

# 云南省德宏州2014年HIV-1 耐药传播警戒线调查

陈敏 王继宝 邢辉 马艳玲 杨锦 陈会超 姚仕堂 罗红兵 段星  
王译葵 段松 贾曼红

650022 昆明, 云南省疾病预防控制中心性病艾滋病防制所(陈敏、马艳玲、陈会超、罗红兵、贾曼红); 678400 芒市, 云南省德宏州疾病预防控制中心艾滋病性病防治科(王继宝、杨锦、姚仕堂、段星、王译葵、段松); 102206 北京, 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心病毒免疫研究室(邢辉)

陈敏、王继宝同为第一作者

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

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.02.011

**【摘要】** 目的 调查2014年云南省德宏州未经抗病毒治疗的HIV感染者的耐药株传播水平。方法 2014年1—8月在德宏州收集70份新报告的16~25岁HIV-1感染者的血浆样品, 对符合耐药警戒线调查要求的58份样品进行HIV-1基因型耐药检测和耐药株传播水平分析。结果 50份样品完成了基因型及耐药鉴定, 中国籍占34.0%, 缅甸籍占66.0%。通过进化分析对 $pol$ 区进行分型, 主要的基因型包括CRF01\_AE、C亚型、URFs、CRF62\_BC、CRF08\_BC、CRF07\_BC、CRF64\_BC、B亚型和CRF55\_01B, 分别占28.0%、20.0%、20.0%、10.0%、8.0%、4.0%、4.0%、4.0%和2.0%。在1个序列中检测到1个针对蛋白酶抑制剂类药物的耐药突变位点(M46I), 按照耐药警戒线的统计方法估算耐药株流行率 $<5\%$ 。结论 德宏州16~25岁新报告的HIV-1感染人群中外籍比例较高, HIV新型重组开始传播, 但HIV-1耐药性传播尚处于低度水平。

**【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

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10001-002)

## Study on the threshold of HIV-1 drug resistance in Dehong prefecture of Yunnan province in 2014

Chen Min, Wang Jibao, Xing Hui, Ma Yanling, Yang Jin, Chen Huichao, Yao Shitang, Luo Hongbing, Duan Xing, Wang Yikui, Duan Song, Jia Manhong

Institute for AIDS/STDs Control and Prevention, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China (Chen M, Ma YL, Chen HC, Luo HB, Jia MH); Department of AIDS/STDs Control and Prevention, Dehong Center for Disease Control and Prevention, Mangshi 678400, China (Wang JB, Yang J, Yao ST, Duan X, Wang YK, Duan S); Division of Research on Virology and Immunology, National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Xing H)

Chen Min and Wang Jibao are the first authors who contributed equally to the article.

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

**【Abstract】 Objective** To study the HIV-1 genotypes and transmitted drug resistance (TDR) in Dehong prefecture of Yunnan province in 2014. **Methods** A total of 70 plasma samples of recently reported HIV-infected individuals between 16 and 25 years old were collected in Dehong prefecture from January to August 2014. Among them, 58 samples which met the criterion of HIV drug resistance threshold survey (HIVDR-TS) were subjected to genetic drug resistance detection. **Results** 50 plasma samples were successfully sequenced and analyzed. Among them, 34.0% were Chinese and 66.0% were Burmese. Based on  $pol$  sequences, all the identified HIV genotypes would include CRF01\_AE (28.0%), subtype C (20.0%), URF (20.0%), CRF62\_BC (10.0%), CRF08\_BC (8.0%), CRF07\_BC (4.0%), CRF64\_BC (4.0%), subtype B (4.0%) and CRF55\_01B (2.0%). One drug, which resistant

mutation to proteinase inhibitors had been detected in one sequence. Based on the statistical method of HIVDR-TS, the prevalence of transmitted HIV-1 drug resistance was adjusted as  $<5\%$ . **Conclusion** The proportion of Burmese was relatively higher among those newly reported HIV-infected individuals aged 16 to 25 in Dehong. We noticed that the novel circulating recombinant forms began to function. However, the level of transmission through HIV-1 drug resistant strains still kept low in Dehong.

