

2008—2013 年福建省 HIV-1 毒株耐药基因变异研究

王征桦,吴守丽,张春阳,颜莘莘

摘要:目的 分析 2008—2013 年福建 HIV-1 毒株耐药基因变异情况。**方法** 收集 2008—2013 年福建省病毒载量大于 1 000 copy/mL 艾滋病患者,采用自建 HIV-1 基因型耐药检测进行耐药检测和分析。**结果** 共收集 226 例病毒载量大于 1 000 copy/mL 样本,平均载量值 1.62×10^5 copy/mL;124 例样本扩增及测序后获得蛋白酶以及部分反转录酶基因序列,亚型分析显示 92 例(74.2%)为 CRF_01AE 亚型,14 例(11.3%)为 B 亚型,C 和 BC 亚型各有 7 例,另 4 例为其他亚型。77 对反转录酶以及蛋白酶抑制剂有不同程度耐药;对核苷类和非核苷类反转录酶抑制剂的耐药分别有 63 例(50.8%)和 74 例(59.7%),对蛋白酶抑制剂耐药 9 例(7.3%);核苷类反转录酶抑制剂主要耐药突变包括了 M184V、M41L、D67N、L70R、T219F、K219Q 等,造成对 3TC、AZT、D4T 等不同程度耐药;非核苷类反转录酶抑制剂主要耐药突变包括 K101E、Y181C、K103N、G190A 等,造成对 NVP 和 EFV 不同程度耐药。**结论** 福建省 HIV-1 感染者总体耐药率较低,但是随着治疗人数增加以及治疗时间延长,对反转录酶抑制剂出现较高程度耐药,仍需加强艾滋病患者耐药检测。

关键词:人类免疫缺陷病毒;抗病毒治疗;耐药;基因突变

中图分类号:R373.9

文献标识码:A

文章编号:1002-2694(2015)04-0330-04

Evaluation on drug-resistant gene mutation of HIV-1 strains in Fujian Province, China, 2008—2013

WANG Zheng-hua, WU Shou-li, ZHANG Chun-yang, YAN Ping-ping

(Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China)

Abstract: To evaluate the drug-resistance gene mutation of HIV-1 strains in Fujian Province, 226 samples with viral load of HIV-1 in plasma above 1 000 copy/mL were collected from 2008 to 2013. The average of viral load was 1.62×10^5 copy/mL. Then the whole sequence of gene including the pol gene and the partial reverse transcriptase gene of HIV-1 were amplified by RT-PCR, in which 124 samples were amplified successfully and then the sequences of those amplified ones were edited by the software Conting Express and submitted to the website <http://hivdb.stanford.edu/> to analyze the drug resistance status. It was found that 92 samples (74.2%) of that strains were classified as CRF_01AE, 14 samples were B, C and BC were 7 samples, respectively. According to the interpretation of Stanford University drug resistance database, 63 of 124 sequences occurred mutations for NRTIs, 74 of 124 sequences occurred mutations for NNRTIs, and 9 of 124 sequences occurred mutations for PIs. The NRTI resistance mutations were M184V, M41L, D67N, L70R, T219F, and K219Q, which caused high or medium level of resistance to TDF, 3TC, D4T and so on. The NNRTI resistance mutations were K101E, Y181C, K103N, and G190A, which caused high or medium level of EFV and NVP. These results showed that the rate of total drug resistance mutation of HIV-1 in Fujian Province was low. But with the increase of the populations using highly active anti-retrovirus therapy and the length of the time during therapy, the mutation may cause high or medium level of drug resistance, so the surveillance for that of HIV-1 is necessary.

Keywords: HIV; antiretroviral therapy; drug resistance; mutation

Corresponding author: Yan Ping-ping, Email: 406040286@qq.com

自 20 世纪 90 年代中期全球开展艾滋病高效抗反转录病毒疗法(highly active anti-retrovirus ther-

apy, HAART)以来,它使艾滋病从一个被称之为死亡率最高的疾病,变成了一个可治疗的慢性病,挽救了大量患者的生命,并提高患者的生存质量^[1-2]。但是由于 HIV-1 的高度变异性以及药物选择压力等

