

· 综述 ·

乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药研究进展

杨松 邢卉春 成军

【摘要】核苷(酸)类似物耐药问题是慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的重要问题之一。随着核苷(酸)类似物耐药研究的不断进展,耐药检测新技术逐渐被研发,对病毒变异的机制了解更加精确且全面。核苷(酸)类似物新的可疑耐药位点不断被提出,但这些位点的临床意义尚待进一步明确。尤其是慢性乙型肝炎患者应用核苷(酸)类似物抗病毒治疗的过程即是病毒与机体相互作用的过程逐渐被认知,在此过程中病毒准种及全基因组序列存在动态演变。核苷(酸)类似物耐药仅为此相互作用过程的表现之一,应将核苷(酸)类似物耐药放在机体免疫与病毒相互作用的整体背景下进行研究。

【关键词】肝炎、乙型、慢性;肝炎病毒、乙型;耐药

Progress in hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues Yang Song, Xing Huichun, Cheng Jun.

Division 3 of Center of Hepatology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Cheng Jun, Email: chengj817@sina.cn

【Abstract】 Nucleos(t)ide analogues resistance is still one of the most important questions in management of patients with chronic hepatitis B. New techniques to detecting resistant mutations were developed, showing the resistance more precisely and comprehensively. New possible variants related to nucleos(t)ide analogues resistance were identified, but the clinical significance still need to be verified. The researches on nucleos(t)ide analogues resistance as one of the manifestations in dynamic interaction between HBV and host immunity during nucleos(t)ide analogues therapy were realized. And nucleos(t)ide analogues resistance in the background of virus-host interaction should be understood.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Hepatitis B virus, Resistance

核苷(酸)类似物[nucleos(t)ide analogues, NAs]为当前慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)抗病毒治疗的主要药物之一。目前有5种NAs被批准用于我国CHB患者的抗病毒治疗,分别为拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)、替比夫定(telbivudine, LdT)、恩替卡韦(entecavir, ETV)与替诺福韦酯(tenofovир disoproxil fumarate, TDF)。NAs长期治疗产生的耐药问题一直是乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染相关研究的热点之一。近年来,在耐药检测方法、新耐药位点与耐药发生机制等方面均有所进展,深化了临床中关于NAs耐药变异的认识,现就上述相关内容综述如下。

一、NAs耐药检测方法的研究进展

(一) NAs耐药检测技术进展

目前临床上常用的NAs耐药检测方法包括PCR产物直接测序法、针对单一位点的焦磷酸测序法、基因芯片法与

线性探针反向杂交法等^[1-5],关于这些经典耐药检测方法的优缺点已有相关综述^[2]。近年来不断有新耐药检测方法的研究报道。Tadokoro等^[3]和Gauthier等^[4]设计了可检测HBV整个基因组上S、C、Pol与X基因上的994个突变位点的报道,将基于结构特异性并耐热的核酸内切酶Invader[®] PCR技术用于HBV耐药检测,该研究分别设计了探针检测LAM、ADV、ETV的耐药变异。结果表明,该方法可检出病毒准种中2%的耐药株,检测灵敏度优于PCR产物直接测序法。Gauthier等^[4]设计了可检测HBV整个基因组上S、C、Pol与X基因上的994个突变位点的芯片,该基因芯片还可以检测HBV基因型。结果表明,该芯片检测血清样本中HBV DNA载量的检测下限为400拷贝/ml,而对于NAs耐药突变检测结果与PCR产物直接测序法在检测NAs等的结果吻合度达91%。Hu等^[6]报道利用改进的斑点杂交法来检测菌株对ADV耐药变异,可检测血清HBV DNA载量检测下限为1 000拷贝/ml,可检测出病毒准种中超过5%的变异株。Jia等^[7]报道采用多重连接探针real-time PCR方法来同时检测菌株对LAM与ADV耐药变异,结果提示该方法可检出病毒准种中低于10%的耐药变异,优于PCR产物直接测序。Sun等^[8]报道设计了针对LAM耐药变异病毒的3'-端硫化突变特异性引物,采用PCR

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.01.001

基金项目:北京市卫生系统高层次卫生技术人才队伍建设专项经费(No. 2016-108);北京市医院管理局扬帆计划项目(肝炎专业)(No. ZYLX201402);登峰计划项目(肝病专业)(No. DFL20151701)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院肝病三科

