

乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点

夏国良 Omana V Nainan 贾志远 刘洪斌 罗述斌 李荣成 曹慧霖
刘崇柏 Harold S Margolis

R51 A

【摘要】 目的 研究乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)基因型和血清亚型的分布特点及其基因的相关性。方法 湖南、广西、河南和河北 4 省(区)25 个县(市)280 例慢性 HBV 携带者,应用聚合酶链反应(PCR)扩增和脱氧核糖核酸(DNA)序列分析,确定 HBV 基因型和血清亚型。结果 HBV 基因型 B、C 和 D 均有分布,分别占 29.3%、67.9% 和 2.9%,其中 B 和 C 为优势基因型。adr、adw2、ayr、ayw1、ayw2 和 ayw3 等 6 种血清亚型均有分布,其中 adr 和 adw2 为优势血清亚型,分别占 64.3% 和 31.4%。基因型 B 与 adw2 血清亚型,基因型 C 与 adr 血清亚型有非常密切的基因相关性。280 例 HBV 携带者表面抗原基因序列每 100 个核苷酸的平均置换频数为 2.94。基因型 B(adw2 血清亚型)毒株核苷酸置换频数为 5.63(5.48),而基因型 C(adr 血清亚型)仅为 1.6(1.51)。结论 HBV 基因型和血清亚型的分布均有明显的地区性;基因型 B 及相对应的 adw2 血清亚型毒株的基因可变性明显高于基因型 C 及相应的 adr 血清亚型。

【关键词】 肝炎病毒,乙型;流行病学,分子;基因型;血清亚型

Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China

XIA Guoliang*, Omana V Nainan, JIA Zhiyuan, et al.* Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China

【Abstract】 **Objective** To determine the distribution and genetic relationship of hepatitis B virus (HBV) genotypes and subtypes. **Methods** HBV genotypes and subtypes were determined by PCR and DNA sequencing among 280 chronic HBV carriers in 25 counties of 4 provinces (Hunan, Guangxi, Henan and Hebei) in China. **Results** Genotype B, C and D were detected in these regions. Genotypes C and B were the majority genotypes of HBV with 190 out of 280 (67.9%) genotype C, 82 (29.3%) genotype B, and 8 (2.9%) genotype D. Adr, adw2, ayr, ayw1, ayw2 and ayw3 subtypes were determined among these carriers. Adr and adw2 subtypes were the leading subtypes of HBV, taking up 64.3% and 31.4%, respectively. Adr subtype was completely encoded by genotype C while majority of adw2 subtype was encoded by genotype B. An average rate nucleotide substitutions of 2.94 was seen among 280 Chinese HBV sequences. The average rate of nucleotide substitutions of genotype B (adw2 subtype) was 5.63 (5.48), but only 1.6 (1.51) for genotype C (adr subtype). **Conclusion** The results suggested that there were significant differences in geographic distribution of HBV genotypes and subtypes; genotype B, in which mostly consistent with adw2 subtype, was a higher variable than genotype C (adr subtype).

【Key words】 Hepatitis B virus; Molecular epidemiology; Genotype; Subtype

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染在世界各地均有不同程度的流行,但地区差异非常明显^[1]。国家间和国内地区间流行程度的差异,除与卫生状况、生活习惯、人体免疫遗传特征等因素明显

相关外,无疑与病毒本身生物学特性(基因型、血清亚型、基因变异等)也有关。应用免疫学试验,按表面抗原共同抗原决定簇 a 和另外二组相互排斥的抗原决定簇 d/y 和 w/r,可将 HBV 表面抗原分为 4 个血清亚型(adr, adw, ayr, ayw)。70 年代中期以来,按主要抗原决定簇亚型的组合,可将 HBV 细分为 9 个血清亚型(ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq⁺, adrq⁻)^[2-5]。依照感染人类 HBV 全基因组系统进化的分析结果,又可将 HBV 分为 6 个基因型(A~F)。HBV 基因组序列分析现已成为描述

基金项目:国家“九五”科技攻关项目(96-906-03-02)

