

HCV RNA 基因分型多色荧光 PCR 筛查和确认方法的建立

马洪滨 李永利 刘立明 王雪飞 朱剑功 杨宁 李妍 庞君丽 洪炜
王大刚 王海滨

【摘要】 目的 建立多色荧光丙型肝炎基因分型检测方法。**方法** 针对 HCV 5'NCR 区特异性基因设计一对通用引物和 I/II/III/IV 型特异性探针, I 型和 III 型探针标记 FAM 荧光染料, II/IV 型标记 VIC 荧光染料, 分别建立 I/II 型和 III/IV 型两管双色荧光 PCR 扩增系统。分别采用测序和本研究方法对 97 份丙型肝炎阳性血清进行分型, 比较两种方法分型结果的一致性, 并对双色荧光法检测的 2889 例 HCV 分型结果进行分析。**结果** 在 97 份丙型肝炎阳性血清中, 双色荧光法分出 I 型 65 例(67.0%), II 型 25 例(25.8%), III 型 2 例(2.1%), I/II 混合型 3 例(3.1%), 有 2 例 HCV RNA 定量为 $(1 \sim 3) \times 10^3$ IU/ml 弱阳性标本未分出型; 测序法分出 I 型 61 例(62.9%), II 型 24 例(24.7%), III 型 2 例(2.1%), I/II 混合型 2 例(2.1%), 有 8 例 HCV RNA 定量结果为 $(1 \sim 5) \times 10^3$ IU/ml 的阳性标本测序法未分出型, 有 1 例 I/II 混合型标本测序无法判断, 而荧光法分型明确。我院采用本研究建立的方法检测 2889 例临床丙型肝炎标本, 2268 份分出基因型, 其中 I 型 1545 例(68.1%), II 型 702 例(31.0%), I/II 混合型 18 例(0.8%), III 型 3 例(0.1%), 高 HCV 载量血清全部涵盖在 I/II/III 型中, 未发现 IV 型和其他型的病例。**结论** 本研究建立的双色荧光 HCV 基因分型的方法具有良好的敏感性、特异性、可重复性且省时省力, 由于近 99% 的 HCV 阳性血清为 I/II 型, 所以临床可选择 I/II 型试剂进行常规检测, 对高病毒载量而非 I/II 型的标本可采用 III/IV 型试剂进一步分型明确。

【关键词】 逆转录聚合酶链反应; 多色荧光; HCV 分型

Multiplex real-time reverse transcription-PCR screening and conforming assay for determination of hepatitis C virus genotypes MA Hong-bin, LI Yong-li, LIU Li-ming, WANG Xue-fei, ZHU Jian-gong, YANG Ning, LI Yan, PANG Jun-li, HONG Wei, WANG Da-gang, WANG Hai-bin. Center for Clinic Laboratory Medicine, 302th Hospital, PLA, Beijing 100039, China

Corresponding author: WANG Hai-bin, Email: haibin_wang@sohu.com

【Abstract】 Objective To develop and evaluate a new, simple multiplex real-time reverse transcription-PCR (MRRTP) method for genotyping of HCV fitting for clinical laboratory routine detection. **Methods** Multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) and Taqman probes (I/III modified with FAM, II/IV modified with VIC respectively) targeting the 5' non-coding region had been used. The method was compared with sequencing assay on 97 serum samples representing genotypes I/II/III, and was applied on a further 2889 clinical samples. **Results** MRRTP typing of the 97 samples showed genotype I in 65 (67.0%), genotype II in 25 (25.8%), genotype I and genotype II mixed in 3 (3.1%), genotype III in 2 (2.1%), and no genotype IV were detected, while 2 samples of HCV RNA quantitation less than 3×10^3 IU/ml were non-reactive. In controlling method of sequence, genotype I in 61 (62.9%), genotype II in 24 (24.7%), genotype I and genotype II mixed in 2 (2.1%), genotype III in 2 (2.1%), and no genotype IV were detected also. There was a complete concordance with sequence with the exception of 1 sample, which were of genotype I and II by MRRTP, but genotype II by sequence. There were 8 samples of HCV RNA quantitation less than 5×10^3 IU/ml were not detected in sequence method, only 2 samples were not detected in MRRTP

method. Out of 2889 consecutive clinical samples between 2008 and 2009, 2268 could be typed by the MRRTTP assay; 68.1% were genotype I, 30.9% were genotype II, genotype I mixed genotype II were only 0.79% and genotype III were 0.1%, none of genotype IV and others were detected. **Conclusions** The method is overall accurate and provides an attractive alternative for genotyping because processing time and costs are significantly reduced. MRRTTP of I/II probe screening method is fitting for clinical amplification in China (almost 99%). Inclusion of probes targeting genotypes III less than 0.1 percent is required for the method to be useful in areas where these genotypes are present.

