

台灣之 E 型肝炎病毒感染：依血清中和抗體陽性率探討

摘 要

E 型肝炎病毒(Hepatitis E virus; HEV)感染是亞洲與中國大陸一個重要傳染性疾病。感染後，嚴重之黃疸及高孕婦死亡率是其特徵。在台灣並無爆發性流行之紀錄。為瞭解 HEV 在台灣可能的流行情形及傳染途徑，本研究利用新開發之酵素免疫分析法，偵測 HEV 專一性之中和性抗體(HEV neutralizing antibody; anti-HEVne)在國人血清出現情形，推測探討該病毒可能在台灣感染流行情形。我們利用專一性極高的 HEV 病毒外套膜(ORF2)片斷中引起中和抗體之序列(aa578-aa607)來製作檢驗抗體之試劑。分析族群分別為 4-5 歲(200 位；平均年齡 4.4 歲)，20-40 歲(250 位；平均年齡 32.5 歲)，40-60 歲(300 位；平均年齡 53.1 歲)，60-80 歲(300 位；平均年齡 71.9 歲)及孕婦(300 位；平均年齡 33 歲)。研究結果顯示，開發之中和抗體試劑(anti-HEVne)對 HEV 感染之專一性極高。該 Anti-HEV 抗體在國人不同年齡族群之陽性率分別為 2%(5-6 歲)，8% (20-40 歲)及 13%(40-60 歲)及 11%(60-80 歲)。此外，約有 6%孕婦擁有此抗體。此項結果顯示，HEV 的感染似乎在 40-60 歲年齡層較高。國人平均感染率依本方法所得為 8.9%。本研究，利用此新開發之檢驗方法求證了國人血清中 anti-HEV 陽性率。在

疑似境外移入案例中，中國大陸(56%)仍是可能主要感染源。另外，推測該病毒也可能以一種低傳染性(low circulation/sporadic)的方式在國內流行。在選定的研究族群裡，anti-HEVne 在 40-60 歲之族群有較高之陽性率。大致上來講，年齡愈高其陽性率愈高。但因 anti-HEVne 會在感染後數年間漸漸消失，是否這樣結果暗示年齡層較大之族群可能有再次感染之可能性，仍有待繼續探討。

前 言

E型肝炎病毒(Hepatitis E virus; HEV)感染遍佈全球(圖一)。重要流行的蹤跡可在印度、緬甸、中國、亞洲的前蘇聯共和國和墨西哥找到。在其他地方，研究者也可診斷出一些零星的病例，包括其他亞洲國家、北非、中非和中南美洲。比較起來，幾乎所有發生在北美、歐洲和澳洲的零星病例都是病人本身來自於或是曾到過該病流行的區域。然而，現在HEV不存在於已開發國家的推論已經面臨了挑戰。最近，該傳染被稱為重要之再浮現傳染病^(1,2,3)。

HEV感染是一種急性的肝炎疾病。由於我們與大陸、東南亞國家的接觸日益頻繁，該項傳染病防治已日趨重要。同如A型肝炎病毒感染，E型肝炎病毒感染的嚴重性也是隨著年齡而增長。此病好發於青年人，大部份的個體是感染自原始來源(primary source)，而二次接觸(secondary contacts)的感染較少見。這不像A型肝炎容易傳遞給高危險群家族(susceptible family)、家庭和其他與病患有親密接觸的人。最近幾年有報導，兒童有時會同時感染HAV和HEV，可導致特別嚴重的疾病，包括急性肝功喪失^(2,3,4,5)。臨床上，雖然有不顯性感染，但誘發嚴重之黃疸(cholestatic jaundice)及孕婦(第 7~9 月的孕婦)高死亡率也是其特徵。這些致病機制，仍尚未明白。但依據資料報導暗示，它會引起肝細胞與膽細胞嚴重發炎及凋零死亡^(47,48)。相對此一嚴重症狀，存在著不顯性感染(sub-clinical infection)的可能

性是值得注意的⁽³⁶⁾。

HEV基因組(genome)約為 7.5kb長、單股RNA(positive sense) (請見圖二)。它有三個ORFs(conserved open reading frames)。ORF1 是位於基因組(genome)上靠 5'的那端，它轉錄(encode)了一個約 1693 個胺基酸的蛋白分子。這個蛋白分子之後可能經過蛋白酶切割(proteolytic cleavage)，形成的主區(domains)功能可能與病毒的複製有關，如RNA-dependent RNA polymerase。ORF2 位於基因組(genome)上靠 3'的那端，其產物是組成病毒外鞘的蛋白(capsid protein)。比較短的ORF3 重疊了部份的ORF1 和ORF2，但是其 123 個胺基酸的基因產物之功能為何則不清楚。這個蛋白質之後被磷酸化(phosphorylate)同時它也許連接到細胞骨骼。而對於ORF3 產物最終會整合入病毒外鞘的說法，目前仍沒有獲得任何實驗數據的支援。基因序列上，與 caliciviruses 或其他病毒如 Norwalk agent 和 SSRVs (small, round-structured viruses)相似。他們同樣是透過糞-口途徑(faecal-oral route)散播的。但是否可把HEV歸類於Caliciviridae科仍必須重新思維，因為它的病毒特性與該科中的其他病毒的確仍存有差異⁽⁴⁾。

目前已找到HEV有四種基因型 (Genotype)，不過對於HEV的基因歧異度(genetic diversity)，即基因型的多寡和可感染的動物物種之全盤瞭解，還需要更進一步的努力。HEV的原型(prototype)是源自緬甸的病例(稱為緬甸基因型(genotype))，之後，又在亞洲、非洲其他地方分離到與此型有相當高的同質性(homology)的病毒。從墨西哥病人分離到的病毒(1986 年在 Telixtac的那次流行)與緬甸病人身上分到的有區別(稱為墨西哥基因型)。最近，從美國HEV病毒株，經過遺傳族譜分析(phylogenetic analysis)顯示它們又是另一個不同的基因型(美國基因型)。在中國分離出的HEV則可分成至少兩群，其中一群與緬甸基因型相似，而另一群則是新的基因型(中國基因型)。至於更多的其他HEV基因型則有待更進一步的發現⁽⁶⁻¹³⁾。

