

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.06.033

502 例丙型肝炎患者病毒基因分型及与性别和年龄的关系研究 *

宫 瑞^{1,2} 蒋红梅¹ 孙 广² 于明瑞^{1,2} 岳龙飞³ 张云东^{1,2,Δ}

(1 贵州医科大学医学检验学院 贵州 贵阳 550004; 2 贵州省安顺市人民医院医学检验科 贵州 安顺 561000;

3 贵州省安顺市人民医院全科医学科 贵州 安顺 561000)

摘要 目的:探讨 502 例丙型肝炎患者病毒基因分型的情况,分析其与性别和年龄的关系,为丙型肝炎的防治提供参考。**方法:**收集贵州地区 502 例丙型肝炎患者的血液标本,采用 PCR- 荧光探针法检测丙型肝炎病毒基因型,并对检测数据进行统计学分析。**结果:**共检出 4 种基因型及 5 种基因亚型,主要以 1b 型、3b 型为主,其次是 6a、3a 型,2a 型较少。不同性别丙型肝炎病毒(HCV)基因型分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.029, P=0.026$),男、女性患者均以 1b 型、3b 型为主要基因型,但男性感染者明显多于女性。各个年龄组 HCV 基因型分布比较,差异有统计学意义($\chi^2=102.946, P=0.000$),40-59 岁组感染者最多,以 1b 型为主,其次是 20-39 岁组,以 3b 型为主, ≥ 60 岁组感染人数较少,以 1b 型为主。**结论:**贵州地区 HCV 呈现多基因型分布,1b、3b 型为主要流行基因型,6a、3a 型次之,其余基因型较少,不同性别、年龄的 HCV 基因型分布存在差异性。

关键词:丙型肝炎病毒;基因型;PCR- 荧光探针法;贵州;性别;年龄

中图分类号:R512.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)06-1147-04

Genotyping of Hepatitis C Virus in 502 Patients and Its Relationship with Gender and Age*

GONG Rui^{1,2}, JIANG Hong-mei¹, SUN Guang², YU Ming-rui^{1,2}, YUE Long-fei³, ZHANG Yun-dong^{1,2,Δ}

(1 College of Medical Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou, 550004, China;

2 Department of Medical Laboratory, Anshun People's Hospital of Guizhou Province, Anshun, Guizhou, 561000, China;

3 Department of General Practice, Anshun People's Hospital of Guizhou Province, Anshun, Guizhou, 561000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the genotyping of hepatitis C virus in 502 patients, and analyze its relationship with gender and age, so as to provide reference for the prevention and treatment of hepatitis C. **Methods:** The blood samples of 502 patients with hepatitis C in Guizhou Province were collected. The genotypes of hepatitis C virus were detected by PCR fluorescence probe method, and the data were analyzed statistically. **Results:** 4 genotypes and 5 subgenotypes were detected, the main genotypes were 1b type and 3b type, followed by 6a and 3a types, and 2a type was less. The genotype distribution of hepatitis C virus (HCV) in different gender was statistically significant ($\chi^2=11.029, P=0.026$). 1b type and 3b type were the main genotypes in both male and female patients, but the number of male patients was significantly more than that of female patients. There was significant difference in the distribution of HCV genotypes among different age groups ($\chi^2=102.946, P=0.000$). The 40-59-year-old group was the most infected, mainly with 1b type, followed by 20-39-year-old group, mainly with 3b type, and the ≥ 60 year-old group was the least infected, mainly with 1b type. **Conclusion:** The distribution of HCV genotypes in Guizhou was multi genotype, 1b and 3b types were the main prevalent genotypes, followed by 6a and 3a types, and the rest were less. There were differences in the distribution of HCV genotypes in different gender and age.

