

# 杭州市 2004—2011 年戊型肝炎 流行特征及病原学分析

考庆君 孙昼 谢立 濮小英 杨旭辉 黄仁杰

**【摘要】** 目的 分析杭州市 2004—2011 年戊型肝炎(简称戊肝)的流行特点以及戊肝病毒基因分型特点。**方法** 利用中国疾病预防控制中心信息系统《疾病监测信息报告管理系统》,收集 2004—2011 年杭州市戊肝的发病情况及患者的基本信息。于 2011 年在杭州市定点传染病医院,采用随机数字表法选取实验室已确诊的戊肝患者 65 例,采集其血液标本 60 份及粪便标本 18 份;在全市范围内采用随机整群抽样的方法选取杭州市 1 个城区及 2 个周边县区,选取该区生猪定点屠宰场及农户作为采样点,采集猪胆囊标本 52 份,采集散养猪和兔子的粪便分别为 30 和 15 份。对标本进行戊肝病毒检测,并进行基因提取和基因序列分析,将测得的核酸序列与 GenBank 数据库中戊肝病毒毒株的基因序列进行比对,并绘制进化树。对 2004—2011 年杭州市戊肝发病流行特征进行描述,分析杭州市各年份及性别间戊肝发病率的差异。**结果** 2004—2011 年杭州市累计报告戊肝患者 3 490 例,死亡 3 例,年平均发病率为 5.79/10 万(3 490/60 276 338)。不同年份间发病率呈上升趋势( $\chi^2 = 52.38, P < 0.01$ ),其中 2011 年最高,为 8.10/10 万(705/8 700 373),2005 年最低,为 4.19/10 万(304/7 259 008);男性[8.12/10 万(2 474/30 450 990)]高于女性[3.46/10 万(1 016/29 384 491)]( $\chi^2 = 558.45, P < 0.05$ )。采集确诊患者血液及粪便标本共 78 份,检出阳性标本 16 份,阳性率为 21%,采集猪胆、猪粪便、兔子粪便标本共 97 份,检出 2 份兔子粪便阳性标本,阳性率为 2%。杭州市分离的戊肝病毒基因以 IV 型为主,同源率为 91.8%~100%;与人戊肝病毒 IV 型毒株同源率为 84.6%~96.7%;与猪分离的戊肝 IV 型病毒株同源率为 82.6%~95.2%。**结论** 杭州市戊肝发病年呈逐年上升趋势,戊肝病毒基因型以 IV 型病毒株为主,在人群中与猪群中存在高度同源性。

**【关键词】** 肝炎, 戊型; 肝炎病毒, 戊型; 基因型; 流行特征; 疾病控制

**Analysis of epidemiologic and etiology of hepatitis E in Hangzhou, 2004-2011** Kao Qingjun, Sun Zhou, Xie Li, Pu Xiaoying, Yang Xuhui, Huang Renjie. Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Hangzhou Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310021, China  
Corresponding author: Sun Zhou, Email: hzcdc@qq.com

**【Abstract】 Objective** To comprehend the epidemiologic of hepatitis E and genetic characteristics of hepatitis E virus (HEV) in Hangzhou from 2004 to 2011. **Methods** Using China information system for disease control and prevention, the incidence of hepatitis E from 2004 to 2011 in Hangzhou city, and the basic information of patients were collected. In 2011, 65 hepatitis E laboratory confirmed cases were selected by random number table sampling method from the hospitals designated infectious diseases in Hangzhou city, and acquisition of the 60 blood specimens and stool specimens of 18 copies. One city and two surrounding counties were selected by cluster random sampling method in the context of Hangzhou city, and the pig slaughters and farmers were selected as the sampling point, and acquisition of pig gallbladder specimens of 52 copies, and 30 stool samples of scatter-feed pigs, 15 stool specimens of scatter-feed rabbits. HEV was tested in samples, gene extraction and analysis of gene sequence were conducted which were compared with gene bank HEV gene sequence, and a phylogenetic tree was formed. The epidemic characteristics of hepatitis E of Hangzhou city from 2004 to 2011 were described. The difference of incidence of hepatitis E was analyzed between years and sexes in Hangzhou city. **Results** There were reported a total of 3 490 cases of hepatitis E in Hangzhou from 2004 to 2011, and 3 cases of death; The average annual incidence rate was

