

福建省 HIV-1 新近感染者流行毒株基因亚型及其流行特征分析

邓永岳 张春阳 严延生 颜莘莘 吴守丽

【摘要】 目的 了解福建省 HIV-1 新近感染者流行毒株的亚型分布和流行特征。方法 随机抽取福建省 2011—2012 年使用 BED 捕获酶免疫试验检测出的 104 例新近感染者血样标本, 采用反转录巢式 PCR 扩增 *gag*、*pol* 和 *env* 基因片段, 并测定和分析核酸序列。结果 目标人群中存在 B 亚型和 01_AE、07_BC、08_BC、55_01B 四种流行重组型, 其中以 01_AE 和 07_BC 流行重组型为主, 分别占 45.68% 和 35.80%。基因亚型的流行特征分析显示, 亚型分布中 01_AE 所占比例下降, 07_BC 所占比例上升; 性传播是主要感染途径, 其中同性传播比例明显上升。结论 福建省 HIV-1 流行毒株亚型分布众多, 随着时间推移, 亚型构成和传播途径已发生改变, 应加强对 HIV-1 感染的分子流行病学趋势动态监测。

【关键词】 艾滋病病毒; 新近感染者; 亚型

Genetic subtype and epidemiological feature of HIV-1 circulating strains among recently infected patients in Fujian province Deng Yongyue^{1, 2}, Zhang Chunyang³, Yan Yansheng³, Yan Pingping³, Wu Shouli³. 1 Affiliated Zhongshan Hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China; 2 School of Public Health, Fujian Medical University; 3 Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Yan Yansheng, Email: yysh@fjcdc.com.cn

This work was supported by a grant from the Youth Research Fund of Fujian Provincial Department of Health (No. 2012-1-12).

【Abstract】 **Objective** In order to evaluate the distribution of genetic subtypes and epidemiological feature of HIV-1 circulating strains in Fujian province. **Methods** Blood samples and epidemiological data were collected from 104 newly infected patients who were distinguished by BED-CEIA methodology, during 2011–2012. Viral sequences ($n=81$) of HIV-1 *gag*, *env*, and *pol* segments were amplified by nested PCR. **Results** Subtypes B and four Circulating Recombinant Forms, (CRF01_AE, CRF07_BC, CRF08_BC and CRF55_01B) were found in the samples, CRF01_AE (45.68%) and CRF07_BC (35.80%) were the two main HIV-1 strains in Fujian province. Compared with previous data, the proportion of CRF07_BC rose significantly while it gradually decreased in CRF01_AE. Heterosexual contact was still the principal transmission route in Fujian province, but the number of infection among men-who-have-sex-with-men grew rapidly. **Conclusion** Results from this study suggested that different subtypes of HIV-1 strain existed in Fujian province. The distribution of subtypes and the mode of transmission were changing with the progress of epidemic. Dynamic monitoring of the molecular epidemiology trends of HIV-1 infection should be enhanced.

【Key words】 HIV-1; New recent infections; Subtype

近年来,福建省新报告的 HIV/AIDS 病例数呈逐年上升趋势。为此,本研究对福建省 2011—2012 年 HIV-1 新近感染者流行毒株做相关检测分析,研

究 HIV-1 亚型分布及其流行病学特点,为决策者制定防控策略提供科学依据。

材料与方法

1. 样本收集:采用 Calypte 公司的 BED 捕获酶免疫试验 (BED-CEIA) 对福建省 2011 和 2012 年艾滋病常规监测体系中新诊断的 HIV-1 感染者血样标本进行新近感染检测,共检测 1 268 份标本,其中 140 份被判定为新近感染,其比例为 11.04%,本研究

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.000

基金项目:福建省卫生厅青年科研基金(2012-1-12)

作者单位:361004 厦门大学附属中山医院(邓永岳);福建医科大学公共卫生学院(邓永岳);福建省疾病预防控制中心(张春阳、严延生、颜莘莘、吴守丽)

