

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.34.019

含洛匹那韦/利托那韦二线方案抗 HIV 病毒治疗失败 基因型耐药情况分析*

刘家法,张 米,李健健,杨壁琿,邓雪媚,雷素云[△]
(云南省传染病专科医院/艾滋病关爱中心,昆明 650301)

[摘要] **目的** 分析更换含洛匹那韦/利托那韦(LPV/r)二线治疗方案治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者/艾滋病(AIDS)患者(简称 HIV/AIDS 患者)治疗失败的基因型耐药情况。**方法** 收集 2014 年 1 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日来自云南省部分接受高效抗逆转录病毒治疗(HAART)的患者治疗信息,筛选出更换含 LPV/r 的治疗方案且治疗时间大于 6 个月、治疗期间检测病毒载量大于 1 000 copy/mL 的血浆标本共计 162 份,对该样本进行基因型耐药检测。**结果** 通过基因型耐药检测共获得符合条件 pol 区序列 162 条,该人群中耐药发生率为 40.1%(65/162)。在使用过的药物中,耐药率较高的几个药物分别是奈韦拉平(NVP)、依非韦伦(EFV)、拉米夫定(3TC)、恩曲他宾(FTC),发生高度耐药的患者分别有 45 例(27.8%)、35 例(21.6%)、26 例(16.0%)、26 例(16.0%)。**结论** 云南省部分更换含 LPV/r 抗病毒治疗失败患者的耐药率相对较低,但部分患者出现了包括 LPV/r 在内的多重耐药。

[关键词] 人类免疫缺陷病毒;抗病毒治疗;洛匹那韦/利托那韦;基因型耐药
[中图法分类号] R310.41 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)34-4399-04

Analysis on genotype drug resistance situation in failure of anti-HIV treatment with second-line regimen containing lopinavir/ritonavir*

LIU Jiafa, ZHANG Mi, LI Jianjian, YANG Bihui, DENG Xuemei, LEI Suyun[△]

(Yunnan Provincial Hospital of Infectious Disease/AIDS Care Center, Kunming, Yunnan 650301, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the genotype drug resistance situation in the failure for treating the HIV infected persons /AIDS patients by replacing the second line treatment regimen containing lopinavir/ritonavir(LPV/r). **Methods** The treatment information of the partial patients receiving the highly active antiretroviral therapy (HAART) in Yunnan Province from January 1 2014 to December 31 2016 was collected and 162 plasma samples of replacing treatment regimen containing LPV/r, treatment time >6 months and the viral loads >1 000 copy/mL detected in treatment process were screened out, their genotype drug-resistance detection was performed. **Results** One hundred and sixty-two strips of pol region sequence in according with the condition were totally obtained by using the genotype drug resistance detection and the incidence rate of drug resistance in this population was 40.1% (65/162). Among the used drugs, the drugs of high drug resistance rate were NVP, EFV, 3TC and FTC, the partial patients developing high drug-resistance had 45 cases (27.8%), 35 cases (21.6%), 26cases (16.0%) and 26 cases (16.0%) respectively. **Conclusion** The drug resistance rate in the patients with failure by replacing the antiviral treatment regimen containing LPV/r is relatively low. But the partial patients appeared the multiple drug resistance including LPV/r.

[Key words] HIV-1; antiviral therapy; LPV/r; genotype drug resistance

云南省是我国人类免疫缺陷病毒(HIV)/艾滋病(AIDS)的传播、流行和危害最为严重的地区之一,目前治疗人数较多,基因型较为复杂,已成为云南省的重大公共卫生问题和社会问题之一,引起社会各界的高度重视。据云南省防治艾滋病局的报道,截至 2016 年 12 月,全省存活 HIV 感染者 92 957 例,累计治疗患者 88 549 例,正在治疗 70 317 例,其中因耐药发生治疗失败总人数 9 344 例,累计治疗总人数中耐药发

