

昆明市某猪场猪戊型肝炎病毒流行情况调查*

王 源¹, 郑晓林¹, 严红亚², 段新慧³, 张以芳¹, 杨莎莎¹, 李文贵^{1**}

(1. 云南农业大学 动物医学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南省畜牧兽医科学院, 云南 昆明 650224;

3. 云南农业大学 动物科学技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】了解昆明市某猪场戊型肝炎病毒感染情况, 进一步探究病毒基因型及分子进化情况, 为戊型肝炎防控提供参考。【方法】从该猪场随机采集 39 份新鲜粪便, 用逆转录巢式聚合酶链反应对 HEV *ORF2* 部分基因片段扩增、克隆及测序; 应用生物信息学软件进行同源性分析并构建系统进化树。【结果】PCR 检测结果发现: 该猪场核酸阳性率达 35.9% (14/39)。同源性分析结果表明: 14 株流行毒株核苷酸序列与 GenBank 中 HEV I-IV 型参考株的同源性分别为 77.4%~83.9%、81.0%~83.2%、78.8%~86.9% 和 90.5%~98.5%, 全部流行株均属基因 IV 型。进化分析结果表明: YN-KM-9 与该猪场其他流行毒株同源性较远, 应属不同基因亚型。【结论】该猪群 HEV IV 感染率较高, 对公共卫生安全构成潜在威胁。

关键词: 猪戊型肝炎; 分子流行病学; 人畜共患病; 同源性分析

中图分类号: S 852.651

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 06-1111-04

Study on the Prevalence of Hepatitis E Virus in a Swine Farm in Kunming City

WANG Yuan¹, ZHENG Xiaolin¹, YAN Hongya², DUAN Xinhui³,
ZHANG Yifang¹, YANG Shasha¹, LI Wengui¹

(1. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Kunming 650224, China;

3. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To determine the hepatitis E infection situation in a pig farm of Kunming City, Yunnan Province, further explore the virus genotype and molecular evolution, and provide a reference for the prevention and control of hepatitis E. [Method] Thirty-nine fresh fecal samples were randomly collected from the target a pig farm. The reverse transcription nested polymerase chain reaction (RT-nPCR) was used to detect the *ORF2* gene of swine hepatitis E virus. After cloning and sequencing, bioinformatics software was used for homology analysis and the phylogenetic tree was constructed. [Result] RT-nPCR detection results found that the positive rate was 35.9% (14/39). The analysis results showed that homologies between 14 detected strains and genotype I-IV represents were 77.4%-83.9%, 81.0%-83.2%, 78.8%-86.9% and 90.5%-98.5%, respectively, indicating that all the prevalence strains belongs to HEV type IV. Evolutionary analysis showed that YN-KM-9 is away

收稿日期: 2019-07-01

修回日期: 2020-05-09

网络首发时间: 2020-10-30 08:15:40

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31160495)。

作者简介: 王源 (1995—), 女, 辽宁朝阳人, 在读硕士研究生, 主要从事兽医公共卫生学研究。

E-mail: 721736168@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 李文贵 (1972—), 男, 云南昆明人, 博士, 教授, 主要从事兽医公共卫生学研究。E-mail: li.wengui@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20201029.1645.001.html>



from other prevalence strains and should belong to different sub-genotypes. [**Conclusion**] The HEV IV infection rate of this pig herd is relatively high, posing a potential threat to public health safety.

Keywords: swine hepatitis E; molecular epidemiology; zoonosis; homology analysis

戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 属于戊型肝炎病毒科戊型肝炎病毒属的家族成员, 是一种单股正链 RNA 病毒^[1]。HEV 的传播风险包括食用未煮熟的猪肉、贝类等海鲜和鹿肉等, 尤其是动物的实质器官 (如肝脏等)。中国猪群中 HEV 感染率较高, 核酸阳性率约 10%, 血清流行率 60%~100%^[2-3]。在中国戊型肝炎已经发展成感染率高、难以防控的疾病, 正威胁着人们的健康。此外, 由于人体器官来源非常有限, 猪是未来异体器官移植良好的替代供体, 而其所携带的 HEV 等人畜共患病病原又对人的健康构成威胁。本研究旨在调查昆明某猪场戊型肝炎病毒的感染、病毒基因型及分子进化情况, 为戊型肝炎防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

