

Annu Rev Immunol, 2009, 27; 591-619.

[2] Yokosuka T, Kobayashi W, Takamatsu M, et al. Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation[J]. Immunity, 2010, 33(3): 326-339.

[3] Flores-Borja F, Jury EC, Mauri C, et al. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(49): 19396-19401.

[4] Xue H, Liang F, Liu N, et al. Potent antirheumatic activity of a new DNA vaccine targeted to B7-2/CD28 costimulatory signaling pathway in autoimmune arthritis[J]. Hum Gene Ther, 2011, 22(1): 65-76.

[5] Choi JM, Kim SH, Shin JH, et al. Transduction of the cytoplasmic domain of CTLA-4 inhibits TcR-specific activation signals and prevents collagen-induced arthritis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(50): 19875-19880.

[6] Wan B, Nie H, Liu A, et al. Aberrant regulation of synovial T cell activation by soluble costimulatory molecules in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol, 2006, 177(12): 8844-8850.

[7] Nishimura H, Nose M, Hiai H, et al. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor [J]. Immunity, 1999, 11: 141-151.

[8] Raptopoulou AP, Bertsias G, Makrygiannakis D, et al. The programmed death 1/programmed death ligand 1 inhibitory pathway is up-regulated in rheumatoid synovium and regulates peripheral T cell responses in human and murine arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(7): 1870-1880.

[9] Wang G, Hu P, Yang J, et al. The effects of PDL-Ig on collagen-induced arthritis[J]. Rheumatol Int, 2011, 31(4): 513-519.

[10] Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses[J]. Nat Immunol, 2003, 4: 899-906.

[11] Tran CN, Thacker SG, Louie DM, et al. Interactions of T cells with fibroblast-like synoviocytes: role of the B7 family costimulatory ligand B7-H3[J]. J Immunol, 2008, 180(5): 2989-2998.

[12] Zhang GB, Hou JQ, Shi JF, et al. Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum [J]. Immunology, 2008, 123(4): 538-546.

[13] Murphy KM, Nelson CA, Sedy JR. Balancing co-stimulation and inhibition with BTLA and HVEM[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(9): 671-681.

[14] Pierer M, Brentano F, Rethage J, et al. The TNF superfamily member LIGHT contributes to survival and activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2007, 46(7): 1063-1070.

[15] Yao S, Zhu Y, Zhu G, et al. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human[J]. Immunity, 2011, 34(5): 729-740.

[16] Takahashi N, Matsumoto K, Saito H, et al. Impaired CD4 and CD8 effector function and decreased memory T cell populations in ICOS-deficient patients[J]. J Immunol, 2009, 182(9): 5515-5527.

[17] Frey O, Meisel J, Hutloff A, et al. Inducible costimulator (ICOS) blockade inhibits accumulation of polyfunctional T helper 1/T helper 17 cells and mitigates autoimmune arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(8): 1495-1501.

[18] Her M, Kim D, Oh M, et al. Increased expression of soluble inducible costimulator ligand (ICOSL) in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Lupus, 2009, 18(6): 501-507.

[19] Croft M. Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134) [J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 57-78.

[20] Yoshioka T, Nakajima A, Akiba H, et al. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(10): 2815-2823.

[21] 华建江, 姜健, 吴雄君, 等. 新肿瘤标志物 sB7-H4 初探[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 576-578.

[22] 周厚清, 吴瑾彦, 董敏. 类风湿因子阴性类风湿关节炎患者血清抗瓜氨酸肽或蛋白抗体、IL-10 及 IL-18 检测分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1441-1442.

