

HBV基因分型方法在家系传播研究中的应用

王全立¹ 蒋豫图² 唐时幸² 张习坦² 田 辛² 马立人¹ 刘耀清¹ 王玉琴³

摘要 本文报告了河北省一个自然村乙型肝炎的血清流行病学研究结果。HBsAg 阳性率为3.75%，HBV总感染率为27.65%，属于低发区；其成因可能与人群特征（献血员占多数）和HCV感染率高（10.31%）有关。经二项分布拟合分析，抗-HBc和HBV总感染率有家庭聚集性，并且主要是父母对其子女的传播和子女之间的水平传播所致。HBV DNA 阳性率为24.77%（27/109），大多数（72.22%）家庭成员感染者之间为同一HBV基因型。在HBV亚型基因分类的基础上，将HBV的家庭传播划分为家系世代、水平、隐性、内外混合传播型和家系不传播型及未定型等六种。

关键词 乙型肝炎病毒 家庭聚集

在乙肝高发区，家庭内传播包括配偶之间、双亲与其子女之间和子女之间的传播是造成HBV感染家庭聚集性的主要因素^[1,2]。将HBsAg亚型分类用于家系传播的研究屡见报道^[3]，但有关将HBV的基因型分类用于该研究的并不多见。我们对此做了初步探讨。

对象与方法

一、调查对象：选择河北省某自然村的全体1岁以上人群为整群抽样调查对象。于1992年1月由专职人员进行询问调查、填表和采静脉血5ml；5岁以下儿童采颈静脉血5ml，分离血清后-20℃保存待检。采血、调查率为77.51%（586/756），其中男76.31%（306/401）、女78.87%（280/355）。完整户调查采血率为70.45%（124/176）。

二、检测方法：

1. HBV感染的血清学标记（HBV-M）用北京四环生物生化制品厂的ELISA试剂盒；抗-HCV检测用本院基础所的ELISA试剂盒，S/CO≥1.0判为阳性。

2. HBsAg亚型检测为AGID/RPHA法，为中国药品生物制品检定所试剂。

3. HBV-DNA检测及分型为PCR法。按文献^[4]提取DNA，用本所研制的试剂盒。

HBV-DNA分型：① w^-/r^+ 亚型基因扩增方法：4×dNTP150μmol/L，引物（HBS1/HBS3）0.4μmol/L，MgCl₂ 1.5μmol/L，Taq DNA聚合酶1u/50μl 体积。热循环参数：94℃30s→64℃40s→72℃100s。② d^+/y^- 亚型基因扩增：4×dNTP200μmol/L，MgCl₂ 2.0μmol/L，去离子甲酰胺5%。热循环参数：94℃30s→65℃30s→72℃100s。结果判断：两次扩增均阳性为 adr 亚型，第1次阳性、第2次阴性为 ayr 亚型，第1次阴性、第2次阳性为 adw 亚型，两次均阴性为 ayw 亚型。

三、统计学方法：二项分布拟合与 χ^2_{MH} 检验按文献^[5]进行。

结 果

一、总的HBV感染情况：本次调查对象586人中，HBsAg阳性率为3.75%；HBV总感染率为27.65%，性别间无显著差异，而各年龄组间的差别显著，有与年俱增的趋势（表1）。

二、HBV DNA的检测及亚型分类：在22个受检家庭的109名成员中，HBV DNA检

1. 军事医学科学院放射医学研究所 100850 北京

2. 军事医学科学院微生物流行病学研究所

3. 中国药品生物制品检定所

表1 河北某村人群HBV感染率

年龄 (岁)	检测 人数	HBV-M阳性人数					合 计	
		HBsAg	HBeAg	抗-HBs	抗-HBe	抗-HBc	阳性人数	%
1~	137	5	3	13	10	20	28	20.44
10~	80	3	0	8	7	14	20	25.00
20~	124	1	1	13	9	21	31	25.00
30~	96	6	1	11	8	18	21	25.00
40~	63	3	0	12	6	15	21	43.75
50~	49	3	0	7	9	16	19	38.78
≥60	37	1	1	8	2	13	19	51.35
合计	586	22(3.75)	6(1.02)	72(12.29)	51(8.70)	117(19.97)	162	27.65

OR_{MH}=0.96, 95%CI: 0.86~0.93; M-F: $\chi^2_{MH}=0.5426$, $P>0.99$; 年龄: $\chi^2=19.0563$, $df=6$, $P<0.05$

