

# 北京市郊区八种动物戊型肝炎病毒抗体 流行率调查及病毒基因型研究

耿家宝 付红伟 王玲 王晓娟 关建民 常义宾 李凌君  
朱永红 庄辉 刘全红 彭兴春

**【摘要】** 目的 调查北京地区与人密切接触的猪、牛、羊、马、驴、犬、鸡、鸭8种动物血清中戊型肝炎病毒(HEV)抗体流行率及该地区猪HEV基因型和亚型。方法 收集8种动物的血清标本及幼猪粪便标本,用双抗原夹心ELISA法检测血清中抗-HEV;用巢式反转录聚合酶链反应法(RT-nPCR)检测HEV RNA;对部分PCR产物进行克隆和测序,并对测序结果进行基因分型。结果 在8种动物中抗-HEV阳性率分别为猪80.43%(481/598),其中成猪(>6月龄)为87.86%(369/420),幼猪(2~3月龄)为62.92%(112/178);牛15.02%(52/346);马14.29%(40/280);驴0(0/26);羊9.88%(33/334);犬0(0/21);鸭3.03%(7/231);鸡2.53%(8/316)。RT-nPCR检测3月龄以下猪粪便标本HEV RNA阳性率为66.67%(74/111)。HEV RNA阳性的标本测序后可归为6株(分别命名为***bjsw1***、***bjsw2***、***bjsw3***、***bjsw4***、***bjsw5***和***bjsw6***),6株HEV开放读码框2(ORF2)部分核苷酸序列的相似性为94.5%~99.6%,与1、2、3、4型HEV的相似性分别为75.6%~78.6%、75.6%~76.2%、77.1%~80.7%和83.7%~94.5%。6株HEV与人HEV 4d亚型的同源性最高,为90.0%~94.5%。结论 北京市郊区猪、牛、马、羊、鸭、鸡中均存在HEV感染,其中猪抗-HEV流行率最高,驴、犬抗-HEV的流行率最低;6株猪HEV属于基因4型、4d亚型。

**【关键词】** 戊型肝炎病毒;抗-HEV;基因型;人兽共患病

**Hepatitis E virus (HEV) genotype and the prevalence of anti-HEV in 8 species of animals in the suburbs of Beijing** GENG Jia-bao<sup>1</sup>, FU Hong-wei<sup>1</sup>, WANG Ling<sup>1</sup>, WANG Xiao-juan<sup>1</sup>, GUAN Jian-min<sup>2</sup>, CHANG Yi-bin<sup>1</sup>, LI Ling-jun<sup>1</sup>, ZHU Yong-hong<sup>1</sup>, ZHUANG Hui<sup>1</sup>, LIU Quan-hong<sup>2</sup>, PENG Xing-chun<sup>2</sup>. 1 Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; 2 Beijing Huairou Districtal Center for Animal Disease Control

Corresponding author: WANG Ling, Email: lingwang@bjmu.edu.cn; ZHUANG Hui, Email: zhuangbmu@126.com

This work was supported by a grant from the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA02Z453) and National Natural Science Foundation of China (No. 30570063)

**【Abstract】 Objective** To investigate the prevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) and genotypes of hepatitis E virus in 8 species of animals including swine, cattle, sheep, horse, donkey, dog, chicken and duck in the suburb of Beijing. **Methods** Serum samples were collected from the 8 species of animals, and fecal samples of younger swine were collected from 2 stock farms. Anti-HEV was detected by Double Antigen Sandwich Assay. HEV RNA from fecal samples was detected by a reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR). Parts of the PCR products were cloned and sequenced. The swine HEV sequences were analyzed genetically. **Results** The positive rates of anti-HEV in serum specimens of swine, cattle, horse, donkey, sheep, dog, duck and chicken were 80.43% (481/598), 15.02% (52/346), 14.29% (40/280), 0 (0/26), 9.88% (33/334), 0 (0/21), 3.03% (7/231) and 2.53% (8/316), respectively. The anti-HEV prevalence of adult swine ( $\geq 6$  months) and younger swine ( $\leq 3$  months) were 87.86% (369/420) and 62.92% (112/178) respectively. 74 of 111 (66.67%) pig faces were positive for HEV RNA. Sequence analysis on these positive samples showed that there were 6 groups of HEV designated as *bjsw1*, *bjsw2*, *bjsw3*, *bjsw4*, *bjsw5* and *bjsw6*. The 6 strains of HEV shared 94.5%~99.6% sequence identity of partial HEV ORF2 nucleotide with each other. The identities of HEV ORF2 nucleotide sequences between the 6 strains and genotype