通信作者:成军, Email: chengj0817@sina.cn

方法检测耐药变异;其中对于LAM变异毒株的检测灵敏度达到10~100拷贝/ml。

近年来超深度焦磷酸测序(ultra deep pyrosequencing, UDPS)技术在NAs耐药检测中的应用有较多报道。UDPS可呈现整个HBV反转录酶的编码情况,而非单个或数个位点变异的检测^[9]。同时UDPS技术可检测出准种中极低比率的变异株,如Rodriguez等^[10]报道,UDPS可检出病毒准种中低至0.03%的耐药变异株。与INNO-LIPA相比,UDPS检测NAs初治与经治患者耐药更为敏感,可更早地发现耐药变异^[11]。耐药检测中的应用使医者对于NAs初治患者预存耐药变异、耐药变异种类以及NAs抗病毒治疗过程中的准种演化均有了更为深入的认知^[12-14]。

(二)对NAs基因型耐药检测方法的新认识

从技术的角度来说,理想的NAs耐药检测方法应该满足以下几点要求:

1. 该方法能从病毒准种中检出较低比率的变异毒株,并能对耐药株在准种的比率进行定量。一般而言,在药物的选择压力之下,耐药株有从在病毒准种占较小比率到逐渐成为优势株的过程,临床中希望在耐药株成为优势株,尤其是导致患者出现病毒学突破前被检出。随着耐药检测技术的进步,现有耐药检测方法已可以检出准种中低于0.03%的耐药株。而这些在准种中占极低比率的耐药株的意义该如何定位?对抗病毒过程中准种演化的深入研究提示,这些占有极低比率的耐药株在未更换药物的情况下可逐渐消失,并非必定成为优势株,这与变异株的复制能力及免疫位点的改变等多种因素均有关^[12-14]。因此,对于基因型耐药的定义将不再是发现了耐药变异即被认定为基因型耐药,还要参考耐药株在准种中的比率以及对毒株复制能力等的因素方能确定为有意义的耐药变异。

2. 对耐药检测的灵敏度的另一个要求对血清总病毒有较高的扩增效率,并能检出绝对数量上较低拷贝数的变异病毒。现有绝大多数耐药检测均基于PCR扩增。PCR扩增效率高,则在患者血清总病毒载量仍处在数百乃至数十个IU/ml时检出耐药变异,而如果PCR扩增效率低,则需患者血清病毒载量升高至 $\geq 3 \times 10^3$ IU/ml时方可检出,则有可能延误挽救治疗的时机。以rtA181T为例,单纯rtA181T变异患者并不表现为显著的HBV DNA载量升高^[15-16]。临床中期望变异株在绝对数量较低时被检测出以尽可能减少对肝脏的损伤。Tong等^[17]报道通过优化引物的方式可使病毒载量在20 IU/ml时即可被检测出来,有利于耐药变异的早期检出。

3. 理想的耐药方法应该能充分考虑HBV的基因多态性。目前HBV至少有从A到I 9种基因型,此外还可进一步分为不同亚型,即使在同一亚型内特定位点也存在多种基因多态性^[18]。这给基于探针杂交技术的INNO-LIPA、基因芯片乃至real-time PCR方法的耐药检测方法带来极大的挑

战。以探针杂交技术为例,要想设计出针对包含了数百种基因多态性的HBV反转录酶的各个耐药位点均能有较高特异性结合的探针是非常困难的。对比各种耐药检测方法,基于测序技术的耐药检测方法具有较好的特异性。

4. 理想的耐药方法应该能通过一次检测呈现所有位点的耐药变异。目前有大量研究报道称设计了针对LAM或ADV等的耐药检测方法^[8]。这种技术的创新价值值得肯定,但从临床的角度来讲,很多患者经过了多种NAs的序贯或联合治疗,耐药检测还需要明确对可能采用的挽救治疗药物的耐药情况。能通过一次检测来明确现有已知位点耐药情况的方法才能更好地满足临床需求。进一步而言,对于多耐药变异患者,耐药检测应该能够帮助判断多耐药变异的位点是在一个毒株上,还是分别处于多个毒株。以PCR产物直接测序结果提示rtM204I + rtN236T变异为例,在体内病毒准种中,rtM204I变异与rtN236T变异在同一个毒株还是分别位于不同的毒株对于后续挽救治疗药物方案具有重要判断价值^[19]。另外,近年来S基因以及C基因相关变异对于HBV复制能力的影响也受到关注,理想的耐药检测应该能够同时检测HBV S基因与C基因的变异情况^[20-22]。基于以上标准,笔者推测深度测序技术在成本、可操作性以及可及性进一步改善的情况下将是较为理想的临床耐药检测方法。