原因使HIV病毒在快速复制的过程中出现耐药性^[3],从而影响治疗效果。福建省从2005年初开始免费抗病毒治疗,长期的抗病毒治疗必定导致耐药性毒株的发生和流行,及时了解和掌握HIV毒株的耐药性演变及进化的规律,有助于减少HIV耐药的产生,为我省制订抗病毒治疗计划和HIV耐药预防措施提供依据。为此,本次研究收集2008—2013年福建省HIV-1病毒载量检测大于1 000 copy/mL病毒学治疗失败艾滋病患者进行HIV-1耐药基因变异研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选择2008—2013年福建省籍且接受抗病毒治疗满1年以上,病毒载量检测值大于1 000 copy/mL的病毒学治疗失败艾滋病患者进行耐药性检测分析。

1.2 方法

1.2.1 HIV-1病毒载量检测 参照《HIV-1病毒

载量测定及质量保证指南》(2013版),选用中山大学达安基因股份有限公司生产的人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)核酸定量检测试剂盒(探针法)提取RNA和反应液的配置,并运用ABI公司的Real-time 7000进行实时荧光定量PCR测定,检测范围为 $2.5 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ 。所以操作均严格按照说明书进行。

1.2.2 自建基因型耐药检测 参照QIAGEN公司QIAamp Viral RNA分离试剂盒提取研究对象血浆中病毒核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA),并采用自建基因型耐药检测方法(In-house)进行反转录扩增,并参照《HIV-1基因型耐药检测及质量保证指南》(2013版),通过套式聚合链反应扩增覆盖蛋白酶基因全序列以及反转录酶1—300位密码子序列,扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行纯化和序列测定。扩增和测序所用引物参考《HIV耐药监测策略和检测技术》,见表1。

表1 引物名称、碱基序列

Tab. 1 Primer and sequences

Primer classification	Primer	Sequences(5'-3')
扩增引物	RT20	CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC
Amplification primers	PRO1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA
	MAW26	TTGGAAATGTGAAAGGAAGGAC
	RT21	CTGTATTCTGCTATTAAGTCTTTGATGGG
测序引物	PROS3	GCCAACAGCCCCACCA
Sequencing primers	RTAS-qian	GGACCTACACCTGTCAAC
	RTB	CCTAGTATAAACAAATGAGACAC
	RROC1S	GCTGGGTGTGGTATTCC
	RT20S3	GTTCTAGCTCTGCTTC

1.2.3 耐药程度分析 测序得到的序列利用ChromsaPro和BiEdit软件进行初步的质量评估,编辑,拼接,混合碱基判读等一系列流程后将序列上传美国斯坦福大学HIV-1耐药基因型检测数据分析和解释系统(HIVDRDB)进行耐药程度分析。获得蛋白酶,反转录酶的氨基酸编码位置,病毒亚型及与数据库中同亚型序列的同源性,序列质量及耐药位点及解释等基本信息。根据耐药突变位点得到某种药物的单分值,然后累计得到该药物的总分值,按照总分值来判断耐药程度,0~9分为敏感,10~14分为潜在耐药,15~29分为低度耐药,30~59分为中度耐药,60分以上为高度耐药。

2 结果

2.1 一般情况 2008—2013年在对我省籍治疗满1年及以上的艾滋病患者病毒载量检测中共发现226份病毒载量大于1 000 copy/mL样本,其病毒载量平均值为 1.62×10^5 copy/mL;男性169例,占74.8%,女性57例,占25.2%;平均年龄为38.7岁,其中最小者4岁,最大者79岁。226例样本中初始治疗方案中主要为NVP+3TC+AZT,共109例,占48.2%;EFV+3TC+AZT共有54例,占23.9%;EFV+3TC+D4T和NVP+3TC+D4T分别为22例和33例,分别占9.7%,14.6%;另外其他治疗方案有8例。

2.2 耐药基因扩增和测序结果 226例样本中,124例经自建基因型耐药检测RT-PCR扩增阳性,

扩增阳性率为 54.9%。将扩增出来的片段进行基因序列测序, 获得 124 份完成基因序列。

2.3 病毒亚型分析 124 例完整基因序列, 经美国斯坦福大学 HIV-1 耐药基因型检测数据分析和解释系统结果显示, 主要为 CRF_01AE 亚型, 共 92 例 (74.2%); 其次为 B 亚型, 共有 14 例 (11.3%); C 亚型和 BC 亚型分别各 7 例 (分别 5.65%); 另外还有 4 例为其它亚型。

