

湖南省张家界市永定区老年HIV-1感染者B亚型病毒传播关系分析

伍永勤 邹潇白 覃锐 贺健梅 张平芳 江艳 陈贵梅 杨郁君 陈曦

421001 衡阳, 南华大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(伍永勤、张平芳、陈贵梅); 410005 长沙, 湖南省疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制科(邹潇白、贺健梅、陈曦); 427000 张家界市永定区疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制科(覃锐); 423000 郴州, 湘南学院公共卫生学院流行病与卫生统计学系(江艳); 427000 张家界市疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制科(杨郁君)

通信作者: 陈曦, Email: chenxi161@sohu.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.12.016

【摘要】 目的 研究湖南省张家界市永定区老年HIV-1感染者间B亚型毒株的传播关系, 并探索一种溯源方法。方法 选取43例张家界永定区新发老年HIV-1感染者作为研究对象, 取首次检测CD₄⁺T淋巴细胞血浆样本, 用In-house法扩增HIV-1的pol区序列, 测序后, 通过HIV进化树结合流行病学结果对个体间病毒传播关系进行相关性分析。结果 共获得42条有效序列。B亚型占80.95%(34/42), 分为8个聚集簇, 簇内毒株的遗传距离明显小于34条B亚型的平均遗传距离(0.058 3)。聚集簇内感染者有相同高危行为史, 且发生高危行为的地点呈现明显关联灶性分布。提示该地老年人群中HIV-1感染在地理位置和行为学方面具有同源性。结论 张家界市永定区老年人HIV-1间存在地理位置和行为关联性的灶性分布。研究方法可为实施精确疫情定位和干预措施提供依据。

【关键词】 艾滋病病毒; 老年人; B亚型; 传播

基金项目: 湖南省卫生与计划生育委员会课题(C2016028)

Correlativity of subtype B viral transmission among elderly HIV-1 infected individuals in Yongding district, Zhangjiajie city, Hunan province Wu Yongqin, Zou Xiaobai, Qin Rui, He Jianmei, Zhang Pingfang, Jiang Yan, Chen Guimei, Yang Yujun, Chen Xi

Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China (Wu YQ, Zhang PF, Chen GM); Department for AIDS/STD Control and Prevention, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China (Zou XB, He JM, Chen X); Department for AIDS/STD Control and Prevention, Yongding District Center for Disease Control and Prevention, Zhangjiajie 427000, China (Qin R); Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China (Jiang Y); Department for AIDS/STD Control and Prevention, Zhangjiajie Center for Disease Control and Prevention, Zhangjiajie 427000, China (Yang YJ)

Corresponding author: Chen Xi, Email: chenxi161@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the characteristics of transmission correlativity regarding subtype B among elderly HIV-1 infected individuals in Yongding district, Zhangjiajie city, Hunan province and to explore a method on its traceability. **Methods** A total of 43 newly diagnosed elderly HIV-1 infected individuals in Yongding district were enrolled in this study. Pol area genes were amplified and sequenced by 'In house' method. Methods used to analyze the relationship related to HIV individuals transmission would include Bayesian phylogenetic tree and other epidemiological ones. **Results** A total of 42 valid sequences were successfully obtained, with predominant strain as subtype B (80.95%, 34/42). All the 42 sequences were gathered into eight clusters. In each cluster, the genetic distance was significantly shorter than the average from the 34 subtype B strains (0.058 3). The HIV-1 infected individuals in one cluster had the same high-risk behaviors and the significantly patchy distributions were identified at the sites where the high-risk behaviors existed. Our results indicated that the local elderly HIV-infected individuals had high level of homology between geographical

position and related behaviors. **Conclusions** The patchy distribution between geographical position and behavior was associated among the elderly HIV-1 infected individuals. Guidance related to epidemic precise positioning and effective interventions was provided through the findings of this study.

