

戊型肝炎病毒核酸阳性血浆经输血传播感染恒河猴的研究

夏宁邵 张军 郑英杰 邱艳 葛胜祥 叶祥忠 欧山海

【摘要】 目的 了解戊型肝炎病毒 (HEV) 核酸阳性血浆对灵长类动物的感染性和致病性。 **方法** 对抗-HEV IgM 阳性而 IgG 阴性志愿献血员血浆进行 HEV RNA 检测, 并将存在病毒血症献血员的 10 ml 血浆静脉输入健康恒河猴, 观察其对恒河猴的感染性和致病性。 **结果** 从 1 份抗-HEV IgM 阳性而 IgG 阴性志愿献血员血浆中分离出 HEV 基因 IV 型 RNA 片段。该份血浆输入恒河猴后, 恒河猴出现典型急性肝炎生物化学和病理表现, 病毒血症, 血清抗-HEV IgM 和 IgG 抗体阳转。 **结论** HEV 病毒血症献血员血浆输入可以引起灵长类动物的 HEV 感染以及急性肝炎, 提示 HEV 经输血传播的可能性。

【关键词】 肝炎病毒, 戊型; 输血传播; 恒河猴

Detection of hepatitis E virus on a blood donor and its infectivity to rhesus monkey XIA Ning-shao, ZHANG Jun, ZHENG Ying-jie, QIU Yan, GE Sheng-xiang, YE Xiang-zhong, OU Shan-hai. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

【Abstract】 Objective To understand the infectivity and pathogenicity of the plasma of hepatitis E virus (HEV) viremia to primate animals. **Methods** RNA fragment of HEV genotype IV was detected on one donor who was positive for anti-HEV IgM and negative for anti-HEV IgG. Then 10 ml plasma from above donor was transfused to rhesus monkey to observe its infectivity and pathogenicity. **Results** Acute hepatitis E was developed in rhesus monkey who accept HEV RNA positive plasma. It was confirmed by virological, immunological, biochemical and histopathological data. **Conclusion** Acute hepatitis E can be induced by plasma transfusion of HEV viremia, which indicate the possibility of transfusion transmitted hepatitis E.

【Key words】 Hepatitis E virus; Monkeys; Transfusion transmission

在灵长类动物模型中研究携带病毒的志愿献血员血浆输入导致戊型肝炎病毒 (HEV) 感染以及急性肝炎发生的可能性。

材料与方法

1. 标本来源: 志愿献血员 (编号 206) 血浆由北京红十字中心血站提供, 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 正常, 抗甲型肝炎病毒 IgM、抗乙型肝炎核心抗原 IgM、抗丙型肝炎病毒 IgG、抗丁型肝炎病毒 IgG 阴性。

2. 抗-HEV 抗体检测: 献血员 206 血浆以 Genelabs

公司 (新加坡) 抗-HEV IgM、抗-HEV IgG 试剂进行检测, 并同时以国产新型抗-HEV IgM、抗-HEV IgG 试剂 (北京万泰公司) 进行检测^[1]。抗-HEV 中和单克隆抗体为本实验室鉴定制备^[2], 阻断实验按文献进行^[1]。

3. HEV RNA 的反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测: 血清 250 μl 用 TRIZOL 试剂 (美国 Gibco 公司) 按操作说明提取 RNA; 提取的 RNA 以配好的反转录体系溶成 20 μl, 进行反转录, 反转录引物 A3 (5'-GGCTCACCGAGTGTTC-3')。取 2 μl 反转录产物进行第一轮 PCR 扩增, 反应体积 20 μl, 引物为 A5 (5'-CTTTGATGACACCGTCTTCTCG-3') 和 A3, 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 68℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min; 取 1 μl 第一轮 PCR 产物, 在 20 μl 反应体积中进行第二轮 PCR,

作者单位: 361005 厦门, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心 (夏宁邵、张军、郑英杰、葛胜祥、叶祥忠、欧山海); 北京市红十字血液中心 (邱艳)

夏宁邵 男, 39 岁, 研究员, 博士生导师, 发表论文 60 余篇。

引物为 B5 (5' -GCCGCAGCAAAGGCATCCATG-3') 和 B3 (5' -GTGTTTCTTCCAAAACCCTCGC-3'), 条件为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 40 s, 56℃ 40 s, 72℃ 80 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。将扩增片段用胶回收试剂盒 (上海华舜公司) 回收纯化, 连接入 pMT-18 载体 (大连宝生物公司), 由上海博亚公司进行序列测定, 测序结果与 HEV 4 种基因型代表株用 Clustal X 软件进行同源性分析, 以 TreeView 软件绘制系统树。

4. 实验动物: 实验所用恒河猴由广西壮族自治区疾病预防控制中心提供, 1~2 岁, 实验前进行常规医学观察, 并持续 2 周检测血清 ALT 正常, 以及抗-HEV IgM、IgG 抗体阴性。

