

中国北方 5 城市慢性乙型肝炎患者中 SEN 病毒检测

闫杰 何忠平 庄辉 董庆鸣 宋淑静 朱林 王小红

【摘要】 目的 了解 SEN 病毒 D 和 H (SENV-D/H) 在中国慢性乙型肝炎患者 (CHB) 中的感染情况。方法 应用巢式聚合酶链反应法 (nPCR) 对中国北方 5 城市 595 例 CHB 患者和北京市 96 名正常人血清检测 SENV-D/H DNA, 并用 PCR 产物直接测序法对 7 株 SENV 进行了序列分析。结果 CHB 患者 SENV 感染率为 61.3%, 正常人为 62.5%, 两者差异无显著性 ($\chi^2 = 0.047, P = 0.829$)。但不同城市 CHB 患者中 SENV 感染率存在一定差异。从不同城市分离的 SENV 的核苷酸序列同源性较高, 4 株 SENV-D 同源性为 91%~98%, 3 株 SENV-H 同源性为 95%~98%。结论 在 5 城市 CHB 患者中存在 SENV-D/H 感染, 其感染率与正常人群相似, 提示 SENV-D/H 可能没有直接致病性。

【关键词】 SEN 病毒; 乙型肝炎, 慢性; 巢式聚合酶链反应

Detection of SEN virus in sera of patients with chronic hepatitis B and general population in 5 cities of China YAN Jie*, HE Zhong-ping, ZHUANG Hui, DONG Qing-ming, SONG Shu-jing, ZHU Lin, WANG Xiao-hong. *Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

【Abstract】 Objective To study the prevalence of SEN virus (SENV) infection in CHB patients in five cities of China. **Methods** A nest-polymerase chain reaction (nPCR) was used for detection of SENV-D and SENV-H in sera of 595 CHB patients from 5 cities of China and 96 normal individuals from Beijing. A total of 7 SENV strains were analyzed by direct sequencing. **Results** The prevalence rates of SENV in CHB patients and normal individuals were 61.3% and 62.5%, respectively ($\chi^2 = 0.047, P = 0.829$). The prevalence rates of CHB patients between 5 cities were different. Nucleotide sequence analysis showed that the homology between 4 SENV-D strains was 91%-98% and 95%-98% between 3 SENV-H strains isolated from 5 cities in China. **Conclusion** SENV-D/H were prevalent in CHB patients of China and their prevalence rates were similar to that in normal individuals.

【Key words】 SEN virus; Hepatitis B, chronic; Nest-polymerase chain reactions

SEN 病毒 (SENV) 是一种新近发现的单股环状 DNA 病毒^[1], 至少有 8 个成员 (SENV-A~H)。初步研究表明, SENV-D/H 在输血相关的非甲~戊型肝炎病人中流行率较高, 而在健康供血员中流行率较低。因而认为 SENV-D/H 可能是非甲~戊型肝炎的主要病原^[2,3]。为探讨 SENV-D/H 在慢性乙型肝炎 (CHB) 感染情况, 本研究应用巢式聚合酶链反应 (nPCR) 技术检测中国北方 5 城市 595 例 CHB 患者中 SENV-D/H 感染情况, 并与正常人进行比较。现将结果报告如下。

材料与方 法

1. 血清来源: 595 份 CHB 血清采自中国北方 5

基金项目 北京市卫生局肝炎重点学科资助

作者单位: 100011 北京地坛医院病毒研究室 (闫杰、何忠平、董庆鸣、宋淑静); 北京大学医学部病原生物学系 (庄辉、王小红); 北京市东城区疾病预防控制中心流行病科 (朱林)

城市传染病医院住院和门诊病人, 按 2000 年第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的“病毒性肝炎防治方案”, 诊断为 CHB (轻度)。其中北京 173 例、天津 100 例、长春 102 例、沈阳 109 例、大连 111 例。正常人血清采自北京市妇产医院婚前检查者, 共 96 名。

