

我国甲病毒的研究进展

方美玉 林立辉 任瑞文

甲病毒属披膜病毒科,以往也称为 A 组虫媒病毒或甲组虫媒病毒,是一类由吸血昆虫或节肢动物叮咬敏感脊椎动物而传播的传染病。蚊虫为其主要传播媒介。目前已发现 28 种甲病毒^[1],其中与人类疾病密切相关的有 8 种:基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)、马雅罗病毒(Mayaro virus, MAYV)、罗斯河病毒(Ross river virus, RRV)、辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SINV)、东方马脑炎病毒(eastern equine encephalomyelitis virus, EEEV)、西方马脑炎病毒(western equine encephalomyelitis virus, WEEV)、委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalomyelitis virus, VEEV)、阿尼昂昂病毒(O'nyong-nyong virus, ONNV)。这些病毒均可引起人类和动物产生严重的疾病。

一、甲病毒感染的临床症状及其传播媒介^[1-20]

在自然界大多数甲病毒感染发生在鸟类、鼠类、爬行动物和两栖类动物等,在这些自然宿主中某些表现为无症状的、长期的、高滴度的病毒血症,这样有利于蚊虫的传播,一旦经蚊媒传播到人和家畜以后,则可引起流行。疾病的症状包括发热、皮炎、关节炎、肌炎或脑炎。严重者可造成人和动物的死亡。根据病毒种类和宿主不同,引起疾病的症状不同,一些发热原因不明的患者也往往与该类病毒感染有关,应加强对该类病毒快速诊断的研究,重视进出口检疫工作,防止该类疾病在我国的传播和流行。以下简述与人类疾病相关的 8 种甲病毒感染的临床症状及其传播媒介。前 5 种病毒已在我国分离到病原。

1. CHIKV^[1-21]: CHIKV 原始株是 1953 年在乌干达发热患者血中分离,1950 年以来该病毒在亚洲,尤其是东南亚也有广泛流行,泰国曼谷 8% 发热患者由该病毒引起,因此 CHIKV 被认为是引起传染病的重要病毒。我国最早是 1986 年从云南蝙蝠脑内分离到该病毒。该病主要在夏秋季流行。

CHIKV 感染引起的临床症状与登革热很相似,称为“基孔肯雅热”。发病潜伏期为 3~12 天,可表现为发热、头痛、结膜炎、淋巴结肿大、多个关节剧烈疼痛、皮疹出现在第 2~5 天,并有斑丘疹或猩红热样皮疹,可伴出血点、瘀斑等出血性体征,患者时有恶心、呕吐等胃肠道症状,也可表现上呼吸道感染症状或“不明热”。约有半数患者可发生反复无热型关节痛。确诊需要病毒的分离鉴定和血清学检测。血清学实验与其他甲病毒有交叉反应。CHIKV 的主要传播媒介为埃及伊蚊、非洲伊蚊、白纹伊蚊和三带喙库蚊等。

2. SINV^[1-22]: SINV 最早是 1950 年在埃及尼罗河三角洲辛德毕斯地区从库蚊中分离,曾在世界许多地区流行,印度、南非、澳大利亚、俄罗斯等地区均从库蚊标本中分离到该病毒。亚洲许多国家已报道分离到该病毒,但未见该病流行的报道,我国于 1990 年在新疆分离到 SINV。该病主要在夏秋季流行。

SIN 发病潜伏期为 3~7 天,感染后的主要症状为发热、头痛、关节痛和皮疹,最显著的表现是皮疹,在躯干和四肢出现斑丘疹,面部不出现皮疹。皮疹的发展为斑疹、丘疹、水疱和脓疱四个时期,有些患者关节痛可持续几周,患者感染病毒后可自愈,偶有发生中枢神经系统感染,一般无后遗症及死亡发生。SINV 的传播媒介以库蚊(单条库蚊、尖音库蚊等)和伊蚊为主。

3. RRV^[1-2-20]: 该病毒感染主要分布在澳大利亚等南太平洋地区的岛屿。主要流行期为 2~7 月份,我国于 1993 年从海南岛捕获的蝙蝠中分离一株病毒,经血清学和分子生物学鉴定为 RRV。

RR 发病潜伏期为 3~10 天,感染的主要症状为发热、头痛、皮疹,多在躯干和四肢发生斑丘疹、淋巴结肿大和多发性关节炎,往往表现手的小关节和踝关节肿痛,活动受限,一般 2 周可自愈,但有的患者有持续性的或再发性关节疼痛,可长达 1 年。该病毒是引起流行性多发性关节炎的主要病原之一。RRV 主要传播媒介为伊蚊和库蚊。

