

乙型肝炎病毒的基因变异及其临床意义

张磊, 张淑云

■背景资料

病毒和机体的相互作用决定乙型肝炎病毒(HBV)感染的自然进程和治疗结果。尤其是HBV基因组在长期进化中形成的具有种族和地域差异的HBV基因型(Genotype)、基因亚型(Sub-genotype)和准种(Quasispecies)特征在HBV感染和治疗中的作用备受关注。

张磊, 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

张磊, 硕士, 主要从事临床病毒感染的转归机制研究。

黑龙江省省政府博士后启动基金资助项目, No. LRB2006-354

黑龙江省教育厅科学技术研究基金资助项目, No. 12521186

作者贡献分布: 本综述由张磊完成; 张淑云审校。

通讯作者: 张淑云, 教授, 主任医师, 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: 2012-03-20 修回日期: 2012-05-07

接受日期: 2012-06-11 在线出版日期: 2012-06-28

Variations in the hepatitis B virus genome and their clinical significance

Lei Zhang, Shu-Yun Zhang

Lei Zhang, Shu-Yun Zhang, Scientific Research Center, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Postdoctoral Foundation of Heilongjiang Province, No. LRB2006-354; the Science and Technology Project of Educational Department of Heilongjiang Province, No. 12521186

Correspondence to: Shu-Yun Zhang, Professor, Scientific 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: 2012-03-20 Revised: 2012-05-07

Accepted: 2012-06-11 Published online: 2012-06-28

Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is a hepatotropic DNA virus. The HBV genome is prone to variations. Based on genomic variations, HBV is divided into ten genotypes, many subgenotypes and quasispecies. These genotypes, subgenotypes and quasispecies have distinct race and geographic distribution and have been associated with outcome of HBV infection, disease progression and treatment.

Key Words: Hepatitis B virus; HBV genotype; HBV subgenotype; HBV quasispecies; HBV infection

Zhang L, Zhang SY. Variations in the hepatitis B virus genome and their clinical significance. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2012; 20(18): 1644-1652

摘要

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染仍是世界范围内的公共健康问题。HBV为一嗜肝细胞DNA病毒, 不仅可以引起隐匿性、急性和慢性病毒性肝炎, 还与肝硬化和肝细胞癌的发生发展密切相关。HBV基因组易发生变异, 并在长期进化过程中不断积累, 形成了具有种族和地域差异的HBV基因型、基因亚型和准种, 与HBV感染的发生、发展和治疗等密切相关。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 基因亚型; HBV准种; HBV感染

张磊, 张淑云. 乙型肝炎病毒的基因变异及其临床意义. 世界华人消化杂志 2012; 20(18): 1644-1652

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1644.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)为一嗜肝细胞DNA病毒, 不仅可以引起隐匿性、急性和慢性病毒性肝炎, 还与肝硬化和肝细胞癌的发生发展密切相关。虽然通过对HBV和宿主及其相互作用的研究, 已经发展了有效的预防疫苗和多种抗病毒药物, 但HBV感染仍是世界范围内的公共健康问题^[1,2]。大量研究表明, HBV基因组易发生变异, 在长期的进化中已经形成具有种族和地域差异的HBV基因型(Genotype)和基因亚型(Subgenotype)^[3-5], 而且使HBV在机体内的状态具有准种(Quasispecies)的特点, 抗病毒药物的应用增加了准种的复杂性^[6,7]。对HBV基因变异的深入研究和深刻认识, 必将为揭示HBV感染不同临床表现的分子机制和开发治疗预防新策略提供依据。

1 HBV基因组及其变异

HBV基因组是一松弛环状、部分双链DNA。负链长度固定, 约为3.2 kb, 包含HBV全部遗传信息。其结构分为4个开放读码框架(open reading frame, ORF)和多个基因表达调控区。HBV基因组易发生变异, 一方面是由其复制特点决定的,

■同行评议者

宣世英, 教授, 青岛市立医院肝病内科

即HBV-DNA聚合酶不仅是DNA聚合酶, 而且还是前基因组RNA逆转录为子代DNA的逆转录酶, 这种逆转录过程和逆转录酶的活性, 不具备有效的校对功能, 可产生众多的基因变异. HBV复制虽然缺乏校对功能, 但复制效率却非常高, 有研究^[8-10]综合报道HBV进化率为每年每位点 $<2 \times 10^{-4}$ (1.4×10^{-4} - 5.7×10^{-5}) 个核酸替换, 体现了HBV高复制的动力学状态, 其突变率是其他DNA病毒的10倍, 这使HBV种群具有明显的异质化倾向; 另一方面由于机体的免疫系统和抗病毒药物等的选择性压力, 使HBV种群的组成和比例不断地动态变化^[7,11]. 所以, HBV变异在长期进化过程中不断地积累形成了具有重大意义的HBV基因型、基因亚型和准种.

2 HBV基因型、基因亚型及临床意义

2.1 HBV基因型及亚型的种类和分布 1979年Galibert等^[12]首次报告了HBV的全基因序列; 1988年Okamoto等^[13]对18株不同血清型HBV全基因序列比较, 以不同基因型间核苷酸序列异源性 $\geq 8\%$ 为标准, 将18株HBV分为A、B、C、D 4个基因型; 此后, Norder等^[14]用PCR方法, 发现2株HBV基因区序列与其他毒株间差异分别为13.6%和15.5%, 遂鉴定了2个新的基因型E和F; 2000年Stuyver等^[15]分析了来自法国和美国的121例HBV慢性感染者的基因型分布, 其中来自法国的2例和来自美国的11例不能归为已知的A-F型, 其异源性为15.8%, 分子进化分析显示为新的基因型, 命名为G型; 2002年Arauz-Ruiz等^[16]在分析来自西班牙、瑞典、中非、尼加拉瓜和美国共10株HBV的基因型时发现, 来自尼加拉瓜的2株和来自美国的1株与已知的基因型异源性为8.1%-14.1%, S基因差异为3.6%-8.0%, 分子进化分析显示有分枝, 应该为1个新的基因型, 命名为H型; 2007年Tran等^[17]应用长链PCR技术, 在越南分离出1株全基因与已确定的基因型差异为7.4%-15%, 通过分子进化分析为新的基因型, 命名为I; 2009年Tatematsu等^[18]应用巢式PCR技术在日本分离出1株全基因, 将HBV全基因克隆在DH5 α 细胞中进行基因测序, 分析与其他基因型差异为11.7%-15.7%, 命名J基因型. 到目前为止, HBV共分为A-J 10个基因型.

