

HIV-1 耐药检测技术进展

沈奎灵^{1,2}, 闫会敏^{2,3}, 李林¹, 李韩平¹

(1. 军事科学院军事医学研究院 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071; 2. 河北医科大学公共卫生学院, 石家庄 050017; 3. 石家庄市第五医院临床医学研究中心, 石家庄 050021)



李林, 军事科学院军事医学研究院病原微生物生物安全全国重点实验室研究员、博士生导师。主要研究领域包括 HIV 耐药性、HIV 分子流行病学、HIV 与机体相互作用等。先后主持国家重点研发计划项目、国家自然科学基金项目、国家科技重大专项等项目, 在 *Journal of Infection*、*Advanced Science*、*Cancer Research* 等 SCI 期刊上发表论文 70 余篇, 获得专利/软件著作权 12 项, 参编专著 2 部, 研究成果获得中华预防医学会科学技术奖二等奖 1 项(排名第二)。兼任中国性病艾滋病防治协会病毒学研究委员会常委和青年委员会副主任委员、北京医学会医学病毒学分会委员等。

摘要 艾滋病病毒已在全球肆虐 40 多年, 对全球公共卫生造成极大压力, 时至今日艾滋病仍然是全球公共卫生面临的一道医学难题。高效联合抗病毒疗法(HAART)是艾滋病治疗的首选方案, 已为众多艾滋病患者/人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者带来巨大福祉, 并为减缓艾滋病病毒的进一步传播发挥了很大作用。但随着这一方案的全面推广与应用, HIV-1 耐药性也日益突出。HIV-1 耐药性是影响临床抗病毒治疗效果的主要原因之一, 因此进行 HIV-1 耐药性检测, 对抗病毒药物的优化与选择、降低传播性耐药发生与防控十分重要。HIV-1 耐药检测方法众多, 因应用场景不同而方法各异, 本文汇总国内外众多文献资料, 就 HIV-1 耐药检测方法进行综述。

关键词 艾滋病; HIV-1 耐药检测; 基因型耐药检测; 表型耐药检测

中图分类号: R512.91 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2024)10-1353-07

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.10.005

Advances in HIV-1 resistance detection technology

SHEN Kuiling^{1,2}, YAN huimin^{2,3}, LI Lin¹, LI Hanping¹. (1. Institute of Microbiology and Epidemiology, Institute of Military Medicine, Academy of Military Sciences, National Key Laboratory of Pathogenic Microbial Biosafety, Beijing 100071, China; 2. School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 3. Clinical Research Center, the Fifth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050021, China)

Abstract HIV has ravaged the world for more than forty years, causing great pressure on global public health. Today, AIDS is still a medical challenge for global public health. Highly active anti-retroviral therapy (HAART) is the preferred option for AIDS treatment. It has brought well-being to many people living with HIV, and has played a great role in slowing the further spread of HIV. However, with the comprehensive application of this therapy program, HIV-1 drug resistance has also become increasingly prominent. HIV-1 drug resistance is one of the main causes affecting the efficacy of clinical antiviral therapy. Therefore, it is very important to carry out HIV-1 drug resistance testing, optimize and select antiviral drugs, reduce the occurrence of transmitted resistance, and prevent and control them. HIV-1 resistance testing methods are numerous and various depending on the application scenarios. This paper summarizes many literatures around the world and comprehensively discusses HIV-1 drug resistance testing methods.

Keywords AIDS; HIV-1 drug resistance testing; genotypic drug resistance assays; phenotypic drug resistance assays

[基金项目] 国家重点研发计划项目(No.2022YFC2304900; No.2022YFC2304903); 国家自然科学基金项目(No.82173583)

