

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.027.html>

不同基因型慢性乙肝患者的耐药变异位点分析

李淑悦¹, 程娜¹, 王嘉鑫², 肖金平¹

摘要 目的 通过研究江西省核苷(酸)类似物(NAs)下乙型肝炎病毒逆转录区(RT区)的变异位点,分析乙肝病毒耐药原因。方法 采集104例门诊接受NAs抗病毒治疗且疗程 ≥ 1 年的患者血清,扩增乙型肝炎病毒(HBV)RT区可能耐药变异位点片段。收集出现应答不佳时和挽救治疗1月后血清HBV DNA、丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平,分析挽救治疗的疗效。采用BioEdit软件包进行核酸与氨基酸序列的比对,分析患者RT区主要变异类型及在不同基因型患者中的分布。采用DataMonkey在线软件进行不同基因型的选择压力及正选择位点分析。结果 挽救治疗后患者HBV DNA、ALT水平均下降,HBV DNA水平降低更加明显,但在不同基因型中无差异。104例患者中87例检测出与药物相关变异位点,其中14例(13.46%)出现多位点耐药变异(3个及以上位点);剩余17例中7例未检出耐药变异位点,10例为可能耐药变异位点。C基因型M204I+L180M位点变异率高于B基因型,差异有统计学意义。选择压力分析表明,两种基因型的选择压力无差别,并且都以中性选择为主,B基因型中rt207、rt229为正选择位点,C基因型中未发现。结论 江西省慢性乙型肝炎患者B、C基因型最为常见,并且以M204I位点变异为主,在B基因型中检测出正选择位点,说明核苷(酸)类似物的广泛使用,促使新的基因功能出现,也可能是出现多个新耐药位点的原因。

关键词 乙型肝炎病毒;基因型;耐药;选择压力;正选择位点中图分类号 R 512.6+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0461-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.027

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染仍然是一个重要的公共卫生问题,全世界每年大约有超过78万人死于乙肝相关性疾病(如肝硬化、原发性肝癌)^[1]。HBV病毒感染的特点是感染率高、感染人数众多、病程长,目前缺乏特效药物且难以完全治愈。大面积乙肝疫苗的普及,已经使HBV感染率明显下降^[2],现在人们开始关注耐药和彻底

清除乙肝病毒问题。近几十年来,HBV感染的治疗药物主要依赖于干扰素和核苷(酸)类似物(nucleoside/nucleotide analogues, NAs)这两大类,NAs具有很强的抑制病毒复制作用,比基于干扰素的疗法更方便并且具有更少的副作用,然而长期用药后,一些药物会出现病毒学突破现象。现拟使用直接测序法对江西省104例样本的逆转录区(RT区)行耐药变异位点检测,区分基因型、筛选正选择位点,进一步分析该地区慢性乙肝患者耐药相关原因,为患者个体化医疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选择2015~2018年间在南昌大学第一附属医院门诊定期随访的慢性乙型肝炎患者,共计104例。患者均来自江西省本地区市、县,所有诊断符合《慢性乙型肝炎诊断标准(2015年版)》^[3]。排除HCV、HDV、HIV混合感染,排除酒精性肝病、脂肪肝及自身免疫性肝炎患者。其中男77例,女27例,年龄21~75(43.36 ± 12.47)岁。所有患者均接受了NAs抗病毒治疗,疗程 ≥ 1 年。患者每1~6个月行血清HBV DNA、肝功能检测。研究设计经南昌大学第一附属医院伦理委员会审核并通过。

1.2 实验室指标 实验室检测指标包括乙型肝炎病毒e抗原(HBeAg)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、HBV DNA水平。

