

编码的特异大环内酯类外排机制增强是 GBS 对大环内酯类抗菌药物耐药的两大主要原因^[8]。如要选用该药,一定要经过药敏结果证实该菌株对此药敏感,否则很可能治疗无效。对氯霉素虽然敏感率大于 70%,该药会引起灰婴综合征,所以并不适用于孕妇身上。对左氧氟沙星的敏感率尚可,但其对婴儿影响较大,故一般不推荐使用。万古霉素敏感率是 100%,但不易通过胎盘屏障,且不良反应较大,所以用在孕妇身上并不合适^[9];但若是新生儿发生 GBS 感染,在青霉素及头孢菌素均过敏时,万古霉素将是一个最终的治疗方法。

产妇很难明确什么时候分娩,如能在产妇分娩前就能明确 GBS 培养结果阳性,就可以预防用药,避免产生感染的后果;而产妇若没有先做过 GBS 的培养,而分娩后怀疑新生儿有 GBS 感染可能,则尽早应用抗菌药物前留取新生儿血标本进行血培养检查,经 2~3 d 初步知道培养结果,可指导临床诊治。

参考文献

[1] 时春艳,曲首辉,杨磊,等.妊娠晚期孕妇 B 族链球菌带菌状况的检测及带菌对妊娠结局的影响[J].中华妇产科杂志,2010,45(1):12-16.
[2] 孙秀莉.吉林地区非妊娠妇女阴道 B 族链球菌带菌情况调查[J].

中国临床研究,2012,25(9):892-893.
[3] 李永红,赵期菊,容春风,等.生殖道 B 族溶血性链球菌感染与稽留流产的关系探讨[J].齐齐哈尔医学院学报,2011,32(6):874-875.
[4] Karat C, Madhivanan P, Krupp K, et al. The clinical and microbiological correlates of premature rupture of membranes[J]. Indian J Med Microbiol, 2006, 24(4): 283-285.
[5] 陈惠玲,叶惠芬,邓家德,等. B 族链球菌皮肤软组织及创伤感染分离株的耐药基因检测[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(10): 1057-1058, 1061.
[6] 汤洁,马向薇,张宁. 孕妇生殖道 B 族链球菌及其他病原微生物感染情况调查[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(10): 942-943.
[7] Schrag S, Gorwitz R, Fultz-Butts K, et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC[J]. MMWR Recomm Rep, 2002, 51(RR-11): 1-22.
[8] 周义正,李高莲,邱晓燕,等. B 群链球菌耐药性及红霉素耐药机制的研究[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(1): 66-68.
[9] 鲁炳怀,李雪清,时琰丽. 477 例孕晚期妇女宫颈分泌物携带细菌的分布和耐药分析[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(2): 155-156.

(收稿日期:2013-03-08)

• 检验技术与方法 •

5'端非翻译区和 NS5B 区在丙型肝炎病毒基因分型中意义的再评价^{*}

俞 杨, 郭 兰, 焦 杰, 杜同信, 王自正

(南京医科大学附属南京医院核医学科分子诊断室, 江苏南京 210006)

摘要:目的 研究丙型肝炎病毒(HCV)的 5'端非翻译区(5'-UTR)和 NS5B 区对中国人群感染的 HCV 基因分型的确切意义。**方法** 选择 NCBI 核苷酸数据库中来源于中国人的 HCV 全基因组,利用 NCBI 基因分型工具,对同一条 HCV 序列中 5'-UTR 区、NS5B 区和全长基因组进行基因分型,确定 5'-UTR 区和 NS5B 区在 HCV 基因分型中的全基因组代表性。在此基础上,选择 NS5B 区对 125 例临床 HCV-RNA 大于 1.0E3 的标本进行了基因分型。**结果** 与全长基因组的分型结果相比,5'-UTR 区基因分型在基因型判断上存在差异,仅有 45% 的符合率,特别是其无法精确判断基因亚型;而 NS5B 区基因分型结果与全长基因组的分型结果无论在基因型还是在基因亚型的判断上都具有良好的一致性,符合率可达 95%;利用 NS5B 区对临床 125 例标本成功进行了基因分型,结果显示以 1b 和 2a 两种亚型为主。**结论** NS5B 区在 HCV 基因分型中具有良好的全基因组序列的代表性,能够有效用于临床常规的 HCV 基因分型检测。

