

拉米夫定耐药变异株在急性HBV感染者中的流行调查

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 施宇光, 房绍红, 刘伟, 张淑云

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 施宇光, 房绍红, 刘伟, 张淑云, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D2007-18

哈尔滨医科大学附属第二医院博士科研基金资助项目, No. BS2007-07

黑龙江省卫生厅医学科研课题基金资助项目, No. 2005-311
作者贡献分布: 李兴库与周志红对此文所作贡献两均等; 此课题由李兴库、周志红、房绍红、刘伟及张淑云设计; 研究过程由李兴库、金茜、杜博、施宇光、房绍红及刘伟操作完成; 研究所用试剂及分析工具由刘伟提供; 数据分析及本论文写作由李兴库、周志红及张淑云完成。

通讯作者: 张淑云, 教授, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心。

zhshuyun136@yahoo.com.cn

电话: 0451-86664393 传真: 0451-86664393

收稿日期: 2009-07-19 修回日期: 2009-08-07

接受日期: 2009-08-08 在线出版日期: 2009-09-08

Prevalence of lamivudine-resistant hepatitis B virus strains in patients with acute hepatitis B virus infection

Xing-Ku Li, Zhi-Hong Zhou, Qian Jin, Bo Du, Yu-Guang Shi, Shao-Hong Fang, Wei Liu, Shu-Yun Zhang

Xing-Ku Li, Zhi-Hong Zhou, Qian Jin, Bo Du, Yu-Guang Shi, Shao-Hong Fang, Wei Liu, Shu-Yun Zhang, Scientific Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2007-18; the Doctor Research Fund of the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, No. BS2007-07; and the Medical Research Foundation of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2005-311

Correspondence to: Professor Shu-Yun Zhang, Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhshuyun136@yahoo.com.cn

Received: 2009-07-19 Revised: 2009-08-07

Accepted: 2009-08-08 Published online: 2009-09-08

Abstract

AIM: To investigate the prevalence of lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) strains (YIDD/YVDD variants) in patients with acute HBV infection (AHB).

METHODS: A total of 321 patients with HBV infection (HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L)

were included in the study, of which 100 had AHB and underwent no treatment, and 221 had chronic HBV infection (CHB) and were treated with lamivudine (100 mg/d). Serum specimens were taken from these patients and used to identify wild-type and YMDD motif mutant HBV strains by fluorescent hybridization biprobe-based polymerase chain reaction (PCR) and melting curve assay (FH-PCR-MC).

RESULTS: Only wild-type HBV was detected in patients with AHB (YMDD, 100%). Both wild-type and YMDD motif mutant HBV strains were detected in patients with CHB. The YMDD mutation rate in CHB patients was 63.4%. Of all YMDD mutations detected, YIDD variant accounted for 52.1%, YVDD variant 37.9%, and the mixed type (YIDD + YVDD) 10.0%. The YMDD mutation rates in CHB patients treated with lamivudine for < 1 year, 1-2 years, 2-3 years, 3-4 years and > 4 years were 45%, 66%, 77%, 75% and 40%, respectively. There was a significant difference in the YMDD mutation rate between the two groups of patients ($\chi^2 = 112.3, P = 0.00$).

CONCLUSION: Lamivudine-resistant HBV strains are not detected in patients with acute HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; Acute hepatitis B; Chronic hepatitis B; Lamivudine; YMDD mutations; Polymerase chain reaction

Li XK, Zhou ZH, Jin Q, Du B, Shi YG, Fang SH, Liu W, Zhang SY. Prevalence of lamivudine-resistant HBV strains in patients with acute HBV infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(25): 2631-2634

摘要

目的: 调查YMDD变异株在急性HBV感染(AHB)中的流行情况, 为指导AHB的防治提供依据。

方法: 收集HBV感染者321例(HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L), 其中未开始治疗的AHB患者100例和拉米夫定治疗(100 mg/d)不同时期的CHB患者221例。采集外周血标本, 用荧光标

