

doi:10.3969/j.issn.1001-4616.2016.02.014

江苏地区无偿献血人群HCV流行病学调查

许剑锋,朱绍汶,蒋昵真,胡文佳,汤心怡,王金花,朱胜江,林红

(江苏省血液中心,江苏南京 210042)

[摘要] 本文旨在研究江苏地区无偿献血人群的 HCV 感染情况及其流行特征。对 2013 年-2014 年度江苏省血液中心 157,119 名健康无偿献血者血液标本进行抗-HCV ELISA 双试剂检测和 HIV、HBV 和 HCV6-混样核酸检测,对 HCV RNA 阳性标本用定量 PCR 方法检测病毒滴度情况;对 HCV RNA 阳性标本进行巢式 PCR 扩增核心区片段,根据测序结果分析基因型,分析 HCV 基因型的分布及其与性别、年龄的关系。结果共检出 347 例抗-HCV 反应性标本,阳性率为 0.22%。经核酸检测,在抗-HCV 阴性和单试剂阳性标本中均未检出 HCV RNA 阳性标本;125 例抗-HCV 双试剂阳性标本中 HCV RNA 阳性标本 46 例,病毒血症阳性率为 36.8%。巢式 PCR 扩增 HCV RNA 阳性标本并成功测序和分型 36 例。基因型分型为 1a(2.6%)、1b(74.4%)、2a(10.2%)、3b(5.1%)、6a(5.1%)和 6n(2.8%)4 种基因型和 6 种基因亚型,未发现 4 型和 5 型。1 型和 2 型在男性组中比例明显高于女性组,但差异无统计学意义;1 型与 2 型患者平均年龄小于 3 型和 6 型患者,差异有统计学意义。结果显示,江苏地区无偿献血人群抗-HCV 阳性率呈现下降趋势,HCV 的感染与性别和职业受教育程度没有相关性,但与年龄和职业具有相关性,感染的 HCV 基因型以 1b 为主,不同基因型在不同年龄之间具有显著差异。

[关键词] HCV,无偿献血者,基因型

[中图分类号]R446.1 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1001-4616(2016)02-0073-05

HCV Epidemiological Survey of Voluntary Blood Donors in Jiangsu Area

Xu Jianfeng, Zhu Shaowen, Jiang Nizhen, Hu Wenjia, Tang Xinyi,
Wang Jinhua, Zhu Shengjiang, Lin Hong

(Blood Center of Jiangsu Province, Nanjing 210042, China)

Abstract: To study the prevalence of HCV infection and its epidemiological characteristics in Jiangsu area. 157,119 health blood donation of blood samples in blood center of Jiangsu Province from the year 2013 to 2014 anti HCV ELISA double reagent detection and HIV, HBV and HCV6-mixed like nucleic acid detection, the HCV RNA positive samples were detected by quantitative PCR method to determine the titer of virus; HCV RNA positive samples were nested PCR amplified fragments of the core area, according to the analysis of the gene sequencing results. Analysis of HCV genotype distribution and correlation with sex and age. A total of 347 cases of anti-HCV reactive specimens were detected, the positive rate was 0.22%. RNA HCV positive samples were not detected in the anti-HCV negative and -HCV positive samples by nucleic acid detection, and 46 cases of RNA positive samples were 125 cases of HCV positive samples, the positive rate was 36.8%. Nested PCR amplification of HCV RNA positive samples and sequencing and typing of 36 cases. Genotypes were 1a(2.6%), 1B(74.4%), 2A(10.2%), 3b(5.1%), 6a(5.1%) and 6N(2.8%) four genotypes and six kinds of genotypes, 4 and 5 were not found. The proportion of type 2 and type 1 in the male group was significantly higher than that in the female group, but the difference was not statistically significant; the difference was statistically significant between the type 1, 2 and type 3, 6. The positive rate of anti-HCV in blood donors in Jiangsu area was decreased, and the infection of HCV was not correlated with the degree of gender and occupation education. However, there was a significant difference between genotype and age and occupation, and the genotype of HCV was 1b.

