

2018 年珠海市 HIV-1 基因型及耐药分析

周兰兰, 魏泉德, 黄辉涛, 李晓凤

珠海市疾病预防控制中心, 广东 珠海 519000

摘要: **目的** 了解 2018 年广东省珠海市新确诊且未接受抗病毒治疗的 HIV-1 抗体阳性病例不同感染途径病毒亚型分布和耐药情况。 **方法** 收集研究对象血浆标本 207 份, 提取病毒 RNA, 采用巢氏 RT-PCR 扩增 HIV-1 多聚酶 pol 区, 测序定型和耐药分析。 **结果** 在男男性行为者中流行基因型为 CRF07_BC (43.3%)、CRF01_AE (36.1%) 和 CRF55_01B (13.4%); 在异性性感染人群优势基因型为 CRF01_AE (52.5%)、CRF07_BC (31.1%) 和 CRF08_BC (6.6%); 在 3 例注射吸毒感染人群检出 CRF01_AE; 有 1 例血源性感染病例检测基因型为 H 亚型; 在 MSM 和异性性感染人群产生低度耐药, 低度耐药率分别为 4.1% 和 4.9%; 在注射吸毒和血源性传播感染人群未检出耐药病例。 **结论** 在经性传播途径感染 HIV-1 多种基因型共同流行, 以 CRF01_AE 和 CRF07_BC 基因型为主; 在四类人群未检出低度以上耐药病例, 总体传播性耐药呈低度流行。

关键词: HIV-1; 感染途径; 基因型; 亚型; 耐药

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)12-1409-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.12.001

Genotypes and drug resistance of HIV-1 in Zhuhai, 2018

ZHOU Lan-lan, WEI Quan-de, HUANG Hui-tao, LI Xiao-feng

Zhuhai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhuhai, Guangdong 519000, China

Abstract: **Objective** To study the genotype distribution and drug resistance of newly-confirmed HIV-1 positive cases without antiretroviral therapy (ART) through different pathways of infection in Zhuhai, Guangdong province in 2018. **Methods** Two hundred and seven plasma samples were collected from the research subjects. Viral RNA was extracted, and HIV-1 pol gene was amplified by nested RT-PCR and sequenced. According to pol gene sequences, the subtype distribution and drug resistance of HIV-1 were analyzed. **Results** The epidemic genotypes in MSM were CRF07_BC (43.3%), CRF01_AE (36.1%) and CRF55_01B (13.4%), and those in heterosexually-acquired HIV infection cases were CRF01_AE (52.5%), CRF07_BC (31.1%) and CRF08_BC (6.6%). CRF01_AE was detected in three injecting drug users, and H subtype in one case of blood-borne infection. HIV-1 infection in MSM and heterosexually-acquired HIV infection cases showed low drug resistance, with the low drug resistance rates of 4.1% and 4.9%, respectively. No drug resistance case was detected in the injecting drug users and the blood-borne infection case. **Conclusions** CRF01_AE and CRF07_BC were predominant in sexually transmitted HIV-1 infections, and many other genotypes were prevalent together. Intermediate and high-level resistance cases were not detected in the above-mentioned four kinds of populations. Transmissible drug resistance rate was generally low in Zhuhai.

Keywords: HIV-1; pathway of infection; genotype; subtype; drug resistance

HIV 在 1981 年首次被发现后, 在全世界广泛传播流行。目前主要传播途径已经从注射吸毒转变为经性传播, 在广东珠海又以男男性行为 (man have sex with man, MSM) 传播为主^[1]。HIV 分为两个型别 HIV-1 和 HIV-2, 在我国流行的主要为 HIV-1, HIV-1 极易发生变异, 产生对药物的耐受, 甚至发生基因间重组, 产生新的流行重组形式。HIV-1 基因型复杂, 基因型

