**北京MSM人群HIV-1基因多样性及相关因素研究**

周知涵1，张晶1，辛若雷2，阮玉华1，卢红艳2，冯毅1，康瑞华1，廖玲洁1，邵一鸣1，邢辉1

(1.中国疾病预防控制中心,北京102206 ；2.北京市疾病预防控制中心，北京100013)

**摘要：目的** 了解北京MSM人群HIV-1基因多样性情况及影响因素。**方法** 对北京HIV阳性MSM人群采用横断面研究调查，通过建立的基于Illumina平台的二代测序技术（next generation sequencing, NGS）方法，综合两个pol基因区片段和一个env基因区片段的结果进行亚型和系统进化分析。**结果** NGS检测的376例样本中，单一亚型样本占比83.2%（313/376），主要亚型为CRF01\_AE（60.1%，188/313），CRF07\_BC亚型（27.8%，86/313），B亚型（10.2%，32/313），C亚型（1.0%,3/313），CRF55\_01B亚型（1.3%，4/311）；重组率和共感染率分别为8.24%（31/376）和8.51%（32/376）。其中亚型内重组率为1.86%（7/376），亚型间重组率为6.38%（24/376）；亚型内共感染率为1.33%（5/376），亚型间共感染率为7.18%（27/376）。多因素Logistic回归分析结果显示，与HIV-1基因多样性相关的影响因素是无工作（P=0.03）,过去三个月使用新型毒品（P=0.03）,和通过互联网寻找男性性伴侣的方式（P=0.01）。**结论** 北京MSM人群中有较高的HIV-1基因多样性，反映了HIV阳性MSM人群复杂的高危行为。

**关键词：**HIV；二代测序；亚型；基因多样性；共感染

**中图分类号： R512.91 文献标志码：A 文章编号:**

**HIV-1 gene diversity and related factor in MSM population in Beijing** *ZHOU Zhi-han1, ZHANG Jing1, XIN Ruo-lei2, RUAN Yu-hua1, LU Hong-yan2, FENG Yi1, KANG Rui-hua1, LIAO Lin-jie1, SHAO Yi-ming1, XING Hui1.(National Center for AIDS/STD Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 155 Changbai Road, Changping District, Beijing 102206, China)*

Corresponding author: XING Hui, Email: xingh@chinaaids.cn

Supported by National Natural Science Foundation of China(81471962,81261120393)；Beijing Science and Technology Project (D161100000416002)

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**收稿日期：**

**基金项目：**国家自然科学基金（81471962,81261120393）；北京市科技计划项目（D161100000416002）

**作者简介：**周知涵（1991—），男，北京市人，硕士在读，研究方向，艾滋病病毒基因多样性，Email:rtzrricky@163.com

**通讯作者：**邢辉，研究员，硕士生导师，Email:xingh@chinaaids.cn

**Abstract: Objective** To investigate the HIV-1 gene diversity and influencing factors in Beijing MSM population. **Method** A cross-sectional study of HIV-positive MSM population in Beijing MP3 project was conducted to establish an experimental and research method based on the Illumina platform's next generation sequencing technology, while two pol gene regions and one env gene region were analyzed. **Result**  Among the 376 samples tested by NGS, the rate of single subtype is 83.2%(313/376) and the main subtypes were were CRF01\_AE (60.1%, 188/313), CRF07\_BC (27.8%, 86/313), subtype B (10.2%, 32/313), subtype C(1.0%, 3/313) and CRF55\_01B (1.3%, 4/311). While the recombination and superinfection accounted for 8.24% (31/376) and 8.51% (32/376) respectively. The intrasubtype recombination rate was 1.86% (7/376), the intersubtype recombination rate was 7.18% (27/376); the intrasubtype superinfection rate was 1.33% (5/376) and the intersubtype superinfecton rate is 7.18% (27/376). Analysis of relevant influencing factors showed that the risk factors associated with HIV diversity were working status (P=0.03), whether new drugs were used in the past three months (P=0.03), and the way to find male sexual partners (P=0.01).  **Conclusion**  We established experimental and research methods for detecting HIV diversity based on NGS sequencing technology; HIV diversity is associated with working status, the use of new drugs and the way to find male sexual partners through the Internet.

