

浙江省 46 对夫妻双方感染艾滋病毒者中病毒株亚型及传播关系的研究

潘晓红 张佳峰 姚亚萍 徐云 杨介者 郭志宏

【摘要】 目的 分析研究夫妻双方艾滋病毒(HIV)感染病毒株亚型特征和夫妻间传播关系。方法 以浙江省艾滋病疫情报告中双方均感染 HIV 的夫妻为研究对象,基因序列分析结合个案危险行为史分析,采用巢式 PCR 扩增 *gag* 基因区,分析亚型特征、夫妻间基因距离,并做系统进化树分析夫妻间传播关系。结果 获得 46 对夫妻(92 例)的样本检测结果,其中 39 例 CRF01_AE、10 例 CRF07_BC、18 例 CRF08_BC、18 例 B、5 例 C、2 例 CRF02_AG 六种亚型,分别占 42.4%、10.9%、19.6%、19.6%、5.4% 和 2.2%。夫妻双方亚型一致的为 44 对(95.7%)。经系统树分析,41 对夫妻序列中,33 对(80.5%)提示有夫妻间直接传播关系,其中 CRF01_AE、CRF08_BC 和 CRF02_AG 主要为非婚性行为感染后经婚内性行为传播,B 亚型和 CRF07_BC 主要为经血传播感染后经婚内性行为传播。结论 浙江省夫妻双方感染 HIV 的病毒株亚型呈现多样性,CRF01_AE 是主要类型。一方高危行为感染后经婚内性传播是夫妻人群感染的主要模式。

【关键词】 艾滋病病毒;亚型;传播关系;夫妻

Subtype and transmission of HIV strain in both HIV infected spouses in Zhejiang province
PAN Xiao-hong, ZHANG Jia-feng, YAO Ya-ping, XU Yun, YANG Jie-zhe, GUO Zhi-hong. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: PAN Xiao-hong, Email: xhpan310009@yahoo.com.cn

This work was supported by a grant from the Provincial Medicine and Health Research Fund of Zhejiang Province (No. 2007A040)

【Abstract】 Objective To analyse the subtype and transmission of HIV strain in both HIV infected spouses. Methods Reported both HIV infected spouses were selected as objects. Analysis on genetic sequence and high risk behaviors was carried out. Subgenomic *gag* was amplified by nest-PCR analysis of whole blood samples from objects. Genetic subtype characterization of HIV was identified and pairwise genetic distances were calculated. Sequence relationships were also examined by phylogenetic tree analysis. Results Genetic sequences of 46 pairs (92 cases) were obtained. The genetic subtype comprised 39 CRF01_AE (42.4%), 10 CRF07_BC (10.9%), 18 CRF08_BC (19.6%), 18 B (19.6%), 5 C (5.4%) and 2 CRF02_AG (2.2%). 44 pairs had the same subtype between the two partners, accounted for 95.7% of the total. 33 of the 41 pairs with phylogenetic tree analysis were found having epidemiological linkage in pair wise. Sexual behaviors of out-marriage were the main risk factors of CRF01_AE and CRF08_BC and CRF02_AG strains infection. Blood transmission was associated with B and CRF07_BC. Conclusion The HIV strains subtype detected in HIV infected spouses characterized with diversity. CRF01_AE was the main strain subtype. The main route of transmission to the spouses was through unprotected sexual contacts. Surveillance programs on HIV infected partner together with intervention between the spouses should be improved.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Genetic subtype; Transmission relationship; Spouses

浙江省自 1998 年首次报告夫妻双方感染艾滋病毒(HIV),截止 2008 年底全省共报告双方感染 HIV 的夫妻或固定性伴 570 例,占全省报告异性性

传播疫情的 28.4%,其中 2006—2008 年报告数占 59.3%。夫妻人群感染 HIV 是艾滋病从高危人群向普通人群传播的重要环节,目前国内较少有关该人群的 HIV 分子流行病学研究,因此研究该人群的 HIV 病毒株亚型分布特征及在夫妻间的传播关系,有利于深入分析人群的流行特征,为加强监测和干预提供依据。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.06.008

基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金(2007A040)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心

通信作者:潘晓红, Email: xhpan310009@yahoo.com.cn

材料与方法

1. 研究对象和样本选择: 根据浙江省艾滋病疫情报告, 选择夫妻双方均感染 HIV 为研究对象, 根据疫情报告有关危险行为史等个案信息建立夫妻对数据库, 并利用与夫妻对数据库相对应的浙江省艾滋病确证中心实验室-70 ℃冻存全血标本进行样本检测。