作者单位 100052 北京,中国预防医学科学院病毒学研究所肝炎室(夏国良、贾志远、曹慧霖、刘崇柏);Hepatitis Branch, Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, USA (Omana V Nainan, Harold S Margolis);河北省卫生防疫站(刘洪斌);湖南省卫生防疫站(罗述斌);广西壮族自治区卫生防疫站(李荣成)

病毒学特征的重要方法。可应用 HBV 基因序列数据来寻找和追踪传染源、分析病毒进化史,也可进行血清分型分析^[5,6]。初步研究发现 HBV 基因型与血清亚型间有一定的基因相关性,但 9 个血清亚型与 6 个基因型间内在的关系目前并不清楚;HBV 基因型和血清亚型分布的地区性非常明显,但对国内地区间 HBV 基因型和血清亚型分布特点的了解尚少。我国 HBV 感染流行强度的地区差别是否与 HBV 基因型和血清亚型等病原生物学因素相关也有待调查。

对象与方法

1. HBV 携带者标本:280 例慢性 HBV 携带者的血清标本均为独立的个体,来自湖南(92 例)、广西(60 例)、河南(48 例)和河北(80 例)4 省(区)共 25 个乙型肝炎疫苗试点区和疾病监测点(县、市)。其中 97 例系在新生儿完成全程免疫后,1~14 年的随访观察中收集的乙型肝炎疫苗免疫后携带者(国家“七五”至“九五”重点科技攻关项目——乙型肝炎疫苗预防效果的随访者),年龄 2~15 岁(平均 7.8 岁,男、女分别为 52 例和 45 例)。其余 183 例为未免疫携带者,均来自 1992 年全国肝炎流行病学调查时低温保藏的携带者血清标本^[1],其中 95 例为未免疫的儿童携带者(2~15 岁,平均 7.8 岁,男、女分别为 51 例和 44 例),免疫后携带者的年龄和性别构成与未免疫携带者可相比;另 88 例为未免疫的育龄妇女(21~35 岁,平均年龄 31.5 岁)。

2. HBV 表面抗原基因的聚合酶链反应扩增和脱氧核糖核酸序列分析:按文献^[7]报告的巢式聚合酶链反应(nest-PCR)方法扩增携带者血清标本的表面抗原基因。外寡核苷酸扩增引物为:HBV409:5'-CAT CCT GCT GCT ATG CCT CAT CT(HBV nt 409~431)和 HBV703A:5'-CGA ACC ACT GAA CAA ATG GCA CT (nt 680~703)。nest-PCR 扩增的内引物为:HBV458:5'-GGT ATG TTG CCC GTT TGT CCT CT(nt 458-480)和 HBV686A:5'-GGC ACT AGT AAA CTG AGC CA (nt 667~686)。

血清 HBV DNA 提取的操作步骤简介如下:40 μ l 血清加入 20 μ l 3 倍裂解缓冲液(420 mmol/L NaCl, 30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 45 mmol/L MgCl₂, 1.5% Nonidet P-40) 37 $^{\circ}$ C 30 min,室温 1 h,然后 95 $^{\circ}$ C 加热 10 min 后,将混合物在 10 000 r/min

离心 5 min。取 7.5 μ l 上清作为 PCR 扩增的模板,PCR 扩增反应按文献^[7]报告的方法进行。

应用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物,应用 ABI Prism dRhodamine 测序反应试剂盒进行测序循环反应,应用 ABI 377 自动序列测定仪进行测序。

3. 数据分析:所有 HBV 携带者 HBsAg 基因 DNA 序列数据(HBV nt494~679),1999 年已录入美国 GenBank 数据库,数据检索号从 AF198683 至 AF198963。应用 GCG 软件分析确定 HBV 基因型和基因特点。根据 HBV HBsAg DNA 序列推导的氨基酸序列,按 122、127、134、159 和 160 位氨基酸组成确定 HBsAg 的抗原决定簇和亚决定簇。应用 SPSS 软件分析整理分子流行病学数据。

