

## 湖南省艾滋病患者抗病毒治疗后耐药性分析

邹潇白, 贺健梅, 张国强, 李向忠, 彭瑾瑜, 陈曦

(湖南省疾病预防控制中心, 湖南长沙 410005)

**[摘要]** **目的** 了解湖南省艾滋病患者接受免费抗病毒治疗的效果以及人免疫缺陷病毒(HIV)的耐药情况, 为改善该省的高效抗逆转录病毒治疗效果, 指导临床医生用药提供科学的依据。**方法** 收集湖南省衡阳市抗病毒治疗6个月以上的252例HIV感染者的血标本, 进行病毒载量检测, 其中32例病毒载量 $>10^3$ 拷贝/mL, 对此32份样本进行进一步的HIV基因型耐药检测。**结果** 测得的31个序列中, 发生突变的样本18份, 其中13份(5.16%, 13/252)对蛋白酶抑制剂(PIs)、核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)以及非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)这3类抗逆转录病毒药物有耐药突变; 对PIs、NRTIs和NNRTIs均耐药者1例(0.40%), 对NRTIs和NNRTIs均耐药者9例(3.57%), 对NNRTIs耐药者3例(1.19%)。同时发现M184V、K103N、Y181CG、G190A引起NRTIs和NNRTIs高水平耐药的重要突变位点。**结论** 湖南省艾滋病治疗者中, PIs耐药发生率极低, NRTIs和NNRTIs的耐药发生率相对较高; 已出现NNRTIs高水平的多药耐药。但总体耐药的发生仍处于较低水平。

**[关键词]** 艾滋病; 人免疫缺陷病毒; 高效抗逆转录病毒治疗; 抗药性; 微生物; 基因突变

**[中图分类号]** R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)05-0305-05

## Drug resistance analysis on AIDS patients after highly active antiretroviral therapy in Hunan Province

ZOU Xiao-bai, HE Jian-mei, ZHANG Guo-qiang, LI Xiang-zhong, PENG Jin-yu, CHEN Xi (Hunan Provincial Center for Disease Prevention and Control, Changsha 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of antiretroviral (ARV) treatment on AIDS patients in Hunan Province and to analyze the drug resistance of human immunodeficiency virus (HIV), so as to improve the treatment effect of highly active antiretroviral therapy (HAART) and provide reference for clinical application of drugs. **Methods** Blood samples of 252 AIDS patients who had taken HAART for more than 6 months were collected for viral load test, viral load of 32 samples were  $>10^3$  copies/mL, these samples were further detected HIV genotypic resistance profile. **Results** Among 31 HIV detected sequences, 18 samples were found the drug resistance mutations, 13 samples (5.16%, 13/252) showed drug resistance mutation to protease inhibitors (PIs), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), 1 (0.40%) sample was resistant to PIs, NRTIs and NNRTIs, 9 (3.57%) were resistant to both NRTIs and NNRTIs, 3 (1.19%) were resistant to NNRTIs. M184V, K103N, Y181CG and G190A were common mutation sites which induced high-level resistance to NRTIs and NNRTIs. **Conclusion** The prevalence of HIV drug resistance to PIs among AIDS patients is very low, and NRTIs and NNRTIs are relatively higher; high level NNRTIs multi-drug resistance has emerged, the level of HIV drug resistance in AIDS patients in Hunan is still low.

**[Key words]** AIDS; human immunodeficiency virus; highly active antiretroviral therapy; drug resistance; microbial; gene mutations

[Chin Infect Control, 2010, 9(5):305-309]

高效抗逆转录病毒治疗(Highly active antiretroviral therapy, HAART)能有效抑制人免疫缺陷病毒

[收稿日期] 2010-03-04

[基金项目] 国家十一五重大专项课题艾滋病病毒基因变异规律与耐药监测技术研究(2008ZX10001-004) 湖南省卫生厅课题(B2009-089)

