

恩替卡韦治疗后出现病毒学突破的慢性乙型肝炎患者的耐药分析

薛瑞霞 张燎云 杨松 王琦 邢卉春 郭江 谢雯 闫杰 成军

【摘要】 目的 研究恩替卡韦(ETV)治疗后出现病毒学突破的慢性乙型肝炎(CHB)患者的 ETV 耐药情况。**方法** 收集 10 例 ETV 治疗后出现病毒学突破患者的血清,PCR 产物直接测序结合克隆测序法用于 ETV 耐药检测,NCBI HBV 基因型分析软件用于 HBV 基因型确定。**结果** 10 例病毒学突破患者中 B 基因型者 3 例,C 基因型者 7 例,其中检出 8 例 ETV 基因型耐药。**结论** PCR 产物直接测序结合克隆测序法可以作为目前国内检测 ETV 耐药的主要手段;rtT184L 变异在 B 或 C 基因型的 ETV 耐药患者中较为常见。

【关键词】 慢性乙型肝炎;恩替卡韦;耐药

Resistance assay in chronic hepatitis B patients who underwent virological breakthrough during entecavir treatment XUE Rui-xia, ZHANG Liao-yun, YANG Song, WANG Qi, XING Hui-chun, GUO Jiang, XIE Wen, YAN Jie, CHENG Jun. Department of Infectious Diseases, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: CHENG Jun, Email: editor.ditan@gmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the resistance profiles of chronic hepatitis B patients who underwent virological breakthrough during entecavir (ETV) treatment. **Methods** Ten serum samples of patients who underwent virological breakthrough during ETV treatment were collected. Direct sequencing of PCR products and cloning sequencing were used to determine ETV genotype resistance. NCBI HBV genotyping tool was used for determining HBV genotype. **Results** Of ten patients with virological breakthrough, 3 were genotype B and 7 were genotype C. Eight were ETV resistance positive. **Conclusions** Direct sequencing of PCR products and cloning sequencing may be the main methods to determine ETV genotype resistance in China; rtT184L was common in patients with ETV genotype resistance in our study.

【Key words】 Chronic hepatitis B; Entecavir; Drug resistance

基金项目:首都特色临床医学技术发展研究攻关类项目(Z07050700690702);北京市卫生局青年科学研究资助项目(QN2007-47)

作者单位:030000 太原市,山西医科大学第一附属医院感染病科(薛瑞霞、张燎云);首都医科大学传染病研究所(杨松、王琦、成军);北京地坛医院肝病中心(邢卉春、郭江、谢雯、闫杰);

通讯作者:成军,Email:editor.ditan@gmail.com

在慢性乙型肝炎的治疗中,抗病毒治疗是关键。目前,主要有两大类抗病毒治疗药物:干扰素和核苷(酸)类似物。核苷(酸)类似物由于服用方便、抗病毒作用强且不良反应少而在临床上得以广泛应用。目前,我国临床上应用于抗 HBV 治疗的核苷(酸)类似物有 4 种:拉米夫定(LVD)、阿德福韦酯(ADV)、恩替卡韦(ETV)和替比夫定(LdT),都可以作用于 HBV 的逆转录过程,通过与 dNTP 竞争性结合而阻止新病毒 DNA 的合成。但是随着治疗的进行,HBV 会逐渐出现对核苷(酸)类似物的耐药。据报道,LVD 的耐药发生率在 1 年时为 24%,4 年时则达到 70%^[1],而 ADV 在 HBeAg 阴性的初治患者中 1 年的耐药发生率为 0,5 年时达到 28%^[2]。ETV 自 2006 年在中国正式上市以来,因其抗病毒活性强且耐药发生率低,逐渐在拉米夫定、阿德福韦酯治疗效果欠佳的患者中得到应用。但是由于上市时间短、耐药发生率低而且治疗费用高于其他核苷(酸)类似物,目前国内鲜有关于 ETV 耐药的报道。因此,我们对 ETV 治疗后出现病毒学突破的患者进行了耐药检测并对其相关因素进行分析。

资料与方法

一、研究对象

2008 年 3 月~9 月于北京地坛医院就诊的 CHB 患者。入选标准:符合 2000 年《病毒性肝炎防治方案》CHB 的诊断标准;患者规范口服 ETV(0.5 mg/d)并且出现病毒学突破,除外依从性等因素所致的病毒载量上升;自愿提供详细病史资料并接受抗病毒耐药检测。病毒学突破与基因型耐药等定义参照 2007 年美国肝脏病学会《慢性乙型肝炎防治指南》。

