

云南省德宏州 HIV-1 新近感染者 基因型耐药分析

王慧杰 段松 项丽芬 杨跃诚 涂源泉 王继宝 姚均 齐军 蒋岩

【摘要】 目的 了解云南省德宏州 HIV-1 新近感染者中耐药的发生情况。方法 收集德宏州 2006 年 7-12 月期间所有的 HIV-1 阳性样品共 1048 份,使用 BED 捕获酶免疫试验进行新近感染检测,共检出新近感染样品 101 份;使用 Bayer 公司的 TruGene 方法进行基因型耐药检测,应用所有样品的序列构建系统进化树以确定样品的亚型。结果 云南省德宏州 HIV-1 新近感染者中的耐药发生率为 6.25% (4/64),样品 PR 区中 M36I/V、L63P 和 H69K 等次要耐药突变出现的频率较高,分别占 81.25%、70.31% 和 65.63%; HIV-1 流行株以 C/CRF07_BC/08_BC 为主,占 65.63% (42/64)。结论 德宏州 HIV-1 新近感染者中耐药的流行处于中等水平;有必要加强 HIV-1 的耐药监测。

【关键词】 艾滋病病毒; 新近感染者; 基因型耐药

Study on the drug resistance situation among recently infected HIV-1 patients in Dehong WANG Min-jie*, DUAN Song, XIANG Li-fen, YANG Yue-cheng, TU Yuan-quan, WANG Ji-bao, YAO Jun, QI Jun, JIANG Yan. *Cancer Hospital & Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100027, China

Corresponding author: JIANG Yan, Email: jiangyan03@263.net; QI Jun, Email: qijun5610@126.com

【Abstract】 Objective To study the HIV-1 drug resistance (DR) situation among newly infected persons in Dehong. Methods 1048 HIV-1 positive blood samples from July to December in 2006 from Dehong prefecture of Yunnan, were collected. HIV drug resistance were tested using TruGene in newly infected people that were distinguished with BED-CEIA, while the subtype were determined with phylogenetic analysis using a set of reference sequences available on the Los Alamos Database. Results Of sixty-four successfully analyzed samples, drug resistance mutations were detected in 4 samples with the resistance rate as 6.25%. Minor mutation in PR region such as M36I/V, L63P and H69K appeared frequently and the rates were 81.25%, 70.31% and 65.63% respectively. The predominantly prevalent strains were seen as C/CRF07_BC/08_BC (65.63%, 42/64) in this study. Conclusion The prevalence of genotypic drug resistances in HIV-1 recent infections in Dehong prefecture appeared to be at moderate level. Drug-resistance surveillance program among HIV-1 infections should be continued and strengthened.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; New recent infections; Genotypic resistance

高效抗反转录病毒治疗(HAART)开创了 HIV/AIDS 治疗的新纪元,它能延长 HIV 感染者的生命并提高他们的生活质量^[1]。然而,日益严重的 HIV 耐药在很大程度上影响 HAART 的疗效,并有可能使少数患者陷入无药可用的危险境地^[2],在 HIV 新近感染者中耐药基因的传播引起越来越多的关注。

本研究对云南省德宏州未接受过 HAART 的 HIV-1 新近感染人群进行基因型耐药检测,旨在了解该地区 HIV-1 新近感染人群的耐药流行状况。

材料与方法

1. 样品收集与新近感染样品的判定:收集云南省德宏州 2006 年 7-12 月 AIDS 常规监测体系中新诊断的 HIV-1 感染者样品共 1048 份,全部经免疫印迹(Western blot, WB)或替代策略确认^[3]。所有阳性样品分装后保存于 -80℃ 待检,样品均采用冷链运输。采用 Calypte 公司的 BED 捕获酶免疫试验(BED-CEIA)方法完成新近感染检测^[4,5]。

2. RNA 提取:取 140 μl 血浆,使用德国 Qiagen

作者单位:100027 北京,中国医学科学院肿瘤医院(王慧杰、齐军);云南省德宏州疾病预防控制中心(段松、项丽芬、杨跃诚、王继宝);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心国家艾滋病参比实验室(涂源泉、姚均、蒋岩)

