

· 论 著 ·

温州市新报告 HIV-1 感染者治疗前耐药分析

朱传新¹, 郑文力¹, 金聪因², 苏菲菲³, 吴矛矛¹, 孙宝昌¹, 张佳峰⁴

1. 温州市疾病预防控制中心微生物检验科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医科大学检验医学院 (生命科学学院);
3. 温州市中心医院感染科; 4. 浙江省疾病预防控制中心艾滋病防治所实验室

摘要: **目的** 了解温州市2019年新报告艾滋病病毒 I 型 (HIV-1) 感染者治疗前耐药 (PDR) 情况, 为指导艾滋病抗病毒治疗提供依据。**方法** 选择温州市2019年新报告的232例尚未经抗反转录病毒治疗 (ART) 的 HIV-1 感染者为研究对象, 采集血浆样本, 提取 HIV-1 病毒 RNA, 采用反转录 PCR 和巢式 PCR 扩增 *pol* 区基因并测序, 分析耐药突变位点及对非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTIs)、核苷类反转录酶抑制剂 (NRTIs) 和蛋白酶抑制剂 (PIs) 的耐药情况。**结果** 获得199例未经 ART 治疗的 HIV-1 感染者的 *pol* 区基因序列, 共检出8种基因亚型, 以 CRF07_BC 和 CRF01_AE 为主, 分别为94例和58例, 占47.24%和29.15%; 检出2种独特重组型毒株 (URFs), 分别为 URF (CRF01_AE/BC) 和 URF (B/C)。PDR 16例, 检出率为8.04%。耐药位点突变31例, 占15.58%; 其中针对 NNRTIs、NRTIs 和 PIs 耐药突变位点分别检出20例、2例和9例, 占64.52%、6.45%和29.03%。NNRTIs 耐药位点突变包括 K101E、K103N/R、V106I、E138K、V179D/E/T、Y181C、G190A 和 H221Y, 4例病例同时出现2个耐药位点突变; NRTIs 耐药位点突变为 V75M 和 M184V; PIs 耐药位点突变为 M46I、L33F 和 Q58E。对我国新上市的 NNRTIs 新药多拉韦林 (DOR) 检出2例耐药病例。**结论** 温州市2019年新报告 HIV-1 感染者 PDR 检出率为8.04%, 以 NNRTIs 耐药为主; 已出现对新药 DOR 的耐药, 应加强耐药监测。

关键词: 艾滋病病毒 I 型; 抗反转录病毒治疗; 耐药; 基因序列

中图分类号: R512.91 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2021) 05-0446-05

Pre-treatment drug resistance of newly reported HIV-1 infected individuals in Wenzhou

ZHU Chuanxin*, ZHENG Wenli, JIN Congnan, SU Feifei, WU Maomao, SUN Baochang, ZHANG Jiafeng

*Department of Microbiology, Wenzhou Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou, Zhejiang 325000, China

Abstract: **Objective** To know the pre-treatment drug resistance (PDR) status of newly reported human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected individuals in Wenzhou, so as to provide guidance for antiretroviral therapy (ART). **Methods** Totally 232 plasma samples of newly reported HIV-1 infected individuals who had not received ART were collected in Wenzhou in 2019. Virus (HIV-1) RNA was extracted, followed by reverse transcription PCR and nested PCR to amplify the *pol* region and sequence. Resistance mutations and resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and protease inhibitors (PIs) was analyzed. **Results** The *pol* region sequences from 199 infected patients were obtained and the incidence of PDR was 8.04% (16/199). Eight genotypes were detected, including circulating recombinant forms (CRFs) CRF07_BC (47.24%, 94/199) and CRF01_AE (29.15%, 58/199) which were the dominant types. Two unique recombinant forms (URFs) were detected, namely URF(CRF01_AE/BC) and URF(B/C). Thirty-one cases (15.58% 31/199) had drug-resistant mutations. For NNRTIs, NRTIs and PIs, 20 cases(64.52%), 2 cases(6.45%) and 9 cases(29.03%) with drug resistance muta-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.05.004

