

南京地区中孕孕妇戊型肝炎病毒感染血清流行病学调查

周璇 黄红玉 段红蕾 陈珊珊 周乙华 胡娅莉*

(南京大学医学院附属鼓楼医院,江苏 南京 210008)

【摘要】 目的 调查南京及其周边地区孕妇人群戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)感染状况。方法 912例中孕期孕妇血清采用ELISA法初筛血清抗-HEV IgG和IgM抗体,初筛阳性血清进一步采用Western Blot确认。结果 南京及其周边地区中孕期孕妇人群抗-HEV IgG抗体阳性率为13.6%(124/912),抗-HEV IgM抗体阳性率为1.4%(13/912)。在<21岁、21~25岁、26~30岁和>30岁孕妇中,抗-HEV IgG阳性率分别为14.0%(6/43)、12.6%(62/492)、15.2%(39/256)、12.1%(17/121);抗-HEV IgM阳性率分别为2.3%(1/43)、1.0%(5/492)、1.2%(3/256)和3.3%(4/121);各年龄组抗-HEV IgG和IgM抗体阳性率差异均无统计学意义($P>0.05$)。所有抗-HEV IgM阳性血清,同时抗-HEV IgG阳性。结论 南京及其周边地区中孕孕妇人群存在HEV散发感染,以无症状的隐性感染为主。

【关键词】 戊型肝炎病毒;孕妇;血清学调查

【中图分类号】 R714.251 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate the seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in pregnant women in Nanjing and the surrounding areas. **Method** The sera collected from 912 pregnant women at gestation age of 15-21 weeks were tested for anti-HEV IgG and IgM with ELISA and then confirmed by Western Blot. **Results** The overall prevalence of anti-HEV IgG and anti-HEV IgM in pregnant women were 13.6% (124/912) and 1.4% (13/912), respectively. The positive rates of anti-HEV IgG in the pregnant women at the ages of <21, 21~25, 26~30, and >30 years were 14.0% (6/43), 12.6% (62/492), 15.2% (39/256) and 3.3% (17/121), respectively, and the positive rates of anti-HEV IgM in those four groups were 2.3% (1/43), 1.0% (5/492), 1.2% (3/256), and 1.2% (4/121), respectively; the prevalence of anti-HEV IgG and IgM did not differ significantly among the four age groups ($P>0.05$). All the anti-HEV IgM positive samples were also IgG positive. **Conclusions** Sporadic cases of HEV infection in pregnant women were detected in Nanjing and the surrounding areas, mainly with sub-clinical infections.

【Key words】 hepatitis E virus; pregnant women; seroprevalence

戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)是我国成年人散发性急性肝炎的主要病原^[1],主要经粪

口途径传播。戊型肝炎多数呈自限性,一般于发病的6~12周内恢复正常。普通人群急性戊型肝炎的病死率为0.07%~0.6%,但孕妇病死率较高,尤其在妊娠晚期可高达10%~25%^[2]。血清流行病学表明,世界范围内孕妇人群普遍存在HEV感染,抗-HEV IgG抗体阳性率在发达国家约为3.6%~

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2015.01.006

基金项目:国家临床重点专科建设项目(2011271);江苏省科技发展计划项目(BL2012015);江苏省母胎医学重点学科建设项目(XK201102);南京市卫生人才工程项目(QRX11024)

* 通讯作者:胡娅莉,E-mail:dtylhu@126.com

7.74%^[3,4];在印度、埃及等发展中国家可高达33.67~84.3%^[5,6];在我国为10.27%~25.16%^[7,8]。但是我国现有的有关孕妇人群血清流行病学调查的样本量均较小,不能准确反映该群体 HEV 感染水平。本研究通过调查南京及其周边地区大样本孕妇人群血清中抗-HEV 抗体阳性率,了解孕妇人群 HEV 感染状态,为我国 HEV 感染情况提供循证医学证据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 912例血清均来自2010年在南京大学医学院附属鼓楼医院进行母血清唐氏综合征产前筛查的中孕期孕妇,年龄18~42岁,平均25.62岁;孕周15~21周,平均17.85周。采外周静脉血,3000 r/min离心5分钟,吸取上层血清置-80℃保存。

