临床研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000803

重庆地区乙肝疫苗免疫无效儿童病毒基因组表面抗原区变异研究

邓海君[1],黄 勇[2],龙泉鑫[1],黄爱龙[1]

(1. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016;
2. 重庆医科大学附属第二医院检验科,重庆 400012)

【摘 要】**目的**:探讨重庆地区乙型肝炎病毒(hepatitis B virus,HBV)疫苗免疫失败儿童患者体内病毒表面抗原(surface gene)基因主要亲水区(major hydrophilic region,MHR)及 a 决定簇变异情况。**方法**:收集乙型肝炎病毒疫苗免疫保护失败患儿及未接种疫苗的乙型肝炎病毒感染患儿血清样本,通过扩增 HBV S 基因并测序,与相应基因型的标准序列进行比对分析。**结果**:243 例免疫保护失败患儿体内病毒 a 决定簇突变检出率明显高于 20 例未经疫苗免疫组患儿(31.7% vs. 10.0%,P=0.044);免疫失败组儿童体内病毒 MHR 突变率数值也高于未接种组儿童,在统计学上差异不显著(49.8% vs. 30.0%,P=0.106)。在疫苗免疫失败儿童病例中,MHR 和 a 决定簇突变发生与病毒低水平复制相关:突变组患儿 DNA 滴度均明显低于无突变组患儿($\log_{10}$ 6.9 ± 1.8 vs. $\log_{10}$ 7.7 ± 1.8,P=0.000;$\log_{10}$ 7.1 ± 1.6 vs. $\log_{10}$ 7.6 ± 1.9,P=0.000)。免疫失败儿童病例中,MHR 突变组儿童谷丙转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)数值也明显高于未突变组(67.1 ± 58.8 vs. 56.5 ± 51.8,P=0.018)。在 243 例疫苗免疫保护失败儿童体内病毒 MHR 区域中共检出 145 个变异氨基酸,热点变异类型主要包括 I110L(6 例)、K122R(15 例)、T126A(18 例)、I126T(14 例)、M133L(7 例)、G145R(6 例)及 Y161F(12 例)等。进一步分析各类型突变与临床表型间差异,发现含 G145R 及 Y161F 突变病例体内血清病毒 DNA 水平明显低于无突变组($\log_{10}$ 6.8 ± 1.1 vs. $\log_{10}$ 7.5 ± 1.8,P=0.048;$\log_{10}$ 5.0 ± 2.6 vs. $\log_{10}$ 7.3 ± 1.8,P=0.000)。**结论**:疫苗免疫保护失败儿童病例体内病毒 a 决定簇及 MHR 具有较高的突变率,且该区段的突变与病毒较低的复制水平及及较高的 ALT 相关。

【关键词】乙型肝炎病毒;疫苗保护失败;儿童病例;病毒变异

【中图分类号】R373.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-07-10

S gene variations of hepatitis B virus in children with vaccination failure

Deng Haijun[1], Huang Yong[2], Long Quanxin[1], Huang Ailong[1]

(1. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To determine variations of 'major hydrophilic region' (MHR) and 'a determinant region' in S gene of hepatitis B virus (HBV) in children with vaccine immunized failure. ***Methods***: Serum samples from HBV vaccine immunized failure child and non-immunized child were collected; HBV S gene was amplified, sequenced, and compared with the consensus sequence of different genotype HBV genomes. ***Results***: Nucleotide mutation ratio of 'a determinant region' in HBV patients with vaccine immunized failure was obviously higher than that of vaccine navie patients (31.7% vs. 10.0%, P=0.044). Vaccine immunized failure patients with mutation in MHR or a determinant had a obviously lower viral DNA loading compared with that of mutation free patients (MHR: $\log_{10}$ 6.9 ± 1.8 vs. $\log_{10}$ 7.7 ± 1.8, P=0.000; a determinant: $\log_{10}$ 7.1 ± 1.6 vs. $\log_{10}$ 7.6 ± 1.9, P=0.000). In addition, vaccine immunized failure patients with MHR mutation also had higher ALT value (67.1 ± 58.8 vs. 56.5 ± 51.8, P=0.018). Totally 145 amino acid variation types were detected in vaccine immunized failure patients, including several 'hot mutations': I110L(6), K122R(15), T126A(18), I126T(14), M133L(7), G145R(6) and Y161F(12). Patients with G145R and Y161F had obviously lower serum

