

2015 年江苏省 HIV 耐药警戒线调查

周莹¹,徐晓琴¹,卢静¹,张之¹,王金格²,傅更锋¹,还锡萍^{1*}

(¹江苏省疾病预防控制中心性病艾滋病防制所,江苏 南京 210009;²南京农业大学农学院,江苏 南京 210095)

[摘要] 目的:了解 2015 年江苏省的免疫缺陷病毒(HIV)耐药株传播水平和亚型分布。方法:采用 WHO 的截断序贯抽样法,在江苏省获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)疫情主要发生地南京采集 47 例当年新报告 25 岁以下 HIV 感染者血样,提取病毒 RNA,采用 RT-PCR 和巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 区片段,并进行传播型耐药基因型分析。结果:2015 年调查对象的序列成功获得率为 100%(47/47),亚型以 CRF01_AE 亚型为主(59.6%),其次依次为 CRF07_BC(25.5%)、C 亚型(6.4%例)和 B 亚型(2.1%),并在亚型分析中发现 3 例 URFs。江苏省 HIV 耐药传播水平为低流行,47 份样本中发现 1 份样本存在传播型耐药位点突变,为蛋白酶区耐药位点突变(M46I)。该例耐药个体感染途径为同性传播,亚型为 CRF01_AE。此次抽样调查发现学生所占比例最大,为 46.8%(22/47),已超过商业服务人员 29.8%(14/47)的比例。传播途径除 1 例异性传播外,其余均为同性传播。结论:江苏省首次发现传播型耐药 1 例,说明耐药株已开始传播。虽仍为低流行,但应密切关注耐药株传播水平的趋势变化。学生逐渐成为 25 岁以下感染者的主要群体,扩大对该人群的检测咨询干预工作应成为艾滋病防控工作的重点。对男男性行为做好预防措施,是控制耐药株传播的关键。

[关键词] HIV-1;HIV 亚型;耐药警戒线调查

[中图分类号] R512.92

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-256-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170228

A survey of HIV drug resistance threshold in Jiangsu Province in 2015

Zhou Ying¹, Xu Xiaoqin¹, Lu Jing¹, Zhang Zhi¹, Wang Jinge², Fu Gengfeng¹, Huan Xiping^{1*}

(¹Department of STD & HIV Control and Prevention, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009; ²College of Agriculture, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

[Abstract] **Objective:** To survey the prevalence of drug resistant and subtypes HIV in Jiangsu province in 2015. **Methods:** WHO truncated sequential sampling technique was adopted by using 47 samples of newly diagnosed as HIV positive and aged <25 years in Nanjing. RNA was extracted and HIV pol region was amplified by RT-PCR and nested PCR. Pol genetic mutation associated with transmitted drug resistance (TDR) was analyzed. **Results:** The success rate for sequence acquisition in the survey was 100%(47/47). The main subtype was CRF01_AE (59.6%), the rest subtypes in the sequence were CRF07_BC (25.5%), C (6.4%), B (2.1%), additional with 3 URFs. The prevalence of TDR in Jiangsu was low, and only 1 surveillance drug-resistance mutation (SDRMs) in protease inhibitor (PI) (M46I) was found by analyzing the 47 sequences. The individual with drug resistant HIV stain found in this study was infected by homosexual transmission and the subtype was CRF01_AE. The point finding in this study is that the percentage of HIV students was 46.8%(22/47), exceeding the percentage of HIV business servicers of 29.8%(14/47). A total of individuals with HIV were infected by homosexual transmission, except one by heterosexual. **Conclusion:** TDR has arisen in Jiangsu. Though the prevalence was low, we should still pay a closed attention on the tendency of TDR change. Students under age 25 are becoming the main constitution in newly diagnose HIV infections. Scanning up on consulting, testing and behavioral intervention are beneficial to HIV prevention and control. The key point on prevalence of TDR is to take preventive measures between men who have sex with men (MSMs).

