

河南省 26 例 HIV 感染长期不进展者病程进展及耐药情况

薛秀娟 田随安 朱谦 孙定勇 王哲

【摘要】 目的 分析河南省 HIV 感染长期不进展人群 3 次随访过程中病程进展情况及耐药情况。方法 于 2009 年 5 月,选取河南省艾滋病重点疫情地区尉氏、上蔡、临颖县为研究现场,招募 26 例既往采供血途径感染 HIV、感染时间 >10 年、未接受抗逆转录病毒治疗、CD4⁺T 淋巴细胞计数 ≥ 350 个/ μl 并未出现艾滋病典型症状的长期不进展者。采用队列分析方法,自 2009 年开始每两年随访 1 次,连续随访 3 次。收集感染途径、感染时间等流行病学信息。每次随访均采集研究对象 10 ml 乙二胺四乙酸抗凝全血,共采集 78 份。分析 2009—2014 年期间 CD4⁺T 淋巴细胞计数、病毒载量、病毒基因的变化情况。采用 in-house 方法,探讨长期不进展人群的原发耐药状况。采用非参数 Kruskal-Wallis 检验比较不同随访时间研究对象 CD4⁺T 淋巴细胞计数和病毒载量变化。**结果** 26 例研究对象的年龄为 (48.51 ± 6.75) 岁,感染时间为 (13.42 ± 4.26) 年。3 次随访中,CD4⁺T 淋巴细胞计数的 $P_{50}(P_{75} \sim P_{25})$ 分别为 573.5 (487.4 ~ 789.8)、499.8 (403.5 ~ 635.7) 和 418.8 (297.6 ~ 537.8) 个/ μl ($H=63.99, P<0.001$), 病毒载量自然对数的 $P_{50}(P_{25} \sim P_{75})$ 分别为 3.93 (3.43~4.55)、4.29 (3.78~4.75)、4.50 (4.01~4.81) ($H=3.19, P=0.355$); HIV 亚型及系统进化分析显示,感染者以 B 亚型为主,占 88.5% (23/26), 3 例出现重组变化。18 例病毒载量 >1 000 拷贝/ml 的感染者中,有 2 例出现中高度耐药。**结论** 河南省长期不进展人群 CD4⁺T 淋巴细胞计数有逐年下降的趋势,少数感染者病毒亚型出现重组变化,同时存在原发耐药现象。

【关键词】 HIV; 抗药性; 病毒亚型

基金项目: 河南省医学科技攻关计划省部共建项目 (2011010016); 国家十二五科技重大专项 (2012ZX10001-006); 河南省疾病预防控制中心科研基金课题; 河南省防治艾滋病规模化现场流行病学和干预研究 (2012ZX10004905)

Detection and analysis of 26 cases of long-term non-progressors who infected HIV in Henan province Xue Xiujuan, Tian Suian, Zhu Qian, Sun Dingyong, Wang Zhe. Center for AIDS/STD Control and Prevention, Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Wang Zhe, Email: wangzhe@hncdc.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the progression and drug resistance of long-term non-progressors during three follow-up in Henan province. **Methods** In May 2009, 26 cases of long-term non-progressors were recruited who infected HIV more than 10 years with blood collection and supply routes, did not receive anti-retroviral therapy, CD4⁺T lymphocyte count ≥ 350 / μl and did not show typical symptoms of AIDS from Weishi, Shangcai, and Linying of Henan Province. Continuous follow-up were conducted three times since 2009 every two years with cohort analysis, the epidemiological information of infection routes, infection time and blood were collected, and 78 parts of 10 ml EDTA anticoagulated whole blood were collected. The changes of CD4⁺T lymphocytes, viral load, and virus gene variety were characterized from 2009 to 2014. In-house methods were used to explore primary drug resistance of long-term non-progressors. Nonparametric Kruskal-Wallis test were used to compare CD4⁺T lymphocyte count and viral load changes during different follow-up times. **Results** The average age and infection time of 26 cases were (48.51 ± 6.75) years, (13.42 ± 4.26) years, respectively. Three follow-up times, CD4⁺T lymphocyte count $P_{50}(P_{25} \sim P_{75})$ was 573.5 (487.4~789.8), 499.8 (403.5~635.7), and 418.8 (297.6~537.8)/ μl ($H=63.99, P<0.001$), respectively. And natural logarithm of viral load $P_{50}(P_{25} \sim P_{75})$ were 3.93 (3.43~4.55),