背景资料

在国外拉米夫定不仅能安全有效地用于慢性乙型肝炎的治疗, 也安全有效地用于急性(重症)乙型肝炎的治疗, 以促进病毒清除和机体康复。但大量的临床实践已证明, 应用拉米夫定治疗慢性乙型肝炎易发生HBV YMDD基序的变异(用药3年变异率可达70%), 变异株的存在会导致拉米夫定疗效下降或无效, 部分病例还会出现病情加重, 威胁生命。而且目前国内外也均有报道在未经拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者中也有YMDD变异株存在, 比率高达20%以上。有必要调查急性HBV感染者中是否有YMDD变异株存在, 以明确YMDD变异株的流行情况, 更好地指导拉米夫定安全有效地应用。

同行评议者
黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

研发前沿
抗病毒药物的开发、应用和耐药变异的防控仍是该研究领域的热点和重点。

记杂交双探针PCR融解曲线法(FH-PCR-MC)检测血清HBV YMDD及其变异, 统计分析HBV YMDD变异在两组中的分布。

结果: 在AHB组, 只检出HBV YMDD野生型, 未检出变异型。而在CHB组, YMDD变异检出率为63.4%, 其中YIDD占52.1%, YVDD占37.9%, YIDD+YVDD混合变异占10.0%; 1年内、1-2年、2-3年、3-4年和4年以上疗程YMDD变异率分别为45%, 66%, 77%, 75%和40%, YMDD变异检出率在两组中差异显著($\chi^2 = 112.3, P = 0.00$)。

结论: 目前在用拉米夫定治疗的CHB患者中仍有较高比率的YMDD变异株存在, 但尚未发现该变异株在AHB患者中流行。

关键词: 乙型肝炎病毒; 急性乙型肝炎; 慢性乙型肝炎; 拉米夫定; YMDD变异; 聚合酶链反应

李兴库, 周志红, 金茜, 杜博, 房绍红, 刘伟, 张淑云. 拉米夫定耐药变异株在急性HBV感染者中的流行调查. 世界华人消化杂志 2009; 17(25): 2631-2634
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2631.asp>

0 引言

核苷(酸)类似物作用于乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)多聚酶区, 终止HBV DNA链的合成, 抑制病毒复制, 具有较好的抗病毒作用^[1-2]。拉米夫定是第1个在全球和我国批准的核苷类似物, 大量临床研究证明拉米夫定能迅速降低外周血HBV载量, 改善肝功能和肝组织学病变, 延缓肝硬化进展和减少肝癌的发生率, 已被广泛应用于慢性HBV感染(chronic hepatitis B, CHB)的抗病毒治疗, 其长期应用的安全性和有效性已得到评价^[3-4]。目前在国外, 拉米夫定也已安全有效地用于治疗急性(重症)乙型肝炎(acute hepatitis B, AHB), 以促进病毒清除和机体康复^[5-6]。但大量的临床实践已证明, 应用拉米夫定治疗CHB易发生HBV耐药变异, 主要表现为HBV聚合酶区酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(tyrosine-methionine-aspartic acid-aspartic acid, YMDD)基序变异, 即第522位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)所取代, 形成M552V(YVDD)与M552I(YIDD)变异株, 变异株的存在会导致拉米夫定疗效下降或无效, 部分病例还会出现病情加重, 威胁生命^[3-4, 7]。近年国内外也有研究报道在未经拉米夫定治疗的CHB中存在YMDD基序自然变异^[8-11]。那么, 在AHB

人群是否有HBV YMDD变异株的传播目前还不清楚。因此, 我们检测了100例AHB患者中的HBV YMDD及其变异, 初步调查了HBV YMDD变异株的流行情况, 以便指导AHB的防治。