二、新NAs耐药位点的研究进展

(一)新NAs耐新位点研究进展

目前已明确以及处于研究阶段的NAs耐药位点如表1所示。随着NAs应用范围的不断推广以及表型耐药检测技术的普及,不断有研究提出新的NAs耐药变异位点。就LAM而言,研究提示rtM204Q为可能的耐药变异位点^[27];而L80I、rtS117F、rtL229、rtQ267H和rtL269为可能的补偿变异位点^[24-26, 29-30]。对ADV来说,rtA181S变异是可能的耐药位点^[28],而rtQ215H和rt233V作为ADV的耐药变异位点则存在争议^[31, 33-37]。对于ETV来说,有研究提示在rtM204V/I ± rtL180M变异基础上出现rtI163V或rtA186T变异构成菌株对ETV耐药^[38]。菌株对TDF耐药是临床关注的热点之一。

(二)TDF耐药变异研究现状

TDF治疗CHB患者的全球注册临床试验随访7年的结果提示仍无明确TDF耐药病例报道^[49]。该研究中患者在经过1年的TDF或ADV的双盲研究后转入7年的开放研究。开放研究进展到5年时,3.4% (16/466) TDF或TDF + FTC治疗患者出现了病毒学突破。但其中14例患者可归为依从性不佳(因在患者体内未检测到药物)。通过治疗前后序列对比分析,发现部分治疗失败患者出现了新的rtL91I/L变异,但表型耐药分析提示rtL91I/L变异与耐药无关^[50]。除临床试验之外,在临床实践中TDF治疗患者还有大量应答不佳与病毒学突破病例报道^[51],但不能除外患者治疗失败是依从性以及体内药物代谢过程的

因素^[52]。相关研究人员一直在寻找TDF可能耐药位点。早在2008年, Villet等即通过表型耐药分析rtA181T变异可导致TDF的50%抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀)升高2~3倍, 而rtA181T + rtN236T变异则可导致TDF的IC₅₀升高6倍。最近Murakami等^[53]研究也提示rtN236T可能会导致TDF的敏感性下降。此外Amini-Bavil-Olyae等^[39]通过体外实验表明, rtA194T可导致TDF敏感性下降, 但单纯rtA194T变异的聚合酶复制能力会下降, 如rtA194T变异联合HBV核心蛋白前-C区以及BCP变异则病毒的复制能力可恢复。另外Qin等^[40]通过表型耐药分析发现rtP177G与rtF249A变异可导致TDF敏感性下降, 该研究不仅通过小鼠动物模型进一步验证了此结果, 还通过数字模型分析表明rtP177G与rtF249A位点可影响HBV聚合酶上DNA模板与寡核苷酸的结合。但这些变异尚未在大量临床样本中得到确认, 还需进一步临床研究证实。

(三) 对新发现耐药位点的认识

虽然不断有新的耐药位点被提出, 但是这些新位点的临床意义尚需进一步明确。现有明确耐药变异的提出始于在临床上对比治疗基线时NAs治疗失败的患者, 尤其是病毒学突破时病毒序列出现了特定位点的突变。其次, 通过

表1 已获得广泛认可的 NAs 耐药位点与部分尚处于研究阶段的 NAs 耐药位点

NAs种类	耐药变异	对该变异的认识现状
LAM	rtM204V/I ± rtL180M	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
	rtA181T	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
	L80I	待确认的补偿变异 ^[24]
	rtS117F	待确认的补偿变异 ^[25]
	rtL229	待确认的补偿变异 ^[26]
	rtM204Q	待确认的耐药变异 ^[27]
	rtQ267H	待确认的补偿变异 ^[29]
	rtL269	待确认的补偿变异 ^[30]
	rtA181T/V	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
ADV	rtN236T	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
	rtA181S	待确认的耐药变异 ^[28]
	rtQ215H	有争议的耐药变异 ^[31-32]
	rtI233V	有争议的耐药变异 ^[33-37]
	rtM204V/I ± rtL180M	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
LdT	rtA181T	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
	rtM204V/I ± rtL180M基础上 + rtI169、rtT184、rtS202或rtM250任一个或多个位点变异	广泛认可的耐药变异 ^[1, 23]
ETV	rtI163V	待确认的耐药变异 ^[38]
	rtA186T	待确认的耐药变异 ^[38]
	rtA194T	待确认的耐药变异 ^[39]
TDF	rtP177G	待确认的耐药变异 ^[40]
	rtF249A	待确认的耐药变异 ^[40]
	rtA181T + rtN236T	待确认的耐药变异 ^[41]

