

2005—2008 年浙江省生猪主产区猪戊型肝炎血清流行病学调查

帅江冰¹, 张晓峰¹, 徐晶靓³, 陈 宁², 方维焕^{2*}

(1. 浙江出入境检验检疫局, 杭州 310012; 2. 浙江大学 浙江省动物预防医学重点实验室, 杭州 310029;
3. 杭州市畜牧兽医局, 杭州 310029)

摘 要: 本研究旨在建立检测猪戊型肝炎病毒(HEV)感染的间接 ELISA 方法, 并将其用于分析浙江省生猪主产区猪群的 HEV 感染状况。首先人工合成并原核表达了 HEV ORF2 蛋白的主要抗原表位区, 免疫印迹显示表达产物对 HEV 抗体阳性的猪血清具有良好的反应性。以此纯化蛋白为包被抗原建立了猪血清中 HEV 特异性抗体的 ELISA 检测方法, 检测结果显示其与商品化 HEV 抗体诊断试剂盒的检测符合率达 91.5%。对 2005—2008 年采集自浙江省不同地区 46 个猪场的 1 330 份血清进行了检测, 有 741 份血清检测为猪 HEV 抗体阳性, 平均阳性率为 55.7%。其中 2005 和 2006 年 HEV 抗体阳性率分别为 62.7% (175/279) 和 61.4% (301/490), 明显高于 2007 年的 43.1% (59/137) 和 2008 年的 48.6% (206/424)。同时, 66—100 日龄中猪的血清 HEV 抗体阳性率(58.2%, 110/189)显著高于 30—65 日龄小猪(39.7%, 73/184)和 101—160 日龄大猪(44.1%, 83/188)。从猪场水平来看, 仅有 3 个猪场未检测到 HEV 抗体, 场阳性率 93.2%。结果表明本研究建立的 ELISA 方法切实可行, 检测结果显示浙江省猪场中 HEV 感染相当普遍。

关键词: 猪戊型肝炎病毒; 间接 ELISA; ORF2 蛋白; 血清学调查

中图分类号: S851.347.1; S852.659.6; R512.6 文献标识码: A 文章编号: 0366-6964(2009)07-1037-06

Sero-prevalence of Hepatitis E Virus Infections in Pigs from Zhejiang Province During 2005—2008

SHUAI Jiang-bing¹, ZHANG Xiao-feng¹, XU Jing-jing³, CHEN Ning², FANG Wei-huan^{2*}

(1. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310012, China;
2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 3. Hangzhou Animal Husbandry and Veterinary Bureau, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The study was aimed to establish an indirect ELISA for epidemiological investigation of hepatitis E virus (HEV) infections in pigs from the major pig-producing regions of Zhejiang Province. The gene fragment covering immunogenic epitopes of HEV ORF2 was synthesized and expressed in *Escherichia coli*. Western blot analysis revealed that the purified protein reacted to HEV positive sera, but not to positive sera of other common viruses infecting pigs. An indirect ELISA system was then developed using truncated HEV ORF2 protein as the coating antigen and had diagnostic accuracy of 91.5% as compared with a diagnostic kit for HEV antibodies. A total of 1 330 serum samples were collected from 46 pig farms in Zhejiang province during 2005—2008 and tested for sero-prevalence of HEV using the indirect ELISA. The average HEV-positive rate was 55.7% (741/1 330). The positive rate of 2005 and 2006 was 62.7% (175/279) and 61.4%

收稿日期: 2008-11-20

基金项目: 浙江省国境安全检验检疫科技创新服务平台项目(2006C17014); 浙江出入境检验检疫局科技项目(ZK200611)

作者简介: 帅江冰(1980-), 男, 浙江临安人, 博士, 工程师, 主要从事分子病毒学研究, E-mail: jbsuai@yahoo.com; Tel: 0571-89955623

* 通讯作者: 方维焕, E-mail: whfang@zju.edu.cn

(301/490) respectively, much higher than those of 2007 (43.1%, 59/137) and 2008 (48.6%, 206/424). Meanwhile, the pigs aged 66 – 100 days had a statistically higher positive rate (58.2%, 110/189) as compared with that of pigs of 30 – 65 (39.7%, 73/184) and 101 – 160 (44.1%, 83/188) days. Only three herds in the study were HEV antibody-negative, indicating high sero-prevalence of HEV in the pig populations in Zhejiang Province.

