

江苏省连续 3 年 HIV-1 耐药警戒线及流行亚型的调查研究

徐晓琴,郭宏雄,胡海洋,傅更锋,卢静,周莹,张之,还锡萍,羊海涛*

(江苏省疾病预防控制中心性病艾滋病防制所,江苏 南京 210009)

[摘要] 目的:了解江苏省艾滋病新近感染者在开展艾滋病抗病毒治疗以来 HIV-1 耐药株的传播水平及亚型分布情况。方法:采用 WHO 的截断序贯抽样法,连续 3 年在江苏省部分地区采集 16~25 岁 HIV-1 新近感染者的血样本各 65、66 和 49 例,提取病毒 RNA,采用 RT-PCR 和巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 区片段并测定 pol 区编码蛋白酶和逆转录酶基因的序列,提交到斯坦福大学 HIV 在线耐药数据库中鉴定耐药位点。用 MEGA4.0 软件构建进化树,分析亚型。结果:根据采样时间对样本排序,2009—2010 年前 47 例未检出耐药样本数,2011 年第 28 个序列出现 1 例耐药传播相关的耐药突变,后续一直到第 44 例均未有耐药样本出现,按传播水平判别表,属 HIV 耐药株的低度传播水平,采集的样本按 pol 区分型,2009、2010、2011 年调查对象成功获得序列的前 47 例(2011 年为 44 例)的亚型结果看,亚型以 CRF01_AE 为主,分别占 40.40%、46.80%和 56.80%,其次为 CRF07_BC,分别为 29.80%、25.50%、27.30%,其余还有 CRF08_BC、C、B、URFA/B。结论:2009—2011 年江苏省 HIV-1 新近感染者中 HIV-1 耐药株传播水平属低度,主要亚型流行情况与 2006 年本省调查结果类似,但与 2003 年前调查的 HIV-1 流行亚型比还是发生了显著变化。

[关键词] HIV-1;耐药警戒线调查;亚型

[中图分类号] R181.8+1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)09-1329-04

doi:10.7655/NYDXBNS20150933

高效抗反转录病毒联合疗法是目前为止治疗艾滋病最为有效的方法,它能延长 HIV 感染者及患者的生命并提高他们的生活质量^[1]。国内使用的药物主要是核苷类反转录酶抑制剂、非核苷类反转录酶抑制剂及蛋白酶抑制剂。但是,高效抗反转录病毒联合疗法也可能引起一些负面作用,首要的问题就是耐药性的产生及耐药株的传播,这有可能使少数患者陷入无药可用的危险境地^[2]。江苏省自 2004 年开展艾滋病抗病毒治疗以来,治疗人数不断增加,目前在治人数已近七千人。根据国际上抗病毒治疗的经验,在开展抗病毒治疗 3 年以上的地区,可能会出现 HIV 耐药株的传播,继而给感染耐药株的 HIV 患者的抗病毒治疗带来困难。

为了更好地了解江苏地区 HIV 耐药株的传播情况及亚型流行现状,本研究采用了世界卫生组织(WHO)推荐的资源最小化的 HIV 警戒线调查方法(HIV drug resistance threshold survey, HIVDR-TS),对江苏地区 2009—2011 年部分地区 1—6 月份经艾滋病确证实验室用蛋白印迹试验确证为 HIV 抗体阳性的 16~25 岁新发现符合要求的 HIV 感染者

进行了耐药传播水平及流行亚型的调查,以推导本地区本底耐药水平及亚型的流行状况,为江苏省有效开展抗病毒治疗进而减少艾滋病患者的死亡提供参考依据并分析新近感染者亚型流行情况,以利于更好地了解并掌握江苏省 HIV-1 毒株亚型流行分布情况及传播情况。

