

深圳市 SEN 病毒 D 和 H 亚型感染的检测与分析

欧阳玲 黄呈辉 陈汝光 刘永梅 黄建国

【摘要】 目的 了解深圳市一种新的单链 DNA 病毒(SEN)的感染流行状况。方法 以 SEN 读码框架 1 区(ORF1)核苷酸序列设计引物建立巢式聚合酶链反应(nPCR)方法。采用多重 nPCR 对 601 份来自不同人群血标本进行 SEN-DNA(D 和 H 亚型)检测,并对所分离的病毒部分基因进行克隆后测序分析。结果 在乙型肝炎患者、丙型肝炎患者、血液透析患者和吸毒人群 SENV DNA 阳性率分别为 27.8%、22.2%、26.9% 和 39.3%;在献血人群中,体检不合格献血者和丙氨酸转氨酶(ALT)异常升高献血者 SENV 阳性率分别为 28.1% 和 31.3%,均明显高于体检合格的献血者人群(15.1%)的感染率($\chi^2=8.29, P<0.01$ 和 $\chi^2=6.03, P<0.01$)。6 例来自不同人群的 SENV-D 亚型分离株部分核苷酸序列与标准株变异 $<6.8\%$;4 例来自不同人群 SENV-H 亚型分离株部分核苷酸序列与标准株核苷酸最大变异为 13.5%。结论 在深圳市高危人群(献血和吸毒人群及肝炎患者等)中 SENV 感染均广泛存在。

【关键词】 SEN 病毒;聚合酶链反应;序列分析;感染率

Detection of SEN virus (subtype D/H) infection in Shenzhen OUYANG Ling, HUANG Cheng-hui, CHEN Ru-guang, LIU Yong-mei, Huang Jian-guo. Shenzhen Bao-an Blood Center, Shenzhen 518101, China

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence of newly identified single-chain DNA virus (SEN) infection in Shenzhen. **Methods** Nested polymerase chain reaction (nPCR) was established using primers from ORF1 region of SENV genome. Six hundred and one sera samples from different populations were detected for SENV DNA (D and H subtype) by nPCR. Products of PCR were cloned into T-vector and sequenced. **Results** The positive rates of SENV DNA in different populations were as follows: 27.8% in patients with hepatitis B, 22.2% in patients with hepatitis C, 26.9% in hemodialysis patients and 39.3% in IDUs. Among blood donors, the positive rates of SENV DNA were 28.1% in unqualified blood donors, 31.3% in blood donors with an elevated ALT levels and 15.1% in qualified blood donors. The infection rates of SENV in unqualified blood donors and blood donors with an elevated ALT levels were obviously higher than in qualified blood donors ($\chi^2=8.29, P<0.01$ and $\chi^2=6.03, P<0.01$). There was a 6.8% difference of nucleotide between SENV-D standard subtype and 6 isolates with 13.5% difference of nucleotide between SENV-H standard subtype and 4 isolates from Shenzhen. **Conclusion** Results suggested that SENV infection was common in high-risk groups in Shenzhen.

【Key words】 SEN virus; Polymerase chain reaction; Sequence analysis; Prevalence

SEN 病毒(SEN)是近年发现的一种新的单股 DNA 病毒,其基因组全长约 3 900 bp 左右,且存在较大变异,根据其基因组的差异,可分为 SENV A~H 8 种亚型^[1]。有报道 SENV D 和 H 亚型在输血后不明原因肝炎患者中的检出率明显高于健康献血者,且多次输血者感染的机会较大,提示 SENV 可能与输血后肝炎的发生有关^[2]。为了解深圳地区不同人群中 SENV 感染状况,我们采用聚合酶链反

应(PCR)方法对深圳地区部分人群进行 SENV 亚型感染的检测与分析。

材料与方

1. 研究对象:18 例乙型肝炎(乙肝)患者、45 例丙型肝炎(丙肝)患者和 26 例血液透析患者来自深圳市宝安区人民医院;112 例吸毒者来自深圳市宝安区戒毒所;400 例无偿献血者来自深圳市宝安区血站。采用无菌试管采静脉血 3 ml,分离血清或血浆于 -20°C 低温保存。