HEV 多發生在開發中國家，但已往之試劑卻顯示在已開發國家亦有

感染。台灣之感染偵測亦相同。進口之試劑是否可用於本土特有之基因型是值得懷疑的。目前雖已有商業化的試劑可用來偵測 IgG 抗體，但因為病毒本身基因的變異與檢驗試劑抗原的不同，臨床分子診斷上，該病毒感染偵測上，尚難標準化。目前檢驗試劑主要是利用發展自緬甸基因型和墨西哥基因型的重組抗原或合成氨基酸(synthetic peptides)，它們是比較常碰見的病毒基因型。而美國基因型和中國基因型的測定則不包括在目前的檢驗中。所以，有關目前 HEV 血清流行病學的報告，因所使用之試劑不同而有相當程度之差異。因此，若利用這些試劑，其檢驗結果對國內流行情形或感染所提供之知識，仍有很多討論之空間。

酵素免疫分析(enzyme immunoassays)和RT-PCR可用來做有限度的診斷，現今，尚無可用來偵測抗原(HEV antigen)之商業化試劑，但研究者可用RT-PCR的技術去偵測其存在。唯因其病毒該片斷基因之變異仍大，RT-PCR結果可能存在假陰性之結果。目前，實驗疫苗臨床實驗正在開始階段^(41, 47)。若要阻止HEV的散佈，改善衛生條件是惟一有效的方法⁽²³⁾。目前的研究證據暗示病毒有人畜共通之特性。家畜中，特別是豬，為HEV重要的傳染源或病原傳染窩(reservoir)。類似這樣的儲藏庫也許在已開發國家中也存在著，極可能是偶發臨床病例的導因^(17, 18)。

最近，Schofield 等人報告了在病毒外套膜片斷中之序列(aa578-aa607)是誘導中和病毒抗體的重要結構。也是目前發現幾個基因型中氨基酸序列同質性(Homology)極高之片斷^(18, 19)。本實驗主要目的，亦即，利用人工合成之氨基酸來偵測國人血清中含有該中和抗體(在本文中簡稱anti-HEVne)之盛行率。藉此，期望能實際求證過去國人研究結果，並可瞭解該病毒在台灣一般人可能的流行情形及其可能之傳染途徑。

材料與方法

研究之國人族群

共分為以下各組：

表一：研究族群分類

組別	族群年齡	檢體總數	平均年齡	性別比例(男/女)
1	4-5 歲	100	4.4	1.13(53/47)
2	20-40 歲	250	32.5	1.17(135/115)
3	40-60 歲	300	53.1	1.33(171/129)
4	60-80 歲	300	71.9	0.85(138/162)
5	孕婦	300	33	0(0/300)
	總計	1250	44.7	

這些檢體分別從台南捐血中心、臺北捐血中心、臺北市立忠孝醫院、宜蘭羅東博愛醫院、彰化基督教醫院、屏東基督教醫院、衛生署澎湖醫院等收集得來。

臨床檢體對照組

急性B型、C型肝炎病患血清、慢性B型/C型肝炎帶原者血清、急性A型肝炎血清、急性腸病毒感染血清、急性胃炎血清等分別收集自台南捐血中心、臺北捐血中心、臺北市立忠孝醫院、宜蘭羅東博愛醫院、彰化基督教醫院、屏東基督教醫院、衛生署澎湖醫院。在本研究裡，我們利用過去曾經收集之一位國人因至印度、巴基斯坦感染之急性E型肝炎血清、E型肝炎癒後血清有陽性反應為陽性對照⁽²²⁾。另外，利用一腸病毒感染但未曾感染肝炎之學童血清當作陰性對照。

酵素免疫分析試劑(Enzyme-linked immunosorbent assays; ELISAs/EIA)

本實驗利用專一性極高病毒外套膜(ORF2)片中引起中和抗體之序列(aa578-aa607)來製作檢驗抗體之試劑。該氨基酸序列之決定是由本實驗室分離出之五種本土型HEV ORF2基因序列後與全球各地已知序列之其他八種病毒株或基因型之同樣片斷比對後採用。經過我們利用人工合成之氨基酸來處理(coating) 96孔微量滴定盤。該氨基酸 (Synthetic Peptides;

Laboratory of Molecular Diagnosis, Tuebingen)之使用是依據商品說明書作業程序操作且必需先以 1%DMSO 溶解後稀釋使用。

96 孔微量滴定盤(Nunc Immunoplate, Denmark)每一小孔可吸附 500ng 合成氨基酸(溶於Phosphate-buffered saline;PBS) 當抗原密封置於室溫。隔夜後，取出滴定盤後以PBS沖洗二次即可加入抗體反應。測試抗體之反應過程如下：在 96 孔微量滴定盤孔分別加入 10 μ l待測血清檢體及 200 μ l稀釋液(PBSTA; PBS with 0,05%Twenn 20/1,25%Albumin)。在 37°C下作用二小時後，以 200 μ l沖洗液(PBST; PBS with 0,05%Twenn 20)沖洗五次後，再加入 100 μ l山葵過氧化酶-單株抗體(HRP-conjugated human IgG或IgA; 1:6000)在 37°C下作用半小時反應。反應後，以 200 μ l稀釋液再沖洗五次後，再加入 100 μ l含 0.1% O-phenylenediamine (OPD)及 0.03%過氧化氫檸檬酸液呈色。室溫暗室呈色 30 分鐘後，加入 50 μ l停止液(Stop solution; 2N硫酸溶液，停止呈色反應。最後，實驗結果可利用 96 孔微量滴定盤吸光儀測試在波長 490nm之吸光度(Optical Density)。Anti-HEV IgM測定則是利用 μ -chain specific 原理修正抗原為HEV改裝而成⁽⁴⁹⁾。

