

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.20.003

文章编号: 1005-8982(2016)20-0012-04

论著

河南省部分地区人群散发戊型肝炎流行病学 及病毒基因型分析*

刘霞¹, 王帅², 武跃明², 司海超³, 王婷², 司伏生²

(1. 江苏大学医学院, 江苏 镇江 212013; 2. 南阳医学高等专科学校 医学技术系, 河南 南阳 473000;
3. 河南省南阳市中心医院 麻醉科, 河南 南阳 473000)

摘要:目的 研究分析河南省南阳地区散发戊型肝炎的流行病学特征及流行毒株的基因型。**方法** 在对目标人群的戊型肝炎流行病学调查过程中,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)对采集到的血清样本进行抗体检测,对其中抗体为阳性的戊型肝炎病例,通过巢式 PCR(nested RT-PCR)方法,扩增基因组 ORF2 区域 150 bp 的片段并进行测序及生物信息学分析。**结果** 本研究采集到的 1 100 份血清样品中有 295 份血清戊肝抗体阳性,阳性率 26.8%。男女戊肝患病比为 1.86 : 1, 戊肝患者中男性多于女性,80.3% 的患者集中在 35 岁及以上的年龄组。HEV RNA 检测表明 128 份血清阳性,阳性率 43.4%,病毒序列在分型上属于基因 4 型,与中国西安株的核苷酸序列同源性最高。**结论** 南阳地区的戊肝以散发为主,基因 4 型是该地区的优势基因型。本地区戊肝的亲缘关系与中国西安株最近,推断两地毒株可能来源于戊肝病毒的同一种系。

关键词: 戊型肝炎;病毒;流行病学;基因

中图分类号: R512.6

文献标识码: A

Epidemiological and genotype analysis of sporadic Hepatitis E in some parts of Henan*

Xia Liu¹, Shuai Wang², Yue-ming Wu², Hai-chao Si³, Ting Wang², Fu-sheng Si²

(1. School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212013, China; 2. Department of medical technology, Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473000, China; 3. Anesthesiology Department, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China)

Abstract: Objective To investigate the epidemiological characteristics of the sporadic Hepatitis E infection cases in Nanyang area. **Methods** In the investigation process of the target population, ELISA was used to detect the antibodies in the collected serum samples. The 150bp fragments of the ORF2 were amplified from the positive samples by nested RT-PCR and the target fragments were sequenced and analyzed. **Results** 295 of 1100 serum samples were HEV antibody positive, and the positive rate was 26.8%. Sporadic hepatitis E cases of 80.3% occurred with age over 35, and the male to female ratio was 1.86 : 1. A total of 128 serum samples were HEV RNA positive, and the viral sequences belonged to the genotype 4 with the maximum homology to Xi'an isolate. **Conclusions** Hepatitis E sporadic in Nanyang area and genotype 4 is the predominant strain in the city. The strains isolated in Nanyang have the closest relationship with Xi'an isolate, and this maybe infer that these two strains probably originate from the same HEV strain.

Keywords: Hepatitis E; Virus; Epidemiology; Genotype

收稿日期: 2016-05-09

* 基金项目: 河南省教育厅科学技术研究重点项目资助(No: 13B310179)

[通信作者] 司伏生, E-mail: mr.fusheng@163.com

戊型肝炎(hepatitis E, HE)是由戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染而引起的急性自限性病毒性肝炎,主要经粪口途径传播,引起戊型肝炎(HE)的流行和散发。戊型肝炎是个新发的全球性疾病,在世界上越来越多的国家发生和流行^[1-2]。人对 HEV 普遍易感,病人发病症状严重,病死率高,青壮年戊肝病死亡率可达 1%~2%,远较其他各型肝炎高,妊娠妇女患 HEV 的死亡率高达 10%~25%,给人类健康造成严重威胁^[3]。我国为 HEV 流行区,1986~1988 年在我国南疆地区曾发生过戊肝的大流行,并造成 707 例死亡,对人类健康造成了严重威胁^[4]。河南省未发生过戊肝的暴发流行,但近年来散发病例逐渐增多。由于 HEV 基因组自身的特点及其准种现象的存在^[5],不同地区 HEV 的序列变异情况较大并且具有地方特异性,因此国内外的研究结果并不能完全代表河南省的具体情况。本研究对 HEV 在河南省的流行情况及其基因组的序列进行分析,以便研究其序列变异情况并为有效地监控该病提供理论性参考。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