通信作者:严延生, Email: yysh@fjcdc.com.cn

随机抽取其中 104 份样本进行序列测定和分析。

2. PCR 及测序:取 140 μl 血浆,用 Qiagen 试剂盒(QIAamp RNA Blood Mini Kit)按照说明书要求提取 RNA。应用 RT-nPCR 对 *gag*、*pol* 和 *env* 区进行扩增,引物见表 1,所用引物由 TaKaRa 公司合成,PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序。

3. 序列分析:测得的序列用 Vector NTI 8.0 软件包中的 Contig Express 组件进行编辑、校正后,使用 Bioedit 7.0.1 软件中的 ClustalW 组件与 HIV-1 参考毒株序列进行多重排列、比较。利用 Mega 4.0 软件将序列进行格式转换后,用 Neighbor-joining (N-J) method 进行系统进化树的构建,进化树的可靠性用 Bootstrap 重复检测 1 000 次。利用 distance 程序中的 Kimura 双参数方法计算序列间的基因离散率。选用的参考序列选自美国拉莫斯国家实验室 HIV 核酸数据库参考序列。

4. 基因序列亚型鉴定:采用美国拉莫斯国家实验室 HIV 核酸序列库(<http://www.hiv.lanl.gov/>)中提供的分型工具 BLAST 和重组分析工具 RIP 程序对序列基因型进行初步鉴定,根据系统树分析结果,对在网上获得的基因型进行验证,最后根据 3 个基因区的基因型做出综合判断。

结 果

1. 基本情况:104 份样本中,扩增阳性并取得序列的有 *pol* 区 95 份,*gag* 区 96 份,*env* 区 94 份,3 个基因区(*gag/pol/env*)序列均完整者 81 份,故最后选取 81 份流行病学资料及 3 个基因区序列完整样本进入亚型分析。

2. 新近感染者情况:81 例 HIV-1 新近感染者

中,男性 68 例,女性 13 例;年龄最小 18 岁,最大 80 岁,平均年龄 36.2 岁,以 21 ~ 40 岁年龄组最多,占 70.37%(57/81)。感染途径经异性传播者 53 例,经同性传播者 26 例,经静脉注射毒品感染者 1 例,经血制品途径感染者 1 例。

3. 基因亚型的鉴定:3 个基因区域构建的系统进化树(图 1 ~ 3)总体特征相似,样本序列分散在不同的亚型群体内,未发生明显的聚集。同一样本在不同基因区域的亚型分布有 79 份(97.53%)全部相同,有 2 份样本在不同基因区域构建的进化树中分属于不同的亚型分支,对这些样本重复扩增和测序后结果相同。

4. CRF01_AE 流行重组型:38 份样本(46.91%)位于 CRF01_AE 参考毒株两侧,样本呈各自独立分布或与周围感染人群的某一个体较为接近的特点,整体分布较为分散。基因距离的分析显示:福建省流行的 CRF01_AE 毒株与参考株 Ref.01_AE.TH.90.CM240.U54771 较为接近,分别为 4.43 ± 0.64 (*gag*), 3.33 ± 1.35 (*pol*), 10.40 ± 3.44 (*env*);毒株组内基因距离分别为 5.79 ± 1.53 (*gag*), 5.20 ± 2.14 (*pol*), 14.64 ± 5.54 (*env*);*env* 区的序列差异性显著高于其他区域($P < 0.05$),三者间的比较具有统计学意义。38 例 CRF01_AE 中,男性 35 例(92.11%),感染途径 20 例经异性传播,17 例经同性传播,1 例经静脉注射毒品感染。

5. CRF07_BC 流行重组型:28 份样本(34.57%)位于 CRF07_BC 参考毒株两侧,样本呈各自独立分布或与周围感染人群的某一个体较为接近的特点,整体分布较为分散。基因距离的分析显示:福建省流行的 CRF07_BC 毒株与参考株 Ref.07_BC.CN.05.

