

无锡市 2013—2016 年 HIV-1 亚型及进化分析

殷玥琪¹ 陈剑双¹ 成浩² 张轩³ 吴楠楠⁴ 陈璐斯¹ 王蓓¹

¹东南大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系,南京 210009; ²无锡市新吴区疾病预防控制中心 214028; ³无锡市疾病预防控制中心 214000; ⁴无锡市第二人民医院医院感染管理科 214002

通信作者:王蓓, Email:wangbeilxb@163.com

【摘要】 目的 了解无锡市 HIV-1 亚型流行及进化特征,为预测本地 HIV-1 疫情变化提供参考依据。方法 样本来源于 2013 年 4 月至 2016 年 7 月无锡市部分 CD₄⁺T 淋巴细胞监测队列,进行 HIV-1 基因的扩增和测序,采用 ChromasPro 1.6 和 MEGA 7.0 软件构建 HIV-1 序列数据库;采用 FastTree 2.1.10 和 BEAST 1.7.2 软件和贝叶斯系统进化推断法重构 HIV-1 历史传播情况,采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。结果 有 205 例 HIV-1 感染者,其中 ≥50 岁占 32.68% (67/205)。共检测出 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF67_01B、B、CRF08_BC、CRF68_0B、CRF78_cpx 7 种 HIV-1 基因型及 1 例独特重组型。流行亚型以 CRF01_AE (51.67%, 93/180) 及 CRF07_BC (17.22%, 31/180) 为主,不同亚型之间传播方式的差异有统计学意义 ($\chi^2=16.99, P\leq 0.05$)。CRF67_01B 型 (12.78%, 23/180) 所占比例较高。贝叶斯系统进化推断法分析结果显示,无锡市 CRF67_01B 型进化率为 2.29×10^{-3} ,最近共同祖先时间约为 2 003.10 年,与江苏省及安徽省来源的参考株可能存在亲缘关系,CRF67_01B 型于 2003 年开始在无锡市出现传播。结论 2013—2016 年无锡市 HIV-1 亚型复杂多样,CRF67_01B 型已经开始在无锡市流行,应持续监测 HIV-1 亚型变化,从分子角度为疫情预测提供参考依据。

【关键词】 HIV-1 型; 亚型; 进化

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(2242016K40025);江苏省研究生科研与实践创新计划(KYCX17_0184)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.019

Transition and evolution of HIV-1 subtype among HIV-1 infections in Wuxi city, 2013–2016

Yin Yueqi¹, Chen Jianshuang¹, Cheng Hao², Zhang Xuan³, Wu Nannan⁴, Chen Lusi³, Wang Bei¹

¹Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; ²Wuxi Xinwu District Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214028, China; ³Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Wuxi 214000, China; ⁴Department of Healthcare Associated Infection Control, Wuxi Second People's Hospital, Wuxi 214002, China

Corresponding author: Wang Bei, Email:wangbeilxb@163.com

【Abstract】 **Objective** To understand the distribution of HIV-1 subtype in Wuxi city, to predict the local HIV-1 epidemics. **Methods** Samples were collected from the 'CD₄⁺T lymphocyte monitoring cohort study' in Wuxi from April 2013 to July 2016. HIV-1 gene was amplified, sequenced and with HIV-1 sequence database constructed, using both the ChromasPro 1.6 and MEGA 7.0 softwares. Bayesian phylogenetic inference was used to rebuild the history of HIV-1 transmission, while BEAST 1.7.2 and FastTree 2.1.10 software were used for data analysis. Statistical analysis using SPSS 22.0 software. **Results** Among the 205 subjects of HIV-1 infection, 32.68% (67/205) of them were over 50 years old. Seven subtypes (including CRF01_AE, CRF07_BC, CRF67_01B, B, CRF08_BC, CRF68_0B, CRF78_cpx) and one of the unique recombinant forms (URFs) were detected. The main subtypes were CRF01_AE (51.67%, 93/180) and CRF07_BC (17.22%, 31/180). Differences between subtypes and ways of transmission were statistically significant ($\chi^2=16.99, P\leq 0.05$). The proportion of CRF67_01B (12.78%, 23/180) was higher than before. Results from Bayesian phylogenetic inference analysis showed that the evolution rate was 2.29×10^{-3} and Time to the Most Recent Common Ancestor (tMRCA) was 2 003.10. CRF67_01B was probably related to the reference strains from

Jiangsu and Anhui provinces, and had been spreading in Wuxi since 2003. **Conclusions** HIV-1 subtypes seemed complex and diverse in Wuxi city in 2013–2016, with CRF67_01B being pervasive. Continuous molecular monitor program was still needed to provide reference for the prediction of epidemics, from the molecular perspective.

