

作用于感染 HIV 的细胞,发现二者均能抑制病毒复制^[20];而将该适配体结合到 HIVgp160 上,也可抑制 HIV-1 复制,降低传染性。适配体还能够靶向运输治疗药物、毒素和放射性同位素,明显减少其毒副作用和有效治疗剂量。Huang 等^[21]将阿霉素连接到酪氨酸蛋白激酶-7(tyrosine protein kinase -7,PTK7)适配体 sgc8c 上,发现该复合体对表达目的蛋白的细胞有高选择性,明显提高化疗效果。

4 展望

随着 SELEX 筛选技术的不断发展和完善,众多可用于临床检测和疾病治疗的适配体被逐步筛选出来,并广泛地用于临床诊断与治疗研究。然而,适配体在临床诊断和治疗中的大规模应用还面临许多问题,但随着适配体研究的不断深入,将会有更多高特异性适配体不断问世,并将在疾病诊断和治疗中发挥重要作用。

参考文献

- [1] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.
- [2] Shamah SM, Healy JM, Cload ST. Complex target SELEX [J]. Acc Chem Res, 2008, 41(1): 130-138.
- [3] Liu J, Stormo GD. Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein-DNA interactions [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(17): e141.
- [4] Li S, Xu H, Ding H, et al. Identification of an aptamer targeting hnRNP A1 by tissue slide-based SELEX [J]. J Pathol, 2009, 218(3): 327-336.
- [5] Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis [J]. Anal Chem, 2004, 76(18): 5387-5392.
- [6] Kim HJ, Kwon M, Yu J. Elucidation of the RNA target of linezolid by using a linezolid-neomycin B heteroconjugate and genomic SELEX [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(24): 7688-7695.
- [7] Li T, Wang E, Dong S. A grafting strategy for the design of improved G-quadruplex aptamers and high-activity DNazymes [J]. PLoS One, 2009, 4(4): e5126.
- [8] Missailidis S, Thomaidou D, Borbas KE, et al. Selection of aptamers with high affinity and high specificity against C595, an anti-MUC1 IgG3 monoclonal antibody, for antibody targeting [J]. J Immunol Methods, 2005, 296(1/2): 45-62.
- [9] Zhao Z, Xu L, Shi X, et al. Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells [J]. Analyst, 2009, 134(9): 1808-1814.
- [10] Farokhzad OC, Jon S, Khademhosseini A, et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells [J]. Cancer Res, 2004, 64(21): 7668-7672.
- [11] Nowak M, Helleboid-Chapman A, Jakel H, et al. Insulin-mediated down-regulation of apolipoprotein A5 gene expression through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway: role of upstream stimulatory factor [J]. Mol Cell Biol, 2005, 25(4): 1537-1548.
- [12] Singh R, Bandyopadhyay D. MUC1: a target molecule for cancer therapy [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(4): 481-486.
- [13] Pieve CD, Perkins AC, Missailidis S. Anti-MUC1 aptamers: radio-labelling with (99m) Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice [J]. Nucl Med Biol, 2009, 36(6): 703-710.
- [14] Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, et al. Tumor targeting by an aptamer [J]. J Nucl Med, 2006, 47(4): 668-678.
- [15] Akiyama H, Kachi S, Silva RL, et al. Intraocular injection of an aptamer that binds PDGF-B: a potential treatment for proliferative retinopathies [J]. J Cell Physiol, 2006, 207(2): 407-412.
- [16] Sennino B, Falcon BL, McCauley D, et al. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102 [J]. Cancer Res, 2007, 67(15): 7358-7367.
- [17] Mi Z, Guo H, Russell MB, et al. RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells [J]. Mol Ther, 2009, 17(1): 153-161.
- [18] Kikuchi K, Umehara T, Nishikawa F, et al. Increased inhibitory ability of conjugated RNA aptamers against the HCV IRES [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 118-123.
- [19] Zhou J, Li H, Li S, et al. Novel dual inhibitory function aptamer-siRNA delivery system for HIV-1 therapy [J]. Mol Ther, 2008, 16(8): 1481-1489.
- [20] Zhou J, Swiderski P, Li H, et al. Selection, characterization and application of new RNA HIV gp 120 aptamers for facile delivery of Dicer substrate siRNAs into HIV infected cells [J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(9): 3094-3109.
- [21] Huang YF, Shangguan D, Liu H, et al. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells [J]. Chembiochem, 2009, 10(5): 862-868.