二、PCR 产物直接测序

取患者血清 200 μ l 提取 HBV 模板(采用 Axygen 体液病毒提取试剂盒)。巢式 PCR 扩增 HBV 逆转录酶区:第一轮 PCR 引物为 P3(5'-YCTCWSYCAATCGTCAA-3', nt 105 ~ 122)和 AP3(5'-GAGMCACAAAGGTTCCAC-3', nt 1238 ~ 1256)。反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 延伸 7 min。第二轮引物为 Xnp2(5'-AGGCAGGATAGCCACATT-3', nt 146 ~ 163)和 XAnp2(5'-GCACCGAACATGGAGAR C-3', nt 1034 ~ 1051)。反应条件为 94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min 共 40 个循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物经纯化后直接用于测序分析,测序引物采用 Xnp2,测序仪为 ABI 3730xl,通过 Sequence Navigator 软件得出序列。

三、PCR 克隆测序

随机选取 PCR 产物直接测序结果峰型杂合和峰型整齐的样本各 1 例进行克隆测序。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后进行回收(采用威格拉斯 DNA 凝胶回收与纯化试剂盒)。回收产物连接 T-easy 载体(购于 Promega 公司);连接产物转化 DH5 α 感受态大肠埃希菌(本室保留)。挑取阳性克隆进行菌落 PCR,PCR 反应体系同巢式 PCR 第二轮;提取质粒(采用威格拉斯高纯质粒小提试剂盒),Eco R I 酶切鉴定(购于 TaKaRa 公司),取鉴定阳性克隆 15 ~ 20 个进行测序分

析,测序引物为 T-easy 载体通用引物 T7(5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')和 SP6(5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3')。

四、测序结果分析

本研究中,如果发现 rtM204V/I 及其补偿变异位点(rtL180M、rtV173L)变异合并 rtT184、rtS202、rtM250 或 rtI169 位点的其中任意一种变异即认定为恩替卡韦基因型耐药。HBV 基因型通过 NCBI HBV 基因型分析软件确定^[3]。

结 果

一、一般情况

共收集 10 例患者血清。男性 8 例,女性 2 例,平均年龄 41.7 岁(30 ~ 66 岁),平均 ETV 治疗时间为 22.7 个月(16 ~ 58 个月)。

二、既往核苷(酸)类似物应用史

10 例患者中有 9 例既往有 1 年以上的 LVD 服用史,1 例既往有 ADV 服用史,最终均表现为 LVD 或 ADV 治疗失败。

三、PCR 产物直接测序结果

10 例患者的血清均进行 PCR 产物直接测序,运用 CHROMAS 软件读取测序结果,分析常见耐药位点的变异情况,有 8 例患者检出了 ETV 耐药,1 例检出 rtM204V 和 rtL180M 变异,1 例未发现变异(表 1)。将患者测序结果输入 NCBI HBV 基因型检测软件,得出此 10 例患者中 B 基因型 3 例,C 基因型 7 例。

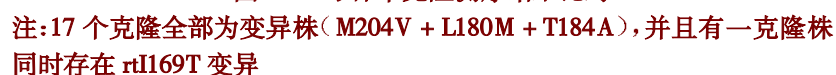
表 1 患者的变异情况及变异位点

编号	YMDD 变异相关位点			ETV 变异相关位点			
	rtM204	rtL180	rtV173	rtT184	rtS202	rtM250	rtI169
1*	V	M	-	-/L	-/G	-	-
2	V	M	L	L	-	-	V
3	V	M	-	L	-	-	-
4	V	M	-	L	-	-	-
5	V	M	-	L	-	-	-
6*	V	M	-	A	-	-	-/T
7	V	M	-	-	G	-	-
8	V	M	-	L	-	-	-
9	V	M	-	-	-	-	-
10*	-	-	-	-	-	-	-

注: * 为进行克隆测序的样本

四、克隆测序结果

对其中的编号为 1、6 和 10 的样本分别挑取 15 ~ 17 个克隆进行测序,运用 NTI 软件进行比对。在 1 号样本中,野生株和变异株共存,以变异株为主(13/15)。变异株均存在 rtM204V 和 rtL180M 变异,但 rtT184L 和 rtS202G 变异不共存于同一克隆株中(图 1);在 6 号样本中,17 个克隆全为变异株,并且有一克隆株同时存在 rtI169T 变异(图 2、图 3),这在两次 PCR 产物直接测序图中表现不同(图 4、图 5);10 号样本克隆测序均为野生株,未见变异株。



