

分类号：
学 号： 2012109057

密 级： 无
单位代码： 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



石河子地区戊型肝炎病毒感染的 基因型研究

学 位 申 请 人	夏小伟
指 导 教 师	左维泽
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	病毒性肝炎的基础与临床 研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2015年5月

分类号:
学 号: 2012109057

密 级: 无
单位代码: 10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



石河子地区戊型肝炎病毒感染 的基因型研究

学 位 申 请 人	夏小伟
指 导 教 师	左维泽
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	病毒性肝炎的基础与临床 研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2015年5月

**The Infection and Partial Nucleotide Sequencing of Hepatitis E Virus
for People in Shihezi of Xinjiang Province**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Xia Xiaowei

(Internal Medicine)

Supervisor: **Zuo Weize**

May,2015

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：



时间：2015年6月10日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：



时间：2015年6月10日

导师签名：



时间：2015年6月10日

中文摘要

目的 新疆是戊型肝炎的高发区，在我国石河子地区 HEV 在人群中的流行情况的详细报告较少，我们希望通过本实验研究探讨戊型肝炎病毒在石河子地区的人群血清流行病学和分子流行病学的情况，以期对今后 HEV 的预防和进一步研究奠定良好的理论基础。

方法 用 ELISA 试剂盒检测人血清中的抗-HEV 抗体，对部分血清、粪便标本进行 HEV RNA 检测，并对 PCR 阳性产物进行克隆测序，并进行部分基因序列分析。

结果 1. 本次调查共检测 3513 人，总体抗体阳性率为 26.10%，其中，男性 1678 人，抗体阳性率为 25.98%，女性 1835 人，抗体阳性率为 26.21%。城镇人口 2417 人，抗体阳性率为 17.21%；乡村人口 1096 人，抗体阳性率为 45.71%。不同年龄组人群抗体阳性率差异有显著性，且随着年龄的增长抗体阳性率呈增长趋势。不同职业人群中，农牧民的抗体感染率最高，为 46.70%。不同民族人群阳性率差异有显著性。2. 本研究为在同一急性戊型肝炎患者的血清和粪便中分别检测到 3 份 HEV RNA 阳性样本，序列分析显示石河子各株间氨基酸同源性在 96.7%~100%，核苷酸同源性均在 84.5%~93.8%。选取不同基因型 ORF2 的部分核苷酸与石河子地区 3 株 HEV (Sh-H-r、Sh-H-f-1、Sh-H-f-2) 进行比较分析，石河子地区 3 株均属基因 IV 型。

结论 石河子地区抗-HEV 抗体阳性率为 26.10%，具有较高的感染率。石河子地区 3 株 HEV 均属基因 IV 型。

关键词 戊型肝炎病毒；流行病学；基因型

论文类型 A(基础研究)

Abstract

Objective Xinjiang is the high incidence area of HE in Shihezi area. There are less detailed reports about HEV in the crowd prevalence, we hope that the passage of this experimental study of HEV in Shihezi in the crowd epidemiology and molecular epidemiology serum, the situation with a view to the future HEV further study and the prevention lay a good theoretical basis.

Method By ELISA for detection of the anti-serum - HEV antibody, for some serum and stool specimens for HEV RNA detection, and positive PCR products were cloned and sequenced and partial gene sequence analysis.

Result 1. The overall positive rate of anti-HEV IgG was 26.10% in a total of 3513 people. While, in 1678 male and 1835 female, the positive rate was 25.98% and 26.21%. The antibody positive rate was 17.21% and 45.71% in urban population 2417 people and rural population of 1096 people. The positive rate of anti-HEV IgG increased with age. Farmers and herdsmen antibodies infection rate that was 46.70% was highest, in different occupational groups of people. Different ethnic people have significant positive difference. 2. This study in the serum of patients with acute HEV, feces detected three HEV RNA positive sample, sequence analysis showed that the strains between Changchun amino acid homology of 96.7% to 100%, nucleotide homology are 84.5% to 93.8%, select different genotypes ORF2 part of nucleotide and Shihezi three hepatitis E viruses (Sh-H-r, Sh-H-f-1, and Sh-H-f-2) conducted a comparative analysis, all of three Shihezi hepatitis E viruses are Type IV.

Conclusion The results of HEV antibody positive rate was 26.10% in Shihezi, with higher infection rates. Shihezi three HEV genes are type IV.

Key Words hepatitis E virus ; epidemiology ; genotype

Type of thesis A (Basic research)

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
中英文缩略表.....	V
前言.....	1
第一部分 石河子地区戊型肝炎血清流行病学调查研究	
实验一的材料与方法.....	3
实验一的结果.....	5
实验二的材料与方法.....	7
实验二的结果.....	8
第二部分 戊型肝炎病毒基因型研究	
材料与方法.....	10
结果.....	19
讨论.....	21
结论.....	23
参考文献.....	24
综述.....	25
致谢.....	35
作者简介.....	36
导师评阅表.....	37

英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补DNA
DNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
DNase	Deoxyribonuclease	脱氧核糖核酸酶
dNTP	Deoxy NTP	脱氧核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二巯基苏糖醇
E.coli	Escherichia coli	大肠杆菌
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid	二乙胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
HAV	Hepatitis A virus	甲型肝炎病毒
HBV	Hepatitis B virus	乙型肝炎病毒
HCV	Hepatitis C virus	丙型肝炎病毒
HEV	Hepatitis E virus	戊型肝炎病毒
HGV	Hepatitis G virus	庚型肝炎病毒
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect immunofluorescence assay	间接免疫荧光分析
Kana	Kanamycin	卡那霉素
Kb	Kilobase	千碱基
kDa	Kilodalton	千道尔顿
TE	Tris-EDTA buffer	Tris-EDTA缓冲液
UTR	Untranslated region	非翻译区
NSP	non-structure protein	非结构蛋白
OD	Optical density	吸光度
OPD	Ortho-phenylene-diamine	邻苯二胺
ORF	Open reading frame	开放阅读框架
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-PCR	Reverse transcription PCR	逆转录-聚合酶链式反应
poly (C)	poly cytosine tract	胞嘧啶富集区

前 言

戊型肝炎 (Hepatitis E, HE) 是由戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus, HEV) 引起的一种经粪-口途径传播的严重危害人类健康的急性自限性病毒性肝炎。据不完全统计, 全球目前已有 23 亿人口感染了HEV^[1-2], 所以说HE已成为全球关注的公共卫生问题。在急性肝炎病例中, 尤其是在亚、非等发展中国家, HEV感染可居首位。随着对HEV感染宿主研究的开展, 已在多种动物中检测到抗HEV 抗体或病毒RNA, 同时, 还发现, 吃生的或未煮熟的肉制品和奶制品是导致HEV感染病例发生的一个重要原因, 它已被证实, 是一个新兴的人畜共患传染病^[3-9]

HEV 属于戊型肝炎病毒科 (Hepevirida family) 戊型肝炎病毒属(Hepevirus genus), 形状呈球形, 无包膜, 大小约为 27-34nm, 20 面体, 表面不规则, 为单股正链的RNA病毒。该病毒活性不稳定, 对一般的化学试剂敏感, 在-70℃~8℃之间保存易降解。HEV全基因组长约为 7.5kb; 其基因组结构为 5' NCR-NS-S-NCR-Poly(A) 3'; 其中 5' NCR 含有 27 nt, 3' NCR 含有 48 nt, 全基因组含有三个相互重叠的开放阅读框架(open reading frame, ORF)^[10-11]。其中ORF2 是HEV的主要结构基因编码区, 编码着病毒衣壳蛋白。通过分析pORF2 aa序列, 其结果显示具有典型的病毒衣壳蛋白特性, 并且带有明显的序列样信号片段同时包含有潜在的切割位点(PA/PPP)。根据研究结果显示^[12], HEV仅有一个血清型, 但基因型却远远不止一个, 目前, HEV的基因分型多采用的是ORF2 基因或基因片段, 学术界多数认为HEV有 5 个基因型。其中, 基因 I 型是缅甸类似株基因型 (也称亚洲基因型), 以缅甸株为代表, 又包括中国的北京、新疆、杭州和深圳等地区分离出HEV病毒株、吉尔吉斯斯坦株、印度株、巴基斯坦株及非洲株; 基因 II 型是墨西哥基因型, 此型仅仅为墨西哥株; 基因 III 型是美国基因型, 包括人的HEV US-1 和US-2 以及猪的HEV病毒株; 基因 IV 型是中国基因型, 包括从广州分离得到的两株HEV G-9 和G-20, 及从辽宁、河北、厦门和台湾等地区的急性散发性戊型肝炎患者的血清或粪便标本中分离得到的HEV变异株; 基因 V 型目前仅发现于禽类, 可引起鸡的大肝脾病, 也可越种感染猪、火鸡等。其中, 基因 I 型和 II 型仅发现于人类, III型和IV型在人与动物间均有发现, 为人兽共患^[2]。

对于HE的临床诊断, 主要依靠流行病学、临床表现以及实验室检查来综合判断。流行病学主要考虑是否接触有急性病毒性肝炎患者或者到过HE高发地区等; 传播途径是否有不解饮食或生食肉、奶等; 易感人群, 人群普遍易感。该病最常见于卫生条件较差的偏远地区, 通常可通过被污染的水和食物引起HE的爆发或流行。HE的临床表现与甲型肝炎相似, 多起病急骤, 常可伴有发热、畏寒、食欲减退、乏力、恶心、肝脾肿大以及肝功异常等, 一般很少见慢性病例, 但黄疸型病肝炎和重症肝炎的比例较高, 病死率高于其他类型的病毒性肝炎。目前, 实验室检查主要凭借肝功能检查、病毒抗原或抗体检测以及对病毒RNA的检测。HEV的抗原检测, 主要使用患者恢复期的血清作为抗体, 来检测急性期患者的粪便及胆汁中病毒的抗原, 通过免疫电镜观察符合率接近 100%; HEV

的抗体检测,检测方法包括有酶联免疫、Western Blot等,这些方法在日常工作和研究中均有应用。目前,HEV抗原、抗体检测试剂盒的研发工作已取得了明显的成效,当前,用于临床上检测血清抗HEV抗体的试剂盒多是围绕ORF2 或ORF3 而设计。国内外很多商家生产了一整套用于检测IgG、IgM、血清总抗体,以及检测抗原的试剂盒,其特异性和灵敏性都比较好^[2,13]。另外,利用RT-PCR技术、免疫荧光等方法,可以检测肝组织、血清以及粪便标本中的HEV-RNA。

HE主要流行于亚洲、非洲和拉丁美洲的一些发展中国家,但在美国、英国、法国以及日本等发达国家中,散发病例在一年四季中也常有发生。在我国,各省、市、自治区均有HE病例的发生,其中新疆、内蒙、河北、山东、辽宁、吉林和北京等地曾发生过HE的暴发或流行。根据卫生部全国法定传染病疫情报告分析来看,自2003年以来,我国HE的发病情况呈现一种上升的态势;2009年共报告HE病例20275例,较2008年同期增加了8.89%,其中死亡24例。同时,HE在急性病毒性肝炎病例中所占的比例已从2003年的8.85%上升为2009年的31.62%^[14]。