2. 实验试剂: $10 \times$ Taq 酶缓冲液、Taq DNA 聚合酶、dNTPs (Promega 公司产品); pBluescript II-KS T 载体、XL1-Blue 感受态菌(美国 Invitrogen 公司产品) T4-DNA 连接酶和缓冲液(日本 TaKaRa 公司产品) Acupure DNA/RNA 提取试剂、HBV-DNA 和 HCV RNA 荧光定量 PCR 试剂(美国 Biotronics 公司产品) PCR Marker(华美生物公司产品) HBsAg 和抗-HCV ELISA 试剂(美国 Ortho 公司产品) 抗-HIV(Organon 公司产品) 梅毒 TPHA 试剂(Randox 公司产品)

3. 献血者的筛查: 所有献血者常规检测丙氨酸转氨酶(ALT)、HBsAg、抗-HCV、抗-HIV 和梅毒抗体间接血凝试验(TPHA), 各项检测阴性者为体检合格献血者组, 任何一项阳性者为体检不合格献血者组; ALT 升高 (>40 U/L) 献血者进一步用荧光定量 PCR 方法检测血标本中 HBV DNA 和 HCV RNA 对 ALT 大于正常值 2 倍以上, 而 HBV 和 HCV 检测为阴性者为 ALT 异常升高献血者组。

4. PCR 检测 SENV-DNA: 取 $50 \mu\text{l}$ 血清或血浆标本, 按 Acupure DNA/RNA 提取试剂 SENV DNA^[3]。采用巢式 PCR (nPCR) 方法检测 SENV DNA, 所用的引物分别为: SEN-P1: $5' \text{-TACCCCAACGACCAACTAGACC-3'}$; SEN-P2: $5' \text{-GTTTGTGGTGAGCAGAACGGA-3'}$; SEN-DS: $5' \text{-TAAGCAGCCCTAACACTCATCCA-3'}$; SEN-DA: $5' \text{-CAGTTGACCGCAAAGTTACAAG-3'}$; SEN-HS: $5' \text{-ATACTTTGGCTGCACCTTCTG-3'}$; SEN-HA: $5' \text{-CCAAGTACTAGGGGAACCTTA-3'}$ 。其中 SEN-P1、SEN-P2 为外引物, SEN-DS、SEN-DA 为 SENV-D 亚型特异引物, SEN-HS、SEN-HA 为 SENV-H 亚型特异引物。PCR 反应条件为: $5 \mu\text{l}$ 核酸模板加入 $25 \mu\text{l}$ 含 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 外引物、 $200 \mu\text{mol/L}$ dNTPs、Taq 酶 1 U 的 PCR 反应体系进行第 1 次扩增。循环参数 94°C 180 s 预变性后 94°C 45 s 55°C 45 s 72°C 50 s ; 扩增 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min 。取第 1 次 PCR 扩增产物 $2 \mu\text{l}$, 加入到由引物 SEN-DS/SEN-DA 或 SEN-HS/SEN-HA 组成的 PCR 反应体系中进行第 2 次扩增。循环参数 94°C 180 s 预变性后 94°C 40 s 58°C 40 s 72°C 45 s , 30 个循环, 再 72°C 延伸 5 min 。取第二次 PCR 扩增产物 $10 \mu\text{l}$ 于 2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 $0.5 \mu\text{g/ml}$) 100 V 电泳 30 min , 置紫外灯下观察, 通过标准分子量 PCR Marker 比较作出判断。

5. PCR 产物的克隆与测序: PCR 产物经纯化后克隆至 T 载体上, 转化 XL1-Blue 感受态菌, 用 LB 抗生素平板培养和蓝白斑筛选, 提取阳性质粒, 用 PCR 方法和酶切鉴定后, 阳性菌种送上海生工公司, 采用荧光标记末端终止物循环测序试剂盒, 在 DNA 自动分析仪进行测序。

