

## · 临床论著 ·

阿德福韦酯治疗应答不佳的慢性乙型肝炎患者的  
耐药分析杨松<sup>1</sup> 邢卉春<sup>1</sup> 姚永远<sup>3</sup> 王琦<sup>2</sup> 王笑梅<sup>1</sup> 李贵<sup>1</sup> 刘顺爱<sup>2</sup> 成军<sup>2</sup>

**【摘要】目的** 明确临床实际工作中ADV治疗 $\geq 48$ 周末获病毒学应答患者基因型耐药情况并对耐药相关因素进行分析。**方法** 收集ADV治疗 $\geq 48$ 周末获病毒学应答患者的血清样本及临床资料,应用PCR产物直接测序法联合焦磷酸测序法进行基因型耐药检测;分析基因型耐药与患者抗病毒治疗经过、HBV DNA载量等因素的相关性。**结果** 共收集104例ADV治疗 $\geq 48$ 周末获病毒学应答患者,共检出基因型耐药22例,耐药位点25个;耐药变异以rtA181T变异为主(60%)。既往LAM经治换用ADV患者ADV耐药检出率显著高于ADV初治患者( $\chi^2 = 5.448, P = 0.020$ );本组患者中能否检出ADV耐药变异与患者ADV治疗时间( $t = 1\ 212.5, P = 0.647$ )、送检耐药时HBV DNA载量( $t = 1.648, P = 0.102$ )以及应用ADV治疗病毒下降速度( $t = 1\ 135.5, P = 0.877$ )无显著相关性。**结论** ADV治疗 $\geq 48$ 周末获病毒学应答患者ADV基因型耐药检出率为21.15%,其中以rtA181T位点变异为主;提示对于ADV长期治疗应答不理想的患者,即使未出现病毒学突破,也应酌情考虑进行耐药检测。

**【关键词】** 阿德福韦酯; 耐药; 肝炎, 乙型, 慢性; 焦磷酸测序

**Genotype resistance profile in chronic hepatitis B patients with suboptimal virological response to adefovir dipivoxil** YANG Song<sup>1</sup>, XING Huichun<sup>1</sup>, YAO Yongyuan<sup>3</sup>, WANG Qi<sup>2</sup>, WANG Xiaomei<sup>1</sup>, LI Ben<sup>1</sup>, LIU Shunai<sup>2</sup>, CHENG Jun<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Center of Hepatology, <sup>2</sup>Institute of Infections Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; <sup>3</sup>The Second Ward of Intensive Medicine, People's Hospital of Rizhao City, Rizhao 276500, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: chengj0817@sina.cn; XING Huichun, Email: huichunxing@126.com

**【Abstract】Objective** To investigate the genotype resistance profile in real-life patients with chronic hepatitis B who got suboptimal response after  $\geq 48$  weeks adefovir dipivoxil (ADV) treatment and clinical factors related to ADV resistance. **Methods** The clinical data and serum samples were collected from patients with CHB who got suboptimal response after  $\geq 48$  weeks for ADV treatment. The genotype resistance of ADV was detected by PCR products direct-sequencing and pyrosequencing. Correlation between resistance and treatment history, HBV DNA level, etc were analyzed, respectively. **Results** Total of 104 patients with CHB were enrolled and ADV genotype resistance were found in 22/104 patents. There were 25 (60%) ADV resistance mutations were identified and rtA181T was the most common resistant mutation. Less resistance were identified in ADV naïve patients than patients who took lamivudine/ADV sequential therapy ( $\chi^2 = 5.448, P = 0.020$ ). ADV resistant positive was not significantly related to ADV treatment duration ( $t = 1\ 212.5, P = 0.647$ ), HBV DNA level when detecting ( $t = 1.648, P = 0.102$ ) and ratio of HBV DNA decline during treatment ( $t = 1\ 135.5, P = 0.877$ ). **Conclusions** About 21.15% ADV treated patients who got suboptimal response after  $\geq 48$  weeks ADV treatment were identified as ADV genotype resistance. RtA181T was the most common resistant mutation. Patients got suboptimal response after long-term ADV treatment