关键词:丙型肝炎病毒; 基因分型; 5'-UTR; NS5B

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.041

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)15-2007-03

全世界有超过 2 亿人是慢性丙型肝炎病毒(HCV)的感染者,慢性 HCV 感染是慢性肝脏疾病的主要病因之一,尤其是其造成的肝硬化和原发性肝癌是严重的公共卫生负担^[1]。HCV 目前可分为 6 种基因型,每种又分为不同的亚型。HCV 基因分型结果有助于抗病毒治疗个体化方案的制定和感染流行病学调查的实施,因此有效的 HCV 基因分型方法的使用十分重要^[2]。国外的研究显示,和基因组中 NS5B 区相比,基于 5'端非翻译区(5'-UTR)的基因分型方法尽管对基因型的区分较为有效,但是不能精确地区分亚型^[3-5]。本研究对 NCBI 核苷酸数据库中来源于中国人的 HCV 全长基因组序列(仅限于中国人群中常见的 1b 亚型和 2a 亚型)进行了分析,并在此基础上选择在分型上更有代表性的 NS5B 区域对 125 例临床患者的 HCV 基因组进行了基因分型检测。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 1 月至 2012 年 12 月间在南京医科大学附属南京医院进行丙肝病毒基因分型检测的 125 例丙型肝炎患者作为研究人群,所有患者静脉采集 2 mL EDTA 抗凝的全血,采集 2 h 内分离血浆,所有标本经 HCV-RNA 的定量证实滴度均大于 1.0E3。本研究中所涉及的研究流程均符合南京医科大学伦理委员会伦理审查标准并取得患者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 HCV 基因组提取试剂盒 E. Z. N. A. Viral RNA Kit 和切胶纯化试剂盒 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 来自 Omega Bio-Tek 公司;逆转录酶 M-MLV 来自天根生化科技公司;rTaq DNA 聚合酶来自 TaKaRa 公司;S1000 PCR 仪和

* 基金项目:南京市医学科技发展资金卫生青年人才培养项目(NJH201132)。

Gel Doc EZ Imager 凝胶成像系统来自 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 NCBI 数据库中 HCV 全基因组、5'-UTR 区和 NS5B 区基因分型的结果比较 在 NCBI 的核苷酸数据库中检索“HCV AND complete AND China”,共显示 216 条记录,其中中国人中最常见的 1b 亚型 20 条,2a 亚型 5 条。20 条 1b 亚型的序列中,有 4 条序列因未包括 5'-UTR 而被排除,有 1 条序列只包括了基因组的小部分也被排除,因此共有来源于中国人的 15 条全长 HCV1b 亚型的基因组序列入选本研究,Genbank 登录号分别为: AY460204. 1、DQ071885. 1、EF638081. 1、EU857431. 1、GU451218. 1、GU451219. 1、GU451220. 1、GU451221. 1、GU451222. 1、GU451223. 1、GU451224. 1、HQ639940. 1、HQ639946. 1、HQ639947. 1 和 L02836. 1。5 条 2a 亚型的序列均符合本研究的要求,Genbank 登录号分别为: HQ639938. 1、HQ639939. 1、HQ639943. 1、HQ639944. 1 和 HQ639945. 1。若将检索词换为“HCV AND complete AND Chinese”,结果未得到 2a 亚型序列,而所得到的 12 条 1b 亚型的序列均在以上序列中。将 1b 和 2a 亚型共 20 条序列的 5'-UTR 和 NS5B 两个区域的全长序列分别在 NCBI 基因分型工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>),在“Select”中选择 HCV)中通过序列比对进行基因分型,比较同一条 HCV RNA 序列中 5'-UTR 区、NS5B 区和全长基因组的基因分型结果是否存在差异。

