



淮北市HCV感染者基因亚型分布特征及1b型天然耐药突变分析

木朝宇, 张晓梅, 范德胜, 刘培明, 姚慧琳

引用本文:

木朝宇, 张晓梅, 范德胜, 刘培明, 姚慧琳. 淮北市HCV感染者基因亚型分布特征及1b型天然耐药突变分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2023, 48(2): 260–263.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.02.029>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

丙型肝炎患者5080例Anti-HCV、HCV-RNA及基因分型分析

The detection of Anti-HCV, HCV-RNA and its genotype in 5 080 patients with hepatitis C

蚌埠医学院学报. 2015(8): 1108–1110 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.08.041>

丙型肝炎病人基因分型与疾病严重程度及免疫活性细胞表达的关系

Study on the relationships between the genotyping and disease severity, expression of immunocompetent cells in patients with hepatitis C

蚌埠医学院学报. 2022, 47(4): 529–532 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.04.025>

淮北市人乳头状瘤病毒感染及其亚型分布特点

Human papillomavirus infection status and its subtype distribution in Huaibei city

蚌埠医学院学报. 2022, 47(11): 1576–1579 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.11.024>

丙型肝炎病毒NS4B对YAP转录、表达、磷酸化及细胞内分布的影响

Effect of the hepatitis C virus non-structural protein 4B on the levels of YAP transcription, expression, phosphorylation and intracellular distribution

蚌埠医学院学报. 2022, 47(5): 566–569, 575 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.05.002>

HCV-cAg与HCV-Ab、HCV-RNA及肝功能之间的关系探讨

Study on the relationship between HCV-cAg, and HCV-Ab, HCV-RNA and liver function

蚌埠医学院学报. 2021, 46(9): 1258–1261 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2021.09.028>

淮北市 HCV 感染者基因亚型分布特征 及 1b 型天然耐药突变分析

木朝宇¹, 张晓梅¹, 范德胜^{1,2}, 刘培明¹, 姚慧琳¹

[摘要] **目的:** 分析淮北市 HCV 感染病人基因亚型分布特征及 1b 型天然耐药突变情况, 为 HCV 临床抗病毒治疗和感染防控提供依据。 **方法:** 选取 2019-2022 年就诊于淮北矿工总医院住院的 HCV 感染者 (未经任何 DAAs 治疗) HCV-RNA 阳性血清样本, 抽提 RNA 后逆转录, 采用巢式 PCR 扩增 NS5B、NS5A 及 NS3/4A 区域基因序列, 产物送交测序公司测序。采用 Mega11.0 软件对测序结果进行序列比对分析。 **结果:** 结果 HCV 1b 型 (68.63%) 为主要亚型, 2a 型次之 (29.41%), 此外检出 3a 型 2 例 (1.96%)。HCV 亚型的分布与性别、年龄无明显相关 ($P > 0.05$), 1b 型多见于 ≥ 55 岁年龄组中。RASs 主要类型为: NS5B 区 C316N (100.00%); NS5A 区 Q54H (40.47%), Y93H (19.05%); NS3/4A 区 Q86P (30.88%), I71V + Q86P (19.12%), V170I + Q86P (14.71%) 及 T72I/A + Q86P (13.24%)。其中突变频率较高的 RASs 依次为: C316N (100.00%)、Q54H (60.00%)、Q86P (53.78%)、Y93H (33.33%)、I71V/S (15.97%)。 **结论:** 淮北市 HCV 以 1b 亚型为主, 2a 型次之, 首次检出 3a 型。1b 型天然耐药突变以 NS3/4A 区为主, NS5A 区次之, NS5B 区较单一。提示 HCV 感染者 DAAs 治疗前应进行亚型及 RASs 的检测。

[关键词] 丙型肝炎病毒感染; 耐药相关突变; 基因亚型

[中图分类号] R 373.21; R 512.62 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2023.02.029

Analysis of HCV genotype distribution and natural drug resistance mutation in Huaibei city

