

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.20.005

基因型检测对诊断乙型肝炎病毒感染程度的价值*

吴意¹,甘霖^{2△},黎村艳¹,蒋琰¹,李原¹

(1.湖南省人民医院检验科,长沙 410005;2.重庆市卫生信息中心 400014)

摘要:目的 分析基因型检测对诊断乙型肝炎病毒(HBV)感染程度的临床价值。方法 选取某院 2011 年 1 月至 2013 年 8 月的 HBV 感染者 433 例,采用 PCR-反向点杂交法检测感染者的 HBV 基因型,PCR 法检测感染者 DNA 表达载量,ELISA 方法检测 HBV 的 E 抗原。结果 HBV 感染患者中 B 基因型患者比例(68.13%)明显高于 BC 混合基因型(5.77%)和 C 基因型(26.10%),差异有统计学意义($P < 0.05$);HBV 患者 DNA 表达载量在不同基因型间差异无统计学意义($P > 0.05$);但 HBV E 抗原阴性率在不同基因型之间有所不同,B 基因型 23.82%,BC 混合基因型 14.78%,C 基因型 1.42%,差异有统计学意义($P < 0.05$);基因型与病情严重程度有关:轻中度乙型肝炎患者 B 基因型比例最高(87.20%),其次为 C 基因型(9.34%)和 BC 混合基因型(3.46%)、重度乙型肝炎分别为 C 基因型(77.08%)、BC 混合基因型(14.58%)、B 基因型(8.33%)。结论 基因型与感染的严重程度及 HBV E 抗原阴性率有关,与 DNA 表达载量无关。

关键词:乙型肝炎病毒;基因型;基因;反向点杂交;聚合酶链反应

中图分类号:R512.6

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)20-2557-02

The value of genotype detection for diagnosis of hepatitis B virus infection*

Wu Yi¹, Gan Lin^{2△}, Li Cunyan¹, Jiang Yan¹, Li Yuan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, People's Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410005, China;

2. Chongqing Health Information Center, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the value of genotype detection for diagnosis of hepatitis B virus (HBV) infection. **Methods** 433 HBV patients from January 2011 to August 2013 were detected by PCR-reverse dot blot hybridization; the DNA were assayed by PCR; the HBeAg were tested by ELISA. **Results** Of the 432 HBV patients, the ratio of genotypes B (68.13%) was significantly higher than that of genotypes BC(5.77%) and of genotypes C(26.10%) ($P < 0.05$); there were no significant difference in the copy of the HBV DNA among the various genotype ($P > 0.05$); HBeAg negative rate of genotypes B(23.82%), genotypes BC(14.78%), genotypes C(1.42%) had statistically significant ($P < 0.05$); Genes associated with disease severity; the ratio of genotype B for patients with mild-to-moderate hepatitis B was 87.20%, the ratio of genotype C was 9.34% and genotype BC was 3.46%, while the ratio of genotype C was 77.08%, genotype BC was 14.58%, genotype B was 8.33% in severe hepatitis B. **Conclusion** The genotype of HBV is related to disease severity and the negative rate of HBeAg, it is not associated with HBV DNA of HBV.

Key words: hepatitis B virus; genotypes; gene; reverse dot hybridization; polymerase chain reaction

乙型肝炎病毒(HBV)为一种双链 DNA 病毒,主要由 3 200 个碱基对构成,有研究表明,HBV 基因型存在明显的地域差异^[1-3]。为分析 HBV 基因型检测的临床价值,选取湖南省人民医院 2011 年 1 月至 2013 年 8 月收治的 433 例 HBV 感染者,检测 HBV 的基因型、DNA 载量和 HBV 的 E 抗原。

