

· 现场调查 ·

河南省人免疫缺陷病毒 1 型流行现状研究

赵飞 王哲 朱谦 崔兆麟

【摘要】目的 了解河南省人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)毒株的亚型状况及序列变异、流行特征,分析其传播来源和传播规律。**方法** 对 2006—2007 年在河南省采集的 1287 例 HIV-1 感染者抽取静脉血,用巢式聚合酶链反应(nest-PCR)对单个核细胞中前病毒脱氧核糖核酸的 *env* 基因和 *gag* 基因进行扩增,并测定和分析核苷酸序列。**结果** 1287 份样本中存在 B'、C 亚型及 BC、AE 两个重组亚型,其在所有分析样本中的比例分别为 95.882%(1234/1287)、0.466%(6/1287)、2.875%(37/1287)、0.777%(10/1287)。与国内及国际的参考毒株 RL42、C.95in21068、07-BC.CN.97.C54A、01AE.TH.90.CM240 间的离散率分别为(9.327±0.245)%、(5.214±0.183)%、(6.278±0.194)%、(5.332±0.158)%。**结论** 目前河南省艾滋病感染者中有 B'、C 亚型及 BC、AE 两个重组亚型。泰国 B' 亚型依然占主导地位。B' 亚型以既往有偿献血人员为主,BC 亚型以性传播为主,AE 亚型以性传播及既往献血途径为主,C 亚型以性传播为主。

【关键词】 人免疫缺陷病毒 1 型; 亚型; 巢式聚合酶链反应; 序列测定

Studies on HIV-1 strains in Henan province ZHAO Fei, WANG Zhe, ZHU Qian, CUI Zhao-lin. Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

【Abstract】Objective To study the epidemic status of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes and sequence variation in Henan thus to explore the characteristics and sources of transmission. **Methods** HIV-1 *env* and *gag* gene were amplified by nested PCR from uncultured peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from 1287 HIV-1 carriers confirmed in Henan from 2006 to 2007. 1287 *env* and *gag* genes were obtained from the patients. **Results** Among 1287 samples, there were 4 HIV-1 strains including subtype B', C and recombinant subtype BC and AE, accounting for 95.882% (1234/1287), 0.466% (6/1287), 2.875% (37/1287), 0.777% (10/1287) respectively. In comparison with the sequence of the international strains of RL42, C.95in21068, 07-BC.CN.97.C54A, 01AE.TH.90.CM240, the genetic divergence was 9.327%±0.245%, 5.214%±0.183%, 6.278%±0.194% and 5.332%±0.158%, respectively. **Conclusion** There were 4 HIV-1 strains including subtype B', C and recombinant subtype BC and AE in Henan with main dominant subtype as subtype B' which was closely related to HIV-1 strains of Thailand B'. The major transmit route in subtype B' was through blood donation in the past years while with BC, it was through sexual transmission. The major transmit routes in subtype AE were sexual transmission and blood donation. The major route of transmission in subtype C was through sexual contact.

【Key words】 Human immunodeficiency virus type 1; Subtype; Nested PCR; Sequence analysis

HIV 根据血清学及病毒核酸序列可以分为 HIV-1、HIV-2 两型。根据 *env* 基因(编码包膜蛋白)和 *gag* 基因(编码壳蛋白)序列的同源性将 HIV-1 分为 M、N、O 三个组^[1]。由于 HIV 的高度变异,分离和鉴定感染人群中 HIV-1 亚型的分布特点并监测其变化过程,是研制有针对性的 HIV-1 疫苗的重要课题,同时也是研究 HIV-1 生物学特性的基础^[2]。HIV-1 型内,各亚型之间的基因离散率为 20%~35%,同一亚型的基因离散率为 7%~20%。单一亚型毒株疫苗难以保护其他亚型流行株,定期对 HIV 进行亚型测定和分析是艾滋病防治工作中不可缺少的。因此必须立足我国自身情况,开展针对中国流行株的艾

