

## 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

潘晓红 张佳峰 陈琳 杨介者 郭志宏 徐云

**【摘要】** 目的 分析浙江省外来婚嫁女感染 HIV 亚型特征和家庭内传播关系。方法 以浙江省艾滋病疫情报告中 HIV 感染的农村外来婚嫁女及其感染配偶和子女为研究对象,基因序列分析结合个案流行病学分析,采用巢式 PCR 扩增 gag 基因区,分析亚型特征和病毒株来源,并利用系统进化树分析夫妻间、母子间传播关系。结果 在 118 例报告 HIV 感染外来婚嫁女中获得 72 株亚型,分别为 21 株 CRF01\_AE(29.2%)、12 株 CRF07\_BC(16.7%)、31 株 CRF08\_BC(43.1%)、6 株 B 亚型(8.3%)和 2 株 C 亚型(2.8%)。外来婚嫁女感染病毒与原户籍地或原户籍地周边省份流行株相似的有 45 例(62.5%),其中 70.3%(26/37)原户籍为云南省外来婚嫁女中感染的病毒与云南省流行株相似。84.7%外来婚嫁女在嫁入浙江省之前有异性性行为。检测 17 对夫妻 HIV 亚型,结果夫妻间亚型均一致。系统树分析提示夫妻间和母子间有传播关系。结论 浙江省农村外来婚嫁女感染 HIV 呈现亚型多样性特征,其中以 CRF08\_BC 和 CRF01\_AE 为主,病毒株主要来源是云南省及其周边地区。外来婚嫁女在原户籍的异性性行为是感染的主要危险因素。应加强对该人群的主动监测和夫妻间性行为干预。

**【关键词】** 艾滋病病毒;遗传亚型;外来婚嫁女;传播关系

**Relationship between strain subtypes and transmission of HIV infection within marriage-based immigrant women in rural area of Zhejiang province** PAN Xiao-hong, ZHANG Jia-feng, CHEN Lin, YANG Jie-zhe, GUO Zhi-hong, XU Yun. Zhejiang Provincial Center for Diseases Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

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

This work was supported by grants from the National Important Technology Specific Research Program of China (No. 2008ZX10001-003), Provincial Technology Plan of Zhejiang Province (No. 2009C33145) and Provincial Medicine and Health Research Fund of Zhejiang Province (No. 2008A025).

**【Abstract】** **Objective** To analyze the relationship between strain subtypes and transmission of HIV infection on marriage-based immigrant women, their spouses and children in rural area of Zhejiang province. **Methods** Marriage-based immigrant women with HIV infection, their HIV infected spouses and children in rural area in Zhejiang province, were selected as study objects. Analysis on genetic sequence and epidemiologic information was carried out. Subgenomic gag was amplified by nest-PCR analysis on the whole blood samples. Genetic subtype characterization and the source of HIV strains were analyzed. Relationships on sequences were also examined by phylogenetic tree analysis. **Results** Genetic sequences of 72 samples from HIV infected marriage-based immigrant women were obtained. The genetic subtypes comprised 21 CRF01\_AE (29.2%), 12 CRF07\_BC (16.7%), 31 CRF08\_BC (43.1%), 6 B (8.3%), 2 C (2.8%). HIV strains from 45 cases (62.5%) were similar to the prevalent HIV strains in the province where former census of marriage-based immigrant women were registered. In total, there were 26 (70.3%) cases from Yunnan province. 84.7% of the infected women had heterosexual behaviors before settling down in Zhejiang province. Genetic sequences of 17 pairs showed the same subtype between the couples and data from phylogenetic tree analysis supported the assumption of transmission linkage in the family. **Conclusion** The HIV subtype strains detected in those HIV infected marriage-based immigrant women in the rural area of Zhejiang province characterized with diversity, showing CRF08\_BC and

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.11.005

基金项目:国家科技重大专项(2008ZX10001-003);浙江省科技计划(2009C33145);浙江省医药卫生科学研究基金(2008A025)

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

CRF01\_AE were the main HIV strain subtypes. HIV infection originated mainly from Yunnan province and nearby regions. Heterosexual behaviors of the marriage-based immigrant women in the original region where they had their residence registration, seemed to be the primary high risk factors for these women. Surveillance and intervention programs on these marriage-based immigrant women and their family members should be improved.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Genetic subtype; Marriage based immigrant women; Transmission relationship