1 资料与方法

1.1 一般资料 湖南省人民医院 2011 年 1 月至 2013 年 8 月收治的 433 例 HBV 感染者,年龄 18~82 岁,平均(45.26±18.6)岁,其中男 298 例,女 135 例。感染者均符合 2000 年全国病毒性肝炎学术会议所制定的《全国病毒性肝炎防治方案》中有关乙型肝炎的诊断标准:DNA 表达载量大于 1.0×10^4 copy/mL,ALT>40 U/L,AST>40 U/L。排除其他疾病,同时排除酗酒、吸毒、妊娠、哺乳的患者。轻中度乙型肝炎患者 289 例(临床表现为肝功能轻度异常,HBV 指标为阳性),重度

乙型肝炎患者 144 例(肝功能严重异常)。本次研究获得患者及家属知情同意,并经医院伦理委员会通过。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 仪器:PE7500 型全自动荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司生产),杂交炉(深圳亚能生物制品有限公司生产),全自动酶免疫分析仪(瑞士哈数顿公司)。试剂:PCR-反向点杂交法基因型检测试剂盒(达安基因股份有限公司生产)。HBV-DNA 试剂盒(长沙盛湘公司生产)。HBV E 抗原检测试剂盒(北京万泰生物医药有限公司)。

1.2.2 HBV-DNA 表达载量测定 HBV-DNA 按照试剂盒说明书操作:一步法提取 DNA,反应体系,总体积 40 μ L,包括样本 5 μ L,50 $^{\circ}$ C 2 s,94 $^{\circ}$ C 5 s,94 $^{\circ}$ C 15 s,57 $^{\circ}$ C 31 s,25 $^{\circ}$ C 10 s,40 个循环。同时作阴阳对照各 1 管及标准对照 4 管。

1.2.3 基因分型 一步法提取 DNA 产物,然后进行 PCR 反

* 基金项目:湖南省科技计划资助项目(04FJ3024);湖南省医药卫生科研计划项目(B2012-086)。 作者简介:吴意(1970-),主任技师,硕士,主要从事临床检验研究。 △ 通讯作者,E-mail:2464040410@qq.com。

应, 93 °C 6 s 预变性; 93 °C 30 s, 58 °C 40 s, 72 °C 45 s, 10 个循环; 93 °C 30 s, 56 °C 40 s, 72 °C 45 s, 10 个循环; 93 °C 30 s, 55 °C 40 s, 72 °C 45 s, 15 个循环。72 °C 7 min。将探针通过氨基酸结合硝酸纤维膜; 产物 95 °C, 10 min; 膜与 DNA 杂交, 洗脱未杂交的 PCR 产物; 特异性杂交产物 5' 端与过氧化物酶 (POD) 结合, 显色出现蓝色斑点。

1.2.4 HBV E 抗原的检测 血清 50 μ L, 同时加入阳性对照和阴性对照, 加 50 μ L 酶标液, 混匀 37 °C 30 min, 洗板 5 次, 加入 A 液、B 液各 50 μ L, 混匀 37 °C 15 min, 终止液 50 μ L, 空白调零比色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理和分折, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基因分型结果 HBV 感染者基因型分析结果显示, B 基因型患者 295 例 (68.13%), 显著高于 BC 混合基因型 25 例 (5.77%) 和 C 基因型 113 例 (26.10%), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C 基因型患者比例, 显著高于 BC 混合基因型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 基因型与 DNA 表达载量及 HBV E 抗原关系 HBV 感染者 B 基因型 HBV E 抗原阴性率显著高于 BC 混合基因型、C 基因型; BC 混合基因型 HBV E 抗原的阴性率显著高于 C 基因型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DNA 表达载量在 3 种基因型间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 各基因型与 DNA 表达载量及 HBV E 抗原关系 ($n=433$)

| 基因型 | <i>n</i> | DNA 表达载量 | HBV E |
|----------|----------|---|-----------------------|
| | | ($\bar{x} \pm s, \times 10^3$ copy/mL) | 抗原阴性 [$n(\%)$] |
| B 基因型 | 295 | 6.12 \pm 1.34 | 63(21.36) |
| BC 混合基因型 | 25 | 7.33 \pm 1.44 | 4(16.00) ^a |
| C 基因型 | 113 | 8.30 \pm 1.58 | 2(1.77) ^{ab} |