滋病疫苗研究。有资料显示,不同的亚型对非核苷酸反转录酶抑制剂具有不同的敏感性。因此在开发及使用抗病毒药物时,要考虑到亚型的差别^[2]。

河南省在 20 世纪 90 年代中期许多既往献血者由于不规范的采血导致感染 HIV,1998 年我国政府对采血点进行规范,并对既往献血人员进行检测。到 2006 年,河南省一共确认 35 232 名 HIV 感染者,21 828 例艾滋病患者,其中 7107 例死亡。河南省目前有 53% 的艾滋病患者进行了抗病毒治疗^[3],并于 2004 年 10 月完成既往有偿献血人员的普查,详细掌握了 HIV 感染者的感染状况及流行病学资料,但是对 HIV 感染者的亚型分布状况,知之甚少。本研究对 2006—2007 年河南省发现的 1287 份 HIV-1 毒株进行实验室及流行病学分析,报告如下。

材料与方法

1. 标本来源及处理: 2006—2007 年河南省发现的 1287 例经确认的 HIV-1 抗体阳性者, 其中男 680 例, 女 607 例, 年龄 18 ~ 59 岁。1144 例 (89.7%) 为既往有无偿献血者, 104 例 (8.02%) 为经性传播者, 受血感染为 21 例 (1.63%), 母婴传播为 10 例 (0.78%), 吸毒感染为 8 例 (0.62%)。共有 388 例进行抗病毒治疗, 其中 212 例服用 Stavudine (D4T) + Lamivudine (3TC) + Nevirapine (NVP), 147 例服用 Zidovudine (AZT) + 3TC + NVP, 29 例服用 D4T + 3TC + Efavirenz (EFV)。每名对象采集静脉血 5 ~ 7 ml, 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝 (1.5%), 采血后 4 h 内, 离心半径 6 cm, 1200 r/min 离心 20 min, 提取外周血单个核细胞 (PBMC), -20℃ 保存。

2. 核酸提取: 采用德国 Qiaegen 公司的 DNA Blood Mini Kit, 按照说明书操作步骤逐步提取样本外周血单个核细胞 HIV-1 前病毒 DNA。加入含 6 μg/ml 蛋白酶 K 的裂解液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.4, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.1% gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween 228) 成为 6 × 10⁶ 的细胞浓度, 60℃ 温育 2 h 后, 95℃ 15 min 灭活蛋白酶 K, 样品 -20℃ 保存。

3. 聚合酶链反应 (PCR): 按巢式 PCR 方法, 设计合成多对 PCR 引物, 扩增 HIV-1 *env* 基因及 *gag* 基因 (表 1)。所有反应均采用 50 μl 反应体系。

表 1 PCR 和测序引物

引物	序列	位置 (HXB2)	长度 (bp)
Env Env-B1	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6557 ~ 6582	1250
Env-4	GCCCATAGTGCTTCCTGCTGCTCC	7811 ~ 7792	
Env-7	TGTCAGCACAGTACAATGTACACATG	7002 ~ 7021	668
Env-8	TTCACCTCTCCAATTGTCC	7668 ~ 7648	
Env-D	CTGTAAATGGCAGTCTGGCAG		
Gag GagF2	ATG GGTGCG AGAGCGTCARTATTA	790 ~ 814	1242
Gage2	TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG	2032 ~ 2011	
306	GGGAAA AAAATTC GCT TAA GGCC	836 ~ 857	671
c-gag	TAG TTC CTG CTA TRT CAC TTCC	1507 ~ 1486	

(1) *env* 区反应条件: 用外侧引物 Env-B1/Env-4 进行第 1 次 PCR 反应, 94℃ 3 min, 52℃ 30 s, 72℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。第 2 次 PCR 以 Env-7/Env-8 为内侧引物, 取第 1 轮 PCR 产物 5 μl 为模板, 94℃ 3 min, 55℃ 30 s, 72℃ 3 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

