

戊型肝炎病毒的动物宿主研究进展

柳剑 陈焰锋 李政泰 吐达洪 吴华 朱永红 庄辉

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是1982年发现的一种新型肝炎病毒^[1],当时称为肠道传播的非甲非乙型肝炎病毒,1989年正式命名为HEV。其基因组为单股正链RNA,全长约7.2 kb,基因组编码区有3个开放读码框架(ORFs)。HEV至少有8个基因型^[2];基因1型和2型分别为亚非型和墨西哥型,美国的猪和人HEV为基因3型;中国的北京株和台湾株HEV属于基因4型,欧洲株、意大利株和希腊株等属于HEV基因5~8型。HEV主要经粪-口途径传播,有流行和散发两种形式。流行主要发生在发展中国家,多因水源被污染引起。散发主要发生在欧美一些发达国家,患者多有到流行区的旅游史,但也有的患者发病前未到过流行区。为弄清楚HEV感染和流行的真正原因,各国学者对HEV的动物宿主进行了大量研究,并取得了不少的进展,现综述如下。

一、猪作为HEV自然宿主的研究

猪是一种圈养家畜,与人类关系较密切,各国学者对猪是否为HEV自然宿主进行了较为充分的研究。

1. 猪抗-HEV 流行率调查:应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测猪血清抗-HEV IgG 抗体。Clayson等^[3]应用重组的缅甸和墨西哥HEV株结构蛋白作为抗原,检测尼泊尔加德满都峡谷的农村55头猪抗-HEV抗体,其中18头为阳性,阳性率为32.7%。Hsieh等^[4]从台湾各地随机抽取275头6月龄以下幼猪,用台湾人HEV株ORF2表达的相对分子量(M_r) 55×10^3 的重组蛋白作为抗原,检测猪抗-HEV IgG 抗体,其中102头猪阳性,阳性率为37.1%。美国报道从21头商品母猪中检出18头抗-HEV阳性,阳性率为90%^[5]。新西兰检测22头猪,其中20头抗-HEV IgG 阳性,阳性率为91%^[6]。各国猪群中抗-HEV流行率不同,除确实存在地区差异外,与样本数量、样本的代表性及检测试剂的灵敏度等因素有关。

2. 猪HEV核苷酸序列分析:为了解猪HEV与人HEV异同,各国学者应用逆转录聚合酶链反应法(RT-PCR)扩增猪HEV病毒核酸片段,并进行了序列分析。Meng等^[5]设计ORF2和ORF3 2套简并引物,从自然感染的猪血清中扩增HEV RNA,序列分析发现一种新型猪HEV,它与人HEV的同源性较高,ORF2区的核苷酸序列同源性为79%~80%,氨基酸同源性为90%~92%。基因进化树分析表明,美国猪和人HEV同属于基因3型^[5]。1999年台湾Wu等^[7]

用与Meng等^[5]相同的简并引物,采用RT-PCR法,从235头猪血清中扩增出HEV ORF2和ORF3基因片段,其基因序列与从台湾急性戊型肝炎患者粪便中分离的HEV核苷酸同源性高达84%~95%,氨基酸同源性为91%~94%。台湾猪和台湾地区人HEV构成了一个独立的亚型,即HEV基因4型^[7]。后来Wu等^[8]检测台湾北、中、南、东部猪场521份猪血清和54份猪粪便,HEV RNA阳性率为1.2%~1.8%间,测序结果表明,大部分猪HEV为基因4型,少数从美国进口的猪为HEV基因3型^[8]。王佑春等^[9]用RT-PCR法检测北京、河南、浙江、新疆等8个地区263份猪血清,其中5份PCR阳性,序列分析猪HEV序列相互间同源性为83%~93%,与HEV基因4型同源性为83%~99%。提示猪和人的HEV可能来自同一传染源。

3. 猪与人HEV相互感染的关系:由于美国猪HEV与人HEV US-2 有较高的氨基酸同源性,Meng等^[10]用人HEV US-2株静脉内注射感染健康猪,3~4天后,从猪粪便中分离到HEV RNA,2周后猪抗-HEV阳转。但用巴基斯坦和墨西哥HEV株感染健康猪未获得成功,是否与不同地区的动物宿主对HEV易感细胞受体不同有关,尚需进一步研究。

