

江苏省某地区人源与猪源戊型肝炎病毒的检测和部分序列分析

张雪峰¹, 闫强², 艾星¹, 姜汉民³, 蔡加平³, 王忠泽³, 张军², 朱凤才¹

(¹江苏省疾病预防控制中心急性传染病防制所, 江苏 南京 210009; ²厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361005; ³东台市疾病预防控制中心, 江苏 东台 224200)

[摘要] 目的: 调查了解江苏省某农村地区人源与猪源戊型肝炎病毒(HEV)的相关性。方法: 应用逆转录-巢式聚合酶链法(RT-PCR)对同一地区内一般人群中 HEV IgM 阳性者、急性戊型肝炎患者血标本和生猪胆囊标本进行 HEV RNA 检测, 并对 HEV RNA 阳性标本进行克隆测序和序列分析。结果: 一般人群中检出的 HEV 基因 1、4 型比例相近, 临床散发性戊肝病例绝大部分为 HEV-4 型病毒感染所致(95.24%); 生猪胆汁标本 PCR 阳性率为 12.11%, 猪源 HEV 基因分型均为 HEV-4 型; 分离于人和生猪的 HEV-4 型病毒高度同源, 同源性 81%~97%。结论: 该地区人群 HEV 基因分型以 HEV-4 型为优势毒株; 猪源 HEV 均为基因 4 型; 人源和猪源的 HEV-4 型病毒高度同源, 猪是当地 HEV 主要宿主动物之一。

[关键词] 戊型肝炎病毒; 基因型; 序列分析; 人兽共患病

[中图分类号] R512.65

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-500-05

Analysis of partial sequences of Hepatitis E virus isolated from human and swine in a certain area of Jiangsu province

ZHANG Xue-feng¹, YAN Qiang², AI Xing¹, JIANG Han-min³, CAI Jia-ping³, WANG Zhong-ze³, ZHANG Jun², ZHU Feng-cai¹

(¹Department of Acute Infectious Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009; ²National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361005; ³Dongtai Center for Disease Control and Prevention, Dongtai 224200, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the correlation between swine and human hepatitis E virus(HEV) in Jiangsu province. **Methods:** Specimens collected from HEV-IgM positive people of the general population, patients with acute hepatitis E and cholecyst from swine in the same area, were detected for HEV RNA by nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). HEV-positive samples were further analyzed by direct nucleotide sequencing. **Results:** Among the HEV IgM carriers, 8 positive cases were identified, and the subtype of HEV were type 1 and type 4. The majority cases of clinical sporadic HEV were type 4 (95.24%). The HEV-positive rate of swine bile samples was 12.11%, and the virus genotype was type 4. The type 4 HEV of human and swine showed a high degree of homology (81%~97%). **Conclusion:** Both HEV-1 and HEV-4 were found in human in this area with the dominant type of HEV-4. All the swine HEV-positive samples showed HEV-4 genotype. The HEV-4 of human and swine in the Dongtai area showed a high degree of homology. These findings suggest that swine may be one of the main hosts of HEV in this region.

[Key words] hepatitis E virus; genotype; sequence analysis; zoonosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 500-504]

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染引起的急性病毒性肝炎, 在人群中可呈暴发、流行或散发传播。江苏省未曾报告过 HEV 大流行, 但近年报告散发病例增多, 一般人群 HEV 感

染率为 52.0%, 高于国内已报告的其他地区^[1-3]。近些年来越来越多的研究表明, 戊型肝炎是一种人兽共患病, 而猪可能是 HEV 的主要宿主动物之一^[4-6]。本文通过对江苏省东台地区的一般人群中 HEV-

IgM 阳性者、急性戊型肝炎患者和当地猪群进行 HEV RNA 检测,并比较不同来源 HEV 病毒基因序列,以了解同一地区人源和猪源 HEV 之间关系,为戊型肝炎防制提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

一般人群 HEV-IgM 阳性标本来自东台地区常驻人群。戊型肝炎感染状况横断面调查中筛选出 HEV-IgM 检测阳性者;急性戊型肝炎病例标本则通过在当地建立覆盖市、镇、村三级医疗卫生服务机构的疑似肝炎主动监测系统收集的、经实验室确诊为戊型肝炎病例发病 1 周内的急性期血标本;生猪标本来源于同期监测区内部分生猪屠宰场采集的待宰成年生猪的完整胆囊标本。

