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

99 年度成果報告

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 (6)

三、前言 (9)

四、材料與方法 (14)

五、結果 (20)

六、討論 (26)

七、結論與建議 (31)

八、計畫重要研究成果及具體建議 (32)

九、參考文獻 (33)

十、表 (39)

十一、圖 (43)

共　(44)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：本計劃探討以 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 300 位，以及回溯性篩檢 332 位各醫院留存之非 A 非 B 非 C 型肝炎病人，外加 20 位 A 型肝炎、66 位 B 型肝炎(47 位慢性與 19 位急性)、19 位 C 型肝炎之血清，並收集 281 位對照組之血清(非 A 非 B 非 C 型肝炎接受體檢者剩餘血清)，總計 718 例，檢測其中的 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李天成博士及疾管局使用之 HEV ELISA 試劑偵測 E 型肝炎抗體，加上反轉錄聚合酶鏈反應(RT PCR)偵測 E 型肝炎病毒 RNA，來評估 4 種 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：本研究完成疑似急性 E 型肝炎之血清樣本分析，包含 300 位疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本，其中有 114 位 anti-HEV IgG 陽性，為急性 E 型肝炎之疑似病例，而有 9 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA

陽性，為急性 E 型肝炎之確定病例。其中 4 位為第一型，1 位為第三型，另外 4 位為第四型。急性 E 型肝炎確定病患均為男性，平均發病年齡為 48.6 ± 16.4 歲。居住地點以北部為主。這些病患在發病 3 個月內有出國旅行史者有 6 位(66.7%)，其中尼泊爾 3 位、中國大陸 2 位、印度 1 位。而在 114 位急性 E 型肝炎疑似病患中，男性 86 位，女性 28 位；平均發病年齡為 52.6 ± 16.9 歲；男性發病年齡較女性為大（男性 54.5 ± 15.8 歲；女性 46.6 ± 18.7 歲，P 值 0.030）。居住地點北部 36 位、中部 21 位、南部 22 位、東部 3 位。在旅行史方面，114 位急性 E 型肝炎疑似病患中，有 16 位有出國旅行史，其中中國大陸 10 位、尼泊爾 3 位、印度 2 位以及越南 1 位。急性 E 型肝炎疑似病患於發病過程中有 10 位患者死亡，死亡率為 8.8%；其中男性 9 位，女性 1 位，男女之間死亡率無明顯差別（P 值 0.447）；但死亡之患者平均年齡明顯較存活者為高（死亡者 62.7 ± 8.5 歲；存活者 51.6 ± 17.2 歲，P 值 0.003）。此外，亦已完成 706 位醫學中心以及 12 位區域醫院之血清分析。經 ELISA 檢測，有 22 位以 RT-PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，其中 3 位為第一型， 19 位為第四型。對疾管局疑似急性 E 型肝炎之血清樣本的檢測，若以 RT-PCR 或 Anti-HEV IgM 任一有陽性為診斷之金字標準，比較五種試劑中，以 RW IgG 之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為 61.2%、88.8%、61.2%以及 88.8%；且 AUROC 值為 0.750 相對為佳；在各

醫院的血清標本檢測，則以李天成博士提供之試劑較佳，其 AUROC 值為 0.732。

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：台灣仍有散在性之急性 E 型肝炎發生，但主要感染源仍是境外移入，快速且正確的診斷 E 型肝炎是防疫極需完成的課題。由本研究之結果發現，由李天成博士所提供、MP 以及 RW 等 3 種 ELISA 檢驗試劑，在診斷急性 E 型肝炎方面，與疾病管制局提供之試劑在陰性預測值相當。建議考慮開放 anti-HEV 試劑給醫院做為第一線篩檢，疑似病例則送疾管局確認，分析病毒基因型與危險因子，而達到 E 型肝炎防治最經濟有效的策略與可行的政策。