[通信作者] 李林, E-mail: dearwood@sina.com; 李韩平, E-mail: hanpingline@163.com

[收稿日期] 2024-03-01

据联合国艾滋病规划署统计,至2022年底全球累计已有8 560万人感染艾滋病病毒,4 040万人死于艾滋病相关疾病^[1]。目前,高效联合抗病毒疗法(highly active anti-retroviral therapy, HAART)已广泛用于艾滋病患者及人类免疫缺陷病毒1型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)感染者的治疗,极大地延长了生命周期,减缓了疾病进程^[2]。耐药性的出现大大降低了病毒对抗病毒药物的敏感性,成为影响抗逆转录病毒治疗效果的关键因素,而且耐药变异株可以传播给未接受过治疗的个体,形成传播性耐药,限制了治疗药物的选择^[3]。因此,对抗病毒治疗失败人群进行耐药检测、对新感染人群与即将接受HAART治疗的患者进行本底耐药检测,对抗病毒治疗方案的有效选择和减缓耐药毒株的传播都具有重要意义。HIV-1耐药性检测方法种类繁多,大致可以分为4种:基因型耐药检测方法、表型耐药检测方法、虚拟表型耐药检测方法与基于机器学习的耐药预测方法。本文就国内外HIV-1耐药检测方法的技术进展分类进行综述。

1 基因型耐药检测方法

基因型耐药检测主要是通过获得药物靶标核酸序列信息,分析序列变异发生情况,最终确定变异与耐药性的关系。核酸序列的获取有基于群体测序、深度测序和点突变等几种方法,其中群体测序法主要使用一代测序方法,即桑格测序法,不同实验室自建的HIV-1耐药基因型检测方法(in-house法)即是基于此方法^[4]。深度测序法涵盖了二代测序(next-generation sequencing, NGS)、三代测序(third-generation sequencing, TGS)及四代测序方法。通过测序获得HIV-1基因序列信息后,将靶基因序列提交至相关HIV耐药解释系统分析序列中与耐药相关变异发生的水平。目前使用较广泛的平台包括斯坦福大学HIV耐药数据库(HIVdb)、法国国家艾滋病研究机构(ANRS)、Rega研究所(Rega)和中国艾滋病病毒基因序列数据平台。基于点突变的检测方法是携带特异性耐药突变探针与待测序列杂交,通过荧光信号强弱来评估相关突变发生情况,主要包括AS-PCR、MAS-PCR、OLA、SMART、GeneChipTM、HTA、LiPATM等方法。

1.1 基于测序的基因型耐药检测方法

1.1.1 桑格测序 桑格测序采用链终止法进行测序,是经典的测序方法,因其测序准确率高而成为

HIV-1基因型耐药检测的金标准,也是世界卫生组织推荐的主要HIV耐药检测方法之一。

食品药品监督管理局(FDA)批准可应用于HIV-1耐药检测的商业试剂盒有“HIV-1 TRUGENETM Genotyping system”(TRUGENE)和“ViroSeqTM HIV-1 Genotyping system”(ViroSeqTM)。两者均具有配套的检测试剂、序列处理系统与耐药评价软件,可以产生耐药报告。Kuritzkes等^[5]利用TRUGENE法对HIV-1感染者进行耐药检测发现,不同抗凝剂、反复冻融、化合物与其它病毒干扰在一定程度上不会对测序质量造成显著影响,但是对低于1 000 copies/mL的样本得出可评估序列的效率低,故在检测时应保持待检样本病毒拷贝数在1 000 copies/mL以上。而ViroSeqTM适用的载量范围为2 000~750 000 copies/mL^[6]。由于种种原因,目前上述2种试剂盒基本上已退出市场。

我国经国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心获批了由广州达安基因股份有限公司研发的商业化HIV-1耐药检测试剂盒。该试剂盒利用PCR技术扩增样本中药物靶标序列信息,使用循环测序模块通过桑格测序技术进行测序。该试剂盒适用于HIV-1 PR与RT区耐药突变检测,结果可用于临床参考。

GeneSeqTM和VicroGENTM经过美国临床实验室修正案批准可用于临床检测。GeneSeqTM方法通过构建含有目的基因序列的单克隆,利用克隆测序检测患者体内的准种及耐药信息,检测下限可达500 copies/mL。VicroGENTM方法检测混合碱基的能力可达到10%,与TRUGENE相比,两者检测HIV-1突变结果具有高度一致性^[7]。Dejesus等^[8]采用该方法通过对抗逆转录病毒治疗前、后的患者群体进行耐药检测,提示该方法可用于药物的评价与选择。ATCC[®] HIV-1检测试剂盒兼具分型与耐药分析两种功能^[9],与ViroSeqTM相比,两者检测血浆样本耐药突变一致性较高,而ATCC法干血斑样品检出率更高,且可将检测成本降低约60%^[10]。