[作者简介] 邹潇白(1981-), 男(汉族), 湖南省长沙市人, 技师, 主要从事艾滋病检验研究。

[通讯作者] 陈曦 E-mail: chenxi161@sohu.com

(HIV)复制,重建机体免疫功能,显著降低 HIV 感染者的死亡率和发病率,延长其生命<sup>[1]</sup>。湖南省自 2003 年开始对艾滋病患者进行免费抗病毒治疗,这为我省艾滋病患者带来了福音,同时随着 HAART 药物广泛普遍地应用,也带来了一个无法避免的问题:HIV 耐药性毒株的产生,根据国际上抗病毒治疗的经验,开展抗病毒治疗 3 年以上的地区可能会出现耐药株<sup>[2]</sup>。为了解湖南省艾滋病患者接受免费抗病毒治疗效果,监测耐药株在我省发生情况,在中国疾病预防控制中心的支持和帮助下,我们对湖南省衡阳市的在治 HIV 感染者进行了一次 HIV 耐药性调查和检测,探讨在抗病毒治疗过程中 HIV 耐药出现情况及发生规律,更好地改善我省 HAART 治疗效果,进一步为医生用药提供指导依据。

### 1 对象与方法

- 1.1 研究对象 2009 年 6 月,对衡阳市接受抗病毒治疗的艾滋病患者进行调查,除去因患者死亡、停止治疗、外出及其他原因无法做调查外,共调查 252 人,均为抗病毒治疗 >6 个月且仍在治疗的患者。
- 1.2 调查方法 采用美国雅培公司的 m2000 全自动病毒载量检测系统对 252 份血样进行病毒载量检

测,病毒载量检测结果 >10<sup>3</sup> 拷贝/mL 的样本进行 HIV 基因型耐药检测。

#### 1.3 实验方法

- 1.3.1 RNA 提取 采用美国雅培公司的 m2000 全自动核酸提取仪及其配套试剂盒提取。
- 1.3.2 聚合酶链反应(PCR) 采用巢式 PCR,第 1 轮 PCR 使用 Takara One Step RNA PCR Kit (AMV),总反应体系 25 μL,其中 10 × buffer 2.5 μL, MgCl<sub>2</sub> 5 μL, dNTP 2.5 μL, 引物 MAW26 0.5 μL,引物 RT21 0.5 μL, RT 酶 0.5 μL, Taq 酶 0.5 μL, RNase Inhibitor 0.5 μL, 蒸馏水 7.5 μL, 模板 5 μL; 反应条件为 50℃ 30 min, 94℃ 5 min, 94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 2.5 min 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保温。第 2 轮 PCR, 以第 1 轮扩增产物为模板, 使用 Takara Perfect-shot™ Ex Taq Mix 试剂, 加上 5 μL 模板, 总体系为 50 μL, 其中 Mix 液 25 μL, 引物 PRO-1 1 μL, 引物 RT20 1 μL, 蒸馏水 18 μL, 模板 5 μL; 反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 2.5 min 30 个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保温。2 轮 PCR 扩增引物见表 1。
- 1.3.3 电泳与测序 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段分子量正确后, 将扩增产物送交北京博迈德测序公司进行序列测定, 测序引物见表 1。

表 1 基因型耐药性检测使用的引物  
Table 1 The primers of genotypic drug-resistance testing

引物名称	序列(5'—3')	HXB2 位点
第 1 轮扩增引物	外侧上游引物 MAW 26	TTGGAATGTGAAAGGAAGGAC
	外侧下游引物 RT 21	CTGTATTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG
第 2 轮扩增引物	内侧上游引物 PRO-1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA
	内侧下游引物 RT 20	CTGCCAGTCTAGCTCTGCTTC
正向测序引物	PROS3	GCCAACAGCCCCACCA
	RTAS	CTCAGATTGGTTGCAC
	RTB	CCTAGTATAACAATGAGACAC
反向测序引物	PROC1S	GCTGGGTGTGTAATTCC
	RT20S3	GTTCTAGCTCTGCTTC