Key words: swine hepatitis E virus; indirect ELISA; ORF2 protein; sero-prevalence

戊型肝炎(Hepatitis E)由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)引起,是一种经粪-口传播、以黄疸为主的急性传染病^[1]。戊型肝炎的病死率较甲、乙、丙型和丁型肝炎高,患病孕妇的病死率可高达21%^[2-3]。自1955年印度发生第1次大暴发以来,戊型肝炎已在亚洲、非洲与拉丁美洲的很多国家广泛流行^[4]。近年来该病亦在日本等发达国家散发流行^[5]。我国是戊型肝炎高发区,新疆、辽宁、山东等省均有流行^[3,6],其对公共卫生和人类健康构成了极大威胁。

HEV基因组为单股正链RNA,约7.3 kb,依次包含5'非编码区、3个部分重叠的开放读码框(ORF)以及3'端非编码区和1个polyA尾^[7]。自Meng等^[8]1997年首次分离鉴定猪戊型肝炎病毒(sHEV)以来,越来越多的研究表明猪源HEV与人类HEV基因组具有很高的同源性,在遗传进化关系上也有较高的亲缘性^[9-10]。猪源HEV能通过人工接种感染黑猩猩等灵长类动物;人HEV也能成功感染猪等动物^[11-12]。因此,戊型肝炎也被认为是人畜共患性疾病^[13]。葛胜祥等^[14]对20个省、市的8 626头猪进行了HEV血清学调查,阳性率高达83.1%。马勋等^[15]以含有HEV美国株ORF2 C端含中和抗原表位的基因片段的表达产物作为抗原,ELISA检测新疆猪群中HEV抗体阳性率达到52.5%。但是到目前为止,国内用于猪HEV血清流行病学调查的ELISA方法并不统一,且一些方法以人戊肝病毒的ORF2蛋白作为包被抗原。尽管人戊肝病毒与猪源HEV毒株有很高的基因同源性,但其蛋白中存在的氨基酸位点变异可导致抗原性的改变,检测结果容易出现偏差。因此,建立一套基于地区流行毒株的猪戊肝病毒ELISA检测体系迫在眉睫。本研究旨在建立适合猪HEV毒株特点的ELISA检测方法,并对浙江省猪血清样本进行HEV抗体检测,分析HEV在猪群中的感染及流行规律,为开展HEV所致疾病的监控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 猪HEV ORF2蛋白的表达和纯化

参考GenBank公布的猪HEV全基因组序列,根据Emerson等对HEV核衣壳ORF2免疫原性的研究^[16],选择位于ORF2 459–607aa的部分片段,并依据大肠杆菌偏爱密码子,将该片段的密码子转换成大肠杆菌偏爱的形式。根据优化后的序列,人工合成6对引物,长度分别在48~59 bp(表1)。其中F1与R1、F2与R2、F3与R3、F4与R4、F5与R5、F6与R6之间分别存在17~19 bp的同源区域。用重叠延伸PCR方法(图1)合成猪HEV的主要抗原表位序列。扩增产物克隆入原核表达载体pET-30a,经鉴定后转化入大肠杆菌Rosetta株进行原核表达。选择构建好的阳性重组菌大量诱导表达,用Invitrogen公司的镍琼脂糖凝胶FF柱纯化,取少量进行SDS-PAGE电泳检测蛋白纯度,并按BRADFORD方法测定蛋白浓度。

