

· 基础理论与方法 ·

病例父母对照研究

易洪刚 陈峰

【摘要】 目的 介绍病例父母对照研究的设计及统计分析方法。方法 以TIVS7-2等位基因与人类神经管缺损关联研究为实例,采用单体型相对风险(HRR)分析、基因型相对风险(GRR)分析、传递/不平衡检验(TDT)等方法进行统计分析。结果 采用HRR分析,HRR=1.33($\chi^2=1.4618$, $P=0.2266$);采用GRR分析, $\Psi_1=1.26$, $\Psi_2=0.98$ ($\chi^2_{(2)}=3.1809$, $P=0.2038$);采用TDT其值为1.4516($P=0.2283$)。提示TIVS7-2等位基因与神经管缺损有微弱关联,但HRR经检验差异均无统计学意义。结论 病例父母对照设计使用患者双亲作为对照,避免了人群分层现象,可以用来检测与疾病发病相关的基因及评价基因与环境暴露的交互作用。

【关键词】 流行病学;关联;基因;交互作用;传递/不平衡检验

Case - parental control study YI Hong-gang, CHEN Feng. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: CHEN Feng

【Abstract】 Objective To introduce the methodology on the design and statistical method as well as analysis of published data related to case-parental control study. **Methods** Data from a research on association between the human neural tube defects and the T allelic variant TIVS7-2 was analyzed by haplotype relative risk (HRR), genotype relative risk (GRR) and transmission/disequilibrium test (TDT) methods. **Results** Using the HRR method, HRR value was 1.33 (chi-square statistic is 1.4618 with $P=0.2266$). The results of the GRR method showed that Ψ_1 value was 1.26 and Ψ_2 value was 0.98 (chi-square statistic is 3.1809 with 2 df, $P=0.2038$). The transmission/disequilibrium test showed that TDT was 1.4516 with $P=0.2283$. All results suggested that when a weak association of TIVS7-2 allele with neural tube defects was found, there was no evidence showing the statistical difference. **Conclusion** The case-parental control design method avoids population stratification when parents used as controls. This method might be used to test the association between genes and disease, as well as to evaluate the gene environmental interaction.

【Key words】 Epidemiology; Association; Gene; Interaction; Transmission/disequilibrium test

复杂性疾病 (complex disorder) 的致病基因的研究已经成为当代医学研究的新热点^[1]。关联分析是一种用来研究特定遗传标记 (genetic marker) 与疾病关联的一种方法。由于这种方法易于实施且对于基因定位非常有用,因而在分析复杂遗传性疾病时发挥了重要的作用。病例对照研究就是其中之一,该设计通过比较大量病例和种族相似的无关联对照中变异等位基因的频率,来评估这种变异基因与疾病的关联。但是由于许多人群都是根据种族而分层,且遗传背景很难测量,同时还因为在不同的种族间遗传标记的频率存在差别,不恰当地选择对照就会使病例组和对照组之间有不同的遗传背景,从

而产生虚假关联 (spurious association)。因而在用传统的病例对照设计研究遗传因素时,选择恰当的对照非常重要同时又是非常的困难^[2]。近年来在流行病学方法中出现了许多新的研究设计,病例父母对照研究 (case-parental control study) 就是其中的一种。由于使用患者及其双亲作为研究对象 (患者间没有关联),避免了传统病例对照研究在致病基因研究方面的缺陷。近年来该设计出现了许多统计分析方法,在研究疾病发病机制中的遗传作用以及环境与基因的交互作用 (interaction) 方面该设计也得到广泛的应用。现将这些方法简介如下。

基本原理

由于患者及其双亲具有相似的遗传背景, Rubinstein 等^[3]和 Falk, Rubinstein^[4]提出了在病例

对照研究中使用双亲作为对照来研究疾病关联的一种新设计,称之为病例父母对照研究。他以没有关联的患者及其双亲为研究对象,对患者及其父母进行基因分型,并且收集患者的环境因素暴露资料。随后许多学者提出了使用患者双亲作为一种对照时的统计分析策略^[5-9],检测与疾病发病有关联的遗传标记或与其相邻位点上连锁不平衡的等位基因,评估环境致病因素与基因型之间的交互作用。

