

云南省德宏傣族景颇族自治州 2016 年新报告艾滋病病毒感染者的基因亚型分析

段星 王可然 王继宝 叶润华 王译葵 杨锦 杨涛 周素娟 杨跃诚
姚仕堂 段松 何纳

678400 芒市, 云南省德宏傣族景颇族自治州疾病预防控制中心(段星、王继宝、叶润华、王译葵、杨锦、杨涛、杨跃诚、姚仕堂、段松); 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室、公共卫生安全教育部重点实验室(王可然、周素娟、何纳)

段星、王可然同为第一作者

通信作者: 何纳, Email: nhe@shmu.edu.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.05.027

【摘要】 目的 分析 2016 年云南省德宏傣族景颇族自治州(德宏州)新报告 HIV 感染者 HIV 基因亚型, 了解中国籍和缅甸籍 HIV 感染者基因亚型分布特征。方法 对 2016 年德宏州新报告 HIV 感染者提取核酸, 使用 RT-PCR 法对 HIV 基因 *gag*、*env* 和 *pol* 进行反转录扩增, 直接测序扩增产物。综合分析 3 个基因的测序结果, 确定最终基因亚型。结果 2016 年德宏州新报告 HIV 感染者 1 112 例, 成功测定基因亚型的感染者 860 例。C 亚型所占比例最大(占 33.6%, 289/860); 其后为独特重组(unique recombinant forms, URFs)(占 28.4%, 244/860)、CRF01_AE(占 18.6%, 160/860)等亚型; URFs 中主要包括 4 种形式的重组, 其中以 CRF01_AE 和 C 亚型重组为主。缅甸籍感染者的亚型分布与民族和传播方式相关。结论 德宏州 2016 年新报告 HIV 感染者基因亚型主要集中在 C、URFs 和 CRF01_AE 亚型, URFs 分布依然复杂多样。

【关键词】 艾滋病病毒; 艾滋病病毒感染者; 基因亚型

基金项目: 国家重点地区艾滋病防治项目; 国家科技重大专项(2013ZX10004-906); 国家自然科学基金(81373062)

HIV gene subtypes of newly reported HIV/AIDS cases in Dehong Dai and Jingpo autonomous prefecture of Yunnan province, 2016 Duan Xing, Wang Keran, Wang Jibao, Ye Runhua, Wang Yikui, Yang Jin, Yang Tao, Zhou Sujuan, Yang Yuecheng, Yao Shitang, Duan Song, He Na
Dehong Dai and Jingpo Autonomous Prefectural Center for Disease Control and Prevention, Mangshi 678400, China (Duan X, Wang JB, Ye RH, Wang YK, Yang J, Yang T, Yang YC, Yao ST, Duan S); Department of Epidemiology, School of Public Health, Key Laboratory for Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China (Wang KR, Zhou SJ, He N)
Duan Xing and Wang Keran are the first authors who contributed to the article equally.
Corresponding author: He Na, Email: nhe@shmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore distribution of HIV gene subtypes among newly reported HIV/AIDS cases from China and Myanmar in Dehong Dai and Jingpo prefecture of Yunnan province in 2016. **Methods** We conducted DNA extractions from newly reported HIV/AIDS cases in 2016. The *gag*, *env* and *pol* genes were amplified by using reverse transcription-PCR (RT-PCR) and sequenced to identify HIV subtypes. **Results** A total of 1 112 newly diagnosed HIV cases were reported in Dehong in 2016, and the HIV subtypes were identified for 860 cases. Subtype C was predominant (33.6%), followed by unique recombinant forms (URFs) (28.4%), CRF01_AE (18.6%) and so on. URFs include four recombination, among which the recombination of CRF01_AE and C subtype were predominant. The HIV subtype distribution was associated with nationality and transmission route in HIV/AIDS cases from Myanmar. **Conclusions** The gene subtypes of C, URFs and CRF01_AE were mainly distributed; distribution of URFs remained complex and diverse among newly reported HIV/AIDS cases in Dehong in 2016.

