

• 论 著 •

乙型肝炎基因分型同耐药位点突变的关系研究

郑志远

(梅州市人民医院检验科, 广东梅州 514031)

摘要:目的 探讨耐药位点突变与乙型肝炎病毒(HBV)基因分型及其他临床信息的相关性。方法 以 358 例慢性乙型肝炎(CHB)患者为研究对象,采用聚合酶链反应(PCR)-反向点杂交法检测耐药位点及基因分型。收集患者血清 HBV DNA 载量、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,以及乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、性别、年龄、核苷(酸)类似物用药时间等临床资料。结果 所有标本均成功扩增阳性条带。HBV 基因型以 B 型(267 例)为主,其次为 C 型(81 例)、D 型(10 例)。使用核苷(酸)类似物的 311 患者中完全野生型 269 例,未用药的 47 例患者均未见耐药突变。耐药位点突变以 204 及 180/204 位点突变为主。耐药突变与患者性别、年龄、血清 HBV DNA 载量、病毒基因型、ALT 水平及 HBeAg 无明显相关性($P>0.05$);用药时间越长,耐药突变率越大($P<0.05$);180 位点突变与 204 位点突变有一定相关性($P<0.05$)。结论 PCR-反向点杂交技术可有效检测 HBV 基因型及突变位点,可有效指导临床用药。

关键词:乙型肝炎; 聚合酶链反应-反向点杂交; 耐药位点突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.13.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)13-1905-03

Study on relationship between hepatitis B virus genotypes and drug resistance mutation

Zheng Zhiyuan

(Department of Clinical Laboratory, Meizhou City People's Hospital, Meizhou, Guangdong 514031, China)

Abstract: Objective To explore correlations between hepatitis B virus (HBV) genotyping, other clinical information and drug resistance mutations. **Methods** 358 cases of patients with chronic hepatitis B (CHB) were selected as subjects, and the resistance loci and genotypes were detected by using the polymerase chain reaction (PCR)-reverse dot blot technique. Clinical data, such as serum HBV DNA loads, serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and hepatitis B virus e antigen (HBeAg), gender, age and length of nucleoside analogues use were collected. **Results** All samples were successfully amplified positive band. Type B (267 cases) was the main HBV genotype, followed by type C (81 cases) and type D (10 cases). In the 311 cases of patients taking nucleoside analogues, 269 cases were completely wild type. No drug resistance mutation was found in 47 cases of patients not taking medicine. The drug resistance mutations mainly occurred in 204 and 180/204 site. There was no significant correlation between resistance mutations and gender, age, serum HBV DNA loads, genotype, serum levels of ALT and HBeAg ($P>0.05$). While the medication time was longer, the incidence of resistant mutants was greater ($P<0.05$). The 180 mutation had a certain correlation with 204 site mutation ($P<0.05$). **Conclusion** PCR-reverse dot blot technology can effectively detect the HBV genotype and mutations, which could effectively guide the clinical medication.

Key words: hepatitis B; polymerase chain reaction-reverse dot blot; drug resistance mutation

随病程发展,乙型肝炎(简称乙肝)可进一步导致肝硬化、肝功能衰竭等危险疾病,直接威胁患者生命安全^[1]。核苷(酸)类似物为临床治疗乙肝的一线药物,具有起效迅速、不良反应轻等优势^[2]。但此类药物均作用于乙型肝炎病毒(HBV)基因 RT 区,长期应用易导致耐药性突变,严重影响药物作用效果。研究指出 HBV 病毒药物靶位氨基酸替代是耐药性突变的基础,因此临床检测 HBV 耐药位点突变能够有效指导用药^[3],但关于耐药位点突变与乙肝基因分型间关系的研究并不多见。基于此,本研究首先建立了一套可有效检测 HBV 基因分型及耐药位点突变的方法,并探讨了耐药位点突变与 HBV 基因分型及其他临床信息的相关性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 8 月至 2014 年 8 月入院,参考《慢性乙型肝炎防治指南》^[4]确诊为慢性乙型肝炎(CHB)的患者 358 例,男 249 例,女 109 例;年龄 31~61 岁,平均(40.3±9.2)岁;病程 1~17 年,平均(5.7±2.1)年;纳入的所有患者均知情同意。按患者是否服用核苷类似物(包括拉米夫定、阿德福韦、恩

