

广西壮族自治区低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者基因亚型研究

邓月琴 李剑军 方宁烨 王斌 王江伟 梁淑家 沈智勇 蓝光华 张鸿满
吴兴华 陆华湘 葛宪民

530023 南宁, 广西医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室(邓月琴、葛宪民); 530028 南宁, 广西壮族自治区疾病预防控制中心艾滋病防制所(李剑军、方宁烨、王斌、王江伟、梁淑家、沈智勇、蓝光华、张鸿满、吴兴华、陆华湘、葛宪民)

邓月琴、李剑军同为第一作者

通信作者: 葛宪民, Email: gxgexm@sina.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.03.010

【摘要】 目的 了解广西壮族自治区低档场所中老年嫖客与暗娼的 HIV-1 感染者病毒基因亚型特征及传播规律。方法 采用方便抽样的方法, 于 2012 年对广西壮族自治区 4 个城市和 9 个县(区)低档场所的嫖客(年龄 ≥ 50 岁)与暗娼开展分子流行病学调查, 进行 HIV-1 抗体筛查, 对 HIV-1 抗体阳性者血浆进行 *pol* 区基因片段扩增和序列测定, 对获得的基因序列进行系统进化树构建并鉴定毒株的基因亚型, 分析毒株亚型分布特征及传播规律。结果 共招募 4 048 例中老年嫖客和 784 例低档暗娼, 共发现 116 例 HIV-1 抗体阳性, 中老年嫖客与暗娼的 HIV-1 抗体阳性检出率分别为 2.5%(103/4 048)、1.7%(13/784), 对其中 84 例 HIV-1 抗体阳性者进行基因扩增和序列测定, 53 例获得基因序列(中老年嫖客 48 例、暗娼 5 例)。发现 3 种基因亚型, 均为重组株, CRF01_AE 占 90.6%(48/53), CRF08_BC 占 7.5%(4/53), CRF07_BC 占 1.9%(1/53)。经系统进化树分析发现, 48 例 CRF01_AE 流行毒株聚集成 2 个传播簇 Cluster 1 和 2; 4 例 CRF08_BC 聚集成 1 个传播簇。在 CRF01_AE Cluster 1 中又形成 4 个亚簇 C1-SC1、2、3、4, 各亚簇对象来源于同一处或相邻低档场所、或与同一省道毗邻乡镇的低档场所。结论 广西壮族自治区低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者流行毒株仍以 CRF01_AE 为主, 以同一处或相邻低档场所或毗邻乡镇呈小范围聚集, 当地 HIV-1 阳性的中老年嫖客与暗娼可能是该人群易感者毒株快速传播的重要传染源。

【关键词】 艾滋病病毒; 基因亚型; 传播簇; 嫖客; 暗娼

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX10004910); 广西八桂学者艾滋病防控关键技术岗位专项; 国家自然科学基金(81360442, 81460510)

Study on HIV-1 subtype among elderly male clients and female sex workers of low-cost venues in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China Deng Yueqin, Li Jianjun, Fang Ningye, Wang Bin, Wang Jiangwei, Liang Shujia, Shen Zhiyong, Lan Guanghua, Zhang Hongman, Wu Xinghua, Lu Huaxiang, Ge Xianmin

Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530023, China (Deng YQ, Ge XM); Institute of HIV/AIDS Control and Prevention, Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Nanning 530028, China (Li JJ, Fang NY, Wang B, Wang JW, Liang SJ, Shen ZY, Lan GH, Zhang HM, Wu XH, Lu HX, Ge XM)
Deng Yueqin and Li Jianjun are the first authors who contributed equally to the article.