2. 夫妻感染 HIV 行为信息分类: 夫妻任何一方如有除婚内性行为外的高危行为, 则该研究对象的感染危险行为属该类高危行为, 包括非婚性行为史、注射吸毒行为史、献血浆史、输血史、男男性行为史; 如夫妻中一方仅有婚内性行为史, 配偶有高危行为, 则仅有婚内性行为一方的感染行为分类为婚内性行为史。如夫妻双方均没有除婚内性行为外的高危行为, 则感染危险行为分类为不详。

3. 核酸提取及目标片段的扩增、序列测定: 采用 QIAGEN 公司 DNA Blood Mini Kit 对 200 μl 全血标本进行基因组 DNA 提取。以提取的 DNA 为模板, 采用巢式 PCR 扩增 *gag* 基因。第一轮 PCR 采用 25 μl 扩增体系, 各成分终浓度: 2.0 mmol/L Mg²⁺, 0.2 mmol/L dNTP, 引物 GAG-L/GAG-E2 浓度为 0.4 μmol/L, 1.5 U Ex Taq, 5.0 μl DNA 模板。第二轮 PCR 采用 50 μl 扩增体系, 各成分终浓度: 2.0 mmol/L Mg²⁺, 0.2 mmol/L dNTP, 引物 GUX/GDX 浓度为 0.4 μmol/L, 2.0 U Ex Taq。 *gag* 基因扩增引物序列及 PCR 反应条件: 外侧引物为 GAG-L: 5'-TCG ACG CAG GAC TCG GCT TGC-3', GAG-E2: 5'-TCC AAC AGC CCT TTT TCC TAG G-3', 产物大小为 1347 bp; 第一轮 PCR 反应条件为 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 90 s, 30 个循环; 4 ℃ 保存。内侧引物为 GUX: 5'-GGC TAG TTC CTC CTA CTC CCT GAC AT-3'; 产物大小为 1081 bp, 反应条件 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 60 s, 35 个循环; 4 ℃ 保存。最后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定是否为目标产物。21 份标本采用 Gag F2/Gag2, c-gag/306 的巢式 PCR 扩增方法^[1], 以获得相应的 *gag* 基因序列。由上海生工生物工程技术有限公司提供测序, 所用测序仪器为 ABI PRISM 3730, 测序试剂为 BigDye terminator v3.1。

4. 序列分析: 使用 VECTOR NTI suite 9.0 软件包组件 Contig Express 对序列进行编辑和校正。使用 Clustal X(1.8) 将样本序列和标准序列比对进行序列的质量控制。国际参考株序列来自 Los

Alamos HIV 数据库; 经整理的样本序列利用 HIV BLAST Search 工具对上述序列分析以确定基因亚型 (http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html), 另外也通过系统进化树分析, 综合判断确定基因亚型。用 MEGA 4 软件计算亚型一致的成对夫妻间的基因距离, 并对序列进行 Neighbor-Joining 系统进化树构建。

5. 直接传播关系的推测: 夫妻双方感染 HIV 亚型分类一致, 系统进化树分析中, 夫妻对的基因序列较其他夫妻对的基因序列首先聚集在一个进化簇上, 则推测该对夫妻之间有直接传播关系。

结 果

1. 研究对象基本信息: 共获得 46 对 (92 例) 夫妻的 HIV 毒株 *gag* 基因序列结果。46 对夫妻中最小年龄 19 岁, 最大 59 岁, 平均年龄 (34.9 ± 8.524) 岁。初中及以下程度者 75 例 (81.5%); 94.6% 为汉族。浙江省户籍 61 例 (66.3%)。35 对夫妻户籍一致, 其中浙江省户籍为 25 对, 外省户籍为 10 对 (来自云南、贵州、安徽等 7 个省份); 11 对夫妻户籍不一致, 其中男性以浙江省户籍为主 (90.9%), 女性中外省户籍为 10 例 (90.9%), 分别来自云南、广西、贵州、四川省 (区)。农民、家政或待业人员、民工, 分别占 20.7%、19.6%、18.5%。有 4 对夫妻采样间隔时间为 1 年, 3 对夫妻采样间隔时间为 2 年, 其余采样间隔时间在 1 年内。46 对夫妻分布在浙江省 90 个县 (市、区) 的 34 个县 (市、区)。