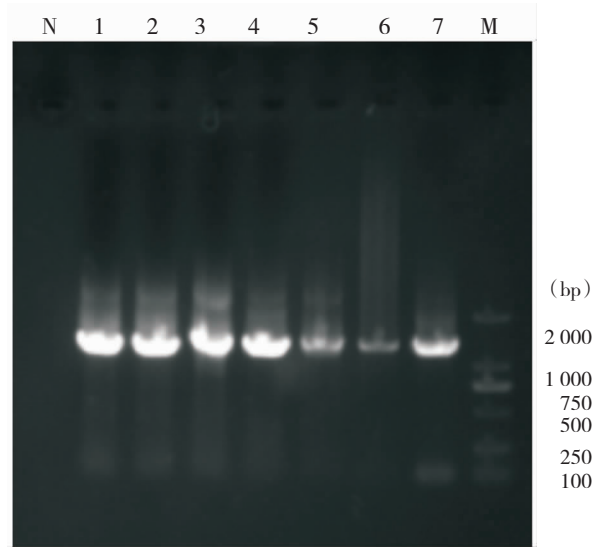
原则上每一段序列的有效长度是 700 bp 左右,具体的长度取决于机器和模板

1.3.4 序列分析 对测得的序列,应用 Contig Express 和 Bioedit 软件进行拼接整理、校对,整理后的序列提交美国斯坦福大学的 HIV 序列网络数据库(<http://hivdb.Stanford.edu>),利用该数据库提供的 HIV 耐药突变信息进行分析,寻找耐药相关突变,并作出样本对各药物敏感、潜在耐药、低度耐药、中度耐药或者高度耐药的结论。根据耐药评分,低度以上的耐药才认定对药物耐药。对耐药变异作出解释的同

时,该网站可同时给出序列亚型分析的结果。

## 2 结果

2.1 基因突变情况 252 份血样进行病毒载量检测,有 32 份病毒载量  $>10^3$  拷贝/mL,对此 32 份样本进行 HIV 基因型耐药检测,其中 31 份样本通过巢式 PCR 获得了目标基因,PCR 结果见图 1;同时进行了测序,序列图见图 2。31 个序列中,18 个序列发现了突变位点,其中 1 个序列发现了蛋白酶抑制剂 (PIs) 的主要突变位点,12 个序列发现了核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs) 的突变位点,17 个序列存在非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) 的突变位点。在这些突变位点中, M184V 出现频率为 55.56% (10/18), K103N 为 33.33% (6/18), Y181C 为 27.78% (5/18), D67N/DN/E 与 K101E 均为 16.67% (3/18), T215I/Y 与 G190A 均为 11.11% (2/18)。详见表 2。