1.2 抗-HEV IgG 和 IgM 抗体检测 抗-HEV 抗体具有仅与 HEV ORF2 的主要抗原决定簇多肽二聚体反应,而几乎不与主要抗原决定簇多肽单体反应的特性^[9],因此我们制备了能形成二聚体的重组主要抗原决定簇多肽(ORF2 459-607 多肽)以及不能形成二聚体的截短多肽(ORF2 472-607 多肽),并联合应用这两种多肽,建立了检测抗-HEV IgG 和 IgM 抗体的 ELISA 法,这一检测系统,一方面可以检测抗-HEV 抗体,另一方面可以排除部分假阳性^[10,11]。本研究采用本室 ELISA 法初步检测孕妇人群抗-HEV IgG 和 IgM 抗体,主要操作步骤如下:分别用终浓度为 1 μg/ml ORF2 459-607 多肽和 ORF2 472-607 多肽包被 ELISA 板,100 μl/孔,4℃过夜。次日 PBST(含 0.05% Tween-20 PBS 缓冲液)洗涤 1 次后,加入封闭液(5% PBST-脱脂奶)300 μl/孔,37℃封闭 1 小时;加入待测血清(5% PBST-脱脂奶 1:100 稀释)100 μl/孔,37℃孵育 1 小时,PBST 洗涤 4 次,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗人 IgG 和 IgM 抗体(Sigma 公司,美国, PBST 1:3000 稀释),100 μl/孔,37℃孵育 30 分钟;PBST 洗涤 4 次后拍干,加入四甲基联苯胺。室温孵育 15 分钟后,加 2 mol/L H₂SO₄(50 μl/孔)终止反应,酶标仪读取 OD₄₅₀ 值,分别记作 OD₄₅₉₋₆₀₇ 和

OD₄₇₂₋₆₀₇。以 OD₄₅₉₋₆₀₇ ≥ 0.5 且 OD₄₅₉₋₆₀₇ - OD₄₇₂₋₆₀₇ > 2 或 OD₄₅₉₋₆₀₇ : OD₄₇₂₋₆₀₇ > 0.5 为 ELISA 法初筛阳性判断标准。

我们既往研究证明,ORF2 459-607 多肽在 Laemmli 缓冲液中,不加热处理直接进行 SDS-PAGE,其多肽既以二聚体形式,也以单体形式存在,而加热后进行 SDS-PAGE,则仅以单体形式存在^[9,10]。根据抗-HEV 抗体主要与二聚体反应这一特点,459-607 多肽未加热处理直接进行 SDS-PAGE;转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜后,5% TBST-脱脂奶室温封闭 1 小时;待测血清(5% TBST-脱脂奶 1:20~100 稀释)室温孵育 3 小时,TBST 洗涤 4 次;HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体(Sigma 公司,美国, TBST 1:7500 稀释)或 HRP 标记的羊抗人 IgM 抗体(Sigma 公司,美国, TBST 1:5000 稀释)室温孵育 1 小时,TBST 洗涤 4 次后 ECL 显色。此外,为观察 ORF2 459-607 多肽二聚体和单体,根据 ORF2 459-607 多肽氨基端有 6×组氨酸(His₆)标识的特点,将抗-His₆ 抗体(用封闭液 1:3000 稀释)与膜孵育 30 分钟,经 TBST 洗涤 4 次后 ECL 显色作为对照。如图 1 所示,带有抗-His₆ 的 ORF2 459-607 多肽,无论二聚体还是单体都能与抗-His₆ 抗体反应,而人血清只能与二聚体反应。

抗-HEV IgG 和 IgM 抗体阳性判断标准:以经 ELISA 法初筛,Western blotting 验证为阳性的明确判定为阳性标本。

1.3 统计学分析 应用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学分析,率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中孕孕妇血清抗-HEV IgG 抗体阳性率 912 例中孕期孕妇血清经 ELISA 法初筛,抗-HEV IgG 抗体阳性 124 例,其中 60 例抗-HEV IgG 抗体 OD 值 < 0.725(1.5 倍临界值);选取其中 27 例用 Western blotting 验证,结果均为阳性,代表性实验结果如图所示(图 1)。因此,124 例初筛抗-HEV IgG 抗体阳性孕妇,确认为抗-HEV IgG 阳性,阳性率 13.6%。根据年龄将 912 例中孕孕妇分为 4 组,分别

