

应用系统进化分析作为 HIV 传播关系证据的专家共识

冯毅¹, 钟平², 李敬云³, 潘晓红⁴, 张佳峰⁴, 梁姝⁵, 陈敏⁶, 吴建军⁷, 赵锦⁸, 梁淑家⁹, 辛若雷¹⁰,
安明晖¹¹, 何翔¹², 郝静静¹, 袁丹⁵, 李林³, 韩晓旭¹¹, 廖玲洁¹, 阮玉华¹, 邢辉¹, 邵一鸣¹

(1. 中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心, 北京 102206; 2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200051; 3. 军事医学研究院微生物流行病学研究所, 北京 100071; 4. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310057; 5. 四川省疾病预防控制中心, 成都 610044; 6. 云南省疾病预防控制中心, 昆明 650034; 7. 安徽省疾病预防控制中心, 合肥 230601; 8. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055; 9. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028; 10. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 11. 中国第一医科大学, 沈阳 110001; 12. 广东省公共卫生研究院, 广州 510635)

关键词: 系统进化分析; 艾滋病病毒; 传播; 证据

中图分类号: R 373.9

文献标志码: A

文章编号: 1672-5662(2024)04-0347-07

HIV 主要通过性行为、共用针具吸毒等途径传播,多数由尚未知晓自身 HIV 感染状态的 HIV 感染者传播,但也有知晓自己 HIV 阳性仍然与他人发生高危行为,甚至故意通过无保护高危行为传播他人的 HIV 感染者。故意传播 HIV 的事件尽管报道的不多,但后果严重、影响恶劣,有时还会形成生物恐怖事件,社会危害极大。根据 2013 年 6 月 29 日修订的《中华人民共和国传染病防治法》第七十七条,“单位和个人违反本法规定,导致传染病传播、流行,给他人人身、财产造成损害的,应当依法承担民事责任”^[1]。根据 2019 年 3 月 2 日修订的《艾滋病防治条例》第六十二条,“艾滋病病毒感染者或者艾滋病病人故意传播艾滋病的,依法承担民事赔偿责任;构成犯罪的,依法追究刑事责任”^[2]。对 HIV 传播相关案件进行溯源调查,掌握证据链、揭示事实真相,能够为依法打击故意传播提供依据,维护受害者合法权益,伸张正义,形成震慑,从而有效减少故意传播,对于减少 HIV 传播暨新发感染具有重要的意义。

由于 HIV 在高度复杂的社会网络中传播且具有潜伏感染的特点,认定原告与疑似传播者之间是否存在直接传播关系非常困难。因而司法机关在认定 HIV 传播相关案件事实的过程中,需要综合全案证

据并排除合理怀疑。

流行病学调查是认定传播关系必要的经典方法,通过流行病学调查可以了解传播双方及其他相关人员的 HIV 感染状态、性行为及其他风险行为的社会网络关联关系。但被调查人出于规避责任和隐私保护等动机,自我报告的性行为可能存在偏倚。调查性行为及追踪社会网络等 HIV 传播溯源相关调查的难度很大。严格遵循法医学原则的分子进化分析可以为传播关系的认定或排除提供相对客观的依据。

近年来随着传染病防治法的普及和公民应用法律保护自身权益的意识逐步提升,越来越多的 HIV 传播事件被诉诸法律。目前,全球已有 92 个国家或司法管辖区将 HIV 故意传播定为犯罪,然而我国仍然缺乏可供司法机关参考的应用分子进化分析作为司法证据的标准。在广泛征求国内艾滋病分子进化和流行病学领域专家,特别是具有作为专家证人参与 HIV 传播司法鉴定案件经验的专家的意见和建议后,撰写本共识的专家团队回顾和分析了已发表的国内外相关科学文献,对涉及的方法学应用和标准化等相关问题进行了认真讨论,形成了我国的应用系统进化分析作为 HIV 传播关系证据的专家共识,旨在解释系统进化分析如何用于支持 HIV 传播的事实认定,为 HIV 传播相关案件的审判提供专业参考。

1 HIV 系统进化分析

系统进化学(Phylogenetics, 又称为系统发育学)是生物学的一个领域,被广泛应用于研究和确定不同物种之间的进化关系。系统进化分析(又称为系统发育分析)应用生物信息学计算方法通过基因序

收稿日期:2024-02-26; 修回日期:2024-03-06

基金项目:“十四五”国家重点研发计划(2022YFC2305201);首都卫生发展科研专项项目(首发 2022-1G-3011)

