

非O1非O139群霍乱弧菌多重PCR和SYBR Green实时PCR检测方法的建立

李凤娟 阚飙 王多春

【摘要】 目的 建立检测非O1非O139群霍乱弧菌的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法。方法 分别以霍乱弧菌的外膜蛋白基因(*ompW*)、O1和O139群O抗原编码基因(*rfb*)设计引物,建立多重PCR和SYBR Green实时PCR方法,评价两种方法检测非O1非O139群霍乱弧菌的特异性、重复性和一致性及最低检测菌量。结果 建立了检测非O1非O139群霍乱弧菌的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法,根据特异性条带(多重PCR)和特异性溶解温度(SYBR Green实时PCR),两种方法均能特异性检测非O1非O139群霍乱弧菌,并能鉴别其他弧菌(5种)和肠道杆菌(3种);两种方法的最低检测菌量分别为 7×10^4 cfu/ml(多重PCR)和 7×10^2 cfu/ml(SYBR Green实时PCR),差异有统计学意义($P < 0.05$);对实时PCR的重复性检测,批内变异系数(CV)为0.22%~0.92%,批间CV为0.27%~1.41%;经370株非O1非O139群霍乱弧菌的检测,两种方法的一致性均为100%。结论 建立的两种方法其特异性、敏感性及重复性均好,可适用于不同条件下非O1非O139群霍乱弧菌的检测和鉴定。

【关键词】 非O1非O139群霍乱弧菌;多重PCR;SYBR Green实时PCR

Development of both multiple PCR and real-time SYBR green PCR for the detection of *Vibrio cholerae* non-O1/O139 serogroups Li Fengjuan, Kan Biao, Wang Duochun. State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center of Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Wang Duochun, Email: wangduochun@icdc.cn

This study was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30872260), the National Special Science and Technology Project for Major Infectious Diseases of China (No. 2008ZX10004-012).

【Abstract】 Objective To develop methodology of both multiple PCR and real-time SYBR green PCR for the detection of *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) serogroups non-O1 and non-O139. **Methods** The outer membrane protein gene (*ompW*) specific for *V. cholerae*, as well as O antigen *rfb* genes specific for both O1 and O139, were used for the design of the PCR primers. Both multiple PCR and real-time SYBR green PCR systems were used to detect both O1 and O139. Specific *rfb* genes and *ompW* were developed to evaluate their specificity, limit of detection, reproducibility and consistency. **Results** We established multiple PCR and real-time SYBR green PCR methods. According to the specific electrophoretic bands (multiple PCR) and the specific melt curve temperature (real-time SYBR green PCR), both methods could specifically detect the non-O1, non-O139 *V. cholerae*, and to differentiate them from O1, O139 *V. cholerae*, other five *Vibrios* and 3 intestinal bacteria. The detection limits were 7×10^4 cfu/ml (multiple PCR) and 7×10^2 cfu/ml (real-time SYBR green PCR), with statistically significant difference seen ($P < 0.05$). For the reproducibility of real-time SYBR green PCR, the external coefficient variation ranging from 0.22% to 0.92% while the internal coefficient variation ranging from 0.27% to 1.41%. 370 strains of non-O1, non-O139 *V. cholerae*, were detected, with both consistency rates as 100%. **Conclusion** Both multiple PCR and real-time SYBR green PCR could detect non-O1, non-O139 *V. cholerae*, rapidly, specifically, and reproducibly, that could all be used for the detection and identification of non-O1, non-O139 under different conditions.

