

艾滋病溯源技术研究进展

伍永勤¹, 邹潇白², 陈曦²

1. 南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省疾病预防控制中心

摘要: 艾滋病溯源能较为精准的尽早发现感染者, 明确传播途径, 切断传播链, 阻止艾滋病病毒传播。本文就传统溯源技术和分子生物学溯源技术进行比较。两个技术结合更有利于艾滋病防治的精准性。

关键词: 艾滋病; 现场流行病学; 分子生物学; 溯源技术

中图分类号: R512.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)06-0762-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.06.036

Development of HIV/AIDS tracing approaches

WU Yong-qin^{*}, ZOU Xiao-bai, CHEN Xi

^{*} School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Corresponding author: CHEN Xi, E-mail: chenxi161@sohu.com

Abstract: HIV infected individuals can be found more accurately and timely through tracing approaches, and these approaches can identify the transmission route, cut off the transmission chain and block HIV spread. Field epidemiology and molecular biology tracing approaches are compared in this article, and the combination of the two methods is more conducive to the accuracy of HIV prevention and treatment.

Key words: HIV/AIDS; field epidemiology; molecular biology; tracing approaches

艾滋病溯源技术 (HIV/AIDS tracing) 是指以 HIV/AIDS 病人为研究对象, 运用分子生物学技术对感染的 HIV 毒株的同源性进行分析, 从病原分子角度精准构建 HIV 感染者间相互传播链, 为及时开展针对性的干预措施, 切断进一步传播, 保护健康人群提供依据。艾滋病溯源技术始于 20 世纪 90 年代初, 即通过基因技术分析 HIV 病毒序列, 判断其关联。但限于当时基因技术发展有限, 该技术的稳定性不佳、难度较大。进入 21 世纪后, 全球生物技术迅猛发展, 出现了多种高效、高灵敏度的检测技术, 为精确判断病毒传播链提供了可靠保证。将分子生物学技术与现场流行病学调查结合, 将更加精准阐述病例的来源及感染途径的相互关联性。

1 传统溯源技术

传统溯源技术也称接触者追踪 (contact tracing), 是在病例发现 (case finding) 基础上, 依靠对感染者进行流行病学调查或者随访, 确定感染来源与传播^[1]。

基金项目: 科技部“十二五”科技重大专项 (2012ZX10001001-003); 湖南省卫生计生委课题 (C2016028)

作者简介: 伍永勤 (1991-), 男, 湖南会同人, 硕士在读, 研究方向: 艾滋病防治。

通信作者: 陈曦, E-mail: chenxi161@sohu.com。

基本原理是由种子 (初始 HIV 感染者) 自愿提供第一代高危行为接触者 (一代溯源) 进行 HIV 检测, 再由第一代阳性感染者提供二代高危行为接触者 (二代溯源), 以此类推, 形成一个传播链, 直至线索中断。

1.1 种子病例来源

1.1.1 疫情报告 主要指医疗单位在诊疗过程中发现 HIV 感染者后通过疫情报告系统上报, 主要是病例报告, 也是管理人员明确该地区传播危险因素及特征的途径之一^[2]。

1.1.2 监测系统 是指根据特殊需要疾病预防控制、卫生保健机构主动寻找 HIV 感染者, 包括哨点监测 (sentinel surveillance)、行为监测 (behavioral surveillance) 和重点人群专题调查。如 HIV 扩大检测项目、重点人群哨点监测、监管场所羁押人员普查、孕 (产) 妇孕产前检查等。

1.1.3 自愿咨询检测 (HIV voluntary counseling & testing, VCT) 指有高危行为者为了解自身感染状况, 主动寻求医务人员咨询与检测。VCT 门诊是一种干预措施, 更是一个发现 HIV 感染者的重要渠道。此时求询者是主动角色, 因此, 能较好配合医务人员, 也可以动员相关人员主动参与检测。但是它主要依靠高危行为者自愿寻求咨询帮助, 所以发现感染者的效率不高, 约 2.79% (247/8 842)^[3]。

1.2 传统溯源技术优劣 溯源调查从种子病例开始,能否深入开展,从而形成明显的传播链,将会受到如下因素影响:1.艾滋病的特点。HIV 感染后潜伏期长,除家庭内配偶易于寻找外,其他密切接触者(第一代)信息由于时间、空间等问题难以准确提供;2.专业人员的能力限制。即使提供了准确的高危行为发生的时间、地点和对象,专业人员能否找到第一代感染者存在极大未知;3.种子感染者及其密切接触者配合程度。出于个人的某些特殊情况,调查对象拒绝配合、隐瞒、