【Key words】 HIV; Elderly; Subtype B; Transmission

Fund program: Science Foundation of Hunan Province Health Department (C2016028)

联合国艾滋病规划署提出 2020 年实现“三个 90% 目标”，并在 2030 年终结艾滋病^[1]。要实现这一目标，就要找到 HIV 传染源，并分析传播特征和关联性，从而阻断传播链，这是遏制疫情的进一步扩大的关键。为了找到一种较为精确可行的，能分析 HIV-1 在人群中传播特征的方法，本研究以湖南省张家界市永定区老年 HIV-1 感染者为研究对象，结合分子生物学、流行病学、社会学方法，研究 HIV-1 在感染者间传播及感染地点的关联性，为精确预防干预提供参考。

对象与方法

1. 研究对象：以 2013—2015 年张家界市永定区老年 HIV-1 感染者为研究对象，用自制统一问卷调查表，进行面对面现场访谈，收集人口学、行为学资料。同时，在湖南省 CDC HIV 确证实验室血浆库中，查询到当年首次检测 CD₄⁺T 淋巴细胞 (CD₄) 后保留的血浆样本，共计 43 人。排除条件：①已经接受过抗病毒治疗者；②自主拒绝接受访谈者；③已经死亡或者身体条件不允许接受访谈者。本研究通过湖南省 CDC 伦理委员会审查。

2. 研究方法：

(1) 核酸提取及目标片段的扩增、序列测定：使用美国雅培公司的 m2000 全自动病毒载量检测系统对 43 份血样进行病毒载量检测，对结果 $>10^3$ 拷贝/ml 的样本进行 HIV 基因进化树分析。目的片段为 *pol* 区，长度约为 1 300 bp (HXB₂ 位置：2 028 ~ 3 462)，采用 In-house 方法，具体实验条件和方法参照文献 [2-3]，两轮 PCR 后的产物经 1% (质量分数) 琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段分子量正确后，将扩增产物送北京诺赛基因测序公司测序。

(2) 亚型分析和构建系统进化树：序列用 Contig Express 和 BioEdit 软件进行拼接整理和校对，整理后的序列按照国内外学者提出的方法进行系统进化树分析^[4-6]。使用 Mega 5.2 软件构建系统进化树，选择 Neighbor-Joining Tree 法，Bootstrap method 重复抽样次数设置为 1 000。

(3) 遗传距离的分析：选择 Compute Pairwise Distances，在 Model 中选择 Kimura 2-parameter，碱

基替换为 d: Transitions + Transversions，计算序列的校正遗传距离。

3. 统计学分析：使用 SPSS 18.0 软件建立数据库并进行数据双录入，计数资料用构成比、率描述，计量资料用均数描述。

结 果

1. 聚集簇分析：43 份血样成功扩增到 42 条有效序列。其中，B 亚型占 80.95% (34/42)，CRF01_AE 亚型占 14.29% (6/42)、C 亚型占 4.76% (2/42)。研究组 34 条 B 亚型中有 8 簇共计 19 条序列 Bootstrap 检验值 >80 ，形成明显聚集簇，有高度传播关联 (图 1)。其中，YDQ30、YDQ32 与参考株 07_BC.CN.97.CN54 ACC AX149771 重组亚型聚集，其余均与 B.FR.83.HXB2-LAI-IIIB-BRU ACC K03455、B.TH.90.BK132 ACC AY173951 聚集成簇。34 条序列成簇率为 55.89% (19/34)，说明该地区 B 亚型感染者之间呈现高聚集性，且在小范围内传播，传播链具有封闭性。

2. 遗传距离分析：选取 34 条 B 亚型序列和 8 个聚集簇中序列，分别计算序列的校正遗传距离与平均校正遗传距离，可得 34 条 B 亚型序列遗传距离均值为 0.058 3，8 个聚集簇中簇内遗传距离均小于 34 条 B 亚型序列的平均遗传距离 (表 1)，说明聚集簇内部序列具有高度的同源性。

3. 簇内个人信息分析：8 个聚集簇 19 名研究对象中，男性 13 名，自述有嫖娼史占 84.62% (11/13)，皆到过比较固定的暗娼点，且部分老年男性感染者有结伴嫖娼行为。男男性行为占 15.38% (2/13)，其高危行为发生点主要在录像厅、公园。6 名女性中，承认卖淫者 2 人；自述无婚外高危史、配偶为 HIV 感染者 4 人。地点 A 在主城区，地处老街区，交通便捷，市内老年人常在周边活动，且卖淫女大部分居住此地。地点 B 位于城区西北方向的城郊，距主城区约 35 km，交通相对闭塞，嫖客以本地人为主。聚集簇内的序列特征分布与感染者的高危行为史吻合，确证时间相距较近，明显形成具有传播关联的灶点分布。说明该地区老年人感染 HIV-1 B 亚型在地理位置和行为学方面有同源性 (表 2)。