表型测序分析证实, 该位点变异导致对于该药物的敏感性下降。如果表型耐药提示某变异导致某NAs的IC₅₀升高≥10倍, 则考虑耐药; 如IC₅₀升高≤5倍则认为无耐药, 介于二者之间则称为部分耐药^[42]。此外, 目前已有NAs耐药的小鼠模型来辅助判断该类药物的耐药情况^[40]; 同时如果能够通过生物信息学手段构建耐药变异病毒的反转录酶的数字模型并分析其与NAs的相互作用改变情况, 也有助于确定耐药变异^[43]。

理论上符合上述条件的变异即可确定为耐药变异。但实际上除了表1已经取得广泛认可的位点外, 其他疑似耐药位点的意义存在广泛争议。以rtQ215变异为例, Micco等^[31]报道rtQ215H为疑似ADV耐药变异位点; 但随即Amini-Bavil-Olyae等^[32]提出rtQ215H/S等氨基酸改变只是该位点的正常基因多态性, 与LAM与ADV的耐药无关。2006年, Schildgen等^[44]报道rtI233V变异为ADV耐药变异位点。随后2007年Curtis等^[36]通过对大样本ADV治疗队列进行分析并结合表型耐药分析结果指出, rtI233V仅为该位点的正常基因多态性。2010年Schildgen等^[35]报道在临床病例中观察到ADV抗病毒治疗压力下选择出rtI233V变异的情况, 为rtI233V是ADV耐药变异位点增加了新证据。但2014年最初报道rtI233V为ADV耐药位点课题组内部发生意见分歧: 其中Geipel等^[33]认为rtI233V变异并不是导致ADV治疗失败的原因; 而Sirma等^[34]则仍坚持认为rtI233V是ADV耐药变异位点, 之所以出现结果差异是由于表型耐药检测方法的差别; 而Liu等^[37]报道rtI233V变异可能在修复ADV耐药株的复制能力过程中起到一定作用。

实际上表型耐药检测方法的具体细节的确会对病毒变异的评价结果存在影响。目前多数表型耐药检测是通过将野生株质粒进行点突变的方式来构建疑似耐药株质粒^[33-37]。但从HBV反转录酶的三维结构来分析, 有可能是HBV反转录酶上多个氨基酸位点改变的合力才导致了HBV反转录酶与NAs结合力下降^[43, 45]。因此能真实再现患者体内病毒准种多个毒株及多个位点变异的表型耐药检测方法似乎是更接近临床现实情况的选择^[46-47]。另外目前的表型耐药检测多采用HBV复制子质粒转染的方式来模拟HBV感染的过程^[33-40], 与HBV自然感染过程仍存在一定差距。随着HBV肝细胞受体的发现以及HBV自然感染细胞模型的建立与优化, 未来基于患者血清HBV感染肝细胞模型的表型耐药检测可能更贴近临床真实耐药情况^[48]。

三、耐药发生机制的研究进展

(一) 从HBV基因组的角度来理解耐药变异

随着深度测序技术的发展, 研究人员逐渐认识到出现HBV基因组耐药相关变异如rtM204I本身只是构成相关变异的必要因素, 但仅出现rtM204V变异并不能构成临床耐药, 而是在抗病毒治疗过程中HBV整个基因组的演变导致了临床耐药的发生^[54]。如Chen等^[58]对LAM与ADV序贯治疗

