

# HCV 1b 亚型体内和水平传播过程中进化速率的分析

许茹<sup>1,2</sup>, 黄杰庭<sup>1,2</sup>, 王敏<sup>1,2</sup>, 廖峭<sup>1,2</sup>, 戎霞<sup>1,2</sup>, 付涌水<sup>1,2</sup>

1. 广州血液中心, 广东 广州 510095; 2. 广州市医学重点实验室(血液安全重点实验室), 广东 广州 510095

**摘要:** **目的** 获得 HCV 1b 感染者体内以及水平传播过程中的进化速率和病毒群体的生物多样性。 **方法** 收集广东地区献血者中 HCV 感染标本 2 例, 每隔半年对其进行随访, 通过二代测序技术和生物信息学分析方法获得全基因组序列, Mega 7.0 软件进行基因分型, Beast 软件中的 MCMC 算法进行进化速率和病毒群体生物多样性的分析。 **结果** 获得 2 例 HCV 感染者 3 次标本共 6 条全基因组序列, 平均测序深度为 2 486, 均为 HCV 1b 亚型。Relaxed lognormal 分子钟模型显示 1 号献血者体内的进化速率高于 2 号献血者, Relaxed lognormal 和 Strict 分子钟模型均显示 1 号献血者和 2 号献血者的体内进化速率高于水平传播的进化速率。我国 HCV 1b 的最近共同祖先起源于 1938 年, 1986—1998 年在中国的感染人数呈对数增长, 1998 年之后逐渐下降。 **结论** HCV 1b 亚型体内进化速率高于水平传播的进化速率, 不同个体的进化速率不同。

**关键词:** 丙型肝炎病毒; 二代测序技术; 进化速率

**中图分类号:** R512.6<sup>+</sup>3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)02-0160-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.02.009

## Evolution rates of *in vivo* and horizontal transmission of HCV 1b subtype

XU Ru<sup>1,2</sup>, HUANG Jie-ting<sup>1,2</sup>, WANG Min<sup>1,2</sup>, LIAO Qiao<sup>1,2</sup>, RONG Xia<sup>1,2</sup>, FU Yong-shui<sup>1,2</sup>

