

徐春忠, 仇伟, 翟俊琼. 一例亚洲象亲内皮疱疹病毒感染的临床与分子诊断 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 117-125.

XU C Z, ZHANG W, ZHAI J Q. Clinical and molecular diagnosis of endothelial herpesvirus infection in an Asian elephant [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 117-125.

一例亚洲象亲内皮疱疹病毒感染的临床与分子诊断

徐春忠¹, 仇伟², 翟俊琼^{3*}

(1. 上海野生动物园, 上海 201399;

2. 济南市公园发展服务中心动物园工作部, 山东 济南 250031;

3. 广州动物园, 广东 广州 510070)

摘要: 旨在弄清一例幼年亚洲象突然死亡的病因。对疑似感染象亲内皮疱疹病毒 (EEHV) 的亚洲象进行病毒检测, 通过亚洲象临床症状观察、组织病理学检查、高通量病毒组学测序以及 PCR 验证等方法对死亡亚洲象进行病原微生物鉴定, 并设计引物对 EEHV 进行囊膜糖蛋白 gB 的基因进行扩增、测序, 应用 MegAlign 及 MEGA7 软件对本次获得的 EEHV gB 基因与 GenBank 上公布的 EEHV gB 基因进行序列比对分析; 同时对 EEHV 全基因组进行序列分析。结果: 死亡亚洲象组织剖检及病理变化与 EEHV 感染症状相吻合, PCR 检测结果显示亚洲象感染 EEHV; gB 基因同源性分析表明该毒株与 Kimba NAP23 (KC618527.1) 相似性最高, 为 99.4%。通过高通量测序, 组装出 177 219 bp 的基因组, 与 EEHV 1Raman 基因组结构一致, 共包含 113 个 CDS 区域, 与 EEHV-1A 毒株 (OP169006) 的全基因组相似性最高, 为 94.8%。综上, 本研究从致死性感染的亚洲象中鉴定到 1 株 EEHV, 为 EEHV-1A 型, 对 gB 等糖蛋白基因进行分析, 明确了 EEHV 的遗传变异情况, 为该病的防控提供了参考资料。

关键词: 象亲内皮疱疹病毒感染; 亚洲象; gB 基因; 临床诊断; 分子诊断

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)09-0117-09

Clinical and molecular diagnosis of endothelial herpesvirus infection in an Asian elephant

XU Chunzhong¹, ZHANG Wei², ZHAI Junqiong^{3*}

(1. Shanghai Wild Animal Park, Shanghai 201399, China;

2. Zoo Department, Jinan Park Development Service Center, Jinan 250031, China;

3. Guangzhou Zoo, Guangzhou 510070, China)

Abstract: The aim of this study was to clarify the cause of a sudden death of a young Asia elephant. To detect the virus in Asian elephants with suspected endotheliotropic herpesvirus infection and analyze the genetic variation of the virus, this study conducted pathogen identification on dead Asian elephants through clinical symptom observation, histopathological examination, high-throughput viromics sequencing, and PCR verification. Primers were designed to amplify and sequence the gB gene of the elephant endotheliotropic herpesvirus (EEHV). Sequence comparison and analysis of the obtained EEHV gB gene and those published in GenBank were performed using the MegAlign and MEGA7 software. Meanwhile, whole-genome sequence analysis of EEHV was carried out. The results showed that the tissue autopsy and pathological changes in the dead Asian elephants were consistent with the symptoms of EEHV infection. The PCR detection confirmed EEHV infection in Asian elephants. The homology analysis of the gB gene indicated that this strain had the highest similarity (99.4%). Through high-throughput sequencing, the 177 219 bp genome of Elephant endotheliotropic herpesvirus YZX250323 (EEHV) was assembled, which had the same genomic structure as that of EEHV 1Raman, containing 113 CDS regions. It showed the highest whole-genome similarity (94.8%) with EEHV 1A (OP169006). This study identified an endotheliotropic herpesvirus strain from lethally infected Asian elephants, which was of the EEHV 1A type. Analysis of glycoprotein genes such as gB clarified the genetic variation of EEHV, providing reference materials for prevention and control of this disease.

Keywords: elephant endotheliotropic herpesvirus infection; Asian elephant; gB gene; clinical diagnosis; molecular diagnosis

收稿日期: 2025-06-24; 修回日期: 2025-07-19

基金项目: 广州国家实验室专项 (GZNL2023A01001)

第一作者: 徐春忠, 男, 高级工程师

* 通信作者: 翟俊琼, 硕士, 兽医师, 主要从事野生动物病原研究, E-mail: zhajunqiong@sina.com。

象为目前世界陆地上最大的哺乳动物，包括亚洲象和非洲象，均被世界自然保护联盟列为极度濒危物种，我国现存野生亚洲象仅 300 多头^[1]，数量稀少。传染病对亚洲象保育与保护是严重的威胁，象亲内皮疱疹病毒（elephant endotheliotropic herpesvirus, EEHV）感染可以导致象出现系统性出血性疾病，造成亚洲象急性死亡，感染导致幼象的死亡率极高，是制约亚洲象种群健康的重要因素^[2]。

EEHV 是疱疹病毒科鼻病毒属成员，为双链 DNA 病毒，全长为 168~205 kb。基因组编码多种蛋白，包括 gB、gH、gM、gN 等。该病毒包含 7 个基因型（1~7）12 个亚型，它们在致病性和宿主偏好上存在差异，其中，4 个亚型（EEHV-1A、EEHV-1B、EEHV-4 和-EEHV5）是亚洲象特有^[3-6]。自 20 世纪 90 年代被发现以来，EEHV 被证实是导致圈养亚洲象幼崽死亡的主要原因^[7-10]。亚洲象感染 EEHV 后，多呈亚临床症状，可能终生感染，出现间歇性病毒脱落，而年轻亚洲象感染该病毒多导致急性、致命的出血性疾病^[8]。受感染的亚洲象最初表现出非特异性临床症状，如嗜睡和厌食。随着疾病的进展，通常会出现头部水肿和舌尖点状出血，由于病毒对内皮细胞有较强的组织嗜性，导致血管损伤和严重的内出血。因此，动物可以在出现临床症状后的 12~72 h 内死亡；尸检显示心包积液、肠出血和黏膜溃疡，组织学表现为出血、水肿、轻度炎症，病变组织毛细血管内皮细胞内出现包涵体^[11]。象感染 EEHV 出现症状后，疾病发展快速，往往来不及治疗，迄今为止仅报告了 10 例象幸存^[7]。