(收稿日期:2014-01-15)

· 综述 ·

HIV 新发感染的实验室检测方法进展

韩梅^{1,2} 综述, 张波^{1△} 审校

(1. 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038; 2. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042)

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 新发感染; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-1013-03

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)是艾滋病的病原体,其发病率是衡量 HIV 流行程度的最重要参数,用以描述艾滋病的流行特征,如识别高危人群、评估干预

效果。在 HIV 感染早期,患者无典型临床症状,难以判断感染时间,造成艾滋病发病率无法准确统计。传统的发病率计算方法通常复杂、成本昂贵、不精确,如通过在 HIV 阴性人群中开

展前瞻性队列研究,所获得的发病率不具有人群代表性,且由于干预措施影响到研究对象的行为改变进而不可避免地影响到监测结果。

鉴于上述方法的局限性,人们开始关注通过实验室检测 HIV 感染者样本中的标志物来区分是否新发感染,进而计算发病率。本文主要对近年发展起来的 HIV 新发感染实验室检测方法进行综述。

1 免疫标志物判断 HIV 感染时间的血清学方法 (serologic testing algorithms, STARHS)

Janssen 等^[1]于 1998 年报道了一种用于 HIV 新发感染检测的血清学方法,即 STARHS。STARHS 是基于酶联免疫反应原理,利用抗体生成的不同阶段,其数量、比例、亲和力、同种异构体(isotype)或特异性等属性存在差异,精确地从 HIV 阳性样本中检测出近期感染者。当“近期”被定义为一个准确的时间段后,HIV 发病率便可以借助一次横断面调查精确计算出来。遗憾的是,这类方法最初因为在亚型之间差异明显,影响了其在全球范围的推广应用。此外,因为该类方法主要用于监测和研究,在当时缺乏商业前景,因而一度发展受挫。

1.1 基于 HIV 特异性抗体定量检测的 BED-捕获酶联试验 (BED-capture EIA, BED-CEIA)

1.1.1 检测原理 为了解决 STARHS 方法检测 HIV 亚型时出现的差异问题,美国疾病预防控制中心在 20 世纪 90 年代初建立了 BED-CEIA。该方法通过检测 HIV 感染者体内 HIV 特异性 IgG 占 HIV 总抗体的比例来区分是否为近期感染。因为方法设计过程中采用了由 HIV-1 3 种亚型(B、E、D)衍生所得的 gp41 片段,在检测中加入这种片段(肽),就可与酶联板上包被的羊抗人 IgG 抗体结合,而该抗体可以识别来自广泛范围的 HIV-1 亚型的 gp41 片段,因此称为 BED-CEIA。HIV 感染者在血清阳转后,其体内的 HIV 特异性 IgG 抗体与总 IgG 抗体的比例随 HIV 感染时间的增加而增高,从感染者的抗体检测呈阳性开始到 BED-CEIA 的光密度值达到一个设定的临界值(用来区分 HIV 长期感染与新发感染)为止的这段时间,为 STARHS 的窗口期。不同的 HIV 亚型有不同的窗口期,最新的研究结果提示最佳窗口期为 155 d,其对应的临界值为 0.8,检测方法的敏感性和特异性分别达到 76.82% 和 93.48%^[2]。

1.1.2 应用情况 BED-CEIA 发展至今,已经有商品化试剂,价格低廉、操作简便、性能稳定。但使用一段时间后,人们发现 BED-CEIA 会将一部分长期感染者错判为近期感染者,导致对 HIV 发病率的高估^[3-4]。因此,WHO 在 2005 年曾建议该方法不能用于常规监测^[5]。此后研究表明,导致错分的原因与患者体内抗体水平下降有关。导致抗体水平下降的原因有接受高效抗逆转录病毒治疗情况、感染者疾病进展情况、天然的低抗体水平,以及免疫反应变异性等。因此,错分率作为校正因子被引入发病率计算公式中。然而 BED-CEIA 高错分率的问题仍然无法根本解决,这迫使决策者们开始慎重考虑是否使用该方法。尽管面临严峻的挑战,美国疾病预防控制中心仍然坚持将其作为 HIV 发病率监测评估系统的重要组成部分使用^[6]。目前,BED-CEIA 仍然是迄今应用最广泛的方法。中国于 2005 年开始将 BED 法应用到常规哨点监测系统中,现已在全国病例报告系统中广泛应用^[7-11]。

1.2 基于检测成熟 HIV 特异性抗体占总抗体比例的亲和力试验

1.2.1 检测原理 抗体亲和力是评价抗体与相应抗原结合能力的指标。其原理为 HIV 抗体对 HIV 抗原的亲和力在感染

后的一年内会随时间而呈线性增加。标本预先以 1 mol/L 的亚硝基胍和 10% 的磷酸缓冲液分别处理,成熟抗体的氢键将不被亚硝基胍破坏,其抗原抗体结合反应则不受影响。用 Ax-SYM HIV1/2gO 试验进行检测,结果以亲和力指数(avidity index, AI)表示。