表 1 巢式 PCR 引物序列及位置^[1]

扩增区域	引物名称	序列(5' ~ 3')	方向	定位	片段长度(bp)
gag	GAG-L	TCGACGCAGGACTCGGCTTGC	正向	686 ~ 707	1 346
	GAG-E2	TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG	反向	2 011 ~ 2 032	外侧
	GUX ^a	AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC	正向	781 ~ 806	1 080
	GDX ^a	GGCTAGTTCCTCCTACTCCCTGACAT	反向	1 836 ~ 1 861	内侧
pol	MAW-26	TGGAAATGTGGA AAGGAAGGAC	正向	2 027 ~ 2 050	1 512
	RT-21	CTGTATTTCTGCTATTA A GTCTTTTGATGGG	反向	3 509 ~ 3 539	外侧
	PRO-1 ^a	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	正向	2 147 ~ 2 166	1 315
	RT-20 ^a	CTGCCAGTTCTA GCTCTGCTTC	反向	3 441 ~ 3 462	内侧
	RTA ^a	GTTGACTCAGATTGGTTGCAC	正向	2 519 ~ 2 539	
	RTB ^a	CCTAGTATA AACAATGAGACAC	正向	2 946 ~ 2 967	
	env(C2 ~ V5)	ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	正向	6 557 ~ 6 582
ED12		AGTGCTTCCTGCTGCTCCCA	反向	7 792 ~ 7 811	外侧
Env7 ^a		CTGTAAATGGCAGTCTAGC	正向	7 002 ~ 7 021	646
Env8 ^a		CACTTCTCAATTGTCCCTCA	反向	7 648 ~ 7 668	内侧