疱疹病毒糖蛋白 gB 是高度保守的 III 类融合蛋白^[12-13]，常用于病毒鉴定和遗传进化分析^[13]。Furin 裂解位点是一种在病毒刺突蛋白中发现的特定氨基酸序列，它在病毒的感染性和致病性方面起着关键作用^[14]，分析其特点对研究病毒致病性和遗传变异有着极其重要的意义。为了更好地了解病毒遗传多样性及流行病学特性，本研究通过观察疑似感染 EEHV 的亚洲象生前体征、死后剖检变化、病理切片、PCR 检测以及全基因组序列分析，对 EEHV 进行鉴定和生物学特性分析，为 EEHV 感染的流行病学调查及防控研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物样品和主要试剂

试验样品收集于华东地区某动物园死亡的一例 2 岁 10 个月雄性亚洲象的肝脏、肺脏等组织。病毒 RNA/DNA 提取试剂盒购自 AXYGEN 公司，PCR 反应酶购自 Thermo Fisher 公司。

1.2 疑似 EEHV 感染的临床症状以及病理观察

观察并记录疑似 EEHV 感染的亚洲象生前症状以及死亡剖检症状，并取病变组织做病理切片观察。

1.3 实验室 PCR 检测及 gB 基因测序

参照 EEHV 序列，设计合成一对用于检测 EEHV 的引物，参照 GenBank 上传的 EEHV 全基因序列，设计合成用于扩增 EEHV gB 基因的引物 EEHV1A-gB，见表 1，对 EEHV 进行 PCR 检测及 gB 基因扩增，扩增产物送至北京擎科生物科技有限公司测序。

表 1 PCR 扩增所用的引物

名称	序列 (5'→3')	引物长度/bp
EEHV-F	CCTTTCAGCCGTCATC	531
EEHV-R	TGTCACCCGTGCTGATGT	
EEHV1A-gB-F	TTTAAGAGCGTTTAGGGTTG	2 732
EEHV1A-gB-R	GAGGCTTGTCGTTTCCAT	

1.4 gB 基因同源性和遗传进化分析

将 gB 基因测序结果经 DNASTAR Lasergene. v7.1 拼接后，分别应用软件 MegAlign、MEGA 7 将本研究得到的 gB 基因与 GenBank 上公布的 IP165 Thirunelli2 (MN366292.1)、IP165 Thirunelli2 (MN366293.1)、IP91 Thirunelli1 (MN366290.1) 等 20 株 EEHV 的 gB 基因进行同源性和遗传进化分析。

1.5 全基因组序列分析

使用 fastp 对原始测序数据进行质控。使用 bowtie2 分别针对 Silva 核糖体数据库和亚洲象基因组进行比对，然后将比对上的 reads 去除以核糖体和宿主序列获得 clean reads。然后使用 megahit 将过滤后的 reads 进行从头组装，并使用 blastn 针对 nt 数据库进行序列注释。使用 taxonkit 获取序列分类谱系。使用 bowtie2 将 clean reads 回帖到从头组装获得的 EEHV 基因组，以检查组装错误和延长基因组序列。在 Geneious 中预测基因组 ORF，然后在 NCBI 上下载参考 EEHV 1Raman (NC_020474) 基因组进行参考，并人工进行基因组注释。使用 pyGenomeViz 进行基因组结构可视化。使用在线工具 ProP 1.0 Server 预测 Furin 裂解位点。

2 结果

2.1 临床症状及剖检变化

亚洲象，雄性，2 岁 10 个月，既往健康，膘情良好，发病前精神、食欲均正常，无明显临床症状。据饲养人员反映，早上发现该象精神状态一般，不愿活动，厌食，多次腹泻，中午站立不稳倒地，终因发病急，病情严重，经抢救无效死亡。自发现至死亡仅

半天时间。

剖检结果见图1。心包有大量积液，心肌、心脏内外膜出现大面积出血点；肺脏表面有少量出血点；腹腔肠系膜有少量出血点，并伴有轻度水肿；各段肠管浆膜均有大量出血点，尤以盲肠最为严重；胃、肠

