

· 论 著 ·

哈尔滨市 108 例新发 HIV-1
感染者体内 CRF01-AE 亚型毒株成簇性分析

张 琳, 王福祥, 陈晓红

[摘要] 目的 了解哈尔滨市男男性行为 (men who have sex with men, MSM) 人群中新确诊 HIV-1 感染者体内 CRF01-AE 亚型毒株成簇性特征, 为制定科学有效的防控措施提供依据。方法 收集哈尔滨市 2017 年新确诊 MSM 人群中 HIV-1 感染者流行病学及人口学信息, 通过 DNA 测序和基因分型, 对 CRF01-AE 亚型的序列进行成簇性分析。结果 本研究共获得 108 条 CRF01-AE 亚型序列, 以簇内基因距离 ≤ 0.045 和 Bootstrap $\geq 90\%$ 为界定簇标准, 产生传播簇 15 个, 其中由 10 条序列构成的传播簇 1 个; 患者年龄、常住地、性伴数、性取向、婚姻状况、性病史在未成簇与成簇 2 组中差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.05)。结论 CRF01-AE 亚型毒株是哈尔滨市 MSM HIV-1 感染者中的优势传播株, 具有较强的成簇性, 在艾滋病防控中对于未婚、性行为活跃的青壮年人群及与该人群关系密切的人群须高度关注。

[关键词] 男男性行为; CRF01-AE; 传播簇; HIV-1 感染

[中国图书资料分类号] R512.91

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2019)06-0509-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2019.06.006

Cluster analysis of CRF01-AE subtype
recombinant strains in 108 newly diagnosed HIV-1 infected cases in Harbin

ZHANG Lin, WANG Fu-Xiang, CHEN Xiao-Hong*

Department of Infectious Disease, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150000, China

*Corresponding author, E-mail: catherine89034@163.com

[Abstract] **Objective** To provide the scientific evidence for effective prevention and controlling measures of AIDS by getting information of the cluster characteristics of CRF01-AE subtype recombinant strains in newly diagnosed HIV-1 infected men who have sex with men (MSM) in Harbin. **Methods** The epidemiological and demographic information of newly diagnosed HIV-1 infected MSM in Harbin in 2017 were collected. The CRF01-AE subtype sequence was analyzed in cluster by using DNA sequencing and genotyping technology. **Results** A total of 108 CRF01-AE subtype sequences were acquired. According to the criteria of defining a cluster with gene distance ≤ 0.045 and Bootstrap $\geq 90\%$, 15 transmission clusters were obtained, of which only 1 cluster consisted of 10 sequences. The age, permanent residence, number of sexual partners, sexual orientation, marital status, history of venereal disease were statistically significant between non-clustering group and clustering group ($P < 0.05$). **Conclusions** CRF01-AE subtype recombinant strain is the dominant transmission strain among MSM infected by HIV-1 in Harbin, and it has strong clustering potential. In the prevention and control of AIDS, we should pay great attention to the unmarried, sexually active young and middle-aged people and the people closely related to the infected MSM.

[Key words] men who have sex with men; CRF01-AE; transmission cluster; HIV-1 infection

HIV-1 在男男性行为 (men who have sex with men, MSM) 人群中感染率呈逐年上升趋势, 2006 年哈尔滨地区 MSM 人群 HIV-1 感染率仅为 1.0%, 截至 2011 年底, 感染率上升至 9.5%^[1-2]。此外, 有研究显示 MSM 已成为哈尔滨地区 HIV-1 感染的主要传播途径^[3], 故实时监测哈尔滨地区 MSM 人群中 HIV-1 分子流行病学情况具有重要意义^[3]。CRF01-AE 亚型是哈尔滨市 HIV-1 的优势毒株, 在 MSM 人群中感染率最高, 但其流行现状、成簇性监测

及成簇性分析研究较少, 本研究拟纳入哈尔滨市 MSM 人群中新确诊 HIV-1 感染者, 开展 CRF01-AE 亚型毒株成簇性研究, 为制定科学有效的防控措施提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象 选取 2017 年 1—6 月于哈尔滨医科大学附属第四医院感染科新确诊的 150 例 HIV-1 感染者作为研究对象, 收集感染者人口学信息 (包括年龄、常住地、文化程度、性伴侣数、性取向、婚姻状况、收入等) 和临床相关资料。纳入标准: ①传播途径均为 MSM; ②感染者 CD4⁺ T 淋巴细胞计数 < 200 个/ μ l; ③感染者均未进行抗病毒治疗。排除标准: ①初筛阳性时间超过半年且未做确证实验的感染者; ②有遗

