

云南省德宏州 2012 年 HIV-1 耐药传播警戒线调查

陈敏 王继宝 邢辉 马艳玲 姚仕堂 陈会超 杨锦 李艳玲 段松 贾曼红

【摘要】 目的 调查 2012 年云南省艾滋病高流行区德宏州未经抗病毒治疗的 HIV 感染者的基因型分布和耐药株传播水平。方法 根据 HIV 耐药警戒线调查实施方案,对 2012 年 1—8 月德宏州符合要求的 60 份年龄在 16~25 岁新发现的 HIV-1 感染者的血浆样本进行 HIV-1 耐药基因型检测和耐药株传播水平分析。结果 52 份样本完成基因型及耐药鉴定,其中中国籍占 59.6%,缅甸籍占 40.4%。通过进化分析对 *pol* 区进行分型,38.5% 的样本为独特型重组 (URF),其他依次为 C 亚型 (34.6%)、CRF01_AE (21.2%)、CRF08_BC (3.8%) 和 B 亚型 (1.9%)。在 2 个序列中各检测到 1 个针对非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTI) 类药物的耐药突变位点,按照耐药警戒线的统计方法估算耐药株流行率为 5%~15%,属于中度水平。结论 德宏州新感染人群中存在复杂的 HIV-1 基因型,HIV-1 耐药株已处于中度流行水平。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒; 基因型; 耐药警戒线调查; 抗病毒治疗

Study on HIV-1 related genetics and threshold on drug resistance in Dehong prefecture of Yunnan province in 2012 Chen Min¹, Wang Jibao², Xing Hui³, Ma Yanling¹, Yao Shitang², Chen Huichao¹, Yang Jin², Li Yanling², Duan Song², Jia Manhong¹. 1 Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China; 2 Dehong Center for Disease Control and Prevention; 3 National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention

Corresponding authors: Jia Manhong, Email: jiamanhong@hotmail.com; Duan Song, Email: dhduansong@sina.com

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Support Projects for the "Twelfth Five-Year Plan" of China (No. 2012ZX10001-002).

【Abstract】 Objective To study the HIV-1 genotypes and transmitted drug resistance (TDR) in Dehong prefecture of Yunnan province in 2012. **Methods** Referring to the guidelines for HIV drug resistance threshold survey (HIVDR-TS), 60 plasma samples of recently reported HIV-infected individuals between 16 and 25 years old were collected in Dehong prefecture from January to August 2012. Genotyping of partial *pol* gene was performed by using reverse transcriptional PCR. HIV-1 genotype and the prevalent levels of HIV-1 drug resistance transmission were analyzed. **Results** 52 plasma samples were successfully sequenced and analyzed. Among them, 59.6% were Chinese, and the rest (40.4%) were Burmese. Based on *pol* sequences, identified HIV genotypes would include unique recombinant forms (URFs, 38.5%), subtype C (34.6%), CRF01_AE (21.2%), CRF08_BC (3.8%), and subtype B (1.9%). One drug resistant mutation to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) was detected in respective two sequences. Based on the statistical method of HIVDR-TS, the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance was adjusted as a moderate level (5%–15%). **Conclusion** Diverse HIV-1 genotypes were found in this study, and the current HIV-1 drug resistant strains transmission was catalogued as moderate prevalence level in Dehong.

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

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.08.008

基金项目:“十二五”国家科技重大专项(2012ZX10001-002)

作者单位:650022 昆明,云南省疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(陈敏、马艳玲、陈会超、贾曼红);德宏州疾病预防控制中心(王继宝、姚仕堂、杨锦、李艳玲、段松);中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心(邢辉)

通信作者:贾曼红, Email: jiamanhong@hotmail.com; 段松, Email: dhduansong@sina.com

耐药警戒线调查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 感染者进行耐药检测,判断耐药株的传播水平^[1]。德宏州为云南省艾滋病高流行地区之一,截至 2011 年底,德宏州累计报告 HIV/AIDS 超过 15 000 人,占云南省的 16.7%;累计抗病毒治疗 4 137 人,占云南省的 17.9%。为评价德宏州 HIV-1 基因型及耐药株的流行情况,保证抗病毒治疗的科学性和可持续性,本研究对 2012 年德宏州 HIV-1 基因型及耐药传播水平进行调查。

对象与方法

1. 研究对象:按照《全国艾滋病病毒耐药性监测指南》耐药警戒线调查的要求,2012 年 1—8 月在云南省德宏州连续收集 16~25 岁 HIV 新发现感染者血浆样本,排除不满足要求的样本后获得 60 份血浆样本。排除标准:①既往有 HIV 阳性检测记录;②既往接受过抗病毒治疗;③有 WHO 提出的 III 期或 IV 期临床症状;④ CD₄⁺T 淋巴细胞计数 < 200 cell/μl。调查对象均签署知情同意书。

