

甘肃省陇南地区不同基因型 HCV 分布特征研究^{*}

王 洁(甘肃省陇南市第一人民医院检验科 746000)

【摘要】 目的 了解甘肃省陇南地区不同基因型丙型肝炎病毒(HCV)的分布特征。**方法** 选择 2013 年 7 月至 2014 年 2 月于本院就诊的 HCV 感染确诊患者 53 例。采用酶联免疫吸附法进行 HCV 抗体检测,以重组免疫印迹法进行结果确认。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测血清病毒载量。采用多重 PCR 对病毒载量大于 103 copy/ μ L 的标本进行 HCV 基因分型检测。**结果** 共检出 1b 基因型 40 例,占 75.5%,检出 2a 基因型 9 例,占 17.0%,检出 3a 基因型 4 例,占 7.5%,各基因型检出率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 甘肃省陇南地区 HCV 感染患者以 1b 型 HCV 感染为主,其次为 2a、3a 型。

【关键词】 丙型肝炎病毒; 聚合酶链反应; 基因型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.17.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)17-2364-02

Distribution characteristics of different genotypes of HCV in Longnan area of Gansu province^{*} WANG Jie (Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Longnan, Longnan, Gansu 746000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the distribution characteristics of hepatitis C virus (HCV) in Longnan area of Gansu province. **Methods** During Jul. 2013 and Feb. 2014, a total of 53 patients with HCV infection were enrolled. HCV antibody was detected by using enzyme linked immunosorbent assay, and the results were confirmed by immunoblotting test. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed to detect viral load. HCV genotypes in samples with viral load higher than 103 copy/ μ L were then detected by using multiple PCR. **Results** A total of 40 cases were with 1b genotype infection, accounting for 75.5%, 9 cases were with 2a genotype infection, accounting for 17.0%, and 4 cases were with 3a genotype infection, accounting for 7.5%. The positive rates of different genotypes were with significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** In Longnan area of Gansu province, the most popular HCV genotype might be 1b genotype, followed by 2a and 3a genotype.

【Key words】 hepatitis C virus; polymerase chain reaction; genotypes

丙型肝炎病毒(HCV)感染是临床常见传染性疾病之一,具有较高的发病率。HCV 存在不同的基因型,且不同基因型 HCV 在生物学特性方面存在较大的差异,对抗病毒治疗的应答程度也有所不同。为了解甘肃省陇南地区不同基因型 HCV 的分布特征,本研究对 53 例 HCV 感染确诊患者进行了 HCV 基因分型检测,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 7 月至 2014 年 2 月于本院确诊的 HCV 感染患者 53 例,男 24 例、女 29 例,年龄(23.0 \pm 2.6)岁。

1.2 仪器与试剂 酶联免疫吸附法(ELISA)HCV 抗体(HCV-Ab)检测试剂盒购自英科新创(厦门)科技有限公司,重组免疫印迹法 HCV-Ab 检测试剂盒购自新加坡 MP 生物医学亚太公司。二氧化硅吸附法核酸纯化柱、实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司。逆转录及 PCR 试剂购自中山大学达安基因股份有限公司。基因分型引物由中山大学达安基因股份有限公司合成。

1.3 方法

采用不含抗凝剂的真空采血管采集所有患者静脉外周血,3 000 r/min 离心 10 min 后分离血清标本离心 HCV-Ab 及 HCV 核酸检测。HCV-Ab 检测采用 ELISA 检测试剂盒,结果确认采用重组免疫印迹法检测试剂盒。HCV 核酸检测采用实