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.012

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2006AA02Z453);国家自然科学基金(30570063)

作者单位:100191 北京大学医学部(耿家宝、付红伟、王玲、王晓娟、常义宾、李凌君、朱永红、庄辉);北京市怀柔区动物疫病预防控制中心(关建民、刘全红、彭兴春)

通信作者:王玲, Email: lingwang@bjmu.edu.cn; 庄辉, Email: zhuangbmu@126.com

1, 2, 3 and 4 were 75.6%–78.6%, 75.6%–76.2%, 77.1%–80.7% and 83.7%–94.5%, respectively. The sequence identity between the 6 strains and human HEV genotype 4d was 90.0%–94.5%.  
**Conclusion** HEV infection was seen in swine, cattle, horse, sheep, duck and chicken in the suburbs of Beijing. The anti-HEV positive rate appeared the highest in swine and the lowest in dog and donkey. The six strains of HEV isolated from younger swine belonged to genotype 4d.

**【Key words】** Hepatitis E virus; Anti-HEV antibody; Genotype; Zoonosis

戊型肝炎病毒(HEV)主要经粪口途径传播,也有经输血传播的报道<sup>[1]</sup>。根据病毒核酸序列分析,HEV至少有5个基因型,其中5型为禽HEV<sup>[2,3]</sup>。迄今研究表明,1、2型HEV只能感染人,3、4型HEV既可感染人,也可感染多种动物。最近,Zhao等<sup>[4]</sup>在甘肃省农场养殖兔的血清中检测到抗-HEV和HEV RNA,二者的阳性率分别为57.0%(191/335)和7.5%(25/335),扩增出兔HEV ORF2部分片段的核苷酸序列与1、2、3、4型及5型(禽)HEV的相似性分别为73%~77%、70%~76%、75%~82%、71%~77%和53%~65%,基因进化分析提示,兔HEV可能为一种新的基因型。兔HEV是否为人畜共患及其与其他基因型HEV的关系还有待进一步研究。流行病学调查发现,在许多国家人群和动物(猪、犬、猫、羊、啮齿类动物和非人灵长类动物)血清抗-HEV阳性率很高<sup>[5]</sup>,提示动物可能是HEV宿主,并在HEV传播过程中发挥着重要作用。越来越多的证据表明,戊型肝炎(HE)的发生和流行与动物宿主密切相关,Yazaki等曾报道<sup>[6-8]</sup>,在日本、荷兰、美国等地商店出售的猪肝中检出HEV RNA;Tei等<sup>[9]</sup>和Tamada等<sup>[10]</sup>曾分别报道食用过未煮熟的鹿肉和野猪肉后发生HE的病例,并在剩余的鹿肉中检出HEV RNA,其核酸序列与患者HEV核酸序列的同源性高达99.7%。因此,HE目前已被列入人畜共患传染病,人是HEV的天然宿主。为了进一步探讨HEV在自然界中的动物宿主及传播途径,本研究对北京市怀柔区的8种动物血清抗-HEV流行率、猪HEV基因型及亚型进行分析,结果报告如下。

**材料与方法**

1. 标本来源:从北京市怀柔区2个养猪场分别采集屠宰成猪血420份;用一次性注射器通过前腔静脉采集幼猪血178份;在农户家通过颈静脉分别采集不同动物血(肉牛77份、奶牛269份、马280份、驴26份和羊334份);通过前肢静脉采集犬血21份;从1个养鸭场采集屠宰鸭血231份、2个养鸡场采集屠宰鸡血316份。采集的动物血离心后取血清分装成3管置-80℃冰箱备用。从2个养猪场采集3月龄以下猪粪便111份,每头猪采集单份新鲜粪便。

