

## 陕西省新发现艾滋病感染者 HIV 耐药警戒线调查研究<sup>\*</sup>

任 强,付钰淋,李 华,邹扬帆,张梦妍,张 超,常文辉 (陕西省疾病预防控制中心,西安 710054)

**摘要:**目的 分析新发现且尚未治疗的艾滋病病毒(HIV)感染人群的耐药基因序列,了解陕西省 HIV 耐药毒株的传播情况和流行特点。方法 根据世界卫生组织推荐的艾滋病病毒耐药警戒线调查方法(HIVDR-TS),对 47 例 16~25 岁新确诊 HIV 感染者的阳性血清,用 In-house 方法测定 pol 基因区部分序列,采用在线 CPR 软件判断是否存在传播性耐药基因突变,并提交至美国斯坦福大学 HIV 在线耐药数据库中进行耐药程度分析,使用 MEGA5.0 软件构建进化树,分析亚型。结果 47 份样本中没有发现传播性耐药基因突变,但有 14 份样本发现有与耐药相关的基因突变位点,包括蛋白酶区的 T69N, E138A 和 V179D/E 突变位点,反转录酶区的 A71T/V 和 L101/V 突变位点;其中在 CRF01\_B 亚型的一份样本中出现了 K103R 位点,其与 V179E 存在协同作用,导致对依非韦仑(EFV)和奈韦拉平(NVP)等药物的中度耐药。其余 13 份样本中发现的突变位点或可引起部分药物的低度潜在耐药,没有实际临床意义。基于 pol 区基因型分型,共有四种亚型,其中以 CRF01\_AE 为主(26/47),其次为 CRF07\_BC(17/47)。结论 陕西省 HIV 耐药株流行率<5%,属于低度流行水平,个体治疗前尚不需要进行耐药性检测,同时还需定期进行耐药警戒线调查研究。

**关键词:**艾滋病病毒;耐药基因;耐药警戒线;亚型

中图分类号:R512.91;Q786 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)06-136-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.039

## Investigation on Drug Resistance Threshold of Newly Found HIV Infected Persons in Shaanxi

REN Qiang, FU Yu-lin, LI Hua, ZOU Yang-fan, ZHANG Meng-yan, ZHANG Chao, CHANG Wen-hui  
(Shaanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China)

**Abstract:** Objective To analyze the resistance gene sequences of newly untreated HIV infected people, and to understand the prevalence and epidemic characteristics of HIV drug-resistant strains in Shaanxi Province. **Methods** According to the recommended by the World Health Organization HIV drug resistance threshold (HIVDR-TS), sera from 47 newly diagnosed HIV infected patients aged 16~25 years were analyzed. In-house determination of pol gene partial sequence, using online CPR software to determine whether there was transmission of resistant mutants, and submitted to Stanford University in the United States online HIV drug resistance database for the extent of the drug resistance analysis, the phylogenetic tree was constructed using mega 5.0 software, analysis of subtypes. **Results** No spread drug mutations were found in 47 samples, but there were 14 samples that were found to have associated with resistance gene mutation sites, including the RT region T69N and E138A, V179D/E mutations, PR A71T/V, L101/V mutation sites and in subtype CRF01\_B a like this in the site K103R, with V179E and there was a synergistic effect, resulting in accordance with efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP) drugs such as moderately resistant. The mutations found in the remaining 13 samples would lead to a low degree of resistance to some of the drugs, and there was no clinical significance. **Conclusion** The prevalence rate of HIV resistant strains in Shaanxi province was <5%, which be longed to the low epidemic level. It is not necessary to detect drug resistance before individual treatment, and it is necessary to carry out the investigation of drug resistance.

