

一种新的 HBV DNA rtA181T 耐药突变检测方法

陈洪涛¹, 何桂蓉², 吴诗品^{1*}

(¹暨南大学医学院附属第二临床医学院感染内科, ²检验科, 广东 深圳 518020)

[摘要] 目的:通过巢式 PCR 及特异引物,建立一种新的乙型肝炎病毒(HBV) DNA rtA181T 耐药突变的 PCR 直接扩增检测方法。方法:巢式 PCR 方法第 1 轮扩增 HBV DNA 逆转录酶 rt 活性域片段,第 2 轮 PCR 上游引物 3'末端碱基设计为与 HBV DNA rtA181T 突变碱基相同的碱基,扩增出的目的基因片段,即为突变片段。利用该方法,本文检测了 43 例 HBV DNA rtA181T 变异标本,分析该方法检测的灵敏性;并比较分析低拷贝 HBV DNA 水平与高拷贝 HBV DNA 水平下,该方法与 PCR-Sanger 测序法检测 HBV DNA rtA181T 突变的一致性。结果:产物经测序证实,突变检测引物巢式 PCR 法能扩增出 HBV DNA rtA181T 耐药突变。在 HBV DNA 水平为 24 U/ μ L,rtA181T 突变株含量低至 10%时,该方法仍能较好检测出 rtA181T 变异片段。对 43 例不同拷贝水平的 HBV DNA rtA181T 耐药变异临床标本检测显示,该方法检测灵敏性达 100%,常规 PCR-Sanger 测序灵敏性为 74%,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:基于巢式 PCR 及突变引物为基础的 HBV DNA rtA181T 耐药突变 PCR 直接检测法能较好地检测 HBV DNA rtA181T 耐药变异发生;对 HBV DNA 低拷贝水平下的 rtA181T 耐药变异检测,该方法灵敏性优于 Sanger 测序法,且有较好的特异性。这对早期发现 HBV DNA 耐药突变、及时更改抗 HBV 治疗策略具有重要临床指导意义。

[关键词] 乙型肝炎病毒;耐药性;突变;基因测定

[中图分类号] R512.6

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2016)07-880-06

doi:10.7655/NYDXBNS20160724

A new method to detect drug-resistant mutation of HBV DNA rtA181T

Chen Hongtao¹, He Guirong², Wu Shiping^{1*}

(¹Department of Infectious Diseases, ²Department of Clinical Laboratory, Shenzhen People's Hospital, the Second Affiliated Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a new direct amplification PCR method to detect HBV rtA181T drug resistant mutation by nested PCR and specific primers. **Methods:** Nested PCR was performed to amplify the HBV polymerase rt domain fragment in the first round, and the base in the 3' end of the sense primer was designed same as the mutation one of HBV DNA rtA181T in the second round. Thus, the amplified fragment was the HBV DNA rtA181T mutation fragment. Using this method, we examined 43 specimens of various HBV DNA loading with HBV DNA rtA181T mutation and analyzed the sensitivity of this method; and compared it with the PCR-Sanger sequencing method in consistency under the level of low or high copy DNA HBV. **Results:** Confirmed by PCR products sequencing, this nested PCR based specific primers had successfully detected the HBV DNA rtA181T drug resistant mutation. This method had confirmed rtA181T drug resistant mutation even when the virus load was 24 U/ μ L and the mutation strain was less than 10% in the whole quasi-species pool. By detection of the 43 specimens, we found that the sensitivity of this method was 100%, significantly superior to Sanger sequencing, which was 74% ($P < 0.05$). **Conclusion:** Based on nested PCR and specific primers, our new method can successfully detect HBV DNA rtA181T mutation. Especially in low virus load circumstance, this new method is superior to Sanger sequencing in sensitivity, and also shows good specificity, thus is beneficial to early detection of HBV DNA drug resistant mutation and important for adjustment of the anti-HBV therapy in time.