2. 血清抗-HEV抗体检测:采用双抗原夹心ELISA法,用HEV总抗体诊断试剂盒(北京万泰生物药业有限公司)检测8种动物血清中的HEV抗体。严格按说明书操作。

3. 猪粪便HEV RNA检测:①用PBS(0.01 mol/L, pH值7.4)将猪粪便稀释为10%的悬液,振荡混匀,4℃条件下4000 r/min离心15 min,取上清液置-80℃保存。②用Trizol试剂盒(美国Invitrogen公司)提取悬液中RNA,提取过程严格按照说明书进行。③参照4个基因型的HEV序列(AB108537、AJ272108、AY594199、M74506、AF060668、D11093、D11092、L08816、M94177和L25547)在ORF2的保守区域设计1套引物(S引物见表1)。④对提取液进行RT-nPCR检测, RNA模板35 μl, 10×PCR缓冲液5 μl, 10 mmol/L dNTP 1 μl, S1、S4各3 μl, AMV反转录酶0.2 U, 42℃反转录50 min。加入2.5 U的Taq DNA聚合酶,然后进入第1轮PCR:94℃4 min, 94℃30 s, 52℃30 s, 72℃35 s, 30个循环, 72℃延伸5 min;第2轮PCR引物为S2、S3各3 μl,加第1轮产物5 μl,总体积为50 μl, 94℃预热4 min,然后94℃30 s, 52℃30 s, 72℃30 s, 30个循环, 72℃延伸5 min。为了避免交叉污染,病毒提取过程及PCR过程均设阴性对照和阳性对照,病毒提取、PCR过程和电泳分别在不同房间进行。第二轮PCR产物用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化,连接入PGEM-T载体(美国Promega公司),送北京华大中生科技发展有限公司测序。

**表1 检测ORF2的引物序列**

引物	序列(5'~3')	位点
S1	ATGTTCGYATYYTWTGCCA	5887~5905
S2	TGGCGYTCKGTTGAGACCTCY	5967~5987
S3	CDGCCGACGA AATCAATTCTG	6369~6349
S4	GWCGGTCYTGTCTCATGYTG	6549~6531

注:Y=C/T, S=C/G, W=A/T, K=G/T, D=G/A/T;引物位点参照中国猪HEV基因序列(GenBank登录号:AY594199)

4. 序列相似性分析及基因型:用Vector NTI Suite 9.0对所分析的基因序列进行同源性比较,用Bioedit计算核苷酸序列的相似性,用Mega 4.0绘出基因进化树。序列分析所用1、2、3、4型HEV ORF2参照序列分别为AF444003、M80581、X98292、D10330、M73218、M94177、AF076239、D11093; M74506;

AF060669、AF060668、AF082843、AB301710、AB073912、AJ272108、AB161717、AY594199、EU676172、AB197673、EU366959、AB097812。所用4a、4b、4c、4d和4e亚型参照序列分别为AF296162、AF117275、AJ344171、AF134812；AB124818、AF117280、AJ344186、AF103940；AB107367、AB105888、AB105902、AB094223、AB079762；AY594199、AY596308、AJ272108；AF324501和AB108537。

结果

1. 血清抗-HEV 抗体检测：用双抗原夹心ELISA法检测8种动物血清抗-HEV阳性率分别为猪80.43%(481/598)，其中成猪为87.86%(369/420)，幼猪为62.92%(112/178)；牛15.02%(52/346)；马14.29%(40/280)；驴0(0/26)；羊9.88%(33/334)；犬0(0/21)；鸭3.03%(7/231)；鸡2.53%(8/316)。

