

封面式樣

計畫編號：DOH98-DC-1102

行政院衛生署疾病管制局 98 年度科技研究發展計畫

E 型肝炎檢驗試劑評估及我國急性 E 型肝炎發生率、危險因子評估

研究報告

執行機構：國立陽明大學臨床醫學研究所

計畫主持人：吳肇卿

研究人員：吳肇卿、蘇建維、陳貞吟

執行期間：98 年 4 月 1 日至 99 年 12 月 31 日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對外研究成果應事先徵求本署同意

目 錄

	頁 碼
封面	
目錄	
一、中文摘要	(3)
二、英文摘要	(5)
三、前言	(7)
四、材料與方法	(12)
五、結果	(19)
六、討論	(20)
七、結論與建議	(23)
八、計畫重要研究成果及具體建議	(24)
九、參考文獻	(25)
十、表	(31)
	共 (32) 頁

摘 要

背景：E 型肝炎藉著糞口途徑傳染，許多熱帶以及亞熱帶的開發中國家，均是流行區。然而因目前缺乏可靠的診斷試劑，台灣 E 型肝炎的發生率、危險因子評估以及預防策略仍無法落實，形成防疫漏洞。

研究方法：本計劃將以 2004 年以來因疑似急性 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎送至疾病管制局通報之個案檢體約 300 位，以及回溯性篩檢 700 位非 A 非 B 非 C 型肝炎病人血清中，E 型肝炎抗體及 E 型肝炎病毒 RNA，以了解其 E 型肝炎的盛行率。偵測方法以源自日本及德國使用之 HEV ELISA 試劑偵測 E 型肝炎抗體，加上反轉錄聚合酶鏈反應偵測 E 型肝炎病毒 RNA，評估兩種新 HEV ELISA 試劑與現行疾管局所用 E 型肝炎 ELISA 試劑的優缺點，及急性 E 型肝炎的真正盛行率，以明瞭目前肝炎通報系統有無改進之處。

研究發現：目前本研究已完成 123 位疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本，其中 114 位 anti-HEV IgG 為陽性，而有 9 位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性。其中 4 位為第一型，1 位為第三型，另外 4 位為第四型。此外，亦已完成 300 位醫院留存血清之分析，其中 30 位 anti-HEV IgG 為陽性，而有 11 位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，且有 22 位 anti-HEV IgG 陽性之患者於病發前三個月有旅行史。本研究第二年將繼續完成所有

1000 個檢體的檢驗以及危險因子之分析。

結論：台灣 E 型肝炎之感染主要以基因型第一型以及第四型為主。此外患者常於病發前 3 個月內有旅行史。

建議事項：從第一年的初步分析可知，台灣仍有散在性之急性 E 型肝炎發生，快速且正確的診斷 E 型肝炎是防疫極需完成的課題。

關鍵詞：E 型肝炎病毒、流行病學、基因型、診斷

Abstract

Background: Hepatitis E virus (HEV) infection is transmitted by a fecal-oral routine. Acute hepatitis E (AHE) is more prevalent in developing countries in tropical and subtropical areas. However, the incidence of HEV infection in Taiwan, as well as risk factors analysis and strategy of prevention is still controversial due to the lack of accurate diagnostic tool.

Methods: This study plans to enroll 300 patients with available serum stored in “Centers for Disease Control (CDC)” due to the diagnosis of suspected AHE or icteric hepatitis with unknown origin since 2004. Besides, 700 patients with the diagnosis of acute non-hepatitis A, non-hepatitis B, non-hepatitis C would also be enrolled to estimate the prevalence of HEV infection by testing anti-hepatitis E virus antibody and HEVRNA. This study compared 4 different methods (2 ELISA kits wildly applied in Japan and Germany, 1 RTPCR and the ELISA currently performed in CDC for sensitivity, specificity, accuracy rate for diagnosing acute hepatitis E. In addition, thorough history taking including travel history was done to clarify the risk factors of acute hepatitis E.

Results: This study has analyzed 123 samples from CDC. There were 114 samples with positive anti-HEV IgG and 9 samples with positive HEVRNA by RTPCR. All of the 9 samples with positive HEVRNA have been sequenced and 4 were classified as genotype 1, 1 as genotype 3 and the remaining 4 as genotype 4. In addition, we have screening 300 serum samples from hospital patients diagnosing as acute non-A, non-B, non-C hepatitis. There were 30 samples with positive anti-HEV IgG and 11 with positive HEVRNA by RTPCR. Furthermore, 22 of the 30 patients with positive anti-HEV IgG had a history of

travel within 3 months of manifestation. We will continue to analyze all of the 1000 samples and estimate the risk factors in the next years.

Conclusion: HEV infection is transmitted predominately by genotype 1 and genotype 4 in Taiwan. Besides, patients who had AHE often had a travel history within 3 months before the onset of manifestations.

Suggestion: From the preliminary data, sporadic AHE indeed existed in Taiwan. It is mandatory to develop and validate diagnostic tools to diagnose AHE accurately and promptly.

