

# 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 哈尔滨医科大学微生物教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086  
张海红, 呼伦贝尔盟防疫站检验科 内蒙古海拉尔 021008  
阿部贤治, 日本国立感染症研究所病理室 日本东京 162-8640  
谷鸿喜, 女, 1943-09-18 生, 黑龙江省哈尔滨人, 汉族, 1967 年哈尔滨医科大学毕业, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤相关病毒的研究。  
日本健康科学基金资助项目, No. 0109  
项目负责人: 谷鸿喜, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 194 号, 哈尔滨医科大学微生物教研室. hxgu2432@163.com.  
电话: 0451-86685122 传真: 0451-86685122  
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-02

## Epidemiology of HBV genotypes by nested PCR with multi-paired primers

Hong-Xi Gu, Zi-Long Xu, Jian-Yu Liu, Zhao-Hua Zhong, Hua-Qing Wang, Shu-Yun Zhang, Di Li, Hai-Hong Zhang, Kenji Abe

Hong-Xi Gu, Zi-Long Xu, Jian-Yu Liu, Zhao-Hua Zhong, Hua-Qing Wang, Shu-Yun Zhang, Di Li, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Hai-Hong Zhang, Hulanbeier Center of Diseases Control and Prevention, Hailaer 021008, Inner Mongolia, China  
Kenji Abe, Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan  
Supported by Japan Health Science Foundation, No. 0109  
Correspondence to: Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hxgu2432@163.com  
Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-02

## Abstract

AIM: To investigate the epidemiology of HBV genotypes among HBV-infected persons in northern China.

METHODS: The HBV DNA in 801 sera samples collected from hepatitis patients (594), healthy controls (154), and HCV-infected patients (53) were tested by nested PCR, the positive sera were then genotyped by nested PCR with six pairs of HBV genotype-specific primers (A to F).

RESULTS: 464 samples (57.9%) were HBV DNA positive among the 801 samples. Among 594 cases with various hepatitis B clinical manifestations, 74.4% (442/594) were HBV-DNA positive, while 8.4% (13/154) of healthy controls were HBV-DNA positive. There was significant difference between the hepatitis patients and healthy controls ( $P < 0.01$ ). 17% (9/53) of HCV-infected patients were HBV-DNA positive, too. Among the 464 HBV-DNA positive samples, the percentage of genotype A was 5.2% (24/464), genotype B 7.1% (33/464), and type C 77.2% (358/464), type D 2.4% (11/464), while none of type E and F had been found in those samples. 14 samples (3%) were both type B and C positive. The 24 samples could not be genotyped in this study.

CONCLUSION: The HBV genotypes prevailed among HBV-infected persons in northern China are types A, B, C, and

D, and the major genotype is type C (77.2%). Type C is also the major genotype among the clinical groups. There is no statistical difference between the groups.

Gu HX, Xu ZL, Liu JY, Zhong ZH, Wang HQ, Zhang SY, Li D, Zhang HH, Abe K. Epidemiology of HBV genotypes by nested PCR with multi-paired primers. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1073-1076

## 摘要

目的: 掌握我国北方地区乙型肝炎病毒(HBV)感染者HBV基因型分布情况, 为了解其流行病学及临床意义提供基础。

方法: 首先采用巢式PCR法对801份血清进行HBV DNA检测, 其中包括154份健康人血清、594份HBV感染的各类肝病患者及53例抗HCV阳性血清标本。再采用HBV A-F六个主要基因型特异性多引物对巢式PCR法对HBV DNA进行基因型检测及分析。

结果: 在801例血清标本中有464例(57.9%)检测到HBV DNA, 其中154名健康人血清阳性率为8.4%(13/154), 594例不同临床表现的乙肝患者血清HBV DNA总检出率为74.4%(442/594), 二者相比差异显著( $P < 0.01$ ); 抗HCV阳性血清中检出HBV DNA占17%(9/53)。464例HBV DNA阳性标本中, HBV基因型检出率分别是: A型为5.2%(24/464), B型为7.1%(33/464), C型为77.2%(358/464), D型2.4%(11/464), 未检出E和F型, 但尚有14例(3%)同时检出B型和C型, 有24例未检出型别。急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化、原发肝癌各不同临床表现组间基因型分布无统计学差异。

