DOI：10.3969/j.issn.1002－2694.2022.00.099

·实验研究·

烟台市2015－2018年人感染戊型肝炎病毒基因型分析

崔伟红[1]，刘　娟[2]，宫连凤[2]，颜丙玉[3]，徐迎春[2]

摘　要：目的　分析2015－2018年烟台市人感染戊型肝炎病毒（HEV）基因型别变化，探讨分子流行病特征。**方法**　选取烟台市2015－2018年国家法定传染病报告系统上报的戊型肝炎病例为研究对象，采集血清标本检测HEV-IgM抗体，对血清HEV-IgM阳性病例的血清和粪便标本提取HEV核酸，采用逆转录PCR方法对HEV开放式阅读框架2区域内的核苷酸片段（644 bp）进行扩增，测序后进行系统进化分析。**结果**　共采集360份血清样本，198份（55％）样本HEV-IgM阳性。HEV-IgM阳性的血清标本，HEV核酸检出率27.78％（55/198）；粪便标本HEV核酸检测阳性率39.58％（19/48）。总阳性病例数72例，男性48例，女性24例。本次检测的72例HEV病毒株基因型全部是Ⅳ型，以4d亚型为主，占77.78％（56株）；其次是4b亚型，占19.44％（14株）；4a亚型占2.78％（2株）。72株HEV核苷酸序列的遗传距离为0.002～0.303。56株4d亚型HEV序列与山东地区猪源（KF176351）、羊源（KU904267）、牛源（KU904278）HEV序列的遗传距离为0.021～0.160、0.010～0.178、0.008～0.176。**结论**　基因Ⅳ型HEV在2015－2018年烟台地区占主导趋势，4d亚型为主要流行株。本地人感染HEV可能与进食动物制品或密切接触动物相关。

关键词：戊型肝炎病毒；基因型；序列分析
中图分类号：R373.2　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1002－2694(2022)08－0703－04

Genotype distribution of human hepatitis E virus in Yantai, 2015－2018

CUI Wei-hong[1], LIU Juan[2], GONG Lian-feng[2], YAN Bing-yu[3], XU Ying-chun[2]

(1.*Shandong College Of Traditional Chinese Medicine, Yantai* 264003, *China*;
2.*Yantai Center for Disease Control and Prevention, Yantai* 264003, *China*;
3.*Shandong Center for Disease Control and Prevention, Jinan* 250012, *China*)

Abstract: This study analyzed the genotype changes in hepatitis E virus (HEV) infection in Yantai from 2015 to 2018, to explore the molecular epidemiology characteristics. HEV cases reported to the National Notifiable Disease Reporting Systems from 2015 to 2018 in Yantai were studied. A total of 360 serum samples were collected for HEV-IgM antibody detection. Nucleic acid was extracted from serum and fecal samples of HEV-IgM positive cases. Nested reverse transcription-polymerase chain reaction was used to amplify 644 bp fragments within the HEV open reading frame (ORF2) region, to perform phylogenetic analysis. A total of 198 (55%) serum samples were positive for HEV-IgM. The positivity rate of HEV strains was 27.78% (55/198), and that in feces was 39.58% (19/48). The total number of positive HEV strains was 72, in 48 males and 24 females. The genotypes of 72 HEV strains detected in this study were type IV, mainly 4d subtype (77.78%, 56 strains), 4b subtype (19.44%, 14 strains) and 4A subtype (2 strains). The genetic distance of the HEV nucleotide sequence in 72 strains was 0.002－0.303. The genetic distances between 56 4d HEV subtypes and swine-origin HEV (KF176351), sheep-origin HEV (KU904267) and cattle-origin HEV (KU904278) were 0.021－0.160, 0.010－0.178 and 0.008－0.176, respectively. The dominant strain of HEV in Yantai was genotype IV, 4d subtype. Animal-borne HEV transmission may be the main source of HEV in this region.