2. HIV 亚型分布: CRF01_AE 39 例 (42.4%), CRF07_BC 10 例 (10.9%), CRF08_BC 和 B 亚型各 18 例 (分别占 19.6%), C 亚型 5 例 (5.4%), CRF02_AG 2 例。亚型结果一致的有 44 对, 亚型一致率为 95.7%, 不一致的有 2 对。

3. 系统树分析: 使用的标准株为 CRF01_AE.CM240、CRF07_BC.97CN001、CRF08_BC.97CN6F、C.IN.98IN022, 以及 B 亚型的 B.RL42、B.FR.HXB2、B.US, C 亚型的 C.IN.98IN022、CRF02_AG 的 CRF02_AG.NG。44 对夫妻样本亚型结果一致的序列中, 根据进化树分析对序列信息容量的要求, 对其其中 41 对夫妻样本序列进行基因序列系统进化树分析, 结果有 33 对夫妻的基因序列首先聚集在一个进化簇上, 然后才与其他样本序列或标准株聚集在一起, 显示出夫妻间的 HIV 毒株序列非常接近, 提示样本中存在夫妻之间直接传播关系占 80.5% (33/41)。33 对夫妻双方间病毒株亚型平均基因距离为

2.02% ± 1.22% (表 1), CRF01_AE、CRF08_BC 和 B 亚型的系统进化树见图 1~3。另外 8 对夫妻的基因序列并不能直接聚集在一个进化簇上,因此不能提示夫妻之间有直接传播关系。

表 1 系统进化树分析 HIV 亚型传播关系和夫妻间病毒株基因间距

亚型	亚型一致夫妻对数	有传播关系夫妻对数	有传播关系夫妻成对基因间距 ($\bar{x} \pm s$)
01_AE	18	13	0.015(0.003 ~ 0.039) ± 0.0095
07_BC	3	2	0.017(0.007 ~ 0.027) ± 0.0141
08_BC	9	7	0.021(0.012 ~ 0.044) ± 0.0113
B	8	8	0.027(0.011 ~ 0.046) ± 0.0140
C	2	2	0.016(0.016 ~ 0.016) ± 0
02_AG	1	1	0.043
合计	41	33	0.020(0.003 ~ 0.046) ± 0.0122

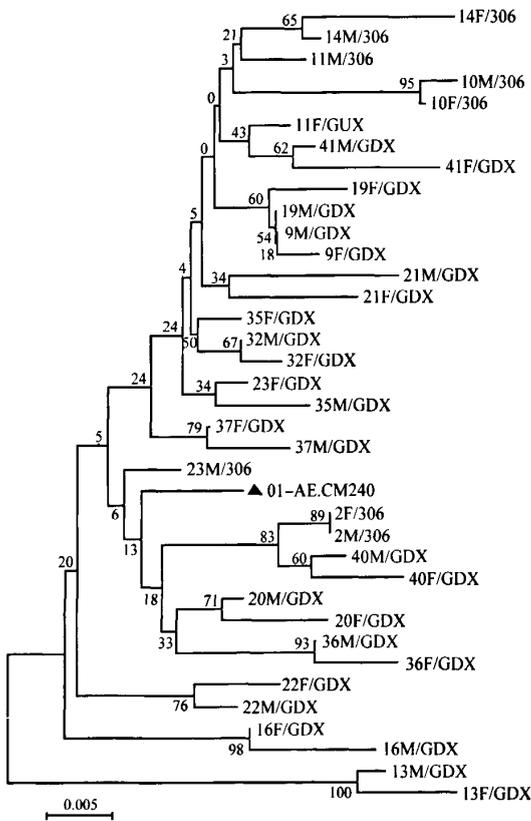


图 1 CRF 01_AE 亚型系统进化树 (共 18 对)

4. 不同序列分析结果与夫妻行为特征的关系:

(1) 提示有直接传播关系夫妻的危险行为特征:

33 对夫妻中, CRF01_AE 26 例 (39.4%), CRF07_BC 4 例 (6.1%), CRF08_BC 14 例 (21.2%), B 亚型 16 例 (24.2%), C 亚型 4 例 (6.1%), CRF02_AG 2 例 (3.0%)。33 对夫妻中, 23 对 (69.7%) 单方有危险行为史, 有 8 对 (24.2%) 夫妻双方均有危险行为史, 2 对 (6.1%) 夫妻危险行为史不详。CRF01_AE 感染夫妻

