

超深度焦磷酸测序技术用于 HIV-1 RT 基因区原发性耐药突变的研究

贺健梅 邹潇白 陈曦 郑军

【摘要】 目的 利用超深度焦磷酸测序技术(UDS)研究湖南省 HIV 感染者中原发性耐药流行趋势。方法 90 份未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者同时采用 UDS 测序和 Sanger 测序进行 HIV 基因型耐药检测,测序结果采用斯坦福大学 HIV 耐药突变数据库进行分析比对,分析湖南省 HIV-1 反转录(RT)基因区原发性耐药突变情况。结果 UDS 检测成功获取 90 份测序结果,84.4% 为 AE 亚型(76/90),发现 38 例(42.2%, 38/90)针对 RT 基因区的耐药突变位点,其中 14 例样本仅发生核苷类反转录酶(NRTI)耐药突变(15.6%),15 例仅发生非核苷类反转录酶(NNRTI)耐药突变(16.7%),9 例样本同时发生了 NRTI 和 NNRTI 类耐药突变。在 16 个位置上共发现 54 次耐药突变。17 例(18.9%, 17/90)样本有针对 RT 基因区的中度及以上的耐药突变。传统 Sanger 法仅检出 7 例;其中针对 NRTI 类药物耐药的 6 例;针对 NNRTI 类药物耐药的 5 例。结论 Sanger 法测序能够鉴定出显著的耐药性突变($\geq 20\%$),但不能及时发现尚未达到显著突变量的突变位点或稀有型抗药型突变($< 20\%$)。而 UDS 则能更灵敏检测到低频突变毒株,这些耐药突变同样可在药物选择压力下快速增长引起病毒学治疗失败,导致临床治疗失败。因此选择更高灵敏度和精确度的技术检测低水平耐药突变位点,对于 HIV 抗病毒临床治疗有着十分重大的意义。

【关键词】 HIV-1; 原发性耐药; 超深度焦磷酸测序; Sanger 法测序; 核苷类药物; 非核苷类药物

The use of ultra deep sequencing technique in the screening program on HIV-1 drug resistance mutation among ART-naïve patients in Hunan province He Jianmei, Zou Xiaobai, Chen Xi, Zheng Jun. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China

Corresponding author: Chen Xi, Email: chenxi161@sohu.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2012ZX10001001).

【Abstract】 Objective To determine the prevalence rates of nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI) and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) TDRs among HIV-1 ART-naïve patients in Hunan province using the ultra deep sequencing (UDS) technique. **Methods** ART-naïve subjects diagnosed in Hunan between 2010 and 2011 were evaluated by both UDS technique and Sanger sequencing techniques, to the 1% variant level. Mutations were scored using the Stanford HIVdb algorithm to infer the status on drug resistance. **Results** UDS method was performed on 90 ART-naïve subjects that seeking service of care, in Hunan. In total, 42.2% (38/90) of the subjects showed major NRTI or nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor NNRTI TDRs by UDS technique, at a HIV variant frequency level of $\geq 1\%$, 15.6% (14/90) showed NRTI TDR, 16.7% (15/90) showed a major NNRTI TDR and 10% (9/90) were both resistant to NRTI and NNRTI when variants were analyzed by Stanford HIVdb. **Conclusion** ART-naïve subjects from Hunan province, which had been predominately infected by subtype AE, would frequently possess HIV variants with NRTI/NNRTI TDRs that would affect the use of first line ART in the region, identified by the UDS technique. Further studies were needed to describe the prevalence of TDRs and to gather related information.

【Key words】 HIV-1; Drug resistance; Ultra deep sequencing; Sanger sequencing; Nucleotide reverse-transcriptase inhibitor; Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.015

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10001001)