(收稿日期: 2011-10-08)

• 综 述 •

急性心肌梗死的新生标志物

李建珍¹, 刘春江¹综述, 田晋洪^{1△}, 府伟灵²审校

(1. 武警山西省总队医院, 太原 030006; 2 第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 心肌梗死; 生物学记; 诊断
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 02. 026 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)02-0188-04

急性心肌梗死(AMI)是临床常见的死亡原因。最新资料显示, 美国每年因 AMI 死亡人数达 20~25 万, 全世界每年因心脏猝死的人数达 400~500 万^[1]。而及时明确诊断, 给予纤溶治疗、冠状旁路移植或皮下冠状动脉介入治疗, 可大大降低死亡率。心电图改变是诊断心肌梗死(MI)的强有力证据之一, 而其对于非 ST 抬高型、非 Q 波型、亚急性心肌梗死等的诊断却有一定局限, 这将直接影响临床治疗^[2]。心电图诊断 AMI 的阳性率最多是 80%, 其余的 20% 必须依靠生物化学标志物确诊, 因此, 寻求有价值的生物标志物变得越来越重要。

因为这不仅使疾病的诊断更加准确, 而且为疾病的预后提供更有价值的信息。有价值的生物标志物应具有以下特点: 稳定存在且便于测量; 有较高的敏感性和特异性; 能够检测早期心肌损伤, 其变化可以反映疾病的严重程度; 能够提供临床表现以外的诊断信息。本文就近年来新生物标志物的特点和临床意义作一综述。

1 MI 的定义及诊断标准

MI 是在冠状动脉病变的基础上, 发生冠状动脉血供急剧减少或中断, 使相应的心肌严重而持久地急性缺血导致心肌坏

△ 通讯作者, E-mail: tianjohn2006@sina. com.

死。近年来,随着高灵敏血清生化标志物的发现和更精确影像技术的发展,临床对 MI 的诊断能力逐渐提高。2007 年 ESC 联合 ACC、AHA、WHF 对 MI 进行了重新定义:心脏标志物中至少有一项升高或降低(尤其是肌钙蛋白)超过参考值上限的 99%分位值,同时至少伴有一项心肌缺血的证据,如存在缺血症状;新的缺血性心电图改变;病理性 Q 波改变、影像学提示存活心肌有新的损失或新的局部室壁活动异常^[3]。

2 AMI 的现行标志物

自 1979 年世界卫生组织提出 AMI 的诊断标准以来,血清天门冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)以及同工酶组成血清心肌酶谱,对于 AMI 的诊断起了重要作用。临床上还常选用 α -羟丁酸脱氢酶(HBDH)、肌钙蛋白、肌红蛋白作为 AMI 的诊断指标。

3 AMI 的新生标志物

近年来,随着分子生物学的深入发展和新检测技术的应用,越来越多的新生标志物进入人们的视线。因其在诊断 AMI 方面有特殊的优势,从而得到广大医学科研工作者的青睐。

3.1 心肌钙蛋白 是肌肉收缩的调节蛋白,由肌钙蛋白 T(TnT)、肌钙蛋白 I(TnI)及肌钙蛋白 C(TnC)三种亚单位组成。1987 年, Cummins 等^[4]首先描述了 cTnI 的多克隆抗体检测。随后陆续有 TnI 和 TnT 的单克隆抗体方法。然而最初的商业化试剂盒测量 TnT 与骨骼肌存在交叉反应,后来逐步发展了心肌特异的实验^[5-6]。2000 年和 2007 年的 MI 定义中, cTn 已取代 CK-MB,成为诊断心肌损伤的敏感指标。cTn 在 MI 发作 3 h 后开始升高,12 h 达到高峰,大约持续 10 d 左右(cTnI:7~10 d, cTnT:10~14 d)。在 MI 时其峰值达参考值上限的 20 倍以上,而 CK-MB 通常是其上限参考值的 10 倍左右,因而对于微小的心肌损伤, cTn 具有更高的敏感性。同时,由于其持续时间长,对于 MI 的后期诊断具有明显的优势,然而对于再次 MI 的早诊断却存在局限性^[7-8]。

cTnI 和 cTnT 对于 AMI 的诊断差异无统计学意义。前者具有较低的初始灵敏度和较高的特异性,后者则是 AMI 的确定性标志物。另据文献报道,肾病晚期患者(ESRD)在排除急性冠状动脉综合征(ACS)的情况下,有 30%~70%的患者 cTnI 升高,而小于 5%的患者其 cTnI 升高。因此,对于 ESRD 的患者, cTnI 比 cTnT 具有更高的特异性^[7,9]。