注:序列的定位根据 HXB2 株的序列; ^a 测序引物

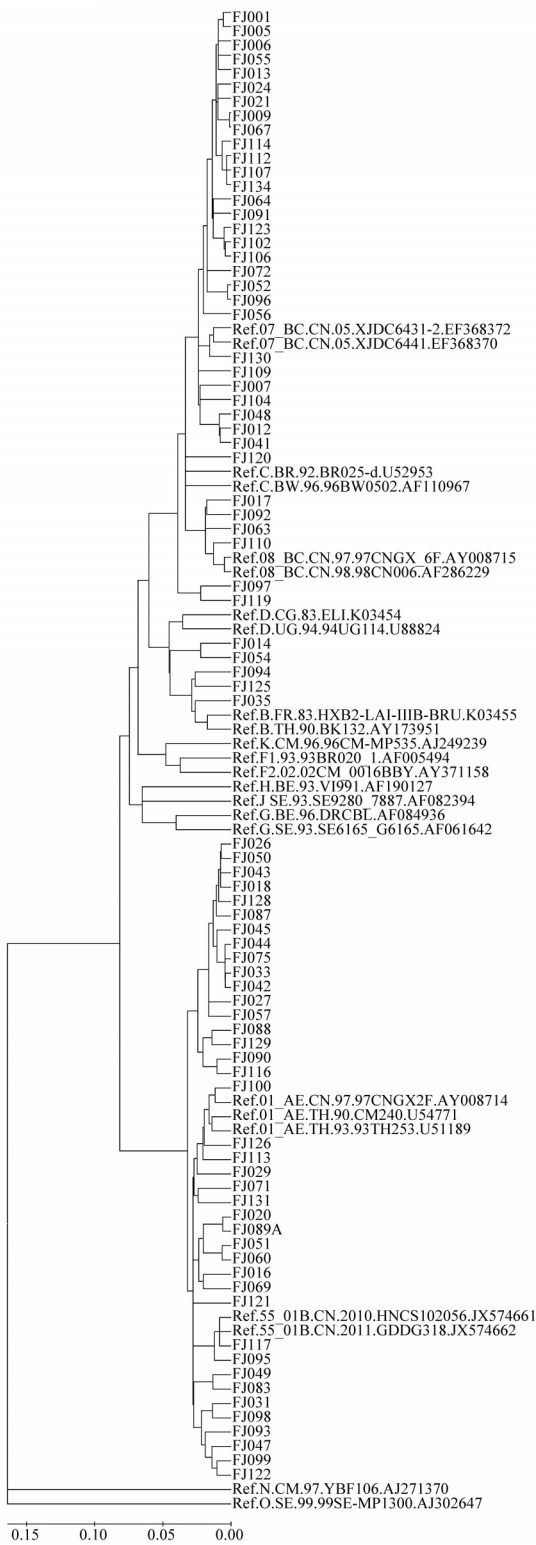


图1 福建省 HIV-1 新近感染者流行毒株 *gag* 基因区系统进化树

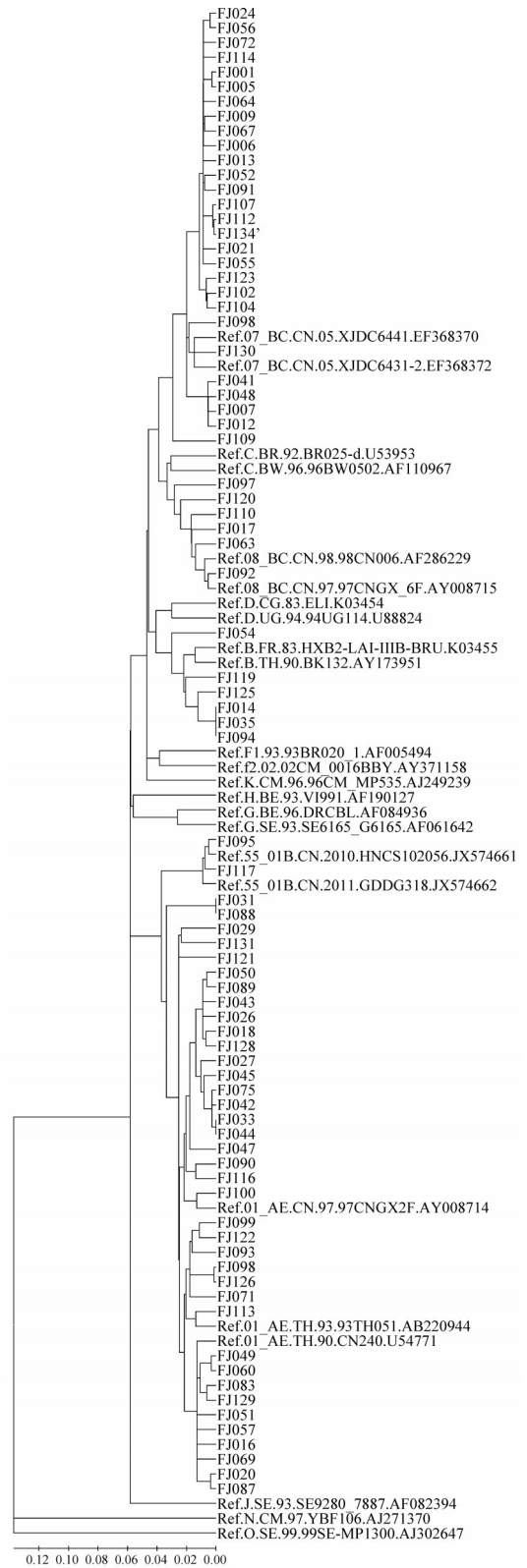


图2 福建省 HIV-1 新近感染者流行毒株 *pol* 基因区系统进化树

XJDC6441.EF368370 较为接近,分别为 4.02 ± 0.75 (*gag*), 3.83 ± 1.27 (*pol*), 11.40 ± 3.54 (*env*);毒株组内基因距离分别为 4.05 ± 1.87 (*gag*), 3.00 ± 1.46 (*pol*), 13.54 ± 9.52 (*env*), *env* 区的序列差异性显著高于其

他区域 ($P < 0.05$),三者间的比较具有统计学意义。28例 CRF07_BC 中,男性 25 例 (89.29%),感染途径 21 例经异性传播,6 例经同性传播,1 例经血制品感染。