**Keywords:** human immunodeficiency virus; drug resistance gene; drug resistance threshold; subtype

艾滋病(HIV)耐药严重影响着艾滋病抗病毒治疗的效果<sup>[1]</sup>。近年来,我国部分地区已经出现 HIV 耐药株在新感染的未治疗人群中流行和传播<sup>[2,3]</sup>。陕西省自 2003 年开始对艾滋病感染者和病人进行抗病毒治疗,截止 2014 年年底共有治疗人数 3 620 人,是否有 HIV 耐药株的传播尚不明确。根据世界卫生组织(WHO)推荐的资源最小

化的 HIV 警戒线调查方法(HIV drug resistance threshold survey, HIVDR-TS)<sup>[4]</sup>,即在开展大规模抗病毒治疗的地区,选取 1~4 个相邻近的 HIV 监测点,在 3~6 个月内连续收集 60~70 例新诊断病例作为研究对象,通过 RNA 提取并扩增后至少获得 47 条有效的 pol 区序列,进行传播性耐药株监测,根据结果来确定 HIV 耐药株的流行和传播

<sup>\*</sup> 基金项目:陕西省卫生与计划生育委员会科研基金项目:2012E2。

作者简介:任 强(1983—),男,西安交通大学硕士研究生,主管检验师,研究方向:艾滋病防治与实验室检测。E-mail:175538852@qq.com。

通讯作者:常文辉(1972—),女,博士研究生,副主任医师,艾滋病综合防治,E-mail:429674121@qq.com。

情况。本研究通过此调查方法,监测陕西省未治疗人群中 HIV 耐药毒株流行情况,现将结果报告如下:

## 1 材料和方法

1.1 研究对象 根据 HIVDR-TS,选取陕西省2014年12月~2015年4月期间新确证 HIV 抗体阳性、年龄16~25岁、未服用过艾滋病抗病毒治疗药物的51例 HIV 感染者,并从中成功获得47个样本的有效 pol 区序列。47个样本的年龄主要集中在20~25岁(41/47),以男性感染者为主(46/47),未婚居多(45/47),男男同性性行为传播为主要传播方式(34/47)。

1.2 试剂和仪器 HIV-1 RNA 的提取使用德国 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Mini kit 试剂盒,使用东胜兴业科学仪器有限公司的梯度 PCR 仪 ETC811 进行核酸序列扩增,使用 contig Express, BioEdit 和 MEGA 软件处理目标基因片段。

## 1.3 研究方法

1.3.1 样本采取:使用 EDTA-K<sub>2</sub> 采血管采集研究对象静脉全血 3~5 ml, 4 h 内离心后分装血浆, -80℃ 保存待用。

1.3.2 提取 HIV-1 RNA 后进行反转录和目的基因 PCR 扩增:使用 RT-PCR 和巢式 PCR 方法扩增编码 HIV 蛋白酶区和逆转录酶区的 pol 区基因片段,全长约 1 300 bp。外侧上游引物为 MAW-26: 5'-TGGAATGTGGAAGGAAGGAC-3', 外侧下游引物为 RT-21: 5'-CTGTATTTCTGCTAT-TAAGTCTTTTGA-3', 内侧上游引物为 PRO-1: 5'-CAGAGCCAACAGCCCCACCA-3, 内侧下游引物为 TR-20: 5'-CTGCCAGTTCTAGCTCT-GCTTC-3'。委托北京诺赛基因组研究中心有限公司进行产物纯化及序列测定。

1.3.3 HIV-1 亚型和耐药性分析:测序完成后使用 contig Express 软件进行拼接和编辑,使用 BioEdit 软件进行序列比对,将得到的核酸序列提交至斯坦福大学 HIV 耐药数据库,利用 CPR5.0 系统判断传播性耐药基因突变,采用 HIVdb7.0 系统进行耐药程度和位点的分析。使用 MEGA 软件构建进化树和亚型分析。

1.3.4 HIV 耐药株传播水平分析:根据 HIVDR-TS,在顺序抽样的 47 份样本中判断是否存在传播性耐药基因突变,从而评估 HIV 耐药株的传播水平,并将传播水平<5%归为低流行,>15%为高流行,介于5%~15%之间被认定为中度流行。

## 2 结果

2.1 亚型分析 见表1。以 pol 区构建进化树,共

有4个子树,亚型分别是 CRF01\_AE, CRF07\_BC, CRF01\_B 和 B 亚型。CRF01\_AE (26/47) 和 CRF07\_BC (17/47) 为主要流行亚型,主要在以同性传播和异性传播为感染途径中流行。