2. nPCR 检测 SENV-D/H DNA: 采用异硫氰酸胍-酚/氯仿法提取血清中的 DNA。第一轮共用引物

为 SP1 (5'-TTTAGCCTACAGGTGCTCTATGACC A-3') 和 SP2 (5'-CAATACCTGGAAGGTGTA-3'), 第二轮 SENV-D 型特异性引物为 SD1 (5'-AT-ACCAGACACCTCAACAG-3') 和 SD2 (5'-GGCAGTTGACCGCAAAGTTA-3') SENV-H 型特异性引物为 SH1 (5'-GGCTGCACCTTCTGGTTCT-3'), SH2 (5'-AACCGCCAACTGACTAGGGG-3')。PCR 反应体系中含 Taq 酶 1 U、10× 扩增缓冲液 3 μ l、25 mol/L dNTP 0.12 μ l、50 μ mol/L 引物

0.12 μl, 第一轮 PCR 模板为血清 DNA 提取物 6 μl, 引物为 SP1、SP2; 第二轮 PCR 模板为第一轮 PCR 产物 3 μl, 引物分别为 SD1、SD2 和 SH1、SH2, 加 DEPC 水使两轮 PCR 体系的总体积各为 30 μl。两轮 PCR 循环温度条件均为 94℃ 3 min, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 共 30 个循环, 然后 72℃ 延伸 7 min。取第二轮 PCR 产物 8 μl, 以 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于紫外线灯下观察结果, SENV-D/H 的扩增产物分别为 340 bp 和 271 bp。

3. PCR 产物测序: 将第二轮 PCR 产物经 1.0% 低熔点琼脂糖凝胶电泳纯化后, 分别以 SD1、SH1 为测序引物, 应用双脱氧末端终止法进行序列测定(由上海生工生物技术公司完成)。

4. 统计学处理: 应用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, 率的比较采用 χ^2 检验。

5. 核苷酸序列同源性比较及进化关系分析: 应用 Vector NTI suite 7 和 TreeView 软件, 将测序结果与 GenBank 收录的 SENV-A~H(序列号分别为: AX025667、AX025677、AX025718、AB059353、AX025761、AX025822、AX025830、AB059352) 进行核苷酸序列同源性比较, 并分析分子进化关系。

结 果

1. CHB 与正常人 SENV 感染状况: 595 例 CHB 患者血清中共检出 SENV 感染 365 例(61.3%), 其中单纯 SENV-D 80 例(13.4%), 单纯 SENV-H 133 例(22.4%), 两型混合感染 152 例(25.5%)。96 名正常人血清中共检出 SENV 阳性 60 例(62.5%), 其中单纯 SENV-D 型 24 例(25%), 单纯 SENV-H 17 例(17.7%), 两型混合感染 19 例(19.8%)。经统计学分析, 两者 SENV 感染率差异无显著性(表 1)。

表1 CHB 患者与正常人 SENV 感染状况比较

人群类别	检测例数	SENV-D 和/或 H 阳性例数(%)	各型阳性例数(%)	
			SENV-D	SENV-H
CHB	595	377(61.4)	237(39.0)	285(47.9)
健康人	96	60(62.5)	43(44.8)	36(37.5)
χ^2 值		0.047	1.161	3.594
P 值		0.829	0.281	0.058

2. 各城市 CHB 患者 SENV 感染状况: 由表 2 可见, 各城市 SENV 总感染率及各型 SENV 感染率不同, 各城市 H 型感染率均高于 D 型。

3. 从不同城市分离的 SENV 核苷酸序列同源性比较及进化关系分析: PCR 产物直接测序后, 选择 4 株 SENV-D(沈阳 sy609d、北京 bj318d、bj3d、长

春 cc563d) 和 3 株 SENV-H(bj294h、sy593h、bj25h) 进行 DNA 序列分析。SENV-D 型各株间的核苷酸序列同源性为 91%~98%, 与 GenBank 收录的 SENV-D 基因序列相应区段的同源性为 89%~91%(AB059352 nt1038-1333)。SENV-H 型各株间的核苷酸序列同源性为 95%~98%, 与 GenBank 收录的 SENV-H 基因序列相应区段的同源性为 88%~90%(AB059353 nt1116-1350)。进化关系分析显示 sy609d、bj318d、bj3d、cc563d 与 SENV-D 进化距离较近, bj294h、sy593h、bj25h 与 SENV-H 进化距离较近(图 1)。

