

基于长期研究队列的广西隆安县乙型肝炎病毒准种研究

贾蕙华^{1,2}, 陈钦艳¹, 蒋智华¹, 王学燕¹, 张文嘉^{1,2}, TIM J Harrison³, J BROOKS Jackson⁴, LI Wu⁴, 方钟燎^{1,2*}

1. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西病毒性肝炎防制研究重点实验室, 广西 南宁 530021;

2. 广西医科大学基础医学院, 广西 南宁 530021; 3. Division of Medicine, University College London Medical School, London, UK; 4. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, USA

摘要: **目的** 明确广西隆安县队列 HBsAg 无症状携带者感染的乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 准种序列长期演化特征。**方法** 收集 9 名广西隆安县队列 HBsAg 无症状携带者 2004 年、2007 年、2013 年、2019 年或 2020 年 4 个不同时间点血清样本。酶联免疫吸附测定法检测 HBV 血清学标志物; 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 荧光探针法检测 HBV 病毒载量; 试剂盒提取 HBV DNA; PCR 法扩增 HBV 全基因组, 进行二代测序; 利用 Mega 等软件对所获得的序列进行生物信息学分析。**结果** 共获得 23 份血清样本, 309 条全长基因准种序列, 每份标本平均获得 (0.18±0.07)G 测序数据量。55.55%(5/9) 的研究对象携带的 HBV 毒株基因型在长期进化过程中发生了基因型转换, PreS/S 区系统进化树基因分型结果与全基因组分析结果完全一致; 发现 B/C、I/C 重组体; 各研究标本的 Sn 值范围为 0~0.37, D 值范围为 0~0.11; 共检出 21 种特殊单核苷酸/氨基酸突变位点 (S 区 7 种, X 区 2 种, PreC 区 3 种, BCP 区 9 种) 和 6 种缺失突变, 发现多联突变组合形式, 未发现任何耐药突变, 77.8%(7/9) 研究对象在 2004 年携带的 HBV 毒株发生了 BCP 区 nt1 762 (A→T)/1 764 (G→A) 双突变和 PreC 区 1 896 位 (G→A) 点突变, HBV 基因可在无抗病毒药物压力下由突变型可恢复为野生型和 (或) 野生型转变为突变型; HBV 基因组进化率为 $2.03 \times 10^{-5} \sim 3.50 \times 10^{-3}$ 。**结论** 在 HBV 自然感染进程中, HBV 基因型和重组体、准种复杂性和多样性可随时间发生改变; HBV 基因突变型和野生型可相互转换, 一定程度上降低了利用基因型和相关突变来预测临床结局的价值; 隆安县乙型肝炎表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg) 无症状携带者 HBV 基因组进化率很高。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 二代测序; 准种; 基因突变;

中图分类号: R512.6⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2023)08-822-06

DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.08.08

Study on the characterization of hepatitis B virus quasi-species based on the long-term cohort study in Long'an County, Guangxi

JIA Huihua^{1,2}, CHEN Qinyan¹, JIANG Zhihua¹, WANG Xueyan¹, ZHANG Wenjia^{1,2}, TIM J Harrison³, J BROOKS Jackson⁴, LI Wu⁴, FANG Zhongliao^{1,2}

1. Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Guangxi Key Laboratory for the Prevention and Control of Viral Hepatitis, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. School of Preclinical Medicine, Guangxi Medical University Nanning, Guangxi 530021, China; 3. Division of Medicine, University College London Medical School, London, UK; 4. Carver College of Medicine, University of Iowa, Iowa City, USA

