

上海市部分地区散发性戊型肝炎病毒基因型别和发病危险因素研究

李燕婷 朱奕奕 申伟国 张爱香 张建明 任宏 袁国平 顾丽娟

【摘要】 目的 探讨上海市部分地区急性散发性戊型肝炎(戊肝)病毒(HEV)型别和发病危险因素。方法 用巢式 RT-PCR 方法检测 HEV 序列,并进行序列的同源性比较分析;同时采取 1:2 病例对照研究的方法,选取上海市 3 个区 2003-2004 年急性散发性确诊戊肝 86 例住院病例,分别配以本区和其他区健康人群对照组,用单因素和多因素 logistic 回归模型进行分析。结果 病毒序列分析表明戊肝病例中的 HEV 病毒序列属于 IV 型;单因素分析结果显示居住条件、外出就餐、有海鲜海鲜食用史等均为戊肝发病的危险因素;多因素分析结果显示海鲜(生、炆)食用史($OR = 7.048$)是戊肝感染的危险因素。结论 上海市部分地区散发性 HEV 流行株以 IV 型病毒株为主,海鲜(生、炆)食用史等是戊肝发病的危险因素。

【关键词】 戊型肝炎病毒; 危险因素; 病原学

Study on risk factors of sporadic hepatitis E virus cases in some districts of Shanghai LI Yan-ting*, ZHU Yi-yi, SHEN Wei-guo, ZHANG Ai-xiang, ZHANG Jian-ming, REN Hong, YUAN Guo-ping, GU Li-juan. *Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

【Abstract】 Objective To study the risk factors of acute sporadic hepatitis E virus(HEV) cases and to analyze its partial sequence in some districts of Shanghai. **Methods** 30 blood samples were collected from the acute sporadic HEV cases in 2003-2004 and the RT-nPCR method was applied to obtain the sequence of HEV in these cases. Meanwhile, a 1:2 case-control study was used to identify risk factors in the process of sporadic HEV infection in these regions of Shanghai. **Results** Data from the sequential analysis showed that HEV of the sporadic cases belonged to HEV genotype IV. Finding from the case-control study implicated that the housing condition, outside eating history, especially seafoods($OR = 7.048$) played an important role in the infection of HEV. Results from multiple logistic regression showed that eating raw seafoods appeared to be one of the risk factors of HEV infection. **Conclusion** HEV sequences isolated from the sporadic cases of HEV in some districts of Shanghai belonged to HEV genotype IV. Foods, especially seafood, were the risk factors in the infection of HEV.

【Key words】 Hepatitis E virus; Risk factors; Pathology

戊型肝炎(戊肝)主要为粪-口途径传播的传染病,能引起大暴发或流行。1986-1988 年我国新疆南部地区曾发生水污染引起戊肝流行,共计发病 119 280 例,死亡 707 例,是迄今世界上最大的—次戊肝流行,研究表明该流行的病毒株为 I 型^[1]。上海地区的戊肝病例多为散发型病例,每年均有病例发生。近来我国的一些研究者在部分地区的戊肝病例中发现基因型别为 IV 型的病毒。为了掌握上海地

区戊肝的主要病毒流行株的型别及其发病的危险因素,为防治策略提供科学依据,开展了本项研究。

材料与方—法

1. 血样采集、病毒检测和序列分析:

(1) 标本来源:采集闵行、宝山和奉贤区急性散发戊肝住院患者血清 30 份,约 1 ml 左右,经抗-HAV IgM、抗-HBc IgM、抗 HCV 标记物等检测均为阴性(试剂购自上海科华公司),抗-HEV IgM 检测阳性的血清(试剂购自新加坡 Genelabs 公司),保存于 -70℃ 待用。

(2) RNA 抽提和 RT-PCR 的检测:吸取 200 μl 血清标本,用 Trizol/氯仿方法直接抽提,异丙醇沉淀

基金项目:上海市卫生局资助项目(024044)