1.3.2 临床标本的 HCV 基因分型 根据 E. Z. N. A. Viral RNA Kit 的说明书提取 125 例血浆标本的 HCV 基因组 RNA,最终用 25 μ L 洗脱液洗脱。用引物 HCV-NS5B-R(5'-GGC GGA ATT CCT GGT CAT AGC CTC CGT GAA-3',1b 亚型约为 8642-8613,2a 亚型约为 8710-8681)进行逆转录,加入 10 μ M 的 HCV-NS5B-R 2 μ L,10 μ L HCV 基因组洗脱液,2 μ L dNTP(10 mM),补灭菌蒸馏水至 15 μ L,70 $^{\circ}$ C 加热 5 min 后迅速在冰上冷却 2 min,瞬时离心后加入 4 μ L 5 $\times$ First-Strand Buffer,最后加入 1 μ L M-MLV,25 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 50 min,95 $^{\circ}$ C 5 min 终止反应,得到 cDNA 产物。以 cDNA 为模板进行 PCR,扩增 HCV 基因组的 NS5B 区域,反应体系为 100 μ L,PCR 组分为:10 μ M 的 HCV-NS5B-F(5'-TGG GGA TCC CGT ATG ATA CCC GCT GCT TTG A-3',1b 亚型约为 8242-8272,2a 亚型约为 8310-8343)2 μ L,10 $\times$ PCR Buffer(含 Mg²⁺)10 μ L,dNTP(10 mM)4 μ L,rTaq DNA 聚合酶 5 U,cDNA 模板 20 μ L。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,58 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次。用 1.5%琼脂糖电泳检测 PCR 产物,并根据 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 的说明书将 401 bp 处的 NS5B 区扩增条带进行切胶纯化。将切胶纯化的产物送南京金斯瑞公司进行测序,测序引物为 HCV-NS5B-F。将测序结果在 NCBI 基因分型工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>),在“Select”中选择 HCV)中通过序列比对进行基因分型。

2 结 果

2.1 HCV 全基因组、5'-UTR 区和 NS5B 区基因分型的结果比较 来源于中国人的 15 条 HCV 1b 亚型全长序列和 5 条 HCV 2a 亚型全长序列分别用全基因组序列、全长 5'-UTR 区和 NS5B 区进行基因分型的结果提示通过 5'-UTR 区序列比对进行分型的结果和全基因组的分型结果存在很大差异,仅有 45%的符合率,见表 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文

附件”)。无论是在 1b 亚型还是在 2a 亚型中,这种差异主要表现在亚型的判断上,如将 1b 亚型判断为 1a 或 1c;同时也存在基因型之间的差异,如将 1 型判断为 2 型或 6 型。但 NS5B 区的分型结果与全长基因组分型的符合率可达 95%,除了将 EF638081.1 判断为 1b/1a 重组的情况,其余结果均与全长基因组的分型结果一致。

2.2 临床标本的 HCV 基因分型 125 例临床标本中部分标本 NS5B 区 PCR 扩增的结果显示:在 401 bp 目的条带处均有特异性的扩增产物。基因分型的结果显示出现了 1b、2a、2b、3a、3b 五种亚型,其中以 1b 和 2a 两种亚型为主,见表 2。

表 2 125 例 HCV 临床患者中 NS5B 区的基因分型结果

出现的基因亚型	不同基因亚型的例数
1b 亚型	63
2a 亚型	55
2b 亚型	1
3a 亚型	5
3b 亚型	1

3 讨 论

HCV 基因分型在临床个体化医疗方案的确定和分子流行病学研究中具有十分重要的意义,对其基因分型技术的研究是广为关注的热点。5'-UTR 区是国外使用的几种具有代表性的商业化基因分型试剂所选择的区域。但是在与 NS5B 直接测序的分型结果比较之后,好几个研究小组发现,5'-UTR 区在区分基因亚型的精确性上有待提高,而最新的国外研究也显示 5'-UTR 区在 HCV 基因分型中的意义需要被重新评价^[6]。