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 enrolled 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, stored serum samples of 332 cases with NANBNC hepatitis, 20 cases of acute hepatitis A, 66 cases with hepatitis B virus infection (47 chronic hepatitis B, 19 acute hepatitis B), 19 cases with chronic hepatitis C, and 281 cases with negative serum HBsAg and anti-HCV who had been admitted for physical check up were also included. This study compared 10 different anti-HEV IgG and IgM ELISA methods of 5 brands (ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit, ADALTIS EIAgen HEV IgM Kit, 2 ELISA kits (anti-HEV IgG and anti-HEV IgM) provided by Prof. Tian-Cheng Li, GW IgG, GW IgM, MP IgG, MP IgM, RW IgG, RW IGM) 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 300 samples from CDC. There were 114 samples with positive anti-HEV IgG (probable acute hepatitis E) and 9 samples with positive HEVRNA by RT PCR (definite acute hepatitis E). All of the 9 samples with positive HEV RNA have been sequenced and 4 were classified as

genotype 1, 1 as genotype 3 and the remaining 4 as genotype 4. All of the patients with definite acute hepatitis E were male with the mean age of presentation of 48.6 ± 16.4 years. Six of the 9 patients (66.7%) with definite acute hepatitis E had a travel history within 3 months of presentation. Of the 114 patients with probable acute hepatitis E, 86 were male and the remaining 28 were female. Male patients were older than female (54.5 ± 15.8 years vs. 46.6 ± 18.7 years, p= 0.030). Of the 114 patients, 36 lived in northern Taiwan, 21 in middle part, 22 in southern part, and 3 in eastern Taiwan. Sixteen of them had travel history. Of the places traveled, 10 to China, 3 to Nepal 3, 2 to India and one to Vietnam. Ten patients were dead with a mortality rate of 8.8%. Patients who dead in the course of acute hepatitis E were significantly older than those who were alive (62.7 ± 8.5 years vs. 51.6 ± 17.2 years, p= 0.003). No significance difference in mortality rate between genders. In addition, we have screened 706 serum samples from medical centers and 12 from local hospitals patients for anti-HEV using various kits and HEV RNA by RT PCR. Of them, 22 cases were positive for serum HEV RNA. Of the 22 cases, 3 were infected by genotype 1 and 19 by genotype 4. As regarding to the comparison of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive values among different anti-HEV assays, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive values RW IgG and RW IgM were 88.9%, 79.1%, 11.9%, 99.6% and 100%, 89.7%, 23.7%, 100%, respectively. It showed a relatively better sensitivity among various assays. However, the negative predictive values are similar. The results of anti-HEV IgG and IgM testing using different assays

also showed a similar trend, RW IgM showed relatively higher sensitivity for the diagnosis of definite acute hepatitis E and the predictive values are similar among different assays.

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

Suggestion: Sporadic AHE indeed existed in Taiwan, however, the majority of them got infection through traveling to endemic areas of HEV infection. A rapid, sensitive and accurate diagnosis of acute HEV infection is mandatory to diagnosis and control HEV infection. Based on our results, RW IgM assay provides a relatively higher sensitivity in the diagnosis of definite acute hepatitis E and suitable to be used as a first-line screening assay. However, the negative predictive values are similar among various assays. It is advised that anti-HEV assays should be open to hospitals and used as a first-line screening assay. The suspected cases are then reported to CDC and their serum samples sent to CDC for viral sequencing and risk factor analysis. This can be a practical policy to prevent and control HEV infection.

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，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。[21] 結果發現，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，如果病原體不慎汙染了水源或食物，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，目前尚無全面施打的必要。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，並與國內數所醫學中心及區域級醫院合作，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。偵測方法以日本、歐洲、新加坡及美國四種 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，來評估這些檢驗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。第二年則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。

材料與方法

研究設計與檢驗血清來源

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 300 位，並與國內數所教學醫院與及區域級醫院合作，回溯性地篩檢其非 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。兩年之研究期間回溯性篩檢 332 位各醫院留存之非 A 非 B 非 C 型肝炎病人，外加 20 位 A 型肝炎、66 位 B 型肝炎(47 位慢性與 19 位急性)、19 位 C 型肝炎之血清，並收集 281 位對照組之血清(非 A 非 B 非 C 型肝炎接受體檢者剩餘血清)，總計 718 例。

這些血清以四個廠牌的 anti-HEV IgG 與 IgM 試劑檢測，結果與疾病管制局目前使用的試劑比較，以血清 HEV RNA 陽性結果做為診斷的確定病例，來計算各種試劑診斷急性 E 型肝炎的敏感度、特異性、陽性預測值與陰性預測值。

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

本研究偵測方法將以分別源自日本（李天成博士 Tian-Cheng Li 所發表）、新加坡（MP Diagnostics, 即原先的 Gene Lab）、美國 HEV ELISA 試劑(Genway, GW)，以及德國（recomWell, Mikrogen Diagnostik）RW 試劑，實驗方法如試劑所附的操作手冊建議；本研究評估這些 E 型肝炎檢驗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。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。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℃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 (1ug/ml, 100ng/well). The plates will be incubated at 4℃ overnight.

