

[8] Weisel JW. Fibrinogen and fibrin[J]. *Adv Protein Chem*, 2005, 70(1):247-299.

[9] Kollman JM, Pandi L, Sawaya MR, et al. Crystal structure of human fibrinogen[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(18):3877-3886.

[10] Medved L, Weisel JW. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin[J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(2):355-359.

[11] Weisel JW. The electron microscope band pattern of human fibrin; various stains, lateral order, and carbohydrate localization [J]. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, 1986, 96(1/3):176-188.

[12] Gorkun OV, Veklich YI, Medved LV, et al. Role of the alpha C domains of fibrin in clot formation [J]. *Biochemistry*, 1994, 33(22):6986-6997.

[13] Guthold M, Liu W, Sparks EA, et al. A comparison of the mechanical and structural properties of fibrin fibers with other protein fibers[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2007, 49(3):165-181.

[14] Falvo MR, Millard D, O'Brien ET 3rd, et al. Length of tandem repeats in fibrin's alphaC region correlates with fiber extensibility [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6(11):1991-1993.

[15] Park KJ, Kwon EH, Kim HJ, et al. Evaluation of the diagnostic performance of fibrin monomer in disseminated intravascular coagulation[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(3):143-147.

[16] Takahashi D, Takahashi Y, Matsui M, et al. Evaluation of hypercoagulability using soluble fibrin monomer complex in sick newborns[J]. *Pediatr Int*, 2013, 55(2):151-156.

[17] Ieko M, Nakabayashi T, Tarumi T, et al. Soluble fibrin monomer degradation products as a potentially useful marker for hypercoagulable states with accelerated fibrinolysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 386(1/2):38-45.

[18] Schutgens RE, Haas FJ, Agterof MJ, et al. The role of fibrin monomers in optimizing the diagnostic work-up of deep vein thrombosis[J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(5):807-813.

[19] Brügger-Andersen T, Hetland Ø, Pönitz V, et al. The effect of primary percutaneous coronary intervention as compared to tenecteplase on myeloperoxidase, pregnancy-associated plasma protein A, soluble fibrin and D-dimer in acute myocardial infarction [J]. *Thromb Res*, 2007, 119(4):415-421.

[20] Ieko M, Naito S, Yoshida M, et al. Plasma soluble fibrin monomer complex as a marker of coronary thrombotic events in patients with acute myocardial infarction [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2009, 219(1):25-31.

(收稿日期:2013-04-18)

• 综 述 •

HBV DNA 基因分型研究进展

汪 媛^{1,2}综述, 徐元宏^{2△}审校

(1. 芜湖市中心血站, 安徽芜湖 241000; 2. 安徽医科大学第一附属医院检验科, 安徽合肥 230000)

关键词: 肝炎病毒, 乙型; 基因型; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2435-03

乙型肝炎病毒(HBV)感染在世界各地均有不同程度的流行,地区差异非常明显。近年来,随着分子生物学技术的迅猛发展和对 HBV 认识的不断深入,国内外许多学者对 HBV 基因分型及其与临床的相关性开展了大量的研究,发现 HBV 基因分型比血清亚型更能准确地反映原型病毒株之间的自然异质性,HBV 基因型与乙型肝炎病情的进展、临床表现、治疗、预后有密切的关系。为此,本文对 HBV 基因型研究进展和临床意义作一综述。

1 HBV 基因型的发现和发展

以往大多数 HBV 的诊断是运用血清学方法检测特异性病毒相关蛋白及其抗体。1988 年,Okamoto 等^[1]建立了以 HBV 全基因系列核苷酸异源性大于或等于 8% 为不同基因型的分型标准,并将 HBV 分为 A、B、C、D4 种基因型,从而首次提出了 HBV 基因型的概念和基因分型法;1994 年 Norder 等^[2]根据 S 基因异源性大于或等于 4%,发现了 2 种新基因型 E 和 F,并由此简化了分型方法;2000 年 Stuyver 等^[3]发现了基因型 G;2002 年 Wu 等^[4]又发现了 H 基因型;同年 Kao 等^[5]在研究日本献血员 B、C 型 HBV 血清时发现存在混合型感染。根据 HBV 全基因系列异源性大于或等于 8% 或 S 基因序列异源性大于或等于 4%,已将 HBV 分为 A-H8 种基因型,而随着 HBV 基因分型的广泛开展,已陆续发现 Ae 和 Aa, Ba 和 Bj, C1 和 C2 等基因亚型,此外,还发现了 A/D, B/C, Ba 和 Bj 等不同