[基金项目] “十三五”国家“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项 (2018ZX10302104-001-005); 国家自然科学基金面上项目 (81672003)

[作者单位] 150000, 哈尔滨医科大学附属第四医院感染科 (张琳、陈晓红); 518000, 深圳市第三人民医院感染科 (王福祥)

[通信作者] 陈晓红, E-mail: catherine89034@163.com

传免疫缺陷病的感染者。本研究通过伦理学委员会审查和批准。

1.2 方法

1.2.1 HIV-1 感染者确诊 按照《全国艾滋病检测技术规范》^[4]规定,采用2种HIV-1诊断试剂盒检测。结果判定如下:①当2种试剂盒检测结果均为阴性则结果报告为阴性;②当1种或2种试剂盒检测结果为阳性则采用蛋白印迹法进一步确证。本研究纳入患者均通过蛋白印迹法确诊为阳性且有确证报告。

1.2.2 CD4⁺T淋巴细胞计数检测 采用FACSCanll流式细胞仪(德国PARTEC公司)及MultiTESTa四色试剂对CD4⁺T淋巴细胞计数进行检测(美国Becton-Dickinson公司)。

1.2.3 DNA 测序 全血中分离外周血单核细胞,提取DNA,以其为模板扩增Gag基因片段。用外侧引物Gag-OF(5'-ATATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATT-3')和Gag-OR(5'-TCCAACAGCCCTTTTCCTAGG-3')进行第一轮PCR扩增;纯化扩增产物,并以其作为第二轮PCR模板,用内侧引物Gag-IF(5'-TAGTTCCTGCTATGTCACCTCC-3')和Gag-IR(5'-GGGAAAAAATTCGGTTAAGGCC-3')进行第二轮PCR扩增,两轮扩增采用相同的体系和条件。PCR产物纯化后进行序列测定。

1.2.4 基因亚型的鉴定 Gag p17-p24 参考序列均来自 Los Alamos National Laboratory HIV-1 序列数据库,利用 Clustal X 软件对测序后的 Gag p17-p24 基因进行多重序列比对,利用 Fasttree 软件基于最大似然法(maximum likelihood methods, ML)构建基因系统进化树。根据感染者 Gag p17-p24 在进化树上分布和成簇情况,判定感染者体内 HIV-1 基因型。

1.2.5 系统进化树及传播簇的构建 将初步构建的进化树中属于 CRF01-AE 亚型的序列筛选出来,根据上述方法构建系统进化树,根据构建的 ML 进化树的结果以簇内基因距离 ≤ 0.045 和 Bootstrap $\geq 90\%$ 作为成簇的参数,使用 ClusterPicker 软件进行成簇分析,同时使用 GraphPad Prism 5 软件进行阈值分析,以获得传播簇数据。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 2.0 软件对数据进行统计学分析,采用 χ^2 检验对流行病学及人口学资料进行统计分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CRF01-AE 亚型毒株构成比 150 例新发 HIV-1

感染者血清样本,经过 DNA 序列分析共获得 148 条序列,其中 CRF01-AE 亚型 108 条,占总数的 73%。

2.2 序列成簇情况分析 使用上述序列片段构建 ML 进化树,发现基因距离 ≤ 0.045 时成簇数最多,故以此为条件构建成簇进化树,产生传播簇 15 个,其中由 10 条序列构成的传播簇 1 个。具体见表 1、见图 1。

表 1 HIV-1 Gag p17-p24 片段在不同基因距离限定下的成簇情况

Table 1 Clusters of HIV-1 Gag p17-p24 fragment under different gene distances as the criteria of defining a cluster

变量	基因距离 ≤ 0.045	基因距离 ≤ 0.030	基因距离 ≤ 0.015
成簇序列数	56	37	6
成簇序列百分比 (%)	60.2	39.8	6.5
簇数			
$n \geq 2$	15	11	3
$n \geq 5$	3	2	0
$n \geq 10$	1	1	0