1 材料和方法

1.1 材料 2006-10/2008-12我院就诊的AHB患者100例, 男68例, 女32例, 平均年龄 38.47 ± 13.03 岁; 选同期就诊的口服拉米夫定(100 mg/d)治疗的CHB患者221例作为对照组, 男182例, 女39例, 平均年龄 37.66 ± 9.81 岁。诊断均符合第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的诊断标准^[12]。AHB组: 入组时HBsAg阳性和HBcAb-IgM阳性, 追踪1年HBsAg阴性和(或)HBsAb阳性; CHB组: HBsAg阳性持续超过6 mo以上。所有入组病例HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ copies/L, 均排除免疫性疾病和共感染因素。HBV DNA荧光定量试剂盒和HBV YMDD突变核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒均购自深圳匹基生物工程有限公司。仪器主要使用美国罗氏公司的LightCycler™ 荧光定量PCR仪。

1.2 方法 HBV血清学和酶学检测采用临床常规方法, 即病毒感染的血清学检测采用ELISA方法, 酶学检测采用生化方法; 血清HBV DNA定量采用实时荧光定量PCR法。

HBV YMDD变异检测采用荧光标记杂交双探针PCR融解曲线法(FH-PCR-MC), 具体操作步骤按试剂盒说明进行。该方法的原理和阳性对照品检测结果及分析参见文献^[13]。

统计学处理 数据处理采用SPSS13.0统计软件完成。组间比较采用 t 检验和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 321例急慢性HBV感染者的一般临床资料 在两组资料中, 年龄和HBV DNA水平相匹配, 无统计学差异。AHB组的女性和HBeAb(+)比率、ALT和AST水平均较CHB组高, 而HBeAg(+)比率较CHB组低, 均有统计学差异($P < 0.01$), 反映两组疾病的性质不同(表1)。

2.2 HBV YMDD及其变异 在AHB组中, 100份检测标本均为YMDD野生型, 占100%, 未检出YMDD变异型。在CHB组中, 检出YMDD野生型81例, 占36.7%; YMDD变异型140例, 占63.4%, 其中YIDD变异(YIDD/YIDD+YMDD)73例, 占52.1%; YVDD变异(YVDD/YVDD+YMDD)53

创新盘点
已有大量报道总结和评价了拉米夫定治疗慢性HBV感染者的安全性、有效性和YMDD基序变异率; 也有报道调查了在未经拉米夫定治疗的慢性HBV感染者中有YMDD变异株存在, 但在急性HBV感染人群中是否有HBV YMDD变异株的传播目前报道较少。本文即对新发HBV感染人群中是否有YMDD变异株存在进行了调查。

表 1 321例急性HBV感染者的一般临床资料

分组	AHB (n = 100)	CHB (n = 221)	P值
年龄 (mean ± SD, 岁)	38.5 ± 13.0	37.7 ± 9.8	NS
性别 (男/女)	68 32	182 39	0.004
ALT 水平 (mean ± SD, U/L)	1361.4 ± 1165.9	115.5 ± 252.5	0.000
AST 水平 (mean ± SD, U/L)	816.0 ± 684.8	95.4 ± 141.2	0.000
HBV DNA (copies/L)	9.6 ± 6.4 × 10 ⁹	2.1 ± 5.7 × 10 ⁹	NS
HBeAg阳性(%)	31(31)	159(72.0)	0.000
HBeAb阳性(%)	57(57)	23(10.4)	0.000

表 2 221例CHB患者拉米夫定治疗时间和YMDD变异

治疗时间(年)	n	YMDD	变异类型				变异检出率(%)
			YIDD	YVDD	YIDD+YVDD	合计	
<1	44	24	12	7	1	20	45
1-2	112	38	34	32	8	74	66
2-3	43	10	20	10	3	33	77
3-4	12	3	5	2	2	9	75
4	10	6	2	2	0	4	40
合计	221	81	73	53	14	140	63.4

例, 占37.9%; YIDD+YVDD混合变异14例, 占10.0%。两组比较, YMDD变异检出率有显著差异(0.0% vs 63.4%, $\chi^2 = 112.3$, $P = 0.00$)。