表2 中国北方 5 城市 CHB 患者 SENV 感染状况

地区	检测例数	SENV 阳性例数(%)	各型阳性例数(%)	
			SENV-D	SENV-H
北京	173	101(58.4)	59(34.1)	76(43.9)
天津	100	50(50.0)*	35(35.0)	37(37.0)
长春	102	65(63.7)	42(41.2)	52(51.0)▲
沈阳	109	66(60.6)**	33(30.3)	54(49.5)
大连	111	83(74.8)	63(56.8)♯	66(59.5)♯

* 天津:大连 P<0.01, 天津:长春 P<0.05; ** 沈阳:大连 P<0.05; ♯ 大连:北京、天津、沈阳 P<0.01; 大连:长春 P<0.05; ▲ 长春:天津 P<0.01; △ 大连:天津 P<0.01; 大连:北京 P<0.05

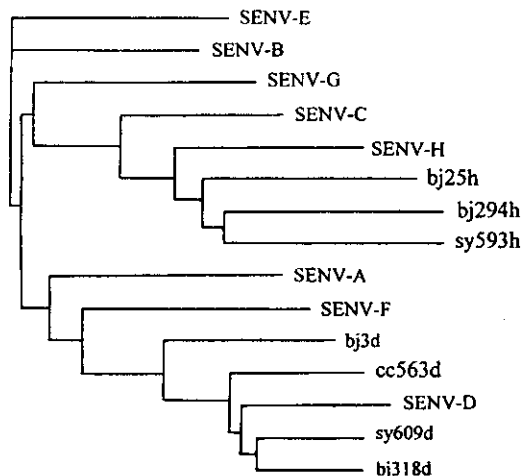


图1 7 株 SENV 部分基因的进化关系

讨 论

以往研究认为 SENV-D 和 SENV-H 在输血相关的非甲~戊型肝炎患者中感染率较高, 而在健康人群中感染率较低^[2,3]; 但其致病性尚未得到证实, 且 SENV 在 CHB 人群中的感染状况也未见诸报道。

中国 HBV 感染率较高, 现患 CHB 病人多达 2 800 万^[4], 因此了解 CHB 人群的 SENV 感染率对 SENV 的临床研究具有指导意义。本研究发现, 中国北方 5 城市 CHB 患者中 SENV 感染率较高(61.3%), 与健康人群(62.5%)相比较差异无显著

性。为了更加深入的了解 SENV 在中国的分布情况 ,尚需调查其他人群的感染状况 ,尤其是与血液传播关系密切的人群 (如输血后肝炎、静脉毒瘾、器官移植、血液透析等人群)。

新近提出的确定新病原的原则中有“在健康人体及其器官中应无假定病原的序列”之规定^[5]。本研究发现 CHB 患者和健康人群中均具有较高的 SENV-D/H 检出率 ,参照上述原则似可推断 SENV-D/H 可能没有直接致病性。但其他基因型是否存在致病性 ,SENV 与 HBV 或其他肝炎病毒重叠感染是否会加重肝脏损伤 ,尚待进一步研究。

本研究还发现不同地区之间 SENV 感染率差异存在显著性。这是否与地区间的生活习俗、卫生状况或环境因素等差异有关 ,进一步研究其原因可能有助于揭示 SENV 的潜在传播途径。

DNA 序列分析表明 :5 城市分离的同型 SENV 株之间核苷酸同源性较高 ,而与 GenBank 收录的 SENV-D/H 同一片段的基因序列 (AB059352、AB059353 均为日本株)同源性相对较低。因此建立各型 SENV 中国株完整基因序列 ,将有利于我国对 SENV 基础及临床各方面进行深入研究。

参 考 文 献

- 1 Primi D, Sittini A. Identification and characterization of SEN virus, a family of novel DNA viruses. *Antiviral Therapy* 2000, 5 (suppl 1): G7.
- 2 Bowden S. New hepatitis viruses: contenders and pretenders. *J Gastroenterol Hepatol*, 2001, 16: 124-131.
- 3 Umemura T, Yeo AET, Sottini A, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology*, 2001, 33: 1303-1311.
- 4 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 2.
- 5 徐晓刚, 陆志檬. 新病毒及其与肝炎的相关性. *国外医学流行病学传染病学分册* 2001, 28: 83.

