

• 临床检验研究论著 •

深圳地区乙型肝炎病毒基因分型和预存耐药变异的研究

陈灿峰, 徐传彬, 黄雪辉

(深圳市西乡人民医院, 广东深圳 518102)

摘要:目的 了解深圳地区临床慢性 HBV 感染患者的 HBV 基因型和预存耐药变异情况。方法 应用 PCR 结合反向点杂交法检测 244 例临床慢性 HBV 感染血清样本的基因型和预存耐药变异情况。结果 244 例慢性 HBV 感染症状的患者中, 共发现有 3 种 HBV 基因型, 其中 B 型 143 例, 占 58.6%; C 型 100 例, 占 41%; D 型 1 例, 占 0.4%; 244 例慢性 HBV 感染症状的患者中, 有 38 例检出 HBV 预存耐药变异, 预存耐药变异的总检出率为 15.57%, 其中与拉米夫定耐药相关的为 22 例(9.01%), 与阿德福韦酯耐药相关的为 16 例(6.56%)。结论 深圳地区 HBV 基因型以 B、C 型为主, 慢性 HBV 感染者其预存耐药率较高。对慢性 HBV 感染者进行 HBV 基因分型及预存耐药检测, 对预测疾病进展及指导个体化治疗具有重要意义。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因型; 预存耐药变异

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.23.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)23-3190-02

Research of hepatitis B virus genotyping and pre-existing antiviral resistance mutation in Shenzhen area

Chen Canfeng, Xu Chuanbin, Huang Xuehui

(Xixiang People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518102, China)

Abstract: Objective To understand the hepatitis B virus(HBV)genotyping and pre-existing antiviral resistance mutation in the patients with clinical chronic HBV infection in Shenzhen area. **Methods** Serum samples in 244 cases of chronic HBV infection were detected for HBV genotyping and pre-existing antiviral resistance mutation by using PCR combined with reverse dot hybridization. **Results** In 244 cases of chronic HBV infection, 3 kinds of genotype were found, including 143 cases(58.6%)of genotype B, 100 cases(41%)of genotype C and 1 case(0.4%)of genotype D; 38 cases(15.57%)of pre-existing antiviral resistance mutation were detected out. The total detection rate of pre-existing antiviral resistance mutation was 15.57%, in which 22 cases(9.01%)were related with lamivudine resistance and 16 cases(6.56%)were related with adefovir dipivoxil resistance. **Conclusion** The genotype B and C are the main genotypes in Shenzhen area, and the incidence rate of pre-existing antiviral resistance mutation in the patients with chronic HBV infection is relatively high. The detection of genotyping and pre-existing antiviral resistance mutation of HBV has the important significance to predict the disease progression and guide the individualized treatment.

Key words: hepatitis B virus; genotyping; pre-existing antiviral resistance mutation.

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染呈世界性流行, 感染 HBV 可引起肝衰竭、肝硬化, 甚至肝细胞癌。根据 HBV 全基因序列差异性大于或等于 8% 或 S 区基因序列差异性大于或等于 4%, 可将 HBV 分为 9 个基因型(A~I)^[1-2]。HBV 基因型与疾病进展和干扰素(IFN) α 治疗效果有关。慢性乙型肝炎治疗的关键是进行抗病毒治疗, 核苷(酸)类似物(例如拉米夫定、阿德福韦酯等)已广泛用于慢性乙型肝炎患者的抗病毒治疗中。但核苷(酸)类药物的长期应用也带来了一个普遍性的问题, 即 HBV 耐药性的产生, 特别是近年来发现慢性乙型肝炎患者在核苷(酸)类似物治疗前即存在耐药位点突变, 即预存耐药变异(pre-existing antiviral resistance mutation)引起了临床医师的高度关注^[3]。

本研究利用 PCR 结合反向点杂交法同时快速检测 HBV 常见基因型及与拉米夫定、阿德福韦酯耐药相关位点的预存耐药变异, 探讨 HBV 基因型分布特征及预存耐药变异情况, 为今后指导临床个体化抗病毒治疗提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 244 例临床病例来自本院门诊和住院的慢性乙型肝炎患者, HBV 拷贝数大于或等于 1 000 IU/mL, 从未用过核苷(酸)类似物。全部病例符合《慢性乙型肝炎防治指南》