1.3 应答不佳界定 抗病毒治疗24周,HBV DNA较基线下降幅度 $>1 \log_{10}$ IU/ml,但仍然可以检测到^[4]。

1.4 HBV DNA RT区测序 根据HBV DNA P基因RT区的保守序列,应用Primer Premire 5.0软件自行设计引物,引物由武汉康圣达医学检验所合成,序列为:外侧正向引物 ESP: 5'-AGGCCTTATAAGTTG-GCGA-3',反向引物 EAP: 5'-TCCTGCTCAAGGAAC-CTCTA-3';内侧正向引物 ISP: 5'-CY(T/C)TGTATTC-CCATCCCATC-3',反向引物 IAP: 5'-TGACATACTTTC-CAATCA ATAGG-3',包含大部分目前已知的HBV RT区核苷酸类似物耐药变异位点,并利用上述引物构建PCR反应体系对目的片段扩增。PCR扩增阳性产物由武汉康圣达医学检验所直接测序。

2020-02-16 接收

基金项目:江西省科技计划项目(编号:20151BBG70221)

作者单位:¹南昌大学第一附属医院感染科,南昌 330006²景德镇市第一人民医院感染科,景德镇 333000

作者简介:李淑悦,女,硕士研究生;

程娜,女,副教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:chengnash@sina.com

1.5 基因变异检测 临床样本测序结果以 NCBI Genotyping 工具中 23 株基因型为 A-H 型的 HBV 全基因组标准序列为参照 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi>) 来确定基因分型。采用 BioEdit 软件包 (版本 7.0.5) 进行核酸与氨基酸序列的比对, 分析氨基酸的变异。

1.6 选择压力分析 非同义突变和同义突变的率比 ω ($\omega = dN/dS$) 是反应选择压力的重要指标。当 $\omega > 1$ 时, 表明该位点受到正选择压力作用, 同时该密码子被称为正选择位点; $\omega = 1$ 或 $\omega < 1$ 则分别说明该位点受到中性选择和纯化选择 (即负选择) [8]。采用 DataMonkey 在线软件 (<http://www.datamoneykey.org/>) 筛选正选择位点, Datamonkey 由 HyPhy 执行, HyPhy 是一种分子进化分析平台, 在计算机集群上进行并行分析, 简化且易于使用 [9]。Datamonkey 筛选正选择位点的算法主要包括随机效应似然模型 (random effects likelihood model, REL)、固定效应似然模型 (fixed effects likelihood model, FEL) 和单一似然祖先计数法 (single likelihood ancestor counting, SLAC) [9]。SLAC 是运行速度最快、同时也是最保守的算法, 适用于分析大型数据集 (50 ~ 150 条序列), 能够重建每个密码子位点的替代过程, 存在错漏选择位点的可能, 但亦能防止将中性位点误判为正选择位点。FEL 在统计性能和计算工作量之间保持有良好平衡, 总体表现属最佳算法, 适用于分析中型或者大型数据集 (50 ~ 100 条序列), 也能重建密码子的替代过程。REL 是 PAML 软件中基于密码子进行选择分析这一算法的扩展, 它允许同义替代率存有差异, 因而 REL 常常是能从小型或者低度分化的

序列比对结果中检测出选择作用的唯一方法, 适用于小型数据集 (5 ~ 15 条序列, 至多 40 条)。然而, 由于此法所依赖的假设条件较多, 也容易产生假阳性。从各方法的适应条件以及出现假阳性和假阴性结果等方面综合考虑, 本研究采用 FEL 方法筛选正选择位点 ($P < 0.1$)。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用双侧 t 检验, 非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用 Wilcoxon 检验。计数资料的比较采用双侧 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 挽救治疗的疗效分析 104 例患者中 B 基因型患者为 93 例, C 基因型患者为 11 例, 未检测出其他基因型。在两种不同基因型中性别和年龄方面均无差异 ($P > 0.05$)。挽救治疗后患者 HBV DNA、ALT 水平均下降, HBV DNA 水平降低更加明显。但 e 抗原阴转率、HBV DNA 及 ALT 水平在不同基因型中的无差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 HBV RT 区主要变异类型及在不同基因型中的分布 B 基因型和 C 基因型患者在性别、年龄、耐药率、HBeAg 阳性率、用药类型方面无差异 (表 2)。104 例患者中 87 例检测出与药物相关变异位点, 其中 14 例 (13.46%) 出现多位点耐药变异 (3 个及以上位点); 剩余 17 例中 7 例未检出耐药变异位点。M204I 位点变异率最高, 以 B 基因型为主; M204I + L180M 位点变异在 C 基因型中发生率高于 B 基因型, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 1 B 基因型及 C 基因型患者的人口学及临床特征 [$M(P_{25}, P_{75})$]