DOI: 10.3760/ema.j.issn.0253-9624.2016.02.008

作者单位: 450016 郑州, 河南省疾病预防控制中心性病艾滋病防治研究所

通信作者: 王哲, Email: wangzhe@hncdc.com.cn

4.29 (3.78-4.75), 4.50 (4.01-4.81) ($H=3.19, P=0.355$), respectively. Subtype and phylogenetic analysis of HIV showed that prevalent cases were B subtype, accounting for 88.5% (23/26), and three cases showed restructuring changes. Two cases appeared highly resistant of 18 infected patients whose viral load >1 000 copies/ml. **Conclusion** The CD4⁺T lymphocyte had a declining trend, virus subtype recombinant changes in a few cases, and primary drug resistance was found of long-term non-progressors in Henan province.

【Key words】 HIV; Drug resistance; Virus subtype

Fund program: Medical science and technology research programs and Province Ministry Project in Henan (2011010016); National Major Projects of Infectious Disease in Science and Technology “Twelfth Five-Year Plan” of China(2012ZX10001-006); Henan CDC research fund project; Scale epidemiological studies and intervention of Aids-Prevention in Henan Province(2012ZX10004905)

根据艾滋病病程的进展特征分析,感染 HIV 8~10 年后,大部分感染者进入艾滋病期需接受抗病毒治疗,仅少部分个体能保持较好状态,CD4⁺T 淋巴细胞维持在正常水平,未出现艾滋病典型症状,病程呈现长期不进展状态^[1]。河南省作为我国艾滋病预防控制的重点地区之一,全省流行病学调查发现,目前存在部分于 1995 年左右因既往采供血途径感染、至今未接受抗病毒治疗的 HIV 感染者,这部分人群免疫水平较高,病毒载量处于较低水平,为典型的长期不进展人群(long-term nonprogressors, LTNP)^[2]。随着感染时间的延长及抗病毒治疗标准的变化^[3-4],不断有更多的感染者接受治疗,这部分 LTNP 数量将不断减少,队列的维持也面临临床治疗的挑战。本研究对部分既往采供血途径感染 HIV 的 LTNP 进行连续几年的跟踪随访,通过分析这部分特殊病例的免疫水平和病毒载量整体变化情况,发现病毒的变异进化情况,为 HIV 感染 LTNP 形成的机制研究提供参考数据。

对象与方法

1.对象:于 2009 年 5 月,选取河南省艾滋病重点疫情地区尉氏、上蔡和临颍县为研究场所,按以下纳入标准进行 LTNP 的招募和建立。LTNP 纳入标准:经既往采供血途径感染,HIV 确证实验阳性,感染时间>10 年,未接受抗病毒治疗,免疫状况较好(CD4⁺T 淋巴细胞计数≥350 个/μl),临床未出现艾滋病典型症状,自愿接受调查并签署书面知情同意书。本研究获河南省 CDC 伦理委员会审核通过(批号:20110415)。

2.CD4⁺T 淋巴细胞计数及病毒载量检测:采用队列分析方法,自 2009 年开始每两年随访 1 次,连续随访 3 年。收集感染途径、感染时间等流行病学信息。每次随访均采集研究对象 10 ml 乙二胺四乙酸(eathylene diamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝

全血,分离 2 ml 全血于 6 h 内采用 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司)进行 CD4⁺T 淋巴细胞计数检测。其余 8 ml 以 3 000×g 离心 10 min 后分离血浆,使用 NucliSens[®] EasyQ 病毒载量试剂盒(法国生物梅里埃公司)进行病毒载量检测,剩余血浆-80 ℃ 保存备用。

3.PCR 扩增:对 26 例研究对象 3 次随访的 78 份血浆样本进行检测。采用德国 QIAGEN 公司 QIAamp[®]Viral RNA Mini Kit 试剂盒,按试剂盒说明书操作进行血浆病毒 RNA 的提取和纯化。采用 Takara 公司(大连宝生物工程有限公司)试剂盒(One Step RNA PCR Kit)进行逆转录 PCR 扩增 HIV 毒株 gag 基因区。第 2 轮扩增采用 Takara 公司 Premix Ex Taq Version 2.0 试剂盒。扩增引物见表 1。扩增阳性序列委托北京博迈德生物技术有限公司完成测序工作。

