

新疆 274 例 HIV/AIDS 抗病毒治疗耐药分析及两种耐药检测方法比较

金涛, 胡晓远, 王凤英, 马媛媛, 倪祯, 倪明健

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 新疆 乌鲁木齐 830000

摘要: **目的** 了解新疆维吾尔自治区目前 HIV 感染者的耐药率, 分析其耐药位点特征。 **方法** 使用实验室自建的 in-house HIV 耐药检测方法和 ViroSeq™ 试剂盒分别对 274 例病毒载量大于 1 000 拷贝/毫升的感染 HIV-1 在治患者的血浆样本进行耐药检测, 获得了样本的耐药状况和耐药位点信息, 进一步分析样本耐药率和突变特征, 并比较两种方法检测结果的一致性。 **结果** In-house HIV 耐药检测结果发现 17 例 (6.2%) 样本出现蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, PIs) 耐药, 70 例 (25.5%) 样本检出对核苷类抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs) 耐药, 119 例 (43.4%) 样本检出对非核苷类抑制剂 (nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs) 耐药。PIs 主要耐药突变位点为 I84V 和 V82A; NRTIs 类耐药突变中频率最高的位点为 M184VI (49.2%); NNRTIs 类耐药突变中 K103N 为主要突变位点 (51.5%)。另外, 两种耐药检测方法在 PI 类位点的一致性为 94.5%, NRTI 类位点一致性为 98.5%, NNRTI 类位点一致性为 92.3%。 **结论** 本研究并未发现特殊的耐药位点。两种检测方法在检测结果方面一致性较高, in-house 方法可以代替 ViroSeq™ 试剂盒以扩大 HIV 耐药检测覆盖面。

关键词: 艾滋病; HIV 耐药; 基因突变; 耐药位点; 检测方法

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)12-1417-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.12.003

Drug resistance analysis of antiviral therapy in 274 HIV/AIDS cases in Xinjiang and comparison of two methods for drug resistance detection

JIN Tao, HU Xiao-yuan, WANG Feng-ying, MA Yuan-yuan, NI Zhen, NI Ming-jian

Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Urumchi, Xinjiang 830000, China

Corresponding author: NI Ming-jian, E-mail: 623245060@qq.com

Abstract: **Objective** To understand the drug resistance rate among HIV-infected people in Xinjiang Uygur Autonomous Region, and to analyze the characteristics of drug resistance sites. **Methods** Self-developed in-house HIV drug resistance testing method and ViroSeq™ kit were used to detect drug resistance in 274 HIV-1 patients receiving antiviral therapy and with viral load more than 1,000 copies/ml. The drug resistance status and drug resistance site information of the samples were obtained. The drug resistance rate and mutation characteristics of the samples were further analyzed, and the consistency of results detected by the two methods was compared. **Results** In-house HIV drug resistance testing displayed that 17 (6.2%) samples showed resistance to protease inhibitors (PIs), 70 (25.5%) samples resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), and 119 (43.4%) samples resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). The main drug-resistant mutations in PIs were I84V and V82A. The most frequent mutation in NRTIs was M184VI (49.2%). The main mutation site in NNRTIs was K103N (51.5%). In addition, the consistency of the two methods to detect PI, NRTI and NNRTI was 94.5%, 98.5% and 92.3%, respectively. **Conclusions** No specific resistance sites are found in this study. The consistency of results detected by the above-mentioned two methods is high. In-house HIV drug resistance testing method can replace ViroSeq™ kit to expand the coverage of HIV resistance detection.

Keywords: acquired immunodeficiency syndrome; HIV drug resistance; gene mutation; drug resistance site; detection method

AIDS 在世界范围内流行, 据估计, 2017 年全世界有 94 万人死于 AIDS 相关疾病^[1]。中国在防治 HIV

基金项目: 国家科技重大专项 (2018ZX10715007); 新疆艾滋病防控研究重点实验室 (XJYS1706)

作者简介: 金涛 (1974-), 女, 上海人, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 艾滋病防治。

通信作者: 倪明健, E-mail: 623245060@qq.com。

疫情方面取得了很大进展, 但感染 HIV 导致免疫功能丧失的人数继续增加^[2]。中国自 2003 年开始在 HIV/AIDS 人群中逐步推广抗病毒治疗, 治疗方案主要由两种核苷类逆转录酶抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs) 和一种非核苷类逆转录酶抑制剂 (nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors,

