

• 临床检验研究论著 •

深圳地区乙肝病毒基因分型与耐药性研究*

刘艾芹,唐曙明[△],陈卫布,余 涟

(深圳市人民医院 518020)

摘要:目的 了解深圳地区乙肝患者 HBV 基因型分布情况,分析 HBV 基因型、耐药性与 HBV DNA 载量、HBeAg 之间的关系。方法 用反向线性杂交技术检测 156 例慢性乙肝(CHB)患者的基因型和耐药突变情况,用荧光定量 PCR 检测其 HBV DNA 载量,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HBV 病毒标志物。结果 156 例 CHB 患者中检出 B 基因型 90 例,占 57.69%;C 基因型 58 例,占 37.17%;B+C 混合基因型 8 例,占 5.13%;耐药突变 37 例,占 23.7%。37 例耐药株中,有 30 例对拉米夫定耐药,主要为 rtL180M+rtM204V 和 rtM204I 突变,占 80%(24/30),C 基因型占拉米夫定突变株的 63.3%(19/30);对阿德福韦耐药株 5 例,耐药位点均为 rtN236T;另有 2 例为多重耐药。HBV B、C 基因型患者间的 HBV DNA 载量及 HBeAg 阳性率结果差异无统计学意义。结论 深圳地区 HBV 基因型以 B、C 型为主,C 基因型容易产生耐药,应根据基因分型和耐药突变结果对慢性乙肝患者选择适合的治疗方案。

关键词:肝炎病毒,乙型; 基因型; 抗药性,微生物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)14-1787-02

Research on hepatitis B virus genotyping and drug resistance in Shenzhen area*

Liu Aiqin, Tang Shuming[△], Chen Weibu, Yu Lian

(Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518020, China)

Abstract: Objective To learn the HBV genotype distribution of hepatitis B patients in Shenzhen region and analyze the relationship among HBV genotypes resistant, HBV DNA load, and HBeAg. **Methods** 156 patients with chronic hepatitis B (CHB) were enrolled. The genotype and resistance mutations were detected using the methods of reverse linear hybridization, HBV DNA load was detected by quantitative PCR, and HBV virus markers were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** 90 cases were detected genotype B in 156 patients with CHB, accounting for 57.69%. 58 cases were detected the C genotype, accounting for 37.17%, 8 cases were detected B + C mixed genotype, accounting for 5.13%. 37 cases were detected resistant mutations, accounting for 23.7%. 30 cases were lamivudine resistance, mainly rtL180M + rtM204V and rtM204I mutations, accounting for 80% (24/30). C genotype accounted for 63.3% of lamivudine mutant strains (19/30), and 5 cases of drug-resistant strains of adefovir resistance sites are rtN236T. Two cases were multiple drug-resistant. Between HBV genotype B and C in patients with HBV DNA load and HBeAg positive results, there was no statistically significant difference. **Conclusion** HBV genotypes in Shenzhen area are mainly hepatitis B and C. C genotype is easy to produce drug resistance, and we should select the appropriate treatment plan according to the results of genotyping and drug resistance mutations in patients with chronic hepatitis B.

Key words: hepatitis B virus; genotype; drug resistance, microbial

根据 HBV 全基因核苷酸序列异源性大于或等于 8%,或 S 基因区核苷酸序列异源性大于或等于 4.2%的标准,HBV 可分为 A~H 8 个基因型,各基因型又可分成若干个基因亚型^[1-2]。研究发现,HBV 基因型的分布存在种族和地理区域差异,不同的基因型其流行病学和临床特点也不相同,且与肝脏病变程度及药物治疗效果存在一定相关性^[2-3]。因此对 HBV 基因型进行检测,有助于指导乙型肝炎临床治疗、预后判断和流行病学分析。本文对深圳地区 156 例慢性乙肝(CHB)患者的基因型分布及其耐药性变异、HBV DNA 载量和 HBV 血清学指标进行检测,探讨各项指标之间的相互关系,更好地指导临床用药,为制订个体化抗病毒治疗方案提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 深圳市人民医院 2012 年 1~7 月期间门诊和住院慢性乙肝患者 156 例,其中男 87 例,女 69 例,年龄 21~55 岁,平均(33.8±7.7)。诊断标准符合 2010 年慢性乙型肝炎

防治指南^[5]。

1.2 仪器与试剂 HBV 基因分型试剂盒为深圳市亚能公司产品,HBV 核酸定量检测试剂盒购自上海科华公司,免疫诊断试剂盒由厦门英科新创提供,核酸扩增使用 ABI 9700 扩增仪,图像分析用 BIO-RAD GEL DOC 图像分析系统。

