

总之,骨创伤后血浆 D-D 和血糖水平随创伤严重度的加重而升高,反映了机体对创伤应激反应的强弱,血浆 D-D 和血糖水平变化随创伤程度的变化与创伤后机体生理病理变化随损伤轻重而变化是相符合的,监测创伤后血浆 D-D 和血糖水平的变化在一定程度上可判断创伤程度及预后。

参考文献

[1] 马海梅,张会冀,张力丹,等. 1 334 例创伤骨科患者血浆 D-二聚体水平的回顾分析[J]. 血栓与止血,2009,15(5): 225-227.

[2] Rovlias A, Kotsou S. The influence of hyperglycemia on neurological outcome in patients with severe head injury [J]. Neurosurgery,2000,46(2):335-342.

[3] 美国机动车医学促进会(AAAM). 重庆市急救医疗中心编译. 简明损伤定级标准 2005[M]. 重庆:重庆出版社, 2005:1-35.

[4] Karunakar MA, Staples KS. Does stress-induced hyperglycemia increase the risk of perioperative infectious complications in orthopaedic trauma patients [J]. J Orthop

Trauma,2010,24(12):752-756.

[5] 王新民,尤杰,姜美荣. 新鲜骨折与血糖的关系[J]. 中国骨伤,2002,15(1):60.

[6] 宋先舟,胡端,白祥军. 70 例严重创伤后血糖变化与预后 [J]. 临床外科杂志,2003,11(1):18-19.

[7] 朝晖,朱文辉,李冰,等. 糖尿病患者血浆 D-二聚体变化及其与血管病学的关系[J]. 中国医师杂志,2003,1(5): 106.

[8] 韩立坤,卢丹. 血浆 D-二聚体水平与 2 型糖尿病及其大血管病变关系的研究[J]. 中国实用诊断学,2007,11(9): 1167-1169.

[9] 左华,黄永辉,徐晓峰. 骨科创伤患者血浆 D-二聚体指标与创伤程度的相关性研究[J]. 医学创新研究,2006,3 (11):5-6.

[10] Yendamuri S, Fulda GJ, Tinkoff GH. Admission hyperglycemia as a prognostic indicator in trauma[J]. J Trauma,2003,55(1):33-38.

(收稿日期:2012-12-04)

• 临床研究 •

实时荧光定量聚合酶链反应在 HBV YMDD 基因变异检测中的应用

刘兴态,郑 霞,汪亚洲,秦 军(葛洲坝中心医院检验科,湖北宜昌 443002)

【摘要】 目的 以 DNA 测序法为标准,探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测乙型肝炎(下称乙肝)病毒 YMDD 基因变异的敏感性和特异性。**方法** 选取 68 例乙肝患者经拉米夫定治疗前及治疗 9 个月后其血清采用荧光定量 PCR 技术联合检测 HBV DNA 及 YMDD 变异,并随机选取 10 例(5 例实时荧光定量 PCR 提示 YMDD 变异;5 例提示未变异)慢性乙肝患者做 DNA 测序,分析二者的检测结果。**结果** 拉米夫定治疗前 HBV DNA 的载量,两组相比差异无统计学意义($P>0.05$),9 个月后 YMDD 的变异率为 14.7%(10/68);YMDD 变异型组 HBV DNA 无 1 例阴转, YMDD 野生型组 HBV DNA 阴转率为 79.3%(46/58),差异有统计学意义($P<0.01$);10 例测序法所测结果与实时荧光定量 PCR 完全相符,总符合率为 100.0%。**结论** 实时荧光定量 PCR 技术联合检测 HBV DNA 及 YMDD 变异具有很好的临床应用前景。

【关键词】 实时荧光定量聚合酶链反应; 测序法; 拉米夫定; YMDD 变异

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.09.034 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)09-1091-02

