

• 临床检验研究论著 •

某地区丙型病毒性肝炎患者 HCV 基因分型研究

徐 辉,居 军,杨伟国
(甘肃省临床检验中心,甘肃兰州 730000)

摘 要:**目的** 了解该地区丙型病毒性肝炎(以下简称丙型肝炎)患者丙型肝炎病毒(HCV)基因分型情况。**方法** 分别以 ELISA 和重组免疫印迹试验进行血清标本抗 HCV 抗体筛查和确认,对抗 HCV 抗体阳性标本用实时荧光定量 PCR 进行病毒载量检测。对病毒载量大于 103 copy/mL 的标本用多重 PCR 进行 HCV 基因分型。**结果** 125 例抗 HCV 抗体阳性标本中,HCV 基因型主要为 1b、2a、3a、1c、2c 的检出率分别为 58.4%、21.6%、3.2%、4.0%和 8.0%。**结论** 该地区 HCV 感染主要以 1b 型为主,其次是 2a 和 3a 型,检出其他地区少见的 1c 和 2c 型,说明该地区丙型肝炎流行的基因型呈多样性。

关键词:肝炎抗体,丙型; 聚合酶链反应; 基因分型
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.06.019 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)06-0683-02

HCV genotype analysis in patients with viral hepatitis type C in certain area

Xu Hui, Ju Jun, Yang Weiguo
(Center of Clinical Experiment in Gansu Province, Lanzhou Gansu 730000, China)

Abstract:**Objective** To investigate hepatitis C virus(HCV) genotypes in patients with viral hepatitis type C in certain area.
Methods ELISA and immunoblotting assay were performed for the screening and confirmation of anti-HCV in serum samples, and the virus load in confirmed samples were detected by real-time quantitative PCR. Samples with virus load more than 103 copy/mL were analyzed for HCV genotypes by using multiplex PCR. **Results** Among 125 cases of samples, positive with anti-HCV, the detection rates of HCV genotype 1b, 2a, 3a, 1c and 2c were 58.4%, 21.6%, 3.2%, 4.0% and 8.0%. **Conclusion** The most common HCV genotype in patients with HCV infection was 1b, followed by 2a and 3a, and genotype 1c and 2c, rarely detected in other districts, were also could be detected, indicating that the geno types of hepatitis C in this area might be diverse.

Key words: hepatitis C antibodies; polymerase chain reaction; geno typing

丙型肝炎病毒(HCV)是经血液和(或)体液传播的一种单股正链 RNA 病毒,由于 RNA 复制酶的低保真性及缺乏校正功能,HCV 呈高度异质性。HCV 基因分型在 HCV 感染、传播、诊疗及预防等方面均有重要意义,且中国不同地区 HCV 基因型存在差异。HCV 基因型与干扰素抗病毒治疗的应答密切相关,是决定丙型病毒性肝炎(以下简称丙型肝炎)患者干扰素治疗效果的重要因素。

1 资料与方法

1.1 一般资料 由甘肃省临床检验中心及各地、州、市级医院收集的 HCV 感染患者血清标本,-70 ℃ 以下保存备用。

1.2 仪器与试剂 MX-3000P 型荧光定量 PCR 扩增仪(美国安捷伦)。抗 HCV 抗体 ELISA 检测试剂盒(厦门新创),重组免疫印迹试剂(美国 MP Biomedicals),核酸纯化柱、实时荧光定量 PCR 试剂(深圳凯杰),PCR 试剂、逆转录试剂(深圳达安)。基因分型引物由深圳达安公司合成。不同基因型扩增引物见表 1。

表 1 不同基因型扩增引物

PCR 扩增	引物名称	引物序列(5'-3')
第 1 次	HCV-Sc2	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATG
	HCV-Ac2	GAGMGGKATRTACCCCATGAGRTCGGC
第 2 次(1b)	HCV-S11	AGACCGTGCACCATGAGCAC
	HCV-G1b	CCTGCCCTCGGGTTGGCTAR
第 2 次(2b)	HCV-S11	AGACCGTGCACCATGAGCAC
	HCV-G2b	GGCCCCAATTAGGACGAGAC
第 2 次(3b)	HCV-S11	AGACCGTGCACCATGAGCAC
	HCV-G3b	CGCTCGGAAGTCTTACGTAC
第 2 次(2a)	HCV-S12	AACACTAACCGTCGCCACAA