国外学者研究证明,AI 在血清阳转后的前 15 个月明显升高,此时 AI 大约为 0.9,此后 AI 增长减缓,直至稳定在 1.0 左右^[12-14]。在血清阳转后的前 6 个月其检测 HIV 新发感染的特异性非常高。所以当 AI 取一个合适的值,就能准确地区分新发感染和既往感染。低 AI 的标本,新发感染的可能性大, AI < 0.8 时,敏感性和特异性达到最适值,分别为 79.4% 和 92.3%。目前,推荐 AI=0.8 作为 HIV 发病率监测的截断值(Cutoff 值),与其对应的感染时间估计在 8~9 个月以内;AI<0.6 时,敏感性为 26.4%,特异性为 98.9%,推荐用于个体新发感染诊断,感染时间估计在 130 d 左右。

1.2.2 应用情况 亲和力试验有商业化试剂,价格便宜,操作简单并已实现自动化,可重复性好,结果不受抗病毒药物、性别、年龄等因素影响,且对 HIV B 亚型和非 B 亚型的检测结果均无差异^[13]。亲和力试验与 BED 试验经校准后联合使用,结果与 6 个月的队列研究所得发病率接近^[15]。

2 病毒学标志物判断 HIV 感染时间的杂合子分类法 (mixed base classifier, MBC)

目前,HIV 发病率研究主要聚焦于建立一种没有病毒亚型差异,错分率更低的新发感染判断方法——一种基于生物信息学原理,以 HIV 基因遗传分化程度作为感染时间标志以判断其是否为新发感染的方法,即 MBC。

2.1 检测原理 研究证实,大多数的 HIV 感染者最初感染的都是单一的 HIV 病毒,感染者体内最初总是单一的病毒群^[16]。但 HIV 病毒因其逆转录酶缺乏校正功能,其基因在宿主体内会随着感染时间的延长而发生分化,以至于病毒群不再单一而出现不同准种。在对患者的核酸序列进行分析时,同一个核苷酸位置可能检测到不止一种碱基,这种现象叫做混合碱基/杂合子现象。以人群为基础的混合碱基/杂合子判读能反映准种遗传分化的程度。混合碱基/杂合子占全序列碱基的百分比可以作为评估患者体内基因分化程度的指标。基因分化速度与时间呈线性关系,在感染的最初 8 年,混合碱基/杂合子比例以每年 0.2% 的速度递增,但此后速度会减慢,直至进入平台期^[17-19]。在已知新发感染者中,混合碱基/杂合子比例在 HIV 不同亚型之间没有差异。因此,HIV 序列的混合碱基/杂合子比例可区分病毒是新发感染还是既往感染,该方法已开始应用于 HIV-1 B 亚型及非 B 亚型 pol 区基因的分析。

2.2 检测方法 通常利用 0.5 mL 左右 HIV 感染者血清样本进行 RNA 提取,对蛋白酶区及部分逆转录酶区基因进行反转录和扩增,得到的产物进行序列测定。在对测序结果进行分析时,发现某些核苷酸位点有别于其他位点的单峰,而是出现主次两个峰,见图 1,预示这些位点可检测到不同的碱基。次峰与主峰的面积比例通常用 τ 表示。目前认为 $\tau>15\%$ 时,可判读为混合碱基/杂合子,但使用受试者工作特征曲线(ROC 曲线)和分析的结果证明,对混合碱基的判读,是否采用同样的阈值不重要,阈值在 15%~25% 时该方法的性能一样好。

2.3 临界值确定 不同的临界值对应不同的窗口期。Kouyos 等^[19]早期的研究中,曾使用 ROC 分析当特异性与敏感性达到最适值时的临界值。Kouyos 等^[19]曾建议临界值取 0.5%,窗口期取 1 年,敏感性可达 86.8%,特异性可达 70%。有

学者认为临界值为 0.47% 时, 敏感性和特异性能达到最佳拟合, 其对应的窗口期为 155 d, 对应的敏感性和特异性分别为 88.8% 和 74.6%。由于 HIV 感染早期病毒载量很高, 传染性很强, 155 d 作为窗口期, 对于研究 HIV 传播动力学更有意义^[20]。

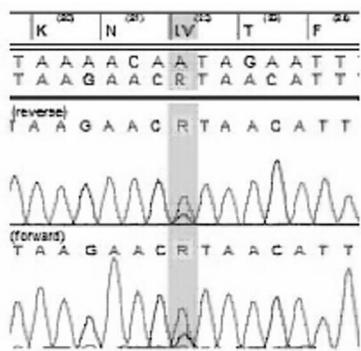


图 1 HIV 核酸序列混合碱基/杂合子判读示例

2.4 方法的影响因素 PCR 引物、测序方法, 以及人工判断时的主观性等技术原因, 都是导致结果偏倚的重要因素。使用短的序列进行分析时, 因为碱基总数小, 偏倚的可能性更大。在 MBC 中, 如果仅依据某一个碱基来判断, 则会大大降低 MBC 的准确性^[20]。

