

湖南省 HIV-1 耐药警戒线调查

陈曦 邢辉 贺健梅 郑军 邹潇白 阮玉华 覃碧云 邵一鸣

【摘要】 目的 了解湖南省开展艾滋病抗病毒治疗以来, 年龄 < 25 岁新近感染 HIV-1 且未服抗病毒药者出现耐药毒株的变异情况。方法 通过横断面调查, 采集 15~24 岁 HIV-1 感染者的血清样本, 进行 HIV-1 pol 区耐药基因变异检测分析。结果 69 份有效样本中, 在 RT 区 1 份样本出现可以导致针对 NNRTIs 系列的 NVP、DLV 和 EFV 药物的高度耐药性的 K103N、V181C 的 2 个主要耐药突变, 1 份样本出现可以导致对 D4T 的低度耐药性和对 DDI 的潜在耐药性的 V75M 耐药突变。PR 区没有检测到高度耐药突变株。在 RT 区高度耐药株检出率为 2.9% (2/69), 说明湖南省 HIV 耐药株的传播仍处于低度范围内 (< 5%)。结论 表明现有的一线治疗方案是有效的, 个体病例尚不需要在治疗开始前进行耐药性检测。但也提示应该加强对早期感染者的耐药监测工作。

【关键词】 艾滋病病毒; 耐药监测; 抗病毒治疗; 艾滋病病毒警戒线调查

Study on the threshold of HIV-1 drug resistance in Hunan province CHEN Xi*, XING Hui, HE Jianmei, ZHENG Jun, ZOU Xiao-bai, RUAN Yu-hua, QIN Bi-yun, SHAO Yi-ming. *Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China

【Abstract】 **Objective** To survey the prevalence of HIV-1 drug resistance in patients newly diagnosed as HIV positive and who were younger than 25 years of age but had not received treatment with antiretroviral treatment (ART) in Hunan province. **Methods** Serum specimens of HIV infected individuals were collected and HIV-1 pol genetic mutations associated with drug resistance were identified with PCR and interpreted with Stanford HIV Drug Resistance Database. **Results** A total number of 69 patients whose HIV sequences were amplified successfully with 2 (2.9%) specimens appeared mutations associated with HIV-1 drug resistance in the reverse transcriptase region, including one as V75M and the other one as K103N and V181C. Data showed that the prevalence of drug resistance in Hunan was 2.9%. **Conclusion** The first line regimens of national ART seemed still effective. Most of the AIDS patients did not need to be tested on drug resistance status before starting ART. However, it is important to start HIV drug resistance surveillance in no time.

【Key words】 Human immunodeficiency virus-1; Drug resistance surveillance; Antiretroviral treatment; HIV drug resistance threshold survey

2003 年以来, 我国开始启动抗病毒治疗, 至 2007 年 10 月底, 全国正在接受抗病毒治疗的艾滋病患者达到 31 849 例^[1]。同年底湖南省启动了艾滋病抗病毒治疗, 全省累计接收抗病毒治疗的艾滋病患者达到 738 例, 目前仍然继续治疗的患者为 511 例。根据国际上抗病毒治疗的经验, 在开展抗病毒治疗 3 年以上的地区, 可能会出现 HIV 耐药株。为了在广泛开展抗病毒治疗资源有限的国家评价 HIV 耐药株的传播情况, WHO 推荐了一个资源最小化的 HIV 警戒线调查方法 (HIV drug resistance

threshold survey, HIVDR-TS)。其设计思想是: 在被调查地区一个或临近的几个 HIV 检测点以 6 个月内连续检测发现的 60~70 名 < 25 岁的感染者作为研究对象, 以血浆或血清作为检测样本, 通过基因型耐药检测确定耐药突变的类型, 根据这些序列对每一类药物的耐药情况, 将 HIV 耐药传播的水平分为三类 (低传播水平: < 5%; 中等传播水平: 5%~15%; 高传播水平: ≥ 15%)^[2]。参照这一方案于 2007 年 8 月与中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 以湖南省作为试点单位, 进行我国 HIV 耐药毒株的传播调查。