Key words: HCV, voluntary blood donors, genotype

收稿日期:2015-05-28.

基金项目:“六大人才高峰”第十一批高层次人才选拔培养资助项目(WSN-002)、江苏省卫生厅科技项目(H20140025)、江苏省自然科学基金(BK20131440).

通讯联系人:林红,研究员,研究方向:输出相关传染病与血液安全研究. E-mail:linhong712003@sina.com

丙型肝炎病毒(HCV)感染所致丙型肝炎为全球传染性疾病,是导致慢性肝病、肝硬化和肝细胞癌的主要原因之一。HCV 基因型在 HCV 感染、传播、预后及抗病毒治疗效果等方面有重要意义,同时能够给流行病学研究提供重要依据。HCV 基因组具有高度的变异性,根据基因组核苷酸序列的差异,HCV 被分为 6 种基因型。近年来,虽然国内关于 HCV 基因型分布的报道逐渐增多,但主要集中在已有感染症状的病人群体中,健康无症状献血人群 HCV 感染的流行病学研究较少;且由于存在地域性差异及选用分型方法不同等问题,基因分型的结果有很大差异性。因此,为了更好地了解江苏地区无偿献血人群 HCV 的分子流行病学特征,本研究对 2013 年-2014 年血站常规标本检测标本中抗-HCV 的结果进行分析;采用核酸测序法对 HCV RNA 标本进行基因型检测,通过分析本研究结果,深入地探讨江苏地区无偿献血人群 HCV 基因型及亚型的分布以及分子流行病学特征,为监控本地区献血人群 HCV 感染的情况提供有价值的资料。

1 材料与方法

1.1 样本来源

2013 年-2014 年度江苏省血液中心通过抗-HCV 酶联免疫(ELISA)双试剂筛查抗-HCV 阳性标本 347 份(男 226,女 121,年龄 18 岁~60 岁)为研究对象,排除合并 HIV、HBV 和 TP 反应性的标本。所有标本均在献血者知情同意下并征得江苏省血液中心伦理委员会审核批准后用于实验研究。

1.2 抗-HCV 检测

抗-HCV 反应性以 2 种 EIA 测定的 S/CO 的均值表示。具体步骤按试剂盒说明书进行操作。标本 ELISA 检测策略及阳性判定标准:每份标本均采用 2 个不同厂家试剂进行检测,检测标本 S/CO \geq 0.5,视为有反应性,并采用 2 种不同厂家试剂进行双孔复试。复试时,单试剂或双试剂 S/CO \geq 0.5,判为反应性,其中单试剂或双试剂 S/CO \geq 1.0,判为阳性,单或双试剂 0.5<S/CO<1.0 定为灰区。

1.3 核酸检测 NAT(nucleic acid test)

采用罗氏 combas s 201 核酸检测系统进行 6 人混样检测 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA,有阳性反应标本通过拆分进行单试剂单人份确定感染病毒种类。