表1 47例新确证感染者不同传播途径中的 HIV-1 亚型分布

感染途径	病毒亚型			
	B	CRF01_AE	CRF01_B	CRF07_BC
同性传播	0	19(55.9)	3(8.8)	12(35.3)
异性传播	1(8.3)	7(58.3)	0	4(33.3)
注射毒品	0	0	0	1(100.0)

2.2 耐药检测结果分析 在 HIVdb7.0 系统中分析 47 条序列,发现 14 条序列存在耐药相关的突变位点。在蛋白酶区 (protease region, PR), 除 CRF01\_B 亚型外,在其余亚型的 7 条序列中检测出 A71T/V 和 L10I/V 位点,但这些位点均出现在次要耐药突变位点上,不会导致对蛋白酶抑制剂 (PIs) 的耐药性。在反转录酶区 (reverse transcriptase, RT), 在 CRF01\_AE 亚型的两条序列中检测出 T69N 位点,可引起核苷类反转录酶抑制剂 (NRTIs) 中的去羟肌苷 (DDI) 的潜在低度耐药;在 CRF01\_B 亚型的 3 条序列中检测出 V179E 位点,在 CRF07\_BC 亚型的两条序列中检测出 E138A 和 V179D 位点, V179D/E 可引起非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTIs) 中的依非韦伦 (EFV) 和奈韦拉平 (NVP) 等药物的潜在低度耐药,但潜在低度耐药在进行抗病毒治疗时可被认定为不耐药, E138A 位点可引起依曲韦林 (ETR) 潜在低度耐药和利匹韦林 (RPV) 低度耐药,但这两种药目前在我国都没有使用,不具有实际临床意义。在 CRF01\_B 亚型的一条序列中出现了 K103R 位点,虽然此位点不是耐药位点,但其与 V179E 存在协同作用,导致对依非韦伦 (EFV) 和奈韦拉平 (NVP) 等药物的中度耐药,见表2。

表2 耐药突变位点在各 HIV-1 亚型样本中的分布

亚型	n	RT		PR
		NRTIs	NNRTIs	PIs
B	1			1(A71V)
CRF01_AE	26	2(T69N)		2(L10I)1(L10V)
CRF01_B	3		3(V179E)	
CRF07_BC	17		1(E138A)1(V179D)	1(A71V)1(A71T)1(L10I)

通过与 2009 年 WHO 公布的 HIV 传播性耐药位点列表<sup>[5]</sup>的对比,以上突变在未治疗的 HIV 相关亚型中出现比例超过 0.5%,被认为是多态性基因突变,未纳入传播性耐药基因突变位点。在本次研究中 47 份样本利用 CPR5.0 系统分析,未发现有传播性耐药基因突变,说明陕西省 HIV 耐药株的传播水平<5%,属于低流行水平。

3 讨论 HIV病毒是迄今为止发现的感染人类后最易发生变异的病原体,在其感染的过程中或在进行抗病毒治疗时药物压力作用下,极易导致靶基因发生耐药性突变<sup>[6]</sup>。耐药性突变是导致临床抗病毒治疗失败的主要原因<sup>[7,8]</sup>。由于发生突变的耐药毒株的感染和传播,未经治疗的感染者也有可能耐药,称为原发性耐药。HIVDR-TS主要目的就是掌握未治疗的HIV感染者中感染HIV耐药毒株的情况,以采取相对应的措施,同时起到必要的警示作用。

陕西省定期开展对于抗病毒治疗失败病人(HIV病毒载量 $>1\,000$  copies/ml)的HIV耐药监测工作,但目前尚未对陕西省HIV耐药株的流行情况进行研究。此次使用HIVDR-TS检测出陕西省抽样的47份样本未发现感染传播性耐药的基因突变位点,低于贵州和山东<sup>[2,3]</sup>的研究结果,与江西、重庆和江苏等地<sup>[9~11]</sup>的研究结果相一致,提示陕西省HIV耐药株位于低流行水平,HIV感染者在进行抗病毒治疗前尚不需要进行HIV耐药检测,常规的艾滋病抗病毒治疗一线药物即可满足其疗效。由于此次调查研究仅判断当年陕西省HIV耐药株的流行水平,为了获得相对精准的HIV耐药株的流行,还需要在下一年重复调查加以验证。