1986~1988年在新疆的南疆地区发生了当时世界上规模最大的一次HE大流行,持续时间长达20多个月,发病人数为119280例,死亡近千人,其流行规模震惊世界^[2,14]。此后,新疆地区的HEV研究倍受关注。2011年,钟崇芳等^[15]对大流行后的新疆和田地区人群进行了血清流行病学调查,结果显示HEV-IgG阳性率为34.98%;虽然,这一结果与内地的HEV-IgG阳性率相似,但是在11岁和21岁以下年龄组中HEV-IgG阳性率分别为20.49%和54.17%,明显高于内地报道的2.5%和7.4%,证明在该地区中儿童与青少年的HEV的隐性感染仍然是很严重的问题。该年龄段群体属于1989年之后出生的新一代,他们的抗体阳性水平较高,反应了新感染者的比例仍然在增加。同时,他们的研究显示在不同民族人群中,HEV-IgG阳性率无差异,与1986-1989年大流行中维吾尔族人群的感染率高于汉族人群有明显不同。其研究结果提示:当前新疆地区的HEV感染已经发生了变化。又根据新疆维吾尔自治区传染病网络直报系统中的HE发病数据,2010、2011、2012年,新疆维吾尔自治区HEV人群发病率分别为0.91/10万、1.15/10万、1.32/10万,表现出了明显的上升趋势。

本课题选取新疆维吾尔自治区石河子地区为研究现场,一方面对辖区范围内不同人群和动物群HEV感染状况的调查,分析抗HEV-IgG抗体在不同宿主间的感染;另一方面,本课题采用巢式RT-PCR方法对石河子市急性散发性HE患者的血清和粪便中的HEV-RNA进行检测,通过对分离株的序列分析,来明确石河子地区流行的HEV基因型,了解本地区感染的HEV基因型分布及其流行趋势,为HE的防治提供科学依据。所以说,为进一步了解新疆范围内HEV感染的情况,开展此次研究就十分有必要。

第一部分 石河子地区戊型肝炎 血清流行病学调查研究

实验一 人群戊型肝炎病毒血清流行病学研究

材料与方法

(Materials&Methods)

1.1 调查对象

采用分层随机抽样方法将石河子地区按行政区划分为市区、石河子镇、下野地、安集海和莫索湾 5 个片区，在每个片区随机抽取 2~3 个乡(村)或社区，按照人口系数以家庭为单位随机抽取居住 6 个月以上，年龄在 1~59 岁的居民为调查对象。共调查 3513 人。

1.2 标本采集

按照流行病学调查要求。采用入户调查方法，统一调查问卷，对确定的调查个体进行现场流行病学调查，同时由专业人员对目标人群采集静脉血 2ml，统一编号，分离血清于-20℃冰柜中冷冻保存待检。

1.3 试剂与仪器

1) 戊型肝炎病毒 IgG 抗体诊断试剂盒（酶联免疫法）：北京万泰生物药业有限公司产品；

2) 蒸馏水：自制；

3) 酶标仪：德国；

4) 洗板机：德国；

5) 恒温培养箱：上海医疗仪器厂；

6) 台式振荡器：国产 HZ881K 台式振荡器；

7) 低温冰箱：日本三洋产 MDF-382E 型；

8) 离心机：德国 Thermo Scientific；

9) 10ul、100ul、200ul 微量移液器：德国 Eppendorf 产品；

10) 一次性 10ul、100ul、200ul 枪头、离心管、炮弹管：上海生物工程公司产品。

1.4 检测方法

1.4.1 检验原理：

采用间接法酶联免疫吸附试验原理。微孔条上预包被的基因重组 HEV 抗原，可与

样品中抗 HEV 抗体结合，洗板后加入酶标试剂进行二次温育。当样品中存在 HEV-IgG 抗体时，将形成“包被抗原-抗体-酶标抗体”复合物。复合物上连接的 HRP 催化显色剂反应，生成蓝色产物，终止反应后变为黄色。若样品中无 HEV-IgG 抗体时，不显色。

1.4.2 检验方法：

- 1) 配液：20 倍稀释浓缩洗涤液，可使用蒸馏水或去离子水；
- 2) 编号：按微孔板顺序编号标本，每次试验设阴、阳及空白对照，其中阴性对照 2 孔，阳性对照 1 孔和空白对照 1 孔；
- 3) 稀释：将 100ul 标本稀释液加入到每孔中，空白孔不加；
- 4) 加样：再依次加入待检标本或阴阳对照各 10ul，振荡器上振荡 10 秒混匀（空白对照孔不加）；
- 5) 温育：封板膜封严后放置温育箱内，37℃温育 30 分钟；
- 6) 洗涤：轻轻揭开封板膜，向反应孔内加入 200ul 洗涤液洗涤 5 次，最后一次洗涤后，扣干反应孔内的洗涤液；
- 7) 加酶：依次加入 100ul 酶标试剂，空白孔不加；
- 8) 温育：方法同 5；
- 9) 洗涤：方法同 6；
- 10) 显色：依次加入 A、B 显色剂液各 1 滴，振荡器振荡 10 秒混匀，室温下避光显色 15 分钟；
- 11) 测定：依次加入终止液 1 滴，振荡器振荡 10 秒混匀，在反应结束 10 分钟内测定结果。酶标仪的波长设定在 450nm 处；调零空白孔后测定各孔 A 值。

1.4.3 参考范围：

- 1) 正常的阴性对照范围：一般情况下，阴性对照孔的 A 值 \leq 0.1（若有 1 孔阴性对照孔的 A 值大于 0.1 应放弃该孔，若有两孔或两孔以上的阴性对照孔 A 都大于 0.1，应重复实验）。
- 2) 正常的阳性对照范围：一般情况下，阳性对照孔的 A 值 \geq 0.8。

1.4.4 检验结果的解释：

- 1) 计算临界值：临界值=0 阴性对照孔 A 值的平均值+16。（若阴性对照孔 A 值都小于 0.03，按 0.03 计算）。
- 2) 判断阳性：样品的 A 值 \geq 临界值，判定为 HEV-IgG 抗体反应阳性。
- 3) 判断阴性：样品的 A 值<临界值，判定为 HEV-IgG 抗体反应阴性。

1.5 统计学处理

采用 Epidata 3.2 数据库软件对所有检测数据进行双盲录入，运用 SPSS 17.0 软件进行数据分析，采用描述性统计分析，组间比较采用 X^2 检验， $P<0.05$ ，认为差异有统计学意义。

结果

(Results)

2.1 戊肝 IgG 抗体检出情况

被调查的 3513 名居民，戊肝 IgG 抗体阳性数为 917 例，阳性率为 26.10%；其中男性检测数 1678 例，阳性数 435 例，阳性率为 25.98%；女性检测数 1835 例，阳性数 481 例，阳性率为 26.21%；两组阳性率差异无统计学意义 ($X^2=0.0386$, $P>0.05$ ；表 1)。

表 1 不同性别戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

性别	检测数	阳性数	阳性率(%)
男	1678	435	25.98
女	1835	481	26.21
合计	3513	917	26.10

2.2 不同年龄组戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

将 3513 名 1~59 岁居民分成 6 个年龄组段，人群 HEV-IgG 抗体阳性水平在各个年龄组间分别为 8.19%、13.22%、21.74%、34.65%、42.73%、48.05%，平均抗体阳性率为 26.10%。不同年龄组间阳性率差异有统计学意义 ($X^2=397.13$, $P<0.05$ ；表 2)。

表 2 不同年龄组戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

年龄段	检测数	阳性数	阳性率(%)
1~	781	61	8.19
10~	605	80	13.22
20~	483	105	21.74
30~	681	236	34.65
40~	578	247	42.43
50~	385	185	48.05
合计	3513	917	26.10

2.3 不同职业人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

3513 名被调查者人群中 HEV-IgG 抗体阳性水平在各个职业间分别为 3.60%、10.32%、46.70%、36.65%、35.56%、22.14%、44.13%、36.53%，平均抗体阳性率为 26.10%。在不同职业组间戊肝 IgG 抗体阳性率差异有统计学意义 ($X^2=408.41$, $P<0.05$ ；表 3)。

表 3 不同职业人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

职业	检测数	阳性数	阳性率(%)
散居儿童	278	10	3.60
学生	1211	125	10.32
农牧民	803	375	46.70
工人	412	151	36.65
干部	45	16	35.36
医护人员	384	85	22.14
个体从业	213	94	44.13
其他	167	61	36.53
合计	3513	917	26.10

2.4 不同居住环境人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

3513 名被调查居民居住地环境不同, 人群HEV-IgG抗体阳性水平在各个地域间分别为 17.21%、45.71%, 平均抗体阳性率为 26.10%。各地域人群戊肝IgG抗体阳性率之间的差异有统计学意义($X^2=317.53$, $P<0.05$; 表 4)。

表 4 不同居住环境人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

居住地	检测数	阳性数	阳性率(%)
城镇	2417	416	17.21
乡村	1096	501	45.71
合计	3513	917	26.10

2.5 不同民族人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

3513 名被调查者依据本地区民族特点可分为四组, 人群HEV-IgG抗体阳性水平在各个民族间分别为 29.35%、20.31%、18.96%、18.27%, 平均抗体阳性率为 26.10%。各民族组间人群戊肝IgG抗体阳性率差异有统计学意义($X^2=39.50$, $P<0.05$; 表 5)。

表 5 不同民族人群戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

民族	检测数	阳性数	阳性率(%)
汉族	2354	691	29.35
维吾尔族	576	117	20.31
哈萨克族	479	90	18.97
其他	104	19	18.27
合计	3513	917	26.10

实验二 动物群戊型肝炎病毒血清流行病学研究

材料与方法

(Materials&Methods)

1.1 标本来源

在石河子地区采集羊血样品 93 份；在玛纳斯县的乐土驿镇、包家店镇、北五贫镇、兰州湾镇、旱卡子滩哈萨克族乡、玛纳斯镇、塔西河哈萨克族乡等 7 个乡（或镇）随机抽取的 200 份牛血清样本；在石河子地区采集鼠类样品 161 份。

1.2 ELISA 诊断试剂盒

双抗原夹心 ELISA 试剂盒为北京万泰生物药业公司产品。

1.3 主要器材

同试验一。

1.4 方法

同试验一。

1.5 结果判定

同试验一。

1.6 统计学分析

同试验一。

结果

(Results)

2.1 不同羊群间戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

石河子地区羊群间HEV-IgG抗体阳性水平在各羊场分别为 33.33%、37.50%、20.83%、4.76%，平均阳性率为 27.31%。各羊场之间戊肝IgG抗体阳性率差异无统计学意义 ($X^2=7.75$, $P>0.05$; 表 6)