1.4 HCV RNA 巢式 PCR 扩增

用罗氏诊断公司的 High Pure Viral Nucleic Acid 试剂盒,从 200 μ L 血清标本中提取病毒 RNA,溶于 50 μ L 洗脱液,-80 $^{\circ}$ C 保存,提取步骤按试剂盒说明书操作。根据 HCV 基因组 Core 区域设计引物,采用巢式 PCR 方法进行两轮 PCR 扩增,确认标本中 HCV RNA 的存在。引物序列如下:上游外引物 CF1 5'-AG-GCCTTGTGGTACTGCCTGATA-3',下游外引物 CR1 5'-GTATGTACCCCATGAGGTCGGC-3';上游内引物 CF2 5'-CGGGAGGTCTCGTAGACCGT-3',下游内引物 CR2 5'-AGGGTATCGATGACCTTACCCA-3'。RNA 样品用 CR1 和 CR2 引物进行逆转录,采用 Promega RT reagent kit 反应体系及条件,反应体系:5 \times primerscript buffer 2 μ L,CR1、CR2 和 Oligarchy(T)各 0.5 μ L,RT mix 1.5 μ L,HCV RNA 5 μ L,共 10 μ L。混匀,反应条件如下:65 $^{\circ}$ C 5 min;42 $^{\circ}$ C 60 min;95 $^{\circ}$ C 5 min;4 $^{\circ}$ C 保存。巢式 PCR 采用 Thermo Taq DNA Polymerase,第一轮扩增反应体系如下:10 \times Taq PCR Buffer 2 μ L,dNTP(2 μ mol/L)2 μ L,CF1(10 μ mol/L)1 μ L,CR1(10 μ mol/L)1 μ L,Taq E(1 U/ μ L)0.25 μ L,cDNA 2 μ L,ddH₂O 补至 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 8 min;4 $^{\circ}$ C 保存。第二轮扩增反应体系及反应条件与第一轮相同,退火温度为 58 $^{\circ}$ C,加入第一轮反应液 5 μ L 作为模板,反应体系为 50 μ L,引物为 CF2 和 CR2。扩增产物用 2%琼脂糖凝胶电泳检测目的条带(385 bp)。

1.5 HCV 基因型分析

将 HCV RNA 确认试验中巢式 PCR 阳性标本的目的条带(385 bp)切胶回收并测序,利用 MEGA version 6.0 软件与来源于 GeneBank 数据库的 32 个参照序列(见图 2)进行对比和系统进化分析,确定标本的 HCV 基因型(图 2)。

1.6 统计方法

用 SPSS 19.0 统计分析软件处理数据。Pearson Chi-square test 用来比较各组间性别比例的差异。 $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抗-HCV 阳性率分析

2013 年-2014 年度江苏地区 157,119 名无偿献血者血液标本经抗-HCV ELISA 双试剂检测,347 例呈反应性,抗体阳性率为 0.22%。347 例标本中 222 例为单试剂阳性标本,占全部阳性标本的 74%,125 例为双试剂反应性标本,占全部阳性标本的 36%。

从表 1 可见,男性与女性抗-HCV 阳性率相等,无明显差异($p>0.05$);而 18 岁~25 岁年龄段的抗-HCV 阳性率最低,25 岁~35 岁年龄段最高,且与其他年龄段之间差异具有统计学意义($p<0.01$);受教育程度不同,抗-HCV 阳性率接近,组间差异无统计学意义($p>0.05$);职业方面,学生和军人的抗-HCV 阳性率高于其他职业,教师和公司职员的抗-HCV 阳性率最低,不同职业献血人群抗-HCV 阳性率具有统计学意义($p<0.05$)。

表 1 江苏地区无偿献血者 HCV 感染与性别、年龄、受教育程度和职业的相关性分析

Table 1 Relationship analysis between HCV infection and socio-demographic characteristics of Jiangsu blood donors

