

• 论 著 •

# 国产 HCV RNA 分型试剂盒检测结果分析\*

曾劲峰, 卢亮#, 孙元璋, 龙洁萍, 古醒辉, 许晓绚, 李彤, 聂冬梅, 王立林<sup>△</sup>

(广东省深圳市血液中心 518035)

**摘要:**目的 分析丙型肝炎病毒(HCV)RNA 分型试剂盒检测深圳市抗-HCV 阳性献血者结果。方法 收集 2014—2015 年 158 份深圳市抗-HCV 阳性献血者血液样本,应用聚合酶链反应(PCR)-荧光探针法进行 HCV RNA 定量检测,病毒载量  $>1.0 \times 10^3$  IU/mL 的样本经 HCV RNA 分型试剂盒检测 HCV 基因型,分析不同基因型所占比例,病毒基因型与载量之间的相关性。结果 158 份抗-HCV 阳性献血者 PCR-荧光探针法检出 HCV RNA 阳性样本 54 例,病毒载量  $>1.0 \times 10^3$  IU/mL 的 45 例,全部得到分型结果,HCV 1b 型、2 型、3 型、6 型分别占 57.78%(26/45)、6.67%(3/45)、8.89%(4/45)、26.67%(12/45)。单因素方差分析结果显示,1b 型与 2 型病毒载量差异有统计学意义( $F=2.861, P<0.05$ );不同性别间 HCV RNA 定量检测结果及抗-HCV S/CO 值结果差异有统计学意义( $P<0.05$ );不同年龄段各基因型分布比例经 Fisher 精确检验,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 HCV 1b 型、6 型仍为深圳市无偿献血人群感染 HCV 的主要基因型,而 HCV 2 型和 3 型比例有所减少。

**关键词:**丙型肝炎病毒; 分型检测试剂盒; 基因分型; 病毒载量; 无偿献血者

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)02-0157-04

## Analysis on the results of domestic HCV RNA genotype diagnostic kit\*

ZENG Jingfeng, LU Liang#, SUN Yuanzhang, LONG Jieping, GU Xinghui,

XU Xiaoxuan, LI Tong, NIE Dongmei, WANG Lili<sup>△</sup>

(Shenzhen Blood Center, Shenzhen 518035, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the HCV genotyping results which obtained by genotype diagnostic kit in Shenzhen area. **Methods** 158 samples which ELISA test of anti-HCV were positive were collected from voluntary blood donors from 2014 to 2015, and were tested by PCR fluorescence probe method for viral load. The samples which viral load were greater than  $1.0 \times 10^3$  IU/mL were then tested by HCV RNA genotype diagnostic kit. To analysis the proportion of different genotypes and the correlation between genotypes with viral load. **Results** 54 HCV RNA reactive sample were quantity by PCR fluorescence probe method from 158 anti-HCV positive samples. The genotyping data for 45 cases which viral load greater than  $1.0 \times 10^3$  IU/mL were obtained by HCV RNA genotype diagnostic kit. The frequencies HCV genotype 1b, 2, 3 and 6 were 57.78%(26/45), 6.67%(3/45), 8.89%(4/45) and 26.67%(12/45), respectively. One-way ANOVA analysis showed that significant difference in viral loads was found between different HCV genotype 1b and 2 ( $F=2.861, P<0.05$ ), and there was a significant difference in viral loads and anti-HCV S/CO by sex ( $P<0.05$ ). Fisher's exact test showed the significance difference between age and genotypes ( $P<0.05$ ). **Conclusion** HCV 1b and 6 were the most predominant genotypes due to the higher viral load than the other subtypes among volunteer blood donors in Shenzhen, while the proportion of HCV 2, 3 declined.

