

· 现场调查 ·

西安市男男性行为人群感染 HIV-1 的分子流行病学研究

张海兰 闫永平 李恒新 李端 卫晓丽 郑海潮 赵鑫

【摘要】 目的 了解西安市 MSM 感染 HIV-1 毒株亚型分布。方法 采集 2010—2012 年西安市确证的经男男同性传播的 HIV 感染者外周静脉血 5 ml, 抗凝后分离血浆, 提取总 RNA, 利用巢式反转录 PCR 扩增 HIV-1 *gag* 和 *env* 基因, 利用 Mega 5.2 软件与国际参考序列进行拼接、比对、计算基因离散率和构建系统进化树; 同时进行流行病学问卷调查, 行为学调查重点包括性行为特征、吸毒史、献血史等。结果 168 份样本中, 165 例 *gag* 与 *env* 序列分型结果一致, 分别为 79 例 (47.0%) CRF01_AE、74 例 (44.0%) CRF07_BC、12 例 (7.1%) B 亚型。3 例 *gag* 与 *env* 序列分型结果不一致, 分别为 2 例 (1.2%) CRF01_AE/A1、1 例 (0.6%) CRF07_BC/CRF01_AE。结论 西安市 MSM 感染 HIV-1 毒株亚型主要为 CRF01_AE、CRF07_BC。

【关键词】 男男性行为者; 艾滋病; HIV-1 亚型

Molecular epidemiology related to human immunodeficiency virus type 1 infection in men having sex with men in Xi'an Zhang Hailan^{1,2}, Yan Yongping¹, Li Hengxin², Li Duan¹, Wei Xiaoli², Zheng Haichao², Zhao Xin². 1 The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2 Xi'an Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Yan Yongping, Email: yanyping@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the subtype distribution of HIV-1 infection among men having sex with men (MSM) in Xi'an city. **Methods** 5 ml anti-coagulating blood samples were collected from MSM who had been reported during 2010–2012 in Xi'an. Both *gag* and *env* genes were amplified by nested RT-PCR from the extracted RNA and then sequenced. The acquired sequences were compared with international subtype references, and then the genetic distances were calculated and phylogenetic trees were constructed by Mega 5.2. Epidemiological information including sexual behavior characteristics, history of drug use, blood donation, etc. were gathered. **Results** 168 samples were successfully amplified and sequenced. Results from Phylogenetic analysis showed that the *gag* and *env* sequences of 165 samples shared the same subtypes, of which 79 (47.0%) were CRF01_AE, 74 (44.0%) were CRF07_BC and 12 (7.1%) belonged to subtype B. There were 3 samples with *gag* and *env* sequences classified into different subtypes, of which 2 (1.2%) were CRF01_AE/A1, and the other 1 was CRF07_BC/CRF01_AE. **Conclusion** At least three HIV-1 subtypes including CRF01_AE, CRF07_BC were identified among MSM population in Xi'an city.

【Key words】 Men having sex with men; AIDS; HIV-1 subtype

西安市属于艾滋病低流行地区, 2002 年报告首例感染 HIV 的 MSM。2008—2012 年, 西安市 HIV 感染者中经男男同性传播比例由 29.4% 上升到 56.7%, 超过注射吸毒传播, 成为西安市艾滋病感染的最主要传播途径。为了掌握西安市 MSM HIV 感染现状, 本研究对 2010—2012 年经西安市确证实验室诊断的感染人群进行分子流行病学特征分析。

资料与方法

1. 资料来源: 采用单纯随机抽样方法从西安市疾病预防控制中心病例报告系统中抽取 2010—2012 年艾滋病确证实验室经免疫印迹试验确证阳性的经 MSM 传播的 HIV-1 感染者/AIDS 患者 278 例, 采用面对面访谈进行流行病学问卷调查, 内容包括一般情况、知识掌握情况、行为学特征及性取向或情感倾向。并采集新鲜全血 5 ml, EDTA 抗凝处理, 24 h 内分离血浆, -80 °C 冻存备用。

2. 研究方法: 使用德国 Qiagen 公司 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒, 按照操作说明书提取血