Unbound VLPs will be removed, and the wells will bee 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℃.

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℃. 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℃ 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 H_2SO_4 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）

上反轉錄聚合酶鏈反應(RT-PCR)偵測 HEV RNA 方法如以往的文獻[16,17,47]。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’]。[16] 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℃ for 50 minutes, followed by 70℃ 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'-AYAACTCCCGAGTTTTACCCACC-3').[47] Each cycle consisted of denaturation at 96℃ for 30 seconds, primer annealing at 55℃ for 30 seconds, and extension at 72℃ for 60 seconds, followed by final extension at 72℃ 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'-TGGTTAATGTWGCSACYGGCGCG-3'), internal reverse primer 3163 (5'-GCTCAGCGACAGTWGACTGRAAA-3') under the same conditions.

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 DH5α (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

本研究共收入 1018 位血清檢體，包括 300 位疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本；以及 718 位醫院留存之血清樣本，包括 706 位醫學中心以及 12 位區域醫院之血清樣本。疾管局留存血清之病患居住地區，北基宜區有 116 位、桃竹苗區 29 位、中彰投區 44 位、雲嘉南區 51 位、高屏澎區 52 位、花東區 6 位、金門縣 1 位，其餘 1 位不詳。醫學中心部分包括台北榮民總醫院 657 位、高雄醫學大學附設醫院 22 位、高雄榮民總醫院 12 位、成大醫院 9 位、林口長庚醫院 5 位以及台北馬偕醫院 1 位；區域醫院則包括台北市立聯合醫院仁愛院區 6 位、台北市立聯合醫院忠孝院區 3 位以及振興醫院 3 位。

疾管局留存血清分析

本年度探討不同檢驗試劑對於診斷疑似急性 E 型肝炎之能力。於 300 位疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本中，疾管局檢驗試劑之 anti-HEV IgG 陽性 114 位檢體中，7 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgG 陰性 186 位檢體中，2 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性；疾管局檢驗試劑之 anti-HEV IgM 陽性 41 位檢體中，7 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgM 陰性 259 位檢體中，2 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性。李博士提供之檢驗試劑 anti-HEV IgG 陽性 46

位檢體中，7 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgG 陰性 254 位檢體中，2 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性；李博士提供之檢驗試劑 anti-HEV IgM 陽性 15 位檢體中，6 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgM 陰性 285 位檢體中，3 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性。GW 檢驗試劑 anti-HEV IgG 陽性 12 位檢體中，2 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgG 陰性 288 位檢體中，7 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性；GW 檢驗試劑 anti-HEV IgM 陽性 11 位檢體中，0 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgM 陰性 289 位檢體中，9 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性。MP 檢驗試劑 anti-HEV IgG 陽性 104 位檢體中，6 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgG 陰性 188 位檢體中，3 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性；MP 檢驗試劑 anti-HEV IgM 陽性 46 位檢體中，8 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgM 陰性 246 位檢體中，1 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性。RW 檢驗試劑 anti-HEV IgG 陽性 67 位檢體中，8 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgG 陰性 224 位檢體中，1 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性；RW 檢驗試劑 anti-HEV IgM 陽性 38 位檢體中，9 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，anti-HEV IgM 陰性 253 位檢體中，0 位以 RT PCR 方法檢測 HEV RNA 為陽性。此外，MP IgM 與 GW IgM

診斷急性 E 型肝炎之一致性並不理想，其 Kappa 值為 0.026。

若以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性為金字標準，五種 Anti-HEV IgG 的檢驗試劑之檢驗結果列於表一。疾管局試劑之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為 71.6%、71.7%、42.1%以及 89.8%；李博士所提供之檢驗試劑分別為 47.8%、89.7%、32.8%以及 82.3%；GW IgG 分別為 7.5%、97.0%、41.7%以及 78.5%；MP IgG 分別為 62.7%、73.4%、40.4%以及 87.2%；而 RW IgG 分別為 61.2%、88.8%、61.2%以及 88.8%。

比較這些試劑診斷疑似急性 E 型肝炎能力之 AUROC，結果如表二以及圖一所示。除 GW anti-HEV IgG 較差外，其餘四種試劑都有良好鑑別能力，其中以 RW anti-HEV IgG 最佳，其 AUROC 值為 0.750 ($P< 0.001$)。

