

· 临床检验研究论著 ·

# PCR-反向点杂交法检测 HBV 耐药变异与基因型的探讨

张达衡<sup>1</sup>, 陈红玲<sup>1</sup>, 谭满胜<sup>2</sup>, 陈瑞林<sup>1</sup>, 杨春媚<sup>1</sup>

(1. 茂名市人民医院, 广东茂名 525000 2. 茂名市妇幼保健院, 广东茂名 525000)

**摘要:**目的 探讨 PCR-反向点杂交法检测 HBV 耐药变异与基因型的相关性及 HBV 变异位点与肝功能指标、HBV DNA 病毒载量的关系。方法 筛选符合条件的 462 例服用核苷类药物治疗的慢性乙型肝炎患者血清标本, 采用 PCR-反向点杂交法检测 HBV 的耐药突变位点以及基因型, 并对 HBV 耐药变异与基因型、肝功能检测指标、HBV DNA 病毒载量等指标进行相关性分析。结果 在 462 例服用核苷类药物治疗的慢性乙型肝炎患者血清中检测耐药变异株 45 例, 变异率约为 9.74%; 其中 180M 和 204I/V 突变株 16 例, 35.5%; 204V 突变株 6 例, 13.3%; 204I 突变株 13 例, 28.9%; 180V 突变株 3 例, 6.7%; 181V 突变株 3 例, 6.7%; 207I 突变株 1 例, 2.2%; 236T 突变株 3 例, 6.7%。HBV 基因型中 B 基因型 105 例, C 基因型 337 例, B 基因型和 C 基因型联合感染 4 例, D 基因型 0 例, 其他基因型 2 例。将检测结果与临床资料进行相关性分析: 乙肝患者的耐药变异位点与基因型、肝功能指标 ALT 无相关性 ( $P > 0.05$ ), 与 HBV DNA 病毒载量有一定相关性 ( $P < 0.05$ )。结论 1. 茂名地区的 HBV 基因型可能与其他南方地区的基因型有差异, 以 HBV-C 基因型为主; 2. PCR-反向点杂交法是一种快速、准确发现核苷类药物治疗后耐药位点的检测方法; 3. 通过临床资料分析显示乙肝患者的耐药变异位点与肝功能指标 ALT 间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 即无相关性, HBV-DNA 病毒载量间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 即有一定相关性。

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因型; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)13-1716-02

## Study on PCR-reverse dot blot for detecting drug-resistance variation and genotypes of hepatitis B virus

Zhang Daheng<sup>1</sup>, Chen Hongling<sup>1</sup>, Tan Mansheng<sup>2</sup>, Chen Ruilin<sup>1</sup>, Yang Chunmei<sup>1</sup>

(1. Maoming Municipal People's Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China; 2. Maoming Municipal

Maternal and Child Health Care Hospital, Maoming, Guangdong 525000, China)

**Abstract: Objective** To study the correlation between the drug-resistance variation and the genotypes of hepatitis B virus (HBV) detected by the PCR-reverse dot blot and the relation between the HBV variation loci with the liver function indexes and HBV DNA viral loading. **Methods** The serum samples from 462 patients with chronic hepatitis B treated by oral nucleoside drugs were screened. The PCR-reverse dot blot was adopted to detect the drug-resistance gene mutation loci and genotypes. The correlation between the HBV drug-resistance mutant with the genotypes, liver function indexes and HBV DNA viral loads was performed. **Results** Among 462 patients taking nucleoside drugs for treating chronic hepatitis B, 45 drug-resistance mutants were detected with the mutation rate of 9.74%; in which, 16 cases (35.5%) were 180M and 204I/V mutant, 6 cases (13.3%) were 204V, 13 cases (28.9%) were 204I mutant, 3 cases (6.7%) were 180V mutant and 3 cases (6.7%) were 236T mutant. The HBV genotyping showed 105 cases of genotype B, 337 cases of genotype C, 0 case of genotype D and 2 cases of other genotypes. **Conclusion** (1) The HBV genotypes in Maoming area may be different from the genotypes in other southern regions and is dominated by HBV-C genotype. (2) The PCR-reverse dot blot method is a detection method for fastly and accurately finding the drug-resistance loci after nucleosides therapy. (3) The clinical analysis demonstrates that the drug-resistance mutation loci has no correlation with the liver function index ALT ( $P > 0.05$ ), but there was certain correlation between the drug-resistance mutation loci in hepatitis B and HBV DNA viral load ( $P < 0.05$ ).