由于商业化HIV耐药检测试剂盒成本较高,且全球各地HIV流行情况不同,鉴于临床上时效性的需求,越来越多实验室自建的、基于一代桑格测序的in-house法不断出现^[4]。这些in-house方法更加适应当地情况,性价比更加优越,大多与经过批准的公认的检测方法性能相当,该方法在全球各地尤其是资源有限地区备受推崇,成为最为流行的HIV-1

耐药检测方法。

桑格测序通量低, 单个样本计算成本相对较高, 且一般在病毒耐药毒株超过总病毒的 20% 时才检测到耐药位点^[11], 故随着临床检测需求的多样化和测序技术不断的发展, 越来越多的新型 HIV-1 耐药检测方法应运而生。

1.1.2 NGS NGS 大致可分为两类: 边连接边测序 (SBL) 和边合成边测序 (SBS)。在 HIV-1 耐药检测领域, NGS 主要基于 SBS 原理。目前使用较多的用于 HIV-1 耐药检测的 NGS 平台是 Illumina 测序平台和 Ion Torrent 平台^[12]。Illumina 的 HiSeq 平台在短片段测序领域占据了相当大的份额, 其技术已相当成熟, 具有高度的跨平台兼容性^[13]。Ion Torrent 等较小规模的台式仪器的发布使耐药检测运行成本更低, 实现了检测需求的高度灵活性。因其分析和耐药性解释是完全自动化的, 从而消除了桑格测序中解释低信号峰时可能涉及的主观性^[14]。Silver 等^[15]利用 NGS 对初治感染人群进行耐药检测, 检测出桑格测序未发现的如 M46I/L、I50V、K65R 等耐药性相关突变, 且与患者的病史相匹配。

近年来, 绿叶生命科学旗下 Vela 公司宣布其基于 NGS 的 Sentosa® SQ HIV-1 基因分型耐药突变检测试剂盒获得美国 FDA 批准上市。该试剂盒搭配高度自动化的 Sentosa®NGS 工作流程, 可实现从 RNA 提取至产生耐药报告的全程自动化。有研究与桑格测序进行了比较, 该试剂盒可准确评估 HIV-1 耐药性且在检测 PR-RT 区域耐药性方面的成功率高于桑格测序, 其中 138K、41I、230I 等突变位点仅由 NGS 检测到^[16]。

NGS 检测的流程与桑格测序相似, 但其单样品成本更低, 能够实现高通量测序且可检测频率在 2%~15% 的低丰度病毒变异, 并能对样本中每个变异的频率进行定量估算, 但其在低频检测到的变异的临床意义不确定; 同时, 由于较高的错误率与较短的读长, 往往需要繁琐的序列拼接和严格的质量控制与二次校正^[13,17]。因此, 该技术通常需要一定的生物信息学分析手段来完成实验操作和数据分析。

1.1.3 TGS TGS 通常以单分子测序为特征, 具有通量高、读长长 (>20 kb) 的特点, 尤其对复杂区域检测具有较高的优势^[18]。当前较为成熟的技术平台有 HeliScope 单分子测序技术、实时单分子测序技术 (single-molecule real-time sequencing, SMRT)、纳米

孔测序技术、Geno Care 单分子测序技术等。

在使用 TGS 的 HIV-1 耐药检测领域, 较为成熟的是以 Pacific Biosciences (PacBio) 平台为代表的 SMRT。PacBio 也采用 SBS 策略, 与 Illumina 检测扩增 DNA 片段的增强信号不同, 该技术通过标记的荧光分子捕获单个 DNA 分子信号, 既解决了因噪声污染导致的读长较短的问题, 也提高了信噪比^[19]。因 PacBio 读长可覆盖 HIV 全长, 所以在研究 pol 以外区域对耐药性的贡献时具有极大的优势。

有研究使用改进的单分子实时测序和 Sequel II 系统在保证长读长的同时实现 >99% 的单分子读取准确性^[20], 但此仪器价格不菲, 目前尚未广泛用于中低收入国家的 HIV 耐药检测。