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.01.004

基金项目: “十二五”国家科技重大专项项目 (No. 2012ZX10004904); 中国肝炎防治基金会光辉基金资助项目 (No. GHF20100207); 北京市优秀人才培养资助 D 类项目 (No. 2012D003034000030); 首都卫生发展科研专项项目 (No. 首发 2011-2017-02)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院肝病中心<sup>1</sup>、传染病研究所<sup>2</sup>; 276500 日照市, 日照市人民医院重症医学科二病区<sup>3</sup>

通讯作者: 成军, Email: chengj0817@sina.cn; 邢卉春, Email: huichunxing@126.com

should consider drug resistance analysis even without virological breakthrough.

**【Key words】** Adefovir dipivoxil; Resistance; Chronic hepatitis B; Pyrosequencing

阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, ADV) 在我国慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB) 患者抗病毒治疗中有着大量应用。ADV 注册临床研究表明, ADV 治疗 HBeAg 阳性与阴性的 CHB 患者 48 周病毒学应答率分别为 39% 与 51% (HBV DNA 检测下限为 400 拷贝 /ml) [1-2]; 在对 ADV 治疗 48 周末实现病毒学应答的患者进行耐药检测时均未检测到耐药变异。参照相关指南意见, ADV 治疗 48 周末未获得病毒学应答的患者可定义为应答不佳 [3]。考虑到我国 CHB 患者在感染自然史、HBV 基因型等多方面与欧美国家患者人群存在差异, 我国 CHB 患者应用 ADV 治疗 48 周应答不佳患者的耐药情况或与欧美国家有所不同 [4]。目前关于我国临床实际工作中应用 ADV 治疗 ≥ 48 周应答不佳患者的耐药情况少见报道。本研究拟分析实际临床工作中 ADV 治疗 ≥ 48 周应答不佳患者的耐药情况并对耐药相关因素进行分析。

资料与方法

一、一般资料

1. 患者资料与血清收集: 患者来源于首都医科大学附属北京地坛医院 2007 年 12 月至 2011 年 9 月就诊的 CHB 患者, 患者均自愿提供详细病史资料并接受抗病毒耐药检测。收集患者血清样本及临床资料供本研究使用。受临床实际样本所限, 本研究入选患者为服用 ADV 单药 (10 mg/d) ≥ 48 周而 HBV DNA 仍可检出患者 (HBV DNA 检测下限为 500 拷贝/ml), 其中包括 ADV 初治患者与拉米夫定 (lamivudine, LAM) 治疗失败换用 ADV 患者; 本研究中剔除治疗期间出现病毒学突破的患者。

2. 主要试剂与仪器: 体液病毒 DNA/RNA 小量制备试剂盒购自 Axygen 公司; PCR 反应试剂盒购自 TaKaRa 公司; 乙型肝炎病毒耐药突变焦磷酸测序法检测试剂盒购自基因科技 (上海) 有限公司。焦磷酸测序仪由 Biotage 公司提供。PCR 扩增仪由德国 Eppendorf 公司提供。PCR 产物双脱氧法测序

由北京奥科生物科技有限公司与上海英骏生物技术有限公司完成。

二、方法

1. PCR 模板制备: 取患者血清 100 μl, 用 Axygen 公司提供的试剂盒提取 HBV DNA, 具体操作详见试剂盒说明书。

2. 巢式 PCR 扩增 HBV 反转录酶区: 第一轮 PCR 引物为: P3 (5'-YTCWSYCAATCGTCAA-3', nt105-122) 与 AP3 (5'-GAGMCACAAAGGTTCCAC-3', nt1 238-1 256)。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 10 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。第二轮引物为 Xnp2 (5'-AGGCAGGATAGCCACATT-3', nt146-163) 与 XAnp2 (5'-GCACCGAACATGGAGARC-3', nt1034-1051)。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 10 s, 共 40 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经纯化后直接用于焦磷酸测序分析。

3. PCR 产物双脱氧法直接测序: 上述 PCR 产物由北京奥科生物科技有限公司、上海英骏生物技术有限公司进行纯化、测序。测序引物选择 Xnp2, XAnp2 为备用测序引物。测序结果应用 Vector NTI 9.0 和 Chromas 软件对测序结果进行耐药位点分析。