采集散发病例和一般人群 5 ml 外周静脉血后,无菌常规分离血清,置-20℃冰箱中保存待检;采集生猪完整胆囊后,使用一次性注射器无菌抽取 15 ml 胆汁分装到冻存管中,-20℃冰箱保存待检。

1.2 方 法

1.2.1 HEV RNA 的提取及 RT-PCR 检测

取 200 μl 的血清、胆汁用 TRIzol 试剂(美国 Gibco 公司)按其操作说明提取,RT-PCR 反应程序和条件参照参考文献[7]进行。PCR 产物采用 2.5% 琼脂糖电泳,阳性标本的 PCR 产物回收,送至上海 Invitrogen 公司测序。

1.2.2 序 列 分 析

测序结果用 Seqman (Lasergene 软件包,DNAstar 公司,美国)进行序列拼接。序列比对由 Mega 3.1 (www.megasoftware.net)完成,采用 Clustal W 方法。核苷酸序列进化树的构建采用 Bayes 法,使用 BEAST v1.5.4 软件包进行。同源性分析使用的参比序列如下:HEV-1a(D10330、E17109),HEV-1b(M94177、D11093),HEV-1c (X98292),HEV-1d (AY230202),HEV-1e (AY204877);HEV-2 型(M74506);HEV-3a (AF060669),HEV-3b(AB091394),HEV-3f(FJ956757),HEV-3g (AF455784),HEV-3i (FJ998008),HEV-3j (AY115488);HEV-4a (EF077630、GU119960、EU366959),HEV-4b(DQ279091、EU676172),HEV-4c(AB097812、AB099347),HEV-4d (AY594199、AJ272108),HEV-4e(AY723745)。

2 结 果

2.1 不同来源标本 HEV PCR 检测及病毒基因型

在一般人群 HEV 病毒感染情况横断面调查检测的 146 份抗 HEV-IgM 阳性标本中,HEV PCR 阳性 8 例,阳性率为 5.48%;经实验室基因分型检测,HEV-1 型病毒和 HEV-4 型病毒各 4 株。92 例急性戊型肝炎确诊病例中,HEV PCR 检测阳性标本 63 例,PCR 检测阳性率为 68.47%;基因分型检测结果为 HEV-1 型 3 例(占 4.76%),HEV-4 型 60 例(占 95.24%)。同时采集并检测了同一地区生猪完整胆囊标本 380 份,HEV PCR 检测阳性 46 份(12.11%),其基因分型检测结果均为 HEV-4 型(表 1)。

表 1 不同来源标本 HEV-RNA 检测及 HEV 基因分型情况
Table 1 HEV-RNA and HEV genotypes from different sources detected by PCR [n(%)]

| | n | HEV-RNA | HEV 基因分型 | |
|------|-----|-----------|----------|------------|
| | | | HEV-1 型 | HEV-4 型 |
| 一般人群 | 146 | 8(5.48) | 4(50.00) | 4(50.00) |
| 临床病例 | 92 | 63(68.47) | 3(4.76) | 60(95.24) |
| 生猪 | 380 | 46(12.11) | 0(0.00) | 46(100.00) |

2.2 不同来源 HEV 病毒序列进化分析

2.2.1 人源 HEV 病毒序列进化分析

将 71 株来自本地区人群(63 株来源于散发临床病例,8 株来源于一般人群)的 HEV 测定序列与 24 株国际代表株参比序列进行基因进化树分析(图 1)。71 株 HEV 标本中有 7 株为 HEV-1 型,其中亚临床感染株 4 株(JXJLD-333-H、JXJLD-125-H、GYAF2B5-H、JXJLD-539-H),临床散发病例株 3 株(GY3570-P、GY3684-P、GY0353-P),组内的核苷酸同源性为 86%~99%,7 株分离株中有 3 株与参考序列的 1b 亚型在同一簇,另外 4 株则独立聚为一簇,在 2 个分支中均分布有亚临床感染株和临床散发病例株。64 株人源 HEV-4 型病毒株中,4a 亚型感染有 49 例,为主要的亚型(76.6%),4b 亚型感染 2 例(3.1%),4c 亚型感染 1 例(1.6%),4d 亚型感染 7 例(11%),此外还有未分亚型感染 5 例(7.8%)。

