

江苏省 HIV 耐药警戒线的调查

羊海涛^{1*}, 肖占沛², 还锡萍¹, 胡海洋¹, 徐晓琴¹, 李雷¹, 郭宏雄^{1*}

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

[摘要] 目的:了解江苏省开展艾滋病抗病毒治疗以来,耐药毒株的传播情况和亚型分布。方法:通过横断面调查,采集 17~25 岁 HIV-1 感染者的全血样品,测定 HIV-1 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:47 份样品中,没有发现 HIV-1 的耐药株。共有 CRF01_AE、B、CRF07_BC 和 CRF08_BC 4 种亚型流行,CRF01_AE 是主要流行的亚型,占 59.6%,其次为 B 亚型,占 25.5%。结论:江苏省还未发现耐药株的传播,个体治疗前尚不需要进行耐药性检测。在江苏省流行的 HIV-1 亚型与 2006 年相比,已经发生了显著变化,为掌握目前江苏省 HIV-1 的亚型分布,应对近 2 年发现的 HIV 感染者进行分子流行病学研究。

[关键词] HIV-1; 耐药警戒线; 亚型

[中图分类号] R512.91

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)01-001-04

Threshold survey of transmitted HIV-1 drug resistance in Jiangsu province

YANG Hai-tao^{1*}, XIAO Zhan-pei², HUAN Xi-ping¹, HU Hai-yang¹, XU Xiao-qin¹, LI Lei¹, GUO Hong-xiong^{1*}

(¹Institute of Venereal Disease and AIDS Control, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009; ²Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To survey the prevalence of HIV-1 drug resistance and subtype distribution among population with newly infected with HIV who were younger than 25 years of age and not received antiretroviral treatment. **Methods:** Blood specimens of HIV infected individuals were collected and HIV-1 pol gene was sequenced. The genetic mutations associated with drug resistance were identified with Stanford HIV Drug Resistance Database online. The phylogenetic tree was built with MEGA4.0 software, and subtypes were analyzed. **Results:** No mutations associated with HIV-1 drug resistance was found in the reverse transcriptase and protease region. There are 4 subtypes, CRF01_AE, B, CRF07_BC and CRF08_BC, identified among 47 isolates. CRF01_AE was predominated, which account for 59.6%, followed by B subtype which reached to 25.5%. **Conclusion:** The first line regimens of national anti-retroviral treatment is still effective. Testing drug resistance to HIV is not needed before starting anti-retroviral therapy (ART). Subtype distribution of HIV changed obviously compared with 2006. To further know dynamic HIV prevalence in Jiangsu province, the molecular epidemiology study on HIV-infected population confirmed within the past two years should be conducted.

[Key words] HIV-1; drug resistance threshold; subtype

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(1): 001-004]

艾滋病流行已经成为全球性的公共卫生问题,根据 2009 年联合国卫生署发布的报告,截至 2008 年底,全球约有 2 900 万艾滋病病毒(HIV)感染者,平均每年有 320 万人新感染 HIV^[1]。目前全球约有 520 万 HIV 感染者接受抗病毒药物治疗,艾滋病的

病死率和发病率明显降低。抗病毒治疗可致 HIV 耐药株的产生,耐药株的传播会降低目前一线治疗方案的效果^[2-5]。在北美和欧洲的一些抗病毒治疗开展较早、应用相对广泛的国家,HIV 的原发耐药率已经达到总感染率的 8%~20%^[6-8]。

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

截至 2009 年底,中国已接受抗病毒治疗的人数累积达 7 万以上。在部分省份,约 48.2% 的接受抗病毒治疗达 2 年以上的感染者对 HIV 耐药^[9]。近年

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

来,在我国部分地区已经发现 HIV 耐药株在新感染者中流行和传播^[10-11]。江苏省自 2005 年开展抗病毒治疗以来,已累积抗病毒治疗 900 多例,占累积发现感染者总数的 20%。江苏省是否已经存在耐药株的传播尚不清楚。为了解 HIV 耐药株的传播情况,对江苏省新感染人群中 HIV 耐药株的流行情况进行了研究。

1 对象和方法

1.1 对象

按照世界卫生组织(WHO)关于“HIV 耐药警戒线监测方案^[12]”,选取 2009 年 1 月 1 日~6 月 30 日新确认的江苏省籍 HIV 感染者。研究对象必须满足以下标准:①实验室确认为 HIV 抗体阳性的感染者;②年龄< 25 岁;③如果是女性,没有怀孕史。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