结 果

1. HBV 基因型和血清亚型在我国 4 省(区)的分布:将我们测定的 HBV HBsAg 基因序列与美国 GenBank 中 HBV 标准株相比较,确定 HBV 基因型。以 HBV HBsAg 基因序列推导的氨基酸序列确定血清亚型。表 1 显示 HBV 基因型和血清亚型在我国 4 省(区)的分布。280 例 HBV 携带者,共检测到 B、C 和 D 等 3 种 HBV 基因型,其中 B 和 C 是优势基因型,分别占 29.3% (82/280) 和 67.9% (190/280),基因型 D 比例较少,仅占 2.9%。HBV 基因型在 4 省(区)的分布,经卡方检验和似然比检验(likelihood ratio),基因型的构成在 4 省(区)间差别有非常显著性(似然比为 104.2, $P < 0.01$),基因型 B 和 C 在广西和湖南均常见,而河南和河北主要为基因型 C。adr、adw2、ayr、ayw1、ayw2 和 ayw3 等 6 种血清亚型均有分布,adr 和 adw2 为优势血清亚型,分别占 64.3% (180/280) 和 31.4% (88/280),其他血清亚型所占比例较小(仅 4.3%)。经卡方检验和似然比检验分析,HBV 血清亚型在 4 省(区)的构成差别有非常显著性(似然比为 92.9, $P < 0.01$)。adr 和 adw2 在广西和湖南均常见,而河南和河北主要为 adr 血清亚型。

2. HBV 基因型与血清亚型间的基因相关性:经配比分析,180 例 adr 血清亚型样本 100% 归类为基因型 C;88 例 adw2 血清亚型样本 77 例(87.5%)归类为基因型 B,8 例(9.1%)为基因型 C,3 例(3.4%)为基因型 D。经卡方检验和似然比检验分析,HBV 基因型与血清亚型间基因相关关系非常显

表1 HBV 基因型和血清亚型在我国 4 省(区)的分布

调查地区	检测例数	HBV 基因型的分布*			HBV 血清亚型的分布**		
		B	C	D	adr	adw2	ayr/w
湖南	92	52(56.5)	37(40.2)	3(3.3)	35(38.0)	51(55.4)	6(6.6)
广西	60	25(41.7)	31(51.7)	4(6.7)	27(45.0)	29(48.3)	4(6.7)
河南	48	4(8.3)	43(89.6)	1(2.1)	42(87.5)	5(10.4)	1(2.1)
河北	80	1(1.3)	79(98.8)	-	76(95.0)	3(3.8)	1(1.3)
合计	280	82(29.3)	190(67.9)	8(2.9)	180(64.3)	88(31.4)	12(4.3)

注:括号外数字为例数,括号内数字为百分率;* HBV 基因型分布似然比为 104.2, $P < 0.01$; ** HBV 血清亚型分布似然比为 92.9, $P < 0.01$

著($\chi^2 = 300.5$, 似然比 301.8, $P < 0.01$)。adr 血清亚型与基因型 C 有非常明确的基因相关性,基因型 B 与 adw2 血清亚型间基因相关性也很强。

3. HBV HBsAg 基因核苷酸置换的频数:表 2 显示 280 例慢性 HBV 携带者 HBsAg 基因序列(HBV nt494~679),每 100 个核苷酸置换的平均频数为 2.94。按基因型和血清亚型分层分析,基因型 B 毒株的核苷酸置换频数显著高于基因型 C,分别为 5.63 和 1.6($t = 29.5$, $P < 0.01$);adw2 血清亚型毒株核苷酸置换频数显著高于 adr 血清亚型,分别为 5.48 和 1.51($t = 28.3$, $P < 0.01$)。基因型 D 及 ayr/w 血清亚型病例太少,不是优势毒株,没有进行组间分析比较。

表2 280 例慢性 HBV 携带者 HBsAg 基因核苷酸置换的频数

HBV 基因型和血清亚型(样本数)	核苷酸置换频数*($\bar{x} \pm s$)
基因型 C(190)	1.60 ± 1.09
B(82)	5.63 ± 0.87
D(8)	7.56 ± 1.03
血清亚型 adr(180)	1.51 ± 1.01
adw2(88)	5.48 ± 1.20
ayr/w(12)	5.72 ± 2.40
合计	2.94 ± 2.24

