

## 慢性乙型肝炎患者拉米夫定耐药快速检测

綦盛麟 宋连平 石铭 祝英华 徐永平

**【摘要】 目的** 探索一种经济、快速、敏感的检测拉米夫定耐药的新方法。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 法检测 145 例拉米夫定治疗患者及 98 例未治疗患者拉米夫定耐药病毒株的变异率,以实验组与对照组中 PCR 反应循环数的变化( $\Delta Ct$ )计算病毒的变异率,同时与测序结果对比。**结果** 145 例患者中,42 例出现变异,变异率为 5% ~ 100%,6 例本实验结果与测序不符合,实时荧光定量 PCR 结果为出现变异,变异率为 5% ~ 20%,该结果经亚克隆证实,而测序未发现变异。98 例未接受治疗患者中 5 例出现变异,变异率为 10% ~ 20%。**结论** 与测序方法相比,实时荧光定量 PCR 为一种检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异的快速、敏感且经济的方法。

**【关键词】** 乙型肝炎病毒; YMDD; 变异; 实时定量 PCR

**Rapid quantitation of lamivudine-resistant mutants in patients with chronic hepatitis B** *QI Sheng-lin, SONG Lian-ping, SHI Ming, ZHU Ying-hua, XU Yong-ping. No. 6 Hospital of Dalian, Dalian 116001, China*

*Corresponding author: SHI Ming, Email: zhsh6655@sohu.com*

**【Abstract】 Objective** To search for a new method for detecting lamivudine resistant mutants rapidly, economically and sensitively. **Methods** Real-time PCR was employed to detect the percentage of lamivudine resistant mutants of 145 lamivudine-treated and 98 untreated patients with chronic hepatitis B. This percentage was calculated as the PCR efficiency raised to the differences between threshold cycle number ( $\Delta Ct$ ) of mutant and control reactions. Serum samples from 145 lamivudine-treated and 98 untreated patients with chronic hepatitis B virus infection were analyzed using this method and compared with DNA sequencing. **Results** Among the 145 patients treated with lamivudine, 42 of them had mutants with percentages of 5% -100%. In six discordant results between real-time PCR and DNA sequencing, real-time PCR detected mutants with percentages of 5% -20%, which were concordant with subcloning. Five of 98 lamivudine-untreated patients had mutants of 10% -20% in wild-type virus populations. **Conclusions** Real-time PCR is a rapid, sensitive and economical method for detecting lamivudine resistant mutants.

基金项目:国家自然科学基金(30371053);国家杰出青年基金(30125034)

作者单位:116001 大连市第六人民医院(綦盛麟、宋连平、石铭、祝英华);大连理工大学(徐永平)

通讯作者:石铭 Email: zhsh6655@sohu.com

**【Key words】** Hepatitis B virus; YMDD; Mutation; Real-time PCR

乙型肝炎病毒(HBV)是导致肝硬化和肝癌的重要因素,全世界约有3.5亿乙型肝炎病毒感染者。拉米夫定是抑制病毒的有效药物之一,但长期用药易出现乙型肝炎病毒YMDD变异,从而导致耐药的产生<sup>[1,2]</sup>。YMDD变异即HBV逆转录酶的保守序列YMDD中M(蛋氨酸)被V(缬氨酸)或被I(异亮氨酸)所取代,变异后成为YVDD(rtM204V)或YIDD(rtM204I)<sup>[3,4]</sup>。YMDD变异使患者体内病毒复制出现反弹,因此,乙型肝炎病毒YMDD快速检测对患者实施个体化治疗方案具有重要意义<sup>[5]</sup>。YMDD变异的分子生物学检测方法很多,然而,这些方法在临床实践中费时、检测费用昂贵<sup>[6]</sup>。本研究拟建立一种经济、快速、敏感的检测拉米夫定耐药的新方法。

## 资料和方法

### 一、研究对象

收集我院慢性乙型肝炎患者血清标本243例,其中145例为接受拉米夫定治疗的患者,时间为9个月~3年。98例未接受任何抗病毒治疗,每例患者保留血清50 μl,提取HBV DNA。试剂盒采用QIAamp,具体参考文献报道<sup>[7]</sup>。

### 二、研究方法

1. 质粒控制:含YVDD的标准质粒与野生毒株按照100%、50%、10%、1%、和0.1%比例稀释,病毒总的含量分别为 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 拷贝/ml。145例拉米夫定治疗患者和98例未治疗的乙型肝炎患者实时荧光定量PCR结果与测序结果相比对。