全血样品 5 ml 采集于含有 EDTA-K3 抗凝剂的真空管内,于 6 h 内在 1 500 r/min,离心 15 min。分别将血浆和外周淋巴血细胞保存于-80℃备用。

1.2.2 HIV-1 RNA 的提取

采用德国 QIAGEN 公司 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒,参照试剂盒说明书提取 HIV-1 RNA。

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 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 MAW26:5'-TGGAAATGTG-GAAAGGA AGGAC-3', 外侧下游引物为 RT21:5'-CTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG-3'; 内侧上游引物为 Pro-1:5'-CAGAGCCAACAGCCCCAC-CA-3', 内侧下游引物为 RT20:5'-CTGCCAGTTC-TAGCTCTGCTTC-3',总扩增长度为 1 300 bp。

1.2.4 产物纯化及序列测定

以 Pro-1;RTA (5'-GTTGACTCAGATTGGTTGC-AC-3', 正向);RTB (5'-CCTAGTATAAACAATGAG-ACAC-3' 正向);RT-20;ProCl-down (5'-CCCTGCTG-GGTGTGGTATTCC-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 ABI 3730 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)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件进行 χ^2 检验和描述性统计分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 研究对象的基本流行病学特征

如表 1 所示,研究对象主要集中在 21~24 岁,该年龄段的感染者达到 72.3%(34/47);男性感染者占 85.1%(40/47);传播途径主要以男男同性传播为主,达到 63.8%(30/47);38.3%感染者受过大专及以上教育,34.0%的感染者受过高中或中专教育。

表 1 研究对象的基本流行病学特征

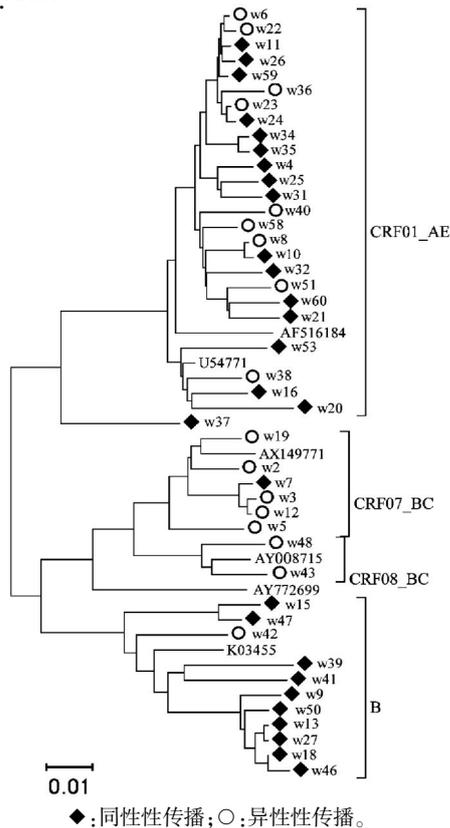
Table 1 Demographic characteristic of patients in research

| 变量 | 病例数(n) | 构成比(%) |
|-------|--------|--------|
| 年龄(岁) | | |
| 17 | 1 | 2.1 |
| 18 | 1 | 2.1 |
| 19 | 2 | 4.3 |
| 20 | 4 | 8.5 |
| 21 | 9 | 19.2 |
| 22 | 11 | 23.4 |
| 23 | 6 | 12.8 |
| 24 | 8 | 17.0 |
| 25 | 5 | 10.6 |
| 性别 | | |
| 男 | 40 | 85.1 |
| 女 | 7 | 14.9 |
| 传播途径 | | |
| 异性性传播 | 17 | 36.2 |
| 同性性传播 | 30 | 63.8 |
| 文化程度 | | |
| 初中 | 13 | 27.7 |
| 高中或中专 | 16 | 34.0 |
| 大专及以上 | 18 | 38.3 |
| 婚姻状况 | | |
| 未婚 | 42 | 89.4 |
| 已婚 | 5 | 10.6 |

2.2 进化树的构建和亚型分析

以 HIV 病毒的 pol 区构建进化树,进化分析表明这 47 条序列分为 3 个子树。在这些感染者中共有 CRF01_AE、B、CRF07_BC 和 CRF08_BC 4 种亚型流行(图 1)。其中 CRF01_AE 是主要流行的亚型,占 59.6%(28/47);其次为 B 亚型,占 25.5%(12/

