

拉米夫定耐药的 HBV 反转录酶区基因突变模式分析*

陈 星¹, 秦红波², 黄钰君³, 邝燕玲¹ (广州市第八人民医院: 1. 检验科; 2 肝病科 510060; 3. 广州市妇女儿童医疗中心检验部 510060)

【摘要】目的 分析慢性乙型肝炎(CHB)患者在拉米夫定(LAM)治疗过程中出现耐药的 HBV 反转录酶区基因的突变模式及临床特征, 指导临床用药。**方法** 采用巢式聚合酶链反应(PCR)方法对 2009 年 1 月至 2011 年 12 月广州市第八人民医院肝病门诊或住院治疗的 LAM 初治发生耐药的 105 例 CHB 患者血清 HBV 聚合酶基因反转录酶区进行扩增, 对 PCR 产物进行测序, 分析 LAM 耐药时 HBV 聚合酶基因的不同突变模式及患者临床特征。**结果** 105 例患者诊断为 LAM 耐药, 98 例患者检测到 LAM 相关的 HBV 聚合酶基因突变, 总体突变模式共 8 种, 其中 95 例患者存在 YMDD 基因突变, 占 96.9%。rtM204I 单点突变患者 42 例, 占 43.9%; rtM204V 单点突变患者 3 例, 占 3.1%, 二者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 21.899, P < 0.05$), 提示 rtM204 位点(YMDD)点突变模式以 rtM204I 点突变为。rtM204V 以联合 rtL180M 组合突变的模式为主。LAM 耐药时, 3 种主要突变模式 rtM204I、rtL180M+rtM204I、rtL180M+rtM204V 患者的年龄、性别比例、血清 HBV DNA 载量、ALT 水平、肝硬化发生率及 HBeAg 阳性率比较, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。HBV 聚合酶区基因突变患者与伴生化突破患者的 HBV DNA 载量明显高于 HBV-P-RT 区基因未突变和未发生生化突破的患者, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** YMDD 基因突变是 LAM 耐药后 HBV 聚合酶基因突变的主要模式, 且突变患者的 HBV DNA 载量明显增高, 检查耐药患者基因序列, 可指导临床合理用药。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; 耐药; 寡核苷酸序列分析; 拉米夫定

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.02.006 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)02-0157-03

Analysis on mutation patterns of HBV reverse transcriptase region gene with lamivudine resistance* CHEN Xing¹, QIN Hong-bo², HUANG Yu-jun³, KUANG Yan-ling¹ (1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Liver Diseases, Guangzhou Eighth People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510060, China; 3. Department of Laboratory, Guangzhou Municipal Women and Children Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510060, China)

【Abstract】Objective To analyse the mutation patterns of HBV reverse transcriptase region gene and the clinical features in chronic hepatitis B(CHB) patients with lamivudine(LAM) resistance for guiding clinical medication.
Methods 105 cases of CHB with LAM resistance were chosen among the outpatients and inpatients in our hospital from January 2009 to December 2011. The serum HBV polymerase gene reverse transcriptase region was amplified by nest PCR, and the PCR products were directly sequenced. The different mutation patterns of the HBV polymerase gene and the clinical features after the emergence of LAM-resistance were retrospectively analyzed.
Results 105 patients were diagnosed as LAM resistance, 98 patients were found to have LAM-resistant-associated mutations in the polymerase gene and the overall mutation modes had 8 kinds. Among them, 95 cases had the YMDD motif mutation, accounting for 96.9%. RtM204I point mutation was in 42 cases, accounting for 43.9%; rtM204V point mutation was in 3 cases, accounting for 3.1%, both comparison, $\chi^2 = 21.899, P < 0.05$, the difference was statistically significant, suggesting rtM204 loci(YMDD) point mutation mode was given priority to rtM204I point mutation. RtM204V was given priority to joint rtL180M combination mutation model. In LAM resistance, the comparison of three main mutation patterns rtM204I, rtL180M+rtM204I, rtL180M+rtM204V, proportion of patient's age and gender, serum HBV DNA load, ALT level and incidence of cirrhosis of the liver and HBeAg positive rate had no statistical significance($P > 0.05$). HBV DNA load in the patients with HBV polymerase gene mutations and the patients with associated chemical breakthrough was obviously higher than that in the patients without HBV-P-RT gene mutation and biochemical breakthrough, the difference had statistical significance($P < 0.05$).
Conclusion YMDD motif mutation is the main mode of HBV polymerase gene mutation in CHB patients with LAM resistance. HBV DNA load in the mutation patients is significantly increased. Testing the gene sequences in the patients with LAM resistance can guide clinical rational drug use.

