

·病毒学诊断·

基于多聚化重组抗原的检测戊型肝炎病毒 IgM 与 IgG 抗体的 ELISA 的建立及初步评估

葛胜祥¹, 张军¹, 彭耿³, 黄果勇², 何志强¹, 顾颖¹, 朱子恒¹, 吴文翰¹, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 北京万泰生物药业有限公司, 北京; 3. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西 430021)

摘要: 建立并评估分别检测戊型肝炎(戊肝)病毒 IgM 与 IgG 抗体的捕获法及间接法 ELISA。以原核表达的多聚化重组 HEV 蛋白为抗原, 建立戊肝捕获法 IgM ELISA (E2- IgM) 和间接法 IgG ELISA (E2- IgG)。利用 29 只实验感染猴系列血清及多份临床急性肝炎血清、正常人血清以及单克隆抗体评估所建立的方法的敏感性与特异性, 并与商品化试剂(Genelabs 公司抗- HEV IgG 和 IgM 试剂, GL- IgG/ GL- IgM) 进行比较。29 只恒河猴 E2- IgM 和 E2- IgG 的阳转率均为 100%, 其中 75% 在感染后 4 周内阳转, 均早于 ALT 异常时间。E2- IgM 持续 2~ 14 周, 平均 6 周; E2- IgG 在 70 周时仍无一阴转。GL- IgG 阳转率为 79. 3% (23/29), 多数晚于 ALT 异常时间, 平均持续约 18 周, 但最长为 1 只在感染后 70 周时仍为阳性。用 E2- IgM 试剂盒检测 928 份正常人血清, 仅 2 份 OD 值略高于 0. 2。检测 510 份临床急性肝炎血清, 可明显将其区分为 2 个部分, 一个部分 OD 值小于 0. 2, 其 OD 值分布与正常人相似; 另一个部分 OD 值大于 0. 4, 共 131 份, 其中 109 份大于 1. 0。可能分别对应于急性肝炎中的非戊肝患者和戊肝患者。119 份非甲~ 丙急性肝炎中, E2- IgM 阳性 57 份, GL- IgM 阳性 29 份(E2- IgM 均阳性)。5 060 份普通人群血清的 E2- IgG OD 值在 0. 2 以下, 形成一个近似对数正态峰, 均值为 0. 022, 在 OD 值 0. 4 以上则分布均匀。用 E2- IgG 试剂检测 200 份临床急性肝炎血清, 结果 OD 值 0. 2 以下也形成一个与普通人群类似的近似对数正态峰, 但 OD 值在大于 1. 0~ 4. 0 间形成另一个尖峰(峰值在 OD 2. 5 处), 其中多数 E2- IgM 阳性。抗- HEV 单抗可明显阻断 E2- IgM 及 E2- IgG, 单抗 Fab 段的阻断效果与完整抗体类似, 提示这种阻断是表位特异的。建立的戊肝 IgM 试剂和 IgG 试剂具有良好的敏感性与特异性。IgM 试剂适用于临床戊肝诊断, IgG 试剂适用于既往戊肝感染诊断。

关键词: 戊型肝炎; 诊断; 试剂; IgM; IgG

中图分类号: R373. 21 文献标识码: A 文章编号: 1000- 8721(2003) 01- 0074- 08

戊型肝炎(简称戊肝)是经消化道传播的主要急性肝炎之一, 其病原体为戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus, HEV)。特异的血清学检测是戊肝诊断的重要指标。目前戊肝 IgG 和 IgM 抗体的 ELISA 检测试剂虽均已建立并商品化, 但仍存在较大缺陷^[1- 4]。对抗- HEV IgG ELISA 而言, 其主要问题在于不同的抗原检测既往感染的能力差别很大。许多 HEV 抗原, 包括合成肽、原核表达的 ORF3 重组蛋白和大多数 ORF2 重组蛋白, 对急性期血清有较好的活性, 但对恢复期血清的反应性则很弱或差异巨大。绝大多数试剂检出的抗- HEV IgG 抗体应答, 在许多患者感染急性期之后会明显减弱或消失。

因此, 当许多病人已阴转时, 另一些病人又会在一段时间内对这些抗原维持较高反应性, 这就使得检测结果的描述十分困难。这类试剂用于血清流行病学研究会明显低估感染率, 而用于临床诊断又无法很好区分既往感染与近期感染。而基于这些抗原的 IgM 试剂则由于灵敏度太低而无法满足临床诊断需要。因此, 可靠的戊肝 IgM 以及 IgG 诊断试剂的研制在戊肝发现近 20 年后, 仍是一个世界范围内急待解决的问题。

近年来的研究表明, 在昆虫杆状病毒表达系统和原核表达系统表达的 ORF2 蛋白中, 存在某些强的构象依赖性表位^[5- 8], 其抗体在绝大多数感染血清中可长期以较高水平存在。这些蛋白已被作为包被抗原被多个实验室用于人群及多种动物的 HEV IgG 血清学研究, 但用于间接法 IgM 诊断则灵敏度仍有较大不足。最近, 作者在大肠杆菌中表达了一段 ORF2 重组蛋白 NE2, 能自发形成多聚体形式, 并正确形成

收稿日期: 2002- 07- 31; 修回日期: 2002- 09- 28

基金项目: 福建省科技重大项目(2002F013)

作者简介:

通信作者: 夏宁邵, 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(E- mail: nsxia@jingxian.xmu.edu.cn)

了多个构象依赖性表位, 其中两个表位的单抗能直接捕获病毒, 并具有中和活性^[9, 10]。本研究利用 NE2 作抗原, 建立了抗 HEV-IgM μ 链捕获法 ELISA 和 IgG 间接法 ELISA, 在 HEV 实验感染恒河猴以及临床急性肝炎患者和普通人群中, 对这两种试剂的检出情况进行了系统评估和初步应用。