1.2 融合蛋白免疫反应性分析

用常规的Western Blot方法分析纯化的HEV ORF2截短蛋白对于猪HEV阳性猪血清的免疫反应性,使用HRP标记的羊抗猪IgG为二抗。

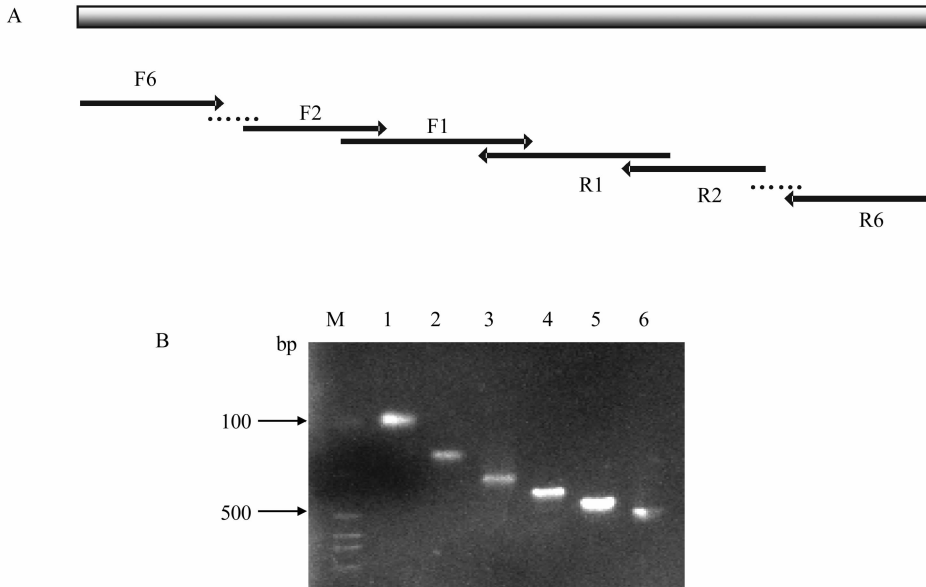
1.3 猪血清样品中HEV抗体间接ELISA检测方法的建立

以纯化的猪HEV ORF2截短蛋白作为包被抗原,利用猪HEV阳性血清和阴性血清为对照进行ELISA检测体系的优化。同时设立猪瘟阳性血清(1:50)、猪细小病毒阳性血清(1:50)以及口蹄疫A、O、C和亚洲I型(兰州兽医研究所)免疫血清(1:64)等对照以鉴定其特异性。并对试验的重复性和稳定性进行分析,即对同一组血清进行多次重复试验,观察它们的OD值差异。间接ELISA操作按常规方法进行,蛋白包被浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,5%脱脂奶粉作为封闭液,血清稀释度为1:100,二抗为HRP标记的葡萄球菌A蛋白(SPA)(1:20 000稀释),显色底物为邻苯二胺。

以北京万泰生物药业股份有限公司生产的戊肝病毒抗体诊断试剂盒检测一定量的猪血清,操作按试剂盒说明书进行。将其结果与本研究建立的 ELISA

方法检测结果进行比较,计算它们之间的符合率。

符合率=(两种方法检测均为阳性的样品数+均为阴性的样品数)/总样品数



M, DL2000 DNA 分子质量标准;1-6, 6 轮 PCR 产物

M, DL2000 DNA marker;1-6, PCR products of 6 rounds of PCR

图 1 HEV ORF2 抗原表位基因合成图例(A)和 6 轮 PCR 结果(B)

Fig. 1 Scheme (A) and identification (B) of amplification of HEV ORF2 epitope sequence