作者介绍:邓海君,Email:164943607@qq.com,
研究方向:乙型肝炎病毒准种研究。

通信作者:黄爱龙,Email:ahuang1964@163.com。

基金项目:传染病十二五重大专项资助项目(编号:2013ZX10002002);国家自然科学基金资助项目(编号:81301394);重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:cstc2013jcyjC10002 和 csts2013jcyja10064)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151023.2041.008.html (2015-10-23)

viral loading(log_{10} 6.8 ± 1.1 vs. log_{10} 7.5 ± 1.8, P=0.048; log_{10} 5.0 ± 2.6 vs. log_{10} 7.3 ± 1.8, P=0.000, respectively). ***Conclusion***: In general, vaccine immunized failure children have a higher mutation rate in MHR region and a determinant region, which correlate with lower viral loading and higher ALT value.

【Key words】hepatitis B virus; vaccination failure; child patients; virus variations

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染依然是严重的公共卫生问题[1]，我国更是乙型肝炎病毒感染大国。我国自 1992 年来将乙型肝炎疫苗纳入儿童计划免疫，新生儿及低年龄组儿童人群 HBV 感染率逐年降低。尽管拥有充分的主动及被动免疫保护措施，仍有 5%~10%的 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎病毒感染母亲所生新生儿因免疫保护失败而被感染[2-3]，这类儿童病例可能会成为慢性 HBV 感染人群。已有的研究结果显示，乙肝病毒 S 基因区尤其a 决定簇及主要亲水区(major hydrophilic region, MHR)氨基酸的变异，可减少 S 蛋白的分泌及降低与抗-HBs 抗体的亲和力，导致 HBsAg 检测失败及免疫逃逸[4-6]。本文对重庆地区乙肝疫苗接种免疫保护失败儿童 HBV S 区氨基酸的变异情况进行分析，可为研制新型乙肝疫苗和 HBV 诊断试剂提供参考价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集 2011 年~2013 年间在重庆医科大学附属儿童医院、附属第一医院及附属第二医院就诊的 HBV 感染儿童血清样本。其中接种乙肝疫苗但免疫保护失败慢乙肝儿童患者 243 例(通过询问家长，患儿出生后是否接受 0、1、6 个月三针疫苗全程接种)，未接受乙肝疫苗接种的慢乙肝儿童患者 20 例。所有患儿均 HBsAg 阳性，抗-HBs 阴性，并经血清学等检查排除 HAV、HCV、HDV、HEV 及 HIV 重叠感染。本研究得到重庆医科大学伦理委员会的批准并与儿童患者监护人进行充分沟通签署知情同意书。

1.2 血清样本中 HBV DNA 的提取

取 200 μl 患者血清，采用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA Blood Mini kit，按照试剂盒说明书操作步骤提取血清中的病毒 DNA，用 100 μl Buffer EB 洗脱 DNA，-80 ℃冰箱保存备用。

1.3 巢氏 PCR 扩增 HBV 基因组 S 区

根据 GenBank 公布的 HBV S 区序列，设计两对引物巢氏 PCR 扩增 HBV S 区，引物序列见表 1，由华大基因公司合成。

第 1 轮以 F1 和 R1 为外引物扩增 HBV S 区，使用Takara 公司高保真 PrimeStar DNA 聚合酶，25 μl 反应体系中加入 5 μl DNA 模板，循环参数为：95 ℃预变性 5 min；98 ℃ 10 s，57 ℃ 15 s(每个循环降低 1 ℃)，72 ℃ 2 min，5 个循环；98 ℃ 10 s，52 ℃ 15 s，72 ℃ 2 min，25 个循环；72 ℃延伸 10 min。取 3 μl PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳观察结果。以 F2 和 R2 为内引物，取第 1 轮 PCR 产物 1 μl 作为 DNA 模板(当第一轮 PCR 产物浓度较高时需进行 1:10 或 1:100 倍稀释)，进行第 2 轮 PCR 扩增，循环参数为：95 ℃预变性 5 min；98 ℃ 10 s，52 ℃ 15 s，72 ℃ 60 s，30 个循环；72 ℃延伸 10 min。取 3 μl PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析结果。

表 1 HBV S 区巢氏 PCR 扩增引物

Tab.1 Primers for the nest PCR of HBV S gene

引物	序列(5'-3')	核苷酸位点	产物长度
F1	CAGCATATTCTTGGGAACAAG	nt 2818-2838	1 826 bp
R1	GTAAACAAAGGACGTCCCGC	nt 1428-1409	
F2	CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC	nt 56-75	1 058 bp
R2	CTTGTAAGTTGGCGAGAAAGT	nt 1113-993	