替卡韦、替比夫定等)将患者分为用药组($n=311$)及未用药组($n=47$)。本研究已得到院伦理委员会批准。

1.2 仪器与试剂 HBV 检测试剂盒由亚能生物有限公司提供, DNA 提取用离心柱法。主要仪器包括低温离心机(湘仪公司)、聚合酶链反应(PCR)仪(德国 Eppendorf 公司)、恒温杂交仪(亚能生物技术有限公司)等。

1.3 方法

1.3.1 试验方法 一般流程如下:(1)提取 HBV DNA。将 HBV DNA 提取液 I 及待测标本 200 μ L 置入 1.5 mL 离心管,高速离心 5 min,弃上清液,置入提取液 II,低速离心后行 100 $^{\circ}$ C 沸水浴,再行数秒低速离心后,加入三氯甲烷,高速离心,取上清液。(2)PCR 扩增。PCR 反应管稍离心,做好标记,置入 1.5 μ L 待测样品,为质量控制,另取 PCR 反应管加入阳性及阴性质控品。按试剂说明书行 PCR 扩增。(3)杂交。取 15 mL 塑料离心管,放入标记后的膜条,加入 A 液,并将 PCR 产物放入 A 液底。沸水浴 10 min,置入 47 $^{\circ}$ C 杂交管 90 min;另取 50 mL 离心管,置入 B 液,预热。(4)同时行洗膜及孵育

后,参考说明书显色。

1.3.2 其他临床信息 行常规实验室检测,收集患者血清 HBV DNA 载量、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)检测结果,同时收集患者性别、年龄、核苷类似物使用时间。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计学软件进行数据处理与统计分析,计数资料以百分率表示,单因素相关性分析采用 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 本研究所有标本均成功扩增阳性条带,显色质控点 CC 正常显色,而质控品也显色良好,未出现污染。总体情况为 B 型 267 例,C 型 81 例,D 型 10 例。

2.2 HBV 基因耐药位点突变情况

2.2.1 HBV 基因耐药位点 所有标本均成功测序,311 例用药患者中,完全野生型 269 例,其余 42 例(13.5%)突变情况如下:(1)单位点突变中 204 位点突变 18 例(42.8%),180 位点

突变 3 例(占 7.1%),181 位点突变 1 例(2.4%),236 位点突变 1 例(2.4%);(2)两位点突变中 180/204 位点突变 12 例(28.6%),181/236 位点突变 3 例(7.1%),204/207 位点突变 2 例(4.8%);(3)三位点突变中 180/181/236 位点突变 1 例(2.4%),180/181/204 位点突变 1 例(2.4%)。47 例未用药患者未见耐药位点突变情况。

2.2.2 变异情况 180 位点共发生变异 17 例,占 40.5%(17/42);204 位点共发生变异 33 例,占 78.6%(33/42),两者突变百分率在所有位点中占前两位,且存在同时突变情况,故相关性分析以上述两位点突变为因变量,做代表性分析。

2.3 HBV 耐药位点突变与乙肝基因型及其他临床因素相关性 单因素分析指出:180 位点及 204 位点耐药突变与患者性别、年龄、血清 HBV DNA 载量、病毒基因型、ALT 水平及 HBeAg 无明显相关性($P>0.05$);核苷类似物用药时间越长,耐药突变概率越大($P<0.05$)。见表 1。

表 1 HBV 耐药位点突变与其他临床因素相关性分析[n(%)]

临床因素	n	180 位点突变(n=17)			204 位点突变(n=33)		
		突变率	χ^2	P	突变率	χ^2	P
性别							
男	249	11(4.4)	0.198	0.656	23(9.2)	0.000	0.985
女	109	6(5.5)			10(9.2)		
年龄(岁)							
≤50	268	11(4.1)	0.978	0.323	21(7.8)	2.433	0.119
>50	90	6(6.7)			12(13.3)		
血清 HBV DNA(copies/mL)							
≥105	193	10(5.2)	0.173	0.677	21(10.9)	1.384	0.239
<105	165	7(4.2)			12(7.3)		
HBV 基因型							
B 型	267	12(4.5)	0.150	0.698	25(9.4)	0.027	0.871
其他型	91	5(5.5)			8(8.8)		
ALT 水平(IU/L)							
≥200	140	6(4.3)	0.109	0.741	16(11.4)	1.343	0.247
<200	218	11(5.0)			17(7.8)		
HBeAg							
阳性	225	12(5.3)	0.458	0.499	23(10.2)	0.730	0.393
阴性	133	5(3.8)			10(7.5)		
核苷类似物用药时间(月)							
≤6	53	0(0.0)	8.842	0.012	1(1.9)	16.770	0.000
6~12	133	3(2.3)			5(3.8)		
>12	172	14(8.1)			27(15.7)		

