·实验室研究·

浙江省2009年随访HIV/AIDS的分子流行病学研究

张佳峰　潘晓红　丁晓贝　陈琳　郭志宏　徐云　黄晶晶

【摘要】 **目的**　分析2009年浙江省随访艾滋病病毒感染者/艾滋病患者(HIV/AIDS)分子流行病学特征。**方法**　以浙江省各地市为单位随机抽样确定303例研究对象，收集个案信息、采集样本并提取基因组DNA，用巢式PCR扩增*gag*基因片段，测序并进行生物信息学分析。**结果**　序列成功获得率为74.3%(225/303)。存在7种亚型，分别为CRF01_AE(58.7%)、CRF07_BC(13.8%)、CRF08_BC(9.8%)、B'(15.1%)、C(1.8%)、G(0.4%)和未定义BC重组(新型独特重组型，0.4%)。HIV BLAST分析显示，毒株同源性最高的报告地涉及国内辽宁、广西、云南、河南等10个省(区)和泰国、越南、印度、南非和利比亚5个国家。CRF01_AE系统进化树分为4簇，同性传播感染者序列聚集于簇1，但与异性传播感染者混合并存。**结论**　浙江省HIV毒株的多样性和复杂性进一步增加。以流行重组型占显著优势，存在新型独特重组型和新型别，同性传播与异性传播感染者呈交叉渗透趋势。

【关键词】 艾滋病病毒；亚型；分子流行病学

Molecular epidemiological study on HIV/AIDS under the follow-up program in Zhejiang province in 2009

ZHANG Jia-feng, PAN Xiao-hong, DING Xiao-bei, CHEN Lin, GUO Zhi-hong, XU Yun, HUANG Jing-jing. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

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

This work was supported by a grant from the Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (No. 2009C33145).

【**Abstract**】 **Objective**　To analyze the molecular epidemiological characteristics on HIV infectors/AIDS patients (HIV/AIDS) under a follow-up program in Zhejiang province in 2009. **Methods**　303 cases were randomly sampled. Information on the cases was collected and followed by genomic DNA extraction. Gag gene fragments were amplified by nested PCR, followed by sequencing and bio-informatic analysis. **Results**　The rate of success for sequence acquisition was 74.3% (225/303). Distributions of HIV subtypes were as follows: CRF01_AE (58.7%), CRF07_BC (13.8%), CRF08_BC (9.8%), B' (15.1%), C (1.8%), G (0.4%) and unassigned BC (unique recombinant form 0.4%). Results from the HIV BLAST analysis showed that the sources of strains with the highest homology involved in 10 provinces/municipalities (Liaoning, Guangxi, Yunnan, Henan, *etc.*) and five other countries (Thailand, Vietnam, India, South Africa and Libya). The CRF01_AE phylogenetic tree was divided into four clusters. The sequences of HIV/AIDS with homosexual transmission showed a gathering in cluster 1, and mixing with those infected through heterosexual contact. **Conclusion**　Circulating recombinant forms of HIV seemed to play a dominant role in Zhejiang province. Unique recombinant form and new subtype of HIV were found. People living with HIV under homosexual transmission and heterosexual transmission had a trend of interwoven with each other. Increase of both the diversity and complexity of HIV strains were also noticed in Zhejiang province.

【**Key words**】 Human immunodeficiency virus; Subtype; Molecular epidemiology

HIV具有高度变异性，可产生多种具有独特基因序列特征的组、亚型和流行重组型(CRF)及大量的独特重组型(URF)[1]。浙江省艾滋病疫情处于不断发展中，自1985年发现HIV感染者以来，感染人数不断增加，截止2009年底，全省累计报告艾滋病病毒感染者/艾滋病患者(HIV/AIDS)5119例，性传播已成为主要传播途径(63.5%)[2]。随着HIV/AIDS的流动性、传播地域的扩大、传播途径多样化以及病

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.01.011

基金项目：浙江省科技计划(2009C33145)

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

程死亡的发展，浙江省的艾滋病疫情处于动态变化中。其中随访的HIV/AIDS是浙江省艾滋病疫情的“蓄水池”，对疫情发展具有深远影响，为此本研究对该人群进行分子流行病学横断面调查。

