溶液包含所述洗脱剂。
9. 根据权利要求1-4、6和8中任一项的方法,其中所述方法在环境温度下进行。
10. 根据权利要求5的方法,其中所述方法在环境温度下进行。
11. 根据权利要求7的方法,其中所述方法在环境温度下进行。
12. 根据权利要求1-4、6、8、10和11中任一项的方法,其中所述方法在不存在摇动或涡旋的条件下进行。
13. 根据权利要求5的方法,其中所述方法在不存在摇动或涡旋的条件下进行。
14. 根据权利要求7的方法,其中所述方法在不存在摇动或涡旋的条件下进行。
15. 根据权利要求9的方法,其中所述方法在不存在摇动或涡旋的条件下进行。

测量干血斑中无细胞病毒颗粒的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及测量血液中病毒载量的领域,并且更具体地讲,涉及测量干血斑中无细胞病毒颗粒的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 2013年,世界卫生组织(WHO)修订了现行的HIV治疗和预防准则并强调了HIV病毒载量(VL)测试在对HIV阳性患者的管理中的重要性。WHO强烈推荐使用HIV病毒载量测试替代临床表现和CD4细胞计数以监测HIV抗逆转录病毒疗法(ART),并且将对于治疗效果的HIV血浆VL水平的截断值从5000份拷贝/mL降至1000份拷贝/mL。换句话说,如果接受ART治疗的HIV患者血浆中的病毒滴度大于1000份拷贝/mL,则将看作是药物治疗失败。对治疗失败的应对(如依从性咨询、药物耐药性测试和二线治疗方案)是耗时且昂贵的,而应当仅在有必要时使用。

[0004] 在感染后,HIV病毒不仅在被感染的细胞内开始自我复制,还将其cDNA整合至宿主染色体中作为潜伏的HIV前病毒DNA(Greene, W.C. 与 Peterlin, B.M., 2002, Charting HIV's remarkable voyage through the cell, Nat Med.8(7): 673-80; Blankson, J.N., D. Persaud, R.F.Siliciano, 2002, The Challenge of Viral Reservoirs in HIV-1 Infection, Annu.Rev. Med.53:557-593)。通常使用血浆作为标本类型测量HIV病毒载量。然而,在资源有限的环境中,如非洲,血浆样品可能不易获得、保存、转移和测试(世界卫生组织 2013,关于使用抗逆转录病毒药物治疗和预防HIV感染的综合准则:对公共卫生措施的建议。世界卫生组织,日内瓦)。已经就干血斑(DBS)作为在资源有限的环境中HIV病毒载量测试的解决方案进行了评价,但取得了有限的成功(Smit PW 等人, 2014, Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis, PLoS ONE.9(3): e86461; Bertagnolio, S., N.T.Parkin, M. Jordan, J. Brooks, J.G.Garcia-Lerma, 2010; Dried blood spots for HIV-1 Drug Resistance and Viral Load Testing: A Review of Current Knowledge and WHO Efforts for Global HIV Drug Resistance Surveillance, AIDS Rev. 12:195-208; Johannessen, A, 2010; Dried blood spots in HIV monitoring: applications in resource-limited settings, Bioanalysis.2(11):1893-1908)。Roche Molecular Diagnostics(RMD)于2009年开发了一款仅研究使用(RUO)的产品,其使用实时PCR COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) HIV-1 测试 v2.0和干燥液斑法(DFSP)以测量DBS中的HIV病毒载量。遗憾的是,当测试成对的血浆和DBS样品时,相比血浆金标准,DFSP测试得到了更高的病毒载量滴度。这一过高估计在具有血浆病毒载量小于5,000份拷贝/mL的样品中尤为明显,据推测是由于检测到了与细胞结合的HIV DNA和RNA。

[0005] 根据CAP/CTM HIV-1 DFSP方法,首先将HIV DBS与离液剂-样本预提取(SPEX)缓冲液一起温育,而将总核酸,包括血液流体中的HIV病毒RNA,加上其它与细胞结合的HIV DNA和RNA(如HIV前病毒DNA),从DBS中提取出并洗脱到SPEX缓冲液中。然后,将提取出的缓冲液置于CAP/CTM仪器上进行核酸纯化,然后是HIV靶标扩增和检测。现行的用于HIV DBS VL测

量的核酸提取方法充分裂解所有细胞并使所有蛋白质复合物变性,使得总核酸(包括血液流体中的无细胞HIV病毒颗粒和与细胞结合的HIV RNA和DNA)从DBS中被完全提取出。

[0006] 对DBS中HIV VL的过度量化不只是Roche的DBS测定的问题,在其它市售测定(如Abbott的HIV DBS测定)中也有观测到。在HIV科学和医学界,已经推测,存在于DBS中被HIV感染的细胞内的HIV DNA会造成对病毒载量的过度量化,但这一过度量化现象的确切机制尚不清楚或尚未得到证实(Médecins Sans Frontières Access Campaign, 2013)。可以通过对RNA比对DNA更有特异性的扩增方法(例如,BioMerieux NucliSENS®所用的NASBA方法)来改善但非消除DBS中的过高估计。仍然存在对于解决样品中HIV VL过度量化挑战的替代方法的需求。

[0007] 发明概述

[0008] 一种对于DBS中过高估计的解决方法可以是:类似于血浆样品,从样品中移除与细胞结合的RNA和DNA,仅留下待检测的无细胞病毒。这可以防止将患者错误归类为治疗失败而造成的高昂代价。本公开中描述了此类方法及相关益处。

[0009] 在一个实施方案中,提供了测量干血斑中无细胞核酸和/或病毒颗粒的方法。该方法可包括以下步骤:将干血样再水化,通过向干血样施加缓冲溶液以产生再水化的干血样;任选地,使用固定剂将存在于再水化的干血样中的细胞固定以将与细胞结合的RNA和/或DNA包含在细胞内;使用洗脱剂将无细胞核酸和/或病毒颗粒从再水化的干血样中洗脱,所述洗脱剂优先地洗脱无细胞病毒颗粒而不破坏与细胞结合的RNA和/或DNA;使用过滤器将无细胞核酸和/或病毒颗粒从可能存在于再水化的干血样中的任何细胞碎片上分离;以及通过病毒颗粒定量技术测量无细胞核酸和/或病毒颗粒,所述病毒颗粒定量技术选自:序列特异性核酸定量、酶联免疫吸附测定(ELISA)、聚合酶链式反应(PCR)、等温核酸扩增、核酸杂交、原位杂交和电子显微镜。

[0010] 在一些实施方案中,DBS中待测量的病毒颗粒可以是人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类嗜T淋巴细胞病毒-1或-2(HTLV-1或-2)、丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)、巨细胞病毒(CMV)(例如,人类CMV)和Epstein-Barr病毒(EBV)中的一种或多种。缓冲溶液的实施方案可以包括固定剂和洗脱剂。固定剂的一个实施方案可以是甲醇,且洗脱剂的一个实施方案可以是磷酸盐缓冲盐水或其它合适的缓冲液。在本方法的一些实施方案中,分离步骤可包括离心柱过滤、真空过滤或离心。实施方案可包括孔径在约0.1 μm 至约100 μm 范围内的过滤器,例如,约20 μm 至约80 μm ,例如,约30 μm 至约70 μm ,例如,约40 μm 至约60 μm 。

[0011] 在另一个实施方案中,缓冲溶液包含PBS。在另外的实施方案中,缓冲溶液包含洗脱溶液。在一个其它的实施方案中,洗脱溶液包含PBS。

[0012] 在以下的附图和说明书中描述了本发明的一个或多个实施方案的详细内容。从附图和详细描述以及从权利要求书中,本发明的其它特征、目标和优点将会是显而易见的。

[0013] 附图简述

[0014] 图1示出了HIV病毒生命周期的示意图。当宿主细胞被HIV病毒感染后,病毒RNA基因组通过病毒编码的逆转录酶被逆转录成cDNA。cDNA随后被整合到宿主染色体DNA中,形成前病毒DNA。额外的HIV病毒RNA基因组从前病毒DNA上被转录并转运至细胞质用于组装病毒颗粒。成熟的HIV病毒从被感染的细胞中出芽而成为无细胞的病毒颗粒。