浙江省自 2007 年以来通过加强 HIV 主动检测, 发现 118 例来自国内部分流行省份的感染 HIV 农村外来婚嫁女, 流行病学调查表明该人群在嫁入浙江省前有危险性行为和夫妻间安全套使用率低, 提示农村外来婚嫁女是艾滋病从高流行区域向浙江省人群扩散的重要人群<sup>[1]</sup>。为此对该人群及其配偶、子女感染 HIV 亚型特征进行研究, 以进一步分析该人群的感染来源及在家庭内传播关系。

### 对象与方法

1. 研究对象: 选择 2009 年及以前浙江省艾滋病疫情报告中农村外来婚嫁女 HIV 感染者和艾滋病患者及其配偶子女为研究对象。①外来婚嫁女: 因婚姻关系从外省迁入浙江省农村地区的女性, 原户籍为浙江省以外的艾滋病高流行省, 配偶为浙江省户籍, 血清 HIV 抗体确诊阳性。②外来婚嫁女配偶: 血清 HIV 抗体阳性外来婚嫁女的配偶, HIV 抗体确诊阳性。③外来婚嫁女子女: 血清 HIV 抗体阳性外来婚嫁女生育的 5 岁以下子女, HIV 抗体确诊阳性。根据外来婚嫁女个案信息, 组织开展流行病学调查, 从浙江省艾滋病确证中心实验室样本库选取研究对象, -80 °C 保存的全血标本进行检测。

2. 感染艾滋病危险行为分类: 根据流行病学调查信息, 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分类为该高危行为, 包括非婚异性行为史、注射吸毒行为史、献血浆史、输血史等。一方有高危行为, 另一方只有婚内性行为, 则有高危行为方分类为主要危险行为方, 双方均有高危行为则分类为双方均有危险行为。

#### 3. 基因测序分析:

(1) 核酸提取及目标片段的扩增、序列测定: 按操作说明书要求, 采用 Qiagen 公司的 DNA Blood Mini Kit 对 200 μl 全血标本提取基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板, 采用巢式 PCR 扩增 HIV 的 *gag* 基因。第一轮 PCR 采用 25 μl 扩增体系, 各成分终浓度为 2.0 mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 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 Mg<sup>2+</sup>, 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 反应条件参照文献[2]。最后采用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定是否为目标产物。目标产物由北京博迈德生物技术有限公司采用引物 GUX 和 GDX 进行双向测序, 测序仪为 ABI PRISM 3730XL, 试剂为 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit。

(2) 序列分析: 使用 VECTOR NTI suite 9.0 软件 Contig Express 对序列进行拼接和编辑。使用国际参考株序列有 CRF01\_AE.CM240、CRF06\_cpx.ML.95、CRF07\_BC.97CN001、CRF08\_BC.97CN6F、C.IN.98IN022、CEF02\_AG.NG、A.SE.SE8891、G.SE6165、C.IN.98IN022、B.RL42、B.FR.HXB2 和 B.US 等, 均来自 Los Alamos HIV 数据库。使用 Bioedit 软件将样本序列和标准序列比对和校正, 并进行序列的质量控制。用 MEGA 4 软件进行 Neighbor-Joining 系统进化树构建, 分析获得亚型结果, 同时结合 HIV BLAST Search 工具综合确定 HIV 分子亚型 ([http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC\\_BLAST/basic\\_blast.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html))。

4. 直接传播关系的推测: 夫妻亚型分类一致, 系统进化树分析中, 夫妻的基因序列或母子(女)的基因序列较其他研究对象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或母子(女)之间有直接传播关系。

5. 同源性(溯源)分析: 利用 HIV BLAST Search 工具分析序列与 Los Alamos HIV 数据库进行同源性分析, 寻找同源性最高的序列, 根据该序列注解的地理位置, 推测所分析的病毒株最可能的起源地。

### 结 果

1. 样本概况: 截至 2009 年 12 月 31 日, 浙江省共检测发现 HIV 抗体阳性外来婚嫁女 118 例, 样本库中有血液样本 83 份, 获得 *gag* 亚型基因序列结果 72 份。72 例 HIV 抗体阳性外来婚嫁女中, 汉族 51 例 (70.8%), 少数民族(包括白族、傣族、哈尼族、佤族、壮族等 15 个民族) 21 例 (29.2%)。检测样本来自浙