在每种基因型中, 又根据HBV全基因序列异质性 $\geq 4\%$, 且 $<8\%$ 的原则分出多种基因亚型. 自2005年Kramvis等^[19]明确提出基因亚型的概念到目前为止, A基因亚型有A1-A7^[20], B基因亚型有

B1-B9^[21], C基因亚型有C1-C16^[22], D基因亚型有D1-D8^[23], F基因亚型有F I a和 I b-FIV^[24], 而E、G、H、I和J尚未有基因亚型的报道.

流行病学调查表明HBV基因型和基因亚型呈一定的地理区域分布(表1). Attaullah等^[25]认为HBV的基因型地理分布与人口流动有相关性. 亚洲人从里海移民到伊朗、印度和欧洲, 在他们移民前就携带有HBV的D基因型, 致使以上地区以D基因型为主. 因此移民较多的国家, 其HBV基因型也较复杂. 而我国北方地区人口流动性小, 以C基因型为主, 占90%, 且为C2基因亚型^[26].

随着研究进展, 对HBV基因型及亚型又有了新的认识. 2008年Kramvis等^[27]通过计算机对670个HBV全基因序列再分析, 提出了新的基因型和基因亚型的分型标准, 即全基因序列异源性 $\geq 7.5\%$ 可分为不同的基因型; 而基因亚型区分要符合2条标准, 一是全基因序列异源性 $\geq 4\%$ 且 $<7.5\%$, 二是有较高的置信值(high bootstrap value)支持. 2010年Pourkarim等^[28]根据新的分型标准对A1-A6基因亚型的全基因序列进行再分析, 其中A1、A2和A6符合分型标准, 而A3-A5则未达到分型标准的要求, 根据其地理分布定为“准亚型”(“quasi-subgenotypes”), 介于基因亚型和进化枝(clade)之间.

2.2 HBV基因型及亚型的临床意义 HBV感染临床表现比较复杂, 初始HBV感染可表现为急性、急性暴发性或隐匿性感染, 在感染过程中与机体免疫系统相互作用, 结果清除病毒者被称为急性自限性HBV感染; 否则转为慢性HBV感染, 表现为无症状的HBV携带者或慢性乙型肝炎. 慢性HBV感染25%-40%可进展为肝硬化和肝癌. 大量的研究表明, 不同HBV基因型或亚型的感染可导致不同的临床结果、疾病进展和对抗病毒治疗的反应^[29].

2.2.1 HBV基因型与HBV感染及慢性化: 日本作为亚洲国家其HBV流行株主要为C型和B型, 但在急性感染者中A型也占较高的比例, HBV急性感染后慢性化比率较低(1%), 且与A2相关^[30], 并在长期的进化中已经导致HBV慢性感染人群A2基因型比例的漂移(2000-2001 vs 2004-2005, 1.7% vs 3.5%)^[31]. 同样来自日本的急性乙型肝炎HBV基因型分布的最新调查数据更证明了这一点, 在日本东京地区急性乙型肝炎HBV基因A型的比率随着时间的推移不断增加, 依次为4.8%(1991-1996), 29.3%(1997-2002)

■ 研发前沿

随着实验技术的发展, 新的HBV基因型、基因亚型和新的耐药位点不断被检出, HBV体内存在的准种特点的研究也不断深入, HBV基因异质性对HBV传播和对HBV感染自然进程、疾病进展和治疗的影响越来越被重视.

■相关报道

近年来不断有基于多中心或社区的大规模回顾性研究报道,进一步阐述了HBV基因型与HBV感染结果和疾病进展等的相关性,以及HBV准种检测在HBV感染治疗中的作用等。

表 1 HBV基因型及亚型的地域分布、突变区域及临床意义

基因型及亚型	地域分布	突变区域	临床意义	参考文献
A	北欧 非洲	前C区		[13,20]
A1	非洲		未确定	
A2	欧洲		急性感染、慢性感染干扰素治疗比D型更敏感	
A3	非洲西部		未确定	
A4	非洲西部		未确定	
A5	非洲西部		未确定	
A6	比利时		未确定	
A7	卢旺达 喀麦隆		未确定	
B	亚洲	基本核心启动子	急性肝炎	[12,21]
B1	日本		爆发性肝炎	
B2	亚洲大部 韩国较多		急性肝炎 <50岁的肝癌	
B3	印度尼西亚		未确定	
B4	印度尼西亚 越南		未确定	
B5	印度尼西亚 菲律宾		未确定	
B6	印度尼西亚		未确定	
B7	印度尼西亚		未确定	
B8	印度尼西亚		未确定	
B9	印度尼西亚		未确定	
C	亚洲 大洋洲	基本核心启动子	肝癌、肝硬化	[13,22]
C1	亚洲南部 中国南部		肝癌、肝硬化	
C2	亚洲东北部 中国		>50岁者易患肝硬化和肝癌	
C3	印度尼西亚 菲律宾		未确定	
C4	澳大利亚		未确定	
C5	印度尼西亚 菲律宾		未确定	
C6	印度尼西亚 菲律宾		未确定	
C7	印度尼西亚		未确定	
C8	菲律宾		未确定	
C9	中国台北		未确定	
C10	印度尼西亚		未确定	
C11	巴布亚		未确定	
C12	巴布亚		未确定	
C13	巴布亚		未确定	
C14	巴布亚		未确定	
C15	巴布亚		未确定	
C16	巴布亚		未确定	
D	地中海 中东 南亚 大洋洲	前C区	慢性肝脏疾病	[13,23]
D1	中东 地中海地区		慢性肝脏疾病、肝癌	
D2	俄罗斯 波罗的海 印度		无明显症状	
D3	印度尼西亚 印度		隐匿性感染	
D4	大洋洲		未确定	
D5	印度		无明显临床症状	
D6	印度尼西亚		未确定	
D7	突尼斯		未确定	
D8	尼日尔		未确定	
E	非洲中部和西部	无特异性	未确定	[14]
F	美洲中部和南部	前C区	未确定	[14,24]
F I a	美国中部 智利 阿拉斯加		肝癌	
F I b	阿根廷 日本 委内瑞拉 美国		未确定	
F II	巴西 委内瑞拉 尼加拉瓜		未确定	
F III	委内瑞拉 巴拿马 哥伦比亚		未确定	
F IV	阿根廷 玻利维亚 法国		未确定	

