

医工结合研究专题

应用高通量测序方法研究 CRF01-AE 亚型 HIV-1 毒株
耐药突变的分子进化规律

邓永岳^{1, 2, 3}, 吴守丽^{1, 3}, 邱丽君⁴, 严延生^{1, 3}

(1. 福建医科大学 公共卫生学院, 福建 福州, 350001; 2. 厦门大学附属中山医院 感染科, 福建 厦门, 361000;
3. 福建省疾病预防控制中心 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福建 福州, 350001;
4. 福建省立医院 医院感染管理部, 福建 福州, 350001)

摘要: 目的 探讨 CRF01-AE 亚型人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1) 毒株在药物选择压力下耐药突变发生和演变的规律。
方法 选取 5 例一线方案治疗失败的 CRF01-AE 亚型 HIV-1 患者, 收集其 6~8 年抗病毒治疗过程中的系列血样, 应用高通量测序方法进行基因型耐药突变分析。**结果** ① 5 例患者在启动治疗后早期即出现 M184V 突变以及非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) 类耐药突变, 常见的有 K101E、G190A 和 K103N, 其中 M184V + G190A + TAMs 是常见突变组合, 停药或更换二线药物, 这些突变也始终存在。② 胸腺嘧啶脱氧核苷类似物变异 (TAMs) 突变成过程中, 有 3 例患者表现为 TAM2 路径, 1 例患者为 TAM1 途径, 还有 1 例患者前期只有 TAM2 路径的突变, 后期累加上 TAM1 途径的突变。③ 有 3 例患者在治疗过程中分别形成 TAMs、Q151M 复合体和 T69 插入复合物等多重耐药突变, 更换二线方案后仍然治疗失败。**结论** ① CRF01-AE 亚型耐药患者在用药早期即开始出现耐药突变, 数种突变逐渐累加, 最终导致临床耐药, 应尽早进行耐药突变监测。② TAMs 突变通过 2 种途径竞争性发展, CRF01-AE 亚型更偏向于 TAM2 途径, 但随着治疗时间延长, 2 种途径可以产生融合。③ 更换二线方案前应排查针对替诺福韦 (TDF) 的耐药突变, 其可能会导致二线方案无效。

关键词: 人类免疫缺陷病毒 1 型; 耐药突变; 高通量测序; 分子进化规律; 非核苷类逆转录酶抑制剂
中图分类号: R 373.9; R 512.91 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2021)19-001-06 **DOI:** 10.7619/jcmp.20211220

Study on molecular evolutionary rules of drug resistance
mutations in CRF01-AE subtype of HIV-1
strain by high-throughput sequencing

DENG Yongyue^{1, 2, 3}, WU Shouli^{1, 3}, QIU Lijun⁴, YAN Yansheng^{1, 3}

(1. School of Public Health, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian, 350001;
2. Department of Infection, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen, Fujian, 361000;
3. Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fujian Provincial Center
for Disease Control and Prevention, Fuzhou, Fujian, 350001; 4. Department of Infection
Management, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian, 350001)

Abstract: Objective To investigate the occurrence and development rules of drug-resistant mutations in CRF01-AE subtype of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strain under the pressure of drug selection. **Methods** Totally 5 HIV-1 CRF01-AE subtype patients with failure of first-line antiretroviral therapy were selected, and blood samples were longitudinally collected during the course of 6 to 8 years of treatment. Genotypic analysis of drug resistance mutations was performed by high throughput sequencing. **Results** ① All the patients had the M184V mutation and a certain type of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) high-frequency major drug resistance mutations at early stage after medication, common sites were K101E, G190A and K103N, and combination of M184V plus G190A plus TAMs was the common mutations. Mutations was still existed after stopping the corresponding drugs or switching to second-line drugs. ② In the process of thymidine analogue mutations (TAMs) formation, 3 patients had TAM2 pathway, 1 patient had TAM1 pathway, and another patient