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.017

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学军事预防医学系流行病学教研室(张海兰、闫永平、李端); 西安市疾病预防控制中心(张海兰、李恒新、卫晓丽、郑海潮、赵鑫)

通信作者: 闫永平, Email: yanyping@fmmu.edu.cn

浆RNA。采用巢式RT-PCR方法扩增HIV-1 *gag* 基因区1 081 bp, *env* 基因区647 bp, 引物见表1, 由上海英骏生物技术有限公司合成。第一轮PCR使用宝生物工程(大连)有限公司 TaKaRa One-Step RNA PCR Kit(AMV)试剂盒, 第二轮PCR使用天根生化科技(北京)有限公司 2 × Taq PCR Mastermix (KT201)试剂盒。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定。PCR阳性产物送北京博迈德科技发展有限公司进行测序, 序列用 Sequencher 4.10 软件进行编辑和校对, 通过美国 Los Alamos HIV 数据库 (<http://www.hiv.lanl.gov/>) 中的 Gene Cutter 工具, 对样本序列进行多重比对, 并从数据库下载 HIV-1 不同亚型和重组型国际参考序列, 利用 BioEdit 软件合并多重比较结果, 个别碱基位置手动调整。利用 Mega 5.2 软件邻接法构建系统进化树, 计算基因距离。综合 *gag* 和 *env* 基因序列比对结果, 确定样本的基因亚型。

3. 统计学分析: 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 不同确证时间样本的 HIV-1 亚型分布差异比较采用 χ^2 检验, 不同亚型 MSM HIV-1 感染者首次 CD₄⁺T 淋巴细胞数量差异比较采用方差分析。

结 果

1. 基本特征: 共收回调查问卷240份, 从240例患者全血样本中成功扩增并测序168例, 平均年龄32(14~61)岁, 未婚99例, 已婚40例, 离异或丧偶29例。大专及以上80例, 高中及中专47例, 初中及以下41例。商业服务45例, 无业及待业35例, 学生及教师28例, 干部职员19例, 工人17例, 农民及民工17例, 医务人员5例, 退休2例。汉族166例, 回族和蒙古族各1例。本省户籍145例, 外省户籍23例。141例在西安市居住时间>2年。艾滋病知识知晓率93.8%。首次 CD₄⁺T 淋巴细胞计数为530(8~1 457) cells/ μ l。31例患者(18.9%)全血 CD₄⁺T 淋巴细胞计数 \leq 350 cells/ μ l, 需要接受抗病毒治疗。

62.5%的调查对象有双性性行为, 且发生异性性行为年龄早于同性性行为($P<0.001$)。57.7%的调查对象同性性行为方式主要是肛交, 每次性行为坚持使用安全套的比例为20.2%, 累计平均性伴数为5

(1~100)人, 近半年平均性伴数至少1(0~20)人。21.4%的调查对象有同居性伴。13.1%的人在性行为过程中曾使用兴奋剂或催情剂。24.4%的人有过献血史。所有调查对象均无吸毒史。168例调查对象中, 在知晓自己感染事实后, 仍与性伴发生性行为的比例为33.3%, 但感染后安全套使用率较高, 达91.1%。40例已婚感染者中, 67.5%的人很少和配偶发生性行为, 27.5%的人与配偶发生性行为的频率在每周>1次, 从未使用安全套的占20.0%。对于性取向或情感倾向调查, 同性占57.1%, 异性占4.8%, 双性占33.9%, 不确定占4.2%。

2. HIV-1 亚型结果及进化树分析: 在成功扩增及测序的168份样本中, 165份 *gag* 与 *env* 分型结果一致, 分别为 CRF01_AE 79例(47.0%)、CRF07_BC 74例(44.0%)、B亚型12例(7.1%)。3例 *gag* 与 *env* 分型结果不一致, 分别为 CRF01_AE/A1 2例(1.2%)、CRF07_BC/CRF01_AE 1例(0.6%)。重组型病毒占92.9%。