2. 检测方法:

(1) HIV-1 RNA 的提取:使用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA 试剂盒,根据标准操作程序从 140 μl 样本中提取 HIV RNA。

(2) 巢式 PCR 扩增 *pol* 基因区:使用 TaKaRa 公司 One Step RNA PCR 试剂盒 (AMV),进行反转录及第 1 轮 PCR 扩增,反应总体积 25 μl,引物为 MAW26 和 RT21 (表 1)。使用天根公司 2 × Taq PCR MasterMix 试剂盒,进行第 2 轮 PCR 扩增,反应体系 50 μl,引物为 PRO-1 和 RT20 (表 1)。扩增产物长度为 1.3 kb,包括蛋白酶 (PR) 基因全长 (1~99 密码子) 和反转录酶 (RT) 基因 1~300 密码子。

(3) PCR 扩增产物电泳测序:使用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物条带,阳性样本送北京梓熙生物科技有限公司纯化和测序。采用 3 个正向测序引物 PROS3、RTAS、RTB 和 2 个反向测序引物 PROC1S、RT20S3 (表 1)。

表 1 HIV-1 扩增及测序引物

引物名称	序列 (5' ~ 3')
MAW26	TTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC
RT21	CTGTATTCTGCTAATAAGTCTTTTGATGGG
PRO-1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA
RT20	CTGCCAGTTCTAGCTCTGCTTC
PROS3	GCCAACAGCCCCACCA
RTAS	CTCAGATTGGTTGCAC
RTB	CCTAGTATAAACAATGAGACAC
PROC1S	GCTGGGTGTGGTATTCC
RT20S3	GTTCTAGCTCTGCTTC

3. 序列分析:使用 Gene Codes 公司的 Sequencher 5.0 软件进行序列拼接, Bioedit 软件进行多序列比对和序列整理。使用 Mega 5.1 软件采用邻接法构建系统进化树,重复运算 1 000 次进行分型验证。所得序列利用 HIV 耐药数据库 (hivdb.stanford.edu) 的校正群体耐药分析工具 [the calibrated population resistance (CPR) tool] 在线贴网分析^[2],参照 2009 版监测相关的耐药突变 (Surveillance Drug Resistance Mutations, SDRM) 列表^[3],确定耐药突变位点和对各种抗病毒药物的耐受程度。

4. 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^[1],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%) 和高度传播水平 (> 15%)。

5. 统计学分析:应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验。出现理论频数 < 5 时,采用 Fisher 精确 χ^2 检验。

结 果

1. PCR 扩增及测序:60 份新报告的 HIV 感染者血样经扩增和测序,52 份样品获得可分析的 *pol* 区序列,满足耐药警戒线统计分析的要求。52 例感染者中,男女性比例为 1.26 : 1,年龄 17~25 岁, $M=22$ ($P_{25}=20, P_{75}=23$) 岁。传播途径分布为异性传播为主,占 61.5% (32/52),静脉注射吸毒传播占 30.8% (16/52),同性传播占 7.7% (4/52);异性传播中,81.3% (26/32) 有非婚异性性接触史,18.7% (6/32) 是由阳性配偶/固定性伴感染。民族以汉族 (46.2%, 24/52)、傣族 (26.9%, 14/52) 和景颇族 (21.2%, 11/52) 为主,其他民族占 5.8% (3/52)。职业以农民为主 (73.1%, 38/52),其他职业占 26.9%。52 例感染者中,中国籍占 59.6% (31/52),缅甸籍占 40.4% (21/52)。其中缅甸籍感染者中 61.9% (13/21) 为强制/劳教戒毒人员,14.3% (3/21) 为检测咨询者,14.3% (3/21) 为孕产期检查,4.8% (1/21) 为术前检查,4.8% (1/21) 为其他。中国籍感染者主要感染途径为异性传播,缅甸籍感染者主要为注射吸毒传播 (表 2)。

2. 基因型分布:利用 *pol* 区序列进行分型,其中 URF 占 38.5% (20/52),C 亚型占 34.6% (18/52),CRF01_AE 占 21.2% (11/52),CRF08_BC 占 3.8% (2/52) 和 B 亚型占 1.9% (1/52)。检测到的 URF 包括 BC 重组 (80.0%, 16/20) 和 C/CRF01_AE 重组 (20.0%,