对象与方法

1. 样本选择：本研究将定期观察检测和问卷调查者定义为随访的HIV/AIDS。以2009年浙江省完成随访的2456例HIV/AIDS为抽样总人群，以各地市为单位进行随机抽样（抽样比例为13%），覆盖所有11个地市。各地市具体抽样方法是利用Excel软件中的RAND随机函数对该地市的随访总人群进行赋值，经大小排序后依次入选。抽样获得总人数为319人，其中16人未留存样本，最终确定303例为研究对象。研究对象的流行病学信息通过艾滋病疫情信息数据库和补充调查获得。血样本（4～8 ml EDTA抗凝全血）由基层疾病预防控制中心工作人员随访时采集，当天分装出全血、血浆和淋巴细胞富积液置于-80 ℃冻存并定期上送至浙江省艾滋病确证中心实验室。

2. 研究方法：

（1）基因扩增及测序：采用Qiagen公司的QIAamp DNA Blood Mini Kit对200 μl全血样本提取基因组DNA，以此为模板，采用巢式PCR扩增HIV的*gag*基因片段（1081 bp）。*gag*基因扩增引物序列及PCR反应条件参照文献[3,4]。第一轮PCR体系为25 μl，各成分终浓度为：2.0 mmol/L Mg^{2+}，0.2 mmol/L dNTP，0.4 μmol/L引物GAG-L/GAG-E2，1.5 U Ex Taq，5.0 μl DNA模板。第二轮PCR体系为50 μl，各成分终浓度：2.0 mmol/L Mg^{2+}，0.2 mmol/L dNTP，0.4 μmol/L引物GUX/ GDX，2.0 U Ex Taq，5.0 μl第一轮产物。目的产物经1%琼脂糖凝胶电泳确认后直接送至北京博迈德生物技术有限公司纯化并进行引物GUX和GDX双向测序，其所用测序仪为ABI PRISM 3730XL，测序试剂为BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit。

（2）序列分析：使用Vector NTI suite 9.0软件包中的Contig Express组件对测序返回的序列进行拼接和编辑。国际参考株来自美国Los Alamos国家实验室HIV数据库。使用BioEdit软件将样本序列和参考株序列进行多重比对并校正。使用Mega 4.0软件自展法（bootstrap）重复运算1000次构建Neighbor-Joining进化树（Kimura双参数模型），分析确定HIV亚型和计算基因遗传距离。

（3）同源性和重组分析：利用美国Los Alamos国家实验室HIV数据库提供的HIV BLAST工具对获得的毒株序列进行同源性分析，寻找同源性最高的序列，根据该毒株序列注解的地理位置，推测所分析毒株最可能的来源地[4]。病毒重组采用Los Alamos国家实验室HIV数据库提供的jpHMM[1,5]和RIP重组分析工具综合分析。

3. 统计学分析：使用SPSS 17.0软件进行频数统计和χ^2检验。

结　果

1. 样本基本特征：303例HIV/AIDS经PCR扩增最终获得合格序列共225例，序列成功获得率为74.3%（225/303）。平均年龄（37.0±13.1）岁；男性150例（66.7%），女性75例（33.3%）；HIV确证阳性时间为2001—2009年，以2007—2009年为主（79.6%，179/225），其中2009年新诊断的为58例（25.8%）；本省户籍165例（73.3%），外省户籍59例（26.2%），外籍（越南）1例，其中外省户籍主要包括云南、四川和贵州各7例，广西、湖北和河北各5例；汉族占94.7%（213/225），少数民族占4.9%（11/225），外籍占0.4%（1/225）；文化程度以初中比例最高（44.0%，99/225），其次为小学（20.0%，45/225）、高中或中专（14.2%，32/225）、大学或大专（12.0%，27/225）和文盲（9.8%，22/225）；职业分类主要是农民/民工/工人（36.9%，83/225）、家政/家务/待业（16.0%，36/225）、公共场所服务人员（16.0%，36/225）。HIV感染途径以异性传播为主（64.9%，146/225），同性传播次之（16.9%，38/225），其他包括注射吸毒（4.4%，10/225）、采血浆/输血（4.9%，11/225）、母婴传播（2.7%，6/225）及其他或不详（6.2%，14/225）。