MU Chao-yu¹, ZHANG Xiao-mei¹, FAN De-sheng^{1,2}, LIU Pei-ming¹, YAO Hui-lin¹

(1. Department of Laboratory Medicine, Huaibei Miners General Hospital, Huaibei Miners General Hospital of Bengbu Medical College, Huaibei Anhui 235000; 2. Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221004, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the distribution characteristics of HCV genotypes and natural resistance mutation of type 1b of patients with hepatitis C virus (HCV) infection in Huaibei city, so as to provide evidence for clinical antiviral treatment and infection prevention and control of HCV. **Methods:** The HCV-RNA positive serum of patients with HCV infection [without any direct antiviral agent (DAAs) treatment] who were treated in Huaibei Miners General Hospital from 2019 to 2022 were selected. The samples were extracted and reverse transcribed, nested PCR was used to amplify the gene sequences of the NS5B, NS5A and NS3/4A regions. The electrophoresis-positive products were sent to company for sequencing. Sequence alignment analysis was performed using Mega11.0 software. **Results:** The HCV 1b subtype (68.63%) was the main subtype, followed by type 2a (29.41%), and 2 cases of type 3a (1.96%) was detected. The distribution of HCV subtypes was not significantly correlated with gender and age ($P > 0.05$), type 1b was more common in the age group ≥ 55 years old. The main types of RASs were: C316N (100.00%) in NS5B region; Q54H (40.47%) and Y93H (19.05%) in NS5A region; Q86P (30.88%), I71V + Q86P (19.12%), V170I + Q86P (14.71%) and T72I/A + Q86P (13.24%) in NS3/4A region. The RASs with higher mutation frequency were: C316N (100.00%), Q54H (60.00%), Q86P (53.78%), Y93H (33.33%), I71V/S and (15.97%). **Conclusions:** HCV type 1b is the main epidemic genotype in Huaibei city, followed by 2a. Type 3a is detected for the first time. NS3/4A region is the main type of natural drug resistance mutation of type 1b, followed by NS5A, and NS5B was single. It is suggested that genotypes and RASs tests should be performed in HCV infected patients before DAAs.

[Key words] hepatitis C virus infection; resistance-associated substitutions; genotypes

[收稿日期] 2022-04-22 **[修回日期]** 2022-11-24

[基金项目] 蚌埠医学院自然科学研究重点项目 (BYKY2019296ZD); 安徽省淮北市科技计划项目 (2021HK023); 徐州医科大学优秀人才基金项目 (XYFY2021049)

[作者单位] 1. 淮北矿工总医院 (蚌埠医学院附属淮北矿工总医院) 检验科, 安徽 淮北 235000; 2. 徐州医科大学, 江苏 徐州 221004

[作者简介] 木朝宇 (1987-), 男, 硕士, 主管检验技师。

[通信作者] 范德胜, 主任技师。E-mail: ganshan 3454@ sina.com; 姚慧琳, 主任技师。E-mail: 490085137@qq.com

慢性丙型肝炎 (chronic viral hepatitis C, CHC) 是一种由丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染引起的病毒性肝炎, 可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化, 部分病人可发展为肝硬化甚至肝癌, 已成为严重的社会和公共卫生的问题^[1-2]。我国 HCV 的感染约有 1 000 万例^[3]。HCV 基因易变异, 在已报道的 HCV 7 个基因型中, 中国发现的