6. 统计学分析: 不同人群检出率采用 SYSTAT 软件的校正卡方 (χ^2) 检验, 测序结果用 DNASTAR 软件进行同源性和系统进化树分析。

结 果

1. 深圳市几种人群中 SENV 感染的检测结果: 采用 nPCR 检测外周血标本中 SENV DNA (D 和 H 亚型), 不同人群 SENV DNA 检测结果见表 1。表中可见, 乙肝、丙肝患者和血液透析患者 SENV DNA 阳性率分别为 27.8%、22.2% 和 26.9%; 吸毒者人群 SENV DNA 阳性率高达 39.3%。在献血者人群中, 体检不合格献血者组和 ALT 异常升高献血者组 SENV 阳性率分别为 28.1% 和 31.3%, 均明显高于体检合格的献血者人群 (15.1%) 的感染率 ($\chi^2 = 8.29, P < 0.01$ 和 $\chi^2 = 6.03, P < 0.01$)。

表1 深圳地区几种人群中 SENV 检测情况

检测对象	检测人数	SENV DNA		χ^2 值	P 值*
		阳性例数	阳性率 (%)		
乙肝患者	18	5	27.8	1.16	0.281
丙肝患者	45	10	22.2	0.93	0.336
血液透析患者	26	7	26.9	1.61	0.205
吸毒人群	112	44	39.3	25.20	<0.001
献血者人群					
体检合格者	238	36	15.1		
体检不合格者	114	32	28.1	8.29	0.004
ALT 异常升高者	48	15	31.3	6.03	0.014

* 与体检合格献血者比较

2. 深圳市不同人群 SENV 分离株部分核苷酸序列的分析比较: 对 6 例分别来自献血者 (SZ-D1)、肝炎患者 (SZB-D5)、血液透析患者 (SZ-D7、SZ-D9) 和吸毒者 (SZX-D2、SZX-D3) SENV-D 亚型阳性 PCR 产物进行序列分析, 结果见图 1。这 6 例分离株之间的核苷酸同源性在 94.8% ~ 98.4% 之间, 与 SENV-D 亚型标准株 (基因库序列号为 AX025730) 相应位置核苷酸同源性在 93.2% ~ 96.4% 之间; 4 例分别来自献血者 (SZ-H7、SZ-H9)、血液透析患者 (SZ-H13) 和吸毒者 (SZ-H15) SENV-H 亚型阳性的 PCR 产物进行序列分析, 结果见图 1。这 4 例分离



图1 深圳市不同人群 SENV 分离株部分核苷酸序列与国际标准株比较

株之间的核苷酸同源性在 88.3% ~ 97.1% 之间,与 SENV-H 亚型标准株(基因库序列号为 AX025838)相应位置核苷酸同源性在 86.5% ~ 93.1% 之间。

3. SENV 深圳分离株的系统进化树分析:采用 Clustal 的邻接算法(N-J),将 6 例 SENV D 亚型分离株和 4 例 SENV H 亚型分离株与 SENV A~H 8 个亚型标准序列做一进化树分析(图 2)显示 6 例 SENV D 亚型分离株与 SENV D 亚型标准株进化距离接近,聚集在同一分支上;4 例 SENV H 亚型分离株与 SENV H 亚型标准株聚集在一起,其中 SZ-H7 和 SZ-H13 与标准株进化距离更为接近。