Corresponding author: FANG Zhongliao, E-mail: zhongliaofoang@hotmail.com

Abstract: **Objective** To clarify the long-term evolution of hepatitis B virus (HBV) quasi-species in HBsAg asymptomatic carriers in Long'an county, Guangxi. **Methods** ELISA was used to detect serological markers of HBV. Viral loads were measured by real time PCR. HBV DNA was extracted from serum by kits. The whole HBV genome was amplified using nested PCR and amplicons were sequenced by next-generation sequencing (NGS). These sequences from NGS were analyzed by the software like Mega. **Results** Serum samples were collected from 9 HBsAg asymptomatic carriers in Long'an County, Guangxi at 4 different time points in 2004, 2007, 2013, 2019 or 2020. A total of 23 serum samples and 309 full-length gene quasi-species sequences were obtained, with an average amount of (0.18±0.07) G sequencing data for each sample. Genotype of 55.54%(5/9) the studied subjects underwent genotype conversion during the long-term evolution process of HBV quasi-species, and the genotyping results of the phylogenetic tree in the PreS/S region are in perfect agreement with the results of the whole genome analysis; recombinant B/C, I/C were found; the Sn ranged from 0 to 0.37 and the genetic diversity ranged from 0 to 0.11, respectively. A total of 21 special single nucleotide/amino acid mutations (7 in the S region, 2 in the X region, 3 in the PreC region and 9 in the BCP region) and 6 deletion mutations were detected, multiple mutations were found and no drug resistant mutations were found; 77.8%(7/9) of the HBV strains carried by the subjects in 2004 had double mutations at nt1 762 (A→T) and 1 764 (G→A) and a stop mutation at nt1 896 (G→A); HBV mutations can be restored from the mutant type to the

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 81860595)

作者简介: 贾蕙华 (1990—), 女, 博士, 研究方向: 病毒性肝炎分子流行病学。

*通信作者: 方钟燎, E-mail: zhongliaofoang@hotmail.com

wild type and (or) vice versa without antiviral drug pressure, and The evolution rate of HBV genome was $2.03 \times 10^{-5} \sim 3.50 \times 10^{-3}$.

Conclusion HBV genotype, recombinants, genetic complexity and diversity of HBV quasi-species can change over time during in natural infection. The transformation between HBV mutation type and wild type reduces the value of predicting clinical outcomes by genetic types and related mutations to some extent. The HBV genome evolution rate of asymptomatic carriers of HBsAg in Long'an County is very high.

Keywords: Hepatitis B virus; genotype; next-generation sequencing; quasi-species; mutation

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是严重的全球性公共卫生问题。由于HBV复制过程中的DNA聚合酶缺乏校对功能,导致HBV同一宿主体内核苷酸序列的差异^[1]。HBV准种是具有微小差异又高度相关的混合毒株组成的动态种群^[2-3]。目前HBV有10种基因型(A~J)及50多种基因亚型^[4-8]。研究发现不同基因型的HBV引起的肝脏疾病、疾病进展、临床转归及抗病毒治疗的应答均有一定差异^[9-10]。HBV基因型和基因突变结果可为乙肝患者个性化方案的制定及预测临床转归提供重要的参考依据^[11]。

2018年广西1~59岁人群乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)总阳性率仍高达7.6%,其防控形势依然严峻^[12-14]。二代测序(next-generation sequencing, NGS)是目前HBV准种序列分析的最佳手段^[15-16],但利用NGS测序技术进行全基因组的长期队列相关研究仍罕见。本研究旨在利用NGS测序技术和广西隆安县研究队列的优势对HBsAg无症状携带者HBV全基因组准种序列进行长期进化研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取9名广西隆安县队列HBsAg无症状携带者为研究对象,收集他们在4个不同时间点(2004年、2007年、2013年、2019年或2020年)的所有血清样本。

1.2 血清学检测 采用酶免疫吸附试验检测HBsAg、乙型肝炎表面抗体(Anti-HBs)、乙型肝炎e抗原(HBeAg)、乙型肝炎e抗体(Anti-HBe)和乙型肝炎核心抗体(Anti-HBc)。采用赖氏法(Reitman)检测肝功能[丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)]。

1.3 病毒载量检测 采用聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)荧光探针法测定HBV病毒载量。用QIAamp MinElute Virus Spin Kit试剂盒提取HBV DNA。

1.4 全长基因组扩增 PCR法扩增HBV全基因组。引物P1(nt1821-1841, 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTC TTCTTTTTCACCTCTGCCTAATCA-3')和P2(nt1823-1806, 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTG CATGGTCTGG-3')。用琼脂糖凝胶电泳分析确定目标片段。

