

重庆市男男性接触人群中 HIV-1 新近感染者耐药监测

冯连贵 王懋杰 韩梅 丁贤彬 蒋岩

【摘要】 目的 调查 2006 年重庆市男男性接触(MSM)人群的 HIV 感染率、估计该人群的发病率,并对新近感染的样本进行耐药检测。方法 通过同性爱者场所的业主、志愿者组织以“滚雪球”的方式招募未接受过抗病毒治疗的 MSM 进行横断面调查。用酶联免疫和蛋白印迹法进行 HIV 抗体检测, BED-酶联捕获试验(BED-CEIA)进行新近感染检测,并通过间接检测血清阳转后 HIV-IgG 抗体占总 IgG 的比例来检测 HIV 新近感染、估算 HIV 发病率。耐药检测采用 Trugene HIV-1 试剂盒扩增出靶 HIV-1 pol 区基因中 288 bp 的蛋白酶基因(PR)和 630 bp 的逆转录酶基因(RT)片段,所得片段进行序列分析,结果由 Bayer 公司基因型耐药突变解释规则[DR 3.7 IVD (2006/07/27) Guidelines 11.0 (2005/12/15)]生成临床耐药报告和突变位点报告,同时序列提交 Stanford HIVdb 数据库进行判断,得到耐药评分结果。上述两种结果再与用 Geno2pheno 方法进行耐药性判定的结果比对。结果 重庆市 MSM 人群 2006 年 HIV 感染率为 10.4%, 估算发病率为 7.98%。使用三种方法分析耐药情况, 分别有 1 例、2 例、1 例出现逆转录酶区(PR)突变, 导致其对蛋白酶类抑制剂(PI)产生耐药, 得到的该人群流行毒株耐药率分别为 4.55%、9.09% 和 4.55%。结论 重庆市 MSM 人群的发病率及感染率已处于较高水平, 应予以密切关注, 原发耐药水平目前尚处于较低水平。

【关键词】 艾滋病病毒; 男男性接触者; 发病率; 耐药突变

Drug resistance among recent HIV-1 infected men who have sex with men in Chongqing municipality of China FENG Lian-gui*, WANG Min-jie, HAN Mei, DING Xian-bin, JIANG Yan. *Congqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To evaluate the situation of HIV prevalence, incidence and drug resistance (DR) among recent HIV infected men who have sex with men (MSM) during the year of 2006. **Methods** A transect investigation was conducted through snowballing to recruit volunteers. HIV infected status was confirmed by ELISA and Western Blot (WB), the recent infected within 155 days were confirmed by BED-Capture ELISA Assay (BED-CEIA), which based on the principle that characteristics of the initial HIV antibody response in recent infections differs from those of established or long-term infections either by antibody titer, proportion, specificity, isotype or avidity. Bayer Trugene was applied to PCR the target sequence of HIV pol gene, and the sequences were analyzed to detect the prevalence of HIV gene mutation. Furthermore, HIV antiretroviral drug resistance among MSM was evaluated. The results were analyzed through three methods: Trugene DR 3.7 IVD (2006/07/27) Guidelines 11.0 (2005/12/15) provided by Bayer company, Stanford HIVdb and Geno2pheno. **Results** The prevalence and incidence of HIV among MSM were 10.4% and 7.98% PY, by three methods. There was only 1 sample found to have occurred resistant primary mutation which could be inferred that the average DR ratio was 4.55% (1/22). **Conclusion** The incidence and prevalence of MSM in Chongqing were notable, and the mutation rate stands at a low level when comparing to researches conducted in developed countries. Secondary mutations appeared frequently, suggesting that more research need to be conducted to understand how HIV was transmitting among the carriers.