had only TAM2 pathway mutations in the early stage and accumulated TAM1 pathway mutations in the later stage. ③ Three patients formed multi-drug resistance mutations including TAMs, Q151 complex and 69 insertion complexes, and they still failed in treatment after changing the second-line regimen. **Conclusion** ① CRF01-AE subtype drug resistance patients begin to develop drug resistance mutations at the early stage of drug use, and several mutations gradually lead to clinical drug resistance, so drug resistance mutation monitoring should be carried out as soon as possible. ② TAMs mutations are competitive in two pathways, CRF01-AE favors the TAM2 pathway. As the treatment time is prolonged, the two pathways can produce fusion. ③ It is recommended to carry out drug resistance testing before switching to the second-line protocol. If the resistance mutation against tenofovir (TDF) is found, the second-line regimen may be ineffective.

Key words: human immunodeficiency virus type 1; drug resistance mutation; high-throughput sequencing; molecular evolutionary rules; non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors

大量研究^[1-3]表明,随着艾滋病抗反转录病毒治疗(ART)的推广,耐药的流行趋势也越来越严重。一项针对来自 64 个低收入国家的 56 044 例感染人类免疫缺陷病毒(HIV)的成年人的荟萃分析^[4]估计,在所有地区中每年的治疗前耐药率的年增长率均大幅增加。鉴于耐药现状,世界卫生组织(WHO)强烈推荐更有效地利用有限的资金对治疗患者进行耐药监测并努力确保提供适当的一线药物^[5],这就要求对当地流行毒株耐药突变的分子进化规律有足够的了解,才能合理选择耐药监测的时间点。近年来,国外学者应用高通量测序方法研究 HIV 耐药突变取得了很好的效果,但国内未见报道。本研究参考 DUDLEY D M 等^[6]建立的检测方法,重新设计适合的测序引物,研究本地区流行毒株在接受抗病毒治疗过程中耐药突变发生和发展的规律,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 5 例在福建省疾控中心经 6~8 年一线抗病毒治疗并发生耐药的人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1) CRF01-AE 亚型艾滋病患者作为研究对象,每例患者每年至少随访 1 次,总随访次数≥6 次,随访时收集患者的 EDTA 抗凝全血, -80℃ 低温冰箱保存,统一检测。共收集 41 份血清标本用于分析,病毒载量 >1 000 copies/mL 的标本可用于耐药检测。

1.2 方法

1.2.1 扩增子文库准备: ① 提取 RNA, 取 140 μL 血浆, 采用 Qiagen 试剂盒提取 RNA, 操作严格按照说明书进行。② 巢式 PCR 第 1 轮, 采用一步法 RT-PCR, PCR 反应条件为 50℃ 60 min, 94℃

2 min, 94℃ 15 s, 60℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 2 次), 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 2 次), 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 16 次), 68℃ 10 min。引物信息见表 1。③ 巢式 PCR 第 2 轮, 分 3 个片段扩增 pol 基因 2 199~3 285 区域, 标记为 Pro、RT-A、RT-B, PCR 反应条件为 94℃ 2 min, 94℃ 15 s, 60℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 2 次), 94℃ 15 s, 58℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 2 次), 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 68℃ 30 s(循环 16 次), 68℃ 10 min。模板特异性引物序列信息见表 2。

1.2.2 高通量测序: 扩增子文库经过纯化、质控和定量以及稀释和富集后进行 EmPCR 和 Roche 454 高通量测序。

1.2.3 序列分析: 使用 Mothur 软件(Version 1.31.2, <http://www.mothur.org/>)对原始测序数据进行过滤, 根据质量分数修剪 3' 端, 去除 Roche/454 amplicon adaptors 和短于 50 bp 的序列。将序列与 HXB2 参考株(GenBank NC_001802)进行比对, 然后采用 GATK 软件进行 SNP calling, 使用参数为“stand_call_conf 50 -stand_emit_conf 10”。最后根据 Stanford HIV drug resistance data base(Stanford HIVDB)已知耐药突变, 列出相应位点的特定氨基酸改变, 将 SNP calling 的结果与之比对, 计算含有某个位点耐药突变的序列在覆盖到该位点的总序列中的比率, <20% 的耐药突变定义为劣势耐药突变。