(2) *gag* 区反应条件: 用外侧引物 GagF2/Gage2 进行第 1 次 PCR 反应, 94℃ 5 min, 52℃ 1 min, 72℃ 150 s, 1 个循环; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。第 2 次 PCR 以 306/c-gag 为内侧引物, 取第 1 轮 PCR 产物 5 μl 为模板, 94℃ 2 min, 50℃ 50 s, 72℃ 90 s, 1 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

4. PCR 产物的纯化: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 与标准对照判定无误后, 切下特异扩增带, 用 Qiaegen 公司的 Qiaex 试剂, 按说明提纯扩增的 HIV-1 DNA 片段。回收的 DNA 溶于 10 mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.7, 经琼脂糖凝胶电泳与分子量标准比较估算核酸浓度。

5. 核苷酸序列测定: 分别使用 Env-D3 和 306 作为 *env* 区和 *gag* 区的测序引物, 以 *env* 区和 *gag* 区的产物为模板, 用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒, 在 PE 公司 9600 型 PCR 仪上进行测序反应, 模板用量约 1 μg, 引物用量为 6 pmol。反应产物经提纯后用自动 DNA 序列分析仪进行序列测定。

6. 序列分析: 测得的序列用 SeqEdit 软件 (ABI 公司研发) 和 DNA 软件进行编辑校正, 每个样品核苷酸的最终序列根据 2 个同向测序引物所测结果重叠校核后确定。序列的排列、比较和同源性等分析使用威斯康星 GCG 公司软件包完成, 具体包括: ① 用 SeaView、Clustal X 程序对样品及国际标准序列的排列和比较; ② 用 Pretty 程序计算 1 组序列的共享序列 (consensus sequence); ③ 用 Distances 计算 1 组序列间的基因离散率; ④ 用 Growtree 程序做系统树分析。

结果

1. 河南省 HIV-1 亚型分布: 1287 份样本中存在 B'、C 亚型及 BC、AE 重组亚型, 其在所有分析样本中的比例分别为 95.882% (1234/1287)、0.466% (6/1287)、2.875% (37/1287)、0.777% (10/1287)。

2. 河南省 HIV-1 亚型的传播途径及人群分布特点: 既往有无偿献血人员中, 主要的流行株是 B' 亚型 (98.5%), 第 2 至 4 位的分别是 BC 亚型 (0.9%)、AE 亚型 (0.4%) 和 C 亚型 (0.2%)。性传播人群中, 主要的流行株是 B' 亚型 (72.1%), 第 2 至 4 位的分别是 BC 亚型 (21.2%)、AE 亚型 (3.8%)、C 亚型 (2.9%)。受血人群中, 主要的流行株是 B' 亚型 (90.4%)。母婴传播中, 主要的流行株是 B' 亚型 (70.0%), 第 2 至 3 位的分别是 BC 亚型 (20.0%)、C 亚型 (10.0%)。吸毒人群中, 主要的流行株是 B' 亚型 (75.0%), 第 2 位

的是 BC 亚型 (25.0%)。非既往有无偿献血人员的艾滋病感染者中, C 亚型及 BC、AE 亚型的比例明显高于既往有无偿献血人员。

B' 亚型感染以既往有无偿献血人员为主, BC 亚型的以性传播为主, 在 37 例 BC 亚型中有 22 例为经性传播, 其余 15 例中吸毒 2 例、母婴传播 2 例、输血及受血感染为 11 例 (由于在许多地方还存在歧视现象, 有一部分感染者会把经性传播和吸毒传播改成输血感染)。10 例 AE 亚型以性传播及既往献血途径为主 (分别为 4 和 5 例)。6 例 C 亚型感染中有 3 例为性传播。6 例同性恋 HIV 阳性感染者均为 B' 亚型, 其中 1 例为 B' (BR/FR) 亚型, 1 例 B' (IT) 亚型, 1 例 B' (KR) 亚型。经分析, 离散率和国际标准 B' 病毒株均大于 15.0%, 组内离散率为 10.7%, 提示变异较大且来源分散 (表 2)。

