

• 短篇论著 •

## 乙型肝炎病毒反转录酶区恩替卡韦耐药位点突变分析\*

张宏宇, 申红玉, 郑国军<sup>△</sup>

江苏省常州市第三人民医院检验科, 江苏常州 213001

**摘要:**目的 探讨乙型肝炎病毒反转录酶区恩替卡韦(ETV)耐药位点突变情况及临床特征。方法 收集 2010 年 7 月至 2020 年 12 月就诊于该院并接受核苷(酸)类似物(NAs)耐药检测的 6 008 例慢性乙型肝炎病毒感染者的临床资料和序列信息,统计 NAs 耐药突变,筛选出含有 ETV 耐药位点突变的患者 228 例,对相关耐药位点突变情况及临床特征进行分析。结果 ETV 耐药位点突变占比 3.8%(228/6 008),ETV 耐药位点阳性率从 2010 年的 0.67%逐年上升,到 2016 年达到峰值 6.81%,2017—2019 年有逐渐下降的趋势,2020 年又有所回升;2016 年后高耐药屏障药物 ETV 和 TDF 使用量增加;228 例 ETV 耐药阳性患者中,最常见的突变模式为 rtL180M+M204V+S202G,其次是 rtL180M+M204V+T184A(G/I/S/L);rtT184A(G/I/S/L)突变者 HBeAg 阳性率,HBV-DNA、ALT、AST 水平略高于 rtS202G 突变,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 高耐药屏障药物 ETV 的大量应用,导致耐药突变率升高,临床在换药治疗时需进行耐药测序检测及定期随访,防止不良事件的发生。

**关键词:**乙型肝炎; 恩替卡韦; 耐药; 核苷(酸)类似物

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2022.03.025

**中图法分类号:**R575.1

**文章编号:**1673-4130(2022)03-0371-04

**文献标志码:**A

近年来,恩替卡韦(ETV)作为一种强效、耐药基因屏障高的药物,广泛应用于慢性乙型肝炎(CHB)患者的抗病毒治疗中<sup>[1]</sup>,ETV 在病毒学、组织学和生物化学改善方面的效果优于拉米夫定(LAM)和阿德福韦酯(ADV)。《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》<sup>[2]</sup>按照“强效低耐药”的原则推荐将 ETV、富马酸替诺福韦酯(TDF)和丙酚替诺福韦(TAF)作为 CHB 防治一线药物,非一线药物比如 LAM、替比夫定(LdT)和 ADV 不再推荐使用。同时,指南进一步建议如果原来使用的药物是 LAM 和 LdT,即使病毒控制得很好也建议调整治疗,原来应用这些药物没有出现耐药的患者建议换用低耐药药物治疗<sup>[2]</sup>。

但患者长期使用核苷(酸)类似物(NAs)进行抗病毒治疗会使乙型肝炎病毒(HBV)反转录酶区一个或多个位点发生突变,即可导致机体对药物的敏感性下降甚至产生耐药<sup>[3-4]</sup>,致使抗病毒治疗失败。目前,关于 ETV 耐药的报道相对较少,在初治 CHB 患者中,ETV 治疗 5 年的累积耐药发生率为 1.2%<sup>[5]</sup>,但在治疗过程中,特别是 ETV 治疗其他 NAs 耐药的患者易出现病毒学突破等再耐药现象<sup>[6]</sup>。有研究回顾

性分析了 2009—2016 年 7 年间该院收治的 12 515 例进行 HBV 耐药性检测的患者,结果显示 2016 年该院 ETV 的耐药突变发生率在 17.1%<sup>[7]</sup>,随着经济发展和社会进步,药物可及性已经得到了很大的改善,部分患者特别是 ETV 用于治疗 LAM 或 ADV 耐药的患者更易发生 ETV 耐药的现象<sup>[8]</sup>。分别 ETV 耐药比例不断升高,成为不容忽视的问题,对于这类患者有必要分析了解其耐药突变特征,为临床规范抗病毒治疗提供参考。