2.3 CHB组中YMDD变异与治疗时间的关系 拉米夫定治疗3年左右YMDD变异率高达70%以上(表2)。

3 讨论

1996年Tipples *et al*^[14]和Ling *et al*^[15]就报道了拉米夫定治疗HBV感染II期临床试验时发现的耐药YMDD基序变异。1998年Allen *et al*^[7]报道了体外验证的结果。但拉米夫定确实能迅速降低外周血HBV载量, 改善肝功能和肝组织学病变, 因而在1999年在我国正式批准上市。姚光弼 *et al*^[3]系统总结和评价了拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者7年结果, 认为拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎是安全有效的, 但同时也报道了拉米夫定治疗5年内HBV YMDD基序的高变异率, 分别为12.1%、49.7%、70.5%、67.0%和70.8%。我们对本地区近两年就诊的221例接受拉米夫定治疗不同时期的CHB患者进行了HBV YMDD及其变异检测和分析, 用药1-4年变异检出率分别为45%、66%、76%和75%, 总变异检出率为63.4%, 包括YIDD、YVDD及其混合型, 用药3年左右YMDD基序变异率高达70%

以上, 与其他报道基本一致^[3-4], 但比我们以前统计报道的总变异检出率结果略高^[13-16], 说明本地区在拉米夫定治疗人群中仍有较高比率的HBV YMDD变异株存在。

那么如此高比率的HBV YMDD变异株在人群中是否有流行, 以及对AHB临床表现及其防治有何影响尚不清楚。我们对100例AHB患者治疗前外周血中的HBV YMDD及其变异进行检测, 均为YMDD野生型, 未检出YMDD变异型, 初步表明本地区尚无明显的YMDD变异株引起的AHB患者, YMDD变异株尚未成为AHB预防和治疗的问题。日本学者Hayashi *et al*^[17]曾对AHB患者HBV YMDD变异株进行检测, 也未检出HBV YMDD变异株。分析YMDD变异株尚未引起AHB患者的原因可能有以下几点: (1)接受拉米夫定治疗的患者也接受了预防HBV传播的教育, 可能会避免HBV YMDD变异株传播的机会。(2)在拉米夫定治疗过程中一旦检测到HBV YMDD变异株会采取新的治疗措施, 如联合应用干扰素或改用阿德福韦酯等, 控制变异株, 使HBV YMDD变异株没有足够的时间引起新的感染。(3)体外实验证明HBV YMDD变异株复制能力较野生株低, 认为其可能具有较弱的传染性, 但尚需进一步证明。

在本研究中AHB组均为急性自限性HBV

名词解释

YMDD基序变异: 即HBV聚合酶区酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)基序的第522位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)所取代, 形成M552V(YVDD)与M552I(YIDD)变异株。由于HBV不同基因型在基因组长度上的差异, 使得对于耐药突变的命名有些混乱。基因型不同突变位点基因序列数目表示不同, 在基因型A为M552V/I, 在基因型B和C为M550V/I, 基因型D为M539V/I, 基因型E和G为M549V/I。这个区域中的突变应该这样描述: 在前缀字母rt后的是原始的氨基酸, 接着是从此区域开始计数的密码子编号, 最后是突变的氨基酸。

同行评价
本研究调查YMDD变异株在急性HBV感染(AHB)中的流行情况,显示在AHB中,只检出HBV YMDD野生型,未检出变异型,对防治AHB具有临床意义。

感染,使本研究可能有一定局限性,因为有报道在未经拉米夫定治疗的慢性HBV感染者中有YMDD变异株存在,比率高达20%以上,而且该类慢性感染是否有由YMDD变异株急性感染所致尚不清楚^[9-11]。所以,我们认为应该研究新发病例的HBV特征,更好地了解HBV感染后的临床表现。另外在应用拉米夫定治疗时要选择合适的患者和治疗方案,提高疗效,减少HBV突变发生^[18]。