时荧光定量 PCR 试剂盒。对于病毒载量大于 103 copy/ μ L 的标本,采用多重 PCR 进行 HCV 基因分型检测。(1)HCV RNA 的提取:采用二氧化硅吸附法从血清标本中提取并纯化 HCV RNA。(2)逆转录反应:逆转录反应步骤为 30 $^{\circ}$ C 10 min,42 $^{\circ}$ C 20 min,85 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。(3)第 1 次 PCR 扩增:反应总体积 50 μ L,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 1 min、45 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 20 次,94 $^{\circ}$ C 1 min、60 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 20 次。(4)第 2 次 PCR 扩增:以不同基因分型引物进行第 2 次 PCR 扩增,反应条件为 94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 1 min、62 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 5 min。(5)产物凝胶电泳:对第 2 次 PCR 扩增产物进行凝胶电泳,不同基因型 PCR 扩增产物长度为 1b 基因型:234 bp,2a 基因型:139、190 bp,2b 基因型:337 bp,3b 基因型:176 bp,1a 基因型:208 bp,3a 基因型:232 bp,4 基因型:99 bp,5 基因型:320 bp,6 基因型:336 bp,1c 基因型:104 bp,2c 基因型:251 bp 或 300、117 bp。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以百分率表示,组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

53 例 HCV 感染确诊患者中,检出 1b 基因型 40 例,占

^{*} 基金项目:甘肃省卫生厅资助项目(1205TCY002)。

作者简介:王洁,女,主管检验师,本科,主要从事临床免疫检验学研究。

75.5%, 检出 2a 基因型 9 例, 占 17.0%, 检出 3a 基因型 4 例, 占 7.5%, 各基因型检出率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。未检出 2b、3b、1a、4、5、6、1c 及 2c 基因型。

3 讨论

丙型肝炎病毒 (简称丙肝) 是 HCV 感染导致的肝脏病变, 可引起肝脏的急、慢性炎症, 主要通过输血、妊娠等途径传播。世界范围内, HCV 感染患者人数已达 (1.7~20.0) 亿, 每年新增患者人数约 350 万, 国内 HCV 感染患者人数已超过 5 000 万^[1]。

不同基因型 HCV 的分布存在地理性差异, 例如 1a 型 HCV 主要分布于美国, 1b 型 HCV 分布范围更为广泛, 在美国及欧洲、亚洲地区的部分国家均有分布。2a、2b 型 HCV 约占全球各基因型 HCV 的 10%~30%, 广泛分布于中国、日本及北美洲、欧洲地区的国家^[2-3]。1~6 型 HCV 在中国大陆地区均可检出, 但大部分地区以 1b、2a 型最为常见, 其中 1b 型占 70%~80%。就地区分布特征而言, 1b 型 HCV 所占比例从南向北逐渐升高。随着人口流动性逐渐增加, 国内 HCV 基因型的分布特征发生了一定的改变。熊瑜琳等^[4]的调查显示, 不同基因型 HCV 感染患者的比例以及单基因型和混合基因型 HCV 感染率, 在国内南北地区之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 即不同基因型 HCV 在国内南北地区的分布和流行无差异。本研究对甘肃省陇南地区 HCV 感染患者进行了 HCV 基因分型检测, 结果显示该地区 HCV 感染患者以 1b 型 HCV 感染为主, 其次为 2a 型。混合基因型 HCV 感染好发于反复接受输血治疗的患者和共用针头静脉注射毒品的吸毒者。国内最为常见的混合基因型感染为 1b、2a 型混合感染, 本研究则未检出混合基因型感染患者^[5]。

一般而言, HCV 感染患者病情较轻, 症状不明显, 但具有发展至慢性化的趋势。约 50%~80% 的 HCV 感染者可发展至慢性感染, 其中约 20% 的患者可发展至肝硬化, 且肝硬化患者中, 约 1%~4% 可发展至肝癌^[6]。不同基因型 HCV 的感染与疾病的病程发展和干扰素 (IFN) 治疗效果有一定的相关性。HCV RNA 浓度水平可以反映病毒的复制活跃程度和患者病情的变化, 与肝脏的炎症活动有明显的相关性。有研究证实, HCV RNA 浓度水平与病毒的基因型存在一定的相关性, 例如 1、2 型 HCV 感染患者血清 HCV RNA 水平明显高于 3 型 HCV 感染患者, 说明 1、2 型 HCV 的复制能力更强, 感染患者也更易发展至慢性感染^[7]。本研究结果显示, HCV 感染患者以 1b 型 HCV 感染为主, 2a 型次之, 而且本研究中的 53 例 HCV 感染患者血清 HCV 病毒载量均大于 10^3 copy/ μ L, 也说明 1、2 型 HCV 感染患者体内的病毒载量较高。