王慧杰与段松同为第一作者

通讯作者:蒋岩, Email: jiangyan03@263.net; 齐军, Email: qijun5610@126.com

公司试剂盒(QIAamp RNA Blood Mini Kit)严格按照说明书要求提取 RNA。

3. 基因型耐药检测:使用通过 FDA 认可的 Bayer TruGene HIV-1 OpenGene DNA sequencing System 进行基因型耐药检测。首先是通过一轮 RT-PCR 反应得到长度 1318 bp 的 *pol* 区片段,再分别通过 4 个模块的测序反应(CLIP 反应)分别得到蛋白酶区(PR)和反转录酶区(RT)的序列;其中通过 PR 和 P2 模块得到 PR 区长度为 288 bp 的序列(4~99 密码子),通过 RT beginning(38~142 密码子)和 RT middle(138~247 密码子)模块得到 RT 区长度为 630 bp 的序列(38~247 密码子)。最后,根据 Bayer 公司提供的基因型耐药突变解释规则[DR 3.7 IVD (2006/07/27) Guidelines 11.0 (2005/12/15)]生成临床耐药报告和突变位点报告。临床耐药报告将样品的耐药程度分为耐药、可能耐药和无耐药发生三种^[6]。

4. 序列分析:首先从洛斯阿拉莫斯 HIV 核酸序列库(<http://www.hiv-web.lanl.gov>)得到 HIV 亚型参考株序列;然后使用 BioEdit 软件完成样品序列的拼接和校对,并与标准株序列进行比对;最后用 MEGA(3.1 版)软件构建系统进化树确定样品的亚型。

5. 实验室质量控制:国家艾滋病参比实验室(NARL)自 2006 年起参加美国疾病预防控制中心(CDC)组织的每年两次的“HIV 新近感染检测(BED-CEIA 法)”能力验证,成绩均为合格;同时,NARL 自 2005 年起参加美国 CDC 委托 RUSH 大学组织的每年两次的“HIV 基因型耐药检测(TruGene 法)”能力验证,成绩均为合格。在核酸提取及耐药检测过程中,使用美国 CDC 提供的能力验

证样品作为室内质控品。

结 果

1. 样品检测情况:云南省德宏州 2006 年 7-12 月 HIV 常规监测系统中新诊断的 1048 份 HIV-1 阳性样品中,经 BED-CEIA 检测共 101 份判为新近感染。有 13 份因样品量不足 100 μ l 无法完成核酸提取,其余 88 份样品中,共 67 份成功进行核酸提取、扩增以及基因型耐药性检测,成功率 76.14% (67/88)。经序列比对和流行病学调查,67 份样品中再次排除 3 份重复检测样品,故完成耐药检测的样品共 64 份。

2. 流行特征:64 例 HIV-1 新近感染者中男性 35 例,女性 29 例,已婚者 40 例;平均年龄 30 岁;在感染途径方面,通过吸毒感染的有 25 例,性行为感染 24 例,其他途径感染 15 例。调查显示,64 例均无 HAART 史。采用系统进化树对 *pol* 区序列的基因亚型分析,64 例样品以非 B 亚型为主,其中 C/CRF07_BC/08_BC 为该地区的优势流行株,占 65.63%。

3. 耐药性分析:根据 TruGene OpenGene System 提供的临床耐药报告,有 4 份样品对 NRTI/NNRTI 类药物耐药,由此得到该地区 HIV 新近感染人群耐药发生率为 6.25% (表 1);另外,还有 6 份样品对 PI 类药物可能耐药。发生耐药的 4 例感染者中,3 例为 B 亚型,1 例为 C 亚型。对 64 份样品耐药位点突变情况进行统计分析:样品 PR 区次要耐药突变出现的频率相当高,M36I/V、L63P 和 H69K 突变发生频率分别占 81.25%、70.31% 和 65.63%。RT 区耐药突变出现频率相对较低(表 2)。

表 1 德宏州 HIV-1 新近感染者样品中发生耐药状况 ($n = 64$)

