

我国部分地区丙型肝炎病毒基因分型研究

庄辉 Tracy L 崔怡辉 凌斌华 张玲霞 Bowden S

【摘要】 目的 研究中国丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布。方法 应用 Amplicor PCR 试剂盒检测北京、青岛、固安和周口等地 27 例抗-HCV 阳性的单采浆供血员和 36 例慢性丙型肝炎病人血清 HCV RNA,并对其中 36 例 HCV RNA 阳性者用 INNO-LiPA™ HCV II 试剂盒进行 HCV 基因分型。结果 抗-HCV 阳性的单采浆供血员和慢性丙型肝炎病人 HCV RNA 检出率分别为 48.15%(13/27) 和 69.44%(25/36),平均为 60.32%(38/63)。对 13 例 HCV RNA 阳性的单采浆供血员和 23 例慢性丙型肝炎病人 HCV 基因分型结果表明,29 例(80.55%)为 1b 型,5 例(13.89%)为 2 型,另 2 例(5.56%)不能被分型。结论 上述调查地区流行的 HCV 基因型以 1b 型占优势。

【关键词】 丙型肝炎病毒;丙型肝炎病毒核糖核酸;基因型

Study on hepatitis C virus genotyping in some parts of China ZHUANG Hui*, TRACY L, CUI Yihui, et al. *Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Beijing University, Beijing 100083, China

【Abstract】 Objective To study the genotypes of hepatitis C virus in some parts of China. **Methods** Twenty-seven sera of plasma donors from Guan county of Hebei province, Zhoukou district of Henan province, and 36 patients with chronic hepatitis C from Beijing and Qingdao cities were tested for HCV RNA by Amplicor PCR kit. Thirty-six of 38 HCV RNA positive sera were further genotyped, using INNO-LiPA™ HCV II kit. **Results** The HCV RNA positive rates of plasma donors and patients with chronic hepatitis C were 48.15%(13/27) and 69.44%(25/36) respectively. Genotyping data from 13 plasma donors and 23 patients with chronic hepatitis C showed that 29 (80.55%) were 1b, 5 (13.89%) were genotype 2, and 2 (5.56%) remained untyped. **Conclusion** 1b seemed to be the prevalent HCV genotype in some parts of China.

【Key words】 Hepatitis C virus; HCV RNA; Genotype

丙型肝炎病毒(HCV)高度变异,在不同国家、不同地区,HCV 基因型分布不同^[1]。HCV 基因型还与干扰素治疗丙型肝炎的疗效和肝移植后再感染有关^[2-4]。因此,研究我国 HCV 基因型分布具有重要的临床和流行病学意义。但 HCV 基因分型方法较多,既往国内有关 HCV 基因分型的报告多用各实验室自己建立的 HCV 分型法,有的用酶切分型法,有的用型特异 PCR 分型法,还有用血清学分型法等^[5-8],仅个别报告用 INNO-LiPA™ HCV II 分型法^[9,10]。因此,无法相互比较,也难以与国外结果比较。由于目前国外 Amplicor PCR 法和 INNO-LiPA™ HCV II 分型法较为常用,因此,本研究应用 Amplicor PCR 法和 INNO-LiPA™ HCV II 分型

试剂盒,对北京、青岛、固安、周口等地 27 名抗-HCV 阳性的单采浆供血员和 39 名丙型肝炎病人进行了 HCV RNA 检测,并对其中 36 例 HCV RNA 阳性者作了基因分型。结果报告如下。

材料与方法

1. 材料:27 例单采浆供血员的血清分别采自河北省固安县(22 例)和河南省周口地区(5 例);36 例慢性丙型肝炎患者血清分别采自北京市(10 例)和青岛市(26 例)某医院,均有 HCV RNA 和抗-HCV 阳性史。本次取血时,所有 63 例被检者均为抗-HCV 阳性。除北京市 10 例丙型肝炎患者于采血时已经 4 个月至 2 年的干扰素治疗外,其他 3 个地区 53 例单采浆供血员和丙型肝炎患者均未经干扰素治疗。

2. 方法:

(1) Amplicor PCR 试剂盒检测血清 HCV

作者单位:100083 北京大学基础医学院病原生物学系(庄辉、崔怡辉、凌斌华);解放军第三〇二医院(张玲霞);澳大利亚维多利亚州立传染病参比实验室(Tracy L, Bowden S)