Keywords: hepatitis E virus; genotype; sequence analysis

山东省医药卫生科技发展计划项目（No.202012050924）
通讯作者：颜丙玉，Email：ybingyu0916@163.com；
ORCID：0000-0002-7931-4787
作者单位：1.山东中医药高等专科学校，烟台　264003；
2.烟台市疾病预防控制中心，烟台　264003；
3.山东省疾病预防控制中心，济南　250012

Supported by the Medical Research and Development Program of Shandong Province (No.202012050924)
Corresponding author: Yan Bing-yu, Email: ybingyu0916@163.com

戊型病毒性肝炎(简称戊肝,HE)是由戊肝病毒(HEV)感染引起的肝脏传染病,主要经消化道传播。近年来中国戊肝报告发病率呈逐渐上升趋势[1-3],东部地区发病率明显高于西部和中部[4]。烟台是沿海开放城市,近年来戊肝发病率为全省平均水平的近 6 倍[5],给群众造成了巨大的经济负担。HEV 主要分为 4 个基因型,基因Ⅰ和Ⅱ型仅人类感染,主要在发展中国家流行;基因Ⅲ、Ⅳ型人兽共患,以散发为主,猪是主要宿主之一,Ⅲ型世界各地均有报道,Ⅳ型主要分布于亚洲国家,尤其中国[6-8]。为了解烟台市人感染戊肝病毒流行株的基因型别,我们收集了法定传染病报告系统报告的戊肝病例,采集急性期粪便和血清标本,用套式 RT-nPCR 进行病毒核酸检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选择 2015－2018 年法定传染病报告系统报告的戊肝病例为研究对象,收集病人的基本信息。采集病例血清标本和粪便标本,血清标本进行 HEV-IgM 抗体检测,对 HEV-IgM 阳性者提取戊肝病毒 RNA,进行核酸检测。共采集 360 份血清、48 份粪便标本。

1.2 试剂 HEV-IgM 抗体检测试剂盒由北京万泰生物药业股份有限公司生产;RNA 提取试剂盒由德国 Qiagen 公司生产;AMV 逆转录酶由美国 Promega 公司生产;PCR 反应试剂、缓冲液由宝生物工程大连有限公司生产。实验检测委托山东省和烟台市疾病预防控制中心完成。

1.3 标本处理 粪便标本用 pH7.4 PBS 稀释,充分震荡混匀,制成 10% 悬液(w/v),4 ℃ 3 000 r/min离心 20 min 提取上清待检;血清标本直接检测。

1.4 HEV RNA 提取、扩增和测序 参考文献[9]合成 HEV ORF2 区域特异性引物,委托上海生工生物工程股份有限公司合成。引物为:HEV 外侧上游:5′-GAYGGSACYAAYACYCATATWATGGC-3′ (5 648-5 673);HEV 外侧下游:5′-GTYGGCTCGCCATTGGCYGAGAC-3′ (6 350-6 372);HEV 内侧上游:5′-GARGCWTCWAATTAYGCCCAGTAYCG -3′ (5 678-5 703);HEV 内侧下游:5′-CCAGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3′ (6 298-6 321)。

取 140 μL 血清或粪便悬液,用 RNA 提取试剂盒进行 RNA 提取,收集 50 μL 提取液。采用 AMV 逆转录酶,在 42 ℃、50 min 进行逆转录;用巢式 PCR(nested PCR, nPCR)扩增 HEV 核苷酸片段。第一轮 PCR 反应:94 ℃预变性 120 s;94 ℃变性 60 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,扩增 45 个循环;72 ℃延伸 10 min;第二轮 PCR 反应:94 ℃预变性 120 s;94 ℃变性 60 s,60 ℃退火 60 s,72 ℃延伸 90 s,扩增 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。

最终获得的 PCR 终产物序列长度为 644 bp(基因组第 5 678～6 321 位,参考缅甸株 M73218),其中用于序列分析的区段长度为 540 bp(病毒基因组第 5 765～6 304 位)。所有 PCR 阳性产物由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。

1.5 基因序列分析 采用 mega7.0 对本研究所得序列和 GenBank 数据库下载的参考序列进行分析,计算遗传距离,并用邻接法构建基因进化树,计算 Bootstrap 值,检验进化树各分支置信度,进行 1 000 次重复运算,当 Bootstrap 值＞70 时则构建的进化树可靠。