样品编号	耐药突变		耐药发生情况
	PR 区	RT 区	TruGene
DH-17	L63P A71V V77I	M41L V75TIA K103N V108I V118I M184V T215Y	NRTIs:3TC,d4T,FTC(耐药); AZT,ddI,ABC,TDF(可能耐药) NNRTIs:DLV,NVP,EFV(耐药)
DH-40	M36I/V L63P H69K	K101E	NNRTIs:NVP(耐药); DLV(可能耐药)
DH-73	L101 M36I L63P H69K V77I	E44D T69D V108I V179E Y181C G190A L210W T215Y	NRTIs:AZT,d4T(耐药); ddI,ABC,TDF(可能耐药) NNRTIs:DLV,NVP,EFV(耐药)
DH-77	L101 L63P V77I	M41L E44D T69D V108I V179E Y181C G190A L210W T215Y	NRTIs:AZT, d4T, ddI, TDF(耐药); ABC(可能耐药) NNRTIs:DLV,NVP(耐药); EFV(可能耐药)
发生耐药的样品数(耐药发生率)			4(6.25%)

表2 德宏州 HIV-1 新近感染者中耐药突变发生状况 (n = 64)

PR 区 耐药突变	突变 例数	百分比 (%)	RT 区 耐药突变	突变 例数	百分比 (%)
L10I	2	3.13	M41L	2	3.13
I13V	8	12.50	E44D	2	3.13
G16E	1	1.56	T69D/N	2	3.13
K20R/I	3	4.69	V75A/T	1	1.56
M36I/V	52(38 + 14)	81.25	K101E/Q	2	3.13
D60E	3	4.69	K103N	1	1.56
L63P	45	70.31	V108I	3	4.69
H69K	42	65.63	V118I	2	3.13
A71V	6	9.38	V179D/E	2	3.13
T74S	1	1.56	Y181C	2	3.13
V77I	4	6.25	M184V	1	1.56
L89M	25	39.06	G190A	2	3.13
			L210W	2	3.13
			T215Y/S	3	4.69

讨 论

第一个抗 HIV 药物齐多夫定(AZT 或 ZDV)在 1987 年 3 月经美国 FDA 批准上市,由此改变了 AIDS 无药可医的局面。1989 年在接受治疗的 HIV 感染者中分离到 AZT 耐药变异株^[7];1993 年又报道 1 例感染 AZT 原发耐药株的 HIV 新近感染者,并首次证实 HIV 耐药株在 HIV 感染者中的传播^[8]。在新感染未经 HAART 的 HIV 感染者中,尤其是 HIV 新近感染者中适时开展耐药突变检测,对于指导 HAART 方案的制定、提高 HAART 的临床疗效等具有重要的战略意义^[9-12];这方面的研究也成为欧美等国家 AIDS 领域中研究热点。欧美国家多项研究结果表明,HIV-1 新近感染者中耐药发生率在 8.0%~24.1%,多重耐药发生率为 2.5%~13.2%,且往往显著高于同期未经治疗的 HIV-1 长期感染者中耐药水平;HAART 在改善 AIDS 临床疗效的同时,还有使耐药发生水平增高的趋势,即 HIV 的耐药呈逐年增高的趋势^[13-19]。开展 HIV 耐药监测已迫在眉睫。

中国政府自 2003 年出台 AIDS 治疗“四免一关怀”政策后,已经陆续在全国范围内开展免费抗 HIV 治疗^[20];多项研究显示,在四川、东北、河南和广东等地开展和未开展 AIDS 抗病毒治疗的感染者或患者均存在不同程度的耐药或继发耐药变异^[21-23]。但是,由于技术等多方面原因的限制,除队列观察方法外,我国此前尚缺乏有效识别 HIV-1 新近感染的方法,因此很难在 HIV-1 新近感染者中开展耐药监测。BED-CEIA 是美国 CDC 推荐、目前最被公认的检测 HIV-1 新近感染的最新实验室方法,

能够在群体水平上识别出 HIV-1 新近感染者^[4,24],从而为在群体水平上监测 HIV-1 新近感染者耐药提供技术上的保证。由于 BED-CEIA 等实验室方法的简便易行,在多个发达国家被广泛用于 HIV-1 耐药毒株传播的监测,并在一定程度上得到了 WHO 的认可^[15,16,25,26]。NARL 引进的 BED-CEIA,通过在几个地区的研究表明该方法同样适用于中国 HIV-1 感染人群^[4]。

