

昆明市2010年HIV-1耐药传播警戒线调查

陈敏 马艳玲 楚承霞 邢辉 徐艳声 苏莹珍 杨颖 陈会超
罗红兵 贾曼红 陆林

【摘要】 目的 了解2010年昆明市未经抗病毒治疗的HIV感染者中耐药株的传播水平。**方法** 根据WHO推荐的HIV耐药警戒线调查方法,对2010年1—8月收集的62份年龄<25岁的HIV-1新发现感染者的血液样本进行HIV-1耐药基因型检测和耐药株传播水平分析。**结果** 62份样本中,54份完成耐药基因型鉴定。按*pol*基因区进行分型,其中53.2%的样本为CRF08_BC亚型,其他亚型包括CRF07_BC、CRF01_AE、C。根据采样时间顺序,前47份扩增阳性的样本用于耐药传播水平的分析,其中1份出现针对蛋白酶抑制剂类药物的耐药突变位点,耐药株流行率<5%。**结论** 昆明市HIV耐药株尚处于低度流行水平,为控制耐药传播水平的上升,规范治疗及科学管理仍然是当前艾滋病患者治疗工作的重点。

【关键词】 艾滋病病毒; 耐药警戒线检测; 抗病毒治疗

Survey on the transmission of HIV drug resistance in Kunming, Yunnan province in 2010
CHEN Min¹, MA Yan-ling¹, CHU Cheng-xia², XING Hui³, XU Yan-sheng², SU Ying-zhen¹, YANG Ying², CHEN Hui-chao¹, LUO Hong-bing¹, JIA Man-hong¹, LU Lin^{1,4}. 1 Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China; 2 Kunming Center for Disease Control and Prevention; 3 National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 4 School of Public Health, Kunming Medical College

Corresponding authors: LU Lin, Email: lulin@yncdc.cn; JIA Man-hong, Email: jmanhong@yahoo.com.cn
This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2009ZX10004-902).

【Abstract】 Objective To study the HIV drug resistance (HIVDR) transmission in Kunming city of Yunnan province in 2010. **Methods** Referring to the guidelines for HIV drug resistance threshold survey (HIVDR-TS) set by WHO, 62 plasma samples of recently reported HIV-infected individuals who were older than 25 years of age, were collected from January to August 2010. Genotyping of *pol* genetic mutations associated with HIVDR with reverse transcriptional PCR was performed and the prevalence of HIV-1 drug resistance transmission was evaluated. **Results** Of the 62 plasma samples, 54 were successfully sequenced and genotyped on *pol* sequence. Based on the *pol* sequences, HIV subtypes including CRF08_BC (53.2%), CRF07_BC (25.5%), CRF01_AE (19.1%) and C (2.1%) were identified. According to the time of sampling, the first 47 sequenced samples were used for drug resistance prevalence analysis. A protease inhibitor (PI) relative mutation was found in one sample. Based on the WHO standard, the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance was <5%. **Conclusion** HIV-1 drug resistant strains transmission was still catalogued as low prevalence level in Kunming. To prevent the increase of HIVDR prevalence, normative treatment and scientific management to AIDS patients seemed to be quite important.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Drug resistance transmission threshold survey; Antiretroviral therapy

抗反转录治疗(ART)在降低HIV/AIDS死亡率

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.01.017

基金项目: 国家“十一五”科技重大专项(2009ZX10004-902)

作者单位: 650022 昆明, 云南省疾病预防控制中心(陈敏、马艳玲、苏莹珍、陈会超、罗红兵、贾曼红、陆林); 昆明市疾病预防控制中心(楚承霞、徐艳声、杨颖); 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(邢辉); 昆明医学院公共卫生学院(陆林)

陈敏、马艳玲同为第一作者

通信作者: 陆林, Email: lulin@yncdc.cn; 贾曼红, Email: jmanhong@yahoo.com.cn

的同时,也导致产生HIV-1耐药株^[1-3]。根据2006—2007年全国HIV耐药调查结果,在调查治疗HIV人群中耐药率已高达17.6%。迅速产生的耐药株有可能传播到新感染人群^[4],使尚未开始治疗的感染者携带HIV耐药株,导致抗病毒治疗困难。为评价HIV-1耐药株传播水平,本研究于2010年在昆明市开展了HIV-1耐药警戒线调查。

对象与方法

1. 研究样本:按照 WHO HIV 耐药警戒线检测 (HIVDR-TS) 的设计要求^[5], 于 2010 年 1—8 月在云南省昆明市连续采集 62 例 HIV 新发现感染者血液样本, 所有样本满足以下条件: ①经免疫印迹试验确认为 HIV 抗体阳性; ②无艾滋病指征性疾病; ③年龄 < 25 岁, 女性是首次妊娠; ④未经任何抗病毒药物治疗; ⑤流行病学资料齐全; ⑥血浆样本未反复冻融且未溶血。调查对象均签署知情同意书。