2.5 应用情况 目前, BED 和 MBC 最高的吻合率只有 68.98%^[18]。与 STARHS 一样, MBC 也是基于人群水平而非个体水平的新发感染检测方法。该方法是对大量序列进行分析时的副产物, 通常是在进行某地区 HIV 传播性耐药监测的同时获得, 可谓一举两得。但因为对实验设备要求高, 试剂昂贵, 所以在资源有限国家的应用受到限制。目前少有对 MBC 方法用于新发感染检测的应用研究报道。

3 展望

HIV 新发感染的实验室检测可以获得较准确的 HIV 发病率, 对艾滋病的预防控制具有重要意义。STARHS 方法技术成熟、操作简便、成本低廉, 适合已建立 HIV 病例报告系统, 资源有限国家或地区大范围开展 HIV 的发病率监测, 但检测结果需要流行病学专家审慎解释。MBC 方法技术成熟, 但操作复杂、成本高, 适合于已建立健全的艾滋病治疗及 HIV 耐药监测体系的国家和地区开展, 该方法还可同时获得抗病毒治疗耐药流行的数据, 后者有望得到进一步发展和应用。

参考文献

- [1] Janssen RS, Satten GA, Stramer SL, et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes[J]. JAMA, 1998, 280(1): 42-48.
- [2] Parekh BS, Medougal JS. Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence[J]. Indian J Med Res, 2005, 121(4): 510-518.
- [3] Hu DJ, Vanichseni S, Mock PA, et al. HIV type 1 incidence estimates by detection of recent infection from a cross-sectional sampling of injection drug users in Bangkok: use of the IgG capture BED enzyme immunoassay[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003, 19(9): 727-730.
- [4] Westreich D, Pettifor A, Karita E, et al. Overestimation of the South African HIV incidence using the BED IgG assay? [J]. S Afr Med J, 2007, 97(7): 476-478.
- [5] Medougal JS, Pilcher CD, Parekh BS, et al. Surveillance for HIV-1 incidence using tests for recent infection in resource-constrained countries[J]. AIDS, 2005, 19 Suppl 2: S25-S30.
- [6] Hall HI, Song R, Rhodes P, et al. Estimation of HIV incidence in the United States[J]. JAMA, 2008, 300(5): 520-529.
- [7] 吕繁, 赵金扣, 蒋岩, 等. BED HIV-1 发病监测方法及其应用[J]. 中国艾滋病性病, 2006, 12(2): 179-181.
- [8] 韩梅, 王豫林, 王惠杰, 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[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(11): 1077-1080.
- [9] Li SW, Zhang XY, Li XX, et al. Detection of recent HIV-1 infections among men who have sex with men in Beijing during 2005-2006[J]. Chin Med J, 2008, 121(12): 1105-1108.
- [10] 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[J]. AIDS, 2007, 21 Suppl 8: S47-S51.
- [11] Xiao Y, Jiang Y, Feng J, et al. Seroincidence of recent human immunodeficiency virus type 1 infections in China[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(10): 1384-1386.
- [12] Wei X, Liu X, Dobbs T, et al. Development of two avidity-based assays to detect recent HIV type 1 seroconversion using a multi-subtype gp41 recombinant protein[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2010, 26(1): 61-71.
- [13] Suligoi B, Buttò S, Galli C, et al. Detection of recent HIV infections in African individuals infected by HIV-1 non-B subtypes using HIV antibody avidity[J]. J Clin Virol, 2008, 41(4): 288-292.
- [14] Braunstein SL, Nash D, Kim AA, et al. Dual testing algorithm of BED-CEIA and AxSYM Avidity Index assays performs best in identifying recent HIV infection in a sample of Rwandan sex workers[J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18402.
- [15] 于海英, 叶艺, 张娜, 等. 检测 HIV-1 新发感染的限制性抗原亲合力方法的重复性与稳定性评价[J]. 中国艾滋病性病, 2013, 19(5): 318-321.
- [16] Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(21): 7552-7557.
- [17] Bonhoeffer S, Holmes EC, Nowak MA. Causes of HIV diversity [J]. Nature, 1995, 376(6536): 125.
- [18] Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, et al. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection[J]. J Virol, 1999, 73(12): 10489-10502.
- [19] Kouyos RD, von Wyl V, Yerly S, et al. Ambiguous nucleotide calls from population-based sequencing of HIV-1 are a marker for viral diversity and the age of infection[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(4): 532-539.
- [20] Ragonnet-Cronin M, Aris-Brosou S, Joannis I, et al. Genetic diversity as a marker for timing infection in HIV-infected patients: evaluation of a 6-month window and comparison with BED[J]. J Infect Dis, 2012, 206(5): 756-764.

(收稿日期: 2013-06-08)