

avian influenza virus infection by newly developed influenza H5 hemagglutinin genespecific loop-mediated isothermal amplification method[J]. J Virol Methods, 2007, 141(2): 173-180.

[6] Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens; meta-analysis and meta-regression[J]. PloS One, 2008, 3(2): e1536.

[7] Bell D, Wongsrichanalai C, Barnwell JW. Ensuring quality and access for malaria diagnosis; how can it be achieved[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(9): 682-695.

[8] Snounou G. Rapid, sensitive and cheap molecular diagnosis of malaria; is microscopy on the way out[J]. Future Microbiol, 2007, 2(5): 477-480.

[9] Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)[J]. J Virol Methods, 2008, 151(2): 264-270.

[10] Boutayeb A. Developing countries and neglected diseases; challenges and perspectives[J]. Int J Equity Health, 2007, 6: 20.

[11] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis; sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA [J]. Int J Parasitol, 2008, 38(5): 589-599.

[12] 江彦增, 朱鸿飞. 非洲猪瘟病毒环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2009(2): 72-74.

[13] 吴绍强, 孙晓智, 林祥梅, 等. 亚洲 I 型口蹄疫病毒环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立[J]. 检验检疫学刊, 2008, 18(1): 9-12.

[14] 朱水荣, 王志刚, 张政, 等. 嗜肺军团菌环介导等温扩增快速检测方法的建立与应用[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 5: 481-485.

[15] Rodger AJ, Cooke GS, Ord R, et al. Cluster of falciparum malaria cases in UK airport[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(8): 1284-1286.

· 综 述 ·

(收稿日期: 2010-05-24)

乙型肝炎病毒基因诊断进展*

商红艳 综述, 欧启水 审校
(福建医科大学附属第一医院检验科, 福州 350005)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因; 突变; 检测
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.028 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2011)03-0345-03

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起中国急、慢性肝炎的主要病原体, 感染后会引慢性乙型肝炎、肝硬化, 最后甚至发展成肝癌。快速、准确、特异地诊断乙型肝炎对于其治疗、预后及转归至关重要, 其中基因诊断技术起关键作用。近年来, HBV 的基因诊断有了很大进展, 基因分型的临床意义得到新的认识, 新的耐药突变位点及检测技术不断被发现, 本文就这方面的进展进行综述。

1 HBV 生物学特性

HBV 基因组是 1 个大约含 3 200 个碱基的部分双链环行 DNA, 其负链核苷酸序列有 4 个相互重叠的开放读码框(open reading frame, ORF), 即 C、S、P、X 基因区, 分别编码核衣壳蛋白、外膜蛋白、DNA 多聚酶和具有反式激活作用的 X 蛋白。HBV 的复制由前基因组 RNA 中间体反转录为负链 DNA, 反转录是利用病毒本身的 DNA 聚合酶, 此酶缺乏校对活性, 可造成复制过程中反转录失真, 导致 HBV 变异率比其他 DNA 病毒高约 4 个数量级。HBV 变异广泛存在于其基因组的不同部位, 可单独存在于某个基因区, 亦可同时出现在几个基因区, 因此 1 个宿主可以感染许多相似株。HBV 感染时, 比较单一的病毒株易于呈自限性经过, 而呈相似株分布的感染将可能使感染慢性化。

2 HBV 基因分型

以 HBV 核苷酸全序列异质性大于等于 8% 为依据, 可将 HBV 病毒株分为 A~H 共 8 个基因型^[1]。HBV 各基因型在

世界范围内具有严格的地理分布特征, 具体见表 1。

表 1 HBV 各基因型的地理分布	
基因型	分布地区
A	北欧、美国、中非
B	中国、日本、韩国、越南等亚洲地区
C	中国、日本、韩国、越南等亚洲地区
D	南欧、中东地区、印度
E	非洲地区
F	美国中部、南部、波利尼西亚
G	美国、法国
H ^[2]	美洲

在中国, HBV 基因型南方以 B 型为主, 北方以 C 型为主, D 型仅见于西部及少数民族地区, A 和 F 型偶有发现, 还未发现其他型别。HBV 基因型影响肝脏疾病的自然史、严重程度、HBeAg 血清转化率、前核心/核心启动子区变异形式^[3]以及抗病毒药物治疗^[4]。有研究表明, A 型 HBV 感染者比其他基因型感染者更不容易形成肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC), 在亚洲地区, C 型比 B 型更容易形成 HCC。近年来, 有研究发现, C 型乙肝患者肝组织病理改变明显重于 B 型, 基因 B、C 分型检测结合肝穿刺病理检查有助于判断疾病轻重程度、指导治疗及评估预后。慢性乙肝患者感染病毒株的基因型将成为医生在对其治疗前进行临床评估时考虑的 1 个重要因素。

