

深圳市 2010 年 HIV-1 分子流行病学调查

石向东¹, 陈琳¹, 杨峥嵘¹, 王晓辉¹, 赵锦¹, 王芳^{2*}

摘要:目的 了解 2010 年艾滋病病毒-1 型(HIV-1)毒株亚型在深圳市的流行情况,为预防和控制 HIV 在本市的流行提供有价值的资料。方法 收集 2010 年深圳市 HIV-1 确认为阳性的样本 150 例,应用巢式聚合酶链反应(nested-PCR)技术,对该样本膜蛋白基因(env 基因)和核心蛋白(gag 基因)进行扩增,并对各基因区核苷酸序列进行测定和分析。结果 共有 128 份样本获得分型结果,其中 CRF01_AE 重组株占 63.3%(81/128),B' 亚型占 14.1%(18/128),CRF07_BC 重组株占 13.3%(17/128),CRF08_BC 重组株占 7.0%(9/128),C 亚型占 0.8%(1/128),A1 亚型占 1.6%(2/128),CRF01_AE 重组株以吸毒传播、异性性传播和同性性传播为主,分别占其感染人群的 23.5%、45.7%和 30.9%,CRF07_BC、CRF08_BC 重组株以异性性传播和同性性传播为主,分别占各感染人群的 41.2%、58.8%和 66.7%、33.3%。B' 亚型主要分布在性传播、献/输血和母婴传播人群。本文首次在吸毒人群中发现 A1 亚型。结论 2010 年深圳市的 HIV-1 是以 CRF01_AE 重组株、B' 亚型、CRF07_BC 和 CRF08_BC 重组株为主要流行毒株,也存在 A1 和 C 亚型;CRF01_AE 重组株是各传播途径人群中的主要流行株,并且 CRF01_AE 重组株在各人群中所占的比例高于国内其他地区。

关键词:人类免疫缺陷病毒-1 型;序列分析;亚型;巢式聚合酶链反应

中图分类号:R512.91 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)2-192-04

Molecular epidemiology of HIV-1 subtypes in Shenzhen of 2010. SHI Xiang-dong, CHEN Lin, YANG Zheng-rong et al. (Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong P. R. China; Corresponding author: WANG Fang, E-mail: wangf@chinaawch.gov.cn)

Abstract: Objective To study the prevalence status of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) subtypes in Shenzhen and study their source in order to predict the epidemic trend. Methods Samples were collected from 150 newly reported HIV-1 infected in Shenzhen in 2010. HIV-1 env gene and gag gene were amplified by nested-PCR from RNA. The C2-V3 region of HIV-1 env and P24 region were sequenced for analyses. Results Among 128 samples, there were 6 HIV-1 strains including CRF01_AE, CRF08_BC, CRF07_BC 3 circulating recombinant forms (CRFs) and B', C, A1 3 subtypes. Subtyping showed that 63.3% (81/128) were CRF01_AE, 14.1% (18/128) were subtype B', 13.3% (17/128) were CRF07_BC, 7.0% (10/122) were CRF08_BC, 0.8% (1/128) were subtype C, 1.6% (2/128) were subtype A1. And CRF01_AE strain mainly from injecting drug users (IDUs) and heterosexuals and homosexuals. CRF07_BC and CRF08_BC strains mainly from heterosexual and homosexual. Subtype B' were mainly from heterosexuals and homosexuals, blood donors and mothers to children. And subtype A1 was first found in IDUs. Conclusion CRF01_AE, subtype B', CRF07_BC and CRF08_BC of HIV-1 strains were mainly epidemic subtypes in Shenzhen in 2010. Subtype C and A1 were also circulating in Shenzhen region. CRF01_AE recombinant was largely predominant among all transmitting population. And the proportion of CRF01_AE in various groups of population is higher than that in other regions of China.

Key words: HIV-1; Sequence analysis; Subtype; Nested-PCR

HIV 的一个重要生物学特征是基因的高度变异,目前,世界上已经发现的 HIV 病毒可分为 HIV-1 和 HIV-2 两个型,HIV-1 型病毒可分为 M (Main) 组、O (the Outline) 组和 N (Non-M, Non-O) 组。M 组是全球主要流行的病毒株,又可分为 A、B、C、D、F、G、H、J 和 K 共 9 个亚型。随着对 M 组病毒研究的进一步深入,又发现了不同亚型以及同一亚型不同毒株间的基因重组现象,称之为流行重组形式(Circulating Recombinant Forms, CRFs),共分为 CRF01-CRF14 种^[1-5]。最新 HIV

