

· 实验室研究 ·

西安市家畜戊型肝炎病毒携带情况调查

邵中军 郑英杰 张景霞 熊成龙 陆一涵 马文涛 徐德忠 姜庆五

【摘要】 目的 探讨西安市家畜戊型肝炎(戊肝)病毒(HEV)携带情况。方法 收集猪、犬等常见家畜的胆汁标本,采用逆转录巢式聚合酶链反应(RT-nPCR)技术扩增 HEV 基因组开放读码 2 (ORF₂)区域内 150 nt 片段;阳性标本 PCR 产物直接测序,并与 GenBank 数据库进行比对,构建进化树分析遗传特征。结果 共收集猪胆汁标本 194 份,犬胆汁标本 178 份,牛胆汁标本 79 份,羊胆汁标本 191 份。RT-nPCR 检测结果表明,四种家畜胆汁标本 HEV RNA 阳性率分别为 4.10%、0%、0%、0%;遗传距离分析发现本次得到的 HEV 与 IV 型 HEV 距离最近,其次为 I 型、II 型和 III 型;氨基酸水平也显示了同样的规律。结论 猪是 HEV 家畜宿主,IV 型是主要流行型。

【关键词】 戊型肝炎病毒;人兽共患病;家畜

An investigation on hepatitis E virus infection status among livestock in Xi'an area SHAO Zhong-jun*, ZHENG Ying-jie, ZHANG Jing-xia, XIONG Cheng-long, LU Yi-han, MA Wen-tao, XU De-zhong, JIANG Qing-wu. *Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: JIANG Qing-wu, Email: jiangqw@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To explore the carrier state of hepatitis E virus(HEV) in livestock in Xi'an area. **Methods** Bile samples from swine, canine, sheep and cow were collected from a local slaughtering house. Reverse transcriptase nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) was employed to amplify the ORF₂ region in HEV RNA genome. All positive samples were sequenced and compared with data from GenBank. Homology analysis was conducted based on the outcome of sequencing. **Results** 194, 178, 79 and 191 bile samples from swine, canine, cow and sheep were collected. Positive rates with RT-nPCR method in these domestic animals were 4.10%, 0%, 0% and 0% respectively. Genetic distance analysis indicated that strains being identified were close to genotype IV of HEV, then genotype I, II and III in nucleic acid. Same outcome was shown by the same analysis on amino acid. **Conclusion** Swine was the only reservoir of HEV in livestock and genotype IV was the prevalent genotype.

【Key words】 Hepatitis E virus; Zoonosis; Livestock

戊型肝炎(戊肝)病毒(HEV)属于经消化道传播病毒,流行病学监测显示 HEV 发病率和暴发次数近年都有上升趋势。越来越多的证据显示 HEV 属于人兽共患病^[1]。目前已经从猪、鹿等动物体内分离到 HEV 毒株^[2],从犬、猫等多种家畜体内均检测到了抗-HEV 抗体^[3,4]。除了猪与人 HEV 的关系已经得到广泛研究之外,其他家畜是否也携带病毒以及与人 HEV 的关系有待于明确。粪便中 HEV 可以直接排泄到环境中并引起人类疾病,因此检测

粪便更具有卫生学意义。然而粪便采集较胆汁标本更难;研究表明 HEV 在胆汁含量最高,其次是肝脏、粪便、淋巴结和外周血^[5],因此推断胆汁标本可能会提高检出率。本研究主要采集西安地区家畜胆汁标本,检测病毒 RNA,通过比较不同家畜的 HEV RNA 阳性率,明确常见家畜中 HEV 对人的潜在影响。

材料与方法

1. 实验材料:TRIzol Reagent 购于 Gibco 公司;引物合成、PCR 产物测序均由北京鼎国生物工程公司完成;Taq 酶、M-MLV 逆转录酶、dNTPs、DNA ladder 均购自于东洋纺生物工程有限公司。