G	墨西哥 加拿大	无特异性	未确定	[15]
H	墨西哥	无特异性	未确定	[16]
I	越南 老挝	无特异性	未确定	[17]
J	日本	无特异性	肝癌	[18]

■创新盘点

从HBV基因型、基因亚型到HBV准种全面系统地综述了HBV基因变异的研究历程及其临床意义。

和50.0%(2003-2008), 并以A2为主. 研究者认为HBV A2亚型已通过性工作者在当地迅速传播^[32]. 中国是HBV感染高流行区, 主要以B(B1, B2)和C(C1, C2)为主, 而且从南方向北方C型逐渐增多, B型逐渐减少. Yin和Zhang等^[33,34]报道在上海地区, 慢性HBV感染人群主要以C2(62.1%-72.9%)和B2(13.4%-28.0%)为主, 但B2在急性感染人群中比例增高为48.5%(33/68), C2比例降低为51.2%(35/68); 慢性化率为8.50%(7/68), 以C2(5/7)为主, 认为HBV C2是急性感染慢性化的独立因素. 我们对中国东北地区HBV感染人群的HBV基因型和基因亚型分布进行了分析, 在慢性感染者中C(C2)高达90%, 有少量B(B2), 即使在急性自限性感染者中也以C(C2)为主, 是否体现地域差异有待进一步研究^[26,35]. 台湾学者对HBV基因型与HBV急性感染慢性化的相关性提出质疑^[36].

急性HBV感染后尚可表现为暴发性HBV感染, 虽然发生率较低, 但死亡率较高, 而且有基因型特异性和伴随的基因变异. 如来自日本的报道是暴发性HBV感染发生与B1相关, 在印度暴发性HBV感染的发生与D1相关, 均伴有BCP G1896A和PreC/C A1762T/G1764A突变^[30,37].

隐匿性HBV感染是指使用现有的常规方法在患者的外周血中未检测到乙肝表面抗原, 而检测到HBV DNA, 即HBsAg-/HBV DNA+, 或只在肝脏中检测到HBV DNA, 是HBV传播, 尤其是输血后HBV感染的重要原因, 已受到高度重视^[38]. 其发生原因可能是因为HBsAg基因突变, 使HBsAg合成障碍, 或共感染使HBsAg表达降低. 但近期有与HBV基因型相关的报道. 有研究报道在隐匿性HBV感染者中, 基因型的种类和分布与慢性感染人群较一致, 但有研究报道隐匿性HBV感染可能与D基因型有关, 而与HCV共感染无关^[39,40].

2.2.2 HBV基因型与慢性HBV感染的疾病转归: 慢性HBV感染即HBsAg阳性持续超过6 mo者, 包括慢性携带者和慢性乙型肝炎(HBeAg阳性或阴性). 慢性HBV感染在自然进程中也可有少数患者(0.5%-2.3%)清除病毒, 即HBsAg转阴^[41,42]. HBsAg转阴的可能性与HBV DNA水平短期内快

速下降密切相关^[42]. 如果HBV DNA水平在3 mo内持续下降3个数量级, HBsAg转阴的可能性增加4倍; 并可能发生在第1次检测到有意义下降后的4.6年. 如果HBV DNA水平能从 10^4 拷贝/mL总体下降到300拷贝/mL以下, 那么在此后第60 mo HBsAg转阴率为25.8%, 第100个月则为51.3%. 早在2002年^[43]和2004年^[44]有2篇关于HBsAg转阴与基因型相关性的报道, 认为HBV基因型A和B比D和C有较高的HBsAg转阴率, 但近期较少有HBsAg转阴与基因型相关性的报道^[45]. 基于目前对HBsAg转阴的认识, 已大大增强了战胜慢性HBV感染的信心.

HBeAg血清逆转是HBV感染临床转归过程中的重要事件, 如果发生在急性感染早期将预示有较好的预后, 但在慢性感染反复发后发生HBeAg血清逆转或HBeAg缺失则可加重病情, 积累较多突变, 易进展为肝硬化和肝癌. 基因型C和D较A和B更易发生延迟或HBeAg缺失的慢性感染, 从而也易进展为年长的严重肝病^[4].

长期慢性HBV感染可导致严重的肝病, 包括肝硬化、肝功能失代偿和肝癌^[29]. Lin等^[4]总结报道慢性HBV感染者每年肝硬化的发生率是2%-10%, 肝癌的发生率是1%-3%. 亚洲是HBV感染高发区, 以C(C2)和B(B2)基因(亚)型为主. 随着年龄的增长, 基因型C感染积累较多突变, 易进展为肝硬化和肝硬化后肝癌; 而基因型B感染病毒复制活跃, 在较年轻时易发生无肝硬化的肝癌, 不同报道分界年龄略有不同(30岁-50岁)^[46-50]. Liang等^[51]研究报道基因型C感染也是肝癌切除后复发的危险因素.

非洲也是HBV感染高发区. 在南非流行的HBV基因型有A、D和E, 其中以A基因型为主, A1亚型感染者常伴有较高的病毒载量, 在年轻时易进展为肝细胞癌^[52-55]. 在印度流行的HBV基因型有A和D, 而D基因型感染者在年轻时易进展为肝细胞癌^[56]. 在美国的阿拉斯加F基因型感染者在年轻时也易进展为肝细胞癌^[43,57].

