

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.07.009

治疗前血浆和全血干血斑样品 HIV-1 Pol 区 基因型耐药检测结果比较*

蔡晓莉,范庆红,兰 芸,李丽雅,王瑾琳,陈伟烈[△]

广州医科大学附属广州市第八人民医院传染病研究所,广东广州 510000

摘 要:目的 比较治疗前静脉血浆和全血干血斑(DBS)人类免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)Pol 区基因型耐药检测结果的差异,并分析 DBS 样品用于 HIV-1 基因型耐药检测的可行性。方法 采集 44 例 HIV-1 感染者治疗前静脉全血,分别制备全血 DBS 样品和血浆样品,提取 RNA,检测病毒载量。采用逆转录 PCR(RT-PCR)扩增 Pol 区基因序列,对 PCR 产物进行 Sanger 测序,采用 Sequencher 5.4.5 软件对序列进行清理和拼接,采用 BioEdit 7.2 软件对参考株序列和样品序列进行比对、系统进化树分析及基因型耐药分析。结果 治疗前 44 例血浆样品检出率 100.0%,DBS 样品检出 30 例,检出率为 68.2%;24 例血浆样品平均病毒载量达到 5.02×10^5 IU/mL,中位数为 1.76×10^5 IU/mL,DBS 样品平均病毒载量为 1.46×10^3 IU/mL,中位数为 7.95×10^2 IU/mL;44 例患者 HIV-1 亚型主要为流行重组株(CRF)07-BC(24/44)、CRF01-AE(16/44);血浆和 DBS 样品序列相似值 100% 26 例(26/30),相似值 99% 3 例(3/30),相似值 97% 1 例(1/30),其中有 6 例发生不同程度的耐药突变,DBS 样品耐药结果与血浆符合率 100%,但在其他位点的突变存在差异。结论 治疗前全血 DBS 样品耐药结果及序列与血浆样品具有高度的一致性,全血 DBS 样品可用于耐药性检测、HIV-1 亚型分析,但检出率比血浆低。

关键词:干血斑; 人类免疫缺陷病毒 1 型; 病毒载量; 基因型耐药; 亚型

中图法分类号:R446.11;R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)07-0893-04

Comparison of HIV-1 Pol genotype resistance detection in plasma and dried blood spot samples before treatment*

CAI Xiaoli,FAN Qinghong,LAN Yun,LI Liya,WAN Jinlin,CHEN Weilie[△]

Institute of Infectious Diseases,Guangzhou Eighth People's Hospital,

Guangzhou Medical University,Guangzhou,Guangdong 510000,China

Abstract: Objective To compare the differences of genotypic resistance in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Pol regions between plasma and whole blood dried blood spot (DBS),and to analyze the feasibility of using DBS for HIV-1 genotype resistance detection. **Methods** The whole venous blood of 44 HIV-1 infected patients from the hospital were collected,and whole blood DBS samples and plasma samples were prepared for RNA extraction,load detection. The Pol region gene sequences were amplified by reverse transcription PCR (RT-PCR),and the PCR products were sequenced by Sanger sequencing. Sequencher 5.4.5 software was for sequence analysis,and BioEdit 7.2 software was used to conduct comparison between the reference strain sequence and sample sequence,phylogenetic tree analysis and genotype resistance analysis. **Results** The detection rate of 44 plasma samples was 100.0%,and 30 DBS samples were successfully detected,the detection rate was 68.2%. The average viral load of the 24 plasma samples detected by the load test reached 5.02×10^5 IU / mL,median 1.76×10^5 IU/mL,and the average load of DBS samples was 1.46×10^3 IU / mL,median 7.95×10^2 IU/mL,which is relatively low. The 44 patients with HIV-1 virus subtypes were mainly epidemic recombinant strains (CRF)07-BC (24/44) and CRF01-AE (16/44). Sequence similarity between plasma and DBS samples was 100% in 26 cases (26/30),99% in 3 cases (3/30),and 97% in 1 case (1/30),among which 6 cases had drug-resistant mutations of different degrees,the coincidence rate of DBS resistance results and

* 基金项目:“十三五”规划课题(2018ZX10732101-001-014)。

作者简介:蔡晓莉,女,副主任技师,主要从事 HIV-1 感染者抗病毒治疗前后耐药研究。 [△] 通信作者,E-mail:gzhscwl@126.com。

本文引用格式:蔡晓莉,范庆红,兰芸,等. 治疗前血浆和全血干血斑样品 HIV-1 Pol 区基因型耐药检测结果比较[J]. 检验医学与临床,2021,18(7):893-896.

plasma was 100%, but there were differences in other mutation sites. **Conclusion** The drug resistance results of DBS samples are consistent with plasma samples, and the sequences are also highly consistent. DBS samples could be used for drug resistance test and HIV-1 subtype analysis, but the detection rate is lower than plasma.