本研究回顾性分析本院 HBV P 基因测序 ETV 耐药位点阳性患者资料,以期了解本地区 HBV 耐药突变特征,为后期临床规范抗病毒治疗提供参考。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2010 年 7 月至 2020 年 12 月在本院就诊并进行 HBV P 区耐药测序的慢性 HBV 感染患者 7 886 例为研究对象,所有患者均接受 NAs 单药或序贯治疗,经 HBV-DNA 定量检测  $> 500$  copy/mL,排除甲、丙、丁、戊、庚型肝炎和 HIV 合并感染者 1 878 例,剩余 6 008 例,所有诊断均符合《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》<sup>[2]</sup>相关标准。

\* 基金项目:江苏省常州市应用基础研究项目(CJ20180023);江苏省卫生和计划生育委员会计划项目(QNRC2016266)。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: immu\_zheng@126.com。

本文引用格式:张宏宇,申红玉,郑国军.乙型肝炎病毒反转录酶区恩替卡韦耐药位点突变分析[J].国际检验医学杂志,2022,43(3):371-

## 1.2 方法

**1.2.1 P 区耐药测序** 采用 QIAamp DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司)提取血清中 HBV-DNA,美国伯乐公司试剂扩增 DNA,反应条件为 95 °C 5 min 后,95 °C 10 s,56 °C 20 s,72 °C 30 s,共 40 个循环,取扩增标本产物 2~4 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,目的条带大小约为 500 bp,参考 Marker 条带,如目的条带亮度大于 Marker 最弱的条带,则认为扩增成功,可进行下一步纯化测序工作。如无肉眼可见目的条带或目的条带亮度低于 Marker 最弱的条带,则需进行巢式 PCR 扩增。巢式 PCR 第一轮扩增引物序列如下, F: 5'-ACTGTATTCCCATCCCATCAT-3'; R: 5'-TTCGTTGACATACTTTCCAATCA-3'。第二轮扩增引物序列如下, F: 5'-CTTGACATACTTTCCAATCAA-3'; R: 5'-AAGGTATGTGCCCCGTTTGT-3'。PCR 产物纯化扩增产物后,采用 ABI3100 测序仪对其测序。所有操作严格按照试剂盒说明进行。

**1.2.2 ETV 耐药性变异的判断** 本研究 ETV 耐药位点变异判断标准为在 LAM 耐药的基础上(M204I/V 和 L180M 变异),再加上至少 1 个 ETV 耐药位点[T184、S202 和(或)M250]的变异<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 临床实验室检测** HBV-DNA 检测采用中山大学达安基因股份有限公司的 DNA 提取试剂盒,在 RocheLightCycler480 仪器进行 PCR 扩增检测,HBV-DNA 结果以 <500 copy/mL 为阴性;乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)检测采用郑州安图生物公司磁微粒化学发光法试剂,在全自动化学发光测定仪 AutoLumo A2000 上进行检测;血清肝脏酶学指标丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST)的检测采用迈克公司试剂在日立 7600 生化仪器上进行检测,所有操作严格按照仪器与试剂说明书进行。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件对数据进行处理和分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采  $\chi^2$  检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 ETV 耐药位点阳性患者的一般资料** 筛选出 ETV 耐药位点阳性的患者 228 例,占比 3.8%(228/6 008),男 185 例,女 43 例,平均年龄(51.25 ± 11.25)岁,ALT 水平为(97.2 ± 146.1)U/L,AST 水平为(64.3 ± 93.9)U/L,HBeAg 阳性率为 47.37%(108/228),HBV-DNA 载量为(6.63 ± 0.12)copy/mL。ETV 耐药位点阳性率从 2010 年的 0.67% 逐年上升,

到 2016 年达到峰值 6.81%,2017—2019 年有一定下降的趋势,2020 年阳性率又上升至 5.96%,但送检病例也有一定数量的减少。见表 1。

**2.2 临床主要 NAs 的使用情况** 考虑 ETV 耐药率可能与药物使用情况有关,本研究分析了 LAM、LdT、ADV、TDF 这 4 类主要 NAs 的使用情况(因 LAM 和 LdT 属于同一类药物,故归为一组;因系统升级,未能查阅到 2010 年药物的使用情况,但不影响整体趋势)。2011—2014 年低耐药屏障的 LAM、LdT 和 ADV 为主要使用的抗病毒药物,2014—2016 年维持一定使用量,2016 年后使用量明显下降;高耐药屏障药物 ETV 在 2014 年后使用量明显增加,2017 开始高耐药屏障药物 ETV 和 TDF 使用量全面超过低耐药屏障药物;2014 年以来,ETV 一直是用量最多的药物。见图 1。