表 1 HEV 抗原表位基因合成用引物

Table 1 Primers used in amplification of HEV ORF2 epitope sequence

引物 Oligo-Nucleotide	序列 Sequence
F1	5'-CTAAAGTCACACTTGATGGCCGCCACTTACTACTATCCAGCAGTATTCTAAGACCTTC-3'
R1	5'-CAGCCTCCCAAAAAGACAACCTTACCACGCAGCGGCAGTACATAGAAGGTCTTAGAATAC-3'
F2	5'-AACTGGTGC GCAAGCCGTGGCCCGCTCTCTGGACTGGTCTAAAGTCACACTTGATG-3'
R2	5'-GGTGTTATAGTTATATGGATAAACCGCTTTCGTAGTACCAGCCTCCCAAAAAGACAAC-3'
F3	5'-CTATGTATGTTTCAGACACTGTTACTTTTGTC AATGTAGCAACTGGTGC GCAAGCCGT-3'
R3	5'-CGCCGATTTTCAATCAGGATCTGATCACTAGCAGTGGTGT TATAGTTATATGGAT-3'
F4	5'-GAGTATGACCAGACTACTTACGGCTCGTCAACCAACCCTATGTATGTTTCAGACA-3'
R4	5'-AGACTAGTTGTGTAAGTAGAAATAGCAACACGATGACCCGCCGATTTTCAATCAG-3'
F5	5'-GCTAATGACGTTTTTATGGCTTTCACCTCACC GCGGCCGAGTATGACCAGACTACT-3'
R5	5'-GCACACCAACAGCAGACACAGACACAGGCC CAGCACCCAGACTAGTTGTGTAAGTA-3'
F6	5'-GCCGGATCCTCTCGCCCTTTTTTCAGTTCTCCGCGCTAATGACGTTTTTATGG-3'
R6	5'-GAACTCGAGCAGAGCAGAGTGAGGAGCAAGCACACCAACAGCAGACA-3'

1.4 浙江省猪群 HEV 感染的血清流行病学调查

利用本研究所建立的 ELISA 体系对 2005—2008 年的 1 330 份分别来自浙江省杭州、衢州、金

华、绍兴和湖州等地区的 46 个规模化猪场的血清样品进行 HEV 特异性抗体的检测,以确定猪群 HEV 感染的血清流行病学情况。其中 2005 和 2006 年分

别随机采样猪血清 279 份和 490 份;2007 年和 2008 年的 561 份样品则分别采自 30—65 日龄($n=184$)、66—100 日龄($n=189$)以及 101—160 日龄($n=188$)的猪群。检测过程中,每块 96 孔板中设立 HEV 阳性血清对照。同时设立 8 个阴性血清对照以计算 ELISA 结果阴阳性判定的阈值(即平均值 + $3s$),即当待测血清样品的 OD_{492nm} 值大于等于这个阈值时,判定为抗体阳性,反之则为阴性。

2 结果

2.1 猪 HEV ORF2 抗原表位序列的克隆

如图 1 所示,6 轮 PCR 产物经 DNA 电泳后的结果表明每一轮产物的大小与预期一致。第 6 轮 PCR 产物克隆入 pET-30a 载体,测序结果表明插入的 HEV ORF2 抗原表位序列与预期序列完全一致。

2.2 HEV ORF2 截短蛋白的表达与纯化

HEV ORF2 蛋白在大肠杆菌中表达后经 SDS-PAGE 分析表明该蛋白以可溶性的形式表达,相对分子质量在 26 ku 左右,经 Ni-NTA 琼脂糖凝胶纯化后可获得较纯的目的蛋白(图 2, lane 1)。Bradford 法测得其蛋白浓度为 $0.9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 纯化蛋白免疫反应性鉴定