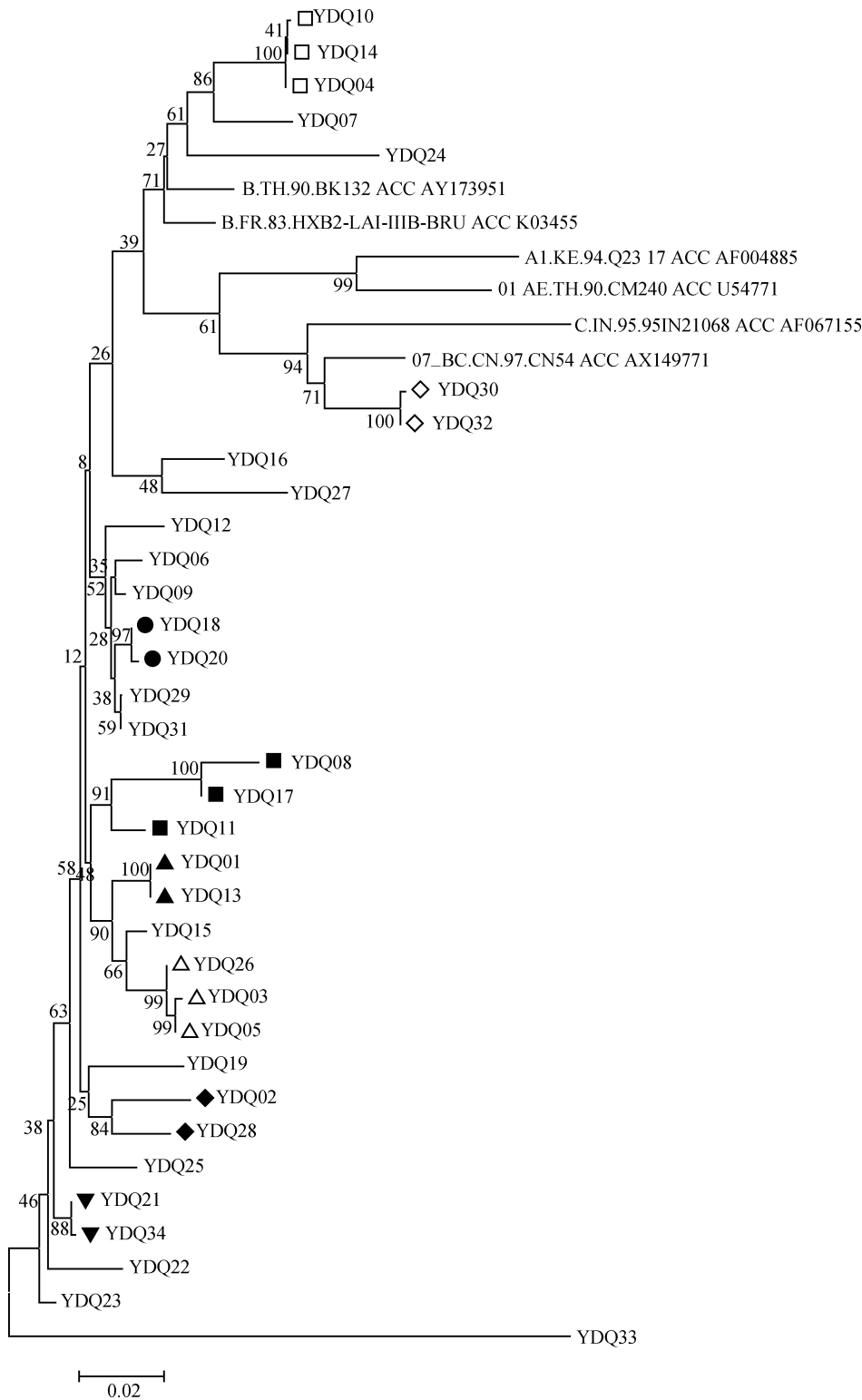


图1 湖南省张家界市永定区 34 条 B 亚型序列系统进化树

讨论

近年来艾滋病的溯源研究成为领域内研究热点^[7-9]。主要涉及非婚异性性行为传播溯源、家庭内传播溯源以及 MSM 传播溯源,赵琦等^[10]运用 Miseq 测序技术对一起疑似非婚异性性行为感染者进行溯

