

乙型肝炎病毒基因型分布及耐药突变位点分析

王卫杰^{1,2}, 张效本², 刘保弟², 卢大雷^{1*}

(1. 开封市医学科学研究所检验科, 开封 475000; 2. 开封市中医院检验科, 开封 475000)

摘要: **目的** 探讨开封地区乙型肝炎病毒 (HBV) 基因型分布, 基因耐药突变位点分布情况。**方法** 选取开封地区 2018 年 1 月至 2020 年 12 月期间收集 200 例乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性患者, 采用基因测序技术检测患者基因型, 对检测结果进行统计分析。并对患者血清中 HBV-DNA 进行核苷类似物 (NAs) 耐药基因位点分析。**结果** 开封地区 200 例乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性患者基因型 C 型 179 例, 占比 97.8%, B 型 4 例, 占比 2.2%, 未检测出 B+C 型及其他型; 200 例患者测序结果中 26 例检测出 NAs 基因耐药突变位点, 基因 C 型患者耐药突变位点检出率高于基因 B 型患者。**结论** 开封地区乙型肝炎表面抗原阳性患者 HBV 基因型以 C 型为主, B 型较少, 未检测到其它基因型; 基因 C 型患者 NAs 耐药位点检出率高于 B 型。NAs 耐药突变位点中共检出 9 种不同耐药突变位点组合模式, 以单位点突变为主。

关键词: 乙型肝炎表面抗原阳性; 基因型; 耐药突变位点;

Hepatitis B virus genotype distribution and drug resistance mutation site analysis

WANG Wei-Jie^{1,2}, ZHANG Xiao-Ben², LIU Bao-Di², LU Da-Lei^{1*}

(1. Kaifeng Institute of Medical Sciences, Kaifeng 475000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Kaifeng Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kaifeng 475000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the distribution of hepatitis B virus (HBV) genotypes and drug resistance mutation sites in Kaifeng area. **Methods** A total of 200 hepatitis B surface antigen (HBsAg) positive patients were selected from Kaifeng area from January 2018 to December 2020. The genotype of the patients was detected by gene sequencing technology, and the test results were statistically analyzed. Nucleoside analogues (NAs) resistance gene loci in serum HBV-DNA of 200 untreated patients were analyzed. **Results** Among 200 HBsAg positive patients in Kaifeng area, 179 cases were genotype C, accounting for 97.8%, 4 cases were genotype B, accounting for 2.2%, and no B+C or other types were detected. Among the 200 patients, 26 were detected NAs gene drug resistance mutation sites, and the detection rate of drug resistance mutation sites in patients with gene C was higher than that in patients with gene B. **Conclusion** Hepatitis B surface antigen positive patients in Kaifeng area of HBV genotype mainly C type, B type is less, no other genotype was detected. The detection rate of NAs resistance sites in genotype C was higher than that in genotype B. A total of 9 different combinations of NAs drug-resistant mutation sites were detected, mainly unit point mutation.

KEY WORDS: hepatitis B surface antigen positive; genotype; drug resistance mutation sites

基金项目: 开封市科技攻关项目 (1803024)

Fund: Kaifeng Science and Technology Research Project (1803024)

* 通信作者: 卢大雷, 硕士, 副研究员, 研究方向为免疫学工作。E-mail: ludalei008@163.com

*Corresponding author: LU Da-Lei, Master, Associate Research Fellow, Kaifeng Institute of Medical Sciences, Kaifeng 475000, China. E-mail: ludalei008@163.com

0 引言

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是全球最常见且高度变异的病原体, 属于嗜肝 DNA 病毒, 可导致肝硬化和肝癌。该病毒的基因型地域性流行程度显著^[1]。核苷酸类似物 (NAs) 是临床上使用的主要抗 HBV 药物, 其靶向 HBV 聚合酶的逆转录酶 (RT) 区域并有效抑制 HBV 复制^[2]。目前临床使用的核苷 (酸) 类似物有拉米夫定 (LAM)、阿德福韦 (ADV)、恩替卡韦 (ETV)、替比夫定 (LdT)。由于这些药物的长期广泛使用, 我国各地乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒 (HBV) 均出现不同程度对核苷 (酸) 类似物耐药突变。长时间的 NAs 治疗可能与产生耐药性的风险增加有关^[3]。本研究收集 200 例开封市诊断为乙肝表面抗原为阳性病人, 对其 HBV 基因型分型, 同时对其 HBV NAs 耐药位点进行检测, 通过对患者基因型及耐药位点分析, 以期为指导临床医生合理用药提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2018 年 1 月至 2020 年 12 月间开封市医科所附属医院就诊的开封籍病人, 经酶联免疫吸附试验 (ELISA) 方法检测病人乙肝五项, 确定为乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 阳性患者,