1. 单体型相对风险(haplotype relative risk, HRR):Rubinstein 等^[3]提出了从有一个受累子女的核心家系中抽样,以双亲未传递给子女的基因型作为一种虚拟对照,比较患者本身的等位基因的分布和虚拟对照的等位基因的分布,从而估计遗传标记与疾病之间相对风险的一种方法(表 1)。

表 1 HRR 分析数据结构

病例基因型	拟对照基因型		合计
	M_1M_1, M_1M_2	M_2M_2	
M_1M_1, M_1M_2	a	b	n_1
M_2M_2	c	d	n_2
合计	n_3	n_4	n

在核心家系中,以 P_1 表示受累子女至少携带一个易感等位基因 M_1 的概率, P_2 表示拟对照中至少携带一个易感等位基因 M_1 的概率。则

$$HRR = \frac{P_1}{1 - P_1} \cdot \frac{1 - P_2}{P_2} \approx \frac{n_1 \times n_4}{n_2 \times n_3} \quad (1)$$

$$\text{方差: } Var_{(HRR)} = \left(\frac{1}{P_1} + \frac{1}{P_2} + \frac{1}{1 - P_1} + \frac{1}{P_2} + 2 \cdot \frac{P_{1/2}P_{2/1} - P_{1/1}P_{2/2}}{P_{.1}P_{.2}P_{1/1}P_{2/2}} \right) \left(\frac{HRR}{n} \right)^2 \quad (2)$$

式中, $P_{.1} = P_{(1/1)} + P_{(2/1)}$, $P_{.2} = P_{(1/2)} + P_{(2/2)}$, $P_{1/1} = P_{(1/1)} + P_{(1/2)}$, $P_{1/2} = P_{(2/1)} + P_{(2/2)}$, $P_{2/1} = a/n$, $P_{2/2} = b/n$, $P_{2/1} = c/n$, $P_{2/2} = d/n$

该设计的优点就是对照的基因型和患者的基因型来源于同种族人群,从而降低了病例和对照间有遗传背景差别的可能性。Falk, Rubinstein^[4]用单体型相对风险来衡量遗传标记与疾病之间的关联。该指标是受累子女和对照中某一特定遗传标记的优势比。Ott^[10]研究了在隐性遗传模式疾病时, HRR 方法的统计学性质。Knapp 等^[11]认为在任意的遗传模式中,当重组率为零时, HRR 方法与传统的病例对照研究是等效的。当重组率大于零时,受累子女与虚拟对照的遗传标记显型之间就不相互独立。但是 HRR 的结果始终要小于传统病例对照设计的 RR。因此 HRR 方法不会高估遗传标记与疾病等

位基因之间的关联。

2. 基因型相对风险(genotype relative risk, GRR):假如一个疾病易感位点有两个等位基因, M 和 N (M 表示易感等位基因, N 表示正常等位基因), P 表示人群中 M 的频率, q 表示人群中 N 的频率。 D 表示研究对象患病。 n 为病例数, x_{ij} 为具有 j 个变异等位基因双亲婚配型为 i 的病例数(表 2)。用 $f_2 = P(D|MM)$, $f_1 = P(D|MN)$, $f_0 = P(D|NN)$ 分别表示候选位点为不同基因时的患病条件概率。 f_j 中的下标 j 表示基因型中具有 M 的个数。用 $\Psi_1 = f_1/f_0$ 和 $\Psi_2 = f_2/f_0$ 分别表示杂合子 MN 和纯合子 MM 相对纯合子 NN 增加的疾病概率,即基因型相对风险^[12]。用极大似然法在符合和不符合 Hardy-Weinberg 平衡定理时分别估计基因型相对风险 Ψ_1 和 Ψ_2 。