源调查和分析。潘晓红等^[11]通过分子技术手段分析研究当地外来婚嫁女感染 HIV 亚型特征和家庭内传播溯源,发现 HIV 感染者中夫妻间和母子间有传播关系。Chen 等^[12]结合分子流行病学技术和数学模型对中国香港地区 MSM 人群 B 亚型毒株进行了溯源分析,提示大数据的挖掘利用在分子溯源领域有重要的应用价值。本研究侧重于对某区域内 B 亚型毒株的非婚异性性传播以及家庭内性传播关系的分析,在传播源头上进行干预,保证研究的高效性和可行性。

湖南省是 HIV 亚型比较多的省份之一^[13]。既往研究发现,在张家界市的 HIV 感染者中, HIV-1 B 亚型明显高于省内其他地区,尤其是近年老年人 HIV-1 感染者,呈现出一定的聚集性和封闭性特点。HIV-1 B 亚型是人类首次分离到的亚型^[14-16],我国最早出现在 90 年代中部地区有偿献血 HIV-1 感染者中^[17-18]。针对张家界市这一特点分析,与该地处于湘西少数民族地区,经济落后,交通闭塞,人员流动小,性观念较开放,

并且 1995 年该地报告的首批感染者为赴河南有售卖血的农民,而引入 B 亚型毒株有关。通过对张家界市永定区 HIV-1 B 亚型系统进化树分析,发现了 8 个明显的聚集簇簇内毒株基因的遗传距离和 Bootstrap 值的判断结果基本吻合,进一步印证了簇内感染个体间感染来源存在高度关联性。

表 1 8 个聚焦簇校正遗传距离的比较

编码	Bootstrap 值	传播关联	基因距离
▲YDQ01	100	有关联	0.000 0
▲YDQ13			
△YDQ03			
△YDQ26	99	有关联	0.001 1
△YDQ05			
□YDQ04			
□YDQ14	100	有关联	0.000 0
□YDQ10			
▼YDQ21			
▼YDQ34	88	有关联	0.000 0
◇YDQ30			
◇YDQ32			
●YDQ20	97	有关联	0.001 1
●YDQ18			
■YDQ17			
■YDQ11	91	有关联	0.028 6
■YDQ08			
◆YDQ02			
◆YDQ28	84	有关联	0.033 5

表 2 8 个聚集簇内个案流行病学调查信息

编号	性别	年龄	婚姻史	确证时间	高危史	行为发生地点	配偶感染史
▲YDQ01	男	81	已婚	2013/09/20	嫖娼	地点 A	阴性
▲YDQ13	男	61	已婚	2013/02/28	嫖娼	地点 A	阳性
△YDQ03	男	66	未婚	2014/04/01	嫖娼	地点 A	无
△YDQ26	女	68	丧偶	2014/09/02	无	家庭内	阳性
△YDQ05	男	54	丧偶	2014/08/26	嫖娼	地点 A	不详
□YDQ04	男	63	离异	2013/12/24	嫖娼	地点 B	不详
□YDQ14	男	65	丧偶	2013/11/04	嫖娼	地点 B	不详
□YDQ10	男	51	未婚	2014/07/08	嫖娼	地点 B	无
▼YDQ21	女	64	已婚	2014/08/15	无	家庭内	YDQ34 配偶
▼YDQ34	男	57	已婚	2014/08/12	嫖娼	地点 A	YDQ21 配偶
◇YDQ30	男	62	未婚	2015/03/12	MSM	不详	YDQ32 性伴
◇YDQ32	男	64	离异	2015/03/18	MSM	不详	YDQ30 性伴
●YDQ20	女	73	已婚	2015/05/13	无	家庭内	阳性
●YDQ18	女	61	丧偶	2014/08/15	无	家庭内	阳性
■YDQ17	女	65	丧偶	2015/05/06	暗娼	地点 A	不详
■YDQ11	男	66	已婚	2014/12/18	嫖娼	地点 A	阳性
■YDQ08	男	53	未婚	2015/03/12	嫖娼	地点 A	无
◆YDQ02	男	77	丧偶	2013/11/12	嫖娼	地点 A	不详
◆YDQ28	女	52	未婚	2013/09/25	暗娼	地点 A	无

