

江苏省抗病毒治疗者 HIV-1 基因耐药性及影响因素的分析

肖占沛¹, 郭宏雄^{2*}, 还锡萍², 刘晓燕², 徐晓琴², 胡海洋², 杨传坤¹, 羊海涛^{2*}

(¹ 东南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系, 江苏 南京 210009; ² 江苏省疾病预防控制中心性病艾滋病防治所, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:了解江苏省抗病毒治疗患者 HIV-1 毒株的耐药性及其影响因素。方法:以 2010 年 4 月底仍在抗病毒治疗的 AIDS 患者为研究对象,采用横断面调查法和基因型耐药分析法对调查者进行耐药性分析。结果:共 591 名研究对象被纳入本研究分析。HIV-1 毒株总耐药率为 8.46%。治疗时间、病程和近期治疗方案 NVP+AZT+3TC 是 HIV-1 耐药毒株产生的危险因素。结论:江苏省抗病毒治疗患者耐药率处于较低水平,但耐药突变多样化,出现多重耐药现象,应多关注病程和治疗时间较长的患者,增加病毒载量检测和耐药检测的频率,以尽早发现耐药情况,尽快选择适当的治疗方案,可能有利于降低耐药毒株的发生。

[关键词] HIV-1; 抗病毒治疗; 药物耐受性; 影响因素

[中图分类号] R512.91

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-016-04

随着高效抗逆转录病毒疗法(highly active anti-retroviral therapy, HAART)的推广, HIV 的耐药问题日益突出。国外研究证明, 耐药变异是导致临床抗病毒治疗失败的主要原因^[1], 而 HIV-1 耐药性与病毒基因组的高度变异特性、药物的选择压力、机体的免疫压力、药代动力学因素和服药依从性等多种因素有关^[2-4], 本研究将通过江苏省艾滋病治疗人群进行耐药变异检测和流行病学调查, 全面了解江苏省 HIV 耐药毒株的流行情况, 分析影响 HIV 耐药的相关因素, 为江苏省制定 HIV-1 耐药性的防治措施提供参考依据。

1 对象与方法

1.1 对象

以江苏省 2010 年 4 月底所能监测到的艾滋病患者为研究对象, 按方便抽样的原则, 抽取了仍在接受抗病毒治疗的艾滋病患者共 591 例。

1.2 方法

1.2.1 标本采集

于 2010 年 6 月对 591 例艾滋病患者进行咨询访谈, 在采集流行病学资料的同时进行临床体检, 并以 EDTA-3K 抗凝管采集外周静脉血。抗凝血经常规离心分离血浆, 分装后 -80℃ 冻存。

1.2.2 CD4⁺ T 淋巴细胞测定

抗凝血于 24 h 内测定 CD4⁺ T 淋巴细胞数, 用流式细胞仪(美国 BECTON DICKINSON 公司)及相对应的试剂盒对 CD4⁺、CD8⁺、CD3⁺ T 淋巴细胞进行分类计数。

1.2.2 病毒载量测定

以 200 μl 血浆采用标准模板制备法提取 RNA, 采用 HIV-Monitor 1.5 Version commercial kit (美国 Roche 公司)在 COBAS AMPLICOR 自动载量仪上测定病毒载量。检测范围为 400~750 000 拷贝/ml。

1.2.3 耐药株基因变异的测定

①病毒 RNA 提取: 以 200 μl 血浆提取病毒基因组 RNA, 采用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒, 参照试剂盒说明书提取 HIV-1 RNA, 纯化 RNA 溶于 60 μl 洗脱液中。②蛋白酶区和逆转录酶区的扩增: 采用巢式 PCR 扩增编码 HIV 蛋白酶区和逆转录酶的 pol 区基因片段, 全长约 1 300 bp。使用引物包括: 外侧上游引物为 MAW26, 外侧下游引物为 RT21; 内侧上游引物为 Pro-1, 内侧下游引物为 RT20。③产物纯化及序列测定: 以 Pro-1, RTA, RTB, RT-20, ProCl-down 作为测序引物。使用德国 QIAGEN 公司 QIAquick Gel Kit 对 PCR 产物进行纯化后, 在 ABI 3730 测序仪上进行核苷酸序列测定, 将序列与 Stanford HIV Drug Resistance Database 中的参考株序列进行比较, 分析耐药变异的位置和种类。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行检验, Logistic 回归模