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

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02):256-260]

[基金项目] 国家自然科学基金(81373125)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: huanxp@vip.sina.com

获得性免疫缺陷综合征(艾滋病,AIDS)的抗病毒治疗因其能有效抑制病毒复制,提高患者生存质量和寿命,在中国快速推广并开展起来。纳入抗病毒治疗的患者 CD4⁺T 细胞数由 200 个/ μ L 逐渐提高到了 500 个/ μ L,因此,接受抗病毒治疗的人数急剧增加^[1]。江苏省于 2004 年开展抗病毒治疗,治疗人数不断增加,而南京市于 2012 年在男同人群中推行“发现即治疗”这一新的防控措施,又进一步扩大了治疗范围。截至 2015 年底,江苏省艾滋病在治人数已超万人。广泛治疗后带来的负面问题就是耐药株的产生和传播,虽然目前中国整体的原发耐药率为 4.7%,未超过 WHO 设置的 5% 的警戒线,但在中国南部和西南部部分省份,HIV-1 耐药株已出现中度流行^[2-3]。另有文献报道,在发展中国家,2009—2013 年的传播型耐药流行率比 2004—2008 年翻了一番^[4]。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%,因此,密切监测 HIV 耐药株的传播,对 HIV 的抗病毒治疗至关重要^[5-6]。

为了及时有效地掌握江苏地区 HIV 耐药株的传播情况及亚型分布,本研究采用了世界卫生组织(WHO)推荐的资源最小化 HIV 警戒线调查方法(HIV drug resistance threshold survey,HIVDR-TS)^[7],在江苏主要疫情发生地,且 HIV-1 治疗人数最多的城市——南京开展耐药警戒线的调查。

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,选取江苏省南京市为研究现场,当年新报告年龄为 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(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⁺T 计数小于 200 个/ μ L。

1.2 方法

1.2.1 CD4⁺T 淋巴细胞计数

采集 5 mL EDTA 抗凝全血标本,立即混匀,颠倒 8~10 次。24 h 内取 50 μ L 全血标本进行 CD4⁺T 淋巴细胞计数,其余全血标本 3 000 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存管中,置 -70℃ 冰箱保存备用。CD4⁺T 淋巴细胞计

数采用美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪进行。

1.2.2 核酸的提取和目的片段扩增

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。以提取的 RNA 为模板,采用 RT-PCR 和巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 编码区,包括蛋白酶全长和逆转录酶前 300 个氨基酸位点。引物包括外侧上游引物 MAW26:5'-TGGAAATGTG-GAAAGGAAGGAC-3',外侧下游引物 RT21:5'-CTG-TATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGGG-3';内侧上游引物 Pro-1:5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3',内侧下游引物 RT20:5'-CTGCCAGTTCTAGCTCT-GCTTC-3'^[8]。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,与 DNA Marker 对照确认目的条带存在与否,目标产物直接送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行纯化和测序。

1.2.3 序列分析及耐药分析

测序后反馈的序列先用 ChromasPro 16.0 软件进行编辑、拼接和校正。用 MEGA4.0 软件将样本序列和参考株序列进行比对,并用邻位对接程序构建进化树和分析亚型。采用美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库中的 Calibrated Population Resistance(CPR)工具(6.0 版本)分析基因型耐药情况(<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>),其中,1 为敏感,2 为潜在耐药,3 为低度耐药,4 为中度耐药,5 为高度耐药,根据 WHO 2009 版监测性耐药突变(surveillance drug-resistance mutation,SDRM)位点确定是否存在 SDRM 突变。国际参考株序列 01_AE.TH.90.CM240、08_BC.CN.97.GX-6F、C.IN.95.95IN21068、B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU、07_BC.CN.97.CN54 来自 Pub-Med 数据库。

1.2.4 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^[9],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%)。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。

2 结果

2.1 基本情况

2015 年共调查满足要求人数为 47 例, 获得序列成功率为 100%。调查对象平均年龄为 22(16~25) 岁。47 例均为男性, 以汉族为主, 文化程度以大专及以上为主, 感染途径除 1 例异性性传播外, 其余均为同性性传播。职业分布, 学生感染者占了 46.8%(22/47), 已超过商业服务人员所占比例(29.8%)。2015 年 47 例调查血样的 CD4⁺T 淋巴细胞中位数为 435 个/ μ L(表 1)。