1.3 方法

1.3.1 HBV 基因分型及耐药性检测 按试剂盒说明书进行,先提取样本 HBV DNA,在装有生物素标记引物的 PCR 反应管中加入 2 μL 已处理好的标本,按下列条件扩增:50 ℃ 3 min,93 ℃ 预变性 6 min,然后按 93 ℃ 30 s→58 ℃ 40 s→72 ℃ 45 s 扩增,10 个循环;93 ℃ 30 s→56 ℃ 40 s→72 ℃ 45 s 扩增,10 个循环;93 ℃ 30 s→55 ℃ 40 s→72 ℃ 45 s 扩增,25 个循环,最后 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物煮沸变性 15 min,加入反应膜条置 42 ℃ 杂交 2 h。用洗脱液洗膜 2 次,加入辣根过氧化物酶标记的亲本素,最后用 NBT/BCIP 系统显色,根据紫色

斑点出现的位置和顺序直接判断结果。

1.3.2 HBV DNA 定量测定 采用实时荧光定量 PCR 检测血清 HBV DNA 含量。

1.3.3 HBV 免疫指标测定 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 CHB 患者血清中 HBeAg 状态。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料的显著性检验用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HBV 基因分型分布及耐药性结果 如表 1, 在 156 例 CHB 患者中共检测出 3 种基因型, 其中 B 型 90 例, 占 57.69%; C 型 58 例, 占 37.17%; B+C 型 8 例, 占 5.13%; 未测出 A、D、E、F 型。119 例 CHB 患者对拉米夫定敏感, 30 例对拉米夫定耐药, 5 例阿德福韦耐药, 2 例为多重耐药。30 例拉米夫定耐药突变株中, 均为 HBV B、C 基因型, 其中 rtL180M+rtM204V 和 rtM204I 突变 24 例, 占 80%; C 型 HBV 基因突变 19 例, 占 63.3%, 且主要为 rtM204I(16/30)。5 例阿德福韦耐药变异主要为 C 型基因型, 耐药突变位点均为 rtN236T。

基因型	耐药突变位点					合计
	180M	204I	180M+204V	180M+204V+204I	236T	
B 型	1	3	2	7	0	13
C 型	0	16	1	2	5	24
合计	1	18	5	8	5	37

2.2 HBV 基因型与 HBV DNA 载量及 HBeAg 指标的关系 如表 2 所示, 不同 HBV 基因型的 HBV DNA 载量结果差异无统计学意义, 不同 HBV 基因型中 HBeAg 阳性率结果差异亦无统计学意义。

基因型	HBV DNA 对数值($\bar{x} \pm s$)		HBeAg(+)
	HBV DNA 对数值($\bar{x} \pm s$)	HBeAg(+)	
B 型	7.08+1.02	56/90(62.2%)	
C 型	7.14+1.13	40/58(68.9%)	
B+C 型	7.12+1.06	5/8(62.5%)	
P 值	0.545	0.473	

3 讨 论

HBV 感染后的临床过程多种多样,除了宿主的免疫状况和感染方式外,与感染病毒株的基因型种类也关系密切^[4-5]。HBV 基因型具有地理区域性分布特征^[6-7]。在我国常见的为 B 型和 C 型^[8-12],其中北方地区以 C 型为主,南方地区以 B 型为主。张晓平^[13]等报告深圳地区以 B 型为主, C 型次之,其他较少,以 C 基因型患者临床症状较重。覃羽华等^[14]等检测桂西地区的 HBV 分型, B 型占 50.48%, C 型占 25.71%, B+C 混合型 16.19%, D 型 0.95%。本研究通过检测深圳地区 156 例 CHB 患者的基因型,发现主要以 B 型为主,占 61.53%, C 型次之,占 37.17%, B+C 型为 5.13%,与上述报道一致。

HBeAg 传染性强,是乙肝预后估计和衡量传染性的重要标志。HBV DNA 载量水平的高低与病毒活动性复制能力及

致病力密切相关。本研究发现,在 C 型和 B+C 型的 CHB 患者中,HBV DNA 水平和 HbeAg 阳性率略高于 B 型患者,但结果差异无统计学意义($P > 0.05$),与文献^[15-16]报道相同,可能与地域、民族差异,以及部分 C 型 CHB 患者发生了 C 区变异有一定关系。