患者的序列血清样本进行深度测序分析发现,随着抗病毒治疗时间延长,患者不仅P基因上的耐药位点发生变异,HBsAg上的T细胞与B细胞表位同样发生变异。HBV基因组包括现有已知的P、S、C与X等4个开放读码框,某一个基因的变异对于其他基因功能均存在交互的影响。RtA181T变异可导致HBsAg出现sW172*截短变异^[55]。rtA181T/sW172*变异可进一步导致肝细胞内质网线粒体应激,可能导致细胞恶变^[15-16]。此外核苷(酸)类似物耐药变异还可引起HBsAg抗原表位的变异,从而影响机体免疫对于病毒的免疫清除^[56]。而HBsAg变异本身也会影响HBV聚合酶的复制能力。Amini-Bavil-Olyae等^[20]报道LAM耐药相关的rtM204V等变异会导致病毒复制能力下降,但如果HBsAg同时发生G145R或P120T则可修复耐药株病毒的复制能力。而Ahn等^[57]研究则提示rtA181T变异导致的病毒复制能力下降以及耐药是由其导致的HBsAg基因变异决定的。如rtA181T变异导致sW172*截短变异,则病毒复制能力下降并表现为对ADV耐药,而如果rtA181T变异导致sW172S变异,则不会引起病毒对于ADV的耐药。通常LAM耐药患者中rtM204V/I变异会导致病毒复制能力下降,一般需要rtL180M变异来对病毒能力进行补偿,而Ohkawa等^[21]研究发现在rtM204V/I变异不合并rtL180M变异时,前-S2与BCP变异可补偿耐药病毒的复制能力。Herbers等^[22]也报道BCP与前-C区变异可增强ADV耐药病毒的复制能力。因此NAs耐药可能不仅仅是HBV聚合酶区某一位点变异的结果,而是在抗病毒药物与机体免疫压力下,病毒整个基因组演变的结果,需要将HBV的耐药变异放在病毒、机体免疫与肝细胞动态复杂的相互作用角度来理解耐药变异。

(二)从准种概念来理解耐药变异

HBV准种的关键早已为大家熟知,测序技术的应用使得对于NAs抗病毒治疗过程中的病毒准种演变有了更直观、深入的认识。Ninomiya等^[60]对CHB患者自基线至用药至出现LAM耐药的序列血清样本进行深度测序分析展示了耐药株在患者准种中所占比率逐渐升高至成为优势株的过程。Lee等^[61]对1例ETV原发耐药患者的序列血清样本进行深度测序分析,结果显示ETV耐药首先出现rtM204V+rtL180M耐药,在此基础上再出现ETV耐药的过程,形象地阐释了耐药屏障的概念。Zhou等^[12]研究报道了抗病毒治疗过程中病毒准种中不同毒株的相互作用以及竞争选择过程。深度测序技术使得对准种演变认识更直观外,还改变了临床中对病毒变异的一些观念。

首先出现某一种NAs耐药如ETV耐药的患者并不一定服用过该药物。Inoue等^[19]通过应用克隆测序动态监测LAM耐药患者应用LAM+ADV联合挽救治疗过程中病毒准种变化,在患者体内发现了ETV耐药毒株的存在。有研究对既往LAM与ADV序贯治疗出现病毒学突破患者血清进行克隆测

序分析也发现,既往未经过ETV治疗患者体内发现了ETV耐药毒株,且发现了LAM/ADV/ETV均耐药的毒株^[59]。

其次患者血清检测到的耐药株也不一定在药物选择压力成为优势株。如Zhang等^[14]通过超深度焦磷酸测序技术深度测序检测了32例ETV治疗患者,包括12例病毒学应答患者与20例部分应答患者,总体预存耐药变异0.10%~6.70%,ETV治疗应答患者基线时也有耐药变异的存在,但在强有力的抗病毒作用下,病毒仍被抑制。毕竟耐药株病毒需要进入到肝细胞核,成为cccDNA模板后方能稳定存在。

另外,临床上考虑病毒耐药出现病毒学突破乃至生化学突破患者血清中耐药株并不一定占优势株。随着测序技术发展,可以对患者体内的HBV野生株与耐药株分别定量并计算耐药株在病毒准种中的比率^[62]。Mello等^[63]报道在CHB患者出现LAM耐药并病毒学突破患者进行焦磷酸测序分析发现耐药株并不一定占优势株(>50%)。本课题组^[64]对于ADV治疗失败患者进行焦磷酸测序分析的结果也表明,即使在出现病毒学突破的患者中,耐药株可能仍以非优势株形式存在,这也验证了上述NAs耐药并非单一耐药位点的作用,而是HBV整个基因组的演变以及与机体免疫相互作用的结果。

四、小结

CHB患者耐药问题仍然是CHB患者抗病毒治疗中的重要问题之一。随着NAs耐药研究的不断进展,新的耐药检测技术不断被研发,可以更加精确、全面地评价病毒变异情况。新的可能耐药位点也不断被发现,但这些位点的临床意义尚需进一步明确。尤其是逐渐认识到CHB患者应用NAs抗病毒治疗的过程即为病毒与机体相互作用的过程,在这个过程中病毒准种及全基因组序列时刻进行着动态的演变。NAs耐药为此相互作用过程的表现之一,应该将NAs耐药置于机体免疫与病毒相互作用的整体背景下来研究。