2 结果

2.1 标本的基本信息

共选取 5 例患者在抗病毒治疗前后的系列标本进行高通量测序分析, 随访 7~9 次, 时间跨度

6~8 年,标本的基本信息见表 3。

表 1 一步法 RT-PCR 引物信息

方向	引物名称	引物序列	位置
正向	MAW-26	TGGAAATGTGGAAGGAAGGAC	2 027 ~ 2 050
反向	RT-21	CTGTATTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG	3 509 ~ 3 539

表 2 模板特异性引物序列信息

名称	序列	位置	扩增长度
Pro-F	5'-CAGAGCCAAACAGCCCCACCA-3'	2 147 ~ 2 166	459 bp
Pro-R	5'-GGGCCATCCATTCTGGC-3'	2 588 ~ 2 605	
RTA-F	5'-AGCCCTATTGAGACTGTACCAG-3'	2 556 ~ 2 577	
RTA-R	5'-GTCATGCTACTTTGGAATATTG-3'	3 022 ~ 3 043	488 bp
RTB-F	5'-ACCATACCTAGTATAAACAATGAG-3'	2 940 ~ 2 963	
RTB-R	5'-TGCCAGTTCAGCTCTGCTTCTC-3'	3 438 ~ 3 461	

表 3 标本的基本信息

患者	标本序号	治疗方案	采样时间	CD4/(个/mm ³)	RNA/(copies/mL)
第 1 例	1	D4T + 3TC + NVP	2005 - 09 - 15	108	35 442
	2	D4T + 3TC + NVP	2006 - 02 - 14	96	56 323
	3	D4T + 3TC + NVP	2007 - 07 - 10	150	10 520
	4	AZT + IDV + DDI	2009 - 01 - 08	5	21 000
	5	AZT + IDV + DDI	2009 - 10 - 10	165	2 532
	6	AZT + IDV + DDI	2010 - 04 - 07	160	9 606
	7	克力芝 + 3TC + TDF	2011 - 08 - 03	130	45 345
	8	克力芝 + 3TC + TDF	2012 - 07 - 03	18	373 000
第 2 例	9	克力芝 + 3TC + TDF	2013 - 03 - 26	240	15 480
	1	AZT + 3TC + NVP	2007 - 09 - 25	162	24 556
	2	AZT + 3TC + NVP	2007 - 12 - 10	153	24 366
	3	AZT + 3TC + NVP	2008 - 12 - 10	93	100 200
	4	AZT + 3TC + NVP	2009 - 06 - 10	47	89 598
	5	AZT + DDI + IDV	2010 - 03 - 03	206	6 584
	6	TDF + 克力芝 + 3TC	2011 - 09 - 08	309	2 546
	7	TDF + 克力芝 + 3TC	2012 - 04 - 10	156	609 000
第 3 例	8	TDF + 克力芝 + 3TC	2013 - 01 - 09	53	1 300 000
	1	D4T + 3TC + EFV	2006 - 09 - 08	184	34 566
	2	D4T + 3TC + EFV	2007 - 04 - 10	142	66 542
	3	D4T + 3TC + EFV	2008 - 10 - 20	173	52 344
	4	D4T + 3TC + EFV	2009 - 10 - 20	228	34 649
	5	D4T + 3TC + EFV	2010 - 07 - 14	20	26 951
	6	D4T + 3TC	2011 - 04 - 13	69	10 718
	7	TDF + 3TC + 克力芝	2012 - 08 - 07	28	154 000
第 4 例	8	TDF + 3TC + 克力芝	2013 - 02 - 05	6	3 201 000
	1	D4T + 3TC + NVP	2005 - 08 - 17	183	34 554
	2	D4T + 3TC + NVP	2006 - 03 - 20	365	22 454
	3	D4T + 3TC + NVP	2007 - 12 - 10	476	12 446
	4	D4T + 3TC + NVP	2008 - 12 - 10	576	10 200
	5	D4T + 3TC + NVP	2009 - 06 - 10	546	6 369
	6	D4T + 3TC + NVP	2010 - 03 - 03	516	7 991
	7	TDF + 3TC + 克力芝	2011 - 11 - 03	268	0
第 5 例	8	TDF + 3TC + 克力芝	2012 - 02 - 08	275	0
	1	D4T + 3TC + NVP	2007 - 07 - 25	186	13 220
	2	D4T + 3TC + NVP	2007 - 09 - 20	315	6 556
	3	D4T + 3TC + NVP	2008 - 12 - 18	231	8 955
	4	D4T + 3TC + NVP	2009 - 09 - 24	216	12 542
	5	D4T + 3TC + NVP	2010 - 09 - 16	160	10 669
	6	D4T + 3TC + NVP	2011 - 06 - 23	218	87 552
	7	克力芝 + 3TC + TDF	2012 - 04 - 25	185	0
	8	克力芝 + 3TC + TDF	2013 - 04 - 23	318	0

