

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.01.006

甘肃地区乙型肝炎病毒分型和耐药突变分析*

丁 丽,陈俏丽[△],田鹏飞,张旭强,雷志萍

甘肃省兰州市第二人民医院肝病研究所,甘肃兰州 730046

摘要:目的 探讨甘肃地区乙型肝炎病毒(HBV)基因型分布特征及耐药情况,为乙型肝炎患者抗病毒用药提供指导依据。方法 选择 2018 年 1 月至 2019 年 8 月于该院就诊的 131 例乙型肝炎患者,通过 Sanger 测序法分析患者 HBV 基因型和耐药突变位点分布情况。结果 131 例乙型肝炎患者共检出 B、C、D 3 种基因型。其中 B 型 2 例(1.53%),C 型 126 例(96.18%),D 型 3 例(2.29%)。检出 51 例核苷酸类似物耐药,总耐药率为 38.93%,其中 B 型 1 例,C 型 49 例,D 型 1 例。耐药突变位点最多见于 M204V/I,多位点突变以 M204V/I+M204V 联合突变多见,常在此基础上发生 3 位点、4 位点甚至 5 位点突变。与阿德福韦酯相关的 A181V/T、N236T、A181V/T+N236T 耐单药突变最常见,共 15 例(29.41%)。耐多药突变 36 例(70.59%),主要以拉米夫定和替比夫定联合耐药为主,在此基础上多有恩替卡韦联合耐药发生。结论 甘肃地区 HBV 患者基因型以 C 型为主,耐药形势严峻,突变组合模式复杂多样,应及时检测患者 HBV 基因型及耐药突变位点,以评价乙型肝炎患者临床疗效,并指导临床抗病毒治疗合理用药。

关键词:乙型肝炎病毒; Sanger 测序; 耐药突变; 基因型; 甘肃

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)01-0024-04

Genotyping and drug resistance mutation analysis of hepatitis B virus in Gansu area*

DING Li, CHEN Qiaoli[△], TIAN Pengfei, ZHANG Xuqiang, LEI Zhiping

Institute of Liver Diseases, Lanzhou Municipal Second People's Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China

Abstract: **Objective** To analyze the genotype distribution characteristics and drug resistance situation of hepatitis B virus (HBV) in Gansu area, so as to provide a guidance basis for antiviral medication for the patients with hepatitis B. **Methods** A total of 131 patients with hepatitis B admitted to this hospital from January 2018 to August 2019 were selected. The distribution situation of HBV genotypes and drug-resistant mutation sites was analyzed by the Sanger sequencing method. **Results** Among 131 patients with hepatitis B, the genotype B, C and D were detected out, including 2 cases (1.53%) of type B, 126 cases (96.18%) of type C and 3 cases (2.29%) of type D. Fifty-one cases of nucleotide drug resistance were detected with a total drug resistance rate of 38.93%, including 1 case of type B, 49 cases of type C and 1 case of type D. M204V/I was the most common drug-resistant mutation site, and the M204V/I+M204V combined mutation was more common in multi-site mutation. The mutations at three sites, four sites and even five sites often occurred on this basis. Adefovir dipivoxil-related A181V/T, N236T, and A181V/T+N236T single-agent mutations were the most common, which had 15 cases (29.41%). There were 36 cases (70.59%) of multi-drug mutations, which was dominated by lamivudine (LAM) and telbivudine (LDT) combined resistance, on this basis more Entecavir (ETV) combined resistance occurred. **Conclusion** The genotype in the patients with hepatitis B in Gansu area is mainly the genotype C, the drug resistance situation is severe, and its mutation combination forms are complex and diverse. Therefore, the HBV genotype and drug resistance mutation site should be detected in time to evaluate the clinical efficacy of the patients with hepatitis B and guide the drug rational use in clinical antiviral therapy.