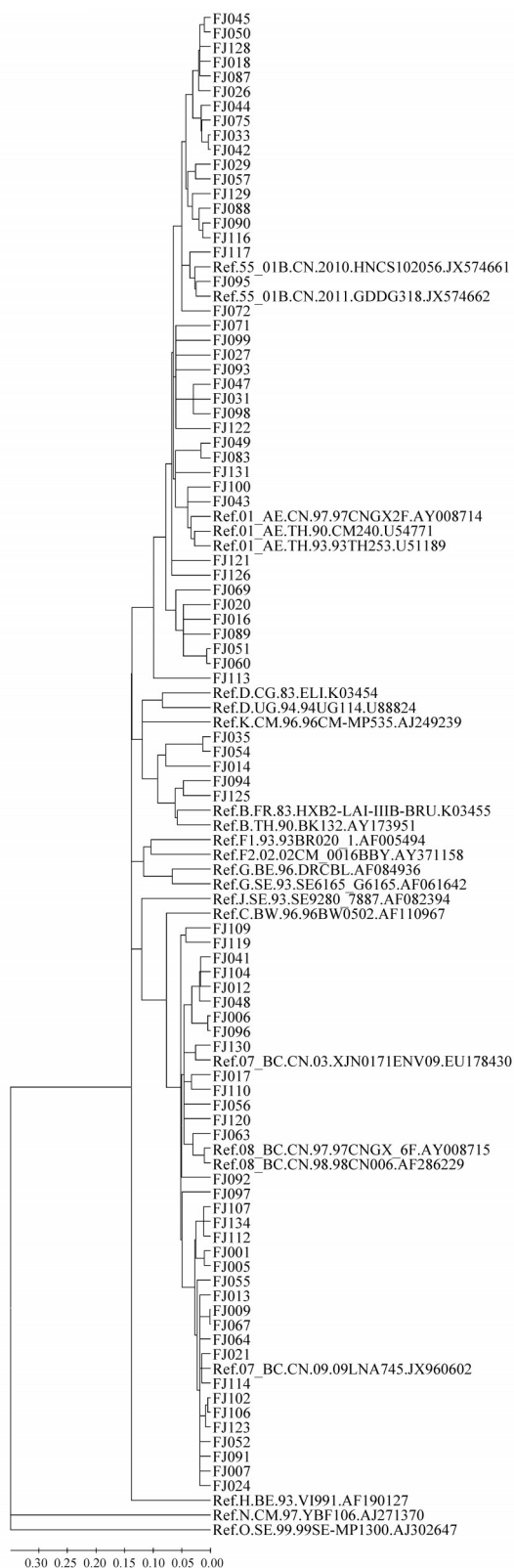


图3 福建省 HIV-1 新近感染者流行毒株 env 基因区系统进化树

6. 其他亚型:①B亚型:5份样本(FJ014、FJ035、FJ054、FJ094、FJ125)在不同的基因区域构建的系统进化树中均与B亚型参考株聚集在一起,与参考株

Ref.B.TH.90.BK132.AY173951的基因距离,分别为 3.04 ± 0.65 (*gag*), 3.43 ± 1.38 (*pol*), 10.52 ± 2.84 (*env*);毒株组内基因距离分别为 3.55 ± 1.19 (*gag*), 2.90 ± 1.57 (*pol*), 11.24 ± 8.25 (*env*),与其他亚型参考株的基因距离在 *gag* 区均 >12 ,在 *pol* 区均 >8 ,在 *env* 区均 >20 。5份样本中3例男性,2例女性;4例经异性传播,1例经同性传播感染。②CRF08_BC 流行重组型:6份样本(FJ017、FJ063、FJ092、FJ097、FJ110和FJ120)在不同的基因区域构建的系统进化树中均与CRF08_BC参考株聚集在一起,与参考株 Ref.08_BC.CN.97.97CNGX_6F.AY008715 的基因距离,分别为 4.13 ± 0.77 (*gag*), 4.03 ± 1.22 (*pol*), 12.41 ± 3.74 (*env*);毒株组内基因距离分别为 4.66 ± 1.95 (*gag*), 2.80 ± 1.52 (*pol*), 11.64 ± 7.58 (*env*)。6份样本中3例男性,3例女性,均经异性传播感染。③CRF55_01B 流行重组型:样本FJ117和FJ095在不同的基因区域构建的系统进化树中均与CRF55_01B参考株聚集在一起,两份样本与参考株 Ref.55_01B.CN.2011.GDDG318.JX574662 的基因距离为 2.70 ± 0.70 (*gag*), 1.85 ± 0.21 (*pol*), 9.50 ± 2.97 (*env*),与其他亚型参考株的基因距离在 *gag* 区均 >11 ,在 *pol* 区均 >7 ,在 *env* 区均 >21 。FJ117病例为男性,有同性性乱史。FJ095该病例为男性,经异性传播感染。