2.2.2 猪源 HEV 病毒序列分析

从猪胆汁阳性 PCR 产物中,共获得 46 株猪源 HEV 病毒序列,其核苷酸序列同源性为 84.1%~100.0%。均属于 HEV-4 型,除分别归属于 4a、4b、4d 亚型外,还存在着一支较独立的分支。其中 4a 亚型是该地区生猪中感染的主要亚型,占有分离株的 53.3%,本研究分离到的猪源 4a 亚型又分为两个主要的分支,其中一支与已报道的在中国大陆分离的猪源 HEV4a 亚型株(EF077603、EU366959、GU119960)最

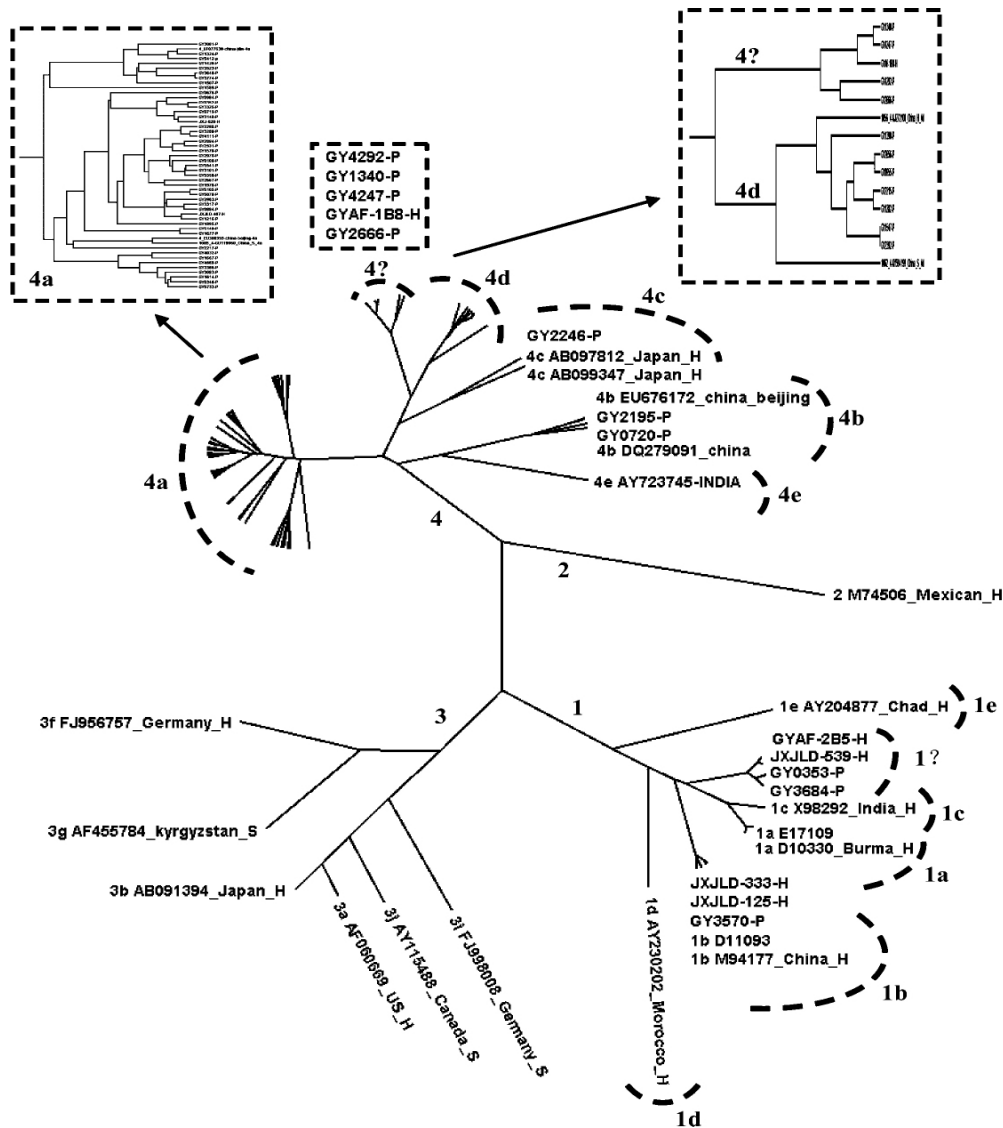


图 1 人源 HEV 分离株核苷酸序列的基因进化树
Figure 1 The gene phylogenetic tree of human HEV

为接近,另一支则构成较独立的 4a 亚型。4b 亚型包括 2 株分离株,分别是 XJ051-S 和 XJ130-S,该两株均分离于同一地区的屠宰场。4d 亚型包含 7 株分离株,分别形成 2 个小的分支,一支与已报道的在中国大陆分离的猪源和人源 HEV-4d 亚型株 (AY594199、AJ272108)最为接近,另一支则构成较独立的 4d 亚型。此外还有 5 株分离株构成较为独立的一支 (XH006-S、SZ33-S、XH019-S、AF0909-S、XJ087-S,图 2)。