1.4 S 区测序、基因分型及比对分析

S 区 PCR 扩增阳性产物送广州 Invitrogen 公司直接测序。样本测序结果采用 NCBI Genotyping 工具(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi)进行基因分型。从 GenBank 中下载 784 条 B 基因型及 1 289 条 C 基因型 HBV 全基因组序列，采用 clustalw 软件分别进行比对分析，计算 B 基因型及 C 基因型每个核苷酸位点的多样性，以各位点比率最高的核苷酸作为该位点的一致性序列，采用 clustalw、BioEdit 等分析软件，将临床样本测序结果分别与 B、C 基因型一致性序列进行比对和分析。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。非参数资料的比较采用 Wilcoxon-Mann-Whitney 检验；2 组资料率的比较采用卡方检验或 Fisher 精确检验。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 临床基本资料

本次研究共收集了乙肝疫苗免疫保护失败慢性 HBV 感染儿童 243 例(接种组)、未接种乙肝疫苗慢性 HBV 感染儿童 20 例(未接种组)。2 组患者均以 B 基因型为主，分别占 76.9%、75.0%，C 基因型分别占 23.1%、25.0%，2 组病例基因

型构成比无统计学差异。2 组病例间性别组成、HBeAg 构成比及血清 DNA 滴度均无明显差异（$P>0.05$），疫苗接种组儿童平均年龄低于未接种组儿童（$P=0.000$），血清 ALT 水平则高于后者（$W=3\ 084.5$，$P=0.045$）。患者详细临床资料见表 2。

2.2 HBV S 基因区突变分析

将 263 例临床样本测序结果分别与 B/C 基因型病毒一致性序列进行比对分析（表 3）。疫苗免疫保护失败的儿童患者组 S 基因区检出核苷酸突变率和氨基酸突变率分别为 92.2%（224 例）及 81.1%（16 例）。而未经过疫苗保护组患儿体内病毒在该区域的核苷酸突变检出率和氨基酸突变检出率分别为 80%和 70%，2 组病例间核苷酸和氨基酸突变率均无统计学差异（$P=0.083$ 和 $P=0.245$），且 2 组病例中平均氨基酸突变个数也无统计学差异（1.89 ± 1.71 vs. 1.20 ± 1.06，$W=2961.5$，$P=0.095$）。

49.8%的疫苗免疫保护失败病例在 S 基因的主要亲水区发生氨基酸突变。而未经历免疫保护的病例在该区域的氨基酸突变率为 30%，两组病例在该区域的氨基酸突变率并无统计学差异（$P=0.106$）。疫苗保护失败组有 77 例患儿在 a 抗原决定簇（aa124-147）检出有氨基酸突变，突变率发生率明显高于未接种组（31.7% vs. 10%，$P=0.044$），此外前者每例样本该区域平均突变氨基酸数量也明显高于后者（0.35 ± 0.54 vs. 0.10 ± 0.31，$W=2\ 963$，$P=0.041$，表 3）。

2.3 MHR 热点突变氨基酸位点及突变类型

本次分析，疫苗保护失败组患儿在 MHR 区域共检出145个变异氨基酸，热点突变氨基酸位点突变类型主要包括：I110L（6 例）、K122R（15 例）、T126A（18 例）、I126T（14 例）、M133L（7 例）、G145R（6 例）、Y161F（12 例）等。未接种组患儿 MHR 共检出 6 个突变氨基酸，包括 K122R（2 例）、I110L（1 例）、T126A（1 例）、M133L（1 例）、Y161F（1 例），未检出G145R、I126T 等突变类型。MHR 区段详细氨基酸突变情况见表 4。

表 2 慢性 HBV 感染儿童临床基本资料

Tab.2 Clinical characters of child patients with CHB

指标	疫苗接种组（$n=243$）	未接种组（$n=20$）	W 值	P 值
性别：男性/女性	159/84	13/7	–	1.000
年龄（岁，$Q_1/M/Q_3$）：	2.0/5.0/7.0	8.5/11.0/12.3	675.500	0.000
ALT（IU/L）：$\bar{x} \pm s$	58.7 ± 62.5	30.4 ± 10.5	3 084.500	0.045
HBV DNA（$\log_{10}$ 拷贝/ml）：$\bar{x} \pm s$	7.3 ± 1.8	7.6 ± 1.7	2 550.500	0.153
病毒基因型：B/C	186/57	15/5	–	0.791
HBeAg(+)/HBeAg(−)	194/49	19/1	–	0.137