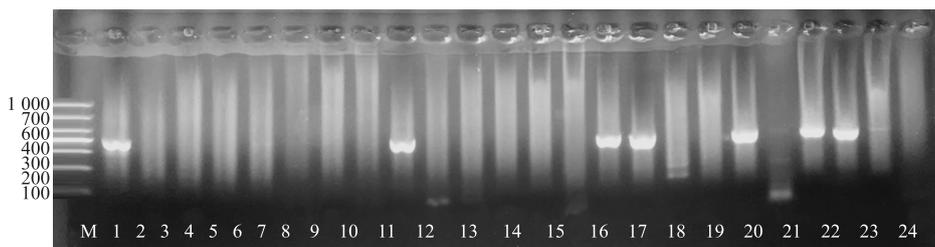
分析指标		检测数	抗体阳性数	抗体阳性率/%	χ^2	<i>P</i>
性别	男性	102 877	226	0.22	0.02	0.892 0
	女性	54 242	121	0.22		
年龄	18~25	74 185	106	0.14	62.28	0.000 1
	25~35	43 324	156	0.36		
	35~45	26 302	48	0.18		
	45~55	12 180	34	0.28		
	>55	1 228	3	0.24		
受教育程度	初中及以下	25 420	57	0.22	6.65	0.354 0
	高中	28 901	56	0.19		
	中技	12 214	25	0.2		
	大专	35 011	77	0.23		
	本科	46 683	120	0.26		
	研究生	6 552	11	0.17		
	未知	2 338	2	0.08		
职业	学生	39 219	118	0.3	27.33	0.001 0
	公务员	3 730	6	0.16		
	医务人员	3 534	6	0.17		
	公司职员	34 709	51	0.15		
	工人	14 451	23	0.16		
	农民	6 649	15	0.23		
	教师	1 553	2	0.13		
	军人	9 149	28	0.31		
	其他	40 367	90	0.22		
	未知	3 758	10	0.27		
总计	157 119	347	0.22			

2.2 HCV 病毒血症阳性率

经核酸检测,所有抗-HCV 阴性标本和单试剂反应性标本均为 HCV RNA 阴性,125 例抗-HCV ELISA 双试剂反应性标本中 46 例 HCV RNA 阳性,病毒血症阳性率为 0.29%(46/157,119)。

2.3 HCV Core 区的 PCR 产物

电泳结果鉴定 46 例荧光定量 PCR HCV RNA 阳性标本通过巢式 PCR 扩增 Core 序列,成功测序标本 36(78.3%)例。



M: Marker, 1 为阳性对照(HCV 病人标本), 2-24: 献血者标本, 其中 9, 15, 16, 19, 21, 22 为阳性结果, 其余均为阴性结果。

图 1 部分抗-HCV 阳性样本 HCV Core 区的第二轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果(385 bp)

Fig.1 Gel result of the second PCR for HCV core region of portion of anti-HCV positive samples

2.4 HCV基因型分析

利用 Mega 6.0 软件进行基因分型(图 1),共检测到 1、2、3 和 6 型 4 个基因型,包括 6 个基因亚型:1a 型占 2.8%(1/36),1b 型占 72.2%(26/36),2a 型占 11.1%(4/36),3b 型占 5.6%(2/36)和 6a 为 5.6%(2/36),6n 为 2.8%(1/36)。江苏地区无偿献血者感染的 HCV 以 1b 基因型为主。