2.2.3 HBV基因型与抗病毒治疗: 慢性乙型肝炎治疗的总体目标是最大限度地长期抑制HBV, 甚至消除HBV即HBsAg转阴和血清逆转. 主要治疗方法是抗病毒治疗, 包括干扰素和核苷(酸)类

■应用要点

通过本文可较全面地了解HBV基因型和准种的研究历程和临床意义。

似物^[29,58]。有研究^[4,5,59]较详尽地综述报道了HBV基因型对抗病毒治疗反应的影响。

干扰素是最早用于抗病毒治疗的免疫制剂,包括普通和长效2种。早期报道普通干扰素治疗后HBeAg血清逆转率可达33%。基因型A和B感染较基因型D和C感染对干扰素治疗有良好的反应,尤其是A基因型伴HBeAg阴性感染者对治疗的长期反应最好(>40%)^[60]。C基因型感染者对长效干扰素治疗的反应好于普通干扰素。到目前为止仍只有1篇关于其他基因型与干扰素治疗关系的报道,即HBV E、F和H基因型感染者干扰素治疗效果要好于HBV G基因型感染者^[61]。

核苷(酸)类似物是针对HBV聚合酶区的抗病毒制剂,先后已有5种被应用于临床,即拉米夫定、阿德福韦、替比夫定、恩替卡韦和泰诺福韦。恩替卡韦和泰诺福韦因最高的有效性和最低的耐药性而作为未治疗的HBV感染者的一线用药^[62]。大量的报道认为HBV基因型与核苷(酸)类似物治疗效果和耐药突变的出现无相关性^[4,5,59,63]。但也有少数不同报道,认为B基因型比C基因型易较早地产生拉米夫定耐药^[64],而且易发生M204I突变^[35],需要进一步研究。

3 HBV准种及临床意义

3.1 HBV准种的概念 1979年Epstein等^[65]在研究RNA分子的复制机制时提出准种的概念,而HBV准种这一概念直至1993年才由Blum^[66]提出。2005年中华肝脏病杂志《慢性乙型肝炎防治指南》将HBV感染者体内形成的以1个优势株为主的相关突变株病毒群称为HBV准种^[29]。所谓准种是指不同病毒种群间核酸突变造成的序列长度差异,一般不超过核苷酸总长度2%-4%,尚不构成病原体不同基因型或基因亚型,但存在基因序列差异即基因异质性的现象。基因型与亚型若无高突变或同源重组常呈稳定状态,而准种则一直在演化。2006年娄国强^[67]进一步提出“准种单位”概念,即准种单位是不同的感染进化单位,是依时空方式的有序组织构成体内混合性的病毒群体,准种单位内的分离株则是感染进化的一个参数。同时提出了基于准种单位上的理论,能更好地解释乙型肝炎发病机制。准种理论的提出可使我们从患者体内整个病毒群体水平上认识HBV的生物学特性和临床意义。

3.2 HBV准种的临床意义 我国学者^[68-70]在国内率先开展了HBV准种的研究。他们先后对HBV的S基因区、反转录酶区、PreC/C基因序列、

X基因及涵盖了DR II、DR I、EN II等调控序列的HBV核心启动子序列等进行了一系列研究,发现准种存在于HBV基因序列的结构基因区和调节基因区,具有普遍性和个体化双重特点。对准种的深入研究已揭示某些特征性点突变可能是形成某种HBV感染不同临床表现和耐药的分子基础。

3.2.1 HBV准种与HBV感染: PreC区第28位氨基酸发生G1896A变异,可产生一个终止密码子(TAG),阻止了HBeAg的翻译;BCP区A1762T/G1764A联合突变,选择性地抑制前C mRNA转录,降低HBeAg合成,形成HBeAg阴性的慢性HBV感染^[71,72]。有报道BCP区G1776A突变也可能与HBeAg阴性的慢性HBV感染相关^[72]。S基因区的基因变异可能与隐匿性HBV感染相关。2011年Burni等^[73]对41名隐匿型乙型肝炎患者和162名非隐匿型乙型肝炎患者HBV核苷酸对比分析,发现有7个点突变(G78A/A233G/G418T/A2240G/C224 1T/C2435A/A2485G)与隐匿性HBV感染相关,突变位点涉及HBV基因组S、P和C 3个开放读码框架,未涉及X基因和调控区,其中意义更大的位点为A233G,此位点突变可导致S和P 2个ORFs以及聚合酶、大表面抗原、中表面抗原和小表面抗原4种蛋白结构发生改变;表面抗原终止密码子的出现率:隐匿型(7.3%)高于非隐匿型(3.1%),但确切相关的突变位点尚不明确。

3.2.2 HBV准种与HBV感染临床转归: 2003年刘映霞等^[74]通过对慢性乙型肝炎不同疾病类型患者S区准种复杂性的差异进行分析,认为HBV准种的复杂性随病情发展而增加;2006年刘霖等^[75]采集了5例慢性乙型肝炎患者在病情发展不同阶段的血清标本,且整个过程未接受抗病毒药物治疗,利用PCR-构象敏感凝胶技术,对HBV前C/C及BCP区进行研究,发现慢性HBV急性发作时HBV准种复杂性较低,而病情好转时准种复杂性较高。2009年Cao^[6]总结报道了在HBV的PreS1 Enh II/BCP/前C区有明显的差异性,PreS缺失、C1653T、T1753V及A1762T/G1764A的突变可增加患肝癌的几率。2010年Zhang等^[72]对192名慢性乙型肝炎病毒患者的全基因研究证实,35岁以上的慢性患者,年龄是疾病发展的重要因素,而G1896A的突变是独立于年龄以外导致疾病发展的另一重要因素。进一步研究证明G1776A突变会导致HBeAg阴性,并伴有高病毒载量,这种患者发展成为肝癌和肝硬化的几率