注：ALT：谷丙转氨酶

表 3 慢性 HBV 感染儿童 S 区核苷酸及氨基酸突变分析

Tab.3 Nucleotide acids mutation and amino acids substitution analysis

统计对象	疫苗接种组（$n=243$）	未接种组（$n=20$）	W 值	P 值
S区核苷酸突变样本发生率：例数（百分比%）	224（92.2%）	16（80.0%）	–	0.083
错义突变个数/同义突变个数	459/454	24/35	–	0.179
S区氨基酸突变样本发生率：例数（百分比%）	197（81.1%）	14（70%）	–	0.245
MHR区：例数（百分比%）	121（49.8%）	6（30%）	–	0.106
a决定簇：例数（百分比%）	77（31.7%）	2（10%）	–	0.044
S区平均突变核苷酸数：$\bar{x} \pm s$	3.77 ± 3.12	2.95 ± 2.95	2 887.000	0.159
S 区平均突变氨基酸数：$\bar{x} \pm s$	1.89 ± 1.71	1.20 ± 1.06	2 961.500	0.095
MHR 平均突变氨基酸数：$\bar{x} \pm s$	0.60 ± 0.70	0.40 ± 0.68	2 851.000	0.149
a 决定簇平均突变氨基酸：$\bar{x} \pm s$	0.35 ± 0.54	0.10 ± 0.31	2 963.000	0.041

注：平均突变氨基酸数指该组患者中每例样本该区段平均突变氨基酸的数量。表中“–”表示该统计量无 W 值

表 4 S 基因 MHR 氨基酸突变位点及突变类型分析

Tab.4 Quality of amino acid mutations in MHR regions of HBV S gene

分组	氨基酸突变类型及例数
疫苗保护失败组（$n=243$）	Q101H(3)，I110L(6)，S113T(1)，P120T(1)，C121G(1)，K122R(15)，T126A(18)，T126S(3)，I126T(14)，I126N(1)，I126S(1)，P127T(3)，P127S(1)，Q129R(2)，Q129H(3)，G130E(1)，G130R(1)，T131N(2)，M133L(7)，M133T(3)，M133I(1)，F134L(2)，T140I(3)，T140S(1)，K141R(1)，K141Q(1)，P142S(1)，T143M(3)，D144A(2)，G145R(6)，G145A(1)，N146D(2)，T148S(1)，I150N(1)，W156L(2)，A159V(2)，K160R(1)，Y161F(12)，Y161S(1)
未接种组（$n=20$）	K122R(2)，I110L(1)，T126A(1)，M133L(1)，Y161F(1)

表 5 243 例疫苗接种患儿 a 决定簇及 MHR 突变与临床资料间的相关性分析

Tab.5 Correlation between mutations in MHR/a determinant region and clinical characters of vaccine immunized failure patients

指标	MHR突变组 (n=121)	MHR无突变组 (n=122)	W 值	P 值	a 决定簇突变组 (n=77)	a 决定簇无突变组 (n=166)	W 值	P 值
年龄(岁,$\bar{x}\pm s$)	4.8 ± 3.2	4.3 ± 2.9	6 796	0.284	4.7 ± 3.1	4.5 ± 3.1	6 103	0.571
性别(男/女)	81/40	78/44	–	0.720	49/28	110/56	–	0.772
ALT(IU/L,$\bar{x}\pm s$)a	67.1 ± 58.8	56.5 ± 51.8	6 085	0.018	66.1 ± 63.4	59.3 ± 56.1	5 827	0.269
DNA 滴度($\log_{10}$,$\bar{x}\pm s$)	6.9 ± 1.8	7.7 ± 1.8	10 415	0.000	7.1 ± 1.6	7.6 ± 1.9	8 090	0.000
HBe+/HBe–	92/29	102/20	–	0.153	61/16	133/33	–	0.865
基因型:B/C	97/24	89/33	–	0.226	57/20	129/37	–	0.520