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

**Fund program:** National Major Science and Technology Projects of China (2012ZX10001-002)

HIV耐药株产生后,会传播到新感染人群<sup>[1]</sup>,使尚未开始抗病毒治疗的感染者携带HIV耐药株,影响其后抗病毒治疗效果。耐药警戒线调查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HIV耐药检测,判断耐药株的传播水平,为采取相应的防治措施提供科学依据<sup>[2]</sup>。德宏州是云南省艾滋病高流行地区之一,截至2013年12月,全州累计报告存活感染者9 474人,占全省的11.9%;抗病毒治疗6 170人,占全省在治人数的14.6%。为评价德宏州HIV-1耐药传播水平,保证抗病毒治疗的科学性和可持续性,2014年在德宏州开展了HIV-1耐药警戒线调查。

## 对象与方法

1. 样本来源:按照《全国艾滋病病毒耐药性监测指南》中耐药警戒线调查要求,2014年1—8月,在德宏州连续收集16~25岁HIV新发现感染者血浆样品70份,排除不满足耐药警戒线调查要求的样本后获得58份血浆样品。排除标准: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的III期或IV期临床症状;④ $CD_4^+$ T淋巴细胞计数 $<200$  cells/ $\mu$ l。调查对象均签署知情同意书。

### 2. 检测方法:

(1) HIV-1 RNA提取:使用Qiagen公司QIAamp Viral RNA试剂盒,根据标准操作程序从140  $\mu$ l样品中提取HIV-1 RNA。

(2)巢式PCR扩增*pol*基因区:使用TaKaRa公司One Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒,进行反转录及第1轮PCR扩增,反应总体积25  $\mu$ l,引物为MAW26和RT21<sup>[3]</sup>。使用Tiangen公司2 $\times$ Taq PCR MasterMix试剂盒,进行第2轮PCR扩增反应,反应体系50  $\mu$ l,引物为PRO-1和RT20<sup>[3]</sup>。扩增产物长度为1.3 kb,包括蛋白酶基因全长(1~99密码子)和反转录酶基因1~300密码子。

(3)PCR扩增产物电泳鉴定和测序:使用1%琼脂糖凝胶电泳观察PCR产物条带,阳性样本送北京

博迈德基因技术有限公司纯化和测序。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<sup>[3]</sup>。

3. 序列分析:使用Gene Codes公司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。用Mega 5.1软件构建Neighbor-joining (NJ)系统进化树,重复运算1 000次进行分型验证。重组分析利用HIV database的RIP 3.0分析工具进行分析。所得序列利用HIV耐药数据库(hivdb.stanford.edu提供)的校正群体耐药分析工具[the calibrated population resistance (CPR) tool]在线分析<sup>[4]</sup>。

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(truncated sequential sampling, TSS)进行抽样,即将获得的序列按照采样时间排序,计算累计耐药样品数依次填入“耐药警戒线监测抽样表”中,并与“耐药警戒线监测抽样表”中每一行的上、下限值进行比较,当小于下限值或大于上限值便可停止抽样,并判断耐药株传播水平<sup>[2]</sup>。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( $>15\%$ )<sup>[2]</sup>。

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 $\chi^2$ 检验,理论频数 $<5$ 时,采用Fisher精确法。

## 结 果

1. 样本特征:58份符合要求的样本,经扩增和测序,50份获得可分析的*pol*区序列,满足耐药警戒线统计分析要求。

50例感染者中,男女性比例为1.78:1,年龄范围为16~25岁,平均年龄为21.8岁。传播途径以异性传播为主占72.0%(36/50),静脉注射吸毒传播16.0%(8/50),男男性传播12.0%(6/50)。民族分布包括:傣族36.0%(18/50)、汉族36.0%(18/50)、景颇族24.0%(12/50)和德昂族4%(2/50)。职业分布以农民为主,占42.0%(21/50),其他职业占58.0%

(29/50)。从地区类别来看,50 例感染者中,缅甸籍占 66.0%(33/50),中国籍占 34.0%(17/50)。中国籍和缅甸籍感染者的传播途径构成上无差异,主要的传播途径均为异性传播(表 1)。

表 1 德宏州 50 名不同国籍 HIV-1 感染者感染途径的分布

地区类别	合计 (%)	感染途径(%)			χ <sup>2</sup> 值	P 值
		异性传播	注射毒品	同性传播		
中国籍	17(100.0)	12(70.6)	2(11.8)	3(17.6)	1.055	0.716
缅甸籍	33(100.0)	24(72.7)	6(18.2)	3(9.1)		
合计	50(100.0)	36(72.0)	8(16.0)	6(12.0)		

注:Fisher 精确法

2. HIV-1 基因型分布:利用 *pol* 区序列进行分型,其中 CRF01\_AE 占 28.0%(14/50),C 亚型占 20.0%(10/50),URF 占 20.0%(10/50),CRF62\_BC 占 10.0%(5/50),CRF08\_BC 占 8.0%(4/50),CRF07\_BC 占 4.0%(2/50),CRF64\_BC 占 4.0%(2/50),B 亚型占 4.0%(2/50)和 CRF55\_01B 占 2.0%(1/50)。检测到的 URF 包括 BC 重组占 40.0%(4/10)、CRF01\_AE/B/C 重组占 30.0%(3/10)、CRF01\_AE/C 重组占 20.0%(2/10)和 A1/C 重组占 10.0%(1/10)。研究对象基因型在传播途径和国籍的分布见表 2。

