

戊型肝炎诊断中血清学及核酸检测意义的研究

张军 葛胜祥 黄果勇 李少伟 何志强 王颖彬 郑英杰 顾颖 吴文翰 夏宁邵

【摘要】 目的 利用恒河猴感染模型评估血清学检测和核酸检测在戊型肝炎诊断中的临床意义。**方法** 对 86 只戊型肝炎病毒 (HEV) 实验感染猴的系列血清和粪便标本, 用反转录聚合酶链反应方法进行病毒学检测, 用 4 种酶联免疫吸附抗体检测试剂 (E₂-IgM, E₂-IgG, GL-IgG 和 YES-IgG) 进行血清学检测。**结果** 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, 其余感染猴均出现粪便排毒和 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 3~7 周内。病毒学指标在潜伏早期即已出现, 较疾病的发生约早 2 周, 并在急性期迅速下降。E₂-IgM 在发病时已有约 2/3 阳转, 并在发病后 10 周内完全转阴。E₂-IgG 几乎与 E₂-IgM 同时阳转, 在所有感染猴中持续存在, 直至 86 周后仍无阴转。GL-IgG 和 YES-IgG 抗体较 E₂ 抗体晚约 1 周, 在感染后 20 周内已有过半数转阴。**结论** E₂-IgM 是一个良好的戊型肝炎急性感染诊断指标, E₂-IgG 是一个良好的戊型肝炎既往感染诊断指标, 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。

【关键词】 肝炎病毒, 戊型; 类人猿亚目; 诊断

Significance of serological markers and virological marker for hepatitis E in rhesus monkey model ZHANG Jun, GE Sheng-xiang, HUANG Guo-yong, LI Shao-wei, HE Zhi-qiang, WANG Ying-bing, ZHENG Ying-jie, GU Ying, NG Mun-hon, XIA Ning-shao. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Corresponding author: XIA Ning-shao

【Abstract】 Objective To evaluate the serological markers and biological marker in the diagnosis of hepatitis E infection in a rhesus monkey model. **Methods** 86 rhesus monkeys had been infected with different doses of HEV. Hence, they were taken sequential blood samples at intervals up to 86 weeks for 4 hepatitis E virus (HEV) specific antibody assays (E₂-IgM, E₂-IgG, GL-IgG, and YES-IgG), and nucleic acid assay. **Results** All the animals produced E₂-IgG and all but one also produced E₂-IgM and excreted the virus in stool, whereas positive rate of GL-IgG and YES-IgG were low and correlated with virus level. Hepatitis occurred over a period of 4 weeks (between 3 to 7 weeks) after infection. Virological marker occurred mainly during incubation period and declined rapidly after onset of hepatitis. Seroconversion of E₂-IgM occurred before onset of hepatitis in 70% monkeys and declined rapidly up to 50% of peak value after 4 weeks. E₂-IgM seroconversion was closely paralleled by E₂-IgG; however, E₂-IgG persisted in all animals for the entire duration of experiment of up to 86 weeks. Production of GL-IgG and YES-IgG was delayed by one week after the E₂ antibodies, these antibodies showed a transient occurrence and seroprevalence declined to 50% of the peak value over a period of 12 weeks. **Conclusion** E₂-IgM might be used as a suitable acute hepatitis E marker, and E₂-IgG as a suitable epidemiological marker. The seroconversion or titer elevation of GL-IgG and YES-IgG antibodies probably used to confirm the infection. The viral markers are optional for early diagnosis.

【Key words】 Hepatitis E virus; Monkeys; Diagnosis

基金项目: 福建省重大科技项目 (2002F013), 教育部跨世纪优秀人才培养计划

作者单位: 361005 厦门, 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心 (张军、葛胜祥、李少伟、何志强、王颖彬、郑英杰、顾颖、吴文翰、夏宁邵); 广西壮族自治区疾病预防控制中心 (黄果勇)