[0015] 图2示出了用于测量干血斑中无细胞病毒颗粒的设置示例性实施方案的示意

图。首先,将在Whatman滤纸上具有DBS的HIV患者样品放置在离心柱中并与固定/洗脱或提取缓冲液一起温育。当从DBS中提取出病毒颗粒后,通过,例如,离心或真空使含有病毒的缓冲液通过离心柱中的过滤器。然后,将收集到的流出缓冲液放置在CAP/CTM上用于进一步的样品制备和靶标扩增以及检测。

[0016] 图3示出了用于测量固定在Whatman 903滤纸上的DBS中无细胞病毒颗粒的方法的示例性实施方案的详细示意图。一经再水化和固定,大多数血细胞保持在滤纸表面并且与细胞结合的HIV DNA和RNA被包含在被感染的细胞内,而无细胞的病毒颗粒则扩散进入洗脱缓冲液中。一些血细胞(包括被HIV感染的细胞和细胞碎片)也可能从903滤纸上脱落。当进行离心时,离心柱过滤器阻止细胞或细胞碎片而非被洗脱的无细胞病毒通过,并从流出溶液中收集无细胞的HIV病毒。

[0017] 图4示出了相对于血浆病毒载量,干血斑SPEX和PBS洗脱的分析性能。

[0018] 图5示出了在使用PBS洗脱的条件下,DBS与血浆病毒载量之间的临床相关性。应用了0.6 log的校正系数。

[0019] 图6示出了将DBS病毒载量方法与作为参照方法的血浆病毒载量进行比较的偏差图。

[0020] 图7示出了DBS与血浆的病毒载量测量结果的相关性和一致性。

[0021] 发明详述

[0022] 尽管可以获得可以减少与细胞结合的DNA对DBS病毒载量测量结果的影响的产品,但是本文所述的方法可以同时减少与细胞结合的RNA和与细胞结合的DNA。所述方法易于操作并且不需要复杂的仪器和生化处理。重要的是,该方法不会改变现有的DBS样品采集方法,或改变现有的下游方案,例如,RMD CAP/CTM HIV-1 DFSP产物。

[0023] 使用仅能从再水化的DBS中洗脱出无细胞的病毒颗粒(例如,无细胞的HIV病毒颗粒)而不会破坏DBS上的细胞或细胞碎片的溶液或提取缓冲液来对DBS(例如,HIV DBS)进行再水化可以使得更小的无细胞颗粒能够从更大的与细胞结合的碎片上分离。然后可以实现从无细胞的病毒颗粒测量病毒载量(VL)(例如,HIV VL)而不会受到来自与细胞结合的RNA和DNA(例如,HIV RNA和DNA)的干扰。

[0024] 在本发明的一个方面,将DBS(例如,HIV DBS)再水化于缓冲溶液中。在一个实施方案中,缓冲溶液包含生物缓冲液和固定剂。例如,可使用带有甲醇(固定剂)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(生物缓冲液),其可以优先地洗脱再水化的DBS(例如,HIV DBS)中无细胞的病毒颗粒(例如,无细胞的HIV颗粒),但不会破坏被感染的细胞(例如,携带与细胞结合的HIV RNA和前病毒DNA的被HIV感染的细胞)。可以使用固定剂(或固定和脱水剂)的示例性实施方案,如甲醇、乙醇、甲醛、氯仿和/或丙酮。洗脱缓冲液的示例性实施方案可包括磷酸盐缓冲溶液,如PBS。PBS是接近人体生理条件的常规缓冲液,而甲醇能够通过沉淀蛋白质以固定细胞。甲醇已在免疫测定中被广泛用作温和的固定剂。当使用PBS加甲醇处理DBS(例如,HIV DBS)时,与细胞结合的病毒RNA和DNA(例如,HIV RNA和DNA)可以被包含在被固定的细胞内,而无细胞的病毒颗粒(例如,HIV颗粒)可以从经PBS再水化的DBS上被洗脱出来。尽管使用此PBS/甲醇溶液得到的无细胞病毒的回收率可能低于使用SPEX缓冲液所得到的,但是此溶液可能显著地减低来自DBS的与细胞结合的病毒DNA和RNA(例如,HIV DNA和RNA)的释放(参见实施例)。对实验方案和程序的优化可以提高来自DBS的病毒回收率。此外,具有与PBS/甲醇

相似特性的其它缓冲液及其与溶剂的组合也可用于所述方法的一些实施方案中。

[0025] 在本发明的另一个方面,将DBS(例如,HIV DBS)再水化于不含固定剂的缓冲溶液中。在一个另外的实施方案中,将DBS再水化于包含生物缓冲液的缓冲溶液中。在另一个实施方案中,生物缓冲液为PBS。在一个其它的实施方案中,缓冲溶液不含固定剂。含有PBS的缓冲溶液可用于优先地洗脱无细胞的病毒颗粒(例如,无细胞的HIV病毒颗粒)而不会破坏存在于再水化的DBS中的被感染的细胞(例如,含有与细胞结合的HIV RNA和前病毒DNA的被HIV感染的细胞)。当使用PBS处理DBS时,与细胞结合的RNA和DNA可以被包含在被固定的细胞内,而无细胞的病毒颗粒可以从经PBS再水化的DBS上被洗脱出来。在一个实施方案中,DBS为HIV DBS。

[0026] 在另外的方面,本发明提供了测量来自干血斑(DBS)中无细胞病毒颗粒的方法。在一个实施方案中,方法包括再水化干血样的步骤,其通过向干血样施加缓冲溶液以产生再水化的干血样。在另一个实施方案中,方法包括使用洗脱剂从再水化的干血样上洗脱无细胞的病毒颗粒的步骤。在一个其它的实施方案中,洗脱剂优先地洗脱无细胞的病毒颗粒而不破坏与细胞结合的RNA和/或DNA。在一个另外的实施方案中,方法包括将无细胞的病毒从可能存在于再水化的干血样中的任何细胞碎片上分离的步骤。在一个实施方案中,分离是以过滤器的方式完成。在一个其它的实施方案中,分离步骤是任选的。在另一个实施方案中,方法包括通过病毒颗粒定量技术测量无细胞病毒颗粒的步骤。在一个其它的实施方案中,病毒颗粒为RNA或DNA病毒颗粒。在另外的实施方案中,在再水化步骤(水性缓冲溶液)期间和在洗脱步骤(水性洗脱溶液)期间,RNA或DNA病毒颗粒存在于水溶液中,使得其适用于方法的分离和/或测量步骤。

[0027] 为了进一步减少再水化的DBS中与细胞结合的病毒(例如,HIV)RNA和DNA的污染,可使经PBS/甲醇(或仅PBS)提取的洗脱液通过过滤器,这使得被洗脱的病毒颗粒能够与可能在提取过程中从DBS上掉落的任何更大的细胞碎片进一步分离。可以获得具有限定孔径的离心柱过滤器。其它分离方法(如真空过滤或离心)可提高此方法的通量。本领域普通技术人员将认识到,其它分离方法可以是合适的。在一个实施方案中,DBS为HIV DBS。

[0028] 本申请所述的方法还可以应用于从DBS或全血中分离其它经血液传播的病毒(如HTLV、HCV、HBV等)。此外,方法可以被扩展到从大的细胞或细胞碎片上分离小的生化分子,如小的核酸或多肽。例如,方法可用于从全血中收集无细胞的肿瘤特异性核酸或抗原而无大量的染色体DNA和细胞碎片的干扰。方法还可以用于从产妇的DBS样品中富集循环胎儿DNA。

[0029] 定期测量病毒载量是指导对被感染个体的治疗方案的重要工具,尤其是那些接受抗病毒疗法(例如,抗逆转录病毒疗法)的个体(Arredondo 等人, J. Clin.Microbiol., 2012, 50 (3):569)。如本文中所讨论的,测量血浆中的病毒载量在资源有限的情况下面临某些困难,而测量干血样中的病毒载量具有有限的成功。本发明的方法可用于从干血样中获得病毒载量测量结果,该结果与血浆样品中的病毒载量(VL)测量结果是一致的。本文中所用的术语“一致性”或“与……一致”指代这样的程度:至少两个病毒载量测量结果在统计学上是一致的。在一些实施方案中,干血样VL测量结果与血浆VL测量结果的一致性在约85%至约99%之间。在其它实施方案中,一致性为至少约85%、至少约86%、至少约87%、至少约88%、至少约89%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约