2.4 耐药情况 将 124 例完整基因序列, 上传美国斯坦福大学 HIV-1 耐药基因型检测数据分析和解释系统结果显示, 77 例对反转录酶以及蛋白酶抑制剂有不同程度耐药; 其中对核苷类和非核苷类反转录酶抑制剂的耐药分别有 63 例 (50.8%) 和 74 例 (59.7%), 对蛋白酶抑制剂耐药 9 例 (7.3%); 具体情况见表 2、表 3、表 4。

表 2 124 例 HIV-1 毒株对核苷类反转录酶抑制剂的耐药程度

Tab. 2 Level of HIV-1 drug resistance for NRTIs

Drug	Susceptible		Potential resistance		Low-level resistance		Intermediate resistance		High-level resistance	
	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)
3TC	61	49.2	0	0	0	0	4	3.2	59	47.6
ABC	61	49.2	2	1.6	22	17.7	18	14.5	21	16.9
AZT	82	66.1	2	1.6	3	2.4	12	9.7	25	20.2
D4T	81	65.3	1	0.8	3	2.4	16	12.9	23	18.5
DDI	62	50.0	18	14.5	7	5.6	10	8.1	27	21.8
FTC	61	49.2	0	0	0	0	4	3.2	59	47.6
TDF	86	69.4	4	3.2	5	4.0	11	8.9	18	14.5

表 3 124 例 HIV-1 耐药毒株对非核苷类反转录酶抑制剂的耐药程度

Tab. 3 Level of HIV-1 drug resistance for NNRTIs

Drug	Susceptible		Potential resistance		Low-level resistance		Intermediate resistance		High-level resistance	
	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)
ETR	66	53.2	12	9.7	17	13.7	20	16.1	9	7.3
EFV	50	40.3	0	0	0	0	34	27.4	40	32.3
ETV	74	59.7	18	14.5	11	8.9	14	11.3	7	5.6
NVP	50	40.3	0	0	0	0	0	0	74	59.7

表 4 124 例 HIV-1 耐药毒株对蛋白酶抑制剂的耐药程度

Tab. 4 Level of HIV-1 drug resistance for PIs

Drug	Susceptible		Potential resistance		Low-level resistance		Intermediate resistance		High-level resistance	
	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)	Cases	Ratio(%)
ATV/r(A)	113	91.1	2	1.6	0	0	6	4.8	3	2.4
DRV/r(A)	119	96.0	2	1.6	2	1.6	1	0.8	0	0
FPV/r(A)	113	91.1	2	1.6	0	0	3	2.4	6	4.8
IDV/r(A)	113	91.1	2	1.6	0	0	2	1.6	7	5.6
LPV/r(A)	113	91.1	2	1.6	0	0	4	3.2	5	4.0
NFV(A)	113	91.1	0	0	1	0.8	1	0.8	9	7.3
SQV/r(A)	115	92.7	0	0	0	0	8	6.5	1	0.8
TPV/r(A)	117	94.4	0	0	5	4.0	2	1.6	0	0

2.5 主要耐药位点 核苷类反转录酶抑制剂主要耐药位点包括了 M184V、M41L、D67N、L70R、T219F、K219Q 等, 见表 5; 非核苷类反转录酶抑制剂主要耐药位点包括 K101E、Y181C、K103N、G190A

等, 见表 6; 对蛋白酶抑制剂基因主要耐药突变位点集中在 46、54、82、84 位密码子, 见表 7。

表 5 124例 HIV-1 耐药毒株中核苷类反转录基因区主要耐药位点

Tab. 5 NRTI major resistance mutations of HIV-1

Resistance mutations	Cases	Ratio(%)
M184V	53	42.7
M41L	10	8.1
D67N	22	17.7
K70R	15	12.1
T215F	15	12.1
K219Q	14	11.3

表 6 124例 HIV-1 耐药毒株中非核苷类反转录基因区主要耐药突变

Tab. 6 NNRTI major resistance mutations of HIV-1

Resistance mutations	Cases	Ratio(%)
K101E	13	10.5
Y181C	20	16.1
K103N	23	18.5
G190A	29	23.4
V108I	8	6.5

