

• 短篇论著 •

DNA 芯片技术在宜昌地区乙型肝炎病毒分型和耐药情况监测中的应用

韩宇¹, 向启云¹, 李沫¹, 乔亚丽²

(1. 湖北省宜昌市第三人民医院检验科, 湖北宜昌 443000;

2. 湖北省宜昌市秭归县人民医院感染科, 湖北宜昌 443600)

摘要:目的 利用聚合酶链反应(PCR)体外扩增和 DNA 反向位点杂交相结合的 DNA 芯片技术检测宜昌地区乙型肝炎病毒(HBV)分型及耐药情况,为临床医师对指导患者选用何种抗病毒药、继续使用该抗病毒药及换用何种抗病毒药提供依据。方法 采集 2015 年 1 月至 2017 年 5 月宜昌地区共 160 例乙肝阳性且乙肝 DNA 检测结果大于 10^3 的患者血清标本。对 160 例患者采取性别、年龄、DNA 检测结果分组的方法分析该地区 HBV 感染分布;采用 DNA 芯片技术检测基因分型 HBV-B、HBV-C、HBV-D,以及 rt180、rt204、rt207、rt181、rt236、rt184、rt202、rt250 基因位点突变情况。结果 DNA 芯片检测出感染 HBV-B、HBV-C、HBV-D 患者分别为 87 例(54.37%)、63 例(39.38%)、0 例,同时感染 HBV-B 及 HBV-C 的患者为 10 例(6.25%)。药敏试验显示该地区 HBV 对拉米夫定(LAM)、替比夫定(LdT)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)4 种药具有耐药性且耐药情况各有差异,4 种同时全部耐药的有 0 例,全部敏感的有 31 例,未检测出耐药突变的有 54 例。DNA 芯片检测 rt180、rt204、rt207、rt181、rt236、rt184、rt202、rt250 基因位点,8 组基因位点均有野生型和突变型被检测出,其中野生型最多的为 rt236,有 150 例,突变型最多的为 rt180,有 23 例,野生型与突变型同时被检测出的最多的是 rt250,有 31 例,被检出率最高的为 rt180,为 98.13%(157/160)。被检测出突变的有 106 例,突变率最高的为 rt180M(为 39.62%);rt184F 及 rt250I 未检测到突变;检测出单基因位点突变的有 48 例,双位点突变的有 29 例。结论 宜昌地区感染 HBV-B 的患者最多。该地区 HBV 对 LAM、LdT、ADV 和 ETV 总耐药率低于全国平均水平,男性 HBV 感染者远高于女性,20~<60 岁感染率最高且耐药率最高。DNA 检测结果在 $10^5 \sim 10^7$ 感染率最高, 10^3 、 10^5 及 10^6 耐药率最高且多为同时耐 2 种或 2 种以上药物。单个基因位点突变的概率最大,双位点突变的概率其次。

关键词:乙型肝炎病毒; 分型; 耐药; 基因位点突变; DNA 芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.033

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)02-0229-04

文献标识码:B

乙型肝炎病毒(HBV)是一种 DNA 病毒,属于嗜肝病毒科,引发乙型病毒性肝炎。乙肝感染是一个严重的公共卫生问题。据世界卫生组织(WHO)报道,全球 60 亿人口中,约 20 亿人曾感染过 HBV,其中 3.5 亿人为慢性 HBV 感染,每年约有 100 万人死于 HBV 感染所致的肝衰竭、肝硬化和原发性肝细胞癌(简称肝癌)^[1]。全球肝癌患者中,75% 以上是由 HBV 所致。我国乙肝患者形势更为严峻,每年因 HBV 导致的肝硬化和肝癌死亡 30 余万,新发乙型肝炎病例 50 万~100 万例^[2]。核苷(酸)类似物长期抗 HBV 治疗面临的最重要问题之一是 HBV 的耐药性问题^[3],随着我国抗病毒药物的广泛应用,HBV 多重耐药较单一耐药的比率呈上升趋势,因此及时了解乙型病毒性肝炎患者的分型及耐药情况,对正确指导临床医师的合理用药具有重要意义。研究证实,与拉米夫定(LAM)有关的主要耐药变异位点为 rt204I/V^[3],ADV 变异位点集中在 rt236T 和(或)rt181V/T^[4],ETV 耐药的突变形式主要有两种,均发生于 LAM 耐药的患者的^[5]。