**Key words:** HIV; next generation sequencing; subtype; gene diversity; superinfection

近年我国报道的男男性行为（MSM）人群HIV感染率逐步上升[1] ，而且MSM人群由于其多性伴的原因，报道的新型重组毒株高于其他感染人群。北京地区超过70%的HIV感染人群来自MSM人群，并且在北京MSM人群中已发现CRF01\_AE/07\_BC,CRF01\_AE/B和CRF01\_AE/B/C[2]的等多种新重组毒株出现[3-5]。HIV-1具有极高的复制速度（108-10个病毒/天/人）和较低的逆转录保真性（1-10个碱基突变/复制周期），这使得病毒间高度相似却又不完全相同，其在感染者体内以“准种”的形式存在；如果同一个体感染了一种以上不同种的毒株，病毒复制过程时不同HIV毒株之间可能发生重组，当重组株持续传播时就会形成新的流行重组型（CRF）[6]。随着测序技术的快速发展，二代测序技术已在分析HIV准种的进化、HIV超感染及感染的溯源调查等多个方面有应用的报道[7]。

本研究以北京MSM人群为研究对象，应用Illumina的二代测序平台尝试分析部分感染者中HIV-1基因多样性及相关影响因素。

**1 对象和方法**

**1.1对象**

自我报告过去三个月内发生过男男性行为，现在的居住地为北京，HIV阳性者且未接受抗病毒治疗，年龄≥18岁的男性，自愿参加。

**1.2方法**

1）通过短信、网络、社区外展和同伴推荐等方式于2013年3月-12月在北京地区招募完成。由专业的检验人员采集全血，并由经过专业培训的调查员进行问卷调查，问卷包括一般社会人口学信息，最近3个月毒品的使用和最近3个月性行为和安全套的使用情况等内容。

2）本研究的HIV 阳性感染者采集5ml 全血样本，进行CD4细胞计数，从全血标本分离血浆检测病毒载量。

3）应用QIAGEN病毒RNA Mini提取试剂盒（*QIAGEN* 公司）提取血浆标本中HIV-1 病毒的RNA。设计并合成*pol*基因区的*pol*-1PR和RT*pol*-2区以及*env*区共三个片段的特异性的引物，以血浆中提取的RNA 模板，通过RT-PCR 一步法进行HIV 的pol基因和env 基因区的扩增，再使用Taq PCR MasterMix（天根生化生物，北京，中国）进行巢式PCR扩增相应的目的基因片段。其中pol-1片段长度为318bp，（位于HXB2的2265-2583）pol-2片段长度为311bp（位于HXB2的2509-2820），env区片段长度为382bp（位于HXB2的6973-7355）。

4）本研究二代测序采用Illumina Miseq 二代测序平台。综合考虑已知中国流行的HIV主要标准参考毒株的基因序列，分别从pol 和env 基因选择适当的基因区，参考HIV-1基因型In-house方法的pol和env基因区引物和具体的基因位置，考虑Miseq V2试剂盒的2×250实际测序读长，设计编码特异性的融合引物（Barcode + 特异性引物）。将DNA末端链接“Adaptor”接头序列并进行PCR反应，并用磁珠法回收PCR产物，使用qPCR法对目的片段进行定量。调整各个测定样本的浓度使其达到均一化，将均一化后的样本混合在一起，将上述准备好的文库进行Illumina Miseq上机测序。

**1.3统计学方法**

本研究使用*SAS*（*SAS V.9.4,SAS Institute Inc.,Cary,North Carolina,USA*）进行数据清理和分析，P值小于0.05被认为有统计学意义。其中，因变量为每个个体的HIV基因多样性，被分为单一亚型和非单一亚型。此外，本研究构建了单因素Logistic回归模型用以分析HIV基因多样性与人口统计学特征、相关行为危险因素，基线CD4和病毒载量（VL）之间的关系。对于有统计学意义的单因素变量进行多因素Logistic回归模型分析，结果以95%置信区间和P值表示。

