

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326098

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

戊型肝炎病原学诊断策略初探及江苏农村
地区戊型肝炎流行病学特征研究

Hepatitis E: Strategy of Pathogenic Diagnosis and the
Epidemiology in Rural Area in Jiangsu, China

黄守杰

指导教师姓名: 夏宁邵教授 张军教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008年6月

论文答辩时间: 2008年7月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008年6月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要	I
Abstract.....	III
前 言	1
1. 戊型肝炎病毒的生物学特征.....	1
1.1. HEV 的形态特征和理化性质	1
1.2. HEV 基因组及其功能	2
1.3. HEV 的归类	4
1.4. 戊肝病毒的基因型及血清型.....	5
2. 戊型肝炎的临床特征、病理变化和感染进程.....	7
2.1. 临床特征.....	7
2.2. 病理变化.....	7
2.3. 感染进程.....	8
3. 戊型肝炎的实验室诊断.....	9
3.1. 免疫电镜 (IEM)	9
3.2. 免疫荧光镜检 (IFM)	9
3.3. 戊肝的分子生物学检测.....	10
3.4. 检测抗 HEV 抗体的酶免疫试验 (EIAs)	11
4. 戊型肝炎的流行病学特征.....	14
4.1. 戊肝的全球流行概况.....	14
4.2. 戊肝的动物宿主.....	16
4.3. 戊肝的传染源和传播途径.....	19
4.4. 戊肝的流行特点.....	22
5. 戊型肝炎疫苗的研究进展.....	24
5.1. 真核细胞表达的重组蛋白.....	24
5.2. 原核细胞表达的重组蛋白.....	25
5.3. 戊肝疫苗临床试验.....	26
6. 本论文研究的思路、目的和意义.....	27

材料与amp;方法	29
1. 材料	29
1.1. 主要仪器	29
1.2. 主要试剂和材料	29
1.3. 常用溶液和培养基的配制	29
2. 方法	30
2.1. 胶回收 Kit 回收片段	30
2.2. 样品检测	31
2.3. 主动监测质量控制	32
2.4. 数据处理软件	36
结果与分析	37
第一部分 急性戊肝诊断中不同病原学指标的应用策略研究	37
1. 病例来源及确诊	37
1.1. 病例来源、入选标准及血清采集	37
1.2. 病例确诊标准和确诊流程	37
2. 戊肝病例血清学和病原学指标变化趋势	38
3. 不同时期标本 HEV IgM 和 PCR 诊断的准确性	39
3.1. 发病后不同时间标本中 HEV RNA 的诊断准确性	40
3.2. 发病后不同时间标本中 HEV IgM 抗体的诊断准确性	41
3.3. 综合评价	43
4. 小结	44
第二部分 江苏农村地区戊型肝炎流行病学特征	46
1. 自然人群中 HEV 感染的特征	46
1.1. 自然人群中的戊肝病毒感染率	47
1.2. 自然人群中的戊肝新感染率	47
2. 江苏农村地区疑似急性肝炎发生情况	48
2.1. 主动监测系统简介	48
2.2. 疑似肝炎病例一般情况	50
2.3. 疑似肝炎病例的发现途径	50

2.4. 疑似肝炎病例的三间分布.....	51
2.5. 疑似肝炎病例的病因谱分析.....	53
3. 戊型肝炎临床病例的三间分布.....	54
3.1. 年龄性别分布.....	54
3.2. 地区分布.....	55
3.3. 月份分布.....	56
4. 戊肝与非戊肝病例的临床特点比较.....	57
4.1. 症状和体征比较.....	58
4.2. ALT 峰值比较.....	59
5. 源于戊肝病例或亚临床感染病例的 HEV 株分子进化分析.....	60
6. 小结.....	62
讨 论.....	63
1. 综合应用 HEV 病原学指标指导临床诊断.....	63
1.1. PCR 引物与抗-HEV 抗体检测试剂的评价.....	63
1.2. 戊肝血清学和病原学指标变化趋势.....	63
1.3. 综合应用检测指标指导临床诊断.....	63
2. 散发性戊肝流行病学特征.....	64
3. 江苏农村地区疑似肝炎病因谱.....	65
3.1. 疑似肝炎病例构成.....	65
3.2. 戊肝与其他肝炎临床特点比较.....	65
4. 自然人群戊肝感染情况.....	65
5. 不同基因型的流行情况.....	66
结论与展望.....	67
参考文献.....	69
致 谢.....	88