7. 可能的新型重组型:样本FJ072在 *gag* 区和 *pol* 区均聚集在CRF07_BC参考株周围,而在 *env* 区则聚集在CRF01_AE参考株周围,说明该样本可能发生这两种重组型的重组或是混合感染。该病例为男性,有同性性乱史。样本FJ119在 *pol* 区聚集在B亚型参考株周围,而在 *gag* 区和 *env* 区则聚集在CRF08_BC参考株周围,说明该样本可能发生这两种重组型的重组或是混合感染。该病例为女性,经异性传播感染。

8. HIV-1 主要基因亚型的流行特征:性传播是福建省 HIV-1 新近感染者主要传播途径,其中异性传播占 65.43% (53/81),以 CRF01_AE 重组型和 CRF07_BC 重组型为主,分别为 37.74% (20/53) 和 39.62% (21/53);同性传播占 32.10% (26/81),以 CRF01_AE 重组型为主,占 65.39% (17/26)。其他亚型和重组型在异性和同性传播中都有出现,呈现多种亚型分布的特征(图4)。

讨 论

本研究结果提示了福建省 HIV-1 最新流行特征,有利于及时调整干预措施,对提高 HIV-1 感染的

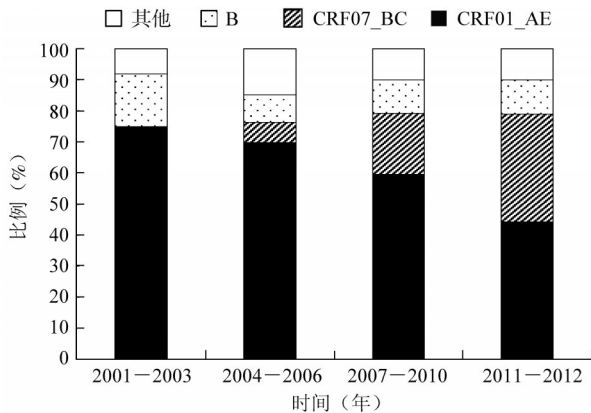


图4 福建省 HIV-1 基因亚型在不同时期的分布

防控水平具有重要意义。BED-CEIA 是美国疾病预防控制中心推荐、目前被广泛应用的检测 HIV-1 新近感染的实验室方法,该方法通过测定 HIV-1 特异性 IgG 占总 IgG 抗体的比例,能够在群体水平上识别出 HIV-1 新近感染者,为在群体水平上监测 HIV-1 新近感染者分子流行病学变化提供了技术保证^[2-4]。中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心于 2005 年底开始对该方法进行评价,证明其具有较好的重复性和稳定性^[5]。福建省于 2008 年起作为第二批试点省份开展该项检测,2011 和 2012 年共筛选出新近感染者 140 名,本研究选取这部分人群作研究对象,以分析福建省 HIV-1 流行毒株的亚型分布和流行特征,与以往研究相比,结果更具有代表性。

福建省地处沿海,早在 1987 年便发现了由国外传入的艾滋病病例,主要传播途径是异性传播, HIV-1 流行毒株种类较多,早期研究结果显示以 CRF01_AE 重组型(早期报道为 E 亚型)为主^[6-8],主要分布在异性传播感染者中,其次是 B 亚型,在输血和经性接触感染人群中均有发现, C 亚型主要在吸毒人群和性接触人群发现。2006 年刘建芳等^[9]首次报道了福建省 HIV/AIDS 中 CRF07_BC 和 CRF08_BC 重组亚型、D 亚型及 AF 重组亚型的存在。谢美榕等^[10]对 2007—2010 年的亚型分析研究结果显示, CRF01_AE 流行重组型仍是福建省主要亚型,但是比例较前下降,相应的 CRF07_BC 流行重组型所占比例逐渐上升。本次研究显示,这种亚型比例的变化趋势更加明显, CRF07_BC 流行重组型所占比例达到 34.57% (28/81)。CRF07_BC 是中国特有的 HIV-1 重组毒株,1997 年邵一鸣等^[11]、Su 等^[12]从四川省和新疆注射吸毒人群中首次证明了该重组毒株的存在,随后在我国大部分地区均发现了