道（尤其回肠）黏膜肿胀，呈深红色的弥漫性斑块状或点状出血；胰腺肿大、散布点状与斑块出血；肝脏、脾脏表面有少量出血点；肾包膜散布少量出血斑点。

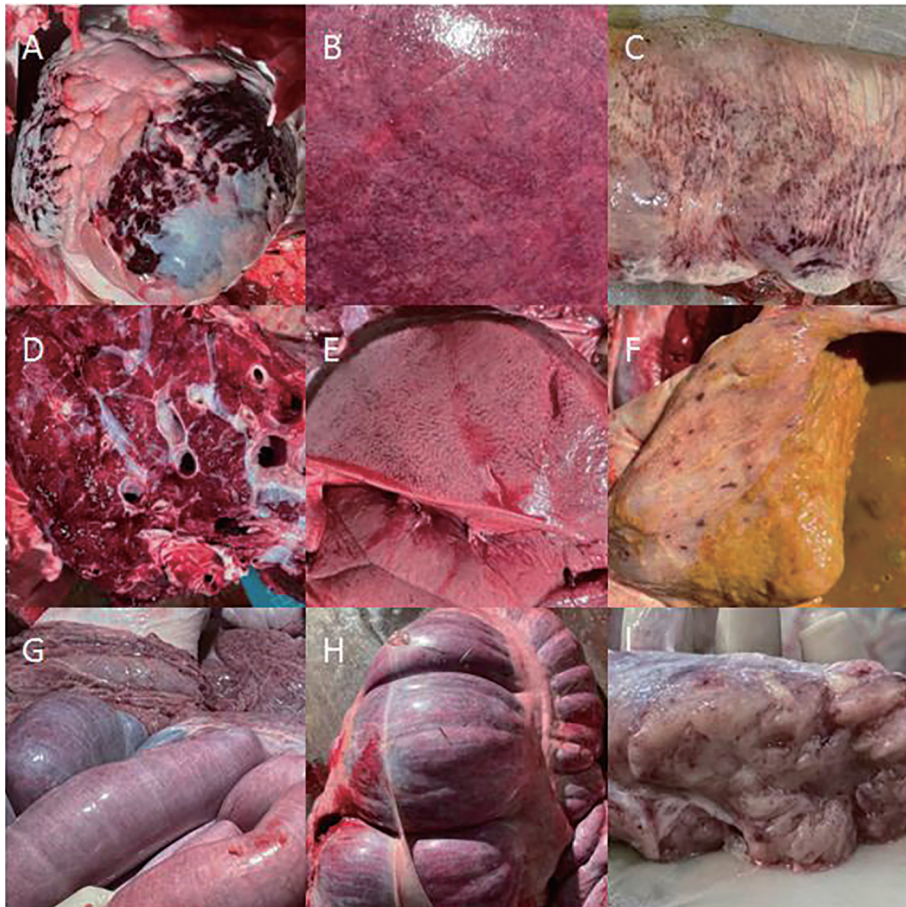


图1 各组织剖检变化
A. 心外膜大面积出血；B. 肝脏表面出血点；C. 脾脏表面布满出血点；D. 肺脏少量出血；E. 肾脏表面出血；F. 胃黏膜肿胀、散布出血斑点；G. 小肠浆膜出血；H. 盲肠浆膜出血严重；I. 胰腺出血。

图1 各组织剖检变化

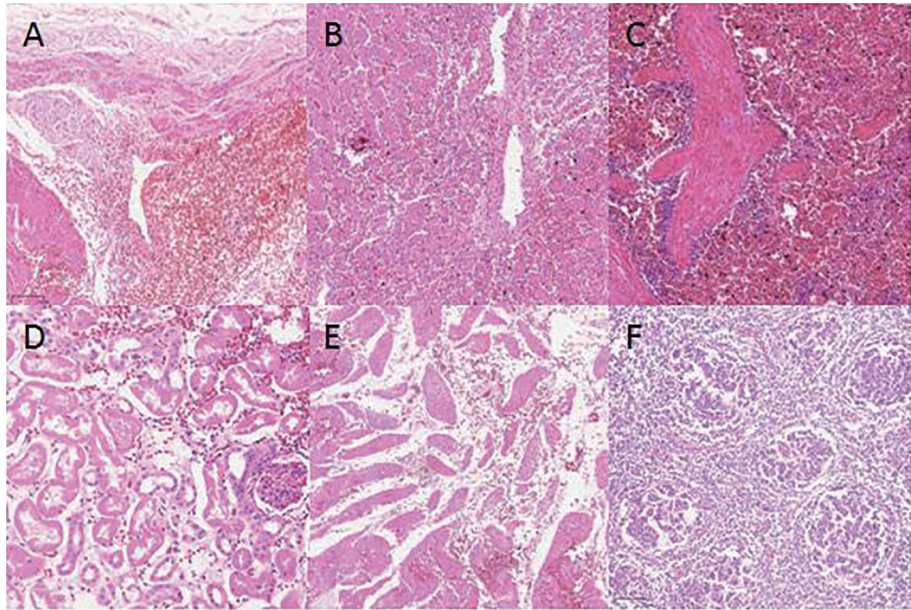
2.2 组织病理学观察

组织病理学结果见图2。心脏内外膜大面积出血淤血，间质水肿；肝脏中央静脉周围见出血；脾脏红白髓分界不清，白髓萎缩，红髓扩张充血；肺脏间质血管见轻度扩张充血；肾脏间质扩张水肿，纤维组织增生，肾小管基底膜增厚，上皮细胞坏死；肾小球毛细血管扩张充血，间质血管扩张充血，上皮细胞坏死，胞浆粉染；胰岛见出血；肠肌层大面积出血，黏膜层水肿、炎性细胞浸润；淋巴结淋巴滤泡水肿，淋巴细胞坏死，髓鞘淋巴窦扩张水肿。组织病理变化符

合 EEHV 感染的病理变化。

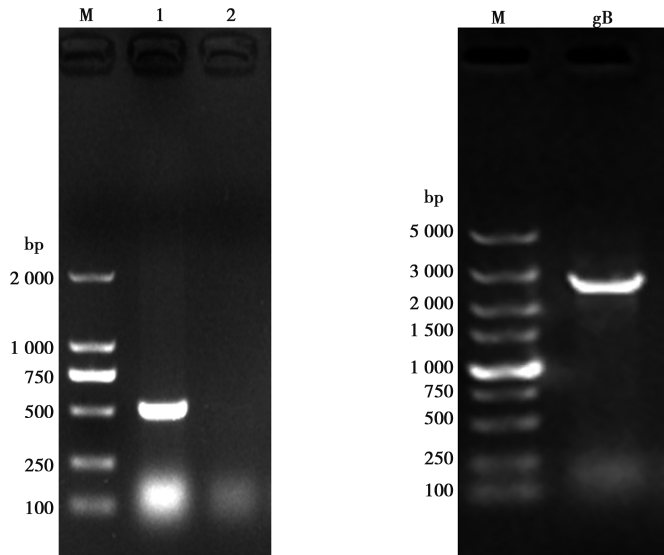
2.3 PCR 检测及 gB 基因测序

通过 PCR 方法对亚洲象肝、肺分别提取 DNA 进行 EEHV 感染鉴定，电泳结果发现肝脏样本所提取的 DNA 获得与预期大小相符条带（图 3A），将产物送至北京擎科生物科技有限公司测序，比对序列证实为 EEHV 基因序列；通过 PCR 扩增 EEHV gB 基因（图 3B），并送至上述公司测序，得到一条完整的 gB 基因序列。将此毒株命名为 YZX250323。



A. 心脏大面积充血，间质水肿；B. 肝脏中央静脉周围见出血；C. 脾脏红白髓分界不清，白髓萎缩，红髓扩张充血；D. 肾小管上皮细胞坏死，胞浆粉染；E. 肠道、肌层大面积出血；F. 淋巴滤泡水肿，淋巴细胞坏死。

图 2 部分组织病理切片情况 (100×)



M. DL2000 DNA 分子质量标准；1. 肝脏；2. 肺脏。

图 3 EEHV 检测 (A) 和 gB 基因扩增 (B)