续表 1 不同基因型扩增引物

PCR 扩增	引物名称	引物序列(5'-3')
第 2 次(1a)	HCV-G2a	CACGTGGCTGGGATCGCTCC
	HCV-S2	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(3a)	HCV-G1a	GGATAGGCTGACGTCTACCT
	HCV-S2	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(4)	HCV-G3a	GCCCAGGACCGGCTTCGCT
	HCV-S2	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(5)	HCV-G4	CCCGGGAACCTTAACGTCCAT
	HCV-S2	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(6)	HCV-G5a	GAACCTCGGGGGAGAGCAA
	HCV-S2	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(1c)	HCV-G6a	GGTCATTGGGGCCCCAATGT
	HCV-S31	AGACCGTGCACCATGAGCAC
第 2 次(2c)	HCV-G1c	GAATAGGCTGRCGCCTTCCG
	HCV-S32	AACACTAACCGTCGCCACAA
	HCV-G2c	AGTGGTGCCCGRTCTTTAGGG

1.3 方法

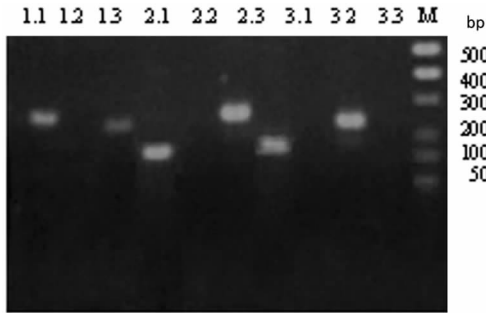
1.3.1 标本确认 以 ELISA 试剂对所收集标本进行抗 HCV 抗体筛查,用重组免疫印迹试验进行确认。对抗 HCV 抗体确认阳性标本用荧光定量 PCR 进行病毒载量检测。具体步骤严格按试剂盒说明书操作。

1.3.2 HCV 基因分型 采用二氧化硅吸附分离技术纯化 HCV RNA,具体步骤严格按核酸纯化柱试剂盒说明书操作。纯化后的核酸按以下程序进行逆转录反应:30 ℃ 10 min, 42 ℃ 20 min,85 ℃ 5 min。取 11 μL 逆转录产物按以下反应条件获得第 1 次 PCR 反应产物:94 ℃ 3 min,94 ℃ 1 min、

45 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 20 个循环, 94 ℃ 1 min, 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 20 个循环。取第 1 次 PCR 反应产物分 3 管进行第 2 次 PCR 扩增, 每管第 1 次 PCR 产物均为 0.5 μL, 反应条件为: 94 ℃ 3 min, 94 ℃ 1 min, 62 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环。以 3% 凝胶对第 2 次 PCR 反应产物进行电泳, 管 1 产物为 1b(234 bp)、2a(139 bp、190 bp, 部分 4 型也出现 190 bp 条带)、2b(337 bp) 和 3b(176 bp); 管 2 产物为 1a(208 bp)、3a(232 bp)、4(99 bp)、5(320 bp)、6(336 bp); 管 3 产物为 1c(104 bp)、2c(251 或 300 bp、117 bp)。

2 结 果

共确认抗 HCV 抗体阳性标本 125 例, 1b、2a、3a、2c、1c 基因型 HCV 检出率分别为 58.4% (73/125)、21.6% (27/125)、3.2% (4/125)、8.0% (10/125)、4.0% (5/125)。不同 PCR 产物凝胶电泳图见图 1。



M: DNA 分子标记物; 1.1、1.2、1.3: 1 号标本第 1 管、第 2 管、第 3 管; 2.1、2.2、2.3: 2 号标本第 1 管、第 2 管、第 3 管; 3.1、3.2、3.3: 3 号标本第 1 管、第 2 管、第 3 管。

图 1 HCV 分型凝胶电泳图

3 讨 论

丙肝是 HCV 经血液和(或)体液感染而引起的肝脏急、慢性炎症性疾病。目前, 全球约有 1.7 亿至 20 亿 HCV 感染患者, 每年新增约 350 万感染患者^[1]。在中国, HCV 主要通过输血传播, 感染患者总数超过 5 000 万, 属 HCV 中高度感染地区^[2-3]。HCV 基因组呈高度异质性。根据 HCV 基因组核苷酸序列的差异程度, 可将 HCV 分为基因型(30%~35%)、基因亚型(20%~25%)、分离株(5%~9%)和准种(1%~5%)^[4], 其中基因型及不同亚型共计 6 种^[5]。HCV 基因型的分布存在地理性差异。最早确定基因序列的是基因型 1a, 多见于美国。基因型 1b 则广泛分布于亚洲、欧洲及美国。基因型 2a 和 2b 占全球 HCV 基因型的 10%~30%, 分布以北美、欧洲、中国和日本等地区为主^[6], 中国大陆地区 HCV 1~6 型均有分布, 但以 1b、2a 型最常见, 其中 1b 型占 70%~80%, 在南方城市占 90% 以上, 2a 型从南向北逐渐增多。随着国外移民增多和人口流动日益频繁, 中国 HCV 基因型分布正逐步发生改变。熊瑜琳等^[7]的研究显示, 不同 HCV 基因型感染患者比例、HCV 基因型在患者中的分布及单基因型和混合基因型 HCV 感染率, 在南北地区间的差异无统计学意义, 即 HCV 基因型在中国南北地区的分布和流行无差异。这与本研究的结果一致。本研究显示, 甘肃地区丙型肝炎患者同样以 1b 型感染为主, 其次是 2a 型。混合基因型 HCV 感染多见于反复接受输血治疗者和共用针头的静脉注射毒品者, 中国以 1b/2a 基因型混合感染为主^[8]。本研究未检出混合基因型感染患者, 可能与标本来源有关(本研究收集的标本主要来源于献血者, 且非固定人群), 但检出了中国其他地区较少见的 1c 和 2c 型, 说