【Key words】 HIV; HIV/AIDS cases; Gene subtypes

Fund programs: AIDS Control and Prevention Project in National Key Areas; National Science and Technology Major Project of China (2013ZX10004-906); National Natural Science Foundation of China (81373062)

云南省德宏傣族景颇族自治州(德宏州)HIV 流行严重^[1],更由于其与缅甸等其他东南亚国家的人员流动和交流,呈现出较为独特的亚型分布表现^[2]。持续的HIV亚型分布监测有利于了解HIV传播动态和流行趋势。本研究探讨2016年德宏州新报告的中国籍和缅甸籍 HIV 感染者 HIV 基因亚型分布特征,为有效防控HIV 和提高干预措施效果评估质量提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:以德宏州2016年新报告 HIV 感染者(即首次 HIV 抗体检测结果阳性)为研究对象,取其参加抗病毒治疗前血浆标本,进行病毒 *pol*、*gag*、*env* 基因扩增。

2. 方法:

(1)扩增 HIV *pol*、*gag* 以及 *env* 基因区:3 个基因均使用 TaKaRa One RNA PCR Kit (AMV) 进行各基因的反转录,并用 TIANGEN 2×Taq PCR MasterMix 进行第二轮 PCR 扩增。各条基因引物见参考文献[5]、PCR 体系配置见文献[3-4]。第二轮 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,所有阳性者送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

(2)基因亚型分析:首先使用软件 LaserGene 7.1 对原始序列进行序列拼接处理,然后提交至美国 Los Alamos 国家实验室 HIV 核酸序列库 (<http://www.hiv.lanl.gov>),并使用网站在线软件 HIV-Blast 将上传的序列与数据库的参考序列进行比对,初步判定亚型。使用 MEGA 7 软件将样本的所有序列与国际参考株进行排列和比对,并使用其 Phylogeny 模块中的 Neighbor-Joining (N-J) 法构建系统进化树,根据进化树上样本的序列与国际参考株的亲缘关系进一步确认亚型。然后将相关序列上载至 jpHMM 网站 (<http://jphmm.gobics.de/>) 进行重组分析,得到基因组嵌合结构。根据亚型及其断点和基因组嵌合结构与 HIV sequence database (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>) 提供的目前已公布的 90 例 CRFs (Circulating recombinant forms) 进行比较,确认样本的 CRFs 和 URFs (Unique recombinant forms)。

3. 统计学分析:使用 Excel 2013 软件整理数据,SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用 χ^2 检验;当其中有至少一个格子理论频数 < 5,使用 Fisher 确切概率法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,双侧检验。

结果

1. 一般情况:2016年德宏州新报告 1 112 例 HIV 感染者,中国籍有 395 例(35.5%),缅甸籍有 717 例(65.5%),对其全部进行病毒 *pol*、*gag*、*env* 基因扩增,最终分型成功的病例共 860 例(77.3%),包括中国籍 346 例(40.2%),缅甸籍 514 例(59.8%)。见表 1。

表 1 2016年德宏州新报告 HIV 感染者人口学及 HIV 亚型分布特征

特征	HIV 感染者		合计	χ^2 值	P 值
	中国籍 ^a	缅甸籍			
性别				1.31	0.253
男	224(64.7)	352(68.5)	576(67.0)		
女	122(35.3)	162(31.5)	284(33.0)		
年龄组(岁)				94.56	<0.001
<25	44(12.7)	120(23.4)	164(19.1)		
25~	85(24.6)	221(43.0)	306(35.6)		
35~	100(28.9)	122(23.7)	222(25.8)		
>45	117(33.8)	51(9.9)	168(19.5)		
民族				74.92	<0.001
傣	104(30.1)	211(41.1)	315(36.6)		
景颇	70(20.2)	175(34.0)	245(28.5)		
汉	145(41.9)	81(15.8)	226(26.3)		
其他	27(7.8)	47(9.1)	74(8.6)		
传播途径				-	<0.001
异性传播	294(85.0)	347(67.5)	641(74.5)		
静脉注射	37(10.7)	160(31.1)	197(22.9)		
同性传播	10(2.9)	2(0.4)	12(1.4)		
其他	5(1.4)	5(1.0)	10(1.2)		
HIV 亚型				27.32	0.001
C	120(34.7)	169(32.9)	289(33.6)		
URFs	102(29.5)	142(27.6)	244(28.4)		
CRF01_AE	49(14.1)	111(21.6)	160(18.6)		
B	12(3.5)	22(4.3)	34(4.0)		
CRF61_BC	18(5.2)	9(1.7)	27(3.1)		
CRF65_cpx	6(1.7)	21(4.1)	27(3.1)		
CRF62_BC	11(3.2)	13(2.5)	24(2.8)		
CRF57_BC	15(4.3)	6(1.2)	21(2.4)		
CRF08_BC	4(1.2)	7(1.4)	11(1.3)		
其他	9(2.6)	14(2.7)	23(2.7)		