临床特征	B 基因型 ($n=93$)	C 基因型 ($n=11$)	$t/Z/\chi^2$ 值	P 值
性别 (n , 男/女)	70/23	7/4	0.22	0.64
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	42.90 $\pm$ 12.40	47.10 $\pm$ 12.60	-1.07	0.31
挽救前 HBV DNA 水平 (IU/ml)	6.20 $\times 10^5$ (2.47 $\times 10^4$, 1.07 $\times 10^7$)	1.38 $\times 10^5$ (1.79 $\times 10^4$, 6.73 $\times 10^5$)	-0.90	0.37
挽救 1 月后 HBV DNA 水平 (IU/ml)	1.00 $\times 10^3$ (0, 1.16 $\times 10^4$)	500.00 (0, 1.52 $\times 10^3$)	-1.32	0.19
HBeAg 阴转 (%)	11 (11.80)	2 (18.20)	0.02	0.90
ALT 复常 (%)	20 (21.50)	3 (27.30)	0.00	0.96

表 2 B 基因型及 C 基因型患者人口学及临床特征

临床特征	B 基因型 ($n=93$)	C 基因型 ($n=11$)	t/χ^2 值	P 值
性别 (n , 男/女)	70/23	7/4	0.22	0.64
年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	42.90 $\pm$ 12.40	47.10 $\pm$ 12.60	-1.07	0.31
耐药 [n (%)]	85 (91.40)	11 (100.00)	0.17	0.68
HBeAg 阳性 [n (%)]	61 (65.60)	9 (81.80)	0.56	0.46
用药类型 (n)				
LAM/ADV/LDT/ETV/LAM + ADV/LAM + ETV/ADV + ETV/LDT + ETV	30/9/4/15/18/4/6/7	2/1/1/1/3/1/1/1	4.10	0.74

表3 B 基因型及 C 基因型患者耐药变异类型 [n(%)]

耐药种类	变异位点	B 基因型 (n=93)	C 基因型 (n=11)	χ^2 值	P 值
LAM + LDT	M204I	29 (31.18)	1 (9.09)	2.34	0.13
	M204I + L180M	3 (3.23)	4 (36.36)	17.21	<0.01
	M204V + L180M	26 (27.96)	1 (9.09)	1.82	0.18
LAM + LDT + ADV	M204I + A181T	0 (0)	1 (9.09)	8.54	0.11
	A181V + N236T	2 (2.15)	0 (0)	0.24	1.00
LAM + LDT + ETV	M204V + L180M + T184A	3 (3.23)	2 (18.18)	4.81	0.09
	M204V + L180M + T184I + V137L	0 (0)	1 (9.09)	8.54	0.11
	M204V/I + L180M + V137L	0 (0)	1 (9.09)	8.54	0.11
	M204V + L180M + I169T/L + S202G	2 (2.15)	0 (0)	0.24	1.00
	M204V + L180M + T184A + I169T/L	2 (2.15)	0 (0)	0.24	1.00
	M204V + L180M + S202G	2 (2.15)	0 (0)	0.24	1.00
	M204V/I + L180M + M250L	1 (1.08)	0 (0)	0.11	1.00
	N236T	6 (6.46)	0 (0)	0.75	0.39
ADV	S/C256G	6 (6.45)	0 (0)	0.75	0.39
无	S213T	1 (1.08)	0 (0)	0.11	1.00
	L217F	1 (1.08)	0 (0)	0.11	1.00
	Q215H	1 (1.08)	0 (0)	0.11	1.00
	Y/F221H	1 (1.08)	0 (0)	0.11	1.00
	无	7 (7.53)	0 (0)	0.89	0.35

2.3 选择压力的分析 两种基因型的选择压力均以中性选择为主,但 B 基因型中可见正选择位点(表4)。利用在线 DataMonkey 软件,以 ω 值 (dN/dS) > 1 且 $P < 0.1$ 时为正选择点筛选出 B 基因型中 rt207、rt229 为正选择位点, rt169、rt245 为负选择位点; C 基因型中只发现 rt202、rt204、rt245 为负选择位点(表5、6)。