张军 男, 31 岁, 副研究员, 发表论文 30 余篇。

通讯作者: 夏宁邵

近有研究用大肠杆菌表达一个戊型肝炎病毒(HEV)开放读码框架2(open reading frame, ORF2)的抗原 E₂, 其能够自发形成同源多聚体, 对戊型肝炎(简称戊肝)急性血清和恢复期血清均有很强反应性, 并从该抗原上鉴定出了2个具有显著免疫优势的构象依赖性中和表位^[1-3]。用该抗原免疫恒河猴可以诱导很好的免疫保护性, 提示该抗原较好地模拟了HEV衣壳蛋白的主要空间构象^[4]。还有研究显示戊肝患者中E₂抗原的血清阳转要早于其他试剂, 但该研究中患者血清的感染时期并不确定^[5]。这一问题同样存在于其他的戊肝诊断试剂评估中, 因为感染时期明确的系列血清标本极难收集。

研究对86只HEV实验感染恒河猴的系列血清抗体动态、病毒复制状况、生物化学指标改变等主要HEV感染、发病标志进行了研究, 以对血清学检测和病毒核酸检测在戊肝临床诊断、流行病学调查的意义有一个较系统的认识。

材料与方法

1. 标本来源: 系列血清和粪便标本来自于86只HEV实验感染恒河猴。均为本实验室进行戊肝疫苗研究时作为对照的健康成年猴, 分别用 $10^3 \sim 10^7$ 聚合酶链反应(PCR)滴度的HEV粪便悬液静脉注射感染, 其中76只以基因I型HEV感染, 另8只以基因IV型HEV感染。感染前2周均连续测得血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)正常, 抗-HEV抗体阴性。感染后2周内每天收集粪便, 随后改为每周收集2次粪便至连续3次粪便病毒RNA阴性。粪便标本于-80℃冻存, 采样2周内进行病毒核酸检测。感染后3个月内每周收集1次血清, 3个月后每月收集1~2次血清, 测量血清ALT后-20℃冻存备检。有12只猴分别在感染后第4周和第12周进行肝穿刺病理活检, 同时采集血清检测ALT。

2. 病毒核酸检测: 取250 μl的不同稀释度的粪便悬液用Trizol试剂(美国Gibco公司)按其操作说明提取总RNA, 20 μl体积反转录, 基因I型病毒反转录引物为特异性引物A3(5'-GGCTCACCGGAGTGTTTCTTC-3'), IV型病毒反转录引物为EE4(5'-GGTTGGTTGGATGAATATATG-3'), AMV反转录酶42℃反转录40 min。基因I型病毒第一轮PCR引物为A5(5'-CTTTGATGACACCGTCTTCTCG-3')、A3, 基因IV型病毒第一轮PCR引物为EE1

(5'-TAACCTGATTGGGATGCT-3')、EE4; 反转录模板加2 μl, 总体积为20 μl, 条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性40 s, 68℃复性延伸40 s, 35个循环; 72℃延伸5 min。基因I型病毒第二轮引物为B5(5'-GCCGCAGCAAAGGCATCCATG-3')、B3(5'-GTGTTTCTTCCAAAACCCTCGC-3'); 基因IV型病毒第二轮引物为EE2(5'-GGGTGGAATGAATAACATGT-3')和EE3(5'-GTCACCCAGAAACCACC-3'); 第一轮模板加1 μl, 总体积为20 μl, 条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性40 s, 56℃复性40 s, 72℃延伸1.3 min, 35个循环; 72℃延伸5 min。以能检出阳性带的最高稀释度粪便悬液250 μl所含有的病毒量定义为1个PCR滴度。

3. 抗-HEV抗体检测: 血清抗-HEV抗体以4种ELISA方法检测。两种E₂抗原, 由北京万泰生物药业有限公司生产^[2]。其中一种为抗-HEV IgM抗体检测试剂(简称E₂-IgM), 另一种为抗-HEV IgG抗体检测试剂(简称E₂-IgG)。第3种试剂采用ORF2、ORF3区域合成肽抗原(由加拿大YES公司提供), 试剂盒由北京万泰生物药业有限公司提供(简称YES-IgG)。第4种试剂为新加坡Genelabs公司生产的抗-HEV IgG抗体检测试剂(简称GL-IgG), 该试剂采用重组ORF2、ORF3抗原。每份标本均双孔重复测量。IgG试剂均采用间接法, 按试剂盒说明书进行。IgM试剂采用捕获法, 即以抗人IgM μ链抗体包被, 加入血清后再加入酶标记的E₂抗原。每种试剂均以感染前血清的A值均值加上3个标准差为临界值, 特异度大于99%(表1)。