结论: 结果看出, 我国北方地区感染的HBV基因型存在A、B、C、D四个型别, 其中C型为主(77.2%), 各临床表现组基因型分布也均以C型为主, 组间无统计学差异。

谷鸿喜, 徐子龙, 刘建宇, 钟照华, 王华庆, 张淑云, 李迪, 张海红, 阿部贤治. 多引物对巢式PCR法检测HBV基因型的流行病学分析. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1073-1076

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1073.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起急、慢性肝炎的主要病原之一, 并可导致肝硬化和原发性肝癌, 严重危害人类健康。HBV DNA易发生变异<sup>[1-2]</sup>, 基因变异可影响基因复制表达, 也可影响临床感染类型和机体免疫应答<sup>[3-4]</sup>。根据HBV基因组核苷酸序列的差

异,目前HBV可分为A-H 8个基因型<sup>[5-8]</sup>. HBV基因型分布有地域性,不同地区流行的基因型不同,而且基因型与疾病的预后、治疗药物的选择等均有一定关系<sup>[9-11]</sup>. 为了解我国北方地区HBV基因型流行病学情况及其临床意义,我们采用HBV A-F 6个主要基因型特异性多引物对巢式PCR法对594例不同临床表现的乙肝患者、154名健康人血清及53份丙肝患者血清中HBV DNA阳性的464例标本进行了基因分型和分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 HBV感染的不同类型肝病患者血清594份采自2001-09/2002-12哈尔滨医科大学附属一院、二院,解放军211医院及海拉尔呼盟人民医院门诊或住院患者,包括急性肝炎63例,慢性肝炎198例,肝硬化72例,原发性肝癌73例,HBV无症状携带者188例.所有病例诊断均符合2000年西安全国肝病会议修订的病毒性肝炎诊断标准及肝癌、肝硬化等诊断指标;同时还采集53例临床诊断为丙型肝炎(抗HCV阳性)患者血清进行了HBV DNA及基因型检测;154份健康人血清采自黑龙江省商业大学2001级新生,HBV血清免疫学标志均为阴性. M-MLV逆转录酶(Promega, 200 MU/L); Taq DNA合成酶(Promega, 5 MU/L); 核酸提取试剂盒(Sepa-Gene RV-R)购自日本三光株式会社; 100 bp DNA Marker(华美生物技术公司). 巢式PCR检测HBV DNA的引物(X区),设计参见文献[12],由北京华美生物公司合成.

外引物对为: 5' -TGCCAACCTGGATCCTTCGCGGG ACGTCCTT-3'(nt1 392-1 421); 5' -GTTCACGGTGGT CTCCATG-3'(nt1 625-1 607). 内引物对为: 5' -GTCC CCTTCTTCATCTGCCGT-3'(nt1 487-1 507); 5' -ACG

TGCAGAGGTGAAGCGAAG-3'(nt 1 604-1 584). 检测HBV基因型用引物根据HBV DNA pre-S和S基因区保守序列设计各基因型特异引物<sup>[13]</sup>, A, B, C…….F代表各基因型(表1). 引物由日本感染病研究所阿部贤治教授惠赠.