[Key words] hepatitis B virus; drug resistance; mutation; genetic testing

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 880-885]

[基金项目] 广东省药学会肝炎用药研究基金(2012G24)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wupoem@126.com

我国现有慢性乙型肝炎患者约 2 000 万人,随着卫生经济条件的改善,接受抗病毒治疗的患者正逐年增多。相关数据显示,在我国大城市接受抗乙肝病毒(HBV)治疗的慢性乙肝患者比例已达 60%。与此同时,低耐药屏障、价格相对低廉的核苷(酸)类抗 HBV 药物如拉米夫定、阿德福韦、替比夫定仍被作为一线药物广泛使用。来自不同地区的横断面研究数据表明,HBV 耐药发生率达 28%以上^[1-3],这些耐药甚至发生于未曾接受抗 HBV 治疗的患者中。不恰当的初始治疗,长期的药物选择压力,加之患者对长期治疗依从性的下降是导致 HBV 耐药现象普遍发生的重要原因。因此,加强我国 HBV 耐药管理、建立耐药监测平台已刻不容缓。至今 HBV 耐药管理仍未被写入我国慢性乙肝防治指南。在一线城市各大医院 HBV 耐药检测技术各不相同,而在小城市、偏远地区 HBV 耐药检测方法更是相对缺乏或单一。这显然对控制快速发展的 HBV 耐药趋势相当不利。若能建立一种简便、适用、灵敏、特异的 HBV 耐药检测方法,将不仅有利于提高 HBV 耐药管理水平,更有利于在普通医疗保健单位开展。为此,本文建立了一种新的少量 HBV 耐药突变 PCR 检测方法。

1 对象和方法

1.1 对象

采血对象为本院肝病门诊或住院治疗的慢性乙肝患者,且服用阿德福韦>1 年而 HBV DNA 未转阴者。阳性血清标本定义为:经 ABI 7500 real-time PCR 仪定量 HBV DNA 仍可测得者(PCR 试剂盒为湖南圣湘生物乙型肝炎病毒核酸定量测定试剂盒,检测线性范围 $5 \times 10^2 \sim 5 \times 10^9$ U/mL,灵敏度 100 U/mL);经深圳亚能生物乙型肝炎病毒分型和耐药突变基因检测试剂盒(PCR-反向点杂交法)检测 HBV rtA181T 突变阳性;43 份 rtA181T 变异血清标本采集时间为 2013 年 10 月至 2014 年 6 月,经 real-time PCR 定量,HBV DNA 低拷贝水平[(2~3)lg U/mL]11 例,中拷贝水平[(4~6)lg U/mL]24 例,高拷贝水平[(7~9)lg U/mL]8 例。该研究已通过本院伦理委员会审核,所有患者采血前均已签署知情同意书。