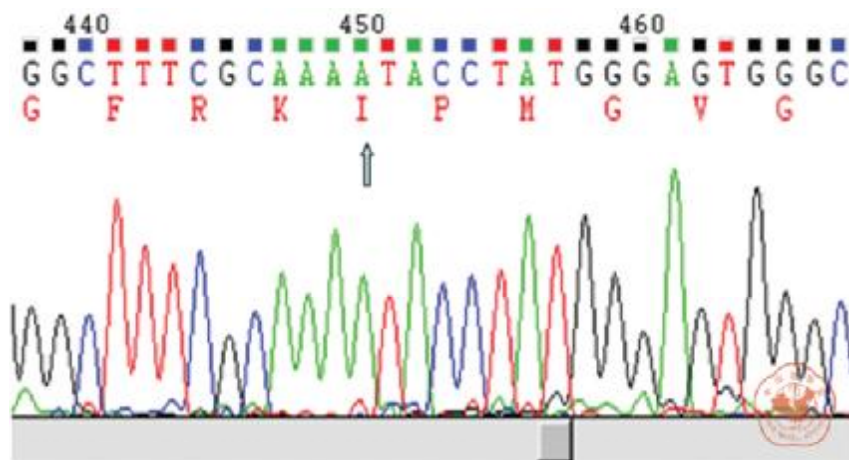


图4 6号样本首次PCR产物直接测序

注:rt169 未见明显变异

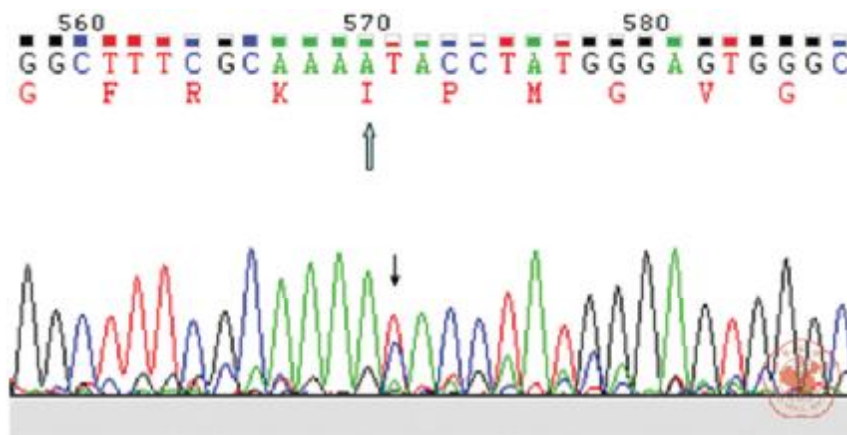


图5 6号样本再次PCR产物直接测序

注:rt169 出现变异小峰

五、耐药检测结果

9例既往LVD治疗失败的患者中,8例检出ETV耐药,1例检出rtM204V和rtL180M变异;1例既往ADV治疗失败的患者,未检出耐药。8例发生ETV耐药的患者的应用ETV至发生病毒学突破的平均治疗时间为 (19.43 ± 2.72) 个月。

讨 论

随着ETV在慢性乙型肝炎治疗中的应用,其耐药问题也日益受到重视。目前有关ETV耐药的报道大多来自于国外研究。对于核苷(酸)类似物耐药的检测,欧美国家多采用INNO-LIPA的方法,该法检测的灵敏度和特异度都比较高,但试剂盒非常昂贵,目前在我国推行尚不太现实;国内对核苷(酸)类似物耐药的检测常用PCR产物直接测序法、克隆测序法、PCR-RFLP法、Real-Time法及基因芯片等方法。但是由于ETV的耐药涉及多个位点,不适于用PCR-RFLP法、Real-Time法,而国内的基因芯片技术尚不成熟,相对而言PCR产物直接测序法比较合

适。其优点在于可以直观显示整个 HBV 逆转录酶(RT)区序列,便于对多个核苷(酸)类似物耐药位点进行分析,所得序列还可以用于基因型分析,并且检测所需费用不高,技术平台也易于搭建;缺点是灵敏度不高,只有当变异病毒达到病毒准种的 20% ~ 30% 以上时方可检出^[4]。当野生株与变异株同时存在时,在 PCR 产物直接测序结果中,主峰之下可能会有小的杂合峰,但有时杂合峰与测序背景干扰很难区分,这是影响 PCR 直接测序法灵敏度的重要因素。克隆测序方法检测耐药具有较高的敏感度, Pallier 等^[5]报道克隆测序方法可比 INNO-LIPA 方法提前检出拉米夫定耐药变异病毒。本研究中,PCR 产物直接测序法检出变异者其克隆测序中均包含有相应变异的克隆株,而对于 PCR 直接测序检测阴性的标本,克隆测序可以提高其敏感度,如在 6 号样本的首次 PCR 产物直接测序法中未见 rt169 位点变异,而克隆测序中发现了 rtI169T 变异株。所以,PCR 产物直接测序法结合克隆测序法可以作为目前国内检测 ETV 耐药的主要手段。

