

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.20.015

两种方法检测 HBV 基因分型比较及基因型检出率与 HBV DNA 定量的关系

张瑞芹, 刘娜, 冯继红, 徐光华, 陈延平

(延安大学附属医院感染病科实验室, 陕西延安 716000)

摘要:目的 分析磁珠法与煮沸法检测乙型肝炎病毒(HBV)基因分型的优势,进一步分析基因型检出率与 HBV DNA 定量的关系。**方法** 选取 2013 年 10 月至 2016 年 7 月、2017 年 1 月至 2018 年 1 月该院感染病科就诊的 1 943 例慢性乙型肝炎患者作为研究对象。其中 2013 年 10 月至 2016 年 7 月采用提取 HBV DNA, 进一步采用荧光探针聚合酶链反应(PCR)检测乙型肝炎基因分型。2017 年 1 月至 2018 年 1 月采用 Abbot m2000 提取的 HBV DNA(磁珠法),进一步采用荧光探针 PCR 检测乙型肝炎基因分型。比较两种检测方法的结果差异。根据基因分型结果分析基因分型的检出率与 HBV DNA 定量水平的关系。**结果** 磁珠法提取的 HBV 基因型检出率显著提高($P < 0.05$),但是磁珠法检测 C 型检出率降低,B、D 型检出率更高($P < 0.05$)。HBV 基因型检出率随着 HBV DNA 水平的升高而升高($P < 0.05$)。**结论** 相对于煮沸法提取的 HBV DNA,磁珠法更能够提高乙型肝炎基因分型阳性率,并且能够提高非 C 型以及低病毒载量的患者检出率,更值得应用于临床。

关键词:乙型肝炎病毒; 基因分型; 磁珠法; 煮沸法

中图法分类号:R373.2+1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)20-3053-03

Comparison of two methods for detecting genotype and relationship between genotype detection rate and HBV DNA quantification

ZHANG Ruiqin, LIU Na, FENG Jihong, XU Guanghua, CHEN Yanping

(Laboratory, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yanan, Shaanxi 716000, China)

Abstract: Objective To analyze the superiority of immunomagnetic beads method and boiling method for detecting hepatitis B virus (HBV) genotype and to further analyze the relationship between genotype detection rate and HBV DNA, quantification. **Methods** A total of 1 943 patients with chronic hepatitis B in the infectious department of this hospital from October 2013 to July 2016, January 2017 to January 2018 were selected as the research subjects. Among them, the boiling lysis method from October 2013 to July 2016 was adopted to extract HBV DNA, and further adopted fluorescence probe polymerase chain reaction (PCR) to detect hepatitis B genotype; the Abbot M2000 (magnetic beads method) from January 2017 to January 2018 was adopted to extract HBV DNA, and further adopted fluorescence probe PCR to detect hepatitis B genotype. The differences between of results were compared between the two detection methods. The relationship between the genotype detection rate and HBV DNA quantitative level was analyzed according to genotyping results. **Results** The detection rate of magnetic bead method for extracting HBV genotype was significantly increased ($P < 0.05$), but the detection rate of magnetic bead method for detecting genotype C was decreased and which for detecting genotype B and D was higher ($P < 0.05$). The detection rate of HBV genotype was increased with the increase of HBV DNA level ($P < 0.05$). **Conclusion** Compared with the boiling method for extracting HBV DNA, the magnetic beads method can more increase the positive rate of HBV genotyping, and can increase the detection rate of the patients with non-genotype C and low viral loading, which is more worthy of clinical application

Key words: hepatitis B Virus; genotype; boiling lysis method; magnetic beads method

慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染是最严重的感染性疾病之一,也是肝硬化和肝癌死亡的主要危险因素之一^[1-3]。HBV 根据全基因序列核苷酸差异 $\geq 8\%$ 以

及 S 区基因核苷酸差异 $\geq 4\%$ 将 HBV 分为 A~H 8 个基因型。HBV 基因型呈地域分布特征,并且不同的基因型病毒的复制能力不同^[4-5]。近年来的研究发