的重组体^[6-8]。基因分型的方法已日趋简化、灵敏和准确,方便广泛使用,基因型和临床的关系亦日趋明朗。

2 HBV 基因型的流行病学分布

HBV 基因型分布具有明显的地域差异。HBV 各基因型流行区域见表 1^[3-4]。我国北方城市以基因 C 型流行为主,由北方至南方,基因 B 型感染率逐渐增高,少数民族地区基因 D 型有较高的感染率,如新疆^[9]。同一基因型内不同亚型的分布也具有一定的地域性,如我国中西部、北部及东南部地区以 C2 亚型为主, C1 亚型多见于南方地区^[10]。目前普遍认为,不同地区优势基因型反映了 HV 自然感染史发生的变异特点,是病毒变异进化的后果。

表 1 世界各地 HBV 基因型流行病学分布

基因型	血清学亚型	主要流行区域
A	adw2, ayw1	西欧, 北欧, 北美洲, 撒哈拉非洲
B	adw2, ayw1	东南亚, 中国, 日本
C	ayr, adrq+, adrq-, adr, adw2	东南亚, 中国, 日本, 澳洲, 美国
D	ayw2, ayw3, ayw4	地中海区, 俄国, 印度, 美国
E	ayw4	西非洲
F	ayw4, adw2, adw4q-	中美洲, 南美洲, 波利尼西亚
G	adw2	美国, 法国, 德国
H	adw4	墨西哥, 美国

作者简介:汪媛,女,在职研究生,主要从事临床检验诊断学研究。

△ 通讯作者, E-mail: xyhong1964@163.com.

3 HBV 基因分型的方法

3.1 HBV 全基因测序 1988 年, Okamoto 等^[1]首先提出根据全基因系列异源性大于或等于 8%, 同源性小于 92% 进行分型。HBV 全基因测序通过 PCR 扩增 HBV 全基因 DNA, 进行测序和种系进化统计, 分析不同病毒株之间的亲缘关系, 得出各病毒株的型别。目前美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网页已提供了一种以网络为基础的 HBV 基因分型工具, 只需输入待分析序列, 就可立即得到结果。该方法目前获取信息最多, 直接、可靠, 是 HBV 基因分型的金标准, 但该方法繁琐、费时, 敏感性有限且成本较高, 不适宜广泛开展。

3.2 S 基因序列测定 随着血清反应性的遗传学基础研究的深入发现 S 基因序列是决定血清型的主要因素, 如 Norder 等^[2]用 S 基因序列测定分型替代全基因序列分析, 根据 S 基因异质性大于或等于 4%、同源性小于 96% 进行分型, HBV S 基因的分子学分类比血清学分类更有价值, 尤其在说明 HBV 传播途径、地理分布及 HBV 携带者群体移动方面更具有优越性。虽然该法初步简化了 HBV 的基因分型, 但仍存在繁琐、费用高等缺点, 难以广泛开展。

3.3 S 基因聚合酶链反应——限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 法 Lindh 等^[11]通过对不同基因型 HBV S 基因的特异酶切位点进行分析, 对 S 基因 PCR 产物成功分型, 并提示前 S 区最适合基因分型。随后 Lindh 等^[12]又建立了前 S 基因 PCR-RFLP 的分型方法。经与 S 基因 PCR-RFLP 比较, 后者不能分型的标本用前 S 基因 PCR-RFLP 法可以明确分型, 表明这种方法简明, 而且更加完善。与其他分型方法相比, RFLP 是目前临床最常用的 HBV 分型方法, 但 HBV 基因组的变异常导致分型错误甚至无法确定型别, 且遇到混合感染或酶切不完全, 就会出现复杂带型, 影响分型结果的判断。

3.4 型特异性引物 PCR Naito 等^[13]用型特异性引物多重 PCR 分型方法, 是针对各基因型的保守区设计特异性引物进行套式 PCR。该方法特异性较高, 结果可靠, 不足之处是容易出现非特异性扩增, 不利于结果的判断; Kirschberg 等^[14]直接采用多重 PCR, 用不同基因区设计的 6 对特异引物, 经一次扩增, 即能检测各基因型。

3.5 型特异性探针核酸杂交分析 Kato 等^[15]用型特异性探针分析技术对 HBV 进行分型, 在 Pre-S1 区设计引物、分型探针和对照探针, 随后进行核酸杂交, 最后对 S 区进行测序以便进一步确认。孙余婕等^[16]建立了一种快速准确的利用基因型 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR 方法, 能快速对乙型肝炎病毒 B 基因型、C 基因型以及 B/C 混合基因型进行检测, 结果准确可靠、特异性高。为临床乙型肝炎病毒感染监测提供一种有效的方法。

3.6 HBV 基因型特异性表位单克隆抗体的 ELISA Usuda 等^[17]用前 S 区 7 种抗原决定簇的产物在不同基因型中有特异的组合, 利用此原理制订单克隆抗体, 并用辣根过氧化物酶进行标记, 证明该法分型与 S 基因测序分型结果完全一致, 该法未能分型的标本是因为不同基因型混合感染或基因型特异性表位点突变之故, 因此适用于大规模的流行病学调查。该方法虽然简单, 但要建立一套单克隆抗体则较为困难, 且该方法对于不同基因型混合感染或基因型特异性表位存在点变异的情况不能分型。