江省10个市的41个县(市、区),占全省县(市、区)的45.6%。嫁入浙江省时间最早的为1997年,最迟2009年,2004—2009年HIV抗体阳性外来婚嫁女46例(63.9%)。该人群原户籍省份包括云南(37例)、广西(11例)、贵州(10例)及湖南、河南、重庆、江西、湖北、广东、四川等10个省(市)。另外发现HIV-1抗体阳性配偶33例,获得血液样本26份,获得基因序列结果18份,夫妻均有序列检测结果17对。另获得阳性子女基因序列结果4份。

## 2. 外来婚嫁女HIV亚型基因序列分析:

(1)一般特征:72例外来婚嫁女中,在嫁入浙江省前有异性性行为者61例(84.7%)。其中20例(27.8%)合并有注射吸毒、输血、单采浆等危险行为,4例仅有婚内性行为,2例仅有注射吸毒行为,5例不详,嫁入浙江省前在原籍有男友或配偶的41例(56.9%)。

(2)HIV亚型分布:CRF01\_AE 21例(29.2%), CRF07\_BC 12例(16.7%), CRF08\_BC 31例(43.1%), B亚型6例(8.3%), C亚型2例(2.8%)。原户籍为云南省37例外来婚嫁女的亚型中, CRF08\_BC 24例, CRF07\_BC 5例, CRF01\_AE 6例, C亚型2例, 08\_BC/07\_BC/01\_AE占94.6%(35/37)。21例CRF01\_AE亚型中,原户籍为广西省8例,云南省6例,贵州省4例,广东、湖南省3例,嫁入浙江省最早时间为2000年;31例CRF08\_BC亚型中,原户籍为云南省24例(77.4%),其余为贵州、重庆、江西和广西省(市、区),嫁入最早时间为1990年;12例CRF07\_BC亚型中,原户籍为云南省4例,其余为广西、湖北、湖南、贵州和四川省(区),嫁入最早时间为1997年;6例B亚型中,3例来自河南省,其余为湖北、贵州和江西省,嫁入最早时间为1995年;2例C亚型原户籍均为云南省,嫁入时间分别为1997年和2007年。

(3)基因序列同源性和系统树分析:72例感染HIV外来婚嫁女的基因序列同源性分析结果见表1。同源性分析的起源省份与外来婚嫁女的原户籍省份一致的为31例(43.1%),平均相似度为96.8%,亚型类别为CRF08\_BC 22例, CRF01\_AE 4例, CRF07\_BC 2例, B亚型1例, C亚型2例。有14例(19.4%)通过同源性分析表明,来源省份与其户籍省份有密切的地理接壤关系,平均相似度为96.8%,亚型类别为CRF01\_AE(7例)、CRF08\_BC(4例)、CRF07\_BC(2例)。

原户籍为云南省37例外来婚嫁女的基因序列通过BLAST同源性分析显示,有26份(70.3%, 26/

表1 浙江省感染HIV外来婚嫁女的基因序列同源性分析

婚嫁女原户籍	例数	同源性最高的病毒株起源地
云南	37	中国云南(26)、广西(4)、辽宁(4);泰国(1), 缅甸(1), 不详(1)
广西	11	中国广西(4)、辽宁(7)
贵州	10	中国云南(3)、广西(2)、河南(1)、辽宁(1);越南(1), 泰国(1), 不详(1)
河南	3	中国河南(1)、云南(1)、湖北(1)
湖南	3	中国辽宁(1)、广西(1);泰国(1)
四川	3	中国辽宁(1)、云南(2)
湖北	2	中国辽宁(2)
江西	2	中国云南(2)
广东	1	中国辽宁(1)
合计	72	