资料与方法

1. 样本来源: 所有 86 份样本均经过湖南省疾病预防控制中心艾滋病确证实验室采用蛋白印迹试验

基金项目: 世界卫生组织-瑞典国际开发合作署资助项目 (WP/2006/CHN/HIV/1.2/002/03.03.AW.01); 国家高科技“863”课题资助项目 (2006AA02Z418)

作者单位: 410005 长沙, 湖南省疾病预防控制中心 (陈曦、贺健梅、郑军、邹潇白、覃碧云); 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心 (邢辉、阮玉华、邵一鸣)

确认为 HIV 抗体阳性的 HIV 感染者,其中 68 份为 HIV 确认实验剩余的血清样本,18 份为血浆样本。所有样本为 8-10 月间采集,个案流行病学资料齐全,年龄范围在 2~25 岁之间,平均年龄为 21.6 岁,均为首次确诊为 HIV 感染,且为非艾滋病患者,从未使用过抗病毒药物。按照生物安全要求,由专人送到中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心进行 HIV 耐药检测。86 份送检血清样本中 7 份因样本体积达不到检测标准未进行检测,最终用于耐药检测的有效样本数为 79 份。

2. 检测方法:

(1) HIV-1 RNA 的提取:采用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒,参照德国 QIAGEN 公司的操作说明提取 HIV-1 病毒 RNA。

(2) RT-PCR 测序及巢式 PCR:采用巢式 PCR 引物对目的基因片段(主要为 pol 区的反转录酶部分)进行扩增,外侧上游引物为 MAW-26:5'-TGG AAA TGT GGA AAG GAA GGA C-3';外侧下游引物为 RT-21:5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3';内侧上游引物为 Pro-1:5-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3';内侧下游引物为 RT-20:5'-CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C-3'。总扩增长度为 1300 bp^[3]。

(3) 产物纯化及序列测定:以 Pro-1(5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3',正向);RTA(5'-GTT GAC TCA GAT TGG TTG CAC-3',正向);RTB(5'-CCT AGT ATA AAC AAT GAG ACA C-3',正向);RT-20(5'-CTG CCA GTT CTA GCT CTG CTT C-3',反向);ProCl-down(5'-CCC TGC TGG GTG TGG TAT TCC-3',反向),作为测序引物。使用德国 QIAGEN 公司 QIAquick Gel Extraction Kit 对 PCR 产物进行纯化后,利用 ABI 3100 测序仪按照仪器操作说明,进行核苷酸序列测定。

3. 亚型及耐药性分析:序列测定后首先使用 Vector NTI 软件包中的 Contig Express 组件进行拼接,然后用 Bioedit 软件进行多序列比对和序列清理

后,得到包括蛋白酶(PR)区 1~99 氨基酸和反转录酶(RT)区 1~272 氨基酸的 pol 基因区序列。样本的亚型结果采用 Phylip 软件对 pol 基因区(共 1113 bp)构建 neighbour-joining(N-J)系统进化树确定。并将得到的序列与 Stanford HIV Drug Resistance Database 中的参考株序列进行比较,分析与已知耐药序列的关联情况。

结 果

1. 基因型耐药性检测:所有样本均用核酸提取仪进行 RNA 提取,用 In-house 基因型耐药检测方法进行检测。79 份样本 PCR 扩增阳性为 71 份,阳性扩增样本中有 2 份测序失败,最终得到有效 pol 区序列 69 个。

2. HIV 耐药株流行情况:

(1) RT 区耐药突变:69 个序列中有 5 个发生针对核苷类反转录酶抑制剂(NRTIs)的耐药突变,其中 V75M(1 例)、V118I(1 例)、T69S(3 例)。只有 V75M 突变为主要耐药突变,可以导致对 D4T 的低度耐药性和对 DDI 的潜在耐药性。有 3 个发生针对非核苷类反转录酶抑制剂(NNRTIs)的耐药突变,其中 K103N、V181C(1 例),K103R(2 例)。