表1 抗-HEV抗体检测试剂的临界值($\bar{x} \pm s$)

组别	感染前血清数	A值	标准差	临界值
E ₂ IgM	86	0.058	0.039	0.17
YES IgG	50	0.034	0.018	0.09
GL IgG	86	0.042	0.069	0.25
E ₂ IgG	86	0.044	0.039	0.16

4. 统计分析: 采用SPSS10.0软件行Fisher精确概率检验、 χ^2 检验及t检验。

结 果

1. HEV感染恒河猴的一般过程: 1只恒河猴在感染后4周ALT开始升高, 在4.5周时达高峰, 第6周时恢复正常。粪便排毒在感染后第3天检出, 持续排毒至第5周。病毒血症出现在第3天~第3.5周。抗-HEV抗体应答出现在第2.5周, E₂ IgM抗体和E₂ IgG抗

体几乎同时阳转, 随后 GL-IgG 和 YES-IgG 陆续阳转。E₂-IgM、GL-IgG 和 YES-IgG 在达到峰值不久后便下降, 而 E₂-IgG 则持续维持至感染 80 周后 (末份标本)。

2. 肝细胞病理改变与血清 ALT 的相关性: 12 只感染猴在感染后第 4 周和第 12 周进行两次肝穿刺病理活检, 以评估血清生物化学指标与肝脏病理表现的一致性。在第 4 周的活检标本中有 9 份可见明显肝炎病理表现, 其中有 8 份同时伴有血清 ALT 异常; 第 12 周的标本均基本正常, 亦无 ALT 异常。3 只双份病理阳性猴的血清 ALT 也始终正常。24 对血清 ALT 与肝病理活检的结果中有 23 对是一致的, 表明血清 ALT 的异常与肝脏病理表现密切相关 (Fisher 精确概率 $P=0.0000122$)。

3. 恒河猴感染过程中生物化学指标、抗体指标和核酸指标的动态变化: 对不同剂量病毒感染的恒河猴的生物化学指标、抗体指标和核酸指标的起始应答时间和应答率进行分析, 发现猴子均出现 E₂-IgG 阳转, 仅 1 只猴子未检出粪便排毒, 同时也未检出 E₂-IgM 应答。E₂-IgM、E₂-IgG 应答时间以及粪便排毒开始时间在低感染剂量组 (10^{3-4} 病毒滴度感染) 要明显晚于高感染剂量组 (t 值分别为 4.47、5.49、8.59, $P<0.01$)。血清 ALT 的应答率、应答时间在低感染剂量组也要明显晚于高感染剂量组 ($\chi^2=28.7$, $P<0.01$, $t=2.45$, $P<0.05$)。在任一感染剂量组, 均可见 E₂ 抗体阳转时间略早于血清 ALT 升高时间, 而较 GL-IgG、YES-IgG 的应答时间提早约 1 周, 应答率也显著高于 GL-IgG、YES-IgG (χ^2 值分别为 29.3 和 14.6, $P<0.05$)。大多数患病猴的肝炎发生在感染后 3~7 周之间, 约持续 4 周。病毒分泌最早发生在感染后 3 d, 并最多持续至 16 周。在感染后第 3 周病毒分泌的百分率达高峰, 与

多数猴 ALT 开始升高的时间 (第 3 周) 重叠, 而早于 ALT 百分率的高峰 (第 4 周)。随后病毒排毒百分率迅速下降, 在第 6 周时降至 50% 以下, 下降趋势与 ALT 异常百分率的下降趋势较为接近。病毒血症的动态改变与粪便排毒基本平行, 但其出现稍晚而持续时间亦稍短。

4. 恒河猴发病前后抗体指标和核酸指标的动态变化: 对 30 只均发生肝炎的恒河猴发病前后各感染标志的阳转和阴转情况分析, 提示绝大多数猴子在发病前 2 周即已出现排毒, 并在发病后 1 周开始迅速阴转 (表 2)。