Key words: Hepatitis C virus; Genotype; PCR fluorescence probe; Guizhou; Gender; Age

Chinese Library Classification(CLC): R512.63 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)06-1147-04

前言

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种肝脏疾病,该病毒可造成急性或慢性感染,其发展程度从持续几周的轻症到伴随终身的严重疾病。HCV 是具有包膜的单股正链小核糖核酸(RNA)病毒^[1],属于黄病毒科,目前将其分为 6 个主要基因

型和 100 多个基因亚型^[2]。研究表明,不同地区的相同类型患者 HCV 基因型的分布特征存在明显差异,相同地区的不同类型患者 HCV 基因型分布特征也存在明显差异^[3],且不同基因型 HCV 对抗病毒治疗物的敏感性有所不同^[4,5],因此明确 HCV 基因型对了解丙型肝炎地域分布特征、追踪传染来源、预测病情均有一定的指导意义^[6]。本研究对贵州地区 502 名丙型肝炎患

* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(81960393);安顺市科技计划项目(安市科社[2019] 05 号)

作者简介:宫瑞(1992-),女,硕士研究生,初级检验技师,从事医学检验方面的研究,E-mail: ldlhsn198726@163.com

Δ 通讯作者:张云东(1970-),女,本科,主任技师,从事医学检验方面的研究,E-mail: 973080965@qq.com

(收稿日期:2020-08-23 接受日期:2020-09-17)

者进行病毒基因分型检测,旨在了解本地 HCV 感染情况、基因型分布特征,可为丙型肝炎病情评估及治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 对象、仪器及试剂

1.1.1 研究对象 根据中华医学会肝病学分会、中华医学会感染病学分会联合修订的《丙型肝炎防治指南(2015 年最新版)》^[7] 诊断标准,收集 2018 年 1 月至 2020 年 6 月期间贵州地区丙型肝炎患者 502 例(HCV 抗体阳性、HCV-RNA $\geq 1.0 \times 10^3$ IU/mL),包括男性患者 307 例,女性患者 195 例,年龄 20-85 岁,平均年龄(46.55 $\pm$ 12.22)岁。

1.1.2 仪器与试剂 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪,丙型肝炎基因分型检测试剂盒(PCR-荧光探针法)由泰普生物科学有限公司提供,批号为(2111710、231803、291812、331905、371909、402002、422005),核酸提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit)由德国 Qiagen 公司提供。

1.2 方法

1.2.1 血液样本采集 于患者治疗前抽取静脉血 3 mL,3000 r/min 离心 10 min 分离血清,置 -80℃ 保存备用。

1.2.2 HCV 基因型检测 ① 采用核酸提取试剂盒对血样进行提取和纯化,获得 HCV RNA。② 向 40 μ L 各组反应体系中(38 μ L

不同亚型 HCV RT-PCR 反应液和 2 μ L 酶系)分别加入质控品或 HCV RNA 的提取产物各 10 μ L,然后将待测 PCR 反应管小心置于仪器中,按照如下的条件进行扩增:42℃ 30 min、95℃ 3 min、94℃ 20 s、55℃ 20 s、72℃ 30 s,进行 10 个循环;94℃ 15s、60℃ 45s,进行 10 个循环;荧光素设置:所有检测孔设置为 FAM 和 HEX;信号收集于第四阶段:60℃ 45 s。③ 结果判定:反应结束后,根据分析后图像调节基线的初始值、终点值以及阈值,在结果界面读取信息。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,不同基因型感染情况采用率(%)或者构成比表示,年龄采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)描述。各组间计数资料采用 χ^2 检验进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCV 基因分型结果

502 例 HCV 基因型检测结果如下,包括 4 种基因型及 5 种基因亚型,主要以 1b、3b 型为主,分别是 219 例(43.60%)、126 例(25.10%),其次是 6a、3a 型,分别为 80 例(15.90%)、70 例(14.00%),2a 型最少,只有 7 例(1.40%),分布情况见表 1。各基因型结果判定图见图 1-5。

表 1 贵州地区 502 例患者 HCV 基因分型结果(例)