1.5 全基因组二代测序 本研究二代测序服务由北京华大基因科技生物有限公司提供,应用的是Illumi-

na NovaSeq6000测序系统。

1.6 测序结果分析 通过计算各研究对象不同时间点及时间段的香农熵(Shannon entropy, S_n)值和遗传距离D值,了解各研究标本HBV准种的复杂性与多样性。通过查找文献中已有报道的常见单核苷酸/氨基酸突变位点及突变检测网站进行突变分析。使用SimPlot软件明确系统发育分析时发现的无法进行基因分型及怀疑重组体的毒株是否存在基因重组现象。

1.7 统计学分析 研究对象的人口学信息、流行病学资料、血清学检测结果均采用Excel软件构建数据库;使用MEGA7.0构建序列库;符合正态分布的计量数据采用均数±标准差表示,所有统计学数据分析均使用SPSS16.0软件进行分析。

2 结果

2.1 基本情况 共9名研究对象,其中女性5名,男性4名,年龄为(40.00±3.89)岁(2004年),HBsAg及HBeAb均为阳性,1名研究对象HBeAg为阳性,其余均为阴性,甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP)均在正常范围(<20),共获得23份血清样本,309条全长基因准种序列,每份标本平均获得(0.18±0.07)G测序数据量。

2.2 基于全基因组及PreS/S区序列的基因分型 与NCBI GenBank数据库检索到的47条HBV全基因组及PreS/S区序列参考序列进行序列比对,构建系统进化树(图1A~图1B)。结果表明,44.45%(4/9)名研究对象(TM188、TM083、YH514、DM736)体内携带的HBV基因型在长期进化过程中未发生基因型转换;另外55.5%(5/9)研究对象(YN358、WB227、TS055、DM209、TX463)的基因型在长期进化过程中发生了基因型转换。PreS/S区系统进化树基因分型结果与全基因组分析结果完全一致。

2.3 HBV准种分析 各研究标本的 S_n 值范围为0~0.37,中位数为0.078(图2)。各研究标本D值范围为0~0.11,中位数为0.007(图3)。各研究对象的 S_n 值、D值与其基因型情况均相符。

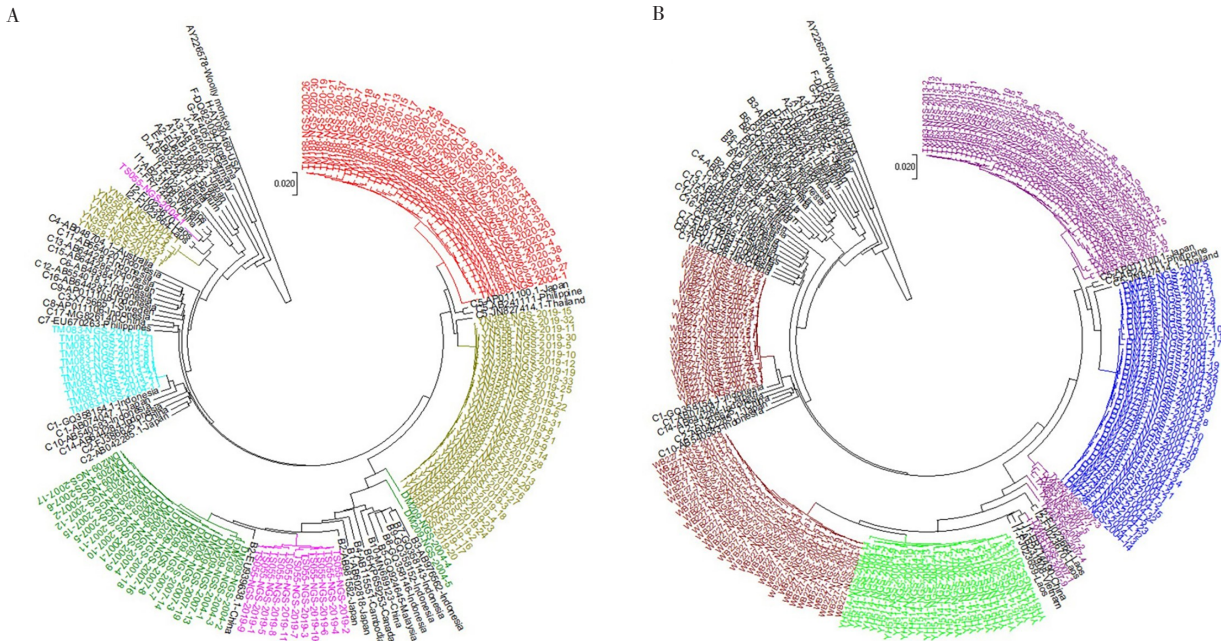
2.4 基于NGS技术的全基因组突变分析 共检出21种特殊单核苷酸/氨基酸突变位点(S区7种,X区2种,PreC区3种,BCP区9种)。同时检出6种缺失突变,在PreC区、BCP区、X区、S区均发现多联突变组合形式,RT区未发现任何耐药突变。77.8%(7/9)研究对象在2004年(即观察最初)携带的HBV毒株发生了