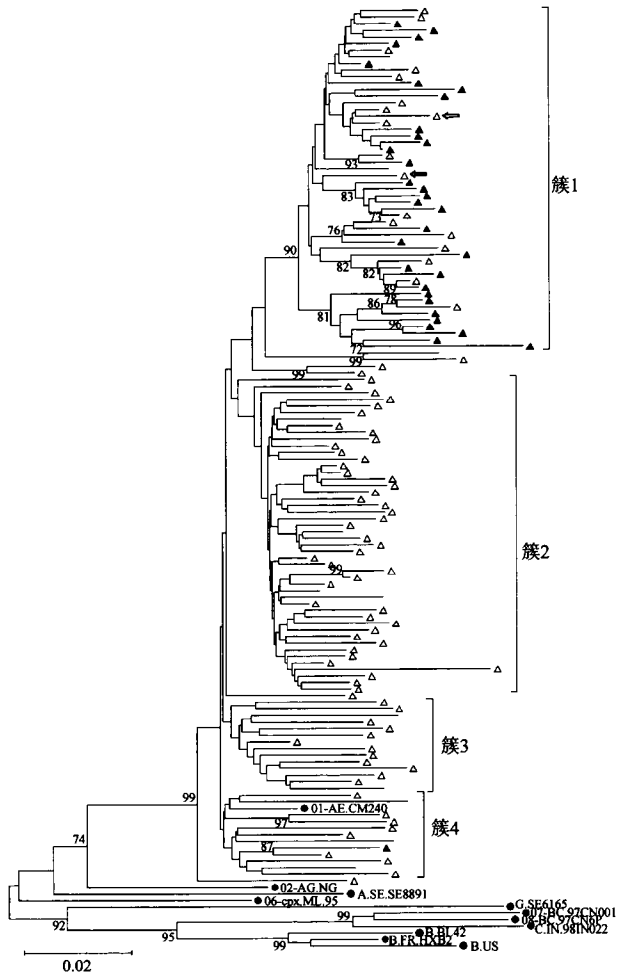
2. 基因亚型分布：HIV亚型中流行性重组型占82.7%（186/225），其中CRF01_AE占58.7%（132/225），BC重组型占24.0%（54/225）；非流行性重组型亚型仅占17.3%（39/225），包括B'（15.1%，34/225）、C（1.8%，4/225）和G亚型（0.4%，1/225），见表1。同性传播与异性传播者HIV亚型的差异存在统计学意义（$\chi^2=11.892$，$P=0.008$），异性传播中59.6%（87/146）为CRF01_AE亚型，而同性传播中该亚型则高达86.8%（33/38）；HIV/AIDS中本省户籍与外省户籍HIV亚型构成的差异无统计学意义（$\chi^2=3.004$，$P=0.391$），汉族与少数民族亚型构成的差异亦无统计学意义（$\chi^2=2.056$，$P=0.342$），2009年新诊断与既往诊断者亚型组成的差异亦无统计学意义（$\chi^2=8.541$，$P=0.07$）。

表1　2009年浙江省225例HIV/AIDS感染途径与HIV亚型分布

亚型	感染途径						合计
	同性传播	异性传播	注射吸毒	采血浆/输血	母婴传播	其他/不详	
CRF01_AE	33	87	3	1	–	8	132(58.7)
CRF07_BC	3	22	4	–	1	1	31(13.8)
CRF08_BC	1	15	3	–	1	2	22(9.8)
B'	–	20	–	10	2	2	34(15.1)
C	–	1	–	–	2	1	4(1.8)
未定义BC重组	1	–	–	–	–	–	1(0.4)
G	–	1	–	–	–	–	1(0.4)
合计	38	146	10	11	6	14	225(100.0)

注：括号外数据为例数，括号内数据为构成比(%)

3. 系统进化树分析：132例CRF01_AE毒株的系统进化树可分为4簇(图1)。簇1呈现异性传播和同性传播感染者并存的显著特征，包括18例异性传播(其中男性16例、女性2例)和32例同性传播感染者，此外发现绝大多数同性传播感染者显著集中在簇1(96.97%，32/33)。对簇1中18例异性传播者的补充调查发现，其中2例女性感染者其配偶或固定性伴为男男性行为者(MSM)；16例男性中2例已死亡，13例否认有双性或同性性行为，仅1例承认有双性性行为，同时存在无保护的同性性行为。簇2、3和4均以异性传播感染者为主。CRF07_BC、CRF08_BC和B'亚型的系统进化树内部的各分支呈散在聚集状态，未见明显分簇现象。