注: 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%); ^a包括云南省及中国其他省份; -为使用 Fisher 精确检验

2. 基因亚型分布: 成功分型的感染者中, C (33.6%)、URFs (28.4%) 以及 CRF01_AE (18.6%) 为两国新发感染者最多的 3 种亚型。在 244 例 URFs 中, CRF01_AE 与 C 亚型重组 48 例(5.6%), BC 亚型重组 46 例(5.3%), CRF01_AE 与 B 和 C 亚型重组 30 例(3.5%), 8 例 CRF01_AE 与 B 亚型重组(0.9%)。151 个标本有 1 个基因片段分型结果, 310 个标本有 2 个基因片段分型结果, 399 个标本有 3 个基因片段分型结果。见表 2。

表 2 2016 年德宏州新报告 HIV 感染者 HIV 亚型基因片段分型结果

基因片段	gag=1 ^a		合计	gag=0 ^a		合计
	pol=1	pol=0		pol=1	pol=0	
env=1	399	70	469	67	61	128
env=0	173	40	213	50	0	50
合计	572	110	682	117	264	178

注: *1 代表该基因片段有分型结果; 0 代表该基因片段没有分型结果

3. HIV 亚型分布的影响因素: 根据国籍进行分层分析发现, 在中国籍的 346 例已知亚型的感染者中, 亚型的分布与感染者的性别、年龄、民族、传播方式并无显著关联, 但是傣族 (16.4%) 和汉族 (18.6%) 拥有相对较高比例的 CRF01_AE, 而景颇族有较高比例的其他亚型 (32.9%), 其他民族的 URFs 所占比例是最高的 (40.7%)。在缅甸籍感染者中, HIV 亚型与民族和传播方式有着显著关联, 傣族和汉族拥有较高比例的 CRF01_AE, 而景颇族有较高比例的其他亚型, 但是傣族是 URFs 比例最多的民族: 异性传播以 C 亚型的比例最高, 因静脉吸毒感染 HIV 的新报告病例以 C 亚型和 URFs 为最多的两种亚型。见表 3。

讨 论

2016 年分型成功的 860 例感染者中, 人口学分布和 2015 年基本一致^[5]。云南省德宏州经异性传播的亚型分布特点与我国其他地区相同^[6-7], CRF01_AE

在异性性传播中比较常见; 但是整体而言, B、C 亚型重组分布较少^[8-9], 可能与云南省德宏州本身的 HIV 流行特点有关。而在缅甸籍感染者中可以发现, 民族和传播方式是影响亚型分布的重要因素。与 2015 年相似, 异性传播主要是以 C 亚型为主, 而经静脉吸毒传播的亚型分布则有更高比例的 URFs, 一方面说明多人多次静脉吸毒共用针具可能会导致较多的新型 HIV 亚型重组的出现; 同时, 除共用针具外的其他传播途径也可能是 URFs 产生的原因。

2016 年德宏州新报告 HIV 感染者亚型分布与 2015 年大体一致^[5], 依然复杂多样, C、URFs 和 CRF01_AE 是分布最多的 3 个亚型。不同于我国内陆其他省份^[2,6-7], URFs 毒株始终在德宏州 HIV 亚型分布中占有较大比例, 显示出该地区 HIV 的流行复杂性和重组多样性。但 2016 年度 HIV 感染者亚型分布也呈现出新的变化, 与 2015 年相比^[5], 2016 年 URFs 的分布比例小于 C 亚型, 位于第二位。而且对于已知亚型和 CRFs 而言, 2016 年新报告感染者的分布更为集中, 主要集中在 C 和 CRF01_AE 型。位于东南亚的柬埔寨、缅甸和泰国主要是以 B、C 和 CRF01_AE 亚型为主; 越南是以 CRF01_AE 亚型为主^[10-11]; 而在中国内陆地区, 主要是以 B、C 亚型重组和 CRF01_AE 为主^[2]。本次研究中未发现 CRF07_BC 亚型, 但 13 例有相似断点和基因组嵌合结构样本的 pol、env 区与 CRF07_BC 的断点和基因组嵌合结构相似, 仅 gag 区不同, 疑似为 CRF07_BC 变异产生的新

