

乙型肝炎病毒耐药基因变异位点与基因型及病毒载量的关系

戚应杰, 岳 莉, 朱义媛, 刘 杨, 石玉如

(安徽省合肥市传染病医院检验科, 合肥 230022)

摘要:目的 研究 81 例慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒(HBV)耐药基因位点变异状况及其基因型分布特征,并探讨其与 HBV-DNA、乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的关系。方法 采用荧光定量 PCR 和基因芯片反向斑点杂交技术检测 81 例慢性乙型肝炎患者血清 HBV-DNA 载量、基因型和 6 种常见耐药位点;用电化学发光法检测 HBeAg 的含量,用酶法检测患者血清中 ALT、AST 的浓度。结果 81 例慢性乙型肝炎患者中,HBV 基因型 B 型 38 例占 46.9%;C 型 38 例占 46.9%;B、C 混合型 5 例占 6.2%;未发现其他基因型。检测出的 43 例耐药基因位点发生变异:B 基因型 26 例突变率为 60.5%,C 基因型 17 例突变率为 39.5%;其中 rt204V 变异率为 9.3%;rt204I 变异率为 34.9%;rt180M+rt204I/rt204V 变异率为 41.9%;rt181V 变异率为 9.3%;rt236T 变异率为 4.7%。在 43 例出现基因位点变异的患者中,发生 rt204I 变异的 B 基因型占 60%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 5.73±1.77;C 基因型占 40%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 6.93±2.12;发生 rt204V 变异的 B 基因型占 75%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 6.85±2.06;C 基因型占 25%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 4.17±1.15;发生 rt180M+rt204I/rt204V 变异的 B 基因型占 22.2%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 5.89±1.95;C 基因型占 77.8%,HBV-DNA(U/mL)的对数值为 5.58±1.56;发生 rt181V 变异的全部为 C 基因型。结论 HBV 发生变异的位点以 rt204I 位点变异和 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点变异为主;在 HBV 发生变异的位点中 C 基因型更易发生 rt181V 位点和 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点变异,B 基因型可能更易发生 rt204V 位点和 rt204I 位点变异;在发生 rt204V 位点和 rt236T 位点的突变中,HBV-DNA 的载量 B 基因型组明显高于 C 基因型组,在发生 rt204I 位点的突变中 HBV-DNA 的载量 C 基因型组则明显高于 B 基因型组,C 基因型较 B 基因型更易发生耐药位点变异。

关键词:慢性乙型肝炎; 基因型; 耐药基因位点; DNA 检测; 乙型肝炎 E 抗原

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.045

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0392-03

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝 DNA 病毒,主要引起急、慢性肝炎,肝硬化和肝癌等。如果病情反复活动或持续进展,则需要及时给予抗病毒治疗^[1]。HBV 的逆转录酶缺乏校正阅读功能,HBV 的变异率较其他 DNA 病毒高十倍以上,HBV 耐药变异的产生无法完全避免,目前已有报道发现针对拉米夫定(Lamivudine,LAM)以及阿德福韦酯(advofirdipivoxil,ADV)预存耐药变异的病例^[2-3]。因此,加强耐药管理,优化治疗显得更为主动。本研究旨在通过分析 81 例慢性乙型肝炎患者 HBV 耐药突变位点的临床特点、基因型分布及病毒学特征,为临床抗病毒治疗与监测提供参考价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 6 月至 2013 年 6 月在合肥市传染病医院门诊就诊和住院的慢性乙型肝炎(CHB)患者 81 例,其中男 46 例、女 35 例,年龄 18~72 岁,平均(36±11)岁。CHB 的诊断参照《慢性乙型肝炎防治指南(2010 版)》^[1]中的标准,所有病例甲、丙、丁、戊型肝炎均阴性,并按是否发生基因耐药位点变异分为变异组和非变异组。