表 1 2010—2020 年 HBV P 区耐药测序情况及 ETV 耐药位点阳性分布情况

年份(年)	<i>n</i>	ETV 阳性( <i>n</i> )	阳性率(%)
2010	150	1	0.67
2011	607	16	2.63
2012	615	13	2.11
2013	779	26	3.62
2014	709	28	3.95
2015	637	28	4.39
2016	558	38	6.81
2017	475	28	5.89
2018	676	16	2.37
2019	500	16	3.20
2020	302	18	5.96
合计	6 008	228	3.79

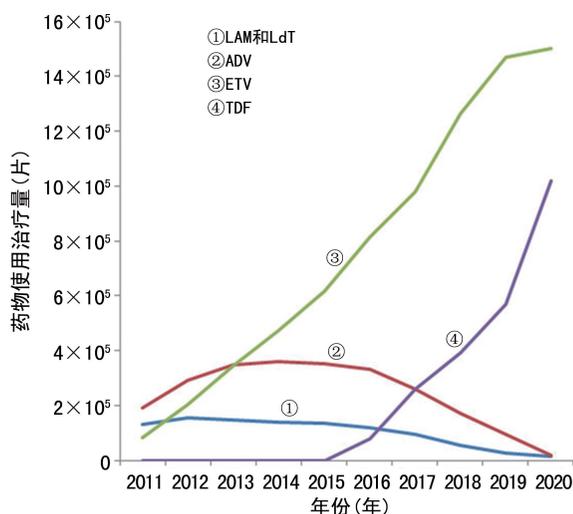


图 1 2011—2020 年临床主要 NAs 的使用情况

**2.3 ETV 基因型突变模式分析** rtL180M + M204V + S202G 和 rtL180M + M204V + T184A(G/I/S/L) 突变最为常见, 分别占 42.54% 和 28.51%; ETV 突变模式主要表现为 rtL180M + M204V 伴随 rtS202G 或 rtT184A(G/I/S/L) 突变, M204I 突变相对较少, 其中 rtL180M + M204I/V 合并 S202G 突变者 110 例, rtL180M + M204I/V 合并 rtT184A(G/I/S/L) 突变者 81 例。见表 2。

**2.4 ETV 主要耐药基因突变模式与临床特征的关系** 鉴于 ETV 主要突变模式为 rtL180M + M204I/V 合并 rtS202G 或 rtT184A(G/I/S/L), 本研究对这两种耐药突变模式患者的一些常见实验室特征如 HBeAg 阳性率, HBV-DNA, ALT, AST 等进行了比较, 结果发现 rtL180M + M204I/V 合并 rtT184A(G/I/S/L) 突变模式患者 HBeAg 阳性率, HBV-DNA,

ALT, AST 等平均值略高于 rtL180M + M204I/V 合并 rtS202G 突变患者, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

表 2 ETV 基因型耐药模式分析

突变模式	n	占比 (%)
rtL180M+M204V+S202G	97	42.54
rtL180M+M204I+M204V+S202G	13	5.70
rtL180M+M204V+T184A(G/I/S/L)	65	28.51
rtL180M+M204I+M204V+T184A(G/I/S/L)	7	3.07
rtL180M+M204I+T184A(G/I/S/L)	9	3.95
rtL180M+M204V+M250V	5	2.19
rtL180M+M204I+M204V+M250V	4	1.75
rtL180M+M204V+T184A(G/I/S/L)+S202G	10	4.39
rtL180M+M204V+V173L+T184A(G/I/S/L)	5	2.19
rtL180M+M204I+M204V+V173L+T184A(G/I/S/L)	2	0.88
rtL180M+M204I/V+V173L+M250V	4	1.75
rtL180M+M204I/V+I169T±rtM250V±T184A(G/I/S/L)±S202G	7	3.07