讨 论

结果表明, 绝大多数猴子的发病出现在感染后 3~7 周内。病毒复制从感染后 1 周内开始, 在潜伏期内持续约 2 周以上, 在发病后开始消退, 共约持续 5 周。这与过去发现的病毒复制早于病理改变发生的现象一致, 均支持 HEV 是一种非直接致病病毒的观点。E₂ 抗体的阳转稍早于肝炎的发生, 与病毒复制消退时间重叠。这一时间顺序支持免疫致病在戊肝发生中起显著作用观点。E₂-IgG 抗体应答与 GL-IgG 和 YES-IgG 抗体应答相比显然更具免疫优势, 因为后者的抗体应答较晚并且与感染剂量相关, 而且在较短时间内会消退。

在感染的不同进程中各感染标志的诊断价值也不同。病毒学标志在发病极早期的诊断价值最大, 而发病中后期其诊断价值迅速降低。E₂-IgM 在发病时已有约 2/3 阳转, 且阳转率上升十分迅速, 在发病 2 周内几乎全部阳转, 发病 4 周后阳性率迅速下降。GL-IgG 和 YES-IgG 的阳转要晚 1 周, 并且持续时间长于 E₂-IgM。它们的诊断价值主要体现在发病后 1~10 周间。E₂-IgG 应答率达 100%, 并且在长达 86 周的观察期内无 1 例阴转, 而 GL-IgG 抗体以及 YES-IgG 抗体在感

表 2 恒河猴发病前后戊型肝炎病毒感染标志情况 (只)

病程 (周)	粪便排毒			E ₂ -IgM			GL-IgG			YES-IgG			E ₂ -IgG		
	阳性	阴转	阴性	阳性	阴转	阴性	阳性	阴转	阴性	阳性	阴转	阴性	阳性	阴转	阴性
潜伏期 -2 周	26	26	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0
-1 周	28	2	0	9	8	0	2	1	0	1	0	0	11	10	0
急性期 0 周	30	2	0	21	12	0	10	8	0	8	7	0	18	7	0
1 周	21	0	9	25	5	1	18	9	1	21	13	0	26	8	0
2 周	15	0	6	27	4	2	19	2	1	26	5	0	30	4	0
3 周	12	0	3	24	0	3	23	4	0	29	3	0	30	0	0
4 周	6	0	6	16	0	8	25	2	0	30	1	0	30	0	0
恢复期 10 周	0	0	6	0	0	16	13	0	10	26	0	4	30	0	0
20 周	0	0	0	0	0	0	9	0	6	21	0	9	30	0	0

检测例数均为 30 例, 除 GL-IgG 检测出 27 例阳性外, 其余组均检测出 30 例阴性; “-” 为发病前

染后 20 周内即有过半数阴转。李新兰等^[6]同样发现 50 例戊肝患者 10 年后血清中, E₂-IgG 的阳性率最高 (86%), 而 GL-IgG 的阳性率仅剩 36%。因此 E₂-IgG 可能会是一个合适的 HEV 感染流行病学指标。

因此, 在临床戊肝诊断中病毒检测应在发病早期尽早进行, 随着疾病进展其检出率会显著下降。E₂-IgM 抗体的阳转主要发生在发病前 1 周到发病后 2 周之间。在各抗体指标中, E₂-IgM 的持续时间最为短暂, 在发病后 3~10 周间迅速阴转。因此 E₂-IgM 是一个良好的急性感染指标, 在发病的前 3 周内阳性率均维持在很高水平, 并且在恢复期后迅速转阴。在这一组发病动物中, GL-IgG 和 YES-IgG 的应答率高于全部感染动物的平均水平 (表 2), 提示这两种抗体在发病猴中有更好的应答。这两种抗体的阳转主要发生在发病后的前 3 周, 并且在发病后 4~20 周之间多数阴转, 但也有许多动物的抗体在 20 周后仍为阳性。因此这两种抗体在发病后 1~10 周之间具有辅助诊断价值。由于这两种抗体的血清阳转多数发生在发病后, 因此 GL-IgG 和 YES-IgG 的发病前后双份血清的阳转或滴度升高可以协助急性戊肝的确诊, 但用于既往感染调查则会有较多漏诊。E₂-IgG 基本上与 E₂-IgM 同时阳转, 但该抗体较为稳定, 在观察期内全部动物中无一阴转, 因此是一个良好的戊肝既往感染指标。

