

华东和华南地区商品猪戊型肝炎病毒携带率和基因分型分析

夏玉刚 陆一涵 胡安群 秦雪 董晓莲 朱建福 姜庆五 郑英杰

【摘要】 目的 了解华东和华南地区商品猪戊型肝炎病毒(HEV)的携带率和基因分型。方法 2007—2009年收集华东和华南地区5家屠宰场商品猪胆汁600份,应用巢式RT-PCR方法检测HEV RNA,测序后做系统进化分析。结果 600份猪胆汁中有47份(7.83%)分离出HEV RNA。基于HEV ORF2区域内150-nt序列的系统进化分析结果,分离的47份HEV病毒株均属于IV型,与I、II、III和IV型参考病毒株的核苷酸同源性分别为75.0%~83.4%、75.0%~84.6%、71.9%~80.7%和88.1%~91.5%,且大部分病毒株按采样地区来源表现出地区聚集性。结论 HEV在华东和华南地区的商品猪中广泛存在,应加强对商品猪食用安全问题的关注。

【关键词】 戊型肝炎病毒;携带率;基因型;猪

Study on the prevalence and genotype of hepatitis E virus among commercial swine population in Eastern and Southern China XIA Yu-gang¹, LU Yi-han¹, HU An-qun², QIN Xue³, DONG Xiao-lian⁴, ZHU Jian-fu⁴, JIANG Qing-wu¹, ZHENG Ying-jie¹. 1 Department of Epidemiology, School of Public Health, Fudan University, the Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education, Shanghai 200032, China; 2 Anqing Municipal Hospital of Anhui Province; 3 The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University; 4 Center for Disease Control and Prevention of Deqing County, Zhejiang Province Corresponding author: ZHENG Ying-jie, Email: yjzheng@shmu.edu.cn This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 30771842, 30872158) and Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. B118).

【Abstract】 Objective To determine the prevalence and genotype of hepatitis E virus (HEV) among commercial swine population in Eastern and Southern China. **Methods** Six hundred specimens of swine bile collected from 5 slaughterhouses in Eastern and Southern China from 2007 to 2009 were tested for HEV RNA using nested RT-PCR. PCR products were sequenced for phylogenetic analysis. **Results** Forty-seven out of the 600 samples (7.83%) were positive for HEV RNA. Based on the 150 nt fragment within HEV ORF2, data from phylogenetic analysis revealed that all the 47 HEV isolates were identified to be genotype IV, sharing 75.0%–83.4%, 75.0%–84.6%, 71.9%–80.7% and 88.1%–91.5% nucleotide identities with prototype I, II, III and IV HEV strains respectively while majority of the isolates clustered within their respective isolation sites. **Conclusion** HEV was widespread in commercial swine population in Eastern and Southern China that raised a serious concern about the safety regarding the consumption of pork products.

【Key words】 Hepatitis E virus; Prevalence; Genotype; Swine

戊型肝炎病毒(HEV)为一种无包膜单股正链RNA病毒,基因组全长约7.2 kb,有3个开放式阅读框架(ORF)构成^[1],根据核苷酸序列的变异情况,哺乳动物HEV被分为I、II、III和IV型4种基因型,各基因型内部又可分为不同的亚型^[2]。基因I型主要分布于亚洲、非洲和南美洲,II型仅见于墨西哥、乍

得和尼日利亚,基因III型为全球分布,基因IV型多见于中国、日本和印度^[3]。不同基因型HEV的流行模式有所不同,基因I和II型多引起戊型肝炎流行或暴发,基因III和IV型以散发多见^[4]。除人以外,在多种动物(如猪、犬、猫、猫鼬、家禽和鹿等)体内均可检测出HEV或血清抗体^[5]。为了解我国华东和华南地区商品猪HEV的携带率和基因分型情况,本研究收集2007—2009年上述地区5市(县)600份商品猪胆汁标本进行分析,结果报告如下。

材料与方法

1. 标本采集:本研究于2007—2009年以上海

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.016

基金项目:国家自然科学基金(30771842, 30872158);上海市重点学科项目(B118)

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院流行病学教研室 教育部公共卫生安全重点实验室(夏玉刚、陆一涵、姜庆五、郑英杰);安徽省安庆市立医院(胡安群);广西医科大学第一附属医院(秦雪);浙江省德清县疾病预防控制中心(董晓莲、朱建福)

通信作者:郑英杰, Email: yjzheng@shmu.edu.cn

市、浙江省德清县、安徽省安庆市、江苏省海门市和广西壮族自治区南宁市为研究现场(表1),选取当地主要的商品猪屠宰场各一所,在生猪屠宰后收集猪胆囊标本共600份,每份各采集胆汁约2 ml, -80 °C保存。