表 2 河南省 HIV-1 亚型的传播途径及人群分布

亚型	传播途径					合计
	性	母婴	既往献血	受血	吸毒	
C	3(2.9)	1(10.0)	2(0.2)	0	0	6
BC	22(21.2)	2(20.0)	10(0.9)	1(4.8)	2(25.0)	37
AE	4(3.8)	0	5(0.4)	1(4.8)	0	10
B'	75(72.1)	7(70.0)	1127(98.5)	19(90.4)	6(75.0)	1234
合计	104	10	1144	21	8	1287

注: 括号外数据为例数, 括号内数据为构成比 (%)

3. 河南省 HIV-1 亚型的地区分布特点: 河南省艾滋病的主要传播途径是既往有无偿献血, 来自该人群的 1287 份样本中 1201 例为河南省籍, 86 例为外省籍。在发现的 53 例非 B' 亚型中, 河南籍 45 例 (其中 11 例有外出打工史), 外省籍有 8 例。这 8 例外省籍非 B' 亚型 HIV 感染者中, 有 2 例 (BC 亚型) 分别来自广东省江门市和福建省泉州市, 6 例为云南省瑞丽地区的外来妇女, 其中 3 例 (均为 BC 亚型) 有静脉吸毒史, 2 例 (AE 及 C 亚型) 为经性传播, 1 例 (C 亚型) 自诉有献血史。

4. 河南省 HIV-1 毒株与部分国内和国际代表株的基因离散率: B'、C 亚型及 2 个重组亚型 BC、AE 间的组内离散率分别为 (7.342 ± 0.265)%、(4.576 ± 0.126)%、(5.107 ± 0.221)% 和 (4.676 ± 0.135)%。与国内、国际参考毒株 RL42、C.95in21068、07-BC.CN.97.C54A、01AE.TH.90.CM240 间的离散率分别为 (9.327 ± 0.245)%、(5.214 ± 0.183)%、(6.278 ± 0.194)% 和 (5.332 ± 0.158)%。

讨 论

目前国际上很少有国家进行过大规模多种人群

的 HIV 分子流行病学调查, 许多国家希望得到较全面的分子流行病学资料, 但因不具备良好的现场条件或已错过了最佳的调查时机而未能得以实现。我国在 1996—1998 年完成了“全国 HIV 分子流行病学调查研究”, 并发现在国内存在着 HIV-1 的 A、B、C、D、E、F、G 亚型、HIV-2 型病毒株和 B'/C 重组病毒株, 查明了在不同人群和不同地区病毒株的分布情况。在已确证 HIV-1 阳性的 19 例河南省籍献血员中, HIV-1 病毒株属泰国 B' 亚型, 并与我国云南省德宏 B' 亚型病毒株密切相关。此为河南省最早作出的 HIV 亚型分析^[4]。2002—2004 年中国疾病预防控制中心性病艾滋病中心在全国范围内开展了“全国 HIV 分子流行病学调查及数据库的建立”项目, 从 26 个省、市、自治区共随机收集 1048 例 HIV 阳性样本。结果显示, 河南省的 28 例献血员均为 B' 亚型。此为河南省第二次作出的 HIV 亚型分析^[4]。

此次“河南省 HIV-1 流行现状研究”为在河南省内进行的第三次大规模的 HIV 分子流行病学调查, 获得 1287 例艾滋病感染者的 HIV-1 亚型结果。研究范围覆盖了河南省的 18 个地区, 采血人群包括既往献血者、性病门诊者、暗娼、吸毒人员、同性恋者、受血人员等。河南省 HIV 分子流行病学研究得益于遍布全省的防疫网络和近年来建立起来的 HIV 实验室系统, 且是在流行的早期就对疫情进行分子流行病学监测, 掌握了较完整的标本和数据。该研究通过现场 HIV 分子流行病学调查, 结合实验室研究数据进行亚型多因素分析, 对 HIV-1 病毒株 *env* 基因及 *gag* 基因序列进行测定和分析, 了解河南省 HIV 流行范围和在人群中的分布变化, 追踪其亚型及 HIV 流行代表株以及变异情况。