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.09.005

基金项目:浙江省医药卫生科技项目(2011KYB078)

作者单位:310021 杭州市疾病预防控制中心传染病防制所

通信作者:孙昼, Email: hzcdc@qq.com

5.79/100 000(3 490/60 276 338)。There was the overall upward trend in incidence between different years ( $\chi^2 = 52.38, P < 0.01$ ), which the highest was 8.10/100 000(705/8 700 373) in 2011, and the lowest incidence rate was 4.19/100 000 in 2005. The incidence of males (8.12/100 000(2 474/30 450 990)) was significantly higher than that of the females (3.46/100 000(1 016/29 384 491)) ( $\chi^2 = 558.45, P < 0.05$ ). 78 specimens of blood and stool were collected, including 16 positive samples, with positive rate 21%. There were a total of 97 specimens of pig gallbladder, pig manure and rabbit stool, including 2 positive rabbit stool samples, with positive rate of 2%. HEV genes isolated from Hangzhou were mainly type IV, with homology of 91.8% to 100%; compared with human type IV strains, the homology of nucleotide was 84.6%-96.7%; compared with type IV strain of pig genome sequence alignment, homology was 82.6%-95.2%. **Conclusion** Hepatitis E's incidence showed an increasing trend year by year in Hangzhou. HEV of type IV was dominant, and HEV strains in the human and swine were highly homologous.

**【Key words】** Hepatitis E; Hepatitis E virus; Genotype; Epidemiologic characteristics; Disease control

戊型肝炎(简称戊肝)是一种由戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)引起的经粪-口途径传播的急性消化道传染病。主要流行于亚洲、非洲和中美洲的一些发展中国家,既可呈散发,也可引起暴发流行<sup>[1]</sup>。随着人们对戊肝认识的不断提高,其危害也逐渐得到人们重视,目前戊肝已被 WHO 认为是发展中国家重要的公共卫生问题之一<sup>[2]</sup>。我国是戊肝高发地区之一,1986—1988 年新疆维吾尔自治区发生迄今为止世界上规模最大的戊肝流行,共计发病 119 280 例,死亡 707 例,造成了极大的危害<sup>[3]</sup>。笔者对杭州市 2004—2011 年戊肝流行特征、HEV 基因型别以及变异状况进行分析,以便掌握杭州市戊肝发病趋势和流行特征和基因变异情况,有针对性地开展防治工作。

## 资料与方法

1. 数据来源:利用中国疾病预防控制中心《疾病监测信息报告管理系统》,收集 2004—2011 年杭州市戊肝的发病情况及患者的基本信息,包括性别、年龄、居住地等。患者诊断参照戊肝诊断标准 WS 301-2008<sup>[1]</sup>。2004—2011 年杭州市人口资料来源于杭州市统计局。

2. 样品采集:于 2011 年选取杭州市定点传染病医院,采用随机数字表法选取实验室确诊的戊肝患者(抗 HEV IgM 阳性)65 例,采集其血液标本 60 份及粪便标本 18 份,所有标本均由 Hanks 液制备成悬浮液,冻存 -80 °C 备用;在全市范围内采用整群随机抽样的方法选取杭州市 1 个城区及 2 个周边县区,选取该区生猪定点屠宰场采集猪胆囊标本 52 份,采用随机数字表选取部分农户,采集散养猪粪便 30 份及散养兔子粪便标本 15 份。

3. 主要试剂和器材:实时荧光 RT-PCR、一步法

普通 PCR 试剂购自宝生物工程(大连)有限公司;QIAamp Viral RAN Kit 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;基因测序所需感受态细胞制备试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;pGEMT 和 pGEMT-Easy 载体系统购自美国 Promega 公司;质粒 DNA 小量提取试剂(离心柱型)和胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司。实时荧光 RT-PCR 及基因序列测定所需的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。荧光 PCR 仪购自德国 Qiagen 公司,梯度 PCR 仪购自德国 Biometra 公司,电泳仪购自美国伯乐公司。