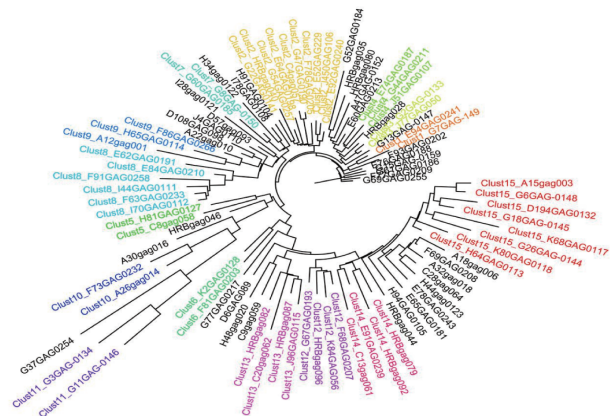


图 1 HIV-1 感染者在基因距离 ≤ 0.045 下成簇的进化树

每个成簇后的亚簇用同一个颜色标注

Figure 1 Phylogenetic tree of HIV-1 infectors when gene distance was ≤ 0.045

2.3 成簇样本人口学及流行病学特征分析 研究对象年龄跨度在 20 ~ 59 岁之间,平均年龄 34.9 岁。其中,感染者年龄在 30 ~ 39 岁人数最多,且多居住于哈尔滨市;患者性伴数 > 10 人、同性恋及未婚 3 者在成簇组中比例最高;同性恋与已婚 2 者在未成簇组患者中比例最高,上述变量在未成簇与成簇 2 组中的差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05)。另外,本研究中成簇样本内大多数学历在初中以下,收入 < 3000 元,具体见表 2。

3 讨 论

目前, HIV-1 流行特点的研究已进入了分子时

表 2 成簇样本人口学和流行病学特征分析
Table 2 Demographic and epidemiological characteristics of clustered samples

变量	例数	未成簇 [例 (%)]	成簇 [例 (%)]	χ^2 值	P 值
各组样本数	108	52	56		
年龄 (岁)				9.984	0.019
20 ~	41	22(53.7)	19(46.3)		
30 ~	36	11(30.5)	25(69.5)		
40 ~	20	10(50.0)	10(50.0)		
50 ~	11	9(81.8)	2(18.2)		
常住地				8.839	0.004
哈尔滨市	75	29(38.6)	46(61.4)		
非哈尔滨市	33	23(69.7)	10(30.3)		
文化程度				2.476	0.127
高中及以上	58	32(55.2)	26(48.2)		
初中及以下	50	20(40.0)	30(60.0)		
性伴数 (人)				9.644	0.008
> 10	21	6(28.6)	15(71.4)		
5 ~ 10	55	26(47.3)	29(52.7)		
< 5	32	20(62.5)	12(37.5)		
性取向				8.609	0.014
同性恋	55	34(61.8)	21(38.2)		
异性恋	29	9(31.1)	20(68.9)		
双性恋	24	9(37.5)	15(62.5)		
收入水平 (元)				0.791	0.385
≥ 3000	27	15(55.6)	12(44.4)		
< 3000	81	37(45.7)	44(54.3)		
婚姻状况				4.566	0.033
已婚	33	21(63.6)	12(36.4)		
未婚	75	31(41.3)	44(58.7)		
性病史				10.322	0.006
有	37	18(48.6)	19(51.4)		
无	36	24(66.7)	12(33.3)		
不详	35	10(28.6)	25(71.4)		

代^[4], 对 HIV-1 基因进行成簇性分析, 有助于深入研究病毒的传播, 从分子角度揭示病毒在人群中的传播关联, 这种方法可以弥补单纯依靠感染者自我报告主观差异以及血清学检测可信性不足的缺点^[5-6]。如果多个感染者的病毒基因聚集成簇, 基因距离较近, 说明这些感染者可能与某些传播事件存在一定的关联, 或者说在传播的过程中存在一些因果关系^[6-7], 比如地域性, 或者社交圈有重合等情况, 甚至可以通过这种方法建立流行的传播网络, 发现潜在的传播者及感染者, 这种方法国外研究较成熟, 但在国内相关研究较少。