表 1 HIV 毒株 gag 基因区扩增引物序列

引物名称	引物序列 (5'~3')	位置 (bp) ^a
<i>gag</i> -1	TGTGGAATACTCTAGCAGTGG	617~638
<i>gag</i> -2	TGACTAGCGGAGGCTAGAAGG	763~783
<i>gag</i> -3	TTGCYCCTATCAATTTTGGTTTCC	2 377~2 401
<i>gag</i> -4	TAATGCTTTTATTTTTYTCYTCTGTCATGGC	2 681~2 712

注:^a以 HXB2 为参考株

4.HIV 毒株亚型及基因进化分析:利用 chromas 软件对测序结果进行初步评价,Contig Express 软件进行序列拼接和编辑,BioEdit 软件用于序列的校对、整理和比对分析。HIV 分型参考株序列来自美国 Los Alamos 国家实验室 HIV 核酸序列库(Los Alamos HIV database: <http://www.hiv.lanl.gov>),使用 Los Alamos HIV database 的 HIV-BLAST 软件和美国 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)提供的在线分析工具,对获得序列进行在线比对,根据比对结果判定序列所属 HIV 基因亚型。以 Ref.B.TH.90.BK132. AY173951、Ref.B.FR.83.HXB2 LAI IIIB BRU.

KO3455、Ref.B.CN.00.671 00T36.AY423387 和 Ref.08 BC.CN06.OX2.HM067748 等 4 种标准参考株为参照,将得到的 HIV 毒株 *gag* 基因区序列与国内、外相近的国际参考株比较,用 MEGA 6 软件中 Neighbor-Joining 系统进行进化树构建和分析,使用 Distance 程序进行基因离散率分析。

5. 原发耐药分析:选择第 3 次随访病毒载量 $>1\ 000$ 拷贝/ml 的对象,参照文献[5-7]的方法进行 in-house 基因型耐药检测。对测序后的 HIV 毒株 *pol* 基因区扩增片段使用 Vector NIT advance 10 软件进行序列的编辑及拼接,用 BioEdit 软件与标准株进行比对和矫正。最终序列提交美国斯坦福大学 HIV 耐药数据库 (<http://hivdb.stanford.edu>) 进行 HIV 耐药相关突变和耐药性分析。对病毒载量 $<1\ 000$ 拷贝/ml,或病毒载量 $>1\ 000$ 拷贝/ml 但未检出耐药的研究对象则认为不耐药。

6. 统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行数据双录入,核对无误后进行统计学分析。采用非参数 Kruskal-Wallis 检验比较不同随访时间的 CD4⁺T 淋巴细胞计数和病毒载量变化,计算 *H* 值。采用方差分析比较 3 次随访过程中 *gag* 基因区离散率的变化。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:26 例研究对象的年龄为 (48.51 ± 6.75) 岁,感染时间为 (13.42 ± 4.26) 年;男性占 65% (17 例),女性占 35% (9 例);感染途径单一,均为既往采样供血途径感染;职业均为农民;高中以上文化程度者占 15% (4 例),初中/小学及以下者占 85% (22 例)。

2. CD4⁺T 淋巴细胞计数和病毒载量变化:26 例研究对象 3 次随访的 CD4⁺T 淋巴细胞计数的 P_{50} ($P_{25}\sim P_{75}$) 分别为 573.5 ($487.4\sim 789.8$)、 499.8 ($403.5\sim 635.7$) 和 418.8 ($297.6\sim 537.8$) 个/ μl ($H=63.99$, $P<0.001$);病毒载量自然对数的 P_{50} ($P_{25}\sim P_{75}$) 分别为 3.93 ($3.43\sim 4.55$)、 4.29 ($3.78\sim 4.75$)、 4.50 ($4.01\sim 4.81$) ($H=3.19$, $P=0.355$)。