M: DNA Marker(DL2000);1—7:样本;N:阴性对照

图 1 巢式 PCR 扩增电泳图

Figure 1 Nested PCR amplification electrophoresis

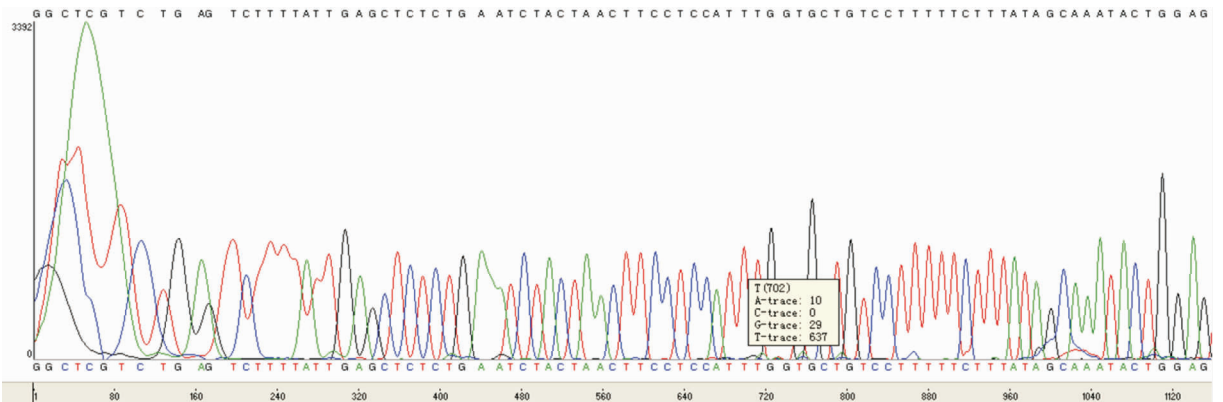


图 2 序列图

Figure 2 Sequencing diagram

表 2 耐药突变位点

Table 2 Drug-resistance mutation sites

样本编号	开始抗病毒治疗时间 (年-月-日)	PIs 主要耐药突变	NRTIs 耐药性突变	NNRTIs 耐药性突变
0031	2005-09-15	-	M41L、E44D、D67E、V75M、M184V、L210W、T215Y	A98G、K101E、Y181C
0036	2005-11-03	-	D67N、K70R M184V、T215I、K219E	K103N、E138Q
0043	2005-12-26	-	T69S	-
0053	2006-02-23	-	M184V	K103N、Y181C
0065	2006-04-26	-	D67DN、K70KR、L74LV、M184V	K101AE、Y181V
0108	2006-11-28	-	-	V106I
0120	2006-12-22	-	M184V、K219KQ	Y181C、H221H、YM230L
0122	2006-12-27	-	D67DN、M184V	K101EQ、G190A
0159	2007-04-05	-	V75IV、M184V	V90I、K103N、H221Y
0168	2007-05-08	I47IV	M184V、K219R	K101E、V108I、G190A
0179	2007-06-14	-	M184V	K101Q、K103N、K238S
0193	2007-07-27	-	-	V106I

续表 2

样本编号	开始抗病毒治疗时间 (年-月-日)	PIs 主要耐药突变	NRTIs 耐药性突变	NNRTIs 耐药性突变
0284	2008-04-18	-	-	Y181C
0299	2008-04-29	-	-	V106IV
0322	2008-06-12	-	V75L L210F	K103N
0359	2008-08-25	-	-	K103N、E138G、Y188L
0360	2008-08-16	-	-	V106IV
0377	2008-09-25	-	M184V	K101E、Y181C

2.2 对不同抗病毒药物的耐药性 18 个发生突变的序列中,有 13 个发现了对 PIs、NRTIs 以及 NNRTIs 这 3 类抗病毒药物存在低度以上耐药;其中,对 PIs、NRTIs 和 NNRTIs 均耐药者 1 例(0.40%),对 NRTIs 和 NNRTIs 均耐药者 9 例(3.57%),仅对 NNRTIs 耐药者 3 例(1.19%)。对于 7 种常用的 NRTIs 类药物,在以上 13 份样本中产生明显耐药性(包括高度耐药性和中度耐药性)的比率依次为:拉米夫定(3TC)与恩曲他滨(FTC)均为 76.92% (10/13),阿巴卡韦(ABC) 23.08% (3/13),齐多夫定(AZT)、司他夫定(D4T)与去羟肌苷(DDI)均为 15.38% (2/13),替诺福韦酯(TDF) 7.69% (1/13),可见 3TC 与 FTC 耐药率明显高于其他 NRTIs 药物;对于 3 种常用的 NNRTIs 药物均产生明显耐药性。详见表 3。

表 3 调查对象对 NRTIs 和 NNRTIs 的耐药情况 (例)

Table 3 Drug-resistance to NRTIs and NNRTIs (case)

耐药水平	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	DLV	EFV	NVP
H	10	1	2	1	2	10	0	11	8	13
I	0	2	0	1	0	0	1	2	5	0
L	0	2	1	1	2	0	1	0	0	0
P	0	5	0	0	1	0	0	0	0	0
S	3	3	10	10	8	3	11	0	0	0

