

浙江省 2004—2007 年 HIV-1 亚型 CRF01_AE 流行毒株的基因型耐药分析

姚亚萍 辛若雷 徐云 杨介者 郭志宏 潘晓红 张佳峰 廖玲洁 邢辉

【摘要】 目的 了解浙江省 HIV-1 主要流行毒株 CRF01_AE 在治疗人群和未治疗人群中的基因型耐药变异情况。方法 选取 2004—2007 年间收集的 HIV 感染者样本,对 HIV 蛋白酶(PR)全长和部分反转录酶(RT)基因区进行 RT-PCR 扩增测序。分析 56 个感染 CRF01_AE 重组亚型样本的序列,其中未治疗组 43 例,已治疗组 13 例。使用 Stanford HIV Drug Resistance Database(<http://hivdb.stanford.edu>)的在线耐药序列分析软件 HIV DB 进行序列分析,寻找耐药相关突变位点。结果 未治疗组 CD₄⁺T 淋巴细胞中位数为 229 个/mm³,病毒载量 log₁₀ 中位数为 3.41,存在基因型耐药突变率的发生(5/43, 11.6%),检出包括 PR 区第 10、46、71 位和 RT 区的第 103、118 位氨基酸的耐药相关突变;治疗组 CD₄⁺T 淋巴细胞中位数为 186 个/mm³,病毒载量 log₁₀ 中位数为 3.91,13 例中有 8 例发生了基因型耐药变异(61.5%),检出 29 个基因型耐药突变。耐药率较高且多表现为交叉耐药。结论 浙江省未治疗的 HIV 感染者存在一定程度的基因型耐药突变;已开始治疗的 HIV 感染者基因型耐药突变发生率较高,而且交叉耐药现象广泛存在。

【关键词】 人免疫缺陷病毒;基因型耐药;变异

Genotypic drug-resistance of HIV-1 CRF01_AE in Zhejiang province, 2004—2007 YAO Ya-ping*, XIN Ruo-lei, XU Yun, YANG Jie-zhe, GUO Zhi-hong, PAN Xiao-hong, ZHANG Jia-feng, LIAO Ling-jie, XING Hui. *Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

【Abstract】 **Objective** To study the genotypic drug-resistant mutation among treat-naïve or treated patients infected with HIV-1 CRF01_AE in Zhejiang province during 2004—2007. **Methods** HIV-1 *pol* amplicons (PR + RT) from 13 treated and 43 treat-naïve patients were obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The sequences were analyzed for genotypic antiretroviral resistance through online tools (<http://hivdb.stanford.edu>). **Results** The median count of CD₄⁺T lymphocytes in 43 treat-naïve patients was 229 cells/mm³ and the median log₁₀ viral load was 3.41. Some drug-resistant mutations were seen in these samples including amino acid 10, 46, 71, in the genes of protease (PR) and 103, 118, in the genes of reverse transcriptase (RT) whereas twenty-nine resistance mutations in the genes of PR and RT were obtained in the 13 treated patients (8/13, 61.5%). The high prevalence of drug-resistant mutations was observed in patients who had been receiving HAART (high active antiretroviral therapy). Among them, cross drug resistance was dominant. Correspondingly, the median counts of CD₄⁺T lymphocytes and the log₁₀ viral load were 186 cells/mm³ and 3.91. **Conclusion** There was a low prevalence of genotypic drug-resistant mutations in treat-naïve patients, but higher drug-resistant mutation in treated patients. More attention should be paid to the transmission of drug-resistant HIV strains and the antiretroviral therapy recipe should be adjusted correspondingly for the development of ART drugs, intervention as well as clinical therapy programs.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Genotypic drug-resistance; Mutation

浙江省从 2004 年 3 月起开始在全省范围内开展免费抗反转录病毒治疗(ART)工作;截至 2007 年底累计治疗 259 例。HIV-1 CRF01_AE 是浙江省的主