**1.4 HIV基因多样性**

在本研究的HIV基因多样性分析中，以大于等于95%的频率为标准，两个以上扩增片段为同一种亚型且序列数所占的比例均大于等于95%，即认为是单一亚型。两个以上扩增片段为不同亚型且序列数所占的比例均大于等于95%的定义为新型重组样本，包括不同亚型间的重组样本和同一亚型不同亚簇间的重组样本；某基因区扩增片段由两种及以上超过5%的不同序列构成，定义为共感染样本，包括发生在不同亚型间的共感染样本和同一亚型不同亚簇间的共感染样本。本研究中将新型重组和共感染样本统一称为非单一亚型。本研究中，新型重组中的亚型内重组和共感染中的亚型内共感染均只发现于CRF01\_AE亚型内的亚簇间，故亚型内重组和亚型内共感染的情况只针对于CRF01\_AE亚型内。根据冯毅等[8]已经报道的CRF01\_AE的7个流行亚簇为参考株，重新分析亚型内重组和亚型内共感染的情况，并对共感染的样本使用FastTree2.1.9的最大似然法构建系统进化树。

**2 结果**

**2.1 调查对象人口学情况**

对376名男男性行为者进行分析，其中93.4%为汉族，84.8%婚姻状况为未婚，75.3%拥有本科及以上学历，70.5%的人出生于城市，87.5%的工作状况为在职，82.7%没有北京户籍，57.4%年龄小于30岁，54.3%的人月均收入超过5000元，56.1%在北京居住超过4年，52.1%目前为非独居状态。

**2.2 北京MSM人群HIV多样性**

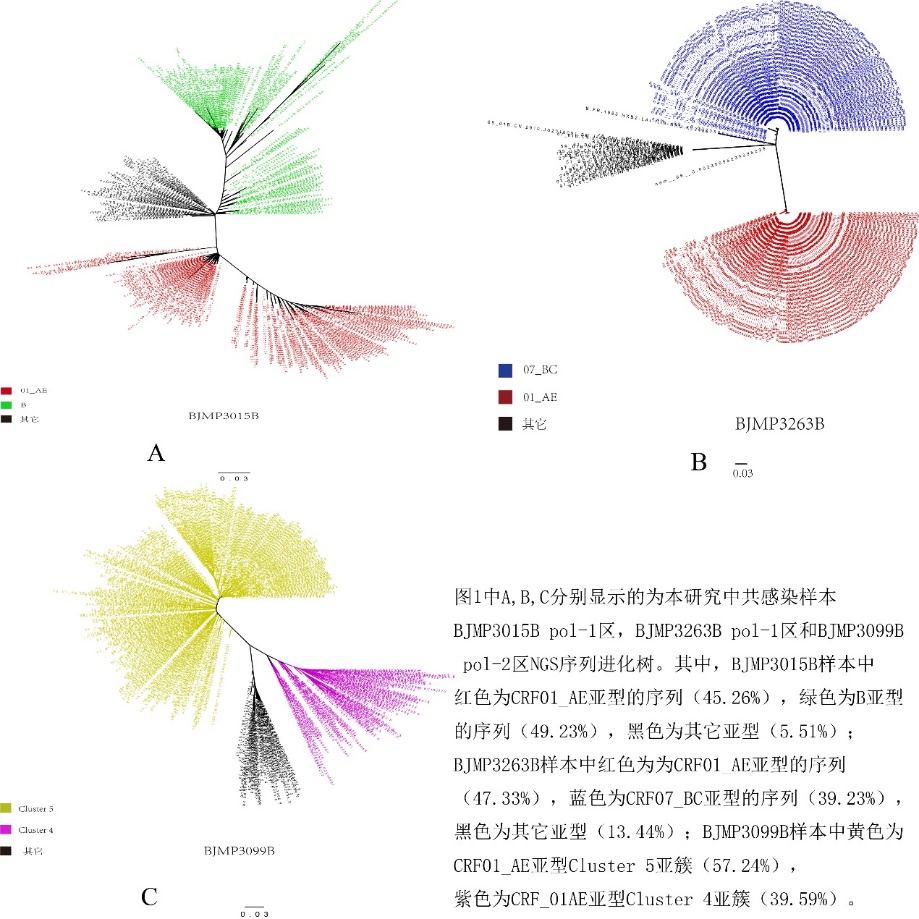
本研究使用Illumina Miseq二代测序平台共检测MSM样本416份， pol-1基因区共扩增成功360例，扩增率为89.5%（360/416），pol-2基因区共扩增成功351例，扩增率为84.4%（351/416），env基因区共扩增成功389例，扩增率为93.5%（389/416）。为研究样本是否发生重组和共感染情况，至少需要考虑pol基因区和env基因区，因此以pol基因区第一段和/或第二段扩增成功以及env基因区扩增成功的样本为研究对象，探讨其基因多样性。以此标准，得到env区和至少一段pol区超深度测序的样本量为376份（90.4%,376/416），样本序列的平均测序深度为12726.80（3429.861，22023.739）条。

