

# 母婴人群隐匿性乙型肝炎病毒感染及病毒株进化特征分析

董晓莲 姚晴青 王学才 徐海涛 王晓丽 陈胜玉 唐智峰 郑英杰

**【摘要】** 目的 了解母婴匹配人群隐匿性 HBV 感染(OBI)及显性和隐匿性病毒株 S 基因的变异。方法 基础调查时随访 135 对母婴,填写调查表及采血样,采用 ELISA 检测 HBsAg, Real-time PCR 测定病毒载量,PCR 扩增 HBV S 基因并进行进化分析。结果 共采集母血 94 份,其子女血样 101 份,OBI 感染率分别为 10.0%和 2.0%,母亲显著高于其子女;显性和隐匿性病毒株病毒载量中位数分别为 399.9 IU/ml 和 247.6 IU/ml,两者差异无统计学意义;OBI 病毒株有 1 株为 B 基因型、adw 血清型,其余 7 株均为 C 基因型、adr 血清型;显性 HBV 感染病毒株有 15 株为 B 基因型、adw 血清型,其余 8 株为 C 基因型、adr 血清型;OBI 病毒株中 C 基因型比例显著高于显性 HBV 病毒株。结论 母婴人群存在一定比例的 OBI,应重视其预防。

**【关键词】** 隐匿性乙型肝炎病毒感染;显性乙型肝炎病毒感染;进化特征分析;基因型

**Prevalence of occult hepatitis B virus infection and its phylogenetic features among mother-teenager pairs** DONG Xiao-lian<sup>1</sup>, YAO Qing-qing<sup>2</sup>, WANG Xue-cai<sup>1</sup>, XU Hai-tao<sup>1</sup>, WANG Xiao-li<sup>1</sup>, CHEN Sheng-yu<sup>1</sup>, TANG Zhi-feng<sup>1</sup>, ZHENG Ying-jie<sup>2</sup>. 1 Deqing County Center for Disease Control and Prevention, Huzhou 313200, China; 2 Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Ministry of Education the Key Laboratory Public Health Safety Corresponding author: ZHENG Ying-jie, Email: yjzheng@shmu.edu.cn This work was supported by grants from the Medical and Health Scientific Research Fund Program of Zhejiang Province (No. 2009A203) and the Major Special Projects in Science and Technology for Prevention and Treatment of Major Infectious Diseases (No. 2008ZX10002-012).

**【Abstract】 Objective** Prevalence of occult hepatitis B virus (HBV) infection (OBI) was investigated in a paired mother-teenager population and HBV S gene variation including overt and occult HBV, was determined. **Methods** A follow-up study based on an initial survey of 135 mother-teenager pairs was carried out through collection of questionnaires and blood samples HBsAg were detected by ELISA method, viral load by PCR amplification and HBV S gene by phylogenetic analysis. **Results** 102 pairs of subjects were followed-up. Blood samples from 94 mothers and 101 children were collected. OBI prevalence in mothers was 10.0% (6/60), significantly higher than 2.0% (2/101) in teenagers. Medians of viral load were 399.9 IU/ml and 247.6 IU/ml in overt and occult HBV strains, but without significant difference. 1 occult HBV strain belonged to genotype B with serotype adw while the other 7 were genotype C with serotype adr. 15 of the overt HBV strains belonged to genotype B with serotype adw and the other 8 were genotype C with serotype adr. Proportions of genotype-C strains were significantly higher in occult HBV strains than in overt HBV strains. **Conclusion** OBI was seen in teenage-mother population.