参 考 文 献

- [1] 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/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2012,6(6):643-650.
- [2] 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.
- [3] Tadokoro K, Suzuki F, Kobayashi M, et al. Rapid detection of drug-resistant mutations in hepatitis B virus by the PCR-Invader assay[J]. J Virol Methods,2011,171(1):67-73.
- [4] Gauthier M, Bonnaud B, Arsac M, et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome[J]. J Clin Microbiol,2010,48(11):4207-4215.
- [5] Jardi R, Rodriguez-Frias F, Tabernero D, et al. Use of the novel INNO-LiPA line probe assay for detection of hepatitis B virus variants that confer resistance to entecavir therapy[J]. J Clin Microbiol,2009,47(2):485-488.
- [6] Hu Y, Zhang WL, Xie SL, et al. An improved reverse dot hybridization

- for simple and rapid detection of adefovir dipivoxil-resistant hepatitis B virus[J]. *Genet Mol Res*,2012,11(1):53-60.
- [7] Jia S, Wang F, Li F, et al. Rapid detection of hepatitis B virus variants associated with lamivudine and adefovir resistance by multiplex ligation-dependent probe amplification combined with real-time PCR[J]. *J Clin Microbiol*,2014,52(2):460-466.
- [8] Sun A, Pu W, Zhou C, et al. A nanoscale mutation-sensitive on/off switch based assays for the detection of hepatitis B virus lamivudine-resistant mutations[J]. *J Nanosci Nanotechnol*,2015,15(5):3939-3943.
- [9] Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, et al. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients[J]. *J Infect Dis*,2009,199(9):1275-1285.
- [10] Rodriguez C, Chevaliez S, Bensadoun P, et al. Characterization of the dynamics of hepatitis B virus resistance to adefovir by ultra-deep pyrosequencing[J]. *Hepatology*,2013,58(3):890-901.
- [11] Mese S, Arikian M, Cakiris A, et al. Role of the line probe assay INNO-LiPA HBV DR and ultra-deep pyrosequencing in detecting resistance mutations to nucleoside/nucleotide analogues in viral samples isolated from chronic hepatitis B patients[J]. *J Gen Virol*,2013,94(Pt 12):2729-2738.
- [12] Zhou B, Dong H, He Y, et al. Composition and interactions of hepatitis B virus quasispecies defined the virological response during telbivudine therapy[J]. *Sci Rep*,2015,5:17123.
- [13] Yin F, Wu Z, Fang W, et al. Resistant mutations and quasispecies complexity of hepatitis B virus during telbivudine treatment[J]. *J Gen Virol*,2015,96(11):3302-3312.
- [14] Zhang XX, Li MR, Cao Y, et al. Dynamics of genotypic mutations of the hepatitis B virus associated with long-term entecavir treatment determined with ultra-deep pyrosequencing: a retrospective observational study[J]. *Medicine(Baltimore)*,2016,95(4):e2614.
- [15] Lai MW, Yeh CT. The oncogenic potential of hepatitis B virus rtA181T/surface truncation mutant[J]. *Antivir Ther*,2008,13(7):875-879.
- [16] Yeh CT, Chen T, Hsu CW, et al. Emergence of the rtA181T/sW172* mutant increased the risk of hepatoma occurrence in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B[J]. *BMC Cancer*,2011,11:398.
- [17] Tong Y, Liu B, Liu H, et al. New universal primers for genotyping and resistance detection of low HBV DNA levels[J]. *Medicine(Baltimore)*,2016,95(33):e4618.
- [18] Kim BK, Revill PA, Ahn SH. HBV genotypes: relevance to natural history, pathogenesis and treatment of chronic hepatitis B[J]. *Antivir Ther*,2011,16(8):1169-1186.
- [19] Inoue J, Ueno Y, Wakui Y, et al. Four-year study of lamivudine and adefovir combination therapy in lamivudine-resistant hepatitis B patients: influence of hepatitis B virus genotype and resistance mutation pattern[J]. *J Viral Hepat*,2011,18(3):206-215.