材料与方 法

1 抗原 HEV 重组蛋白 NE2 为大肠杆菌表达的非融合蛋白, 主要以包涵体形式表达。包涵体经 4mol/L 尿素洗涤后透析复性, 再经分子筛 HPLC 纯化, 纯度大于 95%。纯化的 NE2 蛋白在 PBS 溶液中主要以聚合体形式存在^[11]。

2 辣根过氧化物酶(HRP)的标记 采用改良的过碘酸钠法将 HRP(Sigma 公司) 标记 NE2 蛋白^[12]。

3 抗 HEV IgM μ 链捕获法 ELISA (E2-IgM) 以 0.05mol/L 碳酸包被缓冲液 (CB, pH9.5) 1:1000 稀释的羊抗人 IgM μ 链 (DAKO) 100 μ l/孔包被 96 孔聚苯乙烯微量滴定板, 37 $^{\circ}$ C 吸附 2h, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 洗液 (pH7.4) 洗涤 1 遍, 200 μ l/孔封闭液 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h, 甩尽、拍干后真空密封, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。检测时, 每孔加入 100 μ l 样品稀释液 (20mmol/L pH7.2PBS); 在样品稀释液中加入 10 μ l 待测血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; PBST 洗涤 5 次, 扣干后每孔加入 100 μ l 1:1000 稀释的 NE2-HRP, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; PBST 洗涤 5 次并扣干, 加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 终止, 读取 OD_{450/620nm} 的读值。

4 抗-HEV IgG 间接法 ELISA (E2-IgG) 纯化的 NE2 抗原, 溶解于 CB 中, 10 μ l/孔包被 96 孔聚苯乙烯微量滴定板, 37 $^{\circ}$ C 吸附 2h, 4 $^{\circ}$ C 过夜; PBST 洗液 (pH7.4) 洗涤 1 遍, 200 μ l/孔封闭液 (含 2% 明胶的 PBS) 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h, 甩尽、拍干后真空密封, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。检测时, 于每孔中加入 100 μ l 样品稀释液, 然后加入 10 μ l 血清, 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; PBST 洗涤 5 次, 扣干后每孔加入 100 μ l 稀释好的抗人 IgG-HRP (北京万泰生物药业公司提供), 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; 洗涤 5 次, 扣干, 加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 终止液 50 μ l (2mol/L H₂SO₄) 终止, 读取 OD_{450/620nm} 的读值。

5 抗 HEV 单克隆抗体对 E2-IgM 阳性血清的阻断 单克隆抗体 8C11 和 8H3 为 NE2 免疫小鼠制备, 均识别构象依赖性表位, 可直接捕获 HEV 病毒, 并在实验猴中表现出中和活性 (结果另文发表)。在如上包被的 NE2 微孔板上, 一孔加入抗 HEV 单克隆抗体 8C11 和 8H3 (1:1000) 100 μ l, 另一孔仅加稀释液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 甩净, 再加入系列倍比稀释的待阻断血清 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBST 洗涤 5 次, 扣干后每孔加入 100 μ l 稀释好的抗人 IgM-HRP (北京万泰生物药业公司提供), 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; 洗涤 5 次, 扣干, 加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 终止液 50 μ l (2mol/L H₂SO₄) 终止, 读取 OD_{450/620nm} 的读值。以未阻断孔 OD 值在 1.0~2.0 之间的稀释度计算阻断率, 阻断率= (未阻断孔 OD- 阻断孔 OD) /

未阻断孔 OD \times 100%, 以阻断率 $>$ 50% 为阻断阳性。

6 抗 HEV 单克隆抗体对 E2-IgG 阳性血清的阻断 与 IgM 阻断实验类似。二抗为抗人 IgG-HRP (北京万泰生物药业公司提供)。

7 单克隆抗体 Fab 片段的制备 参照文献进行^[13]。单抗用 0.1mol/L Tris (pH8.0) 平衡, 按照 1:100 重量比加入 DTT 活化的木瓜蛋白酶 (Sigma 公司), 37 $^{\circ}$ C 1h, 加碘乙酰胺 (终浓度 20mmol/L) 终止反应, 再用 DEAE 柱纯化。

8 单抗或其 Fab 段对 E2-IgG 阳性血清的阻断 在如上包被的 NE2 微孔板上, 一孔加入抗 HEV 单抗 8C11 和 8H3 (1:1000) 100 μ l, 另一孔加入单抗 8C11 和 8H3 的 Fab 片段 (1:1000), 第三孔仅加稀释液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 甩净, 再加入系列倍比稀释的待阻断血清 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBST 洗涤 5 次, 扣干后每孔加入 100 μ l 稀释好的抗人 IgG-HRP (北京万泰生物药业公司提供), 37 $^{\circ}$ C 温育 30min; 洗涤 5 次, 扣干, 加入显色剂, 37 $^{\circ}$ C 温育 10min, 终止液 50 μ l (2mol/L H₂SO₄) 终止, 读取 OD_{450/620nm} 的读值。

9 血清来源 临床急性肝炎血清 510 份分别来自香港大学 (167 份)、北京佑安医院 (291 份) 和北京万泰生物药业有限公司 (52 份)。普通人群血清 5060 份分别为山东某厂职工体检血清 2858 份, 解放军某部队体检血清 919 份, 北京地区义务献血员血清 400 份, 北京某部门体检血清 883 份。

10 恒河猴实验感染 29 只抗 HEV IgG 阴性、血清转氨酶 (ALT) 正常的成年恒河猴, 由广西壮族自治区卫生防疫站提供。以 10³~10⁶ PCR 滴度的 HEV 病毒粪悬液静脉注射感染, 从 0 天起每周采血 1 次, 6 月后每 2 周采血 1 次, 检测血清 ALT 及抗体; 从 0 天起每天采集粪便 1 次, 3 周后每 3 天采集粪便 1 次, 检测 HEV RNA, 至连续 3 次阴性 (参见另文)。