Key words: hepatitis B virus; Sanger sequencing; drug-resistant mutation; genotype; Gansu

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(HBV)引起的可导 致肝损伤的慢性传染性疾病。全球约有 20 亿人既往

* 基金项目:甘肃省兰州市卫生健康指导项目(2022-ZD-20);甘肃省兰州市卫生健康行业科研项目(2023-019)。

作者简介:丁丽,女,主任药师,主要从事肝病分子诊断相关研究。 [△] 通信作者, E-mail:405895928@qq.com。

或正在感染 HBV, 每年约有 82 万人死于 HBV 相关的肝衰竭、肝硬化和肝癌^[1]。我国属于 HBV 感染高发国家, 约有 2 000 万人为携带 HBV 的慢性乙型肝炎患者^[2]。核苷酸类似物(NAs)是治疗慢性乙型肝炎患者的主要药物, 且不同基因型患者对 NAs 的治疗应答有所差异。相关研究报道, HBV 会产生耐药突变甚至多重耐药^[3], 给临床治疗带来了困扰。因此, 本文采用 Sanger 测序法就目前甘肃地区 HBV 感染者体内 HBV 基因型及耐药情况进行统计分析, 为临床慢性乙型肝炎患者的个体化治疗提供数据支持。

1 资料与方法

1.1 一般资料 纳入 2018 年 1 月至 2019 年 8 月在本院就诊的 HBV 感染者 131 例, 其中男 101 例、女 30 例, 年龄 15~74 岁、平均(45±12)岁。所有患者均符合 2015 年中华医学会肝病学分会和中华医学会感染病学会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南(2015 年版)》^[4]中的诊断标准, 同时排除甲、丙、丁、戊型肝炎病毒感染, 排除自身免疫性肝炎、酒精性肝炎、药物性肝炎等疾病。本研究经医院医学伦理委员会审核通过(审批号: lzsdermyyyxllwyh202308)。

1.2 仪器与试剂 3500Dx 基因分析仪(美国 ABI 公司)、Eppendorf Centrifuge 5430R 404A 离心机、Eppendorf Research plus 加样枪、Life technologies 2720 Thermal Cycler PCR 仪。HBV 耐药基因突变检测试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司)、HBV 核酸提取试剂盒(湖南圣湘生物技术有限公司)、SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取 严格按照圣湘生物技术有限公司产品说明书进行操作, 取 HBV 患者分离血清 1 mL, 采用磁珠法提取患者 HBV DNA。

1.3.2 PCR 测序 按照中山大学达安基因产品说明书取 37 L 反应液、3 L 反应酶、10 L 核酸产物加入 PCR 反应管中, 充分混匀后瞬时离心, 上机运行 PCR 程序; PCR 扩增结束后, 按照 PCR 产物纯化试剂盒步骤纯化获得 PCR 产物, 鉴定后立即进行 PCR 测序; 按照 1 L PCR 纯化产物、2 L BigDye、3 L BigDye 缓冲液、1 L 测序引物、13 L 灭菌纯化水的比例配制测序 PCR 体系, 混匀后上机运行测序程序。

1.3.3 测序产物纯化 各 PCR 反应管分别加入 2 L 125 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)、2 L 3mol/L 醋酸钠(pH 值 5.2)和 50 L 100%无水乙醇, 短时振荡, 室温避光放置 15 min。4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min, 去上清液, 加入 150 L 预冷 70%乙醇, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 立即去上清液, 室温避光

放置 15~30 min; 加入 10 L 甲酰胺, 短时振荡溶解 DNA, 短时离心后 95 ℃变性 5 min, 迅速置冰水中冷却 4 min, 取样电泳分析。

1.3.4 基因分析仪测序 变性后的测序产物加入与基因分析仪配套的 96 孔板, 盖好, 按加样顺序编辑样品列表。根据测序仪型号选用具有 IVD 标志的测序程序进行测序。

1.3.5 结果分析 测序结束后运用美国国家生物技术信息中心网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>)及生物信息分析云平台(<https://www.celloud.cn/#/app/dashboard/list>)进行测序结果的基因分型和耐药突变位点分析。常见耐药突变位点的信息参考《欧洲肝病协会 HBV 感染临床操作指南》及试剂盒说明书。