2. 猪粪便HEV RNA检测：用S引物分别检测111份幼猪粪便标本，共有74份标本HEV RNA阳性，阳性率为66.67%。随机选取阳性标本的PCR产物25份测序，用Vector NTI Suite 9.0对测序结果进行同源性分析，测序结果显示共有6株HEV，分别命名为***bjsw1***、***bjsw2***、***bjsw3***、***bjsw4***、***bjsw5***和***bjsw6***。

3. 核苷酸序列相似性分析：对6株HEV ORF2的部分核苷酸序列进行相似性分析，6株HEV间的相似性为94.5%~99.6%，与1、2、3、4型HEV参照株的相似性分别为75.6%~78.6%、75.6%~76.2%、77.1%~80.7%和83.7%~94.5%。6株HEV与4d亚型的相似性最高，为90.0%~94.3%，与4a、4b、4c、4e、4g的相似性分别为82.7%~87.7%、86.7%~90.3%、85.0%~89.7%、83.9%~87.1%和84.0%~85.7%(表2、3)。

4. 进化树分析：用MEGA 4.0软件对6株HEV ORF2部分片段进行进化分析，6株HEV序列均在基因4型分支上并属于d亚型(图1、2)。

讨论

本研究对8种动物血清抗-HEV检测结果显示，

表2 6株HEV 核酸序列与4型HEV 核酸序列的相似性比较(%)

	4	3	2	1	<i>bjsw6</i>	<i>bjsw5</i>	<i>bjsw4</i>	<i>bjsw3</i>	<i>bjsw2</i>	<i>bjsw1</i>
<i>bjsw1</i>	84.3~93.6	77.1~77.7	75.9	76.5~78.6	94.8	94.8	94.5	94.8	94.5	100
<i>bjsw2</i>	84.3~93.6	78.6~80.7	75.9	76.5~77.4	99.6	99.0	98.1	99.0	100	
<i>bjsw3</i>	84.0~94.5	78.3~80.1	75.9	75.6~77.1	99.3	99.3	99.0	100		
<i>bjsw4</i>	84.0~93.6	79.8~78.3	75.9	76.2~78.0	98.4	99.0	100			
<i>bjsw5</i>	83.7~93.9	78.0~80.1	75.6	76.2~77.1	98.7	100				
<i>bjsw6</i>	84.6~93.9	78.6~80.7	76.2	76.2~77.7	100					
1	74.4~80.1	74.7~78.0	75.6~78.9	100						
2	73.2~76.8	71.7~73.5	100							
3	74.7~80.4	100								
4	100									