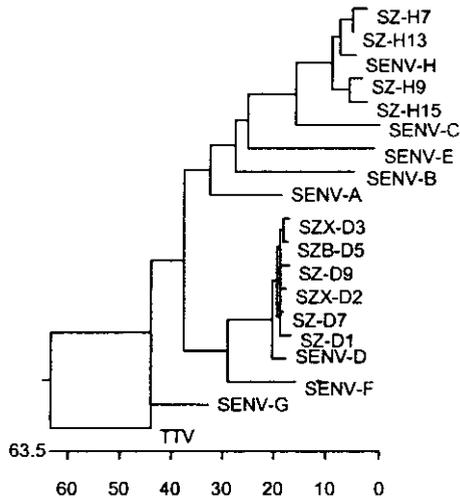


图2 深圳市 SENV 分离株的系统进化树分析

讨 论

研究发现在不同人群中的 SENV 流行情况有较大差异。在美国,静脉吸毒者 SENV-D 和 H 亚型的感染率分别为 32.7% 和 37.5%^[4],健康献血者

SENV-D 和/或 SENV-H 感染率为 1.8%,接受输血者感染率为 30%,明显高于未输血患者的对照组^{2]}。本项研究显示,深圳地区健康无偿献血者感染率为 15.1%,与日本和我国台湾报道健康人群中 SENV 感染率相近^{5,6]},但明显高于美国人群,是否东南亚地区是 SENV 的高流行区,有待进一步研究证实。研究还发现,在深圳市血液透析患者,尤其在吸毒人群中,SENV 感染率最高,同时在体检不合格的献血者中 SENV 感染率明显高于体检正常的献血者人群,提示 SENV 与 HBV 等常见经血传播病毒有相类似的传播途径,可以通过输血、吸毒等肠道外途径传播。

Umemura 等^{2]}报道在输血后非甲~戊肝病例中 SENV(D 和/或 H 亚型)感染率为 92%(11/12),且明显高于健康献血者人群,认为 SENV 与输血传播非甲~戊肝的有关。高志良等^{7]}报道采用原位 PCR 方法在 6 例非甲至非戊型肝炎患者肝组织中发现 2 例 SENV-DNA 阳性。但近来的一些流行病学调查资料发现,SENV 在病毒性肝炎和非病毒性肝炎患者中也有较高的感染率,Shibata 等^{5]}报道日本不同肝病患者中 SENV D/H 感染率在 17%~46% 之间;Kao 等^{6]}报道台湾地区慢性肝炎和肝癌 SENV 感染率为 41%~76%。本项研究显示深圳地区肝炎患者中 SENV 感染率与体检正常的献血人群差异无显著性,虽然本次调查发现 ALT 异常升高献血者中,SENV 感染率高于体检正常的献血者人群,但还没有充分数据说明 SENV 是一种新的肝炎致病因子。

本项研究对分离自不同人群 SENV 流行株部分基因进行测序测定,结果显示 6 例来自深圳地区不同

人群 SENV-D 亚型分离株之间的核苷酸变异 < 5.2% 与 D 亚型标准株相应位置核苷酸同源性差异在 6.8% 以内, 反映不同地区和人群中 SENV D 亚型 ORF1 部分基因相对保守, 变异不大, 而 4 例来自不同人群 SENV-H 亚型分离株之间核苷酸最大差异达 11.7% 与 SENV-H 亚型标准株相应位置核苷酸变异最大为 13.5% 表明不同个体之间和不同地域之间的 SENV H 亚型分离株存在一定的差异。SENV 发现时间不久, 对其生物学特性还缺乏足够的了解, 有必要进一步开展 SENV 感染流行病学研究。

参 考 文 献

1 Tanaka Y, Primi D, Wang RY, et al. Genomic and molecular evolutionary analysis of a newly identified infectious agent (SEN virus) and its relationship to the TT virus family. J Infect Dis, 2001, 183:359-367.

- 2 Umemura T, Yeo AET, Sottini A, et al. SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. Hepatology, 2001, 33:1303-1311.
- 3 刘永梅, 黄呈辉, 陈汝光, 等. 聚合酶链反应检测 SEN 病毒 D 亚型方法的建立. 中华检验医学杂志 2002, 25:26-28.
- 4 Wilson LE, Umemura T, Astemborski J, et al. Dynamics of SEN virus infection among injection drug users. J Infect Dis, 2001, 184:1315-1319.
- 5 Shibata M, Wang RY, Yoshida M, et al. The presence of newly identified infectious agent (SEN virus) in Japan. J Infect Dis, 2001, 184:400-404.
- 6 Kao JH, Chen W, Lai MY, et al. Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. J Infect Dis, 2002, 185:389-392.
- 7 高志良, 彭晓谋, 姚春澜. 广州地区肝病组织 SEN-V 的发现. 中华传染病杂志 2002, 20:30-32.