1.2 方法 待检血清HBV DNA扩增采用巢式PCR法. 首先取血清标本100 μL,按核酸提取试剂盒说明提取血清DNA,将提取物溶解于50 μL无RNA的去离子水中,混匀即为血清DNA提取物. 取DNA提取物5 μL为模板,总反应体系为50 μL,进行巢式PCR扩增HBV DNA,方法见文献[18]. 反应产物经25 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定,出现118bp DNA片段为HBV DNA阳性. HBV DNA阳性者测其基因型. HBV DNA基因型别的检测采用基因型特异多引物对巢式PCR法. 取待检DNA 5 μL为模板,总反应体系为40 μL. 第1次PCR反应参数为: 95 °C 10 min后, 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 40个循环,再72 °C 7 min. 第2次PCR分两组进行,先按表1分成A组(包括A, B, C基因型)和B组(包括D, E, F基因型)加引物,再分别加入第1次PCR产物1 μL. 第2次PCR反应参数为: 95 °C 10 min后,按94 °C 20 s, 58 °C 20 s, 72 °C 30 s进行20个循环之后,按94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s,再进行20个循环,最后72 °C 7 min. 反应后,分别取A组和B组扩增产物10 μL于30 g/L琼脂糖凝胶进行电泳,溴化乙锭染色后,凝胶电泳分析系统(上海天美2010)观察并照相.

2 结果

2.1 HBV DNA检测结果 采用巢式PCR法对801份患者血清,其中包括594例HBV感染组不同肝疾患、53

表1 巢式PCR检测HBV基因型特异引物序列

引物	序列 <sup>a</sup>
第1次 PCR	
P1	5' -TCA CCA TAT TCT TGG GAA CAA GA-3'(nt2823-2845, 通用)
S1-2	5' -CGA ACC ACT GAA CAA ATG GC-3' (nt685-704, 通用)
第2次 PCR	
A 组	
B2	5' -GGC TCM AGT TCM GGA ACA GT-3'(nt67-86, A-E型特异)
BA1R	5' -CTC GCG GAG ATT GAC GAG ATG T-3' (nt113-134, A型特异)
BB1R	5' -CAG GTT GGT GAG TGA CTG GAG A-3' (nt324-345, B型特异)
BC1R	5' -GGT CCT AGG AAT CCT GAT GTT G-3' (nt165-186, C型特异)
B 组	
BD1	5' -GCC AAC AAG GTA GGA GCT-3' (nt2979-2996, D型特异)
BE1	5' -CAC CAG AAA TCC AGA TTG GGA CCA-3' (nt2955-2978, E型特异)
BF1	5' -GYT ACG GTC CAG GGT TAC CA-3' (nt3032-3051, F型特异)
B2R	5' -GGA GGC GGA TYT GCT GGC AA-3' (nt3078-3097, D-F型特异)

<sup>a</sup>:“M”可代表一个核苷酸A或C; “Y”可代表一个核苷酸C或T.

例丙型肝炎组和154例健康人血清进行HBV DNA检测. 结果看出, HBV感染组各类型肝疾病患者血清中HBV DNA检出率65.8-77.7%, 各组间无统计学差异. 健康对照组HBV血清标志虽然均阴性, 但仍有8.4%(13/154)被检出HBV DNA, 其检出率与HBV感染组相比, 差异显著( $P < 0.01$ ). 丙型肝炎组(HCV抗体阳性)有17%(9/53)检出HBV DNA, 说明存在HCV和HBV混合感染的病例(表2).

表2 801份血清标本中HBV DNA检测结果

分组	n	HBV DNA 阳性	
		n	百分率(%)
健康人组	154	13	8.4
HBV感染组	594	442	74.4 <sup>b</sup>
无症状携带者	188	146	77.7
急性乙型肝炎	63	43	73.0
慢性乙型肝炎	198	153	77.3
肝硬化	72	49	68.1
原发性肝癌	73	48	65.8
丙型肝炎组	53	9	17.0

<sup>b</sup> $P < 0.01$ , vs 健康人组.

2.2 HBV DNA 基因型 采用基因型特异多引物对巢式PCR法对464例HBV DNA阳性标本进行了HBV基因型检测, 出现68 bp, 281 bp, 122 bp和119 bp条带者分别为HBV A, B, C和D基因型特异条带, 未出现E和F基因型特异带(图1, 2).