摘 要

随着对戊型肝炎（简称戊肝）研究的深入和诊断方法的进步，为戊肝诊断提供了更多可靠的工具。目前临床上常用的戊肝病原学诊断指标主要包括抗-HEV IgM 抗体、抗-HEV IgG 抗体和 HEV RNA。

分析戊肝病例的病原学指标发现，抗-HEV IgM 抗体在 4w 左右达到峰值，发病 2 个月后开始下降直至阴转；抗-HEV IgG 抗体在 4w 左右达到最高峰，在 2 个月开始下降，但抗体能在较长时间内一直保持阳性；PCR 阳性率在急性早期较高，在 4w 时显著下降，3m 以后基本检测不到 HEV RNA。

由于抗-HEV IgG 抗体能长期维持阳性，单次 IgG 检测值不宜做为诊断依据，而系列血清的抗体阳转或滴度 4 倍以上升高则可确诊；PCR 阳性可以做为确诊依据，但检测时间若在急性晚期或恢复期，则会有较多漏诊；IgM 做为诊断依据时，若早期就诊时阴性则必须进行随访检测以免漏诊。

根据采样时间的不同，设定 IgM 的不同临界值，可提高诊断准确性。在发病后 1w、2w 时 IgM 抗体的最佳临界值为 $sco=3$ ，而 4w-3m 标本的最佳临界值为 $sco=2$ 。戊肝病例就诊时极少会超过发病 2m，在此期间内，抗-HEV IgM 是一个较可靠的诊断指标，阳性预测值和阴性预测值在 95% 以上，诊断的准确率为 96.3% (95%CI: 93.3%~98.2%)。

现有关于较大人群中的戊型肝炎流行病学特征的资料大多来源于爆发调查，国内外对散发性戊型肝炎的流行病学特征的了解一般来源于城市中心医院的临床病例调查，由于各种选择性偏倚的存在，无法全面地反映戊肝的流行全貌。本研究选取了江苏东台市的十个乡镇建立了基于各级医疗点的疑似肝炎主动监测系统，进行了连续 12 个月的监测，以较全面地了解我国农村地区戊型肝炎的流行病学特征。

该地区自然人群中抗-HEV 抗体情况显示当地 HEV 感染率为 51.2%，随年龄累积明显，男性感染率高于女性；一年时间内有 11.2% 的抗体阴性者发生了抗体阳转，提示在此期间内发生了 HEV 新发感染。

当地戊肝病例多见于 40 岁以上中老年人群；男性多于女性，男女比例为 3.4 : 1；各个监测乡镇均有病例，且自西向东可发现东部沿海三个乡镇发病率较高；

全年均有散发,季节性差异不明显;病例中 HEV 基因 4 型为绝大多数,占 94.7%,基因 1 型占 5.3%。在监测期间未发现戊肝爆发。

分析疑似肝炎病因谱发现,急性肝炎构成比由高到低依次为:戊肝、急性乙肝和甲肝;戊肝表现的症状、体征以及肝功能损伤比其他肝炎明显。

关键词: 戊型肝炎; 散发性; 诊断; 流行病学特征; 病因谱

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

With increasing understanding of hepatitis E and developing of its diagnoses, there are more reliable diagnostic tools. At present, ALT, anti-HEV IgM, anti-HEV IgG and HEV RNA are usually detected for clinical diagnosing of hepatitis E.