Table 1 HCV genotyping results of 502 patients with hepatitis C infection in Guizhou Province(n)

Genotypes	1b	2a	3a	3b	6a
n	219	7	70	126	80
Constituent ratio(%)	43.60	1.40	14.00	25.10	15.90



图 1 1b 型结果判定

Fig.1 The result of 1b type

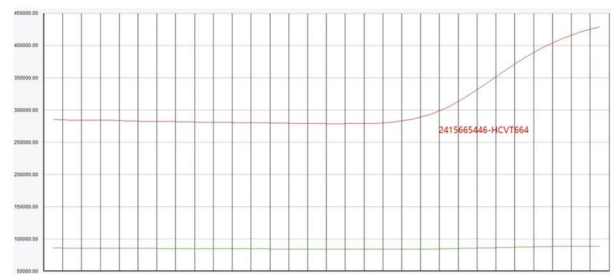


图 2 2a 型结果判定

Fig.2 The result of 2a type

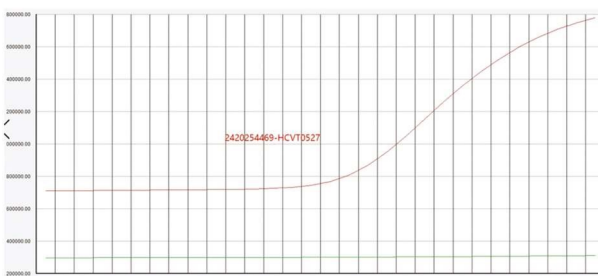


图 3 3a 型结果判定

Fig.3 The result of 3a type

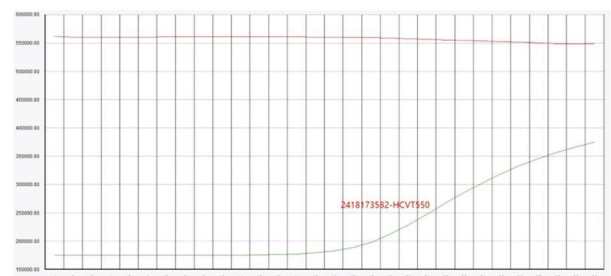


图 4 3b 型结果判定

Fig.4 The result of 3b type

2.2 HCV 基因型与性别的关系

502 例患者中,男性患者 307 例,包括 1b 型 118 例,2a 型 3 例,3a 型 45 例,3b 型 88 例,6a 型 53 例;女性患者 195 例,包

括 1b 型 101 例,2a 型 4 例,3a 型 25 例,3b 型 38 例,6a 型 27 例。男、女性患者均以 1b 型、3b 型为主要基因型,但男性感染者明显多于女性,不同性别 HCV 基因型分布情况比较,差异有

统计学意义($\chi^2=11.029, P=0.026$)。见表 2。

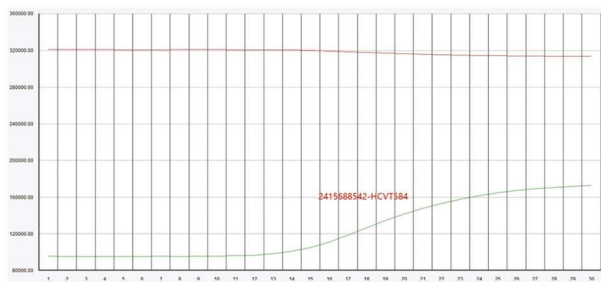


图 5 6a 型结果判定

Fig.5 The result of 6a type

表 2 不同性别患者 HCV 基因型的分布(例)

Table 2 Distribution of HCV genotypes in patients of different genders(n)

Genotypes	Subgenotypes	Male	Female	Total
1	1b	118	101	219
2	2a	3	4	7
3	3a	45	25	70
	3b	88	38	126
6	6a	53	27	80

