

男性HIV/AIDS人群中梨支原体感染状况及其影响因素研究

陈璐斯 吴建茹 王蓓 徐金水 还锡萍

【摘要】 目的 了解江苏省男性HIV/AIDS人群中梨支原体(*Mpi*)感染情况,分析其感染的危险因素,并首次完成*Mpi*全基因组测序,为进一步研究其致病机制奠定基础。方法 以江苏省疾病预防控制中心确认的男性HIV/AIDS人群为研究对象,采用重复横断面调查,进行了4次流行病学调查并分别收集首段尿、静脉血样本进行*Mpi*感染的检测和CD₄⁺T淋巴细胞计数。建立EpiData数据库,使用SPSS 19.0软件进行统计学分析。采用Illumina Hiseq 2000平台对*Mpi*基因组进行测序。结果 共收集1 541名男性HIV/AIDS,其中851人(55.2%)处于HIV感染阶段,690人(44.8%)已发展至艾滋病阶段,*Mpi*感染率15.4%(95%CI:14%~17%);多因素logistic回归分析结果显示,在HIV/AIDS人群中未接受高效抗病毒治疗者,*Mpi*感染风险高于已治疗者($OR=1.344, 95\%CI:1.008\sim 1.792$)。另外,随CD₄⁺T淋巴细胞计数升高,*Mpi*感染风险降低($OR=0.600, 95\%CI:0.444\sim 0.810$)。*Mpi*基因组为850 704 bp,GC含量为24.21%,含有708个基因,总长度为734 085 bp,平均长度1 037 bp,占基因组全长的86.29%。结论 本次调查的1 541名江苏省男性HIV/AIDS人群,*Mpi*感染较高。接受抗病毒治疗以及机体CD₄⁺T淋巴细胞计数保持较高水平者,可降低*Mpi*的感染风险。并首次完成*Mpi*标准株的全基因组序列测定(注册序列号:AZHZ00000001),获得了基因组草图,为今后进一步研究基因功能、探求致病机制等提供依据。

【关键词】 梨支原体; HIV感染者/艾滋病患者; 感染率; 全基因组

Study of *Mycoplasma pirum* infection and related factors among male HIV/AIDS patients Chen Lusi¹, Wu Jianru¹, Wang Bei¹, Xu Jinshu², Huan Xiping². 1 School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2 Jiangsu Provincial Centers for Diseases Control and Prevention

Corresponding author: Wang Bei, Email: wangbeilxb@seu.edu.cn

This work was supported by grants from the Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20130092110048) and National Natural Science Foundation of China (No. 30872156).

【Abstract】 Objective To investigate the infection status of *Mycoplasma pirum* among male HIV/AIDS patients in Jiangsu and analyze the risk factors. The genome sequencing of *Mycoplasma pirum* was completed for the first time. **Methods** Male HIV infected individuals and AIDS patients confirmed in Jiangsu province were enrolled for 4 repeated cross-sectional studies by means of detecting the first flow urine sample and venous blood sample collected and questionnaire survey after informed consent. Genome sequencing was conducted for *Mycoplasma pirum* by using Illumina Hiseq 2000 sequencing platform. **Results** A total of 1 541 HIV/AIDS patients were surveyed in this study. The infection rates of *Mycoplasma pirum* was 15.4%. The patients who received no HAART had higher risk to be infected with *Mycoplasma pirum* ($OR=1.344, 95\%CI:1.008-1.792$). Otherwise, high CD₄⁺T counts was a protective factor for *Mycoplasma pirum* infection ($OR=0.600, 95\%CI:0.444-0.810$). Based on the sequencing result, the genome size of *Mycoplasma pirum* was 850 704 bp, the GC content was 24.21% the genome contained 708 genes, the total length of genes was 734 085 bp, the average length was 1 037 bp, accounting for 86.29% of genome. **Conclusion** More attention should be paid to the high infection rate of *Mycoplasma pirum* among

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.08.012

基金项目:教育部博士点基金(20130092110048);国家自然科学基金(30872156)

作者单位:210009 南京,东南大学公共卫生学院(陈璐斯、吴建茹、王蓓);江苏省疾病预防控制中心(徐金水、还锡萍)

通信作者:王蓓, Email: wangbeilxb@seu.edu.cn

male HIV/AIDS patients in the future AIDS prevention and control. The first genome sequencing of standard *Mycoplasma pirum* strain was completed in this study (registering serial number: AZHZ0000001), which can provide evidence for the further research of gene function and pathogenic mechanism of *Mycoplasma pirum*.