Corresponding author: Ge Xianmin, Email: gxgexm@sina.com

【Abstract】 Objective To understand HIV-1 subtype characteristics and transmission clusters in elderly male clients and female sex workers (FSWs) of low-cost commercial sex venues in Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. **Methods** A cross sectional survey was conducted in FSWS and elderly male clients (≥ 50 years) of low-cost commercial sex venues in 4 cities and 9 counties in Guangxi Zhuang Autonomous Region by convenient sampling in 2012. The blood sample was collected from each case for HIV-1 antibody detection. The *pol* gene fragments were amplified and sequenced from viral RNA template extracted from plasma samples. The phylogenetic tree was constructed and the subtypes were identified. **Results** A total of 4 048 elderly male clients and 784

FSWs were surveyed, and 116 HIV-1 infections were detected, the positive rate was 2.5%(103/4 048) in the clients and 1.7%(13/784) in FSWs. The gene amplification and sequencing of HIV-1 detected in 84 blood samples indicated that 53 *pol* gene sequences were successfully determined (48 blood samples from elderly male clients and 5 blood samples from FSWs). Among 53 *pol* sequences, 48 (90.6%), 4(7.5%), and 1(1.9%) sequences were identified as CRF01_AE, CRF08_BC, and CRF07_BC, respectively. Two transmission clusters were identified among CRF01_AE, including 4 sub-clusters. One transmission cluster was identified among CRF08_BC. The transmission cluster or sub-cluster were from the infected individuals at same low-cost commercial sex venue, or different low-cost commercial sex venues in the same town, or same place, or adjacent villages and towns.

Conclusions CRF01_AE was the predominant HIV-1 subtype among elderly male clients and FSWs of low-cost commercial sex venues in Guangxi Zhuang Autonomous Region, circulating in same venue or adjacent villages and towns. The HIV-1 positive male clients and FSWs might play an important role in the spread of the strains.

【Key words】 Human immunodeficiency virus; Subtype; Transmission cluster; Male client; Female sex worker

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2012ZX10004910); Guangxi AIDS Prevention and Control Key Post Project; National Natural Science Foundation of China (81360442, 81460510)

广西壮族自治区2001—2011年新报告HIV/AIDS人数呈现快速上升趋势,异性性接触传播为主要传播方式,其中,中老年男性所占比例大幅上升^[1]。进一步研究表明,广西壮族自治区中老年嫖客HIV-1的感染率较高^[2-3],其可能与低档场所暗娼发生不安全商业性行为等因素有关^[4-6]。本研究拟对广西壮族自治区中老年嫖客与暗娼HIV-1感染者的基因亚型特征及传播簇进行研究。

对象与方法

1. 研究对象及调查方法:本研究按照地理分布,结合广西壮族自治区艾滋病疫情历年累计报告情况,选择柳州、桂林、贵港、北海4个市的城郊和宾阳县、鹿寨县、都安县、大新县、灵山县、平南县、全州县、灵川县和覃塘区9个县区,共13个调查点开展研究。采用方便抽样的方法,在2012年10—12月,对低档卖淫场所(单次性交易低于50元的场所,或站桩、旅社、出租屋、户外小树林等非固定场所)年龄≥50岁的嫖客及暗娼进行流行病学调查,调查方法见参考文献[6-9]。经研究对象知情同意后,采集5 ml静脉抗凝全血,由当地实验室进行样本处理及HIV抗体初筛,对初筛阳性者血浆标本全部送检广西壮族自治区CDC进行确证试验。确证阳性者作为HIV-1基因亚型测定的对象。

2. 核酸提取及基因扩增:取200 μl研究对象血浆样本,采用法国生物梅里埃全自动核酸提取仪NucliSENS® easyMAG,严格按仪器操作说明提取RNA,置于-80℃保存备用。采用RT-PCR和巢式PCR方法扩增HIV-1的*pol*区基因蛋白酶(全长)和反转录酶区(前300个氨基酸位点),扩增产物大小为1 316 bp,第一轮RT-PCR扩增引物为MAW26

(5'-TGG AAA TGT GGA AAG GAA GGA C-3')和RT21(5'-CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC TTT TGA TGG G-3'),反应条件为50℃ 30 min;94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2.5 min,30个循环;72℃ 10 min;4℃保温。取第一轮PCR产物进行第二轮巢式PCR扩增,扩增引物为Pro-1(5'-CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA-3')和RT-20(5'-CTG CCA GTT CTA GC T CTG CTT C-3'),反应条件为94℃ 5 min;94℃ 30 s,63℃ 30 s,72℃ 2.5 min,30个循环;72℃ 10 min;4℃保温。