2.2.3 不同来源 HEV 病毒序列进化分析

将该地区人源与猪源 HEV 的 ORF2 部分基因片段与 HEV 各亚型的代表株进行分析比较,117 株人源与猪源 HEV 病毒株的同源性从 70.8%~99.3% 不等。其中猪源 HEV 毒株全部分布于 HEV-4 型,

除没有 4c、4e 亚型外,在其他亚型呈散状分布;人源 HEV 毒株在 HEV-1 型和 HEV-4 型均有分布,HEV-1 型中主要集中于 1b 亚型和一支独立分支中,HEV-4 型中除未发现 4e 亚型外,其他亚型均有发现,且与猪源 HEV 毒株相同呈散状分布(表 2)。除了 4c 亚型只有 1 株分离株无法计算亚型内核苷酸差异外,其他分离株的各亚型内核苷酸差异分别为:1b(2.3%),4a(4.7%),4b(1.8%),4d(1.8%),此外在 1 型和 4 型中未能明确亚型的分离株,其亚型内核苷酸差异分别为 1.0%和 4.2%。分离株中 1b 亚型和未明确亚型间的核苷酸差异为 7%;4 型中各亚型间的核苷酸差异为 7.7%~15.1%;分离株中 1 型和 4 型之间的核苷酸同源性为 74.8%~83.1% (图 3)。