表 3 ETV 主要耐药突变模式临床实验室特征对比分析

突变模式	n	HBeAg (PEI U/mL)	HBeAg (+/-, n/n)	HBV-DNA (copy/mL)	ALT (U/L)	AST (U/L)
rtL180M+M204I/V 合并 rtS202G	110	37.47±14.35	58/52	6.72±0.23	103.89±33.39	61.58±21.21
rtL180M+M204I/V 合并 rtT184A(G/I/S/L)	81	46.42±13.98	45/36	6.51±0.94	80.75±29.46	53.18±18.63
P		0.238	0.705	0.382	0.321	0.521

### 3 讨论

采用 ETV 治疗可强效抑制病毒复制, 改善肝脏炎症, 安全性较好, 长期治疗可改善 CHB 肝硬化患者的组织学病变, 降低肝硬化并发症和肝细胞癌发生率, 降低肝脏相关和全因病死率。有研究表明, 长期口服 ETV 或 TDF 的 CHB 患者, 8 年生存率为 94.1%<sup>[10]</sup>。因此抗病毒治疗对 CHB 患者改善生活质量, 延长生存时间至关重要。

目前, 长期应用 NAs 进行抗病毒治疗的 CHB 患者体内病毒在这种药物压力筛选中更易发生突变而导致治疗失败<sup>[9]</sup>。有研究报道, 在初治 CHB 患者中, ETV 治疗 5 年的累积耐药发生率为 1.2%, 在 LAM 耐药的 CHB 患者中, ETV 治疗 5 年的累积耐药发生率提升至 51.0%<sup>[5]</sup>。多项研究显示, 接受长期 ETV 或其他 NAs 治疗的 CHB 患者转换至 TAF 治疗后, 病毒学抑制及肾功能得到显著改善<sup>[11-12]</sup>。充分了解本地区 HBV 耐药突变模式及相关临床症状对于调整用药及新耐药位点预测非常重要。

本研究回顾性分析了近 11 年来本院进行 HBV P 区耐药测序的 6 008 例患者, 筛选出 ETV 耐药位点阳性患者共 228 例, 占比 3.8% (228/6 008), 与之前报道的在初治 CHB 患者中, ETV 治疗 5 年的累积耐药

发生率为 1.2%, 在 LAM 耐药的 CHB 患者中, ETV 治疗 5 年的累积耐药发生率提升至 51.0%<sup>[5]</sup> 存在差异, 出现这种情况的原因考虑与本研究入组人群有关, 虽然本研究多数为经治患者, 但用药史不祥, 有很多是 LAM 或 LdT 经治患者, 可能会引发 ETV 累积耐药, 也有很多为 ADV 经治患者, 稀释了本底系数, 且故本研究 ETV 耐药位点阳性率在 1.2%~51.0%。分析从 2010—2020 年每年的 ETV 耐药位点阳性率, 从 2010 年的 0.67% 逐年上升, 到 2016 年达到峰值 6.81%, 与我国学者回顾性分析结果显示 ETV 的耐药突变发生率在 2016 年上升至 17.1% 的趋势基本一致<sup>[7]</sup>, 考虑与本研究时间跨度较长, 多数患者为 LAM 或 LdT 经治累积耐药筛选有关; 而 2017—2019 年又有逐渐下降的趋势, 可能与后期 ETV、TDF 等高耐药基因屏障药物大量使用有关, 分析这些年的药物使用情况, 2017 年开始, 高耐药屏障药物 ETV、TDF 的使用量全面超过低耐药屏障药物。但在 2020 年, 耐药率却又进一步升高至 5.96%, 出现这种情况可能是高耐药屏障药物的使用导致耐药人数减少, 送检病例减少所致, 也可能与长期大量高耐药屏障药物使用导致新耐药的产生有关, 需进一步研究探索。