现其基因分型与乙型肝炎流行病学特点、乙型肝炎标志物的表达、乙型肝炎的致病性、肝脏疾病的进展、肝硬化与肝癌的风险、治疗药物敏感性、治疗疗效等有密切的关系^[6-9]。

建立一种简便、有效的基因型检测方法有重要的临床意义和参考价值。其中核酸提取是 HBV DNA 检测过程中的重要环节,不同的提取方法可直接影响试验结果^[10]。模板的提取效率直接影响下一步基因分型检测的敏感度,模板的纯度和质量与检测效果密切相关。现在普遍采用的沉淀离心提取法不但提取效率较低(模板的相对丢失率达 70%),而且操作繁琐难以实现自动化,成为制约 HBV 基因分型检测的瓶颈。除此之外,沉淀离心提取法需要标本的 HBV DNA 定量水平在 2 000 IU/mL 以上才能检测到基因分型,给临床带来很多不便。有研究表明,磁珠法的提取效率明显提高(模板的相对丢失量低于 50%),而且为自动化操作,在低拷贝病毒载量时提取效果好。本院 2016 年自主研发,利用 Abbot m2000 全自动核酸提取仪(m2000sp,磁珠法)对提取的 HBV DNA 进行 HBV 基因型别检测,提高了基因型别的检出率,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取来本院感染病科就诊的 1 943 例慢性乙型肝炎患者,其中 2013 年 10 月至 2016 年 7 月 1 411 例(煮沸法),2017 年 1 月至 2018 年 1 月 532 例(磁珠法)。

1.2 仪器与试剂 2013 年 10 月至 2016 年 7 月 HBV DNA 提取(煮沸法)和聚合酶链反应(PCR)荧光探针法检测基因分型均采用泰普生物科技(中国)有限公司的 HBV 基因分型检测试剂盒。基因分型检测仪器采用美国 ABI 公司的 7500 PCR 仪。2017 年 1 月至 2018 年 1 月 HBV DNA 提取(磁珠法)采用 Abbotl m2000SP 核酸提取试剂,仪器采用 Abbot m2000 全自动核酸提取仪。基因分型检测仪器采用美国 ABI 公司的 7500 PCR 仪。

1.3 方法 血样采集:采集 5 mL 的血液(用紫色的乙二胺四乙酸二钾采血管)。转速 3 600 r/min,离心时间≥5 min 分离血清与血细胞。放于-4℃冰箱中待检。2013 年 10 月至 2016 年 7 月采用煮沸裂解法(煮沸法)提取 HBV DNA,进一步采用 PCR 荧光探针法检测基因分型。2016 年 8 月至 2018 年 1 月,血样采集成功后,利用 m2000SP 提取 HBV DNA(磁珠法),进一步采用 PCR 荧光探针法检测基因分型。

1.4 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件对研究数据进行统计分析,计数资料以率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种检测方法结果差异 煮沸法的 HBV 基因型检出率为 81.6%;基因 B、C、D 型检出率分别为

2.1%、77.7%、1.8%;基因 B、C、D 型分别占全部 HBV 感染者的 2.5%、95.2%、2.3%。磁珠法 HBV 基因型检出率为 84.4%;B、C、D 型检出率分别为 4.3%、75.8%、4.3%;基因 B、C、D 型分别占全部 HBV 感染者的 89.9%、5.1%、5.1%。磁珠法检测基因型的检出率更高($P < 0.05$),其中 C 型检出率降低($P < 0.05$),B、D 型检出率更高($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两种检测方法检测 HBV 基因型结果比较[n(%)]

检测方法	n	总检出率	B 型	C 型	D 型
煮沸法	1 411	1 151(81.6)	29(2.1)	1 096(77.7)	26(1.8)
磁珠法	532	449(84.4)	23(4.3)	403(75.8)	23(4.3)