(2010 版)中的慢性 HBV 感染的诊断标准, 收集血清于一 18℃ 保存。

1.2 仪器与试剂 珠海黑马 9600 PCR 仪。恒温杂交仪(YN-H16), 乙型肝炎病毒分型和耐药突变基因检测试剂盒由亚能生物技术(深圳)有限公司提供。该试剂盒可检测常见的 3 种 HBV 基因型(包括 B、C、D 型)以及常见核苷(酸)类似物耐药相关基因的 5 个位点的突变, 分别是: rt180、rt204、rt207、rt181、rt236。

1.3 方法 严格按试剂盒说明书进行操作, 主要操作流程如下: (1)HBV DNA 的提取与纯化。(2)HBV DNA 的 PCR 扩增, 利用第一步提取和纯化的 DNA 做模版, 按照试剂盒给定的反应体系进行操作。(3)杂交: 取 15 mL 塑料离心管, 放入标记好患者编号的膜条、A 液 5~6 mL 以及 PCR 扩增的产物, 将离心管放入沸水浴中加热 10 min, 然后取出放入杂交仪, 47℃ 杂交 1.5 h。(4)洗膜: 取出膜条, 移至装有预热 B 液的 50 mL 管中, 于 47℃ 轻柔洗涤 15 min。(5)孵育: 按 A 液, POD=2 000:1 的比例配制孵育液, 室温轻柔孵育 30 min。(6)显色: 将膜条浸泡于配制好的显色液中避光显色 15~30 min 即可观察结果。

2 结果

2.1 病例 HBV 基因型的分布 在 244 例慢性乙型肝炎患者

中,共发现有 3 种 HBV 基因型,其中 B 型 143 例,占 58.6%;C 型 100 例,占 41.0%;D 型 1 例,占 0.4%。

2.2 预存耐药检测结果 在 244 例慢性乙型肝炎患者中,预存耐药的总检出率是 15.57%。其中与拉米夫定耐药相关的 22 例(9.01%),与阿德福韦酯耐药相关的 16 例(6.56%),见表 1。

表 1 预存耐药检测结果		
药物	变异位点	例数(%)
拉米夫定	rtM204 V/I	14(5.74)
	rtL180M	5(2.05)
	rtL180M+204V/I	3(1.23)
阿德福韦酯	rtA181V	10(4.10)
	rtN236T	4(1.64)
	rtA181V+ rtN236T	2(0.82)

3 讨 论

目前临床上用于慢性乙型肝炎抗病毒治疗的药物主要有干扰素(普通干扰素和长效干扰素)和核苷(酸)类药物(如拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦等),临床研究报道 HBV 的基因型与患者对干扰素的治疗应答有一定相关性,而耐药是核苷(酸)类药物抗病毒过程中一个极其重要的问题。

目前已经发现 HBV 基因型有 A~I 共 9 型,在我国以 C 型和 B 型为主,呈一定的地域性分布,北方地区以 C 型为主(约占 81.6%),南方地区则以 B 型为主,C 型也占相当比例^[4]。本文研究的 244 例患者,B 型 143 例,占 58.6%;C 型 100 例,占 41.0%;D 型 1 例,占 0.4%,与文献报道一致。研究表明,HBV 基因型与疾病进展和干扰素 α 治疗效果有关。与 C 基因型感染者相比,B 基因型感染者较早出现乙型肝炎 e 抗原血清学转换,较少进展为慢性肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌(HCC)^[5]。HBeAg 阳性患者对干扰素 α 治疗的应答率,B 基因型高于 C 基因型,A 基因型高于 D 基因型^[6]。在临床上对乙型肝炎患者进行基因型的检测,可协助临床医生选择优化的抗病毒方案、预测患者预后。但 HBV 基因型与核苷类药物治疗疗效的关系目前尚不清楚。

本研究入组的 244 例未使用核苷(酸)类药物抗病毒的慢性乙型肝炎患者,预存耐药的总检出率 15.57%。其中与拉米夫定耐药相关的 22 例(9.01%),与阿德福韦酯耐药相关的 16 例(6.56%),与文献报道的结果基本一致^[7]。进一步证实了耐药病毒株存在于未经核苷(酸)类药物治疗的慢性乙肝患者中,即预存耐药。