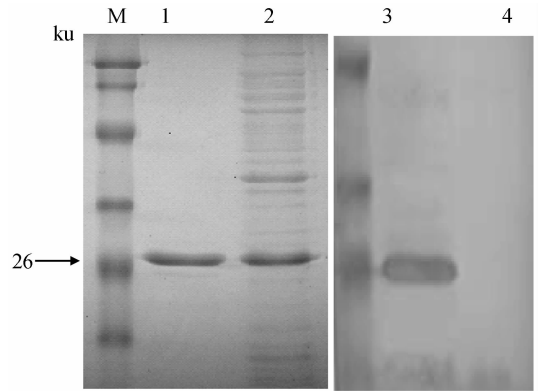
Western Blot 结果显示 26 ku 的纯化蛋白能与 HEV 阳性血清发生特异性反应(图 2, lane 3),表明所表达的 HEV ORF2 抗原区蛋白与 HEV 阳性血清具有良好的免疫反应性。

2.4 猪 HEV 抗体间接 ELISA 检测方法的优化

利用棋盘滴定法,对纯化蛋白的包被浓度和血清稀释倍数进行了优化,得到最佳抗原包被浓度为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;血清最佳稀释倍数为 1 : 100。进一步对 ELISA 方法的特异性和稳定性进行了分析,结果显示猪瘟、猪细小病毒以及口蹄疫阳性血清均不能与 HEV ORF2 蛋白发生反应,其 OD_{492nm} 值都低于阈值。对阴、阳性对照血清的 3 次重复试验数据统计后显示,不同次试验样品 OD 值标准差(s)介于 0.072 和 0.103,表明该检测体系具有很好的重复性。

2.5 与人源 HEV 商品化试剂盒的比对

对 71 份猪血清样品利用商品化试剂盒和本研究建立的 ELISA 方法进行检测,总符合率可达 91.5%(65/71)(表 2),其中本研究中 ELISA 检测结果为 29 份 HEV 阳性血清,万泰 HEV 诊断试剂盒检测结果也均为阳性,符合率达 100%;而对 42



M, 蛋白质分子质量标准;1. 纯化融合蛋白的 SDS-PAGE;2. 诱导表达后重组菌菌体蛋白的 SDS-PAGE;3. 诱导表达后重组菌菌体蛋白的 Western Blot;4. 诱导表达后空白菌体蛋白的 Western Blot

M, Protein marker;1. SDS-PAGE of purified protein; 2. SDS-PAGE of proteins from recombinant *E. coli*; 3. Western Blot of proteins from recombinant *E. coli*; 4. Western Blot of proteins from original *E. coli*

图 2 猪戊型肝炎病毒 ORF2 融合蛋白的表达纯化和 Western Blot 鉴定

Fig. 2 Purification of the HEV ORF2 protein by Ni-NTA agarose and analysis of immunoreactivity by Western Blot

份阴性血清用万泰试剂盒检测后发现其中 36 份为阴性,阴性符合率为 85.7%(36/42)。

表 2 建立的间接 ELISA 与万泰 HEV 诊断试剂盒对 71 份猪血清样品的检测结果

Table 2 Comparison of the developed indirect ELISA in this study with the ELISA kit (Wantai) on 71 serum samples

间接 ELISA	万泰 HEV 诊断试剂盒		
	No. HEV positive	No. HEV negative	Total (%)
No. HEV positive	29	0	29 (100%)
No. HEV negative	6	36	42 (85.7%)
Total	35	36	71 (91.5%)

2.6 浙江省不同地区猪群中 HEV 感染的血清流行病学调查

利用所建立的间接 ELISA 方法对 2005—2008 年采集的 1 330 份猪血清进行猪 HEV 特异性抗体的检测。试验中,判定阈值通过每块板中的猪 HEV

阴性血清换算(阴性血清平均 OD 值 $\pm 3s$), 当待检血清 OD 值大于等于该阈值时为 HEV 抗体阳性。结果表明: 共有 741 份血清为猪 HEV 抗体阳性, 平均阳性率为 55.7%(表 3)。其中 2005 年与 2006 年浙江省不同地区猪群 HEV 抗体阳性率分别为 62.7%(175/279) 和 61.4%(301/490), 明显高于 2007 年的 43.1%(59/137) 和 2008 年的 48.6%(206/424)。进一步按不同日龄统计分析发现: 66—100 日龄中猪的血清 HEV 抗体阳性率较高, 为 58.2%(110/189); 而 30—65 日龄小猪和 101—160 日龄大猪中 HEV 抗体阳性率要显著低于中猪的阳性率, 分别为 39.7%(73/184) 和 44.1%(83/188)(表 4)。从猪场水平来看, 仅有 3 个猪场未检测到 HEV 抗体, 场阳性率 93.5%, 且不同地区猪场的 HEV 感染情况差异较大(数据未显示)。