1.2 方法

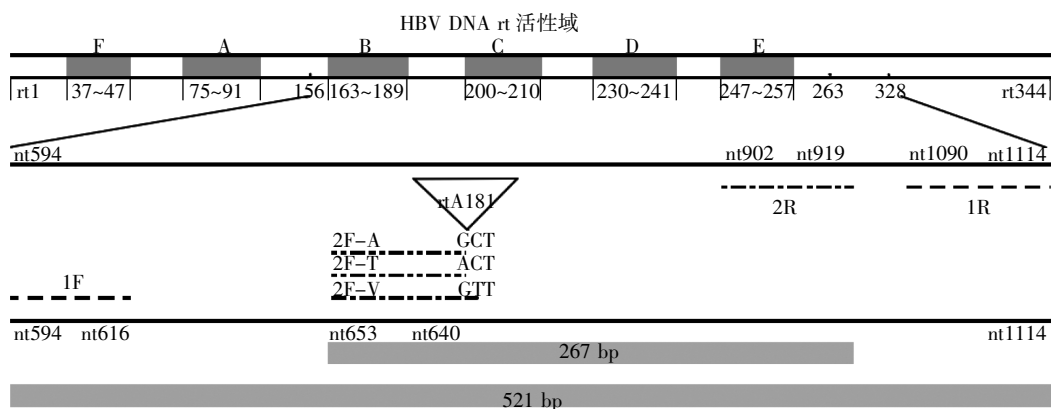
1.2.1 引物设计与合成

采用 Primer-Premier 6.0 引物设计软件设计引物;引物序列见表 1;扩增目的片段见图 1。所有引物均由深圳华大基因合成。

表 1 巢式 PCR 引物序列

Table 1 Primers for nested PCR

| 引物名称 | 标示 | 起始 | 引物序列(5'→3') | 扩增片段大小(bp) |
|----------------------|------|---------------|---------------------------|------------|
| 第 1 轮上游引物 | 1F | nt594~nt616 | GCACTTGATATCCCATCCCATCA | 521 |
| 第 1 轮下游引物 | 1R | nt1114~nt1090 | CCTTGTAAGTTGGCGAGAAAGTGAA | |
| 第 2 轮 rtA181 未突变上游引物 | 2F-A | nt653~nt670 | TCTGTCCGTTTCTCCTGG | 267 |
| 第 2 轮 rtA181 未突变下游引物 | 2R | nt919~nt902 | GTTCTGCGGTAAAGTAC | |
| 第 2 轮 rtA181T 检测上游引物 | 2F-T | nt653~nt670 | TCTGTCCGTTTCTCCTGA | 267 |
| 第 2 轮 rtA181T 检测下游引物 | 2R | nt919~nt902 | GTTCTGCGGTAAAGTAC | |
| 第 2 轮 rtA181V 检测上游引物 | 2F-V | nt653~nt671 | TCTGTCCGTTTCTCCTGGT | 267 |
| 第 2 轮 rtA181V 检测下游引物 | 2R | nt919~nt902 | GTTCTGCGGTAAAGTAC | |



rtA181T 密码子突变:GCT→ACT;rtA181V 密码子突变:GCT→GTT。

图 1 扩增片段示意图

Figure 1 Amplification segments of target gene

1.2.2 巢式 PCR 扩增和产物验证

第 1 轮 PCR 扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 40 s, 56℃ 45 s,72℃ 45 s,循环 35 次;最后 1 次循环 72℃ 5 min;模板为血清 HBV DNA 提取物。第 2 轮 PCR 扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 40 s,52℃ 45 s,72℃ 45 s,循环 35 次;最后 1 次循环 72℃ 5 min;模板为第 1 轮 PCR 扩增产物。加样过程参见 TaKaRa Premix Taq PCR 试剂盒说明书。1.2%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。PCR 产物 20 μL 由华大基因 Sanger 测序。

1.3 统计学方法

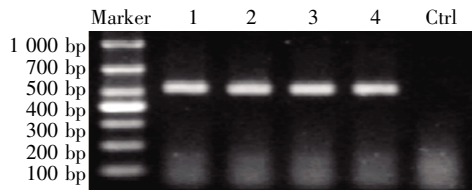
应用 SPSS16.0 软件进行统计分析。计数资料采用卡方检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巢式 PCR+突变引物扩增 HBV DNA rtA181T 突变

第 1 轮扩增片段 521 bp(nt594~1 114,rt AA156~328),产物含 rt181 突变及未突变片段(图 2)。将第 1 轮 PCR 扩增产物送测序(以上游引物扩增测序),测序结果见图 3;其中 rtA181T 突变血清样本产物测序结果显示该样本同时存在 rtL180M 变异(CT-G→ATG,图 3C 箭头所示);rtA181(T+V)突变血清样本第 1 轮扩增产物经 Sanger 测序仅能显示存在 rtA181V 突变(GCT→GTT)(图 3D),未能发现 rtA181T 突变。分别以 HBV DNA rtA181T 突变检测引物(2F-T,2R)、HBV DNA rtA181V 突变检测引物(2F-V,2R)对以上产物进行巢式 PCR 第 2 轮扩增,目的片段 267 bp(nt653~919),电泳结果见图 4。进一步将第 2 轮 HBV DNA rtA181T 突变扩增产物行 Sanger 测序(以下游引物测序),结果见图 5,测序结果证实,产物为 rtA181T 突变片段。