生率为 10.55%。对于治疗失败的患者不得不更换治疗方案,使用二线治疗方案,提高治疗效果。本文对云南省更换含洛匹那韦/利托那韦(LPV/r)二线抗病毒治疗方案治疗失败的患者进行基因型耐药检测,以便了解目前云南省二线治疗方案的耐药情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2014 年 1 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日来自云南省传染病专科医院接受免费抗病毒

* 基金项目:云南省科技计划项目(2016BC005);云南省教育厅科学研究基金项目(2018JS252)。 作者简介:刘家法(1984—),主管技师,硕士,主要从事 HIV 耐药研究工作。 [△] 通信作者, E-mail: cdyxyljf@sina.com。

治疗的患者治疗信息,筛选出更换含 LPV/r 治疗方案且治疗时间大于 6 个月、检测病毒载量大于 1 000 copy/mL 的血浆标本共计 162 份。同时收集这部分患者的人口学、临床及实验室资料。

1.2 方法

1.2.1 HIV-1 病毒载量检测 参照《HIV-1 病毒载量测定及质量保证指南》(2013 版)。采用罗氏公司的 HIV 病毒载量检测仪,以及其配套试剂 COBAS Taq-Man HIV-1 Test v2.0 定量检测 HIV-1 病毒载量,具体检测方法参见仪器说明书及试剂盒说明书。

1.2.2 血浆 RNA 提取 采用美国雅培公司 m2000sp 全自动核酸提取仪及配套试剂从待检血浆中提取病毒 RNA,具体提取方法参见仪器说明书及试剂盒说明书。

1.2.3 基因型耐药性检测 采用自建基因型耐药检测方法进行逆转录扩增,并参照《HIV-1 基因型耐药检测及质量保证指南》(2013 版),通过套式聚合酶链反应扩增覆盖蛋白酶基因全序列和反转录酶 1~300 位密码子序列,扩增产物送北京诺赛基因有限公司进行纯化和序列测定。扩增及测序引物参考文献[1]。

1.2.4 序列拼接与分析 耐药分析应用 Contig Express 软件拼接原始核苷酸序列,用 BioEdit 软件对拼接后的序列校对、整理和比对分析,整理后序列提交美国斯坦福大学 HIV 耐药基因型检测数据分析和解释系统(<http://hivdb.stanford.edu>)进行耐药突变位点的分析和解释耐药变异情况。

2 结 果

2.1 人口学特征 筛选云南省抗病毒治疗数据库,筛选出符合条件样本 162 份,其病毒载量均值为 40 951 copy/mL,CD4⁺ T 淋巴细胞计数均值为 249 个/ μ L,平均治疗时间为 42.3 个月。这部分患者中男 96 例,女 66 例,男女比率为 1.45 : 1.00;年龄 4~81 岁,平均年龄为 43 岁。患者具体信息见表 1。

2.2 耐药基因扩增和测序结果 162 例样本经自建基因型耐药检测方法 RT-PCR 扩增阳性,将扩增出来的片段进行基因序列测序,共获得 162 份完整基因序列。

2.3 耐药情况 以出现任意 1 种药物耐药突变(低、中、高度耐药)统计为耐药,将 162 例完整基因序列,上传美国斯坦福大学 HIV-1 耐药基因型检测数据分析和解释系统结果显示,65(40.1%)例对核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)、非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTIs)以蛋白酶抑制剂(PIs)有不同程度耐药;其中对 NRTIs 和 NNRTIs 的耐药分别有 34 例(21.0%)和 54 例(33.3%),对 PIs 耐药 5 例(3.1%)。在已检出具有不同程度耐药的 65 例患者中,有 3 例(1.9%)出现对 3 类药同时耐药的患者;有 28 例(17.3%)的患者对 NRTIs 及 NNRTIs 两种药物同时出现耐药。在使用过的药物中,对 NVP、EFV、3TC、FTC 高度耐药的情况分别是 45 例(27.8%)、35 例