D4T: 司他夫定; 3TC: 拉米夫定; EFV: 依非韦伦; TDF: 替诺福韦; NVP: 奈韦拉平; AZT: 齐多夫定; IDV: 茚地那韦; DDI: 去羟肌苷。

2.2 耐药突变特征

第 1 例患者治疗 5 个月后,即检测到接近 100% 高频的核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs) M184V 突变,此后一直持续存在,即使更换治疗方案并停用 3TC 长达 29 个月,也始终能被检测到,见表 4。治疗 3 个月后,即检测到高频胸腺嘧啶脱氧核苷类似物变异 (TAMs) D67N 和 K70R,其中 D67N 在整个治疗过程中持续存在,但 K70R 在下次随访中就不再出现。一线方案治疗 40 个月后出现 Q151M/A62V/V75I,换二线方案治疗后又出现 F77L 和 F116Y,形成完整的 151 复合体。非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs) 类耐药突变比较简单,在用药后第 1 次随访即检测到高频主要耐药突变 G190A,比率接近 100.00%,停用奈韦拉平 (NVP) 后未用其他 NNRTIs 药,但 4 年后仍存在该类药物的高频突变。患者在启动治疗后第 3 次随访时换用含蛋白酶抑制剂 (PIs) 类药物茚地那韦 (IDV) 的方案,在第 4 次随访时就检测到 PI 类耐药,即高频的 M46I (99.96%) 和中高频的 I84V (61.66%),第 5 次随访时其频率都接近 100.00%,同时还新出现了 L76V (100.00%),这 3 种耐药突变在随后的几次检测中一直存在,即使换含克力芝的二线方案也一样。

第 2 例患者治疗 3 个月后,即出现高频 M184V 突变,且一直维持在整个治疗过程中,见表 5。在治疗过程中也形成 TAMs 突变,与第 1 例患者不同的是,第 2 例患者主要通过 TAM1 途径。患者在用药后第 1 次随访即检测到 NNRTIs 类高

频主要耐药突变 K101E 和 G190A,停用相应药物或换二线药物后,突变也始终存在;患者换用含 PIs 类药物 IDV 的方案 5 个月后,检测到低频 V82A (2.73%);在换含克力芝的二线方案 2 个月后,检测到都接近 100.00% 的 M46I 和 V82A;第 6 次随访时,在此基础累加了高频的 I47V (100.00%)、F53L (98.44%) 和 I54V (99.72%);第 7 次随访时继续增加了 L76V (80.11%);总体上而言,使用 PIs 类药后,PIs 类药物突变不断累加,至末次随访时共检测到 5 个接近 100.00% 高频的主要突变。