結果判定是依據三個陰性對照組血清吸光度之平均值加上 500 當作篩選值。凡樣品吸光度大於或等於篩選值者判為陽性，小於篩選值者判為陰性。所有陽性樣品均為重覆測試二次結果之判定。

本研究中，也使用一商用 anti-HEV 試劑當對照，實驗步驟完全依據商品說明書作業程序操作。

HEV RNA偵測

HEV RNA偵測是使用HEV基因組專一之引子進行反轉錄酵素聚合反應(Reverse-Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR)。血清檢體經冷凍運輸至本實驗室，分裝後保存於-20°C冰箱內。使用 Qiagen RNA萃取試劑(QIAGEN Ltd, Crawley, UK) 試劑直接從 100 μ l血漿(或血清)分離RNA。然後，再將分離出的RNA溶入 50 μ l緩衝液內。HEV-RNA是使用HEV

專一的啟動引子，在 50 μ l PCR mixture 混合液 (內含 5 μ l 分離出的 DNA，1 x PCR buffer，0.2mM deoxynucleoside triphosphates，2 mM magnesium chloride，0.5 U Tag polymerase)，以及使用溫度循環器 Perkin Elmer (PE4800) 機器的條件下進行反轉錄反應 (Reverse Transcription) 及複製 (amplification) 完成的。該聚合酶反應為二輪式 (nested)。第一輪的反轉錄反應並複製進行第二輪的複製所使用之引子之濃度為 10pmol。所使用之引子序列如下：

表二：HEV RNA 基因體專一引子

引子代號	引子序列	使用關係	複製基因
EORF2	5'-ACAGAAATTRATTTTCGTCGG-3'	External sense	ORF2
EORF2	5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT T-3'	External antisense	ORF2
EORF2	5'-TTGTCTCGGCCAATGGCGA-3'	Internal sense	ORF2
EORF2	5'-TTT TTT TTT CCA GGG AGC -3'	Internal antisense	ORF2
EORF123	5'-GGGTTGACAAATGTTGCG-3'	External sense	ORF123
EORF123	5'-GTT GTG AAA CGA CAT CG-3'	External antisense	ORF123
EORF123	5'-TGT TTA TGG AGT TAG CCC-3'	Internal sense	ORF123
EORF123	5'-GAA TCA ACC CTG TCA CCC-3'	Internal antisense	ORF123
EHVR	5'-AAR ACC TTC MGS ACG WCG -3'	External sense	HVR
EHVR	5'-GAG CAA GTC TCC CGG TAS GC-3'	External antisense	HVR
EHVR	5'-AGC GSC WTT CGC TGA CCG G -3'	Internal sense	HVR
EHVR	5'-GGT ASG CWG CCT CAA GCC T-3'	Internal antisense	HVR

反轉錄反應為在 50°C，一小時完成後進行複製。每輪在複製時的溫度循環變化如下：94°C，30 seconds；58°C，30 seconds；72°C，30 seconds。總共 25 cycles。結果為陽性之檢體，則將有合成之 PCR 產物。經過 Ethidium bromide 染色後，該產物可以在 2% agarose 紫外光照射下觀察出來。為求得

該PCR結果的專一性，陰性的控制組被重複的利用該引子來偵測。

在每一個實驗裡，一個含有HEV-RNA的血清檢體（原檢體經基因分析確認後，編號為E101）及另外一個未含HEV-RNA的血清檢體（原檢體經重覆PCR確認後為陰性，編號為E102）被分別利用來當成陽性及陰性對照。利用以前作者開發的方法估計，該檢體含HEV-RNA量約為 10^7 - 10^8 分子/毫升⁽¹⁵⁾。本實驗所使用之偵測HEV-RNA方法之敏感度大約為 10-100 HEV-RNA分子/毫升。

複製後之 HEV DNA 經過純化 (QIA quick PCR purification kit; Qiagen LTD, Germany)後可直接進行基因序列分析。所使用自動序列分析儀為 ABI 310 automated DNA sequencer; Applied Biosystems, Forster City, CA 並利用螢光染料終結循環方法(fluorescent dye terminator cycle method) 執行。

出國旅遊調查與統計方法

血清陽性人員或病人或健康人，除了邀請醫師協助調查外，均進行電話查訪及問卷資料調查(同時進行)。調查內容除了個人基本資料、臨床症狀、肝膽指數變化、發病期間、就醫情形等。本研究進行之重點調查為急性之陽性患者是否曾經至發展中國家或流行區(泰國或中國大陸等)旅遊、是否有輸血經驗或與動物接觸等。本實驗所使用之統計方法主要為 Sigma Plot 之 t-test。P 值低於 0.05 在統計上有意義。

結 果

Anti-HEVne試劑之可用性

如表三，該試劑對急性 B 型、C 型肝炎病患血清、慢性 B 型/C 型肝炎帶原者血清、急性 A 型肝炎血清、急性腸病毒感染血清、急性胃炎血清等均無反應。但對急性 E 型肝炎血清、E 型肝炎癒後血清有陽性反應。另外，為了檢測高黃疸可能引起的偽陽性，我們也使用慢性 B 型、C 型肝炎帶原者血清（含