1.2 试剂与仪器 美国 ABI7300 型实时荧光定量分析仪;厦门安普利 9800 型全自动荧光定量基因扩增仪;日立 H7180 型全自动生化分析仪;罗氏电化学发光仪;深圳亚能分子杂交仪。HBV-DNA 试剂使用厦门安普利公司生产;乙型肝炎 E 抗原(HBeAg)测定使用罗氏公司生产试剂;HBV 基因分型与耐药位点变异检测使用深圳亚能公司生产试剂;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)浓度检测使用宁波美康酶法试剂盒。

1.3 方法 用一次性无菌真空采血管抽取受检者静脉血 2 mL,1 500 r/min 离心 5 min,吸取上层血清,转移至 1.5 mL 灭菌离心管中。标本可立即用于处理,也可-20℃储存备用。荧光定量 HBV-DNA 的检测采用厦门安普利 9800 型全自动

基因扩增仪,试剂由安普利公司提供,按说明书要求操作。HBV 基因分型以及耐药突变基因位点检测,利用 PCR 结合 DNA 基因芯片反向斑点杂交技术,可同时在同一芯片上检测 B、C、D 3 种常见基因型以及 6 个常见突变位点(rt180M、rt207I、rt204I、rt181V、rt236T、rt204V)。HBeAg 定量检测采用电化学发光法;血清 ALT、AST 浓度检测采用动态速率法在生化仪上直接检测结果。

1.4 统计学处理 HBV 病毒载量对数值、ALT、AST 等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,率及构成比等计数资料的比较采用 χ^2 检验,所有数据均采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙型肝炎患者基因型分布及其与 HBV-DNA 载量、HBeAg 水平和 ALT、AST 水平的关系 81 例慢性乙型肝炎患者中,B 型 38 例占 46.9%,C 型 38 例占 46.9%,B、C 混合型 5 例占 6.2%;未发现其他基因型。基因型为 B 型和 C 型两组 HBV-DNA 载量的对数值、HBeAg 水平和 ALT、AST 水平比较,差异均无统计学意义(*P*>0.05),见表 1。

表 1 两种基因型患者 HBV-DNA 载量、HBeAg、ALT、AST 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

基因型	<i>n</i>	HBV-DNA (lg U/mL)	HBeAg (COL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
B 型	38	5.34±2.15	215.8±40.2	119.7±32.5	108.3±26.5
C 型	38	5.26±2.09	261.7±51.1	85.6±20.3	9.8±16.8
<i>t</i>		0.682	1.325	1.568	1.862
<i>P</i>		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 HBV 变异组与非变异组 HBV-DNA 载量、HBeAg、ALT、AST 水平的比较 将 81 例 CHB 患者分为变异组和非变异组。81 例 CHB 患者中 HBV 发生耐药位点变异的为 43 例,占 53.1%。变异组 HBV-DNA 水平明显高于非变异组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);变异组的 ALT 和 AST 水平明显低于非变异组($P < 0.05$);变异组与非变异组的 HBeAg 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 HBV 变异组与非变异组病毒载量、HBeAg、ALT、AST 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HBV-DNA (lg U/mL)	HBeAg (COL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
变异组	43	5.91±2.26	212.3±48.9	131.5±25.6	71.9±15.8
非变异组	38	4.40±2.01	273.3±61.2	338.6±76.3	203.7±44.7
t		2.436	1.863	2.982	4.361
P		<0.05	>0.05	<0.05	<0.01

2.3 HBV 基因突变位点与基因型之间的关系 在 43 例发生耐药基因位点变异的患者中,C 基因型的突变率为 60.5%,B 基因型突变率为 39.5%,二者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 15 例发生 rt204I 位点的突变中,B 基因型突变率为 60.0%,明显高于 C 基因型的 40.0%,在 4 例发生 rt204V 位点的突变中,B 基因型的突变率(75.0%)也明显高于 C 基因型的突变率(25.0%),二者比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);在 18 例发生 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的突变中和发生 rt181V 位点的突变中,C 基因型突变率明显高于 B 基因型的突变率,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 HBV 基因突变位点与基因型之间的关系[n(%)]