【Key words】 HIV-1; Subtype; Evolution

Fund programs: Fundamental Research Funds for the Central Universities (2242016K40025); Postgraduate Research and Practice Innovation Program of Jiangsu Province (KYCX17_0184)
DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.019

我国主要流行的HIV-1亚型发生过多次变化,从早期以B/B'和C亚型为主逐渐转变为如今以CRF01_AE及CRF07_BC为主^[1]。我国HIV-1新型重组株也在不断地更新报道,目前国际上已经发现101种循环重组型(circulating recombinant forms, CRFs),其中有21种首次报道发现于中国境内^[2]。除此以外,HIV-1的主要传播途径及流行地区也发生了巨大的变化,由最初的注射吸毒、有偿献血等血液传播为主转变为现阶段以性传播为主;HIV-1流行地区从集中流行于我国西南及中原地区到遍布每个省份^[3]。利用HIV-1基因信息数据,并结合采样时间、地点、人群及高危行为等信息进行系统进化分析,能够追溯本地流行病毒的起源及流行时间,并在一定程度上预测病毒的疫情变化^[4]。本研究分析无锡市2013—2016年HIV-1亚型及进化特征,从分子角度为本地疫情预测提供科学依据。

对象与方法

1. 研究对象:2013年4月至2016年7月无锡市各县(区)CDC开展HIV/AIDS常规CD₄⁺T淋巴细胞(CD₄)监测随访队列,收集基本信息及血液样本,于2016年7—12月进行个案流行病学调查205例,其中,接受抗病毒治疗160例,未接受抗病毒治疗为45例。占同时期无锡市HIV-1感染者总报告数的11.88%(205/1725)。排除非本地户籍人口或在本地居住时间<1年者。

2. 实验方法:

(1)基因扩增与测序:①HIV-1前病毒DNA提取:采用TIANamp Blood DNA Kit试剂盒(北京天根生化科技有限公司)及说明书的标准操作流程,从200 μl外周血淋巴细胞中提取100 μl前病毒DNA。②目的基因扩增:采用nest-PCR法和TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version试剂盒(北京宝日生物技术有限公司)对HIV-1基因 pol 区扩增。所需引物及反应条件参考文献[5]。③扩增产物鉴定及测序:扩增产物采用1%琼脂糖凝胶电泳确认,再送至生物工程(上海)股份有限公司测序。

(2)序列分析:①使用ChromasPro 1.6软件对测序结果进行拼接,采用MEGA 7.0软件进行序列比对、清理及剪切。②分别将序列上传至HIV序列数据库(<https://www.hiv.lanl.gov/>)进行亚型判断并下载相似度较高的参考序列,并使用FastTree 2.1.10软件构建近似最大似然树(maximum likelihood tree, ML-tree),以节点处bootstrap>0.90判别亚型。③使用BEAST 1.7.2软件对亚型相同序列进行贝叶斯系统进化推断,采用Exponential relaxed clock Uncorrelated为分子生物钟模型,并采用贝叶斯天际线图(Bayesian Skyline Plot, BSP)方法对该亚型的历史动态变化进行推断,结果区间采用95%最大后验概率密度可信区间(95% highest posterior density, 95% HDP)。设定蒙特卡罗模拟链长为50 000 000,迭代频次1 000。当有效样本数(effective sampling size, ESS)>200时判定为模型收敛,并使用Tracer 1.7软件去除10%初始树后生成合意树(maximum clade credibility tree, MCC-tree)。

3. 统计学分析:使用SPSS 22.0软件进行统计学分析。分类资料包括各组的不同性别、不同亚型间传播途径的构成差异采用 χ^2 检验,各组CD₄均值差异采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,双侧检验。

结 果

1. 人口学特征:205例HIV-1感染者,男性为88.29%(181/205),年龄(43.85±12.44)岁,其中≥50岁老年人为32.68%(67/205)。初中、高中/中专文化程度为62.44%(128/205),男男性行为传播为63.90%(131/205)。