Keywords: hepatitis E virus, epidemiology, genotype, diagnosis

前 言

E 型肝炎藉著糞口途徑傳染，亞洲的中國大陸、印度、巴基斯坦、俄羅斯中亞的共和國、尼泊爾、印尼、緬甸、黎巴嫩等，非洲的阿爾及利亞、蘇丹、索馬力亞、查德與肯亞等，及中南美洲的墨西哥等開發中國家均是流行區。¹⁻¹² 這些地區曾爆發數百人至十多萬人的大流行，這些流行根據分析是因含 E 型肝炎病毒的病人糞便汙染了水源所致，尤其是雨季，洪水將含 E 型肝炎病毒的病人糞便沖至人們飲用水來源的河川或井水，因而爆發大流行，在老人與孕婦容易引發猛爆性肝炎。在非流行區的 E 型肝炎病例大多是至流行區旅行而感染，^{1,4,13} 但也有偶發性病例的感染途徑未明。¹⁴ 台灣是否也有 E 型肝炎存在？因以往只偵測病人血液中的抗體，無法確定是最近或急性感染，¹⁵ 本實驗室首度在台灣病人血液中分離出 E 型肝炎病毒，確定台灣是的確也有 E 型肝炎存在，如表一所示，感染病史的危險因子分析顯示 E 型肝炎病人於發病前大多曾前往流行地區旅行或探親，尤其是中國大陸。¹⁶⁻¹⁷ E 型肝炎病毒的基因序列與族譜分析也顯示與旅行區盛行的病毒的基因序列最相近，因此台灣的 E 型肝炎大多來自流行地區旅行感染所致。¹⁶

然而仍有部分 E 型肝炎病人並無境外旅行史，其感染途徑仍未完全清楚。^{16,18} 美國國家衛生研究院的 Meng 博士首先在豬的血液與糞便中分離出

與人類 E 型肝炎病毒的基因序列極為近似的豬隻 E 型肝炎病毒，¹⁹ 豬被認為是 E 型肝炎病毒的儲藏庫。本實驗室緊接著也在台灣的豬的血液與糞便中分離出與人類 E 型肝炎病毒的基因序列極為近似的豬隻 E 型肝炎病毒，是全球分離出與豬隻 E 型肝炎病毒的前驅者之一。台灣不同地區的豬大約 1-2% 血中仍可測得 HEV RNA。²⁰ 我們進一步以兩年的時間分析分佈在北、中、南、東不同地區不同年齡層豬隻的血液與糞便，結果如表二及表三所示。²¹

台灣病人與豬隻的 E 型肝炎病毒感染主要為第四型，和中國大陸南部省分的 E 型肝炎病毒近似。也曾有印度人返回印度探親而感染當地的第一型 E 型肝炎病毒。數年前因豬隻口蹄疫大流行，而撲殺了大多數豬隻。我們發現從美國引進的種豬體中發現與美國盛行的第三型近似。顯示 E 型肝炎也可能由高度開發的國家藉著豬隻貿易而輸出。陸續的，豬隻 E 型肝炎病毒在全球許多國家被發現，²⁰⁻³³ 未有旅行史的偶發性病人也廣泛的發現於許多國家，即使是已開發的工業化國家也不例外，甚至原先被診斷為藥物性肝炎的部分病人也被證實為 E 型肝炎，而且也顯示 E 型肝炎比原先的觀念來得普遍，³⁴⁻³⁹ 豬隻 E 型肝炎病毒盛行於許多國家的豬隻中，也可能是偶發性本土病例的感染源。後來近似人類 E 型肝炎病毒的病毒也在雞隻、老鼠、山羊與綿羊、牛、野豬、鹿、貓鼬等其他動物血液與糞便中發現，日

本也有獵人生食野豬肉而感染 E 型肝炎的報告，證明人畜感染是可能發生的。⁴⁰⁻⁴⁴

本實驗室有關 E 型肝炎病毒感染在台灣病人與豬隻的分佈與感染率的原創論文被有關 E 型肝炎的學術論文與專書廣泛引用，^{15-16, 20-21, 45}但這些已是多年前發表的資料了。由於全球國與國間的往來、旅遊、貿易日益頻繁，海峽兩岸每年來往的人次超過百萬，合法貿易與非法走私數量也極為龐大，其中也包括豬肉與內臟等農牧產品。為數甚多的東南亞人民前來台灣擔任外籍工人，這些活動均有潛在的可能傳播 E 型肝炎，如果 E 型肝炎病人不能被診斷，他們的糞便污染了水源或食物，甚至造成大流行，值得重視。極須對 E 型肝炎病毒感染情況做定期與近況的大規模篩檢，以避免大流行的發生。最近台中爆發的痢疾病例即是警訊，提醒我們即便是現代化的台灣，如果病原體不慎污染了水源或食物，仍可爆發疾病的流行。本院是以服務榮民為主位於台北的國家醫學中心，台灣其他地區的 E 型肝炎病盛行率與傳染途徑仍然未明。