3. 耐药相关突变和耐药株的流行率:50 例样品中,有 1 例(YN14S0055)检测到一个针对蛋白酶抑制剂(PI)的耐药传播相关的突变位点(SDRM),为 M46I(表 3)。该感染者为同性性接触感染,其户籍地为湖南省邵阳市,现居住于德宏州瑞丽市,基因型为 CRF62\_BC。将获得的序列按采样时间排序,第 40 个序列携带 SDRM,根据耐药警戒线调查的统计方法,可判断为 HIV-1 耐药株的低度流行水平(<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。德宏州是云南省艾滋

表 3 YN14S0055 样品耐药株的特征

地区类别	感染途径	基因型	耐药突变位点 <sup>a</sup>			耐药情况
			PIs	NRTIs	NNRTIs	
其他省	同性传播	CRF62_BC	M46I	-	-	L <sup>b</sup> :NFV

注:<sup>a</sup>根据 WHO 2009 版 SDRM 耐药突变位点分析;<sup>b</sup>低度耐药

病流行时间较长的地区,也是云南省艾滋病防治的重点地区。依据 WHO 耐药警戒线调查的方法<sup>[2]</sup>,德宏州从 2009 年起便开展了耐药传播的调查工作<sup>[3-6]</sup>。通过连续的监测,一方面可评价当地的抗病毒治疗工作,另一方面可为其他未开展相关调查的地区提供借鉴,以便科学地开展艾滋病的预防和治疗。

近年来德宏州每年新报告的感染者中,外籍感染者的比例逐年增加,并超过中国籍感染者的比例。本次研究对象中缅甸籍感染者占 66.0%。中国籍和缅甸籍感染者传播途径的构成差异无统计学意义,均以异性性接触传播为主。

本次调查发现了 2 种 HIV-1 亚型和 6 种流行重组形式(circulating recombinant forms, CRFs),以及多种的独特型重组形式(unique recombinant forms, URFs)。以往的系列工作提示德宏州是国内 HIV-1 基因重组的一个热点地区,存在着大量 URFs,并且这些 URFs 已经在人群中传播,成为潜在的流行重组形式<sup>[7-9]</sup>。近年来一些新型 CRFs 从德宏州的感染人群中被鉴定出来,包括 CRF57\_BC<sup>[10]</sup>、CRF62\_BC<sup>[11]</sup>、CRF64\_BC<sup>[12]</sup>和 CRF65\_cpx<sup>[13]</sup>。本次调查在新报告的感染者中发现了 CRF62\_BC 和 CRF64\_BC,证实了其已形成传播。本调查还首次发现了在中国东部地区的 MSM 中鉴定出来的 CRF55\_01B<sup>[14]</sup>,为一名通过异性性接触感染的缅甸籍女性,其来源还有待进一步研究。

根据 2011—2013 年调查的结果,K103N 是该地区主要的耐药传播位点<sup>[3]</sup>,携带该位点的毒株可能来源于治疗人群。本次调查检测到 1 个针对 PI 的耐药突变位点:M46I。携带该耐药位点的是一名来自其他省的 MSM 感染者。M46I/L 在未治疗的 MSM

表 2 德宏州 50 名不同传播途径和国籍的感染者 HIV-1 基因型分布

项目	合计 (%)	基因型 (%)								
		B	C	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	CRF55_01B	CRF62_BC	CRF64_BC	URF
感染途径										
异性传播	36(100.0)	1(2.8)	10(27.8)	10(27.8)	2(5.6)	2(5.6)	1(2.8)	3(8.3)	1(2.8)	6(16.7)
注射毒品	8(100.0)	1(12.5)	0	3(37.5)	0	0	0	0	1(12.5)	3(37.5)
男男性传播	6(100.0)	0	0	1(16.7)	0	2(33.3)	0	2(33.3)	0	1(16.7)
国籍										
中国籍	17(100.0)	1(5.9)	5(29.4)	4(23.5)	1(5.9)	0	0	2(11.8)	1(5.9)	3(17.6)
外籍	33(100.0)	1(3.0)	5(15.2)	10(30.3)	1(3.0)	4(12.1)	1(3.0)	3(9.1)	1(3.0)	7(21.2)
合计	50(100.0)	2(4.0)	10(20.0)	14(28.0)	2(4.0)	4(8.0)	1(2.0)	5(10.0)	2(4.0)	10(20.0)