谎报,也会为查找下一代感染者带来困难;4.专业人员对种子感染者访谈技巧,也与种子感染者是否配合相关;5.单纯依靠流行病学访谈调查,仅仅只是提供了一个可能感染的线索来源,但是要实现对于个体间感染以及当地不同人群内流行的相关性的精准判断目的,这些方法则无法实现。如果种子及其感染者能够配合专业人员调查,则通过溯源发现新感染者的效率较高,随着溯源层数增加发现难度增加,见表 1。

表 1 传统溯源效率

溯源效率(%)							
文献来源	调查地点	种子	接触者	第一层	第二层	第三层	第四层
李燕等 ^[3]	广州	224	4 712	3.10(1 46/4 712)	37.93(11/29)	—	—
濮永成等 ^[4]	云南陇川	57	1 137	4.05(46/1 137)	28.28(41/145)	33.33(2/6)	40.00(2/5)
朱秋映等 ^[5]	广西某市	—	377	36.60(138/377)	17.39(24/138)	12.50(3/24)	—
黄明安等 ^[6]	广东云安	38	252	31.35(79/252)	54.90(28/51)	100.00(2/2)	—
张建梅等 ^[7]	云南建水	37	223	15.70(35/223)	29.27(12/41)	13.64(3/22)	—
刘婷等 ^[8]	哈尔滨	51	1 688	3.85(65/1 688)	—	—	—
余惠芬等 ^[9]	云南省	761	4 005	15.71(629/4 005)	—	—	—
单多等 ^[10]	云南德宏州	342	2 245	9.16(206/2 245)	1.79(11/614)	5.26(1/19)	—
叶润华等 ^[11]	云南德宏州	309	2 692	10.29(277/2 692)	12.15(73/601)	10.99(10/91)	9.09(1/11)

注:“—”为缺失数据。

2 分子溯源技术

2.1 基本原理 HIV 为单链 RNA 病毒,病毒结构简单,但在病毒复制过程中存在高突变率、高错误率和免疫逃逸机制,导致 HIV 具有高度的变异性。由于基因复制过程中的相似性,在同一传播链上的两个个体中 HIV 毒株的基因序列的相似性会高于非传染关系中的毒株,因此,通过分析基因序列间的关系可以推断出感染者 HIV 之间的亲缘关系。

在 HIV 传播过程中,毒株会在感染者体内产生一系列的准种群^[12],但因进化瓶颈的存在,被感染者仅会感染传染源中一个或者几个准种群。在较短时间内,位于同一传播链中的 HIV 毒株之间的亲缘关系会高于其他准种间的亲缘关系,即同一传播链中的两个个体间的 HIV 准种群存在并列关系,据此即可推断 HIV 毒株的传播方向。利用分子生物学技术追踪 HIV 毒株所携带的基因信息属于分子流行病学前沿技术,它可以推断 HIV 毒株的传播方向。

2.2 常用方法

2.2.1 巢式 PCR 产物克隆测序法 该方法的原理是提取 HIV 病毒的 RNA,用巢式 PCR 扩增 HIV-1 pol 区、gag 区、env 区基因,长度约为 1 100~1 300 bp,经两轮 PCR 后用质量分数为(0.8%~1.0%)的琼脂糖凝胶电泳确认扩增片段,得到纯化序列。时丽丽等^[13]应用巢式 PCR 产物克隆法调查了一起疑似输血传播 HIV 的案例,通过对感染者 env 基因 C2V3 区扩增并对产物克隆测序,分子溯源的结果支持流行病学结果。李燕等^[3]通过对 HIV-1 gag、env 区扩增克隆测序对 2008-2009 年广州市 HIV/AIDS 病人进行溯源调查,分子溯源的证据使流行病学资料更加可信。该方法优点在于技术成熟,易于标准化,且操作简便,成本较为低廉,只需要 PCR 引物和扩增产物纯化后即可直接测序,不需要特殊的设备,因此目前在国内外被广泛使用。缺点在于目前只能测到超过 20%的优势毒株。