11 Genelabs 公司抗-HEV IgG 抗体 ELISA 试剂盒和 IgM 试剂盒的检测 按说明进行。

12 病毒核酸检测 以反转录 PCR (RT-PCR) 方法检测粪便或血清中的 HEV RNA。粪便标本以 0.01mol/L PBS (pH7.4) 制成 10% 悬液, 4 $^{\circ}$ C 15000r/min 离心 15min, 取上清 250 μ l (血清标本则直接吸取 250 μ l) 用 TRIZOL 试剂 (GIBCO 公司) 按操作说明提取 RNA。提取的 RNA 以配好的反转录体系溶成 20 μ l, 进行反转录, 反转录引物 A3 (5'-ggctcaccggagtgtttcttc-3')。取 2 μ l 反转录产物进行第一轮 PCR 扩增, 反应体积 20 μ l, 引物为 A5 (5'-ctttagacacacctgtctctcg-3') 和 A3, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 40s, 68 $^{\circ}$ C 40s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。取 1 μ l 第一轮 PCR 产物, 在 20 μ l 反应体积中进行第二轮 PCR, 引物为 B5 (5'-gecgagcaaggcatcatg-3') 和 B3 (5'-gtgtttcttccaaacctctcg-3'), 条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 40s, 56 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 80s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

13 血清 ALT 检测 采用赖氏法^[14]。

14 主要试剂和仪器设备 AMV 反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP 为 Promega 公司产品。RNA 酶抑制剂 (RNasin) 为华美公司产品。各种常规化学试剂为国产分析纯。台式高

速冷冻离心机为德国 Sigma 3K18 型, PCR 仪为德国 Biometra T3 型, 酶标仪及洗板机为瑞士 Tecan Sunrise 型。

结 果

1 抗 HEV IgM μ 链捕获法 ELISA(E2- IgM) 和 IgG 间接法 ELISA(E2- IgG) 的建立

经正交法优化反应条件后, 对 5 份戊肝病人血清和 40 份阴性血清进行 E2- IgM 和 E2- IgG 的检测, 结果 5 份病人血清的 IgM 和 IgG 的 OD 值均在 1.0 以上, 倍比系列稀释后检测 IgM, 可见 OD 值随稀释度升高先略往上升, 随后下降(图 1a), IgG 的 OD 值则持续下降(图 1b)。40 份阴性血清的 IgM、IgG 的 OD 值均在 0.1 以下。

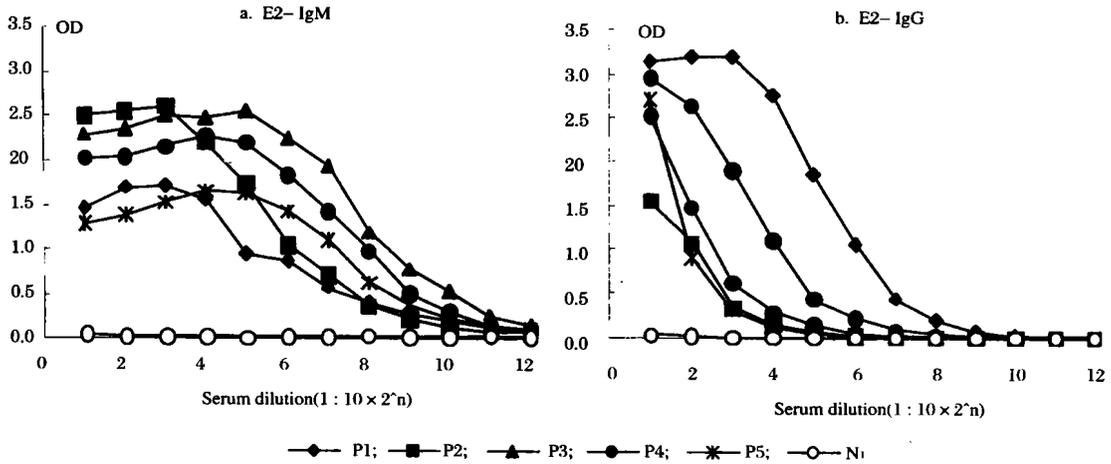


图 1 E2- IgM ELISA 和 E2- IgG ELISA 对戊肝病人血清和正常人血清的检测

Figure 1 Detection of sera of hepatitis E patients and normal people by E2- IgG ELISA and E2- IgM ELISA kit

P1~ P5. Sera of hepatitis E patients; N1. Normal people serum.

2 HEV 实验感染恒河猴中不同抗体的动态变化

以 HEV 阳性粪悬液攻击 29 只恒河猴, 结果粪便排毒和病毒血症的发生率均为 100%。有 22 只 (75.9%) 实验猴在感染后 2~ 7 周(多数在 4 周左右)间 ALT 开始升高, 持续 0.5 周到 9 周不等, 但大多数持续 1.5 周左右。以 Genelabs 试剂检测 IgG 抗体(GL- IgG), 阳转率为 79.3%, 有 6 只实验猴始终未检出。阳转时间从 3~ 14 周不等, 较为分散。在出现阳转的 23 只实验猴中, 有超过一半(12 只)

的猴其阳转时间比 ALT 升高时间晚 0.5~ 5 周(平均晚 2 周左右); 持续时间差别较大, 最短的仅持续 1 周, 最长的在 70 周后仍可检出, 平均持续时间约 18 周。E2- IgM 和 E2- IgG 的阳转率均为 100%, 阳转时间多在 4 周以内, 大多数(E2- IgM28 只, E2- IgG25 只)早于 ALT 升高时间。E2- IgM 一般持续 6 周左右, 多在 ALT 恢复正常后约 3~ 4 周转阴。E2- IgG 产生时间均早于 GL- IgG, 而且在产生后持续存在, 感染后 70 周仍无一阴转(表 1)。

表 1 HEV 病毒实验感染恒河猴后粪便排毒、病毒血症、ALT 和 HEV 抗体的动态

Table 1 Dynamics of virus excretion, viremia, ALT and anti- HEV following experimental infection of Rhesus monkeys with hepatitis E virus