高黃疸；Total Bilirubin >5mg/dl) 來當對照 (表三之第 11,12 項)。

在本研究裡，我們利用過去曾經收集之一位國人因至印度、巴基斯坦感染國人之急性陽性血清為陽性對照⁽²²⁾。另外，利用一腸病毒感染但未曾感染肝炎之學童血清當作陰性對照。重覆 20 次偵測這些檢體，結果顯示其穩定性及重覆性極高。陰性對照血清吸光度之平均值為 0.125；陽性吸光度之平均值為 0.876 (圖三)。除此以外，利用該試劑偵測前述該名急性患者癒後血清抗體有明顯下降(請見表三之 6,7,8 項)。以上種種證據顯示，該試劑對偵測HEV抗體與其感染之可用性。另外，我們也利用一商用HEV試劑與anti-HEVne試劑偵測各國確定病例血清 (表四)。結果發現，兩種試劑基本上差異不大，但該商用試劑對一大陸及一台灣血清反應極差(表四之 8,13 項)。

流行情況

結果顯示，在所選定之國人族群裡，血清陽性率在五至六歲，二十至四十歲，四十至六十歲，六十至八十歲，孕婦分別為 2%，8%，13%，11% 及 6%。(表五) 此項結果顯示，HEV 的感染似乎在 40-60 歲年齡層較高。

在第一組至第四組偵測結果顯示有近七成之陽性為男性(67/94；72%)。相反的，只有三成是女性(27/94；28%)。顯示男性感染的機會較女性為高($p<0.05$)。

經過旅遊或出國調查，在 16 名有疫區旅遊經驗裡有 9 位(56%)曾到大陸旅行。四位(25%)、二位(12%)、一位(6%)曾分別到印度、巴基斯坦、越南居留超過二星期以上。這些疑似急性 HEV 肝炎病毒感染之臨床及實驗室數據如表六。

討論

在一般參加健康檢查的國人中，利用本實驗所用之抗原(ORF2)在血清中偵測出anti-HEVne IgG的陽性率為 8.9% (112/1250)。因不同之抗原，對

病毒之偵測具有不同之專一性與敏感度。因此，在解釋該結果，必需要注意的是，這樣的陽性率是利用本實驗所用之抗原定義下，所得之結果。根據文獻，HEV序列仍有相當程度之變異⁽⁸⁻¹²⁾。使用不同之抗原具有不同之敏感度，當然結果就會不一樣。這樣的結果，尤其與他人結果比較時，必需要先行核對的。本實驗所利用之抗原為能中和HEV的重要片斷，因此，測出來之抗體，理論上應具有中和HEV病毒之抗體anti-HEVne。

本實驗所使用的是能在感染後產生E型肝炎結構區ORF2 氨基酸製作而成之中和性抗體試劑。因此，他所能偵測出的中和抗體也只侷限於該項專一性。理論上，測出之中和抗體代表的是一部份保護性抗體而已；並不是對此病毒抗原的全部抗體，因此，他的結果陽性率較以往發表的為低是預期的。但因它代表著能中和病毒抗原的抗體，因此預期含有該抗體的人對HEV感染應具有保護能力。本研究結果得知，anti-HEVne與商用試劑基本上差異不大，但該商用試劑對一大陸及一台灣血清反應極差。可能是該商用試劑所使用之抗原無法模擬(simulate)特定大陸及台灣病毒株（目前大部份被歸類為Genotype 4）之結構性結構體(conformational epitopes)導致。此點是可以合理推論的。如前言所提，目前商用檢驗試劑主要是利用發展自緬甸基因型和墨西哥基因型的重組抗原或合成氨基酸(synthetic peptides)所製作的。它們是比較常碰見的病毒基因型。而美國基因型、大陸和台灣基因型的測定則不包括在目前的商用檢驗試劑中。因自製anti-HEVne試劑具有本土特點，成為該試劑具比較性之優點。此點與國內其他作者對目前的商用檢驗試劑之分析結果相異⁽⁵⁰⁾。

本研究，利用此新開發之檢驗方法求證了國人anti-HEV血清陽性率。學齡前兒童，有未出國之陽性病例(2%)暗示著該病毒在國內環境中存在之可能性。推測該病毒可能以一種低傳染性(low circulation/sporadic)的方式在國內流行。在選定的研究族群裡，anti-HEVne在 40-60 歲之族群有較高之陽性率。跟據過去之追蹤報導，從急性E型肝炎中復原與產生高濃度(效價，

titer)的anti-HEV抗體間可能有關係，但是隨時間的過去，抗體的效價就會逐漸下降⁽³⁵⁾。這樣結果可能暗示年齡層較大之族群有再次感染之可能性。

有關臺灣人族群中HEV IgG之陽性率，過去曾有報告^(16-17, 30-32)。他們的結果與本實驗結果有些不同。我們現在所得盛行率的結果較前人的結果低^(21, 24)。這些研究結果之差異除了可能與研究族群之取樣及取樣地區有關外，也與所使用試劑之特異性相關。因為，所測得之中和抗體只是宿主感染後產生所有有關anti-HEV的部份族群而已。本研究所得血清陽性率結果較以上各報告為低是預期的。

依據各樣研究結果顯示，嚴重病例之早期感染，膽紅素迅速提高、肝指數不正常與anti-HEV IgM/IgA/IgG等等均是重要之血清標幟變化。雖然在臨床或病理上，HEV感染在引起的表徵範圍很廣且多元，從無症狀到非常嚴重之肝膽疾病等均被報導過。HEV的無症狀或不顯性感染以前曾有間接證據⁽²⁸⁾。最近，Nicand 等人也報告HEV的無症狀或不顯性感染並直接證實感染人能排出病毒核酸⁽³⁶⁾。截至目前，相關台灣HEV感染之臨床報導並不多⁽²⁵⁾。在過去的研究裡，雖然利用突然高濃度抗體陽性及/或病毒核酸陽性及/或核醫掃描^(45-46, 48)可篩選出臨床嚴重黃疸病例(Cholestasis)⁽⁵⁾及輕微膽囊炎(Cholecystitis)⁽³³⁾，但仍有部份血清陽性健康人，無法敘述其過去可能之病史。究竟無症狀或不顯性感染佔HEV感染多少比例，尚有待釐清。因本次研究主要以血清陽性率及可能之傳播途徑為主軸，有關利用該方法篩選之國人急性個案之詳細資料、病毒基因序列及臨床特徵等往後將陸續報導。