表 2 GRR 分析数据结构

双亲婚配型	1			2		3	
	$MM \times MM$		$MM \times MN$	$MM \times NN$		$MM \times NN$	
患者基因型	MM		MM	MN	MN		MN
患者例数	x_{12}		x_{22}	x_{21}	x_{31}		x_{31}
双亲婚配型	4			5		6	
	$MN \times MN$		$MN \times NN$	$MN \times NN$		$NN \times NN$	
患者基因型	MM	MN	NN	NN	NN		NN
患者例数	x_{42}	x_{41}	x_{40}	x_{50}	x_{60}		x_{60}

符合 Hardy-Weinberg 平衡定理时对数似然函数为:

$$\log L = \text{constant} + a \log(p) + b \log(1 - p) + c \log(\Psi_2) + d \log(\Psi_1) - n \log[\Psi_2 p^2 + \Psi_1 2p(1 - p) + (1 - p)^2] \quad (3)$$

式中, $a = 4x_{12} + 3x_{22} + 3x_{21} + 2x_{31} + 2x_{42} + 2x_{41} + 2x_{40} + x_{51} + x_{50}$; $b = x_{22} + x_{21} + 2x_{31} + 2x_{42} + 2x_{41} + 2x_{40} + 3x_{51} + 3x_{50} + 4x_{60}$; $c = x_{12} + x_{22} + x_{42}$; $d = x_{21} + x_{31} + x_{41} + x_{51}$

Knapp 等^[13], Schaid^[14]和 Flanders 等^[7]通过使用极大似然的方法来估计基因型相对风险。此外,许多作者^[5, 6, 8, 9]提出使用非叠代的方法,通过比较具有某种基因型与不具有某种基因型之间的风险,从而获得风险比的最接近估计。当有其他混杂时,可以按其暴露水平分类,分别计算每一层内的估计,用标化或用权重的方法得到总估计。

3. 传递/不平衡检验(transmission/disequilibrium test, TDT):为了在有关联时检测是否连锁, Spielman 等^[15]考虑了杂合子双亲传递遗传标记等

位基因给受累子女的传递率,提出了 TDT。这种方法评价杂合子型双亲在传递变异等位基因给发病子女时,其传递率是否偏离服从孟德尔遗传规律且没有连锁时的期望传递率。

根据表 3, b 为双亲传递 A_1 的例数, c 为双亲传递 A_2 的例数, McNemar χ^2 检验统计量: $TDT = (b - c)^2 / (b + c)$ 。当 $(b + c)$ 较多时, 统计量近似服从自由度为 1 的 χ^2 分布。当样本含量较小时, 可根据样本含量 $(b + c)$ 和概率 0.5, 基于二项分布来计算精确概率^[14]。

表 3 TDT 分析

传递的等位基因	未传递的等位基因		合计
	A_1	A_2	
A_1	a	b	W
A_2	c	d	X
合计	Y	Z	N

TDT 方法可以用于含有单个发病子女的家庭, 也可以用于多个发病成员的大家系。值得注意的是, 只有标记位点为杂合子型的双亲资料才可以提供用于 TDT。当只有发病子女与一个杂合子父亲或母亲的资料, 同时发病子女的基因型与亲代基因型一致或为纯合子时, 应舍弃使用这些资料, 以免引入偏倚。

TDT 的优点是这种方法不需要疾病传递的遗传模型, 而许多复杂疾病很难确定遗传模式。此外 TDT 方法对分层人群 (stratified population) 并不敏感, 避免了由此所产生的虚假联系。因此 TDT 方法即便是在有分层人群的时候还是有效的, 而其他方法 (HRR^[41]; Schaid, Sommer^[16]; Ewens, Spielman^[17]) 的假阳性率将会增高^[18]。TDT 方法的缺点是当没有关联时不能用来检测遗传标记与疾病的连锁。此外, 由于 TDT 方法并不使用对照组, 在零假设时仅仅依赖于遗传标记等位基因按孟德尔遗传规律分离。假如由于某些原因随机人群遗传标记等位基因的分离偏离了孟德尔遗传规律, TDT 方法的结果就会产生偏差。例如最近发现胰岛素基因旁有一种遗传标记发生了这种分离偏离^[16]。