表 6 石河子地区的羊群 HEV-IgG 抗体检测结果

地 区	检测数	阳性数	阳性率(%)
石河子 羊群1	24	8	33.33
羊群2	24	9	37.50
羊群3	24	5	20.83
羊场1	21	1	4.76
合计	93	23	27.31

2.2 不同牛群间戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

玛纳斯牛群间HEV-IgG抗体阳性水平在各乡镇分别为 0.00%、0.00%、0.00%、3.33%、5.00%、0.00%、0.00%，平均阳性率为 1.50%。各乡镇之间牛的戊肝IgG抗体阳性率差异无统计学意义 ($X^2=5.98$, $P>0.05$; 表 7)。

表 7 不同牛群间戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

来源	检测数	阳性数	阳性率(%)
玛纳斯镇	13	0	0
乐土驿镇	30	0	0
包家店镇	39	0	0
北五岔镇	30	1	3.33
兰州湾镇	40	2	5.00
早卡子滩哈萨克族乡	40	0	0
塔西河哈萨克族乡	8	0	0
合计	200	3	1.50

2.3 不同地区间老鼠戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

老鼠的HEV-IgG抗体阳性水平在石河子各地区间分别为 25.00%、0.00%、13.64%、0.00%、33.33%、0.00%、18.18%，平均阳性率为 18.01%。各地区间老鼠的戊肝IgG抗体阳性率差异无统计学意义 ($X^2=8.95$, $P>0.05$; 表 8)。

表 8 161 份石河子地区老鼠血清阳性率统计结果 (1)

血清来源	检测数	阳性数	阳性率(%)
150团良五连与149团交界处	64	16	25.00
133团15连	8	0	0
149团17连	44	6	13.64
149团54公里处	13	0	0
121团7连	9	3	33.33
136团	1	0	0
150团良四连	22	4	18.18
合计	161	29	18.01

2.4 不同鼠种间戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

石河子地区老鼠的HEV-IgG抗体阳性水平在不同鼠种间分别为 25.68%、0.00%、0.00%、17.65%，平均阳性率为 18.01%。各鼠种间戊肝IgG抗体阳性率差异无统计学意义 ($X^2=5.62$, $P>0.05$; 表 9)。

表 9 161 份石河子地区老鼠血清阳性率统计结果 (2)

老鼠种类	检测数	阳性数	阳性率(%)
子午沙鼠	74	19	25.68
怪柳沙鼠	1	0	0
林姬鼠	1	0	0
大沙鼠	85	10	17.65
合计	161	29	18.01

2.5 不同动物间戊肝 IgG 抗体阳性率分布情况

石河子地区范围内各种动物的HEV-IgG抗体阳性水平在不同动物间分别为 27.31%、1.50%、18.01%，平均阳性率为 12.12%。各动物间戊肝IgG抗体阳性率差异有统计学意义 ($X^2=135.72$, $P<0.05$; 表 10)。

表 10 不同动物间戊肝 IgG 抗体阳性率结果

动物类别	检测数	阳性数	阳性率(%)
羊	93	23	27.31
牛	200	3	1.50
老鼠	161	29	18.01
合计	454	55	12.12

第二部分 基因分型

材料和方法

(Materials&Methods)

1 材料

1.1 标本来源

从石河子大学医学院第一附属医院感染科收集急性戊肝病人的血清和粪便标本，其中依据 2000 年西安会议修订的诊断标准来确定急性戊肝的诊断。血清和粪便标本经处理后冻存于-70 °C 冰箱中备用。

1.2 菌种和克隆载体

菌种为大肠杆菌 JM109，由军事医学科学院病毒实验室提供。克隆载体 Pmd18-T 由宝生物工程(大连)有限公司生产。

1.3 主要的酶和其他试剂

- 1) 超纯 RNA 提取试剂盒：北京康为世纪生物科技有限公司；
- 2) PCR 产物胶回收试剂盒：北京全式金生物技术有限公司；
- 3) TRIZOL：美国 MD；
- 4) Taq DNA 聚合酶、AMV 反转录酶：Promega 公司产品；
- 5) dNTP：中科开瑞公司；
- 6) Rnasin：华美公司；
- 7) 限制性核酸内切酶 EcoR I 和 Pst I：Fermentas 公司生产；
- 8) CW0500 高纯度质粒小提试剂盒：北京康为世纪生物科技有限公司；
- 9) 氯仿、异丙醇分析纯：天津市第一化学试剂厂生产；
- 10) 6×Loading buffer：Takara 宝生物工程(大连)有限公司；
- 11) 氨苄青霉素：石药集团生产；

1.4 主要溶液的配制：

1)10×TBE Buffer (pH8.3)

组份浓度:890 mM Tris-硼酸, 20 mM EDTA

配制量:1 L

配制方法:

①称量下列试剂，置于 1 L 烧杯中；

Tris	108 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	7.44 g
硼酸	55 g

②向烧杯中加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解；

③加去离子水将溶液定容至 1 L 后，室温保存。

2) 溴乙锭 (10 mg/ml)

组份浓度: 10 mg/ml 溴乙锭

配制量: 100 ml

配制方法:

①称量 1 g 溴乙锭，加入到 100 ml 容器中；

②加入去离子水 100 ml，充分搅拌数 h 完全溶解溴乙锭；

③将溶液转移至棕色瓶中，室温避光保存；

④溴乙锭的工作浓度为 0.5 g/ml。

注意：溴乙锭是一种致癌物质，必须小心操作。

3) Agarose 凝胶

配制方法:

①配制适量的电泳及制胶用的缓冲液(通常是 0.5×TBE 或 1×TAE)；

②根据制胶量及凝胶浓度，准确称量琼脂糖粉，加入适当的锥形瓶中；

③加入一定量的电泳缓冲液(总液体量不宜超过锥形瓶的 50%)；

注：用于电泳的缓冲液和用于制胶的缓冲液必须统一。

④在锥形瓶的瓶封上保鲜膜，并在膜上扎些小孔，然后在微波炉中加热融化琼脂糖。加热过程中，当溶液沸腾后，请戴上防热手套。小心摇动锥形瓶。使琼脂糖充分均匀融化。此操作重复数次，直至琼脂糖完全融化。必须注意，在微波炉中加热时间不宜过长，每次当溶液起泡沫沸腾时停止加热，否则会引起溶液过热暴沸，造成琼脂糖凝胶浓度不准，也会损坏微波炉。融化琼脂糖时，必须保证琼脂糖充分完全融化，否则，会造成电泳图像模糊不清；

⑤使溶液冷却至 60℃左右，如需要可在此时加入溴乙锭溶液(终浓度 0.5 μg/ml)。并充分混匀；

注：溴乙锭是一种致癌物质。使用含有溴乙锭的溶液时，请戴好手套。

⑥将琼脂糖溶液倒入制胶模中，然后在适当位置处插上梳子。凝胶厚度 一般在 3~5 分钟之间；

⑦在室温下使胶凝固(大约 30 分钟~1 小时)，然后放置于电泳槽中进行电泳。

注：凝胶不立即使用时，请用保鲜膜将凝胶包好后在 4℃下保存，一般可保存 2~5 天。

4) LB 液体培养基

组份浓度：1%(W/V)Tryptone(胰蛋白胨)，0.5%(W/V)Yeast Extract(酵母提取物)，1%(W/V)NaCl

配制量：1 L

配制方法:

①称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中；

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

- ②加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解；
- ③滴加 5 N NaOH(约 0.2 ml)，调节 pH 值至 7.0；
- ④加去离子水将培养基定容至 1 L；
- ⑤高温高压灭菌后，4℃保存。

5) LB 固体培养基

组份浓度：1%(W/V)Tryptone(胰蛋白胨)，0.5%(W/V)Yeast Extract(酵母提取物)，1%(W/V)NaCl，1.5%(W/V)琼脂粉

配制量：1 L

配制方法：

- ①称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中；

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

- ②加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解；
- ③滴加 5 N NaOH(约 0.2 ml)，调节 pH 值至 7.0；
- ④加去离子水将培养基定容至 1 L，加入琼脂粉 15g；
- ⑤高温高压灭菌后，4℃保存。

6)LB/Amp 培养基

组份浓度：

1%(W/V)	Tryptone
0.5%(W/V)	Yeast Extract
1%(W/V)	NaCl
0.1 mg/ml	Ampicillin

配制量:1 L

配制方法：

- ①称取下列试剂，置于 1 L 烧杯中；

Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g

- ②加入约 800 ml 的去离子水，充分搅拌溶解；
- ③滴加 5 N NaOH(约 0.2 mL)。调节 pH 值至 7.0；
- ④加去离子水将培养基定容至 1 L；

⑤高温高压灭菌后，冷却至室温；

⑥加入 1 ml Ampicillin(100 mg/ml)后均匀混合,4℃保存。

1.5 主要实验仪器

- 1) 超净工作台：江苏苏净集团安泰公司生产 SW-C1-IFD 型；
- 2) 低温高速离心机：SIGMA 公司生产 949412-16 型；
- 3) 恒温培养箱：上海医疗仪器厂；
- 4) 温控培养摇床：武汉科学仪器厂；
- 5) 凝胶成像扫描仪：BIO-RAD 公司生产 GEL-DOC2000 型；
- 6) 电泳槽：上海医疗仪器厂；
- 7) PCR 循环仪：Hybrid 公司生产；
- 8) 紫外分光光度仪：上海康华生化仪器制造厂生产，ZF 型；
- 9) 台式振荡器：国产 HZ881K 型；
- 10) 电子天平（万分之一克）：MonoBloc 公司生产 AB204-E 型；
- 11) 调温水浴箱：上海医疗仪器厂；
- 12) 大孔梳齿：北京六一厂；
- 13) 高压蒸汽灭菌器：日本三洋公司生产 ML-S-3020 型；
- 14) 4℃、-20℃、-80℃冰箱：海尔公司生产；
- 15) 漩涡混合器：太仓市科教器材厂生产 WH861 型；
- 16) 雪花制冰机：美国 GRANT-FM100 型；
- 17) 2.5 ul、10 ul、100 ul、200 ul、1000ul 微量移液器：德国；
- 18) 一次性 1 ul、10 ul、200 ul、1000 ul 枪头、PCR 反应管、1.5ml 离心管：上海生物工程公司生产；
- 19) 去离子制水机：美国 Millipore 公司生产；
- 20) 微波炉：中国格力
- 21) 核酸检测仪：Pharmacia Biotech 公司生产
- 22) 酸度计：Beckman 公司生产。

2 方法

2.1 引物设计合成

引物依据GenBank 中注册的HEV 各基因型的保守区序列,参照文献^[35]设计一套简并引物,以M1、M2 为内引物，M3、M4 为外引物。该引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