分布具有地域特征和人群特点, 为分析珠海市不同感染途径 HIV-1 基因亚型分布特征、基因突变和抗病毒药物耐受情况, 获得珠海市 HIV-1 感染者传播性耐药率, 评估 HIV-1 基因耐药株在珠海的产生及累计水平, 现对 2018 年新确诊且未接受抗病毒治疗的 HIV-1 病例进行分子水平和耐药研究。

1 对象与方法

1.1 对象 2018 年经珠海市疾病预防控制中心艾滋病确证实验室采用蛋白印迹试验新确诊并且未接受抗病毒治疗 HIV-1 抗体阳性者; 检测方法和实验结果的

基金项目: 珠海市科技计划医疗卫生项目 (ZH202200071HJL)

作者简介: 周兰兰 (1982-), 女, 硕士, 副主任技师, 研究方向: 传染病检测。

判断依据《全国艾滋病检测技术规范》(2015 年修订版)。

1.2 方法 收集 2018 年 HIV-1 抗体阳性者血浆标本,1 周内进行检测的存放于 4℃,超过一周-70℃冰箱保存,并从国家艾滋病综合防治信息系统查询标本流行病学信息。

1.2.1 病毒 RNA 提取 严格按照德国 QIAGEN 公司生产的 QLAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒说明书,从 140 μl 标本中提取病毒 RNA,将获得 60 μl RNA 模板保存于-70℃。

1.2.2 RT-PCR 扩增 参照文献合成扩增和测序引物,见表 1。采用巢氏 RT-PCR 扩增 HIV-1 多聚酶 pol 区蛋白酶(protase, PR)基因全序列和逆转录酶(reverse transcriptase, RT)基因部分序列^[2-3]。第一轮 RT-PCR 外引物扩增以 RNA 为模板,使用 MAW-26 和 RT-22 引物,按照宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa One Step RNA PCR Kit 说明书要求配置反应体系和设置反应条件。第二轮 PCR 内引物扩增取 5 μl 外引物扩增产物的 1:10 稀释液作为模板,以 PRO-1 和 RT-20 为引物,按照宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa Taq 说明书配制反应体系和设置反应条件,退火温度设置 56.5℃。

表 1 HIV-1 扩增和测序引物

引物名称	碱基序列(5' to 3')
MAW-26	TGGAATGTGGAAGGAAGGAC
RT-22	TTCTGTATTTCTGCTATTAAGTCTTTTGATGG
PRO-1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA
RT-20	CTGCCAGTCTAGCTCTGCTTC
PROS3	GCCAAACAGCCCCACCA
RTAS	CTCAGATTGGTTGCAC
RTBS	GTATAACAATGAGACAC
PROC1S	GCTGGCTGTGCTATTCC
RT20S3	GTTCTAGCTCTGCTTC

1.2.3 测序和序列拼接 内引物扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,预期目的基因片段为 1 316 bp,阳性扩增产物送广州艾基生物公司使用测序引物 PROS3、RTAS、RTBS、PROC1S 和 RT20S3 同时测序。利用 DNASTar 软件中 SeqMan 功能对每个样本测出的序列片段进行编辑、校对和拼接。

1.2.4 HIV-1 基因型和耐药分型 使用美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库网站(<http://hivdb.stanford.edu>)中 HIVdb PROGRAM 下的 ANALYZE SEQUENCES 功能对拼接好的序列进行分析,确定 HIV-1 基因型,明确耐药突变位点、耐药类型和耐药程度^[4]。耐药类型

包括对阿扎那韦(atazanavir/r, ATV/r)、达鲁那韦(darunavir/r, DRV/r)和洛匹那韦(lopinavir/r, LPV/r)三种蛋白酶抑制剂(protase inhibitors, PIs),阿巴卡韦(abacavir, ABC)、齐多夫定(zidovudine, AZT)、恩曲他滨(emtricitabine, FTC)、拉米夫定(lamivudine, 3TC)和替诺福韦(tenofovir, TDF)五种核苷酸类反转录酶抑制剂(nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs),以及多拉维林(doravirine, DOR)、依非韦伦(efavirenz, EFV)、依曲韦林(etravirine, ETR)、奈韦拉平(nevirapine, NVP)和利匹韦林(rilpivirine, RPV)五种非核苷酸类反转录酶抑制剂(non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs)药物敏感性。耐药程度分四类:潜在耐药(potential low-level resistance, P),低度耐药(low-level resistance, L),中度耐药(intermediate resistance, I)和高度耐药(high-level resistance, H)^[4]。本研究仅分析低度及以上耐药,不包括潜在耐药。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 18.0 统计学软件描述性分析 HIV-1 基因型及耐药情况。