1.6 统计学分析 采用 Epidata3.0 软件录入数据,用 SPSS18.0 软件进行统计分析。采用方差分析比较不同亚型组间数值变量差异,采用 Fisher 精确概率法比较不同亚型组建分类变量差异。双侧检测,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 基本情况 共采集了 360 份血清标本和 48 份粪便标本。采集的 360 份血清样本中,198 份 HEV-IgM 阳性,阳性率 55.00%。198 份血清标本中,55 份 HEV 核酸检测阳性,阳性率 27.78%。48 份粪便标本中,19 份 HEV 核酸检测阳性,阳性率 39.58%。其中 2 例病例血清和粪便标本同时阳性。总阳性病例数 72 例,男性 48 例,女性 24 例。发病 3 周内采集的粪便 HEV 核酸阳性率(57.1%)高于发病 3 周后采集的粪便 HEV 核酸阳性率(15.0%)($P=0.003$),发病 3 周内采集的血清 HEV 核酸阳性率(37.9%)高于发病 3 周后采集的血清 HEV 核酸阳性率(2.2%)($P<0.001$)。见表 1。

2.2 基因型分布 本次检测的 72 例 HEV 基因型全部是 4 型。4d 亚型的构成比最高,占 77.78%(56/72);其次是 4b 亚型,占 19.44%(14/72);4a 亚型的构成比最低,占 2.78%(2/72)。采用 Fisher 确切概率法进行组间构成比比较,不同亚型在各年份的构成比差异无统计学意义($P=0.195$)。不同亚型的季节构成差异无统计学意义($P=0.908$)。不同亚型的性别构成比差异无统计学意义($P=0.132$)。4a、4b、4d 亚型病例的年龄分别是(50.0±

7.07)岁、(57.6±9.74)岁、(58.6±10.77)岁,差异无统计学意义($F=0.667$,$P=0.517$);4a、4b、4d亚型病例的ALT值分别是(742.0±912.17)U/L、(1234.8±835.56)U/L、(854.9±821.97)U/L,差异无统计学意义($F=1.235$,$P=0.297$)。见表1。