纳米孔测序技术是单分子实时测序的新一代技术, 有学者也将其归类为为四代测序。该测序技术主要是通过 ssDNA 或 RNA 模板分子通过纳米孔产生的“电信号”变化推测碱基组成进行实时测序, 故可直接对 RNA 进行测序。Oxford Nanopore MinION (ONT) 是一个小体积的 USB 设备, 具有便携、速度快、单碱基灵敏度高、读长长等优点。与桑格测序结果比较, 其可简单有效地测定接近全长的 HIV-1 基因组, 但测序准确性较低^[21]。现已开发出了多种方法来弥补这一短板。如 Gallardo 等^[22]开发的一种称为 MrHAMER 的基于 ONT 的长程测序管道, 通过设计含耐药突变的毒株进行检测, 显示其可提供大约 5 kb 的高精度单分子病毒, RNA 序列检测准确率高达 99.9%。

1.2 基于点突变的基因型耐药检测方法

1.2.1 异源双链示踪检测 (heteroduplex tracking assay, HTA) HTA 利用杂交技术进行序列分析, 将检测点引入放射性标记的探针中, 利用退火产生可通过凝胶电泳分离的探针-PCR 产物异源双链体。突变、插入/缺失都可导致异源双链体迁移改变, 从而可以通过观察迁移揭示病毒基因组的耐药突变信息。Resch 等^[23]开发出一种多位点特异性 (MSS) HTA, 该方法可检测多个基因组中的突变以及基因组中存在的多个突变, 可用于研究病毒种群动态。

1.2.2 RNA 靶向扩增的简单方法 (simple method for amplifying RNA targets, SMART) SMART 使用特定的两个 ssDNA 探针与靶 RNA 中的特定序列结合, 能够检测病原体的多种特征, 如亚型、耐药性等^[24]。与传统的基于核酸序列的扩增相比, SMART 扩增与 RNA 本身的结构无关, 因此避免了 RNA 产

物二级结构的影响,使得引物设计得到优化并可用于多重检测。有学者采用 SMART 检测含 K103N 耐药突变的病毒株,结果显示 SMART 法在 180 min 内完成测试,同时在未知 HIV 野生种群中可以检测到 1% 的突变体,灵敏度约为 6 000 copies/mL^[25]。

1.2.3 即时检测(point of-care test, POCT)法 POCT 法提供了一种新兴的 HIV-1 耐药检测方案,该方案可降低检测成本、扩大检测可及性、缩短周转时间,对于分散样本与在资源缺乏地区检测具有重要意义。OLA-Simple 是 POCT 应用较为广泛的策略之一,研究人员对 K103N、V106M/I、Y181C、M184V 和 G190A 位点的检测效率进行评价,总体灵敏度高达 98%,且无经验人员也可使用并保证检测的准确^[26]。但目前还没有研发出完全符合 WHO 提出的“AS-SURED”标准的 HIV-1 耐药检测的 POCT 方法。

2 表型耐药检测方法

表型耐药检测方法的基本原理是测定耐药突变位点对抗病毒药物敏感性的影响以及某种药物抑制 HIV-1 相关酶活性的情况,被认为是耐药性检测的金标准。目前,表型耐药检测方法可分为基于病毒培养法、重组病毒表型耐药检测、假病毒耐药检测以及一些新兴表型耐药检测方法。

2.1 病毒培养法

病毒培养法依赖分离患者或感染者体内的病毒进行体外药物敏感性分析。将分离出的临床毒株与健康人外周血单个核细胞(PBMC)共培养,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)方法检测培养上清的 P24 抗原量确定药物的半数抑制浓度(IC₅₀),并与野生株比较以评价分离毒株是否具有耐药性以及其耐药程度^[27]。

该方法需要在生物安全 3 级实验室操作,费时费力且早期检测周期较长(8~12 周)。因从患者体内分离病毒的难度大,且健康人 PBMC 在不同供者间有差异,故该方法重现性不好,并不适合应用于临床耐药检测。

2.2 重组病毒法

Kellam 等^[28]于 1994 年首次报道了重组病毒表型检测方法。此种方法利用同源性重组产生含 RT 基因的重组活病毒群体,通过 HeLa CD4 空斑减数法检测药物敏感性。目前常用的重组病毒表型耐药测定方法都与之类似,通过构造重组病毒测定其对不同药物的敏感性。

