

戊型病毒性肝炎研究进展

夏宁邵*, 张 军, 李少伟, 葛胜祥, 吴 婷, 郑子峥,
吴文翰, 史维国

(厦门大学国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 戊型病毒性肝炎是全球最主要的病毒性肝炎之一, 近半个世纪多次发生大规模暴发, 孕妇感染戊型肝炎后病死率高达 20%。近年随着基于构象型表位多肽 E2 的戊型肝炎诊断试剂的出现, 戊型肝炎的病原学诊断及流行病学调查均获得了较大的发展, 越来越引起人们的重视。由我国自主创新研制的重组戊型肝炎疫苗现已在中国完成世界上首个 III 期临床试验, 其预防戊型肝炎的保护率达到 100% (95% CI, 72.1% ~ 100.0%)。

关键词: 戊型病毒性肝炎; 戊型肝炎病毒; E2; 诊断试剂; 重组戊型肝炎疫苗

中图分类号: R 373.2

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2011)02-0431-06

戊型病毒性肝炎是全球最主要的病毒性肝炎之一, 由戊型肝炎病毒(HEV)感染导致。戊型肝炎多数呈自限性, 其症状与甲型肝炎类似, 但病死率更高, 症状更重。孕妇中戊型肝炎的病死率可高达 20%; 慢性肝病患者合并戊型肝炎感染易引发肝衰竭, 病死率达 70%; 若病人为器官移植术后或 HIV 携带者等免疫缺陷患者, 亦可转为慢性化。HEV 主要通过肠道传播, 亦可通过输血或垂直途径传播, 常导致暴发大的流行病^[1]。近半个世纪以来, 全球有文献记载的万例以上的戊型肝炎大暴发近 10 起, 其中规模最大的一次发生于 1986–1988 年的中国新疆, 共发病 119 280 例, 死亡 707 人, 其中 414 名为孕妇。自 2007 年 10 月开始, 乌干达北部发生戊型肝炎大流行, 累计发病人数超过 1 万人, 至少死亡 160 人。在疫情最严重的两个镇, 戊型肝炎发病率分别为 30.9% 和 19.2%, 其中受害最严重的人群是孕妇和 0~2 岁的儿童, 病死率分别为 8.2% 和 8.7%^[2]。近年来大量证据表明戊型肝炎同时是一种人兽共患疾病, 猪是 HEV 的最主要动物宿主和人类戊型肝炎的主要传染源。

1 戊型肝炎的病原学研究

早在 20 世纪 50 年代, 在南亚地区就暴发过因水源污染而致的急性肝炎的流行。由于当时缺乏特异性的病原学诊断方法, 其病因一直不明。直到 80 年代初建立了甲型肝炎和乙型肝炎的特异性诊断方法后, 对该次流行进行回顾性调查时发现, 患者血清内缺乏甲型肝炎病毒感染的指标, 表明有另一种能引起流行性肝炎的病原体存在。1983 年前苏联学者 Balayan 等应用免疫电镜技术首先在一位志愿感染者的粪便中发现了病毒样颗粒。1988 年将本病命名为戊型肝炎, 相应的病原被命名为戊型肝炎病毒。HEV 目前被归为单独的一个属——戊型肝炎病毒属。

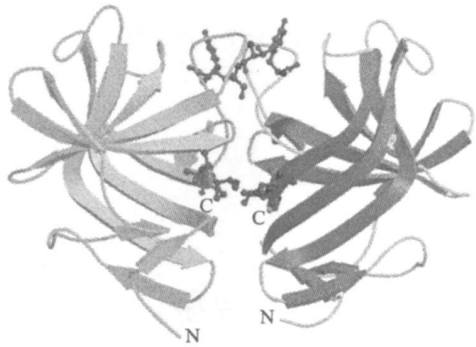
HEV 有 3 个开放阅读框架, 主要结构蛋白由 ORF2 编码。只有深入理解病毒的结构蛋白中的保护性中和表位和结构特征, 才能研制出高保护性的疫苗和高灵敏度特异性的诊断试剂。通过大量重组表达 HEV 衣壳蛋白、制备单克隆抗体、在灵长类模型上进行抗体中和活性研究等手段, 发现 HEV 衣壳蛋白 pORF2 上至少存在两个构象性中和表位, 同时也是 HEV 的主要免疫优势表位, 其中一个表位与单抗的结合会导致另一个表位的空间构象发生明显改变^[3]。对这两个中和表位的结构基础进行的进一步研究发现 pORF2 空间结构域分布与诺瓦克病毒相似, 由 S 结构域和 P 结构域组成, 其中 aa597~602 位于结构蛋白形成同源二聚体的结构界面, 2 个 aa597 空间距离在 0.66 nm 以内, aa368~394 调控着颗粒复合体的形