概略來說，E型肝炎是造成急性肝炎的主要致病因，主要是經由口糞傳遞，特別在發展中國家相當流行。但從本實驗結果得知，國人族群裡，的確含有anti-HEVne（亦即曾感染過HEV）。雖然在16例可追蹤之陽性個案裡，可確定曾至發展中國家或流行區旅遊。依此調查結果分析，中國大陸(56%; 9/16)仍是可能主要境外移入型感染源⁽³⁸⁾。此點與Wu等人⁽²⁹⁾之研究

結果相似。該結果建議國人至大陸旅遊應特別注意飲食衛生，切勿生飲生食^(23,34)。然而其他案例的來源，例如未有旅遊記錄的陽性案例加上學齡兒童 2%盛行率，暗示HEV在台灣本土感染的可能性極大。

由於該病毒能夠感染多種動物（猴子、豬、大鼠、狗、雞⁽⁵²⁾等等），因此該病毒在國內之傳染，可能也與這些人畜相關其他途徑感染有關。特別是豬隻^(25-26, 47)。在台灣約有 1%以上的豬隻血液中能偵測到病毒核酸 RNA⁽²⁵⁾。這表示這些家畜排出之糞便裡，極有可能含有傳染性的病毒顆粒，影響水源及環境。Hsieh 等人⁽²⁶⁾曾報告國內的豬肉販有極高血清陽性率(26.7%)，但由於研究族群較小，尚有待繼續擴大檢體數量來證實及追蹤。最後，因為感染HEV後，病毒在血液中存在時間(Viremia phase)可能很長，外加上無症狀感染，所以我們並不能排除它血源性傳染途徑的可能性⁽⁴²⁻⁴⁴⁾。台灣之E型肝炎感染，是否在疾病之發生上，扮演重要角色，仍有許多值得探討之處。

誌 謝

本文之完成需感謝許須美副局長之鼓勵支持、台北市立忠孝醫院林明賢主任、邱展賢主任，羅東博愛醫院楊增慧主任、羅勝雄主任，彰化基督教醫院蘇維文醫師、施木青主任、盧錫祺博士，屏東基督教醫院李洮俊副院長，衛生署澎湖醫院陳聰安主任等人對於收集檢體之襄助、德國分子診斷實驗室陳淑媛博士對氨基酸合成之諮詢、研究助理陳麗如對實驗技術上之協助。

撰稿者:王傳亨

行政院衛生署疾病管制局檢驗研究組

參考文獻

1. Balayan MS. Epidemiology of hepatitis E virus infection. *J. Viral Hepatitis* 1997;4:155-165.
2. Purcell RH, Hepatitis E virus. In : Fields BN , Knipe DM , Howley PM , eds. *Fields Virology*, 3rd edn., Philadelphia : Lippincott-Raven. 1992; 2831-2843pp.
3. Harrison TJ. Hepatitis E virus – an update. *Liver* 1999; 19:171-176.
4. Labrique AB, Thomas DL, Stoszek SK, et al. Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiologic Reviews* 1999; 21:162-179
5. Wang CH, Lin MH, Chiu CH, et al. Cholestasis and Hepatitis E infection: data from Taiwan. *Hepatology* 2000; Falk Symposium No.117; May 4-6, 2000, Munich (Germany).
6. Huang CC, Nguyen D, Fernandez J. et al. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus. *Virology* 1992;191:550-558.
7. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology* 1991;185:120-131.
8. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, et al. ELISA for antibody to hepatitis E virus (HEV) based on complete open-reading frame 2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates. *J. Infectious Diseases* 1993; 168:369-378.
9. Zanetti AR, Schlauder GG, Romano L, et al. Identification of a novel variant of hepatitis E virus in Italy. *J. Med Virol.* 1999; 57:356-360.
10. Wang Y, Ling R, Erker JC, et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1999;80:169-177.
11. Wang Y, Zhang H, Ling R, et al. The complete sequence of hepatitis E virus genotype 4 reveals an alternative strategy for translation of open reading frames 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 2000; 81:1675-1686.