表 3 2016 年德宏州新报告中国籍与缅甸籍 HIV 感染者 HIV 亚型分布影响因素

影响因素	中国籍感染者 HIV 亚型				χ^2 值	P 值	缅甸籍感染者 HIV 亚型				χ^2 值	P 值
	C	URFs	CRF01_AE	其他 ^a			C	URFs	CRF01_AE	其他 ^a		
性别					6.633					6.592	0.086	
男	68(57.0)	74(72.5)	34(69.4)	48(64.0)		121(71.6)	105(73.9)	69(62.2)	57(62.0)			
女	52(43.0)	28(27.5)	15(30.6)	27(36.0)		48(28.4)	37(26.1)	42(37.8)	35(38.0)			
年龄组(岁)					10.131					9.05	0.433	
<25	13(10.8)	13(12.8)	10(20.4)	8(10.7)		34(20.1)	31(21.8)	27(24.3)	28(30.4)			
25~	28(23.3)	30(29.4)	14(28.6)	13(17.3)		76(45.0)	65(45.8)	45(40.5)	35(38.0)			
35~	33(27.5)	31(30.3)	12(24.5)	24(32.0)		44(26.0)	36(25.4)	23(20.7)	19(20.7)			
<45	46(38.4)	28(27.5)	13(26.5)	30(40.0)		15(8.9)	10(7.0)	16(14.4)	10(10.9)			
民族					16.781					27.79	0.001	
傣	36(30.0)	28(27.5)	17(34.7)	23(30.7)		56(33.1)	64(45.1)	61(55.0)	30(32.6)			
景颇	24(20.0)	19(18.6)	4(8.2)	23(30.7)		67(39.6)	48(33.8)	20(18.0)	40(43.5)			
汉	48(40.0)	44(43.1)	27(55.1)	26(34.7)		30(17.8)	22(15.5)	19(17.1)	10(10.9)			
其他 ^b	12(10.0)	11(10.8)	1(2.0)	3(4.0)		16(9.5)	8(5.6)	11(9.9)	12(13.0)			
传播途径					0.539 ^b						<0.001 ^b	
异性传播	103(85.8)	83(81.4)	45(91.8)	63(84.0)		112(66.3)	79(55.6)	99(89.2)	57(62.0)			
静脉吸毒	13(11.0)	12(11.8)	2(4.1)	10(13.3)		56(33.1)	61(43.0)	10(9.0)	33(35.9)			
同性传播	2(1.6)	6(5.9)	1(2.0)	1(1.3)		0(0.0)	1(0.7)	1(0.9)	0(0.0)			
其他 ^a	2(1.6)	1(1.0)	1(2.0)	1(1.3)		1(0.6)	1(0.7)	1(0.9)	2(2.2)			

注: 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%); ^a母婴传播和不详; ^bFisher 精确概率法

型CRFs。2016年HIV亚型分布变化提示云南省德宏州受到东南亚其他国家HIV疫情较大影响,尤其是已知亚型分布趋于以东南亚其他国家流行特点。

2016年德宏州新报告HIV感染者860例,占当年全部新报告病例的77.3%(860/1112),代表性较好,基本反映德宏州HIV流行亚型分布现状。在860个已分型标本中,有151个标本只有1个基因片段,其中有50个标本的亚型是由*pol*基因确定,该基因片段长,所含信息量大,既往文献也有单独使用*pol*基因判断亚型^[12-13];由于HIV是RNA病毒,其基因变异大且较难获得完整的核酸片段,虽然使用一个基因判断的亚型可能不够全面,但是可以作为标本的初步分型结果。建议未来可以使用全基因组测序的方法准确得到HIV的分型结果。本研究分型成功率为77.3%,仍有提升的空间。