拉米夫定是治疗慢性乙型肝炎病毒(HBV)的一种核苷类药物,对 HBV DNA 复制有明显抑制作用,经过 1 年治疗,它可使 60%左右的患者血清 HBV DNA 水平快速降低,且患者的耐受性较好,但随着疗程的延长,约 14%的患者又出现 HBV DNA 阳转,呈现拉米夫定耐药^[1-2]。研究发现,这种耐药性变拉米夫定是一种具有很强的抑制 HBV 复制作用的核苷酸药物,但在使用过程中 HBV DNA 聚合酶活性区往往发生病毒变异(YMDD 变异),影响治疗效果或引起病情加重^[3]。对 HBV 进行 YMDD 变异检测,对于指导临床用药、疗效判断和推测预后都具有十分重要的临床意义。目前对拉米夫定相关的 HBV 变异的检测方法有多种。本文采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR),以 Taqman MGB 探针分析技术检测 HBV YMDD 变异株,并以 DNA 测序法为金标准,以评价实时荧光定量 PCR 的敏感性和特异性,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 10 月至 2011 年 4 月本院用拉米夫定

抗-HBV 治疗的慢性乙肝患者 68 例,符合 2000 年 9 月西安第 10 次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的《病毒性肝炎防治方案》的诊断标准^[4]。男 44 例,女 24 例,治疗时间大于或等于 9 个月,年龄 16~67 岁,平均(38.1±5.3)岁。清晨空腹采集静脉血 3 mL,不添加抗凝剂,分离血清,于 -20℃ 保存。

1.2 方法 采用实时荧光定量 PCR 和 DNA 测序法。

1.2.1 实时荧光定量 PCR 仪器: TaqmanMG B 探针分型试剂盒购自杭州夸克生物技术有限公司,采用西安天隆公司生产的 TL988 型荧光定量 PCR 仪。操作方法:按照试剂说明书及仪器操作程序进行。

1.2.2 DNA 测序法 随机选取经实时荧光定量 PCR 检测 5 例 YMDD 变异型和 5 例 YMDD 野生型的血清样本,送中山大学达安基因股份有限公司进行 DNA 测序。

1.3 统计学方法 采用 SPSS11.0 统计软件,样本均数之间的差异采用方差分析。

2 结 果

2.1 68 例患者血清中 10 例发生变异,变异率为 14.7%(10/68),变异类型与年龄和性别无明显相关性。将结果分为 YMDD 野生型和 YMDD 变异型,回顾性分析两组治疗前的 HBV DNA 拷贝数(取对数值),差异无统计学意义($t=0.521, P>0.05$),见表 1。

表 1 YMDD 野生型和变异组治疗前的 HBV DNA 拷贝数

HBV 组别	n	HBV DNA(copy/mL)	对数值
YMDD 野生型	58	$3.24 \times 10^3 \sim 7.65 \times 10^7$	3.51~7.88
YMDD 变异型	10	$9.61 \times 10^3 \sim 1.45 \times 10^8$	3.98~8.15

2.2 拉米夫定用药 9 个月后,其 YMDD 变异型与 YMDD 野生型相比,HBV DNA 阴转率明显不同,以小于 1.0×10^3 copy/mL(对数值为 3.00)为阴性,结果显示,变异后 HBV DNA 含量反跳,无一例阴转。而野生型在用药 9 个月后,HBV DNA 阴转率明显增加,阴转率达 79.3%,两组相比差异有统计学意义($t=24.9, P<0.01$),见表 2。

表 2 YMDD 野生型和变异型治疗后 HBV DNA 阴转率

HBV 组别	治疗前	治疗后	阴转	阴转率(%)
YMDD 野生型	58	12	46	79.3
YMDD 变异型	10	10	0	0.0

2.3 10 例(5 例实时荧光定量 PCR 提示 YMDD 变异型;5 例提示野生型)慢性乙肝患者做 DNA 测序,结果与实时荧光定量 PCR 完全相符,总符合率为 100.0%,见表 3。

表 3 实时荧光定量 PCR 测定结果与直接测序结果比较

样本号	HDV DNA (copy/mL)	PCR 检测结果	测序结果
1	5.83×10^6	YMDD 野生型	5'-TATATGGATGAT -3'*
2	7.36×10^5	YMDD 变异型	5'-TATATTGATGAT -3*★
3	4.57×10^4	YMDD 变异型	5'-TATGTGGATGAT -3'▲
4	5.28×10^5	YMDD 野生型	5'-TATATGGATGAT -3'*
5	1.24×10^7	YMDD 野生型	5'-TATATGGATGAT -3'*
6	3.24×10^3	YMDD 野生型	5'-TATATGGATGAT -3'*
7	1.45×10^8	YMDD 变异型	5'-TATGTGGATGAT -3'▲
8	4.48×10^5	YMDD 变异型	5'-TATATTGATGAT -3*★
9	3.94×10^4	YMDD 野生型	5'-TATATGGATGAT -3'*
10	5.33×10^5	YMDD 变异型	5'-TATGTGGATGAT -3'▲