**【Key words】** Occult hepatitis B virus infection; Overt hepatitis B virus Infection; Phylogenetic analysis; Genotype

目前 HBV 主要分为 10 种基因型<sup>[1-6]</sup>。不同基因型 HBV 核苷酸序列差异 ≥8% 或 S 区基因序列差

异 ≥4%<sup>[7]</sup>。而基因型分布具有明显的地域性,亚洲地区,包括我国,以 B、C 型最为常见。传统的 HBV 感染者确诊标准为血清 HBsAg 阳性,即为显性 (overt) HBV 感染。但已证实在 HBsAg 阴性个体中也存在 HBV 感染,即隐匿性 HBV 感染 (occult HBV infection, OBI), 即指现有血清学检测技术检测 HBsAg 阴性,但肝细胞内 HBV DNA 检测阳性的 HBV 感染,感染者血清中 DNA 滴度常 <200 IU/ml<sup>[8]</sup>

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.03.002  
基金项目:浙江省医药卫生科学研究基金计划(A类)(2009A203);  
国家科技重大专项(2008ZX10002-012)  
作者单位:313200 湖州,浙江省德清县疾病预防控制中心(董晓莲、王学才、徐海涛、王晓丽、陈胜玉、唐智峰);复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 公共卫生安全教育部重点实验室(姚晴青、郑英杰)  
通信作者:郑英杰, Email: yjzheng@shmu.edu.cn

(因肝脏标本获得的困难性,实际上几乎所有研究均采用血清 HBV DNA 检测结果来替代)。本报告 135 对母婴按照 0-1-6 月免疫程序共进行 3 次 ( $\times 5 \mu\text{g}$ ) 基因工程乙型肝炎(乙肝)疫苗免疫 13 年后的随访结果,并采用 PCR 产物直接测序方法,选择两种不同的引物筛选 OBI,对 HBV 相应基因片段做进化分析及对病毒株进行基因分型,探讨 OBI 病毒株的分子特征。

### 对象与方法

1. 研究对象:1996 年 10 月 7 日至 1997 年 5 月 17 日在浙江省德清县招募临产孕妇,根据其乙肝感染情况和知情同意的原则,对其所生婴儿按照 0-1-6 月免疫程序每次接种  $5 \mu\text{g}$  酵母重组乙肝疫苗(深圳康泰生物制品有限公司)。2010 年 7-8 月随访上述研究对象,采用结构式问卷调查,并采集静脉血 5 ml,分离血清后  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存待检。问卷调查包括人口学资料、乙肝相关危险因素和乙肝疫苗加强免疫信息等。本研究由复旦大学公共卫生学院伦理委员会批准。所有研究对象为 13 岁,由其父母签署知情同意书。

#### 2. 研究方法:

(1)血清学检测:HBsAg 检测采用电化学发光法。采用罗氏诊断试剂公司 Elecsys 系列试剂盒,并在 Modular Analytics E170 进行自动化检测和分析。

(2)病毒载量测定:取血清标本  $100 \mu\text{l}$ ,按核酸提取试剂盒说明书的步骤要求编写程序,由自动化工作站提取血清 DNA。选择宝生物工程(大连)有限公司提供的引物/荧光探针及试剂 TaKaRa Premix  $2\times$ ,采用 Real-time PCR 测定血清 HBV 病毒载量(最低检测限值为  $20 \text{ IU/ml}$ ),PCR 结果阳性即为 HBV DNA 阳性。所有检测阳性样本均重复检测以确证。

(3)病毒 DNA 手工抽提:选取上述 Real-time PCR 定量阳性的血清,利用手工法提取核酸。取  $200 \mu\text{l}$  血清,利用离心柱法手工抽提病毒 DNA,得到  $200 \mu\text{l}$  DNA 溶液,采用 QIAGEN 生物科技公司生产的 QIAampR DNA Blood Mini Kit 试剂,严格按操作说明书进行。抽提所得 DNA 溶液置于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱保存,用于后续 PCR 及测序。

(4)巢式 PCR 及测序:采用巢式 PCR 方法扩增 HBV 基因组 S 及 A 片段(表 1),引物由上海生工生物技术有限公司合成。在  $0.2 \text{ ml}$  的 eppendorf 管中,依次加入  $10\times$  buffer( $15 \text{ mmol/L MgCl}_2$ )  $2.5 \mu\text{l}$ ,