^a: $P < 0.05$, 与 B 基因型相比较; ^b: $P < 0.05$, 与 BC 混合基因型相比较。

2.3 基因型与病情严重程度关系 HBV 感染者的病情严重程度与基因型关系见表 2, 轻中度乙型肝炎患者 B 基因型比例最高 (87.20%), 其次为 C 基因型 (9.34%) 和 BC 混合基因型 (3.46%)。重度乙型肝炎患者 C 基因型比例最高 (77.08%), 其次为 BC 混合基因型 (14.58%) 和 B 基因型 (8.33%), 差异有统计学意义 ($t=43.52, P < 0.05$)。

表 2 患者病情严重程度与基因型的关系 [$n(\%)$]

| 病情严重程度 | <i>n</i> | B 基因型 | BC 基因型 | C 基因型 |
|---------|----------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 轻中度乙型肝炎 | 289 | 252(87.20) ^a | 10(3.46) ^a | 27(9.34) ^a |
| 重度乙型肝炎 | 144 | 12(8.33) | 21(14.58) | 111(77.08) |

^a: $P < 0.05$, 与重度乙型肝炎比较。

3 讨 论

乙型肝炎是常见的一种血液传播性疾病, 该病在全球范围内具有较高的发病率, 由于基因型的不同, 病毒 DNA 复制能力和免疫逃逸的能力也有差异^[4-7], 这是导致不同基因型的 HBV 感染率呈现出了一定的地域流行的特性^[8-10]。已知的

HBV 基因型共分为 9 种, 分别为: A、B、C、D、E、F、G、H、I^[11-13]。在我国, HBV 基因型主要为 B 基因型与 C 基因型^[14-16]。

研究表明, B 基因型患者比例明显高于 BC 混合基因型和 C 基因型。BC 混合基因型患者比例明显低于 C 基因型。说明 B 基因型与 C 基因型是湖南地区的高发基因型, 其中 B 基因型的爆发率高于 C 基因型。与张韧等^[5]报道的结果相似。

按照基因型不同, B 基因型患者 HBV E 抗原阴性率明显偏高, BC 混合基因型、C 基因型患者 HBV E 抗原阴性率显著偏低 ($P < 0.05$), 此结论与有关研究相似^[17]。同样, 按照基因型不同, DNA 表达载量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明不同基因型的 HBV 载量无差别^[18-19]。按照基因型不同, 轻中度 HBV 感染者 B 基因型比例最高 (87.20%), 其次为 C 基因型 (9.34%) 和 BC 混合基因型 (3.46%)。重度 HBV 感染者 C 基因型比例最高 (77.08%), 其次为 BC 混合基因型 (14.58%) 和 B 基因型 (8.33%), 说明 HBV 基因型检测有助于分析患者病情的严重程度, 轻中度乙型肝炎以 B 基因型为主, 重度乙型肝炎以 C 基因型为主^[20-21]。

综上所述, HBV 基因型与感染的严重程度及 E 抗原阴性率有关, 与 DNA 表达载量无关。

参考文献:

- [1] 黄明清, 胡丽, 咸建春. 慢性乙型肝炎病毒感染患者表面抗原定量检测与病毒载量的相关性[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(14): 3314-3316.
- [2] 张文杰, 毛维武, 田淑菊, 等. 乙型肝炎病毒标志物定量检测及肝组织病理学检测应用于慢性乙型病毒性肝炎患者的临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(13): 1507-1509.
- [3] 卢振, 汪海华. 酶联免疫吸附试验检测乙型肝炎病毒标志物的影响因素及存在问题[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 255-256.
- [4] 李方和, 张小燕, 严兵, 等. 抗 HBs mAb 的研制及其对野生与免疫逃逸变异 HBsAg 的交叉反应特征[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(6): 594-596, 600.
- [5] 张韧, 王敏, 符瑞佳, 等. HBV 基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(3): 152-155.
- [6] 杨丽莎, 吴淋玲, 蒋冬香, 等. 广西桂北地区 HBV 感染者不同免疫状态 HBV 基因型分布研究[J]. 病毒学报, 2012, 18(5): 536-540.
- [7] 崔华复, 陈建英, 张智勤, 等. 仙居地区 HBV 基因型分布与若干相关问题的研究[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(5): 288-289.
- [8] 夏献颖, 郭佐华. 采用 PCR 法对乙型肝炎病毒基因型检测的临床观察与分析[J]. 中国医药指南, 2012, 10(1): 68-69.
- [9] Okamoto O, Tsuka E, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence comparison of surface antigen subtypes[J]. J Gen Virol, (下转第 2562 页)