1.4 统计学处理 采用 Excel2010 软件进行统计分析, 计数资料以例数或百分率表示。

2 结果

2.1 HBV 感染者病毒基因型及耐药情况 131 例乙型肝炎患者中男性占比(77.10%)显著高于女性(22.90%), 40 岁以上中老年患者比例(67.18%)高于青年(32.82%)。131 例 HBV 感染者中产生耐药突变 51 例, 耐药率为 38.93%。此外, 共检测出 B、C、D 3 种基因型别, 其中 C 型是主要基因型。见表 1。

表 1 不同基因型突变及耐药情况				
基因分型	n	构成比(%)	耐药突变例数(n)	耐药率(%)
B 型	2	1.53	1	50.00
C 型	126	96.18	49	38.89
D 型	3	2.29	1	33.33
合计	131	100.00	51	38.93

2.2 不同基因型耐药突变模式分析 51 例耐药患者中检出 M204I(10 例)、M204V/I(29 例)、M204V(10 例)、M250V/L/I(10 例)、S202G/I(3 例)、T184A/G/S/(2 例)、A181V/T(17 例)、N236T(11 例)、L180M(13 例)、V173L(2 例)及 I160T(1 例)共 11 个耐药突变位点。其中突变频率最高的位点是 M204V/I(29 例), 这种高频突变主要引起拉米夫定(LAM)和替比夫定(LDT)耐药; 其次为 A181V/T(17 例), 这种突变主要引起阿德福韦酯(ADV)耐药。此外, 共检出 19 种耐药突变位点组合模式, 其中单一位点突变 17 例(33.33%, 17/51), 双位点突变 17 例(33.33%, 17/51), 3 位点突变 12 例(23.53%, 12/51), 4 位点及以上突变 5 例(9.80%, 5/51)。多位点突变以 M204V/I+M204V 联合突变多见, 常在此基础上发生 3 位点、4 位点甚至 5 位点突变, 未检出与富马酸替诺福韦酯(TDF)耐药相关位点。见表 2。

2.3 HBV 感染者耐药情况突变位点分析 51 例耐药患者中,耐单药突变 15 例,突变率为 29.41% (15/51);耐多药突变 36 例,突变率为 70.59% (36/51)。其中与 ADV 相关的 A181V/T、N236T、A181V/T+N236T 以耐单药突变最常见,共 15 例 (29.41%,15/51)。混合突变主要以 LAM 和 LDT 联

合耐药为主 (21.57%,11/51),在此基础上多有 ADV (5.88%,3/51)、恩替卡韦 (ETV,9.80%,5/51) 以及 与 ADV、ETV 联合耐药 (5.88%,3/51) 发生。此外, 还有 LAM 和 ETV 联合耐药 (13.72%,7/51),ADV、 ETV 联合耐药 (13.73%,7/51),未检出 TDF 耐药 株。见表 2。

表 2 HBV 感染者耐药突变情况 (n)

突变位点	耐药情况	B 型	C 型	D 型	合计
A181V/T	ADV	1	8	0	9
A181V/T+M250V/L/I	ADV+ETV	0	4	0	4
A181V/T+N236T	ADV	0	2	0	2
N236T	ADV	0	4	0	4
N236T+M250V/L/I	ADV+ETV	0	3	0	3
A181V/T+M204V/I	ADV+LDT+LAM	0	1	0	1
V173L+L180M+M204V+M204V/I	ADV+LAM+LDT	0	1	0	1
A181V/T+N236T+M204V/I	ADV+LAM+LDT	0	1	0	1
M204V/I+M204I	LDT+LAM	0	4	0	4
M204V/I+M204V	LDT+LAM	0	3	0	3
M204V/I	LDT+LAM	0	4	0	4
L180M+M204V/I+S202G/I	ETV+LAM	0	1	0	1
L180M+M204V/I+M204V	ETV+LAM	0	5	0	5
S202G/I+L180M+M250V/L/I+M204V+M204V/I	ETV+LAM	0	1	0	1
L180M+M204V/I+M204I	ETV+LAM+LDT	0	2	1	3
I160T+L180M+M250V/L/I+M204V/I	ETV+LAM+LDT	0	1	0	1
V173L+L180M+M204I+M204V/I	ETV+LAM+LDT	0	1	0	1
T184A/G/S/I/L/F+M204I+M204V/I	ADV+ETV+LAM+LDT	0	2	0	2
N236T+M250V/L/I+M204I+M204V/I	ADV+ETV+LAM+LDT	0	1	0	1