基因序列数据库中流行重组形式已分为 CRF01-CRF49 种(<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/CRFs/CRFs.html>)。

HIV 的结构基因按顺序有编码核心蛋白的 gag 基因、编码 pol 基因以及编码外膜蛋白的 env 基因。在不同的亚型毒株中,env 区基因的变异程度最大。其中 env 基因的 V3-V4 区及其临近区域特别是 V3 环是主要中和抗体决定簇和辅助受体的结合部位。因此 env 区的基因序列特别是 V3-V4 区及其临近位点的基因

作者单位:1.深圳市疾病预防控制中心 广东 深圳 518055; 2.中国疾病预防控制中心妇幼保健中心 北京 100050

作者简介:石向东(1966~),男,硕士,副主任技师,主要从事艾滋病防控工作。

* 通讯作者: E-mail: wangf@chinaawch.gov.cn

变异成为研究 HIV-1 分型的重要依据^[6]。

深圳市是全国流动人口最多的城市之一,自 1992 年发现 HIV 感染者以来,深圳市 HIV 的感染人数呈逐年上升的趋势,且上升趋势明显(年均上升 24.7%)。目前也是国内发现 HIV-1 亚型最多的城市之一。对深圳市流行的 HIV-1 毒株的核酸序列进行分析并确定其亚型,从分子水平上揭示 HIV-1 在深圳市的流行情况,分析其传染来源以及传播规律,对预防与控制 HIV-1 在本市的传播具有重要意义。

1 对象与方法

1.1 对象及样本 收集深圳市 2010 年 1 月~12 月间发现的 128 例经初筛实验(酶标,PA 或 ELISA)和 WB 确认实验证实为 HIV-1 抗体阳性样本作为研究对象。128 例 HIV-1 感染者中,男、女分别为 95 例和 33 例,经性途径感染者 105 例(82%),经静脉吸毒感染者 21 例(16.4%),经输血、母婴传播途径感染者各 1 例。每例研究对象采集静脉血 3~5ml,EDTA 抗凝(1.6%),分离血浆,分装, -70℃ 冻存备用。

1.2 病毒 RNA 的提取 使用 QIAamp Viral RNA extraction Mini kit(德国 Qiagen 公司),按说明书操作步骤提取研究对象的 HIV-1 RNA。

表 1 env 区引物名称、序列和位置

Table 1 Name sequence and position of primer at env site

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')	方向 Direction	长度 Length(bp)
44F	5'-ACAGTTCATTGGACACATGG-3'	F	714bp
35R	5'-CACTT TCCAATTGTCCITCA -3'	R	外侧 outside
33F	5'-CTGTTCAATGGCAGTCTAGC-3'	F	539bp
48R	5'-CATGGGAGGTGGATACAT-3'	R	内侧 inside
207	5'-CTGTTAAATGGCAGTCTAGC-3'	测序 Sequencing	单向 Single direction

表 2 gag 区引物名称、序列和位置

Table 2 Name sequence and position of primer at gag site

引物 Primer	序列 Sequence(5'→3')	方向 Direction	长度 Length(bp)
332	5'-GCGAGAGCGTCAGTATTA AGTGG-3'	F	521bp
308	5'-TCTGATAATGCTGGTAACATGGG-3'	R	(外侧 outside)
306	5'-GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC-3'	F	435bp
307	5'-CTTCTAGTACTTTGACCCATGC-3'	R	(内侧 inside)
306	5'-GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC-3'	测序 Sequencing	单向 Single direction

1.3 基因片段的扩增 通过 RT-PCR 试剂盒(One-Step Perfectshot,日本 TaKaRa 公司)进行逆转录和扩增,再经巢式聚合酶链反应(nested-PCR)方法扩增 env 外膜蛋白基因 C2V3 区和 gag 核心蛋白 P17 区,env 基因 PCR 引物见表 1, gag 基因引物见表 2。反应条件如下:env 基因:第一轮,以 44F/35R 为外侧引物,94℃ 1min

1 个循环,94℃ 30s—52℃ 30s—72℃ 50s,35 个循环;72℃ 5min。第二轮,以 33F/48R 为内侧引物,取第一轮 PCR 产物 1μl 做模板,94℃ 1min,1 个循环,94℃ 30s—55℃ 30s—72℃ 50s,30 个循环,72℃ 5min。gag 基因:第一轮,以 332/308 为外侧引物,94℃ 1min,1 个循环,94℃ 30s—55℃ 30s—72℃ 50s,35 个循环;72℃ 5min。第二轮,以 306/307 为内侧引物,取第一轮 PCR 产物 1μl 作模板,94℃ 1min,1 个循环,94℃ 30s—55℃ 30s—72℃ 50s,30 个循环,72℃ 5min。