从 *gag* 进化树来看, B亚型中119、157、35、67、226号样本与云南瑞丽B亚型参考株聚集在一起, 236、27、147、159、150、232号样本聚集在一起。CRF07_BC亚型样本中, 163、18、117号样本高度同源。CRF01_AE亚型样本中, 131号样本与泰国CM240参考株非常接近, 53、201、239号样本高度同源(图1)。

从 *env* 进化树来看, B亚型的分布与 *gag* 基本一致。37和200号样本与伊朗A1亚型离散距离最近, 且两者同源性很高, 但两者的 *gag* 区基因序列归属于CRF01_AE(图2)。

187号样本的 *gag* 区是CRF07_BC, *env* 区却归属于CRF01_AE, 初步推断为新重组亚型CRF07_BC/CRF01_AE。

3. 不同扩增基因区基因离散率分析: 将对165份 *gag*、*env* 分型结果一致的序列与 HIV-1 各亚型国际参考株基因序列进行比较, 计算基因离散率。结果显示, 3种亚型与国际参考株比较, B亚型毒株的变异最大, 不同亚型毒株组内比较, *env* 基因离散率均大于 *gag* 基因(表2)。

4. 不同确证时间样本的 HIV-1 亚型分布: 3种

表1 HIV-1 *gag* 及 *env* 基因引物

基因	第一轮		第二轮	
	引物	序列(5'~3', 相对于HXB2位置)	引物	序列(5'~3', 相对于HXB2位置)
<i>gag</i>	正向	GAG-L TCGACGCAGGACTCGGCTTGC	GUX	AGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTC
	反向	GAG-E2 TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG	GDX	GGCTAGTTCCTCTACTCCCTGACAT
<i>env</i>	正向	44F ACAGTRCARTGYACACATGG	DR7m4	tgtaaaacgacggccagtCTGTAAATGGYAGYCTAGC
	反向	35R CACTTCTCCAATTGTCCITCA	DR8m4	caggaaacagctatgaccCTCCAATTGTYCCTCATAT

注: 小写字母为测序引物

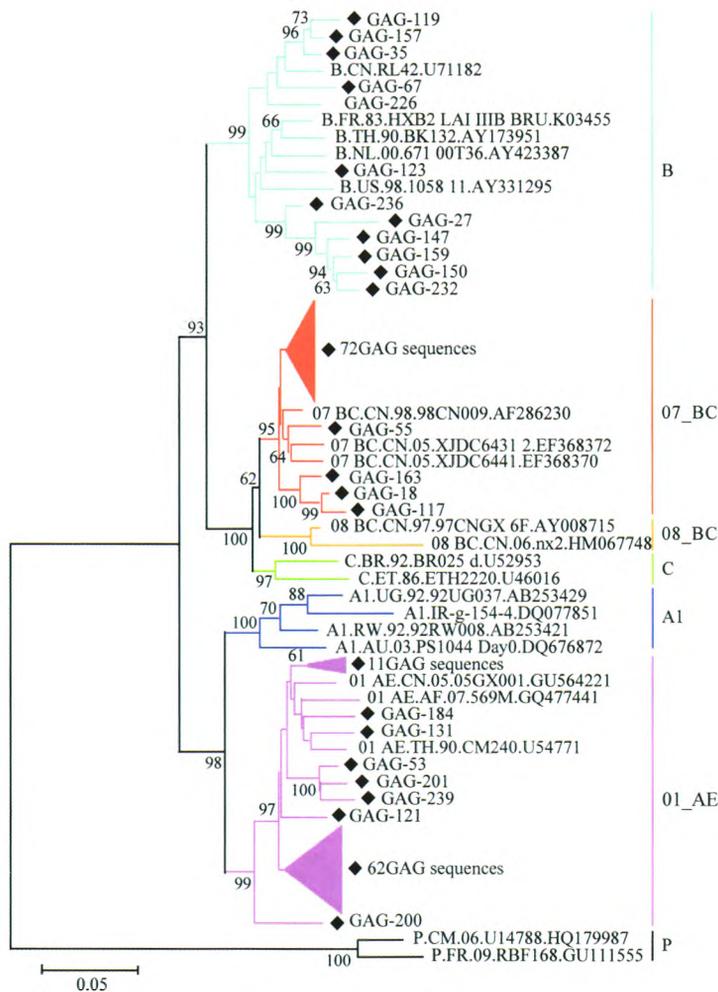


图1 gag 基因系统进化树

主要亚型 (CRF01_AE、CRF07_BC 和 B) 在 2010、2011 和 2012 年均分布, χ^2 检验结果显示, 各年度 3 种亚型分布差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