醫院留存血清分析

已完成分析醫院留存血清之檢體包括 706 位醫學中心以及 12 位區域醫院之檢體，共計 718 位。分析結果若以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性為金字標準，四種 Anti-HEV IgG 的檢驗試劑之檢驗結果列於表三。以李博士所提供之檢驗試劑 anti-HEV IgG 診斷急性 E 型肝炎之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為 69.3%、80.8%、77.4%以及 73.6%；GW IgG 之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為 20.4%、88.8%、59.0%以及 58.4%；MP IgG 之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為

17.4%、91.5%、65.9%以及 54.2%；RW IgG 之敏感度、特異度、陽性預測值與陰性預測值分別為 22.1%、85.4%、58.7%以及 53.7%。

比較這些試劑診斷疑似急性 E 型肝炎能力之 AUROC，結果如表四以及圖二所示。除 GW anti-HEV IgG 較差外，其餘四種試劑都有良好鑑別能力，其中以李博士所提供之檢驗試劑最佳，其 AUROC 值為 0.732 ($P< 0.001$)。

在各組肝炎病人與健檢血清標本中，僅有一位急性 A 型肝炎病人合併血清 HEV RNA 陽性，其餘受檢血清無論 anti-HEV IgG 與 IGM 陽性與否，血清 HEV RNA 皆陰性。

急性 E 型肝炎之臨床表徵與旅遊史

於疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本中，有 9 位以 RT PCR 方法檢測 HEVRNA 為陽性，為急性 E 型肝炎確定病患。這些患者均為男性，平均發病年齡為 48.6 ± 16.4 歲。居住地點以北部為主，其中台北縣 4 位、台北市 2 位，而新竹市、嘉義市與高雄縣各有 1 位。這些病患在發病 3 個月內有出國旅行史者有 6 位(66.7%)，其中尼泊爾 3 位、中國大陸 2 位、印度 1 位。這些患者於發病過程中無死亡病例。

以疾管局試劑 anti-HEV IgG 檢測，有 114 位為陽性，男性 86 位，女性 28 位。平均發病年齡為 52.6 ± 16.9 歲；男性發病年齡較女性為大（男性 54.5 ± 15.8 歲；女性 46.6 ± 18.7 歲，P 值 0.030）。居住地點北部 36 位、

中部 21 位、南部 22 位、東部 3 位；疾管局試劑 anti-HEV IgM ，有 41 位為陽性，男性 31 位，女性 10 位。平均發病年齡為 52.6 ± 16.6 歲；男性發病年齡較女性為大（男性 54.8 ± 14.5 歲；女性 45.7 ± 20.6 歲，P 值 0.131）。居住地點北部 27 位、中部 10 位、南部 4 位。

在旅行史方面，疾管局試劑檢測 anti-HEV IgG 陽性 114 位急性 E 型肝炎疑似病患中，16 位有出國旅行史(14%)，分別至中國大陸 10 位、尼泊爾 3 位、印度 2 位以及越南 1 位；anti-HEV IgM 陽性 41 位急性 E 型肝炎疑似病患中，12 位有出國旅行史(29.3%)，分別至中國大陸 9 位、尼泊爾 2 位以及印度 1 位。疾管局留存之血清若以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性共計有 67 位，其中 14 位有出國旅行史(20.9%)，分別至中國大陸 9 位、尼泊爾 3 位、印度 1 位以及日本 1 位。

於發病過程中 114 位急性 E 型肝炎疑似病患有 10 位患者死亡，死亡率為 14%；其中男性 9 位，女性 1 位，男女之間死亡率無明顯差別（P 值 0.447）；但死亡之患者平均年齡明顯較存活者為高（死亡者 62.7 ± 8.5 歲；存活者 51.6 ± 17.2 歲，P 值 0.003）。

718 位醫院留存血清之檢體分析，706 位醫學中心以 RT PCR 方法檢測為陽性 21 位，12 位區域醫院以 RT PCR 方法檢測為陽性 1 位，這些病患在發病 3 個月內有出國旅行史者有 6 位(27.3%)，其中尼泊爾 1 位、中國大陸

1 位、印度 1 位、印尼 1 位、納米比亞 1 位以及馬來西亞 1 位。這些患者於發病過程中無死亡病例。醫院留存之血清若以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性共計有 359 位，其中 27 位有出國旅行史(7.5%)，分別至中國大陸 14 位、香港 1 位、菲律賓 1 位、尼泊爾 1 位、印度 1 位、印尼 1 位、新加坡 1 位、馬來西亞 1 位、納米比亞 3 位、日本 1 位、墨西哥 1 位以及美國 1 位。