第一作者简介:冯毅(1973—),男,黑龙江省哈尔滨市人,副研究员,主要研究艾滋病病毒分子流行病学和分子网络。Email: fenyi@chinaaids.cn

通信作者:邢辉,研究员 Email: xingh@chinaaids.cn; 邵一鸣,研究员/博士生导师, Email: yshao@bjmu.edu.cn

列的差异评价物种之间遗传关系的远近。

由于HIV高速复制且在复制过程中反转录酶缺乏修正机制,其病毒变异速度非常快,导致任一时刻同一感染个体体内都拥有一群遗传上彼此接近又略有不同的病毒,称为“准种”^[3],且HIV的遗传多样性会随着感染时长、多病毒感染、超感染等情况发生变化^[4]。在传播过程中,这些病毒变异体中的一个或几个被传播给新的宿主,并随后在新感染的个体体内产生新的进化和变异^[5-7]。

HIV系统进化分析(Phylogenetics analysis)利用HIV高进化速率的特点,根据病毒基因序列之间的相似性,确定HIV的来源,并跟踪世界各地的各种HIV毒株。目前系统进化分析已广泛应用于HIV毒株的进化史、系统地理学^[8-9]、分子传播网络和耐药毒株传播^[10-12]等流行病学研究,已经成为表征HIV进化和传播关系的标准方法。此外,HIV系统进化分析还可以用于分析和判断感染者个体之间的传播关系,已经在一些国家作为疑似故意传播HIV案件法庭判决的证据,用以证明或排除疑似传播者和原告之间的传播关系。

2 应用系统进化分析进行HIV传播司法鉴定的案例

自20世纪90年代首次采用系统进化分析对HIV传播进行司法调查以来,国际上公开报道的将系统进化分析作为HIV传播法庭认可证据的事件越来越多。有的被诉诸司法指控故意传播,例如隐瞒感染状况的恶意传播、强奸导致传播等,有的应用于医疗事故鉴定,包括院内感染传播、哺乳引起的传播等。

1990年,美国在审理佛罗里达州一名HIV阳性牙医在侵入性牙科手术过程中将HIV传播给其患者的指控时,首次参照了病毒系统进化分析的结果,判断这名牙医有可能是至少6人感染HIV的源头^[13]。但由于使用的分析方法存在争议,直至该牙医死亡仍未对其提出刑事指控^[14-15]。

1991年,美国疾病预防控制中心针对广受关注的另一名佛罗里达州的HIV阳性牙医导致28名患者感染HIV的指控,对双方的病毒基因序列进行了系统进化分析,认为该牙医与任何一名HIV阳性患者都没有传播关系,因而被免于起诉^[16]。

1992年,瑞典首次将系统进化分析的结果作为判决一名HIV阳性男性犯有故意传播HIV罪的证据^[17]。值得注意的是,卡罗林斯卡学院和斯德哥尔摩皇家理工学院的病毒学家Jan Albert博士在本案

的证词中提道:“需要重点强调的是,即使我们的调查显示罪犯和受害者携带的毒株在流行病学上是相关的,我们依然无法确定传播方向,也不能排除两人都被第三方感染的可能性。因此,病毒基因序列调查的结果必须与其他流行病学信息结合使用”^[18]。

1997年,美国的一位护士指控同医院的一位医生使用HIV血液污染的针具注射而故意使她感染HIV。系统进化分析发现疑似传播的两个毒株之间的关系比它们与对照序列的关系更为密切,提示可能是传播事件,在另一个实验室的重复分析得到了相似的结果,法院认为系统进化分析的证据符合司法标准^[19],被告被判二级谋杀未遂罪处以50年监禁。病毒学家Michael Metzger博士在2002年的一篇文章中详细介绍了他们的方法并提道:“据此,美国法院开创了使用系统进化分析来支持或不支持病毒传播案件判决的先例”^[20]。

自此,越来越多的国家在HIV传播案件起诉中将系统进化分析的结果作为法医证据。其中包括一名澳大利亚男子被起诉强奸一名智力缺陷男子而故意传播HIV^[21];一名丹麦男子因性虐待一名12岁男孩并传播HIV而在被判处6年监禁^[22];一名比利时男子因强奸导致六名女性感染HIV而被起诉^[23]。

系统进化分析也已被用于排除传播关系的证据。例如利比亚HIV医院感染案件。一名实习医生和五名护士被控在1998年故意使400多名儿童感染HIV,导致了当地一家儿童医院的HIV流行。从1999年起,涉事的六名医务人员经历了长达8年的判刑、上诉和最终释放的过程。最终,系统进化分析证据对于排除医护人员罪责,对判决起到了关键的作用^[24-25]。