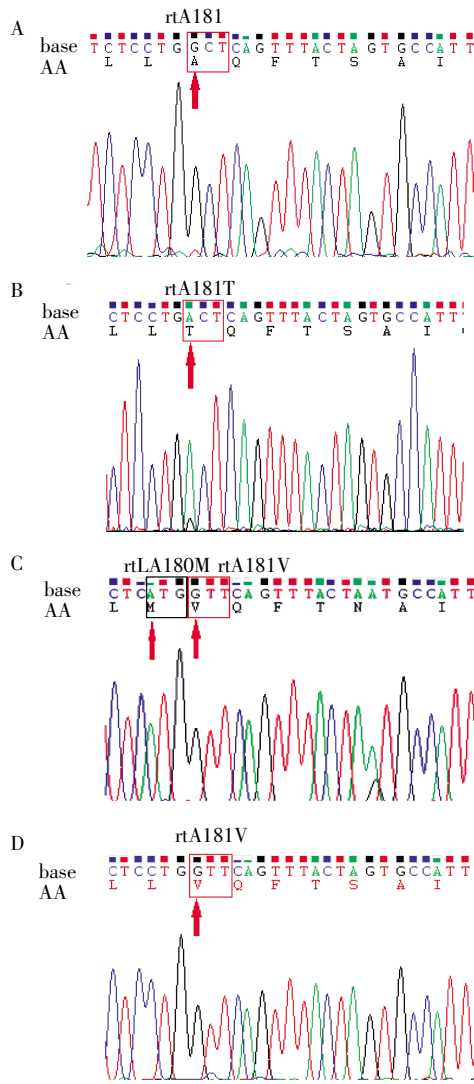
2.2 第 2 轮特异引物直接扩增检测 HBV DNA rtA181T 变异



1: 野生型 HBV DNA 血清样本 (阳性对照);2:HBV DNA rtA181T 突变血清样本;3:HBV DNA rtA181V 突变血清样本;4:HBV DNA rtA181(T+V)突变血清样本;Ctrl:阴性对照(无模板)。

图 2 巢式 PCR 第 1 轮扩增片段电泳图

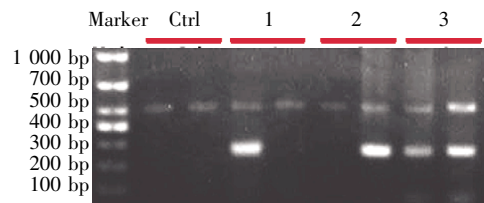
Figure 2 Electrophoregram of the first round products of nested PCR



A: 野生型 HBV DNA 血清样本 (阳性对照);B:HBV DNA rtA181T 突变血清样本;C:HBV DNA rtA181V 突变血清样本;D: HBV DNA rtA181(T+V)突变血清样本;base:碱基;AA:氨基酸。

图 3 第 1 轮扩增产物测序图

Figure 3 Sequencing results of the first round products of nested PCR



Ctrl:阴性对照,模板为野生型 HBV DNA 521 bp;1,2,3:分别为 HBV DNA rtA181T 突变样本 521 bp、HBV DNA rtA181V 突变样本 521 bp、HBV DNA rtA181(T+V)突变样本 521 bp 片段第 2 轮扩增结果,每一样本的左侧泳道引物为 HBV DNA rtA181T 突变检测引物(2F-T、2R),右侧泳道引物为 HBV DNA rtA181V 突变检测引物(2F-V、2R)。

图 4 第 2 轮扩增片段电泳图

Figure 4 Electrophoregram of the second round products of nested PCR

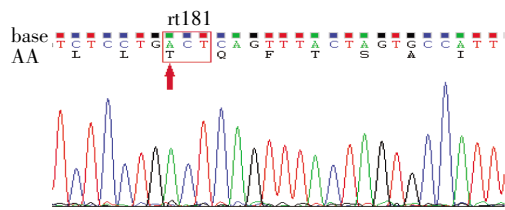


图 5 第 2 轮扩增 rtA181T 变异片段测序图

Figure 5 Sequencing results of the second round products of nested PCR

不经巢式 PCR,以第 2 轮突变检测引物(2F-T,2R)直接扩增 HBV DNA rtA181T 变异血清样本(图 6)。检测的血清样本包括 HBV DNA 高拷贝水平(8lg U/mL)及低拷贝水平(3lg U/mL)的 rtA181T 突变样本,电泳结果显示均无目的条带。阳性对照组上游引物 3'末端碱基为未突变碱基 G(即未突变引物 2F-A),电泳结果显示高拷贝水平及低拷贝水平 HBV DNA 均能扩增出未突变目的基因片段。图 7 为未突变引物扩增片段(阳性对照组)测序结果;将测序结果经 NCBI-BLAST 搜索、比对,为 HBV DNA rt 域片段(Identity=99%,E 值=0),181 位点核酸序列为 GCT(对应氨基酸为 A),证实未突变引物扩增片段为 HBV DNA rt181 位点未突变基因序列。