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。由本研究之結果發現，於疾管局留存之 300 支急性非 A 非 B 非 C 型肝炎檢體中，以 RT PCR 檢測 HEV RNA 陽性，有 9 位急性 E 型肝炎之確定病例，以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性則有 67 位急性 E 型肝炎之疑似病例；而在各醫院留存之 718 支血清中，RT PCR 檢測 HEV RNA 陽性，有 22 位急性 E 型肝炎之確定病例，以 RTPCR 或 anti-HEV IgM 任一為陽性則有 359 位急性 E 型肝炎之疑似病例。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。根據以往文獻，在台灣一般成人中與 B 或 C 型肝炎病人中，即有 10%以上血清 anti-HEV 陽性，因此本研究疑似病例只有 anti-HEV IgG or anti-HEV IgM 陽性，其血清 HEV RNA 陰性，是否是真正的 E 型肝炎確定病例仍有待商榷。以疾管局的非 A 非 B 非 C 病例而言，血清 HEV RNA 陽性的 E 型肝炎確定病例發病前的國外旅行史有 66.7%，和我們以往發表的文獻一致，[16, 17] 但在 114 個 anti-HEV 陽性病例國外旅行史僅有 16 例

(14%)，如扣掉重疊的 7 例 HEV RNA 陽性確定病例，國外旅行史比例更低，這些病人是否是真正的 E 型肝炎確定病例仍有待證明。目前已知 E 型肝炎病毒也存在豬與其他動物中，[19-21] 因此這些只有 anti-HEV 陽性但 HEV RNA 陰性的病例中，有相當比例可能曾暴露於 E 型肝炎病毒抗原(如煮熟的含 E 型肝炎病毒的豬肉或豬肝)，但並未曾被感染，其血清轉氨酶的升高可能另有原因。然而當病人抽血時間已超過急性期或血清轉氨酶高峰三週時，HEV RNA 不易測得，[16] 因此若以 RTPCR 檢測血清 HEV RNA 陽性作為黃金標準，為診斷確定病例的限制(limitation)。

過往之研究發現，血清 HEV RNA 存在之時間約三週 [49]，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。因此其他 ELISA 檢驗試劑，如 anti-HEV IgG 以及 anti-HEV IgM，在診斷急性 E 型肝炎方面，仍占有重要的輔助角色。本研究已完成李天成博士所提供以及三種商用檢驗試劑與疾管局現行試劑比較。發現這五種試劑，若以 RT PCR 檢測為金字標準，除 GW 表現較差外，其他四種試劑（包括 IgG 以及 IgM），不論是在疾管局或是醫院留存之血清，均表現相當良好之特異度與陰性預測值。顯示這些檢驗陰性之患者，幾可排除急性 E 型肝炎之感染。但靈敏度稍有不足，可能須加測系列追蹤血清以提高敏感度。RW IgM 試劑

在疾管局 300 個病例中，其靈敏度 100%，每個 HEV RNA 陽性病例均能檢出，陰性預測值也達 100%，意指當 RW IgM 陰性時，沒有一例 HEV RNA 陽性，不至於漏掉仍具感染性病例，似乎相對的較適合用於第一線篩檢。至於陽性預測值偏低，其中較佳的李天成博士 anti-HEV IgM 試劑也只有 40%，RW IgM 只有 23.7%，目前疾管局所用的 ADALTIS IgG 與 IgM 更只有 6.1%與 17.1%。可能有三種原因，其一是這些患者雖是急性 E 型肝炎之感染，但血清 HEV RNA 已消失；第二種為過往有 E 型肝炎病毒之暴露或感染，但非急性 E 型肝炎之感染；其三則為偽陽性。如何加強這三種狀況之鑑別，仍需更多研究來加以探討，也許針對 anti-HEV IgG 或 anti-HEV IgM 檢驗陽性、但血清 HEV RNA 陰性之個案，以 RTPCR 方法，加測糞便 HEV RNA，是一個加強診斷急性 E 型肝炎的輔助方法。在特異性方面也是以李天成博士 anti-HEV IgM 試劑與 RW IgM 的 96.9%及 89.7%較佳。