1.4 PCR 产物的鉴定和核苷酸序列测定 PCR 产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定无误后。分别用 306 和 207 作为测序引物,取 1μl PCR 产物作模板,用 ABI 公司荧光标记末端终止物循环测序试剂盒(Applied Biosystems, Inc, Foster City, CA)进行测序反应。反应产物经 ABI PRISM3130xl 测序仪进行序列测定。

1.5 亚型测定的分析 亚型测定的分析 测定后的序列(除去引物段序列)与 HIV-1 参考株进行比较分析,判断亚型结果。用 Mega4.0 的 ClustalW 工具对序列进行编辑、校正,然后用 GCG 和 Mega4.0 对序列进行比较和同源性分析,将排列、校正后的序列和国际标准参考序列用 Pileup、Pretty 和 ClustalW 等软件进行排列和比较。

2 结果

2.1 HIV-1 亚型结果 共 128 份样本获得分型结果,其中发现 B'、C、A1 3 种亚型,分别占 14.1% (18/128)、0.8% (1/128) 和 1.6% (2/128),以及 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组毒株,分别占 63.3% (81/128)、13.3% (17/128) 和 7.0% (9/128)。

2.2 HIV-1 亚型的传播途径分布特点 目前 HIV-1 的三种传播途径(血液、性、母婴)在深圳地区均已出现。在吸毒人群中流行的 HIV-1 以 CRF01_AE (19/21)重组株为主,也存在 A1 亚型;异性性途径感染者以 CRF01_AE (37/57)重组株为主,B'、CRF07_BC 和 CRF08_BC 在该人群中所占的比例基本相同,同时在该人群中发现一例 C 亚型;同性性途径感染者以 CRF01_AE (25/48)重组株、B' (10/48) 和 CRF07_BC (10/48)重组株为主;1 例经输血感染者和 1 例经母婴传播均为 B' 亚型。(见表 3)

2.3 env 和 gag 扩增基因区的系统树分析 综合 env 和 gag 扩增基因区与国际参考株对比的系统进化树分析,发现 18 例 CRF01_AE 重组株与国际参考株 01AE.TH.90.CM240 聚集在一起,63 例 CRF01_AE 重组株与参考株 01AE.CN.97.97CNGX2F 聚集在一起,

表 3 128 例样本的亚型与感染途径分布

Table 3 Distribution of subtypes and infection route of 128 samples

HIV-1 亚型 (Subtype)	吸毒 Drug use		异性性传播 Heterosexual		同性性传播 Homosexual		血液 Blood & Blood product		母婴 Mother & child		合计 Total
	例数 No.	%	例数 No.	%	例数 zno.	%	例数 No.	%	例数 No.	%	
CRF01_AE	19	90.5	37	64.9	25	52.1	0	0	0	0	81
B'	0	0	6	10.5	10	20.8	1	100	1	100	18
CRF07_BC	0	0	7	12.3	10	20.8	0	0	0	0	17
CRF08_BC	0	0	6	10.5	3	6.3	0	0	0	0	9
C	0	0	1	1.8	0	0	0	0	0	0	1
A1	2	9.5	0	0	0	0	0	0	0	0	2
合计 Total	21	100	57	100	48	100	1	100	1	100	128

其中 7 例在系统进化树中出现了明显的汇集现象,该 7 例样本 gag 基因区组内离散率为 $(2.800\pm 0.173)\%$, env 基因区组内离散率为 $(5.300\pm 1.752)\%$ 。18 例 B' 亚型样本与国际参考株 B.CN.RL42 聚集在一起。17 例 CRF07_BC 重组株与国际参考株 07_BC.CN.97.97 CNGX- 9F 聚集在一起,其中 6 例在系统进化树中出现了明显的汇集现象,该 6 例样本 gag 基因区组内离散率为 $(3.200\pm 0.165)\%$, env 基因区组内离散率为 $(6.120\pm 1.645)\%$ 。9 例 CRF08_BC 重组株与国际参考株 08_BC.CN.97.97CNGX- 9F 聚集在一起。2 例 A1 亚型样本在系统进化树与国际参考株 A1.UG.92.92. UG037 聚集在一起,其 gag 基因区和 env 基因区的基因离散率分别为 2.2 和 3.4。1 例 C 亚型样本在系统进化树中与参考株 C.IN.95.95.IN21068 聚集在一起。