为21岁以下、21~25岁、26~30岁、30岁以上,不同年龄段孕妇抗-HEV IgG抗体阳性率见表1。各年龄组抗-HEV IgG抗体阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=1.025, P=0.795$)。

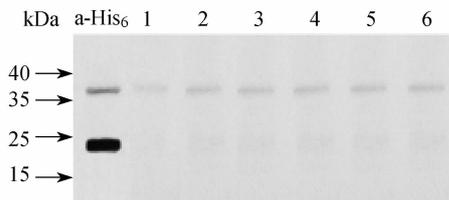


图1 Western blot 检测血清中抗-HEV IgG 抗体

注:图中左侧标记为蛋白质分子量标准;a-His₆表示为1:3000稀释的抗-His₆抗体孵育30分钟,ECL显色;位于25kDa下方的条带为HEV ORF2多肽单体,介于35kDa和40kDa条带为ORF2多肽二聚体。泳道1~6分别表示6例待测血清(抗-HEV IgG抗体OD值为1.210、0.922、0.814、0.706、0.684及0.581),经1:20~100稀释后孵育3小时,采用1:7500稀释的HRP标记的羊抗人IgG抗体孵育1小时,ECL显色。泳道1~6均为阳性

表1 不同年龄阶段抗-HEV IgG 抗体阳性率

年龄组	例数	抗-HEV IgG 抗体阳性数[例(%)]	P
<21岁	43	6(14.0)	0.795
21~25岁	492	62(12.6)	
26~30岁	256	39(15.2)	
>30岁	121	17(12.1)	
合计	912	124(13.6)	

2.2 中孕期孕妇血清抗-HEV IgM 阳性率 912例中孕期孕妇血清经ELISA法初筛,抗-HEV IgM抗体阳性53例,其中13例抗-HEV IgM抗体OD<0.725(1.5倍临界值),因为抗-HEV IgM抗体ELISA检测方法易出现假阳性,我们对所有抗-HEV IgM抗体阳性标本均采用Western blot进一步验证,确认抗-HEV IgM抗体阳性13例(1.4%),代表性实验结果如图所示(图2),这些抗-HEV IgM抗体阳性血清,抗-HEV IgG抗体同时阳性。另外40例ELISA初筛阳性血清,Western blot结果显示为阴性,确认为假阳性。不同年龄段孕妇抗-HEV IgM抗体阳性率见表2。各年龄组抗-HEV IgM抗体阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.996, P=0.262$)。

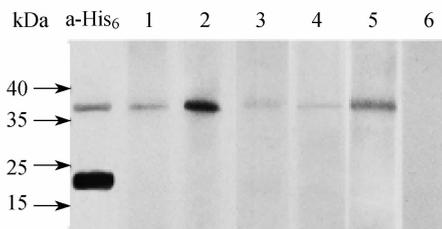


图2 Western blot 检测血清中抗-HEV IgM 抗体

注:图中左侧标记为蛋白质分子量标准;a-His₆表示用1:3000稀释的抗-His₆抗体孵育30分钟,ECL显色;位于25kDa下方的条带为HEV ORF2多肽单体,介于35kDa和40kDa条带为ORF2多肽二聚体。泳道1~6分别表示6例待测血清(抗-HEV IgM抗体OD值为1.486、0.964、0.745、0.622、0.572及0.745),经1:20~100稀释后孵育3小时,采用1:5000稀释的HRP标记的羊抗人IgM抗体孵育1小时,ECL显色。泳道1~5为阳性,泳道6为阴性

表2 不同年龄阶段抗-HEV IgM 抗体阳性率

年龄组	例数	抗-HEV IgM 抗体阳性数[例(%)]	P
<21岁	43	1(2.3)	0.262
21~25岁	492	5(1.0)	
26~30岁	256	3(1.2)	
>30岁	121	4(3.3)	
合计	912	13(1.4)	