聚集簇内感染者的流行病学调查结果显示,嫖娼为当地老年男性的主要感染途径。流行病学调查的结果指向,多名 HIV 感染者都到过地点 A 和 B 嫖娼,与实际情况 A、B 两地分布的暗娼点较密集相一致。有两个聚集簇簇内遗传距离为 0.000 0,提示簇内的感染者来源于同一地点并被同一传染源感染。同时 8 个聚集簇内的 19 名调查对象,4 名女性的传染来自配偶;13 名男性中,3 人将病毒传播给了自己的妻子,表明家庭内传播成为另一个重要途径。老年人丧偶、未婚、性生活不和谐、卖淫妇女引诱和同

伴的影响是催生嫖娼的动因,无保护性行为则是感染 HIV 的主要因素^[19]。在当地老年人中,已经形成了嫖娼感染 HIV 和感染后家庭内传播两个传播途径。本研究发现的 2 例老年 MSM HIV-1 感染者具有高度同源性,提示对此类人群应该引起重视。

现阶段艾滋病防治工作中,主动发现 HIV 传染源的难度越来越大,部分感染者不愿意提供可能的感染场所,这为深入开展行为干预和溯源带来困难。上述研究表明,通过分子生物学技术与流行病学个案调查结合,可以很好地印证传染源的灶性分布,实现了在空间和人间的“精准”定位,对于研究毒株的传播链和开展针对性的定点干预有很好的指导意义并提供了一个新的工作思路。但是,该方法涉及分子生物学技术,对技术、时间和经济成本要求较高,加之 HIV-1 病毒变异性大,本研究样本量较少且仅分析了 *pol* 区序列,缺全序列分析,影响序列信息的精确性,对研究结果造成一定影响。随着分子生物学技术向快速、简便方向发展,将广泛用于流行病学领域。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] 联合国艾滋病规划署. 理解快速通道 [EB/OL]. (2015-12-01) [2016-07-20]. <http://www.unaids.org.cn/pics/20151120152521.pdf>.
UNAIDS. Understanding fast-track [EB/OL]. (2015-12-01) [2016-07-20]. <http://www.unaids.org.cn/pics/20151120152521.pdf>.

[2] 邹潇白,贺健梅,张国强,等. 湖南省艾滋病患者抗病毒治疗后耐药性分析 [J]. 中国感染控制杂志, 2010, 9 (5) : 305-309. DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2010.05.001.
Zou XB, He JM, Zhang GQ, et al. Drug resistance analysis on AIDS patients after highly active antiretroviral therapy in Hunan Province [J]. Chin J Infect Control, 2010, 9 (5) : 305-309. DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2010.05.001.

[3] 邹潇白,贺健梅,张国强,等. 湖南省衡阳市 2004—2009 年艾滋病抗病毒治疗情况分析 [J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1 (5) : 363-366. DOI:10.16505/j.2095-0136.2011.05.015.
Zou XB, He JM, Zhang GQ, et al. Efficacy of HIV highly active antiretroviral therapy in Hengyang, Hunan, 2004-2009 [J]. Chin J Viral Dis, 2011, 1 (5) : 363-366. DOI: 10.16505/j.2095-0136.2011.05.015.

[4] Han XX, Takebe Y, Zhang WQ, et al. A large-scale survey of CRF55_01B from men-who-have-sex-with-men in China: implying the evolutionary history and public health impact [J]. Sci Rep, 2015, 5: 18147. DOI:10.1038/srep18147.