作者单位:200336 上海市疾病预防控制中心(李燕婷、朱奕奕、张爱香、任宏);上海市闵行区疾病预防控制中心(申伟国);上海市奉贤区疾病预防控制中心(张建明);上海市宝山区疾病预防控制中心(袁国平);上海市黄浦区疾病预防控制中心(顾丽娟)

法抽提血清标本中的 RNA, 溶于适量 DEPC 水中, 预备进行下一步试验。Trizol 为 Invitrogen 公司产品。每次抽提反应均设定阳性对照和阴性对照。采用巢式逆转录-聚合酶链式反应法 (RT-nPCR), 扩增戊肝病毒 (HEV) 开放阅读框 ORF2 (6302~6491 bp) 的部分序列片段。取 RNA 溶解产物, 加入逆转录 $5 \times$ buffer $4 \mu\text{l}$, 10 mmol/L dNTP $1 \mu\text{l}$, 10 pmol/L 逆转录引物 $0.6 \mu\text{l}$, RNA 酶抑制剂 $0.1 \mu\text{l}$, AMV 逆转录酶 $0.2 \mu\text{l}$, 用 DEPC 水补足体积至 $20 \mu\text{l}$ 。充分混匀后置于 42°C 水浴 40 min , 置于冰上备用, 进入下一步巢式 PCR 反应。取逆转录产物 $2 \mu\text{l}$ 作为模板, $10 \times$ buffer $2 \mu\text{l}$, dNTP $0.2 \mu\text{l}$, 正向、反向引物各 $0.2 \mu\text{l}$, Taq 酶 $0.2 \mu\text{l}$, 最后补足体积至 $20 \mu\text{l}$ 体系。PCR 反应过程为: 94°C 5 min 变性, 94°C 40 s , 53°C 40 s , 72°C 40 s 扩增 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min 结束反应。两轮反应后的 PCR 产物取 $10 \mu\text{l}$, 配制 3.5% 的琼脂凝胶, 进行琼脂糖凝胶电泳, DNA Marker 为 DGL2000, 紫外灯下观察结果, 阳性结果进行序列测定。

(3) 序列分析: 所用的参照序列, HEV I 型代表序列为 B1 (M73218)、chi-xinjiang (D11092); II 型的代表序列为 Mexico (M74506); III 型为 US-1 (AF060668)、US-2 (AF060669) 和 US-swine (AF011921); IV 型的代表序列为 chi-IV A (AJ272108)、chi-IV B (AF151963)。序列资料分析采用 Clustal W 对所分析的基因进行比较, 计算进化距离并画出基因进化树。

2. 危险因素调查:

(1) 调查对象: 选择上海市 2003-2004 年闵行、奉贤和宝山区急性散发性戊肝住院患者 86 例, 患者血清经抗-HAV IgM、抗-HBc IgM 和抗 HCV 抗体检测均为阴性, 抗-HEV IgM 为阳性。将 86 例急性散发性戊肝患者作为病例组, 按 1:2 配对的方法, 选择同一区内和区外 (黄浦区) 社区中无病毒性肝炎发病史的健康人群各 86 人作为区内和区外对照组, 要求与病例同性别、年龄 (± 5 岁)。

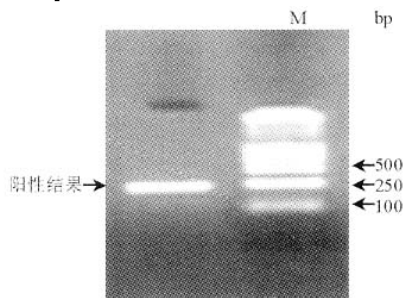
(2) 调查内容: 自行设计调查问卷, 内容包括一般情况、既往史、职业史、生活史等。一般情况主要有文化程度、居住情况、卫生设施等。生活史包括卫生习惯、饮用水源、动物接触史、在外就餐史、外出史、医学治疗史、与患者的接触史等。统一培训调查员, 采取面对面的调查方式进行现场调查。

3. 统计学分析: 用 Epi Data 3.0 软件建立数据库, 使用 SPSS 11.5 软件, 按照病例对照研究的原理, 把可能与戊肝发病相关的危险因素逐个进行单因素条件 logistic 回归分析, 然后将全部因素纳入多因素条件 logistic 回归模型分析。