* 以 280 个 HBV 表面抗原基因序列(nt494~679)的共同序列为参照,样本每 100 个核苷酸被置换的频数

讨 论

HBV 感染的流行强度在我国有明显的地区性^[1],其原因目前尚不完全清楚。应用现代分子流行病学研究方法来描述 HBV 感染在我国的分布,可进一步掌握乙型肝炎的流行规律,并更有针对性地开展预防和控制工作^[2,8]。我们分析了部分地区 HBV 基因型和血清亚型的分布及其特点。结果显示:基因型 B 和 C 在湖南等 4 省(区)为优势基因型,分别占 29.3% 和 67.9%,其分布有明显地区性,广西和湖南基因型 B 和 C 均常见,而河南和河北主要是基因型 C。

应用 HBV HBsAg 基因扩增产物基因序列直接

进行血清分型,不但分析精确,也毋需进行免疫学检测,是进行 HBV HBsAg 血清分型的新途径^[3,4]。我们发现 adr、adw2、ayr、ayw1、ayw2 和 ayw3 等 6 种血清亚型均有分布,adr 和 adw2 为优势血清亚型,地区间血清亚型分布有明显差别,与 1979 年全国肝炎流行病学调查应用免疫检测进行血清分型的结果相一致。

经配比分析研究发现:adr 血清亚型与基因型 C 相对应;adw2 血清亚型主要与基因型 B 相对应。由此提示,可根据其中一种分型结果初步推导另一种分型结果^[4]。

280 例 HBV 携带者 HBsAg 基因平均每 100 个核苷酸置换频数仅为 2.94,提示 HBV HBsAg 基因相当保守^[5,6,9]。基因型 B 及相应的 adw2 血清亚型毒株基因可变性明显高于基因型 C 及相应的 adr 血清亚型,这是否是我国南方地区乙型肝炎流行更为严重的病原生物学基础,有待进一步研究。

(本文实验研究由美国疾病控制中心资助,并在该中心肝炎实验室完成)

参 考 文 献

- 1 Xia GL, Liu CB, Cao HL, et al. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general Chinese population. Results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D and E virus infections in China, 1992. International Hepatology Communications, 1996, 5: 62-73.
- 2 Magnus LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. Intervirology, 1995, 38: 24-34.
- 3 Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. J Gen Virol, 1992, 73: 3141-3145.
- 4 Norder H, Hammas B, Lofdahl S, et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. J Gen Virol, 1992, 73: 1201-1208.
- 5 Magnus L, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus, large-scale analysis using a new genotyping method. J Infect Dis, 1997, 175: 1285-1293.

- 6 Bollyky PL, Holmes EC. Reconstructing the complex evolutionary history of hepatitis B virus. *J Mol Evol*, 1999, 49: 130-141.
- 7 Nainan OV, Cromeans TL, Margolis HS. Sequence-specific, single-primer amplification and detection of PCR products for identification of hepatitis viruses. *J Virol Meth*, 1996, 61: 127-134.
- 8 Mulyanto F, Tsuda F, Karossi AT, et al. Distribution of the hepatitis B surface antigen subtypes in Indonesia: implications for ethnic heterogeneity and infection control measures. *Arch Virol*, 1997, 142: 2121-2129.
- 9 Patricia AR, Norder H, Visona KA. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central American reflected in the genetic variability of the small gene. *J Infect Dis*, 1997, 176: 851-858.

(收稿日期: 2001-04-15)

(本文编辑: 张林东)

· 短篇报道 ·

甲型肝炎减毒活疫苗与麻疹减毒活疫苗联合免疫的实验研究

张世勇 高秋菊 张勇 侯通 夏建玲 刘新立

RS11 B

甲型肝炎减毒活疫苗(甲肝疫苗)与死疫苗如乙型肝炎(乙肝)疫苗、免疫球蛋白联合免疫的研究已有报道^[1],但与麻疹减毒活疫苗(麻疹疫苗)的联合免疫尚未见报道,为此,对甲肝疫苗与麻疹疫苗联合免疫的血清学效果进行了观察,报告如下。

