

戊型肝炎实验室诊断研究进展

王延臣¹, 张军²

中图分类号: R373.2 文献标识码: A

戊型肝炎(戊肝, HE)是一种由戊型肝炎病毒(HEV)引起的主要经肠道传播的急性传染性肝炎,既往称肠道传播的非甲非乙型肝炎,常引起爆发或流行,病死率约0.5%~1.5%,稍高于甲肝,但孕妇戊肝的病死率可高达20%。我国是戊肝的高流行区之一,约占临床散发性肝炎病例的10%~20%。1986~1988年我国新疆南部地区曾发生世界上最大的一次戊型肝炎流行^[1]。近年来,发现在猪、牛、羊、鸡、鼠等多种与人类密切接触的动物可感染HEV,并且动物中分离的HEV与人体内分离的HEV的基因序列高度一致,使人们逐渐将戊肝视为一种人兽共患病。在美国、日本及欧洲等传统的非戊肝流行区普通人群中发现了较高的戊肝感染率,使国际上对戊肝的危害性予以了更大的关注^[2]。

1 戊型肝炎病毒的基因型及血清型

HEV为无包膜二十面体对称结构病毒,基因组为线性单股正链RNA,全长约7.5knt。在2004年第8次国际病毒学分类委员会会议中,HEV被单独归为戊肝病毒科(Hepviridae)戊肝病病毒属(Hepivirus)^[3]。HEV包含3个开放读码框架(ORF),其中ORF2编码病毒唯一的衣壳蛋白,组成病毒衣壳。

不同来源的戊肝毒株的基因序列存在一定的差异。编码核衣壳蛋白的基因变异可能引起病毒表面抗原表位的变化,从而导致血清型的差异,因此Ando等^[4]提议采用一个大体与Norwalk病毒相似的分类标准,即将ORF2区的核酸变异不超过20%的分离株归为一个基因型。根据这个标准,HEV至少可分为4个主要的基因型,即以缅甸株为代表的I型(亚洲型),以墨西哥株为代表的II型(北美洲型),以美国株和猪株为代表的III型(美国型),以及以中国株和台湾株为代表的IV型(中国型)。不同基因型HEV间衣壳蛋白氨基酸同源性约90%,核酸同源性约80%。迄今我国仅发现I型和IV型病毒。

各地毒株在ORF2氨基酸序列上的高度同源性造成了HEV血清学上的相似性。多次动物交叉保护实验证实不同基因型病毒间具有几乎完全相同的交叉保护效果。用不同基因型病毒的衣壳蛋白为抗原,对感染猴系列血清、大量人群血清和猪血清进行平行检测,均具有极高的符合率^[5-10]。因此,目前认为HEV与甲肝病毒类似,也只有一个血清型。

2 戊型肝炎的实验室诊断

戊型肝炎潜伏期为15~75d,临床表现与其它急性肝炎相似。患者具有较典型的急性病毒复制和血清学过程,即感染后首先可在粪便、血清中检出病毒RNA,约在感染后2~4w血清中可检出特异性IgM抗体和IgG抗体,在急性期后IgM抗体较快消退,而IgG抗体长期持续存在。因此病毒检测和血清学检测均可作为戊肝实验室诊断的依据。

2.1 病毒检测

戊肝病毒的检测包括HEV病毒颗粒的检测和HEV核酸检测两类。前者主要采用免疫电镜法检测粪便标本,对仪器设备和检测人员素质要求较高,而且灵敏度极低,仅适合个别研究单位使用。后者主要采用逆转录套式聚合酶链反应法(RT-nPCR),其灵敏度较电镜法高出许多,但用于临床诊断也存在一些明显的局限性:(1)HEV的复制多数发生在疾病的潜伏期和极早期,因此多数患者在就诊时粪便或血清中的病毒量已较少而不易检出;(2)HEV的基因组二级结构较为复杂,因此对RT-nPCR的反应条件和操作要求较高;(3)不同HEV基因型常对引物有一定的选择性,即虽然设计的引物序列在各个基因型中均是保守的,但在扩增时有些引物对某些基因型扩增效率会显著高于另一些基因型,不易找到具有普遍通用性的高灵敏引物;(4)RT-nPCR操作繁复,对技术人员和操作环境的要求也较高;(5)同大部分PCR检测一样,也容易出现实验室内的模板污染,造成大量的假阳性,因此RT-nPCR阳性结果的确认通常必须依靠扩增片段的克隆测序。