注:表中“–”表示该统计量无 W 值

2.4 MHR 及 a 决定簇氨基酸突变与临床资料间相关性分析

从表 5 可以看出,在 243 例疫苗保护失败儿童患者中,MHR 和 a 决定簇氨基酸突变与 DNA 低水平复制相关,突变组患儿 DNA 滴度均明显低于无突变组患儿($\log_{10}$ 6.9 ± 1.8 vs. $\log_{10}$ 7.7 ± 1.8,W =10 415.000,P=0.000;$\log_{10}$ 7.1 ± 1.6 vs. $\log_{10}$ 7.6 ± 1.9,W=8 090.000,P=0.000)。MHR 突变组患儿 ALT 水平比无突变组明显升高(67.1 ± 58.8 vs. 56.5 ± 51.8,W= 6 085.000,P=0.018),a 决定簇突变组患儿 ALT 水平也有升高的趋势(66.1 ± 63.4,59.3 ± 56.1,W=5 827.000,P=0.269)。但 MHR 及 a 决定簇区段氨基酸突变与患者的年龄、性别、HBeAg 状态及基因型之间均无统计学相关(P>0.05)。

分别对 MHR 区热点变异位点(包括 I110L、K122R、T126A、I126T、M133L、G145R 及 Y161F)的突变与临床资料间的关系进行了统计分析。结果显示,G145R 突变与病毒低 DNA 滴度相关:G145R 突变组患儿血清 DNA 滴度明显低于野生型组(6.8 ± 1.0 vs. 7.5 ± 1.8,P=0.048),但该突变与 ALT 水平、基因型、年龄、性别及 HBeAg 状态等临床资料无相关。15 例 K122R 突变全部见于 B 基因型样本,提示 B 基因型比C 基因型患者更容易发生 K122R 突变(8.1% vs. 0.0%,P=0.025)。Y161F 突变更多见于 HBeAg 阴性患者(P=0.000),并且也与 DNA 低水平复制相关,突变组 DNA 滴度显著低于野生型组(5.0 ± 2.6 vs. 7.3 ± 1.8,P=0.000)。其余多数位点突变的发生与 ALT 水平、DNA 滴度及基因型等临床资料间并无明显相关性。

3 讨 论

宿主免疫压力、药物选择压力、疫苗诱导的免疫压力以及乙型肝炎病毒本身易错的复制方式会导致病毒 S 区发生突变[6]。乙型肝炎病 MHR 或者 a 抗原决定簇个别关键氨基酸的突变可导致 HBsAg 空间结构的改变,降低抗乙型肝炎 S 蛋白抗体对其的结合力,使现有疫苗或者 HBIG 的免疫保护无效导致免疫逃逸,还会导致现有针对 HBsAg 的诊断试剂失效[7-8]。因此,对乙肝疫苗免疫保护失败儿童 S 区序列进行分析,了解 MHR 及 a 决定簇氨基酸突变特征,对于研制新型乙肝疫苗和 HBV 诊断试剂具有重要的参考意义。

本次研究对重庆地区 243 例乙肝疫苗免疫保护失败的慢性 HBV 感染儿童和 20 例未接种疫苗的对照儿童 S 区序列的突变特征进行了检测分析。结果显示,疫苗保护失败儿童病例 MHR 突变率高达 49.8%,高于未接受疫苗免疫儿童病例 30%的突变率,也高于其他国家和地区慢性乙型肝炎感染人群该区域的突变率(摩洛哥 14.9%[9]、塞尔维亚 22.6%[10] 以及中国广西[5])。疫苗保护失败儿童病例患儿 a 决定簇突变率显著高于未经受疫苗保护儿童病例(31.7% vs. 10.0%),台湾相关研究显示,在乙肝疫苗使用 10 年后,儿童病例群体 a 决定簇突变率从 7.8%上升至 28.1%;同样的趋势在中国北京地区的调查中也被证实:在 1992 年乙型肝炎疫苗纳入儿童计划免疫时,慢性乙型肝炎儿童病例中 a 决定簇突变率为 6.5%,而该指标在计划免疫 13 年后上升至 14.8%,与此同时,成人慢性乙型肝炎患者该区域的突变率并无明显改变[3]。这部分研究显示,乙型肝炎病毒疫苗对病患体内病毒产生筛选压力,导致病患体内病毒 a 决定区的突变率逐渐升高。

S 基因主要疏水区是 S 抗原中和抗体的识别区域,疫苗免疫保护失败儿童病例该区域的突变能直观的反应病毒应对抗体压力的防御方式。本研究中,疫苗保护失败儿童病例中主要的热点突变位点和