分析 ETV 耐药突变模式, 结果显示 rtT184A(G/

I/S/L)和 rtS202G 是 ETV 耐药相关的最常见变异位点,而 rtM250V 位点变异较为少见,与之前相关报道一致<sup>[13-14]</sup>; ETV 耐药基因屏障的打破有赖于 rtL180M+M204V/I 的存在,本研究显示大部分 ETV 耐药发生在 rtM204V 的基础上,rtM204I 相对较少,与相关研究基本一致<sup>[9]</sup>,这可能是由于 rtM204I 突变株仍保留了对 ETV 较高的敏感性<sup>[13]</sup>;由于 ETV 耐药突变经常发生在 LAM 或 LdT 经治基础上,rtM204I 是 LAM 和 LdT 的主要变异形式,因此,有学者推测,在 ETV 耐药突变筛选过程中可能存在 rtL180M+M204I 突变向 rtL180M+M204V 突变转换的过程<sup>[14]</sup>。有研究表明发生 rtT184A/G/I/S 基因突变患者的肝脏炎症状况比发生 rtS202G/I 突变的患者更为严重,且更易进展为肝硬化<sup>[15]</sup>,本研究结果则显示两种突变模式的疾病严重程度无明显差异,与之前研究不同的原因可能与纳入患者临床分期不明确所致,仍需进一步观察研究。

本研究对本院近 11 年 CHB 患者的 ETV 耐药位点阳性进行回顾性分析,若有患者的用药史会更加完整,但由于时间跨度较长,且大部分患者为门诊病例,用药史、依从性不一,资料追踪难度较大,无用药情况说明,预存耐药情况不明。但作为中国东部地区长期的 ETV 耐药位点阳性患者的回顾性分析,本研究对于了解 HBV 变异情况、预后判断及换药治疗具有一定的指导意义。

## 参考文献

- [1] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398.
- [2] 中华医学会感染病学分会,中华医学会肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2019, 27(12): 938-961.
- [3] ZOULIM F. Detection of hepatitis B virus resistance to antivirals[J]. *J Clin Virol*, 2001, 21(3): 243-253.
- [4] STUYVER L J, LOCARNINI S A, LOK A, et al. Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region[J]. *Hepatology*, 2001, 33(3): 751-757.
- [5] TENNEY D J, ROSE R E, BALDICK C J, et al. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5): 1503-1514.
- [6] PARK J W, KIM H S, SEO D D, et al. Long-term efficacy of entecavir in adefovir-refractory chronic hepatitis B patients with prior lamivudine resistance[J]. *J Viral Hepat*, 2011, 18(10): e475-481.
- [7] GUO X, WU J, WEI F, et al. Trends in hepatitis B virus resistance to nucleoside/nucleotide analogues in North China from 2009-2016; a retrospective study[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 52(2): 201-209.
- [8] LI W, WANG L, LIU Y, et al. Efficacy of entecavir-based rescue therapy in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients in China: a retrospective study[J]. *Pharmazie*, 2018, 73(4): 223-247.
- [9] BALDICK C J, EGGERS B J, FANG J, et al. Hepatitis B virus quasispecies susceptibility to entecavir confirms the relationship between genotypic resistance and patient virologic response[J]. *J Hepatol*, 2008, 48(6): 895-902.
- [10] PAPTODORIDIS G V, SYPSA V, DALEKOS G, et al. Eight-year survival in chronic hepatitis B patients under long-term entecavir or tenofovir therapy is similar to the general population[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(6): 1129-1136.
- [11] OGAWA E, NOMURA H, NAKAMUTA M, et al. Tenofovir alafenamide after switching from entecavir or nucleos(t)ide combination therapy for patients with chronic hepatitis B[J]. *Liver Int*, 2020, 40(7): 1578-1589.
- [12] AGARWAL K, BRUNETTO M, SETO W K, et al. 96 weeks treatment of tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate for hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 672-81.
- [13] LIU L, LIU Y, CHEN R, et al. Prevalence of the entecavir-resistance-inducing mutation rtA186T in a large cohort of Chinese hepatitis B virus patients[J]. *Antiviral Res*, 2019, 164: 131-138.
- [14] 徐飞, 孙喜斌, 何艳群, 等. 恩替卡韦耐药位点阳性患者的回顾性分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2014, 8(2): 227-231.
- [15] 高国生, 翁彭剑, 许小敏, 等. 慢性 HBV 感染者恩替卡韦耐药突变特征分析[J]. *中华临床感染病杂志*, 2015, 8(2): 139-142.

(收稿日期: 2021-05-10 修回日期: 2021-09-22)