M1 : 5'- GTC(T)ATGC(T)TGCATACATGGCT -3'(6010 - 6031);

M2 : 5'- AGCCGACGAAATC(T)AATTCTGTC - 3' (6336 - 6358);

M3 : 5'- AAC(T)TATG(C)CAGTACCGGGTTG- 3'(5725 - 5746);

M4 : 5'- CCCTTATCCTGCT(G)AGCATTCTC - 3'(6433 - 6455)。

2.2 HEV-RNA 的提取

按照超纯 RNA 提取试剂盒使用说明操作:

①血清 250 μ l 加 1ml RLT 缓冲液, 用移液器反复吸吹数次, 将标本充分裂解。常温下静置 10 分钟, 保证能完全裂解蛋白核酸复合物;

②加入 200 μ l 氯仿剧烈振荡 15 秒, 室温放置 2 分钟;

③室温下, 12000rpm 离心 10 分钟, 标本被分为上层无色水相、中间层和红色有机相三层, 所需要的 RNA 主要存在上层水相中, 自备一个新的无 RNase 离心管, 将上层水相转移到其中;

④加入等体积的无 RNase 水配置的 70%乙醇在得到的水相溶液中, 轻轻上下颠倒混匀;

⑤转移上一步骤所得的全部溶液到已装入 2ml 收集管 (Collection Tube) 的吸附柱 (Spin Column RM) 内。可根据溶液多少分多次转移。10000rpm 离心 30 秒, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

⑥加 RW1 缓冲液 700ul 到吸附柱内, 10000rpm 离心 30 秒, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

⑦加已经加入无水乙醇的 RW2 缓冲液 500ul 到吸附柱内, 10000rpm 离心 30 秒, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中;

⑧重复方法⑦;

⑨10000rpm 离心 3 分钟, 丢弃收集管中废液。常温下, 将吸附柱放置 10 分钟, 使其彻底晾干;

⑩将吸附柱放置于一个新的 1.5ml 的无 RNase 离心管 (Collection Tube) 中, 加 50ul 无 RNase 水到吸附柱的中间部位, 常温放置 2 分钟, 10000rpm 离心 2 分钟, 收集 RNA 溶液, -80°C 保存 RNA, 防止降解。

2.3 逆转录(RT)

在无 RNA 酶的离心管中依次加入:

RNA模板	10ul
M4	1ul
dNTP	2ul
5 \times RT Buffer	4ul

混匀后 70°C 水浴箱温育 5 分钟, 然后迅速冰浴;

再依次加入:

Rnasin	1 μ l(25 Unit)
反转录酶 (AMV)	2 μ L (200 Unit)

混匀后 42°C 水浴箱温浴 1 小时, 再 95°C 温浴 5 分钟, 用以灭活反转录酶 (AMV), 最后 -20°C 冰浴 30 分钟;

最后取 4ul 产物用于 PCR, 剩余 -20°C 储存备用。

2.4 PCR 扩增

1) 第一轮反应体系:

cDNA	4ul
M3	0.2ul
M4	0.2ul
Mix	10ul
H ₂ O	5.6ul
反应体积	20ul

反应条件: 95℃预变性 5 分钟
 94℃变性 1 分钟
 53℃退火 30 秒
 72℃延伸 40 秒 } 30 个循环
 最后 72℃终延伸 10 分钟。

2) 第二轮反应体系:

第一轮PCR产物	4ul
M1	0.2ul
M2	0.2ul
Mix	10ul
H ₂ O	5.6ul
反应体积	20ul

反应条件: 95℃预变性 5 分钟
 94℃变性 1 分钟
 53℃退火 30 秒
 72℃延伸 40 秒 } 30 个循环
 最后 72℃终延伸 10 分钟。

循环结束后, 用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳, 观察扩增结果。

2.5 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

1) 配制 1%琼脂糖凝胶: 取 250ml 三角瓶, 加入 100ml TBE 缓冲液, 称取 1g 琼脂糖加入缓冲液中, 微波炉中加热 3~5 分钟至完全溶解, 加入终浓度为 0.5 μg/ml 的溴化乙锭(EB)。在模具中插入梳齿, 将冷却的凝胶倒入模具。凝胶厚度 3~5mm, 避免产生气泡。

2) 取 10ul PCR 产物与上样缓冲液混匀后加入加样孔, 以 10×TBE 为缓冲液, 100 伏恒压, 电泳 30 分钟, 使 DNA 向阳极移动。电泳结束后, 关闭电源, 取出琼脂糖凝胶, 放置于观察结果, 以出现 348bp 条带的 PCR 产物为阳性样品。

2.6 PCR 扩增产物的纯化

使用小量胶回收试剂盒将回收的 PCR 产物进行纯化, 严格按照操作按试剂盒说明书进行:

①凝胶成像扫描仪下, 切下包含目的条带的琼脂糖凝胶胶块, 放入 1.5ml 的离心管中, 按操作说明书加入 300ul 溶胶液, 置 50℃ 水浴箱中温浴 10 分钟, 每 2 分钟颠倒混匀一次, 使琼脂糖块完全溶化;

②加入 150ul 异丙醇, 轻轻混匀, 50℃ 水浴箱温浴 1 分钟后, 再次混匀;

③将溶化后的琼脂糖液转移到已经套上收集管的吸附柱内, 12000rpm 离心 30 秒, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;

④向吸附柱中加入 500ul 洗涤液, 12000rpm 离心 1 分钟, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中;

⑤再次向吸附柱中加入 500ul 洗涤液, 室温放置 1 分钟, 12000rpm 离心 30 秒, 丢弃收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中, 12000rpm 离心 2 分钟;

⑥将吸附柱放入一个新的离心管 (1.5ml) 中, 室温静置 5 分钟, 彻底晾干, 向吸附柱的中央加入 50ul 洗脱液, 室温静置 1 分钟后, 12000rpm 离心 1 分钟, 收集 DNA 溶液, 将 1.5ml 离心管 (DNA) 于 -20℃ 储存。

2.7 连接

连接反应体系:

Pmd18-T Vector	0.5ul
Ligation Solution I	5ul
纯化PCR 产物	3ul
水	1.5ul
总体积	10ul

16℃ 连接过夜。

2.8 转化

1) 大肠杆菌 JM109 感受态细胞的制备

①用无菌接种环刮取 -70℃ 冻存的大肠杆菌 JM109, 接种于新配制的不含 Amp 的 LB 平板上, 37℃ 温箱培养 12~16 小时;

②从长有宿主菌的 LB 平板中, 用无菌牙签挑取单个菌落, 接种到 3ml 不含 Amp 的 LB 液体培养基的试管中, 于 37℃, 220rpm 振荡培养 6~8 小时;

③培养完成后, 将 1ml 上述菌液倒入 300ml 不含 Amp 的 LB 液体培养基中, 37℃, 220rpm, 振荡培养 2~3 小时;

④在无菌条件下, 将菌液在冰上预冷 30 分钟, 每 5 分钟轻轻摇晃一次, 使细菌均匀冷却, 随后将上述菌液分装到 300ml 预冷的离心管中, 4℃、3000rpm 离心 10 分钟收集菌体;

⑤弃上清, 离心管中加入 10ml 预冷的 0.1mol/L CaCl₂ 溶液, 使悬浮沉淀, 冰浴 30 分钟, 4℃、5000rpm 离心 5 分钟, 收集菌体;

⑥弃上清,往离心管中加入用 2ml 预冷的 0.1mol/L CaCl_2 溶液,使沉淀悬浮,冰浴 1 小时;

⑦分装感受态细胞于预冷的 1.5ml 的离心管中,每管 100ul, -80°C 储存备用。

2) 连接产物转化感受态细胞

①从 -80°C 的冰箱中取出冻存的感受态细胞,握于手中解冻, 4°C 静置 10 分钟,取 40ul 的感受态细胞加入到预冷的无菌的 1.5ml 离心管中,再取 5ul 连接产物加入其中,轻轻吹打混匀,冰浴 30 分钟;

② 42°C 热休克 2 分钟,快速冰浴冷却 5 分钟;

③加入 300ul 不含 Amp 的液体 LB 培养基, 37°C 、150rpm 振荡培养 50 分钟;

④取 200ul 转化液涂于含 Amp 的固体 LB 培养基上, 37°C 恒温培养箱中正向放置 20 分钟,然后倒置培养 10~14 小时,出现转化菌落;

⑤取单个菌落接种到含有 Amp 的液体 LB 培养基 (3ml) 中, 37°C 、220rpm 振荡培养 12~16 小时,所得菌液于 -70°C 冰箱储存备用。

2.9 重组质粒的酶切鉴定

1) 重组质粒的提取,严格按照说明书操作:

①取 1.5ml 过夜培养的菌液于微量离心管中, 12000rpm 离心 1 分钟,尽量吸弃上清液;

②向留有菌体沉淀的离心管中加入 250ul Buffer P1(请先检查是否已加入 RNase A),使用漩涡振荡器充分混匀,悬浮菌体沉淀;

注意:如果菌块未彻底混匀,将影响裂解效果,导致提取量和纯度偏低。

③向离心管中加入 250ul Buffer P2,温和的上下颠倒混匀 4-6 次,充分混匀使菌体裂解,此时溶液变得清亮粘稠;

注意:温和混匀,不要剧烈震荡,以免造成基因组 DNA 污染,此步骤所用时间应不超过 5 分钟,避免质粒受到破坏。

④向离心管中加入 350ul Buffer N3,立即温和地上下颠倒混匀 4-6 次,充分混匀,此时应出现白色絮状沉淀。13000rpm 离心 10 分钟;

注意: Buffer N3 加入后应立即混匀,避免产生局部沉淀。

⑤将步骤 4 中所得到的上清液转移到已装入收集管的吸附柱 (Spin Column CM) 中, 13000rpm 离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中;

⑥向吸附柱中加入 500ul Buffer PB, 13000rpm 离心 45 秒,倒掉收集管中的废液,将吸附柱重新放回收集管中;

⑦向吸附柱中加入 750ul Buffer PW (请先检查是否已加入无水乙醇), 13000rpm 离心 1 分钟,倒掉收集管中的废液;

⑧将吸附柱重新放回收集管中, 13000rpm 离心 2 分钟,倒掉废液,将吸附柱置于室温 5 分钟,以彻底晾干;

⑨将吸附柱置于一个新的离心管中,向吸附膜的中间部位加入 200ul Buffer EB,室

温放置 4 分钟，13000rpm 离心 1 分钟，将质粒溶液收集到离心管中。-20℃冰箱中保存。

2) 重组质粒的酶切和 PCR 鉴定

①提取的质粒用 EcoRI 和 Pst I 双酶切鉴定。

反应体系:

10×H Buffer	1ul
EcoR I	0.5ul
PstI	0.5ul
质粒	4ul
水	4ul
总体积	10ul

反应条件：水浴箱内 37℃水浴 12~14 小时，终止反应加上样缓冲液。

② PCR 鉴定

反应条件:

94℃预变性	4 分钟	} 扩增 30 个循环
94℃变性	45 秒	
55℃退火	45 秒	
72℃延伸	45 秒	

最后一个循环后 72℃终延伸 10 分钟。

2.10 阳性重组质粒测序及系统进化分析

将阳性重组质粒送往宝生物工程(大连)有限公司，由其完成测序及系统进化分析工作。

石河子分离株(标本来自于同一患者)名称:Sh-H-r(石河子 HE 病人血清分离 HEV)、Sh-H-f-1 (石河子 HE 病人粪便分离 HEV-1)、Sh-H-f-2(石河子 HE 病人粪便分离 HEV-2)。

结果

(Results)

1 HEV RNA 的检测

使用 1%的琼脂糖凝胶，对巢式 RT-PCR 扩增得到的产物，进行电泳检测，（图 1），得到扩增后大小为 348bp 的目的条带。

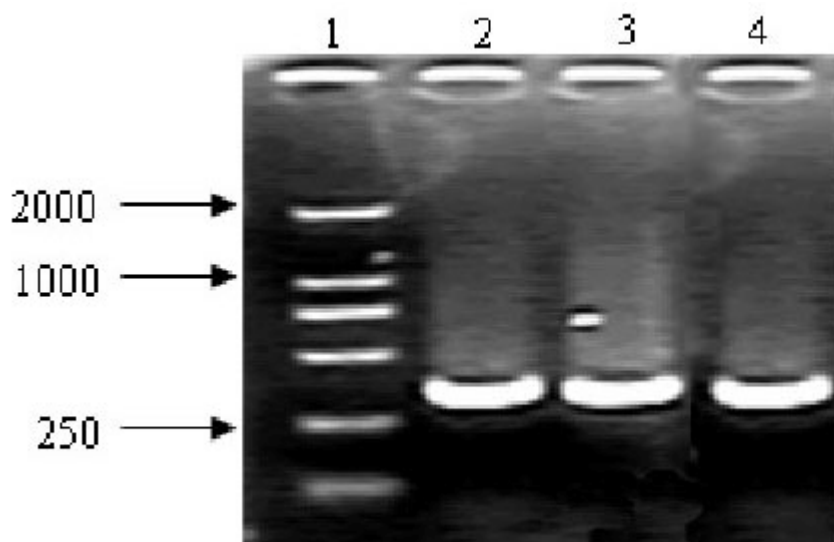


图 1 PCR 产物凝胶电泳分析

1. Marker DL2000;2,3,4PCR 产物 (348bp)

2 序列分析结果

本研究在石河子地区分离得到的 3 株人源戊型肝炎病毒部分序列的长度为 348bp，在全基因中的位置为 6010~6360 bp，位于 ORF2 内，编码了 118 个氨基酸。序列测定分析如下：

讨 论

(Discussion)

人体在感染戊型肝炎病毒之后,典型的感染经过常表现为:最早在2周左右可在粪便出现病毒,随后在血液中出现病毒,一般4周左右才可出现明显的临床症状,紧接着可在标本中测出IgM或IgG抗体,但随着病情的发展,IgM抗体水平逐渐下降,而IgG抗体水平可出现升高并可持续多年。

本次调查针对以上因素,主要检测IgG抗体水平,结果表明,3513名石河子居民戊肝IgG抗体阳性率为26.10%,低于钟崇芳^[15]等人在新疆和田地区调查的人群戊肝IgG抗体阳性率34.98%,其原因可能为和田地区曾在80年代发生过戊肝爆发流行,且戊肝IgG抗体又是既往感染的一个重要标志。男性和女性戊肝IgG抗体阳性率差异无统计学意义,分别为25.98%和26.21%,与其他研究男性高于女性^[16,17],以及王祥英^[8]等研究女性高于男性都有所不同,其原因主要可能是地域风俗差异造成,在本地区男女外出工作的机会平等,故而感染几率相当有关。石河子居民随着年龄的增长,戊肝IgG抗体阳性率递增,感染率越高,这与其他地区^[18,19]的研究一致。不同职业人群戊肝IgG抗体阳性率差别很大,最高为农牧民和个体从业人员,分别为46.70%和44.13%,农牧民和个体从业人员为石河子市居民中戊肝感染的重点人群,这与刘小桂^[20]等的调查结果相吻合,其原因可能是农牧民、个体从业人员的生活的卫生环境条件较差,多有不良的卫生习惯以及在生活中经常会接触到猪、羊等家禽及其粪便有关;工人、其他公共场所服务人员和干部职工的阳性率也很高,达到36.65%、36.53%和35.56%,可能与这部分人群在外就餐机会较多,接触到不洁食物的几率高有关,另外,干部阳性率高,也可能是由于样本量太少的原因为,有待需要进一步证实。此次调查证实居住环境不同,戊肝IgG抗体阳性率不同,分别为城镇17.21%、乡村45.71%;这与戊肝感染和职业有关相吻合。本研究结果显示在不同民族人群中,戊肝IgG抗体阳性率差异有统计学意义,这与钟崇芳^[15]等人在新疆和田研究结果不同,分析原因可能为本地区民族分布不同有关,在石河子地区主要以汉族居民为主,且肉质品消费以猪为主,这与猪在戊肝流行过程中为主要宿主^[21]相一致,进一步为说明戊肝为经消化道接触传播的人畜共患传染病提供依据。

戊肝已被世界卫生组织认为是发展中国家的一个重要的公共卫生问题。戊肝病人发病后IgG基本保持在一个较稳定的水平,约33%的病人在发病后10年体内仍有IgG抗体,提示抗戊肝IgG可长期存在^[22],因此,单纯戊肝IgG阳性,只能说明既往感染或急性感染的恢复后期,故戊肝IgG可作为戊肝流行病学调查的指标。本次戊肝血清流行病学调查发现,人群中戊肝IgG流行率随着年龄的增长而增高,差异有统计学意义,而与性别无关,与居住地类型、职业和民族有关。所以石河子市戊型肝炎的流行情况不容低估,应进一步加强对戊型肝炎的监测力度,制定预防控制措施,防止戊型肝炎的爆发流行。

作为一种新发现的人兽共患病,戊型肝炎病毒的感染,在动物群体中流行也普遍存

在。已经发现多种非人灵长类（黑猩猩、短尾猴、恒河猴、梟猴、小绢猴、非洲绿猴等）、家猪、野猪、鹿、猫鼬、啮齿类、狗、猫、绵羊、山羊、牛、驴、鸡、贝类等动物可以自然或人工感染戊型肝炎病毒^[4,5,23-28]。已经证实人群的发病或感染与感染了戊型肝炎病毒动物有着密切的关系。我国的研究人员，对国内常见的家畜、宠物和老鼠等多种动物都进行了戊型肝炎病毒感染的流行病学研究，结果都提示有不同程度的感染^[8,9,13,29,30,31]。葛胜祥等^[32]检测了我国多个省、市、自治区的上百个猪场的几千头普通商品成年猪的血清，显示HEV阳性率高达83.4%，每个猪场的商品猪中均HEV感染的现象，虽然阳性率在不同地区、省份有所差别，但最低也有68.0%，半数感染率在90.0%以上。王佑春等^[29]对北京、河南、河北、浙江、广东和大观山收集的猪血清进行HEV抗体检测，结果抗体阳性率分别为92.8%，85.2%，80.0%，87.5%，77.7%和73.7%，各地区抗体阳性率无明显的差异，平均阳性率为83.6%。表明在我国商品猪中HEV的感染比较普遍。王灵岚等^[9]研究发现黄胸鼠、褐家鼠、家犬、乳牛、猪、山羊的感染率分别为：10.24%，6.47%，38.78%，23.33%，71.31%，86.21%。表明除了家畜外，多种野生动物可以感染HEV。这与本次调查的动物间感染情况都有相似之处。

在新疆地区动物戊型肝炎病毒感染研究中，马勋、武军元、曲立春等发现新疆地区猪感染阳性率高达61.84%（503/813），绵羊HEV阳性率为28.8%（142/490），牛HEV阳性率为5.78%（39/675）^[31,32]。本次调查，动物间感染率低于以上结果，可能主要是因为样本量较少的缘故，希望在以后的研究中增大样本量，进一步证实。

同时，胡广东、王永霞、马勋等^[13,33,34]分别从牛、羊、猪体内检测到了HEV-RNA，经过序列比对和遗传进化分析，证实新疆地区三种家畜来源的HEV均属于基因IV型。本次研究通过分子水平，测得的来源于同一患者血清和粪便的HEV也属于基因IV型。其他研究证实^[36-39]HEV具有一定的地域性分布特点，同一地区的HEV在核酸和氨基酸水平上的表现，通常是人和猪的HEV同源性较高，基本上属于同一基因型，但同源性与其他地区HEV分离株相比比较低。另外，实验研究证实猪等动物对各型人HEV敏感，猪HEV也可跨种系感染非人灵长类^[40-42]，再次提示戊型肝炎是一种人畜共患传染病。

结 论

(Conclusion)

1. 3513 份各类人群的血清检测抗-HEV 抗体，其结果是石河子地区抗-HEV 抗体阳性率为 26.10%，具有较高的感染率。
2. 石河子市人群中抗-HEV IgG 感染率与居住地类型、年龄、职业和民族有关，而与性别无关。石河子地区戊型肝炎病毒感染率随着年龄增加而增加，尤以年龄段超过 50 岁的人群感染较多。
3. 动物间抗-HEV IgG 感染率存在不同的感染。
- 3 石河子地区人感染戊型肝炎病毒株属于基因 IV 型。

参考文献

- [1] World Health Organization. Viral hepatitis. October 28, 2010, date last accessed. Available from: URL: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/A62/A62_22-en.pdf.
- [2] 夏宁邵, 张军, 李少伟等. 戊型病毒性肝炎研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2011, 50(2): 431-436.
- [3] Priyanka Shukla, Hanh T. Nguyen, Udana Torian, et al. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant [J]. PNAS, 2011, 108(6): 2438-2443.
- [4] Masaji N, Kazuaki T. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence [J]. Hepatol Res, 2006, 34: 137-140.
- [5] Shuchin T, Naoto K, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings [J]. Lancet, 2003, 362: 371-373.
- [6] Kazuaki T, Naoto K, Natsumi A, et al. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer [J]. Virology, 2004, 330: 501-505.
- [7] Saad MD, Hussein H A, Bashandy M M, et al. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt [J]. Infect Genet Evol, 2007, 7(3): 368-373.
- [8] 朱建福, 郑英杰, 王法弟, 等. 禽类养殖职业人群戊型肝炎病毒感染状况及其危险因素研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22(5): 483-484.
- [9] 王灵岚, 陈亮, 何似, 等. 福建省六种哺乳动物戊型肝炎病毒感染调查[J]. 中国人兽共患病杂志, 2006, 22(2): 188, 131.
- [10] 王佑春, 张华远, 李河民, 等. 戊型肝炎病毒IV型全基因序列分析[J]. 中华微生物和免疫学志, 2001, 21(2): 210-213.
- [11] 何水珍, 郑子峥, 吴婷, 等. 戊型肝炎病毒细胞吸附模型的建立及病毒吸附区域初步研究[J]. 病毒学报, 2006, 22(6): 426-430.
- [12] Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome [J]. Virology, 1991, 185(1): 120-131.
- [13] 马勋, 陆承平, 孟继鸿. 新疆地区猪戊型肝炎血清流行病学调查[J]. 中国病毒学, 2004, 19(3): 285-287.
- [14] 付红伟, 朱永红, 庄辉. 我国戊型肝炎流行病学研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2011, 1(1): 67-70.
- [15] 钟崇芳, 李俊红, 胡志明, 等. 新疆和田地区人群血清抗 HEV 水平调查[J]. 传染病信

息, 2011,24(5): 289-292.

