

• 临床检验研究论著 •

# 太仓市慢性乙型肝炎患者耐药突变和基因型分布研究

沈逸辛<sup>1</sup>, 张影<sup>2</sup>

(1. 苏州市太仓市中医医院检验科, 江苏太仓 215400; 2. 江苏省人民医院感染科, 江苏南京 210001)

**摘要:**目的 研究太仓地区慢性乙肝患者耐药突变和基因型分布情况, 及 HBV 基因型与耐药突变的相关性。方法 选择太仓地区 350 例慢性乙型肝炎患者, 在使用核苷(酸)类药物抗病毒前, 检测患者耐药突变及基因型情况, 分析患者耐药突变与基因型的相关性。结果 350 例慢性乙型肝炎患者, HBV 基因型分布: B 基因型 172 例, 占 49.14%; C 基因型 164 例, 占 46.85%; 其中 D 基因型 9 例, 占 2.57%; B、C 混合型基因型有 5 例, 占 1.42%; 未发现其他基因型。本研究共检出 58 例耐药突变患者, 其中 B 基因型 22 例, C 基因型 35 例, D 基因型 1 例, B、C 混合基因型患者未发现耐药突变。耐药突变位点: 与拉米夫定相关的耐药突变 36 例(10.28%), 与阿德福韦相关的耐药突变 16 例(4.57%), 与恩替卡韦相关的耐药突变 6 例(1.71%)。结论 太仓地区慢性乙型肝炎患者 HBV 基因型以 B、C 型为主, 2 种基因型占 90% 以上, 两种基因型比例相似。C 基因型患者发生耐药突变的比例较 B 基因型高, 拉米夫定相关的耐药突变比例最高。建议对用药史不明确、复发再治疗的慢性乙肝患者, 在接受核苷(酸)类药物治疗前进行耐药检测, 选择针对性治疗方案。

**关键词:** 耐药突变; 基因型; 慢性乙型肝炎

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.016

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3336-03

## Distribution of drug resistance mutations and genotypes in patients with chronic hepatitis B in Taicang city

Shen Yixin<sup>1</sup>, Zhang Ying<sup>2</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Taicang Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taicang, Jiangsu 215400, China; 2. Department of Infection, Jiangsu Provincial People's Hospital, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

**Abstract: Objective** To study the distribution of drug resistance mutations and genotypes in the patients with chronic hepatitis B(CHB) in Taicang area. **Methods** 350 cases of CHB were selected and detect the drug resistance mutations and genotypes before using nucleoside(acid) anti-viral drugs. The correlation between the drug resistance mutations with genotypes in CHB patients was analyzed. **Results** Among 350 cases of CHB, the distribution of genotypes was genotype B in 172 cases, accounting for 49.14%, genotype C in 164 cases, accounting for 46.85%, genotype D in 9 cases, accounting for 2.57%, mixed genotype of B and C in 5 cases, accounting for 1.42%, no other genotypes were found. In this study, the drug resistance mutations were detected in 58 cases, including 22 cases of genotype B, 35 cases of genotype C and 1 case of genotype D, no drug resistance mutations were found in mixed genotype B and C. The drug resistance mutations sites: lamivudine resistance-associated mutations in 36 cases(10.28%), and adefovir resistance-associated mutations in 16 cases(4.57%) and entecavir associated resistance mutations in 6 cases(1.71%). **Conclusion**

The genotype of CHB patients in Taicang area was dominated by genotype B and C, which accounting for more than 90% and the proportion of these two kinds of genotype is similar. The proportion of drug resistance mutation occurrence in the patients with genotype C is higher than that with genotype B. The lamivudine resistance-associated mutation has the highest proportion of drug resistance occurrence. It is suggested that the CHB patients with undefined medication history and recurrence treatment should be performed the drug resistance detection for selecting the targeted therapeutic schemes before accepting nucleoside(acid) drug therapy.