本研究利用 DNA 芯片技术对宜昌地区 160 例已确诊的乙肝阳性且乙肝 DNA 检测结果大于 10^3 的患者临床标本进行 HBV-B、HBV-C、HBV-D 分型,及 rt180、rt204、rt207、rt181、rt236、rt184、rt202、rt250 基因位点检测,并分析 HBV 感染的性别、年龄及 DNA 检测结果的分布,以了解本地区 HBV 感染、分型及耐药情况。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 5 月宜昌地区,通过酶联免疫法及化学发光法得以确诊的乙肝阳性且乙肝 DNA 检测结果大于 10^3 的患者。收集各年龄段、男女患者均有的血清标本 160 份,且均为互不重复标本。

1.2 仪器与试剂 病毒 DNA 提取纯化试剂盒,HBV 分型和耐药突变基因检测试剂盒, Bioer Life Express 聚合酶链反应(PCR)扩增仪(型号为 BYQ6931-211),PCR 分子恒温杂交仪(型号为 YN-H16)均由深圳亚能生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 实验概述 检测基因分型包括 HBV-B、HBV-C、HBV-D。检测基因包括 LAM、LdT、ADV、ETV 的耐药基因，及 rt180、rt204、rt207、rt181、rt236、rt184、rt202、rt250 的野生型及不同突变型。其中 rt180 基因检测 1 个突变位点，为 rt180M；rt204 基因检测 2 个突变位点，为 rt204I、rt204V；rt181 基因检测 2 个突变位点，为 rt181V、rt181T；rt236 基因检测 1 个基因突变位点，为 rt236T；rt184 基因检测 5 个突变位点，为 rt184I、rt184S、rt184A、rt184F、rt184L；rt202 基因检测 2 个突变位点，为 rt202G、rt202I；rt250 基因检测 3 个突变位点，为 rt250I、rt250L、rt250V。具体操作步骤可按配套试剂盒内的说明书操作。

1.3.2 DNA 提取纯化 将全血标本离心取血清备用。分别在离心管内加入 20 μL 蛋白酶 K、200 μL 血清样本、200 μL 裂解液，上下颠倒混匀后置于 56 °C 恒温裂解 10 min；再依次加入 300 μL 无水乙醇、700 μL 洗液 I、700 μL 无水乙醇后离心；将离心管置于洁净的 1.5 mL 离心管，打开离心柱管盖，室温晾置 5 min；在离心柱内加入 50 μL 洗脱液，盖上管盖，室温静置 3 min，离心，取滤液备用。

1.3.3 PCR 扩增 每份标本进行 1 管聚合酶链反应，扩增产物为 HBV 目的基因片段，该片段包含了所要检测的基因型和耐药突变位点。扩增程序：50 °C 2 min；95 °C 10 min；94 °C 60 s，68 °C 90 s，共 30 个循环；94 °C 30 s，54 °C 30 s，72 °C 30 s，共 30 个循环；72 °C 5 min。

1.3.4 点样杂交 取 15 mL 塑料离心管，放入耐药突变检测膜条和基因分型检测膜条，加入 A 液 5~6 mL，取 25 μL PCR 产物加到 A 液液面以下，放入沸水浴中加热 10 min。取出离心管，放入杂交箱 47 °C 杂交 1.5 h。同时取 50 mL 塑料离心管，加入 40 mL B 液于杂交箱中进行预热至 47 °C。

1.3.5 洗膜与显色 取出膜条转移至装有预热 B 液的 40 mL 管中，于 47 °C 轻摇洗涤 15 min。按 A 液：过氧化物酶 = 2 000 : 1 配置孵育液，取出膜条放入孵育液，室温轻摇孵育 30 min。取出膜条，用 A 液室温摇洗两次，每次 5 min。用 C 液室温洗膜 1~2 min。将膜条浸泡于显色液中避光显色 10~15 min，用纯水终止显色反应。