96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%。此类型的一致性适用于针对抗病毒疗法之前、期间或之后的患者的医疗决策点的背景下。在医疗决策点,通常以每mL中病毒拷贝(cp)数量的 $\log_{10}$ (或 $\log_{10}$ cp/mL)来测量患者样品中的HIV病毒载量。一般来讲,HIV病毒载量(VL)的截断值为1000 cp/mL,其中 > 1000 cp/mL 或 < 1000 cp/mL的测量结果指导医疗决策。例如,根据测得的cp/mL,医疗决策可能是启动HIV治疗方案,以及继续、修改或停止现行的HIV治疗方案。例如,对于正接受抗逆转录病毒疗法的HIV患者而言, > 1000 cp/mL HIV的后续测量结果将表明现行疗法尚未成功,而 < 1000 cp/mL HIV的测量结果将表明现行疗法已经成功。因此,在医疗决策点的语境中,来自干血样和来自血浆样品的病毒载量测量结果之间的一致性意味着cp/mL显示出统计学上显著的相关性。如实施例3的表3.2中所述,使用了来自196份患者样品的成对样品以获得来自血浆样品和来自根据本发明的方法的干血样方法(也被称为游离病毒洗脱或FVE方法)的病毒载量测量结果。在196份成对样品中,(i)93份被发现其血浆和干血样VL均 < 1000 cp/mL;(ii)93份被发现其血浆和干血样VL均 > 1000 cp/mL;并且(iii)仅有10份被发现其血浆中 > 1000 cp/mL,而干血样中 < 1000 cp/mL。因此,干血样与血浆的总的一致性高达95%。相比之下并如表3.1中所示,使用干燥液斑法(DFSP)得到的干血样与血浆的总的一致性则低得多,因为在196份成对样品中,64份被发现其在血浆中 > 1000 cp/mL但在干血样中 < 1000 cp/mL。因此,干血样与血浆的总的一致性仅为67%。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了这样的方法,其中:用于指导医疗决策的目的的HIV病毒载量(VL)测量结果的截断值在约1000 cp/mL至约5000 cp/mL之间,其中VL测量结果 $>$ 截断值将表明现行疗法尚未成功,而VL测量结果 $<$ 截断值将表明现行疗法已经成功。在其它实施方案中,VL测量结果截断值为约1100 cp/mL、约1200 cp/mL、约1300 cp/mL、约1400 cp/mL、约1500 cp/mL、约1600 cp/mL、约1700 cp/mL、约1800 cp/mL、约1900 cp/mL、约2000 cp/mL、约2100 cp/mL、约2200 cp/mL、约2300 cp/mL、约2400 cp/mL、约2500 cp/mL、约2600 cp/mL、约2700 cp/mL、约2800 cp/mL、约2900 cp/mL、约3000 cp/mL、约3100 cp/mL、约3200 cp/mL、约3300 cp/mL、约3400 cp/mL、约3500 cp/mL、约3600 cp/mL、约3700 cp/mL、约3800 cp/mL、约3900 cp/mL、约4000 cp/mL、约4100 cp/mL、约4200 cp/mL、约4300 cp/mL、约4400 cp/mL、约4500 cp/mL、约4600 cp/mL、约4700 cp/mL、约4800 cp/mL、约4900 cp/mL或约5000 cp/mL。

[0031] 在一个方面,本发明提供了用于从干血样中获得病毒载量测量结果的方法,该结果与血浆样品中的病毒载量测量结果是一致的。在另一个方面,本发明提供了测量干血样(例如,干血斑)中无细胞病毒颗粒的方法。在一个实施方案中,方法包括使用缓冲溶液再水化干血样的步骤。在另一个实施方案中,干血样疑似含有病毒颗粒。在其它的实施方案中,缓冲溶液包含PBS。在另外的实施方案中,再水化步骤之后是洗脱步骤。

[0032] 在另一个实施方案中,方法包括使用洗脱剂从再水化的干血样上洗脱无细胞的病毒颗粒的步骤,所述洗脱剂优先地洗脱无细胞的病毒颗粒而不破坏与细胞结合的核酸(或在不破坏与细胞结合的核酸的情况下洗脱无细胞的病毒颗粒)。在一个实施方案中,与细胞结合的核酸为RNA和/或DNA。在另外的实施方案中,洗脱剂与再水化步骤中的缓冲溶液相同。在另外的实施方案中,洗脱步骤之后是分离步骤。

[0033] 在另一个实施方案中,方法包括将干血样在缓冲溶液中温育的步骤,以再水化干

血样并洗脱无细胞的病毒颗粒而不破坏与细胞结合的核酸(或在不破坏与细胞结合的核酸的情况下洗脱无细胞的病毒颗粒)。在另外的实施方案中,温育步骤之后是分离步骤。

[0034] 在一个其它的实施方案中,方法包括将无细胞的病毒从再水化的干血样中分离的步骤。在一个实施方案中,分离步骤包括将无细胞的病毒从可能存在于再水化的干血样中的任何细胞碎片上分离。在另一个实施方案中,分离步骤包括过滤,包括但不限于,通过离心或真空的离心柱过滤。在一些实施方案中,过滤包括使用具有孔径在约0.1 μm 至约100 μm 之间的过滤器。在另外的实施方案中,在分离步骤之前会有再水化步骤和/或洗脱步骤,或在其之前会有温育步骤。

[0035] 在一个方面,方法包括基于得自分离步骤的样品的测量步骤。在一个实施方案中,测量步骤包括测量在分离步骤后所得到的样品中无细胞病毒颗粒的量。在另一个实施方案中,测量步骤包括从样品中获得病毒载量测量结果,该结果与来自血浆样品的病毒载量测量结果是一致的。在一个其它的实施方案中,测量步骤包括病毒颗粒定量。在一些实施方案中,病毒颗粒定量技术选自序列特异性核酸定量、ELISA、PCR、等温核酸扩增、核酸杂交、原位杂交和电子显微镜。本领域普通技术人员将认识到,其它病毒颗粒定量技术可适用于本文所述的方法。

[0036] 在一个实施方案中,本文所述的方法适用于测量各种病毒,包括但不限于,HIV、HTLV、HCV、HBV、CMV和EBV。

[0037] 如本文所述,CAP/CTM HIV-1测试干燥液斑法涉及将干血样与离液剂(SPEX缓冲液)一起温育以提取核酸。此方法还需要将样品在缓冲液中于56 $^{\circ}\text{C}$ 及1000 rpm的持续摇动下温育10分钟。在一个方面,本发明提供了从干血样中提取无细胞病毒的方法,其中对加热或高温以及涡旋或摇动的使用是任选的或不是必需的。在一个实施方案中,本文所述的方法在没有加热或高温和/或没有涡旋或摇动的条件下进行。在另一个实施方案中,再水化、洗脱、温育和分离步骤中的至少一个或全部是在下列条件下进行的:(i)没有或不存在加热或高温;(ii)不存在或没有涡旋或摇动;和/或(iii)在环境温度下。术语“环境温度”指代干血样与根据本发明的方法的缓冲液接触时所处的温度。通常,环境温度为温控环境的温度。环境温度在约18 $^{\circ}\text{C}$ 至约30 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内。在一个实施方案中,环境温度为约18 $^{\circ}\text{C}$ 、约19 $^{\circ}\text{C}$ 、约20 $^{\circ}\text{C}$ 、约21 $^{\circ}\text{C}$ 、约22 $^{\circ}\text{C}$ 、约23 $^{\circ}\text{C}$ 、约24 $^{\circ}\text{C}$ 、约25 $^{\circ}\text{C}$ 、约26 $^{\circ}\text{C}$ 、约27 $^{\circ}\text{C}$ 、约28 $^{\circ}\text{C}$ 、约29 $^{\circ}\text{C}$ 或约30 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0038] 在一个其它的实施方案中,待再水化的DBS包括EDTA-全血。当被用于血样中时,EDTA具有有利的特性,包括但不限于防腐、抗凝和/或抗菌。本领域普通技术人员将认识到,其它防腐剂/抗凝剂/抗菌剂可适用于血样及其对应的DBS中,所述DBS是本文所述方法的主题。