在376例患者中共有83.2%（313/376）的样本在片段内以及片段间亚型分布一致，判断为单一亚型。313例单一亚型样本中，亚型主要为CRF01\_AE亚型（60.1%，188/313），其次为CRF07\_BC亚型（27.8%，86/313），另外有32例（10.2%，32/308）为B亚型、3例（1.0%，3/308）为C亚型和4例（1.3%，4/308）为CRF55\_01B，这313例单一亚型样本的亚型与使用sanger法一代测序结果完全一致。63例样本（16.8%）存在不一致情况划分为非单一亚型。按上述非单一亚型标准划分为新型重组样本31例，共感染样本32例。31例新型重组样本中含亚型间重组24例，占总样本376例中的6.4%，亚型内重组7例（1.9%）。32例共感染样本亚型内亚簇间的共感染为5例（1.3%），不同亚型间共感染27例（7.2%）。图1显示的为本研究中共感染样本BJMP3015B pol-1区，BJMP3263B pol-1区和BJMP3099B pol-2区NGS序列进化树。其中，BJMP3015B样本中红色为CRF01\_AE亚型的序列（45.26%），绿色为B亚型的序列（49.23%），黑色为其它亚型（5.51%）；BJMP3263B样本中红色为为CRF01\_AE亚型的序列（47.33%），蓝色为CRF07\_BC亚型的序列（39.23%），黑色为其它亚型（13.44%）；BJMP3099B样本中黄色为CRF01\_AE亚型Cluster 5亚簇（57.24%），紫色为CRF\_01AE亚型Cluster 4亚簇（39.59%）。由图可见共感染样本在单一区段内存在多种亚型共存的情况。

**表1 北京MSM人群中HIV-1基因多样性分布情况**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 变量 | 样本例数 | 构成比（%） |
| 单一亚型 | 313 | 83.2 |
| 新型重组 |  |  |
| 亚型内重组 | 7 | 1.86 |
| 亚型间重组 | 24 | 6.38 |
| 共感染 |  |  |
| 亚型内共感染 | 5 | 1.33 |
| 亚型间共感染 | 27 | 7.18 |
| 合计 | 376 | 100.0 |

**图1 北京MSM人群中非单一亚型样本进化分析图**



**2.3 HIV新型重组样本分析**

31例新型重组样本中包括24例亚型间重组样本和7例亚型内重组样本。其中pol-1区与pol-2区之间亚型间重组样本4例（16.7%，4/24），亚型内重组样本2例（28.6%，2/7）；pol区和env区之间亚型间重组样本20例（83.3%，20/24），亚型内重组样本5例（71.4%，5/7）。

1. 亚型间重组

对于亚型间重组样本，我们对比Sanger和NGS测序结果是否一致，对于结果一致的样本可以认定为重组已发生。我们用Sanger法发现pol和env基因区不一致一般认为可能发生基因重组或有共感染现象存在，只有在检测HIV全长基因后才能认定真正发生了重组。

1. 亚型内重组

为了探讨序列中是否存在亚型内部的重组问题，NGS测序实验结果分析时，我们将新亚型精确到亚簇水平进行分析。根据冯毅等[8]已经报道的CRF01\_AE的7个流行亚簇为参考株，重新分析亚型内重组。根据上述定义标准，结果发现有8例样本发现亚型内亚簇间重组现象，主要为CRF01\_AE中 cluster4和cluster 5之间的重组。