[16] Vivek R., Nihal L., Illiyaraja J. et al. Investigation of an epidemic of Hepatitis E in Nellore in south India [J]. Trop Med Int Health. 2010, 15 (11): 1333-1339.

[17] Takahashi M., Tamura K., Hoshino Y. et al. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan [J]. J Med Virol. 2010, 82 (2): 271-281.

[18] 王祥英, 钱树生, 单三毛, 等. 亳州市农村居民戊型肝炎血清学调查分析[J]. 安徽预防医学杂志, 2014, 20 (2): 76-78.

[19] 阳帆, 张仁利, 艾宝民, 等. 深圳市自热人群戊型肝炎感染状况分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28 (10): 1286-1288.

[20] 刘小桂, 李秀纪, 陈平, 等. 湖北地区人畜共患病戊肝病毒在不同人群中的流行病学研究[J]. 中国自然医学杂志, 2008, 10 (5): 321 -324.

[21] 郭志, 吴超, 朱嘉磊, 徐建生. 苏中某地区猪戊型肝炎病毒检测及基因序列分析[J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2013, 34(1): 28-31.

[22] 庄辉. 戊型肝炎防治不容忽视 [J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31 (2): 81-82.

[23] Yasuyuki Yazaki, Hitoshi Mizuo. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food[J]. Journal of General Virology .2003, 84: 2351-2357.

[24] Tian-Cheng Li, Katsumi Chijiwa. Hepatitis E Virus Transmission from Wild Boar Meat[J]. Emerging Infectious Diseases. 2005, 11: 1958-1960.

[25] H. Okamoto. Presence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Japanese Pet Cats[J]. Infection. 2004, 32: 57-58.

[26] Hideto Sonoda, Masahiko Abe, et al. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a Genotype 3 HEV from a Boar in Japan[J]. Journal of clinical microbiology. 2004, 42: 5371-5374.

[27] Abe K, Li TC, Ding X, et al. International collaborative survey on epidemiology of hepatitis E virus in 11 countries[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2006, 37(1): 90-5.

[28] Leenata P. Chobe, Kavita S. Lole, Vidya A. Arankalle, Full genome sequence and analysis of Indian swine hepatitis E virus isolate of genotype 4[J]. vetmic. 2005, 12, 7: 1010-1016.

[29] 王佑春, 张华远, 崔鹏等. 戊肝病毒(HEV)在猪和牛群中的流行病学研究[J]. 中国预防医学杂志, 2002, 3(3): 199-201.

[30] 武军元, 康强, 白万胜, 等. 新疆阿克苏地区绵羊戊型肝炎血清流行病学调查[J]. 病毒学报, 2010, 26(3): 234-237.

[31] 李红文, 金宁一, 屈勇刚等. 我国部分地区鹿、牛群中戊型肝炎病毒血清流行病学

调查[J].中国病原生物学杂志.2006,1(6):401-403.

[32] 葛胜祥,田克恭,多海刚,等. 中国不同地区商品猪中戊型肝炎病毒感染情况调查[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,19(2): 108-109.

[33]胡广东,马勋.新疆奶牛戊型肝炎病毒 RNA 检测及序列分析[J].病毒学报, 2010, 26 (1):27-32.

[34]王永霞,马勋.新疆羊粪便戊型肝炎病毒 RNA 的检测与序列分析[J].微生物学报.2010,50(7) :937—941.

[35] Lin C , Wu J , Chang T , et al . Diagnostic value of immunoglobulin G(IgG) and IgM anti2hepatitis E virus (HEV) test s baseon HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic (J) . JClin Microbio , 2000 ; 38 :3915~3918

文献综述

戊型肝炎病毒感染的研究进展

摘要 戊型肝炎病毒是一种 RNA 病毒, 主要引起急性自限性肝炎, 该病毒不仅可以感染人, 而且有多种动物可以作为其自然宿主。文章从病原学、流行病学、诊断与治疗、预防几个方面对其进行了综述。

关键词 戊型肝炎病毒 病原学 流行病学 预防

戊型肝炎 (Hepatitis E, HE) 是由戊型肝炎病毒 (Hepatitis E virus, HEV) 引起的一种严重危害健康经粪-口途径传播的急性自限性肝炎。该病毒主要经肠道传播, 常引起爆发或流行。临床症状类似甲型肝炎 (甲肝), 但临床表现比甲肝严重, 并可出现肝内胆汁淤积甚至发展为慢性肝炎^[1], 主要发生在青壮年, 男性高于女性^[2,3]。最早关于 HE 的记录是 1955~1956 年印度新德里发生的一次水源性传播的肝炎大流行^[4]。1989 年 Reyes 等应用分子技术得到了本病毒的基因克隆。在东京国际会议上正式将这一类型的肝炎及病毒命名为戊型肝炎 (HE) 和戊型肝炎病毒 (HEV)。

由于 HE 是通过粪一口途径传播, 因此主要在卫生条件较差的地区流行, 包括亚洲、非洲和南美洲等发展中国家, 我国也属于高发区。据 WHO 在 2011 年估计, 全球每年新发 HE 约 3400 万例, 其中死亡 30 万例, 并可导致 5200 个孕妇流产^[5]。1986~1989 年在中国新疆南部地区曾暴发世界上规模最大的 HE 流行, 发病 119280 例, 死亡 707 例^[6], 其中 414 名为孕妇。1997 年 Meng 等^[7]在美国分离得到首株猪的 HEV 核酸分离株, 并发现与美国人源的 HEV 分离株具有高度同源性, 使人们产生一种 HE 可能是人畜共患病的猜想。近年来大量研究表明 HE 是一种人兽共患疾病, 猪是 HEV 的最主要动物宿主和人类 HE 的主要传染源。最近研究显示, 在欧洲和亚太等发达地区, 无疫区旅行史的本土 HE 病例时有发生, 并偶有小范围的 HE 暴发的报道。随着人们对 HEV 认识的日益深入, 其重要性越来越突出。现就 HEV 研究进展做如下综述。

1 病原学特点

HEV 是正二十面体, 无囊膜的球形颗粒, 直径 27~34nm 的单股正链 RNA 病毒, 表面带有刺突 (spikes) 和缺刻 (indentation), 全基因组长约 7.2kb。当前, 根据国际核酸序列数据库提供, 大约有 1600 个 HEV 基因序列, 而且 HEV 基因序列的数量还在不断增加^[8]。

HEV 全基因组含有 3 个非连续及部分重叠的开放读码框 (open reading frame, ORF), 分别为 ORF1、ORF2 和 ORF3, 编码所有结构性或非结构性的蛋白^[9]。其中 ORF1 基因长约 5kb, 是 ORF 中结构最大的, 它在 RNA 合成酶的参与下编码非结构蛋白 (pORF1)。ORF2 为 HEV 的主要结构基因编码区, 编码病毒衣壳蛋白, 衣壳外表面是病毒优势中和表位的聚集区, 也是宿主识别的关键区域。ORF3 编码一个小分子的功能蛋白, 该蛋白能够参与组成细胞内膜结构, 特别是细胞骨架, 能促进肝细胞外周免疫抑制环境的形成, 参与介导细胞内 MAPK/ERK 的转导通路, 在病毒感染早期可促进细胞增殖、分化, 进而逃避细胞凋亡机制。因为在血清和粪便中 HEV 的滴度低, HEV 细胞培养没

有稳定可靠的结果，所以关于HEV的理化特性甚少。一般认为，HEV在-70~8℃中不稳定，对高盐、氯仿、氯化铯敏感，但在液氮中极为稳定。4℃下保存易降解，反复冻融易导致病毒活性下降。在碱性环境中较稳定，有镁和锰离子存在时能保持病毒完整，用56℃加热1小时或71℃加热10分钟均不能破坏HEV的抗原反应性。用71℃水浴加热20分钟，大火炒（191℃）5分钟或沸水煮5分钟可彻底灭活病毒^[10]。

目前，各国学者根据克隆株核酸、氨基酸的同源性及遗传性将已经发现的与人类疾病发生有关的HEV病毒株分为4个主要基因型：HEV-1、HEV-2、HEV-3和HEV-4，代表株分别为缅甸株、墨西哥株、美国株和中国台湾株^[11]。各基因型又分为许多亚型。不同基因型和亚型在HEV的流行病学研究中都具有非常重要的意义，传播途径的多样性和疾病的严重程度受基因型的影响^[12]。HEV-1和HEV-2的自然宿主目前仅见于人类（人源型），而HEV-3和HEV-4的自然宿主还包括猪及多种野生哺乳动物（人畜共患型）^[10]。同一地区分离得到的人与猪的HEV同源性高度接近，甚至同一亚型内，两者之间同源性可达95%~100%^[13]。迄今已知的暴发性的HEV感染主要仅与HEV-1或HEV-2有关，与粪-口传播直接相关。而HEV-3或HEV-4主要引起急性散发性HE，偶尔引起食源性小暴发。HEV-3主要在动物之间传播，人感染HEV-3主要是因为物种间的传播^[14]。目前我国仅发现HEV-1、HEV-3和HEV-4^[15]三种，其中HEV-1只感染人类，HEV-3仅在上海地区的猪场中发现^[16]，HEV-4在人和猪中普遍存在^[17]。目前，在我国HEV-4感染占据主导地位^[18]。

2 流行病学特点

2.1 流行情况

HE在全球范围内均有发病，迄今为止世界上已有50余次HE的暴发或流行^[19]。其暴发或流行主要集中在亚洲和非洲的一些发展中国家，特别是在贫穷落后、卫生条件较差的一些国家和地区^[20]。在欧美等发达国家仅出现散发病例，尚无大规模暴发和流行的报道，且病例多出现在外来移居者或旅行者。但近10年来，欧美等发达国家出现大量无疫区旅行史的本土病例，并发现多种与HEV感染相关的并发症及肝外症状，且在世界各地的驯养和野生的动物身上不断发现天然感染的HEV^[21]。目前，全球HE流行可分为2种明显的不同模式，分别与人源型HE和人畜共患型HE的流行有关^[22-24]。我国各地区均有散发性HE存在，但分布不平衡。最近的调查显示，中国普通人群抗-HEV IgG阳性率大约20.0%~40.0%，高于以往的调查，且流行病学特征与1992年的调查结果相似^[25]。