(2) PR 区耐药突变:所有序列中没有发生针对 PR 区的主要耐药突变,仅有次要耐药突变出现:如 A71V(2 例)、L101(1 例)、L10I, A71T(1 例),这些耐药突变还不会导致对现有蛋白酶抑制剂(PI)的耐药性。因此 PR 区耐药株的传播率为 0,属于低度传播范围(<5%)。

(3) 亚型:根据 pol 区亚型分型结果,样本中 CRF01-AE 亚型所占比例最大,为 73.9%(51/69),其次为 B 亚型 10.1%(7/69)、C 亚型 8.7%(6/69)、B/C 重组亚型 7.2%(5/69)。

3. 感染途径和 HIV-1 亚型与耐药基因突变的关系:耐药基因型突变的样本在注射吸毒、性途径和母婴传播等感染途径中均有发现,并且在 CRF01-AE、B 和 C 亚型中均有发现(表 1)。

表1 耐药突变位点在各 HIV-1 亚型样本及不同感染途径中的分布

感染途径	CRF01-AE 亚型			B 亚型			C 亚型			B/C 重组亚型		
	份数	NRTIs	PR	份数	NRTIs	PR	份数	NRTIs	PR	份数	RT	PR
注射吸毒	15	1(T69S)	-	0	-	-	1	-	-	4	-	-
异性性传播	32	1(V75M) 1(L101, A71T) 1(V1181)	-	5	1(K103N, V181C) 1(K103R)	1(A71V)	4	2(T69S)	1(L101)	1	-	-
同性性传播	2	-	-	0	-	-	0	-	-	0	-	-
母婴传播	2	-	1(A71V)	2	1(K103R)	-	1	-	-	0	-	-
合计	51	3	2	7	3	1	6	2	1	5	-	-

讨 论

HIV 由于其自身的特征,在感染的过程中或在药物的选择压力下,极易发生基因突变从而导致多种亚型和对抗反转录病毒药物耐受病毒株出现,影响临床治疗效果^[4]。选择低年龄组作为监测对象主要考虑是这些人的 HIV 高危行为一般都是发生在近期,可能是近期发生的感染,可作为病毒株传播情况的研究对象。而且由于 HIV 感染时间较短,没有接受抗反转录病毒药物治疗,体内检测出的 HIV 的特征与传染源个体的 HIV 特征应该基本一致,基因发生变异的概率也相对较低,可以很好地起到预警作用。

从本研究结果可以看出, pol 基因的 RT 区出现了 K103N、V181C 的 2 个耐药突变,这两个突变为主要耐药突变,可以导致针对 NNRTIs 系列的 NVP、DLV 和 EFV 药物的高度耐药性。在 RT 区出现的另一个突变 V75M 也是主要耐药突变,可以导致对 D4T 的低度耐药性和对 DDI 的潜在耐药性。PR 区未检测到高度耐药突变株,仅出现 A71V、L101I、L101I、A71T 等次要耐药突变,这些耐药突变还不会导致对现有 PI 的耐药性。那么,在 RT 区高度耐药株检出率为 2.9% (2/69), PR 区高度耐药检出率为 0%,说明湖南省 HIV 耐药株的传播仍处于低度范围内 (< 5%)。而且我们的监测样本量大于 WHO 推荐的最低 47 份有效序列的要求,可以满足 HIV 耐药毒株传播监测的分析。表明现有的一线治疗方案仍是有效的,个体患者尚不需要在治疗开始前进行耐药性检测。这一结果与先前我们开展未接受抗病毒药物治疗者耐药基因变异研究发现没有出现高度耐药突变结果基本吻合^[5]。