2. HIV-1亚型分析:180例样本(87.80%, 180/205)成功扩增并获得病毒序列,与参考序列共同构建ML-tree,分型结果显示共检测出7种亚型和1例独特重组型(unique recombinant forms, URFs),以CRF01_AE(51.67%, 93/180)为主,其他为CRF07_BC(17.22%, 31/180)、CRF67_01B(12.78%, 23/180)。其他亚型还包括B(9.44%, 17/180)、CRF08_BC(5.00%, 9/180)、CRF68_01B(2.22%, 4/180)、CRF78_cpx

(1.11%, 2/180)和URFs(0.56%, 1/180)。

HIV-1 亚型不同传播途径构成不同($\chi^2=16.99$, $P\leq 0.05$), CRF67_01B(86.36%, 19/22)、CRF01_AE(70.97%, 66/93)及CRF07_BC(57.14%, 16/28)以男男性行为传播途径为主, B(52.94%, 9/17)及其他亚型(68.75%, 11/16)以异性性传播为主。见表1。

表1 2013—2016年无锡市HIV-1亚型不同传播途径构成比(%)

HIV-1 亚型	男男性行为传播	异性性传播
CRF01_AE	66(70.97)	27(29.03)
CRF07_BC	16(57.14)	12(42.86)
CRF67_01B	19(86.36)	3(13.64)
B	8(47.06)	9(52.94)
其他 ^a	5(31.25)	11(68.75)