	Positive/ Tested	Positive seroconversion(week)			Lasting period(week)		
		First seroconversion	Latest seroconversion	75% seroconversion	Longest	Shortest	Median
Virus excretion	29/ 29	0.5	2.5	1	15.5	2	5
Viremia	12/ 12	1	4	1.5	11	0.5	3.5
ALT	22/ 29	2	7	4	9	0.5	1.5
E2- IgM	29/ 29	3	7	4	14	2	6
E2- IgG	29/ 29	2	7	4	> 70	> 70	> 70
GL- IgG	23/ 29	3	14	6	> 70	1	18

图 2 代表了较为典型的猴 HEV 感染后各指标的动态过程, 即在感染后 0.5 周左右首先出现粪便

排毒, 随后出现病毒血症, 约在第 3 周几乎同时检出 E2- IgM 和 E2- IgG 抗体, 同时 ALT 开始升高, 之后 GL- IgG 陆续阳转, 病毒血症较快消失, ALT 陆续恢复正常, 粪便排毒转阴。之后约 3~ 4 周 E2-

IgM 转阴, GL- IgG 缓慢消退, 而 E2- IgG 则长期维持在较高水平, 至感染 70 周后阳性率仍为 100%。

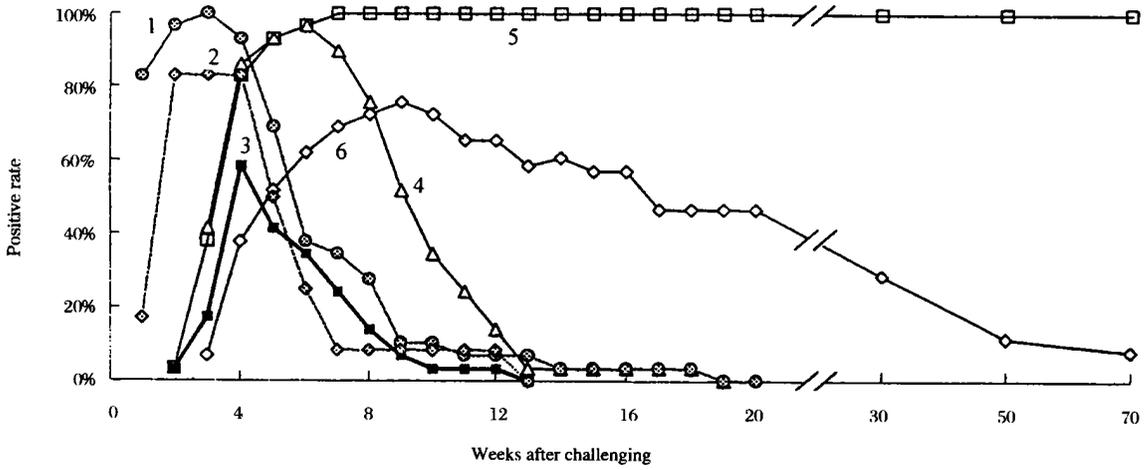


图 2 HEV 实验感染猴在感染进程中各指标的消长情况

Figure 2 Dynamics of infectious markers during infection course of experimentally HEV infected Rhesus monkeys

1. Virus excretion; 2. Viremia; 3. ALT; 4. E2- IgM; 5. E2- IgG; 6. GL- IgG.

3 抗 HEV IgM μ 链捕获法 ELISA(E2- IgM) 对临床急性肝炎标本的检测

用 E2- IgM 试剂盒检测某部队 928 份体检血清, 结果仅 2 份高于 0.2 (1 份 0.203, 另一份 0.333), 绝大多数 OD 值在 0.15 之下, 平均 OD 值为 0.012。检测 510 份临床急性肝炎标本, 则 OD 值有高至 4.0 (酶标仪检测上限), 低至 0.001 (酶标仪检测下限)。因 ELISA 反应 OD 值分布接近于指数曲线, 因此对测得的 OD 值乘 1 000 后取对数进行频数分布分析 (图 3), 可明显地看到, 在 OD 值 0.398~ 0.631 两边分为两个部分, 左侧峰呈近似正态分布, 均值为 0.077 (对数平均数), 可能对应于 IgM 阴性的其他肝炎患者 (左峰); 右侧部分 (OD > 0.398) 共 131 份, 从 OD 1.0 起例数明显上升, 共 109

份, 可能对应于 IgM 阳性的戊肝患者。以 OD 0.4 为 E2- IgM 的临界值, 在 200 份临床急性肝炎血清中, E2- IgM 阳性的血清, 其相应的 IgG OD 值均较高, 而 IgM 阴性者其 IgG 多阴性, IgG 阳性的其 OD 值亦从低到高散在分布 (图 4)。

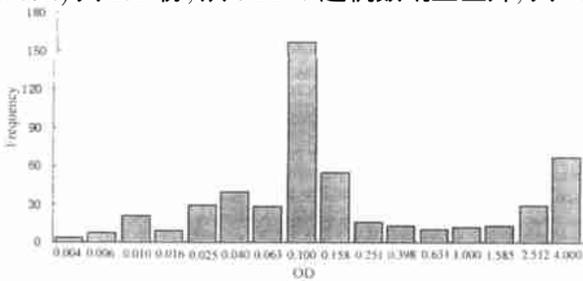


图 3 510 例临床急性肝炎血清 E2- IgM ELISA 的 OD 值频数分布

Figure 3 Frequency of E2- IgM ELISA OD value in 510 clinical acute hepatitis patients' sera