**Key words:** hepatitis C virus; genotype diagnostic kit; HCV genotyping; plasma viral load; volunteer blood donors

丙型肝炎病毒(HCV)感染是肝硬化、肝衰竭及肝癌的重要病因,每年全球因 HCV 而死亡的人数大约有 28 万<sup>[1]</sup>。由于不同的 HCV 基因型对药物敏感程度不同,欧洲肝脏研究学会 2013 年 HCV 感染诊治指南中,各基因型 HCV 的治疗方案也有所区别。目前,除少数具备条件的血液中心开展逆转录巢式聚合酶链反应(PCR)对 HCV 测序分型,很多医院、血站尚未开展测序法基因分型,部分血站、医院则采用 HCV RNA 基因分型试剂盒检测 HCV 基因型<sup>[2-3]</sup>。市场上多数基因分型试剂只能区分 HCV 1 型及非 1 型病毒感染,为临床提供的信息量有限。本研究采用湖南圣湘生物科技有限公司研发的 HCV

RNA 分型检测试剂盒,检测深圳市抗-HCV 阳性献血者,分析基因型分布结果及其与病毒载量之间的关联,对分子流行病学研究、预测慢性 HCV 和抗病毒治疗效果具有重要的意义,同时,更好指导献血者招募,保障输血安全。

### 1 材料与方法

**1.1 研究标本** 随机收集 2014—2015 年深圳市血液中心无偿献血者血液样本 158 份,献血者均符合国家《献血者健康检查要求》,采血现场金标乙型肝炎表面抗原(HBsAg)试纸条对献血者快速初筛阴性(丙氨酸氨基转移酶和快速 HBsAg 试纸条检测合格的血液样本),排除 HCV 以外的其他类型肝炎病

\* 基金项目:广东省深圳市科技创新委员会资助项目(JCYJ20140403093211510);广东省深圳市卫生计生系统科研资助项目(201401074)。

作者简介:曾劲峰,男,主任技师,主要从事输血安全方面的研究。# 共同第一作者:卢亮,男,主任技师,主要从事输血医学检验方面的研究。△ 通信作者,E-mail:lilywang0724@163.com。

毒感染。

**1.2 仪器与试剂** HCV RNA 定量检测试剂盒、HCV 基因分型试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司); Ortho 抗-HCV EIA Kit(美国 Ortho-Clinical Diagnostics); Murex 抗-HCV V4.0 (美国雅培); ABI 7500 型实时定量荧光 PCR 扩增仪(美国 ABI 应用生物系统公司); MX3005P 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Agilent 公司); FAME 24/30 酶免疫检测仪器(瑞士 HAMILTON); TECAN RSP/200 酶免疫加样仪器(瑞士 TECAN), Beckman UniCel DXC600(美国贝克曼库尔特有限公司)。

**1.3 血清学检测结果判定** 血清学反应性样本经酶免疫试剂检测 2 次,若≥1 次反应性最终结果判定为阳性。

**1.4 丙氨酸氨基转移酶检测** 丙氨酸氨基转移酶检测试剂购自贝克曼库尔特试验系统(苏州)有限公司(批号 Z506245)。

**1.5 逆转录 PCR 定量检测 HCV RNA** 按照湖南圣湘生物科技有限公司 HCV 病毒核酸定量检测试剂说明书设置相关仪器参数,进行试验操作。试剂 95%最低检出限为 25 IU/mL,线性范围 50.0~1.0×10<sup>8</sup> IU/mL。对于测定值>1.0×10<sup>8</sup> IU/mL 的样本,将样本倍比稀释后再次检测。

**1.6 PCR-荧光探针法检测 HCV 基因型** 按照湖南圣湘生物科技有限公司 HCV 分型检测试剂盒试剂说明书操作。根据试验结果 CT 值解释如下:如果各基因型反应液的检测结果为 No Ct 或 Ct 值>36,则判断为 HCV 1b 型、1 型、2 型、3 型和 6 型阴性;如果 HCV 1/3 型反应液的检测结果 FAM Ct 值≤36,报告为 HCV 1 型阳性,HEX Ct 值≤36,报告为 HCV 3 型阳性;如果 HCV 2/6 型反应液的检测结果 FAM Ct 值≤36,报告为 HCV 2 型阳性,HEX Ct 值≤36,报告为 HCV 6 型阳性;如果 HCV 1b/内标型反应液的检测结果 FAM Ct 值≤36,报告为 HCV 1b 型阳性。