H:高度耐药;I:中度耐药;L:低度耐药;P:潜在低度耐药;S:敏感  
AZT:齐多夫定;DLV:地拉韦定;EFV:依非韦伦;NVP:奈韦拉平

### 3 讨论

由于本次调查样本量不大,因此本文未对数据作统计学分析。本研究中,对 PIs 耐药者仅 1 例(0.40%),耐药发生率极低,这与 PIs 在我国应用较少有关。而 NRTIs 和 NNRTIs 药物的耐药发生率相对较高,分别达到 3.97% (10/252) 和 5.16% (13/252)。虽然如此,但是我省抗病毒治疗 6 个月以上患者的耐药发生总体水平较低<sup>[2]</sup>,这一结果与我省

2007 年开展的 HIV-1 耐药警戒线调查研究结果<sup>[3]</sup>基本吻合,表明我省近年来抗病毒治疗效果较好,现有的一线治疗方案是有效的。对 RT 区序列的耐药性突变分析表明,针对 NNRTIs 的耐药突变中,K103N、Y181C、G190A 突变发生较多,其中 K103N 的突变发生率最高,达 33.33% (6/18)。K103N 能引起目前所有 NNRTIs 药物 20~50 倍耐药;Y181C 可引起 NVP 和 DLV 30 倍以上耐药,EFV 2~3 倍耐药;G190A 能引起 NVP 和 EFV 高水平耐药,不引起 DLV 耐药,以上这些突变均有重要临床意义,足以导致任何一个病毒学治疗的失败<sup>[4]</sup>。这些突变位点的出现,往往引起针对 NNRTIs 的多药耐药,因此高水平的交叉耐药在 NNRTIs 药物中十分常见;本研究中,约有 53.85% (7/13) 的患者对 3 种 NNRTIs 药物均表现出高度耐药性,另有 30.77% (4/13) 的患者对 2 种 NNRTIs 药物表现为高度耐药。这与国外同类研究结果<sup>[4-6]</sup>一致。而 106 位置发生突变单独出现 4 次,均未引起对任何药物的耐药,106 位置上的突变是否与耐药的发生有关尚待进一步研究。NRTIs 耐药性突变位点较为分散,包括 M41L、D67E/N/G、V75M、M184V、L210W、T215Y、K70R、K219E、L74LV 等,均已证实了对 NRTIs 药物的耐药性<sup>[6]</sup>。M184V 突变位点的出现,国外已有学者指出其往往引起对 3TC 高度耐药<sup>[7-8]</sup>;本研究中出现 M184V 突变的病例均对 3TC 高度耐药,与国外研究结果一致。

在湖南省,接受抗逆转录酶抑制剂治疗 6 个月以上的 HIV 感染者中,大约有 50% 发生 1 个以上主要的耐药突变<sup>[9]</sup>。目前,国内艾滋病患者的经济条件不佳,知识水平普遍不高,能接受正规治疗、坚持疗程的人较少,更加容易对抗病毒治疗药物产生耐药性。病毒的耐药性是抗病毒药物治疗成败的关键问题。本研究发现,随着抗病毒治疗时间的延长,耐药突变位点产生的数量有上升趋势,导致对药物的耐受水平逐渐增加。当 HIV 患者服药依从性不好、病毒抑制不完全时,耐药性会很快出现,这是已存在

的突变病毒株在药物作用下被选择出来的缘故<sup>[10]</sup>。如何提高艾滋病患者的服药依从性,尽可能地减少抗病毒药物耐药现象的发生已成为现在我国艾滋病防治工作中急需重点考虑和解决的问题。目前,我省发现的 HIV 耐药性突变中,原发性耐药发生水平很低<sup>[11]</sup>,仍是以继发性耐药突变为主。因此,在接受抗病毒治疗的艾滋病患者中定期开展耐药性监测意义重大。在我国目前抗病毒药物种类有限的情况下,加强耐药监测,及时发现耐药株,更换药物,提高患者生存质量的同时,更要加强对患者治疗依从性的教育,尽可能地避免耐药性毒株的广泛流行与传播。

(致谢:感谢中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心在样本的病毒载量检测和基因型耐药检测中提供的帮助和指导,感谢湖南省衡阳市传染病医院在样本采集过程中提供的帮助)

#### [参 考 文 献]

- [1] Palella F J Jr, Delaney K M, Moorman A C, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection[J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(13): 853 - 860.
- [2] 尹春煜, 卢洪洲, 娄国强, 等. 中国部分地区应用高效抗逆转录病毒治疗 HIV-1 患者的耐药性检测[J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(3): 164 - 166.
- [3] 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.