本研究发现在哈尔滨市新发的 MSM 人群中的 HIV-1 感染者中, CRF01-AE 仍是哈尔滨市这一群体中最主要的流行亚型, 这与以往研究相符^[5], 从表 1 可以看出随着基因距离上限的下降, 成簇序列的绝对数、百分数以及规模较大的传播簇也呈现递减趋势, 规模较大的簇减小较明显, 并且绝大多数的传播簇内序列的数量少于 5 条。基因距离对传播簇形成的序列比例和数目大小起着关键作用^[7-8]。当选取基因距离 ≤ 0.015 作为传播簇的

界定条件时, 所形成的簇数仅有基因距离 ≤ 0.045 和基因距离 ≤ 0.030 时的 50% 左右。而选择基因距离 ≤ 0.045 时, 成簇数更多, 这个数值的选择在类似研究中也体现^[9], 故对于样本少的情况, 选取合适的基因距离十分重要^[9-10]。

从年龄上看, 成簇样本多为青壮年(30~40岁), 大部分脱离了学校生活, 有相对稳定的社交圈, 且这些感染者中未婚人士比例较高, 没有婚姻家庭的影响, 性活跃度进一步提高, 高危性行为常有发生^[11-12]。成簇样本较大比例的感染者不明确自己有无性病史, 这部分感染者发现 HIV-1 抗体阳性通常在发生相关并发症就诊时被发现。在调查中发现他们对于高危性行为的羞于承认以及较为焦虑的情绪, 对于后续的治疗过程也会产生影响^[13]。成簇样本中大多性伴数较多且为异性恋人群, 有研究显示, 性取向及性伴数是活跃在传播网络中的重要影响因素^[14-15]。从我们的数据也可以看出, 哈尔滨市新发的 HIV-1 感染者中, 此因素也在传播网络中占重要地位, 这些人通常不能与固定的性伴侣保持联系^[16], 只能通过寻找临时性伴侣来满足对性的需求, 但是却缺乏保护自己的意识^[17], 对于这类人群我们必须采取有效的措施, 干预无保护的 MSM, 遏制艾滋病进一步蔓延。

另外, 本研究存在一定不足之处, 其一由于本研究收集样本数较少, 这可能降低了成簇的敏感性^[8], 利用传播簇对毒株间的传播轨迹及流行史进行精准的估计尚须扩大样本量进行进一步验证; 其二是本研究仅仅对 Gag p17-p24 基因片段进行扩增, 在今后的研究中须增加其他基因区的信息辅助判断, 或对病毒全基因组进行测序分析^[18]。

综上所述, 我们在对艾滋病的防控中, 应加强对未婚、性行为活跃的青壮年人群以及与该人群关系密切的人群进行高度关注, 且对于艾滋病的宣传教育应从低龄群体深入, 并须进一步探讨社会因素及社会心理因素对于 MSM 人群的影响, 关注 MSM 人群心理健康, 引导正确求医行为, 对 MSM 人群消除歧视, 呈现更加包容和理解的态度, 以及提供生殖健康服务等综合干预措施^[19]。

【参考文献】

[1] Chun TW, Carruth L, Finzi D, *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection [J]. *Nature*, 1997, 387(6629):183-188.
[2] Li X, Xue Y, Cheng H, *et al.* HIV-1 Genetic diversity and its impact on baseline CD4⁺ T cells and viral loads among recently infected men who have sex with men in Shanghai, China [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0129559.