表4 不同基因型的选择压力分析 (n)

选择压力	B 基因型	C 基因型
负选择	2	3
中性选择	26	27
正选择	2	0

表5 B 基因型序列的选择位点

选择位点	ω 值 (dN/dS)	LRT	P 值
rt207 (正选择)	4 128 745 239 008 464.500	10.07	0.001 5
rt229 (正选择)	1 212 420 766 676 728.000	3.32	0.068 4
rt169 (负选择)	0.279	2.71	0.099 7
rt245 (负选择)	0.098	3.44	0.063 7

LRT:似然比检验

表6 C 基因型序列的选择位点

选择位点	ω 值 (dN/dS)	LRT	P 值
rt202 (负选择)	0	6.43	0.011 2
rt204 (负选择)	0.045	7.79	0.005 2
rt245 (负选择)	0	2.87	0.090 5

3 讨论

HBV 是一个部分闭合的环状双链 DNA 病毒,

HBV 在复制过程中依赖逆转录酶产生的前基因组 RNA 完成,而逆转录酶缺乏校正活性,故是一种具有高变异性的 DNA 病毒^[7-8]。近年来,慢性乙型肝炎的治疗取得了实质性进展,以服用 NAs 为主,但无限期治疗会增加耐药性发展的风险,在药物和人体免疫环境双重诱导下,HBV RT 区出现了位点突变^[9]。目前 LAM、LDT 出现高耐药率,慢性乙型肝炎诊疗指南明确指出可加用 ADV,或改用 ETV、TDF,随着各种 NAs 的广泛使用,研究^[10]表明 ETV、ADV、TDF 也出现耐药现象。本研究中 104 例定期随访患者出现耐药后多选用 ETV 或 TDF 进行挽救,都表现出良好疗效。在不同基因型中,e 抗原阴转率、ALT 复常率、e 抗原阳性率、耐药率、用药类型方面均无差异,但耐药变异位点 A181V + N236T、M204V + L180M + I169T/L + S202G、M204V + L180M + T184A + I169T/L、M204V + L180M + S202G、M204V + L180M + M250L、N236T、S/C256G、S213T、L217F、Q215H、Y/F221H 只在 B 基因型中检测到,而 M204I + A181T、M204V + L180M + T184I + V137、M204V/I + L180M + V137L 只在 C 基因型中检测到; M204I + L180M 位点变异率在 C 基因型中高于 B 基因型,差异有统计学意义,提示 HBV RT 区位点突变是多因素综合影响的结果,在临床工作中基因分型及 RT 区测序应联合应用。