4. WEEV^[1-21]: 该病毒感染的主要分布是美国中部、加拿大、墨西哥、巴西和阿根廷等。我国于 1990 年从新疆乌苏县分离到该病毒。该病流行有严格的季节性,主要发生在夏秋季。

WEE 发病潜伏期为 5~10 天,主要症状:发热、头痛、呕吐、嗜睡、肌痛、颈背强直、惊厥等一系列脑炎症状。重症患者可剧烈头痛、言语失常、运动失调、抽搐、昏迷等,一般持续 7~10 天,严重病例多死于 3~5 天。该病一旦发生流行,死亡率达 12%~50%。蚊虫是 WEEV 的主要传播媒介,包括库蚊和伊蚊。

5. EEEV^[1-21]: EEEV 感染主要分布于美洲,美国东部、东北部及南部,加拿大的东部、墨西哥、巴拿马、哥伦比亚等地区,此外,菲律宾、泰国、波兰和俄罗斯也分离到该病毒,但未见病例报道。我国 1992 年从新疆博乐地区分离到该病毒。该病流行有严格的季节性,主要发生在 7~10 月份。

EEE 发病潜伏期 7~10 天,其临床表现与乙型脑炎相似,主要症状为发热、寒战、头痛、恶心、呕吐,部分患者嗜睡、

昏迷、颈项强直等脑炎症状,患者可表现为呼吸不规则,呼吸浅表以至停止,脑疝患者可突然停止呼吸。病死率达50%~80%,幸存者可有后遗症。EEEV主要传播媒介为黑尾脉毛蚊、盐泽伊蚊和刺扰伊蚊。

6. MAYV^[1,2]:主要分布在南美洲热带丛林地区,最早是1954年在特立尼达山 Mayaro 县内5例发热患者血液中分离到,该病流行季节为3~5月份。

MAY 病潜伏期一般为3~8天,临床主要表现为发热、寒战、头痛、关节疼痛和皮疹。多见于腕、指、踝和趾关节疼痛。皮疹常见于胸、背、臂和腿部,为斑疹或小丘疹,常于发病后第5天出现,约3~4天消失,少数患者可有恶心、上肢部疼痛、眼痛、背痛等症状,一般症状持续3~7天好转,部分患者关节疼痛可长达2个月,目前无死亡病例报道。其主要传播媒介为一种趋血蚊(*Haemagogus janthinomys*),在南美各国均有分布。

7. VEEV^[1,2]:VEEV 主要在美洲流行,如委内瑞拉、哥伦比亚、巴拿马等,于1938年在委内瑞拉从病马脑组织中分离,1952年从感染者分离到病毒,第一次确认为脑炎病原体。本病主要在春夏季流行。

VEE 潜伏期一般为2~5天,其主要临床症状表现为发烧、寒战、头痛、恶心、呕吐、腹泻,部分患者嗜睡、颈强直等脑炎症状,病情持续3~5天后逐渐恢复。重症病例出现惊厥、昏迷、麻痹至死亡。幸存者留有后遗症。蚊虫为其传播媒介,包括库蚊、伊蚊、按蚊和曼蚊等。

8. ONNV^[2]:ONNV 主要在非洲流行,乌干达、肯尼亚、坦桑尼亚和马拉维等国家均证实有该病流行。1959年在乌干达流行时从发热患者血中分离到该病毒,其主要在夏秋季爆发性流行。

ONN 潜伏期为3~10天,其临床症状类似基孔肯雅热。表现为发热、头痛、背痛、眼眶痛和结膜炎,淋巴结肿大,多个关节剧烈疼痛。发病第3~5天部分患者出现麻疹样皮疹,约4~7天消失。病后无后遗症。血清学实验表明 ONNV 与 CHIKV 抗原关系密切。因此有学者认为该病毒是 CHIKV 的一个亚型。其主要传播媒介为按蚊。

二、我国甲病毒的分离及血清流行病学调查

1. 甲病毒的分离:甲病毒是近几十年来发展较快的一组病毒,但我国在这方面的研究起步较晚,目前我国已分离到的甲病毒有鸫山病毒(*Sigiyama virus*, SAGV)、CHIKV、SINV、RRV、EEEV、WEEV 等6种病毒(表1)。

除上述已明确种属关系的病毒外,近年来我国各地学者从海南、云南、贵州等地陆续分离到多株病毒^[8,9,14,15],经生物学和血清学鉴定,其中有些病毒初步定为甲病毒,尚有待进一步研究。