3 讨论

我国是戊型肝炎高流行地区之一。本研究显示,2010年南京及其周边地区孕妇人群抗-HEV IgG抗体阳性率为13.6%,明显低于蒋理等^[8]对南京地区155例孕妇人群25.16%的阳性率,也略低于山东省孕妇人群的16.2%^[12]。本研究抗-HEV IgM抗体阳性率为1.4%,低于山东地区的2.6%^[12]。本研究调查结果较低的原因可能与不同实验室采用的试剂盒及检测方法的不同有关。国内外研究均表明,对同一人群采取不同检测方法,获得的抗-HEV IgG阳性率差异很大。如Wenzel等^[13]的研究显示,采用3种不同试剂盒对同一人群血清进行检测,在健康医务人员中血清抗-HEV IgG抗体阳性率分别为4.5%、18%和29.5%。我国学者用5种不同试剂盒检测同一普通人群血清抗-HEV IgG抗体,阳性率从低到高依次为3.48%、7.83%、17.39%、23.91%和31.74%^[14]。为了更加准确地获得孕妇

人群抗-HEV 抗体阳性率,我们采用了更加严谨的检测策略。首先,本研究中 ELISA 法是根据抗-HEV 抗体与 HEV ORF2 的主要抗原决定簇多肽二聚体呈高反应性,而与单体的不反应性的特点,分别以重组 4 型 HEV 的 ORF2 主要免疫表位多肽(459-607 位氨基酸,可形成二聚体)及截短多肽(472-607 位氨基酸,仅形成单体)作为包被抗原,以此检测抗-HEV IgG 及 IgM 抗体,并可排除部分假阳性^[10];此外,本研究在 ELISA 检测方法基础上又采用 Western blot 法验证,进一步排除了假阳性的存在,提高了检测特异性。因此,虽然本室所得抗-HEV 抗体阳性率较其他研究低,但具有较高的可靠性,更能确切反映南京及其周边地区 HEV 实际感染水平。

年龄是影响抗-HEV 抗体水平的重要因素^[15],本研究显示,抗-HEV IgG 抗体阳性率在 26~30 岁年龄组孕妇最高(15.2%),在 >30 岁年龄组孕妇最低(12.1%);而抗-HEV IgM 抗体阳性率在 >30 岁年龄组的比例最高(3.3%),在 21~25 岁年龄组最低(1.0%),但统计发现,各年龄组抗-HEV IgG 和 IgM 抗体阳性率差异均无统计学意义,这与孕妇人群年龄较为接近有关。

人体感染 HEV 后 3~4 周,首先出现抗-HEV IgM 抗体,此后约 1 周即可检测到抗-HEV IgG 抗体。一般认为,抗-HEV IgM 抗体阳性表示近期感染,单纯抗-HEV IgG 抗体阳性表示既往感染或急性感染后期。其中,抗-HEV IgM 抗体阳性作为近期 HEV 感染的指标,如果同时抗-HEV IgG 抗体阳性,则更加支持诊断^[16]。由于特异性 IgM 抗体产生后与出现特异性 IgG 的间隔仅一周左右,而不是特异性 IgM 抗体消失后才出现特异性 IgG 抗体,因此临床上很少出现仅 IgM 阳性的情况,故检测出单独 IgM 阳性多为假阳性。本研究也证实了这一结论,在检测过程中未发现仅抗-HEV IgM 抗体阳性的血清标本。本研究所有抗-HEV IgM 抗体阳性血清标本其抗-HEV IgG 抗体同时阳性,但由于研究表明血清学检测中抗-HEV 抗体可能与其他病毒特异性抗体(巨细胞病毒、EB 病毒等)产生交叉反应而造成假阳性结果^[17],故虽提示为 HEV 近期感染,但是仍

需谨慎判断。

综上所述,南京及其周边地区中孕期孕妇人群存在 HEV 散发感染,抗-HEV IgG 抗体阳性率分别为 13.6%;抗-HEV IgM 抗体阳性率,即近期感染率为 1.4%。本研究中近期感染的孕妇均无临床症状,同样说明了我国 HEV 感染主要以无症状的隐性感染为主。目前 HEV 感染对妊娠结局影响的研究主要以发生急性戊型肝炎的孕妇为研究对象^[18],而隐性感染是否影响妊娠结局则鲜有报道,因此有待进一步观察研究。