4. HEV 的 RNA 检测与基因序列分析:(1)病毒核酸的提取:对采集的标本提取总病毒 RNA,用 QIAamp Viral RAN Kit 提取试剂盒,按说明书进行操作。(2)HEV 的 RNA 检测:HEV 基因变异较大,有 3 个部分重叠的开放读码区(ORF),基于对 GenBank 中 HEV 的 ORF 区域基因组序列的多序列比对,选择其中较为保守的 ORF3 区域作为扩增位点。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为,引物 1:5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3';引物 2:5'-AGGGTTGGTTGGATGAA-3';引物 3:5'-TGATTCTCAGCCCTTCGC-3'。采用 TaqMan 探针的方法进行实时荧光 RT-PCR<sup>[4]</sup>,通过检测反应体系中的荧光强度,检测 PCR 产物的扩增量。(3)基因测序:对实时荧光 RT-PCR 法检测结果为阳性且浓度较高(Ct 值 < 30)的标本进行普通 PCR 扩增,然后将 PCR 产物直接进行基因序列测定。PCR 程序设置按照参考文献[5]提供的方法操作,采用 2 组套式引物进行 PCR,所需的引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1 为通用引物,引物 2 为针对 IV 型基因型,具体见表 1。

5. 系统进化分析:将测得的核酸序列用 DNAMAN 软件进行多序列比对排列并绘制进化树。

表 1 PCR 测序所用引物序列

名称	引物序列(5'-3')
引物 1(外套)	
ORF1-s1	CTGGCATYACTACTGCGYATTGAGC
ORF1-a1	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGGTC
引物 1(内套)	
ORF1-s2	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG
ORF1-a2	GGCAGWRTACCARCCTGAACATC
引物 2(外套)	
HEV4F1	GGCCTCACWACTGCTATTGAGC
HEV4R1	GCRTCYTCRARGCRITCCA
引物 2(内套)	
HEV4F1nest	GCCTTGCGAATGCTGTG
HEV4R1nest	GYCTGTCCATATATGCAGGGAC

注:Y代表C或T;R代表A或G;W代表A或T。ORF:开放读码区;HEV:戊型肝炎病毒

从美国生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的GenBank数据库中下载 17 条 HEV 全长序列作为比对的参考的 HEV 毒株的基因序列。具体见表 2。应用 Mega 5.03 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,并形成进化树,采用 DNASTar 软件绘制同源图。

表 2 参考的全序列戊型肝炎病毒株

名称	GenBank 登陆号	基因型	宿主	地区	分离年份
Mor	AY230202.1	I	人	摩洛哥	2003
1Hin00Lon	DQ459342	I	人	印度	2007
1hCN88xin	D11092	I	人	中国新疆	1988
1hCN86xin	108816	I	人	中国新疆	1986
Mexican	M74506	II	人	墨西哥	1986
US1	AF060668	III	人	美国	1996
Swine	AF082843	III	猪	美国	1998
Swine	FJ527832	III	猪	中国	2008
China-T1	AJ272108	IV	人	中国北京	2000
ind-Sw01	AY723745	IV	猪	印度	2006
Changchun	AB108537	IV	人	中国长春	2000
Shanghai	AB197674	IV	人	中国上海	2001
Xi'an	AB197673	IV	人	中国西安	1998
Swine	GU119960	IV	猪	中国新疆	2009
Swine	FJ610232	IV	猪	中国甘肃	2008
Swine	ef570133	IV	猪	中国上海	2005
Swine	DQ450072	IV	猪	中国上海	2005

6. 统计学分析:采用 Excel 2003 对数据进行录入,采用 SPSS 16.0 软件进行资料整理和统计分析。结合杭州市人口资料,计算 2004—2011 年杭州市戊肝发病率;采用描述性流行病学方法,对 2004—2011 年杭州市戊肝发病流行特征进行描述。采用  $\chi^2$  检验分析杭州市各年份及性别间戊肝发病率的