1.3.6 结果判读 临床样本试验成立条件：显色质控点 CC 正常显色；阳性质控品正常显色且阴性质控品除 CC 外其余所有阵列位点不显色。在试验成立的条件下，根据显色（蓝色斑点）出现的阵列位点直接判读 HBV 的基因型和耐药突变类型；当临床样本除 CC 外其余所有阵列位点均不显色，表明被检样本中无 HBV 病毒或者病毒量在本试剂盒最低检出限以下，即 DNA < 10³ IU/mL。因 HBV 变异快，本品各阵列位点可能会因为探针覆盖范围内的基因序列出现新的碱基多态而导致不显色。异常结果分析：显色质控点 CC 不显色，提示显色不成功；阳性质控品相应阵列位点部分不显色或所有阵列位点不显色，提示可能是样本 DNA 提取、PCR 扩增、杂交失败；阳性质控品相应阵列位点以外的阵列位点显色，提示发生非特异杂交或发生污染；阴性质控品除 CC 外任何阵列位点显色，提示发生污染。

2 结 果

2.1 HBV 感染、分型及耐药人群分布 本研究男性 HBV 感染占 127/160 (79.38%)，女性占 33/160 (20.62%)，男性多于女性，差异有统计学意义 (χ² = 92.0, P < 0.05)。感染 HBV-B 患者最多，占 54.37% (87/160)，感染 HBV-D 患者未被检测出来，同时感染 HBV-B 及 HBV-C 的患者为 10 例，占 6.25% (10/160)。本研究患者总耐药率为 46.87% (75/160)，单耐一种药物的耐药率远低于同时耐 2 种或 2 种以上药物的耐药率，耐药主要发生在 20~<60 岁，DNA 检测结果为 10³、10⁵ 及 10⁶ 耐药率最高且多为同时耐 2 种或 2 种以上，见表 1、2。160 例患者中有 72.5% (116/160) 的患者在进行耐药检测之前使用过 LAM、ADV、LdT、ETV 等药物。

2.2 基因位点检测情况 DNA 芯片法检测 rt180、rt204、rt207、rt181、rt236、rt184、rt202、rt250 等 8 组基因位点检测情况见表 3。rt180 检出率最高 [98.13% (157/160)]，其次为 rt236 及 rt184 [均为 96.88% (155/160)]，rt207 检出率最低 [80.63% (129/160)]。每组基因位点均有野生型和突变型被检测出，其中野生型最多的为 rt236 150 例，其次为 rt184 139 例；突变型最多的为 rt180 23 例，其次为 rt204 21 例；野生型与突变型同时被检测出的最多的是 rt250 31 例，其次为 rt204 30 例。

表 1 宜昌地区 HBV 感染及分型的性别、年龄、DNA 检测结果分布

分型	性别(n)		年龄(n)				DNA 检测结果 (IU/mL)					
	男	女	<20 岁	20~<40 岁	40~<60 岁	≥60 岁	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
HBV-B	76	11	2	45	35	5	10	10	28	16	16	7
HBV-C	43	20	—	19	39	5	9	4	7	15	24	4
HBV-D	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
HBV-B/C	8	2	—	7	3	—	5	3	2	—	—	—
合计	127	33	2	71	77	10	24	17	37	31	40	11

注：—表示无数据

表 2 宜昌地区 HBV 感染及耐药的性别、年龄、DNA 检测结果分布

药敏分类	性别(n)		年龄(n)				DNA 检测结果 (IU/mL)					
	男	女	<20 岁	20~<40 岁	40~<60 岁	≥60 岁	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
							—	—	—	—	—	—
LAM	3	3	—	2	4	—	—	1	2	1	2	—
LdT	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ADV	2	—	—	—	2	—	—	2	—	—	—	—
ETV	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
LAM+LdT	12	7	—	7	10	2	3	2	5	5	4	—
LAM+LdT+ADV	11	11	—	4	17	1	2	3	3	6	6	2
LAM+LdT+ETV	19	5	—	8	14	2	9	—	6	9	—	—
LAM+ETV	2	—	—	—	2	—	—	—	—	—	2	—
全部敏感	31	—	—	17	10	4	2	3	11	7	3	5
未检测到突变	47	7	2	33	18	1	8	6	11	3	23	3
合计	127	33	2	71	77	10	24	17	38	31	40	10