3. 基因产物纯化及测序:PCR扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳,经DNA Marker比对确认无误后送至北京梓熙生物科技有限公司进行纯化和测序,测序仪为美国ABI公司PRISM 3730XL,测序试剂为Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing试剂盒。

4. 序列分析及亚型鉴定:所获得的原始序列经Sequencher 5.0软件进行序列剪切、次级峰搜索、拼接、清理和混合碱基判读后,加入Los Alamos HIV序列数据库提供的HIV-1分型参考毒株序列和来源于广西壮族自治区及中国其他地区的参考毒株序列,使用BioEdit软件进行序列比对,然后使用Mega 6.0软件中Neighbor-Joining方法(Kimura 2-parameter模型,包括both transitions and transversions,bootstrap=1 000 replicates)构建*pol*区序列的系统进化树,根据系统进化树确定基因亚型。将系统进化树上聚集成簇,且校验值>70的分支定义为可靠进化簇。

结 果

1. 基本情况:共招募了4 048例中老年嫖客和784例低档场所暗娼,HIV抗体初筛阳性分别为108例和13例。确证试验发现116例HIV-1感染者,其中,

中老年嫖客 103 例,暗娼 13 例,中老年嫖客和暗娼 HIV-1 抗体阳性检出率分别为 2.5%(103/4 048)和 1.7%(13/784)。除了 32 例 HIV-1 感染者的血浆标本量不足或前期实验已用完外,其余 84 例(72.4%, 84/116)有足够血浆标本进行 HIV-1 基因亚型测定,其中,中老年嫖客 71 例,暗娼 13 例。核酸提取 84 例,PCR 扩增 84 例,扩增阳性 60 例,扩增阳性率 71.4%(60/84),基因测序 60 例,获得序列 53 例,序列获得率 88.3%(53/60),其中,老年嫖客 48 例,暗娼 5 例,基本情况见表 1 和图 1。

2. HIV-1 毒株基因亚型分析:从美国 Los Alamos 国家实验室的 HIV 序列数据库选取 114 条不同基因亚型参考株序列,包括 Feng 等^[10]发现目前在中国流行 7 个 CRF01_AE 传播簇 Cluster 1~7 的 35 条 pol 区序列(表 2),加上本研究获得的 53 条 pol 区序列,共 167 条 pol 区序列构建系统进化树,见图 2。图 2 结果显示,广西壮族自治区低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者中有 3 种亚型流行,且都是重组型,其中,CRF01_AE 48 例,占 90.6%,CRF08_BC 4 例,占 7.5%,CRF07_BC 1 例,占 1.9%。

3. 传播簇分析:以 Feng 等^[10]的研究结果为参照,本研究获得的 48 条 CRF01_AE 毒株全部在这 7 个传播簇的第 1 和第 2 簇内,分别占 87.5%(42/48)和 12.5%(6/48)。CRF01_AE 包括 4 个亚簇 C1-SC1、2、3 和 4,其中,C1-SC1 包括大新县某一场所 7 条序列(中老年嫖客 6 条序列和暗娼 1 条序列),此场所人员流动较大;C1-SC2 由来源于鹿寨县城内 3 个不同街区低档场所内的 3 条中老年嫖客序列聚集在一