2. 检测方法:基因序列获取及耐药分析, 通过 HIV-1 RNA 的提取、反转录 PCR 和巢式 PCR 扩增 *pol* 基因区后, 对扩增产物进行电泳鉴定和测序。序列测定后经过拼接和整理, 提交 HIV 耐药数据库 (hivdb.stanford.edu) 在线贴网分析, 参照 WHO 耐药突变位点列表 (2009 年)^[6], 确定亚型及耐药性突变位点和对各种抗病毒药物的耐受程度。

3. HIV-1 耐药株传播水平分析:根据 WHO 的 HIV 耐药警戒线调查方案, 采用截断顺序抽样法 (TSS) 进行抽样^[7], 并结合“耐药警戒线监测抽样表”进行耐药株传播水平分析。传播水平分为低传播水平 (< 5%)、中度传播水平 (5% ~ 15%) 和高传播水平 (≥ 15%)。

结 果

1. PCR 扩增及测序:62 例样本平均年龄为 21.48 (2 ~ 25) 岁。其中 HIV 经异性传播占 72.6%、同性传播占 12.9%、静脉注射吸毒传播占 11.3%、母婴传播占 3.2%。采用 In-house 方法对 *pol* 基因区进行扩增测序, 长度为 1160 bp, 获得序列成功率为 87.1% (54/62), 序列数和长度满足进行 HIV 耐药警戒线分析的要求。

2. 亚型分布:将采集的样本按 *pol* 基因区进行分型, 53.2% 的样本为 CRF08_BC 亚型, 其他亚型分别为: CRF07_BC (25.5%)、CRF01_AE (19.1%) 及 C (2.1%)。

3. 耐药基因型分析:按照采样时间排序, 对前 47 个有效 *pol* 基因区序列进行耐药基因型分析。其中 1 例样本 (KM11083) 出现蛋白酶抑制剂 (PI) 相关的耐药突变位点 (D30DN), 发生率为 2.1%; 该突变位点可对 Nelfinavir (NFV) 产生高度耐药, 对 Atazanavir (ATV) 产生潜在耐药。该样本亚型为 CRF01_AE, 经异性接触途径感染 HIV。

4. HIV-1 耐药传播水平:将获得序列的样本按

采样时间排序, 随着样本量的增加, 计算累计耐药样本数并填入“耐药警戒线监测抽样表”(表 1) 中。如果该累计数小于同一行的下限, 确定为低传播水平; 大于同一行中的上限, 确定为高传播水平; 上述两种情况之一都可停止抽样。否则逐渐增加样本量, 每增加 1 个样本都按照上述标准进行判别; 未检测到的样本需要继续抽样, 达到最大样本量 47 个时, 停止抽样。此时, 如果检出耐药的样本数小于下限, 可以分为低传播; 大于上限, 可以分为高传播; 介于上下限之间, 认为是中度传播。本次调查中第 28 个样本检测到耐药突变, 此时的耐药样本累计数介于上下限值之间, 按照上述规则需要继续抽样。当达到第 44 个样本时, 耐药样本累计数小于同一行的下限值, 可停止抽样, 确定耐药株流行率 < 5%, 属 HIV-1 耐药株的低度流行水平。

表 1 昆明市 HIV-1 耐药株调查抽样情况和耐药传播水平

成功 检测 样本数	下限	检出 耐药 样本数	上限	成功 检测 样本数	下限	检出 耐药 样本数	上限
1	ND	0	ND	25	ND	0	6
2	ND	0	ND	26	ND	0	6
3	ND	0	ND	27	ND	0	6
4	ND	0	ND	28	ND	1	6
5	ND	0	ND	29	ND	1	6
6	ND	0	ND	30	ND	1	6
7	ND	0	ND	31	ND	1	6
8	ND	0	ND	32	ND	1	6
9	ND	0	ND	33	ND	1	6
10	ND	0	ND	34	1	1	7
11	ND	0	ND	35	1	1	7
12	ND	0	ND	36	1	1	7
13	ND	0	ND	37	1	1	7
14	ND	0	5	38	1	1	7
15	ND	0	5	39	1	1	7
16	ND	0	5	40	1	1	7
17	ND	0	5	41	1	1	7
18	ND	0	5	42	1	1	7
19	ND	0	5	43	1	1	7
20	ND	0	5	44	2	1	7
21	ND	0	5	45	2	1	7
22	ND	0	5	46	2	1	8
23	ND	0	5	47	2	1	8
24	ND	0	5	停止	停止	停止	停止

注:ND 为未检测到

讨 论

云南省到 2010 年底抗病毒治疗人数逐年增加, HIV 耐药传播监测在同步开展^[8], 监测是通过在已开展抗病毒治疗的地区对未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者进行耐药性检测, 判断 HIV 耐药毒株的传播

水平。为了在资源有限的国家评价HIV耐药株的传播情况,2003年WHO推荐了一个资源最小化的HIV警戒线调查方法(HIVDR-TS)^[5],即在被调查地区1个或临近的几个HIV检测点,以连续检测发现的60~70例感染者作为研究对象,并均符合5项标准者,以血浆或血清作为检测样本,获得有效 pol 区序列不少于47条,通过基因型耐药检测确定耐药突变的类型,利用截断顺序抽样法,并结合“耐药警戒线监测抽样表”进行耐药株传播水平分析。