结 果

1. 献血员血浆中 HEV RNA 的检出及其同源性分析: 用国产新型抗-HEV IgM、IgG 检测试剂盒对献血员进行 HEV 流行率调查时发现, 献血员 206 血浆抗-HEV IgM 抗体滴度大于 1:640, 而抗-HEV IgG 阴性; 同时用进口 Genelabs 公司抗-HEV IgM、IgG 检测试剂盒检测均为阴性; 对该血浆标本进行单克隆抗体阻断实验, 发现其抗-HEV IgM 抗体可被抗-HEV 中和单克隆抗体显著阻断 (图 1); 其血清学表现复合 HEV 感染早期特征, 推测同时具有病毒血症的可能性较大。用 RT-PCR 方法从献血员 206 血浆中扩增出一条特异带 (图 2), 经克隆测序后 (Genbank 登录号: AY245779) 与 HEV 各基因型代表株进行同源性分析。从献血员 206 中分离出的序列与 HEV IV 型 T-Ct1 株的同源性为 80%, 与其他型的同源性均小于 70%, 证实为 HEV 基因 IV 型 (图 3)。

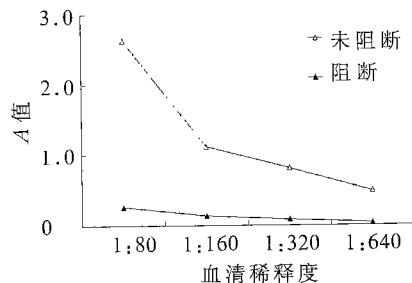


图 1 抗-HEV 中和单克隆抗体对献血员 206 血浆抗-HEV IgM 抗体的阻断实验

2. HEV 病毒血症献血员血浆对恒河猴的感染性和致病性: 将 10 ml 献血员 206 血浆静脉注入一只抗-HEV 抗体阴性健康恒河猴体内, 连续观察恒河猴血清

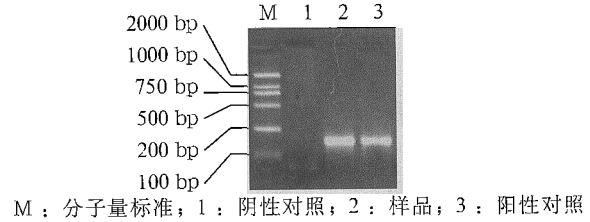


图 2 RT-PCR 检测献血员 206 血浆 HEV RNA

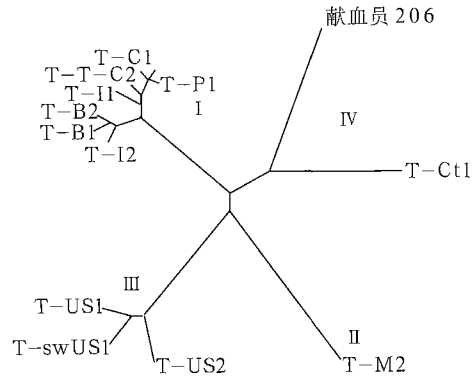


图 3 献血员 206 中 HEV RNA 序列与 HEV 4 种基因型代表株的同源性分析

ALT、血清抗-HEV 抗体以及粪便排毒情况, 结果见图 4。对 RT-PCR 扩增出的血清和粪便中的 HEV RNA 片段进行克隆测序, 所得序列与献血员 206 血浆中克隆出的相应序列完全一致。

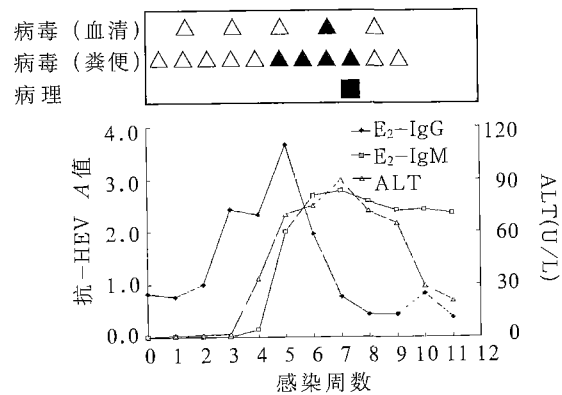


图 4 输入献血员 206 血浆后恒河猴的戊型肝炎相关指标动态变化

讨 论

HEV 的感染主要表现为亚临床感染, 病毒血症可以在感染急性期和亚急性期出现^[3-5]。HEV 病毒血症通常持续 2~3 周, 但也有长达 112 d 的报道^[3, 4]。有流行病学研究发现在血液透析患者、血友病患者和静脉药瘾者中的 HEV 感染率较一般人群更高。Arankalle 等^[6, 7]报道, 在 37 例抗-HEV IgG 阴性受血者中有 2 例在

输血后出现了抗-HEV 抗体阳转, 在印度的 200 例健康献血员中发现了 3 例 HEV 病毒血症。这些发现均提示着 HEV 经血液传播的可能性, 但该研究中未发现感染性献血员与血清阳转受血者之间存在的直接联系。Nicand 等^[5]曾提出无症状携带者在 HEV 流行中的作用。研究中, 将一份来自于志愿献血员的 HEV 病毒血症的血浆输入恒河猴, 发现恒河猴出现了较典型的急性肝炎表现以及 HEV 复制, 从而直接证实了 HEV 经血液传播并导致急性戊肝的可能性。研究的结果以及上述的其他流行病学证据充分提示了 HEV 经血制品传播的可能性。