第 3 例患者治疗 7 个月后出现 M184V 突变且一直维持在整个治疗过程中,见表 6。与第 1 例和第 2 例患者不同的是,该患者的一线 and 二线方案都含拉米夫定 (3TC),治疗过程中主要通过 TAM2 途径形成多重耐药 TAMs,治疗早期即出现高频 D67N、K70R,治疗中 T215F 和 K219Q 频率逐渐增加。治疗中还形成不完整的第 2 种多重耐药: 69 插入复合物,可以看到 T69N/D 从低频到高频的演变过程。NNRTIs 类耐药突变方面,患者在用药后第 1 次随访即检测到 K103N 和 G190A,停用相应药物或换二线药物,突变也始终存在。该患者在治疗后第 6 次随访前使用 PIs 类药物 (含克力芝的二线方案),随后就检测到高频的 M46I (100.00%)、I47V/A (98.88%)、I84V (100.00%) 和低频 V82A (1.16%);第 7 次随访时,3 种高频突变维持不变,V82A 未检测到,但检测到低频 G73S (1.03%)。

表 4 第 1 例患者的主要耐药突变频率情况 [n (%)]

标本序号	M184V	D67N	K219Q	A62V	Q151M	G190A	K238T	M46I	I84V
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	6 302 (98.79)	559 (100.00)	—	—	—	6 262 (99.20)	—	—	—
3	7 871 (98.85)	7 781 (98.59)	—	—	—	7 818 (98.88)	2 401 (29.12)	—	—
4	5 873 (99.55)	1 305 (99.77)	4 953 (99.41)	1 804 (99.72)	—	5 860 (99.91)	3 874 (99.94)	—	—
5	6 602 (99.45)	4 876 (99.91)	1 160 (32.63)	2 051 (99.46)	3 485 (100.00)	6 592 (99.93)	4 886 (99.91)	2 517 (99.96)	1 454 (61.66)
6	1 340 (99.25)	2 041 (99.46)	860 (90.52)	2 091 (99.66)	6 235 (100.00)	1 340 (99.25)	850 (100.00)	2 583 (99.84)	944 (99.89)
7	8 168 (99.62)	8 612 (99.89)	4 379 (82.08)	6 119 (99.55)	2 013 (100.00)	2 850 (100.00)	4 897 (100.00)	3 042 (99.70)	1 300 (92.85)
8	8 682 (99.71)	3 065 (100.00)	2 152 (43.59)	370 (100.00)	3 041 (100.00)	8 602 (99.89)	6 109 (99.55)	2 542 (99.96)	300 (100.00)
9	858 (98.51)	2 041 (100.00)	—	276 (99.63)	4 412 (100.00)	2 037 (99.85)	2 295 (99.31)	2 295 (99.73)	874 (100.00)

表 5 第 2 例患者的主要耐药突变频率情况 [n (%)]

标本序号	M184V	D67N	M41L	L210W	T215F	G190A	K101E	V82A	M46I
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	5 237 (98.24)	6 430 (99.92)	—	—
3	8 013 (99.91)	240 (8.72)	3 715 (95.97)	3 990 (82.26)	3 990 (82.26)	7 937 (99.84)	3 145 (99.80)	—	—
4	9 882 (99.78)	4 866 (99.91)	3 352 (97.57)	5 559 (93.58)	5 559 (93.58)	9 798 (99.83)	3 382 (97.57)	—	—
5	7 540 (99.88)	2 954 (99.89)	2 954 (99.89)	2 642 (99.92)	2 642 (99.92)	7 483 (99.97)	3 103 (98.82)	57 (2.73)	—
6	6 512 (99.87)	7 751 (98.59)	4 056 (99.93)	620 (91.17)	620 (91.17)	6 470 (99.92)	2 776 (98.44)	1 613 (99.81)	2 467 (100.00)
7	5 703 (99.87)	6 119 (99.73)	6 119 (99.73)	436 (100.00)	436 (100.00)	5 563 (99.61)	5 247 (98.29)	1 566 (99.87)	2 227 (100.00)
8	8 144 (99.82)	8 622 (99.89)	7 837 (99.84)	1 121 (98.59)	1 121 (98.59)	8 072 (99.98)	6 592 (99.93)	1 780 (97.80)	1 465 (100.00)