基金项目: 温州市科技局项目 (Y2020554, Y2020542)

作者简介: 朱传新, 中专, 副主任技师, 主要从事微生物检验工作

通信作者: 张佳峰, E-mail: jfzhang@cdc.zj.com

tions were detected, respectively. The resistance mutations to NNRTIs included K101E, K103N/R, V106I, E138K, V179D/E/T, Y181C, G190A and H221Y. Four cases each had two resistance mutations to NNRTIs. The resistance mutations to NRTIs were V75M and M184V. The resistance mutations to PIs were M46I, L33F and Q58E. For the newly released NNRTI drug Doravirine (DOR), two cases were found to have mutations of resistance. **Conclusions** The incidence of PDR among newly reported HIV-1 patients in Wenzhou is 8.04%, mainly caused by NNRTIs drug-resistant mutation. Resistance to the new drug DOR has emerged. The surveillance of drug resistance should continue to be strengthened.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1; antiretroviral therapy; drug resistance; gene sequence

艾滋病病毒 (HIV) 具有高度遗传变异性, 随着抗反转录病毒治疗 (antiretroviral therapy, ART) 的普及, 耐药株在未治疗的感染者中检出增多。为评估和预防耐药的传播, 需对新感染人群进行传播性耐药 (transmitted drug resistance, TDR) 监测^[1]。由于 TDR 监测较为复杂, 2015 年世界卫生组织 (WHO) 不再建议常规开展此项工作, 而建议开展治疗前耐药 (pre-treatment drug resistance, PDR) 评估^[2-3], 用以指导并制定抗病毒治疗方案^[4-5]。在发达国家, 未经 ART 治疗的 HIV 感染者耐药率稳定保持在 10%~17%^[1, 6]。2015 年我国未经 ART 治疗的 HIV 感染者耐药率为 3.6%, 其中男男性行为人群耐药率为 3.1%^[7]。浙江省温州市从 1985 年发现第一例 HIV 感染者以来, 感染人数逐年增加^[8], 研究温州市 2019 年新报告但未经 ART 治疗的 HIV-1 感染者 PDR 及耐药位点突变情况, 为指导艾滋病抗病毒治疗提供依据。现报道如下。

1 对象与方法

1.1 对象 选择 2019 年温州市 232 例新报告未经 ART 治疗的 HIV-1 感染者为研究对象。通过中国疾病预防控制中心艾滋病综合防治信息系统收集研究对象的年龄、性别、文化程度、婚姻状况和感染途径等基本资料。本研究经过温州市疾病预防控制中心伦理委员会审批 (WZCDCLLSC2020001-002)。

1.2 核酸提取和 PCR 扩增 采集 HIV-1 感染者抗凝静脉血, 及时分离血浆, 置于 -70 ℃ 保存。采用 QIAGEN 公司的 Viral RNA Mini Kit 提取血浆样本中的病毒 RNA, 参照文献 [9] 进行反转录 PCR 和巢式 PCR 扩增 *pol* 基因。扩增产物送至杭州擎科梓熙生物科技有限公司进行琼脂糖凝胶电泳检测、纯化和测序。

1.3 序列整理和耐药突变位点分析 采用 Sequencher 5.0 软件对序列进行清理、拼接和编辑。整理完成后的序列提交美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库, 利用 HIVdb 工具 ([\[sequences\]\(https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences\)\) 分析耐药突变位点, 以及对非核苷类反转录酶抑制剂 \(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs\)、核苷类反转录酶抑制剂 \(nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs\) 和蛋白酶抑制剂 \(protease inhibitors, PIs\) 的耐药情况。根据斯坦福网站评分标准划分耐药程度为敏感、潜在耐药、低度耐药、中度耐药和高度耐药, 后 3 个等级定义为耐药, 进一步分析耐药位点突变的分布特点。从美国 Los Alamos 实验室的 HIV database 网站下载 HIV 各亚型参考株序列, 再用 BioEdit 7.0.9 软件将样本序列与参考株序列进行比对和校准。采用 MEGA 7.0 软件构建 Neighbor-Joining 系统进化树 \(重复运算 1 000 次\) 分析基因亚型, 并进一步用 HIV BLAST 进行序列分析以复核亚型。](https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-se-</p></div><div data-bbox=)