4. 焦磷酸测序反应: 取上 PCR 产物进行焦磷酸测序, 具体操作详见焦磷酸测序用试剂盒说明书 [5]。

三、统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 本研究中计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两样本均数比较根据正态分布检验与方差齐性检验结果采用 *t* 检验、*t'* 检验或 Wilcoxon 秩和检验。计数资料比较根据样本量相应采用 Pearson 卡方检验与 Yates 卡方检验, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

结 果

一、患者的一般情况

总纳入 ADV 治疗 ≥ 48 周应答不佳患者 104

表 1 104 例 ADV 治疗应答不佳患者的基因型耐药情况

基因型耐药类型	例 (%)
rtA181T	13 (12.50)
rtA181V	2 (1.92)
rtN236T	4 (3.85)
rtA181T + rtN236T	2 (1.92)
rtA181V + rtN236T	1 (0.96)
合计	22 (21.15)

例, 其中男性88例, 女性16例; 平均年龄( $36.33 \pm 11.61$ )岁。平均ADV治疗时间为17.08个月。其中ADV初治患者56例, LAM应答不佳换用ADV治疗患者48例。

## 二、患者 ADV 基因型耐药检测结果

PCR产物直接测序法和(或)焦磷酸测序耐药检测阳性即认定为ADV基因型耐药。共检出ADV耐药患者22例(21.2%); 共检出耐药变异位点25个, 其中rtA181T变异数15个(60%), rtA181V变异3个(12%), rtN236T变异7个(28%)。相应耐药变异位点情况, 见表1。

## 三、ADV 治疗 $\geq 48$ 周应答不佳患者出现基因型耐药的相关因素分析

1. ADV初治患者与LAM治疗失败患者耐药检出率比较: ADV初治患者56例, 共检出ADV耐药7例; LAM治疗失败患者48例, 共检出ADV耐药15例。LAM治疗失败患者ADV耐药检出率高于ADV初治患者, 差异具有统计学意义( $\chi^2 = 5.448, P = 0.020$ )。

2. 送检耐药检测时患者HBV DNA水平与耐药检出的相关性: 检出ADV耐药的22例患者送检时HBV DNA平均水平为( $4.232 \pm 0.976$ )  $\log_{10}$ 拷贝/ml, 相应未检出耐药患者送检时HBV DNA平均水平为( $4.653 \pm 1.088$ )  $\log_{10}$ 拷贝/ml; 二者差异无统计学意义( $t = 1.648, P = 0.102$ )。

3. ADV治疗时间与耐药检出的相关性: 22例检出ADV耐药患者平均治疗时间为( $19.136 \pm 11.103$ )个月, 相应82例未检出耐药患者平均治疗时间为( $16.951 \pm 8.188$ )个月, 二者差异无统计学意义( $t = 1.2125, P = 0.647$ )。

4. 送检耐药时患者HBV DNA载量下降速度与耐药检出的相关性: 22例检出ADV耐药患者HBV DNA平均下降速度为( $0.105 \pm 0.120$ )  $\log_{10}$ 拷贝 $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{月}^{-1}$ , 相应82例未检出耐药患者HBV DNA平均下降速度为( $0.111 \pm 0.102$ )  $\log_{10}$ 拷贝 $\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{月}^{-1}$ , 二者差异无统计学意义( $t = 1.1355, P = 0.877$ )。

## 讨 论

既往ADV临床研究中对于耐药的检测多关注病毒学突破人群, 未关注病毒学应答不佳患者人群<sup>[6]</sup>。本研究结果初步表明, ADV治疗约17个月患者出现ADV基因型耐药检出率为21.15%; 其中ADV初治患者检出率为12.5%。该结果提示, 对于ADV治疗应答不理想患者, 即使未出现病毒