本研究对 NCBI 的核苷酸数据库中出现的来源于中国人的 HCV 基因组(仅限于中国人群中常见的 1b 亚型和 2a 亚型)进行了不同区域 HCV 分型结果的比较,发现 NS5B 区的全基因组代表性明显优于 5'-UTR 区域,这一点和国外人群中感染 HCV 的研究结果相似^[3-5]。5'-UTR 区域除了无法精确地区分基因亚型之外,在某些标本中还出现了基因型判断的错误。因此可以进一步明确,尽管 5'-UTR 区是 HCV 基因组结构中最保守的区域之一,但是在基因分型方面其全基因组的代表性不如 NS5B 区。NS5B 区在中国人中 HCV 基因分型方面的意义已被近来的一些研究所证实^[7-8]。在本研究中,通过 NS5B 区对 125 例临床标本成功进行了 HCV 基因分型,分型结果提示中国人中以 1b 和 2a 两种亚型为主,这与之前的研究结果吻合^[9]。

本研究使用的 NCBI 基因分型工具^[10]是在线的病毒基因分型程序,可以完成几种重要医学病毒(如 HIV、HBV 和 HCV)的基因分型。以 HCV 为例,该程序进行基因分型时将检测序列与程序中包含的各个基因亚型的参考序列(各个亚型的参考序列见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/view.cgi?db=3>)进行比对,若判断为不同亚型的重组情况,则将序列分为不同区段显示,分别以不同颜色指示不同的基因亚型,结果直观易读。

本研究结果表明,与 5'-UTR 区相比,NS5B 区在 HCV 基因分型中具有良好的全基因组代表性,能够有效用于临床常规的 HCV 基因分型检测。

参考文献

[1] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical

practice guidelines; management of hepatitis C virus infection[J]. J Hepatol, 2011, 55(2): 245-264.

[2] 中华医学会肝病学会, 传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2004, 20(4): 197-203.

[3] Chen Z, Weck KE. Hepatitis C virus genotyping: interrogation of the 5' untranslated region cannot accurately distinguish genotypes 1a and 1b[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(9): 3127-3134.

[4] Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on analysis of the 5' noncoding region[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4): 1558-1564.

[5] Murphy DG, Willems B, Deschênes M, et al. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1102-1112.

[6] Hong SK, Cho SI, Ra EK, et al. Evaluation of two hepatitis C virus genotyping assays based on the 5' untranslated region(UTR): the limitations of 5' UTR-based assays and the need for a supplementary sequencing-based approach[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(11): 3741-3743.

[7] 张继明, 尹有宽, 谢怡, 等. 基于丙型肝炎病毒 NS5B 基因序列分析的基因分型[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003, 3(5): 287-290.

[8] 李峥, 高玉红, 张桂前, 等. NS5B 区核酸序列测定的丙型肝炎病毒基因分型研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 550-552.

[9] Lu L, Nakano T, He Y, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants[J]. J Med Virol, 2005, 75(4): 538-549.

[10] Rozanov M, Plikat U, Chappey C, et al. A web-based genotyping resource for viral sequences[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(Web Server issue): W654-W659.

(收稿日期: 2013-03-23)

• 检验技术与方法 •

酶联免疫吸附法检测丙型肝炎病毒

唐 彦¹, 李云霞^{2△}

(1. 重庆市中医骨科医院检验科, 重庆 400012; 2. 重庆医科大学附属第二医院病案统计科, 重庆 400010)