有 1、2、3 和 6 型^[4]。HCV 基因型及亚型的检测是直接抗病毒药物 (direct antiviral agent, DAA) 治疗方案的基础,即不同 HCV 基因型病人所采用的 DAAs 治疗方案以及疗程不相同^[3]。因此,HCV 基因型及亚型的检测在直接抗病毒治疗方案中具有重要意义。随着 DAAs 药物的广泛应用,尤其是单药应用时,部分病人出现耐药相关突变 (resistance-associated substitutions, RASs),而且未经过任何抗病毒治疗的丙型肝炎病人体内也存在 DAAs 耐药突变株,即天然耐药突变^[5]。本研究旨在分析安徽省淮北市 HCV 感染者基因亚型的分布情况,同时检测主要流行亚型 NS3/4A、NS5A 和 NS5B 的 DAAs 靶点 RASs,以了解该地区 HCV 基因亚型的流行特征及主要亚型的天然耐药情况,为本地区 HCV 感染防控和临床个体化抗病毒治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019–2022 年就诊于淮北矿工总医院住院的 HCV-RNA 阳性 HCV 感染者(未经任何 DAAs 治疗)血清 130 例。其中男 82 例,女 48 例,年龄 25~88 岁。以上所有 CHC 诊断符合我国《丙型肝炎防治指南(2019 版)》^[3]。排除合并感染 HIV 或其他病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性疾病等病人。血清标本 -70 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 HCV-RNA 抽提 采用中山大学达安基因股份有限公司提供的核酸柱提取试剂盒,操作步骤参照试剂盒说明书。

1.2.2 RT-PCR 采用 Thermo Fisher Scientific 公司生产的 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(货号:K1622)进行逆转录,步骤参照试剂盒说明书。

1.2.3 HCV 基因分型、RASs 检测 采用巢式 PCR 进行 HCV 基因分型、RASs 检测。PCR 引物见表 1,扩增条件均参考文献^[4,7–8],其中 NS5B 区 PCR 条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环,72 °C 5 min;第二轮与第一轮 PCR 条件相同;NS3/4A 区 PCR 条件:第一轮 94 °C 5 min,94 °C 1 min,55 °C 60 s,72 °C 70 s,35 个循环,72 °C 10 min,第二轮 94 °C 5 min,94 °C 1 min,52 °C 60 s,72 °C 70 s,35 个循环,72 °C 10 min;NS5A 区 PCR 条件:第一轮 94 °C 5 min,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 2 min,35 个循环,72 °C 10 min,第二轮 94 °C 5 min,94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 1.5 min,35 个循环,72 °C 10 min。PCR 产物在

2.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳后测序。PCR 引物合成及产物测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成。

表 1 HCV 基因各亚型引物名称及序列

扩增靶区	引物名称	引物序列(5'→3')	引物备注	产物大小
NS5B ^[4]	EN02	TGG GST TYK CST ATG AYA CYC GMT GYT TTG A	外侧正向	
	EN04	ART ACC TRG TCA TAG CCT CCG TGA A	外侧反向	377 bp
	NS5S3	TAT GAT ACC CGC TGC TTT GAC TCC AC	内侧正向	
NS3/4A ^[7]	NS5A5	GTC ATA GCC TCC GTG AAG GCT C	内侧反向	
	1bF	CGA GAC CTT GCG GTG GCA GT	外侧正向	
	1bR	CAG CCG TYT CCG CTT GGT CC	外侧反向	1 018 bp
	1bF	CAT CAC CTG GGG GGC AGA CAC C	内侧正向	
	1bR	GTC AGT TGA GTG GCA CTC ATC AC	内侧反向	
NS5A ^[8]	1bF1	CAG TGG ATG AAC CGG CTG ATA GC	外侧正向	
	1bR1	GTC TTC CAG CAA GTC CTT CCA CAC GG	外侧正向	1 712 bp
	1bF2	GCT TCG CGG GGT AAC CAC GTC TCC	内侧正向	
	1bR2	TTC GCC TTC ATC TCC TTG AGC ACG TCC	内侧反向	

1.2.4 序列比对与分析 从 GenBank 下载 HCV 1b 型标准序列株(AJ238799.1),采用 Mega. 11 软件进行 NS5B、NS5A 及 NS3/4A 区的序列比对分析。

1.3 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 HCV 基因亚型分布特征 130 例 HCV 感染者中有 102 例样本 NS5B 区扩增成功,扩增成功率为 78.46%,NS5B 区段扩增 PCR 产物片段大小 377 bp,电泳结果见图 1A。PCR 产物经测序分析后,其中 1b 型 70 例(68.63%),2a 型 30 例(29.41%),3a 型 2 例(1.96%),其他型别未检出。1b 型为 HCV 流行的优势亚型,2a 型次之;HCV 1b、2a 型男女感染分布差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 2)。