Key words: dried blood spot; human immunodeficiency virus-1; viral load; genotype resistance; subtype

获得性免疫缺陷综合征(AIDS)是因人类免疫缺陷病毒(HIV)感染导致的机体免疫系统遭到破坏,造成许多伺机性疾病的攻击,促成多种临床症状的一种综合症状^[1]。据统计,全球总计有 3 690 万 AIDS 存活者,然而在 2017 年全球仍有 94 万人死于 AIDS 相关疾病,新发感染病例仍达 180 万左右;我国 AIDS 疫情形势严峻,感染人数呈缓慢上升趋势,截至 2018 年底存活感染者约 125 万,全人群感染率约为 9/10 000^[2-3]。高效抗逆转录病毒治疗(HAART),即鸡尾酒疗法,是目前治疗和缓解 HIV 感染最有效的方式^[4]。我国从 2003 年开始推广免费的抗病毒治疗方案,使 AIDS 患者的病死率显著下降,生活质量显著提升。随着抗逆转录病毒治疗(ART)的推广,药物压力逐渐升高,一方面由于长期服药的不良反应,患者依从性下降,最重要的是,HIV 自身的高度变异性导致 HIV 耐药问题日趋严重,治疗效果不佳。因此,建立耐药基因的人群筛查工作刻不容缓。目前关于 HIV 的耐药检测,主要是针对 HIV-1 建立的基因型耐药检测和表型耐药检测两种方式,在国内主要应用基因型分析方法来进行耐药性监测。

基因型耐药检测的样品主要来自 HIV-1 感染者的血浆或全血,但是对于一些实验室条件较差的地区医院,全血或血浆样品在采集、分离、保存和运输过程中不可避免地会遇到一些难题,HIV 感染者全血或血浆样品属于危险生物制品,需专人看护、冷链运输。全血干血斑(DBS)样品在一定程度上可以解决血浆或全血样品在采集、保存和运输上存在的问题,为贫困地区监测 HIV-1 耐药性提供便利^[5]。但是,由于 DBS 样品承载的样品量有限,其检测灵敏度较血浆或全血样品低。本研究采集了治疗前 44 例来自本院的 HIV-1 感染者的全血,分别制备血浆、全血 DBS 样品,通过逆转录 PCR(RT-PCR)分别扩增血浆和全血 DBS 样品 HIV-1 RNA 并进行基因型耐药分析,将血浆和 DBS 检出结果进行对比,比较二者在检出率、HIV-1 病毒载量、亚型、耐药突变位点及耐药检测结果等方面的差异,以验证全血 DBS 样品用于 HIV-1 亚型分析和耐药性检测的可行性,为其在临床检验中的应用提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集本院收治的 44 例 HIV-1 感染者的临床资料。此前均未接受 HAART 治疗。其中男 40 例,女 4 例;年龄 19~79 岁,中位年龄 32 岁;基线 CD4 细胞中位数 289 个/ μ L、CD8 细胞中位数 923 个/ μ L、CD4/CD8 比例中位数 0.29。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 静脉采集 44 例 HIV-1 感染者乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝血 10 mL,依照文献[5]中的方法制作全血 DBS 样品,每例患者样品制作 3~5 个血斑,室温干燥保存。将剩余的 EDTA-K₂ 抗凝血以 3 500 r/min 离心 5 min,收集血浆,制备血浆样品,-20 ℃短期保存或-80 ℃长期保存。

1.2.2 HIV-1 RNA 提取 血浆样品 RNA 提取:取 200 μ L 的血浆用核酸提取纯化试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)于 Smart 32 核酸提取仪(中山大学达安基因股份有限公司)进行提取,所得 RNA 保存于-80 ℃。DBS 样品 RNA 提取:剪取 DBS 滤纸片,按照海力特核酸提取试剂盒(广州海力特生物科技有限公司)的操作说明进行 RNA 提取,将所得的 RNA 样品保存于-80 ℃。