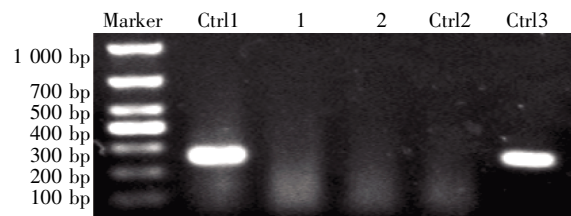
2.3 特异引物巢式 PCR 检测 rtA181T 突变灵敏性分析

将 43 例不同拷贝水平的 HBV DNA rtA181T 突变血清样本进行系列等比稀释,使其终浓度分别为 12、24、48、96 U/ μ L,各取 200 μ L 稀释血清按试剂盒说明提取 HBV DNA,最后将所得 HBV DNA 上清定容为 200 μ L,各取 1 μ L 作为巢式 PCR 第 1 轮反应模板(模板量分别约为 12、24、48、96 U),2 轮扩增后统计检测阳性率,结果显示在终浓度为 12 U/ μ L 时,不同拷贝水平的标本检测阳性率分别为 91%、88%、75%,差异无统计学意义;在终浓度为 24、48 U/ μ L 时,不同拷贝水平的标本检测阳性率均为 100%,与终浓度为 12 U/ μ L 比,总体检测阳性率有显著性差异($P < 0.05$)。将 43 例变异血清样本同 real-time PCR 荧光定量为 1.01×10^7 U/mL 野生株血清标本按 1:1、1:9、1:19、1:49、1:99 比例混合,进行巢式 PCR 检测 rtA181T 突变。结果显示,突变与未突变样本以 1:1、1:9 浓度混合时,不同拷贝水平的标本检测阳性率均为 100%;混合比为 1:49 时,不同拷贝水平的标本检测阳性率分别为 45%、58%、88%,但差异无统计学意义;混合比为 1:99 时,不同拷贝水平的标本检测阳性率分别为 9%、33%、50%,差异无统计学意义;1:49 混合组与 1:9、1:1 混合组比,总体检

测阳性率有显著性差异(均 $P < 0.05$),1:99 混合组与 1:49、1:9、1:1 混合组相比,总体阳性率有显著性差异($P < 0.01$,表 2)。

2.4 特异引物巢式 PCR 法与 Sanger 测序法检测 rtA181T 突变结果一致性分析

对 43 例不同拷贝水平的 HBV DNA rtA181T 突变血清标本、10 例 HBV DNA 为阴性的慢性乙肝患者血清标本进行特异引物巢式 PCR 法与 Sanger 测序法检测,结果显示。对 HBV DNA real-time PCR 定量在(2~3)lg U/mL 的 11 例血清标本,经第 1 轮扩增后 Sanger 测序发现仅 2 例存在 HBV DNA rtA181T 变异,其余 9 例突变标本 rt181 位点测序结果均显示为正常碱基(GCT),而特异引物巢式 PCR 检测阳性率为 100%,差异有统计学意义($P < 0.05$);而对 HBV DNA 定量在(4~6)lg U/mL 范围内的 24 例血清标本,Sanger 测序仅有 2 例未测出,特异引物巢式 PCR 法检测阳性率为 100%,两者比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而 HBV DNA 定量在(7~9)lg U/mL 的 8 例血清标本,两种检测方法阳性率均为 100%。总体而言,特异引物巢式 PCR 法较 Sanger 测序法对检测 HBV DNA rtA181T 突变有较高的灵敏性(100% vs. 74%, $P < 0.05$)。