2.2 HCV 基因亚型分布与年龄的关系 本研究中 HCV 感染者按年龄分为 <55 岁和 ≥ 55 岁组,HCV 基因型在 2 个年龄组中的分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。HCV 1b 型的 CHC 病人多见于 ≥ 55 岁年龄组中。HCV 1b 型与非 1b 型在 2 个年龄组中分布差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表 3)。

2.3 HCV 1b 型 NS5B、NS5A 及 NS3/4A 区 RASs 发生情况 70 例 1b 亚型样本中,NS5B 区全部扩增成功(见图 1A),扩增成功率 100.00%,70 例均检出

NS5B 相关耐药位点突变, 突变率 100%; NS5A 区扩增成功 42 例(产物大小 1 712 bp, 见图 1B), 占 60.00%, 其中 28 例检出 NS5A 相关耐药位点突变, 突变率 66.67%; NS3/4A 区扩增成功 68 例(产物大小 1 018 bp, 见图 1C), 扩增成功率 97.14%, 64 例检出 NS3/4A 相关耐药位点突变, 突变率 94.12%。NS5B 区主要 RASs 类型: C316N (70 例, 100.00%); NS5A 区主要 RASs 类型: Q54H (17 例, 40.47%)、Y93H (8 例, 19.05%); NS3/4A 区 RASs 类型: Q86P (21 例, 30.88%)、I71V + Q86P (13 例, 19.12%)、V170I + Q86P (10 例, 14.71%) 及 T72I/A + Q86P (9 例, 13.24%) (见表 4, 5)。其中 NS3/4A 区突变频率较高的 RASs 依次为: Q86P (53.78%)、I71V/S (15.97%)、V170I (10.92%) 及 T72I/A (10.08%); NS5A 区突变频率较高的 RASs 依次为: Q54H (60.00%)、Y93H (33.33%); NS5B 区突变频率较高的为 C316N (100.00%)。

表 2 102 例 HCV 感染者基因亚型分布 [n; 百分率 (%)]

基因亚型	男	女	χ^2	P
1b	46 (71.88)	24 (63.16)	3.72	>0.05
2a	18 (28.12)	12 (31.58)		
3a	0 (0.00)	2 (5.26)		
合计	64 (100.00)	38 (100.00)		

表 3 HCV 基因亚型在年龄中的分布情况 [n; 百分率 (%)]

分组	n	HCV 基因亚型			χ^2	P
		1b	2a	3a		
<55 岁组	38	22 (57.89)	14 (36.84)	2 (5.27)	5.52	>0.05
≥55 岁组	64	48 (75.00)	16 (25.00)	0 (0.00)		
合计	102	70 (68.63)	30 (29.41)	2 (1.96)		

3 讨论

本研究明确了淮北市 HCV 亚型流行特征: 以 1b 型为主, 2a 型次之, 此外首次检出 3a 型 (2 例, 1.96%)。这与国内 HCV 亚型的流行情况基本相符^[3]。HCV 亚型的分布在性别、年龄上无明显差异 ($P > 0.05$), 与国内报道^[9] 不尽相同, 其中 HCV 1b 型的 HCV 感染者多见于 ≥55 岁年龄组中, 2a 型在 2 个年龄组中均常见。2 例 3a 型的病人均分布在 <55 岁年龄组。

目前 NS5A、NS5B 及 NS3/4A 区域是 DAAs 治疗的主要靶点。随着 DAAs 广泛应用, 有部分丙肝病人体内存在针对 NS5A、NS5B 及 NS3/4A 抑制剂