注：●国际参考株；▲同性性行为传播；△异性性行为传播；未标注的分支为其他感染途径；簇1中箭头标示的是2例女性

图1　HIV亚型CRF01_AE系统进化树分析

4. 同源性分析：各亚型的毒株序列经HIV BLAST分析均有较高相似度(92%～99%)的序列与之匹配，统计显示毒株同源性最高的报告地涉及我国10个省(市)和其他5个国家(泰国、越南、印度、南非和利比亚)，见表2。毒株同源性出现频率较高的前五位国家(地区)依次为中国辽宁(62例)、广西(52例)、云南(35例)、河南(18例)及泰国(18例)。CRF01_AE毒株同源性最高的报告地区数量最多，共涉及8个地区或国家，组内基因遗传距离也最大(0.052±0.014)，说明CRF01_AE毒株来源广泛，遗传多样化。CRF08_BC的毒株同源性最高的地区主要集中在云南和广西。感染未定义BC重组的病例(男性，四川户籍)与南非的毒株同源性最高，相似度为93%，该例于2008年12月确证，有男男性行为史，但否认有其他特殊感染史；感染G亚型的病例(男性)与利比亚的毒株同源性最高，相似度为92%，该例于2008年12月确证，有非婚异性性接触史，目前已失访；越南籍病例与当地流行株同源性最高，相似

表2　2009年浙江省HIV不同亚型毒株同源性分析

亚型	例数(构成比，%)	基因遗传距离($\bar{x}\pm s$)	毒株同源性最高的报告国家(地区)*
CRF01_AE	132(58.7)	0.052±0.014	广西(47)，辽宁(44)，泰国(18)，河南(10)，越南(6)，河北(3)，江苏(3)，福建(1)
CRF07_BC	31(13.8)	0.042±0.013	辽宁(11)，北京(8)，新疆(4)，广西(3)，云南(3)，河北(2)
CRF08_BC	22(9.8)	0.042±0.010	云南(20)，广西(2)
B'	34(15.1)	0.049±0.016	云南(10)，河南(8)，湖北(8)，辽宁(7)，福建(1)
C	4(1.8)	0.050±0.010	云南(2)，新疆(1)，印度(1)
未定义BC重组	1(0.4)	–	南非(1)
G	1(0.4)	–	利比亚(1)

注：* 括号内数据为例数

度达96%，该感染者为女性，通过涉外婚姻至浙江省；5例云南户籍的病例均与当地流行株同源性最高，相似度均达97%。

5. 独特重组型分析：本研究发现1例样本经系统进化树分析难以确定具体的亚型，通过jpHMM和RIP重组分析工具的显示为B和C亚型的重组，序列为910 bp，相对HXB2的位置为876→1785，BC亚型重组断点的间隔区位置为1385±25（图2），与现有报道HIV流行重组型的重组断点模式均有差异，是一种新型的独特重组型。