近年来我国涉及HIV感染的司法案例也越来越多。2015年,云南省报道了一起故意性传播HIV的案件。一名女性指控一名男子隐瞒其为HIV感染者的事实,通过性途径而故意将病毒传播给她。系统进化分析及流行病学结果均支持这一指控,法院采纳这些结果作为证据,支持了案件判决^[26]。浙江省于2021年和2022年分别报道了两起疑似传播者明知自身感染状态,仍与受害人发生男男同性无保护性行为,致其感染HIV的故意传播案例。系统进化分析结果均支持传播关系,其中一起的结果被法院采纳作为证据实施了判罚(被告人犯故意伤害罪,判处有期徒刑七年),另外一起由于其他原因未完成司法程序^[27-28]。

此外,我国也有应用系统进化分析鉴定传播事

实但未进入司法程序的公开报道。例如,2023年,浙江省报道了一起通过HIV分子传播网络分析发现的涉及11例HIV感染者的聚集性疫情。流行病学调查发现其中一名男性感染者于2020年至2022年间在不知自己被HIV感染的情况下与多名女性发生过无保护性行为,引起HIV传播^[29]。该案例是我国第一例公开报道的通过分子传播网络发现的群体传播HIV的事件。同年,四川省报道了一例HIV感染来源不明的儿童。系统进化分析排除了母婴传播和家庭内传播的可能,而曾经为患儿主刀的手术医生HIV抗体确证阳性,与患儿的病毒基因高度相似,且耐药相关基因突变高度一致,因而推断该患儿疑似为医源性HIV感染^[30]。

3 应用系统进化方法分析HIV传播关系的技术流程

采用系统进化方法分析HIV传播关系的主要步骤包括:调查对象背景信息收集以及样本采集、病毒基因扩增及测序、系统进化分析及结果判读。

3.1 调查对象背景信息收集以及样本采集 应用于司法鉴定的HIV传播关系的系统进化分析应严格遵循法医学原则进行调查对象的背景信息收集以及样本采集。

调查对象包括原告(被感染者)、原告本人或相关机构指认的疑似传播者、以及在原告HIV阳转期间与其有高危行为接触的其他HIV感染者。调查未成年人需要其监护人知情同意。

背景信息收集包括原告和疑似传播者的HIV抗体筛查阳性和确证阳性的时间、免疫印迹确证条带、末次HIV检测阴性时间、cART情况、历次病毒载量、CD4细胞计数等。应尽可能完整地收集这些信息,以提高传播关系分析的可靠性。

样本采集与保存。发生疑似HIV传播事件后,应尽早采集原告和疑似传播者的血液样本,包括血浆、全血等。样本采集和保存方法参照《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断》及《全国艾滋病检测技术规范》^[31-32],样本采集、运输和保存过程应严格核对采样对象的身份和样本编号,应有1~2名专业人员在现场见证采样过程。由于越接近传播事件发生的样本越可反映真实的传播关系,因此应尽可能采集距疑似传播事件发生时间最近的血液样本,同时应尽可能调取疾病预防控制或临床机构留存的既往检测样本与新采集的样本共同分析,用于佐证分析结果。由于cART可抑制病毒复制,应尽可能在调查对象接受治疗之前采血。如调查对象采样时未接受cART,

首选血浆样本从病毒RNA中扩增病毒基因片段;如采样时调查对象已接受cART且血浆病毒RNA扩增失败,宜选择全血或其他类型的样本从HIV前病毒DNA中扩增病毒基因片段。

3.2 病毒基因扩增及测序

3.2.1 扩增基因区的选择 由于我国流行的主要是HIV重组毒株,且药物压力或宿主免疫压力可导致毒株趋同进化,单基因片段的系统进化分析可能会导致误判,因此应扩增至少两个基因片段加以分析,可相互验证,以提高结果的可靠性。由于*pol*(PR-RT)基因区序列被常规用于耐药基因型检测,公开数据库中有大量*pol*区序列可用做参考序列,因此应首选*pol*基因进行扩增^[7],辅以*env*和/或*gag*基因区。但由于*pol*区序列可能受到药物的选择压力而发生耐药基因突变,为避免趋同进化的干扰,应删除耐药突变位点后进行分析。此外,基因序列越长提供的系统进化信息越多,分析结果越可靠,必要时也可以扩增半长或近似全长HIV序列(Near full length genome, NFLG)。