2.4 gB 基因核苷酸序列的相似性分析

应用 MegAlign 软件对本研究得到的 EEHV gB 基因、GenBank 上公布的 20 株 EEHV gB 基因进行相似性分析 (图 4)，结果表明，gB 基因序列的相似性为 39.5%~99.4%，其中，本研究中的 EEHV 与 EEHV-5 型毒株 Vijay (NC_024696.1) 相似性最低，为 39.5%；与参考的 8 株 EEHV-1A 型毒株相似性为

98.9%~99.4%，相似性最高毒株为 Kimba NAP23 (KC618527.1)。

2.5 gB 基因遗传进化分析

应用 MEGA7 软件对本研究得到的 EEHV gB 基因与 GenBank 上公布的 20 株 EEHV gB 基因进行遗传进化分析 (图 5)。

		同源性/%																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
差异性/%	1	■	99.4	99.4	99.2	99.2	99.4	99.4	99.1	79.3	79.2	79.5	79.5	79.6	73.1	65.2	65.8	64.3	72.7	39.5	84.1	99.2	1	MN366291.1 EEHV 1A.seq
	2	0.6	■	100.0	98.9	98.9	99.8	100.0	99.1	79.5	79.4	79.6	79.6	79.7	72.8	65.0	65.7	64.2	72.5	39.4	84.0	99.1	2	MN366292.1 EEHV 1A.seq
	3	0.6	0.0	■	98.9	98.9	99.8	100.0	99.1	79.5	79.4	79.6	79.6	79.7	72.8	65.0	65.7	64.2	72.5	39.4	84.0	99.1	3	MN366293.1 EEHV 1A.seq
	4	0.8	1.1	1.1	■	100.0	98.9	98.9	98.8	79.1	79.0	79.3	79.3	79.4	72.7	65.0	65.6	64.1	72.6	39.3	83.7	98.9	4	MN366294.1 EEHV 1A.seq
	5	0.8	1.1	1.1	0.0	■	98.9	98.9	98.8	79.1	79.0	79.3	79.3	79.4	72.7	65.0	65.6	64.1	72.6	39.3	83.7	98.9	5	MW015025.1 EEHV 1A.seq
	6	0.6	0.2	0.2	1.1	1.1	■	99.8	99.1	79.5	79.4	79.6	79.7	79.7	72.9	65.0	65.7	64.1	72.6	39.4	84.1	99.1	6	OR543011.1 EEHV 1A.seq
	7	0.6	0.0	0.0	1.1	1.1	0.2	■	99.1	79.5	79.4	79.6	79.6	79.7	72.8	65.0	65.7	64.2	72.5	39.4	84.0	99.1	7	MN366290.1 EEHV 1A.seq
	8	1.0	1.0	1.0	1.2	1.2	1.0	1.0	■	79.4	79.3	79.6	79.6	79.6	72.9	65.1	65.6	64.0	72.6	39.7	83.8	99.4	8	KC618527.1 EEHV 1A.seq
	9	24.6	24.4	24.4	24.8	24.8	24.3	24.4	24.5	■	99.9	99.9	99.9	100.0	72.2	62.1	62.8	62.1	73.8	39.8	79.9	79.3	9	HM568536.1 EEHV 1B.seq
	10	24.7	24.6	24.6	25.0	25.0	24.5	24.6	24.6	0.1	■	100.0	100.0	99.8	72.2	61.9	62.6	62.0	73.7	39.9	79.7	79.2	10	HM568550.1 EEHV 1B.seq
	11	24.4	24.2	24.2	24.6	24.6	24.1	24.2	24.3	0.1	0.0	■	100.0	99.9	72.4	62.2	62.9	62.2	73.8	39.8	79.9	79.4	11	JF692761.2 EEHV 1B.seq
	12	24.3	24.1	24.1	24.6	24.6	24.1	24.1	24.2	0.1	0.0	0.0	■	99.8	72.4	62.2	62.9	62.2	73.7	39.8	79.8	79.4	12	JF692771.2 EEHV 1B.seq
	13	24.2	24.1	24.1	24.5	24.5	24.0	24.1	24.1	0.0	0.2	0.1	0.2	■	72.3	62.2	62.9	62.2	73.8	39.8	79.9	79.5	13	KY888884.1 EEHV 1B.seq
	14	33.7	34.2	34.2	34.3	34.3	34.0	34.2	34.0	35.5	35.6	35.2	35.2	35.3	■	66.1	65.9	66.4	85.4	41.8	73.6	73.0	14	MZ22421.1 EEHV 2.seq
	15	47.6	47.9	47.9	47.9	47.9	48.0	47.9	47.8	54.3	54.6	54.0	54.0	53.9	45.4	■	92.6	87.8	64.2	37.3	63.4	65.2	15	MN373268.1 EEHV 3A.seq
	16	46.4	46.7	46.7	46.9	46.9	46.6	46.7	46.8	52.7	53.0	52.6	52.6	52.5	45.9	7.8	■	87.5	64.7	37.5	64.2	65.9	16	OK350073.1 EEHV 3B.seq
	17	49.5	49.7	49.7	49.8	49.8	49.8	49.7	50.1	54.7	55.0	54.5	54.5	54.4	45.1	13.4	13.7	■	63.8	36.6	62.1	64.1	17	NC_028379.EEHA 4.seq
	18	34.3	34.6	34.6	34.5	34.5	34.4	34.6	34.5	32.7	32.9	32.8	32.9	32.8	16.5	49.5	48.3	50.5	■	41.6	74.0	72.7	18	OL982749.1 EEHV 5B.seq
	19	130.1	130.7	130.7	131.6	131.6	130.5	130.7	128.5	126.6	125.8	126.6	126.3	126.6	115.8	142.0	140.8	149.4	117.5	■	39.9	39.5	19	NC_024696.1 EEHV 5.seq
	20	18.1	18.3	18.3	18.7	18.7	18.2	18.3	18.6	23.9	24.1	23.8	23.9	23.8	33.0	51.2	49.7	54.3	32.4	127.0	■	84.1	20	MZ22422.1 EEHV 6.seq
	21	0.8	0.9	0.9	1.1	1.1	0.9	0.9	0.6	24.7	24.9	24.5	24.4	24.4	33.9	47.5	46.2	49.8	34.4	130.3	18.2	■	21	YZX250323