收稿日期: 2010-12-14

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)重点项目(2006AA02A209); 国家自然科学基金杰出青年基金(30925030); 传染病重大专项(2009ZX10004704); 国家自然科学基金项目(30870514)

通信作者: nsxia@xmu.edu.cn

成^[4](图1). 随后, 我们成功结晶了包含 pORF2 的中和表位区域的二聚体蛋白并解析出 X-射线衍射晶体结构. 进而, 通过系统体液免疫和细胞免疫比较研究, 发现了病毒样颗粒抗原与非颗粒抗原相比在免疫原性上具有显著优势, 并初步阐明了这一差异的分子基础^[5]. 这些关于 HEV 中和表位及结构的首次发现, 成为重组戊型肝炎疫苗以及高质量免疫诊断试剂研制的核心理论基础.



二聚体相互作用界面氨基酸以球棍模式表示^[4].

图1 E2s 二聚体的晶体结构

Fig. 1 Structure of E2s

2 戊型肝炎感染进程与宿主免疫应答

戊型肝炎为自限性疾病, 多数情况下不发展为慢性. 症状与甲型肝炎类似, 其各项实验室检测指标(包括转氨酶、胆红素、血清碱性磷酸酶等)一般在 1~6 周内恢复正常. 儿童感染 HEV 后多表现为亚临床型, 成人则多为临床型感染. 本病多见于青壮年, 男性发病率高于女性, 孕妇易感性高, 重症者较多, 且早产、死胎率高. 戊型肝炎总病死率高于甲型肝炎, 孕妇戊型肝炎的病死率可高达 20%, 其机制尚未阐明.

对志愿者观察发现, 病毒经口感染后, 原发性复制部位可能在肠道, 然后经血流侵入肝脏. 在肝细胞胞浆内复制并释放入胆汁和血流, 然后再排入肠道, 一般感染后 1~3 周内(约发病前 1 周)即可从血液和粪便中检出病毒. HEV 感染人后的潜伏期约为 2~9 周, 平均 40 d. 在潜伏期末及急性期初传染性最强. 我们以 HEV 病毒感染恒河猴, 感染后采集系列粪便和血清标本, 发现戊型肝炎对猴子的感染进程与人类类似. 在感染后第 3 天至第 5 周可以在粪便和血清中检测到核酸, 转氨酶在第 4 周开始升高, 第 6 周恢复正常. 抗 HEV IgM 和抗 HEV IgG 抗体随之阳转^[6]. 抗 HEV-

IgG 通常能持续数年, 有报道急性戊型肝炎病人康复后抗 HEV IgG 抗体能持续 10 a 以上^[7].

3 戊型肝炎流行病学及人兽共患研究

戊型肝炎容易在水源短缺的地方暴发流行, 我国是戊型肝炎的高流行区之一, 至今已报道了 10 余次戊型肝炎暴发流行. 除 1986—1988 年发生在新疆的大流行之外, 其余均为因食物或水源污染而导致的小型暴发流行. 我们与广州南方医院、铁道部北京总院等单位合作, 对广州、北京单位食堂发生的 2 起戊型肝炎暴发进行了分子流行病学和血清学调查, 积累了科学可靠的数据^[8]. 2009 年 7 月, 国务院依据戊型肝炎的流行病学数据颁布了《食品安全法实施条例》, 明确规定食品从业人员体检时需进行戊型肝炎检测.

用传统试剂进行的研究显示, 即使在戊型肝炎的高流行区, 健康人群中抗体的整体阳性率也很少超过 25%. 1993 年全国人群流调结果表明普通人群抗 HEV IgG 抗体阳性标化率为 17.2%. 近年来由于 HEV 免疫优势表位的发现, 新一代抗体检测试剂有了质的提高. 应用新一代试剂, 我们在广西、浙江、江苏等地的 12 个县市进行了近 3 万人的大规模横断面流行病学调查以及血清学随访, 结果显示各地的血清抗体阳性率大大高于以往用传统试剂检测的结果, 广西地区和江浙地区的血清抗体阳性率分别为 43%^[9] 和 58.4%^[10](图 2).