当遗传标记位点的等位基因多于两个的时候, 可以对每一个等位基因用 TDT 方法来计算, 这时候需要校正, 以免增加假阳性率。许多学者扩展了 TDT 方法用来进行多个等位基因的检验^[6, 19-21]。

Schaid^[22] 曾经提出一种扩展的 TDT 用来检测基因环境的交互作用, 统计量:

$$z = (\hat{\pi}^+ - \hat{\pi}^-) / \sqrt{\hat{\pi}(1 - \hat{\pi}) \left[\frac{1}{n^+} + \frac{1}{n^-} \right]} \quad (4)$$

式中 $\hat{\pi}^+$ 和 $\hat{\pi}^-$ 分别表示暴露患者和未暴露患者传递概率的估计值; $\hat{\pi}$ 是整个病例的传递率估计值; n^+ , n^- 分别表示双亲基因型为 Aa 的暴露患者和未暴露患者数; z 统计量近似服从标准正态分布。

通过比较杂合子双亲传递变异等位基因给暴露和未暴露受累子女的传递率的不同来检测交互作用。当暴露者和未暴露者的变异等位基因传递率不同时就意味着存在交互作用, 可以通过 χ^2 检验或者确切概率法比较两者的比率。相似的方法还有 Harley 等^[23] 和 Maestri 等^[24]。但是这些以传递率为基础的方法在研究基因环境交互作用时, 会出现两个问题^[25]。第一, 当变异等位基因影响患病风险的时候, 即使暴露根本不影响患病风险, 或者只单独影响患病风险或者与变异等位基因共同影响, 传递率也会在暴露者和未暴露者之间不同。即使在没有交互作用的时候, 杂合子双亲将变异等位基因传给暴露的患者和未暴露的患者的传递率也会不同。第二, 以传递率为基础的检测需要假设杂合子双亲的等位基因的传递是独立事件, 然而, 有时候这个假设却不成立。当发病子女的双亲均杂合子, 在父亲传递变异等位基因的时候, 母亲传递等位基因的概率为 $R_2 / (R_1 + R_2)$, 然而在父亲未传递变异等位基因的时候, 母亲传递等位基因的概率为 $R_1 / (R_1 + 1)$, 这两个概率的不同, 就意味着不独立。

4. logistic 等位基因传递模型: 每一个杂合子型父母与其发病子女的基因型所组成的配对资料可用 logistic 等位基因传递模型来分析。假如父母基因型都是杂合子型的, 那么每一个父亲或母亲与发病的子女形成一个配对。每一个杂合子型亲代的两个等位基因形成一个配对。这时用条件 logistic 回归方法对传递的概率建立模型。用 p_{ij} 表示父亲或母亲基因型为 i/j 的概率 (i 表示传递, j 表示未传递给发病子女的等位基因)。则有:

$$\log(p_{ij} / p_{ji}) = \alpha_i - \alpha_j + \beta_{ij} \quad i < j \quad (5)$$

式中 α_i 为等位基因 i 对于传递率的作用的优势比的对数; β_{ij} 是交互作用参数。当 $\alpha_i > 0$ 时, 相应的等位基因优先传递给患病子女, 表明该遗传标记与疾病存在连锁不平衡。零假设时, $\alpha_i = \beta_{ij} = 0$, 用似然比检验进行假设检验。

当遗传标记有很高的多态性, 有多个等位基因而且交互作用项数量较多时, 似然比检验的效能就会降

低。这时,可以用其他方法^[19,23]进行假设检验。

logistic 回归模型可以用来评价交互作用。

$$\log(p_{ij}/p_{ji}) = \alpha_i A_i + \beta_{int}(A_i E) \quad (6)$$

式中 A_i 表示在传递和未传递的等位基因中某种特定的等位基因是否出现; E 表示环境暴露情况; β_{int} 为交互作用参数。

Harley 等^[23]用这个模型研究了发病子女及其双亲的性别对某一特定等位基因对传递率的影响。Maestri 等^[24]用这个模型研究了口裂患儿的基因与种族、家族史、母亲吸烟和口裂类型间的交互作用。