1.2.3 HIV-1 病毒载量测定 分别吸取提取的血浆或 DBS 样品的 RNA 20 μ L,按照 HIV-1 核酸测定试剂盒(PCR 荧光探针法,中山大学达安基因股份有限公司)操作说明加样,于 ABI Vii7 高生产率荧光定量 PCR 仪(Lifetech,美国)上机测定,根据标准曲线计算各样品病毒载量。

1.2.4 RT-PCR 反应 采用巢式 PCR 反应扩增 HIV-1 Pol 区基因序列(HXB2,2253~3318 nt),使用 Primescript™ one step RT-PCR Ver. 2.0 试剂盒(TAKARA,日本)对提取的病毒 RNA 进行逆转录和 PCR 扩增^[6-7]。第 1 轮扩增使用外引物:MAW 引物序列为 5'-TGGAATGTGGAAAGGAAGGAC-3',RT-21 引物序列为 5'-CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG-3'。反应程序:25 μ L 体系,50 ℃ 30 min,94 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,35 个循环,72 ℃ 5 min。第 2 轮 PCR 扩增使用内引物:PRO-1 引物序列为 5'-CAGAGC-CAACAGCCCCACCA-3',RT-20 引物序列为 5'-CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC-3'。反应程序:50 μ L 体系,95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 80 s,31 个循环,72 ℃ 5 min。

1.2.5 Sanger 测序 将已扩增的 PCR 产物用 QIA-quick 胶回收试剂盒(QIAGEN, 德国)纯化后进行 Sanger 测序,委托天一辉远基因科技有限公司进行测序。

1.2.6 系统进化树分析及亚型鉴定 Sanger 测序得到的 Pol 区前 1 300 个碱基序列,用 Sequencher 5.4.5 软件双人序列进行清理和拼接,混合碱基按照 30%比例主峰的次级峰进行判定。采用 BioEdit 7.2 软件对拼接好的序列进行比对^[8]。采用 MAGE 6.06 软件建立邻接法进化树,参考株选择 HIV-1 病毒 M 组亚型株 A(A1、A2)、B、C、D、F(F1、F2)、G、H、J、K、CRF01-AE、CRF07-BC、CRF08-BC、CRF55-01B、CRF59-01B、CRF67-01B 等,下载自 HIV Database 数据库(www.hiv.lanl.gov/content/index)。

1.2.7 HIV-1 基因型耐药分析 将 Fasta 序列文件,输入 HIV Database 数据库 BLAST 对亚型进行比对,将序列提交 Stanford HIV 耐药数据库(<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-sequences/>)分析蛋白酶抑制剂(PI)、核苷类逆转录酶抑制剂(NRTI)以及非核苷类逆转录酶抑制剂(NNRTI)基因型耐药突变^[9]。

2 结 果

2.1 血浆和 DBS 样品 PCR 扩增检出率 44 例 HIV-1 感染患者治疗前血浆样品提取 RNA 后 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳出现目的条带有 44 个,阳性检出率为 100.0%(44/44);在 DBS 样品中,1%琼脂糖凝胶电泳出现目的条带的有 30 个,无条带样品为 14 个,DBS 样品阳性检出率为 68.2%(30/44)。

2.2 血浆和 DBS 样品病毒载量 24 例治疗前 HIV-1 感染患者血浆样品和 DBS 样品荧光定量 PCR 探针法检测 HIV-1 病毒载量。结果显示,血浆样品中病毒载量均达到 1.0×10^3 IU/mL 以上,平均病毒载量为 5.02×10^5 IU/mL,中位数为 1.76×10^5 IU/mL;DBS 样品中平均病毒载量为 1.46×10^3 IU/mL,中位数为 7.95×10^2 IU/mL,DBS 样品病毒载量远低于血浆样品。

2.3 系统进化分析 44 例血浆样品和 30 例 DBS 样品 Pol 区基因序列与参考株在 BioEdit 7.2 软件比对后,MEGA 6.06 软件建立邻接法进化树。通过邻接法进化树分析发现,这 44 例患者所感染 HIV-1 为 CRF07-BC(24/44)、CRF01-AE(16/44)、CRF59-01B(2/44)、B(1/44)、CRF67-01B(1/44),其中 CRF07-BC 和 CRF01-AE 为主要亚型病毒株。同时,对血浆和 DBS 基因序列比较发现,30 例扩增检出成功的 DBS Pol 区基因序列与血浆样品 Pol 区序列相似值为 100%的有 26 例(26/30),相似值为 99%的有 3 例(3/