明甘肃地区流行的 HCV 基因型呈多样性。HCV 感染的重要特点是发病初期临床病情较轻, 然而具有极易慢性化的趋势, 约 50%~80% 的患者可发展至慢性, 其中约 20% 发展至肝硬化, 而肝硬化患者中, 每年约 1%~4% 可发展至肝癌^[9-10]。不同基因型和基因亚型 HCV 对肝脏的损伤程度不同。HCV RNA 含量反应病毒复制的活跃程度和病情变化, 其血清水平与肝脏炎症活动程度明显相关。有研究表明, HCV 基因型与 HCV RNA 含量有明显相关性, 基因型 1、2 感染者血清 HCV RNA 水平显著高于基因型 3 感染者, 前者病毒复制活跃, 病情易慢性化^[11-12]。因本次检测结果以 1b 型为主, 2a 型次之, 而且研究标本的病毒含量均大于 103 copy/mL, 这可能与 1、2 型常见于病毒含量高的标本有关。不同 HCV 基因型对治疗的反应也有明显差异^[13]。HCV 基因型是可用于抗病毒治效判断的强有力的独立的预测因子。 α 干扰素 (IFN- α) 是治疗 HCV 感染的首选药物, 而 IFN- α 的临床疗效与 HCV 基因型有密切关系, 确定 HCV 基因型对于治疗方案的选择极为重要。因此, HCV 基因分型具有重要的临床意义, 研究 HCV 各基因型的临床差别及其相关机制, 能够为丙型肝炎的诊断、治疗和预防以及预后判断提供强有力的依据。

参考文献

- [1] Alberti A, Benvegna L. Management of hepatitis C[J]. Hepatol, 2003, 38(Suppl1): 104-118.
- [2] 刘姐姐, 王全楚. 输血后丙型肝炎患者的临床特点及自然病程[J]. 实用肝脏病杂志, 2008, 11(6): 410-411.
- [3] 刘剑荣, 黄永建, 夏洪娇, 等. 丙型肝炎基因型分布特点及流行分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 32(12): 1347-1348.
- [4] Sinmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus 15 years on[J]. Gen Virol, 2004, 85(11): 3173-3188.
- [5] Hion K, Yamaguchi Y, Fujiwara D, et al. Hepatitis C virus quasispecies and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C: a prospective study [J]. J Viral Hepat, 2000, 7(1): 36-42.
- [6] Nguyen MH, Keefe EB. Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9[J]. Clin Liver Dis, 2005, 9(3): 411-426.
- [7] 熊瑜琳, 张长江, 王小红, 等. 中国人 HCV 标本库的建立[J]. 免疫学杂志, 2008, 5(24): 568-571.
- [8] Yuen MF, Lai CL. Response to combined interferon and ribavirin is better in patients infected with hepatitis C virus genotype 6 than genotype 1 in HongKong[J]. Intervirology, 2006, 49(1-2): 96-98.
- [9] 许爱萍, 吴林, 李俊, 等. 丙型肝炎病毒非结构蛋白 NS3 对环加氧酶 2 表达的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 778-779, 782.
- [10] 邱国华, 杜绍财, 孙南熊, 等. 丙型肝炎病毒非编码区 ABC 程序酶切分型研究[J]. 中华肝病杂志, 2004, 12(4): 237-239.
- [11] 徐皖苏, 刘靛雯, 秦晓华, 等. 山东地区丙型肝炎病毒基因型及相关因素分析[J]. 山东大学学报: 医学版, 2010, 48(2): 140-141.
- [12] Raghuraman S, Shaji RV, Sridharan G, et al. Distribution of the different genotypes of HCV among patients attending a tertiary care hospital in south India[J]. J Clin Virol, 2003, 26(1): 61-69.
- [13] Seeff LB, Hoofinagle JH. Appendix: The National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C 2002[J]. Clin Liver Dis, 2003, 7(1): 261-278.