5. logistic 基因型模型:

Self 等^[26]根据发病子女双亲的基因型和这些子女必须患病,提出一个基于基因型的 logistic 模型,似然函数为:

$$L = \frac{\exp(Z_i \gamma)}{\sum_{g_j \in G} \exp(Z_j \gamma)} \quad (7)$$

式中 Z_i 为病例基因型的编码; γ 为优势比(odds ratio)的对数,近似等于基因型相对危险度的对数; G 表示双亲所产生的四种子代基因型的集合; g_j 表示病例基因型编码为 Z_j 时患者所对应的基因型。

当只有两个等位基因的时候,这个模型可以简化为只有三个基因型和两个优势比参数。这时可以用最大似然方法来估计参数^[14],可以用得分检验对优势比进行检验^[12],也可以用非叠代的方法得到直接估计^[5,6,8,9]。

这种条件似然模型的一个优点是基线风险可随着不同家庭而不同,或者随着不同的病例而改变,且当标记基因对基线风险有相乘作用时这种模型仍然能够得到基因型相对风险的无偏估计。

条件 logistic 模型可以用来评价交互作用。

实例分析

Shields 等^[27]采用病例父母亲对照设计,收集 218 对病例父母亲对资料,通过分析 TIVS7-2 等位基因来研究 T 位点变异(T locus variant)与人类神经管缺损(neural tube defects,NTDs)的关联(表 4)。

1. HRR 分析:由式(1)得 $HRR = 98 \times 135 / (120 \times 83) = 1.33$ ($\chi^2 = 1.4618, P = 0.2266$)。HRR 95% CI 0.89~1.98(表 5)。

2. GRR 分析:按公式(3)采用极大似然法估计 $GRR: \hat{\Psi}_1 = 1.26, \hat{\Psi}_2 = 0.98$ ($\chi^2_{(2)} = 3.1809, P = 0.2038$),见表 6。

3. TDT: $TDT = (85 - 70)^2 / (85 + 70) = 1.4516$

($P = 0.2283$)。OR = 1.21, 95% CI :0.80~2.00 (表 7)。

表 4 神经管缺损患者 T (TIVS7) 基因型频数分布

母亲	父亲	神经管缺损患者基因型			合计
		1/1	1/2	1/3	
1/1	1/1	70	-	-	70
1/1	1/2	24	30	-	54
1/2	1/1	19	28	-	47
1/2	1/2	7	10	7	24
1/1	2/2	-	8	-	8
2/2	1/1	-	9	-	9
2/2	1/2	-	2	2	4
1/2	2/2	-	1	1	2
2/2	2/2	-	-	0	0
合计		120	88	10	218

注:1/1 = TIVS7-1/TIVS7-1;1/2 = TIVS7-1/TIVS7-2;2/2 = TIVS7-2/TIVS7-2

表 5 HRR 分析

病例基因型	拟对照基因型		合计
	2/2,1/2	1/1	
2/2,1/2	33	65	98
1/1	50	70	120
合计	83	135	218

表 6 GRR 分析

双亲婚配型	1		2		3	
	2/2×2/2		2/2×2/1		2/2×1/1	
患者基因型	2/2	2/2	2/1	2/1	2/1	2/1
患者例数	x_{12}	x_{22}	x_{21}	x_{31}	x_{31}	x_{31}
	0	3	3	17	17	17

双亲婚配型	4		5		6	
	2/1×2/1		2/1×1/1		1/1×1/1	
患者基因型	2/2	2/1	1/1	1/1	1/2	1/1
患者例数	x_{42}	x_{41}	x_{40}	x_{50}	x_{51}	x_{60}
	7	10	7	58	43	70