差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. 流行特征:(1)发病情况:2004—2011 年杭州市累计报告戊肝患者 3 490 例,死亡 3 例,年平均发病率为 5.79/10 万(3 490/60 276 338)。不同年份间发病率呈上升趋势( $\chi^2 = 52.38, P < 0.01$ ),其中 2011 年最高,为 8.10/10 万(705/8 700 373),2005 年最低,为 4.19/10 万(304/7 259 008);男性 [8.12/10 万(2 474/30 450 990)] 高于女性 [3.46/10 万(1 016/29 384 491)] ( $\chi^2 = 558.45, P < 0.05$ ),具体见表 3。(2)分布特征:2004—2011 年全年均有患者,其中 1—3 月份发病数所占比例最高,为 35.79%(1 249/3 490),7—9 月份最低,为 18.31%(639/3 490),4—6 月份和 10—12 月份分别为 25.27%(882/3 490)和 20.63%(720/3 490);发病集中在 25~65 岁之间,占发病总数的 84.58%(2 787/3 490),<25 岁占 6.73%(235/3 490),>65 岁的占 8.68%(303/3 490)。职业分布以农民为主,占 36.07%(1 259/3 490),依次为工人 [15.56%(543/3 490)] 及退休人员 [10.52%(367/3 490)]。

2. HEV RNA 的检测情况:(1)样本:2011—2012 年,采集确诊患者血液及粪便标本共 78 份(血液 60 份,粪便 18 份),其中 16 份为阳性,阳性率为 21%(16/78);血液标本中 6 份阳性,阳性率为 10%(6/60),粪便标本中 10 份阳性,阳性率为 10/18。(2)动物标本:采集猪胆、猪粪便、兔子粪便标本共 97 份,其中 2 份为阳性,均为兔子粪便标本,阳性率为 2%(2/97)。

3. 基因分型检测:挑选实时荧光 RT-PCR 法阳性且浓度较高的 3 份标本(编号为 hangzhou6、8、19)进行 RT-PCR,扩增其特异的基因片段,之后用 2 套套式 PCR 引物扩增出目的片段并进行基因测序,测序结果显示,Hangzhou6 和 Hangzhou8 的同源性达 100%,Hangzhou19 与两者的同源性仅为 91.8%。

4. 同源性比对分析:(1)基因分型及同源性分析:对完成测序的 3 株病毒株基因核苷酸序列与 GenBank 中全基因序列的 HEV 毒株进行 BLAST 比较,与 I、II、III、IV 型参考毒株进行比对,核苷酸序列同源性分别为 75.3%~76.3%、74.1%~74.2%、78.0%~78.4%、84.6%~96.7%,显示 3 株毒株均为 HEV IV 型。3 株毒株与人 IV 型毒株序列(chi-T1-AJ272108-chi-2000、Changchun-AB108537-

表 3 2004—2011 年杭州市不同性别居民戊型肝炎的发病情况

年份	男			女			合计		
	例数	人口数 (名)	发病率 (/10 万)	例数	人口数 (名)	发病率 (/10 万)	例数	人口数 (名)	发病率 (/10 万)
2004	307	3 283 106	9.35	111	3 129 670	3.55	418	6 412 776	6.52
2005	229	3 693 191	6.20	75	3 565 825	2.10	304	7 259 008	4.19
2006	271	3 691 343	7.34	92	3 595 435	2.56	363	7 286 779	4.99
2007	298	3 761 344	7.92	117	3 638 852	3.22	415	7 400 196	5.61
2008	278	3 815 693	7.29	100	3 695 218	2.71	378	7 510 912	5.03
2009	283	3 854 955	7.34	129	3 737 181	3.45	412	7 592 136	5.43
2010	340	3 894 170	8.73	155	3 779 105	4.10	495	7 673 275	6.45
2011	468	4 457 185	10.50	237	4 243 206	5.59	705	8 700 373	8.10
合计	2 474	30 450 990	8.12	1 016	29 384 492	3.46	3 490	60 276 338	5.79