疾病監測系統的健全有賴於正確的診斷，而急性病毒性肝炎的診斷必須依賴可靠的檢驗試劑，目前 A 型、B 型、C 型肝炎已有可靠的診斷試劑且為醫院常規的檢驗項目，然而對於 E 型肝炎的診斷，目前國內各醫院皆面臨無確定診斷試劑可用的窘境。長久以來是否可能使第一線的醫師忽略 E

型肝炎的存在，遺漏 E 型肝炎的通報，進而使防疫機關低估 E 型肝炎的盛行率、造成肝炎防疫上的漏洞，值得研究。目前雖已有 E 型肝炎疫苗的研究報告，⁴⁶ 防治的效益初步看來不錯，對其他基因型 E 型肝炎病毒的預防能力仍有待進一步評估。如同 A 型肝炎疫苗一樣，目前尚無全面施打之必要。值得注意的是以氯處理飲水，並不足以預防 E 型肝炎在蘇丹達夫地區因衝突而遷徙的人民中傳播，⁴⁷ 因此了解並阻斷其傳染途徑才是目前最重要的策略。本計劃以 2004 年以來因疑似急性 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎送至疾病管制局通報之個案檢體約 300 位，並與國內北、中、南三區之醫學中心及區域級醫院合作，回溯性篩檢 700 位（醫學中心 300 位、區域級醫院 400 位）非 A 非 B 非 C 型肝炎病人血清中 E 型肝炎抗體及 E 型肝炎病毒 RNA，以了解不到通報標準的非黃疸急性肝炎中 E 型肝炎的盛行率及防疫措施有無改進之空間等。偵測方法將以日本及德國使用之 HEV ELISA 試劑偵測 E 型肝炎抗體，加上反轉錄聚合酶鏈反應(RTPCR)偵測 E 型肝炎病毒 RNA，評估兩種新 HEV ELISA 試劑與現行疾管局所用 E 型肝炎 ELISA 試劑（ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit、ADALTIS EIAgen HEV IgM Kit）的優缺點，及急性 E 型肝炎的真正盛行率，以明瞭目前肝炎通報系統有無改進之處。經確定診斷為急性 E 型肝炎病人的病史與危險因子將做詳細分析，以了解其感染途徑。第二年將繼續第一年未完成的工作，並以臨床上急性 A

型肝炎、慢性 B 型肝炎急性發作、慢性 C 型肝炎急性發作患者血清各 20 位為對照組，以了解診斷為其他型肝炎病人中實為或合併 E 型肝炎的比例，並探討因診療單位無 E 型肝炎診斷試劑而可能漏報的 E 型肝炎病人。如此來明瞭急性 E 型肝炎在台灣的真正盛行率以及目前肝炎通報系統有無改進之處，供主管機關作參考。因此，這一系列的研究對台灣 E 型肝炎病毒感染的盛行率了解，感染途徑研究與疾病控制將提供非常寶貴的資料與建議。

材料與方法

研究設計、資料收集

患者收案條件為疾病管制局所定義之疑似急性病毒性 E 型肝炎，即臨床上出現以下任一肝炎急性發作症狀，如發燒、全身倦怠、噁心、嘔吐、腹部不舒服、黃疸或 ALT 上升，且排除急性 A、B、C 型肝炎。

本計劃以 2004 年以來因疑似急性 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎送至疾病管制局通報之個案檢體約 300 位，並與國內北、中、南三區之教學醫院合作，回溯性地篩檢 2003 年以前，其非 A 非 B 非 C 型肝炎病人血清中 E 型肝炎抗體及 E 型肝炎病毒 RNA 呈陽性之陽性率，以了解不到通報標準的非黃疸急性肝炎中 E 型肝炎的盛行率。兩年之研究期間預計篩檢北、中、南三區之醫學中心 300 位及區域級醫院 400 位患者之非 A、非 B、非 C 型急性病毒性肝炎之檢體，以了解不同層級之醫療院所 E 型肝炎之盛行率、通報比率以及防疫措施有無改進之空間等。若將來有需要時，亦將計畫以前瞻性研究方法，探討各教學醫院追蹤新案之檢體，以了解非黃疸急性肝炎中 E 型肝炎的盛行率及其危險因子。但本研究排除 CMV, EBV 病毒感染及酒精、藥物性肝炎。

本研究偵測方法將以兩種源自日本(李天成博士 Tian-Cheng Li 所發表)及德國使用之 HEV ELISA 試劑(MIKROGEN GmbH ELISA , Dr. Ulrich Mohn, Ioriansbogen 2-4, 82061 Neuried Register Gericht München HRB Nr.:

87312, Geschäftsführung, Dr. Manfred Motz, Dr. Erwin Soutschek, Sitz der Gesellschaft Neuried bei München), 再加上反轉錄聚合酶鏈反應(RTPCR)偵測 HEV RNA, ¹⁹ 評估此兩種新 HEV ELISA 試劑與現行疾管局所用 E 型肝炎 ELISA 試劑(ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit、ADALTIS EIAgen HEV IgM Kit) 的優缺點, 及急性 E 型肝炎的真正盛行率, 以明瞭目前肝炎通報系統有無改進之處。經確定診斷為急性 E 型肝炎病人的病史與危險因子將做詳細分析, 以了解其感染途徑。第二年將繼續第一年未完成的工作, 並對診斷為 A、B、C 型肝炎病人也將篩檢其血清中 E 型肝炎抗體及 E 型肝炎病毒 RNA, 以了解診斷為其他型肝炎病人中實為或合併 E 型肝炎的比例, 並探討因無 E 型肝炎診斷試劑而可能漏報的 E 型肝炎病人。

急性 E 型肝炎定義

病人血清經 HEV ELISA 試劑檢驗呈抗體陽性者定義為疑似病例, HEV RNA 呈抗體陽性者定義為確定病例。

Anti-HEV ELISA

IgG 及 IgM anti-HEV ELISA 檢測方式依據製造廠商所建議方式執行, ELISA 以二重覆執行, 將 100ul 血清標本及陽、陰性控制組與定量組加入已預先處理之 96 孔盤中, 在 37°C 靜置 60 分鐘, 清洗後加入酵素 substrate 呈色, 在 ELISA reader 讀出數值。

日本(國立感染症研究所)李天成博士提供的方法如下:

To detect anti-HEV IgM and IgG using VLPs, an ELISA has been established as follows: VLPs will be expressed by a recombinant baculovirus as described previously.

Flat-bottom 96-well polystyrene microplates (Immulon 2, Dynex Technologies, Inc. Chantilly, VA) will be coated with the purified VLPs (1 μ g/ml, 100ng/well). The plates will be incubated at 4°C overnight.

Unbound VLPs will be removed, and the wells will be washed twice with 10 mM phosphatebuffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), and then blocked for 1 hr with 200 ml of 5% skim milk (Difco Laboratories, Detroit, MI) in PBS-T at 37°C.

After washing 6 times with PBS-T for the plates, serum samples (100ul/well) will be added in duplicate at a dilution of 1:200 in PBS-T containing 1% skim milk.

The plates will then incubated for 1 hr at 37°C. The plates will be washed 3 times as described above and will be administered with 100ul of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Cappel, West Chester, PA) (1:10,000 dilution) or IgM (Cappel) (1:2,000 dilution) in PBS-T containing 1% skim milk. The plates will be incubated for 1 hr at 37°C and washed 4 times with PBS-T.

Then 100ul of the substrate orthophenylenediamine (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO) will be added to each well.

The plates will be incubated in a darkroom for 30 min at room temperature, then 50ml of 4N H₂SO₄ will be added to each well.

After the plates standing at room temperature for 10 min, the absorbance at 492 nm will be measured.

反轉錄聚合酶鏈反應 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

HEV RNA 以反轉錄聚合酶鏈反應做偵測，外引子採用 3156 [forward, position 5687-5708, 5'-AATTATGCMCAGTACCGGGTTG-3']及 3157 [reverse, position 6395-6417, 5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3']與 3160 [forward, position 6578-6600, 5'-GCCGAGTAYGACCAGTCCACTTA -3']及 3161 [reverse, position 7105-7127, 5'-AYAACTCCCGAGTTTTACCCA CC-3']，內引子採用 3158 [forward, position 5972-5993, 5'-GTTATGYTYTGC ATACATGGCT-3']及 3159 [reverse, position 6298-6319, 5'- AGCCGACGAA ATYAATTCTGTC-3']與 3162 [forward, position 6645-6667, 5'-TGGTTAATG TWGCSACYGGCGCG-3']及 3163 [reverse, position 7063-7085, 5'-GCTCAG CGACAGTWGACTGRAAA-3']。¹⁹ 病毒 RNA 自 50ul 病患血清標本萃取出，並進行反轉錄成 cDNA，再將 cDNA 以 35cycle 進行 PCR 反應。此試驗的敏感性可偵測 10-100 copies 的病毒基因體。⁴⁸

日本(國立感染症研究所)李天成博士提供的方法如下：

Total RNA will be extracted with the QIAmp viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and resuspended in 20ul of DNase-, RNase-, and proteinase-free water.

Reverse transcription (RT) will be performed at 42°C for 50 minutes, followed by 70°C for 15 minutes in a 20ul reaction mixture containing 1ul of

Superscript™ II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1ul of oligo (dT) primer, 1ul of RNaseOUT™ (Invitrogen), 2ul of 0.1 M dithiothreitol, 4ul of 5X RT buffer, 1ul of 10 mM deoxynucleoside triphosphates, 5ul of RNA, and 5ul of distilled water.