综上所述,云南省德宏州HIV亚型分布复杂多样,有>50%的新发HIV感染者均为缅甸籍,缅甸籍感染者可能作为传染源,使HIV的亚型分布呈现复杂化发展,有必要对德宏州新报告HIV感染者开展持续的亚型监测,为未来更好地检测和控制HIV疫情提供科学依据。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Jia YJ, Sun JP, Fan L, et al. Estimates of HIV prevalence in a highly endemic area of China: Dehong Prefecture, Yunnan Province [J]. *Int J Epidemiol*, 2008, 37(6): 1287-1296. DOI: 10.1093/ije/dyn196.
- [2] 苏迎盈,刘慧鑫,吴静,等. 中国HIV-1基因亚型分布及流行趋势[J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(10): 1164-1168. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.020.
Su YY, Liu HX, Wu J, et al. Distribution of HIV-1 genotypes in China: a systematic review [J]. *Chin J Epidemiol*, 2014, 35(10): 1164-1168. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.020.
- [3] 张星灿,林青,王小光,等. 上海市闵行区2013年HIV-1分子流行病学研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2015, 16(3): 217-221. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2015.03.010.
Zhang XC, Lin Q, Wang XG, et al. Molecular epidemiological study of Human Immunodeficiency Virus type 1 in Minhang district of Shanghai [J]. *Chin J Prev Med*, 2015, 16(3): 217-221. DOI: 10.16506/j.1009-6639.2015.03.010.
- [4] 陈敏,姚仕堂,马艳玲,等. 云南省德宏州2011年HIV-1不同亚型人群分布特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2012, 33(9): 883-887. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.09.002.
Chen M, Yao ST, Ma YL, et al. Distribution of HIV-1 subtypes among different populations in Dehong Prefecture, Yunnan province, in 2011 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2012, 33(9): 883-887. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.09.002.
- [5] 段星,王可然,王继宝,等. 云南省德宏傣族景颇族自治州2015年新报告HIV感染者亚型分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38(8): 1107-1112. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.08.022.
Duan X, Wang KR, Wang JB, et al. HIV subtype in newly reported HIV infected cases in Dehong prefecture of Yunnan province, 2015 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2017, 38(8): 1107-1112. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.08.022.
- [6] 王洪,梁冰玉,周波,等. 2010-2012年广西壮族自治区HIV-1流行株*pol*基因亚型的分布情况[J]. *中华预防医学杂志*, 2016, 50(1): 79-84. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.01.014.
Wang H, Liang BY, Zhou B, et al. Distribution of subtypes of *pol* gene in HIV-1 epidemic strains in Guangxi Zhuang Autonomous Region, 2010-2012 [J]. *Chin J Prev Med*, 2016, 50(1): 79-84. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.01.014.
- [7] 鲍毅,王晓辉,陈琳. 深圳市人类免疫缺陷病毒-1不同亚型分布与传播途径的关联性分析[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(9): 532-537. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2012.09.005.
Bao Y, Wang XH, Chen L. The relationship between distribution of different subtypes of human immunodeficiency virus-1 and the transmission routes in Shenzhen [J]. *Chin J Infect Dis*, 2012, 30(9): 532-537. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2012.09.005.
- [8] 邓永岳,张春阳,严延生,等. 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[J]. *中华流行病学杂志*, 2014, 35(6): 714-719. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.000.
Deng YY, Zhang CY, Yan YS, et al. Genetic subtype and epidemiological feature of HIV-1 circulating strains among recently infected patients in Fujian province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2014, 35(6): 714-719. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.06.000.
- [9] 郑敏娜,宁铁林,高永军,等. 天津市2015年HIV流行和传播的分子流行病学特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2016, 37(8): 1142-1147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.08.018.
Zheng MN, Ning TL, Gao YJ, et al. Molecular epidemiology and transmission of HIV in Tianjin, 2015 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2016, 37(8): 1142-1147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.08.018.
- [10] Oyomopito RA, Chen YJ, Sungkanuparph S, et al. Risk group characteristics and viral transmission clusters in South-East Asian patients infected with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) circulating recombinant form (CRF) 01_AE and subtype B [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(9): 445-453. DOI: 10.1016/j.kjms.2015.07.002.
- [11] Pitisuttithum P, Rerks-Ngarm S, O'Connell RJ, et al. An HIV vaccine for South-East Asia-opportunities and challenges [J]. *Vaccines (Basel)*, 2013, 1(3): 348-366. DOI: 10.3390/vaccines1030348.
- [12] 韩志刚,吴昊,梁彩云,等. 广州市2008-2010年和2015年外籍HIV-1感染者病毒亚型分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2017, 38(6): 805-809. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.06.023.
Han ZG, Wu H, Liang CY, et al. Distribution of HIV-1 subtypes among foreign patients, in Guangzhou, between 2008 and 2010, and in 2015 [J]. *Chin J Epidemiol*, 2017, 38(6): 805-809. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.06.023.
- [13] 张佳峰,杨介者,潘晓红,等. 浙江省男男性行为人群HIV-1新近感染者的毒株亚型和传播簇研究[J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(1): 61-66. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.015.
Zhang JF, Yang JZ, Pan XH, et al. HIV-1 subtype diversity and transmission clusters among men having sex with men who recently got HIV-1 infection, in Zhejiang province [J]. *Chin J Epidemiol*, 2015, 36(1): 61-66. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.015.

(收稿日期:2017-09-30)

(本文编辑:斗智)