【Key words】 Reverse transcriptase polymerase chain reaction; Multiplex real-time; Hepatitis C virus genotypes

干扰素的治疗剂量和用药周期与 HCV 基因型直接相关^[1-2], 全国肝病专家共识中提出, 国内 HCV RNA 基因分型将列为丙型肝炎抗病毒治疗的重要参考指标, 近年国内外文献报道的 HCV RNA 基因分型的研究方法主要有 HPLC 酶切法^[3]、引物特异性电泳分型法^[4-7]、熔点曲线法^[8-9]、分管引物测序^[10]和 Rolfe 等^[11]方法, 由于以几种方法均存在操作复杂、结果鉴定开放式或分管多步等缺陷, 因此没有成为临床常规开展的技术。近年国外基于 TaqMan 荧光探针技术建立了荧光 PCR 的分型方法^[12-16], 解决了开放鉴定和时间长、消耗大等问题, 是新近具有临床推广价值的技术。为建立适合我国国情并能够应用于临床常规检测荧光 PCR 分型方法, 本文根据我国丙型肝炎基因型的分布特点, 建立了双色荧光 HCV-I/II 基因分型的筛查和 HCV-III/IV 型确认方法, 为临床诊疗提供快而准确的参考信息。

对象与方法

1. 对象: 选择在解放军第 302 院确诊的 97 例丙型肝炎患者 HCV RNA 阳性血清作为方法学研究对象。

2. 双色荧光分型引物和探针的选择: 根据 GenBank 记录, 在 NCR 保守区域设计引物和探针^[17], 设计通用引物 HCG-PFI 和 HCG-PRI, 型特异性探针 FAM-HCG-I-TAMRAR 和 VIC-HCG-II-TAMRAR, 作为丙型肝炎 I/II 临床筛查方法; 型特异性探针 FAM-HCG-III-TAMRAR 和 VIC-HCG-IV-TAMRAR, 作为 III/IV 型确认方法。

3. 核酸提取方法: 采用 QIAamp Viral RNA mini Kit 核酸提取试剂盒提取病毒核酸, 按照试剂操作说明书进行操作。

4. 实时荧光 PCR 试剂的配制和扩增仪器: 采用

Invitrogen 公司生产的 SuperScript III Platinum One-Step qrt-PCR 缓冲液系统和混合酶配制 PCR 反应体系, 反应系统已经包括 A/C/G/T 四种核糖核酸成分, 镁离子的浓度无需进一步优化, 系统提供了 SuperScript III RT 逆转录酶和 PCR 扩增所需要的 Taq DAN 酶, 可进行一管法扩增。本研究数据主要采用 MX3000P 荧光 PCR 扩增仪器进行检测。

5. 结果判断: I 型和 III 型为 FAM 通道, II 型和 IV 型为 VIC 通道。在常规筛查实验中, 如果 FAM 通道有阳性曲线为 I 型(图 1), 如果 VIC 通道扩增有阳性曲线则为 II 型(图 2), 如果二者全部有阳性曲线, 则为 I/II 混合型(图 3), III 型和 IV 型的判断方法与 I/II 型相同。阳性分型的曲线判断要求: 荧光阈值除了常规按照平均荧光值的 5% 制定外, 对弱阳性的标本应结合阴性对照单独分析其荧光 PCR 曲线, 具备以下条件者应视为阳性: (1) 标本的荧光 PCR 曲线应呈典型 S 型指数增长特点; (2) 荧光 PCR 曲线与阈值线交接的 CT 值小于总扩增循环数的 10% (<40.5)。如果标本的 CT 值介于 5% ~ 10% (42.5 ~ 40.5) 之间的可视为阳性可疑标本, 建议同一份标本复查或重新采样再测。