表1 5市(县)600份猪胆囊标本的采集时间和来源地

地区(省、市)	采集时间(年-月)	生猪来源地	标本编号
浙江德清	2007-10, 2009-03	浙江	SZ, 1 ~ 100, 601 ~ 700
安徽安庆	2007-10	安徽、河南	SA, 1 ~ 100
江苏海门	2008-01	江苏	SJ, 1 ~ 100
上海	2007-10	上海、湖南	SS, 1 ~ 100
广西南宁	2009-03	广西	SG, 1 ~ 100

2. 病毒RNA的提取:本研究设计了单份检测(直接对每份标本逐一进行检测)和混合检测(将3份标本混合后进行检测;发现阳性后,再对混合的每份标本逐一进行检测)两种方法分离检测HEV。单份检测时,每份猪胆汁标本抽取150 μl;混合检测时,从每份标本中抽取85 μl猪胆汁,然后每3份标本进行混合。按操作说明利用TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司)从单份/混合标本中提取HEV RNA,并溶解于10 μl DEPC水。提取的RNA立即用于后续实验或保存于-80 °C备用。为比较两种检测方法检出能力和成本效果的优劣,本研究对2007—2008年收集得到的400份标本(表1)分别进行了单份和混合检测。

3. 巢式RT-PCR和测序:42 °C,以E5(5'-WGA RAG CCA AAG CAC ATC-3')为引物,AMV反转录酶(大连宝生物公司)反转录40 min,利用巢式PCR扩增ORF2区域内150-nt片段(参考缅甸株6317~6466 nt, GenBank登录号D10330),第一轮PCR使用的引物为:E1(5'-CTG TTT AAY CTT GCT GAC AC-3')和E5(5'-WGA RAG CCA AAG CAC ATC-3'),第二轮PCR使用的引物为:E2(5'-GAC AGA ATT GAT TTC GTC G-3')和E4-1(5'-TGT TGG TTR TCA TAA TCC TG-3')或E4-4(5'-TGC TGG TTA TCG TAA TCC TG-3'),其中Y代表C或T, R代表A或G, W代表A或T, 两轮PCR反应条件均为:94 °C预变性5 min; 94 °C变性30 s, 53 °C复性30 s, 72 °C延伸40 s, 35个循环; 72 °C延伸5 min^[6]。阳性PCR产物经割胶、纯化后进行测序(上海华大基因生物工程公司)。每份PCR产物均双向测序以获得准确的核苷酸序列。

4. 系统进化分析:本研究从GenBank中下载33条HEV全长序列作为比对的参考序列(表2)。选用Clustal X(Version 2)软件对参考序列病毒株和本研

究中获得病毒株的核苷酸序列进行比对,然后使用Modeltest(Version 3.7)软件模拟常规的56种核苷酸置换模型,并以Akaike信息准则(AIC)选择最佳模型。最后用BEAST(Version 1.5.2)软件包,以随机树为先验树,运用Markov Chain Monte Carlo(MCMC)法迭代50 000 000次,每迭代1000次拟合1次样本树,舍弃10%的老化样本后构建最终的系统进化树^[7]。系统进化树中,后验概率>0.7的进化分支被认为有足够的支持证据。