4 参考文献

- 1 Humphries JC, Dixon JS. Antivirals for the treatment of chronic hepatitis B: current and future options. *Intervirology* 2003; 46: 413-420
- 2 Quan DJ, Peters MG. Antiviral therapy: nucleotide and nucleoside analogs. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 371-385
- 3 姚光弼,朱玫,马秀云,蔡皓东.拉米夫定治疗HBeAg阳性慢性乙型肝炎患者7年结果总结. *肝脏* 2007; 12: 81-85
- 4 Yuen MF, Fong DY, Wong DK, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Hepatitis B virus DNA levels at week 4 of lamivudine treatment predict the 5-year ideal response. *Hepatology* 2007; 46: 1695-1703
- 5 Miyake Y, Iwasaki Y, Takaki A, Fujioka S, Takaguchi K, Ikeda H, Kobashi H, Sakaguchi K, Shiratori Y. Lamivudine treatment improves the prognosis of fulminant hepatitis B. *Intern Med* 2008; 47: 1293-1299
- 6 Lisotti A, Azzaroli F, Buonfiglioli F, Montagnani M, Alessandrelli F, Mazzella G. Lamivudine treatment for severe acute HBV hepatitis. *Int J Med Sci* 2008; 5: 309-312
- 7 Allen MI, Deslauriers M, Andrews CW, Tipples GA, Walters KA, Tyrrell DL, Brown N, Condreay LD. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* 1998; 27: 1670-1677
- 8 Shin YM, Heo J, Kim GH, Kang DH, Song GA, Cho M, Yang US, Kim CM, Park HK, Jang HJ. [Natural YMDD motif mutations of HBV polymerase in the chronic hepatitis B virus infected patients] *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2003; 9: 1-9
- 9 Ramezani A, Velayati AA, Roshan MR, Gachkar L, Banifazl M, Keyvani H, Aghakhani A. Rate of YMDD motif mutants in lamivudine-untreated Iranian patients with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Infect Dis* 2008; 12: 252-255
- 10 张照华,孟红.乙型肝炎病毒YMDD变异研究进展. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)* 2008; 2: 64-66
- 11 覃亚勤,赵登蕴,覃后继,李朝敢,黄重敏.125例广西壮族慢性肝病HBV YMDD自然变异研究. *中国医师杂志* 2005; 7: 1551-1552
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 13 张淑云,刘伟,李迪,谷鸿喜; 仰曙芬,周志红,杜博,金茜,常曼丽.荧光标记杂交双探针PCR融解曲线法在临床的应用评价. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1291-1294
- 14 Tipples GA, Ma MM, Fischer KP, Bain VG, Kneteman NM, Tyrrell DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996; 24: 714-717
- 15 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996; 24: 711-713
- 16 Li D, Gu HX, Zhang SY, Zhong ZH, Zhuang M, Hattori T. YMDD mutations and genotypes of hepatitis B virus in northern China. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59: 42-45
- 17 Hayashi K, Katano Y, Takeda Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Hirooka Y, Nakano I, Yano M, Goto H, Yoshioka K, Toyoda H, Kumada T. Comparison of hepatitis B virus subgenotypes in patients with acute and chronic hepatitis B and absence of lamivudine-resistant strains in acute hepatitis B in Japan. *J Med Virol* 2007; 79: 366-373
- 18 Gish RG. Hepatitis B treatment: Current best practices, avoiding resistance. *Cleve Clin J Med* 2009; 76 Suppl 3: S14-S19

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 成功通过评审被 PMC 收录

本刊讯 PubMed Central(PMC)是由美国国家医学图书馆(NLM)下属国家生物技术信息中心(NCBI)创立的开放存取(Open Access)的生物医学和生命科学全文数据库。此数据库只收录采取国际同行评审制度评议的期刊,并对收录期刊有较高的科学、编辑及数据文件质量要求。

截至目前,我国只有两本期刊被PMC收录。《浙江大学学报B》(英文版)(*Journal of Zhejiang University Science B*)是我国第一本通过PMC评审并于2006-03-15被收录的期刊。《世界胃肠病学杂志》(英文版)(*World Journal of Gastroenterology, WJG*)第二本通过PMC评审并于2009-03-26被收录,全文免费向公众开放,见: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/tocrender.fcgi?journal=818&action=archive>(编辑部主任:程剑侠 2009-09-08)