3. HIV 毒株 *gag* 和 *pol* 基因区基因扩增和测序情况:对 78 份样本进行 *gag* 基因区扩增,最终得到 70 条 *gag* 基因区完整序列,扩增效率为 89.7% (70/78)。第 3 次随访检测显示,26 例研究对象中有 19 例病毒载量 $>1\ 000$ 拷贝/ml,对该 19 例研究对象进行 *pol* 基因区基因型耐药检测,最终 18 例样本扩增测序成功。

4. HIV 毒株亚型变化及突变位点分析:应用美国 Los Alamos 实验室 HIV 核酸序列库初步对 3 次随访的亚型分析发现,第 1 次亚型分析全部为 B 亚型,第 2 次随访发生亚型改变的有 2 例,第 3 次累计出现 5 例亚型改变(含之前的 2 例)。对可疑样本进行重新测序后以排除序列原因,最终发现有 3 例研究对象发生亚型变化(编号为 14, 13, 9)。对以上 3 例进行网上基因比对分析发现 *gag* 基因区出现重组变化,突变区域集中在 301~600 和 201~500 bp 位置,突变亚型为 CRF08_BC。以国际标准株 HXB-2 序列为参照,将以上 3 例样本与 HIV Database 中的国际参考株进行比对寻找变异位点,结果发现突变区域分别为 *gag-p17* (对照 HXB-2 位置 790~1 186 bp) 1 065~1 073 bp 区域插入 TACTATTTT 序列;*gag-p24* (对照 HXB-2 位置 1 186~1 879 bp) 1 645~1 649 bp 区域 CCCAG 碱基突变为 TGTTT; 1 859~1 871 bp 突变前 CAGAAT--GCGAA 到突变后 TAGCTCCCTGCTT。亚型分析显示突变亚型为 CRF08_BC。

5. 遗传进化分析及基因离散率情况:3 次随访显示,78 份样本大多聚集在一起。总体显示以 TH_B 和 CN_B 两种亚型为主,少数 CRF08_BC 亚型(编号为 14, 13, 9)并存。详见图 1。基因离散率分析显示,3 次随访总体离散率分布为 9.6 ± 0.6 、 9.8 ± 0.4 和 10.6 ± 0.4 ($F=0.49$, $P=0.783$)。

6. 原发耐药分析:18 例扩增成功的病毒载量 $>1\ 000$ 拷贝/ml 的研究对象中,有 2 例出现中高度耐药。其中 1 例出现对多种核苷类反转录酶抑制剂 (NRTIs) 耐药的 TAMs-1 突变,包括 M41L、L210W、T215Y 和 D67N,导致对齐多夫定 (zidovudine, AZT)、司他夫定 (Sanilvudin, d4T) 的高度耐药和去羟肌苷 (didanosine, DDI)、替诺福韦 (tenofovir, TDF) 中度耐药。另 1 例的 G190S 导致对非核苷类反转录酶抑制剂 (NNRTIs) 依非韦伦 (efavirenz, EFV), 奈韦拉平 (nevirapine, NVP) 的高度耐药。

讨 论

本研究选择的 26 例研究对象具有感染时间一致、感染途径相同、感染地区集中等特点,在最大程度上降低了宿主遗传背景等差异对结果分析的影响^[8]。CD4⁺T 淋巴细胞数和病毒载量作为反映研究对象免疫功能水平、监测疾病进程的两个重要实验

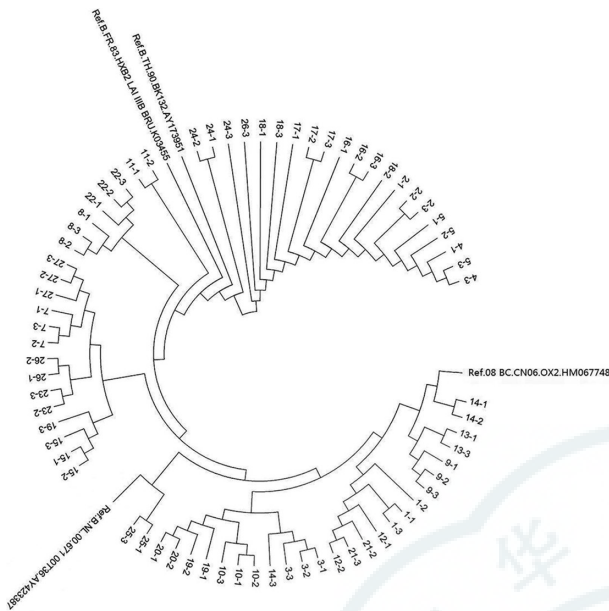


图 1 河南省 HIV 感染长期不进展者 3 次随访的 HIV 毒株系统进化分析图(n=26)