BCP区 nt1 762(A→T)/1 764(G→A)双突变和PreC区 1 896位点突变(G→A)。9名研究对象携带的HBV毒株在自然感染的不同时间点均出现了HBV基因由突变型恢复为野生型和(或)野生型转变为突变型的现象,研究结果提示HBV基因突变是一个动态变化过程。见表1。

2.5 HBV重组分析 结果显示:(1)DM209: DM209-NGS-2004-4及DM209-NGS-2004-5序列发现重组现象,重组事件不相似。DM209-NGS-2004-4序列重组位点位于1 841 nt, nt 1~1 841来自C基因型, nt 1 841~3 215来自B基因型;DM209-NGS-2004-5重组位点位于525 nt、1 936 nt及2 393 nt, nt 1~525和nt 1 936~2 393来自C基因型, nt 525~1 936和nt 2 393~3 215来自B基因型;(2)YN358:未发现明显重组现象。(3)

TX463: TX463-NGS-2007-2和TX463-NGS-2007-4发现明显重组事件,且重组事件相似。重组位点位于285 nt、2 149 nt, nt 1~285和nt 2 149~3 215来自C基因型, nt 285~2149来自I1基因型;YN358-NGS-2004-3、YN358-NGS-2004-5、YN358-NGS-2004-7及YN358-NGS-2004-8序列发现重组事件,且重组事件相似。重组位点位于1 931 nt, nt 1~1 931来自C基因型, nt 1 931~3 215来自I1基因型。

2.6 HBV进化率分析 研究对象DM736、TM083、WB227、YH514 HBV毒株的进化速率相似,为 $2.03 \times 10^{-5} \sim 5.52 \times 10^{-5}$; TM188、TX463、YN538 HBV毒株的进化速率很高,为 $1.21 \times 10^{-4} \sim 7.10 \times 10^{-4}$;研究对象TS055及DM209 HBV毒株较其他研究对象具有更高的HBV进化率分别为 1.74×10^{-3} 、 3.50×10^{-3} 。



注:A. 研究样本YN358、TM188、TS055、DM209及TM083全基因组序列系统进化树;B. 研究样本WB227、YH514、DM736及TX463全基因组序列系统进化树。Note: A. The phylogenetic tree of the whole genome sequences of study samples YN358, TM188, TS055, DM209, and TM083; B. The phylogenetic tree of the whole genome sequences of study samples WB227, YH514, DM736, and TX463.