关于不同基因型 HCV 感染对肝脏损伤程度和疾病进展、转归的影响尚无定论, 但普遍认为 1b 基因型 HCV 感染患者更易出现疾病的慢性化趋势, 且肝脏损伤程度更重, 可能与型特异性变异基因编码的蛋白具有较强的细胞毒性作用有关。有研究证实, 中国大陆地区慢性丙型肝炎及肝炎后肝硬化和肝癌患者以 1b 型 HCV 感染为主, 占 80% 以上, 且 1b 型 HCV 感染患者血清丙氨酸氨基转移酶水平更高, 提示肝细胞损伤程度较重^[8]。HCV 感染也可引起并加重肝脏脂肪变性。目前, 普遍根据肝脏脂肪变性发病机制的不同, 将其分为代谢性脂肪变性和 HCV 诱导的脂肪变性两大类, 后者好发于 3 型 HCV 感

染患者, 前者则好发于非 3 型 HCV 感染患者。

不同基因型 HCV 感染患者 IFN 治疗效果也存在一定的差异, 因此, 可以根据 HCV 基因分型检测的结果, 预测抗病毒治疗的效果。IFN- α 是目前治疗 HCV 感染的首选药物, 且 IFN- α 治疗效果与 HCV 的基因型有密切关系, 不同基因型 HCV 感染患者 IFN- α 治疗效果存在一定的差异。即使采用相同的治疗药物和治疗方案, 2、3 型 HCV 感染患者对 IFN- α 治疗的持续性病毒学应答率是 1 型 HCV 感染患者的 2~3 倍, 即 1 型 HCV 感染患者 IFN- α 治疗效果低于 2、3 型感染患者。聚乙二醇化 IFN- α 联合利巴韦林治疗 HCV 感染的效果优于 IFN- α 联合利巴韦林治疗, 但仍有部分 HCV 感染患者的对聚乙二醇化 IFN- α 联合利巴韦林治疗无应答。由此可见, 明确 HCV 的基因型, 对于选择治疗药物、确定治疗方案极为重要。

目前, 导致不同基因型 HCV 感染患者对 IFN- α 治疗的应答程度存在差异的原因尚不清楚, 一般认为与不同基因型 HCV 有不同的 coreE2、NS5a 蛋白表达水平以及病毒复制能力有关。不同基因型 HCV 不仅对 IFN- α 存在不同的抵抗性, 且复制能力也有所不同, 导致在 IFN- α 治疗过程中, 不同基因型 HCV 感染患者体内病毒载量的下降速度存在一定的差异。因此, HCV 的基因型与 IFN- α 治疗应答程度密切相关, 明确 HCV 的基因型有助于制订个体化的抗病毒治疗方案。

总之, 不同基因型 HCV 可能存在生物学特性差异, 感染患者的病情也存在一定的差异。因此, HCV 基因分型检测有重要的临床意义。研究 HCV 各基因型在生物学特性等方面的差异, 以及导致各种差异的具体机制, 有助于为丙型肝炎患者的诊断、治疗和预后判断等提供有力的依据。

参考文献

- [1] Alberti A, Benvegnu L. Management of hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2003, 38(Suppl 1):104-118.
- [2] 刘大姐, 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] Nguyen MH, Keeffe EB. Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9[J]. *Clin Liver Dis*, 2005, 9(3):411-426.
- [4] 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.
- [5] 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 Hong Kong[J]. *Inter-virology*, 2006, 49(1-2):96-98.
- [6] 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]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(3):237-239.
- [7] 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 Virology*, 2003, 26(1):61-69.
- [8] Rubbia-Brandt L, Quadri R, Abid K, et al. Hepatitis C virus genotype 3[J]. *Hepatology*, 2000, 33(1):106-115.