3.7 HBV 基因型特异性线性探针检测法 游晶等^[18]依据 A~F 基因型的保守序列设计了 18 种型特异性探针与 HBV S 基因的 PCR 产物进行杂交实现分型。该方法需要的 PCR 产

物多, 费用昂贵。

3.8 微板核酸分子杂交 ELISA 微板核酸分子杂交 ELISA 是将待测核酸经 PCR 扩增后, 分别与各型探针同时杂交, 然后通过酶联免疫显色判定结果^[19]。该方法杂交时间短、分型准确可靠、操作简单、自动化程度高, 可大规模进行 HBV 基因分型。

3.9 反向杂交技术 反向杂交技术是 Saiki 等^[20]提出的一种斑点杂交技术, 该技术较正向斑点杂交和凝胶电泳印迹转移杂交具有快速、简便、高敏感性、特异性强的特点, 尤其是基因分型、基因突变检测、病原体的检测等方面有其独特的优势。

3.10 基因芯片技术 基因芯片技术是近几年发展起来的新技术, 其检测结果具有灵敏度高、所需样本微量和操作简便等特点, 但其费用高, 不适合临床。目前将基因芯片与探针技术等其他技术结合, 如邢亚斯等^[21]利用双纳米金探针结合基因芯片平台建立了一种检测乙型肝炎病毒基因 (HBVDNA) 的新方法, 可达到对 HBVDNA 的可视化检测。该方法的灵敏度高, 可检测 10 fmol/L 的 HBVDNA, 且能在 1.5 h 内完成检测。

4 HBV 基因型与临床

众多研究显示, 基因型是影响 HBV 感染后疾病转归的主要决定因素之一。不同基因型有致病性差异, 如 A 型 HBV 急性感染后易导致慢性持续感染^[22], 在以 B、C 为优势的地区, C 型具有较强的致病能力, 预后差; 在以 A、D 为优势的地区, D 型具有较强的致病性, 肝病严重, 预后不良。目前普遍基因型 C 引起的炎性坏死及纤维化程度比 B 型更加严重, HBeAg 阳性率更高, 平均年龄高于 B 型, 且 C 型与肝硬化和肝癌有关; 基因型 B 的累积生存率要明显高于 C 型, 基因型 D 容易在年轻的患者中发生原发性肝细胞癌, F 型比 A、D 等型更容易引起与肝脏疾病相关的死亡^[23]。HBV 基因分型对临床诊断和治疗乙型肝炎病毒感染有很大的帮助。

近年来乙肝基因型与抗病毒药物疗效的研究, 提示不同基因型间的药物敏感性也有差异。Kao 等^[24]还比较了 B、C 型乙肝患者对干扰素 A-2b 的应答反应, 结论为年轻、B 基因型感染者可能预示对干扰素有较好的应答。Erhardt 等^[25]对 165 例慢性乙肝患者的研究发现, 不论是 HBeAg 阳性或是阴性者, 干扰素治疗后的持久应答 A 基因型比 D 型好。

5 HBV 基因分型研究存在的问题及展望

越来越多的研究表明, HBV 基因型与病毒复制、临床表现、治疗应答和预后均有一定的联系, 提示不同基因型具有不同的致病性。由于各地区检测方法不同, 势必影响客观结果, 所以尚有待于寻找更加简便易行、高效准确、费用较低的分型方法。基因芯片技术的进一步发展, 越来越符合这一要求, 值得深入研究, 而基因型有助于评估临床病情, 选择治疗药物和治疗方案及预后判定, 与临床的关系还应进一步观察研究。因此能否通过改变基因型, 加强乙肝的预防和治疗, 是个值得思考和研究的问题, 为难以根治的乙型肝炎提供一个新的治疗方向。

参考文献

- [1] Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes[J]. J Gen Virol, 1988, 69(Pt 10): 2575-2583.
- [2] 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[J].