* 基金项目: 福建省科技计划重点项目(2010 Y0022); 福建省医学创新课题(2009-CX-9)。

3 HBV 基因变异

3.1 前 C 区和核心启动子的变异 HBV 的 C 基因区分为前 C 区和 C 区,编码 HBeAg 的基因起始于前 C 区,编码 HBcAg 的基因起始于 C 区。HBeAg 可以看作是 HBcAg 的分泌型,对 HBV DNA 复制具有调节作用,前 C 基因超表达时病毒复制被明显抑制,故当前 C 基因变异使 HBeAg 不表达或产量减低时会产生高复制水平的病毒株。(1)HBeAg 不表达:最常见的是 nt1 896 位 G→A 的变异,使 TGG(色氨酸)变为 TAG 终止子,导致 HBeAg 不能合成。这个变异点位于病毒复制起始的重要结构即茎环结构内,在这种结构中,有 3 对核苷酸不能形成互补配对,即 1858T 对 1896G,1855T 对 1899G 以及 1850A 对 1904G。如果发生 1896G→A 或伴 1899G→A 突变,该茎环结构则具有更强的稳定性。而不同基因型 nt1 858 位的碱基是不同的^[5],所以前 C 区是否发生 1896G→A 突变常与基因型有关。(2)HBeAg 表达量下降:突变发生在基础核心启动子区(basal core promoter, BCP)。近来发现,HBV BCP 突变株感染者的 HCC 发病率较高^[6]。最常见的是 T1762A 和 G1764A 双突变,可导致 HBeAg 表达量下降 70%,但病毒的复制能力却有所加强。有研究发现,HBeAg(+)患者从慢性肝炎进展到肝硬化的过程中,nt1762T/1764A 双变异与病情进展关系密切^[3]。除了 T762A 和 G1764A 双突变,还有 1762/1764/1766 三联突变或 1753/1762/1764/1766 四联突变,均可导致 HBeAg 表达量下降和病毒复制能力增强,这在体外试验均得到证实。最近研究发现,发生拉米夫定耐药的患者如果伴有前核心区变异会有更高的肝脏疾病恶化的危险^[7]。

3.2 抗病毒治疗引起的耐药突变 长期服用拉米夫定进行抗病毒治疗易出现 HBV 的 YMDD 变异,产生耐药,抗病毒效应发生逆转,即血清 HBV DNA 水平重新上升,称为病毒学突破。研究发现,拉米夫定治疗 1、2、3、4 年后,耐药发生率分别为 25%、>40%、>50%、>70%^[8]。

目前,抗病毒药物的靶位主要集中在逆转录酶区,此区包括酪氨酸(Y),蛋氨酸(M),2 个天冬氨酸(D),称 YMDD 基序,YMDD 变异即保守序列 YMDD 中 M(蛋氨酸)被 V(缬氨酸)或被 I(异亮氨酸)取代,称为 YVDD(rtM204V)或 YIDD(rtM204I)^[9]。变异后,拉米夫定针对此位点抑制病毒复制的作用难以发挥,病毒开始继续复制,HBV DNA 和 ALT 水平出现反弹,因此快速检测 YMDD 变异在对患者实施个体化治疗方案方面具有重要意义。

尽管 HBV 的基因存在许多变异位点,但对拉米夫定和阿德福韦酯产生耐药的位点在逆转录酶区主要有 3 个:rtM204V/I、rtL180M、rtN236T。C 区的 rtM204V/I 常伴随 B 亚区 rtL180M 的发生。最新发现的突变位点是针对阿德福韦酯耐药的变异(rtN236T^[10]),位于 YMDD 序列的下游。

4 HBV 分子生物学检测

4.1 基因分型方法 (1)测序法:根据 HBV 核苷酸全序列异质性大于等于 8%、同源性小于 92%(或 S 基因区核苷酸异质性大于等于 4%,同源性小于 96%)进行分型,是基因分型的经典方法,被认为是金标准,但测序所需的技术和实验条件高、费用大,无法在临床实验室开展。(2)S 基因聚合酶链反应-限制性酶长度多态性分析(polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism, PCR-RFLP):依据不同基因型的序列(主要针对前 S 区或 S 区 PCR 扩增产物)分别具有独特的限制性酶切位点。虽然比测序法方便、费用低,但操作步骤仍较烦琐,酶切图谱分析复杂,参考序列少,代表性略差。(3)型特异性引物 PCR:利用 2 套 PCR 引物对进行 2 轮 PCR 扩增反应,首先用共用引物扩增 S 区,再加入型特异性引物混合物进行第 2 轮扩增,根据产物长度不同分型。操作较简单、结果准确,适合于临床实验室和大范围的调查。(4)PCR 微板核酸分子杂交-ELISA 法:用 HBsAg 共同决定簇的抗体包被,捕获血清中的 HBsAg,然后通过针对前 S-2 区基因型特异性表位的单克隆抗体进行基因分型,操作简便,适用于一般实验室测定,但无法对血清 HBsAg 阴性的 HBV 感染进行基因分型。