2.2 传染源

HEV-1和HEV-2的传染源为潜伏期末期或急性期早期的HE患者和亚临床感染者；HEV-3和HEV-4除了感染人体外还可感染其他多种动物宿主，其主要传染源为猪和HE患者。其中，猪是HEV重要的自然宿主和传染源，这与其极高的感染率和与人群的密切接触程度有关。

2.3 传播途径

目前已知的HEV传播途径包括消化道传播、血液传播、垂直传播和密切接触传播。

消化道传播最常见, 饮用被HEV污染的水或食用被HEV污染的食物而导致感染; 血液传播, 近年有报道HEV可通过血液传播^[26], 而且在献血员中的感染率很高; 垂直传播也有报道, 有报道称^[27], 在阿根廷垂直传播导致患儿感染率在 33.3%~50.0%之间; 密切接触传播, 有HE病人的家庭成员的HEV阳性率比无HE病人的家庭成员要高。在各种传播途径中, 通过污染的水源传播是过去最常见的传播途径, 但随着各地区环境卫生条件的改善, 近年来水源性传播的报道逐渐减少, 而以散发性HE多见。

2.4 易感人群

人群对HEV普遍易感, 各年龄段均可感染, 幼年时感染多为亚临床型, 成年人感染多为临床型。密切接触的从业人员(包括畜牧养殖人员和餐饮业人员)、野外工作者、军人、疫区务工或商务旅行者和大学生等人群由于有更多接触病原体的机会而具有较高的HEV感染风险。人体感染HEV后可产生保护性抗体并持续 20 年以上。具有HEV抗体的人群再次感染HEV的风险降低, 且感染后绝大多数为隐性感染或仅出现轻微症状, 预后良好^[28]。我国近年来发病人群以男性为主, 且发病率男性高于女性, 以中、老年者居多, 儿童及青少年少见; 孕妇也有较高的感染率和病死率, 其重型肝炎的发生率明显高于正常人群^[29]。

2.5 人畜共患型 HE

HE是一种以粪-口传播为主的人畜共患病^[30], 1990 年Balayan等^[31]成功的将HEV感染猪, 并猜想猪可能在HEV的传播中起着重要作用, 这也是最早关于HEV动物宿主的推测。近年来, 许多国家的学者在对家猪养殖场员工检测时发现, 其HEV的感染率明显高于其他人群, 如Galiana等^[32]对家猪养殖工作者调查显示, 该人群HEV感染率为 18.6%, 显著高于对照人群, 进一步为猪是HEV动物宿主这一推测提供了有力证据。猪HEV分为HEV-3 和HEV-4, 其与人HEV-3 和HEV-4 的核酸序列具有高度的同源性, 并在许多国家中被证实。研究表明, 同一个地区可以存在 2 种或 2 种以上的基因型, 也发现同一种基因型可以分布在不同地域^[33]。

人畜共患型HE分布于世界各地, 主要表现为散发及食源性小暴发, 尚未见大规模暴发的报道。在西方, HEV-3 感染导致的戊肝已成为最常见的急性肝炎。在欧美的研究结果显示, 有大部分被诊断为药物性肝炎的患者为HEV感染^[34]。在日本和中国台湾地区, HEV -3 和HEV-4 感染均有发生。消化道传播是人畜共患型HE的主要传播途径, 人畜共患型HEV感染多为隐性, 小于 5%的感染者会出现临床症状, 通常为持续 4~6 周的自限性疾病^[35]。与人源型HE主要发生在青壮年明显不同, 人畜共患型常见于中老年。越来越多的证据显示HE是一种人兽共患疾病, 猪是HEV的最主要动物宿主和人类HE的重要传染源^[36]。

3 临床特征

根据国内流行病学调查, HE潜伏期为 2~10 周, 平均 40 天^[37], 大部分呈自限性, 临床表现与其他急性病毒性肝炎相似。成人感染多表现为临床型, 儿童为亚临床型。HE主要分为 3 个临床类型^[38]: 急性黄疸型、急性无黄疸型和重型戊型肝炎。

在HE高流行区，常见的表现是急性黄疸型肝炎，与其他类型的急性病毒性肝炎无明显差异。整个病程分为两个阶段：初期表现为发热、恶心、纳差、厌食、呕吐、腹痛、肌肉痛等，并持续数天；黄疸发作期时前驱症状基本消失。HE为自限性疾病，病程数周，体检可见黄疸、肝脾肿大。部分患者会出现延迟性胆汁淤积，表现为皮肤瘙痒，预后较好。在HE流行区无症状或隐性 HEV 感染也常见。较多的研究发现，HEV感染也会引起多种严重并发症，包括慢加急性肝病、肝外征候和慢性肝炎，预后则较差；妊娠是HE患者发生肝衰竭的危险因素，且病死率高；垂直传播所致的婴儿HEV 感染可发展为黄疸型肝炎，无黄疸型肝炎或高胆红素血症，早产，低体温以及低血糖均较常见，病死率可高达 50%^[39]。

在 HE 的低流行区的表现包括黄疸型肝炎、无黄疸以及无症状的转氨酶升高，多在血清检测结果出来后才考虑 HE。低流行区的 HE 多见于年龄较大的男性，多有肝病或饮酒史，无特异性症状。

HE也有些不常见的临床表现，如急性胰腺炎、溶血、格林巴利综合征、血小板减少、脑膜脑炎、自身免疫现象、假性脑瘤、颅神经麻痹双侧椎体综合征等^[40-41]。这些不典型患者的诊断多依赖于 HEV -IgM 的检测。

HE严重程度的决定因素尚不清楚。人类HE的发生考虑与病毒滴度有关^[42]。孕妇的病情往往较重且病死率高，可能与孕妇体内雌激素水平以及孕妇免疫状态有关^[43]。

4 诊断和治疗

HE的诊断依据流行病史、临床表现、血清学以及病原学的结果。因HE没有特异的临床表现，特别是患者无明显的HE流行病学史，所以在诊断中需注意鉴别诊断。虽然转氨酶检测灵敏度高，但其非特异性指标，仅提示肝功能损害；因此除了转氨酶的升高外，仍需HE的特异性检测：抗HEV IgM阳性或抗HEV IgG由阴性转阳性(或滴度明显升高>4 倍)或HEV RNA检测阳性^[44]。一般情况下这 3 项指标中的任何一项阳性都可作为HEV急性感染的临床诊断依据，如同时有 2 项指标阳性则可确诊。

HE 多表现为自限性，尚无特异性的治疗药物及方法。因此无须治疗或仅采取适当的对症支持治疗。对出现严重症状的 HE 患者，无论是否合并慢性肝病，均可考虑使用抗病毒药物进行治疗。对于合并慢性肝病的患者，可能出现由 HEV 感染导致的肝衰竭时，如有需要可进行肝移植。对于孕妇的治疗尚缺乏相关的资料。

5 预防

与大多数粪-口传播的传染病一样，通过安全饮水、加强人畜排泄物的消毒处理、卫生宣教等是最重要的公共预防措施。在 HE 爆发期间，水源氯消毒和饮用水煮沸能有效预防 HEV 感染。

散发性的 HE 确切来源常难以确认，目前尚未发现主要的单一危险因素，而是多种 HEV 感染途径并存，且在大多数情况下传播过程尚不完全清楚，因此制定针对性的防控策略十分困难。但是，加强饮食从业人员的健康体检，加强畜牧养殖人员的管理、加强人畜排泄物处理，严格执行生熟食分开等措施通常被认为可降低 HE 感染风险。

疫苗接种是个体防护的最有效和最直接的方法^[45]。HE疫苗已于 2012 年在我国上市^[46]。从公共卫生的角度,有必要加强对饮食行业从业人员、畜牧养殖人员、无偿献血者进行疫苗接种。从个体防护角度,将前往HE高流行地区的务工人员、旅行者、维和部队官兵以及准备怀孕的妇女、已有慢性损伤人群和中老年人等也有必要进行疫苗接种。

6 小结

由于HE是一种长期被忽视的重要的病毒性肝炎,及对HEV 缺乏合适的细胞模型及动物模型,对其完整的研究较少,因此其发病机制尚不完全清楚。在HEV RNA 的检测方面,全世界并没有很好的标准,有研究显示,在全世界 10 个国家的 20 个实验室内,检测 HEV RNA 的灵敏度相差 100~1000 倍^[47]。目前,在我国的临床实践中,HE诊断率与实际感染率严重不符。有研究显示^[48],近 10 年来卫生部门疫情监测数据中报告的HE病例和我国市场上HE诊断试剂盒使用量的增长密切相关,而目前国内HE诊断试剂盒的销量仅为甲肝试剂盒的 1/5,提示仍有大量的HE病例被漏诊。在过去 10 年里,随着研究的不断深入和诊断技术的进步,国内外对HE和HEV的理解和认识发生了重大变化,这将更有助于降低HEV的感染率,提高人们的生活质量。

参考文献

- [1] Rodriguez-Frias F., Jardi R., Buti M [.Hepatitis E: Molecular virology,epidemiology and pathogenesis.] [J] .Enferm Infecc Microbiol Clin.2012
- [2] Vivek R., Nihal L., Illiyaraja J.et al.Investigation of an epidemic of Hepatitis E in Nellore in south India [J] .Trop Med Int Health.2010, 15 (11): 1333-1339
- [3] Takahashi M., Tamura K., Hoshino Y.et al.A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan [J] .J Med Virol.2010, 82 (2): 271-281
- [4]Wong D.C., Purcell R.H., Sreenivasan M.A.et al.Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology [J] .Lancet.1980, 2 (8200): 876-879
- [5] WHO. Viral hepatitis in the WHO south-east Asia region [M] . India: regional office for south-east Asia, 2011.
- [6] Wang XC, Liu XM, Tan CZ, et al. Epidemic non-A, non-B hepatitis in Xinjiang. Clinical and pathologic observations. J Med Chin 1990, 103(11): 890-8.
- [7] Meng X J , Purcell R H, Halbur P G ,et al. A novel rirus in swine is closely related to the human hepatitis E vines. Proc NstlAcad Sci USA, 1997 ,94(1): 9860-9865.
- [8] Shin-I T, Tanaka Y, Tateno Y,et al.Development and public release of a comprehensive hepatitis virus database [J].Hepatol Res,2008,38(3):234-243.
- [9]Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. Virus Res, 2011, 161(1):47-58.