(收稿日期 2002-04-10)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

从一起副伤寒疫情分析实验室病原学检查的结果

韦忠碧 罗东 陈良芳

柳城县 2001 年 10 月爆发一起甲型副伤寒,发病 292 例。此起疫情实验室病原菌血培养、粪便培养、血清肥达反应阳性率均较低,有 19.12% 血培养阳性患者的血清肥达反应呈阴性。

1. 材料和方法:

(1)标本采集:采集可疑患者(疫区内不明原因持续发热 ≥3 天,病程 1~2 周)静脉血 5.0 ml 加入 10 倍量的胆汁葡萄糖肉汤内,立即轻轻摇匀,送检。或待血凝固后,取出血清做肥达反应,血块搅碎后加入 20~30 ml 胆汁葡萄糖肉汤中,置 37℃ 培养 1~7 天,再转种血平板。采集粪便标本(病程一般 2~4 周患者)进行粪便培养。

(2)检测方法和试剂:依据国家《伤寒、副伤寒诊断标准及处理原则》(GB16001-1995)规定的实验诊断方法进行。使用的沙门菌属诊断血清生产商为北京天坛生物制品股份有限公司,批号:20010801,有效期至 2003-08-30。伤寒、副伤寒诊断用菌液生产厂家为卫生部兰州生物制品研究所,批号 20010510,有效期 2002-11-01。血平板、SFM、SS、KIA 微量生化管均由广东环凯生物科技公司生产。

2. 结果:

(1)甲型副伤寒杆菌菌落形态、生化反应及血清凝集反应:在 SS 平板上伤寒沙门菌为无色半透明菌落,在液体培养基呈均匀生长。细菌形态和染色:革兰阴性、无芽孢、无荚膜杆菌,有鞭毛,能运动。生化反应:不分解乳糖、蔗糖,能分解

葡萄糖,产酸产气,赖氨酸脱羧酶阳性,谷氨酸脱羧酶阴性,甲基红试验阳性。KIA:中段(黄)斜面(红)气体(+)H₂S(-/+),MIU:尿素(-)动力(+)靛基质(-),颜色变化(不变色、细菌扩散生长)。血清凝集反应:O 群因子:A~F⁺,O₂⁺,H 因子:H_a⁺。

(2)血、粪便标本病原菌培养和血清肥达反应结果:共进行病原菌血培养 146 份,阳性 68 份,阳性率 46.58%;粪便病原菌培养 126 份,阳性 3 份,阳性率 2.36%;血清肥达反应 144 份,其中“O”抗体阳性率 29.16%(42/144),副伤寒“A”抗体阳性率 34.72%(50/144)。在 68 例血培养阳性患者中有 13 例血清肥达反应呈假阴性。

3. 讨论:此次发生的甲型副伤寒疫情,病原菌血培养阳性率为 46.58%,而有关文献报道^[1],在病程 1~2 周的患者中采样进行血培养阳性率可达 80%~90%。其原因可能是疫情报告较迟,很大一部分患者服用抗生素后降低血培养阳性率。但此次进行病原菌血培养对象均处发热期(体温均在 37.5℃ 以上)检出病原菌的概率应该比较高。在血培养阳性的 68 例患者中有 13 例肥达反应呈阴性,假阴性率为 19.12%,这与有关文献报道^[1],有少数患者抗体阳性较迟才出现,或抗体效价水平较低,约有 10%~30% 患者肥达反应始终为阴性相符。故肥达反应对诊断副伤寒只起辅助作用,不能作为确诊的唯一依据。

参 考 文 献

- 1 彭文伟,主编. 传染病学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社, 1999. 95-96. (收稿日期 2002-09-09) (本文编辑:张林东)