- [4] Petropoulos C J, Parkin N T, Limoli K L, *et al.* A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(4): 920 - 928.
- [5] Wilson J W. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care[J]. *AIDS Read*, 2003, 13(1): 25 - 30.
- [6] Huang W, Gamarnik A, Limoli K. Amino acid substitutions at position 190 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase increase susceptibility to delavirdine and impair virus replication[J]. *J Virol*, 2003, 77(2): 1512 - 1523.
- [7] Hamburgh M E, Drosopoulos W C, Prasad V R. The influence of 3TC-resistance mutations E89G and M184V in the human immunodeficiency virus reverse transcriptase on mispair extension efficiency[J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26(19): 4389 - 4394.
- [8] Chin B S, Choi J Y, Kim G J, *et al.* Antiretroviral genotypic resistance mutations in HIV-1 infected Korean patients with virologic failure[J]. *J Korean Med Sci*, 2009, 24(6): 1031 - 1037.
- [9] Susman E. Many HIV patients carry mutated drug-resistant strains[J]. *Lancet*, 2002, 359(9300): 49.
- [10] Conway B, Weinberg M A, Hall D, *et al.* Development of drug resistance in patients receiving combinations of zidovudine, didanosine and nevirapine[J]. *AIDS*, 2001, 15(10): 1269 - 1274.
- [11] 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[J]. *实用预防医学*, 2007, 14(4): 1260 - 1262.

(上接第 326 页)

乙肝重点防治的人群和地区等策略提供了一定的线索依据。如在 15 ~ 59 岁年龄组人群中, HBsAg 携带率高于其余 2 个年龄组, 同时该年龄组中接种过乙肝疫苗和未接种过乙肝疫苗人群的 HBsAg 携带率存在显著性差异( $P < 0.05$ ); 而在 1 ~ 4 岁组和 5 ~ 14 岁组不同免疫状况人群中, HBsAg 携带率差异无显著性( $P > 0.05$ )。这可能与随着年龄增长, 在无保护的人群中 HBsAg 更易转阳, 故其携带率也高于其他年龄组有关, 这也提示我们应加强对 15 岁以下人群乙肝免疫屏障的巩固以更好防控乙肝。

尽管与 1992 年相比 HBsAg 携带率明显下降, 但已成为 HBsAg 携带者的大部分人为终生携带, 因此成人 HBsAg 携带率不会出现明显下降, 乙肝传播危险因素仍存在; 另一方面, 由于受预防保健服务可及性的限制、人口流动性增快等原因, 提高边远农村、流动人口聚集地新生儿儿童及计划外出生的儿

童的乙肝疫苗接种工作难度较大, 这也将是我们今后乙肝防治及扩大免疫规划工作的重点。

#### [参 考 文 献]

- [1] 戴志澄, 祁国明. 中国病毒性肝炎血清流行病学调查(1992—1995 年)(上卷)[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1997: 39 - 60.
- [2] 甄宏元, 李玉慧, 任代兰, 等. 甘肃省病毒性肝炎血清流行病学调查(1992—1995 年)(下卷)[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1997: 206 - 211.
- [3] 梁晓峰, 陈园生, 王晓军, 等. 中国 3 岁以上人群乙型肝炎血清流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(9): 655 - 658.
- [4] 张宁静, 王华庆, 陈园生, 等. 2004 年全国计划免疫评审不同免疫覆盖率县的儿童乙肝疫苗及乙肝病毒血清学标志物的调查[J]. *中国计划免疫*, 2007, 13(4): 324 - 327.
- [5] 汪志国, 马福宝, 汤奋扬, 等. 江苏省儿童乙肝流行及疫苗接种