2. 引物及探针设计:用primer express software软件设计,YMDD、YVDD、YIDD检测共用上游引物及探针,引物具体序列如下:上游引物:5'-CCTATGG-GAGTGGGCTC-3',下游引物C:5'-GCCCCCAATACCACATCATC-3',下游引物V:5'-CCCAATACCACATCATCCAC-3',下游引物I:5'-CCCCCAATACCACAT-CATCA-3',探针:5'-AGCCCTACGAACCACTGAAC-3'。

3. 病毒变异率计算:YVDD变异株及YIDD变异株同时检测,引物对的区别仅限于下游引物不同。整个反应在ABI7500上进行,反应条件为:50℃ 2 min, 95℃ 5 min, 94℃ 20 s, 53℃ 30 s, 40个循环,反应体系为:总体积50 μl,模板5 μl, 1×PCR反应液,100 nmol/L引物和探针,400 μmol/L dNTP, 1.5 μl Taq DNA聚合酶。当反应中有荧光信号出现时的循环数(Ct值)做为阈值,病毒变异率计算公式为<sup>[8]</sup>:(1)  $\Delta Ct = Ct_{\text{控制}} - Ct_{\text{变异}}$ ; (2) 变异率 =  $2^{\Delta Ct}$ 。

4. HBV亚克隆:乙型肝炎病毒亚克隆的引物及方法按照Kobayashi等<sup>[9]</sup>文献报道方法。

5. HBV DNA扩增体系为1×PCR缓冲液,95℃ 5 min,94℃ 20 s,53℃ 30 s,40个循环。

## 结 果

### 一、检测的灵敏度与检测限

YVDD 变异株与野生株混合后浓度分别为  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  拷贝/ml, 每份管中 YVDD 变异株的比例分别为 100%、50%、10%、1% 和 0.1%。除了  $10^5$  拷贝/ml 中 0.1% 稀释倍数时 YVDD 变异株检测阴性, 其他浓度的混合株均能测到 (图 1、表 1)。检测值与理论值相符, 检测限为 1000 拷贝/ml。

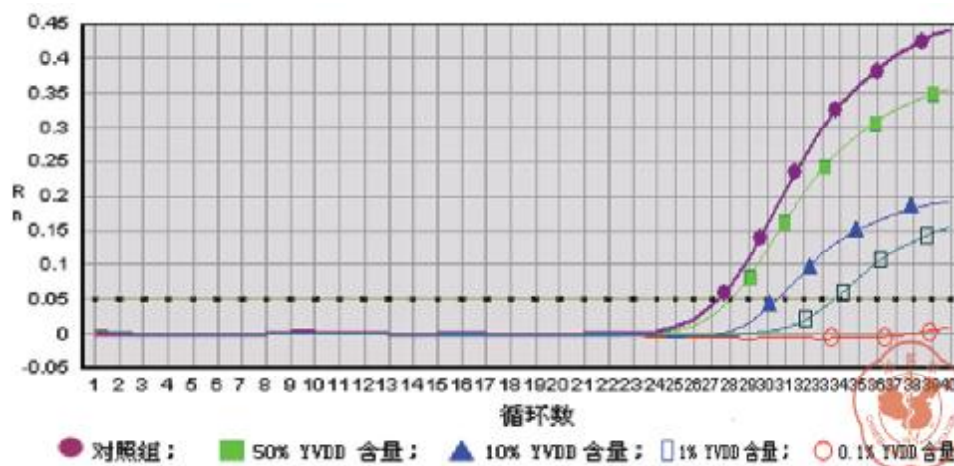


图 1 病毒含量为  $10^5$  拷贝/ml 时实时荧光定量 PCR 检测 YVDD 质粒变化

表 1 病毒含量为  $10^5$  拷贝/ml 时实时荧光定量 PCR 检测 YVDD 质粒变化

| YVDD 病毒稀释倍数 | 实时定量检测结果 | $\Delta C_t$ | 检测值 |
|-------------|----------|--------------|-----|
| 100%        | YVDD     | -0.11        | 93% |
| 50%         | YVDD     | -0.73        | 60% |
| 10%         | YVDD     | -3.24        | 11% |
| 0.1%        | YMDD     | ND*          | 0   |