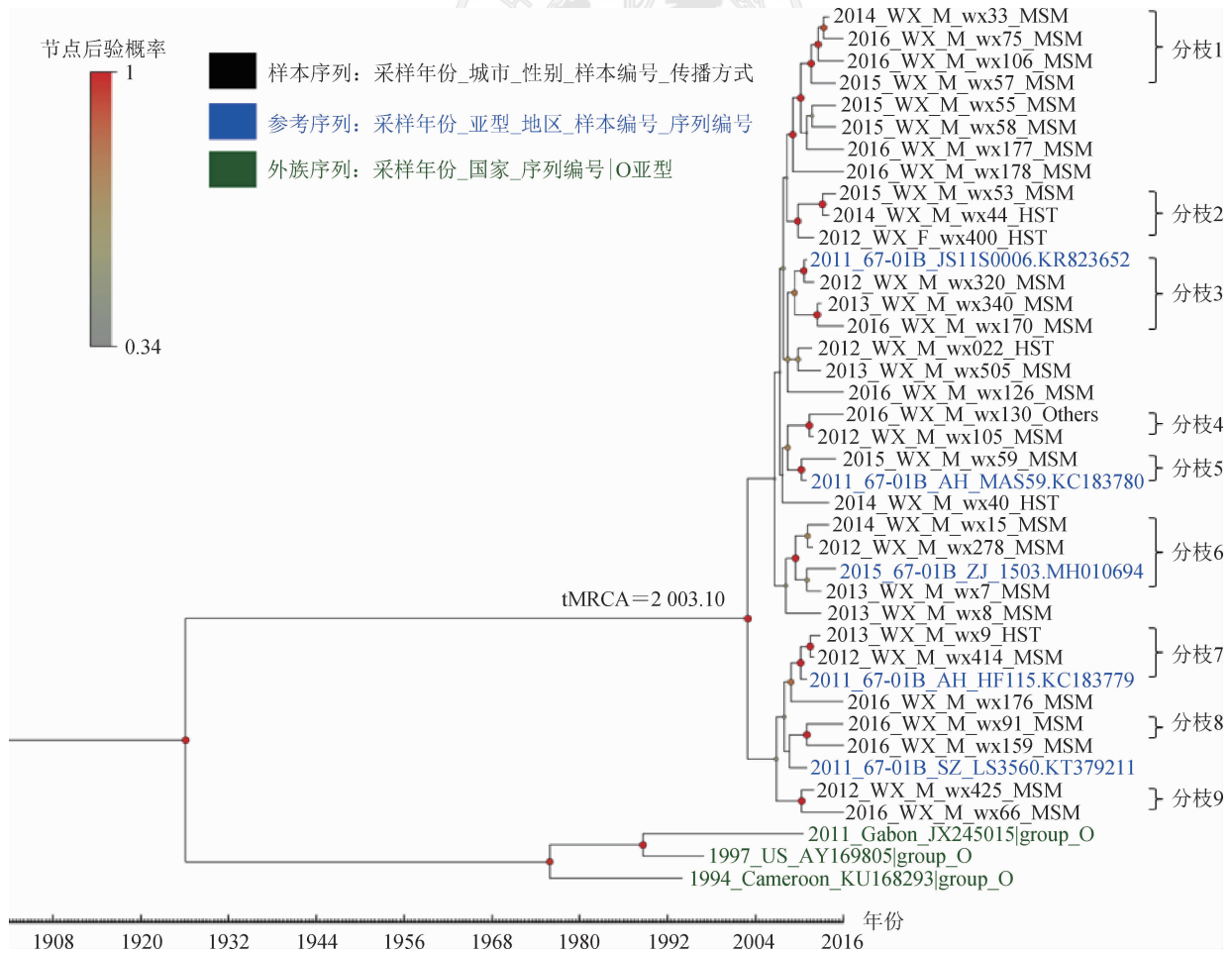
注:^a包括CRF08_BC、CRF68_01B、CRF78_cpx和URFs

3. CRF67_01B 进化分析: 无锡市此前无CRF67_01B流行的相关报道, 因此对该亚型进行流行历史重构分析。共获得CRF67_01B *pol* 区序列23条, 结合前期研究所得的12条无锡市2012—2013年

HIV-1 序列及5条从HIV序列数据库下载的参考序列, 共计40条CRF67_01B序列进行贝叶斯系统进化推断, 以O亚型作为外族序列。结果显示CRF67_01B的进化率为 2.29×10^{-3} (95%HPD: $9.94 \times 10^{-4} \sim 3.60 \times 10^{-3}$), 最近共同祖先时间(tMRCA)为2003.10年。结点>0.90的后验概率标记在图1中, 本研究中无锡市CRF67_01B存在9个小分枝, 除江苏省内参考序列之外, 安徽省参考株与无锡市序列呈现出较近的亲缘关系, 2个省之间可能存在传播关联。不同性别及不同传播方式之间也存在较为相近的亲缘关系, 因此不同高危行为人群之间可能存在交叉传播。

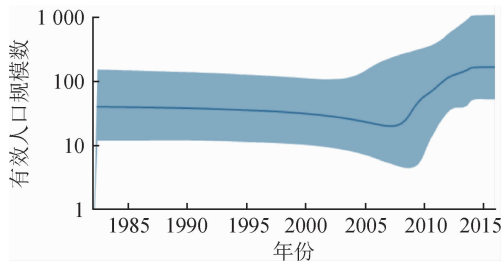
对无锡市CRF67_01B采用BSP法进行历史动态演变模拟结果显示, 该亚型于2003年开始在无锡市出现, 其有效人口规模数经历了2003—2008年平稳阶段和2008—2013年快速增长阶段, 2014年后趋于平稳。见图2。

4. 重组分析: wx37号样本在*pol*区表现为不同



注: 不同颜色标记为数据库中下载的参考株, 参考序列采样地点分别来自江苏省(JS)、安徽省(AH)、浙江省(ZJ)、深圳市(SZ); MSM为男男性行为传播, HST为异性性传播

图1 2013—2016年无锡市HIV-1 CRF67_01B亚型构建合意树



注:灰蓝色线(区域)为估计的CRF67_01B亚型的有效人口规模数中位数(95%CI)

图2 2013—2016年无锡市HIV-1亚型CRF67_01B的贝叶斯天际线图

于CRF07_BC与CRF08_BC的B、C亚型重组体,在进化树中与0708亚型参考株同源性较高。为进一步了解该样本HIV-1亚型,利用已经提取的核酸扩增wx37号样本的env(823 bp, HXB2: 6 551 ~ 7 374)与gag(737 bp, HXB2: 1 098 ~ 1 835)区,不同区表现为不同的分型结果:env(CRF01_AE)、gag(C)。wx37号样本的pol、env、gag 3个区建立的重组亚型模式见图3。样本wx37为B/C/CRF01_AE重组型,该HIV感染者为69岁男性农民,异性性传播感染,无STD感染史,已接受抗病毒治疗。