2 结果

2.1 基本情况 共获得 199 例 *pol* 区序列。男性 159 例, 占 79.90%; 女性 38 例, 占 19.10%。年龄为 (55.3 ± 18.2) 岁。温州市户籍 166 例, 占 83.42%。异性性接触感染 122 例, 占 61.31%; 同性性接触感染 46 例, 占 23.12%。见表 1。

2.2 基因亚型 199 例 *pol* 区序列经基因分型共检出 8 种流行重组型毒株 (circulating recombinant forms, CRFs) 和 2 种独特重组型毒株 (unique recombinant forms, URFs), 分别为 CRF07_BC、CRF01_AE、CRF08_BC、C 亚型、B 亚型、CRF85_BC、CRF55_01B、CRF59_01B, URF (CRF01_AE/BC) 和 URF (B/C)。其中以 CRF07_BC 为主, 94 例占 47.24%。见表 1。

2.3 耐药位点突变 出现耐药位点突变 31 例, 占 15.58%。其中针对 NNRTIs、NRTIs 和 PIs 耐药突变位点分别检出 20 例、2 例和 9 例, 占 64.52%、6.45% 和 29.03%。NNRTIs 耐药位点突变病例包括 6 例 V179D、6 例 V179E、2 例 K103N、1 例 E138K、1 例 V106I 和 4 例同时出现 2 个耐药位点突变的病例: 病例 WZ20190194 出现 K103N 和

V179T, 病例 WZ20190110 出现 K101E 和 G190A, 病例 WZ20190010 出现 Y181C 和 H221Y, 病例 WZ20190047 出现 V179D 和 K103R。NRTIs 耐药位

点突变病例为 1 例 M184V 和 1 例 V75M, PIs 耐药位点突变病例为 6 例 Q58E、2 例 L33F 和 1 例 M46I。

表 1 199 例未经 ART 治疗的 HIV-1 感染者基本特征 [n (%)]

项目	获得 <i>pol</i> 区序列病例	含耐药突变位点（ <i>n</i> =31）			
		NNRTIs	NRTIs	PIs	合计
性别					
男	159（79.90）	16（51.61）	1（3.23）	7（22.58）	24（77.42）
女	38（19.10）	3（9.68）	1（3.23）	2（6.45）	6（19.35）
不详	2（1.01）	1（3.23）	0	0	1（3.23）
年龄（岁）					
<30	43（21.61）	5（16.13）	1（3.23）	0	6（19.35）
30～	50（25.13）	6（19.35）	0	1（3.23）	7（22.58）
50～	77（38.69）	7（22.58）	1（3.23）	4（12.90）	12（38.71）
≥70	27（13.57）	1（3.23）	0	4（12.90）	5（16.13）
不详	2（1.01）	1（3.23）	0	0	1（3.23）
亚型					
CRF07_BC	94（47.24）	5（16.13）	1（3.23）	5（16.13）	11（35.48）
CRF01_AE	58（29.15）	4（12.90）	1（3.23）	4（12.90）	9（29.03）
CRF08_BC	13（6.53）	6（19.35）	0	0	6（19.35）
B	9（4.52）	2（6.45）	0	0	2（6.45）
CRF55_01B	3（1.51）	3（9.68）	0	0	3（9.68）
其他 ^a	22（11.06）	0	0	0	0
户籍					
温州市	166（83.42）	17（54.84）	2（6.45）	8（25.81）	27（87.10）
非温州市	31（15.58）	2（6.45）	0	1（3.23）	3（9.68）
不详	2（1.01）	1（3.23）	0	0	1（3.23）
感染途径					
同性性接触	46（23.12）	6（19.35）	1（3.23）	2（6.45）	9（29.03）
异性性接触	122（61.31）	9（29.03）	1（3.23）	7（22.58）	17（54.84）
注射	1（0.50）	0	0	0	0
不详	30（15.08）	5（16.13）	0	0	5（16.13）