2.2.2 高通量测序法 该技术是近年来生物医学领域发展最快的前沿热点技术之一。又称“第二代”DNA 测序技术,具有代表性有基于焦磷酸测序原理的罗氏

(Roche)454 技术、基于边合成边测序的 Illumina 公司 Solexa Genome Analyzer 测序平台、基于连接技术的 ABI 公司 SOLID 5500xl 测序平台。Hedskog 等^[14]应用该技术对抗病毒治疗人群 HIV 的 pol 区进行测序,获得了 2 406~35 104 条核酸序列。赵琦等^[15]应用高通量测序调查一起疑似经性传播感染 HIV 的案例,推断了其传播关系及传播方向。高通量测序平台的优点在于一次性获取的数据量大,测序长度较长,可以用于劣势毒株的检测。缺点在于成本高昂、操作比较繁琐、对实验室硬件条件以及操作人员要求均比较高。

2.2.3 单基因扩增法 全称为单基因组测序法(single-genomesequencing),又名终点有限稀释 PCR 技术,该方法近年来分析 HIV 准种的一种新技术,它的原理是现对 RNA 模板设计为系列梯度稀释,认定阳性率 $\leq 30\%$ 的模板为单基因,再以此为基准进行 PCR 放大扩增^[16]。它能得到完整的 pol 区序列,从而对 HIV 准种的基因进行全面的分析。陈伟烈等^[17]建立了监测 HIV-1 准种的终点有限稀释 PCR 技术具有灵敏度高、特异性好、高通量的优点,能够应用于低水平病毒载量($< 1\ 000$ copies)的感染者的准种研究。焦丽燕等^[18]对 AIDS 的外周血单核细胞进行单基因扩增测序,并与克隆测序法进行对比,发现二者对于优势准种的检测无明显区别,且单基因扩增法能获得更多的劣势准种。该方法的优点是单模板扩增避免了 PCR 过程中的基因重组,灵敏度和特异度较高。但该方法的缺点是前期摸索单模板稀释度会消耗大量的样本,故需要样本量大,且成本较为高昂,不易操作。目前在全球使用比较少。

2.3 分子溯源技术的应用

2.3.1 单个案例调查中的应用 1992 年美国一位患艾滋病牙医通过医源性感染传染了 7 位病人,最终通过测序,确定了其中 5 位有高度同源性,确定为医源性感染^[19]。1997 年美国一名 48 岁身体健康的医生给一名 AIDS 做手术时不幸接触到患者血液而罹患 HIV 及 HCV,通过对比该医生和患者血液中病毒序列,发现该医生与病人的 HIV/HCV 基因序列之间仅相差 0.5%,说明二者具有高度同源性^[20]。1999 年美国一家医院的病人怀疑是静脉注射感染了 HIV,通过病毒测序最终确定该案例为院内感染,并及时阻断了传播途径,将不良影响降至最小^[21]。同年美国 CDC 报道,一名医生被沾染了 HIV 患者血液的试管割伤,尽管紧急处理了,但 17 d 后还是发现 HIV 抗体阳性。利用 PCR 技术对比该医生和血液来源患者的基因序列,发现二者并无明显关系,进一步的流行病学调查表明该医生感染于

其他途径^[22]。2009 年加拿大通过测序技术推断了一个 HIV 携带者故意将病毒传染给多位密切接触者之间的关联性^[23]。

2.3.2 人群调查中的应用 2000 年英国 Doncaster 地区报道了一起 HIV-1 B 亚型在异性性行为人群中暴发的分子流行病学结果:运用巢式 PCR 技术,收集了 13 例患者的样品,其中 10 例样品出现了两个明显的聚集簇,两个聚集簇之间患者流行病学史和病毒情况明显不同^[24]。2002 年美国报道了一起女性聚集性感染 HIV-1 疫情,研究者收集患者外周血并进行测序,发现 13 个感染者中有 10 个出现了 DNA 序列的高度相关性,为流行病学调查提供了线索^[25]。国内浙江台州地区男男性行为人群调查中,研究者发现有部分聚集性人群间基因亚型一致,且流行病学有关联,提示他们之间有直接 HIV 传播关系^[26]。2008 年在西双版纳首次报道了 HIV-1 在异性性行为人群中的分子流行病学证据^[27]。2015 年格鲁吉亚报道了 16 个静脉吸毒感染者将 HIV-1 传染给女性伴侣,16 对异性性伴侣中有 14 对基因遗传距离小于 0.015,提示有直接的传染关系,且流行病学资料也支持该结论^[28]。2015 年国内学者收集了全国 1996-2006 年间 324 名感染途径未知的血样,通过测定病毒基因序列,判断出其中 100 名为血液传播,114 名为静脉注射吸毒,11 名为性传播^[29]。