CRF07_BC 的传播和流行,并成为部分地区的主要流行毒株^[13-15]。最新的全国 HIV 分子流行病学调查结果显示^[16], CRF07_BC 重组型增长迅速,已经成为我国所占比例最高的亚型,本研究的结果符合这种趋势。此外,本次研究还发现了福建省此前未见报道的 CRF55_01B 流行重组型和 2 份可能新型重组型。这些都说明,亚型分布随着时间推移出现了新的流行特征,这为福建省艾滋病诊断及分子流行病学研究工作带来新的挑战。

近年来, MSM 人群的 HIV 流行出现上升趋势,福建省历年报告的 HIV 感染者中同性传播比例为 3.6%,而 2009 年新报告的 HIV 感染病例中,同性传播占 8.5%,本次研究中,同性传播占 32.10% (26/81),比历年明显增加,提示福建省 MSM 人群的 HIV-1 感染亟需我们加以关注。国内研究发现^[17,18],近年来 MSM 人群的 CRF01_AE 亚型的比例逐渐上升,有取代 B 亚型成为该人群主要流行毒株的趋势,这可能与该人群本身的特性有关,如多性伴、无保护肛交性行为等,本研究结果与其相似。此外,本研究在该人群中发现 CRF08_BC 和 CRF07_BC 流行重组型均有存在,提示该人群同时存在注射吸毒传播的可能性,多种传播途径并存也可能是造成近年 MSM 人群 HIV 感染率上升的原因之一,这也提示我们在该人群中进行艾滋病防治工作的难度和重要意义。

总之,福建省 HIV-1 新近感染者的流行毒株为多种亚型并存,以 CRF01_AE 和 CRF07_BC 流行重组型为主,构成比例和传播途径较以往有明显的改变,建议相关部门加强对 HIV-1 感染者特别是新近感染者的分子流行病学状况和变化趋势进行动态监测并及时调整防控策略。

参 考 文 献

- [1] Wei M, Liang H, Chen JP, et al. Development of a subtype screening assay for human immunodeficiency virus type 1 by nested multiplex PCR [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2004, 18(1): 83-86. (in Chinese)
魏民, 梁浩, 陈健平, 等. 使用多重巢式 PCR 对我国 HIV-1 主要流行株亚型鉴定方法的建立 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2004, 18(1): 83-86.
- [2] Shen S, Jiang Y. Advances on the assays for newly affected HIV cases [J]. Chin J Epidemiol, 2010, 31(4): 462-465. (in Chinese)
沈圣, 蒋岩. HIV 新近感染检测方法研究进展 [J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(4): 462-465.
- [3] Parekh BS, Kennedy MS, Dobbs T, et al. Quantitative detection of increasing HIV type 1 antibodies after seroconversion: a simple assay for detecting recent HIV infection and estimating incidence [J]. AIDS Res Hum Retroviruses 2002, 18(4): 295-