**1.7 统计学处理** 病毒载量取对数,计算均值和标准差。应用 SPSS19.0 软件,计量资料采用单因素方差分析,方差不齐时,用 Welch 检验;计数资料采用卡方检验, $P<0.05$  表示差异有统计学意义。分类变量理论频数  $T<5$  超过 20%时采用 Fisher 精确检验。

**2 结果**

**2.1 HCV 各基因型病毒定量结果** 抗-HCV 阳性样本 158 例中,病毒载量>1.0×10<sup>3</sup> IU/mL 的 45 例,全部得到病毒基因型结果。HCV 各基因型中,1b 型与 2 型病毒载量差异有统计学意义( $F=2.861, P=0.45$ );其余各型之间病毒载量差异无统计学意义( $P>0.05$ )。具体见表 1。

**2.2 不同性别组 HCV RNA 定量及分型检测结果** 单因素

方差分析,男性与女性之间 HCV RNA 定量检测结果及抗-HCV S/CO 值结果经 Welch 检验,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。男性与女性之间年龄、丙氨酸氨基转移酶单因素方差分析检验结果差异无统计学意义( $P>0.05$ )。男性、女性中各基因型分布比例 Fisher 精确检验差异无统计学意义( $P>0.05$ )。女性中未有 HCV 2、3 型分布。女性抗-HCV 阳性献血者中,本地户籍比例高于男性,HCV RNA 反应性样本比例低于男性。具体见表 2。

**2.3 不同年龄组 HCV RNA 定量及分型检测结果** 单因素方差分析不同年龄组病毒载量之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。不同年龄组各基因型分布比例经 Fisher 精确检验差异有统计学意义( $P<0.05$ )。具体见表 3。

表 1 HCV 各基因型病毒定量检测结果(IU/mL)

HCV 型别	n	病毒载量均值	病毒载量标准差	极小值	极大值
1b 型	26	5.930 0	1.06	3.90	7.26
2 型	3	7.090 0	0.08	7.04	7.18
3 型	4	6.710 0	0.64	5.83	7.35
6 型	12	6.700 0	0.90	3.94	7.54
合计	45	6.414 7	0.94	3.90	7.54

表 2 不同性别 HCV RNA 定量及分型检测结果

项目	男性	女性	合计
抗-HCV 阳性(n)	98	60	158
HCV RNA 阳性(n)	40	14	54
本地户籍[n/n(%)]	19/98(19.39)	16/60(26.67)	35/158(22.15)
年龄(岁)	31.42±9.50	32.62±9.95	31.88±9.66
丙氨酸氨基转移酶	30.82±9.27	26.15±6.68	29.78±8.91
抗-HCV S/CO 值( $\bar{x}\pm s$ )	3.21±1.60*	2.27±1.43*	2.85±1.60
病毒载量( $\bar{x}\pm s, IU/mL$ )	5.80±2.03 <sup>△</sup>	4.87±2.31 <sup>△</sup>	5.56±2.12
HCV 1b 型(n)	20 <sup>#</sup>	6 <sup>#</sup>	26
HCV 2 型(n)	3 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	3
HCV 3 型(n)	4 <sup>#</sup>	0 <sup>#</sup>	4
HCV 6 型(n)	8 <sup>#</sup>	4 <sup>#</sup>	12

注:抗-HCV S/CO 值男性显著高于女性,\* $P<0.05$ ;基因型在男性、女性中分布差异无统计学意义,<sup>#</sup> $P>0.05$ 。男性组 HCV RNA 定量检测结果显著高于女性组,<sup>△</sup> $P<0.05$ 。