注: a 包括 C、CRF59_01B、CRF85_BC、URF (CRF01_AE/BC) 和 URF (B/C)。

2.4 PDR 情况 发现 PDR 16 例, PDR 检出率为 8.04%。未发现同时耐 2 类或 3 类药物的病例。

NNRTIs 耐药位点突变病例中耐药 7 例, 检出率为 3.52%。2 例含 K103N 突变病例和病例 WZ20190194 对依非韦伦 (EFV)、奈韦拉平 (NVP) 高度耐药; 病例 WZ20190110 对 EFV、NVP、利匹韦林 (RPV) 高度耐药, 对依曲韦林 (ETR) 中度耐药, 对多拉韦林 (DOR) 低度耐药; 病例 WZ20190010 对 NVP、RPV 高度耐药, 对 EFV、

ETR、DOR 中度耐药; 病例 WZ20190047 对 EFV、NVP 中度耐药, 对 RPV 低度耐药; 1 例含 E138K 突变病例对 RPV 中度耐药; 含 V106I、V179D/E 突变病例未出现耐药。EFV、NVP、RPV 耐药比例分别为 3.02% (6/199)、3.02% (6/199) 和 2.01% (4/199), NRTIs 耐药位点突变病例中耐药 2 例, 检出率为 1.01%。1 例含 M184V 突变病例对恩曲他滨 (FTC, 温州市已停止单剂使用) 和拉米夫定 (3TC) 高度耐药, 对阿巴卡韦 (ABC) 低度耐药; 另 1 例含 V75M

突变病例对司他夫定 (D4T) 中度耐药, 对去羟肌苷 (DDI) 低度耐药。

PIs 耐药位点突变病例中耐药 7 例, 检出率为 3.52%。1 例含 M46I 突变病例对奈非那韦 (NFV)

中度耐药; 6 例含 Q58E 突变病例对替拉那韦 (TPV) 低度耐药; 2 例含 L33F 突变病例未引起耐药。见表 2。

表 2 16 例耐药病例对 NNRTIs、NRTIs 和 PIs 的耐药情况

耐药位点突变	病例数	NNRTIs					NRTIs					PIs	
		DOR	EFV	ETR	NVP	RPV	DDI	ABC	D4T	FTC	3TC	TPV	NFV
K103N	2	S	H	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S
K103N+V179T	1 (WZ20190194)	S	H	S	H	S	S	S	S	S	S	S	S
K101E+G190A	1 (WZ20190110)	L	H	I	H	H	S	S	S	S	S	S	S
Y181C+H221Y	1 (WZ20190010)	I	I	I	H	H	S	S	S	S	S	S	S
V179D+K103R	1 (WZ20190047)	S	I	S	I	L	S	S	S	S	S	S	S
E138K	1	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
M184V	1	S	S	S	S	S	S	L	S	H	H	S	S
V75M	1	S	S	S	S	S	L	S	I	S	S	S	S
M46I	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Q58E	6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	L	S

注: S, 敏感; P, 潜在耐药; L, 低度耐药; I, 中度耐药; H, 高度耐药; DOR, 多拉韦林; EFV, 依非韦伦; ETR, 依曲韦林; NVP, 奈韦拉平; RPV, 利匹韦林; DDI, 去羟肌苷; ABC, 阿巴卡韦; D4T, 司他夫定; FTC, 恩曲他滨; 3TC, 拉米夫定; TPV, 替拉那韦; NFV, 奈非那韦。