6. 测序分型方法的设计: 采用同区的保守基因序列设计测序引物^[18], 采用巢式 PCR 方法进行扩增, 将扩增物进行测序。测序引物设计为 HCG-F1S 和 HCG-RS 进行第一步 RT-PCR 扩增, 取第一步扩增产物 3 μ l 进行第二步的巢式 PCR, 第二步 PCR 的正向引物为 HCG-F2S, 反向引物与第一步 RT-PCR 相同。扩增产物采用 2% 琼脂糖电泳进行确认, 然后送上海生工公司进行测序。

7. 双色荧光 PCR 检测 2889 例丙型肝炎患者分型: 对 2008 年 1 月至 2009 年 12 月在解放军第 302 医院采用本研究方法分型的 2889 例丙型肝炎患者的结果进行分析。

表1 双色荧光法与测序结果的比较(例)

方法	I型	II型	III型	IV型	I/II混合型	未分型
双色荧光法	65	25	2	0	3	2
测序法	61	24	2	0	2	8

注: $\chi^2 = 3.81 < \chi_{0.05,4}^2 = 9.49$,说明两种方法检测差异无统计学意义

8. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 做四格表的卡方检验进行关联与相关分析。

结 果

1. 敏感度:在 97 例 HCV RNA 定量结果 $> 10^3$ IU/ml 的丙型肝炎患者血清中,本研究方法分出基因型 95 例(98.0%),2 例未检出型的标本为 HCV 病毒载量较低的标本(1.6×10^3 IU/ml 和 2.16×10^3 IU/ml),这两份标本测序方法同样未分型,并且另有 6 例本研究方法分出型的标本,测序方法未分出(表 1)。

2. 特异度:本研究方法检测 50 份 HBV DNA 阳性、抗 HCV 抗体阴性血清标本,结果全部为阴性,特异性为 100%。

3. 重复性和准确性:对 40 份已分型(I 型 23 例,II 型 17 例)的丙型肝炎患者血清标本,重新提取核酸和对已经提取核酸重复检测的方法,三次试验结果全部一致,并且其 CV 值 $< 20\%$ 。

4. 与测序结果的对比:在 97 例 HCV RNA 定量结果 $> 10^3$ IU/ml 的研究标本中,双色荧光法分出 I 型 65 例(67.0%),II 型 25 例(25.8%),III 型 2 例(2.1%),I/II 混合型 3 例(3.1%),有 2 例 HCV RNA 定量为 $(1 \sim 3) \times 10^3$ IU/ml 弱阳性标本未分型;测序法分出 I 型 61 例(62.9%),II 型 24 例(24.7%),III 型 2 例(2.1%),I/II 混合型 2 例(2.1%),有 8 例 HCV RNA 定量结果为 $(1 \sim 5) \times 10^3$ IU/ml 的阳性标本测序法未分型,有 1 例 I/II 混合型标本测序无法判断,而荧光法分型明确。我院采用本研究建立的方法检测 2889 例临床丙型肝炎标本,2268 份分出基因型,其中 I 型 1545 例(68.1%),II 型 702 例(30.9%),I/II 混合型 18 例(0.79%),III 型 3 例(0.1%),高 HCV 载量血清全部涵盖在 I/II/III 型中,未发现 IV 型和其他型的病例。本文方法与测序法比较二者吻合率为 93.8%(表 1,91/97),在 12 份 HCV RNA 定量结果 $< 5 \times 10^3$ IU/ml 标本中,测序法未分型有 8 份,本研究方法只有 2 份。并且有 1 例 I/II 混合型测序

无法判读,而本研究方法分型肯定。

5. 双色荧光 PCR 检测 2889 例丙型肝炎患者分型:2268 份分出基因型(检出率为 78.5%),其中 I 型有 1545 例(占总分型的 68.1%),II 型为 702 例(占总分型的 31.0%),I/II 混合型 18 例(0.8%),采用确认方法分出 III 型 3 例(0.1%),无 IV 型病例的检出,在强阳性血清中也未发现未分型者。

讨 论

HCV RNA 基因分型具有重要的临床应用价值,传染病专科医院大多采用直接测序或杂交的方法进行检测,由于其成本高、敏感性低和报告速度慢等缺陷,该项目的检测一直没有在临床广泛开展应用^[19-20]。因此建立一种操作简单、快速、准确且适合临床常规开展的丙肝分型方法,对满足临床诊疗的需求和全面提高我国丙型肝炎抗病毒治疗的水平具有重要的现实意义。