图1 基于全基因组序列的系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of whole genome alignment

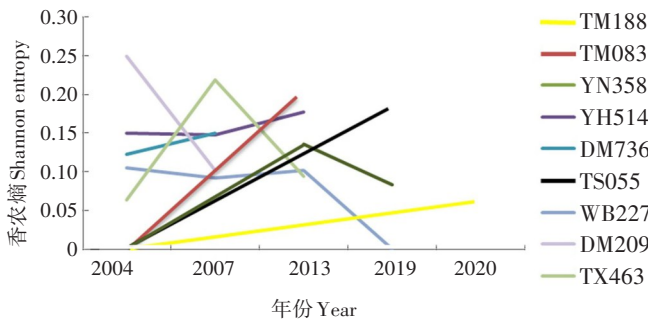


图2 各研究对象在不同时间准种序列的香农熵
Fig. 2 Shannon entropy of the subjects' time series quasi-species

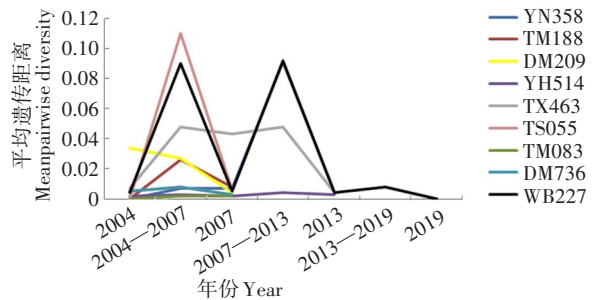


图3 各研究对象在不同时间准种序列的遗传距离
Fig. 3 Genetic diversity of the subjects' time series quasi-species

表1 研究标本突变检测结果汇总

Table 1 Summary of mutation detection results of study specimen

样本编号 Sample ID	年Year	PreC			BCP								
		G1862T	G1896A	G1899A	C1673T	T1753C	T1753G	A1762T	G1764A	C1766T	T1768A	C1799G	A1846T
TM188	2004	-	-	-	-	-	-	1-1	1-1	-	-	-	1-1
	2020	-	32-38	-	-	38-38	-	38-38	38-38	-	-	-	-
TM083	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2013	-	-	-	-	-	-	10-10	10-10	-	-	-	-
YN358	2004	1-1	1-1	-	-	-	1-1	1-1	1-1	-	-	1-1	1-1
	2013	5	5-5	5-5	-	-	-	5-5	5-5	5-5	-	-	5-5
	2019	33	-	33-33	-	1-33	-	-	33-33	33-33	-	-	-
WB227	2004	-	14-14	14-14	-	14-14	-	14-14	14-14	-	-	-	14-14
	2007	-	-	-	-	26-26	-	26-26	26-26	-	-	-	26-26
	2013	-	9-18	4-18	-	4-18	1-18	18-18	18-18	-	2-18	-	10-18
	2019	1-1	1-1	1-1	-	1-1	-	1-1	1-1	-	-	-	-
YH514	2004	-	13-13	-	-	-	-	13-13	13-13	-	-	-	-
	2007	-	6-6	-	-	-	-	6-6	6-6	2-6	2-6	-	6-6
	2013	3-8	8-8	-	-	-	-	8-8	8-8	-	-	-	-
DM736	2004	-	32-32	-	-	12-32	20-32	32-32	32-32	-	-	-	32-32
	2007	-	11-11	-	-	11-11	-	11-11	11-11	-	-	-	11-11
TS055	2004	1-1	1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1-1
	2019	-	11-11	-	5-11	-	-	-	6-11	-	-	4-11	11-11
DM209	2004	3-5	4-5	1-5	4-5	2-5	-	5-5	5-5	-	-	3-5	5-5
	2007	4-19	13-19	8-19	19-19	-	-	19-19	19-19	-	-	19-19	19-19
TX463	2004	-	29-29	29-29	-	29-29	-	29-29	29-29	-	-	-	29-29
	2007	-	9-11	9-11	-	8-11	-	11-11	11-11	-	-	-	9-11
	2013	-	15-15	15-15	-	15-15	-	15-15	15-15	-	1-15	-	15-15