表 3 不同年龄组 HCV RNA 定量及分型检测结果

年龄段(岁)	抗-HCV 阳性(n)	病毒载量均值(IU/mL)	病毒载量标准差(IU/mL)	HCV 1b(n)	HCV 2(n)	HCV 3(n)	HCV 6(n)	合计(n)
>18~≤25	56	5.95	1.92	11	1	0	8	20
>25~≤35	41	5.78	2.10	4	0	0	4	8
>35~≤45	44	5.41	2.07	9	1	4	0	14
>45~≤55	17	4.45	3.10	2	1	0	0	3
合计	158	5.56	2.12	26	3	4	12	45

表 4 不同户籍组 HCV RNA 定量及分型检测结果

项目	深圳户籍	非深圳户籍	合计
性别[n(%)]			
男	19(19.39)	79(80.61)	98
女	16(26.67)	44(73.33)	60
抗-HCV 阳性(n)	36	122	158
HCV RNA 阳性(n)	16	38	54
年龄(岁)	32.37±11.64	31.74±8.97	31.88±9.63
丙氨酸氨基转移酶	22.39±11.57	21.57±9.19	21.75±9.77
抗-HCV S/CO 值(±s)	3.01±1.70	2.81±1.56	2.85±1.60
病毒载量(±s, IU/mL)	5.90±2.01	5.42±2.18	5.56±2.12
HCV 1b 型(n)	11	15	26
HCV 2 型(n)	1	2	3
HCV 3 型(n)	0	4	4
HCV 6 型(n)	2	10	12

2.4 不同户籍组 HCV RNA 定量及分型检测结果 单因素方差分析不同户籍组年龄、丙氨酸氨基转移酶、病毒载量、抗-HCV S/CO 值、性别比例之间差异无统计学意义( $P>0.05$ )。不同户籍组各基因型分布比例经 Fisher 精确检验差异无统计学意义( $P>0.05$ )。具体见表 4。

### 3 讨论

HCV 基因分型命名系统尚无统一标准,目前多采用第 2 届 HCV 与相关病毒国际讨论会议上制订的 Simmonds 系统<sup>[4]</sup>。该系统应用分子进化树分析 HCV 基因组 C 区、E1 区和 NS5 区核酸测序结果,按发现先后次序用阿拉伯数字命名 HCV 基因型(如 1、2、3 等),用英文小写字母表示基因亚型(如 1a、2b、3c 等)。进化树判定 HCV 基因型的方法是目前 HCV 基因分型的金标准,但很多实验室条件有限,实际应用中难以操作。HCV RNA 分型试剂盒为了解病毒基因型提供 1 个更为简便、有效的途径。

本研究在献血者中对 158 例抗-HCV 阳性人群应用 HCV RNA 分型试剂盒检测基因型,其中 54 例检出 HCV RNA 病毒,与 2012 年本中心的研究结果 51 例(共 152 例)较一致,说明深圳市病毒血症的流行率变化不大<sup>[4]</sup>。试剂盒说明书中 95%最低检出限为  $1.0 \times 10^3$  IU/mL,45 例病毒载量  $>1.0 \times 10^3$  IU/mL 样本 100%得到基因型结果。与测序法扩增无效比例较高相比,试剂盒的各项性能更加稳定、可控。

HCV 感染在世界各地间基因型及亚型的分布存在差异。1 型、2 型呈全球流行态势,欧美以 1a 型、1b 型最常见;2a 型、2b 型主要分布在北美、欧洲和日本;3a 型常见于西方国家,特别是静脉药瘾者;4 型主要流行于中非、中东和欧洲地区;6 型见于东南亚、中国香港、中国澳门以及中国南方部分地区<sup>[5]</sup>。本文试验结果中,HCV 1b 型占 57.78%,仍然是中国 HCV 感染者的优势基因型,与既往研究一致<sup>[6]</sup>。6 型所占比例远超 2 型、3 型,这一现象早在 2005 年就有发现,中国珠江三角洲地区 6a 型逐渐取代 2a 型成为第 2 常见亚型<sup>[7]</sup>。近年,中国广州、深圳、云南等地区的研究也发现这一改变越来越显著<sup>[8-9]</sup>。