参 考 文 献

- [1] 孟运运,种红云,王耀峰,等. 218 例散发性急性甲、戊型肝炎流行病学特征分析[J]. 现代预防医学, 2007, 34(7): 1345-1347.
- [2] Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis E[J]. Lancet, 2012, 379(9835): 2477-2488.
- [3] Lindemann ML, Gabilondo G, Romero B, et al. Low prevalence of hepatitis E infection among pregnant women in Madrid, Spain[J]. J Med Virol, 2010, 82(10): 1666-1668.
- [4] Renou C, Gobert V, Locher C, et al. Prospective study of Hepatitis E Virus infection among pregnant women in France[J]. Virol J, 2014, 11: 68.
- [5] Begum N, Devi SG, Husain SA, et al. Seroprevalence of subclinical HEV infection in pregnant women from north India: a hospital based study[J]. Indian J Med Res, 2009, 130(6): 709-713.
- [6] Stoszek SK, Abdel-Hamid M, Saleh DA, et al. High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2006, 100(2): 95-101.
- [7] Huang F, Ma T, Li L, et al. Low seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women in Yunnan, China[J]. Braz J Infect Dis, 2013, 17(6): 716-717.
- [8] 蒋理,谢而付,杨瑞霞,等. 中孕孕妇血清中戊型肝炎血清标志物的分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(12): 1721-1723.
- [9] 潘金顺,庄辉,吴超,等. 利用戊型肝炎病毒 ORF2 多肽的二聚体特性和抗原性特征[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2008, 28(11): 993-997.
- [10] Pan JS, Zhang K, Zhou J, et al. Application of truncated immunodominant polypeptide from hepatitis E virus (HEV) ORF2 in an assay to exclude nonspecific binding in detecting anti-HEV immunoglobulin M[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48

- (3): 779-784.
- [11] 毕永春, 潘金顺, 庄辉, 等. 利用戊型肝炎开放读码框架 2 截短多肽降低抗戊型肝炎病毒 IgM 检测中的假阳性[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(7): 821-824.
- [12] Cong W, Sui JC, Zhang XY, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus among pregnant women and control subjects in China[J]. J Med Virol, 2014, Epub ahead of print.
- [13] Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, et al. Test performance characteristics of Anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis E seroprevalence estimates[J]. J Infect Dis, 2013, 207(3): 497-500.
- [14] 江永珍, 田瑞光, 鲁建, 等. 我国戊型肝炎 ELISA 诊断试剂的质量比较[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2007, 21(1): 59-61.
- [15] Chen Dong, Xing Dai, Jiuhong Liang, et al. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Varies Considerably Among Chinese Provinces[J]. Hepat Mon. 2012, 12(6):386-390.
- [16] 周乙华, 庄辉. 中国戊型肝炎流行病学研究进展[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(12): 1414-1416.
- [17] Hyams C, Mabayoje DA, Copping R, et al. Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection[J]. J Med Virol, 2014, 86: 478-483.
- [18] Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers [J]. Journal of Viral Hepatitis, 2009, 16: 519-523.

(收稿日期:2014-12-30)

编辑:杨颖俊

· 视频导读 ·

孕期 TORCH 感染的筛查和诊断

周乙华

(南京大学医学院附属鼓楼医院)



有人将 TORCH 定义为以下感染:弓形虫(toxoplasma)、风疹(rubella)、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)及疱疹病毒(herpesviruses)。

宫内感染的产前诊断始终是围产医学的一大挑战,绝大部分的孕期感染孕妇无明显症状,但各种病毒却可能对胎儿及新生儿造成不同程度的危害。那我们究竟该不该做产前 TORCH 筛查? 如果该做的话又该如何做? 来自南京医科大学医学院附属鼓楼医院的周乙华教授在视频中向我们分析了以上 4 种病毒在

我国的感染现状、实验室诊断及围产儿结局,以期对 TORCH 感染的临床诊断给出意见和建议。

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2015.01.007