图 4 EEHV 参考毒株 gB 基因序列相似性分析

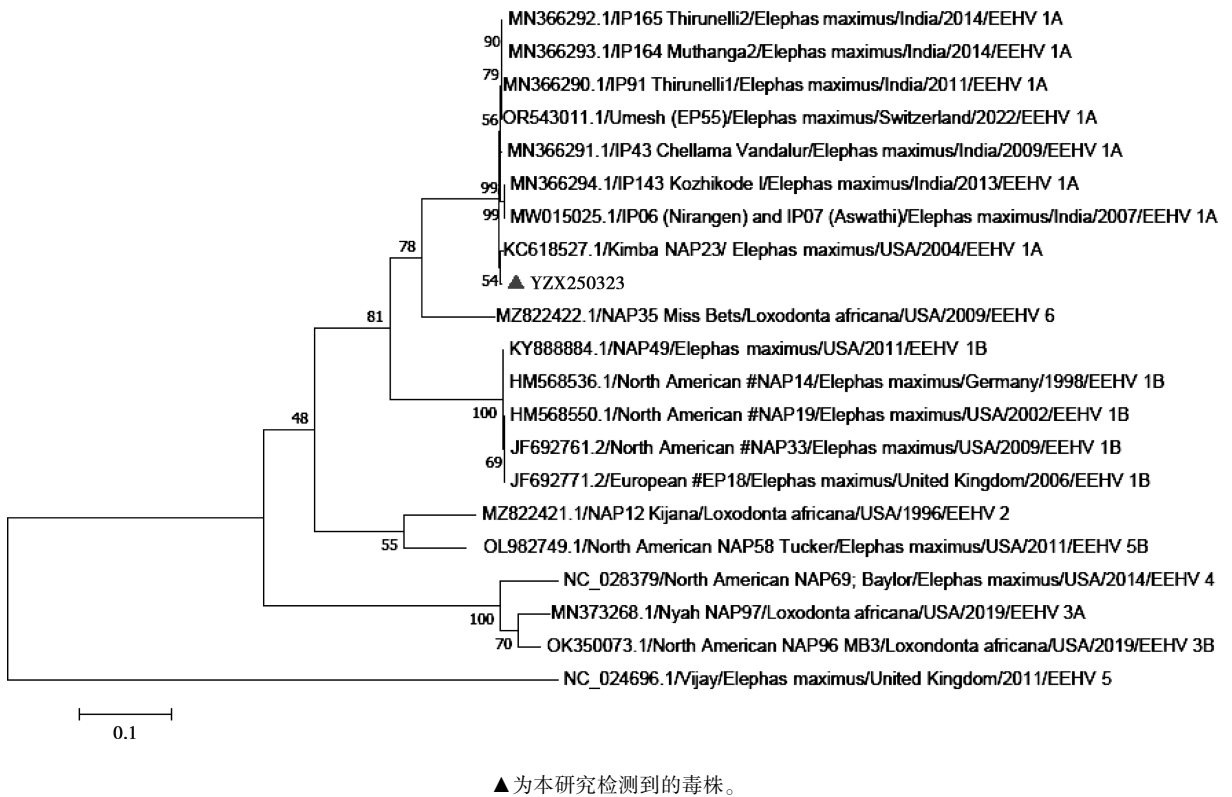


图 5 本研究的 EEHV 与参考的 20 株 EEHV 遗传进化分析

2.6 gB 基因序列差异分析

通过 MegAlign 软件将本研究中的 EEHV gB 基因与参考的 8 个 EEHV 1A gB 基因进行分析比对,发现本研究中的 EEHA gB 基因全长 2 544 bp,与参考的 MN366292.1 (IP165 Thirunelli2)、MN366293.1 (IP164 Muthanga2)、MN366290.1 (IP91 Thirunelli1)、OR543011.1 (Umesh)、MN366291.1 (IP43 Chellama

Vandalur) gB 基因序列长度一致,与参考的 MN366294.1 (IP143 Kozhikode 1)、MW015025.1 (IP06)、KC618527.1 (Kimba NAP23) gB 基因 (2 553 bp) 相比,有 9 个碱基的缺失,使得其 gB 编码蛋白有 3 个氨基酸缺失 (图 6)。本研究中的 gB 基因与参考的 Kimba NAP23 (KC618527.1) gB 基因差异最小。