RT-PCR: Two microliters of the cDNA will be used for the first PCR in a 50ul reaction mixture with external forward primer 3156 (5'-AATTATGCMCAGTACCGGGTTG-3'), external reverse primer 3157 (5'-CCCTTATCCTGCTGAGCATTCTC-3') and external forward primer 3160 (5'-GCCGAGTAYGACCAGTCCACTTA -3'), external reverse primer 3161 (5'-AYA ACTCCCGAGTTTTACCCACC-3').¹⁹ Each cycle consisted of denaturation at 96°C for 30 seconds, primer annealing at 55°C for 30 seconds, and extension at 72°C for 60 seconds, followed by final extension at 72°C for 7 minutes.

Two microliters of the first PCR product will be used for a nested PCR with internal forward primer 3158 (5'-GTTATGYTYTGCATACATGGCT-3'), internal reverse primer 3159 (5'-AGCCGACGAAATYAATTCTGTC-3') and internal forward primer 3162 (5'-TGGTTAATGTWGC SACYGGCGCG-3'), internal reverse primer 3163 (5'-GCTCAGCGACAGTWGACTGRAAA-3') under the same conditions.

分析

本計劃以反轉錄聚合酶鏈反應作為診斷的標準，其陽性參考標準為本院 20 位經反轉錄聚合酶鏈反應測定 HEVRNA，已証實為急性 E 型肝炎感染之患者血清；陰性參考標準則為本院另 20 位慢性 B 型肝炎急性發作，且

其血清 HEVRNA 檢驗為陰性之患者血清。以此先比較 30 位因疑似急性 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎通報至疾病管制局之個案檢體中，各種 HEV ELISA 試劑與現行疾管局所用 E 型肝炎 ELISA 試劑(ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit、ADALTIS EIAgen HEV IgM Kit) 的敏感性與專一性。再選擇最佳之試劑，配合反轉錄聚合酶鏈反應，來完成其餘個案檢體之檢測工作。

此外，本研究並計劃以臨床上急性 A 型肝炎、慢性 B 型肝炎急性發作、慢性 C 型肝炎急性發作患者血清各 20 位為對照組，以了解診斷為其他型肝炎病人中實為或合併 E 型肝炎的比例，並探討無 E 型肝炎診斷試劑可能漏報的 E 型肝炎病人。如此來明瞭急性 E 型肝炎在台灣之真正盛行率以及目前肝炎通報系統有無改進之處，供主管機關作參考。

E 型肝炎病毒基因選殖、定序與基因族譜分析

E 型肝炎病毒 RNA 以反轉錄聚合酶鏈反應得到的產物將選殖至 pCR2 載體內 (Original TA Cloning[®] Kit, Invitrogen Corporation, CA)，再轉形至 *Escherichia coli* strain DH5 α (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)，^{16, 20-21} 定序則以 dye terminator cycle sequencing reaction (Dye terminator cycle sequencing core kit #402117, Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT) 為之，在 ABI 373A 定序儀中進行 (Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT)。基因族譜分析，方法如我們已發表的文獻所述。^{16, 20-21}

E 型肝炎感染的危險因子分析

有關 E 型肝炎感染的危險因子分析，包括病人基本資料、最近半年內（特別是三個月內）的旅行史、生食或生飲、和急性肝炎病人接觸、豬隻養殖、屠宰或豬肉品及肝臟的販賣業者、三個月內接受輸血。

結 果

目前本研究第一年已完成 423 位血清檢體之分析，包括 123 位疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本，其中 114 位 anti-HEV IgG 為陽性，41 位以 anti-HEV IgM 檢測為陽性，而有 9 位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性。此 9 位均已完成基因定序以及基因型測定，其中 4 位為第一型，1 位為第三型，另外 4 位為第四型。

此外，亦已完成 300 位醫院留存之急性非 A 非 B 非 C 型肝炎之血清分析，其中 30 位 anti-HEV IgG 為陽性，9 位以 anti-HEV IgM 檢測為陽性，而有 11 位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，且有 22 位 anti-HEV IgG 陽性之患者於病發前三個月有旅行史。

本研究第二年計畫將繼續完成所有 1000 個檢體的檢驗以及危險因子之分析。包括病人基本資料、最近半年內(特別是三個月內)的旅行史、生食或生飲、和急性肝炎病人接觸、豬隻養殖、屠宰或豬肉品及肝臟的販賣業者。預期可以幫助釐清台灣急性 E 型肝炎感染的傳播途徑，作為防疫參考。

此外，本研究第二年之計畫，將繼續確認疾管局與台北榮民總醫院檢體之採檢年代、對象及詳細病史，並補強其他地區及醫院層級具代表性之檢體，以及增加 IgG 檢測項目，來探討台灣急性 E 型肝炎之盛行率以及危險因子。