量减少椎旁肌肉的牵拉、压迫、剥离,能减少术中出血量、术后出血量、减轻患者术后疼痛。

脊柱稳定性后柱约占 20%,前中柱约占 80%^[8],后路椎弓根螺钉内固定系统术后,若前中柱结构破坏,应力 100%由内固定承担,这样内固定系统处于高负荷状态易发生断钉断棒。若前中柱结构完整,则应力 80%通过前中柱,后柱通过应力为 20%^[9],作者也有类似观点。尽管术后即刻伤椎恢复正常高度,但由于局部粉碎松质骨吸收而形成空化区域,这在合并骨质疏松的患者尤其常见^[10],若患者过早下地,此时内固定会承担很大应力,内固定容易产生疲劳,可能出现松动断裂,甚至椎体高度进一步丢失^[11]。患者(尤其是骨质疏松)术后均在支具保护下逐渐活动,并维持支具保护 1~2 个月。由于支具能限制患者前屈后伸,使应力始终通过脊柱的中柱向下传导,而不通过前柱传导,避免椎弓根螺钉过度承重,减少内固定疲劳断裂发生率^[12]。而且支具保护可以分担伤椎受力及内固定系统受力,保护伤椎及内固定系统,在空化区新骨形成前和(或)骨折线消失前减少伤椎高度丢失及断钉断棒发生率。

部分剥离伤椎椎旁肌肉与传统剥离伤椎椎旁肌肉术后椎体高度矫正率、后凸 Cobb 角矫正率、Oswestry 功能障碍指数无明显差别,但术中出血量及术后出血量明显减少,术后疼痛情况较轻,后路椎弓根 schanz 螺钉内固定术部分剥离伤椎椎旁肌肉治疗胸腰椎骨折具有创伤小、恢复快,是安全有效的手术方法。

参考文献:

- [1] 袁文. 胸腰椎骨折外科治疗相关问题探讨[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(1): 8-9.
- [2] 周雷杰, 雷村, 黄燎原, 等. 微创经皮 Sextent 固定系统治疗腰椎骨折[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2007, 22(1): 20-21.
- [10] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 67-74.
- [11] 邓少丽, 黄恒柳, 陈伟, 等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 249-251.
- [12] 吴诗品, 张新枝, 周建良, 等. 乙型肝炎病毒基因型检测及其临床应用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(4): 195-198.
- [13] 李艳霞. 时间分辨荧光免疫分析和酶联免疫吸附实验检测乙型肝炎病毒血清标志物结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1218-1219.
- [14] 张秀瑜, 赵耀, 张文露, 等. 荧光定量分型 PCR 检测重庆地区乙型肝炎病毒感染者 HBV 基因型分布特征[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 91-94.
- [15] 张东华, 于德敏, 金根娣, 等. PCR-荧光探针法检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异与 DNA 序列分析法的比较[J]. 检