1 对象和方法

1.1 对象

按照 WHO 关于“HIV 耐药警戒线监测方案”,按抽样单位最小化原则,选取江苏省部分地区 2009—2011 年当年 1—6 月份连续检测中经艾滋病确证实验室用蛋白印迹试验确证为 HIV 抗体阳性的 16~25 岁新发现并愿意提供联系信息的 HIV 感染者为研究对象,并提供书面知情同意书参加此调查(18 岁以下的未成年人需父、母或法定监护人签署),有以下情况之一者予以排除:①以前有 HIV 阳性检测记录;②以前接受过抗病毒治疗;③有 WHO III 期或 IV 期临床症状;④ CD4 计数小于 200 个/ μ L。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

采集 8 mL EDTA 抗凝全血标本,立即混匀,颠倒 8~10 次。采集后 24 h 内 1 500 r/min 离心 15 min 后,分离出血浆和淋巴细胞富集液并分装在样品保

[基金项目] 江苏省医学重点人才项目(RC2011083, RC2011086, RC2011087)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yht@jscdc.cn

存管中,置-70℃冰箱保存备用。

1.2.2 HIV-1 RNA 的提取

使用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Kit 试剂盒提取血浆中的病毒 RNA,用于 PCR 扩增,方法参考试剂盒说明书。

1.2.3 蛋白酶区和逆转录酶区的扩增

采用巢式 PCR 扩增编码 HIV-1 蛋白酶区和逆转录酶的 pol 区基因片段,全长约 1 300 bp。引物包括外侧上游引物 MAW26:5'-TGGAATGTG-GAAAGGAAGGAC-3', 外侧下游引物 RT21:5'-CTCTATTCTGCTATTAAGTCTTTTGTATGGG-3'; 内侧上游引物 Pro-1:5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3', 内侧下游引物 RT20:5'-CTGCCAGTTCTAGCTCT-GCTTC-3',总扩增长度 1 300 bp。

1.2.4 产物纯化及序列测定

以 RTA(5'-GTTGACTCAGATTGGTTGCAC-3',正向),RTB(5'-CCTAGTATAACAATGAGACAC-3',正向),ProC1-down(5'-CCCTGCTGGGTGTGGTATTCC-3',反向)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 ABI3730 测序仪上进行核苷酸序列测定。

1.2.5 亚型及耐药性分析

序列测定后首先使用 Contig Express 软件进行拼接,然后用 Bioedit 软件进行多序列比对和序列编辑。用 MEGA4.0 软件中的邻位对接程序构建进化树和分析亚型。将获得核酸序列提交至斯坦福大学 HIV 耐药数据库进行耐药位点的分析(http://hivdb.stanford.edu/pages/algs/sierra_sequence.html)。

1.2.6 HIV 耐药流行水平的判定

根据 WHO 的 HIV 耐药警戒线监测抽样表,分别将获得有效序列的样本按确证时间先后进行排序。第一阶段抽样:先抽取 34 个样本填入“HIV 耐药警戒线监测抽样与分类表”,计算累积耐药样本数,如累积耐药样本数小于低流行阈值即下限(LL)则判为低流行(<5%),若大于高流行阈值即上限(UL)则判为高流行(>15%),否则进行第二阶段抽样;继续抽取下一个样本,重复上述过程,直至作出低流行或高流行判断,当遇到累积样本量达到 47 例时仍无法作出判断的情况,此时作出中流行的判断(5%~15%)^[3-6]。当完成 47 例样本的抽样时,若累积的耐药样本数为 2 例,与下限的数目相同,此时耐药率为 4.3%(2/47)<5%,为低流行程度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件包进行统计分析,年龄、

CD4 淋巴细胞计数用平均数,传播途径、亚型分布采用构成比表示,年度间构成比比较采用 χ^2 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