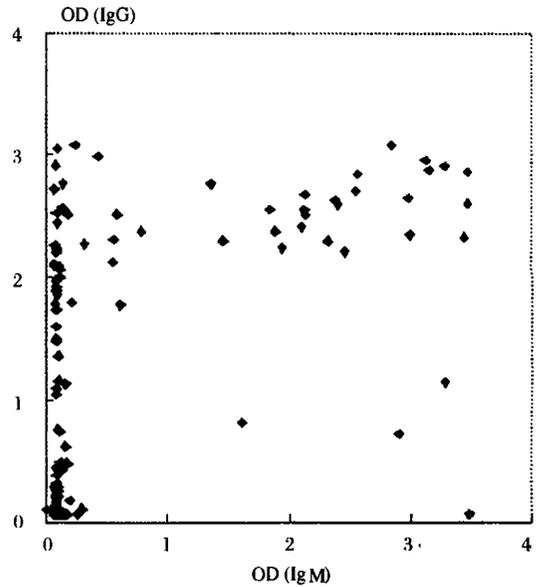


图 4 200 例临床急性肝炎患者血清 E2- IgM 与 E2- IgG OD 值的比较

Figure 4 Comparison of OD value of E2- IgM and E2- IgG in 200 clinical acute hepatitis patients' sera

用 Genelabs 公司的 IgM 试剂(GL- IgM) 与 E2- IgM 试剂同时检测 119 例非甲~ 丙急性肝炎病例血清, 比较二者的 OD 值分布, 同样可见 E2- IgM 的 OD 值在 0.4 两边分成清晰的两个部分, 而 GL- IgM 试剂的 OD 值分布则很不规则(图 5)。E2- IgM 若以 0.4 为临界值, 则 119 例中 57 例阳性, 阳

性率为 47.9%, GL- IgM29 例阳性, 阳性率为 24.4%。

29 例 GL- IgM 阳性标本的 E2- IgM 均为阳性。另外, 在 30 例 HAV- IgM 阳性者、HBc- IgM 阳性者或 HCV- IgG 阳性者中, E2- IgM 无一 OD 值超过 0.2。

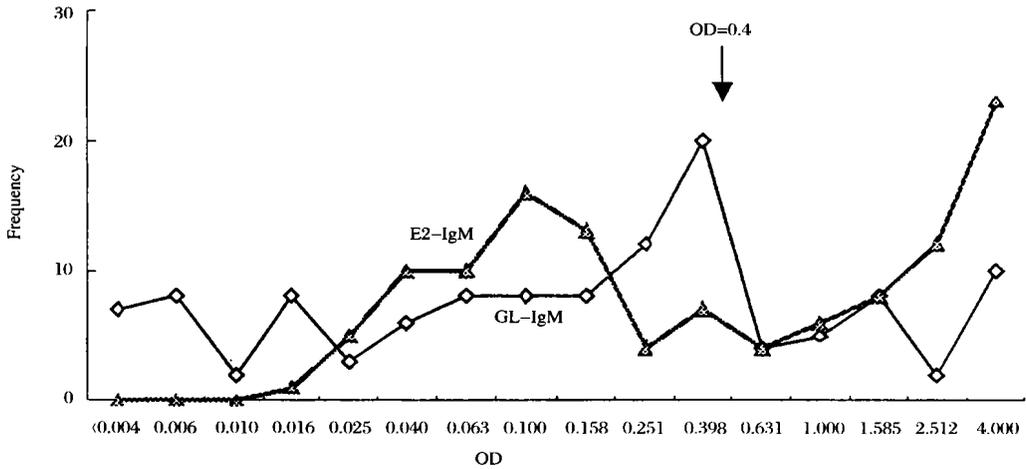


图 5 119 例临床非甲、乙、丙急性肝炎血清的 E2- IgM 和 GL- IgM OD 值频数分布比较
Figure 5 Comparison of frequency of E2- IgM and GL- IgM OD value in 119 clinical acute non A~ C hepatitis patients' sera

为验证 E2- IgM ELISA 检测的特异性, 取 10 份 E2- IgM 阳性血清, 用两个能直接捕获 HEV 病毒的抗- HEV 单克隆抗体 8C11 和 8H3 进行阻断实验。结果单抗可明显阻断血清与 E2 抗原的反应, 阻断率在 66.4% ~ 94.8%, 平均阻断率为 86.6%(86.6% ± 7.9%) (图 6)。对 1 份 E2- IgM 阳性而 E2- IgG、GL- IgG 和 GL- IgM 均阴性的血清, 用 RT- PCR 检测其病毒血症, 结果出现一条特异带, 并经测序证实其为 HEV 基因 ⑤型的一个片段(结果另文报道)。

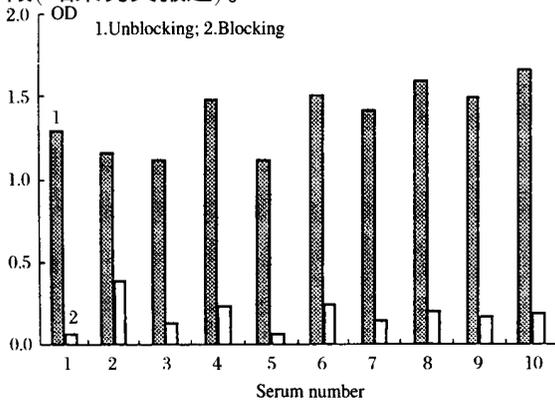


图 6 抗 HEV 单克隆抗体对 E2- IgM 阳性血清的阻断
Figure 6 Blocking of E2- IgM with anti-HEV monoclonal antibodies

4 抗- HEV IgG 间接法 ELISA (E2- IgG) 对普通人群和临床急性肝炎血清的检测

用 E2- IgG 试剂盒检测 5 060 份普通人群血清和 200 份临床急性肝炎血清, 类似地绘制 OD 值的对数频数分布图(图 7)。可见在相当于 OD 值 0.025 附近形成一个明显的近似正态峰, 但在 OD 值高于 0.2 以上则一直平缓延伸至 OD 值 4.0(酶标仪检测上限)。用 OD 值小于 0.251 的测量值拟合正态曲线, log(OD) 的均值为 1.333(OD 0.022), 标准差 0.362, 试剂盒 95% 特异度的临界 OD 值为 0.111(x = 2.042), 99% 特异度的临界 OD 值为 0.185(x = 2.266), 小于临界值的部分, 呈近似正态分布, 可以认为绝大多数为 E2- IgG 阴性标本, 大于临界值的部分则为人群中滴度不等的 E2- IgG 阳性标本。此时人群 E2- IgG 阳性率为 22.2%。

