

• 论 著 •

广西 HIV-1 首次流行的分子流行病学分析

陈杰¹ 刘伟¹ Nancy L, Young² Shambavi Subbarao² 梁富雄¹ 李荣健¹
梁绍伶¹ Timothy D, Mastro² Suranga Saganwongse³ Suthon Wongsheree³

【摘要】 目的 广西自 1996 年 4 月起在静脉吸毒者和卖血者中发现 HIV 感染者, 为了解其传染来源和判断其流行趋势, 对广西流行的 HIV 进行分子流行病学分析。方法 选取 HIV 抗体阳性血清标本 44 份, 分别采用多肽酶免疫法 (PEIA) 和经逆转录 PCR 扩增作 cDNA 序列分析, 分别确定其 HIV-1 基因亚型并加以比较。结果 结果表明广西存在 4 种 HIV-1 M 组基因亚型, 即 B' (泰国 B 亚型)、C、D、E 亚型。在静脉吸毒人群和性混乱者中存在 HIV-1 E 亚型流行和 C 亚型感染者; 而在卖血者中发现 HIV-1 B' 和 D 亚型感染。结论 HIV-1 D 亚型感染和 E 亚型流行已在国内出现, E 亚型病毒已由东南亚传入流行并将在我国南部形成新的流行区域。提出血清学分型方法可作为 HIV-1 基因亚型分析的筛选技术推广应用。

【关键词】 人免疫缺陷病毒 1 型 基因亚型 血清学分型 脱氧核糖核酸序列分析

Molecular-epidemiological analysis of HIV-1 initial prevalence in Guangxi, China CHEN Jie*, LIU Wei, Nancy LY, et al. *Guangxi Health and Anti-epidemic Center, Nanning, Nanning 530021

【Abstract】 Objective In April 1996, HIV-1 infection was first found among both commercial blood donors and IDUs in Guangxi. In order to identify the source of HIV-1 transmission and analyze the trend of HIV-1 epidemic, the study was carried out. **Methods** HIV-1 genetic subtypes were determined by peptide enzyme immunoassays (PEIA), RT-PCR and DNA sequencing. **Results** Four subtypes of Group M HIV-1 were found in Guangxi: subtype B' (Thai B), C, D and E. Subtype E and C (1 person) were circulating among IDUs and heterosexual, while subtype B' and D (1 person) were among commercial blood donors. Subtype B' infections were discovered among a group of commercial blood donors and one of them was infected by subtype D. **Conclusion** It is the first report of subtype D infection and subtype E that were identified in China. This observation indicated that subtype E HIV-1 was spread into China from Southeast Asia, and a new epidemic region with subtype E HIV-1 would emerge in southern China. Serotyping might be a useful screening method for HIV-1 molecular epidemiological analysis.

【Key words】 HIV-1 Genetic subtype Serotyping DNA sequence

1996 年 4 月, 我区开始在一些流动到外省有偿供血的人员中检出 HIV 感染者, 并在

中越边境地区发现静脉注射吸毒人群 (IDUs) 中存在 HIV 流行的情况^[1]。这是广西首次在本区居民中发现 HIV 感染和出现区域性流行。

为了掌握广西首次 HIV 流行的病毒基因亚型资料, 以分析其传染的来源和判断其今后的流行趋势, 于 1996 年 4 月至 7 月收集

1 广西壮族自治区卫生防疫站 南宁 530021

2 Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA

3 National Institute of Health, Dept. of Medical Sciences, Thailand

了一批经确证试验为 HIV-1 抗体阳性的血清标本,分别采用多肽酶免疫(PEIA)血清学分型和逆转录 PCR(RT-PCR)及序列分析的方法,对广西 HIV-1 病毒的基因亚型进行型别分析。结果报告如下。

材料与方法

一、样本及资料收集:选取本实验室保存的 1996 年 4~7 月间采集的 HIV-1 抗体阳性的血清标本作为亚型分析样本;所选样本均经过蛋白印迹试验确认,在 -80℃ 低温保存 1 至 4 个月不等。每份样本在采集时,均采用统一的问卷了解被采样者的基本资料和高危行为资料。