作者单位: 410005 长沙, 湖南省疾病预防控制中心

通信作者: 陈曦, Email: chenxi161@sohu.com

虽然高效抗反转录病毒治疗(HAART)在 HIV 抗病毒临床治疗上取得很好的效果,然而 HIV-1 基因耐药突变也在不断增加。有研究表明即使在很高的病毒载量水平下($\geq 10^4$ copies/ml),传统 HIV 基因型耐药检测技术(Sanger 测序)无法检测到较低水平的耐药突变($< 20\%$)^[1,2]。新开发的“超深度焦磷酸测序(UDS)”能够一次性获得更高通量的 HIV 基因组测序结果,可以帮助了解病毒株中那些罕见、低频的耐药突变位点。目前我国将 UDS 用于 HIV 耐药检测的研究和文献少见。为掌握和灵活运用此技术,2013 年同时采用 UDS 和 Sanger 测序对 90 份未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者进行 HIV 基因型耐药研究,并分析湖南省未治疗的 HIV 感染者中原发性耐药流行趋势。

材料与方法

1. 样品来源:本实验室保存的 2011 年 7 月至 2012 年 6 月来自衡阳市和长沙市未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者血浆 90 份,其中长沙 20 份,衡阳 70 份。所有样本病毒载量均 $\geq 10^4$ copies/ml。

2. 实验室检测:①HIV 载量检测:用“COBAS TaqMan HIV-1 test”全自动病毒载量检测系统(美国罗氏公司),检测病毒载量。②UDS:cDNA 合成用罗氏公司提供的 HIV 试剂盒(内部研发,暂未上市),每个样本对应 HIV pol 区[包括蛋白酶区和反转录(RT)区]的 4 条特异引物,共 1.3 kb,每条特异性引物上连接着多重标记物(MID)。扩增子使用 Agencourt AMPure XP magnetic beads 试剂(美国贝克曼库尔特公司)进行纯化,使用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(美国 Invitrogen 公司)进行荧光定量分析确定核酸含量。若核酸含量低于 5 ng/ μ l,使用 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Life Science, Santa Clara, California, US)对扩增产物长度和质量进行分析,确定是否弃掉该扩增产物。所有样本的 4 个扩增产物等 mol 集合成为 1 管,然后进行油包水 PCR。油包水 PCR 产后,将 500 000 个被富集的 DNA beads 被均匀的铺到 1 个 PTP 芯片上,放到 GS Junior 上进行焦磷酸测序(正向与反向同时测序)。数据分析采用罗氏公司的 Variant Analyzer (AVA) 软件。所有与 HIV 抗病毒治疗耐药性

相关的氨基酸位点的判断和分析均来自斯坦福大学 HIV 耐药突变数据库(<http://hivdb.Stanford.edu>)^[3]。

③Sanger 测序:用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取 RNA 为模板,采用巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 基因区,扩增产物长度约为 1 160 bp,包括蛋白酶区以及 RT 区,第 1 轮 PCR 使用宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒,第 2 轮 PCR 以第 1 轮扩增产物为模板,使用天根生化科技(北京)有限公司的 Perfectshot TM Ex Taq Mix 试剂盒,反应条件参考相关文件^[1-4]。两轮 PCR 扩增引物见表 1。将扩增产物送交北京诺赛基因研究中心有限公司进行序列测定,测序引物见表 1。测得的序列应用 Contig Express 和 BioEdit 软件拼接整理和校对,并提交斯坦福大学的 HIV 序列网络数据库进行数据分析和讨论。

3. 统计学分析:统计学分析采用 SPSS 13.0 软件。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 样品亚型:检测发现 75 个样本为 CRF01_AE 亚型(83.3%, 75/90),9 个为 B 亚型(10.0%, 9/90),5 个为 C 亚型(5.6%, 5/90),1 个是 G 亚型(1.0%, 1/90)。

2. UDS:90 例样本 UDS 全部成功测序。72.2% (65/90) 的样本产生了传播性耐药突变位点(TDRs),其中突变频率 $> 1\%$ 的 RT 基因区耐药突变位点样本有 38 例(突变频率范围:1.02%~75.36%)。见表 2。对核苷类反转录酶(NRTI)耐药突变者 14 例(15.6%, 14/90),对非核苷类反转录酶(NNRTI)耐药突变者 15 例(16.7%, 15/90),同时对 NRTI 和 NNRTI 类耐药突变者 9 例。共发现在 16 个位置上