为了提高荧光 PCR 检测试剂效率和缩短检测时间,本文采用了 Invitrogen 公司生产的高效 Super-Script III RT 逆转录酶和相应的缓冲液系统,逆转录时间只需 10 min 即可,双探针在单管 RT-PCR 中完成。研究结果显示,本文建立的方法具有较好的敏感性和良好的重复性,与测序结果对比,吻合率为 93.8%,不但敏感性高而且具有结果易判断等优点。对我实验室预存的两份 III 型血清,本研究方法与测序结果一致。分析我院两年来的临床检测标本,I 型有 1545 例(占总分型的 68.1%),II 型为 702 例(占总分型的 31.0%),I/II 混合型 18 例(0.8%),采用确认方法分出 III 型 3 例(0.1%),无 IV 型病例的检出,在强阳性血清中也未发现未分型者。以上数据说明,目前国内临床常规开展的丙型肝炎基因分型项目,只开展 I/II 型即可满足临床常规检测的需要,符合我国主要以 I 型和 II 型为主的国情^[21],对 HCV RNA 定量结果为强阳性而非 I/II 型的患者标本,可进行 III/IV 型进一步确认。

综上所述,本文建立的双管双色荧光 HCV 基因分型的方法具有良好的敏感性、特异性和可重复性,

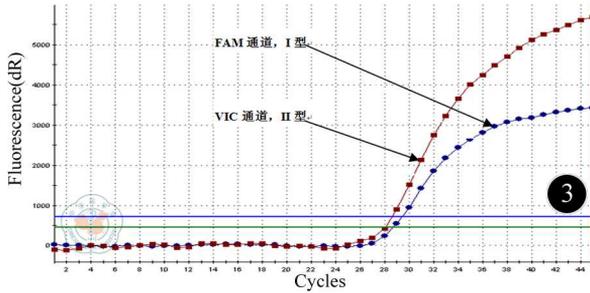
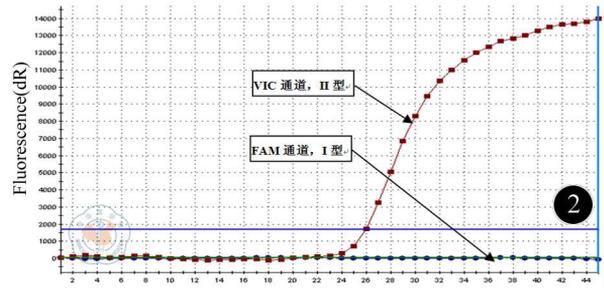
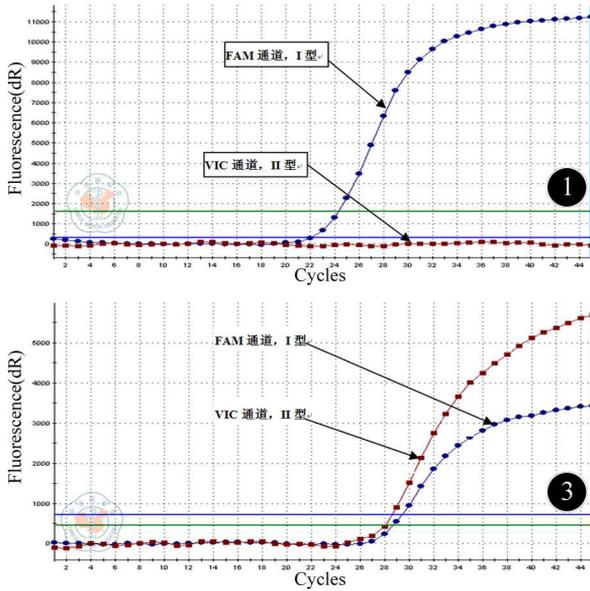


图1 I型曲线(FAM通道扩增)
图2 II型曲线(VIC通道扩增)
图3 I/II混合型曲线(FAM/VIC同时扩增)

与测序结果的高度吻合和其对结果的易判读性能,为在基层推广应用创造方便。本研究发现近99%的HCV阳性血清为I/II型,所以临床首选I/II型试剂进行筛选,对高病毒载量而非I/II型的标本可采用III/IV型试剂进行分型确认即可满足临床常规工作的需求。Liu等^[22]在云南HIV合并感染HCV的患者中检出丙肝病毒VI型,其余全部为I/II/III型,提示有必要将IV型改为VI型再进一步结合临床研究,从而涵盖外来感染者基因型的检出率。

参 考 文 献

[1] Hayashi K, Katano Y, Honda T, et al. Mutations in the interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus genotype 2a correlate with response to pegylated-interferon-alpha 2a monotherapy. *J Med Virol*, 2009, 81:459-466.