表 1 不同特征调查对象的分布情况

Table 1 The distribution of different demographic characteristics' patients

特征	例数	构成比(%)
性别		
男	47	100.0
女	0	0.0
民族		
汉族	45	95.7
少数民族	2	4.3
文化程度		
初中	3	6.4
高中及中专	7	14.9
大专及以上	37	78.7
传播途径		
同性性传播	46	97.9
异性性传播	1	2.1
职业		
学生	22	46.8
商业服务	14	29.8
家政及待业	5	10.6
工人及职员干部	4	8.5
其他	2	4.3
合计	47	100.0

2.2 HIV 亚型分布

以 HIV 病毒的 pol 区构建进化树, 进化分析表明 47 条序列分为 5 个子树。在这些感染者中共有 CRF01_AE、CRF07_BC、C、B、4 种亚型流行, 另发现 3 例 URFs(图 1)。亚型以 CRF01_AE 为主, 占 59.6%(28/47), 其次是 CRF07_BC, 占 25.5%(12/47)(表 2)。

2.3 耐药流行水平

2015 年, 第 36 份样本检出 SDRM 耐药突变, 但抽样排序中, 在第 34 份样本出现时, 检出的累计耐药样本数为 0, 低于检测下限, 已可做出低流行水平

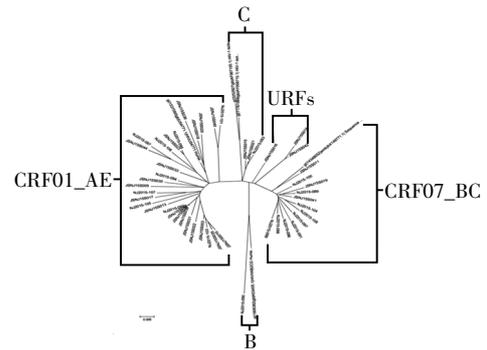


图 1 基于 HIV-1 pol 区的进化树分型

Figure 1 The phylogenetic tree based on partial pol gene fragment of HIV-1 in research

表 2 不同特征人群的亚型分布情况

Table 2 The subtype distribution of different transmission (n)

传播途径	CRF01_AE	CRF07_BC	C	B	URFs
男男性传播	27	12	3	1	3
异性性传播	1	0	0	0	0
合计	28	12	3	1	3

的判断(表 3)。

2.4 SDRM 突变及耐药情况

47 份样本中, 首次发现 1 例样本存在 SDRM 突变, 突变位点为 M46I/L, 位于蛋白酶抑制剂(PI)区, 表现为对阿扎那韦合剂(ATV/r)、福沙那韦合剂(FPV/r)、茚地那韦合剂(IDV/r)、洛匹那韦合剂(LPV/r)的潜在耐药, 对奈非那韦(NFV)的低度耐药。该例样本为男男同性性行为传播, 亚型为 CRF01_AE。M46I 是基于药物选择的 PI 耐药突变位点, 与其他 PI 耐药突变位点同时存在可降低个体对 IDV/r、NFV、FPV/r、LPV/r 和 ATV/r 的敏感性。

3 讨论

HIV 具有很高的复制能力, 并容易产生突变, 这使 HIV 在药物压力下很容易产生药物选择性突变。随着 AIDS 抗病毒治疗人数的不断增加, HIV 耐药株的产生及其在人群中的逐步传播流行, 给后续治疗带来严峻挑战, 因此对 HIV 传播型耐药开展早期预警监测显得尤为重要。对于发展中国家, 在未治疗的 HIV 感染者中对传播型耐药采用普遍监测需要大量的人力财力, 而本研究采用 WHO 的截断序贯抽样法, 经济高效, 十分适合我国现有的资源情况^[8]。

本研究发现, 江苏省传播型耐药依然处于低流行状态, 与之前本省报道的传播型耐药的流行率相同^[8,10], 说明 HIV-1 耐药株的传播在本省并未流行, 现有的抗病毒治疗措施有效, 暂不需要进行重大调