本研究除以 RT-PCR 方法來確定急性 E 型肝炎之診斷外，另以 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準，來探討不同 Anti-HEV IgG 試劑對於診斷疑似急性 E 型肝炎之能力，發現除 GW IgG 較差外，疾管局之 ADALTIS、李天成博士 anti-HEV IgG、MP IgG 以及 RW IgG 等四種試劑均有良好之診斷能力，其中在疾管局留存之血清以 RW IgG 較佳，其 AUROC 值為 0.750；而在各醫院留存血清，則以李天成博士 anti-HEV IgG 較佳，其

AUROC 值為 0.732。因此可建議將這些試劑開放於非疫區國家，如台灣使用。

本研究遇到的困難：

本研究原本計畫以疾管局庫存 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 300 位為研究對象，由於這些血液標本是全國醫學中心、區域醫院與各診所收集，最具代表性。後經委員建議加做醫學中心三百例與區域醫院四百例疑似急性 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎血清，雖覺得非常困難，仍願努力嘗試。計畫開始後，多次與醫學中心與區域醫院的消化系專科醫師聯繫、拜託，由於他們並未有 E 型肝炎及不明黃疸性肝炎的研究計畫，在送血液至疾管局後，並未特地收集與庫存此類標本。因此覺得窒礙難行，曾向疾管局申請計畫變更，當時未獲同意。只好繼續努力，在多次懇求後，才有少數醫院願意前瞻式的收集新病例，但也只有 12 例區域醫院幫忙收集的標本，根據疾管局統計，在本計畫執行期間(2009-2010)，由區域醫院送至疾管局的血標本只有 58 例，根本不可能達到 400 例的目標，計畫主持人只能拜託其他醫院幫忙，本身並無公權力，強制別人合作，這是實際上無法克服的困難，敬請諒察。由於評估肝炎試劑，除非 A 非 B 非 C 肝炎外，其他 A、B、C 肝炎與肝炎的一般人口也應納入，以評估試劑的特異性，並排除合併感染的可能性，事實上，

我們也在 20 例 A 型肝炎病例中，找到 1 例合併 HEV RNA 陽性病例。因此我們列入上述對照組，總檢測血液標本超過 1000 例，在數量上符合合約的規定，並讓評估更全面且完整。

結論與建議

本研究顯示，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 個月內有國外旅行史。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。本研究將 HEVRNA 陽性視為診斷之金字標準外，另外將 HEVRNA 或 anti-HEV IgM 為陽性者當作診斷之金字標準，重新探討各檢驗試劑診斷 E 型肝炎之能力，並加入 AUROC 之分析，冀能增加研究之完整性與臨床可用性，以作為診斷急性 E 型肝炎之重要輔助診斷工具。

計畫重要研究成果及具體建議

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，但境外感染為其主要感染途徑，佔了 2/3。快速且正確的診斷 E 型肝炎是防疫極需完成的課題。目前因疾病管制局檢驗 E 型肝炎之試劑廠商不再提供，由本研究之結果發現，由李天成博士所提供、MP 以及 RW 等 3 種 ELISA 檢驗試劑，在診斷急性 E 型肝炎方面，與疾病管制局提供之試劑在陰性預測值相當，在敏感度方面則以 RW IgM 最佳，較適合做為第一線篩檢急性 E 型肝炎疑似病例之用。建議考慮開放 anti-HEV 試劑給醫院做為第一線篩檢，疑似病例則送疾管局確認，分析病毒基因型與危險因子，而達到 E 型肝炎防治最經濟有效的策略與可行的政策。將 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準，以探討不同 Anti-HEV IgG 試劑對於診斷疑似急性 E 型肝炎之能力，在疾管局留存之血清以 RW IgG 較佳；在各醫院留存之血清，則以李天成博士 anti-HEV IgG 較佳。因此可建議將這些試劑開放於非疫區國家，如台灣使用。本研究已達到原先計畫的目的，其研究結果不但對台灣的 E 型肝炎防治政策有很具體的參考價值，也將是歐美與日本等非 E 型肝炎盛行區的 E 型肝炎診斷與防治的珍貴參考資料。

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 waterbourne 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, 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 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]Mushahwar IK. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*. 2008; **80**: 646-58.