拉米夫定作为乙肝一线抗病毒治疗药物,其主要耐药机理为 HBV DNA 聚合酶基因发生突变^[17],导致与拉米夫定的结合力降低,突变以 B 区和 C 区为主,尤其是 C 区 YMDD 变异最为多见,其主要形式为 YIDD 或 YVDD^[18-19]。本研究 156 例 CHB 患者中,有 30 例对拉米夫定耐药,耐药病毒株均为 B 和 C 基因型,其中 YVDD 和 YMDD 变异 8 例,突变位点以 180M 和 204V 为主;YIDD 变异者 16 例,突变位点为 204I,且主要见于 C 基因型,显示 C 型较 B 型更容易对拉米夫定产生耐药。

继拉米夫定后的新型抗病毒药物阿德福韦酯(ADV)因近期使用耐药率低且与其他核苷酸类似物无交叉耐药,已在抗 HBV 治疗中起到越来越重要的作用,但研究发现其长期应用也可导致 HBV 发生耐药突变。目前已证实与 ADV 耐药相关的突变位点主要为 rtA181 和 rtN236^[17]。卜范峰等^[18]研究发现:年龄、HbeAg 阴性状态、肝硬化和拉米夫定耐药与阿德福韦耐药变异发生显著相关。本次研究检测到 5 例阿德福韦耐药突变,位点均为 rtN236T,且均见于 C 基因型,5 例患者年龄偏大,均为 HBeAg 阴性。与报道一致,但由于标本数量有限,还需进一步扩大样本量进行验证。

综上所述,C 型患者较 B 型容易产生耐药突变基因型,故 C 型患者应用抗病毒治疗中尤其要注意监测常见耐药位点的突变,通过对长期服用核苷酸类似药物患者进行 HBV 耐药突变和基因型检测,有助于了解不同基因型患者的 HBV 相关耐药基因情况,有利于抗病毒药物的选择和更换,为制订个体化抗病毒治疗方案提供科学依据。

参考文献

[1] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝脏学分会.病毒性肝炎防治方案[J].中华肝病杂志,2010,8(1):324.

[1] 张智,张珍,李楠,等.185 例广东人乙型肝炎病毒基因分型及耐药性基因检测[J].广东医学,2008,29(1):97-98.

[2] Chu CJ,Keefe EB,Han SH,et al. Hepatitis B virus genotypes in the United States:Results of a nationwide study[J]. Gastroenterology,2003,125(2):444-451.

[3] Ding X,Mizokami M,Yao G,et al. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China[J]. Intervirology,2001,44(13):43-47.

[4] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med,2008,359:1486-1500.

[5] Nowak MA,Bonhoefer S,Hill AM,et al. Viral dynamics in hepatitis B virus infection[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93:4398-4402.

[6] 梅晓莉.慢性乙型肝炎的治疗研究进展[J].临床和实验医学杂志,2009,8(2):131-133.

[7] 刘磊.乙型肝炎表面抗原携带者乙肝血清学标志物模式转变分析[J].检验医学与临床,2011,8(11):1301-1304.

[8] Ding X,Mizokami M,Ge X,et al. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning,southern China[J]. Hepatol Res,2002,22:37-44.

[9] Ding X,Gu H,Zhong ZH,et al. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin,China[J]. Jpn J Infect Dis,2003,56:19-22. (下转第 1791 页)

表 2 自制免疫金标纸条稳定性检测结果							
批号	测定日期	保存温度					
		4 ℃ (n=10)		18~25 ℃ (n=10)		37 ℃ (n=10)	
		阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
20121001	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	9	11
20121002	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	10	10
20121003	30 d	10	10	10	10	10	10
	60 d	10	10	10	10	10	10
	90 d	10	10	10	10	9	11

表 3 自制 HCV 金标层析试纸条特异性检测结果				
样本	HIV(n=20)	HBV(n=30)	HBV+HCV(n=20)	HCV(n=20)
结果	阴性	阴性	阳性	阳性

3 讨 论

目前检测 HCV 的方法包括 ELISA 检测、PCR 技术测定 HCV RAN 和金标免疫层析法,但主要集中于血清中的病原微生物的抗原、抗体检测^[9]。由于检测灵敏度和特异性的限制,目前国内金标免疫层析法还无检测唾液中的抗 HCV 抗体的报道。我们在检测线区域同时包被鼠抗人 IgG 和 IgM 抗体,同时检测唾液中 HCV IgG、IgM 抗体,显著提高了试纸条的检测灵敏度和选择特异性。

HCV 核心蛋白不同区段的亲/疏水性极不平衡,氨基端表现为亲水性,而羧基端表现为疏水性,N 端 1~154 个氨基酸包含了核心蛋白的大部分疏水区。HCV 核心蛋白的疏水性能其在被用作检测线的包被蛋白时,对检测液体流中的蛋白产生疏水结合,极易产生假阳性的现象^[10]。本研究经过探索,采用将鼠抗人混合抗体(不易产生疏水结合)包被于检测线的方法,避免了假阳性结果的产生。