2.4 存在的不足 分子溯源技术虽然可以在分子水平上较精准解释感染者之间感染毒株的联系,但是在个案运用中,必须联系感染者间是否存在相关联的流行病学特征。分子生物学技术现在已经被广泛应用,但是仍存在下列的局限性:(1)实验室配套设施要求高,一般实验室难以进行,需提交商业测序公司完成,这过程中或存在人为因素导致样品测序误差;(2)对于治疗效果好的病人样本,往往因为 HIV 病毒得到了有效抑制而无法提取到核酸进行测序;(3)耗时较长,整个过程包括核酸的提取、PCR 扩增、测序、序列拼接以及数据分析,最短也需要 3~5 d 的时间。

3 小 结

联合国艾滋病规划署提出“快速通道战略”^[30],到 2020 年要实现“90%的携带者了解自己的感染状况,90%感染者接受治疗,90%接受治疗者不再复发”^[31]。截至 2015 年 11 月 30 日,我国现存活 HIV/AIDS 病人 580 409 例^[32],艾滋病疫情依然严峻。要实现三个“90%”目标最重要的是寻找到感染者,及时给予治疗,将大大降低病毒继续传播的风险^[33]。在亚太和非洲地区,有 49%的不知道自己的感染状况,约 57%的人没

有获得抗病毒药物,在中国约有 30% 的感染者不知道自身感染状况^[31]。因此,尽可能多的发现感染者是一项紧迫的工作。

传染病防控的关键是尽最大可能发现传染源,阻断传播。将传统溯源技术和分子溯源技术结合有助于更加精准的绘出本地感染者间的传播特征与网络,为及时开展针对性的干预提供了更加“精准的打击方向”。