In this study, the dynamic analysis of those serological markers shows: the titer of anti-HEV IgM reaches peak about 4 weeks after illness onset, decreases about 2 months till seroreversion; the titer of anti-HEV IgG reaches peak about 4 weeks also, but it can persist for a long time at high titer; the positive rate of HEV RNA is higher at early acute stage, but decreases markedly, and no HEV RNA can be detected 3 months after onset.

As mentioned above, these different serological markers have different clinical signification in different illness stage. Regarding anti-HEV IgG, positive result of single sample has no clinical signification. But if there is seroconversion or 4 folds elevation of its titer, acute hepatitis E can be diagnosed. If there is detectable HEV RNA, acute hepatitis can be diagnosed also. But only depending on HEV RNA detection, there will be many false negative results in later acute phase or convalescence.

When anti-HEV IgM is used for diagnostic marker for acute hepatitis E, it will lift diagnostic accuracy that different threshold value is used in different illness stage. The best clinical threshold value of anti-HEV IgM is $s/co=3$ in the first 2 weeks of illness and $s/co=2$ from 15th day to 3th month after onset. The majority of hepatitis E patients visit a doctor within 2 months after onset. In this clinical stage, anti-HEV IgM is a reliable clinical diagnostic marker with accuracy of 96.3% (95% CI: 93.3%-98.2%, both PPV and NPV are more than 95%).

At present, the epidemiology character of hepatitis E in large population is mostly based on outbreak investigations, and the epidemiology character of sporadic hepatitis E is drawn from case investigations in urban central hospitals. For investigating epidemiology of hepatitis E in Chinese rural district all sidedly, an active

surveillance system for suspected hepatitis patients based on medical aid posts at different levels was established in 10 selected towns in DongTai, Jiangsu, and a surveillance lasting one year was conducted.

According to sero-epidemiology study on normal population, the infection rate of hepatitis E virus is 51.2% in this region and becomes higher with age, and the infection rate in male is higher than in female. There are 11.2% of population with anti-HEV seroconversion in this year, which clues to new infection of HEV.

In this region, sporadic hepatitis E mainly attacks older people (with age \geq 40 years); the attack rate of male is higher than female with M/F ratio of 3.4:1. Hepatitis E cases were found in all 10 surveiled towns, but the attack rate in the 3 eastern towns at seaside was higher; the cases could be found in all year with unobvious seasonal distribution. In all HEV isolates, the overwhelming majority (94.7%) belong to genotype 4, only 5.3% belong to genotype 1. In this one year surveillance period there is no outbreak of hepatitis E.

To analyse the constituent ration of suspected acute hepatitis, the largest propotion is hepatitis E, the next is acute hepatitis B, and the smallest is hepatitis A. The physical symptom and liver injury of hepatitis E patients are more serious than other hepatitis.

Key word: Hepatitis E, sporadic, Diagnosis, Epidemiology, etiology

前 言

戊型肝炎病毒 (hepatitis E virus, HEV) 是一种近二十年来发现的新型肝炎病毒, 但科学家认为这种病毒的历史已经很长, 最早可以考证的流行是发生在 1955 年的印度^[1]。1983 年前苏联学者 Balayan 等^[2]应用免疫电镜技术首先在一位志愿感染者的粪便中发现了直径为 27~30nm 的病毒样颗粒, 1988 年将该病原被命名为戊型肝炎病毒。1990 年 Reyes 等^[3]首先获得 HEV 的全基因克隆并进行了序列分析。此后, 对戊型肝炎病毒的研究发展迅速。