【Key words】 *Mycoplasma pirum*; HIV/AIDS; Infection rate; Whole genome

梨支原体 (*Mycoplasma pirum*, *Mpi*) 因从 HIV/AIDS 人群体内成功分离, 而被称为“艾滋病相关支原体”^[1]。因其具有侵袭黏膜细胞的特性, 释放介质所致的局部炎症反应可致生殖道黏膜的破溃, 使 HIV 更易侵入宿主细胞造成感染^[2-3]。此外, HIV 感染后破坏机体的免疫系统, 造成更多支原体的机会性感染, 从而加速 AIDS 病程发展及死亡。现有 HIV/AIDS 人群中支原体感染情况的流行病学研究数据尚不充分, 而在支原体基因组学研究中尚缺乏 *Mpi* 全基因组序列。本研究旨在调查分析江苏省男性 HIV/AIDS 人群中 *Mpi* 的感染情况和危险因素, 并首次对 *Mpi* 进行全基因组测序, 为进一步研究 HIV 与支原体共感染及其对 AIDS 病程的影响机制提供依据。

对象与方法

1. 研究对象: 2009—2011 年 4 次横断面调查, 分别纳入 497 例、317 例、349 例和 677 例调查者, 剔除重复检测的 250 人, 共纳入 1 541 例男性 HIV/AIDS 人群为研究对象。调查对象均经知情同意后进行问卷调查及相关生物样本采集。问卷调查包括人口学特征, 行为学特征等信息。

2. 样本采集及相关指标检测方法:

(1) 样本收集: 用尿杯按要求收集与上次排尿间隔 2 h 以上的首段尿 10~20 ml, 转入尿液标本保存管, 常温保存。编号登记 (包括地区、姓名等信息), 4 h 内送实验室检测 *Mpi*。采集患者全血 5~6 ml 于 EDTA-K3 抗凝管, 并于 4 h 内送至江苏省疾病预防控制中心实验室, 用于检测 CD₄⁺T 淋巴细胞。

(2) DNA 提取: 首段尿液经 3 500 r/min 离心 15 min 后, 弃上清液, 用 1 ml 生理盐水溶解沉淀, 振荡混匀后取 400 μl 于 0.5 ml 离心管内, 15 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加裂解液 30 μl, 充分混匀后置入 55 °C 水浴保温 60 min, 后置入 95 °C 保温 10 min, 10 000 r/min 离心 30 s, 上清即为 PCR 扩增用模板液。所用裂解液由 KCl 溶液 (1 mol/L) 5.0 ml、MgCl₂ 溶液 (1 mol/L) 0.25 ml、Tris-HCl 缓冲液 (1 mol/L, pH 8.0) 1.5 ml、20% Tween-20 2.5 ml, 加双蒸水定容至 100 ml 所配制。应用前裂解液与蛋白酶

K (200 μg/ml) 以 50:2 的体积混合。

(3) PCR 检测 *Mpi*: 采用巢式 PCR 对 *Mpi* 检测, 相关引物见表 1。反应体系最终为 50 μl, 含 PCR buffer (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 0.1% Triton X-100), 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L dNTP, 引物各 0.5 μmol/L, 1 U 的 Taq 酶及 5 μl 样本。PCR 扩增条件: 两次 PCR 扩增热循环参数均为 94 °C 预变性 2 min, 然后按 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 40 个循环, 最后一个循环 72 °C 延长至 5 min。每次检测均设立阳性、阴性对照。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并经全自动凝胶成像仪观察结果。

表 1 外套引物及特异性引物

项目	引物序列 (5'→3')	产物大小 (bp)
外套	GAGTTTGATCCTGGCTCACG	535
	ATTACCGCGGCTGCTGGCAG	
<i>Mpi</i>	ATACATGCAAGTCGATCGGA	180
	ACCCTCATCCTATAGCGGTC	

(4) CD₄⁺T 淋巴细胞计数: TruCOUNT 绝对计数管中准确加入 20 μl MultiTEST 四色试剂和 50 μl 全血, 充分混匀, 室温阴暗处放置 15 min; 加入 450 μl FACS 溶血液, 充分混匀, 室温阴暗处放置 30 min 向另外 3 个 TruCOUNT 绝对计数管中分别加入 50 μl TruCOUNT Control Beads (low/medium/high) 作为绝对计数质控; 运行 MultiSET 程序上机检测。