1. Guangzhou Blood Center, Guangzhou, Guangdong 510095, China;

2. Guangzhou Key Laboratory of Medicine (Key Laboratory of Blood Safety), Guangzhou, Guangdong 510095, China

Corresponding author: FU Yong-shui, E-mail: fuyongshui1969@yahoo.com

**基金项目:** 广州市医学重点学科建设项目(血液安全重点实验室); 广东省医学科学基金资助(A2018499); 广州市医药卫生科技项目资助(20161A010074)

**作者简介:** 许茹(1982-), 硕士, 副主任技师, 主要从事肝炎病毒流行病学和免疫学研究工作。

**通信作者:** 付涌水, E-mail: fuyongshui1969@yahoo.com。

- [9] 郑建东, 庞琳, 徐杰, 等. 北京市大学在校男生男性行为者 HIV 感染状况及其相关危险性行为调查[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(4): 337-340.
- [10] Haukoos JS, Lyons MS, Lindsell CJ, et al. Derivation and validation of the Denver human immunodeficiency virus (HIV) risk score for targeted HIV screening[J]. AM J Epidemiol, 2012, 175(8): 838-846.
- [11] Smith DK, Pals SL, Herbst JH, et al. Development of a clinical screening index predictive of incident HIV infection among men who have sex with men in the United States[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2012, 60(4): 421-427.
- [12] Hoenigl M, Weibel N, Mehta SR, et al. Development and validation of the San Diego early test score to predict acute and early HIV infection risk in men who have sex with men[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(3): 468-475.
- [13] 胡培, 钟斐, 程伟彬, 等. 广州市男男性行为者艾滋病感染风险模型的建立[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(7): 667-671.
- [14] Jones J, Hoenigl M, Siegler AJ, et al. Assessing the performance of 3 human immunodeficiency virus incidence risk scores in a cohort of black and white men who have sex with men in the south[J]. Sex Transm Dis, 2017, 44(5): 297-302.
- [15] Xu JJ, Tang WM, Zou HC, et al. High HIV incidence epidemic among men who have sex with men in china: results from a multi-site cross-sectional study[J]. BMC Public Health, 2016, 5(1): 82.
- [16] Brunelli A, Rocco G. Internal validation of risk models in lung resection surgery: bootstrap versus training-and-test sampling[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 131(6): 1243-1247.
- [17] 中国疾病预防控制中心. 全国艾滋病检测技术规范(2009 年修订版)[Z]. 2009-09-01.
- [18] McLaughlin K. HIV infections are spiking among young gay Chinese[J]. Science, 2017, 355(6332): 1359.
- [19] Chu ZX, Xu JJ, Zhang YH, et al. Poppers use and sexual partner concurrency increase the HIV incidence of MSM: a 24-month prospective cohort survey in Shenyang, China[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 24.
- [20] Lampinen T M, Mattheis K, Chan K, et al. Nitrite inhalant use among young gay and bisexual men in Vancouver during a period of increasing HIV incidence[J]. BMC Public Health, 2007, 7(1): 1-6.
- [21] 邱兴庆, 孟丽丽, 崔德勇. 2017 年襄阳市 MSM 人群 HIV 感染状况及影响因素分析[J]. 实用预防医学, 2019, 26(4): 393-396.
- [22] Freeman EE, Weliss HA, Glynn JR, et al. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies[J]. AIDS, 2006, 20(1): 73-83.
- [23] Li D, Yang X, Zhang Z, et al. Nitrite inhalants use and HIV infection among men who have sex with men in China[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014(11): 365261.
- [24] R. Lavoie G, F. Fisher J. Receptive anal intercourse and HIV Infection[J]. World J AIDS, 2017, 7(4): 269-278.
- [25] Golden MR, Brewer DD, Kurth A, et al. Importance of sex partner HIV status in HIV risk assessment among men who have sex with men[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004, 36(2): 734-742.

收稿日期: 2019-04-30

**Abstract: Objective** To obtain the evolution rates of *in vivo* and horizontal transmission of HCV 1b subtype and its biodiversity. **Methods** Samples collected from two blood donors infected with HCV in Guangdong region were followed up every 6 months. The next-generation sequencing technology and bioinformatics analysis method were used to obtain the whole mitochondrial genome sequence. Mega 7.0 software was employed to determine HCV genotype. The evolution rates of *in vivo* and horizontal transmission of HCV 1b subtype and its biodiversity were analyzed by using Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method in Beast package. **Results** We obtained 6 HCV full-length sequences in three samples collected from two HCV-infected patients, with the average depth of 2,486. The 6 specimen sequences could basically cover the HCV whole genome, all of which were HCV 1b subtype. The evolution rate of *in vivo* transmission in the sample 1 was higher than that in the sample 2 under the relaxed lognormal model, while the evolution rates of *in vivo* transmission in samples 1 and 2 were both higher than those of horizontal transmission under relaxed lognormal and strict models. In addition, the recent common ancestor of HCV 1b in China originated in 1,938. The number of HCV-infected cases in China during 1986–1998 increased logarithmically, but there was a gradually decreasing trend after 1998. **Conclusions** The evolution rate of *in vivo* transmission of HCV 1b subtype is higher than that of horizontal transmission, and the evolution rates of different individuals are dissimilar.

**Key words:** hepatitis C virus; next generation sequencing; evolution rate

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是一种高度异质性正链 RNA 病毒,具有 RNA 病毒复制的特点,即感染者体内分布着进化距离密切相关的变异群体<sup>[1]</sup>。这些变异群体被称为准种,是由 HCV 病毒的进化引起的。据报道,HCV 不同基因型的变异在 35%以上,亚型的变异在 13%~15%以上,来自于相同亚型的分离株之间的变异高达 10%,即使在同一个体,其体内的变异也达 1%~3%<sup>[2-3]</sup>。根据其基因组的变异程度,可将 HCV 分为 7 种基因型和 67 种亚型<sup>[2]</sup>。前期的 HCV 流行病学调查发现,我国流行的 HCV 基因型(亚型)主要为 1b,约占整个感染人群的 60%,其次是 2a,占 17%左右,其余基因型和亚型所占的比例较低<sup>[4-6]</sup>。