【Key words】 *Vibrio cholerae* non-O1/O139 serogroups; Multiple PCR; Real-time SYBR green PCR

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.01.016

基金项目:国家自然科学基金(30872260);国家科技重大专项(2008ZX10004-012)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室

通信作者:王多春, Email: wangduochun@icdc.cn

非O1非O139群霍乱弧菌是指除O1和O139群霍乱弧菌以外的霍乱弧菌血清群^[1],其广泛存在于环境,尤其是水体和海产品中,可引起夏秋季腹泻和食物中毒,临床表现为轻症胃肠炎或严重的腹泻。非O1非O139群霍乱弧菌引起的腹泻在世界许多地区均有流行和散发^[2,3],但由于其临床感染程度没有O1群、O139群霍乱弧菌严重,因此常被忽略。鉴定非O1非O139群霍乱弧菌,要求其不与O1群和O139群分群血清凝集,而与其他群的分群血清凝集,但目前绝大多数实验室无O1、O139群霍乱弧菌诊断血清之外的其他群血清产品。对非O1非O139群霍乱弧菌的鉴定,传统方法是采用生化检测鉴定为霍乱弧菌,然后用O1、O139群血清凝集试验排除O1、O139群霍乱弧菌,则认定为非O1非O139群霍乱弧菌。但该方法操作复杂,费时费力,达不到快速检测的要求。因此有必要开发和建立一种更高效且能弥补传统方法缺陷的检测方法。为此本研究以霍乱弧菌的外膜蛋白基因(*ompW*,霍乱弧菌共有基因)、O1群O抗原基因(*O1-rfb*)、O139群O抗原基因(*O139-rfb*)为目的基因,建立了用于检测非O1非O139群霍乱弧菌的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法,并评价两种方法的特异性、最低检测菌量和一致性。

材料与方法

1. 实验菌株:非O1非O139群霍乱弧菌370株(均经生化鉴定为霍乱弧菌,并用O1、O139群血清凝集排除O1、O139群霍乱弧菌);O1、O139群霍乱弧菌各30株;副溶血弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌、麦氏弧菌、弗尼斯弧菌各2株;单胞菌、大肠埃希菌、痢疾杆菌各5株。菌株均为本实验室保存。

2. 主要仪器和试剂盒:包括FX96型荧光PCR仪(美国BIO-RAD公司),PTC-200型PCR扩增仪(美国MJ RESEARCH公司),凝胶成像仪(美国BIO-RAD公司)、电泳仪及电泳槽(北京六一电泳设备厂),5415R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司);2×Taq PCR MasterMix(天根科技有限公司),SYBR®Premix Ex Taq™、DL2000 Marker(TaKaRa大连公司),GoldVeiw DNA染料(北京赛百盛基因技术有限公司)。

3. 引物:多重PCR及SYBR Green实时PCR引物序列见表1,由上海生工

生物工程有限公司(北京)合成。

4. DNA模板制备:从霍乱弧菌培养平皿上挑取单菌落,溶于200 μl纯水中煮沸10 min,冰浴10 min后,以12 000 r/min离心10 min,取上清即为提取的DNA。

5. PCR体系和反应条件:

(1)多重PCR组成成分:在20 μl体系中,2×Taq PCR MasterMix 10 μl,O1、O139 *rfb* 和 *ompW* 上下游引物(10 μmol/L)各1 μl,DNA模板1 μl,其余用水补足。反应条件:94℃预变性5 min,然后94℃30 s,55℃30 s,72℃1 min,进行30个循环,最后72℃延伸7 min。PCR扩增产物上样于1%琼脂糖凝胶中电泳,用凝胶成像仪拍照。

(2)SYBR Green实时PCR:每份样品在2个反应体系中检测完成,在每个体系(20 μl)中,SYBR®Premix Ex Taq™(2×)各10 μl,一管中O1/O139 *rfb* 引物上下游(10 μmol/L)各0.4 μl,另一管中*ompW*引物上下游各0.4 μl,每管中DNA模板各2 μl,其余用水补足。采用TaKaRa公司产品说明书中的两步法PCR扩增标准程序作为循环参数。

6. 特异性检测:对经生化及O1、O139群血清鉴定的5株非O1非O139群霍乱弧菌和O1、O139群霍乱弧菌各60株,弗尼斯弧菌、创伤弧菌、麦氏弧菌、副溶血弧菌各2株,单胞菌、大肠埃希菌、痢疾杆菌各5株,分别采用多重PCR和SYBR Green实时PCR方法进行检测。