2. 甲病毒的血清流行病学:早在20世纪80年代,陈伯权等^[16]和张天寿等^[17]就调查了人血清中的虫媒病毒抗体,发现我国广大地区主要存在乙组虫媒病毒,同时也存在甲组虫媒病毒和布尼亚病毒。梁国栋等^[10]对我国13个省、市、

自治区521份人血清中 SINV 抗体调查表明,宁夏、安徽、新疆伊犁和新疆福海等地区阳性率较高。

表1 我国甲病毒的分离状况

分离的病毒	分离年代	地点	标本来源	宿主
SAGV ^[3-5]	1964	海南保亭县	库蚊	白鹭、猪、羊等
CHIKV ^[6,7]	1986	云南西双版纳	蝙蝠患者	野生灵长类、蝙蝠
SINV ^[10]	1990	新疆伊犁	按蚊	鸟类及家畜等
WEEV ^[12]	1990	新疆乌苏县	赫坎按蚊	马和鸟类等
WEEV ^[12]	1991	新疆博乐	全沟硬蜱	马和鸟类等
EEEV ^[11]	1992	新疆博乐	全沟硬蜱	马、家禽和鸟
RRV ^[13]	1993	海南	蝙蝠	家畜(马、牛、羊),野生哺乳动物

90年代为了解虫媒病毒在我国南方分布情况,我们对南方11个地区进行调查,共采健康人血清3077份进行了14种虫媒病毒抗体检测。结果表明,人血清中甲病毒 SINV、CHIKV、SFV、MAYV、RRV、SAGV 和 GET(盖塔)等病毒抗体的阳性率为3.68%(分别是0.64%、1.13%、0.64%、0.04%、0.94%、0.11%和0.18%),黄病毒:日本脑炎病毒(JEV)和登革病毒(DENV)1~4抗体的阳性率为11.3%(分别为2.60%和8.65%);布尼亚病毒科:新疆出血热病毒(XHFV)和雪靴野兔病毒(SSHV)抗体为7.99%(2.66%和5.33%)。同时调查了海南的三亚、琼中和琼海三个地区野鼠标本共401份,其中甲病毒(SINV、CHIKV、RRV 和 SFV)抗体的阳性率为18.92%(1.80%、6.31%、4.50%和6.31%);黄病毒(JEV 和 DENV 1~4)抗体的阳性率为11.8%(3.69%和8.11%);布尼亚病毒(XHFV 和 SSHV)抗体的阳性率为6.89%(3.10%和3.79%)。上述结果表明,在我国南方一些地区生活的人群和鼠类不同程度的感染了甲病毒、黄病毒和布尼亚病毒^[18]。

杨起饶等^[19]在云南省洱源县对鸟血清虫媒病毒抗体做了调查,其中9种鸟检出甲组虫媒病毒抗体,阳性率14.4%(46/319),15种鸟检出乙组虫媒病毒抗体,阳性率为53.9%(172/319)。说明鸟类存在着甲、乙组虫媒病毒感染。

三、病毒的基因组结构

1. 病毒基因组^[1,21]:甲病毒基因组是单链线形正股RNA,长约12 kb,其5'端有帽状结构,3'末端有多聚腺苷酸序列,基因组RNA单独即可引起完整的复制周期。基因组可分为两个不同的区段,5'端前2/3部分编码4种非结构蛋白,称为非结构区;基因组3'末端后1/3编码数种结构蛋白,称为结构区。

(1)非结构区:靠近基因组5'端前2/3含有7600个核苷酸,也称49s RNA。根据蛋白质在基因组的排列顺序称为非结构蛋白1~4(nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)。

(2)结构区:基因组3'末端后1/3部分含有4100个核苷酸,也称为亚基因组RNA或26s mRNA,编码病毒结构蛋白:衣壳蛋白C、外膜糖蛋白E1、E2、E3,另外一个6K蛋白是E2蛋白在跨膜序列之后,含有33个氨基酸的信号肽序列。