(收稿日期: 2002-07-31)

(本文编辑: 尹廉)

· 疾病控制 ·

3 509 名煤矿井下工人血压分类及危险因素探讨

马兰 陈彦龙

高血压病是常见的心血管病, 我们于 2001 年 3 月至 2002 年 6 月对宁夏煤业集团石嘴山矿区井下工人进行了高血压病流行病学调查。

1. 对象与方法: 对象为宁夏煤业集团石嘴山矿区井下男职工共计 3 509 人, 年龄 22~74 岁, 平均 45 岁。调查对象均填流行病学调查表。详细询问病史, 排除继发性高血压, 使用经校正的水银柱式血压计, 取坐位右上臂, 每次间隔 30 s 以上, 测 3 次, 对血压偏高者休息 30 min 后再测 3 次取均值。血压分类标准采用美国 JNC-VI 的成人(年龄 ≥ 18 岁) 血压分类标准。

2. 结果: 平均收缩压为 (121.2 ± 2.72) mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 平均舒张压为 (75.8 ± 1.64) mm Hg。高血压患病率为 18.55%。明显高于石嘴山市男性高血压患病率 (8.01%), 且差异有非常显著性 ($u = 21.3, P < 0.01$)。井下工人年龄与血压的关系见表 1。本组资料家族有高血压病史者, 其患病率为 58.7%, 家族无高血压病史者, 其患病率为 4.5%。经统计学分析表明两者差异有非常显著性 ($u = 36.1, P < 0.01$), 说明家族史与高血压病关系密切。超重或肥胖也是血压升高的重要危险因素, 本组平均体重指数为 23.42 ± 3.22 。体重指数越大, 患病率越高, 呈正相关 [$r = 0.956, t(r) = 0.951, P < 0.01$], 体重指数 ≥ 24 其患病率为 21.49%, 是 < 24 患病率 (6.76%) 的 3.2 倍, 差异非常显著 ($\chi^2 = 218.25, P < 0.001$)。

表1 石嘴山矿区不同年龄组井下工人高血压患病情况

年龄组 (岁)	高血压患病情况			宁夏(1991年)		
	受检人数	病例数	患病率 (%)	受检人数	病例数	患病率 (%)
20~	234	3	1.282	1 064	33	1.680
30~	900	58	6.444	1 364	58	4.250
40~	957	115	12.017	931	69	7.410
50~	459	93	20.261	649	93	14.330
60~	959	382	39.833	531	110	20.720
合计	3 509	651	18.552	4 539	363	7.997
标化率			15.002			9.01

3. 讨论: 煤矿井下职工高血压病标化患病率明显高于宁夏 20 岁以上男性标化患病率, 也明显高于 1991 年全国高血压患病率 (11.26%)。主要因素为: ①井下工人长期处于高温 (平均 25℃) 高湿度 (95%) 的环境中, 体热不能很好蒸发, 体温升高, 心率加快, 心输出量增加, 血压升高。②噪声及井下高危作业环境, 使工人长期处于高度精神紧张状态, 造成大脑皮层功能紊乱, 使机体产生一系列的生理反应。③粉尘及有害气体刺激血管收缩使血压升高, 而工作面大气氧分压降低, 造成缺氧和高碳酸血症, 引起心率加快, 心输出量增加, 血压上升。基于上述因素长期协同作用, 造成工人血压持续升高。

作者单位: 753203 石嘴山, 宁夏煤业集团石嘴山中心医院

(收稿日期: 2003-01-24)

(本文编辑: 尹廉)