Balayan等^[11]用急性HEV患者粪便提取液感染4头8~10 kg白猪,同时采用口服(2.0 ml)和静脉注射(1.5 ml)2种途径感染,4头猪中有3头感染HEV。于感染后14天和37天出现急性肝炎的组织病理学改变,提示人HEV可感染猪。为证实猪HEV是否可感染人,Meng等^[10]用猪的HEV静脉注射2只恒河猴,1~2周后从粪便中分离出HEV RNA,并持续3~5周,4周后抗-HEV阳转,持续16周,表明猪HEV可感染猕猴,从而为猪HEV感染人类提供了依据。据Hsieh等^[4]报道,屠宰场的工人和卖猪肉者抗-HEV阳性率明显高于普通人群(分别为26.7%、15.0%和8.0%),提示携带HEV的猪可能作为人感染HEV的传染源。

4. 猪HEV致病机制和动物模型的研究:Meng等^[10]用猪HEV阳性血清静脉感染健康仔猪,2周后即可从鼻咽和肛门拭子标本中检测到HEV RNA,4~8周后出现病毒血症,持续1~3周,4~8周后抗-HEV IgG阳转,但无临床症状,血清肝功能生化指标也未见明显升高。与已接种HEV猪同时圈养但未接种的猪也发生感染,推测可能通过猪-猪接触传播。

Williams等^[12]对HEV在猪体内的复制和致病性进行了系统研究,将猪分为3组,第1组18头,用猪HEV感染;第2组19头,用人类HEV US-2株感染;第3组17头作为空白对

照,于感染后第3、7、14、20、27和55天每组解剖2头,每头猪收集13种不同类型的组织和器官标本,用RT-PCR法检测负链RNA,结果表明,HEV除在肝脏复制外,在小肠和结肠淋巴结中也检测到HEV负链RNA。在血清中出现HEV RNA前,即在肠道检测到负链HEV RNA,这对阐明HEV致病机制、发展HEV体外细胞培养系统及寻找实验动物模型具有重要意义。

二、啮齿类动物作为HEV自然宿主的研究

猪虽被认为是HEV的自然宿主,且具备感染人的可能性,但在美国非流行区的健康人群与猪无密切接触史,而抗-HEV阳性率较高(0.4%~5.0%)^[13]。为此,Lazizi等^[13]对鼠进行了研究,他们从美国巴尔的摩、马里兰、欧胡岛、夏威夷、新奥尔良和路易斯安娜等地捕获239只野鼠,用ELISA法检测鼠血清抗-HEV。结果从马里兰、夏威夷和路易斯安娜捕获的野鼠抗-HEV阳性率分别为77%、90%和44%。Favorov等^[14]于1994~1998年间共捕获15属26种啮齿类动物共计806只,用杆状病毒表达的 $M_r 55 \times 10^3$ ORF2重组蛋白做抗原,用ELISA法检测,抗-HEV阳性率为38%(303/806),而用ORF2和ORF3表达的重组嵌合蛋白作为抗原检测,抗-HEV阳性率为40%(244/612),两者差异无显著性。城市中鼠抗-HEV阳性率高于农村,其原因尚不清楚。在一些城市挪威鼠(*Rattus norvegicus*)密度较高,有可能造成HEV的传播。在啮齿类动物中,来自马里兰巴尔的摩的挪威鼠抗-HEV流行率最高,为91.3%,而来自宾西法尼亚州门罗地区的白足鼠(*P. leucopus*)和鹿鼠(*P. maniculatus*)最低,仅为4.5%。*Rattus*属和*Mus*属的鼠均起源于HEV呈高度地方性流行的中亚地区,后被引入美洲大陆。只有将源于新旧大陆的啮齿类动物HEV进行测序比较,才能确定两者之间的相互关联。由于病毒血症出现的时间大部分是在血清抗-HEV阳转之前,该实验室捕获的野鼠大都为成年鼠,因此未能分离出HEV RNA。感染鼠的试验正在进行中。究竟鼠HEV是其物种所特有,还是从人或猪HEV感染而来的变异株,尚需进一步研究证明。Tsarev等^[15]从啮齿类动物中分离出HEV,部分序列分析表明,鼠HEV与从急性戊型肝炎患者粪便中分离的HEV一致,但尚需做全序列分析比较,才能确定鼠在流行区是否为HEV的保存宿主,是否可作为感染人和猪的传染源,或是存在于自然界的一个生物种。由于克隆和测序技术的成熟,野鼠HEV基因组的研究将会取得新的突破,从而确定啮齿类动物在传播HEV上的作用和意义。Manceerat等^[16]曾成功地用人HEV粪便提取物感染27只Wistar实验鼠获得成功,并在接种后4、7、11、14、18、21、25、28和35天用直接免疫荧光染色法在3只鼠肝脏、外周血单核细胞、脾脏、淋巴结和小肠检测到HEV抗原,发现肝、脾、淋巴结的组织有病理改变,提示HEV可在鼠的肝、脾、淋巴结中复制。由于鼠实验和饲养方便,在作为人HEV动物实验模型较猴和猪具有更大的优越性。但尚需与猪、猴同时感染并进行严格的实验比较,才能确定其作为动