表1　2015－2018年烟台市HEVRNA检测阳性数量及分布

Tab.1　Number positive and distribution of HEV RNA in Yantai from 2015 to 2018

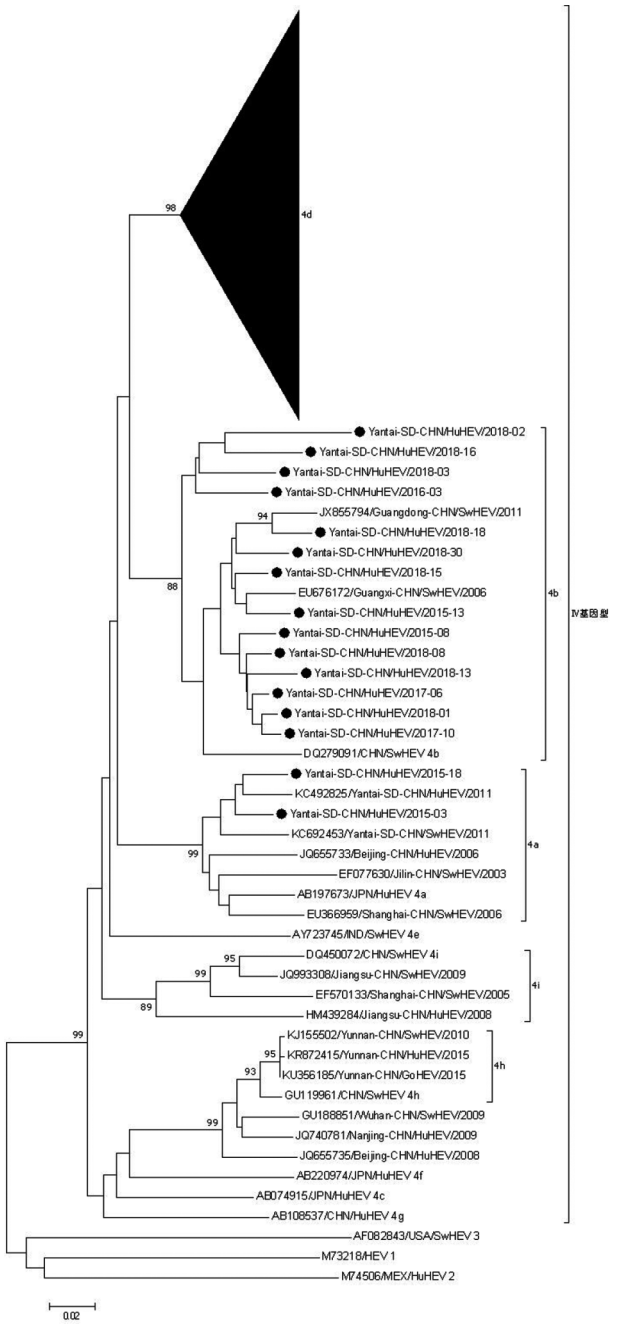
项目	血标本数	HEV-IgM阳性数	粪便标本数	HEVRNA阳性数	HEV基因亚型		
					4a亚型	4b亚型	4d亚型
性别							
男	226	131	34	48	2	12	34
女	134	67	14	24	0	2	22
年份							
2015	100	78	28	21	2	2	17
2016	55	51	1	4	0	1	3
2017	93	17	4	17	0	2	15
2018	112	52	15	30	0	9	21
季节							
春	123	77	24	35	2	8	25
夏	79	38	8	14	0	2	12
秋	77	43	9	13	0	3	10
冬	81	40	7	10	0	1	9
合计	360	198	48	72	2	14	56

2.3　遗传距离分析　人感染HEV核苷酸序列的遗传距离为0.002～0.303。其中4a亚型间的遗传距离是0.035;4b亚型间的遗传距离是0.015～0.127;4d亚型间的遗传距离是0.002～0.094。对72例病人和不同物种的核苷酸序列遗传距离进行分析,结果显示本次分离出的56株4d亚型HEV序列与山东地区猪源(KF176351)、羊源(KU904267)、牛源(KU904278)HEV序列的遗传距离为0.021～0.160、0.010～0.178、0.008～0.176;14株4b亚型与广西(EU676172)、广东(JX855794)、黑龙江(DQ279091)猪源HEV序列的遗传距离为0.033～0.180;2株4a亚型HEV序列与吉林(EF077630)和上海(EU366959)猪源HEV序列的遗传距离为0.060～0.226。见图1。

3　讨　论

近年来戊肝在病毒性肝炎中发病占比逐年升高[10],开展戊肝病原学监测对于分析戊肝病毒传播路径,有效进行戊肝防控非常重要[11]。欧洲地区已经建立HEV分子监测网络,涵盖了人、动物、食品和外环境等各类来源的HEV[12]。我国也有不少学者在进行HEV分子流行病学研究。有研究显示,戊肝患者感染后2周内血清HEV RNA阳性率可高达90%左右[13],但因戊肝早期发病不典型,病例往往症状持续一段时间才就诊,另外部分基层医院不具备诊断能力,确诊时间靠后,采集标本时往往病例已经发病较长时间,因此HEV RNA检出率不高。本研究血清标本核酸总阳性率27.78%(55/198),高于江苏(19.2%)[14]但低于上海(32.79%)[15]的阳性率。粪便标本的核酸阳性率相对较高,达到阳性率39.58%(19/48),可能与采集粪便样本时,仅选择了发病早期的病例有关。

研究显示,我国HEV最常见的Ⅳ型病毒,常见亚型是4a、4d和4h亚型[16]。本次检测的烟台戊肝流行株均属于第Ⅳ基因组,流行株以4d亚型(占77.78%)为主,其次是4b亚型(19.44%),4a亚型占比最低(2.78%)。本次未在样本中检出4c亚型,山东省和烟台市以往的检测中也未曾检出4c亚型[11,17],推测4c亚型在烟台地区不是优势株。而2012年烟台地区人源HEV主要流行株是4a亚型,其次是4d亚型[17]。说明各年份的流行优势株有差异,这与疾病的自然流行规律有关系。各年份之间