检测 HCV 的进化速率,即检测 HCV 从正链到负链,负链再到正链的复制过程是非常困难的。因此,只能通过病毒序列的变化,根据一定的模型和算法来推测病毒的进化速率。据文献报道,HCV 在水平传播过程中的进化速率是  $10^{-4}$  碱基替换个数/位点/年份,与其他 RNA 病毒的进化速率相似,但不同基因型/亚型的进化速率不同<sup>[7]</sup>。而一个感染个体的病毒变异是由病毒与宿主的适应性进化以及水平传播引起的变异共同作用形成的<sup>[8]</sup>。宿主体内的变异相对来说不易获得,因为体内变异与选择压力和病毒的多次复制有关<sup>[9-10]</sup>。据报道,宿主体内进化速率的计算有赖于 HCV 随访标本的获得<sup>[11]</sup>。因此,对从不同个体获得的序列和从同一个体(尤其经历窗口期感染的个体)获得的不同时间点的序列进行分析,可以反映出这两个过程对病毒变异的影响<sup>[12]</sup>。

近年来,贝叶斯理论与进化论和相关的统计学分析方法相结合,通过对病毒序列进行分析可以推算出

病毒群体的生物多样性以及进化速率<sup>[13]</sup>。MCMC 算法解决了贝叶斯理论中存在的先验分布问题。目前 MCMC 算法应用最广泛的为 Beast (bayesian evolutionary analysis by sampling trees)软件<sup>[14-15]</sup>。既往对 HCV 的进化分析多采用部分基因序列,如 Core、E1、E2、NS5A 和 NS5B 等<sup>[16]</sup>。然而此方法具有一定的局限性:由于 HCV 不同基因片段的序列变异程度不同,采用部分基因片段不能完全代表和反映整体情况。因此,全基因组序列被认为是用于 HCV 分子流行病学和进化分析的“金标准”<sup>[17]</sup>。但由于 HCV 病毒序列变异较大,且全基因组序列长度为 9.6 kb,常规的 PCR 扩增方法难以获得。近年来迅速发展的二代测序技术(next generation sequencing, NGS)以其高通量、超深度、高灵敏度的优点解决了这一难题。国外已有学者应用 NGS 技术检测 HCV 特定区段,以研究病毒准种或抗药相关替换突变。本研究拟在前期研究基础上,收集广东地区献血者中 HCV 感染者的随访标本,对其进行全基因组序列的测序,并在 GenBank 中下载我国所有的 HCV 1b 全基因组序列,通过 Beast 分析获得体内的进化速率和水平传播的进化速率以及病毒群体的生物多样性。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

1.1 标本来源及采集 实验编号为 1(男性,壮族,20 岁)和 2(男性,汉族,42 岁)的 2 位无偿献血者于 2015 年 4 月 20 日在广州血液中心参与无偿献血,血液筛查显示其抗-HCV 抗体和 HCV RNA 呈阳性反应,无乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒和梅毒感染。后每隔半年对其进行随访,共随访 2 次,2 位献血者 3 次标本的抗-HCV 抗体和 HCV RNA 均呈阳性反应,即两位献血

者为慢性 HCV 感染者。初次献血和随访过程中均抽取静脉血 5 ml, EDTA 抗凝, 离心后将血浆置于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。2 位献血者在初次献血和随访时均签署知情同意书。

**1.2 检测方法** 血浆标本经  $0.45\ \mu\text{m}$  滤器过滤去除细胞碎片后, 取  $120\ \mu\text{l}$  加入核酸酶混合物 (RNase One Ribonuclease, 普洛麦格生物技术有限公司; Turbo DNase, 赛默飞世尔科技有限公司) 于  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h 以去除游离核酸, 随后使用 Agencourt RNAdvance Blood Kit (美国贝克曼库尔特公司), 按照说明书的步骤利用 KingFisher 核酸提取仪提取病毒 RNA。逆转录以及文库构建采用 SuperScript III First-Strand Synthesis Kit (赛默飞世尔科技有限公司) 将病毒 RNA 逆转录为 cDNA。然后使用 KAPA Library Preparation kit (600 个循环, 读长为  $2\times 300\ \text{bp}$ ) 进行测序文库的构建。构建好的文库在 Illumina Miseq 测序平台采用 MiSeq Reagent Kit v3 反应池进行高通量测序。