2. 基因组保守序列^[1, 21]: 甲病毒基因组核酸序列中具有 4 个完全相同的区域, 称为序列保守区, 一般说来, 在基因组序列愈保守, 在功能上愈重要。

(1) 第一保守区, 基因组 5' 端帽结构之后 44 个核苷酸, 形成一个带柄的环状结构, 具有启动子功能。

(2) 第二保守区, 紧接第一保守区, 由 51 个核苷酸组成, 其功能目前尚不清楚。

(3) 第三保守区, 在基因组 49s 与 26s mRNA 的接合部, 由 24 个核苷酸组成, 为 26s RNA 的转录启动子。

(4) 第四保守区, 在基因组 3' 末端, 其后多为多聚腺苷酸尾, 由 19 个核苷酸组成, 也称为 19 核苷酸保守区。

据报道, 以上 4 个保守区序列仅出现在甲病毒或甲病毒样病毒的基因组中, 与其他种属病毒无任何同源性, 因此这些保守序列成为鉴定甲病毒的依据。

3. 基因组 3' 末端重复序列: 在基因组 3' 末端的核苷酸序列有一般长度在 40~60 碱基的重复序列, 所有的甲病毒都有重复序列, 但其重复序列的长度, 碱基排列的顺序, 重复序列之间的距离以及重复序列距终止密码子的距离都不相同, 但相同病毒不同地理株的病毒却基本一致^[22]。因此, 甲病毒基因组的 3' 末端重复序列可作为甲病毒属内鉴定的根据^[1, 22]。

四、甲病毒的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测及分子生物学研究

随着分子生物学技术的不断发展以及在医学领域的广泛应用, RT-PCR 及分子克隆等技术也广泛应用于甲病毒的研究中^[23-26]。国内外学者根据甲病毒全基因组序列分析, 分别在其保守序列和 3' 末端重复序列设计了相应的特异性引物, 应用保守序列的引物可以鉴定甲病毒属, 应用基因组 3' 末端重复序列的引物扩增后再进行克隆、测序, 可以鉴定甲病毒属内的种群。

Pfeffer 等^[23, 24]在甲病毒基因组保守区设计了 3 条引物, 利用半套式 PCR 可以扩增 27 种甲病毒, 随后他们又在甲病毒基因组 3' 末端重复序列设计了一对特异引物扩增了甲病毒 3' 末端序列, 然后克隆、测序, 根据其重复序列的长度、碱基排列的顺序, 重复序列之间的距离等, 证明能够很好的鉴别甲病毒属内的种群。

梁国栋等对我国分离的多株甲病毒进行了深入的研究^[27, 28], 他们根据基因组的保守序列和 3' 末端的重复序列, 设计了特异性引物, 将国内分离的甲病毒能够鉴定到种, 然后部分进行了全基因序列测定及分析。如: XJ-160 病毒是 1990 年从新疆的蚊虫标本中分离, YN87448 病毒是从发热患者的血中直接分离, 在病毒分离和初步鉴定的基础上, 对该两株病毒进行了全基因组测定及分析, 填补了我国在甲病毒分子生物学研究领域的空白。

何海怀等^[12]对我国分离的 XJ-90260 和 XJ-91006 两株病毒的分类地位、种系发生和遗传性进行了研究, 应用 RT-PCR 扩增两株病毒的 NsP4、E1 基因区和 3' 末端非编码区, 然后测序, 进行核苷酸序列同源性比较和 3' 端非编码区核苷

酸序列分析。结果表明, 我国分离的这两株甲病毒与 WEEV 同源性最高, 具有 WEEV 3' 端非编码区及结构特征, 其 NsP4 基因区与 EEEV 同源, E1 基因区与 SINV 同源, 两株病毒均位于 WEEV B 组。因此, 这两株病毒属于 WEEV 同一遗传型, 均为重组甲病毒。

我们与中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所合作对海南岛分离的 2 株甲病毒基因组 3' 末端核苷酸序列进行了克隆与分析^[5], 从蝙蝠脑内分离的甲病毒(HBb17)与 RRV 国际标准株 T48 在 3' 末端非翻译区同源性高达 99%, 两者都有四个重复序列。在病毒结构蛋白 E1 区序列, HBb17 与 RRV 核苷酸(氨基酸)同源性为 99%(99%)。从蚊体内分离的 M1 病毒与 SAGV 在 3' 末端非翻译区的同源性为 98%, 在结构蛋白 E1 区与 SAGV 核苷酸(氨基酸)同源性为 97%(98%)。因此, 经重复序列分析表明: 海南岛分离的 HBb17 属于 RRV, M1 病毒属于 SAGV。

综上所述, 虫媒病毒的研究在我国进展很快, 目前, 国内学者对已分离的甲病毒正进一步深入研究, 一些发热原因不明的患者中可能存在甲病毒的病原体, 正在继续分离和鉴定。这些工作都具有重要的流行病学意义。随着我国改革开放的深入, 旅游事业的发达, 商贸的频繁交流, 还可能会有新的虫媒病毒发现。我们必须加强在虫媒病毒领域的研究和防治工作。