2. 标本采集:2007 年 3-4 月从西安市某屠宰场中收集猪胆汁标本 194 份,犬胆汁标本 178 份,牛

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771842)

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院流行病学教研室(邵中军、郑英杰、熊成龙、陆一涵、姜庆五);第四军医大学预防医学系流行病学教研室(张景霞、徐德忠);大同市第二卫生防疫站(马文涛)

通讯作者:姜庆五,Email:jiangqw@shmu.edu.cn

胆汁标本 79 份,羊胆汁标本 191 份。

3. 病毒 RNA 提取: ①取胆汁 100 μ l, 加 TRIzol Reagent 500 μ l, 颠倒混匀, 室温静置 5 min, 加入氯仿 100 μ l, 振荡混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; ②取上清, 加入等体积异丙醇, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; ③吸走液体, 加入 DEPC 处理的 75% 冰乙醇 1 ml, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; ④吸走液体, 加入冰乙醇 1 ml, 颠倒混匀, 12 000 r/min 离心 10 min; ⑤吸走液体, 阴干, 加 50 μ l DEPC 水, -20℃ 保存备用。

4. 逆转录巢式聚合酶链反应 (RT-nPCR) 检测和测序: 逆转录引物以及 nPCR 引物参照文献 [6]。首先, 以 E5 引物 2 μ l 与模板 3 μ l 混合, 93℃ 3 min, -3℃ 5 min, 在 PCR 仪中完成; 然后利用 M-MLV 逆转录酶进行逆转录; 反应条件为 42℃ 50 min, 75℃ 5 min。然后利用 E1、E5 引物扩增开放读码 2 (ORF₂) 区域内 350 nt 片段; 以 E2、E41/E42 引物扩增 ORF₂ 区域内 150 nt 片段; 阳性 PCR 产物进行双向测序。

5. 同源性分析: 从 GenBank 选取 I、II、III、IV 型 HEV 全序列 32 株做参比序列, 参比序列及其 GenBank 登录号、分离地域、基因型别、宿主信息见表 1。利用 MEGA V3.0 软件将测定的核苷酸序列与 GenBank 数据库中登录的 HEV 全长基因序列进行同源性队列。序列之间差异程度的两两比较利用 Kimura-2 模型, Neighbor-Joining 模型生成进化树。

结 果

1. RT-nPCR 检测结果: 有 8 份猪胆汁标本 HEV RNA 阳性, 犬、牛、羊胆汁标本均未检测到 HEV RNA。猪、犬、牛、羊胆汁标本 HEV RNA 阳性率分别为 4.10%、0%、0%、0%。

2. 同源性分析: 8 株 150 nt 目的片段测序结果经同源性分析发现 ZJSw24 与 ZJSw47 最远, 同源性为

92.5%; ZJSw131 与 ZJSw3 最近, 同源性为 99.9%。而与参考株进行遗传距离分析后发现, 本次得到的 HEV 与 IV 型 HEV 距离最近, 其次为 I 型、II 型和 III 型; 氨基酸水平也显示了同样的规律 (表 2)。采用 Neighbor-Joining 模型构建的进化树提示本次得到的病毒均为 IV 型 HEV, 与分离于西安 (AB197673) 和上海 (AB197674) 的 HEV 毒株同源性最高 (图 1), 而这二者均是人源来源的毒株, 证实了 HEV 的人兽共患性。