预存耐药可导致接受核苷(酸)类药物抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者发生原发性无应答、部分病毒学应答或病毒学突破。因此,自文献报道以来,预存耐药问题已引起了临床医生的重视,国内肝病专家制定的《核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理》^[8]中明确指出:一些慢性乙型肝炎患者在治疗前体内已有 HBV 耐药突变病毒株,称为预存耐药。同时推荐,对于因复发、耐药或其他原因再经核苷(酸)类药物治疗患者,有条件者应进行耐药位点检测,针对性治疗。对于原发性无应答、部分病毒学应答或病毒学突破的患者,进行耐药位点检测有助于指导治疗方案的调整。

盖洪鹏等^[7]就预存耐药与慢性乙型肝炎患者核苷(酸)类

药物抗病毒治疗应答和耐药的相关性进行了研究,结果显示在抗病毒治疗前进行预存耐药检测,制定个体化抗病毒方案,能显著降低耐药发生率,提高 48 周、96 周的 HBV DNA 转阴率,以及 HBeAg/抗-HBe 血清学转换率。提示预存耐药与核苷(酸)类药物耐药和治疗应答密切相关,治疗前进行预存耐药检测,对临床选择个体化抗病毒方案,以及预防耐药的发生有切实的临床价值,建议临床对有条件的慢性乙型肝炎患者在接受核苷(酸)类药物治疗前进行预存耐药检测,根据检测结果,制定个体化用药方案,提高疗效。

目前,临床上检测 HBV 耐药突变的常见方法有 PCR-测序法、PCR-荧光探针法和 PCR-反向点杂交法。PCR-测序法可以获知 HBV 已知及未知基因突变,但只有当耐药变异株超过 HBV 准种池 20% 以上直接测序才能检测到^[9],并且设备昂贵,检测结果需要专业人员进行分析、解读,而检测到未知突变位点,需要进一步的实验验证是否与耐药相关,因此,PCR-测序法更适合科研使用。PCR-荧光探针法,其自动化程度高,但目前仅能检测 rt180、rt204 2 个耐药位点,结果仅提示拉米夫定耐药,对临床调整用药的价值有限。PCR-反向点杂交的基因芯片具有检测快速、高通量、位点覆盖广泛、易操作等优点,还能同时检测 HBV 基因型,充分满足临床对疾病预测、选择合理抗病毒药物、及合理调整治疗方案的需求,并且设备通用、操作简单、结果易读,适合有大、中、小型实验室的各级医院使用。

参考文献

[1] Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam[J]. J Virol, 2008, 82(11):5657-5663.

[2] Olinger CM, Jutavijittum P, Hubschen JM, et al. Muller CP: Possible new hepatitis B virus genotype, southeast Asia[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(11):1777-1780.

[3] 钟艳丹, 杨永峰. 关于乙型肝炎病毒预存耐药变异的认识[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(20):6215-6216.

[4] 周霞, 王宇明. 乙型肝炎病毒基因分型研究进展[J]. 重庆医学, 2008, 37(1):91-93.

[5] Chu CM, Liaw YF. Genotype C hepatitis B virus infection is associated with a higher risk of reactivation of hepatitis B and progression to cirrhosis than genotype B: a longitudinal study of hepatitis B e antigen-positive patients with normal aminotransferase levels at baseline[J]. J Hepatol, 2005, 43(3):411-417.

[6] Liu CJ, Kao JH. Genetic variability of hepatitis B virus and response to antiviral therapy[J]. Antivir Ther, 2008, 13(5):613-624.

[7] 盖洪鹏, 孙伟翔, 袁德胜, 等. 预存耐药对核苷(酸)类似物抗病毒治疗应答和耐药的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(11):841-844.

[8] 参加乙型肝炎耐药讨论会专家. 核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(1):10-17.

[9] Lok AS, Zoulim F, Locarnini S, et al. Antiviral drug-resistant HBV: standardization of nomenclature and assays and recommendations for management[J]. Hepatology, 2007, 46(1):254-265.