2 结果

2.1 病例基本信息 共收集到 207 份新确诊并且未接受抗病毒治疗 HIV-1 抗体阳性样本,扩增、测序和拼接成功后可用于分析的样本 162 份(78.3%)。在 162 份样本病例中,平均年龄 38.6 岁(12~78 岁);男性 142 例(87.7%),女性 20 例(12.3%);未婚 85 例(52.5%),已婚有配偶 54 例(33.3%),离异或丧偶 23 例(14.2%);大专及以上学历 53 例(32.7%),高中或中专 32 例(19.8%),初中 52 例(32.1%),小学 22 例(13.6%),文盲 3 例(1.9%);商业服务 71 例(43.8%),家政、家务及待业 44 例(27.2%),工人 20 例(12.3%),学生 6 例(3.7%),农民、餐饮食品业、干部职员、离退人员、民工及其它共 21 例(13.0%);感染途径 MSM 传播 97 例(59.9%),异性性行为 61 例(37.7%),注射吸毒 3 例(1.9%),血液 1 例(0.6%)。

2.2 HIV-1 基因亚型分布特点 对 162 份样本分型共获得 9 种基因型,按照检出率从高到低排列为 CRF01_AE 型 70 例(43.2%)、CRF07_BC 型 61 例(37.7%)、CRF55_01B 型 16 例(9.9%)、CRF08_BC 型 5 例(3.1%)、B 型 5 例(3.1%)、C 型 2 例(1.2%)、CRF52_01B 和 CRF68_01B 以及 H 型各 1 例(0.6%)。在 MSM、异性、注射吸毒和血源性感染途径中 HIV-1 基因型分布,见表 2。

表 2 162 例珠海市不同感染途径 HIV-1 基因型分布(n,%)

感染途径	基因型分布								
	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF55_01B	CRF08_BC	B	C	CRF52_01B	CRF68_01B	H
MSM	35(36.1)	42(43.3)	13(13.4)	1(1.0)	4(4.1)	1(1.0)	0(0.0)	1(1.0)	0(0.0)
异性	32(52.5)	19(31.1)	3(4.9)	4(6.6)	1(1.6)	1(1.6)	1(1.6)	0(0.0)	0(0.0)
注射吸毒	3(100.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
血源性	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	1(100.0)

2.3 HIV-1 基因耐药突变 162 份样本中共 32 例样本检测到耐药突变,总体突变率 19.8%(32/162),均为单耐药位点突变。在 MSM 传播途径中检出 23 例,该组的突变率为 23.7%(23/97),其中 NNRTIs 突变率 20.6%(20/97),NRTIs 突变率 2.1%(2/97),PI 次要耐药突变率 1.0%(1/97);在异性传播中检出 9 例,该组的突变率 14.8%(9/61),其中 NNRTIs 突变率 13.1%(8/61),PI 主要耐药突变率 1.6%(1/61);在注射吸毒组 3 例和 1 例血源性感染样本中未检出耐药突变。在 MSM 和异性感染途径中 HIV-1 基因突变分布和突变率,见表 3。

感染途径	突变区域	突变位点	突变例数(例)	突变率(%)
MSM(<i>n</i> =92)	NNRTI	V179E/D	16	16.5
		K103Q	2	2.1
		V106I	1	1.0
		E138G	1	1.0
	NRTI	K70E/N	2	2.1
	PI 次要耐药突变	Q58E	1	1.0
异性(<i>n</i> =61)	NNRTI	V179E/D	5	8.2
		V106I	3	4.9
	PI 主要耐药突变	M46L	1	1.6