在对 1287 例 HIV-1 阳性感染者 PBMC 中 HIV-1 *env* 基因及 *gag* 基因序列进行分析后发现, 目前河南省 HIV 感染仍以 B' 亚型为主, 但也出现了 C 亚型及 BC、AE 两个重组亚型, 这是以往的研究所未出现的。河南省 HIV-1 B' 亚型已经产生了一定变异, 在 1998 年所做的 19 人份的研究中, 本型内、泰国 B' 亚型、欧美 B' 亚型的基因离散率分别为 (4.41 ± 2.88)%、(4.57 ± 2.13)%、(15.89 ± 2.43)%。2002 年所做的 28 人份的研究中, 本型内、泰国 B' 亚型、欧美 B' 亚型的基因离散率分别为 (5.75 ± 2.89)%、(5.80 ± 1.76)%、(18.05 ± 1.84)%。2007 年的本型内、泰国 B' 亚型、欧美 B' 亚型的基因离散率分别为 (7.34 ± 0.27)%、(9.327 ± 0.245)%、(20.12 ± 2.36)%。同 1998 年和 2002 年的研究相比, B' 亚型离散率增

大。从本研究中 HIV-1 基因离散率的结果看, 1234 个 B' 亚型病毒株间的基因离散率为 7.342%, 这表明 HIV-1 B' 亚型在河南省内的流行已有一段时间^[5]。根据 HIV-1 基因平均每年以 0.5% ~ 1.0% 的速率变异计算, 可以认为 HIV-1 B' 亚型在河南省内的流行时间大约在 10 ~ 16 年之间^[6], 且已经产生比较大的变异, 与 2002 年和 1998 年的研究相比, B' 亚型组内的离散率增大, 提示 B' 亚型在河南省流行的时间较长。近几年随着流动人口的增多使河南省 HIV 亚型呈现出多元化的特点, 应该加大对各种流动人员的 HIV 检测及监测。

参 考 文 献

[1] 陈建平, 邵一鸣. HIV-1 的分类与命名. 国外医学病毒分册,

2001, 8 (6): 161-163.
 [2] Booth CL, Garcia-Diaz AM, Youle MS, et al. Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. J Antimicrob Chemother, 2007, 59: 517-524.
 [3] 李宁, 王哲, 孙定勇, 等. 河南省艾滋病流行现状分析. 医药论坛杂志, 2007, 28: 22-23.
 [4] 邢辉, 梁浩, 洪坤学, 等. 我国 HIV-1 主要流行株外膜蛋白(*env*) 基因 C3 ~ V4 区变异及其与生物学特性的关系. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25: 185-189.
 [5] 崔为国, 邢辉, 王哲, 等. 河南省 HIV 流行毒株 *env* 膜蛋白基因 C2 ~ V3 区序列特征和亚型研究. 中国艾滋病性病, 2004, 10: 403-406.
 [6] 赵飞, 王哲, 薛晓玲, 等. HIV 发病时间推算研究. 医药论坛杂志, 2006, 27: 43-44.