表 7 TDT 分析

传递的等位基因	未传递的等位基因		合计
	A ₁	A ₂	
A ₁	23	85	108
A ₂	70	258	328
合计	93	343	436

采用上述三种统计方法分析,提示 TIVS7-2 等位基因与神经管缺损有微弱关联,但相对风险经检验差异均无统计学意义。

讨 论

病例父母亲对照研究以患者的双亲为对照,来检测与疾病发病有关的遗传标志或者与之存在连锁不平衡的等位基因,评价环境暴露与基因之间的交互作用。由于这种设计避免了人群分层现象,从而

在多基因病因研究中得到了广泛的应用。分析病例父母亲资料的许多方法,必须服从以下假设,否则会产生偏倚。

每种分析病例父母亲设计资料的方法都必须服从孟德尔遗传规律^[26]。对于每种婚配类型,在先证者进入研究的这个年龄时子女的基因型必须服从孟德尔遗传规律。对于病例父母亲对照设计资料,遗传作用的评价基于观测值与符合孟德尔遗传规律时的期望值之间的偏差^[20]。

在检测交互作用时,还必须服从这样一个假设:双亲具有不同基因型时,子女的暴露状态与其候选位点的基因型是相互独立的^[22]。这种独立性假设可表示为 $P(C, E | M, P) = P(C | M, P)P(E | M, P)$ 。传统的病例对照研究并不需要这种独立性。

Schaid^[22]模拟显示有时候病例父母亲对照比传统的病例对照研究的效率要高,尤其当易感等位基因外显率罕见和环境危险因素对没有易感基因的患者作用较大的时候。

在研究遗传因素作用时,病例父母亲对照设计的一个显著特点是:对于一个潜在遗传人群结构来说该法是稳健的(robust)^[25]。通过使用该设计,可减少由于遗传人群结构(包括人群分层和混杂)所造成的偏倚,这正是传统病例对照研究所不能解决的问题。此外,在使用这种设计中,病例的父母亲比随机对照有更高的参与率。

分析方法选用恰当时,病例父母亲对照设计可以很好地来研究遗传和遗传环境的交互作用,而且所需的样本含量较小。尽管这种设计需要服从两个假设,但是在很多情况下,都能够近似服从孟德尔遗传规律和条件独立这两个假设。当不存在人群结构时,病例父母亲对照设计的检验交互作用的效能等于或者高于传统的病例对照研究^[22]。但是当存在潜在的人群结构时,该设计就比传统的病例对照设计要稳健。尽管在基因影响暴露时病例父母亲研究设计就会得出虚假的结论,但是对于许多包含遗传和环境作用的人群结构来说,病例父母亲对照设计能够得出恰当的结论,而此时传统的病例对照研究设计往往得不到正确的结论。

在研究基因型与环境的联合作用的时候,病例父母亲对照设计可以检测遗传的作用或者交互作用,但是不能评价单独的环境作用^[25]。因为这种设计没有提供参照值以用来评价单独暴露是如何影响患病风险。

假如先证者的基因型影响其暴露的概率,用病例父母亲对照设计资料,不管用什么模型分析都会出现错误的结论。因此,研究者必须仔细考虑某一特定候选基因是否会影响暴露水平。

随着分子生物学技术的发展,国内也开始采用病例父母亲对照研究设计进行研究,如在高血压、唇腭裂、精神分裂症等疾病研究中,为检测与发病有关的基因发挥了重要的作用,其中 TDT、HRR 等分析方法最为常用。