表 6 第 3 例患者的主要耐药突变频率情况[*n*(%)]

标本序号	耐药突变频率%(突变序列数/总序列数)								
	M184V	D67N	K70R	K219Q	T69N/D	K103N	G190A	M46I	I47V
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	7 840(99.84)	511(100.00)	511(100.00)	—	88(15.82)	—	6 173(80.69)	—	—
3	7 657(99.85)	6 140(90.65)	6 140(90.65)	5 222(85.10)	213(3.12)	6 102(99.28)	7 498(99.97)	—	41(1.72)
4	10 151(99.91)	6 513(98.54)	5 443(99.54)	7 155(96.07)	6 273(80.69)	3 743(98.88)	9 965(99.97)	—	—
5	7 576(99.86)	5 433(99.54)	5 433(99.54)	5 533(99.80)	5 433(99.54)	5 305(99.71)	7 474(99.77)	—	—
6	4 886(99.91)	4 256(98.42)	4 091(99.66)	5 873(99.55)	9 633(99.85)	5 453(99.54)	5 414(99.95)	—	—
7	9 681(99.84)	3 461(96.97)	2 923(99.55)	6 413(98.54)	2 923(99.55)	3 502(94.67)	9 501(99.93)	2 628(100.00)	2 743(98.88)
8	8 082(99.80)	2 587(97.03)	2 587(97.03)	5 296(99.04)	4 246(98.42)	1 745(50.96)	7 953(99.93)	2 190(99.86)	2 337(99.10)

第 4 例患者治疗 7 个月后发现 M184V 突变并一直维持在整个治疗过程中,换二线方案前未出现明显的多重耐药, TAM 类突变仅有 K219Q, 而 M41L 和 K70R 一度出现低频,但随后消失。NNRTIs 类耐药突变方面,患者在用药后第 1 次随访即检测到高频主要耐药突变 G190A, 还出现一过性低频 K103N 和 V108I。该患者在第 6 次随访前才使用 PIs 类药物(含克力芝的二线方案),更换方案后治疗有效,病毒转阴。在整个治疗过程中,未监测到高频 PIs 类突变,仅在第 2 次随访时检测到一过性的低频 PIs 类 K20R(14.15%),第 4 次随访时检测到一过性的低频 PIs 类 I84V(1.69%)。

第 5 例患者治疗 2 个月后发现 M184V 突变并一直维持在整个治疗过程中,治疗中通过 TAM2 途径形成 TAMs 突变,但出现时间较第 3 例患者更晚,在第 3 次随访后逐渐形成,换二线方案前未出现明显的多重耐药。患者在用药后第 1 次随访即检测到高频主要耐药突变 G190A, 治疗中后期出现高频 K103N。在第 6 次随访前才使用 PIs 类药物(含克力芝的二线方案),更换方案后治疗有效,病毒转阴。整个治疗过程中未监测到高频 PIs 类突变。

3 讨 论

HIV-1 在宿主体内不断变异,形成了一个由高度同源而又各不相同的变异体组成的病毒群,即所谓的准种。由于耐药突变的适应性代价,耐药准种在治疗前一般以低比率劣势准种的形式存在,在药物选择压力下,劣势耐药准种具有生长优势,会被筛选出来,逐渐变成体内优势病毒株,这被认为是治疗失败的主要原因。掌握劣势耐药准种分子进化规律对制订耐药监测方案有重要意义,但由于受到检测劣势突变的方法学限制,在这方面的研究较少。既往研究^[7-9]大多采用的是克隆 RT-PCR 产物测序法、单基因组扩增法、等位基因特异性 PCR 法等,但都不能很好地体现比率 < 20%