2009、2010、2011 年调查人数分别为 65、66 和 49 例(其中 5 例在 2010 年已采过样,剔除),获得序列成功率分别为 72.3%、71.6%、100.0%。调查对象平均年龄分别为 22(17~25)岁、23(19~25)岁、23(19~25)岁,均小于 25 岁,男性居多,多为汉族,文化程度以初中及以上为主,感染途径以同性传播为主。2009、2010、2011 年的 CD4 淋巴细胞的平均数分别为 485、495、508 个/ μ L。将输血/血制品、注射毒品和不详 3 种传播途径合并为一组,进一步将 3 年传播途径进行比较,年度间传播途径构成比无差别($\chi^2=3.05, P=0.55$)。从表 1 中可见,调查对象感染以性传播为主,3 年中分别占 91.49%、85.10%、93.19%,尤以同性传播为多,3 年中分别占 63.83%、53.19%、54.55%。

表 1 2009—2011 年调查对象感染途径构成 [n(%)]

传播途径	2009 年 (n=47)	2010 年 (n=47)	2011 年 (n=44)
同性性接触	30(63.83)	25(53.19)	24(54.55)
异性性接触	13(27.66)	15(31.91)	17(38.64)
输血/血制品	1(2.13)	1(2.13)	0(0)
注射毒品	0(0)	1(2.13)	2(4.54)
不详	3(6.38)	5(10.64)	1(2.27)

2.2 2009—2011 年调查对象的 HIV 亚型分布情况

采集的样本按 pol 区分型,2009—2011 年调查对象成功获得序列的前 47 例(2011 年为 44 例)的亚型结果看,亚型以 CRF01_AE 为主,分别占 40.43%、46.80% 和 56.82%,其次为 CRF07_BC,分别为 29.78%、25.53%、27.27%,其余还有 CRF08_BC、C、B、URFA/(表 2)。将 C、B、URFA/B 合并为一组,进一步将 3 年的亚型分布结果进行比较,年度构成比间有统计学意义($\chi^2=14.88, P=0.01$)。

2.3 HIV 耐药传播相关的突变位点

根据 WHO2009 版 SDRM 耐药突变位点分析,2009、2010 年的 47 份样本中,均未发现耐药传播相关的突变位点。2011 年的 44 份样本中只有 1 份(NJS1336)出现了针对非核苷类逆转录酶抑制剂的耐药传播相关的突变位点 K101E。其对地拉夫定、奈韦拉平中度耐药,对依非韦伦低度耐药。

表 2 2009—2011 年调查对象 HIV 亚型分布情况
[n(%)]

亚型	2009 年 (n=47)	2010 年 (n=47)	2011 年 (n=44)
CRF01_AE	19(40.43)	22(46.80)	25(56.82)
CRF07_BC	14(29.78)	12(25.53)	12(27.27)
CRF08_BC	13(27.66)	4(8.51)	0(0)
C	1(2.13)	1(2.13)	7(15.91)
B	0(0)	6(12.77)	0(0)
URFA/B	0(0)	2(4.26)	0(0)

2.4 HIV 耐药传播水平

耐药流行水平: 根据采样时间对样本排序, 2009、2010 年前 47 例未检出耐药样本数, 2011 年第 28 个序列出现 1 例耐药传播相关的耐药突变, 后续一直到第 44 例均未有耐药样本出现, 按传播水平判别表, 属 HIV 耐药株的低度传播水平, 根据 WHO“HIV 耐药警戒线监测抽样与分类表”, 计算累积耐药样本数, 3 年的累积耐药样本数均小于低流行阈值, 应判为低流行(<5%), 即流行率小于 5%, 属 HIV 耐药株的低度传播水平(表 3)。

3 讨论

自 1996 年建立联合抗病毒治疗方案以来, 艾滋病的抗病毒治疗已在全世界范围展开, 根据国际抗病毒治疗的经验, 随着 AIDS 抗病毒治疗人数的不断增加和治疗时间的延长, HIV 耐药株也随之产生, 并在人群中逐步传播流行, 给后续治疗构成严峻挑战, 为了更好地进行抗病毒治疗, 最好在治疗前先对每例需要治疗的患者进行基础耐药情况的检测, 但对所有未进行抗病毒治疗患者开展基因型耐药检测需要大量的人力财力, 目前还无法实施, 因此对 HIV 传播性耐药开展早期预警监测显得尤为重要。