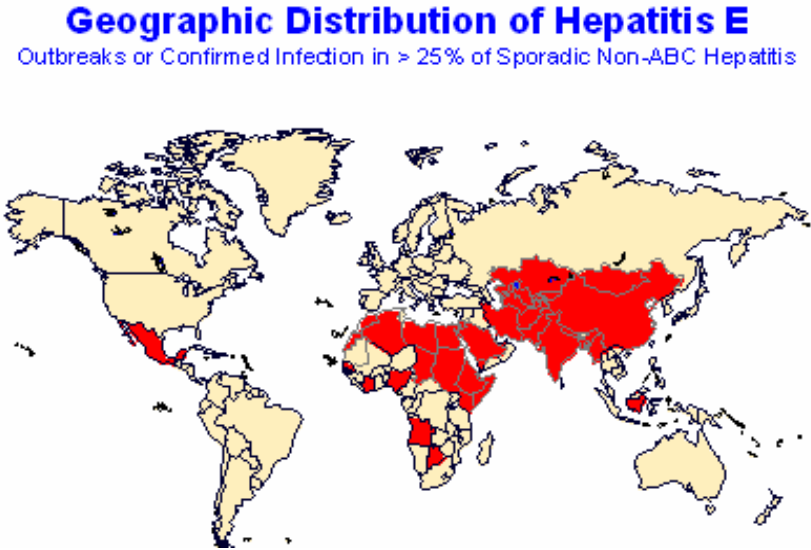
12. Erker JC, Desai SM, Schlauder GG, et al. A hepatitis E variant from the United States: molecular characterization and transmission in cynomolgus macaques. *Journal of General Virology* 1999; 80:681-690
13. Kabrane-Lazizi Y, Zhang Mingdong, Purcell RH, et al. Acute hepatitis caused by a novel strain of hepatitis E virus most closely related to United States strains. *J.Gen.Virol.* 2001; 82:1687-1693.
14. Mast EE, Alter MJ, Holland PV, et al. Hepatitis E virus antibody serum panel evaluation group. Evaluation of assays antibody to hepatitis E virus by a serum panel. *Hepatology* 1998;27:857-61.
15. Turkoglu S, Lazizi Y, Meng J, et al. Detection of hepatitis E virus RNA in stools and serum by reverse transcription-PCR. *J.Clinical Microbiology* 1996; 34:1568-1571
16. Khudayakov YE, Lopareva EN, Jue DL, et al. Antigenic domains of the open reading frame 2-encoded protein of hepatitis E virus. *J.Clin.Microbiol.* 1999; 37:2863-2871.
17. 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.USA* 1997; 94:9860-5.
18. Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J.Infectious Diseases* 2000; 181:449-455.
19. Tanaka E, Takaeda N, Tian-Chen L, et al. Seroepidemiological study of hepatitis E virus infection in Japan using a newly developed antibody assay. *J.Gastroenterol.* 2001; 36:317-21.
20. Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, et al. Identification of phage display and characterization of two neutralizing Chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J.Virol.* 2000;74:5548-5555.
21. Hsieh SY, Yang PY, Ho YP, et al. Identification of a novel strain of hepatitis E virus responsible for sporadic acute hepatitis in Taiwan. *J.Medical.Virology* 1998;55:300-304.
22. Wang CH, Lin MH, Chiu CH, et al. Hepatitis A and hepatitis E

- co-infection in Taiwan. 10th International Symposium on viral Hepatitis and Liver Disease. April 9-13, 2000, Atlanta USA.
23. Smith JL. A review of hepatitis E virus. *J Food Prot.* 2001 Apr;64(4):572-86
 24. 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(11):3915-8.
 25. Wu IC, Chen CM, Chiang TY, et al. Clinical and epidemiological implications of swine hepatitis E virus infection. *J Med Virol.* 2000 Feb;60(2):166-71.
 26. 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 Dec;37(12):3828-34.
 27. Chu CM, Lin SM, Hsieh SY, et al. Etiology of sporadic acute viral hepatitis in Taiwan: the role of hepatitis C virus, hepatitis E virus and GB virus-C/hepatitis G virus in an endemic area of hepatitis A and B. *J Med Virol.* 1999 Jun;58(2):154-9.
 28. Ool WW, Gawoski JM, Yarbough PO, et al. Hepatitis E seroconversion in united states travelers abroad. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1999;61:822-824.
 29. 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 May;27(5):1415-20.
 30. Peng CF, Lin MR, Chue PY, et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among healthy individuals in southern Taiwan. *Microbiol Immunol.* 1995;39(9):733-6.
 31. Tsai JF, Jeng JE, Chang WY, et al. Antibodies to hepatitis E and A viruses among patients with non-alcoholic chronic liver disease in Taiwan. *Scand J Gastroenterol.* 1994 Jul;29(7):651-4.
 32. Lee SD, Wang YJ, Lu RH, et al. Moeckli R Seroprevalence of antibody to hepatitis E virus among Chinese subjects in Taiwan.

- Hepatology. 1994 Apr;19(4):866-70.
33. Tschen SY, Lin MH, Su CC, et al. Cholecystitis and hepatitis E virus infection. XI. International Congress of Liver Diseases: Liver Cirrhosis and its Development. October 22-24, 1999 Basel (Switzerland). P. 168
 34. Schwartz E, Jenks NP, Van Damme P, et al. Hepatitis E virus infection in travelers. Clin.Infect. Dis 1999; 29:1312-14.
 35. Wang CH, Flehmig B, Tschen SY. First case of acute hepatitis E infection acquired in Germany: 5 years' follow-up. APASL Commemorative International Congress on Viral Hepatitis , Prevention and Control. 16-19 Feb 2000, Singapore.
 36. Nicand E, Grandadam M, Teyssou R, et al. Viraemia and faecal shedding of HEV in symptom-free carriers. Lancet 2001; 357:68-9.
 37. Pillot J, Tuerkoglu S, Dubreuil P, et al. Cross-reactive immunity against different strains of the hepatitis E virus transferable by simian and human sera. C.R.Acad.Sci.Paris 1995;318:1059-64.
 38. Wang CH. Hepatitis E virus infection in Taiwanese travelers, World Travel Medicine Conference Exhibition 2000, June 23-26, 2000 Taipei, Taiwan.
 39. Wang CH, Lin MH, Chiu CH, et al. Biliary tract obstruction and hepatitis E virus infection. Antiviral Therapy 2000; 5 (Suppl.1):E5.
 40. Lin MH, Chiu CH, Su CC, et al. Hepatitis E virus infection visualized by quantitative hepatobiliary scintigraphy: induction of hepatocellular death by bile salts. Antiviral Therapy 2000; 5:E6.
 41. Stevenson P. Nepal calls the shots in hepatitis E virus vaccine trial. The Lancet 2000; 355:1623.
 42. Wang CH, SY Tschen. Hepatitis E virus infection by multiple transfusions in an intensive unit: a case report. Anaesthesiologie.Intensivmedizin Notfallmedizin.Schmerz-Therapie (AINS) 1998; 33:627.
 43. Arankalle VA, Chobe LP. Retrospective analysis of blood transfusion recipients:evidence for post-transfusion hepatitis E. Vox Sang. 2000; 79:72-74.