有关 ETV 的耐药位点尚无统一定论。Colonno 等^[6]认为,产生恩替卡韦耐药性的先决条件是 YMDD 变异的存在,YMDD 变异株的 rtI169T、rtT184A/G/I/S、rtS202G/I 及 rtM250V 等进一步变异可形成对恩替卡韦的耐药性。Tenney 等^[7]认为,需要至少 3 个变异位点方可构成有临床意义的 ETV 耐药,即 rtM204V 和 rtL180M 再加上至少一个 ETV 耐药位点 T184、S202 或 M250。2008 年 APASL 会议《慢性乙型肝炎管理指南》中正式提出,至少有 3 个位点的碱基置换才能构成有临床意义的 ETV 耐药,即 M204V 和 L180M 再加上以下任何 1 个 ETV 耐药位点 T184、S202 和(或)M250^[8]。本研究的 8 例 ETV 基因型耐药患者均出现 rtM204V 和 rtL180M 变异,而 ETV 相关的变异位点以 rtT184L 为主,也可见 rtS202G 单独变异,未见 rt250 变异。另外,在 1 号样本的 PCR 产物直接测序中检测到 rtT184L 和 rtS202G 同时变异,但克隆测序中发现 rtT184L 和 rtS202G 变异不共存于同一克隆株中,说明这两个变异位点是独立的,不存在相互依附的关系;在 2 个样本检测到 rt169 位点的变异,但其都是在 rt184 变异的基础上,说明 rt169 可能为继发变异位点。

在本研究的基础上,结合 Tenney 等^[7]研究中的 ETV 耐药患者的基因型与耐药位点,我们发现 rtT184L 主要存在于 B、C 基因型的 HBV 中,目前在 A、D 基因型中尚未发现。我国的 HBV 患者以 B、C 基因型为主,所以 rtT184L 很可能是我国 HBV 患者 rt184 位点的主要变异类型,这可以为国内 ETV 基因芯片等方法的准确建立提供初步依据。

针对 6 号样本 PCR 产物直接测序和克隆测序在 rt169 位点上的不同,我们用同一份血清进行了第二次 PCR,并对 PCR 产物进行测序,发现此次 rt169 出现了变异小峰。在人体内 HBV 以准种形式存在,当野生株和变异株共存时,不同批次的 PCR 所选择的模板在野生株和变异株的比例上很可能有较大差异,从而导致 PCR 扩增结果的不同。这也是导致 PCR 产物直接测序法敏感性不高的原因之一。这也提示我们,对于 PCR 产物直接测序法结果阴性的患者,可以进行克隆测

序,某些情况下也可以再次或多次行 PCR 产物直接测序。

由于 ETV 有很高的耐药屏障,所以在初治患者中发生耐药是非常少的,在治疗 96 周时仅有 1% 的患者由于耐药而出现病毒学突破^[7]。但在已经存在 LVD 耐药的基础上(M204V 和 L180M),只需要再有 1 个位点的碱基突变即可突破这个很高的基因屏障从而抑制 ETV 的作用。本研究中发现的 8 例 ETV 基因型耐药的患者既往都有 1 年以上 LVD 应用史并最终表现为 LVD 治疗失败,而后其应用 ETV 至发生病毒学突破的平均治疗时间为(19.43 ± 2.72)个月,这在一定程度上提示我们既往 LVD 治疗失败的患者再应用 ETV 治疗时,18 个月左右可能是基因型耐药和病毒学突破的频发点,需要密切监测 HBV DNA 水平的变化,必要时可在病毒学突破之前进行 ETV 耐药检测。当然这仍需要进一步大样本的临床资料总结进行验证。

参 考 文 献

- 1 Lai CL, Dienstag J, Schiff E, et al. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. Clin Infect Dis, 2003, 36: 687-696.
- 2 Marcellin P, Asselah T. Resistance to adefovir: a new challenge in the treatment of chronic hepatitis B. J Hepatol, 2005, 43: 920-923.
- 3 Rozanov M, Plikat U, Chappey C, et al. A web-based genotyping resource for viral sequences. Nucleic Acids Res, 2004, 32: W654-W659.
- 4 Lai CL, Gane E, Liaw YF, et al. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. N Engl J Med, 2007, 357: 2576-2588.
- 5 Pallier C, Castera L, Soulier A, et al. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. J Virol, 2006, 80: 643-653.
- 6 Colonna R, Rose R, Levine S, et al. Entecavir two year resistance update: no resistance observed in nucleoside naive patients and low frequent resistance emergence in lamivudine refractory patients. Hepatology, 2005, 42(suppl 1): A962.
- 7 Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, et al. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51: 902-911.
- 8 Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance and crossresistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure. Hepatol Int 2008, doi:10.1007/s12072-008-9048-3.

(收稿日期:2008-12-02)

(本文编辑:温少芳)

薛瑞霞,张缘云,杨松,等.恩替卡韦治疗后出现病毒学突破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,2009,3(2):137-144.