*同时有多项指标阳性者只按1人计

出率为24.77% (表2)。其中HBsAg阳性家庭占77.27% (17/22)。

表2 HBV-DNA检测结果

HBV-M	检测 HBV-DNA	
	数	阳性数
HBsAg/HBeAg	2	2
HBsAg, HBeAg/抗-HBc	3	2
HBsAg	2	1
抗-HBc, HBe	6	3
HBsAg/抗-HBc	5	2
HBsAg/抗-HBe, HBc	8	2
抗-HBc	10	2
抗-HBs	5	1
HBsAg/抗-HBc, HBe, HBs	1	0
抗-HBc, HBe, HBs	5	0
抗-HBc, HBs	3	0
None-HBVM	59	12
合 计	109	27(24.77%)

按 HBV-DNA 进行基因型分类, *adr* 占 81.48% (22/27), *adw* 7.41% (2/27), *ayw* 11.11% (3/27); 亚型一致家庭为 5/6, 不一致的为 1/6。HBsAg 亚型分类结果为: *adr* 63.64% (14/22), *adw* 9.09% (2/22), *ayr* 4.55% (1/22), *ayw* 22.73% (5/22); 亚型一致家庭为 2/5, 不一致的为 3/5。在

HBsAg和HBV DNA 均为阳性者中, 亚型一致的为 7/9, 不一致的为 2/9。如果以 HBV 基因型为准, 结合表型分类, 则亚型一致家庭为 71.43% (10/14), 不一致的为 23.57% (4/14)。

三、抗-HCV抗体: 总的抗-HCV阳性率为 10.31% (59/572), 其中 99 份 HBV DNA 检测者的为 9.09% (9/99), 只有 1 例 HBV DNA 与抗-HCV同时阳性。

四、家庭传播关系:

1. 家庭聚集性分析: 在所有 HBV-M 中, 只有抗-HBc 和 HBV 总感染有家庭聚集性 (表 3)。

2. 家庭成员之间的传播关系:

① 父母对其子女的传播: 父母 HBV-M 均阳性的子女 HBV 的感染率为 70.59% (12/17), 高于阴性者的子女 26.39% (19/72, $\chi^2=9.9691$, $P<0.005$; $r_n=0.46$, $OR=6.69$, $OR_{95\%CI}$ 为 1.46~30.66)。

② 配偶之间: 考虑到结婚年限可能为混杂因素, 所以以此分层分析配偶之间的 HBV 传播关系, 结果无显著性差别。

③ 子女之间: 以父母 HBV 感染状况作分层调整, 长子女 HBV 感染增加了次子女感染的危险性 (表 4)。

表3 HBV感染家庭分布与二项分布拟合度的 χ^2 检验结果

HBV-M	每户阳性人数	实际数 (O)	理论数 (T)	O-T	(O-T) ²	(O-T) ² /T	P 值
HBsAg	0	106	103.6613	2.3387	5.4695	0.0528	>0.5
	≥1	18	20.3887	-2.3387	5.4695	0.0528	
						0.1056	
抗-HBc	0	53	41.6324	11.3676	129.2223	3.1039	<0.01
	1	44	50.7782	-6.7782	45.9440	0.9048	
	2	16	24.7732	-8.7732	76.9690	3.1069	
	≥3	11	6.8161	4.1839	17.5050	2.5682	
						9.6838	
抗-HBe	0	89	95.8319	-6.8319	46.7161	0.4875	>0.05
	≥1	35	28.1650	6.8350	16.7172	1.6587	
						2.1462	
抗-HBs	0	76	78.9254	-2.9254	8.5580	0.1084	>0.05
	1	39	37.7484	1.2516	1.5665	0.0415	
	≥2	9	7.3262	1.6738	2.8016	0.3821	
						0.5323	
						0.5323	
总的HBV-M	0	42	30.3824	11.6172	134.9593	4.4420	<0.01
	1	47	49.3446	-2.3446	5.4971	0.1114	
	2	20	32.0596	-12.0596	145.4340	4.5361	
	≥3	15	12.2162	2.7838	7.7495	0.6314	
						9.7242	

表4 子女之间HBV的传播

		S2			OR	95%CI	χ^2	P(精确概率)
		+	-	合计				
	S1	+	9	15	3.90	1.35~11.27	6.8470	<0.025
		-	10	65				
	合计*	19	80	99				
F+M+	S1	+	1	6	0.33	0.02~1.98	0.0232	>0.25 (1.0)
		-	2	4				
	合计	3	10	13				
F+M-	S1	+	0	3	0.35	0.01~2.00	0.4167	>0.50 (0.4560)
		-	3	8				
	合计	3	11	14				
F-M+	S1	+	3	1	15	0.98~228.91	2.4242	>0.10 (1.0)
		-	2	10				
	合计	5	11	16				
F-M-	S1	+	5	5	14.33	2.61~78.84	9.3790	<0.005 (0.0028)
		-	3	13				
	合计	8	48	56				