2.2 基因型检出率与 HBV DNA 定量的关系 选取 2017 年 8 月至 2018 年 1 月 280 份标本采用磁珠法同时检测 HBV DNA 和乙型肝炎基因分型。由表 2 可以看出 HBV 基因型检出率随着 HBV DNA 水平的升高而升高($P < 0.05$)。HBV DNA 水平在 $>100 \sim 500$ IU/mL,HBV 基因型检出率为 50.0%;HBV DNA 水平在 $>500 \sim 1\ 000$ IU/mL,HBV 基因型检出率为 86.7%;HBV DNA 水平在 $1\ 000$ IU/mL 以上,HBV 基因型检出率为 96.4%。HBV DNA 水平在 $100 \sim 1\ 000$ IU/mL,检出率为 60.3%。以往的临床工作中标本的 HBV DNA 定量水平在 $2\ 000$ IU/mL 才能检测到基因分型,磁珠法提高了基因分型的检出率。

表 2 基因型检出率与 HBV DNA 定量的关系[n(%)]

HBV DNA 水平 (IU/mL)	n	检出率	B 型	C 型	D 型
$>100 \sim 500$	38	19(50.0)	4(10.5)	14(36.8)	1(2.7)
$>500 \sim 1\ 000$	15	13(86.7)	0(0.0)	10(66.7)	3(20.0)
$>100 \sim 1\ 000$	53	32(60.3)	4(7.5)	24(45.3)	4(7.5)
$>1\ 000$	174	168(96.4)	5(3.1)	159(91.4)	4(2.2)

3 讨论

HBV 基因型分布存在一定的地域性差异。国外学者研究表明,随着纬度的增加,呈现 B 型分布逐渐减少,而 C 型分布逐渐增加的趋势。在我国以长江为界,长江以南地区 HBV 基因型以 B 型为主,长江以北地区以 C 型为主。陕北地区地处我国北方,按照以上规律以 C 型分布为主。

临床研究表明 HBV 基因 C 型感染的患者其肝脏疾病进展较快,且患肝硬化和肝细胞癌的风险增加。C 型复制较活跃,不易发生 e 抗原血清转换。耐药性方面,B/C 型极易产生拉夫米定耐药突变,D 型感染者更易发生阿德福韦酯耐药。不同基因型的乙型肝炎感染者对药物敏感性也不一致,拉夫米定抗病毒治疗时 B 型较 C 型有更好的应答,干扰素治疗时 C 型比 B 型有更好的应答率。国内研究报道显示 B、C、D 3

种基因型的慢性乙型肝炎患者临床表现差异明显。慢性乙型肝炎患者中 B 型比例明显高于其他两种型别^[11]。目前大多数的临床医师已经将 HBV 基因型的检测纳入乙型肝炎患者肝细胞性肝癌发生和治疗预后的观测指标,以帮助其在工作中选择最佳的治疗方案,指导预防肝癌。HBV 基因型的检测显得尤为重要。

HBV 基因型检测的方法采用基因型特异性引物 PCR 法。根据不同 HBV 基因型存在的差异序列设计一系列特异性引物。PCR 扩增后可得到不同长度的片段,以此进行分型。在此过程中,HBV DNA 的提取是关键步骤。如何成功提取 HBV DNA 成为检测基因分型中起决定性作用的一步。磁珠是一种壳/核结构的微球,核由铁、钴、镍的氧化物组成,壳由高分子材料组成,并根据需要在磁性纳米壳外包被不同的高分子材料。用于血中 HBV DNA 检测的磁珠在化学合成中利用专利技术进行了特殊的表面修饰,使其具有对 DNA 的高特异性吸附能力。此外磁珠吸附免去了传统浓缩提取中核酸沉淀步骤,减少了 DNA 的丢失。

本文就磁珠法提取的 HBV DNA 结合 PCR 荧光探针法检测 HBV 基因分型与传统煮沸法提取的 HBV DNA 进行比较,包括基因型检出率、各型的比例,以及与 HBV DNA 水平的关系等。从以上数据可以看出,磁珠法提取的 HBV DNA 表现出良好的检测性能,更符合临床的要求。

参考文献

[1] OTT J J, STEVENS G A, GROEGER J, et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity [J]. *Vaccine*, 2012, 30(12): 2212-2219.