- type 1 in urban Baltimore, Maryland [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45(12):1625–1632.
- [11] 池小铿, 郭颖, 谭艺真, 等. 单中心 7 年维持性血液透析的回顾性分析 [J]. *广东医学*, 2017, 11(38):1731–1733.
- [12] Tourret J, Tostivint I, du Montcel ST, *et al.* Outcome and prognosis factors in HIV-infected hemodialysis patients [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1(6):1241–1247.
- [13] 叶伟, 段志兵, 胡丽莉, 等. 不同等级医院血液透析患者原发病及死因的差异性分析 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 13(26):126–130.
- [14] Yen TH, Lin JL, Lin-Tan DT, *et al.* Association between body mass and mortality in maintenance hemodialysis patients [J]. *Ther Apher Dial*, 2010, 14(4):400–408.
- [15] Kalantar-Zadeh K. Causes and consequences of the reverse epidemiology of body mass index in dialysis patients [J]. *J Ren Nutr*, 2005, 15(1):142–147.
- [16] Mohamed-Ali V, Goodrick S, Bulmer K, *et al.* Production of soluble tumor necrosis factor receptors by human subcutaneous adipose tissue *in vivo* [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(6):e971–e975.
- [17] Kamkuemah M, Kaplan R, Bekker LG, *et al.* Renal impairment in HIV-infected patients initiating tenofovir-containing antiretroviral therapy regimens in a Primary Healthcare Setting in South Africa [J]. *Trop Med Int Health*, 2015, 20(4):518–526.
- [18] Lucas GM, Ross MJ, Stock PG, *et al.* Clinical practice guideline for the management of chronic kidney disease in patients infected with HIV: 2014 update by the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 59(9):e96–e138.
- (2019-10-09 收稿 2019-12-13 修回)
(本文编辑 揣征然)
-
- (上接第 511 页)
- [3] Shao B, Song B, Cao L, *et al.* Molecular epidemiology is becoming complex under the dynamic HIV prevalence: the perspective from Harbin, China [J]. *J Med Virol*, 2016, 88(5):807–814.
- [4] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范 [J]. *中国药物依赖性杂志*, 2004, 13(4):318.
- [5] Shao B, Li Y, Yu L, *et al.* The HIV/AIDS epidemic characteristics in a northeast province of China—men who have sex with men have made a tremendous contribution to the growth of the HIV epidemic [J]. *J Infect*, 2014, 68(3):273–280.
- [6] Wang K, Yan H, Liu Y, *et al.* Increasing prevalence of HIV and syphilis but decreasing rate of self-reported unprotected anal intercourse among men who had sex with men in Harbin, China: results of five consecutive surveys from 2006 to 2010 [J]. *Int J Epidemiol*, 2012, 41(2):423–432.
- [7] 朱可心, 庄勋, 周元, 等. 人类免疫缺陷病毒-1CRF01AE 毒株在我国的分子流行特征分析 [J]. *中华传染病杂志*, 2015, 33(7):396–402.
- [8] Lazzarin A, Saracco A, Musicco M, *et al.* Man-to-woman sexual transmission of the human immunodeficiency virus [J]. *Arch Intern Med*, 1991, 151(12):2411–2416.
- [9] Beyrer C, Baral SD, Griensven FV, *et al.* Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men [J]. *Lancet*, 2012, 380(9839):367–377.
- [10] 林怡, 薛以乐, 王绪琴, 等. 上海市男男性行为者中感染 HIV-1 的 CRF01-AE 毒株传播簇分析 [J]. *中国艾滋病性病*, 2016, 22(3):165–169.
- [11] Price MN, Dehal PS, Arkin AP. Fasttree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments [J]. *PLoS One*, 2010, 5(5):e9490.
- [12] 叶梅, 陈鑫, 王雨, 等. HIV-1 阳性配偶 / 固定性伴的分子流行病学研究进展 [J]. *传染病信息*, 2016, 29(6):358–363.
- [13] Zhang K, Li D, Li H, *et al.* Changing sexual attitudes and behavior in China: implications for the spread of HIV and other sexually transmitted diseases [J]. *AIDS Care*, 1999, 11(5):581–589.
- [14] Ragonnet-Cronin M, Hodgecroft E, Hué S, *et al.* Automated analysis of phylogenetic clusters [J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14(1):317.
- [15] Zhang BC, Chu QS. MSM and HIV/AIDS in China [J]. *Cell Res*, 2005, 15(11–12):858–864.
- [16] Hassan AS, Pybus OG, Sanders EJ, *et al.* Defining HIV-1 transmission clusters based on sequence data [J]. *AIDS*, 2017, 31(9):1211–1222.
- [17] Wang L, Wang L, Jessie L, *et al.* HIV prevalence and influencing factors analysis of sentinel surveillance among men who have sex with men in China, 2003–2011 [J]. *Chin Med J*, 2012, 125(11):1857–1861.
- [18] 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.
- [19] Li X, Xue Y, Zhou L, *et al.* Evidence that HIV-1CRF01-AE is associated with low CD4⁺ T cell count and CXCR4 co-receptor usage in recently infected young men who have sex with men (MSM) in Shanghai, China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e89462.
- [19] Lewis F, Hughes GJ, Rambaut A, *et al.* Episodic sexual transmission of HIV revealed by molecular phylodynamics [J]. *PLoS Med*, 2008, 5(3):e50.
- (2017-11-14 收稿 2019-11-27 修回)
(本文编辑 揣征然)