用 E2- IgG 试剂盒检测 200 份临床急性肝炎标本, 可见 OD 值明显地在临界值两边分为两个峰, 左侧的峰与普通人群的检测结果类似, 而右侧从 OD 约 1.6 至 4.0 之间形成一个明显的峰, 峰值在 OD 2.5 处, 说明在急性肝炎中存在两类人群, 一类与普通人群相当, 其 E2- IgG OD 值低于 0.2, 另一类 OD 值较高, 其中多数的 E2- IgM 为阳性(图 4), 很可能对应于急性肝炎中的戊肝患者。

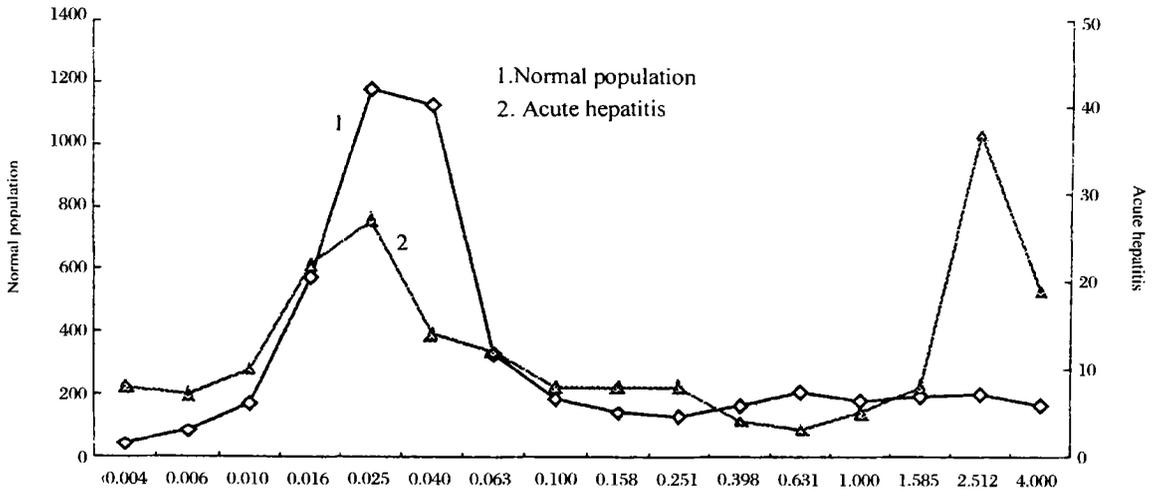


图 7 普通人群和急性肝炎患者血清中 E2- IgG 的 OD 值比较

Figure 7 Comparison of OD value of E2- IgG in sera of normal population and acute hepatitis patients

为验证 E2- IgG 的特异性, 对 10 份 E2- IgG 阳性血清进行抗- HEV 单抗 8C11 和 8H3 的阻断实验, 结果 10 份血清与抗原的反应均被有效阻断, 阻断率为 55%~ 96%, 平均阻断率为 75.7%。为估

计单抗位阻效应对阻断实验结果的影响, 同时对 2 份血清用 2 株单抗的 Fab 片段进行阻断实验, 结果如图 8。Fab 段的阻断效果与完整抗体基本一致, 提示单抗对阳性血清的阻断效应是表位特异的。

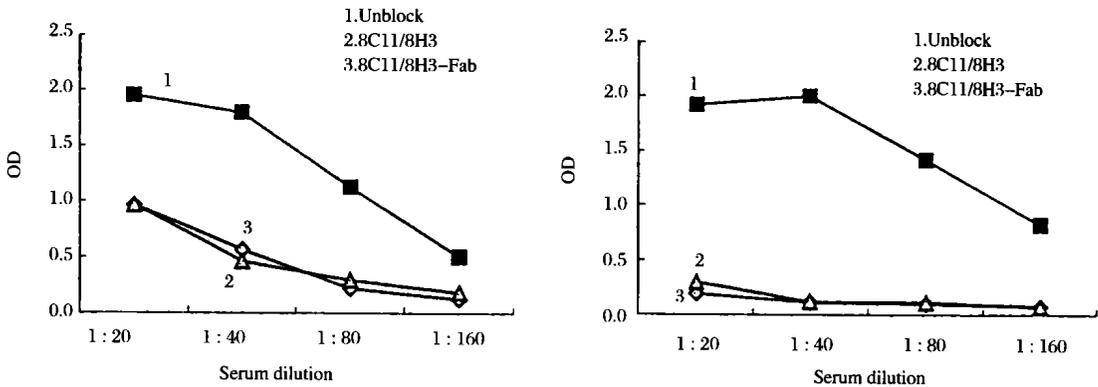


图 8 抗 HEV 单抗或其 Fab 片段对 E2- IgG 的阻断

Figure 8 Blocking of E2- IgG with anti- HEV monodonal antibodies or their Fab fragments

讨 论

从实验猴感染系列血清及普通人群、临床急性肝炎患者血清检测结果来看, E2- IgM 是一个较好的 HEV 近期感染指标, 用于戊肝临床诊断具有较好的灵敏度和特异性, 主要体现在: (1) 在 29 只实验感染猴中, E2- IgM 阳转率为 100%, 而且大多数阳转时间早于 ALT 升高时间; 而传统上用于急性戊肝诊断的 GL- IgG 的阳转率为 79.3%; (2) 在实验猴中 E2- IgM 平均持续时间约 6 周, 最长持续 14 周, 在恢复期后不久全部转阴; 而有半数猴子 GL- IgG 在 18 周后仍阳性, 有些猴子可持续 70 周以上; (3)