注:—表示无数据

表 3 不同基因位点检测情况(n)

检测情况	rt180	rt204	rt181	rt236	rt184	rt202	rt250	rt207
野生型	117	97	137	150	139	115	108	124
突变型	23	21	2	2	5	5	0	2
未检测到	3	12	7	5	5	19	21	31
野生型+突变型	17	30	14	3	11	21	31	3

2.3 基因位点检测突变 DNA 芯片法检测有 106 例基因突变,其中单基因位点突变的有 48 例,双位点基因突变的有 29 例,3 个同时突变的有 19 例,4 个同时突变的有 7 例,5 个同时突变的有 3 例,见表 4。突变率最高的为 rt180M[39.62%(42/106)];其次是 rt204V[28.30%(30/106)];rt184F 及 rt250I 未检测到突变,突变率为 0,见表 5。

表 4 DNA 芯片法检测基因突变位点分布

突变位点	标本数(n)	突变率(%)
rt180M	5	4.72
rt204I	10	9.43
rt204V	5	4.71
rt181V	7	6.60
rt181T	7	6.60
rt236T	2	1.89
rt184I	—	—
rt184S	—	—
rt184A	—	—
rt184F	—	—
rt184L	—	—
rt202G	—	—
rt202I	3	2.83
rt250I	—	—
rt250L	7	6.60
rt250V	2	1.89
rt202G+re180M	5	4.72
rt204V+rt180M	7	6.60

续表 4 DNA 芯片法检测基因突变位点分布

突变位点	标本数(n)	突变率(%)
rt204I+rt180M	2	1.89
rt202G+rt181V	2	1.89
rt250V+rt236T	2	1.89
rt250V+rt202I	3	2.83
rt204V+rt202I	2	1.89
rt202I+rt184L	2	1.89
rt204I+rt202I	2	1.89
rt250V+rt181T	2	1.89
rt204V+rt184S+rt180M	2	1.89
rt204V+rt202G+rt180M	2	1.89
rt202G+rt180M+rt184I	2	1.89
rt204V+rt184A+rt180M	3	2.83
rt204I+rt184S+rt180M	2	1.89
rt250V+rt204I+rt204V	2	1.89
rt250V+rt250L+rt204I	2	1.89
rt250L+rt204I+rt180M	2	1.89
rt204V+rt180M+rt184L	2	1.89
rt250V+rt250L+rt181T+rt207I	2	1.89
rt250V+rt250L+rt204V+rt180M	2	1.89
rt250V+rt204I+rt184S+rt180M	2	1.89
rt250V+rt250L+rt181I+rt181T	1	0.94
rt250V+rt250L+rt204I+rt204V+rt180M	2	1.89
rt250V+rt202G+rt184S+rt184A+rt180M	1	0.94

注:—表示无数据

表 5 DNA 芯片法检测基因突变位点分布

突变位点	被检出次数(n)	突变率(%)
rt180M	42	39.62
rt204I	24	22.64
rt204V	30	28.30
rt181V	10	9.43
rt181T	12	11.32
rt236T	3	2.83
rt184I	2	1.89
rt184S	7	6.60
rt184A	5	4.72
rt184F	0	0.00
rt184L	3	2.83
rt202G	14	13.21
rt202I	12	11.32
rt250I	0	0.00
rt250L	19	17.92
rt250V	23	21.70