【Key words】 hepatitis virus, B type; drug resistance; oligonucleotide array sequence analysis; lamivudine

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)多聚酶(polymerase, P)基因编码的含 844 个氨基酸的 P 蛋白, 是病毒复制的主

要功能单位, 也是抗病毒药物开发的重要靶标, 而 P 基因变异主要见于反转录酶区(reverse transcriptase region, RT)发生突

变。拉米夫定(lamivudine, LAM)是首个被美国食品与药品监督管理局(FDA)批准的用于慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)治疗的核苷(酸)类似物(nucleoside analogue, NA)药物,然而患者长期服用 LAM 可导致 HBV 发生病毒耐药变异的比例也明显增加,第 1、2、3、4 年耐药比例分别为 14%、38%、49%和 66%^[1]。因此,通过对 P 基因的 RT 区基因片段进行测序,可从基因水平进行相关耐药突变分析,从而指导临床合理用药。本研究拟对 105 例 LAM 治疗失败患者(排除原发性无应答患者)的血清 HBV-P-RT 区进行测序,以探讨 LAM 耐药的突变模式及与临床的关系,帮助临床合理制订抗 HBV 治疗方案。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2009 年 1 月至 2011 年 12 月于广州市第八人民医院门诊及住院初治且接受 LAM 单药治疗至少 6 个月发生耐药的 CHB 患者 105 例,平均年龄(44.2±12.9)岁,其中男 72 例,女 33 例;HBeAg 阳性患者 72 例,HBeAg 阴性患者 33 例;中位治疗时间 24(5~60)个月。LAM 诱导耐药患者 99 例,LAM 预存耐药患者 6 例。排除合并 HCV、HDV、HEV、HIV 等感染患者,排除曾有其他 NA 及干扰素治疗史者,排除不规范服药患者,诊断标准符合《慢性乙型肝炎防治指南》^[2]。

1.2 实验仪器与试剂 血清 HBV DNA 提取采用 QIAGEN 公司生产的病毒 DNA 提取试剂盒,基因扩增采用 Takara 公司生产的聚合酶链反应(PCR)试剂盒。血清 HBV DNA 检测采用实时荧光定量 PCR,用美国 ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪,最低检测下限为 1×10³ copy/mL。采用酶联免疫吸附试验检测 HBV 血清学标志物,试剂盒购自新科英创(厦门)科技有限公司。肝功能检测采用日本 Olympus 全自动生物化学分析仪,试剂购自日本 Olympus 公司。所有检测均严格按照产品说明书操作。

1.3 HBV-P-RT 序列分析 应用巢式 PCR 进行 DNA 扩增,比对我国常见的 HBV B 型和 C 型序列,根据 HBV P 区的反转录酶(POL/RT)基因片段的保守区序列,进行巢式 PCR 引物设计,外侧引物上游序列:5'-CTC GTG GTG GAC TTC TCT C-3';下游序列:5'-AAA CCC CAA AAG ACC CA-3',产物约 920 bp;内侧引物上游序列:5'-TCG TGG TGG ACT TCT CTC AA-3';下游序列:5'-CGT TGA CAG ACT TTC CAA TCA-3',产物约 766 bp,由上海生物工程有限公司合成。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min;98 °C 变性 10 s,54 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 50 s,40 个循环;72 °C 再延伸 5 min。将 PCR 产物经电泳鉴定有扩增产物后,送华大基因公司测序。