2.2.1 Antivirogram 检测 Antivirogram 是一种基于细胞和病毒培养的检测方法。该方法获得的含有 HIV-1 PR 和 RT 基因片段的重组病毒用增强的绿色荧光蛋白报告基因标记,可通过流式细胞术在单细胞水平上区分细胞是否感染,从而具有较高的灵敏度。在 HIV-1 M 组亚型的临床样本上进行验证,显示该方法具有较高的样本提取率且能够确定突变或联合突变对所有临床批准的 HIV-1 抑制剂的易感性的影响^[29]。

2.2.2 ViralARTs HIV assay Weber 等^[30]开发了一种 HIV-1 表型分析方法,该方法将 HIV *p2-INT* 基因序列引入可表达人肾荧光素酶基因的载体中,可通过测量细胞中的荧光素酶表达来评估药物敏感性。

与 PhenoSense assay 比较,两者对 HIV-1 初治人群的药物敏感性测定的一致性没有差异,而 ViralARTs HIV assay 可检测出含有低至 25% 的耐药病毒与野生型易感菌株混合的病毒混合物中的耐药性。因其能够构建和测试携带较大 HIV 衍生片段的具有复制能力的重组病毒,可同时量化对各种药物的易感性,所以可用于检测 HIV 感染患者在各种治疗方案下的耐药性及评估新抗病毒药物的疗效^[30-31]。

2.3 假病毒法

美国 Virologic 公司对重组病毒表型耐药测定法进行改进,研发出假病毒法。因假病毒关键毒力基因被人为删除,使其能替代各种野生型高致病性病毒在生物安全 2 级实验室进行研究^[32]。目前常用的假病毒耐药检测方法有 PhenoSense Assay 和 PhenoscryptTM。

2.3.1 PhenoSense Assay PhenoSense Assay 包括 PhenoSense GT、PhenoSense Entry、PhenoSense Integrase^[32]。在 PhenoSense Assay 检测中,将从血浆中扩增的 PR 和 RT 及荧光素酶表达基因分别插入到 HIV-1 载体的 pol 区和 env 区构建耐药检测载体(RTV)。利用不具备自主复制能力的缺陷型病毒来测定样本对 PR 和 RT 抑制剂的敏感性,通过药物敏感曲线来确定药物的 IC₅₀。该方法可以实现高通量检测,且省略了培养病毒的步骤,8~10 d 就可完成,大大缩短了检测的时间,可有效地用来选择以往治疗失败患者新治疗药物以及感染耐药毒株患者的初治方案。

RTV 不依赖于低效随机的同源重组,与产生具有复制型病毒且使用指示细胞系进行检测的方法

相比,使用RTV具有更高的灵敏度和可重复性,故该方法可区分易感性差异至2.5~4倍的病毒。一般情况下,该方法可以检测耐药病毒亚群低至20%~25%的样本耐药性。采用该方法对HIV-1感染者进行表型耐药检测,结果与以往文献一致,如M184V/I突变可显著降低对拉米夫定的易感性^[32]。

2.3.2 Phenoscript™ Phenoscript™是一种体外单循环重组病毒检测方法,每种PCR产物与相应的质粒分别转染细胞,加入待测药物里面。指示细胞含有HIV-ILTR控制的 β -半乳糖苷酶(LacZ),结果通过比色进行检测。由于PR、RT及env均被扩增,因此还可以检测融合抑制剂(FI)的耐药性。Zennou等^[33]采用此方法对5例接受蛋白酶抑制剂治疗的患者进行研究,发现治疗失败后利托那韦耐药毒株在蛋白酶的密码子第20、第36、第46、第54、第82、第90位处携带典型利托那韦耐药性突变的不同组合。

2.4 其他表型耐药检测方法

随着生物技术的不断发展,一些不依赖培养病毒的方法建立起来。比如将相关病毒基因连入某些发挥病毒蛋白作用的载体中,间接地测定相关酶在药物存在情况下的活性,如TyHRT;或利用快速、简单的生化方法直接测定血浆中相关酶对其抑制剂的敏感性,如Amp-RT。