慢性乙肝患者在接受 NAs 药物后,来自病毒变异体之间的竞争(复制效率的差异)和/或宿主免疫活性的选择压力,使含有耐药突变的变异株逐渐发

展成为优势株,最终导致 HBV 群耐药^[1-13]。病毒基因突变符合达尔文进化理论——适者生存。对单一的一种抗病毒药物而言,病毒群体所面临的就是一个针对特定靶点的具有高度特异性的选择压力,当一个基因受到正选择作用,说明其群体为了适应新的环境,需要提供有利的突变,产生新的基因功能;而当一个基因受到负选择作用即此基因保持原有的功能且趋于稳定^[4]。正选择位点筛选是研究病毒基因序列进化分析的一个重要方法。RT 区是相对保守区,以负选择作用为主,在本研究中 B 基因型患者筛选出正选择位点 rt207、rt229,这两种基因位点并不包含在常见的耐药位点中,说明江西省内核苷酸类似物的广范使用,促使新的基因功能出现,并亦可能是出现多个新耐药位点的原因,但这两个突变位点与哪种药物耐药相关尚未明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 卓家同. 乙肝疫苗大规模应用效果与预防效益研究进展 [J]. 应用预防医学, 2016, 22(5): 471-3.
- [2] 杨付英. 我国预防接种服务现状研究 [D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [3] 中华医学会肝病学会. 慢性乙型肝炎诊断标准(2015 年版) [J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(6): 384, 附 I - II.
- [4] Da Silva A G. Measuring natural selection [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1525: 315-47.
- [5] Weaver S, Shank S D, Spielman S J, et al. Datamonkey 2.0: a modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(3): 773-7.
- [6] 王郁, 吴红岩, 赵希畅, 等. 上海市浦东新区注射吸毒者 HCV 的进化分析与正选择位点研究 [J]. 中华流行病学杂志, 2017, 38(3): 378-83.
- [7] Hatazawa Y, Yano Y, Okada R, et al. Quasispecies variant of prE-S/S gene in HBV-related hepatocellular carcinoma with HBs antigen positive and occult infection [J]. Infect Agent Cancer, 2018, 13: 7.
- [8] Ngui S L, Teo C G. Hepatitis B virus genomic heterogeneity: variation between quasispecies may confound molecular epidemiological analyses of transmission incidents [J]. J Viral Hepat, 1997, 4(5): 309-15.
- [9] Lim Y S. Management of antiviral resistance in chronic hepatitis B [J]. Gut Liver, 2017, 11(2): 189-95.
- [10] Liu Y, Zhou Y, Li X, et al. Hepatitis B virus mutation pattern: rtL180M + A181C + M204V may contribute to entecavir resistance in clinical practice [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 354-65.
- [11] Solmone M, Giombini E, Vincenti D, et al. Slow response to entecavir treatment in treatment-naïve HBV patients is conditioned by immune response rather than by the presence or selection of refractory variants [J]. Antivir Ther, 2014, 19(2): 201-9.
- [12] Liang Y, Yano Y, Putri W A, et al. Early changes in quasispecies variant after antiviral therapy for chronic hepatitis B [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5528-37.
- [13] Domingo E, Gomez J. Quasispecies and its impact on viral hepatitis [J]. Virus Res, 2007, 127(2): 131-50.
- [14] Nei M. Selectionism and neutralism in molecular evolution [J]. Mol Biol Evol, 2005, 22(12): 2318-42.

Analysis of drug-resistant mutation sites in patients with different genotypes of chronic hepatitis B

Li Shuyue¹, Cheng Na¹, Wang Jiaxin², et al

(¹Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006; ²Dept of Infectious Diseases, The First People's Hospital of Jingdezhen City, Jingdezhen 333000)

Abstract Objective To analyze the cause of drug resistance of hepatitis B virus by studying mutation sites the of HBV RT region under nucleoside (acid) analogues in Jiangxi Province. **Methods** Serum samples of 104 outpatients receiving NAs antiviral therapy for more than one year were collected, and fragments of possible drug-resistant mutation sites in HBV RT region were amplified. The levels of HBV DNA and ALT with poor response and salvage treatment for 1 month were collected to analyze the effect of salvage treatment. Nucleic acid and amino acid sequences were compared by BioEdit software package to analyze the main variant types in RT region of patients and their distribution with different genotypes. DataMonkey online software was used to analyze the selection pressure and positive selection sites of different genotypes. **Results** After salvage treatment, HBV DNA and ALT levels decreased, and HBV DNA levels decreased more significantly, but there was no difference among different genotypes. Of 104 patients, 87 were associated with drug resistance-related mutations, 14 (13.46%) were multi-site resist-