1.4 统计学处理 符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数和百分数表示,率的比较采用 χ^2 检验,组间定量资料经方差齐性检验,多组样本比较采用方差分析,不符合正态分布的数据以中位数(最小值~最大值)表示。两样本采用非参数检验 Mann-Whitney U 检验,多组样本比较采用 Kruskal-Wallis 检验。所有数据采用 SPSS17.0 软件进行分析,双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LAM 耐药的 CHB 患者的基线情况 98 例 CHB 患者可测出 HBV-P-RT 区突变,占 93.3%(98/105)。HBV-P-RT 区突变患者平均年龄(44.0±12.8)岁,其中男 68 例,女 30 例;HBeAg 阳性患者 71 例,HBeAg 阴性患者 27 例;中位治疗时间 24(6~60)个月,患者临床均表现为病毒学突破,即继发性治疗失败。

2.2 LAM 耐药患者 HBV-P-RT 区序列总体突变类型及频率

98 例 LAM 耐药的 CHB 患者中,总体突变模式共 8 种,其中 95 例患者存在 YMDD 基因突变,占 96.9%。涉及 rtM204I 点突变的患者多见,即 rtM204I 点突变及 rtM204I+rtL180M 组合突变,突变频率分别为 42.9%(42/98)和 12.2%(12/98);涉及 rtM204V 点突变的患者数量稍低,即 rtM204V 点突变、rtM204V+rtL180M 组合突变和 rtM204V+rtL80M+rtV173L 组合突变患者的突变频率分别为 3.1%(3/98)、36.7%(36/98)和 2.0%(2/98)。rtL180M 突变患者模式有 4 种,其中仅为 rtL180M 点突变患者少见,占 1.0%(1/98),而其组合突变模式 rtM204I+rtL180M、rtM204V+rtL180M 和 rtM204V+rtL80M+rtV173L 的患者较多。涉及 rtV173L、rtV173L+rtM204I 的突变较为少见,见表 1。

表 1 LAM 耐药患者的 HBV-P-RT 区突变模式及频率

HBV-P-RT 区突变模式	n	百分比(%)
rtM204I	42	42.9
rtM204I+rtL180M	12	12.3
rtM204V	3	3.1
rtM204V+rtL180M	36	36.7
rtM204V+rtL80M+rtV173L	2	2.0
rtV173L	2	1.0
rtV173L+rtM204I	2	1.0
rtL180M	1	1.0
合计	98	100.0

2.3 rtM204 位点(YMDD)的突变频率 98 例 LAM 耐药的 CHB 患者中,其中 95 例患者存在 YMDD 基因突变,占 96.9%。涉及 rtM204 点突变的患者多见。rtM204I 点突变患者明显比 rtM204V 点突变患者多,二者比较差异有统计学意义($\chi^2 = 21.899, P < 0.05$);rtM204V+rtL180M 组合突变比 rtM204I+rtL180M 组合突变与 rtM204V+rtL80M+rtV173L 组合突变多,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.98, P < 0.05$),见表 2。

表 2 rtM204 位点(YMDD)的突变频率

组别	n	百分比(%)	χ^2	P
rtM204I	42	42.9		
rtM204V	3	3.1	21.899	<0.05
rtM204I+rtL180M	12	12.2		
rtM204V+rtL180M	36	36.7	5.980	<0.05
rtM204V+rtL80M+rtV173L	2	2.0		

2.4 HBV-P-RT 区常见突变模式的人口学及病毒学生物学特征 根据检测出的 HBV-P-RT 区常见突变模式:rtM204I、rtL180M+rtM204I、rtL180M+rtM204V 分组,比较 3 组 CHB 患者的年龄、性别比例、是否有肝硬化、HBeAg、HBV DNA 载量及血清 ALT 水平,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。

2.5 HBV-P-RT 区基因突变及生化学突破对 HBV DNA 载量的影响 按检测出基因突变的 98 例与未检出基因突变的 7 例分组比较提示,检测出基因突变者的 HBV DNA 载量明显高于未检出基因突变者,差异有统计学意义($\chi^2 = 17.895, P < 0.05$);按是否伴生化学突破的 32 例与不伴生化学突破的 73 例分组比较提示,伴生化学突破者的 HBV DNA 载量明显高

于不伴有生化学突破者, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 23.180, P < 0.05$), 见表 4。