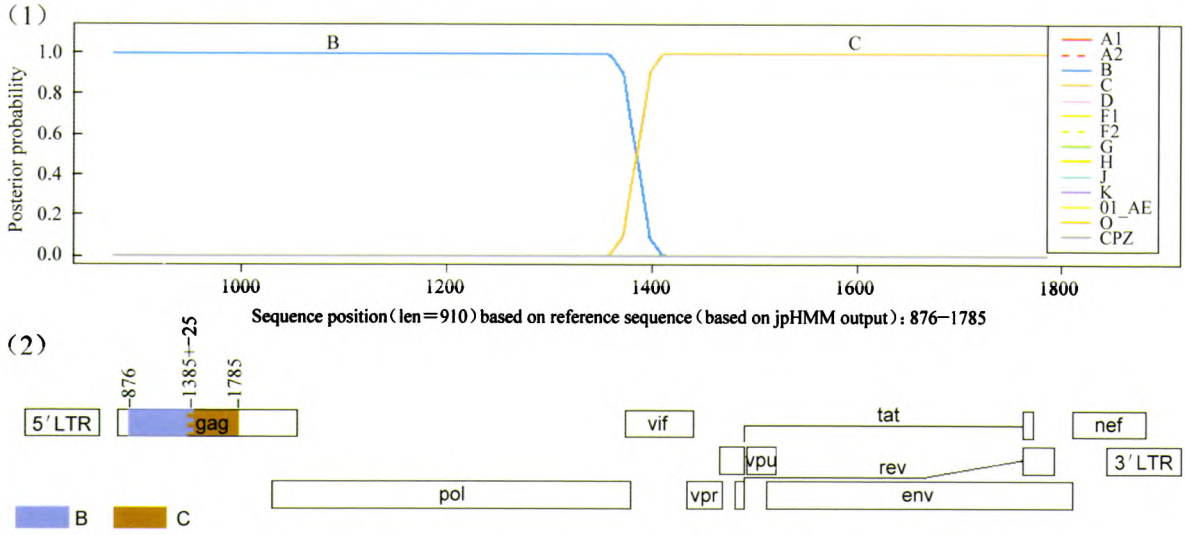
讨　论

本研究发现浙江省2009年随访的HIV/AIDS中感染途径以性传播为主（81.8%，184/225），其中异性传播比例最大（64.9%，146/225），同性传播次之（16.9%，38/225）。HIV亚型以流行性重组型占显著优势（82.7%，186/225），其中CRF01_AE为主（58.7%，132/225），BC重组型次之（24.0%，54/225），与2003—2005年调查结果相似[6]，但CRF01_AE比例有所增加。2009年随访的HIV/AIDS中以本省户籍病例为主，表明这是艾滋病通过多种途径向一般人群扩散的必然趋势[2]。

经过HIV BLAST分析，毒株同源性最高的报告地分布十分广泛，包括国内10个省（市）及东南亚和非洲的5个国家，说明浙江省流行的HIV毒株来源呈现多元化特征。研究发现1例新型的独特重组型（BC重组）和罕见的G亚型，提示浙江省存在新型的HIV重组亚型和新型别的毒株，同源性分析显示这两例毒株均与国外流行地区的毒株存在较高同源性，预示浙江省HIV毒株的多样性和复杂性进一步加大。

CRF01_AE最早从泰国经异性传播途径传入我国（代表株为CM240），并在不同地域呈现不同的流行特征。叶景荣等[7]报道北京地区流行的CRF01_AE株分化为4个亚簇（Homo-Max、Homo-Min、Hetero和Mix）；姚亚萍等[8]报道浙江省2004—2007年流行的CRF01_AE株分化为MIX、SEX和MSM组；本研究显示CRF01_AE系统进化树分为4簇［簇1呈现同性和异性传播并存的显著特征（类似其他报道的Mix亚簇），簇2、3和4均以异性传播为主，其中仅簇4与参考株CM240具有较近的亲缘关系，其他则演变分化成有别于祖先株的进化簇］。CRF01_AE的进化分簇现象表明HIV病毒具有高度变异、不断演化的特征，也显示在不同地域和时间的流行模式具有不同的特征。

浙江省MSM感染的毒株亚型全部是流行重组型，以CRF01_AE为主（86.8%，33/38），其次是BC重组（13.2%，5/38），这与国外及香港地区的MSM人群HIV感染毒株主要以欧美B为主有所差异[9]，与四川省MSM人群的亚型组成也有不同[10]。姚亚萍等[8]报道浙江省户籍的MSM感染者CRF01_AE达85.7%（6/7），但分析使用的同性恋病例数较少，本研究通过全省范围和较大样本量进一步明确了浙江省MSM感染的毒株类型和流行特征。本研究显示浙江省MSM的感染毒株在进化树上明显集中成簇，表明其在一个相对封闭的交流圈内流行。同时也发现18例异性传播感染者序列与MSM毒株的聚集簇（簇1）交叉并存，其中2例女性经补充调查其配偶或