表 3 不同年龄组患者 HCV 基因型的分布情况

Table 3 Distribution of HCV genotypes in different age groups

Genotypes	20-39 year-old	40-59 year-old	≥ 60 year-old	Total
1b	21(15.67%)	130(45.45%)	68(82.93%)	219
2a	2(1.49%)	2(0.70%)	3(3.66%)	7
3a	30(22.39%)	37(12.94%)	3(3.66%)	70
3b	50(37.31%)	73(25.52%)	3(3.66%)	126
6a	31(23.13%)	44(15.38%)	5(6.10%)	80
Total	134	286	82	502

胞癌^[9],这对世界公共卫生构成了严峻的挑战^[10]。HCV 具有高度的遗传多样性^[11],目前已有多种基因分型^[12],且具有不同的地理分布和对药物治疗的敏感性^[13,14]。根据丙型肝炎防治指南(2019 年版)^[15],慢性丙型肝炎病毒感染者的抗病毒治疗已经进入了直接抗病毒药物(DAA)的泛基因型时代,优先推荐无干扰素的泛基因型方案,它可以用来治疗基因 1-6 型、混合型及未知型慢性 HCV 的成人感染者,但对不同的基因型的疗效还有一定差别^[16],DAA 的选择和持续时间主要取决于病毒基因型,由此可见基因型分类尤为重要^[10]。

HCV 的感染呈全球性流行,基因型 1-3 分布于世界各地,基因型 4 和 5 主要存在于中东和非洲,基因型 6 主要出现在东南亚国家^[3,17,18]。我国 HCV 基因型主要以 1b、2a 型为主,但不同地区之间存在较大差异,北方地区基因型较单一,以 1b、2a 型为主,南方地区基因型种类较多,以 1b 型为主,2a、3a、3b 及 6a 型均占较大比例^[3,19]。西南地区的川、滇、黔三地主要以 1b 型为主,与全国大部分地域的基型分布相似^[20]。

本研究对贵州地区 502 例丙型肝炎患者进行 HCV 基因型检测,感染率前 3 名的基因型为 1b 型 219 例(43.60%)、3b 型 126 例(25.10%)、6a 型 80 例(15.90%),与王梅等^[21]报道的 2011-2018 年贵州地区 HCV 感染者基因型分布特征中所发表

2.3 HCV 基因型与年龄的关系

各基因型在不同年龄组的分布情况如下,主要分为 3 个年龄组,20-39 岁组、40-59 岁组、≥ 60 岁组,其中 40-59 岁组感染者最多,主要以 1b 型为主,其次是 20-39 岁组,多为 3b 型,≥ 60 岁组感染人数较少,以 1b 型为主。HCV 基因型在不同年龄组分布比较差异有统计学意义($\chi^2=102.946, P=0.000$)。见表 3。

3 讨论

据世界卫生组织(WHO)统计,HCV 的全球感染率在 3% 左右,每年由此导致的死亡人数约达 35 万例^[8]。HCV 主要在细胞质中复制,容易造成持续感染,导致慢性肝炎、肝硬化和肝癌

的研究结果基本相一致(1b 型 26.84%、3b 型 27.17%和 6a 型 24.28%),但 1b 型较王梅等的报道明显升高,3b、6a 型有所下降,考虑可能与感染途径相关。据研究显示,1b 型和 2a 型主要由外科感染和输血引起^[22],基因型 3 和 6 在静脉吸毒者中较为常见^[23],贵州地处内陆,人口流动相对较少,主要由输血、外伤手术等引起,通过数据对比可知近 10 年贵州地区 HCV 感染的主要流行基因型没有明显变化,也未发现混合基因型的报道,但在其他研究中有混合基因型的报道,如北京地区出现 1b/2a、1b/3b、2a/3a 混合基因型^[24],南京地区有 1b/2a、1b/3a 混合基因型^[25],宁夏地区出现 1b/2a 混合基因型^[26],造成混合感染的原因可能是高危人群同时或先后感染不同基因亚型的 HCV,混合感染后具体表现形式可能与各亚型的生存状态有关^[24],本次研究中可能是由于特异性引物所致的方法局限性,从而未有混合基因型被检出。本研究还对 HCV 基因型在不同性别、不同年龄的分布情况进行了分析,结果显示差异均有统计学意义。杨兴林等^[27]在 2014 年发表的贵州地区丙型肝炎病毒基因分型的研究中显示:贵州地区不同 HCV 基因型的感染在男性、女性中的分布比较差异无统计学意义,王梅等^[21]在 2020 年报道的研究结果中显示二者的差异有统计学意义,可见随着样本量的逐渐增大、基因型多样化的逐渐发展,HCV 基因型与性别的关系也