样本编号 Sample ID	年Year	X		S (逃逸突变 Escape mutation)							缺失突变 Deletion mutation					
		C1653T	T1674C	I19R	I23A	I26N	I29H	I31N	I33T	G145R	nt2849-2864	nt2850-2864	nt2847-2864	nt2924-2972	nt40-59	nt2855-3050
TM188	2004	1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2020	-	4-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TM083	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	1-1	-	-	-	-	-	-
	2013	-	-	1-10	1-10	-	-	-	-	-	-	2-10	1-10	-	-	-
YN358	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2013	-	-	-	-	-	-	-	4-5	-	-	-	-	-	-	-
	2019	33-33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5-5	-	-	-
WB227	2004	-	14-14	1-14	-	-	-	-	-	14-14	-	-	-	-	-	-
	2007	3-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25-26	-	-
	2013	-	18-18	-	-	-	-	-	-	18-18	-	-	-	-	-	18-18
	2019	-	1-1	-	-	-	-	-	-	1-1	-	-	-	-	-	-
YH514	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DM736	2004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2007	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TS055	2004	1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2019	-	-	-	-	2-11	6-11	2-11	-	-	-	-	-	-	-	-
DM209	2004	4-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2007	19-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TX463	2004	29-29	25-29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2007	7-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2013	15-15	15-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: - 无突变。Note: - No mutation.

3 讨论

本研究利用NGS测序技术对广西隆安队列HBsAg无症状携带者HBV全基因组长期进化进行分析,主要发现是,在HBV自然感染进程中,HBV基因型和重组体可发生转换、准种复杂性和多样性随时间发生改变;发现两种重组体(B/C、I/C);HBV基因突变型和野生型可相互转换;隆安县HBsAg无症状携带者HBV基因组进化率很高。

HBV基因型/亚型、重组体对制定治疗方案和风险评估有重要意义^[17],准种复杂性可影响HBV感染进程和抗病毒治疗应答^[18]。本研究发现在HBV自然感染进程中,HBV基因型和重组体、准种复杂性和多样性可随时间发生改变。可能的原因是HBV的高错配率及高复制率,以及HBV在抗病毒药物、免疫选择压力下不断发生变异,导致HBV在同一宿主体内核苷酸序列的差异,这些差异在长期进化过程越来越大,最终造成了基因型的改变。另外一个可能的原因是这些HBsAg无症状携带者期间感染了新的基因型或亚型毒株,与先前感染的不同基因型/亚型的毒株准种互相竞争,导致体内多重感染及重组体的发生。

研究报告PreC区1896位核苷酸即第28位密码子由TGG突变为终止密码子TAG,引起HBeAg不表达^[19]。本研究在S区发现7种免疫逃逸突变,S区突变可导致乙型肝炎病毒表面抗原和相关蛋白的合成、分泌障碍,具有重要的病理生理意义和临床影响^[20]。BCP区的A1762T/G1764A双突变增加肝癌发生发展的风险^[21-22]。本研究发现HBV基因突变型和野生型可相互转换,这也部分解释了为什么BCP(ntA1762T/G1764A)双突变或PreS缺失突变株感染者不发生肝癌的原因,尽管已有研究提示这些突变是肝癌高危因素。据报道,抗病毒治疗可导致PreC区及BCP区由突变型恢复为野生型,有学者发现在HIV自然感染过程中,可传播的HIV耐药株在没有药物压力下也可恢复成野生毒株^[23-24]。本研究未发现RT区耐药突变,与研究对象未进行抗病毒治疗情况相符。

HBV基因型之间的重组是导致HBV遗传多样性的重要因素之一。当2种或2种以上的基因型/基因亚型HBV毒株混合感染时可引起不同基因型毒株之间遗传信息的重组^[25]。本研究发现B/C重组体、I/C重组体,目前不同基因型之间的重组机制尚未清楚,但这些重组体已形成了各自特定的地理分布和流行病学特征,成为某些地域的主要流行株^[26-28]。

研究发现HBV进化率约为 10^{-5} ^[29-30],本研究HBV基因组进化率为 $2.03 \times 10^{-5} \sim 3.50 \times 10^{-3}$,HBV进化率较高,本研究数据基于NGS测序技术及长期队列研究的