TyHRT通过将相关酶区DNA插入酵母菌内形成含有相关耐药检测区域的完整TyHRT元件。虽然病毒蛋白诱导酵母细胞死亡,但培养基中药物对细胞的抑制使其以剂量依赖性方式生长,故可以通过观察酵母菌的生长情况间接测定酶的活性,评估耐药敏感性^[34]。

Amp-RT利用逆转录PCR扩增脑心肌炎病毒(EMCV)RNA基因组产生EMCV cDNA,采用Southern印迹杂交检测EMCV特异性的内部探针^[35]。Amp-RT的灵敏度是标准RT检测的100 000倍,比RT-PCR或TCID₅₀检测的灵敏度高100倍,可以检测血浆中极低水平的RT活性。

3 虚拟表型耐药检测方法

虚拟表型耐药检测方法由美国强生Virco BV-BA公司研发,该技术使用突变模式匹配方法,依托于已有超过13 000个基因型-表型数据库信息,根据患者HIV序列的耐药突变对耐药程度的表现进行预测。此技术与表型检测相比耗时少(1~2周),价格低,结果直观。

virco®TYPE HIV-1检测试剂盒采用线性建模方法构建了7种蛋白酶抑制剂和10种逆转录酶抑制剂的耐药性模型,权衡单个突变和联合突变对药物敏感性的影响,这种加权方法使得在估计病毒耐药性时有了更高的分辨率^[36]。尽管该方法被称为表型检测方法,但通常认为它是标准基因型检测的改进版,因为它不是一种直接的检测,而是基于基因型检测和数据库匹配的一个预测结果。

4 基于机器学习的耐药预测方法

机器学习越来越多地用于预测和了解HIV的耐药性,如HIV-TRePS系统,使用数据库建立模型以预测病毒学反应的概率、耐药变化和趋势,以进行预防。标准分类器模型包括HIV基因型、治疗时间、CD4计数在内的信息,在交叉验证和独立测试中实现了0.89的受试者工作特征曲线下的面积(AUC),而缺少某些信息的模型AUC值也可达到0.78~0.90^[37]。患者的病例信息、检测结果和基因型信息可以长时间存储在数据云中,以便相关人员进一步进行相关特性分析或传输网络分析。因这些模型使用免费,故在中、低收入国家具有巨大的应用潜力,但一方面该方法发展还不够成熟,另一方面面对各个国家制定的治疗方案缺乏临床应用契机,故并未得到广泛应用。

综上所述,HIV-1耐药检测方法种类繁多,各有优缺点。与其他检测方法相比,GDRAS具有快速、灵敏、可重复和成本效益高的特点,目前广泛用于监测HIV-1耐药性的出现和传播,但其耐药解释大多依赖于现有耐药数据库。不同地区HIV-1流行亚型不同,且随着流行趋势变化与抗逆转录病毒药物的发展,GDRAS并不能准确解释全部耐药信息。PDRAS通常检测周期长,灵敏度低,且检测结果易受到细胞状态、实验室条件等因素影响而重现性较差,但它可直接定量测量HIV-1病毒的耐药情况,且对任何亚型、任何抗病毒药物均可评估,结果易于解释,是HIV-1耐药检测的金标准。但目前并未对所有药物设立标准的cut-off值,且检测只是针对单个抗病毒药物,故PDRAS在临床耐药解释中仍具有一定的局限性。虚拟表型耐药检测方法基于机器学习的耐药预测方法利用数据库或建立模型,通过患者现有数据信息预测该患者HIV-1耐药性,在未来有望用作治疗支持工具以评估临床结果,但在序列数据与原始数据的保密性、安全性、共享性

等方面仍亟待达成共识。临床与科研活动中,选择哪种检测方法需根据实际需求而定。在更多时候,综合应用不同检测方法才能得到一个客观、准确的检测结果。

参考文献:

- [1] UNAIDS. Global HIV & AIDS statistics — Fact sheet[Z]. 2023.
- [2] PALELLA F J J, DELANEY K M, MOORMAN A C, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators[J]. The New England journal of medicine, 1998, 338(13): 853-860.
- [3] LITTLE S J, HOLTE S, ROUTY J P, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV [J]. The New England journal of medicine, 2002, 347(6): 385-394.
- [4] MANYANA S, GOUNDER L, PILLAY M, et al. HIV-1 drug resistance genotyping in resource limited settings: current and future perspectives in sequencing technologies [J]. Viruses, 2021, 13(6): 1125.
- [5] KURITZKES D R, GRANT R M, FEORINO P, et al. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 genotyping kit and the opengene DNA sequencing system[J]. Journal of clinical microbiology, 2003, 41(4): 1594-1599.
- [6] ESHLEMAN S H, HACKETT J J, SWANSON P, et al. Performance of the celera diagnostics viroSeq HIV-1 Genotyping system for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains[J]. Journal of clinical microbiology, 2004, 42(6): 2711-2717.
- [7] BILÉ E C, ADJÉ-TOURÉ C, BORGET M Y, et al. Performance of drug-resistance genotypic assays among HIV-1 infected patients with predominantly CRF02_AG strains of HIV-1 in Abidjan, Cote d'Ivoire[J]. Journal of clinical virology: the official publication of the pan American society for clinical virology, 2005, 32(1): 60-66.
- [8] DEJESUS E, GOTTLIEB M S, GATHE J C J, et al. Safety and efficacy of enfuvirtide in combination with darunavir-ritonavir and an optimized background regimen in treatment-experienced human immunodeficiency virus-infected patients: the below the level of quantification study [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008, 52(12): 4315-4319.
- [9] INZAULE S, YANG C F, KASEMBELI A, et al. Field evaluation of a broadly sensitive HIV-1 in-house genotyping assay for use with both plasma and dried blood spot specimens in a resource-limited country[J]. Journal of clinical microbiology, 2013, 51(2): 529-539.
- [10] ROSEMARY A, CHIKA O, JONATHAN O, et al. Genotyping performance evaluation of commercially available HIV-1 drug resistance test[J]. Plos one, 2018, 13(6): e0198246.
- [11] PARIKH U M, MCCORMICK K, VAN ZYL G, et al. Future technologies for monitoring HIV drug resistance and cure[J]. Current opinion in HIV and AIDS, 2017, 12(2): 182-189.
- [12] CHANG M W, OLIVEIRA G, YUAN J Y, et al. Rapid deep sequencing of patient-derived HIV with ion semiconductor technology[J]. Journal of virological methods, 2013, 189(1): 232-234.
- [13] GOODWIN S, MCPHERSON J D, MCCOMBIE W R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature reviews genetics, 2016, 17(6): 333-351.
- [14] PYNE M T, SIMMON K E, MALLORY M A, et al. HIV-1 drug resistance assay using ion torrent next generation sequencing and on-instrument end-to-end analysis software[J]. Journal of clinical microbiology, 2022, 60(7): e0025322.
- [15] SILVER N, PAYNTER M, MCALLISTER G, et al. Characterization of minority HIV-1 drug resistant variants in the United Kingdom following the verification of a deep sequencing-based HIV-1 genotyping and tropism assay[J]. AIDS research and therapy, 2018, 15(1): 18.
- [16] RAYMOND S, NICOT F, ABRAVANEL F, et al. Performance evaluation of the Vela Dx Sentosa next-generation sequencing system for HIV-1 DNA genotypic resistance [J]. Journal of clinical virology: the official publication of the pan American society for clinical virology, 2020, 122: 104229.
- [17] GERETTI A M, BLANCO J L, MARCELIN A G, et al. HIV DNA sequencing to detect archived antiretroviral drug resistance[J]. Infectious diseases and therapy, 2022, 11(5): 1793-1803.
- [18] ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH J R, et al. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics[J]. Nucleic acids research, 2018, 46(5): 2159-2168.
- [19] BOLDOGKÖI Z, MOLDOVÁN N, BALÁZS Z, et al. Long-read sequencing - A powerful tool in viral transcriptome research[J]. Trends in microbiology, 2019, 27(7): 578-592.
- [20] SU B, ZHENG X, LIU Y, et al. Detection of pretreatment minority HIV-1 reverse transcriptase inhibitor-resistant