的“劣势准种”,因此无法掌握耐药突变早期的发生发展规律。本研究成功运用高通量测序方法,检测出比率 < 1% 的 HIV“劣势准种”,观察到耐药准种从极低占比开始逐渐发展为高占比优势毒株的过程,这将为临床制订恰当的耐药监测方案提供科学依据。

3.1 NRTIs 类耐药突变的进化规律

NRTIs 是首类被美国食品药品监督管理局(FDA)批准的药物,也是目前应用得最多的一类药物。本研究的一线 and 二线方案中均包含 3TC, 本研究的 5 例患者均在治疗后第 1 次随访时就出现 M184V, 第 5 例患者更是在启动治疗 2 个月后即检测到了这一突变,提示耐药监测的时间应适当提前。本研究还发现的显著特征是 M184V 的顽固性,作者观察到 M184V 一旦出现后,就会一直维持在整个治疗过程中,即使停用 3TC 也不会消失,例如第 1 例患者停药达 29 个月,第 2 例患者停药达 21 个月,但仍然能继续检测到 M184V 突变。一线方案中的另一种 NRTI 药物是胸苷类似物齐多夫定(AZT)或司他夫定(D4T),其选择出来的耐药突变主要是 TAMs, TAMs 促进焦磷酸水解,并参与 AZT 和的 D4T 的切除^[10-11]。TAMs 的形成是不断积累的过程,其在 HIV-1 逆转录酶的氨基酸变化包括 2 个不同的的途径: TAM1 途径(M41L、L210W、T215Y, 偶见 D67N)和 TAM2 途径(D67N、K70R、T215F、K219E/Q)^[12]。作者观察到第 1、3、4、5 例患者是 TAM2 路径,第 2 例患者是 TAM1 途径。借助于低频突变的检测,本研究从第 2 例患者身上发现 2 种不同途径的进化模式,即在用药初期时所有 6 种突变 TAMs 都会产生,但存在竞争关系,其中一种途径的突变会占上风,频率逐渐增加,而另一种途径的突变会被淘汰。但是 2 种不同途径的突变并不是绝对不相容的,随着治疗时间的延长,不同途径的突变也会发生组合,例如第 3 例患者前期只有途径 2 的突变,第 6 次随访后累加途径 1 的突变(M41L),其原

因可能是这位患者当时已经持续使用了 5 年的 D4T。

3.2 NNRTIs 类耐药突变进化规律

与其他类耐药显著减少复制适应性不同的是, NNRTIs 的单核苷酸的变化就可能导致高水平耐药性,同时只有轻微的复制适应性损失^[13]。本研究观察到 5 例患者中只有第 3 例患者在用药后期累积了 4 种突变,其他 4 例患者都只有 1~2 种突变。既往报道中,一般主要的 NNRTIs 突变包括: K103N、V106A/M、A98G、Y181C/I,但本研究观察到的是 G190A 几乎“一枝独秀”,其特点与此前讨论的 M184V 类似,出现的时间极早、持续时间极长、停药后不消失,似乎在 CRF01-AE 亚型中, G190A 的竞争优势非常明显。因为,通过高通量测序可以发现治疗过程中其他突变通常只会低频出现,大多数随即消失,只有少数逐渐累积到耐药中, G190A 的这种适应性优势现象在之前的报道中未被提及。有学者^[14-15]分析中国治疗失败的 HIV 感染者耐药变异结果, NRTI 类最多的是 M184V (42.7%), NNRTI 类最多的是 G190A (23.4%), 与本研究结果一致, 5 例患者都存在 M184V + G190A 的基本组合,说明这种组合有治疗失败的预警价值。关键的是,作者发现这 2 种突变都是非常迅速地出现,都在治疗后第 1 次随访就可以检测到,说明了及早进行耐药监测的重要性。