并排除其它类型肝病疾患, 从中抽取 200 例患者进行基因分型检测, 进行耐药位点突变检测分析。

1.2 材料和方法

所有患者均无菌采集外周静脉抗凝血 3 mL, 3000 r/min 离心 5 min, 分离血浆用于检测。采用磁珠法病毒 DNA 提取试剂盒提取 HBV-DNA, 荧光定量 PCR 法进行扩增, 利用 ABI3500Dx 基因分析测序仪进行基因型和耐药位点分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件, 计数资料以例或百分比表示, 组间比较采用卡方检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 200 例乙肝表面抗原阳性患者 HBV 基因型分布

结果显示, 200 例患者中有 17 例未检测出基因型, 可检测出基因型的为 183 例, 其中 B 基因型 4 例, 占比为 2.2%; C 型 179 例, 占比为 97.8%; 未检出 B+C 混合型及其他型, 本地乙肝表面抗原阳性患者 HBV 基因型以 C 型为主。

2.2 不同性别及年龄患者基因型分布

男性与女性患者之间以及不同年龄段之间基因型分布具有差异, 且差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 乙肝表面抗原阳性患者 HBV 基因型分布

Table 1 Distribution of HBV genotypes in patients with positive HBsAg

参数	例数	HBV 基因型			χ^2 值	P 值
		B	C	DNA 浓度低于检测下限		
性别	男性	118	2	105	183	0.000
	女性	82	2	74		
年龄	≤20	8	1	6	132.1	0.000
	21-40	141	2	133		
	41-60	45	1	36		
	≥60	6	0	4		

2.3 不同基因型患者检出 NAs 耐药突变位点情况

在选取的 200 例患者中 17 例为检测出基因型, 剩余 183 例患者中有 26 例检测到 NAs 耐药基因突变位点, 其中检出 26 例

NAs 耐药突变位点全部为基因型 C 型, 检出率为 14.5%; HBV 基因 B 型患者未检出 NAs 耐药突变位点, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 不同基因型患者检出 NAs 耐药突变位点情况

Table 2 Detection of NAs resistance mutation sites in patients with different genotypes

HBV 基因型	检出耐药突变位点例数	未检出耐药突变位点例数	合计	耐药位点检出率 (%)	χ^2 值	P 值
B 型	0	4	4	0	183	0.000
C 型	26	153	179	14.5		
合计	26	157	183	14.2		

2.4 不同 HBV 基因型患者 NAs 耐药突变位点分析

HBV B 基因型未检出耐药位点突变, 因为研究样本较少, 还有待进一步确证。HBV C 基因型 NAs 耐药突变位点中

检出单位点突变 24 例, HBV 基因 C 型患者耐药突变位点以单位点 rtS213T、rtN/H238T/D 突变占比较高, 为 50% (13/26); rtS213T 单位点突变为 7 例, 联合其他位点突变共 1 例; 6 例 rtN/H238T/D 位点突变。以上耐药突变位点分析见表 3。

表 3 26 例乙型肝炎表面抗原阳性患者 NAs 耐药突变位点分析

Table 3 Analysis of NAs resistance mutation sites in 26 patients with hepatitis B surface antigen positive

聚合酶 P 区耐药突变位点	HBV 基因型别		检测到 NAs 的突变位点
	B 型	C 型	
合计	0	26	-
rtV173L	0	1	拉米夫定
rtA181V/T/S	0	3	阿德福韦酯
rtN/H238T/D	0	6	阿德福韦酯
rtS213T	0	7	拉米夫定
rtV207I/L/G	0	2	拉米夫定
rtQ215S	0	2	阿德福韦酯
rtV214A	0	3	阿德福韦酯
rtS213T+rtV214A	0	1	拉米夫定、阿德福韦酯
rtI180M+rtS202G/I+rtM204I/V/S	0	1	拉米夫定、阿德福韦酯

2.5 NAs 耐药基因突变模式分析

26 例 NAs 耐药突变位点检出患者中共检出 9 种不同耐药突变位点组合模式, 其中主要突变模式有三种, 单位点 rtS213T,

rtN/H238T/D, rtA181V/T/S 等突变共 24 例; 双位点 rtS213T+rtV214A 突变 1 例; 多位点 (三位点及以上) 1 例。三种不同突变模式在 HBV 基因 B、C 型间差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 4。

表 4 不同基因突变模式在 HBV 基因 B 型与 C 型患者中的情况分析

Table 4 Analysis of different gene mutation patterns in patients with HBV genotype B and C

突变模式	HBV 基因型		合计	χ^2 值	P 值
	B	C			
单位点	0	24	24	26.00	0.000
双位点	0	1	1		
多位点	0	1	1		
合计	0	26	26		