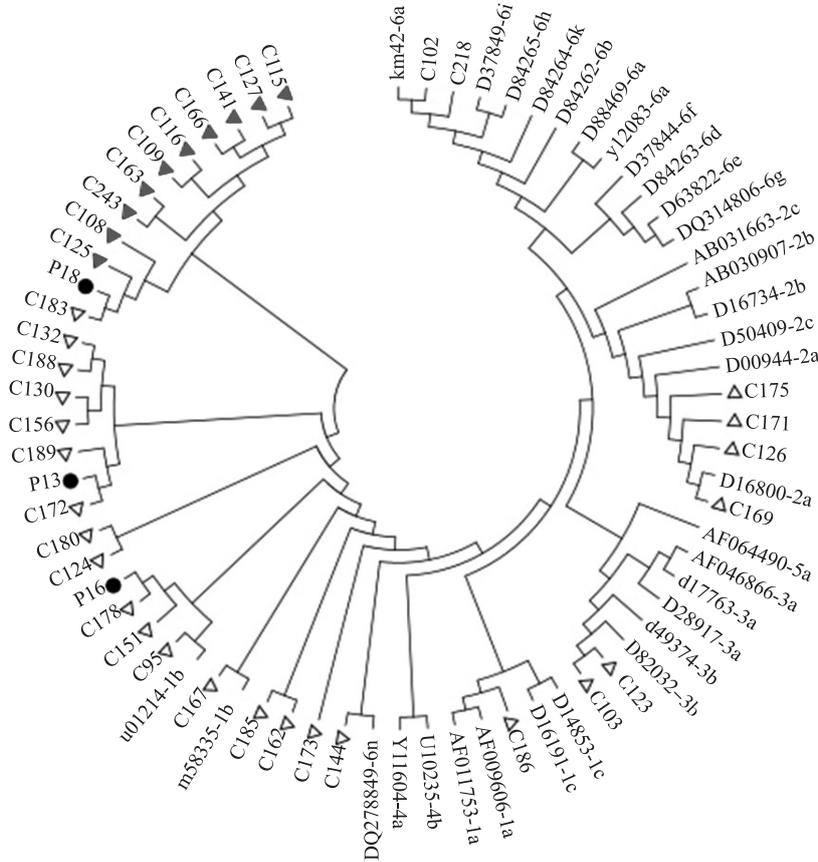


图2 HCV基因型

Fig.2 HCV genotypes by phylogenetic analysis

2.5 献血者HCV基因型与性别、年龄的关系分析

从表 2 可以看出,36 例 HCV RNA 阳性标本男性 21 例、女性 15 例,男性的病毒血症率高于女性。基因型 1 型和 2 型中男性约为 60%,女性约为 40%,但其分布在男女之间无明显差异;总体来看,感染 HCV 表现病毒血症的献血者偏向于年轻人,其中 1 型和 2 型 HCV RNA 主要分布在 <30 岁人群中,占 86.1%(31/36),而 3 型和 6 型主要分布在 >40 岁的人群中,为 13.9%(5/36)。

表 2 HCV RNA 阳性献血者在不同性别、年龄中的分布
Table 2 Distribution of HCV RNA positive blood donors in different genders and ages

基因型	例数	性别		平均年龄
		男	女	
1	27	16	11	27
2	4	2	2	29.2
3	2	1	1	44
6	3	3	0	40
Total	36	22	14	29

3 讨论

本研究显示江苏地区无偿献血人群抗-HCV 阳性率为 0.22%,与前两年接近,并呈下降趋势^[1]。比较性别,发现近两年抗-HCV 在男女中的阳性率持平,而之前的数据^[1]则是男性远高于女性,这与近几年女性献血人数的增加有很大关系,有些地区女性抗-HCV 阳性率甚至超过了男性^[2]。抗-HCV 阳性率与受教育程度无显著相关性,但在不同职业中的阳性率则有很大差异,其中一直作为献血招募主要群体的学生和军人的抗-HCV 阳性率高于其他职业,这是需要深入研究和进一步探讨原因的方面。

目前,全球约有 1 亿 7 千万人感染 HCV,不同国家和地区人群的 HCV 基因型分布有明显的差异,1a 在美国和北欧为优势基因型,在中东地区 1b 型占感染 HCV 人群的多数,2a 和 2b 型则在北美、日本较为

多见,2c型主要分布在地中海一带及远东地区,3a型在欧洲的吸毒者中较常见,4型主要在北非和中东流行,5型基本分布在南非,6型在越南、澳大利亚以及我国的香港地区分布较广^[3]。在我国大陆地区,1b和2a型为较常见的基因型,其中以1b型为主,其次是2a^[4]。但近年来,6型,尤其是6a的比例呈上升趋势^[5]。江苏地区病人基因型分布主要为1b,其次是2a和3b,还有6a,近几年出现的6型还有6b和6h^[6-8]。本次调查的献血者HCV基因分型结果与病人类似,且比例排序也一致,与以前单一的1b基因型^[9]相比,基因型种类呈现多样化分布。而广东地区^[10]临床患者和献血者中的HCV基因亚型主要是1b和6a,但1b、3a和6a亚型在2组人群中所占的比例不同,临床患者1b的比例高于献血者,献血者中3a、6a的比例高于临床患者。说明HCV基因型分布与地域分布有很大关系。