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK2009432); 江苏省社会计划发展(BS2006078)

*通讯作者, E-mail: guohongxiong@sohu.com; yht@jscdc.cn

型,分析 HIV-1 耐药的相关因素。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

本次调查共有 591 例艾滋病患者。其中病毒载量大于 1 000 的有 88 例,CD4⁺ T 淋巴细胞水平 200 个/ μ l 以上的有 421 例,其中 75 例有 PCR 扩增结果。

2.2 HIV-1 耐药性分析

经过扩增和测序,共获得 75 例患者的 pol 区序列,有 50 例患者至少对 1 种抗病毒药物产生低度以上耐药,总耐药率为 8.46%(50/591),在 50 例耐药者中,针对蛋白酶抑制剂(protease inhibitors,PIs)的耐药 5 例;针对核苷类逆转录酶抑制剂(nucleo-

side reverse transcriptase inhibitors,NNTRIs) 的耐药 45 例;对 NRTIs 和 NNTRIs 的二重耐药有 32 例,对 3 种药物均高度耐药的有 1 例。核苷类与非核苷类耐药突变位点较多,占与耐药有关突变的 90%;其中耐药位点 M184V 和 G190A 出现频率最高,分别为 4.57%(27/591)和 2.88%(17/591)。

2.3 HIV-1 耐药性影响因素分析

2.3.1 单因素耐药分析

将患者按不同性别、年龄、体重、婚姻状况、临床分期、初始治疗方案、近期(即近 6 个月)治疗方案、治疗时间、病程、传播途径等特征分组,采用 χ^2 检验方法,比较各组耐药率,结果发现:不同性别、年龄、体重、婚姻状况、临床分期、初始治疗方案、传播途径以及是否存在慢性腹泻、反复发热、带状疱疹,其耐药率差异无统计学意义。而不同治疗时间、病程和近期治疗方案,其耐药率差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

表 1 HIV-1 耐药单因素分析

特 征	耐药人数(n)	未耐药人数(n)	耐药率(%)	χ^2 值	P 值(双侧)
年龄				3.881	0.144
< 30 岁	12	75	13.8		
30~30 岁	30	355	7.8		
> 50 岁	8	111	6.7		
性别				1.023	0.312
男	38	374	9.2		
女	12	167	6.7		
婚姻				4.744	0.180
未婚	14	106	11.7		
已婚或同居	26	352	6.9		
离异或分居	4	46	8.0		
丧偶	6	37	14.0		
体重				4.180	0.191
< 40 kg	0	21	0		
40~60 kg	25	241	9.4		
60~80 kg	22	271	7.5		
> 80 kg	2	8	20.0		
传播途径				2.142	0.516
血液传播	11	100	9.9		
性传播	38	399	8.7		
母婴传播	0	3	0		
其他	1	39	2.5		
病程				15.515	0.007
< 1 年	10	131	7.1		
1~2 年	10	133	7.0		
2~3 年	3	94	3.1		
3~4 年	9	83	9.8		
4~5 年	4	48	7.7		
> 5 年	14	52	21.2		

(转下页)

(接上表)