表 2 不同基因型HBV感染者抗病毒治疗的耐药突变位点

药物	A	B	C	D	E	F	参考文献
拉米夫定	M204V L180M	V173L	M204I/V M552Y M552I L180M	T128N W153Q A181T V173L, L180M, M204V/I	—	M204I	[63,83]
恩曲他滨		L180M	M250V/I N236T P237H A181T				[79,83]
阿德福韦	—	A181V	I233V	N236T	A194T	—	[82,83]
恩替卡韦	—	I169T	M204V/I L180M T184S/A/I/ L/G/	M250V	—	—	[83]
		T184G	C/M S202C/G/I I169T M250V/I				
替比夫定	—	—	M204V/I L180M	—	—	—	[81,83]
泰诺福韦	—	—	—	A194T	A194T	—	[79,80,82]

■名词解释

HBV准种: HBV感染者体内形成的以一个优势株为主的相关突变株病毒群。

更高。192名患者中BCP和前C区存在3种最常见的多重突变: 二重突变A1762T/G1764A(36%), 三重突变A1762T/G1764A/G1896A(11%), 四重突变T1753(A/C)/A1762T/G1764 A/G1896A(8%)。多重突变越多、年龄越大后果越严重。患者长时间受感染, 宿主的免疫系统会引起HBV突变, 但某些突变可能只代表长期感染的结果, 例如T1753A/C、G1764A和A1762T; 而另一种突变一旦出现, 则预示可能发展成严重的临床结果, 如G1896A。

2006年Osiowy等^[76]对4名未经过任何抗病毒药物治疗的慢性乙型肝炎患者, 25年前后的血清样本中HBV全基因序列进行分析, 其中差异性最大的1对为1.9%, 在平均进化率水平上, 无明显差异性。说明在25年间准种的变化率不会使整体平均进化率产生明显改变。2007年赫兢等^[77]对5例急性自限性HBV患者的表面抗原区进行测序, 碱基序列非常相似, 均为adw亚型, 其中有3例碱基序列同源性>99%。每例患者提取5个重组质粒进行测序, 结果所有质粒序列相同, 证明所测序列应为优势种群。2009年黄维金等^[78]克隆了HBV中国流行株B、C、D/C及A基因型的全基因并进行了序列分析。同一标本中分离的不同HBV克隆存在一定的差异, 但差异性不大, 保持了一定的种群稳定性。以上研究表明HBV准种的复杂性随着疾病的波动和进展而加重。相对简单的HBV准种组成可能有利于疾病的稳态和病毒的清除。

3.2.3 HBV准种与抗HBV治疗: 抗病毒治疗耐药是治疗失败的主要原因。研究已发现针对不同抗病毒药物的多种耐药位点(表2), 而且HBV感染者体内HBV准种的组成特点是抗HBV治疗反应的基础^[6,7,79-83]。2003年兰林等^[84]应用构象敏感凝胶电泳(CSGE)对20例(完全应答者和无应答者各10例)已接受IFN- α 治疗的慢性乙型肝炎患

者治疗前血清中HBV准种的异质性进行检测, 以研究HBV准种的异质性与IFN- α 应答性间的关系。结果证明HBV准种的异质性对IFN- α 的应答性有影响。慢性乙型肝炎患者血清中HBV准种异质性越大, IFN- α 治疗的难度可能越大。最近研究报道HBV的干扰素调控元件的突变将影响干扰素治疗反应^[85]。

2007年Zhu等^[79]对1名经阿德福韦治疗和另1名已对拉米夫定产生耐药性又改为阿德福韦治疗的2名患者HBV DNA进行准种群的克隆测序, 纵向分析临床治疗时准种群的变化, 结果治疗初期无耐药的, 治疗后出现阿德福韦耐药株(rtA181V); 有拉米夫定突变株存在的(rtL180M/M204I/V)又出现新的阿德福韦突变株(rtS202S/G)。2009年Margeridon-Thermet等^[86]应用超深焦磷酸测序法(Ultra-deep pyrosequencing, UDPS)与PCR直接测序法对核苷酸逆转录酶抑制剂(NRTI)治疗者和未治疗者的准种组成进行检测。结果UDPS的高灵敏度不仅较PCR直接测序法可多检出低流行的变异株, 而且在17名未治疗者中有2名检出NRTI耐药性突变, 其中1名为M204I, 其突变率为1.3%。另1名为A181T和M204I, 突变率为1.0%, 表明在抗HBV治疗前用高灵敏的方法检测个体病毒准种的组成, 尤其是耐药病毒株的检测, 对制定有效的个体化抗病毒治疗方案有重大的指导意义。Nishijima等^[83]的研究进一步证明了UDPS在准种分析中的作用和意义。

4 结论

HBV易发生变异, 在长期的进化中已形成具有种族和地域差异的基因型、基因亚型和准种。到目前为止, 以HBV全基因序列异源性 $\geq 8\%$ 为标准, 将HBV共分为A-J 10个基因型。在每种基因型中, 又根据HBV全基因序列异质性 $\geq 4\%$, 且

同行评价

本文选题较好, 内容较丰富, 有助于读者从基因水平了解HBV的致病机制, 进而为临床治疗提供一定的参考。

<8%的原则分出多种基因亚型。HBV基因(亚)型与HBV感染、临床转归、疾病进展和治疗等密切相关。某一个体感染的HBV都是一类病毒株相似的群体, HBV全基因序列异质性<4%, 表现为准种, 有优势株和弱势株, 在某一时期体现的是优势株。HBV感染种群变异特点的深入研究增加了对HBV感染多种临床表现、耐药和免疫失败的认识, 同时也认识到慢性HBV感染治疗所面临的困难^[87]。