【Key words】 HIV; Men who have sex with men; Incidence; Drug resistance

高效抗逆转录病毒治疗(HAART)显著降低了

基金项目:卫生部 2007 年艾滋病防治应用性研究项目(WA-2007-03);中美艾滋病防治合作项目(GAP 5U62PS022883-5)

作者单位:400042 重庆市疾病预防控制中心(冯连贵、韩梅、丁贤彬);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(王懋杰、蒋岩)

艾滋病发病率和死亡率,延长了 HIV 感染者的生命^[1]。截止 2007 年底,全国共有 39 298 名 HIV 感染者接受了抗病毒治疗^[2],其中重庆市累计有 134 名感染者接受了免费抗病毒治疗。由于病毒基因多样性与抗病毒药物广泛应用所产生的选择性压力,

HIV 会迅速产生耐药^[3]。目前,广泛应用于临床的几类抗病毒药物均有耐药株产生^[4,6], HIV-1 耐药株的传播已呈现上升趋势^[7], 成为更加严峻的公共卫生问题。HIV 耐药株在新近感染者中的传播, 以及 HIV 新感染者中频繁出现的原发性耐药正引起越来越多的关注。因此开展 HIV 新近感染人群耐药研究能够及早掌握 HIV-1 耐药性突变的发生和流行情况, 并对治疗方案的病毒学应答做出合理的预测, 对国家抗病毒治疗方案的修正, 提高疗效具有重要意义。

资料与方法

1. 样本收集: 2006 年 6-10 月重庆市疾病预防控制中心采取“滚雪球”的方式共采集男男性接触人群(MSM)样本 1000 份, 样本相关信息见表 1。

表 1 2006 年重庆市 MSM 人群调查样本来源及感染率(%)

采集地点(方式)	样本数(%)	HIV 感染率
酒吧	733(73.3)	9.4
浴室及桑拿、按摩室	127(12.7)	19.7
“滚雪球”	126(12.6)	7.1
公园、公厕	9(0.9)	
网络招募	5(0.5)	
合计	1000(100.0)	10.4

2. 检测方法: HIV 抗体初筛检测采用酶联免疫吸附实验(ELISA)(荷兰生物梅里埃, 批号: A47BD); 确认采用免疫蛋白印迹实验(WB)(新加坡健利检验诊断私人有限公司 Genelab Diagnostics, 批号: AE6022)。HIV 新近感染检测采用目前发病率估算应用较为公认的 BED-酶联捕获试验(capture enzyme immunoassay, BED-CEIA)^[8]。该方法通过间接检测血清阳转后 HIV-IgG 抗体占总 IgG 的比例来检测 HIV 新近感染、估算 HIV 发病率, 操作简便, 具有良好的稳定性, 对 HIV-1 型的 A、B、C、D 和 E 亚型均适用, 已经在美国、泰国、荷兰、柬埔寨以及非洲的多个国家进行试验和观察, 在我国 HIV 感染以吸毒为主的几个城市已有初步的应用, 其稳定性和可重复性均较好^[9,10]。美国自 2005 年开始已经将该方法作为新近感染监测的国家方案^[11]。本研究采用美国 Calypte 公司 HIV-1 BED 发病率检测 EIA 试剂盒, 使用试剂批号为 I1105A。

采用 BED 方法计算发病率的公式^[12,13]:

$$\text{HIV 年发病率}(\%) = \frac{(365/w)N \times 100}{n + (365/w)N/2}$$

式中, N 表示 BED 方法确定的新近感染数, n 表示

该样本中 HIV-1 抗体阴性数, w 为 BED 方法定义的窗口期, 在计算人群发病率时采用 155 d。

耐药突变检测采用 Bayer TruGene HIV-1 DNA Genotyping kit (Bayer Healthcare LLC, Tarrytown, USA, U028A1) 对新近感染样本进行基因型耐药检测, 并根据 Bayer 公司专门提供的基因型耐药突变解释规则 [DR 3.7 IVD (2006/07/27) Guidelines 11.0 (2005/12/15)] 生成临床耐药报告和突变位点报告, 同时序列提交 Stanford HIVdb 数据库进行判断, 得到耐药评分结果, 上述两种结果再与用 Geno2pheno 方法进行耐药性判定的结果进行比对。