1. 戊型肝炎病毒的生物学特征

1.1. HEV 的形态特征和理化性质

HEV 为大小约 27~34nm (平均 30~32nm) 的单股正链无包膜 RNA 病毒。其表面有许多类似杯状病毒的凸起和缺刻结构, 与 HAV 的平滑表面明显不同。据推测 HEV 病毒颗粒可能为 T=3 的正二十面体立体对称结构, 由 60 个形态亚单位组成, 每个形态亚单位由一个 HEV 结构蛋白同源二聚体构成。病毒颗粒有实心和空心两种, 实心颗粒内部密, 为完整的病毒颗粒, 约占 2/3, 空心颗粒内部透亮, 为不含完整基因的缺陷病毒颗粒 (图 1-1)^[4]。

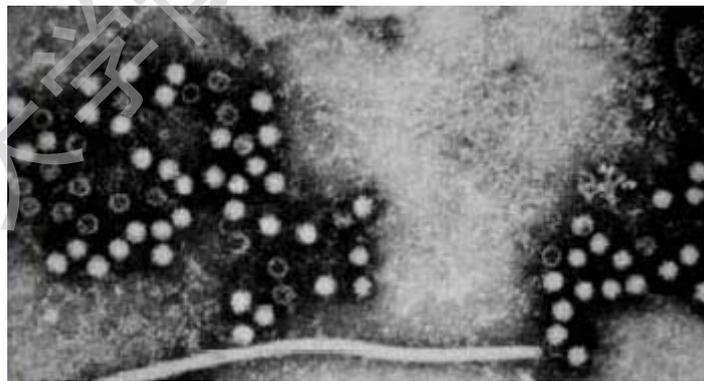


图 1-1 HEV 天然病毒颗粒的免疫电镜观察

Fig1-1 Natural HEV particles visualized by IEM

(Quoted from *Centers for Disease Control and Prevention(CDC)*, Atlanta, USA)

完整天然 HEV 颗粒在氯化铯中的浮力密度为 $1.35\sim 1.40\text{g/cm}^3$, 沉降系数为 183S, 缺陷型空心颗粒的沉降系数为 165S。HEV 在 -70°C 与 8°C 温度范围之间不稳定, 但在液氮中能长时间保存; 在酸性和弱碱性的肝内胆汁和胆囊内胆汁环境

中稳定存在^[5]，也有研究认为在生肉或没有完全熟的肉制品里面 HEV 仍旧可以保持相当的感染性^[6-8]。

1.2. HEV 基因组及其功能

早期的研究表明 ET-NANBH（急性传染性非甲非乙型肝炎）可能是由 RNA 病毒引起的，因此 Reyes 和他的同事们试图构建其 cDNA 文库。他们用二次传代的缅甸株感染猕猴后，获得富含病毒的胆汁并以此为原料在 γ gt10 中构建出一个 cDNA 文库，尔后从其中筛选出一个 1.3kb 的非人非猴基因的 cDNA 克隆，命名为 ET1.1^[9]。

1991 年 Tam 等^[10]报道了 HEV 的全基因组结构（图 1-2）。HEV 基因组为线性单股正链 RNA，全长约 7.5kb，5' NTR 为 27 nt、3' NTR 为 48 nt（所有的数据来自于缅甸株的原型株）。全基因组含有三个互相重叠的 ORFs，ORF1 起始于 5' 端的 28nt，止于 5106nt；ORF2 起始于 ORF1 的 3' 端的 38nt，延伸 1980nt，止于 Poly (A) 上游的 65nt 处；ORF3 全长 369nt，5' 端与 ORF1 重叠 1nt，3' 端与 ORF2 重叠 328nt。全基因组的核苷酸构成为：A17%、C 32%、G 26%、U25%、(G+C) 58%^[10-12]。