表2 参考的全序列HEV病毒株

名称	GenBank 登录号	基因 型	宿主	地区	分离 年份
1hCN86Xin	L08816	I	人	China: Xinjiang, Hetian	1986
1hCN88Xin	D11092	I	人	China: Xinjiang, Hetian	1988
1hIN00Lon	DQ459342	I	人	India: Lonawala	2000
1hMM82Ran	M73218	I	人	Burma: Rangoon	1982
1hMM89Ran	D10330	I	人	Burma: Rangoon	1989
2hMX86Tel	M74506	II	人	Mexico: Telixtac	1986
3hJP99	AB246676	III	人	Japan	1999
3hUS96Min	AF060668	III	人	USA: Minnesota	1996
3pCN08Sha	FJ527832	III	猪	China: Shanghai	2008
3pKR071	FJ426403	III	猪	South Korea	2007
3pMN061	AB290313	III	猪	Mongolia	2006
3pTH07Nak	EU375463	III	猪	Thailand: Nakhon Pathom & Ratchaburi	2007
4CN06Gua1	EU366959	IV	猪	China: Guangxi	2007
4hCN00Bei	AJ272108	IV	人	China: Beijing	2000
4hCN00Cha	AB108537	IV	人	China: Changchun	2000
4hCN01Sha	AB197674	IV	人	China: Shanghai	2001
4hCN98Xia	AB197673	IV	人	China: Xi'an	1998
4hJP00Sap	AB074917	IV	人	Japan: Sapporo	2000
4hJP00Toc	AB080575	IV	人	Japan: Tochigi	2000
4hJP02Nii	AB193178	IV	人	Japan: Niigata	2002
4hJP03Tok	AB291964	IV	人	Japan: Tokyo	2003
4hJP900Ki	AB253420	IV	人	Japan: Okinawa	1990
4hJP95Hok	AB161717	IV	人	Japan: Hokkaido, Sapporo	1995
4hJP98Hok	AB220974	IV	人	Japan: Hokkaido	1998
4pCN01Xin	AY594199	IV	猪	China: Xinjiang	2001
4pCN02Daq	DQ279091	IV	猪	China: Daqing	2002
4pCN03cha	EF077630	IV	猪	China: Changchun	2003
4pCN05Sha1	DQ450072	IV	猪	China: Shanghai	2005
4pCN05Sha2	EF570133	IV	猪	China: Shanghai	2005
4pCN06Gua2	EU676172	IV	猪	China: Guangxi	2007
4pCN08Gan	FJ610232	IV	猪	China: Gansu	2008
4pCN09Xin2	GU119960	IV	猪	China: Xinjiang	2009
4pJP02Hok	AB097811	IV	猪	Japan: Hokkaido	2002

5. 统计学分析:运用SPSS 13.0软件,对混合检测和单份检测两种方法的HEV RNA阳性检出率差异做配对 χ^2 检验和一致性Kappa检验,检验水准 α 设为0.05。

结 果

1. 混合和单份检测方法的比较:混合检测和单份检测方法对400份标本检测的结果显示,HEV

RNA 阳性检出率分别为 7.25% 和 7.75% (表 3), 两种方法阳性检出率的差异无统计学意义 ($\chi^2=0.5, P>0.05$; Kappa=0.96, 95% CI: 0.91 ~ 1.00), 因此尚不能认为两种方法的检出能力不同。然而, 采用混合检测和单份检测的检测次数分别为 223 次和 400 次, 前者仅为后者的 55.75%。

表 3 400 份猪胆囊标本两种检测方法的比较

混合阳性	单份检测		合计
	阳性	阴性	
阳性	29	0	29
阴性	2	369	371
合计	31	369	400

2. 不同地区商品猪 HEV 的携带率: 以南宁市商品猪的 HEV 携带率最高 (10.00%), 德清县的携带率最低 (6.50%)。5 市 (县) 共计检出 47 份阳性标本, 平均携带率为 7.83% (表 4)。

表 4 5 市 (县) 商品猪 HEV 的携带率

地区 (省、市)	检测份数	阳性份数	携带率 (%)
浙江德清	200	13	6.50
安徽安庆	100	7	7.00
江苏海门	100	8	8.00
上海	100	9	9.00
广西南宁	100	10	10.00
合计	600	47	7.83

3. 系统进化分析: 按照 AIC 准则, 在 56 种常规的核苷酸置换模型中, GTR+G 模型拟合最优。本次研究分离到的 47 条核苷酸序列位点间置换速率的变异模式服从 Gamma 分布, 分布参数 α 为 0.1889, 碱基之间的转换/颠换率比为 2.283, 推算其进化速率每年约为 3.81×10^{-3} 位点, 95% CI: $(3.79 \sim 3.83) \times 10^{-3}$ 位点。构建的系统进化树显示, 上述 47 株 HEV 病毒株均为基因 IV 型, 与基因 I、II、III 和 IV 型参考序列的核苷酸同源性分别为 75.0% ~ 83.4%、75.0% ~

84.6%、71.9% ~ 80.7% 和 88.1% ~ 91.5%, 与基因 IV 型的同源性最高。47 株中, 大部分病毒株根据采样的地区来源呈聚集分布, 但也存在少量散在分布 (图 1)。

讨 论

猪粪便、血液、肝脏和胆汁均可分离和检测出 HEV RNA, 检出率由高到低依次为肝脏、胆汁 (或胆汁、肝脏)、粪便和血液^[8-10]。然而, 猪粪便容易在猪圈内发生交叉污染; 猪血液采集困难, 且 HEV RNA 检出率低; 猪肝脏是 HEV 最主要的靶器官, HEV RNA 检出率高, 但肝脏内有丰富的内源性 RNA 酶, 易降解 HEV RNA, 检测前需对此类酶做预处理, 增加实验难度, 因此三者均不适用于大规模 HEV 流行病学研究。胆囊是猪 HEV 的靶器官之一, 作为消化器官还具有浓缩胆汁的功能, 可使胆汁中的 HEV 浓度升高, 易于检出; 同时, 胆囊中的胆汁有囊壁保护, 与外界隔离, 避免了采集时的交叉污染, 此外, 胆汁标本的采集、保存和预处理简单, 使得猪胆汁更适合做大规模 HEV 检测的标本。