3 讨 论

HBV 是严重危害人类健康的肝炎病毒之一, NAs 能有效抑制 HBV DNA 复制,缓解病情,但 HBV 在慢性持续感染中可产生自然变异,也会因药物 治疗产生诱导变异,从而导致其对抗病毒药物敏感 性降低,难以根除病毒,患者病情反复发作,给临床 治疗带来了极大的困扰^[5-6]。本研究对甘肃地区 HBV 基因分型特征及耐药突变模式进行分析,对指导临床 用药具有一定意义。

目前,将 HBV 分为 9 个基因型 (A~D),另有报道 J 型 HBV^[7]。HBV 不同基因型呈现不同的地区分布 特点,B 型和 C 型是我国最常见的 HBV 基因型,约占 我国乙型肝炎患者的 95%^[8]。其中北方以 C 型多见, 南方以 B 型为主,各省间分布不完全相同^[9]。本研究 对甘肃地区 131 例 HBV 感染者进行 HBV 基因型分 析,结果显示,共检出 B、C、D 3 种基因型,C 型为主要 基因型,这与既往研究结果一致^[10]。

临床常用的 NAs 有 LAM、LDT、ADV、ETV、 TDF 这 5 种^[11]。本研究 131 例患者中共检出 51 例 耐药突变,耐药率达 38.93%,耐药形势严峻,且多发 生联合耐药。混合突变以 M204V/I/、L180M、 M204V 位点及其组合形式突变例数较多,这 3 种位 点突变导致 LAM 及 LDT 耐药。LAM 与 LDT 是我 国较早上市的核苷酸类药物,虽有一定的抗病毒疗 效,但耐药屏障低,长时间服用易导致患者产生耐药 性^[12]。单药耐药以 A181V/T、N236T 及其组合形式 突变导致的 ADV 耐药最为常见,耐药率为 29.41%。 部分患者在 LAM、LDT 及 ADV 耐药基础上发生 M250V/I、T184A/G/S/I、V173L、S202G/I 位点突 变导致 ETV 耐药且耐药率高,这提示本地区患者仍大 量使用耐药屏障低的 NAs 作为初治药物,会导致 ETV 类耐药屏障高的药物耐药,应减少 LAM、ADV、 LDT 等耐药屏障低的药物的使用,首选强效耐药屏障 高的药物^[13]。有研究显示 80% 患者在使用 LAM、

ADV 等耐药屏障低的药物作为初治药物是导致我国 HBV 耐药率居高不下的的重要因素之一^[14-15]。TDF 耐药在临床中少见,这提示 TDF 在本地乙型肝炎治疗中具有广泛应用前景。

慢性乙型肝炎患者需长期服药,停药后复阳率高^[16-17]。但由于经济条件差及随访制度不健全等因素,我国慢性乙型肝炎患者坚持长期服药的依从性并不高。有研究显示,依从性差是导致慢性乙型肝炎抗病毒初级治疗失败的主要原因^[18-20]。患者自行停药不仅起不到治疗作用,还可能加速 HBV 耐药的发生,甚至使病毒复制增多,导致病情加重。一旦发生耐药,患者须加大药物剂量或者换药,从而进一步增加治疗成本。随着 NAs 纳入医保及强效低耐药屏障药物的应用,患者的依从性及耐药情况都有所改善。