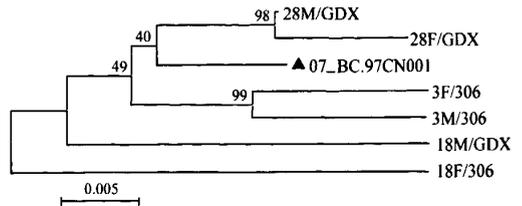


图 2 CRF07_BC 亚型 (共 3 对)

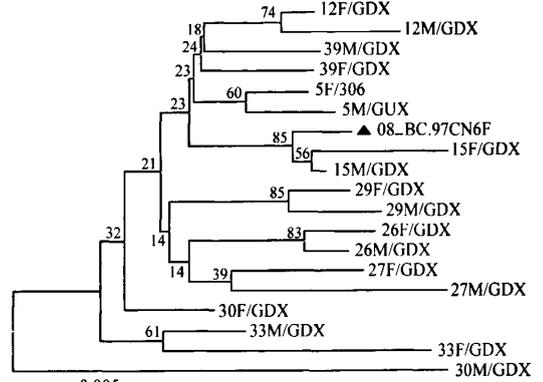


图 3 CRF08_BC 型系统进化树 (共 9 对)

中以男方有危险行为为主, 占 53.8% (14/26), 见表 2。33 对夫妻中, 双方户籍不一致的有 9 对, 其中 7 对的女方来自外省 (云南、广西、四川、江西等省区)。根据危险行为特征, CRF01_AE 主要与非婚性行为有关; B 亚型和 CRF07_BC 感染夫妻与血液传播途径感染有关, 占 50.0%, 包括输血、献血浆以及注射吸毒等单一危险行为和合并多种血液传播有关行为。B 亚型中有 1 对夫妻与男性有男男性行为有关。CRF08_BC 感染主要与非婚性行为感染有关 (表 3)。1 对 CRF02_AG 感染夫妻中男方曾有在非洲嫖娼史。

表 2 系统进化树分析夫妻间有直接传播关系的 HIV 亚型检测结果与危险行为性别特征的关系

危险行为的性别特征	不同亚型类别例数						合计
	CRF 01_AE	CRF 07_BC	CRF 08_BC	B	C	CRF 02_AG	
仅男方	14	2	4	8	0	0	28
仅女方	6	2	4	4	2	0	18
夫妻双方	6	0	2	4	2	2	16
行为不详	0	0	4	0	0	0	4
合计	26	4	14	16	4	2	66

(2) 提示没有直接传播关系夫妻的危险行为特征: 系统树分析未提示直接传播关系的 8 对夫妻中, CRF01_AE 5 对, CRF08_BC 2 对, CRF07_BC 1 对。8 对夫妻中有 7 对双方户籍一致。CRF01_AE 的 5 对中, 3 对夫妻中男性有非婚性行为, 1 对为双方均有非婚性行为史, 1 对夫妻为危险行为史不

表3 系统进化树分析夫妻间有直接传播关系的HIV亚型检测结果与感染行为特征的关系

感染行为	不同亚型类别例数							合计
	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	B	C	CRF02_AG		
非婚性行为	14	0	5	1	1	2	23	
婚内性行为	10	2	4	6	1	0	23	
注射毒品	1	1	1	0	1	0	4	
输血	0	1	0	2	1	0	4	
献血浆	0	0	0	2	0	0	2	
男男性行为	0	0	0	1	0	0	1	
一种以上高危行为	1	0	0	4	0	0	5	
不详	0	0	4	0	0	0	4	
合计	26	4	14	16	4	2	66	

注:一种以上高危行为不包括婚内性行为

详。CRF07_BC的1对夫妻中女方有非婚性行为。CRF08_BC 2对,1对为男性有非婚行为,另1对是女性有非婚性行为,男性则有注射毒品行为。

(3)病毒株亚型结果不一致夫妻的危险行为特征:2对病毒株亚型不一致夫妻,其型别为C亚型(男方)与CRF07_BC(女方)、CRF07_BC(男方)与CRF01_AE(女方)。第一对夫妻的确诊时间间隔12年,是男方于1990年确诊HIV阳性若干年后结婚,婚内性行为中未坚持使用安全套,女方否认有其他危险行为史。另1对夫妻是双方都曾有过非婚性行为,确诊时间间隔1年,女方婚前性伴HIV阳性,自身检出HIV阳性后约6个月与男方结婚,婚内性行为未坚持使用安全套,男方婚前和婚后均有非婚性行为。