chi-2000、Shanghai-AB197674-chi-2001、Xi'an-AB197673-chi-1998,核苷酸同源性为 84.4%~93.7%)进行比对,核苷酸同源性分别为 84.6%~85.9%、84.6%~84.7%、93.0%~93.2%、92.2%~96.7%;与猪基因 IV 型病毒株序列(Sw01-AY723745-ind-2006、Swine-GU119960-chi-xinjiang-2009、Swine-FJ610232-chi-gansu-2008、Swine-ef570133-chi-shanghai-2005、Swine-DQ450072-chi-shanghai-2005,核苷酸同源性为 83.1%~96.5%)比对,核苷酸同源性分别为 85.4%~86.3%、91.8%~95.2%、84.2%~84.8%、83.0%~83.9%、82.6%~84.1%。(2)进化树构建:将 3 株病毒株基因序列与 HEV 各基因型参考的全序列 HEV 病毒株进行同源性分析,绘制进化树(图 1)。结果显示,本次研究分离的 3 株 HEV 病毒株在 HEV IV 型分支上,与西安株、新疆株、上海株在同一簇上,同源性为 91.8%~96.7%。与北京、长春、上海、西安等地的分离人 IV 型毒株(AJ272108、AB108537、AB197674、AB197673)的同源性为 84.6%~96.7%。与猪分离的 HEV IV 型基因序列比较,发现与新疆分离的毒株(GU119960)同源性最高,为 91.8%~95.2%。与其他地区(上海、甘肃等)猪分离的毒株(FJ610232、ef570133、DQ450072)同源性较低,仅 82.6%~84.8%。

### 讨 论

在我国,戊肝的发病率和感染率均较高,多为散发性流行<sup>[6]</sup>。笔者分析了 2004—2011 年杭州市戊肝的流行特征,结果显示,杭州市

戊肝发病以散发为主,发病率呈逐年上升趋势。发病集中在 25~65 岁,男性发病率高于女性,推测与该人群成年走向社会,生活和行为方式发生了改变,且男性外出活动较多有关。职业分布以农民为主。因为农业人口基数大,易接触猪,而且猪是 HEV 最主要的动物宿主,故容易发病<sup>[7-10]</sup>。

本研究通过 RT-PCR 方法对 78 份戊肝患者血液及粪便标本进行了 HEV 检测,阳性率为 20.51%。有研究显示,戊肝在疾病的早期 RNA 阳性率较高,随着时间的延长逐渐下降,发病后第 4 周抗 HEV IgM 阳性率达 93.8%,而 HEV RNA 阳性率仅有 9.4%<sup>[11]</sup>。本研究患者标本来自抗 HEV IgM 阳性患者,因此 HEV RNA 检出率相对较低。戊肝已被认为是一种人畜共患病,猪是 HEV 最主要的动物宿主,我国猪群中 HEV RNA 的检出率为 1.8%~24%<sup>[12-14]</sup>。陆一涵等<sup>[15]</sup>调查显示,浙江省猪的

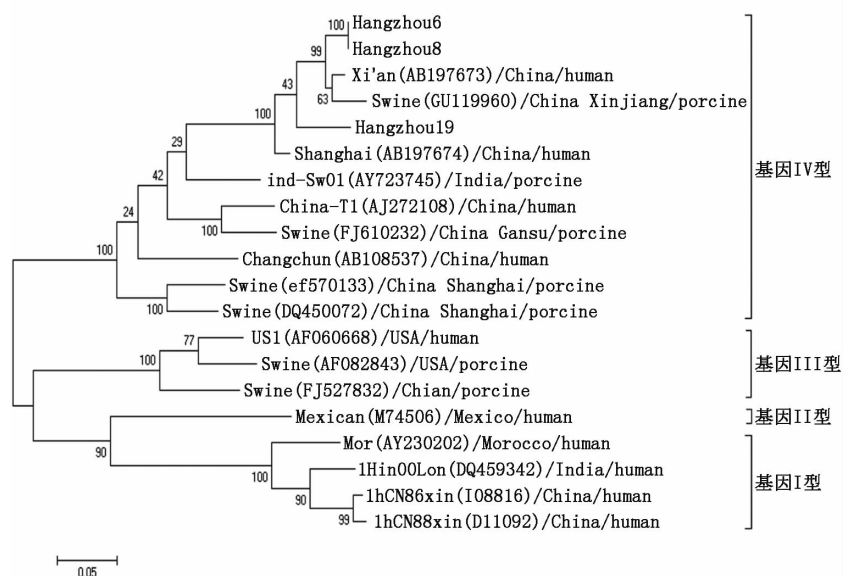


图 1 杭州市戊型肝炎病毒毒株核苷酸序列系统进化树

HEV 检出率较低,仅为 2.5%,低于江苏省(6%)和安徽省(5%)。本研究从猪胆囊及猪粪便标本中均未检出戊肝病毒,可能与本地猪感染率较低有关。本研究从兔子粪便中检出的 2 份 HEV 核酸阳性标本,但由于病毒浓度偏低,未做基因序列分析。有研究已从家兔中获得新的基因型-兔 HEV<sup>[14,16]</sup>,但该基因组是否会传染给人,仍有待进一步探讨。