3.2.2 测序方法的选择 链末端终止法(Sanger法)是目前HIV测序的常规方法,但仅能获得病毒准种每个基因片段的一条共享序列。Sanger法测序可用于判定病毒的基因亚型并初步判断传播关系,早期报道的案例多数仅采用Sanger测序数据进行分析。考虑到病毒在感染者体内以准种形式存在,为了提高分析的可靠性,推荐采用单基因扩增测序法(Single Genome Amplification, SGA)、克隆测序法或深度测序方法(包括二代测序和三代测序)从每个基因片段获得多条病毒基因序列^[33-37]。深度测序技术能够获得每个感染者的多个病毒序列,检出低丰度的病毒基因序列,提升传播关系判断的可信度,甚至可以提示传播方向^[35-37]。但深度测序技术检测和分析难度大、成本高,技术难以标准化,推断传播方向仍存在例外的情况,需谨慎对待^[38]。

3.3 系统进化分析 常用的HIV系统进化分析方法包括计算基因距离、基因特征分析、构建系统进化树等。计算基因距离时可以选择不同的模型(如TN93)计算每两条序列之间的基因距离并将结果进行分组比较。特别是需比较原告和疑似传播者之间的基因距离与原告和对照序列之间的基因距离是否存在显著差异。基因特征分析应重点分析原告和疑似传播者的序列是否存在区别于对照序列的标志性基因位点或基序(motif)。系统进化树(phylogenetic tree,又称为系统发育树)是一种呈现病毒遗传进化

关系的树状图。其结果涵盖了基因距离和基因特征信息,是系统进化学(phylogenetics)的核心方法。进化树中每个分支代表一个感染者的毒株,内部合并的节点代表推断的共同祖先。具有高度遗传相似性毒株的基因序列在进化树上聚集成簇,从而提示毒株间的亲缘关系,两组病毒序列间的进化关系可能反映两个个体之间的流行病学关系。

常用的构建系统进化树的方法有邻接法(Neighbor-Joining, NJ)^[39]、最大似然法(maximum-likelihood, ML)^[40]和贝叶斯法(Bayesian)^[41]等。邻接法通过确定基因距离最近的(相邻的)成对分类单元使进化树的总距离最小,循环地将相邻点合并成新的点,最终形成完整的树,具有计算速度快、计算量较小的优势。最大似然法比邻接法的结果更可靠,但选择合适的模型才能得出正确的结果,而且计算量大,对计算机性能的要求高。贝叶斯法基于先验理论构建系统进化树,与最大似然法类似,构建的系统进化树可靠性高,由于整合了分子钟假设,在推断共同祖先时间,判断进化方向上比最大似然法具有优势,但贝叶斯法需要设定先验模型,且计算速度较慢。

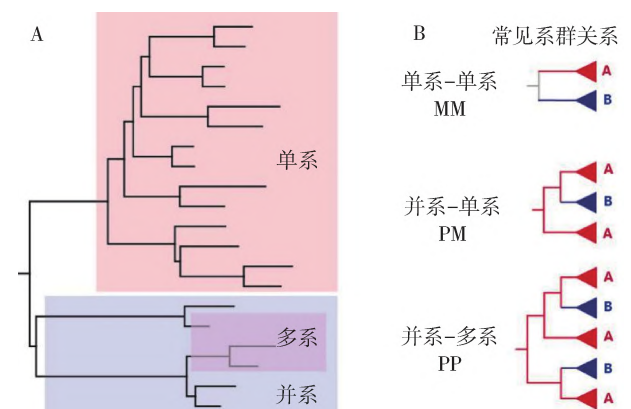
构建系统进化树包括以下几个关键步骤:1)选择合适的参考序列。参考序列应包括 HIV 分型参考序列和对照序列。调查对象的 HIV 系统进化分析应置于当地 HIV 流行的背景下研判,应科学选择对照序列,包括足够的个体数量、与调查对象具有相似的流行病学背景特征等,并合理利用公开或内部数据库检索到的基因距离相近的序列^[7,18];2)使用基因序列比对软件将调查对象的序列与参考序列对齐。可以选择 ClustalW、MAFFT、Muscle 等软件,也可以选择 HIVAlign、Gene Cutter 等在线分析工具^[42];3)构建系统进化树并对进化树节点进行可靠性检验^[41,43]。建议采用两种以上方法构建进化树,比较进化树关键分支和节点的拓扑结构,避免单一分析方法系统误差造成的误判,提高分析的可靠性。

3.4 系统进化树分析结果的解读

3.4.1 根据单条病毒基因序列判断传播关系 如仅基于 Sanger 法获得的单条基因序列判定传播关系,应着重比较调查对象之间及调查对象与对照之间病毒基因序列的相似性,从而判断毒株之间的关系。如果在进化树上受害者和疑似传播者的病毒基因序列分支位于一个独立的节点之下,并得到可靠性检验的支持,相互之间的基因距离显著小于与对照序列之间的基因距离,就表明二者属于同一家系,进化