检测 928 份正常人血清, 结果仅 2 份 OD 值略高于 0.2; (4) 检测 510 份临床急性肝炎血清, 可将其明显区分为两个部分, 一部分 OD 值在 0.2 以下, 其 OD 值分布与正常人相似; 另一部分 OD 值高于 0.4, 其中大多数高于 1.0, 这部分血清的 E2- IgG 值亦较高, 很可能对应于急性肝炎中的戊肝患者; (5) 在 119 份非甲~ 丙型肝炎患者中, E2- IgM 阳性 57 份, 明显高于 GL- IgM 的 29 份, 而且 GL- IgM 阳性的标本 E2- IgM 均阳性; (6) 用 2 株能捕获 HEV 的抗- HEV 单抗对 E2- IgM 阳性血清与抗原的反应进行阻断实验, 结果 10 份阳性血清均被有效阻断; (7) 1 份 E2- IgM 阳性而 E2- IgG、GL- IgG、GL- IgM 均阴性的血清, 经 RT- PCR 及测序证实

存在病毒血症。

E2- IgG 则更适应于人群感染情况调查: (1) 在 29 只实验感染猴中 E2- IgG 100% 阳转, 而且持续时间均超过 70 周; 而 GL- IgG 有 6 只猴始终阴性, 阳转的猴子有半数在 18 周内转阴, 仅有 1 只持续时间超过 70 周; (2) 检测 5 060 份普通人群血清, 在 OD 值 0.2 以下形成一个近似对数正态峰, 均值为 0.022, 99% 特异度的临界值为 0.185, 而从 OD 值 0.4 以上部分各 OD 值频数分布均匀, 与普通人群中不同时间的 HEV 感染者体内抗体有高低预期相符; (3) 检测 200 份急性肝炎病人血清, OD 值 0.2 以下也形成一个与普通人群类似的近似对数正态峰, 但 OD 值大于 1.0 起到 4.0 间形成另一个尖峰, 其中多数 E2- IgM 阳性; (4) 抗- HEV 单抗能有效阻断 E2- IgG 的反应, 而且单抗 Fab 片段的阻断效果与完整单抗一致, 提示这一阻断是表位特异性的。

具有 HEV 重要构象性表位的重组抗原的陆续研制成功, 是近年来国际上戊肝研究的主要进展之一, 但迄今仅杆状病毒表达的 55kD 蛋白被较广泛地应用于人群及动物中 HEV 感染调查。在美国等一些传统上非戊肝流行国家的普通人群中, 检出了 1%~3% 的抗体阳性率, 并直接导致发现多种动物存在 HEV 天然感染, 并形成戊肝是一种人兽共患病的假说。但该抗原用于 IgM 检测的报道却极少, 其原因暂时还不清楚^[15-17]。由于杆状病毒表达系统的成本高, 该抗原尚未被用于商业试剂的生产。由于临床戊肝诊断一直缺乏被广泛认可的金标准, 国内大多数临床单位不得不选用 IgG 试剂用于辅助诊断, 而流行病学研究机构则用同样的试剂进行既往感染调查, 导致戊肝临床及科研上产生了众多疑问。本研究利用大肠杆菌表达出的一段 ORF2 重组抗原, 在证实其对恢复期血清有较强的反应性, 免疫恒河猴可产生有效保护性, 所制备的单抗识别包括 2 个中和性表位在外的多个构象性表位的基础上, 用其研制出 μ 链捕获法 IgM 试剂和间接法 IgG 试剂, 在实验感染猴以及临床急性肝炎、普通人群样本中进行了初步评估, 证实 E2- IgM 是一个良好的急性戊肝诊断指标, 而 E2- IgG 是一个良好的 HEV 既往感染指标, 从而为更为广泛、深入、精确地开展戊肝相关临床、流行病学研究提供了两种重要的工具。李新兰等^[18]用 E2- IgG 试剂和 GL- IgG 对 50 份新疆地区戊肝患者 10 年后的血清进行平行检测, 结果 E2- IgG 试剂阳性率为 86%, 而 GL- IgG

仅检出 36%。王延臣等^[19]用 E2- IgG 试剂对山东某地普通人群戊肝感染情况进行了初步调查, 发现了明显的年龄累积效应, 从 20 岁起人群中基本上以每年约 1% 的新感染率平稳上升。对这两种试剂的全面而科学的评价仍有赖于更为广泛、深入的临床及科研应用。

(致谢: 北京佑安医院提供部分临床急性肝炎血清; 山东济南钢铁总厂总医院王延臣医师、厦门 174 医院万发银博士、北京铁道总医院谈春荣主任、北京血站邱艳主任提供部分普通人群血清; 军事医学科学院朱关福教授、中国药品生物制品检定所张华远教授、王佑春博士、周诚医师均对本文提供了重要参考意见, 特此致谢。)

参考文献:

- [1] Ke W M, Tan D, Li J G, et al. Consecutive evaluation of immunoglobulin M and G antibodies against hepatitis E virus [J]. *J Gastroenterol*, 1996, 31: 818- 822.
- [2] 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.
- [3] Mast E E, Alter M J, Holland P V, 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.
- [4] 戎广亚, 孙杰, 周继文, 等. 戊型肝炎病人血清抗- HEV IgG 与 IgM 和 HEV RNA 的动态变化 [J]. *病毒学报*, 1998, 14: 268- 270.
- [5] Li F, Riddell M, Seow H, et al. Recombinant subunit ORF2.1 Antigen and induction of antibody against immunodominant epitopes in the hepatitis E virus capsid protein [J]. *J Med Virol*, 2000, 60: 379- 386.
- [6] Li F, Zhuang H, Kolivas S, et al. Persistent and transient antibody responses to hepatitis E virus detected by Western immunoblot using open reading frames 2 and 3 and glutathione S- transferase fusion proteins [J]. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 2060- 2066.
- [7] Li F, Torresi J, Lacarnini S A, et al. Amino- terminal epitopes are exposed when full- length open reading frame 2 of hepatitis E virus is expressed in *Escherichia coli*, but carboxyterminal epitopes are masked [J]. *J Med Virol*, 1997, 52: 289- 300.
- [8] Tsarev S, Tsarev T, Emerson S, et al. ELISA for antibody to hepatitis E virus based on complete open reading frame- 2 protein expressed in insect cells: identification of HEV infection in primates [J]. *J Infect Dis*, 1993, 168: 369- 378.
- [9] Zhang J Z, Ng M H, Xia N S, et al. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein [J]. *J Med Virol*, 2001, 64: 125- 132.
- [10] Im S, Zhang J Z, Zhuang H, et al. A bacterially expressed peptide prevents experimental infection of primates by the hepatitis E virus [J]. *Vaccine*, 2001, 19: 3726- 3732.
- [11] 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 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18: 463- 467.