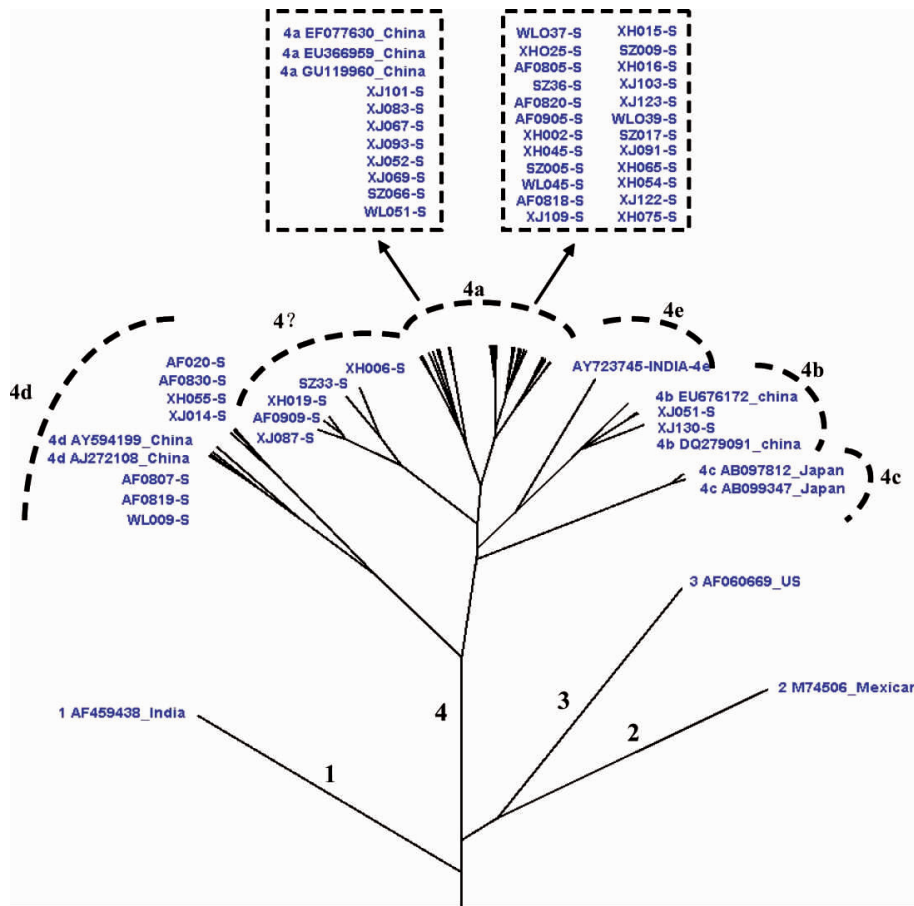


图 2 来源于生猪 HEV 分离株核苷酸序列的基因进化树

Figure 2 The gene phylogenetic tree of swine HEV

表 2 不同来源的 HEV 病毒株的亚型分布

Table 2 Subtypes of HEV virus strains isolated from different sources

[n(%)]

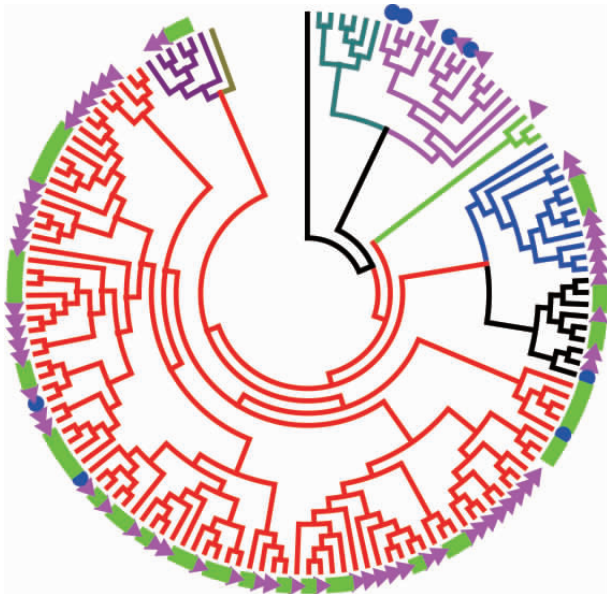
| 来源 | 1 型 | | | | | | 4 型 | | | | | |
|-------------|---------|----------|---------|---------|---------|----------|-----------|---------|---------|----------|---------|----------|
| | 1a | 1b | 1c | 1d | 1e | 1? | 4a | 4b | 4c | 4d | 4e | 4? |
| 生猪 (n=46) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 37(80.43) | 2(4.35) | 0(0.00) | 3(6.52) | 0(0.00) | 4(8.70) |
| 一般人群 (n=8) | 0(0.00) | 2(25.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 2(25.00) | 3(37.50) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 1(12.50) |
| 临床病例 (n=63) | 0(0.00) | 1(1.59) | 0(0.00) | 0(0.00) | 0(0.00) | 2(3.17) | 46(73.02) | 2(3.17) | 1(1.59) | 7(11.11) | 0(0.00) | 4(6.35) |

3 讨论

戊型肝炎是新发现的一种传染病,人兽共患病一直是其研究的热点之一。此次研究发现江苏省 HEV 基因型只有 1、4 两个基因型,本次研究发现人群隐性感染由 HEV-1、4 型引起的机会均等;而临床散发急性戊型肝炎则主要由 HEV-4 型引起,生猪中发现的分离株全部都是 HEV-4 型,与之前其他地区开展的研究结果一致^[8-12]。本次研究猪源 HEV 分离株在 ORF2 部分核酸序列的同源性为 84.1%~100.0%,提示该地区猪源 HEV-4 型病毒核苷酸序列存在不同程度的变异,但同一区域内的核苷酸序列高度同源;该地区一般人群和急性戊肝患者的 HEV