[0039] 将在以下实施例中进一步描述本公开的实施方案,其不会限制权利要求书中所述的本发明的范围。

实施例

[0040] 提供了以下实施例和图表以帮助理解本发明,其真实范围由所附权利要求书规定。应当理解,可在所规定的程序内做出修改而不脱离本发明的精神。

[0041] 实施例1

[0042] 方案:

[0043] 1. 使用标准方法采集待测试的DBS样品,将血液点在Whatman 903过滤卡片上并允许其干燥。

[0044] 2. 将干血斑从Whatman过滤卡片上切下并放置于经正确标记的S管或离心过滤柱中。

[0045] 3. 向装有DBS的管中加入1000 μL 10%甲醇(于PBS中)。如果是添加至离心柱,则仅加入500 μL 缓冲液。

[0046] 4. 将S管或离心过滤柱置于培养箱中,56 $^{\circ}\text{C}$,1000 rpm,10分钟。

[0047] a. 如果DBS被直接放置于S管中,则跳过第4步。

[0048] 5. 将柱在微型离心机中短暂离心(如果使用VWR 0.2 μm 离心过滤器,则以5000 $\times g$ 的最高速度离心5-10分钟)。然后移除并弃去离心柱,并向收集管中加入500 μL 缓冲液。

[0049] 6. 将样品上样至COBAS[®] AmpliPrep并启动HI2DFSP96方案。

[0050] 材料:COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] 96;COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 测试干燥液斑法 RUO 试剂盒;Whatman 903 过滤卡片(Whatman 目录号95026-896);10% 甲醇溶液(于PBS中);和VWR 离心过滤器。目录号82031-356,0.2 μm 孔径。

[0051] 结果:使用不同的盐和去垢剂,如NaCl (3 M)、Tween-20 (0.1%)、Triton X-100 (0.1%)、SDS (1%)和甲醇(10%),评价了PBS缓冲液。SPEX是用作比较的阳性对照。在实验中,用各个不同的缓冲液简单地替换了SPEX缓冲液。将装有DBS的S管在56 $^{\circ}\text{C}$ 摇动温育10分钟。在提取后,接着采用常规的CAP/CTM HIV-1 DFSP方案(参见“COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 测试干燥液斑法”的说明书)。由于掺入的HIV病毒浓度和进入全血(WB)中的HIV细胞的浓度相对低(约500 cp/DBS或7E3 cp/mL、12 个细胞/DBS或1.2E3 个细胞/mL),使得病毒滴度仅显示为 <400 cp/mL。所以,使用靶标的Ct值代替病毒滴度来比较不同的缓冲液。这些样品中几乎所有QS均表现正常。

[0052] 如表1中所示,相比SPEX缓冲液,具有10%甲醇的PBS能够从被病毒污染的WB DBS上相对有效率地洗脱HIV病毒颗粒。使用PBS/MeOH时的Ct延迟可能是由于次优的提取和洗脱条件。

[0053] 表1:从DBS上洗脱HIV病毒颗粒(6个重复)

	SPEX	PBS/MeOH
平均 Ct	31.8 $\pm$ 0.44	34.15 $\pm$ 1.64
阳性	3	6
未检测到的数目	3*	0

[0054] *

[0055] 基于QS,被判定为无效的样品。

[0056] 如表2中所示,相比SPEX,PBS/MeOH仅能够从掺入HIV细胞的WB中洗脱与细胞结合的HIV DNA和RNA的一些可检测到的痕迹并且具有延迟的Ct。换言之讲,PBS/MeOH显著地减少了从掺入HIV细胞的DBS上洗脱与细胞结合的HIV DNA和RNA。

[0057] 表2:洗脱与细胞结合的HIV DNA/RNA(6个重复)

	SPEX	PBS/MeOH
平均 Ct	30.5 ± 1.66	35.27 ± 1.81
[0058] 阳性	6	3
未检测到的数目	0	3

[0059] 当将HIV病毒与HIV阳性细胞混合在一起并掺入 WB时,如表3中所示,SPEX能够有效率地洗脱这两者,而PBS/MeOH仅能够洗脱出HIV病毒并且其Ct类似于仅存在HIV病毒时的Ct(表1)。

[0060] 表3:洗脱病毒+细胞的混合物(6个重复)

	SPEX	PBS/MeOH
平均 Ct	29.58 ± 0.81	33.75 ± 0.99
[0061] 阳性	6	6
未检测到的数目	0	0

[0062] 表4汇总了掺入病毒的DBS与同时掺入病毒和细胞的DBS之间的Ct差值。明显地,由于HIV细胞的贡献,当使用SPEX缓冲液时,存在大的Ct差值,而当使用PBS/MeOH缓冲液时,Ct差值要小得多,这说明无论DBS中是否存在HIV细胞,PBS/MeOH仅洗脱出了无细胞的病毒。

[0063] 表4:

	SPEX	PBS/MeOH
病毒	31.8	34.15
[0064] 混合物	29.58	33.75
Ct差值(病毒-细胞)	2.22	0.4

[0065] 参考文献:

[0066] Johanson, H.C., V. Hyland, C. Wicking, R.A.Sturm, 2009, DNA elution from buccal cells stored on Whatman FTA Classic Cards using a modified methanol fixation method, BioTechniques Vol. 46 No.4.; Médecins Sans Frontières Access Campaign, 2013, Putting HIV treatment to the test: A product guide for viral load and point-of-care CD4 diagnostic tools; 8E5 Cell line Producing Aids Viral Antigens without producing infectious virus particles: Patent No. 4,752,565; Cultured Viral Particles from SeraCare, Certificate of Analysis (Part No: PN-227; Lot #: 51884)。

[0067] 实施例2

[0068] 方案:

[0069] 1. 使用标准方法采集待测试的DBS样品,将HIV阳性EDTA全血点在Whatman 903过滤卡片上并允许其干燥至少3小时。[Munktel1卡片也能用]。

[0070] 2. 将干血斑从Whatman过滤卡片上切下并放置于经正确标记的S管中。

[0071] 3. 向含有DBS的管中加入1000 μ L PBS缓冲液。

[0072] 4. 在环境温度下温育至少30分钟。

[0073] a. 加热并摇动(任选)

[0074] b. 如果需要,温育时间可增加至过夜。

[0075] 5. 将样品上样至COBAS® AmpliPrep并启动HI2DFSP96方案。

[0076] 材料:COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® 96;COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 测试干燥液斑法 RUO 试剂盒;Whatman 903 过滤卡片;PBS (Mediatech, Inc. 并由Corning Cellgro制造, 目录号 21-040-CV)。

[0077] 结果:对方法性能的研究使用了来自157名被HIV感染的个体的成对的干血斑和血浆样品,其病毒载量在检测不到至 $>10^5$ 份拷贝/mL的范围内。将新方法(PBS提取)的性能与旧方法(使用SPEX胍盐缓冲液提取)的性能进行了比较。将血浆病毒载量用作黄金标准。

[0078] DBS由EDTA-全血制成。使用常规的血浆CAP/CTM HIV-1 v2.0方案测量了血浆病毒载量。SPEX提取遵循了常规的DFSP方案,包括在56℃摇动温育10分钟。对DBS的PBS洗脱是在装有1 mL PBS的S管中于室温下静置进行的。洗脱时间从30分钟至过夜不等。在提取后,接着在CAP/CTM HIV-1 DFSP方案下采用了常规的靶标扩增和检测(参见“COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 测试干燥液斑法”的说明书)。

[0079] 如图4中所示,DFSP方法导致了样品的过度量化和低血浆病毒载量。与之相反,无细胞病毒洗脱方法在此范围内显示出少得多的过度量化。无细胞病毒洗脱方法事实上在约0.6 $\log_{10}$ 的测试范围内导致了系统性的量化不足。此量化不足的一部分,0.3 $\log_{10}$,可以解释为:全血仅含50%的血浆,而所使用的测试定义文件没有将此因素考虑在内。

[0080] 如图5中所示,PBS洗脱与血浆病毒载量的改善的相关性也导致了改善的临床一致性。这在应用了0.6的校正因子后尤为明显。

[0081] 实施例3

[0082] 干血斑(DBS)改善了HIV病毒载量测试的可及性,但由于与细胞结合的病毒核酸而得到了不同于血浆的结果。进行了下列实验以评估用于使用磷酸盐缓冲的盐水从DBS样品中优先洗脱与血浆结合的病毒的游离病毒洗脱(FVE)方法。