表 1 基因型耐药性检测使用的引物

引物	碱基组成(5' ~ 3')	位置(国际标准病毒株 HXB2)
第一轮 PCR		
外侧上游引物 MAW26	TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC	2 028 ~ 2 050
外侧下游引物 RT21	CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG	3 509 ~ 3 539
第二轮 PCR		
内侧上游引物 PRO-1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	2 147 ~ 2 166
内侧下游引物 RT20	CTGCCAGTCTAGCTCTGCTTC	3 441 ~ 3 462
正向测序		
PROS3	GCCAACAGCCCCACCA	
RTAS	CTCAGATTGGTTGCAC	2 946 ~ 2 967
RTB	CCTAGTATAACAATGAGACAC	
反向测序		
PROC1S	GCTGGGTGTGGTATTCC	2 826 ~ 2 842
RT20S3	GTTCTAGCTCTGCTTC	3 447 ~ 3 462

表 2 UDS 测序检测耐药突变位点情况

样本编号	STANFORD RT TDR>1
1001A	M184I(1.36), V179D(1.22)
1014A	V106A(4.94)
1022A	M41L(2.41)
1028A	K65N(3.56)
1032A	E138K(1.65)
1038A	V179D(1.16), 179E(25.27)
1051A	P225H(1.1)
3006A	K65R(1.5), V179I(2.71), V179D(1.02), T215I(2.04)
3007A	T69N(4.01)
3012A	T69N(1.2), V179I(2.35), V179D(1.08)
3013A	V188C(1.02)
3019A	P225H(1.32)
3021A	V106I(2.38), V118I(2.36), V179I(5.73), V179D(25.5), M184I(1.17)
3024	D67G(1.79), T69N(44.01), V75L(1.82), V179D(3.72), G190E(3.36), H221Y(1.59)
3029A	D67N(1.15)
3038A	V75L(55.71), K65N(8.13)
3052A	V75LV(59.3), K65N(8.13)
3061A	Y188C(1.27)
3064A	K65N(8.8)
3079A	D67E(1.53), D67G(3.74)
3086A	V90I(1.78)
3087A	V106I(14), V179D(1.92)
3088A	K101E(1.42), V179D(10.56), F227L(1.35)
3089A	K219Q(3.24)
3096A	D67G(1.03)
3098A	P225H(1.69)
3099A	T69N(66.55), F227L(1.36)
3106A	L74V(7.63)
3115A	K65N(16.64)
3117A	V179D(75.36)
3132A	V179D(3.95), Y188H(1.63)
3134A	D67G(3.04), V179D(7.75), Y188H(16.67)
3138A	F77L(2.4), E138K(1.73), V179T(6.1), V179D(1.56), G190A(1.41)
3140A	T69N(43.86), V179D(1.38)
3141A	K65N(1.63), V179D(4.18)
3145A	K65N(9.12)
3146A	D67G(4.45)
3157A	D67G(10.83)

注:括号内数据为百分率(%)

发生 54 频次的耐药突变。其中,针对 NRTI 类药物的突变位点:K65R 为 8 例(8.89%, 8/90), D67N/G 为 7 例(7.78%, 7/90), T69N 为 4 例(4.44%, 4/90), M184I 为 2 例(2.22%, 2/90), T215I/S 为 2 例(2.22%, 2/90), M41L、L74V、F77L 以及 K219Q 等突变位点均只发现了 1 例; 针对 NNRTI 类药物的突变位点: V179D/E/I 15 例(16.67%, 15/90), Y188C/H 4 例(4.44%, 4/90), P225H 3 例(3.33%, 3/90), G190E/A 2 例(2.22%, 2/90), 而 K101E 和 V106A 均只发现了 1 例(1.11%, 1/90)。17 例样本(18.89%, 17/90)有针对 RT 基因区的中度及以上的耐药突变。

3. Sanger 测序:采用 Sanger 测序 90 份样本成功测序 89 例(98.9%, 89/90)。RT 基因区产生耐药突变的共有 7 例,其中针对 NRTI 耐药突变的有 6 例,

NNRTI 耐药突变位点的有 5 例,见表 3。

4. UDS 与 Sanger 测序的比较: UDS 检测出了 38 例样本在 16 个氨基酸位置产生了针对 RT 基因区的 54 个频次的耐药突变。Sanger 法检出 7 例在 4 个氨基酸位置产生了 11 个频次的耐药突变。Sanger 法检出突变频次为 UDS 检出频次的 20.37%(11/54)。