$10 \text{ mmol/L dNTP}$   $0.5 \mu\text{l}$ ,引物 S1/S2 各  $1 \mu\text{l}$ ,模板 DNA  $2 \mu\text{l}$ , $2.5 \text{ U}/\mu\text{l}$  Taq 酶( $5 \text{ U}/\mu\text{l}$ ) $0.5 \mu\text{l}$ ,加  $\text{ddH}_2\text{O}$  至  $25 \mu\text{l}$ 。两片段第一轮 PCR 扩增设置反应参数为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $40 \text{ s}$ 、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $40 \text{ s}$ 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $40 \text{ s}$ ,共 35 个循环;第二轮设置相同反应参数扩增 25 个循环。每次 PCR 均设阳性对照和阴性对照( $\text{ddH}_2\text{O}$ )。阳性 PCR 产物经割胶、纯化后测序(上海华大基因生物工程公司)。每份 PCR 产物均双向测序以获得准确的核苷酸序列。

表 1 PCR 扩增 HBV 基因组片段所用引物

片段	引物	引物序列(5'~3')	引物位点(nt)	
A 第一轮	AF1	GTCTGCGGCGTTTATC	419~435	
	AR1	ACAGTGGGGGAAAAGC	745~759	
	第二轮	AF2	TGCCCGTTTGTCTCTA	503~519
		AR2	AGAAACGGRCTGAGGC	702~687
S 第一轮	S1	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	56~75	
	S2	ATACCCAAAGACAAAAGAAAA	827~807	
	第二轮	S3	GCGGGGTTTTCTTGTGAC	203~222
		S4	GGGACTCAAGATGTTGTACAG	787~767

所有 PCR 检测阳性样本均经重复抽提核酸及 PCR 加以确证。

(5)基因型及突变分析:采用 Mega v5.0(beta)、DNAstar v7.0、Modeltest v3.7 对 HBV 片段序列和参比序列进行基因序列分析。根据 GenBank 发表的人类 HBV 基因序列,用 NCBI 服务器中的 BLAST 进行同源性检索以确定标准 HBV 基因序列。所用的标准序列为:HBV A 基因型有 AY373432、DQ315784; B 基因型有 AY206390、AY206391、AY800391、BX97850; C 基因型有 AB033557、AB112063; D 基因型有 EU939680、X65259; E 基因型有 AB032431、AB091256; F 基因型有 AB036905、AB116654; G 基因型有 AB056515、AB064313; H 基因型有 AB059661、AB375161; I 基因型有 AF241408、AF241409。

3. 统计学分析:数据处理使用 SAS 8.02 软件,两组病毒载量差异比较采用 Wilcoxon 秩和检验;两组间率的差异采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率检验。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

### 结 果

1. 人口学特征:首次调查共招募 135 对母婴,之后随访共获得 102 对。其中有 8 名母亲、1 名子女拒绝采血,故本次随访共采集母亲及其子女匹配血标本 93 对,母亲未匹配子女血标本 1 份,子女未匹配母亲血标本 8 份。随访中母亲平均年龄( $39.34 \pm 3.50$ )

岁,其子女平均年龄(13.71±0.13)岁;子女中男女性别比为1.24:1,其中99%为足月分娩,87.25%(89/101)为家中第一个孩子,现为初中学生。

2. HBsAg 和 OBI 检出情况:在 94 名母亲中 HBsAg 阳性 34 例,其中 HBV DNA 检出率为 73.53% (25/34);HBsAg 阴性的 60 名母亲中,6 例 HBV DNA 阳性,OBI 检出率为 10.00%。在 101 名子女中,仅 1 例 HBsAg 阳性,未检测出 HBV DNA;HBsAg 阴性的 100 名子女中,2 例 HBV DNA 阳性,OBI 检出率为 2.00%(表 2)。母亲显性 HBV 感染率明显高于其 OBI 感染率( $\chi^2=39.63, P<0.001$ ),且母亲 OBI 检出率显著高于其子女检出率( $\chi^2=5.053, P=0.025$ )。显性 HBV 载量与 OBI 病毒载量之间差异无统计学意义(Wilcoxon 秩和检验, $z=0.422, P=0.673$ )。