表 7 124例 HIV-1 耐药毒株中蛋白酶抑制剂基因区主要耐药位点

Tab. 7 PI major resistance mutations of HIV-1

Resistance mutations	Cases	Ratio(%)
M46I	9	7.3
I54V	5	4.0
V82A	6	4.8
I84V	3	2.4

3 讨 论

我国艾滋病抗病毒治疗起步较迟,但中国疾病预防控制中心的专家们早在2003年已经发现了HIV耐药毒株。HIV耐药的出现不仅使患者抗病毒治疗效果下降,乃至完全失败,更为重要的是,一个国家或地区全面开展艾滋病抗病毒治疗期间HIV耐药毒株的出现和流行,将带来严重的公共卫生问题。

目前越来越多的艾滋病患者接受抗病毒治疗。抗病毒治疗拯救了大批艾滋病患者的生命,提高了生活质量。福建省接受抗病毒人数从2005年开始启动免费抗病毒治疗时的100多人发展到2013年2 000多人。但是治疗人数的大量增加以及随着抗病毒治疗时间的延长,加上药物选择压力和HIV病毒本身的高突变率和快速复制等原因均可导致病毒遗传物质的药物靶基因发生突变,并逐渐替代野生毒株成为优势毒株导致耐药的产生^[4-5]。如果HIV

耐药毒株的出现并流行,并且不能提供充足的二线药物的现实的基础上,意味着被拯救的生命将再次面临死亡的危险,来之不易的病病毒治疗的成果将毁于一旦。

目前HIV-1耐药性检测的方法主要有基因型和表型检测两种方法。其中基因型因为其简单、快速、费用低等优点被国际上广泛运用于HIV-1耐药检测。国内同样也有很多省份开展HIV-1耐药基因型检测。我省从2008年开始对HIV-1病毒治疗失败艾滋病患者(病毒载量检测大于1 000 copy/mL)开展基因型耐药检测。颜萍萍等2008年研究已发现8例样本对NRTI及NNRTI表现出至少对3种药物高度耐药,常见的突变位点为G190A、K103N和M184V,造成对NVP和3TC的高度耐药^[6]。为了全面了解我省HIV-1耐药基因突变情况,本次研究综合分析2008—2013年福建省基因型耐药检测结果,发现226例病毒学治疗失败艾滋病患者中有77例表现对反转录酶和蛋白酶有不同程度耐药,其中主要对核苷类和非核苷类反转录酶抑制剂产生耐药,比例达到50.8%和59.7%,而对蛋白酶抑制剂耐药率较低,比为7.3%。研究发现的主要耐药位点突变情况与国内外其研究结果类似^[7],核苷类反转录酶抑制剂主要耐药突变包括了M184V、M41L、D67N、L70R、T219F、K219Q等,造成对3TC、AZT、D4T等不同程度耐药;非核苷类反转录酶抑制剂主要耐药突变包括K101E、Y181C、K103N、G190A等,造成对NVP和EFV不同程度耐药。

本次研究结果说明,福建省的耐药突变率还较低,但耐药性突变累积的现象有所增加,发现了一部分AIDS患者出现对反转录酶和蛋白酶抑制剂耐药情况,一旦耐药毒株成为优势毒株,就可能将带有耐药突变的毒株传播给未治疗的患者,因此,从未治疗过的患者也有可能耐药。因此应继续加强耐药性检测,及时评估治疗失败患者耐药性情况,为减少我省HIV-1病毒耐药株的传播,降低艾滋病患者的发病率和死亡率,制订预防耐药发生措施提供依据。

参考文献:

- [1] Ye S, Feng YL, Ke YF, et al. Analysis of results in antiviral treatment of AIDS patient[J]. China Trop Med, 2006, 30(7): 1143-1144. (in China)
叶晟,冯宇良,柯云峰,等.艾滋病现症病人抗病毒治疗效果分析[J].中国热带医学,2006,30(7):1143-1144.