讨 论

本研究显示,湖南省衡阳市和长沙市人群感染的 HIV 分为 CRF_01AE、B、C 和 G 亚型, CRF_01AE 在不同感染途径的比率明显高于其他亚型(83.33%, 75/90), 为当前优势毒株, 与湖南省近 4 年监测结果吻合^[4-7]。与江西、广东、福建、广西等地类似, 而不同于我国北方省份, 可能与湖南地处华南, 人群主要往来南方省份和东南亚有关^[6]。过去分离到的 A、D 亚型没有再发现^[8], 可能这两种亚型传播人数较少。

本研究还显示, 主要原发性耐药位点分别是: M41L, D67G/N, M184I, K65N/R, T215I/S, P225H, Y188C/H, K101E, V106A, T215I/S 和 G190A/E, 这些 RT 区耐药位点在 2009 年已经发现^[7], 为湖南省常见耐药突变位点。相关文献报道^[9-11], M41L 突变常与 215 位置一起产生, 从而导致对

Zidovudine (AZT) 和 stavudine (d4T) 产生中度以上耐药, 对 tenofovir (TDF) 产生低度耐药; K65N/R 和 T215I/S 常引起 d4T 低度耐药以及 lamivudine (3TC) 和 TDF 中度耐药; M184V 引起对 3TC 高度耐药, 但是同时也增加了针对 AZT、TDF、d4T 的药物敏感

表 3 Sanger 测序检测 HIV 耐药突变位点情况

样本编号	病毒载量	NRTI	NNRTI	RT 耐药
3002A	9 320	T69NT	V106IV	L
3024A	44 000	T69NT	V106IV	L
3038A	97 000	V75LV	NONE	P
3052A	1 560 000	V75LV	V106I	P
3099A	424 000	T69NT	NONE	P
3117A	185 000	NONE	V179DV	P
3140A	8 140	T69NT	V179DV	P

注: P:潜在低度耐药, L:低度耐药

性。D67G/N常与70或215一起发生,导致NRTI中3TC以外的其他药物不同程度耐药;K101E与Y188C/H会引起nevirapine(NVP)的中度或高度耐药以及efavirenz(EFV)低度耐药;V106A和G190A/E导致NVP和EFV高度耐药,P225H与K103N一起出现时会增加对EFV的耐药。湖南省初始一线抗病毒治疗方案是由d4T,3TC,NVP,EFV,TDF,AZT以及lopinavir/ritonavir(LPV/r)组成的三联疗法。暂未发现引起LPV/r耐药的突变位点,这与LPV/r目前是二线治疗方案还未普及使用有关。而在1例样本发现了L74V,它可引发ddI和ABC耐药,ddI和ABC并未在湖南省使用,可能是输入引起的。

本研究也显示,在UDS方法检出的54个耐药位点中,8个为高频($\geq 20\%$)耐药突变,有6个被传统测序同时检出,提示对高频耐药突变($\geq 20\%$)这两种测序方法区别不大。但对于低频耐药突变($< 20\%$),UDS检出46个突变位点,而传统方法仅检出5个,UDS敏感性远高于Sanger测序。UDS检测到所有的耐药突变位点中超过85%以上为低频耐药突变($< 20\%$),其中绝大多数都没有被传统基因型耐药检测方法检测到($P < 0.01$)。依靠传统测序方法检测,近4年湖南省未治疗HIV感染者中原发性耐药每年均低水平传播($< 5\%$)。然而本研究数据显示,采用UDS发现有18.9%(17/90)的样本产生了针对RT中度或高度的耐药,提示通过Sanger法测序能够鉴定出显著的耐药性突变($\geq 20\%$),但对于尚未达到显著突变量的突变位点或稀有型抗药型突变($< 20\%$)不能及时发现。UDS则能更灵敏检测到低频突变毒株^[2,12-16]。