2.2 血清学检测

2.2.1 传统的戊肝血清学检测试剂盒:HEV目前尚不能进行细胞培养,因此戊肝的血清学检测均依赖于重组抗原或合成肽抗原。传统的戊肝抗体诊断试剂盒以GeneLabs公司产品 and Abbott公司产品为代表,分别选用重组抗原和合成肽抗原。这些试剂在评估人群中抗HEV抗体的流行情况时的符合率很低。Mast等^[11]曾两两比较12种此类试剂,其结果为在献血者中的符合率平均68%(41%~94%),在阳性血清中的符合率平均32%(0%~89%)。

2000年Lin等^[12]对11例经PCR确诊的临床戊肝病例用GeneLabs的戊肝抗IgG和抗IgM试剂(GL-IgG和GL-IgM)进行检测,结果IgG试剂漏检2例,灵敏度为81.8%,IgM漏检6例,灵敏度仅45.5%。其中1例IgG、IgM均漏检。而在671例健康对照中IgG阳性率亦有11.0%,IgM阳性率3.7%。在26例急性甲肝患者中,GL-IgM的阳性率高达11.5%,提示GL-IgM的灵敏度、特异性均较差。GL-IgG用于急性戊肝诊断的灵敏度较GL-IgM好,但特异性更差。

2002年李卓等^[13]收集了95例急性肝炎病例的入院时、入院2w和入院4w系列血清,利用PCR从中检出了10例HEV RNA阳性病例,这10例病例入院时血清GL-IgG均

通讯作者:张军, Email: zhangj@xmu.edu.cn

作者单位:1. 济南钢铁集团总公司总医院, 济南 250101;

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

为阴性, 2 周后 7 例阳转, 另 3 例始终阴性, 提示 GL-IgG 用于临床急性戊肝诊断的检出时间较晚, 漏检明显。

李奎等^[14]用合成多肽组装成戊肝 IgG、IgM 诊断试剂盒, 检测结果与 Genelabs 公司试剂结果类似。在 56 例急性戊肝病例从发病后 15 d 至 12m 的系列血清中, IgG 抗体在 15 d 以内阳性率为 93.9%, 阳性率最高在发病后 1 m (98.2%), 在 6 m 后降至 56.7%, 但 1 y 后仍有 29.0% 阳性。抗 IgM 阳性率在半月内最高, 但也仅为 65.3%, 随后迅速下降, 在 2m 时仅为 16.3%, 最长 1 份持续到病后 9m。

这些传统试剂(无论选用重组抗原还是合成肽抗原)的共同特点是所检测的 IgM 抗体的灵敏度较低, 而且特异性较差, 尤其是在其他急性病毒感染患者(如甲肝患者、出血热患者等)容易出现假阳性, 可能与这些感染者中同样存在多量的 IgM 抗体有关, 因此在临床上始终无法得到广泛接受。但由于这些试剂检测的 IgG 抗体在许多患者中不持久, 通常在患者病愈后 6 月内即有过半数转阴, 因而与戊肝急性期有一定的相关性, 长期以来临床上多数以这类试剂检出 IgG 抗体阳性作为戊肝诊断的依据。这一指标的缺陷十分突出。首先, 许多患者的 IgG 抗体在急性期后迅速消退, 另一些患者的 IgG 抗体可以持续 10 年以上, 尤其在戊肝疫区, 这类试剂在普通人群中也可检出 15% 以上的 IgG 抗体阳性; 其次, 在多数患者发病的中后期其 IgG 抗体才可被检出, 造成诊断的延迟和许多漏检; 第三, 在超过 10% 的患者中用此类试剂始终无法检出抗体。这些缺陷造成临床上对这类试剂检出结果的临床意义的描述十分困难, 误诊和漏诊十分常见。这也是一直以来国内外始终未能建立起公认的戊肝实验室诊断标准和公认的实验室诊断标准试剂的主要原因。