人群中是一个常见的耐药突变位点,但主要存在于感染CRF01\_AE毒株者中<sup>[15]</sup>。根据全国和昆明市调查结果,MSM人群中主要的基因型为CRF01\_AE<sup>[16]</sup>,而本次调查中发现该人群的基因型主要为与B和C亚型相关的CRF(CRF08\_BC和CRF62\_BC)或URF。因MSM人群的流动性较大,所以MSM可能像早期的静脉吸毒者一样,把新的重组传播到其他地区。本研究第一次在该人群中发现CRF62\_BC。无论该耐药位点是如何产生的,在新的CRF中出现耐药位点,反映了该CRF进化较快。

耐药警戒线调查主要目的是评估耐药传播水平,即新近感染人群中感染了耐药毒株的水平,但目前确定新近感染相对比较复杂,需要结合流行病学资料或者通过实验室的方法(BED检测或抗体亲和力检测),为了简化耐药传播水平的评估方法,满足地区监测的需要,WHO提出了耐药警戒线的调查方法,在这个方法中近似地以<25岁的新发现感染者来代替新近感染人群,近似的前提就是认为低年龄组的感染者暴露于HIV的时间较短。可以说耐药警戒线调查所抽取的样本是一个近似的HIV新近感染样本。但使用该方法开展连续的监测,仍然可反映一个地区耐药传播水平的变化。

本次调查提示德宏州耐药株的流行率属于低度水平。从根本上来说控制耐药传播主要是通过有效的干预来降低危险行为,减少新发感染。鉴于当前该地区报告的外籍HIV感染者增加及发现外来MSM人员耐药的情况,需要采取措施加以控制。针对该地区HIV-1基因的复杂性,需要开展深入的分子流行病学研究,明确传播链,为有效干预提供依据。

利益冲突 无

### 参 考 文 献

- [1] Little SJ, Holte S, Routy JP, et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(6): 385-394. DOI: 10.1056/NEJMoa013552.
- [2] 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: 25-36.
- [3] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.10.025.  
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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.10.025.
- [4] 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. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp134.
- [5] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0004724.
- [6] 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[J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(4): 424-425. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.04.022.  
Ma YL, Duan S, Chen M, et al. Survey on HIV drug resistance transmission in Dehong of Yunnan province in 2009 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(4): 424-425. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.04.022.
- [7] Chen M, Ma YL, Duan S, et al. Genetic diversity and drug resistance among newly diagnosed and antiretroviral treatment-naive HIV-infected individuals in western Yunnan: a hot area of viral recombination in China [J]. *BMC Infect Dis*, 2012, 12(1): 382. DOI: 10.1186/1471-2334-12-382.
- [8] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.09.002.  
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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.09.002.
- [9] Chen M, Yang L, Ma YL, et al. Emerging variability in HIV-1 genetics among recently infected individuals in Yunnan, China [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e60101. DOI: 10.1371/journal.pone.0060101.
- [10] Wei HM, Liu YJ, Feng Y, et al. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF57\_BC) identified from Yunnan, China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014, 30(4): 384-388. DOI: 10.1089/AID.2013.0228.
- [11] Wei HM, His J, Feng Y, et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF62\_BC) in western Yunnan of China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014, 30(4): 380-383. DOI: 10.1089/AID.2013.0235.
- [12] Hsi J, Wei H, Xing H, et al. Genome sequence of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF64\_BC) identified from Yunnan, China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014, 30(4): 389-393. DOI: 10.1089/AID.2013.0234.
- [13] Feng Y, Wei HM, Hsi J, et al. Identification of a novel HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF65\_cpx) composed of CRF01\_AE and subtypes B and C in Western Yunnan, China [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2014, 30(6): 598-602. DOI: 10.1089/AID.2013.0233.
- [14] Han XX, An MH, Zhang WQ, et al. Genome Sequences of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form, CRF55\_01B, Identified in China [J]. *Genome Announc*, 2013, 1(1): e00050-12. DOI: 10.1128/genomeA.00050-12.
- [15] Yang J, Xing H, Niu JL, et al. The emergence of HIV-1 primary drug resistance genotypes among treatment-naïve men who have sex with men in high-prevalence areas in China [J]. *Arch Virol*, 2013, 158(4): 839-844. DOI: 10.1007/s00705-012-1557-7.
- [16] Chen M, Ma YL, Su YZ, et al. HIV-1 genetic characteristics and transmitted drug resistance among men who have sex with men in Kunming, China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87033. DOI: 10.1371/journal.pone.0087033.

(收稿日期:2015-07-11)

(本文编辑:斗智)