表 3 浙江省猪群中 HEV 感染的血清流行病学调查

Table 3 Sero-prevalence of hepatitis E virus infections in pigs by indirect ELISA

年份 Year	病例 Cases		
	检测样品 No. samples	阳性样品 No. HEV positive	阳性率/% Positive rate
2005	279	175	62.7*
2006	490	301	61.4*
2007	137	59	43.1
2008	424	206	48.6
Total	1 330	741	55.7

* 表示与其它年份的阳性率差异显著($P < 0.05$)

* Marked statistical difference at $P < 0.05$ compared with those of other years

表 4 不同日龄猪群中 HEV 抗体的检测

Table 4 Sero-prevalence of pigs at different age against HEV infections

日龄/d Age/d	检测样品 No. samples tested	阳性样品 No. HEV positive	阳性率/% Positive rate
30—65	184	73	39.7
66—100	189	110	58.2*
101—160	188	83	44.1

* 表示与其它日龄猪群的阳性率差异显著($P < 0.05$)

* Marked statistical difference at $P < 0.05$ compared with those pigs at other ages

病, 能引起畜禽大批死亡, 给畜牧业经济造成重大损失, 同时又对人类健康构成严重威胁。有报道表明有人因食用了野猪肉和鹿肉而引起急性戊肝^[17-18], 说明戊型肝炎病毒可能在自然状态下或通过食物等在动物之间或猪和人之间传播^[13, 19]。因此, 猪 HEV 在公共卫生和食品安全方面具有重大意义, 建立特异性检测 HEV 感染的血清学方法对于该病的防控具有重要意义。作者通过原核表达获得了截短的猪 HEV ORF2 蛋白, 它包含该蛋白已知的主要抗原表位区。Western Blot 分析显示该纯化蛋白与 HEV 阳性血清具有良好的反应性。而 HEV ORF2 蛋白不能与其它几种猪的主要病原体阳性血清发生反应, 表明该蛋白具有良好的特异性, 能用于 HEV 感染的血清学诊断。目前, 商品化 HEV 抗体检测试剂盒多用于人 HEV 血清抗体的筛查, 其包被抗原均为人源 HEV 毒株的重组抗原。本研究以纯化的猪 HEV ORF2 重组蛋白作为诊断抗原, 建立了针对猪 HEV 抗体的间接 ELISA 检测方法, 检测结果与商品化的人用 HEV 抗体诊断试剂盒具有较高的符合率(91.5%)。

目前对于浙江省内猪戊型肝炎病毒的流行尚缺乏系统的调查及完整的数据。作者在建立基于 HEV ORF2 蛋白主要抗原表位的 ELISA 检测方法的基础上, 通过对浙江省不同地区的 46 个规模化猪场 1 330 份猪血清中的 HEV 抗体检测表明, 浙江省猪场中 HEV 抗体阳性率(平均阳性率 55.7%)虽然低于国内其他地区, 但 HEV 在浙江省各地区猪群中也相当普遍, 猪场的阳性率达到 93.5%(43/46)。分析结果显示, 中猪(66—100 日龄)HEV 抗体阳性率明显较高, 可能由于 1—2 月龄仔猪在母源抗体逐渐降低后, 开始受到环境中 HEV 的感染, 并在同批猪群中传播而出现抗体转阳甚至病毒血症^[20]。但由于不同地区猪场饲养管理水平不一, 其猪群 HEV 感染率也存在显著差异。以上结果显示, 利用本研究所建立的 ELISA 方法对 HEV 感染进行血清学监测切实可行。