- [10] 张军, 吴婷, 夏宁邵. 戊型肝炎诊断、预防及治疗新进展 [J] 传染病信息, 2013,26(2): 89-92.
- [11] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus taxonomy, VIIIth report of the ICTV [M] . London: Elsevier/Academic Press, 2005:853-857.
- [12] Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk[J].Vet Microbiol,2010,140(3-4):256-265.
- [13] 王晶晶, 田德英. 戊型肝炎的研究现状和展望[J] 临床肝胆病杂志, 2013,29(2): 84-87.
- [14] Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus[J].Virus Res,2007,127(2):216-228.
- [15] 陆一涵 郑英杰 朱建福 等. 中国发现基因III型戊型肝炎病毒[J]. 疾病控制杂志, 2007, 11(1), 5-10.
- [16] Ning H, Yu S, Zhu Y,et al.Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs [J].Vet Microbiol,2008,126(1-3):257-263.
- [17] 李凌君.中国广西猪 HEVswGX40 全基因组序列的扩增及中国大陆 HEV 基因型和亚型的进化分析(1986-2008) [D].北京:北京大学医学部, 2009.
- [18] 吴金菊,马尔健,苏虹,等.安徽省戊型肝炎基因分型及临床特征研究[J].中华疾病控制杂志, 2009,13(5):541-544.
- [19]Wilhelm BJ,Rajic A,Greig J,et al. A systematic review/meta-analysis of primary research investigating swine,pork or pork products as a source of zoonotic hepatitis E virus [J].Epidemiol Infect,2011,18; 1-18.
- [20] 何义林,移钱华,罗锋. 109 例急性散发性戊型肝炎的流行病学特征分析[J].中华疾病控制杂志, 2009,13(6):667-669.
- [21] Labrique A, Kuniholm M, Nelson K. The global impact of hepatitisE: new horizons for an emerging virus [M] . Washington(DC): ASMPress, 2010:53-93.
- [22] Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E [J] .Lancet, 2012, 379(9835):2477-2488.
- [23] Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E [J] . N Engl J Med, 2012, 367(13):1237-1244.
- [24] Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus [J] . Clin Infect Dis, 2010, 51(3):328-334.
- [25] Ma Z,Feng R,et al.Seroprevalence and distribution of hepatitis E virus in various ethnic groups in Gansu province China [J]. Infect Genet Evol,2010,10(5); 614-619.
- [26] Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T,et al.Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma [J].Hepatol Res,2007,37(2):113-120.

- [27] Sookoian S. Liver disease during pregnancy: Acute viral hepatitis [J].*Ann Hepatol*,2006,5(3):231-236.
- [28] Zhang J, Li SW, Wu T, et al. Hepatitis E virus: neutralizing sites,diagnosis, and protective immunity [J] . *Rev Med Virol*, 2012, 22(5):339-349.
- [29] 隋云华,汪茂荣,徐静,等.散发性戊型肝炎的临床流行病学分析[J].*实用肝脏病杂志*, 2008,11(6):394-395.
- [30] Kamel A.H., Ali M.A., El-Nady H.G et al.Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo [J] .*Clin Microbiol Infect*.2011, 17 (8): 1182-1185
- [31] Balayan M.S., Usmanov R.K., Zamyatina N.A.et al.Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pig [sJ] .*J Med Virol*.1990, 32 (1): 58-59
- [32] Galiana C., Fernandez-Barredo S., Perez-Gracia M.T. [Prevalence of hepatitis E virus (HEV) and risk factors in pig workers and blood donors] [J] .*Enferm Infecc Microbiol Clin*.2010, 28 (9): 602-607
- [33] La Rosa G, Muscillo M, Spuri V V, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing China[J] . *Vet Microbiol*,2009,133(1~2); 75-83.
- [34] Davern TJ, Chalasani N, Fontana RJ, et al. Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug -induced liver injury [J] . *Gastroenterology*, 2011 , 141(5):1665-1672.
- [35] Zhang J, Li SW, Wu T, et al. Hepatitis E virus: neutralizing sites,diagnosis, and protective immunity [J] . *Rev Med Virol*, 2012, 22(5):339-349.
- [36] 夏宁邵, 张军, 李少伟, 等. 戊型病毒性肝炎研究进展[J].*厦门大学学报(自然科学版)*, 2011,50(2): 431-436
- [37] 李立明.流行病学[M].第 6 版.北京:人民卫生出版社,2008.
- [38] 曾国兵,侯金林.戊型病毒性肝炎的临床特点和诊断要点[J].*中华肝脏病杂志*, 2004,12(1):49.
- [39] Khuroo MS, Kamili S. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV —infected mothers [J]. *J Viral Hepat*, 2009, 16(7) : 519 —523.
- [40] Kamar N, Izopet J, Cintas P, et al. Hepatitis E virus —induced neurological symptoms in a kidney —transplant patient with chronic hepatitis[J]. *Am J Transplant*, 2010, 10 (5) :1321 —1324.
- [41] Kamar N, Bendall RP, Peron JM, et al. Hepatitis E virus and neurologic disorders [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17 (2) :173 —179.
- [42] Kar P, Jilani N, Husain SA, et al. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy [J]. *Am J Gastroenterol*, 2008,

103

(10) : 2495 —2501.

[43] Bose PD, Das BC, Kumar A, et al. High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: Association with Hepatitis E — related poor pregnancy outcome [J]. J Hepatol, 2011, 54(6) : 1107 —1113.

[44] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure. Lancet 2010;376:190-201.

[45] Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, . Efficacy and safety of a recom binant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial [J] . Lancet,2010, 376(9744):895-902.

[46] 张玲霞, 王永怡, 陈玉琪, 等. 2012 年传染病热点回顾 [J] . 传染病信息, 2013, 26(1):10-13.

[47]Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, et al. Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique —based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4) : 1234 —1239.

[48] Zhao Q, Zhang J, Wu T, et al. Antigenic determinants of hepatitis E virus and vaccine -induced immunogenicity and efficacy [J] . J Gastroenterol, 2013, 48(2):159-168.

致 谢

光阴荏苒，时光如同白驹过隙，三年的研究生学习生涯即将结束，回首三年时光的点点滴滴，一切都历历在目，并且深切感受到这段人生经历的宝贵。同时，我要感谢在研究生学习期间给予我指导、帮助、支持的各位老师、同学及家人。

首先我要衷心的感谢我的导师左维泽副教授，感谢她在研究生学习期间对我学业上的严格教导，以及在生活中对我无微不至的关心。本课题是在导师左维泽副教授的悉心指导下完成的。从论文选题、设计到论文的撰写以及修改，无不凝聚着导师的心血和汗水值此毕业之际谨向恩师致以诚挚的感谢和敬意！由衷感谢恩师在科研、临床实践中给予我的指导和教诲，感谢恩师在生活中给予我的关怀和鼓励！三年来，在导师的悉心教导下，我在全面认识问题、分析问题和处理问题等方面都取得了巨大进步。导师渊博的知识、严谨的治学态度、正直的人格以及对患者的仁爱之心是我一生学习的榜样。导师的严谨、认真、务实、创新的科研态度以及独特的人格魅力早已深深沁入我的身心。我衷心的感谢导师对我的谆谆教导，教会我做人的道理，以及在生活上给予我的帮助，使我能顺利完成学业。这将成为我宝贵的生命财富。在此，我要对她表示最崇高的敬意和最诚挚的感谢！

同时，我也要衷心感谢石河子大学医学院第一附属医院感染性疾病科刘佩芝教授、季榕医师、买力坎木医师、詹爱琴医师、姚寿敏医师、朱庆峰医师、陈雪莉医师、居马百克医师、程丽医师、陈光海医师、高伊萍护士长及感染性疾病科的全体护士在联系标本、收集标本过程中给予的大力支持和帮助，感谢科室全体教师三年来在临床工作中给予我的指导和帮助！

感谢石河子大学动科院的屈勇刚老师，感谢他在实验检测中所给予的指导和帮助。

感谢石河子疾病预防控制中心的姚明琴老师在联系标本、收集标本过程中给予的大力支持和帮助。

感谢2012级帮助过我的同学，与他们携手一起度过的日子将是我最美好的回忆。

感谢提供样本的患者和健康志愿者！

最后感谢我的家人多年来对我学业、生活的鼓励和支持和关心！

作者简介


夏小伟，男性，汉族，籍贯安徽，1981年7月生于安徽省寿县，2006年6月毕业于石河子大学医学院临床医学系，获医学学士学位，同年到石河子疾病预防控制中心工作，2012年9月于石河子大学医学院攻读医学硕士学位，专业为内科学，研究方向是病毒性肝炎的基础与临床研究。

在研期间发表的文章

- 1、夏小伟,左维泽,屈勇刚.石河子市戊型肝炎感染状况流行特征分析.石河子大学学报,录用待编.
- 2、夏小伟,左维泽.戊型肝炎病毒感染的研究进展.中华传染病杂志,录用待编

石河子大学硕士研究生学位论文

导师评阅表

研究生姓名	夏小伟	学制	三年
专业	内科学	研究方向	病毒性肝炎的基础与临床研究
<p>学术评语:</p> <p>戊型肝炎是一种经粪-口途径传播的急性传染病,主要流行于亚洲、非洲等发展中国家和地区,散发病例分布世界各地。在我国的很多地区都有戊型肝炎感染的报道,全国戊型肝炎感染率在 7%~15%之间。遍及 25 个省,5 个自治区和 3 个直辖市,感染率随年龄增加而增加,20 岁左右达感染高峰,发病者主要为青壮年,主要临床表现是肝炎病毒引起黄疸、急性肝坏死等。一般呈良性经过,但孕妇感染情况较重,死亡率高达 10%~20%,是一种全国普遍流行、危害比较严重的疾病。戊型肝炎病毒为单股正链 RNA 病毒,基因结构较为复杂,因此其诊断手段主要是利用 RT-PCR 检测病毒 RNA,或采用间接酶联吸附分析(ELISA)方法检测血清中的抗体。本课题选取新疆维吾尔自治区石河子地区为研究现场,一方面对辖区范围内不同人群和动物群 HEV 感染状况的调查,分析抗 HEV-IgG 抗体在不同宿主间的感染;另一方面,本课题采用巢式 RT-PCR 方法对石河子市急性散发性 HE 患者的血清和粪便中的 HEV-RNA 进行检测,通过对分离株的序列分析,来明确石河子地区流行的 HEV 基因型,了解本地区感染的 HEV 基因型分布及其流行趋势,为 HE 的防治提供科学依据。</p> <p>该论文从课题设计、观察对象的收集与选择、实验过程到实验数据的统计、分析、论文撰写整个科研过程中思路清晰、研究目标明确、实验方法合理、数据真实,对数据的统计分析方法正确,取得了较为理想的实验结果,达到了科研立题的预期,具有一定的创新性和临床应用价值。</p> <p style="text-align: right;">指导教师签字: </p> <p style="text-align: right;">2015 年 6 月 10 日</p>			