- [12] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays[J]. *Anal Biochem*. 1984, 136: 451-457.
- [13] Harlow E, Lane D. *Monoclonal Antibodies*[A]. Harlow E, Lane D eds. *Antibodies: a laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 627-629.
- [14] 叶应抚, 王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 南京: 东南大学出版社, 1991. 186.
- [15] Meng X J, Purcell R H, Halbur P G, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94: 9860-9865.
- [16] Meng X J, Halbur P G, Shapiro M S, et al. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus[J]. *J Virol*, 1998, 72: 9714-9721.
- [17] Meng X J. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis[J]? *J Hepatol*, 2000, 33: 842-845.
- [18] 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]. *中国地方病杂志*, (已接受).
- [19] 王延臣, 葛胜祥, 孙鲁民, 等. 山东某地戊型肝炎病毒感染情况调查[J]. *中华实验与临床病毒学杂志*, (待发表).

Development and Evaluation of ELISAs for Anti-hepatitis E Virus IgM and IgG Detection Based on Polymerized Recombinant Antigen

GE Sheng-xiang¹, ZHANG Jun¹, PENG Geng¹, HUANG Guo-yong², HE Zhi-qiang¹, GU Ying¹,
ZHU Zhi-heng¹, Ng Mun-hon¹, XIA Ning-shao^{1*}

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Center for Disease Control and Prevention of Guanxi, Nanning 430021, China)

Abstract: This paper focused on development and evaluation of anti- μ chain IgM ELISA and indirect ELISA for IgG antibodies against hepatitis E virus (HEV). Prokaryotic expressed polymerized recombinant HEV protein NE2 was used as antigen to develop two ELISA methods for anti-HEV IgM (E2-IgM) or IgG (E2-IgG) detection. Serial serum samples of twenty-nine HEV experimentally infected Rhesus monkeys were used to understand the dynamics of anti-HEV IgM and IgG detected by E2-IgM or E2-IgG as well as IgG detected by a generally used commercial kit (Genelabs, anti-HEV IgG, GL-IgG). Sera of 928 normal individuals and 510 clinical acute hepatitis patients were detected for anti-HEV IgM using E2-IgM, among them 200 patients were detected by E2-IgG at the same time. Sera of 5060 normal population were detected for anti-HEV IgG using E2-IgG. Sera of 119 non-A to C acute hepatitis cases were detected parallel for anti-HEV IgM using E2-IgM and a commercial IgM kit (GL-IgM). Two anti-HEV monoclonal antibodies which can capture HEV directly were used in blocking test for the evaluation of the specificity of E2-IgM and E2-IgG. The results showed the positive seroconversion rate of HEV by E2-IgM and E2-IgG methods in 29 HEV infected monkeys were both 100%, of which 75% were converted within first 4 weeks post-infection, all earlier than the beginning time of ALT abnormality. Compared with 79.3% seroconversion rate by GL-IgG, 75% seroconverted within the first six weeks, much later than ALT abnormality. The seroconversion rate by E2-IgM lasted from two to fourteen weeks, with a mean of six weeks. Seroconversion by E2-IgG was a little later than E2-IgM, but none converted to negative at 70 weeks after infection. The average lasting time of GL-IgG was 18 weeks, only one monkey's IgG remained to be detectable by GL-IgG at 70 weeks post infection. Among 928 normal people samples detected by E2-IgM, only 2 had OD value a little higher than 0.2. Two groups could be easily differentiated from 510 clinical acute hepatitis patients detected by E2-IgM, one group was the same as detected in normal people with OD value lower than 0.2, the other group including 131 patients had OD value higher than 0.4, among them 109 samples were higher than 1.0. It suggested these two groups were corresponding to non-hepatitis E and hepatitis E patients. Patients with E2-IgM positive also had higher E2-IgG OD. Among 119 non-A to C acute hepatitis patients detected by E2-IgM and GL-IgM parallelly, 57 were E2

* Corresponding author: XIA Ning-shao. E-mail: nsxia@jingxi.cn.xmu.edu.cn

– IgM positive, including all the 29 patients who were positive by GL– IgM. Ten E2– IgM positive samples could be blocked by anti– HEV monoclonal antibodies (MAbs) from 66.4% ~ 94.8%, with an average blocking rate of 86.6%. The OD values of 5060 normal population detected by E2– IgG formed a peak close to logarithm normal distribution with the mean of 0.022, and distributed evenly in samples with OD value higher than 0.4. Two groups also could be differentiated from 200 acute hepatitis patients, one with OD value lower than 0.2 as same as normal people, and the other with OD value higher than 1.0 formed another peak with peak OD value of 2.5, among the latter peak most were E2– IgM positive. Anti– HEV MAbs also could block E2– IgG effectively, and the blocking rate of Fab fragments of MAbs were the same as whole MAbs, which suggested that the blocking is epitope specific. The developed IgM and IgG ELISA methods have good specificity and sensitivity. IgM method is suitable for diagnosis of hepatitis E virus clinically infected, and the IgG method is suitable to diagnose hepatitis E virus infection in the past.

Key words: hepatitis E; diagnosis; reagent; IgM; IgG