注：(1)jpHMM分析得出的重组结果；(2)分析片段（带背景色）的基因图谱，其中数值表示相对于HXB2的位置

图2　1例HIV独特重组型的重组分析

固定性伴为MSM感染者。据报道我国的MSM双性性行为的比例为31.2%[11]，存在高比例的无保护同性性行为和异性性行为[11,12]，因此，簇1中的2例女性HIV感染者很可能是由有双性性行为的MSM感染者经异性性行为传播感染。鉴于簇1具有MSM毒株聚集的典型特征，推测其中15例自述异性传播感染的男性感染者可能隐瞒其同性性行为史，也可能经由异性性行为感染MSM的流行株。通过研究可以发现，目前浙江省MSM分离的毒株已融合形成一个相对独立的进化簇，并可能是藉由MSM的双性性行为与异性传播者交叉渗透，呈现HIV在MSM和异性人群间传播的特征。应针对同性恋人群加强健康教育和综合干预，采取综合防制措施遏制HIV的传播。

参 考 文 献

[1] Liu YQ, Li L, Bao ZY, et al. Identification of a novel HIV type 1 circulating recombinant form (CRF52_01B) in Southeast Asia. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012, 28(10): 1357-1361.

[2] Xu Y, Pan XH, Yang JZ, et al. HIV/AIDS epidemic in Zhejiang province, 1985-2009. Dis Surv, 2010, 25(11): 877-879, 890. (in Chinese)
徐云，潘晓红，杨介者，等. 1985－2009年浙江省艾滋病疫情分析. 疾病监测，2010，25(11)：877-879，890.

[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] Pan XH, Zhang JF, Chen L, et al. Relationship between strain subtypes and transmission of HIV infection within marriage-based immigrant women in rural area of Zhejiang province. Chin J Epidemiol, 2011, 32(11): 1077-1081. (in Chinese)
潘晓红，张佳峰，陈琳，等. 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. 中华流行病学杂志，2011，32(11)：1077-1081.

[5] Zhang M, Schultz AK, Calef C, et al. jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1. Nucleic Acids Res, 2006, 34(S2): W463-465.

[6] Pan XH, Yao YP, Xia SC, et al. Moleculo-epidemiological study of HIV infection cases in 2003-2005 in Zhejiang province. Chin J AIDS STD, 2007, 13(4): 308-310. (in Chinese)
潘晓红，姚亚萍，夏时畅，等. 浙江省2003—2005年HIV-1感染者分子流行病学研究. 中国艾滋病性病，2007，13(4)：308-310.

[7] Ye JR, Lu HY, Bai LS, et al. Genetic characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains circulating in Beijing. Chin J Epidemiol, 2010, 31(11): 1231-1234. (in Chinese)
叶景荣，卢红艳，白立石，等. 北京地区流行的HIV-1 CRF01_AE株基因特征研究. 中华流行病学杂志，2010，31(11)：1231-1234.

[8] Yao YP, Xin RL, He X, et al. Molecular characteristics of HIV-1 CRF01_AE strains in Zhejiang province. Chin J Epidemiol, 2008, 29(2): 161-165. (in Chinese)
姚亚萍，辛若雷，何翔，等. 浙江省HIV-1 CRF01_AE流行株的分子特征分析. 中华流行病学杂志，2008，29(2)：161-165.

[9] Chen JHK, Wong KH, Chao KCW, et al. Phylodynamics of HIV-1 subtype B among the men-having-sex-with-men (MSM) population in Hong Kong. PLoS One, 2011, 6(9): e25286.

[10] Yuan D, Feng L, Xi JJ, et al. Moleculo-epidemiological study of HIV-1/ AIDS among 77 men having sex with men in Sichuan province. Chin J AIDS STD, 2011, 17(4): 410-413, 447. (in Chinese)
袁丹，冯燎，奚竞婧，等. 四川省77名男男性行为人群HIV-1分子流行病学研究. 中国艾滋病性病，2011，17(4)：410-413，447.

[11] Yun K, Xu JJ, Reilly KH, et al. Prevalence of bisexual behaviour among bridge population of men who have sex with men in China: a meta-analysis of observational studies. Sex Transm Infect, 2011, 87(7): 563-570.

[12] Cao Z, Zhang HB, She M, et al. Prevalence of HIV infection and sexual behaviors with both and women among currently married men who have sex with men. Chin J Epidemiol, 2012, 33(5): 488-491. (in Chinese)
曹臻，张洪波，佘敏，等. 在婚男男性行为人群HIV感染及其双性性行为状况调查. 中华流行病学杂志，2012，33(5)：488-491.

（收稿日期：2012-09-19）
（本文编辑：张林东）