**1.3 生物信息学分析** 参照 Thomson 等报导的方法<sup>[17]</sup>, 对测序获得的 Fasta 文件通过 FastQC 软件对其进行质量控制 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), 去除 adaptors、人类基因以及 rRNA 之后, 余下的序列通过 Tanoti (<http://bioinformatics.cvr.ac.uk/tanoti.php>) 与 187 条 HCV 全长参考序列比对得到 HCV 短序列。最后将 HCV 短序列通过 Tanoti 的从头组装拼接得到 HCV 全长序列。

**1.4 HCV 全长序列的进化分析** HCV 全长序列与 GenBank 中具有代表性的 HCV 7 种基因型和 67 种已命名的亚型以及未命名的新的变异体一起采用 Mega 7.0 软件的 Kimura 两参数方法 (应用其中的 Maximum Likelihood 法) 构建进化树, 获得基因分型, 为保证进化树拓扑结构的正确性以及可靠性, Bootstrap 的值设定为  $>70$ 。对获得的 HCV 全基因组序列进行贝叶斯 MC-MC 算法, 采用广义时间可逆模型和伽马分布 (general time-reversible substitution model + a four-bin gamma rate distribution, GTR+ $\Gamma 6$ ) 模型, 合并不同的分子钟模型 (Strict 和 Relaxed Lognormal) 和溯祖模型 (BSP 和 Constant) 获得体内进化速率。根据 GenBank 中的 HCV 序列建立我国 HCV 1b 的数据集, 其序列进入号为 KY120328, KC844051, KC844052, HQ639937, HQ639940, HQ639946, HQ639947, HQ912956, HQ912957, HQ912958, HQ912959, GU451218, GU451219, GU451220, GU451221, GU451222, GU451223, GU451224, EU857431, EF638081, AY460204, L02836。将我国 HCV 1b 数据集以及本研

究获得的 2 例感染 HCV 的初次序列采用同样的方法, 获得病毒群体的生物多样性曲线 (BSP 曲线)。ESS  $\geq 200$  被认为有较好的收敛效果。

## 2 结果

**2.1 HCV 感染者的 6 条全基因组序列测序** 实验编号为 1 和 2 的两位献血者初始和 2 次随访共收集到 6 次标本, 1-1, 1-2 和 1-3 为实验编号为 1 的献血者的 3 次标本, 2-1, 2-2 和 2-3 为实验编号为 2 的献血者的 3 次标本。经过生物信息学分析方法获得了 6 条全基因组序列, 其测序深度、最小测序深度和最大测序深度如表 1 所示。最小测序深度  $>5$ , 平均测序深度为 2 487, 除了 1-1 和 1-2 外, 其余测序深度均在 1 500 以上。6 份标本均能够覆盖 HCV 全长, 其 Phredquality 分数均为 35。

表 1 NGS 测序数据质量控制

标本号	测序深度	测序深度 (最小)	测序深度 (最大)	覆盖碱基 (bp)	覆盖范围 (%)	Phredquality 分数
1-1	440	5	1 021	9 409	100.000	35
1-2	195	14	854	9 387	100.000	35
1-3	3 075	23	6 817	9 385	99.950	35
2-1	5 980	5	13 604	9 388	99.980	35
2-2	3 285	36	6 523	9 388	99.980	35
2-3	1 946	5	3 760	9 381	99.960	35

**2.2 2 个献血者初始和随访共 3 次标本全基因组序列的 Mega 7.0 进化树构建** 将上述 6 例标本的全基因组序列与 GenBank 中具有代表性的 HCV 7 种基因型和 67 种已命名的亚型以及未命名的新的变异体通过进化树分析, 发现其分型均为 HCV 1b 亚型, 见图 1。