**Key words:** resistance mutations; genotype; chronic hepatitis B

我国是乙型病毒性肝炎的高发区, 据 2006 年全国乙型病毒性肝炎流行病学调查, 我国慢性乙型肝炎患者约 2 000 万人。核苷和核苷酸类药物(nucleotide analogs, NAs)是目前使用最为广泛的抗乙型肝炎病毒(HBV)的药物, NAs 作用靶点均为乙型肝炎病毒聚合酶基因区, 直接抑制 HBV DNA 复制, 能减轻肝细胞炎症坏死及纤维化, 从而延缓和减少肝脏失代偿、肝硬化、肝癌及并发症的发生<sup>[1-3]</sup>, 为乙型肝炎的治疗带来了突破性进展。

目前我国在使用核苷(酸)类药物治疗乙型肝炎的过程中, 存在着诸多不规范使用情况, 如单药随意序贯、短期内频繁换药或加药, 以及耐药后不合理加药或换药等情况, 致我国慢性乙型肝炎抗病毒治疗的耐药问题较为严重。近年来, 研究发现一些患者在接受核苷(酸)类药物治疗前, 体内就有 HBV 耐药

突变毒株, 即预存耐药<sup>[4]</sup>。

本研究采用 PCR 反向点杂交的基因芯片方法, 检测太仓地区慢性乙型肝炎患者 HBV 的基因型及耐药突变的分布, 积累本地区 HBV 基因型的流行病学情况, 探讨患者基因型与耐药的关系, 为临床选择合适的诊疗方案提供科学依据。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2010~2013 年期间在本院就诊的慢性乙型肝炎患者 350 例, 年龄 30~60 岁, 纳入标准: (1)慢性乙型肝炎患者, HBeAg 阳性、HBV DNA  $\geq 10^3$  copies/mL、 $2 \times \text{ULN} \leq \text{ALT} \leq 5 \times \text{ULN}$ , 患者从未使用过核苷(酸)类药物或用药史不明确; (2)诊断均符合 2010 年中华医学会肝病学会、感染病学会分会修订的《慢性乙型肝炎防治指南》的诊断标准<sup>[5]</sup>。排除标准: (1)肝硬化患者; (2)有严重基础疾病、酗酒及静脉药

瘾者；(3)有遗传性或代谢性疾病史；(4)合并 HAV、HEV、HDV、HCV 及 HIV 感染者。

**1.2 方法** 所有患者均进行常规理化检查、HBV 血清学标记物、HBV DNA 定量检测及 HBV 基因型和耐药突变位点的检测,其中 HBV 血清标记物检测采用美国 Abbott 公司的 Ci8200 型全自动化免疫工作站及试剂,HBV DNA 定量检测采用罗氏诊断(上海)有限公司的 COBAS TaqMan 仪器及试剂。乙肝病毒基因分型和耐药突变检测,采用亚能生物技术(深圳)有限公司 HBV 基因分型和耐药突变基因检测试剂盒。

**1.3 HBV 基因分型和耐药突变检测** 按亚能生物技术(深圳)有限公司 HBV 基因分型和耐药突变基因检测试剂盒的要求操作。

**1.4 统计学处理** 检测数据采用 SPSS11.0 软件进行分析,组间比较采用两独立样本的  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 患者基因型和耐药突变结果** 本研究组患者基因型检出结果为 B 基因型 172 例,占 49.14%;C 基因型 164 例,占 46.85%;D 基因型 9 例,占 2.57%;B、C 混合型基因型有 5 例,占 1.42%。发生耐药突变的 58 例患者中,B 基因型 22 例,耐药突变率为 12.29%;C 基因型 35 例,耐药突变率为 21.34%;D 基因型 1 例,突变率为 11.11%;B、C 混合型基因型患者未发现耐药突变。其中 C 基因型者较 B 基因型更易发生耐药突变,且两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),B 基因型与 D 基因型、C 基因型与 D 基因型之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。以上各组间统计学情况:B 型与 C 型之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),B 型与 D 型、C 型和 D 型之间的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