5. 不同亚型 MSM HIV-1 感染者首次 CD₄ 结果差异比较: MSM HIV-1 感染的 3 种主要亚型 (CRF01_AE、CRF07_BC 和 B 亚型) 的首次 CD₄ 均值分别为 510、585、337 cells/ μ l, 方差分析结果显示 B 亚型感染者/患者首次 CD₄ 值低于另外 2 种亚型 ($P < 0.05$), 提示其感染程度较重, 或者感染时间较长。

讨论

西安市 1992 年发现首例艾滋病感染者, 2002 年报告首例经 MSM 感染的 AIDS 患者。2010—2012 年西安市 MSM 哨点监测数据显示, 该人群 HIV 感

染率为 5.5% ~ 8.3%, 与南京市 MSM 的 HIV 感染率基本一致 (5.4% ~ 10.3%)^[1], 略高于黑龙江省 (3.1% ~ 3.6%)^[2] 和广西壮族自治区 (4.6%)^[3], 低于成都市 (15.5%)^[4]。从近年来西安市病例报告中传播途径构成情况及哨点监测数据来看, MSM 已经超过注射吸毒人群, 成为西安市艾滋病防治最受关注的人群。

本次调查的 168 例 MSM 对于“正确使用安全套是否可以减少艾滋病的传播?”和“只与一个性伴发生性行为可以减少艾滋病的传播吗?”两道题的知晓率较高, 分别是 98.8% 和 89.3%, 但实际行为却表现出安全套使用率低 (20.2%) 和多性伴 (平均 5 人) 的特点, 知识与行为相悖的现象在 MSM 中普遍存在^[5]。105 例 (62.5%) 调查对象有双性性行为, 与单纯同性性行为者毒株亚型分布差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.984, P > 0.05$)。40 例 (23.8%) 有婚姻家庭, 其中 19 例进行了配偶检测 (结果 1 例阳性, 18 例阴性), 但在后期随访显示, 40 例已婚调查对象中有 13 例配偶在获知调查对象感染事实后选择离异, 离异率为 32.5%, 高于武汉市 2009 年调查结果 (11.2%)^[6]。因此, MSM 具有多性伴、肛交、安全套使用率低

等特点, 使 MSM 通过婚外/婚内性行为将 HIV 传播给社会和家庭成为可能, 而且感染艾滋病会增加婚姻家庭的不稳定性也是一个严峻的社会问题。41 例 (24.4%) 调查对象有过献血史 (HIV 亚型: 24 例 CRF01_AE、18 例 CRF07_BC、1 例 B 亚型, 1 例 CRF01_AE/A1), 提示 MSM 可能将献血作为获知自己 HIV 感染与否的一种手段, 既往工作中发现有已经明确诊断并治疗的感染者继续献血的行为。

本次西安市 MSM HIV-1 亚型分布构成与陕西省 2012 年报道的 MSM 感染 HIV 的基因亚型分布一致 ($\chi^2 = 0.780, P > 0.05$)^[7]。进化树分析显示, CRF07_BC 亚型样本中, 163、18、117 号样本序列高度同源, 流行病学调查发现 18 号和 163 号病例二者之间有性行为, 推断二者之间有传播关系, 但是与 163 号之间缺

表 2 西安市 MSM HIV-1 基因亚型离散率 ($\bar{x} \pm s$) 比较

型别	国际参考株	与国际参考株比较		组内比较	
		<i>gag</i>	<i>env</i>	<i>gag</i>	<i>env</i>
B	B.FR.83.HXB2	0.049 ± 0.006	0.162 ± 0.034	0.057 ± 0.020	0.189 ± 0.059
CRF01_AE	CRF01_AE.TH.90.CM240	0.032 ± 0.012	0.088 ± 0.024	0.032 ± 0.019	0.110 ± 0.034
CRF07_BC	CRF07_BC.CN.98.98CN009	0.018 ± 0.004	0.079 ± 0.031	0.013 ± 0.007	0.071 ± 0.050