注:ND 未检测到 YVDD 变异。

### 二、实时荧光定量 PCR 与测序对比

145 例拉米夫定治疗组中, 111 例 HBV DNA(+) 患者进行了序列鉴定, PCR 与测序结果符合的为 105 例(69 例 YMDD、19 例 YIDD、17 例 YVDD)。其中, 6 例实时 PCR 检测为混合株变异, 而测序为野生株, 实时 PCR 检测为 5 例 YVDD, 1 例 YIDD 变异, 而测序 6 例均为 YMDD。这些病例均服用拉米夫定超过 9 个月, 病毒变异率 < 20%, 低于测序检测限 (见表 2)。98 例未接受治疗的乙型肝炎患者, 4 例为 YVDD 变异。变异率为 10% ~ 20%, 1 例为 YIDD, 变异率为 60%, 对此 5 例标本进行了测序, 结果与上述相符。

### 三、检测时间及费用

血清提取耗时 0.5 h, 实时 PCR 1 h, 整个反应时间为 1.5 h。测序时间大约需 7 h。本研究检测费用约 10 元, 而测序需 15 元。

表2 治疗组6例实时荧光定量PCR检测与测序结果不符

| 服用拉米夫定时间(月) | 测序结果   | 实时荧光定量PCR结果 | 病毒变异百分率 |
|-------------|--------|-------------|---------|
| 9           | rtM204 | rtM204V     | 20%     |
| 9           | rtM204 | rtM204V     | 20%     |
| 10          | rtM204 | rtM204V     | 5%      |
| 11          | rtM204 | rtM204I     | 5%      |
| 13          | rtM204 | rtM204      | 6%      |
| 13          | rtM204 | rtM204V     | 6%      |

## 讨 论

乙型肝炎病毒 YMDD 变异检测常用方法为测序,这种方法昂贵,步骤繁琐,且灵敏度低。为了克服测序法的局限性,其他的分子生物学方法也相继产生,如限制性酶切分析(RFLP)、核酸分析、线性探针分析、分子信标技术、实时荧光放大信号变异分析、芯片技术和竞争分辨 PCR 等。然而,这些方法在临床实践中,有的费用昂贵,有的检测时间较长,不利于临床诊疗。

本研究建立了一种可以大样本检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异率的方法,检测的敏感度为 1000 拷贝/ml,本方法比测序的敏感度高(<20%),且实验过程不需要 DNA 标准品,仅根据对照组与实验组间反应循环数的差异( $\Delta Ct$ )便可计算出变异率。

以总乙型肝炎病毒含量作为对照组,检测总的乙型肝炎病毒、YVDD、YIDD 毒株的上游引物及探针是一样的,而下游引物及扩增片段也几乎相同,因此各样本间的 PCR 扩增效率也几乎相同,将各样本间由于扩增而造成的误差降到最低。

总之,本研究可以不需要 DNA 标准品便可以检测出乙型肝炎病毒的变异率,且快速、经济、敏感,为乙型肝炎病毒患者应用拉米夫定治疗过程中监测病毒变异率变化发挥积极作用。

## 参 考 文 献

- 1 Leung NW, Chang TT, Guan R, et al. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B eantigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology*, 2001, 33:1527-1532.
- 2 Hu KQ. A practical approach to management of chronic hepatitis B. *Int J Med Sci*, 2005, 2:17-23.
- 3 Allen MI, Deslauriers M, Andrews C, et al. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Lamivudine clinical investigation group. Hepatology*, 1998, 2:1670-1677.
- 4 Niesters HG, De Man RA, Pas SD, et al. Identification of a new variant in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene selected during lamivudine therapy. *J Med Microbiol*, 2002, 51:695-699.
- 5 Pillier C, Castera L, Soulier A, et al. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol*, 2006, 80:643-653.
- 6 Sablon E, Shapiro F. Advances in molecular diagnosis of HBV infection and drug resistance. *Int J Med Sci*, 2005, 2:8-16.
- 7 Cane PA, Cook P, Ratcliffe D, et al. Use of real-time PCR and fluorimetry to detect lamivudine resistance-associated mutations in hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43:1600-1608.
- 8 Bernard PS, Wittwer CT. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*, 2002, 48:1178-1185.
- 9 Kobayashi S, Ide T, Sata M. Detection of YMDD motif mutations in some lamivudine-untreated asymptomatic hepatitis B virus carriers. *J Hepatol*, 2001, 34:584-586.

(收稿日期:2008-03-25)

(本文编辑:王丹静)

慕盛麟,宋连平,石铭,等.慢性乙型肝炎患者拉米夫定耐药快速检测[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(3):178-181.