用于亚型分析的 44 份血清样本中,来自有偿供血者的样本 25 份,其中男性 21 份,女性 4 份;25 名供血者均有流动到外省供 HBsAg 阳性血浆的历史。来自吸毒者的样本 16 份,其中 15 份采自位于中越边境口岸城市——凭祥市,1 份采自南宁市;有男性 14 名,女性 2 名,均有静脉注射吸毒的高危行为;另 3 份样本中,2 份采自有在泰国嫖娼史的男性,另 1 份采自凭祥市 HIV 感染的吸毒者的女性配偶。

二、PEIA 血清学分型:实验方法见文献[2]。本次分析采用的 HIV-1 亚型 V3 环合成多肽分别为 B' 亚型(泰国 B 亚型)和 E 亚型;其 14 个 gp120V3 环型特异合成肽段氨基酸顺序为: B' 亚型: N^{*} KSIHL GPGQ AWYTT; E 亚型: N^{*} TSITI GPGQ VFYRT。

三、RT-PCR 和序列分析:血清样本 RNA 的提取采用试剂盒 Qiagen blood kit (Qiagen, Inc, Chatsworth, CA USA) 并按产品说明书要求操作。提取的 RNA 经逆转录 PCR 反应获得样本 cDNA,所采用的引物为 JH35R; 然后进行套式 PCR 反应(外引物 JH44F/JH35R,内引物 JH33F/JH48R),获得包括 V3 环在内的 gp120C2-V4 区、长度为 525 个碱基的 PCR 扩增产物。套式 PCR 扩

增成功的样本 DNA 经纯化和测序处理后,采用自动序列分析仪进行分析。根据获得的序列分析结果,取自 C2 区中段至 V4 区开始段的 gp120 基因的 345 个碱基进行基因相关性分析并构建系统树,参考 HIV-1 标准亚型株判定样本株的基因亚型。

结 果

一、PEIA 分型:44 份血清样本经 PEIA 检测,有 32 份样本被定型,占 73%。其中 18 份划定为泰国 B' 亚型,占 41%;14 份划定为 E 亚型,占 32%。有 6 份样本(14%)对 B' 和 E 亚型均有反应未能确定亚型,其余 6 份样本(14%)则对两个亚型均无反应而无法定型。从样本来源看,25 份供血员样本中有 18 份(72%)划定为 B' 亚型;4 份出现对两个亚型反应,3 份则无反应。在 16 份 IDUs 样本中,12 份(75%)划定为 E 亚型;3 份出现对两个亚型反应,1 份为无反应。3 份来自性接触感染者的样本有 2 份划定为 E 亚型,1 份为无反应。

二、基因序列分析分型:从 44 份血清样本中逆转录和 PCR 扩增成功 29 份(66%) cDNA 样本,并完成了序列分析。通过分析鉴别出 HIV-1 M 组基因亚型 4 种: B'、C、D 和 E 亚型,其中 B' 亚型 13 株, E 亚型 14 株, C 和 D 亚型各 1 株。所有 4 个亚型 28 株病毒 C2-V3 区 340 余个碱基的基因序列均已登录于 Genbank,登记号为 AF080186 至 AF080213。不同危险组人群的基因亚型检出情况见表 1。14 份供血员标本有 13 份鉴别为 B' 亚型,其中 9 株病毒 V3 环顶的特征肽为 GPGQ,2 株为 GPGR 及 1 株为 RWGR; 余下 1 株(96CH11)经测序有 107 个碱基对缺失,包括 V3 环顶的特征肽的 3 个氨基酸缺失而未能进入系统树分析。12 株 B' 亚型病毒基因序列间的同源性为 99%。在 13 份来自凭祥市的吸毒者样本中,鉴别出 E 亚型病毒 12 株;而从性暴露人群样本中检出 E 亚型病毒 2 株。14 株 E 亚型病毒的 V3 环顶

特征四肽序均为 GPGQ, 其基因序列间同源性为 99%。有 1 份供血员样本被鉴别为 D 亚型, 其特征四肽序是 GLGQ; 鉴别为 C 亚型的样本来自南宁市的吸毒者, 特征四肽序为 GPGQ。

表 1 广西高危人群 HIV-1 基因亚型分布

基因亚型	有偿供血 (n= 14)	静脉吸毒 (n= 13)	性接触 (n= 2)
B'	13	-	-
C	-	1	-
D	1	-	-
E	-	12	2
合计	14	13	2