表 1 53 例低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV 感染者 pol 区序列及亚型分布

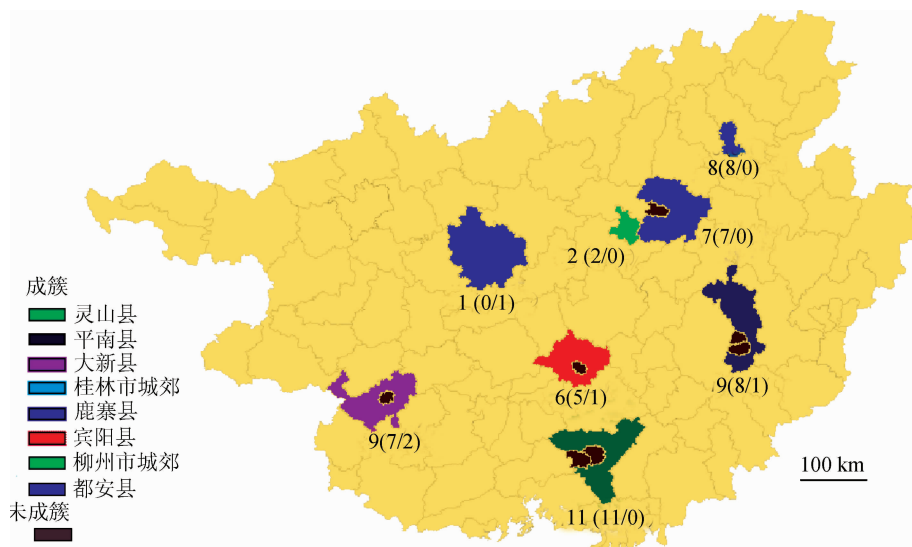
特征	例数	CRF01_AE						CRF C2	CRF 07_BC	CRF 08_BC
		C1				UG	小计			
		SC1	SC2	SC3	SC4					
研究对象										
嫖客	48	6	3	2	2	25	38	5	1	4
暗娼	5	1	0	0	0	3	4	1	0	0
年龄组(岁)										
<60	27	4	1	0	2	16	23	3	0	1
≥60	26	3	2	2	0	12	19	3	1	3
调查点										
大新县	9	7	0	0	0	1	8	1	0	0
鹿寨县	7	0	3	2	0	2	7	0	0	0
平南县	9	0	0	0	2	7	9	0	0	0
宾阳县	6	0	0	0	0	5	5	0	0	1
灵山县	11	0	0	0	0	4	4	4	0	3
桂林市	8	0	0	0	0	7	7	0	1	0
柳州市	2	0	0	0	0	2	2	0	0	0
都安县	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0

注: C: Cluster, (传播簇), CRF01_AE 发现 2 个传播簇 C1 和 C2; SC: Sub-Cluster, (亚簇), C1 簇发现 4 个亚簇 SC1、SC2、SC3 和 SC4; UG: Ungrouped, (未成簇)

起,C1-SC3 为来源于鹿寨县城郊某一场所 2 条中老年嫖客序列,C1-SC4 为来源于平南县毗邻的镇隆镇和大新镇 2 条中老年嫖客序列。4 例 CRF08_BC 也聚集成一簇,其中,3 条中老年嫖客序列来源于灵山县那隆镇和三隆镇,另 1 条中老年嫖客序列来源于宾阳县武陵镇。

讨 论

本研究为 2012 年广西壮族自治区对低档场所的中老年嫖客与暗娼进行较大样本的分子流行病学研究。中老年嫖客 HIV-1 抗体阳性检出率为 2.5%, 低于 2008 年云南省横断面调查嫖客人群的阳性检