讨论

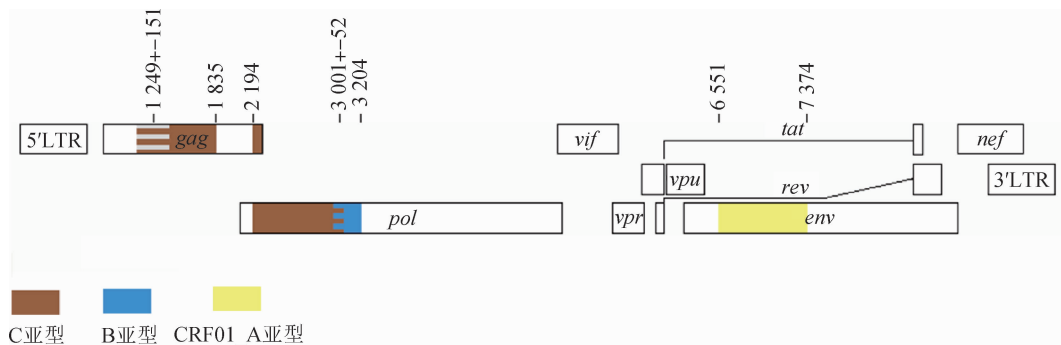
2013—2016年无锡市HIV-1感染者以男男性行为传播为主,与江苏省HIV-1主要传播方式相一致,但是年龄结构有所不同。江苏省MSM以青年居多,而无锡市≥50岁老年人(32.68%, 67/205)占有较高比例,这与当地高度老龄化人口结构特征相符^[6]。

180例扩增成功的样本中,共检测出7种HIV-1亚型与1例UFRs,其中CRF78_cpx未曾在无锡市有过报道。目前无锡市仍然以CRF01_AE及CRF07_BC流行为主,与全国流行亚型一致^[7],也与江苏省

和无锡市的早期研究一致^[8-9]。2例为注射吸毒方式的HIV-1感染者均为CRF07_BC,这与CRF07_BC起源于云南省注射吸毒人群相符合^[10]。

本研究发现HIV-1的7种亚型中,CRF67_01B占12.78%(CRF01_AE与CRF07_BC分别为51.67%与17.22%),这在江苏省2016年之前未见报道^[11]。CRF67_01B是由CRF01_AE与B亚型重组而成。安徽省于2014年在全球范围内首次报道了CRF67_01B,并向HIV序列数据库提交CRF67_01B全长序列,其样本来源于安徽省2011年采样的MSM感染者^[11],江苏省于同年报道检测出2010年采样的MSM感染者为CRF67_01B^[12]。采用BSP法结果显示,2003年无锡市开始出现CRF67_01B亚型,有效人口规模数经历了5年平稳阶段和5年快速增长阶段,2014年后趋于平稳,与该亚型最初报道时间相符、地点相近,系统进化分析显示本研究所得无锡市序列与江苏省及安徽省参考序列节点后验概率大于0.09,可能存在亲缘关系,提示该亚型可能在江苏省与安徽省等地区形成,经过了10多年的传播逐渐在本地流行。BSP法分析显示,该亚型的有效人群规模从2014年开始趋于稳定,提示CRF67_01B在无锡市以稳定的速率流行,随着时间的推移,未来可能有更多该亚型的感染者出现。本研究中CRF67_01B传播方式以性传播为主,男男性行为与异性性行为两种传播方式之间存在交叉,由于数据量不足,尚不能得出CRF67_01B在不同高危人群中的传播模式,需要持续的分子监测掌握其流行规律。

CRF78_cpx为云南省2016年首次报道^[13],是CRF01_AE、B与C重组的HIV-1亚型。除此以外,1例无法判断型别的URFs,重组分析结果显示由CRF01_AE、B与C重组而成。由此可见无锡市HIV-1亚型多样化程度增加,可能有新的重组亚型



注:数字为不同区扩增长度,不同颜色为该区对应亚型;gag区分型结果显示为C亚型,pol区分型结果显示为C与B的重组型,env区的分型结果显示为CRF01_AE

图3 wx37样本HIV-1 pol、env与gag区重组示意图

在不断形成。

本研究存在不足。目前仅对 HIV-1 的 *pol* 区基因进行扩增测序,尚未对其他 3 个区进行扩增,未能做出判定部分重组毒株。因样本量较小及样本采集时间间隔较短,对 CRF67_01B 的进化分析不够全面充分,需要长期及完善的分子监测数据与及时的病毒进化分析,才能为疾病疫情的预测提供更加准确可靠的信息。URFs 样本未进行病毒全基因测序,尚不能判断该病毒为新型重组毒株,还需要后续实验来进一步验证。