2.3 HBV DNA 基因的分布 在464例HBV DNA阳性的血清标本中, 有440份被确定型别, 24份未测出型别. 检出的HBV型别有A, B, C, D型, E和F型未检出, 各型在不同临床组血清标本中的分布不同(表3). HBV基因型总检出率以C型为主, 占77.2%, 其他型别依次是A型为5.2%, B型为7.1%, D型为2.4%, E和F型未检出, 但有3.0%同时检出B型和C型, 还有5.2% HBV DNA没鉴定出基因型别. HBV感染组中不同肝疾病

表3 HBV基因型在各临床组血清标本中的分布

分组	HBV DNA 阳性 / n	HBV基因型 / n (%)					
		A	B	C	D	B+C	UC*
健康人组	13	0	0	10 (76.9)	0	1 (7.7)	2 (15.4)
HBV感染组(小计)	442	23 (5.2)	31 (7.0)	343 (77.6)	10 (2.3)	13(3.0)	20 (4.6)
HBV携带者	146	10 (6.8)	11 (7.5)	110 (75.3)	6 (4.1)	4 (2.7)	5 (3.4)
急性乙型肝炎	46	2 (4.3)	6 (13)	32 (69.6)	2 (4.3)	1 (2.2)	3 (6.5)
慢性乙型肝炎	153	9 (5.9)	11 (7.2)	119 (77.8)	2 (1.3)	3 (2.0)	9 (5.9)
肝硬化	49	2 (4.1)	3 (6.1)	39 (79.6)	0	2 (4.1)	3 (6.1)
原发性肝癌	48	0	2 (4.2)	43 (89.6)	0	3 (6.3)	0
丙型肝炎组	9	1 (11.1)	0	5 (55.6)	1 (11.1)	0	2 (22.2)

\*UC, 型别不确定.

患者血清中HBV基因型同样是以C型为主(77.6%), 不同基因型在各组分布, 组间无统计学差异. 健康人组13例HBV DNA阳性血清中也有10例检出C基因型, 占76.9%, 除1例B和C型混合外, 其余型别未被检出. 9例HBV DNA阳性的丙型肝炎血清中, 有5例是C型, 占55.6%, A和D型各检出1例.

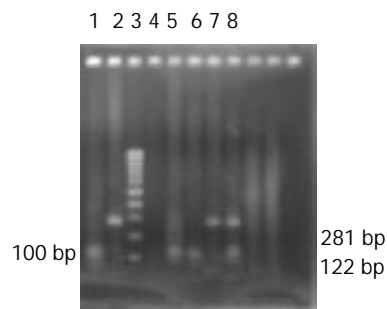


图1 HBV基因B, C型电泳图. 1, 2: C, B型阳性对照; 4: 阴性对照; 3: DNA分子大小标准; 5, 6: C型; 7: B型; 8: C和B混合型.

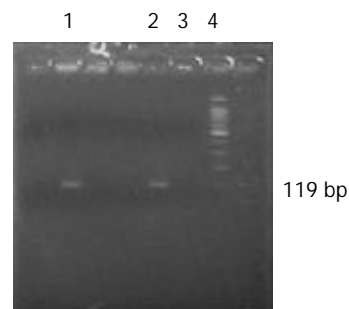


图2 HBV基因D型电泳图. 1: HBV D型; 2, 3: HBV D型阳性和阴性对照; 4: DNA marker.

### 3 讨论

乙型肝炎为世界流行性疾病, 不同国家和地区发病率有明显差异, 我国为高流行区, 人群感染率平均为10%左右. HBV感染的诊断对临床治疗有很大指导意义. 以往临床上主要依据HBV血清学免疫标志分析判断病毒在体内复制情况、传染性及治疗方案等. 近年许多研究通过检测标本中HBV DNA或进行DNA定量来直接判断

病毒在体内复制情况.若HBV血清学免疫标志与DNA检测结合起来会更科学确定乙型肝炎病程进展及治疗方案.根据HBV抗原决定簇的差异可划分为4个血清型,而按HBV基因序列差异目前分为A-H 8个基因型<sup>[17]</sup>.虽然二者有一定的对应关系,但血清亚型并不能完全反映出HBV各株间的异质性,而HBV基因型确能更好地理解各流行株间的不同差异性.为此了解世界各地HBV基因型分布情况,对寻找和追踪传染源、分析病毒衍变和进化更有意义,对研究不同株与临床疾病类型及预后也有一定指导意义,特别是针对各地基因优势株制备疫苗是更值得考虑的问题.