续表 1 HIV-1 耐药单因素分析

特 征	耐药人数(n)	未耐药人数(n)	耐药率(%)	χ^2 值	P 值(双侧)
临床分期				3.666	0.300
1	20	152	11.6		
2	13	142	8.4		
3	7	109	6.0		
4	10	138	6.8		
治疗时间				12.296	0.047
< 1 年	9	79	10.2		
1~2 年	10	168	5.6		
2~3 年	12	118	9.2		
3~4 年	5	73	6.4		
4~5 年	5	59	7.8		
5~6 年	7	43	14.0		
> 6 年	2	1	66.7		
初始治疗方案				1.292	0.731
EFV+AZT+3TC	6	92	6.1		
EFV+D4T+3TC	6	74	7.5		
NVP+AZT+3TC	13	142	8.4		
NVP+D4T+3TC	25	233	9.7		
近期治疗方案				8.214	0.042
EFV+AZT+3TC	3	97	3.0		
EFV+D4T+3TC	5	88	5.4		
NVP+AZT+3TC	20	144	12.2		
NVP+D4T+3TC	22	212	9.4		
腹泻				0.166	0.683
否	44	486	8.3		
是	6	55	9.8		
发热				1.068	0.302
否	35	414	7.8		
是	15	127	10.6		
带状疱疹				0.852	0.356
否	45	461	8.9		
是	5	80	5.9		

EFV: 艾非那韦, AZT: 齐多夫定, 3TC: 拉米夫定 D4T: 司他夫定, NVP: 奈韦拉平。

2.3.2 多因素耐药分析

以是否发生耐药为应变量, 以研究对象的治疗时间、病程和近期治疗方案为自变量, 进行非条件 Logistic 回归分析(表 2), 结果显示: 在三因素同时存在的条件下, 最近治疗方案和治疗时间对耐药率

的影响没有统计学意义, 而病程是 HIV 耐药发生的 1 个危险因素, 其时间越长, 耐药率越高($P < 0.05$)。将最近治疗方案、病程和治疗时间三变量进行相关性分析发现三者存在高度相关。

表 2 HIV 耐药影响因素非条件多元 Logistic 回归

变 量	回归系数	标准误	Wald 检验	P 值	95%可信区间
近期治疗方案			6.484	0.090	
(EFV+D4T+3TC)与(EFV+AZT+3TC)	0.361	0.345	1.099	0.295	0.730~2.820
(NVP+AZT+3TC)与(EFV+AZT+3TC)	-0.520	0.518	1.009	0.315	0.216~1.640
(NVP+D4T+3TC)与(EFV+AZT+3TC)	-1.028	0.634	2.624	0.105	0.103~1.241
病程	0.292	0.122	5.733	0.017	1.054~1.702
治疗时间	-0.091	0.134	0.461	0.497	0.703~1.187
常数	-3.367	0.363	85.821	0.000	

EFV: 艾非那韦, AZT: 齐多夫定, 3TC: 拉米夫定 D4T: 司他夫定, NVP: 奈韦拉平。

3 讨论

我国从 2000 年启动大规模的抗病毒治疗,已达 11 年之久。在我国抗病毒治疗较早的地区,对一线抗病毒药物已经出现了严重的耐药^[5-7]。朱新朋等^[8]于 2007 年对河南省 210 名抗病毒治疗患者的研究表明,该人群 HIV-1 毒株总耐药率为 38.1%。苏齐鉴等^[9]研究表明,2008 年广西壮族自治区 86 名抗病毒治疗者 HIV-1 毒株总耐药率为 17.44%。本研究中发现江苏省治疗患者的耐药率为 8.46% (50/591),低于上述研究结果,但耐药突变为单重耐药和多重耐药并存,呈现多样化、复杂化的特征。

多项研究表明,HIV-1 耐药毒株产生的影响因素包括:病毒自身变异、服药依从性、抗病毒治疗方案及治疗时间,与年龄、种族、感染途径没有相关性,对病毒基因亚型对耐药的影响没有统一结论^[5,10-11]。由于本研究仅对病毒载量 > 1 000 IU/ml 的样本进行 PCR 扩增,不能获得全体样本的病毒基因型,故该变量未纳入分析。同时,由于本研究中所有接受治疗的患者都是国家免费治疗,且依从性较好,故本研究未纳入服药依从性变量。本研究通过单因素分析发现:治疗时间、病程和近期治疗方案是 HIV-1 耐药毒株产生的影响因素,这与前面的研究结论^[5,10-11]类似。随着治疗时间和病程的延长,耐药率会变高,这与长时间的药物选择压力有关^[12];同时治疗方案为 NVP+AZT+3TC 的组别其耐药率较高,这可能与药物的“遗传屏障”和抗病毒复制能力有关,同时也可能与宿主的免疫力有关^[12],但在不同治疗方案耐药率的检验中, $P = 0.042$,在 0.05 附近,所以它对 HIV 耐药的影响还不能确定,有待进一步研究。