本研究使用 Bayer TruGene HIV-1 OpenGene DNA sequencing System 得到样本的 pol 区序列。首先是通过第一轮 RT-PCR 反应得到长度 1318 bp 的 pol 区片段, 再通过 4 个模块的测序反应 (CLIP 反应) 分别得到蛋白酶区 (PR) 和逆转录酶区 (RT) 的序列: 其中通过 PR 和 P2 模块得到 PR 区长度为 288 bp 的序列 (4~99 密码子), 通过 RT beginning (38~142 密码子) 和 RT middle (138~247 密码子) 模块得到 RT 区长度为 630 bp 的序列 (38~247 密码子)。然后使用 Long-READ TOWER OpenGene System 测序仪进行测序。

结 果

1. 重庆市 MSM 人群 HIV 的感染率及发病率: 共 104 份样本经 WB 确认为 HIV-1 阳性, HIV-1 的感染率为 10.4% (表 1)。80.3% 的被调查者为重庆市人, 外省户籍占 19.7%。98.1% 的被调查者是汉族^[14]。

通过 BED 检测, 有 33 份判为新近感染。即采样之前的 155 d 以内发生感染。估算重庆市 MSM 人群 HIV-1 感染发病率为 7.98 (95% CI: 5.26~10.70)。

2. 重庆市 MSM 人群新近感染样本的耐药性分析: 33 份判为新近感染的样本中, 有 8 份因样本量不足无法进行核酸的提取, 对 25 份样本提取了核酸, 其中 22 份成功进行了扩增以及耐药性检测。本研究使用 Bayer TruGene HIV-1 OpenGene DNA sequencing System 得到样本的 pol 区序列。共采用三种方法对测序成功的样本进行耐药性分析: 根据 Bayer 公司专门提供的基因型耐药突变解释规则 [DR 3.7 IVD (2006/07/27) Guidelines 11.0 (2005/12/15)] 生成临床耐药报告和突变位点报告; 根据美国斯坦福大学 (<http://hivdb.stanford.edu/>) 网站提

供的 HIVdb 耐药分析软件进行分析,得到样本的基因型耐药分析报告。耐药报告将样本的耐药程度分为高、中、低水平耐药和潜在低水平耐药及无耐药发生五种;利用德国 Genafor 网站 (<http://www.genafor.org/>) 提供的 Geno2pheno 耐药分析软件 (<http://www.geno2pheno.org/>) 进行表型耐药分析。

三种方法对重庆市 MSM 人群中 BED 方法判为新近感染样本的基因型耐药检测结果见表 2、3。

表 2 重庆市 MSM 新近感染样本中发生耐药的样本信息

样本编号	耐药突变	耐药情况		
		TruGene	HIVdb	Geno2pheno
CQ-1011	M46L	耐药: IDV 和 APV/FPV	低水平耐药: NFV	NFV
	L63P	可能耐药: IDV/r RTV APV/r 和 FPV/r	潜在低水平耐药: ATV/NFV FPV/IDV/LPV	APV
CQ-755	I47L	无	低水平耐药: FPV	无
	L63P		潜在低水平耐药: DRV/TPV/LPV	

表 3 重庆市 MSM 耐药突变的发生情况 (n = 22)

耐药突变	突变出现例数	突变出现比例 (%)
G16E	1	4.55
K20R	2	9.09
M36I	4	18.18
M46L	1	4.55
I47L	1	4.55
L63P	19	86.36
H69K	3	13.64
V77I	4	18.18
L89M	3	13.64

根据 TruGene OpenGene System 提供的临床耐药报告,有 1 份样本的 PR 区发生主要耐药突变 (M46L),导致该样本对 IDV 和 APV/FPV 等 PI 类药物发生耐药,对 IDV/r、RTV、APV/r 和 FPV/r 等可能耐药;由此推算出该群体的总体耐药发生率为 4.55% (1/22)。使用 HIVdb 和 Geno2pheno 耐药分析软件进行耐药分析发现,分别有 2 例和 1 例耐药,其耐药发生率分别为 9.09% 和 4.55%。

对 22 份样本耐药位点的耐药突变情况进行统计发现,全部样本均在 PR (逆转录酶区) 存在次要耐药突变,以 L63P 最为常见,RT (蛋白酶区) 未检出耐药突变 (表 3)。

讨 论

由于 HIV 耐药株有可能回复突变成野生株,所以 WHO、国际艾滋病协会美国分会 (International AIDS Society-USA, IAS-USA)、欧洲 HIV 耐药监测