- 307.
- [4] Dobbs T, Kennedy S, Pau CP, et al. Performance characteristics of the immunoglobulin G-capture BED-enzyme immunoassay, an assay to detect recent human immunodeficiency virus type 1 seroconversion [J]. *J Clin Microbiol* 2004, 42(6):2623–2628.
- [5] Wang MJ, Jiang Y, Han M, et al. An assessment of the performance of BED-CEIA, an assay to detect recent HIV-1 infection [J]. *Chin J AIDS STD*, 2007, 13(4):305–307. (in Chinese)
王懋杰, 蒋岩, 韩梅, 等. 检测 HIV-1 新近感染的 BED 捕获酶免疫实验的重复性和稳定性评价[J]. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(4):305–307.
- [6] Yan YS, Weng YW, Chen G, et al. Relationship between epidemiology of HIV-1 infection and HIV-1 subtypes in Fujian province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2001, 22(6):428–431. (in Chinese)
严延生, 翁育伟, 陈舸, 等. 福建省艾滋病感染的流行病学和病毒亚型之间相互关系的研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2001, 22(6):428–431.
- [7] Weng YW, Yan YS, Chen G. Sequence detection and subtype analysis of HIV-1 in Fujian province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2000, 16(5):17–19. (in Chinese)
翁育伟, 严延生, 陈舸. 福建省 HIV1 流行毒株序列测定与亚型分析[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2000, 16(5):17–19.
- [8] Chen G, Yan YS, Chen L, et al. Analysis of HIV/AIDS prevalence features and trend in Fujian province [J]. *Chin J AIDS STD*, 2005, 11(1):34–36. (in Chinese)
陈舸, 严延生, 陈亮, 等. 福建省 AIDS 流行特征及趋势分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2005, 11(1):34–36.
- [9] Liu JF, Yan YS, Lin X, et al. Genetic subtype and epidemiological feature of HIV-1 circulating strains in Fujian province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2006, 22(7):601. (in Chinese)
刘建芳, 严延生, 林勋, 等. 福建省 HIV-1 流行毒株基因分型与流行特征分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2006, 22(7):601.
- [10] Xie MR, Yan YS, Yan PP, et al. Primary drug resistant gene mutation to HIV-1 infected MSM in Fujian province [J]. *Chin J Zoonoses*, 2013, 29(1):27–29. (in Chinese)
谢美榕, 严延生, 颜萃萃, 等. 福建省 MSM 人群中 HIV-1 感染者原发性耐药基因突变研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(1):27–29.
- [11] Shao YM, Zhao F, Yang WZ, et al. The identification of recombinant HIV-1 strains in IDUs in southwest and northwest China [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 1999, 13(2):109–111. (in Chinese)
邵一鸣, 赵峰, 杨维中, 等. 我国西南西北地区吸毒人群重组人类免疫缺陷病毒 1 型毒株的发现[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2):109–111.
- [12] Su L, Graf M, Zhang YZ, et al. Characterization of a virtually full length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent inter subtype (C/BC) recombinant strain in China [J]. *J Virol*, 2000, 74:11367–11376.
- [13] Meng ZF, He X, Xing H, et al. Construction and characterization of an infectious molecular clone of HIV type 1 CRF07_BC [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2008, 24(2):259–264.
- [14] Xin R, He X, Xing H, et al. Genetic and temporal dynamics of human immunodeficiency virus type 1 CRF07_BC in Xinjiang China [J]. *Gen Virol*, 2009, 90:1757–1761.
- [15] Tee KK, Pybus OG, Li XJ, et al. Temporal and spatial dynamics of the human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms 08_BC and 07_BC in Asia [J]. *J Virol*, 2008, 82:9206–9285.
- [16] He X, Xing H, Ruan Y, et al. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e47289.
- [17] Zhao GL, Feng TJ, Zhao J, et al. Study on molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 infection in men who have sex with men (MSM) in Shenzhen [J]. *Chin J AIDS STD*, 2008, 14:137–141. (in Chinese)
赵广录, 冯铁建, 赵锦, 等. 深圳地区男男同性恋人群中 HIV-1 分子流行病学研究[J]. *中国艾滋病性病*, 2008, 14:137–141.
- [18] Liu ZY, Liu HY, Zhang T, et al. Molecular epidemiologic study on human immunodeficiency virus type 1 infection in partial men who have sex with men (MSM) in Beijing [J]. *J Capital Med University*, 2009, 30(5):616–622. (in Chinese)
刘志英, 李海英, 张彤, 等. 北京市部分男男同性恋人群中 HIV-1 分子流行病学研究[J]. *首都医科大学学报*, 2009, 30(5):616–622.

(收稿日期:2014-02-12)

(本文编辑:王岚)