Ctrl1:阳性对照 1,高拷贝(8lg U/mL)rtA181T 突变血清样本(引物 2F-A,2R,目的片段 267 bp);1:高拷贝(8lg U/mL)rtA181T 突变血清样本(引物 2F-T,2R,目的片段 267 bp);2:低拷贝(3lg U/mL)rtA181T 突变血清样本(引物 2F-T,2R,目的片段 267 bp);Ctrl2:阴性对照(引物 2F-A,2R,无模板);Ctrl3:阳性对照 2,低拷贝(3lg U/mL)rtA181T 突变血清样本(引物 2F-A,2R,目的片段 267 bp)。

图 6 突变引物直接扩增 HBV DNA rtA181T 电泳图
Figure 6 Electrophoregram of direct amplification products of target gene with mutation-detecting primers

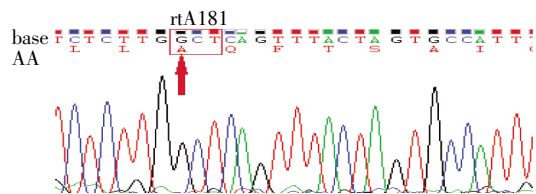


图 7 未突变引物扩增片段(阳性对照)测序结果

Figure 7 Sequencing results of amplification segments with non-mutation-detecting primers(positive control)

表 2 特异引物巢式 PCR 检测 43 例 rtA181T 突变标本灵敏度分析

| HBV DNA (lg U/mL) | 样本数 | 等比稀释后终浓度(U/ μ L) | | | HBV DNA rtA181T 与野生型血清样本混合比例 | | | |
|----------------------|-----|----------------------|------------------|------------------|------------------------------|------|-------|-------|
| | | 12 | 24 | 48 | 1:99 | 1:49 | 1:9 | 1:1 |
| 2~3 | 11 | 91 | 100 | 100 | 9 | 45 | 100 | 100 |
| 4~6 | 24 | 88 | 100 | 100 | 33 | 58 | 100 | 100 |
| 7~9 | 8 | 75 | 100 | 100 | 50 | 88 | 100 | 100 |
| 合计 | 43 | 86 | 100 [△] | 100 [△] | 30 | 60* | 100** | 100** |

与终浓度 12 U/ μ L 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与混合比为 1:99 比较, * $P < 0.01$; 与混合比为 1:49 比较, ** $P < 0.05$ 。

3 讨论

我国是 HBV 高流行区, 伴随核苷(酸)类抗 HBV 药物的长期广泛使用, HBV 耐药现象日渐突出, 耐药模式亦趋复杂。HBV 耐药突变将导致病毒学突破、肝炎发作, 甚至肝衰竭的发生^[4-7]。早期监测、及时发现 HBV 耐药, 并尽早给予援救治疗, 对预防病毒学突破、控制病情反复显得十分重要^[8]; 而建立一种灵敏、简便、快速、特异的 HBV 耐药检测方法, 不仅有助于早期发现 HBV 耐药, 更有利于其在普通医疗保健单位的开展。

基于以上思想, 本研究建立了巢式 PCR+特异引物(突变点检测引物)扩增检测 rtA181T 突变的新方法。鉴于国内外均未见有通过单纯 1 次普通 PCR 扩增检测 rtA181T 突变的研究报道, 本研究试将 rtA181T 突变检测引物直接扩增 HBV DNA rtA181T 突变片段, 结果显示: 无论在 HBV DNA 高拷贝水平还是低拷贝水平下, 电泳结果均无目的片段; 而未突变检测引物均能扩增出目的片段, 测序结果亦证实为未突变正常序列。本文推测, 导致 HBV DNA rtA181T 突变片段不能直接扩增出的原因可能与 rtA181T 突变株在 HBV DNA 准株群中含量比低下有关。因此, 要扩增出 rtA181T 突变, 必需先经 1 轮 PCR 对目的片段池进行放大。经第 2 轮的特异性突变检测引物扩增, 电泳结果显示产物片段大小与预期相符, 而测序证实, 产物片段为 rtA181T 突变序列。针对 rtA181T 突变(GCT \rightarrow ACT), 以碱基 A 为上游引物 3' 末端碱基的特异性引物所扩增片段, 测序证实为 rtA181T 突变, 而非 rtA181V 或其他非特异性突变; 而针对 rtA181V 突变(GCT \rightarrow GTT), 以碱基 T 为上游引物 3' 末端碱基的特异性引物所扩增片段, 测序证实为 rtA181V 突变, 而非 rtA181T 突变或其他非特异性突变; 证实该方法具有较好的特异性及可靠性。