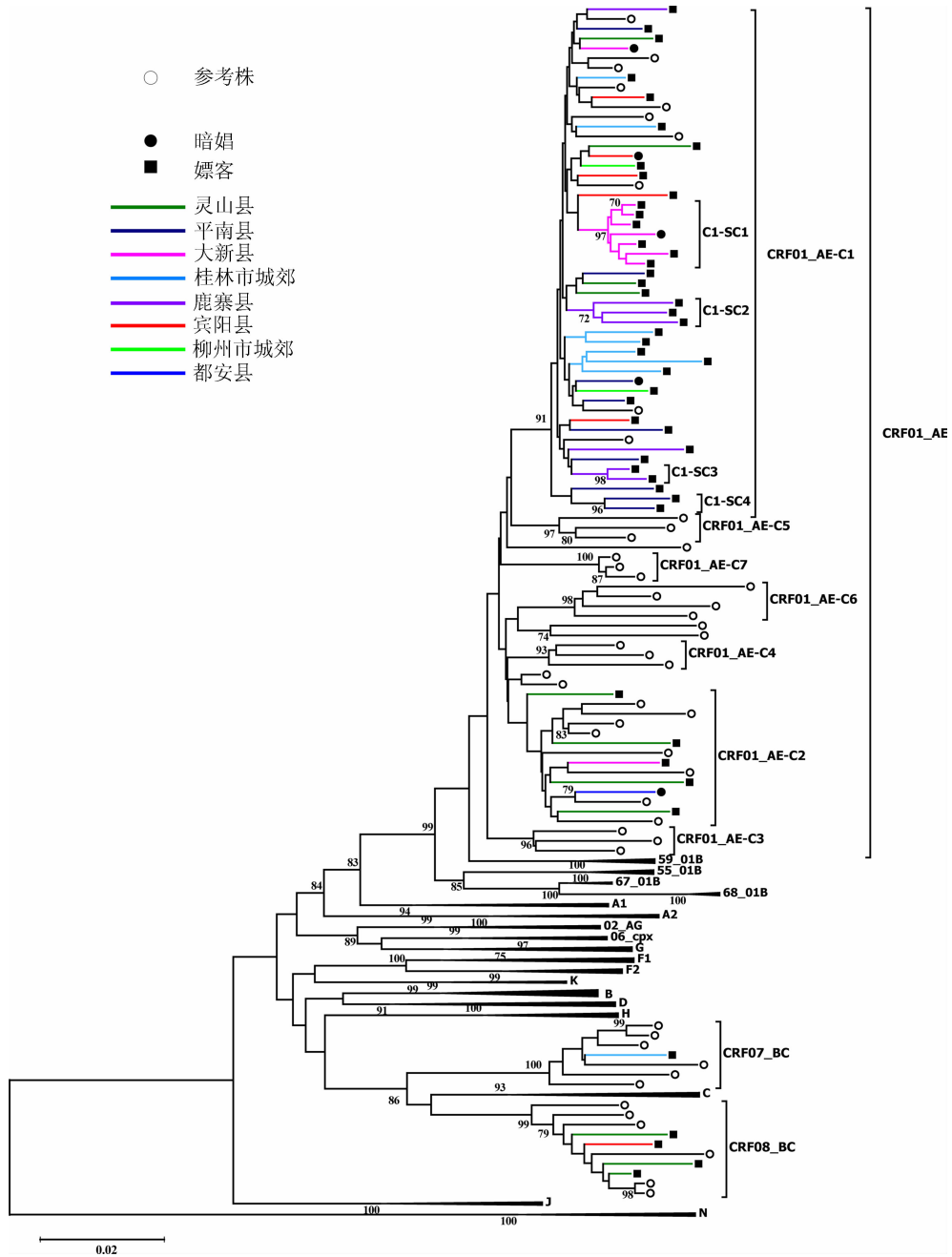


注:图中数字为 HIV/AIDS 病例数(嫖客/暗娼)

图 1 广西壮族自治区低档场所 53 例中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者获得 pol 区序列的研究对象地理分布

表2 来自美国 Los Alamos 国家实验室 HIV 序列数据库的参考株序列

亚型	CRF01_AE 7个传播簇							小计	参考株序列	合计	CRF01_AE 7个传播簇							小计	参考株序列	合计	
	1	2	3	4	5	6	7				1	2	3	4	5	6	7				
A1									3	3	N								3	3	
A2									3	3	01_AE	10	9	3	3	3	4	3	35	4	39
B									6	6	02_AG									3	3
C									4	4	06_cpx									3	3
D									4	4	07_BC									6	6
F1									4	4	08_BC									6	6
F2									4	4	55_01B									4	4
G									4	4	59_01B									4	4
H									4	4	67_01B									2	2
J									3	3	68_01B									3	3
K									2	2	合计	10	9	3	3	3	4	3	35	79	114