按随机抽样法, 从云南省昆明市某散养户 300 多头 2~6 月龄猪中采集 39 份新鲜猪粪便样品, 放置-80 ℃ 冰箱冷冻保存备用。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂 TRIZOL、逆转录试剂盒 (Easy First-Strand cDNA Super Mix)、2×TransTag HIFI Mix II、Marker、凝胶快速回收试剂盒 (EasyPure-Quick Gel Extraction Kit)、质粒小量提取 KIT、pEASY-T1 载体和感受态细胞 (Trans1-T1) 等购自北京全式金公司, 氯仿、异丙醇和 75% 乙醇等为分析纯试剂。

1.3 引物合成

采用巢式 PCR 扩增目的基因片段^[4], 引物由昆明硕擎生物技术公司合成。

1.4 TotalRNA 的提取及目的基因的扩增

取少量粪便, 加入 0.5 mL 生理盐水, 充分混匀后, 4 ℃ 冰箱放置过夜; 4 ℃, 2 000 r/min, 5 min; 4 ℃, 10 000 r/min, 5 min; 取 300 μL 上清, 用 Trizol 法提取 RNA (RNA 保存于-80 ℃)。cDNA 的合成: 2×TS Reaction Mix 5 μL, TS (TransScript™ Two-step RT/RI Enzyme Mix) 0.5 μL, 下游引物

0.5 μL, RNA 4 μL, 总反应体系 10 μL, 42 ℃ 30 min, 85 ℃ 5 min。第一轮 PCR 扩增总反应体系为 20 μL: 上游引物和下游引物各 0.5 μL, 2×TransTag HIFI Mix II 10 μL, DEPC 水 7 μL, cDNA 2 μL; 反应条件为 94 ℃ 预变性 2 min, 94 ℃ 变性 30 s, 56 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 35 个循环, 72 ℃ 延伸 7 min。将第一轮 PCR 产物作为模板稀释 50 倍, 进行第二轮扩增。第二轮 PCR 扩增总反应体系为 20 μL: 上游引物和下游引物各 0.5 μL, 2×TransTag HIFI Mix II 10 μL, DEPC 水 8 μL, cDNA 1 μL; 反应条件与第一轮相同, 循环次数 25 次。

1.5 目的基因的回收、基因克隆及测序

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 阳性 PCR 产物用凝胶快速回收试剂盒 (EasyPureQuick Gel Extraction Kit) 回收纯化, 连接到 pEASY-T1 载体转化到 Trans1-T1, 提取质粒后送至昆明硕擎生物技术公司测序。

1.6 序列分析及遗传进化树构建

从 GeneBank 中选择 32 条 HEV 基因 I 型至 IV 型的代表序列 (表 1), 用 DNASTAR 软件分析序列的同源性, 利用 MEGA 6.0 生物信息学软件构建遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 巢式 PCR 扩增结果

巢式 PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 100 V 35 min 后, 可见 1 条约 137 bp 特异性条带 (图 1)。39 份粪便样品的检测结果显示: 阳性 14 份, 阳性率为 35.9%。

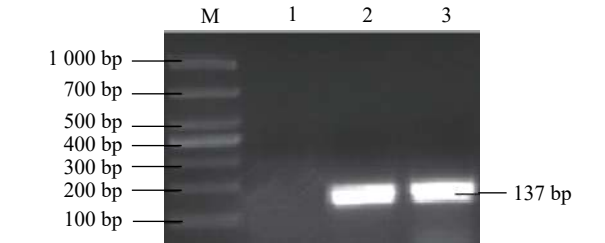
2.2 系统进化分析

与 32 条参考序列进行同源性分析结果表明: 所检测到的 14 株流行 HEV 株 ORF2 基因核苷酸序列与 HEV I~IV 型的同源性分别为 77.4%~83.9%、81.0%~83.2%、78.8%~86.9% 和 90.5%~98.5%, 属基因 IV 型。进化分析表明: YN-KM-9 流行株与其他毒株同源性较远, 应属不同基因亚型 (图 2)。