参 考 文 献

- 1 金奇, 主编. 医学分子病毒学. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2001. 403-420.
- 2 自登云, 陈伯权, 俞永新, 主编. 虫媒病毒与虫媒病毒病. 昆明: 云南科技出版社, 1995. 83-142.
- 3 杨火, 饶颐年, 陈日光, 等. 海南岛一株甲组虫媒病毒的分离、鉴定和血清抗体调查. 中华微生物学和免疫学杂志, 1984, 4: 107-111.
- 4 Li XD, Qiu FX, Yang H, et al. Isolation of Getah virus from mosquitoes collected on Hainan island, China, and results of a serosurvey. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 1992, 23: 730-734.
- 5 赵文忠, 周国林, 何海怀, 等. 海南岛两株甲病毒基因组 3' 末端核苷酸序列的克隆和分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 2000, 14: 213-217.
- 6 张海林, 施华芳, 刘丽华, 等. 从云南省蝙蝠中分离基孔肯雅病毒及血清抗体调查. 病毒学报, 1989, 5: 31-33.
- 7 周国林, 梁国栋, 李蕾, 等. 我国分离的甲属病毒 YN87448 毒株非结构区基因的核酸序列测定及分析. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, 13: 314-320.
- 8 徐普廷, 王逸民, 赵子江, 等. 云南省甲属披膜病毒的分离和鉴定. 病毒学报, 1987, 3: 237-241.
- 9 陈文洲, 丘福禧, Charles HC, 等. 从海南岛蚊和蝉分离出 28 株甲病毒属病毒. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11: 144-146.
- 10 梁国栋, 李其平, 何英, 等. 我国首次分离到辛德毕斯病毒. 病毒学报, 1993, 9: 55-59.
- 11 李其平, 梁国栋, 鄧奇, 等. 东方马脑炎病毒的分离与初步鉴定. 中华实验和临床病毒学杂志, 1992, 5: 101-105.
- 12 何海怀, 吕新军, 杨益良, 等. 我国分离的两株病毒为重组甲病毒. 中华实验和临床病毒学杂志, 2001, 15: 120-124.
- 13 赵春生, 蒋廉华, 余兴龙, 等. 从海南省蝙蝠中分离出 1 株罗斯河病毒及其血清抗体调查. 中国兽医学报, 1997, 11: 241-243.

- 14 蒋廉华,赵春生,刘金华,等. 海南省虫媒病毒分离物的初步鉴定. 中国媒介生物学及控制杂志, 1998, 9:258.
- 15 方美玉,刘建伟,蒋廉华,等. 海南岛“不明热”病人血中虫媒病毒的分离与初步鉴定. 华南国防医学, 2001, 1:20-22.
- 16 陈伯权,刘琴芝,周国芳,等. 我国一些地区人血清的虫媒病毒抗体调查. 中华流行病学杂志, 1983, 4:263.
- 17 张天寿,王逸民,张永和,等. 云南省西南边境地区人血清虫媒病毒抗体调查. 中华流行病学杂志, 1989, 9:150.
- 18 赵春生,白志军,彭翼飞,等. 我国南方人鼠虫媒病毒血清流行病学调查. 中国公共卫生杂志, 2001, 17:64-66.
- 19 杨起饶,刘行知,张嘉玉,等. 云南省洱源县鸟吊山鸟血清虫媒病毒抗体调查. 中华流行病学杂志, 1988, 9:150.
- 20 Aaskov JG, Ross PV, Harper JJ, et al. Isolation of Ross river virus from epidemic polyarthritides patients in Australia. Aust J Exp Biol Med Sci, 1985, 63:587-597.
- 21 侯云德,主编. 分子病毒学. 第 2 版. 北京:学苑出版社, 1990. 430-435.
- 22 Strauss JH, Strauss EG. Alphaviruses. Microbiol Rev, 1994, 58:491-562.
- 23 Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg, 1997, 57:709-718.
- 24 Pfeffer M, Kinney RM, Kaaden T O-R. The alphavirus 3' untranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. Virology, 1998, 240:100-108.
- 25 Hasebe F, Parquet MC, Pandey BD et al. Combined detection and genotyping of Chikungunya virus by a specific reverse transcription-polymerase chain reaction. J Med Virol, 2002, 67:370-374.
- 26 Pfeffer M, Linssen B, Parke MD, et al. Specific detection of chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health, 2002, 49:49-54.
- 27 周国林,梁国栋,李蕾,等. 我国分离的甲病毒 YN87448 毒株全部结构区基因核苷酸的序列测定及分析. 病毒学报, 1999, 15:205-211.
- 28 李蕾,梁国栋,周国林,等. 我国首次分离的辛德毕斯病毒(XJ-160 病毒株)全基因组核苷酸序列测定. 病毒学报, 2000, 16:102-105.