上具有传播关联,但需考虑存在间接传播的可能,且分析结果不能提示传播方向^[7,18]。不满足上述条件则表明无直接传播关联。

3.4.2 根据多条病毒基因序列判断传播关系 由于 HIV 感染者体内的病毒以准种形式存在,采用单基因测序、克隆测序或者深度测序获得调查对象的多条病毒基因序列进行系统进化分析可为传播关系判断提供更多信息。但多条基因序列的系统进化树呈现复杂的拓扑结构,需考虑调查对象的多条序列在系统进化树呈现的单系、并系和多系类群关系。HIV 系统进化分析中单系群(monophyletic)指由一组病毒的最近共同祖先及其所有后代组成的类群;并系类群(paraphyletic)指由最近共同祖先及其一些后代组成的类群;而多系群(polyphyletic)指一组缺乏最近共同祖先的不相关的病毒(图 1A)^[44]。系群关系分析可以提高受害人和疑似传播者之间传播关系判断的可靠性,甚至提示可能的传播方向^[7]。但系统进化的系群关系复杂,存在多种可能,因而需要由有经验的专家谨慎解读。



注: A:单系、并系和多系拓扑结构;B:存在传播关联的两人常见系群关系

图1 拓扑结构与系群关系

3.4.3 考虑多种传播可能和路径 无论是应用单条序列还是多条序列的系统进化分析,解释结果都不应仅考虑受害人和疑似传播者。即便涉案双方在进化上存在传播关联,二者之间也不一定具有直接传播关系,必须考虑间接传播的可能性。假设两名 HIV 感染者 A 和 B 分别为受害人和疑似传播者,在系统进化树中观察到的二者存在传播关联,在现实中至少存在六种可能的情景(图 2)。前两种情景表明 A 和 B 具有直接传播关系(第 1、第 2 种情景),其他四种情况表明存在间接传播关系,例如 A 与 B 之间存在第三方感染者(第 3、第 4 种情景),或者 A 和 B 由一

个或者多个病毒株相似的第三方感染(第5、第6种情景)(图2)。系统进化中存在传播关联的两人通常存在单系-单系、并系-单系和并系-多系3种系群关系的拓扑结构。可以依据系群关系结果推断调查对象双方感染发生的早晚,从而提示传播方向,但同样不能排除几种间接传播的可能(图1B)。系群关系分析十分复杂,需要由经验丰富的专家讨论解读,本文不详述。



图2 系统进化树显示传播关联的两人(A和B)现实中存在可能的传播情景

3.4.4 系统进化分析结合感染时间分析,有助于判断传播关系及传播方向。感染发生的时间分析对于判断传播关系十分重要,应确保受害者与疑似传播者发生感染的时间与当时的感染状态不矛盾^[45]。除了血清学检测(如HIV抗体阳转时间、HIV抗体亲和力检测判断新近感染等)可以帮助估计HIV感染的时间,结合分子钟模型的系统进化分析,通过分析多条病毒基因序列,估计调查对象毒株共同祖先株产生的时间,从而缩小感染时间推断的范围,并为判断传播方向提供依据。但如感染者由多个病毒传播建立感染,推断的共同祖先株产生时间可能远远早于实际发生传播的时间,因而,基于分子钟假设推断感染时间也应由专家讨论解读,避免误判。

4 质量控制

采用系统进化分析方法推断HIV传播关系,包括流行病学信息采集、样本收集、样本检测、系统进化分析的全流程中每个环节都应采取严格的质量控制措施。检测人员、分析人员应为实验室认证认可体系文件中指定的人员,具备相应的检验和分析资质。实验室环境、仪器设备、试剂及耗材应该符合《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》^[46]和《全国艾滋病检测技术规范》^[32]的相关要求。检测和分析过程应严格依照符合《全国艾滋病检测技术规范》^[32]要求的实验室标准操作规程(SOP)。样本核酸提取、扩增、检测与分析均应合理设置对照。为了减少实验室错误和调查者偏倚,校正系统进化分析潜在的干扰因素。可采用两个独立的实验室盲法测

试,将编盲的两套样本分别送到两个具备资质的实验室进行检测分析。分析完成后揭盲,核实信息后经集体讨论得出分析结论。

5 主要共识意见

基于上述应用系统进化分析鉴定HIV传播涉及的关键环节和存在的科学问题,专家团队参考国际上针对此问题的专家共识意见^[18,47-49]和综述性文章^[7,38],经认真讨论,形成如下9点主要共识意见:

1)应用于HIV传播关系司法鉴定的系统进化分析不同于常规的分子流行病学调查,调查对象的背景信息收集以及样本采集需严格遵循法医学原则;