指导专家组等多个国际组织均推荐在 HIV 新近感染者中进行耐药性检测^[7,15,16]。

1. HIV-1 发病率监测: BED-CEIA 是美国疾病预防控制中心目前推荐使用的检测 HIV-1 新近感染者血清阳转的实验室规程,它能够在群体水平上区分新近感染者和长期感染者。多项研究表明使用该方法检测 HIV 新近感染者,并在人群中开展耐药监测 (原发耐药监测) 更能够及早掌握 HIV-1 耐药性的发生和流行情况^[17,18]。本研究采用该方法估算 MSM 人群 HIV-1 发病率,继续进行 MSM 人群发病率监测的队列研究,并将结果与该方法比对,将有助于完善该研究方法。

2. 重庆市 MSM 人群中新近感染者的耐药流行状况: 国外在 MSM 人群中进行的多项研究均提示, HIV-1 耐药株在新近感染者中出现的比例更高。于 1995 年 7 月至 2004 年 12 月间在美国纽约市 HIV-1 新近感染者中进行的一项长达 10 年的耐药性监测显示,耐药的发生率由 1995 - 1998 年的 13.2% (10/76) 增加到 2003 - 2004 年的 24.1% (27/112)^[17]; 加拿大在对 2000 - 2001 年新诊断的 HIV-1 感染者耐药监测发现,总耐药发生率为 8.1% (58/715),多重耐药的发生率为 1%, HIV-1 新近感染者和长期感染者的耐药发生率分别为 12.2% (27/221) 和 6.3% (31/494)^[18]。1996 - 2002 年在欧洲 19 个国家同时进行的 HIV 耐药监测表明,未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者中有 10.4% (230/2208) 携带耐药突变基因; 新近感染者与长期感染者相比,携带 HIV 耐药突变更多 [13.5% (105/777) vs. 8.7% (53/607), P = 0.006]^[19]。本研究使用的重庆市 22 份 MSM 新近感染者样本中,分别有 1 份或 2 份样本判定为耐药 [均对蛋白酶抑制剂 (PI) 类药物发生耐药], 耐药发生率为 4.55%, 虽然目前尚处于较低的水平,但结合 HIV 在该人群中的快速传播, HIV 耐药株的传播应受到足够重视。

3. 与 2005 年全国耐药监测中重庆市样本检测结果的比较: 2005 年重庆市参与了由中国疾病预防控制中心主持的全国范围 HIV 耐药性调查。调查中共获得 15 份未经治疗的 HIV/AIDS 样本,其中 4 份样本病毒载量 > 1000 拷贝/ml, 可用于耐药检测。结果发现对 PI 和逆转录酶抑制剂 (NNRTI/NRTI) 均敏感。该调查于 2005 年 6 月完成,调查对象包括吸毒、性乱等多种感染途径。两次调查结果对比表明, HIV 耐药株已经在重庆市 HIV 感染者中传播。

根据 TruGene 的耐药突变位点报告,在重庆市进行耐药检测的样本中 PR 基因区二级突变非常常见;此类突变主要是恢复或提高携带一级突变耐药突变的突变株复制能力。重庆市的 22 份 MSM 样本中全部在 PR 基因区检出一种或更多的 PI 二级耐药突变,其中以 L63P、M36I 和 V77I 最常见,出现的频率分别为 86.36%、18.18% 和 18.18%。此类位点高频率的出现可能与我国流行病毒株有关, L63P、H69K 和 V77I 均被视为常见的多态性改变,尤其是在接受 PI 治疗的感染者中更为常见。我国的治疗方案主要以 NNRTI 和 NRTI 类药物为主;这种广泛出现的 PR 基因区次要耐药突变,对我国 HIV-1 PI 耐药流行株产生以及传播的影响到底有多大,尚有待进一步研究证实。