3 讨论

深圳是一个外来务工人员和流动人员较多的城市,而人员流动和高危性行为的发生则是艾滋病流行传播的重要影响因素。深圳地区 HIV-1 亚型流行的趋势与全国有所不同,全国范围内以 B、C 亚型流行为主(分别占 65.4%和 26.9%),其他亚型(A 亚型、E 亚型、F 亚型等)在人群中的比例相对较低^[7]。在 2000 年以前,深圳市 HIV-1 的流行以 CRF01_AE 重组株(52.7%)和 B' 亚型(30.9%)为主^[8]; 2001-2004 年在深圳市共发现 B、B'、C 3 种亚型和 CRF01_AE、CRF07_BC、CRF08_BC 3 种重组株,其中 CRF01_AE、CRF08_BC 和 B 亚型为主要流行毒株,分别占 45.1%、31.1%、和 14.8%,而 CRF07_BC、B 和 C 亚型在人群中流行较少,分别仅占 6.6%、1.6%、和 0.8%^[9]。近年来,深圳地区 HIV-1 的流行情况与 2000 年以前或者 2001~2004 年间相比,亦有较明显的变化,主要表现为 CRF01_AE 亚型所占的比例有增加的趋势,其次 CRF07_BC 和 B 亚型逐渐成为继 CRF01_AE 亚型之后的主要流行株^[10]。本研究分析了 2010 年深圳市 HIV-1 的流行情况,发现深圳地区以 CRF01_AE 重组

株、B' 亚型、CRF07_BC 和 CRF08_BC 重组株为主要流行毒株,分别占 63.3%、14.1%、13.3%和 7.0%,其中 CRF01_AE 重组株所占的比例比国内其他地区高。另外本次研究还首次发现了 A1 亚型在深圳地区出现,其样本来源为一对有吸毒史的夫妇。

从各亚型的人群分布来看,深圳地区 2000 年以前,在性传播人群中主要流行 E 亚型,其次为 B 亚型和 B' 亚型;吸毒人群中主要流行 CRF01_AE 重组株,其次为 B 亚型和 C 亚型^[8]。2001 年以来,CRF01_AE 重组株主要以性途径(60.4%)和吸毒途径(34.4%)传播为主。到 2010 年,CRF01_AE 亚型的在检出标本中占的比例 63.3%(81 例),总的看来,是以性感染途径为主(63 例,占 76.8%),静脉注射吸毒次之(19 例,占 23.2%)。而 2001~2004 年间,CRF07_BC 和 CRF08_BC 两种亚型流行毒株主要在吸毒人群中流行^[9]。根据近年的分析数据表明,深圳地区 B/C 重组毒株逐步取代了原来的 C 亚型毒株而成为主要的流行毒株,且这两种亚型逐步向性接触人群扩散。B 亚型的感染人群包括异性性接触、同性性接触、输献血和母婴传播人员,流行人群分布比较分散。近年来,深圳市吸毒人群中的 AE 亚型及性传播人群中 BC 亚型流行呈现上升趋势,说明有性乱或卖淫行为的吸毒者在我市 HIV 传播中起相当重要的作用。深圳市的流行情况表明,AE 亚型主要在性乱人群中流行,但已经传播到静脉吸毒人群特别是男性吸毒者当中。如果不采取有效措施控制,此亚型在人群中的比例将继续快速上升。

总之,深圳地区具有多种复杂的亚型分布,特别是吸毒者和性服务人群中 HIV-1 亚型的交叉传播,将对艾滋病的传播蔓延和新毒株的形成产生深刻的影响。因此,应采取一系列针对性的控制策略,大力开展艾滋病预防知识的宣传、教育和行为干预工作,以阻断外来亚型在深圳地区的传播。

参考文献:

(下转第 197 页)

医药费用补助,2011 年根据市爱卫会、市卫生局、市人力资源和社会保障局《关于本市晚期血吸虫病体症病人医疗费用补助的规定》,提高病人医药费用补助限额为 4 000 元。闵行区严格根据以上文件精神执行晚期血吸虫病病人医药费用补助,达到了一定效果。但晚期血吸虫病病人补助仍需要进一步加强政策宣传,扩大病例补助人数,让更多的病例享受到国家的政策。