[0083] 方法:对于标准的COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® (CAP/CTM) 干燥液斑法(DFSP),根据包装插页说明书(Roche Molecular Systems.COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HIV-1 测试干燥液斑法 RUO 包装插页,Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, USA),使用基于胍盐的样品预提取(SPEX)缓冲液对DBS进行提取。对于游离病毒洗脱(FVE)方案,将每个DBS在1 mL 不含钙和镁的磷酸盐缓冲盐水(PBS:154 mM NaCl,5.6 mM Na_2HPO_4 ,1.1 mM KH_2PO_4 , pH 7.4;Corning)中,于COBAS® S样品管中在室温下静置温育 >30 分钟。然后,将PBS洗脱液在S管中(未移除DBS纸张)以常规的TaqMan HIV-1 Test v2.0工作流程,使用干液斑(DFSP)测试定义文件软件(同上)直接处理。

[0084] 使用DBS模型系统以测试掺入了以下物质的HIV阴性血液:(i)经纯化的病毒8E5;(ii)经纯化的来自8E5病毒的RNA;或(iii)经洗涤的来自8E5细胞系的含有HIV的细胞(Folks TM, 等人1986, Biological and biochemical characterization of a cloned Leu-3-cell surviving infection with the acquired immune deficiency syndrome retrovirus, J Exp Med.164:280-290),从而对FVE的作用方式进行了探究。最终,临床性

能研究使用了来自196名被HIV感染的患者(正接受和未接受抗逆转录病毒疗法)的成对的DBS和血浆样品。将来自经FVE方法处理过的临床样品的VL结果与来自DFSP方案的结果进行了比较,采用由CAP/CTM HIV-1 Test v2.0所测得的血浆VL作为参照方法。对于FVE和DFSP两者,其测定均对DBS与血浆标本之间的体积差异进行了校正。出于下述原因,将额外的+0.3 log叠加到所有的FVE结果上。据信,FVE仅洗脱血液的血浆部分,其大约占全血样品的50%。

[0085] 结果:使用经掺杂的样品的实验发现,相比SPEX(其基本上洗脱所有无细胞的和与细胞结合的病毒核酸),从DBS的PBS洗脱对无细胞病毒的选择性较其对与细胞结合的HIV核酸的选择性高大约5倍。当使用PBS洗脱时,在一系列温育时间和温度的重复样品上观测到了一致且定量的洗脱(定义为测量结果之间的差异小于0.3 log)。在23°C下,于0.5、2和12小时的温育时间分别测得了3.10、3.14和3.11 log cp/mL VL的病毒载量。比较0.5小时的温育,在23、56和70°C的温度分别测得了3.38、3.34和3.20 log cp/mL VL的病毒载量。

[0086] 由于PBS不会像胍盐离液剂那样造成RNase的失活,所以在存在高水平外源RNase的情况下评估了样品的稳定性。临床HIV阳性DBS样品的洗脱液抗降解,在没有RNase时的量化周期(Cq)为31.2,而在有RNase时的Cq值为32.9。掺杂了完整病毒的HIV阴性DBS样品的洗脱液也抗降解,在没有RNase时的Cq为27.4,而在有RNase时的Cq为27.1。相比之下,掺杂了裸露的病毒RNA的HIV阴性DBS样品的洗脱液在没有RNase时的Cq为22.4,而在有RNase时的Cq为34.2。

[0087] 对方法的临床评价使用了来自196名HIV患者的成对的DBS和血浆样品,既有正接受也有未接受抗逆转录病毒治疗的,其血浆VL在检测不到至 10^6 份拷贝/mL的范围内。当使用血浆病毒载量作为参照方法时,相比DFSP方案,PBS洗脱方法减少了DBS中的VL过度量化(图6)。

[0088] 图6示出了将DBS病毒载量方法与作为参照方法的血浆病毒载量进行比较的偏差图。符号指示了PBS洗脱(●)和SPEX(胍盐)洗脱(Δ)。以+0.3 log的体积校正因子调整了PBS的值。相比血浆,PBS具有-0.31 log₁₀ 份拷贝/mL的平均差和0.72 log₁₀ 份拷贝/mL的标准偏差,而SPEX具有+0.94 log₁₀ 份拷贝/mL的平均差和1.07 log₁₀ 份拷贝/mL的标准偏差。

[0089] 当采用标准胍盐SPEX提取DBS时,在1000 cp/mL的医疗决策点,DBS和血浆之间的一致性仅为67%,这是由于过度量化的病毒载量将69%的血浆病毒载量低于1000 cp/mL的患者错误地归类为治疗失败(参见表3.1和图7)。

[0090] 表3.1 - DFSP方案在1000 cp/ml的表现

血浆				
		< 1000 cp/ml	> 1000 cp/ml	
[0091] DFSP	< 1000 cp/ml	29	0	29
	> 1000 cp/ml	64	103	167
		93	103	196

[0092] SPEX提取表现出100%的灵敏度和31%的特异性,对于如血浆病毒载量所定义的病

毒治疗失败而言,其PPV为62%而NPV为100%。

[0093] 图7示出了DBS与血浆病毒载量测量结果的相关性和一致性。符号指示了PBS洗脱(●)和SPEX(胍盐)洗脱(Δ)。以+0.3 log的体积校正因子调整了PBS的值。当使用1000 cp/mL的病毒载量截断值以指示治疗失败时,阴影区域指示了有可能将被DBS错误分类的患者。

[0094] 使用PBS洗脱,被抑制患者均被正确地分类,尽管10%的病毒载量高于1000 cp/mL的患者现在被归类为治疗成功(参见表3.2)。

[0095] 表3.2 - 经体积校正后FVE的表现(+0.3 log cp/mL,由于DBS仅50%为血浆)

[0096]

血浆				
		< 1000 cp/ml	> 1000 cp/ml	
FVE	< 1000 cp/ml	93	10	103
	> 1000 cp/ml	0	93	93
		93	103	196

[0097] DBS与血浆的总的一致性显著提高至95%($p < 0.05$, 双侧 z 检验)。PBS洗脱表现出90%的灵敏度和100%的特异性,对于如血浆病毒载量所定义的病毒治疗失败而言,其PPV为100%而NPV为90%。

[0098] 当与标准胍盐提取方案进行比较时,对DBS的PBS HIV洗脱显著减少了DBS中HIV VL相对于血浆的过度量化。此洗脱可以在没有额外的液体转移步骤或设备的情况下完成。不受限于任何理论,模型系统实验表明,该方法通过从样品中选择性地洗脱游离病毒组分而将与细胞结合的HIV核酸保留在纸张上是可行的。向PBS中加入RNase A不会改变病毒的定量,说明经PBS洗脱的RNA模板可能被封闭在保护性病毒结构的内部。FVE方案将判定病毒治疗失败(如血浆VL > 1000 cp/mL所定义)的总的百分比从67%提高到了95%,并且针对病毒治疗失败显示出90%的灵敏度和100%的特异性。使用PBS洗脱步骤从细胞材料中分离游离病毒显著减少了DBS中HIV VL的过度量化。