- [20] Amini-Bavil-Olyae S, Vucur M, Luedde T, et al. Differential impact of immune escape mutations G145R and P120T on the replication of lamivudine-resistant hepatitis B virus e antigen-positive and -negative strains[J]. *J Virol*,2010,84(2):1026-1033.
- [21] Ohkawa K, Takehara T, Kato M, et al. Supportive role played by precore and preS2 genomic changes in the establishment of lamivudine-resistant hepatitis B virus[J]. *J Infect Dis*,2008,198(8):1150-1158.
- [22] Herbers U, Amini-Bavil-Olyae S, Mueller A, et al. Hepatitis B e antigen-suppressing mutations enhance the replication efficiency of adefovir-resistant hepatitis B virus strains[J]. *J Viral Hepat*,2013,20(2):141-148.
- [23] 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.
- [24] Warner N, Locarnini S, Kuiper M, et al. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2007,51(7):2285-2292.
- [25] Lin CL, Chien RN, Hu CC, et al. Identification of hepatitis B virus rtS117F substitution as a compensatory mutation for rtM204I during lamivudine therapy[J]. *J Antimicrob Chemother*,2012,67(1):39-48.
- [26] Ji D, Liu Y, Li L, et al. The rtL229 substitutions in the reverse transcriptase region of hepatitis B virus (HBV) polymerase are potentially associated with lamivudine resistance as a compensatory mutation[J]. *J Clin Virol*,2012,54(1):66-72.
- [27] Liu Y, Xu Z, Wang Y, et al. rtM204Q may serve as a novel lamivudine-resistance-associated mutation of hepatitis B virus[J]. *PLoS One*,2014,9(2):e89015.
- [28] Liu Y, Li X, Xin S, et al. The rtA181S mutation of hepatitis B virus primarily confers resistance to adefovir dipivoxil[J]. *J Viral Hepat*,2015,22(3):328-334.
- [29] Qin B, Zhang B, Zhang X, et al. Substitution rtq267h of hepatitis B virus increases the weight of replication and lamivudine resistance[J]. *Hepat Mon*,2013,13(10):e12160.
- [30] Ahn SH, Kim DH, Lee AR, et al. Substitution at rt269 in hepatitis B virus polymerase is a compensatory mutation associated with multi-drug resistance[J]. *PLoS One*,2015,10(8):e0136728.
- [31] Micco L, Fiorino S, Loggi E, et al. Polymorphism rtQ215H in primary resistance to adefovir dipivoxil in hepatitis B virus infection: a case report[J]. *BMJ Case Rep*,2009,1(1):287.
- [32] Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Mohebbi SR, et al. Prevalence, viral replication efficiency and antiviral drug susceptibility of rtQ215 polymerase mutations within the hepatitis B virus genome[J]. *J Hepatol*,2009,51(4):647-654.
- [33] Geipel A, Glebe D, Will H, et al. Hepatitis B virus rtI233V mutation and resistance to adefovir[J]. *N Engl J Med*,2014,370(17):1667-1668.
- [34] Sirma H, Schildgen O. More on hepatitis B virus rtI233V mutation and resistance to adefovir[J]. *N Engl J Med*,2014,371(5):482-483.
- [35] Schildgen O, Olotu C, Funk A, et al. Selection and counterselection of the rtI233V adefovir resistance mutation during antiviral therapy[J]. *J Clin Microbiol*,2010,48(2):631-634.
- [36] Curtis M, Zhu Y, Borroto-Esoda K. Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir[J]. *J Infect Dis*,2007,196(10):1483-1486.
- [37] Liu Y, Xin S, Ye X, et al. Increased occurrence of mutant rtI233V of HBV in patients receiving adefovir therapy[J]. *Antivir Ther*,2016,21(1):9-16.
- [38] Hayashi S, Murakami S, Omagari K, et al. Characterization of novel entecavir resistance mutations[J]. *J Hepatol*,2015,63(3):546-553.
- [39] Amini-Bavil-Olyae S, Herbers U, Sheldon J, et al. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains[J]. *Hepatology*,2009,49(4):1158-1165.