闵行区每年都有部分新增晚期血吸虫病病人,究其原因主要是由于近年来,部分历史血吸虫病病人随着年龄增长,出现了门脉高压等晚期血吸虫病相关体征,因而申请纳入晚期血吸虫病体症病人管理者也逐渐增多。因此,除了要加强对历史晚期血吸虫病病人随访管理,加强健康教育,积极开展救治补助,改善病人的生活质量,提高生存率,还要做好每年一度的新增病人甄别工作,提高晚期血吸虫病病人的诊断率,做到早发现,早诊断,早治疗。

参考文献:

- [1] Compilation Committee of Shanghai County. Shanghai County Annals [M]. edition 1st.1993,Shanghai Shanghai Publishing Press.(In Chinese)
(上海县志编纂委员会.上海县志[M].第1版.1993,上海:上海人民出版社.)
- [2] Ministry of Health Disease Control Secretary of People's Republic of Chinas. Schistosomiasis control manual[M]. 2000,Shanghai Shanghai Science and Technology Press.(In Chinese)
(中华人民共和国卫生部疾病控制司.血吸虫病防治手册[M].2000,上海:上海科学技术出版社.)
- [3] Zhu Y. Survey of status of schistosomiasis patients at advanced stage in Nanhui District of Shanghai [J]. Chi Tro Med 2006 6 (9) :1577-1578.(In Chinese)
(朱瑛.上海市南汇区晚期血吸虫病患者现况调查[J].中国热带医学 2006 6(9):1577-1578.)
- [4] Gao GL Sui GD. Analysis on 570 advanced schistosomiasis cases by splenectomy in Jinshan district,Shanghai [J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control 2001,13(2):107.(In Chinese)
(高国龙,隋广德.金山区 570 例晚期血吸虫病切脾病人分析[J].中国血吸虫病防治杂志 2001,13(2):107.)

收稿日期 2011-10-17 编辑 谢永慧

(上接第 194 页)

- [1] Simon F ,Mauclere P ,Roques P et al . Identification of a new human immunodeficiency virus type I distinct from group M and group O [J]. Nat Med ,1998 4 :1032-1037.
- [2] Ayoub A ,Souquiere S ,Njinku B et al . HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon [J]. AIDS 2000 ,14 :2623-2625.
- [3] Takebe Y ,Kusagawa S ,Motomura K . Molecular epidemiology of HIV : Tracking AIDS pandemic[J]. Pediatr Int 2004 46 :236-244.
- [4] Thomson MM ,Najera R . Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic : An update [J]. AIDS Rev 2005 7 :210-224.
- [5] Los Alamos Laboratory :The circulating recombinant forms(CRFs) , 2007[http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html].
- [6] Jay AL . HIV and the pathogenesis of AIDS [M]. California :Wiley-Blackwell 2007 40-146.
- [7] Lu B ,Xing H ,Zhao QB et al . Expression ,purification and function of HIV-1B/C recombinant epidemic strain Tat protein[J]. Chin J Virol , 2002 ,18(2) :297-302 (In Chinese)
(陆彬,邢辉,赵全壁,等.我国 HIV-1 B'/C 重组流行株 Tat 蛋白的表达、纯化及功能分析[J].病毒学报 2002,18(2):297-302.)
- [8] Feng TJ ,Li LC ,He JF et al . Epidemiological analysis of AIDS in Shenzhen area in 188~1998 [J]. Chin J AIDS & STD 2000 6(2) :100-103 (In Chinese)
(冯铁建,李良成,何建凡,等.1988~1998 年深圳地区艾滋病流行病学分析[J].中国艾滋病性病 2000 6(02):100-103.)
- [9] Feng TJ ,Zhao GL ,Chen L et al . Prevalent status of HIV-1 strain in Shenzhen[J]. Chin J China Acad Med Sci 2006 28(5) :637-641. (In Chinese)
(冯铁建,赵广录,陈琳,等.深圳市 HIV-1 毒株的流行状况[J].中国医学科学院学报 2006 28(5):637-641.)
- [10] Yan J ,Wang Y ,Li J et al . analysis of gene sequence of HIV-1ENV prevalent among drug users in Zhujiang delta in Guangdong [J]. Chin J Lab Clin virol 2006 20(3) :223-225. (In Chinese)
(颜瑾,王玉,李杰,等.广东省珠江三角洲地区吸毒者中流行的 HIV-1ENV 基因序列分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2006 20(3):223-225.)

收稿日期 2011-11-24 编辑 崔宜庆