注:括号内数据为病毒株数; \*含重庆

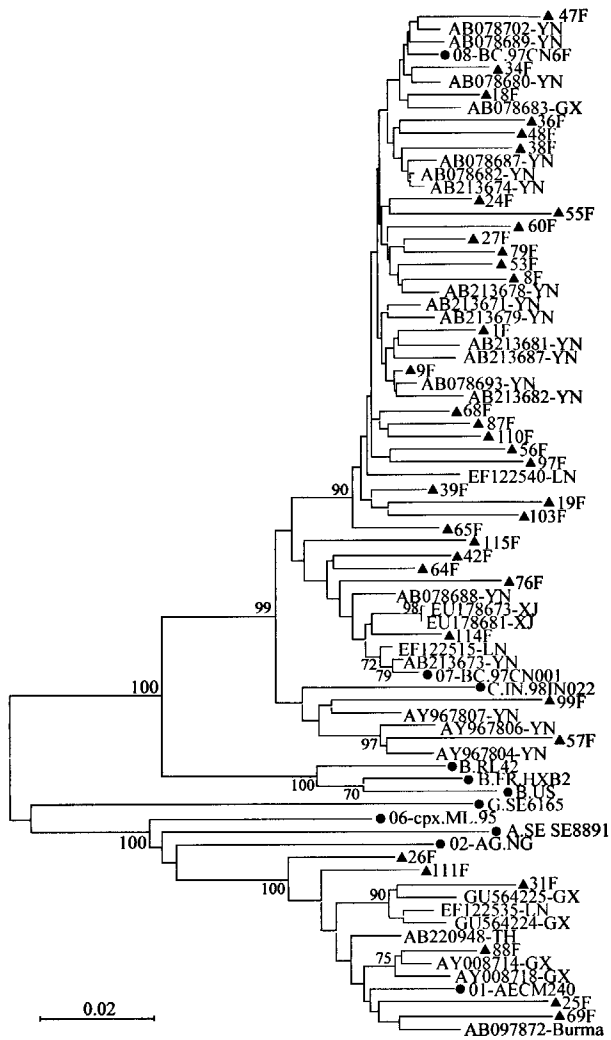
37)与云南省的病毒基因序列最相似,平均相似度为96.8%,亚型类别为CRF08\_BC 22例、CRF07\_BC 2例、C亚型2例。这26例外来婚嫁女嫁入浙江省时间为1997—2009年,其中2004—2008年嫁入者占65.4%(17/26)。另6例(16.2%, 6/37)外来婚嫁女的病毒株与来自中国广西、缅甸、泰国等的病毒株关系密切。系统树分析提示,原户籍为云南省外来婚嫁女的病毒株大部分与云南省的病毒株聚集,部分与中国广西及缅甸的病毒株聚集(图1)。

## 3. 外来婚嫁女夫妻间病毒株基因序列分析:

(1)一般特征:17名外来婚嫁女配偶中,除1名为畲族,其余均为汉族,户籍为浙江省;外来婚嫁女中汉族13例,其余为少数民族,原户籍为云南(10例)、贵州、广西、湖北、重庆市(省、区)。嫁入浙江省时间最早1990年,最迟2009年。17对夫妻中有3对仅外来婚嫁女有危险行为,13对(76.5%)双方均有危险行为(表2)。其中嫁入浙江省前有男友或配偶的10例,5例前男友或配偶有注射吸毒行为(1例HIV抗体阳性),与前男友或配偶性行为时不使用安全套或有时使用。外来婚嫁女检测前,均与现配偶性行为时不用安全套或有时使用。

(2)HIV亚型分布:17对夫妻HIV亚型一致,其中CRF01\_AE型3对、CRF07\_BC型5对、CRF08\_BC型8对、C亚型1对。

(3)基因序列系统树和基因距离分析:所有夫妻对的HIV病毒株基因序列首先聚集在一个进化树上,显示夫妻间病毒株序列非常接近,提示存在夫妻间直接传播关系(图2)。其中57F与57M、64F与64M两对夫妻对在外来婚嫁女检测时HIV抗体阳性其配偶检测则阴性,随访中HIV抗体阳转,阳转时间分别为随访9和18个月。17对的夫妻间病毒株序



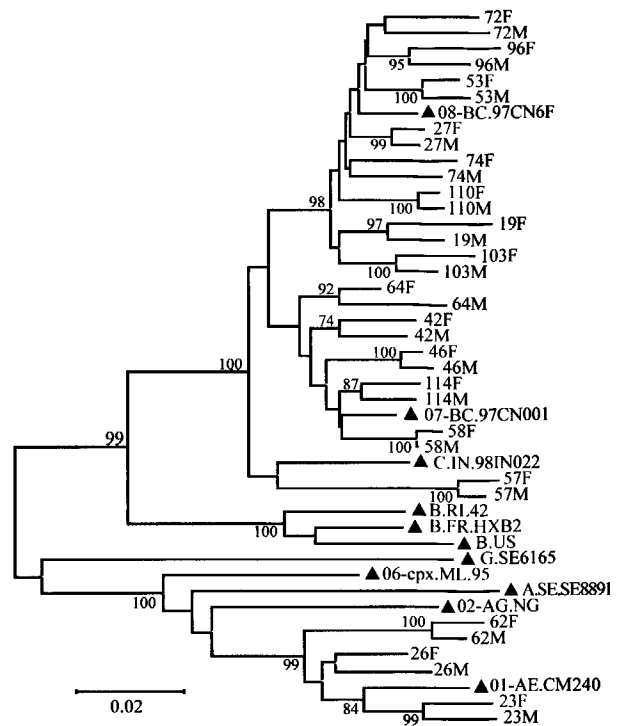
注:进化树分析使用Neighbor-Joining方法构建,节点标记为计算500次得到bootstrap值,仅显示>70%的值。▲云南省籍的外来婚嫁女;●参考株;YN、GX、LN:中国云南、广西、辽宁;Burma:缅甸