**表 1 患者基因型与耐药突变分布**

HBV 基因型	n	耐药突变数(n)	耐药突变率(%)
B 型	172	22	12.79
C 型	164	35	21.34
D 型	9	1	11.11
B、C 型	5	0	0.00

**2.2 患者耐药突变位点** 本研究组共检出耐药突变患者 58 例,检出率为 16.57%,其中与拉米夫定耐药关的 36 例(10.28%),与阿德福韦耐药相关的 16 例(4.57%),与恩替卡韦耐药相关的 6 例(1.71%),详见表 2。

**表 2 患者耐药突变位点检测结果[n(%)]**

指标	耐药突变位点	检出率
与拉米夫定相关	rtL180M	11(3.14)
	rtL180M + rtM204I/V	7(2.00)
	rtM204I/V	18(5.14)
与阿德福韦相关	rtA181V/T	5(1.42)
	rtA181V/T + rtN236T	3(0.85)
	rtN236T	8(2.28)
与恩替卡韦相关	rtS202I	2(0.57)
	rtT184I	2(0.57)
	rtS202G + rtT184A+rtT 184L	2(0.57)

**3 讨论**

目前已发现 HBV 基因型有 A-I 9 个基因型,我国以 C 型和 B 型为主<sup>[5]</sup>。本研究组患者基因型:B 基因型 172 例,占 49.14%;C 基因型 164 例,占 46.85%;两种基因型患者比例相似,患者数量占 90%以上。与张韧等<sup>[6]</sup>的研究报道我国 HBV 基因型以 B、C 型为主,两者之间的感染人数差别不明显的结果一致。本研究还发现有 5 例 B、C 混合基因型 HBV 感染,占总数的 1.42%。显著低于王其亮等<sup>[7]</sup>的报道 B、C 混合型患者比例 21.5%,这与人群 HBV 感染的基因型分布存在地域性差异有关。

本研究组选取的慢性乙型肝炎患者为未使用过核苷(酸)类或用药史不明确的患者,耐药检出率 16.57%,其中拉米夫定相关的耐药突变比例最高(10.28%),阿德福韦次之(4.57%),恩替卡韦最低(1.71%)。说明已经有 HBV 耐药病毒株的传播,慢性乙型肝炎患者存在预存耐药的情况。因此,对用药史不明确的患者,在接受核苷(酸)类药物治疗前,建议进行耐药突变位点检测,明确耐药情况,选择针对性治疗方案,提高临床疗效,节约医疗成本。2012 年欧洲肝病学会指南<sup>[8]</sup>发布数据显示,恩替卡韦 5 年的耐药率不超过 1.2%。本研究中恩替卡韦的耐药率达 1.71%,可能与以下因素相关:(1)既往不规范使用核苷(酸)类药物,如单药序贯治疗、短期内频繁换药或加药,耐药后不合理用药等;(2)患者依从性不高;(3)我国使用核苷(酸)类药物的历史相关:1998 年开始使用拉米夫定,到 2005 年阿德福韦和恩替卡韦才上市,期间使用拉米夫定,致累积耐药率增加。

HBV 基因型与核苷(酸)类药物耐药发生率的关系尚不明确。Orito 等<sup>[9]</sup>的一项病例对照研究表明,基因型 B 与基因型 C 的患者对拉米夫定治疗的应答并无差异,但 C 基因型患者更容易出现 YMDD 变异。南方医院<sup>[10]</sup>的一项临床研究结果显示,基因型 C 的患者与 B 基因型患者的 YMDD 变异的方式无差异。本研究结果显示:基因型 B 基因型 22 例,耐药突变率为 12.29%;C 基因型 35 例,耐药突变率为 21.34%;两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),说明 C 基因型患者较 B 基因型患者更易发生耐药突变。