表 3 按突变模式分组比较患者人口学及病毒学生化特征

项目	n	平均年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	性别 (男/女, n/n)	HBV DNA 载量对数 ($\bar{x} \pm s, \log_{10}$ copy/mL)	肝硬化发生率 (%)	HBeAg 阳性率 (%)	ALT 水平 (U/L)
rtM204I	42	41.9 ± 9.6	25/17	5.68 ± 1.13	28.8	71.2	301(76~2 158)
rtM204V+rtL180M	36	43.0 ± 8.7	28/8	5.82 ± 0.98	25.0	74.8	338(95~2 370)
rtM204I+rtL180M	12	42.5 ± 11.0	9/3	5.76 ± 1.10	26.1	68.9	319(86~2 483)

表 4 HBV-P-RT 区基因突变及生化学突破对患者 HBV DNA 载量的影响 (n=221)

组别	n	HBV DNA 载量 (中位数, copy/mL)	χ^2	P
存在突变	98	3.1 × 10 ⁵	17.895	<0.05
未检出突变	7	5.7 × 10 ⁴		
伴有生化学突破	32	7.9 × 10 ⁶	23.180	<0.05
不伴生化学突破	73	3.2 × 10 ⁵		

3 讨论

LAM 是首个用于 CHB 患者抗病毒治疗的核苷(酸)类似物药物, 开启了口服抗病毒药物治疗乙型肝炎的新纪元。2004 年在全世界著名的《新英格兰医学》杂志上公布了 3 年研究的结果, 研究证实, 通过 LAM 3 年治疗, 可使疾病进展减少 55%, 肝癌的发生减少 51%^[3]。Jonas 等^[4]研究发现, 191 例 CHB 患者 LAM 治疗第 1 年, 突变发生率是 19%, 而安慰剂组未发现突变。长期用药过程中 LAM 发生的耐药问题已成为临床上棘手的难题, 耐药发生后常伴有病毒学突破, 伴或不伴肝炎发作, 少数患者甚至出现肝功能失代偿以致威胁生命^[5]。

目前认为 LAM 形成耐药的机制是 HBV 基因在复制过程中, 由于缺乏校正功能, 病毒基因组在复制过程中发生碱基错配的概率很高, 特别是 P 区和 C 区, 其中 P 区是抗病毒药物的主要结合区域, 长期用药后导致高度保守的 HBV-P-RT 区发生点突变, 会导致药物结合能力下降, 失去对病毒复制的抑制作用, 产生耐药。耐药患者在临床上表现为症状的多样化、复杂化及治疗困难化。因此, 如何正确和有效检测由于基因突变引起的耐药, 准确判定其类型及对相关药物的影响就是一个非常重要和必需的诊断手段。有研究也报道了与 LAM 耐药相关的 9 种突变模式, 主要耐药突变在于 rtM204I/V 位点的变异(YMDD 变异), 可显著降低 HBV 对 LAM 的敏感性, 而其余的变异则被称为辅助性突变位点, 常与 YMDD 变异同时出现, 一定程度上可恢复发生 YMDD 变异 HBV 的复制能力^[6]。这与本研究结果相符, 本研究发现了 8 种 LAM 耐药突变模式: rtM204I、rtM204I + rtL180M、rtM204V + rtL180M、rtM204V、rtM204V + rtL180M + rtV173L、rtV173L、rtV173L + rtM204I 和 rtL180M。在检测到 HBV-P-RT 区突变的 98 例患者中, 95 例存在 YMDD 基因突变, 提示其为 LAM 耐药的主要生物学模式。综合耐药相关的突变模式分析, 以 rtM204I 单点突变率最高, 其次为 rtM204V + rtL180M 联合突变。从补偿性突变来看, rtL180M 与 rtM204V 的联合突变率最高, rtV173L + rtM204V 或 rtL180M 突变的发生率均高于 rtV173L + rtM204I 的突变率, 且 rtV173L 突变多与 rtM204V 和 rtL180M 突变同时发生。本研究中仅发现 1 例为 rtL80M 突变, 2 例 rtV173L 单位点突变, 是否提示部分病例可单独或首先出现 180 或 173 位点变异, 需进一步研究证实。本研究结

果显示, LAM 引起耐药突变具有多样性, 给临床 CHB 抗病毒治疗带来了很大困难。因而, 仔细、准确地检测 CHB 患者在治疗前、治疗中以及治疗后的核苷类似药物的基因突变情况对于合理指导临床用药非常重要。