HEV 可以分为 4 个基因型, 但众多交叉保护实验以及血清学研究表明其均归属于同一个血清型^[7]。源于基因 I 型 HEV 的重组抗原对基因 III 型病毒感染的检出能力与 III 型抗原几乎完全相同, 反之亦然^[8]。在研究中, 有 8 只恒河猴是用基因 IV 型病毒感染的, 但其对源于基因 I 型病毒的 E₂ 抗原的应答模式与基因 I 型病毒感染

猴相似 (结果未列出)。同样的, 基因 IV 型 HEV 感染的猪血清亦对 E₂ 抗原反应良好^[9]。最近发现用一个与 E₂ 抗原性十分相似的抗原作为疫苗免疫恒河猴, 其对 HEV 基因 I 型和基因 IV 型均能产生有效的保护, 而且对两型病毒的保护率完全一致 (待发表)。因此, 基于 E₂ 抗原的免疫检测方法应可以同时用于各种基因型 HEV 感染的诊断。

参 考 文 献

- 1 李少伟, 张军, 何志强, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 片段的聚合现象研究. 生物工程学报, 2002, 18:463-467.
- 2 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. 病毒学报, 2003, 19: 74-82
- 3 顾颖, 葛胜祥, 黄果勇, 等. 戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体的鉴定. 病毒学报, 2003, 19: 217-223.
- 4 葛胜祥, 张军, 黄果勇, 等. 大肠杆菌表达的戊型肝炎病毒 ORF2 多肽对恒河猴的免疫保护研究. 微生物学报, 2003, 43: 35-42.
- 5 Zhang JZ, Im SW, Lau SH, et al. Occurrence of hepatitis E virus IgM, low avidity IgG serum antibodies, and viremia in sporadic cases of non-A, -B, and -C acute hepatitis. J Med Virol, 2002, 66:40-48.
- 6 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. 地方病通报, 2002, 17: 14-17.
- 7 Purcell RH, Nguyen H, Shapiro M, et al. Pre-clinical immunogenicity and efficacy trial of a recombinant hepatitis E vaccine. Vaccine, 2003, 21: 2607-2615.
- 8 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 Clin Microbio, 2002, 40: 117-122.
- 9 Wang YC, Zhang HY, Xia NS, et al. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. J Med Virol, 2002, 67: 516-521.

(收稿日期: 2003-10-16)

(本文编辑: 谢娜)

中华医学会杂志社对一稿两投问题处理的声明

为维护中华医学会系列杂志的声誉和广大读者的利益, 中华医学会杂志社对一稿两投问题的处理声明如下: (1) 本声明中所涉及的文稿均指原始研究的报告或尽管 2 篇文稿在文字的表达和讨论的叙述上可能存在某些不同之处, 但这些文稿的主要数据和图表是相同的。所指文稿不包括重要会议的纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿以及在一种刊物发表过摘要或初步报道而将全文投向另一种期刊的文稿。上述各类文稿如作者要求重复投稿, 作者应向有关期刊编辑部作出说明。(2) 如 1 篇文稿已以全文方式在某刊物发表, 除非文种不同, 否则不可再将该文投寄给他刊。(3) 请作者所在单位在投稿介绍信中注明该文稿有无一稿两投问题。(4) 凡投稿在接到编辑部回执后满 3 个月未接到退稿, 则表明稿件仍在处理中, 作者欲投他刊, 应事先与该刊编辑部联系并申述理由。(5) 编辑部认为文稿有一稿两投问题时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。期刊编辑部与作者双方发生意见分歧时, 应由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。(6) 中华医学会系列杂志对“一稿两投”一经证实, 将择期在杂志中刊出其作者单位和姓名以及撤消该论文的通告; 并对该作者作为第一作者所撰写的一切文稿, 2 年内将拒绝在中华医学会系列杂志上发表。