参考文献

- Kao JH. Molecular epidemiology of hepatitis B virus. *Korean J Intern Med* 2011; 26: 255-261
- Lloje UH, Yang HI, Chen CJ. Natural history of chronic hepatitis B: what exactly has REVEAL Revealed? *Liver Int* 2012; Apr 17. [Epub ahead of print]
- 王洪岩, 张淑云. 乙型肝炎病毒基因亚型的研究进展. *国际病毒学杂志* 2009; 16: 137-141
- Lin CL, Kao JH. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 123-130
- Tanwar S, Dusheiko G. Is there any value to hepatitis B virus genotype analysis? *Curr Gastroenterol Rep* 2012; 14: 37-46
- Cao GW. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5761-5769
- Durantel D. Fitness and infectivity of drug-resistant and cross-resistant hepatitis B virus mutants: why and how is it studied? *Antivir Ther* 2010; 15: 521-527
- Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res* 2008; 134: 235-249
- Jazayeri SM, Alavian SM, Carman WF. Hepatitis B virus: origin and evolution. *J Viral Hepat* 2010; 17: 229-235
- Harrison A, Lemey P, Hurler M, Moyes C, Horn S, Pryor J, Malani J, Supuri M, Masta A, Teriboriki B, Toatu T, Penny D, Rambaut A, Shapiro B. Genomic analysis of hepatitis B virus reveals antigen state and genotype as sources of evolutionary rate variation. *Viruses* 2011; 3: 83-101
- Thai H, Campo DS, Lara J, Dimitrova Z, Ramachandran S, Xia G, Ganova-Raeva L, Teo CG, Lok A, Khudyakov Y. Convergence and coevolution of hepatitis B virus drug resistance. *Nat Commun* 2012; 3: 789
- Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charney P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 1979; 281: 646-650
- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69: 2575-2583
- Norder H, Couroucé AM, Magnius LO. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994; 198: 489-503
- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Tran TT, Trinh TN, Abe K. New complex recombinant genotype of hepatitis B virus identified in Vietnam. *J Virol* 2008; 82: 5657-5663
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F, Sugauchi F, Mano S, Maeshiro T, Nakayoshi T, Wakuta M, Miyakawa Y, Mizokami M. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol* 2009; 83: 10538-10547
- Kramvis A, Kew MC. Relationship of genotypes of hepatitis B virus to mutations, disease progression and response to antiviral therapy. *J Viral Hepat* 2005; 12: 456-464
- Hübschen JM, Mbah PO, Forbi JC, Otegbayo JA, Olinger CM, Charpentier E, Muller CP. Detection of a new subgenotype of hepatitis B virus genotype A in Cameroon but not in neighbouring Nigeria. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 88-94
- Thedja MD, Muljono DH, Nurainy N, Sukowati CH, Verhoef J, Marzuki S. Ethnogeographical structure of hepatitis B virus genotype distribution in Indonesia and discovery of a new subgenotype, B9. *Arch Virol* 2011; 156: 855-868
- Mulyanto P, Depamede SN, Wahyono A, Jirintai S, Nagashima S, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Identification of four novel subgenotypes (C13-C16) and two inter-genotypic recombinants (C12/G and C13/B3) of hepatitis B virus in Papua province, Indonesia. *Virus Res* 2012; 163: 129-140
- Abdou Chekaraou M, Brichler S, Mansour W, Le Gal F, Garba A, Dény P, Gordien E. A novel hepatitis B virus (HBV) subgenotype D (D8) strain, resulting from recombination between genotypes D and E, is circulating in Niger along with HBV/E strains. *J Gen Virol* 2010; 91: 1609-1620
- Mbayed VA, Barbini L, López JL, Campos RH. Phylogenetic analysis of the hepatitis B virus (HBV) genotype F including Argentine isolates. *Arch Virol* 2001; 146: 1803-1810
- Attaullah S, Rehman S, Khan S, Ali I, Ali S, Khan SN. Prevalence of hepatitis B virus genotypes in HBsAg positive individuals of Afghanistan. *Virol J* 2011; 8: 281
- Wang HY, Li D, Liu W, Jin X, Du B, Li YP, Gu HX, Zhang SY. Hepatitis B virus subgenotype C2 is the most prevalent subgenotype in northeast China. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 477-481
- Kramvis A, Arakawa K, Yu MC, Nogueira R, Stram DO, Kew MC. Relationship of serological subtype, basic core promoter and precore mutations to genotypes/subgenotypes of hepatitis B virus. *J Med Virol* 2008; 80: 27-46
- Pourkarim MR, Amini-Bavil-Olyae S, Lemey P, Maes P, Van Ranst M. Are hepatitis B virus "subgenotypes" defined accurately? *J Clin Virol* 2010; 47: 356-360
- 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. *中华肝病杂志* 2005; 13: 881-891
- Ozasa A, Tanaka Y, Orito E, Sugiyama M, Kang JH, Hige S, Kuramitsu T, Suzuki K, Tanaka E, Okada