- variants by ultra-deep sequencing has a limited impact on virological outcomes[J]. The journal of antimicrobial chemotherapy, 2019, 74(5): 1408-1416.
- [21] MORI M, ODE H, KUBOTA M, et al. Nanopore sequencing for characterization of HIV-1 recombinant forms[J]. Microbiology spectrum, 2022, 10(4): e0150722.
- [22] GALLARDO C M, WANG S Y, MONTIEL-GARCIA D J, et al. MrHAMER yields highly accurate single molecule viral sequences enabling analysis of intra-host evolution[J]. Nucleic acids research, 2021, 49(12): e70.
- [23] RESCH W, PARKIN N, STUELKE E L, et al. A multiple-site-specific heteroduplex tracking assay as a tool for the study of viral population dynamics[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2001, 98(1): 176-181.
- [24] MCCALLA S E, ONG C, SARMA A, et al. A simple method for amplifying RNA targets (SMART) [J]. The journal of molecular diagnostics, 2012, 14(4): 328-335.
- [25] MORABITO K, KANTOR R, TAI W, et al. Detection of HIV-1 minority variants containing the K103N drug-resistance mutation using a simple method to amplify RNA targets (SMART) [J]. The journal of molecular diagnostics, 2013, 15(3): 401-412.
- [26] PANPRADIST N, BECK I A, VRANA J, et al. OLA-Simple: a software-guided HIV-1 drug resistance test for low-resource laboratories[J]. EBioMedicine, 2019, 50: 34-44.
- [27] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范 (2020 年修订版) [S]. (2020-07-08) (2024-02-02). <http://www.doc88.com/p-27516514139876.html>
- [28] KELLAM P, LARDER B A. Recombinant virus assay: a rapid, phenotypic assay for assessment of drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 isolates[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1994, 38(1): 23-30.
- [29] COVENS K, DEKEERSMAEKER N, SCHROOTEN Y, et al. Novel recombinant virus assay for measuring susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 group M subtypes to clinically approved drugs[J]. Journal of clinical microbiology, 2009, 47(7): 2232-2242.
- [30] WEBER J, VAZQUEZ A C, WINNER D, et al. Novel method for simultaneous quantification of phenotypic resistance to maturation, protease, reverse transcriptase, and integrase HIV inhibitors based on 3'Gag(p2/p7/p1/p6)/PR/RT/INT-recombinant viruses: a useful tool in the multiget era of antiretroviral therapy[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2011, 55(8): 3729-3742.
- [31] WEBER J, ROSE J D, VAZQUEZ A C, et al. Resistance mutations outside the integrase coding region have an effect on human immunodeficiency virus replicative fitness but do not affect its susceptibility to integrase strand transfer inhibitors[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65631.
- [32] PETROPOULOS C J, PARKIN N T, LIMOLI K L, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000, 44(4): 920-928.
- [33] ZENNOU V, MAMMANO F, PAULOUS S, et al. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo[J]. Journal of virology, 1998, 72(4): 3300-3306.
- [34] RAVAUX I, PERRIN-EAST C, ATTIAS C, et al. Yeast cells as a tool for analysis of HIV-1 protease susceptibility to protease inhibitors, a comparative study[J]. Journal of virological methods, 2014, 195: 180-184.
- [35] HENEINE W, YAMAMOTO S, SWITZER W M, et al. Detection of reverse transcriptase by a highly sensitive assay in sera from persons infected with human immunodeficiency virus type 1[J]. The journal of infectious diseases, 1995, 171(5): 1210-1216.
- [36] MACARTHUR R D. Understanding HIV phenotypic resistance testing: usefulness in managing treatment-experienced patients[J]. AIDS reviews, 2009, 11(4): 223-230.
- [37] REVELL A D, WANG D C, PEREZ-ELIAS M J, et al. 2021 update to HIV-TRePS: a highly flexible and accurate system for the prediction of treatment response from incomplete baseline information in different healthcare settings[J]. The journal of antimicrobial chemotherapy, 2021, 76(7): 1898-1906.

本文引用格式:

沈奎灵, 闫会敏, 李 林, 等. HIV-1 耐药检测技术进展[J]. 广西医科大学学报, 2024, 41(10): 1353-1359. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.10.005

SHEN K L, YAN H M, LI L, et al. Advances in HIV-1 resistance detection technology[J]. Journal of Guangxi medical university, 2024, 41(10): 1353-1359. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2024.10.005