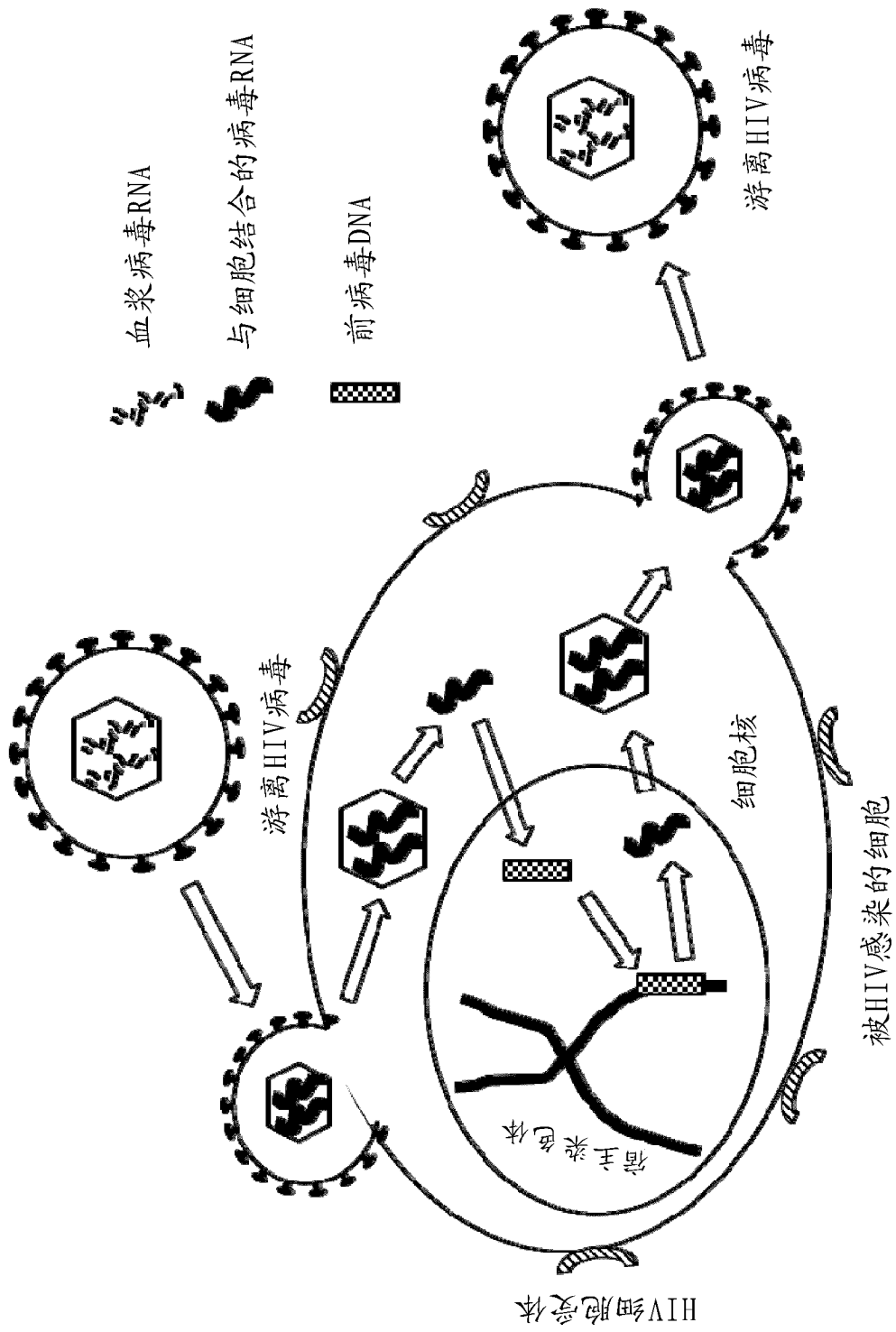


图 1

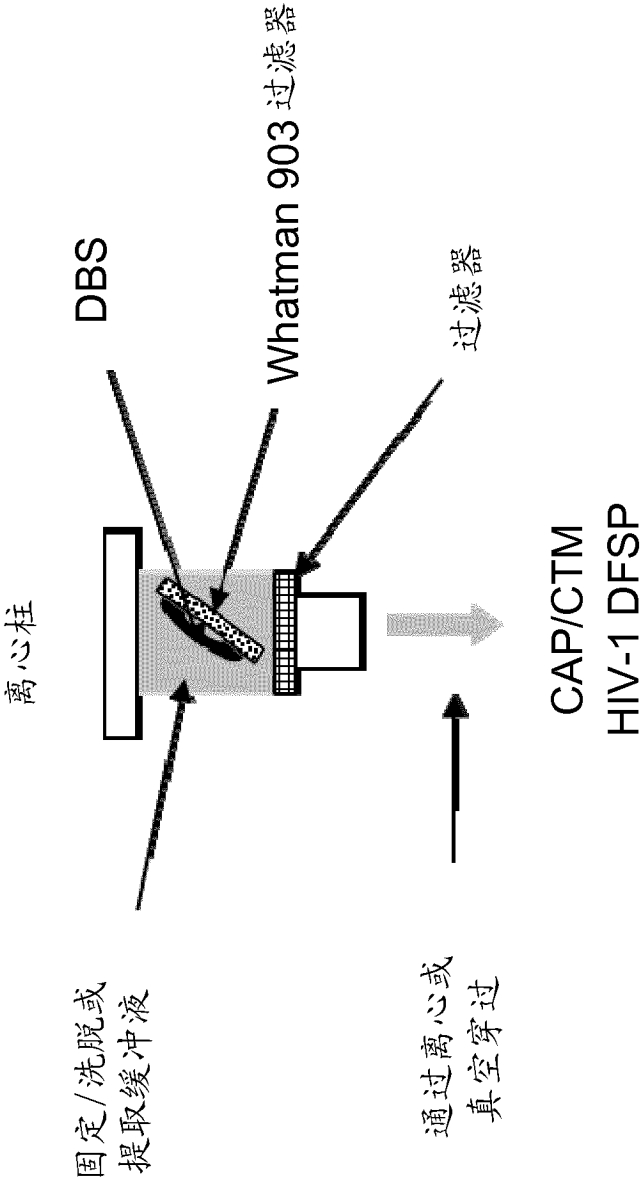


图 2