表 1 同源性分析戊型肝炎病毒参考序列			
Tab. 1 Hepatitis E virus reference sequences used in homology analysis			
基因型 genotype	登录号 accession No.	宿主 hosts	分离地 origins
I	AF444002	人 human	美国 USA
	AF076239	人 human	印度 India
	D10330	人 human	缅甸 Myanmar
	M80581	人 human	巴基斯坦 Pakistan
	M94177	人 human	中国河北 Hebei, China
	NC001434	人 human	中国新疆 Xinjiang, China
	D11092	人 human	中国新疆 Xinjiang, China
II	M74506	人 human	墨西哥 Mexico
III	AP00340	人 human	日本 Japan
	AY115488	猪 swine	加拿大 Canada
	AF060668	人 human	美国 USA
	AF082843	猪 swine	美国 USA
	FJ527832	猪 swine	中国上海 Shanghai, China
	JQ679014	人 human	英国 UK
	FJ956757	人 human	德国 Germany
	EU375463	猪 swine	泰国 Thailand
IV	AB222184	野猪 wild boar	日本 Japan
	HQ634346	人 human	中国台湾 Taiwan, China
	KC163335	人 human	中国山东 Shandong, China
	FJ610232	猪 swine	中国甘肃 Gansu, China
	EU676172	猪 swine	中国广西 Guangxi, China
	JX855794	猪 swine	中国广东 Guangdong, China
	AB197674	人 human	中国上海 Shanghai, China
	AY594199	猪 swine	中国新疆 Xinjiang, China
	GU119961	猪 swine	中国新疆 Xinjiang, China
	KM253769	猪 swine	中国河南 Henan, China
	JQ993308	猪 swine	中国江苏 Jiangsu, China
	KC692453	猪 swine	中国山东 Shandong, China
	AY723745	猪 swine	印度 India
	DQ079628	野猪 wild boar	日本 Japan
	KF736234	牦牛 <i>bos grunniens</i>	中国 China
	KJ816337	毛蚶 <i>scapharca subcrenata</i>	中国 China
	AY535004	禽 avian	美国 USA

3 讨论

戊型肝炎病毒是人病毒性肝炎的重要病原之一, 全球每年超过百万人感染, 被世界卫生组织



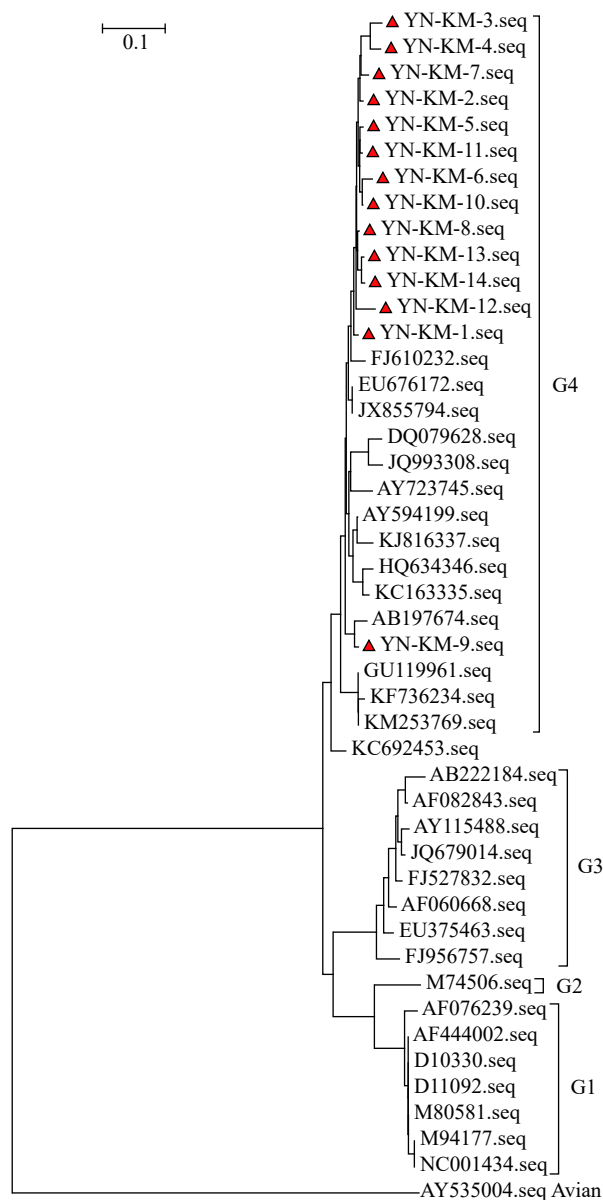
注: M. DNA 分子量标记 DL1000; 1. 阴性对照; 2. 阳性对照; 3. 样品。
Note: M. DNA Marker DL1000; 1. negative control; 2. positive control; 3. sample.