图1 原籍为云南省的外来婚嫁女感染HIV亚型与国内流行株的系统进化树分析

表2 浙江省外来婚嫁女17对夫妻中危险行为特征与HIV亚型分布的关系

相关特征	亚型例数			
	CRF01_AE	CRF07_BC	CRF08_BC	C
危险行为				
仅男性有	-	2	-	-
仅女性有	-	2	2	2
夫妻均有	6	6	14	-
主要危险行为				
非婚非商业性行为	6	10	9	1
商业性行为	1	1	3	-
注射吸毒	1	-	2	1
外来婚嫁女/原籍省份的HIV同源性比例	2/3	2/5	7/8	1/2

列平均基因距离为0.022(0.006~0.037)±0.010,其中CRF01\_AE型为0.026(0.017~0.034)±0.007,



注: F:妻; M:配偶; ▲参考株

图2 浙江省外来婚嫁女中17对夫妻HIV亚型的系统进化树分析

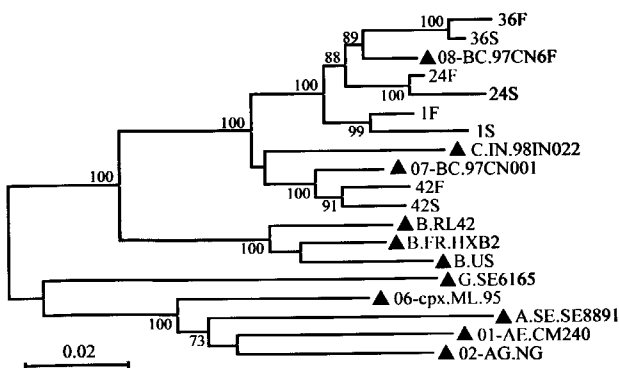
CRF07\_BC型为0.019(0.006~0.028)±0.009, CRF08\_BC型为0.024(0.009~0.037)±0.010, C亚型为0.013。

(4) 基因序列同源性分析:17对夫妻中有7例(均为云南省户籍)HIV基因序列同源性分析结果与原户籍一致,5例外来婚嫁女的原户籍(贵州2例,云南、广西、重庆各1例)与同源性分析得出的病毒株起源地有密切地理接壤关系,两者合计占70.6%。

4. 母子间HIV病毒株基因序列分析:4对母子病毒株基因序列结果中,外来婚嫁女与其子的病毒亚型均一致,其中3对为CRF08\_BC,1对为CRF07\_BC,系统树分析提示均有传播关系(图3)。每对母子间的病毒基因序列遗传距离为0.021(0.011~0.028)±0.007。这些外来婚嫁女均来自云南省,嫁入浙江省的时间分别为1998、2000、2002和2004年。

### 讨论

本次外来婚嫁女感染HIV的基因序列同源性分析表明,有62.5%感染的病毒起源地与外来婚嫁女原籍地或其邻近地区密切相关,而原籍为云南省的外来婚嫁女中,则有86.6%可以推测感染起源地与云南省及其周边地区有关。结合17对夫妻间病毒



注: F:母; S:子; ▲ 参考株

图3 浙江省外来婚嫁女 HIV 亚型的母婴传播系统进化树分析

株序列关系及其行为特征和 4 对母子间病毒基因序列的关系,进一步提示云南等省的艾滋病流行株,通过外来婚嫁女的婚内异性性行为在浙江省进一步传播扩散的流行病学意义。由于该人群原籍地区的 HIV 感染呈高流行水平,以及夫妻间相对固定的长期性关系和安全套使用率低的特点<sup>[1,2]</sup>,提示在浙江省该人群这种夫妻间感染艾滋病的危险要高于暗娼、注射吸毒等高危人群。

本次分析中发现外来婚嫁女感染 HIV 主要亚型为 CRF08\_BC,与近些年浙江和山西省的调查结果(以 CRF01\_AE 亚型为主)有所不同<sup>[3,4]</sup>,与云南省流行毒株亚型变化特征相似<sup>[5,6]</sup>。提示云南省 HIV 不同亚型的流行传播方式,已通过外来婚嫁女的迁移活动影响了浙江省病毒株的传播模式,在一定程度上改变了浙江省异性性传播以 CRF01\_AE 为主要类型的特征,是云南省 HIV 流行株向浙江省扩散的重要表现形式,促使浙江省艾滋病异性间传播模式的进一步复杂。