HIV 耐药影响因素非条件多元 Logistic 回归分析结果显示:最近治疗方案和治疗时间对 HIV 耐药率的影响没有统计学意义,而病程是 HIV 耐药发生的一个危险因素,其时间越长,耐药率越高。出现上述结果的原因可能是由于治疗时间、病程两变量和最近治疗方案三变量共线的结果,因为治疗时间较长的病人一般其病程也相对较长,那么在两变量同时存在的情况下,就有可能出现上述类似的结果。同时,病程和治疗时间越长的人,其治疗方案越不规范,所用药物的遗传屏障越小,那么发生耐药的几率就越高。但由于本研究的局限性,它们之间的关系还有待进一步的研究证明。

江苏省抗病毒治疗患者耐药率处于较低水平,但耐药突变多样化,出现多重耐药现象,应多关注病

程和治疗时间较长的患者,增加病毒载量检测和耐药检测的频率,以尽早发现耐药情况,尽快选择适当的治疗方案,可能有利于降低耐药毒株的发生。

[参考文献]

- [1] Vandamme AM, Van Laethem K, De Clercq E. Managing resistance to anti-HIV drugs: an important consideration for effective disease management [J]. *Drugs*, 1999, 57 (3): 337-361
- [2] Kuritzkes DR. Preventing and managing an tire troviral drug resistance. *AIDS Patient Care and STDs* [J]. 2004, 18(5): 259-273
- [3] Carlson JM, Brumme ZL. HIV evolution in response to HLA-restricted CTL selection pressures: a population based perspective [J]. *Microbes Infect*, 2008, 10 (5): 455-461
- [4] Hsu A, Isaacson J, Brun S, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of lop in avir-ritonavir in combination with efavirenz and two nucleoside reverse transcriptase inhibitors in extensively pretreated human immunodeficiency virus-infected patients [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(1): 350-359
- [5] 王艳, 邢辉, 王哲, 等. 河南省某县 HIV 感染者耐药性影响因素分析 [J]. *中国公共卫生*, 2007, 23(7): 803-805
- [6] 李韩平, 李宏, 杨坤, 等. 河南省部分艾滋病患者抗病毒治疗的临床效果以及基因耐药性分析 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2005, 25(3): 194-198
- [7] 羊海涛, 徐晓琴, 邱涛, 等. 江苏省 2006 年新发现感染者的 HIV-1 的分子流行病学研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(7): 976-980
- [8] 朱新朋, 刘宏伟, 田随安, 等. 河南艾滋病病毒基因型耐药检测研究 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19 (6): 1324-1326
- [9] 苏齐鉴, 周平, 闭志友. 抗病毒治疗艾滋病患者 HIV-1 耐药性影响因素 [J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(4): 438-441
- [10] 朱新朋, 李宏, 刘宏伟, 等. 河南省接受抗病毒治疗的艾滋病患者耐药性及 CD4+T 淋巴细胞计数影响因素的研究 [J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(12): 1181-1184
- [11] 张曼, 胡清海, 程华, 等. 中国部分地区人免疫缺陷病毒耐药及其影响因素分析 [J]. *中国实用内科杂志*, 2007, 27(12): 942-944
- [12] Jackson JB, Becker-Pergola G, Gauay LA, et al. Identification of the K103N resistance mutation in Ugandan women receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission [J]. *AIDS*, 2000, 14(11): F111-F115

[收稿日期] 2011-06-23