表 2 德宏州 52 例不同国籍 HIV-1 感染者感染途径分布

国籍	合计	感染途径			χ^2 值	P 值
		异性传播	注射毒品	同性传播		
中国	31(100.0)	24(77.4)	4(12.9)	3(9.7)	11.153	0.003
缅甸	21(100.0)	8(38.1)	12(57.1)	1(4.8)		
合计	52(100.0)	32(61.5)	16(30.8)	4(7.7)		

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比

4/20)。研究对象基因型在异性传播和注射毒品传播间差异无统计学意义,在中国和缅甸籍感染者间差异无统计学意义(表 3)。

3. 耐药相关突变和耐药株流行率:52 份样本中,有 2 份检测到各携带 1 个针对非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTI) 的耐药传播相关突变位点 (SDRM),分别为 K103N 和 Y181I。根据耐药警戒线调查的统计方法,将获得的序列按采样时间排序,第 9 和第 23 个序列携带 SDRM,计算累计耐药样本数并填入《耐药警戒线监测抽样表》中,达到最大样本量 47 时,停止抽样,此时耐药样本累计数(2)介于上下限之间,属 HIV-1 耐药株的中度流行水平 (5%~15%),见表 4、5。

讨 论

抗病毒治疗人群的耐药监测能够揭示 HIV 耐药发生、发展趋势以及影响因素。而新近感染人群的耐药监测,可提供 HIV 耐药株分布和流行的情况,为制定减少 HIV 耐药株传播的措施提供科学依据,指导制定一线抗病毒治疗方案。但在实际中确定新近感染相对比较复杂,需要结合流行病学资料和新近

表 3 2012 年德宏州 HIV-1 感染者基因型分布

特征	合计	基因型					χ^2 值	P 值
		B	C	CRF01_AE	CRF08_BC	URF		
感染途径							4.250	0.362*
异性传播	32(100.0)	1(3.1)	10(31.3)	8(25.0)	2(6.3)	11(34.4)		
注射毒品传播	16(100.0)	0	8(50.0)	1(6.3)	0	7(43.8)		
同性传播	4(100.0)	0	0	2(50.0)	0	2(50.0)		
国籍							2.025	0.872
中国	31(100.0)	1(3.2)	11(35.5)	6(19.4)	2(6.5)	11(35.5)		
缅甸	21(100.0)	0	7(33.3)	5(23.8)	0	9(42.9)		
合计	52(100.0)	1(1.9)	18(34.6)	11(21.2)	2(3.8)	20(38.5)		

注:括号外数据为人数,括号内数据为构成比;* 仅比较基因型在异性传播和注射毒品传播间的分布

表 4 2012 年德宏州 HIV-1 感染者耐药株特征

样品编号	国籍	感染途径	基因型	耐药突变位点			耐药情况
				PIs	NRTIs	NNRTIs	
YN12S0030	中国	注射吸毒	C	-	-	K103N	DLV EFV NVP (H)
N12S0036	缅甸	注射吸毒	CRF01_AE	-	-	Y181I	DLV NVP (H) EFV ETR (I)

注:根据 WHO 2009 版 SDRM 耐药突变位点分析;H:高度耐药;I:中度耐药

表 5 耐药传播警戒线调查的抽样方法和传播水平划分方法

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

注:-表示停止;ND:未检测到

感染的检测来进行判断。为了满足耐药传播监测的需要,WHO 提出了耐药警戒线调查的方法,这是一个资源最小化的监测方法,主要是将新发现的低年龄组感染者近似地作为新近感染人群,因为其可能暴露于 HIV 的年限较短^[1]。

德宏州是云南省艾滋病流行时间最长,抗病毒治疗规模较大的地区,其耐药传播情况需要连续关注和研究。近年来,德宏州的 HIV 疫情出现一些新的变化趋势。2010 年德宏州筛查 202 089 人次,新报告感染者 1 282 人,其中外籍 366 人,占 28.5%;2011 年筛查 483 214 人次,新报告感染者 1 525 人,其中外籍 595 人,占 39.0%;2012 年筛查 711 347 人次,新报告感染者 1 341 人,其中外籍 661 人,占 49.3%。可见新发现感染者中外籍的构成比例在加大,本次调查中缅甸籍的感染

者占 40.4%，提示跨境人口的艾滋病传播已经是一个很突出的问题。从感染途径来看，异性传播已成为主要的感染途径，但中国籍和缅甸籍 HIV 感染者的感染途径存在差异，中国籍主要为异性传播，而缅甸籍主要为注射吸毒传播。