[2] Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2002, 347:975-982.

[3] Davidson F, Simmonds P, Ferguson C, et al. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5'-non-coding region. *J Gen Virol*, 1995, 76:1197-1204.

[4] Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al. Detection of hepatitis C virus RNA by a two-stage polymerase chain reaction with two pairs of primers deduced from the 5'-noncoding region. *Jpn J Exp Med*, 1990, 60:215-222.

[5] Okamoto H, Sugiyama Y, Okada S, et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol*, 1992, 73:673-679.

[6] Okamoto H, Kobata S, Tokita H, et al. A second-generation method of genotyping hepatitis C virus by the polymerase chain reaction with sense and antisense primers deduced from the core gene. *J Virol Methods*, 1996, 57:31-45.

[7] Othman SB, Trabelsi A, Monnet A, et al. Evaluation of a prototype HCV NS5b assay for typing strains of hepatitis C virus isolated from Tunisian haemodialysis patients. *J Virol Methods*, 2004, 119:177-181.

[8] Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescent resonance energy transfer probes. *Clin Chem*, 2002, 48:2147-2154.

[9] Fujigaki H, Takemura M, Takahashi K, et al. Genotyping of hepatitis C virus by melting curve analysis with SYBR green I. *Ann Clin Biochem*, 2004, 41:130-132.

[10] Cook L, Sullivan K, Krantz EM, et al. Multiplex real-time reverse transcription-PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes. *J Clin Microbiol*, 2006, 44:1091-1100.

[11] Rolfe KJ, Alexander GJ, Wreghitt TG, et al. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol*, 2005, 34:115-121.

[12] MartróE, González V, Buckton AJ, et al. Evaluation of a new assay in comparison with reverse hybridization and sequencing methods for hepatitis C virus genotyping targeting both 5' noncoding and nonstructural 5b genomic regions. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:192-197.

[13] Schröter M, Zöllner B, Schäfer P, et al. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3, and 4 by a one-step LightCycler method using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol*, 2002, 40:2046-2050.

[14] Lindh M, Hannoun C. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. *J Clin Virol*, 2005, 34:108-114.

[15] Vedernikov VE, Ivanov MK, Prasolova MA, et al. Hepatitis C virus

genotyping using 5 nuclease real-time PCR and probes with oligodeoxyinosine linkers. Mol Gen Mikrobiol Virusol, 2009, 4: 32-38.

[16] Rolfe KJ, Wreghitt TG, Alexander Gjet al. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping and methods for further subtyping of isolates. Methods Mol Biol, 2009, 510:55-71.

[17] Elkady A, Tanaka Y, Kurbanov F, et al. Performance of two Real-Time RT-PCR assays for quantitation of hepatitis C virus RNA : evaluation on HCV genotypes 1-4. J Med Virol, 2010, 82: 1878-1888.

[18] Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, et al. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. J Clin Microbiol, 1999, 37:2625-2630.

[19] Oprisan G, Szmál C, Dinu S, et al. Comparative methods for genotyping hepatitis C virus isolates from Romania. Roum Arch

Microbiol Immunol, 2009, 68:151-157.

[20] Gao G, Stuver SO, Okayama A, et al. The minimum number of clones necessary to sequence in order to obtain the maximum information about hepatitis C virus quasispecies: a comparison of subjects with and without liver cancer. J Viral Hepat, 2005, 12: 46-50.

[21] 庄辉, Tracy L, 崔怡辉, 等. 我国部分地区丙型肝炎病毒基因分型研究. 中华流行病学杂志, 2001, 22:76-78.

[22] Liu J, Yang Y, Gong JL, et al. The prevalence of hepatitis C virus (HCV) subtypes in Chinese HIV-1/HCV co-infected individuals. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2009, 30:663-667.

(收稿日期:2011-08-29)

(本文编辑: 戚红丹)

马洪滨, 李永利, 刘立明, 等. HCV RNA 基因分型多色荧光 PCR 筛查和确认方法的建立[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2012, 6(1): 82-86.