(21.6%)、26 例(16.0%)、26 例(16.0%),对 PIs 有 2 例患者出现高度耐药的情况。具体对每种药物的耐药情况见表 2。

表 1 162 例患者的临床资料

项目	患者(n)	构成比(%)
性别		
男	96	59.3
女	66	40.7
样本来源		
昆明	36	22.2
红河	37	22.8
临沧	1	0.6
昭通	7	4.3
文山	19	11.7
曲靖	2	1.2
楚雄	2	1.2
保山	5	3.1
普洱	3	1.9
大理	34	21.0
版纳	5	3.1
怒江	2	1.2
玉溪	9	5.7
传播途径		
性传播	92	56.8
静脉药瘾	59	36.4
不详	8	5.0
母婴传播	2	1.2
输血	1	0.6
基因亚型		
CRF08_BC	97	59.9
CRF01_AE	20	12.3
CRF07_BC	30	18.5
C	6	3.7
URFs	9	5.6
原用药方案		
3TC+AZT+EFV	48	29.6
3TC+D4T+EFV	6	3.7
3TC+D4T+NVP	33	20.4
3TC+TDF+EFV	12	7.4
3TC+AZT+NVP	63	38.9
现用药方案		
3TC+AZT+LPV/r	56	34.6
3TC+ABC+LPV/r	2	1.2
3TC+TDF+LPV/r	102	63.0
AZT+TDF+LPV/r	1	0.6
3TC+EFV+LPV/r	1	0.6

EFV:依非韦伦;NVP:奈韦拉平;3TC:拉米夫定;AZT:齐多夫定;D4T:司他夫定;TDF:替诺福韦;ABC:阿巴卡韦

表 2 3 类药物的耐药数量及耐药水平

项目	PIs					NRTIS							NNRTIS			
	ATV	FPV	IDV	LPV	NFV	3TC	ABC	AZT	D4T	DDI	FTC	TDF	EFV	ETR	NVP	RPV
P	0	1	0	0	1	1	2	5	5	17	0	2	17	30	17	18
L	0	0	0	0	3	0	17	3	5	7	1	0	2	7	0	17
I	1	0	0	0	0	1	6	3	5	4	1	5	9	12	1	10
H	1	1	2	2	2	26	4	4	4	7	26	4	35	5	45	9

P:代表潜在耐药;L:低度耐药;I:代表中度耐药;H:高度耐药

2.4 基因型耐药突变位点情况 162 例患者的检测结果中,与 PIs 相关的主要耐药基因突变位点有 M46I、V82A、L76V、I84V 和 I54V 各 1 例。与 NRTIs 相关的突变中,突变位点发生频率前 3 位的是 M184V/I、T69N/D 和 K70R,分别为 16.0%(26/162)、8.0%(13/162)和 4.3%(7/162)。与 NNRTIs 的突变中,突变位点发生频率前 3 位的是 K103N/E、V179D/E/T 和 V90I,分别为 15.4%(25/162)、14.2%(23/162)和 8.6%(14/162)。具体耐药位点情况见表 3。

表 3 常见耐药突变类型及比例

突变区域	突变类型	突变例数(<i>n</i>)	突变比例(%)
PIs 主要耐药突变	M46I	1	0.6
	L76V	1	0.6
	I84V	1	0.6
	I54V	1	0.6
	V82A	1	0.6
NRTIs 主要耐药突变	M184V/I	26	16.0
	T69N/D	13	8.0
	K70R	7	4.3
	D67N	7	4.3
	A62V	5	3.1
	T215Y/F/I	4	2.5

续表 3 常见耐药突变类型及比例

突变区域	突变类型	突变例数(<i>n</i>)	突变比例(%)
NNRTIs 主要耐药突变	K219E/Q	4	2.5
	K65R	3	1.9
	V75M	3	1.9
	M41L	3	1.9
	L74V	1	0.6
	L210W	1	0.6
	K103N/E	25	15.4
	V179D/E/T	23	14.2
	V90I	14	8.6
	Y181C/I	13	8.0
	E138A/Q	13	8.0
	V106M/I	8	4.9
	K101E/H	5	3.1
	A98G	4	2.5
	P225H	4	2.5
	Y181C	3	1.9
	H221Y	3	1.9
	L100I	2	1.2
	V108I	1	0.6
	M230L	1	0.6
	K238T	1	0.6