近年来, 随着 HEV 构象性表位研究的深入, 已基本明确了传统试剂的这些缺陷的主要原因, 即传统试剂选用的抗原包含的主要是 HEV 的线性表位, 而未能包含 HEV 的主要构象性表位, 而这些构象性表位恰恰是机体抗 HEV 体液免疫应答的主要优势表位。建立在这些构象性表位基础上的新一代戊肝血清学诊断试剂的可靠性正为越来越多的实验数据所证实。

2.2.2 基于构象依赖性表位的新一代戊肝血清学检测试剂盒: 目前国内外报道的 HEV 构象性表位抗原主要有昆虫杆状病毒系统表达的 55kD 抗原、大肠杆菌表达的 ORF2.1 抗原和大肠杆菌表达的 E2 抗原三种。这三种抗原的共同特点是其检出率和检出的 IgG 抗体持续时间均远高于传统试剂, 提示这些抗原均较好地模拟了 HEV 的主要免疫优势表位, 用于 HEV 抗体诊断试剂的研制将有更好的可靠性。

2.2.2.1 对 HEV 感染恒河猴模型系列血清的检测: 国内学者利用 E2 抗原建立了捕获法抗 HEV IgM 抗体诊断试剂盒(E2-IgM), 并同时建立了间接法抗 HEV IgG 抗体诊断试剂盒(E2-IgG), 以及检测抗 HEV 总抗体的双抗原夹心法试剂盒^[15-18]。利用 86 只 HEV I 型或 IV 型病毒感染的恒河猴系列标本对 E2-IgM、E2-IgG、传统抗体诊断试剂(GL-IgG 和 YES-IgG)以及病毒核酸检测的临床意义进行了系统比较, 发现所有感染猴均产生 E2-IgG 抗体, 除 1 只感染猴未检出粪便排毒和 E2-IgM 外其余猴子均出现粪便排毒和 E2-IgM 阳转; GL-IgG 和 YES-IgG 的阳转率较低, 而且与感染剂量

相关; 急性肝炎主要开始于感染后 3w~7w; 病毒学指标在潜伏早期即已出现, 较疾病的发生约早 2w, 并在急性期迅速下降; E2-IgM 在发病时已有过 2/3 阳转, 并在发病后 10w 内完全转阴; E2-IgG 与 E2-IgM 几乎同时阳转, 在全部动物中均持续存在, 直至 86w 后仍无一阴转; GL-IgG 和 YES-IgG 抗体较 E2 抗体阳转晚约 1w, 在感染后 20w 内已有过半数转阴。表明 E2-IgM 是一个良好的戊肝急性感染诊断指标, E2-IgG 是一个良好的戊肝既往感染诊断指标, GL-IgG 和 YES-IgG 抗体的阳转或双份血清滴度升高可以作为辅助诊断指标, 病毒核酸检测仅在发病的极早期具有诊断价值。

2.2.2.2 对临床肝炎血清的检测: 郑英杰等^[9]用 273 份健康人血清和 525 份临床肝炎血清对 E2-IgM、GL-IgG 和 GL-IgM 三种急性戊型肝炎诊断试剂进行比较。结果 E2-IgM 试剂用于急性戊肝诊断的特异度为 100.0%, 显著优于 GL-IgM 试剂的 96.7% 和 GL-IgG 试剂的 85.4%; E2-IgM、GL-IgG 试剂用于急性戊肝诊断的灵敏度分别为 97.9%、93.8%, 均显著高于 GL-IgM 的 72.9%; 在 65 例 GL-IgM 阳性而 E2-IgM 阴性的患者中, 有 58 例(89.2%) 同时为抗甲型肝炎病毒 IgM 抗体阳性, 提示 GL-IgM 试剂的检测受其他 IgM 抗体的较大干扰。提示 E2-IgM 是良好的戊肝急性诊断指标, GL-IgG 用于戊肝诊断无法区分急性感染和既往感染, 而 GL-IgM 用于急性戊肝诊断的灵敏度较低, 而且要注意排除由其他 IgM 抗体造成的假阳性。