2)发生疑似HIV传播事件后,应尽早采集原告和疑似传播者的血液样本,并调取疾病预防控制中心或临床机构留存的既往检测样本;

3)扩增至少两个基因片段加以分析,结果可相互验证,可通过扩增测序半长或近全长HIV序列以提高结果的可靠性;

4)合理利用公开和可获得的内部数据库,选择与调查对象流行病学背景特征相似的对照序列,并保证足够的对照序列数量;

5)系统进化分析的全流程中每个环节都应采取严格的质量控制措施;

6)应由两个独立的具备资质实验室盲法测试,结果相互验证;

7)仅依靠系统进化分析不能证明原告和疑似传播者存在直接传播关系,当系统进化结果显示存在传播关联时,须考虑间接传播或双方均由第三方感染的可能性;

8)系统进化分析结果与原告的指控不一致时,可以排除存在传播关系的可能;

9)系统进化分析的结果应由专家讨论谨慎判读,不宜作为决定性结论,仅作为支持性证据。

近年来,系统进化分析用于支持HIV传播司法鉴定证据的公开报道越来越多,表明该方法可以为流行病学意义上的传播关系认定提供重要支持。基因测序技术和系统进化学的不断发展也从科学上逐步提升了传播关系鉴定的可靠性。但必须认识到系统进化分析结果受到HIV变异速率、传播建立时间长短和是否接受cART等多种因素的影响^[47]。此外,单病毒或多病毒建立感染、双重感染或超感染等HIV感染的复杂性也可对系统进化分析成簇情况、系群关系、感染时间和传播方向判断带来影响^[47,50-52]。但是单凭系统进化分析不能最终推断出两个遗传序列之间的直接关系,认定涉案双方存在