戊型肝炎主要通过粪口途径传播, 但近年来文献陆续报道了 HEV 经输血传播的直接证据. 2001 年, 我们从北京血站义务献血员中发现 1 例 HEV 携带者. 用该份血浆输入恒河猴可引发典型的急性戊型肝炎^[11]. 在北京、浙江、湖北等地的义务献血员中进行了戊型肝炎感染情况调查, 发现献血员中 HEV 携带率约为 0.1%^[12], 提示我国存在不低的戊型肝炎经血传播的危险性, 应引起有关方面的重视.

越来越多的证据显示戊型肝炎同时是一种人兽共患疾病, 猪是 HEV 的最主要动物宿主和人类戊型肝炎的重要传染源. 我们也进行了大量相关研究: 1) 2001 年, 厦门大学与农业部兽医诊断中心合作, 对全国 20 个省市 120 个养猪场以及进口检疫的 9 055 只猪的戊型肝炎感染情况进行了血清学调查, 结果证实我国商品猪中的戊型肝炎感染极其常见, 总感染率高达 83%^[13]; 2) 2002 年, 我们与中国药品生物制品检定所合作, 从国内多个地区的猪中分离到了 HEV 病毒株^[14]; 3) 2004—2005 年, 我们与复旦大学合作在浙江

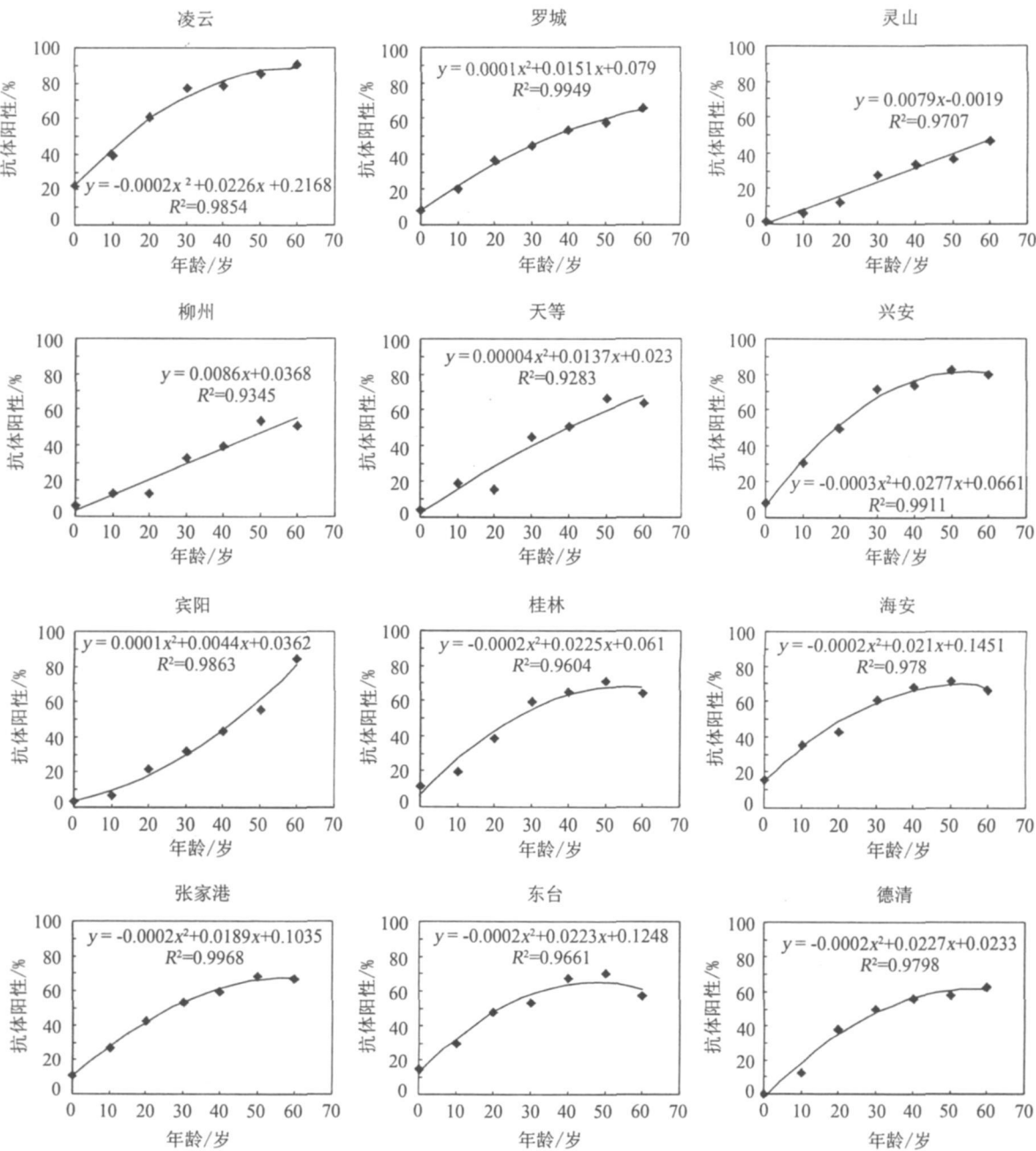


图 2 不同地区戊型肝炎感染情况的年龄分布

Fig. 2 Age distribution pattern of HEV infected people in different areas

某农村进行调查,发现相关养猪职业人群的 HEV 感染危险性约为对照组的 1.5 倍,获得了家猪与人 HEV 感染相关性的基于严格对照的流行病学证据;对病人、健康人、献血员、动物宿主中分离出的 HEV 基因组片段进行进化分析,发现动物 HEV 与人的 HEV 序列特征高度一致,提示动物宿主已成为人类戊型肝炎的重要传染源^[10];4) 2007 年我们对 HEV-1/2(人间型)与 HEV-3/4(人兽共患型)的病毒衣壳蛋白(pORF2)的主要暴露区域的结构差异进行研究,初步发现这两类

病毒在 aa497 位的差别在宿主选择中可能扮有重要角色^[15].

4 戊型肝炎的血清学诊断

由于临床上诊断戊型肝炎及对于戊型肝炎的流行病学调查很大程度掣肘于缺乏高灵敏度和特异性的诊断试剂,因此研制新一代诊断试剂成为控制戊型肝炎最迫切解决的问题.在所发现的中和表位基础上,我们