Key words: hepatitis B virus; genotype; polymerase chain reaction

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染仍然是一个全球公共卫生问题。世界卫生组织报告说, 全世界大约有 20 亿人已经感染了乙肝病毒, 大约有 3.5 亿人患有慢性乙型肝炎<sup>[1]</sup>。在没有干预治疗的情况下, 约 15%~40% 的慢性乙型肝炎患者会发展成肝硬化、末期肝病、原发性肝癌或需要肝脏移植<sup>[1-2]</sup>。因此, 合理干预治疗慢性乙型肝炎患者的病毒载量是刻不容缓的。乙型肝炎病毒是一种高变异的病毒, 在复制过程中可发生一个或多个核苷酸的变异。是因为它在复制过程中必须经过 RNA 中间体的逆转录复制, 因 RNA 聚合酶和逆转录酶缺乏校正功能, 使病毒在复制过程中可发生一个或多个核苷酸的变异<sup>[3]</sup>。迄今, 有学者根据 HBV 全基因序列核苷酸差异大于 8% 或 S 基因区的核苷酸差异大于 4% 进行基因分型分析, 可将 HBV 分为 8 种基因型: A、B、C、D、E、F、G 和 H。各基因型

的 HBV 对各种药物有着各自的疗效特点。快速、准确、特异地诊断乙型肝炎患者的 HBV 耐药变异与基因型对于其治疗、预后及转归至关重要, 其基因诊断技术起着关键作用。本实验采取了深圳亚能公司的 PCR-反向点杂交法试剂盒进行患者血清检测 HBV 耐药变异与基因型, 并用 SPSS 17.0、Excel 软件进行统计和分析。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 本实验选取茂名市人民医院 2012 年 3 月至 2014 年 3 月门诊及住院慢性乙型肝炎患者血清标本 462 例, 其中男 299 例, 女 163 例, 平均 (40.6 ± 15.8) 岁。HBV-DNA 定量标准大于  $1 \times 10^2$  copies/mL 为阳性标本, 慢性乙型肝炎患者符合 2005 年中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会联合制定的诊断标准<sup>[4]</sup>, 同时排除其他基础疾病如 HCV、

HDV、HIV 等混合感染。

1.2 方法

1.2.1 采集和处理血浆标本 用橘色促凝管取静脉血 3 mL, 室温静置到可以析出血清, 然后 4 000 r/min 离心 5 min, 血清分离后控制在 2 h 内检测, 如果不能及时检测, 保存于 2~8 ℃ 不超过 48 h, -18 ℃ 下不超过半年完成实验。

1.2.2 质控品与试剂盒 采取了深圳亚能公司的 PCR-反向点杂交法检测 HBV 耐药变异与基因型; 质控品和试剂均为厂家提供的配套产品, 按仪器说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0、Excel 软件进行分析处理, 计数各类型基因分型的分布和耐药突变的比率, 并结合临床资料进行相关性分析。

2 结 果

2.1 PCR-反向点杂交法结果 在 462 例服用核苷类药物治疗的慢性乙型肝炎患者血清中检测, 检测 HBV-B 例数为 105 例; HBV-C 例数为 337 例; HBV-B 型和 HBV-C 型联合感染例数为 4 例; B 基因型和 C 基因型联合感染 4 例, HBV-D 例数为 0 例; 其中有 2 例送深圳亚能公司测定为其他类型, 检测数

据如表 1 所示。耐药变异株 45 例, 变异率约为 9.74%, 其中 180M 和 204I/V 突变株 16 例, 35.5%; 204V 突变株 6 例, 13.3%; 204I 突变株 13 例, 28.9%; 180V 突变株 3 例, 6.7%; 181V 突变株 3 例, 6.7%; 207I 突变株 1 例, 2.2%, 236T 突变株 3 例, 6.7%。HBV 基因型中 B 基因型 105 例, C 基因型 337 例, D 基因型 0 例, 其他基因型 2 例。HBV 基因型中 B 基因型 105 例, C 基因型 337 例, D 基因型 0 例, 其他基因型 2 例, 见表 1。

2.2 HBV 基因分型与基因变异的相关性 HBV 耐药变异类型与 B、C 基因型的关系结果显示: 在 45 例发生耐药变异的慢性乙型肝炎患者中 11 例为 B 基因型, 33 例为 C 基因型, 1 例为 B、C、D 之外的基因型。HBV-B、C 两基因型间 HBV 基因变异类型差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。另由于 B、C、D 之外的基因型例数较少, 未进行统计。发生变异组与非变异组数据分析如表 2 所示, 用各突变株组和非突变株组进行 *t* 检验: 各突变株组的肝功能指标 ALT 与非突变株组比较 *P* 全部大于 0.05, 差异无统计学意义, 即无相关性, 各突变株组的 HBV DNA 病毒载量与非突变株组比较 ( $P<0.05$ ), 差异具有统计学意义, 即有一定相关性。