5 例患者更换相同的二线方案后, 3 例无效, 2 例病毒转阴,换药有效。与患者开始二线方案前的耐药情况比较发现不同之处在于换药前是否存在针对 NRTIs 类的多重耐药突变,第 1 例患者有 Q151M 多重耐药复合体,第 2 例患者有 TAM1 途径耐药组合,第 3 例患者有 T69 插入多重耐药复合体,其都出现换药失败,而第 4、5 例患者未发现这些多重耐药突变,二线治疗获得成功。因此,耐药监测对用药及一线方案失败后更换二线治疗方案具有重要的指导意义。

综上所述,本研究应用高通量测序方法初步阐明了 CRF01-AE 亚型患者在接受抗病毒治疗过程中 pol 基因区耐药突变的分子进化规律,这对准确监测耐药发生并确保提供适当的一线药物方案有重要意义。同时,本研究也发现,随访间隔时间过长,特别是治疗初期没有尽早开展耐药检测,对完全掌握耐药突变的进化规律会造成一定的影响,今后的研究中还需改进。

参考文献

- [1] World Health Organization. HIV drug resistance report 2019 [EB/OL]. (2019-07-05) [2020-10-01]. <https://www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2019/en/>.
- [2] YE J R, HAO M Q, XING H, *et al.* Transmitted HIV drug resistance among individuals with newly diagnosed HIV infection: a multicenter observational study [J]. AIDS, 2020, 34 (4): 609-619.
- [3] 吴亚松, 马烨. 中国艾滋病病毒耐药现状 [J]. 新发传染病电子杂志, 2019, 4(3): 181-184.
- [4] GUPTA R K, GREGSON J, PARKIN N, *et al.* HIV-1 drug resistance before initiation or re-initiation of first-line antiretroviral therapy in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-regression analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(3): 346-355.
- [5] BENNETT D E, MYATT M, BERTAGNOLIO S, *et al.* Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment [J]. Antivir Ther, 2008, 13(Suppl 2): 25-36.
- [6] DUDLEY D M, CHIN E N, BIMBER B N, *et al.* Low-cost ultra-wide genotyping using Roche/454 pyrosequencing for surveillance of HIV drug resistance [J]. PLoS One, 2012, 7 (5): e36494.
- [7] BRUN-VÉZINET F, COSTAGLIOLA D, KHALED M A, *et al.* Clinically validated genotype analysis: guiding principles and statistical concerns [J]. Antivir Ther, 2004, 9(4): 465-478.
- [8] HIRSCH M S, GÜNTARD H F, SCHAPIRO J M, *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.
- [9] 焦丽燕, 刘永健, 郭东星, 等. 两种 HIV-1 耐药准种分析方法的比较 [J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(3): 261-264.
- [10] RHEE S Y, KASSAYE S G, BARROW G, *et al.* HIV-1 transmitted drug resistance surveillance: shifting trends in study design and prevalence estimates [J]. J Int AIDS Soc, 2020, 23(9): e25611.
- [11] FERREIRA A C G, COELHO L E, GRINSZTEJN E, *et al.* Transmitted drug resistance in patients with acute/recent HIV infection in Brazil [J]. Braz J Infect Dis, 2017, 21(4): 396-401.
- [12] HASSAN A S, ESBJÖRNSSON J, WAHOME E, *et al.* HIV-1 subtype diversity, transmission networks and transmitted drug resistance amongst acute and early infected MSM populations from Coastal Kenya [J]. PLoS One, 2018, 13(12): e0206177.
- [13] WENSING A M, CALVEZ V, GÜNTARD H F, *et al.* 2017 update of the drug resistance mutations in HIV-1 [J]. Top Antivir Med, 2016, 24(4): 132-133.
- [14] 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.
- [15] 赵颀, 吕娅妮, 康续, 等. 239 例治疗失败的 HIV 感染者 HIV-1 亚型及耐药分析 [J]. 中国艾滋病性病, 2020, 26 (10): 1045-1048.

(本文编辑: 梁琥)