学突破, 也应酌情考虑进行耐药检测。而ADV全球注册临床研究中, ADV治疗48周末获得病毒学应答患者进行基因型耐药检测时未检出ADV耐药患者。本研究104例应用ADV治疗 $\geq 48$ 周患者进行耐药检测时共计检出22例(21.15%)ADV基因型耐药患者。分析导致该差别的原因, 一方面本研究纳入患者人群为临床实践中ADV治疗患者, 且用药时间较长(17.08个月); 另一方面本研究采用的耐药检测方法PCR产物双脱氧测序法联合焦磷酸测序法, 可检出占准种比率1%的耐药株病毒, 检测敏感性方法优于ADV注册临床研究采用的单纯PCR产物直接测序法<sup>[7-8]</sup>。

本研究中22例检出耐药患者均未表现为病毒学突破。分析原因, 一方面可能是由于患者检出耐药时间较早, 尚未表现为病毒学突破。另一方面可能与患者出现的rtA181T变异有关。既往研究表明rtA181T变异会导致sW172stop变异从而使HBsAg截短, 截短的HBsAg自身分泌障碍, 同时其还可以抑制野生株HBV的分泌, 从而使出现rtA181T变异患者可不表现为病毒学突破, 或者使病毒学突破时HBV DNA升高幅度较小<sup>[9-10]</sup>。本研究进一步证实, rtA181T变异可导致耐药患者HBV DNA水平仅表现为不再继续下降, 并未表现为典型的病毒学突破。

虽然相关指南已明确建议LAM应答不佳或耐药患者如采用ADV治疗应采用联合治疗方案<sup>[11-12]</sup>, 但在临床实践中仍屡见此类病例。本研究拟进一步分析ADV应答不理想但未出现病毒学突破患者的耐药相关因素, 结果表明, ADV耐药与既往LAM治疗换用ADV相关, 而与患者总计ADV治疗时间、耐药检测时HBV DNA水平以及HBV DNA下降速度均无显著相关性。该结果进一步明确了LAM应答不理想换用ADV的危害, 即导致ADV耐药几率显著升高。

总之, 本研究对于临床实际工作中104例ADV治疗 $\geq 48$ 周末获病毒学应答患者进行耐药分析表明, ADV基因型耐药发生率为21.15%, 其中以rtA181T位点变异为主; 该结果提示对于ADV长期治疗应答不理想患者, 即使未出现病毒学突破, 也应酌情考虑进行耐药检测。

## 参 考 文 献

- 1 Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2003, 348(9): 800-807.
- 2 Marcellin P, Chang TT, Lim SG, et al. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2003, 348(9): 808-816.



- 3 核苷(酸)类药物联合治疗慢性乙型肝炎专家组. 核苷(酸)类药物联合治疗慢性乙型肝炎专家建议[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(2): 65-68.
- 4 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J/CD]. 中国肝脏病杂志: 电子版, 2011, 3(1): 40-56.
- 5 郑金梅, 赵龙凤, 杨松, 等. 焦磷酸测序法在HBV阿德福韦酯耐药检测中的应用[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(10): 1199-1204.
- 6 杨松, 邢卉春, 王琦, 等. 慢性乙型肝炎患者阿德福韦酯治疗出现病毒学突破的耐药分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(3): 403-406.
- 7 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.
- 8 Mello FC, Lago BV, Lewis-Ximenez LL, et al. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients[J]. BMC Microbiol, 2012, 12(1): 96-102.
- 9 Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172<sup>\*</sup> mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound[J]. Hepatology, 2008, 48(1): 88-98.
- 10 Ahn SH, Park YK, Park ES, et al. The impact of the hepatitis B virus polymerase rtA181T mutation on replication and drug resistance is potentially affected by overlapping changes in surface gene[J]. J Virol, 2014, 88(12): 6805-6818.
- 11 参加乙型肝炎耐药讨论会. 核苷和核苷酸类药物联合治疗慢性乙型肝炎的耐药及其管理[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(6): 643-650.
- 12 European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2012, 57(1): 167-185.

(收稿日期: 2014-08-27)

(本文编辑: 孙荣华)

杨松, 邢卉春, 姚永远, 等. 阿德福韦酯治疗应答不佳的慢性乙型肝炎患者的耐药分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2015, 9(1): 10-13.

中华医学会