本调查选用新报告的 16~25 岁低年龄组, 主要考虑其感染 HIV 时间可能较短, 没有接受过抗逆转录病毒药物治疗, 检出的耐药性突变更可能源于原发性耐药株感染, 而不是 HIV 株在体内的进化结果。调查采用 WHO 的截断序贯抽样法, 只需要 34~47 个有效序列即可获得结果, 资源占用少, 经济高效, 适合于 HIV 传播性耐药的快速评估, 十分适合我国现有的资源情况^[6-7]。

2009、2010、2011 年调查对象中以性传播感染为主, 3 年中分别占 91.49%、85.10%、93.19%, 尤以同性传播为多, 分别占 63.83%、53.19%、54.55%, 3 年度间传播途径构成比无差别。调查对象中亚型以

表 3 2009—2011 年抽样情况和耐药传播水平

成功检测的样本数	下限(LL)	检出耐药的标本数			上限(UL)
		2009 年	2010 年	2011 年	
1	ND	0	0	0	ND
2	ND	0	0	0	ND
3	ND	0	0	0	ND
4	ND	0	0	0	ND
5	ND	0	0	0	ND
6	ND	0	0	0	ND
7	ND	0	0	0	ND
8	ND	0	0	0	ND
9	ND	0	0	0	ND
10	ND	0	0	0	ND
11	ND	0	0	0	ND
12	ND	0	0	0	ND
13	ND	0	0	0	ND
14	ND	0	0	0	5
15	ND	0	0	0	5
16	ND	0	0	0	5
17	ND	0	0	0	5
18	ND	0	0	0	5
19	ND	0	0	0	5
20	ND	0	0	0	5
21	ND	0	0	0	5
22	ND	0	0	0	5
23	ND	0	0	0	5
24	ND	0	0	0	5
25	ND	0	0	0	6
26	ND	0	0	0	6
27	ND	0	0	0	6
28	ND	0	0	1	6
29	ND	0	0	1	6
30	ND	0	0	1	6
31	ND	0	0	1	6
32	ND	0	0	1	6
33	ND	0	0	1	6
34	1	0	0	1	7
35	1	0	0	1	7
36	1	0	0	1	7
37	1	0	0	1	7
38	1	0	0	1	7
39	1	0	0	1	7
40	1	0	0	1	7
41	1	0	0	1	7
42	1	0	0	1	7
43	1	0	0	1	7
44	2	0	0	1	7
45	2	0	0	/	7
46	2	0	0	/	8
47	2	0	0	/	8
停止	停止	停止	停止	停止	停止

ND: 无法确定, 继续抽样。

CRF01_AE 重组株为主, 历年分别占 40.43%、46.80% 和 56.82%, 且有逐年增加态势, 其次为 CRF07_BC, 分别为 29.78%、25.53%、27.27%, 其余还有 CRF08_BC、C、B、URFA/B, 主要亚型流行情况与邻近省份浙江省的情况类似^[8], 与 2006 年江苏省流行株的调查结果相比没有显著变化^[9], 但与 2003 年前调查的 HIV-1 亚型相比还是发生了显著的变化, 已从原来的 C(占 40.48%) 和 B'(38.10%) 亚型为主^[10-11] 而转为以 CRF01_AE 为主, 其次为 CRF07_BC。且 CRF01_AE 重组株逐年增多, 这也是很多报道中提及的性传播感染者尤其是男男性行为人群中的主要流行株^[12-14]。