(收稿日期:2002-12-09)
(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

广西百色地区壮族人群乙型肝炎病毒基因型分布初步调查

黄重敏 覃亚勤 覃后继 何延专 卢东 覃雪英

为了解广西百色地区壮族人群乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)基因型分布特点及其与疾病进展的相关性,我们对 30 例壮族慢性乙肝患者进行了 HBV 基因型检测。

1. 对象与方法:①病例均为在本院诊治的慢性乙肝患者,其中轻度、中度、重度分别为 8、11、11 例。全部患者 HBV DNA 阳性,年龄 18~65 岁(男 21 例、女 9 例)。诊断标准根据 2000 年修订的《病毒性肝炎防治方案》。②HBV DNA 基因分型:采用第一军医大学基础部生物医学诊断研究中心研制的 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术进行基因分型,取处理液 100 μ l 于 0.5yn 离心管内,加待测血清 100 μ l,混匀,100 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min,12 000 r/min 离心 5 min。取上清液 12 μ l 于反应液管内,10 000 r/min 离心 10 s 上机,预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min,循环条件:94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 65 s, 共循环 35 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,扩增产物 98 $^{\circ}$ C 10 min,迅速冰浴 10 min。在 37 $^{\circ}$ C 下,用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)等将包被探针在微板孔上包被 14 h 并用封闭剂封闭。各取杂交液 90 μ l,已变性产物 20 μ l,各型核酸探针 23 μ l(每一型加一孔),分别加入反应孔内,轻轻摇动混匀,50 $^{\circ}$ C 水浴 60 min,倒净液体,各孔加洗液 200 μ l,37 $^{\circ}$ C 3~5 min,倒净液体后再重复洗 1 次。于各孔加酶抗体 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 30 min,用吸水纸扣干,每孔加入洗液 200 μ l,置室温 3~5 min,重复洗 2 次,每孔加显色剂 A、B 各 1 滴,避光,置室温 10 min,加 2 mol/L 硫酸溶液 1 滴,于 450 nm 波长测吸光度(A)值。结果判断:P/N \geq 2.1 为

HBV DNA 阳性,P/N<2.1 为阴性。6 型杂交孔阳性者即为所检病毒基因型。

2. 结果:①30 例慢性乙肝患者 HBV 基因型中 D 型 5 例、B 型 2 例、C 型 2 例、CD 10 例、CB 2 例、BD 2 例、非 A~F 7 例。②不同临床类型的 HBV 基因型构成:8 例慢性轻度肝炎患者,B、C 型各 2 例,CB 1 例,非 A~F 3 例;11 例慢性中度患者,D 型 2 例、CD 4 例、BD 和 CB 各 1 例,非 A~F 3 例;11 例慢性重度患者,D 型 3 例、CD 6 例、BD 1 例、非 A~F 1 例。③不同基因型的临床类型:2 例 B 型和 2 例 C 型均为慢肝轻度;12 例 C 混合型慢肝轻、中、重度分别为 1、5、6 例;12 例 D 混合型慢肝中、重度分别 5、7 例;4 例 B 混合型慢肝轻度、中度、重度分别为 1、2、1 例。

3. 结论:HBV 是导致肝脏疾病的主要病因,近几年来国内外的研究证实,HBV 基因型呈世界区域性分布,但各国感染的基因型不尽一致。本研究表明本地的 HBV 为 B、C、D、非 A~F 型以及 CD、BD、BC 型,以 D 型最常见,其次 C 型、非 A~F 型,本地壮族人群 HBV 基因型分布及其优势基因型有一定的特殊性和自身特点规律,可能与民族有关;基因型 D 与严重的疾病过程有关,有报道在重型慢性肝炎的发展过程中,有一部分患者的基因型从原来的 B 或 C 向 D 转换。本研究发现在慢性肝炎中度和重度患者的 D 型及其混合型均占绝大多数,而 DC、CB、BD 型患者中,临床类型为慢性肝炎中重度也占绝大多数。提示 D 型及其混合型、CD、CB、BD 似乎可使病情加重。