耐药发生后需要进行换药或联合用药, 同时要避免出现联合耐药的情况。换药: 如换干扰素或无交叉耐药的核苷类似物。比如, 对本研究的 rtM204V 突变者如果没有伴随 rtV173L、rtL180M 突变建议则可替换恩替卡韦, 然而本研究的检测也发现部分患者有 rtV173L、rtL180L 的突变, 那么用药就要慎重考虑, 避免交叉耐药^[7-9]。联合用药: 2009 年的欧洲肝病年会就联合用药问题开展讨论, 多数人赞成出现耐药后再加药的联合用药方法, 至于如何联合用药要由患者的用药和耐药情况以及检测的基因突变而定, 避免交叉耐药, 不能用对同一位点耐药的另另一类药物来代替。患者如出现 LAM 耐药, 但未发现阿德福韦突变基因如 A181、I233 和 N236 等, 就可加用阿德福韦。本研究中同时也发现 52.0% (51/98) 的患者有 rtL180M 突变, 5.1% (5/98) 的患者存在 rtV173L 突变, 由于这两种耐药基因的出现会降低 CHB 患者对恩曲他滨和恩替卡韦用药的敏感性, 不能与这两种药物联合治疗^[7-9]。所以准确检测不同抗病毒药物的耐药突变位点非常重要。

本研究中 LAM 突变耐药患者之间 HBV DNA 载量及 ALT 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示不同的 HBV 聚合酶基因突变模式可能与患者病情无关。本研究不同的 HBV 聚合酶基因突变模式的患者, 其性别、年龄、HBeAg 阳性率, 肝硬化发生率等差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。但伴生化学突破患者的 HBV DNA 载量明显增高, 提示生化学突破通常发生于病毒学突破之后。本研究中 6.7% (7/105) 的 LAM 耐药患者未检测到耐药位点, 此部分人群 HBV DNA 载量较低, 可能由于耐药株比例低于 25% 而未能由 PCR 产物直接测序法检测到, 或者有些是患者先天对 LAM 耐药, 对此类患者今后的治疗可能需要改变方案才能控制病情^[10]。

总之, CHB 患者应用抗病毒药物治疗的过程中应严密观察血清 HBV DNA 水平变化, 同时也应适时进行多位点耐药突变检测, 有助于及时发现 HBV 耐药, 采取有效的干预措施, 避免或减轻临床反跳引起的肝细胞再损伤, 对临床的合理用药具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Gutfreund KS, Williams M, George R, et al. Genotypic succession of mutations of the hepatitis B virus polymerase associated with lamivudine resistance[J]. J Hepatol, 2000, 33(3): 469-475.
- [2] 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(12): 881-891.
- [3] Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. (下转第 162 页)

床效果。但该血液回输方式对患者血液流变学及患者凝血功能的影响尚未完全明确。

由本研究可以看出,异体输血组与自体输血组输血前红细胞计数、血细胞比容、红细胞聚集性、红细胞刚性差异无统计学意义($P>0.05$)。两组输血后红细胞计数、血细胞比容均较输血前明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。两组输血后红细胞聚集性、红细胞刚性与输血前差异均无统计学意义($P>0.05$),但自体输血组红细胞聚集性较异体输血组表现出下降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。这表明不同输血方式对血液流变学的影响并无明显差异,回收式自体输血对于维持血液流变学稳定具有较高的安全性。两组输血前 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、NK 细胞检查,差异无统计学意义($P>0.05$)。异体输血组异体输血后 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、NK 细胞较术前明显性下降, $CD8^+$ 较输血前有明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。自体输血组输血后较输血前无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。两组输血后自体输血组 $CD4^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 、NK 细胞较异体输血组明显增高($P<0.05$), $CD8^+$ 明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。这就提示,相对于异体输血,自体输血有助于维持患者免疫功能的稳定,减轻患者的输血不良反应。导致免疫功能抑制的原因主要包括手术创伤和麻醉引起 NK 细胞和巨噬细胞等的活性下降^[8]。而自体输血在实现免疫功能稳定的同时,对于术后并发症的减少意义重大。采用循证护理及预见性护理后,自体输血组术后并发症发生率明显降低,总体发生率显著低于异体输血组。该护理方式注重启发自身的临床思维,增强护理问题的预见性,及时发现和解决患者存在和潜在的护理问题,使护士在工作中逐步建立起从生理、心理、社会文化和精神层面去评估和照顾患者的思维和行为模式,探讨、实践出更有效的解决办法,提高实际工作能力^[9]。护理人员的预见意识与所积极主动采取的防范措施,是提高护理质量、改善患者生活质量的基础,它能对护理质量起到明显的保障和促进作用^[10]。