NNRTIs)组成^[3-4]。在抗病毒治疗过程中,毒株产生的对药物的耐受性始终是困扰抗病毒治疗的主要问题^[5-6]。一些病毒的耐药突变,例如 K65R 和 Q151M 会对 NRTIs 类药物产生明显的耐药作用,而 E138A、V106M、Y181C、K101E、K103N 和 H221Y 等突变则会对 NNRTIs 类药物产生明显耐药作用^[7-8]。

目前商业化的 HIV 耐药检测试剂盒 ViroSeq™ (Celera Diagnostics, Alameda, CA, USA) 是基因型检测的代表,但存在费用过高的问题。该试剂可以稳定检测欧美等地的 HIV-1 B 亚型毒株的耐药,但对中国的流行株 BC 和 AE 亚型毒株的耐药检测效力不明确^[9]。为了降低成本和高效检测,研究者开发出了 in-house 耐药检测方法,能够有效检测中国流行的 HIV-1 亚型毒株的耐药情况,已经在各级疾病预防控制中心和医院内广泛使用^[10]。本研究通过对同一批 HIV/AIDS 样本的耐药检测,分析比较两种方法在检测结果上的差别,评估使用 in-house 方法替代 ViroSeq™ 试剂盒的可能性。

1 材料与方法

1.1 样本来源 本研究于 2012 年 1 月—2016 年 6 月收集新疆维吾尔自治区 9 个地州市的 274 份 HIV/AIDS 样本,其中男性 169 人,女性 105 人。吸毒感染患者 91 人,性传播感染患者 183 人。样本病毒载量值均大于 1 000 拷贝/ml。

1.2 样本信息 274 例病例均采用国家一线治疗方案,即两个 NRTIs 与一个 NNRTIs 组合治疗。病人治疗方案中目前没有使用蛋白酶抑制剂 (protease inhibitors, PIs)。病人接受抗病毒治疗时间为 12~114 个月,中位数为 76 个月。

1.3 检测方法 In-house 方法:使用德国 Qiagen 公司生产的病毒 RNA 提取试剂盒从血浆中提取病毒 RNA。首先,采用套式 PCR 扩增 HIV-1 pol 区的前 1.3 kbp (HXB2 标准株位置:HXB2 2166-3462)。然后,使用 3730 测序仪 (ABI company, USA) 对 PCR 产物进行基因测序,测序结果通过 Sequencer 5.0 和 Bioedit 软件完成序列清理和拼接。最后,利用美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库进行耐药结果的比对分析。

ViroSeq™ HIV-1 基因型耐药检测试剂盒是美国 Celera 公司生产的商品化试剂盒。经过对病毒进行 RNA 提取和 RT-PCR 反应得到 HIV-1 pol 区片段的 1.8 kbp,使用 ABI3730XL 进行序列测定。得到序列后使用 ViroSeq v2.8 专用分析软件进行序列分析,获得耐药基因的结果。

1.4 伦理证明 本研究所涉及的试验程序和研究方案经新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心伦理学委员会批准,研究对象全部知情同意并签署知情同意书。

1.5 统计学方法 本研究采用 Excel 整理数据,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。通过 χ^2 检验比较不同变量间的差别,检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 in house 方法检测样本整体耐药情况 在 274 例样本的 in-house HIV 耐药检测结果中,有 144 例 (52.6%) 样本发生了位点突变,但对 PIs、NRTIs 及 NNRTIs 都未发生耐药反应,剩余 130 例样本发生的位点突变至少对 PIs、NRTIs 及 NNRTIs 中的任一类药物产生耐药,整体耐药率为 47.4% (130/274)。其中有 17 例 (17/274, 6.2%) 样本对至少一种 PIs 类药物耐药。病人所用治疗方案中 NRTIs 和 NNRTIs 两类药物的耐药情况, NRTIs 耐药率为 25.5% (70/274), NNRTIs 耐药率为 43.4% (119/274)。同时对 NRTIs 和 NNRTIs 都耐药的样本有 69 例 (69/274, 25.2%), 98.6% 的 NRTIs 耐药病例同时对 NNRTIs 耐药,见表 1。