的天然耐药位点突变, 会影响抗病毒治疗的疗效^[6-8, 10-11]。NS5A 抑制剂主要有 Daclatasvir、Ledipasvir、Qmbitasvir、Elbasvir 及 Velpatasvir 等, 主要 RASs 包括 L31M 和 Y93H 突变, 其中 L31M 主要是对 Ledipasvir 耐药, 对 Daclatasvir 可能耐药, 而 Y93H 对 Daclatasvir、Ledipasvir 和 Qmbitasvir 均明显耐药。H58P 和 P58S 主要针对 Daclatasvir 耐药, Q54H 主要是 Daclatasvir 和 ABT-267 的耐药^[8]; 本研究中 HCV1b 型 NS5A 相关耐药位点突变率 66.67%, 远高于伍菲菲等^[8, 12] 报道的 46.0%、22.4%, 推测以上结果可能是 HCV 基因型分布的地域差异性导致。NS5A 区主要突变为 Q54H (40.47%)、Y93H (19.05%), 其中 Y93H 突变率远高于 SUN 等^[12] 报道的 6.6%、15.5% 的结果。此外, 不同的是, 本研究未检测出 L31M 突变, 检出的联合突变为 Q54H + Y93H、P58S + Y93H。这些联合突变是否会增加抗病毒药物疗效的影响, 还有待于进一步研究。

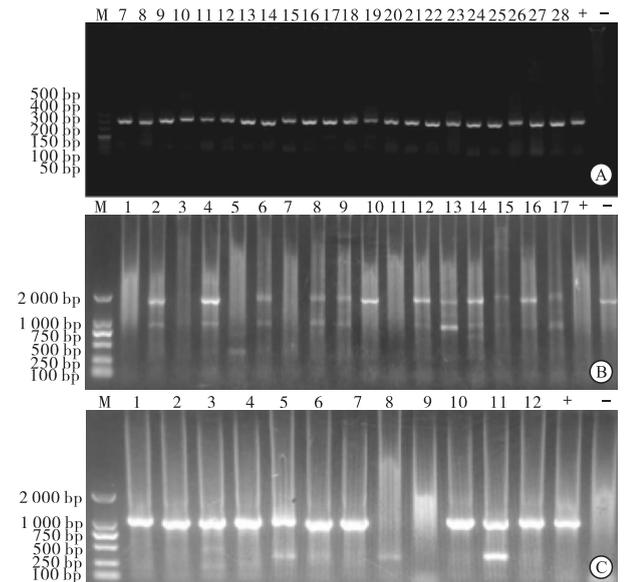


图 1 部分 HCV 样本 NS5B、NS5A 和 NS3/4A 区段巢式 RT-PCR 产物电泳结果

NS5B 抑制剂主要包括核苷类聚合酶抑制剂 Sofosbuvir 和非核苷类聚合酶抑制剂 Dasabuvir, RASs 主要包括 S282T、C316N 等; 其中 S282T 是索磷布韦的重要耐药位点, C316N 被认为是引起病人未达到持续病毒学应答的原因之一^[6]。本研究中 HCV 1b 亚型 NS5B 区域 C316N 为 100.00%, 均未发现 S282T, 这与国内的相关报道^[6] 一致。而 HCV

C316N 出现选择性变异与 HCV-796 治疗的病人后迅速出现病毒反弹有关^[11],提示日后应用该药时易出现耐药,也提示联合药物治疗的必要性。

表 4 68 例 HCV 感染者 NS3/4A 耐药相关突变情况 [n; 百分率 (%)]

NS3/4A 突变类型	样本数 (n = 68)
V36G + T54I + V55F + Q86P	1(1.47)
Q41H + V55F + I71S + Q86P	1(1.47)
D79N + Q80L + V170I + I71V + Q86P	1(1.47)
V170I + I71V + T72I + Q86P	1(1.47)
Q80L + I71V + Q86P	2(2.94)
T72I + I71V + Q86P	1(1.47)
V170I + T72I + Q86P	1(1.47)
V36D + Q86P	2(2.94)
V170I + Q86P	10(14.71)
I71V + Q86P	13(19.12)
T72I/A + Q86P	9(13.24)
Q80S + Q86P	1(1.47)
Q86P	21(30.88)

表 5 42 例 HCV 感染者 NS5A 耐药相关突变情况 [n; 百分率 (%)]

NS5A 突变类型	样本数(n = 42)
Q54H	17(40.47)
P58S	1(2.40)
Y93H	8(19.05)
Q54H + Y93H	1(2.40)
P58S + Y93H	1(2.40)