研制出了基于专利技术重组蛋白 E2 的 3 种高灵敏、高特异的新一代戊型肝炎免疫诊断试剂盒(戊型肝炎 IgM 抗体、戊型肝炎 IgG 抗体、戊型肝炎总抗体). 所研制的戊型肝炎 IgM 抗体诊断试剂盒(简称“E2-IgM”)和戊型肝炎 IgG 抗体诊断试剂盒(简称“E2-IgG”)已在国内外得到广泛应用.

国内外已报道众多临床研究数据以及动物试验数据显示, 利用 E2-IgM 试剂进行戊型肝炎 IgM 抗体检测优于传统的进口试剂, 是急性戊型肝炎诊断的一个可靠指标, 而利用 E2-IgG 试剂进行戊型肝炎 IgG 抗体检测是一个可靠的戊型肝炎既往感染指标. 英国皇家康沃医院(Royal Cornwall Hospital Trust)^[16]、英国健康保护署(Health Protection Agency)^[17]、西班牙 Universidad Cardenal Herrera-CEU 大学^[18]、香港公共卫生署^[19]等应用 E2-IgM 试剂和 E2-IgG 试剂对英国、新西兰、香港的散发戊型肝炎病例以及自然人群中戊型肝炎血清流行病学、相关养猪职业人群戊型肝炎感染情况进行了系统研究, 表明以重组蛋白 E2 为基础的系列诊断试剂较以往市场上广泛使用的传统试剂在灵敏度和特异性上均有大幅度提高. 这些由第三方独立进行的研究以及相应论文在国际上的公开发表, 标志着我们研制的戊型肝炎系列抗体诊断技术已得到国际认可, 成为当前戊型肝炎免疫诊断的重要方法之一. 根据这些结果, Dalton 等 2008 年在国际著名学术刊物“Lancet (Infectious Diseases)”上撰写的一篇戊型肝炎综述^[1]中, 多次引用了我们的研究成果, 并第一次明确提出了目前戊型肝炎 IgM 抗体的检测已可作为临床上戊型肝炎诊断的主要依据之一.

根据中国医师学会感染科医师分会于 2009 年制定的《戊型病毒性肝炎诊疗规范》^[20], 目前戊型肝炎 IgM 检测已成为我国戊型肝炎实验室诊断的最主要依据, 据 2008 年卫生部临床检验中心在国内进行的“实验室间质量评估”数据, 在开展戊型肝炎项目的二级以上医院中约 80% 使用的是 E2-IgM 试剂.