抽样调查中, 2009、2010 年前 47 例均未检出耐药样本, 2011 年第 28 个序列出现 1 例耐药传播相关的耐药突变, 该对象为同性传播途径, 后续一直到第 44 例均未有耐药样本出现, 按传播水平判别表, 属 HIV 耐药株的低度传播水平, 根据 WHO “HIV 耐药警戒线监测抽样与分类表”, 计算累积耐药样本数, 3 年的累积耐药样本数均小于低流行阈值, 应判为低流行, 即流行率小于 5%, 属 HIV 耐药株的低度传播水平。目前江苏省主要以性传播为主, 占总发现的 95% 以上, 同性传播与异性传播比例相近, 有报道与其他人群相比, 男男性行为人群中的原发耐药发生率更高^[15-16], 近年来, 我国艾滋病流行新动向亦显示, 部分地区的男男性行为人群急性感染者中耐药株呈增加趋势^[17], 因此该人群的原发耐药问题需引起高度重视, 同时应加强抗病毒治疗人群的规范治疗及科学管理, 加大对高危人群尤其是同性恋人群的干预及健康教育, 继续进行耐药警戒线的调查, 根据监测结果指导抗病毒治疗和综合干预政策。

[参考文献]

[1] Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection[J]. *N Engl J Med*, 1998, 338(13):853-860

[2] Sabin CA, Hill T, Lampe F, et al. Treatment exhaustion of highly active antiretroviral therapy (HAART) among individuals infected with HIV in the United Kingdom: multi-centre cohort study[J]. *BMJ*, 2005, 330(7493):695-699

[3] Bennett DE, 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):S25-36

[4] Myatt M, Bennett DE. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross sectional survey for use in low resource settings[J]. *Antivir Ther*, 2008, 13(Suppl 2):S37-48

[5] 马艳玲, 段松, 陈敏, 等. 云南省德宏州 2009 年 HIV-1 耐药株传播水平调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(4):412-413

[6] 袁源, 曹新良, 刘宏伟, 等. 河南省人类免疫缺陷病毒-1 耐药毒株的变异情况研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(11):956-959

[7] 陈曦, 邢辉, 贺健梅, 等. 湖南省 HIV-1 耐药警戒线调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(8):787-789

[8] 裘丹红, 翁坚, 沈伟伟, 等. 2011 年浙江省台州地区新发现 HIV-1 感染者分子流行病学调查[J]. *疾病监测*, 2013, 28(12):984-987

[9] 羊海涛, 徐晓琴, 邱涛, 等. 江苏省 2006 年新发现感染者的 HIV-1 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

[10] 贾成梅, 羊海涛, 徐晓琴, 等. 江苏省艾滋病病毒感染流行病学研究[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(9):1090-1091

[11] 羊海涛, 邢辉, 贾成梅, 等. 江苏省艾滋病病毒感染的分子流行病学研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2003, 24(11):976-979

[12] 于茂河, 郑敏娜, 左桐, 等. 天津市男男性行为人群中 HIV-1 阳性者的行为特征与基因亚型分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2011, 17(1):32-34

[13] 赵翠英, 李巧敏, 赵宏儒, 等. 同性和异性传播感染人群的 HIV-1 亚型分布和特征分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2011, 15(12):1035-1037

[14] 杨绍敏, 李惠琴, 陈立力, 等. 云南省 2008-2009 年 HIV-1 病毒株亚型分布[J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(8):836-840

[15] Levy I, Mor Z, Anis E, et al. Men who have sex with men, risk behavior, and HIV infection: integrative analysis of clinical, epidemiological, and laboratory databases [J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 52(1):1363-1370

[16] Pando MA, Gomez-Carrillo M, Vignoles M, et al. Incidence of HIV Type 1 infection, Antiretroviral drug resistance, and molecular characterization in newly diagnosed individuals in Argentina: A global fund project [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2011, 27(1):17-23

[17] 汪宁. 中国艾滋病流行的一些新动向[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(11):1205-1209

[收稿日期] 2015-03-09