F: 父亲, M: 母亲; +: HBV-M阳性, -: HBV-M阴性; S1: 长子女, S2: 次子女

* $r_n=0.49$ $OR_{MH}=3.02$, 95%CI: 1.27~7.20; $\chi^2_{MH}=6.2123$, $P<0.025$

讨 论

本次调查结果表明, 该村的HBsAg 阳性率和HBV 总感染率均低于已往北京郊区的调查结果^[2]。但有报告指出, 在河北省境内确实存在HBV感染低发区, 如河北平山县农村5岁以下儿童的HBV总感染率为22.3%, HBsAg阳性率为1.3%, 比本次调查结果还低^[6]。该村是一个献血员基地, 大部分青壮年长期献血, 其HBV感染率低下可能与经常发现HBsAg阳性和ALT升高者而注意防止交叉传染有关。本村的抗-HCV阳性率比较高(10.31%), 几乎与住院病人相近, 高于其他地区^[7]。在9例抗-HCV阳性者中, 只有1例HBV DNA阳性, 这可能是该村HBV感染率低下的另一原因; 已有报道HCV感染对HBV复制有抑制作用^[8]。

在124个完整家庭中, 用二项分布拟合法分析了HBV感染的家庭聚集性。与其他作者的结果不同^[1,2], 只有抗-HBc和HBV总感染率呈现家庭聚集性, 可能系调查人数少的缘故。另外, 对于特殊分布资料可能要用不同的统计学方法。谭红专等用G统计量分析确定抗-HBc有家庭聚集性, 而用二项分布分析则没有^[1]。

利用PCR技术, 在无HBV标记的59人中检出12例HBV DNA阳性者(20.34%), 使HBV总感染率增加了11.01%, 显示出该方法的优点。这在HBV亚型分类中更为重要; 因为HBsAg阳性者只有22人, 如果仅凭该指征去验证家系传播关系, 则只有5个家庭可以确定。而两类分型方法的结合, 则可以确定14个家庭的HBV传播关系。在本研究中, 亚型一致的家庭占大多数(71.43%, 10/14), 与以往HBsAg表型分类的研究结果一致^[3]; 并且与血清学感染标记分析的趋势一致, 存在父母与子女之间和子女之间的传播(表4)。在HBV亚型分类的基础上, 将HBV的家庭传播划分为以下六种类型: 家系世代、水平、内外混合和

隐性传播型, 家系不传播型和未定型。

因为HBV感染的各种标记处于动态变化之中, 而以上六种类型的划分只是基于横断面调查的结果, 所以尚需前瞻性研究的验证。另外, 由于同一社区内的HBV感染者多为同一亚型, 所以亚型不一致可以肯定是家系外感染, 而亚型一致尚不能肯定是家系传播所致, 应该进一步做基因序列分析加以肯定^[10]。

(参加本项工作的还有周育森、鲍作义、赵秋敏、李丽等同志, 谨此致谢)

Application of HBV Gene Subtyping Method in Study on Familial Transmission Wang Quanli, et al., Institute of Microbiology and Epidemiology, Military Academy of Medical Sciences, Beijing 100071

A cross-section epidemiological study for hepatitis B was conducted in the population of a village in Hebei Province. The prevalence rate of HBsAg was 3.75% (22/586), and HBV infection rate, 27.65% (162/586), without significant difference between males and females; and increasing with age. This village belongs to a low HBV incidence region in China. This phenomenon might possibly be related to the characteristic of the population (mostly blood donors) and high incidence of HCV (prevalence rate of anti-HCV was 10.31%, 59/572). The anti-HBc and overall HBV infection rate showed family clustering by binomial distribution analysis. The family clustering of HBV infection resulted mainly from the transmission from parents to their children and among the children. The overall positivity rate of HBV DNA was 24.77% (27/109), and the majority of the family members belonged to the same subtypes (72.22%). On the basis of HBV subtyping, familial transmission of HBV was classified into six types, ie. generational, horizontal, recessive, intra- and extra-familial, non-familial and undetermined ones.