3 讨论

近年来随着分子诊断技术的发展, DNA 芯片技术开始用于 HBV 的分型及耐药性的研究^[6]。乙肝患者在使用抗病毒药物治疗前和治疗期间, 临床医师需要掌握其感染的乙肝病毒是否具有某种耐药突变, 以及各基因型对抗病毒药物治疗的反应性差异, 这对指导患者选用何种抗病毒药、是否继续使用该抗病毒药、换用何种抗病毒药都有很现实的意义, 对患者抗病毒治疗的疗效判断、预后评估十分重要^[7], 因此 DNA 芯片技术在临床诊断中的应用越来越广泛。本研究利用 PCR 体外扩增和 DNA 反向位点杂交相结合的 DNA 芯片技术对宜昌地区 HBV 分型及耐药情况进行检测, 结果发现本地区乙肝患者感染 HBV-B 的比例最高, 感染 HBV-D 的比例最低, 这与张智等^[8]及陈灿峰等^[9]的报道相符。这表明本地区的 HBV 分型比例与其他地区比例基本一致。对 HBV 感染者进行性别、年龄和 DNA 检测结果构成分析, 结果为男性患者(79.38%)多于女性(20.62%), 是否与喝酒、饮食等不良生活习惯有关还需要进一步调查分析。年龄在 20~<40 岁及 40~<60 岁的青壮年感染 HBV 的感染率最高, 分别为 44.38% 和 48.13%, 尽管小于 20 岁的感染率仅有 1.25%, 但也不容忽视。本地区 HBV 总耐药率为 46.88%, 单耐一种药物的耐药率远低于同时耐 2 种或 2 种以上药物的耐药率, 与张宝等^[10]的报告基本相同。本地区耐药主要发生在 20~<60 岁, DNA 检测结果为 10³、10⁵ 及 10⁶ 耐药率最高且多为同时耐 2 种或 2 种以上药物。被检测的 8 组基因位点均有野生型和突变型被检测出, 其中野生

型最多的为 rt236, 有 150 例; 突变型最多的为 rt180, 有 23 例; 野生型与突变型同时被检测出的最多的是 rt250, 有 31 例。在 106 例基因突变中单个基因位点突变的有 48 例, 2 个或 2 个以上同时突变的有 58 例。突变率最高的为 rt180M, 突变率为 39.62% (42/106); 其次是 rt204V, 突变率为 28.30% (30/106); rt184F 及 rt250I 未检测到突变, 突变率为 0, 基因突变位点分布及比例不同, 可能是突变位点存在地区差异^[11-12]。本组有 54 例(占 33.75%)患者标本未检测到突变, 可能标本中的 HBV 存在探针覆盖范围内的基因序列的新碱基多肽而导致无法检测出来^[13]。

参考文献

- [1] GANEM D, PRINCE A M. Hepatitis B virus infection natural history and clinical consequences[J]. N Engl J Med, 2004, 350(3):1118-1129.
- [2] 庄辉. 乙型肝炎流行病学研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2004, 20(3):133-135.
- [3] 侯金林, 孙剑, 王程. 乙型肝炎病毒耐药变异研究的回顾与展望[J]. 中华肝脏病杂志, 2007, 15(1):1-3.
- [4] GNGUS P, VAUGHAN R, XIONG S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in zhe HBV polymerase[J]. Gastroenterol, 2003, 125(1):292-297.
- [5] TENNEY D J, LEVINE S M, ROSE R E, et al. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine[J]. Anti Agents Chem, 2004, 48(1):3498-3507.
- [6] 刘伟, 李代红, 刘纯. PCR-反向点杂交法检测乙型肝炎病毒的基因耐药变异与基因分型[J]. 山东医药, 2013, 53(25):51-53.
- [7] 庄辉. 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.
- [8] 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基因检测[J]. 广东医学, 2008, 29(1):97-98.
- [9] 陈灿峰, 徐传彬, 黄雪辉. 深圳地区乙型肝炎病毒基因分型和预存耐药变异的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, (23):3190-3191.
- [10] 张宝, 李世龙, 葛保民, 等. 乙型肝炎病毒的基因分型及其多药耐药位点变异与耐药性的相关性研究[J]. 中国药业, 2014, 26(11):11-12.
- [11] 阎纳新, 霍建峰, 芦飞, 等. 石家庄地区乙型肝炎病毒基因分型及 P 区耐药基因突变分析[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 20(4):336-338.
- [12] 江浪进, 李金玲. 沈阳地区 90 例乙型肝炎病毒基因分型及耐药变异分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15):2008-2010.
- [13] 庄辉, 李雅娟, 李杰. 乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及临床意义[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(10):724-729.