RNA:取被检血清 100 μ l,加入 400 μ l 裂解液,混匀,60 C 孵育 10 min,加入 500 μ l 异丙基乙醇,混匀,室温 2 min, 14 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 70%乙醇清洗并沉淀,加 100 μ l 样品稀释液重悬。每次试验均设 3 个阳性对照和 1 个阴性对照。取已提取的标本及阴阳性对照各 50 μ l,分别加入微量扩增反应管,标记后盖严,放入 9600 GeneAmp PCR 仪,逆转录 50 C 2 min,60 C 30 min,95 C 1 min。尔后 95 C 15 s,60 C 20 s,2 个循环;90 C 15 s,60 C 20 s,38 个循环,延伸 72 C,不超过 15 min。扩增完毕后,每管立即加入 100 μ l 变性液,置室温 10 min。取已包被 HCV cDNA 探针的微量反应板,每孔加入 100 μ l 杂交液,再加入 25 μ l 扩增产物或对照,37 C 孵育 1 h,用洗涤液清洗 5 次,每次 30 s,拍干后每孔加入生物素辣根过氧化物酶结合物 100 μ l,37 C 孵育 15 min,用洗涤液洗 5 次,每次 30 s,拍干后加入底物液 100 μ l,室温避光 10 min,加入终止液 100 μ l,检测 450 nm 处吸光度值(A),>0.60 为阳性,<0.25 为阴性,0.25~0.60 者重测,重测后,如 A 值<0.40 为阴性,>0.40 为阳性。

(2) INNO-LiPA HCVTM II 试剂盒基因分型:每个反应槽中加入 10 μ l 变性液,再加入 10 μ l HCV cDNA 扩增产物,混匀,室温变性 5 min。每槽加入预热的杂交液 2 ml,混匀,立即放入含多个型特异性探针的杂交条,50 C 水浴振摇 60 min。然后吸去杂交液,加入 2 ml 洗涤液,室温振摇 10 s,如此反复洗 2 次。每孔加 2 ml 洗涤液,室温振摇 50 C 30 min。加 2 ml 洗涤液清洗 2 次,每次 1 min。加入 2 ml 结合物,室温振摇孵育 30 min。用洗涤液清洗 2 次,每次 1 min,再用 2 ml 底物液洗 1 次。加入 2 ml 底物液,室温振摇孵育 30 min。最后,用蒸馏水清洗以终止反应,室温下至少振摇 3 min。当杂交条上出现紫色带时,与标准的比色带比较,以判断基因型别。

结 果

1. HCV RNA 检测结果:由表 1 可见,上述地区 HCV RNA 阳性率为 30.00%~84.62%,平均为 60.32%。

2. HCV 基因分型结果:在 63 例被检者中,38 例(60.32%)为 HCV RNA 阳性,其中 2 例因血清量不足而未作分型,其余 36 例用 INNO-LiPA HCVTM II 试剂盒进行了 HCV 基因分型。结果无论是丙型肝炎病人还是单采浆供血员,均以 1b 型占多

数,分别为 78.26%(18/23)和 84.62%(11/13),平均为 80.55%(29/36)。此外,在丙型肝炎病人中检出 5 例为 2 型,占 13.89%(5/36);在单采浆供血员中有 2 例不能被分型,占 5.56%(2/36)(表 2)。

表1 4 个地区 63 例丙型肝炎病人和单采浆供血员 HCV RNA 检测结果

地 区	人群类别	被检例数	HCV RNA 阳性例数	阳性率 (%)
北 京 市	丙型肝炎病人	10	3	30.00
青 岛 市	丙型肝炎病人	26	22	84.62
固 安 县	单采浆供血员	22	10	45.45
周口地区	单采浆供血员	5	3	60.00
合 计		63	38	60.32

表2 36 例 HCV RNA 阳性血清基因分型结果

地 区	人群类别	HCV 基因型		
		1b 型	2 型	不能分型
北京市	丙型肝炎病人	3/3	0/3	0/3
青岛市	丙型肝炎病人	15/20(75.00)	5/20 (25.00)	0
	小 计	18/23(78.26)	5/23 (21.74)	0
固安县	单采浆供血员	8/10(80.00)	0	2/10 (20.00)
周口市	单采浆供血员	3/3	0	0/3 (0.00)
	小 计	11/13(84.62)	0	2/13 (15.38)
合 计		29/36(80.55)	5/36 (13.89)	2/36(5.56)