7. 最低检测菌量:取新鲜非O1非O139群霍乱弧菌单菌落接种LB肉汤,37℃培养至A值约为0.9,然后以LB肉汤采用涂平板法计数系列稀释液的菌量10倍系列稀释;同时用水煮法制备系列稀释液的

表1 霍乱弧菌多重PCR及SYBR Green实时PCR相关引物序列

| 引物 | 引物序列 | 产物长度 (bp) | 引物来源 |
|--------------------|----------------------------|-----------|-------|
| 多重PCR | | | |
| O1 <i>rfb</i> -F | GGAAATTTGGACGCTCTTCG | 813 | 本研究 |
| O1 <i>rfb</i> -R | TTAACGTCTCTACGCTCAC | | |
| O139 <i>rfb</i> -F | TCGTGGACCGAATGATAGTG | 382 | 本研究 |
| O139 <i>rfb</i> -R | CTGCCACCCGTAATAAAGAG | | |
| <i>ompW</i> 1-F | CTCAGACGGGATTTGTTAGGCACG | 588 | 文献[4] |
| <i>ompW</i> 1-R | TCTATCTCTGTAGCCCCTATTACG | | |
| SYBR Green I实时PCR | | | |
| O1-P2F | GCGTAAATATCTAAACGATTGCATTG | 83 | 文献[5] |
| O1-P2R | AAACTCAGTTTCGAAGCGATCAA | | |
| O139-P1F | GCGGTGTAGCGGGTTTTATTAG | 76 | 文献[5] |
| O139-P1R | TGCATAATACTTTCGACCATGGA | | |
| <i>ompW</i> 2-F | CAAACCATTTGCGGCCTAGC | 92 | 本研究 |
| <i>ompW</i> 2-R | GGTACTACCGAGGCAATACC | | |

DNA作为模板,分别采用建立的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法检测。根据能观察到的最弱PCR电泳条带(多重PCR)和特异的熔解温度峰值及 $Ct \leq 35$ 的荧光曲线(SYBR Green实时PCR),确定样品的检测下限,即为最低检测菌量。

8. 重复性和一致性检测:采用SYBR Green实时PCR检测同一批次和不同批次的10倍稀释标准品 $10^8 \sim 10^1$ cfu/ml后,根据 Ct 值的变异系数($CV, s/\bar{x} \times 100\%$)评价其重复性。对经生化及O1、O139群血清鉴定的370株非O1非O139群霍乱弧菌,分别利用建立的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法检测。两种方法分别能鉴定为非O1非O139群霍乱弧菌的百分比,即为该方法检测的一致性百分比。

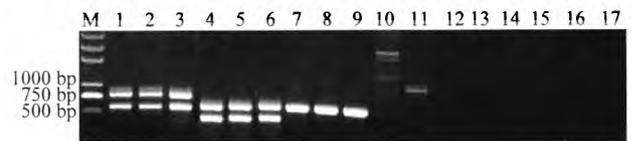
结 果

1. 检测方法的建立:在多重PCR中,针对一个核酸样品,当出现588 bp霍乱弧菌 $ompW$ 的唯一电泳条带,则判断为非O1非O139群霍乱弧菌阳性;而同时出现813 bp(O1- rfb)和588 bp($ompW$)或同时出现382 bp(O139- rfb)和588 bp($ompW$)的电泳条带,则判定为O1或O139群霍乱弧菌阳性。在SYBR Green实时PCR中,针对一个核酸样品的2个反应体系,当 $ompW$ 反应体系中出现 $Ct \leq 35$ 的荧光曲线和特异性熔解温度峰值($T_m = 84.5^\circ C$),同时 rfb 反应体系中荧光和特异性熔解温度峰值曲线均不起峰时,即判断为非O1非O139群霍乱弧菌阳性;当出现荧光曲线($Ct \leq 35$)和特异性熔解温度峰值($T_m = 78.0^\circ C$ 或 $79.5^\circ C$)时,即判断为O1或O139群霍乱弧菌阳性。