本研究中 5 例外来婚嫁女 HIV 同源性分析显示,病毒株可能的起源地为泰国(3 例)、越南(1 例)和缅甸(1 例),其亚型均为 CRF01\_AE,结合文献报道<sup>[7,8]</sup>,推测 CRF01\_AE 亚型可能先从越南、缅甸和泰国等地传播到我国云南省及其接壤地区,后经注射吸毒和性途径传播到浙江省。本研究发现部分原户籍为云南和广西地区外来婚嫁女感染的病毒株其同源性最高的起源地为辽宁省,这是由于该省的 CRF07\_BC 和 CRF08\_BC 株与来自云南和广西的病毒株关系密切<sup>[9]</sup>,流行株真正的起源地很可能还是云南或广西地区。

本研究在同源性分析中发现,美国 Los Alamos 国家实验室的 HIV 序列数据库中有我国病毒株序

列相对集中在云南、广西、辽宁等省份,其他地区代表性病毒株序列相对缺乏,一定程度上影响同源性分析的全面性和广泛性。建议建立全国各省的典型株序列库,完善序列共享和综合利用,提高利用病毒株同源性分析和溯源调查的准确性,为掌握 HIV 流行株传播规律提供依据。

### 参 考 文 献

- [1] Pan XH, Yang JZ, Chen L, et al. Analysis on epidemiological characteristics of HIV infected marriage based immigrant women in rural area in Zhejiang province. *Chin J Prev Med*, 2010, 44(11): 1023-1026. (in Chinese)  
潘晓红,杨介者,陈琳,等.浙江省农村外来婚嫁女人免疫缺陷病毒感染的流行病学特征分析. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(11): 1023-1026.
- [2] Yang L, Ma YL, Luo HB, et al. A dynamic analysis on incidence and trend of HIV-1 epidemics among Intravenous Drug Users, attendants at the STD clinics and pregnant women in Yunnan province, China. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(12): 1204-1207. (in Chinese)  
杨莉,马艳玲,罗红兵,等.云南省 2000—2007 年静脉吸毒者、性病就诊者和孕产妇 HIV-1 新近感染率及流行趋势变化. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(12): 1204-1207.
- [3] Pan XH, Zhang JF, Yao YP, et al. Subtype and transmission of HIV strain in both HIV infected spouses in Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(6): 638-641. (in Chinese)  
潘晓红,张佳峰,姚亚萍,等.浙江省 46 对夫妻双方感染艾滋病病毒者中病毒株亚型及传播关系的研究. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(6): 638-641.
- [4] Xing H, Wei J, Ma PF, et al. Genetic features of HIV-1 strains circulating in immigrant women and their spouses in a rural district of Shanxi province. *Chin J AIDS STD*, 2007, 13(2): 101-103. (in Chinese)  
邢辉,卫军,马鹏飞,等.山西某县农村外来嫁入女性及配偶中 HIV 感染者病毒序列特征分析. *中国艾滋病性病*, 2007, 13(2): 101-103.
- [5] Li XJ, Kusagawa S, Xia X, et al. Molecular epidemiology of the heterosexual HIV-1 transmission in Kunming, Yunnan province of China suggests origin from the local IDU epidemic. *AIDS Res Hum Retroviru*, 2005, 21(11): 977-980.
- [6] Lu L, Jia M, Ma Y, et al. The changing face of HIV in China. *Nature*, 2008, 455(7213): 609-611.
- [7] Zhang Y, Lu I, Ba L, et al. Dominance of HIV-1 subtype CRF01-AE in sexually acquired cases leads to a new epidemic in Yunnan province of China. *PLoS Med*, 2006, 3(11): e443.
- [8] Piyasirisilp S, McCutchan FE, Carr JK, et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. *J Virol*, 2000, 74(23): 11286-11295.
- [9] Han X, Zhang M, Dai D, et al. Genotypic resistance mutations to antiretroviral drugs in treatment-naive HIV/AIDS patients living in Liaoning province, China: baseline prevalence and subtype-specific difference. *AIDS Res Hum Retroviru*, 2007, 23(3): 357-364.

(收稿日期: 2011-05-26)

(本文编辑: 张林东)