47)。在男男同性性传播途径的感染者,主要流行的亚型为 CRF01_AE, 占传播途径感染者的 63.3% (19/30), 其次为 B 亚型, 占 33.3% (10/30)。在异性性传播途径的感染者中, CRF01_AE 仍然是该人群中主要流行的亚型, 占 52.9% (9/17); 其次为 CRF-BC 亚型, 占 35.3% (6/17) (表 2)。两种传播途径的感染者中, HIV 在亚型分布方面差异有统计学意义 ($P = 0.0005$)



◆:同性性传播;○:异性性传播。

图 1 基于 pol 区的进化分析

Figure 1 The phylogenetic tree analysis of HIV-1 pol gene

表 2 两种传播途径中 HIV-1 亚型的分布

| 传播途径 | CRF01_AE | B | CRFBC | χ^2 | P |
|---------|----------|----|-------|----------|-------|
| 男男同性性传播 | 19 | 10 | 1 | 8.855 | 0.010 |
| 异性性传播 | 9 | 2 | 6 | | |
| 合计 | 28 | 12 | 7 | | |

CRFBC 包括 CRF07_BC 和 CRF08_BC。

2.3 耐药位点分析

在 47 份样本中, 没有发现耐药突变位点。但是存在一些可能影响药物敏感性的突变位点, 这些位点包括 A71T, T69N, V181I, V106I, V179D (表 3)。V106I 突变并不降低病毒对依曲伟林的敏感性, 但该突变与依曲伟林治疗效果的降低有关。7 个

V106I 突变, 均出现在同性性传播途径的 B 亚型中。存在 V179D 突变的 HIV 对奈韦拉平 (NVP)、艾非那韦 (EFV) 和地拉夫定 (DLV) 敏感性降低 2 倍, 该突变常在 1% 的未治疗感染者中出现。T69N 是核苷类逆转录酶抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI) 选择性突变, 其对 NRTI 类药物的影响还不清楚。V181I 通常在 2% 的未治疗感染者中发生, 在接受 NRTI 治疗后, 该突变出现频率增加, 能导致对拉米夫定出低水平的耐药。A71T 在 2%~3% 未治疗的感染者中出现, 当用蛋白酶抑制剂治疗后该突变的频率增加, 但其作用还不清楚。

表 3 耐药突变位点和亚型的关系

Table 3 The correlation between drug resistance mutation site and HIV-1 subtypes (n)

| 突变位点 | PI | NRTI | NNRTI | 亚型 |
|------------|----|------|-------|----------|
| 主要耐药位点 | 0 | 0 | 0 | - |
| 次要耐药位点 | 0 | 0 | 0 | - |
| 与耐药可能相关的突变 | 0 | 8 | 8 | - |
| A71T | 0 | 1 | 0 | CRF07_BC |
| T69N | 0 | 1 | 0 | CRF01_AE |
| V181I | 0 | 1 | 0 | CRF01_AE |
| V106I | 0 | 0 | 7 | B |
| V179D | 0 | 0 | 1 | B |

PI: 蛋白酶抑制剂; NRTI: 核苷类逆转录酶抑制剂; NNRTI: 非核苷类逆转录酶抑制剂。

3 讨论

HIV-1 病毒具有很高的复制能力, 且 HIV-1 编码的逆转录酶缺乏校正功能, 在复制的过程中产生高度的突变。这使 HIV 病毒在药物压力不足的情况下很容易产生耐药株, 如果治疗不当, 耐药株往往在开始治疗后数周内产生^[13]。这样, 在抗病毒治疗有限的国家和地区, 经过多年的抗病毒治疗后, 耐药株的传播和流行不可避免。

我国从 2000 年启动大规模的抗病毒治疗, 已达 11 年之久。截至目前, 我国一线抗病毒治疗药物仅有 6 种, 二线抗病毒治疗药物仅仅增加了 1 种蛋白酶抑制剂茚地那伟^[14]。由于二线抗病毒治疗药物来源有限, 在一线抗病毒治疗失败后并不能及时地采取二线抗病毒药物治疗是我国抗 HIV 治疗面临的主要挑战。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耐药^[9, 15-16]。不仅如此, 具有耐药性的病毒株已在这些地区传播^[10-11]。虽然耐药株的流行率还不高, 但具有耐药性 HIV 病毒株传播的危害已经存在。在江苏省小于 25 岁未接受治疗的 HIV