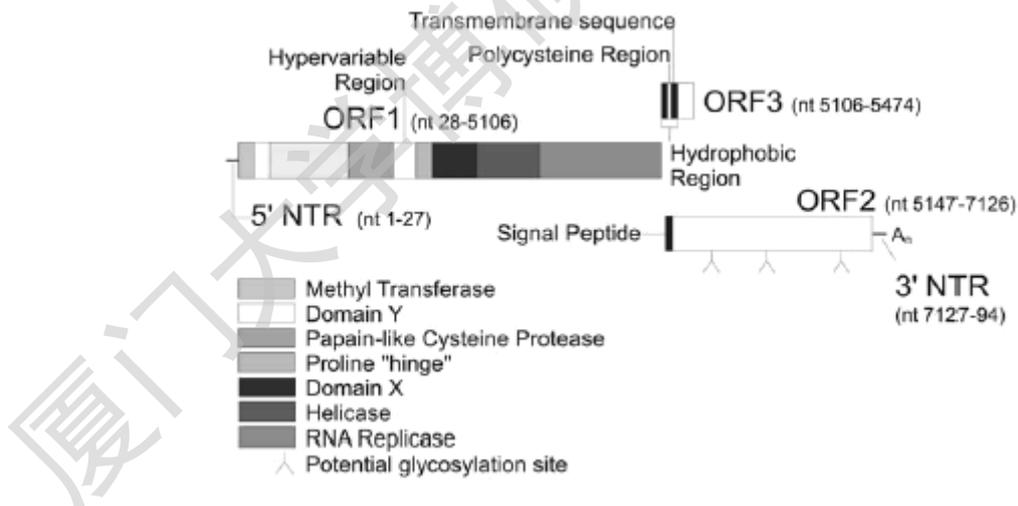


图 1-2 HEV 基因组^[10]

Fig 1-2 Genomic organization of HEV^[10]

1.2.1. ORF1

ORF1 起始于病毒基因组 5' 端 28bp 的非编码区之后开始，全长 5079bp。ORF1 核苷酸序列变化最大，其高变区（HVR）的长度在不同 HEV 病毒株中有

所不同。ORF1 有 3 个保守序列：GDD 序列、GVPGSGKS 和 DEAP 序列。

ORF1 编码大约 1693aa 的非结构蛋白 (pORF1)，这些蛋白具酶活性，涉及病毒的复制和病毒蛋白的成熟。保守结构域分析表明 ORF1 有多个酶活性区^[13]：RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RdRP) 区 (位于多聚蛋白 C 端)、RNA 螺旋酶区 (在基因复制和转录中解开 RNA 结构)、木瓜蛋白酶样的半胱氨酸蛋白酶区 (也发现于 α 病毒和风疹病毒)、甲基转移酶区 (位于多聚蛋白 N 端)、两个未知功能的 X 区和 Y 区 (与风疹病毒类似)。

所有基因型的 HEV RNA 能与抗 7-甲基鸟嘌呤的单抗反应，这一结果表明 HEV 的 RNA 基因组有 5' 帽子结构^[11]，病毒基因组 5' 非编码区 (NTR) 只有 27-35bp 的事实与基因组有帽子结构的假设相一致，其催化加帽的反应与真核细胞不同，而与 α 病毒超家族的类似^[14]。重组 HEV 基因组的体内感染实验^[15]表明，HEV 基因组的 5' 帽子结构是 HEV 保持活性和感染性所必须的。Magden 等^[14]也证实在昆虫细胞中表达的 pORF1 活性可被 5' 帽结构类似物抑制。这为抗病毒药物的研制提供了理想的靶向。

在 X 区之前有一个富含脯氨酸的高变绞链区，其碱基和氨基酸序列在不同地域分离的 HEV 株中同源性很小。这样的高变区通常见于某些病毒的结构蛋白当中，用以逃避宿主的免疫反应^[16-17]。

1.2.2. ORF2

ORF2 与 ORF1 相隔 41nt，开始于 5147 位碱基，终止于 3' 端 poly (A) 尾上游 65bp 处，含 1980nt，编码 660aa 的多肽 (pORF2)，推测为病毒主要结构蛋白，组成病毒衣壳。ORF2 蛋白在 N 端有一个典型的信号肽序列，其后是一个富含精氨酸的强正电结构域，被认为与病毒组装过程中的基因组 RNA 衣壳化有关。ORF2 在翻译过程中通过信号肽识别蛋白 (SRP) 机制进入内质网 (ER) 中糖基化和累积，并很可能在此形成衣壳的子粒。