这种从北向南,2 型逐渐减少而 6 型逐渐增多的现象主要归因于中国南方地区与东南亚毗邻,人员流动性增强。HCV 3 型所占比例 8.89%,超过 2 型,3 型的比例较内地高的原因在排除研究样本数较少及检测技术差异后,考虑与沿海地区吸毒高发有密切关联,尽管低风险献血者 HCV 基因型的分布与传播模式的关联并不如高风险人群密切。与深圳市血液中心 2012 年 3 型比例为 19.40%的研究结果相比,本次结果 3 型比例降低,得益于献血者招募工作的细致开展。

对不同基因型之间的病毒载量作单因素方差分析,结果显示,1b 型病毒载量显著高于其他基因型,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),这也是 1b 型感染者对干扰素治疗效果较差,只有约 50%的患者能产生持续的病毒应答反应的原因。不同性别组 HCV RNA 定量及基因型检测结果分析,HCV RNA 定量检测结果及抗-HCV S/CO 值结果差异有统计学意义( $P<0.05$ ),女性感染 HCV 后病毒血症的程度及循环中病毒蛋白的水平均低于男性,女性感染 HCV 后 RNA 阳性率低于男性,提示女性患者易发生病毒的自发清除。这一现象与 2014 年澳大利亚新南威尔士大学及 2016 年中国江苏省的研究结果一致<sup>[10-11]</sup>。来自澳大利亚的研究发现,病毒自发清除不仅在女性,而且在 IL28B-CC 基因型、1 型 HCV 感染患者都易发生。本研究还发现,不同年龄组 HCV 感染基因型分布比例不同, $>18 \sim \leq 25$  岁年龄组 HCV 感染更为普遍,得到基因型结果的比例也最大,病毒载量均值最高,原因与深圳市城市人口年龄结构以年轻人居多有关,这部分人也是献血的主力军。HCV 3 型全部分布在  $>35 \sim \leq 45$  岁年龄段,提示吸毒或许为该年龄段人群感染的主要原因,后期随访可偏重相关情况的询问。

对深圳户籍和非深圳户籍 HCV RNA 定量及分型进行检测,结果显示各指标之间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),分析原因考虑深圳市作为中国最大的移民城市,近年积分入户政策放开吸纳不同地域人群,人口组成趋于多元化,减少了不同户籍人员间基因型差异。研究结果对了解本市安全献血者的主要来源,制订相应的招募方式、帮助献血者自(下转第 162 页)

胎儿在体内正常发育;并且,本地区的甲状腺激素参考值范围以本地区就诊的妇女为研究对象,为诊断甲状腺激素提供明确标准,有效降低了误诊率,为准确发现和及时治疗甲状腺功能紊乱的患者提供可靠依据和有效的干预,将会很大程度改善本地区的妊娠结局,提高人口质量。

参考文献

[1] 陆琳,李梦薇,陈金燕,等. 东莞市厚街地区 473 例正常孕妇不同妊娠期甲状腺功能变化研究[J]. 现代诊断与治疗, 2015, 8(8):1699-1700.

[2] 张宁,闫素文,徐斌莹,等. 建立地区、孕龄和方法特异性甲状腺激素参考值范围在妊娠期甲状腺功能评价中的作用[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 2(21):57-59.

[3] 程雪君,王开芹. 滕州市正常孕妇妊娠期甲状腺功能变化的研究[J]. 中国社区医师(医学专业), 2009, 11(24):52.

[4] Li HL, Bai BL, Zhang Q, et al. Ectopic cross-talk between thyroid and retinoic acid signaling: A possible etiology for spinal neural tube defects[J]. *Gene*, 2015, 573(2): 254-260.