猪胆汁标本较多时, 单份检测方法需要投入大量人力和物力, 本研究设计了混合检测方法分离 HEV。假设共有猪胆汁标本 N 份, HEV RNA 的检出率为 $a\%$, 3 份为一混合标本。不考虑重复检测的情

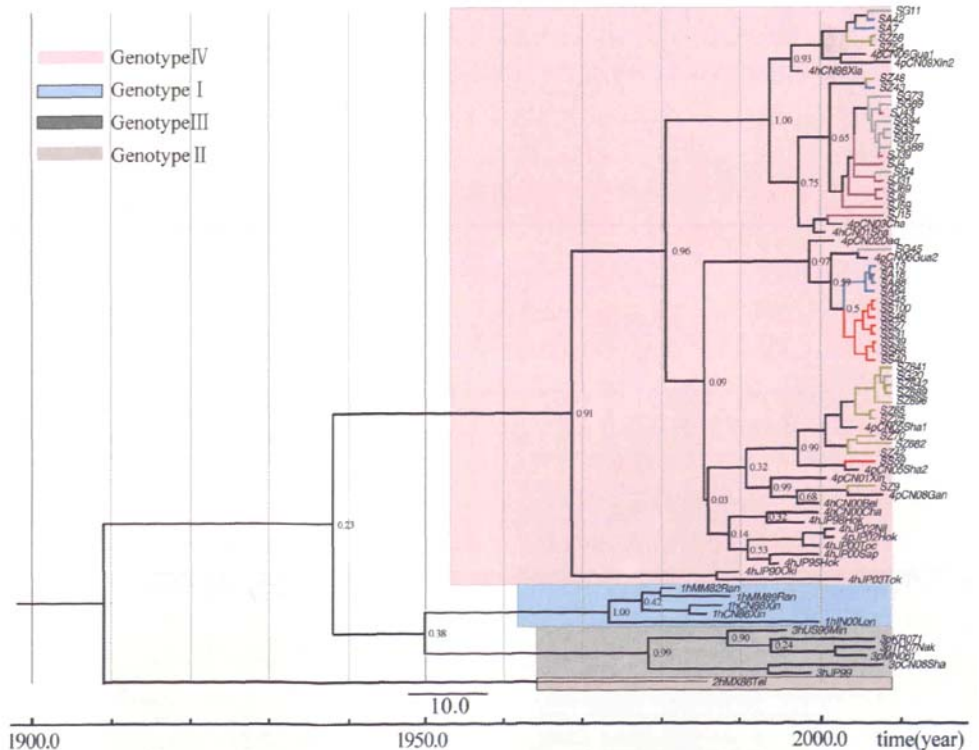


图 1 HEV ORF2 区域内 150-nt 序列系统进化树

况下,单份检测需要检测 N 次;混合检测首先需要检测 $N/3$ 次,假设每份混合标本中最多只包含一份阳性标本,则还需要 $a\% \times N \times 3$ 次(若至少有 2 份阳性标本混合在同一份混合标本中,则检测次数更少),因此混合检测最多需要检测 $(N/3 + a\% \times N \times 3)$ 次。我国猪群中 HEV RNA 的检出率为 1.8% ~ 24%^[11-15],若 $a\%$ 在 1.8% ~ 19% 之间取值,则混合检测最多需要检测 $38.73\% \times N$ 次至 $90.33\% \times N$ 次,相对单份检测至少能减少约 1/10 至 3/5 的检测次数;若 $a\%$ 在 19% ~ 22% 之间取值时,两种方法的检测次数可能相差不大;若 $a\% > 22\%$ 则单次检测方法可能比混合检测更优。本研究用此两种方法对 400 份商品猪胆汁标本进行检测,结果表明,两种方法对 HEV RNA 检出能力的差异无统计学意义,然而,在 HEV RNA 的检出率为 7.75% 时,前者相对于后者减少了 44.25% 的检测次数,有效地降低了工作量和成本,具有明显的成本效果优势。