2. 特异性分析:使用本研究菌株分别利用建立的两种方法进行检测。在多重PCR中,受试的3株非O1非O139群霍乱弧菌出现588 bp的唯一一条带(图1中7~9),O1和O139群霍乱弧菌各3株,分别同时出现588 bp与813 bp和588 bp与382 bp的条带(图1中1~3和4~6),而5种其他弧菌(副溶血弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌、麦氏弧菌、弗尼斯弧菌各2株)和3种肠杆菌(嗜水气单胞菌、大肠埃希菌、痢疾菌各5株),多重PCR检测均未出现 $ompW$ 、O1- rfb 和O139- rfb 基因的特异条带,图1中10~17条带显示8种菌的检测结果(副溶血弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌,麦氏弧菌、弗尼斯弧菌、单胞菌、大肠杆菌、痢疾杆菌各1株)。

SYBR Green实时PCR的特异性检测表明,受试

的O1群、O139群霍乱弧菌含有 $ompW$ 引物管和 rfb 引物管的样品均检测到 $Ct < 35$ 的荧光曲线(图2A中的1、2),但熔解温度峰值有所不同,O1群霍乱弧菌的两管熔解温度峰值分别为 $78.0^\circ C$ 和 $84.5^\circ C$ (图2B中1),O139群霍乱弧菌的两管熔解温度峰值分别为 $79.5^\circ C$ 和 $84.5^\circ C$ (图2B中2);对于受试非O1非O139群霍乱弧菌,只在含有 $ompW$ 引物管的样品中检测到 $Ct < 35$ 的荧光曲线,而 rfb 引物管的检测为阴性(图2A中3),且 $ompW$ 和 rfb 引物管的熔解温度峰值分别为 $84.5^\circ C$ 和阴性(图2B中3);其他受试的弧菌和肠杆菌,其熔解温度峰值均与非O1非O139群霍乱弧菌相区分(图2中4~6)。



注:M:Marker; 1~3:O1群霍乱弧菌N16961(O1稻叶型)、40-42(O1小川型)、吴江-2(O1稻叶型)代表株; 4~6:O139群霍乱弧菌MO45、FJ97129、HL08001; 7~9:非O1非O139群霍乱弧菌; 10~17:除霍乱弧菌外的其他弧菌与肠杆菌代表株

图1 多重PCR检测霍乱弧菌

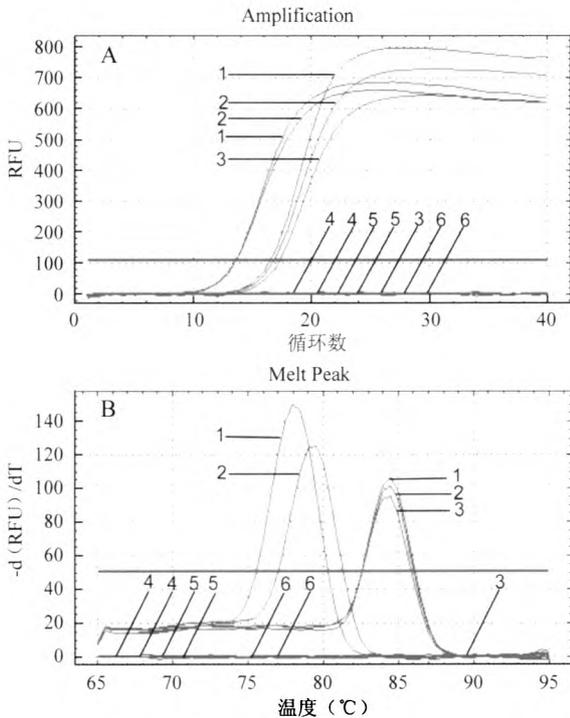
3. 确定最低检测菌量:多重PCR在菌液浓度为 7×10^4 cfu/ml时,可观察到最弱PCR电泳条带(图3)。SYBR Green实时PCR在菌液浓度为 7×10^2 cfu/ml时,有特异的熔解温度峰值,且有 $Ct \leq 35$ 的荧光曲线;而菌液浓度为 7×10^1 cfu/ml时,特异熔解温度峰值不明显,且荧光曲线 $Ct > 35$ (图4)。两种方法最低检测菌量的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4. 重复性和一致性分析:利用SYBR Green实时PCR检测同一批次和不同批次的10倍稀释标准品 $10^8 \sim 10^1$ 拷贝后,批内 Ct 值CV为0.22%~0.92%,批间 Ct 值CV为0.27%~1.41%,表明本研究建立的实时PCR具有良好的重复性(表2)。采用两种方法检测370株非O1非O139群霍乱弧菌其一致性均为100%。