要流行毒株,占 42%^[1],这说明浙江省 ART 的对象主要是感染 HIV-1 CRF01_AE 的患者。2007 年耐药基因监测结果也显示,在 146 份治疗病例样本中有 23 份能检出 HIV 并扩增出 *pol* 基因,其中 9 例感染 CRF01_AE。国内目前 ART 的基因型耐药研究针对 B 亚型比较多^[2-4],本研究对浙江省治疗人群和未治疗人群 HIV-1 CRF01_AE 毒株 *pol* 基因的基因型耐

药突变和原发耐药发生情况进行分析。

株序列来自 Los Alamos HIV 数据库。

材料与方法

结 果

1. 人口学特征: 选取 2004—2007 年间收集的 362 例 HIV 感染者样本进行 HIV 蛋白酶(PR)全长和部分反转录酶(RT)基因区的 RT-PCR 扩增和序列测定。对获得序列的 149 例样本进行亚型分析。对亚型判定为 CRF01_AE 的 56 例样本进行耐药基因分析。其中, 女性 15 例, 平均年龄 29 岁(19~53 岁); 男性 41 例, 平均年龄 37 岁(20~60 岁)。主要感染途径为性接触(45 例, 80.4%), 其中 12 例经男男性行为感染。其他感染途径包括: 注射吸毒传播 8 例, 经血液制品传播 1 例, 不详 2 例。有 43 例样本在采样前未经抗病毒治疗(未治疗组), 有 13 例样本采样前已接受抗病毒治疗(治疗组)。治疗组平均治疗时间为 12 个月(2~31 个月)。治疗方案均为 2 种核苷类反转录酶抑制剂(NRTIs)和一种非核苷类反转录酶抑制剂(NNRTIs) 配伍。

1. 一般情况: 未治疗组 CD₄⁺ T 淋巴细胞中位数为 229 个/mm³ (2~1032), 病毒载量 log₁₀ 中位数为 3.41 (2.23~5.28); 治疗组 CD₄⁺ T 淋巴细胞中位数为 186 个/mm³ (17~291), 病毒载量 log₁₀ 中位数为 3.91 (2.68~4.97)。

2. 亚型确定和病毒来源: 根据美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库报告的亚型结果并结合 Mega 软件构建的系统进化树确认毒株亚型(图 1), 56 个序列样本均与国际参考株 01_AE.th.cm240 聚集成簇, 而且 Bootstrap 值为 96%, 确定感染的毒株亚型为 CRF01_AE。进化图显示至少有 2 个不同的 CRF01_AE 毒株来源并在浙江省内通过性接触和吸毒途径造成播散, 形成 2 个大的单一系统进化簇(bootstrap 分别为 88%和 98%)。

2. CD₄⁺ T 淋巴细胞和病毒载量检测: 使用 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪对新鲜 EDTA 抗凝全血进行 CD₄⁺ T 淋巴细胞检测。血浆样本-80℃冻存, 载量检测采用生物梅里埃公司 NASBA HIV-1 QT 检测系统, 最低检测限为 50 cp/ml。

3. 未治疗组的耐药突变结果: 在未治疗的 43 例样本中, 有 5 例样本序列检出 7 个耐药突变位点(表 1)。其中 1 例样本(07CNZJ01411)存在 PR 抑制剂主要耐药相关突变(PI Major Resistance Mutation) M46I。该突变可能导致对 Atazanavir(ATV)、奈非那韦(Nelfinavir, NFV)的低度耐药, 对茚地那韦(Indinavir, IDV)、洛匹那韦(Lopinavir, LPV)、Fosamprenavir (FPV) 3 种药物的潜在耐药。其余 6 个突变为 PR 区第 10、71 位氨基酸的次要耐药相关突变(PI Minor Resistance Mutations)和 RT 区的第 103、118 位突变, 目前未观测到上述位点变异与 ART 耐药发生相关。

3. RNA 提取及目的片段的扩增: 生物梅里埃公司的 NUC LIS.ISOL.KIT AUTOMATED 试剂盒从 200 μl 血浆样本提取 HIV 病毒 RNA。以 RNA 为模板, RT-PCR 和 nPCR 方法扩增 HIV-1 pol 区 PR 和 RT 基因区(HXB2 nt 2147~3441, 1315 bp), 包括 PR 全长和 RT 前 300 氨基酸位点。扩增引物、反应体系见参考文献[5]。One-step RNA PCR kit(AMV)试剂盒和 EX-Taq 酶购于大连宝生物工程有限公司。