参考文献：

- [1] Wilton S, Cousins D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in single tube[J]. PCR Methods Appl, 1992, 1(4): 269-273. DOI: 10.1101/gr.1.4.269
- [2] Awah-Ndukum J, Kudi AC, Bradley G, et al. Molecular genotyping of *Mycobacterium bovis* isolated from cattle tissues in the North West Region of Cameroon[J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(3): 829-836. DOI: 10.1007/s11250-012-0295-x
- [3] Mekibeb A, Fulasa TT, Firdessa R, et al. Prevalence study on bovine tuberculosis and molecular characterization of its causative agents in cattle slaughtered at Addis Ababa municipal abattoir, Central Ethiopia[J]. Trop Anim Health Prod, 2013, 45(3): 763-769. DOI: 10.1007/s11250-012-0287-x
- [4] Adesokan HK, Jenkins AO, van Soolingen D, et al. *Mycobacterium bovis* infection in livestock workers in Ibadan, Nigeria: evidence of occupational exposure[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(10): 1388-1392. DOI: 10.5588/ijtd.12.0109
- [5] Rodriguez-Campos S, Gonzalez S, de Juan L, et al. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis [J]. Infect Genet Evol, 2012, 12(4): 877-882. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.10.008
- [6] Chambers MA, Lyashchenko KP, Greenwald R, et al. Evaluation of a rapid serological test for the determination of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) found dead[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(3): 408-411. DOI: 10.1128/CVI.00424-09
- [7] Zhang XY, Hu XD, Yang JW. Application of interferon-Y testing and the comparative cervical skin test in herds infected with *Mycobacterium bovis*[J]. Chin J Zoonoses, 2010, 26(1): 53-56. (in Chinese)
- 张喜悦, 呼西旦, 杨经纬, 等. 干扰素试验及比较皮试在结核污染牛群的应用研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26 (1): 53-56.
- [8] Judith K, Leo S, Arend K, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(4): 9077.
- [9] Ian B. The story of bovine TB -- The attack of the clones[EB/OL]. (2014-04-03) [2014-04-15] <http://tacklingbovinetb.tumblr.com/post/47025052679/the-story-of-bovine-tb-the-attack-of-the-clones>.
- [10] McLernon J, Costello E, Flynn O, et al. Evaluation of mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (12): 4541-4545. DOI: 10.1128/JCM.01175-10
- [11] Zum MJ, Arriaga C, Barandiaran S, et al. Understanding the relationship between *Mycobacterium bovis* spoligotypes from cattle in Latin American countries[J]. Res Vet Sci, 2013, 94 (1): 9-21. DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.07.012
- [12] Ojo O, Sheehan S, Corcoran GD, et al. *Mycobacterium bovis* strains causing smear-positive human tuberculosis, Southwest Ireland[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(12): 1931-1934. DOI: 10.3201/eid1412.071135
- [13] Rodwel TC, Kapasi AJ, Moore M, et al. Tracing the origins of *Mycobacterium bovis* tuberculosis in humans in the USA to cattle in Mexico using spoligotyping[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14: 129-135. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.11.037
- [14] Veterinary Laboratory Agency. Specificity Trial of the BOVIG-AM IFN-Gamma Test in GB Cattle[EB/OL]. (2013-03-01) [2014-04-05] http://archive.defra.gov.uk/foodfarm/farmanimal/diseases/atoz/tb/documents/gifn_specificityreport.pdf.

收稿日期:2014-02-14;修回日期:2014-10-20

(上接第 333 页)

- [2] Violari A, Cotton MF, Gibb DM, et al. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV infected infants[J]. N Engl J Med, 2008, 359 (21): 2233-2244. DOI: 10.1056/NEJMoa0800971
- [3] Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2): 247-277. DOI: 10.1128/CMR.15.2.247-277.2002
- [4] Ma Y, Zhang F, Li H, et al. Monitoring HIV drug resistance using early warning indicators in china: results from a pilot survey conducted in 2008[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(S4): S300-S302. DOI: 10.1093/cid/cir1018
- [5] Jiao L, Li H, Li L, et al. Impact of novel resistance profiles in HIV-1 reverse transcriptase on phenotypic resistance to NVP
- [J]. AIDS Res treat, 2012, 2012(2): 1-8. DOI: 10.1155/2012/637263
- [6] Yan PP, Xie MR, Wu SL, et al. Evaluation of the effectiveness of anti-retroviral therapy on AIDS patients in Fujian province and the current status of their drug resistance pattern[J]. Chin J Zoonoses, 2008, 24(10): 896-900. (in Chinese)
- 颜萍萍, 谢美榕, 吴守丽, 等. 福建省艾滋病患者抗病毒疗效和耐药性检测分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2008, 24(10): 896-900.
- [7] Tam LW, Hogg RS, Yip B, et al. Performance of a World Health Organization first-line regimen (stavudine/lamivudine) in anti-retroviral-naïve individuals in a Western setting[J]. HIV Med, 2007, 8(5): 267-270.

收稿日期:2014-07-17;修回日期:2014-10-29