[5] Han XX, An MH, Zhang M, et al. Identification of 3 distinct HIV-1 founding strains responsible for expanding epidemic among men who have sex with men in 9 Chinese cities [J]. J

- Acquir Immune Defic Syndr, 2013, 64(1):16–24. DOI: 10.1097/QAI.0b013e3182932210.
- [6] Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees [J]. BMC Evol Biol, 2007, 7: 214. DOI: 10.1186/1471-2148-7-214.
- [7] English S, Katzourakis A, Bonsall D, et al. Phylogenetic analysis consistent with a clinical history of sexual transmission of HIV-1 from a single donor reveals transmission of highly distinct variants [J]. Retrovirology, 2011, 8: 54. DOI: 10.1186/1742-4690-8-54.
- [8] Wei M, Xing H, Feng Y, et al. Estimating HIV-1 transmission routes for patients with unknown risk histories by viral sequence phylogenetic analyses [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2015, 70(2): 195–203. DOI: 10.1097/QAI.0000000000000735.
- [9] Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(21):7552–7557. DOI: 10.1073/pnas.0802203105.
- [10] 赵琦, 时丽丽, 蒋岩, 等. Miseq高通量测序平台用于一起疑似经性传播 HIV 的溯源调查 [J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48(6): 471–475. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.06.010. Zhao Q, Shi LL, Jiang Y, et al. Contact tracing of a possible case of HIV sexual transmission by using Miseq platform [J]. Chin J Prev Med, 2014, 48(6): 471–475. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.06.010.
- [11] 潘晓红, 张佳峰, 陈琳, 等. 浙江省农村外来婚嫁女 HIV 亚型感染溯源及家庭内传播研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(11): 1077–1081. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.11.005. Pan XH, Zhang JF, Chen L, et al. Relationship between strain subtypes and transmission of HIV infection within marriage-based immigrant women in rural area of Zhejiang province [J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(11): 1077–1081. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.11.005.
- [12] Chen JH, Wong KH, Chan KC, et al. Phylodynamics of HIV-1 subtype B among the men-having-sex-with-men (MSM) population in Hong Kong [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25286. DOI: 10.1371/journal.pone.0025286.
- [13] 贺健梅, 邢辉, 陈曦, 等. 2009–2012年湖南省 HIV-1 耐药状况分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(11): 1065–1067. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.11.021. He JM, Xing H, Chen X, et al. Drug resistance of HIV-1 in Hunan province in 2009–2012 [J]. Chin J Prev Med, 2013, 47(11): 1065–1067. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2013.11.021.
- [14] Paraskevis D, Pybus O, Magiorkinis G, et al. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach [J]. Retrovirology, 2009, 6: 49. DOI: 10.1186/1742-4690-6-49.
- [15] Parekh B, Phillips S, Granade TC, et al. Impact of HIV type 1 subtype variation on viral RNA quantitation [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1999, 15(2): 133–142. DOI: 10.1089/088922299311556.
- [16] Chalmet K, Staelens D, Blot S, et al. Epidemiological study of phylogenetic transmission clusters in a local HIV-1 epidemic reveals distinct differences between subtype B and non-B infections [J]. BMC Infect Dis, 2010, 10: 262. DOI: 10.1186/1471-2334-10-262.
- [17] Li Y, Uenishi R, Hase S, et al. Explosive HIV-1 subtype B' epidemics in Asia driven by geographic and risk group founder events [J]. Virology, 2010, 402(2): 223–227. DOI: 10.1016/j.virol.2010.03.048.
- [18] Deng X, Liu HZ, Shao YM, et al. The epidemic origin and molecular properties of B' : a founder strain of the HIV-1 transmission in Asia [J]. AIDS, 2008, 22(14): 1851–1858. DOI: 10.1097/QAD.0b013e32830f4c62.
- [19] Pilowsky DJ, Wu LT. Sexual risk behaviors and HIV risk among Americans aged 50 years or older: a review [J]. Subst Abuse Rehabil, 2015, 6(1): 51–60. DOI: 10.2147/SAR.S78808.

(收稿日期: 2016-08-16)

(本文编辑: 王岚)