ORF2 上有三个 N-糖基化位点 (Asn-137、Asn-310 和 Asn-562)，在各毒株间高度保守，其中 Asn-310 为主要糖基化位点。以 ORF2 转染哺乳动物细胞 COS、人肝癌细胞 Huh-7、HepG2，可表达出 88kD 糖蛋白，在胞浆和胞膜上均有分布^[18]。对三个糖基化位点进行突变，并不影响 pORF2 定位于细胞膜，而去除信号肽序列后则 pORF2 仅见于胞浆，提示信号肽为 pORF2 细胞表面定位所必需，而

非糖基化位点。

另一个值得注意的是,用具备翻译修饰功能的体外转录翻译体系进行 pORF2 的体外翻译,翻译出的 88kD 的 gpORF2 除单体外,还可见明显的二聚体形式,说明 gpORF2 有自发形成同源二聚体的倾向,病毒衣壳的子粒很可能即是由 gpORF2 的同源二聚体组成。Li 等^[19]通过缺失突变发现 ORF2 形成正确构象和同源二聚体的核心区域为 459-606aa, 394-458aa 和 606-660aa 是其所需环境氨基酸,核心区域要形成同源二聚体至少需要其中一个区域的存在。368-398aa 是 ORF2 同源二聚体形成颗粒的关键性区域。

1.2.3. ORF3

ORF3 是一个小的读码框,位于 ORF1 的末端,全长 369 个碱基,编码一个 123aa 的小肽 (pORF3),无糖基化,分子量约 13.5kDa。pORF3 在哺乳动物细胞中表达时,仅见于胞浆中,无糖基化,无信号肽,是一个细胞骨架相关磷蛋白,其第 80 位的丝氨酸 (Ser) 可被细胞有丝分裂原激活的蛋白激酶磷酸化^[20]。该磷酸化蛋白分子的 N 端含有两个强的疏水区域,可形成跨膜的 α -螺旋结构。磷酸化的 pORF3 与肝细胞骨架结合,并可与衣壳蛋白 pORF2 形成复合体,表明此蛋白在病毒颗粒组装的过程中可能扮演了细胞骨架锚定位点的角色^[21]。

1.3. HEV 的归类

HEV 的病原在用免疫电镜初次观察到后就被估计是一种 RNA 病毒,并被建议归类到细小病毒科^[22]。后来发现 HEV 病原的免疫原性和各种理化性质与细小病毒没有明显关系。1988-1998 年间 HEV 被暂时的分类到杯状病毒科 (*Caliciviridae*)。与无包膜的杯状病毒相比,HEV 颗粒更小,表面刺突和缺痕更精细,但在蔗糖中的沉降系数和浮力密度相似。然而,HEV 的 ORF3 的位置、ORF2 的长度以及 ORF1 中功能蛋白结构域的排列方式均与杯状病毒不同。HEV 非结构区的系统进化分析也不支持将 HEV 分类到杯状病毒科 (图 1-3)^[23]。

近来发现 HEV 基因组的排列方式和使用方式与披盖病毒科 (*Tagaviridae*) 的风疹病毒 (*Rubella virus*) 和甜菜黄叶脉坏死病毒 (*Beet necrotic yellow vein virus*) 更为类似 (图 1-3)^[10, 24]。因此有人建议将其归于风疹病毒族 α 病毒亚组。

在 1999 年的第六届悉尼国际病毒学会议上,HEV 被归类为相对单独的一个种 (genus)——戊型肝炎病毒种 (*Hepatitis E-like viruses*)^[25]。2004 年第八次国