耐药警戒线所抽取的样本是一个近似的 HIV 新近感染样本，其基因型分析能够提示 HIV 分子流行病学的实时变化。在德宏州既往的调查中，C 亚型和 URF 分别占第一、二位^[4]。而在本调查中，URF 已经上升到了第一位，表明当地不但存在着复杂的病毒基因重组，有的重组可能已开始传播。从总体上来说，HIV 基因型在异性传播和注射毒品传播之间的差异无统计学意义，在不同国籍感染者之间的差异无统计学意义。

本次调查检测到 2 个针对 NNTRI 的耐药突变位点：K103N 和 Y181I。根据 2008 年德宏州的一项调查，抗病毒治疗 >1 年病毒载量超过 1 000 copy/ml 的患者中，K103N 的检出率达 39% (27/69)，居 NNRTIs 耐药突变位点首位^[5]。在 2011 年德宏州的耐药监测中，已发现 K103N 传播的情况^[6]。与此相反，Y181I 在之前的耐药监测中均未报道^[5,7]，并从 1 名缅甸籍的 IDU 中检测到，提示耐药突变可能不是来源于本地治疗人群。由于中缅两国在疫情的流行特点和感染者的管理模式上存在差异，防止耐药株的跨境传播应引起重视。

目前，德宏州 HIV-1 的主要传播途径已经由早期的注射毒品转变为性传播，但本次调查中发现的 2 例耐药毒株均为注射毒品传播。以往的调查发现注射吸毒人群服药依从性较其他人群差^[8,9]，提示该人群产生耐药的可能性较大，加上德宏州注射毒品传播时间较长，积累的原发性耐药比较容易通过注射吸毒途径传播到新近感染人群中。为了证实这种推测需要加强对治疗人群的耐药监测。

根据警戒线的判别方法，德宏州 2011 年耐药株为低度流行水平 (<5%)^[6]，本次调查提示德宏州耐药株的流行率已属于中度水平。从该地区对治疗艾滋病患者耐药发生的监测情况来看，HIV 病毒载量 >1 000 copy/ml 的艾滋病患者中 HIV 耐药株检出率较高^[7]。因此当前控制耐药株传播的关键，是进一步加强抗病毒治疗人群的规范治疗及科学管理，同时通过有效的干预来降低危险行为，减少新发感染。为全面了解耐药传播的情况，还需要开展连续耐药监测。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY, et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (9): 1197-1198.
- [3] Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4724.
- [4] Chen M, Yao ST, Ma YL, et al. Distribution of HIV-1 subtypes among different populations in Dehong prefecture, Yunnan province, in 2011 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2012, 33 (9): 883-887. (in Chinese)
陈敏, 姚仕堂, 马艳玲, 等. 云南省德宏州 2011 年 HIV-1 不同亚型人群分布特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33 (9): 883-887.
- [5] Yang SM, Fan YS, Li HQ, et al. Investigation of *pol* gene variation of HIV-1 epidemic strains after treatment with HARRT at Dehong prefecture and Kunming in Yunnan province [J]. *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反转录病毒治疗后 HIV-1 流行毒株 *pol* 区基因变异分析 [J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4): 315-320.
- [6] Chen M, Wang JB, Xing H, et al. Threshold survey on HIV-1 drug resistance in Dehong of Yunnan province in 2011 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2012, 33(10): 1096-1097. (in Chinese)
陈敏, 王继宝, 邢辉, 等. 云南省德宏州 2011 年 HIV-1 耐药传播警戒线调查 [J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33 (10): 1096-1097. (in Chinese)
- [7] Yao ST, Ma YL, Xu YW, et al. Mutation rate and risk factors of HIV resistance among AIDS patients receiving antiretroviral treatment in Dehong prefecture, Yunnan province [J]. *Chin J Dis Control Prev*, 2012, 16(12): 1019-1023. (in Chinese)
姚仕堂, 马艳玲, 许元武, 等. 云南省德宏州艾滋病患者抗病毒治疗后 HIV 耐药突变率及影响因素研究 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(12): 1019-1023.
- [8] Hinkin CH, Barclay TR, Castellon SA, et al. Drug use and medication adherence among HIV-1 infected individuals [J]. *AIDS Behav*, 2007, 11(2): 185-194.
- [9] Lu J, Liu ZF, Wang FY, et al. Efficacy evaluation of HAART among IDUs in minority regions and its impact factors [J]. *Chin J AIDS STD*, 2013, 19(1): 2-5. (in Chinese)
陆娟, 刘中夫, 王凤英, 等. 少数民族地区吸毒人群艾滋病抗病毒治疗的疗效及影响因素 [J]. *中国艾滋病性病*, 2013, 19(1): 2-5.

(收稿日期: 2014-02-26)

(本文编辑: 王岚)