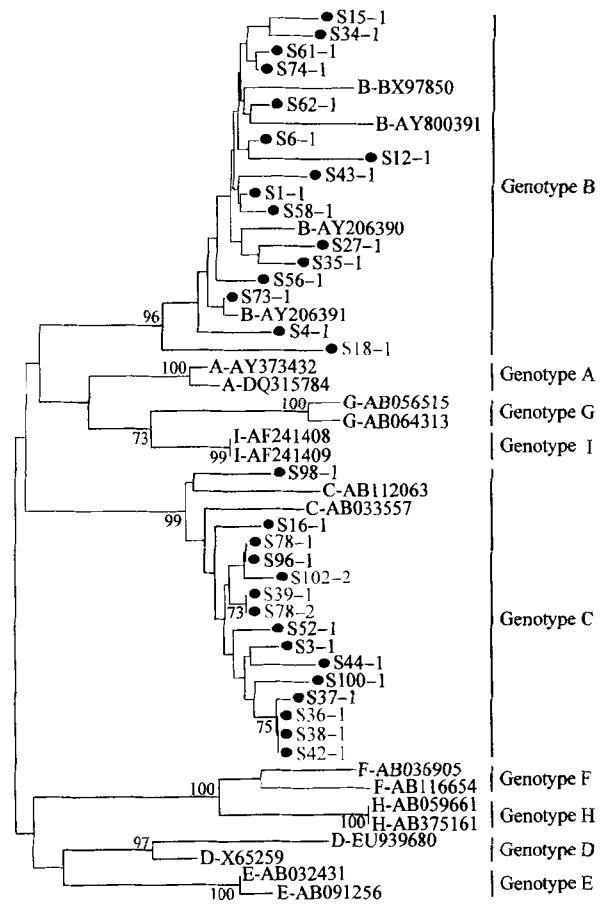
表 2 母子 HBsAg 及 HBV DNA 检测

项目	HBsAg(+)(显性感染)	HBsAg(-)(OBI)
母亲		
DNA 定性	73.53(25/34) <sup>a</sup>	10.00(6/60) <sup>a</sup>
病毒载量(IU/ml)	399.9(136.2~4838.3) <sup>a</sup>	247.6(123.2~16 677.5) <sup>a</sup>
S 序列	67.65(23/34) <sup>a</sup>	10.00(6/60) <sup>a</sup>
子女		
DNA 定性	0(0/1) <sup>a</sup>	2.00(2/100) <sup>a</sup>
病毒载量(IU/ml)	-	78.3, 558.0
S 序列	0(0/1) <sup>a</sup>	2.00(2/100) <sup>a</sup>

注: <sup>a</sup> 括号外数据为阳性率(%),括号内数据分母为检测例数,分子为阳性例数; <sup>b</sup> M(四分位数)

3. 系统进化树构建及分型分析:对 33 株 HBV DNA 阳性(母亲显性 HBV 感染 25 例、OBI 6 例,子女 OBI 2 例)进行 HBV S 基因的扩展和测序,获得 31 株 HBV 病毒株。按照邻接法构建系统进化树(图 1)。分析结果显示 31 株病毒中,16 株为基因 B 型、血清型均为 adw,与基因 B 型参考序列同源性最高,为 94.2%~98.9%;其余 15 株为基因 C 型、血清型均为 adr,与基因 C 型参考序列同源性最高,为 95.2%~98.1%。31 株病毒中 OBI 和显性 HBV 病毒株分别为 8 株和 23 株,两者整体突变率大致相同,分别为 7.04‰和 7.19‰。对 8 株 OBI 病毒株 S 基因的位点突变分析表明,仅 1 株为基因 B 型,其 a 表位发生 F161N 突变;其余 7 株均为基因 C 型,其中 2 条序列发生 Q129R 突变(母亲及其子女各 1 条,编号分别为 S39-1 和 S78-2)和 1 条序列发生 K141E 突变(S102-2)。OBI 病毒株中基因 C 型的比例(7/8)显著高于显性 HBV 病毒株(8/15),Fisher 确切概率检验, $P=0.015$ 。