- S, Tokita H, Asahina Y, Inoue K, Kakumu S, Okanoue T, Murawaki Y, Hino K, Onji M, Yatsushashi H, Sakugawa H, Miyakawa Y, Ueda R, Mizokami M. Influence of genotypes and precore mutations on fulminant or chronic outcome of acute hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 44: 326-334
- 31 Matsuura K, Tanaka Y, Hige S, Yamada G, Murawaki Y, Komatsu M, Kuramitsu T, Kawata S, Tanaka E, Izumi N, Okuse C, Kakumu S, Okanoue T, Hino K, Hiasa Y, Sata M, Maeshiro T, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, Miyakawa Y, Mizokami M. Distribution of hepatitis B virus genotypes among patients with chronic infection in Japan shifting toward an increase of genotype A. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1476-1483
- 32 Tamada Y, Yatsushashi H, Masaki N, Nakamuta M, Mita E, Komatsu T, Watanabe Y, Muro T, Shimada M, Hijioka T, Satoh T, Mano Y, Komeda T, Takahashi M, Kohno H, Ota H, Hayashi S, Miyakawa Y, Abiru S, Ishibashi H. Hepatitis B virus strains of subgenotype A2 with an identical sequence spreading rapidly from the capital region to all over Japan in patients with acute hepatitis B. *Gut* 2012; 61: 765-773
- 33 Yin J, Zhang H, Li C, Gao C, He Y, Zhai Y, Zhang P, Xu L, Tan X, Chen J, Cheng S, Schaefer S, Cao G. Role of hepatitis B virus genotype mixture, subgenotypes C2 and B2 on hepatocellular carcinoma: compared with chronic hepatitis B and asymptomatic carrier state in the same area. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1685-1691
- 34 Zhang HW, Yin JH, Li YT, Li CZ, Ren H, Gu CY, Wu HY, Liang XS, Zhang P, Zhao JF, Tan XJ, Lu W, Schaefer S, Cao GW. Risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis in Shanghai, China. *Gut* 2008; 57: 1713-1720
- 35 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
- 36 Lin CL, Kao JH. HBV genotypes and chronicification of acute hepatitis B: more questions than answers. *Gut* 2009; 58: 1027-1028; author reply 1027-1028
- 37 Khare S, Negi SS, Singh S, Singhal M, Kumar S, Prakash C, Venugopal R, Rawat DS, Chauhan LS, Rai A. Genetic analysis of precore/core and partial pol genes in an unprecedented outbreak of fulminant hepatitis B in India. *Epidemiol Infect* 2012; 1-7. [Epub ahead of print]
- 38 Dandri M, Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut* 2012; 61 Suppl 1: i6-i17
- 39 Candotti D, Lin CK, Belkhir D, Sakuldamrongpanich T, Biswas S, Lin S, Teo D, Ayob Y, Allain JP. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence. *Gut* 2012; Jan 20. [Epub ahead of print]
- 40 Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G, Salehi M, Ahmadabadi BN, Kennedy D. Hepatitis B virus genotype, HBsAg mutations and co-infection with HCV in occult HBV infection. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011; 35: 554-559
- 41 Liaw YF, Sheen IS, Chen TJ, Chu CM, Pao CC. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection: a prospective study. *Hepatology* 1991; 13: 627-631
- 42 Liu J, Yang HI, Lee MH, Lu SN, Jen CL, Wang LY, You SL, Iloeje UH, Chen CJ. Incidence and determinants of spontaneous hepatitis B surface antigen seroclearance: a community-based follow-up study. *Gastroenterology* 2010; 139: 474-482
- 43 Sánchez-Tapias JM, Costa J, Mas A, Bruguera M, Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology* 2002; 123: 1848-1856
- 44 Yuen MF, Wong DK, Sablon E, Tse E, Ng IO, Yuan HJ, Siu CW, Sander TJ, Bourne EJ, Hall JG, Condeay LD, Lai CL. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in the Chinese: virological, histological, and clinical aspects. *Hepatology* 2004; 39: 1694-1701
- 45 Tseng TC, Liu CJ, Yang HC, Su TH, Wang CC, Chen CL, Kuo SF, Liu CH, Chen PJ, Chen DS, Kao JH. Determinants of spontaneous surface antigen loss in hepatitis B e antigen-negative patients with a low viral load. *Hepatology* 2012; 55: 68-76
- 46 Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, Hasnain SS, Leung N, Lesmana L, Phiet PH, Sjalfoellah Noer HM, Sollano J, Sun HS, Xu DZ. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 1356-1361
- 47 Yin JH, Zhao J, Zhang HW, Xie JX, Li WP, Xu GZ, Shen J, Dong HJ, Zhang J, Wang L, Han JK, Wang HY, Cao GW. HBV genotype C is independently associated with cirrhosis in community-based population. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 379-383
- 48 Yang HI, Yeh SH, Chen PJ, Iloeje UH, Jen CL, Su J, Wang LY, Lu SN, You SL, Chen DS, Liaw YF, Chen CJ. Associations between hepatitis B virus genotype and mutants and the risk of hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1134-1143
- 49 Yin J, Zhang H, He Y, Xie J, Liu S, Chang W, Tan X, Gu C, Lu W, Wang H, Bi S, Cui F, Liang X, Schaefer S, Cao G. Distribution and hepatocellular carcinoma-related viral properties of hepatitis B virus genotypes in Mainland China: a community-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 777-786
- 50 Han YF, Zhao J, Ma LY, Yin JH, Chang WJ, Zhang HW, Cao GW. Factors predicting occurrence and prognosis of hepatitis-B-virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 4258-4270
- 51 Liang TJ, Mok KT, Liu SI, Huang SF, Chou NH, Tsai CC, Chen IS, Yeh MH, Chen YC, Wang BW. Hepatitis B genotype C correlated with poor surgical outcomes for hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2010; 211: 580-586
- 52 Kew MC, Kramvis A, Yu MC, Arakawa K, Hodgkinson J. Increased hepatocarcinogenic potential of hepatitis B virus genotype A in Bantu-speaking sub-saharan Africans. *J Med Virol* 2005; 75: 513-521
- 53 Viana R, Wang R, Yu MC, Welschinger R, Chen CY, Kew MC. Hepatitis B viral loads in southern African Blacks with hepatocellular carcinoma. *J Med Virol* 2009; 81: 1525-1530
- 54 Kew MC. Hepatocellular carcinoma in African Blacks: Recent progress in etiology and pathogenesis. *World J Hepatol* 2010; 2: 65-73
- 55 Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus

- infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. *Pathol Biol* (Paris) 2010; 58: 273-277
- 56 Thakur V, Gupta RC, Kazim SN, Malhotra V, Sarin SK. Profile, spectrum and significance of HBV genotypes in chronic liver disease patients in the Indian subcontinent. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 165-170
- 57 Livingston SE, Simonetti JP, McMahon BJ, Bulkow LR, Hurlburt KJ, Homan CE, Snowball MM, Cagle HH, Williams JL, Chulanov VP. Hepatitis B virus genotypes in Alaska Native people with hepatocellular carcinoma: preponderance of genotype F. *J Infect Dis* 2007; 195: 5-11
- 58 Yuen MF, Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1: 138-143
- 59 Raimondi S, Maisonneuve P, Bruno S, Mondelli MU. Is response to antiviral treatment influenced by hepatitis B virus genotype? *J Hepatol* 2010; 52: 441-449
- 60 Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Seko Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Ikeda K, Kobayashi M, Kumada H. Long-term efficacy of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection in Japan. *J Gastroenterol* 2012; Feb 24. [Epub ahead of print]
- 61 Erhardt A, Göbel T, Ludwig A, Lau GK, Marcellin P, van Bömmel F, Heinzl-Pleines U, Adams O, Häussinger D. Response to antiviral treatment in patients infected with hepatitis B virus genotypes E-H. *J Med Virol* 2009; 81: 1716-1720
- 62 Tujios SR, Lee WM. New advances in chronic hepatitis B. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28: 193-197
- 63 Mello FC, Fernandes CA, Gomes Sde A. Antiviral therapy against chronic hepatitis B in Brazil: high rates of lamivudine resistance mutations and correlation with HBV genotypes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107: 317-325
- 64 Hsieh TH, Tseng TC, Liu CJ, Lai MY, Chen PJ, Hsieh HL, Chen DS, Kao JH. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C. *Antivir Ther* 2009; 14: 1157-1163
- 65 Epstein IR, Eigen M. Selection and self-organization of self-reproducing macromolecules under the constraint of constant flux. *Biophys Chem* 1979; 10: 153-160
- 66 Blum HE. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993; 35: 40-50
- 67 娄国强. HBV准种单位—超感染模式的探索与研究. *医学研究杂志* 2006; 35: 6-7, 17
- 68 董菁, 成军, 王勤环, 刘友昭, 王刚, 施双双, 夏小兵, 邵清, 斯崇文. 慢性乙型肝炎患者体内乙型肝炎病毒准种特点的初步研究. *中华内科杂志* 2000; 39: 838-839
- 69 陈恩强, 雷秉钧, 唐红. 乙型肝炎病毒准种的临床应用及其研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1086-1091
- 70 王琦, 成军. HBV准种的研究进展. *诊断学* 2008; 7: 93-95
- 71 吴伟, 李兰娟, 陈瑜, 李君, 钱香, 程东庆. 重型乙型肝炎患者血清乙型肝炎病毒全基因克隆及测序. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 734-737
- 72 Zhang D, Ma S, Zhang X, Zhao H, Ding H, Zeng C. Prevalent HBV point mutations and mutation combinations at BCP/preC region and their association with liver disease progression. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 271
- 73 Bruni R, Prosperi M, Marcantonio C, Amadori A, Villano U, Tritarelli E, Lo Presti A, Ciccozzi M, Ciccaglione AR. A computational approach to identify point mutations associated with occult hepatitis B: significant mutations affect coding regions but not regulative elements of HBV. *Virol J* 2011; 8: 394
- 74 刘映霞, 胡国龄, 谭德明. 乙型肝炎病毒S区准种与疾病活动性的关系. *中华传染病杂志* 2002; 20: 282-286
- 75 刘霖, 王宇明, 兰林, 李俊刚, 邓国宏, 夏杰, 赵学兰, 张绪清. 慢性乙型肝炎急性发作患者血清病毒准种动力学研究. *中华肝脏病杂志* 2006; 14: 29-32
- 76 Osiowy C, Giles E, Tanaka Y, Mizokami M, Minuk GY. Molecular evolution of hepatitis B virus over 25 years. *J Virol* 2006; 80: 10307-10314
- 77 赫兢, 辛绍杰, 杨静, 沈宏辉, 胡燕, 侯俊, 貌盼勇. 急性乙型肝炎患者血清中乙型肝炎病毒序列的研究. *中国卫生检验杂志* 2007; 17: 2242-2243, 2297
- 78 黄维金, 周诚, 王佑春, 张华远, 吴星, 梁争论, 李河民. 乙型肝炎病毒中国流行株B、C、D/C及A基因型的全基因克隆与序列分析. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 2978-2983
- 79 Zhu Y, Curtis M, Snow-Lampart A, Yang H, Delaney W, Miller MD, Borroto-Esoda K. In vitro drug susceptibility analysis of hepatitis B virus clinical quasispecies populations. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 3335-3341
- 80 Sheldon J, Soriano V. Hepatitis B virus escape mutants induced by antiviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 766-768
- 81 Wang YZ, Xiao JH, Liu LG, Ye CY, Shen HY, Xu TM, Zhu KZ. Simultaneous detection of hepatitis B virus genotypes and mutations associated with resistance to lamivudine, adefovir, and telbivudine by the polymerase chain reaction-ligase detection reaction. *Braz J Infect Dis* 2011; 15: 560-566
- 82 Dupouey J, Gerolami R, Solas C, Colson P. Hepatitis B virus variant with the a194t substitution within reverse transcriptase before and under adefovir and tenofovir therapy. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2012; 36: e26-e28
- 83 Nishijima N, Marusawa H, Ueda Y, Takahashi K, Nasu A, Osaki Y, Kou T, Yazumi S, Fujiwara T, Tsuchiya S, Shimizu K, Uemoto S, Chiba T. Dynamics of hepatitis B virus quasispecies in association with nucleos(t)ide analogue treatment determined by ultra-deep sequencing. *PLoS One* 2012; 7: e35052
- 84 兰林, 王宇明. 乙型肝炎病毒准种异质性对干扰素应答性的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 169-172
- 85 Lu JJ, Chen EQ, Yang JH, Zhou TY, Liu L, Tang H. A mutation in the interferon regulatory element of HBV may influence the response of interferon treatment in chronic hepatitis B patients. *Virol J* 2012; 9: 10
- 86 Margeridon-Thermet S, Shulman NS, Ahmed A, Shahriar R, Liu T, Wang C, Holmes SP, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Hanczaruk B, Simen BB, Egholm M, Shafer RW. Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients. *J Infect Dis* 2009; 199: 1275-1285
- 87 Panjaworayan N, Brown CM. Effects of HBV Genetic Variability on RNAi Strategies. *Hepat Res Treat* 2011; 2011: 367908