图 1 巢式 RT-PCR 产物电泳结果
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of fragment amplified by RT-nested PCR

认定为影响发展中国家的重要公共卫生问题^[5]。HEV 引起的戊型肝炎感染通常是一种自限性疾病, 偶尔也能导致大规模的肝炎暴发。目前已知的 HEV 宿主有猪、野猪、禽类、牦牛和毛蚶等, 猪是最重要的潜在传染源^[6]。中国猪饲养量大且与人类关系密切, 而云南很多偏远农村甚至还存在人猪混住的现象, 猪群 HEV 的传播流行对人构成重大威胁, 不容忽视。掌握当地猪群戊型肝炎病毒流行情况是防控人戊型肝炎的必要前提^[7]。

中国在调查猪群 HEV 感染方面已做了大量的工作。广东地区对 300 份猪粪便和猪肝进行检测, 共检测到 81 份阳性样品, 阳性率为 46.7%。江苏盐城地区的 747 份猪粪便样品的病原学检测结果显示: 阳性样品共 86 份, 阳性率为 11.5%^[8-9]。本次调查发现 HEV 核酸流行率高于此前的报道, 原因应与样品来源于散养户有关。该病毒主要以粪口途径传播, 与环境卫生关系密切。规模化饲养场大多设有粪污处理设施, 生物安全防护措施完善, 散养户与规模化猪场相比, 卫生条件较差, 排泄物不能及时清除, 猪群的随意流动和误食导致该病毒感染率高。此前研究已证实流行率与养殖规模有关联^[10]。

近年来, 各国科学家在细胞培养体系和感染模型建立等限制戊型肝炎研究的瓶颈问题上已获较大突破, 有望加速对该病的致病机理、人和动物间传播模式等研究^[11-12]。与此同时, 越来越多的学者也开始关注 HEV 在人与人、人与动物、动物与动物间的越种传播机制以及 HEV 基因型、亚型与致病性和宿主选择的分子基础等长期以来悬而未决的问题。



注: ▲代表 14 株流行 HEV 株。

Note: ▲ represent 14 epidemic HEV strains.

图 2 基于 *ORF2* 基因核苷酸序列的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis based on *ORF2* gene nucleotide sequence

[参考文献]

- [1] 张厚勇. 猪戊型肝炎病毒的分子流行病学调查及 *ORF2* 区的克隆和表达[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [2] 黄芬, 禹文海, 马天武, 等. 云南某农村猪戊型肝炎病毒分子流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(3): 274. DOI: [10.3969/j.issn.1002-2694.2012.03.019](https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-2694.2012.03.019).
- [3] 王佑春, 张华远, 崔鹏, 等. 戊肝病毒(HEV)在猪和牛群中的流行病学研究[J]. 中国预防医学杂志, 2002, 3(3): 199. DOI: [10.3969/j.issn.1009-6639.2002.03.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.1009-6639.2002.03.011).
- [4] INOU E J, TAKAHASHI M, YAZAKI Y, et al. Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence[J]. Journal of Virological Methods, 2006, 137: 325. DOI: [10.1016/j.jviromet.2006.07.004](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.07.004).
- [5] WEBB G W, DALTON H R. Hepatitis E: an underestimated emerging threat[J]. Therapeutic Advances in Chronic Disease, 2019, 80: 399. DOI: [10.1177/2049936119837162](https://doi.org/10.1177/2049936119837162).
- [6] PAVIO N, MENG X J, RENOU C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks[J]. Veterinary Research, 2010, 41(6): 46. DOI: [10.1051/vetres/2010018](https://doi.org/10.1051/vetres/2010018).
- [7] 徐磊, 林伯全, 李贺来, 等. 猪戊型肝炎病毒研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2011, 33(3): 24. DOI: [10.3969/j.issn.1003-4331.2011.03.012](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-4331.2011.03.012).
- [8] 佟铁铸, 刘星, 李春萍, 等. 广东地区猪戊型肝炎流行病学调查[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(4): 13.
- [9] 闫蕾. 猪戊型肝炎病毒荧光定量PCR检测方法的建立及盐城地区流行病学调查[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016.
- [10] LI W G, SHE R P, WEI H T, et al. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 133(1/2): 75. DOI: [10.1016/j.vetmic.2008.06.026](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.026).
- [11] FU R M, DECKER C C, THI V L D. Cell culture models for hepatitis E virus[J]. Viruses, 2019, 11(7): 608. DOI: [10.3390/v11070608](https://doi.org/10.3390/v11070608).
- [12] CORNEILLIE L, BANDA D H, MEULEMAN P. Animal models for hepatitis E virus[J]. Viruses, 2019, 11(6): 564. DOI: [10.3390/v11060564](https://doi.org/10.3390/v11060564).

责任编辑: 何承刚