突变位点	n	B 型	C 型	χ^2	P
rt204I	15	9(60.0)	6(40.0)	4.326	<0.05
rt180M+rt204I/rt204V	18	4(22.2)	14(77.8)	7.065	<0.01
rt204V	4	3(75.0)	1(25.0)	4.968	<0.05
rt181V	4	0(0.00)	4(100)	8.653	<0.01
rt236T	2	1(50.0)	1(50.0)	0.031	>0.05

2.4 HBV 基因突变位点与病毒载量的关系 在 15 例发生 rt204I 位点的突变中,B 基因型组 HBV-DNA 载量(U/mL)对数值为 5.73±1.77,C 基因型组为 6.93±2.12。在 4 例发生 rt204V 位点的突变中,B 基因 HBV-DNA 载量(U/mL)对数值为 6.85±2.06,C 基因型组为 4.17±1.15,二者比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);而在 18 例发生 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的突变中,B 基因型组和 C 基因型组的 HBV-DNA 载量对数值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨 论

目前,我国流行的 HBV 基因型主要以 B 基因型和 C 基因型为主,HBV 基因型存在地理分布差异,北方以 C 基因型为主,南方以 B 基因型为主^[4-5]。本研究, B 基因型 38 例占 46.9%;C 基因型 38 例占 46.9%;B、C 混合型 5 例占 6.2%;未发现其他基因型,提示本地区 HBV 感染基因型主要为 B 型和 C 型。研究结果提示,B 基因型患者血清 HBV-DNA 水平、HBeAg 水平、ALT 和 AST 的浓度与 C 基因型相比均无明显差异。许利军等^[6]报道 B 基因型患者的 HBV-DNA 水平低于

C 基因型患者,说明在拉米夫定无良好应答的患者中,C 基因型患者更容易出现病毒载量升高。本研究结果与之不符,原因可能系本研究病例数不足及病例选择有关。赵鸿等^[4]对 884 例 HBV 感染者的调查结果表明,未经抗病毒治疗的 B 基因型患者与 C 基因患者之间的病毒载量无明显差别。本研究中表 2 的结果显示,变异组患者中 HBV-DNA 的载量值明显高于非变异组,可能与发生耐药基因位点突变的患者更易发生病毒反弹有关;变异组与非变异组中的 HBeAg 水平无显著性差异;而非变异组中的 ALT 和 AST 水平明显高于变异组,其原因可能是变异组的患者绝大多数为使用核苷酸类药物治疗的 CHB 患者,其肝组织中的炎症程度与 ALT 和 AST 的异常程度并不相关^[13]。

HBV P 区位点变异是 HBV 对核苷(酸)类似物抗病毒药物发生耐药的分子基础,也是病毒反弹的重要原因之一。本研究结果显示,在对 81 例慢性乙型肝炎患者 HBV 耐药基因位点突变检测结果中发现,43 例患者 HBV 发生了耐药基因位点的突变,在 43 例发生基因位点突变的患者中有 15 例发生了 rt204I 位点突变占 34.9%和有 18 例发生了 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的突变占 41.9%,其他位点的突变占 23.2%,提示 rt204I 位点和 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点变异在患者中最为普遍,是主要发生变异的位点,与许利军等^[6]报道一致。在发生 rt204I 位点和 rt204V 位点的变异中,B 基因型患者的突变率明显高于 C 基因型,这一结果可以解释潘小平等^[7]研究提出的在拉米夫定耐药突变后,B 基因型以 YVDD 突变为。在发生 rt181V 位点和 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的突变中,C 基因型患者的突变率则明显高于 B 基因型,提示 B 基因患者易发生 rt204I 位点和 rt204V 位点的变异,而 C 基因型的患者更易发生 rt181V 位点和 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的变异,rt236T 位点变异有待于扩大样本量进一步研究。吴菲等^[8]研究结果显示:阿德福韦酯耐药株感染者 HBV,C 基因型易发生 rtA181V/T 变异,B 基因型多出现 rtN236T 变异,因此,初步认为阿德福韦酯耐药株感染者病毒基因型与多聚酶基因区基因突变存在有一定的相关性,C 基因型比 B 基因型更易出现 rtA181V/T+rtN236T 双突变,故推测阿德福韦酯耐药株感染者 rtA181V/T+rtN236T 双突变可能是造成 C 型患者比 B 型存在更严重肝损害的原因之一。CHB 的发病既与病毒因素有关,又与宿主免疫因素有关^[9]。一些非常见位点变异(如 S256C、L229V 等)虽然未在体外表型测定证实,但是临床调查结果显示其与拉米夫定耐药相关,而这些位点的变异是否在 B、C 基因型之间存在差别需要进一步研究^[10-11]。Yuen 等^[12]的研究结果则显示,B 基因型的 HBV 能活化 Th1 细胞且抑制 Th2 细胞,而 C 基因型相反,提示 B 基因型的 HBV 更能诱发人体的免疫反应,这也可能是 B 基因型的患者较 C 基因型的患者更容易出现良好应答且病毒载量较低的原因之一。在本研究中 C 基因型的突变率为 60.5%明显高于 B 基因型,提示 C 基因型可能更易发生耐药基因位点的突变。