Trizol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司,PCR 凝胶纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒和 2 × Taq Plus PCR Master Mix 购自 Tiangen 公司,DL2000 DNA marker, Ribonuclease Inhibitor 购自日本 TaKaRa 公司,凝胶成像系统购自 Bio-Red;琼脂糖、水饱和酚、氯仿、异丙醇、DEPC 购自美国 Sigma 公司,M-MLV Reverse Transcriptase 购自美国 Promega 公司,戊型肝炎病毒 IgG 抗体诊断试剂盒购自北京万泰药业股份有限公司。

1.2 标本来源

本研究中血清样品主要来源于南阳、信阳及郑州 3 地,为 2013 年 1 月~2013 年 12 月住院治疗的肝炎病患者血清样本。此外,还有南阳市疾病预防控制中心对下辖区县检测到的急性黄疸及肝功能异常人群的血清样本。对所获得的样本按照性别、年龄、临床症状及既往病史等进行详细的登记调查。

1.3 抗体检测

对收集到的血清首先进行抗 HEV IgG 抗体的检测,抗体检测试剂盒购自北京万泰药业股份有限公司,详细检测步骤及结果判定标准严格按照说明书所要求的进行。

1.4 引物设计及合成

对 HEV 抗体阳性的血清样品进行病毒 RNA 的提取并进行扩增。根据文献报道,利用 DNA star 和 Primer 5.0 软件,选择 HEV ORF2 区域作为 RT-nPCR 及基因分型引物,该引物公认能够扩增 HEV 多个基因型的毒株,PCR 产物大小为 150 bp。引物序列如下:外引物:H1(5'-CTGTTTAAAYCTTGCTGACAC-3'), H2(5'-WGARAGCCAAAGCACATC-3');内引物:H3(5'-GACAGAATTGATTCGTCG-3'), H4(5'-TGYTG GTTRTCRTAATCCTG-3')。引物由上海生工有限公司进行合成。

1.5 RNA 的提取及扩增

抗体阳性血清用 TRIZOL Reagent 进行裂解后提取病毒 RNA,最后溶解到 DEPC 水中。然后以病毒 RNA 为模板用 M-MLV Reverse Transcriptase 和 Prime STAR HS DNA polymerase 进行 RT-PCR 反应,合成病毒 cDNA。PCR 反应条件和程序参考说明书进行,产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测确认。

1.6 基因克隆、测序及遗传进化分析

用胶回收试剂盒对经琼脂糖凝胶电泳确认后的片段进行纯化回收,目的 DNA 连接至 T 载体后转化大肠杆菌 DH5 α,涂布平板过夜生长后挑取克隆进行质粒提取,获得的质粒送华大基因进行测序。测得的序列用 CLUSTAL-W(version 1.8)进行序列比对,计算核苷酸序列的同源性,用 Mega 4.0 绘制构建遗传进化树。

2 结果

2.1 HEV IgG 抗体检测

本研究中,河南的南阳(980)例、信阳(60)例、郑州(60)例,3 地共采集到肝炎患者血清 1 100 份,经抗体检测,戊肝抗体阳性病例 295 例,占总数的 26.8%。其中南阳、信阳、郑州的戊肝病例数分别为 272 例、10 例和 13 例,戊肝占各地肝炎患者病例分别为 27.8%、16.7%和 21.7%,信阳地区的戊肝病例比例低于其他两个地区。

2.2 戊肝病例年龄及性别分布特征

295 例戊肝患者中,男性 192 例,女性 103 例,男:女=1.86:1。在戊肝患者中年龄最小 18 岁,最大的为 68 岁,80.3%的患者集中在 35 岁及以上的年龄组(见附表)。尤其以 40~60 岁年龄组占多数(58%)。

附表 戊肝病例的年龄与性别分布特征

年龄	病例数	男性阳性数 例(%)	女性阳性数 例(%)
20~	20	15(7.8)	5(4.9)
25~	18	8(4.2)	10(9.7)
30~	20	15(7.8)	5(4.9)
35~	36	17(8.9)	19(18.4)
40~	38	25(13.0)	13(12.6)
45~	40	23(12.0)	17(16.5)
50~	32	22(11.5)	10(9.7)
55~	31	25(13.0)	6(5.8)
60~	29	20(10.4)	9(8.7)
65~	31	22(11.5)	9(8.7)
总计	295	192	103

2.3 戊肝发病季节分布特征

2013 年全年确定的 295 例戊肝病例中,在全年每个月份都有发生。61.7%的病例集中在前 5 月份和 11、12 月份之间(见图 1)。戊肝病例在季节分布上,从 11 月份开始逐步增多,直至到 5 月份,其中 4 月份的戊肝发病数达到最高峰。