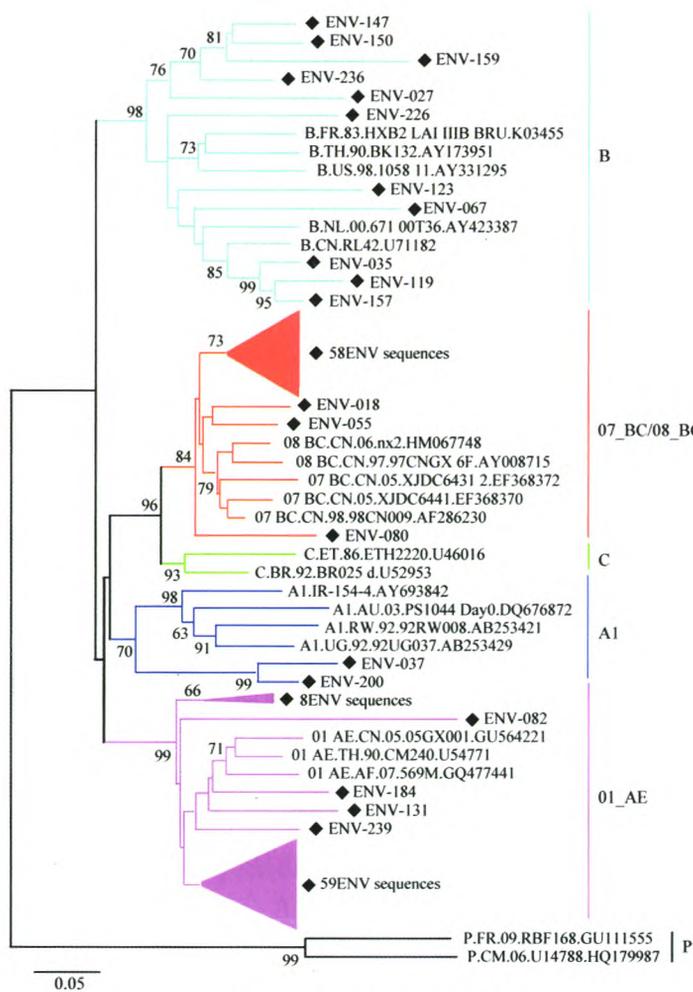


图2 env 基因系统进化树

表3 西安市 MSM HIV-1 感染者不同确证年份亚型分布情况

分离年份	亚型			合计
	CRF01_AE	CRF07_BC	B	
2010	9(36.0)	13(52.0)	3(12.0)	25(100.0)
2011	32(48.5)	31(47.0)	3(4.5)	67(100.0)
2012	38(51.4)	30(40.5)	6(8.1)	74(100.0)

注: 括号外数据为人数, 括号内数据为构成比(%)

乏流行病学联系。CRF01_AE 亚型中 53、201、239 号样本序列高度同源, 行为学问卷调查显示共同特征为“有双性行为”和“与同性发生性行为的场所通常在浴池”, 提示该人群与异性存在交叉感染现象, 并且可能感染于同一传染源。HIV-1 高度变异, 毒株流行时间越久, 组内基因距离越大, 根据 HIV-1 基因变异率每年为 0.5%~1% 计算^[8], B、CRF01_AE 和 CRF07_BC 亚型在西安市 MSM 中流行时间分别为 4~15 年、1~10 年和 1~4 年, B 亚型在西安市流行时间最久。B 亚型最早在美国同性恋人群中传播, CRF01_AE 是 1989 年在泰国发现, 1994 年经泰国卖淫回国妇女传入我国云南后不断传入内陆, 主要是