3.2 心脂肪酸结合蛋白(H-FABP) 是一类相对分子质量较小而对脂肪酸有高亲和力的可溶性蛋白质,相对分子质量约为 15×10^3 。除分布于心肌外,也存在于脑、肾脏和骨骼组织中。在急性局部缺血或剧烈运动时会升高,一般在 5~6 h 血清水平达峰值,36 h 后恢复至正常,可作为诊断早期心肌缺血和 MI 的标志物之一^[10]。然而, FABP 作为独立指标诊断 AMI 时,结果并不尽如人意,研究显示其阳性和阴性预测值分别为 65.8%、82.0%^[11]。Okamoto 等^[12]对 3 组患者:140 例 MI 患者、49 例胸痛患者(非 MI)和 75 例健康志愿者的 3 项指标进行测定,其敏感度和特异度分别是 92.9%、67.3%(FABP), 88.6%、57.1%(肌红蛋白), 18.6%、98.0%(CK-MB)。FABP 持续增高的患者,其心脏发病概率显著增加^[13-14]。ACS 患者 FABP 的四分位数显示,最高分位数的死亡率是最低分位数死亡率的 6.59 倍。而同时测定 cTn 时,当 cTn 阴性且 FABP < 5.8 mcg/L 时,其 6 个月的死亡率为零;当 cTn 阴性且 FABP > 5.8 mcg/L 时,死亡危险概率增加 4.93 倍;当 cTn 阳性且 FABP > 5.8 mcg/L 时死亡危险概率增加 7.93 倍^[15]。

H-FABP 作为低相对分子质量蛋白质,大多数被肾脏清除,而在肾脏衰竭时, H-FABP 的血清水平会显著增加。FABP 和肌红蛋白都存在于心肌和骨骼肌组织中,然而,心肌中肌红蛋白水平低于骨骼组织,而 FABP 水平至少是骨骼组织中的 2 倍。因此,采用肌红蛋白/心脂肪酸结合蛋白的比值来区分是心肌还是骨骼组织损伤更准确(心肌为 2~10, 骨骼组织为 20~70)^[16]。

3.3 B 型钠尿肽(BNP) 又称脑尿钠肽,是由心肌细胞合成的具有生物学活性的天然激素,主要在心室表达,同时也存在于脑组织中。当左心室功能不全时,由于心肌扩张而快速合成释放入血,有助于调节心脏功能。心肌细胞所分泌的 BNP 先以 108 个氨基酸组成的前体形式存在,当心肌细胞受到刺激时,在活化酶的作用下裂解为由 76 个氨基酸组成的无活性的直线多肽(NT-proBNP)和 32 个氨基酸组成的活性环状多肽 BNP。BNP 具有较短的半衰期,而 NT-proBNP 在血清中更稳定和便于测量。

BNP/NT-proBNP 作为心衰定量标志物,不仅反映左室收缩功能障碍,也反映左室舒张功能障碍、瓣膜功能障碍和右室功能障碍情况。文献报道,其预测 AMI 患者死亡率不差于 GRACE 危险评分系统^[17],而两者联合应用可增加诊断的准确性。在非 ST 抬高的 ACS 中, BNP 水平可提示患者是否入院,预测 180 d 死亡率或心力衰竭^[15]。

3.4 C 反应蛋白 是由 5 个相同亚基依靠非共价键形成的环状五聚体,在急性损伤时由肝脏合成并释放非特异性炎症标志物。急性刺激 6 h 后升高,48 h 内达到峰值,约为初始值的 100 倍。刺激去除后,逐渐降至正常水平,半衰期 18~20 h。健康成年人 C 反应蛋白水平升高,提示心血管疾病发生的危险性增加,而且 C 反应蛋白本身可调节动脉粥样硬化血栓的形成,这个已有大量文献报道^[18-19]。