自 1989 年云南省瑞丽市静脉吸毒人群中首次发现 146 例 HIV-1 感染者以来^[27],就一直属于我国 HIV 流行最严重的地区之一^[28,29],德宏州是多个 HIV-1 亚型进入云南省乃至中国大陆的第一站^[29];特殊的地理位置,使得在德宏州 HIV-1 新近感染者中进行的耐药水平监测具有重要的意义。通过对该地区 64 例 HIV-1 新近感染者基因型耐药检测,其耐药流行率为 6.25%;与发达国家 HIV-1 新近感染者相比^[13-19],耐药流行水平相对较低;耐药发生率与柬埔寨报道的数据接近^[30]。按照 WHO 耐药监测指南,耐药发生率超过 5%,达到中等程度^[26];提示,应进一步在该地区加强耐药株传播监测,并扩大监测地区;同时,还应加大对治疗患者的督管,提高服药依从性。

我国推荐使用的 ART 方案多为两种 NRTIs 联合一种 NNRTIs 或联合一种 PIs 类药物;德宏州目前广泛使用的 ART 方案中,主要药物包括 AZT、3TC、d4T、ddI、EFV、NVP 以及 IDV,发生耐药的 4 份样品对上述一种或多种药物出现耐药。进一步分析后发现,发生耐药的 4 例 HIV 感染者中,男女各 2 例,除 1 例静脉吸毒男性是通过共用针具感染的以外,其余 3 例感染者均是通过性途径感染的。该结果提示:一方面,通过禁毒教育以及美沙酮替代治疗,共用针具感染在一定程度上得到控制,但性安全教育方面还需进一步加强,以切断 HIV 传播途径;另一方面,应进一步在该地区 HIV-1 感染者,尤其是新感染者中加大耐药的监测力度,及时发现耐药株的流行。

PR 基因区次要突变单独或者联合出现都不能够导致治疗的失败,但与主要耐药突变同时出现可能会提高毒株的适应性从而使其复制水平提高^[13]。根据 TruGene 的耐药突变位点报告,64 份 HIV-1 新近感染样品中,除 1 例 B 亚型感染者外,其余 98.44% 的样品均在 PR 区检出一种或多种 PI 次要耐药突变;以 M36I/V、L63P 和 H69K 最常见,出现

的频率分别为 81.25%、70.31% 和 65.63%。M36I/V 在非 B 亚型中很常见,其对药物的影响尚不明确;L63P、H69K 和 V77I 均被视为常见的多态性改变,尤其是在接受 PI 治疗的感染者中更为常见^[12]。目前广泛使用的几种基因型耐药分析方法中,均以 B 亚型作为参考毒株;而本研究中,感染者以非 B 亚型为主,占 81.25%,且未发现 PI 类耐药的发生,故推断 PR 区此类次要突变高频率的出现可能与我国的流行毒株有关。我国的 HAART 方案主要以 NNRTIs 和 NRTIs 类药物为主;这种广泛出现的 PR 基因区次要耐药突变,对我国 HIV-1 PI 耐药流行株产生以及传播的影响到底有多大,尚待进一步研究证实。

国外多项研究显示,HIV-1 新近感染者中的耐药流行率往往显著高于未接受 ART 的长期感染者,可能由于长期感染者的感染时间大多发生在几年前,那时 ART 尚未大规模的开展;此外,HIV-1 在药物选择性压力去除后发生“返祖突变”^[13-19]。在德宏州这样一个开展 HAART 已经 3 年多,接受 HAART 的 AIDS 患者众多的地区,HIV-1 新近感染者中的耐药流行率为 6.25%;可以初步推断,目前我国未治疗 HIV-1 感染者的整体耐药流行率应低于 5.0%,仍处在相对较低的流行水平,该推断也与此前文献报道的约 4.5% 的耐药流行水平相吻合^[21-23]。