4. 三种耐药分析方法的结果比较:本研究同时采用三种耐药分析方法对重庆市 HIV-1 新近感染样本进行耐药分析,得到的结果不尽相同。在 22 份新近感染样本中,TruGene、HIVdb 和 Geno2pheno 分别判定有 1 份、2 份和 1 份样本发生耐药。由于目前使用的基因型/虚拟表型耐药检测方法的判定规则大多建立在以 B 亚型的实验数据基础之上,因此,对耐药检测结果应谨慎对待,并尽可能的采用其他判定方法加以验证,以确定样本是否发生耐药。

综上所述,重庆市 MSM 人群中 HIV-1 新近感染的耐药发生率为 4.55%,是国内关于该人群原发耐药监测的首次报道。根据 WHO 对耐药程度的定义,目前重庆市的 MSM 人群耐药流行水平尚处于低水平^[20]。为了更好的干预和关怀 MSM 人群,切实提高 MSM 人群的艾滋病防治效果,该人群的发病率监测与耐药监测研究工作亟待深入开展。

参 考 文 献

- [1] Palella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, et al. Cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1998, 338:853-860.
- [2] 中国艾滋病防治联合评估报告(2007年). <http://www.chinaids.org.cn/>.
- [3] 谢静,李太生. HIV-1 耐药性产生机制及检测方法. *中国艾滋病性病*, 2005, 11(2):150-153.
- [4] Little SJ, Daar ES, D' Aquila RT, et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA*, 1999, 282:1142-1149.
- [5] Palmer S, Shafer RW, Mergan TC, et al. Highly drug — resistance

HIV-1 clinical isolates are cross-resistance to many antiretroviral core-pounds in current clinical development. *AIDS*, 1999, 13:661-667.

- [6] Menzo S, Castagna A, Monachetti A, et al. Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to en-fuvirtide during long-term treatment. *Antimicrob Agents Chem Other*, 2004, 48:3253-3259.
- [7] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*, 2002, 347:385-394.
- [8] Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002, 18:295-307.
- [9] Jiang Y, Wang MJ, Wang YL, et al. HIV-1 incidence estimates using IgG-capture BED-enzyme immunoassay from surveillance sites of injection drug users in three cities of China. *AIDS*, 2007, 21 Suppl 8:S41-51.
- [10] 王慧杰,蒋岩,韩梅,等. 检测 HIV-1 新近感染的 BED 捕获酶联免疫实验的重复性和稳定性评价. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(4):305-307.
- [11] Lee LM, McKenna MT. Monitoring the incidence of HIV infection in the United States. *Public Health Reports*, 2007, 122 Suppl 1: S72-79.
- [12] Nesheim S, Parekh B, Sullivan K, et al. Temporal trends in HIV type 1 incidence among inner-city childbearing women in Atlanta: use of the IgG-capture BED-enzyme immunoassay. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21(6):537-544.
- [13] Parekh BS, McDougal JS. Application of laboratory methods for estimation of HIV-1 incidence. *Indian J Med Res*, 2005, 121(4): 510-518.
- [14] 冯连贵,丁贤彬,卢戎戎,等. 重庆男男性接触人群高危行为和性病艾滋病感染率调查. *热带医学杂志*, 2007, 7(5):483-486.
- [15] WHO, Geneva 2004. Scaling up antiretroviral therapy in resource-limited settings: treatment guidelines for a public health approach (2003 revision). Accessed at: http://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/arvrevision2003en.pdf.
- [16] The European HIV Drug Resistance Guidelines Panel. European HIV drug resistance guidelines 2006 update. Available at http://www.kuleuven.be/regae/cev/links/European_drug_guidelines/index.htm.
- [17] Priddy FH, Pilcher CD, More RH, et al. Detection of acute HIV infections in an Urban HIV counseling and testing population in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2007, 44(2): 196-202.
- [18] Jayaraman GC, Archibald CP, Kim J, et al. A Population-based approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections. Results from the Canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006, 42:86-90.
- [19] Masquelier B, Bhaskaran K, Pillay D, et al. Prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance and the role of resistance algorithms: data from seroconverters in the CASCADE collaboration from 1987 to 2003. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005, 40:505-511.
- [20] WHO. Guidelines for surveillance of HIV drug resistance. Available at <http://www.who.int/hiv/drugresistance/en/>.

(收稿日期:2008-02-15)

(本文编辑:张林东)