目前对于戊型肝炎尚缺乏有效的防控方法, 建立有效的戊型肝炎病毒监测和预警机制, 以切断传播途径为主的综合性预防措施则是控制戊型肝炎流行的关键。因此, 本研究结果为开展 HEV 的监控奠定了一定的基础。

参考文献:

[1] ARANKALLE L P, CHOBE J JHA, CHADHA M

3 讨论

人畜共患病是严重危害人畜健康的传染性疾

- S, et al. Aetiology of acute sporadic non-A, non-B hepatitis in western India [J]. *Med Virol*, 1993, 40: 121-125.
- [2] TAM W, SMITH M M, GUERRA M E, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome [J]. *Virology*, 1991, 185: 120-131.
- [3] 王凤阳, 杜 丽, 张莉娜. 猪戊型肝炎病毒的研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2007, 7(6): 1000-1004.
- [4] PURDY M A, McCAUSTLAND K A, KRAWCZYNSKI K, et al. Preliminary evidence that a trpE-HEV fusion protein protects cynomolgus macaques against challenge with wild type hepatitis E virus (HEV) [J]. *J Med Virol*, 1993, 41(1): 90-94.
- [5] MUNNE M S, VLADIMIRSKY S, OTEGUI L, et al. Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti HEV antibodies in swine in Argentina [J]. *J Med Virol*, 2006, 78(12): 1579-1583.
- [6] 庄 辉, 毕胜利, 王佑春, 等. 我国戊型肝炎研究 [J]. *北京大学学报(医学版)*, 2002, 5(34): 434-439.
- [7] CHOBE L P, LOLE K S, ARANKALLE V A. Full genome sequence and analysis of Indian swine hepatitis E virus isolate of genotype 4 [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 114(3-4): 240-251.
- [8] MENG X J, PURCELL R H, HALBUR P G, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9860-9865.
- [9] WANG Y C, ZHANG H Y, XIA N S, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China [J]. *J Med Virol*, 2002, 67: 516-521.
- [10] NAKAMURA M, TAKAHASHI K, TAIRA K, et al. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence [J]. *Heaptol Res*, 2006, 34: 137-140.
- [11] BALAYAN M S, USMANOV R K, ZAMYATINA N A, et al. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs [J]. *J Med Virol*, 1990, 32: 58-59.
- [12] MENG X J, HALBUR P G, SHAPIRO M S, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus [J]. *J Virol*, 1998, 72: 9714-9721.
- [13] OKAMOTO H. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus [J]. *Virus Research*, 2007, 127: 216-228.
- [14] 葛胜祥, 田克恭, 多海刚, 等. 中国不同地区商品猪中戊型肝炎病毒感染情况调查 [J]. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19 (2): 108-109.
- [15] 马 勋, 陆承平, 孟继鸿. 新疆地区猪戊型肝炎血清流行病学调查 [J]. *中国病毒学*, 2004, 19: 285-287.
- [16] EMERSON S U, CLEMENTE-CASARES P, MOIDUDDIN N, et al. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of hepatitis E virus confirmed by quantitative cell-culture assay [J]. *J Gen Virol*, 2006, 87 (3): 697-704.
- [17] TEI S, KITAJIMA N, TAKAHASHI K, et al. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings [J]. *Lancet*, 2003, 362: 371-373.
- [18] LI T C, CHIJIWA K, SERA N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat [J]. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11: 1958-1960.
- [19] NISHIZAWA T, TAKAHASHI M, MIZUO H, et al. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99% identity over the entire genome [J]. *J Gen Virol* 2003, 84: 1245-1251.
- [20] WU J C, CHEN C M, CHIANG T Y et al. Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan [J]. *J Med Virol*, 2002, 66 (4): 488-492.