[5] 王慧,罗炜,廖伟娇,等. 妊娠期糖尿病高危孕妇甲状腺功能及甲状腺自身抗体变化的研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(2):273-276.

[6] 王秀梅. 妊娠期糖尿病高危孕妇甲状腺功能及甲状腺自身抗体变化的研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(20):20-21.

[7] 阎玉芹,董作亮,董玲,等. 正常孕妇早中晚孕期的甲状腺激素参考值范围[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008, 24(6):

609-612.

[8] 许红,何红美,高虹,等. 石家庄地区正常孕妇妊娠期甲状腺功能变化研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 10(19):94-102.

[9] Ajavon A, Killian D, Odom R, et al. Influence of thyroid hormone disruption on the incidence of shingles[J]. *Epidemiol Infect*, 2015, 143(16):3557-3571.

[10] 申妍. 济南地区正常妊娠妇女甲状腺功能指标监测及正常值范围探讨[D]. 济南:山东大学, 2013:39-40.

[11] 王慧,罗炜,廖伟娇,等. 妊娠期糖尿病高危孕妇甲状腺功能及甲状腺自身抗体变化的研究[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(2):273-276.

[12] 王秀梅. 妊娠期糖尿病高危孕妇甲状腺功能及甲状腺自身抗体变化的研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(20):20-21.

[13] Worden F, Fassnacht M, Shi Y, et al. safety and tolerability of sorafenib in patients with radioiodine-refractory thyroid cancer[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2015, 22(6): 877-887.

[14] 林清兰,徐灼均. 妊娠妇女尿碘与甲状腺功能异常的初步研究[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(8):1069-1072.

[15] 张明会,吕玲玲. 北京市平谷区正常孕妇妊娠早中晚期甲状腺功能变化研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2014, 5(24):454-455.

(收稿日期:2016-09-26 修回日期:2016-11-15)

(上接第 159 页)

我排查、降低受血者感染也具有十分重要的意义。

综上,本研究首次应用 HCV 分型检测试剂盒得出深圳市献血者 HCV 基因型分布特点,分析 HCV 基因型与血液筛查检测各项结果之间的关联,确定本市献血人群 HCV 感染状态的特征,为新型检测方法的应用推广、积累数据,有助于更多机构开展应用基因分型判定疗效及制订治疗方案。今后还可以对这部分样本应用基因测序法分析 HCV 基因型及亚型,平行比对得到更多有关 HCV RNA 分型试剂盒评估的信息。

参考文献

[1] Lavanchy D. The global burden of hepatitis C[J]. *Liver International*, 2009, 29(1):74-81.

[2] 黄杰庭,戎霞,熊华平,等. 广州地区无偿献血者 HCV 基因分型与病毒滴度的相关性研究[J]. 中国输血杂志, 2012(10):1063-1065.

[3] 曾劲峰,李婷婷,许晓娟,等. 深圳献血者中 HCV 感染自然清除与病毒血症特征分析[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(4):356-360.

[4] Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology*, 2005, 42(4):962-973.

[5] Negro F, Alberti A. The global health burden of hepatitis

C virus infection[J]. *Liver International*, 2011, 31(2): 1-3.

[6] Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(2):223.

[7] 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.

[8] 廖峭,许茹,王敏,等. 广州无偿献血人群中丙型肝炎抗体阳性者 HCV 基因型与病毒载量的关系[J]. 中国免疫学杂志, 2012, 28(3):242-245.

[9] 李媛,冯悦,夏雪山,等. 云南省丙型肝炎病毒基因型和基因亚型的分布与流行特点[J]. 山东医药, 2013, 53(9):91-92.

[10] Grebely J, Page K, Sacks-Davis R, et al. The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection[J]. *Hepatology*, 2014, 59(1):109-120.

[11] 朱绍汶,林红,毛平,等. 江苏地区无偿献血者 HCV 基因型的分布[J]. 中国输血杂志, 2016, 29(2):131-134.

(收稿日期:2016-09-22 修回日期:2016-11-11)