討 論

急性 E 型肝炎病毒的感染，是以糞口傳染為主，因此飲食與飲水的不潔，容易造成 E 型肝炎的流行。¹ 台灣近年來，雖無發現有大規模的群聚急性 E 型肝炎感染，然隨著地球村的時代來臨，交通便捷，各國往來日趨密切，如何有效地防治急性 E 型肝炎的發生，並找尋出重要的危險因子，乃是防疫政策與公共衛生的當務之急。由本研究第一年針對 300 位醫院留存之急慢性非 A 非 B 非 C 型肝炎之血清分析，發現其中有 30 位 anti-HEV IgG 檢驗為陽性，9 位以 anti-HEV IgM 檢測為陽性，而有 11 位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性。由此可見急性 E 型肝炎感染，的確仍存在於台灣，且是急性非 A 非 B 非 C 型肝炎的重要原因之一。而且由本實驗室過往所發表的論文發現，與急性 A 型肝炎相較，台灣感染急性 E 型患者感染時的年齡較大、有較嚴重之臨床表徵，甚至會有猛爆性肝炎以及死亡的病例發生。¹⁷ 因此如何找尋出快速、準確並合乎經濟效益的檢驗試劑，是當前防疫政策急需解決的課題。本研究第二年度將廣續探討各種 HEV ELISA 試劑與現行疾管局所用 E 型肝炎 ELISA 試劑的敏感性與專一性，來選擇最佳之試劑，預期將可提供 E 型肝炎防疫以及篩檢上快速、準確且符合成本效益分析之重要參考。

目前 E 型肝炎病毒主要有四種基因型。⁴⁹ 第一型主要分布於亞洲以及

北非，第二型於墨西哥以及中非，第三型主要分布於美洲、歐洲以及日本，第四型則主要分布於台灣、日本、中國以及越南。由本研究第一年之先期分析，9位以 RTPCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，並已完成基因定序以及基因型測定的患者中，4位為第一型，1位為第三型，另外4位為第四型。因此可知各種基因型均可能存在於台灣 E 型肝炎患者中，其臨床意義需詳加深入評估。本研究第 2 年將繼續完成所有 E 型肝炎病毒檢測為陽性患者之病毒基因定序、基因型檢測以及危險因子之評估，以徹底了解台灣 E 型肝炎病毒基因型分佈之狀況，並配合病毒基因族譜分析、危險因子（尤其旅遊史以及職業等）之分析。如此，方能對於台灣 E 型肝炎傳播之途徑，做全盤之了解，以作為防治政策之參考標的。

許多研究已證實 E 型肝炎病毒可能是一種人畜共通感染的病原。⁴⁰⁻⁴⁴ E 型肝炎病毒盛行於許多國家的豬隻中，後來近似人類 E 型肝炎病毒的病毒也在雞隻、老鼠、山羊與綿羊、牛、野豬、鹿、貓鼬等其他動物血液與糞便中發現。近年來，少數不肖業者偷渡進口許多未經檢疫之牲畜，形成 E 型肝炎傳播的隱憂。因此要了解並防治 E 型肝炎的散播與傳染，除了人類遷徙以及旅遊因素外，有關牲畜、畜牧環境之探討亦須詳加研究，方不至成為防疫之缺口。此外，過往之研究報告亦顯示國內豬隻相關產業確實有 E 肝傳播風險存在，建議未來在執行疫調相關作業時，應將豬隻養殖屠宰、

販賣業者及食用豬肉豬肝等條件列入疫調項目。總而言之，本研究除了病毒學之檢測外，亦著重於危險因子、暴露史之釐清，冀望能為防疫提供更周全之防護網。

過往之研究發現，血清 HEVRNA 存在之時間約三週⁵⁰，因此急性 E 型肝炎其病毒血症期間甚短，HEV RNA 陽性固是急性 E 型肝炎，但 HEV RNA 陰性並不代表不是急性 E 型肝炎感染個案，其可能與採樣時間有關，因此本研究第二年將繼續探討患者採樣時間與疾病發作之時序相關性，以釐清是否有 HEVRNA 陰性之急性 E 型肝炎病例，並藉此來了解各種病毒血清標誌於台灣急性 E 型肝炎自然史中所扮演之角色以及診斷正確性。

此外，目前因疾病管制局檢驗 E 型肝炎之試劑廠商不再提供，本研究所將使用之 ELISA 試劑亦仍與廠商議價中，本研究第二年將盡速解決此問題，並完成各試劑專一性、準確度、精確度和適用範圍之評估。俟選擇出較優試劑後，再就收案檢體進行檢驗分析。

結論與建議

本研究第一年的期中分析顯示，台灣 E 型肝炎之感染主要以基因型第一型以及第四型為主。此外，患者常於病發前 3 個月內有旅行史。建議所有急性肝炎患者均須詳細詢問其病史，尤其是旅遊史、暴露史與職業。此外，快速且正確的診斷 E 型肝炎是台灣防疫不可忽略的重要課題。

計畫重要研究成果及具體建議

從第一年的初步分析可知，台灣仍有散在性之急性 E 型肝炎發生，且是急性非 A 非 B 非 C 型肝炎的重要原因之一，境外感染為其主要感染途徑，快速且正確的診斷 E 型肝炎是防疫極需完成的課題。