本文对 HBV 不同基因突变位点与病毒载量的关系进行了初步研究,结果发现在发生 rt204I 位点的突变中,B 基因型组 HBV-DNA 载量低于 C 基因型组;在发生 rt204V 位点和 rt236T 位点的突变中,B 基因型组 HBV-DNA 载量则高于 C 基因型组;而在发生 rt180M+rt204I/rt204V 混合位点的突变中,B 基因型组和 C 基因型组的 HBV-DNA 载量无明显差别,关于 HBV 其他基因型的变异特点,还需要扩大样本,作进一

步的研究证实。

总之,HBV 耐药基因突变一方面可出现对药物的耐受性,另一方面其复制能力也受到影响,而 HBV-DNA 载量作为与感染者预后直接相关的因素,决定了病情的进展。如果耐药株较野生株复制能力下降,则相应病毒载量会维持在一个较低水平,反之耐药株复制能力增强则可能加速病情进展。本文对慢乙型肝炎患者 HBV 耐药突变位点的临床特点、基因型分布及病毒学特征进行了初步研究,旨在为临床抗病毒治疗与监测提供参考价值。

参考文献

[1] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学会.慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J].胃肠病学,2011,16(6):351-366.

[2] 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].继续医学教育,2007,21(8):19-21.

[3] 隗佳,王华,李淑莉,等.慢性乙型肝炎患者血清中病毒的 YMDD 自然变异[J].中华肝脏病杂志,2010,18(11):855-856.

[4] 赵鸿,李俊,李兴丰,等.感染乙型肝炎病毒不同基因型和亚型患者的临床特点分析[J].中华流行病学杂志,2007,28(1):74-77.

[5] Zeng G, Wang Z, Wen S, et al. Geographic distribution, virologic and clinical characteristics of hepatitis B virus genotypes in China [J]. J Viral Hepat, 2005, 12(6): 609-617.

[6] 许利军,潘晨,李勤光,等.拉米夫定治疗无良好应答患者乙型肝炎病毒 P 区突变与基因型的关系[J].中华肝脏病杂志,2010,18

(3):180-183.

[7] 潘小平,李兰娟,杜维波,等.对拉米夫定耐药患者乙型肝炎病毒基因型与病毒载量及其核苷酸序列分析[J].中华传染病杂志,2007,25(5):285-288.

[8] 吴菲,吕铁锋,郭晓凤,等.阿德福韦酯耐药株感染者乙型肝炎病毒基因型和多聚酶区基因变异分析[J].医学研究杂志,2013,42(1):122-124.

[9] Kreutz C. Molecular, immunological and clinical properties of mutated hepatitis B viruses[J]. J Cell Mol Med, 2002, 6(1): 113-143.

[10] Ciancio A, Smedile A, Rizzetto M, et al. Identification of HBV DNA sequences that are predictive of response to lamivudine therapy[J]. Hepatology, 2004, 39(1): 64-73.