研究显示, C 反应蛋白水平可以预测 MI 后患者的心力衰竭和死亡发生率。在 MI 早期,升高的 C 反应蛋白峰值与早期并发症(包括心脏破裂、心室动脉瘤、血栓等)有一定关系。MI 发生后 2~4 d, C 反应蛋白达到峰值,8~12 周可降至正常水平。因此,与肌钙蛋白相似,其不能预测再次 MI 的发生,除非降至正常水平以后(约 12 周)。另外, C 反应蛋白的非特异性在其他炎症条件下也会升高,比如风湿性关节炎、恶性肿瘤、脉管炎等^[15]。

3.5 髓过氧化物酶(MPO) 由中性粒细胞、单核细胞和某些组织的巨噬细胞分泌的含血红素辅基的血红素蛋白酶,是血红素过氧化物酶超家族成员之一。MPO 通过产生自由基和多种反应性物质,促进动脉粥样硬化斑块形成,进而引起多种并发症,如急性冠状动脉综合征(ACS)。研究发现, MPO 缺陷的个体罹患心血管疾病的危险性明显下降。MPO 水平的升高不仅与患冠状动脉疾病易感性相关,还可以预测早期患 MI 的危险性。MPO 高于中位数水平可预测 1 年后的死亡和 MI 发生率,而当 MPO 和 NT-proBNP 都高于中位数水平,则患病风险大大增加^[20-21]。

MPO 是预测 ACS 患者发生不良心血管事件的一个新的预测因子,特别是在肌钙蛋白 T(TnT)水平较低的患者, MPO 能够识别那些将来发生心血管事件危险性较高的患者^[22]。Baldus 等^[23]选择 1 090 例 ACS 患者,测量血浆 MPO 水平并进行 6 个月的随访,记录患者 MI 和死亡情况。结果显示,患者血浆 MPO 水平与血浆 TnT、可溶性 CD40 受体、C 反应蛋白水平以及 ST 段的改变无关。但随着 MPO 水平升高(>350

$\mu\text{g/L}$), 心血管发病风险明显升高, 对判断 TnT 水平低的 ACS 患者的危险性意义更大。MPO 表达和活性增加先于 TnT 和 CK-MB, 甚至在患者发生胸痛的 2 h 内, 其水平明显升高, 所以对胸痛患者而言, 用 MPO 预测其是否发生 ACS 将有更重要的临床意义。值得指出的是, 由于中性粒细胞和单核细胞的活化会发生在任何感染和炎症性疾病中, 因此 MPO 对于心脏疾病的诊断尚缺乏特异性。

3.6 妊娠相关血浆蛋白 A(PaPPA) PaPPA 为一种潜在的促动脉粥样硬化的基质金属蛋白酶, 其在血浆中水平的升高, 对于不稳定型心绞痛或急性心肌梗死有诊断价值, 可以作为急性冠状动脉综合征的一种新的标志物。PaPPA 在不稳定型心绞痛和 AMI 时显著升高, 与胰岛素样生长因子和 C 反应蛋白有一定相关性, 而与 cTn 无相关性。当 PaPPA $> 2.9 \text{ mIU/L}$ 时, 即使 cTn 不升高, 预测 AMI 的死亡风险也增加 4.6 倍^[24]。