參考文獻

- [1] Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000; **15**: 9-20.
- [2] Aye TT, Uchida T, Ma XZ, *et al*. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res*. 1992; **20**: 3512.
- [3] 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.
- [4] De Cock KM, Bradley DW, Sandford NL, Govindarajan S, Maynard JE, Redeker AG. Epidemic non-A, non-B hepatitis in patients from Pakistan. *Ann Intern Med*. 1987; **106**: 227-30.
- [5] Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, *et al*. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol*. 1992; **36**: 246-50.
- [6] Huang R, Nakazono N, Ishii K, Kawamata O, Kawaguchi R, Tsukada Y. Existing variations on the gene structure of hepatitis E virus strains from some regions of China. *J Med Virol*. 1995; **47**: 303-8.
- [7] Hyams KC, Purdy MA, Kaur M, *et al*. Acute sporadic hepatitis E in Sudanese children: analysis based on a new western blot assay. *J Infect Dis*. 1992; **165**: 1001-5.
- [8] Nanda SK, Yalcinkaya K, Panigrahi AK, Acharya SK, Jameel S, Panda SK. Etiological role of hepatitis E virus in sporadic fulminant hepatitis. *J Med Virol*. 1994; **42**: 133-7.

- [9] Skidmore SJ, Yarbough PO, Gabor KA, Reyes GR. Hepatitis E virus: the cause of a waterborne hepatitis outbreak. *J Med Virol.* 1992; **37**: 58-60.
- [10] Tsega E, Krawczynski K, Hansson BG, *et al.* Outbreak of acute hepatitis E virus infection among military personnel in northern Ethiopia. *J Med Virol.* 1991; **34**: 232-6.
- [11] Velazquez O, Stetler HC, Avila C, *et al.* Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987. *JAMA.* 1990; **263**: 3281-5.
- [12] Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR, Pavri KM. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet.* 1980; **2**: 876-9.
- [13] Mast EE, Kuramoto IK, Favorov MO, *et al.* Prevalence of and risk factors for antibody to hepatitis E virus seroreactivity among blood donors in Northern California. *J Infect Dis.* 1997; **176**: 34-40.
- [14] Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, *et al.* The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol.* 1998; **79** (Pt 3): 447-56.
- [15] Lee SD, Wang YJ, Lu RH, Chan CY, Lo KJ, Moeckli R. Seroprevalence of antibody to hepatitis E virus among Chinese subjects in Taiwan. *Hepatology.* 1994; **19**: 866-70.
- [16] Wu JC, Sheen IJ, Chiang TY, *et al.* The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analyses. *Hepatology.* 1998; **27**: 1415-20.
- [17] Su CW, Wu JC, Huang YS, *et al.* Comparison of clinical manifestations and epidemiology between acute hepatitis A and acute hepatitis E in Taiwan. *J*

Gastroenterol Hepatol. 2002; **17**: 1187-91.

[18]Hsieh SY, Yang PY, Ho YP, Chu CM, Liaw YF. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J Med Virol.* 1998; **55**: 300-4.

[19]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 U S A.* 1997; **94**: 9860-5.

[20]Wu JC, Chen CM, Chiang TY, *et al.* Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol.* 2000; **60**: 166-71.

[21]Wu JC, Chen CM, Chiang TY, *et al.* Spread of hepatitis E virus among different-aged pigs: two-year survey in Taiwan. *J Med Virol.* 2002; **66**: 488-92.

[22]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**: 3828-34.

[23]Caron M, Enouf V, Than SC, Dellamonica L, Buisson Y, Nicand E. Identification of genotype 1 hepatitis E virus in samples from swine in Cambodia. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**: 3440-2.

[24]Feagins AR, Opriessnig T, Guenette DK, Halbur PG, Meng XJ. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J Gen Virol.* 2007; **88**: 912-7.

[25]Fernandez-Barredo S, Galiana C, Garcia A, *et al.* Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Can J Vet Res.* 2007; **71**: 236-40.

[26]Kasorndorkbua C, Opriessnig T, Huang FF, *et al.* Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but

evidence of water contamination is lacking. *Appl Environ Microbiol.* 2005; **71**: 7831-7.

[27]Munne MS, Vladimirov 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 Med Virol.* 2006; **78**: 1579-83.

[28]Ning H, Niu Z, Yu R, Zhang P, Dong S, Li Z. Identification of genotype 3 hepatitis E virus in fecal samples from a pig farm located in a Shanghai suburb. *Vet Microbiol.* 2007; **121**: 125-30.

[29]Nishizawa T, Takahashi M, Endo K, *et al.* Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan. *J Gen Virol.* 2005; **86**: 3321-6.

[30]Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknegt M, de Roda Husman AM. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods.* 2007; **143**: 112-6.

[31]Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martin M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J.* 2008; **175**: 130-2.

[32]Wibawa ID, Suryadarma IG, Mulyanto, *et al.* Identification of genotype 4 hepatitis E virus strains from a patient with acute hepatitis E and farm pigs in Bali, Indonesia. *J Med Virol.* 2007; **79**: 1138-46.