开始出现变化,据报道^[21]女性在有创美容和输血的感染比例较高,男性在静脉药瘾感染的比例高于女性,故二者关系的转变考虑可能与不同的感染途径相关。

唐维等^[28]的研究显示 HCV 基因型与年龄相关,1b 型多见于 40 岁及以上人群,小于 40 岁的患者主要以 3 型及 6a 型为主,本次研究结果也与其相符,20-39 岁组感染率为 26.69%,以 3b 型为主,40-59 岁组感染率最高为 56.97%,以 1b 型为主,≥ 60 岁组感染率为 16.33%,以 1b 型为主,可知 1b 型为主要流行基因型。1b 型与其他基因型相比在体内存在时间久,长期感染易导致肝硬化、肝癌等疾病^[29],肝硬化的病情进展会影响治疗方案的选择,如失代偿期肝硬化患者,不能使用含蛋白酶抑制剂的药物,可使用不含蛋白酶抑制剂的含索磷布韦的方案,如索磷布韦联合维帕他韦^[30,31],由此可见不同年龄组的感染型别可能有所不同,HCV 基因型与肝病程度存在相关性,且由于病情程度不同治疗方案也有所变化,从而可知通过对 HCV 基因型的了解可为患者提供更好的针对性治疗。

综上所述,贵州地区 HCV 呈现多基因型分布,不同性别、年龄的 HCV 基因型分布存在差异性。不同基因型患者对治疗方案的反应不同,根据患者感染 HCV 的基因型选择治疗方案,已被纳入丙型肝炎防治指南,基因分型的临床意义体现在可以探讨其分型及追溯传染来源、了解肝脏疾病损伤和归转的关系以及起到对临床用药的指导作用,因此 HCV 基因型的研究对临床的治疗及传播途径的追踪有着重要的意义。本研究中试剂盒仅可检测 1b、2a、3a、3b 和 6a 型,样本量从数量和广度的不足都可能会对结果产生些许影响,今后将会加大样本量,从更多的角度进行全面的分析。

参考文献(References)