**2.4 共感染样本分析**

共32例共感染样本中包括27例亚型间共感染样本和5例亚型内共感染样本。

1. 亚型间共感染

通过二代测序，我们发现有些样本在每个基因区内存在着多种亚型共存的情况。共发现27例样本同一段基因区中由两种或者两种以上的亚型毒株构成，其中，CRF01\_AE与B毒株间共感染9例，CRF01\_AE与CRF07\_BC毒株间共感染15例，共感染CRF55\_01B与B毒株间共感染1例，CRF58\_01B与B毒株间共感染1例，CRF68\_01B与CRF01\_AE毒株间共感染1例。

1. 亚型内共感染

我们在二代测序结果分析时，把亚型进一步分到亚簇水平。以冯毅等[8]报道的CRF01\_AE的7个流行亚簇为参考株，重新分析亚型内共感染，根据上述定义标准，结果发现，有5例样本发现亚型内共感染，均为CRF01\_AE cluster 4 和 cluster 5间发生的共感染。其中，BJMP3074B为pol-1区段内cluster 4和cluster 5间的共感染；BJMP3085B为pol-1和env区段内cluster 4和cluster 5间的共感染；BJMP3099，BJMP3171B，BJMP3245B为pol-2区段内cluster 4和cluster 5间的共感染。

**2.5 HIV非单一亚型相关因素分析**

应用单变量logistic回归详细分析北京MSM人群社会人口学信息和与HIV多样性相关危险行为的关联性发现与HIV多样性相关的重要危险因素是无工作（P=0.03）,过去三个月使用新型毒品（P=0.03）,和通过互联网寻找男性性伴侣（P=0.01）。在多变量分析中，无工作人群的HIV多样性的概率是有工作人群的2.8倍（95%CI，1.4-5.8）；近三个月使用新型毒品人群HIV多样性是未使用人群的2.0倍（95%，1.1-3.4）；通过互联网寻找男性性伴侣的人群的HIV多样性是通过其他方式寻找男性性伴侣者的6.1倍（95%CI,1.8-20.4）。

**表2 北京MSM人群HIV基因多样性相关危险因素的Logistic回归分析**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 人口学特征 | 人数 | 非单一亚型 (%) | OR (95% CI) | P值 | AOR (95% CI) | P值 |
| 现工作状况 |  |  |  |  |  |  |
| 有 | 329 | 49 (14.9) | 1.0 |  | 1.0 |  |
| 无 | 47 | 14 (29.8) | 2.1(1.1,4.2) | 0.03 | 2.8(1.4,5.8) | 0.01 |
| 近三个月使用新型毒品 |  |  |  |  |  |  |
| 无 | 240 | 32 (13.3) | 1.0 |  | 1.0 |  |
| 有 | 136 | 31 (22.8) | 1.8(1.1,3.1) | 0.03 | 2.0(1.1,3.4) | 0.01 |
| 寻找性伴侣最常用途径 |  |  |  |  |  |  |
| 酒店酒吧等 | 62 | 3 (4.8) | 1.0 |  | 1.0 |  |
| 互联网 | 314 | 60 (19.1) | 5.2(1.6,17.2) | 0.01 | 6.1(1.8,20.4) | <0.01 |
| 合计 | 376 | 63 (16.8) |  |  |  |  |

**3 讨论**

本研究的313例单一亚型样本中，亚型构成为CRF01\_AE亚型（60.1%，188/313），CRF07\_BC亚型（27.8%，86/313），B亚型（10.2%，32/308）、C亚型（1.0%，3/308）为和CRF55\_01B亚型（1.3%，4/308）。2014年报道北京市的主要流行亚型为CRF01\_AE、CRF07\_BC和B亚型[9]，本研究的单一亚型构成比的结果与以往研究中的结果相似。中国的CRF01-AE亚型原主要存在于经异性传播的HIV感染者中, 随后逐渐成为MSM人群中的主要流行亚型。CRF07-BC亚型一直是IDU人群中的主要流行亚型，近年来,CRF07\_BC亚型在我国MSM人群中增长迅速。此种情况的产生可能与MSM人群本身特性相关,例如活跃的无保护性行为、多性伴侣、使用新型毒品等。