表 3 HIV 耐药警戒线监测抽样
Table 3 HIV drug resistance threshold survey

检测样本份数	下限(LL)	检出的累积 耐药样本数(份)	上限(UL)
1	ND	0	ND
2	ND	0	ND
3	ND	0	ND
4	ND	0	ND
5	ND	0	ND
6	ND	0	ND
7	ND	0	ND
8	ND	0	ND
9	ND	0	ND
10	ND	0	ND
11	ND	0	ND
12	ND	0	ND
13	ND	0	ND
14	ND	0	5
15	ND	0	5
16	ND	0	5
17	ND	0	5
18	ND	0	5
19	ND	0	5
20	ND	0	5
21	ND	0	5
22	ND	0	5
23	ND	0	5
24	ND	0	5
25	ND	0	6
26	ND	0	6
27	ND	0	6
28	ND	0	6
29	ND	0	6
30	ND	0	6
31	ND	0	6
32	ND	0	6
33	ND	0	6
34	1	0	6
停止	停止	停止	停止

整。但是,随着扩大检测和扩大治疗的推行,发现随着治疗的人数会越来越多,必会导致耐药株也越来越多,因此,对传播性耐药的长期不间断的实时监测显得尤为重要。据报道,我国其他省份已出现耐药株的传播^[11],而本省自 2011 年以来,只在 2015 年进行了传播型耐药监测调查,监测力度与近年来抗病毒治疗的扩大幅度以及耐药人数的增加并不相符,应加大耐药株传播的监测力度。

本研究中检出的重要耐药突变为 M46I/L,为 PI 突变,并且其单独存在可表现出对药物的潜在或低度耐药,这在本省之前的耐药传播调查中从未发

现^[12]。该例突变通过男性性行为传播,而其他省份发现的传播性耐药也以男性同性性传播为主。有文献报道,男男同性性行为(MSM)人群耐药突变中,针对我国并未普及使用的蛋白酶药物的突变逐渐增加^[13]。而在我国,非核苷类反转录酶抑制剂(NNRTI)和核苷类反转录酶抑制剂(NRTI)作为一线药物,是 HIV-1 抗病毒治疗的主要用药。PI 作为二线药,在我国只有一种药物可选,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。一旦二线药物出现耐药,将面临抗病毒治疗无效而又无药可用的状态。

此次调查发现 25 岁以下人群中,学生群体成为调查对象的主要构成,且均为同性性传播。江苏省为教育大省,而南京高校最多,因此纳入该研究中的学生较多。但是新发现感染者中学生群体的高比例构成,仍应引起广泛重视。近几年,HIV 新发感染者,学生群体的逐年增多说明 HIV-1 的传播已从社会向校园侵入,校园已不再是净土,对学生的宣传教育已成为了 HIV 防治工作的新重点。幸而,在本研究中并未发现在学生群体中有 HIV 耐药株的流行。

另外,此次调查人群中,性传播已成为唯一一种传播方式,除 1 例异性传播外,其余均为男性同性性传播,说明男性同性性传播已成为本省 HIV 的主要传播方式。该人群性行为的多样性导致一旦耐药株出现,就可能致其快速传播,因此对该人群的 HIV 防治工作是否有效是控制 HIV 耐药株传播的关键因素。而 HIV 亚型分布,与本省之前的报道并无明显差异,说明亚型的分布已趋于固定,但是与部分省份以 B 亚型为主要流行亚型仍有所不同^[14],说明江苏的亚型分布有其自身特点。该研究发现 3 例 URFs,且样本均来源于 MSM 人群,从分子学角度印证了该人群性行为的多样性。目前虽无明确报道 HIV 重组体对抗病毒治疗的影响,但其与病程进展有一定相关性,同时重组突变也是 HIV 分子流行病学重点研究的对象。

2015 年江苏省耐药警戒线调查发现,江苏省仍处于低流行状态。加大对同性性行为人群的耐药监测,同时加大对该人群的干预及健康教育,防止耐药株在该人群的传播。针对学生群体扩大干预广度和深度,降低该人群新发感染成为 HIV 防治的新重点。单次调查结果可能存在偏倚,多年连续监测更有利于准确判断流行水平及趋势,全面掌握耐药传

播情况,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] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M].3 版. 北京:人民卫生出版社,2012