在本次调查中,CRF01\_B亚型仅有3例,均发生V179E位点突变,且这3个病例均为男男同性性行为传播,存在感染同来源HIV病毒或相互传播的可能。由于样本量过少,无法判断此亚型在全省男男同性性行为传播中的流行形势,但可以此为切入点,结合流行病学信息,针对男男同性性行为感染艾滋病人群进行耐药监测和分子流行病学调查研究,或可形成此HIV耐药流行株在陕西省的流行方向和趋势。

有研究表明<sup>[12]</sup>,通过连续监测,发现陕西省男男同性性行为感染艾滋病人群的HIV感染率和HIV-1新发感染率均处于较高水平。HIV耐药毒株一旦在此人群中传播,可能会导致新发现的HIV感染者直接感染HIV耐药毒株,在进行抗病毒治疗时需要更换更为昂贵的二线药物,从而导致治疗经费增加。因此,定期对陕西省新发现艾滋病感染者进行HIV耐药警戒线调查,及时发现耐药株及流行状况,通过对目标人群采取相应的干预措施,来达到遏制HIV耐药株流行的目的。

#### 参考文献:

[1] Havlir D, Vella S, Hammer S. The global HIV drug resistance surveillance program: a partnership between WHO and IAS. International AIDS Society[J]. AIDS, 2002, 16(10): 7-9.

- [2] 童毅,邢辉,申莉梅,等. 贵州省2015年HIV耐药警戒线调查[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(15): 100.  
Tong Y, Xing H, Shen LM, et al. Surveillance of HIV drug resistance in Guizhou Province in 2015[J]. Clinical Research and Practice, 2016, 1(15): 100.
- [3] 孙晓光,于海英,苏生利,等. 山东省2013~2015年新发现未治疗HIV-1感染者耐药毒株传播警戒线调查[J]. 中华预防医学杂志, 2017, 51(7): 604-609.  
Sun XG, Yu HY, Su SL, et al. Survey of HIV-1 drug resistance threshold in shandong province in 2013-2015[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2017, 51(7): 604-609.
- [4] World Health Organization. Guidelines for surveillance of HIV drug resistance[R]. Switzerland: Geneva, WHO, 2003; 30-36.
- [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.
- [6] Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS[M]. // Shao YM. Beijing: Science Press, 2000: 289-290.
- [7] Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2): 247-277.
- [8] Beinker NK, Mayers DL, Lange CG, et al. Genotypic drug resistance and cause of death in HIV-infected persons who died in 1999[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2001, 28(3): 250-253.
- [9] 张娜,蒋岩,廖清华,等. 2013年江西省HIV-1耐药警戒线调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(3): 425-428.  
Zhang N, Jiang Y, Liao QH, et al. Drug resistance threshold survey of HIV-1 in Jiangxi province in 2013[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(3): 425-428.
- [10] 周全华,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, 3864.  
Zhou QH, Ling H, Xing H, et al. Survey on the drug resistance threshold of HIV-1 in Chongqing[J]. Modern Preventive Medicine, 2013, 40(20): 3860-3862, 3864.
- [11] 徐晓琴,郭宏雄,胡海洋,等. 江苏省连续三年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.  
Xu XQ, Guo HX, Hu HY, et al. Investigation on HIV-1 drug resistant alert line and epidemic subtype in Jiangsu province for three years[J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Sciences), 2015, 35(9): 1329-1332.
- [12] 任强,常文辉,张梦妍,等. 2009~2014年陕西省艾滋病哨点监测重点人群HIV感染和新发感染检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 56-59.  
Ren Q, Chang WH, Zhang MY, et al. Analysis of HIV infection and new infections detection of AIDS sentinel surveillance focus groups in Shaanxi Province 2009~2014[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 56-59.

收稿日期: 2017-09-28

修回日期: 2017-10-23