发现一对匹配母子均为 OBI(图 1 中 S78-1 和 S78-2,前者为野生 HBV 株,后者仅发生 Q129R 突



注:实心圆点标记蓝色和绿色分别代表基因 B 型和 C 型 HBV 病毒株,其中红色为 OBI,黑色为显性 HBV 病毒株

图 1 31 株 HBV S 基因区片段分子进化分析

变);一对匹配母女均为显性 HBV 感染,母亲分离到野生株(图 1 中 S73-1),但女儿未分离到其病毒株;还有一对匹配母女中女儿为 OBI(图 1 中 S102-2),母亲未感染乙肝。

### 讨 论

OBI 是指按照现有血清学检测技术检测 HBsAg 阴性,但肝细胞内 HBV DNA 检测阳性的 HBV 感染(感染者血清中可检测不到 HBV DNA,或即使检测到 HBV DNA,其 DNA 滴度通常 <200 IU/ml)<sup>[9]</sup>。由此提出所谓“假 OBI”的概念,即具有与 OBI 类似的特征,但血清 HBV DNA 水平与显性 HBV 感染相当,通常由 HBV 的 S 基因突变株(逃避株)引起,该突变株合成的变异型 HBsAg 无法被部分或者全部商品化检测技术所识别。

OBI 感染率与显性 HBV 感染率、地区及人群有关,并受到标本类型、HBsAg 及 HBV DNA 检测灵敏度的影响。丙型肝炎病毒(HCV)感染人群中,OBI 感染率较高。在地中海地区,HBsAg 阴性的 HCV 携

带者约有 1/3 检测 HBV DNA 结果为阳性;在东亚亚洲国家,该比例会更高<sup>[10]</sup>。一般认为 HBV 感染率较高的国家或地区,献血人群的 OBI 感染率要高。在 HBV 高发区(中国台湾、福建省)的献血人群中,OBI 感染率分别为 1:1022(10/10 223)<sup>[11]</sup>、1:569(34/19 360)<sup>[12]</sup>。健康人群 OBI 感染率研究较少。土耳其有研究显示,健康的 HBsAb 阳性和/或 HBcAb 阳性人群中 OBI 感染率为 5%(5/100)<sup>[13]</sup>;北美一项社区研究显示 HBsAb 阳性和/或 HBcAb 阳性人群 OBI 感染率为 17.5%(14/80),HBsAb 和 HBcAb 均为阴性的人群 OBI 感染率为 8.1%<sup>[14]</sup>;Raimondo 等<sup>[15]</sup>以肝组织为检测样本得出意大利 OBI 感染率为 16.3%(16/98);阿根廷一项横断面调查显示当地 HBsAg 阳性率为 1.1%,属 HBV 低流行区,OBI 感染率为 1:51(11/561),其中 F 基因型和 C2 基因型为优势基因型<sup>[16]</sup>。本研究中母亲 OBI 感染率为 10.0%,与之接近,显著高于其子女 OBI 感染率(2.0%)。有研究表明,选择肝组织作为检测样本,检出的 OBI 流行率要比选择血清作为检测样本高<sup>[17]</sup>。本研究采用血清为检测样本,存在低估 OBI 流行率的可能性。

我国自 1992 年将乙肝疫苗接种纳入计划免疫管理<sup>[18]</sup>,故 <15 岁人群显性 HBV 感染率降低。但有研究表明,OBI 可经母婴传播,乙肝疫苗免疫降低显性 HBV 感染率,却可能提高 OBI 感染,乙肝疫苗免疫的个体更易感染 OBI<sup>[19]</sup>。本研究中,子女仅 1 例 HBsAg 检测阳性,且血清 HBV DNA 阴性,却有 2 例 OBI 感染者。由于调查对象均为初中生年龄较小,通过社会活动感染 HBV 的可能性较低,提示极有可能是由于免疫失败或母婴传播而受到 HBV 感染。