表 1 新疆 274 例 HIV/AIDS 样本对 NRTIs 及 NNRTIs 的耐药情况

NRTIs	NNRTIs		共计
	耐药	未耐药	
耐药	69	1	70
未耐药	50	154	204
合计	119	155	274

2.2 不同感染途径的 HIV/AIDS 样本的耐药情况 不同感染途径 PIs、NRTIs 及 NNRTIs 耐药构成差异无统计学意义 ($\chi^2=1.737, P>0.05$)。吸毒感染耐药患者中对 PIs 耐药为 5 例 (6.8%), NRTIs 耐药为 29 例 (39.7%), NNRTIs 耐药为 39 例 (53.4%); 性传播感染耐药患者中对 PIs 耐药为 12 例 (9.0%), NRTIs 耐药为 41 例 (30.8%), NNRTIs 耐药为 80 例 (60.2%), 见表 2。

表 2 不同感染途径的 HIV/AIDS 样本的耐药结果 (n, %)

感染途径	PIs 耐药	NRTIs 耐药	NNRTIs 耐药	χ^2 值	P 值
吸毒	5 (6.8)	29 (39.7)	39 (53.4)	1.737	0.420
性传播	12 (9.0)	41 (30.8)	80 (60.2)		
合计	17 (8.2)	70 (34.0)	119 (57.8)		

2.3 in-house 方法检测 PIs 类耐药突变位点 274 例样本经过 in-house HIV 耐药突变位点检测后发现了 21 例 (7.6%) 样本存在 PIs 耐药突变位点。其中有 2 例样本分别有 1 个 PIs 主要耐药突变位点 (I84V 和 V82A), 从而导致对多个蛋白酶抑制剂具有耐药性。有 15 例 (71.4%) 样本含有 PIs 类次要耐药位点

Q58E。另外,还有 4 例样本产生了突变位点,包括 PIs 次要耐药位点 L10F (2 例), V32A (1 例) 和 L33F (1 例),但没有产生耐药。

2.4 in-house 方法检测 NRTIs 类耐药突变位点 本研究样本中共有 70 例 (70/274, 25.5%) 样本检出对 NRTIs 类药物耐药。其中突变频率最高的位点为 M184VI, 占比 49.2%。此外,在这些耐药样本中有 35 例 (26.9%) 出现了 2 个及以上的 NRTIs 耐药突变位点,见表 3。

表 3 70 例 HIV/AIDS 样本中 NRTIs 的突变位点统计

突变位点	样本数	突变频率(占总耐药样本比例,%)
M184VI	64	49.2
K65R	14	10.7
K70E	4	3.1
Y115F	7	5.4
M41L	2	1.5
D67N	6	4.6
K70R	3	2.3
L210W	2	1.5
T215FY	3	2.3
E44D	1	0.8
A62V	2	1.5
V75I	3	2.3
T215TNSY	1	0.8
K219QE	6	4.6

2.5 in-house 方法检测 NNRTIs 类耐药突变位点 274 例样本中共有 119 例 (43.4%) 检出对 NNRTIs 类药物耐药。其中,发生 K103N 位点突变的样本为 67 例,占比 51.5%。另外,不同感染途径的样本中 PIs、NRTIs 和 NNRTIs 相关突变位点并无明显差异 ($\chi^2 = 0.937, P = 0.333$), 主要突变位点与前述中相同。表明不同感染途径可能并不影响 PIs、NRTIs 及 NNRTIs 耐药的突变位点,见表 4。

表 4 119 例 HIV/AIDS 样本中 NNRTIs 突变位点统计

突变位点	样本数	突变频率(占总耐药样本比例,%)
K103N	67	51.50
Y181C	23	17.70
G190A	13	10.00
V179DE	11	8.50
V106M	10	7.70
E138A	10	7.70
K101E	8	6.20
P225H	8	6.20
Y188L	5	3.80
V108I	4	3.10
H221Y	4	3.10
A98G	2	1.50
L100I	2	1.50
K101P	2	1.50
K103N	67	51.50
Y181C	23	17.70
G190A	13	10.00
V179DE	11	8.50
V106M	10	7.70
E138A	10	7.70
K101E	8	6.20