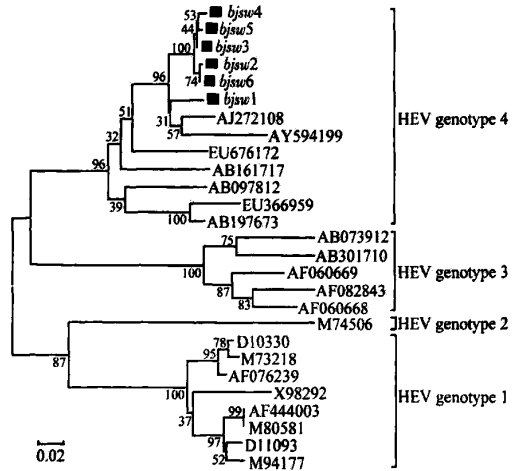


图1 猪 HEV ORF2 部分核苷酸序列的生物种系进化树分析

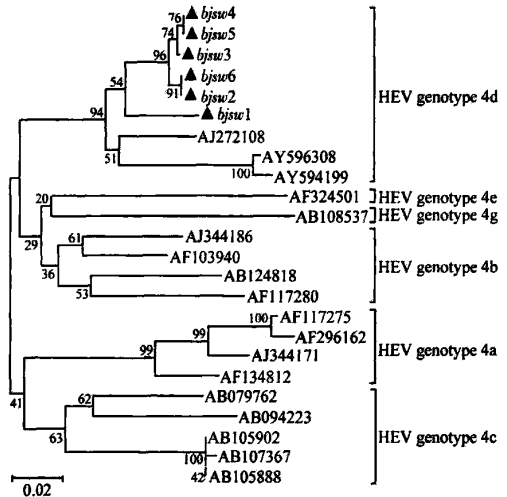


图2 猪 HEV ORF2 部分核苷酸序列的生物种系进化树亚型分析

猪血清抗-HEV 阳性率最高(80.43%)，其中幼猪(62.92%)与成猪(87.86%)血清抗-HEV 阳性率经 $\chi^2$ 检验， $P < 0.001$ ，差异有统计学意义。该结果提示，随着猪龄的增加，抗-HEV 阳性率升高，虽然不同地区的研究结果显示，成猪与幼猪的抗-HEV 阳性率不尽相同，但与同地区的其他动物相比，猪的抗-HEV 阳性率均为最高<sup>[11,12]</sup>，证明 HEV 在猪群中广泛流行，猪作为 HEV 的动物宿主在 HEV 的传播过程中发挥重要作用。因此，控制 HEV 在猪群中的流行，对控制 HEV 在人群中暴发或流行具有重要意义。马血清抗-HEV 阳性率为 14.29%(40/280)，与朱光泽等<sup>[12]</sup>报道长春地区马

表3 6株HEV核酸序列与4型HEV各亚型核酸序列的相似性比较

	4g	4e	4d	4c	4b	4a
bjsw1	85.3	83.9	90.6~93.3	85.0~89.7	86.7~88.3	82.7~85.3
bjsw2	85.7	87.1	90.3~93.6	85.7~87.7	88.3~90.3	84.3~87.7
bjsw3	85.0	86.4	90.3~94.3	85.7~87.7	87.0~89.7	83.7~87.0
bjsw4	84.0	85.7	90.0~93.3	85.7~87.3	86.7~88.7	83.7~87.0
bjsw5	84.7	86.1	90.0~94.0	85.7~88.0	87.3~89.3	83.7~87.0
bjsw6	85.7	87.1	90.3~93.6	85.7~87.7	87.7~90.3	84.3~87.7

血清中抗-HEV 流行率为 15.74% 相似,但是从马血清中分离出 HEV RNA 的报道很少,曾有报道从马血清中分离到 1 型 HEV<sup>[13]</sup>,最近 Zhang 等<sup>[14]</sup>报道从马血清中分离出 3 型 HEV,但马是否为 HEV 的动物宿主以及马 HEV 与人和其他动物 HEV 的相似性、同源性尚需进一步研究。目前,已经从多种动物血清中检出抗-HEV,但从动物血清中分离出 HEV RNA 的报道却相对较少,多种动物(马、牛、羊、鼠等)血清中很难分离出 HEV 的原因可能是病毒在体内持续复制的时间较短、血清中病毒滴度较低。本研究中驴和犬血清中抗-HEV 检测结果均为阴性,可能由于检测的样本量较少所致(分别为 26 份和 21 份),故北京地区驴和犬中是否存在 HEV 的感染尚有待进一步研究证实。

鸡血清抗-HEV 阳性率为 2.53%(8/316),与朱光泽等<sup>[12]</sup>报道接近。本研究表明,鸡和鸭血清抗-HEV 阳性率较低,说明 HEV 在鸡、鸭群动物中的感染率较低。也可能是由于本研究应用人 HEV 株 ORF2 基因表达的重组蛋白作为诊断试剂抗原检测禽 HEV 抗体灵敏度和特异度偏低有关。HEV 是否能在鸡、鸭中流行,其与其他动物和人 HEV 的同源性,以及家禽中 HEV 的真实流行情况等有待深入研究。