讨 论

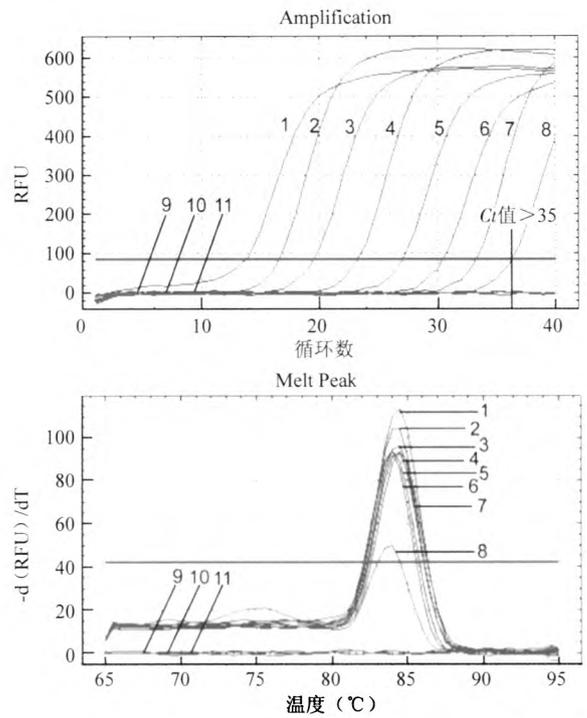
本研究建立的多重PCR和SYBR Green实时PCR方法在特异、快速检测非O1非O139群霍乱弧菌的同时,可有效区分O1、O139群霍乱弧菌,且能鉴别霍乱弧菌与其他弧菌和肠道杆菌。两种方法的一致性均为100%。

本研究建立检测非O1非O139群霍乱弧菌方法的思路,是对受试菌鉴定到霍乱弧菌($ompW$)的同时,排除O1和O139群霍乱弧菌(O抗原的特异 rfb



注: 1: O1 群霍乱弧菌代表株; 2: O139 群霍乱弧菌代表株; 3: 非 O1 非 O139 群霍乱弧菌代表株; 4~6: 其他弧菌代表株

图2 检测霍乱弧菌 *ompW* 和 *rfb* 的实时 PCR 扩增曲线



注: 1~8: 非 O1 非 O139 群霍乱弧菌, 对应的模板菌液浓度分别为 $7 \times 10^8 \sim 7 \times 10^1$ cfu/ml; 9~11: 阴性对照

图4 实时 PCR 对非 O1 非 O139 群霍乱弧菌最低检测菌量的确定



注: M: Marker; 1~8: 非 O1 非 O139 群霍乱弧菌, 对应的模板菌液浓度分别为 $7 \times 10^8 \sim 7 \times 10^1$ cfu/ml