三、PEIA 和序列分析结果比较: 采用 PEIA 血清学分型结果与 DNA 序列分析结果比较见表 2。两种方法对 B' 亚型鉴别的符合率为 91.6% (11/12); 而对 E 亚型鉴别的符合率为 90% (9/10)。PEIA 未能定型的 7 份样本经序列分析均鉴别定型, 其中 3 份 B' / E 双反应的样本均为 E 亚型。

表 2 广西 HIV-1 基因亚型分析 PEIA 和序列分析结果比较

PEIA	序列分析				合计
	B'	C	D	E	
E		1		9	10
B'	11		1		12
E/B				3	3
无反应	2			2	4
合计	13	1	1	14	29

讨 论

尽管广西发现 HIV-1 在本地居民中流行或散发感染的时间晚于国内多数省份, 但从一开始就呈现为多种 HIV-1 M 组病毒基因亚型混合存在的情况。从广西居民中首次获得的 44 份 HIV-1 感染者血清样本中, 同时鉴别出 4 种 HIV-1 M 组基因亚型; 而且 E 亚型已经在局部地区的 IDU 人群中形成了流行。最近, 在另两次 HIV-1 基因亚型分析研究中, 也分别证实了我区 B' 和 E 基因亚型的存在及新发现 C 基因亚型已经在我区多个地区的 IDU 人群中出现了播散性流行^[3]。目前, 广西 IDU 人群中 HIV-1 流

行的优势基因亚型是 C 亚型, 已广泛分布于广西大部分地区; 而 E 亚型则暂时局限流行在广西西南部中越边境地区。B' 和 D 亚型感染全部见于流动到外省卖血浆的供血员, 未见有其他人感染的情况。D 亚型感染在我国及周边国家均罕见^[4, 5], 我们的发现表明这一在非洲流行的基因亚型已经传入我国。

通过遗传进化分析, 12 株 B' 亚型病毒的核苷酸序列的相关程度非常紧密, 显示为来自同一传染源的感染; 实际上这些供血员有在同一单采浆站长期供浆的历史, 估计是在卖血过程中受到感染。类似的情况也见于 E 亚型病毒的进化关系分析中。12 株 E 亚型病毒间基因差异极小, 并且与泰国 E 亚型标准株的基因关联度极为紧密, 提示这些 IDU 人群受到同一来源的 HIV-1 病毒的感染。越南 IDU 人群中 HIV-1 E 亚型的流行由南向北迅速发展, 与广西相邻省份的 IDU 中已发现有 HIV-1 流行^[6]。而中越边境地区 IDU 人群跨国交往使用毒品的情况非常普遍, 相信在广西流行的 E 亚型病毒是从越南传入的。随着不断地蔓延, HIV-1 E 亚型将在广西造成更大范围的流行, 并将影响到周边的省份, 在我国形成 E 亚型的流行区域。

采用合成 V3 环肽段作抗原以 EIA 法进行 HIV-1 血清学分型已得到肯定和在国际上更多地应用, 并不断地得到改进和完善^[7~9]。李大勤等^[10]采用该法对云南 HIV-1 亚型进行血清流行病学追踪观察也取得成功; 我们的结果显示该法的分型成功率与序列分析的符合率比较理想。血清学分型方法简便易行, 可利用库存血清作回顾性调查和进行大批量样本分析; 尽管该法仍存在亚型间交叉反应等问题, 但经改进和结合基因序列分析或 HMA 方法, 不失为 HIV-1 M 组病毒基因亚型分子流行病学筛选分析的有用方法, 尤其是更为适合在地方或基层实际工作中推广应用。