3.7 生长分化因子-15(GDF-15) 是 β -细胞因子超家族转化生长因子的成员之一, 正常情况下在心脏中并不表达。在应急状态(如缺血再灌注等)其表达水平在一系列组织中会显著升高, 包括在心肌细胞中。GDF-15 具有抗肥大的效应, 这在早期心脏肥大的基因敲除小鼠中得到证实^[25]。GDF-15 还可以为 AMI 和 ACS 提供预后信息。研究显示, GDF-15 增高水平(四分位数)与非 ST 抬高的 ACS 患者的 1 年死亡率呈正相关^[26], 分别是 1.5%、5.0%、14.1%。Wollert 等^[27]将 NSTEMI 患者随机分为保守治疗组和侵入式治疗组, 发现 GDF-15 可以预测保守治疗组患者的死亡或再次 MI, 而对于侵入式治疗组则不能。同时, 对早期侵入式治疗患者 GDF-15 与 cTn 作比较, 显示 cTn 阳性而 GDF $< 1\,200 \text{ ng/L}$ 患者零死亡。然而, GDF-15 对于心血管疾病也非特异, 在恶性肿瘤是也会升高。

4 小 结

随着分子生物学的不断发展, 越来越多的标志物被发现, 如和肽素、CD40 配体、胱蛋白酶抑制剂 C 等。然而, 任何一个标志物都有其优点和局限性, 进行多标志物联合诊断可以互相弥补其不足, 为疾病的诊断、预后提供更加有价值的信息, 这也将是未来的发展趋势。因此, 深入开展随机对照实验, 了解每一个标志物的生物学特点和在 AMI 中的代谢周期, 是更好地为临床提供服务的前提, 也是临床和检验医师共同努力的方向。

参考文献

- [1] Chugh SS. Early identification of risk factors for sudden cardiac death[J]. Rev Cardiol, 2010, 7(6): 318-326.
- [2] Kumar A, Cannon CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management[J]. Mayo Clin Proc, 2009, 84(10): 917-938.
- [3] Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal definition of myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(22): 2173-2195.
- [4] Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction [J]. J Am Heart, 1987, 113(6): 1333-1344.
- [5] Katus HA, Looser S, Hallermayer K, et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiotroponin T [J]. Clin Chem, 1992, 38(3): 386-393.
- [6] Muller-Bardoff M, Hallermayer K, Schroder A, et al. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform: assay development and analytical and clinical validation[J]. Clin Chem, 1997, 43(3): 458-466.
- [7] Nagesh CM, Roy A. Role of biomarkers in risk stratification of a-

- cute coronary syndrome[J]. Indian J Med Res, 2010, 132(5): 627-633.
- [8] Keller T, Zeller T, Peetz D, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2009, 361(9): 868-877.
- [9] de Zoysa JR. Cardiac troponins and renal disease[J]. Nephrology (Carlton), 2004, 9: 83-88.
- [10] Chan CP, Sanderson JE, Glatz JF, et al. A superior early myocardial infarction marker. Human heart-type fatty acid-binding protein[J]. Z Kardiol, 2004, 93(5): 388-397.
- [11] Body R. Towards evidence based emergency medicine; best BETs from the manchester royal infirmary. Bet 2. heart fatty acid binding protein for rapid diagnosis of acute myocardial infarction in the emergency department[J]. Emerg Med J, 2009, 26(7): 519-522.
- [12] Okamoto F, Sohmiya K, Ohkaru Y, et al. Human heart-type cytoplasmic fatty acid binding protein(H-FABP) for the diagnosis of acute myocardial infarction clinical evaluation of H-FABP in comparison with myoglobin and creatine kinase isoenzyme MB[J]. Clin Chem Lab Med, 2000, 38(3): 231-238.
- [13] O'Donoghue M, de Lemos JA, Morrow DA, et al. Prognostic utility of heart-type fatty acid binding protein in patients with acute coronary syndromes[J]. Circulation, 2006, 114(6): 550-557.
- [14] Kilcullen N, Viswanathan K, Das R, et al. Heart-type fatty acid-binding protein predicts long-term mortality after acute coronary syndrome and identifies high-risk patients across the range of troponin values[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(21): 2061-2067.
- [15] Chan D, Ng LL. Biomarkers in acute myocardial infarction[J]. BMC Med, 2010, 7(8): 34.
- [16] Van Nieuwenhoven FA, Kleine AH, Wodzig WH, et al. Discrimination between myocardial and skeletal muscle injury by assessment of the plasma ratio of myoglobin over fatty acid-binding protein[J]. Circulation, 1995, 92(10): 2848-2854.
- [17] Khan SQ, Narayan H, Ng KH, et al. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide complements the GRACE risk score in predicting early and late mortality following acute coronary syndrome[J]. Clin Sci(Lond), 2009, 117(1): 31-39.
- [18] Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells; implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis[J]. Circulation, 2003, 107(3): 398-404.
- [19] Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes[J]. Circulation, 2002, 105(5): 570-575.
- [20] Mocatta TJ, Pilbrow AP, Cameron VA, et al. Plasma concentrations of myeloperoxidase predict mortality after myocardial infarction[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 49(20): 1993-2000.
- [21] Meuwese MC, Stoes ES, Hazen SL, et al. Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals; the EPIC-Norfolk Prospective Population Study[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(2): 159-165.
- [22] 汤红英, 郑玉建, 吴顺华. 髓过氧化物酶相关疾病的研究进展[J]. 新疆医科大学学报, 2009, 32(3): 255-258.
- [23] Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum level predict risk in patients with acute coronary syndromes[J]. Circulation, 2003, 108(16): 1440-1445.
- [24] Lund J, Qin QP, Ilva T, et al. Circulating pregnancy-associated plasma protein a predicts outcome in patients with acute coronary