核苷(酸)类药物在治疗慢性乙型肝炎过程中,耐药是极为重要的问题,耐药可能导致疾病进展,增加肝功能失代偿和肝癌的风险,加大后续治疗的难度,增加长期治疗的医疗成本。因此,重视慢性乙型肝炎患者耐药的预防及监测,尤其是用药史不明确的患者预存耐药情况,及时发现耐药突变,选择合理治疗方案,提高临床疗效,节约医疗成本。本研究采用基因芯片进行耐药检测,具有快速、灵敏、高通量等特点,及时给临床调整治疗方案提供依据,适合各级实验室推广使用。

**参考文献**

[1] Suzuki F, Akuta N, Suzuki Y, et al. Selection of a virus strain resistant to entecavir in a nucleoside-naïve patient with hepatitis B of genotype H [J]. J Clin Virol, 2007, 39(2):149-152.

[2] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. N Eng J Med, 2004, 351(15):1521-1531.

[3] Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, et al. Meta-analysis: treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2008, 28(9):1067-1077.

[4] 参加乙型肝炎耐药讨论会专家. 核苷和核苷酸类药物治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理[J]. 临床肝胆病杂志, (下转第 3340 页)

表 5 非发酵革兰阴性杆菌对常用抗菌药物的耐药率 (%)

抗菌药物	鲍曼不动杆菌		铜绿假单胞菌		嗜麦芽窄食单胞菌	
	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感
氨苄西林/舒巴坦	22.7	68.2	100	0	—	—
哌拉西林/他唑巴坦	19	66.7	12.5	87.5	—	—
头孢他啶	45.5	54.5	12.5	87.5	8.0	64.0
头孢曲松	100.0	0.0	100.0	0.0	—	—
头孢吡肟	22.7	63.6	25	75.0	—	—
亚胺培南	31.8	68.2	0.0	62.5	—	—
庆大霉素	19.0	66.7	12.5	87.5	—	—
妥布霉素	33.3	66.7	0.0	87.5	—	—
环丙沙星	19.0	62.0	0.0	87.5	—	—
左旋氧氟沙星	13.6	68.2	0.0	100.0	0.0	100.0
复方新诺明	36.4	63.6	100.0	0.0	4.0	92.0

—:无数据。

### 3 讨 论

本研究共收集 8 846 份血培养标本,其中阳性标本 969 例,检出阳性率为 11.0%,略低于近期有关报道<sup>[1-2]</sup>。这可能与本院未能全面开展双侧采血有关系。毛美丽等<sup>[3]</sup>的统计显示,实行血培养双侧采血后 10 个月阳性率增加 5.08%。亦有报道表明,血培养双侧双瓶可提高血培养阳性率,且并不增加污染率<sup>[4]</sup>。2014 年我将进一步向临床医生宣传双侧采血,提高本院血培养的阳性率,降低污染率,为临床判断血流感染提供更可信的实验室依据。

本研究表明,血液感染中革兰阳性菌占 55.7%,革兰阴性菌占 42.6%,真菌占 1.7%。革兰阳性菌感染率略高于革兰阴性菌,与陈杏春等<sup>[5]</sup>和杜坤等<sup>[6]</sup>的研究结果相一致,而与陈文思等<sup>[7]</sup>和刘行超等<sup>[8]</sup>的研究结果存在一定的差异。这说明不同研究地域和不同时间期间,血培养阳性病原菌的菌群分布是有区别的,因此,及时了解本地区血液感染病原菌分布及耐药性,为指导临床合理用药极为重要。从表 1 中可看出,凝固酶阴性葡萄球菌已经成为医院感染最重要的病原菌,表皮葡萄球菌是最常见的凝固酶阴性葡萄球菌占 21.6%,这与各种侵袭性操作和介入治疗手段的广泛应用有关。链球菌和肠球菌的检出率分别为 5.6%和 2.3%。革兰阴性杆菌中肠杆菌科细菌分离率高于非发酵菌。其中肠杆菌科以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主,并检出 3 株沙门伤寒菌属菌株。非发酵革兰阴性杆菌中,主要是嗜麦芽窄食单胞菌和鲍曼不动杆菌以及铜绿假单胞菌。真菌检出率最低,以假丝酵母菌为主。