结 果

1. 病毒基因检测和序列分析:

(1) 急性散发病例的 HEV 检测: 采取 RT-PCR 方法对 30 例急性散发性戊肝患者血清标本进行检测, 结果 6 份血清 PCR 检测呈现阳性, 阳性条带的大小为 190 bp 左右 (图 1)。



Marker 为 DGL2000, 阳性条带大小为 190 bp 左右

图1 上海地区 30 例急性散发性戊肝患者血清标本 RT-PCR 检测

(2) 急性戊肝患者 HEV 的序列分析: 将测序结果进行分析, 图 2 是用 Clustal W 分析 6 例患者血清中得到 HEV ORF2 的 150 bp 序列与国际标准株的序列进行比较, 国际代表株主要有 HEV I 型 (B1、chi-xinjiang); II 型 Mexico; III 型 (US-1、US-2、US-swine); IV 型 (chi-IV A、chi-IV B)。患者血清中 sh-1、sh-2、sh-3、sh-4、sh-5、sh-6 的 6 株病毒序列与 I、II、III、IV 型的同源性比较的结果, 分别为 78.7%~85.3%、82.0%~86.7%、78.0%~80.7%、84.7%~94% (表 1)。sh-1、sh-2、sh-3、sh-4、sh-5、sh-6 与 IV 型中的 chi-IV A 和 chi-IV B 的同源性分别为 90.0%、86.0%、84.7%、85.3%、85.3%、88.7% 和 88.7%、88.7%、90.0%、90.7%、89.3%、94%。HEV 中的 IV 型虽属同一型别, 序列也有一定差别, chi-IV A 和 chi-IV B 的同源性为 86.7%。从同源性分析可见 sh-2、sh-3、sh-4、sh-5、sh-6 与 chi-IV B 同源性更高, 均属于 IV 型中的 B 亚型。sh-1 与 IV 型中的 A 亚型同源性更高, 可见本次调查中得到的 HEV 序列在型别上有一定的差异。

表1 上海市部分地区散发性戊肝患者中 HEV ORF2 部分序列的同源性分析

病毒株	B1	chi-Xinjiang	Mexico	US-1	US-2	US-swine	chi-IV A	chi-IV B
sh-1	84.0	85.3	82.0	79.3	81.3	80.0	90.0	88.7
sh-2	81.3	82.7	84.7	78.0	80.0	80.7	86.0	88.7
sh-3	78.7	80.7	86.0	78.0	78.0	79.3	84.7	90.0
sh-4	79.3	80.0	86.7	78.7	78.7	80.0	85.3	90.7
sh-5	79.3	80.0	86.7	78.7	78.7	78.7	85.3	89.3
sh-6	80.7	81.3	84.7	79.3	80.0	80.0	88.7	94.0
B1	-	94.7	82.7	79.3	82.7	83.3	81.3	80.7
chi-Xinjiang	94.7	-	82.0	76.7	80.0	82.0	80.7	82.0
Mexico	82.7	82.0	-	80.0	82.0	83.3	81.3	81.3
US-1	79.3	76.7	80.0	-	94.0	90.0	78.7	80.7
US-2	82.7	80.0	82.0	94.0	-	90.7	80.7	78.7
US-swine	83.3	82.0	83.3	90.0	90.7	-	78.7	79.3
chi-IV A	81.3	80.7	81.3	78.7	80.7	78.7	-	86.7
chi-IV B	80.7	82.0	81.3	80.7	78.7	79.3	86.7	-

表2 上海地区散发性戊肝单因素条件 logistic 回归分析

因素	β	Wald χ^2 值	P 值	OR 值(95% CI)
文化程度高	-1.676	5.397	0.020	0.187(0.046 ± 0.770)
居住情况差	1.310	4.522	0.033	3.708(1.108 ± 12.406)
卫生设施差	2.311	4.972	0.026	10.088(1.323 ± 76.942)
合用厨房水池	1.714	5.249	0.022	5.551(1.281 ± 24.057)
经常外出就餐	1.295	7.351	0.007	3.652(1.432 ± 9.315)
海鲜(生、炆)食用史	1.209	10.399	0.001	3.351(1.607 ± 6.989)
河鲜(生、炆)食用史	0.816	4.838	0.028	2.262(1.093 ± 4.680)
火锅食用史	0.738	5.983	0.014	2.092(1.158 ± 3.781)