综上所述,本研究通过对甘肃地区 HBV 患者进行基因分型及耐药突变位点的检测分析,为制订患者个体化精准治疗方案提供了一定科学依据,在用药过程中临床需加强对患者的监测与管理,以免发生多重耐药。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Accountability for the global health sector strategies 2016-2021: actions for impact[EB/OL]. [2023-01-05]. <https://apps.who.int/iris/hitstream/handle/10665/342808/9789240030985-eng.pdf>.
- [2] LIU J, LIANG W, JING W, et al. Countdown to 2030: Eliminating hepatitis B disease, China [J]. Bull World Health Organ, 2019, 97(3): 230-238.
- [3] PARK E S, LEE A R, KIM D H, et al. Identification of a quadruple mutation that confers tenofovir resistance in chronic hepatitis B patients[J]. J Hepatol, 2019, 70(6): 1093-1102.
- [4] 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(2015 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(3): 389-400.
- [5] RAJORIYA N, COMBET C, ZOULIM F, et al. How viral genetic variants and genotypes influence disease and treatment outcome of chronic hepatitis B. Time for an individualised approach[J]. J Hepatol, 2017, 67(6): 1281-1297.
- [6] 张文艳, 杨军政, 陈珊, 等. 豫北地区 148 例乙型肝炎患者乙肝病毒多位点耐药突变分析[J]. 实用预防医学, 2023, 30(4): 480-483.

- [7] TIAN Q, JIA J. Hepatitis B virus genotypes: epidemiological and clinical relevance in Asia [J]. Hepatol Int, 2016, 10(6): 854-860.
- [8] CHEN X, GAO J, JI Z, et al. A description of the hepatitis B virus genomic background in a high-prevalence area in China[J]. Virol J, 2014, 11(1): 101-112.
- [9] 姚玮, 王久香, 霍星星, 等. 乙型肝炎病毒基因分型与耐药突变基因位点的检测分析[J]. 临床输血与检验, 2019, 21(4): 428-430.
- [10] 何莉莉, 张兴旺, 王平, 等. 甘肃地区乙型肝炎病毒基因型分布研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5): 647-648.
- [11] 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]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2648-2661.
- [12] 鲁凤民, 封波, 郑素军, 等. 核苷(酸)类似物经治的慢性乙型肝炎患者低病毒血症的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(6): 1268-1274.
- [13] 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(2022 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26(3): 18-20.
- [14] 陶昕彤, 周易, 赵珍珍, 等. 四川大学华西医院乙型肝炎病毒基因分型和耐药突变分析[J]. 华西医学, 2019, 34(8): 890-894.
- [15] VELKOV S, OTT J J, PROTZER U, et al. The global hepatitis B virus genotype distribution approximated from available genotyping data[J]. Genes (Basel), 2018, 9(10): 495.
- [16] HALL S A L, VOGRIN S, WAWRYK O, et al. Discontinuation of nucleot(s)ide analogue therapy in HBeAg-negative chronic hepatitis B: a meta-analysis [J]. Gut, 2022, 71(8): 1629-1641.
- [17] 仵朝晖, 陈顺, 贾栋, 等. 核苷类似物耐药在慢性乙型肝炎的机制研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2023, 32(1): 101-109.
- [18] 任菲菲, 姚雷娜. 慢性乙型肝炎患者用药依从性个体化预测模型的建立与验证[J]. 传染病信息, 2021, 34(5): 411-416.
- [19] 韩宗儒, 闵晓春, 沈启刚, 等. 慢性乙型肝炎患者服用核苷(酸)类药物的依从性调查及其影响因素分析[J]. 肝脏, 2020, 25(11): 1148-1152.
- [20] 郑燕红, 王俊丽, 吴芳芳, 等. 慢性乙型肝炎患者抗病毒药物依从性与疗效的研究[J]. 北京医学, 2014, 36(12): 1066-1067.

(收稿日期: 2023-04-06 修回日期: 2023-11-20)