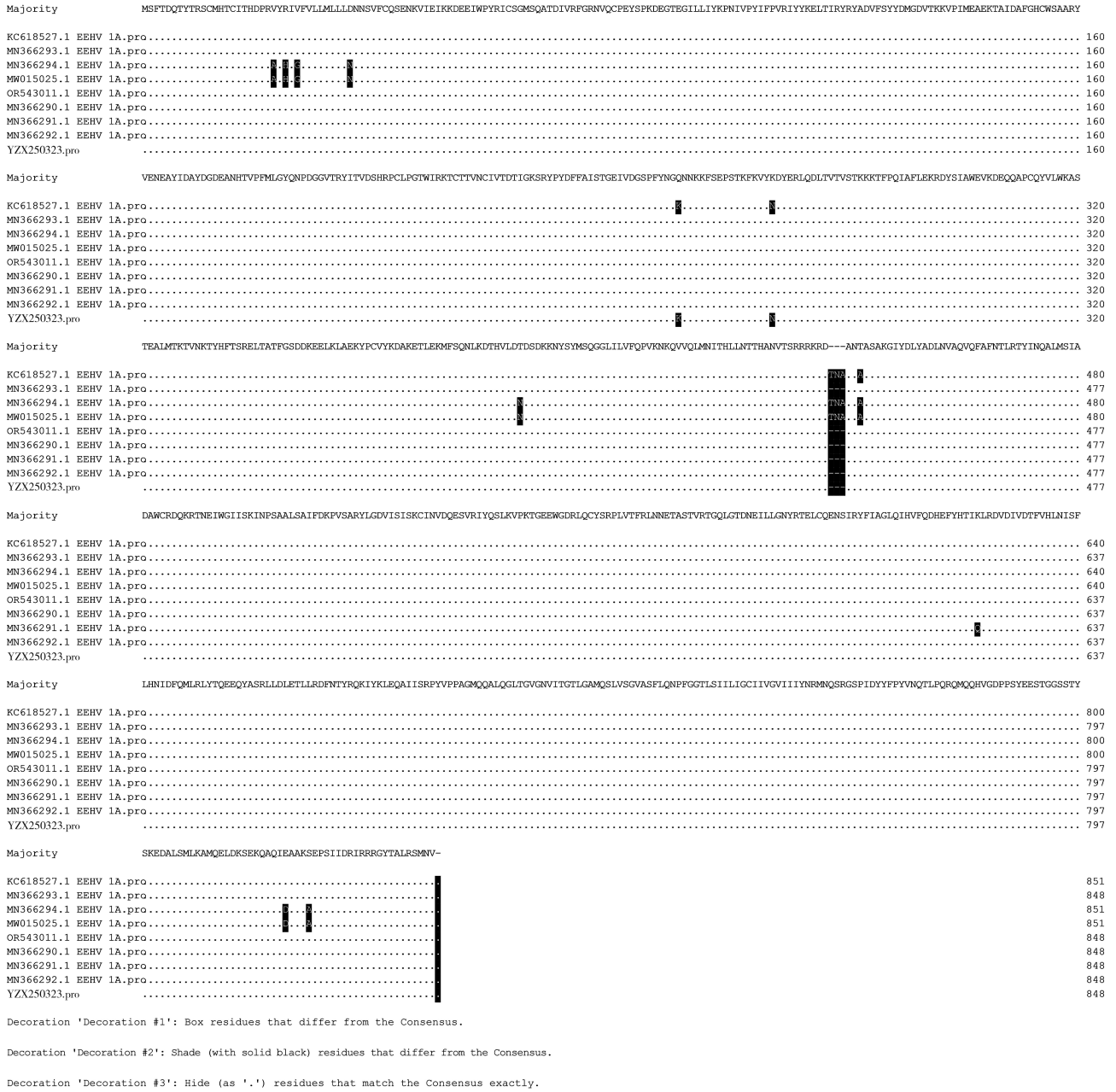


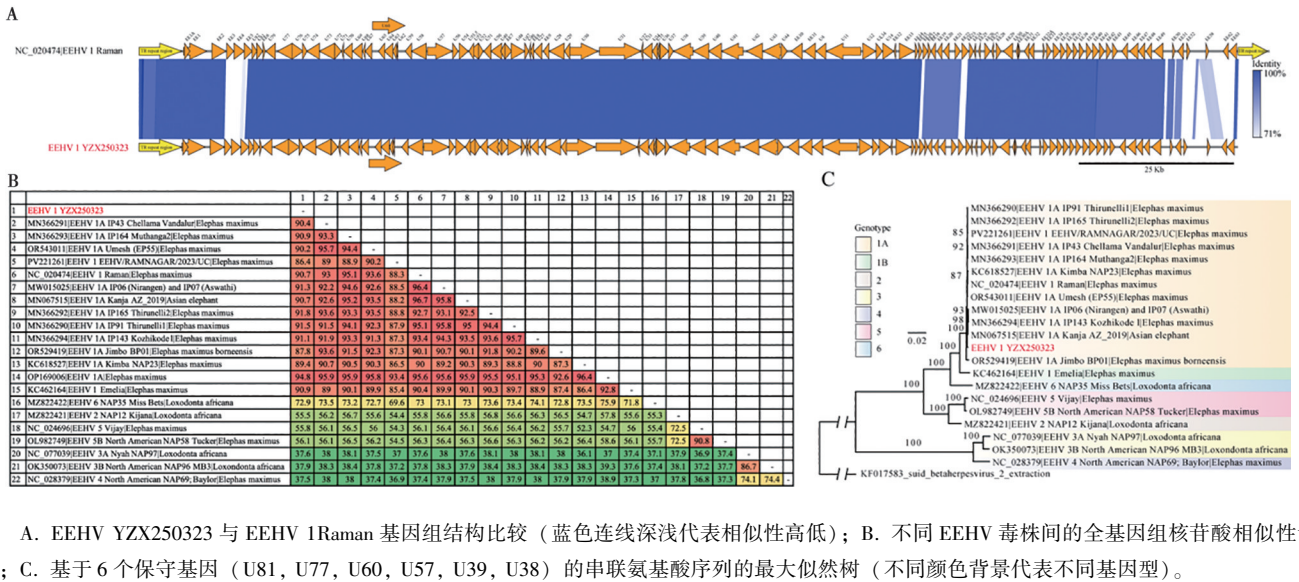
图6 本研究的EEHV与参考的8株EEHV 1A gB氨基酸位点比对分析

2.7 全基因组测序及序列分析

由图7可知，参考EEHV 1Raman (NC_020474)基因组对EEHV YZX250323进行基因组注释，结果EEHV YZX250323与EEHV 1Raman基因组结构一致，共包含113个CDS区域，但是EEHV YZX250323缺少右端的直接重复序列。与其他具有完整基因组的EEHV核苷酸相似性结果显示EEHV YZX250323与EEHV-1A型毒株(OP169006)具有最高94.8%的全基因组相似性，与其他EEHV-1型具有86.4%~91.8%的全基因组相似性，与EEHV-2、EEHV-3、