讨 论

本次研究采用分子生物学方法从上海市部分地区散发性戊肝患者中得到了 6 株病毒 ORF2 的部分核苷酸序列,并与国际标准株进行了同源性的比较和分析。结果表明同属于 HEV 基因型的 IV 型,其中 sh-2、sh-3、sh-4、sh-5、sh-6 与 IV B 型位于同一基因进化树的分支,同源性在 89.3% ~ 94.0% 之间,sh-1 与 IV A 的同源性为 90%,与 chi-IV A 同属一个进化树分支。所得到的序列与国内外已报道的其他 HEV 基因型包括我国新疆株的同源性较低,为 78.7% ~ 86.7%,遗传关系较远,不在同一分支。2000 年 Wang 等^[2] 报告了 HEV IV 型基因型全基因序列,此后国内的研究显示散发性 HEV 基因不同于 20 世纪 80 年代新疆地区的爆发性流行的 HEV 株^[3]。本研究表明上海市部分地区散发性戊肝患者病毒序列与新疆爆发性流行的病毒株序列不同,以 IV 型为主,这为今后选择特异的戊肝诊断试剂进行病原学检测提供了依据。

在另外一些研究中报道^[4,5],我国部分地区猪的 HEV 序列属于基因型 IV,人和猪体内得到的 HEV 序列同属一型别,提示散发性戊肝发病与猪的

戊肝感染有一定关系,尚需要进一步的深入研究探索其可能性。

戊肝主要通过污染的水源和食物传播,水源途径的传播曾造成新疆地区戊肝大规模爆发性流行。在上海地区,戊肝的发病大多为散发性,未发生人群的暴发。本次调查中采用病例对照研究的方法,调查了戊肝发病的危险因素,结果发现居住情况差、卫生设施差、合用厨房水池、经常外出就餐、海鲜(生、炆)食用史、河鲜(生、炆)食用史、火锅食用史等是散发性戊肝发病的危险因素,多因素分析表明海鲜(生、炆)食用史是戊肝发病的主要危险因素。这与以往的研究结果基本符合^[6],进一步提示散发性戊肝感染可能的传播途径。

近年来一些研究者在猪血或内脏中分离到 HEV-RNA,提示猪携带的 HEV 可能会通过接触传播给人,或人食用未煮熟的猪的脏器可能会导致感染,本次研究将与猪接触相关的职业作为可能的危险因素列入调查,结果未发现其与上海市散发性戊肝的发病相关。是否与猪的直接接触会导致戊肝的感染,需进一步的调查予以证实。

参 考 文 献

- 1 Aye TT, Uchida T, Ma XZ, et al. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic(1986 - 1988) of China. *Nucleic Acids Res*, 1992,20:3512.
- 2 Wang Y, Zhang H, Ling R, et al. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J Gen Virol*, 2000, 81:1675-1686.
- 3 Liu Z, Chi B, Takahashi K, et al. A genotype IV hepatitis E virus strain that may be indigenous to Changchun, China. *Intervirology*, 2003,46:252-256.
- 4 王佑春, 张华远, 兰海云, 等. 猪戊型肝炎病毒的克隆和部分核酸序列分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002,22:261-265.
- 5 朱永宏, 庄辉, 董庆鸣, 等. 猪戊型肝炎病毒 IgG 抗体检测和部分核酸序列分析. *中华肝病杂志*, 2003,11:405-407.
- 6 陈健, 李燕婷, 张爱香, 等. 上海市中老年人戊型病毒性肝炎危险因素调查. *上海预防医学杂志*, 2004,16:60.

(收稿日期:2005-06-16)

(本文编辑:张林东)