HBV基因型分布有明显地域性<sup>[14-15]</sup>.A型主要分布于欧洲和美国;B、C型主要分布于远东和亚洲地区;D型是地中海地区和近东的优势基因型;E型主要分布非洲;F、G型见于美国;最近中美洲有H型的报道<sup>[7]</sup>.我国各地区报道也不同<sup>[15-17]</sup>.我们采用基因型特异多引物对巢式PCR法,对464例HBV DNA阳性患者血清中HBV进行了基因分型检测.方法不仅简单而且结果可靠.本结果表明,北方地区被检血清标本中HBV DNA存在A、B、C、D 4个基因型,其中以C型为主,占77.2%,B、A和D型的检出率较低,分别为7.1%,5.2%和2.4%,E、F型未检出.该结果与2002年南宁、广州地区报道相似<sup>[16-17]</sup>.至于14例同时检出B型和C型基因是否是重叠感染,尚须进一步证实.还有24例患者血清中HBV DNA虽然阳性,但未确定出型别,有可能是A-F基因型以外的型别,如G型或H型,尚需进一步加以证实.从本研究结果看出丙型肝炎患者血清中有17%检出HBV DNA,其中也是以C型为主(55.6%),说明两种肝炎病毒可重叠感染<sup>[18]</sup>.

#### 4 参考文献

- Seo Y, Yoon S, Nakaji M, Yano Y, Nagano H, Ninomiya T, Hayashi Y, Kasuga M. Hepatitis B virus DNA in anti-HBe-positive asymptomatic carriers. *Intervirology* 2003;46:43-49
- Hannoun C, Horal P, Lindh M. Long-term mutation rates in the hepatitis B virus genome. *J Gen Virol* 2000;81:75-83
- Pumpens P, Grens E, Nassal M. Molecular epidemiology and immunology of hepatitis B virus infection-an update. *Intervirology* 2002;45:218-232
- Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol* 2002;83:1267-1280
- Miyakawa Y, Mizokami M. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology* 2003;46:329-338
- Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002;40:1207-1209
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnus LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002;83(Pt 8):2059-2073
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000;81:67-74
- Joh R, Hasegawa K, Ogawa M, Ishikawa K, Iizuka A, Naritomi T, Kanai N, Torii N, Hashimoto E, Hayashi N. Genotypic analysis of hepatitis B virus from patients with fulminant hepatitis: comparison with acute self-limited hepatitis. *Hepatol Res* 2003;26:119-124
- Kato H, Orito E, Gish RG, Sugauchi F, Suzuki S, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Characteristics of hepatitis B virus isolates of genotype G and their phylogenetic differences from the other six genotypes (A through F). *J Virol* 2002;76:6131-6137
- Yuen MF, Sablon E, Yuan HJ, Wong DK, Hui CK, Wong BC, Chan AO, Lai CL. Significance of hepatitis B genotype in acute exacerbation, HBeAg seroconversion, cirrhosis-related complications, and hepatocellular carcinoma. *Viral Hepatitis* 2003;37:562-567
- Konomi N, Yamaguchi M, Naoto H, Aiba N, Saito T, Arakawa Y, Abe K. Simultaneous detection of hepatitis B, C, and G viral genomes by multiplex PCR method. *Jpn J Infect Dis* 2000;53:70-72
- Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 2001;39:362-364
- Chu CJ, Keeffe EB, Han SH, Perrillo RP, Min AD, Soldevilla-Pico C, Carey W, Brown RS Jr, Luketic VA, Terrault N, Lok AS. Hepatitis B virus genotypes in the United States: results of a nationwide study. *Gastroenterology* 2003;125:444-451
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-47
- Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002;22:37-44
- 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:1362-1364
- Ding X, Gu HX, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki Y, Li TC, Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:19-22