图3 多重 PCR 对非 O1 非 O139 群霍乱弧菌最低检测菌量的确定

表2 非 O1 非 O139 群霍乱弧菌批内和批间 C_t 值 CV 的确定

| 项目 | 浓度($7 \times$ cfu/ml) | | | | | | | |
|------------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 10^8 | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 |
| 批内 C_t 值 | | | | | | | | |
| 1 | 14.33 | 17.09 | 20.08 | 23.70 | 27.48 | 30.41 | 33.34 | 36.02 |
| 2 | 14.49 | 17.01 | 20.00 | 23.82 | 27.64 | 30.42 | 33.34 | 36.12 |
| 3 | 14.38 | 17.07 | 20.00 | 23.78 | 27.52 | 30.90 | 33.71 | 36.22 |
| CV(%) | 0.55 | 0.22 | 0.23 | 0.25 | 0.30 | 0.92 | 0.63 | 0.27 |
| 批间 C_t 值 | | | | | | | | |
| 1 | 14.33 | 17.09 | 20.08 | 23.70 | 27.48 | 30.41 | 33.34 | 36.02 |
| 2 | 14.81 | 17.16 | 20.18 | 23.16 | 27.49 | 30.05 | 33.44 | 36.05 |
| 3 | 14.98 | 17.49 | 20.08 | 23.78 | 27.23 | 30.26 | 33.68 | 36.92 |
| CV(%) | 1.39 | 1.24 | 0.27 | 1.41 | 0.54 | 0.60 | 0.51 | 1.40 |

基因)。在多重 PCR 和 SYBR Green 实时 PCR 的引物设计上, 根据特异性条带(多重 PCR)和特异性熔解温度(SYBR Green 实时 PCR), 两种方法均能特异地检测非 O1 非 O139 群霍乱弧菌, 鉴别 O1、O139 群霍乱弧菌, 可将霍乱弧菌与其他弧菌和肠道杆菌相区分, 且单一样品检测时间均 < 2 h。由于 SYBR Green 实时 PCR 方法是利用荧光染料(SYBR Green)与双链 DNA 分子结合发光的特性指示扩增产物, 但 SYBR Green 无特异性, 无法识别特定的双链^[6]。而本研究采用两管法, 在 2 个反应体系中检测一份样品, 其特点是无需另外设计荧光探针和优化条件, 简便易行, 成本较低, 对定量 PCR 仪亦无选择。但缺点是专一性不如探针法, 需要根据 2 个反应体系中的检测结果加以判断。

目前世界各地非 O1 非 O139 群霍乱弧菌引起的腹泻并不少见, 尤其在发展中国家。但由于 O1 和 O139 群霍乱弧菌引起的霍乱更易导致流行^[7], 且常规实验室缺少非 O1 非 O139 群霍乱弧菌的血清, 因此更多情况下仅注意对 O1 和 O139 群霍乱弧菌鉴定, 而忽略了非 O1 非 O139 群霍乱弧菌感染的可能性。本研究建立的两种方法, 为不同条件的常规实验室鉴定非 O1 非 O139 群霍乱弧菌提供了选择。

O1、O139 群霍乱弧菌的主要毒力因子是 cholera toxin(CT)^[8], 由 *ctxAB* 编码, 另一个毒力因子是毒素协同菌毛(toxincoregulated pilus, TCP), 在霍

乱弧菌肠道定植中起着重要作用。在非 O1 非 O139 菌株中,除可能存在 CT 和 TCP 外,还含有的外膜蛋白、脂多糖、肠毒素、蛋白酶、溶血素和磷脂酶等,对宿主细胞造成破坏甚至最终引起细胞死亡。因此后续工作将上述毒力因子也加入到检测体系中,判断非 O1 非 O139 群菌株的毒力情况,将更具有流行病学实际意义。

参 考 文 献

[1] Karaolis DK, Lan R, Reeves PR. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxicogenic, non-O1 *Vibrio cholerae* [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177(11):3191-3198.

[2] Sharma C, Thungapathra M, Ghosh A, et al. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(3):756-763.