NS3/4A 抑制剂主要有 Telaprevir、Roceprevir、ITMN191、SCH900518 及 TMC435 等,主要 RASs 包括 V36G、V55F、I71V/L、T72I/A/L、Q80N、Q86P、V170A/T 及 M175L 等,其中 V36、V55F 及 V170A/T 与 Telaprevir、Roceprevir 耐药相关,M175L 与 Boceprevir 耐药相关,Q80N 与 TMC435 耐药相关等^[7,10]。

本研究中 HCV 1b 型 NS3/4A 耐药相关位点突变率为 94.12%,远高于国内李展翼等^[10]报道的 38.33%。68 例 HCV 型样本中 NS3/4A 区以联合突变为,最多可达五重突变,均存在 Q86P 变异。NS3/4A 区 RASs 主要为低-中度耐药的变异,如 V36L、T54S、Q80P、V170I 等,未检出致高度耐药的主要变异 A156S 及 R155Q^[7,10],多位点耐药联合突变的现象是否会增加对抗病毒药物的影响还需进一

步研究。此外,本研究还提示淮北市 HCV 1b 型突变频率较高的天然耐药突变位点依次为: C316N (100.00%)、Q54H (60.00%)、Q86P (53.78%)、Y93H (33.33%) 及 I71V/S (15.97%)。这提示该地区感染 HCV 1b 型病人 DAAs 替换治疗时候应对以上位点耐药相关的药物引起注意,避免和减少耐药的发生。

综上所述,淮北市未经过抗病毒治疗 HCV 感染病人以 1b 型为主,2a 型次之,3a 型较少。其主要流行的 1b 型存在天然耐药位点突变。DAAs 抗病毒治疗时,需要先进行基因型和 RASs 的检测,再制定适合的治疗方案。

[参 考 文 献]

- [1] MOROZOV VA, LAGAYE S. Hepatitis C virus: morphogenesis, infection and therapy[J]. World J Hepatol, 2018, 10(2): 186.
- [2] 陶象男, 孙悝, 程霞. HCV-eAg 与 HCV-Ab、HCV-RNA 及肝功能之间的关系探讨[J]. 蚌埠医学院学报, 2021, 46(9): 1258.
- [3] 中华医学会肝病学会, 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, 13(1): 1.
- [4] 尹琦, 罗洲, 陈钦艳, 等. 2014-2018 年广西柳州市 HCV 的基因型和 1b 亚型 NS5B 区的序列特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2020, 24(10): 1228.
- [5] POVEDA E, WYLES DL, MENA Á, et al. Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents[J]. Antiviral Res, 2014, 108: 181.
- [6] 阳光, 苏明华, 江建宁, 等. 广西地区 HCV 1b 型感染者 NS5B 区基因耐药多态性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(5): 992.
- [7] PAOLUCCI S, FIORINA L, PIRALLA A, et al. Naturally occurring mutations to HCV protease inhibitors in treatment-naïve patients[J]. Virol J, 2012, 9(245): 1.
- [8] 伍菲菲, 苏明华, 江建宁, 等. 广西地区基因 1 型丙型肝炎患者 NS5A 抑制剂天然耐药突变的研究[J]. 广西医科大学学报, 2018, 35(4): 472.
- [9] 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.
- [10] 李展翼, 严颖, 刘莹, 等. 慢性丙型肝炎患者 NS3/4A 蛋白酶抑制剂预存耐药的临床研究[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2015, 36(3): 437.
- [11] 李展翼, 刘莹, 蔡庆贤, 等. 慢性丙型肝炎患者 NS5B 聚合酶抑制剂预存耐药的特点研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2015, 23(9): 653.
- [12] SUN D, DAI M, SHEN S, et al. Analysis of naturally occurring resistance-associated variants to NS3/4A protein inhibitors, NS5A protein inhibitors, and NS5B polymerase inhibitors in patients with chronic hepatitis C[J]. Gene Expr, 2018, 18(1): 63.

(本文编辑 刘璐)