HEV 病毒株主要划分为四个基因型(I~IV型),中国 HEV 病毒株主要为 I 型和 IV 型<sup>[10,12]</sup>。本研究对分离的病毒株序列进行核苷酸同源性分析,结果均为 IV 型,且同源性较高,表明杭州市 HEV 以 IV 型病毒株为主。此外,通过与北京(AJ272108)、长春(AB108537)、上海(AB197674)、西安(AB197673)等地的人 IV 型毒株同源性进行比较,同源性为 84.6%~96.7%,与我国多地的研究结果一致<sup>[7-8,17-18]</sup>。任宏等<sup>[7]</sup>研究显示,上海市人群和猪群间 HEV 核苷酸同源性为 83.09%~97.96%,存在高度同源性。本研究将杭州 HEV 基因序列与 GenBank 基因库中猪分离的 HEV IV 型代表基因序列(GU119960、FJ610232、ef570133、DQ450072)进行比对,同源性为 82.6%~95.2%。提示杭州市 HEV 在人群中与猪群中存在高度同源性。

#### 参 考 文 献

- [1] 曲立春. 戊型肝炎病毒的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5):209-212.
- [2] Aggarwal R, Naik S. Epidemiology of hepatitis E: current status [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(9):1484-1493.
- [3] Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E virus: epidemiology, diagnosis, pathology and prevention [J]. Trop Gastroenterol, 2006, 27(2):63-68.
- [4] Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus[J]. J Virol Methods, 2006, 131(1): 65-71.
- [5] 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[J]. 病毒学报, 2005, 21(3): 181-187.
- [6] 徐洪涛,叶军,咸建春,等. 泰州地区人群戊型肝炎病毒基因的分型[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(10):623-627.
- [7] 任宏,李燕婷,周欣,等. 上海市 1997—2012 年戊肝流行特征和基因分型研究[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(5): 419-423.
- [8] 张雪峰,张军,田华,等. 江苏省部分地区散发戊型肝炎流行病学及病毒基因型[J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(12): 1207-1209.
- [9] 陆一涵,宋建根,姜庆五,等. 浙江农村人群戊型肝炎感染率调查[J]. 复旦学报(医学版), 2006, 33(3):357-362.
- [10] 姜梅,崔伟红,李波,等. 烟台市戊型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):1417-1420.
- [11] 马英杰,陈焕永,邵凤娟. 散发性戊型肝炎临床特征和病毒血症的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2011, 45(3):251-254.
- [12] Ji Y, Zhu Y, Liang J, et al. Swine hepatitis E virus in rural southern China: genetic characterization and experimental infection in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) [J]. J Gastroenterol, 2008, 43(7): 565-570.
- [13] Yu Y, Sun J, Liu M, et al. Sero epidemiology and genetic characterization of hepatitis E virus in the northeast of China [J]. Infect Genet Evo, 2009, 9(4):554-561.
- [14] Shao ZJ, Li JH, Zheng YJ, et al. Epidemiological screening of hepatitis E virus in bile specimens from livestock in northwest China [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3):814-816.
- [15] 陆一涵,郑英杰,胡安群,等. 华东地区猪基因 4 型戊肝病毒的季节变化及与人同源性的分析[J]. 中华预防医学杂志, 2009, 43(6):504-508.
- [16] Ma H, Zheng L, Liu Y, et al. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses [J]. PLoS One, 2010, 5(2):e9160.
- [17] 程险峰,陈瑾,詹圣伟,等. 马鞍山地区戊型肝炎病毒分型及流行病学分析[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(6):710-712.
- [18] 郝娃,赵晨燕,陈俊梅,等. 北京市急性散发性戊型肝炎血清学分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(11):1361-1362.

(收稿日期:2013-10-18)

(本文编辑:吕相征)