物模型的意义。

三、其他动物作为HEV宿主的研究进展

除鼠和猪动物宿主外,还研究了牛、羊、鸡、狗及非人灵长类动物,如恒河猴、黑猩猩等作为HEV宿主的意义。索马里、塔吉克斯坦和土库曼斯坦牛群中HEV的感染率为29%~62%^[17],我国牛群中HEV感染率仅为6.3%^[9]。羊HEV的研究在以畜牧业经济为主的地区具有重要意义,土库曼斯坦绵羊和山羊HEV感染率在42%~67%之间^[17],我国羊HEV感染率为0%^[9]。1994年前苏联Usmanov等^[18]用急性戊型肝炎患者的10%粪便悬液感染羊羔,出现急性肝炎的生化和组织学改变,用电镜检测羊粪便、外周淋巴结和小肠内容物标本,观察到类似病毒样颗粒,在羊的实质器官中也检测到HEV RNA。

据越南Tien等^[19]调查,鸡抗-HEV流行率为44%,狗为27%。1999年Payne等^[20]从澳大利亚肝脾肿大的鸡中检测到与人类HEV有关的病毒,该病毒与人类HEV解旋酶基因区的氨基酸同源性为60%。最近,美国Haqshenas等^[21]在北美肝脾肿大的鸡中也分离到一种与人HEV有关的新病毒,其遗传特征与人和猪HEV类似,在电镜下为30~35 nm的圆球状颗粒。为了与人和猪HEV相区别,暂命名为禽HEV。用3'RACE和'touch down'PCR法扩增出病毒基因组全序列,长约4 kb。序列分析表明,禽HEV含有完整的非编码区和编码区基因,具有完整的ORF2和ORF3区。在ORF1区含有完整的依赖RNA的RNA多聚合酶(RDRP)和解旋酶基因,禽HEV解旋酶基因区与其他HEV一样,均为最保守的基因,两者核苷酸序列同源性为57%~60%,氨基酸同源性为58%~61%;RNA依赖的RNA聚合酶(RDRP)基因与其他HEV株相比较,核苷酸同源性为52%~53%,氨基酸同源性为47%~50%。ORF2区的核苷酸序列同源性为48%~51%,氨基酸序列同源性为47%~50%。与Payne等^[20]报道的鸡HEV氨基酸同源性为80%^[21]。禽HEV与人类HEV株系统进化树分析表明,两者在遗传学上既有联系,又有区别。在病毒分类学上,禽HEV是属于HEV的一个新种,还是属于HEV中的一个新基因型,有待进一步确定。大部分学者倾向于将其归为动物HEV。禽HEV的发现对HEV命名、动物模型及自然史研究均具有重要意义。

HEV的自然宿主研究虽然已取得长足进展,但还有很多问题有待进一步探索。HEV的保存宿主到底是哪些动物,HEV的自然感染的源头究竟在哪里,是由哪些类似HEV的病毒重组或变异而成,这些问题均有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 1983, 20:23-31.
- 董庆鸣, 庄辉. 戊型肝炎病毒基因型的研究进展. *中国公共卫生*, 2001, 17:470-471.
- Clayson ET, Innis BL, Myint KSA, et al. Detection of hepatitis E