际病毒分类委员会上戊肝病毒被单独归为戊肝病毒科 (*Hepeviridae*) 戊肝病毒属 (*Hepevirus*) [26]。

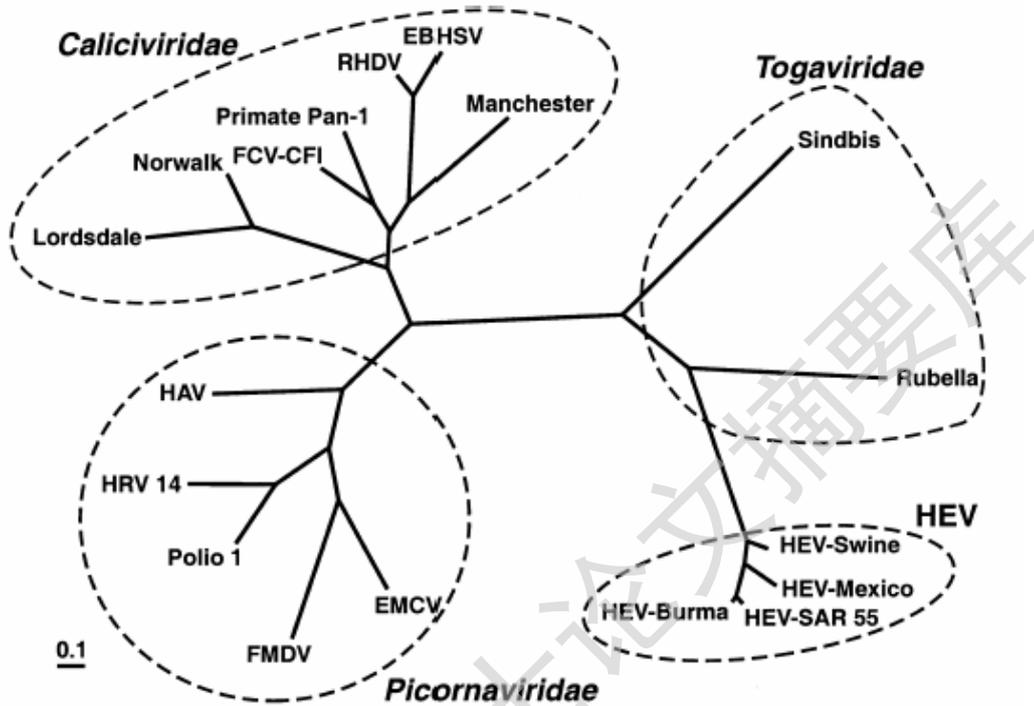


图1-3 聚合酶区的同源性分析表明HEV与杯状病毒相距较远而与披盖病毒较接近[23]

Fig 1-3 Maximum likelihood phylogram of partial polymerase nucleotide sequences showing that HEV segregates away from the *caliciviridae* and is more closely related to the *Togaviridae* [23] (*Caliciviridae*, 杯状病毒科; *Togaviridae*, 披盖病毒科; *Picornaviridae*, 细小病毒科)

1.4. 戊肝病毒的基因型及血清型

1.4.1. 基因型

通过对各 HEV 株的 ORF2、ORF3 氨基酸序列进行分析, 根据 Fankhauser 等的提议, 参照 Norwalk 病毒的分类标准[27], 即将 ORF2 区的核酸变异不超过 20% 的分离株归为一个基因型, 共发现了 4 种基因型的 HEV (图 1-4)。

基因 1 型的大部分病毒株为从亚洲和非洲疫区分离的病毒株; 基因 2 型的病毒株包括墨西哥株[29]和尼日利亚株[30]; 基因 3 型有从美国、部分欧洲国家 (意大利、希腊、西班牙等) 和阿根廷的急性戊肝患者中分离的 HEV 株[31-35], 它们与疫区的各分离株相距较远 (变异度 > 20%); 最近在中国发现的新分离株包括中国台湾地区的分离株[30]属于基因 4 型。猪体内也分离到的一些新的病毒株[28, 31, 36-38]分别属于基因 3 型和 4 型。四种基因型的代表株分布为缅甸株 (1 型)、墨西