syndrome but no troponin I elevation[J]. Circulation, 2003, 108 (16):1924-1926.

[25] Wang J, Xu N, Feng X, et al. Targeted disruption of Smad4 in cardiomyocytes results in cardiac hypertrophy and heart failure[J]. Circ Res, 2005, 97(8):821-828.

[26] Wollert KC, Kempf T, Peter T, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2007, 115(8):962-971.

[27] Wollert KC, Kempf T, Lagerqvist B, et al. Growth differentiation factor 15 for risk stratification and selection of an invasive treatment strategy in non ST-elevation acute coronary syndrome[J]. Circulation, 2007, 116(14):1540-1548.

(收稿日期:2011-07-21)

• 综 述 •

丙型肝炎病毒基因分型检测策略

赵 荣¹, 彭劲松¹, 黄汉菊¹综述, 陈维贤²审校

(1. 广东省妇幼保健院 510010; 2. 重庆医科大学附属第二医院检验科 400010)

关键词: 肝炎病毒属; 基因分型; 检测策略
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 02. 027 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)02-0191-04

自 1989 年以来^[1], 丙型肝炎病毒感染已成为全世界最关注的问题。据 WHO 报道, 全世界有 1. 7 亿感染者, 其流行率约 3%^[2]。HCV 感染后病情隐匿, 50%~80% 会转变成慢性肝炎, 如未经任何合理的治疗, 在 10~20 年后, 有 10%~30% 会发展成为肝硬化, 1%~5% 甚至会发展成原发性肝癌^[3], 严重危害患者的健康和生命。

丙型肝炎病毒(HCV)是一类球形、单股正链 RNA 病毒, 其基因组序列具有高度变异性。根据不同区域的基因序列变异情况, HCV 分为 6 个基因型, 80 多种基因亚型, 最近在加拿大还报道出 7a 这个新的亚型^[4]。由此可以看出, 随着时间推移和分子生物学技术的不断发展, 越来越多新的基因亚型将被人类所发现。而本文将根据近几年来对 HCV 基因分型的检测经验, 分别从以下几个方面来探讨 HCV 基因分型的检出策略。