- [3] 杨守铭. 胸腰椎骨折的研究[D]. 广州: 第一军医大学, 2001: 55-56.
- [4] Farrokhi MR, Razmkon A, Maghami Z, et al. Inclusion of the fracture level in short segment fixation of thoracolumbar fractures [J]. Eur Spine J, 2010, 19(10): 1651-1656.
- [5] 邢金明, 彭文明, 施初云. 后路短节段内固定治疗胸腰椎骨折失败的原因分析和前路翻修[J]. 中国骨伤, 2013, 26(3): 187-188.
- [6] 沈斐, 潘文明, 王筱林. 两种不同入路治疗无神经症状胸腰椎骨折的病例对照研究[J]. 中国骨伤, 2012, 25(4): 303-305.
- [7] Max A, Vincent A, JohnK W. 脊柱手册-原理与技巧 [M]. 陈仲强, 袁文, 译. 山东: 山东科学技术出版社, 2010: 128-130.
- [8] 胡临, 田伟, 刘波, 等. 陈旧性胸腰椎骨折的术式选择 [J]. 中华创伤骨科杂志, 2004, 6(8): 1223-1225.
- [9] 张晓冬, 方剑利, 庄汝杰, 等. 胸腰椎骨折后路内固定术后并发椎体真空征的临床分析[J]. 中国骨伤, 2011, 24(7): 557-559.
- [10] 宋元进, 孙海燕, 王谦军, 等. 后路短节段固定结合伤椎固定经椎弓根植骨治疗胸腰段骨折[J]. 中国矫形外科杂志, 2010, 18(2): 110-112.
- [11] 张正丰, 周跃, 王建, 等. 后路椎体切除减压椎间植骨融合椎弓根螺钉内固定治疗严重胸腰椎旋转骨折脱位[J]. 中华创伤杂志, 2010, 26(1): 32-35.
- [12] 张贵林, 荣国威, 丁占云, 等. 脊柱胸腰段骨折术后椎弓根钉断裂及弯曲松动的原因分析[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(8): 470-472.

(收稿日期: 2014-03-08 修回日期: 2014-04-09)

(上接第 2558 页)

1988, 69(Pt 10): 2575-2583.

- [10] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1): 67-74.
- [11] 邓少丽, 黄恒柳, 陈伟, 等. 乙型肝炎病毒耐药变异与基因型检测在临床上的应用[J]. 重庆医学, 2008, 37(3): 249-251.
- [12] 吴诗品, 张新枝, 周建良, 等. 乙型肝炎病毒基因型检测及其临床应用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(4): 195-198.
- [13] 李艳霞. 时间分辨荧光免疫分析和酶联免疫吸附实验检测乙型肝炎病毒血清标志物结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(11): 1218-1219.
- [14] 张秀瑜, 赵耀, 张文露, 等. 荧光定量分型 PCR 检测重庆地区乙型肝炎病毒感染者 HBV 基因型分布特征[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 91-94.
- [15] 张东华, 于德敏, 金根娣, 等. PCR-荧光探针法检测乙型肝炎病毒 YMDD 变异与 DNA 序列分析法的比较[J]. 检验医学, 2011, 26(1): 5-8.
- [16] 张卫英, 张红河, 邵听军, 等. 微流体芯片在乙型肝炎病毒基因型检测中的应用[J]. 放射免疫学杂志, 2006, 19(1): 63-65.
- [17] 唐克明, 高伏圣, 张春林, 等. 中国安徽地区肝癌组织中 HBV 基因型的分布研究[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(12): 1703-1705.
- [18] 徐严, 张永贵, 季尚玮, 等. 乙型肝炎病毒基因型检测的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 61-63.
- [19] 黄彬, 陈茶, 陈利达. 乙型肝炎病毒基因型检测及其临床意义[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(9): 1749-1751.
- [20] 孙文锦, 肖作汉, 赵丽芹, 等. 乙型肝炎病毒基因分型与疾病病情的关系[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16(1): 66-67.
- [21] 黄亚琴, 杨丽莎, 吴淋玲. HBV 基因型在 HBV 感染性肝癌及慢性 HBV 感染自然史不同阶段的分布[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(12): 1258-1261.

(收稿日期: 2014-03-04 修回日期: 2014-05-09)