2.6 In-house 和 ViroSeq™ 检测方法的比较 In-house方法和商品化试剂盒 ViroSeq™的耐药检测结果对比发现,PIs 耐药样本和非耐药样本的一致率为 94.5%,NRTIs 耐药样本和非耐药样本的一致率为 98.5%,NNRTIs 的耐药和非耐药样本的一致率为 92.3%。两种检测方法对艾滋病患者 HIV 病毒耐药检测的一致性高于 92%,表明 in-house 检测方法具备了检测和研究 HIV-1 耐药的条件,见表 5。

表 5 In-house 与 ViroSeq™耐药检测方法的一致性

In-house	ViroSeq™					
	PIs		NRTIs		NNRTIs	
	耐药	未耐药	耐药	未耐药	耐药	未耐药
耐药	2	15	66	4	109	10
未耐药	0	257	0	204	11	144
一致率(%)	94.5		98.5		92.3	

3 讨论

本次研究对服药一年以上的 HIV/AIDS 患者中病毒学治疗失败病例进行了耐药特征分析,有助于全面了解本地区长期抗病毒治疗的 HIV/AIDS 人群的耐药特征,为提高预防和治疗效果提供科学依据。艾滋病的抗病毒治疗需要定期服用药物,甚至终生服用^[11]。但药物的不良反应及漏服等影响了服药的依从性,导致了耐药的发生,这是造成抗病毒失败的主要原因^[12-13],而耐药的发生和病毒学治疗失败两者是互为因果的^[14]。

本地区之前相关研究^[15-16]显示,HIV 感染者初次接受抗病毒治疗后,病毒抑制率迅速上升,治疗效果显著,接受免费抗病毒治疗 12 个月的患者病毒抑制率达到 70%,在病毒抑制失败人群中的耐药率为 10.6%。本次研究显示,抗病毒治疗持续时间一年以上的艾滋病病毒学治疗失败患者中的整体耐药率为 47.4%。其中 NRTIs 耐药率为 25.5%,NNRTIs 耐药率为 43.4%。本研究结果中 95%的 NRTIs 耐药病例同时对 NNRTIs 耐药,这种多耐药性的现象在之前也有相关报道^[17]。另外,与此前报道一致,NNRTIs 类耐药明显早于 NRTIs 类,NNRTIs 已有耐药后才出现 NRTIs 类耐药的现象^[18]。对耐药突变位点进行分析显示,PIs 类药物相关突变位点主要集中在 Q58E。由于病人目前免费治疗方案中并无蛋白酶抑制剂,可能是耐药毒株传播造成的原发性耐药。

根据美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库对耐药突变序列进行分析^[19-20],NRTIs 与临床相关的主要耐药突变位点有三类,第一类为识别性突变 (discriminatory mutations, DMs), 主要以 M184VI 和 K65R 位点为代

表,造成对 3TC 和 FTC 的高度耐药;第二类为胸苷相关突变(thymidine analog mutations, TAMs),造成对核苷类似物药物 AZT 和 d4T 的耐药,经典的 TAMs 突变位点有 M41L、D67N、K70R、L210W、T215Y/F 和 K219Q/E;第三类为多脱氧核苷耐药(multi-dideoxynucleoside resistant, MDRs),对应位点为 T69ins 和 Q151M,造成对目前所有 NRTIs 类药物的耐药。此次研究中未检测到 T69ins 和 Q151M 的位点突变, NRTIs 类药物相关突变位点主要集中在 M184VI、K65R、Y115F、K219QE。M184VI 位点突变频率最高,其可提高患者对 3TC 和 FTC 的耐药性,以及对 AZT、DDI 和 TDF 的敏感性^[21]。除单个突变就能造成对药物高度耐药的 M184VI 突变外,大部分 NRTIs 突变需要积累 2 个以上的突变才能导致对药物的高度耐药。

另一方面,分析结果显示 NNRTIs 类药物耐药出现多个相关突变位点,主要位点为 K101E、K103N、V106M、E138A、Y181V、G190A、P225H,而在 103 位点相对更为集中。临床耐药相关的主要 NNRTIs 耐药突变位点有 L100I、K101EP、K103NS、V106AM、E138AGKQ、Y181CIV、Y188LCH、G190ASE 及 M230L^[19]。此次研究中出现的 NNRTIs 类药物相关突变位点与临床耐药相关的主要突变位点一致,没有特殊位点出现。

而不同感染途径(吸毒传播、性传播)的艾滋病患者的耐药率及耐药突变位点之间并无明显差异。虽然涉及新疆 9 个地区,但是每个地区有自己特殊情况,比如用药方案、依从性等。每个地区样本量偏少,可能不足以代表新疆的不同途径感染的耐药位点的状况。不同感染途径耐药突变位点的差异有待进一步研究。