参 考 文 献

- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, 1996, 273: 1516-1517.
- Schaid DJ. General score tests for associations of genetic markers with disease using cases and their parents. *Genet Epidemiol*, 1996, 13: 423-449.
- Rubinstein P, Ginsberg-Fellner F, Falk C. Genetics of type 1 diabetes mellitus: a single, recessive predisposition gene mapping between HLA-B and GLO. With an appendix on the estimation of selection bias. *Am J Hum Genet*, 1981, 29: 865-882.
- Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet*, 1987, 51 (Pt 3): 227-233.
- Khouri MJ. Case-parental control method in the search for disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 414-415.
- Flanders WD, Khouri MJ. Analysis of case-parental control studies: method for the study of associations between disease and genetic markers. *Am J Epidemiol*, 1996, 144: 696-703.
- Flanders WD, Sun F, Yang Q. New estimator of the genotype risk ratio for use in case-parental control studies. *Am J Epidemiol*, 2001, 154: 259-263.
- Lee WC, Chang CH. Estimating genotype relative risks in case-parental control studies: an optimal weighting approach. *Am J Epidemiol*, 2000, 152: 487-492.
- Sun F, Flanders WD, Yang Q, et al. A new method for estimating the risk ratio in studies using case-parental control design. *Am J Epidemiol*, 1998, 148: 902-909.
- Ott J. Statistical properties of the haplotype relative risk. *Genet Epidemiol*, 1989, 6: 127-130.
- Knapp M, Seuchter SA, Baur MP. The haplotype-relative-risk (HRR) method for analysis of association in nuclear families. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 1085-1093.
- Schaid DJ, Sommer SS. Genotype relative risks: methods for design and analysis of candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet*, 1993, 53: 1114-1126.
- Knapp M, Wassmer G, Baur MP. The relative efficiency of the Hardy-Weinberg equilibrium-likelihood and the conditional on parental genotype-likelihood methods for candidate-gene association studies. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 1476-1485.
- Schaid DJ. Likelihoods and TDT for the case-parents design. *Genet Epidemiol*, 1999, 16: 250-260.
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 506-516.
- Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Am J Hum Genet*, 1994, 55: 402-409.
- Ewens WJ, Spielman RS. The transmission/disequilibrium test: history, subdivision, and admixture. *Am J Hum Genet*, 1995, 57: 455-464.
- Schaid DJ. Transmission disequilibrium, family controls, and great

expectations. *Am J Hum Genet*, 1998, 63:935-941.

19 Sham PC, Curtis D. An extended transmission/disequilibrium test (TDT) for multi-allele marker loci. *Ann Hum Genet*, 1995, 59(Pt 3):323-336.

20 Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet*, 1996, 59: 983-989.

21 Lazzeroni LC, Lange K. A conditional inference framework for extending the transmission/disequilibrium test. *Hum Hered*, 1998, 48:67-81.

22 Schaid DJ. Case-parents design for gene-environment interaction. *Genet Epidemiol*, 1999, 16:261-273.

23 Harley JB, Moser KL, Neas BR. Logistic transmission modeling of simulated data. *Genet Epidemiol*, 1995, 12:607-612.

24 Maestri NE, Beaty TH, Hetmanski J, et al. Application of

transmission disequilibrium tests to nonsyndromic oral clefts: including candidate genes and environmental exposures in the models. *Am J Med Genet*, 1997, 73:337-344.

25 Umbach DM, Weinberg CR. The use of case-parent triads to study joint effects of genotype and exposure. *Am J Hum Genet*, 2000, 66: 251-261.

26 Self SG, Longton G, Kopecky KJ, et al. On estimating HLA/disease association with application to a study of aplastic anemia. *Biometrics*, 1991, 47:53-61.

27 Shields DC, Ramsbottom D, Donoghue C, et al. Association between historically high frequencies of neural tube defects and the human T homologue of mouse T (Brachyury). *Am J Med Genet*, 2000, 92: 206-211.

(收稿日期 2003-08-11)
(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

昆明地区 A 组轮状病毒感染状况调查与 VP7 血清型分析

赵亚玲 黄永坤 侯宗柳 魏群德 周丽芳

A 组轮状病毒(HRV)是世界范围内小儿急性胃肠炎的主要病原。我们采用 ELISA 和 PAGE 方法对昆明地区 HRV 的分子流行特征进行了 VP7 血清型别研究。