本研究以pol基因区第一段和/或第二段扩增成功以及env基因区扩增成功的376名研究对象中，NGS检测到16.8%（63/376）为非单一亚型样本，新型重组和共感染的比例分别为8.2%（31/376）和8.5%（32/376），在63名非单一亚型患者中，新型重组和共感染比例分别为49.2%和50.8%。与其他国家共感染情况相比[10-12]，北京MSM人群之中重组和共感染发生率较高。这表明在北京MSM群体中性行为活跃，造成了不同的毒株间相互作用和重组，并形成了一个复杂的传播网。由于多次的不安全性行为、静脉注射吸毒等行为使得机体增加感染不同HIV病毒株的风险，进而可能引起共感染。机体发生共感染的同时可发生病毒重组[6],使体内病毒的毒株情况复杂，可能进一步导致体内HIV病毒耐药性的发展和抗逆转录病毒治疗失败[13]。本研究中重组和共感染现象的出现均造成了HIV基因多样性的产生。不同的HIV亚型表现出不同的耐药性，并且新产生的变异株可能会出现多重耐药的情况。疫苗一般的设计是针对特定的亚型或毒株因此，我们需要研制可以刺激机体对未来各种可能产生的流行株均发生免疫反应的广谱疫苗。有文献报道，NGS可检测耐药毒株中的共感染[15]，有助于深入探讨耐药、共感染与治疗效果三者的关系。NGS可以帮助监测患者体内共感染[16]，为分析毒株进化多样性、评估病毒复杂度提供更多依据。而NGS的一个局限性在于判断是否为重组毒株时，需要在检测HIV全长基因后与全长测序结果共同验证来获得更加准确的重组结果。

在本研究的376名HIV阳性研究对象中，我们发现HIV-1基因多样性与研究对象目前的就业状况、近三个月是否使用新型毒品以及寻找男性性伴侣的场所有显著关系。无工作、近三个月使用新型毒品以及通过互联网寻找男性性伴侣均会增加个体的HIV重组和共感染率。以往的研究显示使用新型毒品毒品会显著增加MSM人群中HIV传播风险[17]，一些欧美国家的研究中已发现，使用亚硝酸盐类新型毒品会明显加快HIV在MSM人群的传播[18]。这些药物会刺激大脑中的部分区域，进而促进性行为增加，特别是无保护的性行为，这将大大提高HIV感染的概率。新型毒品使用者是HIV感染的高危人群，且在HIV感染者总数中占很大比例。本研究结果显示，近三个月使用新型毒品者的比例为36.2%（176/376），而非单一亚型患者中使用新型毒品者的比例较高，占50%（33/66）。本研究发现的另一个重要的危险因素是利用互联网寻找男性性伴侣，这种方式已逐渐成为中国MSM人群中寻找伴侣的主要方式[19]。有研究使用相同的数据来源，发现与未通过互联网寻找男性性伴侣者相比，使用互联网寻找男性性伴侣的MSM人群更有可能有使用毒品、与男性性伴侣进行被动或无保护的被动肛交行为[19]。由于这种新型社交方式的出现，MSM人群通过网站接收和交换大量信息，这会促进他们之间性活动的增加并进一步促进HIV的传播并导致更多的HIV重组和共感染的出现[20]。互联网的出现为HIV的预防和控制带来了新的挑战，但同时它也可以用于指导高危人群如何在性行为过程中预防HIV的传播。

本研究的一个局限性在于研究对象仅限于北京的MSM人群，因此我们需要验证检查结果的有效性后，招募更多的HIV患者进入研究队列中，以验证结果是否能推广到更广泛的人群中。若想得到更深入的基因复杂度的数据，可对这部分人群继续随访，进行队列研究，进而比较一段时间后，人群中基因的复杂度的变化情况。尽管存在着诸多的局限性，但本研究仍在利用NGS技术检测中国HIV阳性人群中病毒多样性并揭示HIV多样性与社会行为因素之间的关系方面取得了一定的结果。这种类型的测序和研究方法可以应用于全国或全球未来的大规模研究工作。与传统的测序方法相比，NGS技术可以依靠更高的精度和灵敏度大大地提高我们我们对HIV多样性的了解。更好地了解HIV的进化和变异可以未最终预防和个性化治疗HIV提供新的方向和方法。

**参考文献**

[1. Tao J, Vermund SH, Lu H, et al. Impact of Depression and Anxiety on Initiation of Antiretroviral Therapy Among Men Who Have Sex with Men with Newly Diagnosed HIV Infections in China. AIDS Patient Care STDS 2017; 31:96-104.