猪是 HEV 的一种自然动物宿主,且与人的日常生活密切相关,猪 HEV 与人 HEV 之间的关系越来越受到关注。研究表明,美国的人与猪 HEV ORF2 和 ORF3 区域内核苷酸序列同源性高达 79% ~ 92.1%^[16,17];我国浙江和北京地区均发现与猪接触的职业暴露人群(包括养猪场工人、屠宰厂工人、兽医及猪肉销售人员)比一般人群的 HEV 抗体携带率高^[13,18];在日本有戊型肝炎患者高度怀疑是由于生食猪肝或食用未煮熟的猪肉所致^[19,20],均提示戊型肝炎可能为一种人兽共患病。迄今为止,我国华东和华南地区猪群中发现的 HEV 包括基因 III 型和 IV 型,其中 III 型仅见于上海地区^[11,13,21,22];而本次研究在华东和华南地区 5 市(县)分离的 47 株猪 HEV 序列均属于基因 IV 型。

在系统进化树中,47 株样本病毒株按采样的地区来源呈现出以地区聚集为主、散在分布并存的特征,说明同一地区大部分 HEV 的核苷酸序列同源程度较高,亲缘关系较近。存在少量散在分布可能是由于各采样地区的生猪并非完全来自当地(如上海市的生猪有部分来自湖南省,安庆市的生猪有部分来自河南省),以及同一地区的病毒株也存在一定的进化差异所致。

本次研究表明,华东和华南地区商品猪 HEV 的携带率为 6.5% ~ 10%,存在着食用安全隐患。

参 考 文 献

[1] Lu L, Li CH, Hagedorn CH. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and

- zoonosis. *Rev Med Virol*, 2006, 16(1):5-36.
- [2] Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*, 2008, 80(4):646-658.
- [3] Dalton HR, Bendall R, Ijaz S, et al. Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*, 2008, 8(11):698-709.
- [4] Okamoto H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res*, 2007, 127(2):216-228.
- [5] Vasickova P, Psikal I, Kralik P, et al. Hepatitis E virus: a review. *Vet Med (Praha)*, 2007, 52(9):365-384.
- [6] Ge SX, Guo QS, Li SW, et al. Design and preliminary application of a set of highly sensitive universal RT-PCR primers for detecting genotype I/IV hepatitis E virus. *Chin J Virol*, 2005, 21(3):181-187. (in Chinese)
- 葛胜祥,郭清顺,李少伟,等.基因 I、IV 型戊型肝炎病毒高灵敏度通用引物的设计和初步应用. *病毒学报*, 2005, 21(3):181-187.
- [7] Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*, 2007, 7:214.
- [8] Halbur PG, Kasornrorkbua C, Gilbert C, et al. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3):918-923.
- [9] de Deus N, Seminari 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.
- [10] Williams TPE, Kasornrorkbua C, Halbur PG, et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(9):3040-3046.
- [11] Ji YL, Zhu YH, Liang JR, et al. Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *J Gastroenterol*, 2008, 43(7):565-570.
- [12] Li XJ, Zhao CY, Harrison TJ, et al. Investigation of hepatitis E virus infection in swine from Hunan province, China. *J Med Virol*, 2008, 80(8):1391-1396.
- [13] Zheng YJ, Ge SX, Zhang J, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *Am J Infect Dis*, 2006, 193(12):1643-1649.
- [14] Shao ZJ, Li JH, Zheng YJ, et al. Epidemiological screening of hepatitis E virus in bile specimens from livestock in northwest China. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(3):814-816.
- [15] Yan YJ, Zhang W, Shen Q, et al. Prevalence of four different subgenotypes of genotype 4 hepatitis E virus among swine in the Shanghai area of China. *Acta Vet Scand*, 2008, 50:12.
- [16] Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(18):9860-9865.
- [17] Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Mol Virol*, 1998, 79(3):447-456.
- [18] Chang YB, Wang L, Geng JB, 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.
- [19] Matsuda H, Okada K, Takahashi K, et al. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *Am J Infect Dis*, 2003, 188(6):944.
- [20] 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.
- [21] Li LJ, Zhu YH, Fu HW, et al. Full-genome nucleotide sequence and analysis of a Chinese swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 identified in the Guangxi Zhuang autonomous region: evidence of zoonotic risk from swine to human in south China. *Liver Int*, 2009, 29(8):1230-1240.
- [22] Lu YH, Zheng YJ, Zhu JF, et al. Identification of the genotype III hepatitis E virus from swine herds in China. *Chin J Dis Control*, 2007, 11(1):5-10. (in Chinese)
- 陆一帆,郑英杰,朱建福,等.中国发现基因 3 型戊型肝炎病毒. *中华疾病控制杂志*, 2007, 11(1):5-10.