5 HEV 与宿主细胞相互作用

在尝试表达大量不同区段的克隆之后, 我们成功利用大肠杆菌表达系统表达出 HEV 的病毒样颗粒(VLP) P239 蛋白, 研究显示重组 HEV 的 VLP 具有和 HEV 相似的表面结构及细胞结合位点. 因此, HEV 与宿主细胞表面的相互作用及进入细胞后的一些行为很可能表现为 p239 蛋白与宿主蛋白的相互作用^[21]. 上述结果同时阐明了可以利用 p239 代替

HEV 进行受体和早期感染机制的研究, 从而绕过了天然病毒来源困难的难题. 在上述工作基础上, 采用钙调蛋白(CBP)亲和层析等方法分离 HEV 衣壳结合蛋白, 并发现其中数个蛋白很可能参与了 HEV 衣壳的细胞内转运过程^[22], 为进一步研究 HEV 与宿主细胞的相互作用分子机制提供了重要线索.

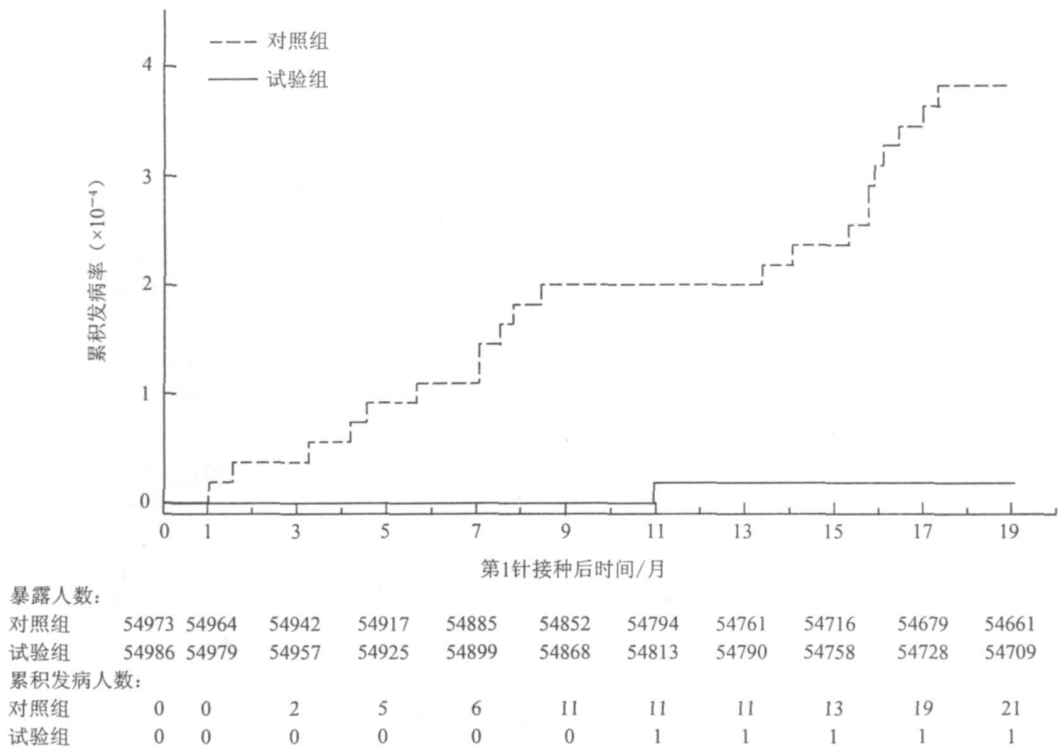
6 戊型肝炎疫苗

目前世界上开展过临床试验的戊型肝炎疫苗仅有 2 个, 葛兰素史克公司研制的戊型肝炎疫苗和我们研制的戊型肝炎疫苗. 2001 年 7 月至 2004 年 1 月间, 葛兰素史克公司在尼泊尔完成了 II 期临床试验. 共 1 794 名(疫苗组 896 人, 安慰剂组 898 人)现役军人完成了 0/1/6 月的全程接种. 结果表明疫苗组“疼痛”发生率稍高于安慰剂组, 未发现特殊疫苗相关安全性问题. 自第 3 针后 14 d 起, 安慰剂组共确诊了 66 例急性戊型肝炎病例, 疫苗组确诊 3 例, 疫苗保护率为 95.5% (95% CI: 85.6% ~ 98.6%)^[23]. 目前葛兰素史克公司尚未启动戊型肝炎疫苗的 III 期临床试验.