4. 扩增片段的鉴定和序列测定: nPCR 扩增片段经 1%琼脂糖凝胶电泳与标准 DNA Marker 比较后, 确定阳性扩增, 送上海生物工程技术服务有限公司测序。标准 DNA Marker 购于大连宝生物工程有限公司。

表 1 2004—2007 年浙江省治疗和未治疗组 HIV-1 CRF01_AE 感染者耐药位点突变分析

组别	耐药突变位点		
	PR 区	核苷类 RT 区	非核苷类 RT 区
未治疗组 (n=43)	M46I, L10I (2), A71T(2)	V118I	K103R
治疗组 (n=13)	M46I	M41L, A62V(2), K65R(2), D67N, T69D, V75I, V75T(3), M184V(2), M184I, Q151M, L210M, L210W, T215F	K101P, V108I, V179L, Y181C(2), G190A(2), Y188L (2)

注: 耐药位点后括号内的数字表示该位点出现的频次

5. 序列分析: 使用 NTI advance 9 软件包组件 contig express 对序列进行编辑、拼接和校正。使用 Bio-edit 软件的 CLUSTAL multiple alignment 对本序列和标准参考序列进行比对和清理。用 Mega 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树; 用美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库(<http://hivdb.stanford.edu>)在线工具进行 HIV 耐药相关突变情况和耐药性分析(版本号为 4.3.1, 最后更新 09/25/2007)。国际参考

4. 治疗组的耐药突变结果: 在治疗组的 13 例样本中有 8 例(占 61.54%)样本序列检出 29 个基因型耐药突变(表 1)。除 1 例样本(07CNZJD0601)检出 PR 区的 M46I 耐药性基因突变外, 其余 7 例样本检出的均为针对 NRTIs 和 NNRTIs 的耐药性基因突变