2008年昆明市开展耐药警戒线调查,在<25岁的新诊断人群抽样中未发现耐药突变。尽管本次调查的结果显示2010年昆明市尚属HIV耐药株的低度流行水平,但有1例出现耐药传播相关的突变位点,提示耐药株的流行有上升的趋势,需要引起注意。

在本次调查中所发现的耐药突变位点是针对PI的(D30DN),而未发现针对反转录酶(RT)区的。D30DN是NFV治疗最常选择的突变,可以导致对NFV的高度耐药和对ATV/r的潜在耐药。根据2008年昆明市的一项调查,抗病毒治疗1年以上病毒载量>1000 copy/ml的患者中,主要RT区相关的耐药突变位点为T1215F/NY/I、M41L/M和T69G/N/I/S/A/D,突变率分别为39%、27%和27%,对PI的主要突变位点为I54V(1.6%)、V82A(1.6%)和L33F(1.6%)^[9]。这些耐药位点在本次调查中均未发现,提示在治疗的患者中引起的二次传播得到一定程度控制。检测到耐药突变的样本KM11083,是通过非婚异性性接触感染,溯源调查具有一定的难度。目前云南省的治疗方案中尚未使用NFV,但在昆明地区发现自行购买使用国外PI产生针对其主要突变的病例^[9],因此HIV感染者管理和规范化治疗仍然是减少此类耐药传播的关键。

HIV耐药传播检测的关键是新发感染者,由于确定新发感染者比较困难,目前主要通过替代的方法。如在BED-CEIA阳性的人群中进行耐药检测^[10],但该方法需要进行大量的前期血清学检测,成本大且周期长,不能满足监测的需要。而耐药警戒线调查最大的优点是资源成本的最小化。它可以把耐药传播的监测和常规的血清筛查结合在一起开展^[11,12]。而且简化了新近感染的纳入标准,仅要求年龄<25岁,女性为首次妊娠,前者减小了可能暴露于HIV的年限,后者避免了为防止母婴传播而进行的ART。新的抽样方法,也最大程度地减小了样本的使用量。这些特点使其比较容易在特定的城市和地区开展监测工作。在云南省的一些高流行区,可以很方

便地收集到足够进行统计分析的<25岁的样本数,因此开展常规的HIV耐药警戒线监测是行之有效的防控手段。

综上所述,昆明市耐药株的传播尚处于低度水平,为有效控制耐药株的传播还需要对治疗人群加强规范治疗及科学管理,减缓耐药株从治疗人群向新发感染人群的传播。耐药发生和耐药传播的监测应该同时连续开展,并逐步扩展到昆明及德宏以外的地区,以便全面地掌握耐药株在全省的发生情况,找到有效的防控环节和手段。

参 考 文 献

- [1] Bartlett JA, DeMasi R, Quinn J, et al. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naive HIV-1 infected adults. *AIDS*, 2001, 15(11):1369-1377.
- [2] Palella FJ, Jr Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV outpatient study investigators. *N Engl J Med*, 1998, 338(13):853-860.
- [3] Tamalet C, Fantini J, Tourres C, et al. Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS*, 2003, 17(16):2383-2388.
- [4] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*, 2002, 347(6):385-394.
- [5] Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, et al. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther*, 2008, 13 Suppl 2:S25-36.
- [6] Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One*, 2009, 4(3):e4724.
- [7] 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. *Antivir Ther*, 2008, 13 Suppl 2:S37-48.
- [8] Ma YL, Duan S, Chen M, et al. Survey on HIV drug resistance transmission in Dehong of Yunnan province in 2009. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(4):424-425. (in Chinese)
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. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(4):424-425.
- [9] Yang SM, Fan YS, Li HQ, et al. Investigation of pol gene variation of HIV-1 epidemic strains after treatment with HART at Dehong prefecture and Kunming in Yunnan province. *Chin J Lab Med*, 2011, 34(4):315-320. (in Chinese)
杨绍敏,樊移山,李惠琴,等.云南省德宏和昆明地区高效抗逆转录病毒治疗后HIV-1流行毒株 pol 区基因变异分析. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4):315-320.
- [10] Wang MJ, Duan S, Xiang LF, et al. Study on the drug resistance situation among recently infected HIV-1 patients in Dehong. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(9):905-908. (in Chinese)
王魁杰,段松,项丽芬,等.云南省德宏州HIV-1新近感染者基因型耐药分析. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(9):905-908.
- [11] Nguyen HT, Duc NB, Shrivastava R, et al. HIV drug resistance threshold survey using specimens from voluntary counselling and testing sites in Hanoi, Vietnam. *Antivir Ther*, 2008, 13 Suppl 2:S115-121.
- [12] Ruelle J, Roman F, Vandenbroucke AT, et al. Transmitted drug resistance, selection of resistance mutations and moderate antiretroviral efficacy in HIV-2: analysis of the HIV-2 Belgium and Luxembourg database. *BMC Infect Dis*, 2008, 8:21.

(收稿日期:2011-07-23)

(本文编辑:尹廉)