我们于 1998 年开始重组戊型肝炎的临床前研究, 于 2005 年完成 I、II 期临床试验, 初步证实疫苗安全有效. 2007 年 8 月启动 III 期临床试验, 在 11 个镇 178 个村顺利完成了对 11.3 万名健康成人志愿者的全部 3 针次的戊型肝炎疫苗接种工作, 是目前国内外唯一完成 III 期临床试验的戊型肝炎疫苗, 临床试验的结果表明该疫苗安全性好, 预防戊型肝炎的保护率达到 100% (95% CI, 72.1% ~ 100.0%)^[24](图 3). 在这个大规模临床试验中, 研究人员创造性地开发使用了接种管理软件和指纹识别软件, 确保了临床试验的科学性和可追溯性. 该疫苗是目前最有希望上市的戊型肝炎疫苗, 因此引起了全世界的关注. 结果发表后, “Lancet”, “Nature Reviews Drug Discovery”发表多篇评论^[25-30], 认为这次世界上最大规模的临床试验之一“令人信服地证实了疫苗的安全性和有效性, 是全世界戊型肝炎防控领域的一个重大突破”. 这标志着我国戊型肝炎疫苗防控研究的世界领先地位已赢得国际权威认可, 也标志着我国独立发展出的大肠杆菌类病毒颗粒疫苗研制系列关键技术已走向成熟.

7 研究展望

自 20 世纪 80 年代发现 HEV 以来, 由于缺乏灵敏、特异的戊型肝炎诊断试剂, 临床上对 HEV 感染无



各时间点累积发病率= 该点累积发病人数/ (暴露人数× 10 000);
暴露人数= 第二阶段进入临床研究初始受试者人数- (累积戊型肝炎病例数+ 失访人数);
试验组与对照组间累积发病率差异具有统计学意义(Log rank 检验, $p < 0.001$).

图 3 戊型肝炎病例累积发病率^[24]
Fig. 3 Cumulative incidence of hepatitis E^[24]

法进行有效地诊断, 戊型肝炎的严重性一直未能引起人们的重视. 进入 21 世纪以来, 厦门大学研究团队率先研制出基于构象型表位的新一代高特异性、高灵敏度的诊断试剂, 大大推动了戊型肝炎的临床诊断和流行病学研究. 与此同时, 我们以大肠杆菌表达系统为平台, 成功表达出戊型肝炎的颗粒型蛋白疫苗, 首次在 11.3 万人的大规模 II 期临床试验中心验证了疫苗的有效性和安全性. 这些工作大大推动了戊型肝炎的防控工作, 然而仍然有许多问题需要我们进一步深入探索: 戊型肝炎的全球疾病负担如何; 感染 HEV 后医学后果严重的特殊人群如孕妇、慢性肝病患者、免疫缺陷人群的感染率和发病率如何; 戊型肝炎疫苗对这些特殊人群的安全性和保护性如何; 戊型肝炎疫苗对于戊型肝炎高流行地区流行株的保护性如何; 戊型肝炎疫苗应如何应用于紧急控制戊型肝炎疫情; 应用戊型肝炎疫苗后的卫生经济学效益如何? 深入探讨和研究这些问题, 将为科学防控戊型肝炎提供重要依据.

参考文献:

[1] Dalton H R, Bendall R, Ijaz S, et al. Hepatitis E: an emer

ging infection in developed countries[J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(11): 698-709.
[2] Teshale E H, Howard C M, Grytdal S P, et al. Hepatitis E epidemic, Uganda[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(1): 126-129.
[3] Zhang J, Gu Y, Ge S X, et al. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein[J]. Vaccine, 2005, 23(22): 2881-2892.
[4] Li S, Tang X, Seetharaman J, et al. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(8): e1000537.
[5] Wu T, Wu X L, Ou S H, et al. Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity [J]. Mol Immunol, 2007, 44(12): 3261-3266.
[6] Zhang J, Ge S X, Huang G Y, et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model[J]. J Med Virol, 2003, 71(4): 518-526.
[7] 李新兰, 任晖, 梁新海, 等. 感染戊型肝炎 10 年后患者血清抗病毒抗体的检测[J]. 地方病通报, 2002, 17(3): 14-17.