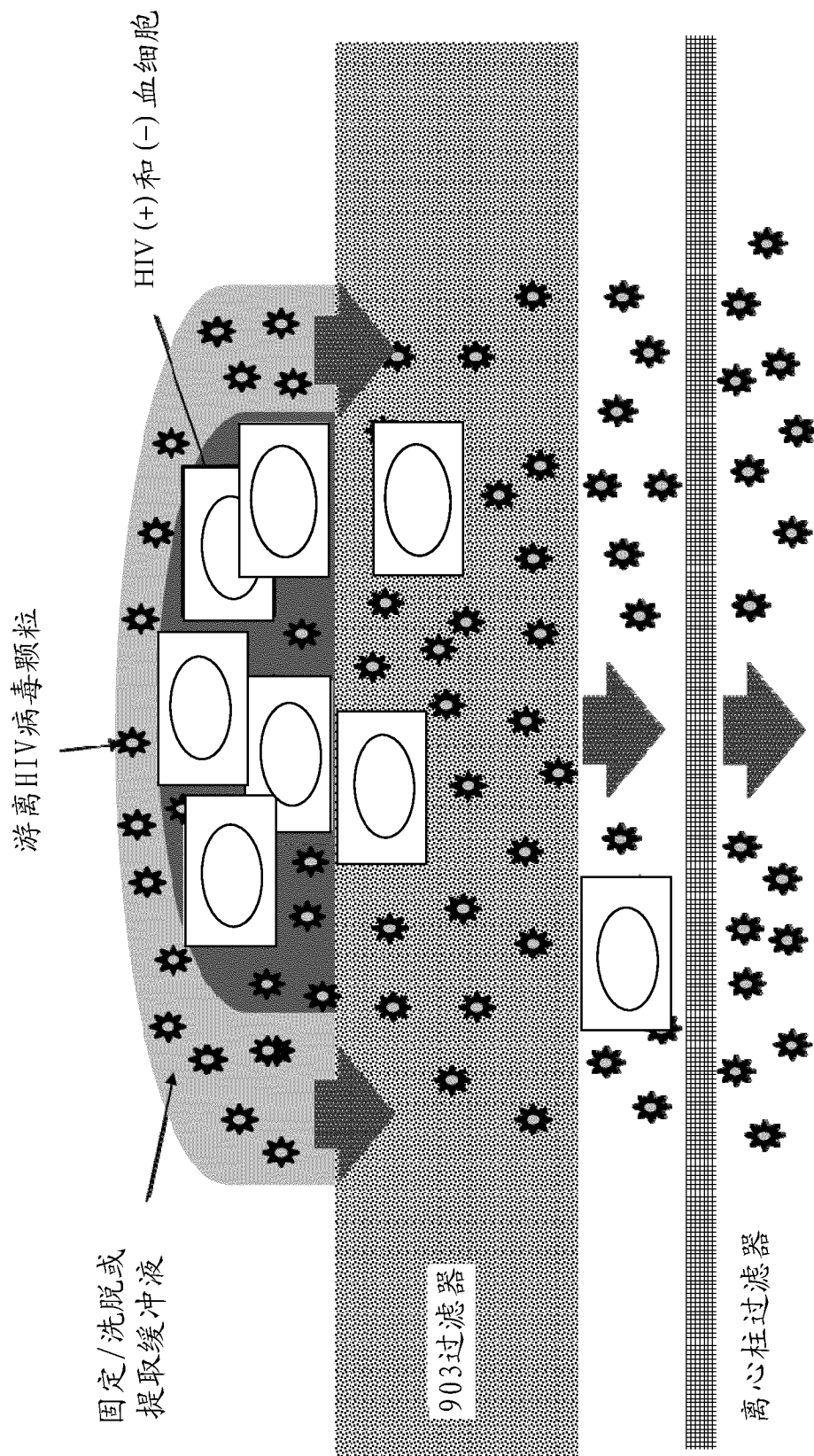


图 3

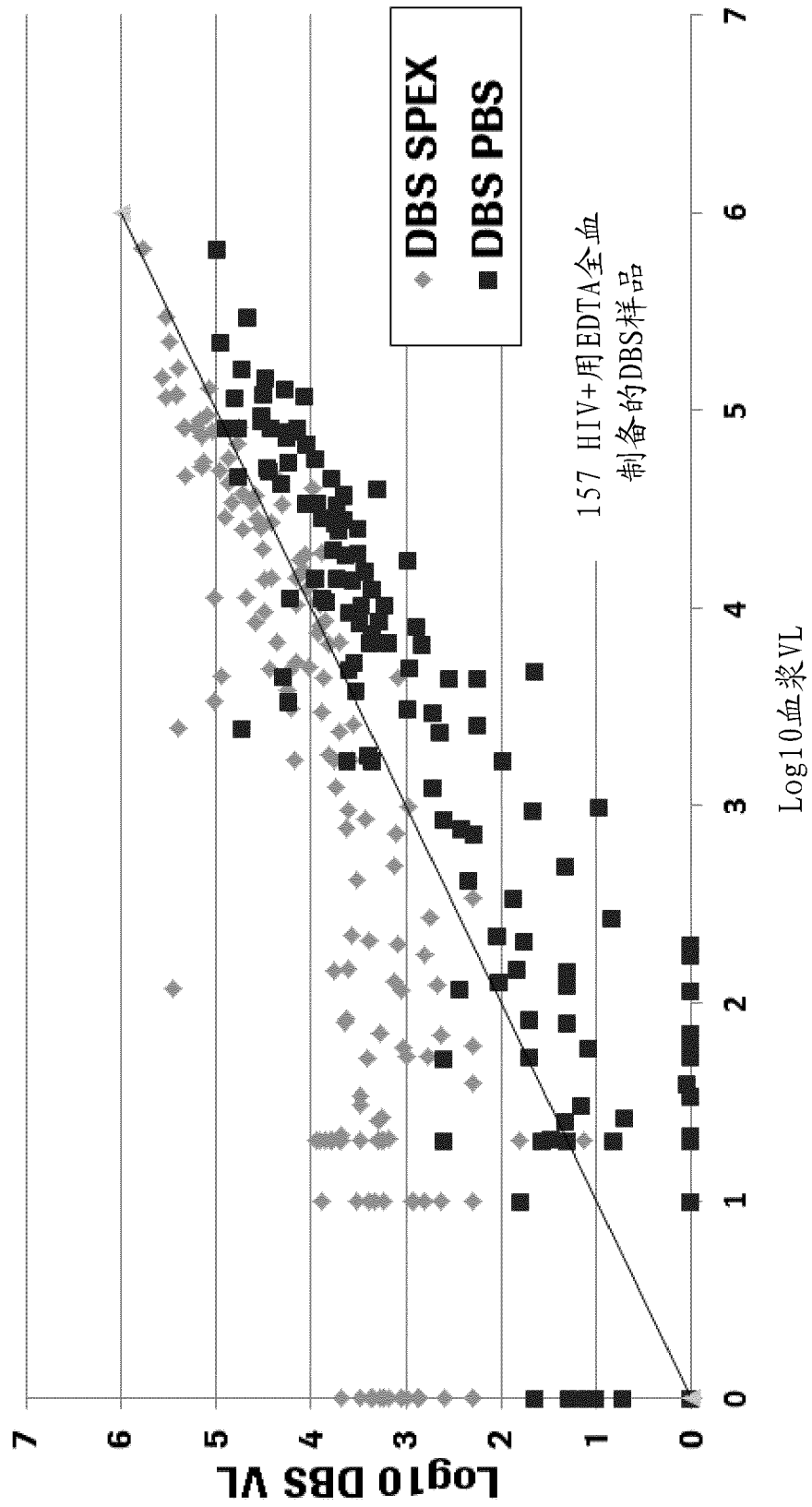


图 4

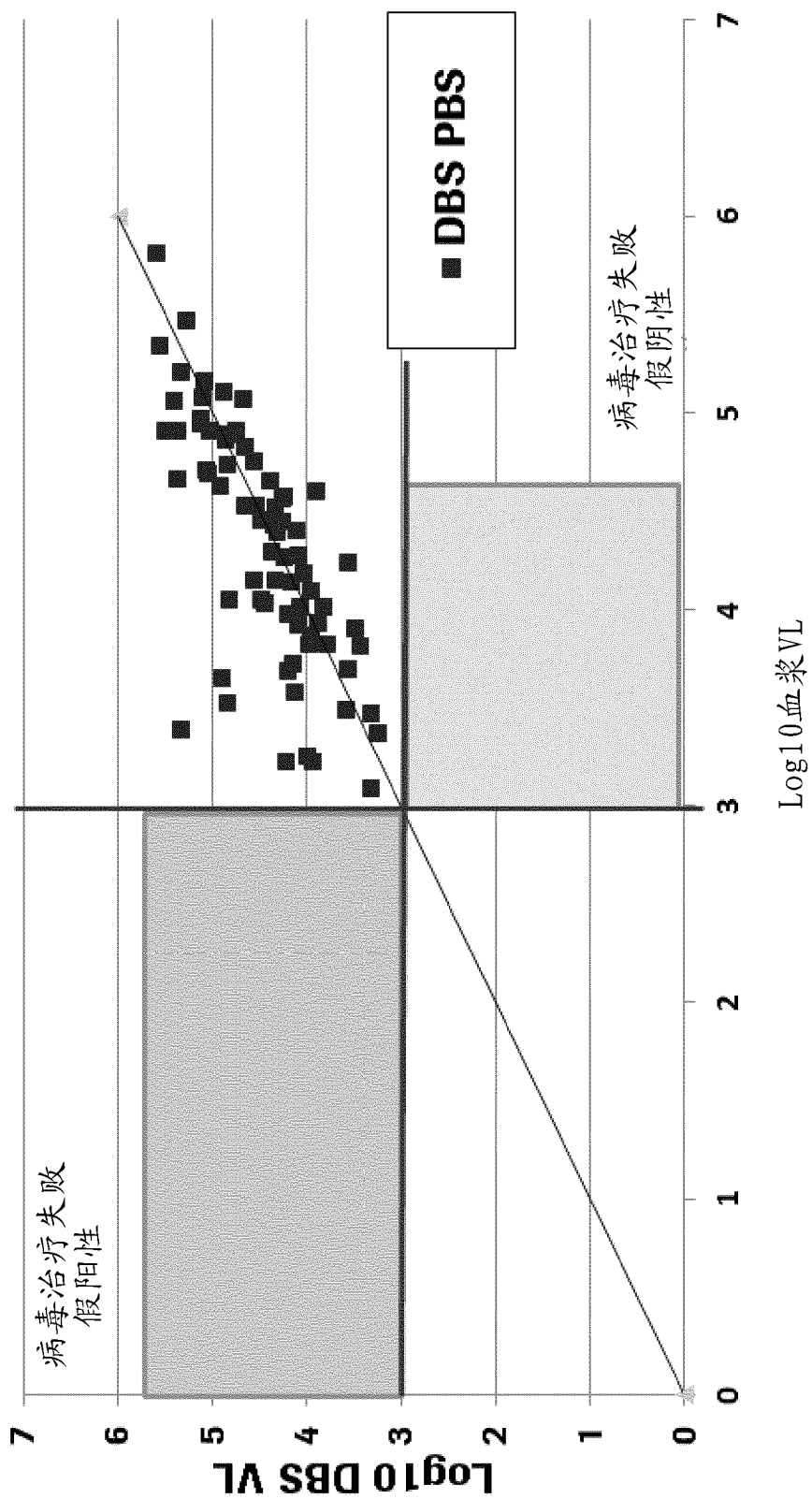