本研究结果显示,OBI 患者中基因 C 型为优势基因型,且 HBeAg 阳性率较高,转阴时间较晚,HBsAg 消失较少,血清病毒载量较高,肝脏组织学的炎症程度较重,病情进展快,更易发生肝硬化和肝癌<sup>[20]</sup>。而 OBI 与慢性肝炎、肝硬化和肝癌等严重的肝脏疾病的发生、发展有显著关联。已有很多证据表明,OBI 是原发性肝癌一个危险因素<sup>[21-23]</sup>。根据本研究的结果,OBI 感染病毒株多为基因 C 型,可能导致 OBI 与严重肝脏疾病之间有显著关联;亦或者 OBI 本身即可导致严重的结局,还值得进一步探讨。

#### 参 考 文 献

- [1] Lee WM. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 1997, 337(24):1733-1745.
- [2] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 1988, 69(Pt 10):2575-2583.
- [3] Norder HCA, Magnius L. Complete genomes, phylogenetic

- relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two genotypes. *Virology*, 1994, 198(9):14.
- [4] Stuyver L, de Gendt S, van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt 1):67-74.
- [5] Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, et al. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 2002, 83(Pt 8):2059-2073.
- [6] Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol*, 2008, 82(11):5657-5663.
- [7] Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype. *J Virol*, 2009, 83(20):10538-10547.
- [8] Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*, 2005, 32(2):102-112.
- [9] Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2008, 49(4):652-657.
- [10] Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(8):479-486.
- [11] Yang MH, Li L, Hung YS, et al. The efficacy of individual-donation and minipool testing to detect low-level hepatitis B virus DNA in Taiwan. *Transfusion*, 2010, 50(1):65-74.
- [12] Yuan Q, Ou SH, Chen CR, et al. Molecular characteristics of occult hepatitis B virus from blood donors in southeast China. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2):357-362.
- [13] Ozaslan E, Demirezer A, Yavuz B. Occult hepatitis B virus infection in Turkish healthy individuals. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 21(12):1436-1437.
- [14] Minuk GY, Sun DF, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American community-based population. *J Hepatol*, 2005, 42(4):480-485.
- [15] Raimondo G, Navarra G, Mondello S, et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol*, 2008, 48(5):743-746.
- [16] Delfino CM, Berini C, Eirin ME, et al. New natural variants of hepatitis B virus among Amerindians from Argentina with mainly occult infections. *J Clin Virol*, 2012, 54(2):174-179.
- [17] Chemin I, Trepo C. Clinical impact of occult HBV infections. *J Clin Virol*, 2005, 34 Suppl 1:S15-21.
- [18] Zhuang H. Hepatitis B vaccination in China. *Basic Med Sci Clin*, 2004, 24(2):5. (in Chinese)  
庄辉. 我国乙型肝炎疫苗免疫. *基础医学与临床*, 2004, 24(2):5.
- [19] Gerlich WH, Bremer C, Saniewski M, et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig Dis*, 2010, 28(1):116-125.
- [20] Liu J, Li Y, Chen T, et al. The distribution of HBV genotypes and clinical significance in familial clustering in an infected population with unfavorable prognosis. *Arch Virol*, 2008, 153(11):2157-2161.
- [21] Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1):S56-61.
- [22] Chemin I, Zoulim F. Hepatitis B virus induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*, 2009, 286(1):52-59.
- [23] Samuel D, Forns X, Berenguer M, et al. Report of the monothematic EASL conference on liver transplantation for viral hepatitis (Paris, France, January 12-14, 2006). *J Hepatol*, 2006, 45(1):127-143.

(收稿日期:2012-08-26)

(本文编辑:张林东)