进化率,结果可靠。

本研究利用NGS测序技术对HBV全长准种序列进行全面分析发现,在HBV自然感染进程中,HBV基因型和重组体、准种复杂性和多样性可随时间发生改变;HBV基因突变型和野生型可相互转换,一定程度上降低了利用基因型和相关突变来预测临床结局的价值。隆安县HBsAg无症状携带者HBV基因组进化率很高,HBV不同重组体在病毒遗传多样性及人群中的传播发挥重要作用。初步认为NGS适合于研究HBV全长基因组准种序列特性,为HBV提供了一种新的认识整个病毒群体情况的方法,但还需后续扩大样本量进一步证实。

伦理审查与知情同意 本研究获得广西壮族自治区疾病预防控制中心伦理委员会批准(批准号:GXIRB2018-0020),患者基本信息的采集和各项检测、治疗均获得受检者或其家属的知情同意

利益冲突声明 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] KHUROO M S, SOFI A A. The discovery of hepatitis viruses: agents and disease[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2020, 10(4): 391-401.
- [2] ZHANG A Y, LAI C L, POON R T P, et al. Hepatitis B virus full-length genomic mutations and quasispecies in hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(9): 1638-1645.
- [3] YANG Z T, HUANG S Y, CHEN L, et al. Characterization of full-length genomes of hepatitis B virus quasispecies in sera of patients at different phases of infection[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(7): 2203-2214.
- [4] WOLF J M, PEREIRA V, SIMON D, et al. Evolutionary history of hepatitis B virus genotype H[J]. *J Med Virol*, 2021, 93(6): 4004-4009.
- [5] PUJOL F, JASPE R C, LOUREIRO C L, et al. Hepatitis B virus American genotypes: Pathogenic variants?[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2020, 44(6): 825-835.
- [6] REN C C, CHEN Q Y, WANG X Y, et al. Novel subgenotype D11 of hepatitis B virus in NaPo County, Guangxi, bordering Vietnam[J]. *J Gen Virol*, 2019, 100(5): 828-837.
- [7] THIJSEN M, TROVÃO N S, MINA T, et al. Novel hepatitis B virus subgenotype A8 and quasi-subgenotype D12 in African-Belgian chronic carriers[J]. *Int J Infect Dis*, 2020, 93: 98-101.
- [8] YIN Y H, HE K, WU B T, et al. A systematic genotype and subgenotype re-ranking of hepatitis B virus under a novel classification standard[J]. *Heliyon*, 2019, 5(10): e02556.
- [9] SHEN S, LIANG X E, HAMED K, et al. Effect of hepatitis B virus subgenotype on antiviral response in nucleoside-treated hepatitis B envelope antigen-positive patients[J]. *Hepatol Res*, 2018, 48(2): 134-143.
- [10] WANG L P, HAN F Z, DUAN H L, et al. Hepatitis B virus pre-existing drug resistant mutation is related to the genotype and disease progression[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2017, 11(9): 727-732.
- [11] WANG Q R, FU S W, ZHANG J, et al. Expression level of small en-