注：C：Cluster(传播簇)，CRF01_AE-C1/CRF01_AE-C2/CRF01_AE-C3/CRF01_AE-C4/CRF01_AE-C5/CRF01_AE-C6/CRF01_AE-C7 为目前在中国流行的 CRF01_AE 7 个传播簇；SC：Sub-cluster(亚簇)，C1-S1/C1-S2/C1-S3/C1-S4 为 CRF01_AE-C1 簇发现的 4 个亚簇
图2 广西壮族自治区低档场所中 53 例老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者获得 pol 区序列的系统进化树

出率(6.0%)^[11]。暗娼 HIV-1 抗体阳性检出率为 1.7%，略低于 2011 年广西壮族自治区低档场所暗娼 HIV-1 抗体阳性检出率(2.1%)^[12]。

广西壮族自治区低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者流行毒株以 CRF01_AE 为优势毒株。1996—1997 年,广西壮族自治区在静脉注射吸毒人群中 HIV-1 感染者发现 CRF01_AE 和新的 BC 重组型(后来证实为 CRF08_BC)流行^[13]。2006 年全国艾滋病分子流行病学调查显示^[14],广西壮族自治区新发现报告病例中以 CRF01_AE(53.4%)为主,其次是 CRF08_BC(35.7%)和 CRF07_BC(6.4%)。刘伟等^[15]分析广西壮族自治区 13 个市 2008—2009 年报告的 272 例患者以 CRF01_AE 为主,占 77.6%。而本研究发现 CRF01_AE、CRF08_BC 和 CRF07_BC 3 种流行重组型,以 CRF01_AE 为主,占 90.6%,均高于广西壮族自治区历年报告。

CRF01_AE 传播簇 1 又形成 4 个亚簇。进一步分析发现有 2 个亚簇毒株来源于同一低档场所,1 个亚簇毒株来源同一县城郊附近 3 个低档场所,1 个亚簇毒株来源于同一省道相距约 10 km 的相邻乡镇。另外,4 例聚集成簇的 CRF08_BC 毒株序列对象也来源于同一省道相邻乡镇,其中 3 条序列对象来源的乡镇相距约 10 km。提示广西壮族自治区低档场所暗娼与中老年嫖客 HIV-1 感染者的流行毒株呈现小范围聚集性,外源性毒株输入的可能性小,当地 HIV-1 阳性的中老年嫖客或暗娼可能是该人群毒株快速传播的重要传染源。

根据本研究发现低档场所中老年嫖客与暗娼 HIV-1 感染者流行毒株的新特点,应及时调整艾滋病防治对策,不断加强中老年人群的警示性教育,并为其免费提供方便可及的安全套发放措施;同时严厉打击卖淫嫖娼的违法行为,为嫖客与暗娼感染者提供及时治疗服务,从而更好地预防 HIV 新发感染及有效控制广西壮族自治区中老年男性艾滋病疫情。

志谢 感谢广西壮族自治区 13 个调查点各级 CDC 的支持和协作

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] 王勇,唐振柱,朱秋映,等.广西 2009—2011 年艾滋病流行特征分析[J]. 华南预防医学, 2013, 39(1): 6-11.
Wang Y, Tang ZZ, Zhu QY, et al. Epidemiological characteristics of HIV/AIDS in Guangxi, 2009-2011 [J]. South China J Prev Med, 2013, 39(1): 6-11.

[2] 许艳,王璐,国内外 ≥ 50 岁年龄组人群艾滋病流行特征及危险因素[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(11): 1166-1169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.11.025.
Xu Y, Wang L. The prevalence characteristics and risk factors of AIDS among people fifty years or older, at home and abroad [J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(11): 1166-1169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.11.025.

[3] 黑发欣,王璐,秦倩倩,等.中国 50 岁以上人群艾滋病疫情特点及流行因素分析[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(5): 526-527. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.05.025.
Hei FX, Wang L, Qin QQ, et al. Epidemiological analysis on the characteristics and related factors of HIV/AIDS in 50-year and older Chinese population [J]. Chin J Epidemiol, 2011, 32(5): 526-527. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.05.025.