**2.3 体内和水平传播的进化速率及进化距离的研究**

表 2 列出了 HCV 全基因组序列在不同分子钟模型和溯祖模型下的统计学数据和进化参数。总体来说, Relaxed lognormal 分子钟模型的收敛效果明显好于 Strict 分子钟模型 ( $\text{BF}>20$ )。溯祖模型中 Constant 模型和 BSP 模型相比没有大的差异, 但 1 号献血者标本和 2 号献血者标本体内进化速率 MCMC 运算过程中, 由于其随访次数为 2 次, 即只获得了 3 条序列, 无法采用 BSP 模型进行溯祖分析, 只能对 GenBank 中的 HCV 序列即我国 HCV 1b 的数据集以及本研究获得的 2 例感染 HCV 的初次序列进行 BSP 分析。从表 2 可以看出, Relaxed lognormal 模型显示 HCV 在 1 号献血者体内的进化速率高于 2 号献血者, 而两种模型均显示 HCV 在 1 号献血者和 2 号献血者体内的进化速率均高于体外进化速率。1 号献血者 3 次标本的进化距离



为 0.003~0.009,2 号献血者 3 次标本的进化距离(0.009~0.013)高于 1 号献血者,我国 HCV 1b 亚型水平传播过程的进化距离为 0.003~0.105。此外,HCV 在 1 号献血者体内传播的协方差大于 2 号献血者的协方差。

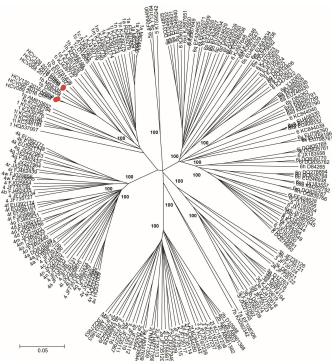


图 1 2 个献血者初始和随访共 3 次标本全基因组序列的 Mega 7.0 进化树构建

2.4 我国 HCV 1b 的 BSP 曲线 通过 BSP 曲线获得我国 HCV 1b 的基因流行历史。图 2 代表了我国 HCV 1b 的有效感染人数随着时间的推移而发生的变化。我国 HCV 1b 的最近共同祖先起源于 1938 年(置信区间:1904—1966 年)。1938—1986 年 HCV 1b 在我国的感染人数呈缓慢上升趋势,1986—1998 年呈对数增长,1998 年之后随着时间的推移呈现逐渐下降趋势。

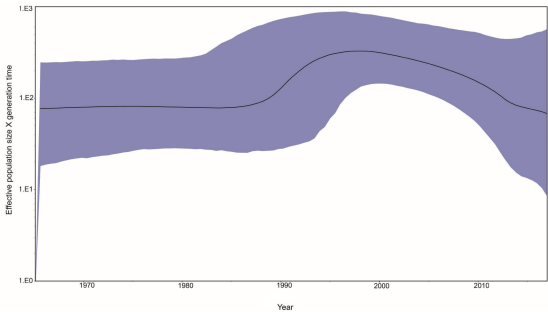


图 2 我国 HCV 1b 的 BSP 曲线

表 2 体内和水平传播的进化速率

分类	分子钟模型	溯祖模型	对数似然方程	进化速率	协方差	进化距离
1 号献血者标本体内	Strict	Constant	-13 507.652	1.291E-3	Not applicable	0.003-0.009
	Relaxed Lognormal	Constant	-13 497.083	1.364E-3	0.835	
2 号献血者标本体内	Strict	Constant	-13 794.101	1.421E-3	Not applicable	0.009-0.013
	Relaxed Lognormal	Constant	-13 191.045	1.314E-3	0.399	
水平传播	Strict	Constant	-43 419.473	4.615E-4	Not applicable	0.003-0.105
	Relaxed Lognormal	Constant	-43 170.994	1.062E-3	0.805	
	Relaxed Lognormal	BSP	-43 171.493	1.142E-3	0.716	