当前高病毒载量伴低水平的耐药突变(1%左右)难以被传统的检测手段所发现,有可能在药物选择的压力下增加抗病毒治疗的失败^[17-21]。因此选择更高灵敏度和精确度的技术检测低水平耐药突变位点,对于预警和研究原发性耐药毒株的流行和传播及HIV抗病毒临床治疗有着十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Roquebert B, Malet I, Wirden M, et al. Role of HIV-1 minority populations on resistance mutational pattern evolution and susceptibility to protease inhibitors [J]. *AIDS*, 2006, 20 (2): 287-289.
- [2] Wang C, Mitsuya Y, Gharizadeh B, et al. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance [J]. *Genome Res*, 2007, 17(8):1195-1201.
- [3] Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS society-USA panel [J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(2):266-285.
- [4] Chen X, Xing H, He JM, et al. Study on the threshold of HIV-1

- drug resistance in Hunan province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29 (8):787-789. (in Chinese)
- 陈曦,邢辉,贺健梅,等.湖南省HIV-1耐药警戒线调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(8):787-789.
- [5] Zou XB, He JM, Zhang GQ, et al. Drug resistance analysis on AIDS patients after highly active antiretroviral therapy in Hunan province [J]. *Chin J Infect Control*, 2010, 9 (5): 305-309. (in Chinese)
- 邹潇白,贺健梅,张国强,等.湖南省艾滋病患者抗病毒治疗后耐药性分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2010, 9(5):305-309.
- [6] Chen X, Xing H, He JM, et al. A molecular epidemiological study on HIV-1 infection in Hunan province [J]. *Practical Prev Med*, 2005, 12(3):483-485. (in Chinese)
- 陈曦,邢辉,贺健梅,等.湖南省HIV-1分子流行病学研究[J]. *实用预防医学*, 2005, 12(3):483-485.
- [7] He JM, Xing H, Chen X, et al. Surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance in Hunan province from 2009 to 2012 [J]. *Chin J Prev Med*, 2013, 47(11):1065-1067. (in Chinese)
- 贺健梅,邢辉,陈曦,等.2009-2012年湖南省HIV-1耐药状况分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(11):1065-1067.
- [8] Xing H, Ruan YH, Li JY, et al. HIV drug resistance and its impact on antiretroviral therapy in Chinese HIV-infected patients [J]. *PLoS One*, 2013, 8:e54917.
- [9] Yerly S, Kaiser L, Race E, et al. Transmission of antiretroviral drug-resistant HIV-1 variants [J]. *Lancet*, 1999, 354:729-733.
- [10] Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration [J]. *PLoS Med*, 2005, 2:e112.
- [11] Grossman Z, Istomin V, Averbuch D, et al. Genetic variation at NNRTI resistance associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C [J]. *AIDS*, 2004, 18:909-915.
- [12] Avidor B, Girshengorn S, Matus N, et al. Evaluation of a Bench-Top HIV Ultra-Deep Pyrosequencing Drug-Resistance Assay in the Clinical Laboratory [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51 (3): 880-886.
- [13] Kozal MJ. Drug resistant HIV [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2009, 15 Suppl:S169-173.
- [14] Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors [J]. *Nature*, 2005, 437(7057):376-380.
- [15] Hoffmann C, Minkah N, Leipzig J, et al. DNA bar coding and pyrosequencing to identify rare HIV drug resistance mutations [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35(13):e91.
- [16] Shafer RW. Low-abundance drug-resistant HIV-1 variants: finding significance in an era of abundant diagnostic and therapeutic options [J]. *J Infect Dis*, 2009, 199:610-612.
- [17] Johnson JA, Li JF, Wei X, et al. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy [J]. *PLoS Med*, 2008, 5:1112-1122.
- [18] Johnson JA, Li JF, Wei X, et al. Baseline detection of low-frequency drug resistance associated mutations is strongly associated with virological failure in previously antiretroviral naïve HIV-1 infected persons [J]. *Antivir Ther*, 2006, 11:S79.
- [19] Svarovskaia ES, Margot NA, Bae AS, et al. Low-level K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase of treatment-experienced patients exposed to abacavir or didanosine [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007, 46:174-180, 700.
- [20] Palmer S, Boltz V, Maldarelli F, et al. Selection and persistence of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant HIV-1 in patients starting and stopping non-nucleoside therapy [J]. *AIDS*, 2006, 20:701-710.
- [21] Halvas EK, Wiegand A, Boltz VF, et al. Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(5):672-680.

(收稿日期:2014-04-30)

(本文编辑:王岚)