1 HCV 感染的确定

HCV 感染的确定, 是基因分型的前提。目前, 可以从三个方面来确定机体是否感染了丙型肝炎病毒。

1.1 HCV 抗体的筛查 抗-HCV 是非中和性的抗体, 是 HCV 感染的标志。它的检测是临床上较为常用的诊断方法。现今有两种方法来检测血清中 HCV 的抗体: (1) 酶免疫法(EIA 法): 市面上基于 EIA 的抗-HCV ELISA 诊断试剂盒众多, 分国产试剂和进口试剂两种。因厂商的不同其灵敏度和特异性存在着一定的差异, 在使用过程中一般会挑选 2 种不同厂商的试剂同时进行检测。(2) 免疫印迹法(RIBA 法): 主要解决 ELISA 实验中出现的假阳性问题, 在操作上较 EIA 法困难, 费时, 成本也很高, 因此限制了此项技术在临床上的普遍使用。目前, 主要用于科研或参比实验室中。

1.2 HCV 抗原的检测 主要是 HCV 核心抗原的检测。目前已开发出两种 HCV 核心抗原的 ELISA 检测试剂, 一种是直接检测血清或血浆样本中的游离 HCV 核心抗原, 主要用于血液筛查; 另一种是检测血清或血浆中的总 HCV 核心抗原, 不仅可用于血液的筛查, 还可用于指导慢性丙型肝炎患者的治疗^[5]。该试剂的价格较便宜, 而且可实现对 HCV 早期感染的发现, 因而可以大力推广。

1.3 HCV RNA 检测 HCV RNA 检测能较直观地反映出病毒的存在, 常作为 HCV 感染的主要确诊手段。RNA 检测可分为定性与定量两种。定性检测: 常采用逆转录套式聚合酶链

反应, 此技术主要用于血液及相关的生物制品中 HCV 的筛查, 其灵敏度和特异性都比较高, 但该技术复杂, 受多种因素的影响。定量检测: 反映机体内病毒活跃程度及实际水平, 此项技术适合于临床样本的检测, 具有快速、特异、高灵敏度等优点, 对 HCV 患者的早期确诊, 感染人群的筛查、污染源的监测以及预测和观察抗病毒药物的疗效具有较高的实用价值。目前国内外 HCV 核酸定性、定量检测试剂较多, 其性能参照表 1。

2 HCV 基因型的检测

HCV 基因分型及准确的亚型识别问题, 对更好地了解 HCV 病毒进化、探讨传播途径、判定病情变化、评价抗病毒治疗效果等具有重要的意义, 下面将结合工作经验, 探讨 HCV 基因型的检出策略。

2.1 HCV 基因分型方法的选择 HCV 基因分型方法是以 PCR 技术为基础的, 主要有以下几种。

2.1.1 测序法 直接对 HCV 的核酸序列进行测序, 是 HCV 基因分型的“金标准”。

2.1.2 型特异性引物扩增法 根据不同 HCV 基因型在某一区段序列的差异, 设计一系列型特异性引物, 针对不同 HCV 基因型, 可扩增出长度大小不同的片段, 以此进行分型。

2.1.3 基因芯片和型特异性探针杂交法 HCV 基因分型芯片法是将型特异性的寡核苷酸探针固定在经处理的玻片上, 荧光标记的 PCR 产物与之特异结合, 杂交后, 经过扫描, 在相应的型特异性探针位置上出现荧光点, 根据点位置确定 HCV 的基因型和基因亚型。

2.1.4 限制性片段长度多态性分析 根据 HCV 不同基因型某一区段个别碱基的变异直接导致了某些酶切位点的改变而进行基因分型的。

2.1.5 遗传发育关系进化树分析 是在测序法的基础上所建立的。

2.1.6 异源分子迁移率法 但无论是哪种方法, 一般都是围绕 5'UTR、C-E1 和 NS5b 这三个区来进行的。单独扩增这三个区域中的任何一个区的基因序列对 HCV 进行基因分型, 都存在着一些漏诊或误诊的可能性^[6], 因此, 根据实验室现有条件以及分型的主要目的, 选择合适的方法来检测 HCV 的基因型别。

2.2 HCV 基因分型区域的选择 检测 HCV 基因分型最准