表 1 参比序列及其 GenBank 基本数据特征

顺序	序列号	基因全长 (nt)	地区	型别	宿主
1	NC_001434	7176	中国新疆	I	人类
2	D11092	7207	中国新疆	I	人类
3	D11093	7194	中国新疆	I	人类
4	AY204877	7170	乍得	I	人类
5	AF051830	7199	尼泊尔	I	绒猴
6	AF076239	7194	印度	I	人类
7	AF459438	7206	印度	I	人类
8	AY230202	7212	摩洛哥	I	不明
9	M80581	7125	巴基斯坦	I	不明
10	M74506	7180	墨西哥	II	人类
11	AB089824	7262	日本	III	人类
12	AB091394	7218	日本	III	人类
13	AB189070	7247	日本	III	野猪
14	AB222182	7240	日本	III	野猪
15	AB222183	7241	日本	III	野猪
16	AB222184	7240	日本	III	野猪
17	AB236320	7236	日本	III	猫鼬
18	AB246676	7231	日本	III	不明
19	AF455784	7239	Kyrgyzstan	III	猪
20	AF082843	7207	美国	III	猪
21	AY115488	7255	加拿大	III	猪
22	AJ272108	7232	中国	IV	人类
23	AB091395	7234	日本北海道	IV	人类
24	AB097811	7258	日本北海道	IV	猪
25	AB108537	7193	中国长春	IV	人类
26	AB197673	7257	中国西安	IV	人类
27	AB197674	7260	中国上海	IV	人类
28	AB220971	7262	日本	IV	人类
29	AB220972	7271	日本北海道	IV	人类
30	AY594199	7270	中国新疆	IV	猪
31	AY723745	7262	印度	IV	人类
32	DQ279091	7228	中国黑龙江	IV	猪

注: “不明宿主”: 无文献明确说明宿主来源

表 2 西安市部分家畜 HEV RNA 核苷酸与氨基酸的遗传距离分析

片段	I 型 (%)		II 型 (%)		III 型 (%)		IV 型 (%)	
	核酸水平	蛋白水平	核酸水平	蛋白水平	核酸水平	蛋白水平	核酸水平	蛋白水平
ZJXS45	14.57~16.59	0.00~1.80	15.93	3.64	15.19~21.70	1.80~3.64	5.18~9.39	0.00
ZJXS42	14.47~17.27	0.00~1.80	14.53	3.64	15.19~21.07	1.80~3.64	2.24~9.46	0.00
ZJXS11	14.44~17.19	0.00~1.80	13.97	3.64	15.19~21.70	1.80~3.64	2.79~9.42	0.00
ZJXS47	15.15~16.55	0.00~1.80	15.23	3.64	14.50~20.93	1.80~3.64	2.24~9.46	0.00
ZJXS3	15.19~17.19	0.00~1.80	15.15	5.51	15.19~21.70	3.64~5.51	2.79~10.69	0.00
ZJXS9	13.14~17.27	1.80~3.64	15.93	5.51	15.88~20.93	3.64~5.51	3.39~12.13	1.80
ZJXS13	12.48~16.55	0.00~1.80	15.23	3.64	15.19~21.17	1.80~3.64	2.81~10.83	0.00
ZJXS24	17.14~20.02	7.41~9.35	18.59	11.33	17.84~24.53	9.35~11.33	5.68~12.16	7.41