2.5 基因型耐药突变位点情况 不同感染方式中的基因型分布见表 4。

表 4 不同感染方式中 HIV-1 基因型分布[*n*(%)]

感染方式	基因型					合计
	CRF08_BC	CRF01_AE	CRF07_BC	URFs	C	
性传播	48(29.7)	16(9.9)	18(11.1)	7(4.3)	3(1.9)	92(56.9)
静脉药瘾	43(26.6)	0(0)	11(6.7)	2(1.2)	3(1.9)	59(36.5)
母婴传播	1(0.6)	1(0.6)	0(0)	0(0)	0(0)	2(1.2)
输血	1(0.6)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(0.6)
不详	4(2.4)	3(1.8)	1(0.6)	0(0)	0(0)	8(4.8)
合计	97(59.9)	20(12.3)	30(18.4)	9(5.5)	6(3.8)	162(100)

表 5 针对不同治疗方案耐药发生情况及耐药比例

用药方案	总例数(<i>n</i>)	耐药发生例数(<i>n</i>)	耐药比例(%)
3TC+TDF+LPV/r	102	36	35.3
3TC+AZT+LPV/r	56	12	21.4
3TC+ABC+LPV/r	2	0	0
3TC+EFV+LPV/r	1	1	100
AZT+TDF+LPV/r	1	0	0

2.6 不同抗病毒治疗方案耐药发生情况 对不同治疗方案的耐药情况见表 5。

3 讨 论

为了有效控制 AIDs 疫情的蔓延,我国从 2002 年开始试行 AIDs 免费抗病毒治疗项目,自 2003 年起全面开展落实国家“四免一关怀”政策^[2-3]。经过 10 多

年来各级政府逐步落实 AIDs 患者免费抗病毒治疗的政策,建立起了免费 AIDs 抗病毒治疗的各级保障机制,符合治疗标准且接受抗病毒治疗的患者比例逐年增多。随着抗病毒治疗时间延长,治疗失败的患者逐年增多。对于治疗失败的患者,需要选择更换为二线治疗方案。在我国,主要的二线治疗方案为两种 NRTIs 加一种 PI 共同治疗^[4]。目前国内免费使用的 PIs 主要是 LPV/r,对于更换含 LPV/r 二线治疗方案治疗失败的患者,将面临无免费抗病毒药可用的情况。

HIV 属于反转录病毒,病毒在复制过程中伴随着高度变异性。经过长时间的治疗,在抗病毒药物的选择压力下,HIV 基因易发生突变而对多种药物的产生耐药^[5]。在本研究中,65(40.1%)例对 NRTIs、NNRTIs 和 PIs 有不同程度耐药;其中对 NRTIs 和 NNRTIs 的耐药分别有 34 例(21.0%)和 54 例(33.3%),对 PIs 耐药 5 例(3.1%)。在已检出具有不同程度耐药的 65 例患者中,有 3 例(1.9%)出现对 3 类药同时耐药的患者;有 28 例(17.3%)的患者对 NRTIs 及 NNRTIs 两类药物同时出现耐药。云南省 2012 年所有治疗失败人群的耐药率为 58.9%^[1],2008—2012 年所有治疗失败人群的耐药率为 53.8%^[6],本研究耐药率低于之前的研究。究其原因一方面是因为这些更换二线治疗方案的患者可能仅有少数是因为耐药更换治疗方案,还有一部分是因为免疫重建不良、药物不良反应及怀孕等原因更换,其患者对药物本身并不耐药。另一方面可能是由于 PIs 比 NNRTIs 有更高的耐药屏障,不易产生耐药。