综上所述,2013—2016 年无锡市 HIV-1 亚型复杂多样,CRF67_01B 已经开始在无锡市流行,应持续监测 HIV-1 亚型变化,从分子角度为疫情预测提供参考依据。有必要进行持续的分子流行病学监测,实时掌握本地区 HIV-1 亚型流行动态,从分子角度为疫情预测提供信息。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] U.S. Department of Energy's National Nuclear Security Administration. HIV sequence database-HIV circulating recombinant forms (CRFs) [EB/OL]. (2019-02-05) [2019-04-01]. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>.
- [3] 吴尊友. 我国艾滋病经性传播新特征与防治面临的挑战[J]. 中华流行病学杂志, 2018, 39(6): 707-709. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.06.002.
- Wu ZY. Characteristics of HIV sexually transmission and challenges for controlling the epidemic in China [J]. Chin J Epidemiol, 2018, 39(6): 707-709. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.06.002.
- [4] Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(5): 1185-1192. DOI: 10.1093/molbev/msi103.
- [5] 袁瑞,成浩,陈璐斯,等. 无锡市 HIV-1 毒株耐药基因突变的调查研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2016, 20(12): 1216-1220. DOI: 10.16462/j.cnki.zhjbkz.2016.12.008.
- Yuan R, Cheng H, Chen LS, et al. A survey on drug-resistance gene mutations in HIV-1 strains in Wuxi city [J]. Chin J Dis Control Prev, 2016, 20(12): 1216-1220. DOI: 10.16462/j.cnki.zhjbkz.2016.12.008.
- [6] 安娜青. 无锡市老龄化特征及对策研究[J]. 长沙民政职业技术学院学报, 2018, 25(2): 4-8. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5136.2018.02.002.
- An NQ. Study on the characteristics and countermeasures of aging in Wuxi city [J]. J Changsha Soc Work Coll, 2018, 25(2): 4-8. DOI: 10.3969/j.issn.1671-5136.2018.02.002.
- [7] Yuan R, Cheng H, Chen LS, et al. Prevalence of different HIV-1 subtypes in sexual transmission in China: a systematic review and Meta-analysis [J]. Epidemiol Infect, 2016, 144(10): 2144-2153. DOI: 10.1017/S0950268816000212.
- [8] 吴楠楠. 江苏省部分地区 HIV-1 亚型及耐药突变的流行病学研究[D]. 南京: 东南大学, 2018.
- Wu NN. A molecular epidemiological study on HIV-1 subtypes and drug-resistance in some parts of Jiangsu province [D]. Nanjing: Southeast University, 2018.
- [9] 成浩,袁瑞,谢彦昕,等. 无锡市艾滋病病毒感染分子流行病学调查[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(12): 1195-1199. DOI: 10.16462/j.cnki.zhjbkz.2015.12.003.
- Cheng H, Yuan R, Xie YX, et al. A molecular epidemiological study on the human immunodeficiency virus infection in Wuxi city [J]. Chin J Dis Control Prev, 2015, 19(12): 1195-1199. DOI: 10.16462/j.cnki.zhjbkz.2015.12.003.
- [10] Su L, Graf M, Zhang YZ, et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China [J]. J Virol, 2000, 74(23): 11367-11376. DOI: 10.1128/jvi.74.23.11367-11376.2000.
- [11] Wu JJ, Meng ZF, Xu JQ, et al. New emerging recombinant HIV-1 strains and close transmission linkage of HIV-1 strains in the Chinese MSM population indicate a new epidemic risk [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54322. DOI: 10.1371/journal.pone.0054322.
- [12] Guo HX, Hu HY, Zhou Y, et al. A novel HIV-1 CRF01_AE/B recombinant among men who have sex with men in Jiangsu province, China [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2014, 30(7): 706-710. DOI: 10.1089/AID.2014.0012.
- [13] Song YD, Feng Y, Miao ZJ, et al. Near-full-length genome sequences of a novel HIV-1 circulating recombinant form, CRF01_AE/B/C (CRF78_cpx), in Yunnan, China [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2016, 32(6): 601-606. DOI: 10.1089/AID.2015.0351.

(收稿日期: 2019-05-13)

(本文编辑: 斗智)