讨 论

本次研究结果表明,浙江省46对夫妻中双方感染HIV亚型以CRF01_AE为主,也有CRF07_BC、CRF08_BC、B、C和CRF02_AG等亚型和重组型的存在,呈现亚型的多样性,与浙江省HIV流行毒株亚型分布接近^[2]。

对夫妻人群的感染病毒株和危险行为分析,表明非婚性行为是夫妻感染CRF01_AE、CRF08_BC的主要危险因素,输血、注射吸毒、献血浆和男性同性性行为是感染B、CRF07_BC亚型的主要危险因素,本研究结果与全国和浙江省HIV分子流行病学调查接近^[2]。7例外来婚嫁女家庭的夫妻感染,提示有HIV流行的地区间的人口婚嫁活动是造成夫妻间传播的危险因素。不同亚型病毒株通过高危行为感染家庭中有危险行为一方后,再通过夫妻间性行为进一步传播,这将在一定程度上改变原来不同亚型与传播途径关系的特征。不同亚型病毒株经异性性行为传播的概率和影响因素还需结合队列观察研究

进一步分析。

HIV分子生物学研究方法曾应用于多种疑似传播关系的分析^[3-5]。Trask等^[6]曾在赞比亚开展HIV感染血清学状况不一致夫妻队列研究中夫妻间性传播的分子流行病学研究,描述夫妻间传播病毒株亚型特征和流行病学传播的关系。在本研究双方均有亚型结果的46对夫妻样本中,有44对(95.6%)HIV亚型一致。在41对夫妻样本系统树分析中,80.5%的夫妻检测结果提示有直接传播关系,比例稍低于Trask等的研究。

本研究中8对夫妻感染HIV属同一亚型。但未提示直接传播关系,这除了考虑夫妻间存在不同感染来源和同一病毒株基因在体内变异的可能性外,以下因素影响了序列分析:①单向测序反应得到的序列难以避免存在一定比例的错误(<1.5%);②夫妻双方的病毒株经历不同的进化历程,可能产生随机差异,从而造成两病毒株序列上的差异;③进化树分析的序列所包含的有限信息在一定程度上使进化簇变异增大。正是序列存在一定的差异度,使得基因距离增大,在系统进化树上表现出一定程度的离散。对于本次研究中2对亚型不一致和基因序列分析不能提示是直接传播关系的夫妻对样本,还需进一步研究。

(感谢浙江省各市和相关县、市、区疾病预防控制中心的支持和协作)

参 考 文 献

- [1] Yao YP, Liang H, Yang JZ, et al. Subtype and sequence analysis of the gag genes among HIV-1 strains in Zhejiang province. Chin J Health Lab Technol, 2004, 14: 660-661. (in Chinese) 姚亚萍,梁浩,杨介者,等.浙江省HIV-1流行毒株gag基因序列测定和亚型分析.中国卫生检验杂志,2004,14:660-661.
- [2] Pan XH, Yao YP, Xia SC, et al. Moleculo-epidemiological study of HIV infection cases in 2003-2005 in Zhejiang province. Chin J AIDS & STD, 2007, 13: 308-310. (in Chinese) 潘晓红,姚亚萍,夏时畅,等.浙江省2003-2005年HIV-1感染者分子流行病学研究.中国艾滋病性病,2007,13:308-310.
- [3] Belec L, Mohamed AS, Mülle-Trutwin MC, et al. Genetically related human immunodeficiency virus type 1 in three adults of a family with no identified risk factor for intrafamilial transmission. J Virol, 1998, 72: 5831-5839.
- [4] Rozenbaum AW, Lot F, Frocrain-Herchkovitch C, et al. Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, 2000, 74: 2525-2532.
- [5] Song JZ, Wang B, Ge YC, et al. Significance of plasma and peripheral blood mononuclear cell derived HIV-1 sequences in establishing epidemiologic linkage between two individuals multiply exposed to HIV-1. Microb Pathog, 1999, 26: 287-298.
- [6] Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zambia. J Virol, 2002, 76: 397-405.

(收稿日期:2009-10-13)

(本文编辑:张林东)