哥株（2 型）、美国株（3 型）和中国台湾株（4 型）。在全世界范围内，大部分 HEV 感染是由基因 1 型引起的，而基因 3、4 型只报道过散发型病例，但目前在我国 4 型有扩大的趋势。最近，研究者在鸟类体内分离出了一种新的 HEV 病毒株，有学者倾向认为可以将其列为第 5 种病毒基因型^[39-42]。

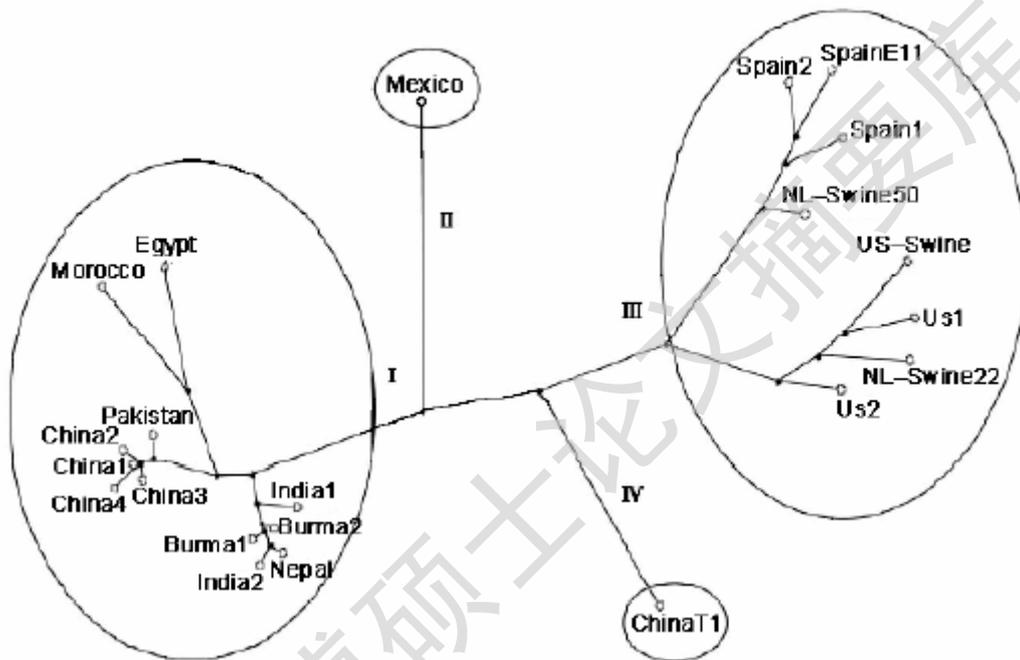


图 1-4 HEV 的系统进化树及基因型划分

Fig1-4 Unrooted phylogenetic tree of HEV genotyping
Phylogenetic relationships among hepatitis E viruses, based on 304 nucleotide fragment sequences of HEV ORF2(nucleotides 5994-6297^[28]).

1.4.2. 血清型

从目前的研究结果来看，多数认为能够感染人类的 1-4 型 HEV 彼此能很好地交叉保护，表明均为一个血清型。有以下几点证据支持这一观点。

虽然不同地理区域来源的 HEV 株基因变异较大，如缅甸株（B1）和墨西哥株（M1，1986 年分离于 Telixtac 流行区^[29]）的两个原型株碱基的同源性只有 76%^[66]，但不同基因型 HEV 的 OFR2 氨基酸序列具有高度的同源性，ORF1、ORF2、ORF3 氨基酸的同源性分别为 84%、93%和 87%^[103]；

各基因型病毒间的交叉保护实验：Arankalle 等^[104]对 5 年前感染过 HEV 的恒河猴静脉攻击异型 HEV，证实低滴度的 HEV IgG 抗体仍能保护实验猴，避免

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库