- [1] Chayama K. Changing therapy against hepatitis C virus infection and issues after eradication of the virus [J]. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2021, 118(1): 1-4
- [2] Nakano T, Lau GM, Lau GM, et al. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region[J]. *Liver Int*, 2012, 32(2): 339-345
- [3] 聂滨,张开烟,刘新波,等. 中国丙型肝炎病毒基因型分布回顾及 Meta 分析[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(20): 2876-2881
- [4] Martinez MA, Franco S. Therapy Implications of Hepatitis C Virus Genetic Diversity[J]. *Viruses*, 2020, 13(1): E41
- [5] Margusino-Framiñán L, Cid-Silva P, Giménez-Arufe V, et al. Influence of drug-drug interactions on effectiveness and safety of direct-acting antivirals against hepatitis C virus [J]. *Eur J Hosp Pharm*, 2021, 28(1): 16-21
- [6] 张晋会,王微. 丙型肝炎病毒基因型研究进展及临床意义 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(34): 6798-6800, 6794
- [7] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2015 最新版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2015, 23(12): 906-923
- [8] Crespo J, Cuadrado A, Perelló C, et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection in a country with universal access to direct-acting antiviral agents: Data for designing a cost-effective elimination policy in Spain[J]. *J Viral Hepat*, 2020, 27(4): 360-370
- [9] Kakizoe Y, Koizumi Y, Ikoma Y, et al. Required concentration index quantifies effective drug combinations against hepatitis C virus infection[J]. *Theor Biol Med Model*, 2021, 18(1): 4
- [10] Peiffer KH, Kuhnenn L, Stelzl E, et al. Performance of Three Common Hepatitis C Virus (HCV) Genotyping Assays for Identification of HCV Genotype 2/1 Chimeras [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57 (7): e00060-e00069
- [11] Indolfi G, Easterbrook P, Dusheiko G, et al. Hepatitis C virus infection in children and adolescents [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(6): 477-487
- [12] Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(1 Suppl): S3-S13
- [13] Sicras-Mainar A, Morillo-Verdugo R. Concomitant use of direct-acting antivirals (DAA) and central nervous system drugs in patients with hepatitis C virus infection[J]. *Adicciones*, 2020, 0(0): 1551
- [14] Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications [J]. *Gut*, 2006, 55 (9): 1350-1359
- [15] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 丙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. *中华临床感染病杂志*, 2019, 12(6): 429-450
- [16] 杨晓宇,王菊仙. 抗丙型肝炎病毒新药及治疗方案研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(22): 2624-2630
- [17] Abou Rached A, Yaghi C, Khalil L, et al. Prevalence of hepatitis C virus genotypes and subtypes in Lebanese population and major high risk groups[J]. *Arab J Gastroenterol*, 2017, 18(2): 114-117
- [18] Lim SG, Aghemo A, Chen PJ, et al. Management of hepatitis C virus infection in the Asia-Pacific region: an update [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2(1): 52-62
- [19] 苏迎盈,刘慧鑫,汪宁. 中国丙型肝炎病毒基因型分布 [J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(1): 80-84
- [20] 温先勇,唐敏,邓正华,等. 中国西南三地 HCV 基因型的分布及临床特征[J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(23): 42-46
- [21] 王梅,杨兴林,张流,等. 贵州地区 HCV 感染者基因型分布特征[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(2): 309-313
- [22] Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, et al. Dynamic hepatitis C virus genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132 (5): 1767-1777
- [23] 陈敏,马艳玲,罗红兵,等. 昆明市静脉注射吸毒人群丙型肝炎病毒基因型分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2015, 36(9): 994-997
- [24] 郭杰,曲沛,李韦杰,等. 5708 例丙型肝炎病毒感染者基因型检测结果评价[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(5): 734-737
- [25] 潘剑,俞海英,丁巧云,等. 慢性丙型肝炎患者 HCV 基因型分析[J]. *实用肝脏病杂志*, 2012, 15(5): 390-391
- [26] 许茹,王敏,陈秋宇,等. 中国不同基因型 / 亚型丙型肝炎病毒混合感染率的研究[J]. *中国病毒病杂志*, 2015, 5(1): 11-16
- [27] 杨兴林,梁跃东,李勇富,等. 贵州地区丙型肝炎病毒基因型的研究[J]. *重庆医学*, 2014, 43(30): 4065-4067
- [28] 唐维,苏明华,江建宁,等. 广西地区丙型肝炎病毒的基因型分布与流行病学特征[J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(9): 1300-1306
- [29] 陈兆云,刘继文,孟存仁,等. 新疆地区汉族、维吾尔族、哈萨克族丙肝患者基因型研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2015, 38(7): 855-857
- [30] 南月敏,刘领弟,赵文,等. 丙型肝炎肝硬化失代偿期抗病毒治疗进展[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(12): 919-922
- [31] 张晓伟,钟蕊. 索磷布韦和维帕他韦联合利巴韦林治疗基因 2、3 型慢性丙型肝炎患者近期疗效和耐受性观察 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(2): 191-194