表 1 HBVA 耐药株基因型和耐药突变点的分布

HBV 基因型	rt180M	rt204V	rt204I	rt207I	rt181V	rt236T	rt180M+rt204V/I	合计
HBV-B	0	3	3	0	1	1	3	11
HBV-C	2	3	10	1	2	2	13	33
其他型	1	0	0	0	0	0	0	1
合计	3	6	13	1	3	3	16	45

表 2 各组与肝功能的的关系和与病毒载量的关系 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	ALT(U/L)	HBV-DNA(copies/mL)
rt180M+rt204V/I	16	204.2±39.9	(15.7±2.9)×10 <sup>5</sup>
rt204I	13	200.3±43.7	(3.8±5.0)×10 <sup>5</sup>
rt204V	6	163.2±39.7	(7.0±2.1)×10 <sup>5</sup>
非变异	403	199.3±43.2	(7.8±3.9)×10 <sup>5</sup>

3 讨 论

目前研究表明, 我国主要与 A、B、C、D 4 型流行为主, 在部分大陆地区主要为 B 基因型和 C 基因型, 南方以 B 基因型为主, 北方以 C 基因型为主, 即 HBV 基因型呈一定的地理区域性分布。本研究发现 HBV-C 型检测率为 72.9%, HBV-B 型检测率为 22.7%, 这两种基因型加上这两种基因型的联合感染例数占总数 96.5%。这与南方以基因型 B 为主的分布特点不一致。陈岳明等<sup>[5]</sup>对上海地区 HBV 感染者慢性乙型肝炎和 HCC 基因型分析比较发现在慢性乙型肝炎感染组中 B 型占绝对优势。这也跟国内学者报道<sup>[6]</sup>广西地区以基因型 B 为主的分布特点不一致。因此, 推断茂名地区的 HBV 基因型可能与其他南方地区的基因型有差异。由于本研究仅限于来本院诊治的部分患者, 因此具有一定的局限性, 要得到进一步的证实, 还需要加大病例数据的收集。

PCR-反向点杂交法是目前一种能够快速准确发现应用核苷(酸)类药物治疗后产生耐药位点的检测方法, 具有快速、成本低的特点, 而且重复性好, 适合于临床推广。核苷(酸)类药物, 如 Adefovir (ADV)、Lamivudine (LMV)、Telbivudine (LdT)、Entecavir(ETV) 等是抗 HBV 常见的药物。这些药物通常情况下均无法完全清除大多数乙肝患者体内的 HBV, 因此需要长期持续治疗。由于 HBV 是一种高度变异的病毒, 在复制过程中可发生一个或多个核苷酸的变异。患者一旦出现

耐药变异, 其肝功能恶化的比例将明显升高甚至会快速进展到肝衰竭。因此, 患者在核苷(酸)类药物治疗后未达到临床预期效果时, 即需进行 HBV 耐药突变检测。PCR-反向点杂交法的敏感度也存在一定的局限性, 本研究存在 14 例 HBV 标本未检出, 主要原因可能是由于这部分患者 HBV-DNA 定量检测小于 1.0×10<sup>3</sup> copies/mL。因此, 当患者 HBV-DNA 定量检测小于 1.0×10<sup>3</sup> copies/mL 时应结合临床分析。通过临床资料分析显示乙肝患者的耐药变异位点与肝功能指标 ALT 间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 即无相关性, HBV-DNA 病毒载量间差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 有一定相关性。与 HBV-DNA 病毒载量越高突变系数就越大, 因为要把患者的 HBV-DNA 病毒载量控制在较低的水平上。

参考文献

- [1] Sorrell MF, Belongia EA, Costa J, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis B[J]. Ann Intern Med, 2009, 150(1): 104-110.
- [2] Shepard CW, Simard EP, Finelli L, et al. Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination[J]. Epidemiol Rev, 2006, 28(2): 112-125.
- [3] Dienstag JL. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1490.
- [4] Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, et al. Response to long-term lamivudine treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes A, B and C[J]. J Med Virol, 2006, 78(10): 1276-1283.
- [5] 陈岳明, 高春芳, 戚鹏, 等. 乙型肝炎病毒基因型与慢性乙型肝炎及原发性肝癌病理特点之间的关系[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(3): 279-282.
- [6] 陈茂伟, 吴健林, 李国坚, 等. 乙型肝炎病毒基因型与广西肝癌关系的病例-对照研究[J]. 应用预防医学, 2009, 15(1): 1-4.