EEHV-4、EEHV-5和EEHV-6型毒株具有37.5%~72.9%的全基因组相似性。

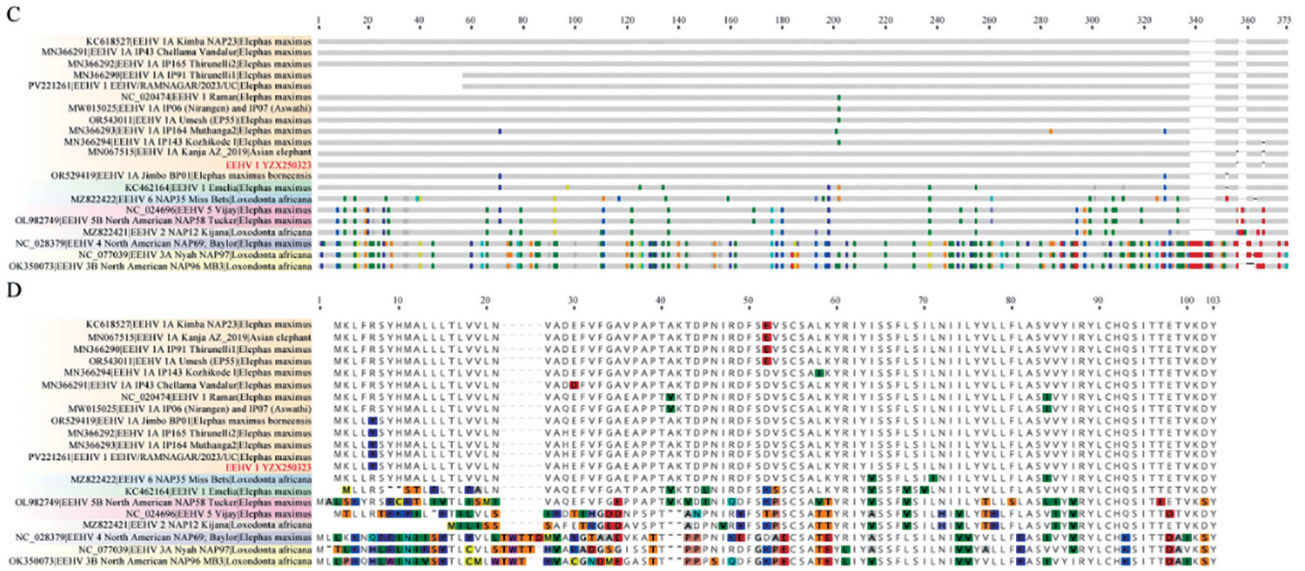
由图8可知，糖蛋白gB的氨基酸比对分析显示EEHV YZX250323与其他EEHV毒株一样，都包含一个Furin位点RRKR。此外，糖蛋白gH上，EEHV YZX250323和其他7个EEHV-1A型毒株中都预测到了一个Furin位点RYGR，而在其他4个EEHV-1A型毒株和非EEHV-1型毒株中没有预测到Furin位点。在糖蛋白gM和gN中没有预测到Furin位点。



A. EEHV 1YZX250323 与 EEHV 1Raman 基因组结构比较 (蓝色连线深浅代表相似性高低); B. 不同 EEHV 毒株间的全基因组核苷酸相似性计算; C. 基于 6 个保守基因 (U81, U77, U60, U57, U39, U38) 的串联氨基酸序列的最大似然树 (不同颜色背景代表不同基因型)。

图 7 EEHV 全基因组序列分析





A. gB 基因氨基酸序列比对; B. gH 基因氨基酸序列比对; C. gM 基因氨基酸序列比对; D. gN 基因氨基酸序列比对。红框内为预测到的 Furin 位点。

图 8 EEHV 氨基酸序列比对及 Furin 位点预测

3 讨论

亚洲象为全球濒危物种，其种群持续面临着严重威胁，极为珍贵。传染性疾病给亚洲象带来极大威胁。EEHV 成为亚洲象健康和生存的重要限制因素，它是过去几十年中圈养幼象死亡的主要原因之一，这种高致病性病毒最初在 1970 年代被描述为可引起皮肤结节和局部感染，但自 1980 年代后期以来已引起致命性出血性疾病暴发。如今，EEHV 被普遍认为在全球范围内的圈养和自由放养的亚洲象种群中普遍存在^[3-5]。Yang 等^[15]曾对中国圈养和野生亚洲象的 EEHV 存在情况进行了系统调查，并首次在云南省西双版纳野象谷的圈养大象中检测到 EEHV-1A 的存在^[15]。本研究也在国内某死亡亚洲象体内检测出 EEHV-1A 病毒，这一发现不仅再次证实了 EEHV-1A 在我国圈养大象中的存在，也揭示了其流行趋势值得关注。因此，密切监测 EEHV 的传播，持续监测大象的健康状况，对及时识别和处理感染病例具有重大意义。

Wilkie 等^[16]通过 PCR 检测法确定了来源于英国不同动物园的 2 头死亡幼年亚洲象的死因为 EEHV-1 病毒感染，并利用高通量测序方法获得了 EEHV-1A 和 EEHV-1B 亚型的全基因组序列^[16]。Pavulraj 等^[17]也对德国某动物园两头确定感染 EEHV-1A 的死亡亚洲象进行了全基因组测序。这些研究提供了宝贵的病毒基因组数据，有助于更深入地了解 EEHV 的遗传特性和致病机制。先前有研究指出，EEHV 在

任何细胞系中均难以培养^[11]。Pavulraj 等^[17]研究者尝试在多种细胞培养物上分离该病毒，结果发现 EEHV 的复制能力极为有限，仅在将受感染的舌组织匀浆接种至象成纤维细胞 (ENL-2) 中，并与受感染的象外周血单核细胞 (PMBC) 共培养时，病毒才能勉强传代四次。这进一步表明了 EEHV 在培养系中难以有效复制的特性，从而大大增加了对该病毒进行体外研究的难度。因此，对 EEHV 的研究主要集中在分子层面。

死亡亚洲象的详细剖检中，观察到心包大量积液，各段肠管浆膜均有大量出血点，病理组织学检查可见心脏、肾脏、肠、淋巴结等出现水肿，肠道出现炎性细胞浸润，与 Richman 等^[11]、Long 等^[6]研究结果一致。剖检可见肺脏表面仅散布有少量出血点，且肺脏组织切面整体显示出正常的组织结构。基于这些解剖学观察，初步推测该象的肺脏组织中 EEHV 的载量可能较低。随后，通过提取自该象的肝脏和肺脏组织的 DNA 进行了 PCR 扩增，在肺脏中未观察到目的条带，这一结果进一步支持了肺脏组织中 EEHV 载量较低的假设。

为深入了解该病毒的分子结构及遗传特性，对鉴定到的 EEHV 进行 gB 基因扩增、测序，并进行了核苷酸同源性、序列差异分析及遗传进化分析，发现本研究鉴定的毒株与参考的 20 株 EEHV gB 基因序列的相似性为 39.5% ~ 99.4%。本研究中的 EEHV 与 EEHV-1A 毒株 Kimba NAP23 (KC618527.1) 相似性最高，为 99.4%。序列差异分析显示，与参考的