3 讨论与结论

乙型肝炎病毒 (HBV) 感染仍是一个世界性的公共卫生问题。全球慢性 HBV 感染人数约有 4.3 亿, 其中会演变成肝硬化和肝癌者为 12%~35%, 研究表明, HBV 不同基因型由于其基因结构的差异可造成其致病性差异, 从而影响慢性乙肝患者病情发展、转归、HBV 标志物的表达及对抗病毒药物治疗的疗效^[3-4]。根据 HBV 全基因组或编码 S 蛋白基因序列的同源性, 确定 10 个 HBV 基因型 (A-J) 和一些亚型^[5-6]。在中国, B 和 C 基因型 HBV 较为流行。随着时间的推移, 新的基因型可能会被陆续发现。目前已在我国发现的基因型有 A、B、C 和 D 四型, 以 B 和 C 型为主^[8-11], 长江以南地区以 B 型为主, 长江以北地区以 C 型为主; 由北向南呈 B 型逐渐增多、C 型逐渐减少的趋势^[12-14]。本研究结果表明开封地区乙肝表面抗原为阳性患者以感染 HBV 基因 B、C 型为主, 基因 C 型比率较高, 未发现其它基因型。基因型的分布与相关文献报道结果一致。乙肝表面抗原阳性患者基因 C 型检出 NAs 耐药突变率高于 HBV 基因 B 型患者, 由

此来看, 患者在治疗前进行基因分型是必要的。

200 例患者中 26 例检出 NAs 耐药基因突变, 以单位点突变为主, 同时出现了双位点和多位点联合突变。NAs 耐药变异位点中, rtS213T 基因位点突变检出率最高。在 HBV C 基因型患者 rtI180M+rtS202G/I+rtM204I/V/S 同时出现, 此在 LAM 耐药的基础上继发 ETV 耐药, rt204 位氨基酸易被拉米夫定诱导突变, 导致多重耐药。提示临床在用药前需慎重选择, 用药过程中要注意拉米夫定耐药性的发生, 用药管理需要加强。

本研究表明本地区耐药突变组合较为复杂, 应根据病毒基因型选择合适的抗病毒治疗方案, 以提高治疗效果和减少药物耐药性的发生。本研究为合理制订抗 HBV 治疗方案提供依据, 对于正确选择抗病毒药物具有一定的参考价值, 减少开封地区出现进一步的耐药突变。

参考文献

- [1] 杨国绘, 窦琳琳, 汪敏, 等. HBV 基因型及服药依从性与 NAS 耐药突变位点的相关性 [J]. 中华医院感染学杂

- 志, 2018, 28(19): 2964-2968.
- [2] LIU Y, ZHOU Y, LI X, *et al.* Hepatitis B virus mutation pattern rtL180M+A181C+M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice. *Emerg Microbes Infect*, 2019, 8(01): 354-365.
- [3] 吴明山, 刘振球, 陈兴栋, 等. 全球乙型肝炎病毒基因型的分布现状 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2020, 24(02): 217-221.
- [4] 张欢欢, 杨欢, 沈思兰, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分布及其耐药基因突变分析 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2019, 22(01): 41-44.
- [5] 马佳, 范晓燕, 刘恩才. 本地区鄂温克与汉族 HBV 基因型分布及其种族差异研究 [J]. *当代医学*, 2019, 25(24): 88-90.
- [6] 木朝宇, 张晓梅, 范德胜, 等. 安徽淮北市 CHB 患者 HBV 基因型、耐药类别分布与耐药突变位点的分析 [J]. *徐州医科大学学报*, 2023, 43(02): 117-121.
- [7] 宋金云, 王建芳, 赵宏宇. 慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清 HBV 基因型分析 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2021, 24(01): 87-90.
- [8] 郭晓琪, 张爽, 郑徽, 等. 中国 15 个民族 HBV 基因型及基因亚型分布特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2023, 44(05): 759-764.
- [9] 郭永豪, 豆巧华, 刘倩, 等. 中国乙型肝炎病毒基因组序列突变及进化分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2022, 43(08): 1309-1314.
- [10] 殷继明, 金荣华, 严艳, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型和亚型分布调查 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2010, 13(01): 19-21, 36.
- [11] 高万芹, 张勤, 朱琳, 等. 慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型分析及对 6 种核苷类药物的耐药性 [J]. *检验医学*, 2019, 34(11): 994-997.
- [12] 张楠, 张爽, 王锋, 等. 我国 2015-2017 年急性乙型肝炎病例 HBV 基因型分布特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2022, 43(06): 865-870.
- [13] 卓芬, 肖华, 黄娟娟, 等. 海南乙肝患者 HBV 基因型分布及临床指标的相关性 [J]. *中国热带医学*, 2018, 18(07): 720-722, 728.
- [14] 郑志远, 吴和明, 李仲坚. 梅州地区客家人群 HBV 不同基因型分布及核苷(酸)类似物耐药位点、感染患者病情对比观察 [J]. *山东医药*, 2020, 60(15): 36-39.

作者简介



王卫杰, 硕士, 主管技师, 研究方向为医学检验工作。

卢大雷, 硕士, 副研究员, 研究方向为免疫学工作。