2.4 样本耐药率 32 例检测到耐药突变的样本中,有 7 例呈低度耐药,无中度和高度耐药病例,总体传播性耐药率 4.3%(7/162)。在 97 例 MSM 人群低度耐药率 4.1%(4/97),对 NNRTIs 和 NRTIs 低度耐药各 2 例,其中 2 例分别对 NNRTIs 类药 DOR 和 RPV 低度耐受,另 2 例同时对 NRTIs 类药 ABC 和 TDF 低度耐受;在 61 例异性感染人群低度耐药率 4.9%(3/61),3 例对 NNRTI 类药 DOR 低度耐受;3 例注射吸毒和 1 例血源性病例没有检出低度及其以上耐药。

3 讨论

广东省珠海市是重要的港口旅游城市,与澳门相连,人员流动大,由于澳门为世界旅游休闲中心,以全球博彩旅游而闻名,这给珠海市疾病控制工作带来更大的挑战。1996 年珠海市报告首例 HIV-1 感染者后,近二十年来年新报告病例数呈现逐年上升趋势。在 2018

年新确诊且未接受抗病毒治疗的 HIV-1 病例中,男女之比 7.1:1,以未婚和商业服务为主,主要传播途径由经异性性传播转变为 MSM 传播,珠海市 2016 年新报告病例中经 MSM 传播占 61.8%^[1],2018 年占 59.9%,这可能由于特区经济发达,与澳门交往频繁,思想观念开放。

本研究发现珠海市 2018 年主要流行基因型为 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF55_01B 和 CRF08_BC 型,优势基因型构成与李扬对 2015 年中国部分地区 16~25 岁 HIV-1 感染者研究结果一致^[5]。在 MSM 传播人群流行基因型前三为 CRF07_BC、CRF01_AE 和 CRF55_01B。于国龙等^[3]研究 2013 年 MSM 人群 HIV-1 感染者优势基因型为 CRF01_AE、CRF_BC 和 B 亚型,当时 BC 亚型包括 07BC 和 08BC 亚型,没有检测到 CRF55_01B。吴昊等^[6]研究 2015 年广州市 MSM 人群 HIV-1 优势基因型与本研究一致,而且 CRF55_01B 检出率为 14.0%,与 13.4% 检出率很接近。CRF55_01B 由 CRF01_AE 和 B 亚型重组而成,起源于深圳,在 2013 年被首次报道,主要存在于 MSM 人群,已经扩散到异性感染人群中^[7-9]。在异性感染人群优势基因型依次为 CRF01_AE、CRF07_BC 和 CRF08_BC,CRF55_01B 检出率 4.9%,位居第四,这正表明 CRF55_01B 已经传播到异性感染人群。在注射吸毒感染人群仅检出 CRF01_AE 基因型,这与孔东锋等^[10]对深圳市 2007—2010 年吸毒人群以 CRF01_AE(占 66.0%)和 CRF07_BC(占 19.1%)为主的研究结论不完全一致,分析原因可能是在本研究中注射吸毒病例数太少所致。另有 1 例血源性感染病例检测基因型为 H 亚型,流调发现病人是一位长期居住在非洲的中国人,为输入性病例。目前 H 亚型在国内未见报道,不同文献报道的血源性感染病例基因型分布也不同^[2,10-11]。

从总体来看,耐药突变呈单个耐药位点突变特点,以 NNRTIs 最高,其次为 NRTIs,与文献报告一致^[12-13]。总体耐药形式呈低度耐药,无中度和高度耐药,传播性耐药率 4.3%,属于低度流行水平。MSM 人群低度耐药率 4.1%,这与于国龙等 2013 年 MSM 人群中 HIV-1 感染者低度耐药 4.1%的研究一致;异性性感染人群低度