EEHV-1A 毒株 gB 序列最接近, 除本研究中的 EEHV gB 基因出现 9 个核苷酸缺失 (3 个氨基酸缺失) 外, 仅有 16 个碱基突变 (1 个氨基酸突变)。此外, 遗传进化分析表明, 本研究中的鉴定株与 GenBank 上公布的 8 株 EEHV-1A 株, 包括 IP91 Thirunelli1、Umesh (EP55)、Kimba NAP23、IP164 Muthanga2、IP165 Thirunelli2、IP06 (Nirangen)、IP07 (Aswathi)、IP43 Chellama Vandalur 和 IP143 Kozhikode 处于同一进化分支, 进一步证实它们存在密切的亲缘关系。通过高通量测序, 本研究中的 EEHV 全基因序列长度为 177 219 bp, 对其全基因组结构进行分析发现, 共包含 113 个 CDS 区域, 与 EEHV-1A 毒株 (OP169006) 具有 94.8% 的相似性。糖蛋白 gB 的氨基酸比对分析显示, 本研究的 EEHV YZX250323 与其他 EEHV 毒株一样, 都包含一个 Furin 位点 RRKR。EEHV-1 的 gB 与其他家族成员类似, 也具有弗林蛋白酶切割位点, 弗林蛋白酶切割基序为 433RRKR436, 可在 gB 中部完成切割, 这可能是其功能活化的关键^[14]。研究人员发现在小鼠体内, 缺失 Furin 切割位点的伪狂犬病毒毒力明显减弱, 表明 Furin 在 PRV 致病性方面起到了重要作用^[5]。本研究鉴定到的毒株 gB 蛋白基因同样含有 Furin 位点 RRKR, 可能是其具有较强毒力的重要因素, 可用于病毒的致病性研究。在治疗上, 根据 gB 基因开发的单克隆抗体可能具有广泛的治疗作用。此外, 糖蛋白 gH 上, EEHV YZX250323 和其他 7 个 EEHV-1A 型毒株中都预测到了一个 Furin 位点 RYGR, 而在其他 4 个 EEHV-1A 毒株和非 EEHV-1 毒株中没有预测到 Furin 位点。在糖蛋白 gM 和 gN 中均没有预测到 Furin 位点。糖蛋白 gH 的 Furin 位点 RYGR 作用有待进一步研究, gH 基因在 EEHV 不同亚型间的保守性低于 gB 基因, 可以作为区分不同亚型或不同毒株的潜在遗传标记。

本研究证实了在我国圈养亚洲象中存在 EEHV-1, 也进一步揭示了 EEHV-1A 病毒在我国的流行情况、遗传特征及基因结构, 为后续研究该病毒的检测方法建立、流行病学调查、致病性研究及疫病防控奠定了基础。

参考文献:

- [1] 曹松. 打造人象和谐新名片 [N]. 经济日报, 2024-04-13. DOI: 10.28425/n.cnki.njrb.2024.002551.
- [2] MILLER R E, LAMBERSKI N, CALLE P P, et al. Fowler's zoo and wild animal medicine current therapy, volume 9 [M]. Louis, Missouri: Saunders, 2019: 672-679.
- [3] SRIPIBOON S, TANKAEW P, LUNGKA G, et al. The occurrence of elephant endotheliotropic herpesvirus in captive Asian elephants (*Elephas maximus*): first case of EEHV4 in Asia [J]. J Zoo Wildl Med, 2013, 44 (1): 100-104.
- [4] RICHMAN L K, ZONG J C, LATIMER E M, et al. Elephant endotheliotropic herpesviruses EEHV1A, EEHV1B, and EEHV2 from cases of hemorrhagic disease are highly diverged from other mammalian herpesviruses and may form a new subfamily [J]. J Virol, 2014, 88 (23): 13523-13546.
- [5] ZONG J C, LATIMER E M, LONG S Y, et al. Comparative genome analysis of four elephant endotheliotropic herpesviruses, EEHV3, EEHV4, EEHV5, and EEHV6, from cases of hemorrhagic disease or viremia [J]. J Virol, 2014, 88 (23): 13547-13569.
- [6] LONG S Y, LATIMER E M, HAYWARD G S. Review of elephant endotheliotropic herpesviruses and acute hemorrhagic disease [J]. ILAR J, 2016, 56 (3): 283-296.
- [7] RICHMAN L K, MONTALI R J, GARBER R L, et al. Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants [J]. Science, 1999, 283 (5405): 1171-1176.
- [8] HAYWARD G S. Conservation: clarifying the risk from herpesvirus to captive Asian elephants [J]. Vet Rec, 2012, 170 (8): 202-203.
- [9] BOONPRASERT K, PUNYAPORNWITHAYA V, TANKAEW P, et al. Survival analysis of confirmed elephant endotheliotropic herpes virus cases in Thailand from 2006 - 2018 [J]. PLoS One, 2019, 14 (7): e0219288.
- [10] PERRIN K L, NIELSEN S S, MARTINUSSEN T, et al. 2021. Quantification and risk factor analysis of elephant endotheliotropic herpesvirus-haemorrhagic disease fatalities in Asian elephants (*Elephas maximus*) in Europe (1985-2017) [J]. Journal of Zoo and Aquarium Research, 2021, 9 (1): 8-13.
- [11] RICHMAN L K, MONTALI R J, CAMBRE R C, et al. Clinical and pathological findings of a newly recognized disease of elephants caused by endotheliotropic herpesviruses [J]. J Wildl Dis, 2000, 36 (1): 1-12.
- [12] CONNOLLY S A, JACKSON J O, JARDETZKY T S, et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9 (5): 369-381.
- [13] SPIESSCHAERT B, OSTERRIEDER N, AZAB W. Comparative analysis of glycoprotein B (gB) of equine herpesvirus type 1 and type 4 (EHV-1 and EHV-4) in cellular tropism and cell-to-cell transmission [J]. Viruses, 2015, 7 (2): 522-542.
- [14] 高明燕, 姜逸, 程旭, 等. 弗林蛋白酶裂解位点在微生物感染宿主中的作用 [J]. 养殖与饲料, 2021, 20 (10): 76-78.
- [15] YANG N, BAO M, ZHU B, et al. Elephant endotheliotropic herpesvirus 1, 4 and 5 in China: occurrence in multiple sample types and implications for wild and captive population surveillance [J]. Viruses, 2022, 14 (2): 411.
- [16] WILKIE G S, DAVISON A J, WATSON M, et al. Complete genome sequences of elephant endotheliotropic herpesviruses 1A and 1B determined directly from fatal cases [J]. J Virol, 2013, 87 (12): 6700-6712.
- [17] PAVULRAJ S, ESCHKE K, PRAHL A, et al. Fatal elephant endotheliotropic herpesvirus infection of two young Asian elephants [J]. Microorganisms, 2019, 7 (10): 396.