为了进一步检验该方法的灵敏性, 将 HBV DNA rtA181T 突变的血清标本进行了两种处理: 方

法一是进行等比稀释, 保持 HBV DNA rtA181T 变异株含量比固定不变; 结果显示, 在模板量低至 24 U (约 134 拷贝) 时, 该方法仍能较稳定地扩增出 rtA181T 突变株片段; 方法二也是进行等比稀释, 但使 HBV DNA rtA181T 变异株含量比不断降低, 当含量比低至 1:9 时, 尚能较稳定扩增出 HBV DNA rtA181T 变异株片段, 稀释至 1:49 时, 不同浓度组扩增出变异株片段的阳性率均下降, 提示该方法至少能扩增出占 HBV DNA 总量 10% 的 rtA181T 突变株片段, 具有较好的灵敏性。最后, 将该方法与 PCR-Sanger 测序法对比, 分析 43 份经 PCR-反向点杂交法检测存在 rtA181T 突变的临床标本, 结果表明, 该方法有较好的线性检测范围, 灵敏性高于 PCR-Sanger 测序法, 尤其是检测低拷贝水平的 HBV DNA 耐药突变样本, 该方法有很高的灵敏性。

目前 HBV 耐药突变检测方法有: PCR 产物直接测序、实时荧光定量 PCR、探针杂交技术(包括 PCR-反向点杂交、INNO-LiPA、基因芯片)、限制性片段长度多态性分析技术(包括 PCR-限制性片段长度多态性分析、限制性片段质谱多态性分析技术)等^[9-10]。其中前三者为国内临床常用 HBV 耐药突变检测方法。PCR 产物直接测序法仍是最经典的耐药检测方法, 该方法的另一优势是能发现新的耐药位点。Keefee 等^[11]曾认为该方法应作为基因型耐药检测的金标准。然而, 越来越多的研究表明, PCR 产物直接测序法灵敏性较差^[12-16], 只有当变异株占准种池的 20% 以上时方能检测出基因型变异^[17], 而此时患者往往已出现病毒学反弹^[18]。本研究也显示, PCR-Sanger 测序法总体灵敏性为 74%, 在低 HBV DNA 拷贝水平时, 检测灵敏性更差。这显然不利于早期发现 rtA181T 突变。类似本试验的原理, 国外有将此种突变特异性引物 PCR 扩增法称之为扩增抗性突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)^[19]。ARMS 扩增成功的关键在于: 一是使用无 3' 端外切酶活性的 PCR 多聚酶; 二是 3' 末端突变导致与正常模板结合的特异性突变检测引物第 1 个核苷酸延

伸受阻,因此延伸反应被终止;相反,由于突变模板能与之完全配对结合,目的片段得以被扩增。但本方法不完全等同于 ARMS 之处在于,将巢式 PCR 与 ARMS 相结合,这样反应的特异性、灵敏性大大提高;本研究也证实,对 HBV DNA 提取物直接进行 ARMS 扩增,结果均为阴性。此外,在设计引物时,3' 末端碱基为 A 时,有引起错配扩增的可能。然而本研究的测序结果证明,扩增的 267 bp 点突变片段,均与预期符合;以 A 为末端的 rtA181T 检测引物不能扩增出 rtA181V 点突变片段;以 T 为末端的 rtA181V 检测引物不能扩增出 rtA181T 点突变片段。未发生错配与研究选用的高保真酶有一定关系。最后,由于 rtL180 位点靠近 rtA181,rtL180M 点突变会影响 rtA181T 特异引物的结合,但测序表明 rtL180M+rtA181T 同样能被 rtA181T 特异引物扩增。以上这些均解释了该方法具有较高灵敏性与特异性的原因。