感染者中还没有发现耐药株,表明一线抗病毒治疗方案在江苏省仍然有效,江苏省籍的感染者在开始抗病毒治疗之前,暂不需要进行耐药性检测。

曾对 2006 年江苏省新发现的感染者中流行的 HIV 进行了亚型分析,结果表明 CRF01_AE 是主要流行的亚型,其次为 CRFBC^[16]。本研究 HIV-1 亚型分析显示,在小于 25 岁的感染者中,CRF01_AE 是流行的主要亚型,其次为 B 亚型。提示江苏省 HIV 的亚型分布可能已经发生了变化。在本次研究中,同性性传播人群流行的亚型主要为 CRF01_AE,其次为 B 亚型。在 2006 年,该人群中流行的主要亚型为 CRF01_AE,其次为 CRFBC。说明该人群中流行的 HIV 亚型也发生了改变^[17]。HIV-1 亚型的变化同样出现在经异性性传播途径感染 HIV 的人群中。为了及时掌握江苏省 HIV 的流行动态,必须及时进行分子流行病学研究。

在本次调查中,47 份样品中有 12 份为 B 亚型,其中 11 份样品是经男男同性性传播途径感染者的样品。这 11 份样品中,共分为 2 个支。其中 w15 与 w47 聚体在一起,可能具有相同的来源。w39、w41、w9、w50、w13、w27、w18、w46 聚体在一起,在耐药分析时发现,这 8 份样品中有 7 份存在 V106I 突变。这从另一个角度验证了这些感染者中流行的 HIV 可能具有相同的来源,在这类人群中 HIV 正处于快速传播阶段。以南京市为例,HIV 在男男性行为人群中的流行率达到了 5.55%^[17]。由此可见,在同性性传播人群中,HIV 的流行趋势不容乐观。因此在加大对男男同性性传播人群中 HIV 流行状况进行大规模调查的同时,必须采取干预措施,以降低 HIV 在该类人群中的传播率。

[参考文献]

[1] UNAIDS and WHO. 2009 AIDS epidemic update[R/OL]. [2010-11-29]. http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf

[2] Linda H, Hannah C, Patricia C, et al. The effect of transmitted HIV-1 drug resistance on pre-therapy viral load[J]. AIDS, 2010, 24(12): 1917-1922

[3] Mark M, Brendoan AL, Charies AB, et al. Broad advances in understanding HIV resistance to antiretrovirals: report on the XVII international HIV drug resistance workshop [J]. Antivir Ther, 2008, 13(8): 1097-1113

[4] Cozzi-Lepria A, Phillipa AN, Ruiz L, et al. Evolution of drug resistance in HIV-infected patients remaining on a virologically failing combination antiretroviral therapy

regimen[J]. AIDS, 2007, 21(6): 721-732

[5] Alethea WM, Walensky RP, Lipsitch M, et al. The effect of antiretroviral therapy on secondary transmission of HIV among men who have sex with men [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(9): 1115-1122

[6] Hillard SW, Irum Z, Walid H, et al. The Epidemiology of antiretroviral drug resistance among drug-naive HIV-1 - infected persons in 10 US Cities [J]. J Infect Dis, 2004, 189(6): 2174-2180

[7] Hanna GJ, Balaguera HU, Freedberg KA, et al. Drug-selected resistance mutations and non-B subtypes in antiretroviral-naive adults with established human immunodeficiency virus infection [J]. J Infect Dis, 2003, 188(6): 986-991

[8] Toni TD, Recordon-Pinson P, Minga A, et al. Presence of key drug resistance mutations in isolates from untreated patients of Abidjan, Cote d'Ivoire: ANRS 1257 study [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003, 19(8): 713-717

[9] 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

[10] 袁源, 曹新良, 刘宏伟, 等. 河南省人类免疫缺陷病毒-1 型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

[11] 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

[12] Mark Myatt, 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 (Suppl2): 37-48

[13] Jackson JB, Becker-Pergola G, Guay 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

[14] 国家免费抗病毒药物治疗手册编写组. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册 [M]. 人民卫生出版社: 北京, 2005: 94-98

[15] 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

[16] 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

[17] 胡海洋, 郭宏雄, 傅更锋, 等. 集合 HIV-1 RNA RT-PCR 方法在男男性行为人群艾滋病窗口期检测中的应用 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(10): 1395-1398

[收稿日期] 2011-05-10