3 讨论

研究发现温州市 HIV-1 基因亚型以 CRF07_BC 和 CRF01_AE 为主, 其中 CRF07_BC 比例最大 (47.24%)。未经 ART 治疗的 HIV-1 感染者 PDR 检出率为 8.04%, 高于我国整体未经 ART 治疗的 HIV 感染者的 3.6%^[7] 和北京市的 3.4%^[10]。NNRTIs、NRTIs 和 PIs PDR 检出率分别为 3.52%、1.01% 和 3.52%, 前两者低于 2014—2017 年浙江省耐药监测结果 (11.1%), PIs 耐药与之 (2.0%) 接近^[11]。耐药位点突变率为 15.58%, 低于绍兴市的 37.78%^[12]。提示目前温州市 HIV 感染者可能存在耐药毒株传播。HIV 感染者应在确证后尽快开始抗病毒治疗, 降低病毒载量, 减少传播^[13-14]; 加强对 HIV-1 感染者的健康教育, 最大限度提高治疗依从性, 减少脱失和危险行为的发生; 建立可有效减少 PDR 的新型防治模式。

本研究中, 含 V179D/E 耐药位点突变病例出现频率最高, 但未出现耐药病例, V179D/E 可降低对 EFV、NVP 的敏感性 2~5 倍^[15]。检出含 K103N 突变病例 2 例。K103N 是经 NNRTIs 治疗的 HIV 感染者最常见的耐药突变^[4, 15-16], K103N 单一突变可能

导致 HIV 感染者对 EFV、NVP 高度耐药^[15, 17], 此时不推荐进一步使用第一代 NNRTIs^[15]。有 4 例病例 (WZ20190194、WZ20190110、WZ20190010 和 WZ20190047) 同时出现 2 个耐药突变, 对多种 NNRTIs 药物产生中、高度耐药。这些病例中出现的 V179D/T、K101E 和 K103R 属次要非多态性突变位点, H221Y 属多态性附属突变位点, 单独出现时对 NNRTIs 的敏感性没有影响, 但联合其他 NNRTIs 耐药突变位点通过协同作用可导致对 NNRTIs 耐药^[15]。同时出现多个耐药位点突变对耐药的产生构成更大的威胁, 增加治疗难度。本研究显示, PDR 病例中主要 NNRTIs 耐药突变位点 K103N、Y181C、G190A 均已出现, 可导致对 1 种或几种 NNRTIs 高度耐药^[15], 提示温州市 PDR 病例中 NNRTIs 耐药突变流行情况较为复杂, 初始治疗或更换治疗方案时均要注意 NNRTIs 的原发性耐药和交叉耐药。本研究检出含 M184V 突变的病例 1 例。M184V 是 NRTIs 最常见的耐药位点突变, 其反转录酶 184 位的氨基酸 M 被氨基酸 V 所取代, 对 3TC 高度耐药 (>100 倍), 并且在接受单一 3TC 治疗后迅速出现^[15]。本研究在 PIs 耐药位点突变检测中仅检出已被 WHO 淘汰^[18] 的 TPV 和 NFV (温州市未使用) 的耐药病例。

DOR 是我国新上市的 NNRTIs 药物。本研究在病例 WZ20190110 和 WZ20190010 中分别检出对 DOR 低度和中度耐药, 病例 WZ20190010 同时对 EFV、ETR 中度耐药。有研究报道, DOR 的高水平耐药与 EFV、ETR 的使用存在很强的相关性, 而与 RPV 相关性较低^[18-19]。提示未经治疗的 HIV-1 感染者中可能有 NNRTIs 耐药株流行, 并且 NNRTIs 形成耐药的遗传屏障弱, 已批准的 NNRTIs 药物之间具有交叉耐药^[15]。

综上所述, 温州市未治疗 HIV-1 感染者 PDR 情况对目前艾滋病抗病毒治疗方案中骨干药物 NRTIs 和 PIs 没有实质影响, 但 NNRTIs 耐药情况较不乐观。提示温州市今后应加大对 HIV-1 感染者的 PDR 检测, 及时发现耐药, 为临床治疗提供依据, 并在后续治疗过程中密切观察临床治疗效果, 及时调整治疗方案。