30),相似值为 97%的有 1 例(1/30),提示血浆和 DBS Pol 区基因序列具有高度的一致性。

2.4 血浆和 DBS 样品基因型耐药的差异 治疗前血浆样品中有 6 例出现基因型耐药,且 6 例患者对 PI 均未产生耐药突变位点。其中 1 例血浆样品在 D67N(1/44)和 K219Q(1/44)位点产生对 NRTI 耐药突变,D67N 位点对阿巴卡韦(ABC)、去羟肌苷(DDI)、替诺福韦(TDF)存在潜在低水平耐药;K219Q 位点对齐多夫定(AZT)、司他夫定(D4T)存在低水平耐药。在 NNRTI 中,V179D(3/44)、V179E(2/44)、G190A(1/44)发生突变,在 V179E/D 位点主要对依法韦仑(EFV)、依特韦林(ETR)、奈韦拉平(NVP)及利匹韦林(RPV)存在潜在低水平耐药;G190A 对 ETR 有潜在低水平耐药性,对 RPV 低水平耐药性,对 EFV 有中等耐药性,而对 NVP 产生高度耐药性。在成功检出的 30 例 DBS 样品中,3 例 DBS 样品出现了耐药突变,其中 1 例同样在 D67N(1/44)和 K219Q(1/44)位点出现 NRTI 耐药突变,这 3 例 DBS 样品分别在 V179E(1/44)、V179D(1/44)G190A(1/44)位点出现 NNRTI 耐药突变,耐药分析的结果与血浆一致。与血浆样品的基因型耐药检测结果相比,DBS 样品 HIV-1 亚型、耐药突变位点和耐药分析结果均一致,但是在 PI 和 RTI 的其他突变位点中,DBS 样品在位点突变数量和突变形式均有一定的差异。

3 讨 论

随着 ART 在全球规模的推广,HIV-1 感染的发病率和病死率显著降低。但是,HIV 耐药性对 ART 的长期效果构成潜在威胁,并且正在成为联合国 2016 年报告的“到 2030 年消除 HIV 作为全球公共卫生安全问题”的巨大威胁,监测 ART 耐药有利于及时对患者用药做出调整^[10-11]。目前,利用 RT-PCR 对 HIV-1 Pol 区基因型检测是对 ART 耐药监测的主要方法。常规耐药检测样品使用的一般是 HIV 患者的血浆,但是血浆在采集、运输及保存方面并不占优势,而 DBS 样品由于其良好的稳定性、易运输性以及采集方面的优势,成为血浆样品耐药检测潜在的良好替代品。本研究结果发现,DBS 与血浆样品在亚型分析结果以及耐药结果上保持一致,虽然在个别其他突变位点上存在一定差异,但是并不影响耐药结果的准确性。有研究发现,DBS 样品可用于 HIV 抗体和抗原检测、HIV 核酸定性和定量检测、HIV 基因型别与耐药性的筛查鉴定等,与配对血浆样品具有 99%以上的一致性^[12-13]。DBS 样品相比于血浆在阳性检出率及病毒载量方面均有较大的劣势。

本研究中,DBS 样品阳性检出率为 68.2%,平均病毒载量为 1.46×10^3 IU/mL,分布在 $1.30 \times 10^2 \sim$

7.90×10³ IU/mL;而血浆样品检出率达到 100.0%,平均病毒载量 5.02×10⁵ IU/mL,分布在 6.64×10³~3.30×10⁶ IU/mL,DBS 样品病毒载量要远低于血浆。由于在本研究中,只剪取了 1 个 DBS 滤纸片,这可能是 DBS 样品检出率低于血浆的主要原因。结合上述分析,后续增加 DBS 滤纸片的数量,提取 RNA 可能会大大提高 DBS 样品检出率。