4.2 突变检测方法 (1)DNA 直接测序法 DNA 测序技术提供了准确完整的 DNA 序列信息,可用于全基因组的任何一部分序列,是检测 YMDD 突变的金标准。但只能检测血清中 1 种优势株,对于混合型感染通常不能识别(即使耐药病毒株已经占到全部病毒株的 30%时仍较难检测到^[11])。同时,技术难度大、实验成本高也限制了其临床应用,不适合开展大规模标本的临床检测。(2)纯系(同源细胞)分析^[12]:DNA 直接测序法无法判断测得的多个突变是存在于同 1 个 DNA 分子中还是存在于不同的克隆亚种,对此可以通过对同 1 个样本的多个克隆进行测序验证,但步骤烦琐、耗时、耗力,不适用于临床应用,而且若分析的克隆数较少,仍然会有少数亚种被漏检。(3)PCR-RFLP:与 DNA 直接测序法具有同样的灵敏性和特异性,而且可用于检测混合型感染。此法简便、快速、无需特殊仪器,曾被众多实验室用来检测拉米夫定耐药突变,但只能检测单位点变异,随着多种核苷(酸)类似物相继问世以及新的耐药变异位点不断出现,该法将难以胜任^[13]。(4)实时荧光定量 PCR:是把酶动力学、核酸扩增与杂交、光谱分析和实时检测巧妙结合的 1 项技术。有学者采用该法结合 lightcycler 技术分析了拉米夫定治疗中的 YMDD 突变,结果与 PCR 直接测序完全符合,该法简便、快速、灵敏、经济,有推广应用价值,但会产生假阳性,且变异株必须占全部病毒株 5%~10%时才能检测到^[14]。(5)线性探针(line probe):Innogenetics 公司开发的 IN-NO-LiPA HBV DR 产品是利用不同的核苷酸片段结合不同的寡核苷酸探针,从而把野生型和变异病毒株区分开。INNO-LiPA 方法在国外已获准应用于临床检测^[15],灵敏度高,可检测出样品中占 HBV 标准池 5%~10%的变异株,提供信息量大,自动化程度高^[13]。(6)基因芯片(microarray):大量特定的寡核苷酸片段探针与待测的有荧光标记的样品核酸按碱基配对的原则杂交。可对核酸序列进行大规模、高通量的研究,快速、高效、敏感、平行化、可自动化检测。不足之处在于成本高、技术难度大,限制了其临床应用。(7)表型分析:分体外表型分析(invitro phenotypic analysis)和虚拟表型分析(virtual phenotypic analysis)。主要是运用分子技术、细胞技术或动物模型,研究 HBV 复制,了解细胞内共价闭合环状 DNA 累积情况以及 HBV 突变体的表型特征。体外表型分析包括聚合酶活性分析和体外药敏试验,是确认基因型耐药的 gold 标准;虚拟表型分析的前提是建立包含相互关联的临床资料和基因型、表型信息的 HBV 耐药变异数据库,并开发专用分析程序。要耗费大

量人力,尚未被用于大批量的检测。

4.3 HBV DNA 定量(病毒载量)检测方法 血清 HBV DNA 定量提示病毒复制能力的强弱,是判断 HBV 传染性、判断疾病进程、检测抗病毒疗效、监测和确定耐药出现、指导临床治疗的基本依据。(1)定量 PCR:一般 PCR 方法定量检测 HBV DNA 必须在扩增完成后才能检测 DNA 拷贝数,即终点检测,而实时荧光定量 PCR 能够在 PCR 反应的指数期持续地进行定量检测,可以动态检测病毒载量,特别是近年来的新技术(TaqMan 技术,分子信标技术)简化了操作步骤,减少了污染,增加了样本处理量,能准确反映血液中病毒核酸的含量,促进了实时荧光定量 PCR 技术的发展。(2)DNA 生物传感器:是利用特定的生物活性材料与 HBV DNA 相互作用,将目的 DNA 的存在转变为可检测光信号的传感器装置,缩短了目的 DNA 检测时间,既可定性又可定量,且灵敏度高、选择性好,无放射性标记的危险性,又可快速定量检测 HBV DNA^[16],但目前光纤 DNA 生物传感器存在灵敏度不够、容易受杂质干扰等缺点,另外寡核苷酸存在高级结构和自身配对也影响分子杂交。