综上所述,回收式自体输血对骨科术中出血量较大的患者,除可以维持血液流变学稳定外,还可以减轻免疫功能受损,预防继发性病变;辅以预见性护理方案,对减少术后并发症及缓解患者焦虑情绪起到积极的作用,但其远期效应仍有必要通过进一步的临床观察来明确。

参考文献

[1] Biró E, van den Goor JM, de Mol BA, et al. Complement

(上接第 159 页)

Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease[J]. N Engl J Med, 2004, 351(15): 1521-1531.
[4] Jonas MM, Mizerski J, Badia IB, et al. Clinical trial of lamivudine in children with chronic hepatitis B[J]. N Engl J Med, 2002, 346(22): 1706-1713.
[5] Clarke B, Bloor S. Molecular genotyping of hepatitis B virus[J]. J Clin Virol, 2002, 25(Suppl 3): S41-S45.
[6] Bartholomeusz A, Locarnini SA. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects[J]. Semin Liver Dis, 2006, 26(2): 162-170.
[7] Sinn DH, Lee HI, Gwak GY, et al. Virological response to adefovir monotherapy and the risk of adefovir resistance

activation on the surface of cell-derived microparticles during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass - is retransfusion of pericardial blood harmful[J]. Perfusion, 2011, 26(1): 21-29.

[2] 刘芳,尹建平.严格控制输血不良反应强化输血安全[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(1): 89-90.
[3] Ellis RP, McGuire TG. Predictability and predictiveness in health care spending[J]. J Health Econ, 2007, 26(1): 25-48.
[4] Gupta S, Naithani U, Doshi V, et al. Obstetric critical care: a prospective analysis of clinical characteristics, predictability, and fetomaternal outcome in a new dedicated obstetric intensive care unit[J]. Indian J Anaesth, 2011, 55(2): 146-153.
[5] Smith LK, Williams DH, Langkamer VG. Post-operative blood salvage with autologous retransfusion in primary total hip replacement[J]. J Bone Joint Surg Br, 2007, 89(8): 1092-1097.
[6] 梁金凤.自身抗体的分析处理及输血策略[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2425-2427.
[7] Olsson C, Olsson P, Radegran K, et al. Intraoperative blood salvage and retransfusion from citrate treated wounds is safe and feasible[J]. Scand Cardiovasc J, 2010, 44(3): 177-182.
[8] McClelland H. Predictability in emergency care[J]. Int Emerg Nurs, 2011, 19(2): 65-66.
[9] Heggstad T, Lilleeng SE, Ruud T. Patterns of mental health care utilisation: distribution of services and its predictability from routine data[J]. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, 2011, 46(12): 1275-1282.
[10] Kreeftmeijer-Vegter AR, Melo MD, de Vries PJ, et al. Manual blood exchange transfusion does not significantly contribute to parasite clearance in artesunate-treated individuals with imported severe plasmodium falciparum malaria[J]. Malar J, 2013, 12(1): 115-119.

(收稿日期:2013-07-11 修回日期:2013-09-02)

[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(30): 3526-3530.
[8] Heo NY, Lim YS, Lee HC, et al. Lamivudine plus adefovir or entecavir for patients with chronic hepatitis B resistant to lamivudine and adefovir[J]. J Hepatol, 2010, 53(3): 449-454.
[9] Lim YS, Lee TH, Heo NY, et al. Entecavir plus adefovir combination treatment for chronic hepatitis B patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues[J]. Antivir Ther, 2012, 17(1): 53-60.
[10] 王程,孙剑,陈金军,等.拉米夫定耐药慢性乙型肝炎患者 HBV P 基因区突变序列分析[J]. 南方医科大学学报, 2008, 28(5): 729-735.

(收稿日期:2013-07-15 修回日期:2013-09-22)