异性传播, 而 CRF07_BC 是我国特有重组亚型, 主要在吸毒人群中流行^[9-11]。3 种亚型在西安市 MSM 中分布, 提示 MSM、异性、吸毒 3 类人群有交叉感染。CRF01_AE 比例远远超过 B 亚型, 提示 CRF01_AE 毒株在本地流行具有优势。

参 考 文 献

- [1] Liu L, Zhang M, Zhu ZP, et al. Analysis of surveillance of AIDS sentinel points of MSM in Nanjing, 2009-2011[J]. Chin J AIDS STD, 2013, 19(1):36-38. (in Chinese)
刘黎, 张敏, 朱正平, 等. 2009-2011 年南京市 MSM 人群艾滋病哨点监测结果分析[J]. 中国艾滋病性病, 2013, 19(1):36-38.
- [2] Yan SC, Zhao YS, Li Y, et al. Analysis of AIDS sentinel surveillance among MSM in Heilongjiang province[J]. Chin J Public Health Manag, 2012, 28(3):300-301. (in Chinese)
闫世春, 赵亚双, 李一, 等. 黑龙江省 MSM 者艾滋病哨点监测结果分析[J]. 中国公共卫生管理, 2012, 28(3):300-301.
- [3] Zheng WB, Zhu QY, Zhu JH, et al. Analysis on monitoring results of AIDS among men who have sex with men (MSM) in Guangxi, 2011[J]. Chin J Dis Control Prev, 2013, 17(3):239-242. (in Chinese)
郑文彬, 朱秋映, 朱金辉, 等. 2011 年广西男男性接触者艾滋病监测结果分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(3):239-242.
- [4] Jiang WH, He QY, Fan SF. Status and risk factors of HIV infection among MSM in Chengdu[J]. J Prev Med Inf, 2013, 29(1):36-39. (in Chinese)
姜维华, 何勤英, 范双凤. 成都市 MSM 人群艾滋病感染状况及危险因素分析[J]. 预防医学情报杂志, 2013, 29(1):36-39.
- [5] Cai J, Xu QY, Huang YZ, et al. Survey of HIV/AIDS awareness and related behavior among MSM in Nanchang[J]. Chin Med Herald, 2007, 4(17):158. (in Chinese)
蔡军, 徐群英, 黄永真, 等. 南昌市男男同性恋者艾滋病知识知晓率及相关行为调查[J]. 中国医药导报, 2007, 4(17):158.
- [6] Yang RR, Gui XE, Rong YP, et al. The influence of HIV/AIDS on family stability[J]. Chin J AIDS STD, 2009, 15(2):135-137. (in Chinese)
杨蓉蓉, 桂希恩, 荣玉萍, 等. 艾滋病对家庭稳定性影响的调查[J]. 中国艾滋病性病, 2009, 15(2):135-137.
- [7] Xing AH, Li X, Zhang MY, et al. Moleculo-epidemiological study on HIV type I among MSM in Shaanxi province[J]. Chin J AIDS STD, 2012, 18(11):741-745. (in Chinese)
邢爱华, 李翔, 张梦妍, 等. 陕西省 MSM 人群中 HIV-1 分子流行病学研究[J]. 中国艾滋病性病, 2012, 18(11):741-745.
- [8] Liu ZY, Li 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):616-620. (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):616-620.
- [9] Ye JR, Zeng Y. The research progress of HIV subtypes in China[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(9):857-859. (in Chinese)
叶景荣, 曾毅. 我国 HIV 亚型研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(9):857-859.
- [10] Jin YT, Guo HJ, Jiang F, et al. Systematic review of public literatures on HIV-1 genetic subtype in China[J]. J Hyg Res, 2011, 40(5):645-648. (in Chinese)
金艳涛, 郭会军, 姜枫, 等. 中国 HIV-1 基因亚型分布文献分析[J]. 卫生研究, 2011, 40(5):645-648.
- [11] Lessells RJ, Katzenstein DK, de Oliveira T. Are subtype differences important in HIV drug resistance? [J]. Curr Opin Virol, 2012, 2(5):636-643.

(收稿日期: 2013-11-07)
(本文编辑: 万玉立)