随着越来越多 HBV DNA 定量方法的出现,各地区检测方法不同势必影响客观结果,因此,对 HBV DNA 病毒载量测定进行标准化成为亟待解决的问题。尽管可以根据血清中 HBV DNA 量的变化判断拉米夫定耐药的出现,但是其他的因素(如患者服药的依从性等)亦可引起 HBV DNA 水平的变化,因此联合检测逆转录酶区耐药突变和血清中 HBV DNA 的水平,将来必定会成为监测 HBV 抗病毒治疗的最佳方法。

5 展 望

目前越来越多的新抗病毒药物被应用,各种各样的 HBV 检测方法相继出现,临床上对病毒耐药的预测和监测将不仅仅局限于耐药监测和病毒载量测定这类检测方法,其他方法包括对前核心启动子和核心启动子区域突变以及 HBV 基因型的检测必将被推广应用。如何应用新药物确定何种长期治疗方案(序贯疗法,联合疗法等^[17]),如何将多种诊断方法同新的治疗药物结合以确定最佳的、个性化的治疗方案,如何早期检测耐药并确定其突变类型是当前面临的关键问题。总之,不管采用何种治疗方案,经典的血清学检测方法和新兴的分子学诊断方法将会联合用于监测疗效,而且这种趋势越来越明显。

参考文献

- [1] Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods[J]. Rev Med Virol, 2004, 14(1): 3-16.
- [2] Flichman D, Galdame O, Livellara B, et al. Full-length genome characterization of hepatitis B virus genotype H strain isolated from serum samples collected from two chronically infected patients in Argentina [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(12): 4191-4193.
- [3] Chen CH, Lee CM, Hung CH, et al. Clinical significance and evo-

lution of core promoter and precore mutations in HBeAg-positive patients with HBV genotype B and C: a longitudinal study[J]. Liver Int, 2007, 27(6): 806-815.

- [4] 杨凯,徐元宏,管世鹤.乙型肝炎病毒抵抗 α -干扰素治疗研究进展[J].国际检验医学杂志,2010,31(3):142-143.
- [5] Davidson F, Lycett C, Sablon E, et al. Hepatitis B virus genotypes and precore mutations in Scottish blood donors[J]. Vox Sanguinis, 2005, 88(2): 87-92.
- [6] Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, et al. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst, 2008, 100(16): 1134-1143.
- [7] Paik YH, Kim JK, Kim DY, et al. Clinical efficacy of a 24-months course of lamivudine therapy in patients with HBeAg negative chronic hepatitis B: a long-term prospective study[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(6): 882-887.
- [8] Ntziora F, Paraskevis D, Haida C, et al. Quantitative detection of the M204V hepatitis B virus minor variants by amplification refractory mutation system real-time PCR combined with molecular beacon technology[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2544-2550.
- [9] Enomoto M, Tamori A, Kohmoto MT, et al. Mutational patterns of hepatitis B virus genome and clinical outcomes after emergence of drug-resistant variants during lamivudine therapy: analyses of the polymerase gene and full-length sequences[J]. J Med Virol, 2007, 79(11): 1664-1670.
- [10] Akyildiz M, Gunsar F, Ersoz G, et al. Adefovir dipivoxil alone or in combination with lamivudine for three months in patients with lamivudine resistant compensated chronic hepatitis B[J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(12): 3444-3447.
- [11] Bartholomeusz A, Schaefer S. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods[J]. Rev Med Virol, 2004, 14(1): 3-16.
- [12] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure[J]. J Hepatol, 2008, 48(5): 747-755.
- [13] 成军. 加强 HBV 耐药的认识和监测[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 849-851.
- [14] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1): 165-256.
- [15] Degertekin B, Hussain M, Tan J, et al. Sensitivity and accuracy of an updated line probe assay (HBV DR v. 3) in detecting mutations associated with hepatitis B antiviral resistance[J]. J Hepatol, 2009, 50(1): 42-48.
- [16] Chen M, Liu M, Yu L, et al. Construction of a novel peptide nucleic acid piezoelectric gene sensor microarray detection system[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2005, 5(8): 1266-1272.
- [17] Perrillo RP. Therapy of hepatitis B—viral suppression or eradication[J]. Hepatology, 2006, 43(2 Suppl 1): S182-193.

(收稿日期:2010-06-18)