类型为 I110L、K122R、T126A、I126T、M133L、G145R 及 Y161F 等。在这些热点突变类型中，G145R 突变仅在疫苗免疫失败儿童儿童中被检出(6 例，2.5%)。已有的研究表明，G145R 突变可改变 a 决定簇第二茎环表面结构，导致疫苗诱导产生的中和抗体不能识别突变的抗原表位[14-15]。G145R 突变虽不影响病毒 mRNA 和蛋白的表达，但会降低病毒颗粒分泌及稳定性，有文献报道，发生 G145R 突变的病人，血清 DNA 滴度会逐渐降低[16]。本研究结果也发现G145R 突变的疫苗保护失败儿童病例中，血清病毒 DNA滴度明显低于无突变组儿童病例，但该突变与 ALT 水平、HBeAg 状态及基因型等临床资料无相关。

a 决定簇 aa126 是突变发生率最高的位点，其在免疫保护失败儿童病例突变率为 13.2%，而在未接受疫苗免疫病人突变率为 5%。文献显示，不同地域该位点的突变率存在明显的差异：日本等东亚国家中，a 决定簇中该位点拥有最高的突变率，而在西班牙等欧洲国家中，该位点的突变率则较低[11-12]，提示该位点的突变频率可能与病毒基因型相关。相反的是，aa120 突变在塞尔维亚的研究中被认为是突变频率最高的位点，但在本研究中，在疫苗免疫失败儿童病例中突变率仅为 0.9%。这提示了不同基因型乙型肝炎病毒在应对疫苗压力过程中使用了不同的突变方式。此外 Q129R 和 D144A 突变等突变也仅在疫苗免疫失败儿童病例中被检出，也印证此前的研究所发现的该两位点突变会导致病毒与抗体结合力的下降，导致疫苗作用减弱或保护失败[7]。

总之，本研究结果表明，疫苗免疫失败儿童MHR 及 a 决定簇氨基酸突变率较高，且该区段的突变与 DNA 低水平复制及 ALT 水平升高相关。热点突变类型 G145R、I/T126V、Q129R 和 D144A 等更多见于疫苗接种组儿童，可能与疫苗逃逸突变相关。

参 考 文 献

[1] Jules L, Dienstag MD. Hepatitis B virus infection[J]. N Engl J Med, 2008, 359(14): 1486-1500.

[2] 沈立萍，杨进业，莫兆军，等. 乙型肝炎疫苗长期免疫对人群乙型肝炎病毒流行状况的影响[J]. 中华流行病学杂志，2007，28(7)：659-662.

[3] 中华医学会肝病学分会，中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 中华肝脏病杂志，2010，19(1)：13-24.

[4] Bian T, Yan HX, Shen LP, et al. Change in hepatitis B virus large surface antigen variant prevalence 13 years after implementation of a universal vaccination program in China[J]. J Virol, 2013, 87(22): 12196-12206.

[5] Wang XY, Harrison TJ, He X, et al. The prevalence of mutations in the major hydrophilic region of the surface antigen of hepatitis B virus varies with subgenotype[J]. Epidemiol Infect, 2015, 143(16): 3572-3582.

[6] Niu JJ, He SZ, Su CH, et al. Variability of the S gene of hepatitis B virus in southeastern China[J]. Arch Virol, 2010, 155(12): 1951-1957.

[7] Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors[J]. J Hepatol, 2012, 57(4): 720-729.

[8] Khedive A, Norouzi M, Ramezani F, et al. Hepatitis B virus surface protein mutations clustered mainly in CTL immune epitopes in chronic carriers: results of an Iranian nationwide study[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(7): 494-501.

[9] Kitab B, El Feydi AE, Afifi R, et al. Hepatitis B genotypes/subgenotypes and MHR variants among Moroccan chronic carriers[J]. J Infect, 2011, 63(1): 66-75.

[10] Lazarevic I, Maja C, Dragan D, et al. Prevalence of hepatitis B virus MHR mutations and their correlation with genotypes and antiviral therapy in chronically infected patients in Serbia[J]. J Med Virol, 2010, 82(7): 1160-1167.

[11] Ogura Y, Kurosaki M, Asahina Y, et al. Prevalence and significance of naturally occurring mutations in the surface and polymerase genes of hepatitis B virus[J]. J Infect Dis, 1999, 180(5): 1444-1451.

[12] Avellón A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers[J]. J Med Virol, 2006, 78(1): 24-36.

（责任编辑：关蕴良）