2. Tao LL, Liu M, Li SM, et al. Impact of Antiretroviral Therapy on the Spread of Human Immunodeficiency Virus in Chaoyang District, Beijing, China: Using the Asian Epidemic Model. Chin Med J (Engl) 2017; 130:32-38.

3. Li Z, Wei H, Feng Y, et al. Genomic characterization of two novel HIV-1 second-generation recombinant forms among men who have sex with men in Beijing, China. AIDS Res Hum Retroviruses 2015; 31:342-6.

4. Li Z, Li J, Feng Y, et al. Genomic characterization of two novel HIV-1 unique (CRF01\_AE/B) recombinant forms among men who have sex with men in Beijing, China. AIDS Res Hum Retroviruses 2015; 31:921-5.

5. Jing Y, Ruolei X, Zheng L, et al. CRF01\_AE/B/C, a Novel Drug-Resistant HIV-1 Recombinant in Men Who Have Sex with Men in Beijing, China. AIDS Research and Human Retroviruses 2015; 31:745-748.

6. Redd AD, Quinn TC, Tobian AAR. Frequency and implications of HIV superinfection. The Lancet Infectious Diseases 2013; 13:622-628.

7. Laehnemann D, Borkhardt A, McHardy AC. Denoising DNA deep sequencing data-high-throughput sequencing errors and their correction. Brief Bioinform 2016; 17:154-79.

8. Li Z, Liao L, Feng Y, et al. Trends of HIV subtypes and phylogenetic dynamics among young men who have sex with men in China, 2009-2014. Sci Rep 2015; 5:16708.

9. 宋映雪, 叶江竹, 辛若雷, et al. 北京地区未经抗病毒治疗的HIV感染者HIV-1毒株耐药基因变异研究. 中国艾滋病性病 2015; 21(10):836-838.

10. Li X, Xue Y, Zhou L, et al. Evidence that HIV-1 CRF01\_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. PLoS One 2014; 9:e89462.

11. Redd AD, Collinson-Streng A, Martens C, et al. Identification of HIV superinfection in seroconcordant couples in Rakai, Uganda, by use of next-generation deep sequencing. J Clin Microbiol 2011; 49:2859-67.

12. Wagner GA, Pacold ME, Kosakovsky Pond SL, et al. Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States. J Infect Dis 2014; 209:1032-8.

13. Hong Luan M, \* Xiaoxu Han, PhD,\* Xiaoou Yu, MD,\* Minghui An, MD,\* Hui Zhang, PhD,\* Bin Zhao, PhD,\* Junjie Xu, PhD,\* Zhenxing Chu, MD,\* and Hong Shang, PhD. Dual Infection Contributes to Rapid Disease Progression in Men Who Have Sex With Men in China. J Acquir Immune Defic Syndr 2017; 75:480–487.

14. Xue J, Cong Z, Xiong J, et al. Repressive effect of primary virus replication on superinfection correlated with gut-derived central memory CD4(+) T cells in SHIV-infected Chinese rhesus macaques. PLoS One 2013; 8:e72295.

15. Pingen M, Nouwen JL, Dinant S, et al. Therapy failure resulting from superinfection by a drug-resistant HIV variant. Antiviral Therapy 2012; 17:1621-1625.

16. Ronen K, McCoy CO, Matsen FA, et al. HIV-1 superinfection occurs less frequently than initial infection in a cohort of high-risk Kenyan women. PLoS Pathog 2013; 9:e1003593.

17. Wang L, Guo W, Li D, et al. HIV epidemic among drug users in China: 1995-2011. Addiction 2015; 110 Suppl 1:20-8.

18. Stephenson KE, D'Couto HT, Barouch DH. New concepts in HIV-1 vaccine development. Curr Opin Immunol 2016; 41:39-46.

19. Liu Y, Qian HZ, Ruan Y, et al. Frequent HIV Testing: Impact on HIV Risk Among Chinese Men Who Have Sex with Men. J Acquir Immune Defic Syndr 2016; 72:452-61.

20. Cui Y, Guo W, Li D, et al. Estimating HIV incidence among key affected populations in China from serial cross-sectional surveys in 2010-2014. J Int AIDS Soc 2016; 19:20609.