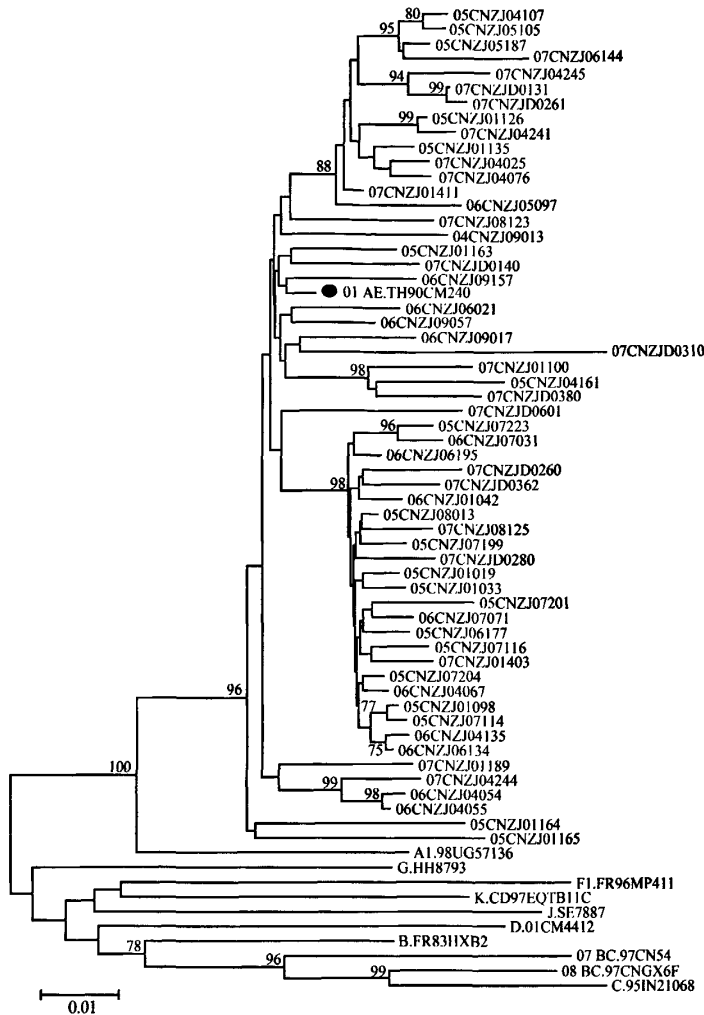


图1 2004—2007年浙江省 HIV-1 CRF01_AE 流行 pol 基因的系统进化树(NJ)分析

(表2), 并可能与耐药发生和 ART 治疗失败相关(除 1 例外, 其余 CD₄⁺ T 淋巴细胞计数均低于 200 个/ml)。在 RT 区发生的耐药基因突变导致交叉耐药严重。有 2 病例序列表现为对所有 NRTIs 出现中度以上的耐药。在非核苷类 RT 抑制区, 只有 1 例样本仍对 DLV 敏感, 其余样本均已经产生对所有 NNRTIs

低度以上的耐药作用。

讨论

ART 是控制 HIV 感染者/AIDS 患者体内病毒数量、改善患者生命质量和延长预期寿命的有效手段。但由此衍生的耐药性毒株的产生进而造成 ART 失败, 需要引起药物研发和实施 HIV 干预的注意。本研究提示, 在未治疗组中有 5 例样本检出基因型耐药性变异发生, 主要为 PR 区和 RT 区的次要耐药相关基因突变。这些突变的发生可能由于在病毒复制过程中 RT 的错误倾向 (error-prone) 造成的, 也可能来源于耐药性 HIV-1 毒株在人群间播散。其中 3 例样本的耐药位点出现在 PR 区域, 2 例样本的耐药突变位点出现在 RT 区。在 PR 区, 2 例样本检出次要耐药突变为 L10I 和 A71T。斯坦福耐药数据库注释表明大约 5% ~ 10% 的未治疗人群中存在 L10I, 与其他耐药位点共存时才会产生 PR 抑制剂的耐受作用; 1% ~ 2% 的未治疗人群中存在 A71T, 为多态性位点。在 RT 区, 约有 2% 未治疗人群中存在 V118I, 1% ~ 2% 的未治疗人群中存在 K103R。这 2 个耐药基因单独存在也不会对相应药物产生耐

受作用。

在治疗组和未治疗组各检出 1 例样本携带针对 PR 抑制剂的主要突变位点 M46I。由于国内尚未大规模使用 PR 抑制剂进行抗病毒治疗。该基因区的耐药性突变毒株, 很可能来自于 PR 抑制剂治疗实施较早的欧美国家。M46I 和 D30N 是 PR 基因功能的

表2 2004—2007年浙江省治疗组 7 例 HIV-1 CRF01_AE 感染者 pol 基因耐药位点分析

样本编号	CD ₄ ⁺ T 淋巴细胞		治疗时间 (月)	药物方案	核苷类耐药突变位点	非核苷类 突变位点
	数量(个/ml)	载量(cp/ml)				
06CNZJ05097	244	2 900	6	DDI+D4T+NVP	V75I, L210M	Y188L
07CNZJ06144	90	7 600	13	D4T+EFV+NVP	K65R, D67N	Y181C, G190A
07CNZJD0280	175	<LDL	9	AZT+3TC+NVP	M184V	G190A
07CNZJD0310	165	10 000	27	AZT+3TC+NVP	M41L, A62V, T69D, V75T, M184V, L210W, T215F	Y181C
07CNZJD0362	148	<LDL	3	D4T+3TC+NVP	M184I	Y181C
05CNZJ01164	91	93 000	21	DDI+D4T+NVP	A62V, K65R, V75T, Q151M	K101P, V108I, V179L
05CNZJ01165	186	8 300	31	D4T+3TC+NVP	V75T	Y188L

主要位点,这些位点的变异将对PR抑制剂耐药产生重要作用。如:M46I突变使毒株对除SQV以外的IDV、RTV、APV和NFV多种PR抑制剂产生耐药。韩晓旭等^[6]在辽宁省男男同性恋人群中 also 发现CRF01_AE感染者携带M46I原发耐药变异,而在以异性性接触为主要传播途径的福建省,其主要流行CRF01_AE毒株中未检出M46I^[7]。本研究的2例携带M46I耐药性突变的感染者均是通过男男性行为感染的,因此M46I耐药性变异基因可能是追踪CRF01_AE毒株在男男性途径传播的线索之一。