注:表中括号内数字为构成比(%),分母为检测数,分子为阳性数

讨 论

检测北京、青岛、固安和周口等地 27 例单采浆供血员和 36 例慢性丙型肝炎病人血清,HCV RNA 阳性率分别为 48.15%(13/27)和 69.44%(25/36),平均为 60.32%(38/63)。但检测北京市 10 例慢性丙型肝炎病人血清,HCV RNA 阳性仅 3 例,阳性率为 30.00%,较其他 3 个地区 HCV RNA 检出率(分别为 84.62%、45.45%、60.00%)明显为低,可能与该组病人持续应用干扰素治疗(4 个月至 2 年)有关。Amplicor PCR 试剂盒系用酶联免疫法(EIA)检测 HCV RT-PCR 扩增产物,其灵敏度和特异性均较常规 RT-PCR 法为高,因此,漏检的可能性较小。

目前 HCV 基因分型方法有多种,如:酶切分型法、型特异 PCR 分型法、型特异探针杂交法、限制性长度多态性分析法、核酸序列分析法和血清学分型法等。INNO-LiPATM HCV II 试剂盒是根据 HCV 不同基因型 5' 非编码区存在变异,设计了 20 个型特异性 DNA 探针,通过末端去氧核糖转移酶作用使其末端带有 poly(T)尾巴,然后转移至硝基纤维膜上。本法是用生物素标记 PCR 引物,扩增时产生生

物素标记的扩增产物,将该产物与硝基纤维膜上的探针发生反向杂交,然后加碱性磷酸酶标记的抗生素,后者与生物素化的杂交产物结合,加 BCIP/NBT 显色,在相应的型特异性探针位置上出现紫色条带。根据条带位置确定 HCV 的基因型和亚型。本法灵敏度高,特异性强,条带清晰,易于判断,可检出 6 个 HCV 基因型和主要亚型,较其他方法更为灵敏和特异^[1]。

本研究表明,无论是丙型肝炎病人还是单采浆供血员,均以 1b 型占多数,分别为 78.26%(18/23) 和 84.62%(11/13),平均为 80.55%(29/36)。本研究从青岛市慢性丙型肝炎病人中检出 5 例 (5/36, 13.89%) HCV 2 型,但在其他 3 个地区均未检出,可能与 HCV 基因型的地区分布不同有关^[1]。值得指出的是:在河北省固安县单采浆供血员中,有 2 例 (2/36, 5.56%) 不能被 INNO-LiPATM HCV II 试剂盒分型,提示我国可能存在个别少见的 HCV 基因型,它们尚不能被现行的 INNO-LiPATM HCV II 分型,因此,该试剂盒尚需进一步改进,以扩大 HCV 基因型的分型谱。

参 考 文 献

- Mellor J, Holmes E, Jarvis L, et al. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J Gen Virol*, 1995, 76 : 2493-2507.

- Chemello L, Bonetti P, Cavalletto L, et al. Randomized trial comparing three different regimens of alpha-2a-interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1995, 22 : 700-706.
- Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C virus genotypes are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1995, 22 : 1050-1056.
- Feray C, Gigou M, Samuel D, et al. Influence of the genotypes of hepatitis C virus on the severity of recurrent liver disease after liver transplantation. *Gastroenterology*, 1995, 108 : 1088-1096.
- 杜绍财,陶其敏,朱凌,等. 丙型肝炎病毒基因 5' 末端非编码区酶切分型的研究. *中华医学杂志*, 1993, 73 : 7-9.
- 唐小平,袁小珍,吴婉芬,等. 丙型肝炎病毒基因酶切分型法及其在干扰素治疗中的应用. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996, 10 : 258-261.
- 葛宪民,王树声,李丹亚,等. 广西吸毒者肝病患者及献血员丙型肝炎病毒血清学基因型和基因型的分子生物学研究. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1996, 10 : 312-317.
- 安文锋,朱万孚,王淑萍,等. 丙型肝炎病毒血清学分型与基因分型研究. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1997, 17 : 88-91.
- 金根娣,陆志檬. 上海等地区慢性丙型肝炎患者中 HCV 基因型的分布. *中华肝脏病杂志*, 1997, 5 : 212-213.
- 蒋伟伦,顾士民,胡芸文,等. 上海地区丙型肝炎病毒基因分型研究. *中华肝脏病杂志*, 1999, 7 : 29-30.
- Stuyver L, Wyseur A, Amhem W, et al. Second generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Microbiol*, 1996, 34 : 2259-2266.

(收稿日期:2000-07-19)