[2] 刘大锦,冯孟贤,刘 民. 中国未接受抗病毒治疗的人类免疫缺陷病毒/获得性免疫缺陷综合征(HIV/AIDS)人群 HIV 原发耐药的 Meta 分析[J]. 北京大学学报(医学版),2015,47(3):474-482

[3] 陈 敏,王继宝,邢 辉. 云南省德宏州 2012 年 HIV-1 耐药传播警戒线调查[J]. 中华流行病学杂志, 2014,35(8):909-912

[4] Pham QD,Wilsona DP,Matthew G. et al. Global burden of transmitted HIV drug resistance and HIV-exposure categories;a systematic review and meta-analysis [J]. AIDS,2014,28:2751-2762

[5] Descamps D,Chaix ML,Montes B,et al. Increasing prevalence of transmitted drug resistance mutations and non-B subtype circulation in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients from 2001 to 2006 /2007 in France [J]. J Antimicrob Chemother,2010,65(12):2620-2627

[6] Kleyn TJ,Liedtke MD,Harrison DL,et al. Incidence of transmitted antiretroviral drug resistance in treatment-naive HIV-1-infected persons in a large South Central United States clinic [J]. Ann Pharmacother,2014,48(4):

470-475

[7] 张佳峰,潘晓红,郭志宏,等. 2009-2011 年浙江省 HIV 耐药警戒线调查[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(6): 519-523

[8] 徐晓琴,郭宏雄,胡海洋,等. 江苏省连续 3 年 HIV-1 耐药警戒线及流行亚型的调查研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(9):1329-1332

[9] Myatt M,Bennett DE. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by crosssectional survey for use in low resource settings[J]. Antivir Ther,2008,13(Suppl 2):S37-548

[10] 羊海涛,肖占沛,还锡萍,等. 江苏省 HIV 耐药警戒线调查[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2006,32(1): 1-4

[11] 周全花,凌 华,邢 辉,等. 重庆市 HIV-1 耐药警戒线调查[J]. 现代预防医学,2013,40(20):3860-3862

[12] Guo H,Xu XQ,Hu HY,et al. Low prevalence of the transmitted HIV-1 drug resistance among newly diagnosed HIV-1 individuals in Jiangsu Province,China during 2009-2011[J]. BMC Public Health,2015,15:12-124

[13] 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

[14] 尹春煜,卢洪洲,黄潇潇,等. 中国部分地区未经抗病毒治疗的 HIV-1 感染者耐药性突变分析[J]. 中华临床感染病杂志,2011,4(4):201-204

[收稿日期] 2016-03-23

(上接第 255 页)

tics,2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108

[2] Jin GF,Ma HX,Wu C,et al. Genetic variants at 6p21.1 and 7p15.3 are associated with risk of multiple cancers in Han Chinese [J]. Am J Hum Genet,2012,91(5): 928-934

[3] 李 霓,郑荣寿,张思维,等. 2003~2007 年中国宫颈癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2012,21(11):801-804

[4] 周 权,黄民主,黄 霜,等. 中国已婚妇女宫颈癌发病影响因素 meta 分析[J]. 中国癌症杂志,2011,21(2): 125-129

[5] 赵旭晔,崔 勇,姜淑芳,等. 高危型人乳头瘤病毒 E6/E7 mRNA 检测在宫颈癌筛查中的意义 [J]. 中华医学

杂志,2014,94(43):3432-3435

[6] Freitas AC,Gurgel AP,Chagas BS,et al. Susceptibility to cervical cancer:An overview[J]. Gynecol Oncol,2012,126 (2):304-311

[7] Wang R,Zhu L,Zhang Y,et al. Genetic variants at 6p21.1 are associated with head and neck cancer in Chinese Han population[J]. Cancer Biomarkers markers,2015,15(1): 27-32

[8] Li Dk,Han J,Liu J B,et al. Genetic variants at 6p21.1 and 7p15.3 Identified by GWASs of multiple cancers and ovarian cancer risk;a case-control study in Han Chinese women[J]. APJCP,2014,15(1):123-127

[收稿日期] 2016-01-13