(5) *Mpi* 标准株 DNA 提取及基因测序: 采用改良 SP-4 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中对 *Mpi* (ATCC25960) 的冻干菌株进行复苏传代和培养增菌, 收获最佳生长期的阳性菌液。培养中均设置单纯培养基空白对照。上述菌液按照 QIAGEN 试剂盒说明书提取基因组 DNA。采用 Illumina Hiseq 2000 平台测序, 经数据清理后, 使用短序列拼接软件 SOAPdenovo 拼接组装。

3. 统计学分析: 采用 EpiData 3.01 软件录入流调问卷, SPSS 19.0 软件进行统计分析, 运用 χ^2 检测和 logistic 回归进行单因素和多因素分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. HIV/AIDS人群特征及Mpi感染状况:

(1)人群特征:本研究共纳入1 541名研究对象,851名(55.2%)处于HIV感染阶段,690名(44.8%)已经发展为AIDS。平均年龄为(39.20±11.28)岁,见表2。

表2 调查对象人群特征

项 目	例数	构成比(%)
文化程度(年)		
≤9	832	54.0
10~	442	28.7
>12	267	17.3
婚姻状况		
未婚	469	30.4
已婚/离异/丧偶	1 072	69.6
HIV感染途径		
同性	623	40.4
异性	668	43.3
其他	250	16.2
STD病史(除HIV)		
是	271	17.6
否	1 270	82.4
HAART治疗		
是	700	45.4
否	841	54.6
疾病进程		
HIV	851	55.2
AIDS	690	44.8
CD ₄ ⁺ T淋巴细胞计数(cell/μl)		
≤350	843	54.7
>350	698	45.3

(2) Mpi感染与CD₄⁺T淋巴细胞水平的关联性:该人群Mpi感染率为15.4%(95%CI:14%~17%)。4次横断面调查Mpi感染率分别为16.3%(95%CI:13%~19%),21.5%(95%CI:16%~27%),12.9%(95%CI:9%~18%)及13.9%(95%CI:10%~16%),存在一定程度的变化,且差异具有统计学意义($\chi^2=11.844, P<0.05$)。按照CD₄⁺T淋巴细胞计数350 cell/μl分组比较Mpi感染情况,结果显示:CD₄⁺T淋巴细胞计数≤350 cell/μl组的Mpi感染率为18.7%,>350 cell/μl组Mpi感染率为11.3%,两组Mpi感染情况存在差异,且具有统计学意义($\chi^2=16.173, P<0.05$),由此提示CD₄⁺T淋巴细胞计数≤350 cell/μl与Mpi感染密切相关。

(3) Mpi感染的危险因素分析:利用非条件logistic回归对Mpi感染因素进行分析,以单纯Mpi

感染者Y=1,无支原体感染者Y=0,分别纳入年龄组、教育程度、婚姻状况、感染途径等因素,分析影响因素。结果显示:与接受HAART组比较,未接受HAART是支原体感染的危险因素(OR=1.344, 95%CI:1.008~1.792);CD₄⁺T淋巴细胞计数>350 cell/μl可降低感染支原体的风险(OR=0.600, 95%CI:0.444~0.810),见表3。

表3 logistic回归分析梨支原体的感染因素

变 量	感染率	OR值(95%CI)
婚姻状况		
未婚	178(31.4)	-
结婚/离异/丧偶	458(36.0)	1.228(0.994~1.517)
HIV感染途径		
同性传播	237(33.2)	-
异性传播	271(33.4)	1.010(0.816~1.250)
其他	128(40.6)	1.378(0.985~1.811)
STIs病史(除HIV)		
是	112(34.1)	-
否	524(34.7)	1.023(0.795~1.315)
HAART治疗史		
是	278(31.3)	-
否	358(37.6)	1.344(1.008~1.792)*
疾病进程		
HIV	355(35.7)	-
AIDS	281(33.2)	0.895(0.738~1.086)
CD ₄ ⁺ T淋巴细胞计数(cell/μl)		
≤350	350(41.5)	-
>350	193(27.7)	0.600(0.444~0.810)*

注:*差异有统计学意义P=0.05

2. Mpi全基因组测序:经Illumina Hiseq 2000平台测序得到Mpi基因组为850 704 bp,GC含量为24.21%。通过基因预测方法获取测序菌株基因组的组成情况,样品Mpi的基因组含有708个基因,总长度为734 085 bp,平均长度1 037 bp,占基因组全长的86.29%。