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.028.html>

医源性多胎妊娠 4 321 例临床特征观察

罗桂英¹, 王春艳¹, 袁爱群¹, 曹云霞¹, 潘发明²

摘要 目的 探讨经体外受精-胚胎移植(IVF-ET)治疗后多胎妊娠的发生、处理和妊娠结局,为医源性多胎妊娠孕期保健及人工辅助生殖多胎并发症的防治提供参考。方法 选取进行 IVF-ET 助孕获得多胎妊娠的患者 4 321 例,检索患者信息管理系统,统计医源性多胎的发生情况和妊娠结局,对多胎妊娠患者资料进行回顾性分析,并根据是否减胎,分析对比多胎妊娠的处理及妊娠结局等指标。应用 SPSS19.0 软件进行数据分析。检验方法主要包括 t 检验、卡方检验等。结果 ① 研究对象按照妊娠绒毛膜性分为单绒毛膜多胎及独立绒毛膜多胎 2 组,2 组患者年龄、体质指数(BMI)、不孕类型、移植周期、胚胎来源组间差异均无统计学意义($P > 0.05$),不孕年限和不孕原因组间差异有统计学意义($P < 0.05$);② 研究对象按照是否减胎分为自然减胎、手术减胎、未减胎 3 组,未减胎组中晚期流产或引产率高于减胎组($\chi^2 = 12.426, P = 0.002$)、未减胎组早产率高于减胎组($\chi^2 = 196.038, P < 0.001$)、未减胎组剖宫产率高于减胎组($\chi^2 = 45.181, P < 0.001$)、未减胎组新生儿出生体质量低于减胎组($F = 3.251, P < 0.001$);③ 研究对象按照持续妊娠胎数分为单胎及双胎 2 组,组间妊娠期并发症、早产率、剖宫产率及新生儿出生体质量差异有统计学意义($\chi^2 = 156.648, P < 0.001$)。

2019-12-08 接收

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFC1000204);安徽省教育厅人文社科重点项目(编号:SK2018A0166)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院生殖医学中心,合肥 230003

²安徽医科大学公共卫生学院,合肥 230032

作者简介:罗桂英,女,硕士,副主任护师;

曹云霞,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:caoyunxia6@126.com

潘发明,男,博士生导师,责任作者,E-mail:famingpan@ahmu.edu.cn

0.001; $\chi^2 = 94.572, P < 0.001$; $\chi^2 = 32.042, P < 0.001$; $t = 14.928, P < 0.001$)。结论 医源性多胎妊娠的妊娠丢失率高、母儿并发症多,应尽量避免医源性多胎妊娠。对于多胎妊娠的患者,于孕早期准确判断绒毛膜性,进行选择性胚胎减灭手术,减少胎儿数目,可有效减少妊娠并发症,改善产科结局。

关键词 体外受精-胚胎移植;医源性多胎妊娠;选择性胚胎减灭

中图分类号 R 715.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)03-0465-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.028

近年来,随着人工辅助生殖技术(assisted reproductive technology, ART)的发展和临床促排卵药物的应用,医源性多胎妊娠率呈现明显上升的趋势^[1]。所谓多胎妊娠,是指在 1 次妊娠时宫腔里同时有 2 个或 2 个以上胎儿生长发育^[2]。一般来说,自然妊娠状态下的多胎发生概率遵循公式 $1/89^{(n-1)}$ ^[3],而采取 ART 后的妊娠,多胎妊娠率较自然妊娠率明显增高,据美国疾病预防控制中心 2015 年的统计数据^[4]显示,如果不加以控制,ART 助孕后的多胎妊娠率可高达 46%。一旦发生多胎妊娠,对母体和胎儿而言,在妊娠和分娩期间发生不良结局的风险都较单胎妊娠高出数倍^[5],且多胎妊娠在产科学领域被划分为“病理产科”(高危产科)的范畴,因此,多胎妊娠被视为 ART 的一个严重并发症^[6-7],需要给予高度关注。

现对安徽医科大学第一附属医院生殖中心因进行体外受精-胚胎移植(*in vitro* fertilization and en-

ance mutations (3 or more sites); 7 of the remaining 17 patients did not detect the drug resistance mutation, 10 were possible drug resistance mutation sites. M204I + L180M site mutation rate in genotype C was higher than that of genotype B, and the difference was statistically significant. Analysis of selection pressure showed that there was no difference in selection pressure between the two genotypes, and neutral selection was the main choice. Rt207 and rt229 were positive selection sites in genotype B, but not in genotype C. **Conclusion** Genotypes B and C are most common types in chronic hepatitis B patients in Jiangxi Province, and the M204I locus variation is dominant. Positive selection sites are detected in Genotype B, so the widespread use of nucleoside analogues promote the emergence of new gene functions, and may also be the cause of multiple new drug resistance sites.

Key words hepatitis B virus; genotype; drug resistance; selective pressure; positive selection site