2.4 PCR 产物的扩增、测序及遗传进化分析

本研究中对 295 份戊肝抗体阳性的患者血清标本进行 HEV RNA 检测,阳性病例 128 例,阳性率 43.4%。扩增出的目的片段均送上海生工测序,进行序列分析及 BLAST 比对。结果表明 128 份样品中,全部为基因 4 型病例,阳性率达 100%,进一步表明河南省南阳市戊肝患者的基因型以 4 型为主。

用 DNA star(version 7.0)和 CLUSTAL-W(version 1.8)软件对来国内主要省份及国外代表性毒株基因组本区段的核苷酸同源性进行比较。去除重复性的序列,本研究选取其中 3 株代表性的毒株用 Mega 4.0 绘制构建遗传进化树。结果表明,本研究中的扩增序列与中国的西安分离株 JKO-Chi Sai 98C(accession number:AB197673)在同一进化分支上,同属于基因 4 型,进一步提示南阳市散发戊肝病例的基因型主要是 4 型,且基因 4 型是本地的优势基因型和主要致病毒株(见图 2)。

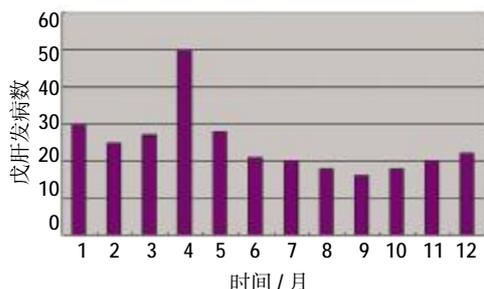


图 1 2013 年 1-12 月戊肝发病时间分布特征

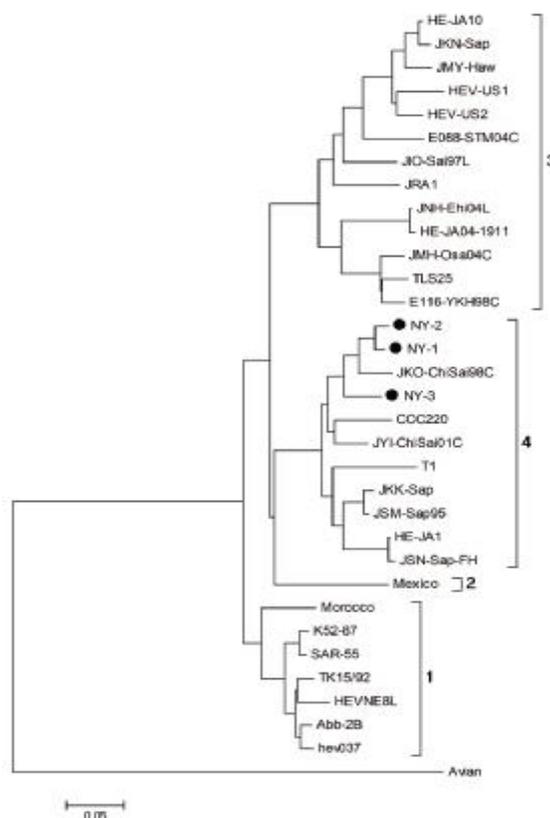


图 2 HEV 代表性毒株和参考序列基于 ORF2 150 bp 片断构建的进化树 (●为本文分离株)

3 讨论

近年来的验证表明,戊型肝炎由原来的在亚洲、非洲等发展中国家的暴发流行逐渐转变为全球范围内的散发流行,成为威胁全球人类健康的一个世界性问题^[9]。最近的研究表明,在无偿献血者的血液中及器官移植患者体内都发现有感染 HEV 的报道^[6-11],并且出现甲肝和戊肝的混合感染^[12]。为了研究河南省南阳市的戊肝流行情况本研究进行了连续 12 个月的戊肝病例筛查,共发现戊肝病例 295 例。本研究表明,年龄与性别是戊肝感染的影响因素。本研究戊肝患者中年龄最小 18 岁,最大的为 68 岁,80.3%的患者集中在 35 岁及以上的年龄组。在关于戊肝发病男女性别比的报道中,不同研究者有不同的说法,如最新研究中有报道戊肝患者男女之比为 1.85 : 1^[13],2.99 : 1^[14],1.58 : 1^[15]。本研究中戊肝患者男女之比为 1.86 : 1,支持男性比女性更易感戊肝的结论。戊肝患者中男性多于女性,80.3%的患者集中在 35 岁及以上的年龄组,可能原因是:随着人群年龄的增长,其活动范围越来越大,生活方式也越来越多样化,因此感染戊肝的几率也就越来越大。