郑铃等^[20]根据 2000 年修订的病毒性肝炎诊断标准诊断对 176 份诊断为“急性散发性戊型肝炎”和 191 份诊断为“非甲~非戊型肝炎”患者血清进行 E2-IgM 检测, 并与国产传统试剂和 GL-IgM 试剂作比较。结果有 68.75% 的“急性戊肝”患者在入院时 E2-IgM 即阳性, 灵敏性显著高于传统试剂(56.25%), 其中 57.02% 的患者可检出 HEV 核酸。有 19.37% 的“非甲~非戊型肝炎”患者血清 E2-IgM 阳性, 其中 32.43% 可检出 HEV 核酸。而 22 例 E2-IgM 阴性的“急性戊肝”患者血清中无一例检出 HEV 核酸。这既说明 E2-IgM 是急性戊型肝炎的敏感性高和特异性强的血清学指标, 又说明既往诊断急性非甲~非戊型肝炎中, 由于诊断试剂的原因, 约有 19.37% 为戊型肝炎的误漏诊。

2.2.2.3 对戊型肝炎恢复期血清及普通人群血清的检测: 李新兰等^[21]用 E2-IgG 和 GL-IgG 试剂平行检测 50 例戊肝患者的感染 10 年后血清, 结果 E2-IgG 的阳性率为 86%, 而 GL-IgG 的阳性率仅为 36%。王延臣等^[22]用 E2-IgG 和 GL-IgG 试剂平行检测一个普通人群的戊肝感染情况, 发现 E2-IgG 检出结果表现出明显的年龄累积效应, 而 GL-IgG 检出结果无明显规律性。

美国学者利用 55kD 抗原试剂在美国这一非流行区域的献血员中检出了近 20% 的抗体阳性, 曾使人们对其特异性产生了怀疑, 但随着在抗体阳性的动物中分离出大量 HEV 病毒, 使人们更倾向于认为这些结果并非是试剂的假阳性, 而是因为动物 HEV 的大量存在使传统的非流行区域的人群中也获得了自然免疫^[23]。同时, 这些抗原作为疫苗对 HEV 感染的优异保护性以及制备出的识别构象表位的中和性单克隆抗体强有力地支持这些抗原的特异性。葛胜祥等^[16]对数十例 E2-IgG 阳性而 GL-IgG 阴性血清用中和单

抗进行阻断试验,结果全部标本均可被中和单抗显著阻断,这一结果以及在 E2-IgM 阳性患者中较高的 HEV RNA 阳性率都进一步证实了试剂的特异性。

2.2.2.4 对动物 HEV 抗体的检测:葛胜祥等^[24]利用 E2 双抗原夹心法试剂对我国 20 个省市 120 个养猪场的 8626 只猪进行 HEV 抗体检测,结果平均阳性率 83.4%,而在一个无特殊病原体(SPF)级猪场的 14 只猪中未见阳性。Wang 等^[25]利用 E2 双抗原夹心法试剂从多种动物中检出抗体,并从中分离出多株动物 HEV 病毒,均为 HEV IV 型。

由于 IgM 抗体仅在戊肝急性感染期存在,因此最适合于临床急性戊肝诊断,但长期以来主要由于戊肝抗原质量的问题而使戊肝 IgM 检测试剂的灵敏度和特异性均存在较大缺陷。现有抗原表位对应的 IgG 抗体多数在发病后期会迅速消退,对于戊肝急性感染诊断具有一定价值,因此在缺乏灵敏可靠的 IgM 诊断试剂的情况下,目前国内外均主要以戊肝 IgG 检测作为急性戊肝感染的诊断依据。由于同时有许多患者 IgG 抗体可以持续很长时间,在临床上 IgG 抗体的检测常无法准确区分近期感染与既往感染,使检测结果的临床意义难以描述。另一方面,由于现有试剂检出的 IgG 阳转时间较临床症状出现时间更晚,因此对早期病例较易漏诊。基于这一情况,长期以来可靠的戊肝 IgM 抗体检测试剂的研制始终是国际上戊肝研究的焦点之一,也是临床上的迫切需求之一。近年来基于 HEV 构象依赖性表位所研制的抗 HEV IgM 试剂和 IgG 试剂为彻底解决这一问题带来了曙光。最近,香港学者利用 E2-IgM 作为急性戊肝诊断依据,对香港地区急性戊肝和急性甲肝的临床和流行病学特征进行了系统分析,发现急性戊肝和急性甲肝在流行病学上以及临床特征上都存在明显的不同,提示临床上对急性肝炎患者进行戊肝和甲肝的鉴别诊断是十分有价值的^[26]。

参考文献:

[1] Zhuang H, Cao XY, Liu CB, et al. Epidemiology of hepatitis E in China[J]. *Gastroenterologia Japonica*, 1991, 26 (Suppl 3): 135-138.