传播关系,需结合其他流行病学调查和其他相关证据、结合排除多种可能的例外情况^[18,47-48]。但当系统进化分析结果与原告指控不一致时,可以排除存在传播关系的可能,为疑似传播者开脱罪责^[18,47]。鉴于上述复杂情况且目前国际上系统进化分析的方法也尚未标准化,分析和解读过程中应充分了解该技术的局限性,认识到在HIV传播关系司法认定过程中,系统进化分析结果不宜作为决定性结论,应作为支持性证据置于所有可用证据背景下合理使用^[18,47,49]。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 《中华人民共和国传染病防治法》[EB/OL]. (2013-06-29) [2024-01-05]. http://www.npc.gov.cn/zgrdw/npc/zfjc/zfjcelys/2018-06/15/content_2056044.htm.
- [2] 《艾滋病防治条例》[EB/OL]. (2019-03-02) [2024-01-05]. https://www.gov.cn/zhengce/202203/content_3337873.htm.
- [3] GOODENOW M, HUET T, SAURIN W, et al. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies; evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1989, 2(4): 344-352.
- [4] RAMBAUT A, POSADA D, CRANDALL KA, et al. The causes and consequences of HIV evolution [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(1): 52-61. DOI: 10.1038/nrg1246.
- [5] TULLY DC, OGILVIE CB, BATORSKY RE, et al. Differences in the selection bottleneck between modes of sexual transmission influence the genetic composition of the HIV-1 founder virus [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12(5): e1005619. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005619.
- [6] LI H, BAR KJ, WANG SY, et al. High multiplicity infection by HIV-1 in men who have sex with men [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(5): e1000890. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000890.
- [7] ABECASIS AB, PINGARILHO M, VANDAMME AM. Phylogenetic analysis as a forensic tool in HIV transmission investigations [J]. *AIDS*, 2018, 32(5): 543-554. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001728.
- [8] FARIA NR, RAMBAUT A, SUCHARD MA, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations [J]. *Science*, 2014, 346(6205): 56-61.
- [9] PYBUS OG, SUCHARD MA, LEMEY P, et al. Unifying the spatial epidemiology and molecular evolution of emerging epidemics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(37): 15066-15071. DOI: 10.1073/pnas.1206598109.
- [10] BEZEMER D, CORI A, RATMANN O, et al. Dispersion of the HIV-1 epidemic in men who have sex with men in the Netherlands: a combined mathematical model and phylogenetic analysis [J]. *PLoS Med*, 2015, 12(11): e1001898; discussion e1001898. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001898.
- [11] RAGONNET-CRONIN M, LYCETT SJ, HODCROFT EB, et al. Transmission of non-B HIV subtypes in the United Kingdom is increasingly driven by large non-heterosexual transmission clusters [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(9): 1410-1418. DOI: 10.1093/infdis/jiv758.
- [12] PINEDA-PENA AC, SCHROOTEN Y, VINKEN L, et al. Trends and predictors of transmitted drug resistance (TDR) and clusters with TDR in a local Belgian HIV-1 epidemic [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e101738. DOI: 10.1371/journal.pone.0101738.
- [13] OU CY, CIESIELSKI CA, MYERS G, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice [J]. *Science*, 1992, 256(5060): 1165-1171. DOI: 10.1126/science.256.5060.1165.
- [14] CENTERS FOR DISEASE CONTROL CDC). Possible transmission of human immunodeficiency virus to a patient during an invasive dental procedure [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1990, 39(29): 489-493.
- [15] BUDOWLE B, HARMON R. HIV legal precedent useful for microbial forensics [J]. *Croat Med J*, 2005, 46(4): 514-521.
- [16] JAFFE HW. Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS [J]. *Ann Intern Med*, 1994, 121(11): 855. DOI: 10.7326/0003-4819-121-11-199412010-00005.
- [17] ALBERT J, WAHLBERG J, LEITNER T, et al. Analysis of a rape case by direct sequencing of the human immunodeficiency virus type 1 pol and gag genes [J]. *J Virol*, 1994, 68(9): 5918-5924. DOI: 10.1128/JVI.68.9.5918-5924.1994.
- [18] BERNARD EJ, AZAD Y, VANDAMME AM, et al. HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigations of HIV transmission [J]. *HIV Med*, 2007, 8(6): 382-387. DOI: 10.1111/j.1468-1293.2007.00486.x.
- [19] LEITNER T, ALBERT J. Reconstruction of HIV-1 transmission chains for forensic purposes [J]. *AIDS Rev*, 2000, 2: 241-251.
- [20] LEMEY P, VAN DOOREN S, VAN LAETHEM K, et al. Molecular testing of multiple HIV-1 transmissions in a criminal case [J]. *AIDS*, 2005, 19(15): 1649-1658. DOI: 10.1097/01.aids.0000187904.02261.1a.
- [21] MACHUCA R, JØRGENSEN LB, THEILADE P, et al. Molecular investigation of transmission of human immunodeficiency virus type 1 in a criminal case [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8(5): 884-890. DOI: 10.1128/CDLI.8.5.884-890.2001.
- [22] METZKER ML, MINDELL DP, LIU XM, et al. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(22): 14292-14297. DOI: 10.1073/pnas.222522599.
- [23] MYERS G. Molecular investigation of HIV transmission [J]. *Ann Intern Med*, 1994, 121(11): 889-890. DOI: 10.7326/0003-4819-121-11-199412010-00012.
- [24] DE OLIVEIRA T, PYBUS OG, RAMBAUT A, et al. Molecular epidemiology: HIV-1 and HCV sequences from Libyan outbreak [J]. *Nature*, 2006, 444(7121): 836-837. DOI: 10.1038/444836a.
- [25] BUTLER D. Molecular HIV evidence backs accused medics [J]. *Nature*, 2006, 444(7120): 658-659. DOI: 10.1038/