[3] Dalsgaard A, Forslund A, Bodhidatta L, et al. A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes [J]. *Epidemiol Infect*, 1999, 122(2):217-226.

[4] Nandi B, Nandy RK, Mukhopadhyay S, et al. Rapid method for

species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW[J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(11):4145-4151.

[5] Wang XM, Wang DC, Tan HL, et al. Development and application of real-time polymerase chain reaction to detect *Vibrio cholerae* O1 and O139 in river water [J]. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(8):768-771. (in Chinese)
王 晓 梅, 王 多 春, 谭 海 玲, 等. 实时 PCR 检测 O1 群和 O139 群霍乱弧菌方法的建立及应用[J]. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(8):768-771.

[6] Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, et al. SYBR Green I : fluorescence properties and interaction with DNA[J]. *J Fluoresc*, 2012, 22(4):1189-1199.

[7] Wang DC, Wang XM, Zhong HJ, et al. Distribution and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 isolates in estuary of Pearl River [J]. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(2):145-150. (in Chinese)
王 多 春, 王 晓 梅, 钟 豪 杰, 等. 珠江河口水体 O1 群和 O139 群霍乱弧菌监测[J]. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(2):145-150.

[8] Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin [J]. *Science*, 1996, 272(5270):1910-1914.

(收稿日期:2013-09-05)

(本文编辑:张林东)

读者·作者·编者

本刊常用医学词汇缩略语

本刊对以下较为熟悉的一些常用医学词汇将允许直接用缩写,即在文章中第一次出现时,可以不标注中文和英文全称。

| | | | | | |
|-------|-----------|-------|-----------|--------|------------|
| A 值 | 吸光度值 | HBcAg | 乙型肝炎核心抗原 | PBS | 磷酸盐缓冲液 |
| AIDS | 艾滋病 | HBsAg | 乙型肝炎 e 抗原 | PCR | 聚合酶链式反应 |
| ALT | 丙氨酸氨基转移酶 | HBsAg | 乙型肝炎表面抗原 | RR | 相对危险度 |
| AST | 天冬氨酸氨基转移酶 | Hb | 血红蛋白 | RT-PCR | 反转录聚合酶链式反应 |
| BMI | 体重指数 | HC | 臀围 | SARS | 严重急性呼吸综合征 |
| CHD | 冠心病 | HDL-C | 高密度脂蛋白胆固醇 | SBP | 收缩压 |
| CI | 可信区间 | HFRS | 肾综合征出血热 | SCr | 血清肌酐 |
| COPD | 慢性阻塞性肺疾病 | HI | 血凝抑制试验 | T2DM | 2 型糖尿病 |
| CT | 计算机断层扫描技术 | HIV | 人类免疫缺陷病毒 | TC | 总胆固醇 |
| DBP | 舒张压 | HPV | 人乳头瘤病毒 | TG | 甘油三酯 |
| DNA | 脱氧核糖核酸 | ICU | 重症监护病房 | UA | 尿酸 |
| ELISA | 酶联免疫吸附试验 | IDD | 碘缺乏病 | WBC | 白细胞 |
| FPG | 空腹血糖 | IFG | 空腹血糖受损 | WC | 腰围 |
| GMT | 几何平均滴度 | LDL-C | 低密度脂蛋白胆固醇 | WHR | 腰臀围比值 |
| HAV | 甲型肝炎病毒 | M 值 | 中位数 | WHtR | 腰围身高比 |
| HBV | 乙型肝炎病毒 | MRI | 磁共振成像 | WHO | 世界卫生组织 |
| HCV | 丙型肝炎病毒 | MS | 代谢综合征 | 抗-HBs | 乙型肝炎表面抗体 |
| HDV | 丁型肝炎病毒 | MSM | 男男性行为者 | 抗-HBc | 乙型肝炎核心抗体 |
| HEV | 戊型肝炎病毒 | OR | 比值比 | 抗-HBe | 乙型肝炎 e 抗体 |