图 5

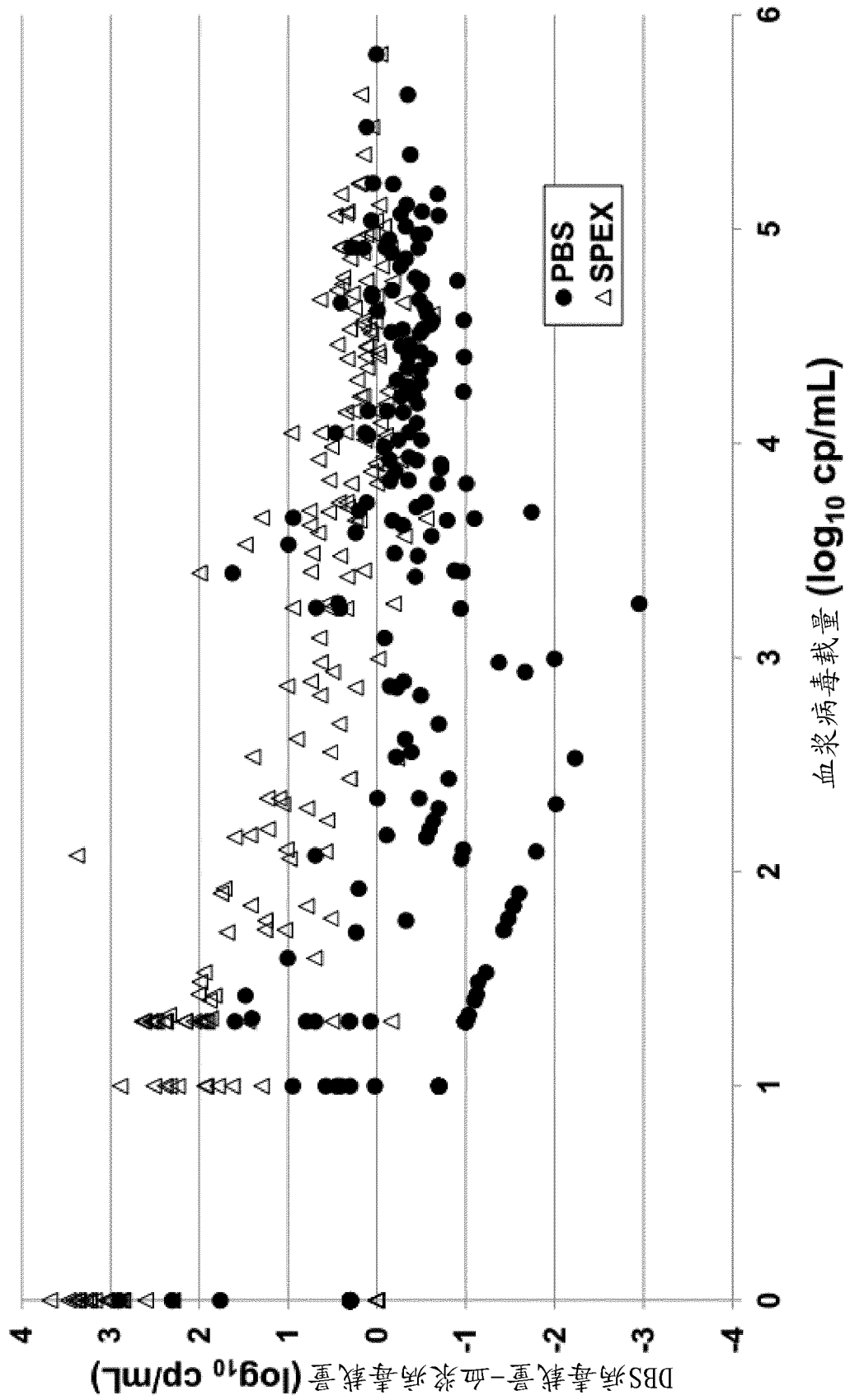


图 6

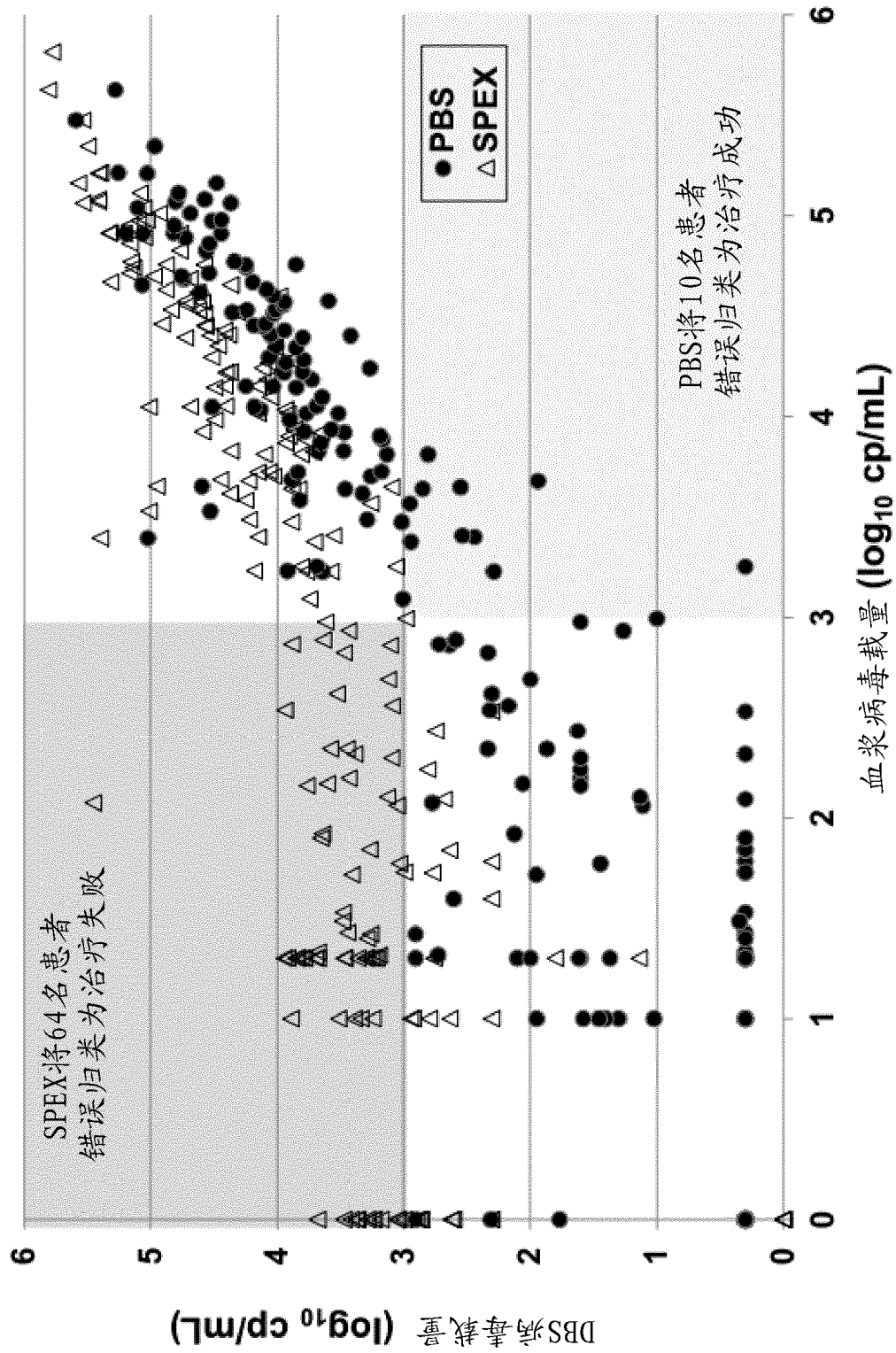


图 7