参 考 文 献

- 1 陈杰, 梁富雄, 梁绍伶, 等. 广西凭祥市吸毒人群 HIV-1 感染状况调查分析. 中国性病艾滋病防治杂志, 1998, 4: 97-99.
- 2 Wasi C, Herring B, Raktham S, et al. Determination of HIV-1 subtype in IDUs in Bangkok, Thailand, using peptide-binding enzyme immunoassay and heteroduplex mobility assay: evidence of increasing infection with HIV-1 subtype E. AIDS, 1995, 9: 843-849.
- 3 Yu XF, Chen J, Shao Y, et al. Two subtypes of HIV-1 among IDUs in southern China. Lancet, 1998, 351: 1250.
- 4 Lee JS, Maeng SH, Cho OH, et al. Phylogenetic analysis of the nef gene reveals a distinctive monophyletic clade in Korean HIV-1 cases. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998, 17: 58-68.
- 5 Paladin FJ, Monzon OT, Tsuchie H, et al. Genetic subtypes of HIV-1 in the Philippines. AIDS, 1998, 12: 291-300.
- 6 Lindan CP, Lieu TX, Giang LT, et al. Rising HIV infection rates in Ho Chi Minh city herald emerging AIDS epidemic in Vietnam. AIDS, 1997, 11: S5-S13.
- 7 Workshop report from the EC and UNAIDS. HIV-1 subtypes implication for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. AIDS, 1997, 11: 17-36.
- 8 Barin F, Courouce AM, Pillonel J, et al. Increasing diversity of HIV-1_M serotypes in French blood donors over a 10-year period (1985-1995). AIDS, 1997, 11: 1503-1508.
- 9 Mauciere P, Damond F, Apetrei C, et al. Synthetic peptide ELISAs for detection of and discrimination between group M and group O HIV type 1 infection. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997, 13: 987-993.
- 10 李大勤, 郑锡文, 张桂云, 等. 中国云南省瑞丽等地人免疫缺陷病毒 1 型 C 亚型分布的研究. 中华流行病学杂志, 1996, 17: 337-339.

(收稿: 1998-12-14 修回: 1998-12-25)

108 例丙型肝炎五年定群研究

黄慧俐 叶淑荣 赵 莉

1992 年 2 月, 我们对昆明市某戒毒所 167 名静脉内毒瘾者进行了抗-HCV 检测, 发现该人群抗-HCV 阳性率高达 92.2%, 随后 6 个月和 15 个月进行了追踪调查, 发现有较高的转慢率和较轻的临床表现。现报道如下。

一、对象与方法:

1. 研究对象及方法: 以 1992 年 2 月经抗-HCV 检测确诊的 154 名 HCV 感染的静脉内毒瘾者为研究对象。每次均由相同的专业人员按统一的方式进行询问调查, 内容为: 一般人口学特征、肝炎的主要症状、体征, 并进行血清学检测及 B 超检查。

2. 诊断标准: 肝炎诊断按 1995 年第五次全国传染病寄生虫病学会会议讨论修订标准。

二、结果:

1. 抗-HCV 检测结果: 1992 年 2 月抗-HCV 阳性率为 92.2%, 随后 6、15 和 60 个月的调查, 阳性率分别为 89.0%、66.7% 和 97.2%。60 个月随访调查时有 32 名抗-HCV 阴转者再次阳转。

2. 临床表现: 肝炎症状体征及血清 ALT 异常率在 1992 年 2 月初次检查时最高, 随后 6 个月至 5 年

期间, 95% 以上无肝炎症状和体征。5 年来, 血清总胆红素、白蛋白无明显变化, 血清 ALT 异常率呈波动下降, ALT 异常表现为持续异常和波动性异常。

3. 临床转归: 5 年来, 除 1 例开始表现为亚型重型肝炎, 最终死亡外, 其余病例均未治疗。60 个月随访 108 名结果显示: 1 例发展为中度慢性肝炎, 2 例发展为轻度慢性肝炎, 28 例呈亚临床型, 52 例表现为“健康”携带, 22 例呈急性无黄疸型肝炎转为慢性携带表现, 3 例痊愈。血清 AFP 检测均在正常水平。

三、讨论: 调查中发现, 原 32 名抗-HCV 已阴转的毒瘾者, 因复吸, 抗-HCV 再次阳性, 推测可能的原因: 一是反复多次不洁静脉注射, 可能造成不同的 HCV 亚型或变异株感染; 二是可能系抗-HCV 滴度水平特殊波动形式。

静脉内毒瘾者 HCV 感染, 约 80% 呈隐性型起病, 20% 有轻微不适感, 典型的肝炎症状、体征不明显。95% 以上 5 年发展缓慢, 呈亚临床型或“健康”携带状态, 仅 3% 左右发展为慢性肝炎。5 年时血清 AFP 检测, 全部阴性, 说明尚未发生肝细胞癌。结果提示, 静脉内毒瘾者 HCV 感染呈持续缓慢的肝细胞损伤过程; 持续性 HCV 感染也不一定表现肝功能异常, 似有“健康”携带者存在的可能。

(收稿: 1998-08-29 修回: 1998-09-30)