1. 材料与方法: 100 例(男 68 例,女 32 例)婴幼儿腹泻粪便标本来源于 2002 年 9~12 月昆明医学院第一附属医院儿科门诊和住院部急性腹泻患儿,标本贮于 -70℃ 冻存以备用。用 ELISA 法检测 RV-Ag, 严格按试剂盒说明操作。RV-RNA 提取参照黄祯祥等^[1]报道的方法。10% SDS 56℃ 温浴 30 min 裂解病毒外壳蛋白,用 Tris 饱和酚及氯仿反复抽提 3~4 次,异丙醇沉淀,无水乙醇干燥,-70℃ 冻存以备用。RV-RNA PAGE 采用垂直板不连续 PAGE 进行 HRV 筛选,即上部浓缩胶和下部分离胶,浓度分别为 3.5% 和 8.0%,电泳液为 1× Tris-甘氨酸缓冲液。200 V 恒压,室温下电泳 3.5 h。电泳完毕后进行快速银染,判断 HRV 电泳型。RT-PCR 和 PCR 分型实验参照文献^[2]的方法。第一次扩增采用编码 VP7 基因两端的保守序列设计引物(正链引物 Beg9, 负链引物 End9),经 RT-PCR 扩增出 VP7 基因的全长序列。第二次 PCR 扩增,正链引物根据报道的核苷酸序列高变区设计型特异性引物(aBT1、aCT2、aET3、aDT4),负链引物为基因 3' 端保守序列的公共引物(Rvg9),这样从放大产物的特征分子量大小即可区别 HRV 样品的不同血清型。

2. 结果:检测婴幼儿腹泻粪便标本 100 份,ELISA RV-Ag 阳性为 83 份,检出率为 83%;PAGE 阳性标本为 80 份,检出率为 80%。其中长型为 80 份,未检测出电泳短型。对 69 份 PAGE 阳性标本进行 PCR 分型,结果 G1、G2、G3、G4 血清型的检出率分别为 55.07%(38/69)、0.00%、30.43%

(21/69)、5.80%(4/69),混合型占 8.70%(6/69)(其中 1 例为 G1、G3、G4 型混合感染,1 例为 G3、G4 型混合感染,4 例为 G1、G4 型混合感染),而有 11 份标本未能分型。

3. 讨论:鉴于目前发展的各种 RV 疫苗主要针对 VP7 血清型,故本研究以检测标本的 G 血清型分布为主。我们对收集秋冬季腹泻患儿便样标本采用 RT-PCR 和 net-PCR 方法对 80 份 PAGE 阳性的标本进行 VP7 型别分析,以深入了解近几年来 HRV 株在昆明的流行和演变情况。结果有 69 份可以确定其血清型,与方肇寅等^[3]的研究结果一致。研究还发现,与以往的研究相比 2002 年 G3 型和混合感染所占比例仍有所增加。此外还发现不同月份 HRV 血清型的构成比不同,G1 型集中于 11、12 月,以 11 月份最为突出;而 G3 型以 10 月份突出。研究提示不同时间流行的 RV 会有所不同,在一定程度上反映了昆明地区 2002 年秋冬季 RV 分子流行变化趋势。本研究未发现常见血清型中的 G2 型,这可能与样本量偏少有关。但在研究中发现了 6 例混合感染(其中 1 例为 G1+G3+G4 型混合感染,1 例为 G3+G4 型混合感染,4 例为 G1+G4 型混合感染),提示 RV 流行毒株的多样性。

参 考 文 献

1 黄祯祥,洪涛,刘崇柏,主编. 医学病毒学基础及实验技术. 第 1 版. 北京:科学技术出版社,1990. 647-648.

2 Gouve V, Glass R, Woods P, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acids from stool specimens. *J Clin Microbiol*, 1990, 28:276-282.

3 方肇寅,齐锦,杨辉,等. 我国 1998~1999 年流行的婴幼儿腹泻轮状病毒的分型研究. *病毒学报*, 2001, 17:18-23.

(收稿日期 2003-06-19)
(本文编辑:尹廉)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院儿科(赵亚玲、黄永坤、魏群德、周丽芳);中国科学院医学生物研究所(侯宗柳)