[4] 陈怡,唐振柱,沈智勇,等.广西壮族自治区 2012 年艾滋病哨点中老年嫖客 HIV 感染危险因素调查[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(11): 1086-1090. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.011.010.
Chen Y, Tang ZZ, Shen ZY, et al. Investigation on the risk factors for HIV infection among elderly male clients of the commercial female sex-workers in Guangxi Zhuang Autonomous Region, in 2012 [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(11): 1086-1090. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.011.010.

[5] 王玉,周楚,吴兴华,等.广西 50 岁及以上嫖客 HIV 感染现状及影响因素研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2014, 18(3): 213-216.
Wang Y, Zhou C, Wu XH, et al. HIV infection and associated factors among clients aged 50 years or older of female sex workers in Guangxi, China [J]. Chin J Dis Control Prev, 2014, 18(3): 213-216.

[6] 陆华湘,朱宇佳,吴兴华,等.广西部分地区老年男性嫖客商业性行为特征及 HIV 感染相关危险因素研究[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(1): 31-34. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.008.
Lu HX, Zhu JY, Wu XH, et al. Study on the characteristics of commercial sexual behavior and the risk factors analysis of HIV infection among the old male clients, in Guangxi [J]. Chin J Epidemiol, 2015, 36(1): 31-34. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.01.008.

[7] 吴兴华,唐振柱,沈智勇,等.广西低档场所中老年男性使用壮阳药与 HIV 感染的相关因素研究[J]. 中国艾滋病性病, 2015, 21(6): 501-504, 508. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2015.06.15.
Wu XH, Tang ZZ, Shen ZZ, et al. Risk factors of aphrodisiac use associated with HIV infection among middle-aged and the elderly men of low-cost commercial sex venues in Guangxi [J]. Chin J AIDS STD, 2015, 21(6): 501-504, 508. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2015.06.15.

[8] 陆华湘,唐振柱,沈智勇,等.广西中部地区中老年嫖客使用助性药西地那非的相关危险因素研究[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(11): 1218-1222. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.11.009.
Lu HX, Tang ZZ, Shen ZY, et al. Sildenafil use and relevant risk factors among middle-aged or elderly male clients of female commercial sex workers in the central areas of Guangxi, China [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(11): 1218-1222. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.11.009.

[9] Tang ZZ, Wu XH, Li GJ, et al. Aphrodisiac use associated with HIV infection in elderly male clients of low-cost commercial sex venues in Guangxi, China: a matched case-control study [J]. PLoS One, 2014, 9(10): 109452. DOI: 10.1371/journal.pone.0109452.

[10] Feng Y, He X, Hsi JH, et al. The rapidly expanding CRF01_AE epidemic in China is driven by multiple lineages of HIV-1 viruses introduced in the 1990s [J]. AIDS, 2013, 27(11): 1793-1802. DOI: 10.1097/QAD.0b013e328360db2d.

[11] Xia J, Smith K, Chen RY, et al. HIV prevalence and risk behaviors among male clients of female sex workers in Yunnan, China [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2010, 53(1): 131-135. DOI: 10.1097/QAI.0b013e328181b3552a.

[12] Li JJ, Zhang HM, Shen ZY, et al. Screening for acute HIV infections and estimating HIV incidence among female sex workers from low-grade venues in Guangxi, China [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e99522. DOI: 10.1371/journal.pone.0099522.

[13] 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]. J Virol, 2000, 74(23): 11286-11295. DOI: 10.1128/JVI.74.23.11286-11295.2000.

[14] He X, Xing H, Ruan Y, et al. A comprehensive mapping of HIV-1 genotypes in various risk groups and regions across China based on a nationwide molecular epidemiologic survey [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47289. DOI: 10.1371/journal.pone.0047289.

[15] 刘伟,梁淑家,杨进业,等.广西壮族自治区 2008—2009 年 HIV-1 流行毒株基因型及其分布[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(1): 53-56. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.013.
Liu W, Liang SJ, Yang JY, et al. Distribution of HIV-1 subtypes in Guangxi Zhuang Autonomous Region, 2008-2009 [J]. Chin J Epidemiol, 2013, 34(1): 53-56. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.013.

(收稿日期: 2016-09-17)
(本文编辑: 斗智)