Key words Polymerase chain reaction
Hepatitis B virus Family clustering

参 考 文 献

- 1 谭红专, 肖亦境, 吴彭年, 等. 某农场148个家庭HBV感染的家庭聚集性分析. 中华预防医学杂志, 1989, 23(3): 135.
- 2 李敬云, 蒋豫图, 野京城. 乙型肝炎病毒感染标记的农村家庭分布规律. 军事医学科学院院刊, 1991, 15(3): 164.
- 3 黄雪卿, 邢玉兰, 周少莲, 等. 北京地区HBsAg亚型分布特征. 中华流行病学杂志, 1988, 9(1): 1.
- 4 Wands JR, Lieberman HM, Muchmore E, et al. Detection and transmission in chimpanzees of hepatitis B virus-related agents formerly designated "non-A, non-B" hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79: 7552.
- 5 杨树勤主编. 中国医学百科全书《医学统计学》. 第1版. 上海: 上海科技出版社, 1985. 5~35.
- 6 张玉成, 史蕴华, 任银海, 等. HBV低感染村儿童HBV感染的动态观察. 实用儿科杂志, 1991, 6(2): 88.
- 7 庄辉, 从全国病毒性肝炎防治学术研讨会看我国病毒性肝炎研究进展. 中国公共卫生, 1991, 7(11): 504.
- 8 Liaw YF, Lin SM, Sheen IS, et al. Acute hepatitis C virus superinfection and HBsAg elimination. Infection, 1991, 19(4): 250.
- 9 黄宝明, 陈奇珠, 陈雄炯, 等. 乙肝疫苗阻断夫妻间传播乙型肝炎的效果观察. 中国公共卫生, 1992, 8(3): 134.
- 10 Lin HJ, Lai CL, Lauder IJ, et al. Application of hepatitis B virus (HBV) DNA sequence polymorphisms to the study of HBV transmission. J Infect Dis, 1991, 164(2): 284.

(收稿: 1992-10-27 修回: 1993-03-15)

兰州市实施乙肝疫苗免疫接种后学龄前儿童 抗-HBs水平调查报告

唐焕文 马芳玉

我市从1987年开始, 先后在城区42所设有产科的县级以上医院, 开展了以母婴阻断为主的乙肝疫苗接种工作。1989年后又将接种对象扩大到全部新生儿; 并使接种率保持在92%以上。为了考核工作成效, 于1992年对部分学龄前儿童进行了乙肝抗-HBs检测。现将情况报告如下。

一、对象与方法: 按群体分层抽样法, 调查市辖2区1县8个点337名2~6岁儿童。抗-HBs试剂由上海实业科华生物技术有限公司提供。检测用酶联免疫吸附法(ELISA), 操作步骤及结果判定按照试剂盒说明书进行。

二、结果:

1. 抗-HBs阳性率: 在调查的337名儿童中, 检出抗-HBs阳性者160名, 阳性率47.48%。

2. 不同年龄抗-HBs阳性率: 在调查的5个年龄组中, 除6岁组抗-HBs阳性率较低为37.70%(23/61)外; 2~5岁阳性率依次为49.25%、50.77%、42.86%及54.32%。

3. 城、乡抗-HBs阳性率: 城区调查175名, 抗-HBs阳性率为75.43%(132/175); 农村调查162名, 阳性率为17.28%(28/162)。城区儿童抗-HBs阳

性率约为农村的3.4倍。

4. 不同免疫史抗-HBs阳性率: 以往曾经注射过乙肝疫苗者抗-HBs阳性率高达82.14%(115/140); 未注射或不详者抗-HBs阳性率仅为22.84%(45/197)。

5. 抗-HBs阳性率与1988年调查结果比较: 此次抗-HBs阳性率与1988年我市用同样方法在同一人群调查的阳性率12.79%(33/258)相比, 增高了2.7倍。

三、讨论: 本次调查阳性率比4年前的结果高出2.7倍, 且城区抗-HBs阳性率3倍于农村, 说明近年来我市城区医院坚持进行新生儿乙肝疫苗免疫接种成效显著。

查阅疫情资料, 我市1991和1992年2~6岁儿童乙肝年发病率分别为77.13/10万和62.76/10万; 1992年发病率较前一年下降了14.55%。发病率的下降也显示出乙肝疫苗免疫后的效果。

本文提示我们, 为了更有效地降低乙肝发病, 保护儿童健康, 今后除继续加强医院接种外, 还应逐步向农村推进扩大接种范围, 纳入计划免疫管理。

(收稿: 1992-12-17)

本文作者单位: 甘肃省兰州市卫生防疫站 730030