摘 要:目的 利用酶联免疫吸附法(ELISA)进行丙型肝炎病毒(HCV)的检测, 同时考察病毒感染患者生化指标的变化。方法 对从 2010 年 6 月至 2012 年 6 月在重庆市中医骨科医院门诊和住院患者中的临床检验结果进行回顾性分析, 采用酶联免疫吸附法检测患者血清中 HCV 抗体, 同时对患者进行生化检测。结果 本组接受临床检验的患者共 2 826 例, 其中抗-HCV 阳性者为 82 例, 阳性率为 2.90%, 生化检测结果表明丙型肝炎患者血清中的 GLU、ALT 和 AST 均值都在正常范围内, K⁺ 和 ALB 的均值偏低。结论 本组酶联免疫检测肝炎病毒阳性率与文献记载一致, 表明该手段诊断 HCV 感染较为可靠。K⁺ 和 ALB 的降低主要是由于大量使用利尿剂和肝细胞坏死有关。

关键词:肝炎, 丙型; 酶联免疫吸附测定; 实验室技术和方法
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.15.042 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)15-2009-02

在中国, HCV 感染率约为 3.2%, 其中 40%~60% 患者会发展为慢性丙型肝炎, 部分发展为肝硬化^[1]。感染途径主要是献血、维持性血透、母婴传播和吸毒传播, 有报道称仅四川地区吸毒人群中丙型肝炎病毒感染率就高达 71%^[2]。目前, 甲型肝炎的治愈率接近 100%, 乙型肝炎治愈率在 38% 以上, 而丙型肝炎治愈率仅在 10% 左右^[3]。因此, 早期诊断 HCV 感染和及时有效的治疗, 是目前肝脏疾病研究的重要课题。手术前、输血前对患者进行血清 HCV 抗体筛查, 早期诊断, 还有利于医患双方采取有效的预防措施, 避免医疗纠纷^[4]。笔者对从 2010 年 6 月至 2012 年 6 月重庆市中医骨科医院门诊和住院的患者中的临床检验结果进行回顾性分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 6 月至 2012 年 6 月笔者所在医院住院及就诊的患者共 2 826 例, 其中男 1 523 例, 女 1 303 例, 年龄 5~91 岁, 平均(35.7±2.9)岁。患者临床表现主要为恶心、食欲下降、腹胀、疲劳、全身无力、尿黄、眼黄等。

1.2 诊断方法 常规采取的静脉血, 离心取血清备用。采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测患者血清中 HCV 抗体。丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒为英科新创(厦门)科技有限公司提供, 严格按说明书操作, 计算 Cut-off 值, 并对结果进行判断。

结果判定标准为: 阴性: 样本 A 值小于 Cut-off 值; 阳性: 样本 A 值大于或等于 Cut-off 值。同时对患者进行生化检测, 检测指标包括葡萄糖(GLU)、K⁺、清蛋白(ALB)、转氨酶(ALT、AST), 指标正常值参考范围为: GLU 为 3.9~6.1 mmol/L; K⁺ 为 3.5~5.5 mmol/L; ALB 为 35~55 g/L; ALT 和 AST 为 0~40 U/L。

2 结 果

2.1 酶联免疫检测结果 本组接受临床检验的患者共 2 826 例, 其中抗-HCV 阳性者为 82 例, 其中男 44 例, 女 38 例, 阳性率为 2.90%。

2.2 生化检测结果 丙型肝炎病毒感染者血清生化检测结果为 GLU(4.6±1.2) mmol/L, K⁺(3.9±0.5) mmol/L, ALB(35.1±0.8) g/L, ALT(19.2±1.7) U/L, AST(23.6±3.4) U/L。丙型肝炎病毒感染者血清中的 GLU、ALT 和 AST 均值都在正常范围内, K⁺ 和 ALB 的均值偏低。

3 讨 论

有学者利用分子生物学方法找到了病毒的基因序列并克隆出了丙肝病毒, 命名为丙型肝炎和丙型肝炎病毒^[5]。HCV 基因分型还无统一标准, 常见的有 I~VI 型。欧美国家多数 HCV-I 型感染, 而亚洲国家以 II 型为主, III 型次之。中国以

△ 通讯作者, E-mail: liyunxia0601@163.com。