此外,季节也是戊肝感染率变化的一个影响因素。本研究中的戊肝病例呈全年散发,前 5 个月和 11、12 月份是戊肝的高发季节,占全年发病总数的 61.7%。

为了初步调查河南其他地区的戊肝流行情况,笔者从河南省会郑州市和南阳市临近的信阳市各采集 60 份血清样品,调查结果显示郑州市和信阳市的戊肝阳性率分别为 21.7%和 16.7%, 低于南阳市的 27.8%。这可能和南阳市人口多,人员流动性大,生活方式多样化有一定的关系。为了进一步查明南阳市流行的戊肝基因型,笔者对 295 份戊肝抗体阳性的患者血清标本进行 HEV RNA 检测, 阳性病例 128 例, 阳性率 43.4%。扩增出的目的片段经测序 BLAST 比对后发现全部为基因 4 型,与近年来国内主要流行毒株基因型一致。

在核苷酸的同源性方面,本研究中分离到 3 株病毒株 NY-1、NY-2、NY-3 与中国分离株 CCC220 (长春株)、JYI-Chi Sai 01C (上海株)和 JKO-ChiSai 98C (西安株)在同一进化分支上。其中与西安分离株 JKO-ChiSai98C (accession number:AB197673)的亲缘关系为最高,同属于基因型 4 型。说明分离到的病毒株较为稳定,未发生较大的变异情况。地理分布上南阳与西安有较近的地缘关系,人员往来较为频繁,这为病毒在两地的快速传播提供了较为便利的条件。

本研究通过一年的监测,对南阳市戊肝的流行情况进行初步的研究,调查结果表明南阳市的戊肝患者以散发为主。选取代表性毒株进行序列比对发现,本地感染人的戊肝基因型为 4 型。该结果将为以后更好的防控该病提供重要理论参考。

参 考 文 献:

- [1] KHU ROO M S. Hepatitis E: an emerging global disease—from discovery towards control and cure[J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 2016, 23(2): 68-79.
- [2] DALTON H R, KAMAR N, IZOPET J. Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives[J]. *Future Microbiology*, 2014, 9(12): 1361-1372.
- [3] REIN D B, STEVENS G A, THEAKER J, et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005[J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 988-997.
- [4] JIA Z, YI Y, LIU J, et al. Epidemiology of hepatitis E virus in China: results from the Third National Viral Hepatitis Prevalence Survey, 2005-2006[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9 (10): e110837.
- [5] GRANDADAM M, TEBBAL S, CARON M, et al. Evidence for hepatitis E virus quasispecies[J]. *Journal of General Virology*, 2004, 85 (Pt 11): 3189-3194.
- [6] TENDULKAR A A, SHAH S A, KELKAR R A. A case of Hepatitis E in a blood donor[J]. *Asian J Transfus Sci*, 2015, 9(1): 82-84.
- [7] MA L, SUN P, LIN F, et al. Prevalence of hepatitis E virus in Chinese blood donors [J]. *Journal of International Medical Research*, 2015, 43(2): 257-262.
- [8] RAMSAY I, SNELL L, SHARMA V, et al. Liver transplantation for acute liver failure because of genotype 3 hepatitis E virus infection[J]. *Liver Transplantation*, 2015, 21(12): 1557-1559.
- [9] ANDERSSON M I, STEAD P A, MAPONGA T, et al. Hepatitis E virus infection: An underdiagnosed infection in transplant patients in Southern Africa[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2015, 70: 23-25.
- [10] TRAORE K A, OUOBA J B, ROUAMBA H, et al. Hepatitis E virus prevalence among blood donors, ouagadougou, burkina faso[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(4): 755-757.
- [11] KURIHARA T, YOSHIZUMI T, ITOH S, et al. Chronic hepatitis E virus infection after living donor liver transplantation via blood transfusion: a case report[J]. *Journal of Surgical Case Reports*, 2016, 2(1): 32.
- [12] HESAMIZADEH K, SHARAFI H, KEYVANI H, et al. Hepatitis A virus and hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in Tehran, Iran[J]. *Hepatitis Monthly*, 2016, 16(1): e32215.
- [13] 王国玲, 谭锦花, 刘青连, 等. 广州市海珠区 2004-2013 年甲、戊型病毒性肝炎流行特征分析[J]. *热带医学杂志*, 2014, 7: 934-936.
- [14] 王智, 姜仁杰, 李长城, 等. 盐城市 2010-2014 年戊型肝炎流行病学特征分析[J]. *江苏预防医学*, 2016, 1: 71-72.
- [15] 孙凤妹. 2013 年无锡市锡山区传染病疫情分析 [J]. *预防医学情报杂志*, 2016, 1: 45-47.

(张蕾 编辑)