表一、300 支疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本以不同檢驗試劑檢驗之結果比較(以 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準)

	陽性	陰性	靈敏度	特異度	陽性預測值	陰性預測值
RTPCR 或 anti-HEVIgM 任一為陽性	67	233		金字標準 (gold standard)		
ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit (疾管局)	114	186	71.6%	71.7%	42.1%	89.8%
Anti-HEV IgG (李天成博士)	46	254	47.8%	89.7%	32.8%	82.3%
GW IgG	12	288	7.5%	97.0%	41.7%	78.5%
MP IgG	104	196	62.7%	73.4%	40.4%	87.2%
RW IgG	67	233	61.2%	88.8%	61.2%	88.8%

表二、於 300 支疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本中，比較以不同檢驗試劑檢驗結果之 AUROC(以 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準)

	AUROC	95% confidence interval	Standard error	P
ADALTIS EIAgen HEV IgG Kit (疾管局)	0.717	0.646-0.787	0.036	<0.001
Anti-HEV IgG (李天成博士)	0.613	0.531-0.695	0.042	0.005
GW IgG	0.522	0.442-0.602	0.041	0.578
MP IgG	0.680	0.605-0.755	0.038	<0.001
RW IgG	0.750	0.676-0.825	0.038	<0.001

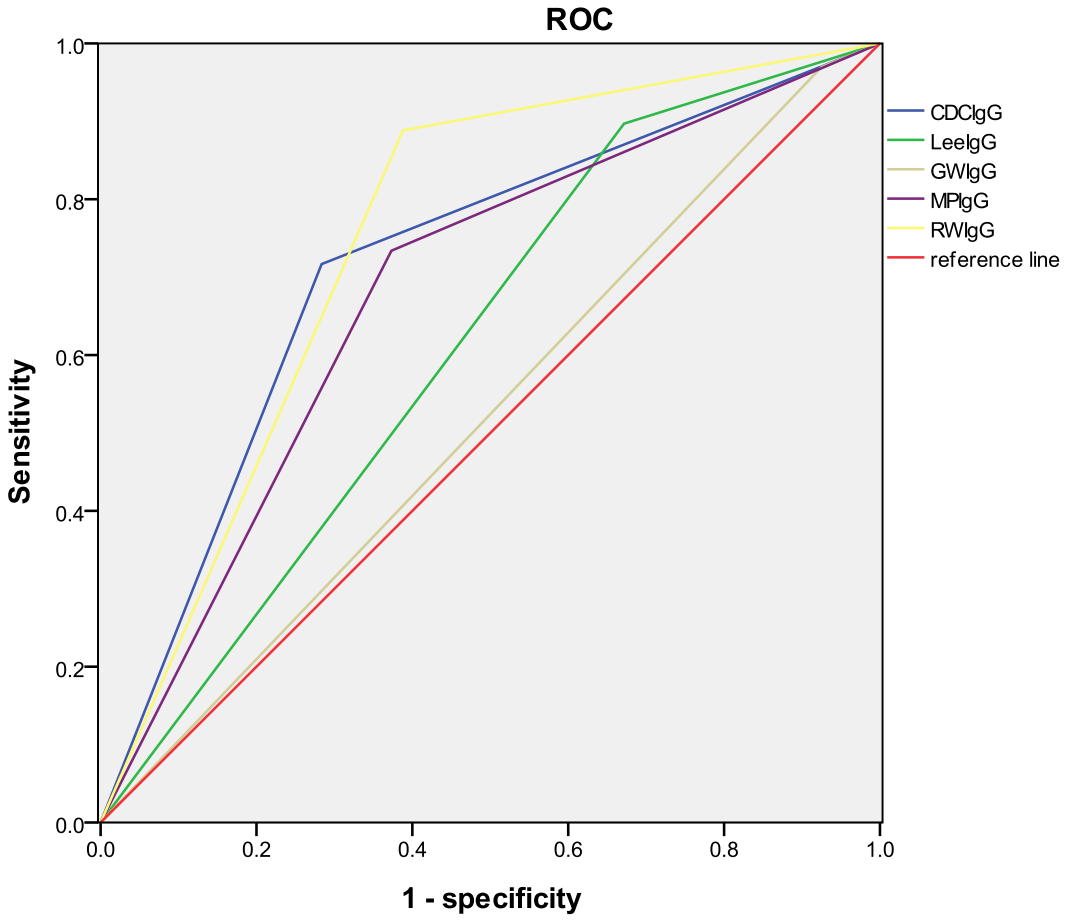
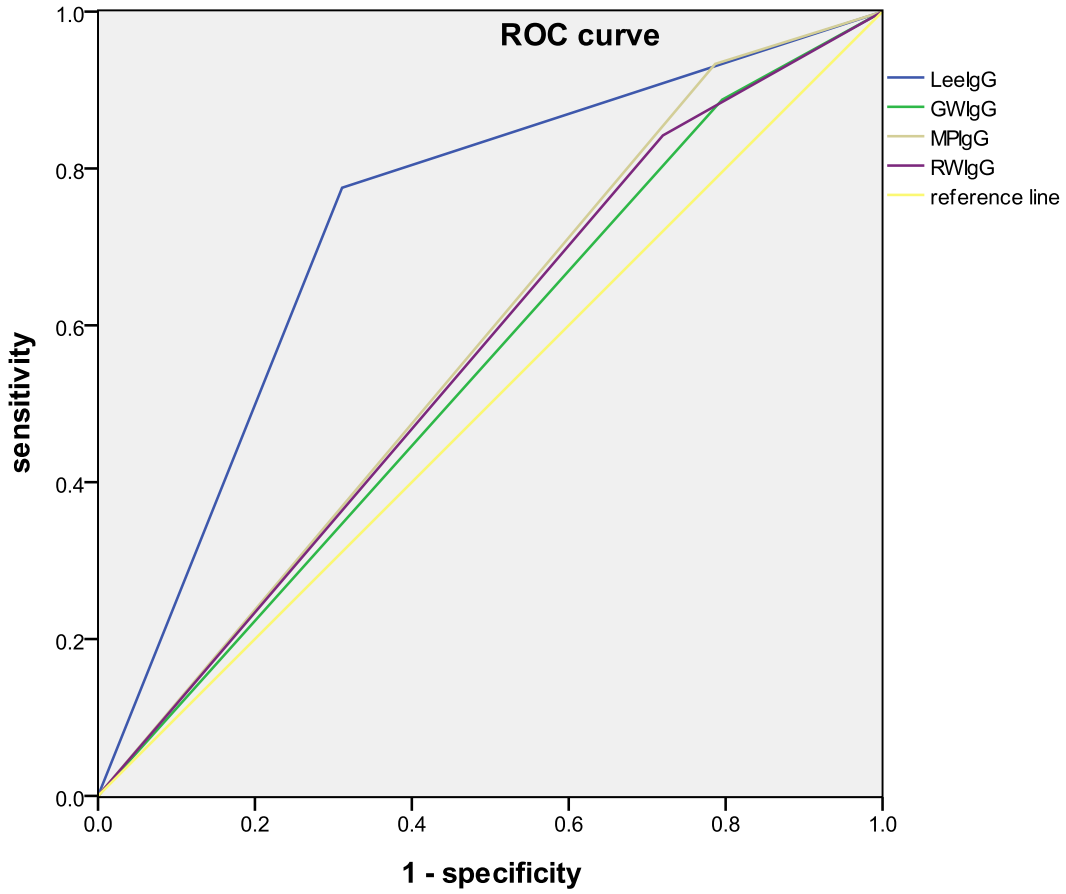
表三、718 支醫院留存之血清樣本以不同檢驗試劑檢驗之結果比較(以 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準)