- [8] 谈春荣,陈敏,葛胜祥,等.一起戊型肝炎暴发的血清流行病学调查[J].中华实验和临床病毒学杂志,2003,17(4): 361-364.
- [9] Li R C, Ge S X, Li Y P, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(11): 1682-1688.
- [10] Zheng Y, Ge S, Zhang J, et al. Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in Eastern China[J]. J Infect Dis, 2006, 193(12): 1643-1649.
- [11] Xia N S, Zhang J, Zheng Y J, et al. Transfusion of plasma from a blood donor induced hepatitis E in Rhesus monkey[J]. Vox Sang, 2004, 86(1): 45-47.
- [12] 严根兴,戴利成,吴康丽,等.献血者中戊型肝炎病毒血症研究[J].中国输血杂志,2004,17(6):417-419.
- [13] 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.
- [14] 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(4):516-521.
- [15] 郭清顺,葛胜祥,熊君辉,等.戊型肝炎病毒基因1型和基因4型中和表位区域分子差异研究[J].病毒学报,2007,23(6):454-456.
- [16] Bendall R, Ellis V, Ijaz S, et al. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries[J]. J Med Virol, 2010, 82(5):799-805.
- [17] Ijaz S, Vyse J, Morgan D, et al. Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems[J]. J Clin Virol, 2009, 44(4):272-276.
- [18] Galiana C, Fernandez Barredo S, Garcia A, et al. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers[J]. Am J Trop Med Hyg, 2008, 78(6):1012-1015.
- [19] Chau T N, Lai S T, Tse C, et al. Epidemiology and clinical features of sporadic hepatitis E as compared with hepatitis A[J]. Am J Gastroenterol, 2006, 101(2):292-296.
- [20] 中国医师协会感染科医师分会.戊型病毒性肝炎诊疗规范[J].中华临床感染病杂志,2009,2(5):260-263.
- [21] He S, Miao J, Zheng Z, et al. Putative receptor binding sites of hepatitis E virus[J]. J Gen Virol, 2008, 89:245-249.
- [22] Zheng Z Z, Miao J, Zhao M, et al. Role of heat shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking[J]. J Gen Virol, 2010, 91:1728-1736.
- [23] Shrestha M P, Scott R M, Joshi D M, et al. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine[J]. N Engl J Med, 2007, 356(9):895-903.
- [24] Zhu F C, Zhang J, Zhang X F, et al. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large scale, randomised, double blind placebo controlled, phase 3 trial[J]. Lancet, 2010, 376(9744):895-902.
- [25] Hepatitis E vaccine: why wait[J]. Lancet, 2010, 376(9744):845.
- [26] Basnyat B. Neglected hepatitis E and typhoid vaccines[J]. Lancet, 2010, 376(9744):869.
- [27] Trial watch: hepatitis E vaccine confers complete protection in phase III trial[J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(10):754.
- [28] Holmberg S D. Hepatitis E vaccine: not a moment too soon[J]. Lancet, 2010, 367:849-851.
- [29] Goel A, Aggarwal R. Prevention of hepatitis E: another step forward[J]. Future Microbio, 2010, 6:23-27.
- [30] Wedemeyer H, Pischke S. Hepatitis: Hepatitis E vaccination- is HEV 239 the breakthrough[J]. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 2010, 8:8-10.

Recent Progress in Hepatitis E

XIA Ning-shao^{*}, ZHANG Jun, LI Shao-wei, GE Sheng-xiang, WU Ting,

ZHENG Zi-zheng, Muir Hon Ng, James Wai Kuo Shih

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Disease, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Hepatitis E is one of the most important viral hepatitis in the world. Lots of large scale hepatitis E outbreaks occurred in recent half century, in which the mortality rate is as high as 20% in pregnant women. With the successfully development of conformational polypeptide E2-based diagnostic reagents, clinical diagnosis and epidemiology study of hepatitis E progressed greatly. The recombinant hepatitis E vaccine developed by Chinese scientists has successfully finished phase III clinical trial in China, which is the first phase III clinical trial in the world, vaccine efficacy after 3 doses is 100% (95% CI, 72.1% to 100.0%).

Key words: hepatitis E; hepatitis E virus; E2; diagnostic reagents; recombinant hepatitis E vaccine

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>