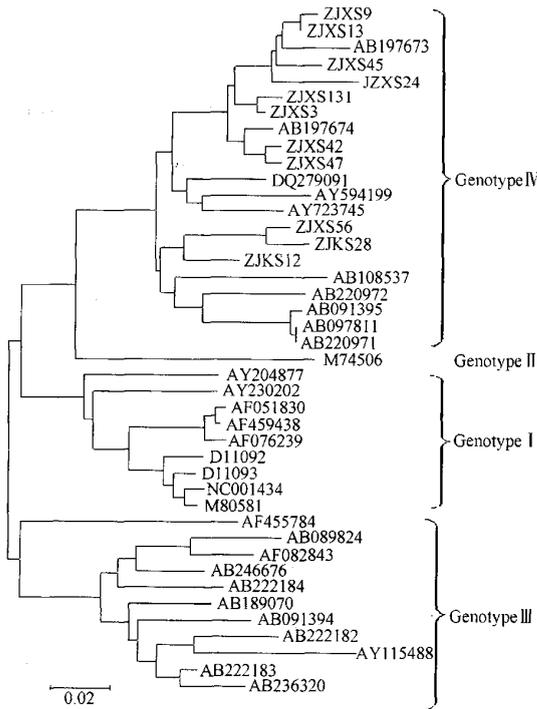


图1 西安市 8 株猪 HEV 进化树分析

讨 论

戊肝主要通过消化道传播,在卫生条件相对较差的发展中国家流行;发达国家患者常有在 HEV 流行区的旅行史。1990 年 Balayan 等^[7]首次用 HEV 感染家猪获得成功,揭示了猪在 HEV 自然循环中的作用。近年资料表明 HEV 不仅在人类中流行,在猪体内亦可发现,从而产生了“戊肝属人兽共患病,猪是其自然宿主”的假设。Zheng 等^[6]对从事生猪屠宰业的职业人群进行了流行病学调查,证实猪与职业人群 HEV 感染率高度相关,首次明确了猪与人群戊肝的关系。

然而,越来越多的血清学证据提示动物 HEV 感染非常普遍。李红文等^[8]对我国部分地区鹿和牛群 HEV 感染情况进行调查后发现,鹿血清抗 HEV 抗体阳性率为 43.61%,牛血清抗体阳性率为 20.00%。朱永红等^[9]调查发现,猪、羊等家畜的天然感染率也非常高,Saad 等^[10]在马群中也得到类似的结果。这些家畜如此的高感染率,其对人类 HEV 感染的状况同样值得关注。本次调查主要以猪、牛、羊、犬为研究对象,从屠宰场收集 600 余份各类家畜胆汁标本直接检测 HEV RNA;在牛、羊、犬标本中均未检测到 HEV RNA,惟有猪胆汁标本中检测到

HEV RNA。尽管牛、羊、犬都存在高比例的自然感染^[8],但未能检测到 HEV RNA,因此其作为人类戊肝传染源的可能性不大。本次得到的 HEV 均为 IV 型,与分离于西安和上海市的人源 HEV 毒株同源性最高,直接证实了 HEV 的人兽共患性。

Deus 等^[5]研究表明,HEV 在胆汁含量最高,其次是肝脏、粪便、淋巴结和外周血,因此推断胆汁标本可能会提高检出率。即便如此,本次调查猪 HEV 阳性率也仅为 4.11%,低于华东地区的阳性率(10%左右)^[6]。这可能是由于西北地区干旱少水,而华东地区水网密集,水量充足,更利于 HEV 传播。获得的 HEV 序列经过同源性分析显示均为 IV 型,与华东地区的主要研究结果一致^[6],说明 IV 型是我国猪 HEV 流行型。本次调查结果不仅提示了猪可能是人 HEV 的惟一宿主家畜,同时也验证了猪是 HEV 自然宿主的这一假说。

参 考 文 献

- [1] 郑英杰,张军,夏宇邵. 戊型肝炎是否为人兽共患病的讨论. 中国人兽共患病杂志,2003,19(6):102-105.
- [2] Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. Rev Med Virol, 2003,13(3):145-154.
- [3] Cláudia LV, Marcelo A, Lia L, et al. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, 2005,100(2): 117-122.
- [4] Mochizuki M, Ouchi A, Kawakami K, et al. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. Vet Rec,2006,159(25):853-854.
- [5] Deus N, Seminati C, Pina S, et al. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. Vet Microbiol,2007,119(2-4):105-114.
- [6] Zheng Y, Ge S, Zhang J, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. J Infect Dis,2006,193(12):1643-1649.
- [7] Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, et al. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. J Med Virol, 1990,32(1): 58-59.
- [8] 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. 中国病原生物学杂志,2006,1(6):45-48.
- [9] 朱永红,陈焰锋,唐荣兰,等. 猪、羊、鸡抗-HEV 抗体流行率调查. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,18(2):127-128.
- [10] Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, et al. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. Infect Genet Evol,2007,7(3): 368-373.

(收稿日期:2007-09-17)

(本文编辑:尹廉)