在使用过的药物中,耐药率较高的几种药仍然是 NVP、EFV、3TC、FTC,耐药率低于其他研究^[1,6-7]。对 PIs 有 5 例患者出现耐药的情况,其中 2 例患者对 LPV/r 产生高水平耐药。本次研究中有 3 例患者对 PIs、NRTIs 和 NNRTIs 这 3 类药均出现耐药,这 3 例患者均是通过性传播方式感染的男性患者,出现多重耐药的原因可能跟性传播导致交叉感染有关。本研究中,PIs 的主要突变位点 M46I、I54V、L76V、I84V 和 V82A 各出现 1 次。M46I 为辅助突变,当与其他 PIs 突变同时出现时,可降低 PIs 敏感性;I54V 与其他 PIs 突变同时出现时,会增加 PIs 的耐药性;V82A 是 PIs 较常出现的耐药突变,通常在 PIs 治疗失败早期出现;I84V 常出现在 PIs 持续治疗无效时,可使全部 PIs 的敏感性降低^[8]。在本研究中和 NRTIs 和 NNRTIs 相关的耐药突变中,排名前 3 位的耐药突变分别是 M184、T69、K70 和 K103、V179、V90,这与云南省杨绍敏等^[6]的研究结果不一致。其主要原因一方面是云南省处于边境地区,人员流动性大,导致 HIV 毒株在不停地变化,重组毒株在不断增加,而耐药突变与 HIV-1 基因亚型相关^[9],导致耐药位点也在不停地变化。另一方面是本次研究的患者都是先使

用一线治疗方案后再改为含 LPV/r 的二线治疗方案,在不同的药物作用下,导致耐药位点发生改变。

在更换的二线治疗方案中,主要使用的是 3TC+TDF+LPV/r 和 3TC+AZT+LPV/r 两种治疗方案,两种方案的耐药率分别为 35.5%(36/102)和 21.4%(12/56),使用 3TC+TDF+LPV/r 的耐药率高于使用 3TC+AZT+LPV/r 方案的患者,其主要原因可能为 TDF 易出现胃肠道不良反应和肾毒性^[10],从而影响药物的吸收有关。

随着抗病毒治疗时间的延长,因为一线药物耐药屏障低,同时不良反应大,在药物压力作用下治疗失败的患者会越来越多,未来会有更多的患者使用二线治疗方案,而我国目前可供免费使用的二线药物有限。因此,在治疗过程中应加强对患者依从性教育,同时加强监测检测,减少对二线药物耐药的产生,同时减少耐药毒株的传播,是以后抗病毒治疗的重点工作。

参考文献

- [1] 钟敏,李韩平,李惠琴,等. 云南省 2012 年人类免疫缺陷病毒感染者和艾滋病患者抗病毒治疗失败基因型耐药情况分析[J]. 中华传染病杂志,2015,33(1):30-33.
- [2] ZHANG F J, HABERER J E, WANG Y U, et al. The Chinese free antiretroviral treatment program: challenges and responses[J]. AIDS, 2007, 21(8): S143-S148.
- [3] ZHANG F J, PAN J, YU L, et al. Current progress of China's free ART program[J]. Cell Res, 2005, 15(11/12): 877-882.
- [4] CMAACFDCA P. Guidelines for diagnosis and treatment for AIDS[J]. Chin J Clin Infect Dis, 2011, 4(6): 321-330.
- [5] JOHNSON V A, BRUN V F, Clotet, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010[J]. Top HIV Med, 2010, 18(5): 156-163.
- [6] 杨绍敏,钟敏,杨壁琿,等. 云南省 2008—2012 年艾滋病抗病毒治疗耐药性检测情况[J]. 中国艾滋病性病, 2014, 20(1): 862-866.
- [7] 王征桦,吴守丽,张春阳,等. 2008—2013 年福建省 HIV-1 毒株耐药基因变异研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(4): 330-333, 344.
- [8] 邵一鸣,李敬云,康来仪,等. HIV 耐药监测策略和检测技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:88-89.
- [9] LI L, SUN G Q, LIANG S J, et al. Different distribution of HIV-1 subtype and drug resistance were found among treatment naive individuals in Henan, Guangxi, and Yunnan province of China[J]. PLoS One, 2013, 8(10): 1-7.
- [10] 抗病毒治疗手册编写组. 国家免费艾滋病抗病毒治疗手册[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2016:123-141.