注:*代表 YMDD 野生型;▲代表 YVDD 变异;★代表 YIDD 变异。

3 讨 论

目前乙肝治疗药物比较多,但是功效明确针对 HBV 的药物主要有两大类:核苷类似物如拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦;干扰素如 α 干扰素、长效 α 干扰素。拉米夫定抑制 HBV 复制作用显著、肝功能正常化作用显著、肝脏组织病理学改善作用显著、基本无不良反应、口服用药(100 mg/d)方便。但在拉米夫定治疗期间,病毒 DNA 编码的 DNA 聚合酶基因系列易发生变

异,这种变异在 YMDD 序列及其附近,因而称为 YMDD 变异。YMDD 位于 P 区第 549~552 aa(即 Y549M550D551D552),YMDD 中蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)替代,变成 YVDD/YIDD^[5]。目前检测 YMDD 变异的分子生物学方法主要有直接测序法、限制性片断多态性分析(RFLP)、5-核酸酶检测法、基因芯片法、荧光定量 PCR 溶解曲线法、焦磷酸测序技术、高效变性液相色谱法等^[6]。测序法是目前专家公认的金标准,但需配置测序仪,一次性投入资金较大,测序周期较长,费用较高;PCR 与酶联免疫吸附试验在进行 PCR 扩增后,需要预杂交、杂交、显色等开放性试验,容易造成标本的交叉污染以及影响实验室的质量控制。同时操作繁琐、费时,不适合当天出检测报告。基因芯片需要开放式杂交,会造成一定的交叉污染需要配置芯片仪,一次性投入资金较大,且芯片成本较高。这些方法对技术和设备要求很高或者操作繁琐,耗时费力,不利于大范围的普及与推广。

以直接测序法为金标准,实时荧光定量 PCR 检测 YMDD 变异具有灵敏度高、特异性强和诊断符合率高的特点,能够满足临床需求。由表 3 结果可以充分说明这一点。

MGB 探针分型技术荧光定量 PCR 检测 HBV YMDD 变异。采用一对共同 PCR 引物,两种分别针对 HBV 保守区、YMDD 变异区核酸序列的 TaqmanMGB 探针,FAM 荧光素作为报告基团,2 管平行检测,荧光 PCR 仪的实验数据通过计算分析,此法不仅可以检测 HBV-YMDD 野生株/变异株混合型,还可以对 HBV DNA 进行定量检测。本方法无需使用外在定量标准,提高了检测效率,降低了检测成本,具有快速、灵敏、准确、经济实用等优点,适合临床实验室开展拉米夫定耐药性突变的监测,值得推广。

参考文献

- [1] Whalley SA, Brown D, Teo CG, et al. Monitoring the emergence of hepatitis B virus polymerase gene variants during lamivudine therapy using the Light Cycler[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(4): 1456-1459.
- [2] Ono-Nita SK, Kato N, Shiratori Y, et al. Susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to other reverse transcriptase inhibitors[J]. J Clin Inves, 1999, 103(12): 1635-1640.
- [3] 崔荣辉,戴二黑,陈翠英,等. 突变特异 PCR 检测 YMDD 突变方法的建立及应用[J]. 河北医药, 2008, 30(9): 1282-1283.
- [4] 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病分会. 病毒性肝炎防治方案[J]. 中华肝脏病杂志, 2000, 8(4): 257-262.
- [5] Ling R, Harrison TJ. Functional analysis of mutations conferring lamivudine resistance on hepatitis B virus[J]. J Gen Virol, 1999, 80: 601-606.
- [6] 孙剑,侯金林,肖蕾,等. 三种乙型肝炎病毒拉米夫定耐药突变的酶切分析方法及其应用[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2003, 17(1): 18-20.

(收稿日期:2011-12-03)