- virus infections among domestic swine in the Kathmandu valley of Nepal. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, 53:228-232.
- 4 Hsieh SY, Meng XJ, Wu YH, et al. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3828-3834.
 - 5 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, 94:9860-9865.
 - 6 Garkavenk O, Obriadina A, Meng J, et al. Detection and characterization of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol*, 2001, 65:525-529.
 - 7 Wu JC, Chen CM, Chiang TY, et al. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol*, 2000, 60:166-171.
 - 8 Wu JC, Chen CM, Tsai WH, et al. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol*, 2002, 66:488-492.
 - 9 Wang YC, Zhang HY, Xia NS, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J Med Virol*, 2002, 81:1675-1686.
 - 10 Meng XJ, Halbur PG, Shapiro Ms, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J Virol*, 1998, 72:9714-9721.
 - 11 Balayan MS, Usmanov RK, Zamyatina NA, et al. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs. *J Med Virol*, 1990, 32:58-59.
 - 12 Williams TP, 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, 39:3040-3046.
 - 13 Lazizi YK, Fine JB, Elm J, et al. Evidence for wide-spread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg*, 1999, 61:331-335.
 - 14 Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Infect Dis*, 2000, 181:449-455.
 - 15 Tsarev SA, Shrestha MP, He J, et al. Naturally acquired hepatitis E virus (HEV) infection in Nepalese rodents. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 59:384.
 - 16 Maneerat Y, Clayson ET, Myint KSA, et al. Experimental infection of laboratory rats with the hepatitis E virus. *J Med Virol*, 1996, 48:121-128.
 - 17 Favorov MO, Nazarova O, Margolis HS. Is hepatitis E an emerging zoonotic disease? *Am J Trop Med Hyg*, 1998, 59:242.
 - 18 Usmanov RK, Balayan MS, Dvoinkova OV, et al. Experimental hepatitis E infection in lambs. *Vopr Virusol*, 1994, 39:165-168.
 - 19 Tien NT, Clayson ET, Khiem HB, et al. Detection of immunoglobulin G to the hepatitis E virus among several animal species in Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 57:211.
 - 20 Payne CJ, Ellis TM, Plant SL, et al. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol*, 1999, 68:119-125.
 - 21 Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J Gen Virol*, 2001, 82:2449-2462.

(收稿日期 2002-03-21)

(本文编辑:尹廉)

· 疾病控制 ·

安庆市 1995~2000 年流行性乙型脑炎流行病学分析

陈荣生

流行性乙型脑炎(乙脑)是蚊媒急性传染病,安庆市每年均有发生,严重危害儿童健康。1995~2000年共收治乙脑患者166例。其中男性84例,女性82例,男女之比为1.1:1,来自于农村156例,城市10例,农村为城市的15.6倍,发病年龄最小为6个月,最大为14岁,7岁以下儿童发病130例,占总数的75.8%。1995年首例发病于5月25日,末例为9月5日,流行持续100天,为流行时间最长的年份。所有病例均以发热起病,以稽留热型多见,头痛136例(82.0%),呕吐116例(70.1%),抽搐109例(65.6%),意识障碍166例(100.0%),其中嗜睡112例(66.5%),脑膜炎刺激征阳性者115例(69.1%)。从住院患者采集急性期及恢复期双份血清17例,经安徽省卫生防疫站血凝抑制试验检测,有12例阳性,

5例阴性。在这几年中临床表现轻型67例(40.36%),普通型78例(47.0%)。1995年和1996年发病人数最多为76例,占总数的45.8%。本市乙脑流行具有严格的季节性,主要集中在7、8月份,是由于气温升高,雨量增加,为蚊媒孳生提供了环境与条件。至于农村发病人数高于城市(15.6:1),其原因就是农村卫生条件差,无纱门、纱窗,加之人们在户外乘凉增加了感染机会,特别是饲养的猪,其主要吸血蚊种是三带喙库蚊,而且其感染的时间较人为早,具备了为乙脑病毒提供扩散宿主。从目前情况看,发病人数逐年下降,发病年龄逐步上升,这与乙脑疫苗接种有关系,计划免疫工作仍因基层工作薄弱而得不到落实,易感人群大量存在所致。

(收稿日期 2002-12-20)

(本文编辑:张林东)