(收稿日期: 2008-09-12)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

浙江省舟山海岛人群肾结石流行现状及危险因素分析

何静兵 谢辉 孙文斌 李舟跃 刘玉海 王国荣 张世宏 唐安

肾结石是一种严重威胁人类健康的多发疾病, 其病因较为复杂, 涉及到遗传、环境、生活膳食习惯等多种因素。舟山海岛地区人群有着特有的生活方式和饮食习惯, 2007 年在该地区开展了肾结石的流行病学调查, 现报告如下。

1. 对象与方法: 调查对象为年龄 15 岁以上、在舟山地区居住 5 年以上(含 5 年)的居民; 采取整群分层随机抽样方法, 调查 5938 人, 其中 5915 人(男 2239 人、女 3676 人)进行 B 超检查和有效问卷应答, 应答率 99.61%。调查方法为自制调查问卷, 内容包括: 一般人口学特征(性别、年龄、职业等)、饮食习惯、尿路感染病史等 13 个项目, 进行量化与编码, 由经过统一培训的调查员直接向调查对象询问调查, 同时收集研究对象的 B 超检查结果。B 超检查图像表现为: ①肾内见强光点或强光团回声, 其后方伴有垂直声影; 或②肾内见多个回声光带、强回声和声影等, 即诊断为肾结石。本研究以 ≥ 3 mm 为结石诊断标准^[1]。由调查人员对调查表格和 B 超检查结果进行统一编码。用 SPSS 11.5 软件包进行数据分析, 单因素分析采用 χ^2 检验, 多因素用非条件 logistic 回归分析。

2. 结果与分析: 本次有效调查 5915 人, 其中城区 2371 人, 渔农村 3544 人。B 超检查结果表明, 肾结石患者 578 例, 患病率为 9.8%。其中男性 300 例, 患病率 13.4%; 女性 278 例, 患病率 7.6%。

(1) 单因素分析: 对调查表中所有研究因素分别做 χ^2 检

验, 发现有统计学意义的因素为性别(男性患病率明显高于女性)、年龄(25 ~ 34 岁是高发年龄段, 患病率达 13.2%)、BMI(患病率与 BMI 呈正相关, 最高 30.8%, 最低仅 6.7%); 此外随文化程度的提高, 患病率相应升高(大专文化程度以上者达 12.8%); 不同职业的患病率也不同, 渔民、机关事业单位人员肾结石患病率较高, 学生、农民患病率较低; 肾结石还与饮食习惯(喜好吃高蛋白的患病率高, 其中好吃海鲜者 13.8%, 好吃肉蛋者 13.9%)、饮水量(>3000 ml/d 者患病率最低, 为 3.1%)有关; 曾有尿路感染患病史者患病率高(16.6%); 但发病与所在地区(城市、农村)无相关性。

(2) 多因素分析: 为了正确估计多因素的综合影响, 将单因素分析中 $P < 0.05$ 的变量用逐步后退法做非条件 logistic 回归分析, 最终进入模型的因素有性别($OR = 0.543$, 95% CI : 0.454 ~ 0.649)、文化程度($OR = 1.253$, 95% CI : 1.151 ~ 1.364)、饮食习惯($OR = 0.882$, 95% CI : 0.823 ~ 0.944)、BMI 分级($OR = 1.274$, 95% CI : 1.142 ~ 1.421)、尿路感染病史($OR = 2.126$, 95% CI : 1.663 ~ 2.718)。

舟山海岛人群肾结石的患病率较高, 可能与诸多因素有关。应重视海岛地区居民肾结石的防治, 加强其危险因素的控制, 尤其应该加强对男性、有尿路感染病史者、高文化程度者、肥胖者及渔民等高危人群的健康教育, 改变不良生活习惯, 从而降低其患病率。

参 考 文 献

[1] 陈运洪, 邵永富. 超声诊断微小肾结石可靠性的实验研究. 中华超声影像学杂志, 2000, 9(2): 123-124.

(收稿日期: 2008-10-16)

(本文编辑: 张林东)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.007

作者单位: 316100 浙江省舟山市普陀区中医院泌尿外科(何静兵、孙文斌、李舟跃、刘玉海); 浙江省温州医学院附属第一医院泌尿外科(谢辉); 浙江省舟山市普陀区疾病预防控制中心(王国荣、张世宏); 浙江省舟山市疾病预防控制中心(唐安)