- 444658b.
- [26] CHEN M, MA YL, YANG CJ, et al. The combination of phylogenetic analysis with epidemiological and serological data to track HIV-1 transmission in a sexual transmission case [J]. PLoS One, 2015, 10 (3): e0119989. DOI: 10.1371/journal.pone.0119989.
- [27] 张佳峰. 系统进化用于判别MSM故意传播HIV案例的报告[Z]. 第七届全国艾滋病学术大会-艾滋病病毒学研究与应用分论坛报告, 2021.
- [28] ZHANG JF, FAN Q, LUO MY, et al. Phylogenetic evidence of HIV-1 transmission linkage between two men who have sex with men [J]. Virol J, 2021, 18 (1): 106. DOI: 10.1186/s12985-021-01573-5.
- [29] 唐慧玲, 蒋均, 虞妮娜, 等. 浙江省一起非婚非商业异性性传播HIV聚集性疫情调查.[J]. 中华流行病学杂志, 2023, 44 (8): 1270-1275.
- [30] 周场, 何勤英, 吴学庆, 等. 分子流行病学在追溯1例儿童HIV-1感染来源中的应用[J]. 中国艾滋病性病, 2021, 27 (10): 1070-1074.
- [31] 卫生行业标准《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断》(WS 293—2019).[S] [EB/OL]. (2019-01-02) [2023-07-01]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/s9491/201905/6430aa653728439c901a7340796c4723.shtml>.
- [32] 《全国艾滋病检测技术规范(2020年修订版)》[EB/OL]. (2020-05-18) [2024-01-18]. https://ncaids.chinaacdc.cn/xxgx/jszl/202005/t20200518_216798.htm.
- [33] SILJIC M, SALEMOVIC D, CIRKOVIC V, et al. Forensic application of phylogenetic analyses – Exploration of suspected HIV-1 transmission case [J]. Forensic Sci Int Genet, 2017, 27: 100-105. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.12.006.
- [34] SCADUTO DI, BROWN JM, HAALAND WC, et al. Source identification in two criminal cases using phylogenetic analysis of HIV-1 DNA sequences [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(50): 21242-21247. DOI: 10.1073/pnas.1015673107.
- [35] ZHANG YF, WYMANT C, LAEYENDECKER O, et al. Evaluation of phylogenetic methods for inferring the direction of human immunodeficiency virus (HIV) transmission: HIV prevention trials network (HPTN) 052 [J]. Clin Infect Dis, 2021, 72(1): 30-37. DOI: 10.1093/cid/ciz1247.
- [36] LI WY, HUANG SW, WANG SF, et al. Source identification of HIV-1 transmission in three lawsuits Using Ultra-Deep pyrosequencing and phylogenetic analysis [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2021, 54 (4): 596-605. DOI: 10.1016/j.jmii.2019.12.002.
- [37] ZHOU ZH, MA P, FENG Y, et al. The inference of HIV-1 transmission direction between a man who has sex with men and his heterosexual wife based on the sequences of HIV-1 quasi-species [J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 1209-1216. DOI: 10.1080/22221751.2021.1938693.
- [38] TODESCO E, WIRDEN M, CALIN R, et al. Caution is needed in interpreting HIV transmission chains by ultra-deep sequencing [J]. AIDS, 2019, 33(4): 691-699. DOI: 10.1097/QAD.0000000000002105.
- [39] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4 (4): 406-425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- [40] EDWARDS A, SFORZA LC. The reconstruction of evolution [A]. In: WINTHER RG, (eds) Phylogenetic Inference, Selection Theory, and History of Science [C]. London: Cambridge University Press; 2018: 15-16.
- [41] SUCHARD MA, LEMEY P, BAELE G, et al. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10 [J]. Virus Evol, 2018, 4(1): vey016. DOI: 10.1093/ve/vey016.
- [42] 美国洛斯阿拉莫斯国家实验室 HIV 数据库 [EB/OL] [2023-07-01]. <https://www.hiv.lanl.gov/>.
- [43] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.
- [44] HENNIG W. Phylogenetic systematics [M]. Illinois: University of Illinois Press, 1966.
- [45] MOLLIDRE S, SMITH AKJ. Reassessing the ethics of molecular HIV surveillance in the era of cluster detection and response: toward HIV data justice [J]. Am J Bioeth, 2020, 20 (10): 10-23. DOI: 10.1080/15265161.2020.1806373.
- [46] 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法(卫医发〔2010〕194号)》[EB/OL]. (2010-12-10) [2024-01-05]. <http://www.nhc.gov.cn/zwgkzt/pyzgl1/201012/49981.shtml>.
- [47] BARRÉ-SINOUSSE F, ABDOOL KARIM SS, ALBERT J, et al. Expert consensus statement on the science of HIV in the context of criminal law [J]. J Int AIDS Soc, 2018, 21 (7): e25161. DOI: 10.1002/jia2.25161.
- [48] TREJO A, MCCLELLAND A. MOLECULAR HIV SURVEILLANCE: A GLOBAL REVIEW OF HUMAN RIGHTS IMPLICATIONS [EB/OL]. (2021-10-20) [2024-01-05]. <https://www.hivjusticeworldwide.org/en/mhs/>.
- [49] 联合国开发计划署. GUIDANCE FOR PROSECUTORS on HIV-related criminal cases [EB/OL]. (2021-06-07) [2024-01-05]. <https://www.undp.org/publications/undp-guidance-prosecutors-hiv-related-criminal-cases>.
- [50] GAO Y, HE S, TIAN W, et al. First complete-genome documentation of HIV-1 intersubtype superinfection with transmissions of diverse recombinants over time to five recipients [J]. PLoS Pathog, 2021, 17 (2): e1009258. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009258.
- [51] ROLLAND M, TOVANABUTRA S, DEARLOVE B, et al. Molecular dating and viral load growth rates suggested that the eclipse phase lasted about a week in HIV-1 infected adults in East Africa and Thailand [J]. PLoS Pathog, 2020, 16 (2): e1008179. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008179.
- [52] VAN DER KUYL AC, JURRIAANS S, BACK NKT, et al. Unusual cluster of HIV type 1 dual infections in Groningen, The Netherlands [J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011, 27 (4): 429-433. DOI: 10.1089/aid.2010.0175.