[33]Zheng Y, Ge S, Zhang J, *et al.* Swine as a principal reservoir of hepatitis E virus that infects humans in eastern China. *J Infect Dis.* 2006; **193**: 1643-9.

[34]Albetkova A, Drobeniuc J, Yashina T, *et al.* Characterization of hepatitis E virus from outbreak and sporadic cases in Turkmenistan. *J Med Virol.* 2007; **79**:

1696-702.

[35]Dalton HR, Fellows HJ, Stableforth W, *et al.* The role of hepatitis E virus testing in drug-induced liver injury. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; **26**: 1429-35.

[36]Gotanda Y, Iwata A, Ohnuma H, *et al.* Ongoing subclinical infection of hepatitis E virus among blood donors with an elevated alanine aminotransferase level in Japan. *J Med Virol.* 2007; **79**: 734-42.

[37]Herremans M, Vennema H, Bakker J, *et al.* Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J Viral Hepat.* 2007; **14**: 140-6.

[38]Ijaz S, Arnold E, Banks M, *et al.* Non-travel-associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis.* 2005; **192**: 1166-72.

[39]Teo CG. Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr Opin Infect Dis.* 2006; **19**: 460-6.

[40]Arankalle VA, Chobe LP, Chadha MS. Type-IV Indian swine HEV infects rhesus monkeys. *J Viral Hepat.* 2006; **13**: 742-5.

[41]Billam P, Sun ZF, Meng XJ. Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV. *J Gen Virol.* 2007; **88**: 1538-44.

[42]Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mongoose. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; **74**: 932-6.

[43]Matsuura Y, Suzuki M, Yoshimatsu K, *et al.* Prevalence of antibody to

- hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol.* 2007; **152**: 1375-81.
- [44]Shukla P, Chauhan UK, Naik S, Anderson D, Aggarwal R. Hepatitis E virus infection among animals in northern India: an unlikely source of human disease. *J Viral Hepat.* 2007; **14**: 310-7.
- [45]Lin CC, Wu JC, Chang TT, *et al.* Diagnostic value of immunoglobulin G (IgG) and IgM anti-hepatitis E virus (HEV) tests based on HEV RNA in an area where hepatitis E is not endemic. *J Clin Microbiol.* 2000; **38**: 3915-8.
- [46]Shrestha MP, Scott RM, Joshi DM, *et al.* Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2007; **356**: 895-903.
- [47]Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, *et al.* A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis.* 2006; **42**: 1685-91.
- [48]Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006; **131**: 65-71.
- [49]Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008; **48**: 494-503.
- [50]Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol.* 2008; **80**: 646-58.

表一、急性 A 型肝炎與急性 E 型肝炎臨床表徵與流行病學之異同

	急性 A 型肝炎	急性 E 型肝炎	P 值
患者數目	26	32	
性別 (男/女)	17/9	25/7	無統計意義之差別
年齡 (平均數 ± 標準差; 年)	30.7 ± 11.0	56.2 ± 15.4	< 0.0001
旅行史(百分比)	7 (26.9)	22 (68.8)	0.001
Albumin (平均數 ± 標準差 mean ± SD; gm/dL)	3.75 ± 0.37	3.42 ± 0.35	0.016
ALT (平均數 ± 標準差; U/L)	3023.0 ± 1958.5	1911.9 ± 1586.7	0.015
AST (平均數 ± 標準差; U/L)	2374.3 ± 2869.2	1681.1 ± 1444.3	NS
Bilirubin (平均數 ± 標準差; mg/dL)	8.66 ± 5.00	17.8 ± 12.25	0.003
死亡(百分比)	0(0%)	5(15.6%)	

表二、偵測不同年齡層的台灣養殖豬血液中的E型肝炎病毒

地區	HEV RNA 陽性的豬隻數目/受檢的豬隻數目 (%)					總計
	<2 個月	2 個月	3-4 月	5-6 月	≥7 月	
北部	0/11 (0)	1/7 (14.2)	1/52 (1.9)	0/32 (0)	0/20 (0)	2/122 (1.6)
中部	0 (0)	1/20 (5)	0/39 (0)	0 (0)	0 (0)	1/59 (1.7)
南部	0 (0)	1/20 (5)	2/124 (1.6)	1/50 (2)	0/56 (0)	4/250 (1.6)
東部	0 (0)	0/20 (0)	0/40 (0)	1/30 (3.3)	0 (0)	1/90 (1.1)
總計	0/11 (0)	3/67 (4.5)	3/255 (1.2)	2/112 (1.8)	0/76 (0)	8/521 (1.5)

哺乳期(Suckling stage): <2 個月， 成長期(growing stage): 2-4 個月， 完成期(finishing stage): 5-6 個月， 預備銷售: ≥7 個月

表三、. 不同年齡層的台灣養殖豬糞便中的 E 型肝炎病毒

Age	豬糞檢體數目	HEV RNA 陽性數目(%)
1-7 週	20	0 (0)
2-4 個月	22	2 (9)
>5 個月	12	1 (8)
總計	54	3 (6)