讨 论

目前,我国支原体感染还未被列入性病门诊常规检测项目,且缺乏支原体的快速诊断技术,仅限于病症上的描述和报告。本研究首次对江苏省男性HIV/AIDS人群Mpi感染情况进行了评价。经过4次横断面调查,Mpi感染率为15.4%。HIV/AIDS人群存在免疫缺陷,更易感染支原体^[4]。有研究显示支原体能够促进HIV复制,将Mpi添加到感染了HIV的外周血单核细胞后,病毒复制程度增加^[5]。

在1 541名研究对象中,一半以上年龄低于40

岁,有 54.0% 的调查对象文化程度较低。以往研究表明,男男性行为在其他艾滋病相关支原体感染中是危险因素^[6-7],但本次研究中对 *Mpi* 感染率影响无统计学差异,需要扩大样本量进一步研究两者之间的联系。调查对象中,未接受 HAART 的人群感染 *Mpi* 的风险更大,较高的 CD₄⁺T 淋巴细胞水平可降低 *Mpi* 感染,这可能由于接受 HAART 会使 CD₄⁺T 淋巴细胞维持在稳定水平,提高患者免疫力,从而降低 *Mpi* 感染。因此,应对该人群进行合理有效的抗病毒治疗^[8-9]。

本课题组先前已对 *Mpi* 16S rRNA 基因片段序列分析^[10],此次本研究对 *Mpi* 标准株进行测序,首次获得 *Mpi* 全基因组序列并提交 NCBI 数据库(注册号:AZHZ00000001),为进一步研究病原菌与宿主互作和病原菌的抗性机制筛选靶标提供数据信息。

本研究提示:男性 HIV/AIDS 人群中 *Mpi* 感染率较高,但横断面研究存在一定的局限性。今后将开展相关前瞻性队列研究,更好地评估该人群中艾滋病相关支原体感染情况及其在 AIDS 疾病进程中的作用,进一步确定 HIV/AIDS 人群中支原体感染和 HIV 感染的因果关系,并且确定支原体感染在 HIV 传播中的临床意义。现阶段已经把 *Mpi* 标准株基因组测序完成并进行了初步的基因比对和功能注释分析,今后将继续探求其致病功能基因,为研究其致病机制提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] Blanchard A, Montagnier L. AIDS-associated mycoplasmas[J]. Annu Rev Microbiol, 1994, 48: 687-712.
- [2] Lo SC, Hayes MM, Wang RYH, et al. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV[J]. Lancet, 1991, 338 (8780): 1415-1418.
- [3] Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas[J]. Lancet, 1998, 351 Suppl 1: S12-15.
- [4] da Costa FAM, da Silva RC, Arruda LB, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* among HIV-infected men in São Paulo city detected by realtime polymerase chain reaction[J]. Int J STD AIDS, 2010, 21(1): 23-25.
- [5] Sasaki Y, Honda M, Makino M, et al. Mycoplasmas stimulate replication of human immunodeficiency virus type 1 through selective activation of CD₄⁺ T lymphocytes[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993, 9(8): 775-780.
- [6] Zheng BJ, Yin YP, Han Y, et al. The prevalence of urethral and rectal *Mycoplasma genitalium* among men who have sex with men in China, a cross-sectional study[J]. BMC Public Health, 2014, 14: 195.
- [7] Taylor-Robinson D, Horner PJ. The role of *Mycoplasma genitalium* in non-gonococcal urethritis[J]. Sex Transm Infect, 2001, 77(4): 229-231.
- [8] Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the search for a cure for HIV-1 infection: targeting the latent reservoir for HIV-1[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134(1): 12-19.
- [9] Geretti AM, Tsakiroglou M. HIV: new drugs, new guidelines[J]. Curr Opin Infect Dis, 2014, 27(6): 545-553.
- [10] Wu JR, Zhu Y, Xie YX, et al. Analysis on *Mycoplasma pirum* infection in male HIV/AIDS patients and related 16S rRNA genes in Jiangsu province[J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(3): 259-262. (in Chinese)

吴建茹,朱一,谢彦昕,等.江苏省男性 HIV 感染者梨支原体 16S rRNA 基因片段序列分析[J].中华流行病学杂志,2013,34(3):259-262.

(收稿日期:2014-12-19)

(本文编辑:王岚)