本研究所参考的 PCR-反向点杂交法具有较高的灵敏性与特异性,该方法检测出的 43 份 rtA181T 阳性突变样本经本研究验证阳性符合率为 100%;但相比其操作过程,本检测方法更为简洁、经济,需 1 台普通 PCR 仪及相关扩增试剂均可开展,操作简单。当然,本方法除了能扩增检测 rtA181T 突变外,通过类似的特异引物,也可以运用于对其他已知耐药位点(例如 rtA181V 突变)的检测,具有较好的通用耐药检测适用性。

[参考文献]

[1] 戴明佳,方 圆,汪莉萍,等. 740 例 HBV 感染者血清 HBV 逆转录酶区耐药位点分析[J]. 实用肝脏病杂志, 2014,17(3):255-258

[2] 陈圆圆,李 巍,张国良,等. 深圳地区 2 465 例慢性乙型肝炎患者 HBV 耐药基因突变的高通量检测及分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(1):28-31

[3] 徐东平,刘 妍,成 军,等. 340 例慢性乙型肝炎患者乙型肝炎病毒多位点耐药相关突变分析[J]. 中华肝病杂志,2008,16(10):735-738

[4] Ghany MG,Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy[J]. Hepatology,2009,49(5 Suppl):S174-S184

[5] Murata M,Furusyo N,Unno M,et al. Long-term effects of lamivudine treatment in Japanese chronic hepatitis B patients[J]. World J Gastroenterol,2011,17(24):2945-2952

[6] Hashimoto Y,Suzuki F,Hirakawa M,et al. Clinical and vi-

rological effects of long-term (over 5 years) lamivudine therapy[J]. J Med Virol,2010,82(4):684-691

[7] Joo MK,Yeon JE,Kim JH,et al. Chronic cirrhotic hepatitis B patients with a high incidence of hepatic decompensation after viral breakthrough with lamivudine-resistant mutants and during rescue treatment[J]. Scand J Gastroenterol,2008,43(12):1514-1521

[8] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病分会.慢性乙型肝炎防治指南 2010 年更新版[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2011,5(1):50-60

[9] 杨 松,成 军. 乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药检测方法的进展[J]. 中华传染病杂志,2009,27(11):697-700

[10] 常静霞,汪茂荣. 乙型肝炎病毒基因耐药变异研究进展[J]. 实用肝脏病杂志,2013,16(5):467-470

[11] Keefe EB,Dieterich DT,Han SH,et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States:2008 update[J]. Clin Gastroenterol Hepatol,2008,6(12):1315-1341

[12] 孙树梅,周 浩,周 彬,等. 巢式 PCR 联合焦磷酸测序法在乙型肝炎病毒耐药基因检测中的敏感性与特异性分析[J]. 南方医科大学学报,2012,32(5):610-613

[13] 张惠琴,冯体玉,张灼锦. 基因芯片法和测序法检测乙型肝炎病毒基因分型的耐药突变比较 [J]. 热带医学杂志,2014,14(7):867-870

[14] 郑慧珂,周 彬,何海棠,等. INNO-LiPA 和直接测序法检测 HBV 耐药突变的比较[J]. 热带医学杂志,2012,12(7):793-795,802

[15] 张迎迎,何海棠,杨 洁,等. 肽核酸钳制 PCR 早期检测乙型肝炎病毒 YMDD 耐药变异[J]. 南方医科大学学报,2013,33(6):853-856

[16] 肖 婷. 质谱法与直接测序法检测 HBV P 基因耐药突变的比较研究[D]. 长沙:中南大学,2010

[17] Pas DP,De Man RA,Fries E,et al. The dynamics of mutations in the YMDD motif of the hepatitis B virus polymerase gene during and after lamivudine treatment as determined by reverse hybridization[J]. J Clin Virol,2002,25(1):63-71

[18] 乙型肝炎病毒耐药专家委员会. 乙型肝炎病毒耐药专家共识 [J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2008,2(1):90-98

[19] Newton CR,Graham A,Heptinstall LE,et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. Nucleic Acids Res,1989,17(7):2503-2516

[收稿日期] 2015-08-20