参考文献

- [1] 吴亚松, 马烨. HIV 耐药评估和预防策略 [J]. 传染病信息, 2017, 30 (6): 351-354.
- [2] World Health Organization. HIV drug resistance surveillance guidance: updated 2015 [EB/OL]. (2017-10-29) [2021-02-08]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204471/1/9789241510097_eng.pdf?ua=1.
- [3] World Health Organization. Surveillance of HIV drug resistance in adults initiating antiretroviral therapy (Pre-treatment HIV drug resistance) [EB/OL]. (2017-05-08) [2021-02-08]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112802/1/9789241507196_eng.pdf?ua=1.
- [4] 刘佳, 许巍, 何翠, 等. 河南省新确诊 HIV 感染者中 HIV 原发耐药状况研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37 (5): 643-647.
- [5] 陈孙云, 郭春辉, 吴楠楠, 等. 江阴市 HIV-1 感染者亚型及原发耐药基因突变研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018, 32 (4): 377-381.
- [6] World Health Organization. WHO HIV drug resistance report 2012 [EB/OL]. [2021-02-08]. <http://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/report2012/en>.
- [7] ZHAO S, FENG Y, HU J, et al. Prevalence of transmitted HIV drug resistance in antiretroviral treatment naïve newly diagnosed individuals in China [J]. Sci Rep, 2018, 8 (1): 12273.
- [8] 叶振森, 金茜, 王大勇, 等. 1985—2016 年浙江省温州市艾滋病病毒感染者/艾滋病患者生存时间及影响因素分析 [J]. 疾病监测, 2017, 32 (7): 557-562.
- [9] ZHANG J, GUO Z, YANG J, et al. Genetic diversity of HIV-1 and transmitted drug resistance among newly diagnosed individuals with HIV infection in Hangzhou, China [J]. J Med Virol, 2015, 87 (10): 1668-1676.
- [10] 孙伟东, 姜天俊, 黄辉煌, 等. 北京地区 HIV-1 感染者治疗前耐药特征及 2 年抗病毒治疗效果研究 [J]. 国际病毒学杂志, 2020, 27 (3): 224-227.
- [11] XU Y, PENG X, PENG X, et al. Characterization of HIV-1 subtypes and transmitted drug resistance among treatment-naïve HIV-infected individuals in Zhejiang, China, 2014-2017 [J]. Arch Virol, 2018, 163 (8): 2233-2237.
- [12] 曹栋卿, 赵丹燕, 何婷婷, 等. 绍兴市 HIV-1 毒株的耐药变异研究 [J]. 中国艾滋病性病, 2017, 23 (4): 284-287.
- [13] World Health Organization. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection, recommendations for a public health approach, second edition, 2016 [EB/OL]. (2019-11-06) [2021-02-08]. <https://www.who.int/hiv/pub/arv/arv-2016/en>.
- [14] 李敬云. HIV 耐药的现状、挑战与应对 [J]. 传染病信息, 2019, 32 (6): 490-495.
- [15] 邵一鸣. HIV 耐药监测策略和检测技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [16] 李扬, 邢辉. 未治疗艾滋病患者中 HIV 耐药株的传播研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36 (7): 540-544.
- [17] 阮尉月清, 刘家法, 张米, 等. 云南省男男性行为人群 HIV/AIDS 病例抗病毒治疗失败基因型耐药分析 [J]. 预防医学, 2020, 32 (10): 987-991, 995.
- [18] 谢小慧, 于凤婷, 张霞, 等. 2019 年北京地区 HIV-1 感染者传播性耐药情况 [J]. 中国艾滋病性病, 2020, 26 (6): 579-583.
- [19] STERRANTINO G, BORGHI V, CALLEGARO A P, et al. Prevalence of predicted resistance to doravirine in HIV-1-positive patients after exposure to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53 (4): 515-519.

收稿日期: 2020-12-30 修回日期: 2021-02-08 本文编辑: 徐文璐