通过比较分析发现,in-house 和 ViroSeqTM试剂盒的检测一致性达到了 92% 以上。导致耐药不一致的原因可能有两方面:HIV 病毒准种对于耐药检测结果的影响以及 in-house 和 ViroSeqTM试剂盒所采用的基因型耐药检测数据库不同。HIV 病毒准种在药物压力下各自发展进化,具有不同的耐药基因模式和突变位点^[22-23]。另外,PIs 类耐药位点 Q58E 在斯坦福大学的 HIV 耐药数据库中判定为对 TPV 可导致低度耐药。而 ViroSeq 结果报告系统中认为 Q58E 是次要耐药位点,单个位点出现并不能造成对 PIs 类药物的耐药。在本研究结果中 PIs 耐药不一致的 15 例样本中 in-house 方法均有 Q58E 位点。对于 NNRTIs 类耐药位点 E138A,斯坦福大学的 HIV 耐药数据库认定其是一个多态性位点,造成对 RPV 临界水平的低度耐药^[19]。而 ViroSeq 结果报告系统中认为 E138A 为多

态性非耐药突变位点,对 NNRTIs 类药物的耐药性无影响。综合 in-house 和 ViroSeqTM试剂盒 HIV 耐药检测结果的一致性、成本和技术要求等因素,in-house 已经具备代替 ViroSeqTM试剂盒长期应用于 HIV 耐药检测和研究工作的条件。两种方法在结果一致性上的差异可能需要更精准的核酸分析方法和跨系统、跨平台的 HIV 耐药基因型-表型数据库校正,以标准化耐药突变位点的耐药作用。

参考文献

- [1] Woodyatt CR. World AIDS day 2018 [J]. Ann Epidemiol, 2018, 28 (12): 829
- [2] Tang Q, Lu H. HIV/AIDS responses in China should focus on the impact of global integration[J]. Biosci Trends, 2018, 12(5): 507-509.
- [3] Zhang FJ, Pan J, Yu L, et al. Current progress of China's free ART program[J]. Cell Res, 2005, 15(11-12): 877-882.
- [4] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 12.
- [5] Voshavar C. Protease inhibitors for the treatment of HIV/AIDS: recent advances and future challenges [J]. Curr Top Med Chem, 2019, 19 (18): 1571-1598.
- [6] Clutter DS, Jordan MR, Bertagnolio S, et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing[J]. Infect Genet Evol, 2016, 46: 292-307.
- [7] Kityo C, Thompson J, Nankya I, et al. HIV drug resistance mutations in non-B subtypes after prolonged virological failure on NNRTI-based first-line regimens in sub-Saharan africa[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2017, 75(2): e45-e54.
- [8] Steegen K, Bronze M, Papathanasopoulos MA, et al. HIV-1 antiretroviral drug resistance patterns in patients failing NNRTI-based treatment: results from a national survey in South Africa [J]. J Antimicrob Chemother, 2017, 72(1): 210-219.
- [9] Chaturbhuj DN, Deshmukh PS, Hingankar NK, et al. Evaluations of an in-house drug resistance method for HIV-1 drug resistance using ViroSeqTM 2.0 genotyping system as a gold standard [J]. J Virol Methods, 2013, 189(1): 87-92.
- [10] Xu S, Li J, Bao Z, et al. Development and evaluation of a national reference panel of HIV-1 protease and reverse transcriptase drug-resistance mutations for HIV-1 genotypic resistance assays in China [J]. Mol Diagn Ther, 2010, 14(1): 31-41.
- [11] Lu DY, Wu HY, Yarla NS, et al. HAART in HIV/AIDS treatments: future trends[J]. Infect Disord Drug Targets, 2018, 18(1): 15-22.
- [12] 于红缨, 李勇忠, 卫学丰, 等. 怀化市艾滋病患者抗病毒治疗效果及耐药影响因素分析[J]. 实用预防医学, 2020, 27(4): 455-459.
- [13] DeGruttola V, Dix L, D' Aquila R, et al. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: reanalysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan[J]. Antivir Ther, 2000, 5(1): 41-48.
- [14] Teno Res Study Group. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study[J]. Lancet Infect