参 考 文 献

1 葛胜祥, 张军, 彭耿, 等. 基于多聚化重组抗原的戊型肝炎

- 病毒抗体 IgM、IgG ELISA 方法的建立及初步应用. 病毒学报, 2003, 19: 74-82.
- 2 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定. 病毒学报, 2003, 19: 217-223.
- 3 Aggarwal R, Kini D, Sofat S, et al. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. Lancet 2000, 356: 1081-1082.
- 4 Nanda S, Ansari I, Acharya S, et al. Protracted viremia during acute sporadic hepatitis E virus infection. Gastroenterology 1995, 108: 225-230.
- 5 Nicand E, Grandadam M, Teyssou R, et al. Viraemia and faecal shedding of HEV in symptom-free carriers. Lancet 2001, 357: 68-69.
- 6 Arankalle V, Chobe L. Retrospective analysis of blood transfusion recipients: evidence for post-transfusion hepatitis E. Vox Sang 2000, 79: 72-74.
- 7 Arankalle V, Chobe L. Hepatitis E virus: can it be transmitted parenterally? J Viral Hepat 1999, 6: 161-164.

(收稿日期: 2003-10-16)

(本文编辑: 谢娜)

· 经验交流 ·

连续分子吸附再循环系统人工肝治疗过程中患者的不良反应及处理

王新 周新民 苗继延 杨艳 赵玲 丁杰 吴开春 樊代明

【关键词】 肝, 人工; 分子吸附再循环系统; 人工肝支持系统
Side-effects and management of continuous MARS artificial liver for patients. WANG Xin, ZHOU Xin-ming, MIAO Ji-yan, YANG Yan, ZHAO Lin, DING Jie, WU Kai-chun, FAN Dai-ming.

【Key words】 Artificial liver; Molecular adsorbent recirculating system; Artificial liver

【First author's address】 Institute of Digestive Disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China

研究分析单次和多次分子吸附再循环系统 (MARS) 人工肝治疗过程中患者出现的不良反应, 及采用相应处理措施后效果, 为各类危重肝病安全有效地实施 MARS 人工肝治疗提供指导。

1. 资料与方法: 20 例各种原因所致急慢性肝功能不全患者, 判定患者的肝功能状态之后, 检测患者的凝血酶原时间, 做深静脉 (颈静脉或股静脉) 置管。使用德国 MARS 人工肝支持系统。透析液组成按比例配制碳酸盐透析液。参数设置: 循环血液量为 150 ml/min, 循环白蛋白 (20%) 流量为 150 ml/min; 透析液流量为 75 ml/min (若采取循环方式, 则为 150~200 ml/min, 2 h 更换一次透析液), 单次连续治疗时间为 6 h。

2. 结果: 对急慢性肝功能衰竭患者分别经 1、3 或 7 次 MARS 治疗, 到目前, 共有 20 人进行了 29 次 MARS 治疗。经

随访 1~9 个月, 16 例治愈或好转, 4 例死亡, 生存率为 80%。13 例患者出现寒冷反应; 11 例出现消化道反应; 4 例出现过敏反应; 3 例出现动脉血压显著升高; 1 例十二指肠癌伴肝转移患者出现消化道出血, 因肝功能衰竭而坚决要求 MARS 治疗, 在治疗进行 2 h 时再次消化道大出血, 遂终止治疗, 后因大出血不止、休克而死亡; 1 例老年患者, 有前列腺增生, 术中尿潴留; 1 例患者连续 3 次 (1 次/d) MARS 治疗后, 血小板和血色素明显下降, 伴乏力、纳差, 但停止 MARS 治疗数天后即可恢复。

3. 讨论: 在治疗 1~2 h 时 13 例患者全身发冷, 与血液在体外循环有关, 经增加透析液和患者周转温度后改善。治疗中 11 例患者出现恶心、呕吐反应, 与 MARS 治疗清除体内大量低分子物, 血液渗透压改变有关, 术前半小时肌肉注射胃复安预防有显效。4 例患者出现过敏反应 (寒颤、呼吸困难、气短) 与管道致热原或自体血细胞破坏有关, 术前半小时静脉滴注 200 mg 氢化考地松可预防。多数患者 MARS 治疗中平均动脉压会有所增高, 但个别患者收缩压会显著升高达 190~220 mm Hg, 有诱发消化道、颅内出血的危险, 应早期用生长抑素类药物、降压药 (心痛定等) 控制。有消化道出血 (显性或隐性) 者应慎行 MARS 治疗。MARS 治疗时间间隔 2~4 d 1 次为宜。在 MARS 治疗过程中, 少数患者出现不良反应, 经积极处理后均可缓解。且提前预防性用药可避免发生上诉不良反应, 无其它特殊并发症。

(收稿日期: 2003-01-14)

(本文编辑: 谢娜)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学西京医院消化病研究所