亚型分析中,将所有比对完成的序列和参考株序列通过 MAGE 6.06 软件建立邻接法进化树,共鉴定出 5 种 HIV-1 病毒株:B 型、CRF01-AE、CRF59-01B、CRF67-01B、CRF07-BC,且 DBS 与血浆样品基因序列高度一致。同样耐药分析结果显示,在 44 例血浆样品中 6 例出现耐药突变,在成功检出的 DBS 样品中有 3 例出现耐药突变。与血浆样品耐药分析结果相比,除了少数其他突变位点存在差异,DBS 耐药结果与血浆高度一致,通过比对差异位点的碱基发现,主要是因为存在混合碱基导致其他位点的突变存在差异。这为 DBS 样品应用于 HIV 患者的耐药分析及亚型分析提供了实验依据。

目前,DBS 样品检测已应用于耳聋基因检测^[14]、梅毒酶联免疫吸附试验检测^[15]、新生儿足跟血 DBS 筛查地中海贫血^[16]以及孕妇中期 DBS 产前检测^[17]等的报道,DBS 在临床检测方面的应用逐步扩大。结合本研究的结果,虽然 DBS 样品在检出率上与血浆相比仍有所不足,但是 DBS 样品在采集和运输方面更加便利,DBS 样品充分干燥后可按非感染性物质运送,不需要传统的血浆或全血样品冷链运输,这极大地节约了运输成本。对于我国偏远地区,由于技术和交通方面均较为落后,HIV 耐药监测和流行病学调查不方便开展,DBS 样品此时就具有巨大的优势。另一方面,DBS 样品亚型分析结果与耐药分析结果的准确性也为 DBS 样品的推广应用奠定了基础。因此,优化后的 DBS 样品检测将是未来 HIV 耐药监测以及流行病学调查的一个创新模式。

参考文献

[1] JUSTIZ VAILLANT A A, GULICK P G. HIV disease current practice[M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing,2020:2-3.

[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会疾控局. 2018 年 11 月 23 日国务院新闻办发布会[EB/OL]. (2018-11-23) [2020-06-17]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1617891964337769110>.

[3] 钟平. HIV 分子流行病学研究和实践进展[J/CD]. 新发

传染病电子杂志,2019,4(3):137-144.

[4] HUYNH K, GULICK P G. HIV prevention[M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing,2019:10-11.

[5] BUCKTON A J, BISSETT S L, MYERS R E, et al. Development and optimization of an internally controlled dried blood spot assay for surveillance of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance[J]. J Antimicrob Chemother,2008,62(6):1191-1198.

[6] ZHAO B, HAN X, DAI D, et al. New trends of primary drug resistance among HIV type 1-infected men who have sex with men in Liaoning Province, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2011,27(10):1047-1053.

[7] HAN X, ZHANG M, DAI D, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning Province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2007,23(3):357-364.

[8] LI T, LAN Y, LI F, et al. Characterization of four nearly full-length genomic sequences of HIV-1 subtype G identified in Guangdong Province, China[J]. AIDS Res Hum Retroviruses,2019,35(7):668-672.

[9] TANG M W, LIU T F, SHAFER R W. The HIVdb system for HIV-1 genotypic resistance interpretation[J]. Intervirology,2012,55(2):98-101.

[10] CLUTTER D S, JORDAN M R, BERTAGNOLIO S, et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing[J]. Infect Genet Evol,2016,46:292-307.

[11] PARIKH U M, MCCORMICK K, VAN Z G, et al. Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure[J]. Curr Opin HIV AIDS,2017,12(2):182-189.

[12] 赫晓霞. HIV 创新检测模式——自我采样传递检测研究[D]. 北京:中国疾病预防控制中心,2019.

[13] 赫晓霞,程焕义,王月华,等. 干血斑用于 HIV 抗体确证(重组免疫印迹法)方法建立与初步应用[J]. 中国艾滋病性病,2019,25(11):1097-1100.

[14] 高鹏,覃诗琪,唐美芳. “新筛”干血斑在耳聋基因检测中的应用[J]. 检验医学,2020,35(3):264-269.

[15] 马洁琼,邢文革,蒋岩. 干血斑样本用于梅毒酶联免疫吸附试验检测方法的初步评价及应用研究[J]. 中国艾滋病性病,2020,26(5):517-521.

[16] 涂志华,林尧,周知,等. 以新生儿足跟血滤纸干血斑为标本的地中海贫血群体筛查研究[J]. 中华检验医学杂志,2018,41(2):132-135.

[17] 刘芙蓉,郝胜菊,王兴,等. 甘肃地区孕妇孕中期干血斑产前筛查结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(24):3426-3428.