参 考 文 献

- [1] Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1998, 338(13):853-860.
- [2] Sabin CA, Hill T, Lampe F, et al. Treatment exhaustion of highly active antiretroviral therapy (HAART) among individuals infected with HIV in the United Kingdom: multicentre cohort study. *BMJ*, 2005, 330(7493): 695-699.
- [3] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2004 年). 2004:8.
- [4] 王慧杰, 蒋岩, 韩梅, 等. 检测 HIV-1 新近感染的 BED 捕获酶免疫实验(BED-CEIA)的重复性和稳定性评价. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(4):305-308.
- [5] Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18(4):295-307.
- [6] Trugene HIV-1 Genotyping Training Program. Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, 2004.
- [7] Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science*, 1989, 243(4899):1731-1734.
- [8] Erice A, Mayers DL, Strike DG, et al. Primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med*, 1993, 328(16):1163-1165.
- [9] WHO. Guidelines for surveillance of HIV drug resistance [OL]. Available at <http://www.who.int/hiv/drugresistance/en/>.
- [10] The European HIV Drug Resistance Guidelines Panel. European HIV Drug Resistance Guidelines 2006 update [OL]. Available at <http://www.kuleuven.be/regal/cev/links/European-drug-guidelines/index.html>.
- [11] Hirsch MS, Brun-Vézinet F, Clotet B, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society USA panel. *Clin Infect Dis*, 2003, 37(1):113-128.
- [12] DHHS. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents [OL]. March 23, 2004. Available at <http://AIDSinfo.nih.gov>.
- [13] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*, 2002, 347(6):385-394.
- [14] Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA*, 2002, 288(2):181-188.
- [15] Shet A, Berry L, Mohri H, et al. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006, 41(4):439-446.
- [16] Jayaraman GC, Archibald CP, Kim J, et al. A population-based approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections: results from the Canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006, 42(1):86-90.
- [17] Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 40(5):505-511.
- [18] UK Group on Transmitted of HIV Drug Resistance. Time trend in primary resistance to HIV drug in the United Kingdom: multicentre observational study. *BMJ*, 2005, 331(7529):1368-1373.
- [19] Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: Implications for clinical management. *J Infect Dis*, 2005, 192(6):958-966.
- [20] 国务院防治艾滋病工作委员会办公室和联合国艾滋病中国专题组. 2007 年中国艾滋病防治联合评估报告 [OL]. 2007-12-1. Available at <http://www.chinaaids.cn/>.
- [21] 杨坤, 李敬云, 鲍作义, 等. 河南省 45 例未经治疗的艾滋病患者蛋白酶和逆转录酶基因型耐药性检测与系统发生分析. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(5):351-355.
- [22] 王慧杰, 姚均, 蒋岩. HIV 新近感染者耐药的现状与耐药的检测方法. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(2):182-184.
- [23] Han X, Zhang M, Dai D, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23(3):357-364.
- [24] Lee LM, McKenna MT. Monitoring the incidence of HIV infection in United States. *Public Health Rep*, 2007, 122 Suppl: S72-79.
- [25] Truong HM, Grant RM, McFarland W, et al. Routine surveillance for the detection of acute and recent HIV infections and transmission of antiretroviral resistance. *AIDS*, 2006, 20(17):2193-2197.
- [26] WHO. Protocol for evaluation of transmitted HIV drug resistance using specimens from HIV sentinel serosurveys in resource-limited settings [OL]. Available at <http://www.who.int/hiv/drugresistance/en/>.
- [27] 马瑛, 李祖正, 张开祥, 等. 首次在我国吸毒人群中发现艾滋病病毒感染. *中华流行病学杂志*, 1990, 11(3):184-185.
- [28] 陆林, 贾曼红, 张小波, 等. 1989-2003 年云南省艾滋病流行态势分析. *中华预防医学杂志*, 2004, 38(5):309-312.
- [29] Yang R, Xia X, Kusagawa S, et al. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan province of China. *AIDS*, 2002, 16(10):1401-1407.
- [30] Ly N, Recordon-Pinson P, Phoung V, et al. Characterization of mutations in HIV type 1 isolates from 144 Cambodian recently infected patients and pregnant women naive to antiretroviral drugs. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21(11):971-976.

(收稿日期:2008-04-23)

(本文编辑:尹廉)