- [40] Qin B, Budeus B, Cao L, et al. The amino acid substitutions rtP177G and rtF249A in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus polymerase reduce the susceptibility to tenofovir[J]. *Antiviral Res*,2013,97(2):93-100.
- [41] Villet S, Pichoud C, Billioud G, et al. Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure[J]. *J Hepatol*,2008,48(5):747-755.
- [42] Locarnini S. Hepatitis B viral resistance: mechanisms and diagnosis[J]. *J Hepatol*,2003,39 (Suppl) 1:S124-132.
- [43] Daga PR, Duan J, Doerksen RJ. Computational model of hepatitis B virus DNA polymerase: molecular dynamics and docking to understand resistant mutations[J]. *Protein Sci*,2010,19(4):796-807.
- [44] Schildgen O, Sirma H, Funk A, et al. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir[J]. *N Engl J Med*,2006,354(17):1807-1812.
- [45] Walsh AW, Langley DR, Colonno RJ, et al. Mechanistic characterization and molecular modeling of hepatitis B virus polymerase resistance to entecavir[J]. *PLoS One*,2010,5(2):e9195.
- [46] Zhu Y, Curtis M, Snow-Lampart A, et al. In vitro drug susceptibility analysis of hepatitis B virus clinical quasispecies populations[J]. *J Clin Microbiol*,2007,45(10):3335-3341.
- [47] Baldick CJ, Eggers BJ, 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.
- [48] Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *Elife*,2012,1(1):e00049.
- [49] Buti M, Tsai N, Petersen J, et al. Seven-year efficacy and safety of treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B virus infection[J]. *Dig Dis Sci*,2015,60(5):1457-1464.
- [50] Kitrinos KM, Corsa A, Liu Y, et al. No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*,2014,59(2):434-442.
- [51] Chan HL, Chan CK, Hui AJ, et al. Effects of tenofovir disoproxil fumarate in hepatitis B e antigen-positive patients with normal levels of alanine aminotransferase and high levels of hepatitis B virus DNA[J]. *Gastroenterology*,2014,146(5):1240-1248.
- [52] Liu W, Song H, Chen Q, et al. Multidrug resistance protein 4 is a critical protein associated with the antiviral efficacy of nucleos(t)ide analogues[J]. *Liver Int*,2016,36(9):1284-1294.
- [53] Murakami E, Tsuge M, Hiraga N, et al. Effect of tenofovir disoproxil fumarate on drug-resistant HBV clones[J]. *J Infect*,2016,72(1):91-102.
- [54] Thai H, Campo DS, Lara J, et al. Convergence and coevolution of hepatitis B virus drug resistance[J]. *Nat Commun*,2012,3:789.
- [55] Warner N, Locarnini S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/SW172^{*} mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound[J]. *Hepatology*,2008,48(1):88-98.
- [56] Sloan RD, Ijaz S, Moore PL, et al. Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant[J]. *Antivir Ther*,2008,13(3):439-447.
- [57] 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.
- [58] Chen CH, Lee CM, Tung WC, et al. Evolution of full-length HBV sequences in chronic hepatitis B patients with sequential lamivudine and adefovir dipivoxil resistance[J]. *J Hepatol*,2010,52(4):478-485.
- [59] Yang S, Xing H, Wang Q, et al. De novo entecavir+adefovir dipivoxil + lamivudine triple-resistance mutations resulting from sequential therapy with adefovir dipivoxil, and lamivudine[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*,2016,15:24.
- [60] Ninomiya M, Kondo Y, Niihori T, et al. Sequential analysis of amino acid substitutions with hepatitis B virus in association with nucleoside/nucleotide analog treatment detected by deep sequencing[J]. *Hepatol Res*,2014,44(6):678-684.
- [61] Lee GH, Inoue M, Toh JK, et al. Two-step evolution of the hepatitis B drug-resistant mutations in a patient who developed primary entecavir resistance[J]. *Liver Int*,2013,33(4):642-646.
- [62] Bhattacharya D, Lewis MJ, Lassmann B, et al. Combination of allele-specific detection techniques to quantify minority resistance variants in hepatitis B infection: a novel approach[J]. *J Virol Methods*,2013,190(1-2):34-40.
- [63] 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*, 2012,12:96.
- [64] Yang S, Zheng JM, Wang XY, et al. PCR product pyrosequencing for detecting HBV resistance to adefovir[J]. *Int J Infect Dis*,2010,14(S2):S65.
- [65] Zhou B, Dong H, He Y, et al. Composition and interactions of hepatitis B virus quasispecies defined the virological response during telbivudine therapy[J]. *Sci Rep*,2015,5:17123.

(收稿日期: 2017-04-27)

(本文编辑: 孙荣华)

杨松, 邢卉春, 成军. 乙型肝炎病毒核苷(酸)类似物耐药研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018,12(1):1-6.