样品垫的处理液配方中,BSA 溶液用于在液体流动过程中,封闭 NC 膜上的非特异性结合位点,防止在层析过程中,金标抗原和抗体与 NC 膜上的位点结合,NC 膜背景不净和拖尾的情况出现。PBS 缓冲液样品垫用于控制样品层析过程中的 pH,保证反应过程中的金标 HCV 重组抗原和兔抗体的结合稳定和生物活性状态。

检测的 217 例标本中,有 2 例假阴性结果,此结果的产生

可能是以下 2 个原因:(1)患者本人的因素,1 d 之内唾液的分泌情况不同,导致收集标本的时候唾液所含抗-HCV 量极少或者没有;(2)采用新的检测原理的金标免疫层析试纸条灵敏度还没有达到绝对满意的程度,以后的试验中还需要改进。

稳定性检测在 37 ℃ 保存 90 d 后的金标条产生了假阳性结果,可能由于试纸条在高温环境下蛋白质的生物活性变化,导致标记蛋白或者金纳米粒子在检测线发生部分聚沉显色。而室温 18~22 ℃ 和低温 4 ℃ 保存 90 d 稳定性好。

综上所述,本研究所制备的金标免疫层析试纸条能够运用于临床唾液样本的检测,并且在 5 min 可以产生肉眼可见的结果,稳定性、特异性和准确度较好,在无创情况下能够满足对人群中 HCV 感染者的快速筛查。

参考文献

[1] Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus[J]. Clin Microbial Infect, 2010, 17(2): 107-115.

[2] Ly K, Xing J, Klevens R, et al. The increasing burden of mortality from viral hepatitis in the united states between 1999 and 2007 [J]. Ann Intern Med 2012, 156(2): 271-279.

[3] 周东平, 杨宗平, 王磊, 等. 唾液中丙型肝炎病毒抗体的检测及应用[J]. 中华口腔医学杂志, 2002, 37(7): 449-451.

[4] Balamane M, Winters M, Dalai S, et al. Detection of HIV-1 in saliva: implications for case-identification, clinical monitoring and surveillance for drug resistance[J]. Virol J, 2010, 4(3): 88-93.

[5] Elsana S, Sikuler E, Yaari A, et al. HCV antibodies in saliva and urine[J]. J Med Virol, 1998, 55(4): 24-27.

[6] Shyu R, Tang S, Chiao D. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 462-466.

[7] Elsana S, Sikuler E, Yaari A, et al. Salivary HCV-antibodies; a follow-up cohort study of liver disease patients[J]. Clin Lab, 2001, 47(2): 335-338.

[8] Firdaus R, Saha K, Sadhukhan PC. Rapid immunoassay alone is insufficient for the detection of hepatitis C virus infection among high-risk population[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(4): 290-293.

[9] 张瑞, 李金明. 丙型肝炎病毒感染临床检测程序的建立及结果报告与解释[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(5): 990-992.

[10] He J, Xiu B, Wang G, et al. Double-antigen sandwich ELISA for the detection of anti-hepatitis C virus antibodies[J]. J Virol Methods, 2011, 171: 163-168.

(收稿日期: 2012-11-08)

(上接第 1788 页)

[10] Xia G, Nainan OV, Jia Z. Characterization and distribution of hepatitis B virus genotypes and subtypes in 4 provinces of China[J]. Zhonghua Liuxing Bingxue Zazhi, 2001, 22(4): 348-351.

[11] 徐红, 张跃新, 魏来, 等. 新疆汉族人群 HBV 基因型与临床病情的关系[J]. 实用肝脏病杂志, 2005, 1(6): 11-13.

[12] 张晓平, 邱丽影, 秦俊生, 等. 深圳地区乙型肝炎病毒基因型与核苷类药物[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 4.

[13] 覃羽华, 岑光旅. 桂西地区慢性乙型肝炎基因分型及其临床特点[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(2): 138-141.

[14] Fang SK, Chen HB, Fontana RJ, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2006, 44(2): 283-290.

[15] 李卓, 李洪权, 李俊红, 等. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(24): 2823-2827.

[16] Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, et al. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during Lumivudine therapy[J]. Hepatology, 1999, 30: 567-577.

[17] 王虹, 冯妙芙, 周鹏辉, 等. 荧光分子信标探针检测拉米夫定耐药基因的研究[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6): 90-93.

[18] 卜范峰, 鲁艳芹, 韩金祥, 等. 实时定量 PCR 检测乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变及其与临床指标的相关性[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 21(9): 806-810.

(收稿日期: 2012-11-28)