通过HCV基因型分布与年龄和性别的比较发现,基因型1型和2型虽然在男性中的分布高于女性,但是在性别之间没有显著差异性。基因1型和2型的年龄分布主要在<30岁的献血人群中,而3型和6型主要分布在40岁以上人群,差异具有统计学意义。而在慢性肝炎患者中基因型不同性别和年龄段的分布则与之相反^[11],1b型在男性组中比例明显高于女性组,差异有统计学意义;1b型和2a型患者平均年龄大于3b型患者,差异有统计学意义。

本次试验获得1例较为少见的6n基因型。此基因型在广州^[9]等南部地区的相关文献中有所报道。虽然在此次试验中的比例不高,但是也可以预见新基因型的HCV病毒在献血人群中有逐步扩散的趋势。这与人口流动性的增大,同时与吸毒人群关系复杂,交叉感染、重复感染有关,所以随着本地新基因型出现,使得HCV导致感染的预防、控制治疗更加复杂。本文初步研究了江苏地区无偿献血者人群HCV感染分子流行病学资料。献血者中HCV感染主要以基因1b型为主,但也出现了新的基因型。6型的检出提示本地区HCV基因型感染的地域性分布特征有所变化。HCV基因亚型分布与性别、年龄之间也存在一定的关系。为了输血安全,要加强献血人群的献血前征询,避免吸毒人群以及其他高危人群献血。在符合年龄的献血人群中提倡低年龄健康人群献血,要加强宣传和招募。

[参考文献]

- [1] 朱绍汶,陈显,王金花,等. 2011-2012年南京地区无偿献血人群丙型肝炎病毒感染情况分析[J]. 临床血液学,2013,26(10):718-720.
- [2] 高艳,孙亚纯,车火娇,等. 茂名市无偿献血者HCV感染人群特征分析[J]. 国际检验医学杂志,2015,36(6):360-362.
- [3] LU L, WANG M, XIA W, et al. Migration patterns of hepatitis C virus in china characterized for five major subtypes based on samples from 411 volunteer blood donors from 17 Provinces and municipalities[J]. J Virol,2014,88(13):7 120-7 129.
- [4] YIN W, HUANG C, QIU F, et al. Risk factors of hepatitis C virus transmission and genotype distribution in former blood donors from Chinese rural area[J]. BMC Public Health,2015,15:184.
- [5] RONG X, XU R, XIONG H, et al. Increased prevalence of hepatitis C virus subtype 6a in China:a comparison between 2004-2007 and 2008-2011[J]. Arch Virol,2014,159(12):3 231-3 237.
- [6] 王建芳,周镇先,肖雯,等. 南京地区2007-2014年丙型肝炎病毒基因型变化分析[J]. 交通医学,2014,28(6):666-668.
- [7] 张永祥,孙南雄,黄祖瑚,等. 江苏地区丙型肝炎病毒基因分型研究[J]. 江苏医药杂志,2004,30(6):463-464.
- [8] 王佳佳,唐筛娣,丁伟良,等. 不同感染途径丙型肝炎患者HCV基因分型[J]. 中国公共卫生,2013,29(6):809-811.
- [9] 孙南雄,孙启俊,张永祥,等. 南京地区无偿献血者HCV流行状况的初步调查[J]. 中国输血杂志,2001,14(5):309.
- [10] 戎霞,郑英,熊华平,等. 广东地区临床患者和献血者HCV感染者HCV基因分型比较[J]. 中国输血杂志,2014,27(4):593-596.
- [11] 谈国蕾,孙梅,王建芳,等. 南京地区丙型肝炎病毒患者基因型分布特征[J]. 临床荟萃,2015,30(4):393-396.

[责任编辑:黄 敏]