表皮葡萄球菌和金黄色葡萄球菌均对青霉素和复方新诺

明有较高的耐药性,均对利奈唑胺和万古霉素敏感。革兰阴性杆菌主要以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主,二者 ESBLs 的检出率分别为 54.8%和 18.2%,含  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的药物中两种菌均对哌拉西林/他唑巴坦高度敏感(>95%)。肠杆菌科细菌对亚胺培南仍然保持较高敏感度(>85%),故碳青霉烯类抗菌药物还是临床治疗肠杆菌科细菌感染的最有效药物之一,但是近年来随着抗菌药物的大量广泛使用,耐药率也呈上升趋势,另外嗜麦芽窄食单胞菌的检出率在非发酵革兰阴性杆菌中最高,是否与此类药物的大量使用有关,有待进一步研究。也有研究表明,鲍曼不动杆菌一旦对碳青霉烯类抗菌药物耐药,则对其他抗菌药物基本都耐药<sup>[9]</sup>,患者往往无药可用。本研究中鲍曼不动杆菌对亚胺培南的敏感率为 68.2%,但已发现有泛耐药的鲍曼不动杆菌,因此要严格控制在临床的经验性使用。

综上所述,本院 2012~2013 年血培养阳性病原菌种类繁多,科室分布广。临床各科应重视血培养,推广双侧采血,进一步提高血培养阳性率,降低污染率。医生应根据药敏试验结果合理使用抗菌药物,减少不合理性的经验用药,预防及控制多重耐药菌株的产生。

### 参考文献

- [1] 谢服役. 血培养标本病原菌的分布与耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(1): 222-224.
- [2] 张小莉, 王珏, 陈友华, 等. 602 例血培养阳性病原菌的分布及其耐药性分析[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 33(2): 195-200.
- [3] 毛美丽, 毛瑞忠. 血培养单、双侧采血阳性率比较及病原菌分布和耐药性分析[J]. 检验医学, 2009, 24(8): 911-913.
- [4] 赵旺胜, 王珏, 文怡, 等. 双侧双瓶血培养在临床应用的初步研究[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(1): 10-12.
- [5] 陈杏春, 赵丽. 血培养标本中病原菌的种类分布及其耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(19): 2650-2652.
- [6] 杜昆, 郑群, 朱丽莎, 等. 血培养主要病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(6): 695-697.
- [7] 陈文思, 朱家馨, 陈伟. 医院血培养的病原菌分布及耐药性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(7): 646-650.
- [8] 刘行超, 莫姍, 高云, 等. 血培养病原菌分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(2): 140-142.
- [9] Yoon J, Urban C, Terzian C, et al. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7): 753-757.

(收稿日期: 2014-04-11)

(上接第 3337 页)

2013, 29(1): 10-17.

- [5] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中国医学前沿杂志, 2011, 3(1): 66-82.
- [6] 张韧, 王敏, 符瑞佳, 等. HBV 基因型在我国九省市的分布与临床指标的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(3): 152-155.
- [7] 王其亮, 李旭. HBV 基因型分布与慢性乙肝临床关系的研究[J]. 安徽医药, 2010, 14(7): 781-783.
- [8] EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-185.

(收稿日期: 2014-05-15)

- [9] Orito E, Fujiwara K, Tanaka Y, et al. A case-control study of response to lamivudine therapy for 2 years in Japanese and Chinese patients chronically infected with hepatitis B virus of genotypes B and C[J]. Hepatol Res, 2006, 35(2): 127-134.
- [10] Sun J, Wang Z, Ma S, et al. Clinical and virological characteristics of lamivudine resistance in chronic hepatitis B patients: a single center experience[J]. J Med Virol, 2005, 75(3): 391-398.