- velope protein in addition to sequence divergence inside its major hydrophilic region contributes to more efficient surface antigen secretion by hepatitis B virus subgenotype D2 than subgenotype A2[J]. *Viruses*, 2020, 12(9): 967.
- [12] 陈词, 庄辉: 中国慢性乙肝流行病学现状[J]. *肝博士*, 2018(1): 8-9.
CHEN C, Zhuang Hui: epidemiological status of chronic hepatitis B in China[J]. *Liver Dr*, 2018(1): 8-9.(in Chinese)
- [13] FANG Z L, HARRISON T J, YANG J Y, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection in a highly endemic area of Southern China after catch-up immunization[J]. *J Med Virol*, 2012, 84(6): 878-884.
- [14] 邓秋云, 钟革, 刘巍, 等. 2018年广西壮族自治区1-59岁人群乙型肝炎血清流行率调查[J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(1): 25-29.
DENG Q Y, ZHONG G, LIU W, et al. Sero-prevalence of hepatitis B among people aged 1-59 years in Guangxi Zhuang Autonomous Region, 2018[J]. *Chin J Vaccines Immun*, 2020, 26(1): 25-29. (in Chinese)
- [15] HU T S, CHITNIS N, MONOS D, et al. Next-generation sequencing technologies: an overview[J]. *Hum Immunol*, 2021, 82(11): 801-811.
- [16] SLATKO B E, GARDNER A F, AUSUBEL F M. Overview of next-generation sequencing technologies[J]. *Curr Protoc Mol Biol*, 2018, 122(1): e59.
- [17] DATTA S, DASGUPTA D, GHOSH A, et al. Oncogenic potential of hepatitis B virus subgenotype D1 surpasses D3: significance in the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(2): 283-292.
- [18] XUE Y, WANG M J, YANG Z T, et al. Clinical features and viral quasispecies characteristics associated with infection by the hepatitis B virus G145R immune escape mutant[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(1): 1-5.
- [19] 江磊, 易冬英, 张伦理. 探讨前C区A1896变异与乙型肝炎病毒相关的进展性肝病的关系[J]. *实用临床医学*, 2010, 11(6): 1-4.
JIANG L, YI D Y, ZHANG L L. Correlation between precore mutation with A1896 and progressive liver disease in chronic HBV infection[J]. *Pract Clin Med*, 2010, 11(6): 1-4.(in Chinese)
- [20] JIA J A, LIANG X T, CHEN S P, et al. Next-generation sequencing revealed divergence in deletions of the preS region in the HBV genome between different HBV-related liver diseases[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(11): 2748-2758.
- [21] 赖欣, 周太成, 韦嘉. HBV A1762T/G1764A双核苷酸替换与肝脏疾病的关系[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(9): 1990-1994.
LAI X, ZHOU T C, WEI J. Association between HBV A1762T/G1764A double nucleotide substitution and liver diseases[J]. *J Clin Hepatol*, 2018, 34(9): 1990-1994.(in Chinese)
- [22] 杨少奇, 杨琴, 杨力, 等. 乙型肝炎病毒增强子II C1653T位点突变与宁夏地区肝细胞癌发生的关系[J]. *山东医药*, 2012, 52(33): 33-34.
YANG S Q, YANG Q, YANG L, et al. Relationship between hepatitis B virus enhancer II C1653T mutation and hepatocellular carcinoma in Ningxia[J]. *Shandong Med J*, 2012, 52(33): 33-34.(in Chinese)
- [23] HOFSTRA L M, NIJHUIS M, PINGEN M, et al. Evolution and viral characteristics of a long-term circulating resistant HIV-1 strain in a cluster of treatment-naïve patients[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, 68(6): 1246-1250.
- [24] LIN C L, LIAO L Y, WANG C S, et al. Evolution of hepatitis B virus precore/basal core promoter gene in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients receiving lamivudine therapy[J]. *Liver Int*, 2004, 24(1): 9-15.
- [25] MUNSHI S U, TRAN T T T, VO T N T, et al. Molecular characterization of hepatitis B virus in Bangladesh reveals a highly recombinant population[J]. *PLoS One*, 2017, 12(12): e0188944.
- [26] MATLOU M K, GAJELEJWE L R, MUSYOKI A M, et al. A novel hepatitis B virus recombinant genotype D4/E identified in a South African population[J]. *Heliyon*, 2019, 5(4): e01477.
- [27] LIAO H, LI X D, LIU Y, et al. Intergenotype recombinant analysis of full-length hepatitis B virus genomes from 516 Chinese patients with different illness categories[J]. *J Med Virol*, 2017, 89(1): 139-145.
- [28] CASTELHANO N, ARAUJO N M, ARENAS M. Heterogeneous recombination among hepatitis B virus genotypes[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 54: 486-490.
- [29] SPAAN M, BRUCE M, AGARWAL K, et al. The role of anti-HBs in hepatitis B reactivation during direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C[J]. *Antivir Ther*, 2018, 23(6): 539-542.
- [30] GAUDER C, MOJSIEJCZUK L N, TADEY L, et al. Role of viral load in Hepatitis B virus evolution in persistently normal ALT chronically infected patients[J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 67: 17-22.

收稿日期:2022-12-27 编辑:王佳燕