[11] 邓俊,张东华,于德敏,等.核苷(酸)类耐药患者中乙型肝炎病毒逆转录酶区基因变异类型及其特点[J].中华肝病杂志,2009,17(5):342-345.

[12] Yuen MF, Wong D, Zheng BJ, et al. Difference in T helper responses during hepatitis flares in hepatitis B e antigen (HBeAg)-positive patients with genotypes B and C: implication for early HBeAg seroconversion[J]. J Viral Hepat, 2007, 14(4): 269-275.

[13] 金福顺,吴晓鹭,刘家俊,等.慢性乙肝患者血清转氨酶变化与肝组织学炎症程度相关性的研究[J].福建医药杂志,2005,27(6): 139-141.

(收稿日期:2014-10-21)

• 临床研究 •

HIV 并发结核病患者生命质量相关危险因素分析

朱荣华¹,杨雪梅²,张积勇³

(1. 保山市中心血站,云南 678000;2. 保山市隆阳区丙麻中心卫生院,云南 678000; 3. 保山市隆阳区疾病预防控制中心,云南 678000)

摘要:目的 了解人类免疫缺陷病毒(HIV)并发结核双感患者治疗、转归情况,分析影响治疗转归的影响因素,探讨因素之间的相互关系,评价各种因素对双感患者生命质量的影响及其相对重要性,为指导临床治疗、研究和卫生决策提供有价值的信息。

方法 对 2007~2012 年隆阳区疾病预防控制中心登记的 HIV 并发结核双感患者的治疗情况进行统计回顾分析。**结果** 2007~2012 年共登记治疗 HIV 并发结核双感患者 82 例,结核治愈 59 例,治愈率为 71.95%;死亡 20 例,失访 2 例,拒绝治疗 1 例。男女间病死率比较差异有统计学意义($\chi^2=32.44, P<0.05$);以是否进行艾滋病抗病毒治疗分组,两组间病死率比较,差异有统计学意义($\chi^2=25.78, P<0.05$);以痰涂片结果分组,两组间病死率比较差异无统计学意义($P>0.05$);经过多因素 logistic 回归分析,痰涂片结果、年龄、抗结核治疗基线 CD4 检测值是双感染患者死亡独立的危险因素;病死率与 CD4 基线数值呈负相关(Pearson 相关),相关系数 $r=-0.37(P<0.01)$ 。**结论** 早发现、早诊断、早治疗,监测患者的 CD4 检测结果,CD4 检测值与 HIV 并发 TB 患者的生命质量存在线性相关。

关键词:人类免疫缺陷病毒; 肺结核; 回归分析; CD4

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.03.046

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)03-0394-03

艾滋病又称获得性免疫缺陷综合征(AIDS),是由人类免疫缺陷病毒(HIV)引起,以侵犯 CD4⁺T 淋巴细胞(简称 CD4)为主要特征的疾病。结核病(TB)是人类历史上最古老的慢性传染性疾病,是单一感染因素引起死亡人数最多的疾病^[1],因此结核病已成为世界范围内最大紧迫的公共卫生问题之一。我国是结核病高疫情国家,随着 AIDS 患者的病情进展,AIDS 并发 TB 已明显影响了患者的生活质量和寿命。本中心自 2007 年起在 AIDS 患者中每年进行一次结核筛查,在管理的结核患者中每年进行一次 HIV 抗体测定,截止 2012 年共发现 AIDS 并发结核病共计 82 例,现将其分析报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 资料来源于隆阳区疾病预防控制中心 2007~2012 年发现并登记的 AIDS 并发 TB 的双重感染患者 82 例。其中男 63 例,女 19 例,平均年龄 38.39 岁(P25、P50、P75 分别为 32、36、45 岁),最大年龄 79 岁,最小年龄 2 岁。

1.2 方法

1.2.1 CD4 检测 CD4 检测采用流式细胞仪。在抗结核治疗前进行一次 CD4 检测,在化疗结束进行一次 CD4 检测。

1.2.2 痰检质控 疗程内 2、5、6 月末痰涂片检查。

1.2.3 结核化疗方案 按卫生和计划生育委员会结核病防治