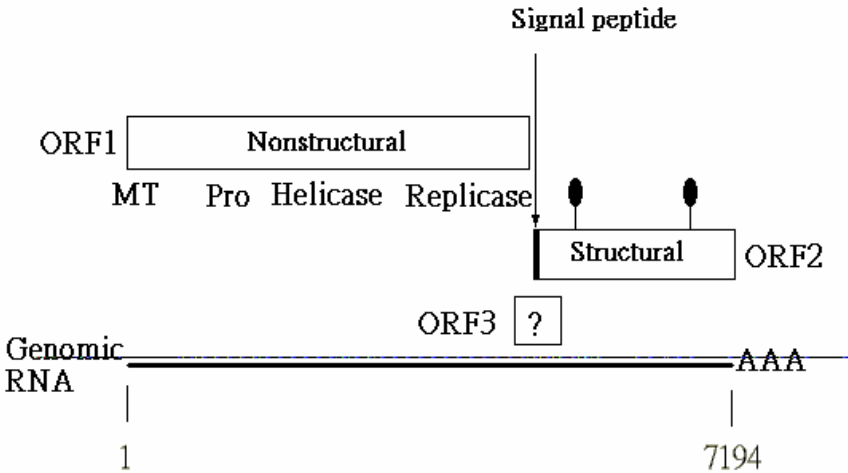
44. Wang CH, Flehmig B, Moeckli R. Transmission of hepatitis E virus by transfusion. *The Lancet* 341; 825-826.
45. Wang CH, Lin MH, Wu LC, et al. Differential Diagnosis of Hepatitis E virus infection by biliary bowel transition time via hepatobiliary scintigraphy. XVI International Bile Acid Meeting, *Biology of Bile Acids in Health and Disease*, October 12-13, 2000 Den Haag (The Netherlands).
46. Tschen SY, Lin MH, Yen MH, et al. Increased nitric oxide levels in Taiwanese liver patients with elevated bilirubin levels: implication for severe inflammation and hepato-biliary pathogenesis. XVI International Bile Acid Meeting, *Biology of Bile Acids in Health and Disease*, October 12-13, 2000 Den Haag (The Netherlands)
47. Fricker, J. Hepatitis E vaccine *Mol.Med. Today* 1996; 2: 137.
48. Henderson CW. Hepatobiliary scintigraphy helps determine severity of hepatitis e virus infection. *Medical Letter on the CDC & FDA* 2000;6:3.
49. Zoeller LG, Yang SI, Goett P, et al. A novel μ -capture enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant proteins for sensitive and specific diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome. *J.Clin.Microbiol.* 1993;31:1194-1199.
50. 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.
51. http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/hep_e/slide_5.htm
52. Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis – splenomegaly syndrome in the United States. *J.Gen.Virol.* 2001; 82:2449-2462.

圖一 E型肝炎病毒(Hepatitis E virus; HEV)感染全球分佈圖⁽⁵¹⁾



圖二： HEV RNA基因組的排列及其功能⁽³⁾

其三個 open reading frames (ORFs) 的位置： 1) ORF1：非結構性蛋白區含有之基因包括 methyltransferase (MT)，potential protease(Pro)，Helicase 和 replicase (RNA-dependent RNA polymerase) domains； 2) ORF2：結構性蛋白區含有之基因帶有 amino-terminal signal peptide 的結構蛋白和可能的糖化部位 (glycosylation sites)； 3) ORF3：介於非結構性蛋白區 ORF1 及結構性蛋白質區 ORF2，功能尚不清楚。