3 讨论

本研究通过 NGS 技术成功地获得了 6 条 HCV 全基因组序列,且对于 HCV 全基因组的覆盖范围均在 99.000%以上,其 Phredquality 分数均为 35,即测序所获得碱基的准确性在 99.900%以上,此外,本研究的平均测序深度为 2 486,除了 1-1 和 1-2 外,其余测序深度均在 1 500 以上。对于最小测序深度,国际标准设定为 5,当测序深度低于 5 时,用 N 代替所在位置的碱基<sup>[18]</sup>。本研究中最小测序深度均在 5 以上。综上所述,本研究获得的 HCV 全基因组序列覆盖范围广,测序质量高,序列较可靠。通过进化分析对上述 6 条序列进行了分型,发现其均为 HCV 1b,且 2 例献血者 3 次标本的序列具有一定的相似性,如 1 号献血者标本的进化距离为 0.003~0.009,2 号献血者标本的进化距离为 0.009~0.013,2 例献血者标本的进化距离差异有统计学意义( $t=4.450,P=0.010$ ),经对其原始资料查阅发现 2 例献血者均为男性,但民族和年龄分布不同,提

示病毒在感染者体内经历了不同的免疫压力导致其发生变异的程度不同<sup>[11]</sup>。但由于本研究只收集到 2 例 HCV 感染者 3 次标本,无法评估不同的宿主因素造成的免疫压力对病毒进化的影响,后续研究中将扩大标本量,均衡考虑年龄和民族的影响因素。

国内外对 HCV 的进化分析目前多采用部分基因序列,而本研究中首次采用我国 HCV 1b 亚型全基因组序列进行进化距离和进化速率的分析,能够避免 HCV 不同基因区变异程度不同所造成的差异。如 Sana Saleem 等对 13 个来自巴基斯坦的慢性 HCV 感染者的病毒序列对比中发现,E1E2 在人群中的基因变异程度最高,为 0.029,接下来为 NS3,其变异程度为 0.011,NS5B 的变异程度最低,为 0.010<sup>[19]</sup>。而通过进化分析发现,HCV 高变区 1 (hypervariable region 1,HVR1)的进化速率高于 E2(除 HVR1),而 E2 的进化速率高于 E1<sup>[20]</sup>。有研究表明,体内 E1E2 的进化速率远远高于宿主之间的进化速率,而 NS5A 基因在宿主之间进化速

率远远高于体内进化速率<sup>[11]</sup>。本研究通过全基因组序列进化分析发现 1 号献血者和 2 号献血者的体内进化速率均高于水平传播过程中的进化速率,表明 HCV 1b 病毒的变异更多的是由病毒和宿主的特异性适应引起的,而不是病毒在长期缓慢的水平传播过程中引起的。目前关于 HCV 全基因组序列的研究只有 James C. Iles 等<sup>[21]</sup>对 HCV 基因型 4 进行 MCMC 计算,获得进化速率为  $1.350 \times 10^{-3}$ ,但该研究并未讨论病毒序列在体内的进化速率。此外,本研究还发现 2 号献血者标本谱系间的变异不显著,其进化相对于 1 号献血者标本和水平传播来说更接近于严格的分子钟模式即病毒的进化是匀速的。

我国 HCV 1b 的基因流行历史曲线揭示其最近共同祖先起源于 1938 年(置信区间:1904—1966 年)。1986—1997 年 HCV 1b 在我国的感染人数呈对数增长,这与 19 世纪 80 年代我国“计划献血”的政策以及我国中部地区单采血浆站以卖血为产业的“血浆经济”导致血液制品不安全有关<sup>[22]</sup>。1998 年之后我国 HCV 1b 感染人数随着时间的推移呈现下降趋势,这与 1998 年我国颁布无偿献血法有关。综上所述,本研究首次采用我国 HCV 1b 全基因组序列对体内和水平传播过程中的进化速率进行研究,并获得了我国 HCV 1b 的基因流行曲线。但由于标本量较少,不同的宿主因素造成的免疫压力对病毒进化的影响等方面的研究还比较欠缺,下一步将扩大随访标本量,对我国 HCV 1b 的传播和进化速率进行更为详尽的研究。