根据对治疗病例的随访调查显示,在出现耐药性基因突变的8例治疗病例中,除1例因为遗忘在最近1个月内有漏服一次药物以外,其余7例最近3天和1个月内均没有漏服药物的记录,且最近1个月在固定时间服用抗病毒药物的比例均在90%以上,表现了较好的服药依从性。因此,除了服药依从性,药物动力学因素和宿主的基因遗传因素等都是出现耐药性基因变异进而导致ART治疗失败的可能原因^[8]。

在治疗组病例中,有8例样本序列检出29个耐药性突变,在基因区上分布较分散。其中RT区的第75、181、184位分别有4、3、3例出现耐药性突变。由于NNRTIs的耐药突变具有高度交叉耐药性,即1种NNRTI引起某些位点的耐药突变,可使该病毒株对其他NNRTI的敏感性降低。目前一线免费ART治疗药物种类有限,一旦出现临床治疗失败,将会面临

没有合适药物替换的局面。分析CRF01_AE的基因型耐药特征和发生情况,将为我国ART治疗方案调整提供基础数据资料,也为ART药物研发、干预实施等提供依据。

参 考 文 献

- [1] 姚亚萍,辛若雷,何翔,等. 浙江省HIV-1 CRF01_AE流行株的分子特征分析. 中华流行病学杂志, 2008, 29(2): 161-164.
- [2] 王晓琼,童骁,汤恒,等. 湖北省抗病毒治疗和未治疗的HIV-1感染者耐药基因变异研究. 中华流行病学杂志, 2007, 28(11): 1112-1115.
- [3] 李韩平,李宏,杨坤,等. 河南省部分艾滋病患者抗病毒治疗的临床效果以及基因型耐药性分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25(3): 194-198.
- [4] 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): 351-354.
- [5] 张旻,尚红,韩晓旭,等. 中国东北地区未经抗病毒治疗的HIV/AIDS患者HIV毒株的耐药基因变异研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004, 24(11): 850-854.
- [6] 韩晓旭,代娣,卢春明,等. 男男同性恋HIV-1感染者原发耐药性分析. 中国公共卫生, 2007, 12(23): 1415-1416.
- [7] 刘建芳,严延生,严萃萃,等. 福建省未经抗病毒治疗的HIV-1毒株耐药基因变异研究. 中国艾滋病性病, 2007, 13(1): 14-16.
- [8] Chew CB, Potter SJ, Wang B, et al. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. J Clin Virol, 2005, 33(3): 206-216.

(收稿日期: 2008-09-24)

(本文编辑: 尹廉)

· 征 稿 通 知 ·

第九届全军防生物危害医学专业学术会议征文

为进一步扩大全军防生物危害医学专业学术交流,研讨该学科领域国内外最新研究进展,以推动全军防生物危害医学不断发展,全军防生物危害医学专业委员会定于2009年8月在广西桂林召开“第九届全军防生物危害医学专业学术会议”,会议由军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室承办。会议届时将邀请全军知名防生物危害医学专家作专题报告。为进一步做好会议准备,提高会议的学术交流水平,现公开征集会议论文。会议热忱欢迎防生物危害医学专家和从事相关工作的同道踊跃投稿,积极参加交流。

1. 征文内容:防生物危害医学各方面的研究成果和经验技术,主要包括防生物危害医学的最新进展和成果、部队在生物危害医学防护方面的技术和措施,以及在生物反恐、生物安全管理等方面经验总结等。2. 征文要求:(1)未公开发表的论文或论文摘要(论文限5000字以内,摘要限400字);(2)文稿全文采用word文本,来稿以A4纸打印一份,请注明作者和联系地址(含所属单位、电话、Email),来稿请注明“全军防生会征文”,同时请提交电子版文档;纸质稿件请寄:100071北京市丰台区东大街20号五所科技处韩晓娜收,电子投稿:hanxn929@126.com 联系电话/传真:010-63897954;(3)来稿请附单位论文投稿介绍信;(4)征文截止日期:2009年5月31日。