分离株与生猪 HEV 分离株的基因序列极为相近,核苷酸序列同源性为 70.8%~99.3%,同属于 HEV-4 型,在系统进化上没有明显的差距,相互交织在一起,提示猪可能是该地区 HEV-4 型的主要宿主动物之一,同时表明人源与猪源 HEV 间是存在共进化的关系,或者说明 HEV-4 型能在人和猪之间实现跨越种属的自由传播。

本研究发现分离株中 HEV-1 型 1b 亚型和未明确亚型间的核苷酸差异为 7%,HEV-4 型中各亚型间的核苷酸差异为 7.7%~15.1%。猪群中 HEV 感染普遍,同时其群数量的庞大和较快的繁殖速度,在自然界形成了一个巨大的病毒库,能使此类 HEV 连续传代。RNA 病毒较易变异,每一次传代均有一



依据 HEV-ORF2 部分序列(150 bp)构建系统进化树,其中包括各亚型 GeneBank 参比序列 24 株(无标志);一般人群中的亚临床感染株 8 株(●);临床散发病例感染株 63 株(▲);生猪来源分离株 46 株(■)。

图 3 人与猪感染戊型肝炎基因序列进化树

Figure 3 The phylogenetic tree of HEV strains from different sources

定程度的变异,但在单位时间内传代次数越多其变异速率就会越大。因此能在猪中持续传代的基因 HEV-4 型变异程度大于在自然界没有能高效传代的 HEV-1 型。

近年来,由于公共卫生状况的持续改善,安全饮用水源的可及性,水源性 HEV-1 型的污染逐步得到了控制;而猪群中有较高的 HEV RNA 阳性率,本研究数据显示该地区生猪的 HEV RNA 阳性率达 12.11%,作为人们主要的肉食来源之一,当人们在食用未充分灭活 HEV 的猪肉或各种脏器时,会大量摄入 HEV-4 型病毒,之前的研究表明 HEV 致病的能力与病毒量成正比^[13],因此这可能是急性戊肝病例中 HEV-4 型占绝大多数的原因或原因之一,进一步加强对生猪等 HEV 病毒宿主动物的优势基因型变化的动态监测意义重大。

[参考文献]

[1] 张雪峰,张 军,刘社兰,等. 江苏省农村地区自然人群戊型肝炎感染状况的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2008,28(3):360-363

[2] 张雪峰,张 军,刘社兰,等. 江苏省部分农村地区戊型肝炎血清流行病学研究 [J]. 中国自然医学杂志, 2007,9(1):53-55

[3] 付红伟,朱永红,庄 辉,等. 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

[4] Matsuda H,Okada K,Takahashi K,et al. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar[J]. J Infect Dis,2003,188(6):944

[5] 郑英杰,张 军,夏宁邵. 戊型肝炎是否为人兽共患病的讨论[J]. 中国人兽共患病杂志,2003,6:102-105

[6] Lu L,Li C,Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences:genetic diversity,subtypes and zoonosis[J]. Rev Med Virol,2006,16(1):5-36

[7] 葛胜祥,郭清顺,李少伟,等. 基因 、 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用 [J]. 病毒学报,2005,21(3):181-187

[8] 朱永豹,黄元成,田德英,等. 武汉地区散发性急性戊型肝炎流行特点和病毒基因型分[J]. 中西医结合肝病杂志,2011,21(1):36-39

[9] 夏玉刚,李燕婷,陆一涵,等. 华东地区散发性戊型肝炎病毒系统进化分析 [J]. 中华流行病学杂志,2009,30(12):1269-1272

[10] Yu Y,Sun J,Liu M,et al. Seroepidemiology and genetic characterization of hepatitis E virus in the northeast of China[J]. Infect Genet Evo,2009,9(4):554-561

[11] 刘志刚,曹宗喜,张得玉,等. 广东地区猪源戊型肝炎病毒的检测和核苷酸序列分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(5):94-96

[12] 张小霞,许 锋,梁振普,等. 河南地区猪戊型肝炎病毒的检测及基因序列分析 [J]. 河南农业大学学报, 2011,45(3):302-306

[13] Li SW,Zhang J,Li YM et al. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine:antigenicity,immunogenicity and protectivity on primates [J]. Vaccine,2005,23(22): 2893-2901

[收稿日期] 2011-12-13