#### 参考文献

- [1] Perales C. Quasispecies dynamics and clinical significance of hepatitis C virus (HCV) antiviral resistance[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, S0924-8579(18):30297-30298.
- [2] Smith DB, Bukh J, Kuiken C, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes; updated criteria and genotype assignment web resource[J]. *Hepatology*, 2014, 59(1):318-327.
- [3] Herring BL, Tsui R, Peddada L, et al. Wide range of quasispecies diversity during primary hepatitis C virus infection[J]. *J Virol*, 2005, 79(7):4340-4346.
- [4] Huang K, Chen J, Xu R, et al. Molecular evolution of hepatitis C virus in China: a nationwide study[J]. *Virology*, 2018, 516:210-218.
- [5] 范公忍, 闻炜, 韩聚强, 等. 蒙古国人丙型肝炎患者 HCV RNA 检测及基因型的研究[J]. *实用预防医学*, 2012, 19(12):1867-1869.
- [6] 戴俊斌, 王芳宇, 邹潇白, 等. 湖南省美沙酮门诊就诊者感染丙型肝炎病毒基因型特征分析[J]. *实用预防医学*, 2019, 4(26):500-502.
- [7] Wertheim JO, Kosakovsky Pond SL. Purifying selection can obscure the ancient age of viral lineages[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(12):3355-

- 3365.
- [8] Wymant C, Hall M, Ratmann O, et al. PHYLOSCANNER: inferring transmission from within- and between-host pathogen genetic diversity[J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(3):719-733.
- [9] Powdrill MH, Tchesnokov EP, Kozak RA, et al. Contribution of a mutational bias in hepatitis C virus replication to the genetic barrier in the development of drug resistance[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(51):20509-20513.
- [10] Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, et al. Viral mutation rates[J]. *J Virol*, 2010, 84(19):9733-9748.
- [11] Gray RR, Parker J, Lemey P, et al. The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts[J]. *BMC Evol Biol*, 2011, 11:131.
- [12] Romero-Severson EO, Bulla I, Leitner T. Phylogenetically resolving epidemiologic linkage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(10):2690-2695.
- [13] Pybus OG, Rambaut A. Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(8):540-550.
- [14] Bartolini B, Lionetti R, Giombini E, et al. Dynamics of HCV genotype 4 resistance-associated variants during virologic escape with pIFN/RBV + daclatasvir: a case study using ultra deep pyrosequencing[J]. *J Clin Virol*, 2015, 66:38-43.
- [15] Henquell C, Guglielmini J, Verbeeck J, et al. Evolutionary history of hepatitis C virus genotype 5a in France, a multicenter ANRS study[J]. *Infect Genet Evol*, 2011, 11(2):496-503.
- [16] Zhou X, Chan PK, Tam JS, et al. A possible geographic origin of endemic hepatitis C virus 6a in Hong Kong: evidences for the association with Vietnamese immigration[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24889.
- [17] Choudhary MC, Natarajan V, Pandey P, et al. Identification of Indian sub-continent as hotspot for HCV genotype 3a origin by Bayesian evolutionary reconstruction[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 28:87-94.
- [18] Thomson E, Ip CL, Badhan A, et al. Comparison of next-generation sequencing technologies for comprehensive assessment of full-length hepatitis C viral genomes[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(10):2470-2484.
- [19] Saleem S, Ali A, Khubaib B, et al. Genetic diversity of hepatitis C virus in Pakistan using next generation sequencing[J]. *J Clin Virol*, 2018, 108:26-31.
- [20] Raghwanji J, Wu CH, Ho CKY, et al. High resolution evolutionary analysis of within-host hepatitis C virus infection[J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(11):1722-1729.
- [21] Iles JC, Raghwanji J, Harrison GLA, et al. Phylogeography and epidemic history of hepatitis C virus genotype 4 in Africa[J]. *Virology*, 2014, 464-465:233-243.
- [22] Ling Lu, Tong W, Lin Gu, et al. The current hepatitis C virus prevalence in China may have resulted mainly from an officially encouraged plasma campaign in the 1990s: a coalescence inference with genetic sequences[J]. *J Virol*, 2013, 87:12041-12050.