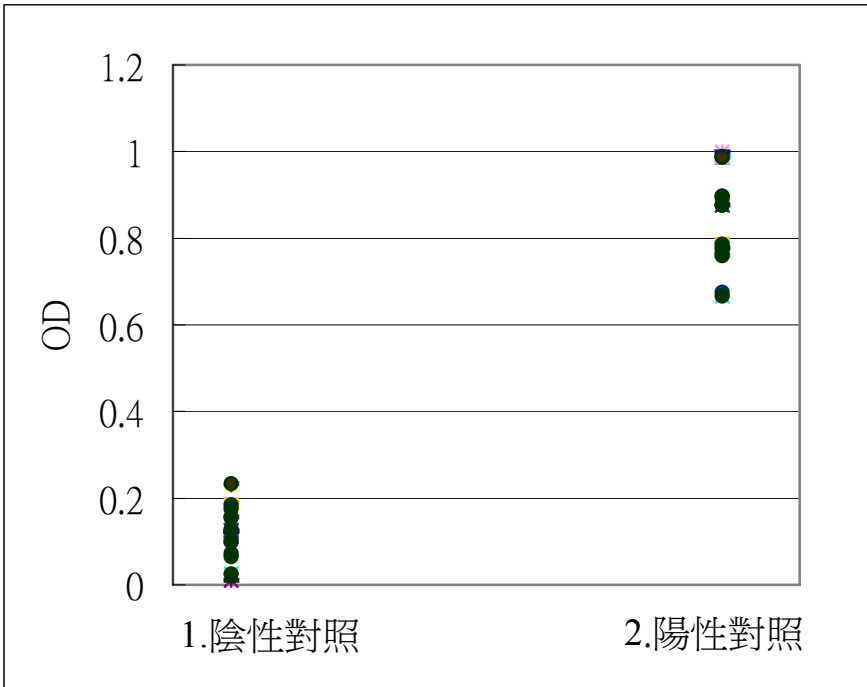


表三：anti-HEVne 試劑對各種臨床血清的反應（篩選吸光值為 0.589）

項次	臨床血清檢體種類	血清數量	平均吸光值	結果
1	急性 B 型肝炎血清	3	0.156	陰性
2	急性 C 型肝炎血清	2	0.127	陰性
3	慢性 B 型肝炎帶原者血清	5	0.122	陰性
4	慢性 C 型肝炎帶原者血清	5	0.124	陰性
5	急性 A 型肝炎血清	2	0.109	陰性
6	急性 E 型肝炎血清	2	0.987	陽性
7	E 型肝炎癒後一年血清	1	0.754	陽性
8	E 型肝炎癒後二年血清	1	0.554	陽性
9	急性腸病毒感染血清	1	0.087	陰性
10	急性胃炎血清	20	0.108	陰性
11	慢性 B 型肝炎帶原者血清 (含高黃膽；Total Bilirubin >5mg/dl)	5	0.129	陰性
12	慢性 C 型肝炎帶原者血清 (含高黃膽；Total Bilirubin >5mg/dl)	7	0.183	陰性

圖三：陽性與陰性對照之吸光值

在本研究裡，我們利用過去曾經收集之一位國人因至印度、巴基斯坦感染國人之急性陽性血清為陽性對照⁽²²⁾。另外，利用一腸病毒感染但未曾感染肝炎之學童血清當作陰性對照。重覆 20 次偵測這些檢體，結果顯示其穩定性及重覆性極高。陰性對照血清吸光度之平均值為 0.125；陽性吸光度之平均值為 0.876。



表四：利用 anti-HEVne 試劑及一商用 HEV 試劑偵測各國確定病例血清 T1 為商用試劑；T2 為 anti-HEVne 試劑；表中值為吸光值(OD)/篩選值(Cutoff)比值

編號	血清代號	病人國籍	病毒感染源	提供者	T1	T2
1	G001	德國	立陶宛	德國杜賓根大學醫學院	2.1	1.7
2	G002	德國	非洲	德國杜賓根大學醫學院	1.9	2.1
3	G003	德國	印度	德國杜賓根大學醫學院	1.2	1.9
4	G004	德國	希臘	德國杜賓根大學醫學院	2.4	1.8
5	F001	法國	越南	法國巴黎巴斯德研究所	1.2	2.5
6	F002	黑猩猩	南非 ⁽³⁷⁾	法國巴黎巴斯德研究所	1.1	1.4
7	F003	黑猩猩	肯亞 ⁽³⁷⁾	法國巴黎巴斯德研究所	2.3	2.9
8	T001	台灣	中國青島	中華民國衛生署疾管局	0.4	2.1
9	T002	台灣	中國福建	中華民國衛生署疾管局	1.6	2.4
10	T003	台灣	巴基斯坦	中華民國衛生署疾管局	1.4	1.2
11	T004	台灣	印度	中華民國衛生署疾管局	2.3	2.5
12	T005	台灣	台灣	中華民國衛生署疾管局	2.1	0.9
13	T006	台灣	台灣	中華民國衛生署疾管局	1.7	2.1
14	T007	台灣	台灣	中華民國衛生署疾管局	0.3	1.1
15	T008	台灣	台灣	中華民國衛生署疾管局	2.8	2.3

表五：anti-HEVne 在國人各種族群的陽性率

組別	研究國人族群分類 (數目)	HEV IgG 陽性(%)	HEV IgG 陰性(%)	平均年齡
1	四歲至五歲 (100)	2(2)	98(98)	4.4
2	二十歲至四十歲 (250)	20(8)	230(92)	32.5
3	四十歲至六十歲 (300)	33(11)	267(89)	53.1
4	六十歲至八十歲 (300)	39(13)	261(87)	71.9
5	孕婦 (300)	18(6)	282(94)	33
	總計 (1250)	112	1138	44.7

表六 急性 HEV 感染病人之臨床及實驗室數據

1:縮寫; M:男性 F;女性; Pos:陽性; Neg:陰性

2:檢體收集並檢測時間:該時間為肝指數最高值(peak)出現後檢體收集並檢測時間日期)

號碼及性別	肝指數 GPT (U/L)	膽紅素 Bil (mg/dl)	IgG 抗體 Anti-HE V	IgM 抗體 Anti-HEV	IgA 抗體 Anti-HEV	病毒核酸 HEVRNA	檢體採 檢時間 2	旅遊經驗
No.1/M	1082	12	Pos	Pos	Pos	Pos	5	印度
No.2/M	802	10	Pos	Pos	Pos	Pos	6	中國
No.3/M	342	2	Pos	Pos	Pos	Neg	8	泰國
No.4/M	253	36	Pos	Pos	Pos	Pos	12	中國
No.5/M	86	2	Pos	Pos	Pos	Neg	14	中國
No.6/M	358	9	Neg	Pos	Neg	Pos	4	印度
No.7/M	36	1	Pos	Pos	Pos	Neg	22	中國
No.8/M	1162	23	Pos	Pos	Pos	Pos	4	中國
No.9/M	165	1.2	Pos	Pos	Pos	Pos	8	中國
No.10/M	45	0.9	Pos	Pos	Pos	Neg	16	巴基斯坦
No.11/M	43	0.8	Pos	Pos	Pos	Pos	12	印度
No.12/M	76	1	Pos	Pos	Pos	Pos	7	中國
No.13/M	1238	6.9	Neg	Pos	Neg	Pos	4	中國
No.14/M	34	0.2	Pos	Pos	Pos	Neg	19	巴基斯坦
No.15/M	765	1.8	Pos	Pos	Pos	Neg	24	越南
No.16/M	888	2.8	Neg	Pos	Neg	Pos	3	中國