●本研究戊型肝炎病毒(HEV)序列;图中未详细展示 HEV 4d 亚型进化分支,包含 56 株本研究序列和 6 株参考序列。

图 1 2015－2018 年烟台市 HEV 分离株 ORF2 区域基因序列进化树

Fig.1 Evolutionary tree of the ORF2 sequence of HEV in Yantai from 2015 to 2018

的流行株并无特定的进化关系,可能与戊肝感染的多源性,高度散发有关。

国际病毒分类委员会(International Committee for Taxonomy of Viruses,ICTV) 按病毒的分子结构对 HEV 分类提出了新的建议:用氨基酸序列所建立的遗传进化树所计算出的遗传距离的大小进行基因分型[18],当 P 值小于 0.30 为同一个基因型。本次分离出的烟台市人感染 HEV 核苷酸序列全部为Ⅳ型,总遗传距离为 0.002～0.303,其中 4a 亚型间的遗传距离是 0.035;4b 亚型间的遗传距离是 0.015～0.127;4d 亚型间的遗传距离是 0.002～0.094。在获得的毒株中,亲缘关系很近,但是没有完全一致的毒株,符合散发感染的特点。

分离出的 4d 亚型 HEV 序列与山东地区猪源、羊源、牛源 HEV 序列的遗传距离分别为 0.021～0.160、0.010～0.178、0.008～0.176,表明烟台市人感染 HEV 序列与猪、牛、羊等动物亲缘关系均较近,提示本地 HEV 感染可能存在跨物种传播,动物源性传播不容忽视。一方面人感染 HEV 可能与进食动物制品有关[19],也可能与 HEV 病毒动物粪便污染导致密切接触传播有关,尚需进一步研究。

本次的研究样本均来自于国家传染病监测网络,由于流行病学调查信息的局限性,对于肝功能仅收集了 ALT 指标,未进一步进行传染源的追溯,但对于追踪烟台地区 HEV 基因特征变化和进行人感染 HEV 病毒传播来源分析提供了重要的线索。

利益冲突:无

引用本文格式:崔伟红,刘娟,宫连凤,等. 烟台市 2015－2018 年人感染戊型肝炎病毒基因型分析[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(8):703-706,713. DOI:10.3969/j.issn.1002－2694.2022.00.099

参考文献:

[1] 孙校金,张国民,郑徽,等. 2004－2017 年中国戊型肝炎流行特征分析[J]. 中华预防医学杂志,2019,53(4):382-387. DOI:10.3760/cma.j.issn.02539624.2019.04.010

[2] Ren X, Wu P, Wang LP, et al. Changing epidemiology of hepatitis A and hepatitis E viruses in China, 1990－2014[J]. Emerg Infect Dis, 2017, 23(2): 276-279. DOI: 10.3201/2302.161095

[3] 刘振球,左佳鹭,严琼,等. 我国 2004－2014 年戊型肝炎流行的时空特征及趋势分析[J]. 中华流行病学杂志,2017,38(10):1380-1385. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.10.017

[4] 孙校金,王富珍,郑徽,等. 中国 2004－2015 年不同预防接种阶段甲型肝炎和戊型肝炎流行病学特征比较[J].中华流行病学杂志,2018,39(10):1351-1355. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.10.012

[5] 姜梅,崔伟红,李波,等. 烟台市戊型病毒性肝炎流行特征及危险因素分析[J].中华流行病学杂志,2010,31(12):1414-1418. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.12.022

[6] María Teresa Pérez-Gracia, Mario García, Beatriz Suay, et al. Current knowledge on hepatitis E[J]. J Clin Transl Hepatol, 2015, 3(2): 117-126. DOI: 10.14218/JCTH.2015.00009

(下转第 713 页)