2.4 180 位点与 204 位点突变相关性 180 位点与 204 位点突变存在明显相关性($\chi^2=5.504,P=0.019$)。见表 2。

表 2 180 位点与 204 位点突变相关性[n=358,n(%)]		
位点	野生型	突变型
180 位点	341(95.3)	17(4.7)
204 位点	325(90.8)	33(9.2)

3 讨 论

乙肝在我国发病率较高,其主要由 HBV 感染所致,因此

临床治疗强调抑制 HBV,同时扭转肝功能衰退^[5]。核苷(酸)类似物为临床治疗乙肝的一线药物,常见包括拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦等,在早期应用时均可达到较为显著的疗效,且其用药方便、不良反应少。但临床研究证实,长期应用此类药物易产生抗药性,且相同位点变异可能影响多种药物疗效^[6]。本研究 311 例患者开始应用此类药物,耐药位点突变率高达 13.5%,在同类研究中居于较高水平。这一方面可能是因为该地区患者多应用拉米夫定,可能已形成区域性耐药;同时也可能是因为本研究纳入患者多已开始应用药物 6 个月以上,更易

形成各种耐药性突变;当然,也可能与样本量过少有关。但无论具体原因如何,均提示必须找到合理有效的方案检测该地区患者耐药性突变情况,从而指导合理应用药物。

本研究首先证实了 PCR-反向点杂交法能够有效应用于乙肝基因分型及耐药位点突变的检测,其他也有基因芯片等技术的研究^[7],均表明 HBV 出现针对某药物的耐药性时,其基因会发生较为明确的突变,有研究进一步证实表型耐药出现前 30~90 d,即可能已出现基因型耐药。

既往针对 HBV 耐药位点突变的研究,已证实长期应用核苷(酸)类似物后,204 位点突变率明显高于其他位点,且常见突变类型为 YIDD 和 YVDD,同时 180 位点多同时发生突变^[8]。考虑到两位点为拉米夫定和恩替卡韦的主要靶点,笔者认为这与这两类药物在我国的大面积使用有一定关系。与上述观点一致,该地区乙肝患者多以这两类药物为主进行治疗,且本研究指出 204 位点与 180 位点突变率处于较高水平。本研究同时还通过巢式 PCR 技术对乙肝基因进行分型,结果指出我国 HBV 主要为 B、C 型,有少量 D 型,且绝大部分为 C 型患者,这与同类研究结论一致^[9]。

同时,本研究探讨了耐药位点突变与基因分型及其他临床因素的相关性,结果指出 180 及 204 位点突变仅与药物使用时长有关,而与其他临床因素均明显无相关性。同时,上述两位点突变发生率也存在一定相关性,二者同时发生概率较高。这提示对出现拉米夫定(或恩替卡韦)耐药的患者,不宜仅将药物变更为恩替卡韦(或拉米夫定)。本研究还显示基因型与耐药位点突变无明显关系,但刘艾芹等^[10]研究指出 C 基因型更易出现耐药,但这可能与区域不同或样本量差异有关。

综上所述,本研究首先证实我国 HBV 基因分型主要为 B、C 型、长期应用核苷(酸)类似物后,180 位点及 204 位点最易出现突变,其次还指出乙肝基因分型可能与耐药位点突变无直