室检测指标,本研究通过对 26 例 LTNP 进行连续随访检测发现,这部分人群在体内病毒控制良好的前提下,CD4⁺T 淋巴细胞绝对计数水平随感染时间的延长有下降趋势,此现象与以往相关调查结论相一致^[9]。然而对这部分免疫细胞虽然呈下降水平,但整体维持在增殖与凋亡的动态平衡的感染者抗病毒机制研究有重要意义。后续将进一步加强该人群的定期随访监测,及时发现 LTNP 的病程进展状况,了解长期生存状况及其影响因素,从现场调查角度为 LTNP 的致病机制研究提供素材。

HIV 病毒由 *gag*、*pol*、*env* 3 个结构基因组成,由于 3 个基因片段在结构、功能和保守区域均不相同,在分子生物学分析时对各结构基因片段选择有所区别^[10]。为探讨病毒在宿主体内潜伏近 20 年的变异情况,本研究选择 *gag* 基因片段进行亚型分析,以发现 LTNP 中体内病毒的变化重组情况。结果显示大部分样本序列的同源性很高,系统进化树分析表明各样本 3 次随访大多聚集在一起,总体以 TH_B 和 CN_B 两种亚型为主。回顾性分析可能来源于同一传染源,并且可能存在相互感染现象。对出现亚型改变的 3 例样本分析显示,变异位点集中在 *gag-p17* 和 *gag-p24* 基因编码区域,该突变区域与以往报道相一致^[11]。然而这种变异与 LTNP 逃避机体免疫压力的能力及适应性的变化有待进一步研究^[12]。由于 HIV 为逆转录病毒,在整个转录过程中表现出很高的碱基错配频率,高突变率加上病毒的高速复制,随着感染时间的延长导致出现与之前调

查不同的结果^[13]。然而有研究对异性传播人群体内病毒重组进化分析,发现与之前感染菌株不同的独特的重组形式^[14]。而本研究发现的 3 例重组亚型 CRF08_BC,形成原因为病毒本身变异或与其他毒株重组而成,有待进一步调查研究。由于本次亚型分析结果主要与既往的大样本量流调数据进行比较,无法追溯本研究中个体的早期分型依据,影响了对个体数据的综合分析。

此外对 *pol* 基因区进行基因型耐药检测发现 2 例研究对象出现中高度耐药,这种未治疗人群中存在原发耐药现象在其他调查中也有类似的发现^[15]。该结果进一步警醒需要加强治疗前人群的耐药监测,探讨耐药传播的风险因素和目前一线抗病毒治疗存在的隐患,分析其发生原因,为艾滋病预防控制提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] Thèze J, Chakrabarti LA, Vingert B, et al. HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression[J]. Clin Immunol, 2011, 141(1):15-30. DOI:10.1016/j.clim.2011.07.007.
- [2] Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut[J]. Top HIV Med, 2007, 15(4): 114-117.
- [3] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2008.
- [4] 张福杰. 国家免费艾滋病抗病毒药物治疗手册[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2012.
- [5] 耿庆茂, 李韩平, 辛天义, 等. 对 in-house HIV-1 基因型耐药性检测方法的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(9):849-854. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2011.09.018.
- [6] Zhong P, Pan Q, Ning Z, et al. Genetic diversity and drug resistance of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains circulating in Shanghai[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007, 23(7): 847-856.
- [7] Liao L, Xing H, Shang H, et al. The prevalence of transmitted antiretroviral drug resistance in treatment-naive HIV-infected individuals in China[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 53 Suppl 1: S10-14. Doi: 10.1097/QAI.0b013e3181c7d363.
- [8] Casado C, Colombo S, Rauch A, et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression [J]. PLoS One, 2010, 5(6): e11079. DOI: 10.1371/journal.pone.0011079.
- [9] 薛秀娟, 孙国清, 刘春华, 等. 河南省 HIV 感染长期不进展者随访研究[J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(8):684-687. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.08.007.
- [10] Li Z, Yang Y, Wei J, et al. Comparison between different gene and near full-length genome on the phylogenetic analyses of HIV-1 subtype B' in China[J]. Bing Du Xue Bao, 2012, 28(4): 366-371.
- [11] 宋艳辉, 邢辉, 王哲, 等. 河南和新疆地区 HIV-1 毒株 gp120 和 gag 基因的变异分析[J]. 中国艾滋病性病, 2007, 13(5): 405-408. DOI:10.3969/j.issn.1672-5662.2007.05.001.
- [12] Gijsbers EF, van Nuenen AC, Schuitemaker H, et al. Gag sequence variation in a human immunodeficiency virus type 1