参考文献

- [1] Dalle NF, Di LF, Sanfilippo A, et al. Contact tracing and partner notification among a cohort of HIV-1 infected patients. A prospective study carried out in Palermo in 2012[J]. *Recenti Prog Med*, 2014, 105(9): 327-332.
- [2] 肖红卫,陈鹏,柴振峰. 株洲地区艾滋病异性传播危险因素评估及特征分析[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(2): 208-209.
- [3] 李燕,陈绮珊,梁颖茹,等. 广州市 2008-2009 年新报告 HIV 感染者/AIDS 病人溯源调查分析[J]. *中国艾滋病性病*, 2011, 16(2): 131-134.
- [4] 濮永成,段启祥,韩文香,等. 云南省陇川县新报告 HIV 感染者的高危行为接触者追踪调查[J]. *中国艾滋病性病*, 2010, 15(5): 476-478.
- [5] 朱秋映,刘伟,朱金辉,等. 2009 年广西某市新报告艾滋病感染者溯源调查[J]. *华南预防医学*, 2011, 52(1): 73-75.
- [6] 黄明安,吴勇能. 2008-2010 年广东省云安县新报告艾滋病病毒感染者和患者溯源调查[J]. *职业与健康*, 2012, 28(4): 403-406.
- [7] 张建梅,李慎坚,普爱华,等. 建水县 2008 年新报告艾滋病感染者溯源调查分析[J]. *卫生软科学*, 2010, 24(2): 176-178.
- [8] 刘婷,罗超,崔文秀,等. 哈尔滨市 2009 年艾滋病新报告感染者溯源调查[J]. *中国公共卫生管理*, 2010, 26(4): 423-424.
- [9] 余惠芬,贾曼红,安晓静,等. 云南省 2008 年 HIV 感染者-艾滋病患者的高危行为接触者追踪分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(12): 1445-1446.
- [10] 单多,段松,崔岩,等. 云南省德宏州 2009 年新报告 HIV 感染者溯源调查[J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(11): 965-970.
- [11] 叶润华,项丽芬,杨跃诚,等. 云南省德宏州新报告艾滋病病毒感染者溯源调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(1): 39-42.
- [12] Boutwell CL, Rolland MM, Herbeck JT, et al. Viral evolution and escape during acute HIV-1 infection[J]. *J Infect Dis*, 2010, 202 Suppl 2(8): S309-314.
- [13] 时丽丽,赵琦,蒋岩,等. 一起疑似输血传播 HIV 的分子流行病学研究[J]. *中华预防医学杂志*, 2013, 47(5): 427-430.
- [14] Hedskog C, Mild M, Jernberg J, et al. Dynamics of HIV-1 quasispecies during antiviral treatment dissected using ultra-deep pyrosequencing[J]. *PLoS One*, 2010, 5(7): e11345-e11348.
- [15] 赵琦,时丽丽,蒋岩,等. Miseq 高通量测序平台用于一起疑似经性传播 HIV 的溯源调查[J]. *中华预防医学杂志*, 2014, 48(6): 471-475.
- [16] Palmer S, Kearney M, Maldarelli F, et al. Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(1): 406-413.
- [17] 陈伟烈,唐小平,唐漾波,等. 检测 HIV-1 准种的终点有限稀释 PCR 技术的建立[J]. *中华检验医学杂志*, 2009, 32(9): 997-1001.
- [18] 焦丽燕,刘永健,郭东星,等. 两种 HIV-1 耐药准种分析方法的比较[J]. *军事医学*, 2010, 34(3): 261-264.
- [19] Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice[J]. *Science*, 1992, 256(5060): 1165-1171.
- [20] Ridzon R, Gallagher K, Ciesielski C, et al. Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needle-stick injury[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(13): 919-922.
- [21] Katzenstein TL, Jorgensen LB, Permin H, et al. Nosocomial HIV-transmission in an outpatient clinic detected by epidemiological and phylogenetic analyses[J]. *AIDS*, 1999, 13(13): 1737-1744.
- [22] Jochimsen EM, Luo CC, Beltrami JF, et al. Investigations of possible failures of postexposure prophylaxis following occupational exposures to human immunodeficiency virus[J]. *Arch Intern Med*, 1999, 159(19): 2361-2363.
- [23] Kaye M, Chibo D, Birch C. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood phylogenetic approaches in two legal cases involving accusations of transmission of HIV[J]. *AIDS Res Hum Retrov*, 2009, 25(8): 741-748.
- [24] Hayman A, Moss T, Arnold C, et al. 022 A heterosexual outbreak in Doncaster involving subtype B of HIV-1: molecular epidemiology as a supplement to contact tracing[J]. *HIV Med*, 2000, 1(3): 172-175.
- [25] Robbins KE, Weidle PJ, Brown TM, et al. Molecular analysis in support of an investigation of a cluster of HIV-1-infected women[J]. *AIDS Res Hum Retrov*, 2002, 18(15): 1157-1161.
- [26] 林海江. 浙江省台州地区艾滋病相关危险行为网络与分子流行病学研究[D]. 上海:上海复旦大学, 2011.
- [27] Bao L, Vidal N, Fang H, et al. Molecular tracing of sexual HIV Type 1 transmission in the southwest border of China[J]. *AIDS Res Hum Retrov*, 2008, 24(5): 733-742.
- [28] Dvali N, Chkhartishvili N, Sharvadze L, et al. Molecular tracing of heterosexual HIV-1 transmission in Georgia[J]. *Georgian Med News*, 2015, (246): 54-59.
- [29] Wei M, Xing H, Feng Y, et al. Estimating HIV-1 transmission routes for patients with unknown risk histories by viral sequence phylogenetic analyses[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2015, 70(2): 195-203.
- [30] 世界艾滋病规划署. 理解快速通道[EB/OL]. (2015-12-1) [2016-10-15]. <http://www.unaids.org.cn/pics/20151120151619.pdf>.
- [31] UNAIDS. The UNAIDS 2016 - 2021 Strategy[EB/OL]. (2015-10-10) [2016-10-15]. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/20151027_UNAIDS_PCB37_15-18_EN_rev1.pdf.
- [32] 中国疾病预防控制中心,性病艾滋病预防控制中心,性病控制中心. 2015 年 11 月全国艾滋病性病疫情及主要防治工作进展[J]. *中国艾滋病性病*, 2016, 21(1): 1-5.
- [33] 覃碧云,贺健梅,邹潇白,等. 湖南省 252 例艾滋病患者抗病毒治疗效果及耐药分析[J]. *实用预防医学*, 2012, 19(7): 964-967.