- Virology, 1994, 198(2):489-503.
- [3] Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness[J]. J Gen Virol, 2000, 81(Pt 1):67-74.
 - [4] Wu F, Wu MJ, Zhuge XL, et al. Correlation of the occurrence of YMDD mutations with HBV genotypes, HBV-DNA levels, and HBeAg status in Chinese patients with chronic hepatitis B during lamivudine treatment[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2012, 11(2):172-176.
 - [5] Kao JH, Chen PJ, Lai MY, et al. Clinical and virological aspects of blood donors infected with hepatitis B virus genotypes B and C[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1):22-25.
 - [6] Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, et al. Epidemiological and sequence differences between subtypes(Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt4):811-820.
 - [7] Huy TT, Ushigima H, Quang VX, et al. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups[J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 2):283-292.
 - [8] Sugauchi F, Orito E, Ichida T, et al. Epidemiologic and virologic characteristics of hepatitis B virus genotype B having the recombination with genotype C[J]. Gastroenterology, 2003, 124(4):925-932.
 - [9] 张韧, 王敏, 符瑞佳, 等. HBV 基因型在我国九省市的分布及与临床指标的关系[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2010, 2(3):152-155.
 - [10] 翁伟, 唐吉斌. 乙型肝炎病毒基因分型研究在抗病毒治疗中的意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2012, 4(2):126-130.
 - [11] Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt 1858 variants, and geographic origin of hepatitis B virus—large-scale analysis using a new genotyping method[J]. J Infect Dis, 1997, 175(6):1285-1293.
 - [12] Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, et al. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon[J]. J Virol Methods, 1998, 72(2):163-174.
 - [13] Naito H, Hayashi S, Abe K. Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(1):362-364.
 - [14] Kirschberg O, Schüttler C, Repp R, et al. A multiplex-PCR to identify hepatitis B virus—genotypes A—F[J]. J Clin Virol, 2004, 29(1):39-43.
 - [15] Kato H, Orito E, Sugauchi F, et al. Frequent coinfection with hepatitis B virus strains of distinct genotypes detected by hybridization with type-specific probes immobilized on a solid-phase support[J]. J Virol Methods, 2003, 110(1):29-35.
 - [16] 孙余婕, 沈佐君. 实时荧光定量 PCR 方法检测乙型肝炎病毒基因型[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(3):148-151.
 - [17] Usuda S, Okamoto H, Tanaka T, et al. Differentiation of hepatitis B virus genotypes D and E by ELISA using monoclonal antibodies to epitopes on the preS2-region product[J]. J Virol Methods, 2000, 87(1/2):81-89.
 - [18] 游晶, 庄林, 陈红英, 等. 乙型肝炎病毒基因型及其临床意义的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(9):921-928.
 - [19] 王虹, 万成松, 王省良, 等. 采用 PCR 微板核酸杂交-ELISA 技术进行 HBV DNA 基因分型的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2):234-236.
 - [20] Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, et al. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(16):6230-6234.
 - [21] 邢亚斯, 邹能利, 毛红菊, 等. 基于双纳米金探针杂交法检测 HBV DNA[J]. 高等学校化学学报, 2012, 7(33):1420-1425.
 - [22] 董梅. 乙肝病毒基因型的研究进展及临床意义[J]. 武警医学院学报, 2005, 14(4):319-321.
 - [23] 倪晓艳, 曹文. 乙型肝炎病毒基因分型方法的研究进展[J]. 中国医药指南, 2013, 11(1):77-78.
 - [24] Kao JH, Wu NH, Chen PJ, et al. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy[J]. J Hepatol, 2000, 33(6):998-1002.
 - [25] Erhardt A, Blondin D, Hauck K, et al. Response to interferon alfa is hepatitis B virus genotype dependent: genotype A is more sensitive to interferon than genotype D[J]. Gut, 2005, 54(7):1009-1013.

(收稿日期:2013-05-02)

• 综 述 •

直接免疫荧光法在阴道加德纳菌感染诊断中的应用研究^{*}

蓝玉清, 陆奉科[△]综述, 闭雄杰 审校

(广西科技大学第一附属医院检验科, 广西柳州 545002)

关键词: 直接免疫荧光法; 阴道加德纳菌; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)18-2437-03

加德纳菌(GV)是一类革兰阴性或阳性短杆菌, 厌氧, 嗜血, 培养困难。阴道加德纳菌不仅引起尿道炎和阴道炎, 还可导致早产、低体质量儿、绒毛膜炎、羊膜炎、羊水感染、子宫内膜炎、急性输卵管炎、手术后感染和子宫颈癌等^[1]。GV 还可经性接触传播, 与男性非淋菌性尿道炎、男性不育亦有一定关系。细菌性阴道病是妇科和产科感染的高危因素^[2]。临床实践中如果能迅速检测并及时处理, 就可能降低早产及异常妊娠的

发生率。但目前的检测方法学受到诸多影响因素所限, 临床检测不能做到及时预测。因此, 探讨快速准确检测方法一直是临床医学关注的热点。本研究从直接免疫荧光法检测阴道加德纳菌的方法学比较及应用研究等方面作以下综述。

1 研究背景

近年来, 我国有关阴道 GV 和细菌性阴道病(BV)的报道甚多, BV 的发病、诊断及治疗亦日渐受到人们的重视和关注。

^{*} 基金项目:广西医疗卫生适宜技术与开发项目(S201317-02)。 作者简介:蓝玉清, 女, 主管技师, 主要从事免疫学研究。 [△] 通讯作者, E-mail:lufengkeliuzhou@126.com。