[2] 郑英杰,张军,夏宁邵. 戊型肝炎是否为人兽共患病的讨论[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2003, 19(6): 118-121.

[3] Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., editors. *Virus Taxonomy: The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier, 2004; p851 - 855.

[4] Ando T, Noel J, Fankhauser R. Genetic classification of Norwalk-like viruses[J]. *J Infect Dis*, 2000; Suppl. 2: 336-348.

[5] Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine[J]. *Vaccine*, 2003, 21: 2607-2615.

[6] Arankalle VA, Chadha MS, Chobe LP. Long-term serological follow up and cross challenge studies in rhesus monkeys experimentally infected with hepatitis E virus[J]. *J Hepatol*, 1999, 30: 199-204.

[7] Meng J, Pillot J, Dai X, et al. Neutralization of different geographic strains of the hepatitis E virus with anti-hepatitis E virus-positive serum samples obtained from different sources[J]. *Virology*, 1998, 249: 316-324.

[8] Pillot J, Turkoglu S, Dubreuil P, et al. Cross-reactive immunity against different strains of the hepatitis E virus transferable by simian and human sera[J]. *C R Acad Sci III*, 1995, 318:

1059-1064.

[9] Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, et al. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 117-122.

[10] Engle R, Yu C, Emerson S, et al. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay[J]. *J Clin Microbiol*, 2002; 40(12): 4576-80.

[11] Mast EE, Alter MJ, Holland PV, et al. for the Hepatitis E Virus Antibody Serum Panel Evaluation Group. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel[J]. *Hepatology*, 1998, 27: 857-861.

[12] Lin C, Wu J, Chang T, 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]. *J Clin Microbiol*, 2000; 38: 3915-3918.

[13] 李卓,郝桂,蓝海云,等. 急性肝炎恢复期血清检测抗戊型肝炎病毒抗体及 RNA 的临床诊断意义[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(3): 268-271.

[14] 李奎,庄辉,朱万孚,等. 抗戊型肝炎病毒 IgG 和 IgM 抗体对诊断急性戊型肝炎的意义[J]. *中华内科杂志*, 1999, 38(11): 733-736.

[15] Zhang J, Gu Y, Ge SX, 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.

[16] 葛胜祥,张军,彭耿,等. 基于多聚化重组抗原的戊型肝炎病毒抗体 IgM、IgG ELISA 方法的建立及初步应用[J]. *病毒学报*, 2003, 19: 74~ 82.

[17] 何志强,葛胜祥,邱艳,等. 戊型肝炎病毒抗体双抗原夹心法 ELISA 的建立与初步应用[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2002, 18(6): 18-21.

[18] Zhang J, Ge SX, Huang GY, et al. Evaluation of antibody based and nucleic acid based assays for diagnosis of Hepatitis E Virus infection in a rhesus monkey model. *J Med Virol* 2003, 71(4): 518-526.

[19] 郑英杰,姜庆五,张军,等. 三种戊型肝炎诊断试剂可靠性的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12(1): 17-18.

[20] 郑玲,柳丽娟,胡莹莹,等. 抗戊型肝炎病毒 E2 IgM 诊断急性戊型肝炎的敏感性和特异性[J]. *中华肝脏病杂志*, 2005, 13(8): 590-593.

[21] 李新兰,任晖,梁新海,等. 戊型肝炎患者十年后血清抗病毒抗体的检测[J]. *地方病通报*, 2002, 17(3): 14-17.

[22] 王延臣,葛胜祥,孙鲁民,等. 戊型肝炎流行区病毒感染的特点[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2004, 20(2): 147-151.

[23] Meng, XJ, Wiseman, B, Elvinger, F, et al. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Veterinarians Working with Swine and in Normal Blood Donors in the United States and Other Countries[J]. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 117-123.

[24] 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.

[25] Wang YC, Zhang HY, Xia NS, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China[J]. *J Med Virol*, 2002, 67: 516-521.

[26] Chau TN, Lai ST, 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.

收稿日期:2006-02-02; 修回日期:2006-05-08