以往报道,在我国猪 HEV 以 4 型为主<sup>[15]</sup>。根据最新基因分型方法做进化树分析,本研究分离的 6 株 HEV 均在基因 4 型分支上,且均为 d 亚型,与 Li 等<sup>[16]</sup>报道北京地区猪 HEV 为 4 型一致。该 6 株 HEV 与本地区 1 株急性肝炎患者 HEV 的核酸序列(AJ272108)同源性最高<sup>[17]</sup>,为 90.0%~94.3%,提示猪 HEV 可能为该地区 HEV 散发病例的重要传染源。另外,应高度重视的是:本研究发现幼猪粪便的 HEV RNA 阳性率为(66.67%),这也与抗-HEV 在猪群中的高流行率相一致。Nakai 等<sup>[18]</sup>报道 2 月龄幼猪粪便中 HEV RNA 阳性率可高达 75%~100%。HEV RNA 阳性率各地报道也不尽相同,可能与采集标本的季节、猪龄以及 HEV RNA 检测方法的灵敏度有关。本研究采集标本的时间为春季,猪龄为 2 月龄左右,抗-HEV 阳性率为 62.92%,HEV RNA 阳

性率为 66.67%,提示 HEV 在 3 月龄以下的猪群中广泛流行,并通过粪便大量排病毒。我们以往研究显示,幼猪养殖场的工人抗-HEV 阳性率明显高于成猪屠宰场的工人和正常对照组人群<sup>[19]</sup>,因此,加强对幼猪粪便的管理以及对养殖场工人的预防保护措施,对切断 HEV 的传播途径具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Matsubayashi K, Kang JH, Sakata H, et al. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion*, 2008, 48(7):1368-1375.
- [2] Schlauder GG, Mushahwar IK. Genetic heterogeneity of hepatitis E virus. *J Med Virol*, 2001, 65(2):282-292.
- [3] Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatosplenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol*, 2001, 82:2449-2462.
- [4] Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J Med Virol*, 2009, 81(8):1371-1379.
- [5] Meng XJ. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol*, 2000, 33(5):842-845.
- [6] Rutjes S, Schreuder TCMA, Reesink H, et al. HEV genotype 3 reservoirs in the Netherlands. *Hepatol*, 2006, 44(4):674A-675A.
- [7] Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. 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 Gen Virol*, 2003, 84(9):2351-2357.
- [8] Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, et al. Detection and characterization of infectious hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol*, 2007, 88:912-917.
- [9] Tei S, Kitajima N, Takahashi K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 2003, 362(9381):371-373.
- [10] Tamada Y, Yano K, Yatsushashi H, et al. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, 2004, 40(5):869-870.
- [11] Wei XF, Liang JR, Tang RL, et al. Serum epidemiological survey of hepatitis E virus infection among swine, rats and dogs in Guangxi. *Chin J Public Health*, 2007, 23(2):228-229. (in Chinese) 韦献飞, 梁靖瑞, 唐荣兰, 等. 广西地区猪、鼠、狗戊型肝炎病毒感染血清学分析. *中国公共卫生*, 2007, 23(2):228-229.
- [12] Zhu GZ, Liu TM, Sun ZF, et al. Prevalence of hepatitis E virus in animals in Changchun area, China. *Chin J Biologicals*, 2007, 20:570-574. (in Chinese) 朱光泽, 刘铁梅, 孙中锋, 等. 戊型肝炎病毒在长春地区动物群中的流行病学研究. *中国生物制品学杂志*, 2007, 20:570-574.
- [13] Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, et al. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol*, 2007, 7:368-373.
- [14] Zhang W, Shen Q, Mou J, et al. Hepatitis E virus infection among domestic animals in Eastern China. *Zoonoses Public Health*, 2008, 55(6):291-298.
- [15] Lu L, Li C, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev Med Virol*, 2006, 16(1):5-36.
- [16] Li W, She R, Wei H, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol*, 2009, 133(1-2):75-83.
- [17] 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(7):1675-1686.
- [18] Nakai I, Kato K, Miyazaki A, et al. Different fecal shedding patterns of two common strains of hepatitis E virus at three Japanese swine farms. *Am J Trop Med Hyg*, 2006, 75(6):1171-1177.
- [19] Chang Y, Wang L, Geng J, et al. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): a study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol Res*, 2009, 39(12):1153-1158.

(收稿日期:2009-09-09)  
(本文编辑:张林东)