1. 材料与与方法:(1)接种对象及分组:从石家庄市郊区筛选 HAV 抗体(抗-HAV)阴性的 5-10 岁健康儿童 160 人,分别接种杭州及昆明产甲肝疫苗,接种杭州苗 80 人,其中 20 人同时接种麻疹疫苗;接种昆明苗 80 人,其中 30 人同时接种麻疹疫苗。接种后 1 年对所有接种者又加强了 1 针甲肝疫苗,初免后 1 年半采集接种者血,检测抗-HAV。(2)接种方法及副反应观察:在每名接种对象上臂三角肌附着处外缘皮下接种一剂甲肝疫苗(1.0 ml),部分人同时在另侧上臂相应位置接种 1 剂麻疹疫苗(0.2 ml)。于每次接种 24、48、72 h 后观察局部及全身副反应。(3)疫苗来源:初免甲肝疫苗均购自疫苗批发单位,分别由杭州(H₂株)和昆明(H₂株)两厂家生产,批号分别为 950830 和 950811,滴度均在 10^{6.5} TCID₅₀/ml 以上,每剂 1 ml。加强免疫用甲肝疫苗由杭州生产(批号:960615)。麻疹疫苗由卫生部北京生物制品研究所生产(批号:95017-1)。(4)抗-HAV 检测:使用浙江医学科学院酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂进行抗体检测,试剂批

号:9512, cutoff = $(\bar{P}_x + \bar{N}_x)/2$, 用 ω/s 表示结果, $\omega/s \geq 1.0$ 为阳性[cutoff(ω)为临界值, \bar{P}_x 为阳性对照光密度均值, \bar{N}_x 为阴性对照光密度均值, s 为样本光密度值]。

2. 结果:(1)副反应观察:接种后 24、48、72 h 未见局部和全身严重副反应,少数仅有注射部位的红肿热痛,但均在 2 d 后消失。(2)甲肝疫苗及甲肝与麻疹疫苗联合免疫 1 年半后的血清学效果见表 1。

两厂家生产的甲肝疫苗加强免疫后抗-HAV 阳性率均达到 100%。杭州苗组其单纯甲肝疫苗免疫与联合免疫的抗-HAV GMT 差异无显著性($t = 0.32, P = 0.74$),而在昆明苗组,联合免疫后的 GMT 要显著高于单纯甲肝疫苗免疫($t = 0.17, P = 0.03$);杭州苗组与昆明苗组其联合免疫及单纯免疫后的 GMT 间差异无显著性($t_{\text{联合}} = 1.87, P = 0.07; t_{\text{单纯}} = 0.00, P = 1$)。

3. 讨论:甲肝疫苗与麻疹疫苗的联合免疫研究中,联合免疫后的副反应发生率未见明显上升,一般仅为注射部位红肿热痛。从本研究来看,麻疹疫苗与甲肝疫苗一起接种,至少两种疫苗之间不存在相互抑制,从联合免疫后抗-HAV 的 GMT 要高于甲肝疫苗单纯免疫来看,甚至可以认为两种疫苗间还存在相互促进现象,具体机制有待进一步研究。

表1 甲肝疫苗与麻疹疫苗联合免疫后的抗-HAV 检测结果

免疫种类	杭州产疫苗				昆明产疫苗			
	检测人数	阳性人数	阳性率(%)	GMT	检测人数	阳性人数	阳性率(%)	GMT
甲肝疫苗+麻疹疫苗	16	16	100.00	6.17	26	26	100.00	7.19
甲肝疫苗	47	47	100.00	4.99	47	47	100.00	4.99

注:GMT 为抗 HAV 几何平均滴度(1:)

参 考 文 献

- 基金项目:国家“九五”科技攻关项目(03-01-01)
- 作者单位:050011 河北省石家庄市卫生防疫站流行病科(张世勇、侯通、刘新立);解放军白求恩军医学院(高秋菊);河北医科大学(张勇);石家庄市郊区卫生防疫站(夏建玲)
- 1 李凌奇,夏胜,王枝新,等. 甲型肝炎病毒 H₂ 株减毒活疫苗与乙型肝炎血源疫苗同时接种的效果观察. *中国公共卫生*, 1994, 10: 529-530.

(收稿日期: 2001-04-20)

(本文编辑: 杨莲芬)