接关系,仅用药时间长短可能影响突变发生率。这说明对长期应用此类药物治疗的患者,需要积极检测病毒突变情况,以指导及时更换药物,改善预后。

参考文献

- [1] 叶非,李晓鸥,过建春,等. 32 例慢性乙型肝炎患者 HBV P 区的多位点耐药突变分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(3): 208-210.
- [2] 姚光弼,任红,徐道振,等. 慢性乙型肝炎患者持续应用恩替卡韦治疗 3 年的疗效[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(12): 881-886.
- [3] 刘彦轩,郭盛菊. 拉米夫定耐药乙型肝炎患者 HBV 多聚酶区基因突变的检测[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(7): 845-848.
- [4] 中华医学会肝病学分会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 13-24.
- [5] 徐丙发,秦侃,范鲁雁. HBV 对 IFN- α 产生耐药性机制的研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(35): 108-109.
- [6] 娄红梅,刘洪海. 乙型肝炎病毒基因自然变异耐药性与 HBV DNA、HBeAg、ALT 及 AST 相关因素分析[J]. 广东医学, 2012, 33(9): 1279-1281.
- [7] 李延武. 利用基因芯片技术研究乙肝病毒耐药机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, 21(12): 1303-1304.
- [8] 代红莹,王伟伟,朱天金,等. 永川地区慢性乙型肝炎患者病毒基因分型及耐药性研究[J]. 重庆医学, 2013, 42(36): 4395-4396.
- [9] 徐玲娟,盛秀胜. 核苷(酸)类药物治疗慢性乙肝患者 HBV 逆转录酶区基因耐药的变异分析[J]. 温州医学院学报, 2011, 41(5): 435-438.
- [10] 刘艾芹,唐曙明,陈卫布,等. 深圳地区乙肝病毒基因分型与耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1787-1788.

(收稿日期:2015-04-28)

Harmony™ 无创产前检测开创唐氏综合征筛查新纪元

日前在北京举行的“第二届中国母胎医学大会”上,罗氏诊断 Ariosa 公司首席医疗官 Thomas J Musci、国际商务拓展总监 Sabah Oney 与众多围产医学、产前诊断、超声影像、儿科及医学遗传学等专家一同深入探讨了唐氏综合征无创产前检测的最新技术及临床应用,并分享了 Harmony™ 无创产前检测产品的技术革新及临床研究成果。

随着医疗技术和医学观念的不断进步,一种新兴的无创产前检测(NIPT)在全球得以迅速应用,因其更高的准确性与安全性正逐渐得到业内专家的高度重视与广泛认可。临床实验发现,胎儿游离 DNA 在母体外周血中平均比例约为 10%。发表于 2013 年 Prenatal Diagnosis 杂志上的临床研究显示,对 22,384 例样本进行分析发现,2% 的样本胎儿游离 DNA 比例小于 4%。

Thomas J Musci 教授解释:“这部分样本胎儿游离 DNA 比例过小,与母体体重、过小妊娠周期等孕征密切相关,导致其检测结果对识别是否患有 21-三体综合征是不准确、不可信的。而 Harmony™ 技术中针对 21-三体检测优化的专利分析 FORTE™ 算法能整合胎儿游离 DNA 比例、母亲年龄及孕周等参数,更清晰地区分阳性和阴性结果,将假阳性率控制在 0.1% 以内。”

在对 11,994 例低风险妊娠病例(母亲年龄<35 岁)进行的亚分析中,Harmony™ 检测鉴别 21-三体综合征的假阳性率为 0.05%,阳性预测值为 76%。在总研究人群中,Harmony™ 检测具有相同出色的表现。II 期研究使用 FTS 和 Harmony™ 对 18-三体、13-三体的检测结果发现,基于 cfDNA 的 Harmony™ 检测对 18-三体和 13-三体同样具有更高的敏感性和阳性检出率以及更低的假阳性率。

此外,专家建议每一位孕妇都应该进行产前筛查。NEXT 研究也证实了 Harmony™ 检测对于 18~50 周岁适龄孕妇的可行性,其对高危孕妇和低危孕妇的检测敏感性和阳性检出率均高于 FTS。

目前,Harmony™ 检测通过大量的临床数据集被证实符合美国临床实验室改进修正案(CLIA)、美国病理学家学会(CAP)和实验室开发诊断试剂监管模式(LDT)认证,预计将于今年 10 月底完成欧盟 CE 认证注册。目前,全世界范围内已有 100 多个国家和地区采用了 Harmony™ 无创产前检测,并已指导超过 45 万名妊娠女性的临床护理。