	陽性	陰性	靈敏度	特異度	陽性預測值	陰性預測值
RTPCR 或 anti-HEVIgM 任一為陽性	336	355	金字標準 (gold standard)			
Anti-HEV IgG (李天成博士)	301	390	69.3%	80.8%	77.4%	73.6%
GW IgG	78	433	20.4%	88.8%	59.0%	58.4%
MP IgG	88	600	17.4%	91.5%	65.9%	54.2%
RW IgG	126	564	22.1%	85.4%	58.7%	53.7%

表四、於 718 支醫院留存之血清樣本中，比較以不同檢驗試劑檢驗結果之 AUROC(以 RTPCR 或 Anti-HEV IgM 任一陽性為金字標準)

	AUROC	95% confidence interval	Standard error	P
Anti-HEV IgG (李天成博士)	0.732	0.687-0.777	0.023	<0.001
GW IgG	0.546	0.495-0.597	0.026	0.074
MP IgG	0.573	0.523-0.624	0.026	0.004
RW IgG	0.561	0.511-0.612	0.026	0.018

圖一、於 300 支疾管局留存之疑似急性 E 型肝炎之血清樣本中，比較以不同檢驗試劑檢驗結果之 AUROC



圖二、於 718 支醫院留存之血清樣本中，比較以不同檢驗試劑檢驗結果之 AUROC