本研究根据 pol 区亚型分型结果,样本中 CRF01-AE 亚型所占比例最大,为 73.9% (51/69),其次为 B 亚型 10.1% (7/69)、C 亚型 8.7% (6/69)、B/C 重组亚型 7.2% (5/69),从感染途径分析可发现,CRF01-AE 成为主要亚型,且在高危人群中普遍存在。B、C 亚型则主要存在于异性接触感染人群,B/C 重组亚型则以注射吸毒者为主。这一结果与我们在 2002-2003 年间开展的根据 env 区亚型分型结果比较,CRF01-AE 为优势亚型株没有变化,分离到的 C 亚型是过去没有分离到的新亚型,过去分离到的 B'、A、D 3 个亚型,此次没有分离到^[6]。结果仍然表明,HIV-1 在湖南省仍然呈现多亚型分布。

耐药基因型突变的样本在 CRF01-AE、B 和 C 亚型中均有发现,没有亚型的特异性现象。

目前,国内可获得用于艾滋病患者抗反转录病毒治疗的药物属于 NRTIs 类的有:齐多夫定 (AZT、ZDV)、司他夫定 (D4T)、去羟基苷 (DDI)、拉米夫定 (3TC) 双汰芝 (AZT + 3TC),属于 NNRTIs 类的有:依非韦伦 (EFV、施多宁)、奈韦拉平 (NVP),属于 PI 只有茚地那韦 (IDV)。我国所有的一线抗病毒治疗方案均包含 2 种 NRTIs 类药物和 1 种 NNRTIs 类药物,具体标准是未接受抗病毒治疗患者的一线抗病毒治疗首选方案为:AZT 或 D4T + 3TC + NVP,当患者出现对 NVP 不能耐受,改为 AZT 或 D4T + 3TC + EFV^[7]。我国治疗的患者中总耐药突变率已达到 17%^[1]。从湖南省的情况看,耐药株的检出率还很低。但是由于我国地域广泛、HIV 流行特征差异显著、开展抗病毒治疗时间差异,实际情况更加复杂,因此,此结果并不能代表全国情况。我国政府实施的免费治疗策略,随着艾滋病流行的加剧,接受抗病毒治疗者也随之增多。长期反复使用相同的几种药物,加上治疗者存在服药依从性差的情况,很容易出现对现采用的一线治疗药物的耐药。可以预见的是,随着接受抗病毒治疗病例的增多,不久的将来 HIV 耐药毒株也会随之增多,并在人群中逐步扩散流行,给治疗带来新的、更严峻的挑战。采取早期预警监测是疾病监测经常采用的策略,及早在全国开展 HIV 耐药早期预警监测,将会更好地为临床选择药物、提高患者的生存质量和制订治疗方案提供依据。

参 考 文 献

- [1] 国务院防治艾滋病工作委员会办公室,联合国艾滋病中国专题组. 中国艾滋病防治联合评估报告. 2007:23-24.
- [2] WHO. Guidelines for surveillance of HIV drug resistance. 2003: 30-36.
- [3] Shafer RW, Warford A, Winters MA, et al. Reproducibility of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease and reverse transcriptase sequencing of plasma samples from heavily treated HIV-1-infected individuals. J Virol Methods, 2000, 86(2): 143-153.
- [4] Jay A Levy. HIV and the pathogenesis of AIDS. (艾滋病病毒与艾滋病的发病机制). 邵一鸣,译. 北京:科学出版社,2000:289-290.
- [5] 贺健梅,陈曦,郑晓红,等. 湖南省未接受抗病毒治疗的 HIV-1 毒株耐药基因变异研究. 实用预防医学, 2007, 14(4): 1260-1262.
- [6] 陈曦,邢辉,贺健梅,等. 湖南省 HIV-1 分子流行病学研究. 实用预防医学, 2005, 12(3): 483-485.
- [7] 编写组. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:25-35.

(收稿日期:2008-04-14)

(本文编辑:张林东)