[11] LITTLE M L, QIN X, ZERR D M, et al. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(1): 52-57.

[12] 张丽娟. 碳青霉烯类肠杆菌细菌的耐药基因研究 [J]. *中国社区医师*, 2017, 33(3): 5-7.

[13] 汤英贤, 温伟洪, 李玉珍, 等. 某医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染情况分析 [J]. *现代医院*, 2017, 17(12): 1838-1843.

[14] 罗洪英, 余水泉. 耐碳青霉烯类抗菌药物的耐药性及其相关影响因素 [J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(4): 492-495.

[2] LIANG X F, BI S L, YANG W Z, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China; declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination [J]. *Vaccine*, 2009, 27(47): 6550-6557.

[3] LIANG X, BI S, YANG W, et al. Evaluation of the impact of hepatitis B vaccination among children born during 1992-2005 in China [J]. *J Infect Dis*, 2009, 200(1): 39-47.

[4] 叶扬, 李俊洁, 吕蕙伶, 等. 血清 HBsAg 定量和 HBV-DNA 检测慢性乙肝患者核苷酸类药物耐药变异的比较研究 [J/CD]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 13(96): 7-8.

[5] 周晨浩, 任宁. 乙型肝炎病毒基因分型与肝细胞癌发生发展的研究进展 [J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(11): 1688-1694.

[6] 李可可, 刘莹, 姚品芳, 等. 中国人群乙型肝炎病毒基因分型不同方法和标准的比较 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(16): 2306-2316.

[7] SOZZI V, WALSH R, LITTLEJOHN M, et al. In vitro studies show that sequence variability contributes to marked variation in hepatitis B virus replication, protein expression, and function observed across genotypes [J]. *J Virol*, 2016, 90(22): 10054-10064.

[8] MAHMOOD M, ANWAR M A, KHANUM A, et al. Distribution and clinical significance of hepatitis B virus genotypes in Pakistan [J]. *BMC Gastroenterol*, 2016, 16(16): 104-110.

[9] 高海彦, 张会玲, 王文斌, 等. 慢性乙型肝炎感染者基因型分布与 HBV DNA 关系的初步探讨 [J]. *卫生职业教育*, 2015, 33(7): 142-143.

[10] 赵洪灿, 裘春宁, 项国谦, 等. 慢性乙型肝炎病毒感染者病毒基因型分布及其与肝纤维化和肝细胞癌的关系 [J]. *中华临床感染病杂志*, 2013, 6(3): 157-161.

[11] 贾冬青. 基因型检测对乙型肝炎感染程度的诊断效果 [J]. *检验医学与临床*, 2015, 12(23): 3536-3537.

(收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-04-09)

(上接第 3052 页)

[11] LITTLE M L, QIN X, ZERR D M, et al. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric Enterobacteriaceae [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(1): 52-57.

[12] 张丽娟. 碳青霉烯类肠杆菌细菌的耐药基因研究 [J]. *中国社区医师*, 2017, 33(3): 5-7.

[13] 汤英贤, 温伟洪, 李玉珍, 等. 某医院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌感染情况分析 [J]. *现代医院*, 2017, 17(12): 1838-1843.

[14] 罗洪英, 余水泉. 耐碳青霉烯类抗菌药物的耐药性及其相关影响因素 [J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(4): 492-495.

[15] 詹玲玲, 陈约慧, 周蓓蓓, 等. 2010—2014 年临床分离的肠杆菌科细菌对阿米卡星耐药性的变迁 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 24(26): 3622-3624.

[16] VAN DUIN D, KAYE K S, NEUNER E A, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 75(2): 115-120.

[17] 徐英春, 肖永红, 卓超, 等. 中国碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌的流行病学和防控策略 [J]. *中国执业药师*, 2013, 10(4): 3-8.

(收稿日期: 2018-01-30 修回日期: 2018-04-03)