transmission cluster influences viral replication fitness[J]. *J Gen Virol*, 2013, 94(Pt 2): 354-359. DOI: 10.1099/vir.0.048371-0.

[13] 赵飞,王哲,朱谦,等.河南省人免疫缺陷病毒 1 型流行现状研究[J]. *中华流行病学杂志*,2009,30(3):231-234.DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.006.

[14] Chen M, Ma Y, Yang C, et al. The combination of phylogenetic analysis with epidemiological and serological data to track HIV-1 transmission in a sexual transmission case

[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119989. DOI: 10.1371/journal.pone.0119989.

[15] 薛秀娟,洪坤学,崔为国,等.河南省部分地区 HIV 感染原发耐药状况[J]. *中华预防医学杂志*,2012,46(11):992-994.DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2012.11.007.

(收稿日期:2015-09-01)

(本文编辑:梁明修 吕相征)

·文献速览·

人体微生物组:精准医疗研究领域被忽视的人体“器官”

Yujing Bi, Nan Qin, Ruifu Yang. Human microbiota: a neglected “organ” in precision medicine[J/OL]. *Infect Dis Transl Med*, 2015, 1(2), Online first.

微生物组在维持人体健康过程中扮演着重要的角色,这一观点逐渐为广大学者所认可。人体微生物组应该被视为如心脏、肺脏、肝脏、肾脏等一样的重要器官。2015年,美国总统奥巴马提出启动精准医疗计划,自此,精准医疗领域研究成为了热门话题。在精准医疗研究领域,人体微生物组对人体健康的影响却被忽视了。

Yujing 等综述了人体微生物与健康相关关系的研究进展,并将微生物与精准医疗两个时下科研热点相联系,对微

生物组在精准医学研究领域中的重要角色进行讨论。作者从“人体微生物组与微生物基因组”、“精准医疗和个体化医疗”、“人体微生物组与健康”、“微生物组是人体内易于调控的‘器官’”、“人体微生物组:精准医疗的理想靶标”等5个方面进行了讨论总结,提出了人体微生物组在精准医疗领域中需要解决的问题,并对未来研究趋势进行了展望。

(梁明修编译 中华医学会《中华预防医学杂志》编辑部)

抗体-抗生素缀合物消灭金黄色葡萄球菌

Lehar SM, Pillow T, Xu M, et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. Aureus*[J]. *Nature*, 2015, in press.

作为一种细胞外的病原体,金黄色葡萄球菌是人类细菌感染的主要原因之一。金黄色葡萄球菌受到宿主细胞的保护,可以存活免于抗生素的消灭。因此,它存在于宿主细胞内,可以长期繁殖,导致临床抗生素治疗失败及抗生素治疗后复发。耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的快速传播,对万古霉素的敏感性的减弱在临床已经被广泛报道。消除的胞内病原体是临床上成功治疗耐甲氧西林金黄色葡

萄球菌感染的关键。《科学》(*Nature*)杂志的最新报道,通过构建抗体-抗生素缀合物可以极为有效的消灭金黄色葡萄球菌。试验结果表明,在治疗菌血症方面,抗体-抗生素缀合物效果优于万古霉素。此外,研究结果提供直接证据表明细胞内金黄色葡萄球菌是侵入性感染的一个重要原因。

(张明编译 深圳大学)